ISSN:0037-3796

神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第29回　日本神経化学会大会論文集

Vol. 25 (No.1), 1986

日本神経化学会

神経化学

第29回日本神経化学会大会論文集

PROCEEDINGS OF THE 29th ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於 岡 山
10月30日(木), 10月31日(金), 11月1日(土)

Vol. 25 (No.1), 1986

日 本 神 経 化 学 会

編集委員　（五十音順）

秋山一文	(岡山大・医・神経精神)
大月三郎(代表)	(岡山大・医・神経精神)
小川紀雄	(岡山大・医・脳研・機能生化)
高坂睦年	(岡山大・名誉教授)
小林清史	(岡山大・医・脳研・病態生化)
佐藤光源	(岡山大・医・神経精神)
庄盛敏廉	(岡山大・医・脳研・病態生化)
西本詮	(岡山大・医・脳神経外科)
森昭胤	(岡山大・医・脳研・機能生化)
渡辺昌祐	(川崎医大・精神)

目　次

1．温度一感受性高親和性〔^{3}H〕tryptamine 結合部位について …… 25
勢理客　成　史・石　谷　良　一　（城西大・薬・薬理）

2．〔^{3}H〕グルタチオンのシナプス膜への結合について …… 28
荻　田　喜代一・大　垣　孝　雄*・米　田　幸　雄
（摂南大・薬・薬理，錦秀会臨検学院*）

3．ラット中枢神経系におけるサブスタンスP受容体のダウンレギュレーションについて …… 31
井　上　敦　子・仲　田　義　啓・瀬　川　富　朗（広島大・医・薬効解析）

4．ラット大脳皮質での Substance P 高一低両親和性受容体の存在
—SP 誘発イノシトール燐脂質代謝亢進との関係— …… 34
森　島　義　行・仲　田　義　啓・瀬　川　富　朗（広島大・医・薬効解析）

5．ラット線条体における^{3}H-verapamil 結合活性の日内変化と加齢による変化 …… 37
盛　政　忠　臣・岡　田　英　俊・金　行　孝　雄・中　野　重　行*・
庄　盛　敏　廉　（岡山大・医・脳研・病態生化，愛媛大・医・薬理*）

6．ラット脳における Ca 拮抗剤結合部位の薬理学的研究 …… 40
松　林　弘　明・鬼　頭　昭　三・三　好　理　絵（広島大・医・第三内科）

7．ラット海馬 CA3 錐体細胞破壊による，虚血性CA1 錐体細胞死の予防効果
—L- グルタミン酸受容体オートラジオグラフィー— …… 43
小野寺　宏・佐　藤　元・小　暮　久　也（東北大・医・神経内科）

8．ラット線条体〔^{3}H〕sulpiride 結合におよぼす温度の影響 …… 46
今　福　淳・西　崎　純・佐　藤　厚　子・朝　倉　幹　雄・
塚　本　徹・松　井　宏　晃・伊　野　美　幸・窪　田　博・
新　保　清・長谷川　和　夫　（聖マリアンナ医科大・神経精神科）

9．培養神経芽腫細胞N1E-115におけるドーパミン取り込みとGBR-12935結合部位 …… 49
白川　治・平井　みどり*・田中　千賀子*
（神戸大・医・精神神経科，薬理*）

10．ラット線条体におけるドーパミン受容体に対するニューロテンシンの影響 …… 52
吉田　智浩・鬼頭　昭三・松林　弘明・三好　理絵
（広島大・医・第三内科）

11．精神分裂病死後脳における VIP およびα_2アドレナリン受容体の分析 …… 55
畑　典男・三ツ汐　洋*・清水　浩光・Micael Custro・
小片　寛・融　道男
（信州大・医・精神医学，Loyola 大・医・薬理*）

12．本態性振戦患者の末梢血リンパ球β_2レセプターの変化について …… 58
三森　康世・中村　重信・亀山　正邦（京都大・医・神経内科）

13．脳脊髄液中の DOPAC 濃度 …… 61
小林　清史・川端　昌弘・岡田　尚志郎・桜井　弘子・
庄盛　敏廉　（岡山大・医・脳研・病態生化）

14．ヒト脳シナプトゾームを用いた MPP^+によるA型モノアミン酸化酵素の阻害 …… 64
高御堂　弘・直井　信・永津　俊治
（名古屋大・医・生化第一）

15．Calcineurin のヒト脳錐体外路系における特徴的局在，
—特に Huntington 病との関連について— …… 67
後藤　恵・松角　康彦・井上　信博・宮本　英七*
（熊本大・医・脳神経外科，第一薬理*）

16．1-Methyl-4-phenylpyridinium ion （MPP^+）の白血球のスーパーオキサイド（O_2^-）
生成系に及ぼす影響 …… 70
平田　洋子・南　正康・永津　俊治*
（日本医大・衛生，名古屋大・医・生化第一*）

17. IgM paraproteinemia を伴う polyradiculoneuropathy 患者にみられた
抗 sialosyllactosaminylparagloboside 抗体 …… 73
宮谷信行・馬場広子*・佐藤修三*・湯浅龍彦*・
宮武正*・中村京子**
（国立療養所・西小千谷病院・神経内科，新潟大・脳研・神経内科*，
東京都臨床医学総合研・代謝**）

18. 筋萎縮性側索硬化症（ALS）における単一脊髄運動ニューロンの
コリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）活性 …… 76
加藤尚彦（東京大・医・脳研）

19. ファブリー病の生化学的組織化学的検討：男性例と女性発症例との対比 …… 79
保住功・西澤正豊・有賀敏夫*・宮武正
（新潟大・脳研・神経内科，東京都臨床医学総合研・代謝*）

20. ヒト正常脳及び脳腫瘍における S-100蛋白サブユニットの免疫組織化学的局在について …… 82
田宮隆・白石哲也・松海信彦・守山英二・
土田高宏・武家尾拓司・松本健五・古田知久・
田渕和雄・西本詮（岡山大・医・脳神経外科）

21. sialylcholesterol によるグリア芽細胞の増殖抑制と分化促進 …… 85
加藤泰治・伊藤仁一・田中亮・野路久仁子・
鈴木康夫*・平林義夫*・松本亮*
（名古屋市大・医・生化第一，静岡薬大・生化*）

22. 培養グリオーマ細胞に及ぼすプロテインキナーゼC阻害剤（H-7）の影響 …… 88
本田千穂・田渕和雄・大本堯史
（香川医科大・脳神経外科）

23. 脳損傷後の反応性アストロサイトの増殖と細胞骨格蛋白の免疫組織化学的検討 …… 91
高宮至昭・高坂新一*・大谷光弘・戸谷重雄・
塚田裕三*（慶応大・医・生理*，脳神経外科）

24. ラット脳ミトコンドリアと肝ミトコンドリアの比較：加令，アルコール，ヒドラジンの影響 … 94
都 築 紀 宏・足 立 香 代*・若 林 隆*
（名古屋市大・医・生化第一，名古屋大・医・解剖第三*）

25. シアル酸含有合成化合物による分化誘導 …… 97
田 中 誠・辻 崇 一・山 下 達 朗・永 井 克 孝
（東京大・医・第二生化）

26. GABA 作動性ニューロンの発達について—初代培養大脳皮質神経細胞による解析— …… 100
大 熊 誠太郎・友 納 昭 一・栗 山 欣 弥（京都府立医科大・薬理）

27. 初代培養大脳皮質神経細胞の発達過程における taurine 生合成系の変化 …… 103
岸 正 孝・大 熊 誠太郎・城 守 美 佐・栗 山 欣 弥
（京都府立医科大・薬理）

28. 培養 NG 108-15細胞の分化と増殖：アデニル酸シクラーゼ系および
プロテインキナーゼC活性化薬の影響 …… 106
東 田 道 久・野 村 靖 幸 （富山医薬大・和漢薬研・生物試験）

29. 培養下の海馬神経細胞間のシナプス形成—細胞内 Ca^{2+} 濃度測定システムの応用 …… 109
小 倉 明 彦・工 藤 佳 久・飯 島 敏 夫・天 野 武 彦
（三菱化成生命科学研・脳神経科学）

30. マウス脳シナプス機能とシナプス膜の加齢変化 …… 112
田 中 康 一・近 一 夫・安 藤 進
（東京都老人総合研・生化）

31. ラット脳および種々組織における多機能性カルモデュリン依存性プロテインキナーゼの
免疫組織化学的局在 …… 115
福 永 浩 司・後 藤 恵*・宮 本 英 七
（熊本大・医・第一薬理，脳神経外科*）

32. 脳の蛋白質脱燐酸化酵素Cによる微小管蛋白質の脱燐酸化反応と微小管重合調節 …… 118
山 本 秀 幸・斉 藤 義 樹*・宮 本 英 七
（熊本大・医・第一薬理，脳神経外科*）

33. ウシ大脳シナプス膜分画からのアクチンフィラメントおよびチューブリンと相互作用を示す
35Kカルモデュリン結合蛋白質の精製 …… 121
祖父江 憲 治・岡 部 登志男・門 脇 浩 三・伊 藤 和 幸・
野 村 政 夫 （大阪大・医・神経薬理生化学）

34. カルスペクチン—アクチン相互作用の Ca^{2+}制御機構
（赤血球スペクトリン—アクチン相互作用との対比） …… 124
田 中 敏 彦・神 田 啓 子・藤 尾 慈・祖父江 憲 治
（大阪大・医・神経薬理生化学）

35. カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡによるアクチンと
微小管結合蛋白質2の相互作用の調節 …… 127
山 内 卓・藤 沢 仁 （旭川医科大・生化第一）

36. 心臓ムスカリン様受容体におけるアゴニスト結合部位と A-cyclase 抑制反応との連関 …… 130
周 暁 明・水 島 淳・内 田 修 次・渡 辺 康 裕・
吉 田 博 （大阪大・医・第一薬理）

37. 興奮性アミノ酸受容体活性化によるラット脳の phosphatidylinositol turnover：生後発達に
伴う変化と ibotenate 刺激効果に対する N-methyl-D-aspartate の増強作用について …… 133
秋 山 一 文・山 田 了 士・氏 家 寛・佐 藤 光 源・
大 月 三 郎 （岡山大・医・神経精神科）

38. 抗うつ薬によるβ受容体減少とグアニンヌクレオチド結合調節蛋白 …… 136
朝 倉 幹 雄・塚 本 徹・窪 田 博・松 井 宏 晃・
今 福 淳・伊 野 美 幸・西 崎 純・佐 藤 厚 子・
新 保 清・長谷川 和 夫 （聖マリアンナ医大・神経精神科）

39. SH 基修飾剤による $5\text{-}HT_2$ 受容体の不活性化に対する phencyclidine の保護作用 …… 139
石 川 和 宏・鍋 島 俊 隆・山 口 和 政・古 川 宏*・
亀 山 勉 （名城大・薬・薬品作用学，薬化学*）

40. ヒト胎盤におけるオピオイドκータイプ受容体の受容体後機構 …… 142
丹 羽 雅 之・太 田 宗一郎*・野 崎 正 勝・鶴 見 介 登・
藤 村 一** （岐阜大・医・薬理，麻酔*，京都薬科大**）

41. 精製 GABA ／ベンゾジアゼピン受容体複合体の構成成分としての糖蛋白：
その糖鎖構造と生理的役割 …… 145
田口淳一・栗山欣弥 （京都府立医大・薬理）

42. ラット副腎内〔^{3}H〕グルタミン酸結合部位の可溶化について …… 148
米田幸雄・荻田喜代一 （摂南大・薬・薬理）

43. IAP 脳室内投与ラット大脳皮質膜画分のβ受容体
—アデニレートシクラーゼ系に及ぼす DMI の効果 …… 151
岡田文彦・徳光幸子*・宇井理生*
（北海道大・保健管理センター，薬・薬効学*）

44. GTP 結合性調節タンパクβγサブユニットの精製とβγによる
アデニレートシクラーゼ触媒タンパクの抑制 …… 154
榎本恵一・高野正子・麻川武雄 （佐賀医科大・薬理）

45. ウシ脳 GTP 結合タンパク質（G_o）の高感度イムノアッセイ系とその脳内分布 …… 157
浅野富子・加藤兼房・仙波禮治*・小笠原信明
（愛知県コロニー研・生化，周生期*）

46. 老年痴呆剖検脳における choline acetyltransferase の質的変化について …… 160
越村邦夫・中村重信・亀山正邦（京都大・医・神経内科）

47. 痴呆疾患における髄液 acetylcholinesterase 活性の検討および血漿 acetylcholinesterase の
同定について …… 163
中野智・川嶋信吾・加藤智信・中村重信・
亀山正邦 （京都大・医・神経内科）

48. 髄液 Acetylcholinesterase と Pseudocholinesterase の臨床的検討 …… 166
岩田悟・小鹿幸生・山本正彦
（名古屋市大・医・第二内科）

49. 各種神経疾患における髄液ソマトスタチン値について—特に痴呆との関係について— …… 169
下田光太郎・竹島多賀夫・浦上克哉・下村登規夫・
西川清方・高橋和郎 （鳥取大・医・脳神経内科）

50. 痴呆脳におけるカテプシンD活性の変化とカテプシンDによるneurofilament 蛋白質の変性 …… 172
鈴木英夫・武田雅俊・加藤佳也・山下　正・
多田國利・播口之朗・西村　健（大阪大・医・精神医学）

51. Kyotorphin 合成酵素の精製 …… 175
植田弘師・吉原良浩・高木博司　（京都大・薬・薬理）

52. Kyotorphin 合成酵素の性質とその生理的意義 …… 178
吉原良浩・植田弘師・高木博司　（京都大・薬・薬理）

53. 抗うつ薬の長期間経口投与とラット脳内エンドルフィン作動系 …… 181
渋谷治男・渡辺明子・高橋　良
（東京医科歯科大・医・神経精神医学）

54. 熱侵害刺激時，一次求心性線維末端から遊離されると思われる substance P の炎症反応への関与について …… 184
米原典史・渋谷　徹*・今井康夫・松浦英夫*・
猪木令三　（大阪大・歯・薬理，麻酔学*）

55. ラット脳内ニューロテンシン様免疫活性に及ぼすドーパミン　アゴニストの影響 …… 187
和知　学・奥田正英・富樫俊二・不破野誠一・
宮下　理・若穂囲徹　（新潟大・医・精神科・脳研・神経化学）

56. 脈絡叢におけるラット心房性 Na 利尿ポリペプチド結合部位について …… 190
堤　圭介・河野輝昭・森　和夫・茨木正明*・
丹羽正美*・尾崎正若*　（長崎大・医・脳外，第二薬理*）

57. ラット脳，心臓，及び血液における心房性利尿ペプチドの存在様式について …… 193
塩野尚三・中尾一和・森井成人・斉藤能彦・
菅原　照・山田敬行・伊藤　裕・向山政志・
荒井宏司・坂本　誠・井村裕夫（京都大・医・第二内科）

58. ラット大脳皮質の phosphatidylinositol 加水分解に及ぼす vasoactive intestinal polypeptide（VIP）の影響 …… 196
垣花　満・寿野正広・加藤浩紀・成実重彦・
永岡明伸　（武田薬品・中研・生研）

59. セルレインの単回末梢性投与による脳内部位別モノアミン関連物質の経時的変化 …… 199
黒木俊秀・松本　孝・平野　誠・鹿子島裕士・
八尾博史・内村英幸・中村　薫*・中原辰雄**・
白石昭雄***
（国立肥前療養所，九州大・医・神経精神医学*，理・化学**，理・生物***）

60. α—（γ—アミノブチリル）—ハイブシンの分布 …… 202
佐野　輝・胡谷和彦・上野修一・柿本泰男
（愛媛大・医・神経精神医学）

61. チロシン水酸化酵素の活性調節機構—カテコールアミンによる酵素の不活性化と安定化— …… 205
奥野幸子・藤沢　仁　（旭川医科大・第一生化）

62. 上頚神経節のコリン代謝の調節—外液コリン濃度と KCl 脱分極刺激の効果— …… 208
安藤正人・岩田光良・永田　豊
（藤田学園保健衛生大・医・生理）

63. ラット脳ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase：その活性に及ぼす可溶性画分の影響 …… 211
塚本卓治・中橋　徹　（佐賀大・農・生化）

64. L-band in vivo ESR 装置によるマウス，ラットに投与された
nitroxide radical の動態の観察 …… 214
石田信一・熊代　永・土橋宣昭*
（福島医大・神経精神科，RI 研*）

65. ESR による脳組織中の SOD 活性測定方法 …… 217
平松　緑・枝松　礼・森　昭胤・光田慶一*・
河野雅弘*　（岡山大・脳研・機能生化，日本電子・ESR 応用研*）

66. ラット大脳シナプス接合部に存在するタンパク質リン酸化酵素の特性 …… 220
鈴木龍雄・田中　亮　（名古屋市大・医・生化第一）

67. 糖タンパクのウシ脳シナプトゾームへの取り込み機構 …… 223
直井　信・青野景也・永津俊治
（名古屋大・医・生化第一）

68. 牛大脳皮質のゴルジ体；分離法と蛋白質燐酸化系について …… 226
宇佐美 美穂子・門 田 朋 子*・門 田 健
（都精神研・神経化学，千葉大・医・解剖*）

69. マウス微小管結合蛋白質（ MAP2 ）の精製及び局在性について …… 229
新 延 道 夫・宮 本 歩・稲 生 英 俊・塩 田 千 代・
前 田 信 明・御子柴 克 彦 （大阪大・蛋白質研）

70. 軸索内チューブリンにみられる二つの存在様式—軸索内輸送との対応— …… 232
田 代 朋 子・小 宮 義 璋・黒 川 正 則
（東京大・医・脳研・生化）

71. 小脳特異蛋白質（P_{400}）の精製と性質 …… 235
前 田 信 明・中 平 健 祐・新 延 道 夫・御子柴 克 彦
（大阪大・蛋白質研）

72. ニワトリ脳のミエリン形成期に存在する他のミエリン塩基性タンパク（MBP_2）について …… 238
中 嶋 一 行・今 澤 正 興・宮 本 侃 治
（国立神経センター・代謝研）

73. ラット中枢神経組織と非神経組織におけるS100—αとS100—βの Developmental profiles …… 241
清 水 温 子・加 藤 兼 房 （愛知県コロニー研・生化）

74. グリア繊維性酸性タンパク（ GFAP ）—黄疸 Gunn ラット小脳における
in vitro 分解様式について— …… 244
青 野 幸 子・佐 藤 浩・仙 波 禮 治・柏 俣 重 夫
（愛知県コロニー研・周生期）

75. 腎臓中のS100抗原の精製とその性質 …… 247
仙 波 禮 治・加 藤 兼 房*・磯 辺 俊 明**・柏 俣 重 夫
（愛知県コロニー研・周生期，生化*，東京都立大・理・化学**）

76. 固定化酵素反応を利用した脳内アセチルコリンおよびコリンの液体クロマトグラフィーによる
測定法；脳破壊後のアセチルコリンの含量変化について …… 250
山 西 嘉 晴・小 笹 貴 史，小 倉 博 雄・窪 田 篤 彦・
荒 木 伸・山 津 清 實 （エーザイ筑波研）

77. Agonist binding of purified muscarinic acetylcholine receptors : Heterogenous affinities and effect of DTT …… 253
Gabriel Berstein・芳 賀 達 也 (浜松医大・生化第一)

78. オートラジオグラフィー法による〔^{3}H〕hemicholinium-3 結合部位のラット脳内分布について …… 256
本 橋 伸 高・Bernard Scatton* (山梨医大・精神, L.E.R.S. *)

79. 線条体および関連部位におけるムスカリン性受容体とイノシトールリン脂質代謝との関係比較 …… 259
本 多 健 治・高 野 行 夫・山 内 武 司・武 田 泰 生・神 谷 大 雄 (福岡大・薬・薬理)

80. 中枢α_2－アドレノセプター－G蛋白の脱共役—N－エチルマレイミドの効果— …… 262
北 村 佳 久・野 村 靖 幸 (富山医薬大・和漢薬研・生物試験)

81. 細胞膜リン脂質による adrenoceptor 結合活性の調節機構 …… 265
宮 本 篤・大 鹿 英 世 (札幌医大・薬理)

82. Phenelzine および carbidopa 前処理ラットの皮質 5-HT_2 receptor と wet-dog shakes に及ぼす5-HT 前駆体投与の効果 …… 268
越 川 憲 明・J.D.Stephenson*
(日本大・歯・薬理, Dept. of Pharmacology, Institute of Psychiatry London *)

83. Age- and sex-related changes in histamine and H-1 receptors in the central nervous system following a long-term castration …… 271
Ramon Cacabelos・大 和 谷 厚*・福 井 弘 幸*・武 田 雅 俊・西 村 健・和 田 博* (大阪大・精神医学, 第二薬理*)

84. 可溶化L－〔^{3}H〕グルタミン酸結合部位の性質：ヌクレオチドによる調節 …… 274
越 谷 和 雄 (金沢大・医・第二生理)

85. Methamphetamine 反復投与ラットにおける脳内ノルアドレナリン代謝に及ぼす条件づけとその成立過程 …… 277
佐藤洋美・田中正敏・津田彰・辻丸秀策・白尾一正・小口雅申・稲永和豊*
（久留米大・医・薬理，精神神経*）

86. ドーパミン系およびセロトニン系神経伝達の前シナプス性制御機構に及ぼすメトアンフェタミンの影響：In vivo brain dialysis による検討 …… 280
市川淳二・小山司・三国雅彦・山下格
（北海道大・医・精神神経）

87. 少量 Sulpiride のドーパミン及びノルアドレナリン代謝に及ぼす影響 …… 283
小松秀邦・阿部哲夫・秀野武彦・金野滋・高橋良
（東京医科歯科大・医・神経精神医学）

88. 高血圧自然発症ラット（SHR）脳内ノルエピネフリン含有量に及ぼす拘束ストレスの影響 … 286
岡村邦博・水野智・松井啓・野村正彦
（藤田学園保健衛生大・医・生理）

89. GTP-cyclohydrolase 阻害剤による Tetrahydrobiopterin 低下動物の作製 …… 289
鈴木周平・渡辺恭良・鏡山博行・早石修
（大阪医科大・医化学）

90. 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞からの catecholamine 分泌におよぼす GABA の作用様式 … 292
今泉美佳・片岡泰文*・植木昭和*・宮川洋二・熊倉鴻之助
（上智大・生命研，九州大・薬・薬理*）

91. ラット視覚領皮質における GABA, GAD および GABA-T の生後変化 …… 295
渡部繁男・後藤昇*・石川紘一
（日本大・医・薬理，解剖*）

92. ゴナドトロピン作働系に対するヒスタミンとヒスタミン拮抗物質の作用（加齢による変化を含めて） …… 298
新川久義・Ramon Cacabelos・三宅侃*・田中潤也・村越和子・多田國利・播口之朗・西村健
（大阪大・医・精神医学，産科婦人科*）

93. セロトニンに由来する黄色物質の分離とその化学構造 …… 301
植村富彦・平井久美子・山野俊雄*・三浦洌*・
金城勝*・三宅可浩*
（東京都精神医学総合研・神経化学，国立循環器センター研・生化学*）

94. ヒト血小板における $5HT_2$ 受容体を介した 5HT 刺激性イノシトールリン脂質代謝 …… 304
三国雅彦・森秀樹・松原繁広・小田垣雄二・
小山司・山下格（北海道大・医・精神）

95. モルモット縦走筋細胞のタキキニン・ペプチド受容体とイノシトールリン脂質代謝 …… 307
高野行夫・山田彰子・波多江靖之・山内武司・
永島亮・武田泰生・本多健治・神谷大雄
（福岡大・薬・薬理）

96. Hypoglycemia および回復期における脳の phosphoinositide およびエネルギー代謝 …… 310
池田益啓*・吉田伸一・Raul Busto・Myron D. Ginsberg
（マイアミ大・医・神経，現エーザイ筑波研*）

97. 哺乳動物の脳における phorbol ester 結合部位 …… 313
西野直樹・花田進・斉藤尚亮*・北村登*・
中井隆・三田達雄・田中千賀子*
（神戸大・医・精神神経，薬理*）

98. ウシ下垂体後葉からの分泌顆粒の分離及び顆粒分画内の Enkephalin の動態 …… 316
竹田二美代・竹田稔・島田明範・倉岡幸令・
紺野邦夫・塩田清二*・中井康光*
（昭和大・医・生化学，解剖*）

99. 外側中隔野に線維を投射する TRH 神経の分布と正中隆起に投射する神経 …… 319
石川巧一・鈴木光雄（群馬大・内分泌研・生理）

100. 中枢神経系に於けるソマトメジンCの存在について：免疫組織化学的検索 …… 322
野口鉄也・ランス倉田・杉崎哲朗（東邦大・医・第二生理）

101. ラット脳微小血管における心房性 Na 利尿ポリペプチド（ rANP ）結合部位について …… 325
茨 木 正 明・堤 圭 介*・太 田 尚・丹 羽 正 美・
尾 崎 正 若 （長崎大・医・薬理第二，脳神経外科*）

102. クラーレ慢性投与による motoneuron 細胞死の抑制と筋由来 survival factor との関連 …… 328
田 中 英 明 （群馬大・医・薬理）

103. 神経成長因子の取り込み過程に対するK^+の効果 …… 331
小 池 達 郎 （佐賀医大・化学）

104. グリア細胞成長因子（ GMF ）によるグリア芽細胞の形態分化誘導：
細胞骨格に作用する薬剤の影響 …… 334
田 中 亮・伊 藤 仁 一・加 藤 泰 治
（名古屋市大・医・生化第一）

105. 神経成長因子の合成促進効果におけるカテコーラミンの構造特異性 …… 337
古 川 美 子・古 川 昭 栄・里 吉 栄二郎・池 田 典 秋*・
林 恭 三**
（国立神経センター・免疫，三井製薬・生物科学研*，岐阜薬大・薬剤**）

106. 神経突起伸展因子のモノクローナル抗体とエラステース抵抗性フラグメントについて …… 340
林 要喜知・谷 浦 秀 夫・三 木 直 正（金沢大・がん研・薬理）

107. 脳のアミロイド …… 343
徳 武 哲・田 中 喜久子・石 井 毅 （都精神研・分子生物）

108. モルモット脳組織のクロマチンタンパクの分析 …… 346
吉 村 和 法・坂 本 安・植 村 慶 一 （埼玉医大・第一生理）

109. 2種類のモノクロナール抗体と Biotin-Avidin system を用いたサンドイッチ法 ELISA による
myelin-associated glycoprotein の定量 …… 349
佐 藤 修 三・馬 場 広 子・犬 塚 貴・田 中 正 美・
西 沢 正 豊・宮 武 正 （新潟大・脳研・神経内科）

110. ウシ14—3—3タンパク質のエンザイムイムノアッセイ法の確立：
ウシ脳各部位での濃度分布 …… 352
加藤兼房・清水温子・仙波禮治*・市村徹**・
礒辺俊明**・奥山典生**
（愛知県コロニー研・生化，周生期*，東京都立大・理・化学**）

111. シナプス膜蛋白のカルボキシメチル化—アデノシン結合
s－アデノシルホモシステイナーゼの存在— …… 355
三宅正治・印南敏彦* （愛媛大・医・機器センター，精神*）

112. 末梢神経ミエリン膜の PO 糖蛋白のリン酸化 …… 358
鈴木勝・坂本安・植村慶一・福永浩司*・
山本秀幸*・宮本英七*
（埼玉医大・生理第一，熊本大・薬理第一*）

113. SDS-PAGE の移動度がカルモデュリンに近い脳の二種のタンパク質について …… 361
中村泰治・小俣久美子・中条茂男・中谷一泰
（昭和大・薬・生物化学）

114. シナプス膜における Actin および Calmodulin の役割
— Acetylcholine と Vasopressin の作用に関連して— …… 364
関谷真・迫昭子 （上智大・生命科学研）

115. 脳のミオシンとそのプロテアーゼフラグメントの Actin-activated Mg-ATPase
活性について …… 367
松村末夫・大森斉・高島敏伸*・近藤敏弘・
安田誠治・公文明 （佐賀医大・生化，内科*）

116. ラット脳組織における Protein Kinase C の分布 …… 370
河本純子・橋本規・荻田浩司・吉川潮・
西塚泰美・斉藤尚亮*・田中千賀子*
（神戸大・医・第二生化，薬理*）

117. 眼球及び中枢神経系に於けるオルニチンアミノ基転移酵素：免疫組織化学と酵素免疫測定 …… 373
松澤健夫・笠原正男*（藤田学園保健衛生大・医・生化，病理*）

118. ラット胚初代培養中枢神経細胞における α（＋）型 Na^+, K^+— ATPase の発現 …… 376
井上順雄・松井英男・津久井弘子*・畠中寛*
（杏林大・医・生化学，三菱化成生命研・脳神経科学*）

119. 脳から精製したグリコーゲン合成酵素の性質及び活性調節 …… 379
井上信博・岩佐隆史*・福永浩司*・松角康彦・
宮本英七*　（熊本大・医・脳外，第一薬理*）

120. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine（MPTP）の神経毒性効果に対する
肝薬物代謝酵素の関与 …… 382
松村敏弘・佐藤信範・只野武・木皿憲佐・
荒井裕一朗・杵鞭宏育　（東北薬科大・薬理）

121. 成人型 Adrenoleukodystrophy 脳の病変各部による Sphingolipids と
Cholesterolester の相違 …… 385
武富保・原厚・北沢信子（信州大・医・脂質生化）

122. 極長鎖脂肪酸伸長反応における N-ethylmaleimide の効果 …… 388
斎藤寿仁・吉田敏・竹下正純　（大分医大・生化学）

123. 脳ミクロソームの長鎖脂肪酸伸長系における脂質—酵素間相互作用 …… 391
吉田敏・亘弘*・斎藤寿仁・竹下正純
（大分医大・生化学，生理研*）

124. 上頚および迷走神経節へのアミノ酸取り込みにおよぼす ganglioside の効果 …… 394
岩田光良・安藤正人・永田豊・原厚*・
武富保*
（藤田学園保健衛生大・医・生理，信州大・医・心脈研・脂質生化*）

125. SY5Y ヒト神経芽細胞腫培養細胞の retinoic acid
による分化後の形態学的および生化学的発達 …… 397
伊野美幸・朝倉幹雄・塚本徹・松井宏晃・
今福淳・長谷川和夫・Greg M. Cole*・Paola S. Timiras*
（聖マリアンナ医大・神経精神科，Dept of Physiology-Anatomy,
Univ, of California, Berkeley*）

126. S－アデノシルメチオニンによる脳シナプス機能の修飾 …… 400
安藤　進・田中康一・近　一夫・金丸恭子・
森口幸栄　（東京都老人総研・生化）

127. Ethylnitrosourea（ENU）誘発脳腫瘍における発癌遺伝子産物の検索 …… 403
村上秀樹・高松　研*・高坂新一*・大谷光弘・
戸谷重雄・塚田裕三*　（慶応大・医・脳神経外科・生理*）

128. シナプトソームの膜電位とエネルギー代謝 …… 406
相内敏弘・松永雅美・中谷一泰・中村泰治
（昭和大・薬・生物化学）

129. ラット海馬由来神経発育因子の神経化学的研究 …… 409
吉田一成*・高坂新一・高松　研・井端由紀郎*・
大谷光弘*・戸谷重雄*・塚田裕三
（慶応大・医・生理，脳外*）

130. 培養中隔核コリン作動性神経に及ぼす海馬因子の多様性について …… 412
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 医大・神経内科**）

131. グリア芽細胞の形態的分化誘導：グリア細胞成長因子（GMF）と dBcAMP との比較 …… 415
伊藤仁一・加藤泰治・田中　亮
（名古屋市大・医・生化第一）

132. ヒトグリオーマ細胞における $PP60^{src}$ 並びに上皮成長因子受容体の発現に及ぼす
抗グリオーマ物質の影響 …… 418
本田千穂・田渕和雄　（香川医大・脳神経外科）

133. フォルスコリンで神経突起を伸張する PC12 細胞の新しいサブライン：
Ⅰ．神経成長因子による突起との比較 …… 421
佐野　護・北島哲子・仙波りつ子*
（愛知県コロニー研・形態，周生期*）

134. フォルスコリンで神経突起を伸張する PC12 細胞の新しいサブライン：
Ⅱ. 内在性 cAMP の NGF 様作用 …… 424
仙波 りつ子・佐野 護* （愛知県コロニー研・周生期・形態*）

135. 神経成長因子・上皮成長因子および線維芽細胞成長因子の Nsp100 リン酸化抑制作用 …… 427
橋本誠一・葛谷博磁 （東北歯科大・生化）

136. 培養下の胎生および新生ラット中隔野コリナージックニューロンに及ぼす NGF の効果 …… 430
畠中 寛・津久井弘子・武井延之
（三菱化成生命科学研・脳神経科学）

137. ヒト神経芽細胞における NGF による c-fos 遺伝子活性化の機序 …… 433
粕谷淳子・大椙弘順・桃井 隆・桃井真里子*
（国立神経センター，自治医大・小児科*）

138. ラット視床下部及び線条体における L-DOPA の
内在性ノルアドレナリン及びドパミン遊離に及ぼす二相性作用 …… 436
五嶋良郎・久保孝夫・三須良実（横浜市立大・医・薬理）

139. 線条体からのカテコールアミン放出に及ぼす L-threo-DOPS の影響
—intracerebral dialysis による検討— …… 439
下山政憲・鬼頭昭三・井ノ川雅恵・松林弘明
（広島大・医・第三内科）

140. ノルエピネフリン代謝回転に対する視床下部刺激の影響 …… 442
斉藤昌之・箕越靖彦・嶋津 孝（愛媛大・医・生化第一）

141. ハルミンの行動薬理学的研究（第6報）：
ドパミンおよびセロトニン神経系による jumping 行動修飾 …… 445
諸井佳代子・久我哲郎 （千葉大・生物活性研）

142. ストレスへの予測性とラット脳内ノルアドレナリン代謝との関連性 …… 448
津田 彰・佐藤洋美・白尾一正・小口雅申・
田中正敏 （久留米大・医・薬理）

143. プロラクチンサージにおける脳部位別 5HT および 5HIAA レベルの経時的変化 …… 451
平野　均・平野　誠・松本　孝・内村英幸・
黒木俊秀・鹿子島裕士・八尾博史・中原辰雄*・
白石昭雄**
（国立肥前療養所・情動行動障害センター，九州大・理・化学*，生物**）

144. 哺乳動物における大脳皮質セロトニンニューロンの加令変化 …… 454
山口知子・山口　仁*　（東女医大・生化・昭和大・医・神経*）

145. ラット海馬内 5-HT axon の collateral sprouting：5HT・5-HIAA 定量値の推移 …… 457
宮崎修平・片山容一・岩崎光芳・坪川孝志・
芝軒信次*・石川紘一*　（日本大・医・脳神経外科・薬理*）

146. 2—ヒドロキシプトレスチンのラット脳内濃度について—GC-MS 法を用いて— …… 460
能登　直・長谷川武史*・上村　宏・中尾純治・
橋本泰道・田村潤一・中嶋照夫
（京都府立医大・精神，GC-MS 研*）

147. GC-MS によるラット脳各部位における GABA 及びグルタミン酸の同時定量
—セルレイン処置ラットへの応用— …… 463
中村　薫・松本　孝*・平野　誠*・平野　均*・
鹿子島裕士*・黒木俊秀*・八尾博史*・内村英幸*・
中原辰雄**・白石昭雄***
（九州大・医・神経精神，国立肥前療養所*，九州大・理・化学**，生物***）

148. ラット脳と脊髄におけるグリシンの免疫組織学的局在 …… 466
青木英子・仙波禮治・柏俣重夫
（愛知県コロニー発達障害研，周生期）

149. 培養C6グリオーマ細胞におけるグルタミン代謝について …… 469
加藤　聖・石田外樹・根岸晃六
（金沢大・医・神経情報研）

150. マウスの攻撃行動に対する脳内ドーパミン系の関与 …… 472
野田恭平・Klaus A. Miczek*・Richard Kream*
（国立武蔵療養所・神経センター疾病3部，タフツ大学*）

151. ラット線条体における dopamine 遊離と再取り込みに対する
methamphetamine 反復投与の影響 …… 475
山田茂人・小島秀樹*・高木裕子*・原尻慎一郎*・
西彰五郎・稲永和豊* （久留米大・医・脳研，精神神経*）

152. Methamphetamine 投与ラットにおける脳内 Substance P とその受容体の変化 …… 478
氏家寛・梶田三郎・山下公三郎・中島誠・
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*）

153. メタンフェタミン逆耐性と脳内特異的 TRH 結合：
持続及び反復投与による差異とハロペリドール前処置による影響 …… 481
中島誠・梶田三郎・山下公三郎・氏家寛・
福田賢司・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*）

154. 扁桃核キンドリングラットの扁桃核・海馬スライスに於ける
ibotenic acid 刺激による phosphatidylinositol turnover の変化 …… 484
山田了士・秋山一文・氏家寛・佐藤光源・
大月三郎 （岡山大・医・神経精神）

155. てんかんマウス（El）脳のムスカリン性アセチルコリン・レセプターと
イノシトール燐酸生成反応の異常 …… 487
藤田精一郎・森浩一・植松直道・前久保邦昭・
山上栄・川北幸男 （大阪市立大・医・神経精神）

156. El マウスの発作感受性に関与する大脳皮質シナプトゾーム蛋白 …… 490
古塚大介・山上栄・千頭孝史・平山栄一・
撫井弘二・森浩一・川北幸男
（大阪市立大・医・神経精神）

157. El マウスの大脳皮質切片におけるアスパラギン酸の uptake と release
—特にけいれん準備性との関係について …… 493
東原慶和・平松緑・小川一寿・森昭胤
（岡山大・医・脳研・機能生化）

158. El マウスの脳内カルシウム含量と痙攣に伴う変動について …… 496
枝松　礼・平松　緑・小出典男*・森　昭胤
（岡山大・医・脳研・機能生化，中央検査部*）

159. α－リノレン酸の弁別学習行動に及ぼす影響 …… 499
野村正彦・奥山治美*
（保健衛生大・医・生理，名古屋市大，薬*）

160. メシル酸カモスタット（FOY305）による実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）
抑制効果について …… 502
犬塚　貴・佐藤修三・馬場広子・宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科）

161. DM-20 を抗原とするマウスにおける実験的アレルギー性脳脊髄炎 …… 505
遠藤真澄・国下龍英・田平　武
（国立武蔵療養所神経センター・疾病研究第六部）

162. 母体性高 Phe 血症ラットにおける脳内ガングリオシドの変化 …… 508
原田　寧・阿相皓晃・平野修助（東邦大・医・第二生理）

163. マウスの中枢神経外傷モデルにおける大脳皮質内モノアミンに対する
GM1 ganglioside の神経修復効果について …… 511
岡本右滋・岡田和洋・空閑茂樹・重森　稔・
倉本進賢・小島秀樹*・山田茂人**・西彰五郎**・
G. Jonsson***・A. Gorio****
（久留米大・医・脳神経外科，精神*，脳疾患研**，Department of Histology,
Karolinska Institute (Sweden)*** , Fidia Research Loboratories (Italy)****）

164. Snell 下垂体性小人症マウス大脳のガングリオシド代謝について …… 514
杉崎哲朗・野口鉄也・金松知幸（東邦大・医・第二生理）

165. 視交叉上核モノアミン代謝の日内変化と加齢による変化 …… 517
盛政忠臣・金行孝雄・中野重行*・庄盛敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化，愛媛大・医・薬理*）

166. 反復ストレスの脳内ノルアドレナリン代謝に及ぼす影響の加齢による差 …… 520
田中正敏・津田彰・小口雅申・白尾一正・
佐藤洋美*・辻丸秀策*（久留米大・医・薬理，精神神経*）

167. 長期強制走行ストレスによる中枢神経諸核のカテコールアミン量の変化 …… 523
原田雅典・井上桂・小森照久・北山功・
野村純一・妹尾英男*
（三重大・医・精神神経，群馬大・医・行動生理*）

168. マウス脳部位・末梢臓器におけるピペコリン酸濃度および取込みに対する
拘束ストレスの影響 …… 526
西尾廣昭・曽我部肇・瀬川富朗（広島大・医・薬効解析）

169. ラット各種脳神経核モノアミン酸化酵素活性・血漿 corticosterone 値
および行動量の日内リズムにおよぼす制限摂食の影響について …… 529
原田豊・水川六郎・狭間秀文・国元憲文*
（鳥取大・医・神経精神，琉球大・医・神経精神*）

170. 高血圧自然発症及び脳卒中自然発症ラットの Monoamine Oxidase 活性の比較検討 …… 532
千丈雅徳・山崎則子*・南勝**・広上貢**・
斉藤秀哉**・H. Parvez***
（北海道大・医・精神，医療短*，第一薬理**，パリ大学***）

171. ラット視床下部視索上核・室旁核における
ダイノルフィン（1—13）微量注入によるバゾプレッシンの遊離 …… 535
津島宏美・森真由美・松田友宏
（名古屋市立大・医・薬理）

172. 黒質・腹側被蓋野におけるオピオイドペプチドニューロンの起始核と調節機構 …… 538
市川宏伸*・西川徹・高嶋瑞夫・三ツ汐洋・
小川篤子・高橋清久
（武蔵療養所神経センター，都立梅ケ丘病院*）

173. 細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体ライブラリーによる
シナプス機能分子の検索 …… 541
小林和夫・大口嘉子・黒田洋一郎
（東京都神経研・神経生化）

174. 褐色脂肪組織の脂肪合成に対する交感神経の作用 …… 544
箕越靖彦・斉藤昌之・嶋津孝
（愛媛大・医・第一生化）

175. マウスの海馬脳波と組織化学的亜鉛反応に及ぼすDithizone の影響 …… 547
根木哲郎・村上哲英*　（香川医大・保健体育・生物*）

176. 中枢神経・神経核におけるプリン受容機構の機能的役割：視床下部体液調節中枢の場合 …… 550
森真由美・津島宏美・松田友宏
（名古屋市立大・医・薬理）

177. ω—conotoxin のシナプス膜分画への結合 …… 553
阿部輝雄・古谷野好・西須英雄・西内祐二*・
榊原俊平*　（新潟大・脳研，ペプチド研*）

178. conotoxin GIIIA の〔^{3}H〕標識と Na channel への結合 …… 556
柳川右千夫・阿部輝雄・佐武明
（新潟大・脳研・神経化学）

179. 種々の酵素で処理したシナプトゾームに対するボツリヌス神経毒素の結合性 …… 559
曽根三郎*・北村勝（東大農化・現：東レ*，国立予防衛生研）

180. ラット脳内 cholecystokinin（CCK）mRNA 濃度の測定と CCK 遺伝子の構造解析 …… 562
薄井宏・長谷川まこと*・桑野良三・荒木一明・
前田利長・高橋康夫　（新潟大・脳研，神経薬理・医・精神*）

181. 2′：3′環状ヌクレオチド3′—フォスフォジエステラーゼ mRNA の
脳の部位による分布及び発育による変化 …… 565
井上雄吉・宮武正・山国徹*・栗原正*・
高橋康夫*　（新潟大・脳研・神経内科，神経薬理*）

182. エノラーゼアイソザイムの構造とその遺伝子発現
：筋組織特異的エノラーゼアイソザイム（ββ）のクローニングとその構造 …… 568
崎村建司・櫛谷悦子・大島由香*・三井宏美*・
高橋康夫 （新潟大・脳研・神経薬理，理・生物学*）

183. jimpy ミュータントマウスにおける PLP の発現障害機構の解析 …… 571
森口聡・岡野栄之・三浦正幸・池中一裕・
塩田千代・御子柴克彦 （大阪大・蛋白研）

184. シバラーミュータントマウスにおけるミエリン塩基性タンパク質遺伝子の
第1エキソンの転写と翻訳 …… 574
三浦正幸・池中一裕・岡野栄之・塩田千代・
塚田裕三*・御子柴克彦 （大阪大・蛋白研，慶大・医・生理*）

185. 培養細胞へ導入したミエリン塩基性蛋白質遺伝子の発現 …… 577
芋川浩・三浦正幸・池中一裕・岡野栄之・
御子柴克彦 （大阪大・蛋白研）

186. ニューロフィラメントの軸索内輸送機構―燐酸化による解析― …… 580
小宮義璋・田代朋子 （東京大・医・脳研・生化）

187. myelin deficient（mld）マウスにおけるミエリン塩基性蛋白質の発現調節機構と
遺伝子重複について …… 583
岡野栄之・三浦正幸・池中一裕・塚田裕三*・
御子柴克彦 （大阪大・蛋白研，慶大・医・生理*）

188. Drosophila Melanogaster 頭部における環状ヌクレオチド PDE の分子薬理学的解析 …… 586
西塔正広・広川佳史・山川薫・吉岡亨*・
堀田凱樹**・日高弘義
（三重大・医・薬理・横浜市立大・医・第一生理*，東京大・理**）

189. ラット脳における極長鎖脂肪酸α―hydroxylation：チトクロム b_5 関与の可能性 …… 589
竹下正純・田村実 （大分医大・生化）

190. 白鼠上頚神経節への神経成長因子の逆行性輸送 …… 592
高浜和也・岩田光良・安藤正人・永田豊・
堀真一郎*・加藤兼房**
（藤田学園保健衛生大・医・生理，東京都神経研・神経生化*，
愛知県コロニー研・生化**）

191. アフリカツメガエル坐骨神経におけるグリセロリン脂質及び蛋白質の軸索内輸送 …… 595
五十嵐道弘・小宮義璋・黒川正則
（東京大・医・脳研・生化学）

1．温度一感受性高親和性〔^{3}H〕tryptamine 結合部位について

勢理客成史・石谷良一　　（城西大・薬・薬理）

〔要　約〕

Cascio & Kellar（1）はラット中枢神経組織において、高親和性[^{3}H]tryptamine結合部位（K_D = 3 nM,すなわち同受容体）の存在の可能性を報告したが、我々も温度－感受性高親和性[^{3}H]tryptamine結合部位（K_D = 0.45 nM）の特異的識別法を新規に開発した（3）。本実験では、この特異的[^{3}H]tryptamine結合能の増大（すなわち一種のup-regulation）現象に関与する諸因子およびその機構について詳細に検討した。得られた結果をまとめると、[^{3}H]tryptamine結合での up-regulation現象は、内在性ligand, metal ions(Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^+), guanine nucleotidesらの関与は認められず、完全に熱因子（37°Cの生理的温度）にのみ制御されており、一種のallosteric modificationにて高親和性結合部位（K_D = 0.45 nM, B_{max} = 102.7 fmoles／mg protein）が構築された結果と考えられる。更に、上記推察はcross-linker（膜蛋白質のmatrix部位を固定する事で、結果として結合部位すなわち受容体蛋白質のconformation change をブロックする）としてのglutaraldehydeが、同現象を特異的に抑制する事実（glutaraldehyde前処理膜の Scatchardプロットは、高親和性結合部位の存在を示さず）から実証し得たと言えよう。

Key word：tryptamine, high affinity binding sites

［はじめに］

Tryptamineは中枢神経組織に存在するトレースアミンの一つであるが、近年神経刺激伝達物質としての可能性が報告されており（2）、更には同受容体の存在も示唆されている（1）。本実験では、ラット全脳由来の高親和性[^{3}H]tryptamine結合部位が熱因子にて一種のup-regulation を受ける事が判明しているので（3）、同現象に関与する諸因子およびその機構について詳細に検討することを目的とした。

［実験材料および方法］

体重 100～150 g のWistar系雄性ラット全脳（小脳および嗅脳を除く）より0.32 M sucrose にて10 % homogenateを作製後、不連続ショ糖密度（0.32, 0.8, 1.2 M）勾配遠心法にてシナプス膜分画（顆粒密度：0.8～1.2 M sucrose）を得た。同膜成分は最終的に0.05 M Tris-HCl buffer,pH 7.4 に懸濁（4 mg protein/ml）し、液体窒素下急速凍結させ-75°C で保存した。凍結膜試料を急速解凍後、各種条件下の膜懸濁液（2 mg protein/ml）を 37°C 55分間preincubate（up-regulation 操作）した。Preincubation 後、遠心洗滌にて得られた膜分画をstandard assay medium（5.7 mM ascorbic acid, 10μM pargyline in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4）に懸濁（mg protein/ml）し、radioreceptor-結合実験に供した。上記試料（0.3～0.5 ml）を用いて一定濃度の[^{3}H]tryptamineと0°C 60分間 incubateした後、rapid-filtration法（Whatman GF/B filter）にて結合型[^{3}H]ligandを計測した。特異的[^{3}H]ligand結合量は、［総結合量］－［非特異的結合量：1～10μM非放射性tryptamine共存下での結

合量］で得られた値とした。Scatchard プロットは、nonlinear regression法（４）にて解析した。なお、one-siteまたはtwo-siteモデルのいずれに適合しているかの検定は、F-test分析（P<0.01）にて行った。

TABLE 1
Effect of Preincubation of SPM on Subsequent [^{3}H]Tryptamine Binding

Preincubation condition	[^{3}H]Tryptamine bound (%)
Temperature (°C)	
37 (control, dpm/mg protein)	(13971 ± 900)
20	59.3 ± 8.7*
0	41.3 ± 3.6**
50	42.5 ± 3.6**
75	1.6 ± 1.6**
+ Pargyline (μM)	
10	101.8 ± 4.5
20	103.7 ± 2.1
+ Ascorbic acid (%)	
0.02	91.8 ± 7.3
0.2	105.4 ± 3.0
+ EGTA (mM)	
0.5	105.1 ± 8.6
2.5	98.6 ± 7.2
5.0	102.9 ± 7.8
+ $CaCl_2$ (mM)	
1	101.7 ± 9.4
5	100.5 ± 3.4
10	101.8 ± 7.3
+ $MgCl_2$ (mM)	
1	105.9 ± 5.8
5	95.7 ± 4.9
10	101.2 ± 8.8
+ NaCl (mM)	
5	104.0 ± 3.0
10	98.8 ± 4.2
+ Guanine nucleotides (1 mM)	
Gpp(NH)p	100.1 ± 7.4
GTP	105.7 ± 4.5
GDP	99.5 ± 1.2
(ATP)	100.5 ± 3.0
Glutaraldehyde (%)	
0.001	104.2 ± 3.2
0.01	41.4 ± 3.1**

Data: % of control (mean ± S.E.M. of 4 experiments)
[^{3}H]Tryptamine: 3 nM $^*P < 0.02$ $^{**}P < 0.001$

［結果および考察］

(1) Preincubation 効果の検討

Up-regulation 機構を検索する目的で、Table 1 に示した種々のpre-incubation条件（シナプス膜の）について検討した。特異的[^{3}H]tryptamine結合能の増大現象は生理的温度依存性を示したが、pargyline, ascorbic acid, EGTA, metal ionsおよびguanine nucleotides は、何らの作用も示さなかった。他方、glutar-aldehydeは上記現象を抑制する事が判明した。以上の結果を考察すると、MAO 阻害剤であるpargyline での結果から、preincubation操作による[^{3}H]tryptamine結合能の増大は単なる内在性ligandの減少（unmasking）に基づくのでは無い事が示唆される。更に、アミノ酸のアミノ基とcross-linking する事で作用が発現するglutaraldehydeが up-regulation現象を抑制する事実から、温度一依存性preincubation 操作は、[^{3}H]tryptamine結合分子内で一種のallosteric modification を誘発するものと考えられる。

(2) Up-regulation 現象に対するglutaraldehyde（およびAzure A）の作用

(1) において、ペプチド鎖のcross-linkerであるglutar-aldehydeが up-regulation現象を特異的に抑制する可能性が示唆されたので、本項にて同抑制機構を詳細に検討した。なお、serotonin受容体機構においてAzure A が、

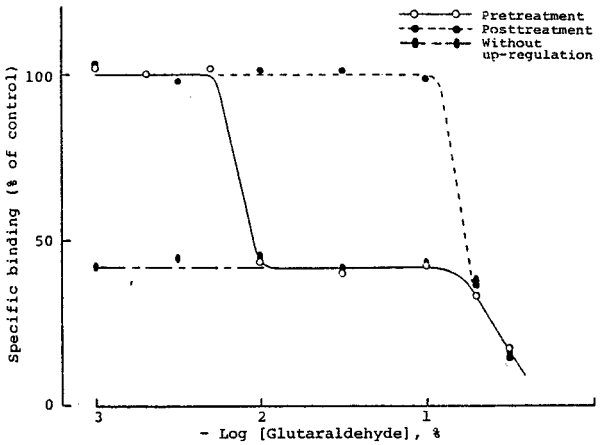


Fig. 1. Concentration-dependent inhibition by glutar-aldehyde of [^{3}H]tryptamine binding. [^{3}H]Tryptamine: 3 nM
Pretreatment: glutaraldehyde-treatment ⟶ preincubation
Posttreatment: preincubation ⟶ glutaraldehyde-treatment
Without up-regulation: glutaraldehyde-treatment

単なるligand認識部位のmaskingに基づくnon-competitive型の阻害作用を呈することが判明しているので（５）、ここでは同試薬をglutaraldehydeに対するreferenceとして用いた。高親和性[^{3}H]tryptamine結合に対するglutaraldehyde（Azure A）－抑制作用の濃度依存曲線をFig.1（２）に示したが、特定濃度領域（0.01～0.1％）においてglutaraldehydeはup-regulation現象のみを特異的に阻害する事が明らかになった。それに反して、Azure Aでの濃度依存曲線は、pretreatmentとpost-treatment間での阻害率に差が無く（glutaraldehydeの場合では、posttreatmentでの阻害作用は発現しない）、且つwithout up-regulationとpre(post)treatment間での阻害率が同程度であった。すなわち、Azure Aにおいてはup-regulation現象のみならず、非特異的に[^{3}H]tryptamine結合能を抑制していると言えよう。更に、上記現象をScatchardプロットにて[^{3}H]tryptamine結合部位の分子構築レベルで解析した結果は、glutaraldehyde前処理された膜試料での同プロットはcurvilinear (two binding sites)では無く直線性(one binding site)を示し、そのK_DとB_{max}は完全にwithout up-regulationでの値に一致していた。

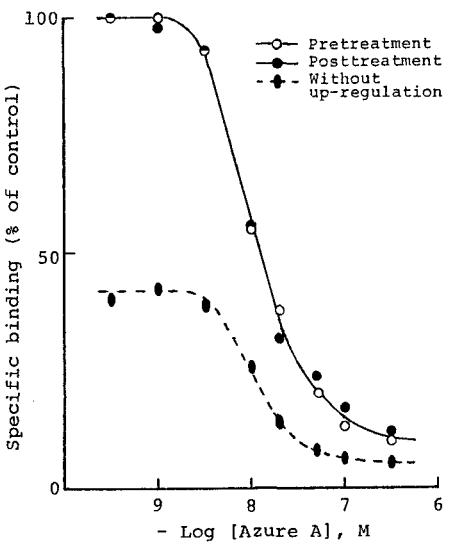


Fig. 2. Concentration-dependent inhibition by Azure A of [^{3}H]tryptamine binding.
[^{3}H]Tryptamine: 3 nM
Pretreatment: Azure A-treatment ⟶ preincubation
Posttreatment: preincubation ⟶ Azure A-treatment
Without up-regulation: Azure A-treatment

以上の結果を総括すると、[^{3}H]tryptamine結合でのup-regulation現象は、完全に熱因子（37°Cの生理的温度）にのみ制御されており、一種のallosteric modificationにて高親和性結合部位（K_D = 0.45 nM, B_{max} = 102.7 fmoles/mg protein）が構築された結果と考えられる。（なお、本現象の神経薬理学的意義についても言及したい）

［参考文献］

1) Cascio, C.S. and Kellar, K.J. (1983) Europ. J. Pharmacol. 95, 31-39
2) Jones, R.S.G. (1982) Prog. in Neurobiol. 19, 117-139
3) Karasawa, A., Serikyaku, S. and Ishitani, R. (1986) Life Sciences 38, 1331-1337
4) Yoshikawa, S. and Ishitani, R. (1984) Neuropharmacology 23, 1227-1230
5) Yoshikawa, S. and Ishitani, R. (1985) Life Sciences 36, 485-492

2.〔^{3}H〕グルタチオンのシナプス膜への結合について

荻田喜代一・大垣孝雄*・米田幸雄
（摂南大・薬・薬理，錦秀会臨検学院*）

〔要　約〕

ラット脳シナプス膜標品への[^{3}H]グルタチオン結合の性質について検討した。還元型グルタチオン(GSH)および酸化型グルタチオン(GSSG)が、[^{3}H]グルタミン酸(Glu)の特異的結合を濃度依存的に阻害したので、脳シナプス膜標品中の[^{3}H]GSH結合部位の存在について検索したところ、シナプス膜中に[^{3}H]GSHの結合活性が認められた。本結合は、GSHおよびGSSGにより濃度依存的に阻害され、その阻害効果はGSSGに比べGSHの方が強かった。一方、L-Gluは本結合に対して、全く阻害作用を示さなかった。[^{3}H]GSH結合は少なくとも500μgまでは用いた蛋白量に依存して直線的に増加した。反応を2℃で行った場合の結合は、30℃の場合の結合の50-60%であった。また本結合は、反応時間に依存して増加し、反応開始後 60分でほぼ定常状態になることが判明した。シナプス膜標品による[^{3}H]GSHの分解について、セルロースプレートを用いた薄層クロマトグラフィーにより検討したところ、本反応条件では有意な[^{3}H]GSHの分解は認められなかった。

以上の結果より、ラット脳シナプス膜標品中に、構造選択性、温度依存性、飽和性を持つ[^{3}H]GSH特異的結合部位が存在することが示唆される。

Key word： [^{3}H]Glutathione binding, High affinity,
Glutamatergic neurotransmission

L-Gluは哺乳動物の中枢神経系において、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(2)。近年、Glu含有の内在性ペプチドであるN-アセチルアスパラチルGluが、Gluやアスパラギン酸などと同様に、ラット海馬および小脳において強い興奮作用を発揮するとともに、[^{3}H]Glu特異的結合を濃度依存的に阻害することが明らかにされている(4)。一方、Glu含有の内在性ペプチドであるグルタチオンの中枢神経系における生理的意義については、未だ充分に解明されていないのが現状である。最近筆者らは、Na^+非依存性および依存性の[^{3}H]Glu結合がGSHおよびGSSGにより阻害されることを見出し、これらのペプチドが中枢神経系のGlu作動性神経におけるシナプス伝達機構に何らかの生理的役割を演じている可能性があることを報告した(1)。したがって本研究では、GSHの中枢神経系での役割をさらに追究する目的で、脳シナプス膜標品中に[^{3}H]GSH特異的結合部位が存在するか否かについて検討を加えた。

【実験方法】　ラット全脳より調整した粗シナプス膜標品を、50 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)に懸濁したのち、50,000 x 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渣を、0.32 M ショ糖溶液に懸濁して－80℃で保存した。使用時には上記洗浄操作をさらに2回行ったのち、得られた沈渣を実験に供した。[^{3}H]Glu結合実験は、このシナプス膜標品を上記緩衝液中で10 nM [^{3}H]Glu(44.6 Ci/mmol, NEN, 陽イオン交換樹脂により精製)と30℃で60分間インキュベートしたのち、Whatman GF/Bフィルターを用いた吸引濾過法により反応を停止させて行った(3)。[^{3}H]GSH結合実験は、リガンドとして100 nM [^{3}H] GSH(1 Ci/mmol, NEN)を用いて、[^{3}H]Glu結合実験の場合と同様に行った。

【実験結果】　GSHおよびGSSGは、基礎結合（IC_{50}値（μM）GSH, 4.44±0.24; GSSG, 11.1±3.8）、Na^+依存性結合（9.79±2.37; 12.4±4.9）の他にも、Cl^-依存性結合（2.65±0.23; 4.16±0.69）、Ca^{2+}刺激性結合（2.52±0.34; 2.77±0.53）を濃度依存的に阻害した（Fig.1）。このことは、GSHがGlu結合部位に親和性を持つことを意味するとともに、脳シナプス膜中にGSHに親和性を持つ部位が存在することを示唆するので、次いで[^{3}H]GSHの脳シナプス膜標品への結合について検討した。その結果、Fig.2に示すように、シナプス膜標品中に[^{3}H]GSHの結合部位が見出された。この結合は反応温度の上昇に伴い増加したが、1 mM GSHおよびGSSGは反応温度に関係なく結合を阻害した。しかしながら、1 mM Gluではいずれの反応温度においても、有意な阻害作用は認められなかった（Fig.2）。したがって、1 mM GSH存在下での結合を非特異的結合とした。全結合量および非特異的結合量は、500μgまでは用いた蛋白量に比例して直線的に増加し、本結合が膜蛋白量に依存して起ることが示された（Fig.3）。また、本結合は反応時間に依存して増加し、反応開始後60分でほぼ定常状態に達することが判明した。反応温度が2℃の場合と30℃の場合を比較すると、2℃での結合は30℃の場合の50-60%程度であったが、いずれの反応温度においても約60分で定常状態になることが見出された（Fig.4）。[^{3}H]GSH特異的結合は、GSHにより濃度依存的に阻害され、そのIC_{50}値は2.76±0.65μMであった。また、本結合はGSSGでも濃度依存的に阻害されたが、そのIC_{50}値は17.6±1.5μMとGSHの場合より大きく、GSSGの阻害作用の弱いことが示された（Fig.5）。さらに、リガンド濃度を変化させて結合を測定すると、本結合は100-10,000 nMの間では飽和性を示すことが明らかとなった。非放射性GSHを脳シナプス膜とともに30℃で60分間インキュベートしたのち、薄層クロマトグラフィーによる分離およびニンヒドリンによる検出を行った結果、GSHのスポットのみが見出され、Gluのスポットは検出されなかった。さらに、[^{3}H]GSHの反応中の分解をセルロースプレートを用いた薄層クロマトグラフィーで検討した結果、30℃で60分間インキュベートしたのちでも、95.7±3.7%が[^{3}H]GSHとして検出されることが確認された。

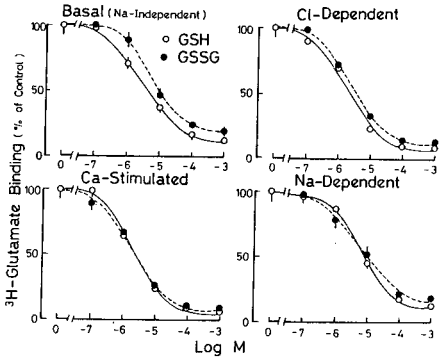


Fig. 1. Effect of GSH and GSSG on [^{3}H]Glu binding.

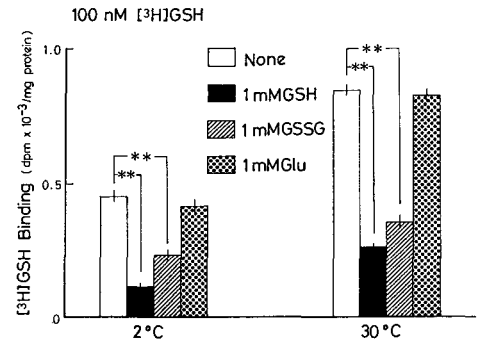


Fig. 2. Effect of excesses of Glu, GSH and GSSG on [^{3}H]GSH binding.

【考察】　本研究により、GSHが[^{3}H]Glu特異的結合を阻害すること、および脳シナプス膜中に構造選択性、温度依存性、飽和性を持つ[^{3}H]GSH結合部位が存在する

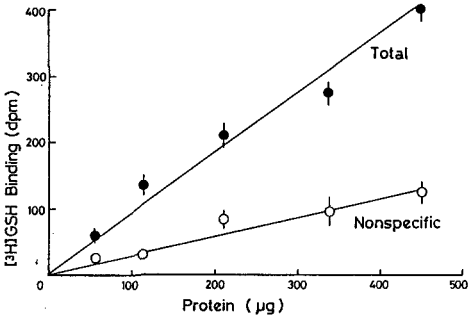


Fig. 3. Effect of protein concentrations on [³H]GSH binding.

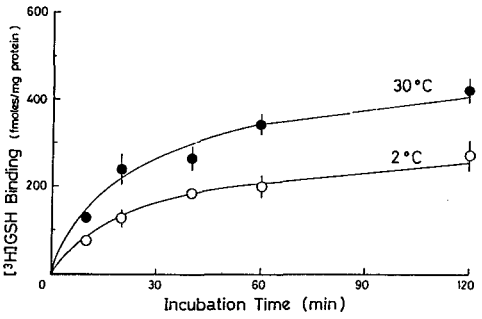


Fig. 4. Effect of incubation time on [³H]GSH binding.

ことが明らかとなった。この[³H]GSH結合が、大過剰のGluにより阻害されないことから考えて、本条件下では[³H]Glu結合部位と[³H]GSH結合部位は異なった部位である可能性が示唆される。しかしながら、[³H]GSH結合部位と特定の条件下で出現する[³H]Glu結合部位との間に相互作用が存在することも否定は出来ない。現在のところ[³H]GSH結合部位の本体は不明であるが、反応中に有意なGSHの分解がないことから、この[³H]GSHの結合がGSHペルオキシダーゼやGSH S-転移酵素あるいはγ-グルタミルトランスペプチダーゼ(γ-GTP)などの酵素への結合を反映するものでないと思われる。事実、γ-GTP活性は反応温度により著明に異なるが(2℃,0.76±0.08; 30℃,4.86±0.06 μmoles/mg protein/min)、GSHの阻害作用は反応温度により大きな影響を受けなかった(1)。以上の結果から、GSHが中枢神経系におけるシナプス伝達機構の中でも特にGlu作動性シナプス伝達に何らかの役割を演じている可能性が示唆される。今後、[³H]GSH結合部位の生化学的、薬理学的性質の検討により、中枢神経系におけるGSHの生理的意義の解明がなされることを期待したい。

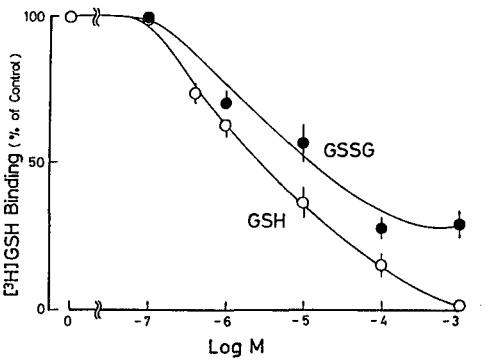


Fig. 5. Effect of GSH and GSSG on [³H]GSH binding.

【謝辞】 本研究の一部は文部省科学研究費(61770161)の援助のもとに行った。

【文献】 1.Ogita,K.,Kitago,T., Nakamuta,H.,Fukuda,Y.,Koida,M., Ogawa,Y.and Yoneda,Y. Life Sci. in press.

2.Watkins,J.C.and Evans,R.H.(1981) Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.21,165-204.

3.Yoneda,Y.and Ogita,K. Brain Res. in press.

4.Zaczek,R.,Koller,K.,Cotter,R.,Heller,D.and Coyle, J.T.(1983) Proc.Natl. Acad.Sci.USA 80,1116-1119.

3．ラット中枢神経系におけるサブスタンスP受容体のダウンレギュレーションについて

井上敦子・仲田義啓・瀬川富朗　（広島大・医・薬効解析）

〔要　約〕

サブスタンス　P（SP）は、ほ乳類の中枢神経系において特異的な受容体を持ち、この受容体を介して種々の生理的役割を演じている神経伝達物質と考えられる。今回、SP-受容体複合体のインターナリゼーションの可能性について調べ、生理機能との関連についてもあわせて考察した。

あらかじめ　3×10^{-5}M　SPで前処置したラット脳切片から調製した粗シナプス膜で、インキュベーション時間、温度、SP濃度依存性、DNP、NaN_3感受性の^{3}H-SP特異的結合の減少が観察された。スキャッチャード解析より、この減少は受容体数の減少によるものと考えられる。また、^{3}H-SPは時間に依存して脳切片に取り込まれ、その諸性質はSP前処置による膜への^{3}H-SP結合量減少の性質とよく一致していた。さらに、ラット脳室内にSP 10μg を投与すると、投与後1時間に行動量減少が観察された。そこでこの時点で脳を取り出し^{3}H-SP特異的結合を測定すると、SP投与ラットにおいて有意な^{3}H-SP特異的結合量減少が認められた。

以上の実験結果は、SP前処置による受容体結合量の減少がSP-受容体複合体のインターナリゼーションによる可能性を示唆するもので、この現象がSP受容体の脱感作に関わっている可能性を示す。

Key word :　Substance P, Receptor Down Regulation, Internalization

《緒言》

一般に細胞は、多くの外来性物質を細胞内に取り込むことが知られている。この機構のうちエンドサイトーシスと呼ばれる現象は、それぞれのリガンドと特異的受容体の複合体のインターナリゼーションによりおこる現象で、種々のホルモンや神経伝達物質で研究が進められている。一方、サブスタンス　P　（SP）はアミノ酸１１個からなるペプチドで、ほ乳類の中枢神経系において特異的受容体を持ち、この受容体を介して種々の生理的役割を演じていることが示されている神経伝達物質である。しかし、SPの中枢神経系における詳細な動態については未だ不明の点が多い。我々は、高濃度SPによりラット脳において^{3}H-SP特異的結合量が減少すること、さらにラット脳切片に^{3}H-SPがとりこまれることを見出し、先に第６９回日本薬理学会近畿部会にて報告した。今回この受容体ダウンレギュレーションと^{3}H-SP取り込みが同様にエネルギー依存性であることを示し、更に、ラット脳室内SP投与により誘発される行動量減少にSP受容体のダウンレギュレーションが関わっている可能性をも示す結果を得たので考察する。

《実験方法》

受容体ダウンレギュレーション

Wistar系雄性ラット全脳（小脳を除く）切片をあらかじめ 3×10^{-5}M SPと３７℃でインキュベーションし、充分洗浄した後粗シナプス膜を調製し、^{3}H-SPとインキュベートして結合量を測定した。^{3}H-SP特異的結合量は 10^{-6}M 非放射性SP共存下での非特異的結合量を全結合量から差し引いて求めた。

^{3}H- SP取り込み

ラット脳切片に^{3}H- SPを加え、３７℃でインキュベートした後、0.2N 酢酸を

含む氷冷生理食塩水で充分洗浄して表面に結合した^{3}H－ＳＰを除いた後、組織中の放射活性を測定した。

ラット脳室内ＳＰ投与と行動量

ペントバルビタール麻酔下でラット脳室にカニューレを装着し、３日後覚醒時にＳＰをゆっくり注入し、アニメックスにて行動量を測定した。

《結果》

ラット脳切片を 3x10^{-5}M ＳＰと３７℃１時間処置した後粗シナプス膜を調製して^{3}H-ＳＰ結合量を測定した。その結果、ＳＰ前処置により^{3}H-ＳＰ特異的結合量が約３０％有意に減少した。そこでこの減少の経時変化を調べた。ラット脳切片をＳＰと３７℃で１０分から９０分までインキュベートした後粗シナプス膜を調製して^{3}H-ＳＰ特異的結合量を測定した。^{3}H-ＳＰ特異的結合は３７℃のインキュベーション時間に依存して減少が、増加していき、６０分で有意に減少することがわかった（Fig.1）。一方、０℃でインキュベートした標品においてはどの時間においても有意な変化はみとめられなかった（Fig. 1）。さらに前処置するＳＰの濃度を変化させて検討したところ、^{3}H-ＳＰ特異的結合量の減少は、3x10^{-5}M、1.7x10^{-4}M という高濃度のＳＰで処置した場合に濃度依存的におこった。さらにこの特異的結合の減少をスキャッチャードプロットにより解析した（Fig.2）。^{3}H-ＳＰ量を 0.05nM から 5nM まで変化させて結合量を測定した結果、この濃度の範囲内では、非処置膜、ＳＰ処置膜共に一相性の結合パターンを示し、前者では Kd=0.26 nM、Bmax=52.8 fmol/mg prot.、後者では、Kd=0.30 nM、Bmax=39.8 fmol/mg prot.であった。従って、ＳＰ処置によりおもにBmax値（全結合数）が有意に減少していることがわかった。そこで実際に^{3}H-ＳＰをラット脳切片とインキュベートし、^{3}H-ＳＰが取り込まれるかどうかについて検討した。Fig.3 に示すように、^{3}H-ＳＰは３７℃では時間依存的に脳切片にとりこまれるが、０℃ではほとんど取り込まれないことがわかった。この時間、温度依存性の^{3}H-ＳＰ取り込みは、Fig.1 で示した受容体結合抑制の性質と極めて類似していた。また、ラット脳Ｐ$_{2}$画分を用いて同様の取り込み実験を検討した結果、３７℃、０℃いずれの温度でも^{3}H-ＳＰ取り込みは観察されなかった。これは、この^{3}H-ＳＰ取り込みがシナプス前部ではなく、シナプス後部でおこっており、ＳＰ受容体を介している可能性を示唆する。

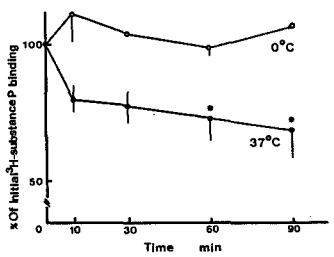


Fig.1 Time course of the substance P induced decrease in ^{3}H-substance P binding

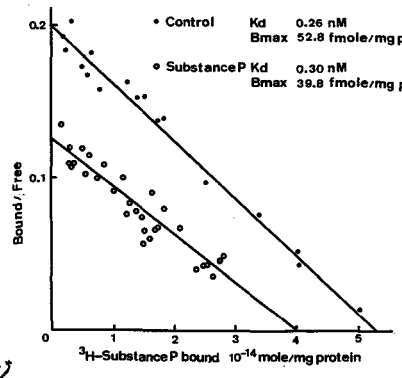


Fig.2 Scatchard analysis of the substance P induced decrease in ^{3}H-substance P binding

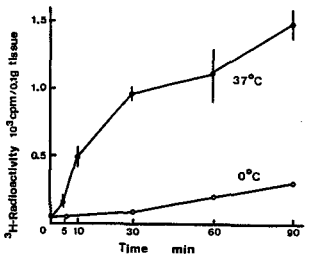


Fig.3 Time course of the ^{3}H-substance P incorporation into rat brain slices

さらにメタボリックインヒビターである窒化ナトリウム（NaN_3）と2,4-ジニトロフェノール（DNP）の影響

を調べた。Fig.4 に示すように、1mM DNPと10mM NaN_3 により^{3}H-ＳＰ取り込みは有意に抑制された。 DNP、NaN_3は粗シナプス膜への^{3}H-ＳＰ結合には無影響であったことから、この^{3}H-ＳＰ取り込み抑制作用は、リガンドの受容体占有への直接作用ではないことがわかる。さらにFig.5 に示すようにＳＰ前処置による^{3}H-ＳＰ特異的結合の抑制は、1mM DNPと10mM NaN_3によりほとんど完全に抑えられた。これらの結果は、ＳＰ取り込みと受容体ダウンレギュレーションが関連している現象であることを示唆する。

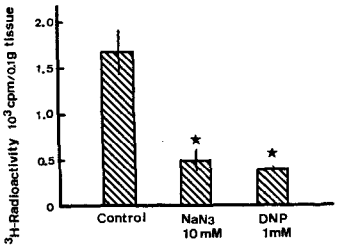


Fig.4 Effects of metabolic inhibitors on ^{3}H-substance P incorporation

次に、この受容体ダウンレギュレーションと生理機能との関連を考察する目的で、 脳室内に高用量ＳＰを投与したラットを用いて実験を行った。 ラット脳室内に10 μgという高用量のＳＰを投与すると投与後１時間までにラットの行動量が非処置ラットに比して有意に減少した。 そこで行動量の抑制された投与後１時間で脳を取り出し膜画分を調製し、充分洗浄した後^{3}H-ＳＰ結合量を測定した。その結果、Fig.6 に示すように^{3}H-ＳＰ特異的結合量は有意に減少していた。

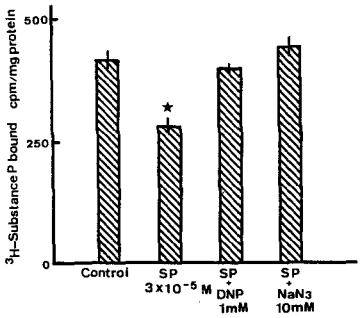


Fig.5 Metabolic inhibitors reverse substance P induced down regulation

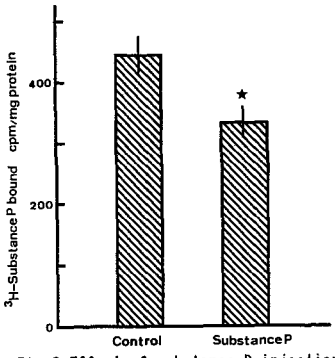


Fig.6 Effect of substance P injection (i.c.v.) on ^{3}H-substance P binding

《考察》

ＳＰ前処置による^{3}H-ＳＰ特異的結合抑制の温度、時間依存性、および、メタボリックインヒビターであるDNP、 NaN_3による抑制が、^{3}H-ＳＰの取り込みにおける諸性質とよく一致したことから、両機構に関連性のあることが示唆された。またスキャッチャード解析より^{3}H-ＳＰ特異的結合減少はおもに受容体数の減少によるものであることがわかった。従って、受容体を介したインターナリゼーションによる受容体ダウンレギュレーションがＳＰ受容体においてもおこっている可能性が示唆された。

このダウンレギュレーションの現象の生理的意義はなお不明である。しかし今回、Rondeanたちの報告（1）と同様に高濃度ＳＰを脳室内に投与して行動量が有意に減少している時点で、ラット脳膜画分への^{3}H-ＳＰ特異的結合が減少していることを発見した。従って、ＳＰ受容体ダウンレギュレーションが、神経系において高濃度のＳＰによる脱感作の機序に関わっている現象であることが想定される。

実験に御協力いただいた梨賢司、福安健両氏に深く感謝する。

《文献》

1. D.B. Rondean, F.B. Jolicoeur, F. Belanger & A. Barbeau (1978) Pharmacol. Biochem. & Behavior 9 , 769

4．ラット大脳皮質での Substance P 高—低両親和性受容体の存在
—SP 誘発イノシトール燐脂質代謝亢進との関係—

森島義行・仲田義啓・瀬川富朗　（広島大・医・薬効解析）

〔要　約〕

中枢神経系 Substance P（ＳＰ） 受容体の活性調節機構、特にＧＴＰ結合蛋白質（N-protein） の関与と、受容体情報伝達経路としてのイノシトール燐脂質代謝回転（ＰＩレスポンス）とＳＰ受容体との関係について検討した。
ラット大脳皮質膜画分を用いた［^{3}H］ＳＰと Physalaemin（ＰＨＹ） との競合実験の結果、ＳＰ結合部位はComputer解析（SIMPLEX）により、Mg^{2+}存在下、ＰＨＹに対し高親和性（ＳＰ-PH）と低親和性（ＳＰ-PL）の２つの部位に区別された。しかし、大脳皮質を凍結（２日以上,-80℃） すると、ＳＰ-PH は消失し ＳＰ-PLのみになった。100μM ＧＴＰ（Mg^{2+}存在下） は、ＳＰ-PL を消失させＳＰ-PH のみにした。Islet Activating Protein（ＩＡＰ）を、予めラット側脳室へ投与（5 μg）した大脳皮質膜画分では、ＳＰ-PLのみとなりＧＴＰを加えても、変化はみられなかった。Mg^{2+}非存在下では、ＳＰ結合部位はすべてＳＰ-PL になり、NaイオンはMgイオンの効果を抑制した。
予め、［^{3}H］Inositol（［^{3}H］ＩＮＳ） を側脳室内に投与したラットに、ＳＰ（20 μg） を側脳室内投与し、その１５分後にイノシトール燐酸類（ＩＰｓ）をＨＰＬＣで測定した。その結果、ＳＰはイノシトール燐脂質に対するＩＰｓの割合を有意に増加させた。このＳＰの作用は、ＩＡＰ前投与ラットでは抑制された。以上の結果、ラット大脳皮質のＳＰ受容体は、ＳＰ-PH とＳＰ-PL の異なる親和性の結合部位をもつ状態で存在し、ＩＡＰで失活されるN-protein を介しＰＩレスポンスと共役（おそらくＳＰ-PH）していること、およびNaイオンとMgイオンにより相互調節されていることが示唆された。

Key word : Substance P receptor, PI Response, GTP regulatory protein

〔 緒言 〕

ＳＰ受容体は、Leeら(3)により tachykinin 類の生物活性への差からＰＨＹに対し高い親和性をもつＳＰ-Ｐ型と、Eledoisin に高い親和性をもつＳＰ-Ｅ型とに分類された。中枢神経組織の受容体は、ＳＰ結合抑制実験よりＳＰ-Ｐ型であり、guanine nucleotides でその結合が抑制されること(1)や、その抑制がＩＡＰで消失するという我々の報告(4)から、ＳＰ受容体とN-protein が共役していることが示唆されてきている。一方、ＳＰの受容体情報伝達経路として、ＰＩレスポンスが報告されているが、受容体との関係については、ほとんど知られていない。そこで我々は、ラット大脳皮質膜画分でのＳＰ受容体活性調節機構を、ＳＰ結合実験と非線形最小二乗法（SIMPLEX）による Computer 解析 を用いて検討した。次にＰＩレスポンスを測定するため、In vivo 投与法を開発し、ＩＡＰを組み合わせて用いることにより、ＳＰ受容体とＰＩレスポンスとの関係について興味ある知見を得た。

〔 実験方法 〕

すべての実験において、動物は Wistar系雄性ラット（体重200g前後）を用いた。

（１）［^{3}H］ＳＰ-ＰＨＹ競合実験

断頭後、摘出した脳から大脳皮質をとりだし、50mM Tris・HCl buffer(pH7.4)にPolytronを用い懸濁した後、20000xg 10min 遠心した。得られた沈さを、10mM $MgCl_2$, 0.02% BSA, 40μg/ml Bacitracin, 4μg/ml Leupeptin, 2μg/ml Chymostatin, 10μM Captoprilを含む50mM Tris・HCl buffer(pH7.4)に懸濁し、膜標本液とした（蛋白濃度約2.5mg/ml）。なお、組織は通常freshなものを用いた。結合実験は、［^{3}H］ＳＰ 50μl（1nM:40～52Ci/mmol,Amersham）及び Displacer 50μlに、膜標本液 400μlを加え、24℃ 1時間incubation することで行った。B/F分離は、0.1% Polyethyleneimine で処理した Whatman GF/B glass filter を用い、filtration 法にて行った。Displacer には、ＰＨＹを13 points に段階希釈して用いた。また、1μM ＳＰ存在下での結合を、非特異的結合とした。Data 解析は、非線形最小二乗法（SIMPLEX）を用いた Computer program により行った。

（2）ＰＩレスポンス

ラットを Pentobarbital(40mg/Kg i.p.,Pitman-Moore)麻酔下、一側の側脳室へ [^{3}H] myo-Inositol(1μCi/rat:16.3Ci/mmol,Amersham)を投与し、　２日後にＳＰ(+100mMLiCl) 又は Saline(+100mM LiCl) 10μlを、エーテル麻酔下、同箇所へ投与した。投与後、一定の時間において断頭、脳を摘出し、投与した側の半脳を分析に用いた。取り出した組織を 5% ＴＣＡ中で homogenize し、20000xg 10min 遠心した。上清をイノシトール燐酸類画分として、ＤＥＡＥ-陰イオン交換(TSK gel DEAE-5PW)ＨＰＬＣを用い、Irvineら(2)の方法に従って分析した。沈さからは$CHCl_3$:MeOH:conc.HCl(100:200:2) を用いて Lipid 画分を抽出した。

（3）ＩＡＰ処置

Pentobarbital 麻酔下、ＩＡＰをラット側脳室へ投与した。競合実験の場合には、2.5μg ずつを左右両側へ投与し、４日後に用いた。ＰＩレスポンスの場合には、2.5μg を一側のみに投与し、その２日後 [^{3}H] ＩＮＳを同箇所へ投与、更にその２日後に実験に用いた。

〔 結果 〕

（1）競合実験

ＳＰ受容体は、fresh な大脳皮質膜画分を用いた場合、10mM $MgCl_2$存在下で、高親和性のＳＰ-ＰＨ (Kd 8.43±0.14:単位 -log M[M:濃度] 以下同様) と、低親和性のＳＰ-ＰＬ (Kd 7.69±0.20)に区別された。このときの Hill係数は 0.90±0.06であり、全受容体量に対するＳＰ-ＰＨとＳＰ-ＰＬの割合は 52.3%と 47.7%であった(Table 1)。　組織を-80℃で凍結（２日以上）した場合、Kd 7.54±0.01、Hill係数 1.14±0.16の１相性となり、この値はＳＰ-ＰＬ とほぼ同じとなった(Table 1)。しかし、１日の凍結では２相性であった。

この２相性結合部位に対するＧＴＰの影響について検討した。ＧＴＰ 100μM 存在下では、Hill係数がほぼ１になり (0.97±0.03)、１相性の結合に近づいた。このときの Kd は8.24±0.09で 、ＳＰ-ＰＨのみの結合になることが示された(Fig.1,Table 1)。このＧＴＰの効果は濃度依存的で、１μMでは２相性を保っていたが、10μMでは１相性に近づきつつあった。

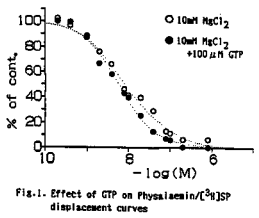


Fig.1. Effect of GTP on Physalaemin/[^{3}H]SP displacement curves

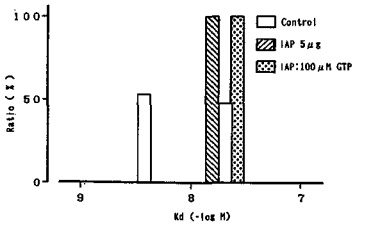


Fig.2. Effect of IAP pre-treatment on [^{3}H]SP binding to rat cortex membranes(fresh)

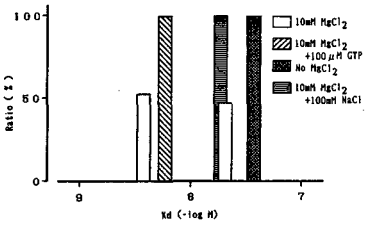


Fig.3. Effects of GTP, $MgCl_2$ and NaCl on [^{3}H]SP binding to rat cortex membranes(fresh)

TABLE 1　Values of Kd and Hill coefficiency of various conditions in rat cortex membranes

Conditions	[n]	Pseudo Hill coefficiency	Kd(SP-PH) (-log M)	Kd(SP-PL) (-log M)
Control(+10mM $MgCl_2$)	[7]	0.90±0.06	8.43±0.14 (52.3%)	7.69±0.20 (47.7%)
GTP 100μM (+$MgCl_2$)	[5]	0.97±0.03	8.24±0.09	--------
No MgCl	[4]	1.43±0.11	-------	7.43±0.19
NaCl 100mM (+$MgCl_2$)	[2]	1.24±0.04	-------	7.73±0.14
Frozen 7days(+$MgCl_2$)	[2]	1.14±0.16	-------	7.79±0.25
IAP treatment				
10mM MgCl	[3]	0.97±0.37	-------	7.81±0.44
GTP 100μM (+$MgCl_2$)	[3]	1.04±0.39	-------	7.58±0.29

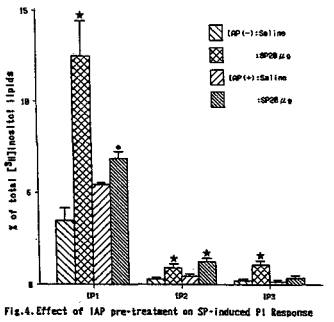


Fig.4. Effect of IAP pre-treatment on SP-induced PI Response

*P< 0.05 vs. Saline, ＊P< 0.05 vs. IAP(-):SP 20μg in student's t-test

次に、ＩＡＰ 5μgを側脳室へ投与した後、４日目のラットの大脳皮質膜画分を用いて同様の実験を行った。ＩＡＰ投与ラットの運動量は、Animex を用いた測定で、対照群のラットに比べ投与４日目で有意に増加していた。このときの［^{3}H］ＳＰ結合は、Kd 7.81±0.44、Hill係数 0.97±0.37となり、ＧＴＰ 100μMを加えても、Kd 及び Hill係数にほとんど変化は見られなかった(Kd 7.58±0.29、Hill係数 1.04±0.39、Fig.2)。

また、 ＳＰ-ＰHとＳＰ-ＰLに対するMgイオンとNaイオンの影響について検討した。Assay buffer からMgイオンを除去すると、Kd 7.43±0.19、Hill係数 1.43±0.11の１相性となり、100mM Naイオン（$MgCl_2$存在下）でもKd 7.73±0.14、Hill係数 1.24±0.04となり、１相性の結合がみられた(Fig.3)。

（２）ＰＩレスポンス

［^{3}H］ＩＮＳ(1μCi)を側脳室に投与した後、12,24,48,72 時間の各時間におけるＩＰｓ画分と Lipid 画分への［^{3}H］の取り込みをみたところ、 両画分とも 48時間後に最大値を示した。そこで、以後［^{3}H］ＩＮＳ投与２日後(48hr）のラットを使用した。次に、薬物投与後のＩＰｓを経時的に測定した結果、IP_1は投与後 60分まで経時的に蓄積したのに対し、IP_2は 30分後、IP_3は 15分後に最大値を示した。従って、以後の実験では投与後 15分でのＩＰｓを分析した。

ＳＰ 20μg 脳室内投与により、全［^{3}H］Lipid 画分に対するＩＰｓの割合が有意に増加したのに対し、ＩＡＰ 2.5μgを側脳室へ前投与したラットでは、ＳＰ 20μg を投与しても対照群(Saline)に比べ、有意な差はみられなかった。ＩＡＰ処置群の対照群と、非処置群の対照群との間に有意な差はなかった(Fig.4)。

〔 考察 〕

中枢組織のＳＰ-Ｐ型受容体が、 異なる親和性をもつ２種の sub-type に分類される可能性を示し、ＳＰ-ＰＨ 、ＳＰ-ＰＬ と名付けた。この sub-type は、ＧＴＰやNa及びMgイオン により相互変換可能であり、 従って生体内でＧＴＰ結合蛋白質や各イオンが、ＳＰ受容体の活性調節機構に重要な役割を演じていることが示唆された。ＧＴＰ存在下でＳＰ受容体がＳＰ-ＰＨの高親和性に移行することは、他の伝達物質で従来報告されているのと異なっている。しかし同時に、ＩＡＰ処置ラットでは、ＳＰにより引き起こされるイノシトール燐脂質代謝回転促進が抑制されることより、ＳＰ-ＰＨ site が受容体情報伝達経路のＰＩレスポンスと共役しているように思われた。しかし、この両結合部位がどのような生理的機能を有しているかは、現在のところ明らかではない。また、ＳＰ受容体と共役し、ＩＡＰ基質となるＮ-proteinの種類、及びＩＡＰの脳室内投与により、どの程度ＡＤＰ-ribosylation されているかについても明らかではない。しかし、実験時における処置群ラットの行動量の増加は確認した。

今回我々が用いたＳＰ結合抑制実験は、 ligandに［^{3}H］ＳＰを、Displacerにagonist のＰＨＹを用いた。しかしながら、現在まで中枢組織でのＳＰ antagonist はなく、この方法がＳＰ-Ｐ型の sub-type を検討できる唯一の方法と考えた。

また,今回我々は、ＰＩレスポンスを測定するため、［^{3}H］ＩＮＳを脳室内に投与し、In vivo で行うという新しい方法を開発した。今まで、中枢組織を用いてＰＩレスポンスを測定する方法は少なく、しかも多量のアイソトープを使用していた。それに比べ、我々の方法は、簡単で、少量の［^{3}H］ＩＮＳでで き、必要に応じては、［^{3}H］ＩＮＳ投与２日後の脳で切片法によるIn vitro の測定にも利用できた。

謝辞:

ＩＡＰを御恵与いただいた 宇井 理生教授（北大）ならびに 野木森 克己先生（科研製薬）に感謝いたします。Computer 解析に際し、programing に御協力いただいた 北村 佳久先生（富山医薬大）及び 瀬尾 明彦先生（広大）に感謝いたします。また、本実験の一部に御協力いただいた 平岡 千恵、梨 賢司 両氏に感謝いたします。

〔 参考文献 〕

(1) Cascieri,M.A.,and Liang,T.(1982) J.Biol.Chem.258,5158-5164

(2) Irvine,R.F.,Änggård,E.E.,Letcher,A.J.,and Downes,C.P.(1985) Biochem.J. 229,505-511

(3) Lee,C.M.,Iversen,L.L.,Hanley,M.R.,and Sandberg,B.E.B.(1982) Naunyn-Schmieberg's Arch.Pharmacol.318,281-287

(4) Tanaka,H.,Nakata,Y.,and Segawa,T.(1986) Eur.J.Pharmacol.125,157-158

5：ラット線条体における^{3}H-verapamil結合活性の日内変化と加齢による変化

盛政忠臣・岡田英俊・金行孝雄・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〕

ラット線条体において、３Ｈ－ｖｅｒａｐａｍｉｌならびに３Ｈ－ＱＮＢ結合活性の日内リズムと、それに対する加齢（９，６５週齢）の影響について検討を加えた．

若齢群においては、３Ｈ－ｖｅｒａｐａｍｉｌ結合活性は暗期前半と後半に二相性のピークを示し、明期中央に低値を示す有意な日内変化のあることが示された．一方，３Ｈ－ＱＮＢ結合活性は、暗期後半に高値、明期中央に低値をしめす、前者に類似した日内変化のあることがしめされた．これらの結果は、ｖｅｒａｐａｍｉｌでラベルされるカルシウムイオンチヤネルの活性とムスカリン性アセチルコリン受容体活性がサーカデイアンリズムの上で同調しており、相互作用のある可能性が示唆された．さらに、ラットが暗期活動性であること、線条体ドパミン活動が暗期後半にこう進している（４、５）ことに対しても、リズムが同調している可能性が示唆された．

加齢群では、３Ｈ－ｖｅｒａｐａｍｉｌ結合活性のサーカデイアンリズムは維持されているが、有意なレベルの低下を示し、３Ｈ－ＱＮＢ結合活性はリズムが平坦化し、有意なレベルの低下をしめした．これは、行動リズムの変化に対応した加齢による変化である可能性が考えられた．

Key word：Ｃａ++　ｉｏｎ　ｃｈａｎｎｅｌ、ｍｕｓｃａｒｉｎｅｒｇｉｃ　Ａｃｈ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ、ｃｉｒｃａｄｉａｎ　ｒｈｙｔｈｍ

カルシウムイオンチャネルは、中枢神経系においては伝達物質の放出、セカンドメッセンジャー系への関与など、膜周辺の重要な役割を担っていることが知られて来ているが、中枢神経系における知見は未だ少ない。カルシウム流入阻害剤として開発されたもののひとつであるｖｅｒａｐａｍｉｌは、本来の電位依存性（１）チャネルのみならず、受容体作動性（２）チャネルに対しても作用のあることが示されている。また、ｖｅｒａｐａｍｉｌ結合とＱＮＢ結合が、互いのアンタゴニストによって影響を受けること（３）から、ムスカリン性アセチルコリン受容体とカルシウムイオンチャネルの共存関係が示唆されている。一方、ＱＮＢ結合が、ラットの活動期において亢進するサーカデイアンリズムの存在（６）が示唆されている。

本研究においては、ラット線条体におけるｖｅｒａｐａｍｉｌならびにＱＮＢ結合活性の関係について、日内変動と加齢の影響について検討を加えた。

［実験方法］

１２時間毎の明暗周期、恒温恒湿、餌・水は自由に摂取できる条件下で少なくとも３週間以上飼育されたウイスター系雄性ラット（９、６５週齢）を用いた。動物は暗転６時間目から４時間毎（それぞれｎ＝６）に断頭し全脳を採取した。パンチアウト（５）によって獲られた線条体の粗膜標品を用いて受容体活性を測定した。放射性リガンドは、それぞれｄｅｓｍｅｔｈｏｘｙｖｅｒａｐａｍｉｌ（１ｎＭ）およびＱＮＢ（０．５ｎＭ）を、ｄｉｓｐｌａｃｅｒにはｄ－ｖｅｒａｐａｍｉｌ（１００μＭ）、ａｔｒｏｐｉｎｅ（１μＭ）を用いて、ｔｒｉｐｌｉｃａｔｅによって特異結合を

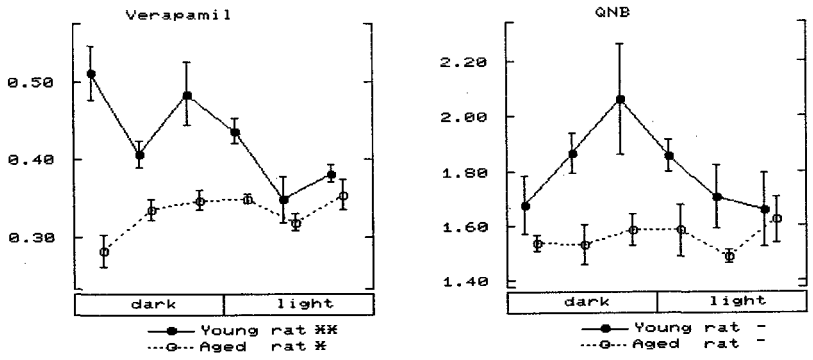


Figure 1 Specificbinding(fmoles/mg protein ,mean±sem) of ^{3}H-desmethoxyverapamil and ^{3}H-QNB to the caudate crude membrane preparations of the young(—⊕—) and aged(--⊕--) rat brain.
*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, by one-way ANOVA.

測定した。

統計学的処理には、一元ならびに二元配置分散分析を用いた。

［実験結果］

若齢ラット（９週齢）線条体における、ｖｅｒａｐａｍｉｌ（３Ｈ－ｄｅｓｍｅ－ｔｈｏｘｙｖｅｒａｐａｍｉｌ）特異結合（Ｆｉｇｕｒｅ１）は、暗期の前半と後半に二相性のピークを有し、明期中央に最小値をとる有意な日内変化を示し、最大値は最小値の１５０％の振幅を示した。それに対して、加齢群では、有意な日内変化を示しながらも、振幅は１２６％と平坦化し、さらにそのレベルは若齢群に対して有意に低下していることが示された。

ＱＮＢの特異結合は、両群において有意な日内変化は示さなかったが、若齢群においては、暗期後半にピーク（振幅１２５％）が認められ、加齢群においては平坦化が目立った。また、そのレベルは、加齢群において有意な低下を示した。

［考察］

ラット線条体におけるｖｅｒａｐａｍｉｌ結合活性に有意なサーカデイアンリズムのあることが示された。また、加齢に伴って、レベルの低下とリズムの平坦化の生ずることが示された。しかしながら、このｖｅｒａｐａｍｉｌ結合部位が、カルシウムイオンチャネルのどのサブクラス（電位依存性チャネル、受容体作動性チャネル、または両者の合計されたものか？）に相当するかは、本実験結果からは明らかではない。

一方しかしながら、ｖｅｒａｐａｍｉｌ結合活性およびＱＮＢ結合活性の両者に暗期後半のピークと明期中央の最小値がそれぞれ同期して認められた。このことは、ｖｅｒａｐａｍｉｌ結合とＱＮＢ結合の両者に相互作用のある（３）ことを合わせ考えると、受容体（ムスカリン性アセチルコリン）作動性イオンチャネルとその受容体相方が、共役してサーカデイアンリズムを形成している可能性は示唆的であることと考えられた。

ＱＮＢ結合には、今回の実験においては有意なサーカデイアンリズムは証明できなかった。しかしながら、ＱＮＢ結合にはサーカデイアンリズムのあるという報告（６）もあり、そのピークの位相は若齢群と同じであることが示された。加齢群のＱＮＢ結合活性の変化（リズムの平坦化、レベルの低下）が、ｖｅｒａｐａｍｉｌ結合活性の場合と同方向であることから、両者の相互関係がさらに示唆的と考えられる。

ドパミン終末の豊富なこの線条体において、アセチルコリンニウロンは二次ニウロンが多いとされている。この部位におけるドパミン活動（４、５）は、ここで得られたＱＮＢ結合活性の位相と一致していることから、両者の活動のサーカデイアンリズムは同期しているものと考えられた。この加齢ラットでは、行動のサーカデイアンリズムが平坦化していることと、線条体ドパミンが若齢ラットに対して過活動であること（５）は、加齢ラットのＱＮＢ結合活性のリズムの平坦化、レベル低下とに何らかの因果関係のあることが示唆された。

［文献］

1. Brown,D.A. et al (1983) J. Physiol. 337, 303-320
2. Geras,E. et al (1982) Endoclinology 110, 901-906
3. 片山禎夫ら (1985) 神経化学 24, 511-513
4. 盛政忠臣ら (1984) 神経化学 23, 111-113
5. 盛政忠臣ら (1985) 神経化学 24, 118-120
6. W-Justice,A. (1981) Pschiatry Research 5, 67-76

6．ラット脳における Ca 拮抗剤結合部位の薬理学的研究

松林弘明・鬼頭昭三・三好理絵　（広島大・医・第三内科）

〔要　約〕

Ca拮抗剤が神経細胞そのものに結合することが明らかにされ、Ca拮抗剤の中枢作用が注目されている。私共は昨年の本学会で中枢神経系におけるCa拮抗剤結合部位とα-adrenoceptorの相互作用を報告するとともに、Ca拮抗剤結合部位とadenylate cyclase活性との関連を報告した。本研究ではラット脳におけるCa拮抗剤結合部位の分子構造的特徴を明らかにするとともに、Ca拮抗剤の作用機序を細胞内情報伝達機構の観点から検索した。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)EDTA処置により^{3}H-nitrendipine結合は減少したが、Caイオン添加により結合が回復した。一方^{3}H-verapamil結合はEDTA処置では不変であったが、Caイオン添加で減少した。2)trypsin前処置膜では^{3}H-nitrendipine結合は減少したが、^{3}H-verapamil結合は不変であった。3)phospholipase C前処置膜では^{3}H-nitrendipine結合は減少したが、^{3}H-verapamil結合は増加した。4)autoradiographyにより^{3}H-nitrendipine結合と^{3}H-verapamil結合の脳内分布はほぼ一致したが、^{3}H-verapamil結合は黒質に強く分布した。以上の結果により、ラット脳内には数種のCa拮抗剤結合部位が存在し、それらの関連する細胞内情報伝達機構は若干異なると考えられる。

Key word：　Ca antagonists, phospholipase C, radioreceptor assay

＜目的＞

Ca拮抗剤は従来より心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[2)]、Ca拮抗剤の中枢作用が注目されている。Ca拮抗剤は、second messengerの1つであるCaイオンの作用を調節する薬物であるが、私共は中枢神経系におけるCa拮抗剤の作用に注目し、昨年、本学会でCa拮抗剤結合部位とα-adrenoceptorとの相互作用を報告した。中枢神経系においては、様々な神経伝達物質がその受容体を介して相互に密接に関係しながら機能を営んでおり、その刺激-応答連関にCaイオンは重要な役割を果たしている事が知られている。そこで私共は、細胞内情報伝達機構という観点からCa拮抗剤の作用を検索する事はきわめて重要と考え、本研究では、数種のCa拮抗剤結合部位の特徴を薬理学的受容体結合実験により検索し、これら薬物の刺激-応答連関への関連性を明らかにする事を目的とした。

＜方法＞

ウィスター系雄ラット(300g)を断頭し、大脳皮質よりsynaptosome分画を調整した。synaptosome分画は，10mM EDTA，10mM ditiothreitol，10mM N-ethylmaleimide，80μg/ml trypsin，1% Triton 100，100μM H-7，80μg/ml phospholipase Cの各種薬物を用いて30分30°Cのincubationで前処置し、receptor標品とした。上記の各処置膜についてdihydropyridine系Ca拮抗剤である^{3}H-nitrendipineとphenylalkylamine系Ca拮抗剤である^{3}H-verapamilを放射性標識物質とする結合実験を行った。^{3}H-nitrendipine結合実験は50mM Tris/HCl，pH7.4，60分25°Cのincubation条件下で行い、B/F分

離はWhatmann GF/B フィルターペーパーを用いた。^{3}H-verapamil 結合実験は 50mM Tris/HCl, pH7.4（含0.1%bovine serum albumin）60分 25°Cのincubation条件下で行い、B/F分離はWhatmann GF/Cフィルターペーパーを用いた。また、上記の各前処置膜において、化学構造の異なるCa拮抗剤である10μM diltiazem及び10μM verapamilの^{3}H-nitrendipine結合に対する影響の変化を観察した。さらに^{3}H-verapamilをリガンドとするin vitro autoradiography行い、^{3}H-nitrendipineの脳内結合部位の分布と比較した。

〈結果〉

EDTA前処置膜では、^{3}H-nitrendipine結合は対照の約30%まで減少した。しかしこの処置膜に10mMのCaイオンを添加すると対照の約70%まで結合が回復した。一方、^{3}H-verapamil結合は処置膜では不変であったが、10mM Caイオン存在下で結合は対照の約20%まで減少した。次に受容体の分子構造を変化させる薬物である10mM ditiothreitol及び10mM N-ethylmaleimideで前処置した膜では^{3}H-nitrendipine結合は不変であった。trypsin 前処置膜では^{3}H-nitrendipine 結合は対照の約 60%まで有意に減少した($p<0.01$)。^{3}H-verapamil結合は対照の約80%まで減少したが有意ではなかった(Fig.1)。また、1%Triton 100前処置膜では^{3}H-nitrendipine結合は対照の約3%とほとんど消失し、^{3}H-verapamil結合は約40%まで減少した。

次にphosphatidyl inositol (PI)代謝回転に関連する薬物で前処置した膜を用いた結合実験で、H-7前処置膜では^{3}H-nitrendipine及び^{3}H-verapamil結合は不変であった。しかしphospholipase C前処置膜では^{3}H-nitrendipine結合は対照の約10%まで減少したが、^{3}H-verapamil結合は対照の1.5倍と増加した(Fig.2)。

^{3}H-nitrendipine結合は10μM diltiazem存在下で約40%増加することが知られている[1]。EDTA, ditiothreitol, N-ethylmaleimide, trypsin, H-7の各前処置膜においても、diltiazemのこの増強効果は認められた。また、autoradiographyにより^{3}H-nitrendipineと^{3}H-verapamil結合の脳内分布はほぼ一致したが^{3}H-verapamil結合は黒質に強く分布した。

〈考察〉

現在、Ca拮抗剤は、電位依存性Caチャンネルの存在証明の手段として用いられているにすぎず、その分子生物学的作用機序は全く知られていない。今回の実験により^{3}H-nitrendipine結合部位は、trypsin前処置で影響される蛋白質と考えられるが、S-S結合切断やアルキル化は結合に影響しないことが判明した。さらにdiltiazemの^{3}H-nitrendipine結合増強効果は、EDTA, ditiothreitol, N-ethylmaleimide, trypsin, H-7の各前処置膜においても認められた。この増強効果発現機構の詳細は不明であるが、上記の各処置によっても影響されないdiltiazem結合部位が^{3}H-nitrendipine結合部位に接近して存在し、その結合部位を介して増強効果を発現するものと思われる。また，EDTA, trypsin, phospholipase Cの各前処置膜で^{3}H-nitrendipineと^{3}H-verapamil結合は異なった修飾を受け、結合部位の性質の違いが示された。

私共は、GTP analogにより^{3}H-nitrendipine結合が減少するが、^{3}H-verapamil結合は無影響であること，nifedipineがadenylate cyclase活性を抑制するが、verapamilは抑制しないことを報告し、dihydropyridine系Ca拮抗剤結合部位と、Ni蛋白質及び

adenylate cyclase系の関連を推定している[4)5)]。一方、PI代謝回転は受容体-N蛋白質-adenylate cyclase系とともに、もう一つの主要な細胞内情報伝達系として注目されており、その代謝産物は細胞内Caイオン濃度の調節に関係している[3)6)]。私共の実験では、PI代謝回転における重要な酵素であるphospholipase Cが、化学構造の異なるCa拮抗剤の結合に対して正反対の効果を示した。この現象のメカニズムは不明であるが、Ca拮抗剤結合部位の性質がPI代謝回転の点からも相違があることが示された。以上により、ラット脳内には数種のCa拮抗剤結合部位が存在し、それらの関連する細胞内情報伝達機構は若干異なると考えられる。

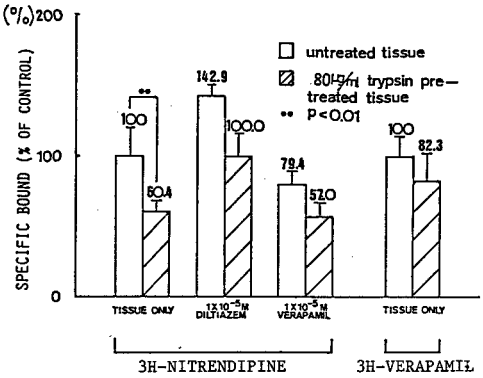


Fig.1 The changes of Ca antagonist bindings in the synaptosomal membrane treated with trypsin.

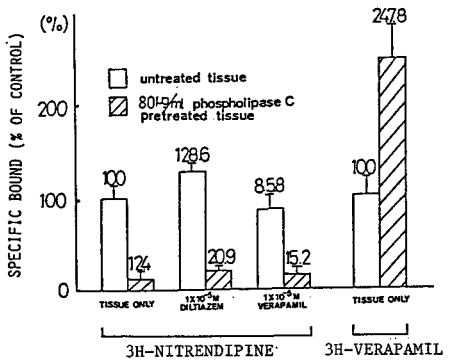


Fig.2 The changes of Ca antagonist bindings in the synaptosomal membrane treated with phospholipase C.

1) Ehlert,F.J., Itoga,E., Roeske,W.R. and Yamamura,H.I.(1982) Biochem. Biophys. Res. Commun.,104, 937-943.

2) Ehlert,F.J., Roeske,W.R., Itoga,E. and Yamamura,H.I.(1982) Life Science, 30, 2191-2202.

3) Mac Intyre,D.E., McNicol,A. and Drummond,A.H.(1985) FEBS Lett.,180,160-164.

4) Matsubayashi,H., Kito,S., Katayama,S. and Miyoshi,R.(1986) Neuroscience Research, suppl.3, S148.

5) Matsubayashi,H., Kito,S. and Miyoshi,R.(1986) Japan. J. Pharmacol.40, 84P.

6) O'Rourke,F.A., Halenda,S.P., Zavoico,G.B. and Feinstein,M.B.(1985) J. Biol. Chem.,260,956-962.

7．ラット海馬 CA3 錐体細胞破壊による，虚血性CA1 錐体細胞死の予防効果
—L- グルタミン酸受容体オートラジオグラフィー

小野寺宏・佐藤　元・小暮久也　（東北大・医・神経内科）

〔要　約〕

海馬ＣＡ１錐体細胞は、虚血侵襲により重篤な障害を示す事が知られているが、虚血負荷後、一度は回復するかに見えても結局は死に到るという特徴ある経過を辿る。これらの神経細胞はＣＡ３錐体細胞から興奮性入力を受けており、ＣＡ１錐体細胞の過興奮がその原因である可能性が考えられる。

一側の側脳室内カイニン酸投与により投与側のＣＡ３錐体細胞を破壊後、２０分間の一過性脳虚血を負荷した。カイニン酸非投与側のＣＡ１錐体細胞に著明な障害を認めたのに対して、投与側のＣＡ１錐体細胞は保護された。更に、ＣＡ１錐体細胞の機能的なマーカーとして ^{3}Ｈ－Ｌ－グルタミン酸結合部位をオートラジオグラフィにて観察した。カイニン酸非投与側で結合部位が著減したのに対して、投与側は有意の変化を示さなかった。

このことから、ＣＡ３錐体細胞からの興奮性入力が虚血性ＣＡ１錐体細胞障害の直接の原因である事が明らかとなった。

Key word : Cerebral ischemia, Hippocampus, Glutamate receptor

脳は虚血等の侵襲により、エネルギー代謝及び神経伝達機能に著明な影響を受けるが(5)、早期に血流を再開すれば脳の多くの部位では大きな障害を残さないとされる。しかし、脳の特定の部位は、ごく短時間の虚血侵襲によっても重篤な神経細胞障害を示す事が知られている。海馬の錐体細胞（pyramidal neuron）は虚血、低血糖等の侵襲に対して極めて脆弱であるが、特にＣＡ１領域の錐体細胞は一度回復するかに見えても結局は死に到るという特徴ある経過をたどる（delayed neuronal death、ＤＮＤと略、2,7）。ＣＡ１錐体細胞は同側のＣＡ３錐体細胞よりSchaffer collateral、対側のＣＡ３錐体細胞よりcommissural fiber を興奮性入力として受けている。これらの線維に加えてＣＡ１錐体細胞自身もグルタミン酸等の興奮性アミノ酸を伝達物質としている事から、ＣＡ１錐体細胞のＤＮＤに対する興奮性入力の関与が注目されている。

ＣＡ１錐体細胞ＤＮＤに対するＣＡ３錐体細胞の影響を調べる為に、あらかじめ一側のＣＡ３錐体細胞をカイニン酸（ＫＡ）で破壊しておいた所、虚血後破壊側のＣＡ１錐体細胞のＤＮＤを予防し得たので報告する。

方法

Wistar系雄ラットをネンブタール麻酔後、カイニン酸0.6 μg を１μl のphosphate buffer(pH7.4)に溶解し、左側脳室内に投与した。ＫＡ投与５日後、four－vessel occlusion model(6) により２０分間の前脳虚血を負荷した。虚血負荷時（ＫＡ処置５日後）及び虚血負荷５日後、光顕による組織学的検討及び、 ^{3}Ｈ－L-グルタミン酸結合部位の定量的レセプタオートラジオグラフィを行なった。既報の方法で脳切片を作成し(4)、Halpain らの方法(1)でＬ－グルタミン酸結合を観察した。300nMのＬ－グルタミン酸と反応後、切片をトリチウムスタンダードと共にトリチウム用フィルムにコンタクトし、画像解析装置により光学密度（ＯＤ）を測定した。ＯＤと放射活性間の標準曲線よりＬ－グルタミン酸結合を算出した。

結果

ＫＡの脳室投与５日後、ＫＡ投与側のＣＡ３錐体細胞は殆ど失われたのに対して、対側のＣＡ３錐体細胞及び両側のＣＡ１錐体細胞、更に両側の歯状回顆粒細胞には異常を認めなかった。この結果、ＣＡ３錐体細胞からＣＡ１錐体細胞への出力は、ＫＡ投与側ではcommissural fiber のみ、対側ではSchaffer collateral のみとなる（figure 1,2）。

虚血負荷後、非ＫＡ投与側にてＣＡ１錐体細胞のＤＮＤの認められた動物のうち、82% に於いてＫＡ投与側のＣＡ１錐体細胞は保護された。興味深い事に、ＫＡ投与側のＣＡ１錐体細胞にもＤＮＤを認めた18% の動物では、ＫＡ投与側のＣＡ３錐体細胞の小集団が残存していた。

一方、Ｌ－グルタミン酸結合部位はTable 1 に示した如く、ＫＡ投与のみでは両側のＣＡ１領域で有意な変化を認めなかった。虚血後、非ＫＡ投与側のＣＡ１で著明なＬ－グルタミン酸受容体の減少を見たのに対して、投与側は有意の変化を示さなかった（figure 2）。

考察

本実験より、海馬のＣＡ１錐体細胞のＤＮＤには同側海馬ＣＡ３錐体細胞が重要な役割を演じている事が明らかとなった。何らかのtoxic substance のＣＡ３錐体細胞終末からの放出、又はＣＡ１錐体細胞の過興奮の誘発がＤＮＤの原因となっている事が推測される。事実、虚血後の血流再開早期にはepileptic activityが一過性にＣＡ１領域で観察される(9)。虚血後神経細胞内にカルシウムの沈着が認められることから、過度の脱分極の持続による細胞外カルシウム濃度の減少が、カルシウム依存性のシナプス活動抑制機能の低下をきたし、神経細胞の興奮性を更に増加させる事が考えられる。細胞外低カルシウム条件下では、一部分のＣＡ１錐体細胞群を刺激するとその興奮が持続し、ときにＣＡ１全域に脱分極が伝播することが報告されている(3)。

ＣＡ１領域は脳内でも極めてグルタミン酸受容体密度の大な部位であり、Schaffer collateral から放出されたグルタミン酸が興奮毒として作用する可能性がある。ＮＭＤＡ受容体のantagonistである2-amino-7-phosphonoheptanoic acid による虚血後のＣＡ１錐体細胞保護効果も報告されている(8)。

今回の実験により、ＣＡ３錐体細胞がＤＮＤの直接の原因である事を示すことが出来たが、虚血後の血流再開早期でのＣＡ３錐体細胞の興奮性の変化を把握する為に、歯状回顆粒細胞からＣＡ３錐体細胞への入力等についても検討を加える必要がある。

Table 1. Effects of KA lesion and ischemia on the ^{3}H L-glutamate binding sites in the CA1 region.

L-Glutamate binding site(% of control ± s.e.m.)			
	buffer(N=7)	KA(N=7)	KA+ischemia(N=6)
KA lesion			
ipsilateral	92.7±5.2	99.1±6.5	91.4±6.8
contralateral	100.0±6.1	103.9±6.4	66.2±2.4*

Data are expressed as percentage of the mean in the CA1 region contralateral to buffer injection (100 % = 1224 fmol/mg protein). *Significantly different from the control value($P<0.01$) by Student t-test.

Figure 1. Effect of intracerebroventricular(i.c.v.) injection of kainic acid(KA) on neuronal-transmission from CA3 pyramidal cells to CA1 pyramidal cells.

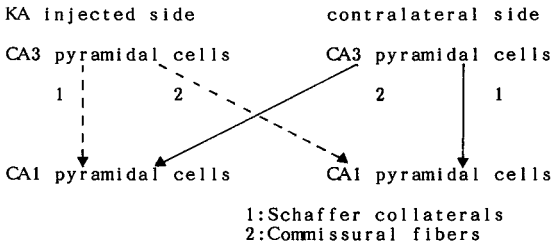
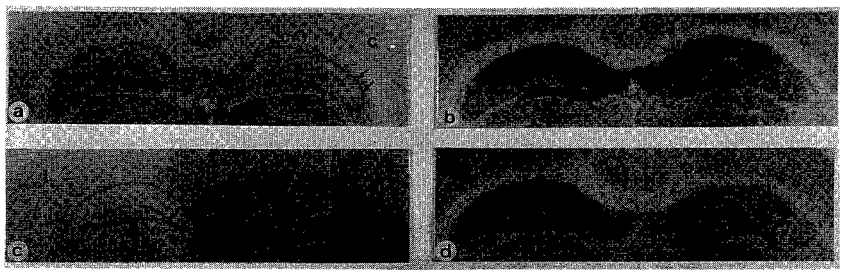


Figure 2. Coronal sections through the dorsal hippocampus showing the effects of KA treatment on ischemia. (a), (c): Cresyl violet stained cryostat sections. (b), (d): Tritium-sensitive film autoradiograms of ^{3}H-L-glutamate binding site. (a), (b): Animals killed 5 days following KA injection. Loss of CA3 pyramidal cells ipsilateral to the KA injected side and concomitant decrease of the glutamate binding sites in that region. (c), (d): Animals killed five days after ischemia following KA pretreatment. CA1 pyramidal cells contralateral to the KA lesion were destroyed(arrowheads). Note the survival of the CA1 pyramidal cells ipsilateral to the CA3 lesion. There was a marked decrease in the glutamate binding sites in the CA1 region contralateral to the KA lesion and the preservation of binding sites ipsilateral to the lesion. Abbreviations: i, ipsilateral to the KA injection; c, contralateral to the KA injection; DG, dentate gyrus. The area CA2 is indicated by arrows at the border between CA1 and CA3.



Reference
(1) Halpain, S. et al. (1984) J. Neurosci. 4:2247-2258
(2) Kirino, T. (1982) Brain Research 239:57-69
(3) Konnerth, A. et al. (1984) Nature 307:69-71
(4) Onodera, H. & Kogure, K. (1985) Brain Research 345:406-408
(5) Onodera, H. et al. (1986) J. Neurochem. 46:1704-1710
(6) Pulsinelli, W. A. & Brierley, J. B. (1979) Stroke 10:267-272
(7) Pulsinelli, W. A. et al. (1982) Ann. Neurol. 11:491-499
(8) Simon, R. P. et al. (1984) Science 226:850-852
(9) Suzuki, R. et al. (1983) Acta Neuropathol. 60:217-222

8．ラット線条体〔^{3}H〕sulpiride 結合におよぼす温度の影響

今福　淳・西崎　純・佐藤厚子・朝倉幹雄・塚本　徹
松井宏晃・伊野美幸・窪田　博・新保　清・長谷川和夫
（聖マリアンナ医科大・神経精神科）

〔要　約〕

[³H]Sulpirideの中枢 D-2ドーパミン受容体結合におよぼす温度の影響を Na^+、GTP、二価陽イオンを用い調べ検討した。ラット線条体に対する[³H]sulpirideの Scatchard plot は直線となり単一の親和性の部位に結合していることを示した。温度の低下に伴い[³H]sulpirideの親和性は増加したが最大結合数(Bmax)の変化はみられなかった。一方、[³H]sulpiride結合に対するアゴニストである apomorphineの阻害曲線は、25°Cではアゴニストに対して親和性の異なる二成分に解析できた。このとき apomorphineの親和性は、GTP により低下し、二価陽イオンにより増加した。温度の低下に伴い阻害曲線は右方に移動し、apomorphine の親和性低下がみとめられた。4°C ではアゴニストに対する低親和性成分のみの阻害曲線となり、GTP および二価陽イオンの効果は消失した。以上の結果よりアゴニストが D-2受容体に結合することによって特異的に形成されるリガンド、受容体、抑制性GTP 結合調節蛋白(Ni)間の ternary complexは低温度では形成されにくくなり、アゴニストの親和性の低下、GTP および二価陽イオンのアゴニスト結合に対する効果の消失がみられるものと思われる。

Key word：[^{3}H]sulpiride　D-2 dopamine receptor　temperature

［　緒言　］

現在受容体研究には放射性リガンドを用いた Receptor assay 法が広く行なわれている。我々は中枢 D-2受容体に対する[³H]spiperoneおよび[³H]sulpiride の結合特性を調べてきたが、今回特異的なアンタゴニストである[³H]sulpirideを用い、温度の影響を調べ受容体結合におよぼす Na^+、GTP、二価陽イオン等の効果を検討した。

［　方法　］

(1) 受容体標品の調製：　Wistar系雄性ラット（体重 180-250 g）線条体を用いた。分割した線条体は 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。沈渣は同 buffer で洗浄の後再び遠心し、得られた最終沈渣を同 buffer に懸濁したものを受容体標品とした。(2) [³H]Sulpiride 結合実験：　結合阻害実験は、最終濃度 2nMの[³H]sulpirideと 100mM NaCl を含む 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5, 25°C)、各種薬物、膜標品(0.1-0.2mg protein) を加え最終容量を 1.5mlとした。結合飽和実験は最終濃度 0.5-16nM の[³H]sulpirideを用いた。非特異的結合は、10μM(-)sulpiride 存在下で同様に行なった。試験管内容は 4-37°C の温度範囲で 15-90分間インキュベートの後 0.3% polyethylenimineで前処置[2,3] した Whatman GF/B filter上に吸引濾過し、5ml 同Tris buffer で 3回洗浄の後、液体シンチレーションカウンターでβ線を測定した。結合阻害実験のデータは、コンピュータを用い非線形最小二乗法により解析した[1,5]。蛋白定量は Lowry法[4] を用いた。

［　結果および考察　］

(1) [³H]Sulpiride結合に及ぼす温度の影響：　ラット線条体に対する[³H]sulpirideの Scatc

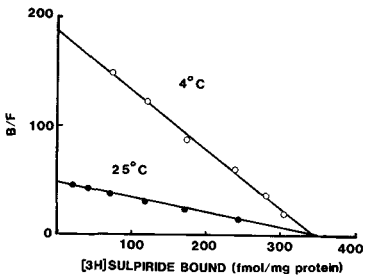


Fig.1 Effect of varing temperatures on the equilibrium binding of [^{3}H]sulpiride.

Rat striatal membranes were incubated at 25°C(●) for 60 min or at 4°C(○) for 90 min with 6 concentrations of [^{3}H]sulpiride in 50 mM Tris-HCl buffer containing 100 mM NaCl. Each point is the mean of triplicate determinations in a single representative experiment which was replicated 3 to 5 times.

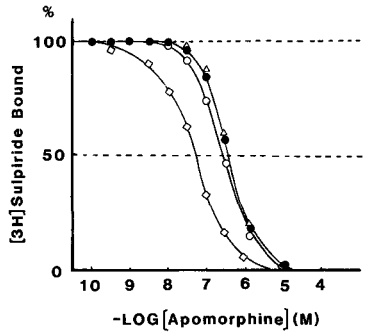


Fig.2 Effects of temperatures on the apomorphine competition for the [^{3}H]sulpiride binding

Assays were carried out at 25°C for 60min with neither $MgCl_2$ nor GTP(◇), or 4°C for 90 min without(●) or with 10 mM $MgCl_2$ (○) or 300 μM GTP(△). Each point is the mean of triplicate determinations in a single representative experiment which was replicated 3 to 5 times. The best fit curves, determined by a computerized analysis are shown. Other details and the estimated parameters are indicated in Table 1.

Table I

Effects of GTP, magnesium ions and varing temperatures on the competition curve for the [^{3}H]sulpiride binding

Addition	KH(nM)	KL(nM)	%RH
At 25°C			
None	20.0 ± 2.94	131 ± 10	59.4 ± 4.1
300 μM GTP	-	128 ± 7	0
10 mM Mg^{2+}	3.97 ± 0.34*	116 ± 3	81.7 ± 1.2*
At 4°C			
None	-	271 ± 37	0
300 μM GTP	-	280 ± 23	0
10 mM Mg^{2+}	-	287 ± 67	0

Striatal membranes were incubated with 2.0 nM [^{3}H]sulpiride and increasing concentrations of apomorphine in 50 mM Tris-HCl buffer containing 100 mM NaCl neither with GTP nor $MgCl_2$(None), with 300 μM GTP or 10 mM $MgCl_2$ at 25°C for 60 min or at 4°C for 90 min. The competition curves were computer-analyzed as described in Materials and methods. KH and KL represent the dissociation constant for agonist high- and low-affinity states, respectively. %RH represents the percentage of the [^{3}H]sulpiride binding in a high-affinity state for the agonist. Values are means ± S.E. of 3 to 5 experiments. Significantly different from the None value at 25°C, *$P < 0.01$.

hard plot は 100mM Na^+ 存在下で 4°Cから 37°C の温度範囲では直線となり、単一の結合部位を標識していることが示された。このとき温度の低下に伴い結合親和性は増加し 4°Cでは25°Cの約 4倍(Fig.1)、37°Cの約10倍となったが、最大結合数(Bmax)の変化はみられなかった。

(2) 結合阻害曲線に及ぼす温度の影響： アンタゴニストである spiperone の [^{3}H]sulpiride結合に対する阻害曲線は急勾配を示し Hill 係数はほぼ 1となった。温度の低下に伴い阻害曲線は右方に移動し、spiperone の親和性低下が認められた。アゴニストである apomorphine の阻害曲線は、25°Cにおいて Hill 係数が 1以下となりコンピュータ解析によりアゴニストに対して親和性の異なる二成分が存在することが認められた。温度の低下に伴い阻害曲線は右方に移動しアンタゴニストと同様に親和性の低下がみられた。4°C では apomorphineの阻害曲線の Hill 係数は 1となり、アゴニストに対して低親和性成分のみの曲線となった。このとき 25°C で認められた GTPによるアゴニストの親和性の低下および二価陽イオンによる親和性の増加は認められなかった(Fig. 2, Table 1)。

中枢 D-2受容体はアデニール酸シクラーゼに抑制性に共役していることが知られている[6]。アゴニストが D-2受容体に結合することによってリガンド、受容体、抑制性GTP 結合調節蛋白(Ni)の三者間に ternary complexが形成され[3,7] アデニール酸シクラーゼ活性を低下させると思われる。今回の結果から、低温度ではアゴニストの親和性が低下しアゴニストに対し低親和性成分のみとなること、および GTP、二価陽イオンの効果が消失することから、低温度(4°C) ではアゴニストによって引き起こされる ternary complexの形成が起こりにくい状態になることが示唆された。今後 Na^+、GTP、二価陽イオンのアゴニストおよびアンタゴニスト結合に対する効果を熱力学的パラメータを用い検討する予定である。

[文献]

(1) Asakura, M., Tsukamoto, T., Imafuku, J., Matsui, H., Ino, M. and Hasegawa, K. (1984) Eur. J. Pharmacol., 106, 141-147

(2) 今福 淳、朝倉幹雄、塚本 徹、松井宏晃、伊野美幸、長谷川和夫 (1986) 神経精神薬理、8, in press

(3) Imafuku, J. (1986) Brain Res., in press

(4) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265-275

(5) Munson, P.J. and Rodbard, D. (1980) Anal. Biochem., 107, 220-239

(6) Onali, P., Olianas, M.C. and Gessa, G.L. (1984) Eur. J. Pharmacol., 99, 127-128

(7) Sibley, D.R. and Creese, I. (1983) J. Biol. Chem., 258, 4957-4965

9．培養神経芽腫細胞N1E-115におけるドーパミン取り込みとGBR-12935結合部位

白川　治・平井みどり*・田中千賀子*
（神戸大・医・精神神経科，薬理*）

〔要　約〕

神経芽腫細胞 N1E-115 におけるドーパミン（DA）取り込み機構及び GBR-12935 {1-[2-diphenylmethoxy)ethyl] -4-(3-phenylpropyl)-piperazine} 結合部位を同定し、その特性を解析した。[^{3}H] DA の取り込みは、温度依存性、部分的 Na^+ 依存性、飽和性を示し、kinetic analysis により Km = 7.1 ± 1.6 μM, Vmax = 8.8 ± 2.1 pmol/min/mg protein であった。[^{3}H] DA の取り込みに対する薬物の阻害は clomipramine > desipramine > nomifensine > methylphenidate > benztropine >> mazindol の順でみられた。[^{3}H] GBR-12935 結合部位は K_D = 3.1 ± 0.5 nM, Bmax = 7.0 ± 0.6 pmol/mg protein であり、Na^+ による特異的結合の増加はみられなかった。[^{3}H] GBR-12935 結合は benztropine > clomipramine > desipramine の順で置換したが、mazindol, nomifensine 及び methylphenidate では置換できなかった。以上から、N1E-115 にはDA の取り込み機構と GBR-12935 結合部位が共存することが明らかになった。

Key word：　N1E-115, GBR-12935 binding, Dopamine uptake

モノアミンの再取り込み機構にはそれぞれに特異的な輸送機構の存在が知られている(1)。ドーパミン（DA）は、精神分裂病やパーキンソン病といった精神神経疾患の病態に深く関与していることが知られているが、再取り込み機構の特性の詳細については明らかにされていない。最近、DA 特異的取り込み部位の同定のためのリガンドとして、1-[2-(diphenylmethoxy)ethyl] -4-(3-phenylpropyl)-piperazine（GBR-12935）が開発され、DA 取り込み部位の同定が可能となった(2,3)。今回、我々は、神経由来の腫瘍細胞 N1E-115 (4,5) を用いて、DA の取り込み機構及び GBR-12935 結合部位を同定しその特性を解析した。

[実験方法]　神経芽腫細胞（N1E-115）は 10 %新生仔牛血清含有ダルベッコ変法イーグル培地を用い、37℃, 10% CO_2 存在下で培養した。

DA の取り込みは Hanks の平衡塩類溶液中で [^{3}H] DA を用いて、37℃, 5 分間及び 0℃, 5 分間での細胞への取り込みの差を特異的取り込みと規定して行った。[^{3}H] GBR-12935 結合実験は緩衝液として 120 M NaCl, 5 mM KCl, 0.01 %bovine serum albumin を含む 50 mM Tris/HCl (pH 7.4) を用いて、Polytron にてホモジナイズ後、20,000 x g, 20 分間の遠心、再懸濁を 3 回繰り返して得られた粗膜分画を標品とした。結合量の測定は 25℃, 90 分間インキュベート後、0.3% ポリエチレニミンで前処置したガラス繊維濾紙（Whatman GF/B）を用いた吸引濾過法によった。特異的結合量は全結合量（benztropine 非存在下）と非特異的結合量（20 μM benztropine 存在下）との差と規定した。

対照実験には、モルモット線条体からの標品（ DA 取り込みに対しては、シナプトゾーム分画、GBR-12935 結合実験に対しては粗膜分画）を用いた。

[実験結果]

1. ドーパミンの取り込み

N1E-115 における [^{3}H] DA (1 μM) の取り込みは、明らかな温度依存性を示した。4℃ ではインキュベートにより殆ど取り込みの増加はみられなかったが、37℃ ではインキュベート後、約 6 分までは直線的で急速な取り込み増加が見られ、

Fig.1 Time course of [^{3}H]DA (1 μM) uptake by N1E-115 cells at 37°C and 0°C

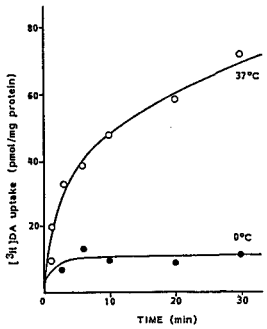


Fig.2 Sodium dependency of [^{3}H]DA uptake in N1E-115 cells and Guinea Pig Striatum

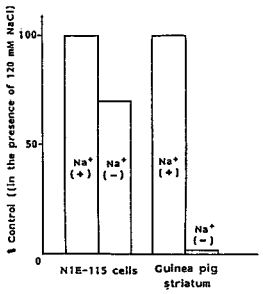
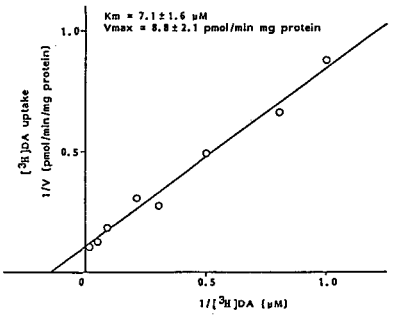


Fig.3 Lineweaver-Burk plots of [^{3}H]DA uptake in N1E-115 cells



以後は緩やかな取り込みの増加を示した (Fig. 1)。NaCl (137 mM)をcholine chloride (137 mM) で置換した場合、N1E-115 では [^{3}H] DA (1 μM) の取り込みが約 70 %にまで減少し、Na^+ に対して部分的依存傾向がみられた (Fig. 2)。これに対してモルモット線条体シナプトゾームにおける [^{3}H] DA (10 nM) の取り込みは、NaCl 非存在下で 98 %の減少と著明な Na^+ 依存性を示した。N1E-115 における [^{3}H] DA 取り込みの Kinetics を Lineweaver-Burk plots により求めるとKm = 7.1 ± 1.6 μM, Vmax = 8.8 ± 2.1 pmol/min/mg protein であった (Fig. 3)。[^{3}H] DA (1 μM) の取り込みに対する種々の薬物の阻害を調べた結果、clomipramine>desipramine>nomifensine > methylphenidate > benztropine >> mazindol の順であった (Table 1)。

Fig.4 Inhibition of [^{3}H]GBR-12935 binding to N1E-115 cell membranes and Guinea pig striatal membranes by benztropine (○,●) and mazindol (□,■)

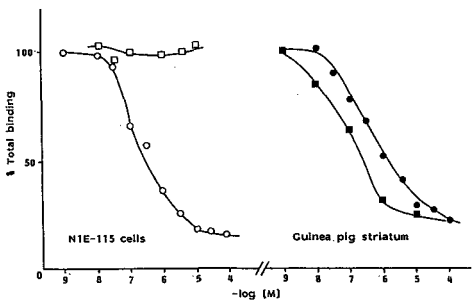


Table 1. Drug inhibitoty potencies on [^{3}H]dopamine (1 μM) uptake in N1E-115 cells

Drugs	IC_{50} (μM) N1E-115
Mazindol	500 >
Nomifensine	99.3
Methylphenidate	132
Benztropine	194
Clomipramine	29.1
Desipramine	80.2

2. [^{3}H] GBR-12935 結合部位の同定

特異的結合を規定する薬物を選択するため、benztropine 及び mazindol の二種の薬物を用いて、1 nM [^{3}H] GBR-12935 に対して結合実験を行うと、N1E-115では、benztropine により置換されるが (IC_{50} = 370 nM), mazindol では全く置換されなかった。一方、モルモット線条体では、benztropine 及び mazindol 何れによっても置換され、それぞれのIC_{50}は 510 nM 及び 54 nM であった(Fig. 4, Table 2)。 Benztropine が強力なムスカリニックレセプターアンタゴニストであることを考慮して、1 nM [^{3}H] GBR-12935結合に対する atropine の効果を検討したが、1 μM の atropine は全く影響を与えなかった。以上から、[^{3}H] GBR-12935 結合実験では 20 μM benztropine を非特異的結合を規定する薬物として用いた。

Fig. 5 Scatchard analysis of [^{3}H]GBR-12935 binding to N1E-115 cell membranes

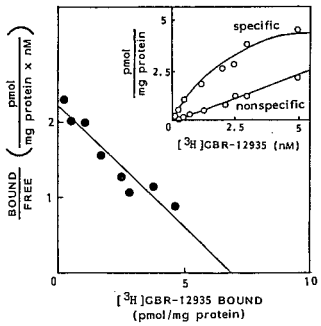


Table 2. Drug inhibitory potencies on [^{3}H] GBR-12935 binding in N1E-115 cell membranes and guinea pig striatal membranes

Drugs	IC_{50} (μM)	
	N1E-115	Guinea pig striatum
Mazindol	100 >	0.054
Nomifensine	100 >	0.35
Methylphenidate	100 >	0.30
Benztropine	0.37	0.51
Clomipramine	3.4	4.2
Desipramine	69.0	14.2

N1E-115 の粗膜分画における特異的 [^{3}H] GBR-12935 結合は、飽和性、高親和性を示し、0.1 ～ 5 nM の [^{3}H] GBR-12935 を用いたScatchared plots により解析すると K_D= 3.1± 0.5 nM, Bmax = 7.0 ± 0.6 pmol/mg protein であった (Fig. 5)。

3. [^{3}H] GBR-12935 結合の薬理学的特性

ラット線条体における [^{3}H] GBR-12935 の特異的結合は NaCl の存在により著明に増加することが知られている (2,3)。N1E-115 における [^{3}H] GBR-12935 (1 nM) の特異的結合に対する NaCl(5 - 240 mM) の効果を検討したが、有意な影響はみられなかった。

種々の薬物の特異的 [^{3}H] GBR-12935 (1 nM) 結合に対する阻害を調べた結果、benztropine > clomipramine > desipramine の順で、mazindol, nomifensine 及び methylphenide は殆ど影響をあたえなかった (Table 2)。

[考察]

マウス神経芽腫細胞 N1E-115 には温度依存性、飽和性の DA 取り込み機構が存在し、kinetic analysis により Km = 7 μM であった。この Km 値は、ラットやモルモットなどの脳 (線条体) のスライスやシナプトゾーム分画における値 (0.1 ～ 0.5 μM) に比べて 10 倍以上高い。Na^+ 依存性も、中枢神経系 (線条体) ではほぼ完全な依存性を示すのに対して、N1E-115 では部分的な依存性しか示さなかった。また、従来、強力な DA uptake blocker とされた benztropine, nomifensine, methylphenidate, mazindol よりもむしろ 3 環系抗うつ薬である clomipramine や desipramine が DA の取り込みを強く阻害する傾向がみられた。以上のように N1E-115 における DA の取り込みは、中枢神経系 (線条体) における高親和性 DA 取り込み機構とは異なる性質を備えており、モノアミンに対する選択性が低いことが示唆された。一方、[^{3}H] GBR-12935 結合部位の特性も、benztropine に対する親和性は高いものの nomifensine, methylphanydate, mazindol では殆ど置換されず、Na^+ による特異的結合の増加もみられなかった。以上のように、神経芽腫細胞 N1E-115 には DA 取り込み機構及び GBR-12935 結合部位の共存が明らかになったが、中枢神経系 (線条体) における高親和性の DA 取り込み機構及び GBR-12935 結合部位とは機能的に異なる特性を有すると考えられた。

[謝辞]

神経芽腫細胞 N1E-115 を供与下さいました三菱化成生命科学研究所、天野武彦先生に心より感謝します。

[文献]

1) Iversen, L.L. (1974) Biochem. Pharmac., 23, 1927-1935

2) Berger, P. et al. (1985) Eur. J. Pharmacol., 107, 289-290

3) Janowsky, A. et al. (1986) J. Neurochem., 46, 1272-1276

4) Amano, T. et al. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 69, 258-263

5) Breakefield, X.O. (1975) J. Neurochem., 25, 877-882

10. ラット線条体におけるドーパミン受容体に対するニューロテンシンの影響

吉田智浩・鬼頭昭三・松林弘明・三好理絵
（広島大・医・第三内科）

〔要　約〕

我々はニューロテンシンのドーパミン受容体に対する影響を binding experiments の手法を用いて検討した。^{3}H-dopamine を用いたsaturation experimentsでD3受容体を観察したところ、Kdは4.31nM、Bmaxは97.4fmol/mg protein であった。この実験系にニューロテンシン5uMを加えるとKd は変化せずに Bmax のみ 48.0fmol/mg protein と有意($p<0.01$)に低下した。dopamine/ ^{3}H-spiperone competition experiments でD2受容体への agonist bindingをみたところ、two-site modelに良く一致し、解離定数はK_Hが0.3×10^{-6}M、K_Lが0.8×10^{-4}M であり、高親和性部位は全体の63% を占めていた。これにニューロテンシン1uMを加えると解離定数は変化しないで高親和性部位の占める割合が 38%と有意($p<0.05$)に低下したが、この効果は IAP100ng/mlを更に添加することで消失した。D2受容体への antagonist binding とD1受容体へのagonist 及びantagonist bindingにはニューロテンシンは影響しなかった。以上より以下の様に結論づけられる。(1) D3受容体への agonist bindingはニューロテンシンによりその Bmax を低下させられる。(2) ニューロテンシンは抑制性 GTP結合調節蛋白を介してD2受容体への agonist bindingの高親和性部位を減少させる。

Key word : neurotensin, inhibitory GTP binding regulatory protein
dopamine receptor

〔1〕 目的

近年、種々の neurotransmitter や neuromodulator 相互間の関係が、議論の的になっている。ニューロテンシンとドーパミンもそのひとつであり、ニューロテンシンがラット線条体からのドーパミン放出をCa 依存性に増加させる (2) など、両者の作用や存在部位の関連性が指摘されてきた。今回、我々は、ラット線条体を用いて binding experiments の観点からニューロテンシンのドーパミン受容体に対する影響を受容体サブタイプおよびagonist 、antagonist別に検討した。

〔2〕 方法

ウィスター系雄ラット（体重200g）を断頭し、速やかに線条体を採取し、De Robertis らの方法に従ってP_2 分画を作成した。最後にできた pellet を50mM Tris-HCl buffer(pH7.4) に均一に浮遊させ、 binding experiments に使用した。 radioactive ligandsとしては ^{3}H-dopamine 、^{3}H-spiperone、^{3}H-SCH23390 を使用した。^{3}H-dopamine を用いたbinding experiments は37°C 15分間50mM Tris-HCl buffer で preincubation した後に22°C 30分間 incubationした。incubation buffer は 5mM Na_4EDTA、5mM $MgCl_2$、1.5mMpargyline 、0.2%BSA 、0.35M bacitracin、 0.1 %ascorbate を含み、tissue 濃度は150ug/mlで実施した。^{3}H-spiperone を用いたbinding experiments は22°C 90分間 incubation し、incubation buffer中には120mM NaCl、5mM KCl、1mM $MgCl_2$ 、2mM $CaCl_2$ 、1mMpargyline0.35M bacitracine 、0.2%BSA を含み、tissue濃度は100ug/mlで行なった。^{3}H-SCH23390 を

使用したbinding experiments ではincubation buffer は120mMNaCl、5mMKCl、1mM$MgCl_2$、2mM$CaCl_2$、1mMpargyline、0.1%ascorbate、0.35M bacitracine、0.2%BSA を含み、tissue濃度150ug/mlで22℃30分間incubationした。B／F分離はWhatman GF／Bフィルターペーパーを用い、ice cold buffer 3mlで3回洗浄した。以上の実験は全てNaランプ下で行なった。

〔3〕 結果

^{3}H-dopamine は我々の実験条件下では主にD3受容体に結合している(3)と考えられた。incubation medium 中にニューロテンシン5uMを添加することによって^{3}H-dopamine のbinding は低下した。そのScatchard analysisがFig.1であり、Kdに変化はないがBmaxは有意に低下している。よってニューロテンシンはD3受容体へのagonist binding をBmaxを低下させる方法で抑制するものと考えられる。

spiperone はD2受容体に比較的特異的なantagonist として良く知られている。dopamine/^{3}H-spiperone competition experiments でD2受容体へのagonist binding を観察した。その inhibition curve はtwo-site modelに最も良く一致し、incubation medium 中にニューロテンシン1uMを添加することにより、K_H及びK_Lは変化することなしに高親和性部位が63%から38%へ有意に減少している(Fig.2)。即ちニューロテンシンはD2受容体へのagonist binding において高親和性部位を低親和性部位に変換しているものと考えられる。ところが、ニューロテンシン1uMに加えて更に、特異的に抑制性GTP 結合調節蛋白を失活させるIAP100ng/mlを添加したところ、上記のニューロテンシンの効果は消失した(Fig.3)。

^{3}H-spiperoneを用いた saturation experiments、即ちD2受容体へのantagonist binding にはニューロテンシンは影響しなかった(Table1)。

SCH23390はD1受容体に特異的なantagonistである(1)が、これを使用してD1受容体へのagonist binding(Table2)、antagonist binding(Table3)を観察したが、両者ともニューロテンシンは変化を与えなかった。

〔4〕 考察

以上の実験より、ニューロテンシンはD3受容体、及びD2受容体へのagonist binding のみを抑制し、antagonist bindingには影響しないことが判明した。

D3受容体は自己受容体であり、既に分泌されたドーパミンがこれを介して自己の過剰な分泌を抑制するが、ニューロテンシンがD3受容体を遮断することでnegative feedbackがかからなくなり、ドーパミンの分泌が促進されるものと思われる。

D2受容体はcAMP活性を低下させ、またGTPによってその高親和性部位が低親和性部位に変換される(4)。このことはD2受容体がアデニレートシクラーゼ系の抑制性GTP 結合調節蛋白と関連していることを示している。ニューロテンシンのD2受容体へのagonist binding に対する影響もほぼ同じ様式であることから、受容体レベルでの作用機序を解明するためにIAPを用いたところ、ニューロテンシンの影響は消失した。このことはニューロテンシンの受容体が抑制性GTP結合調節蛋白を介してD2受容体の活性を調節していることを示唆している。

	Kd(nM)	Bmax(fmol/mg protein)
without Neurotensin	4.31±0.56	97.39±28.61
with Neurotensin(5uM)	3.25±0.42	48.02±7.72**

**significantly different(p<0.01)

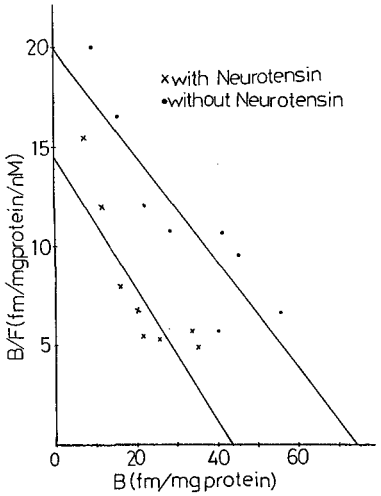


Fig.1 Effect of Neurotensin on Saturation Experiments with ^{3}H-Dopamine

(1)Dissociation constants of high and low affinity binding sites

	K_H(M)	K_L(M)
without Neurotensin	0.3×10^{-6}	0.8×10^{-4}
with Neurotensin(1uM)	1.1×10^{-6}	2.0×10^{-4}

(2)Percentages of binding sites

	R_H(%)	R_L(%)
without Neurotensin	62.5±10.2	37.5±10.2
with Neurotensin(1uM)	38.1±11.2*	61.9±11.2*

*significantly different(p<0.05)

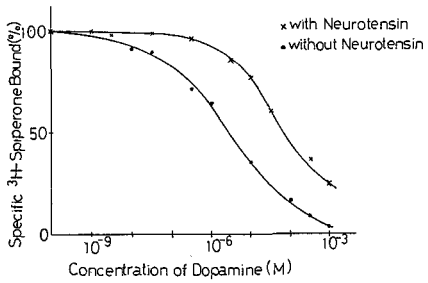


Fig.2 Effect of Neurotensin on dopamine/^{3}H-Spiperone Competition Experiments

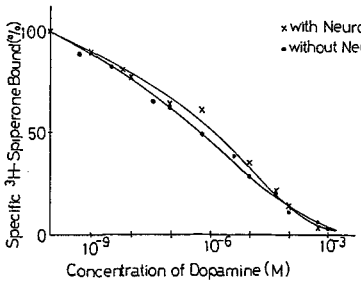


Fig.3 Effect of Neurotensin&IAP on dopamine/^{3}H-Spiperone Competition Experiments

	Kd(nM)	Bmax(fmol/mg protein)
without Neurotensin	0.250±0.051	34.45±11.21
with Neurotensin(5uM)	0.258±0.021	34.12±5.03

Table1 Effect of Neurotensin on Saturation Experiments with ^{3}H-Spiperone

	K_I(M)	IC_{50}(M)	N_H
without Neurotensin	1.20×10^{-6}	2.44×10^{-6}	0.46
with Neurotensin(1uM)	1.48×10^{-6}	3.41×10^{-6}	0.44

Table2 Effect of Neurotensin on dopamine/^{3}H-SCH23390 Competition Experiments

	Kd(nM)	Bmax(fmol/mg protein)
without Neurotensin	0.38±0.15	10.29±0.71
with Neurotensin(5uM)	0.30±0.08	10.65±4.00

Table3 Effect of Neurotensin on Saturation Experiments with ^{3}H-SCH23390

(1) Louis C. Iorio, Allen Barnett, Frederick H. Leitz, Vincent P. Houser and Chryzanta A. Korduba (1983) The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 226,462-468

(2) Marione. de Quidt and Piers C. Emson (1983) Brain Research 274,376-380

(3) Philip Seeman (1984) Brain Receptor Methodologies 285-307 Academic Press

(4) Susan George, Karen Binkley and P. Seeman (1983) J. Neural Transmission, Suppl. 18,149-156

11. 精神分裂病死後脳における VIP およびα_2アドレナリン受容体の分析

畑　典男・三ツ汐洋*・清水浩光・Micael Custro
小片　寛・融　道男
（信州大・医・精神医学, Loyola 大・医・薬理*）

〔要　約〕

Vasoactive intestinal polypeptide（VIP）を精神分裂病死後脳11例と対照群10例を用いて、脳19部位で、またα_2アドレナリン受容体を精神分裂病死後脳13例と対照群10例を用いて、脳８部位について測定した。ＶＩＰは、感覚領野、角回、帯状回で分裂病群が有意に高く、これらの部位では服薬群、非服薬群の値がともに対照群より有意に高かった。側頭葉中・下側頭回では服薬群が、運動領野においては、分裂病群が有意に高く、服薬群の値が有意に高かった。非服薬群は全員死亡前35日以上向精神薬を服薬しなかったものである。α_2特異結合は運動領皮質で分裂病群の値が有意に高く、服薬群、非服薬群においても有意に高かった。視床背内側核では、分裂病群の値が有意に高かった。今回見出された分裂病のいくつかの脳部位におけるVIPの上昇は、抗精神病薬の影響以外に分裂病自体の変化という観点から今後更に検討を続ける必要があり、またα_2特異結合の上昇は、慢性分裂病死後脳でのノルアドレナリン系の神経伝達異常を示唆するものと思われた。

Key word : post-mortem schizophrenic brain, vasoactive intestinal polypeptide, α_2 adrenoceptors

精神分裂病死後脳について、これまで神経ペプチドとしてサブスタンスＰ、メチオニンエンケファリン、α－ネオエンドルフィン、コレシストキニン、thyroid releasing hormone（ＴＲＨ）、ニューロテンシンなどが分析され、それぞれ意義ある異常が見出されている。また神経伝達物質受容体としては、ムスカリン性アセチルコリン受容体およびα_1アドレナリン受容体には異常所見はなく、D_2ドーパミン受容体、グルタミン酸感受性カイニン酸受容体には異常がみられている。今回、従来分裂病脳で分析されることの少なかった神経ペプチドの一つとして vasoactive intestinal polypeptide（ＶＩＰ）と、神経伝達物質受容体としてα_2アドレナリン受容体をとりあげ、脳内のいくつかの部位で測定したので報告する。

Ⅰ．測定方法

1. ＶＩＰ（vasoactive intestinal polypeptide）

分裂病死後脳の19部位について測定し、対照者死後脳と比較した。Broca皮質、前運動領野、運動領野、感覚領野、上頭頂小葉、縁上回、角回、側頭葉（外側後頭側頭回、中・下側頭回、上側頭回、島、側頭葉後部）、第一次視覚領野、第二・第三次視覚領野、海馬（支脚、アンモン角、海馬後部）、帯状回、梨状葉皮質吻側部の計19部位である。脳組織ホモジネートに 20mM 塩酸を含む１Ｎ酢酸を注ぎ、100℃で 10分間煮沸した後、超音波破砕し、一部を蛋白測定用に取りわけ、12,000×g,60分、４℃で遠心分離し、上清20μlをポリスチレンチューブに分注し、一昼夜凍結乾燥した。ＶＩＰ抗血清は家兎４匹に carbodiimideを用いてウシ thyroglobulin とコンジュゲートした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、SephadexG 25 superfine(11×550mm)カラムを用いて 100mM NH_4HCO_3 (pH6.0, 0.5% BSA, 0.025M EDTA, 0.05% NaN_3を含む)でゲルろ過した後、0.2M sucroseを等量加え、CM SephadexC $_{25}$(bed volume 2ml)カラムで、50mM－250mM NH_4HCO_3のgradientで溶出した。アッセイは、authenticVIP (1 fmol－16pmol)、また凍結乾燥した試料にバッファー (0.05M NaH_2PO_4, 0.08M NaCl, 0.25% BSA, 0.025M EDTA, 0.05% NaN_3, pH7.4) を300μl加えて、充分かくはん後、^{125}I標識抗原10,000cpm／tube, VIP抗血清 (最終希釈1:100.000)、バッファーを加え、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-gulobulin 100μlを加えた後、23%ポリエチレングリコール1mlを加えて、かくはんし、4℃、2500×gで20分間遠心分離し、沈渣の放射活性を測定した。

2. α_2アドレナリン受容体

8部位（視床2部位、前頭前野2部位、運動領皮質、上頭頂小葉、縁上回、角回）について測定した。

α_2受容体結合法は、脳組織ホモジネートに25倍容の50mMトリス塩酸バッファー(50mM Tris, 120mM NaCl, 5 mM KCL, 2 mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, pH7.4)を加え、4℃で 39.000×g, 15分間遠沈する操作を2回繰り返し、得られた沈渣を最終蛋白濃度 0.75mg/mlになるようバッファーで懸濁し、膜標品とした。膜標品1 nMの^{3}H-ida-zoxan (RX781094, 60Ci/mmol, Amersham)の各0.4mlに、特異結合を検出する為に0.4mlのDG5128 (10μM) (一部の実験ではフェントラミン10μMを用いた)、または、バッファーを混和し、25℃で1時間半インキュベートした後、吸引ろ過し、5mlの冷却したバッファーで2回洗浄し、フィルター上の^{3}Hを測定した。

II. 結果

1. VIP

表1 精神分裂病(S)及び対照(C)のVIP様免疫活性 (f mol / mg protein)

	側頭葉中.下側頭回	感覚領野	角回	運動領野	帯状回
C	201.0 ± 16.8 (10)	41.7 ± 5.9 (10)	162.8 ± 22.4 (10)	135.7 ± 18.3 (10)	117.2 ± 15.6 (10)
S	242.2 ± 15.2 (9)	68.9 ± 7.0 (11)**	300.9 ± 47.8 (11)**	212.6 ± 21.1 (10)*	309.5 ± 61.2 (11)***
服薬群	276.8 ± 18.3 (4)*	79.9 ± 14.0 (5)*	363.4 ± 99.6 (5)*	242.4 ± 39.2 (5)*	419.0 ± 118.9 (5)**
非服薬群	214.6 ± 14.1 (5)	59.7 ± 3.5 (6)*	248.8 ± 23.7 (6)*	182.8 ± 5.6 (5)	218.2 ± 25.6 (6)**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.002$
平均値 ± SEM (n)

VIPは、感覚領野、角回で分裂病群が対照群より有意に（$P < 0.02$）高く、また服薬群、非服薬群に分けてもそれぞれ対照群より有意に（$P < 0.05$）高かった。帯状回で分裂病群が有意に（$P < 0.002$）高く、また服薬群、非服薬群とも対照群より有意に（$P < 0.02$）高かった。運動領野で分裂病群が有意に（$P < 0.05$）高く、服薬群が対照群より有意に（$P < 0.05$）高かった。側頭葉中・下側頭回で服薬群が有意に

（P＜0.05）高かった。Broca皮質、前運動領野、上頭頂小葉、縁上回、側頭葉4部位（外側後頭側頭回、上側頭回、島、側頭葉後部）、視覚領野2部位（第一次、第二・三次視覚領野）、海馬3部位（支脚、アンモン角、海馬後部）、梨状葉皮質では変化がなかった。

2. α_2アドレナリン受容体

α_2特異結合の値は、測定した部位により、ある程度の差が認められ、最も高かったのは縁上回で、運動領皮質で最低値が得られた。視床背内側核では分裂病群の値が有意に（P＜0.05）高かった。内側前頭皮質、眼窩皮質では両群に変化は認められなかった。運動領皮質では、分裂病群は対照群に比し有意に（P＜0.02）高く、服薬群、非服薬群とも対照群より有意に（P＜0.05）高かった。上頭頂小葉、縁上回、角回では両群に差はなかった。

表2　精神分裂病(S)及び対照(C)のα_2アドレナリン特異結合値　(f mol / mg protein)

	視床背内側核	運動領野
C	5.54 ± 0.73 (7)	4.38 ± 0.61 (10)
S	7.85 ± 0.52 (9)*	6.44 ± 0.43 (11)**
服薬群	7.26 ± 0.85 (5)	6.84 ± 0.62 (5)*
非服薬群	8.60 ± 0.30 (4)	6.11 ± 0.60 (6)*

* p < 0.05 , ** p < 0.02
平均値 ± SEM (n)

III. 考察

分裂病死後脳のＶＩＰについて、Perryら[1]が内嗅領皮質で測定し、対照と差がなかったとしている。Robertsら[2]は14例の分裂病死後脳を12例の対照と比較し、10部位について測定している。これによると前頭葉、頭頂葉、側頭葉、帯状回、海馬、視床背内側核、視床外側核、淡蒼球、被殻では差がなかったが、扁桃体で分裂病の値が有意に高かった。この差は、分裂病を陽性症状を持つＩ型と陰性症状を主とするII型に分けると、Ｉ型に特徴的なものであったという。今回ＶＩＰを測定した19部位のうち、感覚領皮質、角回、帯状回後部では非服薬群分裂病の値も対照に比し有意に高いことが注目された。このようなＶＩＰの上昇は、抗精神病薬の影響以外に、分裂病自体の変化という観点から今後検討を続けていく必要があろう。

今回、α_2アドレナリン受容体測定に際して、リガンドとして、^{3}H-idazoxanを使用した。その選択性は、α_2に関しては、idazoxan＞yohimbine＞rauwolscine＞＞corynanthine、α_1に関しては、rauwolscine＞corynanthine＞yohimbine＞idazoxanと言われている[3]。α_2特異結合を求めるために用いたＤＧ5128はα_2受容体のより特異的なアンタゴニストである。測定した8部位のうち3部位で分裂病群のα_2特異結合値が対照群に比し有意に高かった。うち運動領皮質の変化が最も顕著であり、非服薬群の値も対照群より高い点は注目される。慢性分裂病死後脳で、ノルアドレナリン系の神経伝達に異常があることを示唆する今回の結果は、重要であると思われる。

脳を提供していただいた諸施設、サンプルを作成していただいた国立武蔵療養所神経センター第三部諸先生方、生化学的測定に協力していただいた小林京子嬢に深く感謝いたします。

文献：1) Perry,R.H.et al.(1981) J.Neuro.Sci. 51;465-472
2) Roberts,G.W.et al.(1983) Brain Research. 288;199-211
3) Doxey,J.C.et al.(1984) Arch.Pharmacol. 325;136-144

12. 本態性振戦患者の末梢血リンパ球β_2レセプターの変化について

三森康世・中村重信・亀山正邦　(京都大・医・神経内科)

〔要　約〕

本態性振戦患者16名を対象に，Ficoll-Conray法で得られたリンパ球より膜成分を分離し，〔^{125}I〕-Iodocyanopindololを標識リガンドとして，β_2レセプターの変化を検討した。高親和性，単一の結合部位の存在が確認され，健常対照群20例に比べ，親和性（Kd）は差がなかったが，レセプター数（Bmax）は有意に増大していた。pre-receptorレベルの指標と考えられる血漿ノルエピネフリン値は，安静臥床時および起立後の増加度ともに対照群の値と同程度であり，血清ドーパミン-β-水酸化酵素活性も差がなかった。患者の種々の臨床的特徴とKd, Bmaxの間には一定の相関がなく，propranololが振戦抑制に有効であった6例のKd, Bmaxは，無効であった6例の値と比較して有意の差を示さなかった。本態性振戦患者のリンパ球β_2レセプター数の増加は，内因性ノルエピネフリンの変化などに伴う二次的なものではないと思われ，少なくとも一部の症例では振戦発現と何らかの関連を有する可能性が想定される。疾患のheterogeneityを示唆する結果と考えられる。またpropranololの作用部位について，末梢のβ_2レセプター以外の機序も考慮する必要があると思われる。

Key word：Essential Tremor, Lymphocyte,
β_2-Adrenergic Receptor

本態性振戦は頻度の高い疾患であるが，成因については不明な点も少なくない。現現β遮断薬が治療の第一選択薬として用いられ，一方β刺激薬の副作用として振戦がみられることも多く，いずれもその作用部位は末梢のβ_2レセプターとする考えがある。[4] また振戦をきたす代表的疾患である甲状腺機能亢進症のラットモデルでは心筋のβレセプター数の増加が報告されている。[12] 以上より本態性振戦患者では末梢，特に筋組織のβ_2レセプターに異常が存在する可能性が想定される。リンパ球にはβ_2レセプターが存在し[3]，気管支喘息[8]，多系統萎縮症[2]などでその動態が検討されている。本態性振戦患者におけるリンパ球β_2レセプター，およびそれと関連の深い交感神経機能指標の変化を検討することが本研究の目的である。

【方法】　対象：姿勢時振戦が主に上肢にみられ，他の神経学的異常所見がなく，原因が明らかでないものを本態性振戦と定義した。患者は16名（62.2±12.0才，平均±標準偏差）で，心循環系合併症，糖尿病，気管支喘息を有するものは除外し，健常者20名（62.6±9.5才）からなる対照群と比較した。投薬前あるいは少なくとも2週間の休薬期間をおいて，安静空腹時に採血した。リンパ球膜成分の分離：約30 mlのヘパリン血よりFicoll-Conray法にてリンパ球層を分離した。Aaronsらの方法に従い[1]，ポリトロンで15秒間ホモゲナイズした後，冷水を加え，20000×G，20分，4°Cで2回遠沈し，沈渣に0.15 M NaCl・20 mM Tris-HCl (pH 7.5)を加え，測定まで−80°Cに保存した。Receptor Binding Assay：(−)−3−〔^{125}I〕Iodocyanopindolol（～2000 Ci/m. mol，日本アマシャム）を標識リガンドとして用い，最終濃度が12.5 pMから250pMになるよう調整した。Aaronsらの方法に準じて[1]，50～100 μg蛋白相当のリンパ球膜成分を，0.09 M NaCl,

12 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM アスコルビン酸, 0.4 % BSA, 40 μM phentolamine mesylate および標識リガンドからなる incubation mixture に加え (total 250 μl), 37 °C で30分間インキュベートした。5 ml の 0.075M NaCl・10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 °C を加えて反応を停止させ, 直ちに吸引装置を用いて Whatman GF/C フィルターを通過させた。フィルターはさらに5mlの上記バッファーにて2回洗浄した後, ガンマカウンターにて放射活性を測定した。特異的結合は, 20μMの(±)-propranolol の存在下で得られた非特異的結合を, 全結合から差し引いて求めた。特異的結合は全結合の約70%であった。求めたデータを Scatchard 解析し, 蛋白あたりのレセプター数 (Bmax) と, 親和性の指標として dissociation constant (Kd) を算出した。蛋白量は Lowry らの方法によって測定した[6]。血清ドーパミン-β-水酸化酵素 (DBH) 活性と血漿ノルエピネフリン (PNE)濃度の測定：了承の得られた患者8名 (60.9 ± 11.8才)を対象に, 静脈カテーテルを留置し, 30分間安静臥床後に採血し, さらにすみやかに70度頭部挙上立位とし, 10分の時点で再び採血した。DBH 活性は永津らの方法で[9], PNE は高速液体クロマトグラフを用いた THI 法 (島津 LC-3) にて測定した[13]。統計的処理：Mann-Whitney の U 検定法を用い, 二群間の有意差を検討した。相関性は Kendall の T coefficient を算出し, 検定した。

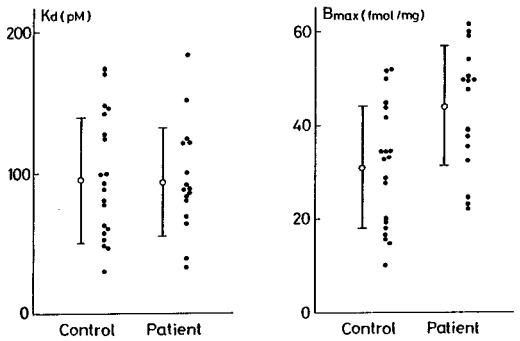


Fig.1 The Affinity and Density of ß1-adrenergic Receptors in Lymphocytes (Maen±SD)

【成績】 患者群, 対照群ともに高親和性の単一な結合部位が同定され, 従来の報告と一致した。患者群のレセプター数は対照群に比べ, 有意の増大を示したが ($P < 0.01$), Kd は二群間に差を認めなかった (Bmax, 43.7 ± 12.8 vs. 31.2 ± 13.1 fmoles/mg 蛋白：Kd, 93.3 ± 38.4 vs. 96.0 ± 43.0 pM) (Fig. 1)。レセプター数の増加がどのような要因と関係するのか, 患者群を年令, 性, 罹病期間, 家族性出現の有無, 振戦が左右対称性か否か, 振戦の分布部位により, subgroup に分けて比較検討したが, Bmax, Kd ともに subgroup 間に差はみられなかった (Tab. 1)。12名の患者に propranolol HCl 30 mg/日を経口投与したところ振戦抑制に有効であったもの6例, 無効6例であった。有効例の Bmax 41.9 ± 12.0, Kd 118.6 ± 38.9 に対して, 無効例は Bmax 48.5 ± 7.8, Kd 71.8 ± 31.5 となり両群間に有意差はなかった。

Tab.1 Kd and Bmax in Subgroups of Patients with Essential Tremor (Mean±SD)

		n	Kd	Bmax
Age	≥65y.o.	8	97.2±41.5	47.3±12.8
	<65y.o.	8	89.5±34.6	40.1±11.7
Sex	M	9	93.1±35.7	41.0±12.4
	F	7	93.6±41.6	47.1±12.4
Duration	≤5years	7	87.8±32.1	45.2±15.7
	>5years	9	97.7±42.1	42.5±9.8
Family History	(+)	2	95.9±28.4	41.2±8.5
	(-)	14	93.0±39.6	44.0±13.2
Symmetrical Hands Tremor		12	98.6±39.5	43.2±13.5
Asymmetrical		4	77.6±29.9	45.2±10.3
Only Hands Tremor		9	97.6±27.6	47.9±11.3
Tremor other than Hands		7	87.9±48.3	38.3±12.5

PNE は起立負荷にて2～5倍に増加したが DBH 活性は全く変化しなかった (前：15.6 ± 6.3, 起立後：15.8 ± 5.7n moles/min/ml, n=8)。安静臥床時の PNE, DBH 活性および起立負荷による PNE の増加度

(⊿PNE)は，我々の教室における年令をマッチさせた対照の値に比べ，[5),7)]有意の変化を示さなかった（Tab. 2）。またDBH活性，PNEとKd, Bmaxの間にも一定の相関関係は認められなかった（Tab. 3）。

【考察】　本態性振戦患者では，リンパ球β_2レセプターの親和性は対照群と同程度

Tab.2 Serum Dopamine-ß-hydroxylase Activity (DBH) and Plasma Norepinephrine (PNE) in Essential Tremor

	DBH (nmol/min/ml)	PNE (pg/ml)	ΔPNE (pg/ml)
Essential Tremor	15.6±6.3 (8)	185±128 (8)	231±163 (8)
Control	17.1±7.2 (34)	197±119 (39)	212±109 (39)

mean±SD, ( ) : number of cases

Tab.3 The Kendall τ coefficient

	DBH	PNE	ΔPNE
Kd	-0.14	0.04	-0.36
Bmax	-0.50	-0.33	-0.14

であったが，レセプター数は有意の増加を示し，少なくとも一部の症例では振戦発現と何らかの関連を持つことが想定された。血清DBH活性やPNEは対照と差がなく，内因性NEの変動に伴う二次的な変化や薬剤の影響ではないと思われる。しかし正常者とのオーバーラップもあり，レセプターレベルでの変化が唯一の要因とは考えにくい。本態性振戦は現象面のみならず，発症機序の面からもheterogenousな病態であると考えられる。propranolol有効例のリンパ球β_2レセプター数および親和性は一定の傾向を示さなかった。投与量が十分かという問題もあるが，propranololの作用部位が末梢のβ_2レセプター以外にも存在するという考えが提出されている。β_1選択性のmetoprololも有効との報告があり，[10)] propranololの血中濃度と振戦抑制とは必ずしも相関せず，[11)] その中枢作用を重視する報告もある。今後はcyclic-AMPの産生やadenylate cyclase活性などpost-receptorレベルの変化も併せて検討したい。

多くの助言とともに研究に御協力いただいた高知医科大学老年病科 島田和幸，北澄忠雄両先生，小沢利男教授に深謝致します。

【文献】
1) Aarons, R.D. et al. (1980) J. Clin. Invest. 65, 949–957.
2) Bannister, R. et al. (1981) J. Physiol. 319, 369–377.
3) Brodde, O.E. et al. (1981) Clin. Sci. 29, 2189–2198.
4) Cleeves, L, and Findley, L.J. (1983) J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 47, 976–982.
5) 北澄忠雄ら（1985） 日老医誌. 22, 1–12.
6) Lowry, O.H. et al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265–275.
7) 宮田 学ら（1984） 自律神経. 21, 341–346.
8) Motojima, S. et al. (1983) Allergy. 38, 331–337.
9) Nagatsu, T. and Udenfriend, S. (1972) Clin Chem. 18, 980–983.
10) Newman, R.P. and Jacobs, L. (1980) Arch. Neurol. 37, 596–597.
11) Sørensen, P.S. et al. (1981) Ann. Neurol. 9, 53–57.
12) Williams, L.T. and Lefkowitz, R.J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2787–2789.
13) Yui, Y. et al. (1979) J. Chromatogr. 177, 376–379.

13. 脳脊髄液中の DOPAC 濃度

小林清史・川端昌弘・岡田尚志郎・桜井弘子・庄盛敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化）

〔要　約〕

脳内ドパミン代謝の状態を知るための臨床的研究手段として，髄液中のドパミン代謝物ホモバニリン酸（ＨＶＡ）の測定が幅広く行われてきた。一方，もう一つの主要代謝物である３，４－ジヒドロキシフェニル酢酸（ＤＯＰＡＣ）については，まだ十分な検討がなされていない。本研究では，種々の精神神経疾患患者７０例における髄液中ＤＯＰＡＣ濃度を，ＨＰＬＣ－ＥＣＤ法により，ＨＶＡ，５－ヒドロキシインドール酢酸（５－ＨＩＡＡ），ｐ－ヒドロキシフェニル酢酸と同時に測定した。

髄液中ＤＯＰＡＣ濃度は，０．１７－２．７５ｎｇ／ｍｌの範囲に分布しており，症例によってかなりの差が認められた。ＤＯＰＡＣとＨＶＡ濃度間には有意な相関関係があり，さらに５－ＨＩＡＡ濃度との間にも相関が認められた。分画採取した最初の３－４ｍｌと８－１０ｍｌ目の髄液におけるＤＯＰＡＣ濃度は，後者で高値を呈した症例が多かったものの共通した濃度勾配の存在は確認されなかった。ＨＶＡ濃度との間に相関があったことは，ＤＯＰＡＣ濃度を脳内ドパミン代謝の状態を知るための指標として用いうる可能性を示唆する所見と考えられるが，その測定意義についてはさらに詳細な検討が必要である。

Key word： DOPAC, Cerebrospinal fluid, HPLC-ECD

種々の精神神経疾患における病因を追究する臨床的研究手段として，髄液を用いる研究が盛んに行われている。これまでに髄液中に存在することが証明された生理活性物質あるいはその関連物質は多岐にわたっているが，従来脳内ドパミン代謝の状態を知る目的には髄液中ホモバニリン酸（ＨＶＡ）濃度の測定が広く用いられてきた。ドパミン代謝物としては，この他に３－メトキシチラミンや３，４－ジヒドロキシフェニル酢酸（ＤＯＰＡＣ）の存在が知られているが，これらについての検討はまだ十分になされていない。その原因としては，これらがドパミン代謝経路における中間代謝物であることや，その髄液中濃度がかなり低いことなどから，その測定意義が明確でなかったことが挙げられる。そこで本研究では，ＤＯＰＡＣ濃度の測定が臨床的に意味あるものかどうかを主課題として，若干の検討を加えたので報告する。

〔対象と方法〕

対象は０歳から７８歳までの種々の精神神経疾患患者７０例で，すでに投与中の薬物は継続のまま髄液を採取した。前夜から安静と絶食を保ったうえ，午前９－１０時の間に施行した腰椎穿刺によって最初に流出する髄液３－４ｍｌを採取することを原則としたが例外もある。なお１３症例では，つぎの４－５ｍｌを髄液一般検査用に採取したのち，８－１０ｍｌ目の髄液を第２分画として得た。髄液は直ちに氷水中で冷却したのち，できるだけ早く－２０°Ｃの冷凍庫内に測定まで保存した。髄液の採取はすべて患者あるいはその家族の了解を得たうえで行った。

髄液中ＤＯＰＡＣ濃度は，すでに報告したＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－１０カラムによる分離後に電極式検出器付高速液体クロマトグラフィー法によって測定した（７）。

この方法ではＤＯＰＡＣとともにＨＶＡ，セロトニンの代謝物である５－ヒドロキシインドール酢酸（５－ＨＩＡＡ）およびｐ－チラミンの代謝物であるｐ－ヒドロキシフェニル酢酸（ｐ－ＨＰＡＡ）の同時定量が可能である。カラムはＣｏｓｍｏｓｉｌ５Ｃ１８（４．６ｘ１５０ｍｍ，半井化学）を用い，流速は０．７ｍｌ／ｍｉｎ，カラム温度は２０°Ｃとした。得られたクロマトグラムの波形処理には，ＳＩＣ社製のＣｈｒｏｍａｔｏｃｏｒｄｅｒを用い，定量は絶対検量線法で行った。

〔成　績〕

私たちの方法による髄液中ＤＯＰＡＣの回収率は９３．６±１．０％と高く，また極めて安定している。さらに絶対注入量３１２．５ｐｇから２０ｎｇの範囲での検量線における相関係数は０．９９６であった。今回測定した７０検体のＤＯＰＡＣ濃度は，０．１７ｎｇ／ｍｌから２．７５ｎｇ／ｍｌの範囲に分布しており症例によってかなりの差が認められた。これを１５歳以下の小児群３１例と１６歳以上の年齢群３９例に分けると，前者の１．２６±０．０７ｎｇ／ｍｌに対して後者では０．９１±０．０７ｎｇ／ｍｌとなり，１５歳以下群で有意に高い値が得られている。一方，１６歳以上の症例における抗精神病薬服用者２４例での値は０．９４±０．０８ｎｇ／ｍｌで，非服用者１５例の０．８６±０．１３ｎｇ／ｍｌより若干高かったが有意差はなかった。しかし，今回の測定対象には正常対照群が含まれていないため，ＤＯＰＡＣ濃度の正常値，性差や年齢差について詳しく検討することはできなかった。つぎに同時に測定したＤＯＰＡＣとＨＶＡ濃度との関係をＦｉｇ．１に示したが，相関係数０．６０で両者間に有意な相関が認められた。両者間の有意な相関は抗精神病薬服用者（ｒ＝０．４２，ｐ＜０．０５）および非服用者（ｒ＝０．６３，ｐ＜０．００１）のいずれにおいても認められている。なお，ＤＯＰＡＣと５－ＨＩＡＡ濃度との間にも全体として有意な相関関係が認められたが（ｒ＝０．３６，ｐ＜０．０５），ＤＯＰＡＣとｐ－ＨＰＡＡ濃度との間には相関はなかった。つぎに最初の３－４ｍｌ（第１分画）と８－１０ｍｌ目（第２分画）の髄液におけるＤＯＰＡＣ濃度の比較では，測定した１３例中８例で第２分画での値が高かったが，残りの

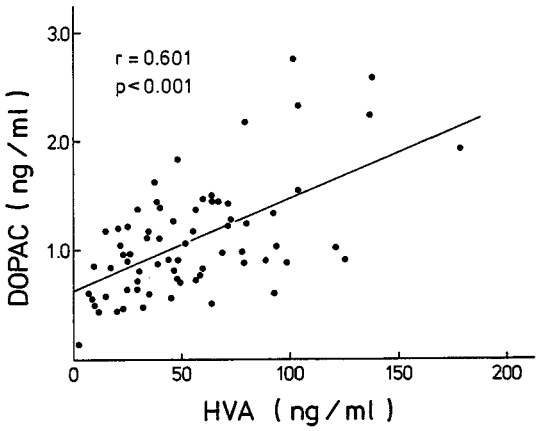


Fig. 1　Correlation between HVA and DOPAC levels in the CSF

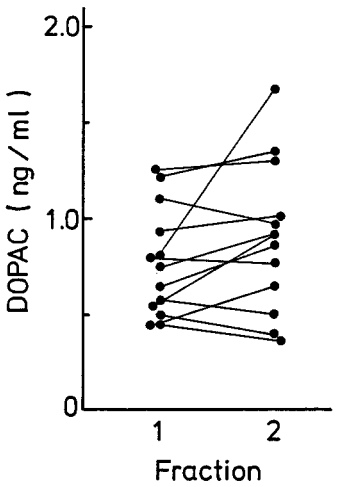


Fig. 2　DOPAC levels in the different CSF fraction

5例では逆に第1分画での値が高く，一定の成績は得られなかった（Fig. 2）。

〔考　察〕

髄液中のDOPAC濃度に関してはこれまでにあまり多くの報告がない。正常成人男性における濃度については0.5±0.1ng／mlとする報告（4）があり，私たちの値はこれより若干高いが，これは本研究における対象に抗精神病薬を服用中の患者などが含まれていることにも関係している可能性がある。いずれにしても髄液中のDOPAC濃度はHVAの約1－2％と極めて低い。DOPACはprobenecidの投与によって髄液からの排せつが遮断され（6），L－DOPA単独またはこれと末梢性脱炭酸酵素阻害剤との併用投与によって有意に増加するなど（2），HVAとよく似た性質を有することが報告されているが，一方では抗精神病薬の一つであるthiothixene投与によってHVAは増加するのに対してDOPACには変化が認められないとする成績もある（8）。さらに従来の報告では濃度勾配が存在し（5），側脳室－大槽－腰部髄液比は22：8：1とHVAのそれより急峻であるとされているが（8），本研究では半数以上の症例で濃度勾配の存在が認められたものの，すべてに共通する所見とはならなかった。

一方，同時に測定した他の酸性代謝物濃度とDOPAC濃度との相関を調べた結果，同じくドパミンの代謝物であるHVAとの間にはかなり高い相関が認められた。これはHVAや抱合型ドパミン濃度との間に有意の相関があったとする報告（1，3）と一致している。本研究での対象には種々の疾患を有する症例が含まれていることや，ドパミン代謝に影響を及ぼすことが知られている抗精神病薬を服用中の患者があることなどを考えあわせると，すでに多くの研究がなされているHVA濃度との間に相関が認められたことは意味あることと思われる。したがって，上述したような問題点は残されているが，HVAと同様に髄液中のDOPAC濃度を脳内ドパミン代謝の状態を知るための指標として用いうる可能性はあるものと考えられる。さらに症例数を増して，各種中枢神経疾患におけるDOPAC濃度の変化やこれに対する薬物の影響などを含めて詳細に分析した結果を報告したい。なお，本研究ではDOPACと5－HIAA濃度との間にも有意な相関が認められたが，他にも両者間に高い相関があるとした報告がある（3）。

〔文　献〕

1. Bagdy G, Arató M, Baraczka K and Fekete MIK (1983) Life Sci. 32, 2667-2676
2. Barczka K, Fekete MIK and Kanyicska B (1983) J. Neural Transm. 58, 299-304
3. Berrettini WH, Nurnberger JI, Scheinin M, Seppala T, Linnoila M, Narrow W, Simmons-Alling S and Gershon ES (1985) Biol. Psychiatry 20, 257-269
4. Faull KF, Guilleminault C, Berger PA and Barchas JD (1983) Ann. Neurol. 13, 258-263
5. Karoum F, Gillin JC, Wyatt RJ and Costa E (1975) Biomed. Mass Spectr. 2, 183-189
6. Karoum F, Bunney W, Gillin JC, Jimerson D, van Kammen D and Wyatt RJ (1977) Biochem. Pharmacol. 26, 629-632
7. Kobayashi K, Koide Y and Shohmori T (1982) Clin. Chim. Acta 123, 161-168
8. Wiesel F-A (1975) Neurosci. Lett. 1, 219-224

14. ヒト脳シナプトゾームを用いたMPP⁺によるA型モノアミン酸化酵素の阻害

高御堂弘・直井　信・永津俊治（名古屋大・医・生化第一）

〔要　約〕

最近1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)が人工的な神経毒素として、ヒトなどにパーキンソン病類似の症状を来すことが知られており、その発症機構について多くの研究がなされている。現在、B型モノアミン酸化酵素（MAO-B)はMPTPをMPDPに酸化し、それが更にMPP⁺となり、この酸化生成物MPP⁺がドーパミンニューロンに対するneurotoxicityを有するとされている。我々はヒト脳シナプトゾームを用いてA型モノアミン酸化酵素(MAO-A)に対するMPP⁺の影響を基質にkynuramineを用い検討した。MPP⁺はMAO-Bに対してtime-dependentに阻害を示したのに対し、MAO-Aに対しては時間に関係なく阻害を示した。またこの阻害は基質に対し競合的であった。更に反応速度論的解析より脳の各画分、肝、胎盤のミトコンドリア内のMAO-Aに対するMPP⁺のKiについて比較検討したところ、脳のMAO-AのKiは胎盤、肝のMAO-AのKiに比して小さく得られた。更に線条体MAO-Aを用いて検討したところ、線条体MAO-AのKi値は皮質MAO-Aに比べやや高く得られた。このMPP⁺によるMAO-Aの阻害をParkinsonismの病因と関連させ検討した。

Key word：　Monoamine oxidase type A, 1-methyl-4-phenylpyridine(MPP⁺)

MPTPはヒトやサルの黒質線条体の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)。この神経毒性はMPTPがMAO-Bにより酸化されMPDPとなり、さらに非酵素的に、1-methyl-4-phenylpyridine（MPP⁺)を生ずることにより発現する(4)。MAO-AもMAO-Bに比べ低いレベルではあるが、MPTPを酸化することが知られている。特に中枢神経系におけるMPTPの神経毒素の生成とその後の毒性発症の機序に対するMAO-Aの役割は無視できなくなってきた(5)。一方MPTPの代謝産物であるMPP⁺はMAO-A、-Bを阻害することが報告されているが、MAO-AとMPP⁺との関連についてはまだ充分検討されていない。我々は、今回MAO-Aに対するMPP⁺の影響よりMPP⁺が特に神経毒素として作用する機序を検討した。様々の臓器、又は脳の部位から得られたMAO-Aを用いてMAO-Aに対するMPP⁺の影響を検討した。

〈実験材料及び方法〉

ヒト脳シナプトゾームは前報に従って(6)、調製し、ヒト胎盤、ヒト肝ミトコンドリアは従来の方法に従って調製した。

MAO活性の測定:　kynuramineを基質として用いて、Kramlらの方法(7)により測定した。脳と肝のミトコンドリアを用いて、MAO-AとMAO-B活性を測定する際には、それぞれ阻害剤として1μMのDeprenylとClorgylineを加え測定した。

〈結果〉

MPP⁺とあらかじめincubationした後でMAO-Aならびに-BでMAOの活性を測定したところ、MAO-Aや-Bは共に活性の低下がみられた。すなわちMAO-A活性は直ちに活性低下がみられるが、preincubation時間による著明な活性低下はみられないのに対し、MAO-B活性はpreincubation時間に従って徐々に低下してい

った。この結果より、15分間のpreincubationをほどこした後、MPP^+によるMAO-A活性の阻害を反応速度論的に分析した。MPP^+はMAO-A活性を基質と競合して阻害することがわかった(Fig. 2)。

ヒト脳、肝、胎盤より調製したミトコンドリアを用いて測定したMAO-Aに対するMPP^+のKi値をTable 1に示す。ヒト脳シナプトゾーム内のMAO-AのMPP^+に対するKi値が最も小さく、次いでKi値はヒト胎盤ミトコンドリアのKi値、そしてヒト肝ミトコンドリアの内のMAO-Aに対する順で小さくなった。更にヒト脳において、皮質MAO-Aと線条体MAO-Aを比べてみると線条体MAO-AのMPP^+に対するKi値の方がわずかに高かった。またシナプトゾームの内と外のミトコンドリアMAO-Aを比較してみたところ、シナプトゾーム内ミトコンドリアMAO-AのMPP^+に対するKi値の方が小さく得られた。

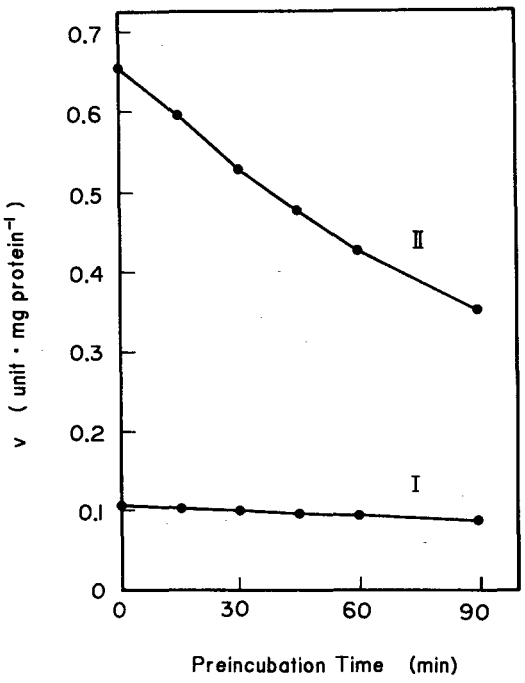


Fig. 1. Effect of preincubation time on the inhibition of MAO-A by MPP^+
Human brain synaptosomes were preincubated with 50 μM MPP^+ at 37°C in the presence of 1 μM deprenyl or clorgyline. The enzyme activity was measured using 0.1 mM kynuramine: Curve I, MAO-A; Curve II, MAO-B.

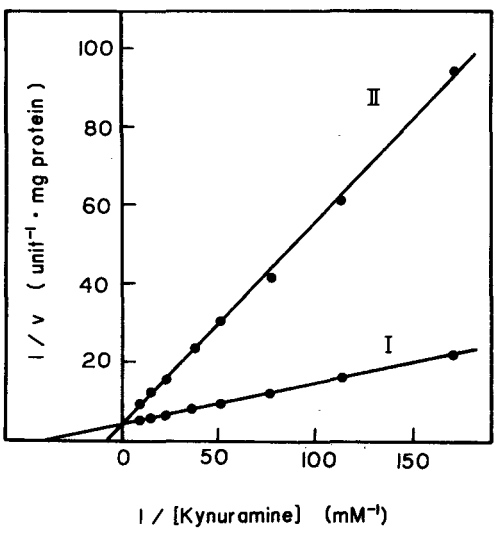


Fig. 2. Lineweaver-Burk plots of MAO-A activity in brain synaptosomes
The reciprocal of MAO-A activity in brain synaptosomes was plotted against that of the substrate concentration: Curve I, in the absence of MPP^+; Curve II, in the presence of MPP^+.

〈考察〉

MPP^+は黒質に選択的に蓄積されることが報告され(8)、MPP^+がmelaninとneuromelaninに高い親和性を持つことから、この両者がMPP^+を蓄積する物質であることが報告されている(9)。MPP^+のMAO-A活性に対するKi値は、反応速度的解析によれば基質のKm値より低く、MPP^+がMAO-Aを基質と競合して阻害することからMPP^+はMAO-Aの活性部位に結合して蓄積される可能性も示唆された。この蓄積が神経細胞を破壊する機構にたいしては更に検討が必要であろう。

臓器によるMAO-AのKi値の違いはMAOが膜結合型酵素の一つであり(10)、脂質の様な膜構成成分が基質特異性または阻害剤に対する感受性に影響を与えることが知られている。今回のMPP^+の影響が脳、肝、胎盤などの臓器により異なったことはMAO-Aが単一タンパクから構成されてい

Table 1 KINETIC DATA ON THE INHIBITION OF MAO BY MPTP AND MPP^+

Enzyme source	Ki for MPP^+ (μM)	Ki for MPTP (μM)	Km for Kynuramine (μM)	Vmax (unit/mg protein)
Human brain cortex synaptosomal mitochondria				
MAO-A (deprenyl-treated)	1.28*	5.02	23.6	0.222
MAO-B (clorgyline-treated)	3.55		46.2	1.38
Human brain cortex extra-synaptosomal mitochondria				
MAO-A (deprenyl-treated)	1.45		31.1	0.661
Human brain cortex intra-synaptosomal mitochondria				
MAO-A (deprenyl-treated)	1.19		47.1	2.10
Human brain putamen synaptosomal mitochondria				
MAO-A (deprenyl-treated)	1.72		31.3	0.178
Human brain caudatus synaptosomal mitochondria				
MAO-A (deprenyl-treated)	1.71		27.9	0.080
Human placental mitochondria	1.87		57.6	2.57
Human liver mitochondria				
MAO-A (deprenyl-treated)	8.15		49.0	1.68

* Each value is the mean of duplicate experiments.

ることを考えあわせるとKi値の差は構成脂質の違いにより生じたと考えるのが妥当であろう。

〈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) Markey, S.P., et al. ; Nature, 311, 464-467 (1984)

5) Salach, J.I., et al. ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 125, 831-835 (1984)

6) Naoi, M. and Nagatsu, T. ; J. Neurochem. 46, 655-657 (1986)

7) Kraml, M. ; Biochem. Pharmacol., 14, 1683-1685 (1965)

8) Irwin, I. and Langston, J.W. ; Life Sci., 36, 207-217 (1985)

9) D'Amato, R.J., et al. ; Science, 231, 987-989 (1986)

10) Huang, R.H. and Faulkner, R. ; J. Biol. Chem., 256, 9211-9215 (1981)

15. Calcineurin のヒト脳錐体外路系における特徴的局在，
—特に Huntington 病との関連について—

後藤　恵・松角康彦・井上信博・宮本英七*
（熊本大・医・脳神経外科，第一薬理*）

〔要　約〕

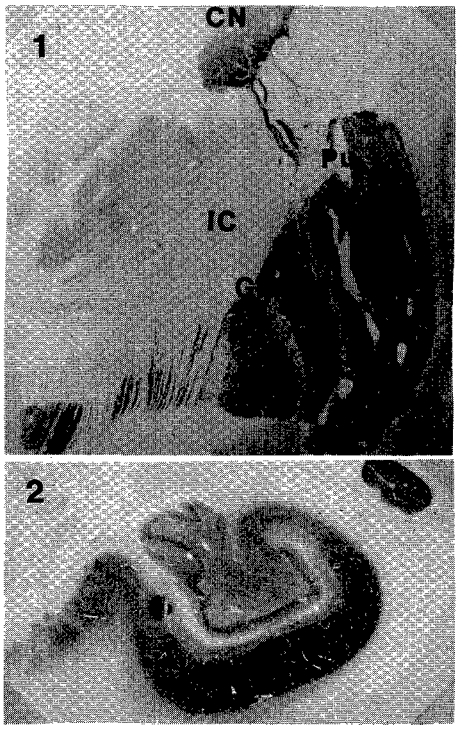
Ca^{2+}，カルモデュリン依存性脱リン酸化酵素である Calcineurin (CaN) のヒト脳内分布及び Huntington 病，Parkinson 病でのその変化の有無につき，免疫組織化学的に検討した。CaN は，ヒト脳においても，ラット脳と同様，特徴的な分布を示し，基底核，黒質及び淡蒼球に多く存在していた。錐体外路系では，CaN 陽性神経細胞体は，線条体に特異的に存在しており，ラット脳における Cerebral hemitransection 等の結果より，これらは，淡蒼球及び黒質へ遠心性線維を送っており，いわゆる striato-pallidal, striato-nigral pathway を形成しているものと思われた。尚，Huntington 病（HD），Parkinson 病（PD）死後脳の検索では，Control に比し，HD にて，被殻における CaN 陽性細胞の著明な脱落が認められ，また同時に，黒質での免疫染色性は著しく低下していた。しかし，PD の場合は，これらの所見は認められなかった。

CaN 免疫染色は，錐体外路系神経網解析の手段として有用であり，HD を始めとする同部の変性疾患の病因解明に役立つものと思われる。

Key word：　Calcineurin, Immunohistochemistry, Huntington's disease

〔緒言〕Ca^{2+}，カルモデュリン依存性脱リン酸化酵素である calcineurin (CaN) は，ラット脳内において錐体外路系に著明に多く存在している。今回，我々は免疫組織化学的手法によりこの部位における CaN の存在様式を明らかにすると共に，正常ヒト脳内分布の検索及び Huntington 病，Parkinson 病患者の死後脳につき，その変化の有無を調べたので報告する。

〔方法〕新鮮ラット脳より精製した CaN を免疫原とし，通常の方法にて家兎に免疫し，抗血清を得た。抗体の特異性およびヒト CaN に対する反応性については，以前に報告した。本実験では，抗原親和性カラムにて得られた精製抗体のみを使用し，免疫染色は，3.3′−diaminobenzidine を chromogen とした PAP 法にて行った。組織は全てホルマリン固定パラフィン包埋のものである。尚，ラット脳大脳半切は Konig & Klippel のアトラスに従い，開頭後，淡蒼球の後方にて行った。6 日間の生存期間の後，麻酔下で，10％ホルマリン灌流固定を行

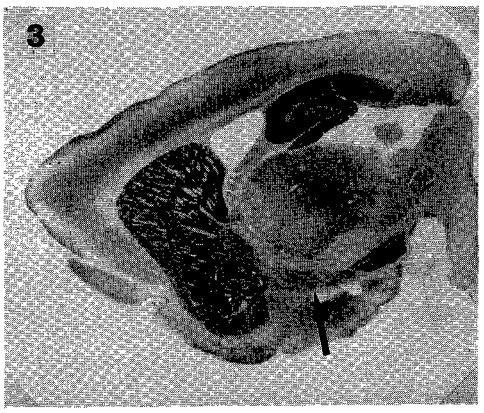


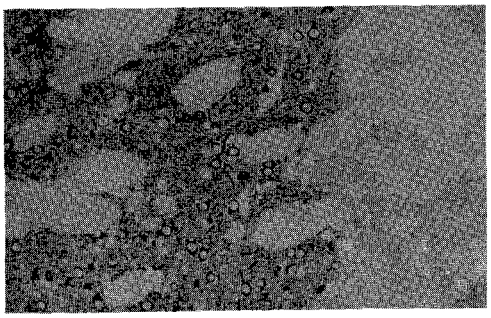
い，同液にて後固定，更にパラフィン包埋を行った。

〔結果及び考察〕正常ヒト剖検脳におけるCaN陽性神経細胞および神経線維の分布は，以前，我々の報告したラット脳内のものと一致していた。基底核(Fig. 1)，海馬(Fig. 2)，および黒質(Fig. 6)の免疫染色を呈示する。

ラット脳旁矢状断の免疫染色をFig. 3 に示している。線条体，淡蒼球，黒質および海馬に強い免疫染色が認められ，基底核部と黒質の間の線維連絡が明瞭に観察されている(arrow)。線条体－淡蒼球移行部の光顕レベル(×50)の観察では，CaN免疫染色は，線条体の中型神経細胞及びその神経突起内に認められ，淡蒼球内では神経線維のみに存在していた(Fig. 4)。尚，ヒト脳被殻－淡蒼球外節移行部の観察で，CaN陽性線維束が被殻より淡蒼球へ走入しているのが認められ，淡蒼球内の陽性線維は線条体神経細胞に起源を有するものと推察された。

ラット脳黒質では，網状部のみに染色が存在し，淡蒼球と同様，その神経線維のみが陽性であった。淡蒼球の後方にて，大脳半切を施すと，Fig. 5 に示す如く，患側(arrow)の黒質(pars reticulata)の免疫染色は，ほぼ完全に消失した。尚，N－MPTP投与では，黒質および線条体の免疫染色に著変はみられなかった。これらのことより，黒質部の染色は，線条体－黒質系の神経線維に





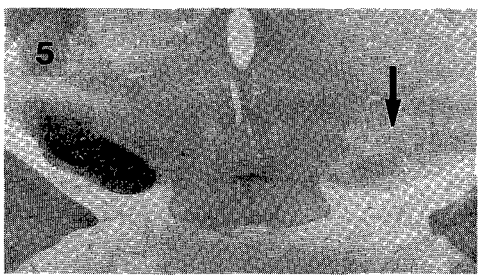


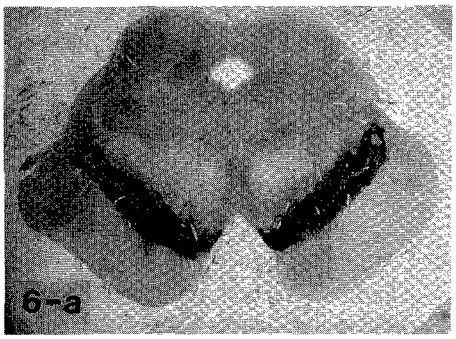
Table I. Immunohistochemical Results in Neostriatum of Postmortem Brain Tissues.

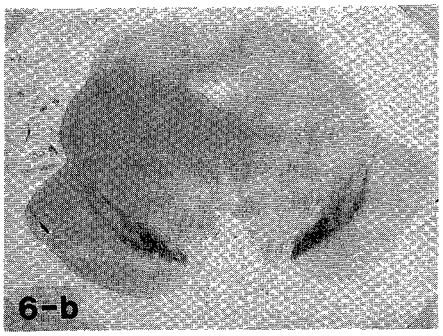
	Age/Sex	Number of CaN-positive neurons Caudate nucleus	Putamen
Huntington's disease			
Case 1	52/F	50 ± 14	61 ± 15
Case 2	65/F	85 ± 20	77 ± 10
Parkinson's disease			
Case 3	70/F	314 ± 16	303 ± 10
Case 4	51/M	331 ± 10	339 ± 15
Case 5	76/F	286 ± 35	273 ± 12
Control cases			
Case 6	76/M	293 ± 11	298 ± 20
Case 7	64/M	290 ± 12	307 ± 11

* Values represent means ± S.D. (n=10).

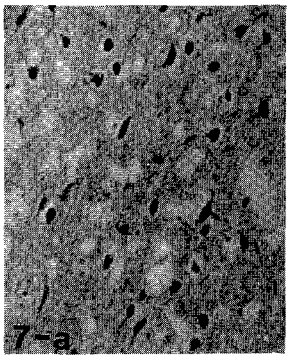
よるものと思われた。

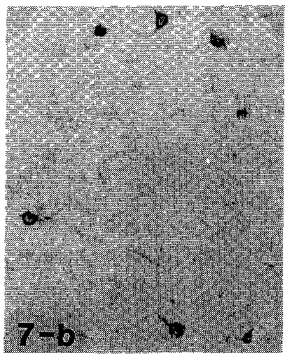
2例のHuntington病(case 1, 2), 3例のParkinson病(case 3, 4, 5), 及び, ほぼ年令の一致した対照例(case 6, 7)のヒト剖検脳同一レベルで厚さ5μmの切片を作製しCaN免疫染色を行った。尾状核, 被殻につき1㎜×1㎜の視野を無作為に10以上選択し, 顕微鏡写真上で, CaN陽性神経細胞体数を計測した(Table Ⅰ)。Huntington病症例において著明な陽性細胞の脱落がみられた。しかし, Parkinson病症例においては, 特に変化はみられなかった。Case 6 (control case)とcase 2 (Huntington病)の中脳水平断の免疫染色をFig. 6に呈示する(case 6, a; case 2, b). Case 2においては, 対照に比し, 著明な黒質部の免疫染色の低下がみられ, 腹内側部を中心に僅かに残存しているにすぎない。尚, Case 1においては, その免疫染色はほぼ消失していた。

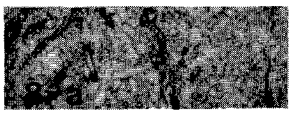


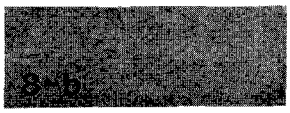


Case 6とCase 2, それぞれの被殻(Pu)および黒質(SN)の免疫染色を光顕的に比較観察すると(Pu of case 6 : Fig. 7a, Pu of case 2 : Fig. 7b, SN of case 6; Fig. 8a, SN of case 2, Fig. 8b), case 2において, 被殻のCaN陽性細胞及び神経線維の著明な脱落が認められ, 黒質では陽性線維の減少がみられた。同症例の淡蒼球でも黒質と同様, 著しい陽性線維の減少が認められた。









Parkinson病症例(case 3,4,5)でも同様の検索を行ったが, 対照に比し, 著変を認めなかった。

〔結語〕CaNは, ラット脳と同様ヒト脳内においても特徴的な分布を示し, 錐体外路系においては, 線条体の神経細胞に特異的に存在している。また, 線条体CaN陽性神経細胞は淡蒼球および黒質への遠心性線維, いわゆるStriato-pallidal, striato-nigral pathwayを有している。これらのことより, CaN免疫染色は錐体外路神経網解析の有用な手段になり得ると思われる。

[References] R.W.Wallace et al. Biochemistry 19 (1980) 1831-1837., S.Goto et al. Brain Res. 371 (1986) 237-243., S.Goto et al. Bull.Jpn.Neurochem.Soc. 24 (1985) 319-321., S.Goto et al. J.Neurochem. 45 (1985) 276-283., S.Goto et al. Brain Res. (in press).

16. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion （MPP$^+$）の白血球のスーパーオキサイド（O_2^-）生成系に及ぼす影響

平田洋子・南　正康・永津俊治*
（日本医大・衛生，名古屋大・医・生化第一*）

〔要　約〕

1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP$^+$)の、白血球の活性酸素生成系に及ぼす影響を調べた。MPP$^+$は、白血球がintactの状態では、ミリスチン酸及びエライジン酸によって起るスーパーオキサイド(O_2^-)の生成に影響を与えなかった。ところが白血球を界面活性剤Renex30で処理した系あるいは細胞膜分画を用いた場合、O_2^-生成系を濃度依存的に抑制した。MPP$^+$のNADPH oxidase活性に対する阻害作用の速度論的解析を行った結果、MPP$^+$はNADPH oxidase活性を非競合的に阻害することが明らかとなった。以上の結果よりMPP$^+$は白血球の細胞膜を透過しないことが示唆された。また、NADPH oxidaseは細胞膜に局在しNADPHの結合部位はその内側に存在しO_2^-は積極的に細胞外へ放出されると考えられている。MPP$^+$はこのNADPH oxidase活性を細胞膜の内側から阻害することが示唆された。

Key word： MPP^+, O_2^- generation, NADPH oxidase

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)はヒト、サル、マウスなどでパーキンソン病様の症状を起す黒質線条体系ドーパミンニューロンの神経毒である（1,2,3)。MPTPはB型モノアミン酸化酵素により1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP$^+$)に代謝され(4)，MPP$^+$はドーパミン取り込み機構によって能動的にドーパミンニューロンに取り込まれて蓄積し(5)，ドーパミンの減少とニューロンの変性を起すことが明らかになっている。またMPTPやMPP$^+$及びその誘導体は線条体組織スライスのチロシン水酸化酵素系を阻害する(6,7,8).しかしMPTPおよびMPP$^+$が細胞変性やチロシン水酸化酵素系を阻害する機構は不明である。

ところで、マクロファージとグリア細胞は類似性があるといわれており、Karnovskyらも、セロトニンのO_2^-生成に対する影響を調べるのにマクロファージを用いている(9)。今回、我々は白血球の活性酸素生成系を用いてMPP$^+$のスーパーオキサイド（O_2^-)生成に対する影響を調べた。

＜実験材料及び方法＞

ヒト末梢血白血球の分離：デキストランを用い山口らの方法(10)に準じて行なった。20mlの末梢血より、約 3×10^7 の白血球が得られた。

スーパーオキサイド(O_2^-)の測定：チトクロムc法(11)によりO_2^-の生成を測定した。チトクロムcはO_2^-から1電子を受け取り酸化型から550nmに吸収極大を持つ還元型に変化する。

$$Cyt\ c(Fe^{3+})+O_2^- \longrightarrow Cyt\ c(Fe^{2+})+O_2$$

このチトクロムcの還元を二波長分光光度計（日立556型）を用い、550nmと540nmの差吸収を経時的に測定した。白血球は 2×10^6 細胞を5mMグルコース、8 μgカタラーゼ、50μMチトクロムcを含む1.6mlのKrebs-Ringer HEPES溶液(KRH)に懸濁し、37℃で測定した。

但し、中性detergent(Renex30)を用いて細胞レベルでのオキシデース活性

を測定するときには、28℃で行った。

＜結果＞

白血球のO_2^-生成は食作用時あるいは、ミリスチン酸をはじめとする種々の代謝誘導物質により引き起こされることが知られている。

図1(A)にエライジン酸によるO_2^-生成に対するMPP⁺の作用を示した。Intactな細胞に加えたMPP⁺はエライジン酸によるO_2^-生成に影響を与えなかった。そこでエライジン酸で活性化した白血球を界面活性剤Renex 30で処理し壊した後、NADPH生成系、[グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)の基質であるNADP及びグルコース-6-リン酸(G6P)](図2)を添加し、NADPH oxidaseのO_2^-生成活性を測定した。エライジン酸(EA)により引き起こされるO_2^-の生成はRenex30の添加で停止する。これにNADPH生成系を添加するとO_2^-生成が認められる(図3)。この時、4mM MPP⁺を添加するとintact細胞のO_2^-生成活性を阻害しないにもかかわらず、(Renex30 + NADP + G6P)の系でのO_2^-生成活性を顕著に阻害した(図4)。このMPP⁺の阻害は濃度依存的であり8mMで約80%の阻害を示した(図1B)。

次にMPP⁺がNADPH生成系に作用してミリスチン酸及びエライジン酸によるO_2^-の生成を阻害している可能性があるので、NADPHを直接添加する実験を行った。エライジン酸によるO_2^-の生成はRenex30の添加により停止するが、NADPHの添加によりintactな細胞と同じレベルのO_2^-生成活性を示した。このときも、MPP⁺は濃度依存性にO_2^-生成を阻害した。これらの結果から、MPP⁺はO_2^-生成系を白血球の内側から直接に阻害する可能性が考えられる。ところで白血球のO_2^-生成酵素は細胞膜に局在するNADPH oxidaseと考えられている(12)。そこで細胞膜分画のNADPH oxidaseに対するMPP⁺の阻害様式を調べた。ミリスチン酸で活性化したヒトおよびブタ

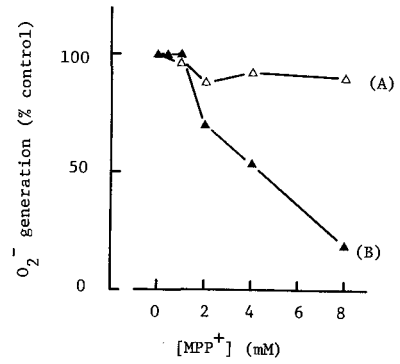


図 1

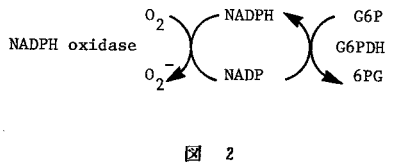


図 2

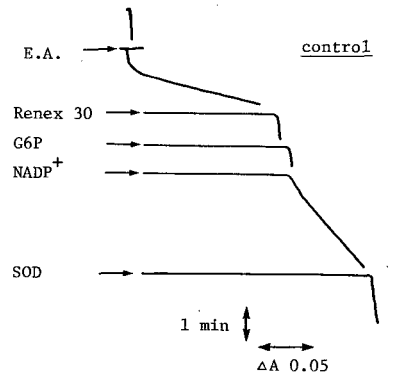


図 3

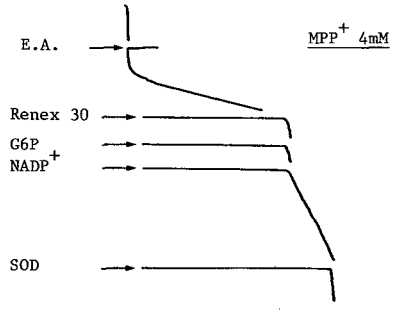


図 4

の白血球から細胞膜分画を分離し、酵素標品とした。反応は5mM グルコース、8 μg カタラーゼ、20μM チトクロームc を含む0.8ml の KRH中、室温で行った。MPP+は細胞膜分画のNADPH oxidase によるO_2^- 生成をNADPH と非競合的に阻害した。

＜考察＞

白血球は生体防御に重要な位置を占める細胞で、その細胞膜上に、殺菌系として重要な活性酸素を生成する酵素をもっている。この活性酸素は、非常に疎水性の強いフラビンタンパクとb 型チトクロームより構成されていると考えられている。一方Singerらのグループは MPP+がミトコンドリアのフラビンタンパクであるNADH dehydrogenaseを阻害することを報告している(13)。今回の成績からMPP+が白血球のO_2^- 生成酵素である細胞膜分画のNADPH oxidase を細胞の内側から阻害し、その阻害様式はNADPH と非競合的であることが示唆された。また、MPTPはO_2^- の生成を促進させるという報告(14)があるが、今回の成績から少なくともMPP+とO_2^- との反応性は認められなかった。組織の傷害作用に関しては、O_2^- より酸化還元電位の高い'OHが重要であると考えられている。したがってO_2^- 以外の活性酸素生成に及ぼすMPP+の影響を検討中である。

＜謝辞＞

本研究は東京都臨床医学総合研究所炎症研究室　山口照英博士、柿沼カツ子博士との協同研究であり、終始、御指導、御助言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) Heikkila,R.E. et al Science 224, 1451-1453 (1984)
4) Chiba,K. et al.; Biochem.Biophys.Res. Commun.120,574-578 (1984)
5) Chiba,K.et al.;Biochem.Biophys.Res.Commun.128,1228-1232(1985)
6) Hirata,Y.and Nagatsu,T,; Brain Res.337 193-196(1985)
7) Hirata,Y.and Nagatsu,T.; Neurosci.Lett.57 301-305(1985)
8) Hirata,Y.et al; Brain Res. (in press)
9) Silverman,D.H.S. et al.; Biochem.Biophys.Res.Commun.131 1160-1167(1985)
10) 東京都臨床医学総合研究所　炎症研究プロジェクト編；白血球実験操作法(1979)
11) Yamaguchi,T.and Kakinuma,K; Biochem.Biophys.Res.Commun.104, 200-206 (1982)
12) Yamaguchi,T. et al.J.Biochem.91 31-40(1982)
13) Ramsay,R.R.et al; Biochem.Biophys.Res.Commun.135 269-275 (1986)
14) Poirier,J.and Barbeau,A.; Biochem.Biophys.Res.Commun.131 1284-1289 (1985)

17. IgM paraproteinemia を伴う polyradiculoneuropathy 患者にみられた抗 sialosyllactosaminylparagloboside 抗体

宮谷信行・馬場広子*・佐藤修三*・湯浅龍彦*・宮武　正*
中村京子**　（国立療養所・西小千谷病院・神経内科，
新潟大・脳研・神経内科*，東京都臨床医学総合研・代謝**）

〔要　約〕

近年IgM paraproteinemia を伴うpolyneuropathy患者の一部において、IgM-M 蛋白がmyelin-associated glycoprotein(MAG) を認識するとの報告がなされ注目されている。一方、抗MAG 抗体陰性例に関する検討は少ない。我々は抗MAG 抗体陰性のIgM paraproteinemia を伴うpolyradiculoneuropathyと診断された症例の血清を用いganglioside との反応性を検討した。人末梢神経より抽出されたganglioside の薄層クロマトグラムの免疫染色により、本患者血清は一本の糖脂質を認識した。抗light chain 抗体を用いた。検索により、この抗原と結合する抗体は、paraprotein と同じIgM K 型であることが確認された。この糖脂質は抗MAG 抗体の認識する糖脂質とはRfも異なり、またイオン交換によりmonosialo 分画に溶出された。この糖脂質は二つの異なる溶媒系でTLC 上sialosyllactosaminylparagloboside (SLPG)と同一のRfを有しており、かつTLC の免疫染色およびELISA 法により、この患者血清は精製されたSLPGそのものとも強く結合することが証明された。以上の検討により、本患者血清には、末梢神経に存在するSLPGに対する高い抗体活性があり、末梢神経障害の発現に関与している可能性が示唆された。

Key word：　paraproteinemia, Ganglioside, polyradiculoneuropathy

骨髄腫や他のparaproteinemia の患者に末梢神経障害の合併がみられることはよく知られているがその機序は十分明らかになっていない。近年polyneuropathyを伴うIgM paraproteinemia 患者の一部においてそのmonoclonal IgM-M 蛋白が、ミエリンの微量成分であるmyelin-associated glycoprotein(MAG) を認識するとの報告がなされ、同様の報告が相次いでいる。Ilyas らは更にこのIgM-M 蛋白が、末梢神経に存在する強酸性糖脂質も認識すると報告している（Ilyas et al. 1984 ）。一方抗MAG 抗体陰性例に関しては、disialosyl gangliosideを認識した症例、およびchondroitin sulfate を認識した例の報告がみられるのみである。今回我々はIgM paraproteinemia を伴うpolyradiculoneuropathyと診断された患者血清中に抗sialosyllactosaminylparagloboside(NeuAc)(SLPG)抗体を見出したので報告する。

［症例］

65歳，男性。四肢末端のしびれ感を主訴として来院。神経学的には、四肢遠位部優位の筋萎縮と筋力低下，腱反射の消失，手袋・靴下型の全感覚障害を認める。血中IgM は1167mg/dl と著明な増加を示し、免疫電気泳動法にて、IgM(K)と同定される。抗MAG 抗体は陰性。全身表在リンパ節の腫大を認め、リンパ節生検にてWaldenstrom 細胞様の異常リンパ球が認められる。以上よりIgM paraproteinemia を伴うpolyradiculoneuropathyと診断，プレドニゾロン投与が実施され、上記症状の著明な改善を認める。３年後、某院に再入院、肺，肝などに転移性腫瘍が見出され、死亡。剖検にてmedium sized cell typeのlymphomaと診断された。以下の検索には、当院入院時得た保存血清を用いた。

［方法］

抗MAG 抗体の作製：ヒト脳より精製したMAG を家兎に免疫してpolyclonal抗MAG 抗体を作製した。

Ganglioside の抽出：剖検により得たヒト腰部神経叢よりchloroform／methanolで総脂質を抽出した。常法（Nakamura et al. 1983）に従いIatrobeadsカラムでsimple lipidを除いた後、DEAE Sephadex A-25カラムで酸性糖脂質を得、アルカリ処理，中和後、LH-20 カラムにて脱塩、最後にIatrobeadsカラムでsulfatide を除いて、ganglioside 分画とした。standardとして同様の方法で抽出したヒト脳灰白質のganglioside 分画、および豚筋より単離精製したsialosylparagloboside(NeuAc)(SPG) およびSPLGを用いた。

薄層クロマトグラムの免疫染色：ganglioside をhigh performance TLCアルミシートにて展開後、 0.0025% polyisobutylmethacrylate in n-Hexan に浸漬，乾燥後、患者血清を一次抗体とし、peroxidaseラベルのウサギ抗ヒトIgM を二次抗体として、PAP 法にて発色させた。light chain typeの検索は、二次抗体としてウサギ抗ヒトK chain ないしλ chainを用い、ビオチン化抗ウサギIgG を三次抗体とし、アビジン・ビオチン・peroxidase complex system (Vectastein ABC kit) を用いて実施した。

ELISA による抗SLPG抗体の検索：単離精製したSLPGをmethanolに溶解し、microplateの各wellに入れた後、乾燥し患者血清を一次抗体，二次抗体にperoxidaseラベルウサギ抗ヒトIgM,色原体にO-phenylenediamineを用い、抗SLPG抗体価を測定した。対照として抗MAG IgM M 蛋白を有するpolyneuropathy患者血清および他の神経疾患患者血清を用いた。

［結果］

この患者血清は末梢神経ganglioside のTLC 免疫染色によりGM_1 とGD1aの間の一本のバンドと結合した（Fig. 1-A)。抗light chain 抗体を用いた検討などにより、この抗原と結合する抗体は患者のparaprotein と同じIgM K 型）であることが確認された（Fig. 2）。患者血清は中枢神経のganglioside 分画とは反応しなかった。この糖脂質は抗MAG 抗体の認識する糖脂質とは異なるRfを有しており、DEAE Sephadex A-25を用いたammonium acetate gradientにて、monosialo 分画に溶出された。この糖脂質は二つの異なる溶媒系で、TLC 上SLPGと同じRfを有し、かつこの患者血清は単離精製されたSLPGそのものとも結合した(Fig.1A,1B) 。一方、sialosylparagloboside(SPG)との結合はみられなかった。SLPGを抗原として用いたELISA 法によってもこの患者血清は高い抗SLPG抗体価を有することが確認された（図３）。一方、抗MAG IgM M 蛋白を有すpolyneuropathy患者血清を含む他のコントロール血清はすべてSLPGと結合しなかった。

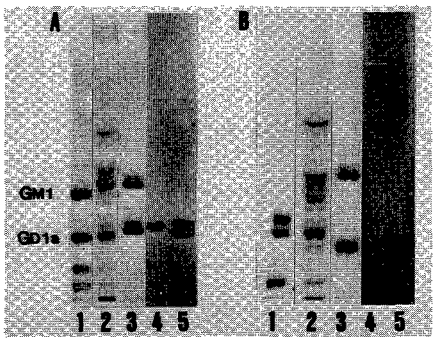


Fig. peripheral nerve. The ganglioside fraction from human peripheral nerve (lumbar plexus) was chromatographed on an aluminum backed thin layer plate of silica gel. Panel A; The plate was developed with solvent system A, chloroform/methanol/0.02% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (55:45:10, by volume). Panel B; The plate was developed with solvent system B, chloroform/methanol/5N NH_4OH/0.4% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (60:40:4:5, by volume). Lane 1; gangliosides from human brain gray matter, lane 2 and 4; gangliosides from human peripheral nerve, lane 3 and 5; sialosylparagloboside (upper) and sialosyllactosaminylparagloboside (lower), lane 1, 2 and 3; gangliosides were stained with the orcinol reagent, lane 4 and 5; gangliosides were immunostained with the patient's serum.

［考察］

以上の検索結果より本患者のIgM M 蛋白は抗SLPG抗体活性を有すると考えられた。

SLPGは、neo-lacto 系ganglioside の一つで赤血球，

脾，骨格筋などに存在するが、中枢神経系における存在は報告されていない。末梢神経のganglioside 組成に関しては未だ十分検討されていないが、最近Chouらにより rat 坐骨神経にSLPGの存在が示唆されている（Chou et al. 1985）。

IgM paraproteinemia を伴うpoly neuropathy患者血清において、末梢神経における抗原が明らかになったものは極めて少なく、本例は抗SLPG抗体の確認された初めての例である。また、本患者血清は、同じneolacto系でGlcNAc-Galの繰返しが１つ少ないSPG とは結合せず，そのepitope を考える上でも興味深い。この抗SLPG抗体が末梢神経障害の成立にどのように関与しているか現在のところ不明であるが、抗MAG 抗体の場合には坐骨神経への注入で脱髄をきたしたとする報告もあり更に検討をすすめる予定である。

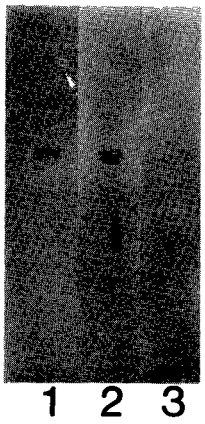


Fig. 2
Binding of the patient's serum to gangliosides from human peripheral nerve. As second antibodies, anti-human IgM (lane 1), anti-human kappa light chain (lane 2), and anti-human lambda light chain (lane 3) were used.

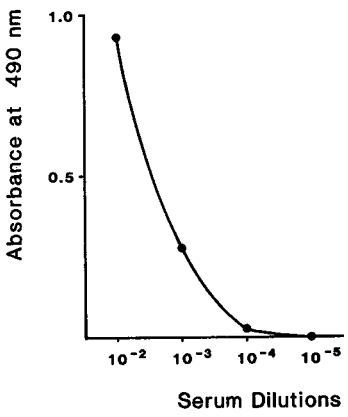


Fig. 3
Binding of the patient's serum to SLPG by ELISA.

［文献］

Chou K.H., C.E. Nolan and F.B. Jungalwala, Subcellular fractionation of rat sciatic nerve and specific localization of ganglioside LM_1 in rat nerve myelin, J. Neurochem., 44(1985)1898-1912

Ilyas A.A., R.H. Quarles, T.D. MacIntosh, M.J. Dobersen, B.D. Trapp, M.C. Dalakas and R.O. Brady, IgM in a human neuropathy related to paraproteinemia binds to a carbohydrate determinant in the myelin-associated glycoprotein and to a ganglioside, Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 81(1984)1225-1229

Nakamura K., T. Ariga, T. Yahagi, T. Miyatake, A. Suzuki and T. Yamakawa, Interspecies comparison of muscle gangliosides by two-dimensional thin-layer chromatography, J. Biochem.(Tokyo) 94(1983)1359-1365

18. 筋萎縮性側索硬化症（ ALS ）における単一脊髄運動ニューロンのコリンアセチルトランスフェラーゼ（ ChAT ）活性

加藤尚彦　（東京大・医・脳研）

〔要　約〕

脳外科的に切除されたヒトの大脳皮質を用いて，剖検試料中の ChAT 活性の死後失活過程を明らかにし，十分に ChAT 活性を持つＡＬＳおよび対照（非神経疾患）例の剖検腰髄から，運動ニューロンの細胞体を単離して，その ChAT 活性を測定した。

（１）　20℃以下に 15 時間置かれたヒト大脳皮質の剖検試料中には，70％以上の ChAT 活性が残っていた。

（２）　腰髄切片に残存する数が少なく，病変の進んだ小型ニューロンは，分離する過程でもろく崩れやすかった。多数残存する大型ニューロン細胞体は，リポフスチンが蓄積して赤味を帯びていた。

（３）　対照およびＡＬＳ例ともに，単一運動ニューロンの ChAT 活性値は広い範囲に分布し，個体差も大きく，全体としては両者間には ChAT 活性値の有意差は認められなかった。

（４）　ＡＬＳ例では，病変の進んだ萎縮小型ニューロンは，残存数の多い大型ニューロンに較べて高い ChAT 活性を持ち，大型ニューロンは，対照例の大型ニューロンより低い ChAT 活性を持つ傾向が見られた。

Key word： ALS, choline acetyltransferase, motor neuron

ＡＬＳ（Amyotrophic Lateral Sclerosis ）は，主に脊髄運動ニューロンを選択的に侵す原因不明の疾患である。脊髄運動ニューロンは代表的なコリン作動性ニューロンであり，そのアセチルコリン生成酵素である ChAT 活性は，運動ニューロンの細胞機能を代表していると考えられる。そこでＡＬＳ脊髄の運動ニューロンを単離し，既に開発した超微量測定法（４）を用いて，単離ニューロンの ChAT 活性を測定し，ＡＬＳの病態解析を試みた。

＜実験方法＞

［対照およびＡＬＳ脊髄運動ニューロン試料］　対照（非中枢神経疾患）とＡＬＳ症例の剖検時に，それらの脊髄を摘出して，約１cmの腰髄片を液体窒素中に投入し瞬間凍結した。凍結脊髄より切片（厚さ 20 μm ）を切り出し凍結乾燥した後，この凍結乾燥切片から顕微鏡下で前角細胞体を切り出した。単離細胞体の乾燥重量を，高感度水晶糸バランス（感度，±23pg）を用いて秤量した後，そのまま反応液に加えた（５，６）。以下に各症例についてのデータをまとめる。

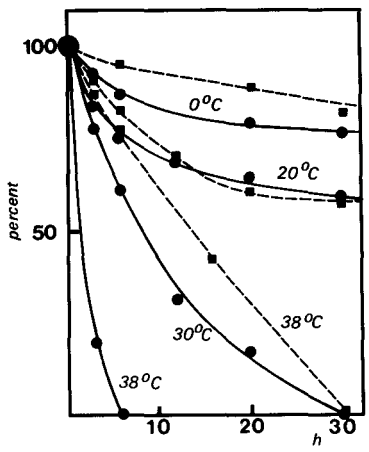
対照：　１）70M 4，（70才，男性，剖検開始までの死後経過時間），死因・肺癌，２）43F 11，（女性），子宮癌，３）11F 3.5 ，心血管系奇形。

ＡＬＳ：　１）60F 15，全経過12カ月，２）70M 3.5 ，５年９カ月，３）70M　4.5 ，４年６カ月，４）34F 3.5 ，４年６カ月。

［ヒト大脳皮質およびマウス脳ホモジェネート］　左側脳葉の腫瘍（48才，女性）の為切除した側頭極の病変のないと思われる部分２ｇを，そのままWarring ブレンダーで破砕し，均一なペーストとした。30mgずつのペーストのバッチを，種々の条件下に置いた後（図１．参照），20 mM Tris-HCl，pH 8.0中で10 %ホモジェネートを調製した。また断頭したマウスの頭部を種々の条件下に置き（図１），同様にしてホモジェネートを調製した。

［ChAT活性超微量測定法］　秤量した単一細胞体を，54.3nlの反応液に直接加えて反応を行なった。反応は逆

図１．ChAT活性の死後変化



100 %の活性は，ヒト大脳皮質(●—●)，0.105 ± 0.03 (4)； マウス脳(●—●)，2.41 ± 0.24 (6)。活性単位，mmol生成アセチルCoA / kg湿重量/ 時。

方向（アセチルコリン＋ CoASH→コリン＋アセチル CoA）に行ない，生成されるアセチル CoAを酵素を用いる増幅反応（ CoAサイクリング，（３））によって 100,000倍に増幅して定量した。比活性は細胞体の乾燥重量当たり，またはホモジェネートの湿重量あたりで表わした（４）。

＜結果および考察＞

［ChAT活性の死後失活変化］　ヒト大脳皮質の小部分（30 mg ）を試料として採取してホモジェネートを調製し，その活性を測定すると，部位による差違と白質の混入の為活性値は試料によって大きくバラツいた。そこで均一なペースト状の試料を調製し，種々な条件下に置いて，死後変化のモデル実験を行なった（図１）。この結果に基づき，全例とも10月～ 3月に死亡し，剖検開始後２時間以内に腰髄片を氷冷するまで，脊髄試料が20℃以下に置かれており，ChAT活性は70%以上残存していると考えられる剖検腰髄を用いた。同様の実験をマウス脳を用いて行なったが，マウスの ChAT はヒトの ChAT より安定であり（図１），死後変化のモデルとしては不適当であった。

［単一運動ニューロン試料］　症例60Ｆ15と70M 3.5の腰髄切片には，大型の運動ニューロンが数多く残っていた。凍結細胞切片を無染色のまま透過光で観察すると，対照ニューロンと比較して細胞体は赤味を帯びており，ＡＬＳの一特徴であるリポフスチンの蓄積が見られた。70Ｆ4.5 と　34Ｆ3.5 の腰髄切片には，１～２個の小型のニューロンが見られるのみで，脱落を免れた萎縮した細胞体が残っていると思われた。前２例の切片からは，ミクロナイフの尖端を細胞体の輪郭にそってさしこんで抉ると，容易に細胞体を単離できたが，病変の進んだ後２例では，細胞体がもろく崩れやすく，病的変性過程の進行を反映していると思われた（写真供覧）。

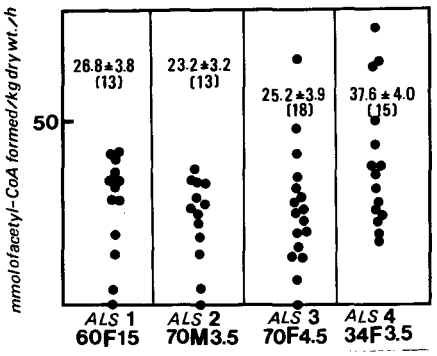
［ＡＬＳ運動ニューロンの ChAT 活性］　萎縮して小型になっていると思われる細胞体の活性は，多数残存する大型の細胞体の活性よりも高い傾向を示した（図２）。

表１．　単一脊髄運動ニューロンの ChAT 活性

対照例		ＡＬＳ患者	
mmol 生成アセチル CoA/kg 乾燥重量／時			
1) 70M 4	49.4 ± 6.3 (33)*	*1) 60F15*	26.8 ± 3.8 (13)
2) 43F11	36.3 ± 7.2 (16)	*2) 70M3.5*	23.2 ± 3.2 (13)
3) 11F3.5	31.9 ± 4.4 (18)	*3) 70F4.5*	25.2 ± 3.9 (17)
		4) 34F3.5	37.6 ± 4.0 (15)

＊平均±ＳＥＭ（測定細胞数）；症例を表わす略記号の意味については方法参照。対照例は文献（５）と同じ症例。

図２．ＡＬＳ脊髄運動ニューロンの ChAT 活性



各点は個々の運動ニューロンの活性値を示す。図中の数字は平均±ＳＥＭ（測定細胞数）。症例を表わす略記号の意味については，方法参照。

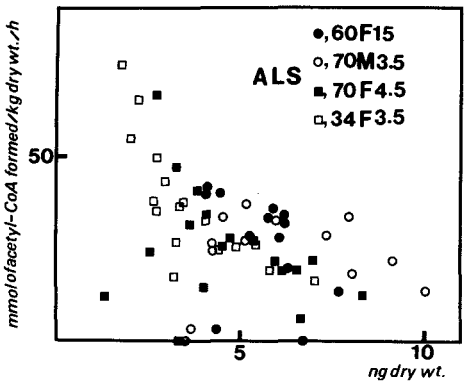
対照例中にはＡＬＳより高い活性値を示す症例もあったが，全体としてはＡＬＳ例と統計的な有意差はなかった（表１）。

［運動ニューロンの大きさと ChAT 活性の関係］　細胞体試料は，全細胞体の一部を切りとったものであ

るが，一般的に大型の細胞からは大きな試料が得られる。従って ChAT 活性を細胞体試料の重さに対してプロットすれば，活性と細胞体の大きさの相関関係を推察できる。ＡＬＳニューロンは萎縮して小型になるほど高い活性値をもっていた（図３）。対照例のニューロンは，大型のものはＡＬＳ例より高い活性をもつ傾向があり，小型のニューロンの活性値は，高い値から低い値にわたって広く分布した（図４）。

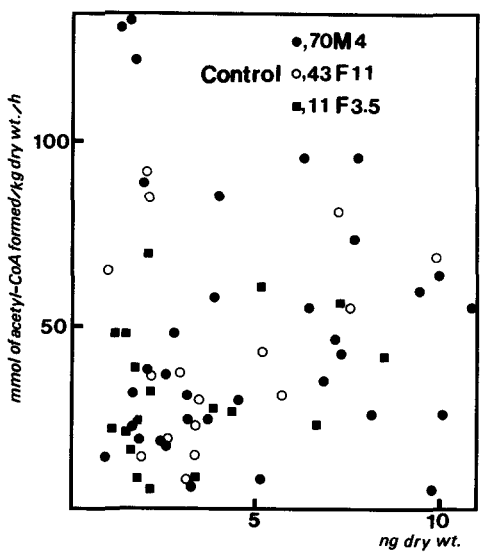
ＡＬＳ脊髄に残存する運動ニューロンについては，形態学的に，病変の進行に伴って大型細胞の数が減少することが知られている（８）。病的過程の進行に伴ってリポフスチンの蓄積も進み，細胞の活動レベルが低下すると予想されるが，運動ニューロンの ChAT 活性は病変の進行と共に一時的には低下するが，萎縮して小型になる脱落前のニューロンはかえって高い ChAT 活性を持つようになる（図３，４）。ＡＬＳの病的ニューロンのエネルギー生産系酵素の活性は，対照ニューロンとほとんど変わらず（１，２），生存のための生化学的な活性は維持されてると思われる。一方細胞機能を代表すると思われる ChAT 活性の特有の変動は，萎縮脱落前のニューロンが，燃えつきる前の最後の活動を強める様子を示し，細胞レベルでの病的な動態を表わす現象として面白い。既に運動ニューロンは GABA 生成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素GAD も含んでおり，GABA が運動ニューロンでは一種の trophic factor として作用する可能性（７）を示したが，ＡＬＳの病的ニューロンでは，GADがどのような変動を示すか興味がもたれる。

図３．ＡＬＳ運動ニューロンの大きさと ChAT 活性の関係。



各点は個々のニューロンの重さと活性値を示す。各点のニューロンが由来する症例をシンボルの違いで表わす。

図４．対照運動ニューロンの大きさと ChAT 活性の関係。



各点は個々のニューロンの重さと活性値を示す。各シンボルは，ニューロンが由来する症例を示す。

[文　　献]

1) Hayashi,H. and Tsubaki,T.(1982) J.Neurol.Sci.,57,133-142. 2) Hirsh,H.E. and Chen,K.M.(1969) J.Neuropath.exp.Neurol., 28,267-277. 3) Kato,T.(1975) Anal.Biochem.,66,372-392. 4) Kato,T.(1984) J.Neurochem.,42,903-910. 5) Kato,T. and Murashima,Y.L.(1985) J.Neurochem.,44,675-679. 6) Lowry,O.H. and Passonneau,J.V.(1972) A felexible system of enzymatic analysis, Academic Press, New York. 7) Murashima,Y. L. and Kato,T.(1985) J.Neurochem.,45,732-738. 8) Tsukagoshi,H., Yanagisawa,N., Oguchi,K., Nagashima,K. and Murakami,T. (1979) J.Neurol.Sci.,41,287-279.

19. ファブリー病の生化学的組織化学的検討：男性例と女性発症例との対比

保住　功・西澤正豊・有賀敏夫*・宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科，東京都臨床医学総合研・代謝*）

〔要　約〕

Fabry 病は伴性劣性の遺伝性疾患で女性に発症をみることは稀であり、その発生機序はLyonの仮説で説明されている。今回我々は、55歳の女性で、心筋肥大，四肢疼痛を認め、白血球のα－ガラクトシダーゼ活性が正常値の約20% で、一般の保因者と比べても低値で、女性発症者と考えられた症例の剖検材料を生化学的，組織化学的に検討して蓄積脂質の同定，定量を行い、男性例との比較検討を行った。女性例においても、男性例と同様、後根神経節，交感神経節に糖脂質の蓄積を認めた。女性例における白血球，線維芽細胞，脳（前頭葉）をはじめとする各臓器の酵素活性は16～32% であった。抽出した中性脂質のTLC では、女性例では心に高度にCTH が蓄積しており、男性例が腎優位に蓄積するのと対照であった。TLC 上より回収したCTH をGLC により定量すると、正常対照に比して女性例の心で63倍，腎で 5倍，男性例の心で17倍，腎で68倍の蓄積を認めた。

このような性別，臓器間における表現型の差異は、酵素活性の値だけでは説明が不可能で、今後遺伝子レベル，酵素活性の修飾因子，酵素の臓器特異性等の検索が必要と考えられた。

Key word：　Fabry's disease,　α-galactosidase, ceramide trihexoside

［目的］

Fabry 病は神経系では、視床下部の視束上核，扁桃核基底部，黒質，後根神経節，交感神経節などにセラミドトリヘキソシド(CTH) が蓄積することが報告されている[(2)]。この疾患は伴性劣性の遺伝性疾患で、女性例で発症する例は稀で、心筋障害を中心に数例報告されている。我々は、女性のFabry 病保因者で著明な心筋症を呈した症例において後根神経節、交感神経節に組織化学的に糖脂質の蓄積を確認している。今回、これらを含めた全身の臓器における蓄積糖脂質の生化学的分析を行い、Fabry 病の典型的男性例と比較検討することを目的とした。

［症例］

症例１．55歳，女性。心電図異常から心尖部肥大型心筋症が疑われ、心筋生検を施行された結果、脂質蓄積症が示唆された。白血球のα－ガラクトシダーゼ活性が正常の18.3% と低値であり、女性Fabry 病と診断された。四肢の激痛を訴えたが、皮疹，腎障害は認めなかった。間質性肺炎にDIC,脳梗塞を合併して死亡した。（新潟大学第一内科症例）

症例２．36歳，男性。 8歳頃から四肢の疼痛が出現。11歳時、蛋白尿を指摘され、腎生検を施行された。白血球のα－ガラクトシダーゼ活性は正常の 3.5% と低値でFabry 病と診断された。現在、腎透析を続けている。（新潟大学第二内科症例）

症例３．36歳，男性。無汗症，疼痛発作，皮疹，蛋白尿を認め、皮膚生検，腎生検からFabry 病と診断された。腎不全にて死亡した。（東京大学第一内科症例）

症例４．41歳，男性。（聖マリアンナ医科大学第一内科症例，同病理より提供）。

［検索方法］

組織学的検索：剖検時に得たの諸臓器をホルマリン固定し、HE染色，ズダンⅢ染色，ナイル・ブルー染色，偏光顕微鏡による複屈折性物質の検索を行った（症例１と症例３，４）。

酵素活性の測定：女性例では白血球，培養線維芽細胞，脳（前頭葉灰白質），心，肝，腎、男性例（症例２）では白血球，培養線維芽細胞のライソゾーム酵素活性を4MU 基質を用いた螢光法により、さらにα－ガラクトシダーゼは［ ^{3}H ］-CTHを基質としても測定した。

蓄積脂質の検索：脳，後根神経節，交感神経節，心，肝，腎よりクロロホルム／メタノール（2:1(v/v)）および1:2(v/v)）により総脂質を抽出し、ついでDEAE-Sephadex A-25カラムで中性分画を得た。これを弱アルカリ水解して、脂肪酸を除き、脱塩した後、TLC （クロロホルム／メタノール／水，65:35:8(v/v)）にて展開した（症例１と症例３，４）。

CTH ，CDH の定量：薄層板よりCTH,CDH （セラミドジヘキソシド）分画をかきとり、イアトロビーズカラムを通し、ついでメチル化した後脂肪酸エステルを除き、さらにTMS 化して、これをgas liquid chromatography(3% OV-1 カラム，カラム温度 175℃）に導入して糖の組成を分析した。内部標準物質にはミオイノシトールを用い、精製グロボシドにより検量線を作製してCTH,CDH を定量した。

［結果］

女性例においても、男性例と同様に後根神経節，交感神経節に偏光顕微鏡で複屈折性を示す顆粒の充満した神経細胞を認めた(Fig.1) 。心筋細胞，肝細胞，腎系球体上皮細胞，遠位尿細管にも組織学的に同様の顆粒を認めた。その蓄積の程度は、心筋により著明であり、一方男性例では腎臓により著明であった。α－ガラクトシダーゼ活性は、男性例で白血球，線維芽細胞で正常の約5%であるのに対して、女性例では、脳，心，肝，腎にて16% ～32% であった(Table 1)。TLC では、女性例においても、脳，後根神経節，交感神経節，心，肝，腎においてCTH の、さらに腎，後根神経節においてはCDH の著明な蓄積が認められた(Fig.2) 。薄層上より回収したCTH を定量すると、男性例（症例４）では正常に比して心で117 倍，腎で68倍のCTH の蓄積を認めたのに対して、女性例では心で63倍，腎で5 倍であった。また、CDH は男性例における心で44倍，腎で18倍、女性例においては心で18倍，腎で15倍の蓄積を認め、本女性例では心により高度にCTH が蓄積しており、男性例が腎優位の蓄積をみるのと対照的であった。

［考察］伴性劣性の遺伝性疾患では女性が発症することは稀で、染色体の転座を除けば、その発症機序はLyonの仮説で説明されている。Fabry 病においてもRomeo ら(3) は培養線維芽細胞のクローニングによって正常のクローンと異常のクローンとが存在することを証明している。我々の今回の検索では脳を含め、全身の各臓器の酵素活性は16% ～32% に低下しているが、各臓器におけるCTH 蓄積は女性例（症例１）では心、男性例（症例４）では腎により顕著であった。男女間の表現型の差異は、酵素活性の低下だけでは説明できない。

Fabry 病の女性発症例では心症状を主とする報告が多い。しかし、我々は、22歳の腎障害，四肢の疼痛，眼症状を認める女性Fabry 病発症者で、心障害を今までのところ確認できない症例を経過観察している。従って女性発症者の表現型も均一ではなく、この理由も明らかではない。

水野ら(1) は、Fabry 病の兄弟例（20歳，17歳）において、酵素活性が同一値でありながら臨床症状の程度の異なる例を報告し、表現型の差は遺伝子自体の変異よりも種々の環境因子の寄与によるものと推論している。

今後、女性発症例も含めたFabry 病の表現型の差異を明らかにするため、遺伝子レベル．酵素活性の修飾因子，酵素の臓器特異性等の検索が必要と思われる。

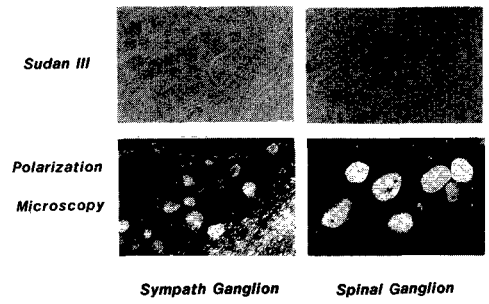


Fig.1a

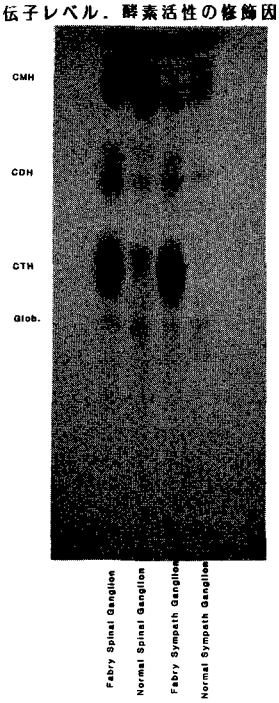


Fig.1b

Fig.1 Sympathetic and spinal ganglia of the female Fabry patient

1a:histochemical study by Sudan III staining and polarization microscopy
1b:thin-layer chromatography of neutral glycosphingolipids

	1. Leukocyte	3. Brain	5. Liver
Female patient	12.4 (18.3%)	2.0 (19.0%)	28.9 (32.9%)
Normal range	67.9±16.2 n=38	10.5±2.72 n=3	87.8±27.6 n=5
	2. Fibroblast	4. Heart	6. Kidney
Female patient	17.1 (20.0%)	15.8 (27.6%)	21.2 (16.4%)
Normal range	85.4±21.8 n=5	57.2±13.7 n=5	129±22.9 n=5

Table 1 α-galactosidase activity of various organs in the female Fabry patient.

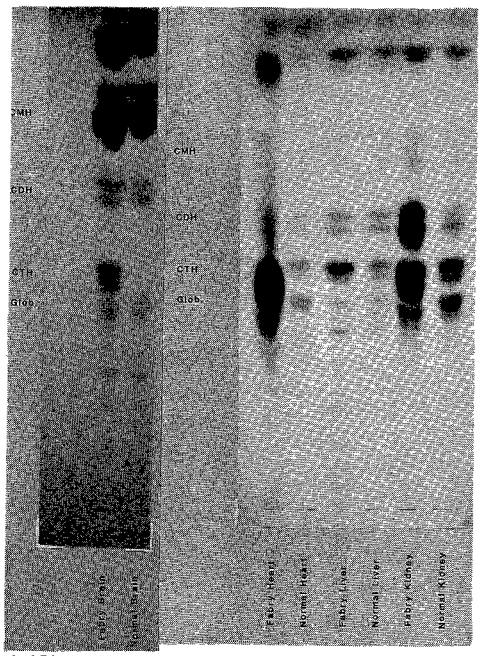


Fig.2

Fig.2 Thin-layer chromatograpy of neutral glycosphingolipids from various organs in the female Fabry patient and control.

[文献]

1)水野愛子他(1981) 医療 35.575-578

2)Rahman A.N. and Lindenberg R. (1963) Arch. Neurol. 9.373-385

3)Romeo G. and Migeon B.R.(1980) Science. 170.180-181

20. ヒト正常脳及び脳腫瘍におけるS-100蛋白サブユニットの免疫組織化学的局在について

田宮　隆・白石哲也・松海信彦・守山英二・土田高宏
武家尾拓司・松本健五・古田知久・田渕和雄・西本　詮
（岡山大・医・脳神経外科）

〔要　約〕

カルシウム結合酸性蛋白の一つであるS−100蛋白は、α鎖、β鎖の2種類のサブユニットからなる2量体である。今回、我々は、ヒト正常大脳及び小脳と、85例のヒト脳腫瘍におけるS−100蛋白サブユニットの局在について免疫組織化学的検索を試みた。抗S−100蛋白α鎖、あるいは、β鎖マウスモノクロナール抗体を使用し、ABC法による酵素抗体法を施行した。大脳では、グリア細胞は、α鎖、β鎖共に陽性、一部の神経細胞は、α鎖のみ陽性、脈絡叢上皮細胞は、β鎖に強陽性を示した。小脳では、バーグマングリア細胞は、β鎖のみ陽性であったが、他のグリア細胞は、α鎖、β鎖共に陽性、神経細胞は全て陰性であった。Low grade astrocytomaでは、α鎖、β鎖共に強陽性であった。High grade astrocytomaでは、α鎖、β鎖共に陽性あるいは陰性　どちらか一方陽性と、症例により様々であった。Oligodendrogliomaでは　核はβ鎖に強陽性であった。Medulloblastomaでは、α鎖、β鎖、共に陰性であった。Choroid plexus papillomaでは、α鎖は弱陽性であったが、β鎖は強陽性を示した。Schwannomaでは、β鎖は強陽性であった。Ependymomaでは、5/7で、Meningiomaでは、約1/3の症例でα鎖、β鎖共に陽性を示したが、一定した所見ではなかった。

Key word：　α and β subunits of S−100 protein, immunohistochemistry, normal human brain and brain tumors

［はじめに］　S−100蛋白は、1965年にMooreら6）によりウシ脳から分離された分子量21000のカルシウム結合酸性蛋白質であり　哺乳類、鳥類などの脊椎動物の神経組織に主に存在している。近年、神経組織以外に、脂肪細胞、軟骨細胞、皮膚のランゲルハンス細胞、リンパ節のinterdigitating reticulum cell等に　幅広く存在することが明らかとなった3）。最近、S−100蛋白は、α鎖とβ鎖の2種類のサブユニットからなる2量体であり、ヒトの脳には、S−100ao（α、α）,S−100a（α、β）、S−100b（β、β）の3分子種が存在することが、明らかにされた1）。これにより、S−100蛋白のサブユニットレベルでの、免疫組織化学的局在検索が試みられている。今回、著者らは、ヒト正常脳及び脳腫瘍におけるS−100蛋白サブユニットの局在について免疫組織化学的に検索を行い、興味ある知見を得たので報告する。

［材料及び方法］　ヒト正常脳組織は、岡山大学脳神経外科教室で、内減圧を目的として施行された前頭葉（3例）、側頭葉（3例）、及び小脳半球（3例）切除生検材料を用いた。ヒト脳腫瘍組織は、当教室での開頭術時の生検材料を用いた。その組織別内訳は、Low grade astrocytoma（10例）、High grade astrocytoma（10例）、Oligodendroglioma（5例）、Ependymoma（7例）、Choroid plexus papilloma（3例）、Medulloblastoma（10例）、Acoustic neurinoma（10例）、Meningioma（30例）の85例である。抗体は　抗S−100蛋白α鎖、及びβ鎖マウスモノクロナール抗体（日本抗体研究所）を、使用した。特異性については、Hawkesらの方法5）にて確認されている。生検材料は、10%中性ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し、6μmの連続切片を作成した。免疫組織化学的方法は　ABC法による酵素抗体法を施行した。

［結果］　1，ヒト正常脳組織：ヒト正常大脳では、Astrocyteは、α鎖及びβ鎖共に強陽性を示した。その陽性反応は、細胞質、核、細胞突起に認められた。Oligodendrocyteも、α鎖、β鎖共に陽性を示したが、Astrocyteに比し陽性反応は弱かった。神経細胞では、α鎖、β鎖共に陰性の細胞と、α鎖のみ細胞質、軸索に陽性を示す細胞とが、認められた。Epithelial cell of choroid plexusでは、β鎖は強陽性を示したが、α鎖は弱陽性あるいは散在性に陽性を示し、染色性に差が認められた。ヒト正常小脳では、白質及び顆粒層のAstrocyteは、α鎖、β鎖共に陽性を示したが、Bergmann's glial cellは、β鎖のみ陽性を示し、分子層に延びる突起にも陽性反応が強く認められた。Purkinje cell及び顆粒層の神経細胞は、α鎖、β鎖共に陰性であった（Fig 1）。

2，ヒト脳腫瘍：Low grade astrocytoma（10例）では、全例　α鎖、β鎖共に強陽性を示した。その陽性反応は、腫瘍細胞の細胞質、核、細胞突起に認められた。また、その反応は、症例間及び細胞間で余り差がなかった。High grade astrocytoma（Glioblastomaを含む）（10例）では、α鎖、β鎖共に陽性あるいは陰性、どちらか一方陽性と、症例により種々の結果を示した。また、同一組織でも、細胞間で陽性反応に差が認められた。Oligodendroglioma（5例）では、β鎖は、核に陽性反応を認めたが、α鎖は、散在性に陽性反応を示すのみであった。Ependymomaでは、7例中5例にα鎖、β鎖共に陽性反応を認めたが、その陽性所見は一定の傾向が認められなかった。Medulloblastoma（10例）では、腫瘍細胞は全て陰性を示した。3例で、散在性にα鎖、β鎖共に陽性細胞を認めたが、その分布及び形態より腫瘍組織に取込まれたAstrocyteと考えられた。Choroid plexus papilloma（3例）では、腫瘍の上皮細胞は、β鎖に強陽性を示し、細胞質及び核に陽性反応が認められた。α鎖は、β鎖に比べ、陰性あるいは弱陽性と明らかに反応に差を認めた（Fig. 2）。Schwannoma（10例）では、全例、α鎖陰性、β鎖強陽性を示した。陽性反応は、比較的均一で細胞質及び核に認められ、Antoni A, B typeの両方に認められた。Meningioma（30例）では、9例のみにα鎖、β鎖共に陽性反応が認められた。その反応は、瀰漫性あるいは散在性の場合を示したが、サブユニット間では差がなかった。

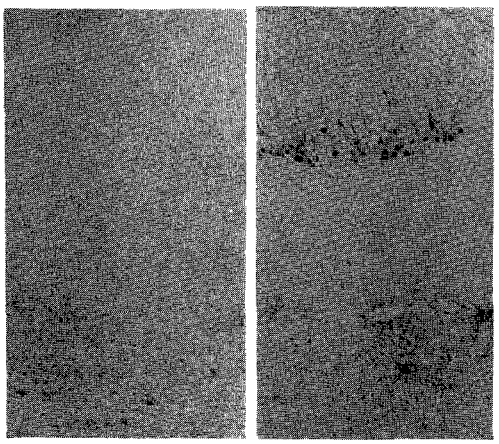


Fig.1，　S−100 α　　S−100 β
Normal human cerebellum

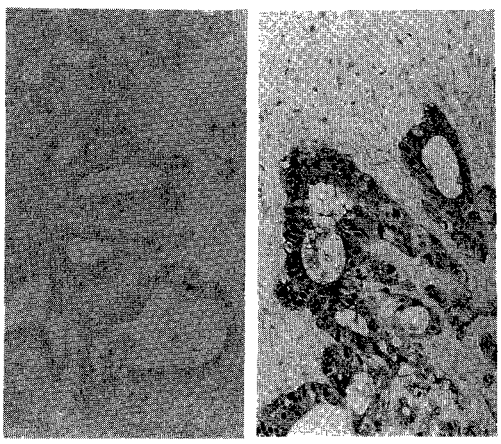


Fig.2　S−100 α　　S−100 β
Choroid plexus papilloma

Table 1.
Immunohistochmical localization of α and β subunits of S-100 protein in normal human brain

Cell type	α subunit	β subunit
Cerebrum		
Astrocyte	++	++
Oligodendrocyte	+	+
Ependymal cell	+	++
Epithelial cell of choroid plexus	+	++
Neuron	+--	-
Cerebellum		
Astrocyte	++	++
Bergmann's glial cell	-	++
Purkinje cell	-	-
Neuron of granular layer	-	-

Table 2.
Immunohistochemical localization of α and β subunits of S-100 protein in human brain tumors

Tumor type	α subunit	β subunit
Low grade astrocytoma	++	++
High grade astrocytoma	++--	++--
Oligodendroglioma	+	+
Ependymoma	+--	+--
Medulloblastoma	-	-
Choroid plexus papilloma	+--	++
Schwannoma	-	++
Meningioma	+--	+--

++ --- positive
+ --- partially or weakly positive
- --- negative

［考察］ 中枢神経系におけるS－100蛋白α鎖及びβ鎖の局在に関する報告では、神経細胞ではα鎖のみ、グリア細胞では、α鎖、β鎖共に存在することが知られている2）4）7）。また、脳腫瘍組織では、Astrocytomaは、α鎖及びβ鎖、Schwannomaは、β鎖のみ存在することが報告されている7）。今回、著者らの免疫組織化学的検索では、ヒト正常脳及び脳腫瘍におけるS－100蛋白α鎖及びβ鎖の局在は、Table 1、Table 2、の如くであった。脈絡叢上皮細胞では、β鎖が強陽性、小脳のBergmann's glial cellは、β鎖のみ陽性、Purkinje cell及び顆粒層の神経細胞は、α鎖、β鎖共に陰性である事が明らかとなった。脳腫瘍では、Low grade astrocytoma, Oligodendroglioma, Medulloblastoma. Choroid plexus papilloma, Schwannoma, では、各々の組織型で、S－100蛋白サブユニットの局在に一定の傾向が認められた。その陽性反応は、同一組織型では 症例間及び細胞間で、あまり差がなく、それぞれのoriginである正常細胞の陽性反応と類似していた。一方、Ependymoma, Meningioma, High grade astrocytomaでは、S－100蛋白の局在が症例により異なり、一定の傾向が認められなかった。特にHigh grade astrocytomaでは、組織間のみならず同一組織での部位、あるいは、細胞によりS－100蛋白サブユニットの局在に著しい差が認められた。このように一部の脳腫瘍では、S－100蛋白サブユニットの免疫組織化学的局在に、多様性を示した。Meningioma, Oligodendrogliomaに関しては、以前よりS－100蛋白の局在に一定の見解が得られていない。Vanstapelらの抗S－100蛋白モノクローナール抗体による免疫組織化学的検索でも腫瘍組織での多様性を示す報告がされている8）。この原因は 現在のところ不明であるが、腫瘍化に伴うS－100蛋白産生能及び局在の変化、S－100蛋白の抗原性の変化、さらに、悪性度の強い組織では、細胞周期によるS－100蛋白の量的及び局在変化、等が要因として推測される。また、モノクローナール抗体の特性や組織の固定条件等の免疫組織化学的方法の影響も、考慮すべきである。今後は 機能面との関係、細胞内微細局在での検討が必要と思われる。

［文献］
1）Isobe,T.,et al （1983）Biochem.Interna.6:419－426
2）Isobe,T.,et al （1984）J.Neurochem.43:1494－1496
3）磯辺俊明,et al （1984）蛋白質核酸酵素 29:1085－1100
4）福岡高宏,et al （1985）神経化学 24:238－240
5）Hawkes,R.,et al （1982）Anal.Biochem 119:142－147
6）Moore,B.W.,（1965）Biochem.Biophys.Commun 19:739－745
7）Takahashi,K.,et al （1984）Virchows Arch.(Cell Pathol.) 4:385－396
8）Vanstapel,M－J.,et al （1986）Am.J.Clin.Pathol.85:160－168

21. sialylcholesterolによるグリア芽細胞の増殖抑制と分化促進

加藤泰治・伊藤仁一・田中　亮・野路久仁子・鈴木康夫*
平林義夫*・松本　亮*
（名古屋市大・医・生化第一，静岡薬大・生化*）

〔要　約〕

合成sialylcholesterol（１１９－３、１１９－４）を培養グリア芽細胞に加えると、２時間以内に形態的分化が認められ、偏平な石垣状のグリア芽細胞から伸張したグリア突起を持つアストロサイト様形態に変化した。分化形態はグリア細胞成長因子（ＧＭＦ）による形態変化に酷似したが、刺激後２時間で始まる形態変化の速さはdibutyrylcAMPの作用に近似した。一方、ＤＮＡ合成に対してsialylcholesterolは低濃度（２μg／ml以下）ではわずかなＤＮＡ合成促進作用を示すが、高濃度（５μg／ml以上）では抑制効果を示した。また、ＤＮＡ合成抑制作用の発現には３時間以上の継続的刺激を必要とした。グリア芽細胞のＲＮＡ合成、タンパク合成もsialylcholesterolにより濃度依存的に抑制された。以上の結果よりsialylcholesterolは、ＧＭＦとは異なった作用機構でグリア芽細胞の形態的分化を促進することが明らかとなり、今後グリア細胞の増殖・分化機構解明にとって有用な物質であることが判った。

Key word： sialylcholesterol, glioblast, differentiation

糖脂質が神経性細胞やグリア性細胞の増殖・分化を制御するという知見は、最近急速に集積しつつある。[1,2,3]特にシアル酸を結合した酸性糖脂質（ＧＭ，ＧＱ，ＧＤガングリオシド）は、脳組織に存在しその生理的機能面で興味ある物質である。今回は、シアル酸を結合した合成sialylcholesterolを用い、グリア芽細胞の増殖・分化に与える影響を検討した。

実験方法

１、グリア芽細胞の培養：在胎１７日目のラット胎児の大脳を２０％ＦＣＳ／Ｆ－１０培地で初代培養した。さらに１０％ＮＢＳ／Ｆ－１０培地で一週間二次培養を行い実験に供した。[4]

２、グリア芽細胞のＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク合成測定：培養グリアが細胞の培地を２％ＮＢＳ／Ｆ－１０培地で交換した。２４時間培養後、各薬剤で刺激し、同時に^{3}Ｈ－チミジン（ＤＮＡ合成測定）、^{3}Ｈ－ウリジン（ＲＮＡ合成測定）あるいは^{14}Ｃ－ロイシン（タンパク合成測定）を添加し続けて２４時間培養後harvestを行った。

３、薬剤調整法：二種のsialylcholesterol（１１９－３、１１９－４）は水溶性で、１mg/mlの濃度で実験に使用した。

結果および考察

sialylcholesterol（１１９－３、１１９－４）で刺激されたグリア芽細胞の２４時間後の形態分化をＦig．１で示した。グリア芽細胞は１１９－３、１１９－４（２０μg／ml）により共に刺激後２時間以内に形態変化が始まり、グリア細胞成長因子（ＧＭＦ）で刺激された時と同様に偏平な石垣状のグリア芽細胞が収縮した細胞体と伸張

したグリア突起を持つアストロサイト様形態に変化した。１１９－３、１１９－４で誘導されたグリア芽細胞の形態変化は、ＧＭＦで誘導されたそれに酷似したものであったが、刺激後２時間から始まる形態変化の速さはdibutyryl cAMP（ｄＢｃＡＭＰ）のそれに近似した（ＧＭＦは刺激後３０時間以後に形態分化を誘導する）。次にsialylcholesterolのグリア芽細胞ＤＮＡ合成に対する効果は、Ｆig.２に示すように、１１９－３、１１９－４は共に低濃度（２μg／ml以下）ではわずかなＤＮＡ合成促進効果を示すが、高濃度（５μg／ml以上）ではＤＮＡ合成抑制効果を示し、１７．８μg／mlの１１９－３、１４．５μg／mlの１１９－４によりＤＮＡ合成は、1/2に抑制された。また１０μg/ml以上の濃度で４８時間以上のsialylcholesterol刺激によりグリア芽細胞の増殖は著しく抑制された。一方、ＲＮＡ合成とタンパク合成に対するsialylcholesterolの効果をＦig．３に示した。Ｆig．３上図に示したようにＲＮＡ合成に対しては、１１９－３、１１９－４共に１０μg／ml以上の濃度でＲＮＡ合成を抑制した。またＦig．３下図で示したようにタンパク合成に対してはＤＮＡ合成に対する作用と同様に１０μg／mlの濃度で抑制効果を示した。ＧＭＦにより誘導される形態分化は、グリア芽細胞内タンパク合成が抑制されると阻害されることを別に示したが、[5] sialylcholesterolで誘導される形態変化は常にタンパク合成阻害を伴っており、ＧＭＦの場合とは異なる作用機序で形態的分化が発現することが示唆された。一方、ｄＢｃＡＭＰで誘導される形態分化は、ピューロマイシンによるタンパク合成阻害で影響を受けないことからsialylcholesterolはｃＡＭＰを介して形態分化を誘導する可能性も示された。

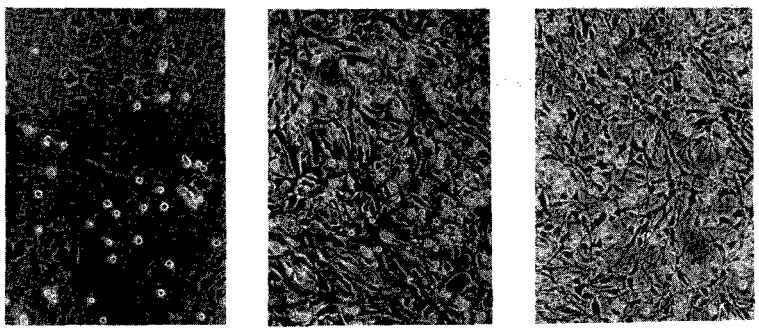


Fig. 1 SIALYLCHOLESTEROL-INDUCED GLIAL MORPHOLOGICAL DIFFERENTIATION

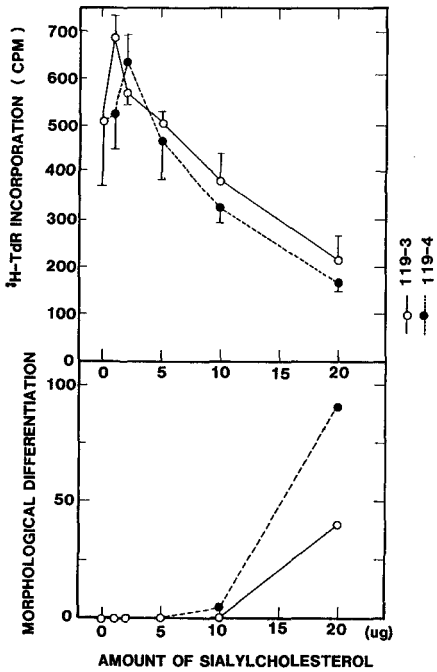


Fig. 2 EFFECTS OF SIALYLCHOLESTEROL ON DNA SYNTHESIS AND MORPHOLOGICAL CHANGE

次にグリア芽細胞のＤＮＡ合成抑制の発現に必要な１１９－４との接触時間を調べた（Ｆｉｇ．４）。２％ＮＢＳ／Ｆ－１０で培地交換したグリア芽細胞を、１１９－４で刺激し１－１２時間までの異なる時間で、インキュベートした。各インキュベーションの最後の１時間のみ^{3}Ｈ－チミジンでパルスラベルした（Ｆｉｇ.４）。１１９－４によるＤＮＡ合成抑制作用発現には、３時間以上の継続的刺激によって誘導される形態分化が、ＤＮＡ合成抑制の発現よりわずかに早く進行し、また形態変化を誘導するsialylcholesterol濃度でＤＮＡ合成が抑制されることを示した。

現在sialylcholesterolによるグリア芽細胞の生化学的分化について検討中である。

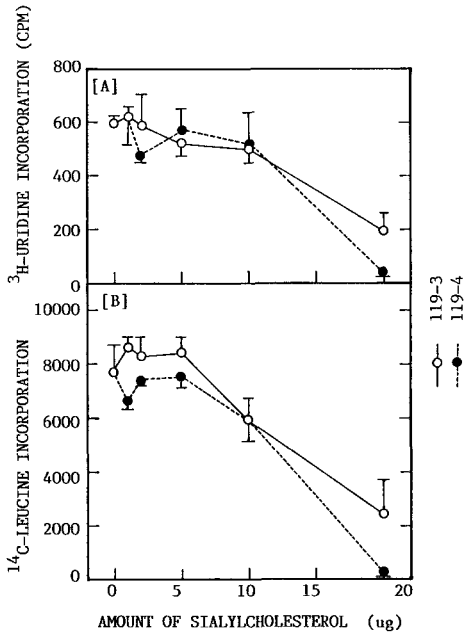


Fig. 3 EFFECTS OF SIALYLCHOLESTEROL ON RNA AND PROTEIN SYNTHESES OF GLIOBLASTS

[A], RNA SYNTHESIS; [B], PROTEIN SYNTHESIS;

REFERENCES

1. Dimpfel et al: in"Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development, and Repair", ed by M.M. Rapport and A. Gorio, Raven Press, New York, 1981, p171.
2. Toffano, G. et al.: Brain Res. 261, 163 (1983)
3. Tsuji, S. et al.: J. Biochem. 94, 303 (1983)
4. Kato, T. et al.: Biochim Biophys Acta, 579, 216(1979)
5. Tanaka, R. et al: Bull. Jap. Neurochem. (1986) in press.

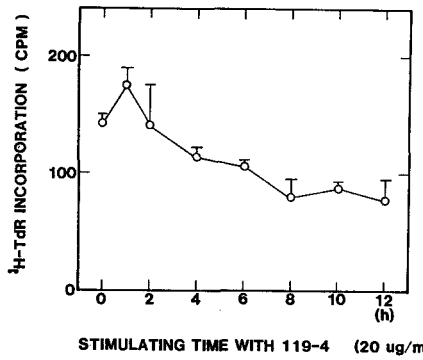


Fig. 4 INCUBATION TIME WITH 119-4 TO INHIBIT DNA SYNTHESIS IN GLIOBLASTS

22. 培養グリオーマ細胞に及ぼすプロテインキナーゼC阻害剤（H-7）の影響

本田千穂・田渕和雄・大本堯史

（香川医科大・脳神経外科）

〔要　約〕

プロテインキナーゼC（Cキナーゼ）は，細胞内の情報伝達系に重要な役割をはたしていることが明らかとなり，細胞増殖や，発癌との関係も注目されるようになった。今回我々は，グリオーマ細胞におけるCキナーゼの働きを解明する試みの一つとして，Cキナーゼの特異的阻害剤であるH-7の培養グリオーマ細胞に対する影響を検討した。ヒトおよびラット由来のグリオーマ細胞株を用い，増殖曲線の変化並びにコロニー形成法により，H-7の増殖抑制および殺細胞効果を判定した。一方，flow cytometryによりDNA合成に及ぼす影響を検討するとともに，細胞の形態変化を光顕並びに電顕で観察した。プロテインキナーゼC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みられたが，1回投与でも連日投与でも効果に著明な差はなかった。一方，殺細胞効果は，40μM，24時間処置でも全く認められなかった。DNA histogramでは，一過性にS期進行の遅延，特にG_0+G_1－S境界部への集積傾向がみられたが，この効果は可逆的であった。細胞の形態変化としては，胞体内に濃染顆粒を有する細胞の出現が認められた。これらの結果から，Cキナーゼはグリオーマ細胞の増殖にも重要な役割を果たしているものと考えられ，今後各種growth factorとの関連も含めてさらに詳細な検討が必要と思われる。

Key word：protein kinase C, glioma cells, growth inhibition

（はじめに）

プロテインキナーゼC（Cキナーゼ）は，1977年，西塚らによって発見されたが(4)，その後，この酵素が細胞内情報伝達系に重要な役割を果たしていると考えられるようになり，細胞機能におけるCキナーゼの役割が次第に解明されつつある。Cキナーゼの働きをとらえるのに最も有効な方法は，Cキナーゼを特異的に活性化または阻害するような薬剤を用いることと考えられる。これまでは，発癌プロモーターの一つである12-O-tetradecanoyl phorbor-13-acetate（TPA）が，Cキナーゼ活性化物質として用いられることが多かったが，TPAの作用は必ずしもCキナーゼに特異的ではなく，また非可逆的な変化を起す可能性があるなど，多くの問題があった。最近，日高らによって合成されたCキナーゼ阻害剤H-7（1-（5-isoquinolinylsufonuyl）-2-methylpiperazine）(3)は，これまでの阻害剤に比べて特異性が高く，今後Cキナーゼの細胞機能解明のために重要な役割をはたすであろうと期待されている。今回我々は，このH-7の培養グリオーマ細胞に及ぼす影響を，細胞増殖，DNA合成，および形態変化の観点から検討し，興味ある結果を得たので報告する。

（材料および方法）

使用した細胞株は，ラットグリオーマC6(1)，ヒトグリオーマ由来のKC(7)，および我々がヒトglioblastoma症例より確立し，継代維持しているKY細胞の3種である。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を用いて，37℃，5％炭酸ガス中で静置培養を行った。H-7（生化学工業）は，蒸留水に溶解し，使用直前に培養液中に加えて，ミリポアフィルターで滅菌して用いた。まず，H-7の細胞増殖に及ぼす影響を検討した。2.5×10^4の細胞をシャ

ーレに接種し，24時間後にH−7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。また，H−7を含む培養液を毎日交換した場合の増殖曲線も作成した。次にコロニー形成法により，H−7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，H−7を含む培養液に交換し，24時間培養した後コロニー形成能をみた。生細胞率は，コントロールとH−7処置細胞のコロニー形成数の比から求めた。また，H−7の細胞周期に及ぼす影響を調べるため，H−7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の染色には，Etidium bromideを用い，G_0+G_1, S, G_2+M，各期の細胞の全細胞数に対する割合は，Fried (2)の式によるコンピューター処理によって算出した。さらに，H−7処置後の細胞の形態変化を，位相差光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した。

（結果）

増殖曲線の変化をみると（Fig. 1），H−7は各細胞株に対し，濃度依存性に増殖抑制効果を示し，今回検索した細胞株の中では，ラットC6細胞に対する増殖抑制効果が最も著明であった。しかし，H−7の増殖抑制効果は可逆的で，24時間以降には再びほぼ対数増殖が認められた。そこで，24時間ごとに新たにH−7を添加した培養液に交換して増殖抑制効果をみたが，増殖曲線はH−7 1回投与の場合と変化なく，40μM連日投与でも完全な増殖停止には至らなかった。一方，コロニー形成法による殺細胞効果の検討では，各細胞株とも，H−7, 40μM, 24時間作用後も，生細胞率の低下は全く認められなかった。次に，H−7の細胞周期に及ぼす影響について，G_0+G_1, S, G_2+M，各期の細胞の全細胞数に対する割合の変化を経時的にみると（Fig. 2），H−7作用後12時間でS期細胞の割合の増加がみられ，次いで，S期細胞の減少，G_2+M期細胞の増加を経て，48時間後にはコントロールパターンへの回復傾向がみられた。実際のDNA histogramをみると（Fig. 3），作用12時間後には主としてG_0+G_1-S移行部からearly S期への細胞集積がみられ，18時間後にはS期全体，24時間後にはG_2+M期への集積が認められた。細胞の形態変化は，低濃度では明らかでなかった

Fig. 1 Growth Curve

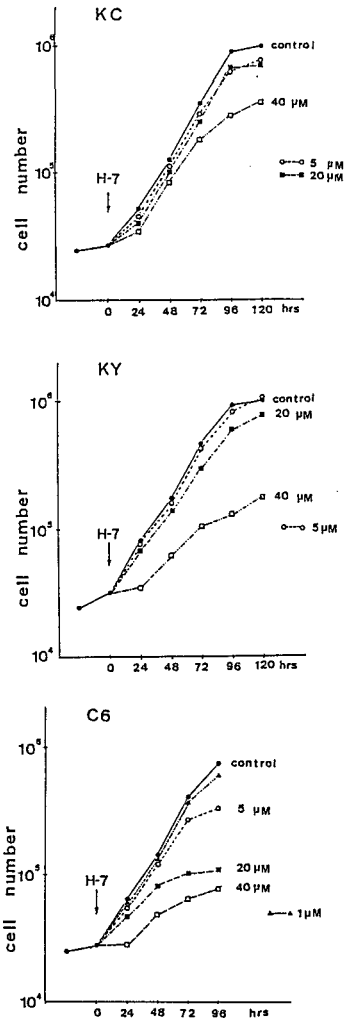
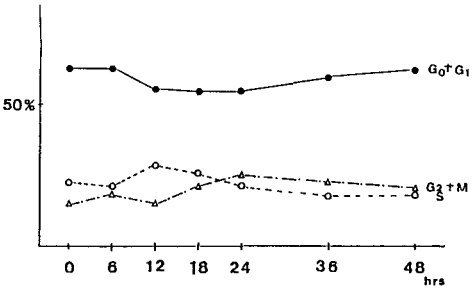


Fig. 2 Chronological change of DNA histogram of KC cells treated with H-7 (20μM)

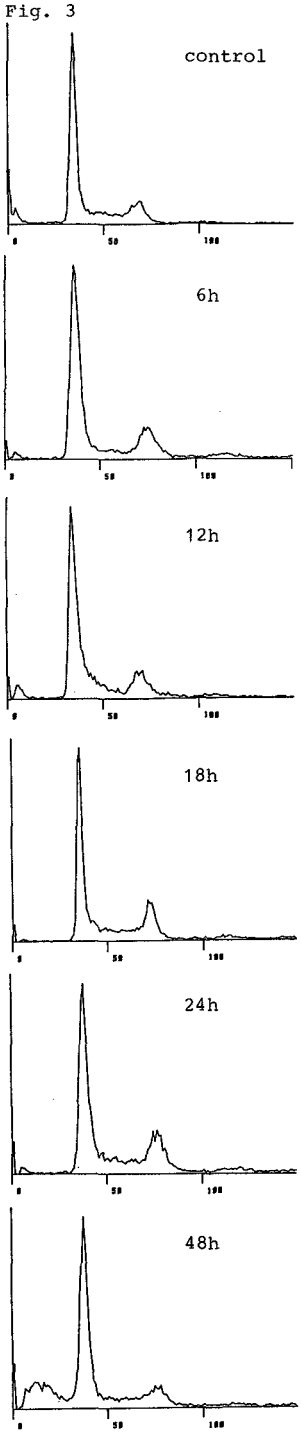


が，40μM，24時間処置では，細胞質内に濃染顆粒を有す，球形細胞の出現がみられた。

（考察）

西塚らが指摘するように(9)，Cキナーゼの作用は数秒あるいは数分以内に完了する短時間の反応であり，細胞増殖のような時間を要する応答に対するCキナーゼの役割の判定は容易でない。今回，Cキナーゼ阻害剤H-7により，殺細胞効果は認められないが，少なくとも24時間以内には増殖抑制効果が認められたことより，グリオーマ細胞の増殖において，Cキナーゼは何等かのpositiveな作用を発揮しているものと考えられる。DNA histogramの変化の経時的観察からは，H-7は細胞のG_0+G_1期からS期への移行阻害，またS期進行の遅延作用を有するものと推察され，これは，CキナーゼがDNA合成の開始およびその進行に重要な役割をはたしていることを示唆する所見と思われる。しかし，H-7の増殖抑制作用は可逆的で，繰返し投与しても効果の増強がみられなかったことなど，今後，各種growth factorによる増殖誘導系との関連も含めて，さらに詳細な検討が必要であろう。また，アクチンなどの細胞骨格系蛋白がCキナーゼによりリン酸化されることが知られており(5, 6, 8)，今回H-7によってもたらされた細胞の形態変化とこれらとの関係も，今後解明すべき問題と考える。

Fig. 3



（文献）

(1) Benda, P. et al (1968) Science 161:370−371
(2) Fried, J. et al (1979) Comput. Prog. Biomed. 10:218−230
(3) Hidaka, H. et al (1984) Biochemistry 23:5036−5041
(4) Inoue, M. et al (1977) J. Biol. Chem. 252:7610−7616
(5) Kawamoto, S. et al (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 118: 736−742
(6) Naka, M. et al (1983) Nature 306:490−492
(7) Ponten, M. et al (1968) Acta Path. Microbiol. Scandinav. 74: 465−468
(8) Werth, D. K. et al (1983) J. Biol. Chem. 258:11423−11426
(9) 吉川潮 et al (1986) 癌と化学療法 13:861−869

23. 脳損傷後の反応性アストロサイトの増殖と細胞骨格蛋白の免疫組織化学的検討

高宮至昭・高坂新一*・大谷光弘・戸谷重雄・塚田裕三*
（慶応大・医・生理*，脳神経外科）

〔要　約〕

脳に損傷が加わると，周辺にGlial Fibrillary Acidic Protein（GFAP）陽性の反応性アストロサイトが著しく数を増す。これらの増殖と細胞骨格蛋白の経時的変化を明らかにすることを目的とし，免疫組織化学的に検討を加えた。損傷後GFAP陽性細胞は2日目より増加し，3日目には同側半球全体に認められた。細胞分裂とGFAPの出現との関連性を検討するためS期細胞を^{3}H-Thymidine（^{3}H-Thd）またはBromodeoxyuridine（BrdU）によってラベルした。^{3}H-Thdあるいは BrdUを取込んだS期細胞はGFAP同様，同側半球全体に認められたが^{3}H-ThdおよびGFAPでラベルされた細胞は大脳皮質分子層と創周辺の白質にのみ認められ，皮質第Ⅱ－Ⅵ層にはほとんどみられなかった。この前者の領域のアストロサイトのみ一過性にVimentin陽性となった。Vincristineを投与し細胞分裂を抑制したラットでは，分裂中期で停止した細胞が，皮質分子層，創周辺の白質に認められたが，皮質第Ⅱ－Ⅵ層には正常形態のアストロサイトがみられた。以上の結果より，皮質分子層，創周辺白質の反応性アストロサイトは損傷後分裂しVimentinを一時的に発現した後GFAP陽性となり，皮質第Ⅱ－Ⅵ層の反応性アストロサイトは細胞分裂することなく，GFAP陽性となるものと思われた。

Key word：Reactive Astrocyte，GFAP，Vimentin.

脳に損傷が加わると周辺にアストロサイトが著しく数を増すことは古くから知られており，[1,5] 反応性アストロサイトと呼ばれているが，この細胞のoriginや増殖機序に関しては議論が多く，一定の見解がない。近年の^{3}H-Thymidine（^{3}H-Thd）オートラジオグラフィーを用いた研究の結果，反応性アストロサイトが細胞分裂により増殖することが確かめられてきた。[3,4] しかしすべての反応性アストロサイトが細胞分裂によりその数を増すのかは未だ明らかではない。また幼若期のアストロサイトに存在するVimentinが，創周辺のアストロサイトに認められること[2,9,10]より反応性アストロサイトの細胞骨格蛋白の変化も注目されている。今回我々は，反応性アストロサイトの増殖過程および細胞骨格蛋白の経時的変化を明らかにすることを目的とし，免疫組織化学的に検討を加えた。

〔実験方法〕

実験には4週齢のWistar系雄ラットを用いた。

1）ラットをエーテル，ケタミン麻酔後，定位脳手術用固定装置に固定した。皮膚を正中切開後，歯科用ドリルで正中より2㎜右方，冠状縫合から4㎜長の骨窓をあけ，22ゲージ注射針を脳表より2.5㎜刺入し，骨窓に沿って縦に脳を切断した。動物は1，2，3，4，5，7，10，14日後に経時的にsacrificeし，エタノールまたはホルマリンで経心的に灌流固定後パラフィンにて包埋し，4 μmの切片を作成した。免疫組織化学的検索にはGlial Fibrillary Acidic Protein（GFAP）（DAKO社），Vimentin（TRI社），S-100（DAKO社）抗血清を用いてABC法にて染色を行った。

2）細胞分裂の有無，分裂細胞の分布をみるため，Bromodeoxyuridine（BrdU）（20 mg／

kg）をsacrificeする2時間前に静注した。動物はエタノールにて灌流固定しパラフィン切片を作成した。免疫組織化学染色は長島らの方法[8]に従い，抗BrdU モノクローナル抗体（Becton社）を用いてＡＢＣ法にて行った。また細胞分裂に伴う細胞骨格蛋白の変化をみるため，BrdUとＧＦＡＰあるいはVimentinとの二重染色を行った。

3）細胞分裂後のＧＦＡＰ発現を検索するため，損傷3日後に^{3}H-Thd（1μCi／gm）を静注した。6，24，48時間後に動物をsacrificeし，同様に切片を作成し，ＧＦＡＰの免疫組織化学染色を行った。発色後切片をエマルジョンオートラジオグラフィーに供した。

4）細胞分裂を抑える目的で，Vincristine（ＶＣＲ）0.1mg／kg／dayを脳損傷前日より連日投与し，4日後にsacrificeした。

〔結果及び考察〕

脳損傷後の反応性アストロサイトの出現をＧＦＡＰ抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。ＧＦＡＰ陽性の反応性アストロサイトは損傷2日後より損傷部位に近接して出現し，3日後には同側半球に広範に認められた[11]。これらのＧＦＡＰ陽性アストロサイトのすべてが，分裂増殖したことにより数を増したのかを検討するため，まずBrdU染色を行ないＳ期にある細胞の局在と経時的変化を検討した。アストロサイトの局在はFig.1aに示した如く4つに分けて検討した。すなわち，1.損傷近接部，2.大脳皮質分子層，3.大脳皮質第Ⅱ層から第Ⅵ層，4.白質部に分類した。BrdU陽性細胞は1日後より損傷近接部位に出現しはじめ，ＧＦＡＰ同様同側半球全体に広がり，いずれの部位でも3日目にピークとなった（Fig.1b）。次にこの分裂がピークに達する3日目に^{3}H-Thdを投与し，経時的に動物をsacrificeし^{3}H-ThdとＧＦＡＰとの二重染色を行なったところ，Fig.2の如く両者が一致した細胞が認められた。^{3}H-ThdとＧＦＡＰで二重にラベルされた細胞の比率（Labeling Index（ＬＩ））を部位別に検討した結果，^{3}H-Thd注射6時間後にsacrificeした場合，創周辺，皮質分子層およ

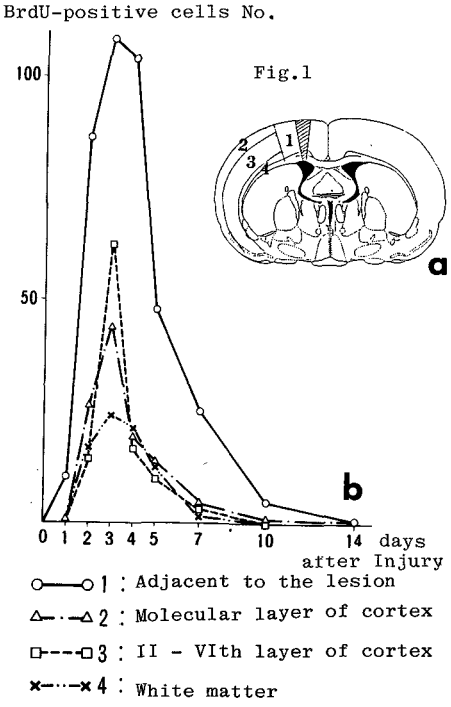


Fig.1

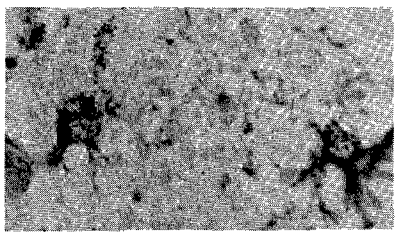
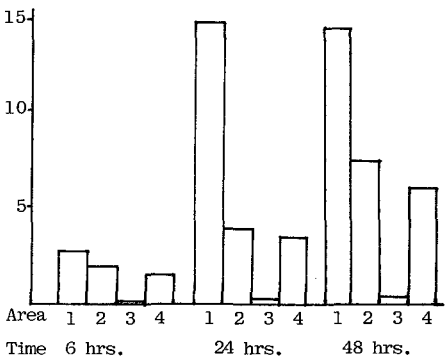
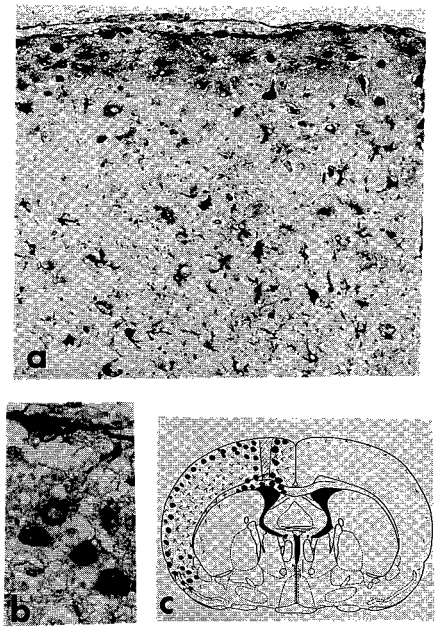

Fig.2 Doublly labeled cells with ^{3}H-Thd and GFAP

Fig.3



び白質ではそれぞれ2.9，1.9，1.5％であったが，皮質第Ⅱ－Ⅵ層では0.2％と明らかに低値を示した。24時間後ではその差がさらに著明となり，創周辺，皮質分子層および白質の15.0，3.6，3.2％に対し，皮質第Ⅱ－Ⅵ層では0.5％であった（Fig.3）。このことから皮質分子層と創周辺の白質のアストロサイトのみが損傷に反応して分裂増殖するものと考えられた。さらに細胞分裂をVCRで抑制すると，分裂途中で停止した円形の細胞が皮質分子層と創周辺の白質に認められたが（Fig.4a,b），皮質第Ⅱ－Ⅵ層ではこの様な細胞は見られず，正常な形態を有した反応性アストロサイトが認められた（Fig.4a,c）。この結果は^{3}H-Thd投与実験から得られた，分裂増殖するアストロサイトの局在をさらに支持するものと思われた。

Fig.4



次に，グリア細胞の主要な細胞骨格蛋白であり，幼若期のアストロサイトに存在し，成熟に伴い消失するVimentinが，反応性アストロサイトに発現するかを免疫組織化学的に検討した。Vimentin陽性細胞は2日目から10日目まで一過性に認められ，その分布は皮質分子層と創周辺の白質に限局していた。これは上記の分裂増殖するアストロサイトの分布と一致した。以上より反応性アストロサイトには分裂増殖し，Vimentinを一時的に発現しGFAP陽性になるものと，分裂することなくGFAP陽性になるものの2種類が存在することが明らかとなった。近年脳内には2種類のアストロサイト（Fibrous Astrocyte（FA）とProtoplasmic Astrocyte（PA））が存在すると言われ，その局在，生化学的性質，また細胞骨格蛋白の構成においても異なるとされている。[6,7] FAは大脳皮質分子層と白質に，PAは皮質第Ⅱ－Ⅵ層に局在しているとする報告[6]を考えると，脳損傷後FAが分裂し，Vimentinを一過性に発現しGFAP陽性となり，GFAP陰性のPAは細胞分裂を経ず，GFAP陽性となることが示唆された。

〔文献〕

1．Cavanagh, J.B.(1970) J.Anat. 106, 471-487．　2．Fedoroff, S. et al.(1983) Develop. Brain Research 7, 303-315．　3．生田房弘・他(1983) 神経進歩 27, 839-856．　4．Ludwin, S.K.(1985) Lab. Invest. 52, 20-30．　5．Mathewson, A.J. and Berry, M.(1985) Brain Research 327, 61-69．　6．Miller, R.H. et al.(1984) J.Neurosci. 4, 585-592．　7．Miller, R.H. et al.(1986) J.Neurosci. 6, 22-29．　8．Nagashima, T. et al.(1985) Acta Neuropathol. 66:12-17．　9．Pixley, S.R. and Vellis, J.(1984) Develop. Brain Research 15, 201-209．　10．Schiffer, D. et al.(1986) Brain Research 374, 110-118．　11．Takamiya, Y. et al.(1986) Brain Research (in press)．

24. ラット脳ミトコンドリアと肝ミトコンドリアの比較：加令，アルコール，ヒドラジンの影響

都築紀宏・足立香代*・若林　隆*
（名古屋市大・医・生化第一，名古屋大・医・解剖第三*）

〔要　約〕

1. ラット脳神経終末におけるCa^{2+}濃度調節機構を研究する一端として、シナプトソーム内ミトコンドリア（S.mit）の呼吸能、チトクローム（cyt.）含量，Ca^{2+}取込み能などを肝ミトコンドリア（L.mit）の場合と比較しながら検討した。

2. L.mitでは加令に伴なうcyt.aa_3，cyt.b含量の減少が見られた（3月後40～50％減）。又、1－3月間のエタノール投与（飲料水中32％）はcyt.aa_3，cyt.bの著しい減少をもたらした（各令対照に比べて～60％減）。これに起因する呼吸量（O_2消費）の低下も見られた。

3. S.mitのcyt.含量はL.mitと較べて2倍程高く（0.48 vs 0.25 nmol／mg prot）、2才ラットでも加令及びエタノール投与に伴なうcyt.の減少はほとんど見られなかった。逆にブタノール、プロパノール投与はcyt.b，cyt.cc_1の増量（～5％）をもたらした。

4. ヒドラジン投与後（粉末飼料中1％，3－7日間）のL.mit，S.mitではcyt.含量の減少はほとんど起らなかったがS.mitでもADP／O ratioの低下，Ca^{2+}取込み能の低下が見られた。ヒドラジンはmit.膜脂質組成の変化をもたらす可能性が示唆された。

5. S.mitは50 mM KCl，1 mM Ca^{2+}存在下ではATPを合成していない可能性が示唆された。

Key word：　rat　brain　mitochondria，　cytochrome　contents，　effect of ethanol.

Ca^{2+}は神経伝達物質放出のtriggerである。神経終末内に流入したCa^{2+}は直ちに除去されると考えられ、この除去機構にはNa^+/Ca^{2+}交換反応やCa^{2+}－ATPaseによる細胞外への放出、ミクロソーム、ミトコンドリアなどのオルガネラ内への取込みなどが挙げられている。特にミトコンドリアへのCa^{2+}の取込みはNa^+によって阻害され、その呼吸はK^+によって高められる事が知られている。この事は神経終末脱分極時に見られるイオンの出入りと、終末内ミトコンドリアの機能が同調しているかの様に思われ興味深い。

一方、ラットなどの実験動物にエタノールを長期間投与すると肝ミトコンドリアのチトクロム含量（特にcyt.aa_3，b）が著しく減少し呼吸量の低下が起る事が報告されている（**1**）。これは多分、エタノールがミトコンドリアDNAを基とするタン白質合成を阻害する結果と言われているが、詳細は現在明らかではない。又、ミトコンドリアの形態は種々の薬物によって変化し、その機能にも差異が見られる事が報告されている（**4**，**7**）。これらの研究は肝ミトコンドリアが主で、脳の（特に神経終末中の）ミトコンドリアに関しては充分なされていない。今回肝ミトコンドリアと比較しながら脳ミトコンドリアの研究を始めたので現在までの結果を報告します。

実験材料と方法

実験動物：4週令から2才までのWistar系雄ラットを用いた。薬物投与：アルコールは飲料水に混ぜ（32％）、固形薬物は粉末飼料に加え（1％）4週令から投与した。ミトコンドリアの調製：断頭後、肝及び脳を摘出し220 mM mannitol，70mM sucrose，2 mM Hepes pH 7.4，0.1 mM EDTA，0.05％ BSA（fatty acid free）を含むmedium中でテフロン－ガラスhomoge－

nizerを用いてhomogenizeした。肝ミトコンドリア（L.mit）は700－7000g（10min）間の遠沈分画を同medium中で2度遠心洗浄し用いた。脳ミトコンドリア（S.mit）は800－8000g（15min）間のP_2分画（freeとシナプトソーム中に含まれるmitの混合）とOzawaら（3）の方法で得たfree mit含量の多い標品を用いた。チトクローム含量：日立2波長分光々度計を用いて測定した。cyt.aa_3，還元型ΔE（605－630nm）－同酸化型ΔE：cyt.b，還元型ΔE（562-575nm）－同酸化型ΔE：cyt.cc_1，還元型ΔE（550－540nm）－同酸化型ΔE．mM吸光係数は夫々13.1，23，19を用いた（2）。O_2消費量：クラーク型O_2電極を用いて30度で測定した。1.6mℓ反応液（220mM mannitol，70mM sucrose，50mM Tris－HCl pH 7.4，0.1mM EDTA，0.05％BSA）は5mM呼吸基質及び2～3 mg mitタン白を含む。Ca^{2+}の取込み：^{45}Caを用いて29度で測定（5）。低温スペクトル：Cary15分光々度計を用いて液体窒素温度近くで測定した（6）。

実験結果

肝ミトコンドリアの場合：表IにはL.mitに見られるcyt.含量の変化が示してある。対照4週令ラットにおいても1週、3月と加令するに伴なってcyt.aa_3，b，cc_1の減少が見られる。エタノール投与群では対照と比べて1週後に既にcyt.aa_3，bの減少が見られ、3月後では40％近くまで減少しているがcyt.cc_1は逆に増量の傾向が起っている。2年後のaa_3－対照値は3月後の値とほぼ等しかったが、投与群では更に半減していた（0.154及び0.02 nmol／mg prot）。図1はL.mitの低温スペクトルであるが、これからも600nmのピーク（aa_3 α帯）の減少と550nm，520nmピーク（cc_1のα，β帯）の増大が確認できる。図2はsuccinateを基質にした時のstate 3，state 4のO_2消費量である。表Iで述べた様に対照ラットでも加令に伴なうcyt.aa_3，bの減少が見られるが、O_2消費に関してはほとんど変化は認められなかった。又、エタノール投与1週後、既にcyt.aa_3，bの減少が起るにもかかわらず、O_2消費量は対照とcomparableであった。しかし、1月、3月後には呼吸量の著しい低下が見られた。Ascorbateを基質にして測定したcyt.oxidase活性は1月投与後に50％に低下していた。呼吸調節能には3月投与後でも、有意な変化は見られなかった。脳ミトコンドリアの場合：表IIにS.mitのチトクローム含量を示す。S.mitではL.mitと比べて一般に高いcyt.含量を示し、加令に伴なうcyt.aa_3，bの減少は見られなかった。アルコール（エタノール，ブタノール，プロパノール）を長期間投与した場合もL.mitで見られた様なcyt.含量の低下は起らなかった。図3に示す様にsuccinateを基質にした場合のO_2消費量、呼吸調節能に関して加令に伴なう

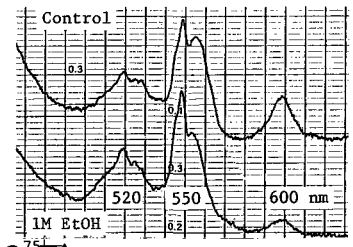
表I Contents of cytochromes in L. mit.

Control (nmol/mg prot.)

Age	aa_3	b	cc_1
1W (7)	0.264	0.212	0.372
1M (3)	0.199	0.184	0.347
3M (3)	0.145	0.135	0.280
Ethanol-fed			
1W (4)	0.158	0.148	0.317
1M (6)	0.052	0.087	0.351
3M (3)	0.056	0.064	0.341

* W,week; M,month; Age, after 4Ws.

図1 低温スペクトル



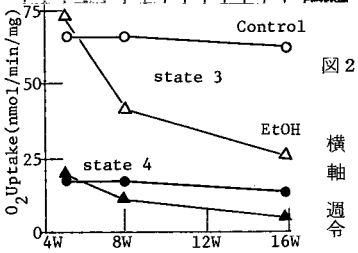


図2

表II Contents of cytochromes in S. mit.

Control

Age	aa_3	b	cc_1
4W	0.470	0.260	0.481
3M	0.485	0.326	0.529
5M	0.502	0.344	0.513
1.5Y	0.431	0.256	0.450
2Y	0.486	0.358	0.490
Alcohol-fed			
1OMProp.	0.560	0.364	0.501
1.5YEtOH	0.468	0.317	0.540
2YButOH	0.465	0.410	0.541

明らかな変化は見られないし、ascorbate を基質にした際の cyt. oxidase 活性も低下していない。この結果より推測すると、エタノールはこれらの機能に影響していないと思われる。L. mitではほとんど見られないが、3 mM Mg^{2+} は S. mit の呼吸調節能を著しく悪化した。50 mM KCl は state 4 の O_2 消費量を 1.6～1.8 倍増大し、呼吸調節能の低下をもたらし、0.5 mM Ca^{2+} はこれを完全に阻害した。 ヒドラジン (NH_2NH_2) の影響：4週令より3日間投与しても S. mit cyt. 含量に明らかな減少は見られなかった。又、succinate を基質とした際、呼吸調節能に差異は見られなかったが ADP／O 比は低下する傾向を示した (1.85⟶1.59)。図4には Ca^{2+} 取込み能が示してあるが、ヒドラジン投与による取込阻害が見られる。しかし、上述の様に cyt. 含量，O_2 消費に低下が認められないので Ca^{2+} 取込みの低下はこれら以外の原因によるのかも知れない。表III にヒドラジン投与後に見られた L. mit 膜脂質及び脂肪酸の変化を示す。一般に3日後に大きく変化し、7日後には対照値に近づく傾向が見られる。リン脂質では PS（酸性リン脂質）及び PE の増大が著しい。脂肪酸ではリノール酸 (18：2) の増量が目立ち、全体的に不飽和脂肪酸の比率が大きくなっていた。

図3

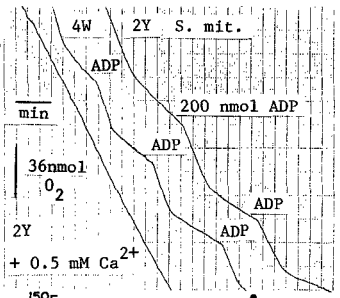
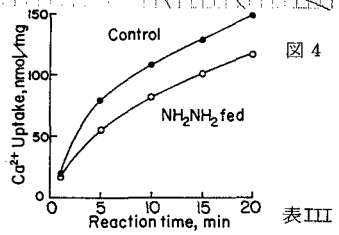


図4



表III

Phospholipids (%) in NH_2NH_2-L. mit.

	Control	3days	7days
PC	36.7	29.8	30.4
PE	28.7	36.9	33.4
PI	6.2	6.3	7.0
PS	3.2	7.4	5.5
Fatty acids (%)			
16:0	20.8	11.7	14.7
16:1	1.5	1.1	1.3
18:0	22.3	18.1	24.3
18:1	8.0	10.5	6.0
18:2	16.7	31.8	22.6
20:4	21.6	22.1	22.9

考　察

加令： 実験開始後3月で対照ラットの L. mit 収量は約 65 % 増加したが、mit 数は加令と共に減少するので cyt. aa_3, b の減少を mit 数で補償しているとは考え難い。mit. タン白当りの呼吸量は3月後も変らないので、若い肝では実働していない半数近くの cyt. aa_3 分子を予備としている可能性がある。エタノール投与1週後の呼吸量が対照とほぼ comparable であった事は、この考えを支持している。エタノール： cyt. aa_3, b は mit 内で合成されるタン白なのでエタノールによるこの合成阻害機構は今後解明されねばならない。脳では cyt. 含量が多い点以外は上記の事実は見られなかった。イオンの作用： Mg^{2+}, K^+ は細胞内に多いイオンであるが、3 mM Mg^{2+}, 50 mM KCl は S. mit の呼吸にかなりの影響を与えた (ATP 合成の低下)。又、Ca^{2+} (約0.4 mM) 添加は S. mit の呼吸調節能を5－6分間（測定中）は完全に阻害した。この事実は synaptosomal cytosol 中にかなり長時間 Ca^{2+} が free で存在していて、その間 ATP 合成が起っていない事を示唆している。1－3 mM Ca^{2+} 存在下、56 mM KCl による脱分極はこの分野でよく使われる手法であるので、pure synaptosomes を用いて、これらのイオンと呼吸の関係を解析する予定で居る。

(1) Bernstein, J.D. & Penniall, R., Biochem, Pharmac. 27, 2337-2342 (1978), (2) Jones, D.P., Orrenius, S., & Mason, H.S., Biochim. Biophys. Acta, 576, 17-29 (1979), (3) Ozawa, K., Seta, K., Takeda, H., Ando, K., Handa, H., & Araki, C., J. Biochem. 59, 501-510 (1966), (4) Rubin, E., Beattie, D.S., & Lieber, C.S., Lab. Invest. 23, 620-627 (1970), (5) Tsudzuki, T., J. Biochem. 86, 777-782 (1979), (6) Tsudzuki, T., J. Biochem. 95, 1585-1592 (1984), (7) Wakabayashi, T., Horiuchi, M., Sakaguchi, M., Misawa, K., Onda, H., Iijima, M., & Allmann, D.W., Eur. J. Biochem. 143, 455-465 (1984).

25. シアル酸含有合成化合物による分化誘導

田中　誠・辻　崇一・山下達朗・永井克孝
（東京大・医・第二生化）

〔要　約〕

シアル酸含有合成化合物をいくつか合成し神経芽腫瘍細胞（Neuro 2a）に対する神経突起誘導・伸展作用を調べた。

3-O-α-D-N-acetylneuraminyl-1,2-di-O-tetradecylglycerol，3-O-β-D-N-acetylneuraminyl-1,2-di-O-tetradecylglycerol では神経突起伸展作用に差がみられた。またその合成原料あるSodium N-acetylneuraminate，1,2-di-O-tetradecylglycerol および両者をモル比１：１の混合物ではいずれの場合にも活性は認められなかった。

次に疎水性基部分のみが異っているN-acetylneuraminyl cholrsterolを用いた。この場合にも神経突起生成・伸展活性が認められた、しかしこの場合にも合成原料個々にはそのような活性は認められなかった。

これらの結果から、シアル酸含有合成化合物による神経突起生成・伸展活性においては、シアル酸とある種の疎水性基がα型に結合しているという構造を持つことが重要な意味を持っていることを示唆している。またこれらシアル酸化合物により誘導された細胞分化はcAMP系によって誘導される分化の方向とは異っていると考えられた。

Key word：**neuroblastoma　sialic acid　neuritogenesis**

＜序＞

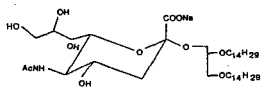
ガングリオシドーシアル酸含有糖脂質ーが神経修復を促進し、また種々の神経系細胞に対して神経突起誘導及び伸展促進作用を持つことは既に知られているが、その実態は必ずしも明かとなってはいない。これらの現象を分子レベルで明らかにすることは神経発生機構のみならず細胞分化を考えていく上でも重要であると考えられる。そこでガングリオシドの生理活性構造の中核を構成していると考えられるシアル酸に着目し、いくつかのシアル酸含有合成化合物を合成し、その生理活性（神経突起を誘導し、その伸展を促進する活性）を培養細胞（マウス神経芽腫瘍細胞Ｃ－１３００由来：Neuro 2a）を用いて検討した。その結果興味ある知見を得たのでここに報告する。なお、合成ガングリオシド化合物による生理活性の検討は本報告が初めてである。

＜方法＞

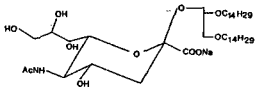
Neuro 2a細胞をプラスチックシャーレ（６０mm）に１～２x１０^{4}となるように播種し、fetal calf serumを１０％含む培養液（Dulbecco's modified eagle medium）で３７℃・５％CO_2下で２日間培養し、その後に被験物質を含む無血清培養液に移し、３７℃・５％CO_2下で培養し一定時間後に顕微鏡写真を撮影し、その写真をもとに個々の細胞の神経突起の長さ・本数を測定した。さらにそれとは別に神経突起を生成した細胞数を求めた。そしてそれぞれを対照群と比較した。なお、神経突起の長さの測定は、KONTRON 社のMOP-Videoplan を用いた。

＜結果・考察＞

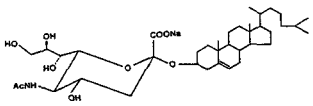
今回我々はシアル酸をその分子内に含む合成化合物によってNeuro 2a細胞がどのよ



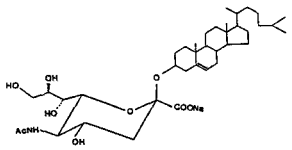
3-O-α-D-N-acetylneuraminyl-1,2-di-O-tetradecylglycerol



3-O-β-D-N-acetylneuraminyl-1,2-di-O-tetradecylglycerol



α-D-N-acetylneuraminyl cholesterol

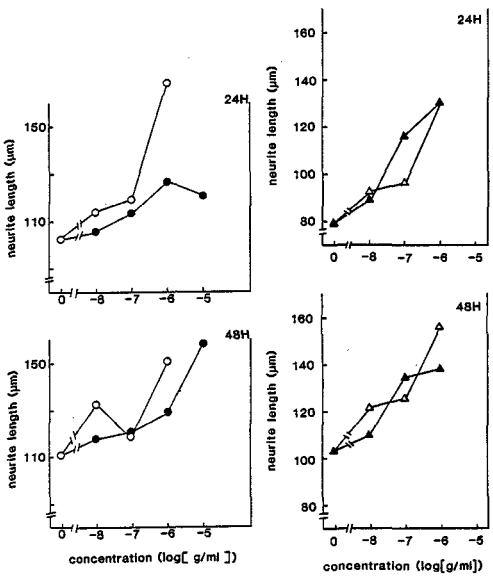


β-D-N-acetylneuraminyl cholesterol

うな形態学的変化を誘導されるのかということに主眼をおき検討を行なった。その結果3-O-α-D-N-acetylneuraminyl-1,2-di-O-tetradecylglycerol（以下α－シアリルグリセロール）では濃度依存的に神経突起の生成・伸展が見られ1ug/ml・24時間培養後の結果では対照群と比較し、その長さは約60%の上昇がみられた。それに対し、シアル酸2位での置換基の配位だけが異なる3-O-β-D-N-acetylneuraminyl-1,2-di-O-tetradecylglycerol（以下β－シアリルグリセロール）は、24時間培養ではほとんど有意な神経突起生成・伸展作用は見られなかった。しかし48時間同じ条件下で培養を続けると、その活性はα－シアリルグリセロールと同等あるいはそれ以上の伸展作用を示した。このことは、この活性の発現にはシアル酸の結合がα配位の方が有利であり、速効的な効果の発現となったのではないかと考えられる。この活性がシアリルグリセロールの特定部位によるものか否かを確認するために、この化合物の合成原料であるSodium N-acetylneuraminate（以下ノイラミン酸ナトリウム）、1,2-di-O-tetradecylglycerol およびこの両者をモル比1：1で混合したものを用いて同様の実験を行なった。結果としては、それぞれ単独で用いた場合もまたモル比1：1の混合物の場合にもそれぞれ神経突起伸展作用は認められなかった。

次にシアル酸の数が多くなるとその活性にいかなる変化が生じるかを検討した。

神経突起生成・伸展作用を持つα－シアリルグリセロールのシアル酸9位にさらにもう一分子のN-acetyl neuraminic acidを結合させた（α2→9）ジシアリルグリセロール、（β2→9）ジシアリルグリセロールを用いた。その結果は、特に活性を増強も減弱もすることなく、α－シアリルグリセロールとほぼ同等の活性を有していた。



○ 3-O-α-D-N-acetylneuraminyl-1,2-di-O-tetradecylglycerol

● 3-O-β-D-N-acetylneuraminyl-1,2-di-O-tetradecylglycerol

△ α-D-N-acetylneuraminyl cholesterol

▲ β-D-N-acetylneuraminyl cholesterol

またこの場合シアル酸同士の配位にα型とβ型があるが、この両者にも顕著な差はなく、二糖となったことによる親水性の増大や糖と糖の結合配位はこの活性にはほとんど影響がないと考えられる。

これらの成績は、シアル酸含有合成化合物による神経突起生成・伸展活性においては、シアル酸とある種の疎水性基がα型に結合しているという構造を持つことが重要な意味を持っていることを示唆している。

またシアリルグリセロールとはシアル酸２位で結合している疎水性基だけが異なるα-D-N-acetylneuraminyl cholesterol （以下α－シアリルコレステロール）、β-D-N-acetylneuraminyl cholesterol （以下β－シアリルコレステロール）では神経突起生成・伸展作用において、比較的低濃度で２４時間培養後に対照群との有意差が認められた。またこの化合物についても活性部位の解明のため合成原料であるノイラミン酸ナトリウムとコレステロール、両者の混合物で行なったが、この場合にも活性は認められなかった。以上のことから、シアル酸と疎水性を有する化合物が単に一緒に存在すればよいのではなく、少なくとも親水性のシアル酸と疎水性基の結合が活性発現には必要であると考えられる。

以上のように、神経突起の長さに関してはシアル酸を含んだ化合物が関与していることは示唆された。しかし今回同時に各細胞が何本の神経突起を伸ばしているかを測定したが、いずれの化合物にも顕著な変化は認められなかった。また突起を伸ばした細胞を形態学的に分類すると、ほとんどの細胞はmonopolar 型あるいはbipolar 型のものでありdbcAMP等を用いたときに見られるmultipolar型の誘導はほとんど見ることができなかった。従って、おそらくcAMP系とは違った方向への分化がシアル酸化合物により誘導されているものと考えられる。

以上形態学的な面から解析を進めてきたが、生化学的ないくつかのパラメーター（例えば TdRの取り込みに与えるこれらの化合物の影響を調べた結果）についての結果も合わせて報告する予定である。

26. GABA 作動性ニューロンの発達について—初代培養大脳皮質神経細胞による解析—

大熊誠太郎・友納昭一・栗山欣弥　(京都府立医科大・薬理)

〔要　約〕

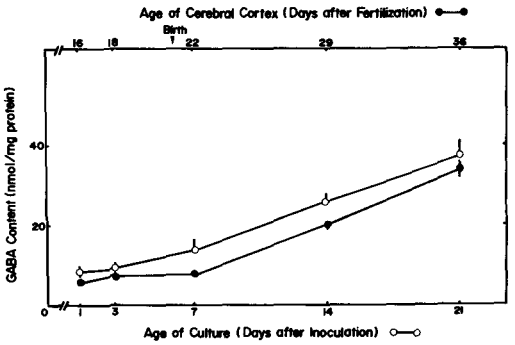
マウスの15日目胎児の大脳皮質より採取した初代培養神経細胞を用い、その発育に伴うGABA代謝及びGABA$_A$とベンゾジアゼピン(BZP)受容体の変化を検討し、併せてin vivo脳の発育に伴う変化と比較した。培養神経細胞の成長に伴い、GABA含量、glutamic acid decarboxylase及びGABA transaminase活性は増加し、これらの変化はin vivo脳の成長に伴う変化とよく一致したものであった。またGABA放出能は高K^+刺激により明らかに増強され、更にその増強の程度は神経細胞の発育に伴いより著明となった。GABA不活性化機構の一つとされるGABA取り込みは、これらの神経細胞においてもNa^+依存性の高親和性取り込み機構により行なわれていることが判明した。[^{3}H]MuscimolのGABA$_A$受容体への結合様式は低親和性及び高親和性結合より成るが、[^{3}H]flunitrazepam (FLN)のBZP受容体への結合は高親和性であり、いずれの場合も細胞の成長に伴い、K_D値に変化なくBmax値の増加のみを示した。また[^{3}H]FLN結合はGABAにより増強された。以上の結果から、初代培養神経細胞がGABA作動性神経細胞としての機能を有することは明らかであり、この細胞系は中枢神経作用薬のGABA作動性神経細胞の機能及びその発達に及ぼす影響を検討するのに適した実験系であると考えられる。

Key word：　GABAergic neurons, development, primary culture

中枢神経系は組織学的には情報伝達機能を有する神経細胞と、神経細胞機能の維持などを司る諸種のグリア細胞及び血液脳関門を形成する血管内皮細胞などにより構成されている。しかも一般的に神経化学的研究などに用いられる脳ホモジネートやシナプトゾームなどの実験材料は、神経細胞のみならず、グリア細胞などの神経細胞以外の細胞成分に由来する細胞下分画が混在していると考えられ、事実、シナプトゾームの蛋白のうち約40%はグリア細胞由来の蛋白であることが報告されている[1]。従って中枢神経作用薬の神経細胞への直接作用を検討する場合には、この様な他の細胞成分の混在しない神経細胞を用いることが必要と考えられる。本研究では、マウス胎児大脳皮質より採取した神経細胞を初代培養し、これらの細胞がγ-aminobutyric acid (GABA) 作動性ニューロンとしての特性を有するかどうか、またその発達過程がage-matchingを行なったin vivoにおける脳の場合とどの様な関係があるかについて、特にGABA代謝関連酵素及びGABA受容体の面から検討した。

〔実験方法〕

初代培養に用いた大脳皮質神経細胞は、STD:ddy系マウスの15日目胎児の新皮質を細切し、trypsin処置、ナイロンメッシュによる濾過、遠沈操作などを行なうことにより得た[5]。得られた沈渣を再浮遊させ、poly-L-lysineにより前処置した培養皿に接種したのち15%ウシ胎児血清含有modified Eagle's minimum essential medium (MEM)中で3日間培養した。次いで20μM cytosine arabinosideに細胞を24時間曝露したのちに、培養液を15%ウマ血清含有MEMに変更し、培養を継続した。またグリア細胞の混在の有無についてanti-GFAPを用い免疫組織学的に検討したところ、グリア細胞の混入は全細



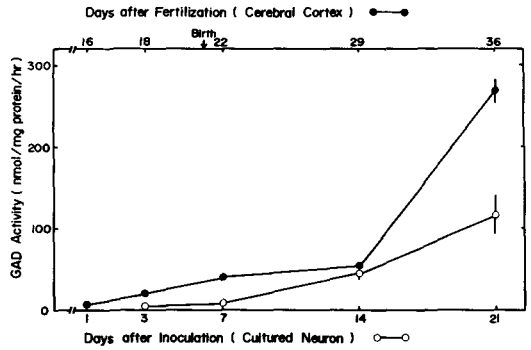


Fig. 1 (Upper) Developmental pattern of GABA content in primary cultured neurons.

Fig. 2 (Lower) Developmental pattern of GAD activity in primary cultured neurons.

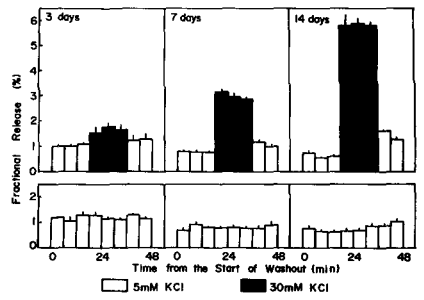


Fig. 3 Developmental changes of high H^+-evoked [^{3}H]GABA release from primary cultured neurons.

Table 1 Developmental changes of kinetic parameters of [^{3}H]muscimol binding in primary cultured neurons.

	(n)	High affinity		Low affinity	
		Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)
A) Neurons in Culture					
7 days	6	76.3 ± 13.5	345 ± 53	497.9 ± 51.5	803 ± 29
14 days	6	77.1 ± 10.4	525 ± 68	564.2 ± 71.9	1290 ± 65
B) Brain in vivo					
1 day after delivery	3	49.8 ± 7.8	198 ± 28	702.5 ± 77.4	1133 ± 6
8days after delivery	3	58.3 ± 6.3	542 ± 36	679.0 ± 18.7	2138 ± 58
Adult	3	42.3 ± 4.5	1202 ± 75	754.3 ± 26.6	3310 ± 15

胞数の５％以下であった。更に細胞の形態を走査及び透過電子顕微鏡で観察したところ、培養７～10日で明らかなシナプス形成が多数認められたことなどから、これらの細胞が神経細胞であることが確認された。

細胞の発育に伴うGABA代謝の変化を検討するため、GABA 含量、glutamic acid decarboxylase (GAD)及びGABA-transaminase (GABA-T)活性をそれぞれIda & Kuriyama[2], Kimura & Kuriyama[3], Nishimura ら[4]の方法により測定した。GABA放出能は、予め２μM [^{3}H]GABAの存在下でpreload した細胞を６分間のintervalで 5mM及び30mM KClの存在下でincubateし、medium中に放出された[^{3}H]GABAの放射活性を測定した。GABAの取り込みは、諸種の濃度の[^{3}H]GABAの存在下で37℃、6分間のincubation後、細胞中の[^{3}H]GABAの放射活性を測定した。なお、GABAの放出及び取り込みを検討する場合には、すべて10^{-4}M aminooxyacetic acid 存在下で実験を行なった。$GABA_A$ 及びベンゾジアゼピン(BZP) 受容体結合の測定を行なう場合には、それぞれ放射性リガンドとして諸種濃度の[^{3}H]muscimol (Mus)及び[^{3}H]flunitrazepam (FLN)を用いた。$GABA_A$ 及びBZP 受容体への特異的結合量は、総結合量から、それぞれ1 mM GABA及び10μM FLN の存在下で得られた非特異的結合量を差引くことにより算出した。また[^{3}H]FLN 結合に及ぼすGABAの作用の検討は、1 nM[^{3}H]FLN と諸種濃度のGABAの存在下で実験を行なった。なお受容体結合実験において用いた標品は、すべて培養細胞より得たparticulate fractionである。

［結果及び考察］

初代培養神経細胞におけるGABA含量は、細胞の発達に伴い増加するのが認められた(Fig. 1)。これらの変化はin vivo脳の成長過程におけるGABA含量の

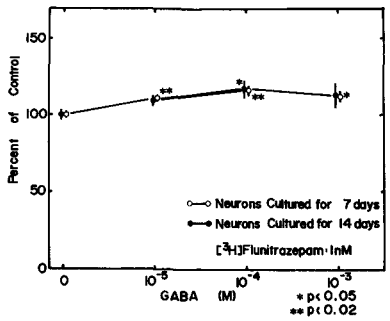


Fig. 4 Effect of GABA on [^{3}H]flunitrazepam binding in primary cultured neurons.

Table 2 Developmental changes of kinetic parameters of [^{3}H]flunitrazepam binding in primary cultured neurons.

Tissue	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)
A) Neurons in Culture		
7 days	1.27 ± 0.27	970 ± 91.7
14 days	1.05 ± 0.01	1240 ± 80.8
B) Brain in vivo		
1 day after delivery	1.43 ± 0.13	950 ± 96.1
8 days after delivery	1.63 ± 0.04	910 ± 22.5
Adult	1.73 ± 0.32	1100 ± 63.2

増加と類似するものであった。GABA生合成酵素であるGADの活性は、Fig. 2に示すように細胞の発育に伴い漸増した。またGABA分解に関与するGABA-T活性の変化もGADの場合と同様であった。[^{3}H]GABA放出能は5mM KCl存在下では培養日数の延長によっても影響を受けず、一方30mM KClの添加により、培養3, 7, 14日目のいずれの細胞においても[^{3}H]GABA放出の増大が認められた。特に培養7日目以降において高K$^+$刺激に対応する[^{3}H]GABA放出は著明な増大を示し、この増大は培養日数の延長に伴いより著しくなるのが観察された(Fig. 3)。これらの[^{3}H]GABA放出能の経時的変化は、形態学的に観察されたシナプス形成の変化とよく一致したものであった。また培養14日目における[^{3}H]GABA取り込みについてみると、Na$^+$依存性の高親和性取り込み機構に行なわれていることが明らかとなった。$GABA_A$受容体への[^{3}H]Mus結合は低親和性及び高親和性の2つの結合様式よりなり、この[^{3}H]Mus結合は神経細胞の発育に伴い、両結合系において、結合部位数の増加として捕えられるものであった。またこれらの[^{3}H]Mus結合の変化は、in vivo脳で発育に伴って認められる変化と同一のものであった(Table 1)。[^{3}H]FLN結合は、培養細胞の場合にも、in vivo脳の場合と同様に高親和性結合を示し、しかも細胞の発育に伴い結合部位数が増加する傾向が観察された(Table 2)。更にこの[^{3}H]FLN結合は10^{-5}-10^{-4}MのGABAの存在により有意に増強された(Fig. 4)。これらの事実は、培養神経細胞においても$GABA_A$受容体とBZP受容体の共軛機構[6]が機能していることを示すものと考えられる。

以上の結果から、本研究に用いた初代培養神経細胞はGABAを含有し、その生合成系と共にNa$^+$依存性かつ高親和性のGABA取り込み機構を有すること、またK$^+$刺激に応答し得るGABA放出機構、更に機能的に共軛する$GABA_A$及びBZP受容体を有していることが判明した。従ってこの初代培養神経細胞は、GABA作動性神経細胞の発育過程の解析と共に、中枢神経作用薬のこれらの発達過程に及ぼす影響などを解析する場合に有用な実験系となりうるものと考えられる。

[文献]

1) Henn, F.A., et al. (1976) Brain Res., 101: 341-344.
2) Ida, S. and Kuriyama, K. (1983) Anal. Biochem., 130: 95-101
3) Kimura, H. and Kuriyama, K. (1975) Japan. J. Pharmacol., 25: 189-195.
4) Nishimura, C., et al. (1981) Brain Res., 219: 433-438.
5) Ohkuma, S., et al. (1986) Int. J. Dev. Neurosci. in press.
6) Olsen, R.W. (1981) J. Neurochem., 37: 1-13.

27. 初代培養大脳皮質神経細胞の発達過程における taurine 生合成系の変化

岸　正孝・大熊誠太郎・城守美佐・栗山欣弥
（京都府立医科大・薬理）

〔要　約〕

マウスの15日目胎児の大脳皮質より採取した初代培養神経細胞を用いて、細胞の発育に伴うtaurine 生合成系の変化を生化学的に検討し、併せてage-matchingを行なったマウス胎児及び新生児の大脳皮質における変化と比較検討した。初代培養神経細胞におけるtaurine,cysteine sulfinic acid (CSA)及びcysteic acid (CA) の含量は、培養第1週目以内に著しい低下を示し、それ以後はほぼ一定のレベルを維持した。また家兎を免疫することにより調製したtaurine 抗体に対する反応性は培養1日目の細胞では強く、培養14日目には明らかな減弱を示した。またin vivo 脳においてもtaurine,CSA 及びCAの含量の変化は周産期において低下するのが観察された。一方、taurine 生合成系酵素であるcysteine sulfinic acid decarboxylase及びcysteine dioxygenase活性は、培養細胞では培養後3-7 日より、in vivo 脳では周産期より増加を示し、両実験材料においてその後も漸増するのが認められた。以上の結果より、本研究で用いた初代培養神経細胞においてはcysteineからtaurine に至る生合成系が作動していること、更にin vivo 脳の発達過程でみられるtaurine 含量の低下は主に神経細胞に起因する変化であることが示唆される。

Key word：　taurine biosynthesizing system, cerebral cortical neurons, primary culture.

Taurine (2-aminoethanesulfonic acid)は中枢神経系において神経伝達物質あるいは神経機能調節因子としての役割を有していると考えられているが[1]、いずれの機能を果たしているのかについては未だ一致した見解が得られていない。神経伝達物質の可能性を否定する根拠の一つに、哺乳動物の脳内taurine 含量が生後減少することがあげられている。すなわちこの点は、他の神経伝達物質の脳内含量が脳の発育に伴い増加するのと基本的に異なっている。一方、脳の発育に伴い、taurine 生合成系酵素であるcysteine sulfinic acid decarboxylase[2] 及びcysteine dioxygenase[3]活性は生後上昇することが報告されている。しかしながら、上述のデータのすべては脳ホモジネートを用いた実験であるため、神経細胞以外の細胞成分、すなわちグリア細胞及び血管内皮細胞などの関与の可能性を否定できないと考えられる。従って本研究では、主としてマウス大脳皮質より採取した神経細胞より成る初代培養系を用いて、神経細胞の発達過程におけるtaurine 生合成系の変化を生化学的に検討し、併せてtaurine 抗体を用いて神経細胞の発育に伴うtaurine 含有細胞の動態の免疫組織化学的検討を行なった。

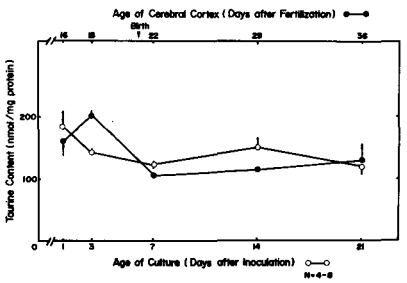


Fig. 1 Developmental pattern of taurine content in primary cultured neurons.

［実験方法］

初代培養に用いた大脳皮質神経細胞はSTD:ddy系マウスの15日目胎児の新皮質より採取した[4]。すなわち、胎児の新皮質を細切し、Ca^{2+}非存在下

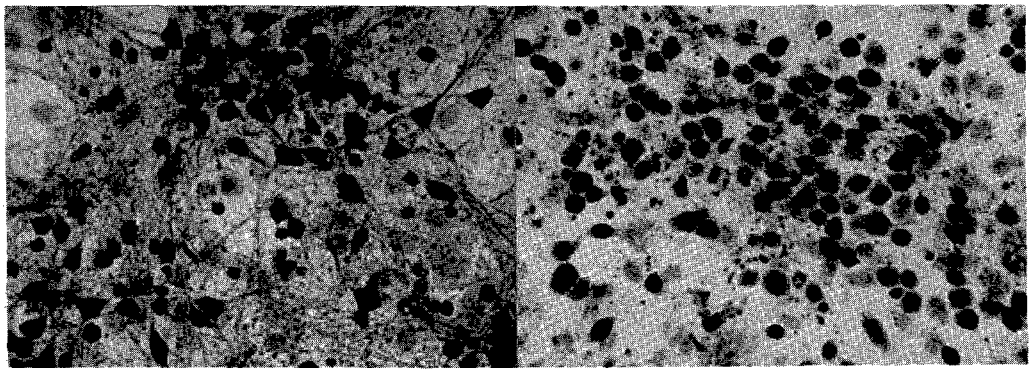


Fig. 2 Immunohistochemistry with rabbit taurine antibody. One day (left) and 14 days (right) after inoculation.

でtrypsin 処理を行なったのち、遠沈により細胞を得た。得られた細胞を15%ウシ胎児血清を含有するmodified Eagle's minimum essential medium (MEM) 中で3日間培養し、次いで20μM cytosine arabinosideに24時間曝露したのち、15%ウマ血清含有MEM中で培養を維持した。なお、anti-GFAP による免疫組織化学的検討により、本研究に用いた細胞群におけるastroglial cell の混在は5%以下であることを確認した。神経細胞内のtaurine,cysteine sulfinic acid (CSA)及びcysteic acid (CA) 含量はIda & Kuriyamaの方法[5]により測定した。またtaurine の生合成に関与するcysteine sulfinic acid decarboxylase (CSD)及びcysteine dioxygenase (CD) 活性はそれぞれYonedaらの方法[6]及びMisra & Olney の方法[3]により測定した。細胞の発育に伴うtaurine の細胞内局在とその変化を検討する場合には、冨田らの方法[7]に準じて家兎より調製したtaurine 抗体を用い、Kimuraらの方法[9]に従いPAP 法により免疫組織化学的染色を行い、hematoxylin による後染色を施した。

[結果及び考察]

初代培養神経細胞におけるtaurine 含量はその発育に伴い、特に培養第1週目に著明な低下を示し、その後培養21日目迄はほぼ一定のレベルを維持していた。一方、age-matchingを行なったマウス胎児及び新生児の大脳皮質においては、脳の発育に伴い、生直後に著しいtaurine 含量の低下が認められたが、それ以降では含量の変化は観察され

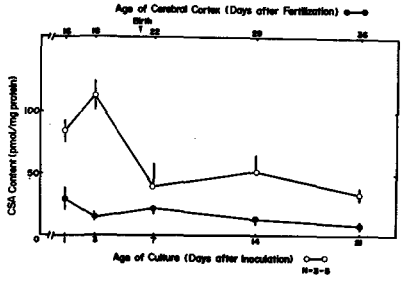


Fig. 3 Developmental pattern of cysteine sulfinic acid (CSA) content in primary cultured neurons.

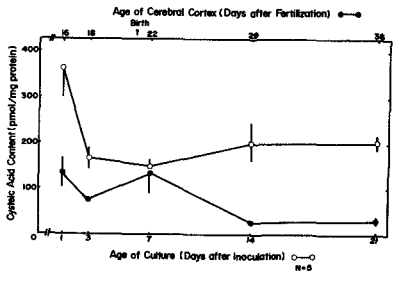


Fig. 4 Developmental pattern of cysteic acid content in primary cultured neurons.

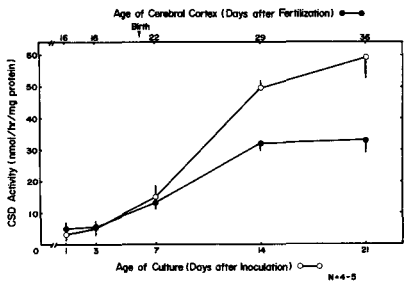


Fig. 5 Developmental pattern of cysteine sulfinic acid decarboxylase (CSD) in primary cultured neurons.

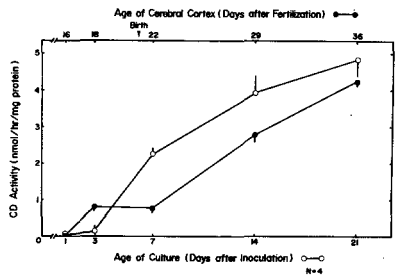


Fig. 6 Developmental pattern of cysteine dioxygenase (CD) in primary cultured neurons.

なかった(Fig. 1)。また家兎より得られたtaurine 抗体を用いて、培養1日目及び14日目の神経細胞について、免疫組織化学的にtaurine 抗体反応性物質の細胞内局在及び培養細胞の発達に伴うその変化を検討したところ、培養1日目にはtaurine 抗体反応性物質は神経細胞体のみならず、神経突起にも存在しているのが観察された。しかし、培養14日目にはtaurine 抗体に対する反応性は低下し、しかも反応性物質は細胞体のみに認められた(Fig. 2)。培養細胞の発達過程におけるこれらの免疫組織化学的変化は、生化学的に検出しえたtaurine 含量の変化とよく一致するものと考えられる。Cysteineからtaurine に至る代謝過程において生成されるCSA 及びCA含量の培養神経細胞の発達に伴う変化は、taurine 含量の場合と同様に、培養第1週において低下し、その後の含量の変化は殆ど認められなかった。更にin vivo 脳の発育過程におけるこれらの物質の脳内含量も、培養細胞で認められたのと類似の変化を示した(Fig. 3 & 4)。一方、taurine 生合成系酵素であるCSD 及びCD活性の培養神経細胞の発育に伴う変化をみると、培養3～7日目以降明らかに増加するのが観察された。更に同様の変化がin vivo 脳においてもみられた。以上の結果から、培養神経細胞がcysteineからtaurine を生成しうる生合成系を有していることは明らかである。更にin vivo 脳の発育に伴うtaurine 含量の低下は、主として神経細胞におけるtaurine 含量の低下に起因する可能性が示唆される。

［文献］

1) Kuriyama, K.(1980) Fed. Proc. 39, 2680-2684. 2) Agrawal, H.C., Davison, A.N., and Kaczmarek, L.K. (1971) Biochem. J. 122, 759-763. 3) Misra, C.H. and Olney, J.W. (1976) Brain Res. 97, 117-126. 4) Kuriyama, K. and Ohkuma, S. (1986) in Model Systems in Development and Aging of the Nervous System (Vernadakis, A., ed.) Martinus Nijhoff Publishing Co., Boston, in press. 5) Ida, S. and Kuriyama, K. (1983) Anal. Biochem. 130, 95-101. 6) Yoneda, Y., Takashima, S., Hirai, K., Kurihara, E., Yukawa, Y., Tokunaga, H., and Kuriyama, K. (1977) Japan. J. Pharmacol. 27, 881-888. 7) 冨田安信，木村宏，井田修二，栗山欣弥 (1985) 神経化学 24, 193-195. 8) Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H., and McGeer, E.G. (1981) J. Comp. Neurol. 200, 151-201.

28. 培養 NG 108-15細胞の分化と増殖：アデニル酸シクラーゼ系およびプロテインキナーゼC活性化薬の影響

東田道久・野村靖幸　（富山医薬大・和漢薬研・生物試験）

〔要　約〕

培養 NG 108-15 細胞の増殖分化へのアデニル酸シクラーゼ（AC）系、ならびにプロテインキナーゼC（PK-C）への関与の有無とその機構を解明する目的で、NG 108-15 細胞の形態変化、細胞数、および細胞膜 AC 活性に及ぼす PGE_1、コレラ毒素、IAP、forskolin ならびに、12-o-tetradecanoyl phorbol 13-acetate（TPA）の影響を検討し、以下の結果を得た。1) 10 μM PGE_1、100ng/ml コレラ毒素、10 μM forskolin はいずれも本細胞に対し軸索伸長作用を示した。2) 1.5% 牛胎児血清存在かでの本細胞の増殖曲線を検討したところ上記薬物はいずれも細胞増殖抑制を示した。3) 10 μM PGE_1、10～100ng/ml コレラ毒素、1～100 IAP および 0.1～100 μM forskolin は濃度依存的に本細胞膜 AC 活性を増大させた。4) 100nM TPA は軸索伸長、細胞増殖抑制作用を示したが、AC 活性にほとんど影響を及ぼさなかった。以上より、NG108-15 細胞に対し、1) PGE_1、コレラ毒素ならびに、forskolin は AC 活性化を介し、分化を促進すること、2) 一方、PK-C 活性化も本細胞の分化に関与することが示唆された。

Key word： differentiation　adenylate cyclase　protein kinase C

［緒言］　神経芽細胞腫細胞と　細胞腫細胞の雑種細胞である NG 108-15 に対し、dibutyryl cAMP や prostagrandin E_1（PGE_1）は、軸索を伸長させたり、筋細胞とのシナプス形成を促進させたりすることが示されている（1）。しかし、本細胞の増殖分化調節機構の詳細は明らかではない。NG 108-15 細胞の増殖分化機構へのアデニル酸シクラーゼ系ならびに、プロテインキナーゼC系の関与を明らかにする目的で、今回、アデニル酸シクラーゼ（AC）活性調節系に作用する各種薬物、すなわち、PGE_1、コレラ毒素、forskolin の本細胞の形態変化、増殖への影響を検討した。また、protein kinaseC（PK-C）の活性化も一部の細胞において分化を誘導することが示されている（2）ので、その活性化薬 12-o-tetradecanoyl phorbol 13-acetate（TPA）の形態変化、増殖への影響を検討した。さらに、これらの薬物の AC 活性への影響も検討し、細胞分化とアデニル酸シクラーゼ系および、プロテインキナーゼC系の関連性について考察した。

［実験方法］　細胞培養：NG 108-15 細胞は、5%牛胎児血清含有 DMEM-HAT 培地を用いて 10% CO_2 中 37℃で 4～6日間培養した。増殖測定：2㎜ グリッド付 60㎜ dish 中に細胞を植え、培養開始 24 時間後の 675×450 μm 中の細胞の個数を数え、その後に薬物添加を行い 24 時間毎に同一の視野の細胞数を計測した。その際、薬物の影響を見やすくするため、牛胎児血清の濃度を 1.5%に減少させ、また、培地は 2 日ごとに交換した。　アデニル酸シクラーゼ活性測定：以下の組成に調製した反応液 400 μl 中に、細胞膜 100 μl（約 1mg/tube 含有）と薬物 50 μlを加え、37℃ 10分間 incubate して反応させた。：0.4mM cAMP、0.4mM ATP（［3H］ATP 0.5 μCi/tube 含有）1mM IBMX, 15mM creatine phosphate, 25U creatine phosphokinase, 5mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, 10 μM GTP, 2mM DTT

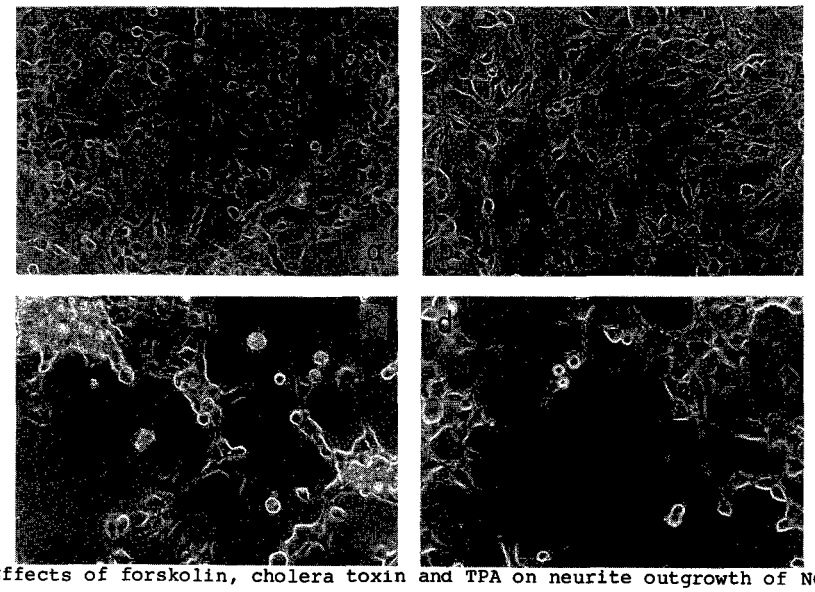


Fig.1 Effects of forskolin, cholera toxin and TPA on neurite outgrowth of NG 108-15
a) control b) 10μM forskolin c) 100ng/ml cholera toxin d) 100nM TPA

反応後、1mM cAMP 400μl 加え、30 秒間撹拌した後、100℃で 3 分間煮沸する事により反応を停止した。上清中の [^{3}H] cAMP は Dowex、Alumina カラムを用いて精製し、その放射活性を測定した。

[結果] 本細胞の形態変化及ぼす各種薬物の影響を Fig.1 に示した。10 μM PGE_1、100ng/ml コレラ毒素、および 10 μM forskolin はいずれも軸索伸長作用を示した。1.5% 牛胎児血清存在下での細胞数の時間経過を検討したところ (Fig.2)、10 μM PGE_1、100ng/ml コレラ毒素、および 10 μM forskolin は有意な増殖抑制を示したが 100ng/ml IAP は影響しなかった。これらの薬物の細胞膜 AC 活性におぼす影響を検討したところ (Table 1) 10 μM PGE_1、10～100 ng/ml コレラ毒素、1～100ng/ml IAPおよび 0.1～100 μMforskolin は濃度依存的に AC 活性を上昇させた。100nM TPA は、軸索伸長、増殖抑制作用を示したが (Fg.1,2)、AC 活性には影響を及ぼさなかった (Table 1)。

[考察] Dibutyryl cAMP や PGE_1 は分化を引き起こすが、これらの作用は、細胞内cAMP 濃度の上昇によると示唆されている。今回我々は、forskolin、コレラ毒素が細胞増殖抑制とともに、軸索伸長を引き起こすことを新たに見いだした。

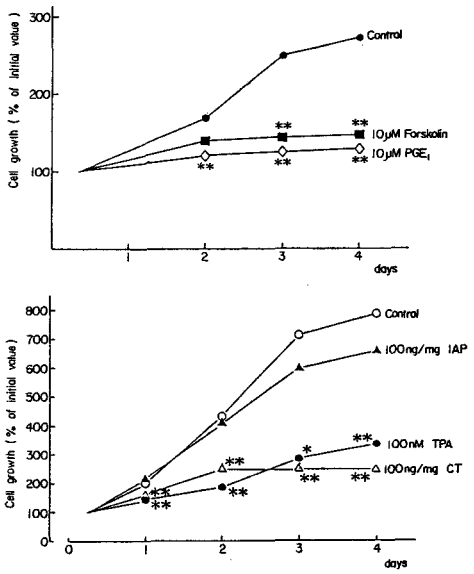


Fig.2 Effects of PGE_1, cholera toxin, IAP, forskolin and TPA on cell growth of NG 108-15.

Forskolin は、PC 12 細胞（3,4）やグリオーマ細胞（5）において、神経細胞への分化を誘導することが示されている。NG 108-15 細胞においても、同様の作用が認められたことより、forskolin は AC 活性化を介して分化を誘導すると推定した。Forskolin の軸索伸長作用が、本細胞のニューロンへの分化促進によるものか否かを、さらに、本細胞アセチルコリン関連酵素活性への forskolin の影響について検討中である。コレラ毒素は増殖抑制、軸索伸長とともに、細胞膜 AC 活性の増加も示した。コレラ毒素は Ns を ADP-リボシル化することにより、その GTPase 活性を阻害し、持続的に AC を活性化し cAMP を増加させると考えられるので、コレラ毒素の軸索伸長作用は cAMP によると考えられる。一方、コレラ毒素添加により、本細胞はコロニーを形成しやすくなり、また、培養 5日目からは細胞死も認められた。S49 lymphoma（wild type）細胞は Ns の活性化によって細胞が死滅することが示されている（6）。NG 108-15 細胞において、コレラ毒素による細胞死が認められた点より、Ns が細胞の生存に関与している事も示唆されるが詳細は不明である。一方、IAP は分化誘導作用を示さなかった。100ng/ml IAP が AC 活性を約2倍に増大させたことおよび、分子量 41,000 の本細胞膜蛋白が IAP により ADP-リボシル化されること（データーは示してない）より、本細胞膜には Ni が存在すると考えられるが、IAP が増殖抑制、軸索伸長作用を示さなかったことより、本細胞における Ni は増殖分化に関与しない事が示唆される。しかし、今回の実験条件ではそのことが、IAP の AC 活性化作用が弱かったことに起因するかもしれず今後詳細な検討が必要である。

Table 1 Influences of forskolin, PGE_1, CT, IAP and TPA on adenylate cyclase of NG 108-15

	Adenylate Cyclase Activity (pmol/mg/min)		
	Forskolin	PGE_1	TPA
0 μM	5.11±1.00(4)	11.06±1.29(5)	11.06±1.29(5)
0.1	9.19(2)	—	11.57+0.43(5)
1	23.9 (2)	—	—
10	53.5 (2)	47.12±1.16(5)	—
100	89.4 (2)	—	—

	CT	IAP
0 ng ml	7.73±1.15(8)	7.73±1.15(8)
1	—	12.64±0.86(3)
10	31.62±2.79(3)	18.97±1.01(3)
100	50.33±6.24(3)	19.95±4.28(6)

TPA もコレラ毒素同様、増殖抑制、分化誘導作用を示したが、TPA は基礎 AC 活性に影響しなかったことより、TPA の増殖抑制、軸索伸長作用は AC 系を介したものではなく PK-C 活性化によると考えられる。細胞内 cAMP 濃度上昇（したがって、protein kinase A 活性化）による分化誘導と、PK-C 活性化による分化誘導とが、同一蛋白のリン酸化および遺伝子発現を介して行われるのか否か、また、本細胞に対し、同種の神経細胞への分化を誘導するのか否かは、今後の課題である。

［謝辞］NG 108-15 細胞を御供与下さった、三木直正教授（金沢大がん研）に感謝申し上げます。

［参考文献］ 1) Nirenberg,M., Wilson,S., Higasida,H., Rotter,A., Krueger,K., Busis,N., Ray,R., Kenimer,J.G. and Adler,M. (1983) Science 222, 794
2) Rosoff,P.M.,Stein,L.F. and Cantley,L.C. (1984) J.Biol.Chem. 259,7056
3) R-Landsberg,C. and Jastorff,B. (1986) J.Cell Biol. 102, 821
4) 北島哲子et. al.(1985) 神経化学 24, 520
5) 本田千穂 et. al.(1985) 神経化学 24, 223
6) Johnson,G.L., Kaslow,H.R., Farfer,Z. and Bourne,H.R. (1980) Adv. Cyclic Nucl. Res. 13, 1

29. 培養下の海馬神経細胞間のシナプス形成—細胞内 Ca^{2+}濃度測定システムの応用

小倉明彦・工藤佳久・飯島敏夫・天野武彦
（三菱化成生命科学研・脳神経科学）

〔要　約〕

1）蛍光顕微鏡、高感度テレビカメラと測光装置を組み合わせたシステムを用い、蛍光性Ca^{2+}指示薬を取り込ませた培養神経細胞の細胞体部での細胞内Ca^{2+}イオン濃度（$[Ca^{2+}]i$）を実時間的に測定した。

2）18日令ラット胎仔大脳海馬皮質よりトリプシン処理によって単離し、５日以上培養した神経細胞は、自発的・周期的な$[Ca^{2+}]i$の振動を示した。この振動は、近隣の他の神経細胞のそれと同期しており、テトロドトキシンの投与によって興奮の伝導を遮断するか、2-アミノホスホノ吉草酸の投与によってグルタミン酸受容体を遮断すると、可逆的に抑制された。

3）パッチ電極を$[Ca^{2+}]i$測定中の細胞に接着し、電位固定を行うと、$[Ca^{2+}]i$の上昇は内向電流のバースト状の発生と同期していた。

4）以上より、培養下の海馬神経細胞は、グルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプス結合を相互に形成して周期的な発火を繰返しており、それに伴う受容体の活性の動態が$[Ca^{2+}]i$の変動に反映されているものと解釈された。この方法は、微小電極の刺入などの侵襲措置を要せずに　多数の神経細胞の活動を同時的に観測しうる点で、シナプス形成過程の解析などに有益な手段となろう。

Key word：　In vitro synapse formation, Ca^{2+}, Hippocampus

【序】　神経系において特異的なシナプス結合がどのような機構で形成されるかという問題は、神経科学の中心的課題の一つである。各種の神経栄養性因子やグリア細胞からの影響など、神経細胞をとりまく環境を任意に操作しうる初代培養系は、この問題にアプローチする有力な手段と考えられるが、培養下の神経細胞が周囲の神経細胞と機能的なシナプスを形成しているかどうかの観測には、従来、対象となる細胞対に微小電極を刺入して、一方を刺激したとき他方にシナプス電位が生ずるか否かを見る方法がとられてきた。しかし、小型の細胞から安定した電位記録を得るには、熟練的技術を要する上、観測できる細胞の数には制限があった。我々は、単一神経細胞内のCa^{2+}濃度を非侵襲的、実時間的かつ定量的に測定する方法を完成して報告してきたが(1)、今回、神経回路を作ることが期待される系として海馬皮質を選び（脳内回路としては、顆粒細胞→CA3錐体細胞→CA1錐体細胞）この方法を適用したところ、果してシナプス結合を反映すると見なせる現象を観測することができたので報告する。

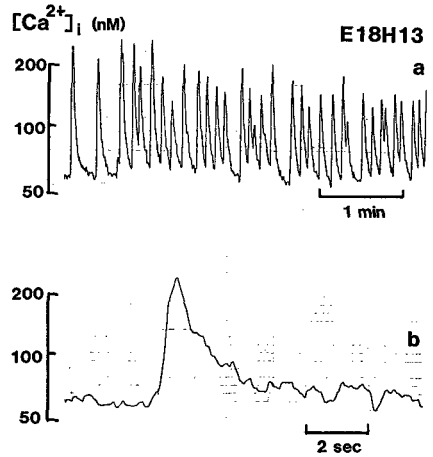


Fig 1. Cytoplasmic Ca^{2+} oscillation in a cultured neuron seen in slow (a) and fast (b) sweeps. Expression E18H13 indicates the neuron isolated from embryonic day 18 hippocampus and cultured for 13 days.

【方法】　胎生18日令のラット胎仔から Banker & Cowan (2)の方法により海馬皮質を摘出し、トリプシン

処理によって細胞を単離した後、ポリリジンを被覆したカバーグラス上に播種した。

蛍光性Ca^{2+}指示薬fura-2を用いての$[Ca^{2+}]i$測定は既述の方法(1)によった。

パッチクランプ法は通常の方法によった(5)。ただし、ピペット口径は1μm以下とし、ピペット内液には10μM fura-2(遊離酸型)を含む溶液を用いた。

【結果】 培養後7日以上経過した海馬神経細胞は、自発的に周期的な$[Ca^{2+}]i$の上昇と下降を繰返していた(図1)。周期は、標本によってまちまちで、同一の細胞でも厳密に一定ではないが、概ね1分に7回程度のものが多かった(図2)。上昇相ははやく、ピークに達した後、指数関数的な時間経過で下降する。ピーク時の$[Ca^{2+}]i$は標本によって差があるが、概ね150－200nM程度、ボトム時の$[Ca^{2+}]i$は 80－90nM程度であった(図2)。

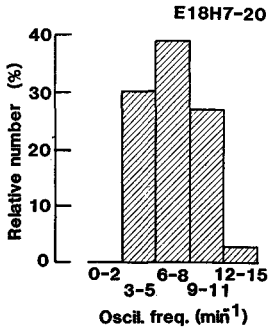


Fig 2. Frequency of the spontaneous $[Ca^{2+}]i$ oscillations. Data are from 33 neurons (one per one dish).

視野中の(すなわちモニターブラウン管画面上の)複数の細胞から同時に蛍光測定を行うと、同期して$[Ca^{2+}]i$の変動を示す細胞(図3a,b)と、まれにではあるが、独立の周期で$[Ca^{2+}]i$の変動を示す細胞(図3c)とがあった。

パッチ電極を細胞に吸着し、ホールセルクランプ条件で膜電位を-70mVに固定すると、自発的・周期的な内向電流のバーストがあり(ピーク値で 0.2－1pA程度)、それは、同時に測定した$[Ca^{2+}]i$の変動と同期していた(図4)。

自発的な$[Ca^{2+}]i$振動と内向電流とは、灌流液中に1μMのテトロドトキシンを加えると、共に抑制され(図5a)、$[Ca^{2+}]i$のレベルは 50nM程度にまで低下した。

L-グルタミン酸受容体拮抗薬として知られる2-アミノホスホノ吉草酸10μMを投与すると、$[Ca^{2+}]i$振動は消失した(図5b)。またムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬のアトロピン0.1μMによっても抑制がみられる場合があった(図5c)。しかし、d-ツボクラリン、フェントラミン、プロプラノロル、メチセルジド(いずれも0.1μM)によっては抑制を受けなかった。

このような$[Ca^{2+}]i$の自発的振動は、培養後1日目では観測されないが、3日目ですでに観測され、5日目以降ではほとんど全例において観測された。

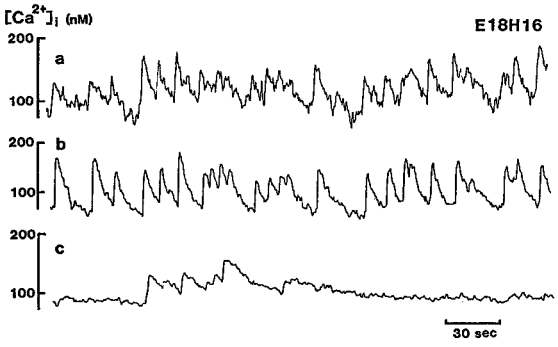


Fig 3. Synchronous and asynchronous $[Ca^{2+}]i$ oscillations seen in 3 cells in one viewfield.

【考察】 ここに観測されたすべての現象を最もよく説明する解釈は、培養下の海馬神経細胞が、日を追って、グルタミン酸を興奮性伝達物質とするシナプス結合を相互に形成して、ネットワークをなす、とする考え方である。その中に、おそらくペースメーカーとなる細胞(群)が存在し、その発火が$[Ca^{2+}]i$振動のレートを決めていると想像される。ただ現在の我々のシステムの時間的分解能では、どの細胞が最も早く$[Ca^{2+}]i$の上昇を開始するかを判定することはできず、その細胞(群)を視野中に特定することはできなかった。内

向電流のバーストは、ペースメーカー細胞から当該細胞まで異なった経路を通ったため、わずかに所要時間が異なって到達した興奮性シナプス電流の集団に相当すると考えられる。

ここで解釈に困難を感じる点は、$[Ca^{2+}]i$振動がアトロピンで阻害される場合があった点である。今回の培養系で興奮性出力をもつ神経細胞は、歯状回顆粒細胞とアンモン角CA1～CA4錐体細胞と想像されるが、いずれもグルタミン酸を伝達物質とするとされている(3)。ただし、最近の文献によれば(4)、抗コリンアセチル転移酵素免疫活性のある介在神経細胞が少数ながら海馬内に存在するという。今回の結果が、この種の細胞の海馬内神経回路中での重要性を示唆するものなのか、あるいは培養系に移した結果、artefactualなシナプス結合が作られたことを示すのかは、今のところ判断できない。また、自発性$[Ca^{2+}]i$振動が、培養後数日を経て現れることは、機能的なシナプスの形成がその時期に行われることを示すのか、あるいは、それ以前にシナプス形成は完了していて、ペースメーカー細胞（群）の自発発火がこの時期に始まる（例えば電位依存性Naチャンネルと同Kチャンネルが完成するなどして）ことを示すのかは明らかではない。

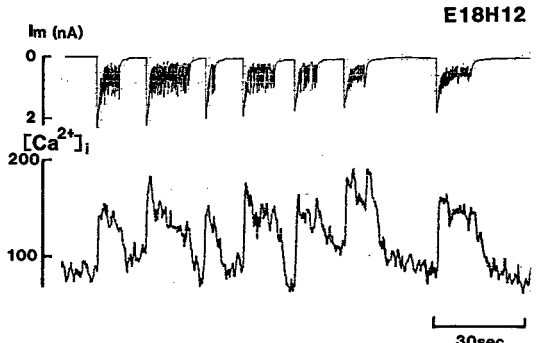


Fig 4. Simultaneous recordings of membrane current (I_m) $[Ca^{2+}]_i$ in one neuron. Note that the bursts of inward current occur coincidentally with rising and plateau phases of the $[Ca^{2+}]_i$.

しかし、以上のような未解明の問題は残るものの、手法として今回の$[Ca^{2+}]i$測定システムを見た場合は、$[Ca^{2+}]i$の変動を通じて、非侵襲的かつ網羅的に、興奮性シナプス結合の有無を検出しうる点で、シナプス結合形成の細胞機構を研究する際の有用性は小さくないといえよう。なお、類似の方法として、電位感受性色素によってシナプス活動を検出する試みも考えられるが、現在のところ、その種の色素の感度は自発性EPSP、IPSPを検知できるほどには高くないのが現状であろう。

培養に当たっての宮本真美助手の技術的協力を感謝する。

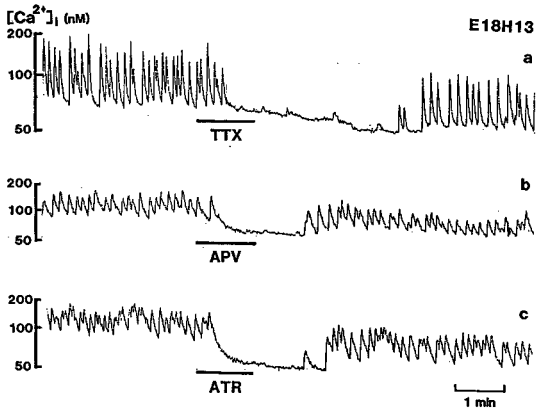


Fig 5. Suppression of the spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillation by 10^{-6} M tetrodotoxin (a), 10^{-5} M 2-aminophosphonovaleric acid (b) and 10^{-7} M atropine seen in one neuron. Note that the basal $[Ca^{2+}]_i$ level decreased concomitantly with the inhibition of the spontaneous activity.

【文献】

1. 学会発表としては、日本生理学会'85, '86、日本薬理学会'85, '86、神経科学学術集会'85。解説記事としては、生体の科学 36, 380('85)、実験医学 4, 156('86)。原著論文としては、Jpn. J. Pharmacol. 41, 345 ('86)、Br. J. Pharmacol. in press ('86)
2. Banker & Cowan, Brain Res. 126, 397 ('77).
3. Bliss & Dolphin, Tr. Neurosci. 5, 289 ('82).
4. Frotscher & Leranth, J. Comp. Neurol. 289, 237('85)
5. Sakmann & Neher, Single-Channel Recording, Plenum ('83).

30. マウス脳シナプス機能とシナプス膜の加齢変化

田中康一・近　一夫・安藤　進（東京都老人総合研・生化）

〔要　約〕

マウスの老化過程におけるシナプスの機能，及びその生化学的性質の変化を調べた。マウス大脳皮質より調製したシナプトゾームでのアセチルコリン（ACh）合成能はyoungからadult stageにかけては変化はみられなかったが，senescent stageに入ったと考えられる12ケ月齢以降低下した。ACh放出能は，% releaseでみる限りにおいては，老齢期でも変化は認められなかった。シナプトゾーム膜電位は，21ケ月齢以降のlate senescent stageで，静止期，脱分極時共，adult stageより約＋2mV変化した値を示した。シナプトゾーム膜構成脂質のリン脂質，コレステロール含量が17～18ケ月齢以降増加し，さらに膜の流動性を規定していると考えられるコレステロール／リン脂質比が同様な時期に変化を開始した。また，DPHをプローブとして測定した膜微小粘度が17～18ケ月齢を堺として加齢に特徴的な変化を示した。

シナプトゾーム膜脂質含量，膜流動性などの膜の性質の変化の始まる時期とシナプス機能のいくつかのパラメータの変化の始まる時期がほぼ同調していたことから，加齢によるシナプス膜の変質が，シナプスにおける種々の機能障害を惹き起こしていることが示唆された。

Key word： **Aging, Synaptic function, Acetylcholine**

老化に伴って，記憶力や認識能力などの中枢神経機能が低下することはヒトや動物において広く認められる。中枢神経系での神経伝達物質のレベルやその合成能，レセプター数とその感受性，イオン輸送能力，エネルギー代謝活性等が加齢により低下することが多数報告されている。しかしながら，今迄の多くの老化研究では用いる年齢群の数が少なく，得られた結果が，発育期の変化なのか，老化による変化なのか不明であった。本研究では，これらの問題点をクリアするため，生存曲線が描けていて老化の時期が推定できるマウスコロニーを用い，脳シナプトゾームにおける機能，及び若干の生化学的性質の加齢変化を調べた。

〔実験方法〕

実験動物：老人研・老化動物開発区で飼育された7つの月齢群（2，6，9，12，15，21，27ケ月齢）のC57BL／6マウスを用いた。図1にこのコロニーの生存曲線を示した。

シナプトゾームの調製：マウスを断頭後，大脳皮質からBooth and ClarkのFicoll密度勾配遠心法(3)によりシナプトゾームを調製した。

Ach合成活性の測定：シナプトゾーム標品をU-^{14}C glucoaeを含むkrebs-Ringer液中で，

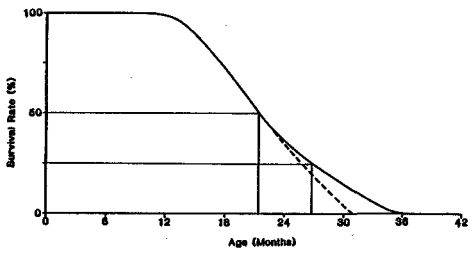


Fig.1 Survival curve of C57BL/6 NCrj mice

95％ O_2下，37℃，1時間インキュベートした。生成した^{14}C－AChを抽出，単離後その放射活性を測定し生成したACh量を求めた。

ACh 放出能の測定：シナプトゾームを 1-^{14}C choline と37℃，30分間インキュベートしシナプトゾーム内AChを標識した。37℃，15分間のインキュベーションを間にはさんで5回洗滌後，Veratridire，あるいは高K^+を含むメディウム中で5分間に放出された^{14}C-AChのカウントを測定した。放出能は％ release で表わした。

シナプトゾーム膜電位の測定：Deutsh and Raflomska (4)の方法に依った。即ち，lipophilic cationの^{3}H- triphenylmethylphosphonium のシナプトゾーム内外の分布より膜電位を計算した。シナプトゾームの water volumeの測定は^{14}C -inulin と^3H_2Oを用いて行った。

化学分析：シナプトゾームよりBligh and Dyer (2)の方法で脂質を抽出した。コレステロールは酵素法で，リン脂質はBartlett法(1)で定量した。またDPHを螢光プローブとして，膜の微小粘度をShinitzky の方法(6)で測定した。

〔結果と考察〕

ACh合成能の加齢変化：図2にシナプトゾームでのACh合成能，即ちコリンアセチル転移酵素活性の加齢変化を示した。youngからadult stage（2～9ケ月齢）にかけてその活性に変化はみられなかったが，senescent stageに入った12ケ月齢以降加齢とともに低下した。21ケ月齢からの late senescent stage では，adultの約60％まで低下した。Gibson and Peterson(5)はマウス脳におけるACh合成が，若齢期に急激に低下すると報告しており，我々の結果とは異なるものであった。彼らは3，10，30ケ月の3点しかみていないところに問題があるかもしれない。

ACh 放出能の加齢変化：図3に示した如く，youngからadult stageにACh放出能に若干の変動がみられたが有意とはいえない。さらにsenescent stage以降は％ release でみる限りにおいてはほとんど変化は認められなかった。しかし，図2に示したように，シナプスでのACh 合成能は加齢により低下していることからACh含有量は老齢マウスで低下していることが推察される。このことより，放出されるAChの絶対量は，senescent stage で減少している可能性が考えられた。

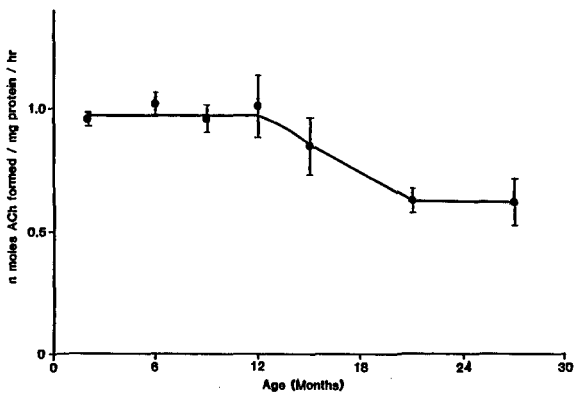


Fig.2 Age-related changes in ChAT activity of mouse brain synaptosomes

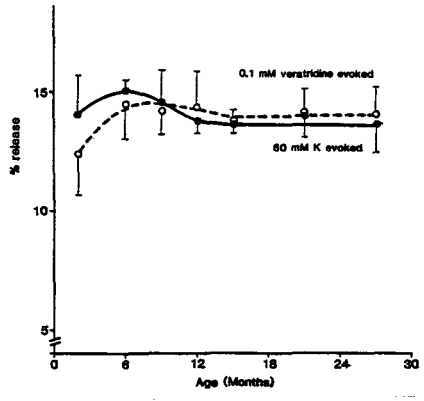


Fig.3 Age-related changes in ACh release from mouse brain synaptosomes

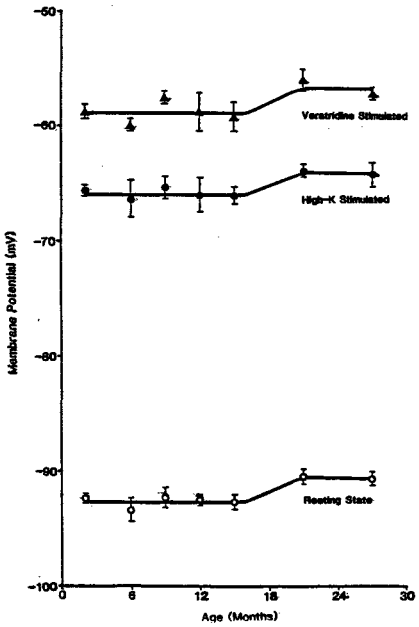


Fig.4 Age-related changes in membrane potential of mouse brain synaptosomes

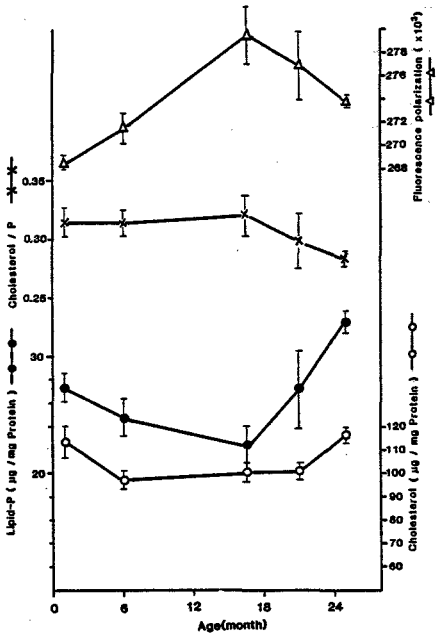


Fig.5 Age-related changes in phospholipid and cholesterol contents and in membrane microviscosity of synaptosomes

シナプトゾーム膜電位の加齢変化：図4はシナプトゾーム膜電位の加齢変化を静止期（5mM K^+），ベラトリジン及び高K^+（60mM)刺激時に測定した結果である。21ケ月齢以降の late senescent stage で静止期，刺激時の膜電位が共に約＋2mV の変化を示した。これはシナプトゾーム内外のイオン濃度平衡を保つ機構（Na^+,K^+-ATPaseなど）の機能低下が老齢期におこるためと考えられる。

シナプトゾーム膜脂質と膜流動性の加齢変化（図5）：膜構成脂質の主要成分であるリン脂質含量が17～18ケ月齢以降急激な増加を示した。またコレステロール含量も senescent stage で増加傾向を示した。膜の流動性を決めているとされるコレステロール／リン脂質比をみると，senescent stage で低下傾向を示した。DPHの螢光偏光で求めた膜微小粘度（P値）は young から senescent stage に入るまで増加し，senescent stage では減少するという変化を示した。

以上の結果で注目すべき点は，膜の性質の変化が始まる時期と，presynaptic 機能のいくつかのパラメータの変化の始まる時期がほぼ同調していることである。即ち，加齢によるシナプス膜の変質がシナプスにおける種々の機能障害を惹き起こしている可能性が示唆された。

〔文　献〕

1. Bartlett, G.R. (1959) J. Biol. Chem. 234, 466-468
2. Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911
3. Booth, R.F.G. and Clark, J.B. (1978) Biochem. J. 176, 365-370
4. Deutch, C. and Rafalomska, U. (1979) FEBS Lett. 108, 274-278
5. Gibson, G.E. and Peterson, C. (1981) J. Neurochem. 37, 978-984
6. Shinitzky, M. and Barenholz, Y. (1978) Biochim. Biophys. Acta. 515, 367-384

31. ラット脳および種々組織における多機能性カルモデュリン依存性プロテインキナーゼの免疫組織化学的局在

福永浩司・後藤　恵*・宮本英七
(熊本大・医・第一薬理，脳神経外科*)

〔要　約〕

精製したラット脳多機能性カルモデュリン依存性プロテインキナーゼに対するポリクローン抗体を作製し、免疫組織化学的手法により、脳内分布、組織分布について検討した。1）ポリクローン抗体は本酵素の4.9万と6万の両サブユニットに反応した。2）ラット脳では、大脳皮質、海馬、線状体、黒質、小脳が強く染色された。3）大脳皮質、海馬、線状体、小脳においては、主に神経細胞体と神経突起が強く反応し、核にも弱い反応性がみられた。4）黒質では神経線維のみに反応性が見られ、神経細胞体はほとんど反応しなかった。5）神経細胞の他に星状細胞、脳室の上衣細胞、脈絡叢の上皮細胞が反応した。グリア系細胞に対する反応性はいくつかのグリア由来腫瘍細胞においても確認できた。6）脳以外の組織では、膵臓のランゲルハンス島に強い染色がみられ、胃の胃底腺、下垂体の前葉、中葉細胞、小腸絨毛の上皮細胞は中程度の染まり方であった。上記以外の組織においても染色程度は弱いものの反応性がみられた。以上の結果から、本酵素が脳では大脳基底核、海馬に高濃度に存在し、この部位での神経機能に関与すること、他の組織においてはそれぞれに個有のCa^{2+}作用を仲介している可能性が示唆された。

Key word： multifunctional calmodulin-dependent protein kinase, polyclonal antibody, immunohistochemistry

我々はラット脳細胞上清分画(1)および顆粒分画(2)よりゲル濾過法で分子量64万を示す多機能性カルモデュリン依存性キナーゼ（CaM-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。また、モノクローン抗体を用いて、種々組織に本酵素のアイソザイムが存在することを報告した(3)。本酵素は脳において、細胞骨格蛋白質の相互作用、神経伝達物質の放出、種々の酵素の活性調節に関与し、多様な機能を発揮している。本研究では、本酵素に対する特異的なポリクローン抗体を用いて、脳内分布、組織分布を検索し、その機能的役割について考察したい。

〔実験材料と方法〕

脳CaM-キナーゼは既報の方法(2)に従い精製した。精製した酵素標本をウサギに免疫し抗血清を得た。本研究に用いたポリクローン抗体はさらに抗原親和性カラムにて精製した。イムノブロット法は、Laemmli (4)によるSDS-PAGE後、ニトロセルロース膜に転移し、抗体、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGとインキュベート後、4-chloro-1-naphthholを基質として発色反応を行なった。免疫組織化学は、新鮮ラット脳および種々組織をホルマリン固定パラフィン包埋後、4μmの切片を作製し、3,3 -diaminobenzidine (DAB)を基質としてPAP法により染色し、光学顕微鏡的に観察した。

〔実験結果と考察〕

1）ポリクローン抗体の特異性

抗体の特異性をイムノブロット法にて検討した。精製酵素標本では主に4.9万と6万の両サブユニットに反応した。標本によっては6万蛋白質付近に6.1万と5.8万の蛋白質が、4.9万蛋白質の付近には5.1万の微量蛋白質が抗体と反応した。これらは

酵素の燐酸化型あるいは分解産物と思われる。ラット脳の粗抽出液を DEAE-セルロースカラムにて酵素を濃縮後、イムノブロットを行なうと、抗体は 4.9 万と 6 万の酵素のサブユニットのみに反応した。

2) 脳各部位の CaM-キナーゼのサブユニット構造

ラット脳を大脳皮質、海馬、線状体、視床下部、中脳と延髄、小脳の 6 部位に分け、CaM-キナーゼを DEAE-セルロースカラムとカルモデュリン親和性カラムにて部分精製後、イムノブロット法でサブユニット構造を比較した。小脳以外の部位では本酵素の主サブユニットは 4.9 万蛋白質であり、小脳では、主サブユニットは 6 万蛋白質であった。この結果はこれまでの報告と一致していた (5, 6)。

3) 免疫組織化学法による脳内分布の検討

CaM-キナーゼ特異抗体では、主に神経細胞と神経突起が染まった。細胞体では主に細胞質が染まったが、核にも弱い染色が見られた。脳内分布では大脳皮質、線状体、海馬、黒質に強い染色が見られた (Fig. 1A, 2A)。大脳皮質では II、III、V、VI 層の神経細胞に強い反応性が見られた (Fig. 1C)。大脳基底核では、尾状核、被殻の大部分の神経細胞が強く染まるのに対して、淡蒼球では神経細胞はほとんど染まらなかった (Fig. 1 B,D)。黒質では網状部に強い染色が見られ、ドーパミン作動性ニューロンを含有する緻密部、外側部は中程度の染色であった。また、黒質では神経細胞は染まらず、周囲の神経線維のみが染まった (Fig. 2C)。海馬では線状体と同様に神経細胞と神経突起に強い染色が見られ (Fig. 2B)、部位では錐体細胞層、放射線維層、網状層が強く染まった。小脳ではプルキンエ細胞層と顆粒細胞層が強く染色された (Fig. 3 A, B)。さらに、神経細胞以外に、星状細胞 (Fig. 2D)、脳室の上衣細胞、脈絡叢の上皮細胞 (Fig. 2E) のグリア系細胞は中程度の染色であった。グリア系細胞に対する反応性は、medulloblastoma、glioneuroblastoma、astrocytoma、ependymoma などのグリア由来腫瘍細胞が染色されることからも確認できた。

4) CaM-キナーゼの組織内分布

調べた組織のなかで、膵臓のランゲルハンス島に強い染色が見られた。胃の胃底腺、下垂体前葉、中葉細胞、小腸絨毛の上皮細胞では中程度の染色であった。これら以外の組織でも抗体との反応性がみられることから、量的な差はあるものの、ほぼすべての組織に存在していると考えられる。ランゲルハンス島、胃底腺細胞ではある特定の細胞が強く反応することから、現在、その細胞の同定を試みている。以前報告したように、脳 CaM-キナーゼと他の組織の CaM-キナーゼはサブユニット構造が異なっており、この抗体と脳以外の組織の酵素との親和性に脳酵素と差があることも考えられるので量的な解析には注意を要する。

CaM-キナーゼの脳内分布は Ouimet ら(7)のモノクローン抗体を用いた実験結果とほぼ一致していた。また、カルモデュリン感受性酵素であるカルシニューリンの分布(8)ときわめてよく一致していた。これらのカルモデュリン系が大脳基底核、海馬の特殊な機能に関与することが考えられる。また、今回、脳のグリア系細胞や他の末梢組織で高濃度に分布する細胞が存在することが明らかとなった。今後、さらに詳細な細胞内局在について検討したい。

〔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) 福永浩司，佐藤 宏，宮本英七 (1985) 神経化学 24, 529-531. 4) Laemmli U.K. (1970) Nature 227, 680-685. 5) Miller S.G. & Kennedy M.B. (1985) J. Biol. Chem. 260, 9039-9046. 6) McGuinness T.L., Lai Y., & Greengard P. (1985) J. Biol. Chem. 260, 1696-1704. 7) Ouimet C.C., McGuinness T.L., & Greengard P. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5604-5608. 8) Goto S., Matsukado Y., Mihara Y., Inoue N., & Miyamoto E. (1986) Brain Res., in press.

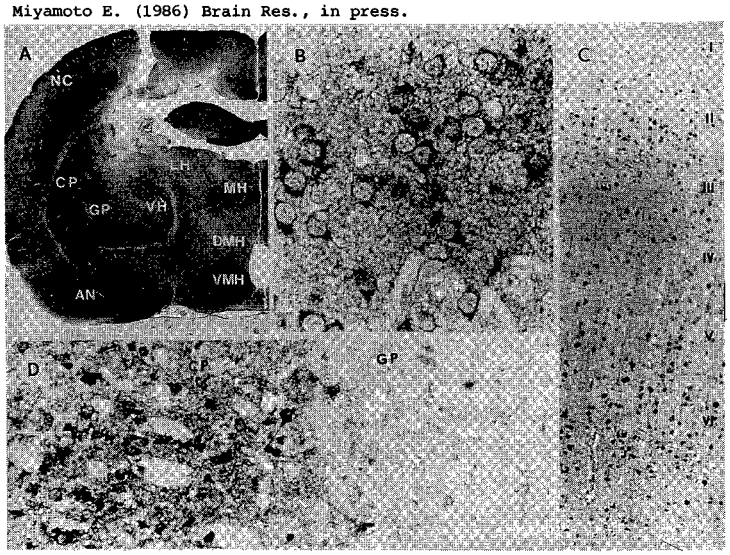


Fig. 1 Immunohistochemical stain for CaM-kinase.
A, coronal section through a hemisphere of rat brain at level of the caudateputamen; B, caudate nucleus; C, layers I-VI of premotor cortex; D, caudateputamen-globuspallidus (NC, neocortex; CP, caudate-putamen; GP, globus pallidus; LH, lateral nucleus of the thalamus; VH, ventral nucleus of the thalamus; MH, medial nucleus of the thalamus; VMH, ventral medial nucleus of the hypothalamus; DMH, dosal medial nucleus of the hypo-thalamus; AN, amygdaloid nuclei.)

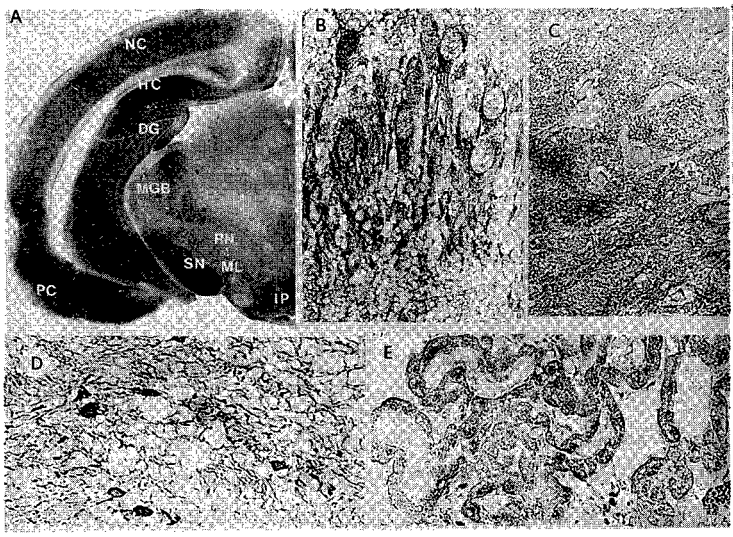


Fig. 2 Immunohistochemical stain for CaM-kinase.
A, coronal section through a hemisphere of rat brain at level of the substantia nigra; B, stratum pyramidale of the hippocampal formation; C, pars reticulata of the substantia nigra; D, astrocytes of the amygdala; E, choroid plexus of the fourth ventricle. (NC, neocortex; HC, hippocampus; DG, dentate gyrus; MGB, medial geniculate body; RN, red nucleus; SN, substantia nigra; ML, medial lemniscus; IP, interpeduncular nucleus; PC, priform cortex.)



Fig. 3 Immunohistochemical stain for CaM-kinase.
A, sagittal section of cerebellum; B, cerebellar cortex. (ML, molecular layer; PL, Purkinje cell layer; GL, granular cell layer.)

32. 脳の蛋白質脱燐酸化酵素Cによる微小管蛋白質の脱燐酸化反応と微小管重合調節

山本秀幸・斉藤義樹*・宮本英七
(熊本大・医・第一薬理，脳神経外科*)

〔要　約〕

牛脳より蛋白質脱燐酸化酵素C（脱燐酸化酵素C）を部分精製し、微小管蛋白質の脱燐酸化反応と微小管重合に対する影響について検討した。1)脱燐酸化酵素Cは牛脳より8％の収率で140倍に部分精製した。2)得られた酵素はcAMP依存性プロテインキナーゼとCa^{2+}、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ（CaM-キナーゼ）で燐酸化されたMAP2、タウ因子、チューブリンを脱燐酸化した。3) CaM-キナーゼによるMAP2、タウ因子のいずれの燐酸化も微小管の重合を阻害した。この阻害効果は、脱燐酸化反応により、ほぼ完全に消失した。4)脱燐酸化酵素Cによるチューブリン脱燐酸化反応は0.1 mM ATPで80％以上、インヒビター2で10％の阻害を受けた。5)脱燐酸化酵素Cのチューブリンに対するK_m値は10−25 μMと生理的濃度を示した。6)精製チューブリンに含まれる約0.5 mol／molチューブリンの燐酸は脱燐酸化酵素Cでは脱燐酸化されなかった。7)脳の脱燐酸化酵素2Aは脱燐酸化酵素Cと同程度に両キナーゼで燐酸化されたチューブリンを脱燐酸化した。これらの結果は、脳に脱燐酸化酵素1と2Aが存在し、微小管蛋白質の脱燐酸化反応に関与していること、蛋白質燐酸化反応による微小管重合調節が可逆的であることを示している。

Key word： Microtubule proteins, Brain protein phosphatases, Brain Ca^{2+}, calmodulin-dependent protein kinase

微小管は細胞骨格蛋白質の1つであり、種々の細胞機能に重要な役割を演じている。私達は、脳の細胞上清分画より精製したCa^{2+}、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ（CaM-キナーゼ）が微小管蛋白質であるチューブリン、微小管付随蛋白質2（MAP2）、タウ因子を燐酸化することを見出した(1-3)。これらの燐酸化反応により微小管の重合は阻害された(2,3)。Ca^{2+}、カルモデュリン依存性蛋白質燐酸化反応による微小管重合調節については山内らによっても報告がなされた(4,5)。微小管蛋白質の脱燐酸化反応に関与する蛋白質脱燐酸化酵素については詳細な検討はなされていない。私達はカルシニウリンがMAP2とタウ因子を脱燐酸化することを報告した(6)。今回、蛋白質燐酸化反応による微小管重合調節系を明らかにする目的で、牛脳より蛋白質脱燐酸化酵素C（脱燐酸化酵素C）を部分精製し、微小管蛋白質の脱燐酸化反応と微小管重合に対する影響について検討した。

〔実験材料と方法〕

実験材料：ラット脳CaM-キナーゼは既報(7)の方法に従い精製した。チューブリン、MAP2、タウ因子は既報(3)の方法により豚脳より精製した。cAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットは既報(8)の方法により精製した。脱燐酸化酵素1のインヒビター2は家兎骨格筋よりYangらの方法(9)により調製した。脱燐酸化酵素2AはTungらの方法(10)により豚脳から部分精製した。

実験方法：蛋白質燐酸化反応は既報(1)の方法、蛋白質脱燐酸化反応は既報(6)の方法にて測定した。微小管重合反応は濁度法(11)にて測定した。チューブリンに含まれる燐酸はAmesの方法(12)にて測定した。SDS-PAGEはLaemmliの方法(13)に従った。

表１．牛脳脱燐酸化酵素Ｃ精製の概略

	Protein (mg)	Specific activity (nmol/mg/min)	Total activity (nmol/min)	Purification (-fold)	Yield (%)
Crude extract	5530	4.4	24332	1	100
0-55% ammonium sulfate fraction	2664	5.9	17517.6	1.3	64.6
Ethanol precipate	315.8	61.3	19358.5	13.9	79.6
0-65% ammonium sulfate fraction	107.8	81.3	8723,5	18.5	35.9
DEAE-cellulose	21.6	183.2	3957.1	41.6	16.3
Sephacryl S-200	2.75	720.5	1981.5	136.8	8.13

〔実験結果と考察〕

1) 牛脳からの脱燐酸化酵素Ｃの部分精製：脱燐酸化酵素Ｃは、家兎骨格筋から脱燐酸化酵素１と2Aの触媒サブユニットを精製する方法(14)に従って部分精製した。cAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットで燐酸化されたヒストンH1を基質として用いると８％の収率で140倍に部分精製された（表１）。得られた酵素標品は12％ SDS-PAGEにて、36Kの主要な蛋白バンドと２、３の微細な蛋白バンドを示した。ヒストンH1の脱燐酸化反応は0.1 mM ATPで約80％、インヒビター２で約10％の阻害を受けた。これらの実験結果より、脳の脱燐酸化酵素Ｃは主に脱燐酸化酵素2Aの触媒サブユニットからなり、わずかに脱燐酸化酵素１の触媒サブユニットが含まれていると結論された。

2) 脱燐酸化酵素ＣによるMAP2とタウ因子の脱燐酸化反応と微小管重合に対する影響：CaM-キナーゼと触媒サブユニットで燐酸化されたMAP2とタウ因子は脱燐酸化酵素Ｃにより脱燐酸化された。両キナーゼによる燐酸化部位が異なることを報告したが(3)、脱燐酸化反応には両キナーゼで、大きな違いは認められなかった。CaM-キナーゼによるMAP2とタウ因子の燐酸化反応が微小管の重合を阻害することを報告したが(3)、脱燐酸化反応の重合阻害に対する影響を検討した（表２）。CaM-キナーゼ存在、非存在下で30分間燐酸化反応後、EGTAを加えて反応を止め、脱燐酸化酵素Ｃ（PrP-C）の存在、非存在下でさらに15分間インキュベートした。〔γ-^{32}P〕ATPを用いて測定すると、CaM-キナーゼにより、10.9 mol/mol MAP2、14.1 mol/molタウ因子の燐酸が取り込まれた。脱燐酸化反応により、3.4 mol/mol MAP2、2.5 mol/molタウ因子と燐酸の量は減少した。同様の条件下で燐酸化反応と脱燐酸化反応を行なった後の重合反応の結果を表２に示した。MAP2、タウ因子どちらの場合も、燐酸化反応により重合の初速度（Rate）と最終程度（Extent）が減少した。脱燐酸化反応により、この阻害効果はほぼ完全に消失した。これらの結果は、CaM-キナーゼによるMAP2とタウ因子の燐酸化反応による微小管重合阻害効果が可逆的であることを示している。同様の結果はcAMP依存性MAP2燐酸化反応について報告がなされている(15)。

表２．燐酸化脱燐酸化反応と重合阻害反応の関係

CaM-kinase	PrP-C	MAP2			Tau Factor		
		MAP2 Phosphorylation (mol/mol MAP2)	MT. Assembly Rate (%)	MT. Assembly Extent (%)	Tau Factor Phosphorylation (mol/mol Tau)	MT. Assembly Rate (%)	MT. Assembly Extent (%)
-	+	0	112.5	96.4	0	89	123
-	-	0	100	100	0	100	100
+	-	10.9	62.5	72.7	14.1	37	61.7
+	+	3.4	93.4	94.5	2.5	82	107

3) 脱燐酸化酵素ＣによるチューブリンＩ脱燐酸化反応：脱燐酸化酵素Ｃにより、両キナーゼで燐酸化されたチューブリンが脱燐酸化された。チューブリンの脱燐酸化反応については、今まで報告がないので、詳細に検討した。a) 触媒サブユニットで燐酸化したチューブリンを用いて二価イオンとカルモデュリンの影響を調べた。チューブリン脱燐酸化反応は、0.1 mM Ca^{2+}、0.1 mM Ca^{2+}と1.5 μMのカルモデュリン、10 mM Mg^{2+}で

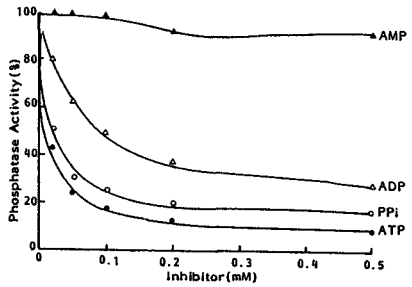


図１．各種阻害剤の影響

は活性化されなかった。1 mM Mn^{2+}によってのみ約1.5倍に活性が増加した。b) チューブリン脱燐酸化反応に対して種々の阻害剤の効果を検討した(図1)。ピロリン酸、ATPは低濃度で脱燐酸化反応を阻害した。ADPの効果は軽度であり、AMPは阻害効果を示さなかった。c) 脱燐酸化反応はインヒビター2により約10％の阻害を受けた。d) 脱燐酸化酵素Cのチューブリンに対するK_m値は10−25 μMと生理的濃度を示した。e) 精製したチューブリンには約0.5 molの燐酸が含まれていたが、脱燐酸化酵素Cでは脱燐酸化を受けなかった。f) 脳より脱燐酸化酵素2Aを部分精製し、脱燐酸化酵素Cによる脱燐酸化反応と比較した。脱燐酸化酵素Cによるチューブリン脱燐酸化反応は20分でほぼプラトーに達し、60分で42−47％の脱燐酸化を受けた。脱燐酸化酵素2Aでは60分まで徐々に脱燐酸化は増加し、50−58％の脱燐酸化を受けた。即ち、チューブリンは脳の脱燐酸化酵素2Aの基質であることが確認された。

以上の結果は、脳に脱燐酸化酵素1と2Aが存在し、微小管蛋白質の脱燐酸化反応に関与していることを示している。微小管蛋白質燐酸化反応についてはcAMP系とCa^{2+}、カルモデュリン系で作用様式が互いに異なることを報告したが(3)、脱燐酸化反応については明確な相違は認められなかった。このことは、両系による細胞内情報伝達の消去機構が共通であることを示唆している。私達はCaM-キナーゼによるMAP2とタウ因子の燐酸化反応が微小管重合を阻害することを報告した(3)。今回の実験により、阻害効果が可逆的であることが示された。これらの結果は、Ca^{2+}、カルモデュリン依存性蛋白質燐酸化反応による微小管重合調節系が実際に生体内で機能している可能性を強く示唆している。

本研究の一部は、第59回日本薬理学会総会で報告した。

REFERENCES

1) Fukunaga K., Yamamoto H., Matsui K., Higashi K. and Miyamoto E. (1982) J. Neurochem. 39, 1607-1617.
2) Yamamoto H., Fukunaga K., Tanaka E. and Miyamoto E. (1983) J. Neurochem. 41, 1119-1125.
3) Yamamoto H., Fukunaga K., Goto S., Tanaka E. and Miyamoto E. (1985) J. Neurochem. 44, 759-768.
4) Yamauchi T. and Fujisawa H. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 975-981.
5) Yamauchi T. and Fujisawa H. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 287-291.
6) Goto S., Yamamoto H., Fukunaga K., Iwasa T., Matsukado Y. and Miyamoto E. (1985) J. Neurochem. 45, 276-283.
7) Fukunaga K., Yamamoto H., Tanaka E. and Miyamoto E. (1984) Biomed. Res. 5, 165-176.
8) Miyamoto E., Petzold G.L., Kuo J.F. and Greengard P. (1973) J. Biol. Chem. 248, 179-189.
9) Yang S.D., Vandenheede J.R. and Merlevede W. (1981) FEBS Lett. 132, 293-295.
10) Tung H.Y.L., Alemany S. and Cohen P. (1985) Eur. J. Biochem. 148, 253-263.
11) Gaskin F., Cantor C.R. and Shelanski M.L. (1974) J. Mol. Biol. 89, 737-758.
12) Ames B.N. (1966) Methods Enzymol. 8, 115-117.
13) Laemmli U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
14) Resink T.J., Hemmings B.A., Tung H.Y.L. and Cohen P. (1983) Eur. J. Biochem. 133, 455-461.
15) Murthy A.S.N. and Flavin M. (1983) Eur. J. Biochem. 137, 37-46.

33. ウシ大脳シナプス膜分画からのアクチンフィラメントおよびチューブリンと相互作用を示す35Kカルモデュリン結合蛋白質の精製

祖父江憲治・岡部登志男・門脇浩三・伊藤和幸・野村政夫
(大阪大・医・神経薬理生化学)

〔要　約〕

ウシ大脳シナプス膜分画より、ハイドロキシルアパタイトカラム・カルモデュリンアフィニティーカラムおよびホスホセルロースカラムクロマトグラフィーを用いて新しいカルモデュリン結合蛋白質を分離精製した。この蛋白質の分子量は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動上 35Kであった。35K蛋白質は、Ca^{2+}やカルモデュリンの存否に関係なくアクチンフィラメントと結合し（遠心法）、またアクチンフィラメントの粘度を上昇させる(low-shear falling-ball 法)。35K蛋白質はアクチンフィラメントをbundlingすることが電子顕微鏡（ネガティブ染色）で観察された。さらに、この蛋白質はチューブリンとも結合し（遠心法）、チューブリン重合を促進させることを明らかにした（光散乱測定法、ネガティブ染色による電子顕微鏡観察）。脳シナプス膜分画に存在し分子量的にこの蛋白質に類似するものとしてカルバクチンやクラスリン軽鎖が挙げられるが、35K蛋白質とは種々の点で相違している。以上のことから、この 35K蛋白質は神経細胞骨格における新しい制御蛋白質として機能していることが期待される。

Key word : Calmodulin binding protein, Actin filament, Tubulin

細胞骨格系の機能制御は、Ca^{2+}ーカルモデュリン(CaM) 系によって行なわれていることが明らかになりつつある。私たちはこれまで CaMと細胞骨格蛋白質間を仲介するものとして一連の CaM結合蛋白質を精製し、その性質を検討してきた。そして細胞骨格関連 CaM結合蛋白質として10種類の蛋白質が存在し、10^{-6}M のCa^{2+}濃度を境としてflip-flop switch system で細胞骨格のCa^{2+}制御を行なっていることを明らかにした(4,10)。今回、私たちはウシ大脳のシナプス分画より新しい細胞骨格関連 CaM結合蛋白質を精製し、細胞骨格蛋白質との再構成実験を行なうことによりその性質を検討した。

［方法］ CaM結合蛋白質の精製：ウシ大脳皮質よりシナプス分画を調整し、細胞骨格構成蛋白質を抽出した後、ハイドロキシルアパタイトカラム・ CaMアフィニティーカラム・ホスホセルロースカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。

アクチン：Spudich & Wattの方法により、ウサギ骨格筋より精製した(11)。

PCーチューブリン：Berkowitz らの方法により微小管を分離し(1)、Sloboda らの方法に従い、ホスホセルロースカラムを用いてPCーチューブリン標品を分離した(8)

Low-shear falling ball法：MacLean-Fletcher & Pollardの方法に従った(5)。

遠心法：a)アクチンとの結合…各標品を混合し、30°C，30分のインキュベート後150,000xg，30 分の超遠心によって、上清分画と沈殿分画に分離し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)によって各分画の分析を行なった(9)。b) PC-チューブリンとの結合…混合物を37°C，20分間インキュベートした以外は、a)と同様。

光散乱測定法： CaM結合蛋白質とPCーチューブリンを混合し、37°Cの条件下で 350

nm における散乱光の時間変化を記録測定した。
SDS-PAGEは Laemmliの方法 (6)で行ない、蛋白質濃度は Lowry法(7) で測定した。
［結果］　図１Ａは、ホスホセルロースカラムの溶出パターンを示す。SDS-PAGE上 35Kに相当する分画のみを集め、ホスホセルロースカラムで再濃縮した（図1B）。収量は、ウシ大脳皮質600gあたり約3mg であった。

この 35K蛋白質を用いて、アクチンフィラメントおよびPC－チューブリンとの再構成実験を行なった。図２は、 35K蛋白質の濃度変化によるアクチンフィラメントの粘度変化をLow-shear falling-ball法により測定したものである。Ca^{2+}および CaM の存否に関わらず、 35K蛋白質濃度依存性に粘度が上昇し、ついにはアクチンフィラメントのゲル化を示す。同様の系で遠心法を行なったのが図３である。Ca^{2+}の有無に関係なく 35K蛋白質はアクチンフィラメントと結合する。興味あることに CaMも 35K蛋白質を介してアクチンフィラメントと結合する。ネガティブ染色による電子顕微鏡観察では、Ca^{2+}およびCa^{2+}-CaM非依存性に、 35K蛋白質はアクチンフィラメントをbundlingさせることが示された。

図４Ａは、PC－チューブリンとの相互作用を光散乱測定法により検討したものである。 35K蛋白質を添加した時は、時間と共に吸光度が上昇し約１分後にプラトーに達する。また同時に行なった遠心法では、チューブリンは 35K蛋白質と共に沈殿分画にみられる（図4B）。ネガティブ染色による電子顕微鏡観察では、 35K蛋白質を添加するとチューブリンは並走する二本のマクロチューブルを単位として重合することが明らかになった。

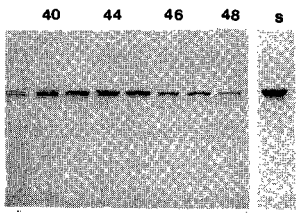


図１　35K 蛋白質の精製
（A）ホスホセルロースカラムクロマトグラフィーの溶出パターン（数字はフラクション番号を示す）
（B）同カラムでの35K 蛋白質分画の再濃縮

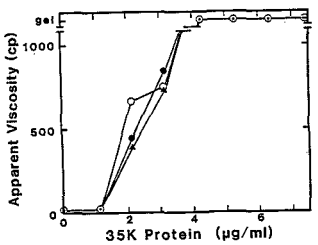


図２　35K 蛋白質によるアクチンフィラメント粘度の変化
EGTA（○）；　$CaCl_2$ （●）；　$CaCl_2$ +CaM（▲）

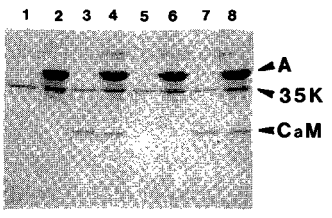


図３　35K 蛋白質とアクチンフィラメントの結合… 遠心法
上清分画(1,2,5,7),沈殿分画(2,4,6,8,)
$CaCl_2$ (1,2)；　$CaCl_2$ +CaM (3,4)；　EGTA (5,6)；EGTA+$CaCl_2$ (7,8)
A－アクチン，　35K－35K 蛋白質

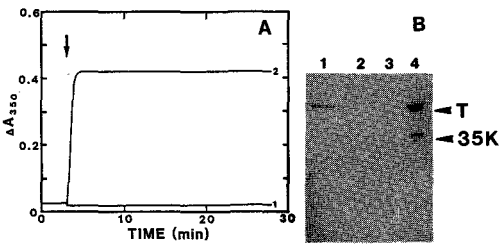


図４　35K 蛋白質のチューブリン重合促進効果
（A）光散乱法　　チューブリン(1)：チューブリン＋35K 蛋白質(2)
（B）遠心法　　チューブリン(1,2)；チューブリン＋35K 蛋白質(3,4)
上清分画(1,3)；沈殿分画(2,4)．T－チューブリン

［考察］　以上、大脳シナプス膜分画から新しい CaM結合蛋白質を精製し、それがアクチン線維およびPC－チューブリンと結合することを示した。分子量的にこの蛋白質に類似するものとしてカルバクチン(calpactin) (2,3) やクラスリン軽鎖(clathrin light chain)(12,13) が挙げられる。しかし、 35K蛋白質はカルバクチンの36K サブユニットとは分子量の点で相違しており、またカルバクチンのもう１つのサブユニットである 10Kサブユニットを有しない。また、小腸じゅう毛より精製したカルバクチンに対する抗体とは免疫学交叉性を示さなかった。カルバクチンはアクチンフィラメントとの結合性にCa^{2+}感受性を有するが、我々の精製した 35K蛋白質は CaM添加によってもCa^{2+}感受性を示さなかった。クラスリン軽鎖については、low-shear falling-ball法および遠心法でアクチンフィラメントと結合しないことから、 35K蛋白質とは異なった蛋白質であると考えられる。現在、この蛋白質の詳細な性質および上記細胞骨格での制御機作などの観点から検討を進めている。

［文献］

1. Berkowitz,S.A.,Katagiri,J.,Binder,H.K. and Williams,R.C.Jr. (1977) Biochemistry 16,5610-5617
2. Gerke,V. and Weber,K. (1984) EMBO J.3,227-233
3. Glenney,G. (1986) J.Biol.Chem.261,7247-7252
4. Kakiuchi,S. and Sobue,K. (1983) Treds.Biochem.Sci.8,59-62
5. MacLean-Fletcher,S.D. and Pollard,T.D. (1980) J.Cell.Biol.85,414-428
6. Laemmli,U.K. (1970) Nature(London) 227,680-685
7. Lowry,O.H.,Rosenbrough,N.J.,Farr,A.L.and Randall,R.J.(1951) J.Biol.Chem. 193,265-275
8. Sloboda,R.D.,Dentler,W.L.and Rosenbaum,J.L. (1976) Biochemistry 15,4497-4505
9. Sobue,K.,Muramoto,Y.,Fujita,M. and Kakiuchi,S.(1981) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78,5652-5655
10. Sobue,K.,Tanaka,T.,Kanda,K.and Ashino,N.(1986) in The role of calcium in biological systems (Anghileri,L.J.ed.) CRC Press,inc.,Florida, in press
11. Spudich,J.A. and Watt,S. (1971) J.Biol.Chem.246,4866-4871
12. Ungewickell,E. (1983) EMBO J. 2,1401-1408
13. Winkler,F.K. and Stanley,K.K. (1983) EMBO J. 2,1393-1400

34. カルスペクチン—アクチン相互作用の Ca^{2+}制御機構
（赤血球スペクトリン—アクチン相互作用との対比）

田中敏彦・神田啓子・藤尾　慈・祖父江憲治
（大阪大・医・神経薬理生化学）

〔要　約〕

私たちは脳の膜分画からカルスペクチンと呼ぶ赤血球スペクトリン類似の蛋白質を分離・精製してその性質を検討してきた。カルスペクチンはF-アクチンと結合するが、この結合はCa^{2+}・カルモデュリン(CaM) により何ら影響を受けない。しかし、ある蛋白質因子の存在下では、Ca^{2+}・CaM依存性に結合の転換を示すこと（フリップ・フロップ結合）を見いだした。この蛋白質因子（フリップ・フロップ因子）同定のため、脳膜分画より粗カルスペクチンを抽出してゲルろ過し、各溶出分画のF-アクチンゲル化能を測定した。溶出の最初のピークは主にカルスペクチン＝アクチン複合体であり強いゲル化能をもつが、Ca^{2+}存在下にCaM を添加するとゲル化能が抑制された。また、赤血球膜より抽出したスペクトリン＝ 4.1蛋白質＝アクチン複合体とアクチン間の相互作用はCa^{2+}濃度に依存しているが、このCa^{2+}感受性はCaM とCaM 結合蛋白質である 4.1蛋白質の相互作用に基づいていること、さらにカルスペクチン・ 4.1蛋白質・アクチン再構成系にも同様のCa^{2+}感受性があること明らかにした。以上からフリップ・フロップ因子と 4.1蛋白質の相似が考えられる。また、実際にカルスペクチン＝アクチン複合体中に抗 4.1蛋白質抗体と交叉する蛋白質を見いだした。

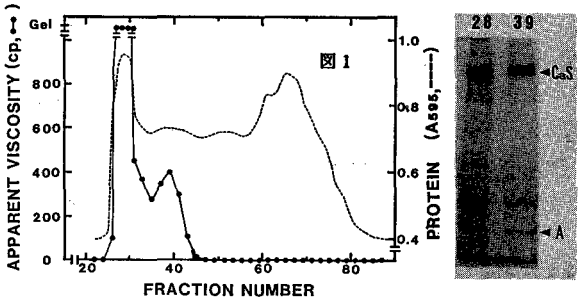
Key word :　calspectin, flip-flop binding, protein 4.1

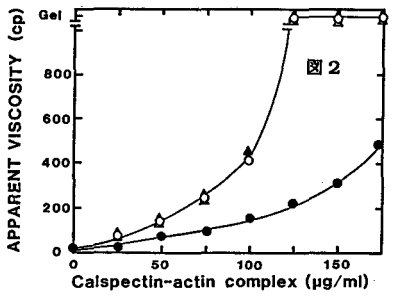
［目的］　赤血球の特異な凹レンズ状形態を維持している細胞膜裏打ち構造は、主にスペクトリン・ 4.1蛋白質・アクチンで構成されている。スペクトリンは赤血球だけに存在するとされていたが、私たちは脳の膜分画中にカルモデュリンと結合するスペクトリン類似蛋白質を発見しカルスペクチンと名付けた(1-3)。カルスペクチンは神経系をはじめ細胞一般に普遍的に存在し、アクチンフィラメントと細胞膜との接点となる蛋白質であり、カルスペクチン・F-アクチン間相互作用の変化が細胞膜裏打ち構造の制御ひいては細胞機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。既に、ある蛋白質因子（フリップ・フロップ因子）の存在下で、カルスペクチン・F-アクチン間相互作用がCa^{2+}・カルモデュリンによって制御されることを見いだしたが(4)、今回、赤血球スペクトリン・ 4.1蛋白質・アクチン系と比較しつつ、この制御機構を検討した。

［方法］　脳よりカルモデュリン・カルスペクチン・カルスペクチン＝アクチン複合体(1-3)を、赤血球よりスペクトリン(5)・ 4.1蛋白質(6)を、骨格筋よりアクチン(7)をそれぞれ分離した。粘度は、100 mM KCl, 20 mM Imidazole•HCl(pH7.2), 0.1 mM DTT, 1 mM EGTA, 0 - 1 mM $CaCl_2$ の条件で各試料を混合して30℃・30分静置後、falling-ball法によって測定した(8)。

［結果］　赤血球膜スペクトリン抽出法と同様に、低イオン強度抽出液で脳の膜分画より粗カルスペクチンを抽出し、セファロース４Ｂを用いてゲルろ過を行なった。各溶出分画をF-アクチンと混合し、falling-ball法によってその粘度を測定した。溶出の最初のピークは主にカルスペクチン＝アクチン複合体であり、次のピークはカルス

スペクチン四量体である（図１）。両分画共にF-アクチンの粘度を上昇させるが、前者の方が作用が強く、添加量を増すと遂にはF-アクチンのゲル化を示した（図２）。このゲル化はCa^{2+}存在下にカルモデュリンを添加すると抑制された（図３）。





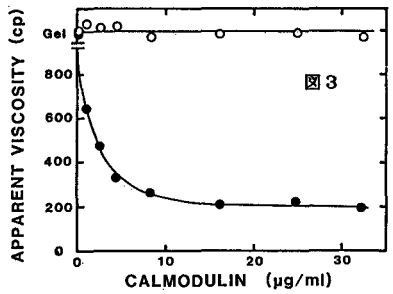
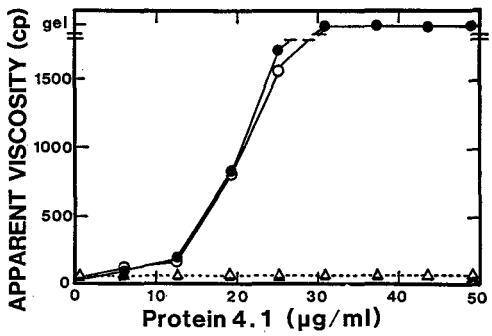


図１　脳抽出液のセファロース４Ｂによるゲルろ過。
SDS-PAGE像はカルスペクチン＝アクチン複合体(No.28)
とカルスペクチン四量体（No.39)の溶出分画。

図２　カルスペクチン＝アクチン複合体による
F-アクチン粘度上昇効果。
Ca^{2+}（▲),Ca^{2+}･CaM（●),EGTA（△), EGTA･CaM(○)

図３　カルモデュリン添加によるゲル化の抑制。
Ca^{2+}（●), EGTA(○)

また、赤血球での再構成実験において、 4.1蛋白質はスペクトリンーアクチン間相互作用を増強する（ゲル化）が、Ca^{2+}感受性は示さなかった（図４）。この条件下にカルモデュリンを添加すると、Ca^{2+}存在下でゲル化が阻害された（図５）。スペクトリンはカルモデュリン結合蛋白質であるが、通常の実験条件ではカルモデュリンと結合しない。しかし、ここで 4.1蛋白質もカルモデュリン結合蛋白質であることがわか



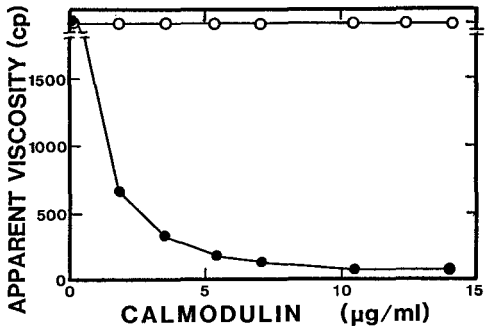


図４　4.1蛋白質によるスペクトリンーアクチン間
相互作用の増強。
F-アクチンのみ　　Ca^{2+}（▲),EGTA（△),
F-アクチン＋スペクトリン　Ca^{2+}（●),EGTA（○)

図５　スペクトリンー 4.1蛋白質ーアクチン系へのカルモデュリン添加効果。　Ca^{2+}（●), EGTA(○)

った。つまり、スペクトリン－4.1蛋白質－アクチン系のCa^{2+}感受性因子はカルモデュリンであり、この系のCa^{2+}制御機作はカルモデュリンと 4.1蛋白質の相互作用に基づいているのである。この再構成系においてスペクトリンをカルスペクチンに置き換えても、カルモデュリンがCa^{2+}感受性因子として作用することを明らかにした（表１）。

表１ Effect of Ca^{2+} and calmodulin on the viscosities of a reconstituted system including calspectin, F-actin and protein 4.1.

assay mixture	apparent viscosity (cp) $1.3X10^{-5}$ M free Ca^{2+}	1 mM EGTA
F-actin	25	24
F-actin + calspectin	160	164
F-actin + calspectin + CaM	160	165
F-actin + 4.1	26	28
F-actin + calspectin + 4.1	>1000	>1000
F-actin + calspectin + 4.1 + CaM	204	>1000

以上のことからフリップ・フロップ因子と 4.1蛋白質の相似が示唆され、抗 4.1蛋白質抗体を用いてイムノブロット法で検索したところ、カルスペクチン＝アクチン複合体標品中にこの抗体と交叉する蛋白質が見いだされた。

［考案］　カルスペクチン・F-アクチン間相互作用のCa^{2+}制御機構の解明は、細胞骨格と細胞膜間の調節機構の解明に繋がる重要な課題である。私たちは、この相互作用にフリップ・フロップ因子が存在することを報告した。この因子を同定し制御機構を解明するため、より単純で良く研究されている赤血球スペクトリン－ 4.1蛋白質－アクチン系を用いた再構成実験を行ない、この結果を脳カルスペクチン系の実験に還元・比較検討した。

カルスペクチン（スペクトリン）・F-アクチン間相互作用はフリップ・フロップ因子（ 4.1蛋白質）存在下で、Ca^{2+}・カルモデュリンによるフリップ・フロップ制御をうけていると考えられる。つまり、カルスペクチン（スペクトリン）・F-アクチンの結合は、フリップ・フロップ因子（ 4.1蛋白質）により増強されるが、Ca^{2+}濃度が高くなるとカルモデュリンとフリップ・フロップ因子（ 4.1蛋白質）が結合するために、その増強効果が抑制される。

［文献］

1. Kakiuchi,S.,Sobue,K. and Fujita,M. (1981) FEBS Lett.132,144-148
2. Kakiuchi,S.,Sobue,K.,Kanda,K.,Morimoto,K.,Tsukita,S.,Tsukita,S.,Ishikawa, H., and Kurokawa,M. (1982) Biomed.Res.3,400-410.
3. Sobue,K.,Kanda,K.,Inui,M.,Morimoto,K. and Kakiuchi,S. (1982) FEBS Lett. 148,221-225
4. Sobue,K.,Kanda,K.,Adachi,J. and Kakiuchi,S. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80,6868-6871
5. Brenner,S.L. and Korn,E.D. (1979) J.Biol.Chem. 254,8620-8627
6. Ohanian,V. and Gratzer,W. (1984) Eur.J.Biochem.144,375-379
7. Spudich,J.A. and Watt,S. (1971) J.Biol.Chem.246,4866-4871
8. MacLean-Fletcher,S.D. and Pollard,T.D. (1980) J.Cell.Biol.85,414,428

35. カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡによるアクチンと微小管結合蛋白質２の相互作用の調節

山内　卓・藤沢　仁　　(旭川医科大・生化第一)

〔要　約〕

我々は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）が微小管結合蛋白質２（MAP2）のリン酸化を介して微小管の重合脱重合の調節を行うことをすでに報告した．そこで，キナーゼIIによるMAP2のリン酸化の重要性をさらに明らかにするため，MAP2のリン酸化がMAP2とアクチンとの相互作用にどのような影響を与えるか調べた結果，MAP2とアクチンとの相互作用がMAP2のリン酸化によって強く阻害されることが明らかとなった．すなわち，リン酸化していないMAP2はアクチンと相互作用しアクチンのゲル化を引起こす．しかし，キナーゼIIによってリン酸化したMAP2はアクチンをゲル化させる活性がMAP2のリン酸化量の増加にともない低下し，十分リン酸化したMAP2はアクチンのゲル化を起こさなかった．一方，MAP2はキナーゼIIばかりでなくcAMP依存性プロテインキナーゼやリン脂質依存性プロテインキナーゼ（キナーゼC）によってもリン酸化され，そのリン酸化によりMAP2のアクチンをゲル化させる活性が阻害されたが，ゲル化の阻害はキナーゼIIとキナーゼCの場合が強かった．この結果，この三種のキナーゼが，MAP2のリン酸化を介して微小管とアクチンの相互作用を調節する可能性が考えられる．

Key word： Calmodulin, Protein phosphorylation, Microtubules,

カルモデュリンはカルシウムの関与する神経機能の調節や種々の細胞機能の調節に重要な役割を果たしている．我々はラットの脳に３種類のカルモデュリン依存性プロテインキナーゼを見出し，そのうちの１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うことを明らかにし，キナーゼIIが神経機能の調節に重要な役割を担っている可能性を示した（10-14）．一方，最近アクチンと微小管の相互作用が神経機能のダイナミックな過程にとって重要である可能性が示され，MAP2とアクチンとの相互作用が，cAMP依存性プロテインキナーゼ（キナーゼA）によるMAP2のリン酸化によって調節される可能性が示唆された（4,7）．我々はMAP2とアクチンの相互作用がカルシウムによっても調節されるものと考え，キナーゼIIによってMAP2をリン酸化するとMAP2とアクチンの相互作用がどのような影響を受けるか調べた．その結果，キナーゼIIがMAP2をリン酸化することによりMAP2とアクチンとの相互作用が強く阻害されることが明らかとなり，キナーゼIIは微小管の重合脱重合の調節ばかりでなく微小管とアクチンの相互作用も調節する可能性が明らかとなった．

［　実　験　方　法　］

キナーゼII(12)，キナーゼC(5) キナーゼA(9) ホスホリラーゼキナーゼ(2) ミオシン軽鎖キナーゼ(1) は，それぞれ報告された方法で精製した．MAP2はラットの脳から熱安定な微小管結合蛋白質を調製し，さらにゲルろ過によって精製した(3)．アクチンはウサギの筋肉から調製し，ゲルろ過によって精製した(6).MAP2とアクチンの相互作用は

Falling ball法による粘度の測定(8)により行った．この条件で見かけの粘度は1cpから12000cp測定でき，3分間測定してボールが全く動かない状態をゲルとした．標準反応液は10mM MOPS Buffer, pH7.0, 1 mM EGTA, 0.1 mM $MgCl_2$, 50mM KCl, 0.1mM ATP, 0.45mM DTT，アクチンとMAP2からなり0.125ml中24℃ 30分間反応した．

リン酸化MAP2は，40mM MOPS buffer中0.05mM ATPを含む反応液にそれぞれのプロテインキナーゼと必要な成分（Ca^{2+}，カルモデュリン，cAMP，ホスファチジルセリン，ジオレインなど）を加えて30℃，15-30分間リン酸化反応を行い調製した．MAP2のリン酸化量は同じ条件で［γ-^{32}P］ATPを用いてリン酸化反応を行い測定した．

［実験結果，考察］

MAP2はアクチンと相互作用しアクチンのゲル化を起こすことが報告されているが，MAP2をキナーゼIIでリン酸化するとアクチンをゲル化させる活性が失われた．キナーゼIIによるMAP2のゲル化活性の消失にはATP, Mg^{2+}, Ca^{2+}, カルモデュリンのすべての成分が必要であり，いずれか一つの成分が欠けてもMAP2のアクチンをゲル化させる活性は失われなかった．図1は，MAP2とアクチンとの相互作用をそれぞれの濃度を変化させFalling ball法による粘度測定で調べた結果を示す．この条件ではアクチンの濃度が0.3mg/mlの

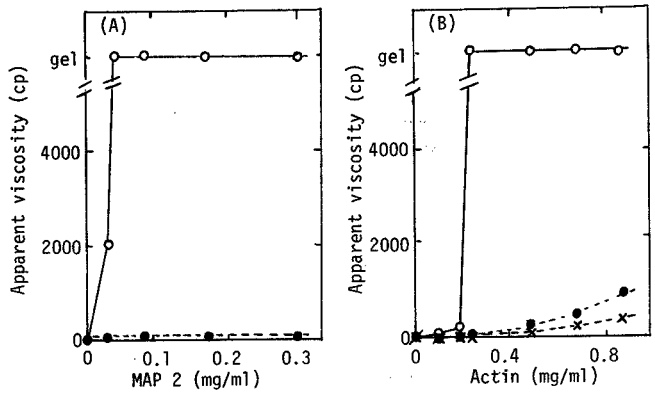


Fig. 1. Dependence on the concentration of MAP 2 (A) and actin (B) of the apparent viscosity of actin filament with MAP 2. o—o, unphosphorylated MAP 2; ●---●, phosphorylated MAP 2; x---x, without MAP 2.

Table I. Relationship between phosphorylation of MAP 2 and critical gelation concentration of MAP 2 mixed with actin filaments

Phosphorylation	Critical gelation concentration
mol Pi/mol MAP 2	mg/ml MAP 2
0	0.04
1.0	0.11
2.4	0.15
4.2	0.22
10.3	-

Actin = 0.30 mg/ml.

Table II. Effects of phosphorylation of MAP 2 by various protein kinases on actin filament cross-linking activity

Protein kinase	Phosphorylation of MAP 2		Apparent viscosity	
	Rate	Extent	Concentration of MAP 2 (mg/ml) 0.08	0.29
	pmol/min/mg	mol/mol	cp	
None	-	-	gel	gel
Kinase II	339	10.3	125	208
Kinase C	280	5.0	125	167
Kinase A	208	4.3	469	gel
Phosphorylase kinase	1	1.3	gel	gel
Myosin light cahin kinase	0.3	0.3	gel	gel

Actin = 0.3 mg/ml.

ときMAP2の濃度0.03mg/ml 以下，あるいはMAP2が0.06mg/ml のときアクチンの濃度が0.20mg/ml 以下ではアクチンのゲル化は起こらなかった．一方，あらかじめMAP2をATP, Mg^{2+},Ca^{2+} とカルモデュリン存在下にキナーゼIIによってリン酸化した後，アクチンとの相互作用を調べると，MAP2あるいはアクチンの濃度を増加させてもアクチンとMAP2の相互作用による粘度の上昇は起こらなかった．このようにMAP2のリン酸化によりMAP2とアクチンの相互作用が阻害されることが明らかとなったので，つぎにMAP2のリン酸化量とアクチンのゲル化に必要なMAP2量の関係を調べた．その結果，表Ⅰに示すように，MAP2のリン酸化量が増加するにともないアクチンのゲル化に必要なMAP2の量が増加し，MAP2が約10モル　リン酸化されると実験条件下ではゲル化が起こらず，ゲル化に必要なMAP2の濃度を決める事ができなかった．従ってMAP2とアクチンの相互作用の強さはMAP2のリン酸化量に依存することを示している．

さて，MAP2とアクチンの相互作用はキナーゼAによるMAP2のリン酸化により調節されていることが報告されているので(7),ここで，種々のプロテインキナーゼによりMAP2のリン酸化を行いないMAP2とアクチンの相互作用を比較した．表IIに示すように，pH7.0でMAP2のリン酸化速度は酵素によって差がありキナーゼII，キナーゼC，キナーゼAはMAP2をよくリン酸化したが，MAP2のリン酸化量はキナーゼIIによる場合が最大であった．ホスホリラーゼキナーゼとミオシン軽鎖キナーゼはMAP2をほとんどリン酸化しなかった．一方，MAP2とアクチンの相互作用を比較すると，MAP2の濃度が低い場合にはキナーゼII，キナーゼC，キナーゼAのいずれでリン酸化してもアクチンのゲル化は起こらないが，キナーゼAでリン酸化した場合にはMAP2の濃度が高くなるとアクチンのゲル化が起こることから，キナーゼIIとキナーゼCに比べキナーゼAの作用は少し弱いものと考えられる．ホスホリラーゼキナーゼとミオシン軽鎖キナーゼではMAP2とアクチンとの相互作用には大きな変化がなかった．従ってMAP2とアクチンの相互作用はキナーゼII，キナーゼC，キナーゼAによって影響をうけるが，それらの作用の強さ，MAP2のリン酸化量のちがいなどに差が認められた．

以上のようにMAP2はキナーゼIIばかりでなくキナーゼCやキナーゼAによってもリン酸化されアクチンとの相互作用が調節されている可能性が明らかになったので．今後さらに生理的条件下にMAP2とアクチンの相互作用を調べ神経機能の調節におけるプロテインキナーゼを介するカルシウムとcAMPの役割について明らかにしたい．

［　文　　献　］

1. Adelstein, R. S. & Klee, C. B. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7501-7509
2. Cohen, P. (1973) Eur. J. Biochem. 34, 1-14
3. Fellous, A., Francon, J., Lennon, A. M. & Nunez, J. (1977) Eur. J. Biochem. 78, 167-174
4. Griffith, L. M. & Pollard, T. D. (1978) J. Cell Biol. 78, 985-965
5. Kitano, T., Go, M., Kikkawa, U., & Nishizuka, Y. Methods Enzymol. in press
6. MacLean-Fletcher, S. & Pollard, T. D. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 18-27
7. Nishida, E., Kuwaki, T. & Sakai, H. (1981) J. Biochem. 90, 575-578
8. Pollard, T. D. & Copper, J. A. (1982) Methods Enzymol. 85, 211-233
9. Rubin, C. S., Erlichman, J., & Rosen, O. M. (1972) J. Biol. chem. 247, 36-44
10. Yamauchi, T. & Fujisawa, H. (1980) FEBS Lett. 116, 141-144
11. Yamauchi, T. Nakata, H. & Fujisawa, H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 5404-5409
12. Yamauchi, T. & Fujisawa, H. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 15-21
13. Yamauchi, T. & Fujisawa, H. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 287-291
14. Yamauchi, T. & Fujisawa, H. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 234, 89-96

36. 心臓ムスカリン様受容体におけるアゴニスト結合部位と A-cyclase 抑制反応との連関

周　暁明・水島　淳・内田修次・渡辺康裕・吉田　博
（大阪大・医・第一薬理）

〔要　約〕

モルモット心臓膜の mAChRの３つのアゴニスト結合部位(superhigh, high, low 親和性アゴニスト結合部位; SH, H, L) はアゴニストに対して高親和性の SH-H と低親和性のH-L タイプに分類できるが、本研究では各タイプと A-cyclase抑制反応との連関を検討した。カルバコール、オキソトレモリン、ピロカルピンによる A-cyclase抑制反応のK$_D$値は、Hに対する各アゴニストの結合のK$_D$値と良く一致した。低濃度カルバコール共存下で膜をPrBCM で処理すると、SH-Hタイプの結合部位と各アゴニストによる A-cyclase抑制効果は保存されたが、H-L タイプの結合部位は消失した。アトロピン共存下でPrBCM 処理した場合は、結合部位の減少と、 A-cyclase抑制効果の減少は、同程度であった。以上の結果より、心臓 mAChRを介する A-cyclaseの抑制に関与しているのは、主にSH-Hタイプの受容体でありH-L タイプの受容体は、 A-cyclase抑制の発現に関与していないと示唆された。

Key word： Cardiac muscarinic receptor, Agonist binding sites, A-cyclase inhibition

ムスカリン様アセチルコリ受容体（mACh-R）には、親和性の異なる３つのアゴニスト結合部位（SH･H･L）がある事が知られている（1, 2, 4)。我々は、モルモット心臓 mACh-R を、アゴニスト共存下に共有結合性のアンタゴニスト Propylbenzilylcholine mustard(PrBCM) で処理することにより、HとLを特異的にアルキル化し、残ったアゴニスト結合部位に対するＧＴＰアナログの効果を検討し、３つのアゴニスト結合部位がそれぞれＧＴＰに依存して相互変換する２つのサブタイプ（SH-Hタイプ・H-L タイプ）に分類できることを報告した(3) 。この結果は、心臓には２種のmACh-Rがあり、それぞれがＧＴＰ結合蛋白質（Ｇ蛋白）を介して別の反応に関与している事を示唆している。

今回、未処理膜及び、PrBCM + カルバコール処理膜にて、イソプロテレノール活性化アデニレートサイクレース(A-cyclase) に対する各種ムスカリン様アゴニストの抑制効果を検討し、副交感神経による心筋陰性変力効果に関与すると思われる A-cyclaseの抑制が、主にSH-Hタイプを介しており、H-L タイプによる寄与は少ないとの結論を得たので報告する。

〔　方　法　〕

１．膜試料　　モルモット心房を 0.32 M 庶糖液中でホモジナイズし、7,000g･30 分間の上清を100,000g･60 分間遠心し、沈渣を用いた。

２．^{3}H-QNB 結合実験　　膜試料を ^{3}H-QNB と100 mM NaCl･1 mM Mg^{2+} を含む50mM Na リン酸バッファー(pH 7.4 ; 以下 PB) 中で、37℃ 1 時間インキュベートし、特

図 1） 各アゴニストによる A-cyclase抑制効果

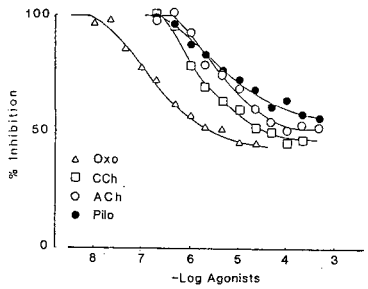


表 1） 未処理膜での各アゴニストによる A-cyclase抑制反応の K_D 値と最大抑制率及びアゴニスト結合部位の K_D 値

	Inhibition of A-cyclase in intact membrane		K_D value of agonist binding site		
	KD (μM)	Maximum %	SH	H	L
CCh	4.3	55.1	60.2 nM	2.18 μM	18.0 μM
OXO	0.35	55.48	6.31nM	0.676 uM	
Pilo	5.27	41.8	441 nM	6.45 uM	
ACh	4.3	48.4	N.D.		

表 2） CCh-PrBCM 処理膜での各アゴニストによるA-cyclase 最大抑制反応及び、未処理膜との比較

	K_D (μM)	Inhibition max (%)	Pretreated/intact (%)
CCh	5.66	43.2	78.5
OXO	–	40.9	74.5
Pilo	–	32.4	77.5
ACh	–	36.2	75.4

図 2） PrBCM 処理による ^{3}H-QNB 結合・ A-cyclase抑制反応の減少作用に及ぼすCCh 及びAtr 共存の影響

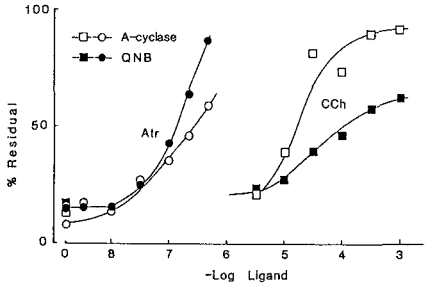
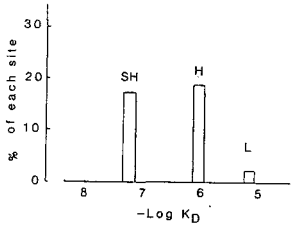


図 3） 表2の膜試料におけるアゴニスト結合部位



異的結合を求めた。また、アゴニスト結合部位の K_D 値及び比率は、 CChによる ^{3}H-結合阻害実験を行い、結果を非線形最小自乗法を用いて解析して得た(2, 4)。

3．PrBCM 処理　0.15～0.4 mg/ml の膜蛋白を200uM の活性化PrBCM を含む PB 中で15℃ 30 分間処理し、2回洗浄後、結合実験及び、 A-cyclase実験に供した。PrBCM 処理に対する各種リガンドの影響を検討する場合は、各リガンドをPrBCM と共存させた。

4．A-cyclase活性　膜蛋白質約 500 ug/ml・ 1 mM IBMX・ 0.1 mM cAMP・ 0.1mM EGTA・ 5 mM creatine phosphate・ 0.4 mg/ml creatine kinase・ 2 mg/ml BSA・ 50 uM [α-^{32}P] ATP(0.2 ～0.3 uCi/tube) を含む PB 中（100 ul）にて、25℃ 9分間反応させ、生成した [α-^{32}P] cAMPを分離後、放射活性を測定した(5)。各ムスカリン様アゴニストによる抑制の K_D 値と最大抑制率は、100 uM isoproterenol(Iso) 存在下での活性に対して抑制実験を行い、結果を最小自乗法で解析して得た。

（ 結　果 ）

1．未処理膜での A-cyclase抑制効果

100 uM Iso存在下での A-cyclase活性に対する、カルバコール（CCh)・ピロカルピン (Pilo)・オキソトレモリン(Oxo)・アセチルコリン(ACh) の抑制効果を検討した（図1）。この結果を最小自乗法で解析し、K_D 値及び最大抑制率(%) を得た（表1）。CCh、Pilo、Oxoの A-cyclase抑制効果の K_D 値は、それぞれ結合実験より得られたH、の K_D 値に良く一致した（表1）。G蛋白を介する反応の K_D 値は、受容体蛋白がG

蛋白と解離している状態のK_D値に一致すると考えられる。従って、この結果は、A-cyclaseの抑制が、SH-Hタイプの受容体を介していることを示唆している。

2．PrBCM + CCh処理膜での A-cyclase抑制効果

PrBCM 処理により、^{3}H-QNB のB_{max}、CCh による A-cyclase最大抑制効果はそれぞれ18%、14.5% にまで減少した。種々の濃度の CChを共存させると ^{3}H-QNB のB_{max}、A-cyclase 抑制効果の減少は、CChの濃度依存的に回復した。しかし、両者の CCh依存性には解離があった（図２）。例えば、CCh 300uM 共存下でPrBCM 処理した場合はリガンドの結合が可能な受容体が、未処理膜の約40% にまで減少しているにも拘らず CChによる A-cyclase最大抑制率は20% 減少したに過ぎなかった（図２、表２）。この時、H-L タイプが選択的にアルキル化されており、^{3}H-QNB の結合が可能な受容体は、ほとんどSH-Hタイプであった（図３）。この処理膜では、他のアゴニストについても、最大抑制効果を発現し得る濃度での A-cyclase抑制率と未処理膜での最大抑制率との比は、80 %程度であった（表２）。この結果は、心臓 mAChRを介する A-cyclaseの抑制効果に係る受容体が、主に SH-H タイプの受容体である事を示唆するが、スペアリセプターの存在を否定するため、以下の実験を行った。

3．PrBCM + アトロピン（Atr)処理膜での A-cyclase抑制効果

種々の濃度のAtr をPrBCM 処理時に共存させると、PrBCM による ^{3}H-QNB のB_{max}・CChによるA-cyclase 抑制効果の減少は、Atr 濃度依存的に回復したが、CCh共存下で見られた様な解離はなかった（図２）。さらに、PrBCM + CCh 処理により CChによる A-cyclase抑制効果のK_D値が変化しないことから（表 1、2)、mAChR による A-cyclaseの抑制効果を検討した今回の実験系に、スペアリセプターの存在を考慮する必要の無いことが解った。従って、以上の結果より、心臓 mAChRを介する A-cyclaseの抑制に関与しているのは、主にSH-Hタイプの受容体であり、H-L タイプの受容体は、A-cyclase抑制の発現にあまり関与していないと思われる。

〔 結 語 〕

ムスカリン様受容体（mACh-R）の分類にはピレンゼピン等の特異的アンタゴニストを用いてM_1・M_2 に分ける方法が良く知られており、それぞれイノシトールリン脂質代謝、アデニレートサイクレース抑制に関与しているとされているが逆の報告もあり混乱している。今回用いたモルモット心臓の mAChRは、M_2 に属すとされているが、ある条件下では、ピレンゼピンに対する親和性の異なる２つの群に分類し得るとの報告もある。この報告とアゴニストの親和性を基礎として、我々が提出した２つのサブタイプとの関連は不明であるが、いずれにせよ心臓 mAChR受容体は、少なくとも異なる２種のサブタイプから成っており、その内１つだけが、A-cyclase抑制に関与していると思われる。今後 mAChRを介する他の反応と、サブタイプとの関連を検討する。

〔 文 献 〕

(1) Birdsal, N.J.M. et. al., 1978, Mol. Pharmacol., 14, 723-736
(2) Mizushima, A. et. al., 1985, Eur. J. Pharmacol., 119, 177-182
(3) Mizushima, A. et. al., 1986, Japanese J. Pharmacol. suppl., 184
(4) Uchida, S. et. al., 1984, Eur. J. Pharmacol., 100, 291-298
(5) Watanabe, Y. et. al., 1986, Molecular Pharmacol., 29, 258-263

37. 興奮性アミノ酸受容体活性化によるラット脳の phosphatidylinositol turnover：生後発達に伴う変化と ibotenate 刺激効果に対する N-methyl-D-aspartate の増強作用について

秋山一文・山田了士・氏家　寛・佐藤光源・大月三郎
（岡山大・医・神経精神科）

〔要　約〕

近年、興奮性アミノ酸受容体のsubtypeのなかに、その活性化に応答して、phosphatidylinositol (PI) turnoverを生じさせるものが見い出されている。本研究では、脳内興奮性アミノ酸受容体に働く各agonistのPI turnover調節への作用を調べる目的で以下の実験（①，②）を行った。① quisqualate, N-methyl-D-aspartate (NMDA), kainateのラット各脳部位（海馬、線条体、大脳皮質）のPI turnoverへの作用を生後の発達段階に応じて検討した。どの脳部位に於ても、生後11日までにL-glutamateとquisqualateによるPI turnoverが著明に認められ、NMDA, kainateによっても basal level を45-75 %上回る反応が存在した。生後18日以後ではどのagonistに対する反応も急速に減退した。②ibotenate刺激による成熟ラット海馬でのPI turnoverはNMDAによって著明に増強された。このNMDAによる増強効果はDL-2-amino-4-phosphono-butyrateによって抑制されたが、DL-2-amino-7-phosphno-heptanoic acidによっては抑制されなかった。これらは、脳内興奮性アミノ酸受容体各subtypeが生後発達段階においてPI turnoverに対する反応性を変え、NMDAが成熟ラットに於てもAPB sensitive site刺激によるPI turnoverを間接的に増強させる所見であると考えられる。

Key word：phosphatidylinositol turnover, N-methyl-D-aspartate, excitatory amino acid

グルタミン酸は、海馬などで興奮性神経伝達物質として作用し、痙攣などに密接に関係していると考えられる(8)。中枢 neuron への興奮作用を指標に、興奮性アミノ酸受容体は電気生理学的にquisqualate, N-methyl-D-aspartate (NMDA), kainateタイプ受容体に分類され、さらにこれらのどの範疇にも属さないL-2-amino-4-phosphono-butyrate (L-APB) sensitive siteがligand結合実験などより提唱されている(4)。最近、Nicolettiら(5)は、グルタミン酸analogueであるibotenateによりラット脳海馬スライスでphosphatidylinositol (PI) turnoverが起こり、この反応はAPBによって選択的に阻害されると報告している。Signal transductionに関係するPI turnoverが興奮性アミノ酸受容体活性化に応答して起こることはシナプス可塑性の研究にとって重要な意義をもつと考えられる(8)が、PI turnoverをめぐって興奮性アミノ酸receptor subtypeがどのような相互作用をもっているか明らかにされていない。そこで今回は、興奮性アミノ酸受容体subtype刺激によるPI turnoverが、ラット脳の生後発達段階でどのように変化するのかを検討すると同時に、成熟ラット海馬でibotenateによるPI responseをNMDAが著明に増強するとの知見を得たので報告する。

（実験方法）

生後発達段階の変化を調べる実験には、S.D.系ラット（雄性及び雌性）を用いた。PI turnover の測定は生後 7日、11日、18日、25日、32日にて海馬、線条体、大脳皮質の3脳部位で行った。薬物間の相互作用を調べる実験には成熟雄性Wister系ラットの海馬を用いた。全てのラットは12時間毎の明暗サイクル下で飼育した。

PI turnoverの測定：ほぼBerridgeらの方法(2)に依った。ラットを断頭後、線条体、

海馬、大脳皮質を氷上で切り出し，直ちにMcIlwain tissue chopperにて350μm x 350μmの大きさにスライスした。脳スライスを95% O_2/5% CO_2 で飽和されたKrebs-Hensleit bufferで37℃、20分間3回洗った後，50μlのgravity-packed slice(約0.4-0.6 mg protein/tube)を37℃，60分間，1.0 μCiのmyo-[2-^{3}H]inositol (Amersham, specific activity 13.8 Ci/mmol)とpreincubateした。そしてLiCl(最終濃度10 mM)存在下に各種薬物を添加し、最終容量200 μlで37℃ 60分間incubateした。反応は、chloroform/methanol(容量比 1:2) 0.94 mlを加えることにより停止させた。続いてスライスを超音波破砕し、0.31 mlのchloroform, 0.31 mlのH_2Oを加え、遠沈分離を行った。0.8 mlのH_2O-methanol相を4 mlのH_2Oと混じ、ミニカラム内に充填した陰イオン交換樹脂(AG 1 X-8, formate form, Bio-Rad)に通し、既報(2)に従い、[^{3}H]inositol 1-phosphate ([^{3}H]IP_1)を溶出し、放射活性を測定した。蛋白測定はLowry法に依った。

(結果)

①海馬と線条体に於ては生後7日と11日目にはL-glutamateとquisqualateによるPI turnoverが著明に(basal levelの600-900 %)認められ、NMDA, kainateによる反応もbasal levelを45-75 %上回って存在した。(図1, A及びB)。大脳皮質でも絶対値は小さいもののこれらの特徴が認められた(結果略)。生後18日以後ではいずれのagonistに対する反応も急速に減退した。

②成熟ラット海馬に於けるibotenate (6 x 10^{-4}M)刺激によるPI turnoverはNMDA (10^{-3}M)によって著明に増強され(図2)、kainate (10^{-3}M)によって抑制された(結果省略)。このNMDAによる増強効果は、DL-2-amino-4-phosphono-butyrate (APB)によって抑制されたが、NMDA型receptorのantagonistであるDL-2-amino-7-phosphono-heptanoic acid (APH)によっては抑制されなかった。NMDAはquisqualateによるPI turnoverを増強せず、NMDAのみでは無反応またはごく軽微な増加を示すにすぎなかった。

(考察)

APB sensitive siteは、従来、電気生理学的指標に基づいていた興奮性アミノ酸受容体の分類(quisqualate, NMDA, kainate)とは別に、主にligand結合実験の成績から提唱されてきた概念でありCa^{++}, Cl^{-1}によって増強され、APBによって選択的に抑制されるという特徴をもつ(4)。最近Nicolettiら(5)が見いだしたibotenic acid刺激によるラット海馬でのPI turnover亢進は、おそらくこのAPB sensitive site活性化に対応したsignal transductionを反映したものと考えられる。

今回の研究で、第1に、生後11日までのラット線条体、海馬では、L-glutamate, quisqualateのみならず、軽度ながらNMDA, kainateによってもPI turnoverが起こることが認められた。NMDA, kainateによる反応は、胎児マウス線条体neuronでも認められる(7)ことから、胎生期又は生後まもない時期には、興奮性アミノ酸受容体各subtypeのPI responseへの態度が成熟後のそれとは異なっているものと考えれられる。

第2に明らかになった点は、成熟ラット海馬でibotenateによるPI turnoverがNMDAによって著明に増強された点である。NMDAのみでは成熟ラット海馬で全くPI turnoverをひきおこさなかったことは、Nicolettiらの報告(5)に一致するが、増強効果という形で、NMDA receptorのPI turnoverへの関与が今回明らかにされた。NMDA型receptorに

ついては、neuronの反復興奮性、或いはlong term potentiationと関係づけられており興味深い(3)。最近、PI turnoverをめぐるreceptor間の複雑な相互作用が知られるようになり、興奮性アミノ酸についても、carbachol, norepinephrineなどによるPI responseを抑制するとの報告(1,6)がある。これらの事より、APB sensitive site刺激によるPI turnoverがNMDA receptorを介する機構によって間接的に増強されると推測される。しかしAPHによってきっ抗されなかった点など必ずしも明快な結論は引出し難く今後の検討が必要であると考えられる。

Fig.1

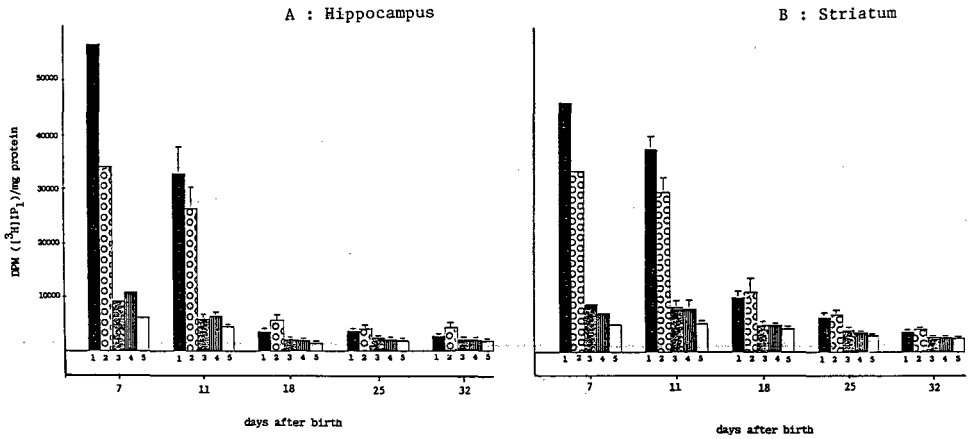


Fig.2

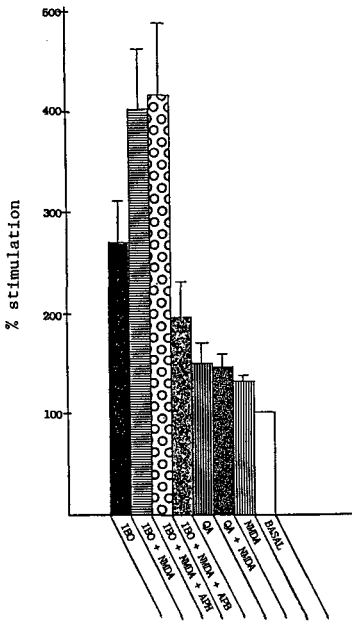


Fig.1 Postnatal changes in excitatory amino acid-stimulated PI turnover in the rat hippocampal (A) and striatal (B) slices.
Values are expressed as mean ± S.E.M. of DPM ($[^3H]IP_1$)/mg protein on 4 determinations.

1 : L-glutamate, 2 : quisqualate, 3 : NMDA, 4 : kainate, 5 : basal. Concentration of each drug is 10^{-3}M.

Fig.2 Enhancement by NMDA of ibotenate-stimulated PI turnover in the rat hippocampal slices
Values are expressed as mean ± S.E.M. of 5 determinations. IBO : ibotenate, QA : quisqualate.
Concentrations of each drug are 6 x 10^{-4}M for IBO and 10^{-3}M for the other drugs.

(文献)
1. Baudry, M., Evans, J. and Lynch, G.(1986) Nature 319,329-331. 2. Berridge, M.J., Downes, C.P. and Hanley, M.R.(1982) Biochem. J.206, 587-595. 3. Dingledine, R. Trends in Neurosci. (1986) 9,47-49. 4. Foster, A.C.and Fagg, G.E. (1984) Brain Res. Rev. 7,103-164. 5. Nicoletti, F., Meek, J.L., Iadorola, M. J., Chuang, D.M., Roth, B.L. and Costa, E. (1986) J. Neurochem. 40, 40-46.
6. Nicoletti, F., Iadorola, M.J., Wroblewski, J.T. and Costa, E. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 1931-1935. 7. Sladeczek, F., Pi, J-P., Recasens, M., Bockaert, J. and Weiss, S. (1985) Nature 317,717-719. 8.山田丁士、秋山一文、氏家寛、佐藤光源、大月三郎(1986) 神経化学、25.

38. 抗うつ薬によるβ受容体減少とグアニンヌクレオチド結合調節蛋白

朝倉幹雄・塚本　徹・窪田　博・松井宏晃・今福　淳
伊野美幸・西崎　純・佐藤厚子・新保　清・長谷川和夫
(聖マリアンナ医大・神経精神科)

〔要　約〕

三環系抗うつ薬 desipramine(DMI) と非定型四環系 mianserin(MIA) 慢性投与後のラット大脳皮質を用いて，β受容体数，β受容体とグアニンヌクレオチド結合調節蛋白（促進性Ns蛋白）との "coupling"，および Ns, Ni 蛋白の量的変化を比較検討した．1) DMI 3日投与の64時間(h)後，β受容体は 22%減少している．　β受容体を減少しないと報告されていた MIA は 3日投与の6h後では 25%の有意な減少を示すが，24h 後には回復する．2) L-isoproterenolによる[^{3}H]CGP-12177結合阻害曲線の結果は，抗うつ薬慢性投与後はβ受容体のアゴニスト高親和性状態(RH)から低親和性状態(RL)への変換（阻害曲線の右方偏移および Hill 係数 $\eta_H \rightarrow 1$）や，アゴニスト高親和性状態の形成能低下は見られなかった．3) Nsαサブユニットをコレラ毒素(CT)と，また抑制性Niαサブユニットを百日咳毒素（islet activating protein; IAP）と[^{32}P]nicotineamide adenine dinucleotide(NAD) による ADP-ribosyl化反応により標識し，オートラジオグラフィーを行ない比較した結果，DMI, MIA 10 日間投与 24h後，NsαおよびNiα・subunitの明らかな量的変化を認めなかった．以上より定型および非定型抗うつ薬に共通の生化学的作用機序を考察した．

Key word：　antidepressant, β-receptor, guanine nucleotide binding protein

【　緒言　】

三環系抗うつ薬 desipramine(DMI) 等の慢性投与後，ラット脳β受容体が減少しnorepinephrine(NE)感受性adenylate cyclase(NE-AC)活性は低下する．しかし非定型四環系 mianserin(MIA) は，NE-AC 活性は低下するがβ受容体を減少しないと報告されていた(4)．NE-AC活性はβ受容体と促進性のグアニンヌクレオチド結合調節蛋白(Ns)を介し活性化され，α2 受容体と抑制性 Ni を介し抑制される二重支配を受けている．従って抗うつ薬投与後では，β受容体－Ns－ACまたはα2 受容体－Ns－ACの間の変化が考えられる．そこでβ antagonistの[^{3}H]CGP-12177結合のl-isoproterenol(l-ISO)による阻害曲線から，β受容体とNs蛋白との "coupling"を検討した．次にNsαとNiα subunitを[^{32}P]NAD の ADP-ribosyl化反応により標識しその量的変化を調べ，定型，非定型抗うつ薬に共通の生化学的変化を検討した．また抗うつ薬によるβ受容体減少機構と5-HTの役割について考察を加えた．

【　方法　】

1. 動物・薬物処置と受容体膜標品：　ウィスター系雄性ラット(180-250g)に,1日 1～ 2回，desipramine(DMI), mianserin(MIA), maprotiline(MPR), zimelidine(ZIM), 1～14日間皮下投与した．ラットは薬物最終投与6h～64h 後に断頭屠殺した．大脳皮質を分割しホモジナイズ後，50,000g 2 回遠心洗浄し，bufferに懸濁したものを受容体膜標品として用いた．

2. [^{3}H]CGP-12177によるβ受容体結合実験：　[^{3}H]CGP-12177結合飽和実験は，膜標品(0.2～0.5mg protein)を 0.05-2.0nM の[^{3}H]CGP-12177([^{3}H]CGP; S.A.30Ci/mmol)と50mM Tris･HCl buffer中で40分間インキュベート後，Whatman GF/B上に吸引濾過し，フィルターを測定した．特異的結合は10μM alprenololより決定し，Scatchard 解析によりBmaxとKdを求めた．

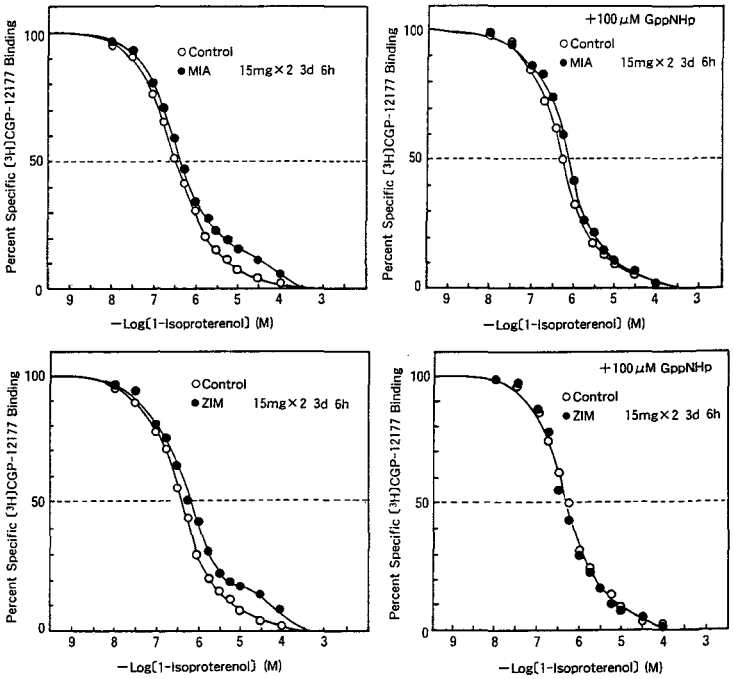


Fig. 1. Displacement curves of [^{3}H]CGP-12177 binging by isoproterenol in the absence or presence of 100μM GppNHp. Rats were treated with MIA (upper) or ZIM(lower) for 3 days and sacrificed after 6 h of last doses.

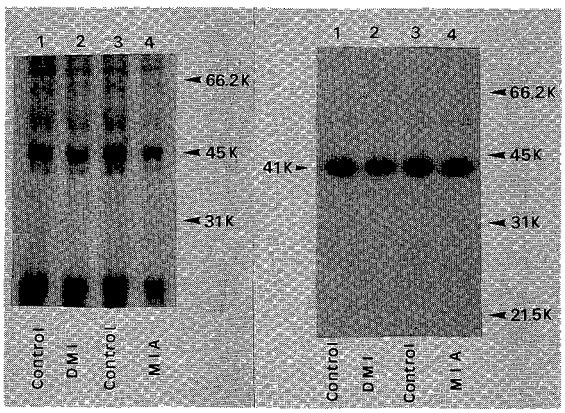


Fig. 2. Autoradiographic analysis of SDS PAGE of radioactive products resulting from cholera toxin(left) or islet activating protein(right)-catalyzed ADP-ribosylation of rat cortical membranes. Rats were treated with desipramine(DMI) or mianserin (MIA) for 10 days. Membranes were incubated with [^{32}P]NAD in the presence of activated CT or IAP as described under methods.

[^{3}H]CGP結合阻害実験はDMI, MIA ZIM 投与ラットの膜標品を1.0nM [^{3}H]CGPと10nM～0.1mM l-ISOをGppNHp, MgCl$_2$ 存在，非存在下で同様に行なった．阻害曲線はtwo-site modelによる非線形最小二乗法で，アゴニスト高親和性(KH)と低親和性(KL)の 2成分(RH, RL)を算出した．

3. [^{32}P]NAD によるNsα，Niαの ADP-ribosylation： DMI, MIA 10日間投与 24h後の膜標品(50 ～100 μg protein)は，25 mM Tris･HCl buffer pH 7.5, thymidine,MgCl$_2$, guanosine-5'-triphosphate(GTP), EDTA, ATP,[^{32}P]NAD (SA 27.5Ci/mmol)と，コレラ毒素(CT)あるいは百日咳毒素(IAP) 存在下でインキュベートした．反応はice-cold

bufferで停止後，Laemmli のsample buffer に懸濁後SDS-polyacrylamide-gelにて電気泳動(SDS PAGE)を行ない，オートラジオグラフィーを施行した．

【 結果と考察 】

1. 抗うつ薬投与後のβ受容体減少： DMIは 3日投与後 24h後のβ受容体数(Bmax)の減少率は22～25% で，7 日投与 12h後は35～37% 減少し64h 後も 22%の減少が続いた．MIA 15mg x2 7日投与6h後では 25%以上の減少を認めたが 24h後には有意な減少を見ない．MIA をfluoxetine(FLX) または5-HTP と併用 7日間6h後では37% の著明な減少が見られ，24h 後も33% の減少が維持された．またPCPA 200mg/kg 7 日前投与し，DMI+PCPA 3日間併用6h後では有意に減少するが 24h後には回復する．抗うつ薬によるβ受容体減少は，NE増加だけでは直ちに回復し，5-HTの増加を伴ってはじめて 24h以上の減少が維持される．従って5-HTはβ受容体減少維持に重要な役割を果たしている(1)． 抗うつ薬によるβ受容体減少が細胞膜から細胞内へのinternalization(2)によるか，β受容体の構造変化によるものかは明らかでないが，β受容体蛋白の再合成が24h 以内とするとかなり速い．

2. L-ISOによる[^{3}H]CGP結合阻害：DMI 14日投与後では，Mg^{2+}，GppNHpの存在に拘らず I-ISOによる阻害曲線のIC50値は対照と変らない．MIA，ZIM 3日または14日投与6h，24h 後ともに阻害曲線は若干右方偏移し，非常に低親和性の成分(2μM)の増加が見られた(Fig.1) ．そのためHill係数 (η H)は0.86から0.74に低下した．またKHやRH %の比率に有意な変化は見られなかった．この結果は抗うつ薬投与後のβ受容体は GTPなどで起こる高親和性(RH)から低親和性状態(RL)への変換や，アゴニストによるRH形成能の低下が起きていないことを示しており，Lefkowitz 一派(3) がin vitroで報告しているagonist-induced desentitization とは異なるようである．しかしMIA やZIM で見られた非常に親和性の低い成分の増加は，何らかのβ受容体の構造変化を否定できない．

3. 抗うつ薬投与後のNsα，Niαの量的変化

DMI，MIA 10日間投与後の膜標品のNsα･subunit (αs)は45K ，Niα･subunit (αi)は 41Kのバンドが確認できる(Fig. 2AB)．DMI，MIA投与後，明らかなNsαとNiαの量的変化はない．したがって，MIA でみられるβ受容体とNE-AC 活性の解離現象は，NsやNi蛋白の機能的変化，すなわちアゴニストによる各α･subunitと結合した GDPの遊離，すなわち GDP-GTP交換反応に変化があることが示唆される．

本研究は昭和60，61年度厚生省神経疾患研究委託費，昭和61年度文部省科学研究費ならびに昭和61年度私学学術研究振興資金の援助を受けている．

【 文献 】

1) 朝倉幹雄，塚本 徹，松井宏晃，今福 淳，伊野美幸，長谷川和夫(1986)，昭和61年度厚生省神経疾患研究委託費研究成果報告書，73-81.

2) Chuang,D.M.,Kinnier,W.J.,Faber,L. and Costa,E.(1984)Mol.Pharmacol.18,348-355.

3) Kent,R.S., De Lean,A and Lefkowitz,RJ.(1980), Mol.Pharmacol.17,14-23.

4) Mishra,R.,Janowsky,A. and Sulser,F.(1980) Noeuropharmacology,19.983-987.

39. SH 基修飾剤による 5-HT_2 受容体の不活性化に対する phencyclidine の保護作用

石川和宏・鍋島俊隆・山口和政・古川　宏*・亀山　勉
(名城大・薬・薬品作用学，薬化学*)

〔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。また、われわれはPCP が5-HT_1 受容体でなく5-HT_2 受容体に作用することをすでに見出している。そこで今回、5-HT_2 受容体へのPCP の作用をさらに明確にするために5-HT_2 受容体の拮抗薬であるritanserin (1 mg/kg, s.c.)を前処置し、PCP によって惹起される常同行動がマウスおよびラットでどのような影響を受けるか検討した。また、PCP が5-HT_2 受容体に結合していればSH基修飾剤による5-HT_2 受容体の不活性化を阻害することが考えられるので、この点についても検討を行った。Ritanserin処置群ではマウス、ラット共にPCP によって惹起される常同行動のうちhead-twitch のみが有意に減少し、このことから、マウスおよびラットにおいて、PCP により惹起されるhead-twitch は、5-HT_2 受容体を介して出現しているものと思われる。一方、4 種のSH基修飾剤すなわちN-ethylmaleimide, iodoacetamide, 5,5'-dithiobis-(2-nitro- benzoic acid) およびp-chloromercuribenzoate によって^{3}H-PCPおよび^{3}H-ketanserin の結合能が修飾剤の濃度に依存して低下した。5-HT_2 受容体を飽和するのに十分な量の10 μM PCP は、SH基修飾剤による ^{3}H-PCP および ^{3}H-ketanserin 結合の阻害作用に拮抗した。 以上の結果より PCPは 5-HT_2受容体にagonist 的に結合してhead-twitch を惹起しているのではないかと思われる。

Key word :　PCP　5-HT_2 receptors　Sulfhydryl reagents

Phencyclidine (PCP) をラットなどのげっ歯類に投与すると自発運動量の増加とともに常同行動の発現がみられ、その常同行動の中には5-hydroxytryptamine (5-HT)神経系を刺激した場合に認められるような5-HT依存性の行動とよく似た行動(head-twitch, head-weaving, turning, backpedalling, forepaw treading, wet-dog shake)が多く見られる(1)。われわれは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すでに報告している(2,3)。また、tryptophan (5-HT前駆体), p-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 が増強されること(3)、PCA で5-HT神経機能を低下させると、PCP の常同行動が減弱され(3)、逆に同じ薬物で5-HT受容体の感受性を増加させるとPCP の常同行動が増強されること(8)、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(4)、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(6) などを報告している。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いる。そこで今回、PCP の 5-HT 神経系におよぼす作用をより明らかにする目的で、5-HT_2 受容体に対して非常に選択性の高いantagonistのritanserin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をマウスおよびラットで検討し、さらにPCP が5-HT_2 受容体に結合していればSH基修飾剤による5-HT_2 受容体の不活性化を阻害することが考えられるので、この点についても検討を行った。

【実験方法】

薬物処置 : 動物はddY 系雄性マウス(30-35 g) およびFischer344系雄性ラット(200-250 g) を使用した。5-HT_2 antagonistのritanserinは、行動観察の1 時間前にマウスおよびラットに皮下投与し、その後5-HT agonist の 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5-MeODMT, 2 および 4 mg/kg), PCP (7.5, 10 および

12 mg/kg) を腹腔内へ投与して2 つの薬物により惹起される行動変化を観察した。

行動観察法 : 5-HT依存性の行動(head-twitch, head-weaving, turning, backpedalling) を経時的に記録した。なお、測定は5-MeODMTでは投与後30分間行い、PCP では7.5 mg/kg のときは60分間、10および12.5 mg/kgのときは120 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。

シナプス膜調製法および結合実験 : ラットを断頭により殺し、われわれの方法によりシナプス膜を調製した。結合実験はシナプス膜 200μl(タンパク含量約0.15-0.25 mg/200μl)に、^{3}H-ligand, cold ligand, buffer等を加え最終容量1 mlとし、25°C 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-PCP および^{3}H-ketanserin に対してそれぞれcold 10 μM PCP およびcold 5μM methysergide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。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 5μM SKF10,047 存在下で行い、また^{3}H-ketanserin の結合実験においては、ketanserinが親和性を持つα_1 受容体をブロックするため、cold 5 μM prazosin存在下で行った。また、SH基修飾剤を用いる実験ではシナプス膜の5-HT_2 受容体を飽和するのに十分な量の10μM のPCP を加え、25°C で30分間インキュベーションした後、SH基修飾剤を一定濃度加え、25°C で30分間インキュベーションした後、2.5mM dithiothreitolで反応を停止させ、その後2 回洗浄した膜を結合実験に使用した(7) 。

【結果および考察】

マウスにおいては、5-MeODMT (2 および4mg/kg) およびPCP (7.5, 10 および12.5mg/kg) により惹起されたhead-twitch は、ritanserin(1mg/kg)前処置により有意に減少し、また、ラットにおいては、ritanse-

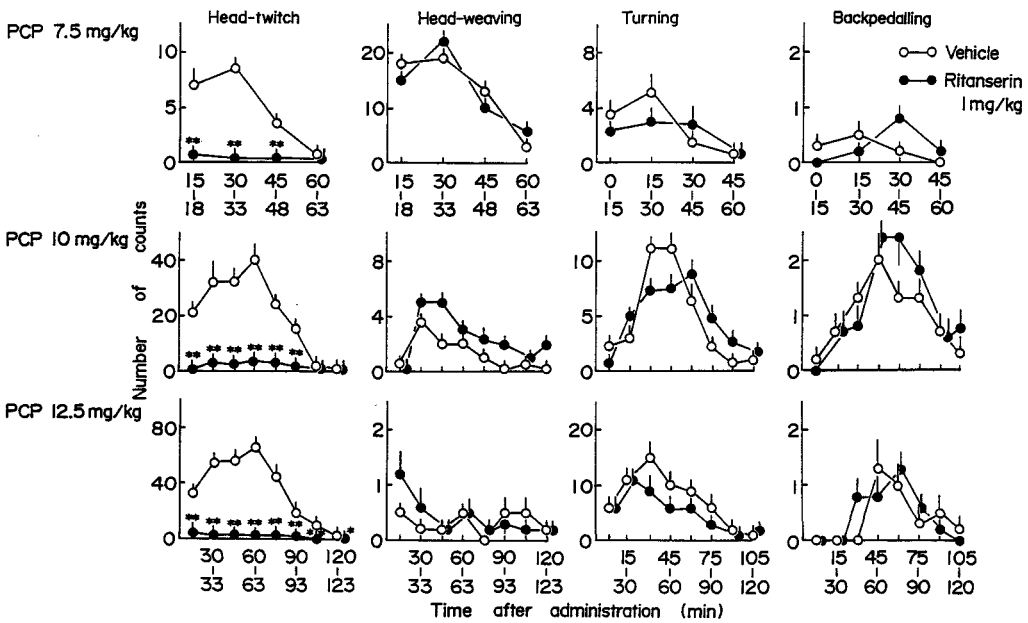


Fig. 1 Effects of ritanserin on the phencyclidine (PCP)-induced behaviors in rats. Each rat was pretreated with ritanserin (1 mg/kg, s.c.) and challenged with PCP. Values are the mean of 6-8 rats. * P < 0.05, ** P < 0.01 as compared with vehicle-pretreatment

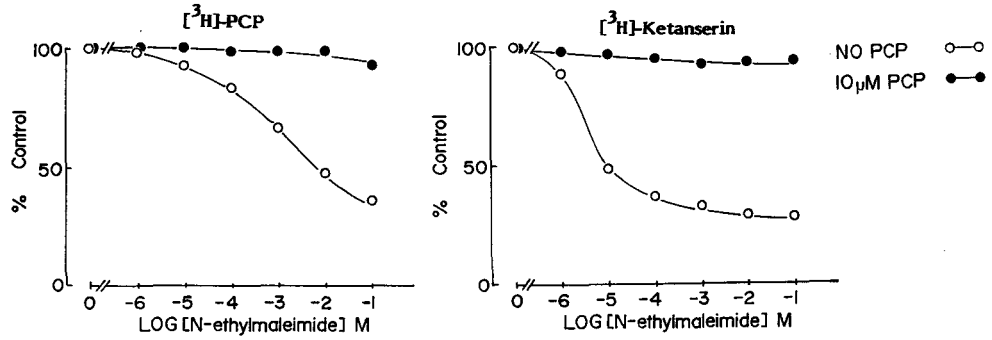


Fig. 2 Protective effects of PCP-pretreatment on [^{3}H]-PCP- and [^{3}H]-ketanserin-binding from inhibitory action of N-ethylmaleimide.

rin は5-MeODMT (2 および4mg/kg) により惹起された行動には全く影響を与えなかったが、PCP (7.5, 10 および12.5mg/kg) により惹起された常同行動のうち、head-twitch のみ有意に減少した(Fig. 1)。さらに、ラットのシナプス膜において、5-MeODMTは5-HT$_1$ 受容体に親和性が高く、PCP は5-HT$_2$ 受容体に親和生が高いということをわれわれは報告しており(4) 、このことは、マウスでは矛盾があるが、ラットではritanserin が5-MeODMTの行動には拮抗しないが、PCP により惹起される行動を拮抗するという結果とよく一致している。これらの結果から、PCP により惹起されたhead-twitch は5-HT$_2$ 受容体への直接的な作用によるもと考えられた。そこで、SH基修飾剤を用いる実験では、ラットのシナプス膜を用いて行った。4 種のSH基修飾剤, N-ethyl-maleimide, iodoacetamide, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) および p-chloromercuribenzoate で修飾後、^{3}H-PCPおよび^{3}H-ketanserin の結合能を検討したところ、修飾剤の濃度に依存して両者の結合能は低下した。一方、5-HT$_2$ 受容体を飽和するのに十分量の10μM PCP 存在下では、SH基修飾剤による^{3}H-PCPおよび^{3}H-ketanserin 結合能の低下作用は見られなかった(Fig. 2)。この結果から、PCP は5-HT$_2$ 受容体に直接結合していることが考えられる。さらに、われわれ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(4,5,6) 。以上の結果を考え合わせると、PCP は5-HT$_2$ 受容体にagonist 的に結合してhead-twitch を惹起しているのではないかと思われる。

【文献】

1)Martin, J.R. et al. (1979) Life Sci. 24, 1699-1704.
2)Nabeshima, T. et al. (1983) Eur. J. Pharmacol. 91, 455-462.
3)Nabeshima, T. et al. (1984) Pharmacol. Biochem. Behav. 21, 401-408.
4)Nabeshima, T. et al. (1984) Res. Commun. Subst. Abuse 5, 81-87.
5)Nabeshima, T. et al. (1984) Res. Commun. Subst. Abuse 5, 175-186.
6)Nabeshima, T. et al. (1985) Eur. J. Pharmacol. 109, 129-130.
7)Nabeshima, T. et al. (1985) Brain Res. 343, 36-43.
8)野田幸裕ほか (1985) 神経化学, 24, 259-261.

40. ヒト胎盤におけるオピオイドκ—タイプ受容体の受容体後機構

丹羽雅之・太田宗一郎*・野崎正勝・鶴見介登
藤村　一**　　(岐阜大・医・薬理, 麻酔*, 京都薬科大**)

〔要　約〕

オピオイドk-タイプ受容体の受容体後機構を解明する目的で, k-受容体の均一な系を確立し, 抑制性ＧＴＰ結合タンパクならびにアデニレートサイクレース(Ａ.Ｃ.)系の関与を検討した。ヒト胎盤P_3分画において ^{3}H-diprenorphine(^{3}H-DPN)および^{3}H-ethylketocyclazocine(^{3}H-EKC)のみが特異的結合を示し, ^{3}H-D-Ala_2-D-Leu_5-enkephalin(^{3}H-DADLE)ならびに ^{3}H-dihydromorphine(^{3}H-DHM)はほとんど特異的結合を示さなかった。^{3}H-DPNと^{3}H-EKC結合のScatchard plotが直線を示し, Bmax値がほぼ等しかったことよりヒト胎盤P_3分画は, オピオイド受容体に関しk-タイプが均一に存在することが示唆された。次に, この胎盤P_3分画はPGE_1によりＡ.Ｃ.活性が上昇したが, basallevelおよびPGE_1刺激時のいずれのＡ.Ｃ.活性も k-タイプアゴニストのU-50488Hにより抑制を受けなかった。さらに胎盤における^{3}H-EKC結合は極めて高用量のguanine nucleotideによってのみ抑制された。これらのことからk-タイプ受容体はGTP結合タンパクおよびＡ.Ｃ.系とは共役していないことが示唆された。

Key word :　Opioid κ-type receptor, human placenta, adenylate cyclase.

〔緒言〕

オピオイドk-受容体は 内因性オピオイドであるdynorphinの受容体とも考えられてはいるが, いまだその生理機能, 性質等は全く解明されていないといっても過言ではない。オピオイド受容体の受容体後機構としてμ, δ-タイプ受容体が, アデニレートサイクレース(Ａ.Ｃ.)系と共役している報告もあるがk-受容体に関しては不明な点が多い。我々はラット脳のオピオイド受容体には少なくとも２種類のＳＨ基が存在し(1,2) このうちの１つのＳＨ基は k-タイプとμ, δ-タイプでは異なった反応性を示すことを見い出し(3), またこの反応性の相異は 受容体後機構の違いに基づくものであることを示唆した(4)。一方, Valetteらは近年ヒト胎盤中にオピオイドの特異的結合部位が存在することを報告している(5)。今回我々はk-受容体の均一な標本を確立する目的でヒト胎盤を検討し, k-タイプ受容体のＡ.Ｃ.系との共役について検討した。

〔実験方法〕

①膜分画の調整

正常満期分娩のヒト胎盤をValetteら(5)の方法に基づき比重遠心法にてP_3分画を得た。比較としてラット全脳及び線条体の粗シナプトソーム分画を用いた。

②結合実験

ヒト胎盤に対する ^{3}H-DPN(36Ci/mmol, NEN), ^{3}H-EKC(23.3Ci/mmol, NEN), ^{3}H-DADLE(45Ci/mmol, NEN) および ^{3}H-DHM(80Ci/mmol, NEN)結合は常法に従いfilter濾過法により行った。非特異的結合はそれぞれの hotリガンドに対する過剰の coldリガンド(DPN,bremazocine,DADLE,morphine)存在下で求めた。

③Adenylate cyclase 活性

ヒト胎盤P_3分画ならびにラット線条体膜分画を 0.5mM ATP, 5mM $MgCl_2$, 0.5mMIBMXならびに0.1mM EGTA含有トリス緩衝液中100μM GTPならびに100mM NaCl存在下で 37℃ 10分間インキュベートし,生成したc-AMP量を Uiら(6)の方法にて測定し，A.C.活性とした。

〔実験結果〕

①ヒト胎盤においてオピオイド受容体のすべてのタイプに結合するとされる^{3}H-DPNとk-選択性アゴニストである ^{3}H-EKCは 飽和を伴う特異的結合を示し，そのScatchard plotは直線をあたえ，Kd値とBmax値はそれぞれ0.37nM, 40fmol/mg protein および 0.64nM, 36fmol/mg protein であった。一方，μ-選択性アゴニストの ^{3}H-DHMおよびδ-選択性アゴニストの ^{3}H-DADLEは特異的結合がほとんど認められなかった。次にヒト胎盤における一定量の ^{3}H-DPN結合に対する各種オピオイドの置換能を検討したところ U-50488H, dynorphin, bremazocine, butorphanol等の k-選択性リガンドは強い置換能を示したが，μ選択性およびδ選択性リガンド等はほとんど親和性を示さないか弱い親和性しか示さなかった。この各種オピオイドの親和性をラット脳での成績と比較すると，ヒト胎盤においてはk-リガンドの分類が明確であった。

Fig.1 Effects of Gpp(NH)p on the ^{3}H-Opioid Binding to Human Placenta and Rat Brain Membranes

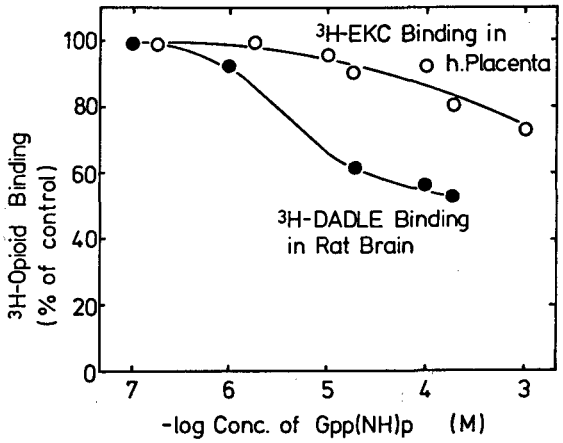
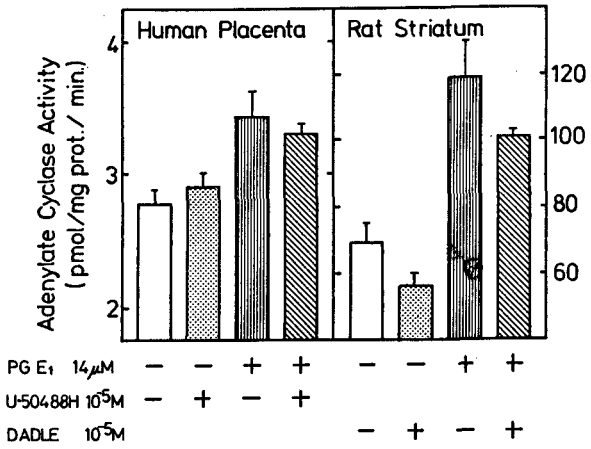


Fig.2 Effects of Opioids on Basal and PG E_1-stimulated Adenylate Cyclase Activities in Human Placental and Rat Striatal Membranes



②ヒト胎盤で k-アゴニストである^{3}H-EKC結合に対するguanine nucleotideの影響をラット脳における ^{3}H-DADLE結合と比較検討した。ヒト胎盤における^{3}H-EKC結合もラット脳における^{3}H-DADLE結合もGpp(NH)pにより用量依存的に結合抑制が認められた。しかしながら，ラット脳では約10μMの Gpp(NH)pによりほぼ最大の結合抑制効果が出現したのに対し，ヒト胎盤では1mMの Gpp(NH)pではじめてほぼ同程度の抑制を示したにすぎなかった（Fig.1)。

③ヒト胎盤における adenylate cyclase 活性は14μMのPGE$_1$により活性化された。しかし，k-agonistのU-50488HはbasalおよびPGE_1刺激時の両レベルに対し全く影響をあたえなかった。ラット脳線条体においては1×10^{-5}Mの濃度のDADLEはbasal levelならびに14μM PGE_1刺激時のA.C.活性をともに抑制した(Fig.2)。

〔考察〕

Morphine, enkephalin等のオピオイドが neuroblastoma×glioma hybrid cell(7)(8)やラット線条体(9)(10)などでオピオイド受容体を介しA.C.活性を抑制すること，このA.C.活性抑制がPertussis toxin(PT)処理により消失する(11,12)ことなどからμおよびδ-タイプ受容体は抑制性GTP binding protein(Ni) を介し，A.C.と共役していると考えられている。

ヒト胎盤における^{3}H-DPNならびに^{3}H-EKC結合のScatchard plotが直線を示し，そのBmax値がほぼ等しく，また^{3}H-DADLEおよび^{3}H-DHMに特異的結合が認められなかったことから本標本における^{3}H-EKC結合はほとんどk-タイプ受容体結合を反映しており，同時に胎盤に存在するオピオイド受容体はk-タイプのみであると考えることが出来る。本標本においてbasal levelおよび PGE_1刺激時のA.C.活性に対し，現在最も選択性が高いとされるk-アゴニストの U-50488Hが全く作用を示さなかったことから，k-タイプ受容体はA.C.系とcouplingしていないと考えられた。また，Gpp(NP)pは胎盤における^{3}H-EKC結合に対し抑制作用を示したものの極めて高用量を必要としたことから，k-タイプ受容体がGTP結合性蛋白と共役している可能性は否定的である。ヒト胎盤P_3分画はPT処理により分子量40,000近辺のタンパクが特異的にADP-ribosyl化されることから本標本にNiもしくはNoと思われるGTP結合タンパクの存在が認められた(13)。しかし，このPT処理によりGpp(NH)pの^{3}H-EKC結合抑制作用は影響をほとんど受けないこと(13)はk-タイプ受容体のGTP結合性タンパクとの非共役性を一層支持している。さらにモルモット腸筋神経叢においてμ，δとkはそれぞれ異なった受容体後機構を有すとの報告(14)からも，k-タイプ受容体はμおよびδ-タイプとは異なりA.C.系とは異なった受容体後機構を有することが想定された。

〔文献〕

(1) Nozaki,M. et al.(1982) Life Sci. 31 1339-1342. (2) Niwa,M. et al.(1983) Life Sci.33 211-214. (3) 丹羽雅之 (1986) 岐阜大医紀要 34 1032-1054. (4) Nozaki,M. et al.(1986) INRC '86 Abstract 07. (5) Valette,A. et al.(1975) FEBS Lett. 103 362-365. (6) Honma,M. et al. (1977) Biochem. Med. 18 257-273. (7) Klee,W.A.(1976) Nature. 263 609-611. (8) Goldstein, A. et al.(1977) Nature 265 362-363. (9) Low,P.Y. et al.(1981) J. Neurochem. 36 1834-1846. (10) Kamikubo,K. et al.(1981) Japan. J. Pharmacol. 31 175-184. (11) Kurose,H. et al.(1983) J. Biol. Chem. 258 4870-4875. (12) Abood,M.E. et al.(1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 127 477-483. (13) Niwa,M. et al.(1986) INRC'86 Abstract. P31. (14) Cherubini,E. and North,R.A.(1985) Proc. Natl. Acud. Sci. 82 1860-1863.

41. 精製 GABA ／ベンゾジアゼピン受容体複合体の構成成分としての糖蛋白：その糖鎖構造と生理的役割

田口淳一・栗山欣弥　（京都府立医大・薬理）

〔要　約〕

ベンゾジアゼピン(BZP) アフィニティーカラムクロマトグラフィーによりウシ大脳皮質粗シナプス膜のNonidet P-40可溶化分画から精製したγ－アミノ酪酸(GABA)/BZP受容体複合体の構成成分とその機能的役割の検討を試みた。精製受容体複合体をpronase, trypsin, guanidine-HCl あるいはureaで処置すると、[^{3}H]muscimol([^{3}H]Mus)結合の有意な低下を来したことから、GABA受容体の結合部位は蛋白で構成されていることは確実と考えられる。更に精製受容体複合体がconcanavalin A Sepharoseに結合すること、その構成サブユニットが糖蛋白の染色に陽性反応を示したことから、この構成蛋白は糖蛋白であると考えられる。また、この精製複合体を各種糖鎖分解酵素で処置した場合、glycopeptidase A, α-mannosidaseあるいはβ-galactosidaseによってのみ[^{3}H]Mus 結合の増大を来したことから、この糖蛋白の糖鎖構造はhybrid型であると推測される。さらに、β-galactosidaseで処置した精製受容体への[^{3}H]Mus 結合をScatchard 解析すると、低親和性結合が消失し高親和性結合のみを示すようになったこと、diazepamによる高親和性結合の活性化が認められなくなったことから、この糖鎖はGABA受容体の結合能調節と両受容体間の活性化機構に関与しているものと思われる。

Key word：　GABA/benzodiazepine receptor complex, Glycoprotein, Carbohydrate chain

哺乳動物の脳内に存在するγ－アミノ酪酸(GABA)受容体のうち、$GABA_A$ 受容体はベンゾジアゼピン(BZP) 受容体と複合体を形成し、この複合体の活性化がCl^- チャンネルの活性化を誘発すると推測されている[3]。我々は両受容体が複合体を形成していることを利用し、BZP アフィニティーカラムクロマトグラフィーによるGABA/BZP受容体複合体の精製を行なってきたが[4]、今回は精製受容体複合体の構成成分とその機能について検討を加えた。

［実験方法］1.ウシ大脳皮質GABA/BZP受容体複合体の精製　Zukin ら[6]の方法に従って得たウシ大脳皮質粗シナプス膜のNonidet P-40可溶化分画をBZP アフィニティーカラムに適用後、BZPによって特異的溶出した分画について、さらにDEAE Sephacel を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行ない、GABA/BZP受容体複合体を得た[4]。　2.精製受容体複合体の酵素および化学的修飾試薬による処置　精製受容体分画を種々の酵素あるいは化学的修飾試薬とそれぞれ37℃と0℃で30分間インキュベートしたのち、[^{3}H]muscimol([^{3}H]Mus) 結合量を測定した。尚、酵素による処置はすべて各酵素の至適pHの条件下で行なうと共に、phospholipase A_2 とphospholipase C による処置の場合

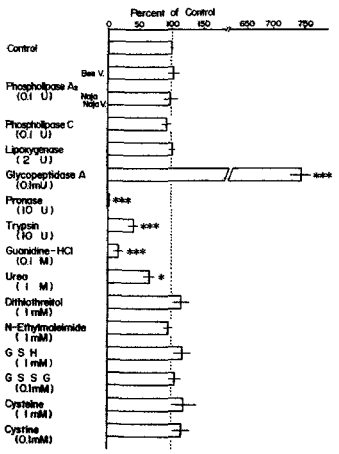


Fig. 1 Effect of treatments with various enzymes and chemically modifying agents on [^{3}H]muscimol binding to purified GABA/benzodiazepine receptor complex. *P<0.05 and ***P<0.001, as compared with control value.

には1 mM $CaCl_2$を存在させた。 3.[^{3}H]Mus 結合の測定 Ito and Kuriyama[2]の方法に従いポリエチレングリコール沈殿－濾過法により行なった。

［結果］Pronase, trypsin, guanidine-HCl あるいはurea処置により[^{3}H]Mus 結合の有意な低下が認められたが、-SH基あるいは-S-S- 基修飾試薬処置によっては有意な変化は認められなかった。また、phospholipase A_2, phospholipase Cあるいはlipoxygenase処置は[^{3}H]Mus 結合に有意な変化を来たさなかった。一方、蛋白分解酵素とは反対にglylcopeptidase A による処置は、[^{3}H]Mus 結合の著しい増大をもたらした(Fig. 1)。次に種々の糖鎖分解酵素による処置を行なうと、glycopeptidase A以外に、Exo 型酵素であるα-mannosidase およびβ-galactosidase による処置のみが[^{3}H]Mus 結合の有意な増大をもたらした(Fig. 2)。精製受容体複合体についてconcanavalin A Sepharoseを用いたカラムクロマトグラフィーを行なうと、[^{3}H]Mus 結合能をもった蛋白の溶出が認められると共に(Fig. 3)、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なったゲルについて、periodic acid-Ag法[1]による糖蛋白の染色を行なうと、複合体の構成サブユニットである分子量53,000と57,000のバンドのいずれもが明らかな陽性反応を示した。β-Galactosidaseで処置した精製複合体への[^{3}H]Mus 結合についてScatchard 解析を行なうと、低親和性結合が消失し高親和性結合のみが認められるようになった。しかもこの高親和性結合は未処置標本に比べBmax値の増大を示し、K_D値の変化を示さなかった(Fig. 4)。さらにβ-galactosidaseによる処置は、精製複合体におけるdiazepamによる高親和性[^{3}H]Mus 結合の活性化を消失させた。［考察］蛋白分解酵素であるpronase やtrypsin 処置によって[^{3}H]Mus 結合が有意に減少したことに加え、蛋白変性剤であるguanidine-HCl やurea処置によっても[^{3}H]Mus 結合の有意な低下が認められたことから、GABA受容体の結合部位が蛋白によって構成されていることは明白であると考えられ

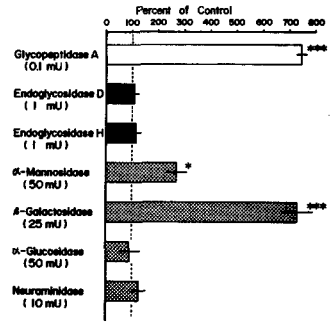


Fig. 2 Effect of various glycosidase treatments on [^{3}H]muscimol binding to purified GABA/benzodiazepine receptor complex. * P<0.05 and ***P<0.001, as compared with control value.

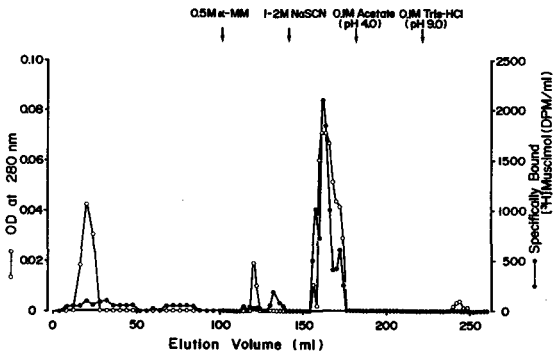


Fig. 3 Concanavalin A column chromatography of purified GABA/benzodiazepine receptor complex.

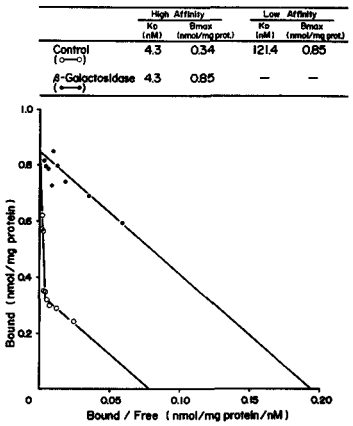


Fig. 4 Scatchard analysis of [^{3}H]muscimol binding to purified GABA/benzodiazepine receptor complex treated with β-galactosidase.

る。また、蛋白に存在する-SH 基や-S-S- 基が結合能の発現に関与している可能性が考えられるが、それらに対する修飾試薬による処置は[^{3}H]Mus 結合に変化を来たさなかった。一方、糖蛋白分解酵素であるglycopeptidase A処置によって逆に[^{3}H]Mus 結合の著しい増大をもたらしたことから、GABA受容体が糖鎖を有する糖蛋白を構成成分として持つこと、しかもこの糖鎖部分がGABA受容体結合能を抑制している可能性が示唆される。事実、糖蛋白を結合するconcanavalin A Sepharoseが精製複合体を結合することに加え、精製複合体の構成サブユニットである分子量53,000と57,000のバンドが糖蛋白を染色するperiodic acid-Ag法によって染色されたことから、この二種類の構成サブユニットのいずれもが糖蛋白を持っていることが明確になった。次にglycopeptidase Aによる処置が[^{3}H]Mus 結合の著しい増大を来たしたことから、糖鎖結合部のアミノ酸はアスパラギンであり、また非還元末端を分解する種々のExo 型酵素のうちα-mannosidaseとβ-galactosidaseによる処置が[^{3}H]Mus 結合の著しい増大をもたらしたことから、本糖鎖は非還元末端にmannose とgalactose を持ったhybrid型糖鎖であると推測される。(Fig. 5)。なおhybrid型糖鎖にも感受性を示すendoglycosidase D 処置によっては結合能が変化しなかったが、本酵素はN-acetylglucosaminyl残基によってその活性が阻害されることが知られており[5]、このことが原因で[^{3}H]Mus 結合に変化が生じなかった可能性が考えられる。またglycopeptidaseA およびβ-galactosidase処置による[^{3}H]Mus 結合の増加は、α-mannosidase処置によるそれに比べて大であったことから、hybrid型糖鎖の中でも特にgalactose 残基がGABA受容体結合能の抑制に関与していることが考えられる。β-Galactosidaseで処置した精製複合体への[^{3}H]Mus 結合をScatchard 解析したところ、低親和性結合部位が消失し高親和性結合のみが認められるようになったこと、また高親和性結合部位ではK$_D$値が変化することなくB$_{max}$値のみが増大を示したことから、hybrid 型糖鎖によってGABA受容体の低親和性結合がもたらされている可能性が考えられる。更にβ-galactosidaseで処置した精製複合体においては、diazepam による高親和性[^{3}H]Mus 結合の活性化が認められなくなったことから、精製複合体の構成成分である糖蛋白のhybrid型糖鎖は、GABA受容体結合能の調節以外にGABA受容体とBZP 受容体間の共役機構にも関与している可能性が考えられる。

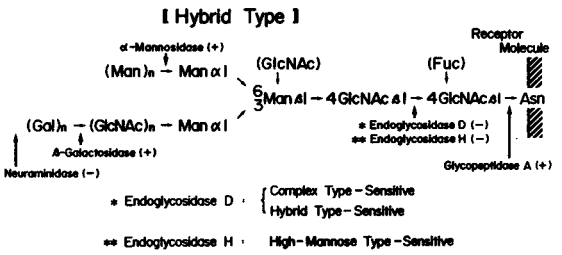


Fig. 5 Hypothetical model on structure of glycoprotein in purified GABA/benzodiazepine receptor complex.

[文献] 1) Dubray, G., and Bezard, G. (1982) Anal. Biochem. 119, 325-329. 2) Ito, Y., and Kuriyama, K, (1982) Brain Res. 236, 351-363. 3) Olsen, R.W. (1981) J. Neurochem. 37, 1-13.4) Taguchi, J., and Kuriyama, K. (1984) Brain Res. 323, 219-226.5) Tai, T,. Yamashita, K., Ogata-Arakawa, M., Koide, N., Muramatsu, T., Iwashita, S., Inoue, Y., and Kobata, A. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8569-8575. 6) Zukin, S.R., Young, A.B., and Snyder, S.H. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4802-4807.

42. ラット副腎内〔^{3}H〕グルタミン酸結合部位の可溶化について

米田幸雄・荻田喜代一　　(摂南大・薬・薬理)

〔要　約〕

ラット副腎における[^{3}H]グルタミン酸(Glu)結合部位を可溶化し、その性質を解析した。種々の界面活性剤を用いて、副腎標品からの[^{3}H]Glu結合部位の可溶化を検討した結果、Nonidet P-40による処理で得られた上清中に最も高い結合活性が認められた。この結合は蛋白量に依存して見られ、20μgまでは用いた蛋白量に比例して直線的に増加した。また、本結合は反応時間の増加に伴って増大し、反応開始後40分で結合はほぼ定常状態になった。さらに本結合は非放射性Gluの添加により抑制されることから、可逆的であることが判明した。反応を2℃で行うと、30℃の場合の10-20%程度の結合活性しか検出されなかった。本結合は、種々のGlu構造関連物質により阻害され、その阻害強度はL-システインスルフィン酸＞L-Glu＞L-アスパラギン酸(Asp)＞L-システイン酸≫D-Asp＞D-Gluの順であった。Glu受容体のアゴニストの中でキスカル酸(QA)は阻害作用を示したが、カイニン酸は有意な変化を与えなかった。一方、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)は10^{-4} M 以上で著明な増強作用を発揮した。

以上の結果から、本可溶化標品中には高親和性、構造選択性、温度依存性、飽和性を持つ[^{3}H]Glu結合部位が存在することが明らかとなった。

Key word :　Adrenal, Solubilization, [^{3}H]Glutamate binding sites

L-Gluが、哺乳動物の中枢神経系において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である(3)。近年、このGlu親和性部位の生化学的指標である[^{3}H]Glu結合に関する研究が数多く行われている(2)。筆者らも、脳シナプス膜における本結合部位の生化学的、薬理学的解析を行っているが、その過程で本結合部位が脳ばかりでなく副腎や下垂体などの末梢性組織にも存在し、この末梢性結合部位の性質が脳とは異なっていることを見出した。しかしながら、この末梢性結合部位の機能的意義については充分解明されていない。したがって本研究では、副腎内[^{3}H]Glu結合部位の可溶化を試みるとともに、この可溶化標品中の本結合部位の性質について解析した。

【実験方法】　ラット副腎を脱イオン水中でホモゲナイズし、そのホモジネートを50,000xgで30分間遠心分離した。沈渣を50 mMトリス酢酸緩衝液(pH 7.4)で3回洗浄したのち可溶化実験に供した。可溶化は、上記緩衝液に懸濁した膜標品(約1 mg蛋白質/ml)に各種界面活性剤を添加したものを、60分間氷水中に放置して行った。可溶化後100,000xgで60分間遠心分離して得られた上清を、0.2% Triton X-100を含む100倍量の上記緩衝液を用いて10時間透析した。この透析操作を3回繰り返したのち、得られた可溶化標品を上記緩衝液中で10 nM [^{3}H]Glu(44.6 Ci/mmol,NEN,陽イオン交換樹脂により精製)と30℃で60分間反応させた。0.3%ポリエチレンイミン処理のWhatman GF/Bグラスフィルターを用いた吸引濾過法(1)により反応を停止した。1 mM非放射性Glu存在下での結合を非特異的結合とした。

【実験結果】　Fig.1は、各種界面活性剤による副腎膜標品の可溶化を検討した結

果である。用いた界面活性剤の中で最も高い結合比活性が得られたのはNonidet P-40であり、次いでTriton X-100、3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS)、Luburol、Emulgen 913、コール酸の順であった。Nonidet P-40の濃度変化の可溶化に及ぼす影響を検討したところ、リガンド濃度が10 nMの場合も1μMの場合もともに、0.5%で比較的高い結合活性を持つ可溶化標品が得られることが判明した(Table I)。したがって、以下の実験には0.5% Nonidet P-40により可溶化した標品を用いた。この可溶化標品に対する結合活性は、20μgまでは用いた蛋白量に比例して直線的に増加した(Fig.2)。また本結合は、反応時間に依存して認められ、反応を30℃で行った場合、反応開始後40分で結合は定常状態を示した(Fig.3)。一方、反応を2℃で行った場合結合活性は、30℃で行った場合の10-20%と低く、また少なくとも90分までは反応時間とともに増加を続けた。本結合は1 mM非放射性Gluの添加によりすみやかに解離し、添加後10分で結合はほぼ非特異的結合にまで低下した(Fig.3)。Table IIは、本結合に対するGlu構造関連物質、Glu受容体の各サブタイプのアゴニストおよびアンタゴニストの影響についての結果である。最も強い阻害作用を示したのはL-システインスルフィン酸であり、次いでL-Glu、L-Asp、L-システイン酸の順であった。一方、D-GluおよびD-Aspは極めて弱い阻害作用しか示さなかった。また本結合はQAにより有意に阻害されたが、NMDAの添加により逆に著明な増加(10^{-4}M,158± 11%; 10^{-3}M,236± 36%)が見られた。一方カイニン酸は、結合に対し有意な変化を与えなかった。さらに、QA型受容体のアンタゴニストであるL-Gluジエチルエステルにより結合は有意に阻害されたのに対して、NMDA型受容体のアンタゴニストであるD-α-アミノアジピン酸では結合は有意な変化を受けなかった。100 mM酢酸ナトリウムの添加により、約40%の結合の減少が誘発された。

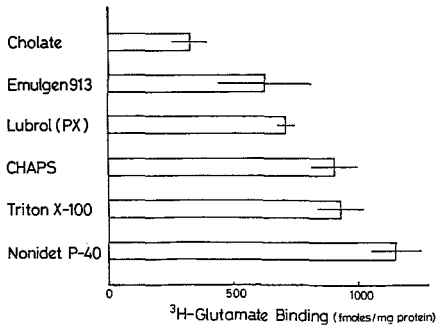


Fig. 1. Effect of various detergents on solubilization of adrenal [³H]Glu binding. sites.

Table I. Effect of varying concentrations of Nonidet P-40 on solubilization of adrenal [³H]Glu binding sites.

Nonidet P-40	[³H]Glu binding	
	10 nM	1 μM
(%)	(pmoles/mg protein)	
0.2	1.20 ± 0.04	10.9 ± 0.7
0.5	1.33 ± 0.04	14.0 ± 3.2
1.0	1.27 ± 0.04	11.9 ± 1.0
2.0	1.14 ± 0.11	12.8 ± 1.5

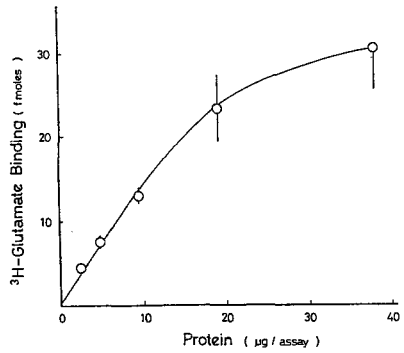


Fig. 2. Effect of varying concentrations of adrenal solubilized proteins on [³H]Glu binding.

【考察】 副腎内[³H]Glu結合部位の可溶化がNonidet P-40を用いて行われ、この

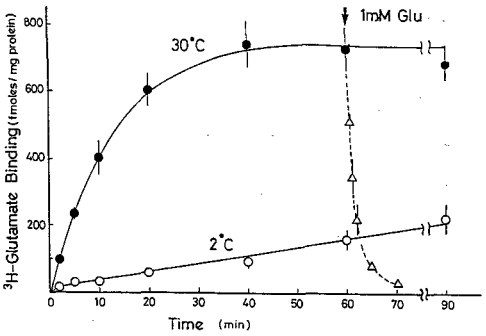


Fig. 3. Effect of incubation time on [³H]Glu binding in adrenal solubilized preparations.

Table II. Effect of various compounds on [³H]Glu binding in adrenal solubilized preparations.

	IC_{50} (μM)
L-Glutamic acid	0.039 ± 0.070
D-Glutamic acid	>1000
L-Aspartic acid	0.11 ± 0.04
D-Aspartic acid	413 ± 113
L-Cysteinesulfinic acid	0.006 ± 0.002
L-Cysteic acid	0.43 ± 0.19
Quisqualic acid	17.8 ± 1.2
N-Methyl-D-aspartic acid	No inhibition
Kainic acid	No inhibition
L-Glutamic acid diethylester	20.6 ± 5.0
D-α-Aminoadipic acid	No inhibition

可溶化標品内本結合部位が、構造選択性、温度依存性、可逆性および高親和性であることが明らかとなった。本結合で特徴的なことは、温度依存性が高いこと、Glu構造関連物質の中でもL-システインスルフィン酸に対する感受性が極めて高いこと、およびNMDA(10^{-4}M以上)で結合の増強が見られることである。これらの結果は副腎膜標品を用いた研究成果　と同様であり、本可溶化標品内結合部位は膜標品中に検出された部位と同一であると考えられる。膜標品では、NMDA型受容体の新しいサブタイプのアンタゴニストであるキヌレイン酸がNMDAによる増強を阻止することから、NMDA型受容体を介した現象である可能性が示唆されている。本可溶化標品における増強現象についても同様の検討が早急の課題である。今後、この可溶化標品を用いて結合部位の単離・精製を行うとともに、その生理的意義を追究する予定である。

【謝辞】　本研究の一部は文部省科学研究費(61770161)の援助のもとに行った。

【文献】

1.Bruns,R.F.,Lawson-Wendling,K.,and Pugsley,T.A.(1983) Anal.Biochem.132, 74-81.

2.Foster,A.C.and Fagg,G.E.(1984) Brain Res.Rev.7,103-164.

3.Watkins,J.C.and Evans,R.H.(1981)Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.21,165-204.

43. IAP 脳室内投与ラット大脳皮質膜画分の
β受容体—アデニレートシクラーゼ系に及ぼす DMI の効果

岡田文彦・徳光幸子*・宇井理生*
(北海道大・保健管理センター，薬・薬効学*)

〔要　約〕

中枢ノルアドレナリン神経系に及ぼす抗うつ薬の効果にα_2受容体を介する Ni 蛋白質—アデニレートシクラーゼ（AC）抑制系が関与する可能性について、この系を特異的に失活させる islet activating protein (IAP) を脳室内に投与したラットを用いて検討した。 IAP 処理群では vehicle 群に比し大脳皮質膜画分のβ受容体数は約２０％減少した。 Desipramine (DMI) 投与により vehicle 群では約３０％減少し、IAP+DMI 群で約４０％減少した。 一方、イソプロテレノール (Iso) 添加による AC 活性の上昇は IAP 群でも vehicle 群と同程度に認められた。 vehicle 群で DMI投与により AC 活性の抑制が発現したが、IAP 処理によりこの抑制が消失した。 Gpp(NH)p あるいはフォルスコリンによる AC 応答では、IAP 群あるいは DMI 投与によっても対照群と差は認められなかった。 以上の結果は、IAP 処理によりβ受容体数が減少しても、それに共役した AC 活性の減少が発現しないことを示し、さらに DMI 投与により、β受容体数減少が高度となっても、DMI 単独で認められる AC 活性の減少がみられなくなることを示している。 従って、DMI 投与によりβアゴニストによる AC 活性応答の減少が発現するには Ni の機能が保たれている必要があると考えられる。

Key word :
desipramine , Ni, islet-activating protein

目的： 中枢ノルアドレナリン(NE)神経系に及ぼす抗うつ薬の効果は、これらの薬物のラットの慢性投与実験にもとづく Sulser[1] らの報告(1975)以来、次のように要約される。 １）ラット大脳皮質スライスを用いた実験では NE による環状AMP 上昇が抑制される(desensitivity)(Vetulani と Sulser[1]、1975)。 ２）受容体が減少する(down regulation)(Banerjee et al[2]、1977)。 ３）β受容体と N 蛋白質の coupling が不充分となる (uncoupling)(Okada et al[3]、1986)。 以上、β受容体-Ns-AC 促進系に及ぼす DMI の効果が明らかにされたが、α_2受容体を介する Ni 蛋白質-AC 抑制系の関与についてはなお不明の点が多い。 われわれはα_2などの抑制性受容体-Ni 蛋白質-AC 系の機能を特異的に失活させる IAP をラットの脳室内に投与して DMI 慢性投与の効果を検討したので報告する。

方法： 雄性ドンリュウ系ラットをネンブタール麻酔下で脳固定装置を用い IAP (1-2.5μg/rat)または vehicle を側脳室に投与した。 IAP 投与後６日目に DMI 10 mg/Kg または生食を１日２回腹腔内投与を開始、５日間投与後に断頭し、大脳皮質膜画分を作製、－７５℃に冷凍貯蔵し、以下の実験に供した。 １）膜画分と^{125}I-CYP 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 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 活性の用量依存性を検討した。 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 活性の用量依存性を検討した。 ４）フォルスコリンによる AC 活性の用量依存性を検討した。

結果：１）β受容体数の検討(図1)。 膜画分と^{125}I-CYP結合実験により、Bmax は DMI ５日投与後、約３０％有意に減少した。IAP 前処置を行うと、対照群より約２０％減少し、さらに DMI 投与により約４０％減少した。 ２）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の間に AC 活性に推計学的有意差はなかった。 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 10 μM 濃度で GTP 単独より AC 活性は約３０％上昇するが、DMI 投与では１０％しか上昇しなかった。 一方 IAP 前処理により、このアゴニストの効果は対照群と同様に出現し、DMI 投与によっても抑制されなかった。 ３）Gpp(NH)p による AC 活性応答（図３）。 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 10μMでほぼ最大応答を示す。 IAP 前処理や DMI 投与により、この用量作用曲線には有意差が認められなかった。

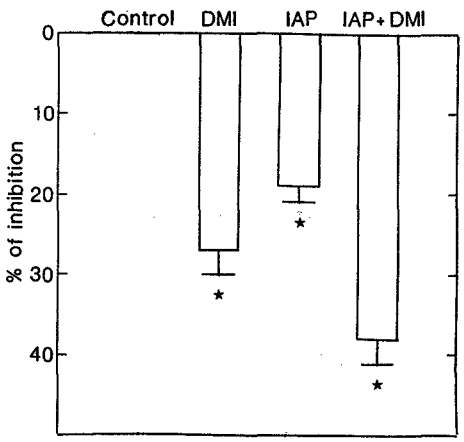


図１ β 受容体数 (Bmax)の変化

４）フォルスコリンによる AC 活性応答（図４）。 フォルスコリンの用量作用曲線は 100 μM で基礎値の約１６倍まで上昇し、IAP 前処理群と対照群との間に有意差は認められなかった。

結論：IAP 処理によりシナプス前部の α_2受容体機能が失活することが推定されている。 したがって、その結果としてシナプス前部よりの NE分泌 が増加し、シナプス後部のβ受容体に down-

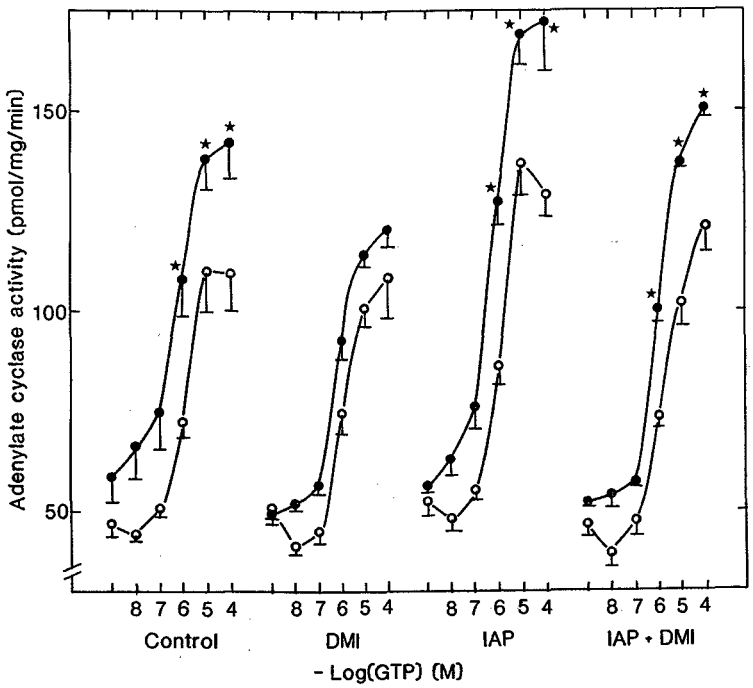


図2 AC 活性の変化 (o GTP 単独、● GTP + 10 μM Isoproterenol)

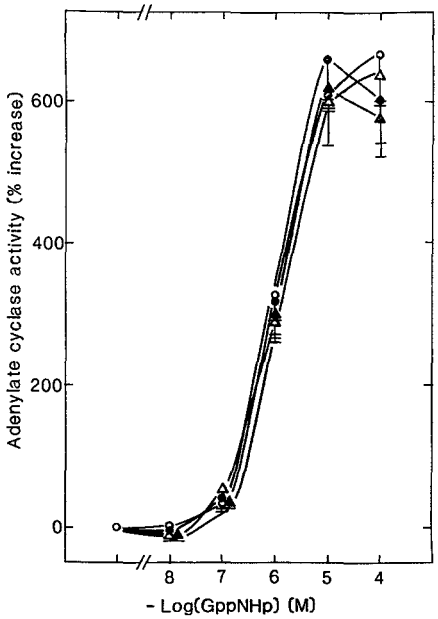


図３ AC 活性の変化 (o control、△ IAP)
(● DMI、▲ DMI + IAP)

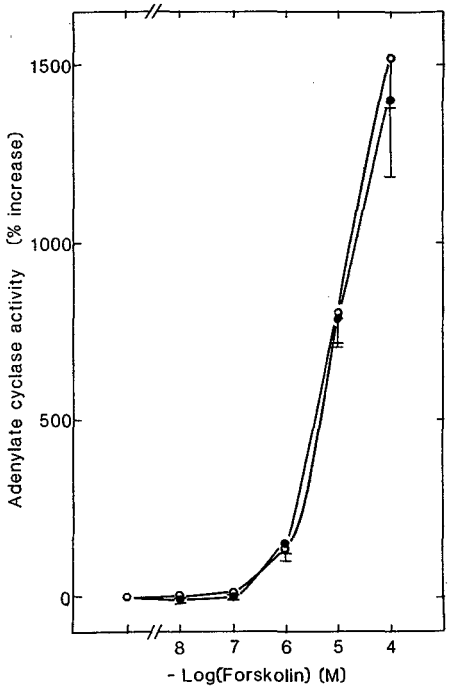


図４ AC 活性の変化 (o control、● IAP)

regulation が発現すると考えられる。 しかし、IAP 処理によりβ受容体に共役した AC 活性減少が発現しないことから、α_2受容体-Ni-AC 機能が失われた結果、見かけ上β受容体-Ns-AC 機能が増強した形で発現するものと思われる。 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より、β受容体と Ns との共役に何らかの効果が発現したものと考えられる。 DMI 投与により認められるβ受容体減少-AC活性低下も、IAP 前処理により、β受容体数の減少が出現しても AC 活性低下は出現しないので、DMI の薬理効果はα_2受容体-Ni-AC 機能を介して AC活性低下をもたらすと考えられる。 この場合、DMI がβ受容体と Ns との coupling に影響を及ぼす効果に Ni が関与することも考えられる。

文 献

1. Vetulani, J. and Sulser, F. (1975) Nature 257, 495-496
2. Banerjee, S.P., Kung, L.S., Riggi, S.J. and Chanda, S.K. (1977) Nature 268, 455-456
3. Okada, F., Tokumitsu, Y. and Ui, M. (1986) J. Neurochem. 47, 454-459

44. GTP 結合性調節タンパクβγサブユニットの精製とβγによるアデニレートシクラーゼ触媒タンパクの抑制

榎本恵一・高野正子・麻川武雄　　（佐賀医科大・薬理）

〔要　約〕

ラット脳よりアデニレートシクラーゼ触媒タンパク（ＣＵ）を抑制するタンパク因子を均一にまで精製し、これをＧＴＰ結合性調節タンパクのβγサブユニットと同定した。精製したβγサブユニットは次のような性質を示した。

1．βγサブユニットはフォルスコリン、または促進性調節タンパク（Ns）とGpp(NH)pで活性化したＣＵをそれぞれ40及び60％抑制した。フォルスコリンでＣＵを活性化した場合、抑制にはグアニンヌクレオチドやNsは必要でなかった。

2．βγサブユニットは精製した抑制性調節タンパク（Ni）のαサブユニットが有するGTPase活性を 3.8倍にまで増大させた。

3．islet-activating protein（ＩＡＰ）によるNiαサブユニットのＡＤＰリボシル化を12倍以上促進した。またNiαのＡＤＰリボシル化後もGTPase活性は変化しなかった。

以上の結果より、受容体によるアデニレートシクラーゼ抑制機構として、受容体刺激によりNiから遊離したβγが直接ＣＵを抑制する機構が存在すると考えられる。

Key word：Adenylate cyclase, Inhibitory GTP-binding protein (Ni), Rat brain

私達は先年ラット脳よりコール酸で可溶化した分画中に、部分精製したアデニレートシクラーゼのＣＵを抑制する活性が存在することを報告した（１、２）。また抑制活性は、別に私達が報告したNiαサブユニットのＩＡＰによるＡＤＰリボシル化を促進し、かつNiαのGTPase活性を増大させる因子と共に精製されることを示した（３、４）。以上の活性を指標として、さらに抑制因子を均一にまで精製し、このタンパク因子をアデニレートシクラーゼ系ＧＴＰ結合タンパク（Ni及びNs）のβγサブユニットと同定した。βγによるシクラーゼ抑制機構として、βγがNsのＧＴＰ依存性の活性化を抑え、間接的にＣＵの活性を低下させる機構がKataダらによって提唱されている（６）。しかし、精製βγによる抑制は、Ns活性を含まないＣＵやβγ標品を用いてもおこることや、グアニンヌクレオチドの添加を必要としないことから、βγが直接ＣＵと相互作用して、これを抑制する機構の存在が考えられる。

Fig.1-A　βγの精製

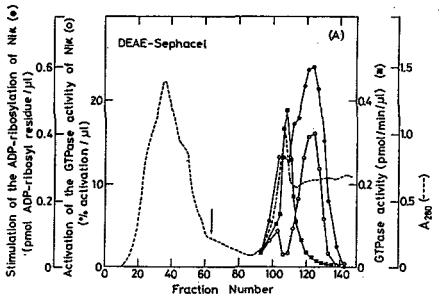
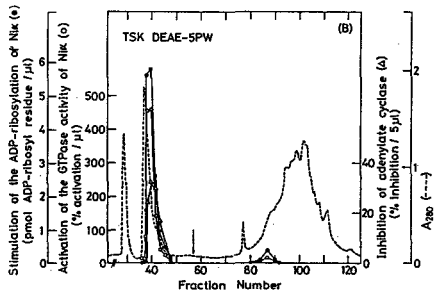


Fig.1-B　βγの精製



なお、本研究の一部は既に発表した（５）。

《方法》

ＣＵ、Niαは既報の方法（３）に基いて精製した。GTPase活性、ＡＤＰリボシル化、アデニレートシクラーゼの抑制は文献（５）に述べた方法で測定した。

βγは脳シナプス膜分画よりコール酸で可溶化した。可溶化上清をコール酸存在下でＤＥＡＥ－Sephacelクロマト(2.2×34cm)にかけた（Fig.1-A)。またβγとαサブユニットとの分離を促進するためF⁻存在下でクロマトした。βγはNaClのグラディエントで～160mM NaClの位置に溶出され、先に溶出されるNiαとは分離された。次にβγ分画をルブロールＰＸ存在下でＤＥＡＥ－５ＰＷカラム(0.8×7.5cm)にかけ、Flow-through分画に溶出されるβγを回収した（Fig.1-B)。βγはついでコール酸存在下でheptylamine-Sepharoseカラム(1×21cm)にのせ、コール酸のグラディエント（F⁻なし）で溶出した（Fig.1-C)。回収したβγは最後にＧ３０００ＳＷ(0.8×30cm)のゲルクロマトをコール酸存在下で行い精製した（Fig.1-D)。

Fig.1-C　βγの精製

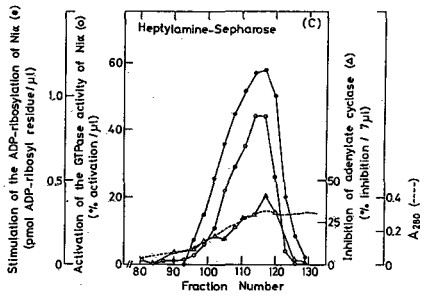
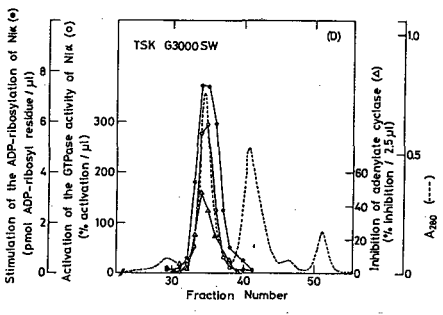


Fig.1-D　βγの精製



《結果と考察》

精製βγ標品をＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけると、分子量 36000と 35500のβサブユニットに相当するバンドと分子量約9000のγサブユニットに相当するバンドが認められた（Fig.2-A)。Fig.2-Bに示したNiα標品中には分子量 41000と 39000の２種のＩＡＰ基質が含まれているが、このうち 39000のαサブユニットを持つＧＴＰ結合タンパクはNoとも呼ばれ脳に特有である。

Fig.2　精製βγ（Ａ）とNiα（Ｂ）のＳＤＳ－ＰＡＧＥ

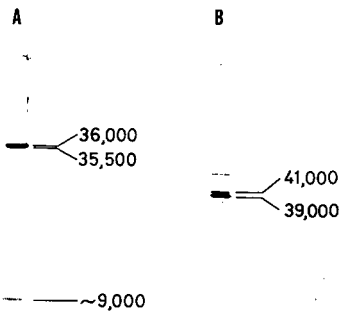


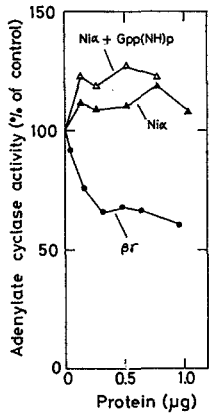
Table 1 にみられる通り、ＡＤＰリボシル化の促進で測定した場合βγはcholate extractから 212倍精製され、その回収率は 7.5％であった。cholate extractにおいてはβγによるGTPase活性の増大は弱く、また精製のはじめの段階では抑制活性の定量的な測定は困難であった。

精製βγはフォルスコリンで活性化したＣＵに添加すると添加量に依存してＣＵを抑制した（Fig.3)。しかし、Niαは抑制活性を示

Table 1
Summary of the purification of the βγ-subunits

Step	Protein (mg)	Stimulation of ADP-ribosylation (nmol ADP-ribosyl residue)	Activation of GTPase activity (% activation x 10^{-5})
Cholate extract	539	82.6	0.76
DEAE-Sephacel	30.3	32.7	10.7
TSK DEAE-5PW	4.4	10.7	8.01
Heptylamine-Sepharose	0.51	8.86	3.55
TSK G3000SW	0.19	6.18	1.92

Fig.3 精製βγによるフォルスコリン活性化CUの抑制



さなかった。Ns及びGpp(NH)pであらかじめ活性化しておいたCUにβγを添加した場合にも明らかなCUの抑制がみられた（Table 2）。正味のシクラーゼ活性の低下はほぼ一定であったが、相対的抑制はNsの添加量が増大するにつれて低下した。これはβγが活性化Nsを不活性化したと考えるか、あるいはCUにはNsで活性化されやすくかつβγによる抑制を受けるものと、そうでないものの2種類が存在すると考えると理解しやすい。

βγはNiαのIAPによるADPリボシル化を著しく促進する（Fig.4）が、同様の現象が精製Niから分離したβγについても報告されている（7、8）。それ以外にβγはNiαが有するGTPaseを活性化する（Fig.4）。またβγ存在下でNiαをADPリボシル化してもGTPase活性には変化は見られなかった（Fig.5）。これは従来予想されていたのとは異り、IAPによるNiのADPリボシル化はαサブユニットへのGTPの結合や水解には直接影響せず、むしろNiと受容体の相互作用を弱めるか失わせると考えられる。

Table 2
Inhibition of Ns-activated catalytic unit by the purified βγ-subunits

Ns (μg)	βγ (μg)	Adenylate cyclase activity (pmol cyclic AMP/10 min)	Inhibition Δ(pmol cyclic AMP/10 min)	(%)
0.11	0	188		
0.11	1.06	76	112	59.6
0.43	0	225		
0.43	1.06	128	97	43.1
1.28	0	289		
1.28	1.06	181	108	37.4

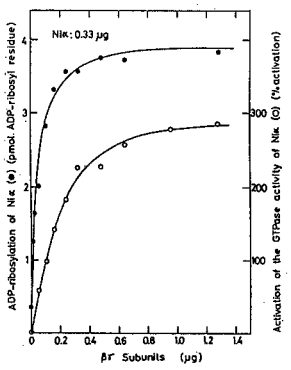


Fig.4 βγによるNiαのADPリボシル化促進及びGTPase活性の増大

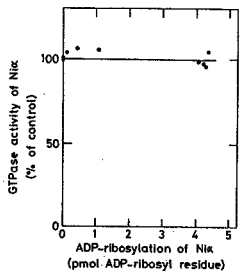


Fig.5 NiαのADPリボシル化とGTPase活性の関係

《文献》

1. Enomoto,K. and Asakawa,T. (1983) Biochem.Int. 6, 81-91
2. 榎本恵一，高野正子，麻川武雄 (1983) 神経化学 22, 324
3. Enomoto,K. and Asakawa,T. (1984) FEBS Lett. 171, 233-239
4. Enomoto,K. and Asakawa,T. (1985) Jap.J.Pharmacol. 39, suppl. 110P
5. Enomoto,K. and Asakawa,T. (1986) FEBS Lett. 202, 63-68
6. Katada,T. et al. (1984) J.Biol.Chem. 259, 3578-3585
7. Neer,E.J. et al. (1984) J.Biol.Chem. 259, 14222-14229
8. Tsai,S.-C. et al. (1984) J.Biol.Chem. 259, 15320-15323

45. ウシ脳GTP結合タンパク質（G_0）の高感度イムノアッセイ系とその脳内分布

浅野富子・加藤兼房・仙波禮治*・小笠原信明
（愛知県コロニー研・生化，周生期*）

〔要　約〕

ウシ大脳皮質よりＧＴＰ結合タンパク質ＧｉおよびＧｏのαサブユニットを精製し、ウサギに免疫して抗血清を得た。抗血清はＧｏαと強く反応し、Ｇｉαとはわずかな交叉反応を示した。そこで抗血清のＧｏα特異抗体をＧｏα結合セファロースカラムを用いて精製した。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エンザイムイムノアッセイ（ＥＩＡ）系を作製した。測定系は高感度で0.1 fmolの微量のＧｏαが測定できた。測定系はＧｉα、βγサブユニットとまったく交叉しなかった。ＧＴＰ結合タンパク質の大部分は細胞膜に結合しているので、ホモジネートを２％コール酸ナトリウムと１Ｍ NaClで処理すると約90%が可溶化された。ウシの脳の各部位を同様に可溶化してＧｏαの濃度をＥＩＡ法で測定した。Ｇｏαは測定したどの部位にも存在し、大脳皮質で最も高い値を示し、白質や延髄で低い値を示した。免疫組織化学的検索で、小脳において分子層が主に染色された。

Key word：　GTP-binding protein,　Enzyme immunoassay,　Immunohistochemistry

細胞膜受容体と連関するＧＴＰ結合タンパク質のうち、ＧｓとＧｉはアデニレートサイクレース活性をそれぞれ促進または抑制することが、またトランスデューシンはcyclic ＧＭＰホスホジエステラーゼを活性化することが知られている。４番目のＧＴＰ結合タンパク質であるＧｏはSternweisら(1)によってウシ脳に高濃度存在することがみいだされ、Ｇｉと同様、ムスカリン性アセチルコリン受容体(2)および$GABA_B$受容体(3)との相互作用が報告されているが、その機能は不明である。ＧＴＰ結合タンパク質のオリゴマーは疎水性であるが、それらのαサブユニットは比較的親水性で界面活性剤のない状態でもモノマーで存在し得る(4)。

今回我々は、Ｇｏαの特異抗体を用いて、高感度ＥＩＡ系を作製し、脳内におけるＧｏαの分布を検討した。また特異抗体を用いて免疫組織化学的検索も行ったので報告する。

（実験方法）Ｇｉおよびｇｏαの精製と抗体作製：　ＧｉおよびＧｏのαサブユニット混合物はウシ大脳皮質膜標品よりSternweisら(1)の方法を一部変えて精製した。精製したＧｉαおよびＧｏαの混合物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Ｇｏα特異抗体は、Ｇｏα結合セファロースカラムを用いて精製した。抗血清100 mlにつき約20mg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（直径 3mm）に結合させた固相(5)と抗体Fab'-ガラクトシダーゼ複合体(Fab'-Gal)(6)はすでに報告した方法にて調製した。抗体結合球１個を検体または標準Ｇｏαを含む反応液（0.5 ml）に加え30°Cで５時間振とうした。球は洗った後、Fab'-Gal 2 mUを含む0.2 mlの反応液に移し、４°C、一夜

振とうした。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。<u>組織抽出液の調製</u>：　新鮮なウシ脳を各部位に分けた後-80°Cで保存した。各組織は10倍量の20 mM Tris-HCl (pH 7.5)/1 mM EDTA/5 mM β-メルカプトエタノール中でホモジナイズし、コール酸ナトリウムおよびNaCl溶液をそれぞれ終濃度2％および1 Mになるように加え、全量を20倍量とした。再びホモジナイズ、ついで超音波処理し、100,000 x g, 1時間遠心した上清をとり、これを10 mM リン酸ナトリウム(pH 7.0)／0.1% ウシ血清アルブミン／0.5% ゼラチン水解物／0.3 M NaCl／0.1% NaN_3／20 μM $AlCl_3$／6 mM $MgCl_2$／10 mM NaFで250倍希釈後、その10μlをGoα測定系に加えた。<u>免疫組織化学的検索</u>：精製抗体IgGを用いた酵素抗体間接法にて行った。

（実験結果）　精製抗体の特異性についてイムノブロット法を用いて検討した。図1に示したように抗体はGoαとのみ反応し、Giαやβγとは反応しなかった。図2にGoα測定系の検量線とGiα、βγとの交叉性を示した。測定系はGoαに特異的で、Giαおよびβγとは全く交叉しなかった。最小検出限度は0.1 fmol (4 pg)であった。Goαに3倍量のβγを添加すると反応性の低下がみられ、オリゴマーの反応性がフリーのαサブユニットより劣ることを示している。脳の各部位のGoα測定にあたってGoαの可溶化を検討した。良い結果を得たのは2％コール酸ナトリウム＋1 M NaClで、約90％のGTP結合活性が可溶化された。この方法を用いてウシ脳各部位のホモジネートからGoαを可溶化し、EIAで定量した。表1のごとくGoαは調べたいずれの部位にも存在したが、大脳皮質で最も高い値を示し、延髄、

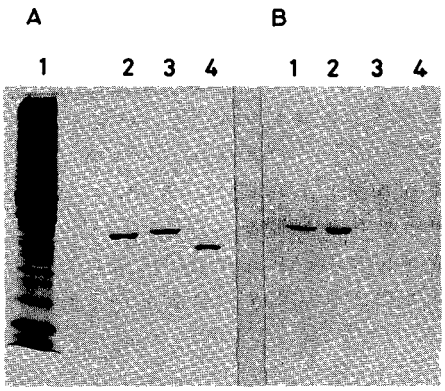


図1　ウシ大脳皮質の膜標品と精製GTP結合タンパク質のSDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動とそのイムノブロット

A．クマシーブルー染色　B．イムノブロット

1：大脳皮質膜標品、2：Goα、3：Giα、4：βγ

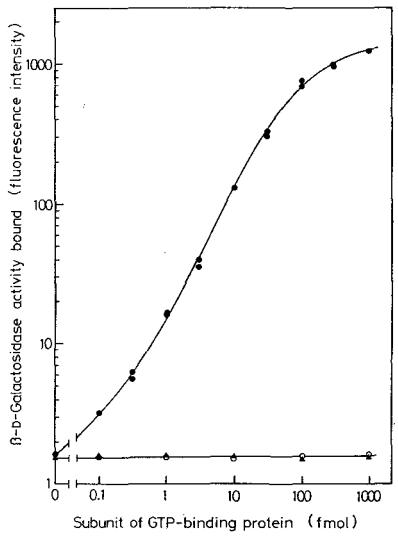


図2　Goαの検量線とGiαおよびβγとの交叉性

Table 1. Regional distribution of Goα in bovine brain

Region	Goα	
	nmol/g tissue	pmol/mg protein
Cerebral cortex		
frontal	5.50 ± 0.92	106 ± 7
parietal	5.12 ± 0.43	94.8 ± 3.9
occipital	4.71 ± 0.73	95.5 ± 14.9
temporal	5.12 ± 0.67	106 ± 17
Cerebral white matter	1.50 ± 0.22	38.8 ± 4.2
Corpus callosum	1.80 ± 0.37	39.3 ± 8.6
Thalamus	3.71 ± 0.25	71.8 ± 9.2
Nucleus caudatus	3.91 ± 0.48	69.5 ± 10.1
Superior colliculus	2.73 ± 0.62	53.4 ± 11.0
Inferior colliculus	2.22 ± 0.59	50.8 ± 8.8
Cerebellar cortex		
vermis	3.53 ± 0.53	79.6 ± 20.2
hemisphere	3.52 ± 0.74	75.6 ± 15.3
Cerebellar white matter	0.90 ± 0.19	24.3 ± 6.0
Middle cerebellar		
peduncle	0.70 ± 0.15	20.3 ± 4.9
Medulla oblongata		
dorsal	1.17 ± 0.35	31.5 ± 5.9
ventral	0.91 ± 0.19	24.5 ± 4.1
Olfactory tract	3.26 ± 1.01	72.6 ± 11.4
Optic tract	1.15 ± 0.39	28.5 ± 7.8

Mean ± SD of 4 animals

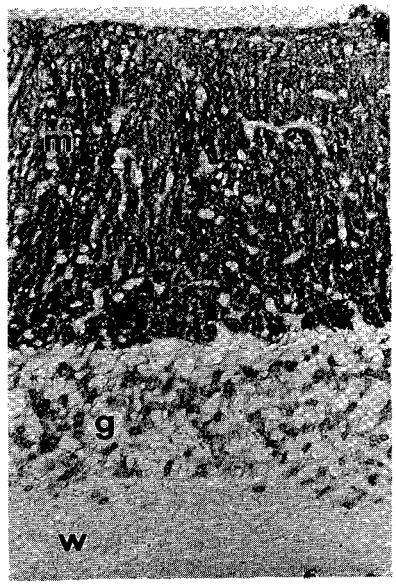


図３　精製抗体を用いたウシ小脳の免疫染色
m：分子層、　g：顆粒細胞層、　w：白質

中小脳脚や白質で最も低い値を示した。小脳の免疫組織化学的検索では、分子層が主に染色され、顆粒細胞層がこれにつぎ、白質はほとんど染色されなかった（図３）。

（考察）　GiとGoのαサブユニットの混合物でウサギを免疫したが、Giαに対する抗体はわずかしか産生されなかったので、抗Goα抗体のみを精製し、EIA系を作製した。得られた抗体およびEIA系はGoαとのみ反応し、Giα、βγとは交叉しなかった。Goαの可溶化の条件については、全タンパク質を可溶化できる方法が望ましいが，SDSで可溶化した場合加えたサンプル量と測定値間の直線性に問題があるため使用できなかった。２％コール酸ナトリウム＋１M NaClはGTP結合活性で測定すると約90％が可溶化された。２％コール酸はEIAの反応液中では10,000倍に希釈されるので測定系には影響を与えなかった。また親水性のGoαサブユニットがフリーになるようにAl^{3+}、Mg^{3+}、F^-の入った希釈液を使用した。Goα脳内分布は連関することが報告されているムスカリン性アセチルコリン受容体(7)、GABA$_B$受容体分布(8)と一致せず、いくつかの受容体と連関するのではないかと考えられる。GABA$_B$受容体が高濃度存在する小脳において、免疫組織学的に分子層がよく染色されたが、この結果はGABA$_B$受容体の分布とよく一致した(8)。

Reference: (1) Sternweis, P.C., and Robishaw, J.D. (1984) J. Biol. Chem. **259,** 13806-13813 (2) Florio, V.A., and Sternweis, P.C. (1985) J. Biol. Chem. **260,** 3477-3483 (3) Asano, T., Ui, M., and Ogasawara, N. (1985) J. Biol. Chem. **260,** 12653-12658 (4) Sternweis, P.C. (1986) J. Biol. Chem. **261,** 631-637 (5) Koto, K, Hamaguchi, Y., Okawa, S., Ishikawa, E., Kobayashi, K., and Katsunuma, N. (1977) J. Biochem. **81,** 1557-1566 (6) Kato, K. (1983) Methods Enzymol. **92,** 345-359 (7) Yamamura, H.I., and Snyder, S. H. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA **71,** 1725-1729 (8) Hudson, A.L., Hill, D.R., and Bowery, N.G. (1981) Nature **294,** 584-587

46. 老年痴呆剖検脳における choline acetyltransferase の質的変化について

越村邦夫・中村重信・亀山正邦　(京都大・医・神経内科)

〔要　約〕

老年痴呆5例，対照6例の剖検脳でcholine acetyltransferase (ChAT) のkineticsと分子量を検討した。前頭葉および側頭葉皮質でcholine ,acetyl-CoA に対するKm, Vmax を求めたが，老年痴呆では両皮質ともいずれの基質に対するKmも増加しVmaxは減少していた。またKmとVmax の間に負相関を認めた。側頭葉皮質を用いカラムクロマトグラフィとショ糖密度勾配遠沈で分子量を検討したが，老年痴呆では対照より高分子量分画にもChAT 活性を認めた。以上の結果より老年痴呆ではChATは質的変化をきたしその原因としてChAT 蛋白の劣化が示唆された。次に老年痴呆および対照各1例の前頭葉皮質でChATのkinetics に対するＶＩＰ，バゾプレッシン，ソマトスタチンの効果を検討した。各ペプチドに対しChATのKm, Vmaxは異なる反応を示したが，いずれのペプチドに対してもVmax の変化は小さくKmにより大きな変化がみられた。さらに老年痴呆は対照に比べいずれのペプチドに対する変化も大きく，反応態度も対照と異なっていた。これらの神経ペプチドのChAT に与える効果は，コリン作動性神経に対するneuromodulator の可能性を示唆した。また老年痴呆と対照での効果の違いはChAT蛋白の変化を支持する所見であった。

Key word： senile dementia, choline acetyltransferase (ChAT), kinetics

Alzheimer病および老年痴呆におけるコリン作動性神経の障害はこれまで生化学的にも病理学的にも量的変化に関する報告が大半であり，質的変化に関するものは少ない。今回我々はコリン作動性神経の特異マーカーであるcholine acetyltransferase (ChAT)のkinetics および分子量を老年痴呆および対照の剖検脳で測定し，ChAT の質的変化を検討した。また老年痴呆に関与すると考えられる神経ペプチドのChATのkineticsに対する効果も合わせ検討した。

【方法】老年痴呆5例（平均87.4才，男3女2），対照6例（平均83.7才，男3女3）の剖検脳を用いた。両群の年令，性差，剖検までの時間（6～8時間）に差はなかった。診断は臨床神経学的所見と病理組織所見により行った。剖検脳は半球に2分し，一側は病理診断に，他側は－80℃に保存し生化学測定に用いた。前頭葉皮質標品としてBrodmann 6野を，側頭葉皮質標品としてBrodmann 21＋22野を採取した。大脳皮質は白質，脳軟膜除去後10 mM リン酸ナトリウム（pH 7.4）緩衝液でホモゲナイズした。ChAT活性の測定は ^{3}H acetyl-CoA を用いFonnumの方法に基いて行った(3)。ChATのkineticsはLineweaver-Burk plotによりKm，Vmaxを求めて検討した。蛋白量はLowryらの方法で測定した(6)。ChAT分子量の測定はSephadex G-200カラムクロマトグラフィとショ糖密度勾配遠沈で行った(1)。いずれも側頭葉ホモジェネートを用いた。ＶＩＰ，バゾプレッシン，ソマトスタチンは前記緩衝液で溶解後，測定まで-80℃で保存し測定後廃棄した。同じ緩衝液でホモジェネートとした前頭葉皮質標品に各々の神経ペプチドを加え，10分間室温で放置後，前記の方法でChAT を測定しKm とVmax を求めた(7)。

【結果】老年痴呆では両皮質共で acetyl-CoA, choline 両者に対するKmは増加しVmax は減少した（図1）。　さらに側頭葉のcholineに対するKmを除きKmとVmaxは負相関を示した

（図２）。ChATの分子量の検討ではいずれの測定法でも老年痴呆にのみ高分子量分画に活性を認めた（図３）。３つの神経ペプチドに対しChATのKm，Vmaxは各々異なる反応を示した。しかも老年痴呆と対照で反応は異った。特にcholineに対するKmは老年痴呆でいずれの神経ペプチドに対しても大きな変化を示した。共通していえることは，Vmaxの変化は小さくKmの変化が大であった点とVmaxとKmの変化が平行していた点であった（図４）。

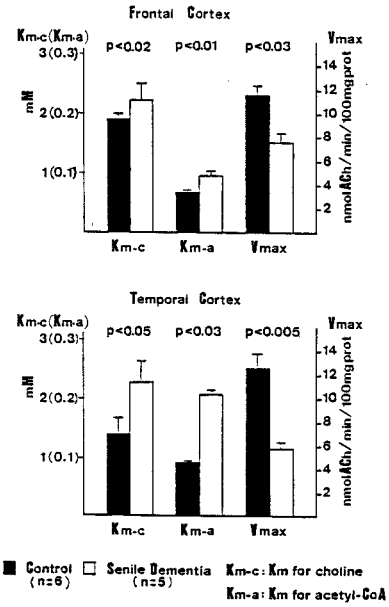
【考察】老年痴呆でのChATのKmの増加は基質に対する親和性低下を意味した。VmaxとKmが負相関していた点より，Km，Vmax両者の変化が共通因子によりひきおこされたと考えられる。その共通因子としてChAT蛋白の劣化が予想された。

ChATの分子量の検討でみられた老年痴呆における高分子量分画のChATは，この推論を支持する所見であった(5)。痴呆では神経ペプチドの変化も観察されているが(2)(4)(8)，その意味は明確でない。今回の実験でみられたChATのkineticsに与える神経ペプチドの影響は，神経ペプチドがコリン作動性神経に対しneuromodulatorとして働く１つの可能性を示唆した。しかも老年痴呆と対象で作用が異なることはChAT蛋白の変化を支持する所見と考えられた。

【文献】

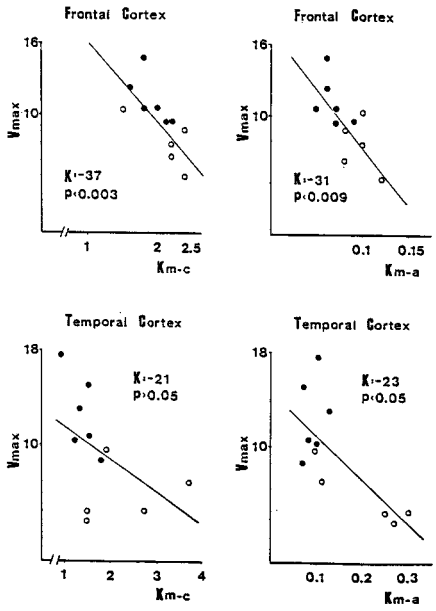
1) Banns,H.E. (1976) J.Neurochem. 26 967-971
2) Candy,J.M.,Gascoigne,A.D.,Biggins,J.A., Smith,A.I.,Perry,R.E.,Perry,E.K.,McDermott,J.R. and Edwardson,J.A. (1985) J.Neurol.Sci. 71 315-323
3) Fonnum,F. (1975) J.Neurochem. 24 407-409
4) Jegou,S.,Javoy-Agid,F.,Delbende,C.,Ruberg,M., Vaudry,H. and Agid,Y. (1985) J.Neurol.Neurosurg. Psychiatry 48 842-843
5) Koshimura,K.,Kato,T.,Tohyama,I.,Nakamura,S. and Kameyame,M. J.Neurol.Sci. in press
6) Lowry,O.H.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.L. and Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193 265-275
7) Luine,V.N.,Rostene,N.J.,Farr,A.L. and Randall,R.J. (1984) J.Neurochem. 42 1131-1134
8) Sørensen,P.S.,Hammer,M.,Vorstrup,S. and Gjerris,F. (1983) j.Neurol.Neurosurg.Psychiatry 46 911-916

Fig.1 Km and Vmax of ChAT in Cerebral Cortex



Statistical significance was carried out by Mann-Whitney test.

Fig.2 Correlation between Km and Vmax

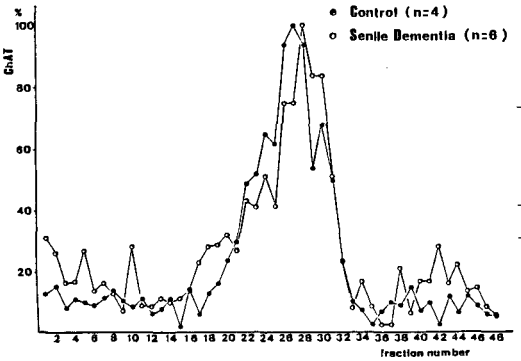


o senile dementia ● control

Statistical analysis was carried out by Kendall's correlation test.

Fig.3 Analysis of Molecular Weight of ChAT

by Column Chromatography on Sephadex G-200



Analysis of Molecular Weight of ChAT

by Centrifugation on Sucrose Density Gradient

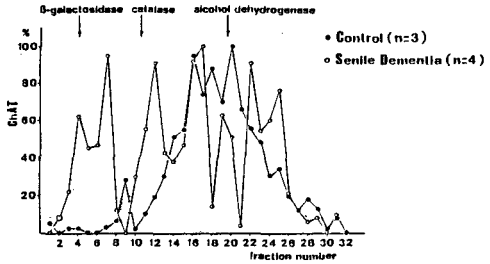
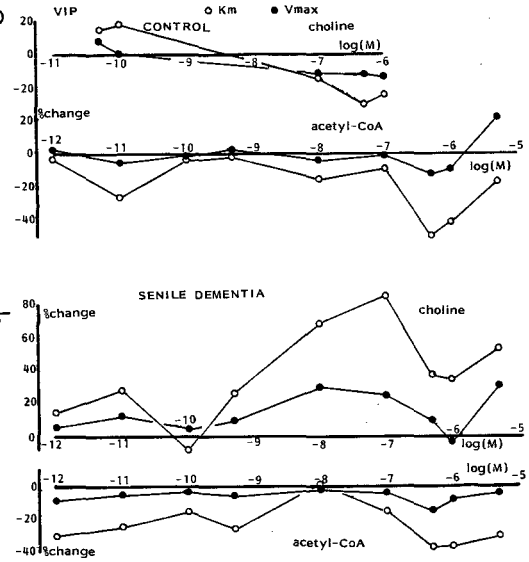
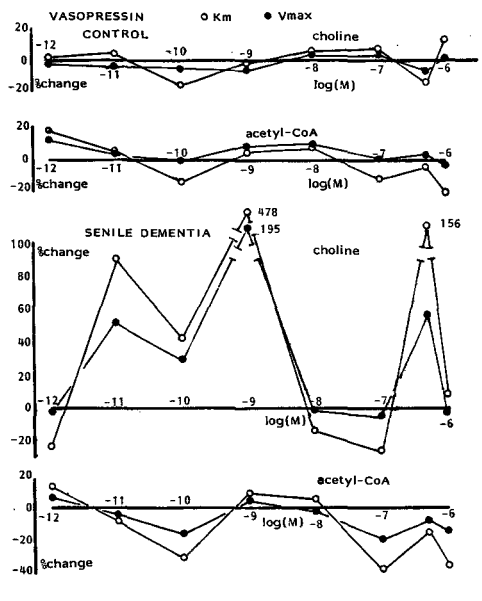
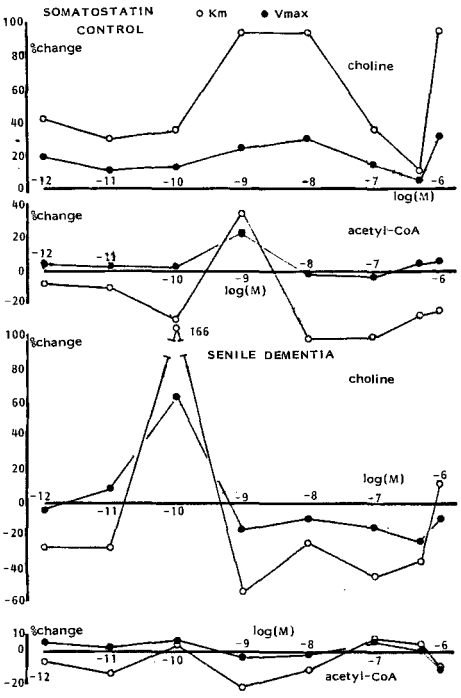


Fig.4

Effects of Neuropeptides on the Kinetics of ChAT







47. 痴呆疾患における髄液 acetylcholinesterase 活性の検討および血漿 acetylcholinesterase の同定について

中野　智・川嶋信吾・加藤智信・中村重信・亀山正邦
（京都大・医・神経内科）

〔要　約〕

痴呆疾患を中心に髄液Ａｃｅｔｙｌｃｈｏｌｉｎｅｓｔｅｒａｓｅ（ＡＣｈＥ）活性の検討を行った。対照例とした非中枢性疾患患者髄液のＡＣｈＥ活性は、加齢とともに上昇していた。痴呆を呈する例のうち、Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ病（６５歳未満発症）では、同年齢の対照群に比し活性は低下していたが、老年痴呆（６５歳以上発症）、脳血管性痴呆、正常圧水頭症では対照に比べ低下を認めなかった。アイソザイムの検討では、髄液には単一のアイソザイム（Ｇ４）が、存在することが明らかとなった。Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ病脳内では、脳中の２種のアイソザイム（Ｇ４，Ｇ１）のうちＧ４が選択的に低下しているが、髄液はこの脳内の変化を反映していると考えられた。

血漿中にもＡＣｈＥは存在する。しかし、多量の偽ＣｈＥのためその測定は一般的には困難である。われわれは、ｐｏｌｙａｃｒｙｌａｍｉｄｅ　ｇｅｌによる電気泳動と、特異的な偽ＣｈＥ阻害剤を用いることにより、血漿ＡＣｈＥを同定した。この結果、血漿中には１－２種のＡＣｈＥが存在し、主要なピークを対象とし、種々疾患の間で活性を比較することが可能となった。

Key word：　acetylcholinesterase, dementia, isozyme

＜はじめに＞

アルツハイマー型老年痴呆では、脳内アセチルコリン系ニューロン、とりわけ、Ｍｙｎｅｒｔ基底核－皮質系の障害が明らかにされている。この知見は、アセチルコリン（ＡＣｈ）の合成酵素であるｃｈｏｌｉｎｅ　ａｃｅｔｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅが該当部位で低下している（６）という事実から導かれたものである。一方ＡＣｈの分解酵素であるａｃｅｔｙｌｃｈｏｌｉｎｅｓｔｅｒａｓｅ（ＡＣｈＥ）もアルツハイマー型老年痴呆脳内では低下しており、しかも脳内の主要なＡＣｈＥアイソザイムであるＧ１（沈降定数４Ｓ）、Ｇ４（１０Ｓ）のうち、Ｇ４が選択的に低下しているという報告がなされた（１）。

ＡＣｈＥは、髄液、赤血球膜、血漿にも存在しており、脳内の変化がこれらの部位に反映されている可能性がある。われわれは髄液ＡＣｈＥ活性を主に痴呆疾患を対象にして検討した。また髄液ＡＣｈＥのアイソザイムを検討した。さらに血漿ＡＣｈＥ活性を測定するため、偽ＣｈＥから分離する目的で、ポリアクリルアミド　ディスク電気泳動法を用いる方法を開発したので報告する。

＜対象および方法＞

－　対象（髄液ＡＣｈＥ）　－

対照群には非中枢性疾患として、頸椎症、末梢神経障害、ミトコンドリア筋症例、そして４５歳女性の家族性血清偽ＣｈＥ欠損症例が含まれている。

アルツハイマー型痴呆例は、神経学的および放射線学的に診断した。全例発症より３年未満であった。血管性痴呆はＨａｃｈｉｎｓｋｉのｉｓｃｈｅｍｉｃ　ｓｃｏｒｅ（４）を参照した。混合性痴呆例や診断の不確かな例は対象より除外した。

－　方法　－

ａ．髄液ＡＣｈＥ活性

酵素活性の測定は、Ｅｌｌｍａｎらの方法（３）に準じ分光学的に行った。反応は３７°Ｃで行い、生成した５－ｔｈｉｏ－２－ｎｉｔｒｏｂｅｎｚｏａｔｅを４１２ｎｍにて吸光度を測定した。

偽ＣｈＥ活性はｂｕｔｙｒｙｌｔｈｉｏｃｈｏｌｉｎｅを基質にし測定した。精製した牛偽ＣｈＥ（Ｓｉｇｍａ社）は　ｂｕｔｙｒｙｌｔｈｉｏｃｈｏｌｉｎｅを　ａｃｅｔｙｌｔｈｉｏｃｈｏｌｉｎｅの　１．７５倍の速度で分解した。したがって髄液ＡＣｈＥ活性は次式で算出した。ＡＣｈＥ活性（ｎｍｏｌ／ｍｉｎ／ｍｌ）＝（ａｃｅｔｙｌｔｈｉｏｃｈｏｌｉｎｅ分解速度）－（ｂｕｔｙｒｙｌｔｈｉｏ－ｃｈｏｌｉｎｅ分解速度）／１．７５。得られたＡＣｈＥ活性は、ＡＣｈＥの特異的な阻害剤であるＢＷ２８４ｃ５１を用いた結果とよく一致した。

ＡＣｈＥの分子量の決定には、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２００　ｃｏｌｕｍｎ　ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙを用いた。密度勾配遠沈法は５－２０％の連続ショ糖密度勾配を作成し、４°Ｃ、１７．５時間、１７５，０００ｇ　にて遠沈した。両者とも、分子量あるいは沈降定数が既知の標品を用い、ＡＣｈＥの分子量、沈降定数を算出した。

ｂ．血漿ＡＣｈＥ

試料としてヒトヘパリン化血漿を用いた。展開ゲルとして６．７５％のアクリルアミドを含有するゲルを用いた。１試料あたり２ｍＡ、３時間電気泳動後、ａｃｅ－ｔｙｌｔｈｉｏｃｈｏｌｉｎｅを基質としＡＣｈＥ染色を行った。発色後、デンシトメーターにて吸光度を測定した。染色液中に偽ＣｈＥの特異的な阻害剤であるｉｓｏ－ＯＭＰＡを加えた。また同時にＡＣｈＥの特異的な阻害剤であるＢＷ２８４ｃ５１を加えることもあった。

＜結果＞

１．髄液ＡＣｈＥ

ａ．髄液ＡＣｈＥの性質

Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２００によるゲル ろ過では、分子量３８０，０００の単一のＡＣｈＥのみが髄液内に存在することが明らかになった。ショ糖密度勾配遠沈法でも単一の、沈降定数１０ＳのＡＣｈＥのみが同定された。アルツハイマー病患者髄液でも、同様の分離パターンを示したが、活性は低下していた。

ｂ．痴呆例における髄液ＡＣｈＥ活性

アルツハイマー型痴呆のうち、６５歳以下の例では、全例同年齢の対照群の平均値に比べＡＣｈＥ活性は低下していた。しかし、６５歳以上の例では、早期発症例と同様低値を示すものから、対照より高値を示すものまであり、均一ではなかった。図１

は髄液ＡＣｈＥ活性測定の結果である。アルツハイマー病では同年齢の対照群に比べ有意に（ｐ＜０．００１）活性は低下していたが、老年痴呆、血管性痴呆、正常圧水頭症例では対照に比し変化を認めなかった。他に、ＡＬＳ例では変化を認めなかった皮質梗塞（大梗塞）例では対照に比し有意な低下を認めた（ｐ＜0.005）。

２．血漿ＡＣｈＥの分離（図２）

血漿を電気泳動後、ｉｓｏ－ＯＭＰＡ（10^{-4} Ｍ）とともにｉｎｃｕｂａｔｅし、偽ＣｈＥを阻害した場合、４－５本のバンドが認められる。ＢＷ２８４ｃ５１（10^{-5} Ｍ）を同時に加えた場合そのうちの１－２本のバンドが消失する。したがって血漿中には１－２種のＡＣｈＥアイソザイムが存在する。

＜考察＞

髄液ＡＣｈＥの検討の結果では、髄液中には脳内に存在する２つの主要なアイソザイム（Ｇ１、Ｇ４）のうち、Ｇ４が髄液中に存在し、アルツハイマー病では脳内同様髄液中でもこのアイソザイムが低下していることが示された。アルツハイマー病と老年痴呆における髄液ＡＣｈＥ活性の差は、脳内における差である可能性がある（５）。

血漿ＡＣｈＥ活性は、アルツハイマー型痴呆では、髄液と逆に上昇しているという報告がある（２）。われわれも同様の方法で測定を試みたが、血漿ＡＣｈＥ活性は偽ＣｈＥ活性の１／５００程度あるため測定誤差が大きかった。そこで、電気泳動法と偽ＣｈＥに特異的な阻害剤を併用する方法により、血漿ＡＣｈＥの定量化を試みた。その結果、血漿中には真のＡＣｈＥは１－２種あり、そのうちの主要なアイソザイム（図２、バンド３）は再現性もよく、種々の神経疾患例での比較が可能であると思われた。

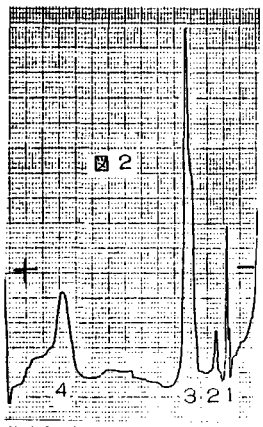
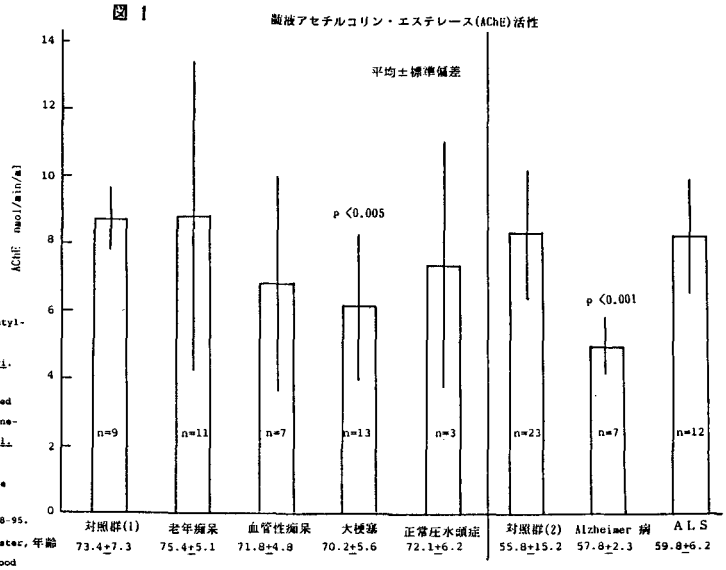


図２

図１



1 Atack,J.R.,E.K.Perry,J.R.Bonham,R.H.Perry,B.E.Tomlinson, G.Blessed and A.Fairbairn(1983) Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: selective loss of the intermediate (10 S) form,Neurosci. Lett.,40:199-204.

2 Atack,J.R.,E.K.Perry,R.H.Perry,I.D.Wilson,M.J.Bober,G.Blessed and B.E.Tomlinson(1985) Blood acetyl- and butyrylcholinesterases in senile dementia of Alzheimer type, J.Neurol. Sci.,70:1-12.

3 Ellman,G.L.,K.D.Courtney,V.Andrews,Jr. and R.M.Featherstone (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem.Pharmacol.,7:88-95.

4 Wechniski,V.C.,L.D.Iliff,E.Zihlka,G.H.DuBoulay,V.L.McAllister, 年齢 J.Marshall,R.N.R.Russel and L.Symon(1975) Cerebral blood flow in dementia, Arch.Neurol.(Chic.),32:632-637.

5 Bowor,N.H.,L.L.Iversen,G.P.Reynolds,C.Q.Mountjoy and M.Roth (1984) Neurochemical characteristics of early and late onset types of Alzheimer's disease, Br.Med.J.,288:961-964.

6 Whitehouse,P.J.,D.L.Price,R.G.Struble,A.W.Clark,J.T.Coyle and M.R.DeLong(1982) Alzheimer's disease and senile dementia——Loss of neurons in the basal forebrain, Science,215:1237-1239.

48. 髄液 Acetylcholinesterase と Pseudocholinesterase の臨床的検討

岩田　悟・小鹿幸生・山本正彦
（名古屋市大・医・第二内科）

〔要　約〕

髄液 Acetylcholinesterase(AchE), Pseudocholinesterase(PchE) 活性，蛋白量を対照（N)群，多発性脳梗塞（MI）群，多発性脳梗塞性痴呆（MID）群，Alzheimer 型老年痴呆（SDAT）群で測定し，その差異について検討した。① AchE 活性の低下は MID, SDAT 両群に認められたが，痴呆 score の低下と AchE の低下は相関はなかった。 PchE 活性の低下は SDAT 群にのみ認められた。 ②髄液 AchE の Km, Vmax を各群で測定した。 Km は各群間に差は認められなかったが，Vmax は MID, SDAT 両群で低値を示した。 ③脳梗塞 30 例の頭部 CT 所見と髄液 AchE 活性の関係を検討した。AchE 活性の低値群に前頭葉萎縮・側頭葉萎縮，脳室拡大を示す症例や脳幹萎縮を示す症例が有意に多く認められたが，梗塞部位との関係では差を認めなかった。

以上の検討より AchE 活性の低下は痴呆と重要な関係にあるが，痴呆程度と相関せず，多因子により影響を受ける可能性が示唆された。MID 群に於ける髄液 AchE 活性の低下は大脳皮質のびまん性変化に起因する前頭葉底部のコリン作動性神経の障害の結果と考えられ，SDAT のコリン作動性神経の障害過程を考える上で興味深い結果と思われた。

Key word :　CSF Acetylcholinesterase, CSF Pseudocholinesterase, Dementia

痴呆とコリン作動性神経の障害の関係について近年多くの研究報告がなされている。髄液 AchE 活性は末梢神経刺激後，一定の潜時を経て上昇してくる事から，脳内のコリン作動性神経の活動と密接に関係している(1)と考えられており，脳内コリン作動性神経の機能的異常および神経細胞脱落の程度を in vitro で検討することを目的として，髄液 Acetylcholinesterase (AchE) 活性を測定し，痴呆を生物化学的に評価しようとする試みがなされているが，結果は一定していない(2)(5)。今回，我々は脳梗塞及び血管性痴呆，Alzheimer 型老年痴呆において，髄液 AchE，Pseudocholinesterase(PchE) 活性，蛋白量，AchE の Km, Vmax の測定を行い，その差異について検討した。更に脳梗塞例では 頭部 X 線 CT, Psychometry 等も実施し髄液 AchE 活性の低下との関係についても検討を加えたので報告する。

〔対象および方法〕

精神神経疾患を有しない痔疾患々者 39 名，平均年令 58 ± 7 才を対照(N) 群とした。N 群は，本人の了解を得て手術時の腰椎麻酔の際に髄液 1ml 採取可能であった症例である。脳梗塞（CI）群は，臨床症状及び頭部 CT より初回の脳梗塞と診断し得た 5 名で平均年令 68 ± 9 才であった。多発性脳梗塞（MI）群は頭部 CT で非連続性の低吸収域が 2 カ所以上存在する 9 名，平均年令 64 ± 14 才であった。多発性脳梗塞性痴呆（MID) 群は MI 群の条件に加え，精神知能検査（長谷川式テスト，WAIS 検査）で Subnormal 以下，Hachinski の ischemic score が 10 点以上で且つ痴呆内容は，人格は保たれているが，いわゆる“まだら痴呆”を呈した 14 名で平均年令 64 ± 12 才であった。尚，脳梗塞患者では，最後の発作後 1 カ月以上経過してから髄液採取を行った。Alzheimer 型老年痴呆

（SDAT）群は7例で，平均年令67±10才であった。発症状況，経過が典型的で且つ頭部CTに低吸収域を認めない症例を選択した。現在7例ともStrub & Blackのstage分類でfinal stageであり，抗精神薬は一年以上投与されていない。

髄液AchE活性，PchE活性，蛋白量の測定及びAcetyl-β-methylthiocholine（Sigma）に対するAchEのKm，Vmaxの測定法は前回の本学会で報告した(4)。AchEのKinetic studyは前述の患者群のうちN群15例，MI群7例，MID群10例，SDAT群7例で検討した。

統計処理はt検定とカイ二乗検定により行った。

〔結果〕

〔髄液AchE活性〕（table 1）髄液AchEの単位容積当りの活性（mU/ml）は，N群：13.4±4.4 mU/ml，MI群：12.0±4.7 mU/ml，SDAT群：9.2±1.1 mU/mlであった。CI群は少数例であるがN群と有意差は認められなかった。MI群はN群と有意差は認められなかったが，低値を示す傾向があった。MID，SDAT両群はN群と比較し有意な低下が認められた（P<0.01）。MID群とSDAT群の比較では有意差は認められなかった。また，MI群と痴呆群（MID，SDAT）との比較では有意差は認められなかったが，痴呆群に低い傾向にあった。しかし，髄液AchEを髄液単位蛋白量当りの活性（mU/mg protein）で表示すると，各群間のいずれも差を認めなかった。

〔髄液PchE活性〕（table 1）髄液PchE活性（mU/ml）はN群，MI群，MID群のいずれに於ても有意差は認められなかった。しかし，SDAT群のみに有意な低下が認められた（P<0.01）。またPchE活性（mU/mg protein）の検討でも同様な結果であった。

〔髄液蛋白量〕（table 1）髄液蛋白量（mg/ml）は，各群に於ていずれも差は認められなかった。

〔髄液AchEのKm〕髄液AchEのAcetyl-β-methylthiocholineに対するKmの平均値は，N群：1.65±0.59（$\times10^{-4}$）M，MI群：1.42±0.27（$\times10^{-4}$）M，MID群：1.15±0.61（$\times10^{-4}$）M，SDAT群：1.32±0.27（$\times10^{-4}$）Mといずれの間にも有意差は認められなかった。

〔髄液AchEのVmax〕髄液AchEのAcetyl-β-methylthiocholineに対するVmaxの平均値は，N群：16.3±5.6，MI群：14.8±5.5，MID群：10.9±3.1，SDAT群：11.0±1.2（$\times10^{6}$）nmol/l/minであり，AchE活性（mU/ml）の検討と同様な結果で，MID群，SDAT群で有意な低下を認めた（P<0.01）。

〔髄液AchE活性（mU/ml）と脳梗塞患者の頭部CT所見〕（table 2）SDAT群に於けるAchE活性の群内変動に比し，MID群のその変動が大きいため，脳の病変部位と髄液AchE活性との間に何らかの関係が存在する可能性が考えられた。失語症の1例を加えた30例で，頭部CT所見との関係を検討した。N群のAchE活性の平均値から標準偏差値を差し引いた値9mU/mlを用い，それ以下（A）群と，より大（B）群の2群に分けた。前頭葉，側頭葉萎縮，脳室拡大および脳幹萎縮はA群に有意に多く認められた（P<0.01）しかし，髄液AchE活性の高低2群とPVLや小脳萎縮の有無，更に各部位に於ける梗塞巣の有無とは明らかな差異が認められず，両群に類似した頻度で認められた。

〔考察〕

髄液AchEの低下が，MID，SDAT両群で認められた事から痴呆とAchEの低下は重要な関係にあると考えられる。しかし，痴呆程度がSDATに比べ軽度であるMIDの中に

TABLE 1 CSF AchE, PchE activity and Protein concentration in Control and Diseases

	AchE activity		PchE activity		Protein
	mU/ml	mU/mg protein	mU/ml	mU/mg protein	mg/ml
CONTROL (n=39)	13.4±4.4	27.7±12.6	4.3±1.2	8.5±2.6	0.53±0.16
CI (n=5)	16.7±4.8	49.8±15.5	4.3±1.3	12.7±3.3	0.35±0.11
MI (n=9)	12.0±4.7	32.2±19.6	3.9±1.4	9.3±3.8	0.45±0.17
MID (n=14)	8.5±2.1	20.1±10.2	3.9±1.0	9.2±4.1	0.49±0.20
SDAT (n=7)	9.2±1.1	21.9±5.4	2.7±0.7	6.4±1.6	0.44±0.11

(M±SD, ** P<0.01)

TABLE 2 AchE activity and Head CT findings

	AchE≦9 mU/ml (11 cases)		AchE>9 mU/ml (19 cases)	
FRONTAL ATROPHY	6 cases	(54.5%)**	2 cases	(10.5%)
TEMPORAL ATROPHY	10	(90.9%)**	7	(36.8%)
VENTRICULAR DELATATION	10	(90.9%)**	7	(36.8%)
BRAIN-STEM ATROPHY	6	(54.5%)**	7	(36.7%)
CEREBELLAR ATROPHY	7	(63.6%)	9	(47.4%)
PERIVENTRICULAR LUCENCY	8	(72.7%)	10	(52.6%)
CORTICAL INFARCTS	5	(45.5%)	9	(47.4%)
SEMIOVALE INFARCTS	6	(54.5%)	10	(52.6%)
INTERNAL CAPSULE INFARCTS	5	(45.5%)	12	(63.2%)
BASAL-GANGLIA INFARCTS	7	(63.6%)	14	(73.7%)

(**P<0.01)

SDATよりAchE活性が低値を示す例や，対照と同じ程度を示す例もあり，痴呆スケールとは相関を認めず，髄液AchE活性の低下には複雑な要因の関与が示唆された。

髄液AchEのKmは痴呆群に於ても差は認められず，痴呆群に於けるAchE 活性の低下は酵素の親和性の低下に基づくものではなく，絶対量の低下に起因するものと考えられた。

脳梗塞患者の頭部CT所見とAchE活性の比較検討の結果，髄液AchE 活性の低下群で皮質萎縮が高頻度に認められた事から，脳循環障害による皮質萎縮がコリン作動性神経の活動や維持に，重大な影響を及ぼしている可能性を示唆するものと考えられた。今回検討したSDAT群は全て，末期の患者で全例皮質萎縮を伴っていた事から，この患者群に於ける髄液AchE活性の低下は，皮質萎縮による二次的結果とも考えられた。

PchE活性の低下はSDAT群で特異的であった。PchE はサルの中枢神経系にも存在する(3)との報告もあり，中枢神経に於て何らかの機能を有する事が示唆され，今後その解明について研究することも必要であると考えられる。

〔文献〕

1) Chubb, I. W. et al. (1982) Nature 299 : 432 - 442
2) Deutsch, S. I. et al. (1983) Biological Psychiatry 18 : 1363 - 1373
3) Graybiel, Ann M., et al. (1982) Nature 299 : 439 - 442
4) 岩田 悟. 他 (1985) 神経化学 24 : 547 - 549
5) Soininen, H., et al. (1984) Acta Neurol Scand 69 : 29 - 34

49. 各種神経疾患における髄液ソマトスタチン値について—特に痴呆との関係について—

下田光太郎・竹島多賀夫・浦上克哉・下村登規夫・西川清方
高橋和郎　（鳥取大・医・脳神経内科）

〔要　約〕

各種神経疾患に於て髄液ソマトスタチンをRIAにて測定し臨床症状、特に痴呆との相関を検討した。対象とした疾患はパーキンソン病２８名、其の内痴呆のあるもの１０名、筋萎縮性側索硬化症１１名、脊髄小脳変性症２４名、痴呆症（アルツハイマー型痴呆５名、多発脳梗塞性痴呆６名）、ＣＯ中毒性痴呆３名、その他の脳血管障害，てんかん、神経症など４１名で、計１２０名である。対照群に於てソマトスタチン値と年齢との間には有意の相関はみられなかった。これらの疾患群に於て最も低値を示したのは、アルツハイマー型痴呆でその値は 42.6 ± 5.3（mean ± S.E）pg / ml であった。次に低値を示したのはパーキンソン病の痴呆を示す群で 42.8 ± 4.7 であった。パーキンソン病で痴呆のあるものはないものに比し明らかにソマトスタチン値が低かった。今回の対象群に於いては痴呆のあるものでは低値を示したがSCDでも対照に比し低かった。ソマトスタチンがアルツハイマー型痴呆のみならず多くの痴呆患者で低値を示すことが明らかになりこの神経ペプチドが中枢神経系において高次機能に重要な働きをしていることが推察された。

Key word：　CSF, somatostatin, dementia

＜はじめに＞

ソマトスタチンははじめ成長ホルモン分泌促進因子としてヒツジ視床下部より単離されたアミノ酸１４個のペプチドである[2]。その後の研究によりソマトスタチンは視床下部のみならず中枢神経系に広く分布し又腸管にもその存在が知られるようになり今日brain gut peptide として注目を浴びている[5]。最近痴呆患者の脳中にてアセチルコリ及びソマトスタチンの低下が報告され、特にアルツハイマー型痴呆ではCSF中に於てもソマトスタチンの低下が知られてきている[3]。痴呆とソマトスチンとの直接の関係は未だ明らかではない。今回我々はCSF中のソマトスタチンの低下がアルツハイマー病に特徴的なものであるか否か確かめるため各種神経変性疾患にてソマトスタチンを測定したので報告する

＜　対象ならびに方法　＞

対象患者は当科に入院した神経変性疾患並びに痴呆を主症状とする疾患で、パーキンソン病２８名、そのうち痴呆のあるもの１０名、脊髄小脳変性症２３名、筋萎縮性側索硬化症１２名、アルツハイマー型痴呆５名、多発脳梗塞性痴呆６名、ＣＯ中毒性痴呆３名を用いた。対照としては同じく当科に入院した患者で脳血管障害、痙攣発作症、多発神経炎、神経症などをもちい、ＣＴ、血液検査、知能検査等にて異常の認めなかった者のみをもちいた。

ＣＳＦ採取は朝絶食とし、１－２時間の安静臥床後腰椎穿刺にて行った。始めの４ｍ

lにて一般検査（蛋白量、細胞数など）を行い、続く４ｍｌを検体として、測定まで－８０°Ｃにて凍結保存した。ＣＳＦは蛋白、細胞数など生化学的に異常のあるもの又 traumatic tap のものはのぞいた。
ソマトスタチンの定量は Arimuraらの二抗体法によるラジオイムノアッセイによった[1]。アッセイはImmuno Nuclear Corporation のものを用いた。測定は triplicate した。最小検出限界は 10-20pg/mlであった。endrophin,substance P,enkephaline との交叉反応は 0.002% 以下、TRH,VIP,LHRH,AVP との交叉反応は 0.01% 以下であった。痴呆の診断はＤＳＭ－Ⅲにておこない、又長谷川式知的機能検査スケールを用いて点数２２以下の predementia 以下のものを痴呆として取扱た。有意差検定は Student-t testによった。

＜ 結果と考案 ＞

対照患者のＣＳＦ中のソマトスタチン値は９２．３±５．３（mean ± S.D.）であったソマトスタチンの髄液中濃度は各施設により差があり一定していない。髄液中のソマトスタチンは比較的安定しており分解も少ないとされている[4]。ＣＳＦ中のソマトスタチンと加齢による変化はかならずしも一定していない、今回我々も対照患者につき年齢との相関を調べたが明らかな相関は認められなかった（Fig-1）。従って痴呆が年齢とすくなからぬ相関をするとすればソマトスタチン値の変動が加齢と関係なく生じることは非常に興味ある事実かもしれない。今回対照者について詳しく分類

＜ CSF somatostatin levels in various neurological disease ＞

age (mean±S.D.), somatostatin levels (mean ± S.E.) pg/ml

control	n=41	51.1 ± 14.7	92.3 ± 5.3 *
Parkinson's disease	n=28	59.9 ± 12.8	70.8 ± 5.3
dementia (-)	n=18	58.4 ± 13.0	84.7 ± 4.7 * N.S
dementia (+)	n=10	60.8 ± 12.6	42.8 ± 4.7 p<0.001
SCD	n=23	57.8 ± 8.0	62.1 ± 6.7 * p<0.01
dementia (SDAT)	n=5	69.8 ± 7.2	42.6 ± 4.5 * p<0.01
(CO intox)	n=3	68.0 ± 14.8	57.0 ± 4.4 * N.S
(MID)	n=6	71.5 ± 7.4	58.5 ± 6.7 * p<0.05
ALS	n=12	61.3 ± 8.1	71.1 ± 7.4 * N.S

SCD : spinocerebeller degeneration. SDAT : senile dementia of Alzheimer type. CO intox : CO intoxication. MID : multi infarct dementia

しなかったが性差、疾患による明きらかなソマトスタチン値の差は認められなかった。パーキンソン病に於けるソマトスタチン値は痴呆のあるものとないものにおいては明らかに差があり痴呆のあるものは有意に低値をしめした（Fig-2）。一方罹病期間や年齢との関係は認められなかった。又痴呆のないパーキンソン病患者は対照と比しソ

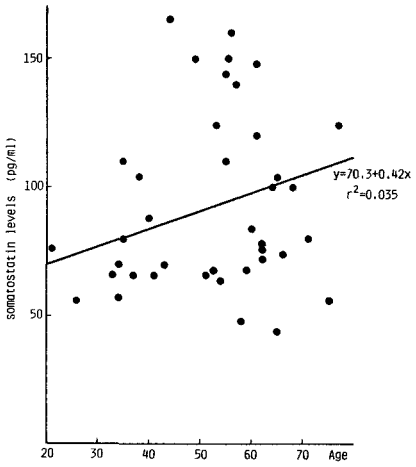


Fig-1

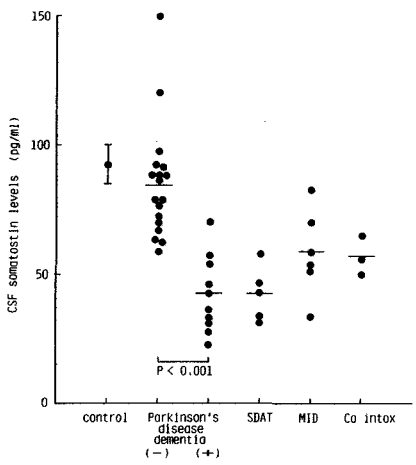


Fig-2

マトスタチン値に有意な差を認めなかった。このことはパーキンソン病に於ける痴呆がSDATなどと同じようなメカニズムで起こっていることも考えられる。SDAT におけるソマトスタチン値の低下は既にいくつか報告されている我々は此の度多発脳梗塞性痴呆においてもすくなからぬ低下を認めた、また一酸化炭素中毒にて痴呆を来した症例のソマトスタチン値も幾らか低下していた。此等の変化はいずれ非特異的なものであろうが低下そのものが痴呆と直接に関係するとすれば興味ある事実と考えられる。ALS にては低下が認められなかった。一方既に我々が報告しているように SCD にてソマトスタチンが低下しているにもかかわらず痴呆がないことを考えるとソマトスタチンが必ずしも痴呆のみとと相関せず変化することも考えられる。

< 文献 >

1) Arimura A, Ludqvist G, et al : Metabolism 27,1139,1978
2) Brazeau P, Vale W, et al : Science 179,77,1973
3) Davis P, Katzman R, et al : Nature 288,279,1980
4) Patel Y C, Rao K, et al : New England J.M 296,529,1977
5) Vale w, River C, et al : Ann, Rev, Physiol 39,473,1977

50. 痴呆脳におけるカテプシンD活性の変化とカテプシンDによるneurofilament 蛋白質の変性

鈴木英夫・武田雅俊・加藤佳也・山下　正・多田國利
播口之朗・西村　健　（大阪大・医・精神医学）

〔要　約〕

ライソゾーム内の酸性プロテアーゼであるカテプシンD（CD）の活性をアルツハイマー病(AD)脳、脳血管性痴呆(CVD)脳及び神経原線維変化(NFC)作製家兎脳で測定し、CDのneurofilament (nf)に及ぼす影響を検討して以下の成績を得た。　1）AD脳及び実験的 NFCをおこした家兎脳ではCD活性の上昇がみられたが、CVD 脳では変化がなかった。他のライソゾーム酵素の1つであるβ-glucuronidaseの活性はいずれの脳でも変化がみられなかった。　2）牛脳CDは、pH5.6 においてneurofilament tripret 蛋白質のサブユニットを分解した。各triplet 蛋白質の分解産物中に、NFC の構成蛋白質と免疫学的に反応する50K 蛋白質と、ポリアクリルアミドゲル電気泳動上、移動度が一致する蛋白質が含まれていた。　3）微細形態的に桿状構造を示す200K,68K蛋白質は CD より顆粒状に分解された。in vitroで再構成されたneurofilament も CD により、その表面が粗となり線維の連続性が破壊されるのが観察された。　4）これらの成績と前回の報告[8)]からAD脳内で活性が上昇するCDが神経細胞内のnf及びmicrotubule蛋白質に作用すること、及び AD 脳内で増生する NFCの形成に CD が関与している可能性が示唆された。

Key word：　Alzheimer's disease　/　cathepsin D　/　neurofilament

われわれは、アルツハイマー型痴呆の脳においては、線維性蛋白質の代謝に異常が生じていることを報告した[7)]。今回、線維性蛋白質の細胞内での異常をさらに詳しく解明することを目的として、脳内酸性プロテアーゼ活性の約 90%を占めるといわれているカテプシンD(EC3.4.23.5.)を中心に、その痴呆脳内での変化及び神経細胞内の線維性蛋白質に対する影響を調べ、以下の結果を得たので報告する。

［材料と方法］

1）人脳剖検材料：AD脳（2例）、CVD 脳（1例）は、死亡約5時間後の剖検で得た。対照人脳としては、ほぼ同年齢、同条件の司法解剖例（3例）を用いた。

2）実験的神経原線維変化（ENFC）の作製：成熟家兎の大脳実質内にHolt's adjuvant[2)](10%$AlCl_3$) 0.5mlを注入し（対照脳には生食0.5ml 注入）、約45時間後に失調状態となった家兎の脳脊髄を摘出した。ENFCの存在は、光顕及び電顕にて確認した。

3）人脳、家兎脳からの CD 分画の分離：Marks ら[3)]の方法に従い、CD分画を分離し、Serra ら[6)]の方法に従い、CD活性を測定した。

4）β-glucuronidase (EC 3.2.1.31.) の活性：脳組織ホモジネートの遠沈上清中のβ-glucuronidase活性を、 phenolphtalein glucronic acid を基質として18時間incubateした後、phenolphtaleinの発色によって測定した。

5）neurofilament(nf) triplet 蛋白質の分離：牛脊髄からTokutakeら[9)]の方法に従い200K,160K,68K のtriplet 蛋白質を分離した。

6）牛脳 CD の分離精製：Benuckら[1)]の方法に従って、牛脳より粗 CD 分画を調整し、このものから pepstatinをリガンドとする affinity chromatographyによって

CD を精製した。精製した CD 活性は、塩酸で変性させた hemoglobin 蛋白質を基質として測定した。

7）nf triplet蛋白質に対する CD の作用：200K,160K,68K の各triplet 蛋白質(4 mg/ml)100 μl と牛脳 CD (0.04mg/ml)100μl と citrate buffer(pH3.2)100μl を混じ、37° C でincubateした。最終 pH は、5.6 であった。incubate時間は、30分、1時間、2時間、4時間とした。対照は、各triplet 蛋白質100 μl と citrate buffer 200 μl とした。incubate後、各試料の7.5 μl を 2/16 graduent polyacrylamide gel 電気泳動(PAGE)に供した。 牛脾臓CD(Sigma corp.12.5U/mg) についても、牛脳CDと同様の方法で検討した。また、牛脾臓 CD による nf triplet の微細形態的変化を、2%酢酸ウラニルで陰性染色をして日本電子100CX 電子顕微鏡で観察した。

[結果]

1）痴呆脳及び ENFC 作製家兎脳におけるライソゾーム内酵素活性：AD脳の CD 活性は、対照脳に比して高値を示した(Fig.1 a)。ENFC脳の CD 活性についても前回報告した如く、対照脳に比して上昇を示した(Fig.2a)が、 CVD脳の CD 活性には大きな変化は認められなかった。β-glucuronidase活性は、AD脳、CVD 脳、対照脳の間に差異はなかった(Fig.1b)。ENFC脳においても、β-glucuronidase活性は対照脳との間に変化は認められなかった(Fig.2b)。

2）CDのnf triplet蛋白質に対する作用：牛脳より CD を分離精製した。分子量は約45000 であり、 CD 活性は、約1000 U/mg protein であった。200K nf 蛋白質は、CDによって分解され (Fig.3 a)、incubate時間に比例して、m.w.190kdt(kilodulton)

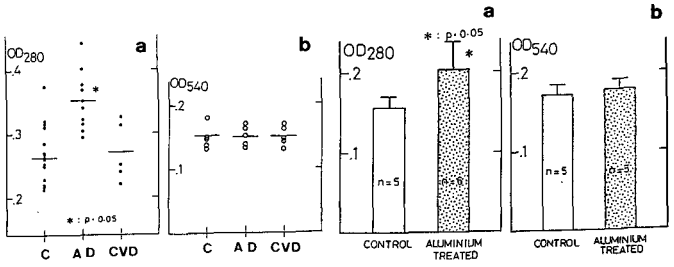


Fig.1.CD(a) and β-glucuronidase (b)activities in human brains. C:control,AD:Alzheimer's disease, CVD:cerebrovascular disease.

Fig.2.CD(a) and βglucronidase (b)activities in rabbit brains.

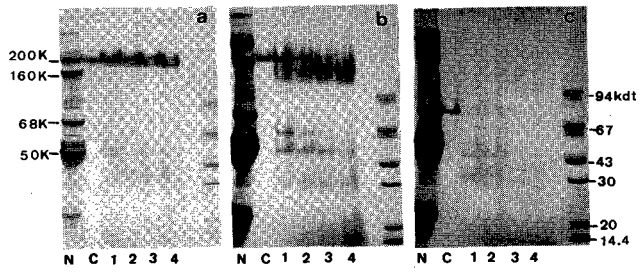


Fig.3. 2/16graduent PAGE. 200K(a),160K(b),68K(c)nf tripret proteins were incubated with CD for 30min.(1),1hour(2),2hours (3),4hours(4) at 37 C in pH5.6. N:crude nf, C:each triplet proteins without CD.

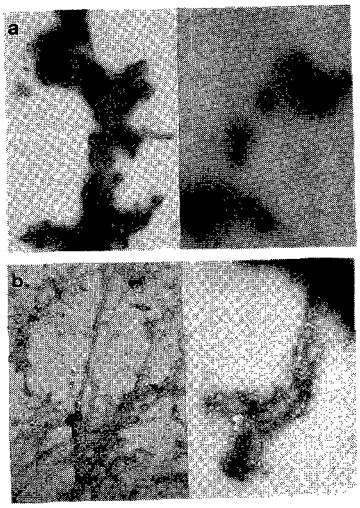


Fig.4.Electromicroscopic findings with negative staining. Reassembled 200K nf(a,left) were disturbed with CD(a,right),and reassembled triplet nf(b,left) also were disturbed with CD(b right).

の蛋白質が増加した。m.w.50～20kdt の間にも、数本蛋白質が認められた。160K nf 蛋白質は、CDによって主としてm.w.150 ～120kdt,65kdt,50kdt,30kdt,20 ～15kdt の蛋白質に分解された(Fig.3 b) 。150 ～120kdt,30kdt,20 ～15kdt の蛋白質は incubate時間に比例して増加し、65kdt,50kdt の蛋白質はincubate時間に反比例して減少した。 68K nf 蛋白質は CD によって主として m.w.45kdt,32kdtの蛋白質に分解され(Fig.3 C) 、incubate時間に比例していずれの蛋白質も減少し、incubate2 時間及び4時間では、PAGE上痕跡程度となった。CDによって68K が最も作用を受けやすく、次いで160K,200K の順であった。牛脾臓 CD も牛脳 CD と同様に、nf triplet蛋白質を分解し、その泳動パタンもほぼ同様であったが、牛脳 CD の場合にみられた 200K における50～20kdt 蛋白質、 160K における65kdt,50kdt 蛋白質は、牛脾臓 CD では認められなかった。牛脾臓 CD でも 68K蛋白質が最も作用を受けやすく、次いで 160K, 200Kの順であった。微細形態的には、陰性染色で桿状構造として観察された200Kは、牛脾臓 CD によってその表面が粗となり、さらに顆粒状に分解されるのが観察された(Fig.4 a) 。68K においても、桿状のものが CD によって顆粒状に変化した。顆粒状の160Kには変化は認められなかった。200K,160K,68K を1:2:9 の重比で混合すると、直径約10nmの線維構造が再構成されたが、これに CD を作用させると、線維表面の粗化が生じ線維の連続性が消失した(Fig.4 b) 。

［考察］

CD活性は、AD脳で上昇を示したが、他のライソゾーム内酵素の1つであるβ-glucuronidaseの活性には変化がみとめられなかった。また、ENFC作製家兎脳においてはCD活性の上昇が認められたのに反して、β-glucuronidaseの活性に変化を認めなかった。これらのことは AD 脳で増生する NFCの形成に CD が何らかの役割を担っている可能性を示唆する。これまでに、粗nf分画[4)]、microtubule 蛋白質[8)]、tubulin [5)]が CD の基質となりうるという報告がある。nf蛋白質に関しては、triplet 蛋白質各々に対する CD の影響やその分解産物についての詳細な報告はなされていない。今回の結果から、200K,160K,68K 各々が CD の基質となり、変性を受けることが電気泳動法、電顕観察によって明らかにされた。 変性ヘモグロビンを基質としたときのCD活性の至適 pH は3.2 とされているが、 今回 nf 蛋白質が分解された条件は pH 5.6 であり、これは生理的状態に近いといえ、in vivo でも CD が nf 蛋白質に作用する可能性が考えられる。 Schwartz ら[5)]も tubulinが CD によって分解される至適pHは5.8 であることを示し、生理的条件下で CD が tubulinに作用している可能性を指摘している。 われわれは、以前に NFCを構成する paired hellical filaments (PHF) が m.w.54000～62000 までの3つの蛋白質からなっており、それらの蛋白質が nf 蛋白質、tubulin 、nf分離の際に付随して分離される 50K蛋白質などの抗体と免疫学的に反応することを報告した[7)]。今回の成績で CD による nf 蛋白質の分解産物の中に、PAGE上 50K蛋白質に相当するものが多く認められたことから、PHF 形成にnf分解産物が係わっている可能性が示唆された。

［文献］

1)Benuck M et al,Brain Res,143,181,1977. 2) Klatzo I et al,J Neuropath Exp Neurol,24,187,1965. 3)Marks N et al,Biochem J,97,74,1965. 4)Nixon RA et al,J Neurochem,43,507,1984. 5)Schwartz MB et al,Neurochem Res,8,51,1983. 6)Serra S et al,Brain Res,44,519,1972. 7) 多田ら，神経化学，20,36,1981. 8)武田ら，神経化学，23,180,1984. 9)Tokutake S et al,Biomed Res,5,235,1984.

51. Kyotorphin 合成酵素の精製

植田弘師・吉原良浩・高木博司　　(京都大・薬・薬理)

〔要　約〕

ラット脳組織においてアミノ酸からkyotorphin(Tyr-Arg)を合成する酵素(kyotorphin synthetase)の存在を見いだし、その部分精製をおこなった。ラット脳シナプトゾームのホモジネートをkyotorphin分解酵素阻害剤のbestatin存在下で37°C, 1時間インキュベートした時のkyotorphin量は、Tyr,Arg各1mMを加えておくことにより、有意に増大した。このことからラット脳シナプトゾーム画分に、アミノ酸からkyotorphinを合成する酵素の存在が示唆された。そこで、ラット脳シナプトゾーム水溶性画分を原料とし、Sephacryl S-300, DE-52 cellulose, Kyotorphin CH-Sepharose 4B アフィニティークロマトグラフィーなどを用いてこの酵素の部分精製をおこない、その性質について検討した。Kyotorphin synthetaseの活性にはTyr, Arg, ATP, $MgCl_2$のすべてが必須であり、この反応の生成物としてkyotorphinとAMPを確認した。さらに、この酵素反応はピロリン酸によって強く阻害され、おそらくこれは生成物阻害によるものと考えられる。また、この酵素の等電点は6.1-6.2, 分子量は約245,000、至適pHは7.4-9.0であった。これらのことから、kyotorphin synthetaseのラット脳での存在が明らかとなった。

Key word：　Kyotorphin(Tyr-Arg),　Kyotorphin synthetase

Kyotorphinは1979年、ウシ脳組織より単離、同定された鎮痛活性ジペプチドであり、[2]その鎮痛作用は脳内Met-enkephalinの遊離を促進して生ずるものであることが確認された。[1),2)] また、Kyotorphinの神経制御物質としての可能性を示唆する以下のよう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、[3)]細胞下分画法によるとシナプトゾーム画分に高濃度存在している。[4)] 2. Kyotorphinは神経終末へ取り込まれ、さらに脱分極刺激により放出される。[7)] 3. Kyotorphinは特異的なレセプターを介したCa^{2+}動員作用を有する。[8)] 4. 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。[5)] 5. Bestatin存在下で脳組織をインキュベートするとkyotorphinは蓄積し、これはシナプトゾーム画分で特に顕著であることから、kyotorphin生合成は神経終末でおこりうる。[6)] 今回、我々は、bestatin, Tyrおよび Arg存在下でkyotorphinの蓄積がさらに著しい増加を示したことから、kyotorphin synthetaseの存在を確認し、その部分精製をおこない、性質について検討した。

＜実験方法＞

実験には体重約200gのSD系雄性ラットを用いた。

1). 脳シナプトゾーム画分でのアミノ酸からのkyotorphinの合成

ラット全脳よりショ糖密度勾配遠心法で調製したシナプトゾーム画分を50mM Tris-HCl(pH7.4)で低張処理し、そのホモジネートをTyr, Arg, bestatin(各1mM)とともに37°C, 1時間インキュベートした。煮沸にて反応停止後、Sep-pak C-18およびHPLCでkyotorphin画分をとり、kyotorphin抗血清を用いたラジオイムノアッセイ(RIA)によ

りkyotorphinを定量した。

2). Kyotorphin合成酵素の部分精製

ラット脳、粗シナプトゾーム画分を 50mM Tris-HCl(pH7.4) で低張処理し,100,000 x g, 1時間の遠心で得た水溶性画分を限外ろ過で濃縮し、Sephacryl S-300 (1x90cm) を用いてゲルろ過をおこなった。ATP, $MgCl_2$依存性kyotorphin合成活性のあったピークA画分を次に、DE-52 陰イオン交換クロマトグラフィー、さらに kyotorphin CH-Sepharose 4Bアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製した。

3). Kyotorphin合成酵素活性の測定

Kyotorphin合成酵素活性は、各フラクションの一部を 1mM Tyr, 1mM Arg, 10μM bestatin, 10μM PCMBとともに、4mM ATP-$MgCl_2$ 存在下および非存在下で 37°C, 1時間反応させ、煮沸にて反応停止後、RIA で生成kyotorphin量を測定した。ここでPCMBは前駆体タンパクからのkyotorphin合成を阻害するために加えた。[6] また、一部の実験において、反応液をSep-pak C-18およびHPLCによりkyotorphinを部分精製した後に RIAをおこなった。

4). Kyotorphin合成酵素の性質

pH依存性および等電点クロマトグラフィーについては Sephacryl S-300ピークA画分を用いておこなった。等電点クロマトグラフィーはFPLC Mono P カラムおよび PBE 94カラム(1x20cm)を用い、Polybuffer74,94 によるpH勾配でタンパクを溶出した。分子量の決定には、DE-52 の活性ピークを酵素原料とし、TSK-gel G4000SW カラム(7.5 mmx60cm)を用いた。

Table.1 Formation of kyotorphin from tyrosine and arginine in rat brain synaptosomes

addition	Kyotorphin formation (pmol/mg protein/hr)		% of control
control (no addition)	3.3 ± 1.7		100
bestatin 1 mM	7.4 ± 0.9	a	224
bestatin 1 mM tyrosine 1 mM arginine 1 mM	12.1 ± 2.4	b	367

Results were obtained from separate 4 experiments.
[a] $p<0.05$, compared to the control (paired t-test).
[b] $p<0.05$, compared to incubation with bestatin (paired t-test).

Fig.1 The first step of purification; Saphacryl S-300 gel filtration chromatography of kyotorphin synthetase

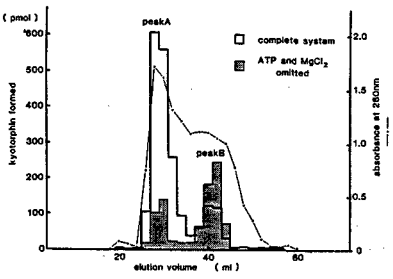


Fig.2 The second step of purification; DE-52 anion exchange chromatography of kyotorphin synthetase

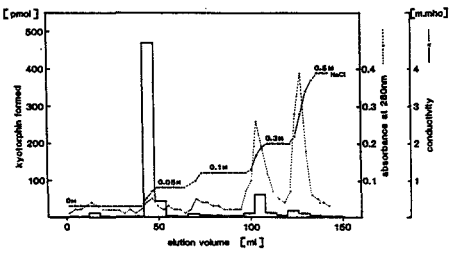
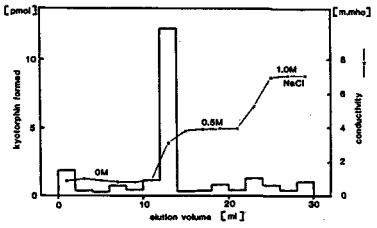


Fig.3 The third step of purification; Kyotorphin CH-Sepharose 4B affinity chromatography of kyotorphin synthetase



＜実験結果および考察＞

1. ラット脳シナプトゾームのホモジネートを 1mM bestatin とともに 37°C, 1時間インキュベートすると、すでに報告したように、[6] kyotorphin が蓄積した。さらに Tyr, Arg 各1mM を加えておくと蓄積kyotorphin量は有意に増大した (Table.1)。このことからラット脳シナプトゾームにはアミノ酸からkyotorphinを合成する酵素が存在することが示唆された。

2. Kyotorphin合成酵素活性はシナプトゾームの中でも特に水溶性画分に最も多く見いだされたので、この画分を濃縮後、Sephacryl S-300 のゲルろ過をおこなった。Fig.1 に示すようにkyotorphin合成活性はふたつのピーク(分子量、A；約30万、B；約10万)に検出された。しかし反応液に ATP, $MgCl_2$ 各4mM を添加するとピークAの活性は著しく増大したのに対し、ピークBの活性はむしろ阻害された。そこで ATP-$MgCl_2$依存性のあるピークA画分を "kyotorphin synthetase" 画分として集め、DE-52イオン交換カラムにかけ、NaClの段階的溶出をおこなった。Kyotorphin合成酵素活性は NaCl 0.05M で単一ピークとして検出され(Fig.2),脱塩後、さらに kyotorphin CH-Sepharose 4B アフィニティカラムで45.4倍まで精製した。しかし失活が大きく、このことを考慮に入れると実際の精製の程度は約1500倍となった。

3. Kyotorphin synthetase の活性には Tyr, Arg, ATP, $MgCl_2$ のすべてが必須であった。なお、Sep-pak C-18, HPLCにより反応生成物がkyotorphinであることを、さらに[^{3}H]-ATPを用いて、ATP からの生成物は AMPであることを確認した。また、この酵素活性はピロリン酸により強く阻害された。これはおそらく、生成物阻害をひき起こしたためであると考えられる。以上のことから、本酵素反応は次式であらわされる。

$$\text{Tyr} + \text{Arg} \xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{ATP} \quad \text{AMP+PPi}} \text{Tyr-Arg (kyotorphin)}$$

4. Kyotorphin synthetase の等電点は 6.1-6.2, 分子量は約245,000 であった。また,至適pHが7.5-9.0であることより、生理的条件下ではたらきうると考えられる。

＜文献＞

1) Shiomi,H.,Kuraishi,Y.,Ueda,H.,Harada,Y.,Amano,H.and Takagi,H.(1981) Brain Res. 221,161-169

2) Takagi,H.,Shiomi,H.,Ueda,H.and Amano,H.(1979) Nature 282,410-412

3) Ueda,H.,Shiomi,H.and Takagi,H.(1980) Brain Res. 198,460-464

4) Ueda,H.,Tatsumi,K.,Shiomi,H.and Takagi,H.(1982) Brain Res. 231,222-224

5) Ueda,H.,Ge,M.,Hazato,T.,Katayama,T.and Takagi,H.(1985) Life Sci. 36,1865-1871

6) Ueda,H.,Yoshihara,Y.,Nakamura,A.,Shiomi,H.,Satoh,M.and Takagi,H.(1985) Neuropeptides 5,525-528

7) Ueda,H.,Matsumoto,S.,Yoshihara,Y.,Fukushima,N.and Takagi,H.(1986) Life Sci. 38,2405-2411

8) Ueda,H.,Yoshihara,Y.and Takagi,H.(1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. in press

52. Kyotorphin 合成酵素の性質とその生理的意義

吉原良浩・植田弘師・高木博司　　(京都大・薬・薬理)

〔要　約〕

Kyotorphin synthetase は脳内で Tyr, Arg, ATPを基質として、kyotorphin(Tyr-Arg)とAMP を生成する酵素である。この酵素は各種アミノ酸のなかで、Tyr とArg に特異的であり、さらにATP を他のヌクレオチドに置換すると、その酵素活性は著しく減少した。また、この酵素の Tyrに対するKm値は 25.6μM, Arg に対しては 769μM, ATP に対しては 294μM であった。しかし、Arg の脳内濃度はこのKm値に比して低いという事実から、Arg が kyotorphin synthetaseを介する kyotorphin 合成の調節に寄与している可能性が示唆された。そこで、Arg をマウスに皮下投与(1g/kg) すると、投与24時間後に脳幹部の kyotorphin 量は約60%の増加を示し、同時に有意な鎮痛作用が認められた。またこの鎮痛作用は naloxone(0.01mg/kg,s.c.) により完全に拮抗された。以上のことより、kyotorphin synthetase が脳内で実際に機能しており、脳内 Arg含量が kyotorphin 合成を調節していると考えられ、あわせて、kyotorphinが内因性の疼痛制御物質である可能性が示唆された。

Key word : Kyotorphin synthetase, Arginine, Analgesia

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] また、最近の研究によりkyotorphinが神経制御物質としてはたらいている可能性が示唆されている。[2)5)6)7)8)9)10)11)] そのうち生合成機構に関しては、1). 前駆体タンパクからのプロセシングによるもの、[9]と、2). アミノ酸(Tyr,Arg) から kyotorphin synthetaseを介して合成されるもの、のふたつの経路が存在することが確認された。今回、我々は、この kyotorphin synthetase の基質特異性および反応速度論的解析をおこない、さらにその生理的意義を検討した。

＜実験方法＞

1). Kyotorphin合成酵素の調製

ラット脳、粗シナプトゾーム水溶性画分を限外ろ過で濃縮後、Sephacryl S-300 のゲルろ過をおこなった。実験 2)-1, 3) では、ATP-$MgCl_2$ 依存性のピークA画分を酵素として用い、実験 2)-2 では、さらに DE-52イオン交換クロマトグラフィーで精製した酵素を用いた。

2). Kyotorphin合成酵素の基質特異性

2)-1. ラジオイムノアッセイ(RIA) を用いての活性測定 (ATPの基質特異性)；Sephacryl S-300 ピークA画分を酵素原料とし、1mM Tyr, 1mM Arg, 10μM bestatin ,10μM PCMB, 4mM $MgCl_2$および 4mM各ヌクレオチドとともに 37°C, 1時間インキュベートし、煮沸にて反応停止後、RIA で生成 kyotorphin 量を測定した。

2)-2. [^{3}H]-ATPを用いての活性測定 (Tyr,Arg の基質特異性)：

DE-52,NaCl 0.05Mの画分を酵素原料とし、1mM 各アミノ酸，10μM bestatin，10μM PCMB，4mM ATP，4mM $MgCl_2$および 1μCi [^{3}H]-ATP(20pmol) とともに 37°C，1時間インキュベートし、冷 ethanolを加え反応停止後、PEI-cellulose の薄層クロマトグラフィーにより、生成 [^{3}H]-AMP 量を測定した。

3). Kyotorphin合成酵素の反応速度論的解析

Sephacryl S-300 ピークA画分を用い、各基質濃度を変化させたときの生成 kyotorphin 量を RIAにより測定した。

4). Arg 全身投与による脳内 kyotorphin 量の変化

実験には雄性 ddYマウス(約15g) を用いた。Arg(1g/kg)および vehicleをマウス皮下に投与し、24時間後、断頭し、脳幹および小脳をとり出し、2N酢酸で抽出、凍結乾燥後、RIA で kyotorphin 量を測定した。

5). 鎮痛検定

酢酸 writhing 法によりおこなった。Arg 投与後、各時間に 0.6% 酢酸(0.1ml/10g) をマウス腹腔内に注射し、5-15分 (10分間) の疼痛反応としての writhing 回数を測定した。なお、naloxone(0.01mg/kg,s.c.)は酢酸投与 5分前に投与した。

＜実験結果および考察＞

1. Kyotorphin synthetase は Tyr, Arg および ATPに対して非常に高い基質特異性を示した。すなわち、Tyr とArg の組み合わせで生成する [^{3}H]-AMP 量を100%とすると、その他のアミノ酸の組み合わせでは、Tyr とLeu で 31.4%を示したのが最高であった (Table.1)。また ATPを他のヌクレオチドに置換すると、ADP で 37.8%、AMP

Table.1 Substrate specificity of kyotorphin synthetase

substrates		enzyme activity (%)
Tyr	+ Arg	100
	+ Leu	31.4
	+ Glu	26.1
Tyr	+ Lys	14.3
	+ His	4.0
	+ Gly	1.1
	+ Trp	11.3
	+ Lys	10.3
Arg	+ Phe	10.0
	+ Leu	3.5
	+ Glu	0
Leu	+ Glu	0

Fig.1 Effects of tyrosine, arginine and ATP concentration on kyotorphin synthetase

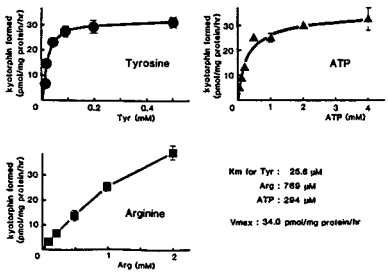


Fig.2 Changes in kyotorphin levels in mouse brain regions after pretreatment with arginine

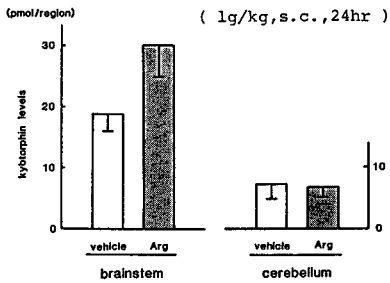
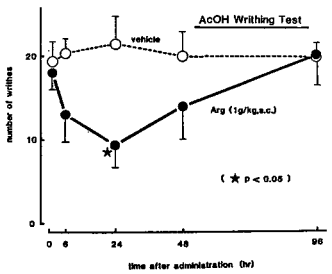


Fig.3 Changes in nociceptive responce in mouse after arginine administration (1g/kg,s.c.)



で 1.6% 、GTP で 20.2%まで酵素活性は減少した。

2. Kyotorphin synthetase の各基質に対するKm値は、Tyr; 25.6μM, Arg; 769μM, ATP; 294μMであった (Fig.1)。これらの値は他のペプチド合成酵素 (carnosine synthetase,[3] glutathione synthetase[1] etc.)と比較しうるものであった。しかしArg の脳内濃度はこのKm値に対して低く、Arg が kyotorphin synthetaseを介する脳内の kyotorphin 合成の調節に寄与している可能性が示唆された。

3. そこでマウスを用いて Arg全身投与による脳内 kyotorphin 量の変化を調べた。Arg(1g/kg,s.c.) 投与24時間後に、脳幹部で kyotorphin 量の約60%の増加が観察された。しかし、小脳では含量の変化が認められなかった(Fig.2) 。

4. Arg(1g/kg,s.c.) 投与24時間後に酢酸writhing法を用いて、鎮痛検定をおこなった。Arg 投与群では対照群に比べてwrithing回数の有意な減少が観察された(Fig. 3)。また、1日1回の繰り返し投与では、2日間の投与で鎮痛作用は最大となり、その作用は Argについて用量依存的であり、さらに naloxone(0.01mg/kg,s.c.) により、拮抗された。なお Tyr(1g/kg,s.c.)の投与では、このような鎮痛作用は観察されなかった。

以上のことより、kyotorphin synthetase が実際に、脳内で機能しており、脳内のArg 含量がkyotorphin合成を調節していると考えられる。また、Arg 負荷により増加したkyotorphin含量がオピオイド性の疼痛閾値上昇に関与していることから、内因性の疼痛制御物質としてのkyotorphinの重要性が確認された。

<文献>

1) Mooz,E.D. and Meister,A.(1967) Biochemistry 6, 1722-1734
2) Shiomi,H., Kuraishi,Y., Ueda,H., Harada,Y., Amano,H. and Takagi,H.(1981) Brain Res. 221, 161-169
3) Skaper,S.D., Das,S. and Marshall,F.D.(1973) J.Neurochem. 21, 1429-1445
4) Takagi,H., Shiomi,H., Ueda,H. and Amano,H.(1979) Nature 282, 410-412
5) Takagi,H.(1986) Jpn.J.Pharmac. 40, 5
6) Ueda,H., Shiomi,H. and Takagi,H.(1980) Brain Res. 198, 460-464
7) Ueda,H., Tatsumi,K., Shiomo,H. and Takagi,H.(1982) Brain Res.198,460-464
8) Ueda,H., Ge,M., Hazato,T., Katayama,T. and Takagi,H.(1985) Life Sci. 36, 1865-1871
9) Ueda,H., Yoshihara,Y., Nakamura,A., Shiomi,H., Satoh,M. and Takagi,H. (1985) Neuropeptides 5, 525-528
10) Ueda,H., Matsumoto,S., Yoshihara,Y., Fukushima,N. and Takagi,H.(1986) Life Sci. 38, 2405-2411
11) Ueda,H., Yoshihara,Y. and Takagi,H.(1986) Biochem.Biophys.Res.Commun. in press

53. 抗うつ薬の長期間経口投与とラット脳内エンドルフィン作動系

渋谷治男・渡辺明子・高橋　良
（東京医科歯科大・医・神経精神医学）

〔要　約〕

うつ病におけるエンドルフィン作動系の関与を検討する目的で、Wistar系雄性ラットにイミプラミン（ＩＭＩ，0.025%あるいは0.1%）クロミプラミン（ＣＬＯ，0.025%あるいは0.1%）ミアンセリン（ＭＩＡ，0.02% あるいは0.08%)をそれぞれ含む固型飼料を40日間投与した時の痛覚閾値と前頭葉皮質、大脳辺縁系領域、線条体のμおよびδタイプオピオイドレセプター、メチオニンエンケファリン免疫活性(ME-I)について測定した。痛覚閾値はＩＭＩ，ＣＬＯ，ＭＩＡ投与第11日には全群で上昇していたが、第39日には有意な上昇は消失していた。抗うつ薬40日投与後には、大脳辺縁系領域のオピオイドレセプターへの標識リガンド結合は抗うつ薬の大量投与群で減少しており、かつ ME-I も有意な減少あるいは減少傾向を示した。線条体においても、0.1%ＩＭＩ、0.02% ＭＩＡ投与群で標識リガンド結合およびME-Iが低下していた。

以上の所見は抗うつ薬の慢性投与によって特に大脳辺縁系領域および線条体においてエンドルフィン作動系のdown-regulation が生じることを示唆している。これはうつ病のエンドルフィン作動系の過剰活動説を間接的に支持する所見であると考える。

Key word :　antidepressants,　opioid receptor,
methionine-enkephalin immunoreactivity

内因性うつ病者では温熱や機械的、あるいは電気的痛覚刺激に対して、痛み閾値が高いことが報告されている。　また、三環系抗うつ薬はそれ自身鎮痛作用を有することもよく知られている。このような所見は脳内エンドルフィンおよびそれらの受容体の機能異常が内因性うつ病の成因に関与していることを示唆している。今回ラットを用いて三環系および四環系抗うつ薬を長期間投与して、エンドルフィン作動系への影響を検討したので報告する。

【実験方法】

実験動物としてWistar系雄性ラット、実験開始時体重160g～190gを用いた。動物を７群に分け、それぞれにイミプラミン（ＩＭＩ） 0.025 %, 0.1 % , クロミプラミン（ＣＬＯ）0.025%, 0.1%, ミアンセリン（ＭＩＡ）0.02%, 0.08%含有固型飼料を40日間投与した。対照動物には薬剤混入のないラット用固型飼料を与えた。

(1) 痛覚閾値の測定：抗うつ薬投与11日、18日、39日に hot plate法で痛覚閾値を測定した。55℃のアルミブロックの上にラットを置き、飛び跳ねるあるいは後肢を舐めるまでの時間を測定した。

(2) オピオイドレセプターの測定：抗うつ薬投与40日目にラットを断頭し、即ちに脳を摘出、－80℃に凍結保存した。脳の切り出しは氷上で行ない、前頭葉皮質（KönigとKlippel アトラスA10500μより前部で嗅索を含まない部分）、大脳辺縁系領域（中隔および側坐核を含む領域）および線条体を取り出した。脳湿重量の 100倍量の0.05 M Tris-HCl buffer (pH7.4, 4 ℃) を加えホモゲナイズした後40000g 15 分間遠心した。得た沈渣はさらに２回遠心洗浄操作をくり返し、最終的に10倍量のbufferに懸濁

して粗膜分画を得た。μタイプオピオイドレセプターの測定では ^{3}H-[D-Ala^{2}-Me Phe^{4}-Gly (ol)]-Enkephalin(DAGO)(0.65nM, s.a. 57.5 Ci/m mol) 粗膜分画（蛋白量 400-600μg)を0.024% bacitracin を含む0.05M Tris-HCl buffer(pH7.4,25℃）で総量1.2 mlとした。25℃で3時間反応させた後Whatman GF/Bガラスフィルターを用いて吸引濾過して結合型、遊離型リガンドの分離をおこなった。特異的結合は10^{-5} M levallorphan存在下、非存在下におけるリガンド結合量の差で示した。δタイプオピオイドレセプターの測定には ^{3}H-[D-Ala^{2}-D-Leu^{5}]-Enkephalin (DADLE)(1nM,s.a. 36.6 Ci/m mol）を用いた。なおこの時、標識リガンドのμタイプへの結合を阻止する目的で10nM DAGO を反応溶液に添加した。

(3) メチオニンエンケファリン免疫活性(ME-I)の測定：ラットを9KW,1.15～1.25秒マイクロウェーブ照射で屠殺した。A 10500 μで前頭断して上述の如く前頭葉皮質を得た。König とKlippel のアトラスA 8920μおよびA 7020μの前頭断で得られる脳切片から大脳辺縁系領域と線条体を切り出した。左半球側脳組織を1N酢酸に移し、95℃で20分間煮沸後超音波破砕し、20000g 20分間遠心して上清を得た。上清は pH 7.0～8.0 に調整の後、既報[3]に従ってME-Iを測定した。

【結果】

(1) ラットの餌および薬物摂取量、体重変化を表1に示した。

(2) 痛覚閾値の変化：抗うつ薬投与11日目にはＩＭＩ，ＣＬＯ，ＭＩＡの少量および大量に投与した全群で痛覚閾値の有意な上昇を認めた。しかし18日目ではＩＭＩ群でのみ痛みに耐性を示したが、他の抗うつ薬では閾値に変化がなかった。39日目には全群で痛覚閾値の上昇を認めることはなく、むしろＣＬＯ少量投与群で閾値の低下をみた。（図１）

(3) μタイプおよびδタイプオピオイドレセプターの変化：ラット全脳の粗膜分画を用いて^{3}H-DAGO 結合の Scatchard解析を行なうとKd 1.19nM, Bmax 297 fmol/mg prot ^{3}H-DADLE結合はKd 2.13, Bmax 211 であった。そこで0.65nM ^{3}H-DAGO,1nM ^{3}H-DADLE の一点濃度を用いてレセプター結合量を測定すると、前頭葉皮質 ^{3}H-DAGO 結合量はＩＭＩ0.025%群で有意に減少していたが他は変化がなかった。^{3}H-DADLE結合量も変化がなかった。大脳辺縁領域の^{3}H-DAGO,および^{3}H-DADLE結合量は共にＩＭＩ0.1%,ＣＬＯ0.1%,ＭＩＡ0.08% 投与ラットで有意に減少していた。線条体の^{3}H-DAGO 及び^{3}H-DADLE結合もＩＭＩ群で減少していた。ＭＩＡ 0.02%群でも有意な低下を認めた。

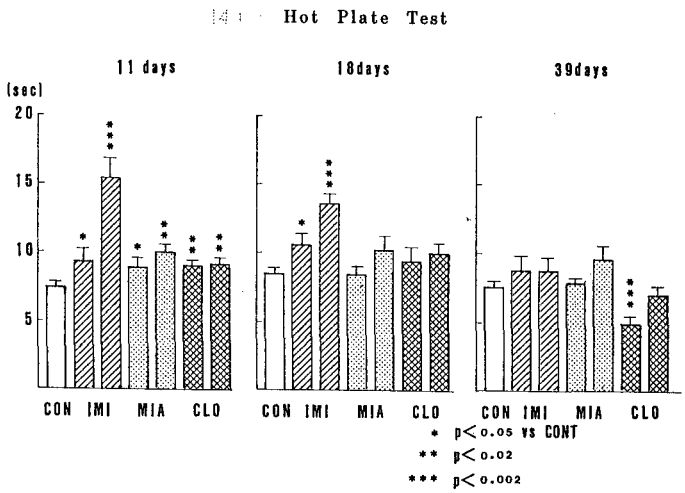
(4) ME-Iの変化：大脳辺縁領域ではＣＬＯ，ＭＩＡ群で有意に減少した。　線条体においてもＩＭＩ少量投与群以外はすべて有意に減少していた。（表２）

		Body Weight (g)		Food Intake		Drug Intake
	(n)	start	end	(g/day)	(g/kg/day)	(mg/kg/day)
Control	(19)	177 ± 6	363 ± 30	21.9	59.3	—
Imipramine						
0.025 %	(14)	178 ± 6	334 ± 24	19.3	59.3	14.8
0.1 %	(14)	179 ± 4	295 ± 20	17.9	61.9	61.9
Clomipramine						
0.025%	(14)	178 ± 7	355 ± 34	23.0	66.4	16.6
0.1 %	(14)	180 ± 7	313 ± 23	18.0	62.9	62.9
Mianserin						
0.02 %	(14)	176 ± 11	290 ± 15	20.8	73.3	14.7
0.08 %	(14)	172 ± 11	274 ± 23	19.7	73.1	58.5

表１：　抗うつ薬40日間投与時の体重変化、餌および薬物摂取量　mean ± S.D.

【考察】

40日間抗うつ薬を経口投与したラットの一部については、断頭時血液採取を行ない、血漿中抗うつ薬濃度の測定を行なった。IMI 0.025%, 0.1%でそれぞれ 9.2±0.5ng/ml(5),42.0±4.5(5), CLO 0.025%および0.1%でそれぞれ測定限界(5.0ng/ml)以下、12.9±0.6(5),MIA 0.02% 及び0.08% では3.10以下（測定限界2.5),7.3±0.9(10) であり、投与量のちがいで血漿中の抗うつ薬濃度は明らかに相違していた。今回のME-Iの所見は、慢性抗うつ薬投与が側坐核、線条体のME-Iを低下させるという車地ら[2]の報告と一致する。彼等は抗うつ薬腹腔内投与1時間後にも側坐後、線条体でME-Iの減少を認めている。痛感閾値の上昇が脳内エンドルフィン作動系の活動状態を反映していると考えると、急性、亜急性抗うつ薬効果として鎮痛とME-Iの減少を認め、大脳辺縁系領域、線条体のオピオイド神経終末部でエンケファリン放出が亢進していると推察される。



40日間の抗うつ薬慢性投与で痛み閾値は元に復し、CLOではむしろ痛みに耐性を示した。このときμおよびδレセプター結合量の減少とME-Iの低下があり、大脳辺縁系、線条体のエンドルフィン作動系の活動性が低下したことを示している。オピエートが多幸作用を持つこと、βエンドルフィンやオピエートアゴニストが短時間だがうつ症状を改善すること、naltrexoneの長期投与がうつ病様症状をひきおこすこと等から、うつ病のエンドルフィン作動系の機能低下を主張する人達が居るが、一方うつ病のエンドルフィン作動系亢進説もあり、今回の所見は後者を支持するものである。

	Frontal Cortex	Limbic Brain	Striatum
Control	1.81±0.15	8.86±0.66	31.2±1.3
Imipramine			
0.025%	1.91±0.14	7.48±0.39	30.2±1.7
0.1 %	1.68±0.07	7.00±0.35	26.5±1.7[a]
Clomipramine			
0.025%	1.73±0.05	6.96±0.51[a]	24.1±1.1[b]
0.1 %	1.56±0.09	5.64±0.26[c]	20.4±0.8[c]
Mianserin			
0.02 %	1.65±0.14	5.86±0.45[c]	24.2±1.2[b]
0.08 %	1.61±0.05	6.49±0.32[c]	25.7±1.6[b]

表2：抗うつ薬40日間投与時のメチオニン免疫活性
a:p<0.04 vs cont, b:p<0.01, c:p<0.002
mean±S.E. (pmol/mg prot)

〔文献〕

1.Davis,G.E,Buchsbaum,M.S,Bunney Jr.W.E,(1979) Am J Psychiatry 136, 148-1151
2.車地暁生、三ツ汐洋、市川宏伸、渋谷治男(1986)日本生物学的精神医学会抄録100
3.融道男、渋谷治男、西川徹、仙波純一、俣賀宣子、高嶋端夫(1981) 精神経誌 83, 430-447

54. 熱侵害刺激時，一次求心性線維末端から遊離されると思われる substance P の炎症反応への関与について

米原典史・渋谷　徹*・今井康夫・松浦英夫*・猪木令三
（大阪大・歯・薬理，麻酔学*）

〔要　約〕

第一次求心性線維の末梢端に存在するsubstance P（SP）の生理的役割を解明する一端として、ラット後肢同軸灌流法を用い、熱刺激時、足蹠皮下から遊離されるSP量の変動と熱炎症反応（浮腫）との関連を検討した。

1．侵害刺激に相当する温度（47±0.5 ℃）で著明なSP遊離の増加ならびに浮腫が観察された。

2．熱侵害刺激に伴うSP遊離増加および浮腫は、capsaicin 前処置（生後1週間以内のラットにcapsaicin 50 mg/kgを皮下注射し、2か月後に実験に使用）により著明に抑制された。

3．伏在神経および坐骨神経（後肢の第一次求心性線維）の機械的および化学的切断（2%lidocaine によるブロック）により熱侵害刺激に伴うSP遊離および浮腫は著明に抑制された。

4．SPを足蹠皮下に投与することにより、投与量に依存した浮腫が観察された。

これらの実験成績は、熱侵害刺激に伴いSPが一次求心性線維末端から遊離されること、遊離されたSPは炎症反応と密接に関連していることを示唆している。

Key word：immunoreactive substance P, noxious thermal stimulation, heat-induced oedema.

Hökfelt らの免疫組織化学的研究より(4)、血管拡張、血管透過性亢進等の薬理作用を有するペプタイド、substance P（SP)が一次求心性線維の中枢末端のみならず末梢末端にも存在し、このSP含有神経が皮膚の毛細血管周辺に分布することが見い出されて以来、本ペプチドは疼痛伝導の神経トランスミッターあるいはモジュレーターとしての生理作用以外に、末梢端において炎症反応に関与している可能性がLembeck(6), Brodin(1) らにより示唆されている。またEdvinsson(2)、Levine(7) らは、病理学的研究より本ペプタイドが種々の炎症性疾患に関与することを明らかにしている。これらの事実は、一次求心性線維の興奮に伴う末梢端からのSP遊離が炎症機構に重要な役割を果たしていることを示唆しているものの、その詳細な作用機序に関しては現在迄のところ不明である。本研究は、炎症反応への一次求心性線維の関与を明らかにするためラット後肢同軸灌流法を用い熱侵害刺激時惹起されるSP遊離と炎症反応（浮腫）との関連を検討した。

［実験方法］

1．ラット足蹠皮下灌流：約 150 gの雄性SD系ラットを用いurethane麻酔後、Rocha e Silva and Antonioの変法により、後肢足蹠皮下に二重同軸チューブを大腿外側より膝足根骨関節の靭帯下を通し挿入、細径チューブ（直径 1 mm）より、bestatin（3 mg/100 ml 生理食塩水）を含む生理食塩水を 1 ml/10 min流速にてpushし、太径チューブ（直径 4 mm）より滴下液を10分間隔で氷令下採集した。得られた試料は、凍結乾燥後 ^{125}I-SPを用いradioimmunoassayに使用した。

2．侵害刺激：侵害刺激として、灌流開始1時間以上経過後、一定温度に調節した温

湯中に灌流側足蹠を30分間浸漬した。炎症反応は、足蹠容積測定装置（Ugo Basile, Italy)を用い経時的に測定した。

3．capsaicin 処置：Jancsóらの方法(5)に従って、溶解されたcapsaicin 50 mg/kgを生後1週間以内のラットに皮下投与した。2か月後 hot plate法にて疼痛閾値が上昇していることを確認後実験に使用した。

4．後肢の第一次求心性線維の機械的および化学的切断：灌流側の伏在神経および坐骨神経を切断し、1週間後に実験に使用した。化学的切断として熱侵害刺激10分前に2%lidocaine にて両知覚神経をブロックした。

［実験結果］

1．SP抗体の特異性：使用したSP抗体に対するSP類似タキキニン、即ちneurokinin Aおよびneurokinin Bの交叉反応率は、いずれも 0.1%以下であった。

2．熱侵害刺激に伴う灌流液中へのSP遊離および炎症反応（浮腫）：灌流開始直後高いSPレベルが観察され、以後徐々に減少し30分後にはほぼ一定値を示した。熱侵害刺激（47±0.5 ℃）により著明なSP遊離増加が観察され（Fig.1)、この遊離増加は熱刺激の強さに依存するものであった（Fig.2)。加えて、SP遊離増加に対応する浮腫の変化が観察された（Fig.2)。

3．capsaicin 処置による影響：capsaicin処置により刺激前（A)、刺激中（B)、刺激後（C)のいずれのSPレベルも無処置群に比べ著明に減少した。熱刺激に伴う浮腫も著明な抑制が観察された（Fig.3)。

4．伏在神経および坐骨神経の機械的および化学的切断：後肢の知覚神経である伏在神経、坐骨神経の機械的切断および2%lidocaine にてブロックを行った場合、熱刺激に伴うSP遊離増加および炎症反応は著明に抑制された（Fig.4、Fig.5)。

5．SPおよびhistamine(His)の足蹠皮下投与による浮腫率の変化：SP、His いずれも足蹠皮下投与により用量に依存して浮腫の増加をひきおこした。SPの浮腫惹起作用はHisに比べ強いものであった（Fig.6)。

6．熱侵害刺激に伴うSP遊離に対するbradykinin(BK)、His の影響：stem bromelain（高分子キニノゲン枯渇薬）(10 mg/kg)およびemorfazone（BK遊離阻害薬）(50 mg/kg）の静脈内前処置により、熱刺激に伴うSP遊離は著明に抑制されたが、compound 48/80(5 mg/kg s.c.1回／1日、2日間投与、投与開始3日目に実験に使用）前処置では有意な影響は認められなかった。

［考察］

電気生理学的研究より、熱刺激に対する侵害受容線維の閾値は、ヒト皮膚で熱痛閾値とほぼ一致し、45℃前後であることが明らかにされている(3)。今回の実験で、47℃前後において著明なSP遊離増加および浮腫が観察されたことは、これらの現象が侵害受容線維を介する反応であることを示唆している。加えて、一次求心性線維の機械的、化学的切断（capsaicin 、局所麻酔薬前処置）により、熱侵害刺激に伴うSP遊離増加が著明に抑制されるばかりでなく、浮腫も有意に抑制されたことは、SP遊離の変動が炎症反応に関与していることを強く示唆している。Rocha e Silva and Antonioらは(8)、45～47℃前後の熱刺激では、肥満細胞が安定化され、5-HT、His は灌流液中に遊離されずBKのみが遊離されることを報告している。本研究において、His 抑制薬

ではなくBK抑制薬で、熱侵害刺激にともなうSP遊離増加が著明に抑制されたことは、熱侵害刺激に伴う侵害受容線維の興奮にBK系が関与しているものと思われる。以上の実験成績は、熱侵害刺激により生じた侵害受容器の興奮が、その線維末端よりSP分泌を惹き起こし、それにより遊離部位（刺激部位周辺の組織）で一種の防御機転である炎症反応が惹き起こされるものと考えられる。

[文献]

(1) Brodin, E. et al.(1981) Acta Physiol. Scand. 111, 501-503. (2) Edvinsson, L. et al.(1982) Brain Res. 232, 466-471. (3) Hardy, J. D. et al.(1951) Science. 114, 149. (4) Hökfelt, T. et al.(1975) Brain Res. 100, 235-252. (5) Jancsó, N. et al.(1967) Br. J. Pharmacol. Chemother. 31, 138-151. (6) Lembeck, F. et al.(1979) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 310, 175-183. (7) Levine, J. D. et al.(1984) Science. 226, 547-549. (8) Rocha e Silva, M. et al.(1960) Med. Exp. 3, 371-382.

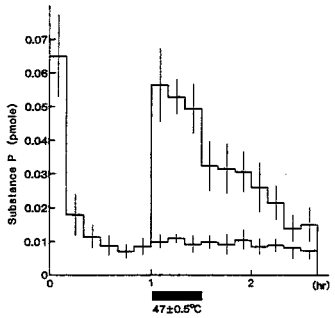


Fig.1 熱侵害刺激によるSP遊離の変動

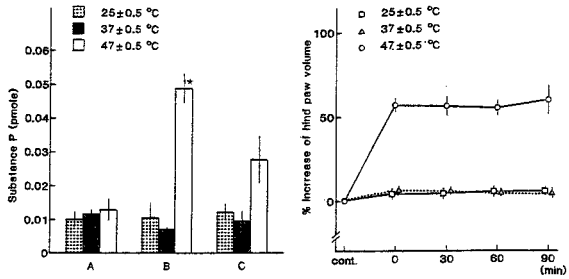


Fig.2 刺激温度のSP遊離、浮腫への影響
A：刺激前　B：刺激中　C：刺激後

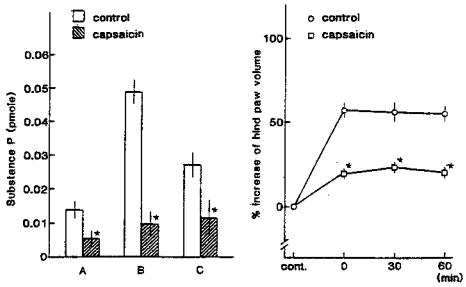
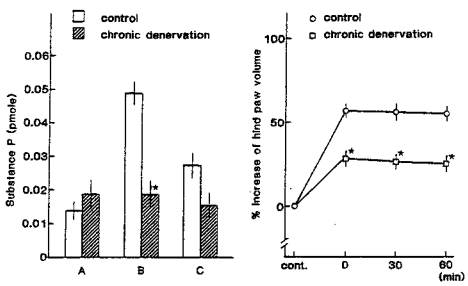
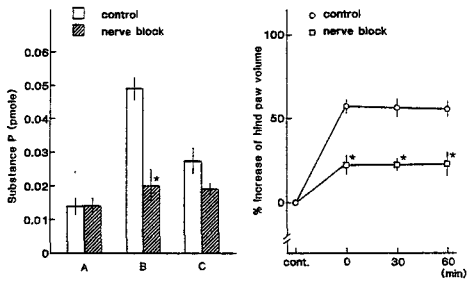


Fig.3 capsaicin処置のSP遊離、浮腫への影響



chronic denervation : cutting of sciatic nerve and saphenous nerve

Fig.4 神経切断のSP遊離、浮腫への影響



nerve block : block of sciatic nerve and saphenous nerve with 2% lidocaine

Fig.5 局所麻酔薬によるブロックのSP遊離、浮腫への影響

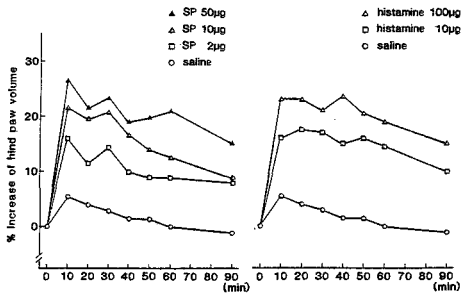


Fig.6 SPおよびhistamineの足蹠皮下投与による浮腫率の変化

55. ラット脳内ニューロテンシン様免疫活性に及ぼすドーパミン アゴニストの影響

和知 学・奥田正英・富樫俊二・不破野誠一・宮下 理
若穂囲徹 (新潟大・医・精神科・脳研・神経化学)

〔要 約〕

脳内ニューロテンシン(NT)に対する各種ドパミン(DA) agonist の影響をラットを用いて検討し次の結果を得た。1)メトアンフェタミン(MAP)10 mg/kg/day を5,10,20日間連続投与した所、尾状核－被殻(CP)では10日(40%), 20日(75%),辺縁系前脳部(LF)では5日(45%),10日(62%),20日(56%),中脳(MB)では5日(39%),10日(36%),20日(37%)でニューロテンシン様免疫活性(NTLI)の有意な増加がみられた。2)MAP 投与量とNTLIの間には用量依存性の増加がみられた。3)MAP 50mg/kg 1回投与後のNTLIの脳各部位での経時的変化をみると、CP及びLFでは12時間後に,MB では24時間後にNTLIの上昇のピークがみられ、48時間後には対照値とほぼ同様の値を示した。4)DA agoni--st であるapomorphine,methylphenidate,bromocriptine を10日間連続投与した結果,apomorphine投与ではLFのみで(34%),methylphenidate 投与ではCP(39%),LF(62%) でNTLIの有意な増加がみられた。

以上の結果から、NTは脳内DA系特に黒質-線状体系及び中脳-辺縁系のDA系と密接な関連を有することが示唆された。

Key word : Methamphetamine,Dopamine agonist,
Neurotensin-like immunoreactivity

ニューロテンシン(NT)は脳室内あるいは大槽内に投与された時、抗精神病薬と類似した生理及び薬理作用を示し(5) 側坐核，尾状核などのドパミン(DA)neuron終末部でのDA代謝産物を変化させることが知られている(6)。更にNTのラジオイムノアッセイ(RIA)や免疫組織化学の知見からNTがDAとの共存(2)やDA neuronと分布の類似性を示す(4)所見が得られておりNTは脳内DA系と密接な関連を有することが示唆されている。昨年私達は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 のラット脳内NT様免疫活性(NTLI)に対する影響について報告した(8)。本研究ではNTLIに対するDA agonist の影響を更に詳細に調べる目的で 1)MAP 1回投与後のNTLIの経時的変化 2)NTLIに対するMAP 投与用量依存性 3)MAP 投与日数によるNTLIの変化 4)他のDA agonist(apomorphine,methylphenida--te,bromocriptine)慢性投与によるNTLIの変化について検討したので報告する。

＜対象と方法＞

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。1)MAP 慢性投与;MAP10mg/kg/day を5,10,20 日間投与し、最終注射24時間後に断頭した。2)MAP 投与量による変化;MAP5,10,30,50mg/kg をそれぞれ1回腹腔内投与し、投与24時間後に断頭した。3)MAP投与による経時的変化;MAP50mg/kg を1回腹腔内投与し1,6,12,24,36,48 時間後に断頭した。4)MAP 以外のDA agonist の投与;apomorphine hydrochloride 5mg/kg,methylphenidate hydrochloride 50mg/kg,bromocriptine mesylate 10mg/kg を1日1回10日間腹腔内投与し、最終注射24時間後に断頭した。5)対照群には投与した薬剤を除いた溶媒を薬剤投与群と同様のスケジュールで投与し

断頭した。なおMAP,apomorphine methylphenidate,はすべて生理的食塩水に溶解し、bromocriptineは5%ethanolを含む0.1N酢酸に溶解した。断頭後既報(7)に従い前頭葉(Fc)，辺縁系前脳部(LF)，尾状核-被殻(CP)，視床下部(HT)，中脳(MB)を切りだしRIAをおこなった(1)。

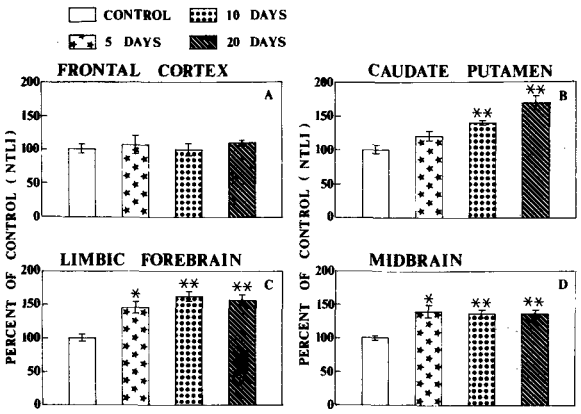


Fig.1. Effect of chronic administration of MAP on NTLI concentration in discrete areas of rat brain. Values show Mean±S.E.M. Significant differences between treated and control groups are denoted as follows:＊P<.01,＊＊P<.001. Control values of NTLI for each tissue examined were:Fc=3.17±0.22;CP=4.07±0.26; LF=14.6±0.74;MB=34.8±1.16(pg/mg wet weight)

＜結果と考察＞

1)MAP10mg/kgを5,10,20日間慢性投与した場合のNTLIはCPでは5日で20%の増加を示したが有意差はなく、10日で40%,20日で75%の有意な増加を示した。LFでは5日で45%,10日で62%,20日で56%のいずれも有意な増加を示した。MBでもLFと同様5,10,20日間の投与でそれぞれ39%,36%,37%の有意な増加を示した。一方Fc,HTではいずれの投与日数でも変化はみられなかった(図1)。2)MAPを5,10,30,50mg/kgと用量を変化させて投与した時、LFにおいて5,10mg/kgの投与でNTLIは増加傾向を示し、30,50mg/kgでは有意な増加を示し、MAP投与量とNTLIの変化には用量依存性がみられた(図3)。同様な結果はCP,MBでも得られたがFc,HTではNTLIに変化がみられなかった。DAのindirect agonistであるMAPによりDA neuronの起始核であるA10,黒質を含むMB，及び終末部である尾状核を含むCPや側坐核，嗅結節を含むLFでNTLIの増加がみられたことはA)、MAPが黒質-線状体系及び中脳--辺縁系のDA neuronに働き、それにより間接的

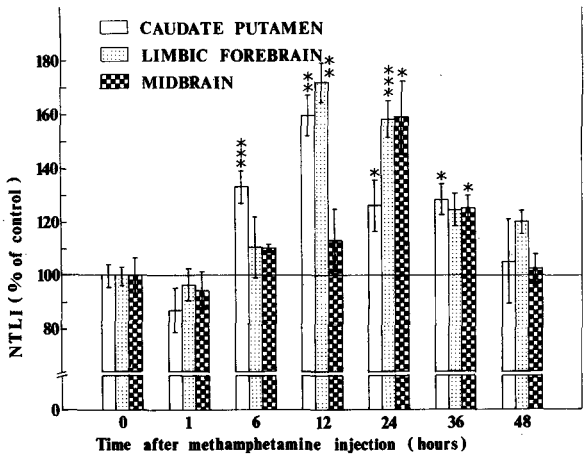


Fig.2. Time-related changes in NTLI in discrete areas of rat brain after MAP administration. Rats were injected with MAP (50 mg/kg,i.p.) or 0.9% saline.＊P<.05,＊＊P<.01(as compared with control).

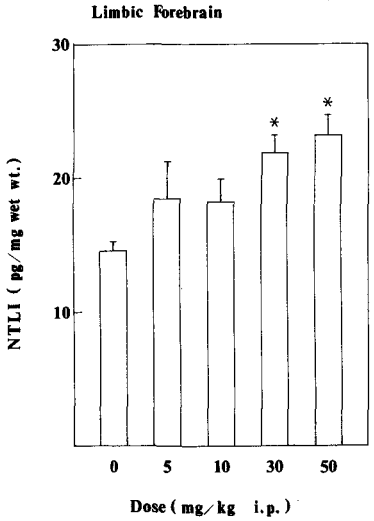


Fig.3. Dose-effect relationship of the MAP-induced elevation in NTLI concentration in LF. Values show Mean±S.E.M. Asterisks indicate value differs significantly from control(P<.05)

にこの部位のNT含量が増加した可能性及び B)腹側被蓋野から側坐核へ投射するNT neuronの存在が知られている(3)ことからMAP が直接このneuronに影響を及ぼした可能性が考えられる。これらの部位でのNTLIの増加のmechanism についてはNTの合成，放出，代謝などの変化が想定されるが、現在の所不明である。3)MAP 投与後のNTLIの変化はCP,LF,MBいずれの部位でも時間経過とともに増加し、12-24 時間でpeakを示し48時間で対照群と同様の値を示した(図2)。MAP による行動異常(常同行動やlocomotoinの増加)はMAP 投与後比較的早い時間にみられることから、これらの行動異常とNTLIの変化を直接関係ずけるのは難しい。このようなMAP 投与後のNTLI変化の遅延がいかなる生物学的な意味を持っているかについては今後検討が必要である。4)MAP 以外のDA agonist のNTLIに及ぼす影響を表1に示す。DA direct agonist ではapomorphine 5mg/kg投与でLFにて34% の有意な増加がみられたが apomorphine のFc,CP,MB及びbromocriptine のFc,CP,LF,MB いずれの部位でも対照との間に差はなかった。一方、MAP と同じDA indirect agonist であるmethylphenidate ではCP,LF でMAP とほぼ同等のNTLIの増加をみとめた。今後これら3種のDA agonist について、投与量によるNTLIの変化及び投与後のNTLIの経時的変化について詳細に検討し、DA direct及びindirect agonist の黒質-線状体系及び中脳-辺縁系のDA neuronに対するNTLIの変化に及ぼす影響の差異について研究を進めていく予定である。

Treatment	Dose	NTLI	
		Caudate Putamen	Limbic Forebrain
	mg/kg i.p.	pg/mg wet weight	
Control		3.35±0.25	14.5±1.07
Methamphetamine	10	4.69±0.10***	23.5±0.84***
Apomorphine	5	3.41±0.37	19.5±1.58*
Methylphenidate	50	4.64±0.25**	23.5±1.12***
Bromocriptine	10	3.00±0.29	14.6±1.23

Table 1. Neurotensin-like immunoreactivity(NTLI) in caudate putamen and limbic forebrain of rats injected daily for 10 days with dopamine agonists. Values are shown as Mean±S.E.M. * P<.05,** P<.01,*** P<.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の佐武明教授に深謝する。

＜文献＞

1)Carraway,R.et al.(1976)J.biol.chem.251,7035-7044. 2)Ibata,Y.et al.(1983) Brain Res.269,177-179. 3)Kalivas,P.W.et al.(1984)Brain Res.4,57-60. 4)Kobayashi,R.M.et al.(1977)Brain Res.126,584-588. 5)Nemeroff,C.B.(1980) Biol.Psychiat.15,283-302. 6)Reches,A.et al.(1983)Peptides,4,43-48. 7)Wachi, M.et al(1985)Brain Res.333,393-396. 8)和知学他(1985)神経化学,24,457-459.

56. 脈絡叢におけるラット心房性 Na 利尿ポリペプチド結合部位について

堤　圭介・河野輝昭・森　和夫・茨木正明*・丹羽正美*
尾崎正若*　（長崎大・医・脳外，第二薬理*）

〔要　約〕

Rat脳の choroid plexus には、心房性Na利尿ポリペプチド[rat atrial natriuretic polypeptide(rANP)]の結合部位が高密度に存在することが報告されている。その生理作用の存在を伺い知る目的で 、rANP 投与に伴う choroid plexusのcyclic GMP量の変化をin vitroで測定するとともに、実験水頭症ratの choroid plexus における^{125}I -rANP結合量の変動を定量的 in vitro autoradiography を用いて検索した。

1 μM の rANPは choroid plexusの cyclic GMPを time-dependentに増加させ、投与後5－10分間でmaximumに達した。100pMから10μMまでのrANPならびに関連ペプチドは、37℃ 5分間のincubationで cyclic GMP を concentration- dependent に増加させたが、10μM の濃度でも concentration-response curve は plateauに達しなかった。　水頭症ratのchoroid plexusにおける ^{125}I -rANPの結合量は、対照群に比し有意に高値を示した。

以上の結果は、 choroid plexus におけるrANPの結合部位が、髄液産生の調節機構に対して何等かの生理作用を有するactiveなreceptorである可能性を示唆している。

Key word： Rat atrial natriuretic polypeptide binding sites, Choroid plexus, cyclic GMP.

〔はじめに〕

心房性Na利尿ポリペプチド [rat atrial natriuretic polypeptide(rANP)]は循環血液中に存在し、末梢では腎臓、副腎皮質、血管などを標的臓器とするが、中枢神経にも ^{125}I - rANPの結合部位の存在が報告されている[1)4)5)6)]。なかでも、髄液の主要な産生部位であるchoroid plexusに高密度の結合部位が証明されたことは、rANPが髄液産生の調節機構に対し何等かの関連を有することを伺わせる。

一方、rANPの作用機序のひとつとして、cyclic GMP を介する細胞内応答の mechanismが推察されている[2)]。 今回、我々は、rat choroid plexusにin vitroでrANPを作用させ、cyclic GMP量の変化を測定するとともに、水頭症ratの choroid plexusにおける ^{125}I -rANPの結合量の変動を定量的in vitro autoradiographyを用いて検索し、choroid plexusにおける生理作用の存在を伺い知ることを目的とした。

〔方法〕

1．cyclic GMPの測定

Rat（雄性 Wistar, 250-300g 体重）断頭後、ただちに摘出した側脳室の choroid plexusを、118.5mM NaCl, 4.74mM KCl, 1.18mM $MgSO_4$, 1.18mM KH_2PO_4,2.5mM $CaCl_2$, 24.9mM $NaHCO_3$, 10mM glucose, 0.2mM isobutylmethylxanthine(IBMX)および1mg/ml bovine serum albumin(BSA) 含有 Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4中で、95% O_2 5%CO_2投与下に 37℃ 5分間 preincubate した後、buffer中にrANPを加えincubationを開始した。　12% trichloro acetic acid 1mlを加えてincubationを終

了しpolytronにてhomogenize後、15000rpm,0℃,10分間遠沈した。上清に5mlの水飽和エーテルを加え5分間振盪後、3000rpm,5分間遠沈しエーテル層をアスピレーターで除去した。　この操作を3回繰り返した後 水層を減圧乾燥し、cyclic GMP RIA kit(Amersham International Limited)を用いて測定した。

2.水頭症の作製ならびに定量的in vitro autoradiography

生後1週目のWistar ratの大槽内にKaolin 25%懸濁液を0.05ml注入することにより水頭症を作製し、対照群として生食水0.05mlを注入したものを用いた。注入後3日目と3週目に断頭により脳を摘出し、ただちにドライアイスで−30℃に冷却したiso-pentane中で凍結し、−16℃で16μmの凍結切片を作製した。　この切片をgelatin coated slide glassに貼り付けた後、4℃で吸引下に一晩乾燥させた。　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, pH 7.4中で室温(23℃)15分間の pre-incubation後、(3-[^{125}I] iodotyrosyl^{28})rat atrial natriuretic polypeptide (28)(Amersham Int, 1850Ci/mmol)(^{125}I-rANP) 700pMを含有した上記buffer中で室温60分間 incubateした。non-specific bindingは1.0μM非放射性rANPと競合させることで得た。4℃、50mM Tris-HCl buffer, pH 7.4中で各 30秒間4回洗浄後、冷風下に乾燥させた。　^{3}H-Ultrofilmに室温下で感光させ結合部位のautoradiogramを得た後、computerized microdensitometerで黒化度を測定し、既知量の^{125}Iを含んだ標準脳ペーストの黒化度と比較することでdpm/μg proteinに変換した[3]。

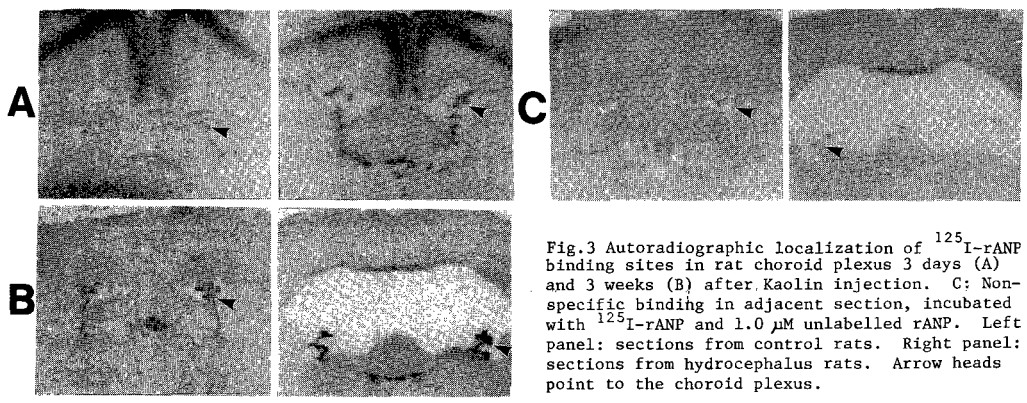


Fig.3 Autoradiographic localization of ^{125}I-rANP binding sites in rat choroid plexus 3 days (A) and 3 weeks (B) after Kaolin injection. C: Non-specific binding in adjacent section, incubated with ^{125}I-rANP and 1.0 μM unlabelled rANP. Left panel: sections from control rats. Right panel: sections from hydrocephalus rats. Arrow heads point to the choroid plexus.

TABLE 1. Changes in binding amount of ^{125}I-rANP in choroid plexus of experimental hydrocephalus rat

	Binding amount (fmol/mg protein)	
	Control	hydrocephalus
3 days after Kaolin injection	24.1 ± 1.1	46.3 ± 2.7*
3 weeks after Kaolin injection	27.3 ± 5.8	71.3 ± 6.2*

*$p < 0.001$ significantly differs from the control group.

［結果ならびに考察］

rANPならびにその関連ペプチドは choroid plexus の cyclic GMP を concentration - dependentに増加させたが、10μMの濃度でもconcentraton-response curveはplateauに達しなかった(Fig.1.)。 1μMのrANPは time - dependentにcyclic GMPを増加させ、投与後 5－10分間でmaximumに達した(Fig.2.)。

水頭症群のchoroid plexusにおける^{125}I -rANPの結合量は、Kaolin注入後3日目ならびに3週目の何れの時期においても対照群に比し有意に増加していた(Fig.3.,Table 1.) さらに、注入後3週目の水頭症群では、3日目の群よりも有意に高い結合量を示していた。

Rat心房性Na利尿ポリペプチド(rANP)の結合部位は中枢神経にも存在し、subfornical organ, area postrema, choroid plexus などに高密度の結合が認められている[1)4)5)6)]。これらの部位は脳室周囲器官群に含まれ、Blood-brain-barrierが欠如していること、直接髄液に接することなどの共通した特徴を持つ。したがって、循環血液中あるいは髄液中のrANPが直接に作用することのできる器官であると考えられる。

今回の研究で、rANPならびに関連ペプチドがchoroid plexusのcyclic GMPを著明に増加させたことより、rANPの結合部位はchoroid plexusの機能をmodulateする生理的にactiveなreceptorである可能性が強い。 さらに、水頭症ratの choroid plexusで^{125}I -rANPの結合量が対照群に比し有意に増加し、水頭症の時期による結合量の変動が認められたことは、rANPがchoroid plexusに存在するreceptorを介し髄液の産生あるいは吸収に関して何等かの調節機能を有する可能性を示唆している。

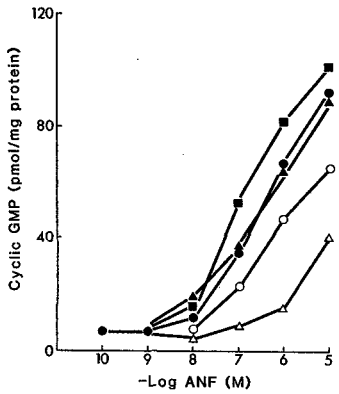


Fig.1 Concentration-response curves for atrial natriuretic peptides on cyclic GMP accumulation in rat choroid plexus. Choroid plexus were exposed to increasing concentration of rANP(●), ANF(8-33)(■), Atriopeptin I(△), Atriopeptin II(▲) and Atriopeptin III(○) for 5 min at 37°C in the presence of 0.2mM IBMX. Each point represents the mean of triplicate determinations.

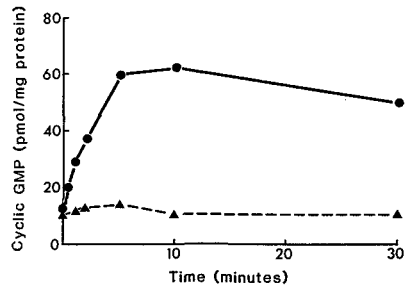


Fig.2 Effect of rANP on the time course of cyclic GNP accumulation in rat choroid plexus. Each point represents the mean of triplicate determinations. ▲, control: ●, 1μM rANP.

［文献］
1) David RL, Karen MB, et al. (1986) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83, 3357-3361
2) Hamet P, Tremblay J, Pang SC. et al. (1986) J Hypertension 4, S49-S56
3) Israel A, Correa FMA, Niwa M, Saavedra JM.(1984) Brain Res.332, 341-345
4) 尾崎正若、丹羽正美、姫野明彦、太田 尚、ほか (1985)神経化学 24, 463-465
5) Quirion R, Dalpe M, De Lean A. et al. (1984) Peptides 5, 1167-1172
6) Saavedra JM, Correa FMA, Plunkett LM. et al. (1986) Nature 320, 758-760

57. ラット脳，心臓，及び血液における心房性利尿ペプチドの存在様式について

塩野尚三・中尾一和・森井成人・斉藤能彦・菅原　照
山田敬行・伊藤　裕・向山政志・荒井宏司・坂本　誠
井村裕夫　（京都大・医・第二内科）

〔要　約〕

Atrial Natriuretic Polypeptide (ANP)は当初、心房抽出物中より単離同定されたpeptide であるが、近年、Radioimmunoassay (RIA)及び Immunohistochemistry により ANPが中枢神経系にも存在することが証明された。本報告ではラット全脳及び視床下部におけるANP の存在様式を高速ゲル濾過 (HP-GPC) 及び逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC) を用いて明らかにするとともに、ラット心臓、心灌流液及び末梢血液におけるANP の存在様式との比較検討を行なった。全脳抽出物のHP-GPCによる分析では、合成α-rANP の溶出部位に溶出されるメジャーピークと分子量約13,000のγ-rANP に該当するマイナーピークを認めた。小分子型ANP についてRP-HPLC を用いて検討した結果、α-rANP(4-28) 及びα-rANP(5-28) が主要成分であることが明らかになった。ラット心臓抽出物のRP-HPLC では主要成分は大分子型のγ-rANP であり、小分子型ANP の溶出部位には、γ-rANP に比べて極めて少量のANP しか検出されなかった。一方、ラット心灌流液抽出物のRP-HPLC では、γ-rANP の溶出部位にはANP は殆ど検出されず、α-rANP に一致するメジャーピークとその近傍の数本のマイナーピークが認められた。末梢血抽出物のRP-HPLC においても心灌流液抽出物のRP-HPLC の溶出パターンと極めてよく似た溶出パターンを認め、α-rANP が主要成分であった。以上の成績より、ANP は中枢神経系では心臓組織中の存在様式と異なり小分子型ANP が主要成分であること、中枢神経系の小分子型ANP の主要成分はα-rANP(4-28) およびα-rANP(5-28)であるのに対し、心臓から分泌される小分子型ANP の主要成分はα-rANP であることが明らかになった。

Key word : Atrial Natriuretic Polypeptide(ANP), Radioimmunoassay(RIA), Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography(RP-HPLC)

我々は既に、 Atrial Natriuretic Polypeptide (ANP) に特異的な Radioimmunoassay (RIA) を確立し (7,9)、ANP が心臓から分泌されるホルモンであること、高速ゲル濾過 (HP-GPC) による分析の結果、心臓では分子量約13,000のγ-rANP が主要成分であるのに対し、末梢血中のANP の主要成分はα-ANPと同一部位に溶出される小分子型ANP であることを明らかにした(9-11)。我々は更に、RIA あるいは Immunohistochemistry を用いて、ANP がラット脳内に広範に分布し、特に視床下部及び中隔に高濃度存在すること(5-7) 、HP-GPCによる分析の結果、脳内ANP の主要成分は分子量約 3,000の小分子型 ANPであることを明らかにした (7)。また、ANP の脳室内投与実験により、脳内ANP が飲水行動 (8)、食塩嗜好性 (1)及び中枢性血圧調節 (3)、ADH 分泌 (12) や corticosterone 分泌 (2)に関与することが明らかになった。一方、抗 ANP抗体の脳室内投与により、 AIIあるいは絶水による飲水行動が有意に亢進することも明らかになった (4)。これらの成績は、ANP が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可能性を示唆している。今回ラット脳におけるANP の存在様式について逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)を用いて詳細に検討するとともに、ラット心臓、心灌流液及び末梢血液におけるANP の存在様式との比較を行なった。【方法】対象：16週齢 Wistar 系ラットを断頭屠殺後、直ちに全脳、視床下部及び心臓を採取し、既に報告した方法に従ってANP を抽出した(7) 。血液サンプルはエーテル麻酔下に腹部大動脈より採血した後 EDTA (1mg/ml)及びアプロチニン (1000 Unit/ml) を添加し、3000rpm 10分間の遠沈にて血漿を得た。心灌流標本は摘出心臓の大動脈路より37℃、pH7.4 の Krebs Henseleit buffer を毎分6ml の速度で灌流して 1分毎に分画採取を行なった。血漿及び心灌流液のANP は既報の Sep-Pak C18 cartridge を用いる方法で抽出した(10,11) 。RP-HPLC: RP-HPLCはTSK-GEL ODS 120Tのカラムを用いて、アセトニトリルのグラジェント(5分 20.5%, 55分 23%, 85分 60%) をかけて溶出した。HP-GPC：HP-GPCはTSK-GEL G2000SW のカラムを用いて既に報告した方法にて行なった (7,9)。 RIA：RIA は既に報告した方法に従っておこなった (7,9)。【結果】全脳抽出物の HP-GPC のprofile を図１に示す。図より明らかなように、脳内のANP は２つの成分から

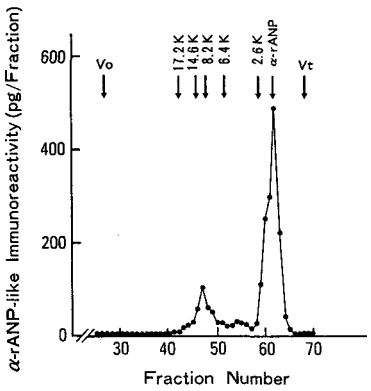


Fig. 1. A gel filtration profile of rat whole brain extract

RP-HPLC で分析したところ、これらの２本のピークはα-rANP(4-28) 及びα-rANP(5-28) と全く一致した。ラット心臓抽出物のRP-HPLC のprofile を図3-A に示す。心臓では主要成分は大分子型のγ-rANP であり小分子型のANP の溶出部位にもANP が検出されたが、γ-rANP に比べて極めて少量のANP しか検出されなかった。ラット心灌流液抽出物のRP-HPLC では、小分子型ANP が溶出される部位に１本の主要ピークと数本のマイナーピークが検出されたが、大分子型のγ-rANP はほとんど検出されなかった（図3-B)。末梢血抽出物のRP-HPLC による分析においても、心灌流液抽出物の場合と極めてよく似た結果が得られ、主要成分はα-rANP であった。

【結論及び考察】我々は既にHP-GPCを用いて、ラット脳内のANP の主要成分がα-rANP の溶出部位に溶出される小分子型ANP であることを報告した（7)。しかしHP-GPCではα-rANP 及び分子量 3,000付近のα-rANP 関連ペプチドを分離することは難しい。今回、我々は脳内ANP の存在様式をRP-HPLC を用いて更に詳細に検討した結果、小分子型ANP のなかではα-rANP(4-28) 及びα-rANP(5-28) が主要成分であることが明らかになった。α-rANP は典型的なprocessing signalとして知られている１組の paired basic amino acids, Arg-Argを含んでいる。この、paired basic amino acidsの所で processing を受ければα-rANP(4-28) 及びα-rANP(5-28) を生成するが、本成績は中枢神経系においてこのような proteolytic

構成されており、主要成分はα-rANP の溶出部位に一致して溶出された。全脳抽出物のRP-HPLC では図 2-Bに示すようにα-rANP の溶出部位の近傍に２本の主要ピークを認めた。同様のRP-HPLC のパターンは視床下部抽出物においても観察された（図2-A)。RP-HPLC でα-rANP の近傍に溶出されるこれらの２本のピークを同定するために全脳抽出物に合成α-rANP, α-rANP(4-28) 及びα-rANP(5-28) をそれぞれ加え

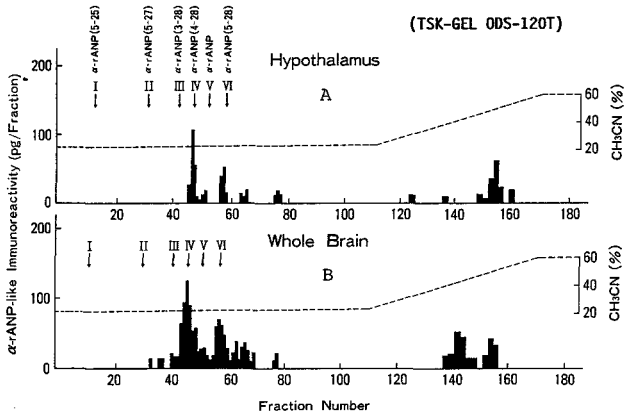


Fig. 2. Reverse phase-high performance liquid chromatographic profiles of immunoreactive ANP of rat whole brain and hypothalamus

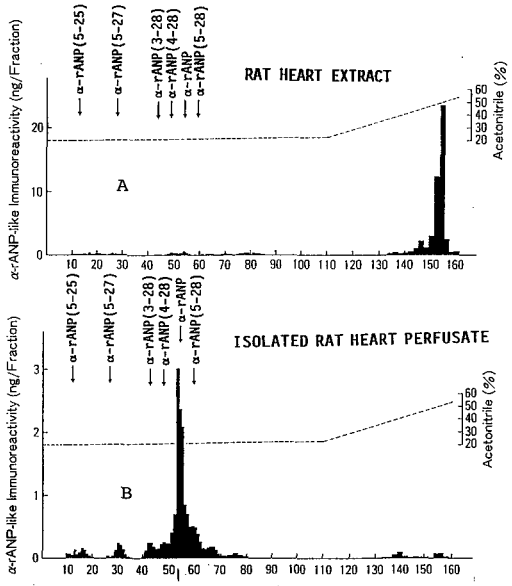


Fig. 3. Reverse phase-high performance liquid chromatographic profiles of rat heart extract and isolated rat heart perfusate.

processingの存在する可能性を示唆する。更に今回、心臓抽出物、心灌流液中及び末梢血中のANP の存在様式をRP-HPLC 用いて検討した結果、心臓抽出物における主要成分は大分子型ANP のγ-rANP であるのに対し心灌流液及び末梢血におけるの主要成分は小分子型のα-rANP であることが明らかになった。このことは心臓組織中では大分子型ANP として存在するが、心臓から分泌される時点で小分子型のα-rANP に変換されることを示唆する。また、脳内の小分子型ANP の主要成分はα-rANP(4-28) 及びα-rANP(5-28) であることから、neuropeptideとしてのANP とcirculating hormone としてのANP の molecular form が異なることが明らかになったが、これらの結果はANP の processing を考える上で興味深い所見であり、今後更に検討を要するものと思われる。

REFERENCES

1. Itoh, H., Nakao, K., Katsuura, G., Morii, N., Shiono, S., Sakamoto, M., Sugawara, A., Yamada, T., Saito, Y., Matsushita, A., and Imura, H. (1986) Circ. Res. in press.
2. Itoh, H., Nakao, K., Katsuura, G., Morii, N., Yamada, T., Shiono, S., Sakamoto, M., Sugawara, A., Saito, Y., Eigyo, M., Matsushita, A., and Imura, H. (1986) Neuroscie. Lett. in press.
3. Itoh, H., Nakao, K., Morii, N., Yamada, T., Shiono, S., Sakamoto, M., Sugawara, A., Saito, Y., Katsuura, G., Shiomi, T., Eigyo, M., Matsushita, A., and Imura, H. (1986) Brain Res. Bull. in press.
4. Katsuura, G., Nakamura, M., Inouye, K., Kono, M., Nakao, K., and Imura, H. (1986) European J. Pharmacol. 121, 285-287.
5. kawata, M., Nakao, K., Morii, N., Kiso, Y., Yamashita, H., Imura, H., and Sano, Y. (1985) Neuroscience 16, 521-546.
6. Kawata, M., Ueda, S., Nakao, K., Morii. N., kiso, Y., Imura, H., and Sano, Y. (1985) Histochemistry 83, 1-3.
7. Morii, N., Nakao, K., Sugawara, A., Suda, M., Shimokura, M., Kiso, Y., Kihara, M., Yamori, Y., and Imura, H. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 127, 413-419.
8. Nakamura, M., Katsuura, G., Nakao, K., and Imura, H. (1985) Neurosci. Lett. 58, 1-6.
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, 815-821.
10. Sugawara, A., Nakao, K., Morii, N., Sakamoto, M., Horii, K., Shimokura, M., Kiso, Y., Nishimura, K., Ban, T., Kihara, M., Yamori, Y., Kangawa, K., Matsuo, H., and Imura, H. (1986) Hypertension 8(Suppl 1), 151-155.
11. Sugawara, A., Nakao, K., Morii, N., Sakamoto, M., Suda, M., Shimokura, M., Kiso, Y., Kihara, M., Yamori, Y., Nishimura, K., Soneda, J., Ban, T. and Imura, H. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 439-446.
12. Yamada, T., Nakao, K., Morii, N., Itoh, H., Shiono, S., Sakamoto, M., Sugawara, A., Saito, Y., Ohno, H., Kanai, A., Katsuura, G., Eigyo, M., Matsushita, A., and Imura, H. (1986) European J. Pharmacol. 125, 453-456.

58. ラット大脳皮質の phosphatidylinositol 加水分解に及ぼす vasoactive intestinal polypeptide（VIP）の影響

垣花　満・寿野正広・加藤浩紀・成実重彦・永岡明伸
（武田薬品・中研・生研）

〔要　約〕

ラット大脳皮質スライスを用いてNE, carbachol および peptides（VIP, somatostatin, substance P, CCK－8, neurotensin 及び met－enkephalin）の phosphatidylinositol（PhI）加水分解に対する作用を調べた。PhI 加水分解は〔^{3}H〕inositol をスライスに取り込ませた後5mM LiCl 存在下に生成，蓄積してくる〔^{3}H〕inositol phosphates（〔^{3}H〕IPs）量から算出した。NE, carbachol および VIP は各々濃度依存的に〔^{3}H〕IPs 生成を促進した。他の peptides にはそのよう作用は認められなかった。NE の〔^{3}H〕IPs 生成促進作用は phentolamine により，また carbachol の作用は atropine によりほぼ完全に阻害された。VIP の場合はこれら阻害剤の影響を受けなかった。VIP の前処置により NE の〔^{3}H〕IPs 生成作用は著明に抑制され，carbachol と VIP の場合は相加的な〔^{3}H〕IPs 生成が認められた。一方，マウス大脳皮質と同様〔Magistretti and Schorderet, Nature 308, 280－282 (1984)〕ラット大脳皮質においても VIP と NE は各々単独で cAMP 生成を促進するが，併用することにより相乗的な cAMP 生成が認められた。以上，VIP はラット大脳皮質において cAMP 生成のみならず PhI 加水分解をも促進すること，また VIP と NE の receptor は同一細胞上で機能的に何らかの協調作用を行っていることが示唆された。

Key word： vasoactive intestinal polypeptide, norepinephrine, phosphatidylinositol hydrolysis

近年 neurotransmitter や hormone などが細胞膜に作用じて PhI 代謝回転を亢進させ，その結果生ずる IP_3 や DG がこれらの second messenger として作用していることが明らかにされている[1,2]。一方，免疫組織化学の発達により脳内に種々の peptide 含有 neurons が存在し，一部は古典的 neurotransmitter と共存（例えば ACh と VIP）していることが報告され，これらは pre－および post－synaptic sites において相互に協調して機能していると考えられている[3,4]。Magistretti と Schorderet[5]は異なる neuron に含有されている NE と VIP を用いて，これらは単独で大脳皮質スライスの cAMP 量を増加させるが，併用することにより相乗的な cAMP 生成が認められることを報告し，脳内の同一部位に終末している異なる neuron に含有されている neurotransmitter と peptide 間の相互作用にも注目すべきことを指摘している。本研究ではラット大脳皮質スライスを用いて，NE および carbachol の PhI 加水分解に対する種々 peptides，特に VIP の作用について検討した。

〔実験方法〕

動物は8－10週齢の雄性 Jcl：Wistar rats を用いた。PhI 加水分解の測定は Berridge ら[6]の方法を改良した Brown ら[7]の方法を用いて行った。McIlwain tissue chopper を用いて大脳皮質スライス（350×350 μm）を作製した。Modified Krebs－Henseleite buffer（NaCl, 118；KCl, 4.7；$CaCl_2$, 1.3；KH_2PO_4, 1.2；$MgSO_4$, 1.2；$NaHCO_3$, 25；glucose, 11.7 mM）中

Abbreviations used：ACh, acetylcholine；NE, norepinephrine；VIP, vasoactive intestinal polypeptide；cAMP, adenosine－3′, 5′－cyclic monophosphate；CCK, cholecystokinin；PhI, phosphatidylinositol；IPs, inositol phosphates；IP_3, inositol trisphosphate；DG；diacylglycerol

37℃，60分 incubate した。Buffer は使用前に 95％O_2／5％CO_2 で pH 7.4 とし，incubation 中 2 回 buffer 交換を行った。静かに沈殿させたスライス 50 μℓ ずつを約 0.3 μM〔^{3}H〕myo-inositol と 5 mM LiCl を含む buffer 240 μℓ を添加したガラスバイアル（容量 5 mℓ）に移し，37℃，30 分 incubate した。Agonist 10 μℓ を添加し，さらに 45分 incubate した。Antagonist あるいは peptide を前処置する場合には agonist 添加 10 分前に行った。Chloroform／methanol 混液（1：2，v／v）940 μℓ を添加して反応を止め，chloroform および水を各々 310 μℓ 添加後遠心し，上層 750 μℓ を採取した。水を加えて 3 mℓ とし，陰イオン交換樹脂 AG1−X8 formate form（Bio−Rad, 100−200 mesh）の 50％スラリー 0.5 mℓ を加えた。5 mM myoinositol 溶液 3 mℓ で樹脂を 4 回洗浄後 1 M ammonium formate／0.1 M formic acid 0.5 mℓ を加えた。攪拌後その 0.4 mℓ を採取し，生成した〔^{3}H〕IPs の放射活性を測定した。なお，〔^{3}H〕myoinositol（NEN, 15.6 Ci／mmol）は使用前に AG1−X8 を用いて少なくとも 3 回洗浄した。

cAMP 量の測定は以下のように行った。大脳皮質スライスを Krebs−Ringer bicarbonate buffer（pH 7.4）中 37℃，30分 incubate した。この間 1 回 buffer 交換を行った。スライス懸濁液を 950 μℓ ずつガラスバイアルに分注し 37℃，5 分 incubate した後 NE および（あるいは）VIP 溶液 50 μℓ を加えて 37℃，1 分 incubate した。100℃，5 分加熱して反応を止め，水 1 mℓ を加えた。ホモジナイズし，一部をタンパク量の測定（Lowry法）に用いた。遠心後，上清中の cAMP 量を YAMASA cAMP Assay Kit を用いて測定した。

〔結果および考察〕

NE 10^{-4}M 添加後の〔^{3}H〕IPs 生成の経時変化を Fig. 1 に示した。15 分から 60 分後まで，直線的に〔^{3}H〕IPs 量は増加した。以後の実験では incubation 時間を 45分とした。Fig. 2 に NE および carbachol の種々濃度添加時の〔^{3}H〕IPs 生成量を示した。NE の場合には 10^{-6}−5×10^{-5}M，carbachol の場合には 10^{-5}−10^{-2}M において濃度に依存した〔^{3}H〕IPs の生成が認められた。NE および carbachol の作用は各々 phentolamine および atropine によりほぼ完全に阻害された（Fig. 3 および 4）。一方，VIP の場合は 5×10^{-6}M 以上の濃度で〔^{3}H〕IPs 生成促進作用が認められた（Fig. 5）が phentolamine あるいは atropine の影響を受けなかった（Fig. 3 および 4）。スライスを VIP で前処置することにより NE による〔^{3}H〕IPs の生成は著明に抑制されたが，carbachol の作用は抑制されなかった（Fig. 3 および 4）。この現象をより明確にする目的で，NE および carbachol の濃度を一定（10^{-4}M）にし，VIP の濃度を変化させて〔^{3}H〕IPs 生成量を測定した（Fig. 5）。VIP と NE を共存させた場合には，NE による〔^{3}H〕IPs の生成は VIP 5×10^{-7}M 以上で濃度依存的に抑制された。一方，VIP と carbachol の場合には相加的な〔^{3}H〕IPs の生成が認められた。Somatostatin（10^{-7}−10^{-5}M），substance P（10^{-7}−10^{-5}M），

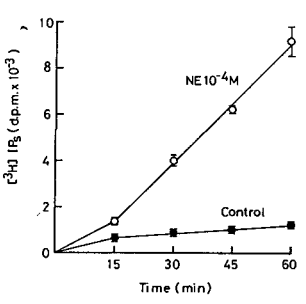


Fig. 1 Time course of [^{3}H]inositol phosphates ([^{3}H]IPs) formation after stimulating cerebral cortical slices with norepinephrine (NE). Each point is the mean±S.E.M. of 2-3 separate incubations.

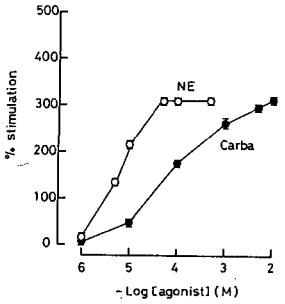


Fig. 2 Concentration-effect curves for NE- and carbachol (Carba)-induced stimulations of [^{3}H]IPs formation in cerebal cortical slices. Each point is the mean±S.E.M. of 2-3 separate incubations.

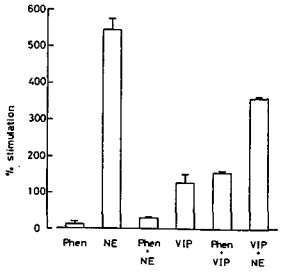


Fig. 3 Effect of phentolamine (Phen) on NE- and vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-induced stimulations of [^{3}H]IPs formation in cerebral cortical slices. Concentration of phentolamine, NE and VIP was 10^{-6}, 10^{-4} and 5×10^{-5}M, respectively. Each bar represents the mean±S.E.M. of 3 separate incubations.

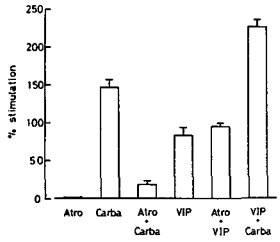


Fig. 4 Effect of atropine(Atro) on carbachol- and VIP-induced stimulations of [^{3}H]IPs formation in cerebral cortical slices. Concentration of atropine, carbachol and VIP was 10^{-6}, 10^{-4} and 5×10^{-5}M, respectively. Each bar represents the mean±S.E.M. of 3 separate incubations.

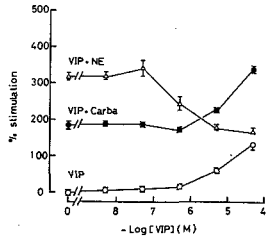


Fig. 5 Effect of VIP on NE- and carbachol-induced stimulations of [^{3}H]IPs formation in cerebral cortical slices. Concentration of NE and carbachol was 10^{-4}M. Each point is the mean±S.E.M. of 3 separate incubations.

CCK−8（$10^{-6}-10^{-4}$M）および neurotensin（$10^{-6}-10^{-4}$M）には〔^{3}H〕IPs 生成促進作用は認められず，またこれらの前処置によって NE（10^{-4}M）および carbachol（10^{-4}M）の〔^{3}H〕IPs 生成促進作用が影響を受けることはなかった。Met−enkephalin は $10^{-6}-10^{-4}$M の濃度で〔^{3}H〕IPs 生成促進作用は認められず，また carbachol の作用にも影響を与えなかった。NE の場合には met−enkephalin 10^{-4}M において軽度の抑制が認められた。

NE（$10^{-6}-10^{-4}$M）および VIP（$10^{-7}-10^{-5}$M）は濃度依存的に cAMP 量を増加させた。また NE と VIP を併用することにより相乗的な cAMP の生成が認められた（Fig. 6）。

以上，マウス大脳皮質と同様[5]にラット大脳皮質においても，VIP と NE は単独で cAMP 生成を促進するが，併用することにより相乗的な cAMP 生成が認められた。また，ラット大脳皮質において，VIP は単独で PhI 加水分解を促進すること，さらに NE の PhI 加水分解作用を抑制することがわかった。これらの結果は，VIP と NE の receptor は大脳皮質の同一細胞上で機能的に何らかの協調作用を行っていることを示唆している。VIP の cAMP 生成促進作用から VIP receptor は脳血管[8]，グリア細胞[9]および神経細胞[9]に存在しており，また labeled VIP の結合実験から，大脳皮質には親和性の異なる receptor の存在が報告[10]されている。VIP と NE による相乗的な cAMP の生成および VIP による NE の PhI 加水分解の抑制が，どの細胞で，またどのような機序で起こるのか，今後に残された問題である。

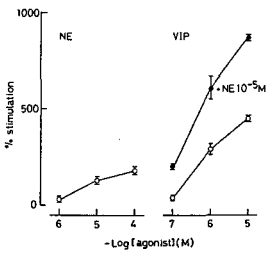


Fig. 6 Synergism between VIP and NE in the stimulation of cAMP formation in cerebral cortical slices. Each point is the mean±S.E.M. of 3-4 separate incubations. Basal cAMP level±S.E.M. was 13.9±0.5 pmol/mg protein.

〔文　献〕

1) Nishizuka, Y. (1984) Science 225, 1365−1370. 2) Berridge, M. J. (1984) Biochem. J. 220, 345−360. 3) Hökfelt, T. et al. (1980) Nature 284, 515−521. 4) Lundberg, J. M. and Hökfelt, T. (1983) Trends Neurosci. 6, 325−333. 5) Magistretti, P. J. and Schorderet, M. (1984) Nature 308, 280−282. 6) Berridge, M. J. et al. (1982) Biochem. J. 206, 587−595. 7) Brown, E. et al. (1984) J. Neurochem. 42, 1379−1387. 8) Huang, M. and Rorstad, O. P. (1983) J. Neurochem. 253, 719−726. 9) Schneiweiss, H. et al. (1985) J. Neurochem. 44, 779−786. 10) Staun−Olsen, P. et al. (1982) J. Neurochem. 39, 1242−1251.

59. セルレインの単回末梢性投与による脳内部位別モノアミン関連物質の経時的変化

黒木俊秀・松本　孝・平野　誠・鹿子島裕士・八尾博史
内村英幸・中村　薫*・中原辰雄**・白石昭雄***
（国立肥前療養所，九州大・医・神経精神医学*，理・化学**，理・生物***）

〔要　約〕

CCK及びcaerulеinの種々の行動薬理学的作用には、中枢のDAニューロンのみならず、他のニューロン系も関与している可能性がある。caerulеinの単回腹腔内投与によるラット脳内部位別の各モノアミン関連物質の変化をHPLC-ECD法を用いて同時測定するとともに、caerulein単回投与後の経日変化を検討した。投与２時間後において5-HIAAレベルが前頭前野外側部、側坐核、嗅結節及び尾状核ー被殻で有意に増加、5-HTレベルも尾状核ー被殻で有意に増加したことから、caerulеinの末梢性投与によっても中枢の5-HTニューロン系の活動が亢進していることが明らかとなった。さらに側坐核、嗅結節及び尾状核ー被殻の３部位において、各モノアミン関連物質の経日変化をみると、5-HIAAレベルが投与１日後においても側坐核と嗅結節で有意に高く、5-HIAA、5-HTレベルの投与２時間後の増加が投与１日後も持続しており、経日に従ってコントロール群のレベルに回復する傾向が認められた。他のモノアミン関連物質ではこのような変化は認められなかった。このようにcaerulеinは単回投与により脳内の特定部位の5-HTニューロンにも持続性の効果を及ぼしていることが示唆された。

Key word：　caerulein, serotonin, long-lasting effect

コレシストキニン（CCK)は、中枢神経系においてDAニューロンと共存して認められ、DAニューロン系の活動を調節していると考えられている。先に我々（６）は、CCKの類似ペプチドであるcaerulеinを急性及び慢性に投与したラットの脳内諸部位におけるDA代謝産物（HVA、DOPAC)のレベルの変化を検討し、急性投与群で尾状核ー被殻において両者とも有意に減少していたことを報告し、caerulеinの運動系への関与を示唆した。しかしながらCCK及びcaerulеinは運動系以外にも種々の行動薬理学的作用を有しており（７）、その機序にDA以外の他のニューロン系も関与している可能性が考えられる。今回、caerulеinの単回投与によ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、さらにcaerulein単回投与後の経日変化も検討した。

[方法]Wistar系雄性ラット（体重290-330g）を用いた。caerulein 400μg/kgを腹腔内に投与し、２時間後に断頭した。経日変化を検討した群では、投与後１日、３日、７日目に断頭した。対照として同様な方法でsalineを投与したラットを用いた。断頭はすべて午後１時から２時の間に行った。断頭後速やかに脳を摘出し、-80 ℃で凍結後、クリオスタット（-12℃）で300μmの連続切片を作製した。各切片は、-20℃のプレート上で前頭前野極部(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)、側坐核(AC)、嗅結節(TO)、中隔(SP)、扁桃核(AM)、尾状核ー被殻(CP)の９部位を切り出した。各モノアミン及び代謝産物は、既報（３）に準じたHPLC-ECD法によって同時に測定した。切り出した各部位を400μM NaHSO3、50μM ascorbate を含む0.1M蟻酸 200μlを加えてホモジナイズ後、遠心（17,700×ｇ、10分、５℃）し、上澄をHPLC-ECDに注入し、NE、MHPG、DA、DOPAC、HVA、3-MT、5-HT、5-HIAAを同時測定

Table 1. Effects of single administration of caerulein on 5-HIAA and 5-HT levels in discrete regions of rat brain (ng/mg protein)

	5-HIAA		5-HT	
	saline	caerulein	saline	caerulein
FCP	2.55± 0.129	2.67± 0.097	7.95± 0.292	7.09± 0.321
FCM	3.31± 0.218	3.58± 0.245	7.49± 0.302	7.75± 0.406
FCL	2.00± 0.074	2.30± 0.074*	6.64± 0.271	6.67± 0.265
ACC	2.06± 0.073	2.27± 0.110	3.64± 0.149	3.66± 0.197
AC	4.48± 0.197	5.12± 0.211*	7.67± 0.324	8.61± 0.440
TO	4.13± 0.165	4.62± 0.159*	12.69± 0.633	13.65± 0.505
SP	3.62± 0.148	3.89± 0.144	8.35± 0.361	8.99± 0.368
AM	3.79± 0.090	3.92± 0.117	10.82± 0.295	10.81± 0.861
CP	3.32± 0.164	3.95± 0.151*	3.44± 0.158	4.22± 0.167**

* p<0.05, ** p<0.01 when compared with control by Scheffe's test

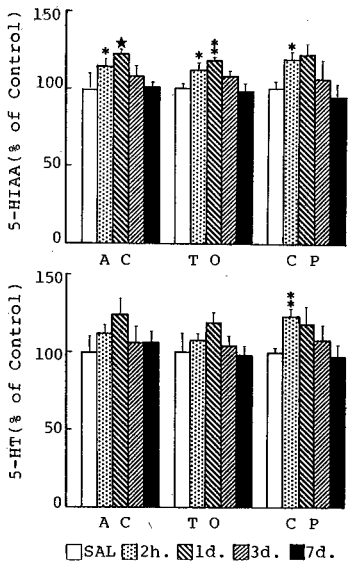


Fig.1 Time-course change of 5-HIAA and 5-HT levels after single injection of caerulein
* p>0.05, ** p>0.01 when compared with control, ★p>0.01 when compared with group of 7 days by Student's t test

した。

[結果]caerulein腹腔内投与2時間後の脳内諸部位における5-HIAA及び5-HTレベルをTable 1に示した。5-HIAAはFCL(+15%)、AC(+14%)、TO(+12%)及びCP(+15%)で有意に増加、5-HTはCP(+18%)のみで有意に増加していた。HVAはCP(+13%)のみで有意に減少していた。NEは測定可能であった部位のうちFCP(-11%)、SP(-12%)で有意に減少していた。DA、MHPG及び3-MTは特に変化なかった。caerulein腹腔内投与後2時間、1日、3日、7日目のAC、TO、CPの3部位における5-HIAAと5-HTレベルの経日変化をFig. 1に示した。5-HIAA、5-HTともに2時間及び1日後が最も高く、経日に従いコントロール群のレベルに戻ってゆく傾向が認められた。1日後の5-HIAAレベルが、TOでコントロール群に比して、ACで7日後に比して有意に高かった。他のモノアミン及び代謝産物ではこのような変化は認められなかった。

[考察]今回、caerulein の単回腹腔内投与により脳内のいくつかの部位で5-HIAA、5-HTレベルの増加が認められ、caerulein がDA以外の他のニューロン系へも作用していることが示された。これまでCCKのDA以外の神経伝達物質に対する影響を調べた研究は少ない。Feketeら（２）は、CCK sulfate formをラットの脳室内に投与し、NEの代謝回転が視床下部、扁桃核で増加、線状体では減少し、5-HTの代謝回転は視床下部のみで減少したことを報告している。またWiderlovら（８）は、CCK-8をラットの腹側被蓋野に注入し、嗅結節、側坐核及び線条体において5-HIAAレベルが有意に減少したことを報告し、CCKと5-HTニューロン系の相互作用を示唆している。5-HTの前駆体であるL-tryptophanは脳内のCCKレベルを急性に低下させるという報告（４）もあり、Morley(７)は5-HTの食欲低下作用にはCCKの放出が関与している可能性を述べている。今回の結果はcaerulein の末梢性投与によっても脳内の特定部位の5-HTニューロン系の活動が亢進することを明らかにした。さらに今回、caerulein投与２時間後にAC、TO、CPの３部位で観察された5-HIAAレベルの増加は、１日後も持続し、以後経日に従いコントロール群のレベルに戻ってゆく傾向が認められた。5-HTは投与２時間後の増加はCPのみで有意であったが、経日変化は３部位とも5-HIAAと同様の傾向を示していた。一方HVAは投与２時間後CPで有意に減少していたが、１日後はコントロール群のレベルと差はなく、5-HIAAのような経日変化は認められなかった。他のモノアミン及び代謝産物も同様であった。このようにcaerulein の末梢投与による5-HTニューロンの変化が投与１日後も持続し、経日に従い回復してゆくことは興味深い知見と思われる。Dumbrille-Rossら（１）は、CCK或はcaerulein 50μg/kgの単回腹腔内投与３時間後に側坐核と線条体でD2受容体の濃度の増加（+20%、+15%）を認めたが、この増加は14日後まで持続したと報告している。Matsubaraら（５）は、アンフェタミンで誘発されたラットの移所行動亢進を抑制するharoperidolの効果が、caerulein の併用により15日後まで持続することを見出した。これらはDAニューロンに対するcaerulein の持続性の効果について報告したものであるが、今回の結果からcaerulein が5-HTニューロンに対しても何らかの持続性の作用を及ぼしていることが示唆される。caerulein はACTHやβ-endorphinなどの内在性ホルモンの変化を生じ、また5-HTはCCKの放出を介してACTHや成長ホルモンの放出をもたらす可能性がある（７）ことから、今回観察された持続性の作用はホルモン系を介している可能性も考えられる。caerulein は精神分裂病や遅発性ジスキネジーの治療薬としても臨床応用が試みられているが、臨床効果においても持続性が認められるという。caerulein の持続性の効果に関しては今後更に研究を深める必要があろうと思われる。

（謝辞：caerulein の提供は塩野義製薬の御好意によった。）

[文献](1)Dumbrille-Ross,A.,et al.(1984)Peptides 5,1207-1212. (2)Fekete,M., et al.(1981)J.Neural Transmission 50,81-88.(3)石橋賢治,他(1985)神経化学 24, 559-561. (4)Lamers,C.B.,et al.(1980)Am.J.Physiol.239,E232-E235.(5)Matsubara, T., et al.(1984)Eur.J.Pharmacol.101,157-158.(6)Matsumoto,T.,et al.(1984) Brain Res.324,195-199.(7)Morley,J.E.(1982)Life Sci.30,479-493.(8)Widerlov,E. et al.(1983)Regul.Peptides 6,99-109.

60. α－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンの分布

佐野　輝・胡谷和彦・上野修一・柿本泰男
（愛媛大・医・神経精神医学）

〔要　約〕

我々は前回の本学会において、ＧＡＢＡと特殊なアミノ酸であるハイプシンとのジペプチドであるα－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンの単離精製および同定について報告した。今回、我々はこのペプチドの定量法を開発し、ほ乳類における臓器分布、脳内分布および種差について検索を行った。定量法は、組織をトリクロル酢酸でホモジナイズし、その遠心上清からイオン交換樹脂を用いてα－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンを含む分画を得た後、陽イオン交換樹脂を用いた高速液体クロマトグラフィーにより定量した。その結果、本ペプチドはウサギ臓器において脳に特異的に検出された。またウシ、ウサギ、ラット、サル脳内には１～１０nmole/g wet weight 検出された。一方イヌ、ネコの脳内からは検出されなかった。さらにサル脳内における詳細な分布を検索した結果、大脳半球に最も高濃度存在した。白質と灰白質の間では有意の濃度差は検出されなかった。

Key word：α-(γ-Aminobutyryl)-hypusine, γ-Aminobutyric acid, Hypusine

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アミノ酸である。[10] このアミノ酸はほ乳類の生体内に遊離型以外に２つの型で存在している。一つは特殊な蛋白質の残基としてであり、[1)7)] 他の一つはＧＡＢＡとのジペプチドである。[9] これら３つの型の間の関係はあきらかではないが、今回我々はＧＡＢＡとのジペプチドの分布をあきらかにしたので、ここに報告する。

（実験方法）

1)実験材料

合成ハイプシンは大阪大学理学部芝哲夫教授から供与された。合成α－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンはわれわれが合成した。

2) α－（γ－アミノブチリル）－ハイプシン分画の調整

組織２ｇを５－１０倍容量の１０％トリクロル酢酸でホモジナイズした。ホモジネートを遠心し生じた沈さをさらに同量の１０％トリクロル酢酸で２回洗浄し、夫々の遠心上清を先の遠心上清と合わせて Dowex 50W × 8 H型（１×５㎝）に通した。続いてカラムを、それぞれ２０ｍｌの水、１Ｍピリジンで洗浄後、２Ｍアンモニア２０ｍｌで溶出して、α－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンを含む分画を得た。この方法による組織ホモジネートからのα－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンの回収率は９０％以上であった。

脚注：GABA --- γ-Aminobutyric acid

3) 高速液体クロマトグラフィー

既述の方法[8]に従い、組織25－100mgに相当するα－（γ－アミノブチリル）－ハイプシン分画を強酸性イオン交換樹脂上でクロマトグラフィーを行なった。ただし溶出緩衝液のpHは9、2とした。

（実験結果）

1) α－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンの高速液体クロマトグラフィー

サルの前頭葉白質から得られたα－（γ－アミノブチリル）－ハイプシン分画と合成α－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンの高速液体クロマトグラフィーによる分析結果を図1に示した。合成ペプチドの溶出時間は56分であった。合成ペプチドを種々のほ乳類から得られたα－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンに加えてクロマトグラフィーをおこなったところ、56分のピークは単一であった。またα－（γ－アミノブチリル）－ハイプシン分画を6N塩酸により4時間水解すると、56分のピークは完全に消失し、当モルのハイプシンが生成した。またピーク面積は0.1－50nmoleに対して直線性を示した。

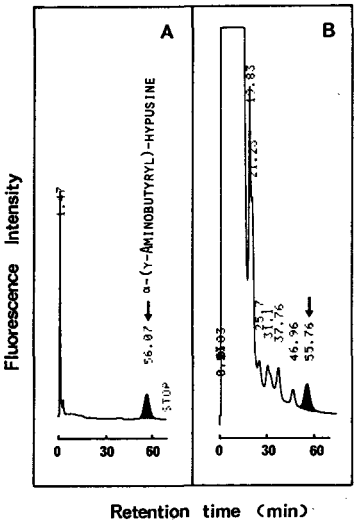


図1 合成GABA－Hypusine 1nmole（A）とサル前頭葉白質100mg質重量相当のGABA－Hypusine分画（B）のHPLC図

2) ウサギにおけるα－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンの臓器分布

ウサギの肝臓、腎臓および骨格筋のα－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンの分布を検索した。それらの臓器について、得られたα－（γ－アミノブチリル）－ハイプシン分画をさらにイオン交換クロマトグラフィーでα－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンを含むと考えられる分画を精製し高速液体クロマトグラフィーで分析したが、α－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンに相当するピークは検出されなかった。

表1 哺乳類脳内のGABA－Hypusineの分布

	GABA－Hypusine濃度		
	大脳	小脳	脳幹
イヌ （n＝5）	n.d.	n.d.	n.d.
ウサギ（n＝6）	5.3 ± 1.0	4.5 ± 1.1	7.8 ± 0.5
ラット（n＝5）	3.2 ± 0.8	n.d.	1.3 ± 0.5

mean value± S.E. (nmoles/g.wet wt.)
n.d.:not detectable

3) α－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンのほ乳動物脳内分布

ウサギ、ラットの脳内においてはこのペプチドが検出されたが、イヌの脳内には検出されなかった。（表1）また図には示さないが、ネコの脳内からも検出されなかった。さらにサルについては詳細な脳内分布を検索し、表2に示すような結果が得られた。個体さは大きいが、全体の傾向として大脳半球にα－（γ－アミ

ノブチリル）－ハイプシンの濃度は高かった。また白質と灰白質の間に有意な濃度差は認めなかった。

表2　サル脳内のGABA－Hypusineの分布

		GABA－Hypusine濃度	
		灰白質	白質
大脳	前頭葉	2.5 ± 1.0	9.0 ± 2.6
	頭頂葉	6.6 ± 1.7	9.5 ± 2.8
	側頭葉	6.4 ± 0.4	7.4 ± 2.2
	後頭葉	7.9 ± 2.1	5.6 ± 1.8
小脳		3.5 ± 2.0	3.0 ± 1.4
脳梁		1.9 ± 0.7	
尾状核		2.9 ± 0.7	
レンズ核		4.1 ± 1.0	
視床		4.8 ± 0.7	
視床下部		n. d.	
中脳		5.5 ± 1.7	
橋		3.2 ± 0.7	
延髄		3.4 ± 1.5	

mean value±S.E. (nmoles/g.wet wt.)
n.d.:not detectable

考察

今回我々はα－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンの分布および種差について検索した。その結果、このペプチドは脳に特異的であった。これは他のγ－アミノブチリルジペプチドと一致している。[2)4)5)6)] または乳類における種差については イヌ、ネコには検出されなかった。これもホモカルノシンの分布とよく一致している。[2)] しかし、より詳細な脳内分布については他のγ－アミノブチリルジペプチドと一致しない点があった。たとえば、ホモカルノシンは小脳、レンズ核および視床下部に非常に高濃度存在する[2)3)] のに対して、α－（γ－アミノブチリル）－ハイプシンは小脳、レンズ核では比較的低濃度でありまた視床下部では検出されなかった。今後はさらにハイプシンおよび他のγ－アミノブチリルジペプチドとの関係について検索し、このペプチドの生理的役割をあきらかにしたいと考えている。

（文献）

1) Imaoka N. and Nakajima T. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 320, 97-103
2) Kanazawa A. and Sano I. (1967) J. Neurochem., 14, 211-214
3) Kish S.J., Perry T.L. and Hansen S. (1977) J. Neurochem., 32, 1629-1623
4) Nakajima T., Wolfgram F. and Clark W.G. (1967) J. Neurochem., 14, 211-214
5) Nakajima T., Kakimoto Y., Kumon A., Matsuoka M. and Sano I. (1969) J. Neurochem., 16, 417-422
6) Perry T.L., Namsen S., Schier G.M. and Holpern B. (1977) J. Neurochem.,29,791-795
7) Sano A. (1985) in polyamines : Basic and Clinical aspects, pp. 81-88, VNU seicnce Press, The Netherland
8) Sano A., Miyake M. and Kakimoto Y. (1984) Biochim. Biophys. Acta 800, 135-139
9) 佐野輝、胡谷和彦、柿本泰男，神経化学24, 25-27
10) Shiba T., Mizote H.,Kaneko T.,Nakajima T., Kakimoto Y. and Sano I. (1971) Biochim. Biophys. Acta 244, 523-531

61. チロシン水酸化酵素の活性調節機構
—カテコールアミンによる酵素の不活性化と安定化—

奥野幸子・藤沢　仁　（旭川医科大・第一生化）

〔要　約〕

チロシン水酸化酵素の活性調節機構について研究し、酵素が平常はその最終反応産物であるカテコールアミンによって不活性型に保たれており、カテコールアミン合成が必要になるとリン酸化を受けて活性型に転換されるという活性調節機構の可能性をこれまでに報告してきた。酵素の最終反応産物であるカテコールアミンによる酵素の活性調節をさらに追究し、カテコールアミンが酵素を不活性化すると同時に酵素を安定化することを見出した。ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン等のいずれもが同等にこの安定化効果を示したが、酵素の直接の反応産物であるドーパや、カテコールアミンの代謝物であるDOPEG、DOPACや、セロトニンは酵素を安定化せず、酵素の不活性化作用と同じように酵素の安定化もカテコールアミンに特異的であった。

これらの結果はチロシン水酸化酵素がその最終反応産物であるカテコールアミンによって平常は不活性で且つ安定な状態に保たれていることを示すものであり、生理的に重要な機構であると思われ興味深い。

Key word：　tyrosine hydroxylase, catecholamine, end product

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。我々はこれまでこの活性調節機構について研究を進めてきた。そしてチロシン水酸化酵素が平常は生理的pHでは酵素活性をもたない不活性型酵素として存在しており、不活性型酵素はサイクリックAMP依存性蛋白質リン酸化酵素によってリン酸化を受けると活性型に転換されることを見出した(1)。さらに酵素を不活性型にする活性抑制物質が生体内に存在することを見出し(5)、これが酵素の最終反応産物のカテコールアミンである可能性を明らかにして(6)、これらの成果を一昨年の本大会で報告した(4)。カテコールアミンとサイクリックAMP依存性蛋白質リン酸化酵素によるチロシン水酸化酵素の不活性型 ⇌ 活性型の相互転換に基づく活性調節機構について研究を進めたところ、カテコールアミンが酵素を不活性型に転換し、さらに酵素を安定化しているという結果を得たので報告する。

［実験方法］

ラットの活性型チロシン水酸化酵素の調製　ラットの副腎の超遠心上清から、硫安分画、ゲル濾過、pH処理、ヘパリンアフィニティークロマト、ホスホセルロースイオン交換クロマトを用いる既報(2)の方法で精製し、SDS電気泳動的に単一バンドを示す酵素標品を得た。得られた酵素標品は中性に至適pHを示す(2)活性型酵素である(6)。

チロシン水酸化酵素の活性測定　pH5.0での活性測定には0.1M酢酸ナトリウム、pH7.0での測定には0.1M Hepes buffer を用いて非酵素的脱炭酸法(3,6)により測定した。1ユニットはこの測定条件で1分間に1nmolのドーパを生成する活性として示した

。

［結果および考察］

既に報告したように(4) 粗抽出液中のチロシン水酸化酵素活性は至適pHを5.4付近に示し、生理的pHと考えられているpH7付近では活性が殆ど認められない(Fig.1A)。この不活性型酵素を酸性にして酵素を沈澱させ酸可溶性画分を除去すると、酵素活性はpH5付近で測定した場合には殆ど変わらないが、中性付近では検出されなかった活性が著明に上昇し、至適pHとなる(Fig.1B)。中性領域に至適pHをもつこの活性型酵素に低濃度のカテコールアミンを加えてインキュベーションすると中性付近の活性が再び低下して、酸性に至適pHを示す不活性型酵素に戻る(Fig.1C)。このようにチロシン水酸化酵素はpH5付近で活性を測定すると活性型も不活性型も同じ活性を示すが、pH7付近では不活性型酵素は活性をもたない。そこでpH5の活性を測定することにより活性型と不活性型を含めた酵素の全量を、pH7の活性より不活性型を含まない活性型の酵素の量を求めることができる。

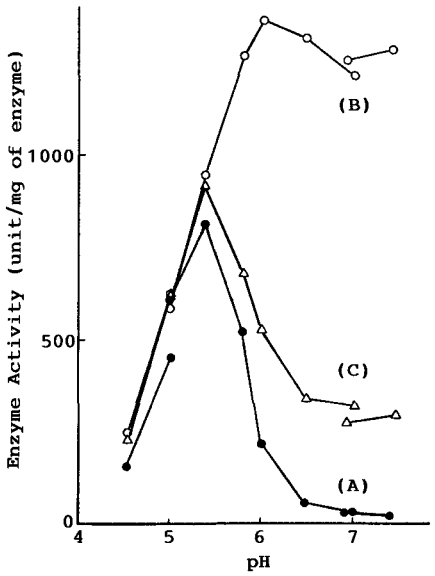


Fig. 1. pH profile of the activity of tyrosine hydroxylase.

pH処理を含む操作で精製された酵素は中性に至適pHを示す活性型酵素であるが、この酵素を30℃でインキュベーションするとpH5の活性はFig.2A(○)のように時間と共に低下し、2時間後の残存活性は33%となった。ところが酵素に10^{-7} Mドーパミンを添加した場合には(●)65%の活性が残存し、ドーパミンによって酵素が安定化されることが明らかになった。この時

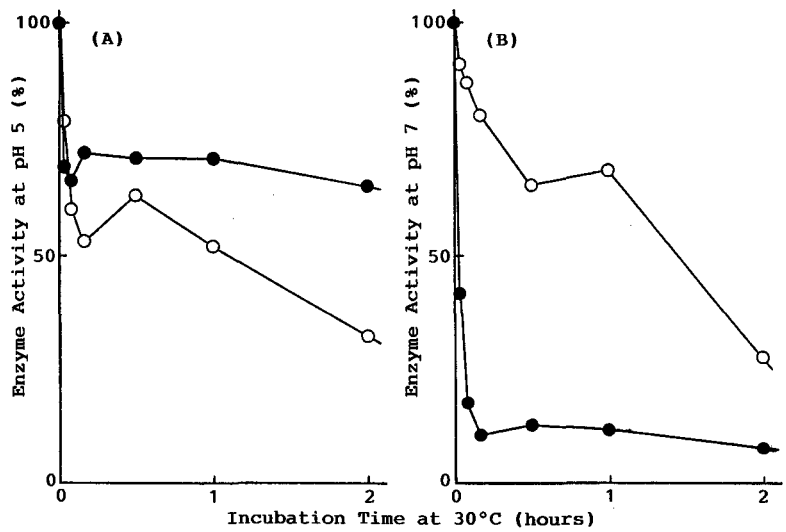


Fig. 2. Time course of loss of the activity of tyrosine hydroxylase in the presence (●) and absence (○) of 10^{-7} M dopamine. Tyrosine hydroxylase (235 ng, approximately 0.8 X 10^{-7} M subunit of the enzyme) was incubated with (●) or without (○) 10^{-7} M dopamine in 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 1 mg/ml bovine serum albumin at 30°C for the indicated periods with shaking, in a total volume of 50 µl, and then 450 µl of the mixture for the enzyme assay were added.

pH７の活性はFig.2Bに示すようにドーパミン存在下(●)で急速に低下し、３０℃、１０分間のインキュベーション後に残存する活性は僅かに１０％であり、殆どの酵素は不活性型に転換されていると考えられる。

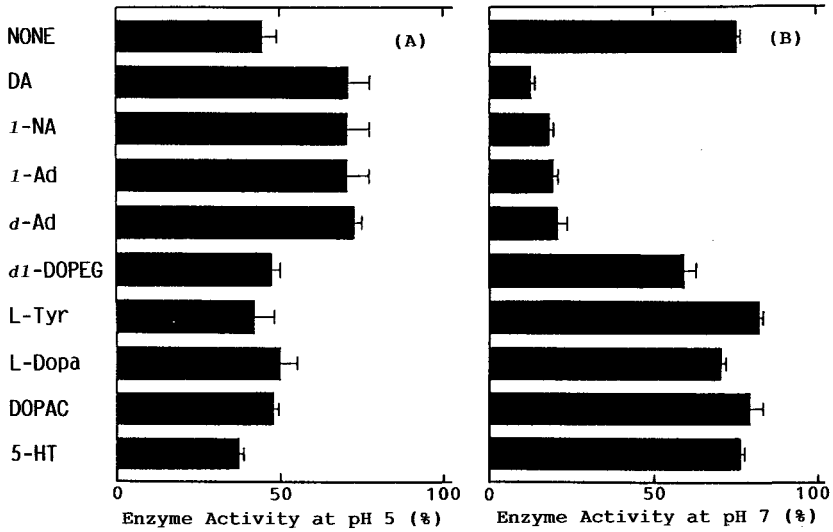


Fig. 3. Effects of catecholamines and related compounds on the loss of the activity of tyrosine hydroxylase. Tyrosine hydroxylase (268 ng, approximately 0.9 X 10^{-7} M subunit of the enzyme) was incubated with the indicated compounds at a concentration of 10^{-7} M in 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 1 mg/ml bovine serum albumin at 30°C for 2 hours (A) or for 10 min (B) with shaking, in a total volume of 50 µl, and then 450 µl of the mixture for the enzyme assay were added. The results are expressed as the mean and sample standard deviation of triplicate incubations. Control values are the activity of the enzyme before incubation.

活性型酵素の不活性型への転換は、酵素の最終反応産物であるカテコールアミン類によって特異的に触媒されることを我々はすでに報告したが、酵素の安定化に効く化合物についてもその特異性を調べ、不活性化作用との相関について検討した。Fig. 3Aは種々の化合物による酵素の安定化効果をpH５の活性を指標に検討した結果であり、Fig.3Bは酵素の不活性化作用をpH７の活性を指標に表したものである。酵素を３０℃で２時間インキュベーションするとpH５の活性は４５％に低下したが、10^{-7}Mのドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン等のカテコールアミン存在下では７１～７３％もの酵素活性が残存し、これらのカテコールアミンが酵素の不活性化作用を示すと同時に酵素の安定化作用をも持つこと、この効果が酵素の最終反応産物であるカテコールアミンに特異的であることが明らかになった。以上の結果はチロシン水酸化酵素が平常はその最終反応産物であるカテコールアミンによって不活性でしかも安定な状態に保たれているという可能性を考えさせるものであり興味深く思われる。

［文献］

1. Fujisawa, H., Okuno, S. & Yamauchi, T. (1984) in Catecholamines Part A (Usdin, E. et al eds.) pp.183-188, Alan R. Liss, Inc., New York
2. Okuno, S. & Fujisawa, H. (1982) Eur. J. Biochem. 122, 49-55
3. Okuno, S. & Fujisawa, H. (1983) Anal. Biochem. 129, 405-411
4. 奥野幸子、藤沢　仁 (1984) 神経化学 23, 469-471
5. Okuno, S. & Fujisawa, H.(1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 124, 223-228
6. Okuno, S. & Fujisawa, H. (1985) J. Biol. Chem. 260, 2633-2635

62. 上頚神経節のコリン代謝の調節—外液コリン濃度と KCl 脱分極刺激の効果—

安藤正人・岩田光良・永田　豊
（藤田学園保健衛生大・医・生理）

〔要　約〕

コリン作動性節前神経末端を含む白鼠上頚神経節（SCG）を，種々の濃度の choline（Ch）を添加した生理溶液中で好気的に incubate した時，膜脂質 lecithin 合成系への第一段階を触媒する choline kinase（CK）と ACh 生成系を触媒する choline acetyltransferase（ChAT）の両酵素活性の発現が，相互にどのように調節されているのかを比較検討した。また，高〔K^+〕。（70mM）脱分極刺激下で両酵素活性を調べ，コリン代謝とシナプス伝達との関連性を追求した。

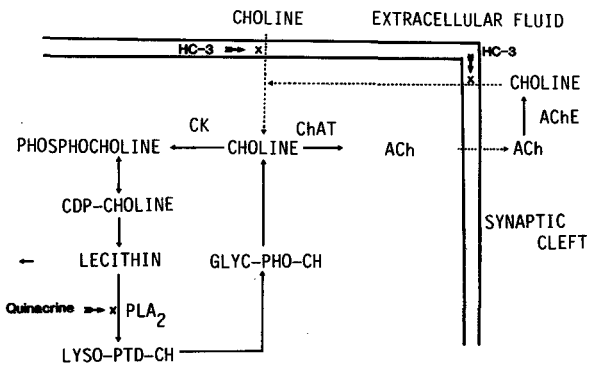
①SCG内ChAT活性は，低濃度 Ch（5 μM）の添加で有意に上昇した。この効果は Ch 濃度を上昇（50 μM）させると対照レベル以下に抑制された。一方，ChAT活性が亢進した濃度（5 μM）では CK 活性の著明な抑制効果が見られたが，この効果は高濃度 Ch（50μM）の添加で逆に有意な活性上昇に転じた。即ち，ChAT および CK 両酵素の活性化と抑制は外液 Ch 濃度に強く依存していることが示された。SCG の高親和性 Ch 輸送系を hemicholinium-3（HC−3, 50μM）添加で抑制すると，CK の活性化効果も消失したことから，細胞内に取り込まれた Ch は，ACh 系よりはむしろ，膜脂質生合成系の基質として優先して利用され得る可能性が示唆された。

②SCG を高〔K^+〕。刺激すると，ChAT は有意に活性化したが，CK 活性は逆に抑制された。さらに，HC−3 を添加しても両酵素活性の変動は殆んど影響されなかった。また，膜構成脂質 lecithin の分解を抑制する quinacrine（10μM）を添加すると，高〔K^+〕。刺激で上昇した ChAT 活性は完全に消失した。即ち，神経末端に取り込まれた Ch は，先づ CK の活性化により膜構成脂質（lecithin）に合成されて貯蔵されるが，一方刺激に反応した phospholipase A_2 の活性化により膜リン脂質分解で生成した Ch は ACh 合成系に利用されるものと考えられた。

Key word : choline acetyltransferase and choline kinase, superior cervical sympathetic genglia, high〔K^+〕。-depolarization.

コリン作動性シナプスでは，細胞外の choline（Ch）は神経末端部膜から取り込まれた後，choline acetyltransferase（ChAT）により伝達物質の acetylcholine（ACh）に生合成され，節前神経末端より遊離され神経伝達機能を果した後，acetylcholinesterase（AChE）により Ch と酢酸とに分解されることはよく知られている。[2], [10] 一方，細胞膜構成脂質の中で phosphatidylcholine（lecithin）は神経組織の主要な構成成分となっている。しかし，細胞外から取り込まれた Ch が伝達物質合成系に入るのか，あるいは膜のリン脂質代謝系へ進んで貯蔵されるのかという“switching”の調節については不明な点が多い。[11] そこで，多数のコリン作動性神経末端が節後 neuron とシナプス結合している上頚交感神経節（SCG）をラットより摘出して incubate した時，lecithin 生合成系（CDP-choline pathway）の第1段階を触媒するリン酸化酵素（choline kinase：EC 2.7.1.32, CK）[6] および伝達物質生成系の ChAT（EC 2.3.1,6）活性（図1）が，外液 Ch 濃度を変化させたとき，どのように相互に変動するのか調べた。また，さらに高濃度 KCl（70 mM）を加えて膜を脱分極状態にしたとき，これら両酵素活性の発現がどのように変化するかを比較検討して，コリン作動性神経末端でのコリン代謝とシナプス活動との関連性を考察した。

FIG. 1. CHOLINE METABOLIC PATHWAY IN CHOLINERGIC NEURONS.



《実験材料および方法》

〔1〕摘出 SCG の incubation は，Wistar 系成熟白鼠より摘出した SCG を，Ch，KCl あるいは各種の薬剤を添加した生理溶液中で 37℃好気的に1時間行った。[1]

〔2〕SCG 内への Ch の取り込みは，tracer 量の〔methyl-^{14}C〕choline および carrier（5および50 μM）を添加して incubate した後，SCG を磨砕して，Haga と Noda の方法[5]に準じて Ch を抽出し，ethanol 上清に回収された Ch の取り込み量を求めた。

〔3〕CK 活性は Burt と Brody[4]の方法で，また ChAT

活性はRossierら[9]の方法でそれぞれ測定し，生成した〔^{14}C〕－phoshocholineあるいは〔^{14}C〕－ACh量で酵素活性を表示した。タンパク量はLowryら[8]の方法で測定した。

《実験成績および考察》

〔1〕ChATおよびCK活性におよぼす外液Ch濃度の影響：

刺激に反応して，シナプス間隙に遊離されたAChは，AChEで加水分解されて，生じたChは高親和性輸送系（Km：4-8μM）で細胞内に取り込まれ再びACh合成に利用されている[5]。一方，ラット胎児脳組織の培養系に添加されたChは，高親和性輸送系により細胞内に取り込まれた後，CKによって速やかにphospho-cholineに変換されていることが認められている[11]。そこで，溶液中に低濃度（1－10μM）のChを添加してみると，SCG内ChAT活性は著明に上昇して，2.5－5μMで最大の活性化（1.5倍）が見られた。しかし，この効果は外液Chをさらに上昇させるのに伴って徐々に失われ50－250μMでは対照レベル以下に抑制された。そして，さらに高濃度（500μM以上）のChを添加すると再び活性化効果が示された。一方，SCGのChATを有効に活性化する低濃度のCh（1－5μM）は，CK活性を著明に低下（－75%）させた。しかし，この抑制効果もCh濃度をさらに上昇させると再び一時的な活性低下が示された。このように，SCGのChAT

FIG. 2. EFFECT OF VARYING THE CHOLINE CONCENTRATIONS ON ChAT(UPPER) AND CK(LOWER) ACTIVITIES.

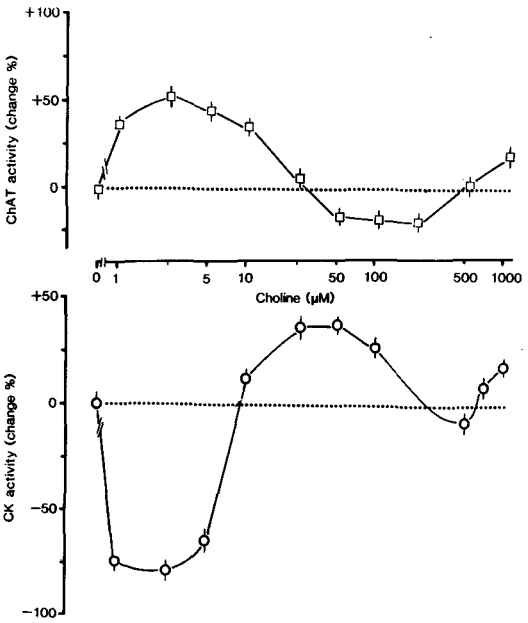


FIG. 3. TIME COURSE OF THE UPTAKE OF CHOLINE INTO SCG.

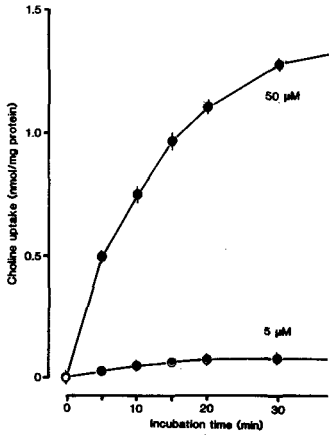
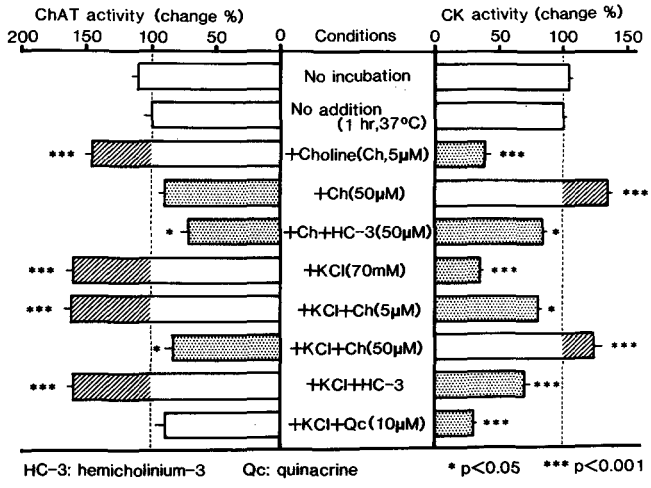


FIG. 4. EFFECTS OF HEMICHOLINIUM-3 OR QUINACRINE ON ChAT AND CK ACTIVITIES IN THE ISOLATED SCG WITH OR WITHOUT HIGH $[K^+]_o$.



およびCK両酵素はともに外液Ch濃度に強く依存して活性化あるいは**抑制**がみられた。そして，低濃度Ch（5μM）の添加ではChAT活性の上昇とCK活性の抑制が，高濃度Ch（50μM）では逆にChATの抑制とCKの活性化が示された両酵素活性の相補的変動は興味深い（図2）。既に，Kuczenski[7]が報告しているように，脳内ChATに対するChの見かけのKm値は200－1000μMと極端に高いことから高親和性輸送系[5]で細胞外から取り込まれたChが，はたして直接的にACh合成系の基質としてのみ利用されるのか否かについては議論が

多い。確かに細胞外液の生理的濃度[10]範囲と考えられるCh濃度（50μM）の添加によって，Chは急速かつ活発にSCG組織内に取り込まれている（図3）。しかし，高Ch濃度ではCK活性もまた著明に活性化されるのにも拘らず，ChAT活性はむしろ抑制されている。また，Chの輸送系を特異的に抑制するhemicholinium-3（HC-3,50μM）を同時添加すると（図1），細胞内Ch濃度が低下するためCKの活性化効果も失われている（図4）。従って，今回の我々の結果から，高親和性輸送系で取り込まれたChは，AChよりはむしろ膜脂質lecithin生合成系の基質として優先的に利用され得ることが示唆される。

〔2〕KCl脱分極刺激とChATおよびCK活性の変動：

一般に，高〔K^+〕。（70 mM）脱分極刺激などによってコリン作動性シナプス活動が亢進すると，Chの細胞内への取り込みが増大することが知られている[10]。そのときSCGのChAT活性もまた上昇したが，そのCK活性は逆に抑制された（図4）。しかし，この両酵素活性はさらにHC-3を添加して，Ch供給を制限しても殆んど影響されなかった（図4）。従って，これら両酵素活性発現にとっては，外液中のChの供給が必ずしも不可欠な条件とい言い難い。即ち，細胞が興奮した状態では，ChATが活性化されてACh生成系が優先的に亢進するようになるために，細胞膜成分が分解されてlecithinとして貯蔵されているChが供給され得ると考えられる。そこで，lecithinの分解を抑制するquinacrine（Qc，10μM）を添加してSCGをincubateしたところ（図1），高〔K^+〕。刺激によって上昇したChAT活性は完全に抑制された（図4）。一方，Bradford[3]らはKCl脱分極により脳シナプトソームのphospholipase A_2が活性化されて，膜リン脂質の分解が起こることを示している。従って，生成されたChが細胞質内Ch濃度の上昇を来してACh生成系が促進される可能性が示唆される。

《文　献》

(1) Ando, M. et. al. (1984) Cell. Mol. Neurobiol. 4：79-90 (2) Barker, L. A.&Mittag, T. W. (1974) J. Pharmacol. Exp. Ther. 192：86-94 (3) Bradford, P. G. et. al. (1983) J. Neurochem. 41：1684-1693 (4) Burt, A. M.&Brody, S. A. (1975) Anal. Biochem. 65：215-224 (5) Haga, T. & Noda, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta. 291：564-575 (6) Kennedy, E. P.&Weiss, S. B. (1956) J. Biol. Chem. 222：193-214

(7) Kuczenski, R. et. al. (1975) J. Neurochem. 24：39-45 (8) Lowry, O. H. et. al. (1951) J. Biol. Chem. 193：265-275 (9) Rossier, J. et. al. (1973) FEBS Lett. 32：231-234 (10) Tuček, S. (1985) J. Neurochem. 44：11-24 (11) Yavin, E. (1976) J. Biol. Chem. 251：1392-1397

63. ラット脳ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase ：その活性に及ぼす可溶性画分の影響

塚本卓治・中橋　徹　　（佐賀大・農・生化）

〔要　約〕

雄ラット脳ミクロソームに存在する estradiol 2-hydroxylase に及ぼす 脳ホモジネート可溶性画分(105,000×g 上清として得られる S-3 画分)の影響を検討した。estradiol 2-hydroxylase のアッセイは、（2-^{3}H）estradiol を基質として用い、その水酸化によって生じるトリチウム水（^3H_2O）を測定することによって行った。S-3 画分は時間依存的、濃度依存的に、脳ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase を活性化した。S-3 画分の存在下、37℃にて反応開始後15分間は、反応の直線性は保持された。また脳ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase の活性は S-3 画分の濃度に比例して上昇したが、S-3 画分のタンパク質濃度が 0.6 mg/ml 以上になると活性の上昇は見られず、逆に活性の低下が観察された。さらに、S-3 画分によるラット脳ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase 活性化は統計的に有意なものであり、2μM（2-^{3}H）estradiol を用いた場合、S-3 画分の存在下、ラット脳ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase 活性は約6.3倍上昇した（$p<0.02$）。従って、S-3 画分はラット脳ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase 活性化を通して、中枢神経系における性腺刺激ホルモン分泌において重要な役割を果たすことが考えられる。

Key word：　Estradiol 2-hydroxylase, Rat brain microsomes, Soluble fraction,

estradiol から 2-hydroxyestradiol 生成に関与している酵素は estradiol 2-hydroxylase と呼ばれている(1,2)。estradiol 2-hydroxylase の存在は、肝臓、腎臓、肺、心臓、生殖器官及び脳らで確認されている(3,4)。特に脳 estradiol 2-hydroxylase は中枢神経系でのゴナドトロピン分泌調節に関与することから、最近重要視されている(5)。脳 estradiol 2-hydroxylase 活性の調節に関しては、in vivo 研究にて、いくつかの知見が得られているが(5,6)、in vitro での活性調節に関する報告は非常に少ない。

前回、脳 estradiol 2-hydroxylase が catecholamine により阻害されることを報告したが、今回、ラット脳ホモジネートの可溶性画分である 105,000×g の上清画分(S-3画分)を加えることによりミクロソーム estradiol 2-hydroxylase の活性が上昇することを見いだしたので報告する。

［実験材料と方法］

体重250～350g の Wistar系雄ラットを使用した。

ラット脳ミクロソーム画分としては、段階的遠心分離を行い、最終的に、105,000×gで 1hr の遠心による沈澱(P-3 画分)および上清(S-3 画分すなわち可溶性画分)をそれぞれ、それ以上の分離はせずに使用した(7)。脳のホモジネートは4倍量(W/V)の 0.32 M ショ糖を含む 10 mM Hepes 緩衝液(pH 7.8)を用いて行い、ミクロソーム画分は 0.155 M Tris 緩衝液(pH 7.0)にて一度、洗浄した後、実験に供した。

estradiol 2-hydroxylase の活性測定は、（2-^{3}H）estradiol を基質として用いる"Radiometric Assay"によって行った(5)。すでに報告したように、ラット脳ミクロソームに存在する estradiol 2-hydroxylase は $NADPH+H^+$ よりも $NADH+H^+$の存在下での方が高い活性を示すことを明らかにしているので(8)、反応系には NADPの代わりに NAD を使用した。すなわち、0.1 M Tris (pH 7.0), 5 mM glucose-6-phosphate,

G-6-P dehydrogenase (Leuconostoc mesenteroides, 1 U/ml) および 1 mM NAD を含む反応液を 37°C で反応させた後、生成した ^3H_2O を分離し(5)、その放射能を測定した。基質として用いた (2-^{3}H) estradiol は以下の方法より得た。まず estradiol から Hillman らの方法(9)に従って、2-iodoestradiol を合成し、それを Amersham 社に依頼して、トリチウムガス気流中、Pd 触媒で接触還元することによって (2-^{3}H) estradiol が調製された。調製された (2-^{3}H) estradiol は中圧クロマトグラフィーにより精製した後、実験に供した。このようにして得られた (2-^{3}H) estradiol の比活性は、20 Ci/m mol である。

［実験結果］

1．S-3 画分存在下におけるミクロソーム estradiol 2-hydroxylase 反応の時間依存性

2 μM (2-^{3}H) estradiol と NADH+H^+ 再生系を含む混合液に S-3 画分(0.46 mg protein/ml)の存在下及び非存在下にてミクロソーム画分(0.324 mg protein/ml)を加えた後、Fig. 1 に示されている反応時間後に、生成した ^3H_2O を定量した。S-3 画分の存在にかかわらず、反応開始後、約15分間は反応時間と反応生成物量の増加は正比例関係にあった。15分～20分経過後は、どちらの場合とも、ラット脳ミクロソーム画分による estradiol 2-hydroxylation の速度は低下し、また、その測定誤差も大きくなった。また、Fig. 1 に示されているように、S-3 画分によるミクロソーム estradiol 2-hydroxylase 活性の上昇は明らかであり、測定された範囲(1 min ～15 min)で8倍以上の活性上昇が見られた。

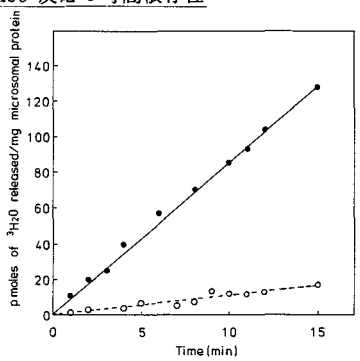


Fig. 1. Effect of incubation time at 37°C on 2-hydroxylation of estradiol by rat brain microsomes in the presence (●) and absence (○) of S-3 fraction.

2．S-3 画分存在下における estradiol 2-hydroxylation に及ぼすミクロソームタンパク質濃度の影響

2 μM (2-^{3}H) estradiol と S-3 画分(0.6 mg protein/ml)の存在下、ミクロソームタンパク質濃度を変化させて生成する ^3H_2O を測定した。反応は37℃で10分間であった。生成する ^3H_2O の量、すなわち 2-hydroxyestradiol の生成とミクロソーム画分含量はミクロソームタンパク質が 0.05～0.20 mg/ml までは比例関係にあった(Fig.2)。ミクロソームタンパク質含量が 0.20 mg/ml になると見かけ上の飽和状態が得られ、2-hydroxyestradiol 生成量の増加は見られなかった。一方、S-3 画分非存在下では、ミクロソーム画分含量と生成量はミクロソームタンパク質含量が 0.47 mg/ml まで比例関係にあることがわかった。

3．ラット脳ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase に及ぼす S-3 画分濃度の影響

S-3 画分によるラット脳ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase の活性化は濃度依存的であった(Fig.3)。この実験においては 10μM (2-^{3}H) estradiol, 0.229 mg protein/mlのミクロソーム画分が用いられ、反応時間は 10分であった。S-3 画分のタンパク質濃度が約0.3 mg/ml までは、ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase の活性はほぼ正比例的に上昇し、それ以上の S-3 画分の濃度では、活性上昇の度合いは穏やかになったが、S-3 画分の濃度の上昇に伴って、0.6 mg/ml のタンパク量濃度まで上昇し続けた(Fig.3)。0.6 mg/ml 以上になると estradiol 2-hydroxylase の活性は除々に低下し始めた(図省略)。

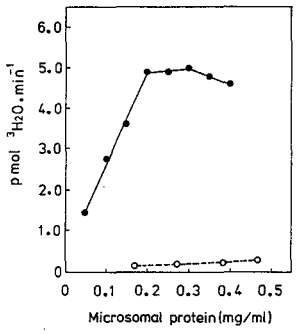


Fig. 2. Effect of microsomal protein concentration on estradiol 2-hydroxylase activity in rat brain in the presence (●) and absence (○) of S-3 fraction.

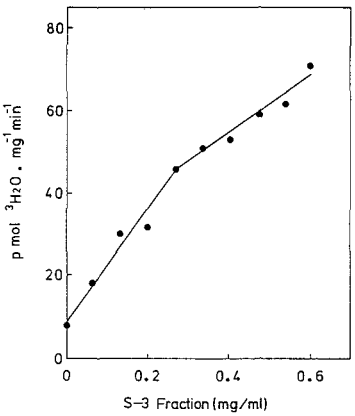


Fig. 3. Effect of protein concentration of S-3 fraction on estradiol 2-hydroxylase activity in rat brain microsomes.

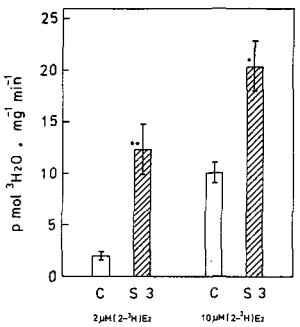


Fig. 4. Effect of S-3 fraction on estradiol 2-hydroxylase activity in rat brain microsomes. Values are the mean ± SEM of replicate determinations from five experiments. Significant effects of S-3 fraction on estradiol 2-hydroxylase activity are depicted by *, P<0.05 and **, P<0.02.
C; microsome , S3; microsome + S-3 fraction

4．ラット脳ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase に及ぼす S-3 画分の影響の有意性

S-3 画分によるミクロソーム estradiol 2-hydroxylase 活性上昇の有意性を student's t test により検討した。この場合、2つの基質濃度を用いラット脳ミクロソーム(0.169～0.262 mg protein/ml)による estradiol の C-2 水酸化への S-3 画分(0.153～0.276 mg protein/ml)の影響を調べた。その結果、Fig.4 に示すように、S-3 画分による estradiol 2-hydroxylase 活性上昇は有意であることが判明した。2μM 及び 10μM (2-^{3}H) estradiol を用いた時、ミクロソーム estradiol 2 hydroxylase 活性上昇はそれぞれ、約6.3倍(n=5,p<0.02)及び 2.3倍(n=4,p<0.05)であった。

［考察］

ラット脳ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase 活性は、肝ミクロソームのそれと比較した場合、非常に低く、10%以下である。S-3 画分によるラット脳ミクロソーム estradiol 2-hydroxylase の活性化は顕著なものであり、基質である estradiol 濃度が低い程、その効果は大であった。このことから、ラット脳内不溶性画分で、通常はその活性が低く維持されている estradiol 2-hydroxylase は何らかの刺激により可溶性画分(S-3 画分)に存在する活性化因子により活性化され、必要に応じた 2-hydroxyestradiolを生成する可能性が高いと思われる。

［文献］

(1) Ball, P., Hoppen, H. O. and Knuppen, R. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1451-1462. (2) Bolt, H. M., Kappus, H. and Käsbohrer, R. (1974) J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 1072-1079. (3) Barbieri, R. L., Canick, J. A. and Ryan, K. J. (1978) Steroids 32, 529-538. (4) Hoffman, A. R., Paul, S. M. and Axelrod, J. (1980) Biochem. Pharmacol. 29, 83-87. (5) Fishman, J., Norton, B. I. and Krey, L. (1980) Biochem. Biophys. Res. Comm. 93, 471-477. (6) Fishman, J., Norton, B. I. and Hahn, E. F. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2574-2576. (7)Whittaker, V. P. (1965) Prog. Biophys. Mol. Biol. 15, 39-45. (8) Tsukamoto, T., Sato, M., Yada, Y. and Inaba, T. (1983) Bull. Jap. Neurochem. Soc. 22, 414-416. (9) Hillman-Elie, A., Hillman, G. and Schied, V. (1953) Z. Naturforsch. 138, 436-440.

64. L-band in vivo ESR 装置によるマウス，ラットに投与された nitroxide radical の動態の観察

石田信一・熊代　永・土橋宣昭*
（福島医大・神経精神科，RI 研*）

〔要　約〕

新たに開発された in vivo ESR装置を応用し、マウス・ラットに投与した nitroxide radical (CTPO) の動態を観測した。マウス大腿部に 0.01M CTPO 0.2 mℓ を筋注しその部位でのESR シグナル強度を観測した。その結果、シグナルが30分後に約 1/2に減少する過程が追跡できた。また、この時点で断頭し摘出された脳全体からも CTPO のシグナルが検出された。ラット頭部を検出器内に固定し、大腿静脈から 0.02M CTPO 1 mℓ を静注して頭部のESR シグナル強度の経時変化を観測した。その結果、シグナル強度の一過性の増加減少とその後の一次反応による減衰過程が観測された。ラットに 0.02M CTPO を点滴静注して頭部でのESR シグナル強度を一定に保った。その状態で Dimethyl sulfoxide (DMSO)を静注しシグナル強度の変化を観察した。その結果、シグナル強度に変化はみられなかった。その時点で断頭し、頭部全体のシグナル強度を観察すると、シグナル強度が徐々に減衰していく過程がとらえられた。一方断頭と同時に採血された血液では時間経過によるシグナル強度の減衰はみられなかった。以上の結果から、 CTPO は血液脳関門を通過し、脳組織内に取り込まれて消去されていくことが推察された。今回の実験を通して、 L-band in vivo ESR 装置が脳内の活性酸素や各種 free radical を動的に検出するシステムとなる可能性が示された。

Key word：　L-band in vivo ESR , nitroxide radical , blood -brain barrier.

生体内に発生した活性酸素や各種 free radical の検出の有力な手段として、これまで X-band ESR 装置が用いられ、多くの有用な研究がなされてきた。我々は、X- band マイクロ波に変えて、L- band マイクロ波を用いる ESR装置を開発し、マウスやラットの頭部全体を検出器内に挿入し、 in vivoで脳内の free radical を測定することを目指している。現在のところ、生体内に発生した free radical を検出するには検出感度がまだ不十分であるが、生体に投与された nitroxide radical が血流によって脳内に運ばれ消去される過程を追跡することができた。

実験方法

1. L- band in vivo ESR装置の製作

JEOL FE3X ESR 装置を基本にL- band 化を行った。従来の X- band ESR 装置と異なる主な点は、共振器、マイクロ波周波数、および磁場である。共振器には W.Froncisz らの用いたループギャップ型共振器[1]を改良し、ループ内の残留電界を極少にしたものを用いた(Fig.1) 。マイクロ波周波数は、L- band の約１GHz を使用した。この帯域は、水の誘電損失が X- bandより小さいという利点があり、これは生体の in vivo計測には必要不可欠な条件である。磁場強度はESR の共鳴条件式(hν=gβH)からわかるように、X-band に比べて約1/10である。

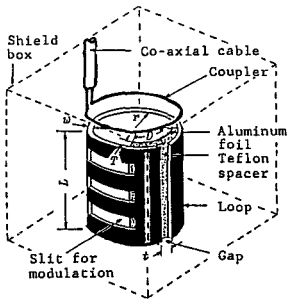


Fig. 1. The principal components of the loop-gap resonator with electric shield.

2. 実験動物

ddy マウス(20g, 雄) および Wistar 系ラット(150-200g,雄) を使用した。

3. nitroxide radical

4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL) および 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpirrolidine-1-oxyl(CTPO)を生食水に溶解し、それぞれ、 0.5M 、 0.02Mに調製して使用した。

4. nitroxide の投与方法とその検出

マウスは、ネンブタール麻酔後、大腿部に 0.01M CTPO 0.02㎖を筋注し、共振器内に大腿部を固定してその部位でのESR シグナルの減衰を観測した。また、筋注後30分に断頭しすみやかに脳を摘出し全脳中のESR シグナルを測定した。

ラットでは、ハロセン麻酔下でラット頭部を共振器内に固定し、大腿静脈から 0.02M CTPO 1 ㎖を静注して頭部での CTPO の ESRシグナルの経時的変化を観測した。さらに、ラット大腿静脈から 0.02M CTPO 1 ㎖を静注した後、同濃度の CTPO を 0.1㎖/minで点滴静注することによって頭部での CTPO のESR シグナル強度を一定に保った。

5. 生食水およびDimethyl sulfoxide (DMSO) の投与

頭部での CTPO シグナル強度を一定に保ったラットに生食水 5㎖を急速に静注した。また、生食水で希釈した 15% DMSO 1 ㎖をそのラットに静注した。

結果

1. マウス大腿部に筋注した CTPO のESR シグナルは、呼吸によるノイズが混入したが、そのシグナル強度は30分後には約1/2 に減少する過程か追跡できた (Fig.2)。また、断頭後摘出された脳からも、 CTPO のシグナルが検出された。

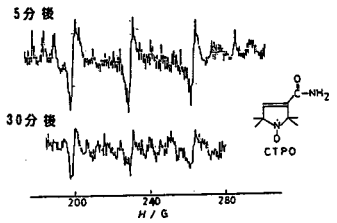


Fig.2 マウス大腿部でのESR シグナルの減衰
(0.01M CTPO 0.02㎖を筋注した)

2. ラット大腿静脈から CTPO を静注すると、その直後に、頭部に CTPO のESR シグナルが出現し、一過性に増加減少し、その後一次反応によって減衰していく過程がとらえられた。 TEMPOL を静注した場合も、 CTPO と同様な変化が見られたが、 CTPO に比較して減衰が速く、それぞれの半減期を計算すると CTPO では370sec. TEMPOLでは68sec.であった。 (Fig.3)

3. CTPO の静注および点滴静注にて頭部での CTPO のESR シグナル強度を一定に保ったラットに、血液脳関門を一過性に開くといわれる DMSO [2)3)]を静注し、頭部での CTPO のESR シグナル強度を測定したが、シグナル強度には、ほとんど変化はみられなかった。また、生食水 5㎖を急速に大腿静脈から静注し、同時に頭部での ESR シグナル強度を観測したが、この場合もシグナル強度にほとんど変化はみられなかった。

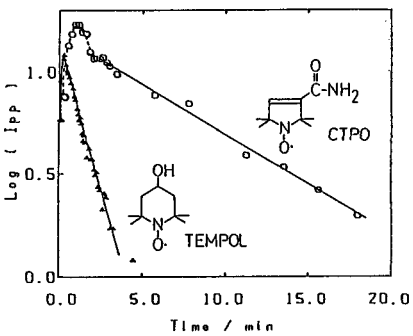


Fig.3 CTPO,TEMPOL のラット脳内での
ESR シグナル強度の変化

4. CTPO 点滴静注によって頭部でのESR シグナル強度を一定に保ったラットを、点滴開始30分後に断頭し、その頭部全体を共振器内に入れ、ESR シグナルを観測すると、シグナル強度は徐々に減衰していった。断頭と同時

に心臓から血液 2.5㎖を採血して CTPO のESR シグナルを観測した。血液中の ESRシグナルは減衰せず、ほぼ一定の強度を保っていた。さらに、断頭した頭部から脳を摘出して除いた残りの頭部全体からは、 CTPO のESR シグナルがわずかに検出されたが、このシグナルもほとんど減衰する傾向はみられなかった。 (Fig.4)

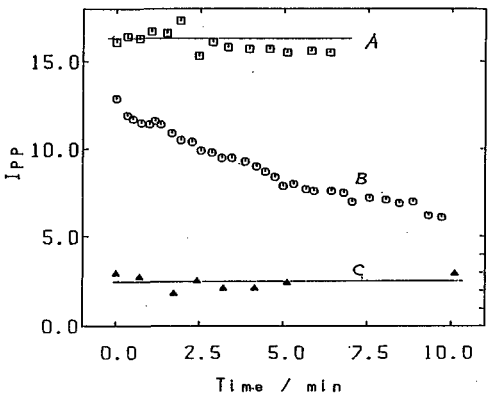


Fig.4 CTPO点滴ラット断頭後の ESRシグナルの経時的変化
A:血液 2.5㎖,B: 頭部, C:頭部 (脳摘除)

考察

生体内に投与された nitroxide radicalは、血液中のアスコルビン酸[4]や肝臓など[5]の組織において、比較的早期に還元され不活性化される。今回我々の実験でも、 one shot で投与された CTPO や TEMPOL は、かなり急速に消失していく様子が、ラット頭部で観測できた。半減期は CTPO で 370sec.TEMPOLで68sec.であった。従来 in vitro の実験によって、生体内では piperidine nitroxide は、 pyrrolidine nitroxideに比べてより速く還元されると報告されていた[5]が、われわれは in vivoの計測で、このことを確認した。また、 CTPO 静注後点滴を続け、頭部での CTPO のESR シグナル強度を一定に保ったラットにおいて、 DMSO の静注でシグナル強度の増加がみられず、また、比較的大量の生食水の急速な静注によって、シグナル強度に減少がみられなかったことから、 CTPO は比較的容易に血液脳関門を通過し、脳組織内に取り込まれていることが推察される。さらに、このラットを断頭した頭部全体での CTPO のESR シグナル強度は、徐々に減衰していくのに対して、同時に採血された血液では、シグナル強度の減衰がみられず、また、頭部から脳を摘出して除いた残りの頭部全体のシグナル強度を測定しても減衰がみられなかった。これらの結果は、かなり大量に、かつ持続的に CTPO を投与しているために、血液中の free radical の scavengerは消費され、ほとんど機能しない状態になっているが、その時点でも、脳組織内では活発に free radical の消去機構が働いていることを示唆するものと思われる。

以上、L-band in vivo ESRによって、生体内に投与した free radical を in vivoで、その出現と消去の過程を追跡することができた。今後、さらに検出感度を上げ、スピントラップ剤の応用などを検討することにより、脳内の活性酸素や各種 free radical の発生消去の過程を追跡することが可能なシステムになりうるものと考える。

本発表を承認された会員外共同研究者、山形大学工学部 尾形健明、小野光弘、両助教授 鎌田仁名誉教授、日本電子(株)の古田栄久夫氏に感謝する。

[文献]

1)Froncisz,W., and Hyde,J.S.(1982)J.Magn.Reson.47,515-521
2)Brink,J.J.,and Stein, D.G.(1967)Science 158,1479-1480
3)Broadwell,R.D.,Salcman,M.,and kalpan,R.S.(1982) Science 217,164-166
4)Couet,W.R., Eriksson,U.G.,Tozer,T.N.,Tuck,L.D.,Wesbey,G.E.,Nitecki,D,and Brasch, R.C.(1984) Pharmacol.Res.,203-209
5)Couet,W.R.,Brasch,R.c.Sosnovsky,G.,and Tozer,T.N.(1985)Magn.Reson.Imaging 3,83-88

65. ESR による脳組織中の SOD 活性測定方法

平松　緑・枝松　礼・森　昭胤・光田慶一*・河野雅弘*
（岡山大・脳研・機能生化，日本電子・ESR 応用研*）

〔要　約〕

従来、superoxide dismutase(SOD) 活性の測定には、チトクロームC 法、NBT 法、エピネフリン法などが用いられてきたが、これらはいずれもO_2^-・発生系に発色反応を組み合わせた比色定量法である。今回我々は、ヒポキサンチン—キサンチンオキシダーゼ系で生成するO_2^-・をスピントラップ剤、 5-5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide に adduct して電子スピン共鳴(ESR) 装置により直接測定し、それを指標としてラット脳組織 7部位の細胞質上清中の SOD活性の測定を行った。その結果、大脳皮質、線条体、海馬、中脳、視床下部、橋・延髄、小脳の SOD活性は 6.4～36.0 unit/mg proteinであり、線条体が最も高く、次いで大脳皮質、視床下部の順であることがわかった。これらの値は NBT法による値とほぼ同じ値であった。 0.8～100 unit/ml の検量線の精度は約±5%であり、回収率は約100%であった。従来は比色定量のため、細胞質上清分画の透析が必要であったが、今回の我々のESR法では、透析の有無にかかわらず SOD活性に差異が認められなかった。

ESRによる組織中の SOD活性測定法は、O_2^-・を直接 ESRで捕らえるもので、操作も簡便であり、信頼性が非常に高いことが特徴である。

Key word :

ESR, SOD activity, rat brain

我々は、てんかん患者摘出焦点組織(6) 、E1マウス（自然発症てんかんマウス）脳、pentylenetetrazoleけいれん ddYマウス脳(5) 及びウサギ髄液(12)、鉄塩てんかん焦点組織(4,14)、てんかん患者髄液(3) などの生体試料中のチオバルビツール酸反応物質と電子スピン共鳴(ESR) 装置による過酸化ラジカル（・OOR)の分析結果から、けいれん発現機構には細胞膜上での活性酸素による過酸化ラジカル反応が関与していること(7) を明らかにしてきた。しかし、これらの知見をさらに明確にするためには、これらの試料中の superoxide dismutase(SOD)活性の変動を知ることが必要となる。

従来、脳組織中の SOD活性の測定には、チトクロームC 法、NBT 法、エピネフリン法などが用いられてきたが、これらはいずれもO_2^-・発生系に発色反応を組み合わせた比色定量法である。今回我々は、スピントラッピング法を用いて、ESR によりヒポキサンチン—キサンチンオキシダーゼ系で生成するO_2^-・を直接測定し、それを指標として脳組織中の SOD活性の測定とその検討を行った。

〔実験方法〕

1.実験動物: Sprague-Dawleyラット（雄、250g) を日本クレアより購入し、使用した。

2. SOD活性の測定: ラットを断頭後、脳を素早く摘出し、Glowinski & Iversen(2)の方法により、氷上で大脳皮質、線条体、海馬、中脳、視床下部、橋・延髄、小脳に部位別した。次いで、 9～45倍量の 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.8 で各脳組織をホモゲナイズし、105,000gで60分間、超遠心後、得られた上清を、0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.8を用いて、 4℃で一晩透析し、精製したフラクションを SOD分画とし、 SOD活性の測定に使用した。

ついで、試験管に 2mMヒポキサンチン50μl, 5.5mM DETAPAC 35 μl, SOD分画50μl,5-5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide(DMPO)15μl を加え、さらにキサンチンオキシダーゼ(XOD)50μl(0.272 unit/ml)を加えたのち、ミキサーで撹拌後、XOD 添加45秒後より ESR で DMPO-O_2^-・ adduct を分析した。検量線は SOD(Sigma, erythrocyte より抽出) を 0.8～100 unit/ml 用いて作成した。回収率の測定は、脳ホモゲネート 1ml (50倍のbufferで

希釈）に 2 unit/mlの SODを加えて、 SOD分画について行った。尚、 ESR測定条件は次の通りである: Field,3350±50 gauss; power, 8mW; Res, 0.5sec; Mod, 2 gauss; Temp, R. T.; Amp,3.2×1000;Sweep time,2 min;Std, MnO.



Fig. 1 ESR spectra of DMPO-O_2^-· in hypoxanthine-xanthin oxydase system. A. Without superoxide dismutase. B. With rat cortical fraction.

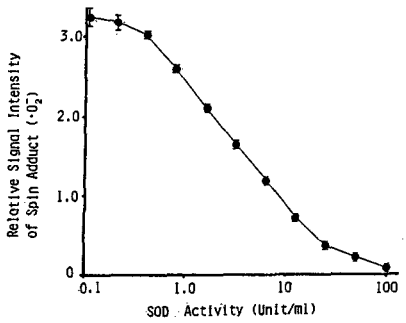


Fig. 2 Dose response curves of SOD activity.

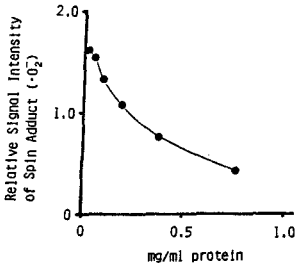


Fig. 3 Dose response curves of protein to SOD activity.

〔実験結果〕

図 1の Aは、ヒポキサンチン—XOD 系により生成したO_2^-· の DMPO adductを示しており、B は、ラット大脳皮質細胞質上清の SOD分画を加えたものである。図 1の Bでは明らかにDMPO-O_2^-· の signal は低下し、 SOD活性の存在が示された。

図 2は、SOD 0.8～100 unit/ml の検量線であり、各濃度の 5回の測定の平均値を示した。その精度は約±5%であった。図 3は、大脳皮質の SOD分画の蛋白量を変えた場合のSOD活性を示しているが、 SOD活性は蛋白濃度に依存していた。

Table 1. Effect of dialysis on SOD activity in rat brain

	Cortex	Striatum	Cerebellum	Hippocampus	Midbrain	Pons-medulla oblongata	Hypothalamus
Dialysis(-)	29.9±2.1 (10)	36.0±5.1 (10)	11.8±1.1 (10)	10.7±1.2 (10)	21.7±2.8 (10)	12.4±1.6 (9)	25.7±4.2 (10)
Dialysis(+)	24.7±1.8 (10)	31.6±4.2 (10)	11.7±1.0 (10)	8.3±0.9 (10)	18.4±2.7 (10)	12.4±2.2 (9)	24.8±4.6 (10)

The results are expressed as unit/mg protein. The values represent the means ± SEM with experimental numbers in parentheses.

表 1は、図 2の検量線を用いて計算した、ラット脳各部位での SOD活性である。細胞質上清での SOD活性は、ラット脳各部位で若干異なり、線条体で高く、次いで大脳皮質、視床下部の順であった。細胞質上清分画の透析を行わなかった場合には、 SOD活性は透析を行った場合に比べて大きな相違は認められなかった。細胞質上清分画での SOD添加回収率は約100%であった。

〔考察〕

SODは、生体内で産生するO_2^-・の最も重要な細胞内の消去酵素である(10)。特に最近では、O_2^-・はガン、心臓疾患、脳虚血、老化、炎症等の疾患の原因として重要視されている。これらの疾患においても生体内の SOD活性を測定することは、これら疾患の原因及び治療法の解明に重要である。従来、 SOD活性の測定には、キサンチン—XOD 系で発生するO_2^-・に発色反応を組み合わせた比色定量法が用いられてきた。今回用いたラット脳の細胞質上清分画は、Danh et al.(1)の方法に従った。そして彼らは NBT法を用いて SOD活性を脳 7部位で測定しているが、彼らの成績と我々の成績とはほぼ同じ値であり、又、線条体で少し高い値が示されているのも同じ傾向であった。その他、 NBT法(9) やチトクロームC 法(10,11,12)による脳内 SOD活性の値ともほぼ同じ値であった。しかし、これらの方法は比色定量によるため、 SOD分画の精製に透析を用いている。今回我々は透析の有無について検討した結果、 SOD活性は透析をしない方がむしろ高い傾向にあることがわかった。又、最近はトラップ剤も改良されたため、 SOD活性の測定に関して非常に高い再現性が得られている。

以上の点から、我々の ESRによる SOD活性の測定法は、従来の方法に比べて、O_2^-・を発色反応を介することなくO_2^-・を trap して ESRで直接測定するということ、及び SOD分画の透析という操作を必要としないということから、信頼性が非常に高く、かつ、より簡便な測定方法だと思われる。

〔参考文献〕

(1) Danh, H.C. et al. (1983) J. Neurochem. 40, 1003-1007. (2) Glowinski, J. and Iversen, L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669. (3) 平松 緑ら (1983) 脳研究会会誌 9, 112-113. (4) Hiramatsu, M. et al. (1984) Neurosciences 10, 281-284. (5) Hiramatsu, M. (1984) Neurochem. Res. 9, 1156. (6) 平松 緑ら (1984) NEUROSCIENCES 11, 208-209. (7) Hiramatsu, M. Folia Psychiat. Neurol. Jpn. in press. (8) Kellog, E.W. et al. (1976) J. Gerontol. 31, 405-408. (9) Ledig, M. et al. (1982) Develop. Brain Res. 4, 333-337. (10) McCord, J.M. and Fridvich, I. (1970) J. Biol. Chem. 245, 1374-1377. (11) Mizuno, Y. and Ohta, K. (1986) J. Neurochem. 1344-1352. (12) 白数明義ら (1984) NEUROSCIENCES 11, 206-207. (13) Vanella, A. et al. (1982) Gerontology 28, 108-113. (14) Willmore, L.J. et al (1983) Brain Res. 277, 393-396.

66. ラット大脳シナプス接合部に存在するタンパク質リン酸化酵素の特性

鈴木龍雄・田中　亮　　（名古屋市大・医・生化第一）

〔要　約〕

ラット大脳からシナプス接合部(synaptic junction, SJ)を単離し、そこに局在するタンパク質リン酸化酵素の特性について調べた。

1、Ca^{2+}/CaM−dependent protein kinase (CaM-PK)　Ca^{2+}, CaMに対するEC_{50}はそれぞれ1.0μM, 100nMであった。ATP に対するKmは150μM であった。SJ中の内在性基質として180K, 150K, 60K, 51K の主要タンパク質と、その他10種のminor タンパク質が存在していた。soluble form のCaM-PKの基質タンパク質に対するリン酸化能は弱く、むしろ内在性タンパク質を特異的にリン酸化した。またautophosphorylationによって酵素活性は低下し、soluble form酵素と同一特性が示された。

2、cAMP-dependent protein kinase (cAMP-PK)　SJ中のsynapsin I を特異的基質とすると考えられた。

3、Independent protein kinase (EGTA-PK)　SJ中にはcAMPやCa^{2+},CaM 非添加時にもタンパク質リン酸化活性がみられた。この活性はcAMP-PK のinhibitor を加えても抑制されなかった。EGTA-PKの特異的な基質として117Kと16Kタンパク質が考えられた。SJをあらかじめ内在するCaM-PKでリン酸化するとEGTA-PKの活性は上昇した。EGTA-PK活性の少なくとも一部はCaM-PKのautonomous form によると示唆された。

Key word :　synaptic junction, protein kinase, aotophosphorylation

脳SJ 画分には、現在、2 種のprotein kinase (cAMP-dependent,Ca^{2+}/CaM-dependent)の存在が知られている。CaM-PKはsoluble formとparticulate-associated formとが知られているが、後者は膜にゆるく結合したformとpostsynaptic density (PSD)に強固に結合したformとに分かれる(1)。この3者は物理化学的には、ほぼ同一のタンパク質と考えられている。今回は、まずPSD に結合したCaM-PKの特性をsoluble 酵素と比較して明らかにした。次いでSJ中にはcAMP, Ca^{2+}/CaM非存在下でもタンパク質リン酸化活性があることを示し、この酵素活性の特性を明らかにし、その酵素の本体(origin)について検討した。

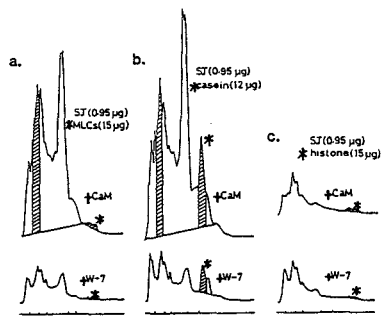


Fig. 1 Amounts of phosphorylation of exogenous proteins and comparison with that of endogenous substrates. Incorporation of ^{32}P into exogenous substrates and into 180k Mr protein in SJ were shaded.

[Methods]

SJはWistar rat大脳からCotmanとTaylorの方法(2)により調製し、20% glycerol を加えて-75℃に保存し、2カ月以内に使用した。タンパク質リン酸化の条件 :　Buffer, 0.1M MES-KOH (pH 7.0), 10mM $MgCl_2$, 0.5mM DTTとSJ protein(0.95-1.7μg/40μl). 必要に応じEGTA (0.5 or 1mM), $CaCl_2$ (0.25 or 0.5mM), CaM (0.44 or 0.59μM) を添加した。反応は25℃で通常1分間行ない、SDS電気泳動用bufferを加えて反応を止め、7-17%アクリルアミドゲルにて電気泳動を行ない autoradiography を行った。リン酸化量は、autoradiogram を densitometer でスキャンして半定量した。CaM, tubulin, MAP-2, τ-proteinは、ブタ脳から調製した。

[Results]

Ca²⁺/CaM protein kinase (SJ-CaM-PK)

SJ中にはCa²⁺/CaM 依存性のprotein kinaseとその基質タンパク質が存在していた。主要基質としては分子量180K, 150K,60K と51K のものがあり、60K と51K のものは、それぞれCaM-PKのβ, α-subunitと考えられた (1,3,4)。その他 minor な基質として約10種が存在していた。Ca²⁺とCaM に対するEC$_{50}$はそれぞれ1.0μM 及び100nM で、ATP に対するKmは150μM であった。SJ画分に添加したタンパク質(myosin light chains from chicken muscles [Sigma], casein, Arg-rich histone [Sigma], MAP-2, τ-protein, PC-tubulin) に対するリン酸化の程度は内在性タンパクのリン酸化に比べわずかであった。1mg あたりの ^{32}P の取り込み量で比べると、SJ中の180K タンパクへの取り込みを基準として、caseinでは1/25, 他のタンパクでは1/110 以下であった。SJ中のCaM-PK活性は、あらかじめCa²⁺/CaM 存在下でリン酸化反応を行なうことにより抑制された(図3)。

Independent protein kinase (SJ-EGTA-PK)

SJはcAMPやCa²⁺,CaM非存在下でもprotein kinase活性を有していた。この活性はcAMP-PKのinhibitorを加えても抑制されなかった。また、Ca²⁺を生理的レベルで変動させても、神経伝達物質(候補)など(Glu, Asp, Ach, concanavalin A)を添加してもkinase活性に変化は見られなかった。EGTA-PKでリン酸化されるSJ内在性のタンパク質の多くはSJ-CaM-PKの基質と一致していた(図4)。しかし16Kと117Kタンパクはリン酸化のtime course による解析から(図5) EGTA-PKの特異的基質と考えられた。EGTA-PKは外来性タンパク質(casein, MAP-2, τ-protein)もよくリン酸化した (図6)。brain soluble画分中にその基質タンパクを検索すると16Kのタンパク質が見つかった。このものと電気泳動上、同一移動度を示すタンパク質は、脳微小管標本中にもみいだされた。SJ proteinをCa²⁺,CaM 存在下であらかじめリン酸化した後EGTA過剰存在下でリン酸化反応を行うと、SJ各タンパクへの^{32}P取り込みは全般的に上がり、特にCaM-PK subunitに相当するバンド(60K,51K)と150K proteinへの^{32}Pの取り込みが著明に増加した。

[Discussion]

Ca²⁺/CaM-dependent Protein Kinase

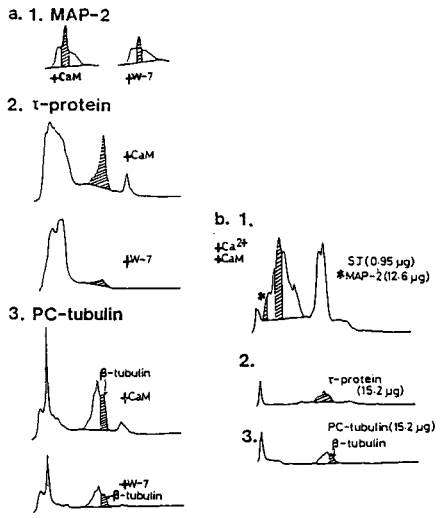


Fig. 2 Amounts of phosphorylation of microtubule proteins added exogenously and comparison with that of endogenous substrates. Incorporation of 32P into microtubule proteins and into 180k Mr protein in SJ is indicated by shaded areas. Top of the gel is left and bottom right.

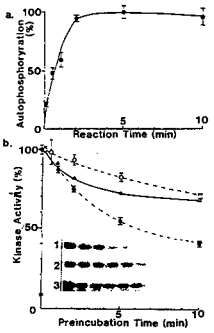


FIG.3. Effect of autophosphorylation on activity of Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase in SJ. a: Time course curve of autophosphorylation. The curve represents ^{32}P incorporation into mPSDp in the presence of $CaCl_2$ and CaM, and in the absence of exogenously added substrates. b: Change in kinase activity by autophosphorylation. After preincubation in the presence either of unlabeled ATP (0.1 mM) and $CaCl_2$, of $CaCl_2$ and CaM, or of unlabeled ATP (0.1 mM), $CaCl_2$, and CaM for the time periods indicated, portions of the enzyme solution (16 μl) were transferred into the second reaction solution which contained $CaCl_2$, CaM $\alpha_{s,1}$-casein, and [γ-^{32}P]ATP. The activity of the preincubated enzyme was defined as ^{32}P incorporation into $\alpha_{s,1}$-casein (12 μg). The degrees of ^{32}P incorporation into $\alpha_{s,1}$-casein were almost identical after 5-s preincubation under these three conditions. The effect of autophosphorylation (solid line) was calculated by subtraction of the effect of preincubation with $CaCl_2$ and ATP (upper dashed line) from that of preincubation with $CaCl_2$, CaM, and ATP (lower dashed line). The insets in (b) show ^{32}P incorporation into $\alpha_{s,1}$-casein after the periods of time of preincubation of SJ proteins in the presence either of $CaCl_2$, CaM and ATP (1), of $CaCl_2$ and ATP (2), or of $CaCl_2$ and CaM (3). The periods of preincubation are 5 s, 30 s, 1 min, 2 min, 5 min, and 10 min from left to right.

soluble formのCaM-PKは、broad substrate specificityを示すことが知られているが、SJ-CaM-PKもSJ中の多数のタンパク質をリン酸化した。これらの内在性タンパク質に対するリン酸化能に比べ、外来性タンパク質に対するリン酸化能は著しく低いものであった。このことからSJ中のCaM-PKへの外来性基質タンパクのaccessibilityが制限されていることが伺われた。SJ-CaM-PKは autophosphorylation によって活性が増加するという報告(5)があるが、今回の実験条件下では、活性は抑制され、soluble form CaM-PKと同様の特性を示した。またautophosphorylationによってSJにbindしたCaM-PKが soluble formになるということは見られなかった。

Independent Protein Kinase SJ中にもindependent PK活性が存在することが示された。SJ中の16Kと117Kタンパク質がこのkinaseの特異的基質であり、この酵素は外来性のタンパク質をもSJ内在性タンパクと同様にリン酸化することから、シナプス後部領域の細胞質成分をも基質とする可能性が示された。この基質タンパク質を検索した結果、微小管に付随すると考えられる16Kのタンパク質が見出された。この活性の由来としては 1)SJ中のindependent kinaseによる，2)SJ-CaM-PKのautonomous form(6)，3) 1)と2)のmixture，であると考えられる。今回の実験で、SJ-CaM-PKがautophosphorylationによりautonomous formになってEGTA-PK活性に寄与する可能性が示された。SJ中でCa^{2+}/CaM依存性のリン酸化が起きた時、Ca^{2+}非存在下でもCa^{2+}流入時と同じタイプのリン酸化が持続し、また微小管と関連する細胞質タンパク質のリン酸化が高まる点は、シナプス伝導効率の持続的変化や、synaptic plasticityとシナプス後部細胞骨格系との関連を考える上で興味深い結果である。

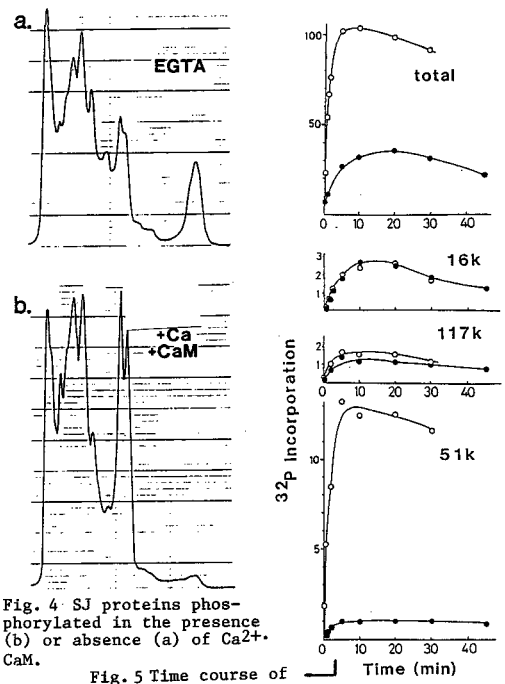


Fig. 4 SJ proteins phosphorylated in the presence (b) or absence (a) of Ca^{2+}. CaM.

Fig. 5 Time course of SJ protein phosphorylation. —○—, $+Ca^{2+}$.CaM; —●— EGTA(+++)

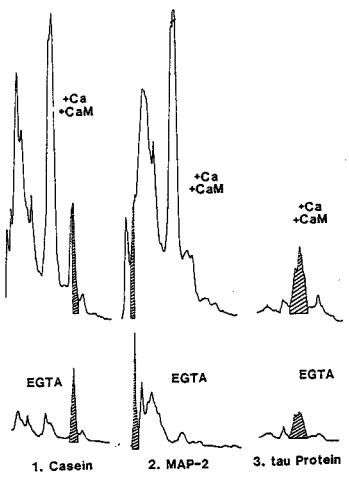


Fig. 6 Amounts of phosphorylation of exogenous proteins and comparison with that of endogenous substrates. Incorporation of ^{32}P into exogenous proteins were shaded.

[References]

1) Kelly,P.T., McGuinness,T.L., and Greengard P.(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 81,945-949

2) Cotman,C.W. and Taylor,D.(1972) J. Cell Biol.55,696-711

3) Kennedy,M.B.,Bennet,M.K., and Erondu,N.E.(1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80,7357-7361

4) Goldenring,J.R.,McGuire,J.S.Jr., and DeLorenzo,R.J.(1984) J.Neurochem.42,1077-1084

5) Shields,S.M.,Vernon,P.J., and Kelly,P.T.(1984) J. Neurochem.43,1599-1609

6) Miller, S.G. and Kennedy,M.B.(1986) Cell 44,861-870

67. 糖タンパクのウシ脳シナプトゾームへの取り込み機構

直井　信・青野景也・永津俊治（名古屋大・医・生化第一）

〔要　約〕

Aspergillus oryzaeより精製したβ-ガラクトシダーゼを一連のβ-アミノフェニルグリコシドで化学修飾し糖タンパクモデルとし、ウシ脳シナプトゾームへの取り込み機構を検討した。糖タンパクのうちβ-D-ガラクトシドにより修飾した酵素が選択的に取り込まれることが明らかとなった。取り込みはβ-D-ガラクトシドに対するリセプターを介することが速度論的解析とGM_1ガングリオシドによる阻害より明らかとなり、また取り込みは代謝阻害剤により阻害をうけた。取り込みはCa^{2+}イオンにより著しく増加し、pH 8.0 と 10 mM Ca^{2+}イオンの存在で最大の取り込みが見られた。Ca^{2+}-ionophoreであるA 23187により、β-ガラクトシダーゼの取り込みは細胞内Ca^{2+}濃度の増加と平行して濃度依存的に増加した。シナプトゾームへの取り込みはcalmodulin拮抗剤であるトリフロペラジンとW-7により著しく阻害され、Ca^{2+}-calmodulin-dependent protein kinaseの阻害剤であるジアゼパムによっても阻害が認められた。一方、dibutyryl cyclic AMPの添加によっては、取り込みは変化せず cyclic AMP-dependent protein kinaseの関与は否定された。これらの結果は、ウシ脳シナプトゾームにβ-ガラクトシドのリセプターが存在することと、この糖タンパクがCa^{2+}-calumodulin-dependent protein kinaseにより取り込まれることを示唆された。

Key word :
glycosylated β-galactosidase, brain synaptosomes, Ca^{2+}-calumodulin-dependent protein kinase

中枢ならびに末梢神経終末から神経成長因子(１)、細菌毒素(２、３)、レクチン(４)などがendocytosisされ逆行性に軸索輸送されることが知られている。これらのタンパクの神経終末への取り込みは細胞表面の特異のリセプターを介する機構によるとされている。一方西洋ワサビペルオキシダーゼ(５)、アルブミン、フェリチンなどは細胞表面には結合せず神経細胞へbulk or fluid endocytosisの機序により取り込まれることが知られている。しかし、これらendocytosisの機序の分子レベルでの解明は充分にされていない。これはタンパクの取り込みを定量的に取扱うことが困難であった為である。この為にウシ脳よりシナプトゾームを調整し神経終末のモデルとし、一連の糖誘導体で化学修飾したβ-D-ガラクトシダーゼをタンパクモデルとして、酵素活性を測定することで取り込みを定量的に分析することとした(６)。この方法により一連の糖タンパクモデルのうちβ-D-ガラクトシドにより修飾したもの(β-D-Gal　β-gal)が選択的に取り込まれることが分かり、今回その取り込みの機構を検討したので報告する。

〈実験材料及び方法〉

Aspergillus oryzaeより精製したβ-D-ガラクトシダーゼをp-アミノフェニルグリコシドと、water-soluble carbodiimideを用い化学修飾した(６)。ウシ脳より調整したシナプトゾームと10 mM Ca^{2+}を含有したphosphate-buffered saline(PBS), pH 7.4にてインキュベイトし、遠心し、1% Triton X-100を含むPBSにてシナプトゾームとを溶解しその中に取り込まれているβ-D-ガラクトシダーゼ活性を測定することで取り込みを測定した(６)。

〈結果〉

シナプトゾームと一連の糖タンパクとをインキュベイトし、取り込みを検討した所、Table 1に示すようにβ-D-Gal　β-galが選択的取り込まれることが明らかになった。この取り込みは、シナプトゾーム量に依存しかつβ-ガラクトシダーゼ量によることが分かり、更にβ-ガラクトシダーゼ量により飽和が見られ、Michaeles-Menten型のリセプターによる取り込みであることが明らかとなった。Km値は216±13 nMと得られ最大取り込み量は145±31 pmol/mgシナプトゾームタンパク/15分と得られた。またHill係数は約1と得られ、単一の結合組織によることが示唆された。更に、この取り込みは末端にβガラクトシド結合を有するGM_1-ガラクトシドにより拮抗的に阻害された。

Table 1

Uptake of β-galactosidase modified with p-aminophenyl glycosides into synaptosomes*

β-Galactosidase modified with	Uptaken β-galactosidase (pmol/mg of synaptosome protein)
p-Aminophenyl β-D-galactoside	113.0 ±11.3**
p-Aminophenyl α-D-galactoside	2.1 ± 0.2
p-Aminophenyl α-L-fucoside	2.5 ± 0.1
p-Aminophenyl β-L-fucoside	3.1 ± 0.2
p-Aminophenyl α-D-glucoside	0.9 ± 0.3
p-Aminophenyl β-D-glucoside	1.4 ± 0.3
p-Aminophenyl α-D-mannoside	2.5 ± 0.3
Native enzyme	1.1 ± 0.2

* Synaptosomes (0.75 mg protein) was incubated with the enzyme samples (500 pmoles) at 37 °C for 15 min, in the presence of 10 mM Ca^{2+}. The amount of enzyme incorporated was assayed as described under Materials and Method.

** Each value is the mean ± S.E.M. of 6 experiments.

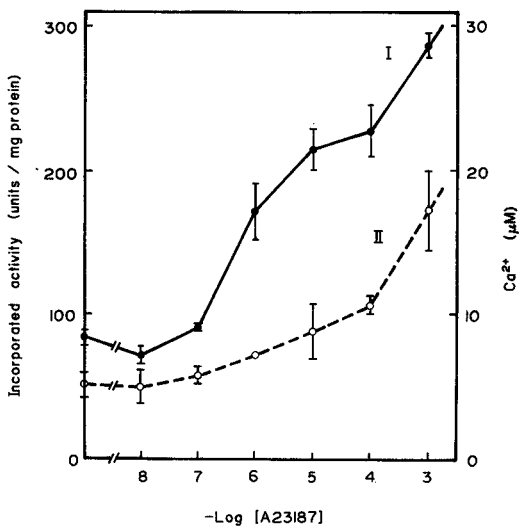


Figure 1. The effect of A23187 on β-D-Gal β-gal uptake into synaptsomes. The modified enzyme (500 pmoles) was incubated at 37°C with synaptosomes (1.2 mg protein). Curve I, the amount of the enzyme incorporated into synaptosomes; curve II, the Ca^{2+} concentration in synaptosomes, measured by use of Quin 2.

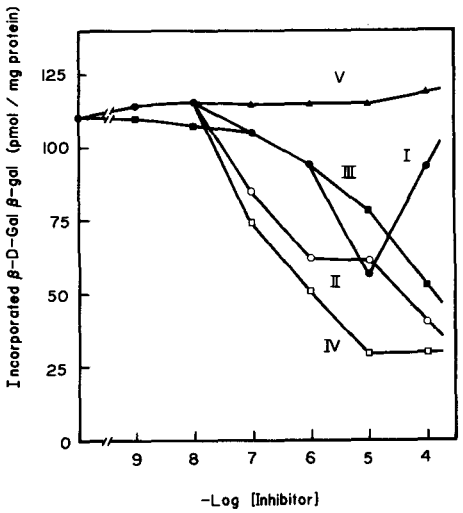


Figure 2. The effects of inhibitors on β-D-Gal β-gal uptake into synaptosomes. The modified enzyme (500 pmoles) was incubated with synatosomes (1 mg protein) in the presence of various concentrations of inhibitors: curve I, trifluoperazine; curve II, W-7; curve III, W-5; curve IV, diazepam; and curve V, dibutyryl cyclic AMP.

取り込みは、Ca^{2+}濃度に依存し、また、至適pHは、37℃において8前後であった。一方、4℃においては結合はpH3~4に至適pHを有した。Fig.1に示すようにCa^{2+}-ionophoreであるA23187の濃度によりβ-D-Gal β-galの取り込みは増大し、かつQuin-2を用いた細胞内Ca^{2+}濃度の定量によるとCa^{2+}濃度も平行して増大した。Ca^{2+}-依存性kinaseのうち、Ca^{2+}-calmodulin dependent kinaseの阻害剤であるトリプロペラジンとW-7により、1～10 μM の濃度で取り込みが阻害されることが明らかとなった。一方、cyclic AMPは1μMから1mMの添加によっても取り込みに影響しなかった(Fig. 2)。

〈考察〉

β-D-Gal β-galのシナプトゾーム内はの取り込みは、2つの機序からなっていることが上記の結果から明らかとなった。1つはシナプトゾーム膜への糖タンパクの選択的な結合である。分離シナプトゾーム膜と糖タンパクモデルとの結合の結果からも、β-D-ガラクトシドと結合するタンパクが膜に存在することが明らかとなっている(6)。この選択的な結合はGM_1-ガングリオシドによる阻害の結果から糖鎖部分の認識ということができる。

β-D-Gal β-galの細胞中の取り込みは、この結合とは異なった機構によることが、pHの影響などからも明らかとなった。更にCa^{2+}-イオンがこの結合には全く影響しないのに取り込みを著しく増加させたこと、選択的な阻害剤の影響から、Ca^{2+}-calmodulin dependent kinaseの関与が示唆された。このシナプトゾームと糖タンパクモデルを用いた系は、タンパクなどの高分子の神経終末の取り込みの機構を研究する一つの有効方法といえよう。

〈文献〉

1) Hendry, I. A., et al. ; Brain Res. 82, 117-128 (1974)
2) Price, D., et al. ; Suence 188, 945-947 (1975)
3) Joseph, K. C., et al. ; Proc. Natl. Acad Sci. USA, 75, 2815-2819 (1978)
4) Dumas, M., et al. ; J. Neurobiol. 10, 179-197 (1979)
5) Lavail, S., Hand Lavail, M. M. ; Science 176, 1416-1417 (1972)
6) Naoi, M. and Nagatsu, T. ; J. Neurochem. 46, 655-657 (1986)

68. 牛大脳皮質のゴルジ体；分離法と蛋白質燐酸化系について

宇佐美美穂子・門田朋子*・門田　健
（都精神研・神経化学，千葉大・医・解剖*）

〔要　約〕

1．牛、大脳皮質をWaringブレンダーで磨砕した後，ゴルジ体に豊む画分を分離した。
2．この画分で各細胞内小器官の標識酵素活性を測定すると，ゴルジ体標識酵素であるgalactosyl transferase およびsialyl transferase活性は各 13.2, 7.9 倍に濃縮されており，NADPH cyt. c reductase, CNPase, acid phosphatase, Na,K-ATPase, cyt. c oxidase, monoamine oxidase の活性は各 0.58, 0.22, 1.64, 0.52, 0.17, 0.35 倍であった。
3．この分画に含まれる蛋白質燐酸化活性を調べたところ，少くとも５種類以上の内在性蛋白質の燐酸化が認められ，分子量は各約 200.000, 115,000, 95,000, 70,000 ，および50,000であった。
4．この画分に含まれる燐酸化酵素は外から加えたホスビチン，ヒストン，カゼインを燐酸化した。
5．反応液中にヘパリンを添加すると分子量 115,000の内在性蛋白質とホスビチンの燐酸化は消失した。
6．この画分中にはcAMP依存性の燐酸化酵素が存在し、cAMPの添加により新たに分子量80,000付近に２本の燐酸化蛋白のバンドが出現した。Ca/calmodulin およびCa/phospholipid 依存性の活性は微弱であった。

Key word： brain cortex, Golgi apparatus, phosphorylation

既に私たちは牛脳よりcoated vesicleを分離精製し，これがcAMPやCa,calmodulin に依存しない２種類の蛋白質燐酸化酵素をそのコートの固有成分として含んでいることを報告した(8) 。coated vesicle は多くのホルモンや物質の受容体介在性endocytosis に関与していると報告されている細胞内小器官であるが，一方で新たに合成された糖蛋白質の細胞内輸送を行っていることも知られている(4) 。糖蛋白質は一般にゴルジ体で糖鎖付加が行われる。またcoated vesicleの固有蛋白質の抗体を使用した免疫化学的実験により，coated vesicleの蛋白成分がゴルジ体に存在することが証明されている(6) 。今回私たちはゴルジ体とcoated vesicleとの関係を明らかにするための一環として牛脳よりゴルジ体に富む画分を分離しその蛋白質燐酸化活性の性質について調べた。

実験方法

1．ゴルジ体の分離：牛脳をwaringブレンダーにて磨砕後、600g 10 分間遠心して得た上清画分をさらに3,000g 10 分間遠心して上清画分を採取した。この画分を38％ショ糖層上に重積して90,000g 45分間遠心した。サンプル層と38％ショ糖層間を採取し、0.32Mショ糖濃度まで稀釈し42％ショ糖層状にのせ5000g 15分間遠心し層間を採取した。

2．標識酵素活性の測定

（１） galactosyl transferase:ovomucoid を基質にしてAndersson(1)の方法で測定した。（２） sialyl transferase:asialo-α,-glycoprotein を基質にしてPaulson(8)の方法で測定した。

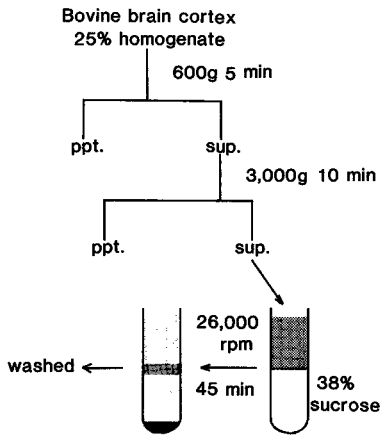


Fig. 1 Purification of Golgi apparatus from bovine brain cortex.

3．燐酸化活性の測定：20mMトリス－HCl(pH 7.0),5mM $MgCl_2$,6mM (6μM) [γ-^{32}P]ATP 存在下ゴルジ画分を30°Cでインキュベートし、TCA または SDS を添加して反応を停止した。燐酸化活性の検出は液体シンチレーションカウンターまたはSDS電気泳動にかけた後オートラジオグラフィーで行った。

結果と考察

昨年度本学会大会において私たちは牛脳からのゴルジ体の分離精製について報告した。既に多くの研究者によって指摘されているようにゴルジ体は細胞を破壊する条件や多くの操作を経るごとにこわれ，形状が異なって分離される。昨年度はテフロンホモジナイザーを用いたためかなり細かな構造として分離された。本年度はできるだけ全体像に近い形状で分離するためラット肝において加藤らが報告している(3) Waringブレンダーを使用して細胞をあらく壊す方法で行った（図１）。

Markers	Fractions				
	Homogenate	600 g sup.		3000 g sup.	
	SA	RSA	%	RSA	%
Galactosyl transferase	0.87 nmol/mg/h	2.27	20.8	2.42	19.3
Sialyl transferase	35.3 nmol/mg/h	1.35	11.4	1.81	10.1
NADPH cyt. c reductase	16.26 nmol/mg/min	1.32	11.3	0.81	9.4
Cyt. c oxidase	114.12 nmol/mg/min	2.32	23.8	1.61	19.3
Monoamine oxidase	35.82 U/mg	1.41	12.2	0.83	9.1
Na,K-ATPase	62.98 nmol/mg/min	0.65	5.1	0.35	3.2
CNPase	2.04 μmol/mg/min	0.26	2.2	0.15	1.2
Acid phosphatase	12.85 nmol/mg/min	1.54	13.2	1.33	12.1
Protein			8.6		7.6

Table 1 Distributions of subcellular markers in the fraction prepared by defferential centrifugation.

はじめの二段階で得られた画分について種々の細胞内小器官の標識酵素活性を測定したのが表１である。ゴルジ体酵素であるgalactosyl transferase, sialyl transferaseは3,000g上清画分でホモジネートの各 2.42, 1.8倍となっている。他の標識酵素活性はcyt. c oxidaseおよびacid phosphataseで各 1.61, 1.33 倍であった。ミエリン酵素はこの段階でかなり低くなっていた。図２はこの3,000g上清画分を38% ショ糖溶液上に層積し遠心分離を行った（図１）ときの標識酵素活性を示している。galactosyl transferase, sialyl transferase活性は共にサンプル層と38% ショ糖層間にホモジネートの活性の各 7.31, 5.8倍濃縮されており，ラット脳より分離したDeshmukhらの報告(2)(galactosyl transferase 6-7倍）とほぼ一致するものであった。

次にこの画分について燐酸化活性を測定した。ゴルジ画分をMg存在下 [γ-^{32}P]ATP とインキュベートすると燐酸のとりこみが生じる。図３はその用量および時間依存性を示している。使用した蛋白量（ 0-0.5mg）の範囲で、また 5分間までは直線性が得られた。さらにこの画分の燐酸化活性の性質について調べた。Mgイオンに依存して少くても５種以上の蛋白バンドが燐酸化され、それらの分子量は200,000, 115,000 950,000, 70,000, 50,000 であった（図４B lane ２）。またこの画分に存在する燐酸化酵素はホスビチン，ヒストンを強く燐酸化しカゼインもわずか燐酸化した（図４B lane ３－５）。ヘパリンを加えると 115,000の内在性蛋白質（図４B lane ６）およ

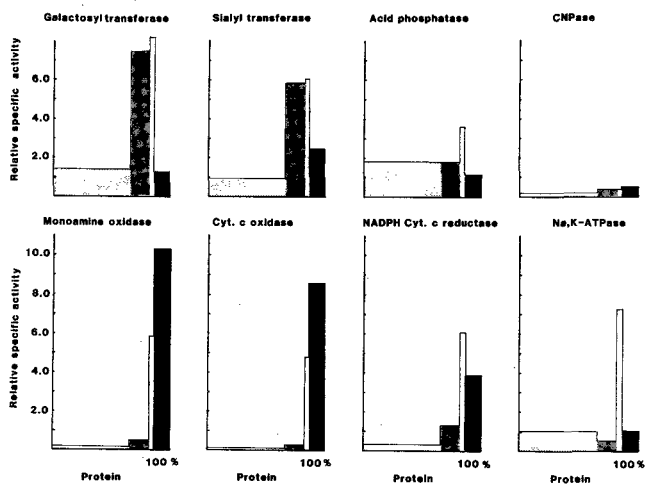


Fig. 2 The distributions of markers in fractions obtained by discontinous sucrose density gradient centrifugation. The subcellular fractions are: ▒, sample layer; ▓, interface region between the sample and 38% sucrose layer; ▒, 38% sucrose layer; ■, precipitate.

びホスビチンの燐酸化は消失した（図４B lane ７）。このことより脳の場合でも乳腺のゴルジ体で報告されている(9) casein kinase の存在が示唆される。次に燐酸化酵素のmodulator の効果をみた。cAMP添加により新たに分子量80,000付近に２本の燐酸化バンドが出現した（図５ lane ２）。この結果はこの画分中にcAMP依存性protein kinaseが存在することを示唆し、Niggら(5) がA-kinaseのregulatory subunitの抗体を使用してfibrobrastにおいて行った成績と一致するものであった。Ca/calmodulin およびCa/phospholipid 依存性の燐酸化酵素の存在も検討したが微弱で痕跡程度であった。

	Golgi Fraction RSA
Galactosyl transferase	13.20
Sialyl transferase	7.93
NADPH cyt. c reductase	0.58
Cyt. c oxidase	0.17
Monoamine oxidase	0.35
Na,K-ATPase	0.52
CNPase	0.22
Acid phosphatase	1.64

Table 2 Concentrations of markers in the Golgi enriched fraction.

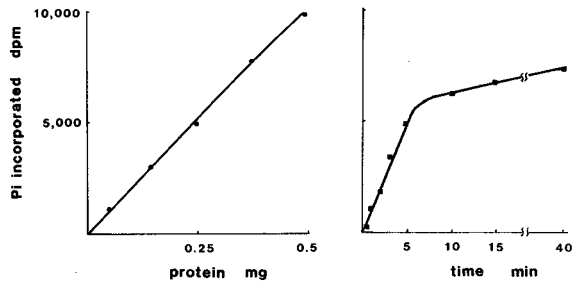


Fig. 3 The dose and time dependency of phosphorylation of Golgi enriched fraction.

このゴルジ画分には燐酸化酵素活性が存在することが判明したが coated vesicle 中に含まれるものとの異同は今後の問題である。

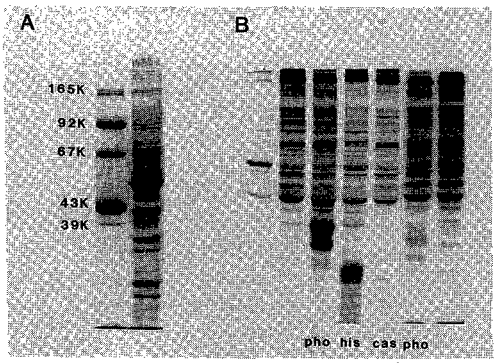


Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of proteins and autoradiographs of phosphorylated proteins of Golgi enriched fraction. A. Coomassie blue stained gel lane. B, autoradiograph of the phosphorylated proteins.

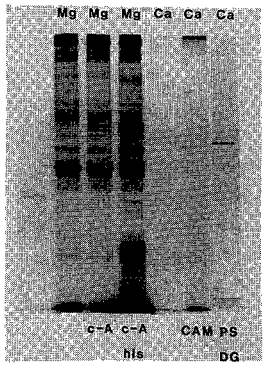


Fig. 5 Effect of various modulators. lane 2, cAMP; lane 3, cAMP and histone; lane4, calmodulin; lane 5, phosphatidylserine and diolein.

参考文献
1. Andersson, G.N. and Eriksson, L.C. (1981) J. Biol. Chem., 256, 9633-9639 2. Deshumukh D. S. Bear, W.D., and Soifer, D.(1978) Biochim. Biophys. Acta, 542, 284-295 3. 加藤敬太郎、辻宏 (1974) 蛋白質核酸酵素，生体膜実験法，258-267 4. Kinnon, C., and Owen, M.J.(1983) J. Biol. Chem., 258, 8470-8476 5. Nigg, E.A., Schafer, G. Hilze, H., and Eppenberger, H. M. (1985) Cell, 41, 1039-1051 6. Orci, L., Ravazzola, M., Louvard, D., and Perrelet, A, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 5385-5389 7. Paulson, J. C., Beranek, W.E., and Hill, R. L.,(1977) J. Biol. Chem., 252, 2356-2362 8. Usami, M., Takahashi, A., and Kadota, K.(1984) Biochim. Biophys. Acta, 798, 306-312 9. West, D.W., and Clegg, R.A.,(1983) Eur. J. Biochem., 137, 215-220

69. マウス微小管結合蛋白質（MAP2）の精製及び局在性について

新延道夫・宮本　歩・稲生英俊・塩田千代・前田信明
御子柴克彦　（大阪大・蛋白質研）

〔要　約〕

ddYマウス脳組織の50%ホモジネートを100,000×g，60分遠心して得られた上清をShelanskiらの方法(1)に従がって、2回重合、脱重合して得られたTubulin画分について熱処理を行ない遠心した上清を硫安を用いて濃縮したのち、Bio Gel A5mで、ゲル濾過を行なうことによりMAP2を精製した。精製したMAP2はSDSポリアクリルアミド電気泳動（SDS PAGE）及び等電点ディスク電気泳動にて単一バンドを示し、分子量30万、等電点4.5であった。

また、P−celluloseを用いて精製したTubulin画分に関する本蛋白質の重合促進活性について調べたところ、濃度依存的に重合を促進することが認められた。つぎに、本蛋白質に対する家兎抗血清を用いて、本蛋白質のマウス小脳における局在性を免疫組織化学的手法により調べたところ、プルキンエ細胞の樹状突起が強く染色されたが、プルキンエ細胞体、グリア細胞は染色されなかった。一方、プルキンエ細胞の樹状突起形成異常と棘突起欠失を示すStaggererミュータントマウスではプルキンエ細胞体に強い染色が認められた。以上の結果から、本蛋白質がプルキンエ細胞体で合成され、樹状突起形成に伴なうTubulinの重合に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Key word：Microtubules associated protein 2（MAP2）Purkinje cell
Staggerer mutant mouse

〔目　的〕

微小管は細胞骨格成分として細胞の運動、形態全般を支配する重要な蛋白質であり、特に脳ではニューロンの形態形成に重要な役割を果たしている。この微小管の重合に不可欠な因子が微小管結合蛋白質であり、現在、数種類の本蛋白質の存在が明らかにされているが、それぞれの成分の蛋白質化学的性質、細胞内調節機構については不明な点が多い。我々は今回、微小管結合蛋白質であるマウスMAP2について、ニューロンにおける機能を調べる目的で精製を行ない、その蛋白質化学的性質について検討を加えるとともに、特異抗血清を用いて、小脳における局在性を正常マウス及び小脳形態形成異常を示すStaggererミュータントマウスで比較検討したので報告する。

〔実験方法〕

1. MAP2の精製：ddYマウス脳をBuffer A（100mM Mes, pH 6.4、1mM EGTA, 1mM GTP、0.5mM $MgCl_2$、1mM leupeptin）を用いてホモゲナイズした。その100,000×g、60分遠心して得られた上清に、等量のBuffer B（Buffer Aに最終濃度8Mになるようにグリセロールを添加）を加え、37℃、30分インキュベーションを行なったのち、100,000×g、30分、30℃で遠心することにより重合したTubulin pelletが得られる。つぎに、このpelletをBuffer Aを用いて、氷冷下にて可溶化したのち、100,000×g、60分遠心して得られた上清について、再びBuffer Bを加えて、37℃、30分、インキュベーションすることによりTubulin画分が重合する。このようにして、重合、脱重合を2回繰り返すことにより得られたTubulin画分を0.75M NaCl、2mM DTT存在下、10分間boilingしたのち遠心を行なうとMAP2が上清に回収される。この上清について、最終濃度60

%になるように硫安を加え、遠心して得られたpelletを少量のBuffer（100mM Mes, pH6.4、1mM EGTA、0.1mM EDTA、0.1mM GTP、1mM β-mercaptoethanol、0.5mM $MgCl_2$、0.75M NaCl、1mM leupeptin、0.1mM PMSF）に溶解したのち、同Bufferで平衡化したBio Gel A 5mを用いてゲル濾過を行なった。最初に出現するピークがMAP2である。

2. 重合活性の測定：MAP2によるTubulinの重合促進能はGaskinら(2)の方法に従がって、37℃における濁度上昇の初速度を380nmで測定することにより行なった。

3. 免疫組織化学：家兎に免疫することにより得られた精製MAP2に対する抗血清を用い、正常及びStaggererミュータントマウス小脳を4%パラホルムアルデヒト固定、パラフィン包埋後、4μmの切片を作製したのち、3，3′diaminobenzidine（DAB）をchromogenとしたAvidin Biotin peroxidase Complex法（ABC法）により染色し、光顕的に観察した。

4. Western blotting：Laemmliの方法により、5%ポリアクリルアミド濃度でSDS PAGEを行なったのち、ゲル中の蛋白質を常法通りニトロセルロース膜に転写し、ABC法を用いて抗原を検出した。

5. その他：Bio Gel A 5mを用いて精製したMAP2のSDS PAGEはLaemmliの方法により、3.75−12.5%のグラジエントゲルを用いて、還元及び非還元下で行なった。また、等電点ディスク電気泳動は4%ポリアクリルアミドゲル、pH range 3.5−10の両性担体を用い、常法通り行なった。

〔結果と考察〕

図1はBio Gel A5mを用いて精製したMAP2のSDS PAGE像である。還元、非還元下において泳動像に変化が見られず、一本鎖であり、分子量30万であった。また、図2は等電点ディスク電気泳動像を示しており、SDS PAGE同様、単一バンドを示し、等電点4.5の酸性蛋白質であることを明らかにした。図3は精製MAP2のin vitroにおけるTubulin重合促進能について調べたものであるが、濃度に依存した重合促進能が観察され、分子量の結果なども併せて、本蛋白質がマウスMAP2であると同定した。

つぎに、本蛋白質の脳組織内分布を免疫組織化学的手法により調べる目的で、Bio Gel A5mを用いて精製した試料を抗原として家兎に免疫することにより抗血清を得た。図4は得られた抗血清の特異性をWestern blotting法により調べたものであるが、lane 3及び4に見られるように、本抗血清がMAP2に特異的であることが認められた。このようにして得られた抗血清を用いて、まず、正常マウス小脳組織について、ABC法によりMAP2の局在を調べたところ、プルキンエ細胞の樹状突起に強い染色が見られたが、プルキンエ細胞体及びグリア細胞に対する染色性は認められなかった（図5a）。この結果は、ラットを用いたMatusら(3)の報告と一致しており、MAP2がプルキンエ細胞の樹状突起における微小管形成に重要な役割を果たしているものと考えられる。つぎに、プルキンエ細胞の樹状突起形成異常と樹状突起上に棘突起がないために顆粒細胞の平行線維とのシナプス形成が出来ないStaggererミュータントマウスにおいてMAP2がどのような局在状態にあるか調べたのが図5bである。図を見て明らかなように、プルキンエ細胞体とわずかに伸びている樹状突起が強く染色された。この結果は、正常マウスではMAP2が細胞体で合成されたのち、突起形成の過程に関与したTubulinの重合を特異的に促進するために、結果的に樹状突起が強く染色されたものと考えられ

るが、Staggererミュータントマウスでは、樹状突起形成不全のために、合成されたMAP2が細胞体内にとどまった状態にあるものと考えられる。しかしながら、樹状突起形成のsignalがMAP2であるのか、あるいは別の因子が介在するのかどうかの問題については現在のところ全くわかっておらず、小脳特異的P400蛋白質との関連において今後の興味ある課題である。

〔文　献〕

1) Shelanski, M.L, et al. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70:765-768

2) Gaskin, F. et al. (1974) J. Mol. Biol. 89:737-758

3) Matus, A. et al. (1983) Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol XLVIII:775-782

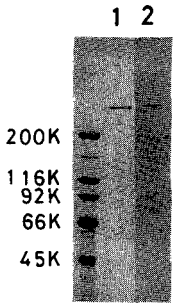


Fig. 1
SDS PAGE of the purified MAP 2. Lane 1 and 2 show the electrophoretic patterns in the absence and presence of 2-mercaptoethanol, respectively.

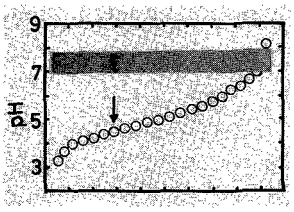


Fig. 2
Polyacrylamide gel isoelectrophoresis of the purified MAP 2.

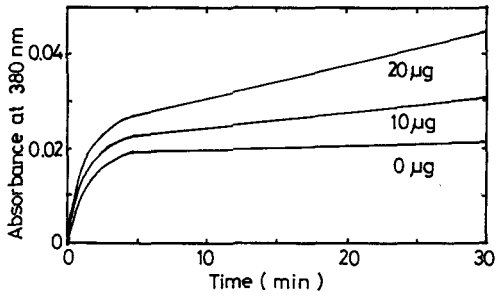


Fig. 3
Time course of tubulin polymerization in the presence of the purified MAP 2.

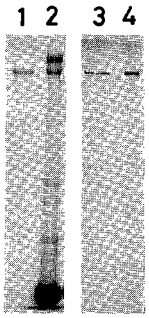


Fig. 4
Immunoblotting of MAP 2. Each left and right two column shows the protein staining and the immunostaining, respectively.
Lane 1 and 3 : purified MAP 2
Lane 2 and 4 : crude tubulin fraction

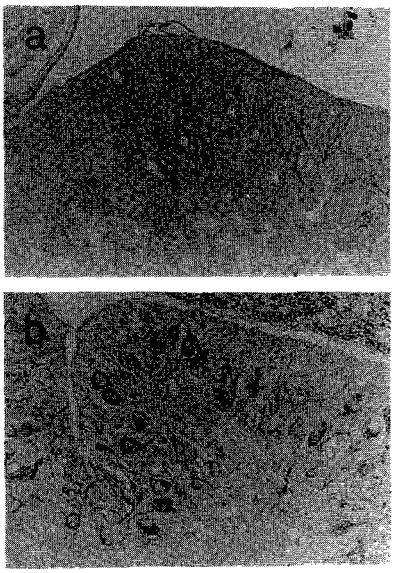


Fig. 5 Immunostaining analysis on the localization of MAP 2 in mouse cerebellum (x400)
a : control mouse
b : staggerer mutant mouse

70. 軸索内チューブリンにみられる二つの存在様式ー軸索内輸送との対応ー

田代朋子・小宮義璋・黒川正則（東京大・医・脳研・生化）

〔要　約〕

1．ラット脊髄後根神経節ー坐骨神経知覚繊維、及び、脊髄前角ー坐骨神経運動繊維の系を用いて、軸索内を輸送される細胞骨格蛋白を放射標識した。低温下、1% Triton で抽出すると、約 30%の軸索内チューブリンが、低温不溶性分画に回収される。低温可溶性分画がα-、β-チューブリン及び微小管附随蛋白（MAPs）から成るのに対し、不溶性分画にはα-チューブリンおよび、MAPsは検出されない。

2．軸索内を輸送されるチューブリンには、ニューロフィラメント蛋白（NF 蛋白）とともに輸送される遅い成分と、これより速い独立の成分とが存在するが、低温不溶性チューブリンは遅い成分に多く見られる。

3．放射標識後、経時的に神経を摘出し、その低温Triton可溶性分画より Taxol法によって微小管を単離してMAPsの軸索内輸送を調べた。軸索内MAPsはいわゆる高分子量MAPsを含まず、主としてτ因子に属する。MAPsは速い輸送には検出されない。

4．以上の結果から、微小管を形成する可溶性チューブリンは，移動する dynamic state に対応し、不溶性チューブリンはNF蛋白とともに構造に組み込まれたstable state に対応すると考えられる。

Key word： tubulin, axonal transport, microtubule-associated proteins

軸索内微小管は、微小管附随蛋白（MAPs）の種類、低温やカルシウムに対する安定性などの点で、一般の細胞質微小管と異なることが明らかとなり、機能との関連で注目されている（1,3,4,8）。我々は、軸索内輸送の解析から、軸索内チューブリンが、ニューロフィラメント蛋白（NF蛋白）とともに輸送される遅い成分と、これより速い独立の成分の二成分から成ることを見出している（9）。今回、更に、軸索内に多量に存在する低温Triton不溶性チューブリンと、可溶性チューブリンを比較すると共に、MAPsの軸索内輸送を調べることにより、輸送上の二成分との対応を明らかにした。

＜方法＞

軸索内輸送による蛋白の放射標識：（A）ラット（7週齢、雄）の第4腰髄（L4）神経節に L-[^{35}S] メチオニン 30-40uCi(0.25ul) 或は [^{32}P]リン酸 50uCi(0.25ul)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。数時間ー数週間後に坐骨神経、L4神経節、L4後根を摘出し、3-6mm の連続切片に切断して、各切片中に含まれる標識蛋白をSDS 電気泳動（6）及び二次元電気泳動（7）により分析するとともに、一部はTriton抽出を行なった。電気泳動後、フルオログラフィー（2）により標識蛋白を検出した。（B）大量の標識細胞骨格蛋白を得る目的には、ラット（4週齢、雄）の脊髄前角ー坐骨神経運動繊維の系を使用した。

神経小片の低温Triton抽出：エアーハンマーを用いて標識神経小片を凍結破砕した後、1% Triton X-100、50mM Tris(pH 7.5)、25mM KCl、10mM $MgCl_2$、5mM EGTA、5mM β-メルカプトエタノールを含む抽出液でホモジェナイズした。2M蔗糖を含む抽出液を等

容加え、100,000g、2時間遠心して、低温Triton不溶性分画と可溶性分画を得た。可溶性分画は、透析後、BioBeads SM-2 樹脂(BioRad 社)を用いて大量のTritonを除去して(5)凍結乾燥した。

神経抽出液からの微小管単離：(A)凍結破砕した神経小片を、低温下、1% Triton X-100、0.1M PIPES(pH 6.9)、0.5mM $MgCl_2$、1mM EGTA、0.1mM GTP (Triton 含有重合用緩衝液)でホモジェナイズし、100,000g、1時間遠心して抽出液を得た。BioBeads SM-2 を用いて抽出液中のTriton濃度を下げた後、最終濃度 1mM GTP, 20uM Taxol とし、37℃、30分反応させた(10)。30℃、100,000g、30分の遠心により、重合した微小管を沈澱として回収した。(B)神経小片をTritonを含まない重合用緩衝液で抽出し、フォスフォセルロース(PC)カラムで精製したラット脳チューブリンを加え、最終濃度4M Glycerol 中で 37 ℃、30 分反応させた後、重合した微小管を遠心分離した。

[^{32}P]標識脳 MAPs：[^{32}P]リン酸 50uCiを脳室内投与 3時間後の脳より温度依存重合脱重合で微小管を単離した後、PCカラムを通してチューブリンと MAPs に分離した。

＜結果と考察＞

低温可溶性及び不溶性チューブリン

低温で脱重合し可溶化される一般の細胞質微小管と異なり、軸索内チューブリンの30% 程度は低温不溶性の状態で存在する。低温可溶性及び不溶性分画の構成を比較すると、通常のα－チューブリン数種とβ－チューブリン数種から成る可溶性分画に対して、不溶性分画には、α－チューブリンは殆ど検出されない(図 1)。

我々は既に、軸索内を輸送されるチューブリンは、NF蛋白とともに輸送される遅い成分と、これより速い独立の成分の二成分から成ることを示してきた(9)。遅い成分には、電気泳動上よく似た挙動を示すがチューブリンには属さない固有の蛋白 NAPが検出される。不溶性分画は、β－チューブリンの他にNF蛋白及び NAPを含み、遅い成分によく似た組成である。放射標識1週後及び2週後に、6mm の連続神経小片を各々低温Triton抽出して、二成分間における可溶性及び不溶性チューブリンの分布を調べると、遅い成分に不溶性チューブリンが多く存在することが明らかになった。

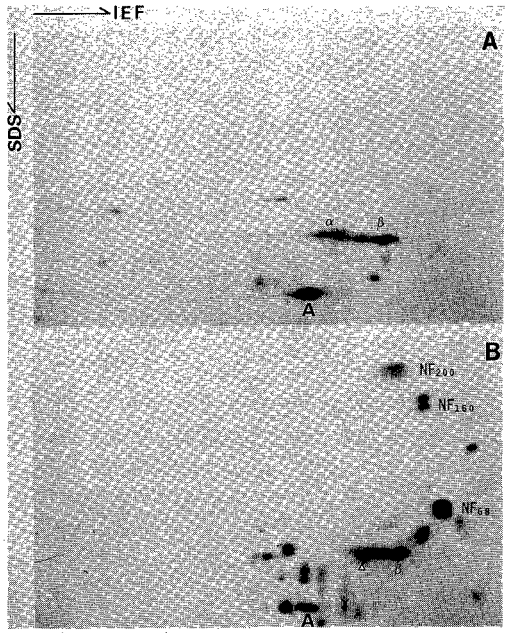


図 1. 低温Triton可溶性分画(A)と不溶性分画(B)。 α：α－チューブリン．β：β－チューブリン．A：アクチン．Δ：NAP.

MAPsの軸索内輸送

標識神経抽出液から Taxol法によって微小管を単離すると、図 2a に示すように、チューブリンの他に 32K、43K、68-70K、80K、100-110K の蛋白が含まれている。精製脳チューブリン(PC-チューブリン)と抽

出液を Glycerol 存在下に共重合して得られる微小管も同様の蛋白を含む（図 2b）。^{32}P 標識脳より得られるMAPs分画（図 2d）との比較から、68-70K蛋白はτ因子の一部と考えられる。チューブリンと重なる 55K付近にも、二次元電気泳動でτ因子に相当する蛋白が検出される。一方、脳微小管では主成分であるMAP2やその他の高分子量MAPsは、軸索微小管には検出されない。これは軸索内を輸送されるリン酸化蛋白全体（図 2c）との比較からも明らかである。

放射標識後の各時点で坐骨神経を摘出し、その標識微小管蛋白を比較すると（図 3A）、膜成分の流れである速い輸送（数時間後に検出）にはMAPsは含まれず、MAPsは総てチューブリンの輸送に伴って輸送されることが判明した。低温不溶性分画（図 3B）には、どの時点においても可溶性分画のMAPsに相当する蛋白は検出されない。

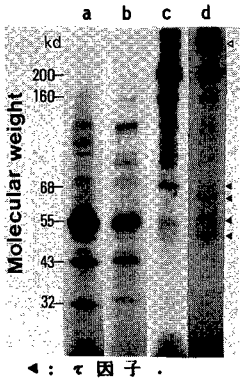


図 2. (a) 標識神経の低温Triton可溶性分画よりTaxol法で得られる微小管蛋白。(b) 可溶性分画と脳 PC-チューブリンをGlycerol法により共重合させて得られる微小管蛋白。(c)in vivoリン酸化された軸索内蛋白。(d) in vivo リン酸化された脳MAPs。◁：MAP 2. ◀：τ因子.

以上の結果から、可溶性チューブリンは、微小管を形成して dynamic state に対応し、不溶性チューブリンは、NF蛋白とともに構造に組み込まれた stable state に対応するものと考えられる。最も遅い標識チューブリンもNF蛋白と同じ速度で移動することから、stable state と dynamic state の間に相互変換が予測される。両者の分子構造を明らかにすることにより、軸索内細胞骨格の形成と調節に関する重要な知見が得られるものと期待される。

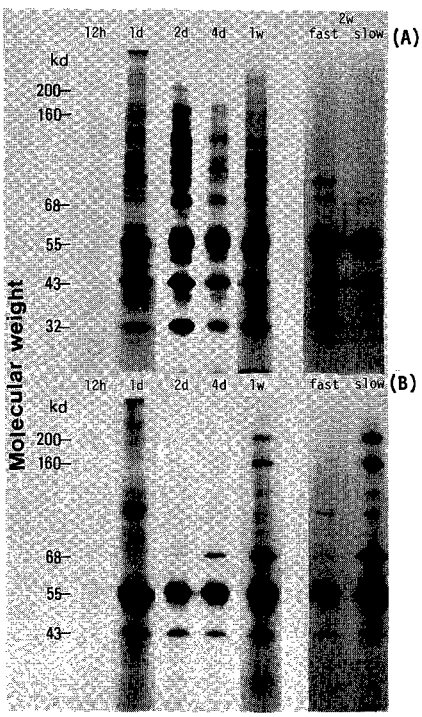


図 3. 放射標識後の各時点において (A)低温可溶性分画より Taxol法で得られる微小管蛋白。(B)低温不溶性分画に回収される蛋白。標識二週間後の場合は、NF蛋白とともに輸送される遅い成分(slow)と、これより速い独立の成分(fast)の各々について分析を行なった。

REFERENCES

(1) Black M.M., Cochran J.M. & Kurdyla J.T. (1984) *Brain Res., 295,* 255. (2) Bonner W.M. & Laskey R.A. (1974) *Eur. J. Biochem., 46,* 83. (3) Brady S.T., Tytell M. & Lasek R.J. (1984) *J. Cell Biol., 99,* 1716. (4) Heidemann S.R. et al. (1984) *J. Cell Biol., 99,* 1289. (5) Holloway P.W. (1973) *Analyt. Biochem., 53,* 304. (6) Laemmli U.K. (1970) *Nature, 227,* 680. (7) O'Farrell P.H. (1975) *J. Biol. Chem., 250,* 4007. (8) Peng I., Binder L.I. & Black M.M. (1986) *J. Cell Biol., 102,* 252. (9) Tashiro T., Kurokawa M. & Komiya Y. (1984) *J. Neurochem., 43,* 1220. (10) Vallee R. B. (1982) *J. Cell Biol., 92,* 435.

71. 小脳特異蛋白質（P_{400}）の精製と性質

前田信明・中平健祐・新延道夫・御子柴克彦
（大阪大・蛋白質研）

〔要　約〕

小脳に特異的な蛋白質であるP_{400}蛋白質をDDYマウス小脳から精製し、その構造解析を行なった。

小脳より、細胞下分画法によってP31画分を調製後、この分画を可溶化し、各種クロマトグラフィーによりP_{400}の精製を進めた。セファロースCL4Bによるゲル濾過で、純度、約70％にまでP_{400}を精製した。この分画をConAセファロースにかけ、P_{400}の約10％が結合型として回収された（ConA結合性P_{400}）。ConAに結合しなかった画分は、TSK DEAE-5PWにより精製した（ConA非結合性P_{400}）。

ConA結合性P_{400}と非結合性P_{400}は共に分子量250Kの蛋白質であるが、2次元電気泳動上で異なった位置にスポットを示し、また、V8プロテアーゼによるペプチドマップで、異なるパターンを示した。従って両者は異なる分子種であると考えられる。ConA結合性P_{400}について、エンド－β－N－アセチルグルコサミニダーゼF消化を行なったところ、ConA結合性は消失したが、分子量は、ほとんど変化せず、ごく少数のアスパラギン結合型糖鎖が結合していることが明らかとなった。

Key word：　P_{400} protein, neuron-specific protein, cerebellum

P_{400}は、小脳に特異的な分子量250Kの膜蛋白質であり、プルキンエ細胞に局在している（1, 2）。プルキンエ細胞が欠損しているnervousマウスやpcdマウスにおいては、P_{400}は、ほとんど見出されない（1, 2）。また、小脳の各層の蛋白質成分の分析により、分子層にもその局在が見られている(3)。プルキンエ細胞は存在するが、その樹状突起形成及び棘突起形成が悪く、顆粒細胞、プルキンエ細胞間のシナプスが形成されないスタゲラーマウスにおいても、P_{400}が見出されないことが知られている。正常動物の発生過程においては、プルキンエ細胞と顆粒細胞間のシナプス形成期に一致してP_{400}の発現量が増大することが知られている(2)。これらの結果より、P_{400}はプルキンエ細胞の細胞膜成分として、プルキンエ細胞の形態形成やシナプス形成に重要な役割を果たしていると考えられている。

P_{400}の性質については、Ca^{2+}非依存性にリン酸化されること(4)が知られているが、その解析はあまり進められていなかった。そこで、P_{400}の解析を進めたところ、以下の結果を得たので報告する。

〔方　法〕

(1)材料と細胞下分画

実験動物には、6週令のddYマウスを使用した。細胞下分画は、小脳を出発材料とし、Mikoshibaらの方法(2)に従って行なった。

(2) 2次元電気泳動

1次元目は、Hjelmelandらの方法(5)を修正した等電点電気泳動、2次元目は、Laemmliの SDS-PAGEにより行なった。

(3) ConA結合性蛋白質の検出

Shimizuらの方法(6)に従って、SDS－ポリアクリルアミド中の蛋白質をdurapore filter上に転写し、ConA、次いでhorseradish peroxidaseと反応させ、3, 3′－diaminobenzidineによる発色で、ConA結合性蛋白質を検出した。

(4) ペプチドマップ

Clevelandらの方法に従って、P_{400}をSDS－ポリアクリルアミドゲル中から切り出し、V8プロテアーゼにより分解し、15%SDS－PAGEによって分析した。

(5) エンド－β－N－アセチルグルコサミニダーゼF（エンドF）消化

P_{400}をSDS／DTTで変性後、Elderらの方法(7)に従って行なった。

〔結果と考察〕

(1) P_{400}の精製

P_{400}はTriton X－100に不溶のため、DDYマウスP31画分（Fig.1, a）を2%Triton X－100で処理し、全蛋白質の約50%を除去した画分を出発材料とした。これを可溶化後、セファロースCL4Bにかけ、純度約70%のCL4B画分を得た（Fig.1, b）。この標品をConAセファロースにかけたところ、P_{400}の内、約10%が結合し、0.5M α－メチル－D－マンノシド、及び、0.1M酢酸によって溶出された。α－メチル－D－マンノシドで溶出されたもののSDS－PAGEパターンをFig.1, cに示す（ConA結合性P_{400}）。ConAセファロースに結合しなかった画分については、TSK DEAE－5PWによるイオン交換クロマトグラフィーによって精製した（ConA非結合性P_{400}, Fig.1, d）。

(2) P_{400}の性質

ConA結合性P_{400}と非結合性P_{400}の性状の違いを解析する目的で以下の実験を行なった。CL4B画分（Fig.1, b）を2次元電気泳動により分析したところ、P_{400}には、等電点の異なる2成分が存在することが、判明した（Fig.2, a, Ⅰ, Ⅱ）。成分ⅠとⅡのどちらがConAとの結合性を有するかを調べたところ成分ⅠがConA結合性であることが明らかになった（Fig.2, b）。

次に、ConA結合性P_{400}と非結合性P_{400}をV8プロチアーゼ分解によるペプチドマップで比較したところ、両者は異なったパターンを示した（Fig.3）。従って、P_{400}には、ConA結合性、等電点、ペプチドマップの異なる2成分が存在することが判明した。

次に、ConA結合性P_{400}をエンドF消化することにより、アスパラギン結合型糖鎖含量を調べた。Fig.4に見られるように、エンドF消化によってConA結合性は失われるものの、分子量は、ほとんど変化せず、P_{400}に結合しているアスパラギン結合型糖鎖は、ごくわずかであることが判明した。

以上のように、P_{400}には構造の異なる2成分が存在するが、両者の機能及び局在性の相違については不明である。今後は、両者に対するモノクローナル抗体を作製し、機能及び局在性についての解析を進めていきたい。

〔文　献〕

(1) Mallet, J., Huchet, M., Pougeois, R., and Changeux, J.-P. (1976) Brain Res. 103, 291-312

(2) Mikoshiba, K., Huchet, M., and Changeux, J.-P. (1979) Dev. Neurosci. 2, 254-275

(3) Mikoshiba, K., and Changeux, J.-P. (1978) Brain Res. 142, 487-504

(4) Mikoshiba, K., Okano, H., and Tsukada, Y., (1985) Dev. Neurosei. 7, 179-187
(5) Hjelmaland, L.M., Nabert, D.W., and Chrambach, A. (1979) Anal. Biochem. 95, 201-208
(6) Shimizu, S., Ito, M., and Dean, J. (1982) Biochen. Biophys. Res. Commun. 109, 449-454
(7) Elder, J.H. and Alexander, S. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4540-4544

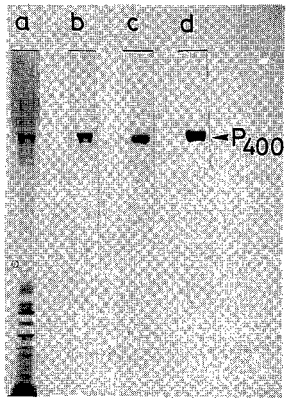


Fig.1. SDS-PAGE of P_{400} protein in the each purification step.
a, P31 fraction;
b, CL-4B fraction;
c, Con A-binding P_{400};
d, Con A-nonbinding P_{400}.

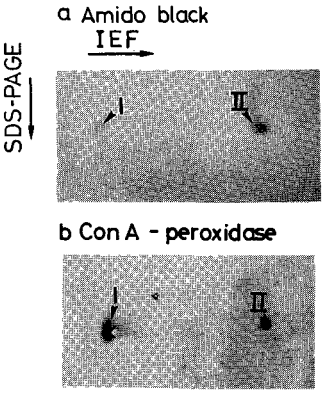


Fig.2. Two-dimensional gel electrophoresis of P_{400} protein.
a, amido black stain;
b, Con A-peroxidase-stain.

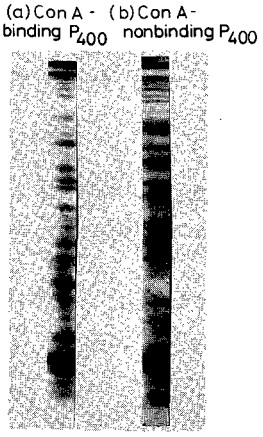


Fig.3. Peptide maps of P_{400} protein.
a, Con A-binding P_{400};
b, Con A-nonbinding P_{400}.

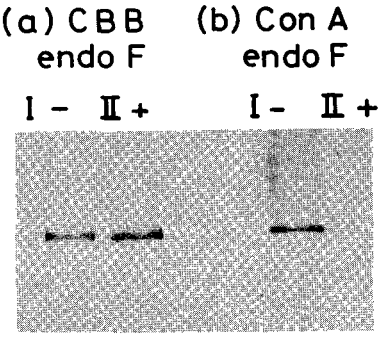


Fig.4. endo-F digestion of Con A-binding P_{400}
a, Coomassie brilliant blue-stain;
b, Con A-peroxidase-stain.
I, control;
II, enzyme-digested P_{400}.

72. ニワトリ脳のミエリン形成期に存在する他のミエリン塩基性タンパク（MBP_2）について

中嶋一行・今澤正興・宮本侃治

（国立神経センター・代謝研）

〔要　約〕

ニワトリ脳のミエリン塩基性タンパク（MBP）に分子量の異なる二種類の分子種を認めた。ふ化後10週ニワトリ脳のMBPは 18.5Kの分子種（MBP_1）がMBPのほとんどを占めるが、ミエリン形成初期のふ卵18日胚脳のミエリンにはMBP_1とともに分子量が1K程度大きい分子種（MBP_2）が存在し、後者の量比がかなり高いことを認めた。両MBPのタンパク化学的性質の類似点は多いが、MBP_2がメチオニル結合の選択的切断を行うBrCNにより分離され難い点と、それにより生じた断片のアミノ酸がMBP_1のものと一部異なることを認めた。ふ卵13日の胚脳の細胞培養を行い、MBP量およびCNP活性が培養30日の時点で、それぞれ約6倍および約4倍程度に増加し、200 ng/mg prot.と170 nmol/min/mg prot.という値を示した。このMBPは SDS-PAGEおよびMBP抗体を用いたイムノブロット法により、MBP_1およびMBP_2をともに含有することを認めた。

Key word： myelin basic protein (MBP), multiple forms, cultured cells

脳ミエリン塩基性タンパク（MBP）はミエリン構成タンパクの主要成分の一つであり、動物種により分子量的に多形性を示すことが知られている。ラット、マウスでは21.5K,18.5K,17K,14Kの４種類[2]が、ウサギ[1]、ヒツジ[3]では18.8Kおよび21.5Kが報告されている。ニワトリ脳においては従来18.5KのMBP_1のみが報告[5]されていたが、我々は、分子量が19.5K程度のMBP_2を認め[6]、両MBPを分離、精製し、両者のタンパク化学的性質を検討した。両MBPの性質の類似点は多いが、ブロムシアン（BrCN）分解の難易度の差およびアミノ酸配列の一部の差が存在することを認めた。このような分子量の異なるMBPの生成、機能については現在不明のままであるが、両MBPはミエリン形成期、および初代培養の脳細胞において認められた。

〔材料および方法〕

(1)材料：白色レグホンの有精卵を38.5℃、湿度90％の条件でふ卵した。またふ化後所定の期間人工飼料を用いて飼育した。

(2)ミエリンの調製：Nortonらの方法により各時期のニワトリ脳からミエリン画分を得、さらにCsCl密度勾配遠心法を用いて精製ミエリンを得た。ミエリンタンパクは前報[6]に従いミエリンをC-M処理後、酸抽出法により調製した。

(3)免疫沈降法：ウサギを用いて調製した抗MBP抗体を試料に加え、さらに第二抗体としてヤギ－抗ウサギIgG－Sepharose 4B conjugate を用いて沈澱させ、SDS－PAGEにより分析した。

(4)MBPのBrCN分解：各MBPを5％BrCN－70％ギ酸中で、30℃、24時間反応させた。分解産物の分離は逆相系カラム（Pro RPC HR 5/10,Pharmacia）を装備したHPLCにより行った。

溶出は0.05%TFAを含むアセトニトリルの勾配(0-27%)により行った。気相法シークエンサー(モデル470, Applied Biosystem, CA)によりアミノ酸分析を行った。

(5)ニワトリの脳の初代培養：ふ卵13日胚脳をミンスし、トリプシン処理を行い、ステンレスふるい(100メッシュ)を通過させ細胞混合物を得た。下記培養液を用いて3回洗浄後、ポリ-L-リジン(PLL)コートしたプラスチックシャーレに播種した。37℃、5%炭酸ガス-95%空気中で、5%ウマ血清、15mg/lグリシンを含むEagle's MEM 培地により培養し、培地の交換は3日毎に行った。

(6)SDS-PAGEおよびイムノブロット法：SDS-15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Laemmliの方法により行った。またMBPの免疫化学的検出はタンパクをTowbinら[7]の方法により、ニトロセルロースに転移させた後、抗MBP_1抗体と反応させ、さらに^{125}I-Protein A を使用しラジオオートグラフィーを行った。

〔結果および考察〕

(1)ニワトリ脳のミエリン塩基性タンパク：ふ卵18日胚脳(e-18d)およびふ化後10週のニワトリ脳(p-10w)を用い、得られた精製ミエリンのタンパクをSDS-PAGEにより分析した。p-10wでは18.5K(MBP_1)が量的にMBP野ほとんどを占めることが認められたが、ミエリン形成のごく初期であるe-18dではMBP_1とともに分子量のやや大きいMBP(MBP_2)の存在が認められた(Fig.1 A)。そこでMBP_1抗体を作製し、抗体に対するMBP_2の反応性を検討した。e-18dの精製ミエリン酸抽出画分に抗MBP_1抗体を加え免疫沈降を行い、MBP_1, MBP_2をともに検出した。そこでMBP_2もMBP_1とほぼ同程度に認識されることが推測された(Fig.1B)。

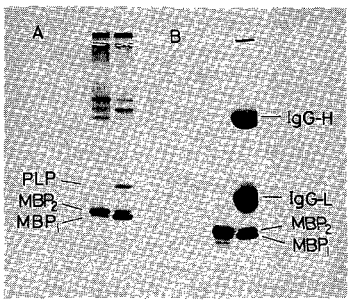


Fig.1 Chick Brain MBP
A. SDS-PAGE of proteins from the purified myelin (CBB)
1) myelin from the 18-d embryonic brain
2) myelin from the 10-w post-hatch chick brain
B. SDS-PAGE of the immunoprecipitated proteins from 18-d embryonic brain myelin
1) acid-extracted fraction after C-M ext.
2) immunoprecipitated proteins with anti-MBP serum

(2)MBP_2の分離、分解と断片の分析：逆相系カラムを使用したHPLCによりMBP_1およびMBP_2を分離、精製した。両MBPを種々の分解法を用いて分解パターンを検討し、Met結合の選択的切断を行うBrCN分解に対する反応性に差がることを認めた。方法に示したBrCN分解の条件によりMBP_1は完全に分解され、断片のPAGE分析により8Kと9Kの断片を生じたが,MBP_2は分解が不完全でMBP_1からの断片とは異なる7Kと12Kの断片を生じることを認めた。MBP_1からの8Kと9KおよびMBP_2からの7Kの断片をHPLCにより分離した(Fig. 2a)が、MBP_2の12K断片は未分解MBP_2との分離が困難であった(Fig. 2b)。N末端からのアミノ酸配列を検討し、Mendzらの報告[5]によるニワトリ脳MBPのアミノ酸配列と比較し、MBP_1の断片の配列は非常に類似したものであることを認めた。しかしMBP_2の7Kの配列はMBP_1の8Kおよび9Kのそれと一致せず、MBP_2のメチオニン残基を含む配列がMBP_1のそれと異なることが示唆された(Fig.3)。

(3)ニワトリ脳細胞の初代培養系におけるCNP活性およびMBP量の変動：培養細胞をラバーポリスマンにより剝し取りホモジナイズし、CNP活性およびMBP量の測定を行った。

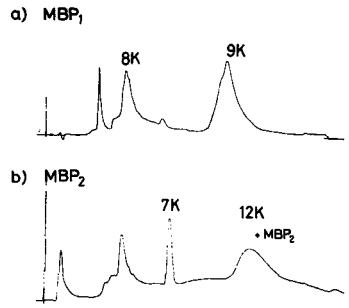


Fig.2 Separation of BrCN fragments with HPLC (Pro RPC HR 5/10)
a) MBP_1 ; b) MBP_2

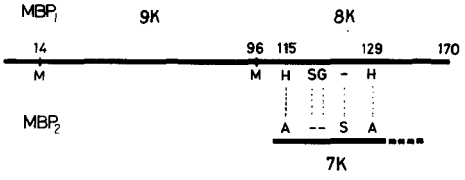


Fig.3 Amino acid sequence of the fragments from MBPs of the chick brain

ミエリン形成前のふ卵13日胚脳より得た細胞を培養すると、CNP活性は培養10日-20日目に増加し、培養30日で約170 nmol/min/mg prot.で、培養開始期に比し4～5倍に増加した。一方MBP含量も培養開始期に比し5～7倍に増加し、培養30日目で約200 ng/mg prot.であった(Table 1)。この値はふ卵20日胚脳から得たオリゴデンドロサイトの値と比較しうるものであった。前報[4]で17日ニワトリ胚脳より単離したオリゴデンドロサイト野培養ではMBPの増加が乏しいことを報告したが、今回、脳細胞の混合物を用い、やや変更した培養系によりMBPの増加が認められた。このことから培養液へのグリシン添加の問題、他の促進因子、他種細胞の影響などが考察されるため、現在検討中である。

ふ卵13日胚脳より調製された混合細胞を30日間培養した後、培養細胞を0.32M ショ糖によりホモジナイズし、0.85M ショ糖に重層、遠心を行い、いわゆる粗ミエリン画分を得た。そのままSDS-PAGEを行い、MBP_1抗体を用いたイムノブロット法により検出し,MBP_1とともにMBP_2の存在を認めた(Fig.4)。ミエリン形成の初期に当たる培養系においてもMBP_2が得られたことはミエリン形成期にMBP_1とともにMBP_2が何らかの役割をもつ可能性を示唆するものである。

Table 1. Changes in CNP activity and MBP content of the cultured cells from the chick embryonic brain

	CNP (nmol/min/mg prot.)	MBP (ng/mg prot.)
cells from 13-d embryonic brain (days in culture)		
0-d	43	30
30-d	174	200
Isolated oligodendrocytes from 20-d embryonic brain	313	270

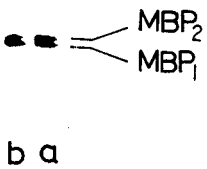


Fig.4 MBP_1 and MBP_2 in the cultured brain cells judged by immunoblotting
a) myelin from the 18-d embryonic brain ; b) myelin fraction from the cultured brain cells. Cells from the 13-d embryonic brain were cultured for 30 days.

〔文献〕1)Agrawal HC, Ravdle CL, Agrawal D (1981) J Biol Chem 256, 12243-12246: 2)Barbasese E, Braun PE, Carson JH (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74, 3360-3364 : 3)Carnegie PR, Dowse CA (1984) Science 223, 936-938 : 4)Kumagai H, Sato S, Imazawa M, Miyamoto K (1984) Bull Jap Neurochem Soc 23, 345-347 : 5)Mendz GL, Moore WJ, Carnegie PR (1982) Aust J Chem 35, 1979-2006 : 6)Nakajima K, Oizumi N, Imazawa M, Miyamoto K (1983) J Neurochem 41, s46B : 7) Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76, 4350-4354

73. ラット中枢神経組織と非神経組織におけるS100—αとS100—βのDevelopmental profiles

清水温子・加藤兼房　　(愛知県コロニー研・生化)

〔要　約〕

ラットS100蛋白質（以下S100）含有組織において、出生直後からの発育成長に伴うS100の消長を、S100α鎖とβ鎖を特異的に測定できる高感度イムノアッセイ法を用いて測定し、α鎖とβ鎖の変動を比較解析した。(1)中枢神経組織(CNS)では、出生時にすでにβ鎖の方が多く、とくに小脳や脳幹ではα鎖の10倍以上の高値を示した。CNS中のβ鎖は日齢が進むに従って増加し,一ヶ月齢では10倍以上に増加していた。しかし、α鎖の増加は3倍程にすぎなかった。(2)一方、検索した非神経組織（舌、心臓、下肢筋、胸骨剣状突起、脾、腎、肝）の中では、少なくとも生後一ヶ月齢までのラットでは、ほとんどがα鎖を多く含んでいた。しかし軟骨組織（胸骨剣状突起）ではβ鎖が優位を占め、そのα鎖とβ鎖の濃度はCNSのそれと類似していた。腎、心臓および脾ではα鎖の含量はβ鎖の10倍以上あり、以後一ヶ月間で3-10倍の増加を示した。成熟したラットの骨格筋（横紋筋）中には比較的高濃度でα鎖が存在するが、出生時の下肢筋や舌ではα鎖は低値で、β鎖の含量と同程度であった。しかしその後一ヶ月間でβ鎖は漸減するのに対し、α鎖は漸増する傾向を示した。肝のS100含量はもっとも低値を示したが、その大部分はα鎖であった。

Key word： S-100 protein, developmental profile, enzyme immunoassay

神経組織特異蛋白と思われていたS100[1]は単一成分ではなく、α鎖とβ鎖よりなる二量体で、少なくともS100ao(αα)、S100a(αβ)とS100b(ββ)の三種類の成分の混合物である[2]。我々は、CNS中に多量存在する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報告した[3]。最近では、心筋と骨格筋中に多量のαα型のS100が局在することを証明した[4,5]。さらに免疫組織化学的に、腎、唾液腺、汗腺、甲状腺、膵外分泌腺などにα鎖が局在することを明らかにしてきた[6]。このようにS100は神経組織に特徴的な蛋白質ではなく、類似のカルシウム結合蛋白であるカルモジュリンと同様、種々の組織細胞に広く分布することが明らかになってきた。しかし、神経組織をはじめ、これら組織におけるS100の生理的役割に関してはほとんど分かっていない。S100の生理的意義を追求する上で、これら各組織の発育分化過程におけるS100の挙動を知る必要があると考え、S100α鎖とβ鎖のラット組織内濃度を出生時から成熟期にわたって測定した。

（材料と方法）

S100α鎖とβ鎖の測定：α鎖あるいは、β鎖に対する精製特異抗体を用いたサンドウィッチ型エンザイムイムノアッセイ系にて測定した。β鎖の測定はすでに報告したウシS100bの測定系[7]を用いた。α鎖の測定には、今回新しく確立したヒトS100α鎖の測定系[8]を利用して行った。この測定系は、ヒト胸筋より純化したS100aoをウサギに免疫して得た抗血清から特異抗体を精製し、この精製抗体IgGのF(ab')$_2$フラグメントを結合したポリスチレン球（直径3 mm）と、大腸菌由来のβ-D-ガラクトシダーゼで標識した同じ抗体のFab'フラグメントよりなる測定系で、上記のS100bの測定系と同様、pgレベルの超微量のヒトあるいはウシS100aoの検出が可能である。両測定系は、α鎖

とβ鎖をもつS100aと20-25%との交叉性を示し、各鎖に特異的な測定系であった。α鎖の測定にはヒトS100aoを、β鎖の測定はウシS100bをスタンダードとして用いたので、測定値はヒトS100ao等価あるいは、ウシS100b等価である。

組織および抽出液の調製：出生後24時間以内、5日齢、10日齢、15日齢、20日齢、32日齢のウイスターラット（雌雄混合）を使用した。各組織は摘出後直ちに-20℃で凍結保存した。2-3日後に各組織は10倍量(vol/wt)の50 mM燐酸ナトリウム緩衝液中でホモジナイズし、20000 x g, 20分間の遠心上清を得た。この粗抽出液を適度に希釈してS100α鎖とβ鎖の測定系に加えた。

（結果）

測定結果を表1に示した。　ラット大脳では、S100βは出生時には平均19.8ng/mg solble proteinであったが、加齢にともない急激に増加して、一カ月齢では1,630ng/mgと出生時の80倍以上の値となった。一方、α鎖は出生時にはβ鎖の約1/3の7.5ng/mgで、一か月齢では23.3ng/mgと出生時の約3倍あった。

小脳と脳幹ではβ鎖は出生時にそれぞれ167ng/mg、241ng/mgとすでに高い値を示していた。一ヶ月齢では出生時の10倍以上の2,270ng/mg、2,830ng/mgとなった。α鎖は小脳、脳幹でそれぞれ出生時14.0ng/mg,17.7ng/mgとほぼ同レベルであった。一ヶ月齢では大脳同様、約3倍に増加した。

CNSのS100はα鎖、β鎖ともに一ヶ月齢では、さらに増加する傾向にあった。これらの結果、とくにβ鎖の動態はこれまで報告されているS100の発育曲線[9,10]とほぼ一致した。しかし、CNS中のα鎖のレベルは発育に伴う増加が少なく、一ヶ月齢でも低値であることがわかった。

一方、非神経組織の中で、軟骨組織である胸骨剣状突起は、脳幹、小脳に続いてβ鎖の含量が高く、出生時で103ng/mg、一ヶ月齢で20倍の2,250ng/mgとCNSと同レベルであった。α鎖は出生時4.9ng/mg、一ヶ月齢で65.6ng/mgと増加したが、β鎖の1/20以下であった。剣状突起ではS100の含量は、α、β鎖ともに20日齢をピークに以後はほぼ一定となった。

下肢筋では出生時から一ヶ月齢までは、α鎖は4ng/mgから7ng/mgの低い値を示した。β鎖も出生時はα鎖と同レベルの4.9ng/mg、ピーク時でも30.5ng/mgと低い値を示した成熟ラット骨格筋では、とくに赤筋中にかなりのレベルのα鎖が存在することから、一ヶ月齢以後にα鎖の増加がおこると思われた。

舌では出生時、β鎖は7.6ng/mg、α鎖は約2倍の13.6ng/mgであった。その後、α鎖は漸増し、一ヶ月で約3倍に増加するのに比べβ鎖は15日齢の31.8ng/mgをピークに減少した。

その他の非神経組織では、β鎖の含量はα鎖に比べ、きわめて低く、心臓、肝臓、腎臓ではβ鎖は1ng/mg以下、脾臓もβ鎖は2ng/mg以下であった。

心臓ではα鎖は出生時44.3ng/mgと比較的高値を示し、15日齢で約3倍の139ng/mgのピークに達し、以後減少した。β鎖はα鎖の1/100以下であった。

腎臓ではα鎖は出生時の10.6ng/mgから加齢とともに直線的に増加して、一ヶ月齢で10倍の106ng/mgとなった。β鎖は出生時から一ヶ月齢まで0.3ng/mg以下であった。成熟腎では、S100α鎖はおもに尿細管上皮細胞に局在することが知られている。脾臓や肝臓はS100の含量はきわめて低く、肝臓ではα鎖、3ng/mg以下、β鎖0.34ng/mg以下、脾臓ではα鎖が出生時2.73ng/mg、15日齢で10.3ng/mgに達し、以後一定の値となった。

（考察）

ラットの10種類の組織において、S100のα鎖とβ鎖の濃度変化を出生時より一ヶ月齢までにわたって調べたが、CNSと軟骨組織ではβ鎖が多く、組織の成長発育に伴って急増するのに対し、α鎖の応答は鈍かった。ところが他の非神経組織ではα鎖が優位で、腎などでは生後一ヶ月間で著しく増加する。この間、β鎖は低値を維持したままである。このようにS100のα鎖とβ鎖はまったく異なる組織分布を示し、それらの組織の分化に伴ってそれぞれのS100が増加することから、一見、α鎖とβ鎖が異なる生物活性を持つことを示唆しているようにも思える。しかし、ヒトやブタのCNSでは比較的α鎖含量が多いことなど、動物種間にわたったα鎖、β鎖の組織細胞種局在傾向は一定ではない。このようなS100の細胞種局在の多様性がいかなる生物学的意義を伴っているのか今後の研究課題である。

Table 1. DEVELOPMENTAL CHANGES OF CONCENTRATIONS OF S100-α AND S100-β IN THE CENTRAL NERVOUS AND PERIPHERAL NON-NERVOUS TISSUES

Age (days)	Concentrations (ng/mg) in: Cerebrum	Cerebellum	Brainstem	Xiphoid	Leg muscle
	S100-α				
0	7.5 ± 1.0	14.0 ± 3.3	17.7 ± 2.4	4.9 ± 1.7	4.2 ± 0.7
5	11.1 ± 0.9	14.4 ± 3.0	17.6 ± 2.2	12.6 ± 2.8	7.8 ± 1.7
10	13.6 ± 1.6	10.4 ± 1.3	21.3 ± 1.7	19.8 ± 6.2	5.1 ± 1.0
15	16.2 ± 1.1	18.3 ± 2.3	20.5 ± 1.5	45.9 ± 13.6	3.8 ± 0.9
20	19.2 ± 2.4	16.7 ± 2.1	22.6 ± 3.0	75.5 ± 18.1	4.6 ± 2.0
32	23.3 ± 1.4	32.2 ± 4.7	50.7 ± 14.9	65.6 ± 11.1	5.2 ± 1.4
	S100-β				
0	19.8 ± 3.6	167 ± 55	241 ± 30	103 ± 24	4.9 ± 0.8
5	66.4 ± 8.9	325 ± 46	522 ± 47	347 ± 84	30.5 ± 13.8
10	165 ± 20	450 ± 53	579 ± 90	1150 ± 852	22.9 ± 7.5
15	354 ± 84	1070 ± 260	1010 ± 90	1260 ± 1060	20.8 ± 9.2
20	627 ± 138	834 ± 106	1510 ± 380	3610 ± 670	12.8 ± 6.1
32	1630 ± 240	2270 ± 410	2830 ± 360	2250 ± 560	4.6 ± 2.5

Age (days)	Tongue	Heart	Kidney	Spleen	Liver
	S100-α				
0	13.6 ± 3.3	44.3 ± 4.5	10.6 ± 1.4	2.7 ± 0.6	0.7 ± 0.1
5	17.6 ± 2.8	51.5 ± 5.4	30.3 ± 2	6.2 ± 0.6	2.0 ± 0.3
10	19.8 ± 1.5	74.9 ± 8.3	42.9 ± 4.7	8.9 ± 1.0	3.0 ± 0.4
15	30.8 ± 3.0	139 ± 24	63.2 ± 9.7	10.3 ± 1.6	1.2 ± 0.1
20	33.5 ± 7.0	115 ± 8	75.3 ± 13.1	10.3 ± 2.1	1.4 ± 0.3
32	42.7 ± 5.5	87.3 ± 7.8	106 ± 17	10.4 ± 2.2	1.4 ± 0.2
	S100-β				
0	7.6 ± 0.8	0.17 ± 0.05	0.11 ± 0.04	0.20 ± 0.05	0.16 ± 0.01
5	13.8 ± 1.7	0.16 ± 0.04	0.25 ± 0.09	0.16 ± 0.04	0.34 ± 0.03
10	19.4 ± 2.0	0.32 ± 0.07	0.23 ± 0.01	0.33 ± 0.03	0.26 ± 0.03
15	31.8 ± 2.8	0.68 ± 0.14	0.28 ± 0.09	0.57 ± 0.08	0.18 ± 0.04
20	27.3 ± 2.2	0.78 ± 0.22	0.24 ± 0.06	1.14 ± 0.13	0.16 ± 0.02
32	22.0 ± 4.8	0.60 ± 0.12	0.27 ± 0.08	1.52 ± 0.10	0.15 ± 0.02

Mean ± SD of 5 rats

REFERENCES

(1) Moore, B.W. (1969) in Handbook Neurochem. (Lajtha, A. ed.) Vol. 1., pp. 93-99, Plenum Press, New York. **(2)** Isobe, T., Ishioka, N., Masuda, T., Takahashi, Y., Ganno, S. and Okuyama, T. (1983). Biochem. Int. 6, 758-764. **(3)** Suzuki, F., Nakajima, T. and Kato, K. (1982) J. Biochem. 92, 835-838. **(4)** Kato, K. and Kimura, S. (1985) Biochim. Biophys. Acta 842, 146-150. **(5)** Kato, K., Kimura, S., Haimoto, H. and Suzuki, F. (1986) J. Neurochem. 46, 1555-1560. **(6)** Haimto, H., Asai, J. and Kato, K. (1986) 75th Annual Meeting of Jap. Pathol. Soc. **(7)** Kimura, S., Kato, K., Semba, R. and Isobe, T. (1984) Neurochem. Int. 6, 513-518. **(8)** Kato, K., Haimoto, H., Shimizu, A. and Tanaka, J. J. Immunol. Methods submitted. **(9)** Haglid, K.G., Hansson, H.-A. and Ronnback, L. (1977) Brain Res. 123, 331-345. **(10)** Matsutani, T., Nagayoshi, M., Tamaru, M., Hirata, Y. and Kato, K. (1985) Neurochem. Res. 10, 1155-1172.

74. グリア繊維性酸性タンパク（GFAP）
—黄疸 Gunn ラット小脳における in vitro 分解様式について—

青野幸子・佐藤　浩・仙波禮治・柏俣重夫
（愛知県コロニー研・周生期）

〔要　約〕
二次元電気泳動法および抗グリア繊維性酸性タンパク(GFAP)抗血清を用いて，グリアフィラメントの主成分であるGFAPの分解ついて検討を行なった．遺伝的に高ビリルビン血症を示すGunnラットホモ接合体(jj)では，ビリルビンにより小脳低形成が誘発されるが，その低形成小脳では，対照のヘテロ接合体(j+)小脳に比べてGFAPの増加とともにその著しい分解がみられ，より低分子量で酸性側に分解産物を示すいくつかのスポットが現れた．GFAPはCa^{2+} 依存性thiol proteaseで分解されることが報告されているので，EGTAの抑制効果について検討を行なったが，ほとんどその効果はみられなかった．またthiol protease阻害剤であるleupeptin, E-64, serine protease阻害剤であるantipainのGFAP分解に対する影響を調べたところ，EGTA共存下ではいずれも分解抑制効果を示しほぼ一つのスポットに収束した．leupeptin とE-64ではEGTA非共存下で異なる泳動パターンが得られ，分子量50,000の位置にそれぞれ一つ，あるいは二つのスポットが現れた．3 mMのCa^{2+} を添加すると非常に著しいGFAPの分解が起こり，通常みられる分解産物の量的増加と共に，時としてより低分子側に新しいスポットがみられたが，やはりleupeptin で抑制された．以上の結果は，jj小脳では少なくとも二つのprotease，すなわちCa^{2+} 依存性・Ca^{2+} 非依存性thiol/serine protease がGFAPの分解に関与していることを示唆するものである．

Key word： Glial fibrillary acidic protein (GFAP), Degradation, Gunn rat

【序論】

遺伝的に高ビリルビン血症を示すGunnラット(7) ホモ接合体(jj)小脳では，プルキンエ細胞を始めとする神経細胞の障害がみられ(13)，神経細胞の指標タンパクであるγ-enolase (1)や，プルキンエ細胞に特徴的なP_{400} タンパク(11)，あるいはGR-250タンパク(8) の減少がみられる一方，アストログリアの肥大(11)，あるいは増殖がおきている(3) ことが示唆され，その指標タンパクであるS100b タンパクの増加もみられる(1).またグリアフィラメントの主構成成分であるグリア繊維性酸性タンパク(GFAP)(6) も顕著に増加していることが見出されている(3,12)が，今回は，GFAPの増加しているjj小脳を用いてGFAPの分解について検討を行なったので報告する．

【方法】

SD系Gunnラット(SDGR)(9,10)は，対照のヘテロ接合体(j+)小脳に比べて，jj小脳でGFAPの増加がみられる15日齢で用いた．断頭後，10 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.2)中で迅速にホモゲナイズし，105,000 x g で60分間遠心分離した．その沈澱を3% SDSで可溶化し，Aonoら(2) の方法で二次元電気泳動を行なった後，Towbin(16)らの方法に従ってニトロセルロース膜上にブロットした．ニトロセルロース膜上のGFAP抗原の位置は，抗GFAP抗血清を用いた免疫染色によって明かにした．protease阻害剤としてそれ

本研究の一部は，昭和61年度文部省科学研究費(No.61570480) および厚生省神経疾患研究委託費(No.85-14)の援助を受けた．

ぞれ，3 mM EGTA, leupeptin(thiol protease 阻害剤), antipain(serine protease 阻害剤), E-64(thiol protease阻害剤), phosphoramidon(metallo-protease阻害剤), pepstatin A(acid protease 阻害剤) を，またprotease促進剤として3 mM $CaCl_2$を用いた．EGTA以外のprotease阻害剤の濃度は120 μM とした．

【結果】

jj小脳ではj+小脳に比べてGFAPの増加とともにその分解が著しく亢進しており，より低分子量で酸性側にいくつかのスポットがみられた(Fig. 1)．GFAPの分解様式を探査するためには，jj小脳は非常に良い材料であると考えられたので，以下の実験はすべてjj小脳を用いて行なった．

GFAPは，Ca^{2+} 依存性thiol proteaseによって分解されることが報告されているので(4,5,14)，Tris-HCl緩衝液中にEGTAを加えたところほとんどその分解は抑制されなかった(Fig. 2A)．

EGTAとleupeptin を同時に加えたところ，若干の分解産物がみられたものの著しく分解が抑制され，ほぼひとつのスポットに収束した(Fig. 2B)．また EGTA とantipain あるいはE-64を加えたところ，程度の差はみられたもののやはりその分解は抑制された．しかし，EGTAとphosphoramidon，あるいはpepstatin A の場合では，GFAPの分解は抑制されなかった．

leupeptin だけを緩衝液中に添加したところ，低分子量側への分解は抑制されたものの，酸性側に新しいスポットが現れ，ほぼ同じ分子量をもつ二つのスポットに収束した(Fig.2C)この酸性側のスポット出現の由来を明かにするために，Tris-HCl緩衝液中にleupeptin と同時に他のprotease阻害剤を加えてみた．E-64を加えるとEGTAを加えた場合(Fig. 2B) と同様の結果が得られた．pepstatin A はほとんど影響を及ぼさなかった．antipain, phosphoramidonはE-64ほどではないが抑制効果を示した．

3 mM $CaCl_2$をTris-HCl緩衝液中に加えたところFig. 2D にみられるように著しい分解が起こり，無添加時にみられたスポットが量的に増加しているのみならず，時により低分子量側に新しいスポットが現れた．3 mM $CaCl_2$と同時にluepeptin あるいはE-64を加えると，多少分解産物がみられたものの低分子量側への分解は抑制された．

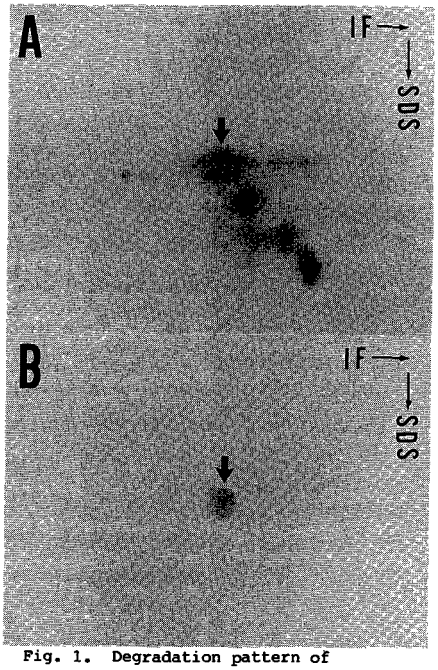


Fig. 1. Degradation pattern of cerebellar GFAP in homozygous (jj) and heterozygous (j+) Gunn rats. Arrows indicate GFAP. A, jj rat; B. j+ rat.

【考察】

Fig. 1で明かなようにjj小脳ではGFAPを分解す

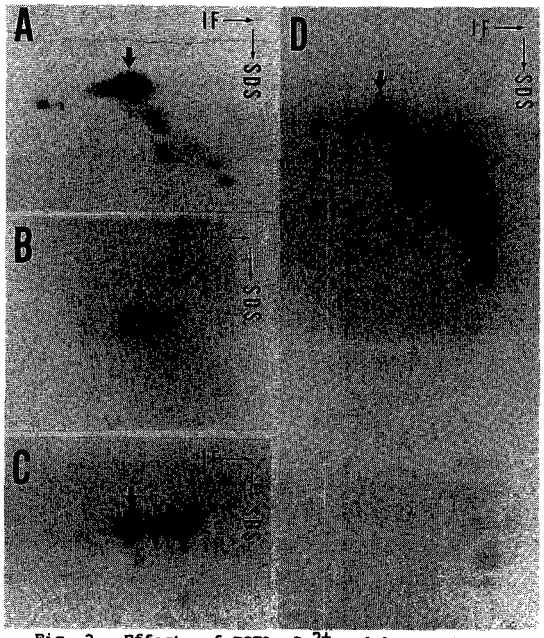


Fig. 2. Effects of EGTA, Ca^{2+} and leupeptin on the degradation of cerebellar GFAP in homozygous Gunn rats. Arrows indicate GFAP. A, 3 mM EGTA; B, 120 μM leupeptin plus 3 mM EGTA; C, 120 μM leupeptin; D, 3 mM $CaCl_2$.

るprotease活性が著しく増加している．現在，GFAPの分解に関連するproteaseとして，Ca^{2+} 依存性thiol proteaseが報告されている(4,5,14)が，jj小脳ではEGTAを加えてもその分解は抑制されなかった(Fig. 2A)ので，Ca^{2+} 非依存性proteaseの活性が増加しているものと考えられる．また，その分解はleupeptin, antipain, あるいはE-64で抑制されたのでthiol かserine protease が関与しているものと思われる．しかし，Ca^{2+} の添加で著しい分解がおき(Fig. 2D)，leupeptinで抑制されることを考えるとGFAPの分解にはやはりCa^{2+} 依存性thiol/serine proteaseも関与しているものと考えられる．Fig. 2Cでみられた酸性側のスポットは，thiol proteaseであるE-64でその出現が抑えられるのでGFAPの分解産物である可能性が高いが，分子量はほとんど変化せず等電点だけが酸性側に移ることを考えると分解というよりは微細な構造変化がGFAPに生じている可能性も示唆される．calcium-dependent neutral proteaseによりnucleotide independent protein kinaseが活性化されること(15)や，GFAPと同じ10 nm フィラメントであるニューロフィラメントがcalcium-activated neutral protease (CANP) によりリン酸化されること(17)を考えると，問題のスポットもGFAPのリン酸化物である可能性も残されている．

【文献】

(1) Aono, S., Kato, K., Kato, T., Sato, H., Tanaka, R. and Kashiwamata, S. (1985) Bull. Jap. Neurochem. Soc. 24,553-555.
(2) Aono, S., Sato, H., Semba, R. and Kashiwamata, S. (1983) Neurochem. Res. 8, 743-756.
(3) Aono, S., Sato, H., Semba, R., Kasiwamata, S. and Eng, L.F. (1985) J. Neurochem. 44, 1877-1884.
(4) Ciesielski-Treska, J., Goetschy, J. and Aunis, D. (1984) Eur. J. Biochem. 138, 465-471.
(5) DeArmond, S.J., Fajardo, M., Naughton, S.A. and Eng. L.F. (1983) Brain Res. 262, 275-282.
(6) Eng, L.F., (1980) in: Proteins of the Nervous System (Bradshaw, R.A. and Schneider, D. M. eds) 2nd edn, pp. 85-117, Raven Press, New York.
(7) Gunn, C.K. (1938) J. Hered. 29, 137-139.
(8) Kashiwamata, S., Aono, S. and Semba, R.K. (1980) Experientia 36, 1143-1144.
(9) Kashiwamata, S., Keino, H., Sato, H., Aono, S., Semba, R. and Aoki, E. (1985) Proc. Jap. Assoc. Animal Model. Human Dis. 1, 28-34.
(10) Keino, H., Sato, H., Semba, R., Aono, S., Aoki, E., Katoh-Semba, R. and Kashiwamata, S. (1986) Pediat. Neurosci. in press
(11) Mikoshiba, K., Kohsaka, S., Takamatsu, K. and Tsukada, Y. (1980) J. Neurochem. 35, 1309-1318.
(12) O'Callaghan, J.P. and Miller, D.B. (1985) J. Pharmacol. Exp. Therapeu. 234, 522-533.
(13) Schutta, H.S. and Johnson, L. (1967) J. Neuropath. Exp. Neurol. 26, 377-396.
(14) Shlaepfer, W.W. and Zimmermann, U.-J.P. (1981) Neurochem. Res. 6, 243-255.
(15) Takai, Y., Yamamoto, M., Inoue, M., Kishimoto, A. and Nishizuka, Y. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 542-550.
(16) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.
(17) Zimmerman, U. P. and Schlaepfer, W. W. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 804-811.

75. 腎臓中のS100抗原の精製とその性質

仙波禮治・加藤兼房*・礒辺俊明**・柏俣重夫
（愛知県コロニー研・周生期，生化*，東京都立大・理・化学**）

〔要　約〕

Mooreの最初の報告以来，S100蛋白は脳特異蛋白の一つと考えられてきたが，我々は腎臓中にS100抗原が存在することを見出した．その後同様の報告が2つの研究室からも出されたが，これらはいづれも免疫学的方法に基づく研究報告でありこの抗原がS100蛋白そのものであるか，それとも抗原性が共通する別の蛋白であるかは分かっていない．そこでラットの腎臓からこの抗原を精製し，その性質をS100蛋白のそれと比較し，この抗原がS100蛋白そのものかどうかを検討した．この抗原はブチルセファロース，DEAE－セファロース，およびセファデックスG-75のカラムクロマトグラフィーで牛脳のS100蛋白と同様の位置に溶出され，さらにフェニールセファロースを用いたカルシウム依存性アフィニティークロマトグラフィーによって単一バンドに精製された．スーパーローズ12による分子量測定，電気泳動度およびアミノ酸分析の結果は，S100aoに一致するものであった．これらの結果からラット腎臓中のS100抗原は，S-100ao蛋白そのものであると考えられた．

Key word： $S100a_0$ protein, kidney, rat

Moore (7) はS100蛋白を牛脳から分離し，同じ抗原性を持つ蛋白が他種類の動物の脳にも存在するが，脳以外の臓器には存在しないことを示した．この報告以来S100蛋白は脳特異蛋白質の一つと考えられてきた．また礒辺ら (3)はS100蛋白が、α，βの二つのサブユニットからなることを見出し，これらの組み合わせによってS100蛋白にはS100ao(αα)，S100a（αβ），S100b（ββ）の3つがあることを示した．一方，Mooreの報告に反して，S100蛋白は神経組織以外の組織でも見出されてきた．例えば鈴木ら (9)は脂肪組織と軟骨組織にS100抗原を見出し，日高ら (2)は前者からS100抗原を精製し，それがS100b蛋白そのものであることを示した．また，加藤ら (4)は筋肉組織に高濃度のS100抗原を見出し，ヒト筋肉組織からS100ao蛋白を分離精製している．また腎臓についてMoore (7)はS100蛋白が無いと報告し，その後同様の報告が繰り返しなされた(2,9)が，我々は腎臓にS100抗原の存在することを見出した (8)．その後我々の結果と一致する2つの報告がなされた(1,6)が，これらの報告はいずれも免疫学的な研究にもとづいており，このS100抗原がS100蛋白そのものであるか否かは不明である．そこで我々はラットの腎臓からこの抗原を精製し，それがS100蛋白そのものであるか否かを検討した．

【材料と方法】

＜S100抗原量の測定＞

ラットの脳および腎臓を5倍量の燐酸緩衝液(20 mM、pH 6.0)中でホモジナイズし100,000 xgで1h遠心し，上清中のS100ao，S100aおよびS100b抗原量を木村らの酵素免疫測定法 (5)を用いて測定した（表1)．この測定の結果腎臓中のS100抗原はほとんどがS100aoと考えられたので，以下の精製に際してはS100ao測定系を用いた．

＜精製＞

240 g のラット腎臓を 1200 ml の上記燐酸緩衝液とホモジナイズし，14,000 xg で 30 min 遠心した．その上清を珪藻土 42 g と混合し，26g の珪藻土を敷いたブフナー濾とで吸引濾過したのち木村らの方法 (5) に従い、ブチルセファロース (4 x 18 cm) にかけた．1 l の上記燐酸緩衝液で洗浄後 0 - 0.5 M の NaCl 勾配を持つ上記燐酸緩衝液 960 ml によって溶出した．S100抗原を有する画分を 20mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0 に対して透析したのち，DEAE－セファロース (1.5 x 20 cm) にかけ，0.1M NaCl を含む上記のトリス緩衝液で洗浄し，0.1 - 0.35M の NaCl の濃度勾配をもつトリス緩衝液によって溶出した．S100抗原を含む画分を濃縮し，セファデックス G-75 (2x40 cm) にかけた．S100 抗原に富む画分 42ml に 840μl の 0.1 M $CaCl_2$ を加え，フェニールセファロース (0.75 x 5cm) にかけ，2mM $CaCl_2$ と 0.1M NaCl を含む 50mM トリス緩衝液 pH8.0 によって洗浄後 $CaCl_2$ の代わりに 2mM EDTA を含む同緩衝液で溶出した (図 1)．この最終標品は FPLC を使った陰イオン交換クロマトグラフィー，分子ふるい，電気泳動，その他の方法によってそれ以上には分離されず，単一蛋白に精製されたと考えられた．

Table 1. Distribution of three forms of S-100 protein in rat kidney and brain

Tissues	S-100a_0	S-100a	S-100b
	ng*/mg protein		
Brain	2 ± 2**	298 ± 27	2810 ± 760
Kidney	214 ± 53	0.65 ± 0.10	0.72 ± 0.25

* Nanograms of bovine S-100 protein equivalent.
** Mean ± S.D. of 5 samples.

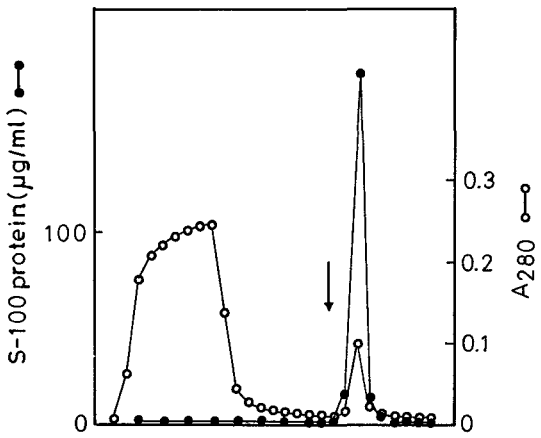


Fig. 1. Calcium-dependent chromatography on phenyl-Sepharose. The S-100-rich fraction (42 ml, 8.9 mg of protein) was applied to a phenyl-Sepharose column (0.75 x 5 cm), and the column was washed with 50 ml of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.1M NaCl and 2mM $CaCl_2$. At a point indicated by an arrow, the buffer was changed to the same buffer containing 2 mM EDTA instead of $CaCl_2$.
Absorption at 280 nm.
S-100-like antigen assayed by enzyme immunoassay.

＜S100蛋白との比較＞

上記精製過程に得られた各種の結果を，牛脳およびヒト筋肉から S100 蛋白を精製する際に得られた結果と比較した．またアミノ酸分析は礒辺の方法 (3)によった．

【結果】

精製過程を表 2に示した．ブチルセファロース，DEAE-セファロース，セファデック

Table 2. Purification of S-100a_0 protein from rat kidney

Purification Steps	volume (ml)	total protein (mg)	S-100a_0 (mg*)	S-100a_0/mg protein (μg)	recovery (%)
Crude extract**	1285	7232	1.54	0.21	100
Butyl-Sepharose	152	367	1.20	3.3	78
DEAE-Sepharose	72	42.5	0.90	21	59
Sephadex G-75	42	8.87	0.78	88	51
Phenyl-Sepharose	5	-	0.90	-	59

* Bovine S-100a_0 equivalent
** Pooled rat kidneys (240g) were used.

スG-75によるカラムクロマトグラフィーの溶出位置は，ヒト筋肉組織から精製したS100aoと一致していた．ポリアクリルアミドゲル電気泳動とFPLCを用いたMono Qおよびスーパーローズ12カラムの結果もS100aoと一致していた．さらにアミノ酸分析の結果（表3）も牛脳，およびヒト筋肉由来のS100aoとよく類似していた．

Table 3. Amino acid composition (mol %) of S-100-like antigen purified from rat kidney

Amino acid	Kidney antigen	S-100a_0 bovine brain	S-100a_0 human muscle	S-100a bovine brain	S-100b bovine brain
Aspartic acid	14.1	14.0*	14.8**	12.0*	9.9*
Threonine	3.6	4.3	3.9	3.8	3.3
Serine	5.1	5.4	5.3	5.4	5.5
Glutamic acid	16.8	16.1	15.7	18.5	20.9
Proline	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Glycine	7.6	6.5	7.6	5.4	4.4
Cysteine	n.d.***	1.1	n.d.	1.6	2.2
Alanine	9.1	8.6	7.4	7.1	5.5
Valine	9.1	8.6	8.5	8.2	7.7
Methionine	1.5	2.2	3.1	2.7	3.3
Isoleucine	1.5	1.1	2.0	2.7	4.4
Leucine	11.2	11.8	12.5	10.3	8.8
Tyrosine	1.7	2.2	2.4	1.6	1.1
Phenylalanine	5.9	5.4	4.7	6.5	7.7
Lysine	10.9	9.7	9.9	9.2	8.8
Histidine	2.1	2.2	2.2	3.8	5.5
Arginine	0.0	0.0	0.0	0.5	1.1
Tryptophan	n.d.	1.1	n.d.	0.5	0.0

* Calculated from the amino acid sequence (Isobe et al.[3])
** Data from Kato et al.[4]
*** Not determined

【考察】

各種のクロマトグラフィーにおける腎臓中のS100抗原の溶出位置は，ヒト筋肉組織から精製したS100ao蛋白のそれとよく一致していた．またこの抗原がフェニールセファロースに対してカルシウム存在下で高い親和性を示しEDTAによってそれを失ったことは，カルモジュリン，S100蛋白などのEF-handカルシウム結合蛋白質の一員であることを示している．以上の結果に加えて電気泳動更にアミノ酸分析の結果はラット腎臓中のS100抗原がS-100ao蛋白そのものであることを強く示唆していると考えられる．一方腎臓にはほとんどS-100蛋白がないと繰り返し報告されてきた．このような著しい相違の原因はつぎのように考えられる．牛脳から精製したS100蛋白を免疫注射すると，牛脳のS100蛋白はほとんどがS100bであるため，得られた抗血清はβ鎖に対する抗体価が高く，α鎖に対する抗体価は低くなりやすい．そしてこのような抗血清を用いてβ鎖に乏しい臓器のS100量を測定するとS100蛋白はほとんど無いという結果が得られると予想される．事実鈴木らの用いたS100測定系（9）は主にS100bの量を示していた．

ラットの腎臓には脳よりも多量のS100ao蛋白がある．しかしその機能はいまだ不明であり，脳における機能と同一かどうかも分からない．

【謝辞】

本研究の一部は文部省科学研究費（No.61570480）の援助を受けた．

【文献】

1 Cocchia, D. et al., Cell Biol. Int. Rep., **9**, 957 (1985).
2 Hidaka, H. et al., J. Biol. Chem., **258**, 2705 (1983).
3 Isobe, T. et al., Biochem. Int., **6**, 419 (1983).
4 Kato, K. et al., J. Neurochem., **46**, 1555 (1986).
5 Kimura, S. et al., Neurochem. Int., **6**, 513 (1984).
6 Molin, S. O. et al., J. Histochem. Cytochem., **33**, 367 (1985).
7 Moore, B. W., Biochem. Biophys. Res. Comm., **19**, 739 (1965).
8 Semba, R. et al., Neurochem. Res., **9**, 1125 (1984).
9 Suzuki, F. et al., J. Biochem., **92**, 835 (1982).

76. 固定化酵素反応を利用した脳内アセチルコリンおよびコリンの液体クロマトグラフィーによる測定法；脳破壊後のアセチルコリンの含量変化について

山西嘉晴・小笹貴史，小倉博雄・窪田篤彦・荒木　伸
山津清實　（エーザイ筑波研）

〔要　約〕

液体クロマトグラフィー（HPLC）と酵素反応リアクターを組み合せた，簡便でかつ高感度の脳内Acetylcholine（ACh），Choline（Ch）の測定法を確立した。Acetylcholinesterase（AChE），Choline oxidase（ChO）の両酵素をアフィニティクロマト用担体に固定化させた固定化酵素カラムを作成した。酵素カラムは分離カラムの後端に接続した。脳内ACh，Chは、有機溶媒による分離・抽出溶液をHPLCに注入し電気化学検出器（ECD）にて測定した。酵素カラムは耐久性に優れ、200－300サンプルの測定が可能であった。

本測定法を用いて以下の実験を行った。

1) 正常ラット脳内諸部位中ACh，Ch含量を測定した。これらの測定値は既報の文献値とほぼ一致した。
2) ラットの各種脳破壊後のACh含量の変化を測定した。コリン系神経毒Ethylcholine mustard aziridinium ion（AF64A）の側脳室注入では選択的に海馬中AChが減少した。Nucleus basalis magnocellularis（NBM）の電気破壊により大脳皮質中AChが減少した。更に、Medial septum（MS）の破壊では海馬中AChが著明に減少した。

以上の実験結果より、本法が脳内ACh動態の研究に有用な手段となることが示唆された。

Key word：ACh，HPLC，immobilized enzyme reactor

AChの測定には古くからbioassay法が用いられているが、特異性に問題がある。近年，GC－MS法による測定が行われている。しかしながら、機器が極めて高価であり、かつ操作が煩雑であることから、その使用には制限があった。最近、Potter等は[5] HPLCと酵素反応を組み合せた新しい脳内ACh測定法を発表した。操作が容易であり、特異性が大でかつ高感度であることから注目されている。しかしながら、測定中にAChEとChOの両酵素溶液を連続的に流すために酵素の消費が大となりランニングコストが高価なものになる。我々はこの点を解決するために両酵素を固定化した酵素カラムの作成を試み、HPLCと酵素カラムを組み合せた新しい測定法を確立した。更に脳内ACh，Chの分離・抽出には同一組織抽出液からmonoaminesおよびそれらの代謝産物が測定可能な有機溶媒抽出を用いた。本測定法の有用性を確認するために、ラット脳破壊後の脳各部位中ACh含量変化について検討した。

[実験方法]

<u>脳内AChおよびChの分離・抽出法</u>　マイクロウェーブにてラット頭部を照射（5 kw，1.2 sec）後、全脳を摘出し、大脳皮質、海馬および線条体を分離し、測定に供するまでフリーザー（−80℃）にて保存した。脳内ACh，Chの分離・抽出にはShore & Olin[6]の有機溶媒抽出法をマイクロ化して用いた。（Fig. 1）脳組織に内標Ethyl homocholine（EHC）1～2.5 n mol添加後、酸性ブタノール（2.5 ml）にてホモジナイズした。遠心後、ブタノール上清に0.01N HClとn－ヘプタンを加え、振盪・遠心し、コリン類を塩酸層に転層し、凍結乾燥した。測定時に残渣を蒸留水に溶解してHPLCに注入した。

固定化酵素カラム調製法　AChEとChOの固定化のために三種類のアフィニティクロマト用担体，Sepharose 4B（pharmacia），AFホルミルトーヨーパール（東洋曹達），ホルミルセルロファイン（生化学工業）について検討した。本実験ではホルミルセルロファインを使用した。固定化法は生化学工業のマニュアルに従った。ゲル1g当りにAChE（550 U, sigma），ChO（275 U, 東洋紡）を加えて2時間撹拌し，更に、還元剤NaCNBH₃ 7 mgを加えて低温下一昼夜撹拌し固定化した。カラム（2.1 mm ID × 7.5 cm）1本当りAChE（80 U），ChO（40 U）を減圧下に充填した。

HPLC条件設定　分離カラムとしてメタクリレート系カラムDE-613（6 mm ID × 15 cm, Shodex）を用い、移動相として1.2 mM tetramethyl-ammonium chloride（TMA）およびsodium octylsulfate（SOS）500 mg/l含有の0.1 M-phosphate buffer（pH 8.3）を流速1 ml/minで流した。ECDの引加電圧を0.5 V（vs Ag/AgCl）とした。

a) Extraction procedure of ACh and Ch.

Rat Brain
↓ added EHC (IS). homogenized in 2.5 ml of acidified n-butanol. centrifuged for 5 min at 4°C (2,000 x g).
2 ml of Supernatant
↓ added 0.5 ml of 0.01 N HCl and 4 ml of n-heptane. shaken for 5 min. centrifuged for 5 min at 4°C (2,000 x g).
0.4 ml of HCl layer
↓ dried under vacuum.
Residue

stored at -20°C untill injection into HPLC.

b) HPLC/ECD System

Injection volume	:	5-20 µl of each sample dissolved with 100 µl of distiled water.
Mobile Phase	:	0.1 M, pH 8.3 phosphate buffer containing 1.2 mM tetramethyl-ammonium chloride and 0.05 % sodium octyl sulfate.
Column	:	Shodex DE-613
Enzyme reactor	:	Formyl cellulofine containing AChE (80 U)$_2$+ ChO (40 U).
Column pressure	:	30-50 kg/cm^2
Flow rate	:	1.0 ml/min
Applied potential	:	500 mV vs Ag/AgCl electrode

Fig. 1. Procedure of measurement of ACh and Ch in rat brain.

脳の破壊操作　Fischer系雄性ラット（150 ~ 230 g）を用いた。ネンブタール（50 mg/kg i.p.）麻酔下、König & Klippel[4]の脳図譜に従って、両側のNBMおよびMSに高周波電流（500 KHz, 20 mA, 5 ~ 10 sec）を通電した。AF64AはFisher[1]の方法で調整し、両側の側脳室に4 n mol/2ul/side注入した。いずれの実験においても処置後2~4週間後に脳内ACh，Chを測定した。

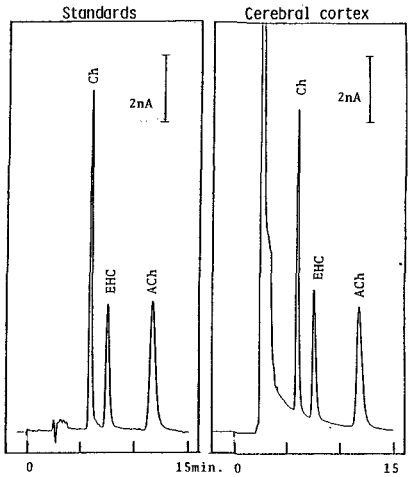


Fig. 2. Chromatograms of standards and rat cerebral cortex extract on DE-613 column with a 7.5 cm enzyme-immobilized post column reactor. Standards contained 50 pmol of Ch, ACh and EHC. Cerebral cortex extract contained 2.5 nmol of EHC as internal standard.

[実験結果および考察]

測定条件　印加電圧の増加により、H_2O_2の検出感度は増し0.6 Vでプラトーに達した。なお本実験では0.5 Vに設定した。AChEおよびChOの至適pHを移動相溶液pHを変化させて検討すると、pH 6以下ではピークは認められずpHが増加するにつれてピークは高くなり、pH 8.0ではほぼピークに達し、最適pHは8.0 ~ 8.5の範囲にあった。Ch，EHC（IS），AChの分離条件に関し、SOSの添加量は250 mg/l以上で3成分のピークの分離が明瞭になった。SOSの添加量を移動相1l当り500 mgとした。

酵素カラムの耐久性　AFホルミルトーヨーパールは圧力が高く、長時間使用に耐え

なかった。Sepharose 4Bは目詰りを起こしやすく、50サンプル注入で圧力上昇をきたした。一方、セルロファインは低圧で、目詰りもなく、200～300サンプル測定にも十分使用可能であった。

HPLCクロマトグラム　Fig. 2にstandard溶液およびラット大脳皮質抽出液のACh, EHCおよびChのクロマトグラムを示した。ACh, EHC, Chのretention timeは各々6.0, 7.5, 11.6分であった。有機溶媒による脳組織抽出液にはコリン類の他、モノアミン類も存在するが、分離カラムDE-613を用いると特異的にACh, Chのみが検出された。抽出操作による回収率はACH, Ch, EHCともに82～85％であった。また測定限界は2～5 p molであった。

正常ラットおよび脳破壊後のACh含量変化　マイクロウェーブ照射により屠殺した、ラット脳各部位中ACH, Ch含量の測定値は文献値[3]とほぼ一致した。

Table 1. Effects of intracerebroventricular AF64A (8 nmol) administration on brain regional acetylcholine and choline contents in rat.

Regions	Control (nmol/g)		AF64A	
	ACh	Choline	ACh	Choline
Cerebral Cortex	19.9 ± 0.6	23.8 ± 2.8	20.3 ± 0.9 (102)	26.1 ± 3.6 (110)
Hippocampus	24.9 ± 0.8	34.2 ± 1.1	10.7 ± 1.3** (43)	40.4 ± 4.1 (118)
Striatum	61.6 ± 1.9	50.4 ± 4.6	59.5 ± 2.0 (96)	51.3 ± 4.5 (102)

Values are means ± S.E.M. of 6 animals. The number in parentheses is % of respective control. **p < 0.01 compared with respective control(Student's t-test). ACh : Acetylcholine

Table 2. Acetylcholine contents in different regions of rat brain with lesion of medial septum.

Regions	Intact (nmol/g) n=5	Lesioned n=10
Cerebral Cortex	17.7 ± 0.3	19.1 ± 1.1 (108)
Hippocampus	25.6 ± 0.8	6.2 ± 0.4** (24)
Striatum	77.2 ± 4.2	67.4 ± 4.3 (87)

Values are means ± S.E.M. The number in parentheses is % of respective intact group. **p < 0.01 compared with respective intact group (Student's t-test).

コリン系神経毒と考えられているAF64Aの脳室内投与により海馬に選択的なコリン系の障害が生じることが知られている[1]。また、海馬コリン系ニューロンの起始部であるMSの破壊によっても海馬の障害を作ることができる。この2つのモデルにおける脳内ACh量を測定した結果、いずれも海馬で著明な低下が認められた（Table 1, 2）。

更に、大脳皮質コリン系ニューロンの起始部と推定されているNBMを併せて破壊すると[2]、線条体には影響せずに大脳皮質および海馬のACh量低下がみられた（Table 3）。このように、本法の有用性を確認する目的で各種の障害モデルでの脳内ACh量の測定を試み、それぞれにおいて脳部位選択的なACh量低下を把握しえた。

Table 3. Acetylcholine contents in different regions of rat brain with lesions of nucleus basalis magnocellularis and medial septum.

Regions	Intact (nmol/g)	Lesioned
Cerebral Cortex	19.2 ± 0.6	10.7 ± 1.1** (56)
Hippocampus	18.5 ± 0.4	1.6 ± 1.1** (9)
Striatum	60.3 ± 2.4	46.6 ± 8.0 (77)

Values are means ± S.E.M. of 5 animals. The number in parentheses is % of respective intact group. **p < 0.01 compared with respective intact group (Student's t-test).

本研究では、脳内ACh, Chの有機溶媒による分離・抽出を試み、更に固定化酵素リアクターを試作し、HPLCと組み合わせた簡便、高感度および経済性に優れた脳内ACh, Chの測定法を確立した。本法は脳内ACh動態の研究に有力な手段になるものと考えられる。

Reference 1) Fischer,A.,Mantione,C.R.,Abraham,D.J. and Hanin,I. (1982) J.Phamacol. Exp.Ther. 222, 140-145 2) Hepler,D.J.,Olton,D.S.,Wenk,G.L. and Coyle, J.T. (1985) J.Neurosci 5,866-873 3) Ikarashi,Y.,Maruyama,Y. and Stabinoha,W.B. (1984) Japan.J. Pharmacol. 35,371-387 4) König,J.F.R. and Klippel,R.A. (1970) The Rat Brain, A Steroetaxic Atlas, Krieger 5) Potter,D.J.,Meek,j.l. and Neff,N.H. (1983) J. Neurochem. 41,188-194 6) Shore,P.A. and Olin,J.S. (1958) J.Pharmacol.Exp.Ther. 122,295-300

77. Agonist binding of purified muscarinic acetylcholine receptors : Heterogenous affinities and effect of DTT

Gabriel Berstein・芳賀達也　（浜松医大・生化第一）

〔要　約〕

Muscarinic acetylcholine receptors were purified from porcine brain to apparent homogeneity following the procedure described previously (5). The affinity of this preparation for muscarinic ligands was examined by means of competitive binding of [^{3}H]quinuclidinylbenzylate ([^{3}H]QNB) and unlabeled ligands, followed by computer analysis. The displacement by antagonists fitted to a single-site model. In contrast, a two-site model was the best fit when muscarinic agonists were tested. The proportion of the high affinity sites (H.A.S.) ranged from 25% to 35% of the total number of binding sites, depending on the agonist. GTP had no effect on the displacement curve. In the presence of 100 mM dithiothreitol (DTT), H.A.S. disappeared and only low affinity sites (L.A.S.) were detected. The presence of intermolecular disulfide bond was not likely to be the case, for the receptor appears to be a single polypeptide in the SDS-PAGE pattern either in the presence or absence of disulfide reducing agents. These results suggest that the existence of H.A.S. in this preparation (a) does not depend on the presence of G proteins and (b) requires the presence of (an) intact and probably intramolecular disulfide bond(s).

Key word : MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR

INTRODUCTION

The existence of high and low affinity binding sites for muscarinic agonists in synaptic membrane preparations has been reported by many groups(2). The heterogeneity of agonist binding can be partially explained by the interaction of muscarinic receptors (mAChR) with guanine nucleotide binding regulatory proteins (G proteins), because the mAChR-G protein complex exhibits high affinity for muscarinic agonists (3,6). It has also been reported that the presence of ions, disulfide reducing and thiol oxidizing and alkylating agents affect the binding properties of muscarinic agonists to membrane preparations(1,4,7,8). But, it has not been determined whether the relevant groups are located in the receptor molecule itself or in other molecules, e.g. the G proteins.

The purpose of the present study is to find out whether the complexity of the muscarinic agonist binding can be also attributed to the presence of differences among the receptor molecules themselves. To this aim, the binding characteristics of several muscarinic ligands were examined in a preparation of purified muscarinic acetylcholine receptors from porcine brain that does not contain G proteins. In order to determine the relevance of the presence of disulfide bonds on the agonist binding, the effect of DTT was also examined. The structural basis of the results obtained in the binding assays is discussed in relation with the effect of disulfide reducing agents on the electrophoretic pattern of the preparation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES. Purification of muscarinic acetylcholine receptors from porcine brain (cortex and caudate nucleus), competitive binding between [^{3}H]QNB and unlabeled muscarinic ligands and SDS-PAGE of the radiolabeled sample were carried out as described previously (5). When DTT was included in the reaction mixture, the incubation was carried out at 10°C for 3.5 hours. PrBCM treatment: purified receptor preparation was incubated at 30°C for 30 minutes with 1 uM propylbenzilylcholine mustard (PrBCM) -an irreversible muscarinic receptor alkylating antagonist- and 1mM acetylcholine. Then, free ligands were removed by gel filtration through a Sephadex G50(fine) column and the displacement by agonists of [^{3}H]QNB binding of the unalkylated sites were measured.

Table I

DISPLACEMENT BY MUSCARINIC LIGANDS OF [^{3}H]QNB BINDING OF PURIFIED MUSCARINIC RECEPTORS

Ligands	Non-linear Least Squares Analysis (S.A.L.S.)			Slope factor
Agonists	Two Sites Model			
	IC_{50}(μM) H.A.	L.A.	Prop. H.A.:L.A.	
Acetylcholine	7,4	580	35 : 65	0,68
Carbamylcholine	24,3	653	30 : 70	0,58
Pilocarpine	2,0	37	25 : 75	0,78
Oxotremorine	1,9	20	25 : 75	0,70
Antagonists	One Site Model IC_{50}(nM)			
Atropine	15,4			0,91
Scopolamine	10,2			0,93
Dexetimide	6,2			0,94
Isopropamide	1975			0,96

RESULTS

The competitive binding of [^{3}H]QNB and unlabeled muscarinic agonists revealed, after the computor analysis, the presence of H.A.S. with an IC_{50} 10 to 78 times lower than that of the L.A.S. The proportion of H.A.S. was around 30%. In contrast, the displacement by muscarinic antagonists fitted to a single site-model (Table I and Figure 1).

Neither the IC_{50} nor the proportions of high and low affinity sites were affected by the presence of 1mM GTP in the reaction mixture (Figure 2).

When the ability of ACh to protect the high and low affinity sites from blockade by PrBCM was measured, it was found that ACh was more potent to protect H.A.S. than L.A.S.

The resulting proportion of high and low affinity sites of the unalkylated sites (H.A.S. : L.A.S. = 70 : 30) was reciprocal to that of the control preparation (H.A.S. : L.A.S. = 30 : 70). This finding indicates that high and low affinity sites were not in equilibrium.

The inclusion of DTT in the reaction mixture caused a decrease of the proportion of H.A.S. in a concentration dependent manner. The maximum effect was obtained by using 100 mM DTT (Figure 3). In this case, the incubation was carried out at 10°C because the high concentration of DTT made the receptor more labile to thermal denaturation.

Figure 1

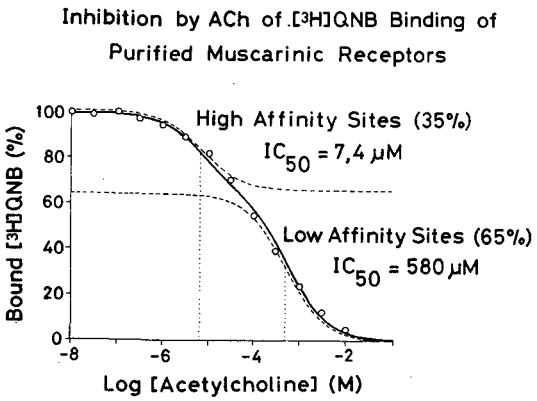
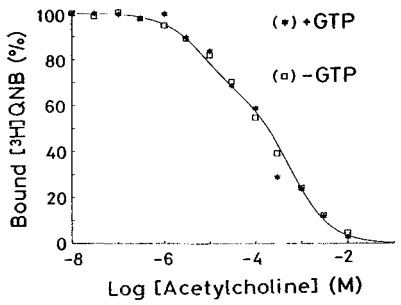


Figure 2



Under this condition, the total [^{3}H]QNB binding was 81% of that in the absence of DTT and only L.A.S. could be detected (Figure 3). In the absence of DTT, 34% of the [^{3}H]QNB binding sites showed high affinity for carbamylcholine. Thus, at least 15% of the binding sites was converted from H.A.S. to L.A.S. by incubation with DTT.

The SDS-PAGE of the preparation labeled with [^{3}H]PrBCM, showed a single major broad peak in the same position as that of bovine serum albumin (Figure 4). There was no difference whether 10% 2-mercaptoethanol or 2% DTT were included or not.

Figure 3

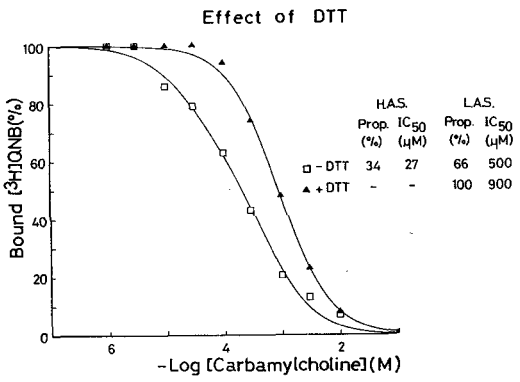
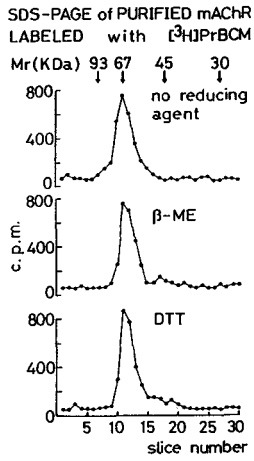


Figure 4



DISCUSSION

The findings that the present preparation is devoid of G proteins and that GTP does not affect the displacement by agonists of [^{3}H]QNB, support an idea that the difference between high and low affinity sites is, in this case, due to some kind of diversity of the receptor molecules.

The effect of DTT suggests that this difference could be connected with the presence of (an) intact disulfide bond(s) in the molecules carrying the H.A.S. As the receptor appears to be a single polypeptide and no evidence of a dimer could be obtained in the SDS-PAGE, even in the absence of disulfide reducing agents, the relevant disulfide bond(s) appear(s) to be intramolecular. The experiment shown in fig. 3 indicated that at least 15% of the binding sites were converted from H.A.S. to L.A.S. in the presence of DTT. On the other hand, the interconversion between H.A.S. and L.A.S. does not appear to occur during the treatment of the receptor preparation with PrBCM and ACh. Taken together, these findings suggest that, in this purified muscarinic receptor preparation, about 30% of binding sites is fixed in the high affinity state and that the presence of (an) intact disulfide bond(s) in these molecules is a necessary condition to hold such a state.

REFERENCES (1)Aronstam R.S. and Eldefrawi M.E.(1979)Biochem.Pharmacol.28,701-703 (2) Birdsall N.J.M. and Hulme E.C.(1983)TIPS 4,459-463 (3)Florio V.A. and Sternweis P.C.(1985)J.Biol.Chem.260,3477-3483 (4)Flynn D.D. and Potter L.T.(1985)Proc.Nac.Acad. Sci.USA 82,580-583 (5)Haga K. and Haga T.(1985)J.Biol.Chem.260,7927-7935 (6)Haga K., Haga T. and Ichiyama A.(1986)J.Biol.Chem. in press (7)Hedlund B. and Bartfai T.(1979) Mol.Pharmacol.15,531-544 (8)Uchida S. et al.(1984)European J. Pharmacol.100,291-298.

78. オートラジオグラフィー法による〔^{3}H〕hemicholinium-3 結合部位のラット脳内分布について

本橋伸高・Bernard Scatton*　(山梨医大・精神, L.E.R.S. *)

〔要　約〕

Hemicholinium-3(HC-3) は、ナトリウム依存性、高親和性コリン取り込みの強力な阻害剤である。[3H]HC-3のラット脳内分布をオートラジオグラフィー法を用いて調べた。線条体を含む切片での [3H]HC-3 結合部位は単一で、最大結合数は 376 fmol/mg protein, 解離定数は 60 nM であった。[3H]HC-3結合は脚間核で最高を示し、線条体側坐核、嗅結節、Broca の対角帯水平脚、視床前腹側核、扁桃体基底外側核で高かった。中等量の結合部位は内側手綱核と歯状回顆粒層で認められた。大脳皮質等その他の部位での[3H]HC-3結合は低かった。以上の分布パターンは、choline acetyltransferase活性やコリン取り込みの分布パターンに類似している。両側手綱核の電気的破壊により、脚間核の [3H]HC-3 結合数は偽手術群の 7% に減少した。これらの結果から、[3H]HC-3結合部位はコリン神経終末に存在することが示唆され、このオートラジオグラフィーはアルツハイマー病等におけるコリン神経終末の変性状態を検索するのに有効だと思われる。

Key word：　[3H]hemicholinium-3, autoradiography, choline uptake

シナプス間隙に放出された生理活性アミンは、主として神経終末への高親和性取り込みによって不活化されている。近年、[3H]imipramine, [3H]desipramine など、神経伝達物質の取り込み阻害剤のナトリウム依存性、高親和性結合部位が、ラット脳内で見い出された。これらの結合部位は、それぞれ、セロトニン、ノルエピネフリンの取り込み部位と結び付いていることが示されている。

コリン神経終末においても、ナトリウム依存性、高親和性のコリン取り込みが認められており(5)、アセチルコリンの合成酵素であるcholine acetyltransferase(ChAT)とともに、コリン系ニューロンの標識となりうることが示されてきた。Hemicholinium-3(HC-3)はコリン取り込みの強力な阻害剤であり、コリン取り込み部位の標識となる可能性が注目されている(7,9)。今回我々は、[3H]HC-3 結合部位のラット脳内分布をオートラジオグラフィー法を用いて調べ、あわせて、両側手綱核の電気的破壊が脚間核の [3H]HC-3 結合に与える影響を検討した。

＜方法＞

約 300g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。ラットは pentobarbital麻酔下(45mg/kg, ip.)にヘパリン化し、0.01% formaldehydeを含む 0.05M リン酸バッファー化した生理的食塩水(pH 7.4, 4°C)で経心臓的に灌流した。取り出した脳は -45°C の isopentane で凍結させた。16μm の組織切片を -20°C のクライオスタット内で切り出し、ゼラチン化したスライド上で解凍し、真空化で乾燥させた後に、凍結保存した。結合実験は Rainbowらの方法(7)に準じて行った。脳内分布の検索には 20nM の [3H]HC-3を用い、Scatchard 解析には 4.5-144nMの [3H]HC-3を用いた。非特異的

結合は 10μM HC-3 存在下のものとした。組織片は LKB film に密着させ、4°C で 2-3週間露光した。オートラジオグラムの光学密度はコンピュータ化されたdensitometer で定量化し、[3H]microscale(Amersham)により mg 蛋白あたりの [3H]HC-3 結合を算出した。Scatchard 解析は、スライドグラスから削り取った切片を直接液体シンチレーションカウンターで測定することにより行った。

手綱核の破壊は Paxinos と Watson の図譜を参照にし、灌流の 14日前に行った。Pentobarbital麻酔下に、ステンレス製の単極性電極（直径 0.35mm, 長さ 0.3mm）を、bregmaの3.8mm後方、中心線の左右0.6mm、頭蓋表面より5.4mm下方に挿入し、2.5mAの電流を10秒間ずつ流した。偽手術群には、手綱核の 2mm上方に電極を下ろし、通電しなかった。

＜結果＞

線条体を含む組織切片での[3H]HC-3 結合の最大結合数(Bmax)は 376 fmol/mg protein であり、解離定数(Kd)は 60 nMであった(Fig 1, 2)。Scatchard plotsが直線であることより、この結合部位は単一のものであると思われる。20 nM [3H]HC-3存在下で、[3H]HC-3結合部位は不均質な分布を示した。特異的結合数は脚間核で最大だった(2000 fmol/mg protein, Fig 3)。結合数が多かったのは(300-700 fmol/mg protein)、線条体、側坐核、嗅結節(Fig 3)、Broca の対角帯水平脚、視床前腹側核、扁桃体基底外側核であった。内側手綱核と歯状回顆粒層では、中等量の結合(200-300 fmol/mg protein)が認められた。大脳皮質等その他の組織では、150 fmol/mg protein 以下の特異的結合を示していた。

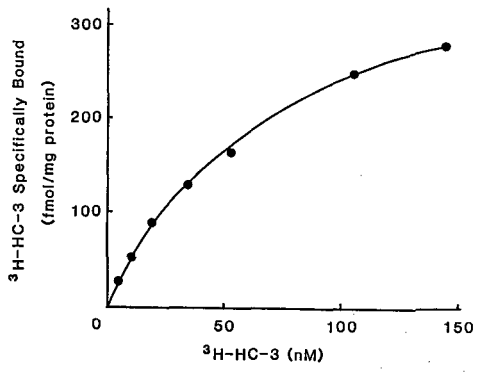


Fig 1 Saturation curve of specifically bound ^{3}H-hemicholinium-3.

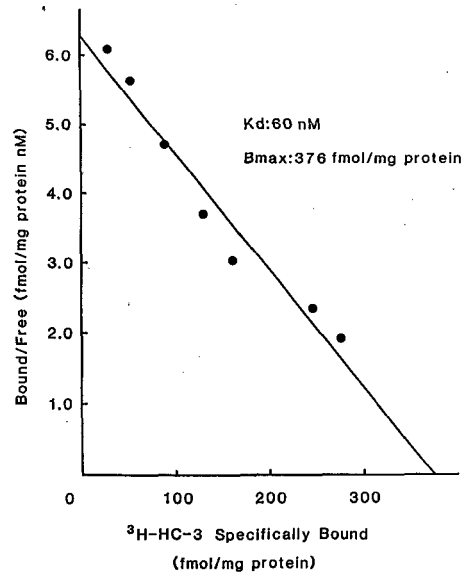


Fig 2 Scatchard plots of ^{3}H-hemicholinium-3 bindig.

両側手綱核の破壊により、脚間核の[3H]HC-3結合は偽手術群の 7% に低下した(破壊群 132±45*, N=4; 偽手術群 2018±119, N=6; * p<0.001)。

<考察>

線条体を含む切片での [3H]HC-3結合は単一部位に結合し、Bmax, Kd の値はこれまでの報告に一致している(7)。また、[3H]HC-3の脳内分布は既知のコリン取り込み部位やChATの分布と類似している(1,3,6)。

手綱核の破壊により脚間核の ChAT 活性やコリン取り込みが著しく低下することから、手綱脚間路はコリン性と考えられている(2,4)。そこで、今回、両側手綱核を電気凝固したところ、脚間核の [3H]HC-3結合は偽手術群の 7%となった。減少の程度は、これまでに報告された ChAT活性やコリン取り込みの減少程度と同様である(2,4)。このことは、[3H]HC-3 がコリン神経終末に分布していることをさらに示唆している。

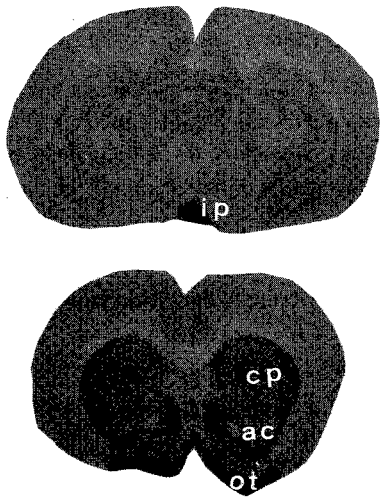


Fig 3

Autoradiograms of ^{3}H-hemicholinium-3 binding sites. ip:interpeduncular nucleus, cp:caudate-putamen, ac:nucleus accumbens, ot:olfactory tubercle.

以上より、[3H]HC-3オートラジオグラフィーはコリン神経終末のマッピングに適しており、アルツハイマー病その他の神経疾患でのコリン神経系の変性状態の検索に利用できるものと思われる。

<文献>

1. Brownstein, M., Kobayashi, R., Palkovits, M. and Saavedra, J.M.(1975) J. Neurochem. 24:35-38.
2. Kataoka, K. and Nakamura, Y. and Hassler, R.(1973) Brain Res. 62:264-267.
3. Kobayashi, R.M., Brownstein, M., Saavedra, J.M. and Palkovits, M.(1975) J. Neurochem. 24:637-640.
4. Kuhar, M.J., DeHaven, R.N., Yamamura, H.I., Rommelspracher, H. and Simon, J.R.(1978) Brain Res. 97:265-275.
5. Kuhar, M.J. and Murrin,L.C.(1978) J. Neurochem. 30:15-21.
6. Palkovits, M., Saavedra, J.M., Kobayashi, R.M. and Brownstein, M.(1974) Brain Res. 79:443-450.
7. Rainbow, T.C., Parsons, B. and Wieczorek, C.M.(1984) Eur. J. Pharmacol. 102:195-196.
8. Sorimachi, M. and Kataoka, K.(1974) Brain Res. 72:350-353.
9. Vickroy, T.W., Roeske, W.R. and Yamamura, H.I.(1984) Life Sci. 35:2335-2343.

79. 線条体および関連部位におけるムスカリン性受容体とイノシトールリン脂質代謝との関係比較

本多健治・高野行夫・山内武司・武田泰生・神谷大雄
（福岡大・薬・薬理）

〔要　約〕

ラット脳の線条体および関連主要部位におけるムスカリン性アセチルコリン受容体（mAChR）とイノシトールリン脂質代謝系との関連性について、各部位よりmicropuncture法で採取した微小切片を用いて比較検討を行なった。

1）この微小試料に ^{3}H-myoinositol を1時間取り込ませた後、10mM Li 存在下にコリン作働薬であるcarbachol(CCh,1mM)で60分間刺激することにより生成蓄積されるinositol monophosphate（IP_1）を主とする inositol phosphates を分離定量することができた。

2）CCh の60分間刺激により蓄積されたIP_1量は線条体背外側部で増加したが、その中心部および淡蒼球ではmAChR が存在しているにもかかわらず、IP_1蓄積に対する CChの刺激効果がほとんど認められなかった。これに対し mAChRが線条体の約50％の密度で存在する大脳皮質では、1mM CCh刺激によるIP_1蓄積率は線条体の背外側部における蓄積率以上に増加した。

以上の成績より脳の mAChRを介する細胞内情報伝達様式には部位による特異性があることが示唆された。

Key word：
carbachol, striatum, phosphoinositide metabolism

近年、細胞内情報伝達機構の仕組みに関する研究が多く報告されている。脳でのムスカリン性アセチルコリン受容体（mAChR）もコリン作働薬であるcarbachol(CCh)の刺激により海馬，線条体，大脳皮質において phosphatidyl inositolの加水分解を促進することが報告されている。（4，5，6）

これより先、本教室の神谷らはラット線条体からmicropuncture 法で微小試料を採取しコリン性神経の神経化学的指標である高親和性の cholineの取り込み量および mAChRを調べ、線条体が中心部と背外側部位ではコリン性神経の活動準位が異なり、heterogenousに分布していることを報告している（2）。そこで著者らはこの研究を発展させる目的で、今回はラットの大脳皮質および線条体より既報で用いた micropuncture法を応用した微小試料を用い、CCh で惹起される phosphatidyl inositolの加水分解により生成した inositol phosphates（IPs)の細胞内蓄積量を調べ、既報の成績とも併せて比較検討した。

【実験方法】

本実験に使用した脳各部位の微小試料は、Wistar系雄性ラット（200 ～250g）よりmicropuncture 法により採取した。断頭後すばやく全脳を摘出し、95%O2-5%CO2 混合ガスを飽和したnormal Krebs-Ringer bicarbonate (normal KRB)溶液（123mM NaCl, 5mM KCl , 0.8mM $CaCl_2$, 1.3mM $MgCl_2$, 1.4mM KH_2PO_4 , 6mM $NaHCO_8$, 10mM glucose pH 7.4）で洗い、McIlwain tissue chopper で厚さ 450 μm の切片を作成して内径 1mmのステンレス管で Köning & Klippel の脳図譜に従い微小試料を調製した。

1）イノシトールリン脂質の代謝；　線条体背外側の微小切片（15～20 μg protein)を

250 μl のnormal KRB又はCa^{2+} free KRB (0.8mM $CaCl_2$ を含まず、1.0mM EGTAを添加したKRB)中で37℃,95% O_2 -5% CO_2 混合ガス下に preincubation後、^{3}H-myoinositol 3 μCiを60分間取り込ませた試料を洗浄後、10mM Li 含有normal KRB中(250 μl) 1mM CChによる60分間刺激を行いmethanol-chloroform(2:1)で反応を停止した。さらにBerridgeら(1) の方法に従い chloroform-waterを加え水相を分取してAG-1×8(formate 型 100～200 mesh) 樹脂を用いて ^{3}H-glycerophosphoryl inositol (^{3}H-GPIns)、^{3}H-inositol monophosphate(^{3}H-IP_1) 、^{3}H-inositol bisphosphate(^{3}H-IP_2) 、^{3}H-inositol triphosphate (^{3}H-IP_3) を分画し各々の放射活性を測定した。タンパク量はLowryらの方法で測定した(2) 。

【結　果】

1) Fig.1は線条体の背外側部より採取した微小切片にあらかじめ ^{3}H-myoinositol を取り込ませた後、1mM CCh を60分間刺激して蓄積されたinosotol phosphates(IPs)を分離して得られた溶出例を示している。0.2 ～1.0M ammonium formate /0.1M formic acidとイオン強度を上昇させることによりIP_1 , IP_2 , IP_3 を溶出したが、特にIP_1 は1mM CCh により著明に増加を示した。この成績からもわかるように著者らの用いた 1枚の線条体微小切片で十分にIPs 蓄積量の変化を読むことが出来た。

2) Fig.2は10mM Li 存在下の1mM CCh 刺激によるIP_1 , IP_2 およびIP_3 の線条体への各蓄積量を、刺激開始後の時間経過(～60分) で表現している。CCh によるIP_1 蓄積の時間的経過は30分以後で急速に進み、45～60分ではCCh 非存在下の対照値に比べ有意に上昇した。これに対し、IP_2 およびIP_3 の各蓄積量は時間経過に伴って上昇したが CCh刺激による蓄積増加は対照値に比べて有意ではなかった。なお1mM に至るまでのCCh による線条体微小切片へのIP_1 蓄積に及ぼす影響ではCCh の濃度依存性が認められ(Fig.3) 、また1mM CCh によるIP_1 蓄積は m- AChRの M1 antagonistである10^{-5} M pirenzepine で完全に抑制された(Fig.4) 。

3) Fig.5は線条体の背外側部と中心部における1mM CCh の60分間刺激により蓄積されたIP_1 量を図示している。なお比較のために調べた大脳皮質は CCh刺激により線条体背外側部と同程度以上のIP_1 蓄積率を示したが、淡蒼球(GP)では対照値以上のIP_1 蓄積量は認め得なかった。

【考　察】

ラット脳の線条体および関連する主要部位から micropuncture法で微小切片を採取し、コリン性神経の受容体 agonistである CChの刺激による phosphatidyl inositolの代謝様式を調べた。神谷らは脳内のコリン性神経の分布図を作製し、中枢のmAChR がコリン作働性の発現に重要であることを示唆したが(2) 、今回の報告ではmAChR 量とphosphatidyl inositol代謝との相関性の有無を検討した。その結果、線条体におけるCCh 刺激効果によるIP_1 蓄積は、背外側部位のみに著明に現われ、中心部でのIP_1 蓄積には対照値との有意差が認められなかった。一方、淡蒼球では CCh刺激の効果はほとんど認められなかった。このようにIP_1 蓄積量の増加が少ないかまたは認められなかった部位は、神谷らの報告によるといずれも mAChR量またはコリンの取り込み量が少ない部位であり、これに対し背外側部位は mAChRの分布が密な部分であった。しかし大脳皮質より採取した試料について測った 1mM CChによる蓄積率は線条体背外側部位よりむしろ多い傾向

を示した(Fig.5)。この大脳皮質のmAChR量は線条体の中心部におけるmAChR量よりも少なく線条体の平均量の概むね50%程度であることを考慮すると、大脳皮質および線条体内各部位におけるmACh量とphosphatidyl inositol代謝能との関係はそれぞれ異なっていることが示唆された。

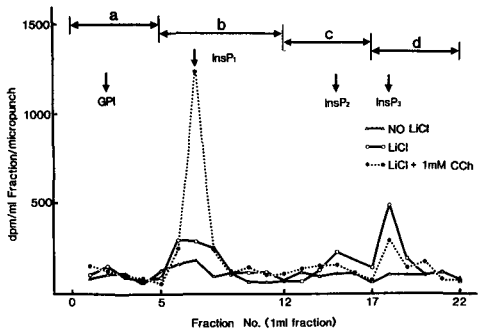


Fig.1 a; 5mM disodium tetraborate/60mM sodium formate.
b; 0.2M ammonium formate/0.1M formic acid.
c; 0.4M ammonium formate/0.1M formic acid.
d; 1.0M ammonium formate/0.1M formic acid.

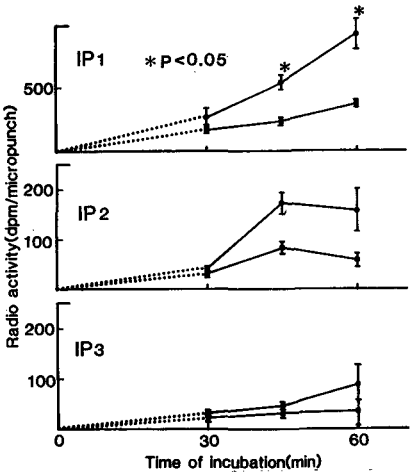


Fig.2 (■): basal (●): 1mM CCh

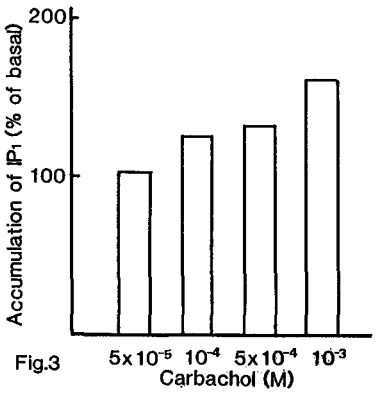


Fig.3

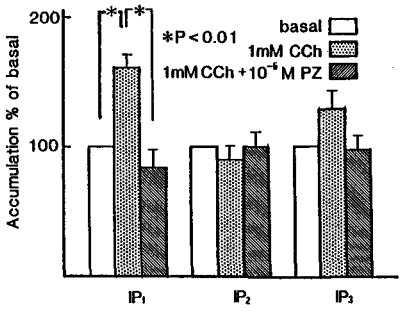


Fig.4

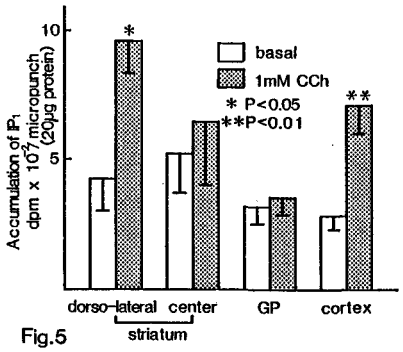


Fig.5

【文献】

(1) Berridge M.J., et al(1983) Biochem.J.,212, 473-482.
(2) Kamiya,H., et al(1982) Brain Res.Bull., 8,431-433.
(3) Lowry.O.H., et al(1951) J.Biol.Chem.,193, 265-275.
(4) Michael.D.Jacobson., et al(1985) J.Neurochem.,44,465-472.
(5) Rueben A.Gonzales., et al(1984) J.Neuro-Scie.,4.3120-3127.
(6) Rueben A.Gonzales., et al(1985) J.Neurochem.,45,1076-1084.

80. 中枢α_2－アドレノセプター－G蛋白の脱共役—N－エチルマレイミドの効果—

北村佳久・野村靖幸　（富山医薬大・和漢薬研・生物試験）

〔要　約〕

中枢α_2-レセプター－ＧＴＰ結合調節蛋白（Ｇ蛋白）の相互作用に及ぼすアルキル化剤のＮ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）の作用について検討した。３μＭ～１ｍＭ　ＮＥＭを０℃，30分間前処置したラット大脳皮質膜における［^{3}Ｈ］クロニジン結合は、ＧＴＰの存在および非存在下において二相性の抑制を示した。この効果を明らかにするため、ＮＥＭ前処置（０，50，500 μＭ）膜のＧＴＰ存在，非存在下における［^{3}Ｈ］クロニジン結合の Scatchard解析を行なった。50μＭ　ＮＥＭ処置膜のＧＴＰ非存在下の Scatchard plot は、ＮＥＭ無処置膜のＧＴＰ存在下の Scatchard plot とよく似ていた。つまり、いずれも高親和性結合数は有意に減少しているが全結合数（Bmax）には有意な差は認められなかった。一方、500 μＭ　ＮＥＭ処置膜における Scatchard plot は、いずれも全結合数は有意に減少していた。次にラット大脳皮質膜およびブタ大脳から精製したＧ蛋白（Ｇｉ，一部Ｇｏ混在）の 50 μＭ　ＮＥＭ前処置によって、百日咳毒素によるＡＤＰ－リボシル化はいずれも抑制された。以上のことから、低濃度ＮＥＭ（～50μＭ）処置は、百日咳毒素によってＡＤＰ－リボシル化されるＧｉのシステイン残基をアルキル化することによりα_2-レセプターとＧ蛋白の脱共役を引き起こすこと、また高濃度ＮＥＭ（～500 μＭ）処置は、さらにα_2-レセプターとクロニジンの結合を阻害するアルキル化が起こっているものと推定された。

Key word：α_2-adrenoceptor，Ｇｉ，N-ethylmaleimide

Ⅰ．緒言

我々は、中枢α_2-レセプターへのリガンド結合調節に、百日咳毒素によって失活されるＧＴＰ結合調節タンパク（Ｇ蛋白，おそらくＧｉ）が関与し（１），このアゴニスト刺激によって引き起こされるアデニル酸シクラーゼ活性の抑制にＧ蛋白が介在していること（２），さらに、クロニジンによるα_2-レセプターを介した鎮静，運動量減少作用にもＧ蛋白が関与していること（３）を報告してきた。ＳＨ基アルキル化剤のＮ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）は、α_2-レセプター－エフェクター系において、アゴニスト結合を抑制したり（４），アデニル酸シクラーゼ活性抑制を消失させたりすること（５）が報告されているがその詳細は明らかにされていない。そこで今回、この分子レベルでの機構について検討した。

Ⅱ．方法

(i) 受容体標品：Wistar 系雄性ラット（体重 180～250 g)の大脳皮質を 0.32 M ショ糖を含む緩衝液（10 mM トリス，1 μg/ml ペプスタチン，0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride，pH 7.4）でホモジナイズし、1,000 x g，10 分間遠心分離した。この上清を 48,000 x g，20 分間超遠心分離した。得られた沈渣を同緩衝液で３回洗浄したものを受容体標品（ラット大脳皮質膜）とした。

(ii)脳Ｇ蛋白の精製：　ブタ大脳皮質（約 100 g）から Sternweisら（６）の方法に準じて脳Ｇ蛋白（Ｇｉ，一部Ｇｏ混在）を精製した。

(iii) ＮＥＭ処置：　最終濃度 0.3μＭ～１ｍＭ　ＮＥＭを受容体標品および脳Ｇ蛋白と０℃，30分間インキュベートした。最終濃度 5 mM ジチオスレイトールを加えることにより反応を停止させた。受容体標品の場合、さらに 48,000 x g，10 分間超遠心分離し、沈渣を緩衝液（50 mM トリス-HCl，pH 7.4）で３回洗浄し、10 mM $MgCl_2$ を含む同緩衝液で浮遊させ結合実験に用いた。

(iv)百日咳毒素（islet-activating protein，IAP)処置：　ＮＥＭ前処置した受容体標品および精製脳Ｇｉ標品を 10 μg/ml ＩＡＰ，10μＭ［^{32}Ｐ］ＮＡＤ存在下ＡＤＰ－リボシル化し Laemmliの方法

（７）に準じてＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ないゲルを乾燥後、Ｘ線フィルムと６時間～10日間曝露することによりオートラジオグラフィーを行なった。

(v) 結合実験：　結合飽和実験は、約 300μg 蛋白量の受容体標品と 0.1～17ｎＭの［^{3}H］クロニジン(41.5 Ci/mmol)および最終濃度 100μＭ　ＧＴＰ存在，非存在下で 25 ℃，30分間インキュベートした。非特異的結合は、10μＭフェントラミン存在下で同様に行なった。 0.3μＭ～１ｍＭ　ＮＥＭ処置した受容体標品は、１ｎＭ［^{3}H］クロニジンとともにインキュベートした。　インキュベート後、GF/Bフィルター上に吸引沪過し、洗浄後β線を測定した。結合飽和実験より得た Scatchard plot は、Rosenthal 法（８）に基づく非線型最小２乗法により解析し、高親和性および低親和性結合成分の各パラメーター（Ｋｄ，Ｂｍａｘ）を算出した。

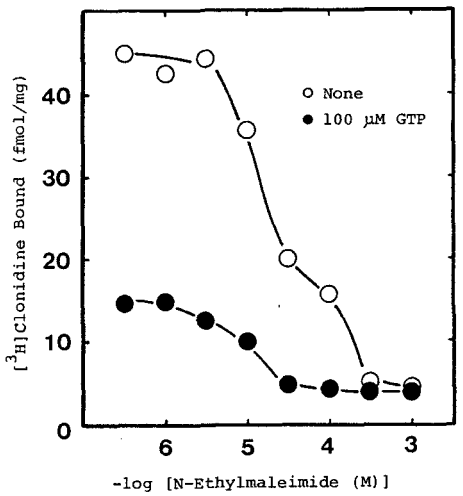


Fig. 1. Concentration-inhibition curve of pretreatment with NEM on cerebral cortical [^{3}H]clonidine binding.

ＩＩＩ．　結果

３μＭ～１ｍＭ　ＮＥＭ前処置したラット大脳皮質膜の 100μＭ　ＧＴＰ存在，非存在下における［^{3}H］クロニジン結合は二相性の抑制を示した(Fig. 1)。30μＭ　ＮＥＭ前処置により［^{3}H］クロニジン結合は約 55 % 抑制され、これはＮＥＭ無処置膜における 100μＭ　ＧＴＰの約 60 % 結合抑制と同様の効果を示した。また300 μＭ以上のＮＥＭ処置により結合は、ＧＴＰの存在，非存在下いずれも約 90 %抑制された。このＮＥＭ処置による効果を詳細に検討するため、Scatchard 解析を行なった。ＮＥＭ無処置膜のＧＴＰ存在下における Scatchard plotは、高親和性結合数が有意に減少したが全結合数には変化は認められなかった（Fig.2A）。 50 μＭ　ＮＥＭ前処置膜におけるＧＴＰ非存在下の Scatchard plot は、このＮＥＭ無処置膜のＧＴＰ存在下の Scatchard plot に類似していた。つまり全結合数には有意な差は認められなかったが、高親和性結合数は有意に同程度減少した。この処置膜のＧＴＰ存在下における Scatchard plot は低親和性結合成分のみの直線を示したが、全結合数には有意な変化は認められなかった（Fig. 2B)。一方、500 μＭ　ＮＥＭ前処置における Scatchard plot は、ＮＥＭ無処置膜に比べ有意な全結合数の減少

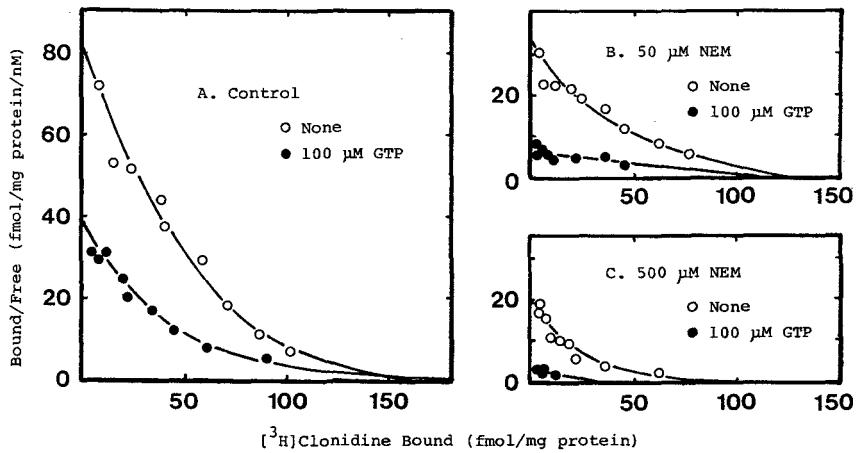


Fig. 2. Scatchard plots of cerebral cortical [^{3}H]clonidine binding and influence of pretreatment with NEM.

が認められた（Fig. 2C）。ラット大脳皮質膜をＩＡＰ，［^{32}Ｐ］ＮＡＤ存在下インキュベートすると特異的に分子量 41,000 の蛋白がＡＤＰ－リボシル化された。しかし、50μＭ　ＮＥＭ前処置膜ではこのＡＤＰ－リボシル化は抑制された。またブタ大脳から精製したＧ蛋白標品は、分子量41,000とともに39,000の蛋白がＡＤＰ－リボシル化されたが、50μＭ　ＮＥＭ前処置によっていずれの蛋白のＡＤＰ－リボシル化は抑制された(Fig. 3)。

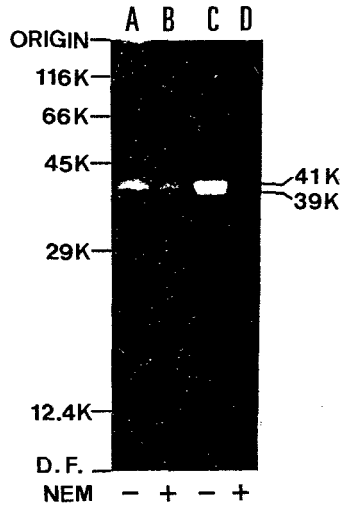


Fig. 3. Effect of NEM on ADP-ribosylation of rat cerebral cortical membranes (A, B) and purified G-prteins (C, D) by IAP.

Ⅳ．　考察

我々は、これまでにラット大脳皮質膜のＩＡＰ処置によってＧｉがＡＤＰ－リボシル化され、α_2-レセプターとＧｉの脱共役が起こり、α_2-アゴニスト結合が抑制されること(1)，α_2-アゴニスト刺激によるアデニル酸シクラーゼ活性の抑制が遮断されること（２），さらに、ＩＡＰのラット脳室内投与によって、クロニジンによる鎮静，運動量の減少作用が抑制されること（３）を報告してきた。最近、ＧｉおよびＧｏの一次塩基配列が決定され、ＩＡＰによってＡＤＰ－リボシル化されるのはＣ－末端側のシステイン残基であることが指摘されている（９，10，11）。　今回、ラット大脳皮質膜への［^{3}Ｈ］クロニジン結合への50μＭ　ＮＥＭ前処置の影響をScatchard 解析するとＧＴＰと同様の影響を示した。この効果は、ラット大脳皮質膜のＩＡＰ処置によってＧｉのみが、ＡＤＰ－リボシル化されたときの効果（１）と同様であった。このことから中枢α_2-レセプターは、ＧｏよりもＧｉと共役するものと推定された。しかしながら、中枢α_2-レセプターとＧｏが共役しえないのかどうかは今後の課題である。またラット大脳皮質膜および脳Ｇ蛋白のＮＥＭ前処置によってＩＡＰによるＡＤＰ－リボシル化が抑制されることから、低濃度（～50μＭ）ＮＥＭはＩＡＰによってＡＤＰ－リボシル化されるシステイン残基をもアルキル化するため、ＩＡＰと同様なα_2-レセプターとＧ蛋白（おそらくＧｉ）の脱共役が起こるものと推定した。しかしながら高濃度（～500 μＭ）ＮＥＭ前処置ではα_2-レセプターとアゴニストの結合をも阻害するようなアルキル化が起こることが示唆された。

Ⅴ．　参考文献

（１）Nomura,Y., Kitamura,Y. and Segawa,T. (1985) J. Neurochem. 44, 364-369.

（２）Kitamura,Y., Nomura,Y. and Segawa,T. (1985) J. Neurochem. 45, 1504-1508.

（３）川田恵子，北村佳久，野村靖幸（1985）神経化学 24, 133-135.

（４）Kawai,M. and Nomura,Y. (1983) Eur. J. Pharmacol. 91, 449-454.

（５）Jakobs,K.H., Lasch,P., Minuth,M., Aktories,K. and Schultz,G. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2829-2833.

（６）Sternweis,P.C., and Robinshaw,J.D. (1984) J. Biol. Chem. 259, 13806-13813.

（７）Laemmli U.K. (1970) Nature 227, 680-685.

（８）Rosenthal,H.E. (1967) Anal. Biochem. 20, 525-532.

（９）Nukada,T., Tanabe,T., Takahashi,H., Noda,M., Haga,K., Haga,T., Ichiyama,A., Kangawa, K., Hiranaga,M., Matsuo,H. and Numa,S. (1986) FEBS Lett. 197, 305-310.

(10) Ito,H., Kozasa,T., Nagata,S., Nakamura,S., Katada,T., Ui,M., Iwata,S., Ohtsuka,E., Kawasaki,H., Suzuki,K. and Kaziro,Y. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, in press.

(11) Asano,T. and Ogasawara,N. (1986) Mol. Pharmacol. 29, 244-249.

81. 細胞膜リン脂質による adrenoceptor 結合活性の調節機構

宮本　篤・大鹿英世　　(札幌医大・薬理)

〔要　約〕

細胞膜における adrenergic receptorの結合活性変化と膜流動性との関係を理解する目的で、rat parotid cells における phospholipase A_2 (EC 3.1.1.4, hog pancreas) と phospholipase C(EC 3.1.4.3, bacillus cereus)の作用を検討した。Phospholipase A_2 および C (0.1～10 U/ml) の parotid cell への処置は、その cell membranesへの [^{3}H] prazosin結合のBmax値を著しく増加した。膜流動性の指標として一般に使用されている蛍光プローブ，1,6-diphenyl-1,3,5 hexatriene (DPH) のparotid cellへの導入は、速やかに行なわれそのRs値 (fluolescence anisotropy)は実験中一定していた。Phospholipase C (0.1～10 U/ml)の cell aggregatesへの添加は、迅速にRs値を著しく低下し、この作用は実験中保持された。一方phospholipase A_2の添加では、10 U/ml においてのみ著しいRs値の増加が認められた。以上の成績より、phospholipase C による α_1-receptor結合活性の増加には、細胞膜内流動性の亢進（Rs値の低下）が関与しているものと考えられる。しかしphospholipase A_2による α_1-receptor結合活性の増加に関しては、膜内流動性の低下（Rs値の上昇）やその他の機構の介在が推察された。

Key word： Membrane phospholipids bi-layer, α_1-adrenoceptor, Membrane fluidity

〔緒　　言〕

一般に細胞膜に存在するreceptor蛋白質は、その分解，崩壊と合成，再利用のバランスの結果であろうと考えられ、近年ではspare receptor或は silent receptorなどの存在も提唱されている。また adrenergic receptorに関しては、特異的な精製法の開発によりその分子的性質・構造が明らかにされつつある。我々は先に、細胞膜における α_1-receptor結合は、β-receptor agonist 処置により著しい活性増加をきたすことを見出し (1, 2, 3)、receptorの活性化機構に関し検討を加えている。

一方、細胞膜 adrenergic receptor結合は、trypsin(4)やprotease(5) などの蛋白質分解酵素処置により著しい活性低下をおこすが、phospholipase A_2(PLase A_2)は逆に著しい活性増加を引き起こす (6)。この事実から adrenergic receptorは、細胞膜内に存在するリン脂質により活性調節を受けていると想定される。しかし、どの様な修飾が細胞膜に加わるとreceptor活性が変化するのかは今だ不明である。

本研究は、リン脂質に作用するPLase A_2およびphospholipase C(PLase C)を使用し、細胞膜における adrenergic receptorの結合活性変化と膜流動性との関係を解析した。

〔方　　法〕

実験には、Wistar系雄性ラット(250-300g)の parotid glandを使用した。

(1) Parotid cell aggregates の調整とその流動性の測定 ： Parotid gland slices は、collagenase(0.6U/ml)とbovine testicular hyaluronidase(2 mg/ml)を含むHanks' solution II (HBSS II, Ca^{2+} and Mg^{2+} omitted, pH 7.4)中で 37°C, 1 hr incubation 後、cell aggregates を分取しHanks' solution I (HBSS I, pH 7.4)中に再浮遊した。Trypan Blue exclusion により検索した調整cellの viabilityは、約９０％であった。

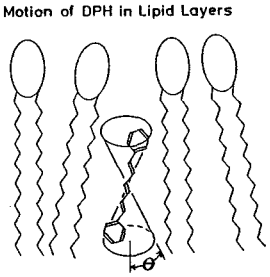


Fig. 1 A wobbling-in-cone model for the motion of DPH in lipid bi-layer.

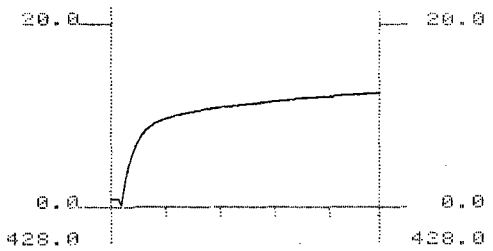


Fig. 2 Changes in fluorescence intensity in parotid cell aggregates.

流動性測定の蛍光プローブとして広く用いられる1,6-diphenyl-1,3,5 hexatriene(DPH)をcell脂質二重層に導入した。導入されたDPHは、Fig. 1に示す様に脂質鎖の間に入りその場所のviscosityを反映した速度で運動する(7)。この時脂質分子によりDPHの運動範囲は制限され自由な回転運動にはならず揺動運動となる。Parotid cell aggregate ($1.5-2.5 \times 10^5$ cells)に導入したDPHの蛍光強度変化は、Fig. 2の様になり5 min間でほぼ一定となる。この後、PLase A_2(EC 3.1.1.4, hog pancreas)及びPLase C(EC 3.1.4.3 Bacillus cereus)を添加し、30 secから5 min後迄の流動性の指標(8, 9)となる蛍光異方性(Rs)をコンピュータ解析した。

(2) Parotid cell membraneの調整と[^{3}H] prazosin結合実験：上述したparotid cell aggregatesの調整後、5 min間PLase A_2, Cを処置した。その後、処置cellはprotease inhibitorsを含む50 mM Tris HCl (pH 7.4)中で破砕し、cell membraneを調整した。このmembranes(0.4-0.6 mg protein)は、[^{3}H] prazosin結合実験に使用した。すなわち[^{3}H] prazosin (0.05-2.5 nM)存在下で25°C, 30 min incubateし、10 μM phentolamineでdisplaceされる結合を特異的結合とした。

【結果及び考察】

(1) PLase C及びPLase A_2の処置によるα_1-receptorの特異的結合の増加

[^{3}H] Prazosin結合に及ぼすPLase C及びPLase A_2の影響を検討した(Fig. 3)。Parotid cell membraneにおいて、[^{3}H] prazosinの濃度(0.05-2.50 nM)の範囲で、Scatchard plotはほぼ直線を示し、結合親和性(Kd)が0.44±0.05nM、最大結合数(Bmax)は35.9±4.02fmols/mg proteinであった(data not shown)。PLase Cの10, 1, 0.1U/mlの処置は、Kd値を変化させることなく[^{3}H] prazosinの結合数を増加した。PLase A_2の10, 1, 0.1U/mlの処置は、僅にKd値を低下し、著しく($P<0.01$)結合数を増加した。この事は、リン脂質のC_2部位のエステル結合を分解するPLase A_2と同様にC_3におけるグリセロールとリン酸のエステル結合を切断するPLase Cにもα_1-receptor数を増加させる作用があると考えられる。PLase A_2やPLase Cは、parotid glandやニューロン内にも存在し、シナプス伝達時にCa^{2+}の動きを介して活性化または放出されることが報告されている(10)。従って上述の様なα_1-receptorの活性調節がin vivoにおいて

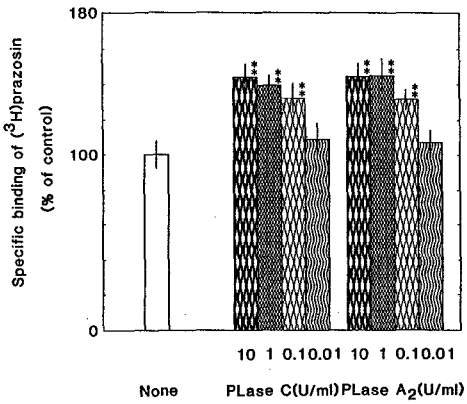


Fig. 3 Influence of PLase C and A_2 treatment on Bmax of specific binding of [^{3}H] prazosin to cell membranes.

も重要な役割を演じている可能性がある。

(2) 細胞膜脂質二重層の流動性に及ぼす PLase CとPLase A_2の相反効果

細胞膜に DPHを導入し、PLase C及びPLase A_2による Rs 値の変化を検討した (Fig. 4, 5)。測定時間内のparotid cellにおける Rs 値は、無処理群において不変であった (data not shown)。PLase C の10, 1, 0.1U/ml の添加は、30 sec後に著しく ($P<0.01$)Rs値を低下させ、膜流動性の高まりを示した。この作用には、僅な dose dependency が認められ 5 min後迄、比較的一定した持続を示した。しかし、0.01U/mlでは殆ど変化がなかった。120°C で15 min間煮沸した PLase C 10U/ml(Boiled)の添加では、Rs値に全く変化は認められなかった(Fig. 4)。PLase A_2 10U/ml の添加は、1 min 後に著しく ($P<0.01$)Rs値を増加し、膜流動性の低下を示した。この作用は、5 min 後迄一定していた。しかし 1, 0.1 0.01U/mlでは、測定時間を通じ著しいRs値の変化を示さなかった。上述の PLase Cと同様、煮沸したPLase A_2では、Rs値の増加を減弱した(Fig. 5)。この事から、PLase C とPLase A_2には、膜流動性の変化の指標となる Rs 値を逆方向に変動させるものと考えられる。従って PLase CとPLase A_2の膜流動性に対する相反効果は、リン脂質の分解・切断部位の相違を反映した結果であるのかもしれない。

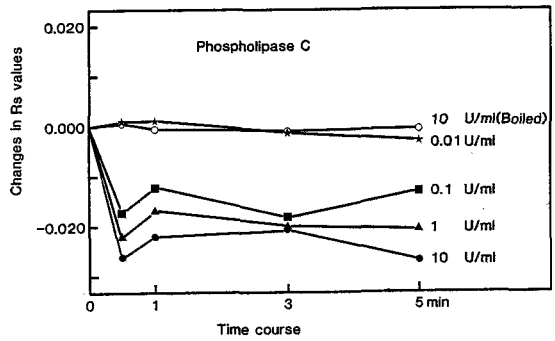


Fig. 4 Influence of PLase C on Rs values of cell aggregates.

以上の成績より、細胞膜内のリン脂質が PLase Cにより分解し、その結果生じる膜内流動性の亢進により膜が軟化し、α_1-receptor結合を増加している可能性が考えられる。しかし PLase A_2によるα_1-receptorの結合増加と膜流動性の関係については不明な点が多いが、このreceptor増加には膜流動性の変化が関与していないのかもしれない。

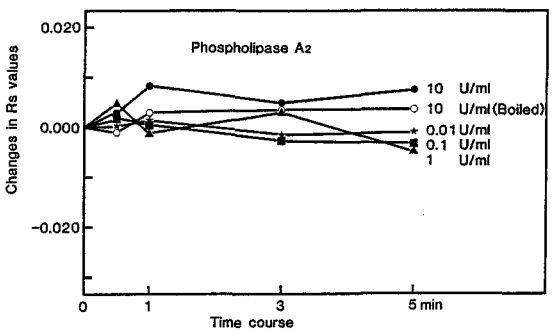


Fig. 5 Influence of PLase A_2 on Rs values of cell aggregates.

【文　　献】

1. Miyamoto, A., and Ohshika, H. (1984) Japan. J. Pharmacol. 34, 356-358 2. Miyamoto, A., and Ohshika, H. (1984) The Autonomic Nervous System 21, 445-451(abs. in English) 3. Miyamoto, A., Akino, T., and Ohshika, H. (1986) Japan. J. Pharmacol. 42, 63-70 4. Strittmatter, W. J., Davis, J. N., and Lefkowitz, R. J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5472-5477 5. Leeb-Lundberg, L. M. F., Dickinson, K. E. J., Herald, S. L., Wirkberg, J. E. S., Hagen, P. O., DeBernardis, J. F., Winn, M., Arendsen, D. L., Lefkowitz, R. J., and Caron, M. G. (1984) J. Biol. Chem. 259, 2579-2581 6. Cohen, R. M., McLellan, C., Dauphin, M., and Hirata, F. (1985) Life Sciences 36, 25-32 7. Kinosita, K. Jr., Kawato, S., and Ikegami, A. (1984) Adv. Biophys. 17, 147-203 8. Jahnig, F. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6361-6365 9. Araiso, T., Shindo, Y., Arai, T., Nitta, J., Kikuchi, Y., Kakiuchi, Y., and Koyama, T. (1986) Biorheology (in press) 10. Castle, A. M., and Castle, J. D. (1981) Biochim. Biophys. Acta 666, 259-274

82. Phenelzine および carbidopa 前処理ラットの皮質 5-HT_2 receptor と wet-dog shakes に及ぼす5-HT 前駆体投与の効果

越川憲明・J.D.Stephenson*　（日本大・歯・薬理，Dept. of Pharmacology, Institute of Psychiatry London *）

〔要　約〕

ラットの皮質 serotonin-2 (5-HT_2) receptor および wet-dog shakes (WDS) 発現に及ぼす5-HT前駆体投与の効果について検討し以下の結果を得た。

1. Phenelzine 前処置(46.8mg/kg 18h前，11.7mg/kg 1.5h前)ラットに tryptophan(150mg/kg)を投与した結果、WDSの発現と3h以内の急速な5-HT_2 receptorの減少が認められた。

2. Carbidopa前処置(25mg/kg 30min前)ラットでは、5-HTP(150mg/kg)投与によってtryptophanの場合より多くのWDSの発現が見られたが、5-HT_2 receptor の変化は認められなかった。

3. 5-HTP 350mg/kg投与では150mg/kgの場合ほどWDSは認められなかったが、投与後3hで 5-HT_2 receptor Bmaxの増加が認められ、6hでは対照と差はなく、24hでは逆に有意な減少を示した。

4. 3hでのBmaxの増加はhaloperidol(5mg/kg)の投与で逆転し、Bmaxの減少を示したが、α-methyl-para-tyrosine(α-MPT,250mg/kg)前投与では相変らず増加を示したままであった。

Key word :　5-HT precursors,　wet-dog shakes,　5-HT_2 receptor

Monoamine oxidase阻害剤(MAOI)と5-HT uptake阻害剤であるparoxetineを併用することによって、急速(3h以内)な皮質5-HT_2 receptorのdown-regulationが起こることが報告されている(6)。同様のdown-regulationはparoxetineの代りにfenfluramineや5-methoxy-N,N-dimethyltryptamineを投与した場合にも見られるが、5-HTPを用いた場合には5-HT依存性の行動と考えられるWDSがより多く出現するにもかかわらずdown-regulationの発現は遅く、その程度も極めて軽度であった(5)。これらの結果は、シナップス間隙の5-HT量の増加だけでは、急速な5-HT_2 receptorのdown-regulationの発現を説明するには十分でないことを示していると思われる。そこで今回はこの点についてさらに検討する目的で、5-HT前駆体(tryptophan,5-HTP)投与が5-HT_2 receptorに与える変化について実験を行ない、併せてそれに対するdopamine系の関与についても検討を加えた。

【実験方法】

WDSの観察　Wistar系雄性ラット体重180~220gを使用した。WDSの測定間隔は15分とし、各測定時点の前5分間の1匹当りのWDS出現回数をカウントした。Phenelzine(MAOI)前処置はMarley and Wozniak(8)の報告に従い、tryptophan(150mg/kg)投与の前18h(46.8mg/kg)と1.5h(11.7mg/kg)に投与した。Carbidopa(25mg/kg)前処置は5-HTP(150mg/kg,350mg/kg)投与の30分前に行なった。また薬物は全て腹腔内に投与した。

5-HT_2 receptor の結合実験　Leysenら(7)の報告に準じて行なった。すなわち、ラットを断頭屠殺後、皮質を取り出し、0.05M Tris-HCl buffer pH7.7を用いて15秒間ホモジナイズし、48200×g,4℃で15秒間遠心した。得られたペレットを上記の条件で3度洗浄後結合実験の試料とした。結合実験には放射性リガンドとして[^{3}H]-Ketanserine(0.1~1.5nM)を用い、最終溶量を0.5ml(2.5mg original tissue)とし、37℃,15分間インキュベートした後、GF/Bフィルターで濾過し、さらにcold buffer 5ml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。また、特異的結合量は全結合量より、1μMのmethysergide存在下で置換されない非特異的結合量を差し引いて求め、得られた6点の特異的結合量の値からdirect linear plots(3)によりBmaxおよびKdの値を算出した。

【結果および考察】

Carbidopa前処理ラットに5-HTP(150mg/kg)を投与した場合のWDSの出現はfig.1に示した通りである。投与後6hの時点でも、すでに報告した3hの時点(5)と同様に皮質5-HT_2 receptorには変化が認められなかった。より大量の5-HTP(350mg/kg)を投与した場合にはWDSの発現頻度は逆に少なかった(fig.2)。この結果は5-HTP投与によるWDSは150mg/kgをピークとする逆U字型の用量反応曲線を示すとするPycokら(2)の報告を裏付けるものである。5-HTP 350mg/kg投与後の5-HT_2 receptorの変化についてはfig.3に示すように、Bmaxは投与後3hでは10%の有意な増加を示し、6hでは対照と差はなく、24h後では逆に有意な減少を示した。また、Kd値にはいずれの時点でも変化は認められなかった。この3hの時点でのBmaxの増加については、大量の5-HTP投与はdopamine(DA) neuronにおいてDAを置換あるいは遊離するとの報告(4)があるので、DA系が関与している可能性も考えられる。そこでhaloperidolを用いDA系の関与について検討した結果、fig.4に示すようにhaloperidolの0.1mg/kg投与では相変らずBmaxの増加が認められ、1mg/kg,5mg/kgと投与量を増やすに従ってこのup-regulationの逆転が認められた。このことは5-HT_2 receptorの調節にDA系が関与していることを示している。しかしα-MPT前処置によって(250mg/kg 16hおよび4h前)catecholamine合成を抑えておいた場合では、相変らず5-HTP 350mg/kg投与によって、5-HT_2 receptorの増加が認められており、〔Bmax(fmole/mg);5-HTP=14.6±0.5, saline=13.5±0.6, Kd(nM);5-HTP=0.43±0.43,saline=0.45±0.01,n=9〕DA系の関与については今のところ簡単には説明が付かない。別の5-HT前駆体であるtryptophanをMAOI前処理ラットに投与した場合にもfig.2に示すようにWDSの発現が見られる。この場合tryptophan投与後3hで15%のBmaxの減少が認められ〔Bmax;tryptophan=9.8±0.4, saline=11.6±0.4, Kd;tryptophan=0.34±0.03, saline=0.36±0.02, n=6〕、6hでも同程度のBmaxの減少が認められた。この結果は、tryptophanは5-HTPと異なり、主に5-HT neuron内で5-HTに合成される(1)ことによるため、5-HTPとは異なった結果を示したものとも考えられる。いずれにしても、何故5-HTP投与の場合だけ他の5-HT系を促進する薬物と異なった作用形式を示すのかという理由については、DA系を含む何か別の複雑な5-HT_2 receptor調節機構の関与が推察される。

【文献】

(1) Aghajanian,G.K.and Asher,I.M.(1971) Science,172,1159. (2) Bedard,P.and Pycock,C.J.(1977) Neuropharmacol.,16,663. (3) Eisenthal,R.and Cornish-Bowden(1974) Biochem.J.,139,715. (4) Fuxe,K.,Butcher,L.L.and Engel,J.(1971) J.Pharm.Pharmacol.,23,420. (5) Koshikawa,F.,Koshikawa,N.and Stephenson,J.D.(1985) Europ.J.Pharmacol.,118,273. (6) Koshikawa,N.,Smokcum,R.W.J. and Stephenson,J.D.(1985) Neuroscience Lett.,55,279. (7) Leysen,J.E.,Niemegeers,C.J.E.,Van Nueten,J.M.and Laduron,P.M.(1982) Mol.Pharmacol.,21,301. (8) Marley,E.and Wozniak,K.M.(1984) J.Psychiat.Res.,18,173.

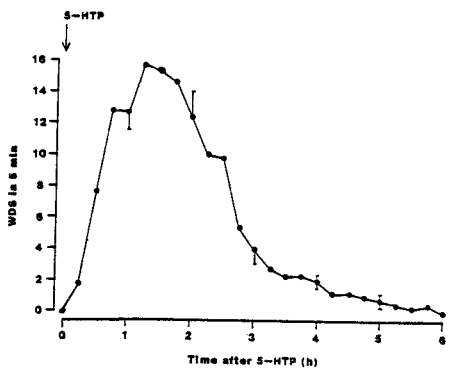


Fig.1 Mean numbers (±S.E.M.) of wet dog shakes (WDS) occurring in rats pretreated 30 min previously with carbidopa (25 mg/kg) and given 5-HTP (150 mg/kg) at zero time. At 6 h, cortical 5-HT$_2$ receptors were found to be unchanged. (5-HTP ; Bmax = 12.1±0.6 fmol/mg tissue Kd = 0.36±0.02 nM, Saline ; Bmax = 11.5±0.5 fmol/mg Kd = 0.36±0.02 nM, n = 6)

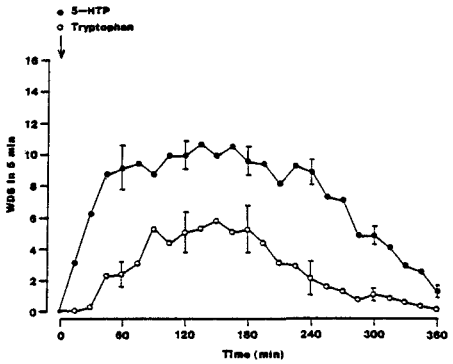


Fig.2 Mean numbers (±S.E.M.) of wet dog shakes (WDS) occurring in rats pretreated (●) with carbidopa (25 mg/kg 30 min previously) or (○) phenelzine (46.8 mg/kg 18 h and 11.7 mg/kg 90 min previously) and given either (●) 5-HTP (350 mg/kg) or (○) tryptophan (150 mg/kg) at zero time. For the tryptophan experiments, n = 15 rats and in the 5-HTP experiments, n = 12 rats until 180 min and n = 6 rats thereafter.

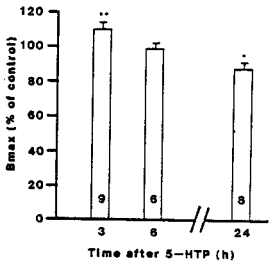


Fig.3 Time course of changes in Bmax of ^{3}[H]ketanserin to cortical membranes prepared from rats pretreated with carbidopa (25 mg/kg) 30 min before injection of 5-HTP (350 mg/kg). The numbers of rats used are given in the columns. The results are expressed as percentages of the Bmax obtained in simultaneously run rats pretreated with carbidopa and given saline instead of 5-HTP. The mean Bmax of the control rats was 14.0±0.6 fmol/mg tissue (Kd = 0.33±0.02 nM, n = 23).
ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$.

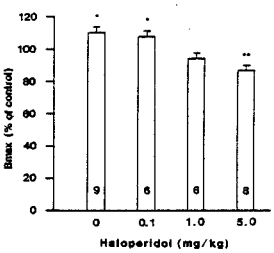


Fig.4 Effects of haloperidol (0.1, 1.0 and 5.0 mg/kg) on 5-HT$_2$ receptor numbers 3 h after giving 5-HTP (350 mg/kg) to carbidopa (25 mg/kg 30 min previously) treated rats. The numbers of rats used are given in the columns. The results are expressed as percentages of the Bmax obtained in simultaneously run carbidopa treated rats not given haloperidol and given saline instead of 5-HTP The mean Bmax of these control rats was 11.42±0.2 fmol/mg. (Kd = 0.37±0.02 nM, n = 20). ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

83. Age- and sex-related changes in histamine and H-1 receptors in the central nervous system following a long-term castration

Ramon Cacabelos・大和谷厚*・福井弘幸*・武田雅俊
西村　健・和田　博*　（大阪大・精神医学，第二薬理*）

〔要　約〕

To clarify the interactive role of histamine (HA) in the gonadotropinergic system, changes produced by a 3-month-castration in infant (3w), young (3m) and adult (16m) Wistar rats of both sexes have been studied. The most significant age-dependent changes in brain HA were found in the hypothalamo-hypophyseal system (HhS). Sex-differences showed that females are more responsive than males to the castration-induced central HA response. HA increased in the anterior hypothalamus (AH) of infant female rats from 1.8±0.1 to 2.9±0.2 nmol/g. The highest response of HA to castration was found in the posterior hypothalamus (PH), with changes from 2.5±0.2 to 4.34±0.43 nmol/g in adult rats, and in the neurohypophysis (Nh), with changes from 10.13±0.9 to 23.12±2.64 nmol/g. In both areas, a positive correlation (r=+0.87) in age-related changes in HA levels was observed. Other areas in which the concentration of HA was modified by castration included the median eminence (ME), adenohypophysis (Ah), thalamus and spinal cord.

The effects of castration on HA H-1 receptors (H1-R) were studied using ^{3}H-Mepyramine binding. Neural structures located within the blood-brain barrier showed a higher average concentration of H1-R in control males than in females. In the ME and hypophysis, on the contrary, ^{3}H-Mepyramine binding was higher in females than in males. The latter areas were more affected by castration than other brain regions. In the ME, ovariectomy elicited a decrease in ^{3}H-Mep binding from 64.57 to 44.84 fmol/mg prot. while orchidectomy caused the opposite effect, H1-R increasing from 30.93 to 58.01 fmol/mg protein. Electrophoretic analysis (SDS-PAGE) of cytosolic proteins from the HhS showed that ovariectomy induced a densitometric reduction in a 15K protein in the AH, PH and ME. In the Ah and Nh, two bands of 22K and 100K, respectively, were increased. Protein changes operated under orchidectomy were different from those observed after ovariectomy.

These results suggest that HA interacts with the GTS through two putative feedback loops: A gonadal estrogen-dependent feedback loop and an intrahypothalamic short feedback loop probably linked to LHRH.

Key word : Histamine, H-1 receptors, ovariectomy, orchidectomy, central nervous system, SDS-PAGE, Hypothalamo-hypophyseal system

INTRODUCTION

Over 10 years ago it was known that castration increased the hypothalamic levels of HA (1). Intracerebroventricular injection of N-2-aminohistidine decreases the lordotic response, sexual receptivity and exploratory behaviour in rats (2). DONOSO (3) demonstrated that HA elicites an acute release of LH in both proestrus and ovariectomized, steroid-treated rats, with absent response in diestrus or estrus. HA receptors mediating these responses are still controversial and there is no agreement among authors. The most accepted theory is that both H-1 and H-2 receptors are involved in the gonadotropic response of HA (4,5) with participation of additional regulatory estrogen-dependent mechanisms (6,7).

With a better understanding of the neuronal distribution of HA in the CNS (8), it should be pertinent to discriminate specific brain areas which respond to the dysruption produced by castration in the feedback mechanism controlling the GTS. As the gonadotropic activity follows a sex- and age-dependent rhythm, we have accomplished the task of investigating age- and sex-related changes in brain HA and H1-R after a long-term castration. In addition, SDS-PAGE studies of hypothalamo-hypophyseal soluble fractions were carried out in order to elucidate protein changes in the HA-secreting neurons and histaminergic pathways in the HhS of castrated and control rats.

MATERIALS AND METHODS

Wistar rats of both sexes of 3 weeks (I = Infant), 3 months (Y = Young) and 16 months (A = Adult) (n = 5-9 rats/age-sex group) of age were ovariectomized and orchidectomized. In female control animals a bilateral laparotomy was performed. In control males, a superficial scrotal incision was practiced and subsequently sutured. Three months later, the animals were decapitated between 10:00 and 11:00 a.m. Brains were removed and dissected into the areas shown in Table I and HA was determined by HPLC with fluorometric detection (9).

For determining H1-R in brain, animals were sacrificed 45 days following castration. Brains were removed and separated into the parts shown in Table II. ^{3}H-Mepyramine binding activity was assayed by a modification of the method of CHANG et al (10) and TRAN et al (11) as previously described (12,13). In brief, samples were homogenized in 4 ml ice-cold Na-K phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) for 30-s periods in a Polytron and centrifuged at 50,000 xg for 20 minutes at 4°C. The pellet was resuspended in 2 ml of ice-cold buffer by Polytron homogenization for 30 s. A 400-µl aliquot of the homogenate was taken for protein assay by a modification of the Lowry's method. Then 400 µl samples of the membrane preparation were incubated for 1 h. at 25°C with 100 µl of 2 nM ^{3}H-Mepyramine with and without 100 µl of 20 µM triprolidine, as a displacing agent, in a final volume of 500 µl. The preparations were then filtered under vacuum on glass fiber filters and their radioactivity was counted in 6 ml of scintillation cocktail. Specific binding was defined as the observed radioactivity minus the nonspecific binding determined in the presence of triprolidine.

Brains from control animals and rats with a 45-days castration were isolated and the HhS was

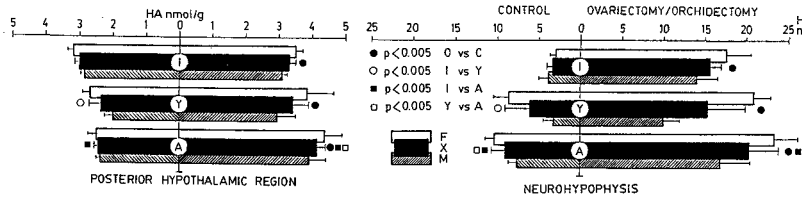


Figure 1. Effects of ovariectomy and orchidectomy on the content of histamine (HA) in the posterior hypothalamic region and neurohypophysis of infant (I), young (Y) and adult (A) Wistar rats. F = Females; M = Males; X = Mean value (X + SD).

dissected into the following parts:anterior hypothalamus (AH), posterior hypothalamus (PH), median eminence (ME), adenohypophysis (Ah) and neurohypophysis (Nh) (n = 3/group). Electrophoretic analysis of cytosolic proteins was carried out by Gradient SDS-PAGE in PAA 4/30 Pharmacia Gels following a standard procedure (13). The densitometric analysis of gels stained with Coomassie blue R250 was realized with a digital densitometer at an absorbance of 620 nm.

R E S U L T S

Age- and sex-related changes in brain histamine after castration (Table I)

The most relevant sex-independent changes in HA after castration were observed in the HhS. Castration-induced HA responses were maximum in adult animals. In the infant female rats, HA increased from 1.8±0.1 to 2.9±0.2 nmol/g (t=12.04, p<0.005) in the AH. The highest increase in HA was detected in the PH and Nh where HA followed a parallel incremental pattern with a clear positive correlation (Y = 10.29+7.61X; r = +0.87; p<0.005). In the PH, HA increased from 3.2±0.18 to 3.5±0.18 nmol/g in infant rats; from 2.71±0.27 to 3.84±0.94 nmol/g (t=2.83, p<0.02) in young rats; and from 2.5±0.2 to 4.34±0.43 nmol/g (t=9.50, p<0.005) in adult rats (Fig. 1). In the Nh of female rats, HA increased from 2.86±0.64 to 17.24±3.20 nmol/g (t=7.79, p<0.005) in infant animals; from 8.43±1.23 to 21.02±1.93 nmol/g (t=13.47, p<0.005) in young animals; and from 10.13±0.9 to 23.12±2.6 nmol/g (t=11.40, p<0.005) in adult animals (Fig. 1). In the ME, a paradoxical response was observed. Whereas HA increased with age in normal rats, castrated animals exhibited a decreasing response from infanthood to adulthood. In the Ah, the HA response to castration was biphasic, with higher peaks in infant and adult rats than in young rats. The concentration of HA was also altered in some other brain regions, such as thalamus, hippocampus and spinal cord (Table I).

TABLE I

AGE- AND SEX-RELATED CHANGES IN HISTAMINE IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AFTER OVARIECTOMY AND ORCHIDECTOMY

AREA	SEX	EXP	AGE		
			INFANT	YOUNG	ADULT
anterior hypothalamic region	F	O	2.60 ± 0.40	2.21 ± 0.29	2.91 ± 0.26
		S	1.86 ± 0.29	1.74 ± 0.21	1.82 ± 0.10
	M	O	2.30 ± 0.30	2.30 ± 0.60	2.69 ± 0.30
		S	1.23 ± 0.20	1.95 ± 0.30	1.70 ± 0.20
posterior hypothalamic region	F	O	3.50 ± 0.10	3.84 ± 0.94	4.34 ± 0.43
		S	3.20 ± 0.18	2.71 ± 0.26	2.50 ± 0.20
	M	O	3.10 ± 0.18	2.97 ± 0.50	3.31 ± 0.50
		S	2.96 ± 0.19	2.01 ± 0.20	2.41 ± 0.20
median eminence	F	O	15.07 ± 2.60	12.67 ± 0.89	8.65 ± 0.53
		S	4.04 ± 1.15	7.99 ± 0.19	8.50 ± 0.70
	M	O	14.90 ± 2.30	13.38 ± 1.80	9.87 ± 0.60
		S	9.60 ± 0.70	5.14 ± 0.19	7.93 ± 0.60
adenohypophysis	F	O	2.90 ± 0.10	1.47 ± 0.28	3.31 ± 0.39
		S	0.92 ± 0.45	0.76 ± 0.02	1.09 ± 0.09
	M	O	2.09 ± 0.09	1.55 ± 0.07	2.64 ± 0.20
		S	1.70 ± 0.40	0.89 ± 0.03	1.05 ± 0.10
neurohypophysis	F	O	17.24 ± 3.20	21.02 ± 1.93	23.12 ± 2.64
		S	2.86 ± 0.64	8.43 ± 1.23	10.13 ± 0.90
	M	O	14.20 ± 2.40	9.87 ± 0.90	17.24 ± 3.30
		S	3.60 ± 0.50	3.01 ± 0.08	7.30 ± 0.70
thalamus	F	O	0.47 ± 0.03	1.39 ± 0.56	1.63 ± 0.45
		S	0.92 ± 0.09	1.53 ± 0.30	1.14 ± 0.30
	M	O	0.53 ± 0.02	1.91 ± 0.30	0.98 ± 0.30
		S	0.91 ± 0.30	0.95 ± 0.10	0.87 ± 0.16
hippocampus	F	O	0.53 ± 0.07	1.20 ± 0.005	0.57 ± 0.09
		S	0.99 ± 0.10	1.17 ± 0.07	0.57 ± 0.20
	M	O	0.38 ± 0.005	0.99 ± 0.10	0.43 ± 0.10
		S	0.93 ± 0.04	0.96 ± 0.20	0.59 ± 0.20
striatum	F	O	0.39 ± 0.04	0.51 ± 0.01	0.68 ± 0.05
		S	0.61 ± 0.04	1.13 ± 0.10	0.73 ± 0.06
	M	O	0.37 ± 0.05	0.36 ± 0.01	0.71 ± 0.03
		S	0.31 ± 0.01	0.77 ± 0.10	0.82 ± 0.04
frontal cortex	F	O	0.73 ± 0.03	0.29 ± 0.01	0.64 ± 0.03
		S	0.75 ± 0.25	0.22 ± 0.01	0.69 ± 0.02
	M	O	0.52 ± 0.02	0.40 ± 0.06	0.39 ± 0.02
		S	0.46 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.46 ± 0.01
temporal cortex	F	O	0.40 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.48 ± 0.03
		S	0.43 ± 0.15	0.48 ± 0.02	0.38 ± 0.01
	M	O	0.42 ± 0.04	1.97 ± 0.35	0.79 ± 0.03
		S	0.44 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.48 ± 0.03
parietal cortex	F	O	0.30 ± 0.05	0.67 ± 0.28	0.52 ± 0.01
		S	0.46 ± 0.10	0.46 ± 0.02	0.42 ± 0.02
	M	O	0.26 ± 0.03	0.51 ± 0.10	0.48 ± 0.02
		S	0.36 ± 0.02	0.31 ± 0.09	0.35 ± 0.02
occipital cortex	F	O	0.45 ± 0.09	1.09 ± 0.18	0.27 ± 0.05
		S	0.41 ± 0.10	0.21 ± 0.01	0.34 ± 0.01
	M	O	0.35 ± 0.10	0.22 ± 0.05	0.31 ± 0.01
		S	0.23 ± 0.10	0.26 ± 0.01	0.32 ± 0.02
cerebellum	F	O	0.08 ± 0.02	0.04 ± 0.005	0.15 ± 0.04
		S	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.003	0.10 ± 0.02
	M	O	0.09 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.09 ± 0.01
		S	0.04 ± 0.001	0.01 ± 0.008	0.07 ± 0.009
mesencephalon	F	O	0.70 ± 0.10	0.15 ± 0.04	0.33 ± 0.02
		S	0.94 ± 0.05	0.17 ± 0.01	0.30 ± 0.01
	M	O	0.77 ± 0.10	0.33 ± 0.01	0.41 ± 0.02
		S	0.34 ± 0.07	0.27 ± 0.08	0.39 ± 0.01
pons	F	O	0.26 ± 0.08	0.26 ± 0.001	0.16 ± 0.05
		S	0.25 ± 0.04	0.10 ± 0.003	0.29 ± 0.01
	M	O	0.20 ± 0.09	0.16 ± 0.03	0.29 ± 0.01
		S	0.15 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.32 ± 0.02
medulla oblongata	F	O	0.47 ± 0.09	0.46 ± 0.04	0.31 ± 0.005
		S	0.21 ± 0.05	0.40 ± 0.02	0.22 ± 0.002
	M	O	0.53 ± 0.19	0.19 ± 0.05	0.32 ± 0.05
		S	0.22 ± 0.10	0.36 ± 0.04	0.49 ± 0.07
cervical spinal cord	F	O	0.99 ± 0.10	0.40 ± 0.09	0.45 ± 0.09
		S	0.59 ± 0.02	0.68 ± 0.03	0.44 ± 0.02
	M	O	1.81 ± 0.59	1.03 ± 0.07	0.99 ± 0.02
		S	0.66 ± 0.07	1.01 ± 0.13	0.96 ± 0.01
thoracic spinal cord	F	O	0.56 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.72 ± 0.01
		S	0.49 ± 0.03	0.43 ± 0.05	0.54 ± 0.02
	M	O	0.54 ± 0.10	0.36 ± 0.16	0.63 ± 0.07
		S	0.33 ± 0.05	0.20 ± 0.03	0.56 ± 0.03
lumbar spinal cord	F	O	0.09 ± 0.009	0.50 ± 0.09	0.47 ± 0.03
		S	0.23 ± 0.01	0.31 ± 0.002	0.43 ± 0.05
	M	O	0.08 ± 0.006	0.83 ± 0.13	0.56 ± 0.03
		S	0.11 ± 0.20	0.42 ± 0.04	0.47 ± 0.04

UNITS: nmol/g; F=Females; M=Males; O=Ovariectomy/Orchidectomy; S=Sham Operation

Effect of castration on ^{3}H-Mepyramine binding activity in brain (Table II)

HA H1-R showed sex-specific characteristics in the CNS. Neural structures included within the blood-brain barrier (bbb) exhibited a higher average concentration of H1-R in males than in females. In contrast, areas located outside the bbb, such as the ME and pituitary, showed higher ^{3}H-Mepyramine binding in females than in males. It was precisely in the latter areas where ^{3}H-Mepyramine binding was mostly affected by castration. Thus, in the ME, ^{3}H-Mepyramine binding decreased from 64.59±5.50 to 44.84± 5.09 fmol/mg protein (p<0.02) after ovariectomy and increased from 30.93±7.66 to 58.01±3.04 fmol/mg protein (p<0.005) after orchidectomy (Table II). In the Ah, ovariectomy elicited an increase in ^{3}H-Mepyramine binding from 3.7±0.48 to 10.57±0.64 (p<0.005) and orchidectomy determined an increase from 0.3±0.01 to 3.06±0.79 fmol/mg protein (p<0.005). In the Nh, changes in H1-R were only significant after ovariectomy (29.20±2.70 vs 39.71±5.44 fmol/mg protein; t=2.99; p<0.05). In this region, the global amount of H1-R appears to be two-fold higher in females than in males (Table II).

Protein modifications in the hypothalamo-hypophyseal system after ovariectomy and orchidectomy

SDS-PAGE studies showed that ovariectomy (45 days) induces a considerable

densitometric reduction in a 15K protein localized in the AH, PH and ME (Fig. 2), together with an increase in a 22K protein in the Ah and a 100K protein in the Nh. On the other hand, orchidectomy produced a reduction in proteins of 20K, 25K and 90K in the hypothalamus and an increase in proteic substances of 15K and 22K in the Ah.

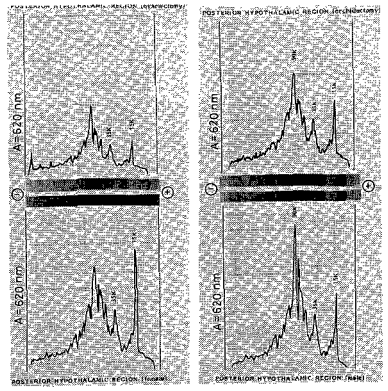


Figure 2. SDS-PAGE studies and densitometric analysis of cytosolic proteins in the posterior hypothalamic region of adult Wistar rats after ovariectomy and orchidectomy (45 days).

D I S C U S S I O N

These results show that the histaminergic response to castration is sex- and area-specific, with a greater responsiveness in females than in males. The strong positive correlation of changes in the concentration of HA in the PH and Nh elicited by a long-term ovariectomy provides some additional support to the hypothesis of a neuronal histaminergic hypothalamo-neurohypophyseal pathway (12, 13, 14) whose functional relevance in the neuroendocrine system is still unknown, although recent data seem to demonstrate that such pathway is involved in the control of vasopressin release (15, 16). Of all brain structures in which HA was affected by castration, the PH and Nh were also the most significantly responsive to endocrine manipulation (19). This fact suggests that a gonadotropinergic feedback mechanism interact with HA neurons located in the PH (8) to activate the synthesis and release of HA to modulate the LHRH-induced LH response (5) that follows to castration through an activation of estrogenic receptors (17). The attenuation of the LH response to LHRH by HA can be reversed by both H1- and H2-antagonists (5; NIIGAWA et al, this volume), but HA alone does not affect the basal plasma LH levels (18). Our results agree with data reported by KNIGGE et al (5, 18) who found that the potentiating effect of HA on LH secretion is more evident in females than in males. Furthermore, the HA action on the GTS mediated through H1-R seems to occur at the level of the ME, Ah and Nh, but the participation of H2-R in the gonadotropinergic response of HA cannot be ruled out (See NIIGAWA et al, this volume). On the other hand, densitometric differences in cytosolic proteins detected by electrophoresis in the HhS may represent preproforms of hormone precursors. (20,21, 22,23,24,25). The interaction and/or coexistence of these substances with HA in histaminergic neurons require further studies.

R E F E R E N C E S

(1) ORR, E.L., QUAY, W.B. (1975) Endocrinology 97:481-484.
(2) DONOSO, A.O., BROITMAN, S.T. (1979) Psychopharmacol. 66:251-255.
(3) DONOSO, A.O. (1978) Endocrinology 76:193-202.
(4) DONOSO, A.O. (1980) Adv. Physiol. Sci. 14:179-183.
(5) KNIGGE, U. et al. (1984) Neuroendocrinology 38:93-96.
(6) DONOSO, A.O., ALVAREZ, E.O. (1984) Trends Pharmacol. Sci. 5:98-100.
(7) DONOSO, A.O., BANZAN, A.M. (1976) J. Neural Transm. 39:95-101.
(8) WATANABE, T. et al. (1984) Brain Res. 295:13-25.
(9) YAMATODANI, A. et al. (1985) J. Chromat. 344:115-123.
(10) CHANG, R.S.L. et al. (1978) Eur. J. Pharmacol. 48:463-464.
(11) TRAN, J.V. et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:6290-6294.
(12) CACABELOS, R. et al. (1985) Biogenic Amines 3:9-19.
(13) CACABELOS, R. Histaminergic modulation of the neuroendocrine system. Santiago University Press, Santiago de Compostela, Spain (1986).
(14) CACABELOS, R. (1984) JANO Med. Hum. 638:46-61.
(15) CACABELOS, R. et al. (1984). Bull. Jpn. Neurochem. Soc. 23:403-405.
(16) CACABELOS, R. et al. (1986) Neuroendocrinology (Submitted).
(17) CAMP, P., BARRACLOUGH, C.A. (1985) Neuroendocrinology 40:45-53.
(18) KNIGGE, U. et al. (1985) Neuroendocrinology 41:337-341.
(19) CACABELOS, R. et al. (1985) J. Endocrinol. Invest. 8 (Suppl. 3):25.
(20) McKELVY, J.F., BLUMBERG, S. (1986) Ann. Rev. Neurosci. 9:415-434.
(21) GAINER, H. et al. (1985) Neuroendocrinology 40:171-184.
(22) EMANUELE, N. et al. (1985) Neuroendocrinology 40:339-344.
(23) LOH, Y.P. et al. (1984) Ann. Rev. Neurosci. 7:189-222.
(24) DOUGLASS, J. et al. (1984) Ann. Rev. Biochem. 53:665-715.
(25) CONN, P.M. et al. (1984) Fed. Proc. 43:2351-2361.

TABLE II

EFFECTS OF OVARIECTOMY AND ORCHIDECTOMY ON ^{3}H-MEPYRAMINE BINDING

AREA	CONTROL (F)	OVARIECTOMY	p value	CONTROL (M)	ORCHIDECTOMY	p value
anterior hypothalamus	9.57 ± 2.15	10.43 ± 2.60	n.s.	15.67 ± 2.54	11.49 ± 2.32	n.s.
posterior hypothalamus	10.26 ± 1.91	8.48 ± 1.35	n.s.	12.90 ± 2.46	15.21 ± 2.59	n.s.
median eminence	64.59 ± 5.50	44.84 ± 5.09	<0.02	30.93 ± 7.66	58.01 ± 3.04	<0.005
adenohypophysis	1.77 ± 0.48	10.57 ± 0.64	<0.005	0.30 ± 0.01	3.06 ± 0.79	<0.005
neurohypophysis	29.20 ± 2.70	39.71 ± 5.44	<0.005	15.13 ± 2.51	15.15 ± 2.86	n.s.
hippocampus	4.03 ± 1.19	5.34 ± 1.20	n.s.	7.09 ± 0.24	5.63 ± 1.42	n.s.
frontal cortex	12.15 ± 2.54	8.79 ± 2.95	n.s.	15.27 ± 2.80	8.37 ± 1.92	<0.02
cervical spinal cord	5.25 ± 1.24	5.75 ± 1.48	n.s.	8.25 ± 1.19	8.21 ± 1.32	n.s.
thoracic spinal cord	6.70 ± 1.23	7.64 ± 1.41	n.s.	8.83 ± 1.38	8.89 ± 1.38	n.s.
lumbar spinal cord	3.35 ± 1.53	3.79 ± 1.27	n.s.	10.71 ± 1.55	8.53 ± 1.59	n.s.

UNITS: fmol/mg protein (mean ± SD, 3 determinations); SAMPLING: 3 animals/group; F = Females; M = Males; Ovariectomy/Orchidectomy: 45 days; Controls: dorsal laparotomy (45 days).

84. 可溶化L－〔^{3}H〕グルタミン酸結合部位の性質：ヌクレオチドによる調節

越谷和雄　（金沢大・医・第二生理）

〔要　約〕

モルモット脳から可溶化したキスカル酸感受性グルタミン酸結合部位をゲル濾過によって部分精製し、その性質を調べた。またヌクレオチドによるグルタミン酸結合の調節について検討した。

モルモット脳 P_2 膜分画よりキスカル酸感受性 L-[^{3}H]グルタミン酸結合部位を可溶化し、これを Sephacryl S-300 または S-400によって約／0倍に精製した。この標品に対するL-[^{3}H] グルタミン酸結合の Scatchardプロットは直線を与え、K_D=85 nM, B_{max}=5.8 pmol/mg protein であった。興奮性アミノ酸レセプターのアゴニスト中ではキスカル酸がもっとも親和性が高く（IC_{50}=5.6 x 10^{-9}M),カイニン酸は中程度、N-メチル-D-アスパラギン酸は低かった。アンタゴニストの中ではグルタミン酸ジエチルエステルがもっとも高い親和性を示し、2-アミノ-4-ホスホノ酪酸や 2-アミノ -5-ホスホノ吉草酸の親和性はきわめて低かった。各種ヌクレオチドは濃度依存性にL-[^{3}H]グルタミン酸結合を阻害した。この効果はGTPがもっとも強く1mMで約 95% の阻害を示した。GTP は L-[^{3}H] グルタミン酸結合の親和性（K_D)を変化させずに結合部位数（B_{max})のみを減少させた。 GTPは同様にキスカル酸の親和性にも影響を与えなかった。以上の結果から、可溶化 L-[^{3}H]グルタミン酸結合部位はゲル濾過を行うことによって、キスカル酸やグルタミン酸の低親和性結合が消失することが明らかになった。　またキスカル酸型レセプターの活性が生体内でヌクレオチドによって調節されている可能性が示唆された。

Key word： glutamate receptor, solubilization, GTP

中枢神経系における興奮性アミノ酸のレセプターには、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種類があることが電気生理学的な研究から示唆されており（ 2,6 ）、興奮性アミノ酸による神経伝達の分子機構を知るうえでこれらのレセプターの実体をとらえることが急務となっている。著者は、これらのうちキスカル酸型レセプターに相当すると考えられる L-[^{3}H]グルタミン酸結合部位の可溶化に成功し、昨年の本学会で報告した（ 3,4 ）。本研究では、この可溶化物をゲル濾過により部分精製し、これを材料として L-[^{3}H]グルタミン酸結合部位の性質を調べた。特に、近年種々の神経伝達物質レセプターとグアニンヌクレオチド結合蛋白(N蛋白）との共役が明らかにされていることから、興奮性アミノ酸レセプターとN蛋白との関連の可能性を検討するために、ヌクレオチドの L-[^{3}H] グルタミン酸結合に及ぼす効果を調べた。

［実験方法］

可溶化にはすでに報告した方法（ 4)を一部改変して用いた。モルモット大脳皮質（ 含線条体 ）から P_2 膜分画を調製し、これを 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate（ CHAPS ）12.5 mM、NH_4SCN 200 mM、$MgSO_4$ 1 mM 、Tris-HCl 50 mM （ pH 7.4 ） 中で 4 °C、30 分間撹はんしたのち 150,000xg の上清をもって可溶化物とした。これをコロジオンバッグで濃縮し、その 4 mlを 0.2 % Triton X-100 、200 mM NH_4SCN 、1 mM EDTA･2Na 、25 mM Tris-HCl （ pH 7.8 ） で平衡化した Sephacryl S-300 または S-400 （ ともに φ1.6 x 90 cm ） に添加した後、流速 8 ml/h で溶出させ活性のピークを回収した。

結合実検の方法の詳細もすでに報告した（ 4)。ゲル濾過溶出物 50 µl を、通常 20 nMの L-[3,4-^{3}H] グルタミン酸を含む 40 mM Tris-HCl (pH 7.4) 500µl 中で 0 °C、2時間インキュベートした後、ポリエチレンイミン処理したガラスフイルターを用いて B/F 分離し、結合放射能を測定した。アッセイは triplicate で行い非特異的結合は 100 µM の非放射性 L-グルタミン酸存在下で測定した。

[結 果 と 考 察]

ゲル濾過の結果、大部分の活性は分子量約80万に相当する位置にピークを形成して溶出した (FIG.1)。

ゲル濾過試料を用いた L-[^{3}H]グルタミン酸結合の Scatchard プロットは直線を与え、K_D = 85 nM、B_{max} = 5.8 pmol/mg protein であった (FIG. 3)。この K_D 値は先に報告した粗抽出物における高親和性成分の K_D 値とほぼ一致しており (4)、そのさいに観察された低親和性成分はゲル濾過試料では観察されなかった。L-[^{3}H] グルタミン酸結合の興奮性アミノ酸類縁物質による置換実験の結果を TABLE 1 に示す。アゴニストの中では、キスカル酸型レセプターに作用するキスカル酸の親和性がきわめて高く、その IC_{50} = 5.6 nM は粗抽出物における高親和性成分(4)とほぼ一致していた。カイニン酸型レセプターのアゴニストであるカイニン酸の親和性は中程度であり、NMDA 型レセプターに作用する NMDA およびキノリン酸は親和性が低かった。アンタゴニストは一般に本標品に対する親和性が低かったが、その中ではキスカル酸型レセプターに作用するグルタミン酸ジエチルエステル (GDEE) や cis-2,3-piperidine dicarboxylate (cis-PDA) の作用が比較的強く、NMDA 型レセプターのアンタゴニストである 2-アミノ-5- ホスホノ吉草酸(APV)や、 APB 型レセプターに働く APB はほとんど作用がなかった。

TABLE 1. Displacement of L-[^{3}H]glutamate binding by various displacers

Displacer	IC_{50} (M)	Displacer	Inhibition at 10^{-4} M (%)
Quisqualate	5.6×10^{-9}	cis-PDA	36.0
L-Glutamate	9.4×10^{-8}	γ-DGG	13.0
Kainate	7.0×10^{-7}	APV	10.5
GDEE	2.6×10^{-5}	APB	8.0
NMDA	5.6×10^{-5}	Quinolinate	5.0
		GABA	0.5

L-[^{3}H]グルタミン酸結合は GTP などのヌクレオチドによって濃度依存性に阻害された(FIG.2,TABLE 2)。阻害作用は GTP がもっとも強く、1 mM で 95 % の阻害を示した。GDP は GTP と同程度であったが、他のヌクレオシド三リン酸はこれらよりやや作用が弱く, GMP や cGMP はさらに弱かった。GTP の阻害作用の Scatchard 解析を FIG. 3 に示す。L-[^{3}H]グルタミン酸結合の K_D は GTP 50 μM 存在下で 89 nM 、GTP 100 μM で 100 nM であり対照 (85 nM) と比較してほとんど変化がなかった。これに対して B_{max} は GTP 50 μMで 4.0 pmol/mg protein 、100 μM で 2.1 pmol/mg protein と著しく減少していた。また L-[^{3}H] グルタミン酸結合のキスカル酸による

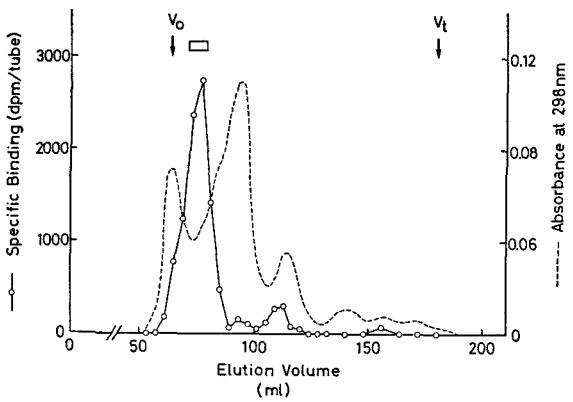


FIG. 1. Gel-filtration chromatography of solubilized L-[^{3}H]glutamate binding sites with Sephacryl S-300. ☐ : Fractions collected.

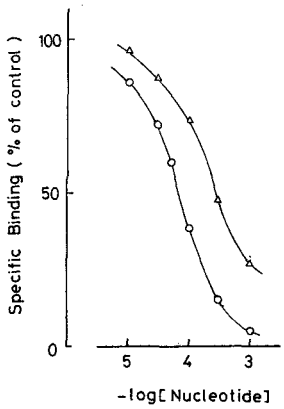


FIG. 2. Inhibition of L-[^{3}H]glutamate binding by GTP (○) and ATP (△).

TABLE 2.
Inhibition of L-[^{3}H]glutamate binding by various nucleotides

Compound	*IC_{50}(μM)
GTP	65
GDP	81
ITP	130
ATP	280
CTP	650
UTP	650
cGMP	800
GMP	820
Guanosine	>1000

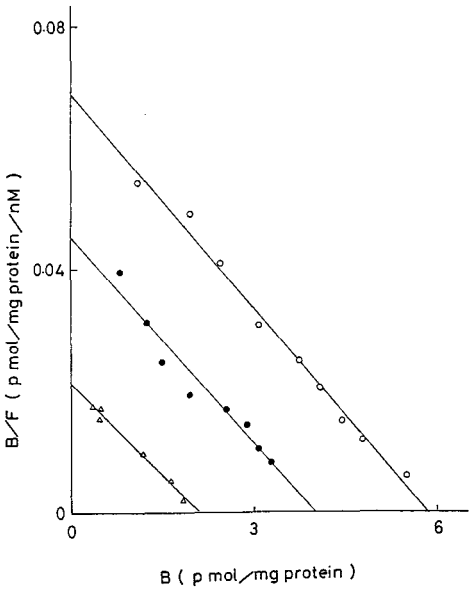


FIG. 3. Scatchard plots of L-[^{3}H]glutamate binding in the presence or absence of GTP. Control (○), 50 μM GTP (●), 100 μM GTP (△).

置換曲線 (% 阻害)も GTP の存在によって不変であった(データ略)。GTP の阻害作用は 1 mM 以上の Mg^{2+} の添加により部分的に回復した (データ 略)。

本研究で用いたゲル濾過標品は前に報告した粗抽出物 (4) と比べて、L-グルタミン酸およびキスカル酸結合の低親和性成分が消失し、高親和性成分のみとなっている。また APB や APVなどの非キスカル酸型レセプターのアンタゴニストに対する親和性もより低くなっている。 これは粗抽出物中に含まれていた因子がゲル濾過によって除かれたためと考えられる。ラット脳の膜分画に対する [^{3}H]APB 結合がヌクレオチドによって阻害されることが最近報告されているが (1)、この [^{3}H]APB 結合に対する阻害作用は cGMP がもっとも強いという点で本研究の結果とは異なる。また本研究の L-[^{3}H]グルタミン酸結合部位には APB はほとんど結合しないので、両者は異なる系の現象であると考えられる。 N 蛋白と共役しているレセプターはそのアゴニスト結合が GTP などによって影響を受けることはよく知られている (5、7)。本研究の結果は、各種ヌクレオチドの中で GTP と GDP の作用がもっとも強いなどの点では、他のレセプターの場合と類似している。しかしながら、他のレセプターの場合 GTP の作用はレセプターの数に影響を与えずにアゴニストに対する親和性のみを減少させるが、本研究の結合部位の場合、親和性は不変で部位の数が減少する。本研究の結果は、キスカル酸型レセプターが生体内で GTP などによって調節されている可能性を示唆するものであるが、この GTP の効果は従来のレセプター・ N 蛋白の相互作用とは異なるものであり、L-[^{3}H] グルタミン酸結合部位と N 蛋白が共役しているかどうかはさらに検討する必要がある。

[文 献]
1. Butcher,S.P., Roberts,P.J. and Collins,J.F.(1986) Biochem. Pharmacol. 35,991-994
2. Foster,A.C. and Fagg,G.E.(1984) Brain Res. Rev. 7,103-164
3. 越谷和雄(1985) 神経化学 24,178-180
4. Koshiya,K.(1985) Life Sci. 37,1373-1379
5. Maguire,M.E., Van Arskale,P.M. and Gilman,A.G.(1976) Molec. Pharmacol. 12,335-339
6. Watkins,J.C. and Evans,R.H.(1981) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21,165-204
7. Zahniser,N.R. and Molinoff,P.B.(1978) Nature 275,435-455

85. Methamphetamine 反復投与ラットにおける脳内ノルアドレナリン代謝に及ぼす条件づけとその成立過程

佐藤洋美・田中正敏・津田　彰・辻丸秀策・白尾一正
小口雅申・稲永和豊*　（久留米大・医・薬理，精神神経*）

〔要　約〕

Methamphetamine(MAP)を投与された時の環境や注射という操作が、MAP反復投与されたラット脳内noradrenaline(NA)代謝にどのような影響を及ぼすのかを、またこのような条件づけが成立するためには何回位のMAP反復投与が必要なのかを、ラット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することにより検討した。MAP 6mg/kgを7日間反復投与したラットでは、休薬7日後であってもsaline(SAL)注射という操作のみで、扁桃核、視床下部のMHPG-SO_4含量は増加した。さらにSAL注射後、特定の環境(box)に暴露することで、扁桃核、視床下部、視床、海馬のMHPG-SO_4含量も有意に増加した。また3回ないし5回のMAP反復投与後、7日間の休薬期をおいても、同様の操作で視床下部、扁桃核のMHPG-SO_4含量は有意に増加し、NAの放出亢進が示された。SAL反復投与されたラットでは、このような変化は認められなかった。以上の結果より、MAP反復投与によりラット脳内NA系ニューロンの活動が注射という操作や特定の環境に対して条件づけられること、しかも3回ないし5回といった比較的少ないMAP投与回数でもラット特定脳部位において条件づけが成立することが示唆された。

Key word：　rat brain noradrenaline,　methamphetamine,　drug conditioning.

Methamphetamine(MAP)を反復投与された動物で見られる異常行動が、MAPの少量再投与により出現しやすくなることが知られている。その発現機序として、脳内カテコールアミンの消長やレセプターレベルでの研究がなされ、とくにdopamine系に関する研究が数多く報告されている(5)。一方、noradrenaline(NA)系に関する研究も報告されているが(7)、結果は必ずしも一致していない。また行動薬理学的見地から、MAPに対する脳内神経系の条件づけ過程との関連性も示唆されている(2,3,8)。今回我々は、薬物(MAP)を投与された時の環境(box)や注射という操作の条件づけ手続きが、MAP反復投与されたラット脳内NA系ニューロンに対してどのような影響を及ぼすのか検討し、さらにMAP反復投与回数による条件づけの成立過程についても調べた。

【方　法】

体重170-190gのWistar系雄性ラットを対象とした。MAP 6mg/kgもしくはsaline(SAL)を1日1回、腹腔内に投与(i.p.)し、MAPと環境とを条件づける目的で、一定のbox(99×93×53cmの透明なプラスチック製の箱で、床はステンレス製のグリッドからなり、1区画18×19×53cmの25区画に分画されている)内にMAPもしくはSALを投与直後より1時間放置した。実験1では、前述の操作を7日間繰り返し、その後7日間の休薬期をおいた後(実験開始14日目)、MAP投与群及びSAL投与群を各々、①無処置のcontrol群、②1時間前述のboxに放置した群、③SALを投与し、ホームケージに戻した群、④SAL注射後boxに1時間放置した群とに分類し、計8群設定した。実験2では、実験1と同様にMAP 6mg/kgもしくはSALの投与を行うが、投与を1日のみ、3日間、5日間の群を設定

し、各々7日間の休薬期をおいた後、①無処置のcontrol群、②SAL注射後boxに1時間放置した群に分けた。実験1と2ともに各操作終了後、断頭し、脳を摘出し、青斑核部はReisとRossの方法(6)で、それ以外の部位はGispenらの方法(1)で分割し、測定まで－45°Cで保存した。脳各部位においてNAの主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO_4)含量を蛍光法で測定した(4)。統計学的解析はすべてStudent's t-testで有意差検定した。

【結果と考察】

実験1の結果を図1に示す。視床下部では、MAP反復投与したラットにおいて、SAL注射によりMHPG-SO_4含量の増加傾向が生じ、SAL注射後boxに放置することでMHPG-SO_4含量の有意な増加が起こった。SALを反復投与した群では、SAL注射後boxに入れても、このような変化は認められなかった。MAP反復投与のみの群、MAP反復投与後boxに放置した群ではMHPG-SO_4含量に有意な変化は認められなかった。扁桃核では、MAP反復投与したラットにおいて、SAL注射のみの群、SAL注射後boxに放置された群のMHPG-SO_4含量が有意に増加した。視床においても、MAP反復投与したラットにおいて、SAL注射後boxに放置することでMHPG-SO_4含量が有意に増加した。また海馬においても同様に、MAP反復投与されたラットでは、SAL注射後boxに放置することでMHPG-SO_4含量が有意に増加した。実験2の結果を図2に示す。扁桃核においては、MAPを3日間反復投与した群、5日間反復投与した群において、SAL注射後boxに1時間放置することで、MHPG-SO_4含量の有意な増加が起こった。視床下部においても扁桃核と同様に、MAPを3

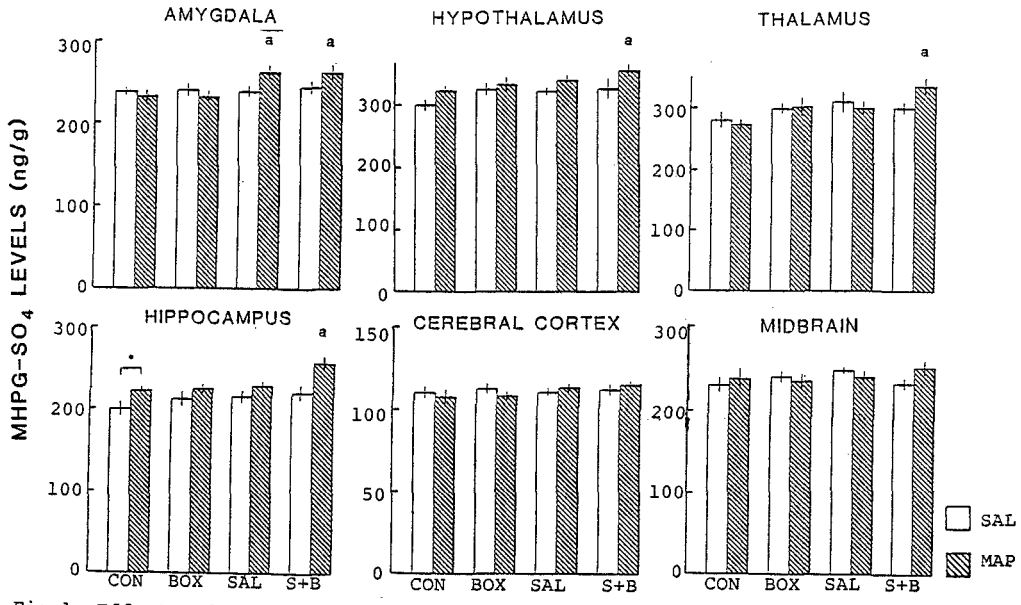


Fig.1. Effects of conditioning for ingection or environment on levels of MHPG-SO_4 in the six brain regions in the rat chronically treated with MAP or SAL.

CON :untreated control, BOX :Rats were placed in the box for 60 min, SAL :saline injection (i.p.), S+B :saline injection followed by being placed in the box for 60 min. Each value is express as the maen ± S.E.M. a: vs MAP CONTROL. $p<0.05$ or less. *: $p<0.05$ or less.

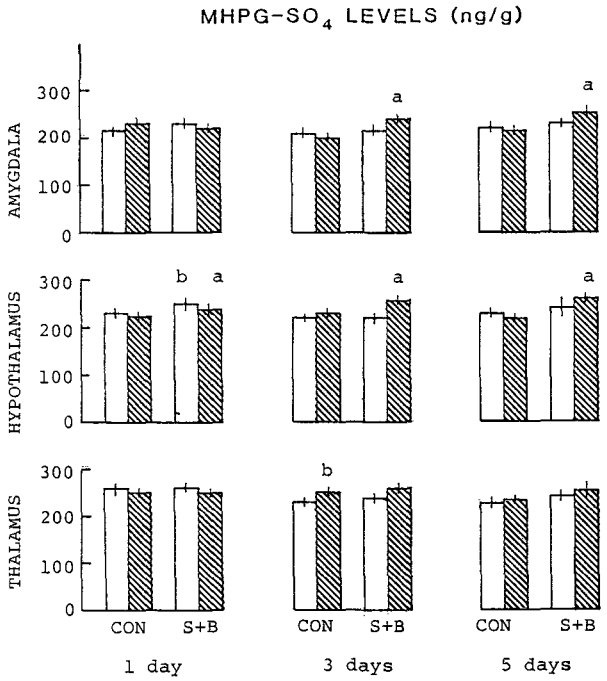


Fig.2.
Effects of conditioning for ijection or environment on levels of MHPG-SO4 in the three brain regions in the rat treated with MAP once a day for 1 day, 3 days, and 5days.

CON : untreated control.

S+B : saline injection followed by being placed in the box for 60 min.

Each value is express as the mean± S.E.M.

a: vs MAP CONTROL. $p<0.05$ or less.

b: vs SAL CONTROL. $p<0.05$ or less.

日間反復投与した群で、SAL注射後boxに放置することでMHPG-SO_4含量の有意な増加が生じた。視床においては、MAPを3日間反復投与しただけで、MHPG-SO_4含量の有意な増加が起こった。

以上の結果より、MAP 6mg/kgを反復投与することにより、休薬7日後であってもSAL注射という操作のみで扁桃核と視床下部のNA放出亢進がみられること、さらにSAL注射後boxに放置することで、扁桃核、視床下部、視床、海馬でもNAの放出亢進がみられること、MAPの反復投与が3日間、5日間であっても、扁桃核、視床下部においてNAの放出亢進がみられるようになることなどが示された。このことから、MAP反復投与により、ラット脳内NA系ニューロンの活動が注射という操作や特定の環境に対して条件づけられ、さらに3回ないし5回という比較的少ないMAP投与回数ですでに条件づけが成立している可能性などが示唆された。

【 引用文献 】

1. Gispen, W.H. et al. (1972) Neuroendocrinology., 9: 285.
2. Hayashi, T. et al. (1980) Japan. J. of Pharmacol., 30: 93.
3. 加藤伸勝 (1981) 臨床精神医学, 10: 1203.
4. Kohno, Y. et al. (1979) Analyt. Biochem., 97: 352.
5. Muller, P. and Seeman, P. (1975) Europ. J. of Pharmacol., 55: 149.
6. Reis, D.J. and Ross, R.A. (1973) Brain Res., 57: 307.
7. Short, P.H. and Shuster, L. (1976) Psychopharmacol., 48: 59.
8. Tilson, H.A. and Rech, R.H. (1973) Pharmacol. Biochem. and Behav., 1 : 149.

86. ドーパミン系およびセロトニン系神経伝達の前シナプス性制御機構に及ぼすメトアンフェタミンの影響：In vivo brain dialysis による検討

市川淳二・小山　司・三国雅彦・山下　格
（北海道大・医・精神神経）

〔要　約〕

メトアンフェタミン（ＭＡＰ）をラットに１日２回，計４日，隔日漸増皮下投与し，対照群には生食を同様の方法で皮下投与した．断薬２日目に両群の線条体内に透析チューブを挿入固定し，手術後２４時間から灌流を始めた．ＭＡＰを両群に５ｍｇ／ｋｇ皮下投与し，細胞外から透析チューブ内に回収されたモノアミンとその代謝産物を投与後６時間まで２０分毎に測定し，投与前後の変化を両群で比較検討した．ＭＡＰ群のドーパミンは，生食群に比較して投与後急激かつ著明に増加した．ＤＯＰＡＣ，ＨＶＡの減少は有意に大きかった．５ＨＴは急激に増加しまたすぐに減少したが，両群に差はなかった．しかし５ＨＩＡＡの減少はＭＡＰ群で有意に大きかった．同時に測定した移所運動量の増加は２峰性を示し，減少時にはステレオテピーを反映し，ドーパミンの大量増加と一致してＭＡＰ群では有意に減少していた．以上のことからＭＡＰ群ではモノアミン系神経伝達のシナプス前制御機構に機能的異常が過大反応を示すという形で生じていることが示唆された．

Key word：　Methamphetamine, Monoamine, In vivo brain dialysis

覚醒剤中毒者が分裂病に酷似した精神症状を示し，しかもそれが抗精神病薬によって特異的に拮抗される場合のあること，また実験研究においてもラットにメトアンフェタミン（以下ＭＡＰと略）を投与して生ずる行動上の変化が同じく抗精神病薬によって抑制されることは良く知られた事実である．しかしその一方で，慢性覚醒剤中毒者の遷延，持続した精神病状態には抗精神病薬が充分な効果を持たないのも事実である．それはＭＡＰを繰り返し，頻回に投与することによって，シナプス前でのモノアミン系生合成酵素の活性や神経末端からの神経伝達物質の放出と再取り込みの機序に半ば非可逆的な変化が生じ，その機能的異常が持続している可能性を示すものであり，この機能的失調状態が覚醒剤中毒精神病の病態生理と深く関わっていると考えられる．ところで，従来の組織内含量を測定する方法では，神経末端に貯蔵されている機能的には不活性な神経伝達物質を含むために，ニューロンの神経伝達状況を正確に反映したものとは言い難いものがあった．最近，脳内の線条体にあらかじめ透析チューブを挿入固定した後，無麻酔でケージ内を自由に動き回ることのできる覚醒した状態にラットをしておき，透析チューブ内を灌流させた　　・Ｒｉｎｇｅｒ液中に細胞外神経伝達物質とその代謝産物を回収する方法がＵｎｇｅｒｓｔｅｄｔら（３）によって開発された．今回われわれは，彼らの原法を一部改変し，ほぼ同様の手技によって，ＭＡＰによるモノアミン系神経伝達の前シナプス性制御の変化について，ドーパミン系，セロトニン系の二つの系について検討した．

【対象と方法】対象には室温２２℃，１２時間明暗周期，摂食・飲水の自由にできる状態で１

ケージ2頭ずつ飼育した250～300gのウイスター系雄性成熟ラットを各群5～6頭使用した．塩酸メトアンフェタミンを1日2回，隔日漸増法（2）で体重キログラム当たり2．5mg，5mg，7．5mg，10mgを皮下投与し（MAP群），対照群には生理的食塩水を1ml/kg同じく隔日で皮下投与した（生食群）．最終投与後，すなわち断薬2日目に，ラットをネンブタール（40mg／kg i．p．）で麻酔してから脳定位固定装置に固定し，頭皮を剝いでKönig&Klippelのアトラスに基づき，Bregmaより前1．5，側2．3mmの位置で頭骨に直径1mmの孔をドリルを用いて穿ち，あらかじめ用意しておいた透析チューブを先端が頭骨上より7mm下になるように線条体に挿入した．頭骨外の部分はデンタルアクリルで固定した．実験終了後脳切片を作り，透析チューブの位置を確認した．透析チューブにはCordis・Dow社製のケン化セルロースエステル膜でできた分子量5500～12000以下の物質を透析する内径195μm，膜厚30μmのチューブを二つ折りにしてステンレス管より4mm線条体内に露出させて用いた．手術後24時間してから．

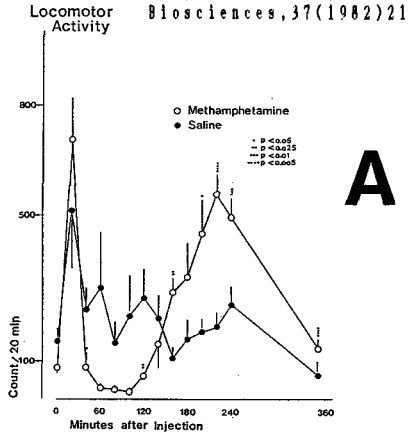
Ringer液（147mMNa^+，2．3mMCa^{2+}，4mMK^+，155．6mMCl^-，pH6．0）を毎分2．5μlで灌流させ，あらかじめ2mg／dlのl－システインを含む0．2NのPCA50μlを入れておいたテストチューブに20分毎に回収し，その全量を直ちに電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーに注入して，各モノアミンとその代謝産物を測定した．また行動上の変化も併せて検討するために，アニメックスを用いて移所運動量を測定した．

連続して三つのフラクションを測定して基礎値の安定していることを確認した後にMAP群生食群ともそれぞれにMAP5mg／kgを皮下投与した．測定は投与前60分から投与後360分にわたって行われた．移所運動量はカウント数で，各モノアミンとその代謝産物は投与前の基礎値に対する投与後の変化の割合を求め，Wilksのラムダ統計量によるMANOVAを用いて多変量解析して統計学的有意差の検定を行った．

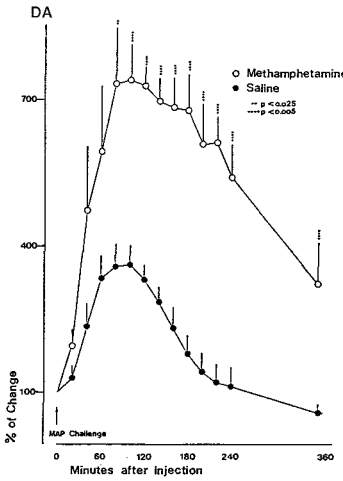
【結果と考察】移所運動量（A）はMAP投与後急激に増加し，MAP群では60分後に投与前値以下に著明に減少した後，120分後から再び増加し始め，360分後に基礎値近くに戻るという2峰性の変化を示しているのに対し，生食群では比較的緩やかに減少していく傾向を示した．急激な減少はステレオテピーを表したもので，シナプス間隙でのドーパミンの大量増加と密接に関連し，ドーパミンの減少と共にステレオテピーも減少し，移所運動量の増加が前景に出てきたものと考えられた．ドーパミン（B）はMAP投与後急激かつ著明に増加し，MAP群では生食群をはるかに上回り，240分後に基礎値に戻っている生食群とは際立った相違を見せ，過大遷延反応を示した．ドーパミンのMAOによる代謝産物であるDOPACは，神経末端からシナプス間隙に放出されたドーパミンが再び神経末端に取り込まれて代謝されると考えられている．MAP投与後，MAP群，生食群共にDOPACが減少しており，MAPの再取り込み阻害効果を示したものと考えられるが，生食群に比べMAP群ではシナプス間隙にドーパミンが大量に存在しているにもかかわらず減少は有意に大きかった．これは再取り込み機序自体にMAP群では変化が生じていることを示すものと思われた．3MTからMAOに

よって，またＤＯＰＡＣからＣＯＭＴによって代謝されるＨＶＡはＤＯＰＡＣと同じパターンを示し，ＭＡＰ群での減少は有意に大きかった．これはＤＯＰＡＣの減少に連動したものと考えられるが，ＣＯＭＴ自体の活性の変化についても検討する必要があると思われた．次いでセロトニン系について検討した．従来，セロトニンはＭＡＰの大量投与によって初めて変化するという報告が多かったが，以前われわれが報告した（１）ように，組織内含量を測定する方法でも２ｍｇ／ｋｇという比較的少量の急性投与でセロトニンが減少することが認められていた．今回の検討でも，ＭＡＰ投与後直ちに急激な増加を示した後すぐに減少し，３６０分後では基礎値以下になるというパターンを示した．しかし両群に有意な差はなかった．これはＭＡＰ５ｍｇ／ｋｇという用量がセロトニンの放出に対して過量であり，放出は既にプラトーに達していると考えることもできるし，あるいはセロトニン生合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素活性がＭＡＰ群では低下しており，放出されるべきセロトニンそのものが減少しているために見掛け上差がなかったのかもしれない．今後は少量での，また酵素活性についても検討が必要と思われた．セロトニンのＭＡＯによる代謝産物である５ＨＩＡＡはＭＡＰ投与後，ＭＡＰ群ではＤＯＰＡＣと似たパターンで減少し生食群に比べ有意に大きかったが，生食群では減少自体が少なく，投与後６０分まではむしろ増加していた．これはＤＯＰＡＣの場合と同じく，ＭＡＰ群ではセロトニンの再取り込み阻害効果が強まっていることとセロトニンの結果について考察したように，放出されるべきセロトニン自体の減少によると考えられ，生食群ではＭＡＰの単回投与による再取り込み阻害効果は軽度であり，シナプス間隙でのセロトニンの増加と連動し，５ＨＩＡＡは一旦増加した後減少したと考えられた．以上示したように，最終投与後すなわち断薬３日目には少なくとも脳内にＭＡＰは存在してはいないと考えられ，ＭＡＰ群ではシナプス前で何らかの機能的異常が生じており，生食群に比較してＭＡＰの再投与によるドーパミン系やセロトニン系の反応は非常に大きく，しかもそれが行動とも密接に関連していることが分かった．すなわち，ＭＡＰ群ではモノアミン系神経伝達のシナプス前制御機構に機能的異常が，過大反応を示すという形で生じていることが示唆された．

【文献】(1) 市川淳二ら．薬物・精神・行動，抄録，5(1985)117-118.(2)Schmidt,C.J. et al.Brain Research,343(1985)305-313.
(3)Ungerstedt,U. et al.Advances in the Locomotor Biosciences,37(1982)219-231.



A



B

87. 少量 Sulpiride のドーパミン及びノルアドレナリン代謝に及ぼす影響

小松秀邦・阿部哲夫・秀野武彦・金野　滋・高橋　良
（東京医科歯科大・医・神経精神医学）

〔要　約〕

少量 sulpiride(SLP) による抗うつ効果の神経化学的機序を明らかにする目的で研究を行なった。マウス全脳を用いて“autoreceptor dose”といわれる少量 apomorphine(APO)と少量 clonidine(CLN) に対する D-SLP,L-SLP, および DL-SLP の少量投与の効果を検討した。少量 APOによる DOPAC濃度の低下に L-,およびDL-SLPは拮抗し、少量 L-SLPがdopamine(DA)自己受容体を遮断することが示された。この所見はラットではみられず、ラットとマウスでは少量 SLPのDA系への影響に種差のあることが考えられる。少量 CLNによってMHPG,DOPAC濃度ともに有意に減少した。このMHPGの低下に対して D-,L-,DL-SLP ともに拮抗作用は認められなかった。一方 DOPAC低下に対してはL-, DL-SLPで拮抗作用が認められた。D-SLP は少量ではα_2自己受容体を遮断しないと考えられる。むしろ少量 CLNがDA自己受容体を直接刺激している可能性を示すものと考えられる。ただしこれまでの研究結果から、大量のD-SLP 投与でα_2受容体が遮断される可能性も考えられるのでさらに検討する必要がある。いずれにしても少量 DL-SLP の効果はnoradrenaline(NE) 系よりもDA系（その自己抑制の遮断）を介していると考えられる。この機序が臨床的な抗うつ効果と関連する可能性が考えられた。

Key word：　Sulpiride, Catecholamine, Antidepressant effect.

臨床使用されているラセミ体の sulpiride(SLP) は比較的少量から中等量(600mg／day 以下）で抗うつ・抗不安効果を持つことが確認されている。SLP の抗うつ効果がDA神経系を介しているか否か、介しているとすればどのような脳部位でのどのような作用によるのか、といった問題はうつ病のDA神経機能障害説との関連で、臨床精神医学上極めて興味が持たれる。しかし、その神経化学的な効果発現機序はいまだ明確になっているとはいえない。動物実験の結果から前シナプスD_2受容体、いわゆるdopamine(DA) 自己受容体に対する少量での優先的遮断作用によって発現しているという考え(3) があるが、現在のところヒトでの実証的な証拠は少ない。我々はこれまでラットを用いた実験で行動上、少量DL-SLPがメトアンフェタミンの作用を亢進させることを見いだしており、これが臨床的な抗うつ効果と関連すると推定した (4)。しかし、DA代謝の面では少量DL-SLPが前頭葉皮質のDA受容体に優先的に作用するという所見が得られたが、少量 APOによるDOPAC, HVA低下に対する少量DL-SLPによる拮抗作用は見いだせなかった。一方 L-SLPは選択的D_2受容体遮断作用を持つが、D-SLP はα_2受容体を遮断するとの報告があり(6) 、我々も 100mg／kgのDL-SLP投与でラット前頭葉皮質のMHPG濃度が増加するという結果を得ており(5) 、D-SLP のNE系に対する作用も考慮する必要がある。したがってDL-SLPによる抗うつ効果がDA神経系を介しているか否かについて言及するためには、D-SLPおよびDL-SLP少量でNE系に対する作用があるか否か検討する必要がある。そこで今回、少量 SLPによる抗うつ効果の神経化学的機序を明らかにするためにマウスを用いて、少量 APOと少量 CLNに対するD-SLP, L-SLPおよびDL-SLPの効果を DA,NEとその代謝産物を指標として急性投与実験によって検討した。

【方法】

実験には各群ともCRJ-ICR 雄性マウスを用いた。SLP はD-SLP, L-SLPを各々 7.5mg／kgを単独で、または同時に皮下投与した。この投与量は、DL-SLP15mg／kg急性投与によってメトアンフェタミン常動行動が増強するという我々の実験結果から決定された。CLN と APOの投与量は文献上、各々DA, NE自己受容体を選択的に刺激する、いわゆる“autoreceptor dose ”といわれる量を選んだ。CLN は 0.075mg／kgを断頭の40分前に、APO は0.05mg／kgを断頭の35分前に各々皮下投与した。いずれの群も SLP投与2 時間15分後に断頭した。対照には生理食塩水を用いた。

NE,MHPG,DA,DOPAC濃度の測定は、当教室の仙波の報告した方法 (7)でマウスの半脳を用い、全て HPLC-ECD を用いて測定した。

【結果】

1.少量 CLNを用いた実験

Fig.1 に示すようにNE,DA 濃度はいずれの薬物投与群でも対照群との間に有意差はみられなかった。CLN 投与によりMHPG濃度は対照より25% 低下した。これに対してD-SLP,L-SLP,DL-SLP投与群いずれにおいても CLNによるMHPG減少に対する拮抗作用は認められなかった。DOPAC 濃度は CLNにより26% 低下した。この DOPAC減少に対してD-SLP は拮抗しなかったが、L-SLP および DL-SLP 投与による拮抗が認められた。しかもDL-SLP投与群の DOPAC濃度は L-SLP投与よりも有意に上昇していた。

2.少量 APOを用いた実験

Fig.2 に示すようにNE, DA濃度についてはいずれの群の間にも有意差はなかった。APO 投与により DOPAC濃度は24% 低下した。これに対して D-SLPでは拮抗しなかったが、L-SLP およびDL-SLPでは拮抗作用が認められた。MHPG濃度は APOにより低下する傾向にあったが有意差は認められなかった。

【考察】

α_2受容体作働薬として知られる CLNの少量投与でMHPG濃度のみならず DOPAC濃度にも低下が認められた。この DOPAC低下の原因として CLNがNE系を介してDA系へ影響した可能性と CLN自体にDA受容体への直接作用がある可能性が考えられる。少量 CLNによるMHPG低下を D-SLPが抑制していないことや、DOPAC 濃度低下を D-SLPは抑制せずに L-SLPが抑制したことから、D-SLP は今回用いたような少量末梢投与では in vivo で中枢α_2自己受容体を遮断しないと考えられる。またこの所見は、少量 CLNがDA自己受容体を直接刺激している可能性があることを示すものと考えられる。これまでの我々のラットを用いた実験結果でも少量DL-SLPはNE系に影響を与えず、より大量で初めて影響が出現する。従って D-SLP大量投与で少量 CLNのMHPG低下作用を抑制する可能性があり、現在検討中であり併せて報告する。少量 L-SLPおよびDL-SLPが少量 APOによる DOPAC低下に拮抗したが、DiChiaraらも既に少量 APOによるマウス脳 DOPAC低下を少量のDL-SLPが抑制したという実験結果を報告している (2)。この結果は L-SLPが少量で優先的にDA自己受容体を遮断することを示している。しかし既報のラットを用いた我々の実験では、同様の投与量で少量DL-SLPが少量 APOによるDOPAC, HVA低下に

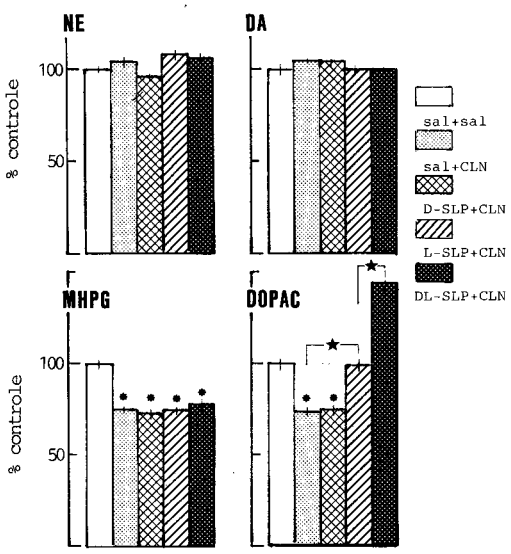


Fig.1. Effects of low doses of sulpiride on NE and DA metabolism in controle and small doses of clonidine treated mice.
controle values(ng/g) NE 373,MHPG 84.3,DA 1496, DOPAC 223. ●P<0.001 vs.controle ★P<0.001

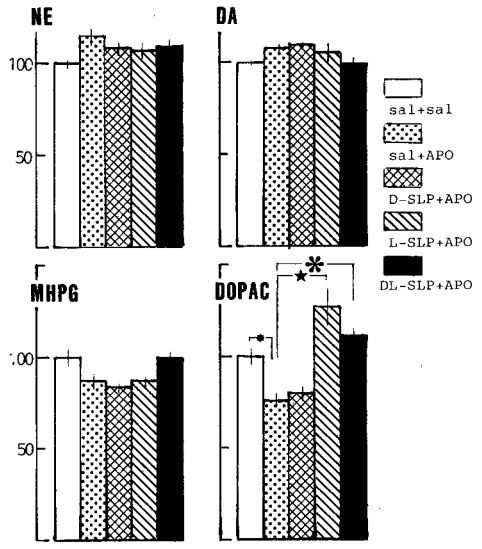


Fig.2. Effects of low doses of sulpiride on NE and DA metabolism in controle and small doses of apomorphine treated mice.
controle values(ng/g) NE 350,MHPG 75.4,DA 1353, DOPAC 221. ●P<0.02, ★P<0.01, ✱P<0.001

拮抗するという所見は得られなかった（3)。SLPがDA後シナプスと前シナプスのどちらに優先的に作用するかについては相反する結果が報告されており、現在定説はない。ラットとマウスでは少量 SLPのDA系（特にDA自己受容体）への影響に種差があることも考えられる。我々は、ラットではむしろ少量DL-SLPが前頭葉皮質のDA受容体に優先的に作用していることを示す所見を得ており、脳部位による SLPの親和性の差異に注目している(4)(5)。以上、今回のマウスを用いた結果からは少なくとも少量DL-SLPの効果は、NE系を介するものではなくDA系、とくにDA自己受容体遮断を介していることが示された。従って、これまでの我々の行なった実験全体からは、少量 SLPによる臨床的な抗うつ効果は、NE系ではなくDA系に対する効果により発現している可能性が強く示唆される。しかし、それがDA自己受容体遮断によるものか、中脳－前頭葉皮質DA神経系に対する優先的な作用によるのかについては更に検討を要す。

文献

1.Ålander, T. et al. Naunyn-Schneideberg' s Arch.Pharmacol.,312:145-150,1980
2.DiChiara, G. et al. Nature 264:564-567,1976
3.Jenner, P. and Marsden, C.D., Adv.Biol.Psychiat., 7:100-112,1981
4.金野　滋　ほか　精神神経薬理シンポジウム 10(1):59-77,1984
5.小松秀邦　ほか　薬物・精神・行動（jpn.j.Psychopharmacol.）6:109-110,1986
6.松原繁広　ほか　精神薬療基金年報 16:146-151,1985
7.仙波純一　精神神経学雑誌 Vol. 85 No.6 349-360 1983

88. 高血圧自然発症ラット（SHR）脳内ノルエピネフリン含有量に及ぼす拘束ストレスの影響

岡村邦博・水野　智・松井　啓・野村正彦
（藤田学園保健衛生大・医・生理）

〔要　約〕

高血圧自然発症ラット(SHR)とその対照ラットであるWistar Kyoto(WKY)の脳内（間脳，延髄）ノルエピネフリン(NE)含有量に及ぼす拘束ストレス及び加齢の影響を比較検討し以下の知見を得た。　4,12週齢のSHRにおいて，ストレス負荷後経時的(5,15,30,60,180 min)に測定した間脳，延髄のNE含有量は，時間経過と共に有意に低下しNEの代謝物 3-methoxy4-hydroxyphenylglycol(MHPG)含有量は有意に増加した。一方，4週齢WKYではNE,MHPGの間脳，延髄での含有量に顕著な変化は認められなかったが，12週齢WKYにおいては間脳でNE,MHPG含有量は，時間経過と共にそれぞれ有意に低下あるいは増加した。しかし，延髄においてはNE,MHPG含有量に有意な変化は認められなかった。ストレス負荷後，各時間におけるNE含有量に対するMHPG含有量の比(M/N)は，4,12週齢SHRの間脳，延髄で経時的に増加する傾向が認められたが，WKYでは顕著な変化は認められなかった。また，SHRの間脳におけるM/N比の増加率は，4週齢に比べ12週齢の方が約40%大きかった。　以上の結果より，拘束ストレスによりSHRの間脳，延髄NE含有量は顕著に低下し，その原因はNEの代謝亢進によると考えられた。さらに，若い週齢のSHRにおいてもすでにストレスに対し高い反応性を有している事が示唆された。

Key word：Immobilization stress, Norepinephrine, SHR

【序論】

ストレス負荷により脳各部位における神経伝達物質及び酵素活性が変動する事は知られている。特にラットにおいては，ノルエピネフリン(NE)代謝回転が拘束ストレスにより亢進することが報告されている(3,6-10)。一方，本態性高血圧自然発症ラット(SHR)においては，拘束ストレスにより対照のWistar Kyoto(WKY)に比べ，間脳及び延髄におけるTH(Tyrosine hydroxylase),DBH(Dopamine-β hydroxylase)活性は上昇し，NE代謝回転は亢進する事が報告されている(5)。しかし，これらの報告の多くは生後3か月程度の成熟ラットを用いたもので，1か月程度の若いラットを用い検討したものは少ない。今回，高血圧発症以前と考えられる4週齢及び高血圧発症後の12週齢のSHRを用い脳内NE含有量に及ぼす拘束ストレスの影響を検討する為に，脳内NE及びその代謝物であるMHPG(3-metoxy-4-hydroxyphenylglycol)含有量をストレス負荷後経時的(5,15,30,60,180分)に測定した。更にSHRの対照と考えられるWKY(4,12週齢)を用い同様の実験を行い比較検討した。

【方法】

4,12週齢の雄性SHR及びWKY（体重4W:80g前後　12W：200g前後）を仰臥位に金網で固定する拘束ストレスをそれぞれ（5,15,30,60及び180分間まで）加え各時間において断頭により速やかに脳を摘出した。Glowinskiらの方法(2)を一部変更し，摘出した脳を7部位に分け間脳と橋を含む延髄の2部位を中心に使用した。得られた脳組織（間脳，延髄）を，内部標準物質としてDHBA(3,4-Dihydroxybenzylamine)を付加した0.2N過塩

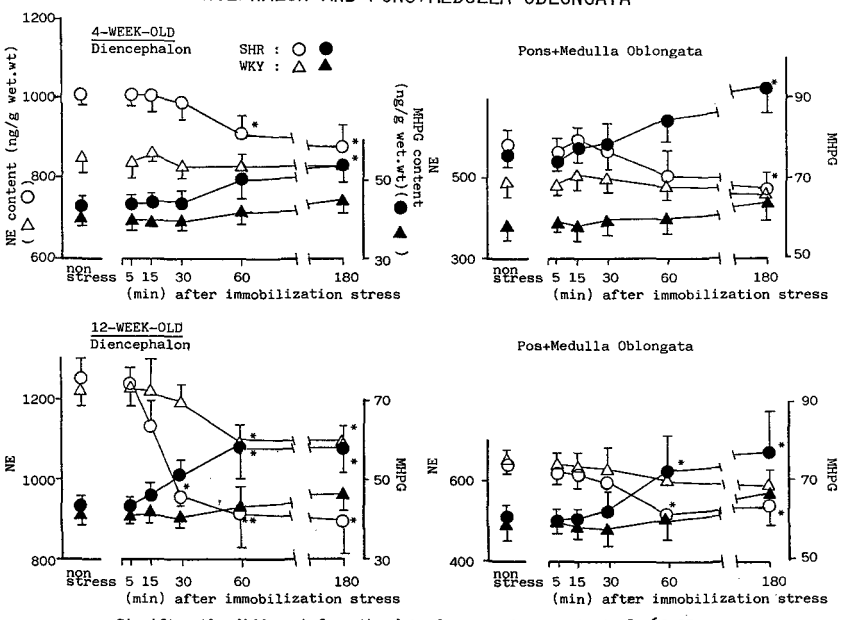
素酸中でホモゲナイズし，30000gで15分間遠心分離し上清を得た。上清中のNEとその代謝物であるMHPG(1)をHPLC-ECD法を用いて定量した。NE，MHPGの含有量は，組織湿重量当たりのng単位で表示した。得られた結果の有意差検定は，t-検定により行った。

【結果と考察】

1）4,12週齢ラットにおけるストレス負荷後のNE及びMHPG含有量の経時変化

Fig.1に示す様に4週齢のSHRの間脳，延髄におけるNE（○）及びMHPG（●）の含有量は，ストレス負荷後の時間経過と伴にnon-stress（コントロール）ラットのそれらに比べ，NEにおいては含有量の低下が，MHPGにおいては増加が認められた。特に60分以後それらの変化は顕著であった。しかし，4週齢のWKY（NE:△，MHPG:▲）では両部位での両物質の含有量はストレス負荷による顕著な変化は認められなかった。12週齢においてはSHR及びWKY共に30分以後，間脳と延髄においてNEとMHPG含有量はそれぞれ有意な低下および増加する傾向が認められた。一方，Kvetnanskyら(4)はSHRに各種のストレスを負荷した場合，血中カテコールアミン濃度は増加し，さらに増加の程度はWKYに比べ大きい事を報告している。又 Fujitaら(5)は，視床下部－視床，脳幹，副腎等におけるDBH活性がストレス負荷時に，SHRではWKYに比べより高くなる事を報告しており，これはSHRがWKYより拘束ストレスに対し，より高い反応性を有するためであると考察している。本結果からも，12週齢SHRのNE，MHPG含有量のストレス負荷後の変動はWKYに比べて大きく，SHRが拘束ストレスに対して，より高い反応性を有していることが推察された。更に4週齢という若いSHRの中枢においてすでにストレスに対し高い反応性を

Fig.1 TIME COURSE OF CHANGE OF NE AND MHPG CONTENTS IN DIENCEPHALON AND PONS+MEDULLA OBLONGATA



*: Significantly different from the data for non-stress rat at $P < 0.05$
**: Significantly different from the data for non-stress rat at $P < 0.01$

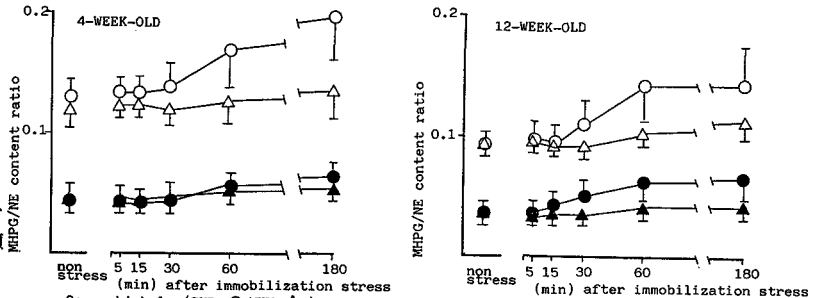
有している事が示唆された。

次ぎに，SHRにおけるNEの減少がMHPGの増加，すなわち代謝回転の亢進によるか否かを詳細に検討するため，ストレス負荷後，各時間におけるNE含有量に対するMHPG含有量の比（M/N比）の経時変化を検討した。

2）4，12週齢における間脳，延髄両部位でのSHRとWKYのM/N比の経時変化

M/N比の経時的変化は，Fig.2に示す様に両週齢において，SHR（○●）では，拘束ストレス負荷後，上昇する傾向が認められたが，WKY（△▲）では，その比は両部位でほぼ一定の値であった。従ってSHRにおけるNE含有量の低下は，ストレスにより，NEの代謝回転が亢進したことによると考えられた。

Fig 2 TIME COURSE OF CHANGE OF MHPG/NE CONTENT RATIO IN DIENCEPHALON AND PONS+MEDULLA OBLONGATA



Open shimbols (SHR: ○ WKY: △) show the ratio in pons+medulla oblongata.
Solid shimbols (SHR:● WKY:▲) show the ratio in diencephalon.

また，SHRにおいてM/N比の増加率は，延髄では，4、12週齢ともに約50％であったのに対し間脳における増加率は，4週齢で約45％，12週齢で約87％でありその差は約40％であった。従って，ストレスに対する反応性が間脳においては加齢に伴って変化する可能性が示唆された。さらに，この間脳におけるストレスに対する反応性の変化は，高血圧発症に伴い生じる可能性も示唆されるため，今後この点に関してより詳細な検討が必要であると考えられる。

【 文 献 】

1) Ben H.C.W., (1984) J. Neurochem., 42, 934-942.
2) Glowinsky, L. and Iuersen, L.L., (1966) J. Neurochem., 13, 655-669.
3) Ida, Y. et al. (1982) Neurobiol. Aging, 3, 233-236.
4) Kvetnansky, R. et al. (1979) Am. J. Physiol., 236, H457.
5) Fujita, K. et al., (1980) Catecholamine and stress. PP.339, Elsevier North Holland, Amsterdam.
6) Palkoriits, M. et al., (1975) Neuroendocrin. 18, 144-153.
7) Ritter, S. and Pelzer, N.L. (1973) Brain Res., 152, 170-175.
8) Stone, E.A. (1973) J. Neurochem., 21, 589-601.
9) Srone, E.A. (1973) Am. J. Physiol., 224, 165-169.
10) Tanaka, M. et al., (1983) Pharmacol. Biochem. Behav., 19, 541-547.

89. GTP-cyclohydrolase 阻害剤による Tetrahydrobiopterin 低下動物の作製

鈴木周平・渡辺恭良・鏡山博行・早石　修
（大阪医科大・医化学）

〔要　約〕

中枢神経系におけるカテコールアミン及びセロトニン生合成系の補酵素であり、その調節因子の一つとして考えられているtetrahydrobiopterinのもつ生理的な役割を生体系を用いて調べる目的で、biopterin生合成系阻害剤投与により、biopterin欠乏モデル状態を作成した。即ち、GTP-cyclohydrolaseの阻害剤である2,4-diamino-6-hydroxypyrimidineを腹腔内連続投与することにより、各臓器のbiopterin濃度を著明に低下させることに成功した。特に肝臓、血漿では、90%以上の減少率であり、また脳各部位（線条体を含む新皮質、間脳、脳幹部）においても50－70%の減少を認めた。このようなbiopterin低下にもかかわらず、セロトニン及び5HIAAは減少しなかった。また、probenecid処理による5HIAA蓄積においても欠乏モデルとコントロール群との間に有意な差はなかった。この事実により、生体内biopterinは、脳内モノアミン生合成系の律速酵素である芳香族アミノ酸水酸化酵素に対して飽和状態にあり、従来考えられてきたような調節因子としては働いていないという可能性が考えられる。

Key word : tetrahydrobiopterin, deficiency, serotonin biosynthesis

神経伝達モノアミン（カテコールアミン、セロトニン）の生合成系律速酵素であるtyrosine hydroxylase（TyrOHase）、tryptophan hydroxylase（TrpOHase）は、いずれも補酵素としてtetrahydrobiopterin（BH_4）を必要とする。これまでの報告によると、中枢神経組織において、BH_4は両酵素のBH_4に対するKm値に比べて低濃度で存在し、従ってその濃度はカテコールアミン、セロトニン生合成調節の一因子であると考えられてきた。この仮説は、外来性BH_4、特に天然型異性体である6R-BH_4が脳内モノアミン生合成を増加させるという事実に依るところが大きい（５、７）。一方、臨床面では悪性フェニルケトン尿症（１、１１）やパーキンソン症候群（８）あるいは小児自閉症（９）等の中枢神経疾患とBH_4の関連が解明されつつあり、治療薬としてのBH_4の重要性も増してきている。こういった現状に対して、生体内のBH_4が枯渇した動物、即ちビオプテリン欠乏モデル動物を作成する事は、生体内でのBH_4の役割を追求する目的ばかりでなく、BH_4の臨床応用に関する研究に対しても必要不可欠であると考えられるが、これに相当するようなモデル動物は、これまでのところ報告がない。我々は、BH_4生合成系路の律速酵素と推定されるGTP cyclohydrolaseの阻害剤である2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine（DAO）（１０）をラットに連続投与することにより、BH_4欠乏モデル動物を作成することができた。さらに、このモデルにおけるセロトニン生合成系の変化を調べたところ、従来の仮説、即ちBH_4を神経伝達モノアミン生合成の調節因子とする説と相違する結果を得たので報告する。

＜実験方法＞離乳直後のWistar系雄ラット（体重約45g）に、DAO50mgを４時間毎４回

腹腔内投与し、最後の投与より４時間後に無麻酔下で断頭し、血漿、脳、肝臓を採取した。DAOは10mMPBS（pH 7.4）中50mg/ml濃度の懸濁液とし、腹腔内に１回当たり1ml投与した。また、脳は左右に分け各々をGlowinskiとIversenの方法（３）に準じて３部位（新皮質、間脳、脳幹）に分けた。但し線条体は新皮質に含めた。脳は右半球をBH_4濃度測定に、左半球をセロトニン，5-hydroxyindole acetic acid（5HIAA）測定に用いた。

各々の臓器について、Fukushimaらの方法（２）、に準じてtotal biopterin assayを行った。0.1N Phosphoric acid で組織をホモジナイズし、酸性ヨード液（I_2 0.9%, KI 1.8%／0.1N HCl）を加え、暗所にて１時間酸化した後、その遠心上清をDowex50W-X8（200-400 mesh、H^+form）にのせ、吸着したプテリンを1N NH_4OHで溶出。それを氷酢酸で中和しHPLC-蛍光検出器でビオプテリンを測定した。検出器の励起波長は360nm、蛍光波長は440nmに設定した。セロトニン及び5HIAAの測定は、左半球またはその一部をMcIlvaine's buffer（pH 3.0）0.25mMアスコルビン酸）でホモジナイズし、その遠心後上清につき、HPLC-電気化学検出器を用いて行った。電気化学検出器は0.7Vにセットした。

また、神経伝達モノアミン生合成率を間接的に知るため、acid transporterの阻害剤であるprobenecid 200mg/kgを断頭５時間前に腹腔内投与し、脳内の5HIAAの蓄積を測定した。

＜結果及び考察＞Table1.に示すように、DAO連続投与（４時間毎４回）が生体内BH_4濃

Table 1 Effect of multiple administrations of DAO on tissue biopterin concentration

	biopterin concentration (nmol/g)		%Decreace
	Control	DAO	
Whole Brain	0.32±0.07	0.11±0.03	65.6
Neocortex	0.28±0.01	0.14±0.02	50.0
Diencephalon	0.52±0.02	0.17±0.02	67.3
Brain Stem	0.39±0.05	0.11±0.02	71.8
Liver	5.79±0.93	0.19±0.07	96.7
Plasma	0.22±0.08	0.02±0.01	90.9

Values of biopterin are mean ± SE of four determinations.

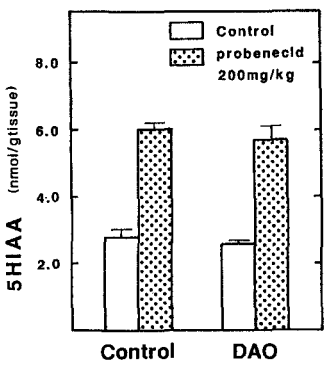


Fig.1 Accumulation of 5HIAA in Whole Brain of Biopterin Decreased Rat after probenecid treatment

Table 2 Effect of multiple administrations of DAO on Serotonin and 5HIAA level in various brain regions

	Serotonin (nmol/g)		5HIAA (nmol/g)	
	Control	DAO	Control	DAO
Neocortex	1.2±0.05	1.1±0.05	1.8±0.1	1.9±0.1
Diencephalon	2.9±0.2	2.9±0.3	4.8±0.4	5.5±0.3
Brain Stem	5.4±0.5	4.6±0.5	6.9±0.4	6.6±0.6

Values are mean ± SE of five determinations.

度に及ぼす効果は著明であり、特に肝臓、血液では90%以上もの減少を認めた。脳ではやや減少率が小さいが、これは阻害剤の血液-脳関門透過性によると推察される。しかし、in vivoでBH_4を極端に減少させた例は他になく、この阻害剤を用いてBH_4欠乏モデルを作成できることが示された。このモデル動物におけるBH_4生合成酵素、特にGTP cyclohydrolase活性については現在検討中である。このモデルにおいてBH_4濃度は、新皮質、間脳、脳幹の各部位で50.0%、67.3%、71.8%まで減少しているのに対し（Table 1）、各部位でのセロトニン、5HIAAはほとんど変化しなかった（Table 2）。さらに、probenecid処理後5時間の5HIAA蓄積についても、BH_4欠乏動物とコントロール群との間で有意な差はなかった（Fig.1）。以上より、脳内BH_4濃度の減少にもかかわらず、セロトニン生合成率は減少しないことが推察される。もちろん、この人工的なモデル状態では、TrpOHase誘導や他の要因について注意深い検討が必要である。BH_4局所濃度がカテコールアミン、セロトニン生合成率を限定しているという従来の仮説は、BH_4を脳内あるいは脳室内投与することにより神経伝達アミン生合成が増加したという実験結果に基づいている。しかし、最近、BH_4投与実験において、これと相反する結果も報告されており（６）、BH_4が神経アミン生合成率を増加させた事実について、他のメカニズムの存在の可能性も考えられなければならない。

上記の結果によると、これまでの説と異なり、神経細胞内でTrpOHaseに対してBH_4は飽和している事が考えられる。今後、このモデル動物において、セロトニンのみならずカテコールアミンについても生合成率のより正確な検討を行っていきたい。

＜引用文献＞

１．Bartholome, K（1974）Lancet, 2, 1580

２．Fukushima, T. and Nixon, J. C.（1980）Anal. Biochem. 102, 176-188

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

４．Hefti, F.（1979）Life Science , 25, 775-782

５．Kettler, R. , Bartholini, G. and Pletscher, A.（1974）Nature, 249, 476-478

６．Miller, L. et al（1986）Neurochem. Res. 11, 291-298

７．Miwa, S. , Watanabe, Y. and Hayaishi, O.（1985）Arch. Biochem. Biophys. 239, 234-241

８．Nagatsu, T. , Narabayashi. H. et al（1981）Clin. Chim. Acta. , 109, 305

９．成瀬浩、武貞昌志、中根允文、山崎晃資　他：厚生省新薬開発研究、酵素障害に基づく代謝異常治療薬の開発研究班、昭和６０年度研究報告集（印刷中）

１０．Rembold, H.（1964）Z. Physiol. 339, 258-259

１１．Smith, I. , Clayton, B. E. and Wolff, A. H.（1975）Lancet, 1, 1108-1111

１２．Sperk, G.（1982）J. Neurochem. 13, 840-843

90. 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞からの catecholamine 分泌におよぼす GABA の作用様式

今泉美佳・片岡泰文*・植木昭和*・宮川洋二・熊倉鴻之助
(上智大・生命研, 九州大・薬・薬理*)

〔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、γ-aminobutyric acid (GABA)刺激によるcatecholamines(CA)分泌、及び Acetylcholine(ACh)によるCA分泌に及ぼすGABAの影響について検討した。培養細胞に対してGABA刺激を与えると、用量依存性にCA分泌が引き起こされた。この CA分泌は、Bicucullineによって拮抗され、また20mM Mg^{2+}存在下で阻害された。従ってGABAによるCA分泌は、GABAがクロマフィン細胞のGABA受容体に作用して脱分極を引き起こした結果であることが示唆された。さらに、GABAのCA分泌作用はDiazepam(DZP)によって増強され、Ro15-1788によってその増強作用が阻害されたことから、クロマフィン細胞においても中枢と同様の GABA受容体/Benzodiazepine受容体の機能的共役が存在することが示唆された。GABA存在下でACh刺激を行なった所、AChによるCA分泌は増強され、Bicucullineによりこの増強作用は阻害された。このことから生体内では、クロマフィン細胞に存在し刺激に伴なって細胞外に放出されるGABAがAChに対する分泌応答の調節に関与する可能性が考えられる。

Key word : Adrenal chromaffin cells, Secretory function, γ-aminobutyric acid

副腎髄質クロマフィン細胞にはGABAの合成・貯蔵系及びGABA取り込み機能があり、取り込まれたGABAはNicotine刺激により細胞外へ放出されることがKataokaら[2]により明らかにされている。同時に、この報告によりGABA受容体/Benzodiazepine受容体共役系の存在が示唆されている。一方、Bormanら[1]は、パッチクランプ法による実験からGABAにより活性化されるCl⁻channelの存在をクロマフィン細胞で明らかにしており、これらの実験からGABAがクロマフィン細胞のCA分泌機能に対し内因性調節因子として働く可能性が示唆されている。本研究では、この点をさらに明確にすることを目的として培養クロマフィン細胞を用いて電気化学検出器(ECD)と連動したCBCP system[3]による分泌測定実験を行ない、GABAによるCA分泌及びAChによるCA分泌に及ぼすGABAの作用様式を検討した。

［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[4]の方法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による実験は既報の方法[3]に従った。即ち、2枚の membrane filterにはさまれた3×10^6個の細胞を250μlのスペースに保持し、このcell bedをLocke's溶液(pH 7.4)、2 ml/min で灌流した。分泌刺激は50μlの刺激物質溶液を灌流液中に加えることによりパルス的に与えた。種々の阻害剤は刺激物質と一緒にパルス的に、又は灌流液中に加えて持続的に与えた。System内は30℃の一定条件とした。ECD systemはbas社製ｸﾞﾗｯｼｰｶｰﾎﾞﾝ電極と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、

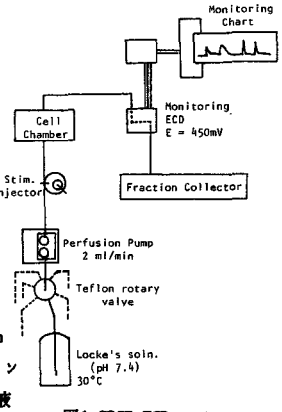


図1. CBCP-ECD system

CA分泌の動態を電流－時間曲線として記録した。

3)HPLC systemによる測定：ECD system を通過後の灌流液をfraction collectorにより分取し、各fraction中に含まれるCA量をHPLC法により定量した[3]。

［結果及び考察］

まずGABA刺激に対するCA分泌について検討を行なった。培養細胞にパルス的にGABA刺激を与えると、用量依存性にCA分泌が引き起こされ、このCA分泌は灌流液にBicuculline(10^{-5}M) を加えることにより阻害された(図2)。またGABAによるCA分泌は、灌流液に20 mM Mg^{2+}を加えることにより完全に阻害された(図3)。従ってこのCA分泌はGABA受容体の刺激による脱分極、それに続くvoltage sensitive Ca^{2+} channelを介したCa^{2+}流入により引き起こされていると考えられる。しかし、GABAの最大濃度(2.5x10^{-4}M)によるCA分泌応答は、ACh(10^{-4}M)によるCA分泌応答の1/20程度と非常に小さく、GABAによる脱分極はAChによって引き起こされる脱分極に比べてかなり小さいものと思われる。

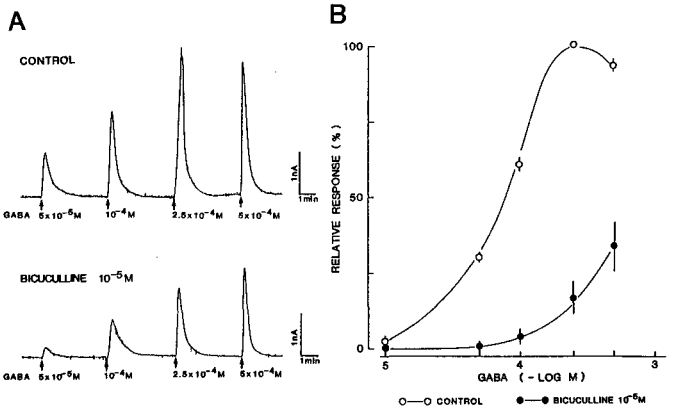


図2. GABAによるクロマフィン細胞からのCA分泌 及び Bicucullineによる抑制
B)応答の大きさはGABAによる最大分泌の大きさを100として表した。

次にBenzodiazepine受容体のagonistであるDiazepam(DZP) 5x10^{-6}Mを含んだGABA溶液をパルス的に細胞に与えると、GABAのCA分泌作用は22%増強されたが、Benzodiazepine受容体のantagonistであるRo15-1788 (10^{-6}M)とDZP (5x10^{-6}M)を含んだGABA溶液をパルス的に細胞に与えると、CA分泌はcontrolレベルにもどり、DZPによる増強作用は全くみられなかった(図-4)。これらのことから、クロマフィン細胞においても中枢と同様のGABA受容体/Benzodiazepine受容体の機能的共役が存在することが示唆され、Binding Studyによって得られた知見[2]と良く一致した。

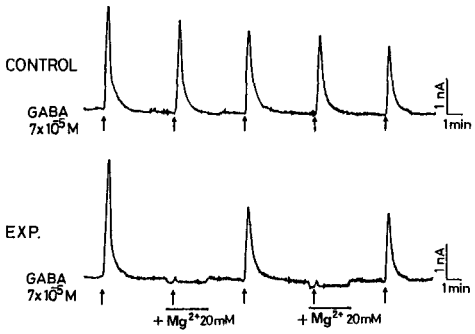


図3. GABAによるCA分泌に対するMg^{2+}の影響

以上の結果は、GABAが脱分極を引き起こすことによってクロマフィン細胞の分泌応答を調節し得る可能性を示唆している。そこでGABAがAChによるCA分泌に対してどのような影響を与えるかを検討するため、灌流液を20 s間 GABA溶液に切り換えてGABAの存在下でAChによるパルス刺激を与え、分泌応答を調べた。その結果、GABAの存在はACh10^{-4}～10^{-2}MによるCA分泌を一様に増強させた(図5,6)。また、このGABAによる増強作用は灌流液中にBicucullineを加えることによって阻害された(図5)。

以上の灌流実験の結果からクロマフィン細胞ではGABAによる小さな脱分極が、ACh

に対する細胞の応答性を増強することが示された。一方、パッチ法によるCA分泌実験では、GABAのantagonistであるBicuculline存在下でAChによるCA分泌の増大が報告されており[2]、GABAが内因性抑制因子として働く可能性が考えられている。我々はCBCP systemによる灌流実験で、AChに対する分泌応答能に及ぼすKCl溶液の影響を既に報告している[3]。すなわち、20 mM～30 mMの狭い範囲のKCl存在下ではAChに対する細胞の応答性は有意に増強されるが、40 mM以上のKCl存在下ではAChに対する分泌応答は著明に抑制され、細胞の脱分極状態がAChに対する分泌応答に促進、抑制両方向の影響を与えることを示している。この点を考慮すると生体内副腎髄質では、GABAはクロマフィン細胞に脱分極を引き起こすことによって細胞の分泌応答能に促進、抑制両方向の調節をかける可能性が考えられる。交感神経活動が低い状態では分泌応答を促進方向に調節し、神経活動が非常に高まった状態においては、AChによるCA分泌を抑制方向に調節するという生理機能は今後充分に検討すべき興味ある仮説であろう。

CONTROL (GABA)	+DZP	+DZP +Ro15-1788
100 %	122±5.1 %*	91±3.8 %**

* P<0.05 when compared with CONTROL
**P<0.05 when compared with +DZP

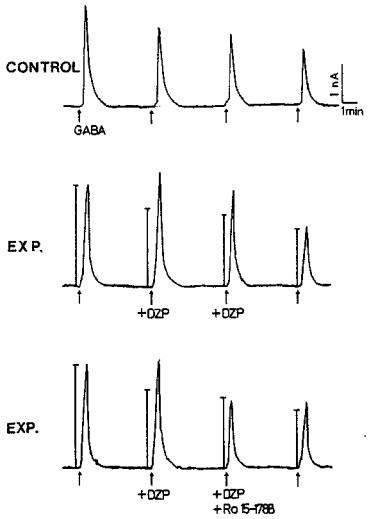


図4. GABAのCA分泌作用に対するDiazepamの影響
実験群の各応答の直前に対応するcontrolの大きさを示した。
GABA:7x10^{-5}M, DZP:5x10^{-6}M, Ro15-1788:10^{-6}M

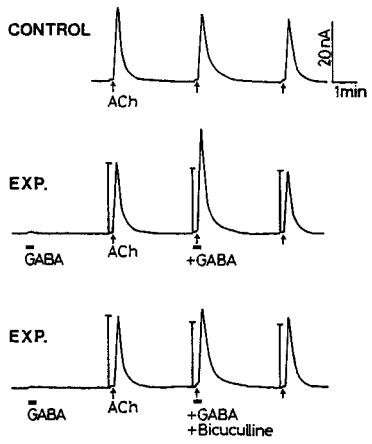


図5. AChに対するCA分泌応答に及ぼすGABAの作用
実験群の各応答の直前に対応するcontrolの大きさを示した。
ACh:10^{-3}M, GABA:5x10^{-5}M, Bicuculline:10^{-4}M

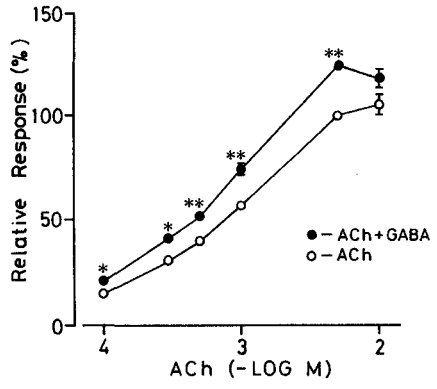


図6. AChによるCA分泌の用量反応曲線に及ぼすGABA(5x10^{-5}M)の影響
各値はAch 5x10^{-3}Mによる CA分泌の大きさを100として表した。
* P<0.05, ** P<0.01

文献
1) Bormann, J. and Clapman, D.E. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2168-2172.
2) Kataoka, Y., Gutman, Y., Guidotti, A., Panula, P., Wroblewski, J., Cosenza-Murphy, D., Wu, J.Y. and Costa, E. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3218-3222.
3) Kumakura, K., Obara, M., Sato, G.P. (1986) J. Neurochem. 46, 1851-1858.
4) Waymire, J.C., Bennett, W.F., Boehme, R., Hankins, L., Waymire, K.G., and Haycock, J.W. (1983) J. Nerosci. Methods 7, 329-351.

91. ラット視覚領皮質における GABA, GAD および GABA-T の生後変化

渡部繁男・後藤　昇*・石川紘一

（日本大・医・薬理，解剖*）

〔要　約〕

抑制性伝達物質であるγ-aminobutyric acid（GABA）およびこの物質の代謝に関係した酵素である glutamic acid decarboxylase（GAD）とGABA transaminase（GABA-T）の laminal distribution およびその生後変化について，Wistar 系ラット視覚領皮質を用いて検討した。成熟ラットにおいて，断頭によって屠殺した場合 GABA 濃度は明らかな laminal distribution を示し，外錐体層で最も高く，分子層や多形層において最も低かった。ところが，microwave を照射して屠殺した場合，GABAの laminal distribution は認められず，このことは microwaveの照射によって代謝回転の速いおそらく伝達物質機能をはたしている GABA が影響を受けたものと考えられる。断頭による屠殺では，GABA 濃度に生後発達が見られ，ほぼ生後15日目で成熟動物の値に成った。GAD や GABA-T の活性においては，明らかな laminal distribution は認められなかった。しかしこれらの酵素においても生後発達が認められ，GABA の濃度と同様に生後15日目でほぼ成熟動物と同じ活性であった。このことから，GABA を伝達物質とする神経系は，生後15日あたりで完成するものと考えられる。

Key word：GABA, GAD, GABA-T, Laminal distribution, Postnatal development

γ-aminobutyric acid（GABA）は哺乳動物中枢神経系内で不均一に分布しており，黒質，淡蒼球，視床下部に高濃度存在している。Purkinje 細胞を用いた実験によれば，GABA は神経終末に集まっていると考えられている（1）。一方免疫組織化学的に，GABA の合成酵素である glutamic acid decarboxylase（GAD）は，明らかな抑制性神経系の終末に存在することが示されている（2,3）。これらの結果は GABA が中枢神経系の抑制性伝達物質であることを意味している。大脳皮質は，GABA 作働神経系の支配が明らかにされている脳内部位に比べると濃度は低いとされている（4）。しかし，皮質表面を刺激して引き起こされる大脳皮質錐体細胞の抑制は，GABA 作働性ニューロンに由来するとされている。最近我々は，ラット視覚領皮質の層内分布（laminal distribution）を検討し，内顆粒層および内錐体細胞層に代謝回転の速い GABA が多く存在し，その部位で神経伝達機構と関係しているであろうと結論した（5）。神経伝達物質の代謝や分布には，そのシナップスでの動態と同様に，生後発生が認められている（6-8）。そこで今回の実験においては，GABA およびその代謝に関係した酵素である GAD と GABA-transamiase（GABA-T）の生後変化について明らかにした。

《実験方法》

当教室の恒温・恒湿に維持された飼育室で飼育された，生後齢の異なった Wistar 系雄性ラットを用いて実験を行った。動物はそれぞれ該当する時期（1,2,3,5,7,15日齢，3,4,8,12,15 週齢）に断頭によって屠殺し，直ちに脳を取り出した。その後，視神経交叉の前方 2 mm および橋の後縁で前額断し，この部位の皮質下に付着する海

馬，視床，視床下部，中脳等を取り除いた。このようにして得られた大脳皮質を軟膜面を上にしてミクロトーム・ステージ上においた。さらに正中線から外側 2 mm およびrhinal fissureに沿って矢状断して視覚領皮質（Area 17)ブロックを作成した。このブロックをクリオスタット（-40°C）中で 5 μmの切片にし，5 枚ごとにluxol fast blueで染色して顕微鏡所見にもとずいて（Ⅰ）分子層，（Ⅱ＋Ⅲ）外顆粒層＋外錐体層，（Ⅳ）内顆粒層，（Ⅴ）内錐体層，（Ⅵ）多形層の 5 層に分け，それぞれの層ごとに集めて -80°Cの超低温槽中で保存した。なお，脳内の GABA を定量した場合には，断頭による屠殺の他に microwave 照射（5 kW, 1.1秒）により屠殺した動物についても，同様にして試料を作成した。

保存されていた脳試料について，GABA の定量および GAD，GABA-T 活性の測定を行った。GABA の定量には Lowry and Passonneau の酵素法（9）を，また GAD および GABA-T 活性の測定にはそれぞれ Okada 等の方法（10）および Wu の方法（11)を用いた。

《結果および考察》

断頭により屠殺した場合，生後5 日目ではGABA濃度に明らかな差を認めなかったが，生後15日目あたりからlaminal distributionに差が認められるようになり，内顆粒層が最も高く，多形層が最も低く，統計学的に有意（$P < 0.01$）の差となった。生後発達についてみると，やはり15日目でほぼ成熟動物と同じ値となった（Table 1)。しかし，microwave 照射により動物を屠殺した場合には，視覚領皮質における GABA 濃度

Table 1. Postnatal changes in laminal distribution of GABA in visual cortex of rats

Layer	5 D	10 D	15 D	3 W	15 W
I	14.9 ± 3.3 (6)	17.4 ± 3.6 (6)	17.8 ± 2.3 (7)	19.6 ± 2.6 (6)	20.8 ± 2.8 (6)
II + III		17.2 ± 1.7 (8)	23.1 ± 2.9 (7)	24.9 ± 1.4 (6)	24.3 ± 1.7 (6)
IV	14.1 ± 1.2 (6)	15.6 ± 4.5 (8)	23.4 ± 2.8 (7)	28.5 ± 2.8 (6)	26.2 ± 3.0 (6)
V			20.0 ± 2.5 (6)	22.3 ± 3.8 (6)	22.8 ± 2.7 (6)
VI	11.6 ± 1.3 (6)	12.0 ± 1.2 (5)	15.6 ± 1.2 (6)	17.8 ± 3.1 (6)	15.9 ± 2.3 (6)

The results are expressed in mmol/kg protein and represent means ± S.E.M. from the number of rats given in parentheses.

Table 2. Postnatal changes in laminal distribution of GAD activities in visual cortex of rats

Layer	5 D	10 D	15 D	3 W	15 W
I	168 ± 31 (6)	192 ± 26 (8)	208 ± 35 (7)	226 ± 10 (7)	240 ± 21 (6)
II + III		178 ± 22 (8)	217 ± 30 (7)	215 ± 9 (6)	221 ± 8 (6)
IV	186 ± 8 (6)	194 ± 28 (8)	185 ± 26 (7)	208 ± 26 (6)	225 ± 28 (6)
V			215 ± 37 (7)	184 ± 16 (6)	198 ± 13 (6)
VI	138 ± 15 (6)	190 ± 25 (8)	175 ± 22 (7)	172 ± 31 (6)	170 ± 9 (6)

GAD activities are expressed in mmol/kg protein/hr.

Table 3. Postnatal changes in laminal distribution of GABA-T activities in visual cortex of rats

Layer	5 D	10 D	15 D	3 W	15 W
I	143 ± 12 (6)	261 ± 22 (8)	315 ± 20 (7)	316 ± 49 (6)	314 ± 45 (6)
II + III		225 ± 33 (8)	272 ± 37 (7)	292 ± 36 (6)	298 ± 25 (6)
IV	144 ± 20 (6)	233 ± 44 (8)	302 ± 59 (7)	320 ± 48 (6)	340 ± 31 (6)
V			273 ± 45 (7)	308 ± 49 (6)	297 ± 16 (6)
VI	143 ± 19 (6)	246 ± 35 (8)	246 ± 46 (7)	300 ± 27 (6)	272 ± 19 (6)

GABA-T activities are expressed in mmol/kg protein/hr.

のlaminal distributionには有意の差は認められず，測定を行ったすべての層ともほぼ 10 mmol/kg protein であった。Microwave 照射によって影響を受けるのは脳内にある2 つの GABA コンパートメントの内，代謝回転の速いもので神経伝達機構と関係したものであると考えられている（5）。したがって，II～IV層にかけて，GABAが抑制性伝達物質として機能していると考えることができる。また GABA 濃度には生後発達が認められ，且つ生後15日目で成熟動物と同程度の濃度になったことは，この時期に伝達物質としての機能が完成するものと考えることができる。

GAD 活性についても明らかな生後変化が認められた（Table 2）。この酵素の場合生後15日目にほぼ成熟ラットの活性が完成した。しかしlaminal distributionという点で比較した場合，I～VI層の間に有意の差は認められなかった。一方 GABA の分解に関係した酵素であるGABA-Tの活性においても，明らかな生後発達が認められ（Table 3），成熟動物の値に達する時期は GADの場合と同じで生後15日目であった。この結果も，GABA作働神経系の完成時期が生後15日前後であることを示し，すでに発表されている高濃度K^+による遊離実験の結果（8）とも一致するものであった。

《文献》

1. Fonnum, F. and Walberg, F. (1973) Brain Res. 62, 577-579.
2. 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.
3. Ribak, C.E. (1978) J. Comp. Neurol. 187, 261-284.
4. Okada, Y., Nitsch-Hassler, C. Kim, J.C., Bak, I.J. and Hassler, R. (1971) Exp. Brain Res. 13, 514-518.
5. Okada, Y. (1974) Brain Res. 75, 362-365.
6. Ramsay, P.B., Krigman, M.R. and Morell, P. (1980) Brain Res. 187, 383-402.
7. Redburn, D.A., Broome, D., Ferkany, J. and Enna, S.J. (1978) Brain Res. 152, 511-519.
8. Watabe, S. and Ishikawa, K. (1984) Biogenic Amines 1, 329-339.
9. Lowry, O.H. and Passonneau (1972) A Flexible System of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, pp. 253-260.
10. Okada, Y. and Shimada, C. (1976) GABA in Nervous System Function, Raven Press, New York, pp. 223-228.
11. Wu, J.-Y. (1976) GABA in Nervous System Function, Reven Press, New York, pp. 7-55.

92. ゴナドトロピン作働系に対するヒスタミンとヒスタミン拮抗物質の作用（加齢による変化を含めて）

新川久義・Ramon Cacabelos・三宅　侃*・田中潤也
村越和子・多田國利・播口之朗・西村　健
（大阪大・医・精神医学，産科婦人科*）

〔要　約〕
視床下部－下垂体系において、外因性 lutenizing hormone-releasing hormone(LH-RH;10-50ug) 投与時の内因性LHRH反応およびLH反応に対する histamine (HA;i.p.), Mepyramine(Mep;H-1 antagonist i.p.),Famotidine(Fam;H-2 antagonist i.p.) の影響をyoung rat(3M) で調べた。また、adult (16M) とold rat (30M) の腺性下垂体(A-h)と血中において、LHに対するHAとHAの拮抗物質の影響を調べた。視床下部前部(AH)で外因性LHRHは内因性LHRHを増加し、HAはこの反応を増強し、Mep とFam の両者は阻害した。HA単独投与はAHではLHRHを減少させる傾向を示し、視床下部後部(PH)ではLH-RHの著明な増加を引き起こした。HAはPHでLHRH投与後のLHRH上昇とLH上昇を抑制した。また、HA単独投与は、young,adult,old rat で血中LHを変えなかったが、Mep とFam はadult とold rat でAhと血中のLHを減少した。 LH は、Ahにおいてadult よりold rat で高く、Mep とFam によって 40-50% 減少した。以上の結果は、HAがH-1 とH-2 receptorの両方を介してゴナドトロピン作働系(GTS) に対して調節性役割を演じていることを示唆している。加齢動物ではHA receptor の障害と共に効率的な GTSのfeed-back mechanismの欠如のためHA拮抗物質の薬理学的作用が増強するのかもしれない。

Key word : LHRH,histamine,histamine antagonist

histamine(HA) がゴナドトロピン作働系において役割を演じていることが報告されている[1,2] 。中枢レベルのestrogen receptor においてHAはH-1,H-2 receptorの両方を介して作用している[4.5] ようであるが、ゴナドトロピン作働系のHA receptor のtypeはまだ明らかにされていない。最近の知見は、視床下部－下垂体系においてLH-RHがHAに直接作用して、視床下部内のfeedback loop が形成されることを示唆している。[5,Cacabelos, 大和谷　未発表] 。他方、老年男性[7] および女性[8] において神経内分泌学的変化があることがよく知られている。これらの変化は視床下部のLHRH[9.10]とHA[11]含量の減少に随伴したものである。今回我々は、ゴナドトロピン作働系におけるHAの神経調節性の役割を明らかにしようとして、young,adult,old rat でLHRHに対するHAとHA拮抗物質の作用を調べた。

材料と方法

3,16,30 か月の雌のWistar ratを用いた。young rat には、LHRH (10-50μg;i.p.), histamine(HA;0.6mmol/Kg i.p.),mepyramine(Mep;0.3mmol/Kg i.p.),famotidine(Fam;0.4mmol/ Kg i.p.)を LHRH+HA,LHRH+Mep,LHRH+Fam,LHRH+HA+Mep,LHRH+HA+Fam,LHRH+HA+Mep+Famのような組合わせで投与した。adult およびold rat には、前述と同量のHA,Mep,FamをHA,HA+Mep,HA+Famの組合わせで投与した。薬剤投与後15分でrat を断頭した。血液をヘパリン化した冷却試験管に集め、O-phenanthroline溶液(50ul/ml) で処理した。RIA に供する血清サンプルは既に報告した[14]方法で処理した。脳組織はstereomicroscope下で分離し、0.1Mの酢酸溶液中でsonicationによってhomogeniza-tionした後、 100度で煮沸し、50,000rpm で遠沈し、その上清をassay するまでの間

－80度で保存した。LHRHは視床下部前部（AHR）、視床下部後部（PHR）、正中隆起（ME）、神経性下垂体（Nh）などの部位で、LHは腺性下垂体（Ah）と血清でRIAによって測定した。dataの統計学的解析はNEC PC-9801F computerによってt-student検定とANOVAを用いて行なった。

結　果

1）HAとHA拮抗物質の視床下部－下垂体系LHRHに対する作用

外因性のLHRHはAHRにおける内因性のLHRHレベルを0.20±0.025ng/mgから0.30±0.035ng/mgに増加した（t=5.19; p<0.005）。この反応はHAによって0.34±0.04ng/mgまで増強され、MepとFamによって阻止された（図1a）。HA単独投与はAHRのLHRHを下げる傾向にあるのに対し、PHRのLHRHを著明に増加した（図1b）。PHRでHAは、外因性LHRH投与後の内因性LHRH上昇を阻止した。MEでは、HAは外因性LHRH投与後の内因性LHRH上昇を増強する傾向にあるものの有意差はなかった。FamでH-2 receptorをブロックすると、MEのこのLH-RH上昇反応は若干増強した。Nhでは外因性LH-RH投与後の内因性LHRHは17.32±4.14ng/mgから28.83±0.35ng/mg（t=6.19; p<0.005）まで増加し、この反応はHAやFamで影響を受けず、Mep投与で40.75±8.58 ng/mg（t=5.49; p<0.005）まで増強した。

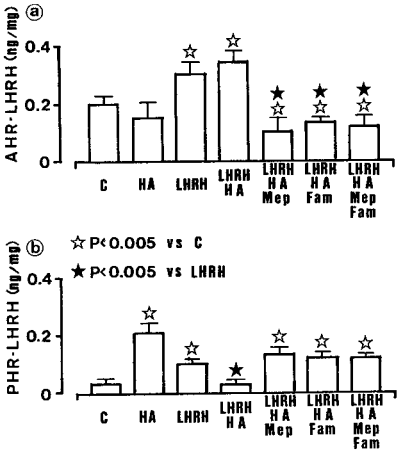


図1．視床下部前部および後部の内因性LHRHに対する外因性LHRH,HAおよびHA拮抗物質の作用

2）Ahおよび血清におけるLHRH惹起LH反応に対するHAとHA拮抗物質の作用

投与後15分でLHRHは血中のLHを0.32±0.009ng/mlから9.95±1.23ng/ml(t=17.5; p<0.005)にまで増加させた。この反応はHAで5.11±0.3ng/ml（t=35.68; p<0.005)まで減少したが、H-1およびH-2拮抗物質であるMepとFamの投与で回復し、MepとFamの同時投与ではLHは27.95±9.00ng/mlの高値に達した（図2）。HA単独投与では血清LHに変化はなかった。AhのLH含量はLHRH,HAおよびHA拮抗物質投与によって有意な変化を示さなかった。

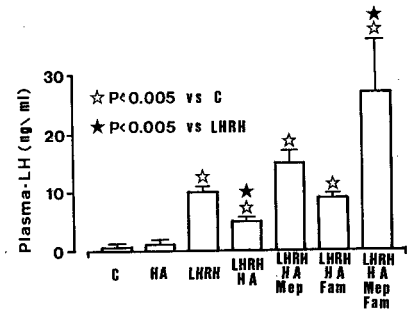


図2．LHRH反応性血中LHレベルに対するHAおよびHA拮抗物質の作用

3）adultおよびold ratのAhと血清におけるLHに対するHAとHA拮抗物質の作用

HAはadultまたはold ratの血中LHの基礎レベルに影響しなかった。しかし、MepやFamは両グループのLHの基礎レベルをさげた（図3）。　血中LHの基礎値はadult rat(1.8±0.21ng/ml)でもOld rat(1.6±0.9ng/ml）でも大きな差はなかった（図3a）。しかし、AhのLH含量はOld rat（78.57±12.15μg/mg)の方がAdult rat(38.68±11.53μg/

mg）よりはるかに高値（t=5.32; p<0.005）であった（図３ｂ）。このレベルでは、血中と同様に、H-1 とH-2 の拮抗物質はLH含量を40-50%減少させた。

考　察

young rat でHAはAHR における外因性LHRHに対する内因性LHRH反応を僅かに増強するが、Mep とFam によるH-1 とH-2 receptorのブロックはこの反応を完全に阻止した。この事実からLHRHが正常に反応するためにはHAの作用が必要であると考えられる。逆に、PHR ではHAは外因性LHRHに対する内因性LHRHの反応を阻止し、これは２種のreceptorをブロックすることにより回復した。従って、LHRHに対するHAの調節作用は視床下部の前後で全く異なり、丁度反対になっている（図１ａｂ）。

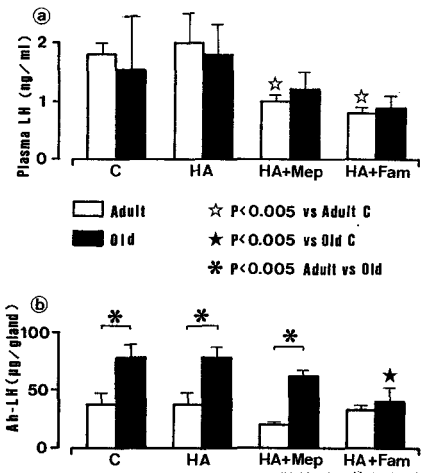


図３．adult rat とold rat の腺性下垂体および血中LHレベルに対するHAおよびHA拮抗物質の作用

下垂体レベルの LH 放出に関して２種のreceptorはHAの効果をほぼ同程度に仲介していると思われが、H-1 receptorの方が若干優勢であるかもしれない。なぜなら、H-1 receptorのブロックの方が外因性LHRHに対するHAが抑えた時に、それを増強させるからである。しかし、２種のreceptorを共にブロックするとこの反応が著しく増強したことから、このような強い反応はMep やFam の二次的な効果による可能性も考えられる。これらの結果は明らかにHAがゴナドトロピン作働系に対して、いわゆる神経調節物質として作用していることを示している[2,4,5,6]。histamine 作働系の反応に関係するreceptorはH-1 とH-2 の両receptorであるようだが、これについては既に人においても同様の結果が得られている[15,17]。しかし種の特殊性による差異は考慮に入れておかねばならない。young rat ではMep もFam もLHの血中基礎レベルに影響しないが、adult またはold rat ではこれらのHA拮抗物質が血中（図３ａ）およびAh（図３ｂ）でのLHレベルを低下させる傾向を示したことは注目に値する。一方、Old rat のAhではLHの明らかな貯留がみられた。最近、prolactin(PRL)の血中基礎レベルがFam 処置によっても変化しないことが報告されている[15]のでHA拮抗物質の作用をPRL との関連のみで論ずるのは問題がある。今回の結果を人で適応すれば、HA拮抗物質を高齢者に投与する際には、十分な注意が必要であろう。なぜなら、HA拮抗物質投与後の血中とAhでのLHレベルの低下は性的活動性の低下やこれらの薬物の鎮静作用の増強に結びつくかも知れないからである。

文　献

[1] Roberts, F., Calcutt, C.R. Neurosci. 9:721-739 (1983)
[2] Cacabelos, R. JANO Med. Hum. 638:46-61 (1984)
[3] Donoso, A.O., Alvarez, E.O. Trends Pharmacol. Sci. 5:98-100 (1984)
[4] Cacabelos, R. et al. J. Endocrinol. Invest. 8 (Suppl.3):25 (1985).
[5] Cacabelos, R. Histaminergic modulation of the neuroendocrine system. Santiago University Press, Santiago de Compostela, Spain (1986).
[6] Cacabelos, R. et al. Neuroendocrinology. Abstr. 1st Int. Congr. Neuroendocrinol. pp. 78 (1986).
[7] Bartsch, W., Voigt, K.D. Maturitas 6:243-251 (1984).
[8] Casper, R.F., Yen, S.S.C. In: Neuroendocrine aspects of reproduction. Norman, R.L. Ed. Academic Press, New York, pp. 359-378 (1983).
[9] Parker, C.R., Porter, J.C. J. Clin. Endocrinol. Metab. 58:488-491 (1984).
[10] Hoffman, G.E., Sladek, J.R. Neurobiol. Aging 1:27-37 (1980).
[11] Cacabelos, R. et al. Bull. Jpn. Neurochem. Soc. 24:337-339 (1985).
[12] Miyake, A. et al. Acta Endocrinol. 93:257-263 (1980).
[13] Hayashi, T. et al. J. Steroid Biochem. 11:1217-1221 (1976).
[14] Cacabelos, R. et al. Endocrinologia 32:126-135 (1985).
[15] Giust, M. et al. IRCS Med. Sci. 14:371 (1986).
[16] Knigge, U. et al. Neuroendocrinology 38:93-96 (1984).
[17] Knigge, U. et al. Neuroendocrinology 41:337-341 (1985).

93. セロトニンに由来する黄色物質の分離とその化学構造

植村富彦・平井久美子・山野俊雄*・三浦　洌*
金城　勝*・三宅可浩*
（東京都精神医学総合研・神経化学，国立循環器センター研・生化学*）

〔要　約〕
グリシン存在下に、活性酸素生成系［キサンチン－キサンチン酸化酵素系（X-XO系）］と5－ハイドロキシトリプタミン（5-HT、セロトニン）を反応させ、5-HT由来の黄色物質（Yellow Substance、Y.S.）を分離した。Y.S.の分子量は、Field Desorption Mass Spectrometry (FDMS) により 186と決定された。その妥当性はY.S.のアセチル誘導体の m/z＝228 である事から確認された。Y.S.の発色反応や ^{1}H-NMR スペクトルおよび生成反応機構の考察から、その化学構造は4,9-dihydro-3H-Pyrido[3,4-b]indol-6-ol(6-hydroxy-3,4-dihydro-β-carboline, 5-hydroxy-2,3-dihydro-tryptoline) と推定され、その妥当性は、FDMSスペクトル、発色反応、および分光学的性質が化学合成品のそれと全く一致する事で確認された。Y.S.はラット大脳皮質の神経終末による5-HTのuptakeを阻害した。そのIC_{50}の決定や他のβ-carbolines との比較およびC1-unit がグリシン由来である可能性の検索は目下進行中である。

Key word：**Yellow Substance(YS), 3,4-dihydro-β-carboline, 5-Hydroxytryptamine(5-HT)**

［序論］私共は、一昨年の本大会と昨年の国際神経化学学会で、Y.S.の分離方法の詳細と、その分光学的性質（紫外、可視、蛍光スペクトル）および、Y.S.の示す種々の発色反応の結果を既に報告したが (15,16)、その化学構造式を決定するまでには至らなかった。今回、Y.S.の化学構造式を決定したので報告する。また5-HTからの生成機構とY.S.のもつ一つの生理作用についても検討を加えたので併せて報告する。なおこれらの結果の一部は、既に、ISTRY '86 および本年度生化学大会で報告した(17,18,19)。

［実験方法］Y.S.の生成反応系および分離精製方法：既報の方法に従った (15,16)。Y.S.のアセチル化：ピリジン溶液中無水酢酸により行った(11)。FDMS：JEOL D 300とJM-4000 Disc System を用いて測定。サンプル導入には、シリカエミッターを使用。 ^{1}H-NMR：JEOL GX 270 スペクトロメーターを用いて測定。外部標準として3－（トリメチルシリル）プロピオン酸－d_4 を用い、サンプルはD_2Oに溶解。ラット大脳皮質シナプトゾームの分離：各実験には、一匹のラット大脳皮質よりDodd等の方法で調整した (9)。[^{3}H]5-HT uptake の測定： BaumannとNa↑treの方法(4) およびAngel とPaulの方法(2) を一部改良して行った。反応系は、final Vol.1 mℓ中、グルコーズ(2mg／mℓ)、EDTA(0.06 mg／mℓ) pargyline (20 μg／mℓ)、アスコルビン酸(0.2mg／mℓ) を含むKrebs-Henseleit bicarbonate 溶液(pH7.5) に、シナプトゾームたんぱく 250μgと[^{3}H]5-HT Creatinine Sulfate (20 Ci／mmol) を 0.5μCi含む。シナプトゾームを５分間37℃又は０℃で preincubation後、[^{3}H]5-HTを加えて反応を開始し、さらに５分間各温度でincubation後、４mℓの cold Krebs-Henseleit 液を加えWhatman GF/Cフィルターで濾過後、２回洗った後、Filterの放射活性を測定した。取込み量は37℃と０℃の差で表した。Cyclic Voltammogram およびHPLC-ECD：BAS Model CV-1B Cyclic Voltammetry を使用。Y.S.を 0.1N 過塩素酸に溶解し、Scan rate 250 mV/secにて測定。HPLC-ECDは、BAS LC4B detector 、電極TL-5A Glassy Carbon Electrode を使用。電位+800 mV 、

カラムODS 5 μ、 4.6×250 mm、移動相 0.1 Mクエン酸、 0.05 mM EDTA-Na_2 、Sodium octyl sulfate 80mg/L、 0.12 %ジエチルアミンにて測定。Flow 1.5mℓ／min.

［結果］FDMSによる分子量の決定（図1a、1b）：図1aは無修飾のY.S.自身のFDマススペクトルである。m/z=186 に分子イオンが見られ、m/z + 1= 187 も出現している。 m/z= 279 のフラグメントイオンは、精製の最終段階で使用したアセトニトリルに混在しているdioctyl-phthalate によるものであろう。アセチル化Y.S.では、図1bに示す如く。m/z=228 に分子イオンが出ており、アセチル基が１つY.S.に導入された事を示している。^{1}H-NMR （図 2）：δ= 9.0および 7.4 ppmにsingle protonによるsinglet が観察され、δ= 6.8および 7.8 ppmにdoublet が見られる。またδ= 3.2 および 4.0 ppmにtriplet が観察された。Y.S.の化学構造式（図 3）：既報の発色反応と分光学的性質(15,16) Mass Number が 186である事および ^{1}H-NMR スペクトルの結果等を考慮して、Y.S.の化学構造式は、図３に示す如く、4,9-dihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-6-ol（6-hydroxy-3,4-dihydro-β-carboline）と推定された。その妥当性は、既報の化学合成品とそのアセチル化誘導体のFDMS、TLC による R_f 、分光学的性質、HPLCの挙動がいずれも完全に一致した事により確認された(19)。Cyclic Voltammogram （図 4）：図４は、Y.S.の酸化電位(curve a) を、5-HT(curve b) のそれと比較したものである。5-HTの酸化電位は+600 mV 附近に、Y.S.のそれは+780 mV 近傍に現われている。HPLC- ECD （図 5）：Y.S.の酸化電位が約+780 mV と求まったので、作用電極電位を +800 mV にset し、HPLC-ECDによるY.S.の分析を試みた。図５に示す如く、5-HT(0.83 ng) は 8.6 分に、メチル5-HT(0.67 ng) は10.7分にY.S.は38分に溶出し、もとのインドールアミンとはよく分離されており、electrochemical detectorでよく測定できることが判明した。ラット大脳皮質シナプトゾームへの［^{3}H]5-HT uptake のY.S.による阻害作用：既に種々のβ-Carbolines によるamine 類のシナプトゾームへのuptake阻害作用は報告されている(7,12,13) が、3,4-dihydro-β-carboline に関しては、報告が少ない (6)。Y.S.は3,4-dihydro 体であるので、Y.S.の5-HT uptake に及ぼす効果を検索した。現在、Y.S.の阻害作用を見出しているが、IC_{50}の決定や他のcarbolinesとの比較検討を進めている。

［考察］Y.S.の化学構造式について： Björklund等の報告では、6-hydroxy-3,4-dihydro-β-carboline(Y.S.)は、quinoidal tautomerの型で存在している (5)。しかし私共の水溶液系で精製されたY.S.は、quinol型で存在しているように思われる。その理由は、①Cyclic Voltammetryで、Y.S.の酸化電位が約+780 mV と求まる事。②求核試薬である GSHをY.S.に加えても付加物のspotが TLC 上で検出できなかった事である。一方非常に強い黄色を呈する事や、harmalolがquinone methide typeのzwitter ion で存在し強い黄色を呈するという報告(10)を考慮すると、Y.S.もzwitter ion 型で存在するのかも知れない。目下 pKaを求めている所である。Y.S.生成反応機構について：5-HTの組織化学的検索に用いられるFalck-Hillarp 法(8) によると、ホルムアルデヒド蒸気と加温により、組織内5-HTが強い黄色蛍光物質に変換するが、この蛍光物質の一つとしてY.S.は、既にBjörklund等により報告されている (5)。しかし、彼等の報告では、水溶液中ではこの黄色蛍光物質は生じ難く、ゼラチンやアルブミンを用いたProtein Matrixでのみ生成される事から、HCHOと5-HTがMannich 縮合反応の結果生じる1,2,3,4,-tetrahydro-β-carbolineに、アミノ酸やたんぱくが触媒として働き、3,4-dihydro-β-carbolineを生じると記載している。今回、水溶液系でもY.S.が生成される事が判明した。その生成機序は次の如く考えられる。加えたグリシンから、X-XO-Fe-EDTA系により、グリオキサル酸が生成し、これが5-HTと反応し、ついで酸化的脱炭酸をおこした結果閉環し、強い黄色蛍光をもつY.S.が生成されるものと考えられる。ゆえ、Y.S.の１位の炭素は、グリシンの２位の炭素由来のものであると思われる。この事を確かめるため [2-^{14}C]glycine を用いてY.S.に放射性炭素が入ったか否か目下autoradiography により検討中である。グリオキサール酸が

生成される酵素反応系は種々あるので、生体内で生じたグリオキサール酸と5-HTが縮合しY.S.を生じるか否かは今後の問題であるが、このようなβ-carboline類縁物質の生体内存在が数多く報告されている(1,3,14)。

[謝辞] 宮崎幸則氏(都精神医学総合研究所RI部門)に[^{3}H]5-HT uptake 測定に御協力願った事を深謝致します。

[文献] (1) Airaksinen, M. M. and Kari, I. (1981) Medical Biol. 59, 21-34 (2) Angel, I. and Paul, S. M. (1984) FEBS Lett. 171, 280-284 (3) Barker, S. A., Harrison, R. E. W., Monti, J. A., Brown, G. B. and Christian, S. T. (1981) Biochem. Pharmacol. 30, 9-17 (4) Baumann, P. A. and Maître, L. (1977) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 300, 31-37 (5) Björklund, A., Falck, B., Lindvall, O. and Svensson, L-A. (1973) J. Histochem. Cytochem. 21, 17-25 (6) Buckholtz, N. S. and Boggan, W. O. (1977) Life Sci. 20, 2093-2100 (7) Buckholtz, N. S. (1980) Life Sci. 27, 893-903 (8) Corrodi, H. and Jonsson, G. (1967) J. Histochem. Cytochem. 15, 65-78 (9) Dodd, P. R., Hardy, J. A., Oakley, A. E., Edwardson, J. A., Perry, E. K. and Delaunoy, J-P. (1981) Brain Res. 226, 107-118 (10) Douglas, K. T., Sharma, R. K., Walmsley, J. F. and Hider, R. C. (1983) Mol. Pharmacol. 23, 614-618 (11) Harley-Mason, J. (1950) J. Chem. Soc. 1276-1282 (12) Melchior, C. and Collins, M. A. (1982) CRC Cri. Rev. Toxicol. 9, 313-356 (13) Rommelspacher, H., Bade, P., Coper, H. and Kossmehl, G. (1976) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 292, 93-95 (14) Rommelspacher, H., Honecker, H., Barbey, M. and Meinke, B. (1979) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 310, 35-41 (15) Uemura, T. (1984) Bull. Jap. Neurochem. Soc. 23, 451-453 (16) Uemura, T. (1985) J. Neurochem. 44, Suppl. S110 (17) Uemura, T., Yamano, T., Miura, R., Kanashiro, M., Miyake, Y. and Kadota, K. (1986) ISTRY '86 Abstract, Cardiff, Wales, U.K. (18)植村富彦、三浦洌、金城勝、山野俊雄、三宅可浩、門田健、第59回日本生化学大会 (19) 山野俊雄、三浦洌、植村富彦、金城勝、門田健、三宅可浩、第59回日本生化学大会

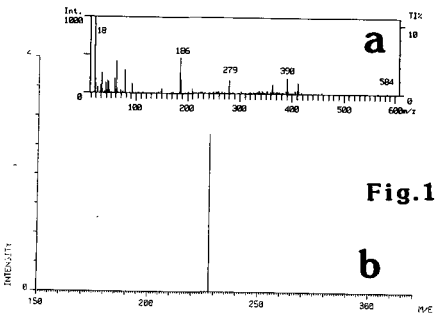


Fig.1

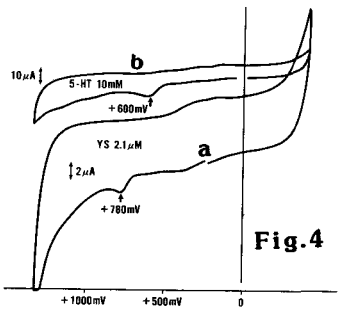


Fig.4

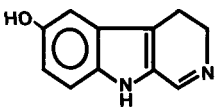


Fig.3

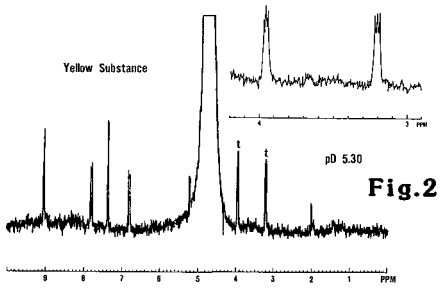


Fig.2

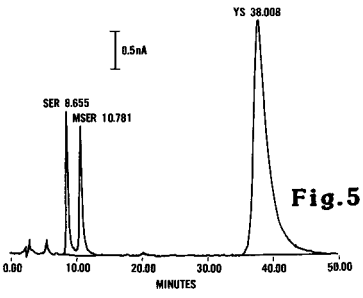


Fig.5

94. ヒト血小板における $5HT_2$ 受容体を介した 5HT 刺激性イノシトールリン脂質代謝

三国雅彦・森　秀樹・松原繁広・小田垣雄二・小山　司
山下　格　（北海道大・医・精神）

〔要　約〕

５ＨＴ２受容体がいかなる膜レセプター後の情報伝達機構を活性化して５ＨＴの刺激を伝達しているのか，なお不明であるが，一つの可能性としてイノシトールリン脂質（ＰＩ）の分解とＣａ動員反応が注目されている。しかし神経系における５ＨＴ刺激後のＰＩ代謝回転の亢進が５ＨＴ２受容体を介しているかというと必ずしも意見の一致をみていない。そこでわれわれはより単純な系であるヒト血小板を用い，５ＨＴ２受容体結合部位の有無の検索と，５ＨＴ刺激によるＰＩ代謝回転の亢進の有無ならびにこの反応に対する薬理学的検討を行ったので報告する。

^{3}H-ketanserin 結合実験によりヒト血小板にも５ＨＴ２受容体結合部位が存在し，そのK_D値は3nMであった。またLi存在下でヒト血小板に５ＨＴを添加すると15分でinositol-1-phosphate（IP_1）の明らかな蓄積率亢進がみられ，30μＭ５ＨＴでプラトーとなり，５ＨＴのEC_{50}値は４μＭであった。10μＭ５ＨＴ刺激に対するIP_1蓄積率亢進は５ＨＴ２選択的阻害剤であるketanserinで抑制されKi 値は10nMであったが，選択的５ＨＴ１阻害作用をもつ１μＭの(-)-propranolol では全く抑制されなかった。従ってヒト血小板には５ＨＴ２受容体結合部位が存在し，５ＨＴ刺激が５ＨＴ２受容体を介してIP_1蓄積率亢進という生化学的反応をひき起こしている可能性を示唆している。

Key word：５ＨＴ２ receptor, ＰＩ response, human platelet

われわれはこれまで抗うつ薬や抗精神病薬の作用機序の一部に５ＨＴ２受容体を介する機序が存在する可能性について検討し，報告してきた(8)。しかし，５ＨＴ１受容体はアデニル酸シクラーゼにリンクしていることが知られているものの，５ＨＴ２受容体についてはいかなる細胞内情報伝達系とリンクしているか不明であり，５ＨＴ２受容体を介する機能を検討する上で隘路となっている。Berridge(2) は５ＨＴ刺激でイノシトールリン脂質（ＰＩ）代謝亢進が唾液腺組織内に起こることを証明し，さらにNahorski一派(3) がLi存在下でのラット大脳皮質切片における５ＨＴ刺激によるinositol-1-phosphate（IP_1）の蓄積増加を報告して以来，この５ＨＴ刺激によるＰＩ代謝亢進が，５ＨＴ１あるいは５ＨＴ２受容体のいずれを介しているか議論の的となってきた(4)(5)。Nahorski一派は５ＨＴ２受容体の性質を一部分確かに持っていることを証明したものの，各薬剤の５ＨＴ２受容体阻害能とIP_1蓄積阻害能とは必ずしも一致しないとしている(6)。

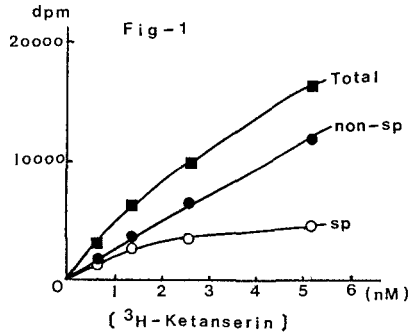
ところで，ネコ血小板には５ＨＴ２受容体が存在することをLeysenらは明らかにしており(7)，またPletscher 一派(1) は，Ca^{++}イオンをメッセンジャーとした，５ＨＴ２受容体を介する5HT刺激性shape change reaction をヒト血小板で報告している。さらにSchachter ら(9) はラビット血小板における５ＨＴ刺激性IP_1蓄積率亢進を報告し，５ＨＴ２受容体を介している可能性を示唆した。

そこで今回われわれは，ヒト血小板の５ＨＴ２受容体binding sites の検索と，５ＨＴ刺激性IP_1蓄積反応の有無，その薬理学的な検討を行い，５ＨＴ２受容体を介する細胞内情報伝達系の一つの可能性を示唆する若干の成績を得たので報告する。

＜実験方法＞健康成人より採血後，すみやかに15％ＡＣＤと混和し，ＰＲＰを作製し，1200×g

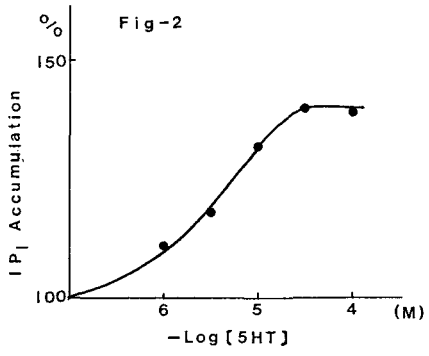
10分間の遠心により血小板を得た。（1）5HT2受容体結合実験には，この血小板を洗滌後ポリトロンで破砕し，49000 ×g 10分間の遠心を3回くり返して50mM Tris bufferにresuspend した。0.6 ～5.2 nMの^{3}H-ketanserin(S.A.64.6Ci/mmol)とともにincubation (37℃，15分間) し，GF/Bフィルターで急速濾過後，3回bufferでフィルターを洗滌し，液シンで放射活性を測定した。非特異的結合は10μM cinanserin の存在下で測定した。（2）PI代謝回転測定には，血小板をCa^{++} free HEPES buffer にsuspend し，100 μCiの^{3}H-myo-inositol(S.A.17Ci/mmol)でpre-label(37℃，120 分間) し，3回 HEPES buffer で洗滌後，10mM LiCl，1 μM fluoxetinとともに血小板浮遊液を10分間37℃でincubationして，IP phosphataseと5HTのuptakeを阻害し，血小板標本とした。①1～100 μMの5HT存在下でこの血小板標本を15分間incubationし，dose-response curve を作製した。②10μM 5HTと10～1000nM ketanserin 存在下で同様に15分間incubationし，inhibition curveを作製した。③10μM 5HTと1 μM (-)-propranololあるいは 100～1000nM metergolin 存在下で同様にincubationし，ketanserinの阻害能と比較した。Berridgeの方法にほぼ従ってchlorform/MeOHで反応を止め，MeOH相内の水溶性^{3}H-inositol phosphatesを Dowex 1×8 イオン交換樹脂に吸着させイオン強度を変化させたformate 溶液を加えてstepweise に溶出した。IP$_1$ は0.1M formic acidと0.2M ammonium formate のsolutionで溶出し，液シンで放射活性を測定した。

＜結果＞（1）Fig-1 にヒト血小板膜に対する^{3}H-ketanserin 結合の結果を示す。特異的結合が30～40%ときわめて低いが，ヒト血小板にも5HT2 受容体が存在し，Scatchard 解析の結果，K_D値は3.0nM であった。（2）①Fig-2 にヒト血小板における5HT刺激によるIP$_1$ 蓄積率のdose-response curve を示す。control 100 %に対し，140 %のIP$_1$ 蓄積がみられ，30μMでプラトーとなった。5HTのEC$_{50}$値は4 μMであった。



②Fig-3 に10μM 5HT刺激によるIP$_1$ 蓄積率亢進に対するketanserinのinhibition curveを示す。1 μMのketanserinで完全に阻害され，IC$_{50}$ 値は35nM，Ki 値は10nMであった。

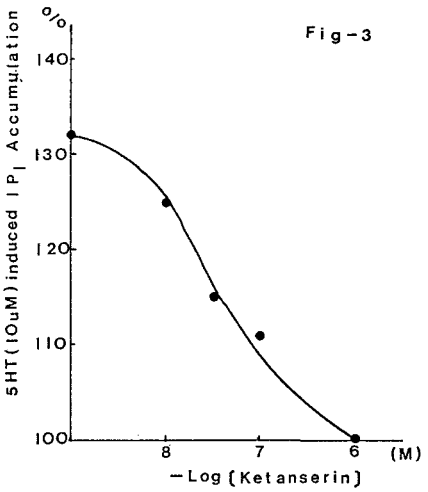
③Fig-4 に5HT$_1$ 阻害能を有する(-)-propranololやmetergolinの，5HT刺激性IP$_1$ 蓄積に対する阻害能を示す。選択的5HT$_1$ 阻害剤である1 μM propranolol はIP$_1$ 蓄積反応を全く阻害せず，5HT$_1$ ならびに5HT$_2$ 両受容体に対しほぼ同等の阻害能を有するmetergolinはdose-dependentにIP$_1$ 蓄積反応を阻害したが，5HT$_2$ 選択的阻害剤であるketanserinとほぼ同等の阻害しか示さなかった。



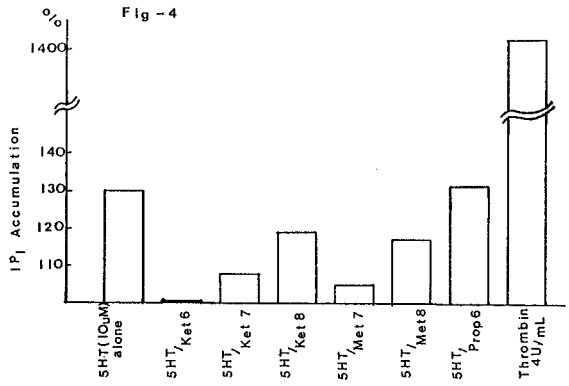
＜考察＞Leysenらの報告によれば，ネコ血小板膜の^{3}H-ketanserin 結合は過剰量のmethysergideでdisplaceしても約60%が非特異的結合となるが，^{3}H-ketanserin 結合のK_D値は1.0nM となっており，ここで観察されたヒト血小板膜の^{3}H-ketanserin 結

合もK_D 3.0nMであって，ほぼ近似した，きわめて親和性に富む結合部位が血小板に存在することが明らかとなった。ラット前頭葉皮質膜5HT2受容体とよく類似した薬理学的プロフィルを示すネコ血小板膜^{3}H-ketanserin結合部位は5HT2受容体と考えられ，5HTのIC_{50}値は1μMであったという。従って今回得られた成績からヒト血小板膜にも5HT2受容体が存在することが示唆される。Pletscher一派が明らかにした2μM 5HTで誘発されるヒト血小板のshape changeはketanserinで阻害され，そのIC_{50}も2.7nMであり，ヒト血小板膜のketanserinのK_D値とよく一致していることもこのことを裏付けている。

ヒト血小板において，5HT刺激によるIP_1蓄積率の亢進が観察され（EC_{50}値4μM），しかもこの反応がketanserinで完全に抑制された（Ki値10nM）ことは，前記のヒト血小板膜の^{3}H-ketanserin結合部位がfunctionalな意味をもっていることを示唆するといえる。ラビットの血小板における5HT刺激性IP_1の蓄積率の亢進を報告したSchachterらの成績と比較すると5HTのEC_{50}値は8μM，ketanserinのKi値は28nMとなっており，よく一致している。



このヒト血小板における5HT刺激性IP_1蓄積反応はketanserinで抑制されるほか，データには示さなかったが，1μMのcyproheptadineでも完全に抑制された。しかし，1μMの(-)-propranololでは全く抑制されなかった。なおラット大脳皮質膜への5HT1結合と5HT2結合に対する(-)-propranololの阻害能は，それぞれ0.7μMと11μMであった。またLeysenらにより5HT1，5HT2両受容体に対し同等の阻害能を有すると報告されているmetergolinによるこの反応の抑制も，ketanserinと同程度であった。以上の結果，ヒト血小板でみられた5HT刺激によるIP_1蓄積率亢進は，5HT1受容体ではなく，5HT2受容体を介していると考えられる。従って5HT2受容体が5HT刺激を伝達して明らかな生化学的反応をひき起こしているということができ，ヒト血小板が5HT2受容体機能，細胞内情報伝達機構を検索する上で，有用な試料となると期待される。



＜文献＞(1)Affolter H.(1984) Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharma 325; 337 (2)Berridge MJ.(1983) Biochem J 212; 849 (3)Brown E.(1984) J Neurochem 42; 1379 (4)Conn PJ.(1984) Neuropharm 23; 993 (5)Janowsky A.(1984) Lif Sci 35; 1953 (6)Kendall DA.(1985) J.P.E.T. 233; 473 (7)Leysen JE.(1983) Eur J Pharm 88; 125 (8)三国(1985)神経進歩 29; 905 (9)Schachter M.(1985) Lif Sci 37; 1641

95. モルモット縦走筋細胞のタキキニン・ペプチド受容体とイノシトールリン脂質代謝

高野行夫・山田彰子・波多江靖之・山内武司・永島　亮
武田泰生・本多健治・神谷大雄　（福岡大・薬・薬理）

〔要　約〕

モルモット回腸の縦走筋を用いsubstance P(SP)に代表されるタキキニン・ペプチドの収縮作用およびイノシトールリン脂質の代謝についてcarbachol(CCh)の場合と比較し受容体結合から収縮機能発現に至る細胞内情報伝達系の様式を検討した。回腸縦走筋の収縮作用の強さを濃度作用曲線の成績から比較するとphysalaemin > neurokinin B > SP≧ neurokinin A ≧ eledoisin≧ CChの順であった。次にinositol phosphates(IPs)の蓄積作用について、刺激物質にSPとCChを用い刺激時間経過および刺激物質の濃度変化によるIPs蓄積への影響を比較した。SPおよびCChの刺激時間経過によるIPs蓄積はSPが刺激開始5分で対照値の130%程度に増加し平衡に達したのに対し、CChは刺激5分で対照値の約200%に増加し、さらに経時的に蓄積の増加を示した。またSPおよびCChの濃度と縦走筋収縮およびIPs蓄積作用との関係から、SPはほぼ同じ濃度域で両作用に濃度依存性を示した。これに対しCCh濃度の場合は、収縮並びにIPs蓄積両作用との関係に大きな差異が認められた。これらの成績からタキキニン・ペプチドおよびムスカリン性各受容体は、それぞれ異なった細胞内情報伝達系と関与していることが示唆された。

Key word：　Substance P, phosphoinositide metabolism, guinea pig ileum

Substance P (SP)に加えて2種の新しいタキキニン・ペプチド、すなわちneurokinin A（またはsubstance K、以下NKAと略記）およびneurokinin B (NKB)が哺乳動物の脳より分離・同定された(1983)（２，３）。我々はSPやNKAについてラジオイムノアッセイ法を用いてそれらの組織内含量の分布や生理作用を調べ、すでに報告してきた（５，８～１１）。今回は主にモルモット回腸縦走筋を用い、これらのタキキニン・ペプチドによる収縮反応と、その受容体結合とイノシトールリン脂質代謝との機能的連絡の様式に注目して検討を行なった。

【実験方法】

１］縦走筋収縮：　体重300～400gの雄性モルモットの回腸を摘出し、縦走筋標本を作製後Krebs液を10ml容れた筋槽中に懸垂した。各種薬物による等尺性張力を測定して得られた平滑筋収縮効果はCCh(5×10^{-5} M)による収縮作用を最大収縮(100%)とし、その比較で表現した。

２］イノシトールリン脂質代謝：　まずモルモット回腸の縦走筋を単離するためにモルモット回腸をcollagenase (0.1%)を含むMEM溶液(Eagle MEM/Nissuiから常法により調製）にて70分間、31℃でインキュベートした。次いで^{3}H-inositolを縦走筋細胞に37℃2時間で取り込ませた後、各薬物にて一定時間（～30分）刺激しイノシトールリン脂質代謝への効果を比較した。刺激反応はethanol:chloroform(2:1)で停止し、Berridgeら（１）の方法に従いchloroform-waterを加え水相を分取し、AG1-X8（formate型）カラムから生成したinositol monophosphate (IP1), inositol 1,4-bisphosphate (IP2)およびinositol 1,4,5-triphosphate (IP3)を分離し放射活性を測定した。

3] ^{3}H-SPおよび ^{3}H-quinuclidinyl benzilate (QNB) の結合実験： モルモット回腸の縦走筋組織を50mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.4)でホモジネートし ^{3}H-QNB 結合にはこのホモジネートを用い既報に準じて実験を行なった（4）。^{3}H-SP結合にはさらに次の操作で試料を調製した。すなわち 5×10^{4} ×gで遠心し、沈殿を緩衝液で 2～3 度洗浄した後、この沈殿を3mM $MgCl_2$,0.02% BSA, 40 μg/ml bacitracin, 4 μg/ml leupeptin 2 μg/ml chymostatinを含む50mM Tris-HCl 緩衝液に懸濁し、膜試料とした。以下 ^{3}H-SPをリガンドに用い既報に従って結合実験を行なった（6，7）。

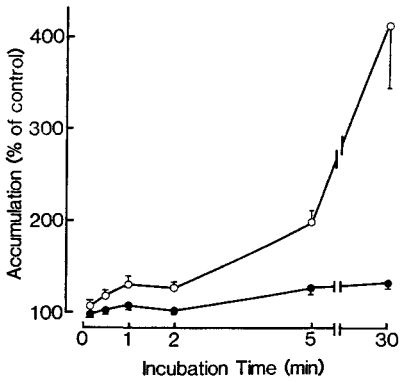


Fig.1
Time course of the accumulation of IPs brought about by SP (1uM) and CCh (1mM).
(●) SP, (○) CCh.

【結果・考察】

1）平滑筋収縮： モルモット回腸縦走筋に対する各種タキキニン・ペプチドの収縮反応の成績をTable I と Fig.1に示した。各タキキニン・ペプチドの収縮反応はphysalaemin > NKB > SP≧ NKA ≧ eledoisin であった。一方 CChによる収縮反応のEC50は2.8 ×10^{-6} M で、NKA と同程度の強さであった。SPによる収縮反応は抗コリン薬、抗セロトニン薬および抗ヒスタミン薬で抑制されず、また tetrodotoxinの10^{-5} M でも同様に消失しなかったことからこの収縮はモルモット回腸のSP受容体を介して行なわれたと考えられる。

2）イノシトールリン脂質： モルモット回腸縦走筋におけるイノシトールリン脂質代謝の指標としては脂質の加水分解により生成するinositol phosphates (IPs =IP1+IP2+IP3)の蓄積量を用いた。まず 1μM SPと 1 mM CCh の各刺激の時間経過による IPs蓄積量をFig.1 に示した。両刺激物質による IPsの蓄積は刺激 5分でSPは対照に比べ30% 程度の増加を示し、それ以上の刺激を続けても蓄積量には変化がなかった。これは CChが刺激 5 分で203%、30分で425%の増加を示した成績と著しく態度を異にするものであった。次にFig.3 にSPおよび CChによる 5分間刺激により蓄積されたIPs 量を濃度作用曲線で示したFig.3 から明らかなよ

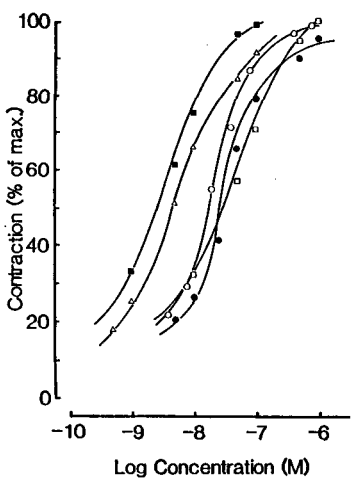


Fig.2
Dose response curves to tachykinin peptides and CCh for contraction of the muscle.
(△)NKB,(○)SP,(●)NKA,(□)CCh,(■)Phy.

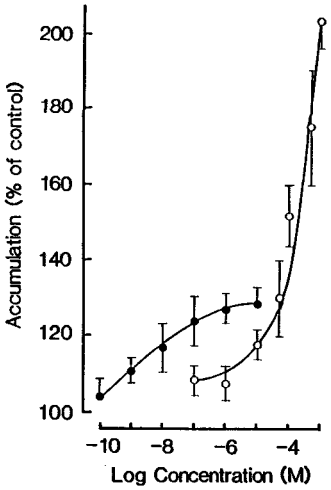


Fig.3
Dose response curves to SP and CCh on 3H-IPs accumulation for 5 min.
(●)SP, (○)CCh.

うに CChによる IPs蓄積は収縮が最大に達した 1μM から生じそのEC50値は 1.6×10^{-4} M であった。一方SPは 10^{-10} ～ 10^{-5} M において収縮が起こり、IPs蓄積もほぼ同じ濃度域で変化した。これは CChが収縮－IPs蓄積の両作用で反応濃度域に 10^{3} ～ 10^{4} 倍の差異を示したのと大きく異なるものであった(Fig.2,3,Table I)

Table IにSPを含むタキキニン・ペプチドおよび CChによる縦走筋収縮作用とSP及び CChの IPs蓄積作用とを比較表示した。タキキニン・ペプチド類の収縮作用のEC50値は 2.5×10^{-9} ～ 2.5×10^{-8} M であった。これに対しSPによる IPs蓄積作用のEC50値は 2.9×10^{-9} M を示し、この濃度はphysalaemin や NKBによる収縮のEC50値に近いものであった。以上の結果を ^{3}H-SP及び ^{3}H-QNB の結合実験の成績と併せ考えると、SPおよびムスカリン性アセチルコリンの各受容体の活性化から収縮反応発現に至る細胞内情報伝達系はかなり異った性格のものであることが考えられる。

	EC_{50} (M)	
	Contraction	^{3}H-IPs accumulation
SP	1.7×10^{-8}	2.9×10^{-9}
NKA	2.4×10^{-8}	——
NKB	4.0×10^{-9}	——
Physalaemin	2.6×10^{-9}	——
Eledoisin	2.5×10^{-8}	——
CCh	2.8×10^{-8}	1.6×10^{-4}
ACh	9.1×10^{-8}	——

TableI.
EC50 values for tachykinin peptides and CCh on contruction and 3H-IPs accumulation.

本研究の一部は、文部省科研費 #61481120, #61570113 によった。

【文献】

1)Berrige,M.J., Dawson,R.M.C., Downes,C.P., Heslop,J.P. & Irvine,R.F. (1983) Biochem.J., 212, 473-482.

2)Kanagawa,K., Minamino,N., Fukuda,A. & Matsuo,H. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun.,114, 533-540.

3)Kimura,K., Okada,M., Sugita,Y., Kanazawa,I. & Munekata,E. (1983) Proc.Japan. Acad. Ser., B, 59, 101-104.

4)Takano,Y., Uchimura,K., Kohjimoto,Y. & Kamiya,H. (1981) Eur. J. Pharmacol., 70, 559-561.

5)Takano,Y., Martin,J.E., Leeman,S.E. & Loewy,A.D.(1984) Brain Res.,291,168-172.

6)Takano,Y. & Loewy,A.D. (1984) Brain Res., 311, 144-147.

7)Takano,Y. & Loewy,A.D. (1985) Brain Res., 333,193-196.

8)Takano,Y., Sawyer,W.B. & Loewy,A.D. (1985) Brain Res., 334, 105-116.

9)Takano,Y., Takeda,Y., Doteuchi,M., Inouye,K. & Kamiya,H. (1985) Eur.J.Parmacol., 111, 381-383.

10)Takano,Y., Takeda,Y., Yamada,K. & Kamiya,H. (1985) Life Sci., 37, 2507-2514.

11)Takano,Y., Nagashima,A., Masui,H., Kuromizu,K. & Kamiya,H. (1986) Brain Res., 369, 400-404.

96. Hypoglycemia および回復期における脳の phosphoinositide およびエネルギー代謝

池田益啓*・吉田伸一・Raul Busto・Myron D. Ginsberg
(マイアミ大・医・神経，現エーザイ筑波研*)

〔要　約〕

Hypoglycemia および回復期におけるラット脳内 phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol 4-phosphate (PIP), phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2), phosphatidic acid (PA), triacylglycerol (TAG), diacylglycerol (DAG) および free fatty acids (FFAs) の変化を調べ，エネルギー代謝および脳波の変化と比較検討した。Insulin 投与により脳波が平坦化する直前にPIP_2の有意の増加および PI の減少傾向が認められた。血糖および脳グルコース値はかなり減少したが，脳エネルギー代謝は若干変化したのみだった。30 分間の脳波平坦化の間に全ての phosphoinositides (PIs) と PA は減少し，全 FFAs と DAG はそれぞれ 7 倍，2 倍に増加した。TAG のパルミチン酸鎖は減少し，アラキドン酸鎖は増加した。血糖および脳グルコース値はほぼ涸渇し，エネルギー状態は非常に悪化した。グルコース注入後，PIP, PA, DAG, FFAs は完全に回復したが，PIP_2は対照値を越え，PI は対照値下にとどまった。血糖値はほぼ完全に回復したが，エネルギー状態および脳波の回復は不良であった。以上の結果から，脳波平坦化前および回復期にはPIP_2の合成促進が起こっていること，脳波平坦時には全 PIs の分解が起こっていることが分った。また TAG が，病態時に増加したアラキドン酸を取り込む可能性が示唆された。

Key word : Phosphoinositides, Free fatty acids, Hypoglycemia.

Hypoglycemia による脳細胞障害は，虚血，ケイレンあるいは低酸素による障害と共通の機序で起こる可能性が示唆されている (3)。これらの病態に共通した現象の一つに，free fatty acids (FFAs) の増加がある (3)。我々は脳虚血時に急増する FFAs は、特に初期には、phosphatidylinositol 4-phosphate (PIP) および phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) から遊離される可能性を示唆した (1)。本研究では，hypoglycemia および回復期において phosphoinositides (PIs) がどのように変化するかについて検討し，脳エネルギー代謝および脳波変化と比較した。

[方法]

雄性 Wister ラットに regular insulin (40 I.U./ kg, i.p.) 投与後，既報の方法 (1, 4) で手術を行った。実験期間中，血圧を 100 ~ 170 mmHg に維持した。以下に実験群を示す。1) 対照群，2) 脳波が平坦化する直前に sampling した群 (preisoelectric)，3) 脳波平坦化 30 分後に sampling した群 (isoelectric)，4) 3) 後グルコース注入し 90 分後に sampling した群 (recovery)。各群の脳は液体窒素で in situ にて凍結した。phosphatidylinositol (PI), PIP, PIP_2, phoshatidic acid (PA), diacylglycerol (DAG), triacylglycerol (TAG), FFAs は既報の方法 (1, 4) で定量した。これは 1) 液体窒素中で粉末にした脳組織からの脂質抽出 (中性クロロホルム・メタノール抽出後，残査を酸性クロロホルム・メタノールで抽出)，2) 一次元 TLC，3) トランスメチル化，4) GLC による定量，というステップからなる。エネルギー代謝産物等の測定は Lawry & Passoneau の方法 (2) を用いた。実験データは一元分散分析・Dunn 法により解析した。

[結果]

Fig. 1 に各群の脳波変化を示した。"Pre-isoelectric" 脳波は insulin 投与後 110 ~ 150 分に出現し、5 ~ 10 分間続きその後平坦化した。30 分間の脳波平坦化後グルコースを投与すると、9 ~ 10 分後に脳波が出現し始め、最終的に Fig.1 に示すようなパターンを呈した。

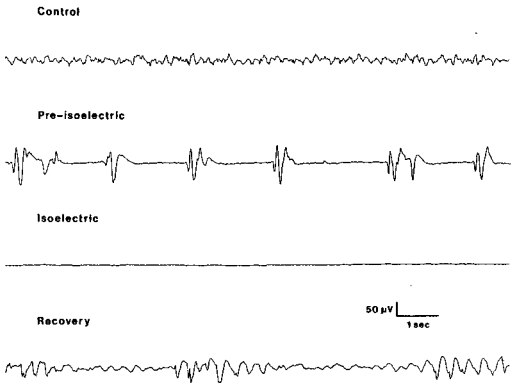


Fig.1 Typical EEG tracings obtained just before sacrifice in control, during hypoglycemia (pre-isoelectric, isoelectric) and after hypoglycemia (recovery).

脂質およびエネルギー代謝の変化

対照群の各脂質含量 (μmol/g, mean±SD) は以下の如くであった。PIP_2, 0.571 ± 0.10; PIP, 0.346 ± 0.025; PI, 1.558 ± 0.073; PA, 0.849 ± 0.024; TAG, 0.172 ± 0.013; DAG, 0.050 ± 0.005; total FFAs, 0.112 ± 0.001. 実験群の脂質変化を Fig. 2 に示した。Pre-isoelectric period では PIP_2 は約 13 % 増加したが, PIP は不変であった。PI は減少傾向を示した。PA, DAG, FFAs は不変であった。組織グルコースおよびグリコーゲンはかなり減少したが, 高エネルギー化合物および Energy charge は若干減少したにすぎなかった。30 分間の脳波平坦化中に全ての PIs および PA は有意に減少した。DAG と FFAs はそれぞれ 2 倍, 7 倍に増加した。高エネルギーリン酸化合物および Energy charge はかなり減少した。グルコース注入により PIP は対照値に戻ったが、PIP_2 は対照値を越えた。PI は対照値にまで回復しなかった。PA, DAG, FFAs は完全に対照値に戻った。全 TAG 値は、実験期間中変化しなかった。ATP, グルコース, グリコーゲンの回復は、不十分であった。

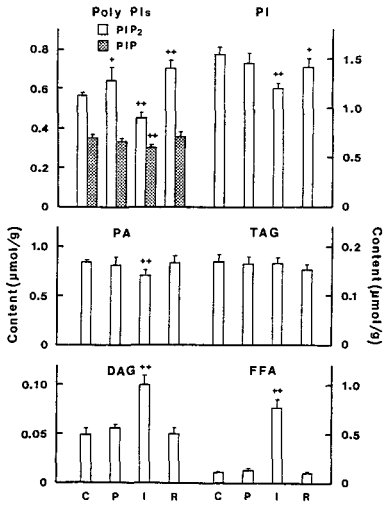


Fig.2 Changes in lipid contents in rat forebrain. C:Control; P:Pre-isoelectric; I:Isoelectric; R:Recovery.
Values are mean ± S.D. $^{+}p<0.05$; $^{++}p<0.01$ vs. controls.

脳波平坦化の間に増加した FFAs は C18:0 が最も多く、C16:0, C18:1, C20:4, C22:6 の順に少なくなった (Fig.3)。DAG 鎖の変化は大きい順に C18:1, C16:0, C18:0, C20:4, C22:6 であった。TAG の C16:0 鎖は preisoelectric period に減少し、回復期においても対照値に戻らなかった。一方, TAG の C20:4 鎖は脳波平坦化の間に有意に増加し、回復期に対照値に戻った。

[考察]

Preisoelectric period における PIP_2 の増加と PI の減少傾向はおそらく神経伝達と関係ある PI 代謝の亢進によるものであろう。この時期にエネルギー代謝はわずかにしか障害されなかった。この変化は、ATP を使った PIP_2 合成の亢進, および myo-inositol の前駆体で

あるグルコースの減少に伴うPIの合成不全によるものと思われる。30分間の脳波平坦化の間に、脳エネルギー代謝はひどく乱されていた。その結果、リン脂質の合成と分解のバランスがくずされたためにPIsとPAの減少およびDAGとFFAsの増加が検出されたのであろう。DAGとFFAプールの脂肪酸鎖の分布はphospholipases Aとphospholipase Cが作用したことを示唆する。各脂肪酸鎖の収支(Table 1)をみると、生成したFFAsの一部は血流によって洗い流されたか酸化された可能性がある。またTAGのC20:4鎖の増加は、free C20:4のTAGへの取り込みによるものであり、これが脳から有毒なfree C20:4を除去する系の一つであろうと思われる。回復期におけるPIP_2のオーバーシュートおよびPIの回復不全はPreisoelectric periodで観察された現象と同じくPIP_2合成の亢進によるものであろう。各PIsの回復程度は異なっていたが、全PIプールは正常に戻っていた(Table 1)ことから、PIプールに新しい定常状態が生じたことが示唆された。また脂肪酸鎖の収支から、これらリン脂質はde novo系およびsalvage系の両系で合成されていることがわかった。

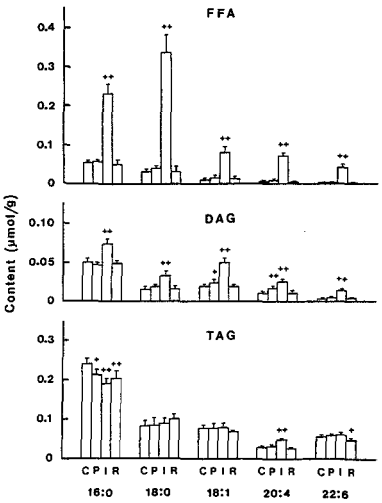


Fig.3 Changes in individual fatty acid contents in FFAs, DAG and TAG in rat forebrain. $^{+}p<0.05$; $^{++}p<0.01$ vs. controls.

要約すると、hypoglycemiaの初期および回復期にはPIP_2合成の亢進があること,また脳波が平坦化しATPが涸枯すると全PIsの分解およびFFAsの増加が検出されることが分った。またTAGが脳内に蓄積したfree C20:4を取り込む可能性が示唆された。

Table 1. Balance sheet of gain and loss of Σfatty acids among cerebral lipids during hypoglycemia and in the recovery period

	Isoelectric-Control	Recovery-Isoelectric
PIP_2	- 237.3	+ 507.2
PIP	- 113.6	+ 128.8
PI	- 712.2	+ 432.3
Total PIs	- 1063.1	+ 1068.3
PA	- 274.6	+ 239.7
TAG	- 16.0	- 33.0
DAG	+ 102.2	- 100.8
FFAs	+ 656.5	- 665.7
Total Balance	- 667.3	+ 605.4

Mean values (nmol/g) are displayed.

[文献]

1. Ikeda M., Yoshida S., Busto R., Santiso M. and Ginsberg M.D. (1986) J.Neurochem. in press
2. Lawry O.H. and Passonneau J.V.(1972) A Flexible System of Enzymatic Analysis. Academic Press. New York
3. Siesjo B.K.(1981) J.Cereb.Blood Flow Metabol. 1, 155-185.
4. Yoshida S., Ikeda M., Busto R., Santiso M., Martinez E. and Ginsberg M.D.(1986) J.Neurochem. in press

97. 哺乳動物の脳における phorbol ester 結合部位

西野直樹・花田　進・斉藤尚亮*・北村　登*・中井　隆
三田達雄・田中千賀子*　（神戸大・医・精神神経，薬理*）

〔要　約〕

[^{3}H] 4β-phorbol-12,13-dibutyrate ([^{3}H] PDBu) をリガンドとして、phorbol ester 結合部位のラット及びヒトでの脳内分布並びにパーキンソン病・精神分裂病患者剖検脳における変化の有無を検討した。更に、放射線不活化法を用いて、ウシ大脳皮質粗膜分画における [^{3}H] PDBu 結合部位の機能的分子サイズを決定した。その結果、1) [^{3}H]-PDBu 結合の脳内分布はラット、ヒトでほぼ同様の分布を示した。ヒト脳では、嗅脳＞基底核＞大脳皮質＞間脳＞中脳＞小脳の順であった。2) 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), PDBu はヒト海馬に対する [^{3}H] PDBu 結合を nM 濃度で著明に阻害したが、4α-phorbol-12,13-didecanoate (PDD), diolein 及び幾つかのカルシウム拮抗薬は μM 濃度でも殆ど阻害しなかった。3) ヒト脳に対する [^{3}H] PDBu 結合は、飽和性、高親和性で、単一の成分であった。4) パーキンソン病脳における [^{3}H] PDBu 結合は、正常対照群に比し全ての測定部位で減少の傾向を示し、特に尾状核、被殻、淡蒼球で有意に減少した。精神分裂病脳の前頭前野、尾状核では有意の変化は認められなかった。5) ^{60}Co を線源とする放射線不活化法により、[^{3}H] PDBu で標識される phorbol ester 結合部位の機能的分子サイズは約 80,000 と決定された。

Key word：　Phorbol ester, Protein kinase C, Parkinson's disease

［緒言］

発癌プロモーターである phorbol ester は、細胞の増殖、分化をはじめ種々の生物学的活性を有する (1)。Phorbol ester は受容体情報伝達機構に関与する phospholipid/Ca^{2+} 依存性 protein kinase (C-kinase) と結合し、本酵素を活性化する (2)。最近、phorbor ester 結合部位は C-kinase そのものであるとの報告がある (3)。従って、phorbol ester の放射性リガンドを用いて、その結合部位の特質を解析することは、C-kinase の機能を解明する上で、有用な手段であると思われる。

［実験方法］

1. ラット脳切片を用いた [^{3}H] PDBu オートラジオグラフィー

Wistar 系ラットを 0.1 M リン酸緩衝食塩水及び 0.32 M サッカロース液で灌流後、脳を取り出し、液体窒素で凍結し、10 μm の連続切片を作製した。切片を 5 μM PDBu 存在下及び非存在下で 5 nM [^{3}H] PDBu を加え、室温で 45 分間インキュベートした。洗浄後、切片を tritium sensitive film に密着させ、暗室で 4℃, 7 日間露光後、現像し、画像解析装置 (IBAS II)にて解析した。

2. ヒト脳粗膜分画を用いた [^{3}H] PDBu 結合実験

正常対照者、パーキンソン病患者及び精神分裂病患者の剖検脳から、Brodmann, Riley の図譜に従って各脳部位を分割し、-75℃ で保存した。用時、組織湿重量 100 mg 当たり 2 ml の氷冷 50 mM Tris-HCl 緩衝液を加え、Polytron でホモジナイズした後、50,000 g, 10 分間遠沈した。得られた沈渣を同緩衝液中で再浮遊と遠沈を 3 回繰り返して洗浄した粗膜分画を膜標品とした。[^{3}H] PDBu 特異結合は、膜標品 (0.06 ～ 0.1 mg protein/tube) を 4 mg/ml 牛血清アルブミンを含む [^{3}H-PDBu と共に 10 μM PDBu 存在下及び非存在下で 30℃, 30 分間インキュベートすることにより得られた結合量の差と定義した。受容体結合実験は、0.3 % polyethyleneimine 前処置ガラス繊維濾紙を用いた急速濾過法によった。

3. 放射線不活化法

ウシ大脳皮質粗膜分画を凍結乾燥後、真空封入し、氷冷下 ^{60}Co (32,000 Ci,線量率 4.5 Mrad/h) を線源としてガンマ線照

射を行った。同時に、内部標準として分子量既知の酵素標品（pyruvate kinase, alcohol dehydrogenase, alkaline phosphatase）を用いた。照射後、膜標品は受容体結合実験を、酵素標品は酵素活性測定を行い、それぞれ特異結合量及び活性の減衰から、［^{3}H］PDBu 結合部位のターゲットサイズを算出した。

［実験成績］

1. ［^{3}H］PDBu オートラジオグラフィー

ラット脳における［^{3}H］PDBu オートラジオグラムは不均等な分布を示した。即ち、灰白質では、嗅球、大脳皮質、海馬、基底核で高く、小脳、黒質、中心灰白質、外側膝状体がこれに次ぎ、延髄、橋では低密度であった。白質では脳梁、内包で示されるように極めて低い密度であった。

2. ヒト脳における［^{3}H］PDBu 結合の特異性

海馬から得られた粗膜分画を用いて、［^{3}H］PDBu 結合に対する種々の薬物の阻害を検討した。Phorbol ester の中で、発癌プロモーターとしての生物学的活性の高い TPA, PDBu が強い阻害を示したのに対し、生物学的活性のほとんどない PDD は μM 濃度まで阻害を示さなかった。また 100 μM で若干の阻害を示した pimozide を除き、nifedipine, nicardipine, verapamil, diltiazem, flunarizine, sulpiride, ketanserin は阻害作用を示さなかった（図 1）。

3. ヒト脳における［^{3}H］PDBu 結合の分布

ヒト脳組織ホモジネートから得られた粗膜分画に対する［^{3}H］PDBu 結合の分布は、嗅脳＞基底核＞大脳皮質＞間脳＞中脳＞小脳の順で、ラット脳切片を用いた［^{3}H］PDBu オートラジオグラムとほぼ同様の分布を示した（図 2）。

4. パーキンソン病脳における phorbol ester 結合部位の変化

［^{3}H］PDBu 特異結合は、パーキンソン病群で全ての測定部位で減少傾向を示した。即ち、正常対照群の平均値を 100 とすると、尾状核 62、被殻 67、淡蒼球 51、黒質 37、海馬 80、小脳 81であり、特に尾状核、被殻、淡蒼球で有意に減少した（図 3）。被殻で［^{3}H］PDBu 飽和結合実験を行うと、Kd, Bmax は、それぞれ正常対照群で6 nM, 17 pmol/mg protein,パーキンソン病群で 5 nM, 4 pmol/mg protein となり、パーキンソン病脳での特異結合の減少は、親和性の低下によるものではなく、受容体数の減少によるものと考えられた。精神分裂病脳の前頭前野及び尾状核では有意の変化は認められなかった。

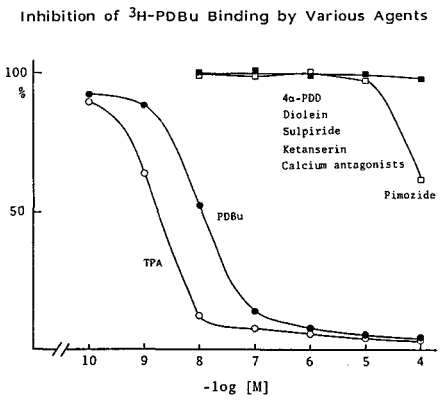


Fig. 1

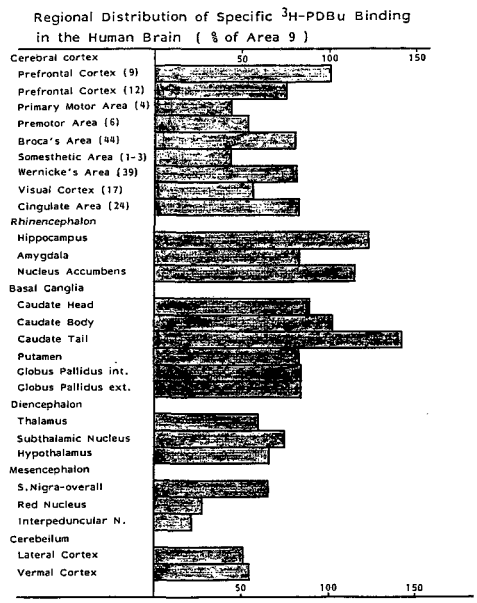


Fig. 2

5. ［^{3}H］PDBu 結合部位のターゲットサイズ

放射線不活化法により、ウシ大脳皮質粗膜分画に対する［^{3}H］PDBu 特異結合は線量依存性に減衰した。同時に内部標準として照射された分子量既知の酵素標品の活性減衰曲線から

得られた較正関数より、[^{3}H] PDBu で標識される phorbol ester 結合部位のターゲットサイズは約 80,000 と決定された。

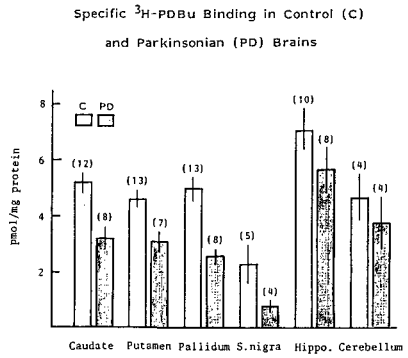


Fig. 3

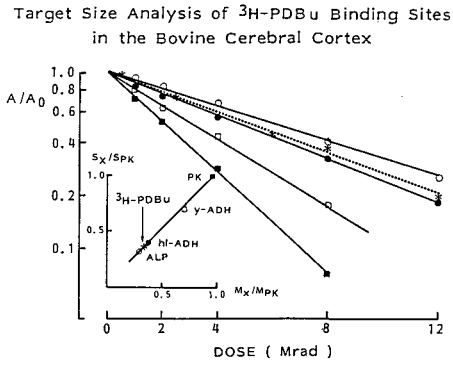


Fig. 4

[考察]

ラット脳、ヒト脳において [^{3}H] PDBu 結合は同様の不均等分布を示した。今回得られた成績は、生化学的に測定された C-kinase 活性の分布 (4) 及びモノクローナル抗体で免疫染色して得られた C-kinase の分布 (5) とよく一致した。種々の薬物を用いた [^{3}H] PDBu 結合阻害実験の成績は、[^{3}H] PDBu がヒト脳においても C-kinase と機能連関を有する phorbol ester 結合部位を標識することを明らかにした。Cytosol 分画を用いた場合 (6) と異なり、膜分画では μM 濃度の diolein は [^{3}H] PDBu 結合を阻害しなかった。神経変性疾患であるパーキンソン病は natural lesion study として有用である。本研究では、パーキンソン病脳において変性のみられる黒質ー線条体 dopamine 神経系の分布領域に一致して [^{3}H] PDBu 結合は有意に減少した。他の脳部位における減少傾向を今回の成績のみから説明することはできないが、対象となった患者は全て臨床的に終末期 (Yahr のV度) であったため、他の神経系の変性に伴う二次的変化を反映している可能性が考えられる。[^{3}H] PDBu で標識されるウシ大脳皮質粗膜分画での phorbol ester 結合部位の機能的分子サイズは、放射線不活化法により約 80,000 dalton であった。この値はウシ大脳皮質の可溶性分画から精製された C-kinase の SDS-PAGE 法による分子サイズ (7) (Mr = 79,500) とよく一致した。この結果は phorbol ester 結合部位は C-kinase そのものであるという仮説を支持すると共に、cytosol に存在する状態での C-kinase と膜に存在する状態での C-kinase とは同一の機能的分子サイズを有する可能性を示唆しているように思われる。

[文献]

1) Ashendel, C.L. (1985) Biochim. Biophys. Acta, 822, 219-242.
2) Nishizuka, Y. (1984) Nature, 308, 693-698.
3) Kikkawa, U. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258, 11442-11445.
4) Walaas, S.I. et al. (1983) J. Neurosci., 3, 302-311.
5) 北野達郎 他 (1985) 神経化学、24, 502-504.
6) Sharkey, N.A. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 607-610.
7) Parker, P. et al. (1984) Eur. Mol. Biol. J., 3, 953-959.

98. ウシ下垂体後葉からの分泌顆粒の分離及び顆粒分画内の Enkephalin の動態

竹田二美代・竹田　稔・島田明範・倉岡幸令・紺野邦夫
塩田清二*・中井康光*　　(昭和大・医・生化学, 解剖*)

〔要　約〕

近年多くの neuropeptide が中枢神経系で発見され、その precurserの一次構造が明らかとなった Enkephalin (Enk) は脳の種々の部位で含量が異なるが、鎮痛作用に関与していることは確かである。Enk は脳のsynaptosome に存在するのでneuro-modulator あるいは neurotransmitter として作用していると考えられる。ところで下垂体後葉には高濃度の Enkが含有されている。しかし下垂体後葉に存在するEnk の生理作用は不明である。そこで今回、こうように存在する種々な size の分泌顆粒をintactに分離し、その顆粒内のpeptide の動態について研究を行なった。我々は短時間にしかもintactな分泌顆粒を分離する目的で庶糖密度勾配遠心はさけ、percoll による遠心分離法を試みた。その結果 percollの連続密度勾配の場合は percoll密度1,128 の処に高濃度の顆粒を得ることが出来た。一方 percollの不連続密度勾配による遠心分離では密度1,054 の分画に分泌顆粒を得た。これらの方法で集められた顆粒は大小様々な size の顆粒の存在がみとめられたが、mitochondriaや synaptosomeの存在は殆ど認められなかった。これらの分泌顆粒分画には Enk及び Oxytocin(Ox),Vasopressin(Vp) の存在がしられているが、その含量はHPLC及び RIAにより測定した。又(3H)Met-enk の取り込み活性も同様に測定した結果 percoll密度 1,054の顆粒分画で、約10 f moles/mg protein/20 min であった。

Key word :　Enkephalin, Percoll, Neurohypophyses

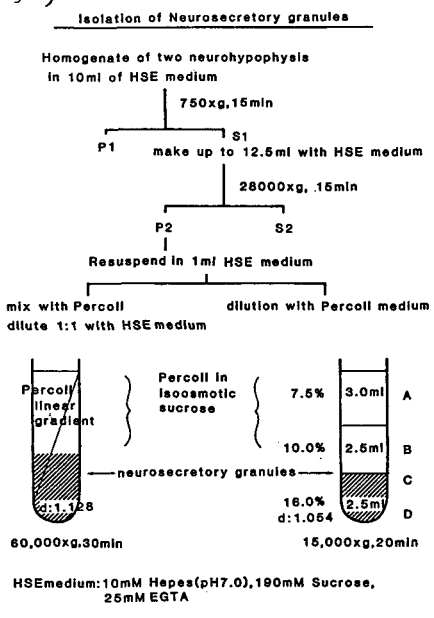
下垂体後葉は神経分泌細胞軸索終末の集合体で、多数の軸索終末と後葉細胞、毛細血管からなる。軸索終末には直径150-300nm の分泌顆粒を含むものと、直径100nm の分泌顆粒の２種類が存在すると報告されている。この大型の分泌顆粒にはOxとVpが含有されている。しかしEnk(Met-,Leu-)がこれら大型の分泌顆粒と共存(5)するとの報告と小型の分泌顆粒に含有される(7)(11) との報告がある。Martinらはラット神経性下垂体のOx,Vp terminalにはMet,Leu-Enk が共存して、神経終末からco-releaseされると報告している(5). 一方、Van Leeuwen らはLeu-Enk が小型の分泌顆粒を含む神経線維内に含有され、その終末が後葉細胞にシナプス様結合して間接的にOx,Vp のrelease を抑制している可能性を示唆している(11) . またClarke Iversen らはEnk や他のopioid peptideはaxon terminal に直接あるいはその近傍でOxとVpのrelease を阻害との報告がある(2)(4)。　そこで我々はこれらOx,Vp を含む顆粒にEnk が共存するのか、あるいはEnk 固有の顆粒が存在するのか、また両者が同一顆粒内に共存している場合Ox,Vp とEnk が生理的にco-releaseされる可能性を検討した。

＜実験方法＞下垂体後葉は牛脳より卜殺後45分以内に切り出し、10倍量のHSE 液 (10mM Hepes Ph=7.0,190mM Sucrose,25mM EGTA) にてhomogenizeし、核を除いた後Mitochondria画分 (P2) を得る。P2画分をHSE mediumに再懸濁し、Fig.1 に示す方法で顆粒の分離を試みた。即ち、Percoll (Pharmacia Fine Chemicals Co.)による連続密度勾配(0-50%) あるいは不連続密度勾配(7.5,10.0,16.0%)による遠心分画である。Percoll 密度はMarker Beadsを用いた。タンパク量はクマシーブルー法

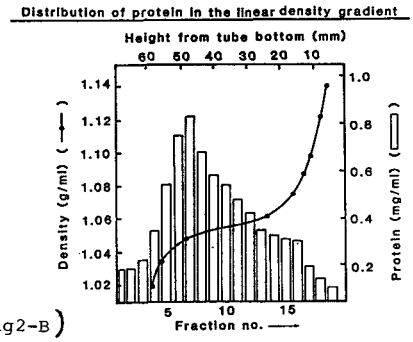
で測定した〈1〉。電顕による観察はPercoll 分画後の各フラクションをグルタールアルデヒド固定に引き続きオスミウムによる固定後、脱水、包埋を経て超薄切片を作製し、酢酸ウラン、クエン酸鉛による染色後観察した。各分画の酵素活性は Mitochondrial Markerはmonoamine oxidase(3)glutamate dehydrogenase(6) 活性を、又、microsomal marker としてNADPH cytochrome C reductase (NCR)(10) nucleoside diphosphatase (NDPase)(12) を、plasma membrane markerとして Na,K-ATPase 活性を測定した。分泌顆粒への(3H)Met-Enk のとり込み活性は、150mM KCl,5mM NaCl,2mM PMSF,5.5x10^{-8} M(2,5uCi(3H)MeT-Enk, 顆粒タンパク 100 ug で25℃ 10分の反応で行なった(9)。顆粒内のEnk,Ox,Vp の含量は Percoll 分画後の各fractionから 1M 酢酸／20 mM 塩酸にてpeptide を抽出後凍結乾燥により濃縮してRIA 法にて測定した(8)。また、HPLCによる分析は Zorbax ODS 4150(column size 4x150 mm) を用い、リン酸 buffer (Ph 4.0)にアセトニトリル 10-50% の linear gradient で分離し、OPA 法で行なった。

＜結果と考察＞ ウシ下垂体後葉からPercoll 分画法による分泌顆粒の分離法をFig.1 に示した。連続及び不連続 Percoll密度勾配遠心法により遠心した試験管より夫々10-20 分画についてタンパク量を測定するとFig.2 A,B のパターンが得られた。この方法で、分泌顆粒は Fig. 1 の斜線部分に回収され、連続密度勾配遠心法では d=1.128 に最も高濃度に顆粒が認められEMでは直径100-300 nm の intact な顆粒のみが観察され、mitochondria, synaptic vesicle の混在は認められなかった(Fig.3)。一方、不連続密度勾配遠心分離法では fraction C に

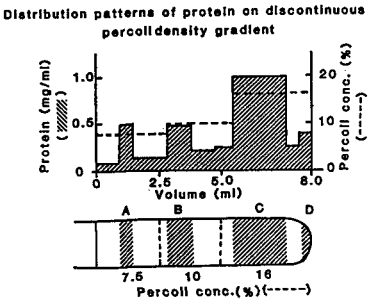
(Fig 1)



(Fig2-A)

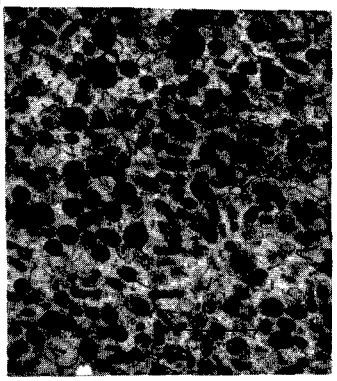


(Fig2-B)



分泌顆粒の回収を認めた。この分画とfraction D の酵素活性を検討するとTable I に示すように、NCR, NDPase, monoamine oxidase, glutamate dehydrogenase, Na,K-ATPase 活性いずれも僅かの酵素活性しか認められずmicrosome, mitochondria の混在が極めて少ないことが示唆された。またこれらの顆粒画分への(3H)Met-enk の取り込み活性を検討するとfraction C では 10f moles/mg protein/20 min であったのに対し、他のfractionでは、ほとんど取り込みは認められなかった。このように今回、比較的均一な顆粒画分を分離することができたが、サイズの異なる顆粒とエンケファリンとオキシトシン、バソプレシンの共存の関連性についてはRIA および、免疫電顕にて検討中である。

(Fig3)



—1μm

(Table 1)

Distribution of merker enzymes in Fraction C and D

Marker enzymes	Specific marker enzyme activities in: Fraction C	Fraction D	
NCR	58.7 ± 0.021	71.1 ± 0.011	U/mg/min
NDPase	3.9 ± 0.016	5.8 ± 0.014	pmoles/mg/min
Monoamine oxidase	9.8 ± 0.015	10.5 ± 0.030	n moles/mg/min
Glutamate dehydrogenase	0.904±0.02	0.92 ±0.09	U/mg/min
Na^{+},K^{+}-ATPase	0.032 ± 0.01	0.086 ± 0.03	u moles/mg/min

References

(1) Bradford,M.M.(1976)Anal.Biochem. 72 248-254
(2) Clarke,G.,Wood,P.,Merrick,L.&Lincoln,D.W.(1979)Nature 282 746-748
(3) Fowler,C.J.(1979)Biochem.Pharmacol. 28 3063-3068
(4) Iversen,L.L.,Iversen,S.D.& Bloom,F.E.(1981)Nature 284 350-353
(5) Martin,R.,Geis,R.,Holl,R.,Schafer,M.& Voigt,K.H.,(1983)Neuroscience 8 212-241
(6) Schmidt,e.(1970) In Methoden der enzymatischen Analyse 2nd edn.,Vol.1 pp607-613
(7) Shioda,S.,Nakai,Y.,Ochiai,H.,Nakada,H.& Sano,Y.,(1984) J.Electron Microsc.33 72-75
(8) Takeda,F.,Takeda,M.,Maruyama,M.,Konno,K.& Kato,T.(1982)神経化学 21 186-188
(9) Takeda,F.,Takeda,M.,Shimada,A.& Konno,K.(1985)Brain Res.344 220-226
(10) Takesue,S.& Omura,T.(1970)J.Biochem 67 259-266
(11) Van Leeuwen,F.W.,Pool,C.W.& Sluiter,a.a.,(1983)Neuroscience 8 229-241
(12) Yamazaki,M,& Hayashi,O.(1968)J.Biol.Chem.243 2934-2942

99. 外側中隔野に線維を投射する TRH 神経の分布と正中隆起に投射する神経

石川巧一・鈴木光雄　　（群馬大・内分泌研・生理）

〔要　約〕
ＴＲＨ含有神経は視床下部に多数且つ広く分布している。これらの細胞体のいずれが正中隆起部に線維を投射しているかを二重染色法を用いて検討した。ＨＲＰを正中隆起部に注入すると、第三脳室に近接する、内側視束前野や室傍核、背内側核、ならびに視束上核　等にＨＲＰを集積した細胞体が多数観察された。このうちＴＲＨ反応陽性の細胞は室傍核を中心に室周囲領域に多い。すなわち、此等の細胞が線維を正中隆起に投射しているものと考えられる。一方、外側中核野にＨＲＰを投与すると反応陽性の細胞は第三脳室周辺と脳弓の近傍とに分かれて分布する。このうち、同時にＴＲＨを含有する細胞体は脳弓周囲に多く視床下部の外側や視束前野に確認された。下垂体と関係しているとされている室傍核や背内側核等には殆ど観察されない。以上の成績は正中隆起に線維を投射するＴＲＨ細胞と中隔野に投射する細胞とは異なっている事を示唆している。下垂体からのＴＳＨ分泌に関与するＴＲＨ神経と、中隔野に線維を送り麻酔や記憶等に関係するＴＲＨ神経とは別々のものであると考えられ、従来の仮説が支持された。

Key word：　TRH, TSH, Median Eminece, Septum, HRP, immunocytochemistry

ＴＲＨを含有する神経細胞体は脳全域に広範囲に分布する（８）。視床下部にあっては、内側視束前核（ｍＰＯ）の周囲、室周囲核（ＰｅＶＮ）、室傍核（ＰＶＮ）、背内側核（ＤＭＮ）、外側視床下部（ＬＨ）、等に比較的密度濃く存在している。一方、線維の終末は細胞体の分布する領野以外にも、正中隆起部やＯＶＬＴ、外側中隔野に多量に分布している（４）。正中隆起部のＴＲＨは下垂体からのＴＳＨ分泌に（３）、外側中隔野のそれは坑麻酔作用の発現（７）にそれぞれ関与していると考えられている。下垂体に作用するＴＲＨと中枢作用に係わるＴＲＨが同一の神経（系）に由来するか否かは、その生理機能を解明する上で興味ある疑問点の一つである。

今回、我々はこの疑問を解く為に神経終末から吸収されたＨＲＰと内在するＴＲＨを同時に検出する、いわゆる二重染色法を用いて、正中隆起部ならびに中隔野に線維を送るＴＲＨ細胞体の同定を行い其れぞれの分布を比較検討した。

＜方法＞

実験には　Wistar 系の雄ラット（２００－３００ｇ）を用いた。ネンブタール麻酔下に０．２ｕｌのＨＲＰを 外側中隔野ならびに正中隆起部に注入し、２４時間後にコルヒチン（２０－７５　ｕｇ）を側脳室に投与した。１－２日の後、５％のアクロレイン溶液で還流固定し、５０ｕｍの切片をビブラトームで作成し、ＤＡＢにて細胞体内に集積したＨＲＰを発色同定した。続いて、Ｎａ（ＢＨ４）処理した同一切片について免疫細胞化学的手法によりＴＲＨ含有神経を同定した。発色には 4-Cl-1 naphtol を用いた。二重染色を施した切片をスライドガラスに封入し、光学顕微鏡で観察した。

＜結果＞

外側中隔野にＨＲＰを注入した動物ではＨＲＰ陽性の神経細胞は、図１（左側）に示す様に注入部位の他に、前交連の周辺、やｍＰＯの近傍、脳弓周囲、外側視床下部等に散在していた。この結果は従来の報告（２）と同様で、ＰＶＮやＤＭＮには反応陽性の細胞体は殆ど認められない。一方、ＴＲＨ反応陽性の細胞体は前述の如くＰＶＮやＤＭＮ等の内側部分とＬＨや脳弓の周囲等の外側部に分かれて存在する（図１、右側）。此等の内、ＨＲＰとＴＲＨ共に陽性の神経細胞はｍＰＯの外側、脳弓の周囲ならびに外側視床下部に確認された。以上の結果は、視床下部の外側領域に分布するＴＲＨ含有神経がその線維を外側中隔野に投射している事を示唆している。

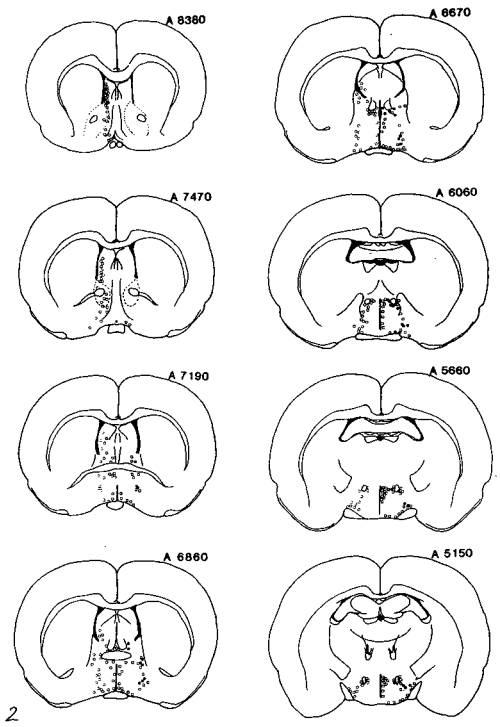


Fig. 1. Schematic drawing of the rat hypothalamus showing the distribution of cell bodies which are TRH immunoreactive (right, open squares) and labelled with HRP (left, open circles). Some neurons contained both TRH and HRP (right, closed squares).

正中隆起部へＨＲＰを投与した際に得られた結果は図２にまとめて表示した。ＨＲＰ陽性の細胞はｍＰＯの内側で第三脳室の周囲、ＰＶＮの全域、ＰｅＶＮ，視束上核（ＳＯＮ）、ＤＭＮ，ならびに弓状核に相当数観察された（図、左側）。従来の報告と殆ど同じである（10）。一方、ＴＲＨとＨＲＰともに陽性の細胞体はｍＰＯ、ＰＶＮ、ＤＭＮの第三脳室の近傍、すなわちＰｅＶＮに多数認められた。この実験成績は視床下部に存在するＴＲＨ含有神経の内、ＰＶＮを中心にして比較的前後に長い領域に存在する内側系の細胞群が正中隆起部にその線維を投射している事を示している。外側中隔野へ線維を投射する神経群がむしろ視床下部の外側領域に存在する事を考慮すると、下垂体に関わるＴＲＨ細胞と抗麻酔作用に関連する其れとは異なっているものと推察される。また、下垂体茎や後葉にＨＲＰを投与するとＰＶＮやＳＯＮの大細胞性の神経群が染色されるのみで、他の神経にはほとんどＨＲＰの集積を観察することはできなかった。

＜考察＞　１９５１年に向下垂体領野という概念が提唱されて以来、下垂体からのＴＳＨ分泌に直接関与する部位やその本体を検索する為の多くの研究がなされてきた。ＰＶＮの電気的破壊やナイフ切離により、血中ＴＳＨ値が低下し寒冷によるＴＳＨ分泌が阻止される（1,5）。逆に、電気的あるいは化学的刺激によりＴＳＨ値は上昇する（6,9）。以上の報告はいずれもＰＶＮ（おそらくＴＲＨ細胞群）が向下垂体領野の本体であることを示唆している。今回得られた結果は従来の報告に概ね一致する。事実、ＰＶＮの内側部に存在するＴＲＨ神経がその線維を正中隆起部に投射する事が直接的に証明された。しかし、それ以外にもＤＭＮやｍＰＯの第三脳室の周囲に分布するＴＲＨ神経も同様に投射していることが明らかになった。この成績は視床下部の前部を破壊すると甲状腺機能が低下するという報告やＰＶＮばかりでなくｍＰＯやＤＭＮの破壊により正中隆起部のＴＲＨ含量が減少するという実験成績とよく合致する。また、これらの下垂体の機能に関わる細胞と中隔野に線維を投射する神経とが異なることも明らかになったが、その生理的意義は今後の検討を待たなければならない。

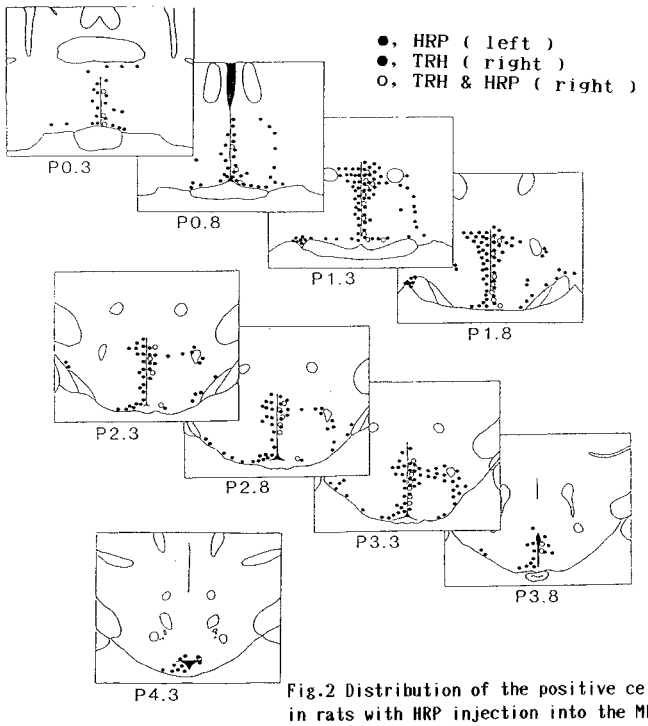


Fig.2 Distribution of the positive cells in rats with HRP injection into the ME.

<REFERENCES>

1. Aizawa, T., Greer, M.A., Endocrinology 109: 1731-1738, 1981.
2. DeVries, G.J., Bujis, R.M., Brain Res. 273: 307-317, 1983.
3. Florsheim, W.H., Handbook of physiology, vol 4, sec. 7, pp 449-498, 1974
4. Ishikawa, K., Inoue, K., Tosaka, H., Shimada, O., Suzuki, M., Neuroendocrinology 39: 448-452, 1984.
5. Ishikawa, K., Kakegawa, T., Suzuki, M., Endocrinology 114: 352-358,1984.
6. Ishikawa, K., Kakegawa, T., Suzuki, M., Acta Endocrinol. 111:25-29,1986.
7. Kalivas, P.W., Horita, A., J. Pharmac. Exp. Ther. 212: 203-210, 1980.
8. Lechan, R.M., Jackson, I.M.D., Endocrinology 111: 55-64, 1982.
9. Martin, J.B., Reichlin, S., Endocrinology 90:1079-1085.,1972
10. Wiegland, S.J., Price, J.L., J. Comp. Neurol. 192: 1-12, 1980.

100. 中枢神経系に於けるソマトメジンCの存在について：免疫組織化学的検索

野口鉄也・ランス倉田・杉崎哲朗　（東邦大・医・第二生理）

〔要　約〕

ソマトメジンC（SMC）（insulin-like growth factor 1)は成長ホルモン（GH）の二次ホルモンとして，主として骨格の発育に関与していると考えられている。SMCは肝臓で作られるが，胎児期にあっては脳を含む種々の臓器で産生されることが知られている。このことは，むしろ，各臓器内で何らかの役割を演じていることが示唆される。大腸菌を宿主として生産した組換えDNA製ヒトソマトメジンC（rSMC)に対する抗体を用いて，PAP法により40日令の正常マウスとSnell dwarfマウス（dw）の中枢神経系でのその存在を比較した。rSMC免疫反応物質（rSMC-IRS)は正常マウスの終脳の神経細胞に存在し，その部位は尾状核／被殻，海馬，視床，視床下部，淡蒼球，扁桃体であった。しかし，大脳皮質の神経細胞には存在しなかった。dwマウスについて，検索すると，rSMC-IRSをもつ神経細胞は正常マウス脳と同じ部位に分布していたが，rSMC-IRSの染色性は乏しく，また，陽性細胞の数も減少していた。40日令のdwマウスに3日間牛GHを投与し，終脳部位をみたが，上記変化の回復は認められなかった。したがって，神経細胞中のrSMC-IRSは血中GH依存性を欠くことから，既知の脳中ホルモンと同様に，神経機能に関与していることが示唆された。

Key word：Somatomedin C,　Central nervous system,　Immunohistochemistry.

我々は既に成長ホルモン（GH）が脳の発育，特に神経細胞の成熟と髄鞘形成に有効であることを報告した（5-7）。しかし，GHは血液－脳関門を通過し得ないことから（2），脳に有効な二次ホルモンの追求が必要とされてきた。他方，Snell dwarfマウス（dw）は流血中のソマトメジン（SMC）が極めて低値で，牛GHを投与すると回復することが知られている（3）。SMCはGHの二次ホルモンとして骨格の発育に有効であることが知られているが，さらにヒトSMCはinsulin-like growth factor-1（IGF-1）と同一であり（9），radioreceptorassay（RRA）で脳内に存在することが報告された（10）。今回，我々はは組換えDNA製ヒトSMC（rSMC）に対する抗体を用い，その分布を正常マウスとdwマウスの大脳につき比較検討した。

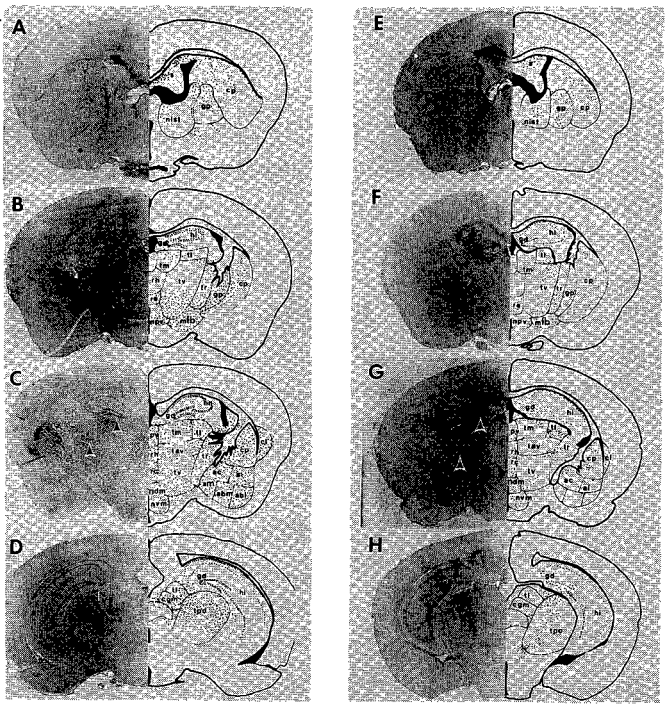
〔実験方法〕

40日令の正常マウス（+／?）とdwマウス（dw／dw）を先ずPBSで，さらにBouin液で灌流固定後，脳と下垂体を剔出，再びBouin液で3日間4℃で固定後，パラフィン包理を行い，脳は6 μmの連続切片を，下垂体は4 μmの切片を作製した。抗SMC抗体は藤沢薬品中央研究所より恵与を受けた。抗体作製法は大腸菌遺伝子組換法により作られたrSMCを家兎に免疫した（4）。免疫組織化学的手技は既報の方法（5）によった。尚，抗rSMC抗体はPBSで500倍に希釈して用いた。

〔結　果〕

正常マウス大脳ではrSMC－免疫反応物質（rSMC-IRS）は尾状核／被殻，海馬，視床，視床下部，淡蒼球，扁桃体に亘って存在し，皮質には皆無であった（Fig. 1）。また，rSMC-IRSは神経細胞の細胞質中に存在した。これらの部位のうち，尾状核／

Fig. 1



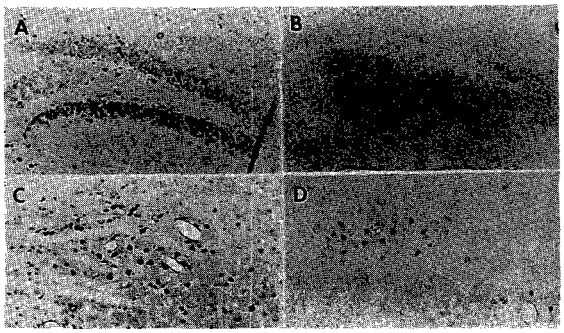
Semischematic drawings of coronal sections of the 40-day-old normal control (+/?) and Snell dwarf (dw/dw) mice showing the location of cells containing rSMC-IRS. The left side of each diagram is a section of neuronal cell stained for rSMC and the right side of each diagram is a drawing of the corresponding brain structures. Sections run (A) rostal to (D) caudal in the +/? brain and (E) rostal to (H) caudal in the dw/dw brain.
Abbreviations: abl: n. amygdaloideus basalis, pars lateralis; abm: n. amygdaloideus basalis, pars medialis; ac: n. amygdaloideus centralis; al: n. amygdaloideus lateralis; am: n. amygdaloideus medialis; cgm: n. centralis corporis geniculati medialis; cl: claustrum; cp: n. caudatus putamen; gd: gyrus dentatus; gp: glopus pallidus; hi: hippocampus; mfb: medial forebrain bundle; ndm: n. dorsomedialis hypothalamus; nist: n. interstitialis striae terminalis; npv: n. paraventricularis hypothalami; nvm: n. ventromedialis hypothalami; pv: n. periventralis thalami; re: n. reuniens; rh: n. rhomboideus; s: n. triangularis septi; tav: n. anterior ventralis thalami; tl: n. lateralis thalami; tm: n. medialis thalami; tpo: n. posterior thalami; tr: n. reticularis thalami; tv: n. ventralis thalami.

被殻，扁桃体，視床，視床下部は強く染った細胞が多く分布していた。また，海馬では歯状回で最も陽性細胞が多数みられた（Fig. 2）

dwマウス大脳では，rSMC-IRSをもつ神経細胞の分布は正常マウス脳と同じであったが，染色性に乏しく，陽性細胞の数も減少していた（Fig. 1と2）。

また，下垂体をみると，正常マウスではrSMC-IRS陽性細胞が多数みられたが，dwマウスでは全く存在しなかった。（データーは省く）。

Fig. 2



rSMC-IRS containing neuronal cell in gyrus dentatae of the +/? (A) and dw/dw (B) brains and in nucleus reticularis thalami of the +/? (C) and dw/dw (D) brains. The area shown in each plate correspond to regions indicated by arrowheads in Fig. 1. Original magnification: 50 X.

次いで，大脳のrSMC-IRS陽性細胞の分布が血流中のGHに依存するか否かを検討するために，40日令のdwマウスに1日10μg／g体重の牛GHを3日間投与し，検索した。その結果，dwマウスのrSMC-IRS陽性細胞の分布と染色性には全く変化が認められなかった。

〔考　察〕

既に我々はdwマウス大脳で神経細胞の発育が未熟で(5)，視交叉上核の発育も遅滞していること(8)を報告した。Saraら(10)はRRAでソマトメジンが大脳皮質を含めた終脳に存在することを報告しているが，今回の我々の検索では皮質部位に陽性細胞は全く認められなかった。彼女らの方法ではIGF-2をも同時に結合すること，また，我々の抗体はMSA(rat-IGF-2)とインスリンに対して交叉しないことなどから，結果の違いは結合物質の差による可能性があろう。rSMC-IRSの存在は二つの可能性を示唆している。(A)マイトジエンか(B) neurotransmitter／neuromodulator の可能性である。しかし，SMCが脳の細胞のマイトジエンであるとの報告は未だない。一方，視床下部－下垂体の関連を調節しているとの報告(1)はある。我々の検索からも，dw下垂体でSMC-IRS陽性細胞が皆無であったこと，脳内rSMC-IRSがGH依存性をもたなかったことなどから，rSMC-IRSは神経細胞で合成され，既知の脳内ホルモンと同様に神経機能を調節していることが強く示唆された。

〔文　献〕

1. Berlowitz, M., Szado, M., Frohman; L.A., Firstone, S., Chu; L:, Hintz, R. L., Science 212, 1279-1281 (1981).
2. Mayberry, H.E., Van den Brande, J.L., Van Wyk, J.J., Waddel, W.J.; Endocrinol. 88, 1309-1317 (1971).
3. Nissley, S. P., Knazek, R. A., Wolff, G. L.,Horm. Metab. Res. 12, 158-164 (1980).
4. Niwa, M., Sato, S., Saito, Y., Uchiyama, F., Ono, H., Yamashita, M., Kitaguchi, T.,Shiga, Y., Notani, J., Yamada, H., Ishii, Y., Ueda, I., Ann. N. Y. Acad. Sci. in press (1986).
5. Noguchi, T., Sekiguchi, M., Sugisaki, T., Tsukada, Y., Shimai, K.; Dev. Brain Res. 10, 125-138 (1983).
6. Noguchi, T., Sugisaki, T., Tsukada; Y., J. Neurochem. 38, 257-263 (1982).
7. Noguchi, T., Sugisaki, T., Takamatsu, K., Tsukada, Y., J. Neurochem. 39, 161-172 (1982).
8. Noguchi, T., Sugisaki, T., Kudo, M., Satoh, I. Dev. Brain Res. 26, 161-172 (1986).
9. Rubin, J. S., Macobs, J. W., Daughaday, W. H., Bradshaw, R. A.; Endocrinol. 110, 734-740 (1982).
10. Sara, V. R., Uvnäs-Moberg; K., Uvnäs, B., Hall, K., Wetterberg, L., Wetterberg, L., Posloncec, B., Goiny, M., Acta. Physiolo. Scand. 115, 467-470 (1982).
11. Suzuki, S., Iguchi, S., Iwasaki, K., Otsuka, K., Niwa, M., Uead, I.; Folia Endocrinol. Jap, 61, 1088 (1985).

101. ラット脳微小血管における心房性 Na 利尿ポリペプチド（rANP）結合部位について

茨木正明・堤　圭介*・太田　尚・丹羽正美・尾崎正若
（長崎大・医・薬理第二，脳神経外科*）

〔要　約〕

水電解質の膜透過性調節因子としてのatrial natriuretic polypeptide(ANP)の脳血液関門(BBB)における意義を探る目的でラット脳微小血管標本で^{125}I-rat ANP(^{125}I-rANP)をリガンドとしたmembrane receptor bindingsを展開した。

ナイロンメッシュ(153 μm)とガラスビーズ(60-80 mesh)の組み合わせで、ラット大脳皮質より得られた脳微小血管標本は細動静脈の混入のない脳capillaryであった。これら脳微小血管標本には、Kd 108 pM、B_{max} 157 fmol/mg proteinの単一な高親和性結合部位が存在した。0℃、25℃に比較して37℃で最も高い特異的結合を示し、30分間のincubationで飽和し、second order rate equationによる結合解離特性はK_{+1} 0.49 X 10^9 $M^{-1}min^{-1}$、K_{-1} 0.054 min^{-1}であった。Incubation media中の２価イオンCa^{2+}、Mn^{2+}の存在で特異的結合は抑制された。

BBBにおけるANPの役割は明らかではないが脳微小血管には、腎・血管平滑筋・副腎顆粒層において生理的拮抗を示すangiotensin Ⅱの受容体が存在し、BBBの機能に密接に関与することを考えるとcapillary endotheliumの水電解質透過性の調節を担うANPの特異的な機能が示唆された。

Key word：　^{125}I-labeled rat atrial natriuretic polypeptide binding, brain capillaries, blood brain barrier

［はじめに］

副腎顆粒層や腎におけるatrial natriuretic polypeptide(ANP)[1]の細胞外液調節因子としての作用は生体膜における水・電解質透過性をNa^+,K^+-ATPase系とは別個の形でangiotensinⅡとのそれぞれの特異的receptorを介した拮抗の中での機序によるらしい[2]。脳血液関門(BBB)を構成する脳capillaryのendotheliumにangiotensinⅡreceptorの存在が報告され[3]、angiotensinⅡが脳capillary透過性を変化させる[4]ことを考えるとBBBの機能へのANPの関与が予想される。今回、我々は^{125}I-標識rat ANP(^{125}I-rANP)によるラット大脳皮質微小血管標本へのreceptor bindingを行い、高親和性の単一な結合部位を見い出した。

［方法］

雄性ウィスター・ラット（体重300 g）を断頭屠殺後、大脳皮質を採取し、ナイロンメッシュ(153 μm)とガラスビーズ(60-80 mesh)を組み合わせたGoldsteinらの方法[5]で、脳微小血管標本を採取した。採取された脳微小血管標本は倒立微分干渉顕微鏡でその純度を確かめた。ホモゲナイズ後、10 mM EDTA-2Na含有の緩衝液中で4℃、30分間インキュベーション後、50,000 G 沈渣をreceptor標品とした。receptor結合は50 mM Tris緩衝液(100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 40 μg/ml bacitracin, 4 μg/ml leupeptin, 2 μg/ml chymostatin, 100 KIU aprotinin) 112 μl中で１検体当たりタンパク量15 μg、リガンドとして^{125}I-α-rANP(Amersham,2000 Ci/mmol)で行った。非特異的結合は1.0 μM 非放射性α-rANP存在下で得た。
インキュベーション後、polyethylenimine処置ガラスファイバー紙(GF/C)上に移し1.0 mlで洗浄後、吸引濾過しB･Fを分離した。

［結果］

ラット大脳皮質より得られた脳微小血管標本はFig.1（右）に示したように細動静脈の混入がない脳capillaryであった（比較の意味でFig.1左側にナイロンメッシュだけによる細動静脈が混入した標本を示してある）。Incubation温度の検討で37℃で最も高い特異的結合が得られた。B/F分離時にglass fiber filterを洗浄する量も

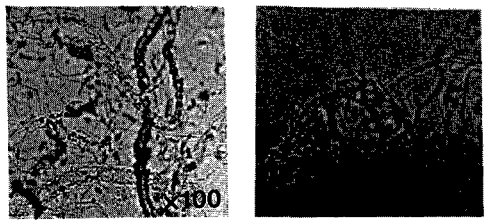


Fig. 1 Phase-contrast figures of cerebral microvessels

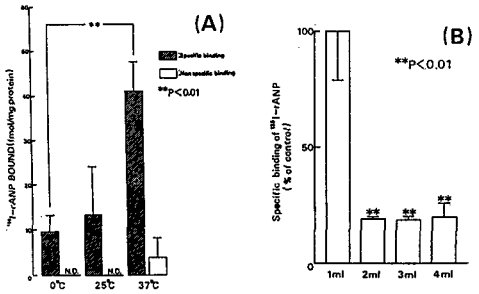


Fig. 2 Effects of temperature (A) and washing-volume of glass fiber filters (B) on specific bindings of rANP to cerebral microvessels

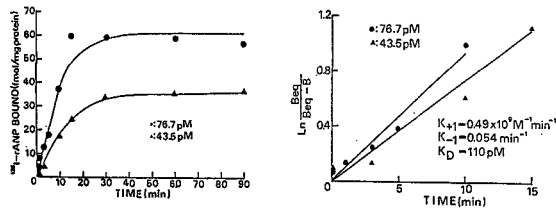


Fig. 3 Time course of binding of rANP to cerebral microvessels. The kinetics was calculated according to the equation of a second-order reaction.

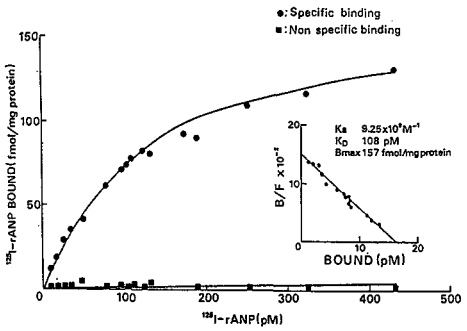


Fig. 4 Binding of rANP to cerebral microvessels as a function of radiolabeled peptide concentration. The data are plotted according to Scatchard analysis.

1.0 mlが最適であった（Fig.2）。
リガンド量43.5 pMと76.7 pMの2濃度での結合の時間経過は30分で平衡に達し90分まで持続した。
結合解離特性を second order rate equationから求めるとK_{+1}=0.49 x 10^9 $M^{-1}min^{-1}$、K_{-1}=0.054 min^{-1}、K_D=110 pMであった（Fig.3）。
リガンド量10 pMから431 pMの間での15濃度で37℃、30分間のincubationで飽和する高親和性、単一な結合部位であった（Fig.4）。
興味深いことにMn^{2+}、Ca^{2+}の存在下でこの結合は著明に抑制され（Fig.5）、特にCa^{2+}は100 μMから抑制した。

［考察］
脳微小血管（脳capillary）には現在まで、angiotensinⅡ receptor3)の他にα_2、β_2- adrenergic receptor[5),7)]、muscarinic cholinergic receptor[8)]、histamine H_1 receptor[9)]の存在が知られている。BBBを構成するcapillaryのendothelial cellにおけるこれらのreceptorが血管内から脳実質内への物質の移動に特異的に関与することが推測されるにすぎない現状ではANPがcapillary領域の特異的結合部位を介して、どのよ

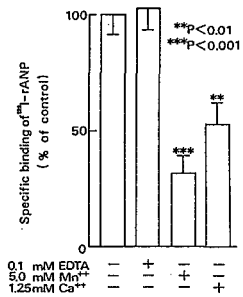


Fig. 5 Effect of divalent ions on binding of rANP to cerebral microvessels

うな形でBBBの機能に参画するのか今回のデータだけでは不明である。しかし、ANPの腎における利尿作用に関して、少なくともNa+-K+ ATPaseの抑制作用を持たないこと[10)]、培養牛大動脈内皮細胞にANPの結合部位が存在し、cGMPを蓄積させること[11)]等を考え合わせると、BBB機能に第一義的役割を果たす脳capillary endothelial cellにNa利尿ホルモンとしてのANPの特異的認識部位が存在することは生体内での新たなANPの生理的機能の

可能性を示唆するものと思われる。とくにangiotensinⅡとの生体内における生理的拮抗という観点からの今後の実験展開を期している。

血管平滑筋にANP受容体が存在することは、すでに多くの研究者によって詳細に検討されており[12]、脳微小血管標本における細動脈の混入の可能性のチェックが必要で、今回用いたGoldsteinらの原法[5]とKobayashiらによる改良[7]は、Fig.1で示したように純粋に脳capillaryを採取できた。データ的にも（単純には比較できないが）今回の脳微小血管におけるrANPのKd値約0.1 nMは、Leitmanらの培養牛大動脈内皮細胞のそれと類似している。

[謝辞]
脳微小血管採取法を御教示いただいた産業医科大学 小林英幸博士に感謝いたします。

References

1) Kangawa K et al (1984) Nature 312, 152-155.
2) Cole FE et al (1985) Regul Pept Suppl 4, 89-96.
3) Speth RC, Harik SI (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82, 6340-6343.
4) Grubb RL, Raichle MF (1981) Brain Res 210, 426-430.
5) Goldstein GW et al (1975) J Neurochem 25, 715-717.
6) Karnushina IL et al (1982) Life Sci 30, 849-858.
7) Kobayashi H et al (1981) J Neurochem 36, 1383-1388.
8) Harik SI et al (1981) J Cereb Blood Flow Metab 1, 329-338.
9) Perourkd SJ et al (1980) Science 208, 610-612.
10) Thibault G et al (1983) Hypertension 5 (Suppl. 1), I-75-I-80.
11) Leitman DC et al (1986) Bioch Biophys Acta 885, 74-79.
12) Shiffrin EL et al (1985) Life Sci 38, 817-826.

102. クラーレ慢性投与による motoneuron 細胞死の抑制と筋由来 survival factor との関連

田中英明　（群馬大・医・薬理）

〔要　約〕

発生過程における神経細胞の細胞死は良く知られている現象であり，その神経支配標的には細胞死に関係すると考えられる survival factor が存在するとされ，二，三同定されつつある．しかし細胞死が survival factor によってどのように調節されているかは未知である．この研究では neuromuscular junction (NMJ)-blocker の慢性投与により motoneuron の細胞死が抑制される現象を解析することによって survival factor と細胞死の関連を調べた．最初に，骨格筋由来の motoneuron survival factor を培養系で assay する条件を確立し，次に NMJ-blocker の作用をみた．その結果，NMJ-blocker 投与により筋に含まれる motoneuron survival factor の量は増加していなく，survival factor の量は motoneuron 細胞死の第一義的な要因ではないと考えられた．

Key word： motoneuron, cell death, survival factor

神経系の発生過程において多くの部位で発生直後に数多くの神経細胞が消失する細胞死の現象が知られている．神経支配の標的を除去すると，そこを支配する神経細胞の細胞死は促進されほとんど全部死滅することから標的由来の trophic factor が示唆され，ＮＧＦの発見後，近年 ciliary ganglion (1)，dorsal root ganglion neuron (2) の生存を細胞培養下で維持する survival factor が同定された．脊髄 motoneuron や ciliary ganglion cell は完全に細胞分裂を終え，ほとんどすべての神経細胞が正しい標的まで軸索を伸ばした後に一斉に細胞死が始まるため，選択的なシナプス形成における error correction として細胞死を説明することはできない．どのような神経細胞が生き残れるのかという問題に関して，標的における軸索間の competition により competition の勝者が生き残るという考えが提案されている(11)．しかし何を競争するのかは漠然としている．標的がつくるsurvival factor が有限で一部の神経細胞しか生き残れないのか，合成量は十分であっても供給できる部位がシナプス部位のようなところに限局していて，一部の軸索しかその部位を占めることができないのか等不明である．

この問題を解明する可能性のある現象として neuromuscular junction (NMJ)-blocker であるクラーレ（dTC），α－Bungarotoxin を慢性的に投与すると motoneuron の細胞死がほとんどなくなる現象(10)が考えられる．筋におけるsurvival factor合成が第一義的な要因であるならば，NMJ-blocker投与により筋に含まれる survival factor は増加する可能性がある．ここではニワトリ胚脊髄の培養を用いて motoneuron を同定し NMJ-blocker 投与により筋に含まれる motoneuron の survival factor が果して増加するのか検討した．

〔方法〕

クラーレ投与と骨格筋抽出液　ふ卵５日目のニワトリ卵殻に小窓を開け 2 mg/0.1 ml 生理

食塩水のクラーレ（ dTC ）を９日目まで連日投与し１０日目， stage 35 (Hamburger & Hamilton)(5)に無菌的に胚を取り出した．両後肢の皮膚，結合組織，骨を取り除き，筋を2 ml の培養液中でホモジナイズし 1500 x g 10 分間遠心し上清を希釈比１として漸次希釈し培養液に加えた．

motoneuron の標識　Tyrode液中に stage 21-23と 29-30 のニワトリ胚を取り出し，シリガードにピンで背位に固定後，内臓と脊椎の腹側を切除し自律神経系の節前線維を含まない脊髄神経 LS3-LS6に螢光色素D-282(Molecular Probes, Inc. OR,USA)をガラス電極を用いて注入した． 5% CO_2 95% O_2 の混合ガスを入れながら 5-6 hr，31-33°C に保ち逆行性軸索輸送により motoneuron に色素を取り込ませた (Fig. 1 A-C) ．

細胞培養　標識した脊髄の腹側半を取り出しよく洗い，トリプシン処理により単一細胞とした．２４穴プレート中の径 12 mm のカバーガラス上に細胞約１万個／ 0.1 ml 入れ，細胞がカバーグラスに接着したのを確認後， 0.5 ml の培養液を加え，２日間培養した．カバーグラスはポリオルニチンでコーティングし筋の conditioned medium 中に含まれる neurite growth factor を吸着させ使用した．このように neurite が伸びやすい条件で培養したため，螢光色素を取り込んでいても neurite を伸ばしていないものは死んでいるものとし，細胞体の大きさ以上に neuriteを伸ばしている染色された細胞を生存している motoneuronとして螢光顕微鏡下で数えた．

〔結果と考察〕

培養条件　ニワトリ胚の motoneuron は cell death period と呼ばれる stage 29-35 の間に約半数にまで死滅する(4)．肢原基を取り除き筋からの survival factor の供給がない場合にも正常と同じ時期まで motoneuron は死に始めないため(3)， motoneuron の survival

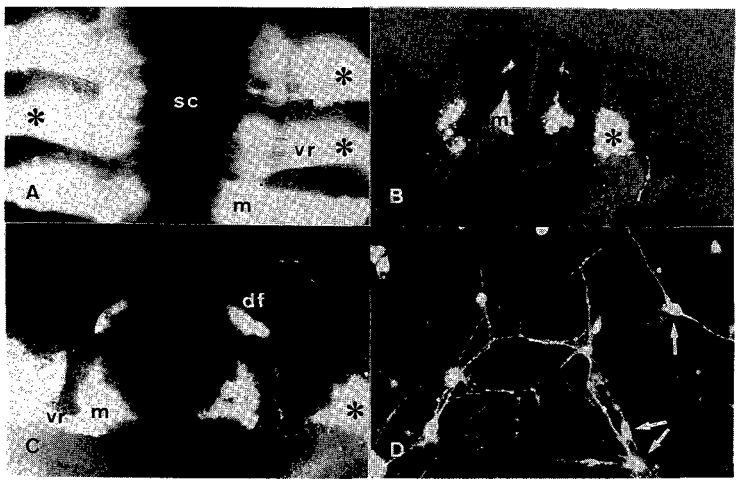


Fig. 1. Back-labeling with fluorescent dye D-282 and a dissociated culture of labeled motoneurons. Dye was injected into spinal nerves in lumbosacral segments 3-6, where there were no visceral preganglionic cells. Details of the procedures used were the same as those for labeling with HRP injected into limb muscles (Tanaka and Landmesser, 1986). (A) Ventral view of the whole mounted embryo. * indicate dye injection sites. sc: spinal cord; vr: ventral root; m: motoneuron. (B,C) Frozen sections of the transverse plane of the labeled embryo at stage 22(B) and stage 30(C). The transported dye was localized in motoneurons and dorsal funiculi (df). Ventral halves of cords were used for the dissociated cell cultures. x65. (D) Two-day culture of labeled motoneurons in the medium supplemented with extract of limb muscles. Arrows indicate motoneuron cell bodies. x 200.

factor 要求性は cell death period から出現すると考えられる．従って筋由来の survival factor は cell death period 以前の motoneuron は生存するが cell death period の胚から取り出した motoneuron は生存できない培養条件下で調べなければならない．螢光色素 D-282 は脂溶性で拡散しにくいため，cell death period 以前の小さな胚で，motoneuron の選択的な標識を可能にした．また低毒性で代謝されにくいため数日間標識された neurite を観察できた (Fig. 1 D)． Ham F 12/DMEM (1:1 mixture) に 10% horse serum, 5% chick serum, 5% fetal calf serum を加えた培地では stage 21-23 の motoneuron は生存したが stage 29-30 の motoneuron は生存し得ず，筋抽出液を加えると生存した．この条件で次の実験を行った．

NMJ-blocker の作用 dTC の長期にわたる投与は筋発生を阻害するが stage 35 くらいまでは正常に分化する．コントロールと dTC を投与した胚からそれぞれ筋抽出液をつくり dose-response curve をとると Fig. 2 のように差がないため，筋に含まれる motoneuron survival factor の量は dTC 投与により増加しない．したがって標的に存在する survival factor 量は細胞死を決定する第一義的な要因ではないと考えられた．除神経等により不活性化された adult の骨格筋では neurite growth factor (6)また survival factor (8)が増加するとされるが，発生途上の筋における今回の結果はこれに一致しない．しかし， dTC 投与によりシナプス部位が増加している(9)ことから neurite growth factor は増加し，筋の survival factor の量は変化しなくても factor を取り込むことのできる部位が増加してより多くの motoneuron が生き残っている可能性がある．さらには NMJ-blocker は脊髄内にも作用し motoneuron を不活性化するため(7)，筋からの survival factor 供給量が増加しなくても motoneuron の survival factor 要求性が減少するため多数の motoneuron が生き残る可能性もあり今後の検討が必要である．

（この研究は Muscular Dystrophy Association からの basic research grant と文部省科学研究費奨励(A) の援助を受けた）

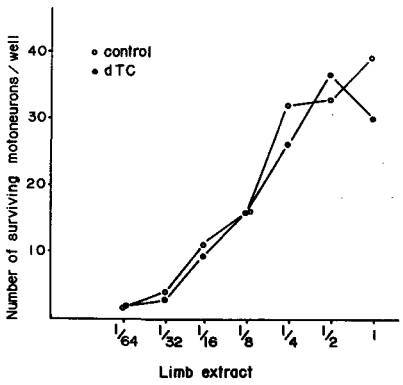


Fig. 2. stage 29-30 motoneuron の生存数と培養液に加えた筋抽出液量との関係．各点は 3-4 wells の平均.

Reference
1. Barbin,G., Manthorpe,M. & Varon,S. (1984) J.Neurochem. 43 1468-1478
2. Barde,Y.A., Edgar,D. & Thoenen,H. (1982) EMBO J. 1 549-553
3. Hamburger,V. (1958) Am.J.Anat. 102, 365-409
4. Hamburger,V. (1975) J.Comp.Neurol. 160 535-546
5. Hamburger,V. & Hamilton,H. (1951) J.Morphol. 88 49-92
6. Henderson,C.E., Huchet,M. & Changeux,J.P. (1983) Nature 302 609-611
7. Landmesser,L. & Szente,M. J. Physiol. (in press)
8. Nurcombe,V. et al. (1984) Brain Res. 291 19-28
9. Oppenheim,R.W. (1984) Dev.Biol. 101 35-39
10. Pittman,R. & Oppenheim,R.W. (1979) J.Comp.Neurol. 187 425-446
11. Purves,D. (1980) Nature 287 585

103. 神経成長因子の取り込み過程に対するK⁺の効果

小池達郎　（佐賀医大・化学）

〔要　約〕

PC12 Pheochromocytoma細胞を^{125}I-NGFを含むHepes-buffered saline、pH7.4中でincubation後、酸処理により表層膜結合性（surface bounded）の^{125}I-NGFを除き、細胞内に取り込まれた（internalized）^{125}I-NGFを測定すると、高K⁺溶液中ではNGFの取り込みが促進される事がわかった。細胞外液のK⁺濃度を変えると、30mM付近で190%、50mM付近で230%、100mM付近で190%の促進効果が見られた。正常又は高K⁺イオン存在下でのNGFの取り込みの濃度依存性を調べ、Scatchardプロットを行うと、高K⁺による取り込みの増加はuptake sitesに対するaffinity（0.6-0.8nM）の増加によるのではなく、みかけの取り込みの速度が速いこと（ほぼ2倍）によることが示された。この効果は、NGF処理して分化したPC12細胞でも見いだされたが、約30mMK⁺で154%と効果は低かった。

Key word：　Nerve Growth Factor, Internalization, K^+

神経成長因子(NGF)は，まず細胞膜上の受容体と結合し，receptor-mediated endocytosisにより細胞内に取り込まれ，その作用を発現する。NGFと交感神経節細胞やPC12細胞との特異的結合の解析から2種の親和能を持つ結合部位の存在が明らかにされている。一方、NGFの取り込み（Internalization）に関する知見は少ない。突起の成長に対する種々のイオンの効果[3]との関連から、PC12細胞においてNGFの結合と取り込みに対するイオン種の影響を調べると、高K⁺イオンがNGFの取り込みを促進することを見いだした。

［実験方法］

NGFの^{125}Iによる標識：マウス顎下腺からMobleyらの方法[5]で精製したNGFをEnzymo-Beeds(immunobilized glucose oxidase and lactoperoxidase)法によりヨウ素標識を行った(~2500cpm/fmole)。

^{125}I-NGFとPC12細胞の結合実験：既報[4]の様に培養したPC12細胞を35mmのdishに5x10^5／dishにまき、2日後、1%BSAを含むHepes-buffered saline溶液pH7.4中で1時間incubation後、30℃で1時間^{125}I-NGFと反応させた。反応後、dishを氷上で冷やし、salineで5回洗った。非特異的結合は400~1000倍のcoldのNGF存在下での結合量から見積もった。高K⁺溶液での反応は20分間preincubationした後、同様に行った。

取り込み量の見積り：細胞表面に結合したホルモンは酸処理[4]により放出されることから、結合量と取り込み量を区別した。実際にはOlefskyとKaoの方法[6]によりpH3.0のbufferで氷冷中6分処理した後、アルカリで細胞を可溶化し、取り込み量とした。蛋白定量はBradfordの方法により定量した。

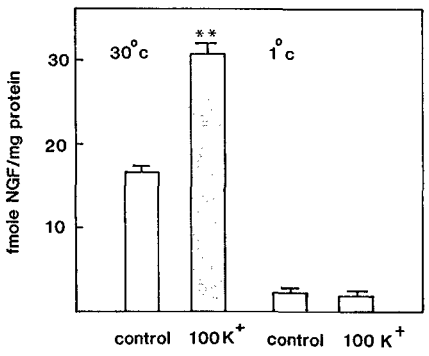


図１　取り込みの温度依存性

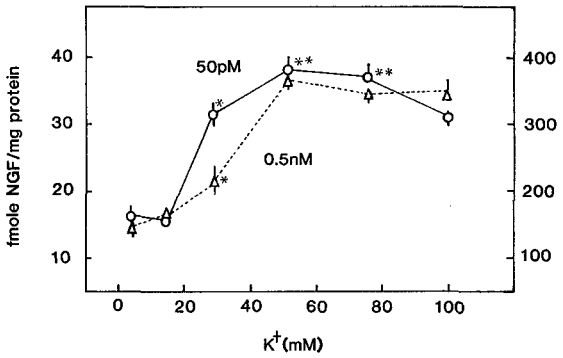


図２　NGFの取り込みの細胞外液K⁺濃度依存性

［結果と考察］

高K⁺溶液による^{125}I-NGFの取り込みの促進：PC12細胞を^{125}I-NGFを含むHepes-buffered saline中でincubation後、酸処理により表層膜結合性分画を除き、細胞内に取り込まれた分画を測定すると、高K⁺溶液中では取り込みが促進される事がわかった（図１）。取り込みの過程は温度に強く依存することが知られている。図１に示した様に低温では取り込みは約90%阻害され、高K⁺による促進も見られない。細胞外液の濃度を変えると、30mM付近で190%、50mM付近で230%、100mM付近で190%の促進効果が見られた（図２）。この取り込みの促進に対するK⁺濃度依存性は50pM及び500pMのNGF濃度でほぼ同様であった。このことは高K⁺イオンの存在によるNGFの取り込みの増加のhalf-saturationはほぼ同じNGF濃度で起こることを示唆する。この事を確かめるために、対照と高K⁺イオン存在下でのNGFの取り込みの濃度依存性を調べ、Scatchardプロットをとった。図３に示すように高K⁺による取り込みの増加はuptake sitesに対するaffinity（0.6-0.8nM）の増加によるのではなく、みかけの取り込みの速度が速いこと（ほぼ２倍）によることが示された。NGFの取り込みの増加は脱分極剤であるveratridine（10-100uM）によっても引き起こされた。

NGF処理したPC12細胞におけるNGFの取り込みとK⁺イオンの効果：PC12細胞を５日間、50ng/mlのNGFで処理し突起が十分形成された状態でNGFの取り込みに対するK⁺イオンの効果を調べた。NGF処理すると^{125}I-NGFの取り込みは増加する（文献1及び図2、4）。図4に示す様に高K⁺イオンの効果はやや小さくなった（30mMで154%、50mMで126%であった）が、濃度依存性では30mMのK⁺濃度で最大となり、以後効果は小さくなった。この高K⁺イオンによるNGFの取り込みの増加はNGF濃度が50pM（図4）でも0.5nM（図5）でも起り、未処理のPC12細胞と同様であった。

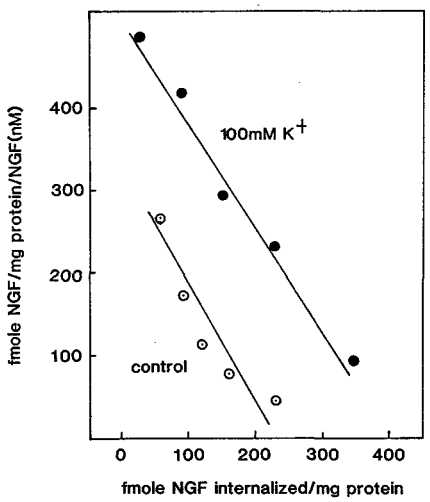


図４　^{125}I-NGFの取り込みのScatchardプロット

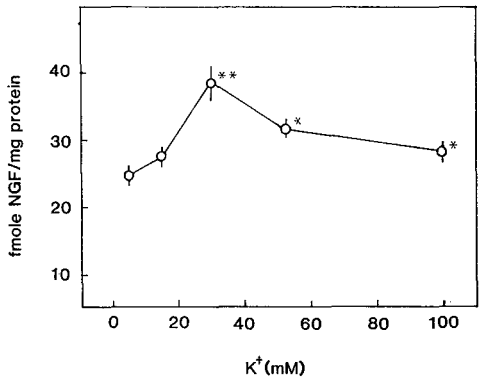


図4　NGF処理したPC12細胞のNGFの取り込みに対する細胞外液のK⁺イオンの効果（50pM NGF）

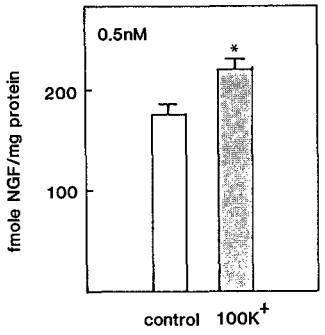


図5　0.5nM NGF濃度におけるNGFの取り込みに対するK⁺イオンの効果

高K⁺イオンを含む培養液は初代培養系に使われ、神経細胞の生存と成熟を促すと考えられている。Schubertら[7]によると脱分極剤はNGFと同様に細胞と基質との接着を促進することによって突起の成長を促すと主張している。NGFと高K⁺との間にはその神経細胞の生存にかんして互換性があるという[8]。しかし、高K⁺の効果についてはまだ不明な点が多い。高K⁺によるNGFの取り込みの増加がはたして役割を果たしてうるのか、細胞に対する生理学的な効果の有無を調べる必要がある。

［文献］

1. P.Bernd and L.A. Greene: J.Biol.Chem.,259,15509-15516(1984)
2. H.T.Haigler et al.: J.Biol.Chem.,255,1239-1241(1980)
3. T.Koike: Brain Res.,289,293-303(1983)
4. T.Koike and A.Takashima: J. Neurochem.,46,1493-1500(1986)
5. W.C.Mobley et al.: Biochem.,15,5543-5551(1976)
6. J.M.Olefsky and M.Kao: J.Biol.Chem.,257,8667-8673(1982)
7. D.Schubert et al.: Nature,273,718-723(1978)
8. A.R.Wakede and H.Thoenen:Neurosci. Lett.,45,71-74(1984)

104. グリア細胞成長因子（GMF）によるグリア芽細胞の形態分化誘導：細胞骨格に作用する薬剤の影響

田中　亮・伊藤仁一・加藤泰治
（名古屋市大・医・生化第一）

〔要　約〕

グリア細胞成長因子（ＧＭＦ）で刺激されたグリア芽細胞の形態分化を間接螢光抗体法により、細胞骨格の変化と関連して検討した。グリア芽細胞内アクチンは多数のアクチンケーブルとして一方向性に存在した。ＧＭＦでアストロサイト様形態に分化させると多くのアクチンケーブルは消失し、代わって細胞膜裏打ちタンパクとして再構成された。ＧＭＦによるグリア芽細胞の形態分化はコルヒチンやタキソールにより阻害されたが、細胞内アクチンは形態分化した状態と同様多くのアクチンケーブルが消失し細胞膜裏打ちを形成した。またＧＭＦの形態分化誘導作用はサイトカラシンＤによりさらに促進され、アクチンケーブルも消失した。このようにＧＭＦにはアクチン脱重合作用がありグリア芽細胞の形態分化にはアクチンの脱重合が関与していることが示唆された。一方、ＧＦＡＰはグリア芽細胞内ではネットワークを形成しているが、ＧＭＦで分化した細胞ではbundle化し、グリア突起内にも太いbundleが形成された。このＧＦＡＰのbundle化はコルヒチンやタキソールで阻害された。これらの事実により、グリア芽細胞の形態分化は微小管により調節され、さらにＧＦＡＰのbundle形成が関与していることが示唆された。

Key word：glia maturation factor (GMF), cytoskeleton, morphological differentiation,

グリア細胞成長因子(GMF)はグリア芽細胞のＤＮＡ合成、細胞分裂を促進し、さらにグリア突起の伸張したアストロサイト様形態に分化誘導する。ＧＭＦで形態分化したグリア芽細胞はアストロサイトに特異的なＧＦＡＰ含量が上昇し、ＧＦＡＰの細胞内変化がグリア芽細胞の形態分化に関与していることが示唆された。またGoldmanらはアストロサイトの細胞骨格は主にビメンチン、ＧＦＡＰ．アクチンから成り、dBcAMPによってアクチン含量が減少し、中間径フィラメントを構成するＧＦＡＰとビメンチン含量が上昇することを報告した。[1]私たちは今回、細胞骨格に作用する薬剤（コルヒチン、サイトカラシンＤ．ファロイジン、タキソール）の存在下、非存在下で、ＧＭＦで誘導されるグリア芽細胞の形態分化の変化を間接螢光抗体法を用いて検討し、さらにdBcAMPで誘導される形態分化をあわせて比較検討した。

〔実験方法〕

1. グリア芽細胞の培養：在胎17日目のラット胎児大脳を初大培養し、さらに二次培養（10％ＦＣＳ／Ｆ－10培地）した。[2]

2. ＧＭＦ活性：ＧＭＦは、成牛大脳抽出液を100%エタノール処理、DEAE-Sephacel, Bio-Gel P-200で部分精製した[3]。ＧＭＦ活性はグリア芽細胞の^{3}Hーチミジン取り込み促進能と形態分化誘導能を指標にした。

3. グリア芽細胞の形態分化

i) GMFによる形態分化：二次培養したグリア芽細胞を２％ＮＢＳ／Ｆ－10培地で置換後ＧＭＦで刺激し、24時間培養した。再び24時間後２％ＮＢＳ／Ｆ－10で培地交換し、ＧＭＦで再刺激し、初回ＧＭＦ刺激後48時間で形態分化を観察した。細胞骨格に作用す

る薬剤(ファロイジン(10 μg/ml)、タキソール(1 μg/ml)、コルヒチン(10^{-9}M～50μM)、サイトカラシンD(0.4～2μM))は形態分化観察前3時間に添加した。ファロイジンは、リゾレシチン(20 μg/ml) 37℃ 2 minの前処理の後に用いた。

ii) dBcAMPによる形態分化：2%NBS/F－10で培地交換し、24時間後各種薬剤と同時にdBcAMP(1～4mM)投与し、3時間後の形態分化を観察した。

3. 間接螢光抗体法

カバーグラス上で培養したグリア芽細胞をformyl alcoholで固定後、3% Tween 80で室温1分間処理した。各種抗血清(抗チューブリン、抗GFAP)で37℃ 30分間反応させた。2次抗体はFITC結合ヒツジ抗ウサギIgGを用いた。またアクチンは3.7% ホルマリンで細胞を固定後、アセトン(－20℃)で5分脱水し、NBD－ファラシジンで37℃ 30分間染色した。

〔結果および考察〕

グリア芽細胞はGMF刺激により30時間以降にアストロサイト様形態に分化する(Fig. 1)。この形態分化は微小管脱重合剤コルヒチン(50μM)により完全に阻害され、アクチンフィラメント脱重合剤のサイトカラシンD(1μM)は形態分化を著しく促進した。しかしF－アクチンと結合するファロイジン(10 μg/ml)は形態分化を阻害しなかった。一方、dBcAMP(2mM)によってもグリア芽細胞は刺激後2時間以降に形態分化が誘導される。このdBcAMP依存性形態分化もGMF刺激の場合と同じく、コルヒチン(50μM)により阻害され、2μMサイトカラシンDにより促進されたが低濃度(1μM)では促進されず、GMF－誘導形態分化に比べサイトカラシンDの分化促進

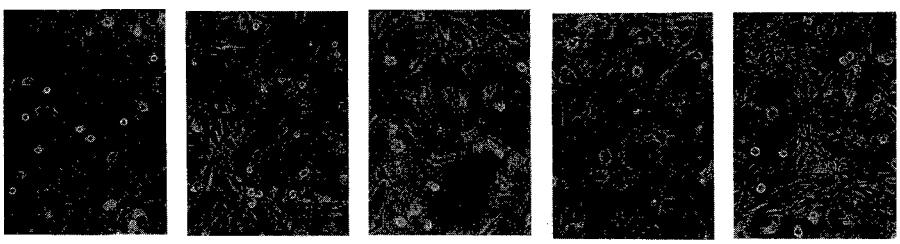
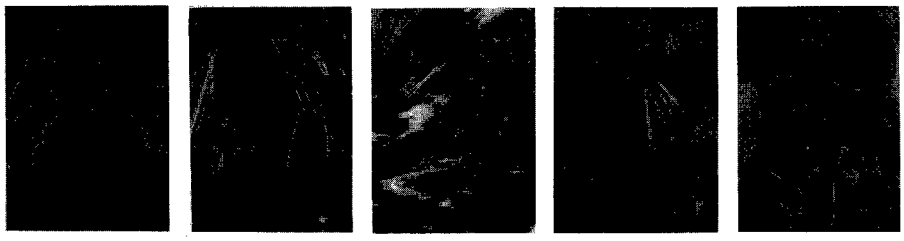


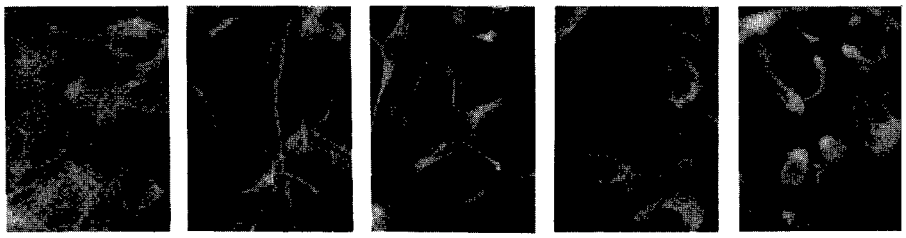
Fig. 1 EFFECTS OF DRUGS ON GLIAL MORPHOLOGICAL DIFFERENTIATION INDUCED BY GMF

能も低かった。またファロイジンは形態分化を阻害した。これらの事実から、GMFおよびdBcAMPにより誘導される形態分化はアクチンフィラメントの脱重合により促進され、微小管重合に依存することが示唆された。アクチンフィラメントの脱重合がGMF－誘導形態分化に寄与することを確認する為に、NBD－ファラシジンによるアクチンフィラメントの染色を行なった(Fig. 2)。Fig. 2に示したようにコントロール細胞ではアクチンケーブルは一方向に向かって存在した。これにGMFを作用させ形態分化させると、多数のアクチンケーブルは消失し代わって細胞膜裏打ち構造に変化した。GMFによる形態分化を促進したサイトカラシンDはアクチンフィラメントの脱重合を促進し、細胞膜の裏打ち形成も観察されなかった。このことからGMFはアクチンフィラメントの脱重合を促進して形態分化を誘導することが確認された。



CONTROL　　GMF　　GMF + CYTOCHALASIN D　　GMF + COLCHICINE　　GMF + TAXOL

Fig. 2　INDIRECT FLUORESCENCE STAINING OF GMF-TREATED GLIOBLASTS USING NBD-PHALLACIDIN



CONTROL　　GMF　　GMF + CYTOCHALASIN D　　GMF + COLCHICINE　　GMF + TAXOL

Fig. 3　INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE STAINING OF GMF-TREATED GLIOBLASTS USING anti-GFAP

しかしながら、ＧＭＦで誘導される形態分化がコルヒチンやタキソールで阻害された時、細胞内アクチンケーブルが消失しており、グリア芽細胞の脱形態分化がアクチンフィラメントの重合（アクチンケーブルの再構築）に必ずしも依存するものではないことを示した。一方ＧＦＡＰはコントロール細胞ではネットワークを形成しているがＧＭＦで分化した細胞ではbundleを形成し、グリア突起内にも太いＧＦＡＰのbundleが見られた。このＧＦＡＰbundleはコルヒチンにより阻害されることからグリア芽細胞の形態分化はＧＦＡＰのbundle形成にも依存することが示唆された。さらにＧＦＡＰのbundleはタキソールによっても阻害されることから、グリア芽細胞の形態分化は動的な微小管構造により調節されている可能性が示された。

〔文献〕

1). Goldman, J. et al. (1984), Brain Res., 306, 85－95
2). Kato, T. et al. (1984), Brain Res., 301, 83－93
3). Kato, T. et al. (1981), Brain Res., 212, 393－402

105. 神経成長因子の合成促進効果におけるカテコーラミンの構造特異性

古川美子・古川昭栄・里吉栄二郎・池田典秋*
林　恭三**
（国立神経センター・免疫，三井製薬・生物科学研*，岐阜薬大・薬剤**）

〔要　約〕

マウス L-M細胞は、神経成長因子（NGF)を合成し速やかに細胞外に分泌するが、培養液にカテコーラミンを加えるとNGF合成量が増大する。カテコーラミンと類似した構造を持つ種々の化合物を加えて培養し、24時間後、培養上清中のNGF量を酵素免疫測定法（EIA)で測定することにより、カテコーラミンの構造と活性の関係を調べた。その結果、ベンゼン環3位の水酸基が水素基やメトキシ基に置き代ると全く活性がないこと、カテコール（o-ジハイドロキシベンゼン）には弱いながら活性があるが、レゾルシノール（m-ジハイドロキシベンゼン）やハイドロキノン（p-ジハイドロキシベンゼン）には活性がないこと、側鎖に2つの飽和炭素をもつ3,4-ジハイドロキシフェニル誘導体は、調べた限り全て強い活性を示すが、飽和炭素の数が少なくなるにつれ活性が低下すること、などが明らかになった。これらの結果から、カテコーラミンのNGF合成促進活性にはカテコール環が必須であり、脂肪族側鎖がその活性を増強していることが示唆された。

Key word：　Nerve growth factor, Catecholamine, L-M cell

神経成長因子（NGF）は、知覚および交感神経細胞の分化、成長、機能維持に必須な分子量26,500のタンパクであり、交感神経支配臓器で合成されていることが証明されつつある（1,2)。演者らはすでに、マウス各種臓器より単離した線維芽細胞がNGFを合成分泌すること（3,4)、株化線維芽細胞であるマウスL-M細胞（5)、　L929細胞、Balb/3T3細胞がNGFを合成分泌することを明らかにし、このことから、交感神経支配臓器におけるNGF合成の場は線維芽細胞であろうと推定している。さらに、線維芽細胞の培養液にカテコーラミンを加えると、分泌されるNGF量が増加する現象を見出した（5)ので、詳細に検討した。

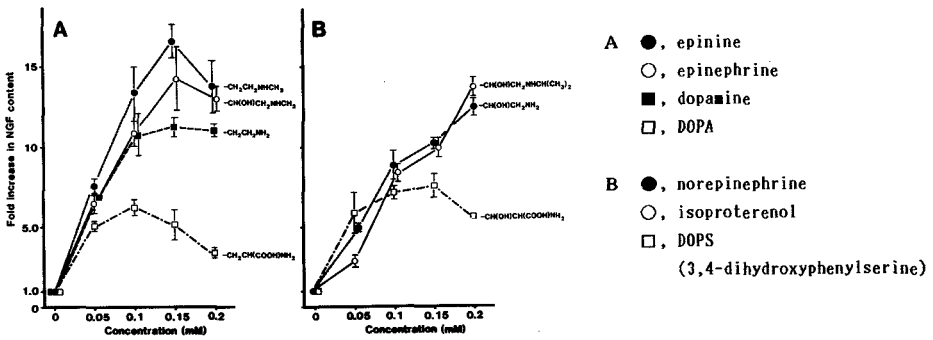
［実験方法］

L-M細胞は、0.5%ペプトンを含む199培地で培養した。カテコーラミンや他の化合物の効果を調べる時には、細胞密度が 2-4 x 10^4 cells/cm^2となるように24穴培養皿に植えた。約3日間培養した後、0.5%ウシ血清アルブミンを含む199培地に化合物を加え、さらに24時間培養した。　24時間後に培養上清を集め、演者らの開発したtwo-site EIA法(6) で NGF量を測定した。

［結果と考察］

L-M細胞の培養液に種々のカテコーラミンあるいはその類似化合物を 0.05-0.2 mM加えると、培養上清中の NGF量が顕著に増加した（図1）。この現象は、1)4時間のlag timeの後に認められること、2)タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドで抑

図1　カテコーラミン及び類似化合物によるマウス L-M細胞における NGF合成の促進



えられること、3)その間に[^{3}H]ロイシン取り込み量、すなわちタンパク合成能にほとんど差がないこと、4) NGFの性質に変化は見られないこと、などから、カテコーラミンを加えることにより NGF合成が特異的に増加した結果と考えられた。カテコーラミンの3-デオキシ前駆体（シネフリン、オクトオパミン、チラミン）や、3-メトキシ代謝物（メタネフリン、ノルメタネフリン、3-メトキシチラミン）にはこのような効果はなかった（5)。そこで、NGF合成促進効果にカテコール環が必須ではないかと考え、以下、カテコーラミンの構造と NGF合成促進効果との関係を調べた。

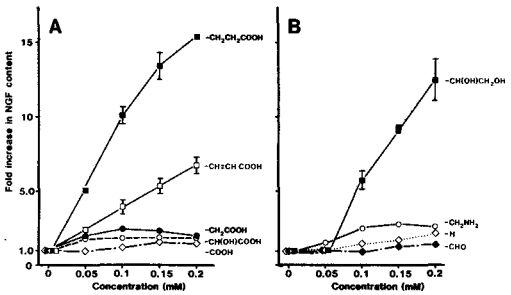
まず、培養液中にピロカテコール（カテコール）、レゾルシノール、ハイドロキノン、2,3-ジハイドロキシピリジン、2,3-ジハイドロキシナフタレンを0.1 mMあるいは0.2 mM加えた。その結果、ピロカテコールにのみ NGF合成促進効果が認められ、（表1）、カテコール環が必須であることが確認された。

表1　ピロカテコール及び類似化合物の NGF合成に及ぼす効果

Treatment		Structure	-Fold increase in NGF content
None (control)			1.00 ± 0.07
Pyrocatechol	0.1 mM	HO-, HO-	2.01 ± 0.09
	0.2 mM		2.31 ± 0.38
Resorcinol	0.1 mM	OH, HO-	0.96 ± 0.02
	0.2 mM		1.16 ± 0.07
Hydroquinone	0.1 mM	-OH, HO-	1.47 ± 0.35
	0.2 mM		0.46 ± 0.22
2,3-Dihydroxypyridine	0.1 mM	HO-, HO-, N	1.16 ± 0.14
	0.2 mM		1.44 ± 0.05
2,3-Dihydroxynaphtalene	0.1 mM	HO-, HO-	0.85 ± 0.12
	0.2 mM		0.69 ± 0.08

次に、カテコーラミン以外の3,4-ジハイドロキシフェニル化合物について調べてみた。その結果、側鎖末端のアミノ基がカルボキシル基やハイドロキシル基に置き代っている3,4-ジハイドロキシフェニルプロピオン酸や、3,4-ジハイドロキシフェニルグリコールにもカテコーラミンと同程度の強い効果のあることが明らかとなった（図2）。両性イオンを持つDOPA（3,4-ジハイドロキシフェニルアラニン）やDOPS（3,4-ジハイドロキシフェニルセリン）は、カテコーラミンよりやや弱い効果を示した（図1）。これらの結果から、側鎖末端のアミノ基は、カテコーラミンの NGF合成促進効果にあまり重要な働きをしていないものと考えられた。また、側鎖上に炭素－炭素二重結合をもつ3,4-ジハイドロキシフェニルケイ皮酸の効果はやや弱いこと、飽和炭化水素が1つの化合物（3,4-ジハイドロキシフェニル酢酸、3,4-ジハイドロキシマンデル酸、3,4-ジハイドロキシベンジルアミン）では効果が著しく減少し、0の化合物（3,4-ジハイドロキシベンジル酸、3,4-ジハイドロキシベンジルアミン）ではさらに減少することが明らかになった（図2）。このこ

図2　3,4-ジハイドロキシフェニル誘導体による NGF合成の促進



A　■, 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid
□, 3,4-dihydroxycinnamic acid
●, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid
○, 3,4-dihydroxymandelic acid
◇, 3,4-dihydroxybenzoic acid

B　■, 3,4-dihydroxyphenylglycol
○, 3,4-dihydroxybenzylamine
◆, 3,4-dihydroxybenzaldehyde
◇, pyrocatechol

とから、カテコーラミンの NGF合成促進効果は、カテコール環に基くものであり、脂肪族側鎖はこの効果を増強していることが示唆された。さらに、 D体、 L体、 DL体のイソプロテレノールの効果に差は見られず、カテコーラミンの効果に立体特異性のないことも明らかになった。

演者らは、すでに、カテコーラミンの NGF合成促進効果はアドレナージック・レセプターを介していないらしいという知見を得ており（５）、カテコーラミンが細胞に取り込まれて作用を発現しているのではないかと推測している。今回報告した側鎖の構造による効果の差は、脂肪族側鎖が取り込みに大きく関係しているためではないかと考えられ、今後検討する予定である。なお、神経末端におけるノルエピネフリンの濃度は極めて高いものと考えられ（５）、ノルエピネフリンが実際に生体内で NGF合成に影響を及ぼしている可能性は充分あると考えられる。このことが確認されれば、神経細胞が自身の生存、機能維持に必要な因子の合成を制御していることになり、極めて興味深い知見である。

［文献］

1. Shelton,D.L. and Reichardt,L.F.(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 81,7951-7955
2. Heumann,R., Korsching,S., Scott,J. and Thoenen,H.(1984) EMBO J. 3,3183-3189
3. Furukawa,Y., Furukawa,S., Satoyoshi,E. and Hayashi,K.(1984) J.Biol.Chem. 259,1259-1264
4. Hayashi,K., Furukawa,Y., Furukawa,S. and Satoyoshi,E. (1985) National Products and Biological Activities(Imura,H. et al eds.) pp.251-261
5. Furukawa,Y., Furukawa,S., Satoyoshi,E. and Hayashi,K. (1986) J.Biol.Chem. 261,6039-6047
6. Furukawa,S., Kamo,I., Furukawa,Y., Akazawa,S., Satoyoshi,E., Itoh,K. and Hayashi,K. (1983) J.Neurochem. 40, 734-744

106. 神経突起伸展因子のモノクローナル抗体とエラステース抵抗性フラグメントについて

林要喜知・谷浦秀夫・三木直正　（金沢大・がん研・薬理）

〔要　約〕

培養末梢神経細胞に働く神経突起伸展因子（ＮＯＦ）を認識するモノクロナル抗体を作製（神経化学　Vol.24,472-474,1985）し、それらのエピトープを含むプロテアーゼ抵抗性フラグメントの性質を調べた。

１）ＮＯＦにエラステース処理を施し、140KDaフラグメント（ダブレット）を得た。このフラグメントは、ヘパリンに対する結合能を保持していた。

２）140KDaフラグメントと反応するモノクロナル抗体をウエスタンブロット法により選び出した（N-1H,4-2C,X-1,M1-2G と名付けた）。これらが認識するエピトープは、ヘパリン結合ドメインそのものではなく、その近傍にあると考えられた。

３）140KDaフラグメントを単離し、マウスでその抗血清を作製した。この抗血清はＮＯＦの生物活性を抑制しなかったが、ニワトリ胚後根神経節単離細胞によるＮＯＦへの結合を用量依存的に阻害した。

以上のことより、ヘパリン結合ドメインを含む140KDaフラグメントには、少なくとも細胞結合ドメインの一部を含むが、突起伸展活性ドメインは含まれていないと推察された。

Key word：　Neurite outgrowth factor,　Heparin-binding domain,　Monoclonal antibodies

最近、培養末梢神経細胞の突起伸展を著名に誘導する生体内因子で、フィブロネクチン（FN）とは異なる蛋白質が精製された[1)3)]。これらは、ラミニンないしはラミニンファミリーに属するマトリクス糖蛋白質であることが明らかとなり、しかもそれらの存在様式が多様であることが示唆されている。我々も、先にニワトリ砂嚢平滑筋に存在する神経突起伸展因子（ＮＯＦ）を精製し、ラミニンとの類似性を示した[6)]。また、ＮＯＦに対する抗血清およびモノクロナル抗体を用いた免疫化学、組織化学的検索を行った[5)]。今回は、いくつかのモノクロナルを用い、それらが認識するＮＯＦフラグメントの性質を調べたので報告する。

〔方法〕

ＮＯＦは、成体ニワトリ砂嚢抽出液より精製し、抗ＮＯＦモノクロナル抗体の作製に供した。ウエスタンブロット法は、Towbinらの方法に従った[8)]。ＮＯＦのエラステース処理は基質対酵素比を30対1の割合にして、50mM NH_4HCO_3（あるいはPBS(-)）溶液中で37℃、24時間反応させ、2mM PMSFで反応を停止させた。フラグメントの精製は、HPLCゲル過（SW 400,東洋ソーダ）およびヘパリンセファロースカラムにて行った。抗血清の作製は、約100μgフラグメント蛋白質を、フロイント完全アジュバントと共にBALB/cマウス腹腔内に反復免疫して得た。抗血清によるＮＯＦ活性の吸着、阻害アセッセイは、既報に従った[6)]。ＮＯＦへの、ニワトリ胚（10日齢）後根神経節単離細胞の結合実験は、Timpleらの方法に従った[7)]。

〔結果と考察〕

これまでにＮＯＦに対するモノクロナル抗体を幾つか作製してきた。これらの中に

は、ＮＯＦの生物活性を阻害するものはなかったが、ニューロンによるＮＯＦへの結合を部分的に阻害するモノクロナル抗体があった。そこで、これらの抗体が認識するフラグメントの性質を調べるため、まず、ＮＯＦにプロテアーゼ処理を施した。Concanavalin A-Sepharoseカラムにより分離したＮＯＦ（80％純度）にエラステース処理を施し、分解パターンを時間経過を追って調べた（図１）。酵素処理を長くすると、140KDaフラグメント（ダブレット蛋白質）の蓄積が観察された。

一方、酵素処理フラグメントをヘパリンセファロースカラムにかけると、この140KDaフラグメントが吸着することが判った。細胞結合を部分的に阻害するモノクロナル抗体が140KDaフラグメントと反応するか否かを調べるため、変性抗原とでもよく反応するモノクロナル抗体を選びだし、プロテアーゼ分解産物を用いてウエスタンブロットを行った（図２）。どれも同じような認識をしたが、N-1H,4-2C,X-1およびM1-2Gは140KDaフラグメントと反応することが判った。これら４つの抗体は、互いに反応する低分子フラグメントのパターンが異なること、さらには、ヘパリンカラムで未吸着分画に回収される低分子フラグメントと反応することより４つのモノクロナル抗体は、ヘパリン結合ドメインの近傍にある異なるエピトープを認識していると考えられた。また140KDaフラグメントは、ニューロンに対する結合ドメインを含むことが示唆されるので、次に140KDaフラグメントをHPLC ゲルロ過あるいはヘパリンカラムにて精製した。その後、このフラグメントに対する抗血清を作製し、そのＮＯＦの生物活性および細胞結合に及ぼす効果を調べた。抗140KDaフラグメント血清は、ＮＯＦ分子を吸着した（図３－Ｂ）が、生物活性は全く阻害しなかった（図３－Ａ）。しかし、ニワトリ胚後根神経節単離細胞のＮＯＦ結合を用量依存的に阻害した（図３－Ｃ）。

ヘパリン結合ドメインを含むフラグメントに関しては、ラミニンでは突起伸展活性が存在し[4]、N-CAM [2]やFNなどでは、細胞結合活性が存在することが知られて

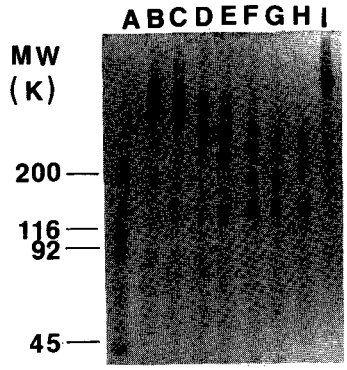


図１、エラステース処理によるＮＯＦ分解の経時的変化
Ａ；マーカー、
Ｂ；エラステース処理 0.5h、
Ｃ；1h，Ｄ；2h，Ｅ；4h，
Ｆ；8h，Ｇ；16h，Ｈ；24h，
Ｉ；0h

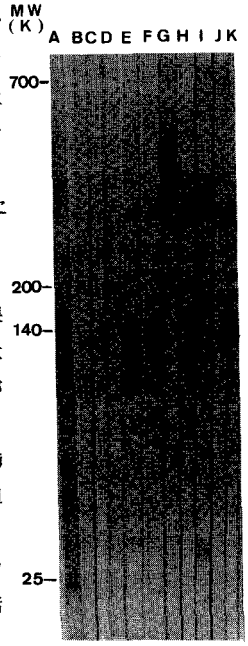


図２、エラステース処理(24h)ＮＯＦサンプルに対するウエスタンブロット

Ａ；アミドブラック染色、
Ｂ；ミエローマ(SP-2)CM、
Ｃ；モノクロナル抗体(8-4A)、
Ｄ；モノクロナル抗体(N-1G)、
Ｅ；モノクロナル抗体(N-1H)、
Ｆ；モノクロナル抗体(4-2C)、
Ｇ；モノクロナル抗体(1-4D)、
Ｈ；モノクロナル抗体(X-1)、
Ｉ；モノクロナル抗体(5-10A)、
Ｊ；モノクロナル抗体(5-4F)、
Ｋ；モノクロナル抗体(M1-2G)

いる。NOFの諸性質は、N-CAMやFNよりは、よりラミニンに近い分子と考えられるが、本実験よりNOFのヘパリン結合領域を含む140KDaフラグメントには、少なくとも細胞結合ドメインの一部が存在することが示されたが、突起伸展活性ドメインは含まれていないか、または、不完全な形でしか存在していないと推察された。細胞結合ドメインや突起伸展活性ドメインの性質や数、およびNOF分子上のこれらドメインの配列を調べるため、現在、活性ドメインを含む、より小さな蛋白質フラグメントの単離、解析を進めている。

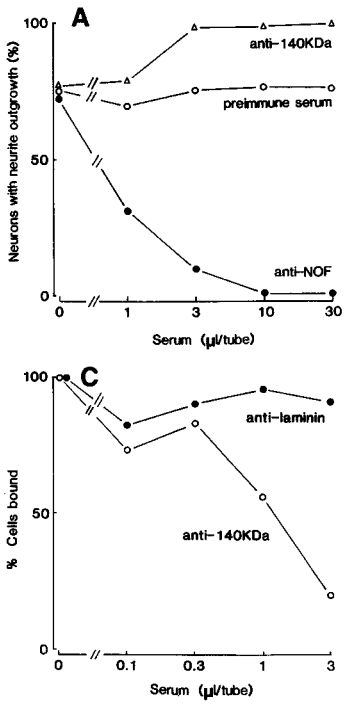


図3、抗140KDaフラグメント血清による、NOF生物活性(A)、NOF分子吸着(B)、及びNOFへの細胞結合(C)に及ぼす効果
(A)ポリオルニチン塗布培皿(φ6mm)に吸着させたNOF(1μg)を種々の量の血清で処理(37℃、12h)した。血清を除去後、CGニューロンを培養し、16h後にニューロンの突起伸展率を調べた。(B) NOF(5μg,1mg/ml(PBS(-))と種々の量の血清を遠心チューブ中で反応(37℃、12h)させ、PBS(-)を加えて300μlとした。その遠心上清30μl中に含まれるNOF活性を調べた。(C) NOF(20 μg)を培養皿に吸着させ、種々の量の血清で処理した。0.5%BSAを含む培養液(DMEM)に懸濁した細胞を加え、37℃、2h静置させた後、洗浄し、吸着細胞数を測定した。

〔 文献 〕

1) Arthur,D.et al.(1985) J.Cell Biol.,101,898-913
2) Cole,G.J.et al. (1986) J.Cell Biol.,102,403-412
3) Davis,G.E.et al.(1985) J.Neurosci.,5,2662-2671
4) Edgar,D.R.et al.(1984) EMBO J.3,1463-1468
5) 林 要喜知、三木直正 (1985) 神経化学、24、472-474
6) Hayashi,Y.and Miki,N. (1985) J.Biol.Chem.,260,14269-14278
7) Timple,R,et al. (1983) J.Biol.Chemi.,258,8922-8927
8) Towbin,H.et al.(1979) Proc Natl Acad Sci.U.S.A.,76,4350-4354

107. 脳のアミロイド

徳武　哲・田中喜久子・石井　毅　（都精神研・分子生物）

〔要　約〕

1．Alzheimer 病および老年痴呆症患者の剖検脳より老人斑(Senile Plaques: SP)，原線維変化(Neurofibrillay Tangles: NFT) およびアミロイド沈着血管(Amyloid Congophilic Angiopathy: ACA) を精製し，β-タンパク質を特異的に可溶化するエチレンジアミン－水酸化第二銅溶液(ED-Cu) に可溶化される成分をTSK Phenyl-5PWを用いた高速液クロにより分離し，そのアミノ酸組成を調べた．
2．その結果，分子量が4-5Kで類似のアミノ酸組成を持つ８つのピークが見出された．さらにSP，NFT およびACA を調製する時，subtilisinやcollagenase 等による酵素分解をおこなわないと，H.W. 13K のGly, Ala, Glu が多い成分が見出された．この成分は，アミロイドの線維中心部の形成に関与している部分を含んでいるのではないかと推定された．
3．ED-Cu 溶液により可溶化された成分を用いモノクローナル抗体の作成を試みているが，現在までのところ，有効な抗体が得られていない．しかし，原発性アミロイドシスの脾臓より抽出したＡＬタンパク質を抗原として得られたモノクローナル抗体は，反応は余り強くなかったが，immunoblot法により，4-5Kタンパク質と反応するようにおもわれた．

Key word： Senile Plaques,　Amyloid,　Alzheimer's Disease

Alzheimer 病および老年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(ACA) 等が見られる．これらの変性組織は，アミロイド組織を良く染色するCongo red により染色され，偏光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推測されている．ここ10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H.W. 10K-50K のいくつかのグループのアミロイドタンパク質の構造が明らかになっており(3)，SPやNFT の構造蛋白質に対する興味が大きくなってきており，ある成分については化学構造が明らかになってきている(4-8,10)，SPやNFT に対する研究の困難な点は，それらが体中のアミロイドにくらべ非常に難溶性であるということである．従って，SPやNFT を可溶化する為には，尿素，SDS やギ酸による可溶化法が試みられているが，本実験では，β-構造蛋白質を特異的に可溶化するエチレンジアミン－水酸化第二銅溶液(ED-Cu) による可溶化を試みたので，それにより可溶化された成分の化学的性質について報告する．

［実験法］

(1) SP, NFT およびACA の調製　　Alzheimer 病により死亡した患者の剖検脳(-70°Cに保存したもの) 5 g を取り，これに10mM NaH_2PO_4-1mM EDTA-0.85M sucrose, pH 6.8 のbuffer 25 mlをくわえポリトロンを用いホモジナイズし，日立RPR 20-2のローターで15000 rpm, 15 min 遠心した．沈澱画分をさらに同量の 1.5M sucrose を含んだbufferでホモジナイズし遠心した．SP, NFT およびACA は細胞核とともに沈澱画分に含まれていた．従来の方法では(1,9)，subtilisinやcollagenase を用い細胞核の分解をおこなっていたがアミロイドタンパク質自体も多少は分解される危険があるので，これを省略し，次ぎの可溶化の操作に行った．

(2) ED-Cu 溶液による可溶化．　細胞核中の可溶性画分を除くため，まず8 M 尿素-1 % 2-ME 溶液2 mlで沈澱画分を処理し，不溶性画分を遠心により集めた．不溶性画分をさらに2 mlのED-Cu 溶液により処理し，遠心により不溶性物質を除いた．上清を酢酸で中和し，蒸留水に対し透析し，ED-Cu 試薬を除いた．試薬を透析により除くと可溶化された成分が再び不溶性となり沈澱してきたが，この沈澱は8 M 尿素溶液に速やかに可溶化されたのでゲル電気泳動や高速液クロによる分析を行うことができた．

(3) モノクローナル抗体の作成．　ED-Cu 溶液により可溶化された画分を用いてモノクローナル抗体の作成を試みているが，まだ有効な抗体は得られていない．しかし原発性アミロイドシスの脾臓より抽出したＡＬタンパク質を 0.1N NaOHで室温16時間処理したものを抗原として得られたモノクローナル抗体20-54-16-3L は大脳皮質のクリオスタット切片中の老人斑と，間接ペルオキシダーゼ法により特異的に反応することが確かめられたのでimmunoblot法による検索に用いた(2)．

［結　果］

(1) ED-Cu 溶液により可溶化された成分の高速液クロによる分離とアミノ酸組成　ED-Cu 溶液により可溶化された成分の高速液クロによる分離は ,TSK Phenyl-5PW(4X 100mm)により行った．溶出は 0.1 %トリフルオル酢酸(TFA) 溶液でアセトニトリルを20 %より80 %まで上昇させることにより行った．溶出パターンはFig. 1にしめしたが，９つのピークが見られた．各ピークを集めアミノ酸組成を調べたところPeak-3よりPeak-9までは類似したアミノ酸組成を示し，アミノ酸残基数は40－50であった．そのうち収量のおおいPeak-5と-8のアミノ酸組成をTable 1 に示した．これ等はすでにGlenner (4,5,10)やMasters (6) がAlzheimer 病やDown症患者の老人斑より，尿素やギ酸により抽出して得たアミロイドタンパク質の組成に類似している．これにたいし，Peak-2のアミノ酸組成やアミノ酸残基数は，他のpeakと異なりGly, Ala, Glu が多くM.W.は13k ぐらいであった．　またこのピークはSPやNFT 調製のとき酵素処理を行うと見出されなかった．

(2) ゲル電気泳動とImmunoblot　Fig. 2のlane-2はED-Cu 溶液により可溶化された画分のSDS-PAGEのパターンを示したものである．ゲルは10 %-20 % を用い，染色はCoommasie brilliant blueを用いた．M.W. 4K-10K ぐらいのところに数本の強いバンドが見られる．電気泳動では．この低分子量の成分しか見出されないが，ED-Cu 可溶化画分をSepharose-6Bでゲル濾過すると低分子量の成分の収量

Fig.1

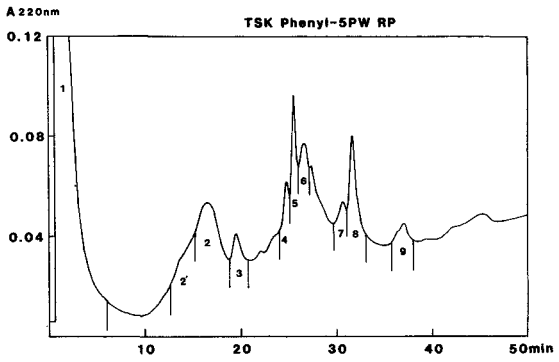


Table 1 AMINO ACID COMPOSITION OF AMYLOID PROTEIN OF SENILE PLAQUE

	Glenner		Masters	Tokutake (TSK Phenyl-5 PW RP)		
	β_1	β_2	AD/DS	Peak-2	Peak-5	Peak-8
Asp	3	3	4	6	3	3
Thr	1	1	(1)	4	2	3
Ser	2	2	3	6	4	3
Glu	4	3	5	13	4	6
Pro	0	0	(1)	5	1	1
Gly	5	5	6	38	4	4
Ala	2	2	4	11	4	5
$\frac{1}{2}$Cys	1	1	(1)			
Val	3	4	4	4	3	2
Met	1	1	1	1	1	1
Ile	1	1	2	3	2	2
Leu	2	2	3	6	3	5
Tyr	1	1	1	1	1	1
Phe	2	2	3	3	1	2
Lys	2	2	2	6	5	4
His	2	2	3	2	1	1
Arg	1	1	1	7	3	5
Total	33	33	45	121	42	48

は10 %以下でほとんどの成分はvoid volume の位置に溶出され，さらに高分子量の成分が可溶化されているものと推定された．Lane-3はモノクロナール抗体20-54-16-3L を用いてimmunoblotしたものである．反応は弱かったが，低分子量の成分と抗体の結合が見られたLane 1はマーカーとして用いたニューロフィラメント Triplet (200K, 160K, 68K) とミエリン塩基性タンパク質(20K) である．

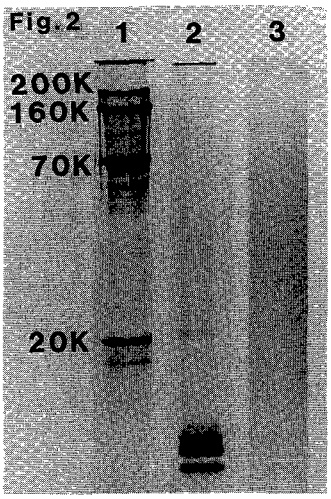
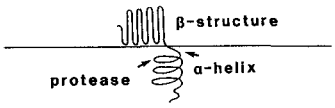


Fig.3 Amyloid Fibril



［考察］

本実験でAlzheimer 病患者剖検脳のSF, NFT およびCAC 分画よりED-Cu 溶液により可溶化されてきた成分のうち，M.W. 4-5Kの成分はすでにGlenner とMasters が報告している成分と本質的には同じであろう．Masters も類似したアミノ酸組成を持ち分子量が多少異なるいくつかの成分を得ている．これは，試料調製の時行う酵素消化の結果と考えられたので，本実験では酵素消化を省略したが，それでも低分子量成分の多様化が見られた．従ってこの部分分解は，死後脳中でendogenousなタンパク質分解酵素により生じたものかも知れない．しかし，ED-Cu 溶液により，さらに分子量が大きくGly, Ala, Gluが多い成分が得られたことは，Fig. 3に示すように，アミロイド原線維の中心部を形成する部分が可溶化された結果と思われ，現在一次構造の解析を進めている．

［謝　辞］

本実験に用たAlzheimer 病患者の剖検脳は，当研究所神経病理研究室の小阪憲司先生の御厚意によりいただいた．またモノクローナル抗体は都立大理学部生物化学研究室の篠田友孝先生と当研究所の佐藤鷹人博士により作られたものを使わせていただきました．先生方各位の御協力に感謝致します．

［文　献］

1. Allsop,D., Landon,M. and Kidd,M. (1983) Brain Research 259,348-352.
2. Ishii,T., Satoh,M., Haga,S. et al. (1986) Neuropathol.Appl.Neurobiol. (in press)
3. Glenner,G.G. (1980) N.Eng.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. Masters,C.L. et al. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 82,4245-4249.
7. Masters,C.L. et al. (1985) EMBO J. 4,2757-2763.
8. Selkoe,D.J. et al. (1986) J.Neurochem. 46,1820-1834.
9. 徳武哲，羽賀誠一，石井毅 (1985) 神経化学，24,367-369.
10. Wong,C.W., Quaranta,V. and Glenner,G.G. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 82,8729-8732 .

108. モルモット脳組織のクロマチンタンパクの分析

吉村和法・坂本　安・植村慶一　（埼玉医大・第一生理）

〔要　約〕

モルモットの脳（Ｂ）と肝臓（Ｌ）組織の核画分より、クロマチン画分を調製し、塩溶液に可溶性の、クロマチンに弱い結合をしたタンパク質を含む画分（Ｓ４）、強い結合をしたタンパク質を含む画分（Ｓ５、Ｓ６）、と不溶性の沈殿画分（Ｐ５、Ｐ６）およびそれらの細画分を得て、それらのタンパクを分析し、神経組織に特異的なクロマチンタンパク質（非ヒストン蛋白質）の検出、同定を試みた。１）ＢＳ４画分について、ＳＤＳポリアクリルアミド電気泳動法で分析した結果、比較的高分子量の特徴的タンパク質の存在する可能性が示唆された。その１細画分のＢＳ４－Ｔ２Ｓについて、逆相系のC-4 樹脂を用いた高速液クロによる分析の結果、保持時間の小さい特異的なピークが検出された。２）Ｐ６画分には、比較的低分子のヒストンタンパク質のバンドが多量に検出された。６Ｍ尿素溶液で抽出されるＳ６画分には、より高分子（40-50K）のタンパクの存在が推測された。ＢＳ６画分は、ＬＳ６画分に比較して、透析、濃縮後の可溶化が、極めて困難であったため、ＳＤＳ溶液による可溶化とゲルロ過ＨＰＬＣを行ない、さらにその溶出液を分取して分析した結果、 40-50K の特異性の高いタンパク群を分離、精製できる可能性が、示された。

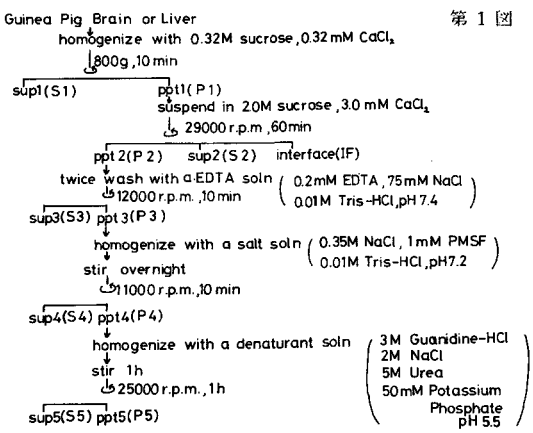
Key word：　chromatin　nonhistone proteins

真核生物のクロマチンはＤＮＡと一定量のヒストンと可変量の非ヒストン蛋白質と少量のＲＮＡからなっている。非ヒストン蛋白質は遺伝的転写の調節やクロマチンの高次構造をつかさどることに関係している高分子クラスとして注目されてきた（２、３）。高度に分化した神経機能の背景には、特異的な遺伝子が発現しているものと予想される。神経組織の非ヒストンタンパク質には、核分画に微量に存在し、ＤＮＡと密接な関係をもち、特異的な遺伝子の発現に関与するものがあると考えられる。最近の高速液クロ、シーケンスアナライザー、質量分析装置などの分析技術の進歩によって、神経組織の微量タンパク質の分析が、可能になりつつある。今回、モルモットの脳組織のクロマチンタンパク質について、分析を行ない、組織特異的な非ヒストンタンパク質の検出を試みたので、報告したい。

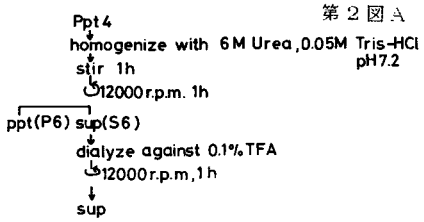
［実験方法］

脳組織より、細胞の核画分を調製する方法は、既報の方法（６）を改良した方法によった。　モルモットの脳

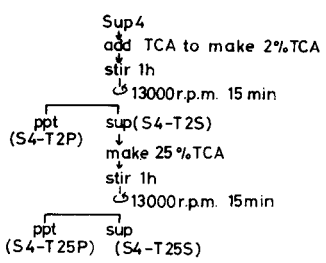
第１図



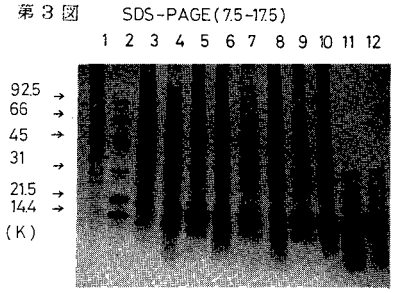
第２図Ａ



第２図Ｂ



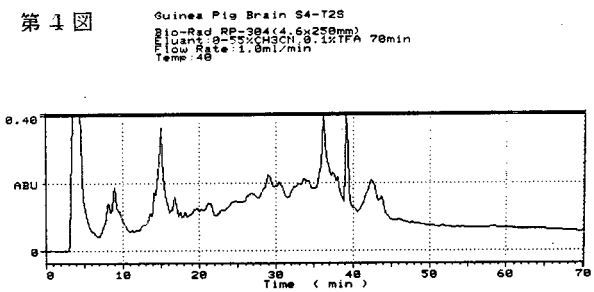
第３図



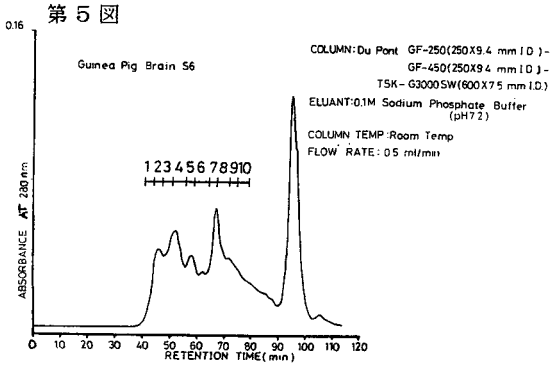
1 Marker Proteins
2 Marker Proteins
3 Brain S4
4 Liver S4
5 Brain P4
6 Liver P4
7 Brain S6
8 Liver S6
9 Brain P6
10 Liver P6
11 Calf Thymus Histones
12 Calf Thymus Histones

組織（Ｂ）を 0.32mM CaCl2 - 0.32M 蔗糖溶液中で、テフロンガラスホモゲナイザーにより、ホモゲナイズし、低速遠心(800gX10min)して、沈殿となる粗核画分（Ｐ１）を3mM CaCl2 - 2.0M蔗糖溶液中で、ホモゲナイズした後、65,000gX60min 超遠心して核画分（Ｐ２）を沈殿として得た。この画分は、神経細胞およびグリア細胞の核に富み、他の成分の混入の比較的少ない画分であることは、既に電顕により、形態学的に確かめた。Ｐ２画分より、ＥＤＴＡ緩衝液(0.2mM EDTA, 75mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.4)によって、２回洗浄して、可溶性タンパク質（Ｓ３）を除いて、Ｐ３画分を調製した。Ｐ３画分を、塩溶液(0.35M NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mMPMSF, 1%DMSO, pH 7.2)によって、クロマチンに弱い結合をしたタンパク質を含む画分（Ｓ４）を抽出し、さらにその沈殿（Ｐ４）より高濃度の変性剤溶液(2M NaCl, 3M Guanidine HCl, 5M Urea, 50mM Phosphate buffer、ｐＨ５．５）を用いて、抽出される強い結合をしたクロマチンタンパク質とＤＮＡをふくむ画分（Ｓ５）と不溶性の沈殿画分（Ｐ５）に分離した（第１図）。またＰ４画分より６MUrea－50mM Tris-HCl, pH 7.2 によって、Ｓ６画分を抽出した（第２図Ａ）。Ｓ４画分は、２％および２５％のトリクロル酢酸（ＴＣＡ）による段階的処理によって、それぞれに可溶性の画分をＴ２Ｓ、およびＴ２５Ｓとし、不溶性の画分をＴ２Ｐ、Ｔ２５Ｐとした（第２図Ｂ）。また比較のために肝臓組織（Ｌ）について、同様の操作を行ない、それぞれに相当する画分を得た。分画法の概要を、第１，２図に示した。ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ＳＤＳＰＡＧＥ）は、Laemmli の方法（４）によった。逆相高速液クロの分析条件はカラムはＢＩＯ－ＲＡＤ　ＲＰ－３０４（４．６ｘ２５０ｍｍ）、溶出液は 0-55%ACETONITRILE LINEAR GRADIENT (70min)　(温度）４０度、流速：1.0 ml/min で行なった。ＳＤＳ高速液クロの分析条件は、カラムはＤｕ Ｐｏｎｔ　ＧＦ－２５０（９．４Ｘ

第４図

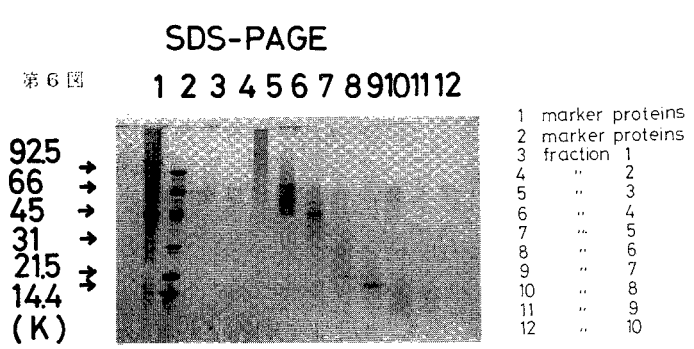


第５図



２５０mm）とＧＦ－４５０（９．４Ｘ２５０mm）とＴＳＫ－Ｇ３０００ＳＷ（７．５Ｘ６００mm）を連結して、溶出液は０．１Ｍ　リン酸緩衝液、１％ＳＤＳ　（温度）室温流速は０．５ml/minで行なった。［実験結果と考察］

第６図



脳と肝臓組織の各画分に含まれるタンパク質をＳＤＳＰＡＧＥで分析した結果を第３図に示した。塩溶液で抽出され、クロマチンと弱い結合をしていると考えられるＳ４画分について、脳（第３図３）と肝（第３図４）で比較すると、全体のパターンとしてかなりの差異があり、脳では特徴的な高分子量のタンパク質群が存在する可能性が示された。Ｓ４画分には、ＨＭＧタンパク群が含まれる事が知られている（５）ので、第２図に示したように細分画を行ない、ＳＤＳＰＡＧＥによって、分析した。その結果Ｓ４－Ｔ２Ｐ画分については、脳と肝組織の間で有意の差異は認められなかったが、ＢＳ４－Ｔ２Ｓ画分に神経組織に特異的な微量の高分子タンパク質の存在する可能性が示唆された。そこで、分画されたＳ４－Ｔ２Ｓ画分について、C-4 系の BIO-RAD RP-304 カラム（4.6X 250mm)による高速液クロによって、クロマチンタンパク質の分離を試みた。その結果を第４図に示した。この分析パターンで、Retention time　が３０分以上のピークは、ヒストンタンパク質に相当し、３０分以下のピークは、主に非ヒストンタンパク質に相当すると推定される。肝組織の同じ画分と比較すると、脳組織では素通りおよび保持時間が８－９分に出現するピークがともに大きいことが特徴的であった。これらについて、さらに分析を進める予定である。一方、Ｐ４およびＰ６画分（第３図５、６、９、１０）には、比較的低分子の標準ヒストンタンパク質群（Calf Thymus Histones）（第３図１１、１２）に一致するバンドが多量に検出された。６Ｍ尿素溶液で抽出されるＳ６画分には、ヒストンタンパク群とは異なった、より高分子（40-50K）のタンパクの存在が、ＳＤＳＰＡＧＥの結果より推測されたので、それらのタンパクのＨＰＬＣによる分析を試みた。ＢＳ６画分は、ＬＳ６画分に比較して、透析、濃縮後の可溶化が、極めて困難であったため、ＳＤＳ溶液による可溶化とゲル口過ＨＰＬＣを行なった（第５図）。さらに、その溶出液を分取して、ＳＤＳＰＡＧＥで分析した結果（第６図）、 40-50K のタンパク群は、４、５画分に濃縮されており、リサイクリング法などを効果的に用いることによって、これらを分離、精製できる可能性が、示された。今まで非ヒストンタンパク質はＤＮＡと高い親和性のために生理的条件下のイオン強度やｐＨでの水溶液中でヒストンやそれ自身と不溶性複合体を形成するので精製が困難であった（１）。今後、今回用いた方法を発展させ、神経組織に特異的な微量のクロマチンタンパク質について、さらに研究を進めてゆきたい。

［文献］１）Altieri,F.,Allegra,P.,Lonigro,I.R.,Scarpa,S & Caiafa,P.(1986)Eur.J.Biochem .154,147-152　２）Bloom,S.K & Anderson,N.J.(1978)J.Biol.Chem.253,4446-4450 ３）Caiafa,P.,Scarpati-Cioffari,R.M.,Altieri,F.,Allegra,P.,Lonnigra & Turano,C.(1981)Eur .J.Biochem.121,15-19　４）Goodwin,H.G.,Nicolas,H.R & Johns,W.E.(1975)Biochim.Biophys .Acta.405,280-291　５）Laemmli,U.K.(1970)Nature(London)227,680-685　６）Uyemura,K. ,Nakayama,T.,Kitamura,K.,Yamanaka,T & Hirano,S.(1974)J.Neurochem.23,65-70

109. 2種類のモノクロナール抗体と Biotin-Avidin system を用いたサンドイッチ法 ELISA による myelin-associated glycoprotein の定量

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

〔要　約〕

Myelin-associated glycoprotein(MAG) はミエリン蛋白の中では微量成分であるが、ミエリン形成や神経軸索との相互作用上重要な物質でありうると考えられている。最近、MAG と神経系のMAG 以外の物質、さらに免疫系など神経系以外の物質との共通抗原決定基の存在が報告され、特異的なMAG の定量法が必要と考えられた。ここではヒト脳のミエリンから精製したMAG に対するmonoclonal antibody(McAb) を作製し、その中からMAG の糖鎖に対する抗体、およびペプチドに対する抗体を用い、一方をビオチン化し、Biotin-Avidin systemを用いたサンドイッチ法ELISA のsystemによるMAG の定量法を確立した。固相化抗体の吸着にはMcAb,5μg protein/ml,4時間が至適であった。ビオチン化抗体濃度は 5μg/mlで充分であった。測定感度は 0.25ng/well=0.1mlであり、検量線は1ng まで直線として得られた。検体処理に用いられるSDS 濃度を検討したところ 0.05%以下ではELISA systemに影響のないことが確認された。MAG の含有量はヒト脳のミエリンでは 8.6ng／μg protein,大脳前頭葉白質homogenateでは 7.5 ± 1.2ng／μg ,脊髄homogenateでは 6.2± 1.3ng／μg であった。既報のradioimmunoassayに比べ10倍の高感度であり、経済性，安全性に優れているものと考えられた。

Key word：　myelin-associated glycoprotein, ELISA, biotin-avidin system

Myelin-associated glycoprotein(MAG) は中枢神経系(CNS) および末梢神経系(PNS) のいづれにも存在する分子量約100kDaの糖蛋白である。ミエリン蛋白の中では微量成分であるが、神経軸索周辺に局在することや、多発性硬化症患者脳にて他のミエリン蛋白よりも早期に減少することなどより、ミエリン形成やミエリンと神経系軸索との相互作用上、重要な役割を担っているであろうと考えられている。最近、多発性神経炎の末梢神経障害とIgM 型のM蛋白血症を有する患者にて、血中M蛋白が抗MAG 抗体であった症例が報告され、抗MAG 抗体が末梢神経障害に関与している可能性が示唆されている。またMAG はミエリン内のMAG 以外の糖蛋白や糖脂質，ミエリン以外の神経組織，およびnatural killer(NK)細胞などの免疫組織[1,2] 、さらに肺癌などの悪性腫瘍組織などと共通抗原決定基を有することが報告されており、それらの組織との関連にて複雑な様相を呈している。MAG の定量はJohnson らのradioimunoassay(RIA)による方法が報告されているが[3] 、共通抗原性の問題などを考慮すると、さらに特異的な方法が必要と思われた。我々はMAG に対するmonoclonal抗体(McAb)を得たが、それらの中にはMAG の糖鎖を認識するIgG およびIgM 抗体(IgG-CとIgM-C)とペプチドを認識するIgG 抗体(IgG-P) があった。ここではIgG-P とIgG-C の 2種類の抗MAG McAbを用い、Biotin-Avidin systemにてサンドイッチ法ELISA により高感度定量法を確立したので報告する。

［方法］

ミエリンはヒト脳白質よりNortonらの方法で精製し、MAG はミエリンよりlithium diiodosalicylate(LIS) - phenol法にて部分精製し(LIS-MAG),McAb作製のための抗原に用いた。定量のための標準としてはLIS-MAG をさらにSepharose CL-6B にてゲル濾過して用いた。MAG のdeglycosilation はtrifluoromethanesulfonic acid (TFMS)を

用いて行った。McAbはLIS-MAG 50μg とFreund's adjvantで 2週毎に 3回免疫したBalb/cマウスの脾細胞とマウスmyeloma cell(x63 Ag8.653) をpolyethylene glycol 4000を用いてfusionさせ、常法により作製した。抗MAG 抗体活性はEISA法を用いてスクリーニングし、positive clone をcloning した。抗原決定基の確認はImmunoblotにてMAG とdeglycosilate MAG との反応の相違によって行った。IgG は抗体を含むマウス腹水よりBio-Rad のAffi-Gel Protein A Monoclonal Antibody Purification system (MAPS^{TM}) にて精製した。McAbのビオチン化は熊谷らの方法[4] を用いた。ELISA はマイクロプレート(Immunoplate-I, Nunc) を支持体として図1のようにBiotin-Avidin systemを用いたサンドイッチ法にて行った。検体は1%SDS の存在下で 2分間加熱し、SDS 濃度が 0.05% 以下になる範囲で各種の希釈濃度にて用いた。抗原のみ除いた対照wellの吸光度をback ground として、実測値より減じて測定値とした。

Sandwich method ELISA using Biotin-Avidin system

(1) Coating: monoclonal anti-MAG-peptide IgG (5μg protein/ml)
↓ 25°C, 4h
(2) Antigen (MAG or samples)
↓ 25°C, 1h
(3) Biotinylated anti-MAG-carbohydrate IgG (5μg/ml)
↓ 25°C, 1h
(4) Avidin-Peroxidase complex (1:500)
↓ 25°C, 1h
(5) Development(0.1% O-phenylendiamine and 0.003% H_2O_2 in PBS)
↓ 25°C, 1h
(6) Microplate photometer (495 nm/ 630 nm)

図1

[結果]

抗体MAG McAbのひとつはImmunoblot上でdeglycosilated MAGを認識し、他のひとつは認識しなかったことより、前者はMAG のペプチドに対する抗体，後者は糖鎖に対する抗体であると考えられた（図2）。固相化抗体の吸着には抗体濃度は 5μg protein/ml（図3）、 4時間（図4）のincubationで至適であることが確認された。ビオチン化抗体濃度は 5μg protein/mlで充分であった（図5）。MAG を標準とした検量線は図6のように1ng/well: 0.1mlまではほぼ直線として得られた。測定感度は 0.25ng/well=0.1mlであった。検体処理に用いるSDS は 0.05%以下ではほとんどELISA systemに影響のないことが確認された（図7）。ヒトCNS におけるMAG の含有量は、精製ミエリンでは 8.6ng／μg protein(n=2)、ヒト大脳前頭葉白質homogenateでは 7.5± 1.2ng／μg(n=5)、脊髄homogenateでは 6.2± 3ng／μg(n=3)であった。

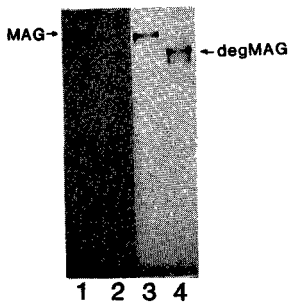


図2： 1,3は精製MAG. 2,4はdeglycosilated MAG. 1,2と 3,4はそれぞれ別のモノクローナル抗MAG抗体によるimmunoblots. 1,2の抗体ではdeg.MAG は染色されず、3,4の抗体では染色されている。

[考案]

本法は糖鎖とペプチドという明らかにことなった抗原決定基に対する 2種のMcAbを用いることによって、共通抗原決定基を有する他の物質を除いて、MAG のみを定量できる極めて特異的な方法であると考えられる。測定感度は既報のRIA の10倍であり、経済性および安全性において優れた方法であると思われる。

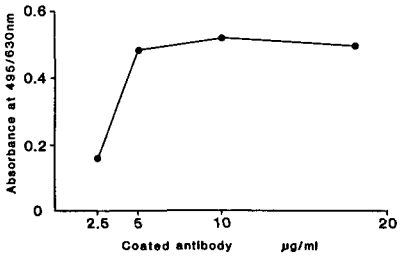


図３：MAG のペプチドに対するモノクローナル抗体(IgG-P) をマイクロプレートのwellに吸着させる際の精製IgG の蛋白濃度の検定。5μg/mlにて充分な測定値が得られている。

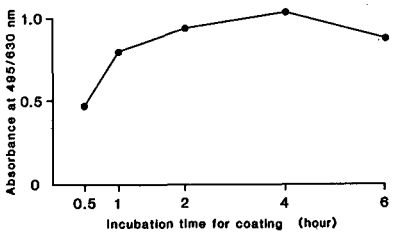


図４：IgG-P を吸着させる際のインキュベーション時間。4時間のインキュベーションにて最大の測定値が得られている。標準としてのMAG は2ng/well, IgG-P 濃度は 5μg/ml, Biotinylated IgG-Cは 5μg/ml, Avidin-Peroxidase は 1:500 希釈を用いた。

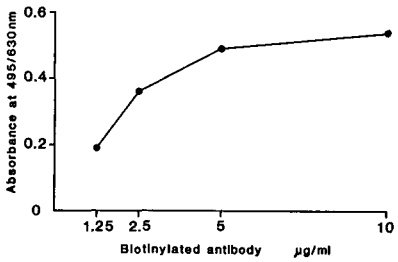


図５：Biotinylated IgG-Cを反応させる際のIgG としての蛋白濃度の検定。5μg/mlにてほぼ充分な測定値が得られている。coating IgG-P は 5μg/ml ,標準としてのMAG は1ng/well, を用いた。

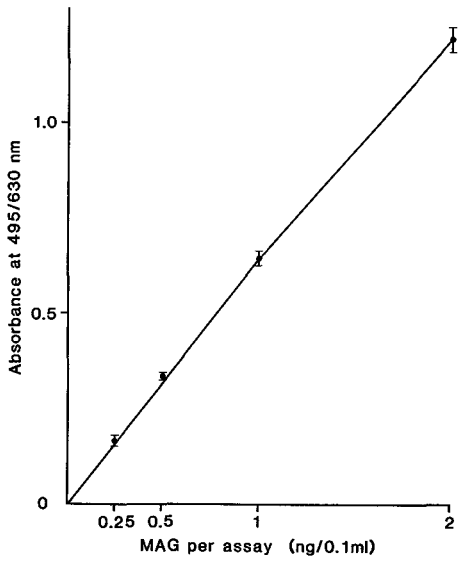


図６：検量線。1ng/well=0.1mlまでほぼ直線として得られている。

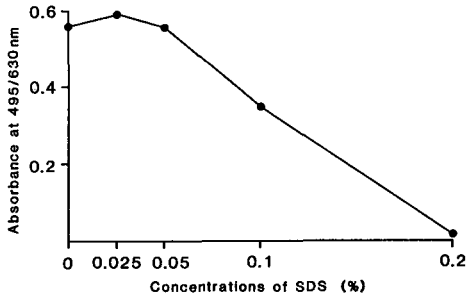


図７：検体の処理に用いるSDS の濃度のELISA systemに与える影響についての検定。SDS 濃度 0.05%以下ではほとんど影響がないことが示されている。

［文献］

1)Sato,S. et al., Biomed. Res., 4:489-494,1983.

2)McGarry,R.C. et al., Nature, 306:376-378,1 983.

3)Johnson,D. et al.,J.Neurochem., 39:1356-1362.

4)熊谷善博 et al.,免疫実験操作法：p2425-2430.

110. ウシ14－3－3タンパク質のエンザイムイムノアッセイ法の確立
：ウシ脳各部位での濃度分布

加藤兼房・清水温子・仙波禮治*・市村　徹**
磯辺俊明**・奥山典生**
（愛知県コロニー研・生化，周生期*，東京都立大・理・化学**）

〔要　約〕
A) ウシ14-3-3タンパク質の高感度エンザイムイムノアッセイ(EIA)系を作製した。(1)ウシ脳より精製した14-3-3タンパク質（27Kと30Kのサブユニットを含む）[1]をメチル化アルブミンと混合し、フロインドの完全アジュバントとともにウサギ皮下に注射して抗血清を作製し、14-3-3タンパク質を不溶化したセファロースカラムを用いて抗血清中の特異抗体IgGを精製した。イムノブロットで、抗体は30Kと27Kの両サブユニットと反応したが、30Kに対する抗体が優位であった。(2)抗体IgGをペプシンで消化し、$F(ab')_2$フラグメントを得て、抗体$F(ab')_2$をポリスチレン球（直径3 mm）に吸着させた固相と、大腸菌由来のβ－ガラクトシダーゼで標識した抗体Fab'を調整し、14-3-3タンパク質のサンドイッチ型EIA系を作製した。(3)測定系の最小検出限度は、抗原として用いた14-3-3タンパク質で30 pgであったが、おもに27Kのサブユニットから成る14-3-3タンパク質は測定系との反応性が低く約300 pgが検出限界であった。
B) ウシ中枢神経系各部位における14-3-3タンパク質の濃度分布を上記の両サブユニットを持つ14-3-3タンパク質を標準として測定した。大脳および小脳皮質、視床などでは約1 mg/g tissue 存在するのに対し、大脳と小脳の白質などでは約0.7 mg/g であった。免疫組織化学的には、おもにニューロンが染色されることを確認した。

Key word： 14-3-3 protein, enzyme immunoassay, immunohistochemistry

14-3-3タンパク質（以下14-3-3）は、中枢神経組織の可溶性蛋白質画分中に多量に存在する酸性蛋白質[2]で、おもにニューロンに局在することが知られている[3]。しかし、その生物活性は不明である。門屋ら[1]は、昨年の本大会で、14-3-3を牛脳より分離精製し、そのタンパク質化学的性質を明らかにした。すなわち、14-3-3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成分であることを報告した。また、従来、抗原性が低くウサギでは抗血清の作製が困難と云われてきたウシ14-3-3の抗血清をマウスで作製し、免疫組織化学的に神経組織の14-3-3はおもにニューロンに局在することを確認した。今回、我々はこのウシ14-3-3に対する抗血清をウサギで作製することに成功し、この抗体を用いて14-3-3の高感度エンザイムイムノアッセイ（EIA）法を確立し、ウシ中枢神経組織の各部位における14-3-3の濃度分布を測定した。

（材料および方法）

<u>抗原と抗体</u>：抗原として用いた14-3-3はウシ脳より精製したもので、27Kと30Kの両サブユニットを約4:1の比で含有する画分であった。この14-3-3画分を等量のメチル化アルブミンと混合した溶液をFreund's complete adjuvantとともにウサギの皮下に注射(0.5 mg/rabbit)した。同様の免疫を4週間隔でくりかえし、免疫開始三ヶ月後に採血した。プールした抗血清（約150 ml)より硫安塩析にてIgG画分を得、これを抗原－セファロースカラムにかけ、抗体IgGを吸着濃縮した。カラム中の抗体は0.1 M グリシン－塩酸、pH 2.5、含1 M NaClで溶出精製した（収量約10 mg）。

<u>酵素標識抗体</u>[4,5]：精製抗体IgGをペプシン処理し抗体$F(ab')_2$フラグメントを得た。

$F(ab')_2$を2-メルカプトエチルアミンで還元して$Fab'(SH)$とし、これをN,N'-o-phenylenedimaleimideを用いてβ-ガラクトシダーゼ（大腸菌由来）と結合させ、セファロース6Bカラムで分離調整した。

<u>抗体結合固相</u>[6]：上記の抗体$F(ab')_2$をポリスチレン球（直径3 mm）に吸着させた。

<u>測定操作</u>：抗体結合球一個を検体または標準14-3-3を含む反応液0.5 mlに加え、30℃で5時間振とうした。球は緩衝液で洗った後、酵素標識抗体1 mUを含む0.2 mlの反応液中に移し、4℃で一夜静置した。球上に結合した酵素活性は、球を洗った後、0.1 mMの4-methylumbelliferyl-β-D-galactosideとインキュベート（30℃、20分間）し、産生した4-methylumbelliferoneを蛍光光度計で測る[5]ことによって測定した。

<u>組織抽出液の調整</u>：各組織は4倍量の50 mM燐酸ナトリュウム緩衝液、pH 7.0中でホモジナイズし、20000 x g, 20分間の遠心上清を得た。14-3-3の測定に際しては、この上清を1000倍希釈して、その10 μlを測定系に加えた。

<u>免疫組織化学的染色</u>：精製抗体IgGを使い、酵素抗体間接法[7]にておこなった。

（結果）

<u>抗体の特異性</u>

抗原として用いた（27Kと30Kサブユニットを含む）14-3-3画分、主として27Kサブユニットよりなる14-3-3画分、ならびにウシ脳粗抽出液をSDS存在下でPAGEし、イムノブロットすると、両サブユニットと抽出液成分のうち30Kと27Kの両サブユニットに一致する部分が強く染色されることから、本抗体は14-3-3の両サブユニットと反応することが明らかとなった。しかしタンパク染色と抗体染色の濃度を比較すると30Kサブユニ

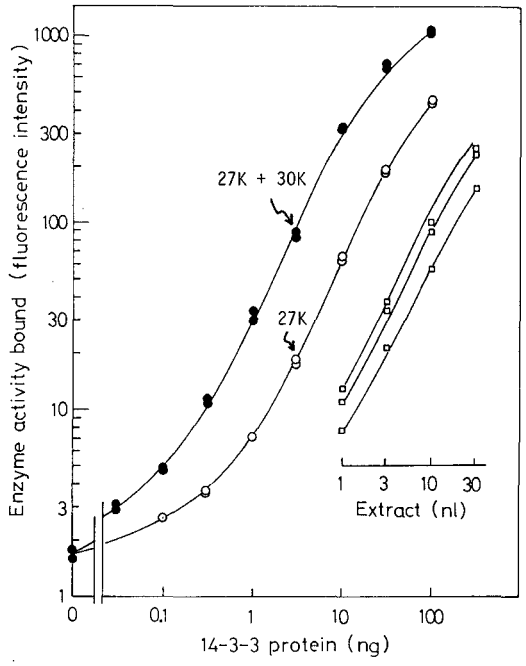


Fig. 1. Standard curve for 14-3-3 assay.

Table 1
Regional distribution of 14-3-3 protein in bovine CNS

Regions	14-3-3 protein	
	μg/mg protein	μg/g tissue
Cerebral cortex		
frontal	48.6 ± 6.7	1010 ± 140
parietal	55.0 ± 14.2	1150 ± 290
occipital	60.0 ± 11.9	1250 ± 230
temporal	50.3 ± 10.6	990 ± 222
Cerebral white matter	71.2 ± 17.2	742 ± 173
Corpus callosum	61.9 ± 13.0	719 ± 165
Thalamus	58.5 ± 10.4	1110 ± 130
Nucleus caudatus	65.6 ± 13.2	1220 ± 190
Superior colliculus	60.1 ± 13.8	1150 ± 180
Inferior colliculus	56.6 ± 8.6	975 ± 149
Cerebellar cortex		
vermis	46.8 ± 9.0	1050 ± 210
hemisphere	56.4 ± 7.3	1120 ± 160
Cerebellar white matter	44.0 ± 7.2	631 ± 102
Middle cerebellar		
peduncle	67.4 ± 11.9	735 ± 154
Medulla oblongata		
dorsal	53.7 ± 4.5	816 ± 112
ventral	52.2 ± 9.5	743 ± 191
Olfactory tract	49.4 ± 9.8	826 ± 195
Optic tract	60.8 ± 9.9	629 ± 58

Mean ± SD of 5 animals

ットに対して強い親和性を持つ抗体であることが示唆された。

測定系の感度と特異性

図1に、抗原として用いた14-3-3画分あるいは、おもに27Kサブユニットよりなる14-3-3画分を測定系に加えた時のdose-response curveを示した。上記のイムノブロットの結果と同一傾向を示し、30Kサブユニットを多く含む14-3-3画分の方が測定系とよく反応し、その最小検出限度は30 pgであった。27K 14-3-3画分の測定系への反応性は上記の抗原と比べると約25%であった。14-3-3と同様、神経組織に多量に存在する酸性蛋白質であるS-100タンパク、ニューロン特異γγエノラーゼやBB型クレアチンキナーゼは、この測定系にはまったく交叉反応しなかった。

測定系の精度

ウシ脳抽出液を適度に希釈し、原液にして1ー30 nl相当を測定系に加えると、図1に示すように検量線とほぼ平行となり、粗抽出液中の14-3-3がnl量の微量検体で測定できることが分かった。三種類のウシ脳抽出液を用いて検討した日内変動係数(n=10)と日差変動係数(n=7)は13%以下であった。

ウシ脳各部位における14-3-3の濃度分布

表1に各部位の組織抽出液中の14-3-3を測定した結果を示した。便宜的に抗原として用いた14-3-3画分をスタンダードとして測定計算した。組織のグラム湿重量当たりで表すと大脳皮質、小脳皮質、視床などでは約1 mg/gであり、大脳白質、小脳白質や視索では0.6-0.7 mg/gであった。しかし、mgタンパク当たりでは平均で44-71 μgの範囲で広く分布していた。これらの値は従来の報告[3]、すなわち14-3-3は脳可溶性蛋白の約1%の濃度で分布すると云う知見と比べるとかなり高い。おそらく今回標準として用いた14-3-3が、実際にウシ脳に分布する平均的な14-3-3と異なるサブユニット組成であるため高い値となったと思われる。

免疫組織化学的局在

精製抗体を用いて14-3-3の免疫染色を行った結果を図2に示した。おもに神経細胞が染色され、従来の知見が確認された。

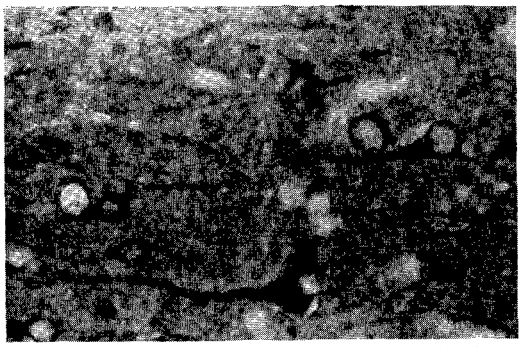


図2　ウシ大脳皮質切片における14-3-3の免疫染色

(考察)

14-3-3は抗原性が低く、とくにウサギでは抗血清の作製が困難とされていた。事実、おもに27Kサブユニットより成る14-3-3で、上記したようにウサギを免疫しても抗体価の上昇は認められなかった。今回得られた抗体も30Kサブユニットとの反応性が高く、従ってこの抗体を用いた測定系も30Kサブユニットが高感度で検出された。また、本測定系は種特異性が比較的高く、ヒトやラットの脳抽出液との反応性はかなり低かった。

REFERENCES
1. Kadoya, T., Tamura, A., Ichimura, T., Manabe, T., Isobe, T., Okuyama, T., and Nakajima, T. (1985) Bull. Jap. Neurochem. Soc., 24, 37-39.
2. 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.
3. Boston, P.F., Jackson, P., Kynoch, P.A.M., and Thompson, R.J. J. Neurochem. (1982) 38, 1466-1474.
4. Kato, K. (1983) Methods in Enzymol., 92, 345-359.
5. Kato, K. (1986) Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U. ed.) 9, 451-462.
6. Kato, K., Hamaguchi, Y., Okawa, S., Ishikawa, E., Kobayashi, K., and Katunuma, N. (1981) J. Biochem. 81, 1557-1566.
7. Nakane, P.K. (1975) Ann. N.Y. Acad. Sci. 254, 203-211.

111. シナプス膜蛋白のカルボキシメチル化—アデノシン結合 s－アデノシルホモシステイナーゼの存在—

三宅正治・印南敏彦*　（愛媛大・医・機器センター，精神*）

〔要　約〕

ラット大脳シナプス膜標品、脳より精製したメチル化酵素および放射性Ｓ－アデノシルメチオニンを用いて、蛋白カルボキシメチル化について検討した。

1、種々の神経伝達物質あるいはアデノシンはいずれもメチル化に影響がなかった。

2、ホモシステイン単独（75.6%）あるいはアデノシン＋ホモシステインの組合せ（87.8%）に著しい抑制効果が認められた。　後者の抑制は膜標品中に含まれるアデノシルホモシステイン（ＳＡＨ）水解酵素によって、ＳＡＨが増加したためと考えられるが、前者の著しい抑制はこれだけでは説明できない。

3、あらかじめ膜標品をアデノシンデアミナーゼで処理すると、ホモシステインの抑制効果は消失し、またＳＡＨ水解酵素の強力な抑制物質であるネプラノシンＡを共存させても、本効果は消失した。

4、種々のホモシステイン関連化合物には全く抑制効果は認められなかった。

5、シナプス膜調製中のアデノシンの膜への結合は、わずかであった。

以上より、シナプス膜中にアデノシンと結合したＳＡＨ水解酵素が存在すると推定した。

Key word：Methylation, Synaptic Membrane, Adenosine-Bound S-Adenosylhomocysteinase

蛋白カルボキシメチル化酵素は、蛋白中のアスパラギン酸あるいはグルタミン酸のカルボキシル基をメチルエステル化する酵素であり、メチル化された蛋白は、非酵素的あるいは特異的水解酵素により脱メチル化される。　最近各種可溶性蛋白（Calmodulin, Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase, cyclic nucleotide phosphodiesterase）や膜構成蛋白（synapsin I, benzodiazepine receptor, nicotinic acetylcholine receptor）がカルボキシメチル化されることが報告され[1]、生体機能との関連が注目されているが、生理的役割は不明な点が多い。　私達は従来より、脳の本酵素活性が高く、内在性基質蛋白量も多いことを明らかにし、最近ではミエリン塩基性蛋白が本酵素の最もよい基質の１つであることを見出した[2]。　今回シナプス膜における蛋白カルボキシメチル化について、興味ある知見を得たので報告する。

〈実　験　方　法〉

1）細胞分画－Wistar系ラット大脳より、Gray & Whittaker[3]の方法に従って調製し、顆粒画分は低張処理を２回行った後酵素反応に用いた。　又シナプトソーム画分は低張処理の後、Whittakerら[4]の方法に準じて、細分画した。

2）蛋白カルボキシメチル化反応－反応組成は、膜画分（10-500 μg）、ウシ脳より精製したメチル化酵素（5-6 μg）、S-adenosyl-L-[^{3}H-methyl] methionine（0.5 μCi）、50 mM リン酸緩衝液（pH 6.4, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol, 1% Nonidet P-40）、総量200μlで、37℃で各種化合物（終濃度50μM）と10分間反応させた後、さらに10分間メチル化反応を行い、Diliberto & Axelrod の方法[5]に従って測定した。

本研究の一部は日本応用酵素協会研究助成費の援助のもとに行った。

3）放射性アデノシンの細胞内分布-ラット大脳を［8-^{14}C］アデノシンを含むショ糖液でホモジネートとした後、方法1）に述べた様にして、各画分を得た。同時に脳中アデノシンをNordstromらの方法を改良した高速液体クロマト（東洋ソーダ、4.6 mm × 15 cm, ODS-80TM, 260 nm にて検出）で定量し、比放射能の補正に用いた。

〈実験結果と考察〉

1）シナプス膜蛋白のカルボキシメチル化－表1に示すように、種々の神経伝達物質あるいはアデノシンはメチル化にほとんど影響がなかった。ホモシステイン単独（75.6%抑制）、アデノシン＋ホモシステインの組合せ（87.8%）あるいはS-アデノシルホモシステイン（SAH）（88%）に著しい抑制効果が認められた。アデノシンとホモシステインの組合せによる抑制は、シナプス膜標品中に含まれるSAH水解酵素によって、SAHが増加したためと考えられる。何故なら、SAH水解酵素の平衡は、著しく合成側に傾いていることが知られているからである。しかし、2つの問題が生じた。1つは、ホモシステイン単独の抑制効果はいかなる機構によるのか、2番目はSAH水解酵素は従来、肝や脳において可溶性画分に局在すると報告[7]されているが、シナプス膜中に十分な酵素活性があるのか、の2つである。

2）アデノシンデアミナーゼとネプラノシンA の作用－表2に示すように、ホモシステイン単独の抑制効果は、アデノシンデアミナーゼ処理によって消失し、またSAH水解酵素の強力な抑制物質であるネプラノシンA[8]を共存させても消失したが、テオフィリン等のメチルキサンチン類には影響を受けなかった。表には示していないが種々のホモシステイン関連化合物（システイン、シスタチオニン等）には全く抑制作用は認められなかったし、ホモシステインとクロロアデノシンの組合せでも、アデノシンとの組合せほど効果はなかった。これらのことから、シナプス膜中にアデノシンと結合したSAH水解酵素が存在すると推定した。

3）“アデノシン結合型”SAH水解酵素の細胞内分布－表3に示すように、ホモシステイン単独でのメチル化の抑制効果を指標にした“アデノシン結合型”SAH水解酵素活性は約70%が膜画分に存在し、特にシナプス膜に分布が多かった。一方アデノシンとホモシステインの組合せの抑制効果を指標にした“アデノシン非結合型”SAH水解酵素活性は、従来からの報告[7]と同じく、約90%が可溶性画分に局在した。表には示していないが、シナプス膜標品中の“アデノシン結合型”SAH水解酵素活性は、超音波処理、0.6M KClあるいは0.1% Cetyltrimethylammonium chlorideのような界面活性剤処理でも消失しなかったし、また高度に精製したシナプス膜標品でもほぼ同じ結果が得られた。

4）放射性アデノシンの細胞内分布－SAH水解酵素は強力なアデノシン結合蛋白であることが知られているので、シナプス膜中の本酵素が、細胞分画操作中に、アデノシンと結合した可能性がある。しかし、表4に示すようにシナプス膜への結合はわずかであり、SAH水解酵素の平衡定数、SAHおよびホモシステインのKi値から計算したアデノシン濃度の約10%を占めるにすぎなかった。これらは上記の仮説を支持するものと考えられる。シナプス膜中の“アデノシン結合型”SAH水解酵素と蛋白カルボキシメチル化との共役に特異性があるかどうかは今後に残された問題であり、また本酵素とホモシスチン尿症やホモシステインによる発作の誘発[9]等との関係に興味がもたれる。

表1　アデノシン、ホモシステイン、神経伝達物質の影響

Additions	Methylation fmol ^{3}H-CH_3OH/mg protein	
Basal	(6)	128.6 ± 3.2
Control	(6)	438.8 ± 5.0
Adenosine	(3)	424.0 ± 1.0
DL-Homocysteine	(6)	107.0 ± 9.0
Adenosine + DL-Homocysteine	(6)	53.4 ± 9.2
S-Adenosyl-L-homocysteine	(3)	52.7 ± 0.6
Norepinephrine	(3)	436.6 ± 2.0
Dopamine	(3)	438.6 ± 7.8
Serotonine	(3)	430.4 ± 4.4
Acetylcholine	(3)	414.0 ±11.6
γ-Aminobutyric acid	(3)	421.4 ±23.4
Glutamic Acid	(3)	428.8 ±11.2
Glycine	(3)	414.8 ± 3.8
100 mM KCl	(3)	349.6 ± 6.6

Basal: without added methylase
Control: with added methylase

S-アデノシルホモシステイン（1μM）以外の化合物は50μMの濃度で用いられた。

表2　アデノシンデアミナーゼ、ネプラノシンAの効果

Additions	Methylation fmol ^{3}H-CH_3OH/mg protein	
Basal	(6)	156.1 ± 7.5
Control	(6)	606.1 ±14.4
Neplanosin A	(3)	543.2 ± 8.8
Adenosine Deaminase	(3)	571.5 ±13.6
DL-Homocysteine	(6)	130.5 ± 4.4
+ Thyophyllin	(3)	121.7 ± 2.6
+ IBMX	(3)	122.9 ± 2.6
+ Neplanosin A	(6)	516.6 ±17.2
+ Adenosine Deaminase	(6)	529.3 ±21.6
Adenosine	(3)	580.6 ±14.4
+ Neplanosin A	(3)	512.6 ±29.1
Adenosine + DL-Homocysteine	(6)	74.2 ± 7.5
Adenosine + DL-Homocysteine + Neplanosin A	(3)	262.8 ±13.1

IBMX:3-isobutyl-1-methylxanthine

ネプラノシンA（1μM）およびアデノシンデアミナーゼ（4U）の存在あるいは非存在下に、各化合物の50μMを用いた。

表3　ホモシステインおよびホモシステインとアデノシンの組合せによる抑制活性の分布

Preparations	DL-Homocysteine		DL-Homocysteine + Adenosine	
	Protein required for 50% Inhibition μg	Distribution (% of total recovered material)	Protein required for 50% Inhibition μg	Distribution (% of total recovered material)
Supernatant	179.8 ± 13.1	31.9 ± 0.2	7.8 ± 0.2	87.3 ± 0.7
Nuclear	≧670	≦0.3	≧220	≦0.1
Microsomal	70.0 ± 0.7	13.3 ± 0.1	43.8 ± 4.8	2.6 ± 0.1
Myelin	91.1 ± 29.6	14.1 ± 0.4	45.4 ± 6.9	3.1 ± 0.2
Synaptic	91.0 ± 8.8	39.3 ± 0.3	69.1 ± 0.6	6.1 ± 0.1
Mitochondrial	611.6 ± 60.6	1.2 ± 0.1	112.6 ± 6.6	0.8 ± 0.1

上清画分は濃縮後透析し、酵素材料として用いられた。　50%抑制に必要な蛋白量は、少なくとも4つの異った濃度を用いて求めた。

表4アデノシンの細胞内分布

Preparations	Adenosine Bound (pmol/mg protein)
Supernatant	12419.6 ± 474.7
Nuclear	13.0 ± 2.5
Microsomal	15.7 ± 2.0
Myelin	12.0 ± 2.1
Synaptic	9.3 ± 0.9
Mitochondrial	15.1 ± 2.2

比放射能は、脳内アデノシン含量より補正した。

＜謝　辞＞

ネプラノシンAを提供いただいた東洋醸造（KK）に感謝いたします。

＜文　献＞

1.Johnson,B.A. & Aswad,D.W. J.Neurochem.45,1119-1127(1985)
2.Innami,T.,Miyake,M.& Kakimoto,Y. Neuroscience Res. in press
3.Gray,E.G. & Whittaker,V.P. J.Anat.96,79-88(1962)
4.Whittaker,V.P. et al. Biochem. J.90,293-303(1964)
5.Diliberto E.J.Jr & Axelrod,J. Proc.Natl.Acad.Sci.71,1701-1704(1977)
6.Nordstöm,C.H. et al. Acta. Physiol.scand.101,63-71(1977)
7.Ueland,P.M. Pharmacol.Review 34,223-253(1982)
8.Borchatdt,R.T. et al. J.Biol.Chem.259,4353-4358(1984)
9.Folbergrova,J. Neuroscience 6,1405-1411(1981)

112. 末梢神経ミエリン膜の PO 糖蛋白のリン酸化

鈴木　勝・坂本　安・植村慶一・福永浩司*・山本秀幸*
宮本英七*　　(埼玉医大・生理第一, 熊本大・薬理第一*)

〔要　約〕

末梢神経ミエリン蛋白の Protein Kinase C および Ca^{2+},Calmodulin dependent Protein Kinase による In Vitro のリン酸化を検討した。

1) Protein Kinase C および Ca^{2+},Calmodulin dependent Protein Kinase により、リン酸の取込みがウシＰ０、Ｐ２蛋白に観察された。

2) Ｐ０蛋白のリジルエンドペプチダーゼ消化後、高速液体クロマトグラフィーによって放射性リンを含むペプチドを分離した。

3) アミノ酸配列分析の結果、以下のリン酸結合部位が推定された。
(1) Protein Kinase C により、Ｐ０蛋白の Thr(123), Ser(204), Ser(214) 残基にリン酸が結合する。
(2) Ca^{2+},calmodulin-dependent protein kinase により、Thr(123), Ser(204) 残基にリン酸が結合する。

4) Ca^{2+},calmodulin-dependent protein kinase によるリン酸化にはリン酸化を受けるアミノ酸のＮ－末端側の塩基性アミノ酸の関与が示唆された。

Key word : phosphorylation,PNS myelin,PO protein,protein kinase

我々はミエリンの構築について、生化学的側面からの解析として構成蛋白の一次構造の決定を行ってきたが、ミエリン蛋白のリン酸化もまた蛋白化学的にあるいはミエリン形成、脱髄などとの関連から興味の持たれる現象である。今回我々は、末梢神経ミエリンＰ０蛋白のリン酸化部位についての検討を行ったので報告する。

実験方法

1) ミエリン蛋白のリン酸化

酵素の調製：Proten Kinase C（Ｃ－Ｋ）は Kishimito らの方法［２］により、Ca^{2+} ,calmodulin-dependent protein kinase（ＣａＭ－Ｋ）は Fukunaga らの方法によった［１］。

Proten Kinase C によるリン酸化：Kishimoto らの方法に従い［２］、25mM Tris-HCl pH 7.5,10mM $MgCl_2$,1mM DTT,0.1M $CaCl_2$, 25ug/ml phosphatidylserine, 2.5ug/ml diolein,5 ug/ml C-kinase, 0.5 mM [^{32}P]-ATP とともに、蛋白 0.28 mg/ml を加え、30 C 60 分反応させた。

Ca^{2+},calmodulin-dependent protein kinase によるリン酸化：Fukunaga らの方法に従い［１］、25 mM Tris-HCl pH7.5,10mM $MgCl_2$,1mM DTT,0.1M $CaCl_2$,20ug/ml calmodulin,5ug/ml CaM-kinase,0.5mM [^{32}P]-ATP とともに,蛋白 0.28 mg/ml を加え、30 C 60 分反応させた。

2) リン酸化Ｐ０蛋白の分画

ＨＰＬＣによるＰ０蛋白の精製：リン酸化反応後のＰ０蛋白は、1% SDS を含むリン酸緩衝液(pH 7.2)を用い、GF-250,GF-450,TSK-3000SW の３本のカラムを連結したＨＰＬＣで精製した。

リジルエンドペプチダーゼ消化： Sakamoto らの方法にしたがい［３］、Ｐ０蛋白を0.1% SDS を含む0.1M 重炭酸ナトリウムに溶解し、1/50 量のリジルエンドペプチダーゼを加え、37 C 24 時間消化した［３］。消化物は、日立 3013-0 カラムで分画し、その素通り画分は ODS カラムで精製した。

3) アミノ酸配列分析

分離したペプチドは気相シーケンスアナライザー（ABI－model 470A）でアミノ酸配列分析を行った。

結果と考察

1) ミエリン蛋白のリン酸化

図１にリン酸化反応後のＰ０およびＰ２蛋白のＳＤＳ電気泳動後の蛋白および、オートラジオグラムを示した。Ｐ０蛋白はＣ－Ｋ、ＣａＭ－Ｋともに有意のリン酸の取込みがみられた（0.13 mol/mol,0.1mol/mol）。ＣａＭ－Ｋでは酵素の自己リン酸化が観察される。Ｐ２蛋白もＣ－Ｋ、ＣａＭ－Ｋともにリン酸の取込みが観察されるが、Ｐ０蛋白の場合にくらべ低値であった(0.04 mol/mol, 0.03mol/mol)。しかし、この条件でミエリン塩基性蛋白への取込みがそれぞれ 0.5mol/mol,0.3mol/molであったことから、条件によってはこれ以上リン酸化される可能性もある。

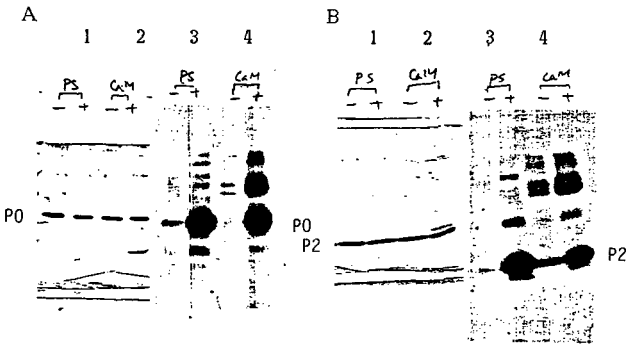


図1．リン酸化反応液のＳＤＳ電気泳動のオートラジオグラフィー
Ａ：Ｐ０蛋白　　Ｂ：Ｐ２蛋白
1,3;C-K, 2,4;CaM-K, 1,2;CB staining, 3,4;autoradiography
PS : phosphatidylserine.　　CaM: calmodulin.

２）リン酸化Ｐ０蛋白の分画

リン酸化反応後の反応液を透析・凍結乾燥後、２％ＳＤＳ溶液に溶解しＨＰＬＣによる精製を行なった（図２）。ともにＰ０蛋白に一致した放射活性がみられた。さらに、リン酸化されたＰ０蛋白をリジルエンドペプチダーゼで消化した後、3013-0 カラムで分画した（図３）。Ｃ－Ｋではフラクション 1,8,10,11,13,14 に、ＣａＭ－Ｋでは 1,5,10,11,13,14 にリン酸の取込みがみられたがＣ－Ｋに比べ低値であった。素通り画分にはかなりの放射活性があり、ODS カラムで再クロマトグラフィーを行った（図４）。Ｃ－Ｋではフラクション 2,9 に最も高い取込みがあり 1,3,4 がそれに次いだ。ＣａＭ－Ｋでは Ｃ－Ｋに比べて低値であったが 1,4 に放射活性が認められた。

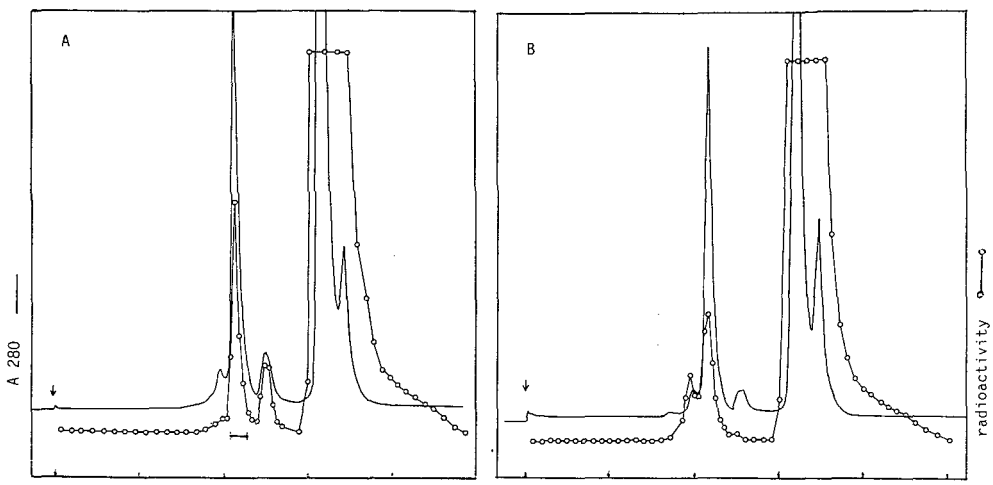


Fig.2. Separation of the PO protein phosphorylated with protein kinases.
A: protein kinase c.　B: Ca and calmodulin dependent protein kinase.

３）リン酸化フラグメントのアミノ酸配列およびリン酸化部位

3013-0 カラムにより分離したリン酸化フラグメント 10 と 14 のＮ－末端アミノ酸配列はウシＰ０蛋白の 121 残基からのアミノ酸配列に相当し（図５－Ａ）、121-170 の部位のペプチドであると予想された。このペプチド中、セリンまたはスレオニンは Thr(123) のみであり、この位置がリン酸化されていることが推定された。

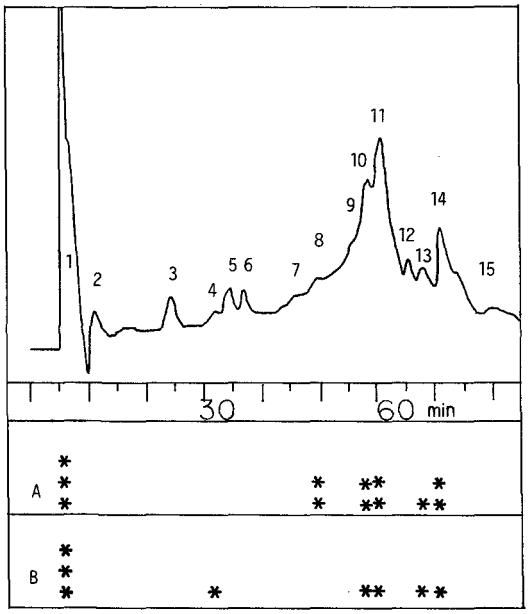


Fig.3.
Separation of the peptides from PO protein digested with lysylendopeptidase C.
Asterisk shows the radioactivity of each fraction.
A: protein kinase C
B: Ca and calmodulin dependent protein kinase.

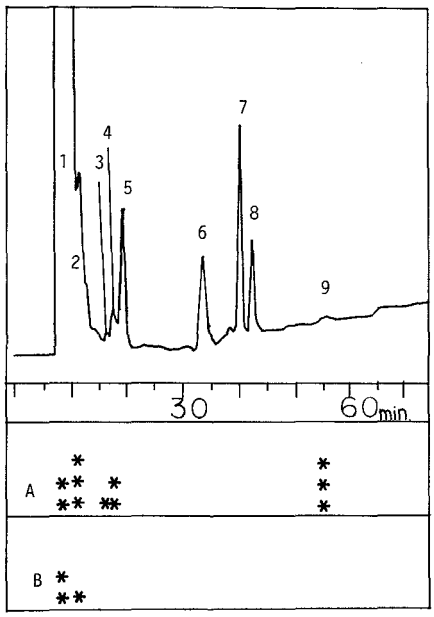


Fig.4.
Rechromatography of the fraction 1 in Fig.3.
Asterisk shows the radioactivity of each fraction.
A: protein kinase C.
B: Ca and calmodulin dependent protein kinase.

一方、ODS カラムによるＨＰＬＣより得られたフラクション２と８のアミノ酸配列分析の結果、それぞれ図５－Ｂ、Ｃに示したペンタペプチドおよびヘプタペプチドの配列が得られた。これらのペプチドはウシＰＯ蛋白の一次構造中では 202-206 および 210-216 に相当することがわかった［２］。リン酸結合部位はそれぞれただひとつのセリン残基 Ser(204)および Ser(214)であることが推定できた。

A Val-Pro-Thr-Arg-Tyr-Gly-- (121-)
B Ala-Ala-Ser-Glu-Lys (202-206)
c Gly-Leu-Gly-Glu-Ser-Arg-Lys(210-216)

Fig.5. Amino acid sequence of phosphorylated peptides.

上記のセリンおよびスレオニン残基はいずれもＣ－Ｋによってリン酸化を受けていることが推定されたが、いずれもＣ末端側近傍に塩基性アミノ酸が存在している。このことは、Ｃ－Ｋによるリン酸化にはＣ側に塩基性アミノ酸が必要であるという Kishimoto らの報告と一致している［２］。また、これらセリン、スレオニン残基のＮ末端側は、Thr(123) および Ser(204) では２残基離れた位置にリジンが存在するが、Ser(214) はリジンまで４残基のへだたりがあり、このセリン残基がＣａＭ－Ｋによるリン酸化を受けないことから、Ｎ－末端側のリジンがＣａＭ－Ｋによるリン酸化に関与する可能性考えられる。

ＰＯ蛋白はミエリン膜を貫通する膜蛋白であることがその一次構造から推定されている。Ser(204), Ser(214) はＰＯ蛋白のＣ末端近くの親水性領域にあり、細胞質側にあると推定され、In Vivo にリン酸化をうけうる可能性がある。一方、Thr(123) は蛋白の膜貫通部分のちょうど外側に位置し、リン酸化された場合には、コンフォメーション変化により膜の状態に影響を及ぼすことも考えられる。

ミエリン蛋白のリン酸化の生理的意義は現在の所不明であるが、ミエリン膜の形成と維持、あるいは脱髄との関連からも興味深い対象であり、未分析の部分の解析とともに検討を続けたい。

文献

1) Fukunaga K.et al.(1982) J.Neurochem.39,1607　2) Kishimoto A.et al.(1985) J.Biol.Chem. 260,12492　3) 坂本ら (1985) 神経化学、24,295

113. SDS-PAGE の移動度がカルモデュリンに近い脳の二種のタンパク質について

中村泰治・小俣久美子・中条茂男・中谷一泰
（昭和大・薬・生物化学）

〔要　約〕

ＳＤＳゲル電気泳動の移動度がカルモデュリン（ＣａＭ）と極めて近いラット脳の二種類の蛋白質について報告する。　一つはシナプス膜画分に存在するカルシウム結合蛋白質で、　他の一つは脳ホモジネートの１５０００ｘｇ上清から得られる熱に安定な酸性蛋白質である。　前者は１９８０年に我々が分離し報告したものであるが、今回はこれを更にＨＰＬＣにより精製し、トリプシン消化後ペプチドマップを作製しＣａＭと比較し、ＣａＭと異なるフラグメントについて、気相シークエンサーをもちいアミノ酸配列を決定した。　このフラグメントは、アミノ酸配列はＣａＭと同一であるが、トリプシンによる切断箇所が異なる二本のペプチドを含むことが明らかになった。　後者は、脳の 15,000 x g 上清からＣａＭの分離法により得られるが、さらにイオン交換、ゲルろか、ＨＰＬＣにより精製した。　この蛋白質は分子量はＳＤＳ－ＰＡＧＥで１３．５Ｋ、ゲルろ過で５５－６４Ｋで、Ｎ末はブロックされていた。この１３．５Ｋ蛋白質をトリプシン消化してペプチドマップを作製し、各フラグメントのアミノ酸配列を気相シークエンサーを用いて決定した。　その一つについて、他の既知のペプチドとのホモロジーを検索したが、同一のアミノ酸配列を持つ蛋白質は未だ報告されていなかった。

Key word : calmodulin like protein, heat stable protein

我々はラット脳のシナプス膜画分から酸性カルシウム結合蛋白質を分離し、SPM 23 と名付けその性質を研究してきた(1—3)。この蛋白質は CaM と極めて性質が類似しいるが、その本質については未だ不明である。今回は、逆相カラムを用いた HPLC で精製したものについて、トリプシン消化後、逆相系 HPLC でフラグメントを分離し、CaM と異なるフラグメントのアミノ酸配列を気相シークェンサーで決定し、CaM との相違を調べた。一方、脳可溶性画分から CaM を分離する際、CaM と SDS-PAGE の移動度に近い、熱安定性の蛋白質が得られるが、今回この蛋白質を精製し、その性質、一次構造について研究した。

［方法］　SPM 23　蛋白質の精製

(1) に述べた通り、ラット脳の P_2 画分を Lithiumdiiodosalycylate(LIS) で可溶化後、フェノールで抽出、水層を透析し得られた粗蛋白質を Sephadex G-100, DEAE-Sepharose CL-6B カラム、さらに逆相カラムによる HPLC で精製した。

13.5 K　蛋白質の精製

ラット全脳ホモジネートの 15,000 x g 上清を100° C、5 分間熱処理し、その遠心上清を 90%　飽和硫安（pH 4.2）処理した。さらに、DEAE-セルロース、Sephadex G-100 カラム、TMS-250 逆相カラムを用いた HPLC により精製した。

ペプチドマップの作製

トリプシン消化後、ODS-120T カラムを用いた逆相系 HPLC にかけ、0 —90% アセトニトリル(0.1% TFA を含む）の直線濃度勾配により溶出した。

アミノ酸配列

気相シークェンサー(Applied Biosystems 470 A)により行った。

他の方法

SDS-PAGE は Laemmli の方法(4) に従って、アミノ酸分析は常法に従って行った。

[結果と考察]

ラット脳の粗シナプス画分より分離した粗 SPM 23 蛋白質をゲルろ過後、DEAE-Sepharose CL-6B カラムにかけ、0.4 M NaClで溶出すると図１に見られるように、SPM 23は、No. 15付近のフラクションに溶出される。これを TMS-250 カラムを用いた HPLC により、混在する CaM を分離し、精製した蛋白質を得た。これをトリプシン消化して逆相系 HPLC により作成したペプチドマップを図２に示した。CaM のマップと比較すると図の矢印のピークは CaM に無いものであり、他は殆ど一致した。ピーク B のペプチドを分取してそのアミノ酸配列を決定すると、図３の結果が得られた。このフラクションには２本のペプチド断片が含まれており、その中の一本は CaM の Ser 38から始まる T4 フラグメントと全く一致した。他の一本は、Pro 43から始まる T4 部分であった。従って、正常 CaM では切断されないT4部分の Asn-Pro の結合が切断されたものである。このことは、SPM 23 は一次構造はCaM と同一か殆ど同一であるが異なったコンフォメーションをとっているものである可能性が考えられる。 次に、ラット脳ホモジネートの 15,000 x g 上清を熱処理し硫安分画後、DEAEセルロースカラムクロマトグラフィーを行うと、図４のように、フラクション No. 40付近に、No.74 付近に溶出する CaMと SDS-PAGE の泳動パターンが類似している蛋白質が得られた。No.40 の分画を取り、ゲルろ過後、TMS-250 によるHPLCを行うと図５のように、電気泳動上均一な蛋白質が得られた。収量は、ラット脳 72 g より約 9 mg であった。この蛋白質の分子量はセファデックス G-100 によると 55-64 KDaで、SDS-PAGEでは13.5 KDaであった。N 末アミノ酸はブロックされており、アミノ酸組成は、Glx が 23% と最も多く、次に Ala 13%, Gly 11% であった。トリプシン消化後、逆相系 HPLCで分離すると、10本 のペプチドが得られた(図 6) 。それらのアミノ酸配列を決定した結果を図 7 に示した。それらの中、f フラグメントの下線部分の配列について、既報されているペプチドのアミノ酸配列とのホモロジーを検索したが f と同一のアミノ酸配列を持つペプチドは報告されていなかった。本蛋白質は CaM や脳の 14.3.3 蛋白質と類似した点があるが、それらとは異なった蛋白質であると考えられる。本蛋白質の c-AMP-phosphodiesterase活性化能を調べたが活性は無く、生化学的機能は目下不明である。

[文献] 1) Nakamura,Y., et. al. (1980) FEBS lett. 112, 155-158
2) 中村ら 神経化学 (1980) 19, 90-93
3) 中村ら 神経化学 (1981) 20, 268-271
4) Laemmli,U,K. (1970) Nature 227, 680-685

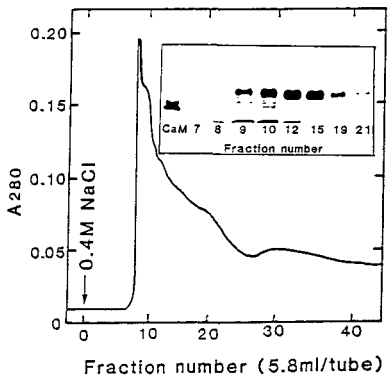


図１．　SPM 23　の DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィー

挿入図は各分画の 13% SDS-PAGE 後のクマシーブルー染色を示す。

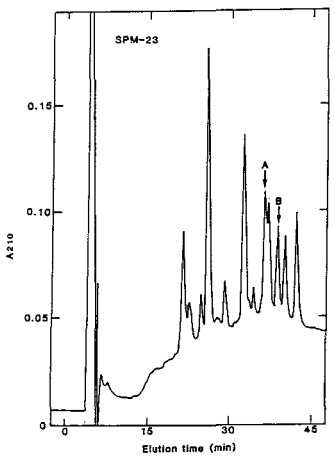


図２．　精製した SPM 23 の HPLC によるペプチドマップ

SPM 23　をトリプシン消化した後、ODS-120T　カラムを用いた HPLC でマッピングした。　溶出は　0.1% TFA　を含む 0-90% アセトニトリル　の直線濃度勾配(60 min) により行った。溶出速度：1 ml/min.

図３．　ピークＢのアミノ酸配列

Pro-Thr-Glu-Ala-Glu-Leu-Gln-Asp-Met-Ile-Asn-Glu-Val-Asp-Ala- - - - -
(50)

Ser-Leu-Gly-Gln-Asn | Pro-Thr-Glu-Ala-Glu-Leu-Gln-Asp-Met-Ile- - - - -
(40) (50)

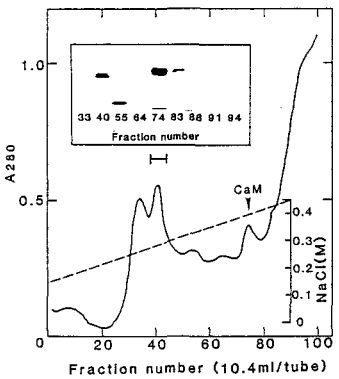


図４．　90% 飽和硫安沈澱画分の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

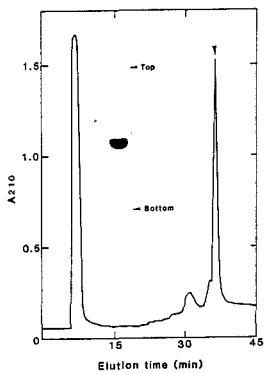


図５．　13.5 K　蛋白質の逆相カラム(TMS-250) を用いた HPLC による精製

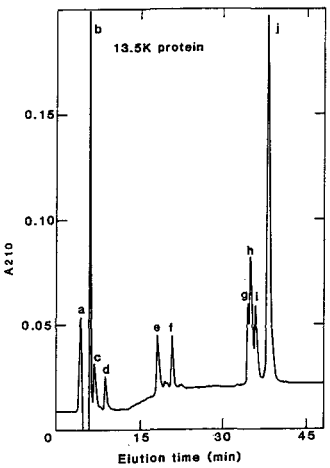


図６．　13.5 K　蛋白質のトリプシン消化後の HPLC によるペプチドマップ

ODS-120T　カラムを用い、0.1% TFA を含むアセトニトリル　の直線濃度勾配(60 min) により行った。溶出速度：1 ml/min.

図７．

図６のそれぞれのピークの配列アミノ酸

a;

b; Gln-Lys-Val-Met-Gly-Ala-

c;

d;

e; Glu-Gly-Val-Lue-Tyr-Val-Gly-Ser-Ser-Lys

f; Gln-Gly-Val-Val-Gln-Gly-Val-Ala-Ser-Val-Ala-Glu-Lys

g;

h; Glu-Gln-Ala-His-His-Leu-Gly-Ser-Ala-Val-Lys

i;

j; Gln-Glu-Glu-Phe-Pro-Thr-Asp-Leu-Lys-Pro-Glu-Glu-Val-Ala-Gln-

114. シナプス膜における Actin および Calmodulin の役割— Acetylcholine と Vasopressin の作用に関連して—

関谷　真・迫　昭子　（上智大・生命科学研）

〔要　約〕

Ｒａｔ大脳皮質シナプス膜の細胞骨格系たんぱく質であるａｃｔｉｎおよびｃａｌｍｏｄｕｌｉｎについてシナプス膜のcholinergic functionおよびvasopressin analogue(Fragment 4-9)のシナプス膜への作用との関連を膜コンホメーションの蛍光プローブ、1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS)を用いて検討した。
調製シナプス膜（ＳＭ）をａｃｔｉｎ脱重合作用のあるＤＮａｓｅＩで処理すると、ＳＭに対するＡＮＳの膜結合性が変化して、ＳＭとacetylcholine (ACh)との反応は抑制された。このことから、ＳＭのcholinergic functionが膜内在のａｃｔｉｎと生理的関連をもつことが示唆された。
Vasopressinについては、ＳＭの蛍光強度を減少させることからその膜作用は明らかであった。ＤＮａｓｅ処理ＳＭに対するホルモンの作用は多少抑制された。
Ca-calmodulin (3.3mMCa, 8μgCALM.)はＡＣｈ作用に対して促進的、vasopressinの作用に対して抑制的に働いた。また、ＣＡ－ＣＡＬＭ．とａｃｔｉｎの直接の相互作用はみられなかったが、ＣＡ－ＣＡＬＭ．系を介する神経伝達物質とホルモン作用制御の膜メカニズムの存在が示唆された。

Key word :　Synaptic membranes　Ca-calmodulin　Actin

生体膜について膜流動性の制御に細胞骨格系の関与が示唆されている（１）。膜流動性それ自体の細胞機能における生理的意義についてはそれほど明らかではない。膜流動性の変化は膜コンホメーシ変化とも考えられるが、われわれは、従来より大脳皮質シナプス膜（synaptic membrane,SM)について蛍光プローブ法によりacetylcholine receptor(AChR)と伝達物質acetylcholine(ACh)との反応に 伴う膜コンホメーションの変化の性質について明らかにしてきた。その変化は、Cholinergic antagonistであるd-tubocurarineあるいは蛇毒cobrotoxin(naja naja arta)で抑制されることからAChRを介するコンホメーション変化と解される（２）一方で、細胞骨格系たんぱく質として、actin,microtuble,neurofilament. また，calspectinなどが同定されている
今回は、シナプス膜骨格系にも多量見出されるactinとシナプス膜コンホメーションとの関連について調べた。その時、シナプス膜(SM)のcholinergic function, vasopressin analogue(Frament4-9,synthesized agent)およびCa-calmodulin(Ca-CALM.)と細胞骨格系との関連をそれぞれの場合について検討した。actinの修飾にはactin脱重合を促すDNaseIを用いた。

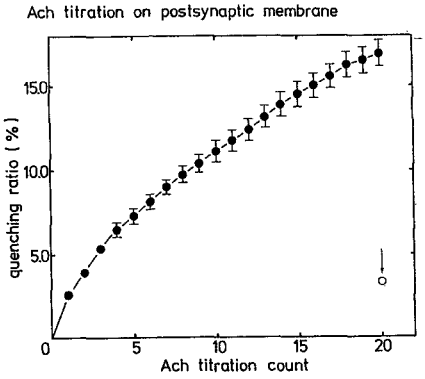


Fig. 1　FLUORESCENCE CHANGE DURING ACh TITRATION ON SM.

実験法　蛍光プローブとして、1-anilinonaphthalene-8-sulfonate(ANS)を用いた。水溶液中ではほとんど蛍光を生じないが、疎水環境で著しい量子収率を示す。ＡＮＳはＳＭに吸着し、３６０ｎｍ励起（キセノン光）で青

方変位をともなって、４８０ｎｍ付近に著明な蛍光ピークが得られる。この蛍光は、周囲の環境変化に応じて変化し、ＡＮＳの膜との結合性（binding affinityおよびbinding number)の変化を反映することがある。

ＳＭの調製はAzucurraらの方法（３）を多少変更して行なった。すなわち、ｒａｔ大脳皮質ｈｏｍｏｇｅｎａｔｅより得られる粗ミトコンドリア画分を0.3%のTritonX-100で30分間処理後、不連続庶糖密度こう配遠心処理し、庶糖0.9-1.0Minterphaseに得られる画分をＳＭとして用いた。

ＤｎａｓｅＩ(1400-1500units mg、フナコシ)を用いた。Vasopressin analogue(Fragment4-9)Ｓｉｇｍａ社製を用いた。Calmodulinはフナコシから市販品を用いた。

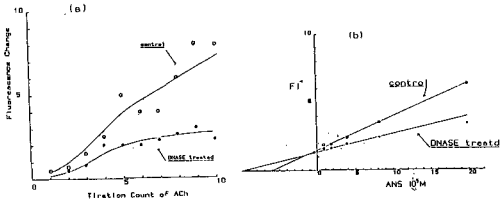


Fig. 2 DNASE EFFECT ON ACH REACTION AND ANS AFFINITY

DNase (660µg) was incubated with 100µg SM/3ml 0.1M Tris-HCl buffer pH7.4 for 30 minutes at room temperature. a, ACh titration was as mentioned in METHOD; b, ANS affinity. Values are the means of n=3

結果　Ｆｉｇ．１はＳＭにＡＣｈ滴下による蛍光変化を示した。ＳＭ100µg/3ml 0.1MTris-HCl buffer pH7.4を蛍光測定用セル(1cm lightpath)中にｓｕｓ－ｐｅｎｄし、1-µl microsyringeによりＡＣｈを一定間隔で滴下を繰り返した。一回滴下ＡＣｈのセル中濃度は、３．３x10^{-4} Mであった。蛍光変化は、$\frac{f_0-f}{f}$ 但し、fo:滴下前の蛍光強度；ｆ：滴下後の蛍光強度。ＡＣｈ滴下は蛍光強度の減少を起こした。しかしながら、この変化は、必ず、繰り返し滴下をした場合に限られる。一時に多量のＡＣｈを作用させても、ＳＭの蛍光変化は起こらない。この繰り返し滴下によるＡＣｈ刺激の実験的条件の その生理的，あるいは機能的意義は未詳である。

あるいは、シナプス膜について、ＡＣｈが膜に作用する時の加重効果の顕れかもしれない。

ＤＮａｓｅＩの影響その１：ＤＮａｓｅＩをＳＭと３０分間ｉｎｃｕｂａｔｅした後、Ｆｉｇ．１の場合と同様にＡＣｈを作用させると蛍光強度の変化は小さくＡＣｈ作用が抑制された（Fig.2a)。また、Ｆｉｇ．２ｂで示されるごとく、ＡＮＳの結合性を調べるとＤＮａｓｅの影響によりＳＭに対するＡＮＳのａｆｆｉｎｉｔｙが大きくなっている。ＤＮａｓｅ処理前のＫｍ値は、２．５x10^{-5} Mであった。　用いたＤＮａｓｅ量は６６０µｇと過剰量であった。図示されていなが、実際は、ＳＭ１００µｇに対してほぼ３００µｇＤＮａｓｅのときにその作用があらわれることを確かめている。また、ＤＮａｓｅもＡＮＳと結合し、その場合のＡＮＳのａｆｆｉｎｉｔｙはＳＭに対する場合より４倍以上の大きさであった。しかしながらＡＮＳ結合量は２倍以上も小さかった。これらのことから、ＤＮａｓｅの作用点、つまり、ａｃｔｉｎとＡＣｈの作用部位であるＡＣｈＲとの機能的関連を示唆する。

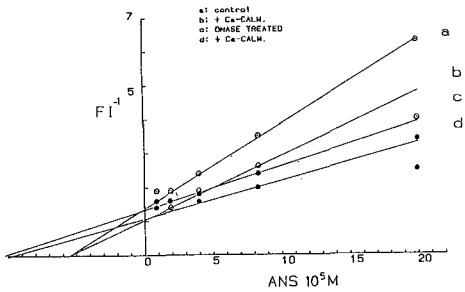


Fig. 3 Ca-CALMODULIN EFFECT ON DNASE TREATEL AND NON_TREATED SM IN RELATION TO ANS AFFINITY.

DNase treatment was as in Fig.2. Ca-CALM. (3.3mM Ca and 8µg CALM.) was incubated with SM(100ug), both DNase-treated and non-treated for 15 minutes at room temperature.
a, control; b, control+Ca-CALM.; c, DNase treated; d, DNase+Ca-CALM.
Values are the means of n=3 for each experiment.

ＤＮａｓｅＩの影響その２：Ｃａ－ＣＡＬＭ．は細胞骨格系たんぱく質との関連が明らかにされている（４）そこで、Ｃａ－ＣＡＬＭ．とＤＮａｓｅとの相互連関を調べたのがＦｉｇ．３である。その結果、直接の相互連関はないと考えられる。すなわち、ＤＮａｓｅ処理膜でＣａ－ＣＡＬＭ．を作用させてもＡＮＳ ａｆｆｉｎｉｔｙはかわらず、単にＶｍａｘをかえた。これは通常ＳＭ膜でおなじＣａ－ＣＡＬＭ．（３．３ｍＭＣａ，８µｇＣＡＬＭ．）の条件でのＶｍａｘの増大と変わらない。ところで、Ｃａ－ＣＡＬＭ．共存下でＳＭにＡＣｈ刺激後、ＡＮＳ結合性をみるとＤＮａｓｅ無処理ＳＭではＶｍａｘを変えた（Ｆｉｇ．４）。ＤＮａｓｅによりＡＣｈ作用

が抑制されたFig. 2の場合と考え併せるとDNase作用点とCa-CALM. 作用の仕方とは異なるといえる。つまり、actinとCa-CALM. がそれぞれ関係する膜因子としての働きは異なることが示唆された。

Vasopressinの作用：Vasopressinの作用についてFig. 5に示した。Vasopressin（8μg）はCa（3. 2mM）存在下あるいは非存在下でも蛍光強度を減少させる（但し、無Caの場合は図示していない）。Ca-CALM. では、蛍光強度の減少は小さくなる。つまり、CA-CALM. はvasopressinのSMへの作用を抑制する。しかし、CALM. は抑制効果がない。むしろ、ある場合には増強することもある。この結果は、ACh作用がCa-CALM. で増強されるのとは反対の作用機序である。DNaseの影響はvasopressin作用に対して抑制的であった。これらのことから、vasopressinの作用は、CALM. とCaにかんして、ACh作用ときつ抗関係にあり、もしも、AChの神経伝達機能にペプチドホルモンの制御を受けるとすれば、Ca-CALMおよびそれと関わる骨格系因子が神経シナプスで重要な役割を担っていることが予想される。一方で、actinは、制御系としてはCa-CALM. 系と別個の制御系を形成しているようにみえる。しかしながら、その詳細はよく分からない

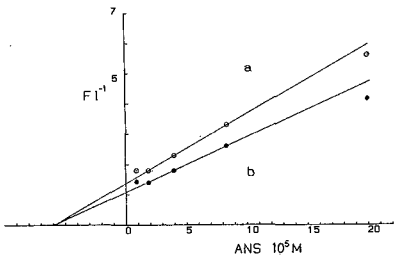


Fig. 4 ACh REACTION AND ANS AFFINITY IN THE PRESENCE OF CA-CALMODULIN._

Ca-CALM.(3.3mM Ca and 8μg CALM.) was incubated with SM(100μg/3ml buffer pH7.4) for 15 minutes at room temperature. a, with ACh titration; b, without titration. Values are the means of n=2 or 3.

考察　膜流動性がtransmembrane controlに関わり、その制御が細胞骨格系たんぱく質であるactinの関与によるならば、以上の結果は、actinが、シナプス膜における情報伝達のcontrolに重要な働きをしていることを示している。また、その他の骨格系たんぱく質は多く見出されている。これらのたんぱく質相互の関連も重要な問題であろう。神経細胞の情報は明らかに細胞内でも処理されるはずであるから細胞質中の諸因子とも関連するであろう。その意味で、ACh作用とvasopressin作用とがCa-CALM. 系に関してきっ抗関係を示したことは興味深い。ACh作用はAChRを介しているのであるから、シナプス膜外表面での作用がCa-CALM. 系の制御を受けているといえよう。vasopressinについては、その作用が内膜におけるものかどうかはこの実験からは分からない。しかしながら、少なくとも、ペプチドホルモンが神経伝達をなんらかの仕方で制御していることは示唆される。vasopressin analogueのFrament 4-9は記憶増強作用がありとされるが興味深い。今後、更に神経伝達機構における細胞内応答の仕方を検討する必要があろう。

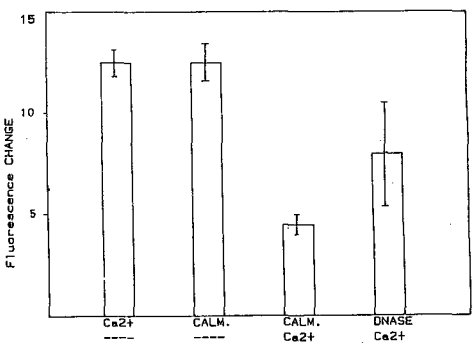


Fig. 5 EFFECTS OF CALMODULIN, Ca-CALMODULIN, AND DNASE ON VASOPRESSIN REACTION ON SM.

Vasopressin(50μg) decreased ANS fluorescence after incubating with SM for 30 min. The concentrations of the agents were as 8ug of CALM. or 3.3mM of Ca. Dnase was 660μg. Values are the means of n=2to5.

文献 1. Matus,A.,Ackermann,M.,Pheling,G.,Byers,H. R.,Fujiwara,.K.,(1982)Proc.Natl.Acad.Sci.USA79,7590-7594; 2. 関谷真、菊野正隆(1974) 化学の領域増刊114(南江堂)109-116 3. Azucurra,J.M.,DeRobertis E.,Fiszer,S(1967)Brain Res.,5,45; 4. Sobue,K.,Muramoto,Y.,Fujita,M.,Kakiuchi,S.,(1981)Proc.Natl.Acad. Sci.UA.78,5652-5655;

115. 脳のミオシンとそのプロテアーゼフラグメントの Actin-activated Mg-ATPase 活性について

松村末夫・大森　斉・高島敏伸*・近藤敏弘・安田誠治
公文　明　（佐賀医大・生化，内科*）

〔要　約〕

脳のミオシンは、他の組織のミオシンと同様に２個のほぼ球形の頭部と１本の細長い尾部から成立っており、その成分としては約２００キロダルトン（ｋＤａ）の重鎖と約１９ｋＤａと１７ｋＤａの軽鎖に加え少量の約２１ｋＤａの軽鎖を含んでいる。通常の方法に従って精製したミオシンの Mg-ATPase 活性はアクチンによってほとんど促進されなかった。２１ｋＤａと１９ｋＤａの軽鎖をミオシン軽鎖キナーゼで燐酸化したミオシンの Mg-ATPase 活性もアクチンによって促進されなかった。一方、キモトリプシンによって限定消化したミオシンの ATPase 活性はアクチンによって促進されるようになった。このときミオシンは、重鎖ポリペプチド鎖のうち頭部内に切断された箇所を含んではいるが未消化のミオシンとほぼ同じ構造を保っており、どの軽鎖成分もほとんど分解されていなかった。ミオシンをパパインによって限定消化すると頭部と尾部の接合部付近および１９ｋＤａと２１ｋＤａの軽鎖が切断され、頭部と尾部が相互分離した。得られたミオシン頭部の Mg-ATPase 活性もアクチンによって強く促進された。これらの結果から、脳のミオシンの Actin-activated Mg-ATPase は、通常、何らかの分子構造上の原因によって抑制された状態にあり、プロテアーゼによる限定消化に伴なって活性型に変換したと考えられる。これらの結果をもとに脳のミオシンの構造と活性との関係について考察を加える。

Key word：

Brain Myosin, Actin-activated Mg-ATPase, Proteolysis

平滑筋のミオシンや、血小板、マクロファージ、胸腺などの非筋肉組織のミオシンの Actin-activated Mg-ATPase 活性は、約２０ｋＤａの軽鎖成分の燐酸化・脱燐酸化反応を介して調節される事が知られている(1)。一方、脳から分離精製したミオシン標品には、Ｃａ・カルモデュリン依存性のミオシン軽鎖キナーゼ（ＭＬＣＫ）によって軽鎖成分を燐酸化すると、Actin-activated Mg-ATPase 活性が促進されるものもあるが、通常のミオシン標品の活性は燐酸化によって上昇しない(3)。従って、分離したミオシンの分子構造上の微妙な差やミオシン標品中の夾雑物の差によって Actin-activated Mg-ATPase 活性が変化するものと推察される。私共は、これまでに脳のミオシンの性質を調べると共に、ミオシンに幾種かのプロテアーゼを作用させ、生じた幾つかのフラグメントの性質を調べる事によって脳のミオシンの分子構造上の特性の幾つかを明らかにしてきた(7)。今回、脳のミオシンをキモトリプシンやパパインで消化し、得られたフラグメントの Mg-ATPase 活性へのアクチンの影響を調べた。その結果、未消化のミオシンの ATPase 活性がアクチンによって促進されないにもかかわらず、これらのフラグメントの活性は、アクチンによって促進される事が明らかになった。　ミオシン分子内のプロテアーゼによる切断部位と Actin-activated Mg-ATPase 活性との関係について考察を加える。

〔実　験　材　料　と　方　法〕

ミオシンは、牛大脳から以前に報告した方法(8)で精製した。ＭＬＣＫはニワトリ砂のうから精製した(2)。カルモデュリンは牛脳から精製し(12)、アクチンはウサギ骨格筋(5)とニワトリ砂のう(11)から精製した。ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli の方法(6)に従った。ミオシンの Actin-activated Mg-ATPase 活性は、２５ mM イミダゾール塩酸（ｐＨ７．０）・３０ mM KCl・５ mM $MgCl_2$・０．１ mM $CaCl_2$・１ mM ATP と０－１．５ mg/ml のウサギ骨格筋Ｆ－アクチンを含む溶

液中で６０分間３０℃で行ない、生じた燐酸を定量した[10]。実験に応じて上記の反応液に MLCK（０－１０ μg/ml）とカルモデュリンを加えた。また、ウサギ骨格筋のＦ－アクチンの代りにニワトリ砂のうＦ－アクチンを加えた。脳ミオシンのキモトリプシン消化は、０．３ＭKCl と１ mMＥＤＴＡを含む１０ mMＴｒｉｓ－塩酸（ｐＨ７．５）中で６０分間３０℃で行ない、１ mMＰＭＳＦで反応を停止した。パパインによる消化は、０．１ＭＮａＣｌと３０ mM $MgCl_2$ を含む１０ mMイミダゾール塩酸（ｐＨ７．０）中で６０分間、３０℃で行ない、パパイン濃度の５０倍の濃度のロイペプチンで反応を停止した。ミオシンとプロテアーゼの蛋白濃度比は１０００：１であった。ミオシン軽鎖に結合した燐酸は Buss と Stull の方法[4]で測定し、燐酸化軽鎖と非燐酸化軽鎖の定量は尿素－グリセロールゲル電気泳動法で行なった[9]。

〔 実 験 結 果 と 考 察 〕

脳から精製したミオシンは約２００ｋＤａの重鎖と約１９ｋＤａと１７ｋＤａの軽鎖に加え少量の２１ｋＤａの軽鎖を含んでいる（Fig. 1, Ａ－Ｍ, Ｂ－Ｍ）。精製したミオシンの２１ｋＤａと１９ｋＤａの軽鎖の燐酸化の割合は標品によって異なり、２０－７０％である。これらの軽鎖の約５０％が燐酸化されたミオシンへの骨格筋Ｆ－アクチンの影響を調べた結果、その ATPase 活性はアクチンによって促進されなかった（Fig. ２, □）。同じ反応液中に５ μg/ml のＭＬＣＫと５ μg/ml のカルモデュリンを加え、ほぼ１００％の軽鎖を燐酸化した場合も ATPase 活性はアクチンによって上昇しなかった（Fig. ２, ■）。一方、例数は少ないが、アクチンによって有意に活性化を受けるミオシン標品が得られる場合もあり、その一例を同図（●, △）に示している。骨格筋アクチン（●）による活性化の程度と平滑筋アクチン（△）による活性化の程度は同じであった。このミオシンは、既にその軽鎖の７０％が燐酸化されていたが、ＭＬＣＫとカルモデュリンを加え、軽鎖のほぼ１００％を燐酸化すると ATPase 活性はさらに約２０％程度上昇した。脳のミオシンをキモトリプシンで消化すると２００ｋＤａの重鎖は約１４０ｋＤａと約６８ｋＤａのペプチドに分解されたが、どの軽鎖もほとんど分解されなかった（Fig. １, Ａ－Ｗ）。６８ｋＤａのペプチドは、２００ｋＤａ重鎖のうち頭部に含まれる領域（約９０ｋＤａ）のＮ末端側に相当し、１４０ｋＤａのペプチドは頭部のＣ末端側の約２０ｋＤａの領域と尾部のほぼ全域（約１２０ｋＤａ）に相当する[7]。これらのペプチドは、非変性下では軽鎖と共に非共有結合により結合しており、未消化のミオシン分子とほぼ同一の構造を保っている[7]。キモトリプシン消化したミオシンを0.05ＭＫＣｌ中で遠心するとほとんどすべてのペプチドが沈渣に回収された（Fig. 1, Ａ－Ｐ）。一方、ミオシンをパパインで消化すると、約１２０ｋＤａと６８

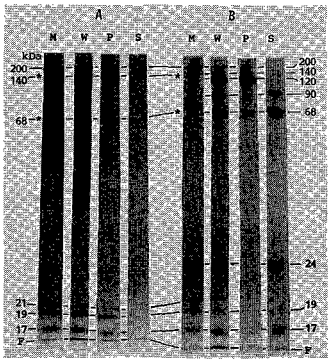


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of chymotryptic (A) and papain (B) digests of brain myosin. M, control myosin; W, whole digest; P, 0.05 M KCl-insoluble peptides; S, 0.05 M KCl-soluble peptides; *, contaminated degradation products of brain myosin; F, dye front.

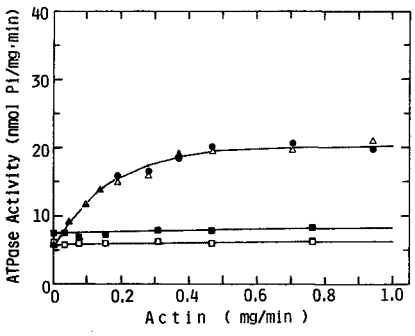


Fig. 2. Effect of actin on Mg-ATPase activity of brain myosin. A usual non-actin-activatable preparation of brain myosin assayed in the presence (■) or absence (□) of MLCK and calmodulin. An unusual actin-activatable preparation of brain myosin assayed in the presence of skeletal muscle F-actin (●) or gizzard F-actin (△).

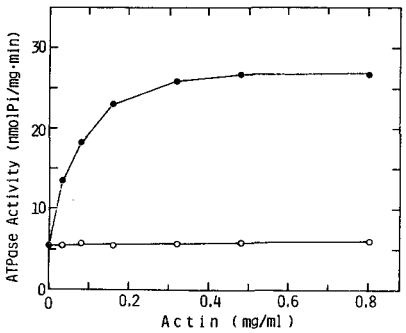


Fig. 3. Effect of actin on Mg-ATPase activity of control (●) and chymotrypsin-digested (○) brain myosin.

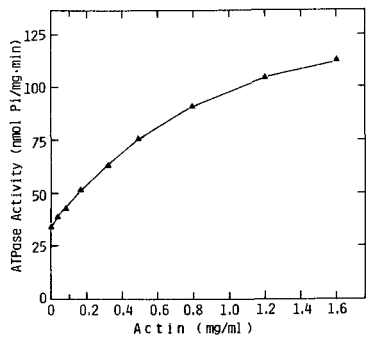


Fig. 4. Effect of actin on Mg-ATPase activity of head fragment of brain myosin.

ｋＤａと２４ｋＤａのペプチドが生じた（Ｆｉｇ．１，Ｂ－ｗ）。２１ｋＤａと１９ｋＤａの軽鎖のかなりな部分が分解していた。少量の１４０ｋＤａのペプチドと９０ｋＤａのペプチドも生じているが、１４０ｋＤａのペプチドは、１２０kDaの尾部の領域と頭部Ｃ末端側の２４kDaの領域とが切断されずに残ったものである[7]。９０ｋＤａのペプチドは、頭部のほぼ全域に相当するペプチドである[7]。パパイン消化したミオシンを0.05Ｍ KCl 中で遠心すると頭部を構成するペプチド、即ち、９０ｋＤａのペプチド、または６８ｋＤａと２４ｋＤａのペプチドと軽鎖は遠心上澄に回収され、尾部を構成する１２０ｋＤａや１４０ｋＤａのペプチドは沈渣に回収された（Ｆｉｇ．Ｂ－ｐ．ｓ）。頭部を構成するペプチドは非変性下では相互分離せず　ほぼ球形の頭部構造を保っている[7]。未消化のミオシンのMg-ATPase活性（Ｆｉｇ．３，○）と異なってキモトリプシンで消化したミオシンの活性（●）は、アクチンによって約２７ｎｍｏｌ Ｐｉ／ｍｇ・ｍｉｎ に達し、Ｆｉｇ．２に示したアクチンによって活性化を受けるミオシンのものと同程度になった。パパインで消化し、得られた遠心上澄（Ｆｉｇ．１－Ｂ，ｓ）をさらにＳｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－３００のカラムによって精製した頭部フラグメントへのアクチンの効果をＦｉｇ．４に示している。その ＡＴＰａｓｅ 活性はアクチンによって高度に促進され（１１０ｎｍｏｌ Ｐｉ／ｍｇ・ｍｌ）、Ｖｍａｘは１４０ｎｍｏｌ Ｐｉ／ｍｇ．ｍｌに達した。通常の方法で脳から精製したミオシンの Ｍｇ－ＡＴＰａｓｅ 活性は軽鎖が十分に燐酸化されているにもかかわらず、アクチンによって促進されなかった。このようなミオシンはキモトリプシン消化によりアクチンによって活性化を受けるようになった。脳のミオシンは、キモトリプシン消化によって頭部内に切断を受けると共に尾部のＣ末端近傍の小領域を失なう[13]。キモトリプシンによる ＡＴＰａｓｅ の活性化にはこれらのいずれかが関与するものと推定される。また、パパイン消化により得られた頭部フラグメントの ＡＴＰａｓｅ もアクチンによって高度に活性化を受けるようになると共にアクチンに対する親和性が低下した（Ｆｉｇ．４）。これらの効果は、パパインにより２１ｋＤａと１９ｋＤａの軽鎖が分解された事や、あるいは、尾部が頭部から分離した事にもとずくものであると推定される。

〔　文　献　〕

1. Adelstein, R.S., and Eisenberg, E. (1980) Annu. Rev. Biochem. 49, 921-956.
2. Adelstein, R.S., and Klee, C.B. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7501-7509.
3. Barylko, B., and Sobieszek, A. (1983) EMBO J. 2, 369-374.
4. Buss, J.E., and Stull, J.T. (1983) Methods Enzymol. 99, 7-14.
5. Eisenberg, E., and Kielley, W.W. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4742-4748.
6. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
7. Matsumura, S., Kumon, A., and Chiba, T. (1985) J. Biol. Chem. 260, 1959-1966.
8. Matsumura, S., Murakami, N., Yasuda, S., and Kumon, A. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 683-688.
9. Perrie, W.T., and Perry, V.P. (1970) Biochem. J. 119, 31-38.
10. Pollard, T.D., and Korn, E.D. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4682-4690.
11. Sobieszek, A., and Small, J.V. (1976) J. Mol. Biol. 102, 75-92.
12. Yazawa, M., Sakuma, M., and Yagi, K. (1980) J. Biochem. 78, 1313-1320.
13. 松村末夫、村上規子、安田誠治、田代裕子、公文　明（1985）神経化学 24，592-594.

116. ラット脳組織における Protein Kinase C の分布

河本純子・橋本　規・荻田浩司・吉川　潮・西塚泰美
斉藤尚亮*・田中千賀子*　（神戸大・医・第二生化，薬理*）

〔要　約〕

Protein kinase C は種々の細胞膜受容伝達機構に関与しており、各種の組織や細胞に広く分布している。本酵素は神経組織においても大量に存在し情報伝達に重要な役割を果たしていると考えられている。今回、ラット脳組織におけるProtein kinase C の局在を、本酵素に特異的な単クローン抗体を用いた免疫組織化学的方法と本酵素の活性測定により比較検討を行なった。

単クローン抗体を用いた免疫染色により、ラット脳組織においてはその部位により強度の異なる Protein kinase C 陽性反応が観察された。即ち、海馬、扁桃体、嗅球、小脳皮質等においては強い反応が認められたが、脳幹部では微弱な免疫反応が観察されたのみであった。また、強い免疫反応が認められるのは神経細胞であり、グリア細胞においてはほとんど陽性反応は観察されなかった。

一方、ラット脳組織の Protein kinase C 活性を部位別に測定したところ、本酵素活性の強度は単クローン抗体を用いた免疫染色の結果ときわめてよく一致した。

Key word：　protein kinase C,　monoclonal antibody,　immunohistochemistry

〈緒言〉

種々の神経伝達物質やホルモン等の細胞外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する。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。このカルシウムと Protein kinase C による蛋白質リン酸化反応とにより、多くの細胞機能が調節をうけていることが知られている（1，5，6）。我々は、細胞外シグナルの受容伝達機構に重要な役割を果たしているこの Protein kinase C について解析をおこなっている。今回、抗 Protein kinase C 単クローン抗体を用いてラット脳組織における本酵素の局在を組織化学的に検討するとともに、その酵素活性の分布との比較解析を行なった。

〈実験方法〉

①単クローン抗体の精製：Protein kinase C に対する３種類の単クローン抗体、CKI－33，CKI－97，CKII－90 はこれらの抗体を産生するハイブリッド細胞をマウス腹腔にて増殖し、腹水中よりプロテインA－セファロースカラムクロマトグラフィーにより精製した（4）。

②免疫染色法：４週齢のウィスター系雄性ラットを用い、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、２０％ サッカロース液にて洗浄の後、２０μm の凍結切片を作成した。

切片を浮遊状態にて、抗 Protein kinase C 単クローン抗体 (CKI－30, CKI－97, CKII－90 それぞれ1 μg/mlの混合液) を用い、ペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ法による酵素抗体染色を施行した。

③Protein kinase C の抽出法：ラット脳組織の各部位を氷冷下にて、１０mM トリス塩酸緩衝液 pH７．５ 、１０ mM ２－メルカプトエタノール、1mM フッ化フェニルメチルスルホニル、０．０１％ ロイペプチンを含む０．２５M サッカロース液中で、テフロングラスホモジナイザーを用いて破砕し、超音波処理を行ないホモジネートとした。ホモジネートを０．５％ トリトンX－１００にて処理し、抽出液として用いた。蛋白質は Bradford の方法にて定量した (２)。

④Protein kinase Cの活性測定法：抽出液中の Protein kinase C 活性は [γ－^{32}P]ATP より仔牛胸腺H1ヒストンへの放射活性の転移により測定した (３)。０．２mM カルシウム、８μg/ml ホスファチジルセリン、０．８μm/ml ジオレインの存在下におけるリン酸化活性と、1mM EGTA の存在下の活性の差を Protein kinase C 酵素活性とした。

〈結果および考察〉

ラット大脳より精製した Protein kinase C を抗原として得られた３種類の単クローン抗体を用いて免疫染色を行なった結果、ラット脳組織においてはその部位により異なる強度の Protein kinase C 陽性反応が観察された。大脳においては図１にしめすように海馬、扁桃体、尾状核に強い免疫反応が認められた。小脳においては図２に示すように小脳皮質の分子層に強い陽性反応が観察され、顆粒層においては染色性が微弱であった。また嗅球に強い免疫反応が認められたが、脳幹部においては、錐体路に軽度の陽性反応が認められるのみであった。図３に示すように、大脳皮質においては第５層の錐体細胞に強い免疫反応が認められ、また小脳においてはプルキニエ細胞が染色された。これらの細胞においては細胞質に強い免疫染色が認められたが、小脳顆細胞ではその細胞膜が染色され、細胞により Protein kinase C の細胞内分布が異なることが示唆された。

ラット脳組織の各部位の蛋白質と Protein kinase C の活性を測定し、各部位における本酵素の比活性を算出し、最高値を示した海馬における本酵素の比活性を１００％として図４に示した。ラット脳組織においては、海馬、嗅球、扁桃体に高い Protein kinase C 活性が認められた。また脳幹部や、視床下部の本酵素活性は低値を示し、本酵素活性は単クローン抗体を用いた免疫組織化学的解析結果ときわめてよく一致した。一方、ラット脳組織を細胞分画法により可溶性画分と膜画分に分画し、 Protein kinase C 活性の細胞内分布を検討した結果、本酵素活性は可溶性画分のみならず膜画分にも存在することが明らかとなっている (3)。また、 Protein kinase C は、発がんプロモーターとして知られるホルボールエステルの受容体として作用していると推定されている (５,６)。脳組織における本酵素の免疫組織化学的局在および酵素活性の分布は、放射性ホルボールエステルを用いたオートラジオグラフィーによる解析結果とよく一致している (７)。 脳組織における Protein kinase C の分布の解析は、本酵素の神経組織における機能の解明に指針を与えるものと考えられる。

〈文献〉

１．Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1984) Nature, 312, 315－321

２．Bradford, M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248－254

３．Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S., Nishizuka, Y. (1982) J. Biol. Chem. 257, 13341－13348

４．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 (1985) 神経化学，24，502－504

5. Nishizuka, Y. (1984) Science, 225, 1365−1370

6. Nishizuka, Y. (1986) Science, 223, 305−312

7. Worley, P.F., and Snyder, S.H. (1986) J. Neurosci. 6, 199−207

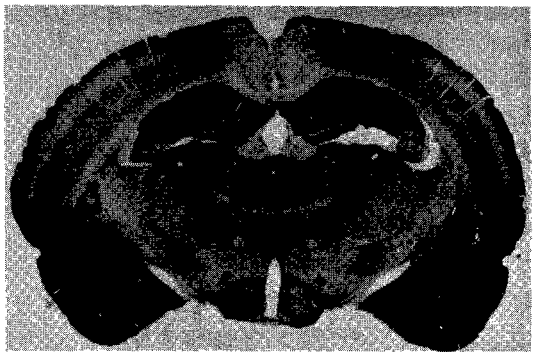


図1．単クローン抗体を用いたラット大脳の免疫染色

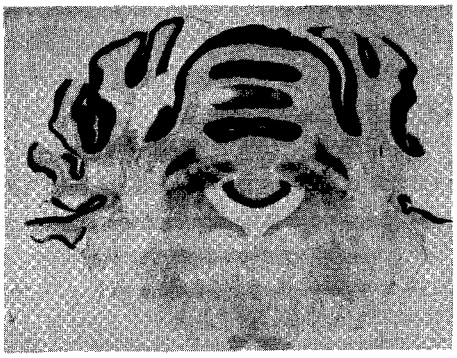


図2．単クローン抗体を用いたラット小脳の免疫染色

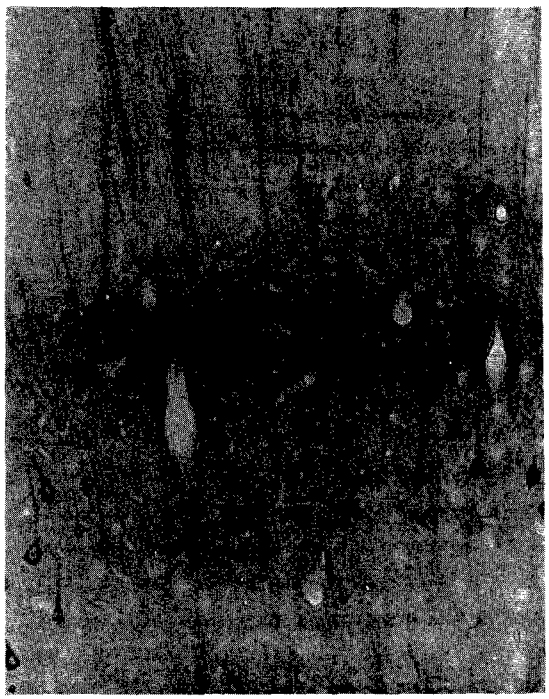


図3．単クローン抗体を用いたラット大脳皮質の免疫染色

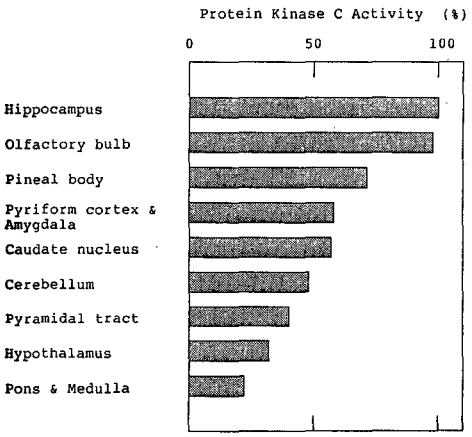


図4．ラット脳組織における Protein kinase C 活性の分布

117. 眼球及び中枢神経系に於けるオルニチンアミノ基転移酵素：免疫組織化学と酵素免疫測定

松澤健夫・笠原正男*

(藤田学園保健衛生大・医・生化，病理*)

〔要　約〕

Ｆａｂ'－ＨＲＰ結合体を用いる直接法によって、ミトコンドリア・マトリックス局在のオルニチン・ケト酸アミノ基転移酵素の免疫組織学的分布が明らかにされた。中枢神経系では大脳皮質、海馬、神経核、視床のニューロン（細胞体と軸索）、プルキヌエ細胞、脈絡叢上皮が陽性であった。また末梢神経が強陽性であった。眼球では上衣細胞由来の細胞すなわち、虹彩上皮、レンズ上皮、毛様体上皮、ミューラー細胞、網膜色素上皮、脈絡膜細胞、角膜など主にグリア系細胞への分布が著明であった。長いミトコンドリアの豊富な視神経内節は殆ど陰性であって、同じミトコンドリアでも本酵素を含むものは小円形のミトコンドリアが主で、ミトコンドアにも細胞分化に伴うｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｉｔｙが示唆される。酵素免疫測定法で定量すると、毛様体に最も多く（総量の約４０％），次いで脈絡・強膜（２３％），網膜（１９％），虹彩（７％），角膜（５％），レンズ（４％）の順に分布がみられた。ＲＣＳ網膜ジストロフィーラットでは対照に比して網膜部分での増加傾向がみられた。

Key word：　Ornithine aminotransferase, CNS, Eye

オルニチン・ケト酸アミノ基転移酵素（ＯＡＴ）はミトコンドリアマトッリックスに存在するので、選択的透過性をしめすミトコンドリア内膜を介して、１５０ＫＤのＩｇＧによる間接法では染色することが不可能であつた。　しかし、この酵素の先天的欠損がＧｙｒａｔｅ　ａｔｒｏｐｈｙ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｃｈｏｒｏｉｄ　ａｎｄ　ｒｅｔｉｎａを発症させることから、その分布をしらべることは重要であるが、ＯＡＴの免疫組織化学的分布については報告はなかつた。　石川ら（１）は４６ＫＤのＩｇＧ断片（Ｆａｂ'）とペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）の結合体を用いてｆｍｏｌレベルのＯＡＴ酵素免疫測定法を樹立した。　今回我々はＦａｂ'－ＨＲＰを用いることにより鮮明で特異的な染色像を得ることに成功した（２）。　ＯＡＴは一般に肝、腎、小腸では吸収やイオン透過に関与する上皮細胞の界面に密集するミトコンドリアに分布している、また中枢神経系ではニューロンや上衣細胞に分布し、末梢神経ではＳｃｈｗａｎｎ細胞が濃染し、眼球では毛様体や虹彩の上皮細胞、網膜ではＭｕｅｌｌｅｒ細胞や色素上皮細胞、レンズ・角膜・脈絡膜の上皮細胞などに分布していることが明らかになっつた。またラット眼球ＯＡＴの分布を酵素免疫測定法で定量し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

〔免疫組織化学的染色〕抗ＯＡＴ抗体は松沢らの方法（３）によつて作製した。Ｆａｂ－ＨＲＰ結合体は石川らの方法（１）によつて調製した。正常ラット組織およびヒト剖検組織のパラフィン切片を作製し、既報（２）の通りに操作した。

〔ラット眼球試料の作製〕眼球各部のＯＡＴの定量のためにラット眼球を角膜・虹彩・レンズ・毛様体・網膜・脈絡強膜（色素上皮を含む）の６部にわけ試料を作製した。その一

定量を取り、酵素免疫測定法で測定した。〔酵素免疫測定法〕ポリスチレンボールに吸着させたＩｇＧとＦａｂ'－ＨＲＰ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓを用いて、サンドイツチ法で測定した。詳細は既報（４）の通りであるが、第一反応は３７℃３時間振とう反応し、第二反応は２５℃３時間３０分振とう反応し、第三のＨＲＰ酵素反応は３０℃３０分反応し、基質ＨＰＰＡからの生成物を励起波長３２０ｎｍ蛍光波長４０５ｎｍで測定した。

結果と考察

〔ＯＡＴの免疫組織化学〕抗ラットＯＡＴ・Ｆａｂ'－ＨＲＰ結合体を用いて、正常ラット及びヒト組織ＯＡＴを直接法で染色した。抗体の特異性は図１に示す様に、又対照実験及び免疫電顕による所見より高い特異性を示すことが明らかである。中枢神経系及び主要臓器の陽性所見は表Ｉに表記した通りである。肝・腎・小腸では吸収やイオン膜透過に関与する上皮細胞の界面に密集するミトコンドリアに分布している。眼球では図２に示す様に、角膜上・内皮、２層の虹彩上皮細胞、水晶体上皮細胞が陽性で、毛様体上皮の２層特に無色素上皮が濃染した。網膜では内境界膜に一致して３角形の陽性ゾーンがみられ、Ｍｕｅｌｌｅｒ細胞の足板突起に一致する。網膜色素上皮も陽性であるが長いミトコンドリアの豊富な内節は殆ど染色されなかつた。これらの所見は脳室壁の上衣細胞が陽性である事と共に、眼球のＯＡＴ陽性細胞が発生学的に脳室の上衣細胞由来であることを示している。これらの上衣細胞は髄液や房水の産生、神経組織の栄養と構築を支えている。しかし中枢神経系では図３に示す様に、海馬、大脳皮質、神経核のニューロンの細胞体や軸索に陽性所見が認められる。小脳のプルキヌエ細胞、ヒト末梢神経のシュワン細胞が陽性であった（図３）。これらニューロンではプロリン・グルタミン酸・GABA

表Ｉ．　ＯＡＴの免疫組織化学的分布

肝：中心静脈・門脈周囲肝細胞、胆管上皮
腎：近位・遠位尿細管上皮
消化管：胃・小腸・大腸の吸収上皮細胞
脳：大脳皮質・海馬のニューロン、神経核細胞、プルキンヌエ細胞、脈絡叢上皮
眼：角膜、虹彩上皮（２層），レンズ上皮毛様体上皮（２層）、網膜（ミュラー細胞と色素上皮），脈絡膜細胞、視神経乳頭。
その他：末梢神経シュワン細胞、筋。

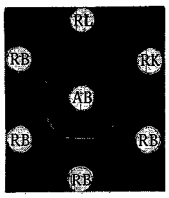


図１．オクタロニー２重拡散試験。ＡＢ：抗ラットＯＡＴ抗体、ＲＬ：ラット肝、ＲＫ：ラット腎、ＲＢ：ラット脳のＯＡＴ．

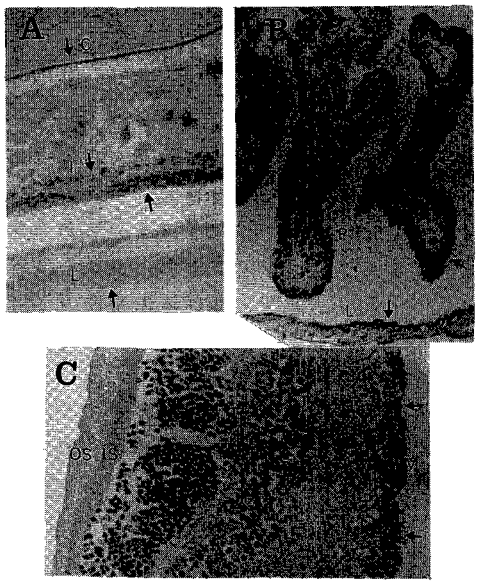


図２．Ａ：角膜（ｃ）－虹彩（ｉ）－レンズ（ｌ）、Ｂ：毛様体（すうへき部〔ｐ〕とへん平部〔ｌ〕、Ｃ：網膜（ｉｌｍ＝内境界膜）．

の生成やエネルギー産生・サイトゾールとミトゾールの酸化還元レベルの調節などにに関与しているらしい（５）。神経細胞ではオルニチンはプロリンのよい前駆体である（５）。このプロリンはグルタミン酸のアンタゴニストとして作用するが、そのシナプトゾームへの取り込みはエンケファリンによって調節を受ける（６）。

〔ラット眼球ＯＡＴのＥＩＡによる定量〕

ＯＡＴの免疫組織化学的分布が明らかになったので、定量的データーを得るために眼球細部のＯＡＴ含量を酵素免疫測定法（ＥＩＡ）で測定した。表ＩＩに示した様に毛様体に於ける含有量が最も高く、次いで脈絡・強膜、網膜、虹彩、角膜、レンズの順であった。この様な含有パターンはウイスターやＲＣＳ対照ラットでも認められた。我々は網膜変性マウスで神経網膜におけるＰ５Ｃ還元酵素の減少を見出したが（７）、ＲＣＳ網膜ジストロフイラットでも同様の減少を認めた。しかし、ＯＡＴの含量は逆に神経網膜と毛様体で増加傾向が認められる（表ＩＩ）。我々はホルモグアナミンを投与したニワトリ雛網膜でｓｅｃ－ｏｎｄａｒｙ　ｇｌｉｏｓｉｓにともなってＯＡＴ活性が増加すること（８）を見出したがこれと類似の現象と考えられる。

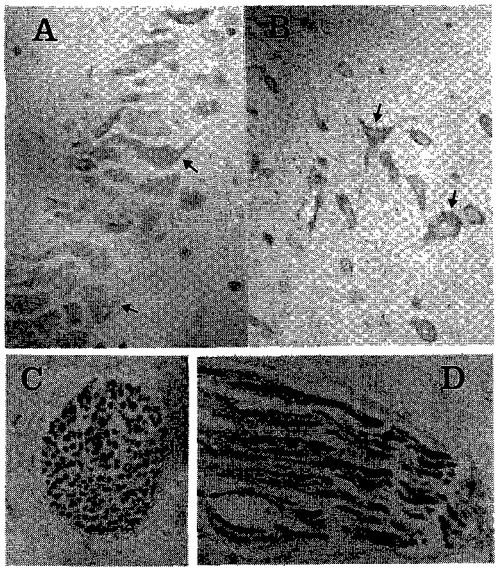


図３．Ａ：海馬歯状回、ｘ１００．Ｂ：大脳皮質、ｘ８０．Ｃ：末梢神経横断面、ｘ５３．Ｄ：末梢神経縦断面、ｘ６６。

表ＩＩ．ＲＣＳラット眼球各部のＯＡＴのＥＩＡによる定量

	対照ラット		網膜ジストロフイ
	おす	めす	めす
	（ＯＡＴ総量ｎｇ／眼球１個の組織）		
角膜	9.0 ± 2.4(6)	8.8 ± 2.1(2)	13.9 ± 2.9(4)
虹彩	11.5 ± 4.2(6)	8.8 ± 1.3(2)	9.2 ± 3.5(4)
レンズ	6.3 ± 3.0(6)	6.5 ± 1.0(2)	5.5 ± 2.8(4)
毛様体	71.1 ± 19.8(6)	82.1 ± 6.5(2)	97.8 ± 23.4(4)
網膜	31.7 ± 8.7(6)	36.6 ± 1.0(2)	50.2 ± 8.9(4)
脈絡・強膜	39.0 ± 6.9(6)	28.0 ± 14.7(2)	35.7 ± 17.8(4)

値は平均値±標準偏差。
ラット日令は１１０－１３０日令。
括弧内は測定数。

謝辞：本研究は鈴木政美、加藤敏晴、大西直子、榊原裕子、前田幸香らの協力によってなされた。

(1) Ishikawa, E., Yoshitake, S., Imanaga, M., and Sumiyoshi, A. (1983) Ann. N.Y. Acad. Sci., 420, 74-89
(2) Kasahara, M., Matsuzawa, T., Kokubo, M., Gushiken, Y., Tashiro, K., Koide, T., Watanabe, H., and Katunuma, N. (1986) J. Histochem. Cytochem., 34, in press
(3) Matsuzawa, T., Katsunuma, T., and Katunuma, N. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 161-166
(4) Ohura, T., Kominami, E., Tada, K., Katunuma, N. (1984) Clin. Chim. Acta, 136, 29-37
(5) Matsuzawa, T., Kasahara, M., and Obara, Y. (1985) Bull. J. Neurochem. Soc., 24, 307-309
(6) Rhoads, D.E., Peterson, N.A., and Raghupathy, E. (1983) J. Biol. Chem., 258, 12233-12237
(7) Matsuzawa, T., Iwasaki, K., Hiraiwa, N., Inagaki, E., and Ishiguro, I. (1982) Adv. Exp. Med. Biol., 153, 361-370
(8) Obara, Y., Matsuzawa, T., Kuba, N. and Fujita, K. (1985) Exp. Eye Res., 41, 519-526

118. ラット胚初代培養中枢神経細胞におけるα（+）型 Na^+, K^+— ATPase の発現

井上順雄・松井英男・津久井弘子*・畠中　寛*
（杏林大・医・生化学，三菱化成生命研・脳神経科学*）

〔要　約〕

ラット胚脳半球から細胞を分離，初代培養し，培養日数に伴うそのNa^+,K^+-ATPaseの量および性質の変化を検討した．１６日胚の脳の不溶性分画のNa^+,K^+-ATPase活性は，118±5(nmol/min·mg protein)(n=8)であった．一方，培養細胞の不溶性分画のNa^+,K^+-ATPase活性は，培養日数に伴い増加し，１３日間培養した細胞では379±17(nmol/min·mg protein)(n=11)であった．Na^+,K^+-ATPaseの分子種はStrophanthidinによる阻害実験で同定し，胚ではNa^+,K^+-ATPaseはほとんどがジギタリス低感受性(IC_{50}～１mM)のα鎖から成る酵素（α型）であるのに対し，１３日間培養後の酵素はα型の他にジギタリス高感受性(IC_{50}～１μM)のα(+)鎖から成る酵素（α(+)型）を含んでいる事が明らかとなった．即ち，培養によって増加するNa^+,K^+-ATPaseは主にα(+)型酵素であり，１３日間培養で１０倍以上になり，全活性に対する割合も５０％以上となった．このように培養した神経細胞においてα(+)型，α型両Na^+,K^+-ATPaseが実際にＮａポンプとして機能していることを明らかにする目的で，細胞へのK⁺取り込みを調べた．その結果，取り込みもウアバインによって二相性の阻害を受けることを確かめた．

Key word : Na^+,K^+-ATPase ; α(+) molecular form ; primary culture

Na^+,K^+-ATPase（Ｎａポンプ）は神経系において重要な機能を果たしている．特にニューロンでは膜電位維持のために活発に働いている．近年，ニューロンには他の細胞のα型酵素（α鎖とβ鎖を構成サブユニットとする）とは異なるアイソザイムα(+)型酵素（α鎖の代わりにα(+)鎖を構成サブユニットとする）が存在することが明らかとなった(１)．このα(+)型酵素は，ジギタリス感受性が高く(１，２)，ピリチアミンにより特異的に阻害を受ける(３)事等から，α型酵素と区別されアミノ末端構造も異なる(４)．しかし，ニューロンにはα(+)型酵素のみ存在するかあるいはα型酵素も存在するのか不明である．更にニューロンの発生とα(+)型，α型酵素の発現はどの様な関係なのかも明らかでなく，２種類の酵素の脳における機能上の相違の有無も全く不明である．

昨年我々は，ラットのクロム親和性細胞腫からクローン化されたPC12h細胞において，神経成長因子によって神経細胞様に分化させるとNa^+,K^+-ATPaseは増加するにもかかわらず，α(+)型酵素は誘導されないことを示した(２)．そこで，今回，培養系でα(+)型酵素が出現するのかどうか明らかにする目的で，ラット１６日胚脳から得た細胞を初代培養し，そのNa^+,K^+-ATPase活性，細胞へのK⁺取り込み活性を測定し培養に伴う変化を検討した．α(+)型とα型の酵素の区別はジギタリスに対する感受性で同定した．

［実験方法］

ラット(Wistar系)の１６日胚から脳を摘出し，トリプシンによって分散し細胞を得る．分離した細胞は，ポリエチレンイミンコートしたディッシュあるいはマルチウェル上に5×10^5 cells/cm^2の濃度でまき，５％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(５)．２又は３日毎に培地を交換し，その一回おきに１μＭのaraＣを添加した．比較に用いたＰＣ１２ｈ細胞は既に示した方法で培養した(２)．ディッシュ上に培養した細胞は0.32M Sucrose，1mM EDTAを含む5mM Imidazole-HCl緩衝液(pH7.4)で洗った後集め，ホモジナイズし，その１０万xg沈渣のNa^+,K^+-ATPase活性を測定した．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，１分preincubation後，ＡＴＰ（最終濃度2mM）を加え，１０分間反応させ遊離したリン酸の量により求めた．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(２)．

細胞へのK⁺の流入を測定するには，２４穴マルチウェル上に培養した細胞を用い，130mM NaCl，0.5mM KCl，0.8mM $MgCl_2$，1.8mM $CaCl_2$，5 mM glucose，25mM Hepes-Imidazole緩衝液(pH7.3)中で25℃で３０分間preincubation後，^{42}KClを添加し，１１分後に細胞を洗い，細胞内にとり込まれた^{42}Kを測定し求めた．尚，この^{42}Kは森永晴彦博士（西ドイツミュンヘン工科大学）によって開発され，日本アイソトープ協会から貸与された^{42}Ar-^{42}Kジェネレイターによって，作ったものである．

表1．ラット胚脳および培養脳細胞のNa⁺,K⁺－ＡＴＰase活性

培養日数	Na⁺, K⁺-ＡＴＰase活性 (nmol/min·mg protein) 全活性	α(+)型活性	α型活性
0（胎児脳） (n=8)	１１８± 5	１８± 4	１００± 3
2 (n=5)	１２９±１５[a]	４５± 5[a]	８４± 1
6 (n=10)	１８１± 8[a,b]	８３± 6[a,b]	９８± 6
１３ (n=11)	３７９±１７[a,b,c]	２０４±１２[a,b,c]	１７５±１５[a,b,c]

a，胚脳と比較して有意 ($p<0.01$)
b，２日間培養細胞と比較して有意 ($p<0.01$)
c，６日間培養細胞と比較して有意 ($p<0.01$)

［実験結果と考察］

表１に示すように細胞の不溶性分画の全Na^+,K^+-ATPase活性は，培養日数と共に増加し，１３日間培養した細胞では379±17(nmol/min·mg protein)と１６日胚の脳の不溶性分画の値の３倍以上になった．この値は，既に報告したＰＣ１２ｈ細胞の活性とほぼ同じ値であった(２)．図１に示すようにラットではStrophanthidinの阻害定数の違いからα(+)型酵素(IC_{50}～１μM)とα型酵素(IC_{50}～１mM)は

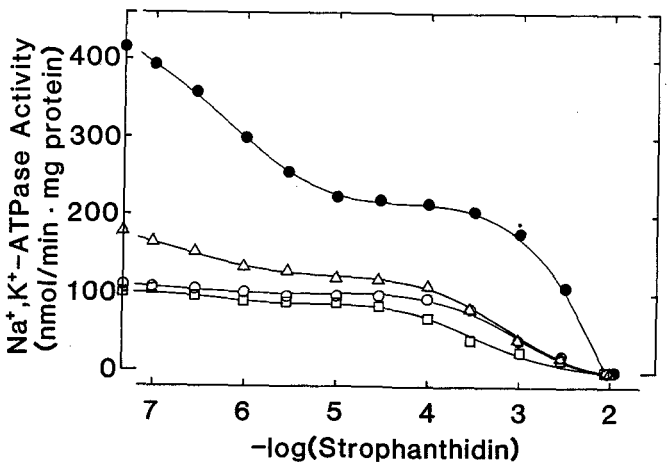


図１．ラット胚脳および培養脳細胞のNa^+,K^+-ATPase活性のStrophanthidin感受性．
○ １６日胚脳，□ ２日間培養細胞，△ ６日間培養細胞，● １３日間培養細胞

区別され(2)，胚の脳ではほとんどがα型酵素であるのに対し，培養とともにα(+)型酵素が出現，増加することが示された．便宜的に10^{-4}M以下で阻害される活性をα(+)型酵素による活性，10^{-4}M以上10^{-2}Mまでに阻害される活性をα型酵素による活性とし，表1の結果を得た．そして，培養によってα(+)型酵素が出現し増加する事が示され，13日間で10倍以上となった．一方，α型酵素活性の培養による増加は少なかった．これに対応して，全酵素中のα(+)型酵素の割合も16日胚の脳では15％以下であるが，培養2日間，6日間，13日間でそれぞれ35％，46％，54％となり培養とともに増加した．

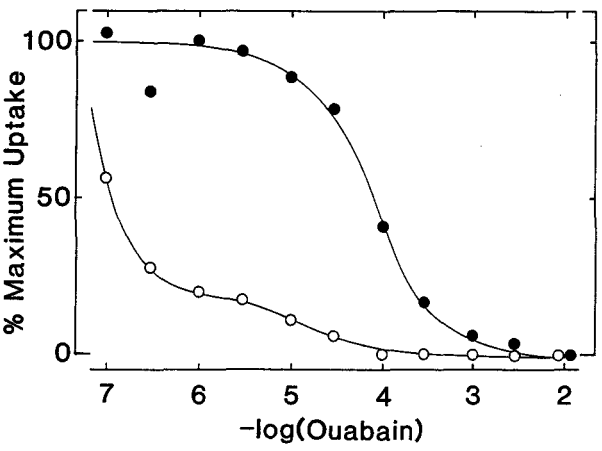


図2．ラット培養細胞のNa⁺,K⁺-ATPaseによる，細胞内へのK⁺の取り込みのOuabain感受性．
○ 13日間培養脳細胞，● PC12h細胞．

以上の結果は培養系において，myelinated axonに特徴的に存在するα(+)型酵素が発現する事を初めて示したものであり，α(+)型酵素の発現にmyelinationが必要ない事を直接示した．一方，培養時にaraCを添加し細胞分裂を抑えているので，培養細胞のほとんどは，ニューロンと考えられ，13日間培養細胞でも全酵素活性の約50％存在するα型酵素活性はニューロンに由来すると考えられる．即ち，ニューロンはα(+)型酵素とα型酵素両方を持つと推定された．一方，培養によって増加したα(+)型酵素は，ミエリンから得たaxolenmmaがα(+)酵素を持つ(1，2)事を考え合わせるとニューロンの分化につれ伸びた突起に存在している可能性がある．

Na^+,K^+-ATPaseのNa,Kポンプとしての働きを見るために細胞へのK⁺の取り込みを測定し，図2の様なウアバイン阻害曲線を得た．比較のために示したPC12h細胞は，α型酵素のみを持ち(2)，低感受性の単相性の阻害のみを受けた．これに対し，13日間培養した細胞は二相性の阻害曲線を示し，この細胞におけるα(+)型酵素，α型酵素の存在と対応し，両者が実際に細胞でポンプとして機能していることが明らかとなった．両酵素の機能上の相違の有無については今後の問題である．

［文献］

1. Sweadner, K.J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6060-6067.
2. 井上順雄，松井英男，畠中寛 (1985) 神経化学 24, 385-387.
3. Matsuda, T., Iwata, H., and Cooper, J.R. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3858-3863.
4. Lytton, J. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 132, 764-769.
5. Hatanaka, H. and Tsukui, H. (1986) Develop. Brain Res. in press.

119. 脳から精製したグリコーゲン合成酵素の性質及び活性調節

井上信博・岩佐隆史*・福永浩司*・松角康彦
宮本英七*　　(熊本大・医・脳外, 第一薬理*)

〔要　約〕

犬脳からグリコーゲン合成酵素（GS）を精製度約70%で部分精製した。精製した脳GSは、ゲル濾過、SDS-PAGE上の分子量がそれぞれ、225,000（ホロ酵素）、88,000（サブユニット）であった。骨格筋GSとは、ホロ酵素、サブユニットの分子量、ホスホペプチドが異なり、構造的に異なった蛋白質と考えられた。

脳GSは、脳 Ca^{2+}、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ（CaM-キナーゼ）によって燐酸化された。最大1.3モル／モル．サブユニットの燐酸化を認めた。0.4モル／モル．サブユニットで酵素の不活性化反応は平衡に達し、それ以上の燐酸のとりこみは効果がなかった。トリプシン処理して、逆相HPLCを用い燐酸化ペプチドを調べると、単一のペプチドピークの溶出を認め、骨格筋GSの既知ホスホペプチドのいずれとも一致しなかった。燐酸化アミノ酸残基は、セリンであった。脳から精製したcAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットおよびプロテインキナーゼCは、脳GSを燐酸化し、燐酸化反応に伴って、酵素の不活性化が認められた。以上の結果は、脳GSの Ca^{2+} による不活性化機構を明らかにし、本酵素が多様な調節下にあることを示唆している。

Key word：Multifunctional calmodulin-dependent protein kinase, glycogen synthase, brain

脳のグリコーゲン含量は、肝臓、骨格筋などに比べて少ないが、その代謝回転速度は、かなり速いことが認められている。[10] 脳グリコーゲンは、主なエネルギー貯蔵源として動的な役割を演じ、神経機能発現に関与していると考えられている。脳はグリコーゲン代謝酵素であるホスホリラーゼ、グリコーゲン合成酵素（GS）を保有している。最近、ヒスタミン[8]、ノルアドレナリン、脱分極刺激[9]が、脳細胞質への Ca^{2+} 動員を促進することを介して、脳グリコーゲン分解を増加させることが報告された。

私達は、先に骨格筋GSが脳 Ca^{2+}、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ（CaM-キナーゼ）によって燐酸化され[3]、燐酸化反応にともなって酵素が不活性化される[4]ことを報告した。燐酸化部位は、I_a、I_b、2であり、部位2が最も速く燐酸化され、他のプロテインキナーゼとは異なる特徴的な燐酸化反応を示した。本研究では、脳からGSを部分精製し、本酵素が脳CaM-キナーゼにより燐酸化をうけ、それに伴い不活性化されることを示し、それらの反応の性質を検討した。

〔実験材料と方法〕

脳のCaM-キナーゼは、既報[2]の方法に従い精製した。GSは犬脳の細胞上清分画から部分精製した。その操作は、DEAEセルロースカラム、硫安分画、セファロースCL-4B、カルモデュリン親和性カラムの順であった。蛋白質燐酸化反応は、既報[2]の方法に従い行なった。GS標本が、他の不純物を含んでいるので、SDS-PAGE[7]を行なった後、GSの染色パターン、オートラジオグラフをデンシトメーターにて分析した。GS活性の測定は、既報[4]の方法に従った。トリプシン処理後の燐酸化ペプチドの分析は、Juhlら[5,6]の方法により行なった。燐酸化アミノ酸の分析は、既報[11]の方法に従った。

〔実験結果と考察〕

1) 精製した脳GSの性質と骨格筋GSとの比較

犬脳から部分精製したGSは、PAGEおよびSDS-PAGE上、約70％の精製度を示した。比活性は、98－135 nmol/mg/min、G-6-P存在、非存在下の活性比は、0.45－0.55であった。後述するように、HPLC、ゲル濾過およびSDS-PAGE上、みかけの分子量は、Table 1に示されている。脳GSのホロ酵素、サブユニットは、骨格筋GSと同じ条件下の測定で、異なった分子量を示した（Table 1）。

Table 1. COMPARISON OF MOLECULAR WEIGHT BETWEEN SKELETAL MUSCLE GLYCOGEN SYNTHASE AND BRAIN GLYCOGEN SYNTHASE

	Skeletal muscle	Brain
HPLC	273,000 (± 700)	225,000 (± 10,000)
SDS-PAGE	87,000 (± 1,000)	88,000 (± 1,000)

2) 脳GSのCaM-キナーゼによる燐酸化反応

精製した脳GSを放射性ATPを用い、CaM-キナーゼによって燐酸化した後、Davis法[1]によるPAGEを行なった（Fig. 1A）。主なバンドと他に微細なバンドを認めた。同時に泳動したゲルを切片とし、切片の放射能を直接に測定した（Fig. 1B）。また、切片から蛋白を抽出し、GS活性を測定した。蛋白質燐酸化反応およびGS活性のピークは、電気泳動上のバンドと一致した。さらに、ピークに相当する切片から抽出した蛋白質をSDS-PAGEで分析すると88,000の分子量をもつ単一の蛋白質バンドを示し、オートラジオグラフ上燐酸のとりこみと一致した（Fig. 1C）。この結果を確認するために、次のような実験を行なった。精製した脳GSをHPLCのゲル濾過カラムに展開させた。得られた分画について蛋白質燐酸化反応と酵素活性を測定すると、両活性は一致していた。また、ピーク分画を燐酸化した後、SDS-PAGEで分析すると、単一の蛋白質バンド（MW 88,000）が観察され、燐酸のとりこみが認められた。以上のことから、脳GSは、CaM-キナーゼにより燐酸化され、そのサブユニットの分子量は、88,000であることが判った。

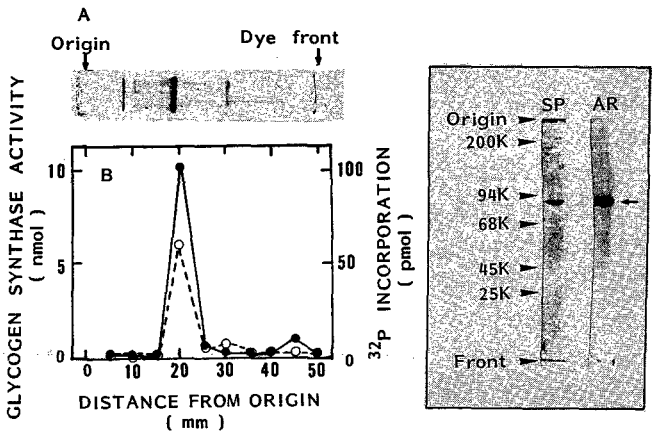


Fig. 1 Coincidence of major protein band with activity and phosphorylation of brain glycogen synthase.
A) Protein staining of partially purified glycogen synthase which was subjected to PAGE in 5 % acrylamide by the method of Davis. B) The activity (●—●) and phosphorylation (o---o) of brain glycogen synthase in gel slices of PAGE. C) SDS-PAGE in 9 % acrylamide using the eluted protein from the gel slice of Fig. 1B at the peak. SP, staining pattern; AR, autoradiograph. An arrow represents the position of the protein at MW 88,000.

3) 脳GSの燐酸化反応と活性に対する効果

脳GSのCaM-キナーゼによる燐酸化反応と活性に対する効果を調べた（Fig. 2）。5分間のインキュベーションにて、GSは、0.7モル／モル．サブユニット燐酸化された（Fig. 2A）。カルモデュリン無添加で、0.25モル／モル．サブユニットの燐酸化が認められた。すなわちGS酵素標本は、カルモデュリン非依存性プロテインキナ

ーゼ活性を含んでいることを示している。長時間インキュベーションすると、最大1.3モル／モル．サブユニットの燐酸のとりこみを認めた。脳GSに対するCaM－キナーゼのK_mとV_{max}は、それぞれ4.8 μMと200 nmol／mg／minであった。GSの燐酸化反応に伴って、酵素の不活性化が認められた(Fig. 2B)。活性比の減少は2分以内に平衡に達した。その時の燐酸のとりこみは、0.4モル／モル．サブユニットであった。これらの結果は、GS活性に関係した部位が先ず、燐酸化され、続いておこる燐酸のとりこみは、酵素活性に影響のないことを示している。

4) 脳GSのホスホペプチド

脳GSをCaM－キナーゼにより燐酸化した後、トリプシン処理し、逆相HPLCを用いて分析した。すでに報告した通り[4]、骨格筋GSは、CaM－キナーゼによって、部位I_a、I_b、2が燐酸化される。それぞれの部位は、本HPLCによって、18－20、64、120分の位置に溶出された。対照的に、脳GSのホスホペプチドは、50分の溶出位置に、ほぼ単一のピークとして認められ、既知の骨格筋GSのいずれの部位とも一致しなかった。ホスホペプチドの溶出位置は、燐酸のとりこみ量にかわりなく同じであった。燐酸化アミノ酸残基は、セリンのみであった。

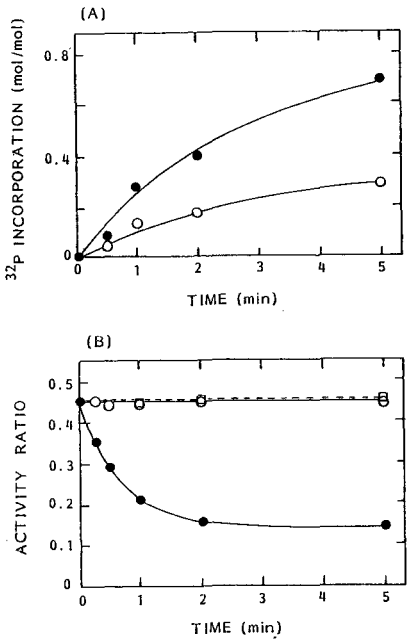


Fig. 2 Time course of phosphorylation and inactivation of brain glycogen synthase. (A) Phosphorylation of the 88,000 protein in the presence (●—●) and absence (○—○) of calmodulin under standard conditions. (B) Change of activity ratio. Symbols are the same as in (A). The activity ratio was determined in the absence of ATP (□---□) in the reaction for phosphorylation.

5) 他のプロテインキナーゼの効果

脳から部分精製したcAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットおよびプロテインキナーゼCの脳GSに対する効果を調べた。脳GSは、両酵素によって燐酸化され、燐酸化反応に伴って、酵素の不活性化が認められた。脳ホスホリラーゼキナーゼが、Ca^{2+}によって活性化されることが報告されている。本研究は細胞質へのCa^{2+}動員が刺激された時に、解糖作用が促進する機能の一面を示していると考えられる。

REFERENCES

1) Davis B.J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-427.
2) Fukunaga K., Yamamoto H., Matsui K., Higashi K., & Miyamoto E. (1982) J. Neurochem. 39, 1607-1617.
3) Iwasa T., Fukunaga K., Yamamoto H., Tanaka E., & Miyamoto E. (1983) FEBS Lett. 161, 28-32.
4) Iwasa T., Fukunaga K., Yamamoto H., & Miyamoto E. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 235, 212-217.
5) Juhl H. & Soderling T.R. (1983) Methods Enzymol. 199, 37-48.
6) Juhl H., Sheorain V.S., Schworer C.M., Jett M.F., & Soderling T.R. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 222, 518-526.
7) Laemmli U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
8) Quach T.T., Rose C., & Schwartz J.C. (1978) J. Neurochem. 30, 1335-1341.
9) Ververken D., Veldhoven V., Proost C., Carton H., & De Wulf H. (1982) J. Neurochem. 38, 1286-1295.
10) Watanabe H. & Passonneau J.V. (1973) J. Neurochem. 20, 1543-1554.
11) Yamamoto H., Fukunaga K., Goto S., Tanaka E., & Miyamoto E. (1985) J. Neurochem. 44, 759-768.

120. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine（MPTP）の神経毒性効果に対する肝薬物代謝酵素の関与

松村敏弘・佐藤信範・只野　武・木皿憲佐・荒井裕一朗
杵鞭宏育　（東北薬科大・薬理）

〔要　約〕

1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine(MPTP)のDopamineニューロンに対する神経毒性の作用に肝の薬物代謝酵素が関与するか否かを検討する目的でSKF525-A又はPhenobarbital(PB)をマウスに連続投与後MPTPの作用を行動薬理学的に検討した．SKF525-A(10mg/kg)前処理後MPTP(10mg/kg)を連続7日間投与すると経日的にCatalepsyの誘発が増加し、その作用はMPTP(50mg/kg)単独投与時と比較しより強力で、かつ長時間継続した。しかし、MPTP誘発Catalepsyは反対にPBの前処理により著明に減弱した。懸垂法、握力テストおよびRotarod法で測定した場合、筋統制機構に対してMPTP単独投与は障害を与えたがSKF525-Aの前処理では無影響で、Rotarod法での場合を除きPBでは反対にMPTPの運動失調作用を減弱した。以上の成績からMPTPのDAニューロンに対する神経毒性効果を行動薬理学的に検討した場合、MPTPのCatalepsyに対する作用はMPTPの肝での代謝を阻害するとMPTPの脳内濃度が上昇して増強される可能性を示唆している。

Key word： MPTP+SKF525-A Catalepsy Neurotoxicity

MPTP(1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine)は黒質－線条体Dopamine(DA)neuronを特異的に変性させ、パーキンソン病を誘発する化合物として注目されている(1)。この神経毒性はMPTP自身によるものではなく脳内MAO-Bにより酸化物1-Methyl-4-Phenylpyridium(MPP^+)へ代謝されることが必須とされている(1)。以来、MPTPによるパーキンソン病の動物モデル作成が可能となり、発病原因の究明と共に、この化合物への関心が高まっている。しかし、MPTPはヒトおよびサルに対して極めて強い神経毒性を容易に発現させるのに反しマウス、ラットなど齧歯類に対しては神経毒性効果、例えばパーキンソン病の動物モデルと考えられるCatalepsyの出現や黒質－線条体DAの減少を誘発させるには高用量のMPTPを連続投与する必要があり、投与経路も考慮する必要性も指摘されている(2)。一方、ラット肝ミクロソーム標本でもMPTPはMPP^+へと急速に酸化されることが報告され(3)、MPTPのMPP^+への代謝にCytochrom P-450系の関与が示唆されている。今回我々は肝薬物代謝系のMPTP神経毒性発現への関与を解明する為に、薬物代謝酵素阻害剤であるSKF525-Aを前処理後、MPTPの連続投与を行い、その影響を主として行動薬理学的に検討した。

実験材料および方法

実験には全て体重25±1gのddY系雄性マウスを使用した。マウスにMPTP10及び50mg/kg(i.p.)を一定期間1日1回連続7日間投与し、それぞれ投与1時間後と休薬後の各種の行動を経日的に観察した。SKF525-A10mg/kg前処理の影響を検討した場合は、投与40分後にMPTP10mg/kgを腹腔にそれぞれ7日間連続投与し、その投与期間で投与1時間と休薬後7日間の行動を観察した。Phenobarbital(60mg/kg,i.p.)前処理の場合は連続5日間の投与後にMPTPを投与し比較検討を行った。行動観察としてCatalepsyはCourvoisierらの方法(4)、運動失調の検討にはCourvoisierらの懸垂法(4)とDunham and MiyaのRotarod法(5)に従い測定を行った。Akinesiaの測定は小川らの方法(6)に従い、垂直の鉄棒(8×550mm)の上端に上向きにマウスをつかまらせ、完全に下向きになる迄の時間(Tturn)と下の床に降りる迄の時間(T_{LA})を各々測定した。また、握力テストは直径2cmのステンレスパイプにマウスの前肢をかけさせ、20秒以上そのままの場合を4、10～19秒を3、3～9秒を2、摑めない時を1とし、金網にのせ、網をひっくりかえすと3秒以内に落下するものを0として各々スコアー表示を行った。

実験結果および考察

1)カタレプシー発現におよぼすSKF525-Aの影響

MPTP低用量(10mg/kg)を単独で連続7日間投与の場合、Catalepsyは、いずれの時点でもほとんど誘発されなかった。しかし、SKF525-A前処理後にMPTPを10mg/kg連続投与を行うと投与2日目からCatalepsyの発現とその保持時間の延長がみられ、この作用は経日的に増強される傾向がみられた。さらに、SKFとMPTP (10mg/kg)併用でみられた群ではMPTP50mg/kg単独投与群でみられたCatalepsyよりも2日目以降では、より強く出現した。また、SKF525-A前処理群でみられたCatalepsy誘発作用は休薬7日後でもみられ、その作用はMPTP50mg/kg単独投与群よりも、より強力であった(図1)。一方、先に我々はMPTP一回投与時のLocomotor activityにおよぼす影響を検討した結果、投与初期(1時間以内)にのみLocomotor activityを減少させることを報告した(7)。しかし、MPTPによるCatalepsy誘発作用は投与初期のみならず、SKF525-A前処理では投与24時間後にもCatalepsyを誘発しこの作用はMPTP単独群と比較し図1とほぼ同様に強い事が示された。この結果から、MPTPのCatalepsy誘発作用はSKF525-Aにより肝の薬物代謝酵素が阻害された結果増強された可能性が示唆されるそこでPhenobarbital(PB,60mg/kg,i.p.)を5日間連続投与後MPTPを投与しCatalepsy誘発作用をMPTP単独投与の場合と比較検討を行った。なお、この際MPTP50mg/kg投与1時間後に、30秒間以上Catalepsyの継続を示すマウスを陽性と判定し出現率で表示した。その結果、PB前処理後MPTP連続投与3～6日後のCatalepsyの出現率は10%にすぎず、これも休薬後では直ちに消失した(図2)。従ってＰＢ前処理後ではMPTPを50 mg/kgと高用量を投与してもそのCatalepsy誘発作用は著明に抑制された。このようにMPTPの

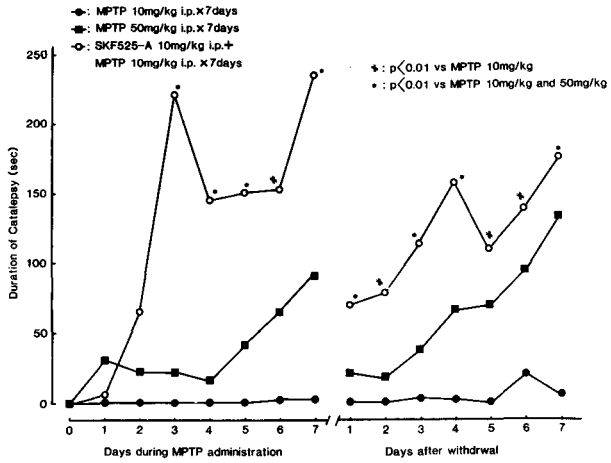


図 1. MPTP及びSKF525-A+MPTP連続処理のCatalepsyにおよぼす影響

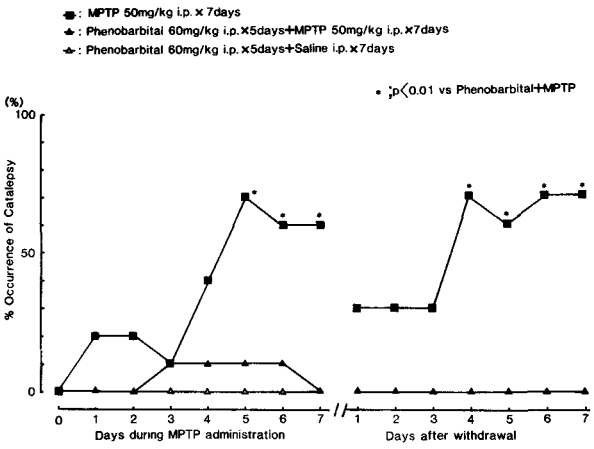


図 2. MPTP及びPhenobarbital+MPTP連続処理のCatalepsyにおよぼす影響

Catalepsy誘発作用は肝ミクロソームのCyto-chrom p-450系によって影響されることが示唆される。

2)筋統制機構におよぼす影響；懸垂法および握力テストの結果からMPTP50mg/kgの単独投与群では投与回数の増加に伴い、いずれも筋緊張に障害を与え、一方、PBで前処理を行うとMPTP50 mg/ kg単独でみられた筋緊張の障害はむしろ反対に減弱された。しかし、MPTP10mg/kg投与群ではSKF525-Aを前処理しても筋緊張に無影響であった(図3)。さらに、Rotarod法で測定を行った結果はいずれもSaline投与群との間に有意な差は認められなかった。従ってSKF525-Aの前処理はMPTPによる筋統制機構に対しては無影響であることが判明した。

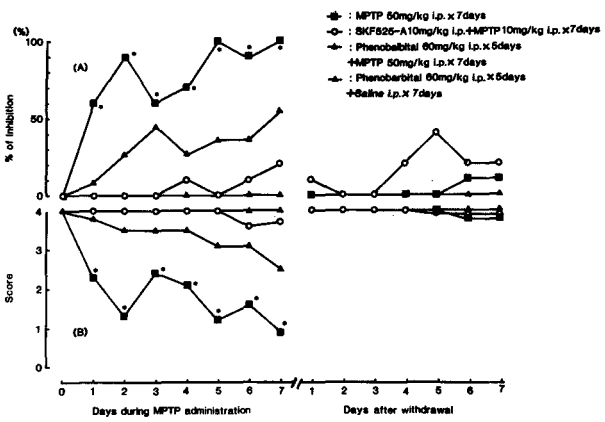


図 3. MPTP,SKF525-A+MPTP及びPhenobarbital +MPTP連続処理の懸垂法(A)及び握力テスト (B)に及ぼす影響
＊ : $p<0.05$ vs Saline

3)Akinesiaにおよぼす影響；MPTP50mg/kg単独投与群、SKF525-AとMPTP 10mg/kg併用投与群のいずれも投与期間中ならびに休薬後においてTturnおよびTLAに対してSaline処理群と比較して有意な差は認められなかった。従ってMPTPはSKF525-A前処理の場合もAkinesiaには影響を及ぼさないものと思われる。以上のごとくMPTPはSKF525-A前処理によりCatalepsyの発現とその強度を著明に増強することが明らかになった。この際SKF525-AによるCatalepsyの発現はMPTP投与後の初期のみならずMPTP休薬後も長期間にわたり継続し反対にPBにより減弱又は消失がみられた。従ってMPTPのCatalepsy誘発作用は肝薬物代謝酵素の活性に大きく依存している可能性が示唆される。この事はSKF525-A前処理後、MPTPのマウスに対するLD_{50}値がMPTP単独投与(約60mg/kg,i.p.)に比しはるかに低値(15mg/kg)へと移行することからも一部支持される。目下、MPTP単独投与時と各薬物前処理後の線条体DA量とその代謝物の変化を測定中である。

一方、 MPTP投与により発現する運動機能への作用を検討する目的で筋統制機能へのSKF525-AとPBの併用を検討した。その結果懸垂法ではSKF525-A前処理の影響は全くみられず反対にPBでは運動機能失調状態をむしろ改善する傾向さえ認められた(図3)。又、 Rotarod法ではMPTPとSKF525-Aを併用しても協調運動の障害を示唆する成績は得られなかった。この原因は、MPTP投与の際にしばしば見られるSpecies differenceに基因しMPTPはマウスにCatalepsyを容易に誘発するか、Sensitivityが低いためか又はCatalepsy誘発原因と他の運動失調の原因とが異なる可能性も考えられる。

1) Langston,J.W.(1985) Trends in Neuro Sci. 8,79-83,
2) Heikkila,R.E.et.al.(1984) Sci. 224,1451-1453
3) Weissman,J.et.al.(1985) J.Med.Chem.28,997-1001
4) Courovisier,S.et.al.(1975) In:Psychotropic Drugs, Ceds.Garateini,S and Ghetei,V,Elsevier,Amsterdam pp373
5) Dunhan,N.W. and Miya,T.S.(1957) J.Am.Pharm.Assoc.Sa. 46,208-211
6) 小川紀雄ら,(1985) 神経化学,24,163-165
7) 只野武ら,(1986) 薬物・精神・行動,6,83-84

121. 成人型 Adrenoleukodystrophy 脳の病変各部による Sphingolipids と Cholesterolester の相違

武富　保・原　厚・北沢信子　(信州大・医・脂質生化)

〔要　約〕

成人型ＡＬＤ脳白質の脱髄病変部位と正常部位、及び視床外側の変性部位と視床内側の正常部位について、Sphingolipids とCholesterolester（ＣＥ）について分析を試みた。この結果は、白質正常部位に比して、脱髄部位にはミエリンの主要脂質であるCerebroside（ＣＭＨ）とSulfatide（ＣＳＥ）が著減し、Sphingomyelin（ＳＭ）が主体を成し、また、Cholesterolesterの蓄積も認められた。脱髄部位に残存するCerebroside とSulfatide の脂肪酸は短鎖化と長鎖オキシ酸の減少が認められ、これらは正常部位のものと明らかに違つた。また、Sphingomyelin の長鎖脂肪酸が著減し、正常部位のSphingomyelin とは明らかに違つた。このことは病理所見でも認められた脱髄に伴なう肥胖性星状膠細胞の増殖にかかわるものと思われた。また、Cholesterolesterの蓄積もミエリン脂質崩壊に伴なう脂肪顆粒細胞の出現と一致した。

視床変性部位と未変性部位では脂質構成と脂肪酸組成に際立つた違いを示さなかつた。本症のこれら分析結果はＡＬＤで、脳障害の発症機序を解明する上に役立つものと思われる。

Key word：
Adrenoleukodystrophy(ALD), Sphingolipids, Cholesterolester

本症脳の試料は鳥取大医学部神経病理部門中村晴臣教授によるものである。患者の臨床像は脊髄小脳変性症とりわけＯＰＣＡに酷似しており、通常の小児ＡＬＤ、成人型ＡＭＮとはかなり掛け離れているが、病理学的には白質の病変は全くＡＬＤと一致する所見で、副腎皮質細胞内に特徴的な線条封入体も認められている。広範な灰白質の変性も見られている。近年、ＡＬＤは先天性脂質代謝障害による遺伝性脂質蓄積症とされ、とりわけ、蓄積脂質は長鎖脂肪酸を有するCholesterolesterで、本疾患を一般に長鎖脂肪酸の代謝障害とする報告が多い。しかしながら、いずれも確固とした証拠に乏しく、症例も世界的に多い割りには不明な点があまりにも多い。我々は本症脳の今までの報告にとらわれずに脂質分析を試みたので発表したい。

［実験方法］

患者は男性で３７歳で死亡。病理解剖後、神経病理組織学的所見が取られた。Formalin固定脳の各部位と比較のため対照Formalin固定脳（２７歳男性進行性筋ジストロフィー患者）の相当部位が実験材料として用いられた。脳の各部位は水洗にて、よくFormalinを除き、濾紙でよく脱水する。この組織をC-M(2:1, v/v)で抽出して総脂質を得た。この一部をＴＬＣにて単純脂質を同定し、また、他の一部をアルカリ処理後、中和して、Folch 分配し、その下層にSphingolipids を得、ＴＬＣにより同定した。各脂質をPreparative ＴＬＣ及び珪酸カラムにより得て、メタノリーシス後、ＧＬＣにより脂肪酸、Cholesterol 、糖を分析した。ＧＬＣにはOV-101と

Thermon-3000のキャピラリー・カラムが用いられた。不飽和モノエン酸の異性体はオゾン酸化によつて得られるFatty aldehydeのＧＬＣ分析によつて確認した(1)。

［結　果］

脳各部位のFormalin 固定に対して比較的安定なSphingolipids のＴＬＣがFig.1 に、また、Fig.2 にそのDensitometric scanのパターンが示されている。ここでは、病理組織学的に高度の脱髄を示した大脳後頭葉白質にミエリン脂質のCerebroside とSulfatide の著減が見られた。しかしながら、Sphingomyelin はかなりよく保たれていた。脱髄のない前頭葉白質は対照脳白質と殆ど変わりないことが分かつた。他方、視床外側は病理組織学的には変性が高度で軟化を示しているにも拘らず、変性の殆どない視床内側とSphingolipids の組成にはあまり違いは見られなかつた。また、対照脳の視床のそれらとも違いはなかつた。次に、Fig.3 に見られるように、脱髄の後頭葉白質にはCholesterolesterの存在が認められたが、脱髄のない前頭葉白質には微量であり、Cholesterolesterのは存在は脱髄のMarkerであることを明瞭に示した。　更に、これらSphingolipids とCholesterolesterの脂肪酸組成がＧＬＣ分析によつて明らかにされた。それらの結果は組成百分率で求められてた（学会当日に呈示）が、ここではＧＬＣのパターンをFig.4 に示すことにした。

ここに見られるように、脱髄部位のSphingomyelin はよく保たれているにも拘らず、脂肪酸組成がミエリンのそれとは全く異なり、視床のそれとはやや類似した。

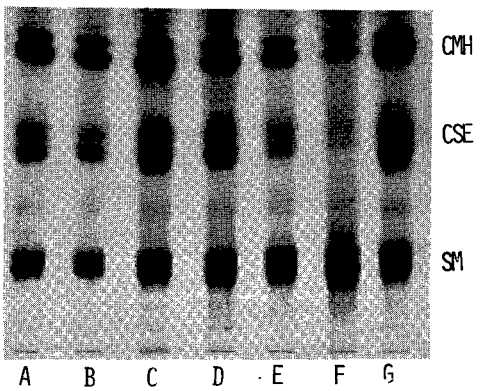


FIG.I

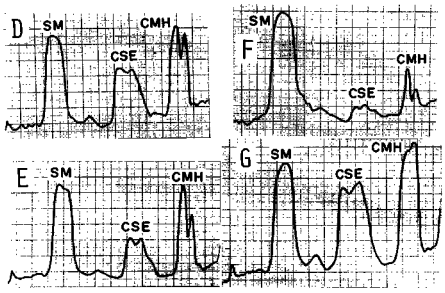


FIG.2

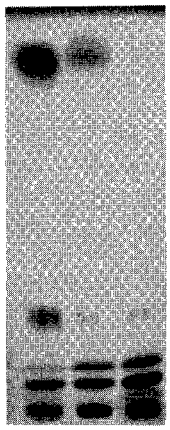


FIG.3

A: CONTROL OCCIPITAL LOBE
B: 〃 THALAMUS
C: 〃 FRONTAL LOBE
D: ALD THALAMUS
E: 〃 THALAMUS (LESION)
F: 〃 OCCIPITAL LOBE (LESION)
G: 〃 FRONTAL LOBE
S: STANDARD SAMPLES

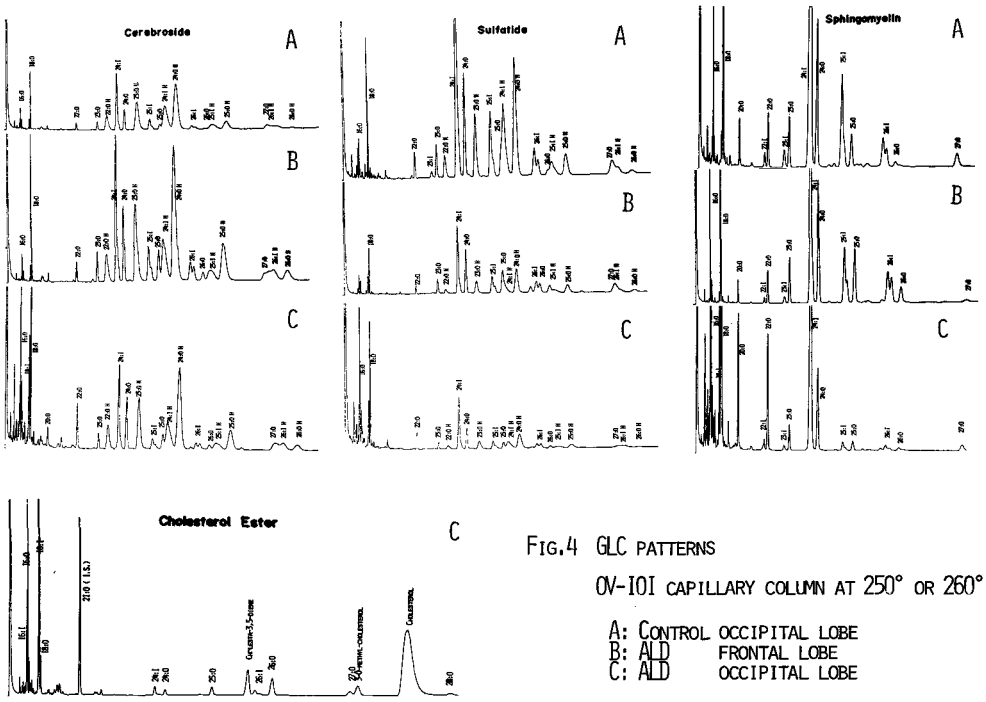


FIG.4 GLC PATTERNS
OV-101 CAPILLARY COLUMN AT 250° OR 260°
A: CONTROL OCCIPITAL LOBE
B: ALD FRONTAL LOBE
C: ALD OCCIPITAL LOBE

おそらく、脱髄部位に見られるAstrogliosisを反映しているように思われた。 脱髄部位のCerebroside とSulfatide の脂肪酸は短鎖化と長鎖オキシ酸の減少が著しく、脱髄現象で一般に言われている傾向が本症例にも認められた。 脱髄部位のCholesterolesterの存在は貪食性の脂肪顆粒細胞の出現と一致した。 このCholesterolesterの脂肪酸組成はC22以上の脂肪酸が約２０％ではあつたが、C18:1酸がやはり主体を成した。 このC18:1はn-9 とn-7(2)からなり、また、Sphingolipids のモノエン酸にもn-9 とn-7 があることが確かめられた。 従来、本症で報告されているように、CholesterolesterはC22以上の脂肪酸を含むものの、ミエリン崩壊によるSphingolipids の長鎖脂肪酸の減少とむしろ関連しているものと思われた。

［考 察］

本症例は病理学的にはＡＬＤと一致する所見で、ミエリン脂質の異常が脱髄部位で顕著であるが、非脱髄部位では正常脳とほとんど差異は見られなかつた。脱髄部位に比較的よく残つたSphingomyelin は、ミエリン膜のそれよりむしろ細胞膜一般に見られる脂肪酸組成に類似し、肥胖性星状細胞などの増殖と関係あるものと思われた。

［文 献］

(1) 河村成子、武富保(1972)神経化学11,79
(2)Yates,A.J.,Kishimoto,Y.et al.(1983)Neurochem.Pathol.1,103

122. 極長鎖脂肪酸伸長反応における N-ethylmaleimide の効果

斎藤寿仁・吉田　敏・竹下正純　　(大分医大・生化学)

〔要　約〕

ブタ脳ミクロソームでの,eicosenoil-CoA(20:1-CoA)鎖長伸長反応を阻害剤を用い検討した。20:1-CoAを外部基質とし,malonyl-CoAとの縮合反応,および伸長反応に関与する複合酵素系の特徴を明らかにするため,SH阻害剤N-ethylmaleimide(NEM)を反応液中に加え,反応活性をGC-MS,ラジオHPLC(RLC)で測定した。NEMにより内在性基質に対する縮合,伸長活性がともに濃度に依存して低下した。外から加えた20:1-CoAに対しての縮合活性は濃度に依存し低下したが,伸長活性で,22:1合成活性はNEM濃度が高いところでやや増強,24:1は高濃度ほど活性が低下した。NEM0.6mMで,RLC上,hexacosenoic acid(26:1)と思われるピークが出現し,該当部分を分取後,ラジオガスクロ(RGC)にて同定された。26:1合成活性はNEM0.6mMで顕著に増大したが,高濃度では阻害された。これらの結果から20:1-CoAを外部基質とする1不飽和脂肪酸伸長反応で,NEM阻害効果に注目すると,内在性基質・外部基質の縮合活性は飽和脂肪酸の場合と同様な阻害を受け,伸長活性では,内在性基質に対する活性は強い阻害を受けた。外部基質に対する伸長活性はNEM濃度に依存した阻害は受けず,特に低濃度NEMで,26:1への鎖長伸長活性が増強されるという事実が示された。

Key word : Brain microsomes, N-ethylmaleimide(NEM)
Very-long-chain acyl-CoA elongation

〔緒　言〕

炭素数22より大の極長鎖脂肪酸はcerebroside, sulfatideの主要構成々分としてミエリン形成に重要な役割りを占めることはよく知られている。これまで我々は,ミエリン形成の機序を知る上で重要なこれら極長鎖脂肪酸合成酵素系の反応の性状,および調節機構を明らかにする目的で種々の酵素化学的解析を行い,本学会等に報告してきた。今回,ブタ脳ミクロソームでの極長鎖1不飽和脂肪酸合成反応解明の一環として,NEM阻害効果に着目し,20:1-CoAを外部基質としたブタ脳ミクロソームでの縮合活性ならびに伸長活性の解析を行った。NEMは,脂肪酸伸長酵素のSH基,および,acyl-CoA synthase活性を阻害するかどうかを調べる目的で用いた。NEM存在下で20:1-CoAを基質とし,22:1,24:1への鎖長伸長活性の特徴ならびに,NEM0.6mMのもとで生成された26:1の同定,伸長反応の特徴を報告し,極長鎖脂肪酸が蓄積する病態との関連についてコメントを加える。

〔実験方法〕

(1)　生後5ないし6ケ月の成熟ブタ脳ミクロソーム(Ms)調整は既に報告された方法によった。(1)

(2)　縮合活性,伸長活性測定のための反応液の調整,反応時間の設定は既に報告された方法(2)にしたがった。NEMはMsを加える直前に添加した。

(3)　縮合活性の測定はGC-MSによったが従来,便宜的に用いてきた方法に変え定量性を増した方法(3)を採用した。1不飽和系酵素反応のうち,22:1-CoAを外部基質とした縮合生成物23:1-2-oneをRLCにて分離収集し,GC-MSにかけ,mass spectrumから検出感度の高いm/zを調べ,mass fragmentogram(MFRA)を求めた。一方,分取した,23:1-2-oneをGCにて定量した。GC-MSのデータとGCのデ

ータとを比較し,MFRAintensityを実際量に換算した。

(4) 伸長反応の活性測定は,HPLC(Model CCPM Toyo Soda Co.)にサンプルをかけ,radio analyzer(Model RLC-551 Aloka)で放射活性をカウントした。カラム(TSK-ODS-120T 4 mm×30cm)は25℃に保ち,流量は0.4ml/minとした。溶媒系は95%アセトニトリル/H_2O(PH3)→80%アセトニトリル/10%テトラヒドロフラン/10%メタノールのgradient系を用いた。

(5) 伸長反応生成物26:1はRLCチャート上に出現したピークの該当部分をフラクションコレクターで分取の後,RGCにかけ26:1放射活性ピークの保持時間と,Msの内在性脂肪酸をFIDにより検出して得たピークの保持時間とを比較し同定した。

〔結果と考察〕

22:1-CoAを外部基質とした縮合生成物,23:1-2-oneのmass spectrumを図1(A)に示した。これによるとm/z=71,58で検出感度が高いことが判明し,m/z=71,58でモニターして図1(B)のMFRAを得た。内部標準のintensityとの比で求め便宜的に使用していたintensityの単位unitは,m/z=71で1unit=12pmoleと換算された。20:1-CoAを外部基質とした縮合活性に対するNEM阻害効果は20:0-CoAを外部基質にした縮合活性への阻害と同様に濃度に依存して活性が低下した。内在性基質16:0-CoA,20:4-CoAに対しての縮合活性は著明に阻害され6mM NEMで活性が消失した。

20:1-CoAを外部基質とした鎖長伸長活性へのNEM添加効果を図2に示した。(A)はNEMを加えない場合,(B)は0.6mM加えた場合である。内在性基質の伸長活性は0.6mMで著明に阻害を受けた。これはacyl-CoA synthaseが強く阻害されたためと考えられる。NEM0.6mMで保持時間50分付近に26:1と思われるピークが出現した。ピーク部分を分取し,RGCにかけ図3の

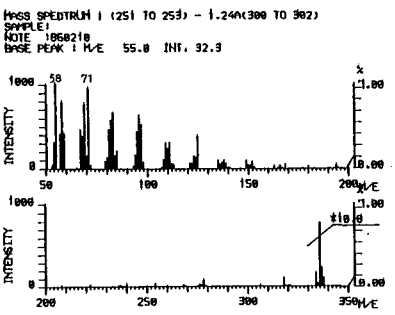


Fig.1.(A) Mass Spectrum of 23:1-2-one.

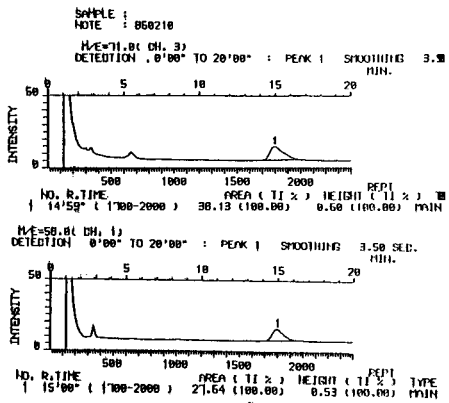


Fig.1.(B) EI-MFRA of 23:1-2-one.

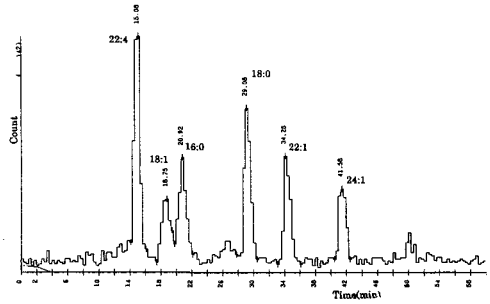


Fig.2.(A) RLC pattern of 20:1-CoA in the absense of NEM.

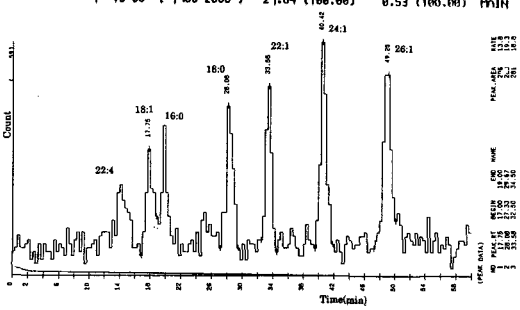


Fig.2.(B) RLC pattern of elongation of 20:1-CoA in 0.6 mM NEM.

patternを得て,当該ピーク部分を26:1と同定した。

NEM存在下での20:1-CoAからの伸長活性を図4に示した。22:1の合成はNEM濃度によらずほぼ一定か,微増する傾向があり,24:1は減少する傾向があった。26:1はNEM0.6mM存在下で22:1,24:1,26:1への鎖長伸長活性の時間依存性を調べたところ,22:1,24:1への伸長活性は類似のpatternを示し,26:1への活性では10分付近で活性が出現し約20分で一定となった。一方,飽和脂肪酸鎖長伸長反応の例として,20:0-CoAを基質として,NEM存在下で,伸長活性を検討すると,26:0に対応する活性がNEM濃度0.6mM付近で出現した。

これらの結果から,ブタ脳ミクロソーム中には,20:1-CoAを基質に26:1までの連続した鎖長伸長過

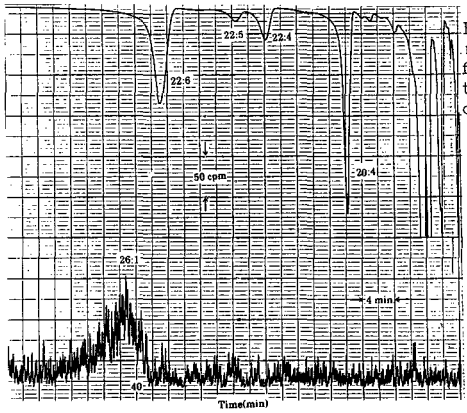


Fig.3 The FID pattern of microsomal endogenous fatty acid,and the radio activity pattern of 26:1.

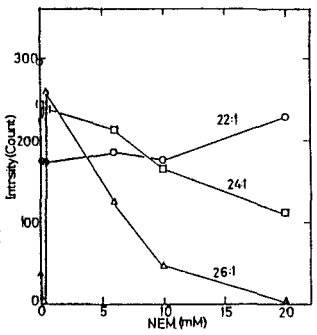


Fig.4. Effect of NEM on fatty acid elongation with 20:1-CoA as the substrate.

程が存在し,26:1への伸長活性は普段は抑制されているが,低濃度NEMによって活性が増大する事実が示され,acyl-CoA synthaneの阻害と何らかの関連が示唆される。Tsujiら(4)は,adrenoleukodystrophy(ALD)患者fibroblastで正常と比べ極長鎖脂肪酸への伸長活性が相対的に増強した事実を報告している。Hashimiら(5)はX-linked childhood ALD患者fibroblastのperoxisomeでlignoceroyl-CoA ligase活性が欠損している可能性を示唆している。ALDやZellweger病で炭素数26の脂肪酸が増加する事実(6)と,低濃度NEMで26:1への伸長活性が著増する事実とに何らかの関連性が存在する可能性がうかがえる。

〔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. and Takeshita,M. submitted for publication.

(4) Tsuji,S., Ohno,T., Miyatake,T., Suzuki,A., Yamakawa,T. (1984) J.Biochem. 96, 1241-1247.

(5) Hashimi,M., Stanley,W., Singh,I. (1986) FEBS LETTERS. 196, 247-250.

(6) Singh,I., Moser,A., Goldfischer,S., Moser,H. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 4203-4207.

123. 脳ミクロソームの長鎖脂肪酸伸長系における脂質—酵素間相互作用

吉田　敏・亘　　弘*・斎藤寿仁・竹下正純
（大分医大・生化学，生理研*）

〔要　約〕

ブタ脳ミクロソーム（Ms）における長鎖脂肪酸伸長系の律速反応である縮合酵素活性について、外部基質として 20:0-CoA と、内在性基質である 16:0-CoA と 20:4-CoAの縮合活性の脂質環境の変化による影響を検討した。まず、脳Ms の膜流動性を、スピンラベル化脂肪酸を用いて調べた所、16℃ 付近に相変化が起こっていることを見い出した。この相変化は加えた脂肪酸量が増大すると消失した。一方、上記基質に対する縮合酵素活性の Arrhenius plot により、16:0-CoA が基質の時、16℃付近に屈曲点を持つことが見い出されたが、20:0-CoA や、内在性の 20:4-CoA が基質の時の活性については、直線性のみ観測され、活性化エネルギー（Ea）は各々 23 と 28 Kcal/mol であり、16:0-CoA 基質の時は、16℃以下で Ea=20.4Kcal/mol、16℃以上では 5.9Kcal/mol であった。Ms に脂肪酸を添加すると、Ea は各々の基質固有の変化を示した。また、ホスホリパーゼ A_2(PLA_2)の縮合酵素活性に対する影響を調べた所、PLA_2 は、すみやかに各基質に対する縮合活性を阻害したが、中でも 16:0-CoA の縮合活性が最も顕著に阻害され、20:0-CoA 縮合活性の阻害は低かった。　各々の縮合酵素の脂質環境が異なっており生理的温度条件下でも脳Ms の膜は相分離状態にあることが予想された。

Key word：Lipid-protein interaction, Fatty acid elongation, Brain microsomes

昨年の本大会において、ブタ脳ミクロソーム（Ms）での極長鎖脂肪酸伸長系の律速部分反応である縮合酵素活性の GC-MS による測定法と、基質によって酵素系が異なることを報告した（1)。中でも、外在性基質として加えた 20:0-CoA と、内在性基質の 16:0-CoA と 20:4-CoAの縮合酵素について、脳内分布が異なることから、20:0-CoA縮合酵素と、16:0-CoA 或は 20:4-CoA 縮合酵素とは異なると考えられる。これらの酵素の異同、酵素化学的性質、酵素発現のコントロールなどを詳細に研究し、ミエリンに特徴的な糖脂質合成活性の調節を研究するためには、それらの酵素の精製が必要である。しかし、動物細胞でのこれらの縮合酵素は、容易に界面活性剤で失活してしまうため、精製は困難と考えられている（2)。この酵素は膜に固く結合していると考えられ、脂質との相互作用によりこの膜酵素が安定に存在していると思われるので、まず、これらの縮合酵素が、膜の脂質成分の変化により、どのように活性が変化するのかを調べ、酵素の脂質環境について研究した。

（方法）

a) ブタ脳Ms の精製は、既報に従って行った（3)。GC-MS による縮合酵素活性測定法は昨年報告した方法によった（1)。

b) 膜流動性の測定は、5-doxyl stearic acid（5-DS）と12-doxyl stearic acid（12-DS）（Aldrich）をスピンプローブとして用い、Brucker ER-200 ESR spectrophotometer を使って測定した。スピンプローブは、1/100～1/300 mol/mol of fatty acid ester in MS の量を、超音波によって Ms膜と懸濁し（この操作で90％以上とりこまれることは、Ms を洗浄後結合していないプローブの量を ESR で測定して明らかになっ

た）とりこませた。この濃度では、信号の saturation はおこっていなかった。ただし、1/75mol/mol of FA ester 以上になると、saturation が観測された。

c）縮合活性の温度変化は、各温度で以前報告した条件で 20分反応させ、15% KOH-メタノールで反応を停止させてケン化し測定した。

d）ホスホリパーゼ A_2（ブタすい臓(Sigma)；PLA_2）による Ms膜の処理は、一定量の PLA_2 を 0.2mlの Ms液と混合し、15～16 sec 室温で反応させた後、EDTA（1mM）を加え 0℃に冷やす。続いて、0.9M sucrose 0.1M phosphate buffer, 1mM EDTA, pH 7.4に上層させ、30,000 rpm x 1時間遠心し、沈査を得、0.2mlに suspend して、縮合反応液に加え反応を開始させる。PLA_2 による遊離した脂肪酸量は、hexane抽出-TMTFTH処理により GLCおよび mass fragmentography で定量した。

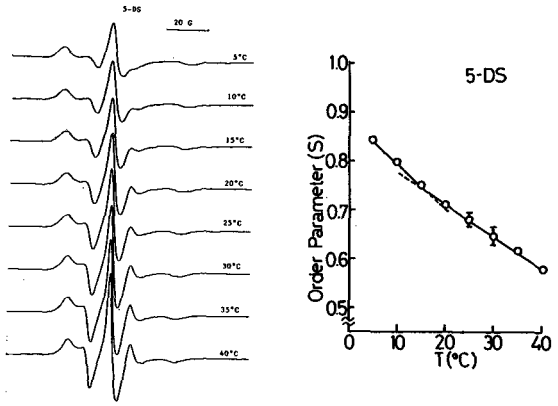
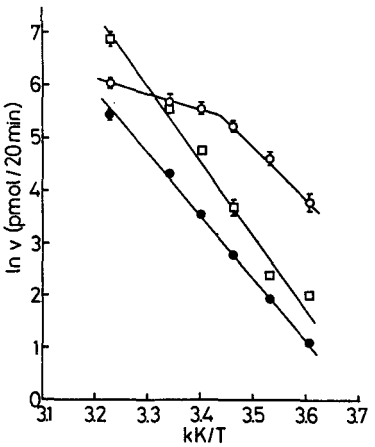


Fig.1. Temperature dependence of ESR signal from 5-DS in swine cerebral microsomes (left) and of the order parameter (S) (right).

（結果）

図1に脳Ms にとりこまれた5-DSのESRシグナルの温度依存性と、オーダーパラメータ（S）の変化を示した。ここで、16℃付近に屈曲点をもっており、この温度で膜の相変化がおこっていることを示している。12-DSを使った場合にも16℃付近に相変化を示す結果を得た。12-DSの場合、プローブの濃度が1/75mol/mol FA ester の時には、16℃の相変化は観察されなくなり、シグナルの broadening が見られた。

膜酵素である長鎖脂肪酸縮合酵素の活性の温度変化を測定し、Arrhenius plot を



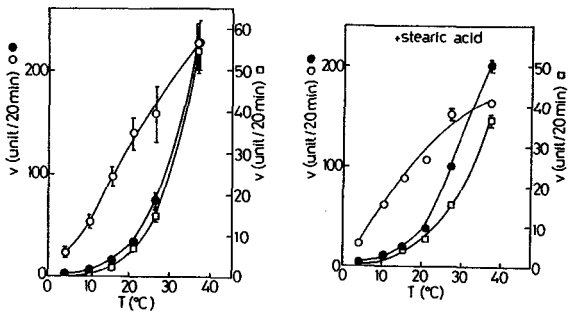
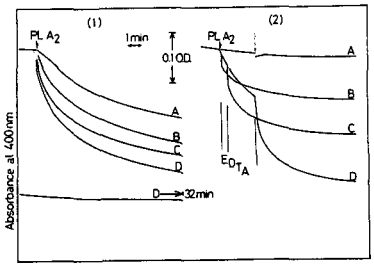


Fig.2. (left) Arrhenius plot of condensation enzyme activities for 16:0-CoA (○), 20:4-CoA (□) and 20:0-CoA (●).
Fig.3. (upper) Temperature dependence of condensation activities observed by GC-MS technique for normal microsomes (left) and in the addition of stearic acid (right).

図2に示した。ここでは、生成物である3-keto fatty acidの量に換算してVを求めている。16:0-CoA縮合酵素活性に、16℃付近にArrhenius breakが観察されたが、20:0-CoAや20:4-CoA縮合酵素については直線性を示しsolidな環境に有ることを示唆する。図3に、活性（V）と温度（T）の関係を、unitを用いて示しstearic acidをMsに超音波によってとりこませた（16.5nmol/mg Ms protein）時の活性の変化も示した。このstearic acidをとりこませると、16:0-CoA縮合酵素活性の16℃のArrhenius breakは見られなくなり、10℃付近に変化したが、他の基質については、活性化エネルギー（Ea）の低下が20:4-CoAで見られ、20:0-CoAについては、Eaは一定で、活性が少々増大した。加えたstearic acidは基質としてはほとんど使われていなかった。これらの結果は、脳Ms膜の相変化（fluid↔solid）が、16:0-CoA縮合酵素活性に影響を及ぼしたが、20:0-CoAや20:4-CoAの縮合酵素は膜の局部的な相変化には不感であり、各々の縮合酵素の脂質環境が異なっていることを示している。一方、図4に、PLA_2の脳Msへの作用を示したが、15秒程度の処理の後EDTAによって濁度の変化を停止した状態にすることができ、種々のPLA_2濃度で処理することによって縮合酵素活性の変化と、遊離脂肪酸（FFA）量の変化を観察することができる。各々の基質に対する縮合酵素活性は、2.5 unit/mg Ms proteinのPLA_2処理（15～16秒間）により完全に失活したが、少量のPLA_2処理では、16:0-CoA縮合活性が顕著に阻害され、20:0-CoA縮合酵素活性の阻害は比較的弱かった。このPLA_2処理の間、遊離してくる脂肪酸は18:1, 20:4, 22:6が主で同程度遊離してきて全体でも、0.8 unit/mg Ms proteinのPLA_2処理により正味約30 nmol/mg Ms proteinのFFAが遊離してきた。しかし、外部よりlysophosphatidyl cholineやarachidonic acidを各々40～60 nmol/mg程度加えても、縮合活性の阻害は低く、低濃度のPLA_2処理による酵素活性の阻害は活性に必要なリン脂質の直接的な分解によるものと思われる。



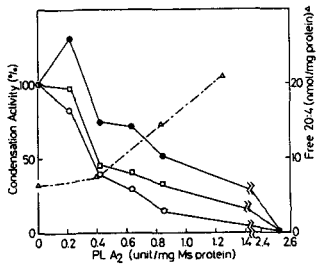


Fig.4. Effect of phospholipase A_2 on the turbidity of microsome suspension (upper) and on the condensation activity, and the amount of free arachidonic acid (lower). (upper) (1) 1.5 unit PLA_2/mg (A); 3.9 unit/mg (B); 7.7 unit/mg (C); 15.4 unit/mg (D). (2) A; +EDTA→+PLA_2→+Ca^{++}. (B); +Ca→PLA_2→16sec→+EDTA. (C); +Ca→PLA_2→40sec→+EDTA. (D); +Ca→PLA_2→168sec→+EDTA. (lower) Symbols were the same as in Fig.2.

（結論）1. 16:0-CoA, 20:4-CoA（以上内在性）と20:0-CoA（外在性）の各基質に対する縮合酵素は異なり、その脂質環境も異なっている。2. 16:0-CoA縮合酵素は、37℃では、“柔かい”相の膜にあるが、16℃以下で“固い”相になると考えられる。3. 20:0-CoAや20:4-CoAの縮合酵素は、37℃でも比較的固い相に存在し、16℃付近の相変化に不感受性を示し、脳Msの膜は、37℃でも相分離状態にあると考えられる。

（謝辞）ESR測定を援助していただいた生理研・市川氏に感謝します。

（文献）（1）吉田敏，竹下正純（1985）神経化学 24, 67-69. （2）Bernert, Jr., J. T. and Sprecher, H.（1979）J. Biol. Chem. 254, 11584-11590.（3）Yoshida, S. and Takeshita, M.（1986）J. Neurochem. 46, 1353-1358.

124. 上頚および迷走神経節へのアミノ酸取り込みにおよぼす ganglioside の効果

岩田光良・安藤正人・永田　豊・原　　厚*・武富　保*
（藤田学園保健衛生大・医・生理，信州大・医・心脈研・脂質生化*）

〔要　約〕

摘出白鼠上頚交感神経節（ＳＣＧ）および迷走神経節（ＮＧ）を *in vitro* で好気的にincubateした時おこる，アミノ酸（α-amino-isobutyric acid，ＡＩＢ）の能動的取り込み過程に対して，gangliosideがどのような影響をおよぼすかについて調べ，それを神経成長因子（ＮＧＦ）やグリア細胞成長因子（ＧＭＦ）の効果と比較・考察した。①摘出ＳＣＧ内へのＡＩＢ取り込みはGM_1（５nM）添加で有意に抑制されたが，GM_2，GD_{1a}の効果は僅かであった。しかし，さらにＮＧＦ（0.25μg／mℓ）やＧＭＦ（　5μg／mℓ）を添加してもGM_1の効果は殆んど影響されなかった。一方，ＮＧ内へのアミノ酸輸送系はGM_1，GM_2およびGD_{1a}で著明に亢進し，GM_1（5nM）が最大効果を示した。しかし，シアル酸を含まないasialo GM_1（５nM）やForssman糖脂質（５nM）は両神経節へのＡＩＢ取り込みを変化させなかった。この効果は，節前（denervation）あるいは節後（axotomy）神経切断（1週間）後の神経節ではやや加速された。したがって，gangliosideがアミノ酸の取り込みをＮＧでは促進し，ＳＣＧでは抑制するという機能発現のためには，分子内galactoseにsialic acidの結合状態が不可欠であって，ＮＧＦやＧＭＦの作用機序とは異なる機構で，ＡＩＢ輸送系を調節している可能性が示唆された。②ＡＩＢ取り込み系の見かけの*Km*値は，GM_1（５nM）添加によってＳＣＧでは上昇し，ＮＧでは反対に有意に減少したが，両神経節の*Vmax*値に殆んど変動が見られなかった。GM_1添加によってＮＧ組織内のNa^+, K^+-ATPaseの著明な活性化がおこるが，ＳＣＧ内輸送系酵素活性には僅かに抑制傾向がみられた。このような実験成績は，*Km*値を変化させずに専ら*Vmax*を上昇させてNa^+, K^+-ATPaseあるいはCa^{2+}, Mg^{2+}-ATPaseの活性化をひき起こすＮＧＦあるいはＧＭＦのアミノ酸取り込みの促進効果とは明らかに異っている。つまり，gangliosideは細胞膜表面の輸送担体の親和性を修飾する結果，主にNa^+, K^+-ATPaseの活性化と共役して，その促進あるいは抑制効果を示すものと思われる。

Key word：gangliosides, α-aminoisobutyric acid uptake, superior cervical sympathetic and nodose ganglia

Ganglioside は細胞膜を構成する複合糖脂質であり，とりわけGM_1，GM_4あるいはGD_{1a}は脳の灰白質中に多く見出されている。そして，これら糖脂質は糖鎖を細胞表面に露出した形で，その疎水性ceramide部分を介して細胞膜脂質層に固定されている。[8] 従って，gangliosideは神経系細胞膜に結合する酵素（adenylate cyclase[7] あるいはNa^+, K^+-ATPase[2),(5)] など）の活性を調節して細胞機能を修飾し得る可能性が示唆されている。

既に我々は，摘出白鼠上頚交感神経節（ＳＣＧ）あるいは知覚性迷走神経節（ＮＧ）を *in vitro* でincubateした時，タンパク生合成基質としてのアミノ酸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）またはグリア細胞成長因子（ＧＭＦ）によって夫々著明に促進されることを報告した（アミノ酸の能動的取り込みは，取込まれた後も代謝されないα-aminoisobutyric acid；ＡＩＢを用いて調べた）。しかもこの際，ＮＧＦはＳＣＧ内交感性neuron膜の輸送系酵素（Na^+, K^+-ＡＴPase）と，またＧＭＦはＮＧ内Ca^{2+}, Mg^{2+}-ＡＴPaseの活性化と共役してＡＩＢの膜輸送系を亢進することを示した。[6),(1)]

そこで，今回は脳由来gangliosidesをＳＣＧとＮＧに作用させた時，溶液中のＡＩＢの能動的取り込み系がどのように変動するのか調べて，gangliosideの作用をＮＧＦあるいはＧＭＦなどのtrophic factorの作用と比較，考察した。

《実験材料および方法》

〔１〕　ＳＣＧおよびＮＧ標本の摘出，さらにＳＣＧの節前（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[6),(1)]に従い実施した。

〔２〕　種々のgangliosideの単離・精製はKawamuraら[4]の方法に準じて行い，牛脳より，カラムおよび薄層クロマト操作を経て，単一なバンドとして得た。

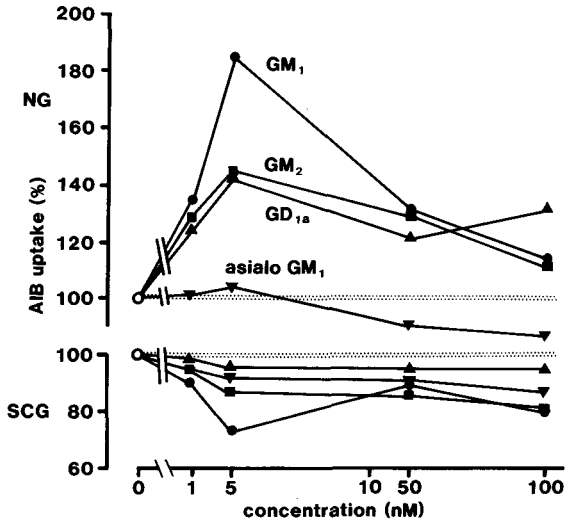
〔３〕　摘出神経節内へのＡＩＢの取り込みあるいはNa^+, K^+-ATPase, Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase 活性および試料タンパクの測定条件等，何も従来の方法[6),(1)]に従った。

《実験成績および考察》

〔１〕ＡＩＢのＳＣＧあるいはＮＧ内への取り込みにおよぼすgangliosideの効果：最近，Guroffら[9]は副腎髄質由来ＰＣ

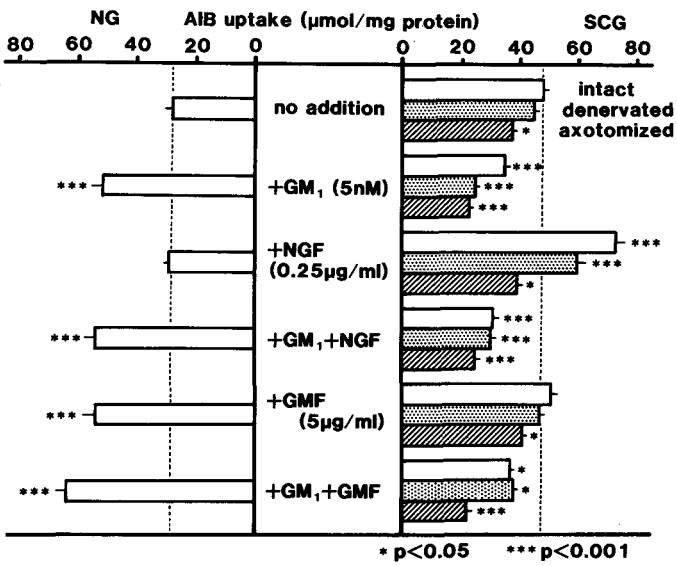
12細胞培養系に種々の外来ganglioside を添加すると，糖タンパクの生合成ならびに遊離過程が促進されることを報告している。このことは，外来性ganglioside が細胞内での糖タンパク生合成に先立って外から与えた基質のアミノ酸の輸送系を短時間に調節している可能性を示唆している。そこで，種々のganglioside を10^{-9} M濃度範囲[5]で添加して摘出ＳＣＧを好気的にincubate すると，GM_1（5nM）はＡＩＢ取り込みを有意に抑成する効果が見られた。しかし，GM_2，GD_{1a} の効果は僅かであった。これに反して，ＮＧ標本内へのＡＩＢ輸送系はGM_1,GM_2およびGD_{1a} の添加で著しい促進効果が示され，特にGM_1（5ｎM）で最大効果（85%）が示された（図1）。しかし，分子構造内にシアル酸を含まないasialo GM_1（5ｎM）あるいは脳に存在しないForssman抗原（F−glycolipid，5 nM）の添加によっては，両神経節へのアミノ酸の取り込みは殆んど影響されなかった（図1，表2）。

FIG. 1. EFFECTS OF VARYING THE GANGLIOSIDE CONCENTRATIONS ON AIB UPTAKE INTO ISOLATED SCG OR NG.



節前末端のWaller変性は生じているが，節後neuronは保持されているdenervated SCG（1週間後）内へのＡＩＢ取り込みに対しては，GM_1（5ｎM）添加は非手術側ＳＣＧに比べてさらに著明な抑制効果を生じた。また，axotomy後（1週間）の節後neuronの脱落と反応性gliaの増殖した標本でも，GM_1の添加はdenervated ＳＣＧと同程度に抑制効果が認められた。この時，さらにＮＧＦ（0.25μg／mℓ）あるいはＧＭＦ（ 5μg／mℓ）を添加してもこれらＳＣＧのGM_1の効果に全く影響をおよぼさなかった（図2）。同様に，GM_1添加によって著明なＡＩＢ取り込み促進の見られたＮＧにさらにＮＧＦを添加してもそれ以上の変動は見られなかった。しかし，ＧＭＦをGM_1と共に添加すると相加的な促進傾向が認められた。即ち，ganglioside はＮＧＦやＧＭＦなどの作用機序とは異なった機構でアミノ酸輸送系を調節していることが考えられた。

FIG. 2. EFFECT OF GM_1 GANGLIOSIDE WITH AND WITHOUT NGF OR GMF ON AIB UPTAKE INTO NG OR SCG WITH AND WITHOUT DENERVATION AND AXOTOMY.



〔2〕 ganglioside による膜輸送系の速度論的検討ならびに膜輸送酵素の変動：次に，GM_1によるアミノ酸輸送系の促進あるいは抑制効果について，速度論的解析を試みた。ＳＣＧのＡＩＢ取り込みの見かけの*Km*値（高親和性成分）はGM_1（5ｎM）添加によって上昇し，アミノ酸と輸送担体との結合の親和性の低下が示唆された。逆にＮＧのＡＩＢ取り込みに対する*Km*はGM_1によって有意に減少し，親和性の増加が示された。しかし，そのＡＩＢ取り込みの最大初速度（*Vmax*）値は，ＮＧ標本では上昇傾向が示されたけれども，ＳＣＧと同様有効な変動ではなかった（表1）。既報のごと

TABLE 1. EFFECT OF GM_1 GANGLIOSIDE ON THE KINETICS FOR AIB UPTAKE INTO SCG OR NG.

	Km (mM)	Vmax (μmol/mg prot./min)
In control medium (SCG)	0.92 ± 0.07(4)	0.56 ± 0.05(4)
+ GM_1 (5nM)	1.28 ± 0.04(4)*	0.54 ± 0.06(4)
In control medium (NG)	0.43 ± 0.03(4)	0.25 ± 0.07(4)
+ GM_1 (5nM)	0.25 ± 0.05(4)*	0.35 ± 0.04(4)

Isolated SCG or NG were incubated at 37°C for 2 h in bathing solution containing AIB (0.01-20 mM) with or without GM_1 ganglioside. *$p < 0.05$

く，ＳＣＧあるいはＮＧ内へのＡＩＢ取り込み系がＮＧＦまたはＧＭＦの添加によって促進される過程は，夫々輸送系酵素の Na^+, K^+-ATPase あるいは Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase の短時間での活性化に対応した *Vmax* 値の著しい増大[6),(1)]を伴うことが示されている。しかし，今回見られたこれら神経節のアミノ酸取り込みにおよぼす GM_1 の効果は，前述の trophic factor の作用とは明らかに異なるものと考えられる。そこで，次にこれら膜輸送系酵素活性におよぼす種々の，ganglioside 添加効果を調べた。ＳＣＧ内の Na^+, K^+-ATPase は GM_1，GD_{1a}，asialo GM_1 および F-glycolipid の何れによっても全く活性化が見られず，むしろ抑制傾向が示された。一方，GM_1，GD_{1a} の添加でアミノ酸輸送系の亢進が認められたＮＧ標本では，この酵素活性もまた著明に上昇（２－2.8倍）することが明らかとなった（表２）。しかし，ganglioside は Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase に対して両神経節で，何れも無効であった（当日発表）。

以上の成績から，ＮＧあるいはＳＣＧ内へのアミノ酸輸送系の亢進あるいは抑制効果は，おそらく外来 ganglioside がそれぞれの細胞膜表面上にある受容体などに影響を与えて修飾（親和性の変化）し，次いで膜輸送系酵素の活性化を引きおこすような現象を理解される。つまり，ganglioside はＮＧＦあるいはＧＭＦなどと同様に trophic 作用を有するのみならず，さらに細胞膜上の識別に与かる受容体との機能発現の調節[3)]とも密接に関与し得ることが強く示唆された。

TABLE 2. EFFECT OF GANGLIOSIDES ON AIB UPTAKE AND Na, K-ATPase ACTIVITY IN EXCISED SCG OR NG.

	AIB uptake		Na, K-ATPase activity	
SCG				
none	48.2 ± 2.6(12)	100%	1340 ± 120(8)	100%
+GM_1(5nM)	35.2 ± 2.2(6)***	73	1219 ± 166(4)	91
+GD_{1a}(5nM)	46.3 ± 3.1(6)	96	1273 ± 152(4)	95
+asialo GM_1(5nM)	45.3 ± 2.9(4)	94	965 ± 167(4)*	72
+F-glycolipid(5nM)	43.4 ± 2.5(4)	90	1059 ± 150(4)	79
NG				
none	27.9 ± 3.3(6)	100%	246 ± 60(4)	100%
+GM_1(5nM)	51.6 ± 3.7(4)***	185	688 ± 110(4)***	280
+GD_{1a}(5nM)	39.9 ± 3.2(4)***	143	474 ± 126(4)***	193
+asialo GM_1(5nM)	29.1 ± 2.1(4)	106	226 ± 99(4)	92
+F-glycolipid(5nM)	30.1 ± 2.4(4)	108	239 ± 108(4)	97

Aerobically incubated for 2 h (AIB uptake; μmol/mg protein) and for 30 min (Na, K-ATPase activity; nmol/mg protein/30min), respectively. *$p < 0.05$, ***$p < 0.001$

《文　献》

(1) Ando, M. et. al. (1986) Brain Res. 373:359－364

(2) Jeserich, G. et. al. (1981) Neurochem. Res. 6:465－474

(3) Jope, R. S. et. al. (1986) J. Neurochem. 46:1567－1572

(4) Kawamura, N. et. al. (1977) J. Biochem. (Tokyo) 81:1217－1225

(5) Leon, A. et. al. (1981) J. Neurochem. 37:350－357

(6) Nagata, Y. et. al. (1985) Neurochem. Res. 10:1173－1185

(7) Partington, C. R. et. al. (1979) Mol. Pharmacol. 15:484－491

(8) Yamakawa, T. & Nagai, Y. (1978) ＴＩＢＳ. 3:128－131

(9) Yavin, E. et. al. (1986) J. Neurochem. 46:794－803

125. SY5Y ヒト神経芽細胞腫培養細胞の retinoic acid による分化後の形態学的および生化学的発達

伊野美幸・朝倉幹雄・塚本　徹・松井宏晃・今福　淳・長谷川和夫
Greg M. Cole*・Paola S. Timiras*　（聖マリアンナ医大・神経精神科，Dept of Physiology-Anatomy, Univ, of California, Berkeley*）

〔要　約〕

ヒト神経芽細胞腫培養細胞SY5YはSK-N-SHを親細胞として3回のサブクローンを経て樹立したadrenergicactivityを持つ細胞である。他の神経芽細胞腫培養細胞と同様に種々のagentにより分化へ誘導され，その形態学的，および生化学的性質はadrenergic神経細胞モデルとして広く研究されて来た。今回我々は螢光抗体法によりSY5Y細胞が分化誘導前からtriplet neurofilament proteinを有していることを確認し，発達という観点からretinoic acidによる分化後のadrenergic神経細胞の経時的形態と機能について分析を試みたが，分化後も増殖を続ける非神経細胞群の存在は長期に渡る定量を困難にすることを予想し，retinoic acidにより分化後の細胞を第7日から第14日までDNA α-polymelase inhibitorであるaphidicolinに曝露し，その除去を計り，神経細胞群の長期培養を試みた。6週に渡り，ganglion様細胞集落の成熟と神経突起の増大，又生化学的にはtyrosine hydroxylase活性monoamine oxydase type A活性の経時的上昇を認めた。以上，retinoic acidによるSY5Y細胞の分化後の経時的発達の可能性について検討した。

Key word： Neuroblastoma, Retinoic Acid, Development

＜序　文＞

ヒト神経芽細胞腫SY5Y細胞はSK-N-SHを親細胞とし，3回のサブクローンを経て樹立したadrenergic activityを持つ，形態学的にはneuroblastlike cellであり，種々のagentにより分化誘導されることが知られており，その分化の方向には，neuronal activityを持つ神経様細胞群と，neuronal activityをもたず増殖能，生着力の強い扁平な“flatt cell variant”と呼ばれる非神経細胞群への2方向性が知られており，それら細胞間のinterconversionやflatt cellの性格について報告されてきた。[5][6] 今回我々は螢光抗体法により分化前のSY5Yがすでにtriplet neurofilament proteinを有していることを確認し“発達”という観点からretinoic acidによる分化後のadrenergic神経細胞の形態と機能について分析を試みる為，一定期間のDNA α-polymelase inhibitorであるaphidicolinの曝露により，非神経細胞群の除去を計り，長期に渡る定量分析について検討した。

＜方　法＞

1. 培養細胞と条件：ヒト神経芽細胞腫SY5Y細胞はDr. June Bielderのご好意により提供された。細胞は10％牛胎児血清および抗生物質を含む1：1 Hams F12，Dulbecco改変Eagle混合培地にて培養されたものを未処置control群とし，その培地に10 μM retinoic acidを添加したretinoic acid処理群，retinoic acid処理後第7日から第14日まで1μg／mℓ aphidicolinを曝露したaphidicolin処理群と3群にわけ，光学顕微鏡下で形態，細胞数算定等を行なった。

2. neurotransmitter enzyme assay：Tyrosine Hydroxylase（TH）活性測定はWaymireらの方法[7]に従い，Monoamine Oxydase type A（MAO A）活性測定はMc Camanら

の方法[4]に準じて行なった。蛋白定量はLowry[3]の方法に準じた。

3. Immunoblotting：SDS-PAGEによって電気泳動した細胞骨格分画をGershioniとPaladeらの方法[2]に準じ，ナイロン膜へ移し，抗neurofilament protein抗体にて処理後発色させた。尚neurofilament antiseraはDr. Doris Dahlのご好意により提供された。

4. 螢光抗体法：ポリリジンコートされたカバースリップ上に培養し，抗neurofilament protein抗体にてColeらの方法[1]に従って処理した。

＜結果ならびに考察＞

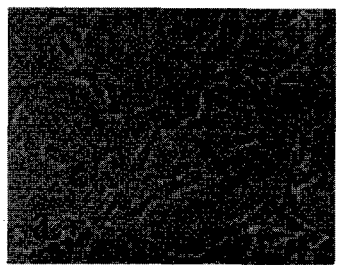
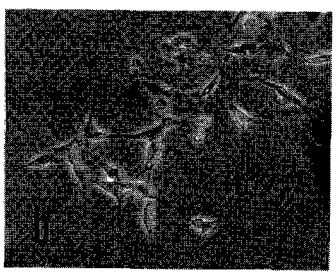
1. 形態学的考察：SY5Y細胞は短かい神経突起を持つ均一な細胞群である（Fig 1, a）retinoic acid処理後2週間では神経突起が長さを増し細胞は小集落を形成する傾向を見せ（Fig 1, b, c），経時的に細胞集落がganglion様に成熟し，放射状にのびる神経突起はganglion間を連絡し，そのネットワークは徐々にその距離と密度の増大を見た。（Fig d, e）但し，aphidicolin未処置の細胞群ではflatt cellが増殖し（Fig 1, b），6週ではganglionや神経突起を不明瞭にする程となった（Fig 1, f）。

2. 細胞成長曲線：aphidicolin処置群では増殖はない。retinoic acid処理では，未処理群に比べ増殖が抑制され，分化誘導されているが，ゆるやかな割合にて，尚増殖する細胞群の存在が示されている。これは前述のflatt cellの増殖と一致する（Fig 2.）。

3. neurotransmitter enzyme activity：TH活性，MAO A活性はretinoic acid処理群で5週で240%，56%と低い増加率だが，aphidicohn処理群ではそれぞれ660%，375%，と高く経時的増加を示している（Fig 3）。TH活性，MAO活性についてはadrenergic神経細胞の発達に伴って上昇する酵素であることが知られているが，TH活性は必ずしも発達のみでなく，薬理学的影響によって増強する可能性もあり，retinoic acidの作用機序の解明によると思われる。

4, neurofilament protein：螢光抗体法にて未処理細胞群にすでにtriplet neurofilament proteinが存在していることを確認したが，Immunoblottingにては68Kにおいて相対的増加を認めたが150K，200Kについては未確認であり今後の検討を要する。

以上の結果より5－6週に渡ってSY5Y細胞のretinoic acid分化後の形態変化，並びに生化学的活性の上昇を認めた。今後，正常神経細胞との比較，レセプターの検索を含め，ヒト由来adrenergic神経細胞，モデルとしての可能性について検討の必要性が考えられた。

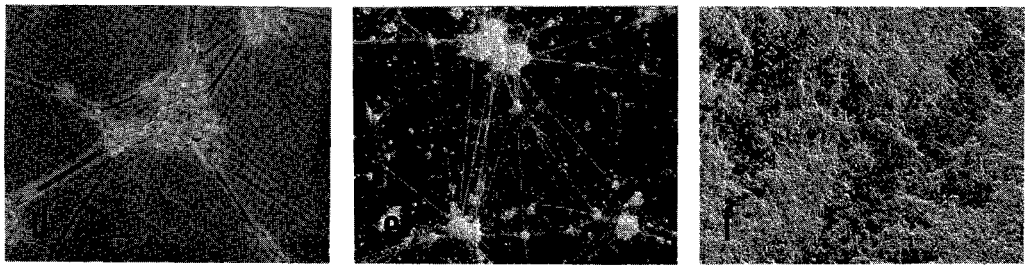



Fig. 1 phase contrast view of SY5Y
a. untreated SY5Y cells, original magnification (o.m.)100X
b. 2-weeks retinoic acid treatment (o.m. 100X)
c. 3-weeks retinoic acid and aphidicolin treatment(o.m. 100X)
d. 3-weeks retinoic acid and aphidicolin treatment (o.m. 100X)
e. 6-weeks retinoic acid and aphidicolin treatment (o.m. 40X)
f. 6-weeks retinoic acid treatment (o.m. 40X)

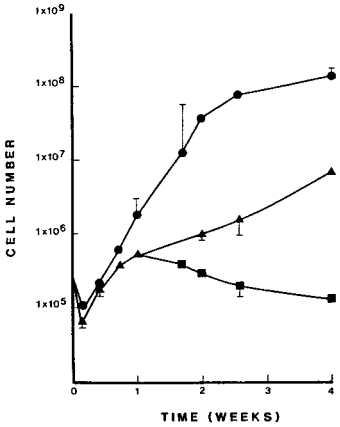


Fig. 2 Growth curves depict cell multiplication in media with 10% FBS. The retinoic acid-treated cells continue to grow at a reduced rate, but cultures treated with retinoic acid and pulsed with aphidicolin for 1 week show an initial loss followed by stable cell numbers. Values represent mean of 3 dishes for each point.

●—● untreated control
▲—▲ retinoic acid treatment
■—■ retinoic acid and aphidicolin treatment

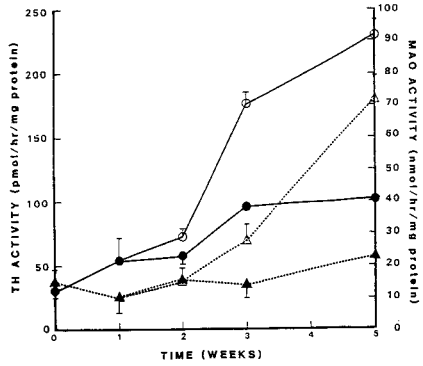


Fig. 3
Tyrosine hydroxylase (TH) and monoamine Oxydase (MAO) values are plotted as a function of time in retinoic acid.
●—● TH activity of retinoic acid
○—○ TH activity of retinoic acid and aphidicolin
▲-▲ MAO activity of retinoic acid
△-△ MAO activity of retinoic acid and aphidicolin

<文　献>

1. Cole, G. M., Wu, K. and Timiras, P. S. (1985) Int. J. Devl Neuroscience, 3, 23−32
2. Gershioni, J. M. and Palade, G. E. (1982) Anal. Biochem. 124 396−405
3. Lowry, O. H., Roseorough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chemy., 193 265−275
4. McCaman, R. E., Mc Caman., M. W., Hunt, J. M. and Smith, M. S. (1965) 12 15−23
5. Ross, A. R. and Bielder, J. L. (1985) Cancer Res. 45 1628−1632
6. Ross, R. A., Spengler, B. A. and Bielder, J. L. (1983) Natl. Cancer Inst. 71 741−747
7. Waymire. J. C. Bjur, R and Weiner, N. (1971) Anal. Biochem, 43 588−600

126. S－アデノシルメチオニンによる脳シナプス機能の修飾

安藤　進・田中康一・近　一夫・金丸恭子・森口幸栄
（東京都老人総研・生化）

〔要　約〕

S－アデノシルメチオニン（SAMe）をラットに静注で10日間投与して，脳シナプス膜の性質およびシナプス機能への影響をみた。脳シナプトゾームをFicoll濃度勾配遠心法で調製し，脂質分析，膜微小粘度の測定，およびAChとGABAの放出能を調べた。SAMe投与によって，コレステロール，リン脂質およびコレステロール／リン脂質比にはほとんど影響を受けなかったが，ケイ光プローブ（DPH，TMA-DPH）でみた膜微小粘度は上昇することが明らかにされた。^{14}C－ACh，^{3}H－GABAをシナプトゾームに取り込ませ，高K^{+}で%releaseをみたところ，ACh放出は僅かに，GABA放出は比較的大きく抑制されることがわかった。この相対的GABA放出の低下から動物の行動の変化をもたらす可能性が考えられた。

Key word : Synaptic function, S-Adenosylmethionine, Membrane microviscosity

〔緒言〕

S－アデノシルメチオニン（SAMe）は生体内の多数のメチル化反応に関与している。ホスファチジルエタノルアミンのメチル化によるレシチンの生成，および膜タンパク質のメチル化は生体膜の性質を修飾すると言われている。肥満細胞を刺激するとトランスメチラーゼⅠ，Ⅱが活性化され，細胞内でホスファチジルエタノルアミンがレシチンに変換されることによって，細胞膜流動性の上昇を来たしヒスタミンの放出に至ることが知られている(3)。ヒト赤血球およびラット脳シナプトゾームをSAMe存在下にインキュベートしただけでは何ら顕著な変化はおこらないが，SAMeを赤血球膜内側から作用させた場合には膜微小粘度の明らかな上昇がみられた（安藤ら，未発表）。そこで本研究では，ラットにSAMeを投与し，脳シナプトゾームの脂質組成，膜微小粘度，およびアセチルコリン，GABAの放出能への効果を検討した。

〔実験方法〕

Wistarラット（M，6週齢）を1群3匹として4群用いた。SAMe製剤はマンニトール，トシル塩添加リン酸緩衝液に溶解したFO－1561（富士化学より供与）を使用した。（投与容量は5 ml／kgとし，尾静脈より毎日1回，10間注射した。Vehicle群2種（A，B），試薬群2種（C，D）を設けた。投与内容は次のとおり：）A群，マンニトール添加リン酸緩衝液；B群，マンニトール，トシル塩添加リン酸緩衝液；C群マンニトール，トシル塩添加リン酸緩衝液に溶解したSAMe 30 mg／kg体重；D群マンニトール，トシル塩添加リン酸緩衝液に溶解したSAMe 100 mg／

kg。最終注射の翌日，断頭にて脳を摘出し，大脳灰白質部からBooth, Clark(2)の方法に従ってシナプトゾーム分画を得た。

シナプトゾーム脂質の分析は1 mgタンパク質量の試料について行った。全脂質をクロロホルム／メタノール／水（1:2:0.8）で抽出し，その一部をとってコレステロールオキシダーゼ法でコレステロールを，Burtlett法で全リン脂質を定量した。脂質組成はＴＬＣ－デンシトメトリーで分析した(1)。膜微小粘度は1,6−diphenylhexatriene（DPH)および1-(p-trimethylaminophenyl), 6-phenylhexatriene（TMA−DPH)をケイ光プローブとして用いてShinitzkyら(4)の方法で測定した。

アセチルコリンおよびＧＡＢＡ放出の測定は，放射性前駆体を用いて行なった。シナプトゾームを1－^{14}C-choline および2,3-^{3}H-GABAと３７°，３０分間インキュベートし，acetylcholine(ACh)の標識とＧＡＢＡの取り込をさせた。３７°，１５分間のインキュベーションを５回繰返して洗滌後，veratridine 或は高K^+を含む外液中で５分間に放出された^{14}C-ACh および^{3}H-GABAの放射活性を測った。放出能は% release で表わした。

〔結果および考察〕

SAMe投与群の動物の体重はvehicle 群と同様に薬剤投与期間中順調に増加した。

シナプトゾーム脂質の含量および組成についてみると，コレステロール，リン脂質およびコレステロール／リン脂質モル比に対するSAMe投与の影響は明らかでなかった。一方，膜微小粘度をDPH，TMA−DPHを用いて測定した結果，図１に示すように

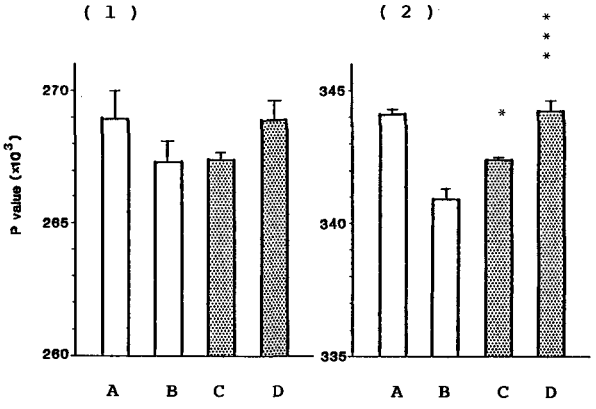


Fig.1. Membrane microviscosity changes in the synaptosomes of rats treated with SAMe. Rat groups A, B, C and D were injected mannitol, mannitol + tosylate, mannitol + tosylate + SAMe 30 mg, and mannitol + tosylate + SAMe 100 mg. P values were measured using DPH (1) and TMA-DPH (2). *, p 0.05; ***, p 0.005 as compared to group B.

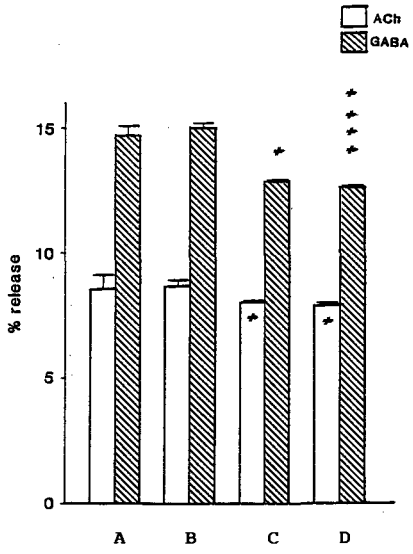


Fig.2. High-K^+ evoked ACh and GABA release from the rat brain synaptosomes. Rat groups A, B, C and D were treated the same as in Fig.1. *, p 0.05; ****, p 0.001 as compared to group B.

顕著な効果が認められた。図中P値の上昇は微小粘度が高くなることに相当するとされている。第一の影響はvehicle中のトシル塩に認められた。陰性荷電を有する脂溶性化合物は細胞膜脂質二重層外層に特に分布するとされていることと，トシル塩による微小粘度低下は一致する現象と考えられる。第二の効果としては，B群をコントロールとしてSAMe群（図1のC，D）を比べると明らかなように，SAMe投与でシナプス膜の微小粘度の上昇が認められた。P値の変化は，膜表面に局在すると想像されるTMA－DPHを用いた方が，完全に疎水性のDPHを用いた場合より大きく観測された。

各ラット群の脳シナプトゾームからのAChおよびGABA放出をみた結果を図2に示す。Vehicleのトシル塩によって膜微小粘度の減少がみられたが，それによってACh，GABAの放出は影響を受けていない。SAMe投与群ではACh，GABAともに放出が低下しているが，特にGABAでより強く放出が抑制されている結果であった。これはSAMeの長期投与によってシナプス膜が修飾を受け，膜微小粘度が上昇したためと考えられるが，膜電位の変化，細胞内情報伝達系の修飾による可能性も今後検討されなければならない。尚，抑制性神経伝達物質GABAの相対的な放出低下は，動物の行動にも影響が出るものと予想される。

〔文献〕

1. Ando, S., Kon, K. and Tanaka, Y., In Membrane Fluidity (Kates, M. and Kuksis, A., eds.) pp. 43-55, Humana, New Jersey (1980)
2. Booth, R.F.G. and Clark, J.B. (1978) Biochem. J., 176, 365-370
3. Hirata, F. and Axelrod, J. (1980) Science, 209, 1082-1090
4. Shinitzky, M. and Barenholz, Y. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 515, 367-384

127. Ethylnitrosourea（ENU）誘発脳腫瘍における発癌遺伝子産物の検索

村上秀樹・高松　研*・高坂新一*・大谷光弘・戸谷重雄
塚田裕三*　（慶応大・医・脳神経外科・生理*）

〔要　約〕

Ethylnitorosourea(ENU)誘発による腫瘍モデルをラットで作成し，各種腫瘍組織形における発癌遺伝子の関与をsrc, erb-B, myc, Ha-ras, fesの遺伝子産物に対する抗体を用いて免疫組織化学的に検討し，以下の結果を得た。1)ENUにより誘発される中枢神経系腫瘍はGlioblastoma, oligodendroglioma, mixed glioma, neurinomaであり，ヒトにおいて自然発生する中枢神経系腫瘍の組織形と酷似していた。2)Malignant astrocytoma(6/8), Malignant neurinoma(2/5)の一部にerb-B遺伝子産物に対する抗体(抗EGF-R抗体)で，腫瘍細胞膜に陽性所見が得られた。3)更に，同腫瘍組織を抗EGF-R抗体を用いたimmunoblot法による検索では，免疫組織化学的に陽性を示した腫瘍細胞の100,000×g沈査分画に分子量約185,000のbandが認められた。これは，分子量的にEGF-Rとは異なっておりEGF-Rと構造的に酷似し免疫学的に交叉するが異なった細胞増殖因子(neu遺伝子産物)である可能性が示唆された。

Key word：Ethylnitrosourea(ENU), Epidermal Growth Factor Receptor(EGF-R)
neu(erb-B-2) oncogene product

〈はじめに〉

中枢神経系腫瘍と発癌遺伝子との関連は，neuroblastoma, retinoblastomaにおけるN-myc，ras, glioblastomaにおけるerb-B, sisの発現が報告されている(2, 6)。我々もヒトastrocytomaにおいてsrc遺伝子産物が発現していることを報告した(9)。これらのことは，少なくとも一部の腫瘍の発生や悪性度の増大に，これらの発癌遺伝子の変化が重要な役割を果たしていると考えられる。一方，ENUは発癌イニシエーターとしてラットの中枢神経系に比較的特異的に腫瘍を生じさせる事，およびその組織形がヒトで自然発生する中枢神経系腫瘍と酷似する事が報告されている(7)。そこで我々は，ENU誘発による実験的腫瘍をモデルとして，中枢神経系に発生する各種の腫瘍での発癌遺伝子の関与を発癌遺伝子(src, erb-B, myc, Ha-ras, fes)産物に対する抗体を用いて免疫組織化学的並びにimmunoblot法により検討した。

〈実験方法〉

妊娠16~17日目のラット(Wistar albino)にENUを生理食塩水に溶解させ，尾静脈より50㎎/㎏投与した。生後1ケ月から6ケ月令の仔ラットより大脳，小脳，脊髄，第5脳神経を摘出し組織を10%ホルマリンまたは，70%エタノールで固定し，パラフィン包埋後，約4μmの切片を作成した。腫瘍の組織形はH-E染色にて同定した。免疫組織化学的染色：Sternberger(8)の方法に準じてsrc, erb-B, myc, Ha-ras, fes遺伝子産物に対する抗血清(Oncor社，Triton Bioscience Inc.)を用いて，ABC法(VECTOR社製)により行った。Immunoblot法：腫瘍組織を4倍量の水でホモジネート，100,000×g，60分遠心し，上清と沈査に分画した。Laemmli(4)の方法に準じ，7.5% polyacrylamide gelを作成し，50μg/laneで電気泳動し

た。gelの一部は固定後coomassie blue染色を行い，一部はTowbin(10)らの方法に準じニトロセルロース膜へtransferし，抗EGF-R抗血清を用いimmunoblottingを行った。

〈結果及び考察〉

ENU処置によって，生後約2ケ月目より中枢神経系に腫瘍が発生した。初期はNeurinomaが主であり，その後次第にoligodendroglioma, mixed glioma, Malignant astrocytoma等，悪性度の高い腫瘍の発生をみた(Fig.1)。また腫瘍発生率は，月齢の経過に従って増加し，5ケ月では30%に達した。腫瘍組織の免疫組織化学的検討ではmyc, Ha-ras, fesの遺伝子産物に対する抗血清では全ての組織形において陽性細胞は認められなかった。一方，erb-Bの遺伝子産物に対する抗血清ではMalignant neurinoma(5例中2例)，Malignant astrocytoma(8例中6例)で陽性細胞を認めた。

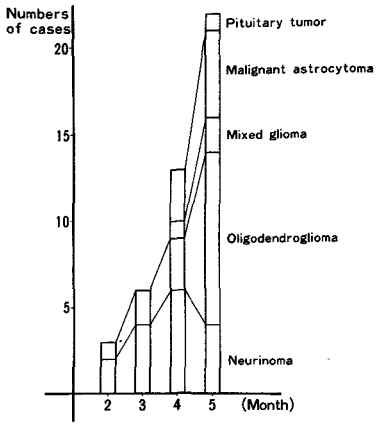


Fig. 1. The incidence and histopathology of ENU induced brain tumor in each age of the month.

Fig.2は脊髄に発生したMalignant astrocytomaの一例であるがerb-B遺伝子産物(EGF-R)抗血清による染色像で，腫瘍組織中の陽性細胞の比率は約80%であった。陽性細胞においては細胞膜がring様に染色されている像や，細胞質が一部欠落しているように染色されている像が認められ，細胞膜が抗血清に反応しているものと考えられた。核は陰性であった。

src遺伝子産物($pp60^{v\text{-}src}$)に対する抗血清でもEGF-R抗血清で陽性であったものと同じ腫瘍細胞組織が陽性反応を示し，同様に，細胞膜が反応している染色像が得られた(表1)。そこで，正常脊髄，oligodendroglioma, Malignant astrocytoma, Malignant neurinomaにおける抗EGF-R抗血清を用いたImmunoblottingを行ったところ，免疫組織化学的所見と一致してMalignant astrocytoma, Malignant neurinomaにのみ分子量約185kdの位置に陽性bandを認めた(Fig.3)。Bargmann(1)らは，妊娠ラットをENUで処置し胎仔脳より分離，継代したラット細胞株(neuro/glioblastoma)よりNIH3T3をtransformするneu oncogeneを分離，同定した。

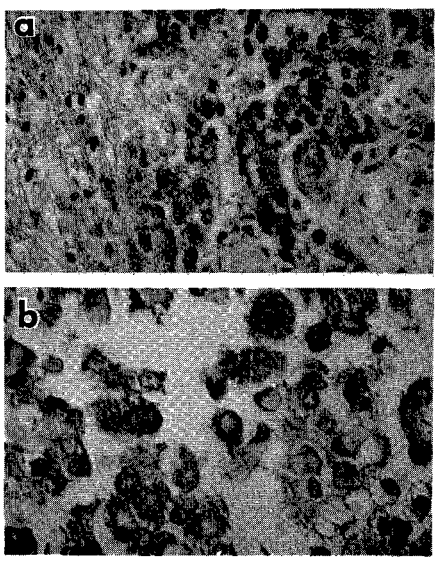


Fig. 2. Immunohistochemical staining with EGF-R antibody. a;Tumor cells were positively stained. b ; Higher magnification of a. Cell membrane was positively stained.

この遺伝子がコードする185kタンパクは構造上，EGF-R(170kd)と酷似しており，抗EGF-R抗血清と免疫学的に交叉するが，EGF結合能は，EGF-Rの約1/1000であり，185kは，EGF-Rとは異なった細胞増殖因子である可能性を示唆している(7)。一方，山本(11)らは，ヒト胃癌細胞株にてerb-B-2遺伝子の発現を認めており，その遺伝子構造がneu oncogeneと極めて高い相同性を示す事より，この2つの遺伝子が同一である可能性を示唆している。我々は，*in vivo*系において，ENU誘発腫瘍の内，Malignant astrocytoma, Malignant neuriomaに，EGF-R抗血清と免疫学的に交叉する分子量が約185kdの蛋白の発現を認めたが，これは分子量170kdのEGF-Rとは異なるものであることが考えられ，neuあるいはerb-B-2の遺伝子産物である185kのタンパクである可能性が高いと考えられる。また，src遺伝子産物(pp60$^{v\text{-}src}$)に対する抗血清を用いたimmunoblottingでも抗EGF-R血清の場合と同様に，分子量約185kdの位置に陽性bandが認められた。Lax(5)等は抗pp60$^{v\text{-}src}$血清は，EGF-Rと免疫学的に交叉する事を報告しており，今回，我々が用いた抗pp60$^{v\text{-}src}$はEGF-R，p185の両者に反応しうるものであると思われた。

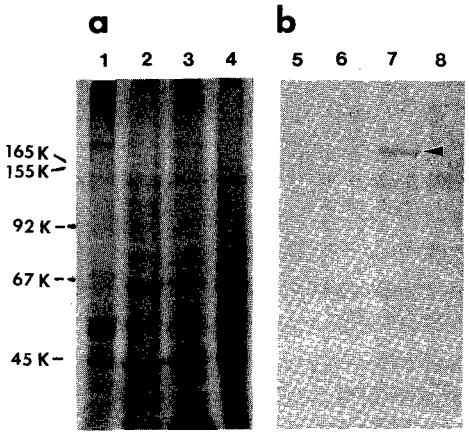


Fig. 3. a ; Coomassie blue stain of SDS-PAGE.
b ; Immunoblot analysis with EGF-R antibody.
Lane 1, 5 ; Normal spinal cord of the rat.
Lane 2, 6 ; Oligodendroglioma.
Lane 3, 7 ; Malignant astrocytoma.
Lane 4, 8 ; Submandibular tumor.

表1 Immunohistochemical detection of the oncogene products in each tumors

	Numbers of cases	erb-B	src	myc	Ha-ras	fes
Neurin.	11	−	−	−	−	−
Malig. neurin.	5	+ (2/5)	+ (2/5)	−	−	−
Oligo.	16	−	−	−	−	−
Mixed glioma	3	−	−	−	−	−
Malig. astro.	8	+ (6/8)	+ (6/8)	−	−	−
Pit. tumor	1	−	−	−	−	−

Neurin.: Neurinoma Malig.: Malignant astro.: astrocytoma
Pit.: Pituitary

文 献

1) Bargmann, C. I. et al. Nature(1986) 319, 226-230. 2) Betsholtz, C. et al. Nature(1986) 320, 695-699. 3) Koestner A. et al. Am J Pathol(1971) 63, 37-50. 4) Laemmli, U. K. Nature(1970) 227, 680-685. 5) Lax, I. et al. Proc. Natl. Acad. Sci.(1984) 81, 5911-5915. 6) Libermann, T. A. et al. Cancer Research(1984) 44, 753-760. 7) Schechter, A. L. et al. Nature(1984) 312, 513-516. 8) Sternberger, L. A. et al. J. Histoch. and Cytoch.(1970) 18, 313-333. 9) Takenaka, N. et al. Brain Research(1985) 337, 201-207. 10) Towbin, H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1979) 76, 4350-4354.

128. シナプトソームの膜電位とエネルギー代謝

相内敏弘・松永雅美・中谷一泰・中村泰治
（昭和大・薬・生物化学）

〔要　約〕

脂溶性イオン（ＴＰＰ⁺）を用いて、synaptosomes の膜電位を求める方法を検討した。ＴＰＰ⁺イオンは、シナプス小胞分画に取り込まれないので形質膜及び細胞内mitochondriaへの分布の簡単な三種の推定法を考え、各々の方法でのＴＰＰ⁺イオンの細胞内の濃度を算出し、膜電位を計算した。何れの方法もほぼ同様の結果が得られた。これらの方法は、多くの神経系の細胞の膜電位の測定に有効であると思われる。種々のエネルギー代謝基質を加え膜電位を計算した。又、対応する条件で、ＡＴＰ量、乳酸産生および酸素消費速度を測定した。膜電位は、乳酸産生及びＡＴＰ量とは対応が良いが、酸素消費速度とはあまり対応しなかった。

Key word :　membrane potential, ATP content, O_2 consumtion

神経系の細胞の膜電位を測定する方法の一つに脂溶性のイオンの膜内分布より求める方法がある。この方法は、蛍光色素を用いる方法(1,4,10)より理論的な裏ずけがあると言われている(9,11)。脂溶性イオンは、細胞内のmitochondriaにも取り込まれるので、種々の計算方法が発表されている(5,6,7,8,9)。本発表では、ラット全脳のsynaptosomesを用いてより簡単な膜電位計算方法を検討した。種々のエネルギー基質を加えて得られた結果と細胞内のエネルギー代謝の相関を調べた。

（方法）

synaptosomesは、粗mitochondria分画を用いた。ＡＴＰ量の測定法は、luciferaseによる発光法を用いた。synaptosomesからＡＴＰの抽出法は１）過塩素酸抽出法、２）熱水中出法の両方法を検討した。脂溶性イオンとして、ＴＰＰ⁺(tetraphenylphosphonium)陽イオンを用いた。ＴＰＰ⁺イオン濃度は、ＴＰＰ⁺選択性電極を用いて経時的に測定した(7,8)。酸素消費は、clark型の酸素電極により測定した。乳酸量は、ＬＤＨを、用いて定量した。

（結果と考察）

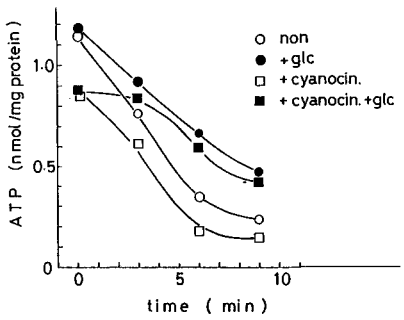
ＴＰＰ⁺イオンの synaptosomes取り込み量は、細胞内への膜電位による分布、形質膜への吸着(Ab)、および細胞内　mitochondriへの分布(Qmit) の和であると考えられる(7)。（シナプス小胞分画はＴＰＰ⁺イオンを殆ど取り込まなかった。）形質膜への吸着量の推定法として次の３つの方法を用いた。[１）生理食塩水中のK⁺イオンを高濃度としたとき膜電位が無くなるとする方法、２）膜への吸着が速いので１０秒以内のＴＰＰ⁺外液よりの消失より推定する方法,３）mitchondria の膜電位を消出し膜の

吸着量を求める方法] Table 1 にそれぞれの方法で求めた膜電位が形質膜およびmitochondriaへの吸着量と共に示されている。Table 1 より分かるようにどの方法でも計算された膜電位はほぼ一定の値となった。得られた値は、synaptosomesの膜電位として妥当な値でありどの方法も有用であると言える。又、mitochondriaへの吸着量はかなり多いのでmitochondriaの膜電位を変える条件での細胞の膜電位測定には、充分注意する必要がある。１）と３）の方法は、対応する条件下で Abを決める実験が必要であるが、２）の方法では、１回の測定で膜電位を計算出来る利点がある。種々の神経系の細胞で、各々に好都合の条件で膜電位の測定が可能になると考えられる。但し、細胞系によっては、イオンの透過性に差があり、ＴＰＰ⁺イオンの透過速度が充分速くない場合もあり(5)脂溶性イオンの選択や、透過促進剤の添加等の条件の検討が必要な場合もある(6)。

Table 1. Membrane potential calculated by the three methods

Method	Ab*	Qmit*	Es (mV)	n
1	0.18	1.05	-64	9
2	0.30	0.88	-58	4
3	0.50	0.74	-56	9

*unit; n moles/mg proteins



Ｆｉｇ　１．ＡＴＰ量の経時変化

膜電位は、Ｋ⁺イオンの透過性で決まる。細胞内のＫ⁺イオンの濃度は、膜のＡＴＰaseにより保たれるので種々のエネルギー基質を加えた時のＡＴＰ量と膜電位を測定し

Ｔａｂｌｅ ２．　膜電位(Es)、ＡＴＰ量、酸素消費速度　および　乳酸産生量

	Es(mV)	ATP*	O_2 consumtion**	lactate***
without substrate	-55	0.6	4.0	0.11
+ glucose	-60	1.0	4.0	0.20
+ mannose	-58	1.0	4.0	0.21
+ fructose	-55	0.6	4.0	0.11
+ pyruvate	-62	0.6	5.0	0.11
+ lactate	-56	0.6	n.d.	n.d.
+ succinate	-55	0.6	10.0	0.11

* n moles/mg protein, ** n moles/mg protein min, *** μmoles/mg protein

た(Table 2)。synaptosomesを100℃（５分）で処理しＡＴＰを抽出し測定すると、エネルギー基質の有無によるＡＴＰ量の変化は見られなかった。Table 2の結果は、過塩素酸により抽出した結果であり、この方法では、基質に因る差は見られる。抽出法によるＡＴＰの差は、細胞内に安定性の異なるＡＴＰが存在している事と基質により合成されたＡＴＰがより不安定で有る事を示していると思われる。synaptosomes内の全ＡＴＰ量は、１０分間のインキュベーションで時間と共にglucoseの有無に関わらず減少した（fig.1）。エネルギー基質によりmitochondriaの膜電位が変わる可能性も考えられるので、その目安として酸素消費量も測定した。Table 2より分かるようにglucose,mannoseおよびpyruvateが膜電位を形成するエネルギー源になる。しかし、この時ＡＴＰ量は、glusose,mannoseにより増加がみられたがpyruvateによる増加は見られなかった。酸素消費速度は、速くなるsuccinateやpyruvateによりＡＴＰ量が増加しなかった。このことは、全ＡＴＰ量が時間と共に減少することとを考え合わせるとmitochondriaによるＡＴＰ合成量がそれほど多く無い事を示していると考えている。glucoseなどにより酸素消費が増加せずにＡＴＰ増加するので、酸素消費とＡＴＰ合成は対応しない点では、結果は一致しているとも言える。又、ＡＴＰ合成と乳酸産生（解糖系の代謝）とは、相関が高く、膜電位変化と対応している。但し、ＡＴＰ測定や乳酸産生の実験条件（1-2 mg synaptosomal protein/ml)は、充分好気的はないのでより好気的な条件でのＡＴＰ測定の条件検討をしている。Table 2 の結果は、rhodamine 6G により得られた結果とほぼ一致している(2)。結果は示さないが、α-cyanocynamateやphloretin（pyruvate の代謝阻害剤）は、ＡＴＰを減少させなかった（fig.1）が、rotenone（呼吸阻害剤）やＣＣＣＰ（脱共役剤）では、ＡＴＰ量は減少した。又、ＴＰＰ⁺は、synaptosomesの代謝系に影響が少ない事は確かめてある(3)。

（参考文献）

1) Aiuchi,T. et al (1982) Biochim. Biophys. Acta 685,289-296
2) Aiuchi,T. et al (1984) Biochim. Biophys. Acta 771,228-234
3) Aiuchi,T. et al (1986) Biochim. Biophys. Acta 843,20-24
4) Blaustein,M.P. and Goldling,J.M. (1975) J.Physiol. 247,589-615
5) Friedman,J.E. et al (1985) J.Neurochem. 44, 1391-1402
6) Lichtshtein,D. et al (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 650-654
7) 松永ら (1985) 膜 10,195-200
8) Nicholls,D.G. et al (1982) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 7924-7928
9) Scott,I.D. and Nicholls D.G. (1980) Biochem. J. 186,21-33
10) Sims,P.J. et al (1974) Biochemstry 13, 3315-3330
11) Skulachev,V.P. (1971) Curr.Top.Bioenerg. 4, 127-190

129. ラット海馬由来神経発育因子の神経化学的研究

吉田一成*・高坂新一・高松　研・井端由紀郎*
大谷光弘*・戸谷重雄*・塚田裕三
（慶応大・医・生理，脳外*）

〔要　約〕

ラット胎仔大脳半球の初代培養系を用いて，中隔核から海馬へのコリン作動性線維〔fimbria fornix(f.f.)〕を切断することにより増強される，海馬由来のneurotrophic factor(HNTF)について検討を行った。ニューロンの生存促進効果が最も上昇する，f.f.の切断7，14日後においても，海馬抽出液のアストロサイト増殖促進効果は増強されなかった。アストロサイトの増殖がみられない無血清培地による短期培養，及びconfluentに達したアストロサイトとのcocultureによる長期培養においても，海馬抽出液には，ニューロンの生存率を上昇させる効果が認められた。このことは，海馬抽出液中には，ラット大脳半球由来のニューロンに直接作用し，生存率を上昇させる因子（HNTF）が存在することを示唆している。f.f.切断14日後の海馬抽出液を，高速液体クロマトグラフィーを用いたゲル沪過カラム（TSK 2000 SW）にて分画し，分子量の推定を行った。HNTFの活性は，M.W.10−20K，30−40K，50−60K 3つのピークに回収された。免疫組織化学染色の結果，HNTF存在下で生存するニューロンの約50％は，glutamic acid decarboxylase陽性であり，GABA作動性ニューロンと考えられた。

Key word：Neurotrophic factor, Hippocampus, Primary culture.

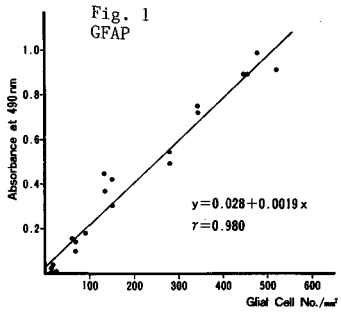
ラット海馬には，神経成長因子（NGF）をはじめ種々の神経発育因子が存在すると考えられている。[1-8,10] 我々はラット胎仔大脳半球の初代培養系を用いてラット脳抽出液の神経発育因子の検定を行い，海馬組織に高いneurotrophic effect（NTE）が存在すること，また，中隔核から海馬へのコリン作動性入力線維〔fimbria fornix(f.f.)〕を切断することにより，14日後をピークにその効果が上昇することを見出し，報告した。[6,10] 今回は，海馬抽出液のNTEについて，さらに詳細な検討を行ったので報告する。

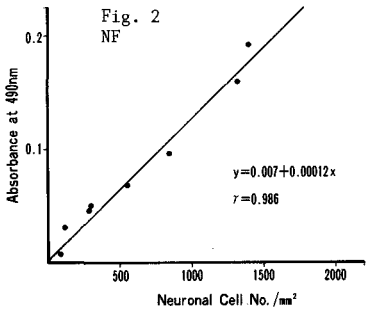
〔実験方法〕

初代培養：ラット胎生16日大脳半球のトリプシン処理による分散は，従来の方法を用いた。[6,10] Poly-L-lysineでコーティングしたファルコン24ウェルプレートにて，2.5×10^5/1 ml medium/wellの細胞数で，牛胎仔血清（FCS）15％を含むMEMにて培養を開始した。培養開始翌日から海馬抽出液を添加し，さらに翌日から隔日に培地交換しその都度抽出液を添加し，6日間培養した。f.f.切断ラットの作成，及び，海馬抽出液の調整は既報のごとく行った。[6,10] 無血清培地における海馬抽出液のNTEの検定では，15％FCS-MEMのかわりにHB-102（フジレビオ）を用い，4日間培養した。また既報のごとく，[9,11] アストロサイトを単層培養した上で，ニューロンを約4週間にわたり初代培養し，この系で海馬抽出液のNTEの検定も行った。

海馬抽出液のゲル沪過による分析：f.f.切断14日後の海馬抽出液（総蛋白量7 mg）を，TSK-2000 SWを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析した。溶出Bufferは10mM PBSを用い，void部分より1 mlずつ20 fractionを採取した。各

々の fraction はフィルター滅菌後，100 μl ずつを培地に添加し，ニューロンの生存に対する効果を検定した。Immuno-colorimetric assay：細胞マーカーに対する抗体を用いた，細胞数の半定量法を確立した。すなわちアストロサイト，ニューロンそれぞれのマーカーである，glial fibrillary acidic protein（GFAP），200K neurofilament protein（NF）の各抗体を用いて，間接酵素抗体法による免疫組織化学染色の場合と同様の方法で，[9-11] それぞれの細胞をラベルした後，o-phenyl-enediamine で発色させ，その上清の吸光度（490 nm）を ImmunoReader NJ200 にて測定した。Blank には一次抗体のかわりに正常ウサギ血清，もしくは牛血清アルブミンを用いた。ラット胎仔脳を継代培養して得られるアストロサイト，及び，ラット胎生16日大脳半球由来のニューロンをそれぞれ種々の細胞密度で培養し，位相差顕微鏡下で実測した細胞数と，上記方法による optical density との相関性をみると，両者は Fig.1，2 に示すごとく極めて高い相関を示す。以後，この方法により半定量した細胞数は，抽出液のかわりにPBSを加えた場合のコントロールを100とし，％表示した。





免疫組織化学：培養細胞を 0.5％ zinc salicylate-10％ formalin，および10％ formalin でそれぞれ20分固定，0.3％ H_2O_2（1 hr），normal rabbit serum（1 hr）処理した後，anti-glutamic acid decarboxylase（GAD）で4℃，16 hr incubate し，以下ABC法により染色した。

〔結果および考察〕

海馬抽出液にはニューロンの生存促進効果とともにアストロサイトの増殖効果も存在する。海馬抽出液のニューロンに対する効果は増殖したアストロサイトによる二次的影響による可能性があることから次の検討を加えた。まず，無血清培養下におけるアストロサイトの増殖を抑制した培養系で海馬抽出液を添加し，ニューロンの生存について検討を加えた結果，この培養系においても抽出液が効果を有していることが判明した。次に，confluent に達したアストロサイトの上でニューロンの初代培養を行ってみると，培養約3週目以降ニューロンが変性脱落する。これに海馬抽出液を添加すると，この培養系においても明らかにニューロンの生存が促進された。次に海馬抽出液のアストロサイト増殖促進効果が，f.f. 切断によりい

Fig. 3 Changes in glial proliferative activity in the hippocampal extract after f.f. lesion.

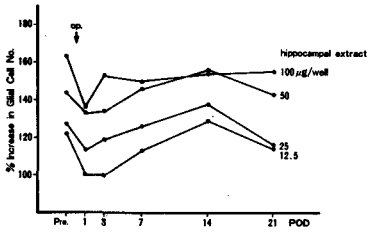
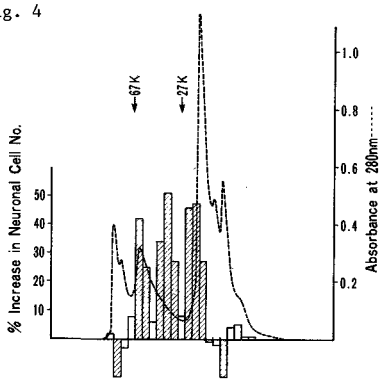


Fig. 4



かに変化するかを検討した。Fig.3に示すごとくf.f.切断1－7日後では，低下しており，14日においても前値とほぼ同様であり，ニューロンの生存に対する効果[6,10]とは明らかに異なっていた。以上の結果から海馬抽出液中には，大脳半球由来のニューロンに直接作用し，生存率を上昇させる因子〔hippocampal neurotrophic factor（HNTF）〕が存在することが強く示唆された。

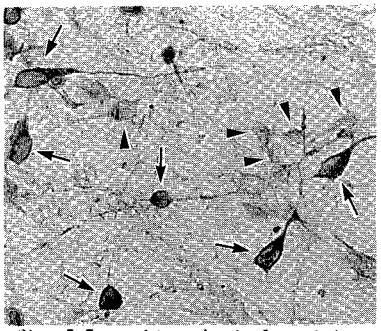


Fig. 5 Immunohistochemical staining with anti-GAD serum. Arrows, GAD-positive neurons. Arrow heads, GAD-negative neurons.

このHNTFは昨年報告したごとく蛋白性因子であることが考えられたため[6]，この分子量を推定するためにHPLCを用いて，f.f.切断14日後の海馬抽出液のゲル沪過を行い，各分画のニューロンの生存に対する効果の検定を行った。Fig.4に示すごとく，M.W. 10-20K, 30-40K，および50-60Kの分画で活性が認められた。いずれの分画においても，アストロサイトの増殖能は，粗抽出液に比し極めて少なく，このカラム条件下では，アストロサイト増殖促進因子は失活，あるいは吸着されたものと考えられた。次に，効果の認められた分画において，生存したニューロンのGAD免疫染色を行ってみると，全ニューロンの約50％がGAD陽性であった（Fig.5）。

ラット海馬には，NGFをはじめとする，主に中隔核コリン作動性ニューロンに作用すると考えられる種々のNTFが存在する[1-8,10]。最近，f.f.切断により，我々の実験系と同様の時間経過で，海馬のNGFレベルが上昇することが合い次いで報告された[3,7]。NGFは，中枢神経系においてはコリン作動性ニューロンのcholine acetyl-transferase活性を上昇させるが[4]，他の中枢ニューロンに対するtrophic effectについては知られていない。Gageらは[2]，移植実験において，f.f.切断により，カテコールアミン作動性ニューロンに対するsurvival factorが放出される可能性を示唆している。我々が，HNTFのアッセイに用いている大脳半球由来のニューロンの多くはGABA作動性であり，しかもゲル沪過の結果から，分子量の異なる複数の因子が存在すると考えられる。その一部には，2.5S NGFの分子量に近いものもあるが，作用細胞の違い等から，HNTFはNGFとは異なる因子であると考えられる。今後は，分画した個々の因子についてさらに詳細な検討を加える予定である。

謝辞：抗GAD血清を御供与頂いた，米国NIMH Dr. I.J.Kopinに感謝致します。本研究の一部は文部省科研費，及び，慶応義塾大学医学部研究奨励費の援助を受けた。

〔文献〕

1) Crutcher KA, and Collins F. Science 217 (1982) 67-68.
2) Gage F, Bjorklund A, and Stenevi U. Nature 308 (1984) 637-639.
3) Gasser UE, Weskamp G, Otten U, et al. Brain Res. 376 (1986) 351-356.
4) 畠中　寛，津久井弘子，二本松伊都子：神経化学 24 (1985) 487-489.
5) 高坂新一，吉田一成，大谷光弘，他：神経化学 24 (1985) 490-492.
6) 高坂新一，吉田一成，戸谷重雄，他：精神神経薬理 8 (1986) 363-373.
7) Korsching S, Heumann R, Thoenen H, et al. Neurosci. Lett. 66 (1986) 175-180.
8) 小鹿幸生，田中　亮，Appel SH：神経化学 24 (1985) 493-495.
9) 吉田一成，高坂新一，大谷光弘，他：神経化学 24 (1985) 469-471.
10) Yoshida K, Kohsaka S, Idei T, et al. Neurosci. Lett. 66 (1986) 181-186.
11) Yoshida K, Kohsaka S, Nii S, et al. Neurosci. Lett. (1986) in press.

130. 培養中隔核コリン作動性神経に及ぼす海馬因子の多様性について

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 医大・神経内科**）

〔要　約〕

ラット中隔核培養組織のコリン作動性神経の発育を促進する因子が海馬組織中に存在し，その一部は polypeptide である事を報告してきた。この様な促進因子は海馬組織内に数種存在する可能性が考えられたので，今回これらの因子の相互関係および性質について報告した。

海馬組織を homogenize 後，遠沈にて上清の可溶性成分と沈渣の不溶性成分に分けると，不溶性成分および可溶性成分にも中隔核コリン作動性神経の発育を促進する作用が認められた。更に可溶性成分を tube dialysis または超限外濾過により macromolecule と micromolecule に分離すると，macromolecule は単独で培養組織の acetylcholine（Ach）の産生を促進したが，micromolecule は単独では同様の作用を示めさず，不溶性成分と一緒に培養系に添加すると著明な Ach 産生促進作用を示した。不溶性成分は phospholipase C に感受性を有す，非特異的成分と考えられた。macromolecule は熱に対し非常に不安定で，Trypsin に感受性を示す比較的特異性の高い蛋白成分と考えられたが，NGF や EGF とは異なる成分と思われた。micromolecule の性質については，過去2回の本学会でその詳細について述べた。

Key word：Septal nucleus, Hippocampus, Neurotrophic factor

〔目的〕　我々は中枢神経系の形態的，機能的発育に於ける，節前神経と節後神経との相互的調節を分子レベルで検討する事を目的とし，中隔核－海馬系を in vitro の系で検討してきた。海馬組織中に中隔核コリン作動性神経の発育を促進する因子が存在し，この因子の一部は部分精製可能な polypeptide である可能性などについて報告してきた(1)(2)(3)(4)。今回，この polypeptide および他の海馬因子の特長と，それぞれの因子の相互関係などについて検討したので報告する。

〔方法〕　胎令16日目のラット脳から得た中隔核の細片組織を培養，培養3日目より海馬成分等を添加し，9日目に acetylcholine（Ach）の産生能を測定した(2)(3)(4)。海馬成分の作成，超限外濾過法，蛋白量の測定法は既報に譲る(3)(4)。

〔a〕 tube dialysis：海馬組織から得た可溶性成分を cut off 14,000 daltons の dialysing tube と 1000 倍容の PBS を用い，4 ℃ の cold room 中で14時間透析を行なった。4 ℃ の cold room 中に同時間放置した海馬可溶性成分を透析を実施しない対照試料とした。

〔b〕 in vitro mixed incubation study：Amicon YM5 filter 濾液 2 ml と海馬不溶性成分 5 mg を混合し，37 ℃，2時間無菌的に試験管内で incubation を実施した。incubation 後 100,000 g，6時間超遠心を施行し，再び上清の可溶性成分と沈渣の不溶性成分に分離，各々の適当量を中隔核培養組織に添加して，incubation 前後に於ける各々の成分の生物学的活性の変化を検討した。

〔c〕 海馬不溶性成分の性質の検討：生後10日目のラット海馬を無菌的に10％ sucrose を含む 5 mM Tris-Hcl（pH7.4）の緩衝液中で Homogenize し，subcellular fractionation を実施した(5)。Microsome, Myelin, Synaptosomes, Mitochondria fraction の一定量を中隔核培養組織に添加し，

その生物的活性を検討した。また，海馬のみならず小脳，脊髄，骨格筋，肝組織より得た不溶性成分の一定量を培養組織に添加し，その生物学的活性についても検討した。更に，海馬不溶性成分をTrypsin, β-N-Acetylgalactosamidase, β-galactosidase, Neuramidase, phospholipase C等と至適条件下で37℃，30分 incubationを実施した。incubation 後PBSを加え，遠沈操作を繰り返し酵素を除去後，培養組織に添加してその活性の変動を検討した。

〔d〕 可溶性成分の性質の検討：生後7日目から12ヶ月目までの各ラット脳から得た海馬可溶性成分の一定量を，単独または海馬不溶性成分と共に中隔核培養組織に添加して，加令による海馬中の活性可溶性成分の変動について検討した。また，2週令ラット海馬，大脳皮質，線条体，小脳，脊髄，骨格筋，肝，腎組織より可溶性成分を抽出し，その一定量を培養系に単独または海馬不溶性成分と共に添加して，組織特異性について検討すると同時に，可溶性活性因子の熱，pH，蛋白分解酵素等に対する感受性についても検討した。更に，胎令16日目の頸部交感神経節や後根神経節の培養組織に2.5S-NGFや海馬可溶性成分を添加して形態的変化を観察したり，海馬可溶性成分を抗NGF抗体や抗EGF抗体で処理後，中隔核の培養系に添加して，処理前後のAch産生能の変化についても検討した。

〔結果および考察〕 既報の如く(3)，海馬可溶性成分および不溶性成分いづれも中隔核培養組織のAch産生を濃度依存性に促進する効果が認められた。また，各々一方の飽和量を一定として他方を可変的に添加すると，同様濃度依存性にAchの産生は増加を示した。この際のAch産生量は両者の飽和量を単独で添加した場合の和またはそれ以上で，更に両者を同時に添加した場合の可変成分の飽和量は，単独で添加した際より少量で飽和を示す傾向が認められた（図1）。

海馬可溶性成分をtube dialysisまたはYM5 filterによる超限外濾過を実施して分画すると，dialysing tube中またはYM5 filter上に残存したmacromoleculeは，単独でAch産生を促進したが，不溶性成分と共に添加しても著明な促進効果を示さなかった。一方，YM5 filter濾液中のmicromoleculeは単独では培養組織のAch産生能を促進しなかったが，不溶性成分と一緒になると著明な促進効果を発揮した。しかし，dialysing tube中のmacromoleculeとYM5 filter濾液を同時に添加しても著明な効果は得られなかった（図2）。以上の事から海馬可溶性成分中には，少なくとも二つの異なった効果を示す成分が存在する事が判明した。一つは分子量14,000 daltons以上のmacromoleculeで，他は5,000daltons以下の

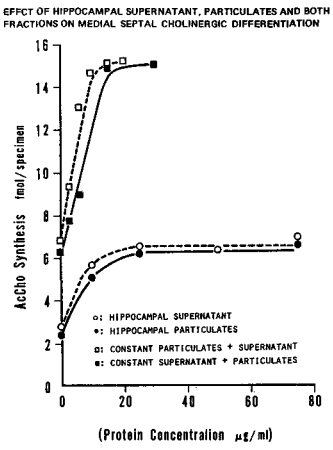


図1

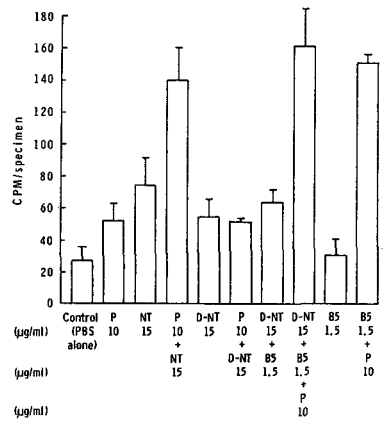


図2 Hippocampal Particulates and Supernatant Interaction
P: particulates NT: Crude supernatant
D-NT: dialyzed supernatant
B5: Amicon YM5 filtrate (Below YM5)

micromolecule であると考えられた。またmacromolecule と海馬不溶性成分とは，その活性発現様式から各々異なる成分であると考えられた。

(表1) ENZYME DIGESTION OF HIPPOCAMPAL PARTICULATES

ENZYMES	% LOSS OF CHOLINERGIC ACTIVITY
TRYPSIN	0
HEXOSAMIDASE A (β-N-ACETYLGALACTOSAMIDASE)	0
β-GALACTOSIDASE	0
NEURAMIDASE	25
PHOSPHOLIPASE C	98

in vitro mixed incubation study の結果， incubation を実施する前後で可溶性成分および不溶性成分には活性の変動は認められなかった。この事から，両成分は全く別の機序により培養組織に影響を及ぼしているものと考えられた。

＜不溶性成分の性質＞ ほぼ良好に分画出来た海馬組織の subcellural fraction を，単独または海馬可溶性成分と一緒に中隔核培養系に添加した。両方法に於ても培養組織のAch 産生能は同様な傾向を示し，どの分画にも促進効果が認められた。また，海馬のみならず他の種々な組織から得た不溶性成分にも，海馬組織と類似した中隔核培養組織のAch 産生促進効果が認められ，不溶性成分には組織特異性が認められなかった。

(表2) Specificity of Tissue Supernatants on Septal cholinergic Activity in vitro

Tissue Source	Cholinergic Activity
Control	100 %
Hippocampus	351 %
Cortex	143 %
Striatum	146 %
Cerebellum	162 %
Spinal Cord	174 %
Muscle	157 %
Kidny	95 %
Liver	136 %

各種酵素に対する感受性の検討の結果，海馬不溶性成分を phospholipase C により処理すると，その効果が著明に減少を示した事から，不溶性成分中の非特異的促進因子には phospholipides が関与している可能性が窺われた（表１）。

＜可溶性成分の性質＞ 海馬可溶性成分中の micromolecule は，不溶性成分と一緒に培養組織に添加した際に，培養中隔核の Ach 産生を促進する効果を発揮するが，この成分についての詳細は過去２回の本学会で報告した(3)(4)。

macromolecule は単独で培養中隔核の Ach 産生を促進する効果を示す事から，各種組織から得た可溶性成分の一定量を培養系に添加した所，海馬組織より得た可溶性成分に最も強い促進効果が認められた（表２）。脊髄および小脳の可溶性成分にも軽度の促進効果が認められたが，腎組織の可溶性成分には類似した効果は認められなかった。この成分は熱に対し非常に不安定で，60℃の加熱により約８分でその活性は50％に減少し，30分で完全に消失した。また，この成分は Trypsin により著明に活性を減少させる事が出来た事から蛋白であると考えられた。

海馬の可溶性成分には頸部交感神経節や後根神経節に対し，2.5S-NGF と類似した効果が認められず，更に抗NGF 抗体や抗EGF 抗体は海馬可溶性成分の Ach 産生促進効果を変化させなかった。この事から海馬可溶性成分中の macromolecule は NGF や EGF とは異なる成分と考えられた。

以上中隔核培養組織のコリン作動性神経の発育を促進する数種の因子が海馬組織中に存在し，それぞれの因子活性の検出法，相互関係およびそれぞれの性質について述べた。

文献：

1. Ojika,K. et al, Banbury report 15, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, pp285-292, 1983.
2. Ojika,K. et al, Proc Natl. Acad Sci USA, 81:2567-2571, 1984.
3. 小鹿幸生他，神経化学，23:351-353, 1984.
4. 小鹿幸生他，神経化学，24:493-495, 1985.
5. Albers, R.W. Basic Neurochemistry, Little, Brown, Boston, pp49-61, 1981.

131. グリア芽細胞の形態的分化誘導：グリア細胞成長因子（GMF）と dBcAMP との比較

伊藤仁一・加藤泰治・田中　亮
（名古屋市大・医・生化第一）

〔要　約〕

グリア芽細胞に対するグリア細胞成長因子（ＧＭＦ）のＤＮＡ合成促進作用と形態分化誘導作用との関連性を検討した。ＧＭＦにより誘導される形態分化はＤＮＡ合成阻害剤（スポンゴアデノシン・ヒドロキシウレア）によって阻害されなかった。またＲＮＡ合成阻害剤であるアクチノマイシンＤによっても形態分化は抑制されなかった。一方、ピューロマイシンでタンパク質合成を阻害すると形態分化は著しく抑制された。グリア芽細胞のタンパク合成はＧＭＦ刺激後30～36時間に促進され、これは形態分化が現われる時期とほぼ一致した。またこの時期にピューロマイシンでタンパク合成を阻害すると形態分化も抑制された。ｄＢｃＡＭＰで誘導されるグリア芽細胞の形態分化はピューロマイシンで阻害されなかった。これらの事実から、ＧＭＦにより誘導されるグリア芽細胞の形態分化は、ｄＢｃＡＭＰの場合とは異なりタンパク合成の過程に依存し、またＤＮＡ合成および細胞分裂の結果生ずる二次的反応ではなくＤＮＡ合成促進反応とは異なる反応系を経て生ずることが示唆された。

Key word： glia maturation factor (GMF), glioblast, morphological differentiation

グリア細胞成長因子（ＧＭＦ）はグリア芽細胞のＤＮＡ合成を促進し、続いてアストロサイト様形態へと分化誘導する。昨年報告したグリア細胞増殖抑制因子（ＧＧＩＦ）は、ＧＭＦのグリア芽細胞ＤＮＡ合成促進作用のみ抑制し、形態分化誘導作用に対しては阻害作用を示さなかった。この事実は、ＧＭＦのＤＮＡ合成促進作用と形態分化誘導作用が異なる作用機序を介して発現することを示唆した。そこで今回はＧＭＦのＤＮＡ・ＲＮＡおよびタンパク合成促進作用を検討し、これらと形態分化誘導作用との関連性を検討した。またｄＢｃＡＭＰにより誘導される形態分化と比較検討した。

〔実験方法〕

1. グリア芽細胞の培養：在胎17日目のラット胎児より大脳を摘出し、髄膜除去後0.1％トリプシン／Tyrode 液にて37℃ 10分間処理し、20％ＦＣＳ／Ｆ－10培地でprimary culture を行なった。一週間後細胞を0.1％トリプシンで subculture し、10％ＮＢＳ／Ｆ－10培地で、一週間 secondary culture し、実験に供した。[1)]

2. ＧＭＦの部分精製：血餅、髄膜を除去した成牛大脳500ｇに1.2ℓの0.02M Tris-HCl buffer, pH7.5を加え homogenize した。この遠心上澄をH_2Oで透析し、これを凍結乾燥して得た powder を100％エタノールで4℃ 30分間処理した。0.15M NaCl／0.02M Tris-HCl buffer で再抽出し、ＤＥＡＥ-Sephacel, Bio-Gel P-200カラムで部分精製した。ＧＭＦ活性はラットグリア芽細胞の^{3}Ｈ－チミジン取り込み増加率で測定した。[2)]

3. グリア芽細胞のＤＮＡ・ＲＮＡおよびタンパク合成測定：それぞれ^{3}Ｈ－チミジン、^{3}Ｈ－ウリジン、^{14}Ｃ－ロイシンの取り込みで測定した。またＤＮＡ合成阻害剤にはスポンゴアデノシンあるいはヒドロキシウレア、ＲＮＡ合成阻害剤にはアクチノマイシン

Dまたタンパク合成阻害剤にはピューロマイシンを用いた。

〔結果および考察〕

ヒドロキシウレア・アクチノマイシンDおよびピューロマイシンを用いて、それぞれGMFで刺激されたグリア芽細胞のDNA・RNAおよびタンパク合成を阻害し形態分化抑制との相関を検討した。Fig. 1で示したように、ヒドロキシウレアおよびアクチノマイシンDでDNA・RNA合成を50%阻害しても形態分化抑制は観察されなかった。一方ピューロマイシンによる40%のタンパク合成阻害で形態分化が50%阻害された。このようにタンパク合成阻害がグリア芽細胞の形態分化阻害を誘導することから、GMFによるグリア芽細胞の形態分化がタンパク合成の過程に依存していることが示唆された。しかしながらdBcAMPで誘導された形態分化は、ピューロマイシンによってタンパク合成を50%阻害しても何ら抑制されなかった。(Fig. 2)。次にGMFで刺激されたグリア芽細胞のタンパク合成を ^{14}C-ロイシンの6時間パルスの取り込みで測定した。Fig. 3に示したように、GMF刺激後30時間以降に促進され、形態分化が現われる時期にほぼ一致した。またピューロマイシン刺激のtime courseおよび6時間パルス刺激によるグリア芽細胞の形態分化抑制を検

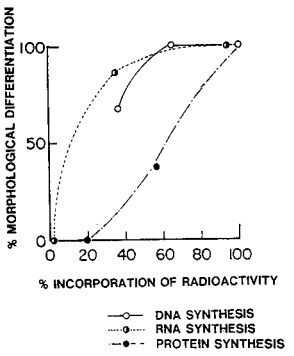


Fig. 1
RELATION BETWEEN MORPHOLOGICAL DIFFERENTIATION OF GLIOBLASTS AND INHIBITION OF DNA, RNA AND PROTEIN SYNTHESIS

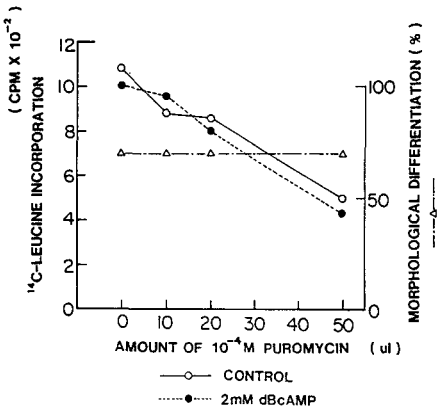


Fig. 2
EFFECTS OF PUROMYCIN ON PROTEIN SYNTHESIS AND MORPHOLOGICAL DIFFERENTIATION OF dBcAMP-TREATED GLIOBLASTS

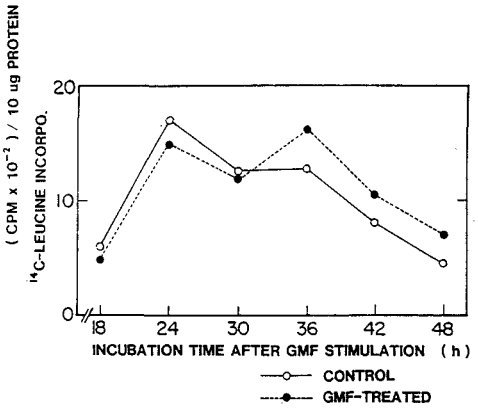


Fig. 3
PULSE LABEL OF GLIOBLASTS WITH ^{14}C-LEUCINE

討した(Fig. 4)。time courseの実験では、GMF刺激後24時間以前にピューロマイシンが存在すると形態分化は抑制されたが、30時間以後では抑制されなかった。同様にGMF刺激後30～36時間、36～42時間の6時間パルス刺激においても形態分化が

抑成され、タンパク合成促進時にタンパク合成が阻害されると特異的に形態分化も抑制されることが示された。これらの事実から、ＧＭＦとdBcＡＭＰはそれぞれ異なる作用機序で形態分化を誘導し、特にＧＭＦによって誘導される形態分化はタンパク合成の過程に依存することが示唆された。またＧＭＦの形態分化誘導作用がＤＮＡ合成促進作用とは異なる細胞内反応を介して発現されることが示唆された。

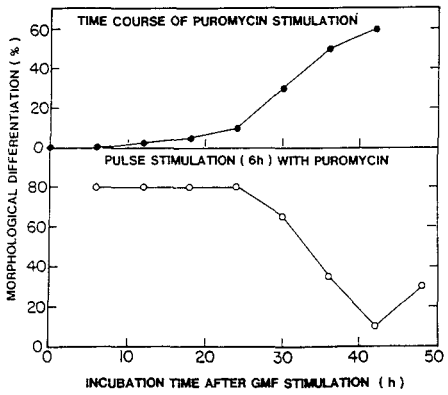


Fig. 4
INHIBITION OF GMF-INDUCED MORPHOLOGICAL DIFFERENTIATION OF GLIOBLASTS BY PUROMYCIN

〔参考文献〕

1). Kato. T. et. al. (1984) Brain Res., 301, 83-93
2). Kato. T. et. al. (1981) Brain Res., 212, 393-402

132. ヒトグリオーマ細胞における PP60^{src} 並びに上皮成長因子受容体の発現に及ぼす抗グリオーマ物質の影響

本田千穂・田渕和雄　　（香川医大・脳神経外科）

〔要　約〕

我々は，昨年の本学会で，グリオーマ細胞における src がん遺伝子産物 pp60^{src} および erbB がん遺伝子産物と相同性が認められる上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor, EGF—R）の発現について検討し，グリオーマのなかにはその発生あるいは増殖に src 群がん遺伝子の関与しているものがある可能性を報告した。今回は，グリオーマ細胞に対し増殖抑制効果を示す Prostaglandin（PG）D_2, PGJ_2, adenylate cyclase 活性化物質 forskolin, カルモジュリン阻害剤 W—7, プロテインキナーゼ C 阻害剤 H—7 を作用させた場合の pp60^{src} と EGF—R の発現の変化を検討した。PGD_2, PGJ_2, forskolin を作用させた場合，pp60^{src}, EGF—R の発現の低下が認められたが，その程度は，forskolin 処置による低下が最も著明であった。W—7, H—7 ではほとんど変化はなく，H—7 でわずかに EGF—R の発現増加傾向がみられた。すでに報告したように培養グリオーマ細胞に形態学的並びに生化学的分化を誘導する forskolin により，強い pp60^{src} および EGF—R の発現の低下がもたらされたことは，src 群がん遺伝子産物が，グリオーマ細胞の脱分化（dedifferentiation）に深く関与している可能性を示唆する所見と思われる。

Key word：glioma cells, pp60^{src}, epidermal growth factor receptor

（はじめに）

最近，ある種のがん遺伝子産物と細胞増殖因子あるいはその受容体との類似性が注目され，発がんの機序を解明するうえで注目されつつある。src 群がん遺伝子に属する erbB 遺伝子産物は，上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor, EGF—R）の一部に相当することが知られている。我々は，昨年の本学会で，グリオーマ細胞における src がん遺伝子産物 pp60^{src} および EGF—R の発現について検討し，グリオーマのなかにはその発生あるいは増殖に src 群がん遺伝子の関与しているものがある可能性を報告した(5)。一方，我々は，prostaglandin（PG）をはじめとする種々の生理活性物質あるいは活性制御物質を用い，それらがグリオーマ細胞に及ぼす影響について検討を進めており，PGD_2 (3)，PGJ_2，adenylate cyclase 活性化物質 forskolin (4)，カルモジュリン阻害剤 W—7 (1)，プロテインキナーゼ C（C キナーゼ）阻害剤 H—7 が培養グリオーマ細胞に対して増殖抑制効果を及ぼすことを認めている。今回，これらのグリオーマ細胞に対し増殖抑制効果を示す種々の薬剤を作用させた場合の pp60^{src} と EGF—R の発現の変化を検討し，グリオーマの発生および増殖を理解するうえで興味ある結果を得たので報告する。

（方法）

我々がヒト glioblastoma 症例より確立し，継代維持している KY 細胞を用いた。この細胞は，対数増殖状態で EGF—R, pp60^{src} ともに発現が認められ(5)，PGD_2, PGJ_2, forskolin, W—7, H—7 の増殖抑制作用に感受性を示す(1, 3, 4)。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，37°C, 5％炭酸ガス中で培養を行っており，各薬剤を，増殖抑制は示すが，殺細胞効果はほとんどもたらさない濃度で作用させ

たのち，pp60^{src} およびEGF−Rの発現の変化を観察した。すなわち，PGD_2，2.5μg/mlまたはPGJ_2，1.25μg/mlを24時間，あるいはadenylate cyclase活性化物質forskolin，10μMを48時間，また，カルモジュリン合成阻害剤W−7，50μMまたはCキナーゼ阻害剤H−7，20μMを24時間作用させた後の細胞を用いた。pp60^{src} とEGF−Rの発現の有無あるいは程度は，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行い，flow cytometerで解析した。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. A40105）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社のCytofluorograf System 50Hを使用した。Falcon社製プラスチックシャーレで増殖させた細胞を，各薬剤を含む培養液と接触させたのち，0.05％trypsin＋0.02％ethylenediamine tetraacetic acidで遊離，単一浮遊細胞化させた。この細胞を99.6％メタノールで30分以上固定したのち，非特異的反応を防ぐため，正常ヤギ血清と30分間反応させた。これを，phosphate buffered saline（PBS）で15分，2回洗浄後，各モノクローナル抗体と4℃，一晩反応させた。次に，PBSで2回洗浄後，2次抗体と30分間4℃で反応させ，これをPBSで15分，2回洗浄したのち，PBS中に浮遊させて，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，蛍光の強い細胞が多いものほどpp60^{src} あるいはEGF−Rの発現が多いものとみなした(9)。

（結果）

図1に示すように，PGD_2，PGJ_2，forskolinを作用させた場合は，各ピークの明らかな左方移動よりpp60^{src}，EGF−Rの発現の低下が指摘できるが，その程度は一定ではなかった。PGD_2，PGJ_2 は，同等の増殖抑制効果をもたらす濃度を使用したのにもかかわらず，PGJ_2 処置により，PGD_2 処置の場合よりも，強いpp60^{src} ならびにEGF−R発現の低下が認められた。forskolin処置によるpp60^{src} およびEGF−Rの発現の低下は，今回検索に用いた薬剤の中では最も著明であった。W−7では，個々の細胞でのEGF−Rおよびpp60^{src} の発現のばらつきが大きく一定の結果は得られなかった。H−7処置では，ほとんど変化がみられず，EGF−Rについては逆にわずかに発現増加の傾向が認められた。

（考察）

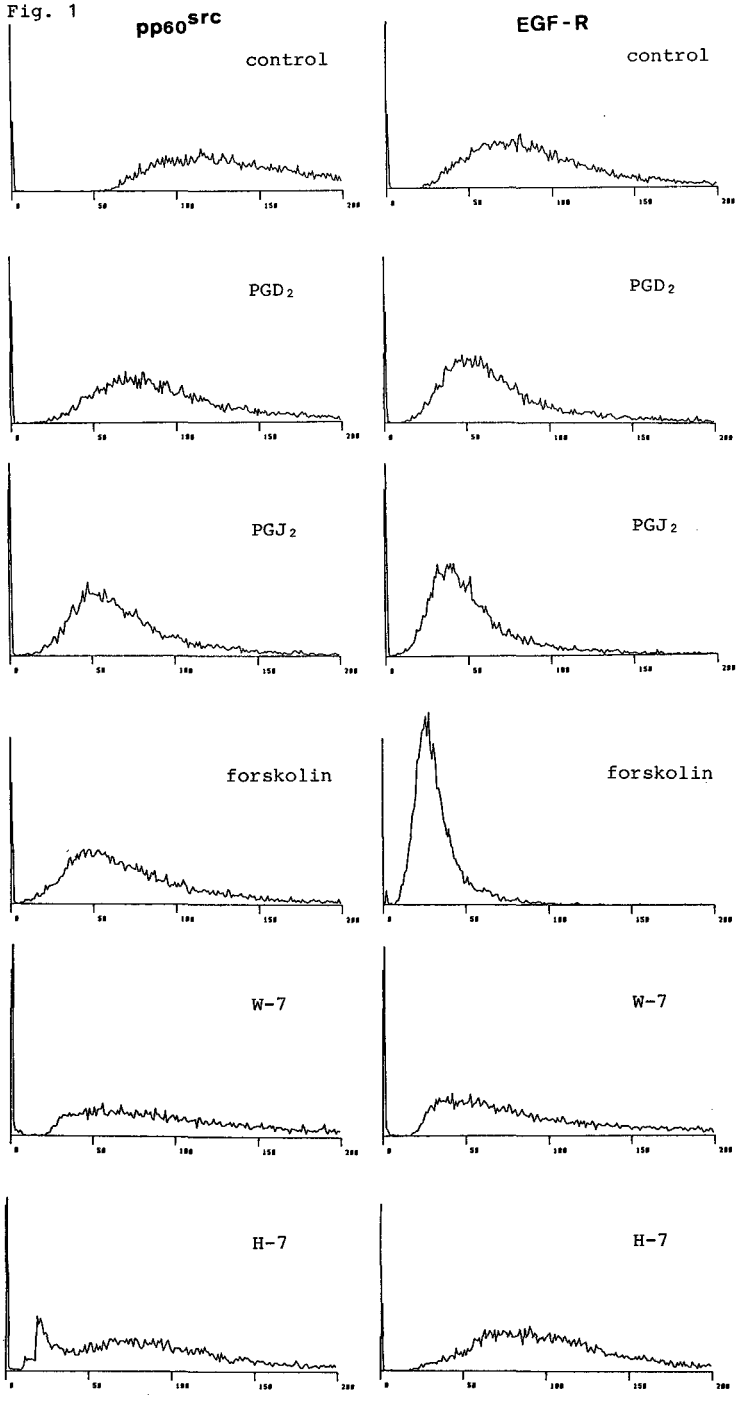
グリオーマ細胞の中には，明らかにpp60^{src} あるいはEGF−Rの発現の増幅が認められるものがあり，グリオーマの発生あるいは増殖にこれらが関与しているものがある可能性についてはすでに指摘されているが(7, 8, 10)，これらのがん遺伝子産物が具体的にどのようにがん化にかかわっているかは未だ明らかでない。今回検索した薬剤は，いずれもグリオーマ細胞の増殖抑制効果をもたらすにもかかわらず，pp60^{src}，EGF−Rの発現に及ぼす効果には相違が認められた。一般にグリオーマ細胞には，細胞内cyclic AMPを増加させる諸因子により分化が誘導されることが知られており，すでに報告したようにforskolinは，培養グリオーマ細胞に形態学的並びに生化学的に分化を誘導する(4)。細胞増殖抑制効果は，forskolinよりもPGD_2，J_2，の方が著明であるにもかかわらず，forskolinが最も強いpp60^{src} およびEGF−Rの発現の低下をもたらしたことは，src群がん遺伝子産物が，グリオーマ細胞の脱分化（dedifferentiation）に深く関与している可能性を示唆する所見と思われる。今回の結果から，pp60^{src}，EGF−Rの発現程度は，増殖速度とは直接関係していないものと思われる。EGF−RはCキナーゼあるいはカルシウムによりフィードバック阻害を受けるこ

とが報告されており（2, 6），これらの阻害剤であるH-7, W-7でEGF-Rを増加させるような傾向がみられたことはこれに符合する所見と考えられ，今後詳細に検討すべき課題の一つと思われる。

（文献）

(1)武家尾拓司　他（1983）神経化学 22:132−134
(2) Cochet, C. et al（1984）J. Biol. Chem. 259:2553−2558
(3)本田千穂　他（1984）神経化学 23:336−338
(4)本田千穂　他（1985）神経化学 24:223−225
(5)本田千穂　他（1985）神経化学 24:388−390
(6) Jetten, A. M.（1985）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1941−1945
(7) Libermann, T. A. et al（1984）Cancer Res. 44:753−760
(8) Libermann, T. A. et al（1985）Nature 313:144−147
(9) Suttles, J. et al（1986）J. Immunol. 136:1586−1591
(10) Takenaka, N. et al（1985）Brain Res. 337:201−207

Fig. 1



133. フォルスコリンで神経突起を伸張するPC12細胞の新しいサブライン：
Ⅰ．神経成長因子による突起との比較

佐野　護・北島哲子・仙波りつ子*
（愛知県コロニー研・形態，周生期*）

〔要　約〕
PC12細胞は，cAMP量を上昇させる試薬によって短いプロセスを伸張する事が知られているが，神経成長因子（NGF)によって誘導される神経突起とは明らかに区別されている。　ところが，我々の見い出したPC12細胞のサブライン，PC12d 細胞ではフォルスコリン(FRK) の投与により長い突起の誘導が観察された。多くの突起はgrowth coneを有し，電顕観察からも多くの分泌顆粒と微小管の存在など，NGF による神経突起と全く区別出来なかった。　更に，PC12d 細胞では，従来のPC12細胞と比較して，神経突起の誘導に必要な時間が著しく短かい。　PC12d 細胞をFRK 又はNGF で処理すると，1日，2日で従来のPC12細胞を1週間NGF で処理した時に匹敵する突起の伸張が観察された。FRK による効果は血清を除くと低下した。又FRK による効果に対する抗NGF抗体の影響は認められなかった。PC12d 細胞をPC12細胞と同じシャーレで培養しても，FRK やNGF に対して，2種の細胞は互いに影響せず，独自の反応性を保持した。　PC12d 細胞がNGF で著しく速く神経突起を形成する事，又それがFRK によっても可能である事実は，本細胞がNGF 依存性の神経突起の形成過程のうち一定のステップが既に完了している可能性を示唆しているものと考えられる。

Key word：　ＰＣ１２，　Ｎｅｕｒｉｔｅ，　ＮＧＦ

PC12細胞はラット副腎褐色細胞腫より樹立されたクローンで，神経成長因子(NGF)に応答し神経細胞の各種機能が誘導される事から，神経細胞の分化を研究する格好の系として利用されている。　フォルスコリン(FRK) は，多くの組織，細胞において内在性cAMP量を顕著に増加させるユニークな薬剤である(7)。　NGF によってPC12細胞に引き起こされる現象のうち，ある種の酵素の誘導や蛋白質の燐酸化などは，dbcAMPの添加によっても類似した結果の出現する事が報告されている(4,5)。　しかし神経突起の伸張は，cAMPの誘導体やFRK によっては起らず，NGF 作用がcAMPを介して起こるものではないと考える根拠にもなっている(3,6)。　本報告では，FRK によっても，NGF と同様に神経突起を伸ばす新しいサブラインPC12d 細胞について紹介する。

（実験方法）

PC12細胞は小池博士（佐賀医大，生化学）およびVaron 博士(Univ.Calif.) より恵与された。　細胞の維持には，5% FCS, N1 Supplement 含むDMEMを培養液に，プラスチックシャーレを用いた。実験には，poly-L-lysine コートしたプラスチックシャーレ，又は24穴培養プレートを用い，5% FCS, 10% HSを含むDMEM, 37度で5%炭酸ガス中で培養を行なった。細胞密度は，10^5 / 直径35mmシャーレ，又は 2.5 x10^4 ／穴になるように植え，24時間後にNGF やFRK を含む培地に変え，2日毎に培地交換を行なった。　細胞体直径の 2倍以上の突起をもつ細胞を神経突起を有する細胞として数えた。

（実験結果）

図 1，2Bに示される様に，従来のPC12細胞はNGF を添加後 6日位経て明確な神経突

起の伸張が見られるが，FRK によっては短いプロセスが生じるが，長い突起の伸張はない。但し，NGF とFRK を同時投与するとNGF による突起形成の促進が見られた。一方，PC12d 細胞（図１）ではFRK，NGF いずれの場合も 1,2日のうちに長い突起の伸張が見られた。 FRK によって誘導された突起は[1] 多くのgrowth cone の存在。[2] 突起中に微少管，分泌顆粒が電子顕微鏡で観察される。[3] コルヒチン処理に対する安定性。 など多くの点で，NGF によって生ずる神経突起と区別できなかった。

図１．PC12,PC12d細胞ののの突起誘導

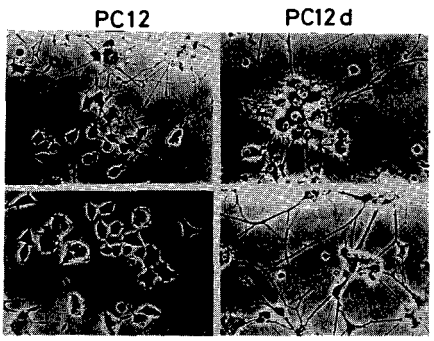


図 3はPC12d 細胞の突起形成に対するFRK の濃度の効果を示しているが，48時間後の ED_{50}値は2-3μM であった。 FRK やNGF 処理の際，血清を培地から除くと，48時間後NGF 処理細胞では60% 以上の細胞に突起が生じたが，FRK 処理細胞では30% と明確な低下が認められた。 この無血清培地でのFRK の効果は，馬血清の高分子分画（アミコンPM10）を添加すると回復したが，低分子分画は無効であった。 PC12d 細胞のFRK による効果が微量のNGF の混在に関連する可能性を検討するため，NGF 抗体を培地に加えたところ，NGF の作用は完全に除かれたが，FRK の作用には影響が無く，NGF の混在の可能性は否定された。 表１では，PC12d とPC12の両細胞を同じシャーレに培養し，NGF やFRK の突起形成に及ぼす効果を調べた。 突起誘導に関して，２種の細胞の共存の影響は無く，両者は互いに独立にそれぞれの反応性示した。

（考察）

新しく樹立したPC12細胞のサブラインPC12d 細胞は，NGF,FRK によって著しく速い神経突起の誘導が見られた。 従来のPC12細胞と異なり，FRK によって形成される突

図 2.NGFとFRK による突起形成。

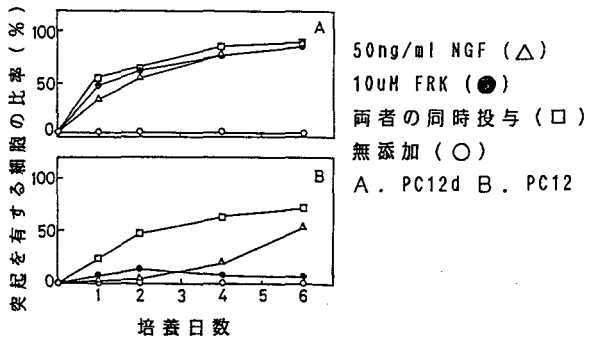
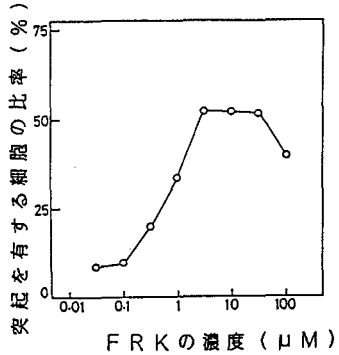


図 3.PC12dとFRK の濃度。



起については，光顕，電顕観察，又コルヒチンに対する突起の安定性(1) 等あらゆる点で，NGF によって形成される突起と酷似している。 FRK の効果が，培地中の血清高分子画分に依存するという結果を得たが，特異的な因子が存在するのか，単なるFRK の有効な溶解状態に関係するのかは不明である。 PC12及びPC12d 細胞を同じシャーレで培養しても，PC12細胞の突起形成に何ら影響しない事実は，PC12d 細胞がFRK に反応してNGF 様物質を放出するなどの可能性を否定し，両細胞の感受性の違いと解釈される。 BursteinとGreene(1978)は，PC12の神経突起の形成には，RNA 合成が必要とされる事を示した，しかも10日位NGF と接触させた細胞(primed cell) では，突起の再生が短時間で起り，その際RNA の合成は必要とされない事が示された(2) 。

従がってNGF による神経突起の伸張の過程には，RNA 合成依存性，非依存性の少なくとも２つのステップが存在すると推定されている(3) 。 Heumann らは，PC12細胞の神経突起の形成には，cAMP依存性のステップとそれ以外のステップの存在する可能性を議論している(4) 。

PC12d 細胞は，NGF によって誘導される神経突起形成過程の一部のステップが既に完成されているのではないだろか。 従ってNGF による反応も素早く起り，又FRK によっても，NGF と同様に突起の誘導が可能であるのかも知れない。 NGF およびFRK によるPC12d 細胞の突起形成はcAMPを介しているのか否か，FRK によって見られる分化はNGF によるそれと生化学的にも類似しているのか否か，興味ある点である。その結果については，次演題に述べる。

表１．PC12d 及びPC12細胞の混合培養におけるNGF,FRK の効果。

細胞	神経突起を有する細胞の比率（％）			
	無添加	ＦＲＫ	ＮＧＦ	ＦＲＫ＋ＮＧＦ
ＰＣ１２ｄ	4.9± 0.6	74.6± 5.5	78.1± 2.9	87/1± 5.1
ＰＣ１２	0.2± 0.3	8.1± 1.1	19.9± 1.5	70.9± 7.0
ｍｉｘｅｄ	4.1± 1.0	30.6± 1.9	42.0± 10.7	81.5± 6.5

10^5 細胞／35mmシャーレを96時間，FRK(10uM),NGF(50ng/ml)添加，無添加で培養した。mixed は同数の２種の細胞を混合した。数値は３結果の平均値±標準偏差値である。

謝辞． 電子顕微鏡観察に関し協力戴きました，当研究所，山崎嘉朗氏に深く感謝いたします。

文献）

１．Black,M, Greene,L (1982)J.Cell .BIOL.95:379-386
２．Burstein,D, Greene,L (1978)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:6059-6063
３．Gunning,P,Landreth,G,Bothwell,M,Shooter,E (1981) J.Cell Biol. 89:240-245
４．Heumann,R, Kachel,V, Thohenen,H (1983)Exptl Cell Res 145:179-190
５．McTigue,M, Cremins,J, Halegoua, S(1985) J.Biol.Chem.260:9047-9 056
６．Richter-Landsberg,C, Jastoroff,B (1986)J.Cell.Biol.102:821-829
７．Seamon,K, Padgett,W, Daly,J (1981)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:3363-3367)

134. フォルスコリンで神経突起を伸張する PC12 細胞の新しいサブライン：Ⅱ．内在性 cAMP の NGF 様作用

仙波りつ子・佐野　護*　（愛知県コロニー研・周生期，形態*）

〔要　約〕

1）我々は神経成長因子（NGF）のみならずフォルスコリン（FRK）にも反応して24h 以内に神経様突起を形成するPC12（PC12d）細胞をすでに紹介した．ここではFRK 以外のcAMP上昇試薬，上皮成長因子（EGF），フォルボールエステル（TPA）の突起形成に対する影響とNGF およびFRK により誘発される生化学的変化をPC12d 細胞で検討した．2）PC12d 細胞はすべてのcAMP上昇試薬に反応して突起を形成したが，EGF，TPA には反応しなかった．またNGF とcAMP上昇試薬との同時投与は突起形成を相加的に増加させたが，TPA との同時投与は逆に突起形成を阻害した．3）FRKはPC12d 細胞のアデニル酸シクラーゼを活性化し，内在性cAMPを増加させたがNGF にはその作用がなかった．4）アセチルコリンエステラーゼ（AchE），オルニチン脱炭酸酵素（ODC），チロシン水酸化酵素（TH）活性はFRK，NGF により増加したが，神経特異的エノラーゼはいずれの条件でも増加しなかった．FRK とNGF の同時投与はODC 活性を相乗的に増加させたが，AchE，THを対照群のレベルに戻した．5）これらの結果はPC12d 細胞では内在性cAMPの上昇がNGF の場合とよく似た作用をもたらし，細胞分化を誘発することを示しているが，両者の作用機構の一部は異なると考えられた．

Key word：PC12，Nerve growth factor，cAMP

PC12細胞はラット副腎髄質のクロマフィン細胞が癌化したもので，神経成長因子（NGF）に反応して神経様突起を形成することから，末梢の神経細胞の分化のモデルとして広く用いられている（4，14）．しかしながらNGF に対する反応性は末梢神経では非常に速いのに対し，PC12細胞では突起形成開始までに少なくとも2-3 日はかかる点では大きく異なる．さらに二次メッセンジャーとしてcAMPが関与するか否かについてはいまだ賛否両論はあるが，PC12細胞ではかなり否定的である（5，12）．我々はNGF および外因性のフォルスコリン（FRK）によって24h 以内に神経様突起を形成するPC12細胞（PC12d細胞）を偶発的に見出し，FRK により形成される突起はNGF によるものと区別できないことを形態学的に示した（11）．本研究では：1）PC12d細胞の突起形成はNGF，FRK によってのみ誘発されるか否か．2）PC12d細胞ではcAMPを介して突起形成が誘発されるか否か．3）FRKにより起こる細胞分化はNGF により起こるそれと生化学的にも同じであるか否か．の三点について検討した．

＜実験方法＞

PC12，PC12d 細胞は5%牛胎仔血清，N1を含むDulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）で維持し，実験には10% 馬血清，5%牛胎仔血清を含むDMEMを用いた．通常突起形成の実験にはポリリジン処理した24 well を，生化学的実験には60mm dish を使用し，細胞は2.5×10^4/well，10^6/dishの濃度でそれぞれ蒔いた．Subculture開始後24h でtest medium に移し，2日ごとに培地を変えた．アデニル酸シクラーゼ（AC）はPC12d 細胞の膜分画を用いてSalomon ら（10）の方法により測定した．アセチルコリンエステラーゼ（AchE），オルニチン脱炭酸酵素（ODC），チロシン水酸化酵素（TH），神経特異的エノラーゼ（NSE）活性の測定（2，3，7-9）には培養終了後培養皿上で洗浄した細胞を機械

約に集め，超音波処理したものあるいはその遠心上清を用いた．内在性cAMPは培養皿上の細胞からTCAで抽出し，Steiner(13)の方法で定量した．

＜結果＞

表IはFRKをはじめ内在性cAMPを上昇させる試薬をPC12d細胞に作用させた結果を示している．dbcAMP，コレラ毒素(ChTx)もFRK同様PC12d細胞の突起形成を誘発した．またこれらの試薬とNGFとの同時投与は突起形成を相加的にした．これらの結果は内在性cAMPの上昇がPC12d細胞の突起形成を誘発していることを示しているが，同時にその作用機構はNGFとは一部異なっているであろうことを示唆している．このことはNGF,FRKのAC活性，内在性cAMPレベルに対する影響を調べることによってさらに明瞭になった．10μMのFRKはAC活性を約12倍（比活性は8.0から93.1 pmol/min/mgに増加）に，内在性cAMP含量を約4-5倍に増加させた（表III）が，NGFはこれらに対し全く影響しなかった．FRKとNGFの作用機構は明かに異なるが，従来のPC12細胞との大きな差異はPC12d細胞ではcAMPが突起形成に関してNGFの代行をし得る点である．次にNGFによって観察される生化学的変化，TH，AchE，ODC活性およびNSE含量に対するFRKの作用をNGFのそれと比較検討した（表IV）．PC12d細胞においてはNGF,FRKのこれらに対する影響には大きな差はなく，これらの結果に関する限り，NGFによって起こる生化学的変化はFRKによっても起こることを示している．しかしながら従来のPC12細胞とは：1) PC12d細胞ではAchE活性がFRK単独で上昇し，NGF FRK共存下で対照群のレベルに落ちる．2) NSEはNGFによっても増加しない．などの点において異なっていた．ところでcAMPの上昇はprotein kinase Aを活性化する．そこで他のprotein kinase活性化試薬であるEGF,TPAをPC12d細胞に作用させてみた．EGFはいずれの条件でも突起形成に全く影響しなかった．これに対しTPAは単独では作用がなかったがNGFとの共存下では突起形成を逆に阻害した（表V）．この点もまた従来のPC12細胞との違いである．

TABLE I. Effects of NGF, cAMP-enhancing reagents and their combinations on neuritic recruitment from PC12d cells

Additions	Neurite-bearing cells (%) 24h	48h	96h
None	4.4 ± 2.2	2.7 ± 1.8	6.9 ± 2.2
NGF (50ng/ml)	21.4 ± 4.2	48.4 ± 3.4	65.5 ± 8.5
FRK (10μM)	37.2 ± 0.9	52.8 ± 1.7	63.1 ± 3.7
ChTx (1μg/ml)	35.9 ± 1.7	56.9 ± 6.9	63.2 ± 11.7
dbcAMP (1mM)	36.9 ± 5.1	56.5 ± 4.8	60.5 ± 5.8
NGF + FRK	54.6 ± 3.7	75.8 ± 4.8	70.0 ± 4.0
NGF + ChTx	50.6 ± 7.1	82.6 ± 4.1	70.5 ± 5.6
NGF + dbcAMP	51.1 ± 4.1	67.6 ± 0.8	65.6 ± 4.4

TABLE III. Changes of intracellular cAMP content in PC12d cells with treatment of NGF, FRK or their combination

Incubation (min)	cAMP content (pmol/mg protein) NGF	FRK	NGF + FRK
0	4.36 ± 0.57		
1	2.89 ± 0.51	11.58 ± 0.27	10.06 ± 1.52
3	2.22 ± 0.13		
10	3.06 ± 0.20		
20	3.16 ± 0.32	18.02 ± 2.30	18.01 ± 1.34
40	2.45 ± 0.22		

TABLE IV. Effects of NGF, FRK and their combination on the activities of tyrosine hydroxylase (TH), acetylcholinesterase (AchE) and ornithine decarboxylase (ODC), and neuron-specific enolase (NSE) content in PC12d cells

		Additions None	NGF	FRK	NGF + FRK
TH		S.A. (nmol/min/mg protein)			
	30 min	1.80 ± 0.41 (12)	2.93 ± 1.18 (5)	2.77 ± 0.44 (6)	1.88 ± 0.37 (6)
	48 h	2.22 ± 0.41 (4)	4.49 ± 0.73 (4)	3.45 ± 0.70 (4)	2.04 ± 0.41 (4)
AchE		S.A. (nmol/min/mg protein)			
	48 h	25.7 ± 3.1 (6)	49.8 ± 3.0 (6)	38.6 ± 2.8 (6)	31.4 ± 2.4 (6)
ODC		S.A. (nmol/h/mg protein)			
	5 h	0.60 ± 0.13 (10)	3.70 ± 0.55 (6)	14.0 ± 3.0 (6)	27.9 ± 5.3 (6)
NSE		Contents (pmol/mg protein)			
	48 h	5.51 ± 1.06 (6)	6.47 ± 0.96 (6)	6.47 ± 0.96 (6)	6.26 ± 0.69 (6)

＜考察＞

この実験では従来のPC12細胞と異なり，PC12d細胞では明かにcAMPがNGFの代行をし得ることを示すと同時に突起形成の作用機構はNGFとは少なくとも一部は異なっていることも示した．FRKによるPC12d細胞の突起形成においてはcAMP依存性protein kinaseが重要な役割を果している考えられるが，他のkinaseでは代用できないことも明かになった．これはおそらくTHのリン酸化に見られるようにリン酸化されるたんぱくあるいはその部位がNGFと相違していることによるものと思われる．

TABLE V. Effects of TPA and EGF on neuritic recruitment from PC12d cells and conventional PC12 cells

Additions	Neurite-bearing cells (%)	
	PC12d cells	PC12 cells
None	2.8 ± 1.6	0.1 ± 0.1
NGF	55.7 ± 6.0	31.2 ± 5.5
FRK	66.7 ± 5.5	12.4 ± 3.1
EGF	2.8 ± 1.2	0.1 ± 0.1
TPA	4.0 ± 5.3	1.3 ± 1.0
NGF + FRK	77.5 ± 9.0	64.1 ± 6.8
NGF + EGF	62.5 ± 14.2	29.5 ± 9.6
NGF + TPA	12.5 ± 1.2	34.0 ± 4.3
FRK + EGF	67.2 ± 4.3	14.7 ± 2.7
FRK + TPA	16.0 ± 3.8	2.6 ± 1.2

Burnstein & Greene(1) はPC12細胞をNGFと長期培養することによってRNA,たんぱく合成に依存せずに突起形成をするprimed細胞を調製している．この細胞は末梢神経系の細胞同様NGFに速く反応して突起形成を開始する．またHeumann ら(6) はNGFにかなり速く反応するクローンを得たが，cAMPでは突起形成を開始しなかたことから，突起形成にはcAMPでは得られないある種の特定の過程の活性化が必要であることを述べている．PC12d細胞ではその過程がすでに活性化されているのかもしれない．Greeneらの報告するprimed細胞にPC12d細胞が近いのか，さらにはまたHeumann らの示唆する特定の過程とは何かは今後の問題であるが，いずれにしてもPC12d細胞は末梢系の神経細胞に近いと言えるのではないだろうか．

PC12細胞を御供与下さいました佐賀医大・小池先生，カリフォルニア大・Dr.VaronおよびTH,NSE測定の御指導いただきました名大・永津先生，愛知県コロニー・生化学加藤先生に深く感謝いたします．

＜文献＞

1. Burnstein D.E. & Greene L.A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 6059-6063.
2. Greene L.A. & McGuire J.C. (1978) Nature, 276, 191-193.
3. Greene L.A., Seeley P.J., Rukenstein A., DiPazza M. & Howard A. (1984) J. Neurochem., 42, 1728-1734.
4. Greene L.A. & Tischer A.S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci., 73, 2424-2428.
5. Hatanaka H., Otten U. & Thoenen H. (1978) FEBS Lett., 92, 313-316.
6. Heumann R., Kachel V. & Thoenen H. (1983) Exp. Cell Res., 145, 179-190.
7. Kato K., Suzuki F. & Umeda Y (1981) J. Neurochem., 36, 793-797.
8. Nagatsu T., Oka K. & Kato T. (1979) J. Chromat., 163, 247-252.
9. Rieger F., Shelanski M.L. & Greene L.A. (1980) Dev. Biol., 76, 238-243.
10. Salomon Y., Londos C. & Rodbell M. (1974) Anal. Biochem., 58, 541-548.
11. 佐野　護，北島哲子，仙波りつ子　(1986)　本誌
12. Skaper S.D., Bottenstein J.E. & Varon S. (1979) J. Neurochem., 32, 1845-1851.
13. Steiner A.L., Parker C.W. & Kipnis D.M. (1972) J. Biol. Chem., 247, 1106-1113.
14. Varon S. (1975) Exp. Neurol., 48, 75-92.

135. 神経成長因子・上皮成長因子および線維芽細胞成長因子の Nsp100 リン酸化抑制作用

橋本誠一・葛谷博磁　　(東北歯科大・生化)

〔要　約〕

PC12h細胞に神経成長因子(NGF)を作用させたのち、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NGFの作用は、予め過剰のEGTAを培養液中に添加することにより消失することを既に報告した。このようなNsp100のリン酸化の選択的な抑制は、PC12h細胞に上皮成長因子(EGF)あるいは線維芽細胞成長因子(FGF)を作用させたのちリン酸化を行っても認められた。また、NGFの場合と同様EGTA前処理により、EGFおよびFGFのNsp100リン酸化抑制作用も消失した。一方、A23187や高濃度K^+脱分極によってもNsp100のリン酸化の抑制が見られたが、常に分子量60,000タンパクのリン酸化の著明な増加を伴った。EGTA単独処理は、逆にNsp100のリン酸化を増加し、分子量60,000タンパクのリン酸化を減少させた。これらのことから、NGF, EGFおよびFGFのNsp100リン酸化抑制作用は、単に細胞内カルシウム濃度を上昇させることによるのではなく、カルシウム関与の反応系を活性化させることによって惹起されるものと思われる。

Key word： Growth Factors, Protein Phosphorylation, PC12h Cell

神経成長因子(NGF)は、交感・知覚神経細胞の分化、生存維持に必須のポリペプチドホルモンであり、神経支配の形成に重要な役割を果たしている。PC12細胞は、NGFに応答して神経突起の形成、神経伝達物質生合成酵素の誘導などの形態的および生化学的変化を示し、交感神経様細胞へと分化することから、NGFの作用機構を研究する為の有用なモデルとして広く用いられている。私達は、PC12細胞にNGFを作用させると分子量100,000タンパク(Nsp100)のリン酸化が著明に減少することを[1]、また、NGFを作用させた後、[γ-^{32}P]ATPを基質として無細胞系でリン酸化を行っても、著明なリン酸化の抑制が見られることを報告した[1)2)3)]。このようなNsp100のリン酸化の抑制は、細胞にA23187や高濃度K^+を作用させることによっても惹起され、EGTAで細胞を予め処理することにより、A23187や高濃度K^+ばかりでなくNGFによるNsp100リン酸化の抑制も消失する[4)]。即ち、NGFの作用の一部は、その作用発現にカルシウムを必要とすることを示した。今回は、上皮成長因子(EGF)および線維芽細胞成長因子(FGF)もNGFと同様に選択的にNsp100のリン酸化を抑制すること、EGTA前処理によってEGFおよびFGFの作用もNGFの場合と同様消失することを見い出したので報告する。また、A23187、高濃度K^+あるいはEGTAなどの細胞内カルシウム濃度を制御する薬物によるタンパク質リン酸化の変化とこれら細胞成長因子による変化との違いについても報告する。

[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、75㎠の培養フラスコで37℃、5％CO_2の条件で行った。

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分間リン酸化を行った。SDS sample bufferを加えて反応を停止し、SDS ゲル電気泳動を行った後、乾燥ゲルにKodak XAR-5 フィルムを密着感光させ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,EGFあるいはFGF 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）。既に報告したように、NGF によるNsp100リン酸化抑制作用は、NGF を作用させる１時間前に培養液にEGTA(3mM)を加えることによって消失することが分かっているので、EGF およびFGF についても同様にEGTAの前処理を行った。図２に示すように、EGTAの前処理により、EGF およびFGF のNsp100リン酸化抑制作用は消失した。このように、これら細胞成長因子によって惹起される細胞内タンパク質リン酸化に対する影響は、極めて類似しており、共通の反応機構の存在が示唆される。また、これらの作用にカルシウムが関与することから、細胞内カルシウム濃度を変化させる薬物の作用との比較を行った。細胞内カルシウム濃度を上昇させるカルシウムイオノフォアA23187あるいは高濃度K^+脱分極によってもNsp100のリン酸化の抑制が見られたが、常に分子量60,000タンパクのリン酸化の著明な増加を伴った（図３）。培養液にEGTAを加えて細胞内カルシウム濃度を減少させると、作用時間とともにNsp100のリン酸化の増加と分子量60,000タンパクのリン酸化の減少が見られた。

[考察]

PC12細胞を用いたNGF の作用の研究において、作用初期に見られるmembrane ruffling 、特異的なタンパク質のリン酸化の変化、アミノ酸取り込みの増加、オルニチン脱炭酸酵素の誘導などの作用の多くは、EGF によっても惹起されることが報告されている。また、FGF も同様の作用を示すことが報告されて来ている。さらに、最近NGF, EGFおよびFGF がともにc-fos, c-myc proto-oncogene およびアクチン遺伝子の転写を活性化することなどが報告され[5]、PC12細胞においてこれらの細胞成長因子が、極めて類似した作用を示すことが明らかになって来た。これらの細胞成長因子を作用させた後、無細胞系リン酸化を行った今回の実験においても、ともにNsp100のリン酸化のみを選択的に抑制し、極めて類似した作用を示した。このことは、一部共通する作用機構を有する可能性を示唆するものと思われる。

[文献] 1 End,D., Hanson,M., Hashimoto,S. and Guroff,G.(1982) J.Biol.Chem. 257, 9223-9225

2 End,D., Tolson,N., Hashimoto,S. and Guroff,G.(1983) J.Biol.Chem. 258, 6549-6555

3 Hashimoto,S., Ikeno,T. and Kuzuya,H.(1985) J.Neurochem. 45, 906-912

4 Hashimoto, S., Iwasaki, C., Kuzuya, H. and Guroff, G. (1986) J. Neurochem. 46, 1599-1604

5 Greenberg, M. E., Greene, L. A. and Ziff, E. B. (1985) J. Biol. Chem. 260, 14101-14110

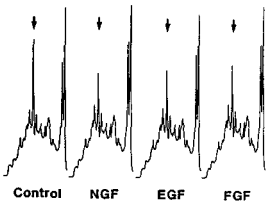


Fig.1. Effect of the treatment of PC12h cells with NGF, EGF or FGF on subsequent cell-free phosphorylation of soluble proteins. Cells were treated for 3 hours with NGF, EGF or FGF at the concentration of 50ng/ml. The arrows in the densitometer tracings indicate the position of Nsp100.

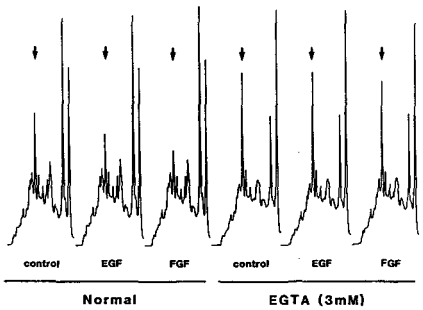


Fig.2. Effect of pretreatment with EGTA on subsequent cell-free phosphorylation of soluble proteins from control PC 12h cells or cells treated with EGF or FGF. The normal panel shows densitometer tracings of autoradiograms from control cells or from cells treated for 3 hours with EGF(50ng/ml) or FGF(50ng/ml). The EGTA panel shows densitometer tracings of autoradiograms from comparable cells pretreated for 60 min with EGTA(3mM). The arrows indicate the position of Nsp100.

Fig.3. Effect of the treatment of PC12h cells with NGF, A23187 or KCl on subsequent cell-free phosphorylation of soluble proteins. Cells were treated with NGF(50ng/ml), A23187(3×10^{-5}M) or KCl(64.4mM) for 3 hours. The left and right arrows indicate the positions of Nsp100 and Mr=60,000 protein, respectively.

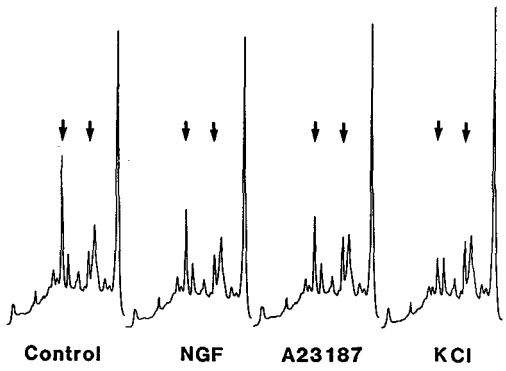
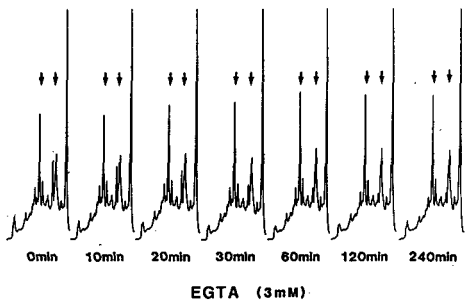


Fig.4. Time course of the effect of treatment with EGTA of intact PC12h cells on subsequent cell-free phosphorylation of soluble proteins. Cells were treated with EGTA(3mM) for indicated time of period. The left and right arrows indicate the positions of Nsp100 and Mr=60,000 protein, respectively.



136. 培養下の胎生および新生ラット中隔野コリナージックニューロンに及ぼす NGF の効果

畠中　寛・津久井弘子・武井延之
（三菱化成生命科学研・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。培養　０、３、６日でＮＧＦ（神経成長因子）を添加し、コリンアセチル基移転酵素（ＣＡＴ）活性の変動を見た。培養下にしばらく置いた細胞では、ＮＧＦ応答性が低下している傾向が見られた。

②種々発生段階の異なるラット胚および新生ラットの中隔野を器官培養し、ＮＧＦによるＣＡＴ活性増加を測定した。２１日胚でもＣＡＴ活性はＮＧＦによって強く増強された。しかし、新生ラットではＣＡＴ活性そのものも低下し、応答性も低いように見える。

③１０日齢ラット脳の中隔野組織をパパイン分散によりアストロサイト上で単層培養下に移した。その結果、新生ラットの中隔野コリナージックニューロンを、アストロサイト上で単層培養することに成功し、十分強いＣＡＴ活性を見ることが出来た。しかし、ＮＧＦ応答性は胚の場合に比べ、低下している傾向が見られた。

④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によってその機能が制御されていると共に、ＮＧＦの応答性が、細胞の発生段階に応じて、変動している可能性を示している。また以上の方法論は、成熟さらには老化ラットからの培養中隔野コリナージックニューロンへのＮＧＦの作用を調べる手掛りを与えるものと思われる。

Key word：Nerve Growth Factor, Septum Cholinergic Neurons, Embryonic and Newborn Rat Septum Monolayer Culture, Choline Acetyltransferase

ＮＧＦ（神経成長因子）は末梢・知覚神経系に特異的に作用する神経性栄養因子の一つとして、その分子レベルでの作用が詳細に調べられている[1),2)]。また最近、中枢神経系にＮＧＦが特異的な存在をすることが明らかにされ、ＮＧＦの中枢神経系における役割が注目を集めている[3),4)]。ＮＧＦは、前脳中隔野および基底核の大型コリナージックニューロンに作用し、コリンアセチル基移転酵素（ＣＡＴ）活性を特異的に上昇させることが明らかにされている[5)]。これらコリナージックニューロンは、脳の老化あるいはアルツハイマー病と関係が深いことが知られており、ＮＧＦとの関わりが新たな注目を集めている。我々は、既に、昨年度本学会および日本生化学会において、１６日胚ラット中隔野初代培養細胞が、ＮＧＦに応答しＣＡＴ活性を数倍に上昇させることを報告した[6),7)]。今回、新生ラットを含む発生段階の異なるラット中隔野コリナージックニューロンの培養に成功し、それらへのＮＧＦの作用を調べたので報告する。

【実験方法】

１６あるいは１８日胚ラット(Wistar系)から摘出した中隔野をトリプシンによって分散したのちニューロンを前回どおり[7),8)]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（５％準胎児牛血清／５％馬血清／ＤＭＥ：Ｆ１２（１：１）培地）で一日培養したのち、無血清完全合成培地（ＴＩＰ／ＤＦ培地）に変え，ＮＧＦを加え数日間培養を続けた。この系の培養中隔野細胞がほぼ全てニューロンであることは抗ＮＦ抗体を用いて確認した。

種々の発生段階の異なるラット中隔野の培養系として、鋭利なメスで約１mm^3角の組織を切りだすOrganotypic Cultureと、０.４mm厚スライス片を用いるSlice Cultureを行った。培地等の条件は前述の方法と同じである。

新生ラットからの中隔野ニューロンの単層培養は、Y.Nakajimaらの方法[9),10)]に準じた。１８日胚ラット皮質の培養アストロサイト上に、１０日齢ラット中隔野のパパイン処理

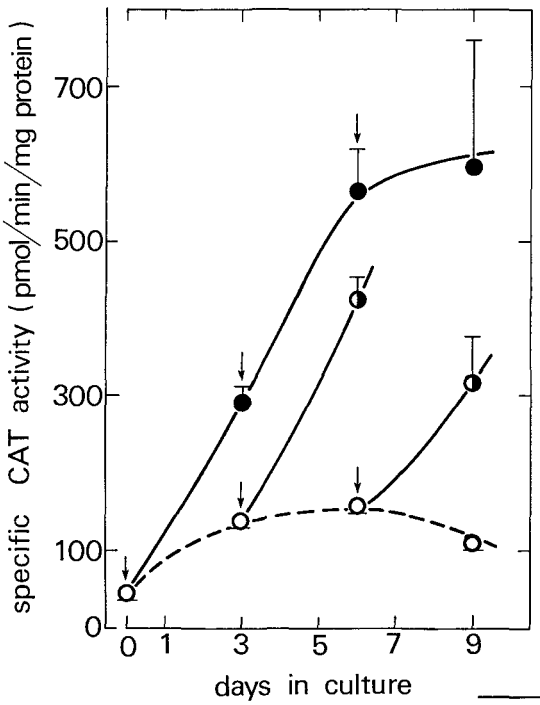


図１　１６日胚ラット中隔野ニューロンのＣＡＴ活性に及ぼすＮＧＦの効果
トリプシン分散後、血清を含む培地に１日置いた後、ＴＩＰ／ＤＦ培地に変えた(0day)。○は無添加対照群を示し、●，◑はＮＧＦ(100ng/ml)添加群を示す。添加時は↓で示した。●は９日間ＮＧＦが存在し続けており、◑は 3days および 6days で加え３日間培養した。ＮＧＦはマウス（♂）顎下腺より精製した。ｎ＝４，値は means ± S.D.。全てのＮＧＦ添加群は、対照群と $P < 0.025$ で有意であった。

表２　種々の age のラット中隔野初代培養系のＣＡＴ活性に及ぼすＮＧＦの効果。
トリプシン分散単層培養系は図１に同じで、ＴＩＰ／ＤＦ培地に変え、ＮＧＦ(100ng/ml)を加えてから３日後のＣＡＴ活性を測定した。
器官培養は、1㎜³角組織を用いる Organotypic Culture と ０.４㎜厚スライス片を用いる Slice Culture の２種を行った。組織を血清を含む培地に沈め、１日後、ＴＩＰ／ＤＦ培地に変えＮＧＦを加えて３日後のＣＡＴ活性を測定した。
ｎ＝３～４，値は means ± S.D.。太字がＮＧＦ添加群を示す。＊は $P < 0.025$。

age	specific CAT activities in dissociated culture	organotypic culture	slice culture
	(pmol/min/mg protein)		
16E	115 ± 8 **321 ± 38***	154 ± 32 **411 ± 104***	
18E	73.7 ± 14.6 **120 ± 16***	213 ± 13 **582 ± 59***	
21E		189 ± 41 **585 ± 302**	87.7 ± 32.6 **321 ± 177**
0P			86.9 ± 60.0 **367 ± 90***
2P		64.5 ± 12.6 **154 ± 68**	
6P		8.3 ± 2.4 **21.8 ± 9.1**	

分散細胞を、前述の血清培地に更に１％のラット血清を添加した培地あるいはＴＩＰ／ＤＦ培地を用いて培養した。

ＣＡＴ活性はFonnum法を改良し、１.５ml容チューブを用いる簡易法を用いた[7]。蛋白量はBovine Immunoglobulinを標準とするLowry法を用いた。

【結果と考察】

図１はトリプシンで分散させ培養下においた１６日胚ラット中隔野ニューロンのＣＡＴ活性へのＮＧＦによる増強作用を日を追って見たものである。ＮＧＦを含まないＴＩＰ／ＤＦ培地のみでの培養を　０、３、６日間した後、ＮＧＦを加えて、３日以上培養して

ＣＡＴ活性を測定した。図１から明らかなように、ＣＡＴ活性は、日を追って加えたＮＧＦに総て応答した。しかし、培養下にしばらく置いたニューロンのＮＧＦ応答性は、低下している傾向を示した。

in vitroでの培養期間を変動させる代りに、発生段階の異なるラット胚さらには新生ラットからの中隔野コリナージックニューロンを培養してＮＧＦの作用を調べた。しかし、トリプシン分散単層培養系は１８日胚が限界であった（表１）。そこで、器官培養により、さらに age を上げて、ＮＧＦ応答性を調べた。表１に明らかなように、ＮＧＦは２１日胚からの中隔野にも高い応答性を示しているが、新生ラットでは、ＣＡＴ活性そのものも低下し、応答性も若干低いように見える。

更に age を上げても培養可能な方法として、パパインによる分散細胞を、アストロサイト上に培養する方法を試みた。表２は、１０日齢ラット中隔野コリナージックニューロンの培養の結果を示している。十分に強いＣＡＴ活性が発現しており、またＮＧＦ応答性も見られた。しかし、ＮＧＦ応答性は、胚の時期に比べ、低下している傾向が見られた。

表３　１０日齢ラット中隔野コリナージックニューロンのパパイン分散単層培養系のＣＡＴ活性に及ぼすＮＧＦの効果。

culture condition	specific CAT activities (pmol/min/mg protein)
sera-containing culture in PNCS/HS/RS/DF medium	30.3 ± 2.7
	66.6 ± 7.2
serum-free culture in TIP/DF medium	56.9 ± 6.5
	114.1 ± 14.8

パパイン分散後、ラット血清を含む血清培地で細胞をまき、翌日、ＮＧＦ(100ng/ml)を加えて、５日間培養した場合と、ＴＩＰ／ＤＦ培地に変え、ＮＧＦを加え５日間培養した場合を示す。太字がＮＧＦ添加群を示す。ｎ＝４，値は means ± S.D.。ＮＧＦ添加群は $P < 0.025$ で、全て有意であった。なお、これら４群については、ＣＡＴ活性測定時に 50 μM 4-(1-naphthylvinyl)-pyridine 添加によって、それぞれ、90.3, 90.6, 86.5, 77.5％阻害され、活性測定がＣＡＴに特異的であることを確認している。

feeder layer として用いたアストロサイトは加藤らの方法[11]に準じて調製した。１８日胚ラット皮質をトリプシンで分散させた後、１５％準胎児牛血清／５％馬血清／ＤＭＥ培地で培養した。得られたアストロサイトは牛クロマフィン細胞で用いた凍結二次培養法[12]を、適用して、保存使用している。

以上の結果は、ＮＧＦの中隔野コリナージックニューロンへのＮＧＦの応答性が age によって、変動している可能性を示していると共に、成熟さらには老化ラットからの培養中隔野コリナージックニューロンへのＮＧＦの作用を調べる手掛りを与えるものと思われる。

【謝辞】
新生ラット脳からのパパイン分散単層培養法について種々御教授下さいましたProf.Yasuko Nakajima (Purdue University) に深く感謝いたします。本研究の遂行にあたり御助力頂きました本研究所の二本松伊都子氏、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，29巻,1937-1954,1984
２．H.THOENEN & Y.-A.BARDE, Pysiol.Rev.,60,1284-1335,1980
３．畠中　寛、細胞工学，4巻，874-880,1985
４．S.KORSCHING,G.AUBURGER,R.HEUMANN,J.SCOTT & H.THOENEN, EMBO J.,4,1389-1393,1985
５．F.HEFTI,J.HARTIKKA,F.ECKENSTEIN,H.GNAHN,R.HEUMANN & M.SCHWAB, Neurosci.,5,55-68,1985
６．畠中　寛、津久井弘子、二本松伊都子、神経化学，25巻，487-489,1985
７．H.HATANAKA & H.TSUKUI, Develop.Brain Res., in press (1986)
８．Y.ARIMATSU & H.HATANAKA, Develop.Brain Res., 26,151-159,1986
９．S.MASUKO,Y.NAKAJIMA,S.NAKAJIMA & K.YAMAGUCHI, J.Neurosci., in press (1986)
１０．Y.NAKAJIMA,S.NAKAJIMA,R.J.LEONARD & K.YAMAGUCHI, Proc.Natl.Acad.Sci.,83,3022-3026,1986
１１．加藤泰治、田中　亮、組織培養，8巻，217-224,1982
１２．高橋正身、畠中　寛、熊倉鴻之助、溝部文夫、神経化学，23巻,324-326,1983

137. ヒト神経芽細胞における NGF による c-fos 遺伝子活性化の機序

粕谷淳子・大椙弘順・桃井　隆・桃井真里子*
（国立神経センター，自治医大・小児科*）

〔要　約〕

ヒト神経芽細胞(Goto)を用いて、神経成長因子(NGF)によるc-fos 遺伝子活性化の機序について検討を行なった。NGF (1-100 ng/ml) で、Goto細胞を処理後、30分で、c-fos 遺伝子の発現が促進された。c-fos 遺伝子の発現は、EGF (10ng/ml)　及び、TPA(10ng/ml)でも観察された。また、NGF 処理により、15-30 分でリン脂質　フォスファチジルイノシトール(PI)合成を亢進した。H-7 の添加により、NGF によるc-fos 遺伝子の活性化は抑制された。以上のことより、Goto細胞のおけるNGF のc-fos 遺伝子活性化は、キナーゼ(特にC-キナーゼ) の制御下にあり、NGF はPI代謝回転を介して、C-キナーゼを活性化し、c-fos 遺伝子の発現を抑制しているものと思われる。

Key word : NGF, PI-turnover and c-fos gene

【緒論】

NGF はラット褐色腫細胞(PC12)及びヒト神経芽細胞(Goto)において、分化誘導能を有しており、神経突起の伸長及び各種神経細胞のマーカーの誘導を促すことが知られている(12) 。一方、c-fos 遺伝子はTPA によるHL-60 細胞の分化に際し、非常に短い時間で、発現されるなど、分化過程におけるc-fos 遺伝子産物の役割りが注目されている(3) 。最近、NGF が PC12 細胞のc-fos 遺伝子を活性化するとの報告があり(4)，本研究では、NGF 感受性ヒト神経芽細胞 Goto を用いて、NGF によるc-fos 遺伝子発現の機序について解析を行なった。

【方法】

リン脂質の解析

PC12　及び、Goto細胞を10% FCS を含む DMEM 培地で培養を行なった。リン欠損 DMEM 培地下で1 時間培養したのち、5 μCi ^{32}P の添加と同時に　NGF (7.5S) 1-100ng/ml 加え、15-120分間培養した。10% TCA を加え反応を停止したのち、細胞をPBS にて 3回洗い、クロロホルム：メタノール(2:1,v/v) にて脂質を抽出した。0.5N HCl　を加えFolch 分配後、下層を 3回　0.5N HCl：メタノール(1:1,v/v) にて洗い、N_2で濃縮後、^{32}P－リン脂質について薄層クロマトグラフィーにて分析した。

c-fos 遺伝子の発現

NGF,EGF,及び、TPA 処理したGoto細胞よりグアニジンチオシアネート法にて、RNA を単離し、v-fos 遺伝子をプローブとして、ノーザン法にてc-fos 遺伝子の発現を検討した。

【結果】

PC12細胞、及び、Goto細胞において、NGF 添加によるPI合成の促進が観察された（図１）。他のリン脂質のうち、PE,PC,PSの変化は、ほとんど観察されず、わずかにPAの合成促進がみられるほどであった。

NGF（50 ～300ng/ml）の添加により両細胞におけるＰＩ合成促進がみられ（図２）、300ng/mlのNGF で約 2～2.5 倍のPI合成の促進であった。一方、PCの合成は、NGFの量に依存せず、促進はみられなかった。

PIの合成促進は、NGF(100ng/ml) の添加後約15分で観察され、60-120分後には、約２～3 倍へと亢進した(図３）。

PC12細胞において、NGFによるc-fos 遺伝子の活性化が報告されているが(4)、PC12細胞同様 Goto細胞においてもc-fos 遺伝子の活性化が、NGF,EGF,及びTPA で認められた（図４）。それぞれNGF(100ng/ml) EGF(10ng/ml)TPA(10ng/ml)添加後、約15-30 分でc-fos 遺伝子の活性化がみられたが、60分後には、同遺伝子の発現は、抑制された。更にキナーゼ阻害剤であるH-7 により、c-fos 遺伝子の発現は、抑制された。

【考察】

(1) NGFはc-fos 遺伝子の活性化に先だって、PI代謝回転を促進する。

(2) TPAもまたc-fos 遺伝子を活性化する。

(3) H-7はc-fos 遺伝子の活性化を抑制する。

以上の3 点より、NGF は、PI代謝回転を促進し、ジアシルグリセロールによるC-キナーゼの活性化を介して、c-fos 遺伝子を活性化するものと考えられる。更に、分化誘導因子である、PGD_2、レチノール酸、ガングリオシドと、c-fos 遺伝子活性化についても併せて報告する。

【文献】

(1) Thoenen, H. and Edgar, D. (1985) Science 229, 238-241

(2) Tsuji, S., Arita, M. and Nagai, Y. (1983) J. Biochem 94, 303-306

(3)Mitchell, R.L., Zokas, L., Schreiber, R.D. and Verma, M. (1985) Cell 40, 209-217

(4) Kruijer, W., Schubert, D. and Verma, I.M. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 7330-7334.

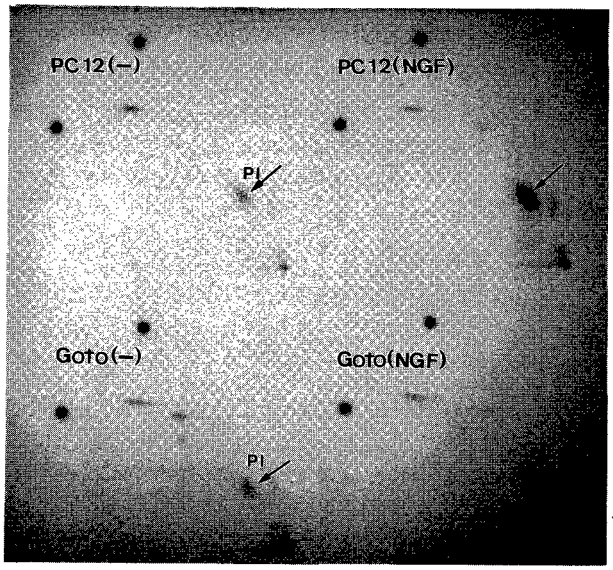


図１．薄層クロマトグラフィーによるリン脂質の２次元展開
右→左　クロロホルム：メタノール：酢酸＝６５：２５：１０

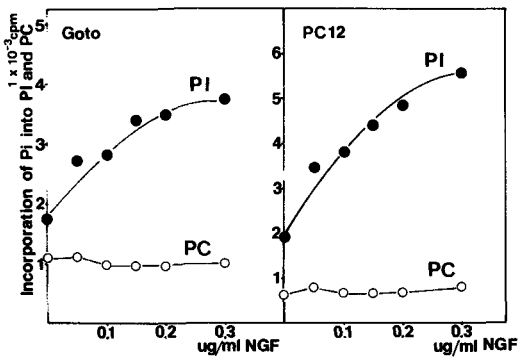


図２．NGF 添加量によるPI,PC 合成の変化

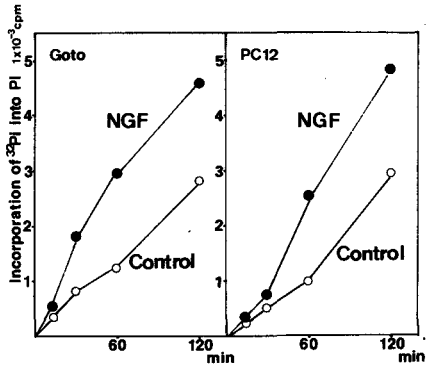


図３．NGF によるPI合成の経時的変化

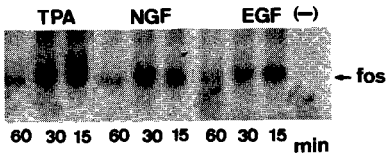


図４．Goto細胞におけるc-fos 遺伝子の発現

138. ラット視床下部及び線条体における L-DOPA の内在性ノルアドレナリン及びドパミン遊離に及ぼす二相性作用

五嶋良郎・久保孝夫・三須良実　(横浜市立大・医・薬理)

〔要　約〕

ラット視床下部及び線条体切片からの内在性ノルアドレナリン(NA)及びドパミン(DA)遊離は、シナプス前β-及びDA受容体により制御されている。今回は、これらの受容体に対するL-DOPAの作用を検討した。視床下部切片において、L-DOPA 0.1～10μMは、ドーパ脱炭酸酵素阻害剤のNSD-1055非存在下において、DAの自発性遊離を用量依存性に増大し、この作用は、NSD-1055 10μMを潅流当初から処置することにより完全に阻害された。NSD-1055存在下において、L-DOPAは視床下部切片からのNA及びDAの誘発性遊離を、0.1μMにおいて促進、1μMにおいて抑制した。0.1μMによる促進は、プロプラノロール(Prop)により、また1μMによる抑制はスルピリド(Sulp)により、立体特異的に拮抗された。一方、線条体切片においても、NSD-1055を潅流開始45分後に前処置した場合、L-DOPAのDA遊離制御作用は、視床下部と類似の二相性作用を示した。0.03μMによる促進は、l-Propにより、また、1μMによる抑制はS-Sulpにより拮抗された。NSD-1055非存在下においても、低濃度のL-DOPAは両切片からのNAならびにDA遊離を、NSD-1055存在下と同程度に促進した。L-DOPAは、視床下部及び線条体において、シナプス前β-及びDA受容体機構を介し、NA及びDA遊離を二相性に制御すると結論される。

Key word：L-DOPA, presynaptic β- and DA-receptors, dopa-decarboxylase inhibitor

ドーパは、カテコラミンの前駆物質として位置づけられ、その薬理作用は、生体組織に広く分布するドーパ脱炭酸酵素により、ドパミン(DA)に変換された後に発現すると考えられてきた。

一方、ノルアドレナリン(NA)ならびにDA作動性神経終末には、促進性及び抑制性のシナプス前β-及びDA受容体が存在し、各々、緊張性に各終末からのアミン遊離を制御している[1-3]。今回、新たにL-DOPAが、これらのシナプス前受容体機構を介して、視床下部及び線条体からのNA及びDA遊離を二相性に制御するとの知見を得たので報告する。

(方法) 雄性SD系ラットを断頭後、GlowinskiとIversen(1966)[4]の方法に従って視床下部及び線条体を取り出し、厚さ約0.7mmの切片を作成した。切片は、恒温チャンバー(10mm x 5mm)に入れ、コカイン20uMを含む、95% O_2 + 5% CO_2 で飽和させたKrebs液(37℃)を用い、流速0.45ml/min, 37℃にて潅流した。電場刺激(5Hz, 2msec, 30mA, 3min)は、潅流開始後30分(S_0:テスト刺激)、60分(S_1)、90分(S_2)に行なった。S_1及びS_2時の誘発性遊離量をS_1及びS_2、各刺激前3分間の遊離量を、自発性遊離量とし、Sp_1、Sp_2と表現した。L-DOPAはS_2前15分より潅流終了時まで適用し、その効果は、S_2/S_1及びSp_2/Sp_1遊離比として評価した。NSD-1055前処置は、潅流開始時(視床下部)またはS_1前15分(線条体)より、潅流終了時まで適用した。また、プロプラノロールは潅流開始より、スルピリドは、S_2前15分より適用した。上清中のNA及びDAは、アルミナパッチ法にて精製後、HPLC-ECD法により分離定量した[1]。

(結果) 視床下部及び線条体切片において、電場刺激による内在性NA及びDA遊離は、外液Ca^{++}に依存し、TTX感受性であった[1]。

NSD-1055 非存在下において、視床下部切片からのNA及びDAの自発性遊離量は、0.022 ± 0.002 及び0.013 ± 0.001pmol／mg湿重量（n＝14）、誘発性遊離量は、0.038 ± 0.006及び0.035 ± 0.004pmol／mg湿重量（n＝14）であった[5]。L-DOPA 0.1～10uMは、DAの自発性遊離を用量依存性に増大した（L-DOPA 1uM：Sp_2/Sp_1 = 3.91 ± 1.22，対照 0.71 ± 0.04に比し，P < 0.01）。NSD-1055前処置を灌流開始時より行なった場合、L-DOPAによるDAの自発性遊離の増大は完全に阻害された（L-DOPA 1uM：Sp_2/Sp_1 = 0.76 ± 0.03，対照 0.83 ± 0.08）。NSD-1055存在下において、L-DOPAは、視床下部切片からのNA及びDA遊離を、0.1uMにおいて促進、1uMにおいて抑制した（Fig.1）。0.1uMによる促進はプロプラノロールにより、1uMによる抑制はスルピリドにより、いずれも立体特異的に拮抗された（Fig.2）。0.1uMにおけるNA遊離の促進は、NSD非存在下においても認められた。

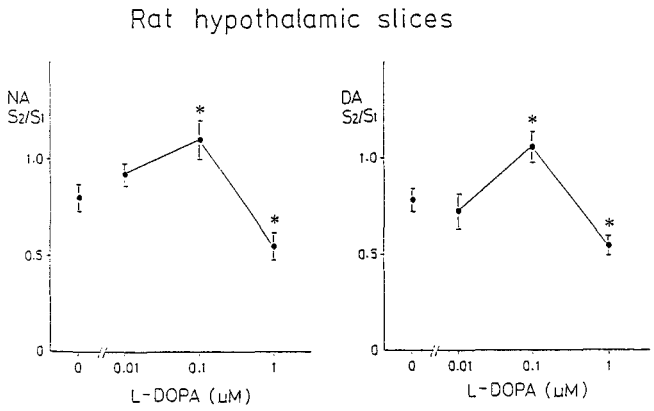


Fig. 1. Effects of L-DOPA on the release of endogenous noradrenaline (NA) and dopamine (DA) from rat hypothalamic slices *in the presence of* NSD-1055 10 μM. Statistical significance: *P < 0.05, compared to control.

一方、線条体切片において、NSD-1055非存在下のDAの自発性及び誘発性遊離は0.104 ± 0.012 及び0.052 ± 0.006 pmol／mg湿重量（n＝17）であった。NSD-1055 10uMをS_1前15分より適用した場合、L-DOPAのDA遊離制御作用は、視床下部切片と類似の二相性パターンを示した（Fig.3）。L-DOPA 0.03uMによる促進は、*l*-プロプラノロールにより拮抗され、同濃度の*d*-体は無作用であった。1uMによる抑制は、S-スルピリド1nMにより拮抗された(Table1)。0.03uMによる促進はNSD-1055非存在下においても認められた。

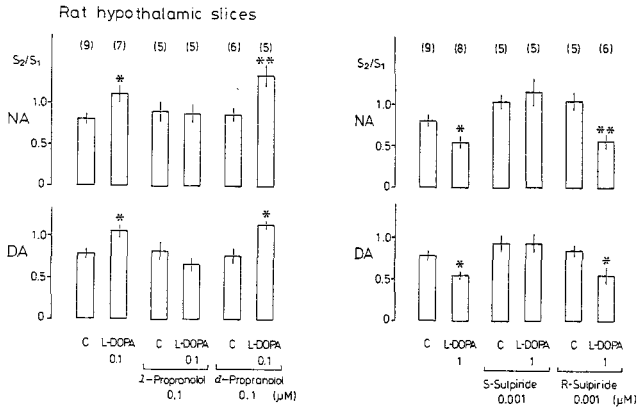


Fig. 2. Stereoselective antagonism by propranolol or sulpiride of L-DOPA (0.1 or 1 μM) induced biphasic actions of the evoked release of NA and DA in rat hypothalamic slices. *P < 0.05, **P < 0.01, *compared to control.*

（考察）L-DOPAは，ドーパ脱炭酸酵素阻害剤(NSD-1055)存在下に、視床下部及び線条体からのNA及びDA遊離を低濃度で促進、高濃度で抑制した。さらに、低濃度による促進は、β-アンタゴニストのプロプラノロールにより、また高濃度による抑制は、

DA-アンタゴニストのスルピリドにより、立体特異的に拮抗された。これらの結果は、L-DOPAの作用が、促進性のシナプス前β-及び抑制性のシナプス前DA-受容体の活性化過程を介することを示している。L-DOPAの二相性制御作用はDOPAから変換したDAによるものではなくて、主として、L-DOPAによると考えられる。なぜなら、これらの作用は、L-DOPA投与時のDAの自発性遊離の著明な増大が、ドーパ脱炭酸酵素阻害剤NSD-1055により、ほぼ完全に阻害された条件下に、発現するからである。さらに、L-DOPAの、NA遊離に及ぼす二相性作用の用量反応相関及び薬理学的性格は、外来投与のDAの同遊離に及ぼす作用とは全く逆の相関にある[3]。

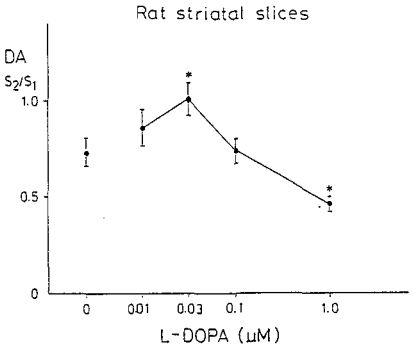


Fig. 3. Effects of L-DOPA on the release of endogenous DA from rat striatal slices in the presence of NSD-1055 10 μM. *P < 0.05, compared to control.

これらの結果は、従来、L-DOPAの作用が、ドーパ脱炭酸酵素の阻害によって遮断され、また、他のDA作動薬と類似であるとの根拠から、L-DOPA自体が、薬理学的に不活性であり、その薬理作用が、組織において変換されたDAによるとされてきた、一般概念とは一致しないものである。低濃度のL-DOPAによる促進は、NSD-1055非存在下においても認められた。

現在さらに、線条体におけるL-DOPA 1 uMの抑制作用に対するスルピリドの立体特異的拮抗、及び線条体膜分画における^{3}H-dihydroxy-alprenolol及び^{3}H-spiperone結合に及ぼすL-DOPAの作用を検討中である。

Table 1. Antagonism by propranolol or sulpiride of L-DOPA (0.03 or 1 μM) induced biphasic actions of the evoked release of DA in rat striatal slices. *P < 0.05, compared to control.

Pretreatment (μM)		L-DOPA (μM)	n	S_2/S_1 ratio	Sp_2/Sp_1 ratio
-		control	16	0.73 ± 0.07	0.79 ± 0.04
-		0.03	8	1.01 ± 0.09*	0.69 ± 0.02
l-Propranolol	0.03	control	6	0.67 ± 0.11	0.71 ± 0.03
l-Propranolol	0.03	0.03	6	0.68 ± 0.18	0.80 ± 0.06
d-Propranolol	0.03	control	9	0.66 ± 0.10	0.72 ± 0.05
d-Propranolol	0.03	0.03	8	1.05 ± 0.13*	0.70 ± 0.04
-		1	9	0.47 ± 0.04*	0.76 ± 0.03
s-Sulpiride	0.001	control	6	0.86 ± 0.05	0.80 ± 0.05
s-Sulpiride	0.001	1	5	0.76 ± 0.10	0.78 ± 0.06

（文　献）

1. Ueda, H., Goshima, Y. and Misu, Y. (1983) Life Sci. 33, 371-376
2. Ueda, H., Goshima, Y. and Misu, Y. (1983) Neurosci. Lett. 40, 157-162
3. Misu, Y., Goshima, Y., Ueda, H. and Kubo, T. (1985) J. Pharmacol. Exp. Ther. 235, 771-777
4. Glowinski, J. and Iversen, L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669
5. Goshima, Y., Kubo, T. and Misu, Y. (1986) Brit. J. Pharmacol. in press

139. 線条体からのカテコールアミン放出に及ぼす L-threo-DOPS の影響
—intracerebral dialysis による検討—

下山政憲・鬼頭昭三・井ノ川雅恵・松林弘明
(広島大・医・第三内科)

〔要　約〕 L-Threo-3,4-dihydroxyphenylserine(DOPS)は合成アミノ酸であり，末梢組織で norepinephrine (NE) に変換されるところから，NEの前駆物質として臨床的応用が試みられている。しかし末梢から投与された L-threo-DOPS が脳内に移行し，NE の前駆体となりうるか否かに関しては多様な議論があり一定の見解に達していない。そこで私共は intracerebral dialysisの方法を用いて，free moving rat の腹腔内に L-threo DOPS(100,200,400 mg／kg)を投与し脳内への移行性および線条体からの catecholamine の放出に及ぼす影響について in vivo の levelで検討した。L-threo-DOPS を投与すると，灌流液中に L-threo-DOPS が dose-dependently に出現し，投与 260分後にその量は最高値に達した。また，L-threo-DOPS投与80分後に灌流液中のNE値は一過性に増加し(20-60%)，その後すみやかに投与前値あるいはそれ以下となった。しかし投与 240分後から再度 NE 値の上昇が観察された。灌流液中の dopamine 量も L-threo-DOPS 投与 100分後に一過性に増加した(25-60%)。次にNEの特異的な uptake inhibitor である N-2-chloroethyl-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP 4, 50mg/kg,i.p.) を投与して誘発される，ラット線条体 NE level の低下を L-threo-DOPS (100mg/kg,i.p.) は抑制した。以上の所見から腹腔内投与された L-threo-DOPS は脳内に移行し，線条体からの catecholamine の放出を刺激するとともに，その一部は NE に変換することが示唆された。

Key word： Intracerebral dialysis, L-threo-DOPS , Catecholamines.

〔目的〕 L-threo-DOPS は生体体内で L-aromatic amino acid decarboxylase によって NE に変換されるところから，NEの前駆物質として臨床的応用が期待されている。近年，家族性アミロイドーシスの際にみられる起立性低血圧[5]やパーキンソン病の feezing phenomenon[4]に対し，L-threo-DOPS の投与が試みられ，その有用性が報告されている。NEの前駆物質としての L-threo-DOPSの生化学的，薬理学的作用については末梢組織では明確にされているが，中枢神経系ではさまざまな見解があり，論議のわかれている所である。とりわけ，Bartholini[1]らは末梢から投与された L-threo-DOPS の脳内への移行性に対して，否定的な見解を明らかにしている。そこで私共は，intracerebral dialysis[3]の方法を用いてin vivo の levelで腹腔内投与された L-threo-DOPS の脳内移行性および線条体からの catecholamine の放出に及ぼす影響について検討したので報告する。

〔対象と方法〕 動物は Wistar 系雄性ラット(180-200ｇ)を使用した。ラットは pentobarbital 麻酔下で stereotaxic apparatusに固定したのち，左右線条体を貫通する位置に水平にアクリルコポリマー製チューブ(Vita Fiber. Amicon. 内径 2㎜)を挿入した。手術後５日目にチューブの一端に motor-driven syringe を接続し，チューブ内にリンゲル液を持続的に灌流させた(2.5μl/min)。このチューブは半透膜の性質をもち，本実験では分子量50,000以下の物質はこの膜を自由に透過しうるものを用いた。チューブが線条体以外を通過する部分は，半透膜機能を除くためあらかじめエポキシ樹脂で被覆した。これによって線条体から放出された物質は，濃度勾配にしたがってチューブ内のリンゲル液中に浸透し，チューブの反対側から採取された。採取した灌流液中の L-threo-DOPS 及び catecholamineは electrochemical detection を組み込んだ HPLC システムで測定した。試料中の L-threo-DOPS と NE を分離して測定

するためSuzukiらの方法[5]にしたがって，灌流液をあらかじめ，処理した。具体的には試料に内部標準としてα-methyldopa を加え，さらに 0.2 M NH_2PO_4 buffer(pH 3.1,0.1 m M EDTA-Na_2)を加えたのち，ホウ酸ゲルカラムに applyした。L-threo-DOPSとα-methyldopa は10% ソルビトール液で溶出し，aliquot は直接 HPLC 用カラムに注入した。NEおよび dopamine(D A)はホウ酸ゲルカラムに1.3M 酢酸メタノールを加えて溶出し，HPLC用カラムに注入した。HPLC の条件としては，L-threo-DOPS，NA および DA の分離，測定は ODS カラムを用いた逆相クロトグラフィーで行い移動相として 0.1 M KH_2PO_4buffer (pH 3 .1,0.1 mM EDTA- Na_2) を用いた。L-threo-DOPSは 5% メチルセルロースに懸濁して，腹腔内投与した。ラットの一部はNE uptake inhibitorであるDSP4 (50mg/kg) を腹腔内投与した。灌流実験中ラットは free movingの状態に保った。

〔結果〕図1,図2 に L-threo-DOPS投与前後のクロマトグラムの実際を示した。投与前には，HPLC上 L-threo-DOPSに相当する peak は存在しなかったが（図1），L-threo-DOPS(400mg/kg,i.p.) 投与後では，L-threo-DOPSに相当する peak が線条体灌流液中に確認された（図2)。線条体において，灌流開始から120 分後までの間の DA と NA の放出量の経時的変化をみると灌流開始から60分後にDA および NA の放出量はほぼ平衡に達した。したがって L-threo-DOSP 投与実験は，灌流開始60分後からはじめた。線条体からの放出量が平衡に達した状態での灌流液中の catecholamine量，即ち basal release は DA が0.87±0.11pmol，NA は0.37±0.04pmol/ 30μl であった。L-threo-DOSP(100, 200,400mg/kg) を腹腔内投与した際の，線条体灌流液中の L-threo-DOPS 量の経時的変化を図3 に示した。投与量が増加するにしたがって，灌流液中の L-threo-DOPS 量も増加し，投与280 分後に maximumに達した(56-80pmol/30μl)。L-threo-DOPS(100-400mg/kg,i.p.) 投与後の，灌流液中の NE 放出量を観察すると，二相性の放出増加がみられた。即ち初期の増加は L-threo-DOPS 投与80分後に出現し(20-60%)，直ちに basal level にもどるか，ないしは逆に減少する傾向がみられた(図4)。しかし投与240 分後から，再度 NE の放出増加がおこり，投与5時間後においても増 加の傾向がみられた(15-42%)。L-threo-DOPS(100-400mg/kg,i.p.)投与後の灌流液中のDAの変化をみると（図5)，投与100 分

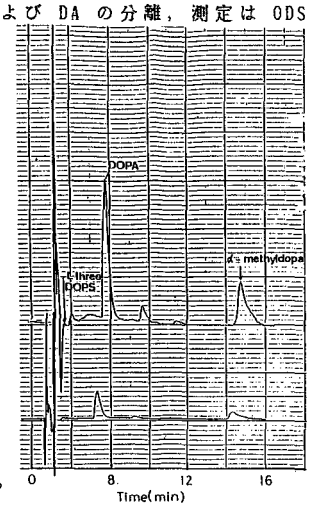


Fig. 1 Chromatogram of 30 μl of dialysate taken under basal conditions.

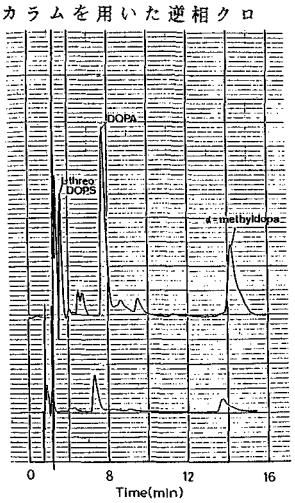


Fig. 2 Chromatogram of 30 μl of dialysate taken under L-threo-DOPS administration (400 mg/kg i.p.).

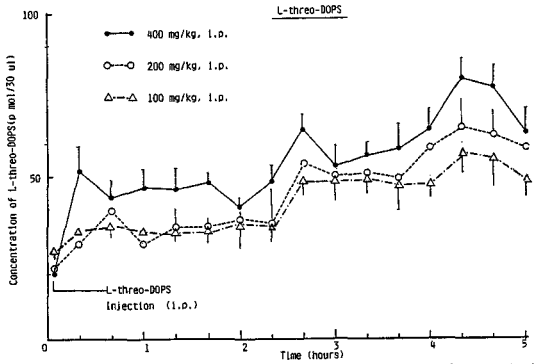


Fig. 3 Effects of various doses of L-threo-DOPS on the levels of L-threo-DOPS in striatal perfusates. Values are means ± S.E.M. of 4 experiments.

後に一過性にDAの放出増加が出現した(30-60%)．最後に DSP 4(50mg/kg,i.p) をラットに投与して，1週間後に線条体灌流液中の NA level を測定すると DSP 4 非処置の control ratのそれと比較して NE 量は約23% 低下していた。この DSP 4処理ラットに，L-threo-DOPS(100mg/kg,i.p) を投与すると，低下していた NE level は投与120分後にcontrol level に回復し，投与280分後には control levelをこえて上昇した。

〔考察〕末梢から投与された L-threo-DOPS の中枢神経系における作用については，いくつかの異なった見解が存在する。Hirai ら[2]は，L- または DL-threo-DOPSを末梢から投与すると脳内 NE 含有量は増加することを報告している。一方，Bartholini ら[1]は L-threo-DOPS を末梢から投与しても脳内 NE量はほとんど増加しないと報告している。同時に彼らは L-threo-DOPS

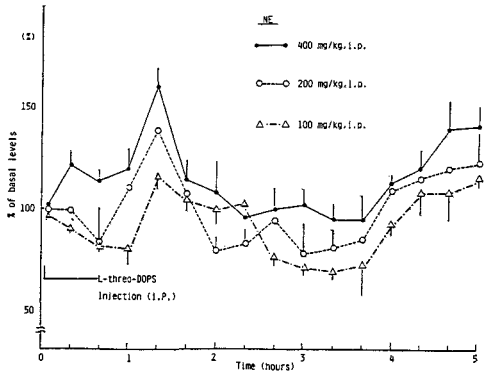


Fig 4 Effects of various doses of L-threo-DOPS on the release of norepineonrine from the striatum. Values are means ± S.E.M. of 4 experiments.

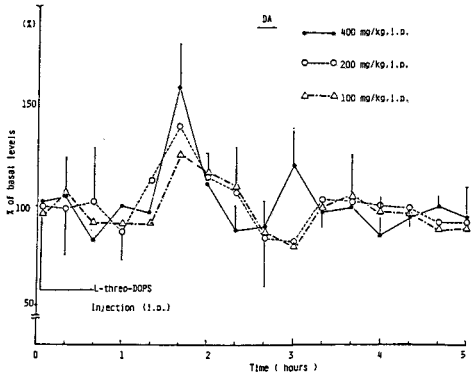


Fig. 5 Effects of various doses of L-threo-DOPS on the release of dopamine from the striatum. Values are means ± S.E.M. of 4 experiments.

を脳室内に投与すると脳内NE量は著明に増加することを観察し，それ故，末梢から投与されたL-threo-DOPSは blood-brain-barrierを通過しえないと主張した。しかし今回の私共のin vivoの実験では，末梢から投与されたL-threo-DOPSは線条体灌流液中に出現することが明らかになった。この点で,L-threo-DOPS は 100mg/kg 以上投与すると,blood-brain-barrierを通過しうるものと考えた。またL- threo-DOPS腹腔内投与後，線条体からの NE および DA の放出がともに一過性に増加したが,これは脳内に移行した L-threo-DOPS が線条体catecholamine neuronの終末に作用し，ここからの catecholamineの放出を刺激したためと考えた。さらに L-threo-DOPS 投与 240分後から再度NEの上昇がみられたが，この上昇は脳内に移行した L-threo-DOPSの一部が NE に変換したためと推測した。DSP 4 前処理により減少した線条体灌流液中の NE level が L-threo-DOPS 腹腔内投与により補完されたことも，脳内に移行した L-threo-DOPS が NE に変換しうることを示唆するものであった。

〔文献〕1) Bartholini, J., Constantinidis,M, Puig,M ., Tissot, R., and Pletscher,R. (1975) J Pharmacol Exp Ther. 193, 523-532.

2) Hirai, M,. Matsuoka, Y., Nakajima, T., and sano, I. (1975) Med. J. Osaka Univ. 26,51-59.

3) Kito,S.,Shimoyama,M.,and Arakawa,R.(1986) Japan.J. Pharmacol.40,57-67.

4) Narabayashi, H., Kondo, T., Hayashi, A., Suzuki, T., and Nagatu, T.(1981) Proc. Japan Acad. 57, 351-354.

5) Suzuki,T., Sakoda, S., Ueji, M., Kishimoto, S., Hayashi, A., Kondo, T., and Narabayahi, H. (1984). Neurology, 34, 1466-1450.

140. ノルエピネフリン代謝回転に対する視床下部刺激の影響

斉藤昌之・箕越靖彦・嶋津　孝　（愛媛大・医・生化第一）

〔要　約〕

交感神経系と視床下部との機能連関を明らかにする目的で，ラットの視床下部腹内側核（VMH）あるいは外側野（LH）を電気刺激して，膵臓，肝臓，心臓，褐色脂肪組織など多くの末梢臓器でのnorepinephrine（NE）の代謝回転の変化を，カテコールアミン生合成阻害剤（α−methyl−p−tyrosine）投与後のNE含量の減少を測定することにより検討した。VMHを電気刺激するといずれの臓器においてもNEの代謝回転速度は2～3倍に増加したが，LHの刺激はほとんど影響を及ぼさなかった。VMHの刺激効果は交感神経節遮断剤の投与によりほぼ完全に消失し，また褐色脂肪組織については交感神経を外科的に切除することによっても刺激効果が消えた。これらの結果は，VMHが交感神経の中枢部位であることを示しており，他の種々の生理生化学的機能に対するVMHの作用様式から示唆されてきたことを直接証明するものである。副腎のNEについては視床下部刺激は特に影響を及ぼさなかったが，epinephrineについてはVMHのみならずLHの刺激もその代謝回転を促進し，他臓器の交感神経活動とは異なる応答が認められた。

Key word： norepinephrine turnover , hypothalamic stimulation

視床下部腹内側核（ventromedial hypothalamus, VMH）は，古くから満腹中枢として知られているが，一方，これを電気的に刺激すると，動物は怒りに似た興奮状態となり，狂暴性をおび闘争や逃亡などの行動が出現すると共に，瞳孔散大，眼球突出，呼吸促迫，立毛，血圧上昇，心拍数増大，血糖上昇，熱産生増大など，交感神経の緊張状態に対応した一連の反応が認められるので，VMHは交感神経の中枢部位と考えることもできる（1）。しかし，VMHと交感神経の機能連関を直接証明した研究成績は意外に少なく，VMHを刺激ないしは破壊して，内臓神経膵臓枝や副腎神経の活動変化を電気生理学的に検索した結果が知られているに過ぎない（4）。

そこで本研究では，末梢諸臓器での交感神経活動とVMHとの関係を明らかにするために，norepinephrine（NE）の代謝回転を交感神経活動の指標として，VMH電気刺激の影響を調べ，視床下部外側野（lateral hypothalamus , LH）刺激の場合と比較検討した。

〔実験方法〕

SD系雌性ラット（230～300g）を実験動物として用いた。ネンブタール麻酔下に，片側のVMHあるいはLHに双極刺激電極を脳定位固定装置を用いて挿入し，電極をプラグに接続して歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。なお，電極先端の挿入部位は，実験終了後脳切片標本を組織学的に検索して確認した。

電極埋込み後約2週間経過してから，NEの代謝回転を以下のように測定した。ラットをウレタン（0.5g／kg）とクロラロース（50mg／kg）の腹腔内投与により麻酔させ，更

に硫酸アトロピン（0.5㎎／㎏）を投与してから，30～32℃に保った恒温箱に移した。約2時間後にカテコールアミン生合成阻害剤であるα-methyl-DL-p-tyrosine(methyl ester, 0.3ｇ／㎏，α-MT）を腹腔内に投与した。α-MT投与と同時にVMHないしはLHの電気刺激（6V，50Hz，持続時間0.1～0.3msec)を，30秒毎に10秒間づつの割合で開始した。これを4時間続けた後，ラットを屠殺脱血させ，直ちに肝臓，膵臓，脾臓，心臓，副腎，顎下腺および肩甲間褐色脂肪組織を採取し，液体窒素中で保存した。対照として電気刺激を加えないラットもα-MT投与後4時間で屠殺した。またα-MT投与前にもラットを屠殺しこれをゼロ時間値とした。

各臓器のNE含量は，過塩素酸で抽出した後アルミナで前処理を行い,HPLC-THIシステム（島津製作所）により定量した。α-MT投与前（ゼロ時間）と投与後4時間のNE含量の減少の割合から，NE代謝回転速度を算出した。

〔結果および考察〕

末梢交感神経の活動を電気生理学的手法により測定するのは，同一動物での経時的観察が可能であること等の利点があるものの，測定部位を多数とることが困難であるため，本研究のように視床下部との関連で巾広く検索するには必ずしも適当とは言えない。そこで今回は，各臓器での交感神経の活動をそこでのNEの代謝回転から推定することとした。NEの代謝回転は，α-MT投与によりカテコールアミン生合成を阻止した後NE含量の減少速度から測定することができる。事実，α-MT投与後4時間ではいずれの臓器でもNE含量が低下していることが確認された（図1）。例えば膵臓では，ゼロ時間値が435±24㎎／ｇであるのに対して221±14㎎／ｇと半減しており，代謝回転速度は68㎎／ｇ／hと求められた。VMHに電気刺激を加えると，NEは著しく減少し代謝回転速度は128㎎／ｇ／hと倍増することが明らかとなった。しかし，LHの刺激では対照群と有意の差異は認められなかった。これらの結果は，内臓神経膵臓枝の遠心性活動を電気生理学的に測定した成績（4）と良く一致しており，膵交感神経が視床下部のレベルでVMHと連絡していることを示唆している。事実Luiten らは最近HRP法やオートラジオグラフ法などを組合せて両者の線維連絡を明らかにしている（2）。

他の臓器についても同様で，LHの刺激では影響されないが，VMHの刺激により程度の差はあれNE含量の減少が加速され，NEの代謝回転が亢進することが判明した。NEの代謝回転に対するこのようなVMHの刺激効果が，確かに交感神経の遠心性活動の増大によることは，交感神経節遮断剤hexamethonium を同時投与するとVMHの刺激効果が完全に消失するこ

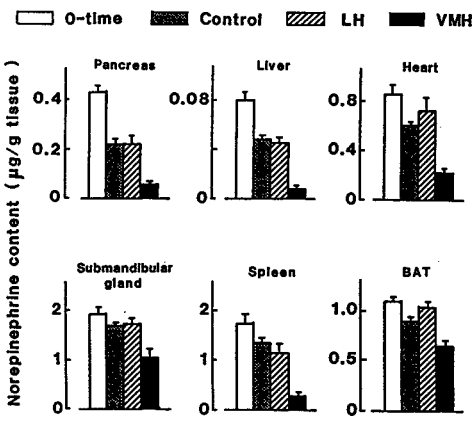


図1　各臓器NE代謝回転に対するVMHならびにLH電気刺激の効果

とからも明らかである（図2）。

褐色脂肪組織（BAT）は寒冷暴落時や過食時の熱産生の主要部位であるが，ここでの熱産生は交感神経の直接支配を受けていることが知られている。図1に示す如く，VMHの刺激はBATのNE代謝回転も有意に増大させており，しかもhexamethoniumの投与やBATに分枝する交感神経の外科的切除によりVMHの刺激効果は消失した。この結果は，VMHを刺激するとBATの脂肪代謝の活性化と熱産生の亢進がおこり，それが交感神経の外科的切除により減弱するという事実（3）とも良く符合しており，BATが交感神経を介してVMHと連関していることを証明するものである。

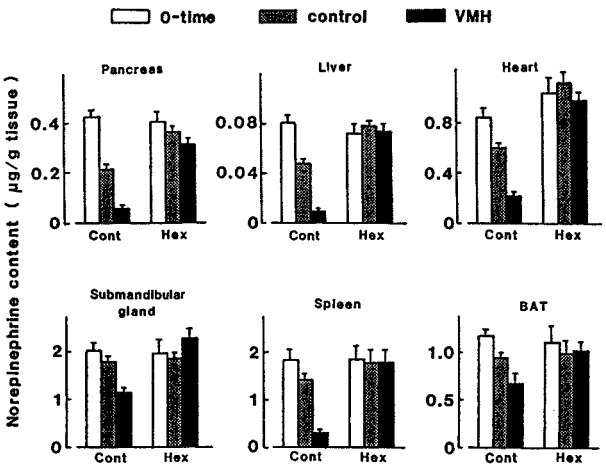


図2　NE代謝回転に対するhexamethonium（Hex）の効果．α−MT投与後0，1.5，3時間でHex（20㎎／㎏，ip）を投与した。

副腎のNE含量はα−MT投与及び視床下部刺激によっても有意の変化を示さないが，epinephrine含量はVMHのみならずLH刺激によっても減少した（図3）。このように，副腎については他の臓器と異なる応答がみられたが，副腎の活動と他の交感神経の活動は種々の生理的条件負荷でしばしば解離することがあるので（5），副腎はVMHの他にもLHなど他の部位によっても支配されていると思われる。

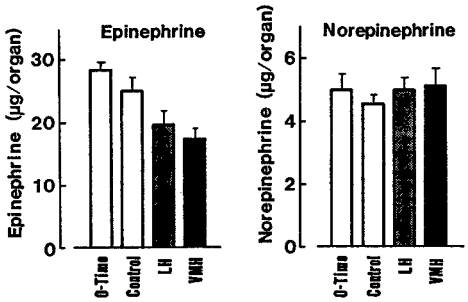


図3　副腎カテコールアミンの代謝回転と視床下部電気刺激の効果

〔文献〕

1. Ban, T.（1975）Pharmac. Biochem. Behav. 3, Suppl. 1, 3−13
2. Luiten, P.G.M., Ter Horst, G.J.（1986）Emotions(ed. Oomura, Y.) Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, pp. 369−380
3. Minokoshi, Y., Saito, M., Shimazu, Y.（1986）Am. J. Physiol.（in press）
4. Niijima, A.（1985）J. Physiol. Soc. Japan, 47, 735−745
5. Young, J. B., Rosa, R.M., Landsberg, L.（1984）Am. J. Physiol. 247, E35−E40

141. ハルミンの行動薬理学的研究（第6報）：ドパミンおよびセロトニン神経系による jumping 行動修飾

諸井佳代子・久我哲郎　（千葉大・生物活性研）

〔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ドパミン（ＤＡ）およびセロトニン（５ＨＴ）作動性神経系の役割について、脳内アミンとその代謝産物の変動、および脳内ＨＡ量との関連から検討を加えた。ＨＡおよびＡＰＯ投与１０分後の脳内ドパミン量は、線条体、前頭葉皮質、視床下部にて高くなる傾向を、代謝産物ＤＯＰＡＣ，ＨＶＡは線条体、前頭葉皮質、視床下部にて著明な低下をしめした。　セロトニン量は、線条体、視床下部、中脳で高くなる傾向を、代謝産物５ＨＩＡＡは、前頭葉皮質、視床下部、中脳でわずか低下した。脳ＨＡ量はＨＡ単独投与群に比べて高かった。メタンフェタミンおよびＬ－ＤＯＰＡ投与ラットでもＡＰＯと同様なjumping行動が見られ、この時の脳内ＤＡ量は上昇していた。ＤＡ拮抗薬ハロペリドールや６－ハイドロキシドパミン処置ラットでは、jumping行動は完全に抑制されたが、脳内ＨＡ量には変化はなかった。５－ヒドロキシトリプトファン（５－ＨＴＰ）は著明なJumping行動の抑制をしめし、これは５－ＨＴＰ投与後の脳内５ＨＴの著明な上昇と、脳内ＨＡ量の著明な低下によることが示された。拮抗薬メチセルチド、ミアンセリンは、jumpingを増強しこの時ＨＡ量の上昇傾向が観察された。以上の結果より、(1)ＤＡ作動性神経系の活性化によるjumping行動の発現は、ＤＡ量の増加と密接な関連をもつこと、(2)５－ＨＴＰによる５ＨＴ作動性神経系の活性化は５ＨＴ量の増加とＨＡ量の著明な減少をひきおこすことによりjumpingを抑制することが示唆された。

Key word：Harmine, jumping behavior, dopaminergic nervous 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ともに突然 jumping が起こりケージ内を暴走する。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）作動性機構が促進している時のみＨＡによって誘発されること、さらに、セロトニン前駆体５－ＨＴＰ投与により本行動が抑制されることから、５ＨＴ作動性神経系の関与も示唆した（１）。また本行動発現と脳内ＨＡ量の間には密接な正の相関関係のあること、すなわち本行動は脳内ＨＡ量に依存していることをしめした（２）。今回は本行動発現機構を解明する研究の一環として，ＤＡおよび５ＨＴ作動性神経系を修飾する薬物投与後の脳内モノアミンおよびその代謝産物の変化，及び脳内ＨＡ量の変化を調べて、ＤＡおよび５ＨＴ作動制神経系の作用機作を検討した。

（実験方法）

（動物及び処置）体重１８０－２２０ｇのＷｉｓｔａｒ系雄性ラットを用い，ＨＡおよびＡＰＯを生理食塩水に溶解し皮下投与下した。メチセルジド、ミアンセリン及びハロペリドールは生理食塩水に溶解し，ＨＡとＡＰＯ投与１０分前および３０分前に投与した．５－ＨＴＰは０．２％ＣＭＣサスペンジョンとし３０分前に腹腔内に投与した．６－ハイドロキシドパミン（６－ＨＤＡ）は生理食塩水に溶解し脳室内に１日１回２日間投与し１週間後に使用した。

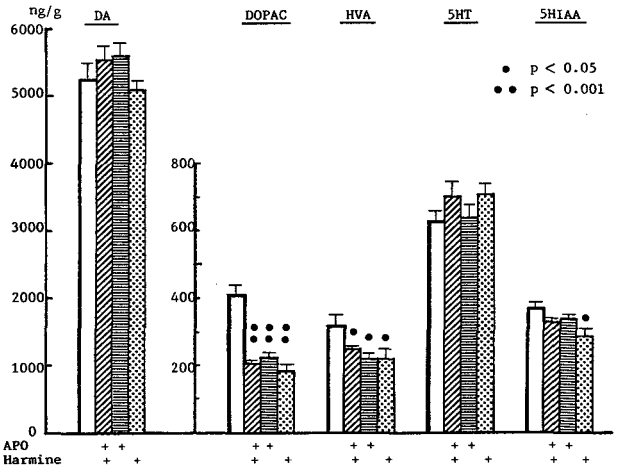
（脳内アミンの定量）ＨＡとＡＰＯ投与後５分、１０分，２０分にラットをマイクロウーブ照射にて致死、脳を７領域に分割した。組織は０．１Ｎ-$HClO_4$－ＥＤＴＡ－$Na_2S_2O_7$液にて１０％ホモジネートとし、１６，０００ｒｐｍ２０分遠心後，その上清（５－２０μｌ）を電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）に応用し，脳内アミンを定量した。電圧７００ｍＶ，移動層：０．１Ｎクエン酸緩衝液（ｐＨ２．５５）、流速１．０ｍｌ／ｍｉｎ。カラム（ｂｉｏｐｈａｓｅ－ＯＤＳ）

（脳内Ｈａの定量）　脳内アミン定量用組織ホモジネートを一定量の小試験管にとり，同量の

0.1 N-$HClO_4$－５０％メタノール液を加える。良く攪拌してＨＡを抽出したのち１６，０００ｒｐｍ２０分遠心し、その上清を蛍光光度計付きＨＰＬＣに応用、ＨＡの定量を行った。カラムｓｃｃ－１１５１Ｎ，移動層：メタノール－０．２％燐酸（６０：４０），流速１．０ｍｌ／ｍｉｎ．励起波長３２０ｎｍ，蛍光波長４２０ｎｍ．

（ＨＡの取り込み実験）ラット脳シナプトゾーム分画を調製、ＤＡのｕｐｔａｋｅ実験に準じて、ＨＡの取り込み実験を行った（３）。各薬物（５ＨＴ，ＤＡ、メタンフェタミン）はシナプトゾームと３７℃、または0℃、１０分インキュベート後ＨＡを添加し、さらに５分間インキュベートした。反応は１６、０００ｒｐｍ１０分遠心することで停止した。得られた沈澱をクレブス緩衝液にてリンス後、ＨＡを０．１ N-$HClO_4$－メタノールにて抽出した。遠心後の上清をＨＰＬＣに応用しＨＡを定量した。

Fig.1. Contents of brain monoamine and the metabolites in corpus striatum of rats 10 min after treatment with harmine (5mg/kg) and apomorphine (2mg/kg).



（結果）

ＨＡ，ＡＰＯ投与後の脳内モノアミン量とＨＡ量：図１にＨＡおよびＡＰＯ投与後の脳内アミン量を示した。線条体では、ＤＡ、５ＨＴのわずかな上昇と、ＤＡ代謝産物であるＤＯＰＡＣ、ＨＶＡの著明な減少が観察された。５ＨＩＡＡの減少は僅かだった。ＤＡの上昇傾向とＤＯＰＡＣ量の低下は、大脳皮質、前頭葉皮質、視床下部でも観察された。この変化はＡＰＯ、ＨＡ単独投与群でも観察された。５ＨＴの上昇傾向は、視床下部と中脳でみられた。アミンの時間的変化を見てみると、線条体、大脳皮質のＤＯＰＡＣ量は５分で低下はじめ１０分では対照に比べ有意に低下していた。５ＨＴの上昇傾向は時間とともに大きくなった。脳内ＨＡは５分ですでに検出され、その値は２０分でも同じであった。１０分後の脳内ＨＡ量は5mg/kgＨＡ投与群（ＡＰＯ併用）で、18.0+1.12nmole/g組織重量で"ＨＡ単独群の 14.8+1.22nmole/g に比し高い値を示した。

ＤＡ作動薬および阻害薬の脳内アミン、脳内ＨＡ量に及ぼす影響：表１に種々薬物処置後ＨＡを投与したラット脳の１０分後のアミンおよびＨＡ量を示した。ＡＰＯの代わりにＬ－ＤＯＰＡ又はメタンフェタミンを前処置したラットにおいてもＨＡ投与後jumping行動が観察された。この時のＤＡ量は著明に増加又は上昇傾向が観察された。ＨＡ量はＡＰＯ投与群と大きな違いはみられなかった。逆にＤＡ神経系の働きを抑える６－ハイドロキシドパミン（6-ＨＤＡ）又はハロペリドールの前処置ではjumping行動は完全に抑制され、この時前者では著明なＤＡ量の減少が見られたが、ＨＡ量に変化は見られなかった。

５ＨＴ作動薬及び拮抗薬の脳内アミンとＨＡ量に及ぼす影響：表２に５ＨＴの前駆物質５ＨＴＰと拮抗薬メチセルシドを前処理した時のjumping行動発現および、脳内アミン、脳内ＨＡ量を示した。５ＨＴＰ前処置にて著明な５ＨＴの増加と、jumping行動の完全な抑制が見られ、ＨＡ量は対照の１５％まで顕著に低下した。逆にメチセルジド投与群では全ラット活発なjumping行動を示した。この時脳内５ＨＴ量には変化はなくＨＡ量の上昇傾向が見られた。この傾向はミヤンセリン処置ラットでも観察された。

ＨＡの取り込み実験：ラット脳大脳皮質のシナプトゾームを用いてＨＡの取り込みを検討したところ、インキュベーション温度が３７℃又は0℃でもその量に変化なくＨＡ量の増加と共に取り込まれるＨＡ量は直線的に増加し、取り込みよりむしろＨＡの非特異的吸着と考えられた。しか

し、この時でも５ＨＴやメタンフェタミンがインキュベーション液に存在すると、ＨＡの結合量が減少した。

Table 1. Effect of several agents which modify dopaminergic function on jumping behavior, brain harmine and brain dopamine contents in corpus striatum.

Pretreatment		occurrence of jumping	dopamine(ng/g)	harmine(nmole/g)
None	APO,HA (5mg/kg)	4/4	6570 ± 410(4)	24.3 ± 1.00(4)
L-DOPA (100 mg/kg,ip)	HA	6/6	12,600 ± 865(6) $p<0.001$	22.1 ± 2.05(6) N.S.
6-HDA (250 ug/rat)	APO,HA	0/5	2698 ± 175(5) $p<0.001$	25.7 ± 3.58(5) N.S.
None	APO,HA(10mg/kg)	5/9	7259 ± 173(8)	17.8 ± 1.93(9)
Methanphetamine (2 mg/kg,ip)	HA	3/4	7583 ± 187(4) N.S.	17.7 ± 2.94(4) N.S.
Haloperidol (0.25 mg/kg, sc)	APO,HA	0/6	6517 ± 250(6) $p<0.05$	14.5 ± 1.24(6) N.S.

L-DOPA and methanphetamine were given to rats 90 min and 20 min before harmine(HA) injection. 6-hydroxydopamine(6-HDA) was injected into lateral ventricle once a day for 2 days and 1 week later rats were used. Brain HA and dopamine contents were determined 10 min after HA injection.

Table 2. Effect of 5-hydroxy-DL-tryptophan and methysergide on jumping behavior and harmine contents in corpus striatum

Pretreatment	Occurrence of jumping	serotonin(ng/g)	harmine(nmole/g)
None	2/5	880 ± 100 (5)	19.1 ± 1.95 (5)
5-HTP (200 mg/kg,ip)	0/5	25,150±1260 (6) $p<0.001$	3.0 ± 0.69 (6) $p<0.001$
Methysergide (10 mg/kg,sc)	5/5	800 ± 125 (5) N.S.	22.0 ± 2.35 (5) N.S.

5-hydroxy-DL-tryptophan(5-HTP) and methysergide were given to rats 30 min before harmine(5 mg/kg) and apomorphine (2 mg/kg) treatment. Rats were killed 10 min later and the brain harmine and serotonin contents were determined.

（考察）

今回の結果はＡＰＯ、メタンフェタミン、Ｌ－ＤＯＰＡなどのＤＡ作動薬によりＤＡ及びその代謝産物に量的変化がみられ、とくにＤＡ量の増加がＨＡ誘発jumpingに関連することが示唆され、ＤＡ作動性神経系の活性化がjumping行動を生ずる条件であることを脳内アミン量の面から裏ずけたものと考えられた。又ＡＰＯやメタンフェタミン投与でＨＡ量の上昇が見られたことはＤＡ神経系の活性化が脳内ＨＡ量の上昇をもたらすこと、並びにこれにより更に活発なjumpingが誘発される可能性のあることを示唆している。５ＨＴ作動性神経系の活性化はjumping行動の抑制に、神経系の抑制はjumping行動の増強に働くこと、更には神経系の働きだけでなく脳内ＨＡ量が重要な働きをしていることが示された。なお、取り込み実験の結果を重ね合わせるとＨＡの吸収や脳への移動に５ＨＴＰ又は５ＨＴが阻害的に働いていることが示唆された。

（文献）

(1)Takashi, K and Kuga, T. (1981) Japan J. Pharmacol. 31. 677-688.
(2)Moroi, K. and Kuga, T. (1986) Japan J. Pharmacol. 40 (supl). 82p
(3)Hyttel, J. (1978) Biochem. Pharmacol. 27. 1063-1068

142. ストレスへの予測性とラット脳内ノルアドレナリン代謝との関連性

津田　彰・佐藤洋美・白尾一正・小口雅申・田中正敏
（久留米大・医・薬理）

〔要　約〕

電撃が間欠的に生じるようなストレス状況下において、電撃が起こる時期を信号によって合図した場合（予測可能性）とそのような合図をしなかった場合（予測不可能性）とで、ラット脳内各部位のnoradrenaline(NA)代謝回転がどのように異なってくるのか、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することで検討した。1組3匹のラットを信号あり電撃群（信号によって合図される電撃を受ける）、信号なし電撃群（信号あり電撃ラットと同じ時期に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、平均2.5分に1回の割合で電撃（1.2mA強度、2秒間持続）を加えるストレスセッションを6時間もしくは19時間負荷した。信号あり、信号なし電撃ラットのNA代謝回転は、広範な脳部位で有意に増加したが、その増加の程度は群によって異なった。6時間のストレス後では、信号あり電撃ラットの視床下部でNA代謝回転の著明な亢進を認めたのに対して、19時間のストレス後では逆に、信号なし電撃ラットの視床下部、扁桃核、青斑核部などでNA代謝回転の亢進が起こった。ストレスへの予測可能性の有無といった心理的現象が脳内NA代謝のような神経化学的側面に反映されることが示唆された。

Key word： Rat brain noradrenaline turnover, Predictability of stress, Fear/anxiety

ストレス状況下での行動学的-心理学的因子と脳内noradrenaline(NA)系神経活動との関連性について検討を加え、ストレスへの対処可能性の有無(6)、ストレス条件づけ効果(7)といった純心理学的現象が脳内NA代謝回転のような神経化学的過程に反映されることを見出だしてきた。また昨年の本学会において、ストレスへの予測可能性(predictability)が一信号の合図によって、電撃ストレッサーが生じる時期を予め予見できる一ラット視床下部と扁桃核のNA代謝回転を亢進させることを報告した(10)。しかしながら、この結果は予測可能な電撃を受けたラットほど胃損傷の発生が軽症であったという前研究(2,9)とは異なるものであった。

そこで今回、これら相反する結果が電撃を負荷したストレスセッションの長さに由来しているかもしれないという可能性を検討するために、ラット脳各部位におけるNA代謝回転に及ぼすストレス予測性の効果を、ストレスの長さを変えることで(6時間と19時間)、神経化学的に調べた。

【　方　法　】

被験体と装置

Wistar系雄性ラット(180-220g)48匹を被験動物として使用した。装置は図1に示すようなラットホルダーと電撃を呈示するためのショッカーなどが主であった。

本研究の一部は、昭和60年度、昭和61年度文部省科学研究費補助奨励研究(A)(課題番号 60710097, 61710096)による援助を受けた。

手続き

トリアディック・デザインに従って、ラットを3群に分けた(8)：信号あり電撃(予測可能)ラット—白色電球の点灯によって、尻尾への電撃(1.2mA、2秒間持続)到来が10秒前より必ず合図される電撃を受ける；信号なし電撃(予測不可能)ラット—信号あり電撃ラットのパートナーとして、信号あり電撃ラットと同じ電撃を同時に受けるが、灯り信号の呈示は電撃の到来とは無関係に起こる；電撃なし対照ラット—信号のみを受け、電撃はまったく受けない。これら1組3匹(計16組)のラットを、平均2.5分に1回の割合で電撃が生じるストレス状況に6時間もしくは19時間暴露した。

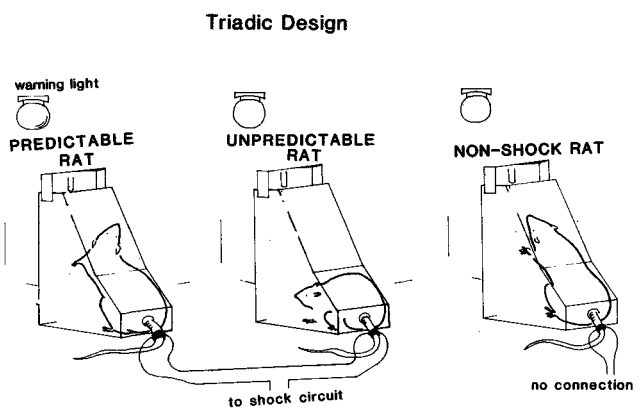


FIGURE 1. The illustration showing a triadic design for the experiment on shock predictability. At left is the predictable (signalled shock) rat which receives a light warning signal before an inescapable shock occurs. At center is the unpredictable (unsignalled shock) rat, whose tail electrodes are wired in series with the predictable rat and thus receives exactly the same inescapable shock but whose light signal occurs with no temporal relationship to the shock. At right is the non-shock control rat.

電撃ストレスセッション終了後、ラットを断頭し、脳をGispenらの方法(1)に準じて視床下部、扁桃核、視床、海馬、中脳、大脳皮質、青斑核部に分割した。これらの脳部位の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(4)。統計学的有意差検定は、2元配置分散分析法とTukey's多重比較法を適用した。

【 結果と考察 】

図2に示すように、6時間と19時間のストレスセッションともに、電撃なしラットと比較した時、被電撃(信号あり、信号なし電撃)ラットのMHPG-SO_4含量は広範な脳部位で著明に増加した。しかしながら、これら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)と電撃セッションの長さによって異なった。

6時間のストレスセッションでは、信号あり電撃ラットのMHPG-SO_4含量は信号なし電撃ラットと比べて、視床下部で有意な亢進、扁桃核、海馬と青斑核部で増加傾向を示した。この結果は前回の報告(10)と一致していた。一方、19時間のストレス負荷後では逆に、信号なし電撃ラットのMHPG-SO_4含量は信号あり電撃ラットと比べて、視床下部、扁桃核、視床、青斑核部、大脳皮質などで有意な増加を示した。この逆転は、信号なし電撃ラットのMHPG-SO_4含量が、6時間セッションの時よりも、視床下部、扁桃核と青斑核部でさらに増加したのに対して、信号あり電撃ラットではこのような増加が起こらなかったためと思われる。

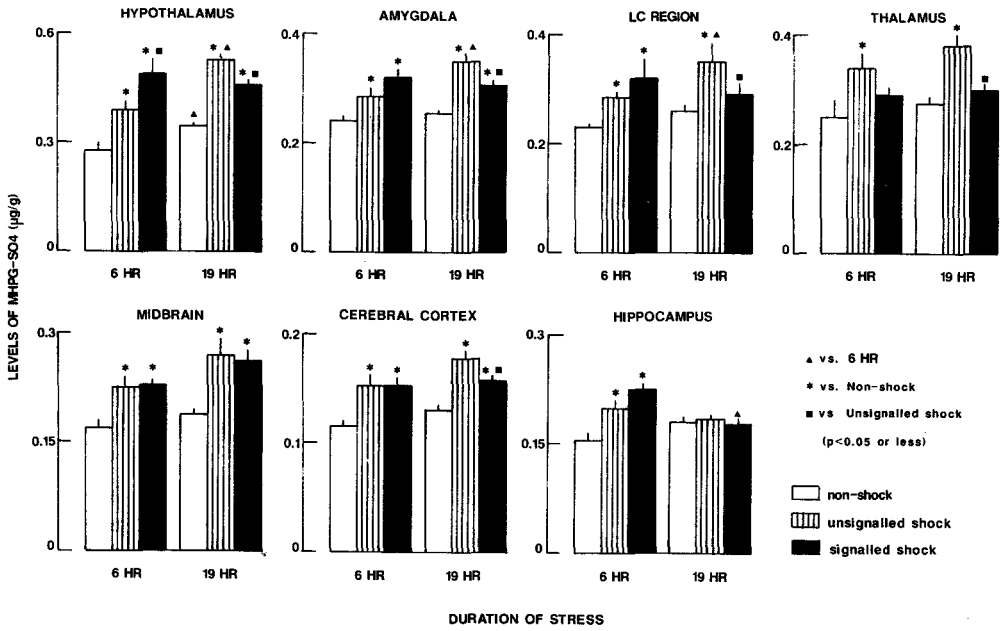


FIGURE 2. Mean (±SE) levels of MHPG-SO_4 in various brain regions of non-shock, unsignalled shock and signalled shock rats after 6-hr and 19-hr stress durations.

ストレスへの予測可能性の効果についてこれまで、予測が可能であった方が胃損傷の発生は少ない(2,9)、あるいはcortisol含量の増加(3)やNA代謝回転の亢進(10)が起こるといった報告が為されていた。今回の実験は、これら矛盾した結果の一部がストレスの長さに起因している可能性を明らかにした。ストレスへの予測可能性を持つことが脳内NA代謝回転の亢進を最終的に減弱させる効果は、信号と電撃との随伴的関係を認知して、電撃の来ない安全な時期と電撃の来る危険な時期との弁別学習が十分に成立した後で生じるように思われる。またNA代謝回転の亢進が視床下部、扁桃核、青斑核部などで顕著に観察されたことにより、NA系神経活動が不安/恐怖などの情動反応の表出に関連しているとする我々の考え(5)がさらに支持された。

【 引用文献 】

1. Gispen WH, Schotoman P & de Kloet ER 1972 Neuroendocrinology 9: 285-296.
2. Guile MN & McCutcheon NB 1984 Behav Neurosci 98: 695-702.
3. Jordan TC, Coe CL, Patterson J et al. 1984 Behav Neurosci 98: 556-560.
4. Kohno Y, Matsuo K, Tanaka M et al. 1979 Analyt Biochem 97: 352-358.
5. Tanaka M, Ida Y, Tsuda A et al. 1986 In Emotions (Y Oomura ed.), Japan Scientific Societies Press: Tokyo, Pp. 417-427.
6. Tsuda A & Tanaka M 1985 Behav Neurosci 99: 802-817.
7. Tsuda A, Tanaka, M, Ida Y, et al. 1986 Pharmacol Biochem Behav 24: 115-119.
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.
10. 津田　彰・田中正敏・辻丸秀策ほか 1985 神経化学 24: 331-333.

143. プロラクチンサージにおける脳部位別 5HT および 5HIAA レベルの経時的変化

平野　均・平野　誠・松本　孝・内村英幸・黒木俊秀
鹿子島裕士・八尾博史・中原辰雄*・白石昭雄**
（国立肥前療養所・情動行動障害センター，九州大・理・化学*，生物**）

〔要　約〕

正常雌性ラットの発情前期の午後に周期的に起こるプロラクチン(PRL)大量分泌（サージ）の中枢機序を解明するために、まず、卵巣摘出後estradiol(E_2;30μg/rat/200μl sesame oil)を投与したラットで、カニューレからと断頭時に採取した両方の血液を用いて、15時をピークとする血中PRLのサージ出現を確認した。つぎに、脳内６部位（視束前野内側部：POM、視交叉上核：SCN、視床下部腹内側核：VM、視床下部背内側核：DM、弓状核：ARC、背側縫線核：RD）における5HTおよび5HIAAレベルの経時変化をHPLC-ECD法を用いて測定した。その結果、対照群では検討した全部位で5HTと5HIAAレベルが15時あるいは9時に比較して18時で有意に低下しており、卵巣摘出後も5HT系の日内変動が認められた。E_2投与ラットでは、POMとSCNでは5HTおよび5HIAAレベルの日内変動そのものは変化しなかったが、他の部位では18時にかけて5HTと5HIAAレベルの低下が抑制され日内変動が消失した。更にこれら４部位(VM,DM,ARCおよびRD)では、18時での5HTと5HIAAレベルが対照に比して有意に増加又はその傾向が認められた。これらの結果から、E_2投与ラットにおいて、脳内特定部位での5HT系ニューロン活動の日内変動が修飾されることがE_2投与後のPRLサージの生起に関与している可能性が推察された。

Key word：
serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, prolactin

正常雌性ラットでは、性周期における発情前期の午後にプロラクチン(PRL)の著明な分泌（サージ）が起き、また卵巣摘出後のラットにestrogenを投与すると、2～3日後より発情前期の正常ラットと酷似したPRLサージが数日間にわたって出現しサーカディアンリズムを示すことが知られている(13)がその中枢機序は未だ解明されていない。PRL分泌の調節機構として種々の視床下部由来のPRL分泌抑制或いは促進因子が想定されているが、抑制因子であるドーパミン放出の抑制のみではこのPRLサージを説明し難い(14)。一方、セロトニン（5HT)はPRL分泌に対し促進的に働くという多くの報告がある(1,6)。従って今回、このPRLサージの現象への5HTニューロン系の関与を検討するために、卵巣摘出後estradiol(E_2)を投与したラットにおいて、血中PRL濃度および脳部位別の5HTと5-ハイドロキシインドール酢酸(5HIAA)レベルを経時的に測定した。《方法》生後４週のWistar系雌性ラットを12時間の明暗周期（明600-1800）、恒温湿の恒常条件下で約2ヶ月間飼育したものを用いた。［実験１］上記ラットをpentobarbital-Na(50mg/kg, i.p.)麻酔下で両側の卵巣摘出を行い、2週間後、ゴマ油に溶かしたE_2(30μg/rat/200μl, s.c.)を投与した（第0日目）。第2日目、同麻酔下で右頸静脈より右心室内へカニューレを留置し、第3日目、午前9

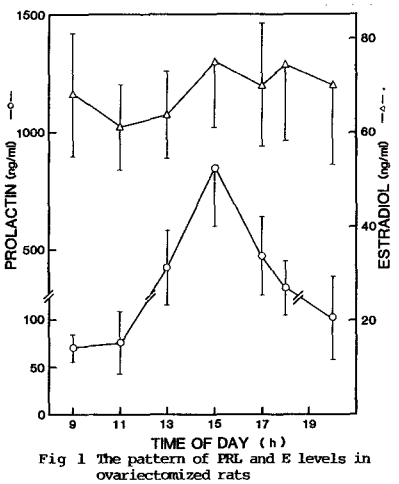


Fig 1 The pattern of PRL and E levels in ovariectomized rats

時より1時間あるいは2時間間隔でカニューレより採血を行い、血球成分は遠心後直ちにheparin含有生食水を加えラットに戻した。血漿を用い、E_2および PRL量を２抗体法によるRIA法（E_2:Estradiol I-125 kits, COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE PRL: NIADDK kits, NADDK-rPRL-RP-3)で測定した。

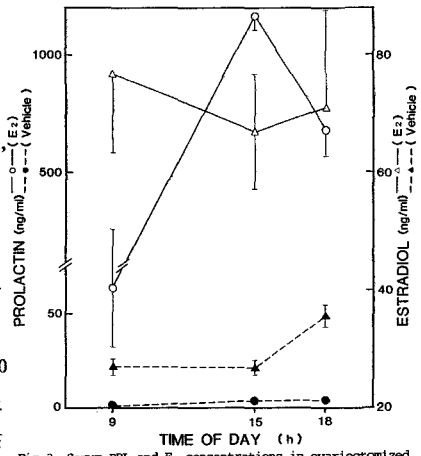
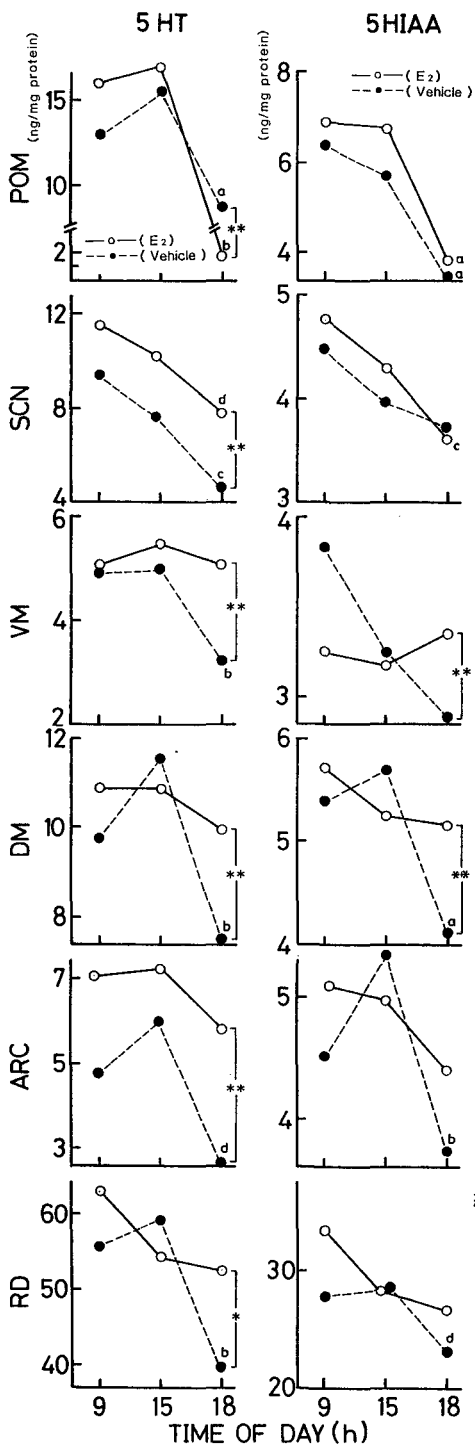


Fig.2 Serum PRL and E concentrations in ovariectomized rats injected with E (30 μg / rat / 200 μl sesame oil) or vehicle (200 μl sesame oil).

［実験2］卵巣摘出後E_2および対照としてゴマ油を投与したラットを第3日目の9時、15時、18時に断頭し、速やかに脳を摘出し、-80° Cで凍結後、クリオスタット(-12° C)で300μmの連続切片を作製した。各切片はKönigとKlippelのアトラス(8)に従い、-20° Cのプレート上で視束前野内側部(POM)、視交叉上核(SCN)、視床下部腹内側核(VM)、視床下部背内側核(DM)、弓状核(ARC)および背側縫線核(RD)の６部位を切り出した。5HTおよび5HIAAは既報(5)に準じたHPLC-ECD法で同時測定した。各組織を400μM $NaHSO_3$, 50μM ascorbateおよび内部標準物質（4-0-MeDA）を含む0.1Mギ酸100μlでホモジナイズし、遠心後その上清をHPLC-ECDに注入した。蛋白量はLowryらの方法(9)で測定した。また、断頭時採取した血液の血清を用い、E_2およびPRLを前記の方法で測定した。

《結果》カニューレ採血によるE_2とPRL濃度の経時変化をFig. 1に示す。E_2は全測定時間を通じ有意差はなくほぼ一定の値であり、PRLは15時で著明なピークを示した。Fig. 2に実験2の断頭時血中E_2およびPRL濃度を示す。E_2はE_2投与ラットおよび対照ラット共に有意な経時変化はみられなかったが、E_2投与ラットで高値を示した。PRLはE_2投与で15時をピークとし18時にかけて高値を示したが、対照では経時変化はなかった。各神経核における5HTおよび5HIAA量の経時変化をFig. 3に示す。まず対照ラットについて5HTレベルは、全部位において15時に比較して18時で有意の低下があり、5HIAAレベルもSCNとVMを除く４部位で有意の低下があった。SCNとVMの5HIAAについては、9時と比較すると18時で有意に低下していた。従って対照ラットでは、測定した全部位で5HTと5HIAAレベルが18時にかけて下がる日内変動がみとめられた。一方、E_2投与ラットについてみると、VM、DM、ARCおよびRDにおいては、対照でみられた18時での5HTレベルの低下が消失していた。また、E_2投与ラットの18時での5HTは、著しい低値を示したPOM以外の５部位で対照より有意に高値であった。5HIAAレベルも同様に、VM、DM、ARCおよびRDの４部位で18時での有意な低下が消失しており、VMとDMでは18時の5HIAAは対照より有意に高値であった。このように卵巣摘出後E_2を投与することによって、測定した部位のうち、5HTおよび5HIAAレベルの日内変動そのものはPOMとSCNでは変化しなかったが、その他の４部位では18時にかけての5HTと5HIAAレベルの低下が抑制された。

《考察》卵巣摘出後E_2投与ラットにおいて、カニューレおよび断頭時血液採取の双方で15時をピークとするPRLサージを確認した。これはPRLサージが15時から17時に出現するというこれまでの報告(3、13)と一致した。対照ラットで、測定した全部位において5HTおよび5HIAAの日内変動が認められたのは注目される。これまで5HT、5HIAAおよび



5HT合成酵素の日内リズムが縫線核細胞体を含む脳諸部位に存在するといわれている(4、7、10)が、今回の結果は卵巣摘出後でも日内変動が生じることを示し、又、これは血中estrogenレベルとは直接関連しない固有のリズムであると考えられる。さて、E_2投与ラットにおいて、この両物質の日内変動の消失が脳内特定部位で、しかもPRLサージが出現する時間帯で生じることは興味深い。これまでPRLサージと直接関連ずけた生化学的知見は少ない。最近、de Greefら(2)はE_2投与3日目のサージの生起中に直接下垂体茎より採取したドーパミン量が50%減じたと報告している。しかし、ドーパミン分泌抑制のみでは、PRL大量分泌促進は説明できず他の分泌促進因子の関与が必要とも考えられている(14)。他方、SubramanianとGala(15、16)は5HT阻害剤(methysergide, cyproheptadine)の断続的投与によって、13時から17時のPRLサージが抑制されるとの実験から、セロトニン系はE_2によるPRLサージの出現およびその程度に促進的効果(positive input)をもつのではないかと示唆している。今回の結果からも、18時での5HTおよび5HIAA両方のレベルがE_2投与ラット脳の4部位において増加傾向にあったことから、PRLサージに一致して5HTニューロン系の活動性が対照ラットより相対的に高まったとも考えられる。従って、E_2投与ラットにおいて、脳内特定部位で5HT系活性の日内変動が修飾されることがE_2投与によるPRLサージの出現に関与しているのではないかと推察される。今回は、これまで破壊実験(11、12)からPRLサージと関連ずけられている部位を中心に検討した。他の部位及び他のモノアミン関連物質の経時変化についても今後検討したい。

1) Clemens, J.A. et al. (1978) Life Sci. 22,2209-2214. 2) de Greef, W.J. et al. (1985) J. Neurocri. 105, 107-112. 3) Demarest, K.T. et al.(1984) Endocrinology (1984) 115, 2091-2097. 4) Hery, F. et al. (1977) Brain Res. 123, 137-145. 5)石橋賢治 他(1985)神経化学24, 559-561. 6) Johnson, M.D. et al. (1984) Neuroendocri. 38, 332-337. 7) Kan, J.P. et al. (1977) Brain Res. 123, 125-136. 8) Konig, J.F.R. and Klippel, R.A. (1963) Williams and Wilkins. 9) Lowry, O.H. et al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275. 10) Morgan W.W. et al. (1976) Brain Res., 117, 77-84. 11) Pan, J.T. et al. (1985) Endocrinology 117, 382-387. 12) Pan, J.T. et al. (1985) Endocrinology 117, 388-395. 13) Sarkar, D.K. et al. (1984) Life Sci. 34, 1819-1823. 14)千原和夫 他(1983)神経精神薬理 5, 529-542. 15) Subramanian, M.G. and Gala, R.R. (1976) Endocrinology 98,842-848. 16) Sabramanian, M.G. and Gala, R.R. (1976) Neuroendcri. 22,249-249.

Fig.3 Daily fluctuation of 5-HT and 5-HIAA levels.

$^{a}P<0.01$, $^{b}P<0.05$ when compared to 1500 h. by Scheffe's test.
$^{c}P<0.01$, $^{d}P<0.05$ when compared to 1500 h. by Students t test.
$^{**}P<0.01$, $^{*}P<0.05$ when compared between E_2 treated and control rat at 1800 h. by Students t test.

144. 哺乳動物における大脳皮質セロトニンニューロンの加令変化

山口知子・山口　仁*（東女医大・生化，昭和大・医・神経*）

〔要　約〕

ラットは加令脳の実験動物としてしばしば用いられてきたが、ヒト加令脳におけるセロトニンニューロンの機能低下の機序の研究とモジュレーター因子の研究モデルとしては必ずしもよいモデル動物とはいえない。食虫目のスンクスは発生学上哺乳類の基幹に位置し大脳皮質に関してはラットよりも霊長類に近縁関係をもつ可能性が示唆されているところから、スンクスの大脳膜分画へのセロトニンリガンドの結合の加令による消長をラットと対比したところ、前シナップスの機能の指標となるイミプラミンおよび後シナップスの機能の指標としての5-ヒドロキシトリプタミン（５－ＨＴ）の大脳膜分画への結合能は、スンクスでは加令とともに低下するがラットでは不変であった。大脳より調製したシナプトソームのカルシウムのとりこみによって反映されると思われるコリン作動性ニューロンの加令による機能低下はラットとスンクス両種で共通に認められ、かつ3,4-ジアミノピリジン（ＤＡＰ）による賦活効果には種による差異はなかったが、セロトニンニューロンの、これら神経伝達機構をモジュレートすると思われるＤＡＰおよびホパンテン酸の結合能に対する効果には種差が認められたところから、モジュレーターの効果に関しては特にセロトニンニューロンの加令変化は動物によって差異があることによる実験動物の選択の重要性が示唆された。

Key word : Aging, Serotonin neuron, Suncus murinus.

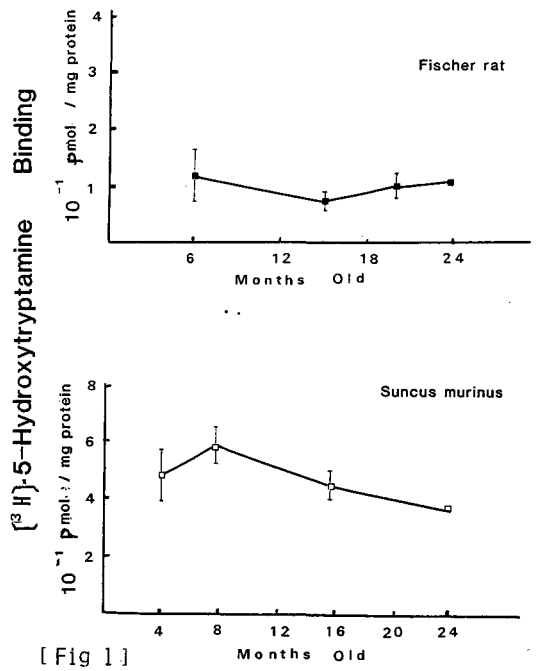
中枢神経細胞の加令による変化は一様でなく選択的に起こることが知られているが、特にＡlzheimer病および老年痴呆脳においては、コリン作動性ニューロンの前シナップスにおける機能障害がさまざまな観点から論じられている[1-2]。　一方ヒトの加令脳の大脳皮質におけるセロトニンの受容体の著しい減少も報告されている[3]。これらのヒトにおけるニューロンの加令変化の基礎的研究に実験動物の導入は不可欠であり、哺乳動物の加令脳に関する多くの研究にはラットが用いられて対比検討されてきた。われわれはラットに見出されないヒト脳でみられる加令変化の研究に発生学上霊長類により近縁関係をもつと思われる食虫目のスンクスの有用性について、大脳皮質から調製したシナプトソームによるカルシウムのとりこみが加令と共に減少し、かつ3,4-ジアミノピリジンがとりこみの減少を賦活することを報告した[4]。このカルシウムのホメオスタシスの加令による消長とモジュレーターとの効果に関してはすでにPetersonら[5]によってラットの加令脳で報告されており、スンクスでも共通に見出される加令脳におけるコリン作動性ニューロンの変性に平行した現象と思われる。　今回われわれはセロトニンニューロンの加令に伴う変性に関してスンクスが加令脳のモデル動物としての有効性をラットと対比して検討した。セロトニンニューロンの変性の指標として5-ﾋﾄﾞﾛｷｼﾄﾘﾌﾟﾀﾐﾝ(5-HT)およびｲﾐﾌﾟﾗﾐﾝの大脳膜分画への結合能を前ｼﾅｯﾌﾟｽおよび後ｼﾅｯﾌﾟｽ受容体として捕え、かつこれらのｼﾅﾌﾟﾄｿｰﾑによるカルシウムのとりこみおよびセロトニンニューロン活性の加令による消長をモジュレートすると思われる3,4-ｼﾞｱﾐﾉﾋﾟﾘｼﾞﾝおよびﾎﾊﾟﾝﾃﾝ酸のﾓｼﾞｭﾚｰﾀｰ効果につき実験動物による差異を検討した。

〔実験方法〕

Fischerラットおよびスンクスの大脳皮質からｼﾅﾌﾟﾄｿｰﾑはBoothら[6]の方法によって調製し^{45}CaのとりこみはPetersonら[5]の方法に従って高ｶﾘｳﾑﾒｼﾞｳﾑ(30mM)中で37°Cで20分ｲﾝｷｭﾍﾞｰﾄした[4]。大脳膜分画はRaismanら[7]の方法に従って調製しタンパク量として約4mg/mlになるように50mMﾄﾘｽ緩衝液pH7.4,120mM NaCl,5mM KCl中にけん濁した。5-HT結合はAllenら[3]の方法によって50mM ﾄﾘｽ緩衝液pH7.4, 4mM$CaCl_2$, 10μM pargyline, 4.5mM ｱｽｺﾙﾋﾞﾝ酸中で^{3}H-5HT 8nMで 37°C 10分ｲﾝｷｭﾍﾞｰﾄ(膜分画0.4-0.6mg/assay)し、東洋濾紙GC/50 上で濾過洗浄し、結合したリガンドの放射能を測定し、非特異的結合は10μMの非標識5-HTを加えたﾒｼﾞｳﾑ中での標識リガンドの放射能を測定し、その差から特異的結合を求めた。ｲﾐﾌﾟﾗﾐﾝ結合はRaismanら[7]の方法に従い膜分画(0.4-0.6mg/assay)を1nMの^{3}H-ｲﾐﾌﾟﾗﾐﾝと共に0°C 60分ｲﾝｷｭﾍﾞｰﾄして同様に濾過法で結合をカウントした。非特異的結合には非標識ｲﾐﾌﾟﾗﾐﾝ 100μMでの標識リガンドの結合を求めた。3,4-ｼﾞｱﾐﾉﾋﾟﾘｼﾞﾝおよびﾎﾙﾓﾝﾃﾝ酸は最終濃度10nMになるように加えた。

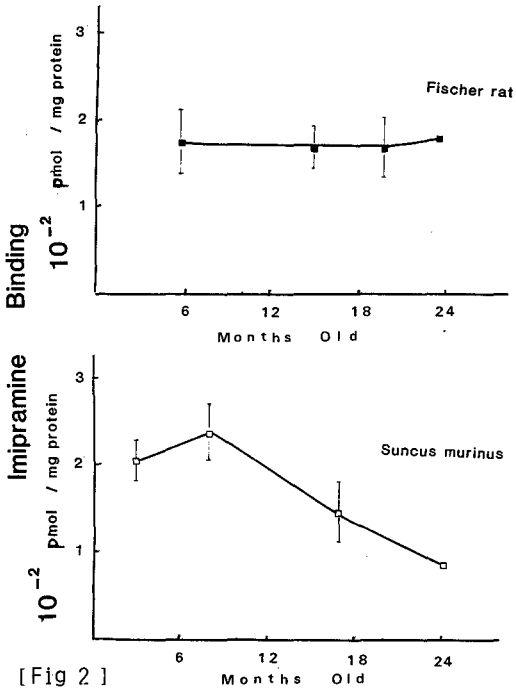
〔結果・考察〕

ラットの大脳膜分画の5-HT結合能は1図に示されているように加令による消長は認められなかった。Allenらによるとヒトの加令脳における5-HT結合能は大脳皮質で著しく低下していることが報告されているにもかかわらず、ラットの加令脳では不変であることはヒトの加令脳のモデル動物としてセロトニンニューロンの消長に関してはラットはモデル動物として適していないことを示している。一方スンクスの大脳膜分画では8か月令をピークに加令に伴って次第に5-HTの膜分画への結合能が低下していることが認められ、5-HT結合の加令による消長には種差が示された。一方、セロトニンニューロンの前シナップス機能の指標になると思われるイミプラミンの膜結合能はラットでは5-HTの結合能と同様に加令で不変である一方、スンクスでは8か月令をピークに加令に伴って著しく減少することが観察された(2図)。またセロトニンニューロンの分布は哺乳類でも分布に種差のあることが知られており[9]、リガンドの結合能からみるとスンクスでは、よりセロトニンニューロンの分布が密であることがわかる。ヒトではセロトニンニューロンの加令変化はむしろ5-HT結合能でみる限り、イミプラミ結合能の加令による低下より、はるかに減少しており[3]、前ｼﾅｯﾌﾟｽよりは後ｼﾅｯﾌﾟｽの変性を示唆しているが、スンクスでは必ずしもその減少の程度はヒトの変化と平行しないものの、セロトニンニューロンの加令による機能低下を観察することが出来る点ではラットよりは大脳皮質の加令モデルに、より適していると思われる。



[Fig 1]

1表にはこれら大脳皮質の神経伝達機能の加令による低下をモジュレートすると思われる3,4-ｼﾞｱﾐﾉﾋﾟﾘｼﾞﾝ（ＤＡＰ）とpantoyl-GABA(ﾎﾊﾟﾝﾃﾝ酸,Hop)を、10nMインキュベーションに加えた効果につき、シナプトソームによるカルシウムのとりこみおよび5-ＨＴ結合およびイミプラミン結合に及ぼす効果をまとめてある。シナプトソームによるカルシウムの加令による低下はＤＡＰで共通に認められる。Ｈopは抑制傾向がラットで認められ、スンクスでは無効であった。５－ＨＴの大脳膜分画への結合能に対するＤＡＰとＨｏｐの作用は加齢に関係なく抑制効果を示した。この阻害効果はセロトニンニューロンの分布の密なｽﾝｸｽでより顕著であった。これらモジュレーターはﾗｯﾄの大脳膜分画のイミプラミン結合に対して無効であった。一方、ｽﾝｸｽの大脳膜分画のｲﾐﾌﾟﾗﾐﾝ結合は加齢によって著しく低下した。そして、ＤＡＰとＨｏｐはｽﾝｸｽのｲﾐﾌﾟﾗﾐﾝ結合を一様に賦活した。　このような薬理効果の差はニューロンの分布の差を示していると思われる。　大脳皮質シナプトソームによるカルシウムのとりこみはコリン作動性ニューロンの活動を反映していると思われるが、この実験系ではラット、スンクス両種とも加令動物としてモデルになる。一方、セロトニンニューロンの加令変化がスンクスで観察されることは、ヒトの加令脳の研究モデルとしての有効性を示していると思われ、かつモジュレーター効果に関しては、種差のあるものと共通の効果とが実験動物の選択で十分考慮される必要性のあることを示している。



[Fig 2]

[Table I]
Effect of Modulators on Aging Synaptic Activities in Rat(Fischer) and Insectivore(Suncus)

			[nmol/mg protein]		
Ca^{2+} uptake	F	Cont.	20.0±2.3	10.8±1.5*	8.2**
		DAP	18.6±2.5	13.5±1.0	13.5
		Hop	20.1±0.7	9.2±1.8	8.4
	S	Cont.	18.6±2.4	13.5±2.1	8.4±1.2
		DAP	20.7±3.0	17.3±2.8	16.1±3.8
		Hop	10.3±2.2	11.3±2.0	n.d.
			[10^{-1} pmol/mg protein]		
5HT binding	F	Cont.	1.2±0.5	0.8±0.2	1.1
		DAP	0.8±0 3	0.7±0.2	0.8
		Hop	0.7±0.2	0.6±0.2	0.6
	S	Cont.	5.5±0.6	4.1±0.6	3.8
		DAP	4.2±0.8	3.4±0.7	3.1
		Hop	3.2±0.7	2.8±0.6	2.6
			[10^{-2} pmol/mg protein]		
Imipramine binding	F	Cont.	1.7±0.4	1.6±0.5	1.7
		DAP	1.6±0.3	1.8±0.4	1.6
		Hop	1.7±0.3	1.6±0.4	1.8
	S	Cont.	2.0±0.6	1.4±0.6	0.9
		DAP	2.3±0.5	1.7±0.4	1.2
		Hop	2.4±0.4	1.6±0.3	1.3

DAP: 3,4-diaminopyridine, Hop: hopantenate
*: Mean of four experiments± s.d.
**: Mean of two experiments in triplicate
n.d.: not determined.

〔文献〕(1) Burtus,R.T.,Dean III,R.L.,Beer,B. & Lippa,A.S.(1981)Science,217.408-417., (2)Sims,N.R.,Bowen,D.M.,Allen,S.J.,Smith,C.C.T.,Neary,D.,Thomas,D.J., & Davison,A.N.(1983)J.Neurochem.,40,503-509. (3)Allen,S.J.,Benton,J.S.,Goodhardt,M J.,Haan,E.A.,Sims,N.R.,Smith,C.C.T.,Spillane,J.A.,Bowen,D.M. & Davison,A.N.(1983 J.Neurochem.,41,256-265. (4)山口知子、山口仁(1984)神経化学、23、300-302. (5)Peterson,C. & Gibson,G.E.(1983)J.Biol.Chem.,258,11482-11486. (6)Booth,R.F.G. & Clark J.B.(1978)Biochem.J.,176,365-370. (7)Raisman,R.,Brieley,M. & Langer,S.Z.(1979)Nature,281,148-150. (8)Mennini,T.,Gobbi,M. & Romandini,S.(1986)Brain Res.,371,372-375. (9)Takeuchi,Y.,Kimura,H.,Matsuura,T.,Yonezawa,T. & Sano,Y.(1983)J.Histochem Cytochem.,31,181-185.

145. ラット海馬内 5-HT axon の collateral sprouting：5HT・5-HIAA 定量値の推移

宮崎修平・片山容一・岩崎光芳・坪川孝志・芝軒信次*
石川紘一*　（日本大・医・脳神経外科，薬理*）

〔要　約〕

rat海馬の主要な5－HT afferentを含む片側 cingulum bundle（CB）に，5，7－dihydroxy-tryptamine（5，7－DHT）を微量注入することにより，これを選択的に破壊した後，海馬の5－HT，5－HIAAを high－performance liquid chromatography with electrochemical detection（HPLC－ECD）により数週間隔で定量した。その結果，同側海馬における5－HT，5－HIAAは1週目より著しい減少を示し2週目には最低値となった。しかしその後は徐々に回復し，7週目には対側海馬と比較しても有意の差を認めないまでになった。対側海馬では有意の変化を認めなかった。免疫組織化学的には，7週目においても同側CBに5－HT fiberを認めなかった。

以上の結果は，CBを経由しない海馬5－HT afferentの collateral sprouting が約7週の経過で生ずることを示していると考えられる。

Key word：　hippocampus，5－HT，sprouting.

rat海馬の主要な5－HT afferentを含むcingulum bundle（CB）[2]に5，7－dihydroxy-tryptamine（5，7－DHT）を微量注入することにより，これを選択的に破壊すると，同側海馬に終止する5－HT fiberの著明な減少がみられる。しかしこの減少は形態的には約4週の経過で目立たなくなることが知られている。しかもこのような海馬に終止する5－HT fiberの回復は，CBを経由する5－HT fiberが消失したままであることから，海馬の他の5－HT afferentのcollateral sproutingによるものであると理解されている。[1][6] したがって，これはregenerationの因子の少ない5－HT fiberのcollateral sprouting を検討する上で好適なmodelと考えられる。そこで私どもは，このようなcollateral sprouting に伴う機能的変化を検討する目的で，片側CBへの5，7－DHT微量注入を行い，その後の海馬5－HT，5－HIAAの変化をhigh-performance liquid chromatography with electrochemical detection（HPLC－ECD）により定量し，その時間的推移を観察した。

実験方法

1）実験動物：体重220－270 gのWistar系雄性rat33匹を使用した。動物は5，7－DHTの微量注入操作を行った期間を除き，恒温（23±1℃）・恒湿（55±5％）に維持し，12時間周期（明期：7－19時）の人工照明を施した飼育室内で飼育した。飼育期間中，水，食餌は自由に摂取できるようにした。

2）5，7－DHT微量注入：Nembutal sodium30㎎/㎏腹腔内投与による麻酔後，口径100 ㎛のstainless tubeを右側でbregmaよりAP：－1.0㎜，L：1.3㎜，　V：－2.4㎜の点に垂直線に15°の角度で定位的に刺入した。5，7－DHT 5 ㎍を，0.02％の割合でascorbic acidを加えた0.9％NaCl 400 nlに溶解し，刺入したstainless tubeを介して50 nl/min の割合

で注入した。なお5，7－DHT注入40分前にdesipramine10㎎/㎏の腹腔内投与を前処置として行なった。

3） 5－HT，5－HIAAの定量：5，7－DHT微量注入後1週（n＝5），2週（n＝4），4週（n＝4），5週（n＝5），6週（n＝6），7週（n＝4）の時点で断頭し，直ちに氷冷ガラス板上でGlowinski and Iversen[3]の方法に従って脳を分画し，秤量後－80℃の超低温槽内に保存した。5－HTおよび5－HIAAの定量は，既に発表されてる方法[4]に準じ，酸性butanol抽出後，HPLC－ECDを用いて行なった。また未処置のrat5匹も同様の方法で測定しcontrol群とした。

実験結果

1） control群：control群の5－HTの量は右側で587.70 ± 79.972 ng/g wet tissueであり，左側では661.52 ± 139.443 ng/g wet tissueであった。また5－HIAAは右側で483.31 ± 80.798 ng/g wet tissueであり，左側では517.50 ± 66.853 ng/g wet tissueであった。(Fig. 1，2)

2） 5，7－DHT注入群：5，7－DHT注入群の5－HTは，右側（注入側）では5，7－DHT注入後2週で最低値42.91 ng/g wet tissueを示し，その後徐々に上昇し，6週で最高値326.99 ± 104.871 ng/g wet tissueとなった。(Fig. 1) これに対し左側（対側）では5，7－DHT注入後1週で最高値671.25 ± 245.866 ng/g wet tissueを示し，その後はむしろやや低下した。(Fig. 1) 5－HIAAの定量結果もほぼ同様の結果を示し，右側では5，7－DHT注入後2週で最低値124.09 ± 34.075 ng/g wet tissueに達し，その後は上昇した。左側では注入後1週で最高値679.15 ± 84.761 ng/g wet tissueを示し，その後はcontrolとほぼ同様の値を示した。(Fig. 2) これらの定量結果を右側（5，7－DHT注入側）の左側（対側）に対する百分率でみると，注入側のpercent contentは5，7－DHT注入後2週で8％にまで低下し，その後徐々に上昇して注入後7週には対側の64％にまで達した。5－HIAAのpercent contentの推移も同様で，5，7－DHT注入後2週で最低28％にまで低下し，その後上昇して注入後7週で対側の86％にまで回復した。(Fig. 3)

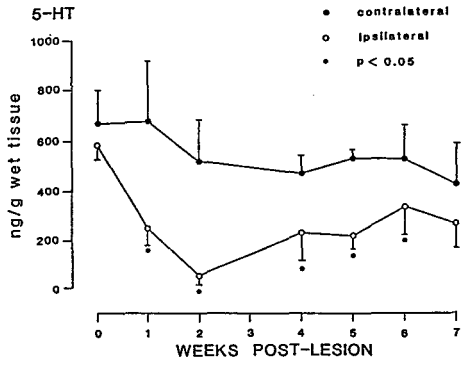


Fig. 1 5,7－DHTの片側cingulum bundleへの微量注入後に生ずる海馬5－HTの変化

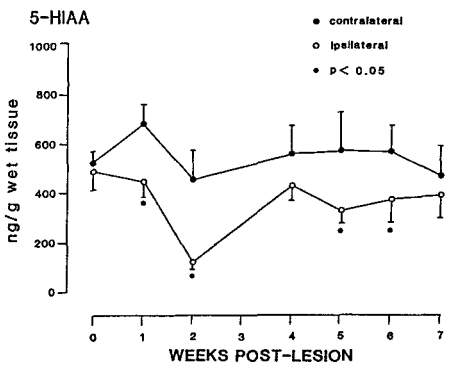


Fig. 2 5,7－DHTの片側cingulum bundleへの微量注入後に生ずる海馬5－HIAAの変化

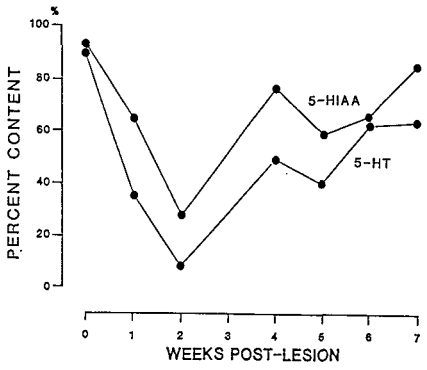


Fig.3　同側海馬5－HT，5－HIAA定量値の対側海馬5－HT，5－HIAA定量値に対する割合（percent content）

考　察

私どもは，免疫組織化学的検討も行っているが，7週目のratでも同側CBに5－HT fiberは認められなかった。[5]　したがって，上記のごとき5－HT，5－HIAAの回復はregenerationよりは他の5－HT afferentのcollateral sproutingによるものと考えられる。この回復過程の時間的推移は現在までに報告されている形態的回復より約3週の遅れがある。しかし一方では，すでに報告されている行動学的回復とはよく一致していた。

〔文　献〕

(1) Azmitia, E C. Buchan, A M. Williams, J H. (1978) Nature 274, 374－376

(2) Azmitia, E C. Segal, M. (1978) J. Comp. Neurol. 179, 641－667

(3) Glowinski, J. Iversen, LL. (1966) J. Neurochem. 13, 655－669

(4) Ishikawa, K. McGaugh, JL. (1982) J. Chromatogr. 229, 35－46

(5) Miyazaki, S. Katayama, Y. Ogawa, H. et al (1985) Neurol. Med. Chir. Suppl., 113

(6) Zhou, F －C. Azmitia, E C. (1984) Brain Res. 308, 53－62

146. 2—ヒドロキシプトレスチンのラット脳内濃度について—GC-MS 法を用いて—

能登　直・長谷川武史*・上村　宏・中尾純治・橋本泰道
田村潤一・中嶋照夫　（京都府立医大・精神，GC-MS 研*）

〔要　約〕

ＧＣ－ＭＳを用いたプトレスチン定量法を一部改変し，ラット脳内の７部位における２－ヒドロキシプトレスチン量を測定した。脳組織中の２－ヒドロキシプトレスチンをTCAを用いて抽出し，Amberlite CG 120,H^+型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－ジアミノヘキサンを用いた。２－ヒドロキシプトレスチンとジアミノヘキサンに特徴的なfragment ion である m/z 215,m/z 232 を用いて，selected ion monitoring method にて測定した。

大脳皮質，小脳で高い値が，線状体，中脳で低い値が，そして延髄，視床下部，海馬で中間の値が得られた。小脳における値が線状体および中脳における値に比して有意に高かった。

Key word：2－Hydroxyputrescine，CNS，polyamines

ジアミンであるプトレスチンは生体内では主としてポリアミンに代謝されることが知られている。しかし，その一部はＧＡＢＡ（5,7,9,）および２－ヒドロキシプトレスチン(4)に代謝されることが知られている。２－ヒドロキシプトレスチンは１９７１年にTobari and Tchen (10)によりPseudomonas cell で初めて見い出され，１９７８年には著者ら(4)によりプトレスチンの代謝産物としてラット尿中で見い出されている。本年，著者らのグループにより牛脳中に２－ヒドロキシプトレスチンが存在することが明らかにされた(3)。

本研究は中枢神経系におけるプトレスチンおよびその代謝産物であるGABAと２－ヒドロキシプトレスチンの生理的役割を解明する一連の研究の一つとして行われた。

【実験方法】

実験動物　１５０－２００g 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。

ヒドロキシ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，クリオスタットにて厚さ１mm の連続切片を作製した。ラット脳図譜(8)を用いて，Glowinski and Iversen の７つの脳分画(2)に相当する大脳皮質，小脳，延髄，視床下部，線状体，海馬および中脳を切片より切り出した。切り出した脳組織に0.1Ｎ塩酸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５００ng の1,6-diaminohexane-2HCl（DAH）と１０％TCAを加え，よく攪拌したのち，遠沈した。この操作を３回繰り返し，上清を集めた。集めた上清中のTCAをジエチルエーテルにて抽出した後，Amberlite CG 120，100-200 mesh,H^+ form のカラムに通した。カラムを水および0.2Ｎ塩酸で洗った後，５Ｎ塩酸で２－ヒドロキシプトレスチンおよびDAHを溶出した。溶出液はロータリーエバポレーターで乾

固させ，少量の水を用いて0.3mlの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2－ヒドロキシプトレスチンおよび内部標準物質（DAH）の組み合わせを用いた。10ng－500ng（DAH），20ng－500ng（DAH），50ng－500ng（DAH）および100ng－500ng（DAH）である。検量線作製のための2－ヒドロキシプトレスチンおよびDAHの抽出操作は，ラット脳組織のかわりに牛血清アルブミンを用いた以外は組織からの抽出操作と同じであった。

2－ヒドロキシプトレスチンの定量　2－ヒドロキシプトレスチン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。

2－ヒドロキシプトレスチンのアシル化は凍結乾燥したサンプルに50μl アセトニトリルと50μlのPFPを加え，室温下でスターラーにて20分間攪拌して行った。反応液を窒素気流下で乾固した後，50μlのアセトニトリルを加え，その内の0.8μlをガスクロマトグラフ質量分析計に注入した。測定は2－ヒドロキシプトレスチンに特徴的なfragment ionであるm/z 215とDAHに特徴的なm/z 232を用いselected ion monitoring method（SIM）にて行った。ガスクロマトグラフ質量分析の条件は以下の通りである。GC－MSの条件：カラム－φ0.2mm×25mキピラリーカラムSE30，キャリヤーガス－ヘリウム（30ml／min），カラム温度－180度，ionizing法－EI法，electron加速電圧－20V，イオン源温度－280度。

【結果】

2－ヒドロキシプトレスチンおよびDAHのアシル化とその定量　PFPによる2－ヒドロキシプトレスチンおよび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)。今回用いた測定法で得られた検量線は直線を示し，安定した2－ヒドロキシプトレスチン定量が行えた。

2－ヒドロキシプトレスチンの脳内濃度　今回定量した脳内7部位の2－ヒドロキシプトレスチン濃度は表に示した。大脳皮質の物質量は2.55±0.77（pg／μg protein,mean±SEM）であり，他の部位における量との間には有意差は認めなかった。小脳における濃度は2.44±0.49であり，線状体および中脳における濃度に比して有意に高い値が得られた。延髄，視床下部，線状体，海馬および中脳における値はそれぞれ，1.84±0.37，1.75±0.39，1.01±0.16，1.52±0.20および1.07±0.19であった。2－ヒドロキシプトレスチン量は大脳皮質と小脳で高値を，線状体と中脳で低値を，延髄，視床下部および海馬で中間値を示した。高い部位と低い部位の間で2倍以上の量の違いが認められた。

【考察】

2－ヒドロキシプトレスチンが生体組織で定量されたのは本研究がはじめてであり，今回用いた定量法は脳組織中の2－ヒドロキシプトレスチンを測定する上で非常に有用であった。前回の本学会で我々が報告(6)したこの物質の前駆物質であるプトレスチンの脳内分布と比較して異った値を示している。最も異っているのは小脳においてであり，プトレスチンは低値を示し，2－ヒドロキシプトレスチンは高値を示している。この解析も含め，中枢神経系におけるプトレスチンおよびヒドロキシプトレスチンの生理機能を今後解明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. Glowinski, J. and Iversen, L.L., J. Neurochem., 13, 655(1966)
3. 長谷川武史ら，医用マス研究会講演集，11(1986)印刷中
4. Noto, T. et al., J. Biochem. (Tokyo), 83, 543(1978)
5. 能登直ら，神経化学，23, 360(1984)
6. 能登直ら，神経化学，24, 109(1985)
7. Noto, T. et al., J. Neurochem., 46, 1877(1986)
8. Pellegrino, L. J. et al., A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain, Plenum Press, New York (1967)
9. Seiler, N. et al., Brain Res., 28, 317(1971)
10. Tobari, J. and Tchen, T.T., J. Biol. Chem., 246, 1262(1971)

Table The contents of 2-hydroxyputrescine in rat brain
(mean ± SEM, pg/μg protein, n=7)

Cerebral Cortex	2.55 ± 0.77
Cerebellum	2.44 ± 0.49
Medulla Oblongata	1.84 ± 0.37
Hypothalamus	1.75 ± 0.39
Striatum	1.01 ± 0.16**
Hippocampus	1.52 ± 0.20
Midbrain	1.07 ± 0.19*

*($p<0.05$) and **($p<0.025$) are significantly lower than the content of 2-hydroxyputrescine in the cerebellum.

147. GC-MSによるラット脳各部位におけるGABA及びグルタミン酸の同時定量
—セルレイン処置ラットへの応用—

中村　薫・松本　孝*・平野　誠*・平野　均*・鹿子島裕士*
黒木俊秀*・八尾博史*・内村英幸*中原辰雄**・白石昭雄***
（九州大・医・神経精神，国立肥前療養所*，九州大・理・化学**，生物***）

〔要　約〕 GC-MSを用いてGABA及びグルタミン酸を同時定量した。ペンタフルオロプロピオン酸(PFPA)とペンタフルオロプロパノール(PFPOH)を用いて、両アミノ酸をone-stepの反応でPFP-PFPA誘導体にしたので、誘導体化が簡便であった。そのうえこの誘導体は安定性が高いことを見出した。この定量法によって、ラット脳の4部位（前部帯状回皮質、側坐核、線条体、黒質）におけるGABA及びグルタミン酸濃度を測定した。さらにGABA分解酵素阻害剤であるアミノオキシ酢酸の投与後に蓄積されるGABA量を測定し、GABAの代謝回転を調べた。0-50分の範囲でAOAA投与後の時間とGABA濃度との間に良好な直線性が得られた。代謝回転は線条体では21、側坐核では38，黒質では75であった（単位はnmol/mg protein/h）。以上の方法を用いて、caerulein末梢投与のGABA、グルタミン酸及びGABAの代謝回転に及ぼす影響を検討した。その結果、caerulein(400μg/kg, i.p.)により側坐核と黒質においてGABAレベルが低下し、逆に線条体では増加した。前部帯状回皮質と線条体では変化がみられなかった。GABAの代謝回転は前部帯状回皮質並びに線条体において低下した。グルタミン酸レベルは前部帯状回皮質と側坐核とで低下した。

Key word：　GC-MS, GABA, Glutamic acid

GABAは抑制性伝達物質であり、その前駆物質であるグルタミン酸(Glu)は、近年興奮性伝達物質としての機能が注目されている。我々はGC-MSを用いて、ラット脳の数部位におけるGABA及びグルタミン酸濃度を同時に測定した。さらにこの定量法を用いてGABA分解酵素(GABA transaminase, GABA-T)阻害剤の投与後に蓄積されるGABA量を測定して、GABAの代謝回転を調べた。一方コレシストキニン(CCK)は中枢神経系に高濃度に存在し、神経伝達物質或は神経修飾物質として作用することが知られている。我々は1983年度の本学会に於て、CCKの類似物質であるcaeruleinの中枢ドパミンニューロン系に及ぼす影響について報告した。今回は上記の定量法を用いて、ドパミンニューロン系と相互に作用するGABAニューロン系についてcaeruleinの影響を検討した。

〈方法〉 Wistar系雄性ラット(250-290g)を用いた。［実験 1］GABA-T阻害剤であるAOAA(25mg/kg)を腹腔内投与後、0, 25, 50分後にラット脳にマイクロウェーブ(MW)を照射(5kW, 1.2sec)した。断頭後迅速に脳を取り出し-80℃で凍結後、クリオスタット内で300μmの連続切片を作り、その切片から実体顕微鏡下で前部帯状回皮質(ACC)，線条体(CP)，側坐核(N.Ac)及び黒質(SN)の4部位を切り出した。各試料を内部標準物質を(GABA-d_6, Glu-d_5)を含む0.1Mのギ酸でホモジナイズした。ホモジネートを15000gで15分間遠心し、上清を脱水後20%のペンタフルオロプロパノール(PFPOH)を含むペンタフルオロプロピオン酸(PFPA)を加えて75℃で30分間反応させ、GABA, Glu及びそれらのd体をPFP-PFPA誘導体にした（GABA及びグルタミン酸の反応定量性(yields)はそれぞれほぼ100%と32.2%であった）。反応液を窒素ガスで蒸発させ、酢酸エチルに溶解し、GC-MSに注入した。測定にはSIM法を用い，m/z 232/238(GABA)，m/z 230/234(Glu)のイオ

ンピーク高比からそれぞれのアミノ酸の濃度を計算した。〔実験 2〕ラットを4群に分け次の処置を行った。caerulein(400μg/kg)の腹腔内投与65分後にMWを照射した(CLN群)。caerulein(400μg/kg)の腹腔内投与15分後にAOAA(25mg/kg)を投与し、その50分後にMWを照射した(CLN-AOAA群)。対照群にはsalineを投与した(SAL群,SAL-AOAA群)。〈結果及び考察〉今回用いた方法では、GABA及びグルタミン酸とPFPOH,PFPAとをone-stepで反応させたので誘導体化が簡便であった。そのうえBertilssonら(1)が用いたhexafluoroisopropanol-pentafluoropropionyl(HFIP-PFP)誘導体が不安定であるのに対し(9)、PFP-PFPA誘導体は安定性が高く、-4℃の保存で少なくとも7日間は安定であることを見出した。GABA及びグルタミン酸のそれぞれに特異的な二つのイオン(GABA,232,176;Glu,230,202)のピーク高比を試料と標準物質とで比較して特異性が確かめられた。この高感度(測定感度 GABA:50pg, Glu:100pg/injection)且つ特異性の高い定量法を用いてGABA及びグルタミン酸濃度をラット脳の核レベルで測定した。実験1の結果をFig.1に示す。三部位とも0～50分の範囲で、AOAA投与後の時間とGABA濃度との間に良好な直線性が得られた。これはAOAAの吸収が非常に早いうえにGABA-T阻害作用が強力であることを示す。さらにAOAAはGABAレセプターやGABAのuptakeに殆ど影響を及ぼさず(3)、低用量ではGABA合成酵素(GAD)を阻害しない(4)。以上の特性からAOAA投与後に蓄積されたGABA量は代謝回転の指標になると考えられる。三部位における代謝回転速度はN.Acでは38, CPでは21, SNでは75であった(単位はnmol/mg protein/h)。GABA-T阻害剤としてgabaculine(intrastriatal injection)を用いたGiorgiら(2)の報告によるとCPの代謝回転は25 nmol/mg protein/hであり、我々の実験結果と近似していた。

実験2の結果をFig.2に示す。caerulein の末梢投与によりN.AcとSNではGABAの定常レベルは低下(-13.7%,-25.6%)していたが、CPでは逆に増加(+8.8%)していた。GABAの代謝回転はACCとCPでは有意に低下しており、他の2部位ではvarianceが大きいために有意な変化は見出せなかった。グルタミン酸レベルはACCとN.Acの2部位で低下していた(-11.9%,-15.6%)。またACC,N.Ac,SNの三部位ではAOAAの投与によってグルタミン酸レベルが低下していた。このようにcaerulein のGABAニューロン系及びグルタミン酸レベルに及ぼす影響は部位によって異っていた。

CPに存在するGABAニューロンの大部分は介在ニューロンであり(7),GADはもとよりGABA-Tは主にGABAニューロンに局在する(10)。従ってAOAA投与後に蓄積されたGABAはGABAニューロンに由来すると考えられ、今回の実験結果はCPではcaerulein によってGABAの放出が抑制されることを示唆する。

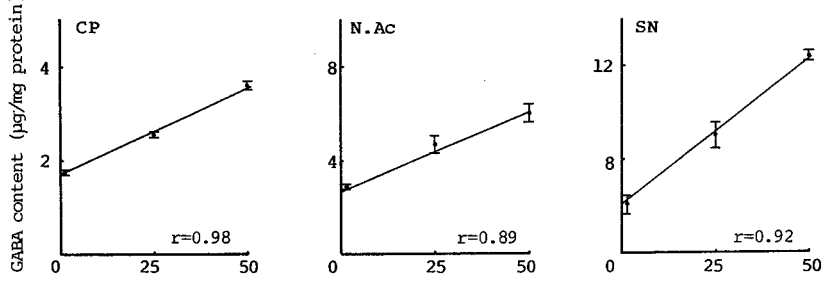


Fig.1 GABA accumulation in striatum(CP), nucleus accumbens(N.Ac) and substantia nigra(SN) after administration of 25mg/kg AOAA. Each value represents the mean ± S.E.M.

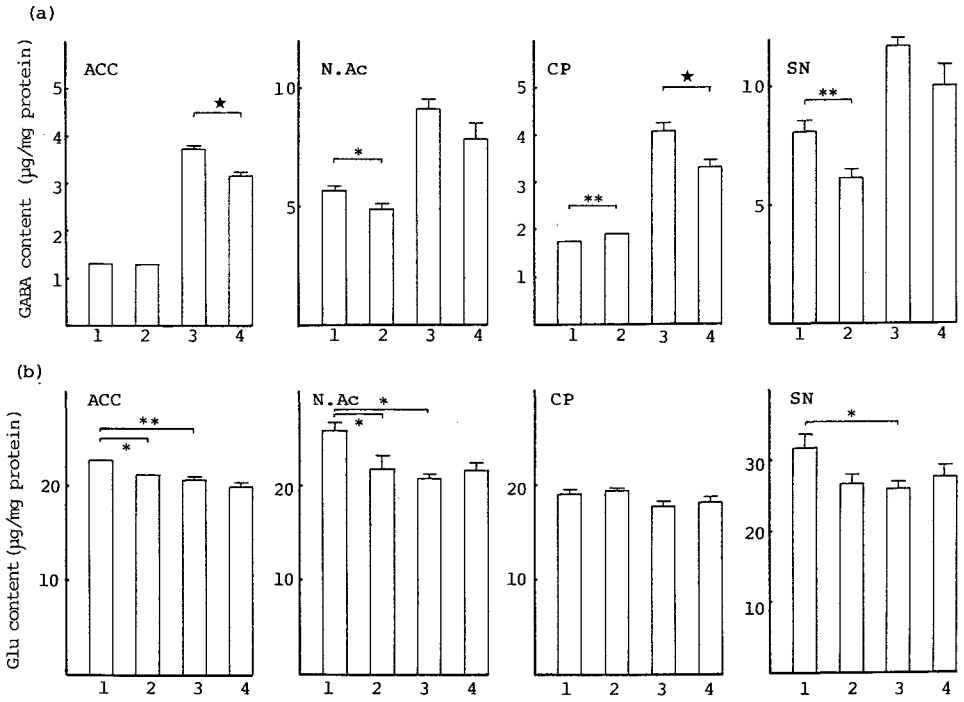


Fig.2 Effects of caerulein on the AOAA-induced accumulation of GABA and the concentrations of GABA(a) and glutamic acid (b) in anterior cingulate cortex(ACC), nucleus accumbens(N.Ac),striatum (CP) and subatantia nigra(SN). Bars represent mean ± S.E.M. for 10-14 determinations. 1:SAL,2:CLN,3:SAL-AOAA,4:CLN-AOAA. *p<0.05,**p<0.01 when compared with saline treated group. ★p<0.05 when compared with AOAA treated group by Scheffe's test.

SNではcaerulein投与65分後にGABAレベルは低下した。今回用いたのと同量のcaerulein末梢投与2時間後に同部位のGABAレベルは有意ではないが低下する(-6.2%)(8)。この部位においてGABAの代謝回転に有意な変化は見出せなかったが、GABAは黒質-線条体ドパミンニューロン系に対し抑制的に作用するので、今回みられたGABAレベルの低下は、caeruleinの末梢投与によってCPのドパミン代謝産物が減少する(6)、或いはCCK-8の末梢投与によって黒質ち密帯の糖利用が低下する(5)等の知見と関連して興味深い。代謝回転については現在更に検討中である。

caeruleinによってACCとN.Acでグルタミン酸レベルが低下した。この二部位においてGABAの代謝回転は低下もしくは変化がみられなかったので、グルタミン酸の低下は、caeruleinが直接、間接にグルタミン酸の代謝を変化させたことによると考えられる。

このようにGABA及びグルタミン酸の機能的役割を、中枢神経系の核レベルで詳細に検討してゆくうえで今回提示した定量法は有力な手段となり得よう。

(caeruleinは塩野義製薬より提供していただいた)

〈文献〉

1)Bertilsson L. et al.(1977) J.Chromatogr.118,277-284. 2)Giorgi O. and Meek J.L.(1984) J.Neurochem.42,215-220. 3)Loscher W.(1980)J.Neurochem.34,1603-1608. 4)Loscher W.(1981)Neurohem Int.3,397-407.5)Lucignani G. et al.(1984)Europian J.Pharmacol.101,147-151 6)Matsumoto T. et al.(1984)Brain Res.324,195-199.7)McGeer P.L. and McGeer E.G.(1975)Brain Res.143,125-138. 8)Nakamura K. et al.(1985)Neurosciences.11,210-211.(in Japanese) 9)Schaaf J.M. et al.(1985)J.Neurosci Meth.13,257-265. 10)Vincent S.R. et al.(1980)Life Sci.27,595-601

148. ラット脳と脊髄におけるグリシンの免疫組織学的局在

青木英子・仙波禮治・柏俣重夫
（愛知県コロニー発達障害研，周生期）

〔要　約〕

グリシンは中枢神経系で抑制性の神経伝達物質として知られており，脊髄に特に多く存在すると考えられている．今回，グリシンをグルタールアルデヒドによってウサギ血清アルブミンと結合させたものを抗原としてウサギに免疫注射し，抗グリシン抗血清を得た．アフィニティクロマトグラフィーによって精製した抗グリシン抗体は，dot immunobinding assay によってグリシンに特異的な抗体であることを確かめ，この抗体を用いて成獣ラット中枢神経系での分布を検索した．グリシンは脊髄，延髄，橋，中脳に多く分布し，大脳皮質，間脳，小脳ではほとんど反応がみられなかった．脊髄では，前角，後角，前索に強く反応がみられ，特に運動神経路に多く分布していた．橋では内側縦束，三叉神経脊髄路とその核，蝸牛神経背側核，脊髄視床路，赤核脊髄路が染色され，中脳では台形体とその核，外側毛帯とその核，下丘の一部が反応し，聴平衡覚に関連する線維群や神経核に主に分布していた．以上のことより，グリシンは脊髄では知覚神経路よりも運動神経路に多く，また橋，中脳では主に第Ⅴ，Ⅷ脳神経に関連した神経路の抑制性伝達物質として働いていることを考えられた．

Key word： glycine, central nervous system, immunocytochemistry

1983年，Storm-Mathisenら（11）によって抗 GABA 抗体が作製されて以来，神経伝達物質と予測されるアミノ酸に対する抗体が次つぎと作製され，これらアミノ酸の脳内での分布が明かにされてきている．中性アミノ酸の一つであるグリシンは，哺乳類の中枢神経系において抑制性の神経伝達物質として働いていると考えられ，生化学的（1,2,4,8），電気生理学的研究（12）のほか［^{3}H］－グリシンの脳内での取り込みが調べられている．グリシンの代謝は複雑で，他のアミノ酸のように主たる合成酵素，分解酵素を特定できず，代謝酵素の抗体によるグリシン分布の予測は不可能であった．今回，抗グリシン抗体を作製し，グリシンのラット中枢神経系での分布を免疫組織化学的に検討したので報告する．

［方法］

（1）抗体の作製

Storm-Mathisenらの方法（11）により，グリシンをグルタールアルデヒド（GAL）によってウサギ血清アルブミン（RSA）と結合させ，透析，遠心した．上清を抗原（Gly-GAL-RSA）としてウサギに免疫注射し，得られた抗血清は epoxy-Sepharose-6B にグリシンを固定化したゲルによるアフィニティクロマトグラフィーで精製した．抗体の特異性はニトロセルロース膜にアミノ酸－GAL-RSA をスポットし，それを PAP法（10）

本研究の一部は昭和61年度文部省科学研究費（No. 61570480）および厚生省神経疾患研究委託費（No. 85-14）の援助を受けた．

により免疫染色する dot immunobinding assay (5)により検討した．

（２）免疫組織化学

動物は成熟した SD 系ラットを用い，1 % GAL，4 %パラホルムアルデヒド，0.2 %ピクリン酸，2 %庶糖，0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH=6.0) の固定液で灌流した後，脳，脊髄を取りだし一晩固定した．50 mM トリス緩衝液 (pH=7.0) で一日洗った後にポリエチレングリコールに包埋し，ガラスナイフで厚さ 3-5μm の切片にした．組織の免疫染色は Sternbergerの方法 (10) に従った．

［結果］

○抗体の特異性

図1で示したように，dot immunobinding assay において精製グリシン抗体はグリシンのスポットとのみ反応した．

○免疫組織化学

脊髄，延髄，橋が主に染まり，中脳にも染まるところがみられた．大脳皮質，間脳，小脳では反応がほとんどみられなかった．脊髄では，後角で一部の神経細胞と線維が，前角では線維と神経細胞の周りにきている軸索終末が染まった．脊髄の線維束では上行線維束よりも下行線維束が強く染まる傾向を示し，前索では太い線維群が顕著に染まっているのがみられたのに対し，後索ではほんの一部の線維の他は染まらなかった（図2）．橋では，内側縦束脊髄視床路，赤核脊髄路，三叉神経脊髄路の線維のほか，三叉神経脊髄路核と蝸牛神経背側核の神経細胞と線維が染色された（図3）．

Glycine-GAL-RSA

GABA-GAL-RSA

Taurine-GAL-RSA

Glutamate-GAL-RSA

Aspartate-GAL-RSA

β-Alanine-GAL-RSA

図１． Dot immunobinding assay
GAL, glutaraldehyde
RSA, rabbit serum albumin



図２． 脊髄 (×40)

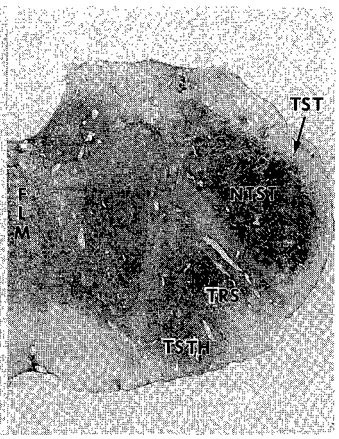


図３． 橋 (×20)

ＶＧ，前角
ＤＧ，後角
ＶＦ，前索
ＤＦ，後索
ＬＦ，側索

ＦＬＭ，内側縦束
ＴＳＴ，三叉神経脊髄路
ＮＴＳＴ，三叉神経脊髄路核
ＴＳＴＨ，脊髄視床路
ＴＲＳ，赤核脊髄路

［考察］

中枢神経系内でのグリシン含量は脊髄で特に高いという生化学的報告(2) と一致して脊髄ではグリシン抗体で染まる線維が多かった．脊髄内でのグリシン含量は，前角，後角，前索に多く，後索では少ないという報告 (1,4,8)があるがそれとほぼ一致する結果が得られた．側索では知覚神経束

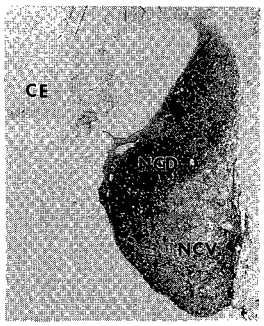


図４－ａ．蝸牛神経核
（×30）
ＮＣＤ，蝸牛神経背側核
ＮＣＶ，蝸牛神経腹側核
ＣＥ，小脳

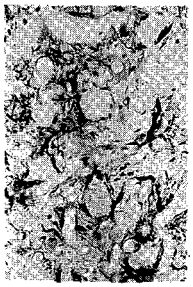


図４－ｂ．蝸牛神経腹側核
（×670）
神経細胞の周囲の軸索終末が染まっている．

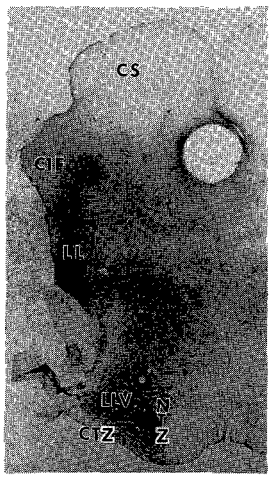


図５－ａ．中脳　（×12）



図５－ｂ．台形体核（×300）

ＣＳ，上丘；　ＣＩＦ，下丘；　ＣＴＺ，台形体；
ＮＴＺ，台形体核；　ＬＬ，外側毛帯；
ＬＬＶ，外側毛帯腹側核

に少なく運動神経束に多かった．一方，橋，中脳で染色された下丘，外側毛帯とその核，蝸牛神経背側核，台形体とその核はすべて聴覚路の一部であり，グリシンは脳内聴覚路の伝達物質として重要な役割を担っていると考えられる．

ごく最近，Campistronら(3)も抗グリシン抗体を作製し，中枢神経系でのグリシンの分布を発表したが，彼らの報告では小脳のゴルジ細胞，バスケット細胞とその軸索終末が染まり，中脳，橋では染まっている箇所がわずかであり，必ずしも我々の結果と一致しない．

REFERENCES

1. Aprison, M.H. and Werman, R.(1965) Life Sci. **4**, 2075-2083
2. Berber, S.J., Carter, J.G. and Lowry, O.H.(1977) J. Neurochem. **28**, 149-158
3. Campistron, G., Buijs, R.M. and Geffard, M.(1986) Brain Res. **376**, 400-405
4. Graham, L.T., Shank, R.P., Werman, R. and Aprison, M.H.(1967) J. Neurochem. **14**, 465-472
5. Hawkes, R., Niday, E. and Gordon, J. (1982) Anal. Biochem. **119**, 142-147
6. Hökfelt, T. and Ljungdahl, A (1971) Brain Res. **32**, 189-194
7. Iversen, L.L. and Bloom, F.E. (1972) Brain Res. **41**, 131-143
8. Johnston, G.A.R. (1968) J. Neurochem. **15**, 1013-1017
9. Logan, W.J.and Snyder, S.H.(1972) Brain Res. **42**, 413-431
10. Sternberger, L.A.(1974) Immunocytochemistry, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, 129-171
11. Storm-Mathisen, J., Leknes, A.K., Bore, A.T., Vaaland, J.L., Edminson, D., Haug, F.-M.S. and Ottersen, O.P.(1983) Nature **301**, 517-520
12. Werman, R., Davidoff, R.A. and Aprison, M.H.(1968) J. Neurophysiol. **31**, 81-95

149. 培養C6グリオーマ細胞におけるグルタミン代謝について

加藤　聖・石田外樹・根岸晃六（金沢大・医・神経情報研）

〔要　約〕

神経系におけるL－グルタミン（L-Gln）の代謝を調べるため、グリオーマC6細胞を①4 mM L-Glnを含むDMEM対照培養液、②L-Glnを含まない液（-Gln）、③更にグルタミン生合成酵素グルタミンシンテターゼ（GS）の阻害剤であるメチオニンスルホキシミン存在下（-Gln+MSF）にて、それぞれ数日～十数日間培養し、細胞増殖に及ぼす影響を検索した。C6細胞は-Glnで顕著に増殖が抑えられ（doubling timeの延長）、-Gln+MSF下では完全に増殖が停止した。この-Gln下にグルタミンシンテターゼの基質である塩化アンモニウム（NH_4Cl）とL－グルタミン酸（L-Glu）を添加すると、C6細胞の増殖抑制が回復（doubling timeの短縮）した。しかしながら、-Gln+MSF下では決して回復しなかった。このことはNH_4ClとL-Gluの効果は生成されるL-Glnを介したものと推論できる。次いでL-GlnによるC6細胞増殖開始のメカニズムを探るためパルスラベル法にて[^{35}S]メチオニンのC6細胞の可溶性タンパク画分への取り込みをフルオログラフィーにて比較したところ、-Gln+MSF下での著しいタンパク合成の抑制が見られた。他方、ニューロブラストーマN18細胞では、グリオーマで観察されたNH_4ClとL-Gluによる-Gln下での増殖回復効果は決して見られなかった。この様にグリオーマとニューロブラストーマにおけるグルタミン・アンモニア代謝に著しい差異が認められた。

Key word：L-glutamine, glutaminesynthetase, glioma cells

〔序〕

グルタミンは生体N源（アミノ基供与体等）として重要なアミノ酸であり、ATP、Mg^{2+}存在下にグルタミン酸及びアンモニアからグルタミンシンテターゼ（GS）により生合成される。またGSはグリアのマーカー酵素であり(1)、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の調節や生体有害物質であるアンモニアの解毒に関与することが示唆されている(2)。しかしながら脳神経系におけるグルタミンやアンモニア代謝については不明のことが多い。そこで我々は、クローン化グリオーマC6細胞とニューロブラストーマを用い、その増殖を指標にグルタミンやアンモニア代謝について比較検討した。

〔実　験　方　法〕

1）<u>培養方法</u>：C6グリオーマ、N18ニューロブラストーマ細胞を既報(3)に従い、ダルベッコーイーグル変法培地（DMEM）＋5％牛胎児血清＋抗生物質共存下にΦ 60 mm皿にて37℃、10% CO_2下に培養した。L-Glnを含まないDMEMを-Gln液とし、更にGSの阻害剤であるメチオニンスルホキシミン(4)を添加したDMEMを-Gln+MSF液とした。細胞数はトリパンブルー排泄試験よりカウントした。

2）<u>[^{35}S]メチオニンのパルスラベリング</u>：種々条件下で培養したC6細胞を[^{35}S]メチオニン（25μCi）を含むL－メチオニンfree DMEMにて3時間培養し、PBS(-)にて洗浄したのち、1000 rpm、5分で細胞沈査を得、PBS(-)にてホモジナイズし、その10万×g上清を、10％SDS-PAGEにて泳動し、ゲルを固定乾燥後オートラジオグラフィーにてタンパクへの取り込みパターンを比較した。

〔結　　果〕

<u>1．C6グリオーマ細胞の増殖に対するグルタミン代謝関連物質の影響</u>

DMEM培地からL-Glnを除くと顕著にC6細胞の増殖が抑えられ、5～6日以降ゆっくりと分

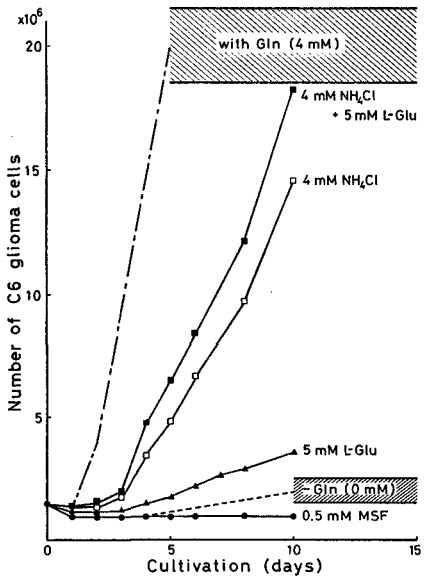


Fig. 1

Compounds	dose (mM)	number of C6 cells ($x10^4$)	%
-Gln	0	115	100
L-Gln	4	2000	1740
D-Gln	4	112	97
	10	180	156
L-Asn	4	120	104
L-Glu	5	168	146
	10	185	161
L-AAA	4	118	103
NH_4Cl	4	510	443
$(NH_4)_2SO_4$	4	488	424
L-Glu+NH_4Cl	5+4	660	573
MSF	0.5	100	87
δ-HL	3.0	105	91
MSF+L-Glu+NH_4Cl	0.5+5+4	110	96
MSF+L-Gln	0.5+4	1040	904

Table 1

裂増殖した（Fig.1, -Gln）。更にGSの阻害剤であるメチオニンスルホキシミン（0.5 mM）を添加したところ、増殖は完全に停止した（-Gln+MSF）。次いで、-GlnにGSの基質である塩化アンモニウム（4 mM）とL－グルタミン酸（5 mM）とを添加するとC6細胞の増殖が約10日間で回復した。またアンモニアの方がはるかにL-Gluより有効であった。また-Gln+MSF下では、NH_4ClおよびL-Gluの添加効果は全く見られなかったがL-Glnの添加では分裂増殖した（Table 1）。Fig.2はC6細胞を正常DMEM（with Gln）、-Gln、-Gln+MSFでそれぞれ5日、10日、15日間培養した時の形態を示したもので、with Glnではは5日でconfluentになり、-Glnでは細い突起を有する細胞からなり、-Gln+MSFでは大部分が丸い胞体のみを有する細胞で占められており、一部極めて細い突起を有する細胞が点在していた。

2．SDS-PAGEおよびフルオログラフィーによるタンパク解析

with Gln、-Gln、-Gln+MSF、で種々の時間培養したC6細胞の10万xg上清のタンパクパターンをSDS-PAGEにて解析したところ、いずれの条件下に培養してもタンパク染色を施されたバンドパターンには顕著な差は認められなかった。そこで、[^{35}S]メチオニンで3時間ラベルし、上記可溶性タンパク画分への取り込みを比較したところ、-Gln+MSF下では著しくタンパク合成の減少が見られた（Fig.3,レーン1）。なお現在with Glnと-Gln下での詳細な比較検討を行なっている。

3．N18ニューロブラストーマ細胞の増殖に対するグルタミン代謝関連物質の影響

C6細胞と同様-GlnによりN18細胞は顕著に増殖が抑制されたが、-Gln下でのNH_4ClとL-Gluによる分裂増殖の誘導作用はニューロブラストーマでは全く観察できなかった（Fig.4）。

［考　察］

L-Glnを培養液から除くと顕著にC6細胞の増殖が抑制された。更にGS阻害剤の存在下で

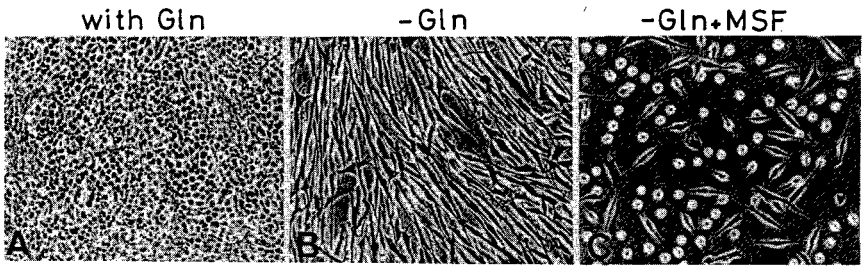


Fig. 2

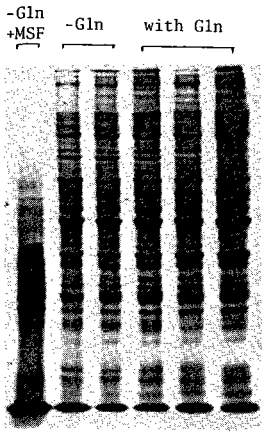


Fig. 3

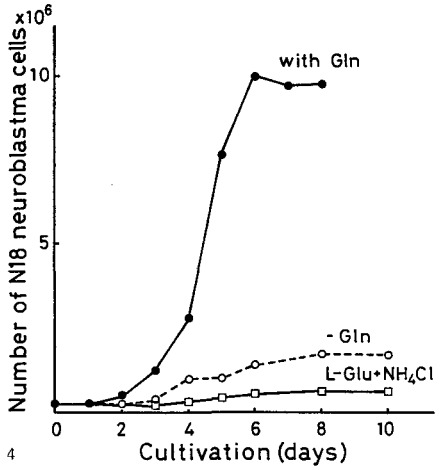


Fig. 4

は完全に増殖が停止した。L-Gln の代わりになるものとして、NH_4Cl 、L-Glu が挙げられたが、これらは GS の阻害剤の存在下では全く分裂増殖がおこらなかったので、生成された L-Glnを介した作用と思われた。他方ニューロブラストーマではこの様な NH_4Cl+L-Glu→L-Gln を介した分裂増殖が全く認められなかった。恐らく GS の欠如ないしは低活性(5) によるものと思われる。以上中枢神経系におけるグルタミン・アンモニア代謝の比較研究に、培養グリオーマ細胞やニューロブラストーマ細胞は有用なモデルとなり得ると考えられる。

[参　考　文　献]

1. Kato, S., Matsukawa, T., Sugawara, K. and K. Negishi (1986) J. Neurochem. (in press)
2. Hertz, L. (1979) Prog. Neurobiol. 13: 277-323.
3. Kato, S., Higashida, H., Higuchi, Y., Hatakenaka, S. and K. Negishi (1984) Brain Res. 303: 365-373.
4. Meister, A. (1978) in Enzyme Activated Irreversible Inhibitors (Seiller N., Jung M. J., and Koch-Wesser J., eds), pp187-210. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
5. Patel, A. J., Hunt, A., Gordon, R. D., and Balazs, R. (1982) Dev. Brain Res. 4: 3-11.

150. マウスの攻撃行動に対する脳内ドーパミン系の関与

野田恭平・Klaus A. Miczek*・Richard Kream*
（国立武蔵療養所・神経センター疾病3部，タフツ大学*）

〔要　約〕

雌雄つがいで飼育したマウス（resident）のケージに、グループで飼育した他の雄性マウス（intruder）を侵入させた時、residentの雄性マウスに生じる攻撃行動を利用して、攻撃行動と脳内ドーパミン系の関連について検討を加えた。d-Amphetamineは、0.1mg/kgで attack bites を増加させる傾向があり、1.0mg/kgでは有意に増加させたが、10mg/kg では無効であるといった用量反応特性を示した。5分間の resident-intruder confrontation の直後に断頭した resident マウスの側座核等の脳部位で、DOPAC/dopamineで表現されるドーパミンの代謝回転が有意に増加していた。毎日1回、 resident がintruderに対し 20 bites を終了するまでの confrontaion を10日間繰り返し経験させたマウスでは、攻撃行動や locomotion を指標にしたd-amphetamineの dose-response curve の平坦化が見られた。生化学的にも、攻撃行動を経験したマウスでは、 dopamine の代謝昂進は見られなかった。以上より、本実験で用いた攻撃行動では、行動の最中に脳内特定部位でのドーパミン性神経活動が増加しており、この行動を毎日繰り返した場合には、 d-amphetamineの薬理作用や攻撃行動によるドーパミンの代謝回転の増加に耐性が形成されることが推察される。

Key word： TERRITORIAL AGGRESSION, DOPAMINE, TOLERANCE

動物の攻撃性(aggression)に関する脳内機序は、この行動の多岐さの故もあって、十分解明されてはいない。Valzelli(4) は、マウスやラットの social isolation で誘発される攻撃行動と、脳内セロトニン伝達の低下が関係していることを報告し、植木(3) は、ラットの *muricide* に脳内ノルアドレナリン伝達の低下が関係していることを報告している。

今回私たちは、薬理学的方法と生化学的方法を用いて、マウスの縄張り行動に基づく攻撃行動に対する脳内の、特に、ドーパミン系の関与について検討を行なった。

（方法）

実験には 20-30g Swiss-Webster 系マウスを用いた。

飼育方法：攻撃行動観察時、 attacker となる雄性 resident マウスは、少なくとも3週間、雌マウスとのペアで 45*24*20 cm のプラスチックケージで飼育した。Intruder として resident からの攻撃を誘発するため雄性マウスは、同型のケージに10匹ずつのグループで飼育した。

行動観察：攻撃行動の観察は午前9時から午後3時までに行なわれ、各用量(0, 0.1, 1.0, 10 mg/kg) の d-amphetamine はテスト前30分にi.p.により注入した。resident マウスのホームケージ内の雌マウス及びpupsは予め別のケージに移しておき、1回のテスト時間は、 resident マウスが intruder に加えた最初の attack bite より5分間と定めた。すべてのテストは、既報(2) のとうりに、ビデオテープに記録された後に、 attack bite, walk, grooming, rearing などの行動の要素の latency, frequency, duration がコンピューターで解析された。このようなスケジュールでの

実験を、naive な resident マウス群とテストに先だって毎日 20 attack bites の量の resident-intruder confrontation を10日間繰り返した経験のある群について行ない比較した。

生化学的方法：同様のテストを行なった直後に断頭したマウスの脳を氷上ですばやく取り出し、ドライアイス上で凍結し、dissection まで -80°C に保存した。Dissectionは-10°C に保たれた microtome で切り出された 300 um の厚さの切片から所定の脳部位(striatum, nucleus accumbens, tuberculum olfactorium, amygdaloid body) を punch-out する方式で行なわれた。組織はＨＰＬＣの mobile phase (10 % isopropanol 含有 phosphate buffer, pH=3.5)で homogenize した後、18,000*g で遠沈し、その上清はクロロホルムで２回脱脂した。得られたクリアーな上清をそのまま、5um C18系逆相カラムを装着したＨＰＬＣシステムに打ち込んだ。内部標準物質(isoproterenol) との比により、dopamine(DA), 3,4-dihydroxyphenylaceticacid (DOPAC) の含量を算定した。ドーパミン性神経活動を DOPAC-DA ratio で表現した。

（結果）

Fig. 1 に示したとうり、naive なマウスにおいては、1.0mg/kgの d-amphetamine は、attack bite の frequency で表現される攻撃行動を促進し、0.1mg/kg でもその傾向があった。しかし10mgの高用量では低下傾向にあるという biphasic な dose-response curve が得られた。10日間の fights を経験したマウスでは、この dose-response curveの平坦化がみられた。

DA神経活動を見ると（Fig. 2）、naive resident では intruder との confrontation 直後で、nucleus accumbens, amygdaloid body で DOPAC/DA 値の上昇した所見がみられ、この変化は、10日間 confrontation を繰り返した群には現われていない。

（考察）

Isolation 飼育がさまざまなマウスの系で攻撃性を増大させることは知られていた(1) が、今回の実験で、雌雄ペアーで飼育された場合にも雄のマウスに雄の intruder に対する激しい攻撃性が観察されたように、isolation は攻撃性を増大させるための必須の飼育条件ではないことが知られる。

amphetamine の類の薬物は、しばしば攻撃性や暴力と結びついて社会問題化するが、今回の動物実験でも、用量によっては、攻撃行動を増加させる効果があることが示された。

高用量での攻撃の低下傾向は、locomotor activityが非常に昂進して、もはやまとまった行動がとれなくなったためと思われる。

Attack bite や locomotion の dose-response curve が、confrontation を毎日繰り返した群で、

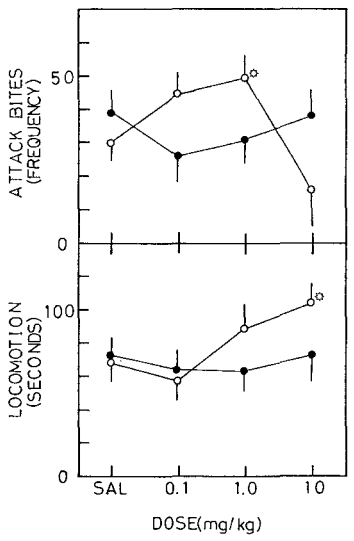


Fig. 1 d-amphetamine の attack bites, locomotion に対する効果.Open circle はnaive, closed circleは experienced residents.

平坦化し、さらに、その群で、DOPAC/DA の上昇が見られなかったことより、急性期には脳内の特定部位でのDAの代謝回転を昂進させることが推定されたresident intruder confrontation (territorial aggression)が、あたかも薬物投与のような効果を有し反復して経験した後にはd-amphetamine のような中枢刺激剤にたいする効果や、この行動に伴う脳内DA代謝回転の上昇に耐性が生じるもののように思われる。

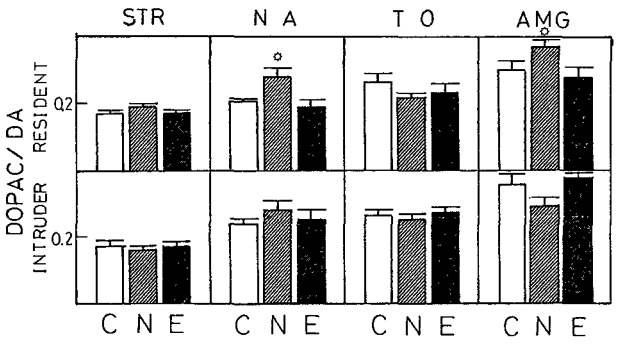


Fig. 2 Resident mice（上段）、intruder mice（下段）の攻撃行動による脳内各部位でのdopamine代謝の変化。　左欄より striatum, nucleus accumbens, tuberculum olfactorium, amygdaloid body. Cはコントロール群で実験群と同じ条件（雌雄のペアー）で飼育された。Nは naive群で初めての攻撃行動の直後に断頭された。Eは experienced群で実験日に先立つ10日間同じ設定での攻撃行動を経験した。

（文献）

1) King,J.T., Chiung,P.L.Y. and Visscher,M.B. (1955) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 88,661-663

2) Miczek,K.A. and O'Donnell,J.M. (1978) Psychopharmacology 57,47-55

3) Ueki,S. (1983) Yakugaku Zassi 103,909-921

4) Valzelli,L. (1981) Psychobiology of Aggression and Violence. Raven Press New York

151. ラット線条体における dopamine 遊離と再取り込みに対する methamphetamine 反復投与の影響

山田茂人・小島秀樹*・高木裕子*・原尻慎一郎*
西彰五郎・稲永和豊*　（久留米大・医・脳研，精神神経*）

〔要　約〕

ラットにmethamphetamine(MAP) 6mg/kg を 9日間反復投与後 9日間休薬してMAP投与により引き起こされる常同行動に関する逆耐性状態を作成した。この時のラット線条体スライスからのdopamine(DA)遊離に及ぼす各種DA関連薬物の影響および線条体シナプトゾームへのDA uptake を観察した。 DA遊離実験では逆耐性群のスライスにおいてphenylethylamine(PEA) の灌流に対するDA遊離反応曲線は左方移動を示し，methamphetamine(MAP),nomifensine(NOM) の灌流と同様にDA遊離反応の増加が認められた。一方haloperidol 誘発DA遊離には高カリウム誘発遊離と同じく両群間に差は認めなかった。^{3}H-DA を使った取りこみ実験では120nM の ^{3}H-DAを37° C 5 分間シナプトゾームとincubateすることにより，取り込まれた^{3}H-DA は逆耐性群で25％の有意な増加を示した。 以上の結果は，MAP 逆耐性形成ラット線条体ではDA uptake 阻害作用をもつ薬物の灌流時にDA遊離の増強が見られることから，両群間の差はDA uptake 阻害による可能性が示唆され，その背景にはDA uptake 機能の増加が推定された。

Key word： methamphetamine, reverse tolerance, dopamine release

MAP 反復投与後に認められるMAP 再投与に対する常同行動の増感状態は，MAP 精神病の再発のモデルとしてばかりでなく，症状の類似性から分裂病のSchub の病体解明への糸口になるのではないかと注目されこの状態の解明にむけて多くの研究がなされている。これまでの研究からこの状態はDAnergic system のMAP に対する過感受性によるものだと考えられている。しかしDA recetpor は過感受性よりむしろ低感受性になっているとの報告が多く（1,3) DA nergic system の過感受性はpostよりむしろDA terminal からのDA遊離の増加に原因を求める報告が多い（9,5)。 そこで我々はMAP に対する逆耐性形成ラットの線条体スライスを灌流し種々の薬物に対する内因性DA遊離の反応性の変化を調べ報告してきた(10)。 今回はPEA,haloperidolによるDA遊離に対するMAP 反復投与の影響と線条体シナプトゾームへの^{3}H-DA の再取り込みを観察することによりMAP 常同行動に対する逆耐性状態の生化学的背景を検討した。

（方法）　Wistar系雄性ラット（180-220gr)を使用した。

1，MAP 逆耐性ラットの作成；　6mg/kg/dayの塩酸methamphetamine(MAP)を毎日1 回9 日間腹腔内投与し，更に9 日間断薬して逆耐性ラットを作成した。断薬9 日目に2mg/kgのMAP を投与した後10分毎に60分間Klawanceらの常同行動評価尺度を用いて常同行動の評価を行った。生食を同様のスケジュールで反復投与し2mg/kgのMAP を投与したラットを対照群とした。

2，線条体スライスの灌流；　断薬9 日目にラットを断頭し脳を0.4mm の厚さにス

ライスした後，線条体部をパンチ（3mm i.d.）して取り出し，1つのchamberに3枚ずつ封入して 0.3ml/min の流速で Krebs 液を灌流した。Krebs 液の組成は$NaCl$, 118; KCl, 4.3; $CaCl_2$, 2.4; $NaHCO_3$, 25; $NaHPO_4$, 1.18; $MgCl_2$, 2.5; glucose 11 (mM)とし，0.1mM pargyline を加え，5% CO2, 95% O2 の混合ガスで十分に飽和させた後37° Cの恒温漕中でchamber を灌流した。chamber は内容積を100 μlとし，1シリーズの実験に12個のchamber を設置した。chamber より流出した灌流液は20分毎にスピッツに集め，Kissinger らの方法(5)に準じて灌流液中の遊離DAを抽出し，電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフでDAの定量を行った。灌流開始90分後より20分間のfraction を2回取り基礎遊離量を求めた。その後haloperidol(0.5 μM, 1 μM, 10 μM)，及び phenylethylamine(PEA, 0.01 μM - 10 μM)を含むKrebs 液を20分ずつ灌流しこれらの薬物によるDA遊離の反応性についてMAP 投与群と生食投与群を比較した。それぞれのDA遊離は基礎遊離量に対する増加率あるいはpg/mg protein/min で表示した。

3. H-DA 取り込み実験　線条体シナプトゾームへの ^{3}H-DA の取り込み実験は Jonsson らの方法(2)に準じて行った。要約すると，ラット線条体を30vol.の0.25M sucrose でhomogenizeし，3000rpm, 10分間で粗シナプトゾームを分離し，50 μl を酸素で飽和したKrebs 液と共に5分間incubateし，その後 ^{3}H-DA (120nM) を加え更に5分間incubateし，4ml の氷冷Krebs 液を加え10000rpmで10分間遠沈し上清を除き沈殿したシナプトゾーム中のradio ativity を測定した。尚，氷冷中でincubateしたものをblank とした。^{3}H-DA uptake量は dpm/mg protein/5 min で表示し，有意差の検定には studentの t-検定 を用いた。

結果 1. 常同行動　2mg/kgのMAP の投与により10分後からMAP 反復投与群において著明な常同行動の増加が観察され20分から60分まで対照群に比して有意に増加していた。

2. DA遊離実験　線条体スライスからのDAの基礎遊離量は420±35 pg/mg protein/10 min でMAP 投与群と対照群の間に差は認めなかった。PEA の灌流によるDA遊離量はMAP 投与群で対照群に比べより低濃度からDA遊離の増加が認められPEA によるDA遊離に対する濃度反応曲線は左方移動を示し（図 1）MAP 前処置群ではPEA に対するDA遊離反応性が高まっている事が示された。　一方高カリウム Krebs液（15mM, 30mM)及びhaloperidol (0.5 μM, 1 μM, 10 μM)により誘発されるDA遊離には両群間に差は見られなかった。以上の結果は以前報告したMAP, NOM の灌流によるDA遊離の変化も含めてtable 1に示す。

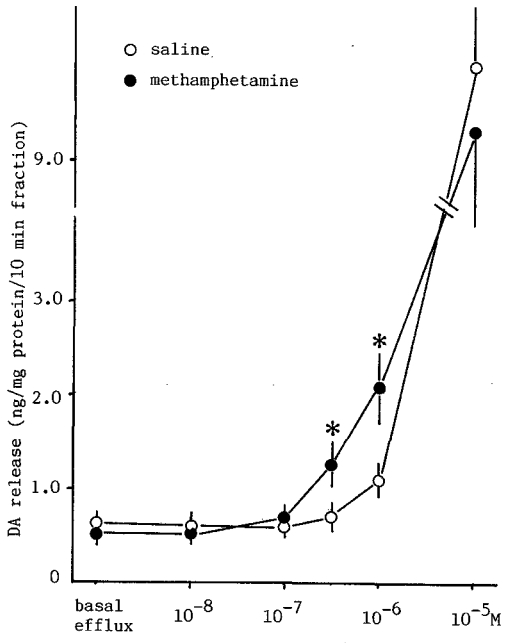


図 1 線条体スライスからのDA遊離に対するPEA の影響　P<0.05

3,DA取り込み実験　^{3}H-DA uptake量は37° C incubationにより0 ° C incubationに比し約6-9 倍の活性を示した。MAP 前処置群の^{3}H-DA uptake 量は対照群に比して25 % の有意な増加が認められた。(table 2)

（考察）　線条体スライスの灌流実験の結果逆耐性ラットでMAP,NOM,PEA に対するDA遊離反応性が昂進している事が示めされた。この事は，MAP に対する行動上の過感受性状態と関連があるのかも知れない。NOM,PEA の灌流で両群間に差が見られた事は薬物間の交叉逆耐性との関連で注目される。同様の実験はRobinsonら,Koltaら（9, 5)によってamphetamine (AMP) を用いて行われ AMP 前処置群で同様にAMP 灌流時のDA遊離量の増加が報告されている。この反応性増加の機序については種々の説明がなされている。　すなわちPresynaptic DA autoreceptor のsubsensitivity(7) DA terminalのMAP 反応性DA pool の増大(6) DA terminal のuptake site の増加(5) 等である。　表１に示すようにCaイオン非存在下でも同様に両群間に差が認められ，MAP,NOM,PEA の灌流とは違い高カリウム，haloperidol 誘発DA遊離には両群間に差は認められずuptake阻害作用を持つ薬物の灌流で差が見られる事はMAP 前処置群の線条体DA terminal におけるuptake site に何かの変化が生じている可能性が考えられる。

		DA release (% of basal release)	
drugs	conc.	saline treated	MAP treated
high K^{+}	15mM	220 ± 52	226 ± 40
high K^{+}	30mM	1010± 270	1170 ± 290
MAP	0.1μM	104 ± 6	142 ± 11*
MAP	1 μM	620 ± 78	699 ±111
MAP	10 μM	2070 ± 595	2154 ± 315
NOM	1 μM	108 ± 13	162 ± 15**
NOM	10 μM	196 ± 37	332 ± 47*
PEA	0.5μM	132 ± 17	317 ±100
PEA	1 μM	175 ± 33	515 ±121*
HAL	1 μM	127 ± 22	120 ± 21
HAL	10 μM	275 ± 24	265 ± 30
MAP(0.1μM,Ca^{2+}free)		102 ± 7	128 ± 9*

Values are shown as the mean ± SEM
* $P<0.05$
** $P<0.01$

Table 1

	DA uptake (10^{3} dpm/mg protein/5min)
saline treated	251.1 ± 15.4
MAP treated	311.4 ± 19.1 *

Values are shown as the mean ±SEM
* $P < 0.05$

Table 2

^{3}H-DA の線条体シナプトゾームへのとり込みを見るとMAP 前処置群で有意な取り込みの増加が認められた。奥田らはMAP 反復投与後にDA uptake の増加を報告しており(8) ，今回の結果と一致している。この事から，MAP 反復投与後のラット線条体DA terminaにおいて通常DA uptake 機能が増加しており灌流液中にDA uptake 阻害作用を持つ薬物が存在するとuptake阻害を受けるDA量が対照群に比べて多くなる結果，灌流液中の遊離DA量の増加を来したものと推察される。

1) Howlett,D.R.et al.(1978) Brain Res.,161,173 (2) Jonsson G. et al.(1982) Br.J.Pharmac.77,335 (3) Kaneno,S. et al. (1981) Eur.J.Pharmac.72,101 (4) kikissinger et al.(1973) Alal.lett.6,465 (5)kolta,M.G.et al.(1985)Neuropharmacol.24,823 (6) Langer,S.Z. (1984) TIPS,Sep.387 (7) Muller et al,(1979) Eur.J.pharmac.55,149 (8) 奥田正英　他：分裂病とは何か：島園，稲永　編，東大出版1984,137 (9)Robinson,T.E. et al (1982) Eur.J.pharmac.,85,253 (10) 山田茂人　他（1986）薬物．精神．行動，6,147

152. Methamphetamine 投与ラットにおける脳内 Substance P とその受容体の変化

氏家　寛・梶田三郎・山下公三郎・中島　誠・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Substance P(SP)系の関与を知るため、Methamphetamine(MAP)投与ラットを用いて脳部位別にSP含量とSP受容体の変化を検討した。1.MAP 8mg/kg1回投与、Haloperidol(HPD)5mg/kg単独投与、HPD前処理後MAP投与のそれぞれを60分後に断頭屠殺し、7脳部位のSP含量をradioimmunoassay法で測定した。その結果、MAP群の線条体で有意な減少が見られ、また、この変化はHPD前処理で阻止された。2.生食を2週間反復投与後1週間放置し生食を単回投与した(S-S)群、同様に1週間後にMAP4mg/kgを腹腔内投与した(S-M)群，MAP4mg/kg/dayを2週間腹腔内投与後1週間放置し生食を投与した(M-S)群、同様に1週間後MAP4mg/kgを再投与した(M-M)群について最終投与より60分後に断頭屠殺し、7脳部位でSP含量を、4脳部位で特異的SP結合をradioreceptor assay法で測定した。SP含量は4群で変化がなかった。特異的SP結合は線条体でM-S群、M-M群がS-S群に比し有意に減少していた。前頭葉皮質では、再投与(M-M)群の特異的SP結合がS-S群およびM-S群に比して有意に増加していた。これらの結果から，MAP反復投与による逆耐性形成あるいは覚醒剤精神病の易再燃性に、線条体でのSP受容体の減少と再投与時に見られた前頭葉皮質のSP受容体増加の関与が考えられた。

Key word： Methamphetamine, Substance P-like immunoreactivity, Substance P receptor

覚醒剤の慢性使用中に起こる症状がしだいに質的変遷をきたし、やがて精神病像が出現するようになる。その場合、断薬して一旦軽快しても覚醒剤再使用で容易に症状再燃をきたす。更に覚醒剤の急性薬理作用が去った後にも精神病像が遷延、持続することがある(10)。これら病像の質的変化、易再燃性、慢性化は覚醒剤の慢性使用中に生じ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。これまでの研究で脳ドパミン系の過敏反応性が形成されることが示されている。これは症状再燃の「ひき金」の役割を演じている点では重要であるが、引き起こされた病像の慢性化を説明し得ない。われわれは昨年Thyrotropin-releasing Hormoneの変化がこれに関与している可能性を報告した(4)。一方、同じneuropeptideに属するsubstance P(SP)もまたドパミンをはじめとするアミン類やアセチルコリン系と相互作用を有することが最近判明してきた。今回、われわれはmethamephetamine(MAP)急性投与及び慢性投与ラットを用いて脳内SP含量とSP受容体の変化を部位別に検討し、覚醒剤精神病の病態生理に於ける脳内SPの関与を調べた。

［対照と方法］

実験1、2ともに8週齢のＳＤ系雄ラットを用い、12時間の明暗サイクルで温度湿度は一定とし、食餌及び水は自由にとれる条件下で飼育した。

実験1　Haloperidol(HPD)5mg/kg一回投与群，MAP8mg/kg一回投与群、HPD前処置後MAP投与群にて、それぞれ腹腔内投与60分後断頭屠殺し、氷上で直ちにGlowinski&Iversenの方法(3)に準じて前頭葉皮質、側坐核、線条体、視床下核、視床＋梨状様皮質、海馬の7脳部位を取り出した．Ogawaらの方法(8)でSP含量をradioimmunoassay(RIA)法で測

定した。

実験2　MAP4mg/kgあるいは生食を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、それぞれに生食あるいはMAP4mg/kgを単回投与する実験を設定した。即ち、生食のみを投与した群を(S-S)群、生食反復投与後MAPを一回投与した群を(S-M)群、MAPを14日間反復腹腔内投与後1週間放置した後生食を再投与した群を(M-S)群、MAP反復投与後一週間断薬後MAP単回再投与した(M-M)群とした。いずれも最終注射より60分後に断頭屠殺し脳部位別にSP含量をRIA法で、特異的SP結合はradioreceptor assay(RRA)法で測定した(8)。SP-RIAは実験1と同じく7脳部位で、SP-RRAは前頭葉皮質、側坐核、線条体、海馬の4脳部位で検討した。

なお、SP-RIAの脳標本の処理は既報の方法(9)に従った。蛋白量測定はLowryらの方法(6)に従った。統計学的解析はone-way ANOVAを適用した。

［結果］

MAP8mg/kg1回投与によるSP含量は線条体で有意の減少が認められた（図1）。この減少はHPD5mg/kgにより阻止された。図2のSM群はMAP4mg/kg一回投与に相当するが、これでは変化がなかった。また、MAP慢性投与（M-S）群および再投与（M-M）群ではSP含量に変化はなかった（図2）。特異的SP結合は、線条体においてM-S群とM-M群がS-S群に比して有意な減少が認められ、約30%減少していた。前頭葉皮質ではS-S群、S-M群、M-S群では不変であったが、M-M群のみに有意な増加がみられた。他の脳部位では変化なかった（図3）。この特異的SP結合の変化が親和性の変化によるものか、結合部位数の変化によるものかは、現在Scatchard解析にて検討中である。

［考察］

主要なSP含有ニューロンの一つに線条体黒質路があり、ドパミン活動に対し興奮性入力を送っていると考えられている。例えば黒質にSPを局所作用させるとドパミンニューロンの興奮を起こし（5）、尾状核でのドパミン放出を増加させ（1）、ラット運動量の増加や常同行動をひきおこす（2）。MAP8mg/kg急性1回投与で線条体のSP含量の減少がみられている。この含量の変化はHPD前処理にて阻止されることより、線条体でのMAPによるSP含量の減少はドパミンを介してSPの遊離が促進されたと考えられる。MAP4mg/kg急性投与では線条体SP含量は不変であった。しかし、特異的SP結合は減少傾向にあるので（図3）、SP含量の変化でとらえられない程度のSPの遊離増加が生じたものと考えられる。三ヶ汐らはMAP2～4mg/kgで線条体SP含量減少を確認しており、この用量のMAPでもSP遊離を促進させていると考えられる。MAP4mg/kg 2週間慢性投与し1週間断薬後では線条体の特異的SP結合は減少していた。これはMAPによるSP遊離の持続的増加によりSP受容体がdown regulationされたものと理解される。この減少がMAP断薬1週後の時点でみられたことは、このSP受容体の変化が持続性であることを意味し、しかもそれがMAPによるドパミンを介した二次的な変化と考えられる点で覚醒剤精神病に見られる症状の慢性化に関与している可能性がある。また、前頭葉皮質での特異的SP結合はMAP慢性投与（M-S）群では不変であったが、再投与（M-M）群で有為に増加している。つまり、MAP慢性投与を前処理しておくと、1回のMAP再投与で特異的SP結合の増加がみられており、覚醒剤精神病にみられる逆耐性の生物学的基盤に関与していると考えられ、症状の再燃現象を考える上で興味深い。

図 1 Regional SP content

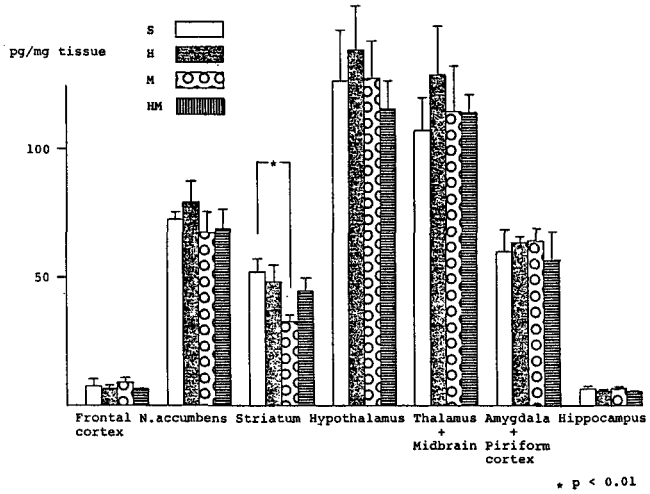


図 3 Regional specific SP binding

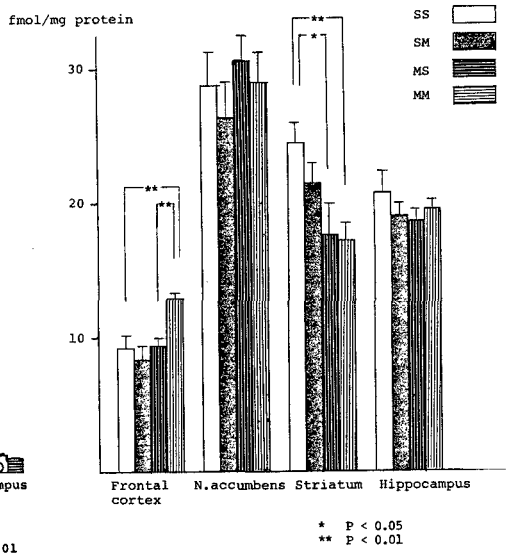
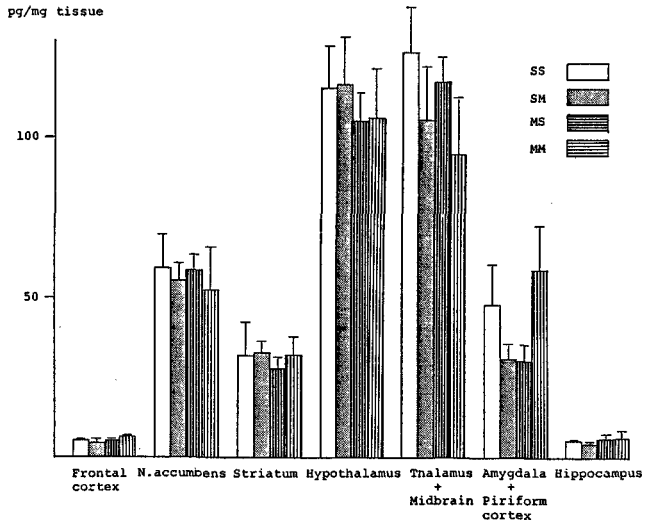


図 2 Regional SP content



[文献]

1) Cheramy, A., Nieoullon, A., Michelot, R. and Glowinski, J. (1977) Neurosci, 4, 105-109 2) Davies, J. and Dray, A. (1976) Brain Res, 107, 623-627 3) Glowinski, J. and Iversen, L. L. (1966) J Neurochem, 13, 655-627 4) 梶田三郎, 藤原豊, 佐藤光源, 大月三郎, 小川紀雄 (1985) 神経化学, 24, 454-456 5) Kelles, A. E., Strius, L. and Iversen, S. D. (1971) Neurosci, 11, 335-339 6) Lowry, O. H., Rosenbough, N. J., Farr, A. L. and Randell, R. J. (1951) J Biol Chem, 193, 265-275 7) 三ツ沙洋, 高嶋端夫, 融道男 (1984) 神経化学, 23, 406-409 8) Ogawa, N., Hirose, Y. and Nomura, M. (1985) In Neurotransmitters in disease (Yoshida, H., ed) Excerpta Medica, Amsterdam, 56-68 9) Ogawa, N., Hirose, Y., Mori, A., Kajita, S. and Sato, M. (1985) Reg. Peptides, 12, 249-256 10) 佐藤光源, 柏原健一: 覚醒剤精神病-臨床と基礎- 金剛出版, 東京, 1986

153. メタンフェタミン逆耐性と脳内特異的 TRH 結合：持続及び反復投与による差異とハロペリドール前処置による影響

中島　誠・梶田三郎・山下公三郎・氏家　寛・福田賢司
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〕

昨年の本学会で、methamphetamine(MAP)を14日間反復投与するとラット線条体で特異的 thyrotropin-releasing hormone (TRH)結合が有意に減少することを報告し、逆耐性現象における脳内ＴＲＨの関与を考察した。今回はさらに1)28日間 MAP反復投与1週間後、2) haloperidol(HPD) を毎回前処置し MAP 14日間反復投与した1週間後、3) MAP持続放出ペレットを用いた場合のそれぞれについて、脳部位別特異的ＴＲＨ結合の変化を調べた。その結果、1)28日間 MAP反復投与後、ＴＲＨ結合は線条体で減少し、海馬で増加しており、2) HPDを前処置すると MAP反復投与によるＴＲＨ結合の減少は阻止され、3) MAPを持続投与すると線条体を含むいずれの脳部位でもＴＲＨ結合は対象群に比し不変であった。これらの成績は、MAP反復投与によりドパミン放出促進を介した線条体ＴＲＨ受容体の変化が生じ、MAP持続投与ではこうした変化が見られないことを示している。このＴＲＨ結合に見られた変化は、MAP反復投与による異常行動の増強（逆耐性現象）が持続投与では起こらず反復投与でのみ起こり、それがHPDの前処置で阻止されるという従来の行動薬理学的知見と一致している。

Key word：　Methamphetamine, TRH receptor, Reverse tolerance phenomenon

動物に Methamphetamine(MAP) を反復投与していると異常行動が増大（逆耐性現象）し[4,10]、線条体や側坐核のドパミン受容体が変化する[1,6]ことが知られている。さらにこの MAP反復投与により出現する異常行動は、ドパミン遮断薬により阻止される[3]。また慢性投与の場合、MAP1日投与量は同じでも、持続投与ならば異常行動に逆耐性現象はみられない[7]。昨年の本学会において、われわれは MAP14日間反復投与ラットでの線条体の特異的thyrotropin-releasing hormone (TRH) 結合の有意な減少を報告し、MAP反復投与により生ずる逆耐性現象に脳内 TRHが関与している可能性について考察した。今回われわれは、この逆耐性現象と脳内 TRHの関係をさらに検討するために、1)28日間 MAP反復投与後の脳部位別特異的ＴＲＨ結合の変化、2)ドパミン遮断薬であるhaloperidol (HPD) 前処置によって MAP反復投与による脳部位別特異的 TRH結合の変化が修飾されるかどうか、さらに3) MAPを反復投与ではなくペレットを用いて持続投与した場合の脳部位別特異的 TRH結合の変化を調べた。

［対象と方法］

８週令のＳＤ系雄ラットを用い、室温24℃、12時間の明暗サイクル、食餌および水は自由にとれる条件下で飼育した。実験１：14匹のラットを、MAP群、Control群に分け、それぞれ MAP 4mg/kg,生理的食塩水を１日１回ほぼ一定時刻に28日間腹腔内投与し、断薬１週間後の時点で断頭屠殺した。実験２：HPD 2mg/kg のみ、あるいは毎回 HPD 2mg/kg 腹腔内投与５分後に MAP4mg/kgを14日間腹腔内反復投与し、断薬１週間後の時点で断頭屠殺した。実験３：12匹のラットを、MAP群、コントロール群各６匹に分け、ネンブタール50mg/kg 腹腔内投与にて麻酔した後、MAP 群には皮下に MAP 4

mg/kg/day 放出するように調節したペレット（alzet, model 2ML2）を植え込み、コントロール群には同様の操作のみ行った。その13日後、同量の麻酔を行い MAP群から植え込んだペレットを取り出し、さらにこの5日後に断頭屠殺した。いずれの実験も、断頭屠殺後ただちに氷上にて、Glowinski & Iversen の方法[2]に準じて、各脳部位組織に分け湿重量を測定した後 -70℃で保存し、radioreceptor assay法[8,9]により特異的 TRH結合を検討した。蛋白量は Lowryらの方法[5]に従って測定した。

［結果と考察］

昨年われわれは、14日間 MAP 4mg/kg 腹腔内反復投与7日後に特異的 TRH結合が有意に減少することを報告した。今回実験1で、同量の MAPを4週間投与した7日後では、線条体での有意な減少とともに海馬で有意な増加がみられた（表1）。線条体に関しては、昨年の結果とほぼ同様であった。MAPの作用は脳内ドパミン系を介して生じると考えられており、事実 MAP投与により生ずる異常行動はドパミン遮断薬で阻止される。実験2では HPD前処置後 MAPを投与して特異的 TRH結合の変化を検討したが、線条体における MAP反復投与による特異的 TRH結合の減少は阻止されていた。HPD単独投与では、いずれの脳部位でも特異的 TRH結合に影響はなかった（図1）。この成績は、MAP反復投与後にみられる線条体特異的 TRH結合の減少が MAPによるドパミン放出促進を介した二次的な変化であることを示唆するものである。これを支持する報告もいくつかある。例えば Winokur ら[12]は、脳室内 6-hydroxydopamine注入後のいくつかの脳部位で TRH含量が増加することを報告しているし、Spindelら[11]は amphetamine(AMP) 投与2時間後より TRH含量が減少すること、HPD や α-methyl-tyrosine の前処置でドパミン系を遮断するとこの AMPの TRHに対する作用が阻止されることを報告している。HPD前処置により異常行動が阻止されると同時に特異的 TRH結合の減少も阻止されるという今回の成績は、逆耐性現象における TRHの関与を示すものとして興味深い。

また MAPを反復投与ではなく持続投与すると異常行動の増強は出現しないといわれている。実験3では、持続放出ペレットを皮下に13日間植え込んで、5日後に特異的 TRH結合を測定した。その結果、線条体を含めいずれの脳部位でも特異的 TRH結合に変化は見られなかった（表2）。

以上にのべたように1)異常行動に逆耐性が出現する MAP反復投与では、線条体における特異的 TRH結合が有意に減少する、2)ドパミン受容体を遮断し異常行動の出現を阻止する HPD前処置で1)の TRH結合の減少が阻止される、3)異常行動に逆耐性現象が出現しない MAP持続投与では線条体

表1. Methamphetamine(MAP)28日間反復投与7日後の脳部位別特異的TRH結合の変化(fmol/mg protein)

	Frontal cortex	N. accumbens	Striatum	Amygdala + Pyriform cortex	Hippocampus
MAP group	38.2±1.8	48.0±2.4	13.7±1.6*	154.0±12.9	68.5±3.0**
Control group	44.5±2.6	44.7±0.9	21.5±2.4	150.2±11.7	56.2±3.0

mean±S.E.M. *p<0.05 **p<0.02

表2. Methamphetamine(MAP)13日間持続皮下投与5日後の脳部位別特異的TRH結合の変化 (% of control)

Frontal cortex	N. accumbens	Striatum	Amygdala + Pyriform cortex	Hippocampus
105.2±10.9	89.1±6.3	88.8±6.4	107.3±5.5	124.3±6.0

mean±S.E.M.

を含めいずれの脳部位でも特異的TRH結合に変化がみられなかったことの3点から逆耐性現象に関連してMAPによるドパミン放出促進を介して線条体TRH受容体の変化が生じることが示唆された。

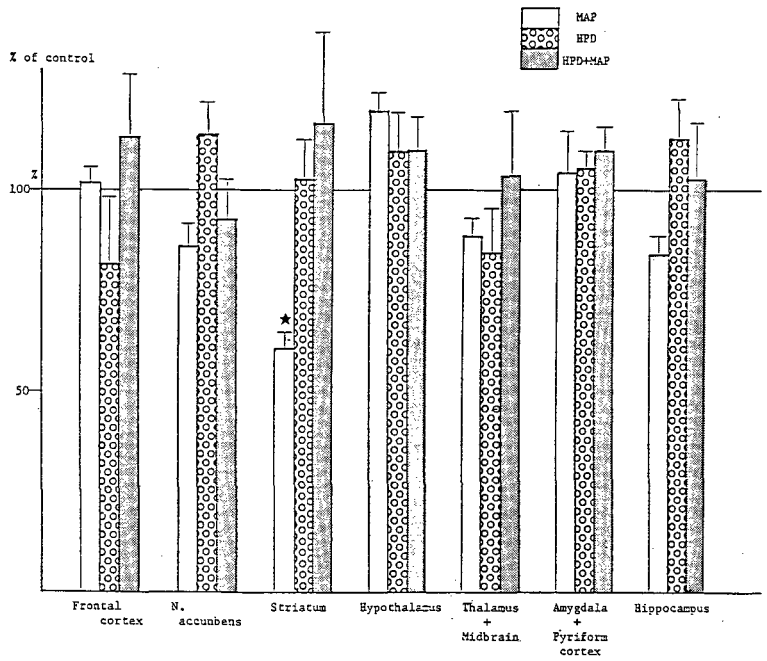


図1
脳部位別特異的TRH結合
MAP：MAP 4mg/kg、HPD：HPD 2mg/kg、HPD+MAP：HPD 2mg/kg 前処置後 MAP 4mg/kg、それぞれ14日間反復腹腔内投与し、1週間の断薬後に検討した。値は、対象群に対する百分率の平均±標準誤差(n=5)で示している。★印は、対象群に対する有意差($p<0.01$)を示す。

［参考文献］

1) Akiyama, K., Sato, M. and Otsuki, S. (1982) Biol. Psychiatry, 17, 223-231
2) Glowinski, J. and Iversen, L. L. (1966) J. Neurochem., 13, 655-669
3) 柏原健一、秋山孝子、佐藤光源、大月三郎 (1984) 精神神経薬理、6, 181-189
4) Klawans, H. L. and Mangolin, D. I. (1975) Arch. Gen. Psychiatry, 32, 725-732
5) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randell, R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265-275
6) Muller, P. and Seeman, P. (1979) Eur. J. Pharmacol., 55, 149-157
7) Nelson, L. R. and Ellison, G. (1978) Neuropharmacol., 17, 1081-1084
8) Ogawa, N., Yamawaki, Y., Kuroda, H., Ofuji, T., Iotaka, E. and Kito, S. (1981) Brain Res., 205, 169-174
9) Ogawa, N., Yamawaki, Y., Kuroda, H., Nukina, I., Ota, Z., Fujino, M. and Yanagihara, N. (1982) Peptides, 3, 669-677
10) Segal, D. S. and Mandell, A. J. (1974) Pharmacol. Biochem. Behav., 2 249-255
11) Spindel, R. J., Pettibone, D. J. and Wurtman, R. J. (1981) Brain Res., 216 323-331
12) Winokur, A., Kreider, M. S., Dungan, J. and Utiger, R. D. (1978) Brain Res., 152, 203-208

154. 扁桃核キンドリングラットの扁桃核・海馬スライスに於ける ibotenic acid 刺激による phosphatidylinositol turnover の変化

山田了士・秋山一文・氏家　寛・佐藤光源・大月三郎
（岡山大・医・神経精神）

〔要　約〕

海馬を中心とする大脳辺縁系のグルタミン酸性神経回路はkindling現象に重要な役割を担っていると考えられる。近年、グルタミン酸受容体のsubtypeのなかに、その活性化に応答してphosphatidylinositol(PI) turnoverを生じさせるものが見い出されている。本研究では、ibotenic acidによって刺激されるPI turnoverを、扁桃核kindling ratの扁桃核および海馬において検討した。PI turnoverの測定は、扁桃核電気刺激により stage 5の全身痙攣を連続20回繰り返したratで、最終刺激から24時間後または1週間後において、[^{3}H]inositol 1-phosphateの蓄積を指標にして行った。Ibotenic acid 10^{-3}M 添加時における[^{3}H]inositol 1-phosphateの蓄積は、最終刺激から24時間後の kindling群では、扁桃核，海馬ともに、それぞれ対照の291%($p<0.01$)、171%($p<0.05$)にまで有意に増加し，最終刺激から1週間後のkindling群では，扁桃核で対照の271%まで有意($p<0.05$)に増加していた。1週間後のkindling群の海馬では，ibotenic acid 10^{-4}M 添加時で対照の139%まで有意な増加($p<0.05$)が見られた。これらのことはkindling現象における興奮性神経伝達機序に扁桃核、海馬のグルタミン酸受容体に共役するPI turnoverの亢進が関与していることを示すと考えられる。

Key word：kindling, ibotenic acid, phosphatidylinositol turnover

kindlingは初めに痙攣閾値下であった電気刺激の反復でやがては全身痙攣に発展する現象をいう。電気生理学的及び神経解剖学的研究によるとkindling現象に対応して刺激部から広範な他の脳部位に至る経シナプス性の変化が起こり、それが脳に長期持続性の痙攣準備状態をもたらせると考えられている。興奮性アミノ酸であるグルタミン酸がこの痙攣準備状態に関与している可能性は以前から指摘されているが、今のところそれを明確に裏づける成績は乏しい。

近年、グルタミン酸受容体のsubtypeの中に，細胞内情報伝達機構に関与するphosphatidyl inositol(PI) turnoverに共役するものが見いだされている(4)。本研究では、kindling現象にグルタミン酸神経伝達機構の異常な亢進が存在するか否かを知る目的で、扁桃核kindling ratの扁桃核及び海馬において、ibotenic acid(IBO)添加時のPI turnoverの検討を行った。

（実験方法）

1）kindling ratの作製。

SD系雄性ラット(体重260～290g)を12時間毎の明暗サイクルにて飼育した。Pentobarbital麻酔下に、左側扁桃核に慢性深部電極を挿入し、400μA，60Hz，正弦波の刺激を1日1回、1秒間加えた。運動発作症状はRacineの分類(6)に準じて5段階に分類した。Stage 5痙攣が20日連続してみられるようになったkindlingラットを最終刺激から24時間又は1週間経た後にPI turnoverの実験に供した。

2）PI turnoverの測定法。

脳スライスを用い、ほぼBerridgeらの方法(2)に従った。測定法の詳細は本学会で発

表する別の報告(1)に譲る。ただし,isotopeとしてはL-myo-[1,2,[^{3}H](N)]inositol (NEN,specific activity 59.4Ci/mmol)を1 tubeあたり1.8μCi使用した。

(結果)

結果はFigureおよびTableに示す。最終刺激から24時間後のkindling群では,IBO 10^{-3}M添加時の[^{3}H]inositol 1-phosphate([^{3}H]IP$_1$)蓄積が扁桃核、海馬に於てそれぞれ対照の291%($p<0.01$)、159% ($p<0.05$)にまで有意に増加(基準値以上の蓄積を指標にすると扁桃核、海馬で対照の411%、175%まで増加)していた。海馬ではIBO 10^{-4}M 添加時でも、両群間で有意差が認められた。最終刺激から1週間後のkindling群では,IBO 10^{-3}M 添加時の[^{3}H]IP$_1$蓄積が、扁桃核で対照の271%(基準値以上の蓄積分では407%)まで有意に増加していた。海馬では,ibotenic acid 10^{-3}Mでは両群間に有意差はなかったものの、10^{-4}Mではkindling群で有意($p<0.05$)に増加していた。

(考察)

Ibotenic acid刺激によるPI turnoverはkindling群で、1)最終刺激24時間後での扁桃核、海馬、2)同1週間後の扁桃核で有意に亢進していた。Iadorolaら(3)の報告でも、stage 3～4に達した扁桃核kindling ratの最終刺激から24時間後で、海馬において同様な所見がみとめられており、今回の研究で彼らの成績が確認された。この海馬での変化の時間的経過について、彼らは最終電気刺激から1ヶ月の期間をおくことで正常に復したと報告している。今回の研究でも24時間後と1週間後における海馬での成績を比較すると、後者でPI turnover亢進の減弱(10^{-4}M IBOでのみ有意な増加)が認められ、少なくとも海馬での変化は一過性のneuronal hyperactivityでありえるという可能性を否定できない。一方、今回の我々の成績で最も注目すべきことは、刺激部位の扁桃核におけるPI turnover亢進の著しい増強が明らかにされたことであり、それは海馬より一層著明であった。そして最終刺激から1週間後でも24時間後と同程度の増加が維持されていた。この理由は刺激部位である特異性から生ずるためなのか、kindling現象の維持に関係した永続的変化に扁桃核自身が関わっているためなのか、今後検討する余地を残す問題といえよう。

IBO刺激によるPI turnoverは2-amino-4-phosphonobutyrate(APB)に依って選択的に阻止される(4)。いわゆる"APB-sensitive site"はCa^{++},Cl^-依存性の[^{3}H]glutamate binding siteにほぼ対応すると考えられている。このCa^{++},Cl^-依存性[^{3}H]glutamate binding siteはkindling ratの海馬では不変であると報告(7)されており、kindling現象における興奮性アミノ酸受容体と結び付いたPI turnoverの増強は、受容体認識部位の増加によるものではなく、膜における興奮性機序の亢進と何等かの形で関係しているものと考えられる。

Petersonら(5)は興奮性アミノ酸に対する各種antagonistsを扁桃核kindling ratの脳室内に注入し、seizure stageおよびafterdischargeの長さへの影響を検討している。それによると、扁桃核kindlingではむしろN-methyl-D-aspartate型receptorに対するantagonistである2-amino-5-phosphonoheptanoic acid(APH)が抑制的に作用し、むしろAPBは無効であると報告されている。一方、"APB-sensitive site"に対応するとされるIBO刺激性PI turnoverがkindlingで有意に増加しており、興奮性アミノ酸受容体subtypeとkindling現象との関連については必ずしも明確ではなく、さらに検討が必要

と考えられる。

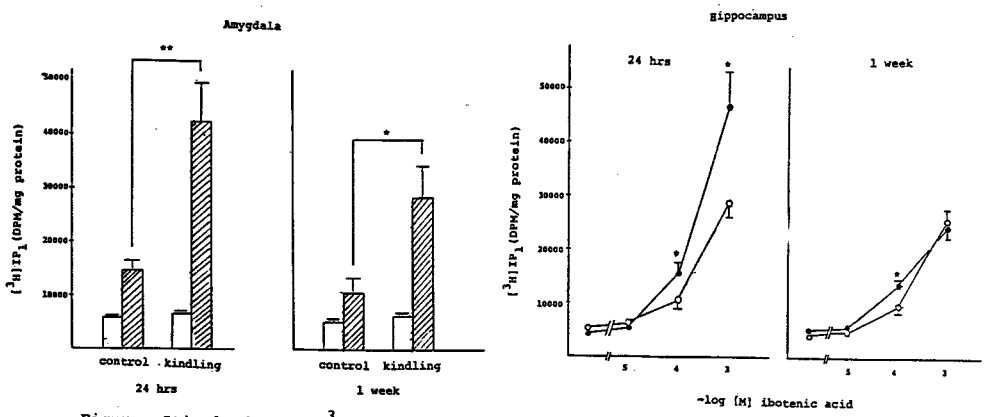


Figure. Stimulation of $[^3H]IP_1$ formation elicited by ibotenic acid in slices from amygdala and hippocampus prepared from brains of amygdaloid kindling rats. Values are expressed as mean ± S.E.M. of 4 determinations (amygdala) or 6-7 determinations (hippocampus).
* : $p<0.05$ as compared to control. (Student's t test)
** : $p<0.01$ as compared to control. (Student's t test)
(□) : basal level (▨) : $+10^{-3}$M IBO (O) : control (●) : kindling

Table. Stimulation of $[^3H]IP_1$ formation elicited by ibotenic acid in slices from amygdala and hippocampus prepared from brains of amygdaloid kindling rats. Values are expressed as mean ± S.E.M. of DPM($[^3H]IP_1$)/mg protein. Values in the parentheses represent ibotenic acid stimulated accumulation of DPM/mg protein above basal levels.
* : $p<0.05$ as compared to control. (Student's t test)
** : $p<0.01$ as compared to control. (Student's t test)

Amygdala

		basal	Ibotenic acid 10^{-3}M
24 hrs	control	5882 ± 516	14565 ± 1908 (8683 ± 1403)
	kindling	6661 ± 680	42381 ± 7175** (36721 ± 7055**)
1 week	control	5126 ± 623	10491 ± 2652 (5365 ± 2065)
	kindling	6584 ± 1119	28395 ± 6205* (21811 ± 5567*)

Hippocampus

		basal	Ibotenic acid 10^{-5}M	Ibotenic acid 10^{-4}M	Ibotenic acid 10^{-3}M
24 hrs	control	5585 ± 470	6400 ± 509 (815 ± 325)	10668 ± 871 (5083 ± 1043)	29158 ± 3135 (23573 ± 3218)
	kindling	5223 ± 360	5964 ± 571 (741 ± 351)	15689 ± 1776* (10446 ± 1573*)	46490 ± 6709* (41268 ± 6440*)
1 week	control	4446 ± 199	4976 ± 259 (530 ± 140)	9934 ± 1094 (5488 ± 954)	25696 ± 2016 (21250 ± 1905)
	kindling	4528 ± 277	5296 ± 225 (768 ± 198)	13805 ± 843* (9276 ± 981*)	24875 ± 2166 (23947 ± 2244)

（文献）

(1)秋山一文、山田了士、氏家寛、佐藤光源、大月三郎(1986)神経化学、25 (2)Berridge, M.J., Downes, C.P., & Hanley, M.R. (1982) Biochem. J., 206, 587-595. (3)Iadorola, M.J., Nicolletti, F., Naranjo, J.R., Putnum, F. & Costa, E. (1986) Brain Res., 374, 174-178. (4)Nicolletti, F., Meek, J.L., Iadorola, M.J., Chuang, D.M., Roth, B.L. & Costa, E. (1986) J. Neurochem., 40, 40-46. (5)Peterson, D.W., Collins, J.F., & Bradford, H.F. (1983) Brain Res., 275, 169-172. (6)Racine, R., (1972) Electroenceph. Clin. Neurophysiol., 32, 281-294. (7)Slevin, J.T. & Ferrada, L.P. (1985) Exp. Brain Res., 89, 49-58.

155. てんかんマウス（El）脳のムスカリン性アセチルコリン・レセプターとイノシトール燐酸生成反応の異常

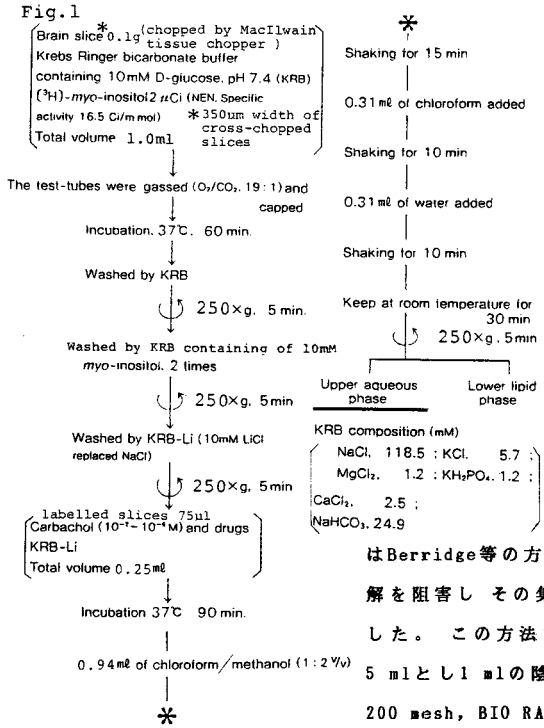
藤田精一郎・森　浩一・植松直道・前久保邦昭・山上　栄
川北幸男　（大阪市立大・医・神経精神）

〔要　約〕

痙攣素因を有するElマウス脳内ムスカリン性アセチルコリンレセプター（mAch・Rと略す）と節後神経伝達系の一つと考えられているイノシトール燐酸生成反応(2,3)との関係について調べた。生後25日、50、75日のElマウス（対照はdd-Y系マウス）を用い発作間歇期において海馬、中隔野、線条体、大脳皮質の4部位につき検討した。Berridge等(1)の方法に従い10 mM Li^+存在下にて[^{3}H]-inositol monophosphate（[^{3}H]-Ins1Pと略す）の集積を測定した。10^{-2}～10^{-6}Mの各濃度carbacholに対する[^{3}H]-Ins1P集積の用量依存曲線を作成し、Jacobson、Fisher(4,5)の方法によりHill式、1 siteと2 site modelの各parameterを算出した。各実験でのHill係数は1に近い値を示した。又、1 site modelにより大なる適合性を示した。各日令、各部位にてEC_{50}値は前報(6)のagonist binding assayにおけるlow affinity binding site（以下L-siteと略す）のKdと一致した。EC_{50}値はEl、dd-Y両群間で有意な差は認められなかった。発育期におけるIns1P集積反応の最大反応量の変化は中隔野にてはL-siteの変化とほぼ一致した結果を得た。一方、海馬に於ては痙攣発作が頻回化の端緒に一致して最大反応量の有意なる増大を認めた。

Key word：　El mouse, Muscarinic acetylcholine receptor, Inositol phosphate

Fig.1



痙攣素因を有するElマウス脳mACh・Rの発育期における変化は痙攣準備性に対応していること、また海馬に於ては痙攣発作によりmACh・Rのlow affinity binding site（L-site）の反跳的増加を示すことを前報(6)にて報告した。今回mACh・Rを介したInositol-1-phosphate（Ins1P）の生成反応（以下IP反応と略す）を調べ両者の関連を検討した。

〈実験方法〉　実験動物の飼育、発作誘発およびマウス脳の部位分けについては前報(6)に従った。今回は日令が生後25、50、75日のマウスで、海馬、中隔野、線条体、大脳皮質の4部位を調べた。対照はdd-Y系マウスとした。IP反応はBerridge等の方法(1)に準じた。Li^+（10mM）存在下Ins1Pの水解を阻害しその集積を測定した(1,9)。Fig. 1に実験の概要を示した。この方法で得られた水溶性分画0.75 mlに蒸留水を加え5 mlとし1 mlの陰イオン交換樹脂AG1-X8（formate form ;100-200 mesh, BIO RAD)にかけた。Fig. 2に示すa～eの5種の溶液に

て分離溶出した。溶出液は10倍量のInsta-Gelを加えGel状態にして液シンで放射活性を測定した。油層は減圧濃縮し1mlのchloroformに溶解、その0.1 mlを取りBartlettの方法により燐含量を測定した(10)。

Fig.2 Elution of water-soluble extracts of the mouse cerebral cortex by anion-exchange columns

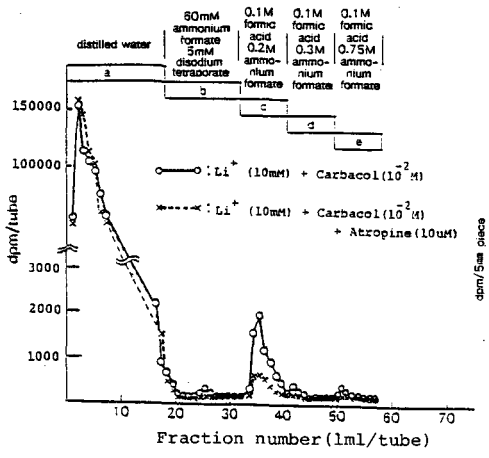


Fig.3

Identification of "C" fraction by paper chromatography

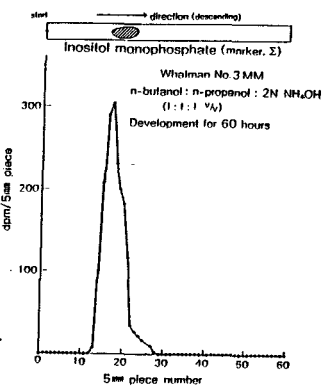


Table 1はLi⁺ (10 mM) 存在下ではIns1Pが分解されず集積すること、Li⁺存在下でcarbacholによるIns1P生成がmAch·Rを介した反応であることを示している。Fig. 4に海馬に於るIP反応の用量依存性曲線を示す。Fig. 5下に示した式にてJacobson、Fisherの方法(4,5)により前報と同様にしてHill係数、1 site、2 site modelの各parameterを算出した。1 site, 2 site modelの選択は赤池の情報量基準 (Minimum AIC Examination) によった。

〈結果〉 Hill係数は全ての実験において0.86～1.11のrangeの値を示した（結果の詳細は学会当日スライドで示す)。 agonist binding assay における値は0.45～0.55のrangeであったが、IP反応の値は1により近い値であった。Table 2にはEC_{50}値を示した。この値は統計学的検定によってagonist binding assayのL-siteのKdと有意な差は認められなかった。（結果の詳細は学会当日スライドで示す)。 EC_{50}値は E1とdd-Yとの間で各日令、 各部位で有意な差は認められなかった。 Fig. 5には4部位の最大反応量(Best fit maximum：f max と略す) の発育期変化を示した。75日令E1の中隔野でf maxは有意に低値を示した。 50日令のE1海馬で f maxは有意に低く、 75日令ではf maxは有意に高い値を示した。

Fig.4 Dose response curve for carbachol-stimulated inositol monophosphate accumulation

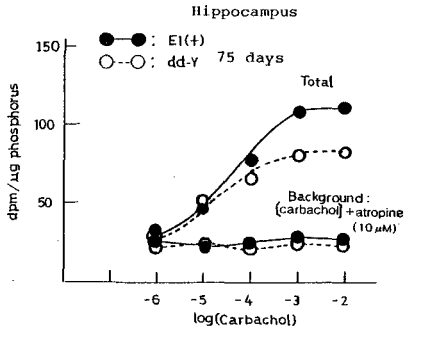


Table 1

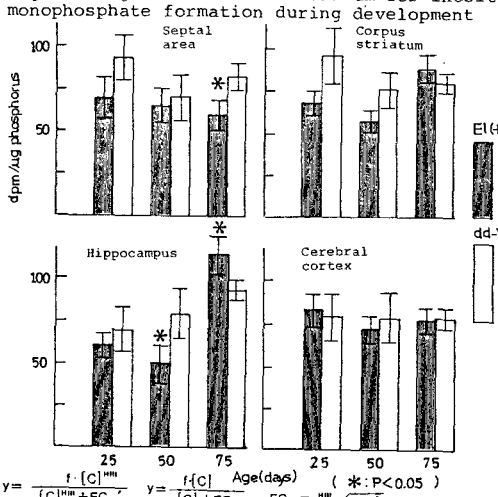
Pharmacology of carbachol-stimulated Ins1P formation in cerebral cortex slices

Incubation	[³H]-Ins1P (dpm/μg phosphorus)
Li(10mM)+carbachol(10mM)	92.80±9.06
Li(10mM)	29.47±8.17 *
carbachol(10mM) only	40.73±6.74 *
Li(10mM)+carbachol(10mM) +atropine(10μM)	23.68±9.97
Li(10mM)+carbachol(10mM) +D-tubocurarine(10μM)	88.29±7.11 *

(*:P<0.05)

〈考察〉 E1脳のmAch·R刺激によるIP反応は対照のdd-Yと比べて海馬と中隔野とで有意のある変化を示し線条体と大脳皮質とでは差はみられなかった。前報で報告したreceptorの変化と今回の節後

Fig.5 Changes of best fit maximum for inositol monophosphate formation during development



神経伝達系の変化によりEl の海馬、中隔野で神経伝達機能が障害されていることが示唆される。IP反応の解析の結果よりL-siteが節後神経伝達系と共役している可能性も示唆された。その可能性の確認には同一の sliceとbufferを用いた agonist binding assayと IP反応のそれぞれの分析値の一致性を検討する必要があるだろう。痙攣発作とIP反応との関連を発育期での変化からみると以下の様になる。発作間歇期El mouseの海馬 mAch·R、L-siteは25日以降はdd-Yと比較して低値を示すこと、また発作誘発刺激中、痙攣発作中にて同部位L-siteは反跳的増加を示すこと(6,7,8)から発作経験の端緒にある生後50日では receptor siteの変化すなわち L-siteのdown regulationでもってIP反応が抑制されているものと考えられる。つまりこの時期発作間歇期にては痙攣発現に対するなんらかの抑制機構が機能しているのではないか。しかし75日令となり痙攣発作頻回化の開始時期に一致して海馬に於ては L-siteとIP responseとの関連性が他の部位とは異なった様式を取るために間歇期IP反応の亢進をきたしたものと考えられる。

Table 2 Changes of EC_{50} values during development in septal area, hippocampus, corpus striatum and cerebral cortex of El(+) and dd-Y mice

Age (days)		Septal area	Corpus striatum	Hippocampus	Cerebral cortex
		($M(\times10^5)$)			
25	El(+)	2.02±1.27	2.94±0.61	2.32±0.14	2.13±0.42
	dd-Y	7.94±2.17	3.91±3.15	5.46±3.36	2.19±0.97
50	El(+)	3.69±3.79	7.01±3.66	3.71±3.57	2.08±1.59
	dd-Y	3.33±2.50	5.33±3.71	5.69±2.29	8.96±3.46
75	El(+)	3.79±2.98	3.30±1.70	3.86±2.43	5.50±2.85
	dd-Y	3.73±1.07	4.53±1.83	3.16±2.35	2.29±0.65

今回の実験ではイノシトール燐酸代謝回路の代謝産物の1つである InsIPの集積でもって同代謝回路の変化を推測した。同回路の他の産物であるイノシトール3燐酸は細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 動員に関与していることが Berridge等により報告されている(2)。El 海馬におけるIP反応の亢進はイノシトール3燐酸の増加、細胞内 Ca^{2+} の増加、更に海馬ノイロンからのてんかん性異常放電の発生に波及していくという機序が考えられよう。(本研究の一部は厚生省神経疾患研究委託費#85-01の助成を受けた。)

〈文献〉 1) Berridge, M. J., Downes, C. P., Hanley, M. R. Biochem. J. 206, 587, 1982. 2) Berridge, M. J. Biochem. J. 212, 849, 1983. 3) Fisher, S. K., Frey, K. A., Agranoff, B. W. Phospholipids in the nervous system. Vol. 1, 363, 1982. 4) Fisher, S. K., Klinger, P. D., Agranoff, B. W. J. Biol. Chem. 258, 7358, 1983. 5) Jacobson, M. D., Wusteman, M., Downess, C. P. J. Neurochem. 44, 465, 1985. 6) 藤田精一郎、森浩一、植松直道、川口賢治、千頭孝史、山上栄、川北幸男。神経化学 23, 24, 1984. 7) 森浩一、藤田精一郎、植松直道、川口賢治、千頭孝史、山上栄、川北幸男。厚生省神経疾患研究委託費「難治性てんかんの成因と治療に関する研究」(#84-05) 昭和59年度報告書 181, 1984. 8) Fujita, S., Mori, K., Uematsu, N., Kawaguchi, K., Chikami, T., Yamagami, S., Kawakita, Y. Folia Psychiat. Neurol. Jpn. 39, 435, 1985. 9) Sherman, W. R., Learitt, A. C., Honchar, M. P., Hallcher, L. M., Phillips, B. E. J. Neurochem. 36, 1947, 1981. 10) Sekar, M. C., Roufogalis, B. D., Biochem. J. 223, 527, 1984.

156. El マウスの発作感受性に関与する大脳皮質シナプトゾーム蛋白

古塚大介・山上　栄・千頭孝史・平山栄一・撫井弘二
森　浩一・川北幸男　　(大阪市立大・医・神経精神)

〔要　約〕

Elマウスの発作では、発作直後の大脳皮質synaptosomesのin vitroにおける蛋白合成が、発作間歇期に比べて有意に促進された。Synaptosomesにおける蛋白とTCA不溶性蛋白のSDS-PAGEによる分析では、分子量が15K、44k、54K、67K、120Kの５種のmajor bandsと20－30種のminor bandsの存在が確認された。さらに、ゲルをdensitometerにかけ、major bandsの割合を百分率で比較した。その結果、44Kと54Kとが16－18％を占め、その他のmajor bandsは６％前後であった。この傾向はEl(+)、ddY、El(o)で大差が見られなかった。ただ、El(+)の発作間歇期における67K蛋白分子は、El(o)やddYの場合より有意な低値を示し、発作によりさらに減少を示した。autoradiographyによる解析では、El(+)において 30K、44K、67Kの３種の新生蛋白分子が検出され、El(o)やddYでも質的に同様な蛋白が認められた。これらの結果から、synaptosomesの67K蛋白分子が、発作感受性と何等かの相関を有することが推測された。

Key word : El mouse, cerebral cortex, synaptosomal protein

〈序文〉　Elマウス脳では、発作感受性に関与する神経伝達物質の代謝障害が指摘されている(6)。これら伝達物質の合成を調製する因子として、Synapseでの酵素蛋白の動向が注目されている。そのため、われわれは、Synapseの構成蛋白の組成、及びin vitroでの合成蛋白と発作感受性との関連について追求した。

〈方法〉　１）実験動物：実験にはEl系とddY系マウスを用いた。Elマウスは生後25日目より週一回の放り上げ刺激を加えたものをEl(+)マウスとし、生後１度も放り上げ刺激を与えないものをEl(o)マウスとし、実験に供した。２）Synaptosomesの調製：マウス脳より大脳皮質を摘出し前報(2,5)に従ってFicoll-Sucrose不連続密度勾配によるfloating method(1)を用いてSynaptosomes画分を調製した。３）In vitroにおけるSynaptosomes蛋白への[^{14}C]-leucineの取り込み、Synaptosomesへの[^{14}C]-leucineの取り込みの反応は前報(5,8)に従った。a) Synaptosomes蛋白画分の調製：反応は氷冷した10％ leucineを含むMedium H (0.32M-Sucrose, 1 mM-$MgCl_2$, 1 mM-Tris-HCl, pH 6.8) を等容加え、incubationを終了した。この混液を12,000 g、20分遠心し、生じた沈殿を10％ leucineを含むMedium Hで３回洗滌して、未反応の[^{14}C]-leucineを除去し、Synaptosomes蛋白画分とした。b) TCA不溶性synaptosomes蛋白画分の調製：反応は氷冷した10％ leucineを含む10％TCAの等容を加えて、incubationを終了した。この混液を12,000 g 20分遠心し、生じた沈殿をさらに10％leucineを含む5％ TCAで２回洗滌し、最後に10％ leucineを含むMedium Hで１回洗滌してTCA不溶性synaptosomes蛋白画分を分離した。また、Synaptosomes蛋白に取り込まれた^{14}Cは前報(5)に従って計測した。４）SDS-PAGEのための試料調製：両Synaptosomes画分とも終濃度2～5 mg protein/mlになるように10 mM-Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM-EDTA-4H, 1％SDS, 5％ β-mercaptoethanolを加え、充分にhomogenateを行った。これを100℃、５分加熱し、冷却後に12,000 g 10分遠心し、その上清を試料として用いた。５）SDS-PAGE：電気泳動には4－30％ gradient polyacrylamide

gel (Pharmacia)を使用した。泳動に用いたbufferは40 mM-Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM-sodium acetate, 2 mM-EDTA-4H, 0.2%SDSであった。70V、1時間の予備泳動後に試料を添加した。電気泳動は最初に300V、10分で行った後、次いで150V、3.5時間行った。標準蛋白としてはFig. 3で示した5種の蛋白を使用した。泳動終了後、25% isopropanol, 10% acetic acid中で蛋白を固定した。これを47.5% ethanol, 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250溶液中で染色後、40% ethanol, 3% acetic acid溶液中で脱色した。6) autoradiography：脱色終了後、gelを55% methanol, 2% glycerol溶液中で脱水した。このgelをENLIGHTNING (New England Nuclear)中で30分間、振盪後、乾燥し、Kodak X-Omat AR film上で－80℃、4－12週間露出した。

〈結果〉 Table 1では間歇期のEl(+)とEl(o)およびddYマウスの大脳皮質synaptosomesにおけるTCA soluble画分とTCA insoluble蛋白への^{14}Cの取り込みを比較した。これらマウスの間で両画分への^{14}Cの取り込みについて有意差は見出せなかったが、発作直後のEl(+)マウスの TCA insoluble蛋白への^{14}Cの取り込みでは間歇期に比べて有意な増加が生じた。Fig. 1と4にSynaptosomesの蛋白とTCA insoluble蛋白のSDS-PAGEによる分析のパターンを示した。5種の major bands と20～30種の minor bands 検出された。この結果はいままでに報告された結果と大体類似したパターンが得られた(9)。major bands の分子量をFig. 3の標準曲線から算出すると、15K、45K、67K、120K であった。gel電気泳動のパターンの相違を量的に検討するために、densitometerでscanしたdataをFig. 2と5とに示した。その結果を百分率で表すと、Table 2に示すように、44Kと54Kとが16～18%を、他のbandsは6%前後であった。El(+)の間歇期における67K蛋白は、El(o)、ddYより有意な低値を示し、発作直後でさらに減少した。autoradiographyによる解析では、30K、44K、67Kの3種の新生蛋白分子がみられ、El(o)やddYでも質的に同様なパターンが得られた。

Table 1 Radioactivities of TCA soluble and insoluble fractions in synaptosomes from El(+), El(o) and ddY mouse cerebral cortices.

Fractions	El(+)		El(o)	ddY
	Interictal periods	Postconvulsions		
dpm in TCA soluble fra. /mg of synapt. protein×10^{-3}	2376 ± 69 (5)	2741 ± 54 (4)	2338 ± 117 (5)	2396 ± 144 (5)
dpm in TCA insoluble fra. /mg of synapt. protein	1764 ± 191 (5) *	2639 ± 251 (4)	1673 ± 165 (5)	1689 ± 155 (5)

Experimental numbers are expressed as number in parenthesis.
* $p<0.05$

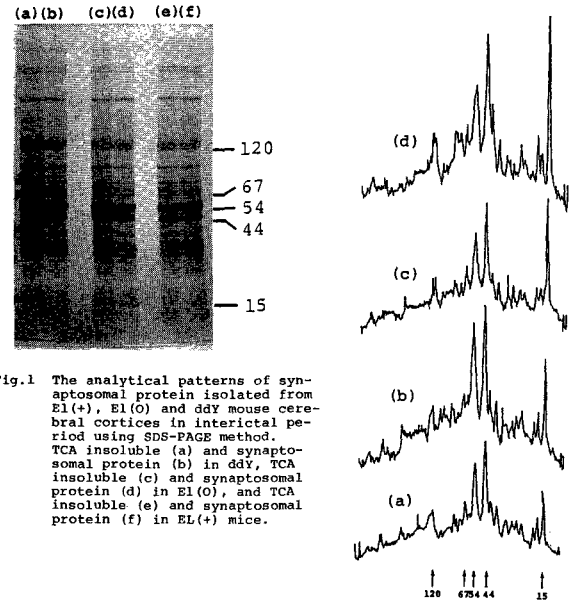


Fig.1 The analytical patterns of synaptosomal protein isolated from El(+), El(O) and ddY mouse cerebral cortices in interictal period using SDS-PAGE method. TCA insoluble (a) and synaptosomal protein (b) in ddY, TCA insoluble (c) and synaptosomal protein (d) in El(O), and TCA insoluble (e) and synaptosomal protein (f) in EL(+) mice.

Fig. 2 Densitometric scans of the electrophoretogram in synaptosomal protein. Synaptosomal (a) and TCA insoluble proteins (b) in interictal period, and TCA insoluble proteins of El(O) (c) and ddY (d) mouse cerebral cortices.

〈考察〉 El(+)マウスの固有の放り上げ刺激により惹起された痙攣によって、synaptosomes の蛋白合成能は増大することが示された (Table 1)。電撃刺激による痙攣 (ECS)で

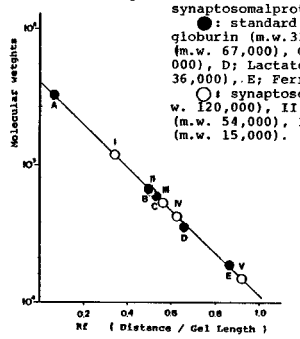


Fig.3 Determination of molecular weights of synaptosomalproteins.
●: standard proteins. A; Thyroglobulin (m.w.330,000), B; Albumin (m.w. 67,000), C; Catalase (m.w.60,000), D; Lactate dehydrogenase (m.w. 36,000), E; Ferritin (m.w.18,500).
○: synaptosomal proteins. I; (m.w. 120,000), II; (m.w. 67,000), III; (m.w. 54,000), IV; (m.w.44,000), V; (m.w. 15,000).

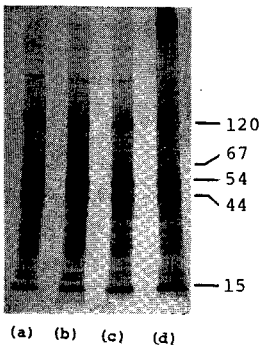


Fig.4 The analytical patters of synaptosomal protein in El(+) mouse cerebral cortices. Synaptosomal protein (a) and TCA insoluble protein (b) in interictal period, and synaptosomal protein (c) and TCA insoluble protein (d) prepared immediately after convulsion by tossed-up.

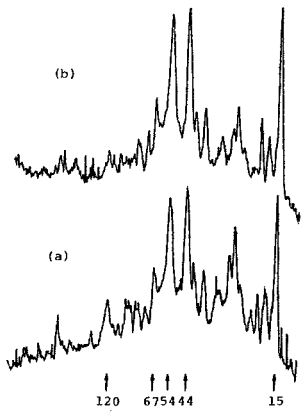


Fig.5 Densitometric scans of the electrophoretogram of TCA insoluble proteins in interictal period (a) and immediately after convulsion by tossed-up (b) of El mice.

は、Essman(4)はin vivoでのsynaptosomesの蛋白合成が顕著に抑制されることを見ている。これに対してDunnら(3)はsynaptosomesの蛋白合成はECSによって何等影響を被らないと反論している。また、Jørgensen(7)らは、D_1,D_2,D_3,synaptinなどのsynapseの特異蛋白がECSによって増加すると述べている。いずれにしろ、ECSによる痙攣は、通電効果の脳に対する影響などを考慮しなければならないので、自然発症てんかんモデルとしてのElマウスの発作と単純に比較することは困難であろう。Elマウスのsynaptosomes蛋白のうち分子量67Kのものが、ddYやEl(o)と比べて低値であり、発作により減少する傾向がみられ、また、autoradiographyによるin vitroの合成でもこの蛋白が検出されたことなどから、この67K分子が発作感受性と何等かの相関を予測させるものである。

Table 2 Percent distribution of the major bands in densitometric scans of electrophoretograms in synaptosomal proteins.

mol. wt. of major bands	synaptosomal proteins (%)				TCA insoluble proteins (%) of El(+)
	El(+)		El(o)	ddY	
	interictal period	Post convulsions			
120K	6.2 ± 1.9 (10)	4.1 ± 2.6 (3)	5.2 ± 0.9 (3)	6.0 ± 1.8 (4)	5.0 ± 1.7 (10)
67K	5.9 ± 2.5 (10)	3.3 ± 1.7 (2) **	9.7 ± 1.5 (2) **	9.8 ± 2.6 (3)	5.4 ± 2.2 (10)
54K	18.0 ± 3.4 (11)	14.5 ± 3.2 (3)	16.6 ± 3.8 (3)	20.8 ± 4.8 (4)	16.3 ± 3.9 (10)
44K	16.2 ± 4.7 (11)	20.1 ± 4.4 (3)	19.0 ± 5.1 (3)	16.8 ± 2.8 (4)	14.2 ± 2.5 (10)
15K	5.8 ± 2.4 (8)	5.8 ± 1.4 (2) **	11.0 ± 3.8 (3) **	8.5 ± 2.5 (4)	8.2 ± 3.9 (10)

Experimental numbers are expressed as number in parenthesis.
* $p<0.1$, ** $p<0.05$

〈文献〉 1) Booth, R. F. G., and Clark, J. B. (1978) Biochem. J. 176, 365−370. 2) 千頭孝史, 山上栄, 古塚大介, 森浩一, 川北幸男 (1983) 神経化学, 22, 396−398. 3) Dunn, A. J., and Bergert, B. J. (1976) J. Neurochem. 26, 369−375. 4) Essmann, W. B. (1974) Psychology of convulsive therapy. John Wiley and Sons, New York pp237−249. 5) 古塚大介, 山上栄, 千頭孝史, 平山栄一, 森浩一, 川北幸男 (1985) 医学のあゆみ, 134, 195−196. 6) Hiramatsu, M. (1983) Neurochem. Res.8, 1163−1175. 7) Jørgensen, O. S. (1979) Science, 205, 705−707. 8) Morgan, I. G. and Austin, L. (1969) J. Neurobiol. 2, 155−167. 9) Wang, Y.-J. and Mahler, H. R. (1976) J. Cell Biol., 71, 639−658.

157. El マウスの大脳皮質切片におけるアスパラギン酸の uptake と release—特にけいれん準備性との関係について

東原慶和・平松　緑・小川一寿・森　昭胤
（岡山大・医・脳研・機能生化）

〔要　約〕

放り上げ刺激を行ってけいれんが誘発されるようになったEl マウス(El(+))の大脳皮質切片における、^{3}H-aspartic acidの uptake と releaseを測定し、ddYマウス(ddY) 及び放り上げ刺激をしないEl マウス（無けいれん群、El(−))の場合と比較検討した。その結果、El(−) の aspartic acidの uptake は ddYに比し低く、El(+) の aspartic acid の uptake は El(−) に比して高かった。El(−) の spontaneous release及び、K^+-stimulated releaseは ddYに比し低く、El(+) の spontaneous releaseと K^+-stimulated release は El(−) に比べて高かった。又、El(−) の大脳皮質の aspartic acid及び glutamic acidの含量は、ddY のものに比べて高く、El(+) の aspartic acid 及びglutamic acid 含量は、El(−) に比べて低かった。

以上の実験成績から、①自然発症 El(−) の大脳皮質では興奮性アミノ酸の生合成系が促進しているか又は代謝系が抑制されていること、②けいれん準備性を獲得すると、興奮性アミノ酸の releaseが異常に促進されその結果含有量が低下することが示唆されたが、特に aspartic acidの releaseの促進が El マウスのけいれん発作発現に大きく関与していることが示唆された。

Key word :

El mouse cortex, aspartic acid, uptake and release

放り上げ刺激をしていないEl マウス（無けいれん群、El(−))の大脳半球の aspartic acid(Asp) は、対照マウス（けいれん素因を有しない CF_1 マウス）に比して高いが、El マウスと CF_1 マウスとの parabiosis によりEl マウスのけいれん発作は抑制され、その際大脳半球の Aspは低下すること(5) 、Valproate でEl マウスのけいれんは抑制されるが、それは大脳半球の Aspの低下に起因すること(9) 、放り上げ刺激によりけいれんが誘発されるようになったものの安静時(El(+))には、El(−) に比べて大脳半球の Aspが低下すること(3) が報告されている。最近、興奮性アミノ酸 receptor の agonistとしての N-methyl-D-aspartate とその antagonist についての知見が注目されている。Mori et al.(8)は、2-Amino-5-phosphonopentanoate(AP5)は El マウスのけいれん発作を抑制し、それは大脳半球の glutamic acidの低下に起因することを認めている。これらの成績は、El マウスのけいれん発作発現に大脳半球の Aspも関与している可能性を示唆している。

今回はEl マウスのけいれん発作発現機序をさらに検討するために、El マウス大脳皮質の切片を用い、^{3}H-Asp の uptake と releaseとを測定し、ddYマウス(ddY) と El(+) についての測定値と比較検討するとともに、さらに大脳皮質での Asp含有量についても検討を行った。

実験方法

(i) 実験動物: El マウス及びその母系の ddYを使用した。El マウスは当教室で飼育保存しており、その雌雄(3〜4 ヵ月齢) を用いた。ddYは静岡実験動物より入手し、El マウスと同週齢の雄を使用した。

(ii) El マウスの放り上げ刺激: 同腹の生後 3週齢の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。

(iii) Aspの uptake 及び releaseの測定: Asp の uptake と releaseの測定は、Chapman et al.(1) の方法に従って行った。マウスを断頭後、氷上ですばやく大脳皮質を摘出し、McIlwain tissue chopper で 0.2mmの厚さの切片を作成した。切片を 95%-5% CO_2 飽和中

の 2ml Krebs-Ringer bicarbonate bufferに入れ、37℃で 5分間 preincubationした。次いで最終基質濃度 0.1μM のL-〔2,3-^{3}H〕-Asp 1μCi (0.1ml)を加え、再び37℃で 20 分間 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 0.75ml/min の速度で、superfusion した。30分後、 2分おきに 4回 fraction を収集し、さらに 50mM K^+のbufferに切り換え、再び 2分おきに 2回 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、それらの radioactivityを測定した。Asp release は 50mM K^+による releaseの増加量で示した。Asp uptakeの測定値は、superfusion chamber 中の切片を取り出し、vialにとり、Soluene ®350 1.5mlを加え、組織溶解後、scintillatorを加えて、radioactivity を測定し、この測定値に上記放出 radioactivity量を加算して求めた。尚、用いた buffer 成分は以下の如くであった。 NaCl, 124mM; KCl, 3.5mM; KH_2PO_4, 1.2mM; $MgSO_4$, 1.3mM; $CaCl_2$, 1.2mM; $NaHCO_3$, 25.0mM; glucose, 10.0mM. High K^+ bufferは、NaClの代わりにKClを 50mM 使用した。

アミノ酸の分析: アミノ酸の分析は、自動アミノ酸分析装置(JLC-6AH, 日本電子) により行った。有意差検定は、Student's t-testによった。

Table 1. Uptake of [^{3}H]aspartic acid into cerebral cortical slices in ddY and El mice

	[^{3}H]Aspartic acid (dpm/mg tissue wet weight)
ddY	1233.4±150.1 (10)
El(-)	792.5±80.1 (10)[b]
El(+)	1377.1±125.5 (10)[a,c]

The figures represent the mean±SEM with the number of experiments given in parentheses.
[a] $p<0.05$, compared with ddY.
[b] $p<0.001$, compared with ddY.
[c] $p<0.001$, compared with El(-).

実験結果

表 1は、ddY 、 El(−) 及び El(+) における、^{3}H-Aspの大脳皮質切片への uptake を示している。

El(−) の Aspのuptakeは ddYに比べて有意に低下していたが、 El(+) の Aspの uptake は El(−) に比べて有意に亢進していた。

図 1〜3 は、ddY 及び El(−) 、 El(+) の大脳皮質切片からの Aspの releaseの実験例を示している。 Aspの release量は Minchin et al.(7)の方法に従い、50mM K^+ によって放出され

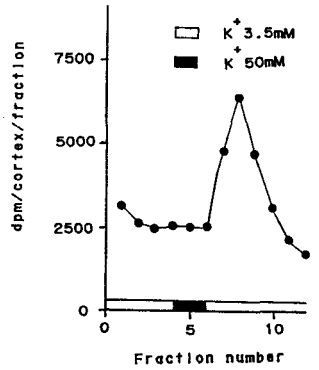


Fig 1. Time course of [^{3}H]aspartic acid release from cortical slices of ddY mouse.

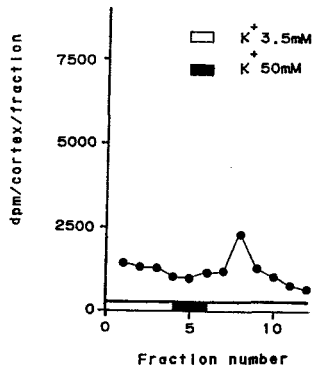


Fig 2. Time course of [^{3}H]aspartic acid release from cortical slices of El mouse (non-stimulated).

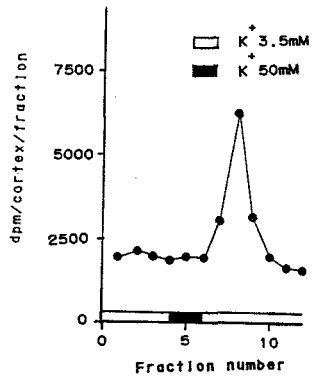


Fig 3. Time course of [^{3}H]aspartic acid release from cortical slices of El mouse (stimulated).

Table 2. K^+-Stimulated release of [^{3}H]aspartic acid from cerebral cortical clices in ddY and El mice

	K^+-stimulated release (dpm/mg tissue wet weight)	spontaneous release	K^+-stimulated release (% increase over spontaneous release)
ddY	8323.0±1807.8(10)	9536.0±1661.2(10)	83.8±10.1(10)
El(-)	2752.6±696.5 (10)[a]	4567.3±641.5 (10)[a]	50.6±7.1 (9)[a]
El(+)	7221.9±1665.0(12)[b]	8193.5±1498.8(12)[b]	81.5±7.2 (11)[b]

The figures represent the mean±SEM with the number of experiments given in parentheses.
[a] $p<0.001$, compared with ddY.
[b] $p<0.001$, compared with El(-).

Table 3. Amino acid levels in the cerebral cortex of ddY and El mice

	n	Aspartic acid (μmol/g tissue wet weight)	Glutamic acid	GABA	Alanine
ddY	10	2.24±0.26	9.96±1.26	2.09±0.69	0.73±0.27
El(-)	10	3.10±0.27[b]	12.43±0.63[b]	1.61±0.16	0.52±0.08
El(+)	10	2.51±0.17[a,d]	10.02±0.63[d]	1.46±0.13[a,c]	0.54±0.09

The figures represent the mean±SEM with ten experiments.
[a] $p<0.05$, compared with ddY.
[b] $p<0.001$, compared with ddY.
[c] $p<0.05$, compared with El(-).
[d] $p<0.001$, compared with El(-).

た^{3}H-Asp量から spontaneous releaseの^{3}H-Asp量をさしひき、spontaneous releaseの^{3}H-Asp量を 100% として示した (表 2) 。 El(−) の spontaneous releaseはddYに比べて有意に低下していたが El(+) の spontaneous releaseは El(−) に比べて 有意に亢進していた。又、K^+-stimulated release も El(−) は ddYに比べ有意に低かったが El(+) は El(−) に比べ有意に高かった。

表(3) は大脳皮質の Asp及びその代謝に関係するアミノ酸量を ddY、 El(−) 及び El(+) で示したものである。 El(−) の AspはddY 及び El(+) に比べて有意に高いが、Glu も Aspと同じ成績であった。 El(+) のGABAは ddY及び El(−) に比べて有意に低下していた。 Alaは ddY、 El(−) 及び El(+) で有意差は認められなかった。

〔考察〕

Glu や Aspを脳室内に投与したり、大脳皮質に直接投与すると強直性けいれんが誘発されることが林(2) によって報告されて以来、これら興奮性アミノ酸と seizureとの関係について数多くの報告がある。実験てんかんモデルの興奮性アミノ酸に関する報告では、エチルクロライド誘発ネコ大脳皮質焦点組織で Gluが減少していること(12)、コバルト焦点組織で Glu及び Aspが減少し(4,14)、glu の放出亢進がコバルト焦点形成に重要であることなどが指摘されている(4) 。他方、竹内(13)は El(+) の脳内 Aspは El(−) に比し高く、発作直前期には Aspは低下することを認めている。最近では、興奮性アミノ酸の antagonist としていちれんのω-phosphono- α-aminocarboxylate が注目されている。例えば、AP5 及び 2-amino-7-phosphonoheptanoate(AP7) は聴原マウスの間代性けいれんを抑制すること (6) 、及び、扁桃核kindlingの発現を抑制すること(10)、及び 2-amino-4-phosphonobutanoate は海馬kindlingの発現を抑制する(11)ことが報告されている。これらの諸報告は、seizure の発現に、Asp が何らかの形で関与していることを示唆している。今回の我々の成績と今までの報告を勘案すると自然発症 El(−) の大脳皮質では、ddY に比べて興奮性アミノ酸の生合成経路が亢進しているか、又は、代謝系が抑制されていること、及び、 El(+) の大脳皮質では spontaneousばかりでなく K^+-stimulated Asp の releaseが異常に亢進しており、この亢進した Asp releaseがElマウスの seizure sensitivityに密接に関与していることが想定された。

(1)Chapman, A.G. et al. (1985) J. Neurochem. 45, 370-381.
(2)Hayashi, T. (1959) Neurophysiology and Neurochemistry of Convulsion. Dainihon-Tosho, Tokyo.
(3)Honda, T. (1984) Brain and Development 16, 17-21.
(4)Koyama, I. (1972) Can. J. Physiol. Pharmacol. 50, 740-752.
(5)増川禎彦 (1963) 岡山医誌 75, 827-833
(6)Meldrum, B. (1984) Epilepsia 25, S140-149
(7)Minchin, M.C.M. et al. (1983) J. Neurochem. 40, 765-768.
(8)Mori, A. et al. (1986) IRCS Med. Sci. 14, 475.
(9)村田祐一 ら (1982) 神経化学 21, 300-302.
(10)Peterson, D.W. et al.(1983) Brain Res. 275, 169-180.
(11)Peterson, D.W. et al.(1984) Brain Res. 311, 176-180.
(12)Purpura, B.S. et al.(1959) J. Neurochem. 4, 311-317.
(13)竹内直司(1968) 阪大医誌 20, 387-398.
(14)Van Gelder, N.N. and Courtois, A. (1972) Brain Res. 43, 477-484.

158. El マウスの脳内カルシウム含量と痙攣に伴う変動について

枝松　礼・平松　緑・小出典男*・森　昭胤
（岡山大・医・脳研・機能生化，中央検査部*）

〔要　約〕

El マウスの痙攣発作発現機序へのCaの関与を調べるために、放り上げ刺激を行っていないElマウス［El(-)］、放り上げ刺激により痙攣が誘発されるようになったElマウス［El(+)］の安静時及びElマウスの母系である ddYマウス（ddY)の、血清、大脳皮質、小脳、中脳、線条体、海馬、視床下部、橋延髄のCa量をOCPC法により比色定量を行った。また El(+)の痙攣を伴うこれらの部位並びに血清中のCa量の変化の検索を行った。その結果、El(-) のCa量はddY に比べて視床下部、中脳及び橋延髄で低値であり、El(+) のCa量はEl(-) に比べて中脳及び橋延髄で増加していることが認められた。次に痙攣に伴うCa量の変化は、脳７部位に一致して、痙攣直前期及び痙攣中期に低下し、痙攣直後から24時間後には安静時レベルに回復することが認められたが、特に中脳と大脳皮質の変化の大きいことが示唆された。血清中のCa量は ddY、El(-) 及びEl(+) 間で有意差が認められず、又、痙攣に伴う変化も認められなかった。

以上の実験成績より、Elマウスでは、Ca量の減少が痙攣準備性と密接に関与していることが示唆され、特に脳幹網様体－大脳皮質系のCa代謝の異常が痙攣感受性に重要であることが想定された。

Key word：El mouse、bain、Ca

さきに我々は、放り上げ刺激をしていないElマウス［El(-)］には、縫線核から大脳皮質投射系に5-hydroxytryptamine(5-HT) neurone の異常があること[1,2]を示唆し、放り上げ刺激により痙攣準備性を獲得したElマウスの安静時［El(+)］には、大脳皮質の5-HT neuroneシナプスに機能低下があること、特に El(-)では対照のddY マウス(ddY) に比べて大脳皮質切片からの5-HTのrelease が異常に亢進しており、El(+) ではEl(-) に比し逆に5-HT releaseが抑制されていることを認め、特に大脳皮質での5-HT relese の異常がElマウスの痙攣発作発現に関与している可能性を指摘した[3]。5-HT releaseのメカニズムは複雑であるがその１つに、5-HT releaseはCaに依存性であることは知られている。しかしElマウスの5-HT releaseの異常がCaとどの様に関係があるかはまだ解明されてない。　Elマウスの Caについての報告は、尿中へのCaの排泄が対照マウス(CF_1) に比べて多いこと[5,6]、尿中へのCaの排泄は痙攣１時間後尿で最も減少し、５時間後で回復すること[6]、脳内Ca量は痙攣時に増加するが、痙攣後は正常時に回復すること[6]、^{45}Ca の脳への移行は CF_1マウスに比べ低いこと[7]がなされている。

今回は、Elマウスの痙攣発現機構解明の一環として、血清及び脳内７部位のCa量をddY 、El(-) 及び El(+)で比較検討し、さらに痙攣過程における El(+)の血清並びに脳内Ca量の変化の検索をも併せて行った。

実験方法

１．実験動物：ddYマウス（雄）は静岡実験動物より入手した。Elマウスは当施設で12時間明暗サイクル（午後１時～午前１時を暗期）の条件で飼育しているものを使用した。飼料はオリエンタル酵母製のものを使用した。Elマウスの痙攣を誘発させるための放り上げ刺激は、１週間に２回、各回に80回の放り上げ刺激を毎週行った。実験には、連続して５回以上痙攣発作を起こす生

後約6ヶ月の El(+)を用いた。 El(+)の痙攣の過程は、安静時、痙攣直前期（各マウスの痙攣を誘発させるまでの放り上げ回数の5回の平均値を求め、これの3分の2放り上げをした時期）、痙攣中期、痙攣後無動状態の痙攣後期及び痙攣24時間後の5群に分けた。 El(-)及び ddYは、El(+) とほぼ同週令のものを使用し、El(-) 及びEl(+) は雌雄の両者を用いた。

2．Ca測定： マウスを頸椎脱臼後、直ちに断頭した。血清試料は、 5μl のヘパリンナトリウム注射液 (1000単位/ml)を加えた試験管に濾斗をおいて血液を採取し、3,000 回転、15分の遠心により得た。脳組織の試料は断頭後、直ちにろ紙上でGlowinski & Iversen 法[4] により、大脳皮質、小脳、線条体、中脳、海馬、視床下部、橋延髄に分け、組織重量の約20～100 倍の蒸留水を加えてホモゲナイズしたものを用いた。Caの測定は、o-クレゾールフタレインコンプレクソン(OCPC)法により臨床検査自動分析装置、クリナライザー(JEOL JCA-VS600)を用い、波長600nm で行った。

実験結果

1． ddY及びElマウスの脳内Ca量： El(-)とddY とを比較すると、El(-) の視床下部、中脳及び海馬のCa量は ddYマウスのものに比べて有意に低下していたが、その他の部位では有意差は認められなかった（表1）。El(+) とEl(-) とでは、El(+) の中脳と橋延髄のCa量が El(-)に比べて有意に増加していたが、その他の部位では両者間に有意差は認められなかった（表1）。

2．痙攣に伴う El(+)の脳内Ca量の変化：

表2は、痙攣に伴う脳内各部位でのCa量の変化を示している。大脳皮質のCa量は痙攣直前期、中期及び痙攣直後では安静時期に比べて減少傾向が認められたが、24時間後には安静時レベルに回復した。小脳は大脳皮質に比べて痙攣による大きな変化は認められなかったが、痙攣中に減少

Table 1. Ca level in brain[1] and serum[2] of ddY and El mice

	ddY	El(-)	El(+)
Cortex	8.40±0.22(10)	8.27±0.45(11)	8.20±0.53(10)
Cerebellum	5.60±0.16(10)	5.10±0.23(10)	5.50±0.17(10)
Midbrain	7.40±0.27(10)[c]	6.55±0.21(11)	7.40±0.16(10)[d]
Striatum	6.40±0.27(10)[b]	5.91±0.25(11)	5.36±0.15(11)
Hippocampus	6.70±0.30(10)[b,d]	5.45±0.25(11)	5.22±0.15(10)
Hypothalamus	5.50±0.27(10)[c]	4.64±0.24(11)	4.91±0.25(11)
Medulla oblongata +pons	7.50±0.31(10)[a]	7.55±0.25(11)	8.80±0.36(10)[c]
Serum	5.57±0.19(10)	5.35±0.54(10)	5.47±0.36(10)

Results are expressed as μg/g tissue wet weight[1] and mEq/l[2]. The values are the means ± SEM with experimental numbers in parentheses. Statistical analysis was performed with a two-tailed Student's t test.
[a]$p<0.05$, [b]$p<0.01$ vs El(+).
[c]$p<0.05$, [d]$p<0.01$ vs El(-).

し、24時間後に安静時レベルに回復した。中脳は、痙攣中のCa量は安静時及び痙攣直前期に比べて有意に低下したが痙攣直後は痙攣中に比べて有意に増加したものの、安静時期に比べて低く、24時間後も安静時期の値に回復せず、低かった。線条体では、痙攣直前期のCa量は有意に低下し、痙攣中も低下したままであったが、痙攣直後には安静時レベルに回復し、24時間後も一定であった。海馬では、痙攣に伴うCa量の大きな変化はないが、痙攣直後は痙攣直前期に比べて増加していた。視床下部では、海馬と同様に痙攣に伴う大きな変化は認められなかった。橋延髄では、痙攣直前期のCa量は低下したが痙攣中には安静時レベルに回復し、以後一定であった。

Table 2. Ca level in brain[1] and serum[2] of stimulated El mouse

	resting	convulsion pre-	during	after	24hrs after
Cortex	5.56±1.39(9)	2.44±0.18(9)	3.30±0.26(10)[d]	2.89±0.35(9)	4.50±0.27(8)[f,h,j]
Cerebellum	2.70±0.21(10)	2.90±0.23(10)	2.33±0.17(9)	2.44±0.18(9)	3.33±0.29(9)[g,i]
Midbrain	3.60±0.15(10)	3.33±0.17(9)	2.40±0.16(10)[c,e]	3.00±0.00(8)[b,h]	3.00±0.21(10)[g]
Striatum	8.10±1.82(10)	2.90±0.10(10)[a]	2.75±0.16(8)[a]	6.90±1.65(10)[d,g]	7.40±1.54(10)[d,g]
Hippocampus	3.78±0.32(9)	3.30±0.15(10)	5.40±0.95(10)	6.80±1.41(10)[d]	6.20±1.26(10)
Hypothalamus	4.11±0.20(9)	4.00±0.39(10)	3.67±0.17(9)	4.60±0.60(10)	4.70±0.40(10)[g]
Medulla oblongata +pons	3.40±0.27(10)	2.67±0.17(9)[a]	2.90±0.23(10)	3.00±0.26(10)	4.33±0.33(9)[e,h,j]
Serum	4.81±0.53(10)	4.63±0.48(10)	4.63±0.40(10)	4.60±0.48(10)	4.53±0.31(10)

Results are expressed as μg/g tissue wet weight[1] and mEq/l[2]. The values are the means ± SEM with experimental numbers in parentheses. Statistical analysis was perfomed with a two-tailed Student's *t* test.
[a]p<0.05, [b]p<0.01, [c]p<0.001 vs resting.
[d]p<0.05, [e]p<0.01, [f]p<0.001 vs pre convulsion.
[g]p<0.05, [h]p<0.01 vs during convulsion.
[i]p<0.05, [j]p<0.001 vs after convulsion.

3．血清中のCa量：血清中のCa量は、ddY、El(-)及びEl(+)の間では有意差は認められなかった。また血清中のCa量は、痙攣に伴っても有意な変化は見られなかった。

考察

細胞の興奮性については，Caの減少と過剰興奮とは極めて密接に関係していることが知られている。今回測定したCa量は、OCPC法により比色定量なので、OCPCによりキレートされるCaが測定されている。今回の成績では、まず自然発症 El(-)の視床下部、中脳及び海馬のCa量が ddYに比し低下していることが見い出された。先に我々は El(-)にはモノアミンのうち5-HT neuroneの縫線核から大脳皮質投射系に異常があることを示唆したが、これらの成績は部位的に一致している点で、非常に興味深い。 El(-)の大脳皮質の5-HT releaseが非常に亢進していることは、これらの部位でのCa量の低下に起因していることが想定される。また El(+)では逆に中脳と橋延髄でCa量が El(-)に比べて高いことが見い出された。 El(+)では5-HT releaseが非常に低下し、5-HTシナプスでは機能低下が認められているので、この成績は、5-HT neuroneの縫線核でのfeed back機構に関与していることを示すものかもしれない。 El(+)脳の測定7部位では、一般に痙攣直前から痙攣中はCa量は低下する傾向にあった。しかし、これらの変化は痙攣直後から24時間後にかけて安静時レベルに回復している。今回得られたCa量の変化はOCPCによってキレートされるCaの変化として示されているので、freeのCa^{2+}及び弱い結合状態にあるCaがより強い結合状態に移行したものとして理解されるので、今後さらに、Caの結合状態の変動を詳細に追求していきたい。

(1) Hiramatsu, M. (1981) Folia Psychiat. Neurol. Jpn. 35, 261-266.
(2) Hiramatsu, M. (1983) Neurochem. Res. 8, 1163-1175.
(3) Hiramatsu, M. et al. Epilepsy Res. in press.
(4) Glowinski, J. and Iversen, L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669.
(5) 杉生了亮 (1963) 岡山医誌 75, 179-188.
(6) 角田正良 (1963) 岡山医誌 75, 835-840.
(7) 角田正良 (1963) 岡山医誌 75, 841-847.

159. α－リノレン酸の弁別学習行動に及ぼす影響

野村正彦・奥山治美*

（保健衛生大・医・生理，名古屋市大・薬*）

〔要　約〕

脳内脂質構成の変化が弁別学習という脳の高次機能発現にどの様な影響を及ぼすかを検索する目的で、以下の実験を行った。高血圧自然発症ラット（ＳＨＲ）にリノール酸７８％、α－リノレン酸0.05％を含むSafflower oil（ＳＡ餌）あるいはリノール酸12.8％、α－リノレン酸６４％を含むPerilla oil（ＰＥ餌）を添加した調合飼料で飼育し、二世代目のラットの脳内脂質分析およびオペラント型明度弁別学習成績を検索した。

二種の餌間での脳内脂質含有量、リン脂質組成、飽和および不飽和脂肪酸比の割合は変化が認められなかった。しかし、リン脂質の脂肪酸組成はＳＡ餌群と比較して、ＰＥ餌群はα－リノレン酸（ｎ－３）系列の脂肪酸含有量が高く、リノール酸（ｎ－６）系列の脂肪酸含有量が低かった。　学習成績はＳＡ餌群およびＰＥ餌群ともに、正および負の反応数が普通飼料飼育群よりも高かった。したがって、正反応率［（Ｒ＋）／（（Ｒ＋）＋（Ｒ－））］ｘ１００はＳＡ餌群が６０％と低く、ＰＥ餌群は学習課程の後半になって８０％と普通飼料飼育群と同じレベルに達した。

即ち、α－リノレン酸（ｎ－３）系列の脂肪酸含有量が高いことが、弁別学習という高次の脳機能発現に関与しているものと考えられる。

Key word：Alpha-linolenate,Linoleate,Brightness discrimination learning.

脳を構成する活性物質のうち、人工的に容易に変化させる事ができる物質があれば、その条件下での学習実験の成績が何等かの関連性のある事が考えられる。今回はラットの脳内脂質構成を変える為に、餌の組成を変えて飼育し（9)、脳内脂質構成の分析と弁別学習課題下で学習実験を行い脳内脂質の機能の一端を明らかにしようとした。ラットを飼育する餌にリノール酸およびα－リノレン酸がそれぞれに多いSafflower（ＳＡ）およびPerilla（ＰＥ）を主体にした脂質を混入した。餌変換により体内の脂質は容易に変化させる事ができるが、脳は代謝回転が比較的遅いため、実験には二世代目のラットを使用した。学習課題は脳の高次機能が要求されると考えられている方法の一つであるオペラント型明度弁別学習課題を用いた。実験動物は弁別学習能力が比較的低いＳＨＲ（8)、およびその対照に用いられるＷｉｓｔａｒ　Ｋｙｏｔｏ（ＷＫＹ）ラットを、それぞれ二群に、ＳＡ餌およびＰＥ餌で飼育した。

〔方法〕

１．実験動物：ＳＨＲおよびＷＫＹはCharles River社のものを、３週齢からＳＡ餌およびＰＥ餌で飼育し、１２週齢で交配させ、Ｆ１を得た。そして、Ｆ１が１２週齢になって以下の実験を始めた。

２．飼料：実験群の脂質源としてSafflower（ＳＡ）およびPerilla（ＰＥ）を５％湿重量（Ｗ／Ｗ）づつ含む精製飼料、または対照群には普通飼料を用いた。各飼料の脂肪酸組成は表１に示した。

３．脂質の分析：脳はBlight and Dyer法(1)で脂質を抽出し、二次元薄層クロマトグラフィーで、Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine(ＰＥ), Phosphatidyl-

serine, Phosphatidylinositol, Lysolecithin, Sphingomyelin,等に分画した。また各脂質に含まれる脂肪酸はメチルエステルとし、ガスクロマトグラフィーで定量、分析した。

4．明度弁別学習：11週齢のラットを個別ケージにいれて、飽食時体重の85%になるよう1週間で餌を制限し、学習期間中この体重を維持した。そして、12週齢時より学習を開始した。スキナー箱にあるレバーを押せば餌ペレットが得られる事を修得させた後1000対1の明度差を弁別させる Multiple VI-15 Seconds Extinction 学習課題下(10)で、連日30日間行った。学習成績は正反応数（R＋）、負反応数（R－）および正反応率［(R＋)／((R＋)＋(R－))］×100で比較した。

［結果及び考察］

表 1　Fatty acid composition (%)

	Safflower oil	Normal diet	Perilla oil
14:0	0.5	0.3	0.6
16.0	8.6	15.8	8.1
18:0	2.2	2.2	1.9
18:1 n-9	10.4	22.2	12.3
18:2 n-6	78.0	49.7	12.8
18:3 n-3	0.05	4.1	64.0

表 2

各飼料飼育ラット脳内ＰＥの脂肪酸の変化

	SA.	PE.		NORMAL
14:0	tr.	tr.		
14:1				
16:0DMA	7.8	8.0		5.4
16:0	5.0	4.7		6.0
16:1	0.6	0.7		0.7
18:0DMA	10.4	10.5		6.7
18:0	22.6	22.3		27.0
18:1	15.3	18.0	**	14.7
18:2n-6	0.3	0.2		0.4
18:3n-6	0.1	0.1		
18:3n-3	0.1	0.2		0.1
20:0				
20:1	2.6	2.7		2.6
20:3n-9	0.2	0.1		0.6
20:3n-6	0.3	0.2		0.2
20:4n-6	12.3	9.3	***	11.7
20:4n-3	tr.	0.1		0.1
20:5n-3	tr.	0.2	*	0.2
22:0				
22:4n-6	6.5	3.8	***	4.4
22:5n-6	7.8	0.1	***	0.2
22:5n-3	tr.	0.9	***	
22:6n-3	7.4	17.3	***	16.4
24:0				
24:1				
Total n6	27.3	13.7		16.9
Total n3	7.5	18.7		16.8
Total FA	780.6	785.2		750.6

* P<0.05
** p<0.01
*** p<0.001

ＳＨＲラットの各飼料飼育条件下での脳内脂質分析の結果は、脂質含有量、リン脂質組成、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、には有位の差はなかった。　これらのうち、リン脂質であるＰＥの分析結果を表２に示した。

総脂質量ではほとんど変化の見られなかったＰＥの脂肪酸は、ＳＡ餌群でｎ－３系列脂肪酸が欠乏しており、ＰＥ餌群ではｎ－３系列が充分存在し、ｎ－６系列も比較的よく存在した。　これは摂取量は少ないにもかかわらず脳内に積極的に取込まれたものと考えられる。これを２種類の実験餌の組成により飼育されたラット脳内ＰＥの構成脂肪酸として、ｎ－３，およびｎ－６系列で分けて図１に示した。即ち餌に少なかったｎ－３系列の脂肪酸が積極的に脳内に取り込まれている事が分る。しかも、ＳＡ餌には極少量しか含まれないα－リノレン酸が脳内に積極的に取込まれたものと考えられる(3,5,6)。

図 1　ＰＥのｎ－３およびｎ－６脂肪酸構成の割合

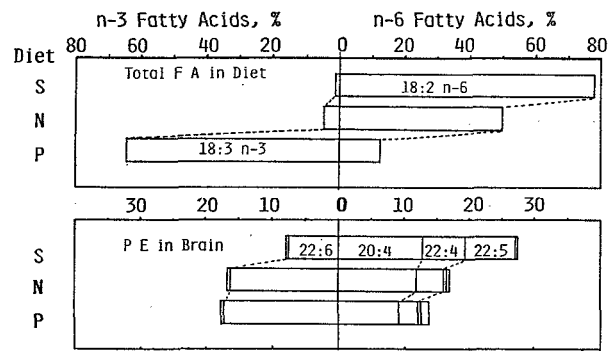


図 2　SHRの明度弁別学習成績

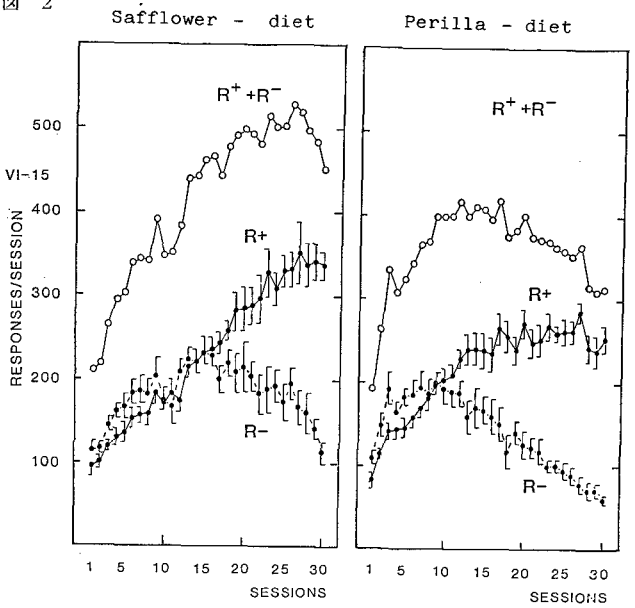
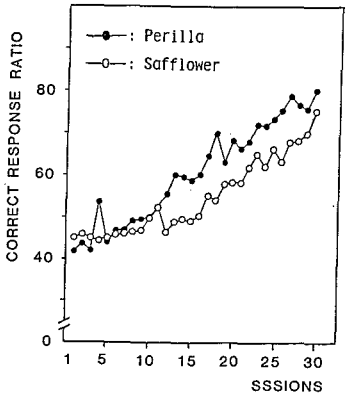


図 3



次に、ＳＨＲの弁別学習成績を、図２および図３に示した。ＳＡ飼群は（Ｒ＋）および（Ｒ－）それぞれの反応数は高かったが、（Ｒ－）は後半で減少が少なかったために正反応率は悪かった。一方、ＰＥ飼群はＳＡ飼群より（Ｒ＋）および（Ｒ－）ともに反応数は低く、正常飼群にほぼ近い反応数を示した。そして、特に後半の（Ｒ－）が著しく減少したため、正反応率は８０％に達した。これは、ＷＫＹに比較してＳＨＲの学習成績は明らかに低く(8)、最高が８０％であった事を考えると、ＰＥ飼群の学習成績は良い結果を示したものと考えられる。この事は、動物の必須脂肪酸であるα－リノレン酸が少ない飼で飼育したラットがＹ迷路学習で明らかな学習の低下を示めしたと言うLamptey and Walker (4) の報告によく一致する。今回、より高次の神経機能の要求されると考えられる、明度弁別学習課題で、ＰＥ飼群が明らかな学習能力の回復を示したことはα－リノレン酸が高次の脳機能発現に関与しているものと思われる。しかも、弁別学習能力が悪いと考えられるＳＨＲ(7)にα－リノレン酸の変動が効果を示した事は特に重要な事である。最近、α－リノレン酸が人の神経機能に必要であるとの報告もあり(3)、脂質の機能を考える上で栄養学的な見地からも、併せ重要な問題である(6)。

［文献］ 1) Bligh,E.G. & Dyer,W.J.(1959).Can.J.Biochem.Physiol.37:912-917.
2) Bivins,B.A.,Bell,R.M.,Rapp,R.P. & Griffen,W.O.(1983).J.Parental Ent. Nutr.7:473-478.
3) Helman,R.T.,Johnson,S.B. & Hatch,T.F.(1982).Am.J.Clin.Nutr.35:617-623.
4) Lamptey,M.S. & Walker,B.L.(1976).J.Nutr.106:86-93. 5) Inoue,M.,Murase,S & Okuyama,H.(1984).Arch.Biochem.Biophys.231:29-37. 6) Murase,S. & Okuyama,H.(1985).J.Biol.Chem.260:262-265. 7) Nomura,M.(1984).Res.Commun.Psychol.Psychiat.Behav.9:373-384.
8) Nomura,M. & Ohtsuji,M.(1982).Hypertensive Mechanism(Schattauer pub.)pp.658-661.
9) Tinoco,J.(1982).Prog.Lipid Res.13:6-17. 10) Tsukada,Y.,Nomura,M.,Nagai,K.,Kohsaka,S.,Kawahata,H.,Ito,M. & Matsutani,T.(1977).Behavioral Neurochemistry. (Spectrum pub.) pp.63-84.

160. メシル酸カモスタット（FOY305）による実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）抑制効果について

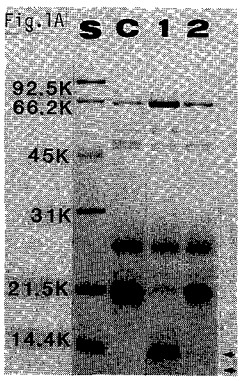
犬塚　貴・佐藤修三・馬場広子・宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科）

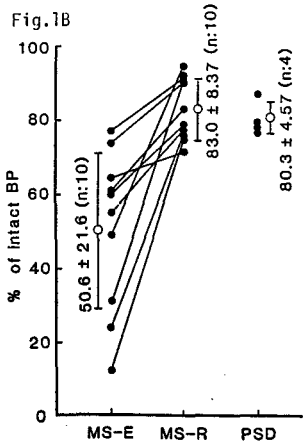
〔要　約〕

実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE) は細胞性免疫を介しておこる病態であるが、その脱髄機序のkey stepとして病巣に浸潤する細胞などに由来するproteaseの働きが注目されている。今回我々はprotease inhibitor メシル酸カモスタット(FOY305)を用いて、Rat EAE の抑制効果を調べた。モルモットの中枢神経ホモジネートをLewis Ratに感作してEAE を作製し、6日後よりFOY305 4mg/ 日または生理食塩水を腹腔内投与したところ、FOY305投与群は生食群に比して、①体重減少が軽度であった。②clinical scoreの平均値は常に低く障害は軽度であった。③脳幹のミエリン回収率が有意に高かった。以上からFOY305にはRat EAE の抑制効果が認められた。FOY305は膵炎などの治療薬として臨床的に用いられているが、本剤が多発性硬化症(MS)増悪期に上昇するヒト髄液中の中性protease活性をin vitroで抑制することが報告されており、さらに今回EAE を抑制することが示され、ヒトのMSなどの脱髄疾患への応用の可能性が示唆された。

Key word :　Experimental allergic encephalomyelitis, Myelin, Camostat mesilate

昨年我々はヒト髄液中にミエリン塩基性蛋白(MBP) を分解する中性プロテアーゼが存在することを報告し(1) 、さらに多発性硬化症(MS)の増悪期にその活性が上昇すること、FOY305がin vitroで活性を抑制することを示し(2) (Fig.1) FOY305の脱髄抑制効果を示唆した。今回MSのモデルであるEAE を用いFOY305のEAE 抑制効果について調べた。





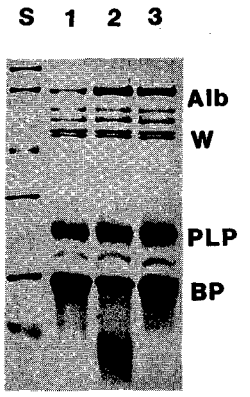


Fig.1C.

Fig.1A. Degradation of MBP by CSF from patient with Multiple sclerosis(MS) in exacerbation(ln.1) and in remission(ln.2) after 4 hrs incubation at 25°C. Incubation system consists of 200μg of heated human CNS myelin and 50μl of CSF from apatient in 0.25% Triton X-100,5mM $CaCl_2$ and 10mM Tris-HCl (pH7.5).Ln.C is control which from myelin suspension plus CSF from patient with psychosomatic disease. Left side ln. is molecular standard. Arrows indicate degradation products. Intact MBP in ln.1 is degradated severly comparing with that in ln.2 because of elevatoin of neutral protease activity in CSF of MS in exacerbation.

Fig.1B Percent of remainig intact MBP in each sample after incubation. Percent of that of MS in exacerbation is significantly lower than that of MS in remission which sugestes higher protease activity is in CSF from MS in exacerbation than in remission Value represents mean + S.D. PSD; Psychosomatic disease

Fig.1C. Effect of FOY305 on protease in CSF from patient with MS in exacerbation(MS-E). The sample in ln.1 was from myelin suspension plus CSF from PSD without incubation, wheras in ln.2 was incubated myelin suspension with CSF from MS-E and in ln.3 was from that added 100μM FOY305. Molecular weight standards indicated are in the left lane.

［方法］

Lewis Rat(体重 360～400g) 24匹をEAE ＋生食投与群(EAE群)8匹、EAE ＋FOY305投与群(FOY群)8匹と無処置群 4匹の 3群にわけた。EAE 群とFOY 群にモルモットの中枢神経ホモジネート（蛋白量1mg)でFreund complete adjuvandと共に感作し、第 6日目よりFOY 群にFOY305を4mg/匹を、EAE 群には生食を連日腹腔内投与した。毎日一定時刻に体重測定と臨床評価を行った。臨床評価はTable に示した項目について行い点数を合計しclinical scoreとした。第18日目に脳幹を取り出しホモジネートにしてNortonらの方法(3) によって、ミエリンを精製し、その回収率を比較した。またホモジネートとミエリンを凍結乾燥し脱脂した上で11% polyacrylamide gel 上を電気泳動しCoomassie blue染色して構成蛋白の変化を調べた。

Table

尾の弛緩；	なし0，あり1
後肢マヒ；	なし0，不全1，完全2
前肢マヒ；	なし0，不全1，完全2
失　禁　；	なし0，あり1

［結果］

①無処置群は体重がやや増加したのに対して、EAE 群，FOY 群では減少傾向を示し、とくに臨床症状の出現する11日目頃から急激に減少した。FOY 群の体重減少はEAE 群に比して軽度であった(Fig.2) 。②Clinical scoreの平均値はFOY 群はEAE 群に比して常に低く、障害が軽度であった(Fig.3) 。③脳幹のミエリン回収率はFOY 群ではEAE 群に比して有意に高かった($t<0.05$)。無処置群とFOY 群では差がなく、無処置群はEAE 群に比して有意に高かった($t<0.01$)(Fig.4) 。④脳幹のホモジネートやミエリンの蛋白染色では各群間に明らかな差は認められなかった。

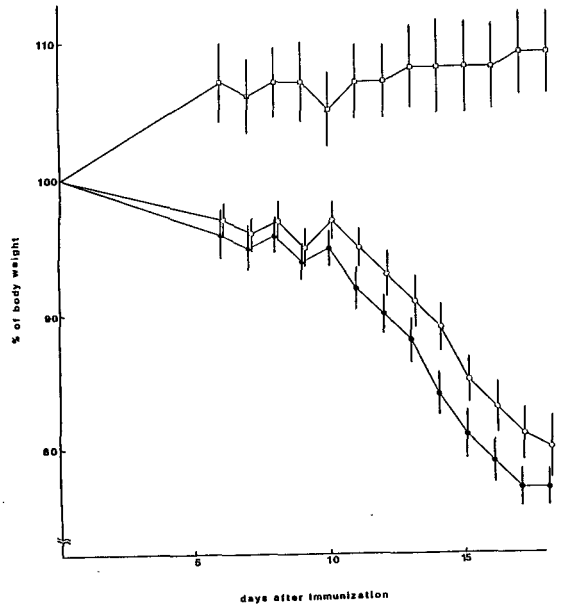


Fig.2　Percent of body weight of each group
open squer: No treated, open circle:EAE+FOY305
closed circle: EAE+Saline
Immunization was on day 0, inhibitor injection was begun day 6. The bars are shown as mean + SEM

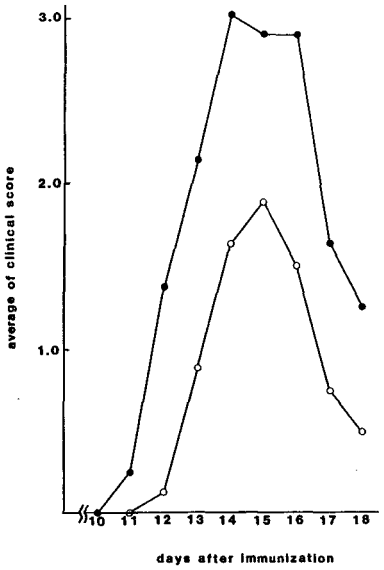


Fig.3　Average of clinical score
open circle: EAE + FOY305
closed circle: EAE + Saline
Animals were sacrificed on day 18

［考察］

EAE は細胞性免疫を介しておこる病態であるが、その脱髄機序の全貌はまだ明らかでない。EAE の病巣では、浸潤するmacrophageや白血球，反応性のastrocyte などに由来すると思われる、酸性及び中性protease活性の上昇がみられ、proteaseの働きが脱髄のkey stepであると考えられている(4)(5)。このような観点から各種のprotease inhibitor によるEAE 抑制実験が行われ、aminomethylcyclohexane carboxylic acid (AMCA) の腹腔内投与がEAE を最も強く抑制したと報告されている(5)(6)。彼らの実験ではLeupeptin は無効とされたがOsanaiら(7) は脳血液関門(BBB) の通過をはかるためsulfatide liposomeに封入し、これをモルモットEAE に腹腔内投与することによってEAE を抑制できたとしている。今回新たに開発されたFOY305を用いた我々の実験では、FOY 群ではEAE 群に比して体重減少，clinical score，ミエリン回収率の低下のいずれもが軽度でありFOY305はEAE を抑制したと考えられる。FOY305は正常ラットでは脳への移行は極めて低いが(8) 、EAE によるBBB の破壊によって脳内へ移行し脱髄にかかわるとされるproteaseを抑制したと考えられる。最近、高ら(9) はラットの受身EAEに 細胞移入翌日から大量のAMCAを腹腔内投与することによってEAEを抑制し、その機序としてBBB の透過性の抑制、効果細胞の標的組織侵入抑制が考えられるとしている。我々の実験では既に効果細胞の少なくとも一部は到達していると考えられる第 6日目からFOY305を投与しており、彼らの抑制機序のみでは説明できないと思われる。従来EAE の脱髄は形態的には血管周囲に容易に認められるが、生化学的にMyelinの減少を示すことは困難でありとくに小動物では無視しうるとされてきた(10)。しかしFig.4 に示すように無処置群とEAE 群，さらにFOY 群とEAE 群の間でミエリン回収率の有意な差が認められた。ミエリン蛋白構成，またホモジネート中の蛋白構成は電気泳動ゲルのComassie blue 染色では各群間に明らかな差を認めなかったが、今後各構成要素についてより精密な計測による検討が必要と思われる。

FOY305は膵炎や播種性血管内凝固症候群の治療薬として臨床的に用いられているが、トリプシン，プラスミン，トロンビンや血漿カリクレインを強く阻害するといわれている(11)。本剤がMS増悪期に上昇する髄液中の中性プロテアーゼ活性をin vitroで抑制したこと(2) 。さらに今回Rat EAE を抑制したことからヒトMSなどの脱髄疾患への応用の可能性が示唆される。

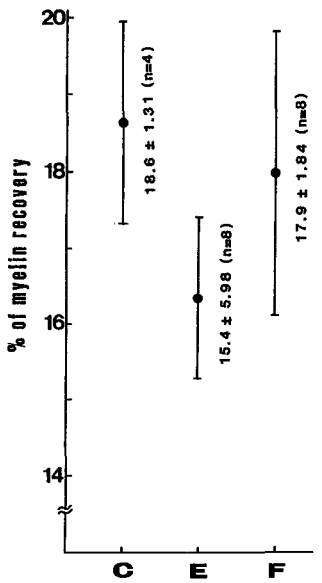


Fig.4. Percent of myelin recovery
(Recovery myelin protein / Total protein in homogenate)
C; No treated group E; EAE+Saline
F; EAE+FOY305(4mg per rat, day)

［文献］

1)犬塚貴他(1985) 神経化学 24.574-576
2)犬塚貴他(1986) 日本神経学会（抄） 363
3)Norton,W.T. and Poduslo,S.E.(1973) J.Neurochem. 21.749-757
4)Smith,M.E.(1977) Neurochem. Res. 2.233-246
5)Smith,M.E.(1980) The suppression of EAE and MS. 211-226
6)Brosnan,C.F. et al.(1980) Nature 285-237
7)Osanai,T. and Nagai,Y.(1984) Neurochem. Res. 9.1407-1416
8)大木史郎他(1989) 現代医療 12(臨). 71-82
9)高昌星他(1986) 日本神経学会（抄） 368
10)Smith,M.E. and Benjamins,J.A. (1984) Myelin 448-451
11)Tamura,Y.(1977) Biochem. Biophs. Acta 484.417-422

161. DM-20 を抗原とするマウスにおける実験的アレルギー性脳脊髄炎

遠藤真澄・国下龍英・田平　武
（国立武蔵療養所神経センター・疾病研究第六部）

〔要　約〕

ミエリンの主要蛋白であるプロテオリピドアポ蛋白（ＰＬＰ）は、ウサギ（１）、モルモット（２）、ラット（３）に実験的アレルギー性脳脊髄炎（ＥＡＥ）を引き起こす事が報告されているが、その起炎性をマウスに於いて検討した。また、ＤＭ－２０とｍａｊｏｒ　ＰＬＰの２つのコンポーネントから成るこのＰＬＰを分離して、それぞれの起炎性を検討した。その結果、以下の知見を得た。

１）ウシ、ラット、マウス、モルモットの各種ＰＬＰは、Ｂａｌｂ／ｃマウスに対しほぼ同頻度にＥＡＥを若起した。

２）各系統マウスに対するウシＰＬＰによるＥＡＥの発症率は、マウスの系統により差がみられた。

３）ウシＤＭ－２０をＢａｌｂ／ｃマウスに免疫した結果、脊髄下部を中心に広範な脱髄を伴う慢性再発性ＥＡＥが発症した。

４）Ｔ細胞を移入したＢａｌｂ／ｃヌードマウスにＤＭ－２０を免疫した結果、血管周囲性単核細胞浸潤を組織所見とするＥＡＥが発症した。

以上より、ＰＬＰはマウスにもＥＡＥを引き起こす事が明らかとなった。また、ＤＭ－２０はＢａｌｂ／ｃマウスに対し脱髄を伴うＥＡＥの抗原となり得、その発症にはＴ細胞の関与が必要である事が明らかになった。

Key word： Proteolipid protein , Experimental allergic encephalomyelitis , Mouse

ＥＡＥの自己抗原としてミエリン塩基性蛋白（ＭＢＰ）が古くから研究されてきたが、最近このＭＢＰの混入が少なく精製度の高いＰＬＰによりウサギに慢性ＥＡＥが起こることが報告され、我々も精製度が高くＭＢＰの混入０．０１４％以下、ガラクトセレブロシドの混入０．１３％以下のＰＬＰによるモルモットＥＡＥの作製に成功した（２）。そこで今回は、各種系統マウスに対する起炎性を検討すると共に、２４－ｋＤａ，２０－ｋＤａの２つのコンポーネントからなるこのＰＬＰを純化し、それぞれの起炎性を純系マウスに於いて検討した。

［材料および方法］

抗原の精製：　Ｆｏｌｃｈらの方法により（４）、脊髄及び全脳より粗ＰＬＰを抽出後メチル化セファデックスＧ－１００にてゲルろ過して得られた２４－ｋＤａ、２０－ｋＤａの２つのコンポーネントからなるｆｒａｃｔｉｏｎを更にＣＭ－ｔｒｉｓａｃｒｙｌイオン交換クロマトグラフィーにかけ２つのコンポーネントを分離した。溶出液はクロロホルム：メタノール：水（４：４：１）を用い、酢酸アンモニウム　０．０１Ｍ（５０　ｍｌ）－０．０５Ｍ（１７５　ｍｌ）のステップグラジェント溶出で行なった。この条件下では、ＭＢＰは全く溶出されなかった。

感作：　各系統マウス（雌、６－８週齢）は、三協ラボサービスより購入した。抗原（２ｍｇ／ｍｌ）１ｍｌ、Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ不完全アジュバント１ｍｌ、結核死菌１ｍｇをマイクロホモジナイザーにかけ、０．１ｍｌをマウス腹部皮内に数箇所感作した。

Ｓｐｌｅｅｎ　Ｔ細胞の調製およびヌードマウスへの移入：　正常Ｂａｌｂ／ｃマウスより得たｓｐｌｅｅｎｃｅｌｌをナイロンウールカラムにかけて分離したＴ細胞１．５ｘ１０^{7}個をＢａｌｂ／ｃヌードマウス（６週齢、雌）に移入し、その直後にＤＭ－２０　１００μｇを感作した。

病理組織学的検索：　光顕的検索には、マウスを１０％中性ホルマリンで固定し、パラフィン包埋標本を作製し

Table 1 Incidence of EAE in different strain of mice

strain	bovine PLP	rat PLP	mouse PLP	guinea pig PLP	rabbit PLP
Balb/c	3/7	2/5	2/5	3/5	0/5
SJL	17/19				
ATH	8/12				
DBA/2	0/5		N.D.		
B10D2	0/5				
C3H	5/5				
A/J	4/5				

N.D. : not done

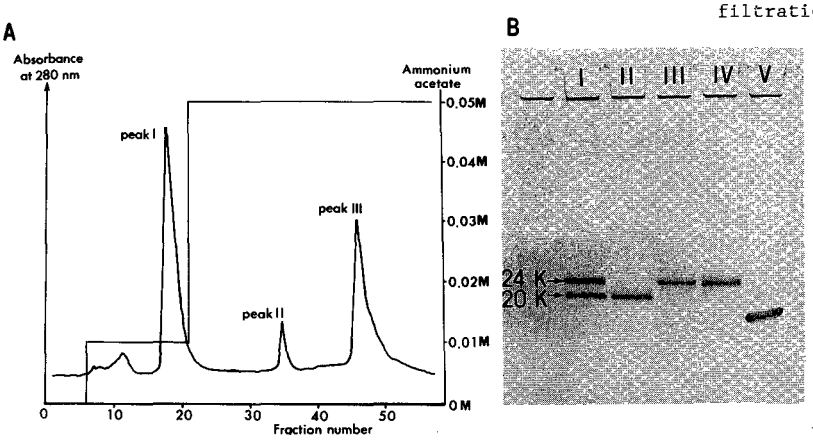


Fig.1 A. Purification of bovine DM-20 and major PLP by ion exchange chromatography.
B. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of peak I, II and III in A. Lane I: PLP fraction after gel filtration; Lane II: peak I in A; Lane III: peak II in A; Lane IV: peak III in A; Lane V; bovine MBP

た。電子顕微鏡的検索には、０．５％パラホルムアルデヒド、１．５％グルタルアルデヒド、０．０８Mリン酸緩衝液（ｐＨ７．６）で灌流固定し、１％ＯｓＣＮで固定後エポン包埋標本を作製した。

<u>ＤＭ－２０抗体価の測定</u>：　ＤＭ－２０で免疫したＢａｌｂ／ｃマウスから感作後２１日－１１８日後に血清を採取し、マイクロプレートを用いたＥＬＩＳＡにて抗体価の測定をおこなった。

［結果］

ウシ、ラット、マウス、モルモットより抽出したＰＬＰは、Ｂａｌｂ／ｃマウスに対しほぼ同頻度にＥＡＥを若起したが、ウサギＰＬＰではＥＡＥを若起することができなかった。また、ウシＰＬＰによるＥＡＥの発症率はマウスの系統による差が顕著であった（表１）。ＣＭ－ｔｒｉｓａｃｒｙｌカラムにより分離されたピークＩは２０－ｋＤａ，ピークＩＩは一部２０－ｋＤａを含む２４－ｋＤａ，ピークＩＩＩは２４－ｋＤａ蛋白であり（図１）、アミノ酸分析の結果２０－ｋＤａはＤＭ－２０と２４－ｋＤａはｍａｊｏｒ　ＰＬＰのアミノ酸組成と一致した。Ｂａｌｂ／ｃマウスにＤＭ－２０を１回免疫した結果、１５匹中９匹（６０％）に感作後１６日から２７日でＥＡＥが発症し（図２、Ｎｏ．１－９），２回免疫では７匹中５匹（７１％）に臨床症状が認められた（Ｎｏ．１０－１４）。また、このうち５匹において２から６週間後に再発が認められた。一方、ｍａｊｏｒ ＰＬＰを２回免疫した結果５匹中３匹に臨床症状が出現した（図２、Ｎｏ．１５－１７）。病理学的所見の検討を行なったところ、ＥＡＥ症状を呈したマウスには、下部脊髄を中心にして血管周囲性単核細胞浸潤と広範な脱髄がＤＭ－２０感作（図３ａ）、ｍａｊｏｒ　ＰＬＰ感作いずれの場合にも認められた。また、ａｘｏｎも強く侵される傾向にあり、視神経、脳幹部、大脳、小脳への影響は少なかった。末梢ミエリンは全く正常であった。一方、再発を示したマウスには病変の新旧混在が見られた。臨床症状を示さなかったマウスには、病理所見は認められなかった。Ｔ細胞を移入したＢａｌｂ／ｃヌードマウス１１匹にＤＭ－２０を免疫した結果、５匹に平均

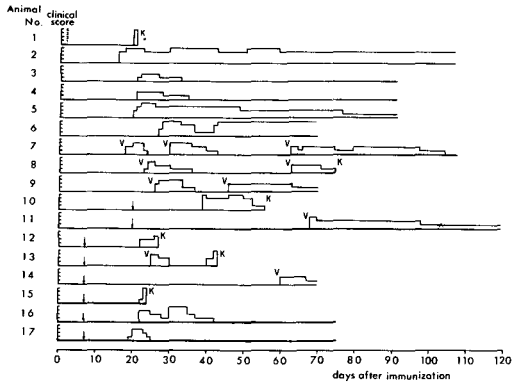
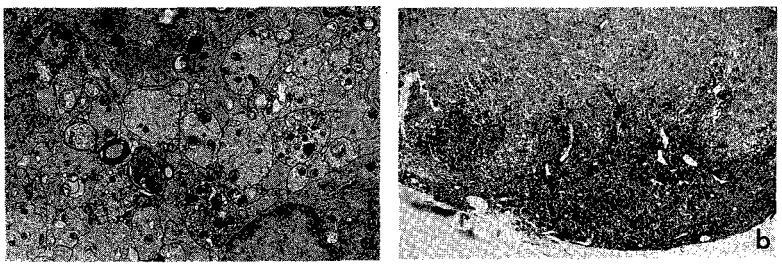


Fig.2 Clinical course of sensitized Balb/c mice.
K : killed
V : Vestibular type
arrow : booster injection

Fig.3 Histrogical evidence of EAE. a. Electron micrograph of a spinal cord of a DM-20 immunized mouse sacrificed on day 21 (animal # 1 in Fig.2) 5000x b. Light micrograph of a spinal cord of a nude mouse reconstituted with T cells, sacrificed on day 28. H.E. stain 70x



３３日で細胞浸潤を組織所見（図３ｂ）とするＥＡＥが発症したが、移入していない８例については臨床的、病理学的にもＥＡＥの発症は認められなかった。ＤＭ－２０に対する血清抗体価を検討したが、臨床症状と抗体価の間に相関を認めなかった。

［考察］

今回の結果より、ＰＬＰは純系マウスに対してもＥＡＥを若起させ得る事が明らかとなったが、ウサギＰＬＰでは若起できない事や発症率の系統差についての詳細は、今後検討する必要がある。ＰＬＰの起炎性については長年論争があり、その主要な論点はＰＬＰ中に混入するＭＢＰの可能性であったが、イオン交換の手法を用いる事により分離したＤＭ－２０、ｍａｊｏｒ　ＰＬＰにはＭＢＰ混入の可能性は否定できると考える。このＤＭ－２０、ｍａｊｏｒ　ＰＬＰによりＢａｌｂ／ｃマウスに脱髄を伴うＥＡＥを発症させる事に成功したが、ＤＭ－２０のアミノ酸組成は、ｍａｊｏｒ　ＰＬＰの１００から１４０番の４１アミノ酸残基が欠損したものである事が報告されており（５）、今回の結果からこの１００－１４０のアミノ酸残基は、Ｂａｌｂ／ｃマウスに於いてはＥＡＥの発症に必須ではない。Ｂａｌｂ／ｃマウスにおけるＤＭ－２０によるＥＡＥの発症には、Ｔ細胞の関与が必要である事が明らかとなったが、今後ＤＭ－２０反応性Ｔ細胞株を用いた解析や抗体の局所での関与などの検討が必要である。

［文献］

1) Cambi F. et al. Ann Neurol.(1983) 13, 303-308. 2) Yoshimura T. et al. J Neurol Sci.(1985) 67, 201-212. 3) Yamamura T. et al. J Neuroimmunol.(1986) in press 4) Folch J. et al. J Biol Chem (1951) 191, 833-841. 5) Trifilieff F. et al. C R Acad Sc Paris (1985) 399, 241-246.

162. 母体性高 Phe 血症ラットにおける脳内ガングリオシドの変化

原田　寧・阿相皓晃・平野修助　（東邦大・医・第二生理）

〔要　約〕

ラットの胎生期に L-Pheを大量に投与し、生後の脳内ガングリオシド変化を正常対照例と比較検討した。脳重量は一貫して外套部で低く、生後 4、15、21、49日とも有意な差が認められた。脳外套部ガングリオシド含量は離乳期まで何等変化を示さなかったが、脳重量が対照に比べ20％も減少した生後49日齢では有意な減少が認められた。ガングリオシド分子種のパターンについても生後49日齢ではGD_{1a}およびGM_1の減少が明らかであり、シナプス形成やミエリン形成の低下が示唆された。脳重量の低下を来たすmethyl azoxy methanol(MAM)投与群と比較して脳内ガングリオシドと脳重量の関連を調べたところ、MAM投与群の生後49日目では脳重低下はPhe 群よりさらに著しかったが、脳内ガングリオシド含量は変化しなかった。しかし、ガングリオシド分子種のパターンにおいてはGD_{1b}の減少ならびにGM_4 の増加が認められ、Phe 群の場合とは明らかに異なることが示された。

Key word：　maternal hyperphenylalaninemia,　gangliosides,　synaptogenesis

我々はヒト母体性高Phe 血症のモデルとしてラットを用いた胎生期高Phe 血症について報告してきたが、本モデル動物はスキナーボックスによる明暗弁別学習において学習障害が認められている(２)。この原因の一つとしてミエリンの低形成が、CNPase活性の低下により示唆されたが、ニューロン・オリゴデンドログリア相関のいずれの部位に一次的な障害があるのかは未だに不明である。今回、我々は脳における細胞集団の構成とその相互作用について検討しうるガングリオシド(３)に注目し、胎生期高Phe 血症ラットにおける脳内ガングリオシドの加齢による変化および脳の発育度合との関連を調べたので報告する。

［実験方法］

1)　動物：2000mg/kgのL-Pheを妊娠したCrj:CD(SD)ラットに妊娠10日から14日までの５日間、１日３回強制経口投与し、出生した雄動物を用いた。溶媒対照として 0.5％トラガントゴム溶液を同様に経口投与し、比較対照としてmethyl azoxy methanol(MAM)を30mg/kg、妊娠13日に単回皮下投与して、それらの出生仔を用いた。なお、交尾の確認された日を妊娠０日とした。

2)　脳重量：生後４、15、21、49日にエーテル麻酔下に放血屠殺して直ちに脳を摘出し、外套部、小脳部、間脳・中脳・延髄部の３つに分けて重量を測定した。

3)　ガングリオシドの測定：Tettamantiらの方法(７)に従って脳

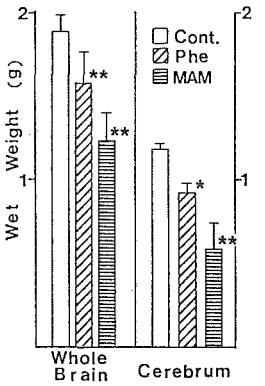


Fig. 1. Brain weight on day 49 after birth.

* : $p<0.05$　　** : $p<0.01$

の各部位よりガングリオシドを抽出し、Warrenの方法(8)でガングリオシド結合性のN-アセチルノイラミン酸を測定し総量を求めた。次いで抽出したガングリオシドをTLC上で展開し、クロマトスキャナーを用いて各ガングリオシド分子種の構成比率を求め、各濃度を算出した。

〔結果〕

1) 脳重量の発達過程に伴う変化

Phe 群の外套部湿重量は生後 4、15、21および49日齢で正常対照群と比較して低値を示した。特に49日齢の脳においては小脳部および延髄を含んだ脳幹部においても減少が認められ、全脳重量で正常対照群に比し、20%の低下が認められた。MAM 投与群は49日齢ではいずれの部位においても有意な低下が見られたが、とくに外套部で減少が著しかった(Fig.1)。

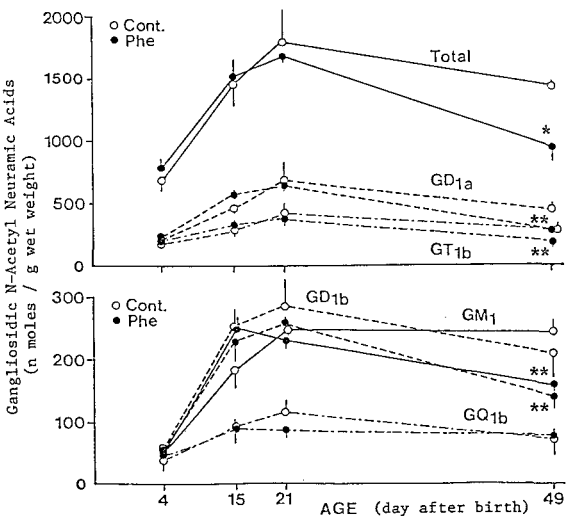


Fig. 2. Effect of maternal hyperphenylalaninemia on age dependent changes of gangliosidic NANA contents in the cerebrum. * : $p<0.05$ **: $p<0.01$

2) ガングリオシドの発達過程に伴う変化

ガングリオシドは生後、離乳期まで急激に増加し、以後漸減することがHilbigらにより報告されている(1)が、Phe 群においてもこの増加減少のパターンは同様であった。しかし、生後49日齢における総ガングリオシド濃度は正常対照と比較して約30%も低下した(Fig.2)。そこで49日齢における脳外套部ガングリオシドについてMAM投与群との比較を行なったところ、濃度は正常対照群と同等であったが、そのパターンに変化が認められた(Fig.3)。

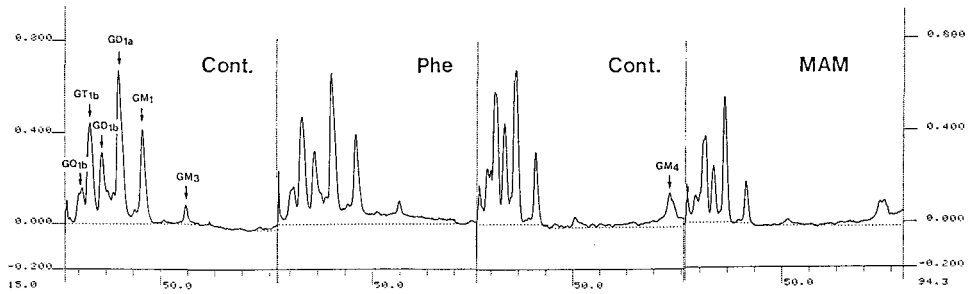


Fig. 3. Densitometoric pattern of brain gangliosides on day 49 after birth (cerebral cortex).

3) 49日齢におけるガングリオシド構成分子種の変化

それぞれの日齢におけるガングリオシド分子種の分析から、49日齢における低下は主としてGD_{1a}とGM_1の変化に起因していると考えられた(Fig.4)。一方MAM 投与群の49日齢の脳外套部ガ

ングリオシドにおいてはGD_{1b}の著しい低下とGQ_{1b}およびGM_1の低下ならびにGM_4の増加が認められた(Fig.4)。

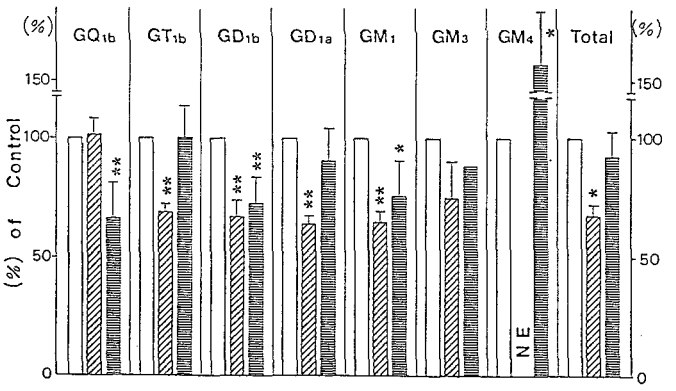


Fig.4 Comparison of each ganglioside content in the cerebrum on day 49 after birth.
□ Cont. ▨ Phe ▤ MAM
* : $p<0.05$ ** : $p<0.01$

[考察]

母体へのL-Phe 投与により成熟動物の脳においてはGD_{1a}、GM_1などのガングリオシド含量の低下が認められた。また、MAM の投与により同じくGD_{1b}の低下およびGM_4 の増加が認められた。それぞれの分子種の神経系細胞における局在(5)を考慮するとPhe 群ではシナプスの低形成とオリゴデンドロサイトもしくはミエリンの変性あるいは低形成が示唆され、一方MAM 群では脳重が低下しているにもかかわらず、重量当りのGM_4 が増加していることから、オリゴデンドロサイトやミエリンには異常がないものと思われ、ニューロンのみが障害を受けていることが示唆された。両薬物とも胎生期の同様な時期に投与しているが、その行動機能に及ぼす影響は非常に異なっている。即ちL-Phe では学習障害と行動量の抑制が認められているのに対し(6)、MAM では著明な小頭症が発現するにもかかわらず明暗弁別学習および自発的運動量には差は認められていない(4)。脳の機能は多岐に渡り、これらの行動機能異常とガングリオシドの変化との関連を一義的に論ずることは出来ないが、少なくとも何等かの差異を表す指標としてガングリオシドを捉えることは可能であろう。我々は胎生期高Phe 血症ラットにおけるミエリンあるいはシナプス低形成とガングリオシドとの関連をより詳細に検討して行きたいと考えている。

[文献]

1. Hilbig, R. et al (1983/1984) Dev. Neurosci. 6, 260-270.
2. Hirano, S. et al (1985) Neurochem. Res. 10, 1071-1081.
3. Ledeen, R. W. (1983) Plenum press, Handbook of Neurochemistry, 3, 41-90.
4. Matsutani, T. et al (1980) J. Neurochem. 34, 950-956.
5. Seyfried, T.N. et al (1983) J. Neurochem. 41, 491-505.
6. Takagi, Y. (1980) J. Med. Soc. Toho, Japan 27, 565-579.
7. Tettamanti, G. et al (1973) Biochim. biophys. Acta 296, 160-170.
8. Warren, L. (1959) J. biol. Chem. 234,1971-1975.

163. マウスの中枢神経外傷モデルにおける大脳皮質内モノアミンに対する GM1 ganglioside の神経修復効果について

岡本右滋・岡田和洋・空閑茂樹・重森　稔・倉本進賢・小島秀樹*
山田茂人**・西彰五郎**・G. Jonsson***・A. Gorio****
（久留米大・医・脳神経外科，精神*，脳疾患研**，Department of Histology, Karolinska Institute (Sweden)***，Fidia Research Loboratories (Italy)****）

〔要　約〕 Ganglioside は神経細胞膜の生理的構成成分の一つである糖脂質で、現在その神経修復効果が注目されている。今回我々は GM1 ganglioside（GM1）の中枢神経修復効果を検索する目的で、マウスの大脳皮質内神経軸索を切断した中枢神経外傷モデルを用い、モノアミン濃度を指標としてその作用について検討した。ddy 系雄性マウス（体重約30g）を用い、右前頭葉皮質を冠状方向に切開し大脳皮質内を尾側に走るモノアミン線維を切断した。この外傷モデルに対し GM1（20mg/ kg/day）を術後14日目より14日間連続で腹腔内注射した。対照群にも同様の手術を加え同量の生理的食塩水を投与した。術後６週目で断頭し大脳皮質を切開部より吻側、尾側、さらに尾側に分けて生化学的分析に供した。組織は 0.1N 蟻酸で homogenize し、上清を ECD 付き HPLC で分析した。対照群術側の NA と 5HT 濃度は切開部より尾側で健側に比べそれぞれ 35％と34％であったのに対し、GM1 投与群では 55％と44％であった。GM1 投与により中枢神経外傷後の減少したモノアミン濃度が回復した。この結果は GM1 が外傷後の中枢神経の修復に何らかの関与をしている事を示唆している。

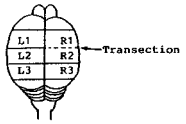
Key word： GM1 ganglioside, Brain Damage, Monoamine

＜目的＞ Ganglioside は神経細胞膜の生理的構成成分の一つである糖脂質で、現在その神経修復効果が注目されている。今回我々は GM1 ganglioside（GM1）の中枢神経修復作用を検索する目的でマウスの大脳皮質内神経軸索を切断した中枢神経外傷モデルを作製し、このモデルに GM1 を投与した。その後、大脳皮質内モノアミン濃度を指標として GM1 の効果について検討した。

＜方法＞ ddy 系雄性マウス（体重 30g）をネンブタール（40mg/kg,i.p.）で麻酔し門歯と両外耳孔の３点で固定した。剃毛、消毒後、前頭頭頂部正中に約５mmの皮膚切開を加え骨膜を剝離した。市販のローターで Bregma の位置から矢状縫合と垂直に右半球のみに幅約１mmの線状開頭を行った。大脳皮質内神経軸索切断（transection）は刃幅 2.5mmのメスを作製し上矢状静脈洞を避け硬膜ごと冠状方向に行った。深さは硬膜の表面から2.5mm で一部脳梁にかかる深さとした。閉頭、消毒し、１日12時間蛍光灯照射の部屋で飼料，水分量とも特に制限せず飼育した。GM1 ganglioside（20mg/kg/day）は術後14日目から27日目まで毎日連続して腹腔内注射した。対照群にも同様の手術を行い同量の生理的食塩水（0.2ml/30g）を腹腔内注射した。また、右前頭頭頂部の線状開頭のみを行った Sham Operation 群も作製した。術後42日目に断頭し transection 部より吻側（R1,L1）、尾側（R2,L2）、さらに尾側（R3,L3）のそれぞれ左右６部位の大脳皮質を切開採取した。transection 部に血腫や感染を認めた例が数％みられたが、これらは本実験から除外した。組織はすぐにドライアイス上に置いたアルミ箔に包んで凍結させた。その後、組織を Internal standard（DHBA）と共に 0.1 N の蟻酸で homogenize し10,000g 10分で遠沈した後、その上清を電気化学検出器付き

高速液体クロマトグラム（HPLC）で 5-hydroxy-tryptamine（5HT）と 5-hydroxyindoleaceticacid（5HIAA）を分析した。移動相にはリン酸 Buffer を用い、Colum は YANAPACK ODS-A を使用した。Noradrenaline（NA）の分析は、残った上清を再びアルミナ吸着法で処理し同様の HPLCで行った。各組織の 5HT, 5HIAA, NA 濃度をクロマトグラムより Internal standard,蛋白量で補正して算出した（TABLE 1）統計処理は Student T test と Mann-Whitney 法で行った。

TABLE 1
Monoamines in Transected Mouse Brain Cortex



		NA		5HT		5HIAA	
		μg/g.prot	R/L×100	μg/g.prot	R/L×100	μg/g.prot	R/L×100
GM1 group	R1	7.32	113.5%	16.70	108.8%	4.68	98.8%
	L1	6.43		15.79		5.19	
	R2	3.20*	55.2%	3.52	44.0%	1.74	52.3%
(n=9)	L2	5.49		8.28		3.29	
	R3	2.65	56.7%	3.21	45.1%	1.79	53.6%
	L3	4.58		6.95		3.41	
Saline group	R1	6.26	110.8%	14.32	102.6%	5.43	122.8%
	L1	5.78		14.21		4.78	
	R2	1.95*	34.9%	2.75	34.4%	1.97	57.6%
(n=9)	L2	5.30		8.23		3.41	
	R3	1.63	33.9%	2.35	37.3%	1.98	60.9%
	L3	4.73		5.77		3.55	

*) The NA concentration in R2 of the GM1 group was statistically higher than that of the saline group, (P<0.05).

＜結果＞ 術後６週を通して手術死亡例は無く著しい体重変化や明らかな異常行動は見られなかった。transection 部より吻側（R1,L1）の NA, 5HT, 5HIAA 値は GM1 群，対照群,Sham Op.群間、また術側,健側間に差は認められなかった。Transection より尾側部（R2,L2）では、Monoamine 値は有意に減少していたが、NA, 5HT に関しては GM1 群が対照群より高値を示した。特に R2 の NA においては両群間に有意差（P<0.05）が認められた。各部位における術側と健側の Monoamine の比（Monoamine Ratio）の平均を Fig.1 に示した。GM1 群の NA 比（R2/L2, R3/L3）は 55%，57%で対照群（35%，34%）より有意（P<0.01, P<0.05）に高く、同部位の 5HT に関しても 対照群の 34%，37%に対して GM1 群は 44%，45%と同様の傾向を示した。5HIAA に関しては両群間の有意差は見られなかった。

TABLE 2.
Monoamines in Sham Operated Mouse Brain Cortex

		NA				NA	
		μg/g.prot	R/L×100			μg/g.prot	R/L×100
GM1 group	R1	6.27	98.0%	Saline group	R1	6.86	104.9%
	L1	6.83			L1	6.54	
	R2	6.30	95.2%		R2	5.77	112.0%
	L2	6.64			L2	5.15	
	R3	4.48	92.6%		R3	4.62	119.6%
	L3	4.83			L3	3.86	

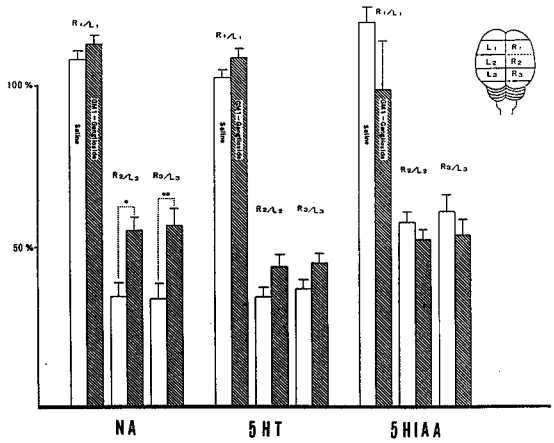


Fig.1. Monoamine Ratios in Transected Mouse Brain Cortex (mean+SEM)

□) Saline group, ▨) GM1 group

*) NA ratio (R2/L2) of the GM1 group was statistically higher than that of the saline group, (P 0.01).

**) NA ratio (R3/L3) of the GM1 group was statistically higher than that of the saline group, (P 0.05).

＜考案＞ Ganglioside は Sialic acid を含む細胞膜の生理的構成成分の一つである糖脂質の類で、約50年前 Klenk[7]により最初に同定された。現在60種以上の分子構造が解明されており、脳、特に灰白質に多量に存在している[15]。最近 Ganglioside

に関する数多くの研究が報告されているが、興味の中心は Ganglioside（特に GM1 ganglioside）の神経修復効果であろう。今回我々はマウスの中枢神経外傷モデルを作製し GM1（20mg/kg/day, 14days）を投与した。大脳皮質内モノアミン濃度は NA, 5HT ともGM1 群の方が対照群より高値を示した。この結果は GM1 投与により中枢神経外傷後のモノアミン濃度の減少が回復した事を示している。In vitro の実験で発達段階にある細胞や腫瘍細胞の培地に Ganglioside を投与すると細胞残存率が増加するという報告[2,5,9,10,11]があり、また In vivo の実験でも GM1 が脳浮腫を軽減させるという報告[6]もある。先に行った本モデルを用いた実験結果によると、術直後より GM1 を14日間投与した場合、対照群に対し術側,尾側の NA 濃度の減少は有意に回復していた。この事実から GM1 による NA 神経修復促進効果と GM1 の抗脳浮腫効果の少なくとも２つの可能性が示唆された。そこで我々は、GM1 の中枢神経修復促進効果をより明確に確認するために今回の実験を計画した。術直後の脳浮腫が消失した時期を見計らって術後14日目から GM1 の投与を開始した処 NA は有意に回復した。この事実は NA の回復が GM1 の抗脳浮腫効果以外の薬理作用によって生じている事を強く示唆している。Ganglioside を末梢神経損傷動物モデルに投与した場合、神経損傷部位への神経軸索の発芽が促進されたという報告[1,3,4,13]があり、本実験結果も正中部と側頭葉部の transection にかからなかった残存神経軸索からの発芽が GM1 により促進されたためかもしれない。また、いくつかの研究報告[8,14,12]で示唆されているように GM1 が損傷神経軸索の再生に促進的効果を持っている可能性も否定できない。GM1 の神経修復作用をもっと詳細に解明するため、今後 GM1 の投与量や投与期間を変化させたり GM1 投与終了から断頭までの期間を変えるなどして生化学的検索を進める一方、組織化学的検索もあわせて行う予定である。

＜文献＞

1. Ceccarelli, B., et al. (1976) "Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol.71, Ganglioside Function." New York, Plenum Press, pp 275-293.
2. Dimpfel, W., et al. (1981) "Gangliosides in Neurological Neuromuscular Function, Development and Repair." New York, Raven Press, pp 119-134.
3. Gorio, A., et al. (1980) Brain Res., 197, 236-241.
4. Gorio, A., et al. (1981) "Posttraumatic Peripheral Nerve Regeneration." New York, Raven Press, pp 481-492.
5. Hauw, J.J., et al. (1981) "Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development, and Repair." New York, Raven Press, pp 171-175.
6. Karpiak, S.E., et al. (1984) J. Neurosci. Res., 12, 485-492.
7. Klenk, E. (1935) Hoppe Seylers Z Physiol. Chem., 235, 24-36.
8. Kojima, H., et al. (1984) Neuroscience, 13, 1011-1022.
9. Mengs, U., et al. (1982) Int. J. Tissue Reac Ⅳ, 277-281.
10. Roisen, F.J., et al. (1981) Science, 214, 577-578.
11. Roisen, F.J., et al. (1981) "Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development, and Repair." New York, Raven Press, pp 135-150.
12. Sabel, B.A., et al. (1984) J. Neurosci. Res., 12, 429-443.
13. Sparrow, J.R., et al. (1982) Exp. Neurol., 77, 230-235.
14. Taffano, G., et al. (1983) Brain Res., 261, 163-166.
15. Vanier, M.T., et al. (1971) J. Neurochem., 18, 581-592.

164. Snell 下垂体性小人症マウス大脳のガングリオシド代謝について

杉崎哲朗・野口鉄也・金松知幸　(東邦大・医・第二生理)

〔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のうち、GM4,GM2,GM1,GD1a,GD3,GD1b,GT1b,GQ1bが低下し、成長ホルモンを投与することにより、GM2,GD1a,GD3,GD1b,GT1b,GQ1bは完全に回復し、GM1とGM4の回復には甲状腺ホルモンの併用投与が必要であつた。このことはガングリオシド代謝にこれらホルモンが異なった役割を演じていることが示唆された。そこで今回はdwマウス大脳におけるガングリオシド代謝につき検討を加えた。その結果、dwマウス大脳ではガングリオシド代謝のA,B両経路の基質であるGM3の代謝回転が発育期を通じて低下し、これにともないA経路の代謝が低下していることが示された。またミエリン形成に必要なGM4の代謝は常に低下していることを見出した。

Key word : Ganglioside metabolism, dw cerebrum, Development.

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発育に伴って検討した結果、15日齢以後、dwマウス大脳の総ガングリオシド含量の増加は緩やかとなり、各分画のうち、GM4,GM2,GM1,GD1a,GD3,GD1b,GT1b,GQ1bの増加は認められず、40日齢でこれら分画は正常マウスのそれらより有意に低下していた。回復を目的として、dwマウスに成長ホルモンを生後20日間投与すると、GM2,GD1a,GD3,GD1b,GT1b,GQ1bは完全に回復し、GM1とGM4の回復にはサイロキシンの併用投与が必要であった。このことはガングリオシド代謝にこれらホルモンが異なった役割を演じていることが示唆された(6)。今回はdwマウス大脳に於けるガングリオシド代謝につき検討を加えた。

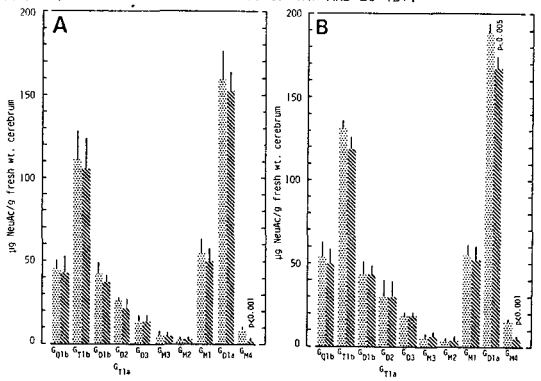
[　実験方法　]

dwマウスはジャクソン研究所より購入し、既報(4)に従って自家繁殖した。15日齢、20日齢の正常マウスとdwマウスの脳室内にエーテル軽麻酔下でAcetyl-D-mannosamine,N-[mannosamine-6-^{3}H] (S.A. 28.6 Ci/mmol) 5 μCiを注入し、6時間後に瀉血断頭、脳を摘出した。大脳よりガングリオシドの抽出はTettamantiらの方法(8)により行ない、HPTLCを用いて各分画を展開した(7)。ガングリオシドのシアル酸の定量はWarrenらの方法(9)により行ない、HPTLC上の分画はデンシトメーターを用い定量し、各分画の含量はシアル酸量をもって示した。また、各分画に転入した放射能はラジオクロマナイザー(Aloka)で測定した。

[　結果　]

大脳ガングリオシド含量:　正常マウスの15日齢と20日齢と比較するといずれのガングリオシドも増加していた。しかし、各日齢での正常とdwマウスとの比較では、15日齢でGM4が有意に減少し、20日齢でこれに加えてGD1aが有意に減少していた(図 1)。

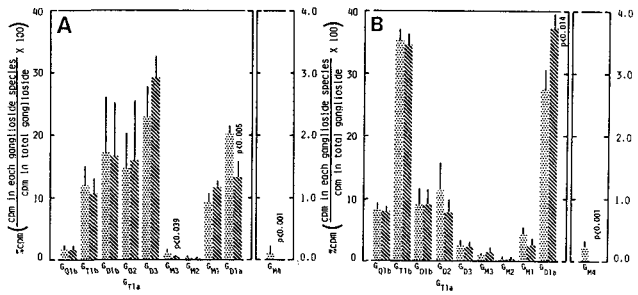
CHANGES IN CONCENTRATION OF GANGLIOSIDE SPECIES FROM dw CORTEX
(図 1) AT POSTNATAL DAYS 15 (A) AND 20 (B).



Mean values are given from 4 animals. Vertical lines represent 1 S.D.
▒▒▒: Control ////////: dw

N-acetyl-D-mannosamineからの大脳ガングリオシドへの放射能の転入: 15日齢正常マウス大脳のガングリオシド分画中最も放射能分布が多かったのはGD3で、以下B経路 (GD3→GD2→GD1b→GT1b→GQ1b)に従って減少していった。他方、A経路(GM2→GM1→GD1a→GT1a)ではD1aに最も多くの放射能が転入され、次いでGM1,GM2と減少していた。これらの代謝経路の基質であるGM3への転入は全体の2%以下であった。他方、20日齢正常マウス大脳では、B経路中のGT1bに最も多く分布し、GD3への転入は15日齢に比較して減少していた。また、A経路では15日齢と同様GD1aに最も多く分布していた。正常マウスとdwマウスを比較すると、15日齢dwマウスではGD1a,GM3,GM4の分布が、20日齢ではGM4の分布が有意に減少していた。また、20日齢ではGD1aへの放射能の分布は正常マウスに比して有意に増加していた(図 2)。次いで各分画の放射能の分布をシアル酸あたりの比活性でみると(図 3)正常15日齢マウスでは、放射能分布(図 2)と同様に、GD3の比活性が高く、B経路の代謝に従って減少していた。また、A経路でも各分画は経路に従って減少していた。しかし、20日齢になると、A,B両経路とも各分画の比活性は一般に低下していたが、代謝系の末端では逆に増加していた。dwマウス各分画の比活性を正常マウスと比較すると、15日齢ではGM3が有意に低値であり、A経路のGM2,GD1aもまた有意に低値であった。しかし、GM1のみ有意に上昇していた。また、GM4は有意に減少していた。20日齢では正常マウスに比較して、GM1とGM4は減少し、GD1aは逆に上昇していた。

% DISTRIBUTION OF RADIOACTIVITIES INCORPORATED FROM N-ACETYL-D-MANNOSAMINE
(図 2) INTO EACH GANGLIOSIDE SPECIES IN dw CEREBRAL CORTEX
AT POSTNATAL DAYS 15 (A) AND (B).



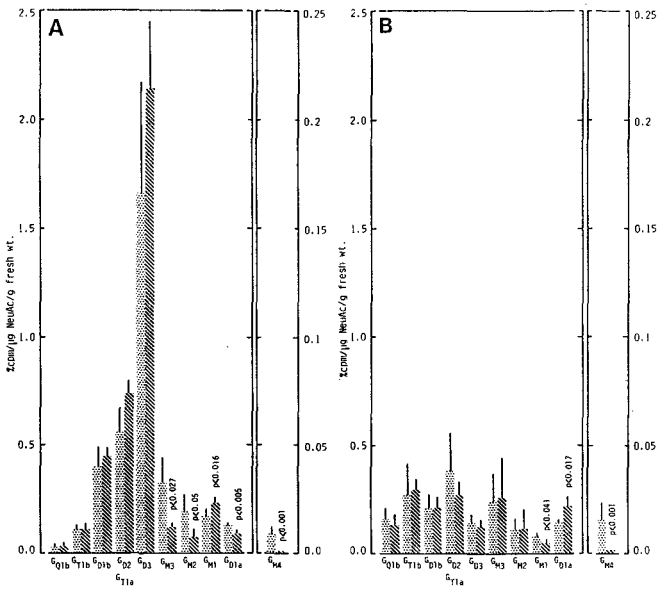
Mean values are given from 4 animals. Vertical lines represent 1 S.D.
▒▒▒: Control ////////: dw

[考察]

GM1とGM4はミエリン形成に伴って増加すること(1,2,10)、GM2はミエリンとオリゴデンドログリアに含まれること(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(6)に関与すると言われている。これらの各ガングリオシドがdwマウスで減少していることはすでに報告した(1)。マウス大脳では生後に大脳のグリア細胞の分裂、ミエリン形成、シナプス形成を含む神経細胞の成熟が行なわれ、20日齢でそれぞれがほぼ完成する。これを裏付けるように、正常マウスでは、20日齢に比して15日齢では各ガングリオシドの放射能分布は高く、かつ代謝も盛んに行なわれていることが示され、この傾向はB経路で著明であった。しかし、既報(5)の7日齢dwマウス大脳でのDNA合成低下は15日齢のGD3分画の変

RELATIVE SPECIFIC ACTIVITIES OF RADIOACTIVITIES INCORPORATED FROM N-ACETYL-D-MANNOSAMINE INTO EACH GANGLIOSIDE SPECIES IN dw CEREBRAL CORTEX AT POSTNATAL DAYS 15 (A) AND 20 (B).

(図 3)



Mean values are given from 4 animals. Vertical lines represent 1 S.D.
▒▒▒▒: Control ▨▨▨▨: dw

化とは一致しなかった。最も著しい変化は15日齢dwマウス大脳でA，B両経路の基質であるGM3の放射能分布と比活性が正常マウスの40%に減少していることであった。したっがて、両経路の代謝全体がdwマウスで低下し、含量低下を引き起こすものと考えられた。20日齢に至るとdwマウスでは正常マウスと同様に代謝回転がすでに低下していることから、未熟な状態で発育が停止してしまうものと考えられるが、dwマウス15日齢のGM1の比活性の上昇、20日齢のGD1aの比活性の上昇は脳の発育遅滞を示すものと思われた。

神経細胞の発育とオリゴデンドログリアの分裂分化の相互の結果としてのミエリン形成に関与するGM4は15日齢、20日齢ともに放射能分布、代謝回転ともに低下していた。以上のことから、dwマウス大脳ではガングリオシド代謝A，B両経路の基質であるGM3の代謝回転が発育期を通じて低下し、これにともない特にA経路の代謝が低下していることが示された。また、ミエリン形成に必要なGM4の代謝が常に低下していた。このことは、シナプス形成の遅滞とミエリン低形成を示すものであった。

今後、成長ホルモンと甲状腺ホルモンの回復実験を行ない、これらの代謝系に及ぼす両ホルモンの関与を検討したい。

[文献]

1. Hilbig,R.,Lauke,G.,Rahmann,H. Devl.Neurosci. 6, 260-270, (1983/84).
2. Ledeen,R.W.,Yu,R.K.,Eng,L.F. J.Neurochem. 21, 829-839, (1973).
3. Mack,S.R., Szuchet,S.,Dauson,G. J.Neurosci.Res. 6, 275, (1981).
4. Noguchi,T.,Sugisaki,T.,Tsukada,Y. J.Neurochem. 38, 257-263, (1982).
5. Noguchi,T.,Sugisaki,T.,Takamatsu,K.,Tsukada,Y. J.Neurochem. 39, 1693-1699,(1982)
6. Noguchi,T.,Sugisaki,T. J.Neurochem. in press, (1986).
7. Rosner,H. Analyt.Biochem. 109, 437-442, (1980).
8. Tettamanti,G.,Bonall,F.,Marchesini,S.,Zambotti,V. Biochem.Biophys.Acta, 296, 160-170, (1973).
9. Warren,L. J.Biol.Chem. 109, 437-442, (1959).
10. Yu,R.K.,Iqbal,K. J.Neurochem. 32, 293-300, (1979).

165. 視交叉上核モノアミン代謝の日内変化と加齢による変化

盛政忠臣・金行孝雄・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〕

ラット脳視交叉上核（ＳＣＮ）におけるモノアミン代謝の日内変化とそれに対する加齢（９、６５週令）の影響について検討を加えた。

ドパミン（ＤＡ）代謝は、代謝産物ＤＯＰＡＣ量ならびに［ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ］／［ＤＡ＋ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ］比から、暗期後半または中央に有意な低値、明期後半に高値を示す日内変化が若齢群に認められた。

セロトニン（５ＨＴ）代謝は、代謝産物５ＨＩＡＡ量ならびに［５ＨＩＡＡ］／［５ＨＴ＋５ＨＩＡＡ］比から、同様に暗期後半または中央に有意な低値、明期に高値を示す日内変化が加齢群に認められた。

ＤＯＰＡＣと５ＨＩＡＡそれぞれの低値、高値を示す時点・位相にずれが認められることから、ＳＣＮのリズム駆動体との対応が、ＤＡと５ＨＴとでは異なることが示唆された。

加齢に伴う変化は顕著ではないが、加齢群においては、ＤＡ代謝の日内変化は消失する傾向、５ＨＴ代謝に関してはより明瞭である結果が示された。

Key word：ｓｐｒａｃｈｉａｓｍａｔｉｃ　ｎｕｃｌｅｕｓ、ｍｏｎｏａｍｉｎｅ　ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ、ｃｉｒｃａｄｉａｎ　ｒｈｙｔｈｍ

ラットにおいては、視床下部腹側視交叉上核（ＳＣＮ）にサーカディアンリズムの駆動体が存在している（２）が、その発振機構は不明である。この脳部位に対しては種々のモノアミン線維の入力があり、電気生理学的には抑制性と興奮性の両者の存在（８）が知られているが、間接的な証拠（１）からは、モノアミン系は駆動体でないことが示唆されている。しかしながら、ＳＣＮ内には各種モノアミンが比較的高濃度に存在（５、６）しており、サーカディアンリズムの発現過程に同調し伝達する重要な神経回路網を形成していると考えられる。

本研究においては、ラットＳＣＮ内モノアミン代謝の日内変化と加齢による変化について検討を加えた。

［実験方法］

１２時間毎の明暗周期（明期７００－１９００）、恒温恒湿の条件下で少なくとも３週間以上飼育されている９および６５週齢のウイスター系雄性ラットを用いた。暗転後６時間目より４時間毎（それぞれ、ｎ＝６）に動物を液体窒素中で固定した後断頭して全脳を得た。脳の処理ならびにモノアミンの測定は既報（４）に準じて行った。パンチアウトして得られたＳＣＮの湿重量は平均２．５ｍｇ／ラットであった。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。

［結果］

若齢（９週齢）群において、ＤＡ量は有意ではないが暗期中央に高値を示す日内変

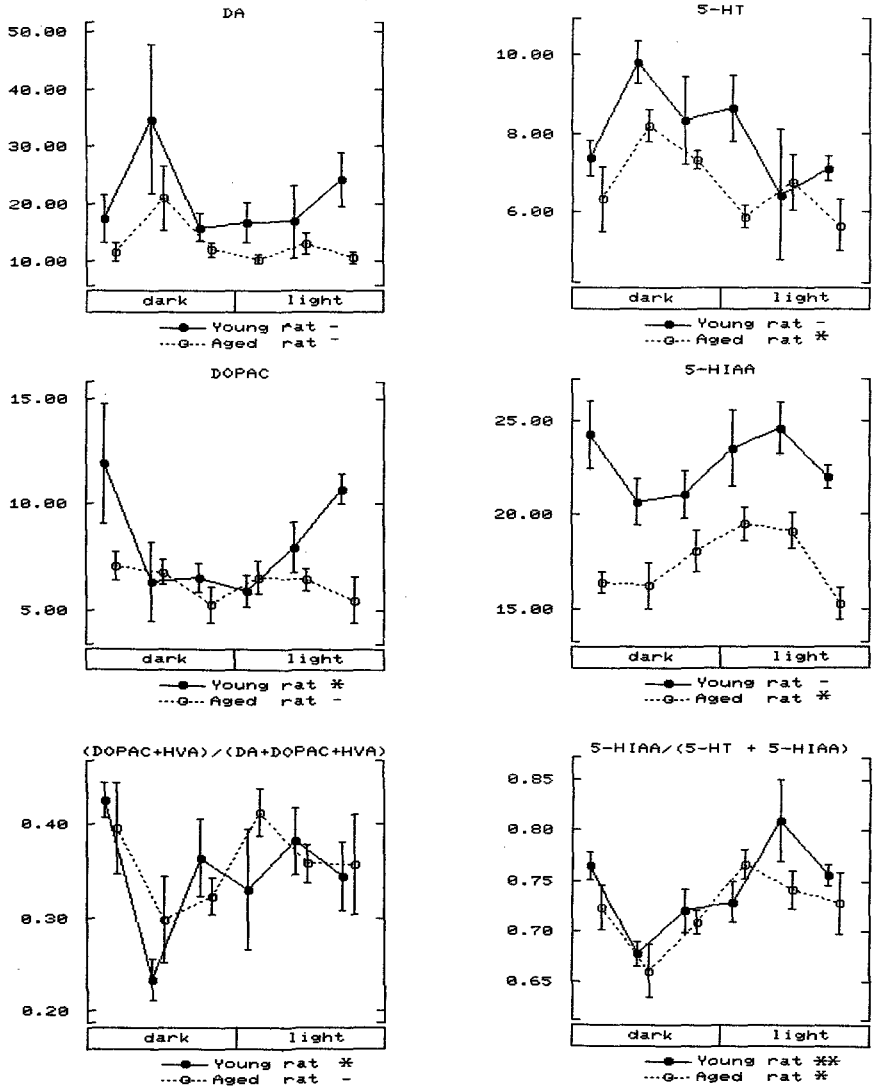


FIGURE 1 Circadian changes of dopamine and serotonin metabolisms in the suprachiasmatic nucleuos of young(—I—) and aged(--I--) rats. Values are indicated nmoles/mg protein (mean±sem).

*; $p<0.05$, **; $p<0.01$ by one-way ANOVA.

化を示した。主代謝産物ＤＯＰＡＣ量は、暗期後半周辺に有意な低値を示す日内変化を示した。［ＤＡＰＡＣ＋ＨＶＡ］／［ＤＡ＋ＤＯＰＡＣ＋ＨＶＡ］比は、暗期中央に有意な低値を示す日内変化を示した。加齢群においては、それぞれリズムの平坦化、レベルの低下が若齢群に対して有意な変化として認められた。

５ＨＴ代謝は、加齢群においてみると、５ＨＴ量が暗期において有意な高値を示し、主代謝産物５ＨＩＡＡは明期後半から暗期中央にかけての有意な低値を示した。若齢群においては、類似した日内変化のパターンを示したが、いずれも有意な変化は認められなかった。［５ＨＩＡＡ］／［５ＨＴ＋５ＨＩＡＡ］比は、両群において明期中央に有意な低値を示すＤＡの場合と類似の日内変化を示した。

［考察］

ＤＡ、５ＨＴの両者において、主代謝産物量ならびに利用率を反映すると考えられる比のいずれにも暗期に低値を示すサーカディアンリズムが認められた。これは、ＳＣＮ内ニウロンの電気活動が暗期に低い（２、９）ことと一致した結果であると考えられる。さらに、この電気活動のリズムが発育（７－２１日齢）の過程で形成されている（９）ことから、加齢群のＤＡ代謝のリズムの消失ならびにレベルの低下は、逆に老化の過程を反映している可能性が示唆された。

主代謝産物量の変化のパターンを見ると、低値または高値を示す時点すなわち位相のずれが認められる。このことは、ＳＣＮにおけるリズムの駆動体からのシグナルに対する対応が、ＤＡと５ＨＴでは異なっていることを反映したものと考えられる。

ＳＣＮにおける３Ｈ－ｉｍｉｐｒａｍｉｎｅ結合部位は、５ＨＴの再取り込み部位であり、この結合活性が暗期後半から明期前半に高値を示すという報告（１０）がある。ここで得られた５ＨＩＡＡのピークは、前者に対して数時間の遅れを示しているが、相互に原因と結果である可能性が示唆された。

ＳＣＮにおけるモノアミンのサーカディアンリズムに対する関与（７）、また、線条体など（４、５）に対する従属オシレーターとしての役割についてはさらに詳細な検討が必要である。

［文献］

1. 池田正明ら (1985) NUROSCIENCES 11, 228-229
2. Inouye,S.T. et al (1979) Proc.nat.Acad.Sci. 76, 5962-5966
3. 盛政忠臣ら (1984) 神経化学 23, 111-113
4. 盛政忠臣ら (1985) 神経化学 24, 118-120
5. Palkovits,M. et al (1974) Brain Research 77, 137-149
6. Saavedra,J.M. et al (1974) Brain Research 77, 157-165
7. Semba,J. et al (1984) Sleep 7, 211-218
8. Shibata,S. et al (1983) Neuroscience Letters 39, 187-192
9. Shibata,S. et al (1983) Neuroscience Letters 43, 231-234
10. Wirz-Justice,A. et al (1983) Eur.J.Pharmacol. 87, 331-333

166. 反復ストレスの脳内ノルアドレナリン代謝に及ぼす影響の加齢による差

田中正敏・津田　彰・小口雅申・白尾一正・佐藤洋美*
辻丸秀策*　（久留米大・医・薬理・精神神経*）

〔要　約〕

2月齢(体重200－220 g)と18月齢(体重470－650 g)のWistar系雄性ラットを対象として、16時間にわたる金網による拘束ストレスを6日間及び7日間反復した時の脳内各部位のnoradrenaline(NA)代謝の変化について、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-SO4)含量を定量することにより検討した。その結果、2月齢のラットでは、視床下部、扁桃核、海馬のNA含量、MHPG-SO4含量は6日間の反復ストレスにより有意な変化を示さなかったが、青斑核部ではMHPG-SO4含量が増加した。しかし、7日目のストレスに対しては、すべての部位でNA含量、MHPG-SO4含量とも有意な変化を示さなかった。これと対照的に、18月齢のラットでは、6日間の反復ストレスによりこれら4部位すべてで、MHPG-SO4含量が有意に増加しており、しかも7日目のストレス負荷によりMHPG-SO4含量はそれからさらに有意に増加した。また12月齢のラットの扁桃核では反復ストレスによりNA含量が有意に低下した。これらの結果から、agedラットでは反復ストレスにうまく適応できず、その結果視床下部、扁桃核、海馬、青斑核部などのNA代謝回転の亢進が持続する可能性が示唆された。

Key word： Repeated stress, Aging, Brain noradrenaline

加齢による生体諸機能の変化は、高齢者が増加するにしたがい重要な医学上の課題になってきている。ラットに拘束ストレスを負荷すると広汎な脳部位でnoradrenaline(NA)の代謝回転が亢進する(2-4、7－9)。2月齢と15月齢のラットに拘束ストレスを負荷すると、両者とも脳内各部位のNA代謝回転は著しく亢進し、その程度の差はみられなかった(3)。しかし、2月齢と12月齢のラットに拘束ストレスを負荷し、その後ストレスから解放して脳内各部位のNA代謝をみてみると、2月齢のラットではストレス解放6時間後にはNA代謝回転がすべての部位で回復しているのに、12月齢のラットでは、ストレス解放6時間後、24時間後でも視床下部、扁桃核でNA代謝回転がなお亢進しており、血漿corticosterone含量もストレス解放24時間後も上昇しており、agedラットの特性は、ストレ状況への適応が悪く、ストレスから解放後も視床下部や扁桃核でNA代謝回転の亢進が持続していることであることを報告した(4)。また7週齢という若いラットでは拘束ストレスを反復すると、ストレスによるNA代謝回転の亢進が次第に減弱してくる(2)。今回は、拘束ストレスを反復した際の若いラットと老齢化したラットの脳内各部位のNA代謝の差について検討したので報告する。

【方　法】

2月齢(体重200～220 g)と18月齢(体重470～650 g)のWistar系雄性ラットを対象とした。両群のラットに毎日午後5時から午前9時までの16時間にわたる金網による拘束ストレスを6日間負荷し、7日目のストレスを負荷する前(図1の7th day stress (－)群)、さらに7日目のストレスを負荷した後(図1の7th day stress (＋)群)に、ラットを断頭した。対照群はストレス負荷群のラットがストレスを負荷されている間

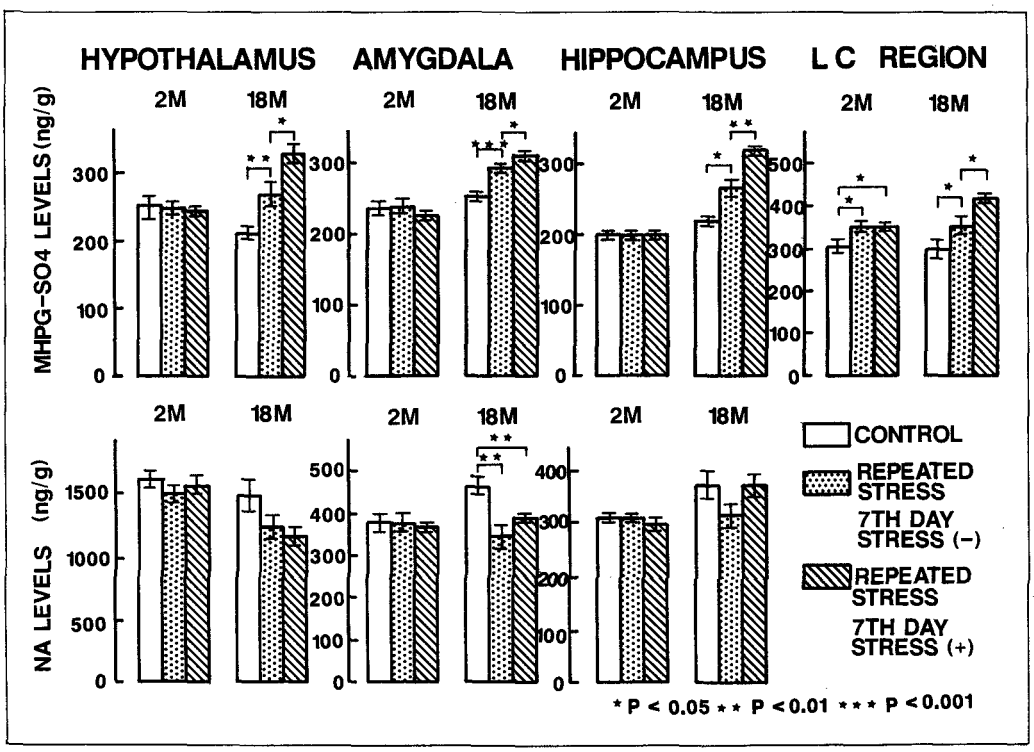


Fig. 1. Effects of Repeated Stress on Levels of Noradrenaline (NA) and 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate (MHPG-SO4) in the Hypothalamus, Amygdala, Hippocampus and Locus Coeruleus (LC) Region in Rats.

は絶食・絶水とした。断頭後速やかに脳を摘出し、Gispenらの方法(1)により各部位に分割した。青斑核部はReisとRossの方法(6)により切り出した。視床下部、扁桃核、海馬についてはNA及びその主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO4)含量を、演者らの方法(5)で蛍光法により定量した。統計的解析はStudent's t-test(両側検定)を適応した。

【結　果】

NA及びMHPG-SO4含量の結果を図1に示す。2月齢のラットでは反復ストレスを負荷しても視床下部、扁桃核、海馬のNA含量、MHPG-SO4含量は有意な変化を示さなかった。また2月齢のラットでは、7日目のストレス負荷後のラットにみられるように、急性の拘束ストレスでみられるMHPG-SO4含量の増加、NA含量の減少(3、4、7-9)はみられなくなった。しかし、青斑核部では反復ストレスによりMHPG-SO4含量は有意に増加した。これに対して18月齢のラットでは、視床下部、扁桃核、海馬、青斑核部のいずれの部位でも、反復ストレスを負荷することによりMHPG-SO4含量が対照群に比べて有意に増加した。しかも、7日目のストレスを負荷すると7日目のストレス負荷前に比べてMHPG-SO4含量が有意に増加した。18月齢のラットではNA含量は反復ストレスにより、視床下部、海馬で減少傾向がみられたが有意な差はなかった。しかし、扁桃核では反復ストレスによりNA含量が有意に減少した。

血漿corticosterone含量は表1に示すように、2月齢のラットでは7日目のストレ

Table 1. Effects of Repeated Stress on Plasma Corticosterone Levels and Relative Weight of Adrenal Grand.

Groups	Plasma Corticosterone Levels (μg/dl)	Relative Weight of Adrenal Grand (mg/g of B.W.x1000)
2 Months		
Control	22.8 ± 1.87(8)	131 ± 6(8)
Repeated Stress		
7th Day Stress (-)	14.0 ± 0.94(7) ^{a***}	182 ± 6(7) ^{a***}
7th Day Stress (+)	31.6 ± 3.32(7) $^{a*}_{b***}$	204 ± 6(7) $^{a***}_{b*}$
18 Months		
Control	15.8 ± 1.06(7)	75 ± 4(7)
Repeated Stress		
7th Day Stress (-)	10.9 ± 1.03(6) ^{a**}	100 ± 5(6) ^{a**}
7th Day Stress (+)	10.0 ± 1.08(7) ^{a**}	97 ± 3(7) ^{a***}

Each value indicates the mean ± S.E.M. Statistical significance: a ; vs. respective control groups, b ; vs. respective 7th day stress (-) groups. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

ス負荷後も有意な増加を示したが、18月齢のラットでは7日目のストレスを負荷しても有意な変化を示さなかった。また、体重に対する副腎の相対重量は2月齢のラットでも18月齢のラットでも反復ストレスにより有意に増加したが2月齢のラットの副腎重量が7日目のストレス負荷でさらに有意に増加したのに対して18月齢のラットでは7日目のストレスを負荷しても有意な差はみられなかった。

【考　察】

今回の結果から、従来の報告(2)のように2月齢といった若いラットではストレスを反復することにより、急性ストレスでみられた脳内各部位のNA代謝回転の亢進がみられなくなることが示された。これに対して、18月齢のラットでは反復ストレスによってむしろNA代謝回転は常時亢進したような状態が生じ、しかも7日目のストレスにも反応してさらにNA代謝回転が亢進することが示された。これらの結果から2月齢のラットが反復するストレスに対してうまく適応していくのに対して、18月齢のラットではそれがうまく出来ず、その結果NA代謝回転の亢進が持続するということが推測される。この結果は12月齢のラットでは急性ストレス解放後も視床下部や扁桃核でNA代謝回転の亢進が持続しているという結果(4)と一致する。副腎皮質機能についても、18月齢のラットでは反復ストレス後はその後のストレスに対してcorticosterone含量も副腎相対重量ももはや増加せず、疲憊状態にあることが推測される。今回の結果からagedラットでは強大なストレスが反復されるとそれにうまく適応できず視床下部、扁桃核、海馬、青斑核部などでNA代謝回転の亢進が持続することが示唆された。

【引用文献】

1). Gispen,W.H., Schotman,P. and de Kloet,R.E.(1972) Neuroendocrinology 9:285-296 2.) 帆秋善生 (1982) 久留米医誌 45: 1390-1407 3). Ida,Y., Tanaka,M., Kohno,Y., Nakagawa,R., Iimori,K., Tsuda, A., Hoaki,Y. and Nagasaki, N. (1982) Neurobiol. Aging, 3: 233-236 4). Ida,Y., Tanaka,M., Tsuda, A., Kohno,Y.,Hoaki,Y., Nakagawa,R., Iimori,K. and Nagasaki, N. (1984) Life Sci., 34:2357-2363 5). Kohno,Y., Matsuo,K., Tanaka,M., Furukawa,T. and Nagasaki,N. (1979) Anal. Biochem. 97:352-358 6). Reis,D.J. and Ross,R.A. (1973) Brain Res. 57:307-326 7). Tanaka,M., Kohno,Y., Nakagawa,R., Ida,Y., Takeda,S. and Nagasaki,N. (1982) Pharmacol. Biochem. Behav. 16:315-319 8). Tanaka, M., Kohno, Y., Nakagawa, R., Iimori, K., Hoaki, Y., Tsuda, A. and Nagasaki, N. (1982) Life Sci. 30: 1663-1669 9). Tanaka, M., Kohno, Y., Tsuda, A., Nakagawa, R., Ida, Y., Iimori, K., Hoaki, Y. and Nagasaki, N. (1983) Brain Res. 275:105-115

167. 長期強制走行ストレスによる中枢神経諸核のカテコールアミン量の変化

原田雅典・井上　桂・小森照久・北山　功・野村純一
妹尾英男*　(三重大・医・精神神経・群馬大・医・行動生理*)

〔要　約〕

成熟雌ラットを長期（平均12日）の強制走行ストレスに曝すと，その内約半数はストレス負荷后2週間経って身体疲労から回復した后もなお発情周期の消失と持続的寡動状態を来すので，これをうつ病モデル群とした。後の半数は次第に活動性と発情周期を回復するので，これを自然回復群とした。これら2群に短期ストレス群（3日および7日），正常対照群を加えて5群とし，その各々から，青斑核，弓状核，正中隆起を切り出し，HPLC－ECD法にて，ノルアドレナリン（NA），ドーパミン（DA）量を測定した。変化の認められたのは青斑核，正中隆起であった。青斑核においては，NA量は，短期ストレス群，うつ病モデル群，自然回復群のいずれでも増加を示していた。正中隆起においては，DA量は短期（3日）ストレス群では著増するものの，うつ病モデル群では激減し，自然回復群では変化がなかった。

これらの結果は，ストレスが脳機能に影響し何らかの病態を発生させる場合，青斑核と正中隆起が重要な役割を担っていることを示唆するものである。殊に正中隆起ではストレスの経過に伴って，DA量が激しく増減しており，このことはうつ病と内分泌機能との関連を考える上で興味深い。

Key word：Forced running stress, Catecholamines, Median eminence

ストレス状況がうつ病の病態発生に先駆することは臨床経験の教えるところである。一方実験的なストレスと脳機能の関係に関してもこれまで数多くの知見が積み重ねられているが，まだ一定の見解は得られていない。殊に本実験の如く，持続的寡動状態に到るまで長期強度のストレスに曝す方法は皆無と言って良く，またストレスを負荷した動物の中枢神経核レベルでのカテコールアミン量を測定した実験も意外に数少い。ここでは，測定部位として，青斑核，弓状核，正中隆起を選び，各々の神経核でのノルアドレナリン(NA)，ドーパミン（DA）量を，短期ストレス群（3日および7日），うつ病モデル群，自然回復群および正常対照群の各群で測定した。

【方　法】

(1)実験動物

成熟雌ラットを回転ケージの中で飼育すると，発情周期に一致して自発活動が増加するような律動周期を示すようになる。この内の一部を正常対照群とし，他を1分間5回転で回転する周囲1mのケージに移し，強制走行ストレスに曝した。その内一部を短期ストレス群（3日および7日）とし，他を長期ストレス（平均12日）に曝した。長期にストレスに曝したラットの内約半数は，ストレス負荷后2週間経って身体疲労から回復した后もなお自発活動の著しい低下と発情周期の消失を示すので，これをうつ病モデル群とし，他の半数はストレス負荷后2週間頃より除々に自発活動量と発情周期を回復するので，自然回復群とした。

(2)諸核の切り出しと遠心分離

5群のラットを断頭后，ただちに氷上で脳を摘出，－80℃で急速冷凍した。その后

クリオスタット（−12℃）で300μmの連続切片にし，実体顕微鏡下でマイクロナイフと中空針を用い，König & Klippel[5]及び Jacobowitz & Palkowits [3]らのアトラスを参考にして，弓状核，正中隆起，青斑核を切り出した。切り出した諸核に0.1M EDTA 2μℓ，DHBA（3,4−dihydroxy−benzylamine）7ngを含む0.1N Hcl 100μℓでホモジナイズした。一部（10μℓ×2）を蛋白定量用に，残りを10,000g,15分間冷却遠心分離し，その上澄20〜30μℓを電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー（HPLC−ECD）に注入した。

(3)蛋白定量

Lowry[6]の方法を一部変更し，bovine serum albumine を標準物質として蛋白量を測定した。

(4)カテコールアミン量の測定

移動相として，3mg／ℓ EDTA, 250mg／ℓ 1− Heptone −sulfonic acid Na, 8.5％ MeoH を含む 0.1Mリン酸バッファー（PH3.1）を使用し，流速は1.2mℓ／分とした。カラムは逆相（Yanapac ODSA）を用い，カラム温度は16℃に設定した。電気化学検出器は，Yanapac VMD−501 を用い，電圧は700mvに設定した。

【結　果】

NA量に関しては，青斑核において，短期（7日）ストレス群，うつ病モデル群，自然回復群で対照群に比し有意な増加が認められた。また正中隆起において，うつ病モデル群で有意な増加が認められた。DA 量に関しては，正中隆起において，短期（3日）ストレス群で有意な増加，うつ病モデル群で有意な低下を認め，自然回復群では正常レベルであった。また青斑核では短期（3日及び7日）ストレス群で有意な増加を認めた。

TABLE 1　NORADRENALINE CONTENTS IN RAT BRAIN REGIONS

NUCLEUS AND AREA	CONTROL	3 DAYS STRESS	7 DAYS STRESS	LONG−TERM STRESS (DEPRESSION−MODEL)	RECOVERY
NUCLEUS ARCUATUS	75.2 ± 4.0(8)	65.2 ± 5.3(8)	79.1 ± 3.7(9)	85.6 ± 5.8(7)	77.3 ± 6.5(6)
MEDIAN EMINENCE	48.4 ± 5.7(6)	57.9 ± 4.5(7)	66.7 ± 6.2(7)	79.1 ± 8.2*(6)	56.2 ± 6.8(6)
LOCUS COERULEUS	99.5 ± 12.0(8)	128.9 ± 17.3(7)	145.5 ± 7.2**(8)	142.1 ± 10.2*(8)	150.3 ± 8.3**(6)

TABLE 2　DOPAMINE CONTENTS IN RAT BRAIN REGIONS

NUCLEUS AND AREA	CONTROL	3 DAYS STRESS	7 DAYS STRESS	LONG−TERM STRESS (DEPRESSION−MODEL)	RECOVERY
NUCLEUS ARCUATUS	15.4 ± 1.9(9)	16.9 ± 2.5(8)	17.0 ± 1.8(8)	15.8 ± 1.6(6)	14.9 ± 1.2(7)
MEDIAN EMINENCE	138.0 ± 22.9(6)	256.2 ± 19.7**(6)	174.4 ± 39.0(6)	77.7 ± 12.7*(7)	131.4 ± 18.1(6)
LOCUS COERULEUS	14.4 ± 2.3(8)	30.6 ± 4.6**(7)	28.1 ± 1.6***(8)	13.6 ± 0.8(9)	16.6 ± 1.3(7)

The results are expressed as mean values ± SEM (number of individual determination)
ng / mg protein.　*$p < 0.05$　**$p < 0.01$　***$p < 0.001$

【考　察】

我々は長期走行ストレスによって，性周期の消失を伴う持続的寡動状態を呈するに到ったラットを，うつ病モデルラットと考え，これまで種々の方法を使用して，その脳機能の検索をすすめて来た。[2] それによれば，蛍光組織化学法によって、青斑核におけるNA蛍光の増強，弓状核，正中隆起でのDA蛍光の低下が示されている。今回は変化のあった上述3部位でのカテコールアミン量をHPLC－ECD法を使って測定したものであるが，NA量に関しては青斑核，正中隆起で増加，DA量に関しては，正中隆起で低下という所見が得られ，ほぼ蛍光組織化学法での結果を裏付けることになった。一方，長期ストレスの経過に伴うカテコールアミン量の推移を継時的に眺めてみると，青斑核のNA量に関しては，経過に伴って増加する傾向を示している。文献的には，ストレスは青斑核のNA機能を低下させるとするものが多く[1]，ここでの結果と異なるが，それにはストレスの種類，長さ，強さ等の相違が関係しているものと思われる。正中隆起のDA量に関しては，短期ストレスで著増，うつ病モデル群で激減，自然回復群で正常という著しい変化を示している。正中隆起に対するストレスの影響については，報告も少く，一定の見解も得られていないが，今回のような結果を報告したものはない。しかしながら，今回の所見は正中隆起がストレスに極めて敏感に反応することを示唆するものと思われ，その意味でも興味深い。

また，昨年の神経化学会で小森ら[4]はストレスおよびうつ病モデルラットにおけるチロシン水酸化酵素（TH）活性について報告している。それによれば，青斑核のTH活性は短期ストレスでは上昇，うつ病モデルでは著明に低下していた。また正中隆起のTH活性は，短期ストレスでもうつ病モデルでも上昇していた。この所見を今回の結果に照らし合わせると，短期ストレスでは青斑核，正中隆起のいずれにおいてもカテコールアミン量とTH活性はともに上昇している。一方うつ病モデルにおいては，青斑核ではNA量の増加とTH活性の低下，正中隆起ではDA量の減少とTH活性の上昇というように，カテコールアミン量とTH活性が逆方向の変化を示したことは興味深い。短期ストレスにおいてみられる所見は，生体の適応機制としてとらえることができようが，ストレスがあまりに強くまた長期にわたり，生体の適応能力の限界をこえると，脳内カテコールアミン代謝に破綻が生じ，その結果うつ病様の病態に到るのではないかと推定される。その場合，上行性NA系の青斑核のみならず，視床下部隆起漏斗DA系，殊に正中隆起が重要な役割を演じているものと考えられる。実際人間のうつ病においても，睡眠や意識，感情や欲動の障害に加えて，内分泌機能，殊に性腺系の異常が稀ならず認められるが，今回の所見はこれらのことによく対応しており，その意味でも示唆に富むものと考えられる。

【文　献】

(1) Glavin, G.B. (1985) Neurosci & Behav. Rev. 9, 233−243
(2) 鳩谷龍，野村純一，北山功，小石澤学（1983）精神医学 25, 249−258
(3) Jacobowitz, D.M. and Palkowits, M (1974) J. Comp. Neur. 157, 13−42
(4) 小森照久，井上桂，北山功，野村純一（1985）神経化学 24, 562−564
(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

168. マウス脳部位・末梢臓器におけるピペコリン酸濃度および取込みに対する拘束ストレスの影響

西尾廣昭・曽我部肇・瀬川富朗　(広島大・医・薬効解析)

〔要　約〕

3時間の拘束ストレスにより，マウス菱脳，肝臓および心臓において有意なピペコリン酸（ＰＡ）濃度の上昇が認められた。ジアゼパム前投与はこれらの変化のうち，菱脳のＰＡ濃度上昇のみを有意に抑制し，中枢におけるＰＡ濃度上昇が末梢におけるそれとは，異なったメカニズムによるものである事が示唆された。このストレス刺激の影響のメカニズムについて明らかにするため，^{3}Ｈ－Ｄ-および^{3}Ｈ－Ｌ-ＰＡの各臓器への取込みについて検討した。正常マウスにおいては，Ｄ-体はＬ-体に比較して腎臓への排泄が有意に大きく，その他の臓器への取込みは低い事が認められた。一方ストレス負荷マウスにおいては，内在性ＰＡ濃度上昇が認められている菱脳，肝臓および心臓への^{3}Ｈ－Ｌ-ＰＡの取込みが有意に増大した。これらの結果は，ストレス刺激の影響はＬ-ＰＡの臓器への取込み過程の促進作用を介するものである可能性を示唆するものと思われる。

Key word： L-Pipecolic acid, D-Pipecolic aicd, Stress.

ピペコリン酸（ＰＡ）は，プロリン，ハイドロキシプロリンとともに哺乳動物脳に含まれる三つのイミノ酸の一つであり，中枢神経系におけるリジン代謝に関係する物質として注目されており，ＰＡの神経機能に対する神経化学的研究も数多くなされつつある(1)。我々はすでに，この脳内に微量存在するイミノ酸の高速液体クロマトグラフ（ＨＰＬＣ）を用いた高感度定量法を確立し(3,4)，ＰＡのラット，マウス脳内局在性，ならびに発育に伴う濃度変化について報告した(5)。さらに最近我々は，絶食，あるいは拘束といったストレス性刺激によって，マウスの菱脳，肝臓および心臓内ＰＡ濃度が特異的に増加する事を見いだした(6)。今回は，このようなストレス刺激によるＰＡ濃度上昇のメカニズムについて明らかにするため，抗不安薬の影響ならびに，ＰＡの臓器への取込みに対する拘束ストレスの影響について検討した。

［実験方法］

１）実験動物は，ddy系雄性マウス（４～５週令）を用いた。３時間の拘束ストレスはプラスチックネット用いて負荷した。　２）臓器内ＰＡ濃度の定量には，我々がすでに報告したＨＰＬＣを用いたフルオレスカミン前処理法(4)，ダンシルクロライド蛍光誘導体化法(3)により行った。各種処置マウスを断頭後，すばやく脳，肝臓，心臓および血液を分離採取し，－80 °Cで保存した。脳は，さらに終脳（Brain A）中間脳（Brain B），菱脳（Brain C）の３部位に細分した。　３）トレーサー実験においては，我々が従来より用いてきた^{3}Ｈ－Ｄ,Ｌ-ＰＡを以下のようなＨＰＬＣによるラセミ分割法により，^{3}Ｈ－Ｄ-ＰＡ，^{3}Ｈ－Ｌ-ＰＡとして分離精製して用いた。すなわち，分離カラムとして東洋曹達 TSK-Enantio L1 を用い，移動相 0.25 mM 硫酸

綱，カラム温度40 °Cで分離精製した。なお，この時のD-体，L-体の Rs 値は1.77 であり，ほぼ完全な光学分割が可能であった。 4）^{3}H－D-および^{3}H－L-ＰＡを用いてのトレーサー実験は，我々が以前に報告した方法(2)に準じて行った。すなわち，標識化合物を25.9 μCi/kg，179 nmol/kg の割合で，マウス腹腔内投与後５分，30分，３時間後に断頭し，脳，肝臓，腎臓，心臓および血液を分離採取し－80 °Cで保存した。脳は，さらに終脳 + 中間脳（Brain A+B），菱脳（Brain C）の２部位に分けた。各臓器内の放射活性は，それぞれ Acid butanol で抽出後，液体シンチレーションカウンターにより測定した。各臓器内へのＰＡの取込みの指標としては，臓器内と血液プラズマ中の放射活性の比率パーセント[T/P %; Tissue/Plasma value (%)]を計算した。

［実験成績］

１）臓器内ＰＡ濃度に対するジアゼパムの影響：３時間の拘束ストレスによるBrain C，肝臓および心臓内のＰＡ濃度の有意な上昇に対する，抗不安薬であるジアゼパムの影響について検討した。ジアゼパム(1 mg/kg, i.p. 投与）は，拘束ストレスによる Brain C のＰＡ濃度上昇を有意に抑制したが，肝臓での濃度上昇に対しては無影響であった(Fig.1)。一方，心臓においては，ジアゼパムは正常マウス

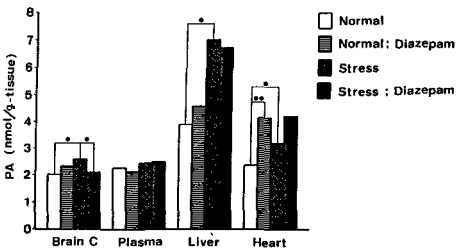


Fig. 1 Effect of diazepam on the immobilization stress induced elevation of pipecolic acid in mouse brain, plasma, liver and heart.

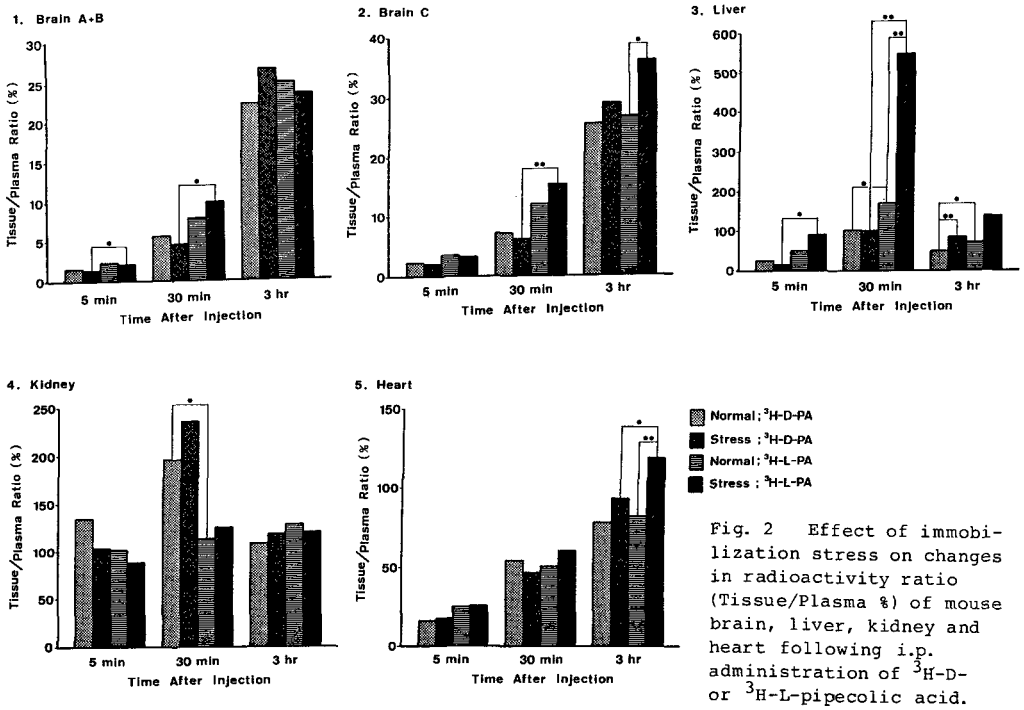


Fig. 2 Effect of immobilization stress on changes in radioactivity ratio (Tissue/Plasma %) of mouse brain, liver, kidney and heart following i.p. administration of ^{3}H-D- or ^{3}H-L-pipecolic acid.

において，ＰＡ濃度上昇作用を示した(Fig.1)。血液プラズマのＰＡ濃度は，拘束ストレスおよびジアゼパムは全く無影響であった(Fig.1)。　2）臓器内へのＰＡの取込み；Ｄ－ＰＡとＬ－ＰＡとの比較：　^{3}Ｈ－Ｄ-あるいはＬ-ＰＡを腹腔内投与した後の血液プラズマ中の放射能活性の時間経過による変化は，^{3}Ｈ－D,L-ＰＡを用いた我々の以前の実験結果(2)と同様であり，投与後５～10分に極大値を示しその後急速に低下し，Ｄ-あるいはＬ-ＰＡ間では差は認められなかった(Data not shown)。各臓器のT/P％は，脳，肝臓および心臓においては，Ｌ-体のほうがＤ-体に比して高い値を示したが，腎臓においては逆にＤ-体のほうがより高い値を示した(Fig.2)。

3）臓器内へのＰＡの取込み；拘束ストレスの影響：　脳，腎臓および心臓における^{3}Ｈ－Ｄ-ＰＡのT/P％値は，3時間の拘束ストレスにより全く影響をうけなかったが，肝臓においては^{3}Ｈ－Ｄ-ＰＡ投与後3時間のT/P％値は，有意に上昇した。一方，^{3}Ｈ－Ｌ-ＰＡのT/P％値は，Brain C（3時間），肝臓（30分）および心臓（3時間）においてそれぞれ有意な上昇が観察された。

［考察］

拘束ストレスによる生体内イミノ酸濃度に対する影響については，すでに報告しているように(6) ＰＡに対して特異的であり，臓器特異性が認められ菱脳(Brain C)，肝臓および心臓においてのみ有意な変化が見いだされた。しかしながら，抗不安薬であるジアゼパムは，これらの臓器のうち中枢における変化のみを有意に抑制した。この結果は，中枢におけるＰＡ濃度上昇が末梢におけるそれとは，異なったメカニズムによってもたらされる事を示唆するものと思われる。　臓器内ＰＡ濃度の上昇のメカニズムの可能性としては，ＰＡ生合成の亢進，ＰＡ代謝の抑制，ＰＡ排泄過程の抑制あるいはＰＡの取込み過程の促進などが考えられる。今回の^{3}Ｈ－ＰＡを用いての実験結果からは，生体内での活性光学異性体である^{3}Ｈ－Ｌ-ＰＡの方が，Ｄ-体に比して臓器への取込まれやすく腎臓からは排泄されにくい事，さらに拘束ストレスによって，^{3}Ｈ－Ｌ-ＰＡの臓器への取込みが促進され，この作用の臓器特異性が内在性ＰＡ濃度上昇作用における臓器特異性と完全に一致した事などから考えて，ストレス刺激の影響はＬ-ＰＡの取込み過程の促進を介するものである事が示唆された。

［文献］

(1) Giacobini, E. (1983) in Handbook of Neurochem. vol.3, (Lajtha, A. ed.) pp.583-605, Plenum Press .

(2) Nishio, H., Giacobini, E., Ortiz, J. & Gutierrez, M.D. (1983) Develop. Brain Res. 6, 107-112 .

(3) Nishio, H. & Segawa, T. (1983) Anal. Biochem. 135, 312-317 .

(4) Nishio, H. & Segawa, T. (1984) Clin. Chim. Acta 143, 57-63 .

(5) Nishio, H. Yamada, Y., Giacobini, E. & Segawa, T. (1985) Int. J. Devel. Neurosci. 3, 379-384 .

(6) Nishio, H., Sawada, E., Sogabe, H. & Segawa, T. (1986) Neurochem. Int. 8, 229-233 .

169. ラット各種脳神経核モノアミン酸化酵素活性・血漿 corticosterone 値および行動量の日内リズムにおよぼす制限摂食の影響について

原田　豊・水川六郎・狭間秀文・国元憲文*
（鳥取大・医・神経精神，琉球大・医・神経精神*）

〔要　約〕

恒暗条件下に2週間飼育した雄成熟ラットを、一群は引き続き自由摂食、他群は12：00～14：00の2時間のみ制限摂食させる条件下でさらに2週間飼育し、制限摂食が各種脳神経核におけるモノアミン酸化酵素（MAO）活性の日内リズムや血漿corticosterone値および行動量に与える影響について検討した。検討部位は、視交叉上核（SCN）、視床下部腹内側核（VMH）、視床下部外側野（LH）であり、それぞれserotonin(5-HT)、β-phenylethylamine(PEA)を基質としたtype Aおよびtype B MAOについて測定した。行動量は摂食時間以外は低下しているが摂食開始前より上昇、血漿corticosterone値は行動量の亢進に3時間先行した峰を有する日内リズムを見た。制限摂食条件下において、SCNやVMHで摂食後より変化するMAO活性の日内リズムの存在が認められ、VMHでは、血漿corticosterone値や行動量の「予知」的変化に関連した摂食開始前からの活性の変化を認めた。VMHが摂食行動を同調因子とした、SCNとは別の計時機構であることや、各種アミンが、摂食に関連した変化を示す一方、生体の日内リズムや「予知」行動に重要な役割を果たしていることが示唆される。

Key word：diurnal variation of MAO activity, restricted feeding, hypothalamic ventromedial nucleus

［はじめに］

脳内モノアミン酸化酵素（MAO）活性の日内リズムに関して近年数多くの研究がなされており、MAOが光刺激や摂食行動と関連してリズムを生じる脳内部位や、リズムが恒暗条件においてフリーランする部位などについて、ある程度明らかにされている。われわれは、これまでに各種環境条件下におけるラット脳神経核レベルでのMAO活性の日内リズム変化を検討してきた[1][2][3]。今回は、摂食行動のリズム性の神経化学的基盤を明らかにする目的で、恒暗条件下において自由摂食と制限摂食群のMAO活性血漿corticosterone値および行動量の示すリズムの相互関連を比較検討し、考察を加えた。

［方　法］

8週齢のWistar系雄性ラットを恒温恒湿の飼育室で外部環境と遮断、摂食摂水は自由として群居飼育した。2週間にわたり12時間周期の明暗条件でadaptationをはかった後、2群にわけて恒暗条件下で引き続き2週間飼育した。1群は自由摂食を続け、他の1群は12：00～14：00にのみ摂食可能な制限摂食条件下に置き、2週間目の02：00、05：00、08：00、11：00、14：00、17：00、20：00、23：00の3時間毎計8時点で6匹ずつ断頭して採血した。脳を摘出し、液体窒素で固定後、cryostat内で60～80μmの連続切片として凍結乾燥した。この切片からKönig and Klippel[4]のAtlasに従い3.0～7.0μgの視交叉上核（SCN）(A 6360)、視床下部腹内側核（VMH）(A 4110)、視床下部外側野（LH）(A 4110)などの神経核を切り出し、重量を測定した。MAO活性はMcCamanらの方法[6]を改変した既報の方法[1][2][3]により測定し、type A MAOの

基質にはserotonin(5-HT)(最終濃度200 μM)、type B MAOの基質にはβ-phenylethylamine(PEA)(最終濃度50.7 μM)を用いた。血漿corticosteroneの定量はHPLC法[8]により、行動量はAutomexを用いて測定した。統計的処理は全てANOVAによった。

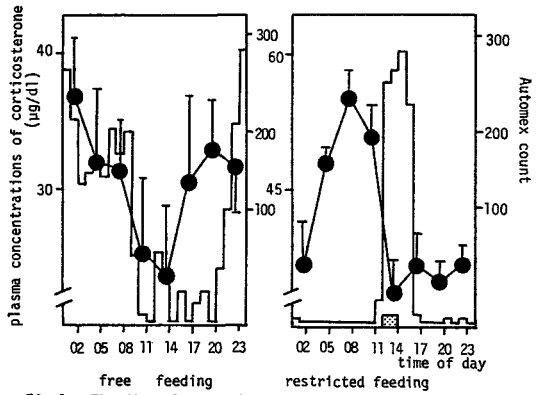


Fig.1. The diurnal variations of plasma concentrations of corticosterone(●—●) and of locomotor activities (▭). ▨: feeding time. ●: M±SE.

［結　果］

1）行動量（Fig.1）；自由摂食群では、20：00～08：00の12時間に全行動量の85%が認められた。制限摂食群では、摂食開始直前の11：00より既に増加を示し始めており、12：00～16：00にピークを示した。全行動量の95%は、12：00～16:00の4時間に集中していた。

2）血漿corticosterone値；自由摂食群では、02：00を最高値、11：00～14：00を最低値とし、20：00からの行動量の増加に先行して14時以降に上昇する日内リズムが認められ($p<0.025$)、制限摂食群では、08：00をピークとし、行動量の変化に先行する形での日内リズムが見られた($p<0.01$)。

3）MAO活性（Fig.2）

ⓐ SCN；type Aとは、自由摂食群の場合、14：00をピークとする一峰性の日内リズムが認められた($p<0.01$)。制限摂食群においても14：00をピークとする一峰性の日内リズムが認められ($p<0.01$)、両群間での大きな位相の差異は見られなかった。type Bでは、自由摂食群では02：00を最高値、11：00を最低値とする日内リズムを認め($p<0.01$)、type Aとは逆の位相を示した。制限摂食群では、摂食後の17：00にピークを示す一峰性の日内リズムを認め($p<0.025$)、type Aに3時間遅れた位相を示した。

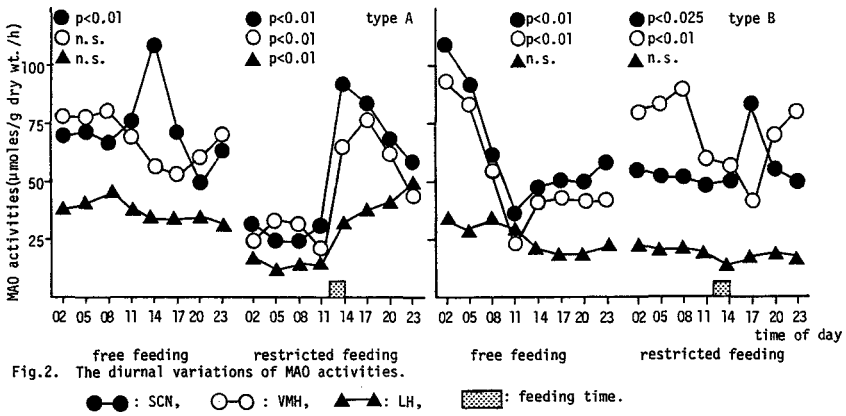


Fig.2. The diurnal variations of MAO activities.
●—●: SCN, ○—○: VMH, ▲—▲: LH, ▨: feeding time.

ⓑ VMH；type Aでは、自由摂食群では日内リズムは認めない。制限摂食群では、17：00をピークとする日内リズムを認め、摂食開始とともに増加しはじめ開始5時間後をピークとして漸減する日内リズム($p<0.01$)が新たに生じた。type Bでは、自由

摂食群では、02：00をピークとする日内リズムを認め（$p<0.01$）、SCNにおけるリズムと同様の位相を示した。摂食制限群においては、摂食開始前より下降を示し、摂食後の14：00～17：00により低値を示す日内リズムを認めた（$p<0.01$）。

© LH；type Aでは、自由摂食群においては日内リズムは見出せなかったが、摂食制限下にて14：00より増加を始め23：00に最高となる日内リズムを認めた（$p<0.01$）。type Bでは、自由摂食、制限摂食群ともに日内リズムは存在していなかった。

［考察］

行動量および血漿corticosterone値は、恒暗下、自由摂食においても明暗条件下の日内リズムが認められた。摂食制限により行動量は摂食期のみに増加し、他の時間帯では強く抑制され、血漿corticosterone値は摂食開始前高値、開始とともに減少し低値を保つ位相に変化を示し、摂食との同調が認められた。制限摂食群における行動量の上昇は摂食開始時刻前より始まる一方、行動量の亢進するさらに3時間前に血漿corticosterone値が最大値を示すことは、生体内に摂食開始を知らせる何らかの「予知」能力があるものと考えられ、これらを司る時刻発信機構の存在が想定される。

SCNでは、type Aは、制限摂食でも自由摂食条件下と同じ位相を示したが、type Bは食後に一度上昇し、再び下降するという摂食に対応した位相のずれを認めた。摂食制限によりtype Aが変化を受けずtype Bのみでリズム位相変化を生じたことは、その基質となるアミンの種類によって関与のしかたが異なることを意味する。VMHでは制限摂食を行うことにより、type Aでは摂食開始後3時間で活性の最高値を、type Bでは逆に最低値を示す日内リズムが生じた。これは、制限摂食行動がVMHのMAO活性に影響を与えていると考えられる一方、type Aとtype Bの基質となるアミンがVMHにおいて別の働きをしているものと推測される。type Bにおける摂食開始前からの活性低下は、摂食開始前の行動量やcorticosterone等の「予知」行動と関連するものと考えられる。VMH破壊によって、corticosteroneの摂食時刻に対応した日内リズムや摂食予知行動の消失[5]が知られており、VMHにはSCNとはその特徴を異にした何らかの計時発信機構があるものと想定される。今回のtype Bの「予知」的変化の存在は、VMH内のPEAなどのアミンにも同様な「予知」的変化が生じていることを示唆している。LHは、摂食活動の日内リズムの調節に関して一定の役割を果たすが、本質的な計時機構ではないと考えられている[7]。以上より、体内には光に同調するSCNと摂食活動に同調するVMHの2つの計時機構があると考えられたが、両者は決して互いに独立した機構ではないと考えられた。各神経核におけるMAO活性のリズムの存在は、種々のアミンにも神経核レベルでの日内リズムが存在していることを間接的に示している。

［文献］ (1) Kamase,H. Folia Psychiat Neurol Jpn 34:481,1980. (2) 国元憲文，他．神経化学 20:420,1981. (3) 国元憲文，他．神経化学 23:463,1984. (4) König,JFR.et al. The Rat Brain.Baltimore.1963. (5) Krieger,DT. Endocrinology 106:649,1980. (6) McCaman,RE.et al. J Neurochem 12:15,1965.(7) 大村裕．蛋白質核酸酵素 27:391,1982. (8) 田村辰祥，他．米子医誌 35:487,1984.

170. 高血圧自然発症及び脳卒中自然発症ラットの Monoamine Oxidase 活性の比較検討

千丈雅徳・山崎則子*・南　勝**・広上　貢**
斉藤秀哉**・H. Parvez***
（北海道大・医・精神，医療短*，第一薬理**，パリ大学***）

〔要　約〕

われわれは本態性高血圧症の発症機構を探る目的で，ウィスター京都(WKY)，脳卒中易発症ラットの脳卒中非発症例(SHRSP-control)，および脳卒中易発症ラットの脳卒中発症例(SHRSP-stroke)を用いて，各群ラットの腎ミトコンドリア画分のMonoamine Oxidase(MAO)活性を測定し，比較検討した。SHRSP 群はWKY 群に比べMAO 活性は低値を示した。反対に血漿noradrenaline(NA) 濃度は，WKY 群に比較してSHRSP 群にて有意に高値を示した(Jpn. Heart J.,25,833-835, 1985)。このことからSHRSP 群に於いてはNAの分解酵素であるMAOの活性の低値，及びそれに起因する血漿NA濃度の高値が高血圧症と何らかの関係を有していることが推測される。我々は更に，MAO-A の特異的阻害剤といわれているclorgyline，およびMAO-B の特異的阻害剤といわれているdeprenylを用いて，WKY,SHRSP-control,及びSHRSP-stroke各群の腎ミトコンドリアMAO のA,B 両タイプの活性を検討した。その結果３群間には，有意の差は見られなかったが，clorgylineによる阻害曲線は33% 阻害のところでplateau に達した。このことから，ラット腎ミトコンドリアMAO は，33% がA-タイプにより，67% がB-タイプより構成される，と推測される。

Key word： SHRSP, MONOAMINE OXIDASE, KIDNEY

脳卒中易発症ラット(SHRSP)，および高血圧自然発症ラット(SHR) はともに高血圧を呈しヒトの本態性高血圧症の疾患モデル動物として広く研究されている[1]。遺伝的要因により起るSHR では，血圧調節中枢に存在する作動神経系のnoradrenaline(NA) 代謝回転の異常が観察されており，このNA作動神経系の障害が高血圧症に関係していることが推測される。又，NAの代謝酵素であるMAO 活性がNA濃度の調節に重要な役割を担っていることが示唆されている[2]。MAO はA タイプとB タイプにわけられ，clorgylineとdeprenylがそれぞれのタイプのMAO の特異的阻害剤として知られている。clorgylineは抗うつ作用を有し，臨床的にも三環系抗うつ剤及びMAO-B 阻害剤であるpargyline などに勝るとも劣らぬ効力があることが知られている[3]。deprenylも脳内dopamine濃度を上昇させることを目的としてパーキンソン病治療にも応用されつつある[4-6]。今回我々は，SHRSP ラットに於ける血圧上昇の機構を明らかにする目的でミトコンドリア画分MAO 活性を比較検討し，又，各群に於けるclorgyline及びdeprenylのMAO 阻害のパターンを検討した。得られた知見を報告する。

―――実　験　材　料　と　方　法―――

SHRSP 及びWKY は岡本教授(Department of Pathology,Kinki University School of Medicine) より恵与された。kynuramineはSigma 社より，4-hydroxyquinolineはNakarai

社より購入した。その他のものはanalytical gradeのものを用いた。

ミトコンドリア画分はFleisher & Kervinaの方法[7]により得た。即ち，ラット腎に5倍容のBuffer(0.3 M sucrose,10 mM HEPES, pH 7.4) を加え，Potter homogenizerにて homogenizeした後，960 x g で10分間遠心し，上清を25,000 x gで10分間遠心して得られた沈殿を同じbufferで２度洗って，ミトコンドリアMAO 酵素源とした。

MAO 活性はKramの方法[8]に従いKynuramineを基質として行った。即ち，0.1 M Kynuramine ミトコンドリア画分(0.24 ～ 0.54 mg protein),50 mM phosphate buffer(pH 7.4)を含んだ反応液を37°C，20分間incubateし，6% perchloric acid で反応を停止させる。遠心後上清に1.0N NaOH を加え，315 nmで励起し，380 nmで測定した。血漿カテコールアミン濃度はPeuler & Johnsonの方法[9]，蛋白濃度はLowry 法[10]で測定した。

－－－結　果－－－

I．血漿NA濃度と腎ミトコンドリアMAO 活性

WKY,SHRSP-control,SHRSP-stroke３群の血漿NA濃度と腎ミトコンドリアMAO 活性を測定した(Table 1) 。血漿NA濃度はそれぞれ 269.1, 301.0, 436.5 pg/ml であり，腎ミトコンドリアMAO 活性はそれぞれ 131.4, 67.9, 62.7 nmoles/hr/mg proteinであり，WKY とSHRSP 間に有意の差がみられた。

II．腎MAO のサブタイプ

特異的MAO-A 阻害剤であるclorgyline及び特異的MAO-B 阻害剤であるdeprenylの濃度を変化させて，３群の腎ミトコンドリアMAO 活性を測定した(Figure 1)。50% 阻害に要するclorgyline及びdeprenylはそれぞれ 1.4～ 4.3 x 10^{-6}M 及び 4.6～ 6.3 x 10^{-8}M であり３群間に差がなかったが，clorgyline濃度が 10^{-8}から 10^{-6}M に於いて阻害曲線はplateau となった。

Table 1. The levels of plasma NE and Epi, and the activities of mitochondrial monoamine oxidase in normal and SHRSP rat kidneys

Group	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	Age (weeks)	NE (pg/ml)	Epi (pg/ml)	MAO Activity (nmol/hr/mg protein)
WKY (n=15)	139.0±15.2	91.5±16.9	27.9±11.1	269.1±138.9	41.7±29.9	131.4±43.5
SHRSP-control (n=59)	203.2±43.7	146.8±38.4	31.0±11.6	301.7±142.8	33.2±32.5	67.9±28.8
SHRSP-stroke (n=11)	202.7±33.1	151.3±25.8	28.0±11.7	436.5±292.0	62.7±58.3	66.0±21.1

－－－考察－－－

SHRSP に於ける高血圧発症機序に血圧調節機構の異常が示唆されてきた[11,12]。今回の実験に於いて，WKY 群に比べて，SHRSP 群のMAO 活性の低値が示された。南らはすでにWKY 群に比べてSHRSP 群の血漿NA濃度の高値を示しており[13]，SHRSP の高血圧発症とMAO 活性の低下には何らかの関連が存在するのではないかとおもわれる。我々は又KynuramineをMAO の基質として，ラット腎ミトコンドリアMAO のA-,B- タイプの割合いを検討した。幼若ラッ

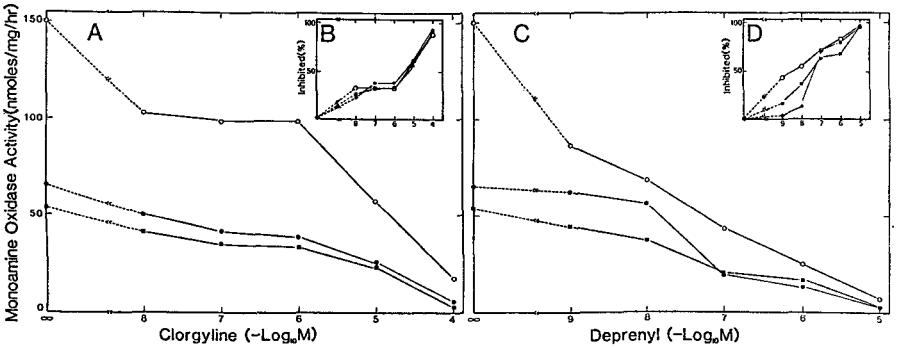


Fig. 1. The effect of clorgyline (A,B) and deprenyl (C,D) on monoamine oxidase in the mitochondrial suspension of WKY, SHRSP rat kidneys. (○); WKY, (●); SHRSP-control, (■); SHRSP-stroke rats. Clorgyline and deprenyl were added in the incubation mixture and monoamine oxidase activities were determined as described in the text.

ト脳毛細血管ではtyramineがMAO-A,Bによりそれぞれ70%,30%酸化されるが，成人ラットになると，それぞれ80%,20%と変化する。ラット心臓[14]，大動脈[15]に於いても類似した割合であり，年齢が増加するに従って，Bタイプが増加する[16]。又，AタイプとBタイプはそれぞれ異なったgene lociに由来することが示唆されており[17,18]，placentaeはAタイプ，plateletはBタイプがdominant MAOとされている[19]。今回の実験では，腎ミトコンドリアMAOは33%がAタイプ，67%がBタイプと示されたが，正確な比率を決定するには更に厳密な検討を要する。また，今回の結果より，高血圧症患者の重症度分類にMAO活性の測定が生化学的な裏づけとして役立つものと思われるが，高血圧症患者の腎ミトコンドリアMAO活性の病態生理学的意義づけは依然として究明されるべき課題として残されている。

－－－文献－－－

1.Okamoto,K.,et al.,Circul. Res.34/35(suppl. I),143-153(1974) 2.Blaschko,H.,In: The Enzymes,Vol.8,337-351(1973) 3.Lipper,S.,et al.,Psychopharmacol.62,123-128(1979) 4.Less,A.J.,Lancet ii,771-775(1977) 5.Knoll,J.,J.Neural.Transmission 43,177-198(1978) 6.Birkmayer,W.,et al.,Mod.Probl.Pharmacopsychiat.19,170-176(1983) 7.Fleischer,S.& Kervina,M.,Methods Enzymol.31,6-41(1974) 8.Kram,M.,Biochem.Pharmacol. 14,1683-1685(1965) 9.Peuler,J.D.,et al.,Life Sci.21,625-636(1977) 10.Lowry,et al.,J.Biol.Chem.193,265-275(1951) 11.Howe,P.R.C.,et al.,Eur.J.Pharmacol.73,123-129(1981) 12.Wijnen,H.,et al.,Brain Res.157,191-195(1978) 13.Minami,M.,et al.,Jpn. Heart J.25,833-835(1984) 14.Edwards,D.J.,et al.,Biochem.Pharmacol.28,2337-2343(1979) 15.Lewinshon,R.,et al.,Biochem.Pharmacol.27,1857-1803(1978) 16.Squrres,R.F.,Adv.Biochem.Psycopharmacol.5,355-370(1972) 17.Mantel,T.J.,et al.,FEBS letter, 64,227-230(1976) 18.Cawthorn,R.M.,et al.,Nature 281,692-694(1979) 19.Donnelly,C.H.,et al.,Biochem.Pharmacol.26,853-858(1979)

171. ラット視床下部視索上核・室旁核におけるダイノルフィン（1—13）微量注入によるバゾプレッシンの遊離

津島宏美・森真由美・松田友宏（名古屋市立大・医・薬理）

〔要　約〕

水負荷エタノール麻酔ラットにおいて、バゾプレッシンニューロン細胞体が局在する視床下部視索上核(SON)、室傍核(PVN)へ直接オピオイドアゴニストダイノルフィン(1-13)(Dyn)を微量注入し、尿流出量、尿浸透圧、血漿バゾプレッシンレベル、血圧、心拍数、呼吸数、体温への影響を検討した。Dynをこれら神経核へ微量注入すると著明な抗利尿作用が現われ、その時間経過は注入20-40分後に最大抗利尿となり約1.5時間でほぼ回復した。Dynの ED50値は両神経核ともに約10nmolであった。抗利尿作用発現時、尿浸透圧、血漿バゾプレッシンレベルは上昇していたが、血圧、心拍数、呼吸数、体温は有意な変化を示さなかった。Dyn(20nmol)の抗利尿作用は、オピオイドアンタゴニストナロキソン(300nmol)の神経核への微量注入による前処置によって、PVNでは部分的に抑制されたが、SONでは無効であった。

以上の結果より、視床下部のこれら神経核でDynが、おそらくはナロキソン低感受性のレセプターを介してバゾプレッシン遊離を調節していることが示唆された。

Key word： dynorphin, vasopressin, hypothalamus.

我々はバゾプレッシンニューロン細胞体が局在する視床下部視索上核(SON)、室傍核(PVN)の伝達物質受容機構を、両神経核に薬物を微量注入した後、尿流出量、尿浸透圧、その他の生理機能を検討し、これら神経核におけるアドレナリン－[4,6]、コリン－[2]受容機構の存在を明らかにした。オピオイド受容機構については、μ－アゴニスト(モルヒネ)とδ－アゴニスト(メチオニン－エンケファリン：ME、その非代謝性誘導体2-D-アラニン-5-メチオニン-エンケファリンアミド：DAMEA)の作用についてはすでに報告した[3,5]，今回、これら神経核に免疫組織化学的に局在が証明されているオピオイドペプチドダイノルフィン(1-13)(Dyn；κ-アゴニストといわれている)を神経核に直接微量注入し、バゾプレッシンの遊離促進を明らかにしたので報告する。

［実験方法］　すでに報告した通り[2-6]、約18時間絶食したWistar系雄性ラット(280-330g)に、水（5ml/100g体重）と同量の12%エタノールを水投与45分後に経口投与した。SON、PVNの位置はKönigらのアトラス[1]により定め、カニューレの先端がこれら神経核に局在することを組織化学的方法とKCl微量注入による抗利尿作用発現により同定した。頚静脈カニューレからの尿流出量は光電ドロップカウンターで10分毎に測定した。尿流出量の変化は薬物投与前 10分間の尿流出量に対する百分率であらわした。ナロキソン前処置の効果は、Dyn(20nmol)を神経核へ微量注入し抗利尿作用を発現することを確認した後、ナロキソン(300nmol)を同一神経核に微量注入し、ナロキソン投与30-80分後同量のDynを微量注入して、ナロキソン投与前後のDynの作用を比較することによった。血漿バゾプレッシンレベルは薬物投与20－25分後（抗利尿発現時）に断頭、採血しRIA法により測定した。既知のバゾプレッシンを含む血漿を標準と

した。尿浸透圧は氷点降下法、心拍数は心電計、頸動脈圧は観血法、呼吸数と直腸温はサーミスターを用い測定した。

［実験結果］ DynをSONへ微量注入し、尿流出量への影響を検討した：Dyn注入約10分後より尿流出量は減少しはじめ、20-40分後に最小となり、約1.5時間後に投与前の尿流出量にまでほぼ回復する著明な抗利尿作用が発現された。この抗利尿作用は用量依存性であり、Fig.1に他のオピオイドと比較し用量作用曲線(SONの場合)を示す。

PVNにおいても、Dynは同様の時間経過と用量作用曲線を示す抗利尿作用を発現させた。ED50値はSONでは10(95%信頼限界：9-13)nmolであり、PVNでは10(8-13)nmolであった(Table 1に他のオピオイドのED50値との比較を示した)。

20nmol Dyn微量注入による抗利尿発現時の尿浸透圧は上昇し、SONでは対照の250±40% (n=5)、PVNでは460±110% (n=5)であった(Fig.2)，この時、血漿バゾプレッシンレベルも上昇していた(Table 2)。しかし、血圧、心拍数、呼吸数、体温はいずれも有意な変化は認められなかった(データー省略：n=3)。

次にDyn微量注入による抗利尿作用へのナロキソン前処置の影響を検討した。PVNにおいてはナロキソン前処置は部分的にDynの抗利尿作用を抑制した(Fig. 3)が、SONにおいてはナロキソン前処置の影響は認められなかった。

［考察］ DynのSON、PVNへ微量注入することによる抗利尿作用は、我々が既に報告したモルヒネ、ME、DAMEAの抗利尿作用と同様著明なものであった[3,5]。両神経核におけるED50値はME＞モルヒネ≧Dyn＞DAMEAの順であったが、Dynの抗利尿作用の時間経過は、MEやDAMEAと同様であった。モルヒネの両神経核への微量注入による抗利尿作用はナロキソン前処置により完全に抑制されたが、Dynによる抗利尿作用のナロキソンによる抑制は部分的であった。PVNにおいてDynはナロキソン低感受性レセプターに作用していると思われる。

Dynの抗利尿発現時に、尿浸透圧と血漿バゾプレッシンレベルは有意に上昇していたが、血圧、心拍数、呼吸数、体温には有意な変化は認められなかったことから、Dynの抗利尿作用は循環系を介したものではなく、バゾプレッシン遊離促進によるものと思われる。SON、PVNにDyn含有ニューロンが存在する[8]こと、バゾプレッシンとDynが共存している[7]ことと考えあわせ、これら神経核においてDynが生理的に機能している可能性が示唆された。

Fig.1 Dose-effect curves for antidiureses induced by opioids microinjected into the SON.

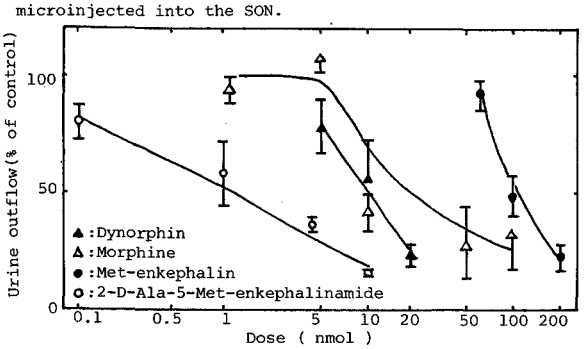


Table 1. ED50 values for antidiureses induced by opioids

Opioids	microinjected into SON	PVN
Dynorphin	10(9-13)	10(8-13)
ME	111(69-178)	61(38-99)
DAMEA	1.3(0.6-2.7)	0.7(0.3-1.7)
Morphine	22(4-126)	11(3-36)

Values were represented in nmol.
Values in the parentheses were 95% confidence limits of ED50 values.
ME :Met-enkephalin
DAMEA : 2-D-Ala-5-Met-enkephalinamide

Fig.2 Effects of dynorphin microinjected into the SON and PVN on the osmotic pressure of urine compared with the effects on the urine outflow. (* P<0.05)

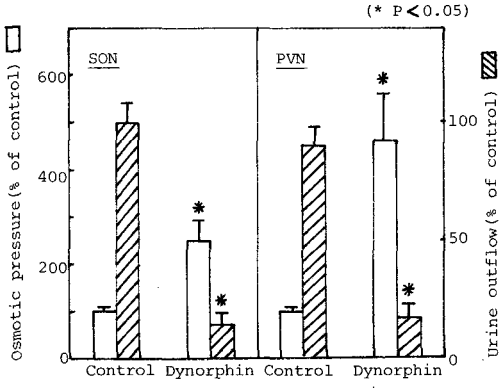


Fig.3 Inhibitory effect of naloxone on antidiuresis induced by dynorphin microinjected into the PVN. (* P< 0.05)

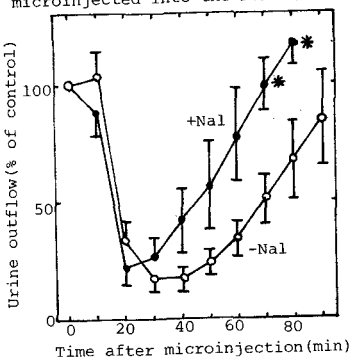


Table 2. Vasopressin level(pg/ml) in the plasma induced by microinjection of dynorphin into the SON and PVN

Drugs	microinjected into SON	PVN
Control(saline)	19 ± 6	28 ± 5
Dynorphin	140 ± 47*	84 ± 18*

* P< 0.05 (Cochran-Cox test)

［謝辞］ バゾプレッシンのRIAについては、京都府立医大精神医学教室 中嶋照夫教授、能登直助教授、橋本泰道先生にご指導を受けました。ここに厚く御礼申し上げます。

［文献］

1) König,J.F.R. and Klippel,R.A.(1963)The Rat, A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

2) Mori,M., Tsushima,H. and Matsuda,T.(1984)Japan.J.Pharmacol. 35, 27-36.

3) 津島宏美・森真由美・松田友宏(1981)神経化学 20, 488-491.

4) Tsushima,H., Mori,M. and Matsuda,T.(1985)Japan.J.Pharmacol. 39, 365-374.

5) 津島宏美・森真由美・松田友宏(1985)第68回日本薬理学会近畿部会要旨集、p.20 大阪。

6) Tsushima,H., Mori,M. and Matsuda,T.(1986)Japan.J.Pharmacol. 40, 319-328.

7) Watson,S.J., Akil,H., Fischli,W., Goldstein,A., Zimmerman,E., Nilaver, G. and van Wimersma Greidanus,T.B.(1982)Sciene 216, 85-87.

8) Watson,S.J., Khachaturia,H., Akil,H. and Coy,D.H. (1982) Science 218, 1134-1136.

172. 黒質・腹側被蓋野におけるオピオイドペプチドニューロンの起始核と調節機構

市川宏伸*・西川　徹・高嶋瑞夫・三ツ汐洋・小川篤子
高橋清久　　（武蔵療養所神経センター，都立梅ヶ丘病院*）

〔要　約〕

線条体－黒質路とオピオイドペプチドの関連について調べると共に、これらの系の調節機構についても検討を加えた。

ラットの線条体あるいは黒質を、神経細胞体を選択的に破壊する、イボテン酸を用いて破壊した際の、黒質のα－ネオエンドルフィン、ダイノルフィンA（1-8）［PH-8P］を測定すると、線条体破壊群でそれぞれ約40%,50% の有意の低下を認め、黒質破壊群では有意の変化を認めなかった。また腹側被蓋野のα－ネオエンドルフィンも低下していたが、統計的有意差はなかった。この結果と線条体－黒質路を電気的に破壊した時に、同様に黒質の2物質が低下している事実を総合すると、これらのオピオイドペプチドを含む神経線維は線条体に起始核をもち、黒質に投射することが示唆された。

更にこれらの経路を調節する系として、手綱核の関与を検討した。手綱核を破壊した際の、黒質、腹側被蓋野における2物質を測定すると、α－ネオエンドルフィンのみ、両部位において有意の増加を示した。これらの結果から手綱核がα－ネオエンドルフィンニューロンの調節に関与していることが示唆された。

Key word：　opioid peptides、 striato-nigral pathway、 habenula

〔はじめに〕

線条体黒質路（S-N 路）を電気的に破壊後、黒質において、γ－アミノ酪酸（GABA）やサブスタンスP（SP）とともに、α－ネオエンドルフィン（α-NE）、ダイノルフィンA(1-8)〔PH-8〕が有意に低下していることを昨年の本学会において報告した。本研究ではさらに線条体－黒質路に含まれる、これらのオピオイドペプチドニューロンの起始核を明らかにする目的で、神経細胞体を選択的に破壊する神経毒であるイボテン酸を線条体あるいは黒質に注入後、黒質におけるα-NE,PH-8P 濃度を測定した。また黒質および腹側被蓋野と密接な線維連絡を有する手綱核による調節を知るため、手綱核破壊後の黒質、腹側被蓋野における両オピオイドペプチドの含量を測定した。

〔方法〕

実験にはWistar系雄性ラットを用い、両側のS-N 路破壊 8日目にラットを断頭し、既報に従って黒質および腹側被蓋野を切り出した。単極性ステンレス電極（長さ1mm,直径0.35mm）の通電部位と条件は以下の通りである。A＋3.8,V＋2.5,L±3.0 & 2.7,3mA,10sec.偽手術群は挿入するのみで通電を行なわなかった。

線条体および黒質の神経細胞体の破壊は線条体 2部位，黒質1部位に外径0.4mm のステンレス製カニューラを挿入して行なった。線条体黒質とも片側に注入し条件は以下の通りである。前方：A＋8.5 , V＋5.4 , L＋2.5

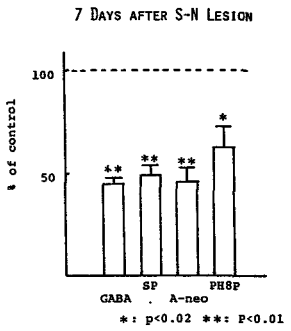


図 1

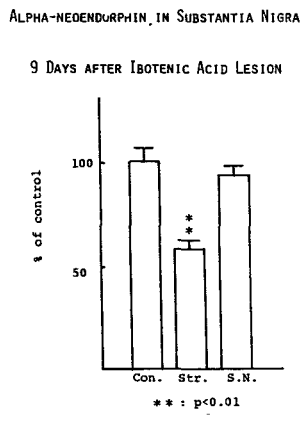


図 2

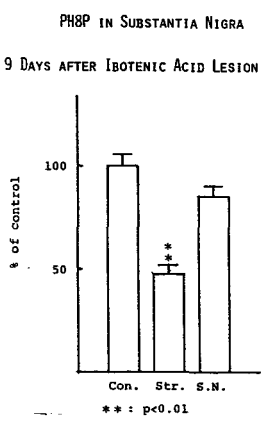


図 3

, 20μg/3 μl/3min , 後方：A＋6.0 , V＋4.9 , L＋4.0 , 13μg/1.5 μl/3min , 黒質：A＋2.3 , V＋2. 5 ,L＋2.0 , 13μg/2 μl/3min , いずれも注入終了後、5min カニューラを留置した。偽手術群は以上 3部位に等容量の生食を注入した。 GABA , SP,α-NE, PH-8PはRIA法により、蛋白はLowry 法により測定した(1) 。統計はRyanの多重比較法によった。

〔結果〕

S-N 路破壊後 8日では偽手術群の値をControl 値(100%)とすると、GABAは45.1± 2.2% (n=9), SPは48.5± 5.2 % (n=10) α-NE は45.4± 6.9% (n=9) , PH-8Pは62.8± 9.5% (n=9)にすべて有意に低下していた(図１) 。Control 値は以下の通り。GABA:66.8 ± 2.7(n mol/mg protein± SE, n=9), SP:5058 ± 159(f mol/mg protein± SE, n=9), α-NE:4023± 419(f mol/mg protein± SE, n=9), PH-8P:1290± 115 (f mol/mg protein ± SE, n=9)

線条体、黒質の神経細胞体破壊後の破壊側黒質のα-NE 値はControl 値 (100 %)に比し、線条体破壊群 (Str.群) は58.1± 4.6 % (n=13), 黒質破壊群 (S.N,群) は93.8 ± 4.4 % (n=12)でありStr.群のみ有意に低下していた (図2)。 Control 値：4509± 314 (f mol/mg protein ± SE, n=8)

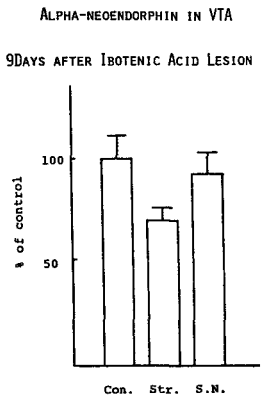


図 4

両部位破壊後の黒質のPH-8P 値はControl 値 (100 %)に比し、Str.群は48.1± 3.6%,(n=13),S.N.群は85.3± 4.8%(n=12)でありStr.群のみ有意に低下していた (図3). Control 値：1262± 82 (f mol/mg protein ± SE, n=8)

両部位破壊後の腹側被蓋野のα-NE 値はControl 値 (100 %)に比し、Str.群は70.1± 6.3 % (n=12), S.N.群は92 .6± 11.3% (n=12)であり、Str.群で低下がみられたが統計的有意差はなかった (図4)。Control 値： 592± 66(f mol/mg protein ± SE, n=8) 手綱核破壊後の黒質のα-NE 値は、Control 値 (100%) に比し、 8日目、30日目それぞれで、134.2 ± 11.7% (n=10), 116.8 ± 6.1 % (n=26)で共に有意の増加を認めた (図6)。Control 値：4369± 377 (n=10), 5187 ± 271(n=24)(f mol/mg protein± SE)

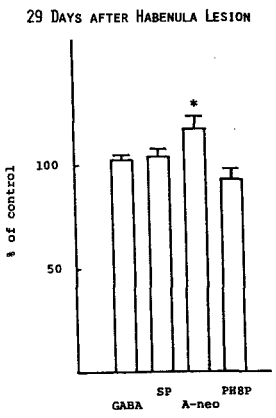


図 5

手綱核破壊後の黒質のPH-8P 値はControl 値 (100 %)と比し、 8日目、30日目で116.6 ± 6.5 % , 92.5± 5.1 % , で統計的な有意差を認めなかった (図7)。 Control 値：1501±

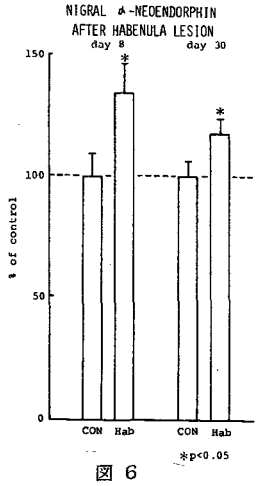


図 6

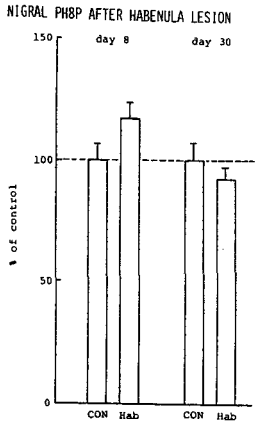


図 7

100 (n=10),1431± 79(n=13)(f mol /mg protein ± SE)

手綱核破壊後の腹側被蓋野のα-NE値は、Control 値 (100%) と比し、8日目、30日目で185 ±21.3%(n=10), 125.5± 6.8 %(n=13) で共に有意の増加を認めた (図8)。Control 値 : 581 ±79(n=10), 683 ± 40(n=12)(f mol/mg protein± SE)

〔考察〕 S-N 路破壊 8日後の黒質におけるGABA, SP, α-NE, PH-8Pの値は、それぞれ45.1, 48.5, 45.4, 62.8% であり、α-NE, PH-8Pも、GABA, SPと同じくS-N 路に含まれていることを支持する事実と思われた。これらの結果からα-NE , PH-8P の方向性を定めると共に、起始核を探るために、線条体、黒質の神経細胞体をイボテン酸により破壊してみると、黒質のα-NE, PH-8PはStr.群においてのみ有意の低下を認めた (図2,図3)。この経路のα-NE, PH-8Pの多くは線条体に起始核を持つ可能性が強く示唆された。腹側被蓋野でα-NE を測定してみると、Str.群で低下をみたが、有意差は認めず、さらに検討を加える必要があると考えられた (図4)。

手綱核破壊30日後の黒質におけるGABA, SP, α-NE, PH-8Pを測定した結果ではα-NE のみ有意の増加を示していた (図5)。手綱核破壊 8日後の黒質におけるα-NE, PH-8Pも測定してみると、α-NE のみ有意の増加を示しており (図6,図7)、以上の結果からα-NE は手綱核から調節を受けていることが考えられた。また時間の経過と共に修復機構の働くことが示唆された。同様に腹側被蓋野のα-NE を調べると更に有意の増加を認められた (図8)。このことから腹側被蓋野も手綱核から調節を受けていると考えられた。組織化学的な報告(2) と合わせると、手綱核から黒質、腹側被蓋野へ投射する線維連絡との関与が考えられた。

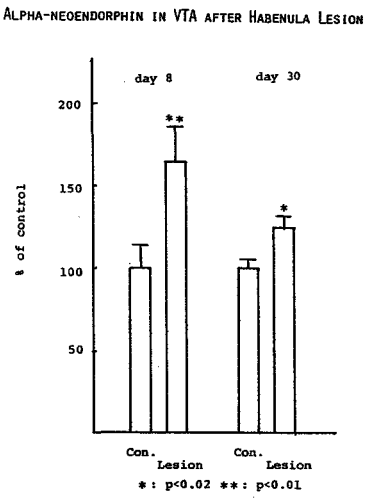


図 8

〔文献〕 (1) 市川宏伸ほか. 神経化学 24:433-435 ,1985

(2) M.Herkennham, et al., J.Comp.Neuro. 187:19 -48,1979

〔謝辞〕 α-ネオエンドルフィン、ダイノルフィンA(1-8)[PH-8P] 抗体を供与して下さった宮崎医大、松尾寿之教授に深謝いたします。

173. 細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体ライブラリーによるシナプス機能分子の検索

小林和夫・大口嘉子・黒田洋一郎

（東京都神経研・神経生化）

〔要　約〕

1）　グルタルアルデヒド固定したＰＣ１２ｈ細胞を抗原にしたＥＬＩＳＡで一次スクリーニングしたモノクローナル抗体の一部を生きた細胞を抗原にしたＥＬＩＳＡでチェックしたところ、約半数が強い陽性を示し、このような方法で生きた細胞の表面に結合するモノクローナル抗体のライブラリーが作れることがわかった。

2）　この方法で取ったモノクローナル抗体中には、脂質分画と結合するものも存在した。

3）　シナプス伝達を抑制する抗体　ＰＣＨ　３２－２０が　in vitro　形成シナプスを用いた機能アッセイ系による二次スクリーニングで得られ、この抗原分子は　イムノブロッティングにより分子量約２４，０００の糖蛋白質と推定された。

4）　モノクローナル抗体　ＰＣＨ　３２－２０により　ＰＣ１２ｈ細胞表面は免疫染色され　その抗原分子は、ＮＧＦ処理によって　細胞当たりの発現量が増加することがわかった。

5）　細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体ライブラリーを用いた二段階スクリーニング法により　シナプス伝達など神経機能を阻害するモノクローナル抗体が得られる可能性が示された。

Key word：　Monoclonal antibody，　cell surface antigen，

我々は　シナプス伝達、シナプス形成などに関係した未知分子に対するモノクローナル抗体をとるStrategyとして、　二段階スクリーニング法を行っている。　この方法では、第一段階として　ＥＬＩＳＡ法を使って細胞膜表面に存在する抗原に対するモノクローナル抗体をまずスクリーニングし、細胞膜表面抗原に対するモノクローナル抗体のライブラリーを作る。　これらのモノクローナル抗体を、通常のハイブリドーマ上清を用いた場合には実際に行うことができないような機能アッセイ系にかけていくという方法である。

クローン化されたラット副腎髄質腫ヨウ細胞（ＰＣ１２細胞）は種々の受容体やチャネルをもつことが知られており、且つカテコールアミンの分泌など神経終末のモデル系ともなっている。　さらにＮＧＦに応答して交感神経細胞様に分化することも知られておりシナプス形成など神経細胞の発生分化を研究するにも良い系であると考えられている（4）。　モノクローナル抗体ライブラリーの作成には　抗原としてＰＣ１２ｈ細胞（１）を細胞のまま、マウスに免疫した。　ＰＣ１２ｈ細胞をウェルの底に固定したＥＬＩＳＡで陽性のハイブリドーマをスクリーニングし、クローン化を行った（２）。　今回は　このようにして得られたモノクローナル抗体ライブラリーのおおまかな構成とシナプス伝達を抑制するモノクローナル抗体（ＰＣＨ　３２－２０）（３）の抗原の性質を報告する。

＜実験方法＞

１）　生きた細胞を抗原とするＥＬＩＳＡ；　96穴の口過システム（ミリタイタープレートＳＶ：ミリポア社）を用い　各ウェルにＰＣ１２ｈ生細胞を2×10^4 個を分注、ＢＳＡでブロックした後、抗体を50 μl加え、１－２時間インキュベートする。　ＰＢＳで

5－6回ロ過洗浄した後　底面をよく拭き　HRP標識抗マウスイムノグロブリン（IgG＋IgM＋IgA）と37°C 20分反応、再度　PBSでよく洗い　底面を拭き取った後　基質として　o-フェニレンジアミンを加える。　発色後　上清の吸光度をマイクロプレート光度計を用いて測定した。

2）　脂質分画を抗原とするELISA；　PC12h細胞（1x10^7個）をPBSで洗った後　凍結乾燥をし　クロロホルム／メタノール（2：1）40°C、20分抽出上清とクロロホルム／メタノール／水（10：20：1）40°C、20分抽出上清分画をN_2ガスで乾燥後　エタノールに再溶解し　96穴プレートに結合させた後　ELISAで測定した。

3）　イムノブロッティング；　PC12h細胞膜をSDSで可溶化し　SDS－PAGEで電気泳動したものを　デュラポア膜（ミリポア社）にブロッティングし　ベクタステインABCキット（アビジン・ビオチン　システム；フナコシ）で免疫染色をおこなった。

4）　生きた細胞のHRP染色；　カバーグラスをポリ-L-リジンで処理後　PC12h細胞を培養し　NGFにより分化させる。　BSAでブロッキングをしモノクローナル抗体溶液（20μg /ml）をのせ　室温、1時間放置。　PBSで洗浄後、HRP標識抗マウスIgGと30分反応させた後　再度よく洗い　ジアミノベンチジンを基質として染色する。

＜結果及び考察＞

1．　モノクローナル抗体ライブラリーの構成内容

シナプス伝達、シナプス形成などに関係した未知分子のモノクローナル抗体をとる確率を上げるためには、生きた細胞の表面にある分子にその抗体が結合しなければならない。　0.025％グルタルアルデヒド固定したPC12細胞を抗原としたELISAでスクリーニングしたモノクローナル抗体ライブラリーの一部を生きた細胞を抗原とするELISAでチェックしたところ、表1のように生きた細胞表面に強い結合性を示したのは　14抗体中、6抗体であった。　＊印を付けた4抗体はミリタイタープレートにnon-specificな結合を示し、生きた細胞への結合は　はっきりしなかった。

固定した細胞を用いたスクリーニングでも　生きた細胞に強い結合を示す抗体が約半分の確率で取れてくることがわかった。　ミリタイターを一次スクリーニングとして用いることには　技術的な問題点がいくつか残っている。

また、糖脂質をはじめとする脂質が神経機能に関係していると考えられている証拠が増えつつある（6）。　PC12細胞表面抗原のモノ

表1．モノクローナル抗体ライブラリーの抗原の性質（一部）

Monoclonal antibody	class	Intact cell	Chloroform/ methanol extract	residue
PCH 21-1	M	＊		
PCH 21-27	M	－		
PCH 21-29	G	＋	－	＋
PCH 22-11	M	＋	＋	±
PCH 22-33	M	－		
PCH 22-35	M	＊		
PCH 22-37	M	＋		
PCH 23-16	M	－		
PCH 23-17	M	－		
PCH 23-46	M	＋	－	＋
PCH 25-23	M	＊		
PCH 32-20	G	＋	－	＋
PCH 32-39	M	＋	+++	++
PCH 31-47	M	＊		
PCH 15-16	M		－	±
PCH 16-24	M		＋	+++

クローナル抗体ライブラリー中に、糖脂質などを抗原とする抗体があるかを調べるために脂質分画を抗原とするＥＬＩＳＡを行った。７抗体中、３抗体が陽性と判定された。これらの抗体中には脂質抽出残査にも反応が強いものがみられ抗原認識部位が糖鎖部分である可能性が考えられる。

２．シナプス伝達を抑制する抗体

生体機能分子を認識する抗体のうち、結合部位によってはその分子の機能を阻害したり、変化させたりする抗体があるはずである。機能アッセイ系の一つとして in vitro で形成されたシナプス（５）を用い電気生理学的にシナプス伝達を観察しながら精製モノクローナル抗体を順次添加してシナプス伝達に影響を与えるモノクローナル抗体がないかをスクリーニングしたところ、シナプス伝達を用量依存的に抑制する抗体（ＰＣＨ３２－２０）が発見された（３）。この抗原の性質を明らかにするためにまずＰＣ１２ｈ細胞膜分画をＳＤＳで可溶化し、イムノブロッティングしたところ２４Ｋにあたる部分にややブロードなバンドが見られた（図省略）。推定分子量が約２４，０００の糖蛋白質に抗体が結合することが示唆された。

表２．ＮＧＦによる分化に伴う細胞表面抗原の量的変化

	PCH 32-20		PCH 21-29	
	Kd	Bmax	Kd	Bmax
Differentiated NGF(+)	2.2	1.000 (247%)	7.1	0.606 (135%)
Control NGF(-)	1.7	0.405	6.2	0.450

Kd; μg/ ml　　Bmax; ELISA OD/ $2x10^4$ cells

さらに生きたＰＣ１２ｈ細胞を用いて、この抗体の細胞表面抗原に対する結合をＮＧＦ非処理とＮＧＦ処理の場合で比較した。ＨＲＰ染色ではどちらの場合でも細胞表面の染色が見られた。ＥＬＩＳＡで定量化したところＫｄに大きな変化はみられなかったが細胞数あたりのＢｍａｘがＮＧＦ処理で約２．５倍に増加した。同じように、生きたＰＣ１２ｈ細胞表面に結合するがシナプス伝達には全く影響を与えない抗体、ＰＣＨ２１－２９ではやはりＫｄの変化は有意でなく、Ｂｍａｘの変化は約１．４倍であった（表２）。ＮＧＦ処理により神経細胞へ分化するのに伴いＰＣＨ３２－２０の抗原分子の発現は細胞当たりで増加した。ただし、ニューライト先端などで局所的に膜表面当たりの抗原分子発現量が増加しているかどうかは、今後別の方法で検討しなければならない。

この研究の一部は文部省科学研究費特定研究（59123006）の援助により行われた。

＜文献＞

1) Hatanaka,H. (1981) Brain Res. 222, 225-233
2) 小林和夫、黒田洋一郎 (1982) 神経化学 21, 378-380
3) Kobayashi,K.,Ohguchi,Y. and Kuroda,Y. (1986) Neurosci. Res. Suppl.3, S172
4) 宮武正、黒田洋一郎編 (1986) 「クロム親和細胞」 科学評論社
5) Ogawa,M.,Ishikawa,T. and Irimajiri,A. (1984) Nature 307, 66-68
6) Tsuji,S.,Arita,M. and Nagai,Y. (1983) J.Biochem. 94, 303-306

174. 褐色脂肪組織の脂肪合成に対する交感神経の作用

箕越靖彦・斉藤昌之・嶋津　孝　（愛媛大・医・第一生化）

〔要　約〕

ラット褐色脂肪組織（BAT）の脂質代謝に対する視床下部腹内側核（VMH）及び交感神経系の調節作用について検討した。VMHを電気的に刺激すると，^3H_2OからのBATの脂肪への^3Hの取り込みは，グリセロール（Gly）及び脂肪酸（FA）部分共に亢進し，脂肪合成が促進した。この反応は，外科的神経切除により著しく低下した。また，交感神経を直接電気的に刺激，または，ノルエピネフリン（NE）を経静脈的に投与して，BATの脂肪合成の変化を調べたところ，20秒間の神経刺激を3分毎に行う場合やNEの投与では，Glyのみに^3Hの取り込みが起り，FAへの取り込みは全く変化しなかった。これに対して，2秒間の刺激を3分毎に行うと，Glyのみならず，FAにも^3Hの取り込みが亢進し，VMHの刺激作用を再現することがわかった。このNEの投与によるGlyへの^3Hの取り込みは，α及びβ遮断剤の前投与により抑制されたが，2秒間の神経刺激を行った時の脂肪合成の促進は影響を受けなかった。以上のことより，VMHの刺激は，交感神経の作用を介してBATの脂肪合成を亢進させると考えられる。また，その作用には，NE以外の作用物質が関与している可能性が高い。

Key word：Brown adipose tissue, Ventromedial hypothalamus, Sympathetic nerve

褐色脂肪組織（Brown adipose tissue, BAT）は，交感神経の支配を豊富に受け，そのβ作用を介して熱産生を引き起こすことが知られている。最近，視床下部腹内側核（VMH）が，その交感神経の作用を介し，BATの熱産生を調節していることが明らかにされ（2），BATに対するVMH−交感神経系の調節作用が注目されてきた。我々は，今回，この熱産生と密接に関連するBATの脂質代謝が，VMH及び交感神経によってどのような調節作用を受けているかを明らかにする目的で，VMH及び交感神経を電気的に刺激，または，ノルエピネフリン（NE）を経静脈的に投与した時の，BATの脂肪合成の変化を調べた。なお，VMHの刺激に際しては，交感神経の役割を明らかにするため，左右対称に存在する肩甲間BATのうち，一側に分枝する神経を外科的に切除，左右組織を比較した。

〔実験方法〕

体重210−280gのSD系雌ラットを用いた。VMHの刺激では，ラットにあらかじめ双極刺激電極を植え込み，2週間後実験に用いた。刺激部位は，実験終了後，組織学的に同定した。実験は全て30−32℃の恒温箱の中で行った。

1)脂肪合成活性の測定　ラットをネンブタールで麻酔し，VMHまたは肩甲間BATに分枝する神経を電気的に刺激，または，NEを経静脈的に投与した。VMHの刺激は，6V，50Hz，0.1−0.3ミリ秒，30秒間の電気刺激を1分毎に行い，交感神経の刺激は，20V，10−40Hz，2ミリ秒，2または20秒間の刺激を3分毎に行なった。NEの投与は，ラットの右外頸静脈より右心カテーテルを挿入し，ポンプを用いて連続的に1−8μg／

100γ B·W·／30min(−)−norepinephrine）を投与した。刺激を開始して3分後，3または5 mCiの^3H_2Oを腹腔内に投与し，30分後ラットを屠殺，肩甲間ＢＡＴの左右組織を各々取り出し，脂肪分画ならびにその脂肪酸（ＦＡ）部分とグリセロール（Gly）部分への^3H の取り込み量を調べた。VMHの刺激に際しては，刺激直前に左右ＢＡＴのうち，一側に分枝する神経を外科的に切除しておいた。

2）α及びβ遮断剤の投与，交感神経の刺激またはＮＥを投与する20分前に，α及びβ遮断剤であるフェノキシベンザミン（5㎎／㎏）とプロプラノロール（ＤＬ type，20 ㎎／㎏）を腹腔内に投与し，1）と同様の実験を行なった。

〔結果と考察〕

我々は，先に，VMHを電気的に刺激すると，BATでの脂肪合成が特異的に亢進し，白色脂肪組織及び肝臓での脂肪合成は全く変化しないことを報告している（3，4）。本研究においても，また，内在性基質の濃度変化を考慮する必要のない^3H_2Oを用いて，BATの脂肪へのアイソトープの取り込みが亢進し，そのアイソトープの取り込み増加が，ＦＡ及びGly部分の両方に起っていることを確認した（図1 FA $P<0.01$，Gly $P<0.01$）。更に，このVMHの刺激作用は，交感神経切除によって著しく抑制されることがわかった（図1，FA $P<0.01$，Gly $P<0.01$）。これらの実験結果は，VMHの刺激によって起るBATの特異的な脂肪合成の亢進が，交感神経の作用を介していることを示唆している。

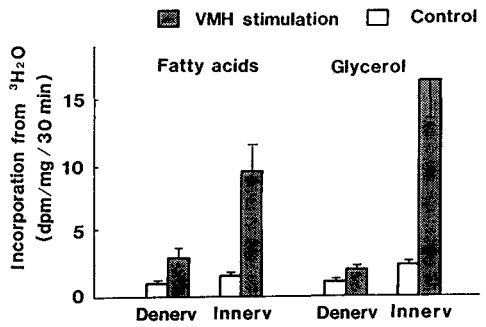


図１　VMHの電気刺激による脂肪合成の変化



図２　交感神経の電気刺激によるＢＡＴの脂肪合成の変化

交感神経を電気刺激（２０Ｖ，１０−４０Ｈｚ，２ミリ秒の刺激を3分間隔で20秒間行う）し，^3H_2O (5m Ci) から30分間に取り込まれた^3Hの放射能を，脂肪酸，グリセロールについて調べた。対照には非刺激動物を用いた。

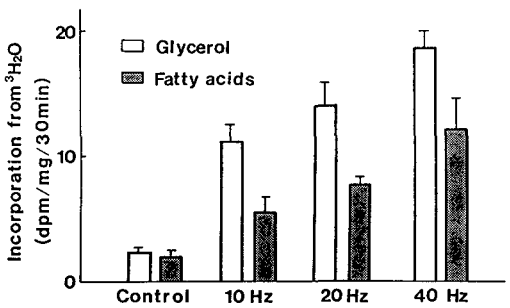


図３　交感神経をバースト状に刺激した時のＢＡＴの脂肪合成の変化

交感神経を電気刺激（２０Ｖ，１０−４０Ｈｚ，２ミリ秒の刺激を3分間隔で2秒間行う）し，^3H_2O (5m Ci) から30分間に取り込まれた ^3H の放射能を調べた。

このように，BATでの脂肪合成が交感神経の支配を受けているならば，交感神経を直接電気的に刺激しても脂肪合成の亢進が観察できるはずである。しかしながら，20秒間の神経刺激を3分間隔で行う刺激法やNEの投与では$^{3}H_2O$からの脂肪への^{3}Hの取り込み増加はGly部分のみに起り，FAへの取り込みは変化しなかった（図2，4）。ところが，神経の刺激条件を変えると，すなわち，刺激時間を短くし，2秒間のバースト状の刺激を行うと，Glyのみならず，FAへのアイソトープの取り込みも亢進し，VMHの刺激作用が再現されることがわかった（図3）。最近，バースト状の刺激を行うと，NEだけでなく，他の共存物質の作用が出現することが報告されており（1），それゆえ，本研究で示したVMHの刺激や交感神経のバースト状の刺激によって起こる脂肪合成の促進は，NE以外の共存物質の作用である可能性もあると思われる。事実，α及びβ遮断剤であるフェノキシベンザミンとプロプラノロールを同時に投与し，その影響を調べると，NE（8μg）によるGlyへのアイソトープの取り込み亢進はこれらの遮断剤によってほぼ抑えられるにもかかわらず，バースト状の神経刺激（20Hz）によるGly及びFA合成の亢進は影響を受けなかった（図5）。

以上の結果より，VMHの電気刺激は，交感神経の作用を介してBATの脂肪合成を亢進させると考えられる。また，その作用は，NE以外の作用物質によっている可能性が高い。

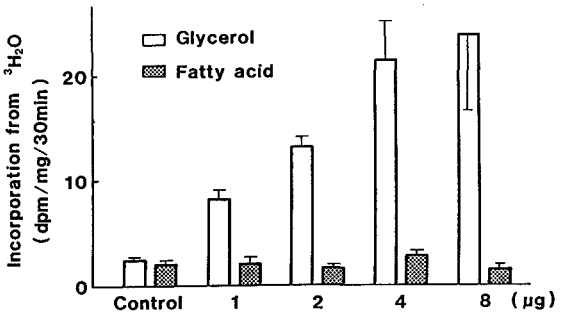


図4　ノルエピネフリン（NE）に対するBATの脂肪合成の変化

右心カテーテルを用いて，連続的に1－8μg／100g B.W.／30minのNEを投与し，$^{3}H_2O$ (5mCi) から30分間に取り込まれた^{3}Hの放射能を調べた。

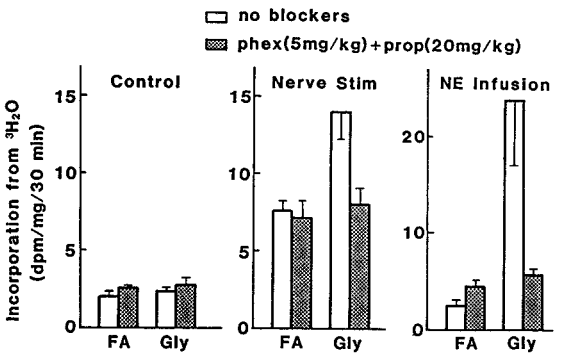


図5　脂肪合成に対するフェノキシベンザミン及びプロプラノロールの影響

交感神経を電気刺激（20V，20Hz，2ミリ秒，2秒，3分間隔）及びNE（8μg）を投与した時のα及びβ遮断剤の影響を調べた。

〔引用文献〕

1) Andersson, P. O. et al.（1982）J. Physiol. 322, 469－483

2) Perkins, M. N. et al.（1981）Nature London 289, 401－402

3) Shimazu, T and Takahashi, A（1980）Nature London 284, 62－63

4) Takahashi, A and Shimazu, T（1982）J. Auton. Nerv. Syst. 6, 225－235

175. マウスの海馬脳波と組織化学的亜鉛反応に及ぼすDithizone の影響

根木哲郎・村上哲英*　　(香川医大・保健体育，生物*)

〔要　約〕

哺乳動物の海馬領域に亜鉛が高濃度に存在していることは，組織化学的分析や化学分析の結果良く知られている。この亜鉛反応は歯状回門，海馬のCA4,CA3 の苔状線維終末に強陽性で，その他，嗅球，中隔，尾状核，被殻や扁桃体にも認められる。亜鉛のキレート剤であるヂチゾンを100mg/Kg 50mg/Kg ，25mg/Kg 腹腔内に投与すると，10分後には全ての部位での亜鉛反応は陰性となる。又，移動活性度や心拍数も減少する。ddN 系マウスの海馬領域及び皮質に慢性電極を植え込み，脳波分析を行ったところ，ヂチゾン100mg/Kg投与により約７分後から著明な振幅の減少が認められ，遂には脳波の完全消失が約５分間続き，約12分後から次第に回復し始める。この振幅の減少と共に，低周波への移行が認められ，完全回復には約２時間を要する。又，組織化学的に亜鉛反応が回復するのにも約２時間を要する。もし，50mg/Kg ，25mg/Kg のヂチゾンを腹腔内に投与すると，10分後には組織化学的には亜鉛反応は完全に消失するにもかかわらず，脳波の完全消失は認められない。この脳波の回復期にエゼリンやアトロピンを投与しても，脳波の波形には何等の影響を与えない。しかし、酢酸亜鉛0.5mg を投与すると，直ちに振幅の増大が認められる。そして，ヂチゾン投与によるマウスのうづくまりも直ちに回復する。しかし，組織化学的には依然として亜鉛反応は陰性であった。此等のことは，脳波の出現と組織化学的亜鉛反応の間に解明される可き問題を残している。

Key word：　dithizone,　hippocampal EEG,　histochemistry.

哺乳動物の海馬領域に亜鉛が高濃度に存在していることは化学分析や組織化学的分析の結果良く知られている[1]。その量は海馬領域では乾燥重量当り60～120ppmである。そして，亜鉛は歯状回門からCA3,CA4 に至る苔状線維の終末に存在し，^{65}Znはオートラジオグラフィーの結果，苔状線維の終末にとり込まれることも明らかとなった[2]。更に，24時間貫通枝を電気刺激すると，刺激を受けた半球の海馬領域のみが亜鉛の組織化学的反応が陰性になることも見出された[3]。これらのことは，海馬領域で苔状線維のシナプス伝達に関して，亜鉛が深く関与していることを物語るものと考えられる。今回，我々は亜鉛のキレート剤であるdithizone をマウスの腹腔内に投与し，慢性に植え込んだ電極から誘導した脳波に及ぼす影響を調べたところ，dithizone 投与により海馬脳波が一過的に消失し，この消失した脳波が亜鉛を投与することにより直ちに回復することを見出し，亜鉛が神経伝達物質として重要な役割を果している可能性を見出したのでここに報告する。

実験方法.

回避学習用実験動物として近交系の育成を続けているddN 系マウスの F39～43世代の雌雄185 匹を用いた。実験開始時生後 2～3 ケ月，体重25-35gであった。マウスはエーテル麻酔下に，マウス用脳定位固定装置に頭部を固定し，頭皮を開き，表層を絶縁した外径0.29mmのステンレス線の双極電極を歯状回門，又は海馬CA3 錐体細胞層の上部の放射層に植え込み，対極としては同様のステンレス線の単極電極を，前頭葉及び頭頂葉の皮質に植え込み，歯科用セメントで固定し，慢性電極とした。電極を植え込み一週間後から実験に供した。脳波及び頚部と後肢の表皮から誘導した心電図はポリグラフを用いて記録し，シグナルプロセッサーで波形分析を行った。

dithizone （和光特級）50mgを再蒸溜エタノール0.5mℓに分散し，濃アンモニア２滴を滴下しエノール型に変えて溶解の後脱イオン水を加えて計 10mℓとし，マウスの体重１Kg当り、100mg,

50mg，25mgを腹腔内に投与した。対照としては溶媒のみを用いた。又，dithizone 投与後の脳波の一過的消失の後，回復期の脳波のアトロピン感受性の有無及びコリン作動性の有無を調べるために，アトロピン1mg/Kg 及びエゼリン0.5mg/Kgを投与し，その影響を調べた。更に，dithizone 投与後の一過性の脳波の消失期に亜鉛を投与して回復が見られるか否かを調べるために，酢酸亜鉛0.5mgを腹腔内に投与した。

実験終了後，脳を摘出しホルマリン固定後切片を作り，電極挿入部位を確認した。又，マウスにdithizone 100mg/Kgを腹腔に投与し，時間を追ってDanscher法に従って固定の後亜鉛の存在を組織化学的に調べた。

結果．

組織化学的検査によると，亜鉛は歯状回門，海馬の CA4,CA3に強陽性で，梨球，中隔，尾状核，被殻，扁桃体で陽性に認められる。dithizone 100mg/Kg及び50mg/Kg 腹腔内投与により，5分後には歯状回門の一部を除き陰性となり，更に10分後には全ての部位で亜鉛反応は陰性となる。（図1）そして約2時間後には元に復する。マウスの移動活性度は100mg，50mg/Kg投与後5分以内に急激に低下し，100 分後には対照と差がなくなる。

dithizone 100mg/Kg腹腔内に投与すると， 409±96秒（ n=39 ）から脳波が消失し始め，著しい場合は完全消失が見られる，この完全消失は平均 297±175 秒間続き，投与後平均 706±201 秒後から次回に回復し始める。この一例を図1に示す。回復期にはpost-ictal depression が見られる。その時振幅の増加と共に低周波への移行が見られる。10Hz脳波がdithizone 投与によって影響を受けない。dithizone 投与後振幅の減少と共に，低周波への移行が見られ，振幅の回復期においても，依然として低周波へ移行したままである。

Dithizone の投与量を50mg/Kg とすると脳波の振幅の減少と低周波への移行がみられるが，100mg/Kg 投与によって現れた脳波の完全消失は認められない。更に投与量を25mg/Kg とすると脳波の変化は微小となる。対照としてdithizone の溶媒のみを 0.5 mℓ腹腔に投与した場合には，脳波の変動は全く認められない。

dithizone 投与後一過的な脳波の消失の後，組織化学的には亜鉛反応が陰性であるにもかかわらず，低周波の脳波が出現し始める。この電気活動がコリン作動性であるか否か或はアトロピン感受性があるか否かを調べるために，dithizone 投与後の脳波の回復期にエゼリン0.5mg,及びアトロピン0.1mg をマウスの腹腔内に注射したところ，エゼリン，アトロピン共に回復期の脳波には全く影響を及ぼさなかった。しかし，dithizone 100mg/Kg腹腔内投与後，脳波の一過的完全消失期に，酢酸亜鉛0.5mg を腹腔内に投与すると，平均19秒後(n=7) より脳波の著明な出現が認められると共に、dithizone 投与によってうづくまっていたマウスはこの脳波の出現と同時に四肢が活動し始める。亜鉛投与による脳波の回復を図3に示す。

考察．

哺乳動物の海馬領域に亜鉛が高濃度に存在していることは良く知られている。この亜鉛は苔状線維のシナプスに存在し，その機能は神経伝達物質として働いているのではなかろうかとの実験事実が次第に増加して来ている[3]。

亜鉛のキレート剤の1つであるdithizone を100mg/Kg腹腔内に投与すると，歯状回門，CA4,CA3で強陽性であった亜鉛の組織化学的反応が約10分後から90分にかけて完全に陰性となる。海馬領域

図の説明．

図1．dithizone 100mg/Kg i.p. 投与による脳波の変動．A．投与前．B．投与7分後，1-2,海馬

図 1

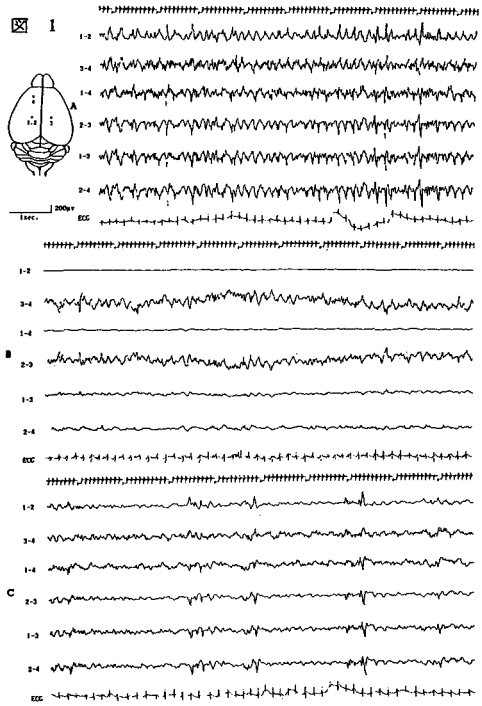


図 2

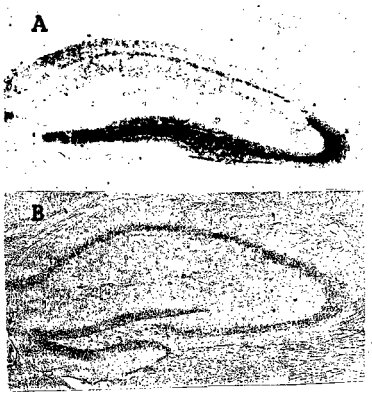
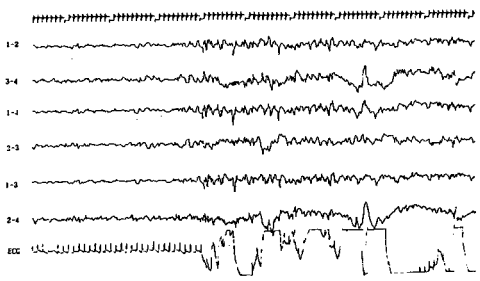


図 3



脳波から消失し始め，3-4,の皮質脳波はまだ見られる．C．投与12分後，消失した脳波は回復し始めるが，発作後抑制が見られる。

図２．dithizone 100mg/Kg投与前と投与後の海馬領域での組織化学的亜鉛反応（cresyl violet で二重染色）。A．投与前．B．投与１時間後．

図３．dithizone 投与によって消失した脳波が酢酸亜鉛投与によって19秒後から回復した一例を示す。

に慢性に植え込んだ電極から誘導した脳波も，組織化学的に亜鉛反応が陰性になる時期にほぼ一致して振幅の減少が認められるようになり，遂には完全に消失する。この完全消失時間は約５分間続き再び振幅の回復が認められるようになると共に，発作後抑制が見られ始め周波数は低周波へと移行する。この脳波の回復期には，組織化学的には亜鉛反応は陰性のままである。この回復期の脳波は投与したエゼリンやアトロピンの濃度では全く影響を受けていない。ところがdithizone 投与による脳波の完全消失期に，酢酸亜鉛0.5mg を腹腔内に投与すると，直ちに脳波の回復が認められるようになり，且つ，うづくまっていたマウスの四肢も活動を開始するようになる。このことは，亜鉛が新神経伝達物質と深く関係していることを物語るものと考えられる。亜鉛に関し組織化学的に検出可能な感度と，電気生理学的に検出可能な脳波測定の感度との間の関係は今のところ不明である。なお，組織化学的亜鉛反応の詳細像は学会発表時に提示する。

文献

１）Otsuka,N. & Ibata,Y.:Histochemie, 12,357-362,1968.

２）Otsuka,N.et al.:Acta Histochem.Cytochem.8,175-176,1975.

３）Pérez-Clausell,J. & Danscher.G.:Brain Res.362,358-361,1986.

176. 中枢神経・神経核におけるプリン受容機構の機能的役割：視床下部体液調節中枢の場合

森真由美・津島宏美・松田友宏（名古屋市立大・医・薬理）

〔要　約〕

視床下部視索上核（SON）、室傍核（PVN）における purinoceptor の存在と機能を明らかにすることを目的として、上記神経核に adenine nucleotides（ATP, ADP, AMP）及び adenosineを微量注入し、尿量、尿浸透圧、血圧、心拍数その他諸機能への作用を検討した。これらの神経核においてATPが最も著明な抗利尿を示した（ATP>ADP>AMP, adenosine）。ATP の抗利尿作用は用量依存的（ED50：SON, 62 nmol；PVN, 70 nmol）であり、時間経過は注入後20分で最大となり、約60－100 分でほぼ消失した。ATP の作用は尿浸透圧上昇を伴っていたが、血圧その他の生理機能の変化は認められなかった。SON においてATP の抗利尿作用はtheophylline、atropine前処置により抑制されたので、それぞれからtheophylline-sensitive purinoceptor, muscarinic receptor の介在が示唆された。PVN の ATPの抗利尿作用は theophylline, atropineにより抑制されず、作用の強さがATP ≫ adenosine であることから、P_2-receptor の介在が推察された。以上の結果、SON, PVN の両神経核に抗利尿作用（おそらく vasopressinの遊離による）を惹起する purinoceptor が存在し、両神経核でその薬理学的性質が異なっていることが示唆された。

Key word： purinoceptor, antidiuresis, hypothalamus

視床下部視索上核（supraoptic nucleus, SON），室傍核（paraventricular nucleus, PVN）は、抗利尿ホルモン（vasopressin）を合成、遊離する vasopressinergic neuron の細胞体が存在する神経核である。我々はこれら神経核の神経伝達受容機構を明らかにするために、神経核へ神経伝達物質候補を微量注入し、尿流出量の変化を調べた結果、muscarinic-,[3] adrenergic-（α-, β-）,[6,7] opiate-receptor[8]を介して、尿浸透圧上昇を伴った著明な抗利尿作用が発現することを認めた。β-receptor の second messenger cyclicAMP のアナログ、dibutyryl cyclicAMP（db-cAMP）も微量注入により、両神経核で尿量減少、尿浸透圧上昇を惹起した。[4,5] この cAMP の抗利尿作用を theophyllineはSON では抑制し、PVN では増強したことからtheophyllineはSON では purinocepttor の antagonist として、PVN では phosphodiesteraseの阻害剤として作用することが示唆された。今回、SON, PVN における purinoceptor の存在と機能を調べるために、adenine nucleotides 及び adenosine を両神経核に微量注入し、その作用について検討した。

［実験方法］尿流出量の測定：ウィスター系雄性ラット（体重 300－350g）を用い、5ml/100g b.w.の水を経口負荷し、45分後に同量の12％エタノールを経口投与して麻酔させた。膀胱カテーテルから流出する尿の滴数を光電ドロップカウンターでカウントし、注入後10分毎の滴数を注入前10分間の滴数に対する％で表し、尿流出量とした。

薬物の微量注入：ラットを脳定位固定装置にセットし、König らのアトラス[2]に従ってSON, PVN にステンレスカニューレ（外径 200μm）を挿入した。このカニューレを介して人工脳脊髄液あるいは生理食塩水に溶解した薬物１μl を３分間で注入した。

両神経核へのカニューレ挿入部位は前報3-7)のとおり確認した。尿浸透圧の測定：尿を蒸留水で10倍希釈した後、氷点降下法(Fiske osmometer)により測定した。諸生理機能の測定：血圧（頸動脈圧）は圧トランスジューサーにより、心拍数は心電計により測定した。呼吸数と直腸温はそれぞれ、気管カニューレと直腸に挿入したサーミスタにより測定した。

［実験結果］ 1) adenine nucleotides 及び adenosine 微量注入による尿流出量変化：SON,PVN にATP,ADP,AMP,及び adenosine を微量注入した時、ATP と ADP は注入後20分で最大となる抗利尿作用を惹起したが、AMP と adenosine はほとんど有意な作用を示さなかった。Fig.1.は上記薬物を注入後、20分時の尿量を、注入前の尿量に対する％で表したものである。両神経核とも抗利尿作用の強さの順はATP>ADP>AMP, adenosineであった。ATP の抗利尿作用は用量依存的であり、用量反応曲線からED50はSON では62(54-71)nmol,PVN では70(44-111)nmolと算定された（ ）内は95％信頼限界）。また ATPの作用は、注入後約60分で消失したが、SON への150nmol の注入では注入約100 分後でも、尿量は注入前の約60% に回復するにとどまった。2)ATP 微量注入による尿浸透圧の上昇：ATP(100nmol)をSON,PVN に微量注入し、尿流出量変化を記録すると同時に、約10分毎の尿を集め、その浸透圧を測定した。浸透圧は最大抗利尿時（注入後20分）と尿量回復時（注入後60分）の浸透圧を注入前の値に対する％として表した(Fig.2)。両神経核において、ATP による最大抗利尿発現時には尿浸透圧はvehicle 注入と比べて有意（約２倍）に上昇していた。3)ATP 微量注入による諸機能への影響：ATP(100nmol)をSON,PVN に微量注入した時、尿流出量変化と同時に、血圧、心拍数、呼吸及び直腸温への影響を調べたが、いずれも有意な変化は認められなかった。4)theophylline前処置による影響：theophyllineをSON,PVN に微量注入して前処置した時、ATP の抗利尿作用への影響について調べた(Fig.3)。theophylline(50nmol) はATP(100nmol)の抗利尿作用に対してSON では抑制したが、PVN では無効であった。5)atropine前処置による影響：atropine(300nmol) はSON,PVN に微量注入して前処置した時、ATP(100nmol)の抗利尿作用に対してSON では抑制したが、PVN では無効であった(Fig.4)。

［考察］ATP のSON,PVN への微量注入により発現した抗利尿作用は、①用量依存的であり、②最大抗利尿の発現は注入後約20分であった。③尿浸透圧の上昇を伴ったが、④血圧その他の生理機能の変化を伴わなかった。すでに報告してきたnoradrenaline, acetylcholine(ACh),opiate などでみられた抗利尿作用とほぼ同様の機序（おそらくvasopressin の遊離）で惹起していると考えられる。SON におけるATP の抗利尿作用は、theophyllineとatropineにより抑制されたので、それぞれ purinoceptor とmuscarinic receptor が介在していることが示唆される。その作用の強さは ATP》adenosine であり、theophylline-sensitive receptor[1)] の一種と思われる。PVN におけるATP の作用はtheophyllineにより抑制されず、作用の強さは ATP》adenosine であるので P_2 - receptor の介在が推察される。これらの点についてはさらに検討の余地があると思われる。以上の結果から、SON,PVN のどちらにも抗利尿を発現させるpurinoceptorが局在するが、その薬理学的物質は両神経核で異なっていることが示唆された。

References

1) Burnstock,G. (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptors, in : Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones (R.W.Straub. and L.Bolis, eds.), Raven Press, New York.

2) König,J.F.R. and Klippel,R.A.(1963) The brain, A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem, Williams and Wilkins Co., Baltimore

3) Mori,M., Tsushima,H. and Matsuda,T. (1984) Japan. J. Pharmacol. 35, 27-36

4) Mori,M., Tsushima,H. and Matsuda,T. (1986) Japan. J. Pharmacol. 40, 311-318

5) Mori,M., Tsushima,H. and Matsuda,T. (1986) Japan. J. Pharmacol. in press.

6) Tsushima,H., Mori,M. and Matsuda,T. (1985) Japan. J. Pharmacol. 39, 365-374

7) Tsushima,H., Mori,M. and Matsuda,T. (1986) Japan. J. Pharmacol. 40, 319-328

8) Tsushima,H., Mori,M. and Matsuda,T. Japan. J. Pharmacol. in preparation.

Fig. 1. Changes in urine outflow by microinjection of adenine nucleotides and adenosine into the SON or PVN. ⁑ $P < 0.05$ vs. the CSF group.

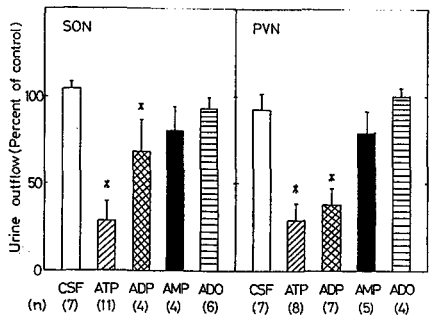


Fig. 2. Changes in urine osmotic pressure compared with urine outflow after microinjection of ATP into the SON or PVN. ⁑ $P < 0.05$ vs. the CSF group.

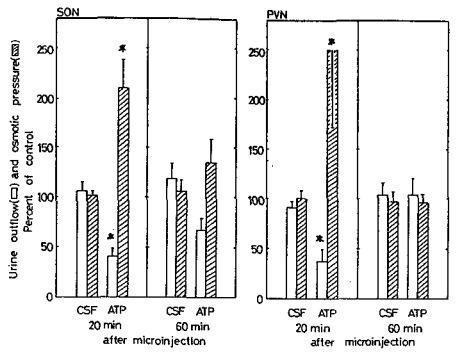


Fig. 3. Effects of theophylline on antidiuresis by microinjection of ATP into the SON or PVN.
o : ATP, 100 nmol,
● : theophylline, 50 nmol + ATP, 100 nmol
⁑ $P < 0.05$.

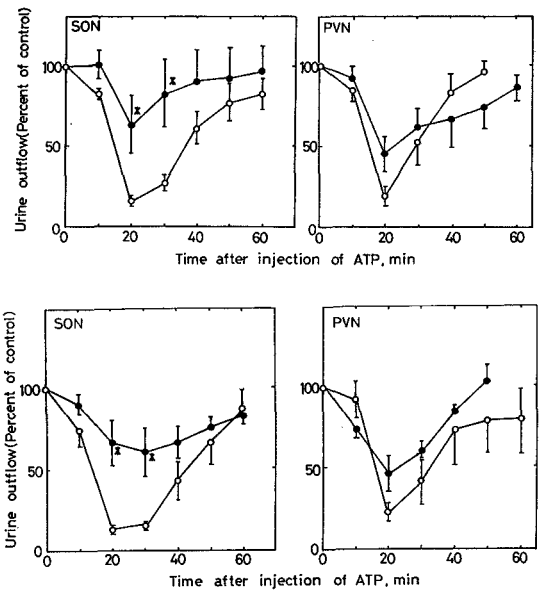


Fig. 4. Effects of atropine on antidiuresis by microinjection of ATP into the SON or PVN.
O : ATP, 100 nmol
● : atropine, 300 nmol+ATP, 100 nmol
⁑ $P < 0.05$.

177. ω—conotoxin のシナプス膜分画への結合

阿部輝雄・古谷野好・西須英雄・西内祐二*・榊原俊平*
(新潟大・脳研，ペプチド研*)

〔要　約〕

化学的に合成したω−conotoxin GVIA（ω−CgTX）を^{125}Iで標識し，そのラット脳シナプス膜分画への結合を調べ，以下の知見を得た。

(1) ω−CgTXは，二つの異なる部位に特異的に結合した。そのK_dおよびBmaxは，それぞれ，10 pM，0.5 nMおよび0.5，3.4 pmol／mg蛋白質であった。

(2) ω−CgTXの結合は，高濃度のCa拮抗剤（dihydropyridines, verapamil, diltiazem, pimozide等）によって有意に影響されなかった。したがって，ω−CgTXの結合部位は，これらの薬剤の結合部位とは異なっている。

(3) ω−CgTXのシナプス膜分画への結合は，2価および3価の金属イオンによって強く阻害された。試みた金属イオンの阻害の強さの順序は，

$La^{3+} > Cd^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+} = Co^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+} > Na^{+} = K^{+}$ であった。この順序は，ニューロブラストーマや脳の神経終末に存在する電位依存性Caチャンネルを通してのCa電流に対するこれらの金属イオンの阻害力の順序によく似ていた。

(4) 以上の結果より，ω−CgTXは，電位依存性Caチャンネルのポアに存在すると考えられるCa結合部位と密接に関係した部位に結合することが示唆される。

Key word：　ω−conotoxin, Ca channel, synaptic membranes

神経系におけるCa^{2+}流入の主要な経路の一つは，形質膜に存在する電位依存性Caチャンネルを通じてのそれである。神経細胞内のCa^{2+}濃度の制御機構を知るためには，Caチャンネルの作用およびその制御のメカニズムを知る必要がある。これまで，神経系を含めて多くの組織における電位依存性Caチャンネルの研究は主として，ジヒドロピリジン系のCa拮抗剤を用いて行われて来た。しかし，ジヒドロピリジン系薬剤は神経終末の脱分極に伴う，Ca^{2+}の取り込みや伝達物質放出に対して，通常ほとんど影響しない。更に，最近のパッチクランプ法による研究によって，神経細胞には，ジヒドロピリジンに非感受性のCaチャンネルが存在していることが示されている(1)。したがって，Caチャンネルの全容を知るためには，ジヒドロピリジン系薬剤以外のプローブが必要である。アンボイナ貝（Conus geographus）の生産する神経毒ペプチドであるω−conotoxin GVIA（ω−CgTX）は，カエル神経筋接合部において，おそらくCaチャンネルを通じてのCa^{2+}流入を阻害することによって，伝達物質の放出を不可逆的に抑制する(2)。それ故，ω−CgTXはCaチャンネルの良いプローブであると考えられる。今回，^{125}Iで標識したω−CgTXの脳シナプス膜分画への結合を調べたので報告する。

〔実験方法〕

化学的に合成したω−CgTX(3)をクロラミンTを用いて^{125}Iで標識し，ゲルロ過およびCM−Sephadexカラムクロマトグラフィーによって，1モルのω−CgTX当り，1モルの^{125}Iが取りこまれた標識毒素（以下，^{125}I−ω−CgTX）を非標識毒素から分離した。^{125}I−ω−CgTXの金魚に対する毒性(3)は，非標識毒素のそれとほとんど差がなかった。2,100 Ci／mmolおよび210 Ci／mmolの比放射能を持つ^{125}I−ω−CgTXを調製した。^{125}I−ω−CgTXの脳シナプス膜分画

への結合は，以下の様にして調べた。20 mM Tris-HCl, pH 7.5，0.1％ bovine serum albumin（BSA），Jones & Matus の方法(4)によって調製したラット脳 synaptic plasma membrane（SPM，蛋白量 1 － 2 μg）および種々の濃度の ^{125}I-ω-CgTX を含んだ反応混合物を 4 ℃で 90 分間インキュベート後，最終濃度 0.15 M の NaCl を加え，その一定量を減圧下にセルロースアセテートフィルターを通して ロ過し，5 ml の 20 mM Tris- 0.15 M NaCl - 0.1％ BSA（HCl にて pH 7.5）溶液で 3 回洗った後，放射能を測定した。非特異的結合は，1 μM の非標識 ω-CgTX の存在下で測定した。結合実験は全て triplicate で行い，その平均をとった。

〔結果と考察〕

(1) SPM 分画への結合

図 1 A に示す様に，非常に低濃度の ω-CgTX で特異的な結合が見られた。特異的結合の Scatchard plot は直線では適合できない（図 1 B）。LIGAND プログラム(5)によって解析すると，2 つの結合部位の存在が示唆された。4 例の実験から，apparent K_d および Bmax は，それぞれ，10 ± 3.1 pM（mean ± SD），0.52 ± 0.35 nM，0.52 ± 0.04 pmol／mg protein，3.4 ± 1.6 pmol／mg protein であった。ω-CgTX のこれら 2 つの結合部位からの解離は遅く，6 時間で 30％程度であった。

(2) Ca 拮抗剤の影響

表 1 に示される様に，ω-CgTX の SPM 分画への結合は，Na チャンネルや K チャンネルに作用する物質によって影響を受けない。また，通常用いられる Ca 拮抗剤（nitrendipine, nifedipine, nisoldipine, verapamil, diltiazem, pimozide など）およびジヒドロピリジン系の Ca アゴニスト（Bay K 8644）等によって，有意に変化しない。ジヒドロピリジン系薬剤に感受性を示す心筋や骨格筋の Ca チャンネルには，ジヒドロピリジン結合部位とアロステリックに連関した，verapamil 等のフェニルアルキルアミン結合部位および diltiazem 等のベンゾチアゼピン結合部位の少なくとも 3 種の薬剤結合部位が存在していると考えられる。ω-CgTX は，これら 3 部位とは異なった部位に結合することが表 1 の結果から明らかであるが，同一分子の異なる部位か，あるいは，異なった分子に結合するのかは，現在，不明である。

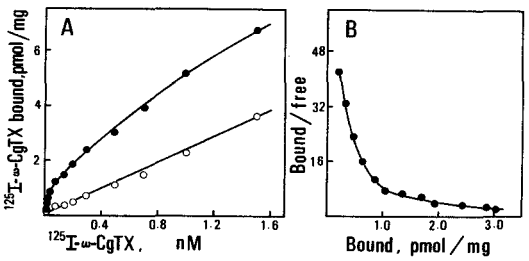


図 1　^{125}I-ω-CgTX の SPM への結合
典型的 1 例を示す。(A)総結合(●)，非特異的結合(○)。(B)，A の特異的結合を Scatchard plot したもの。曲線は，LIGAND プログラム(5)によって得られた。

(3) 金属イオンの効果

試みた 1，2，3 価の金属イオンは全て阻害効果を示した。図 2 A に示す様に，Na^+ および K^+ は高濃度でのみ阻害を示した。最強は La^{3+} で IC_{50} は 1 μM 以下であり，0.1 mM では ω-CgTX の結合は完全に阻害された（図 2 B）。また，通常の Ca チャンネルを通ると考えられ

るイオン（Ca^{2+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}）のうち，Ca^{2+}が最も強い阻害を示した。阻害の強さの順序は，

$La^{3+} > Cd^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+} = Co^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+} > Na^{+} = K^{+}$

であった。この順序は，ニューロブラストーマ細胞に存在する，遅い不活性化を示すCaチャンネル(6)および脳の神経終末にあって伝達物質放出に関与するCaチャンネル(7)のCa電流に対する上述の金属イオンの阻害の強さときわめて似ている。生理的食塩水中の高濃度のNa^{+}およびK^{+}に対して，Ca^{2+}がCaチャンネルを選択的に通過できるのは，このチャンネルのポアに存在する高親和性の，Ca^{2+}に対する選択的結合部位によっていると考えられている（8, 9)。したがって，ω-CgTXは，このCa^{2+}結合部位の近傍あるいは，それに密接に関係した部位に結合することが示唆される。最近，Cruzらは，ω-CgTXのヒヨコ脳シナプトソームへの結合を報告したが(10)，通常のCa^{2+}拮抗剤が，その結合に影響しないという点において，本研究結果と一致している。

〔文　献〕

1）Nowycky, M. C. et al., Nature 316, 440 (1985) 2）Kerr, L. M. & Yoshikami, D. Nature 308, 282 (1984) 3）Nishiuchi Y. et al., Biopolymers, in press. 4）Jones, D. H. & Matus, A. I., Biochim. Biophys. Acta, 356, 276 (1974) 5）Munson, P. J. & Rodbard, D., Anal. Biochem., 107, 220 (1980) 6）Tsunoo, A. et al., Biophys. J., 47, 433a (1985) 7）Nachshen, D. A., J. Gen. Physiol., 83, 941 (1984) 8）Hess, P. & Tsien, R. W., Nature, 309, 453 (1984) 9）Almers, W. & McCleskey, E. W., J. Physiol., 353, 585 (1984) 10）Cruz, J. & Olivera, B. M., J. Biol. Chem., 261, 6230 (1986)

表1　^{125}I−ω−CgTXの結合に影響しない物質（対照の±10％以内の変化）。

Chemicals	Concentration	Target
Apamin	1 μM	
Tetraethylammonium	5 mM	K channels
4-Aminopyridine	5 mM	
3,4-Diaminopyridine	5 mM	
Tetrodotoxin	1 μM	
Veratridine	0.1 mM	Na channel
γ-Toxin from Tityus*	1 μM	
Bay K8644	40 μM	
Nitrendipine	40 μM	
Nifedipine	40 μM	
Nisoldipine ± 0.1 mM $CaCl_2$	40 μM	Ca channel
Verapamil	0.1 mM	
D-600	0.1 mM	
Diltiazem	0.1 mM	
Pimozide	40 μM	

SPMを上記の物質と1時間インキュベートした後，0.02nMあるいは0.2nMの^{125}I−ω−CgTXを加えた。

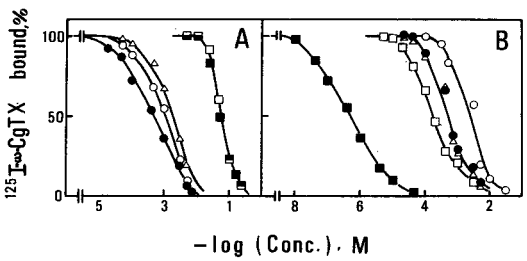


図2　金属イオンによる阻害

SPM分画を種々の濃度の金属イオンと10分間インキュベートした後，0.2nMの^{125}I−ω−CgTXを加えた。(A) 1価および2価金属イオンの効果。□，Na^{+}; ■，K^{+}; △，Sr^{2+}; ○，Ba^{2+}; ●，Ca^{2+}。(B) 2価および3価の金属イオンの効果。○，Mg^{2+}; ●，Co^{2+}; △，Ni^{2+}; □，Cd^{2+}; ■，La^{3+}。全ての金属イオンは塩化物を使用した。

178. conotoxin GIIIA の〔^{3}H〕標識と Na channel への結合

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 GIIIA (CGIIIA)を精製し、N-succinimidyl[^{3}H]propionateを用いて[^{3}H]標識誘導体、mono[^{3}H]propionyl CGIIIA ([^{3}H]Pr-CGIIIA)を合成した。[^{3}H]Pr-CGIIIA を用いて、電気鰻電気器官膜分画（電気器官）に対する結合実験を行ない、CGIIIAの神経毒としての性質を明かにした。

[^{3}H]Pr-CGIIIA は電気器官に特異的に結合し、Scatchard 解析によりKdが1.1 nM、Bmaxが11 pmol/mg蛋白であった。Naチャンネルに作用する各種の神経毒による上記特異的結合の阻害実験では、Naイオン透過性を抑制するtetrodotoxin (TTX)とsaxitoxinは、低濃度で阻害したが、他の種類の神経毒は、阻害効果を示さなかった。また、CGIIIAは、[^{3}H]lysine-TTXの電気器官に対する特異的結合を低濃度で阻害した。したがって、CGIIIAとTTX は、電気器官Naチャンネル分子上で共通の結合部位をもつことが示唆される。

Key word： conotoxin GIIIA binding, eel electroplax, Na channel.

conotoxin GIIIA (CGIIIA)とconotoxin GIIIB (CGIIIB)とは、アンボイナ貝より精製されたペプチドであり、神経毒としての性質をもつ(1, 2)。電気生理学的実験ではCGIIIAが蛙骨格筋の活動電位を抑制し (1)、[^{3}H]lysine-TTXを用いた結合実験では、電気鰻電気器官において低濃度のCGIIIAが結合阻害を示した (3)。したがって、CGIIIAは、Naチャンネルに特異的に作用し、Naイオン透過性を抑制するTTX と類似の生理作用をもつと考えられている。

今回、我々は、CGIIIAを[^{3}H]標識し、電気鰻電気器官膜分画に対する結合の性質を明かにし、[^{3}H]lysine-TTXを用いた結合実験と比較検討を行なった。

［実験方法］

［１］　CGIIIAとCGIIIBの精製は、Yanagawa等 (3)の方法に従い、アミノ酸分析により同定した。

［２］　CGIIIAの[^{3}H]標識：　N-succinimidyl[^{3}H]propionate(105 Ci/mmol) 10 nmol の溶媒をN_2でとばし、400 μlの0.1 M borate buffer 、pH 8.5に溶かしてあるCGIIIA 60 nmolを加え、15分間、4°C で放置し、この反応溶液をCM-Sephadex C-25カラムにかけ、溶出されてきた各fractionの[^{3}H]放射活性と230 nmの吸収を測定した(Fig. 1)。

［３］　結合実験：　電気鰻電気器官膜分画（電気器官）は、Agnew 等 (4)の方法を改良して用いた。この膜分画と種々の濃度の[^{3}H]Pr-CGIIIA とを40 mM choline chloride、0.1% BSA、0.01% NaN_3、20 mM Tris-HCl、pH 7.4の溶液の中で、4°C 、60

分間反応させた後、28,000 g、15分間遠心して沈さに結合した放射活性を測定した。全結合より1 μM CGIIIA 存在下での値を差し引いたものを特異的結合とした。各種の神経毒による阻害実験では、一定の濃度(1 nM)の[^{3}H]Pr-CGIIIA、種々の濃度の神経毒と混合した後、以下同様の条件で行なった。

[^{3}H]lysine-TTX (30 Ci/mmol) は Chicheportiche等 (5)の方法に従い合成し、ほぼ上記と同様の条件で結合実験を行なった。

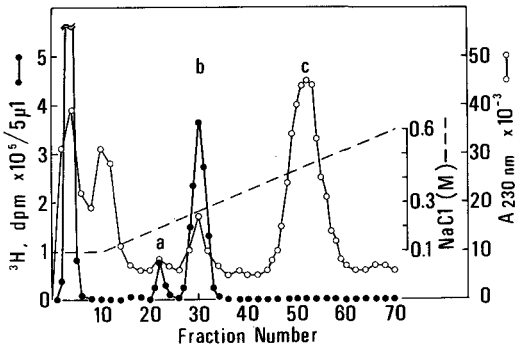


Figure 1. Purification of [^{3}H]Pr-CGIIIA. The reaction mixture was applied to a CM-Sephadex C-25 column (0.75 x 4.5 cm) equilibrated with 0.1 M NaCl in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and eluted with a linear gradient of 0.1-0.6 M NaCl in the same buffer. Absorbance at 230 nm (o) and the radioactivity (●) of 5 μl aliquots of each fraction were determined. The NaCl concentration was estimated theoretically (---). The flow rate was 2 ml/h and 1.0 ml fractions were collected.

[結果と考察]

[1] Fig. 1に[^{3}H]Pr-CGIIIAのCM-Sephadex C-25からの溶出パターンを示した。各peak fractionの放射活性とアミノ酸分析による蛋白定量とにより比放射活性を求めた。peak aはdi[^{3}H]propionyl CGIIIA、peak bはmono[^{3}H]propionyl CGIIIA ([^{3}H]Pr-CGIIIA)、peak cは非標識CGIIIAと決定された。

[2] [^{3}H]Pr-CGIIIAの合成と同様な方法で、低放射活性 Pr-CGIIIA (10.5 Ci/mol) を合成した。電気器官への[^{3}H]lysine-TTX (1 nM) 結合に対する50% 阻害濃度は、CGIIIAで0.9 nM、Pr-CGIIIA で3.5 nMであった。これは、両者とも低濃度で

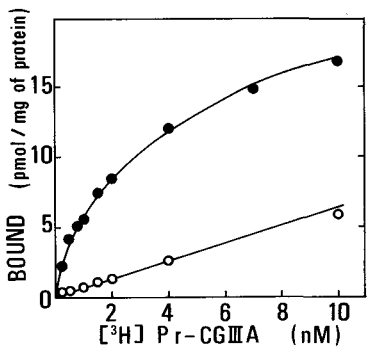


Figure 2. Binding of [^{3}H]Pr-CGIIIA to eel electroplax membranes. Eel electroplax membranes were incubated for 60 min at 4℃ with indicated concentrations of [^{3}H]Pr-CGIIIA and the bound radioactivity was measured by the centrifugation procedure. Total binding (●) and nonspecific binding measured in the presence of 1 μM CGIIIA (o) are plotted versus the free [^{3}H]Pr-CGIIIA concentration.

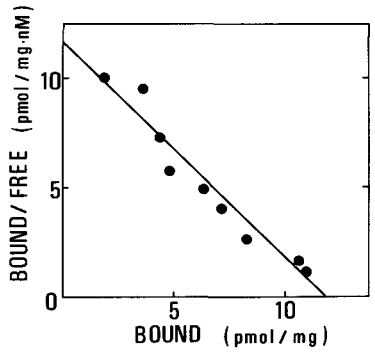


Figure 3. Scatchard's representation of specific [^{3}H]Pr-CGIIIA binding on eel electroplax membranes. Specific binding was calculated as the difference between total and nonspecific binding.

TTX の結合を抑制することを示している。

［３］ [^{3}H]Pr-CGIIIA の電気器官に対する飽和結合実験の結果をFig. 2に示し、また特異的結合をScatchard's plotとしてFig. 3に示した。これにより単一の結合部位が示され、Kdは1.1 nM、Bmaxは11 pmol/mg蛋白であった。同様にして行なった[^{3}H]lysine-TTXの電気器官に対する結合実験では、Bmaxがほぼ同じ値(10 pmol/mg 蛋白)を示した。

［４］ 種々の神経毒による[^{3}H]Pr-CGIIIA (1 nM)の電気器官への結合に対する阻害効果をTable 1 とTable 2 に示した。CGIIIA、CGIIIB、saxitoxin 、tetrodotoxinは、低濃度で強い阻害を示すが、生理作用を異にするNaチャンネル毒は、阻害作用を示さなかった。

Table 1. Inhibition of specific [^{3}H]Pr-CGIIIA binding to eel electroplax membranes by neurotoxins

Neurotoxin	IC_{50} (nM)
conotoxin GIIIA	0.6 ± 0.1
conotoxin GIIIB	1.1 ± 0.1
saxitoxin	2.2 ± 0.4
tetrodotoxin	7.1 ± 0.9

Data represent mean ± SD from three separate experiments.

Table 2. Binding of [^{3}H]Pr-CGIIIA to eel electroplax membranes in the presence of other kinds of neurotoxins and local anesthetics

Addition	Concentration	[^{3}H]Pr-CGIIIA bound (% of control)
veratridine	100 μM	107 ± 1
aconitine	100 μM	95 ± 1
PaTX*	1 μM	99 ± 5
TiTxγ**	100 nM	95 ± 1
lidocaine	1 mM	89 ± 8

* Parasicyonis toxin
**Toxin γ from Tityus serrulatus
Data represent mean ± SD from three different experiments.

［５］ 以上の結果より、CGIIIAとTTX とは、一方がペプチドあり、他方はグアニジウム化合物という全く異なる構造をもちながら、Naチャンネルに特異的に作用し、Naイオンの透過性を抑制する神経毒に分類される。また、それぞれの結合実験より、CGIIIAとTTX とは、Naチャンネル分子上で共通の結合部位をもつことが示唆される。

［文献］

(1) Cruz, L.J., Gray, W.R., Olivera, B.M., Zeikus, R.D., Kerr, L., Yoshikami, D. and Moczydlowski, E. (1985) J. Biol. Chem. 260, 9280-9288.
(2) Sato, S., Nakamura, H., Ohizumi, Y., Kobayashi, J. and Hirata, Y. (1983) FEBS Lett. 155, 277-280.
(3) Yanagawa, Y., Abe, T. and Satake, M. (1986) Neurosci. Lett. 64, 7-12.
(4) Agnew, W.S., Levinson, S.R., Brabson, J.S. and Raftery, M.A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2606-2610.
(5) Chicheportiche, R., Balerna, M., Lombet, A., Romey, G. and Ladzunski, M. (1980) Eur. J. Biochem. 104, 617-625.

179. 種々の酵素で処理したシナプトゾームに対するボツリヌス神経毒素の結合性

曽根三郎*・北村　勝
（東大農化・現：東レ*，国立予防衛生研）

〔要　約〕

種々の酵素で処理したシナプトゾームに対するボツリヌス神経毒素の結合性を検討した。酵素として，トリプシン，ノイラミニダーゼ，ホスホリパーゼA2を使用した。これらの酵素で処理したシナプトゾームのうち，ノイラミニダーゼが著しく毒素の結合性を低下させ，トリプシンまたはホスホリパーゼA2では僅かに低下させた。ノイラミニダーゼ処理による毒素の結合性の低下の傾向はシナプトゾームから遊離したシアル酸の量と一致していた。また，ノイラミニダーゼ処理したシナプトゾームをメタノール・クロロホルムにより抽出し，その抽出液を薄層クロマトグラフィーで展開するとポリシアロガングリオシドが酵素量の増加に比例して減少している事が確認された。一方，シナプトゾームのトリプシンまたはホスホリパーゼA2の処理による毒素との結合性の僅かな低下は，シナプトゾームの可溶化によるものと思われる。最近，シナプトゾウムに於けるボツリヌス神経毒素との結合成分はタンパク質であるとの示唆があるが，今回の結果より，シアル酸を含んだ成分であるものと思われる。

Key word：　Botulinum neurotoxin, Synaptosome, Neuraminidase

ボツリヌス神経毒素は神経・筋接合部において特異的にアセチルコリンの遊離を阻止する作用がある。このボツリヌス毒素は，in vitro において脳シナプトゾームにも結合し(4,7)，アセチルコリンの遊離を阻止する作用がある(12)。この毒素のシナプトゾームに於ける結合様式はシナプス前膜に対してのみ選択的に結合していることが観察された（5)。一方，この毒素は神経系に比較的多く含まれているガングリオシド(10)，特にGT1bとGQ1b（8)とin vitroで結合し，その毒性を失う。我々は，このボツリヌス神経毒素の作用機構をシナプス膜の面より明らかにする目的でこれまで研究を行なってきた。しかし，ボツリヌス神経毒素の作用機構と神経膜上の毒素結合成分（または，膜構造）について，依然明らかにされてない。これまでに，毒素結合成分はタンパク質であるとの示唆が最近なされた(2,3,11)が，これらについて不明な点が多い。そこで，今回はシナプトゾームに存在している毒素結合成分を検索する目的で種々の酵素でシナプトゾームを処理し毒素の結合性を検討した。

［実　験　方　法］

ボツリヌス神経毒素：　ボツリヌスA型結晶毒素からDEAE-Sephadex クロマトグラフィー法により分離・精製した（6)。

シナプトゾームの調製：　ラットの大脳ホモジネイトよりフィコール法（9)により調製した。シナプトゾームは0.32M 庶糖を含んだ10mM HEPES buffer,PH7.2 に懸濁

した。

シナプトゾームに対する毒素の結合測定； シナプトゾーム懸濁液と毒素液を混ぜ20分間 37° C でインキュベイションした後，10,000g 10分間遠心分離し，上清の毒性をマウスを用いて測定した。

シナプトゾームの酵素処理； ノイラミニダーゼ，トリプシン，ホスホリパーゼA2としてβ-ブンガロトキシンを用いて，酵素の濃度を変えて37° C,30分間インキュベーションした後，10,000g 10分間遠心分離した。これらシナプトゾームは毒素の結合性の実験に供した。

シアル酸の定量； Aminoff の方法（１）より行なった。

シナプトゾームのタンパクの定量； 銅-Folin の方法により行なった。

シナプトゾームからのガングリオシドの抽出と同定； 各酵素で処理したシナプトゾームをメタノール－クロロホルムにより37° C，30分，2 回抽出し，薄層クロマトグラフィーに供した。

［結 果 と 考 察］

シナプトゾームをノイラミニダーゼ，トリプシン，ホスホリパーゼA2（β－ブンガロトキシン）の濃度を変えて処理したのち，ボツリヌス神経毒素の結合能の測定をした。図（A)に示した様に，ノイラミニダーゼ処理をしたシナプトゾームに対する毒素の結合性は酵素濃度を高めると共に低下した。このときのシナプトゾームから遊離したシアル酸量と毒素結合性の低下は平行性を示した。しかし，シアル酸濃度が限界に

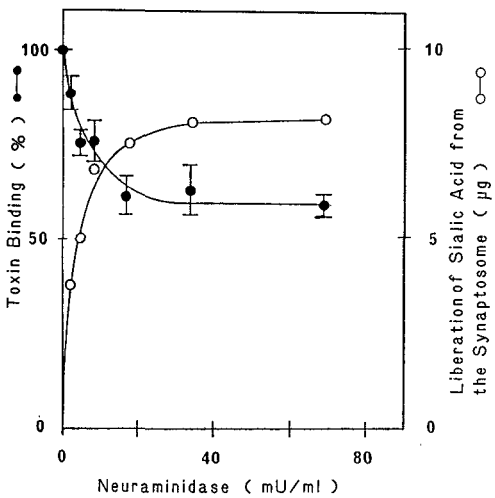


Fig. Binding ability of botulinum neurotoxin to the synaptosome treated with neuraminidase

Table Binding ability of botulinum neurotoxin to the synaptosome treated by combination with neuraminidase and trypsin or phospholipase A2

Enzyme treatment	Toxin binding
Nontreatment	100
Neuraminidase (138 mU/ml)	39
Trypsin (138 mg/ml)	100
Neuraminidase-Trypsin	32
Nontreatment	100
Neuraminidase (39 mU/ml)	59
Phospholipase A2 (39 mU/ml)	97
Neuraminidase-Phospholipase A2	64

達しているにもかかわらず完全に毒素の結合性を失うことはなかった（図）。一方，トリプシン，β－ブンガロトキシン処理したときには酵素濃度の上昇と共に毒素結合能は僅かに低下した。これらの酵素で処理したシナプトゾームの変化をタンパク含有量と濁度で調べたところ酵素濃度の上昇と共に減少していた。しかしながら，ノイラミニダーゼにより処理したところ，これらの変化は認められなかった。また，この両酵素による毒素結合性の僅かな低下は，シナプトゾームのタンパク質および濁度当りに換算してみると無処理との差が認められなかった。また，これら酵素処理により僅かにシナプトゾームよりシアル酸が遊離してきたが，これはシナプトゾームの部分的な破壊または可溶化によるものと思われる。上記の実験において各酵素で処理したシナプトゾームのメタノール－クロロホルム抽出液を薄層クロマトグラフィーに展開した。その結果，ノイラミニダーゼ処理では濃度の上昇に伴ってポリシアロガングリオリドが減少し，逆にGM1 の増加が認められた。また，トリプシンとβ- ブンガロトキシンではガングリオシドの変化は認められなかった。次に，ノイラミニダーゼとトリプシンまたはβ- ブンガロトキシンと組合わせて予めシナプトゾームを処理した後，毒素の結合性を検討したところノイラミニダーゼのみの影響によることが明らかになった（表）。以上の結果より，ボツリヌス神経毒素はシナプトゾームに結合する際にはシナプス膜上のタンパク質または脂質の可能性より，むしろシアル酸含有成分が関わっているものと思われる。この点，Black et al(2),Dolly et al(3),Williams et al（11）らが最近，シナプトゾームをトリプシンとホスホリパーゼA2により処理すると毒素の結合性は著しく低下すると報告しているが，これら報告では使用した酵素量も多くしかもシナプトゾームのタンパク質または濁度の変化または可溶化や部分的な破壊などを考慮せずに見掛け上の毒素の結合性を見ている可能性があると思われる。シナプトゾームをノイラミニダーゼにより処理した時に，遊離したシアル酸の量が最大に達しているにも拘らず毒素の結合性は約半分で，完全に結合性を失うことはなかった（図）。今回の毒素結合実験系では比較的に低塩濃度下で行なったが，ノイラミニダーゼで処理したシナプトゾームと毒素の反応液の塩濃度を変えて同様の実験をしたところ，等張濃度では完全に結合性が失われた。即ち，低塩濃度下でのシナプトゾームに対するボツリヌス神経毒素はシアル酸と塩濃度感受性の二種類の結合部位に結合するものと思われる。

［謝　辞］

本研究にあたり御助言と御指導いただいた東京大学農学部農芸化学科，丸山芳治，小野寺一清両先生そして国立予防衛生研究所，逢坂昭先生に感謝いたします。

［文　献］

(1)Aminoff,D.(1961) Biochem.J.81 384 (2)Black,D.J.et al (1983) J.Neurochem.41 suppl S148,B (3)Dolly,J.O.et al (1982) Toxicon 20 141 (4)Habermann,E.(1974) N-S Arch. Pharmacol.281 47 (5)Hirokawa,N.& Kitamura,M.(1979) J.Cell Biol.81 43 (6)Kitamura,M. Sakaguchi,S.& Sakaguchi,G.(1969) J. Bact.98 1173 (7)Kitamura,M.(1976) N-S Arch. Pharmacol.295 171 (8)Kitamura,M.Iwamori,M.& Nagai,Y.(1980) Biochim.Biophys.Acta 628 328 (9)Kurokawa,M.Sakamoto,T.& Kato,M.(1965) Biochim.Biophys.Acta 94 307 (10)Simpson, L.L.& Rapport,M.M.(1971) J.Neurochem.18 1341 (11)Williams,R.S.et al (1983) Eup.J. Biochem.131 437 (12)Wonnacott,S.(1980) J.Neurochem.34(6) 1567

180. ラット脳内 cholecystokinin（CCK）mRNA 濃度の測定と CCK 遺伝子の構造解析

薄井　宏・長谷川まこと*・桑野良三・荒木一明
前田利長・高橋康夫（新潟大・脳研・神経薬理・医・精神*）

〔要　約〕

Cholecystokinin(ＣＣＫ）は、高次神経機能に深いかかわりを持つと考えられる神経ペプチドである。我々は、ラット脳内各部位のＣＣＫｍＲＮＡ濃度を測定して、ＣＣＫｍＲＮＡが大脳皮質で最も高濃度であり、小脳では検出できず、海馬と線状体ではその中間であることを示した。この結果は、すでに報告されているＣＣＫペプチドの脳内分布とほぼ対応しており、ＣＣＫ合成がｍＲＮＡへの転写レベルで調節されていることを示唆している。我々はまた、ラットＣＣＫ遺伝子を単離してその構造を解析した。その結果、ＣＣＫ遺伝子が３つのエクソンと２つのイントロンを持つことが明らかになった。イントロンＩは5'非翻訳領域に存在して１ｋｂｐの長さを持ち、イントロンIIはＣＣＫ前駆体の７２番目のアラニンを分断して存在し、約4.2Kbpの長さであった。エクソンーイントロン境界の塩基配列はＧＴ－ＡＧ則に従っていた。ラット高分子遺伝子ＤＮＡの Southern blot 解析から、ＣＣＫ遺伝子はラットゲノム中に single copyy 存在し、それは我々が単離したものと同一であることが判明した。また、ヒトの白血球から遺伝子ＤＮＡを抽出して Southern blot解析を行い、ラットＣＣＫｃＤＮＡプローブを用いてヒトＣＣＫ遺伝子の解析が可能であることを示した。

Key word：　Cholecystpkinin(CCK)，　ｍＲＮＡ，　ＣＣＫgene

Cholecystokinin（ＣＣＫ）は、当初消化管ホルモンとして見い出されたが、その後中枢神経系内にも存在することが明らかにされた。ＣＣＫは脳内で神経伝達物質あるいは神経調節物質として働くことが示唆されており、大脳皮質に特に高濃度に存在して高次神経活動に深いかかわりを持つ可能性が考えられている。また、ＣＣＫはヒトの精神分裂病の成因になんらかの役割を果たすのではないかとも考えられており、臨床的にもある種の精神分裂病患者でＣＣＫ類似物質が治療上効果があったとの報告もある。(4) 我々はすでに成功していたラットＣＣＫｍＲＮＡに対するｃＤＮＡクローニング(2)にひき続いて、ＣＣＫ遺伝子の構造と遺伝子発現に関する研究を行いつつある。このような精神分裂病の成因にかかわる可能性のある遺伝子に関する研究は今後臨床的にも重要な問題になるように思われる。

今回我々は、［１］ラット脳内ＣＣＫｍＲＮＡ濃度の部位別測定、［２］ラットＣＣＫ遺伝子の構造解析について報告し、まだ予備的段階であるが［３］ヒトＣＣＫ遺伝子の解析についても述べる。

［方法］

すでに我々が得ていたラットＣＣＫｃＤＮＡクローン（ｐＲＣ１９）を、制限酵素ＰｓｔＩで切断してインサート部分を抽出し、それに［^{32}p］ｄＣＴＰを用いてnick translation法でラベルを入れてＣＣＫプローブを作成した。このＣＣＫプローブを以下の実験に用いた。

［１］Dot blot hybridization：　Wister系ラットの脳から、大脳皮質、小脳、海馬、線状体の４部位を切り出し、核を取り除いた後、フェノール・クロロホルム法に

て細胞質ＲＮＡを抽出した。各細胞質ＲＮＡを変性させた後ニトロセルロース膜上に一定量ずつスポットして固定し、ＣＣＫプローブとhybridize させた。洗浄後，オートラジオグラフィを行ってsignalの強弱を観察した。

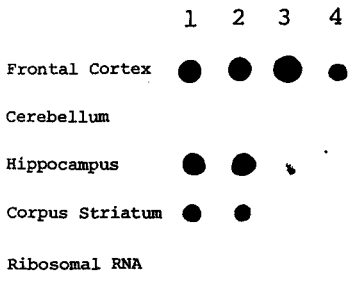
［２］Northern blot hybridization ： 各細胞質ＲＮＡを１％アガロースゲル電気泳動を行った後ニトロセルロース膜にtransferし、ＣＣＫプローブとhibridize させた。洗浄後、オートラジオグラフィを行いバンドを観察した。(6)

［３］Southern blot hybridization ： ラット脳から高分子の遺伝子ＤＮＡを、Blin & Stafford の方法により抽出した。(3) 得られたＤＮＡを数種類の制限酵素で切断した後0.6%アガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜にtransferした。その後ＣＣＫプローブとhybridize させ、洗浄後、オートラジオグラフィを行った。また、健常者と慢性精神分裂病患者から血液を採取して白血球を分離し、同様の方法で遺伝子ＤＮＡを抽出して、Southern blot hybridization を行った。

［４］ラットＣＣＫ遺伝子の単離 ： Bonner博士より供与されたラット遺伝子ライブラリーをＣＣＫプローブを用いてplaque hybridizationn を行い、スクリーニングした。得られた陽性ファージプラークからＤＮＡを抽出し、制限酵素地図を作った。複数のファージＤＮＡの制限酵素地図を組み合わせて、ＣＣＫ遺伝子全長の制限酵素地図を作製した。エクソン－イントロン境界の塩基配列は、Maxam-Gilbert 法により決定した。

［結果と考察］

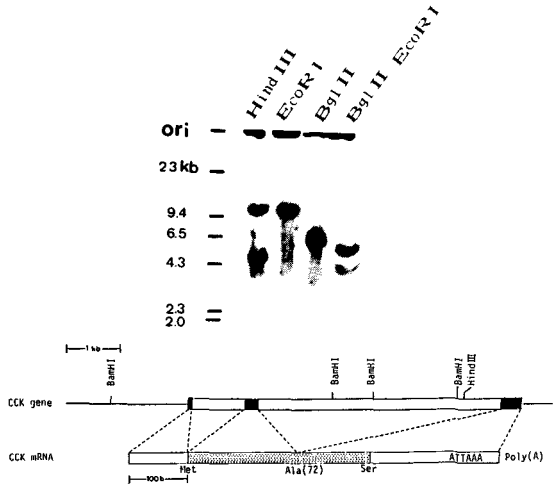
Northern blot analysisの結果、使用したＣＣＫプローブは、約８５０ヌクレオチドのＣＣＫｍＲＮＡとのみ反応することが観察され、他のバンドは検出されなかった。したがって、このプローブはdot blot analysis でＣＣＫｍＲＮＡの濃度を測定するのに適していると考えられた。dot blot analysis の結果は、図１に示したとおりである。各レーンには、(1)12.5 μg (2)6.25 μg (3)3.13 μg (4)1.56 μg の細胞質ＲＮＡがスポットされている。ＣＣＫｍＲＮＡ濃度は、大脳皮質で最も高濃度であり、小脳では検出できず、海馬と線状体ではその中間であることがわかる。この結果はradioimmunoassay法で得られたＣＣＫペプチドの脳内分布の報告とほぼ一致しており、ＣＣＫの合成がｍＲＮＡへの転写レベルで調節されていることを示唆している。(1)



［図１］

ラットＣＣＫ遺伝子の制限酵素地図は、図２の下段に示されている。ラットＣＣＫ遺伝子は、３つのエクソンと２つのイントロンを持つ。すなわち第１イントロンは１ｋbpの長さで5'非翻訳領域に存在する。第２イントロンはＣＣＫ前駆体の７２番目のアミノ酸のアラニンを分断して存在し、約4.2 ｋbpの長さを持つ。エクソン－イントロン境界の塩基配列は、ＧＴ－ＡＧ則に従っていた。また、ラットの高分子遺伝子ＤＮＡの Southern blot analysis から得られた結果（図２の上段）は、ＣＣＫ遺伝子はラットゲノム中にsingle copy 存在し、しかもそれは我々が単離したものと同じであることを示している。

［図２］



最近、Sutcliffeらは、ＩＤ配列と名づけられた82bpの繰り返し配列が脳で発現している遺伝子内に存在し、遺伝子発現調節機構になんらかの役割をはたしているとの仮説を提唱している。(5) 我々は、すでにＳ-100蛋白質βサブユニット遺伝子のイントロン中にＩＤ配列が存在することを見出していたが、今回、ＩＤ配列を含むＤＮＡフラグメントをラベルしてプローブとして検索した結果、ＣＣＫ遺伝子の約５ｋbp上流に２個のＩＤ配列が存在することが判明した。

最後に、ヒト白血球から抽出した遺伝子ＤＮＡのSouthern blot analysisでは、明らかなバンドが観察され、ラットＣＣＫｃＤＮＡプローブを用いてヒトのＣＣＫ遺伝子の解析が可能であることが明らかになった。今後、慢性精神分裂病患者でのＣＣＫ遺伝子の欠損や重複の有無や、主に制限酵素が認識する部位での点突然変異の有無、さらにＣＣＫ遺伝子のpolymorphysmを用いて病因遺伝子と連鎖検定等の解析が可能であると思われる。

［文献］

1.Hasegawa,M.,Usui,H.,Kuwano,R.,Araki,K.,and Takahashi,Y. (1986)FEBS letters 194,224-226

2.Kuwano,R.,Araki,K.,Usui,H.,Fukui,T.,Ohtsuka,E.,Ikehara,M.,and Takahashi,Y. (1984) J.Biochm. 96,923-926

3.Maniatis,T.,Fritsch,E.F.,and Sambrook,J.(1982) Molecular Cloning pp280-281 Cold Spring Harber Laboratory

4.Moroji,T.,Watanabe,N.,Aoki,N.,and Itoh S. (1982) Arch.Gen.Psychiat.39,485-486

5.Sutcliffe,J.G.,Milner,R.J.,Gottesfeld,J.M.,and Reynolrs,W.. (1984) Sience 225,1308-1315

6.Thomas,P. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. 77, 5201-5205

181. 2′:3′環状ヌクレオチド3′—フォスフォジエステラーゼ mRNA の脳の部位による分布及び発育による変化

井上雄吉・宮武　正・山国　徹*・栗原　正*
高橋康夫*　（新潟大・脳研・神経内科・神経薬理*）

〔要　約〕

ウシ脳各部位の2′:3′—環状ヌクレオチド3′—フォスフォジエステラーゼ（CNP）mRNAの含量及びその発育による変化をcDNAプローブを用いて検索した。

(1) ウシ脳CNPのmRNAは調べたすべての部位で約2.7kbの単一のバンドとして検出された。

(2) ウシ脳各部位のCNPmRNAの含量は、CNP活性に対応して白質に高く灰白質では低いという分布を示した。末梢神経の馬尾ではCNPmRNAがかろうじて検出される程度であった。

(3) ミエリン形成が進行中のウシ胎仔脳（9か月）で調べると、CNPmRNAの含量はやはり白質に高く灰白質では低かった。9か月胎仔脳白質のCNP活性は成熟脳白質の活性にくらべてかなり低いと思われるが、CNPmRNA含量は成熟脳白質とほぼ同じレベルにあった。

Key word：　2′: 3′− Cyclic nucleotide 3′− phosphodiesterase
mRNA, Myelin

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。最近我々はウシ脳CNPのcDNAクローニングを行ない、ウシCNPタンパクの全一次構造を解明した（栗原、高橋1985；Kurihara et al. 投稿中）。今回我々は、cDNAプローブを用いて、ウシ脳各部位のCNPmRNAの含量及びその発育による変化をノーザン・ブロット・ハイブリッド形成及びドット・ブロット・ハイブリッド形成によって検索した。

〔 実験方法 〕

ウシ脳各部位から細胞質RNAを図1に示す方法で調製し、細胞質RNAの一定量をノーザン・ブロット及びドット・ブロットの試料として用いた。cDNAはpCNP4のPst I 断片1,300bp（大部分が翻訳領域）を用い、ニック・トランスレーションで ^{32}P 標識した。ノーザン・ブロット・ハイブリッド形成はThomas（1980）の方法で行なった。ドット・ブロット・ハイブリッド形成は細胞質RNAの希釈系列を作ってフィルターにスポットし、ベークしたのちノーザン・ブロット・ハイブリッド形成と同様に行なった。CNP活性はNishizawa et al.（1980）の方法で測定した。

〔 実験結果及び考察 〕

図2はノーザン・ブロット・ハイブリッド形成の結果を示す。ウシ脳CNPのmRNAは調べたすべての部位で約2.7kb の単一のバンドとして検出された。図3は各々の部位から調製した細胞質RNAの希釈系列でドット・ブロット・フィルターを作り、cDNAプローブと反応させたものである。脳りょう、大脳白質、次いで小脳白質が強く反応し、大脳皮質、小脳皮質の反応は弱かった。末梢神経の馬尾ではCNPmRNA

がかろうじて検出される程度であった。これらの反応の強さは表1に示すＣＮＰ活性の分布にほぼ一致していた。ウシ胎仔脳（９か月）で調べると、ＣＮＰｍＲＮＡ含量はやはり白質に高く灰白質では低かった(図4)。９か月胎仔脳白質のＣＮＰ活性は成熟脳白質の活性にくらべてかなり低いと思われるが、ＣＮＰｍＲＮＡ含量は成熟脳白質とほぼ同じレベルにあった。ｍＲＮＡの大きさは成熟脳と変らず約2.7 kbであった。

ＣＮＰｍＲＮＡはおそらくミエリン形成期に最大量に達し、成熟脳になってもかなりのｍＲＮＡレベルを保っているように思われる。発育過程におけるＣＮＰｍＲＮＡ量の変化の詳細は小動物を用いた研究を待つとして、ここでは成熟脳白質でミエリンを維持しているオリゴデンドログリア細胞が依然として活発にＣＮＰｍＲＮＡを生産している点に注目したい。

〔 文　献 〕

栗原　正、高橋康夫（1985）神経化学24、76－78

Kurihara, T, Fowler, A. V., and Takahashi, Y. 投稿中

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

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

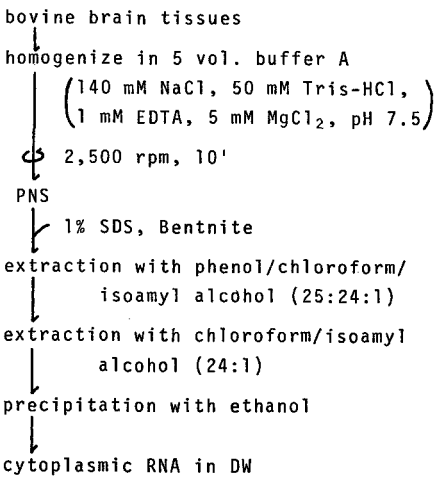


図１　　細胞質ＲＮＡの調製

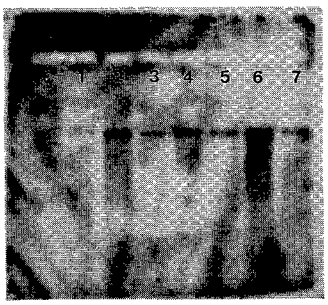


図２　　ノーザン・ブロット・ハイブリッド形成

C Control (rat liver)
1 Cerebral cortex
2 Cerebral white matter
3 Cerebellar cortex
4 Cerebellar white matter
5 Thalamus
6 Corpus callosum
7 Pons

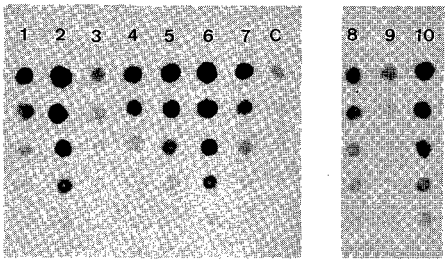


図 3　　ドット・ブロット・ハイブリッド形成

上から 10 , 5 , 2.5 , 1.25 , 0.62 μg RNA

1 Cerebral cortex
2 Cerebral white matter
3 Cerebellar cortex
4 Cerebellar white matter
5 Thalamus
6 Corpus callosum
7 Pons
C Control (rat liver)
8 Spinal cord white matter
9 Cauda equina
10 Striatum

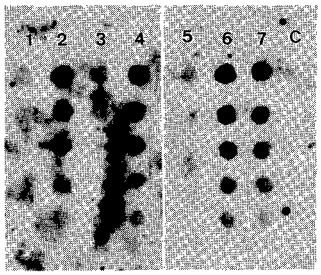


図 4　　胎仔脳のドット・ブロット・ハイブリッド形成

RNA量は図3と同じ

1 Fetal cerebral cortex
2 Fetal cerebral white matter
3 Fetal cerebellar cortex
4 Fetal cerebellar white matter
5 Adult cerebral cortex
6 Adult corpus callosum
7 Adult spinal cord white matter
C Control (yeast tRNA)

表 1　　ウシ脳各部位のCNP活性

Tissue	Enzyme activity (μmol/min/mg of protein)
Cerebral cortex	4.70
Cerebral white matter	18.17
Corpus callosum	25.40
Thalamus	6.20
Striatum	9.14
Superior cerebellar peduncle	17.84
Cerebellar cortex	4.37
Cerebellar white matter	14.31
Pons	15.20
Spinal cord gray matter	11.09
Spinal cord white matter	13.74
Cauda equina	1.42

182. エノラーゼアイソザイムの構造とその遺伝子発現
：筋組織特異的エノラーゼアイソザイム（ββ）のクローニングとその構造

崎村建司・櫛谷悦子・大島由香*・三井宏美*
高橋康夫　（新潟大・脳研・神経薬理，理・生物学*）

〔要　約〕

神経系における細胞レベルの発生、分化及び機能を遺伝子レベルで解明する目的でエノラーゼアイソザイムに注目して、ＮＳＥとＮＮＥのｃＤＮＡクローニングをすでに行ってきた。もう１つのアイソザイム、βサブユニットからなるＭＳＥのｃＤＮＡクローニングを行った。ラットＮＮＥｃＤＮＡの蛋白質コード領域をプローブとして骨格筋組織からのｃＤＮＡライブラリーを検索しいくつかの陽性クローンを選択したこのうち３クローンをシークエンスして、連続する 1413 ヌクレオチドを明らかにした。このｃＤＮＡの中に存在する最長のopen reading frameは、434 残基のアミノ酸をコードしており、開始メチオニンを除く433 残基の長さは、ＮＳＥ及びＮＮＥの長さと一致しさらに各々と約81% の高いホモロジーを持っていたことから、これらのクローンはＭＳＥのｃＤＮＡであると判断した。

Northern blot hybridization によってＭＳＥｍＲＮＡのサイズを測定したところ約1500ヌクレオチドであり、ＮＳＥ2400、ＮＮＥ1800ヌクレオチドと比較してかなり短いものであった。これは3'側の非コード領域が81ヌクレオチドと他の２つのアイソザイムより短いためであった。

Key word：　Enolase isozyme 、cDNA cloning、　muscle

解糖系の酵素エノラーゼは 2量体酵素で 3種類のサブユニットα、β、γから成っている 5種類のアイソザイムが知られている。この酵素は組織特異性が高く、βは筋組織に、γは神経細胞に特異的に存在しており、各々muscle specific enolase （ＭＳＥ）及び　neuron specific enolase （ＮＳＥ）と呼ばれる。一方他の組織に広く分布するαは神経系においてはグリアに存在しておりnonneuronal enolase （ＮＮＥ）と呼ばれており、これらのアイソザイムは細胞マーカーと考えられている。またエノラーゼアイソザイムは、分化及び発達の過程で神経系組織においては、αからγへの転換が起こり、筋組織においても同様にαからβへの転換が起こる。ニューロンと筋細胞という高度に分化した細胞になるに従って起こるこの転換は、遺伝子レベルでの細胞分化のみならず、細胞特異的な遺伝子発現を研究する上で良いモデルになると思われる。我々は神経系における分化という問題に、これらアイソザイム遺伝子の構造と発現のメカニズムを比較検討することによって近づけるのではないかと考えている。その様な目的で我々はすでにＮＳＥ及びＮＮＥのｃＤＮＡクローニングを行い、その構造を明らかにした。(4)(5)　また、これらｃＤＮＡクローンをプローブに用いて、ＮＳＥ及びＮＮＥｍＲＮＡの各発達段階での発現量も測定している。今回、ＭＳＥｃＤＮＡをクローニングしたのでその構造と、他２つのアイソザイムとの比較を報告する。

［実験方法］

筋組織のポリＡＲＮＡは、ラット骨格筋を５倍量の５％ＳＤＳを含むbufferと等量のフェノールで、ブレンダーを用いてホモゲナイズし、フェノール・クロロホルムで

十分除蛋白をした後、2 M LiClでＲＮＡを沈澱させ、オリゴｄＴセルロースクロマトグラフィーで調製した。

ｃＤＮＡの合成は、筋組織ポリＡＲＮＡを鋳型にして、Amersham社のｃＤＮＡ合成システムを用いて行った。この方法は、ほぼGubler and Hoffmanの方法(1)に従っている。合成した2本鎖ｃＤＮＡにターミナルトランスフェラーゼでｄＣテールをつけpBR322の PstI 部位に挿入し、大腸菌ＤＨ１株を用いてライブラリーを作製した。ＭＳＥのクローンは、ＮＮＥｃＤＮＡクローン pERN11 のコーディング部分をプローブにしコロニーハイブリダイゼーションで選択した。

Northern blot hybridization は Maniatis 等の方法(2)に従い、各組織から抽出したＲＮＡを変性後、2.2 M のホルムアルデヒドを含む1.3 %のアガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜に移したものを用いた。

ＤＮＡのシークエンスは、Maxam and Gilbert の化学的配列決定法(3)に従った。

［結果及び考察］

ＮＳＥとＮＮＥのｃＤＮＡのうち蛋白質をコードする部分は高いホモロジーを持ちやや弱い条件でハイブリダイゼーションを行うと互いにハイブリダイズする。実際ＮＳＥのｃＤＮＡをプローブにしてＮＮＥのｃＤＮＡを選択することができた。(5)そこで、ＭＳＥとＮＮＥのホモロジーも高いと考えられるので、ラット筋組織を含むいくつかの組織のＲＮＡをＮＮＥのコード部分をプローブとして Northern blot hybridizationを行った。その結果、図１に示す様に骨格筋にはＮＮＥよりやや小さいサイズのバンドが存在していた。このバンドは、ＮＳＥの非コード部分をプローブにした時は存在しないので、ＭＳＥのｍＲＮＡと推定された。

そこで、ＮＮＥのコード部分をプローブにして筋組織のｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションの条件は、6 xＳＳＣ，0.5 %ＳＤＳ，1 xＦＢＰ，50μｇ／ｍｌ salmon sperm DNA，55℃で行った。その後、2 xＳＳＣ，55℃で洗いラジオオートグラフィーをとり陽性なクローンをいくつか選択した。このうち最も長いインサートを持っていたpM35をシークエンスした。その結果、このクローンにはポリＡシグナルとポリＡが存在しており、3'末端を含むものであった。リーディングフレームを検討した結果、ポリＡ付加位置から約 80 ヌクレオチド上流にあるストップコドンを含むフレームで読んだアミノ酸が、ＮＮＥ及びＮＳＥのアミノ酸と非常に高いホモロジーを持っていたことから、このクローンがＭＳＥのものと判断した。更に、上流のｃＤＮＡを含むクローンを選択するために、pM35のEcoRI 5'側をプローブとし、pM37とpM39を得た。これらのクローンのシークエンスにより、1413ヌクレオチドのｃＤＮＡを明らかにすることができた。Northern blot hybridizationにより算定されたＭＳＥのサイズは、約1500ヌクレオチドであることからポリＡ部分を考えると、5'側の非コード部分はそれほど長くなく、このｃＤＮＡは、ＭＳＥｍＲＮＡのほぼ全長にあたると思われる。このうちアミノ酸をコードする部分は1302ヌクレオチドで、コードするアミノ酸は開始メチオニンを除くと433 残基であり、これはＮＳＥ，ＮＮＥと全く一致していた。アミノ酸のホモロジーは、ＮＳＥと81% 、ＮＮＥと80% であった。さらに、最近 Russell等によって報告された chicken筋エノラーゼアミノ酸配列と比較するとホモロジーは83% であった。ＭＳＥの活性中心 Arg残基

とMg結合部位の His残基は、保存されていた。

ＭＳＥｍＲＮＡは、ＮＳＥ、ＮＮＥのものと比較するとかなり短い。これはＮＳＥが 848、ＮＮＥが 312、ヌクレオチド3'非コード領域があるのに対し、81ヌクレオチドしかないことによっている。神経系で発現している遺伝子のｍＲＮＡの3'側非コード領域は長いものが多いように思われるので、この3'側の非コード領域の長さの違いは、細胞特異的な遺伝子発現に意味を持っているかもしれない。

今後、ＭＳＥ遺伝子をクローニングし、ＮＳＥ及びＮＮＥの遺伝子との構造の違いと、in vitro 及び in vivo での転写効率等を検討していきたいと考えている。

［文　献］

1．Gubler and hoffman (1983)Gene 25,263　2．Maniatis,et al. Molecular cloning , Cold Spring Haber Laboratory　3．Maxam and Gilbert (1980)Methods in enzymol.65,499-560　4．Sakimura,et al. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 82,7453-7457　5．Sakimura,et al.(1985) Nucleic Acids Res.13,4365-4378

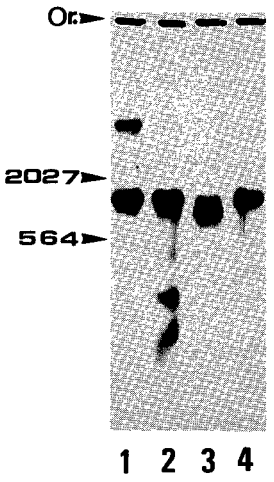


Fig. 1. Northern blot hybridization with the NNE cDNA. Lanes: 1, RNA from heart; 2, RNA from small intestin; 3, RNA from skeletal muscle; 4, RNA from kidney.

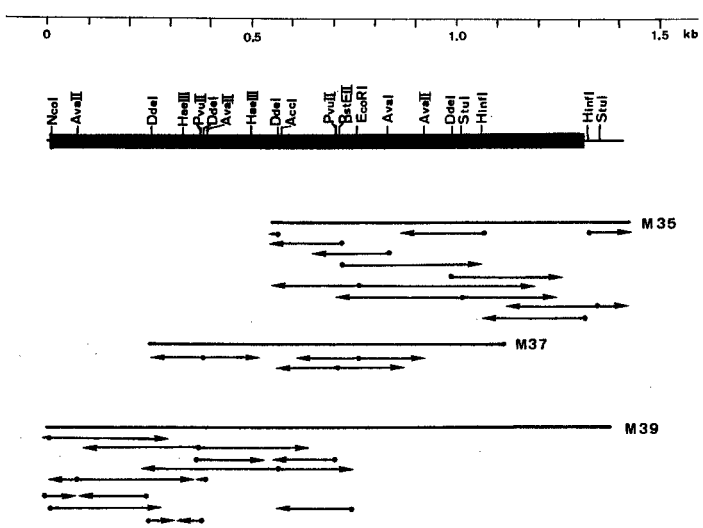


Fig. 2. Restriction endonuclease map of rat MSE cDNA and sequence strategy. The protein-encoding region is indicated by the filled box. The restriction endonuclease map shows only the relevant restriction extent of sequence determination. The arrows under each cDNA indicate the direction and extent of sequence determination for each fragment analyzed.

183. jimpy ミュータントマウスにおける PLP の発現障害機構の解析

森口　聡・岡野栄之・三浦正幸・池中一裕・塩田千代
御子柴克彦　（大阪大・蛋白研）

〔要　約〕 *jimpy* ミュータントマウスのミエリン形成障害機構を明らかにするため、ミエリン構成蛋白質、特に myelin proteolipid protein（PLP）を中心に生化学的解析を進め以下の結果を得た。

1) PLP の extracellular domain と考えられる領域の1つ（N末端から186番目より201番目）に対応するペプチドを抗原として家兎抗血清を得た。

2) 同抗血清を用いた免疫組織化学反応では、*jimpy* の脳で PLP の発現は認められなかった。

3) PLP 及び MBP の cDNA をプローブとして RNA Dot-blot を行ったところ、MBPは生後21日で対照の5％を示した。PLP は対照の約1％と低値ではあるがその mRNA の存在が確認された。しかもその mRNA の大きさは対照と差はなかった。MBP，PLP-mRNA 量は *jimpy* では低下しており、かつ発症につれて漸減した。

4) 近年 PLP 遺伝子が *jimpy* locus の内部、又は極めて近傍に存在することが報告されていることから、PLP の cDNA をプローブにして Southern blot を行ったが、*jimpy* と対照との間に有意な差はみられなかった。

以上の結果と従来の報告を考え合わせると *jimpy* での PLP の減少は PLP 遺伝子及び近傍に大きな欠失や挿入等はないが、PLP 遺伝子の転写障害に一因のあることが示唆された。

Key word：*jimpy*, myelin proteolipid protein（PLP），
myelin basic protein（MBP）

ミエリン形成は、ミエリン形成細胞の細胞体で合成されたミエリン構成成分が分子集合し、密なミエリン膜を形成する過程である。*jimpy* ミュータントマウスは伴性劣性遺伝様式を示し、ヒトの Pelizaeus-Merzbacher 病のモデル動物と考えられている(3)。また、中枢神経系のミエリン形成障害は著明であるにもかかわらず、末梢神経系では全く変化がない。そこで、中枢神経系ミエリンに特異的に発現し、X染色体上に存在する PLP (11)を中心に解析を進め以下の結果を得たので報告する。

〔材料及び方法〕

◎動物；*jimpy*（*jp*/Y）は当研究室に於て飼育・繁殖したものを使用した。対照には、*jimpy* littermate（X/Y）を用いた。

◎ PLP 抗体の作製；抗原としたペプチド（PLP 186–201）は、Beckman 990Eにより固相法で合成後、フッ化水素処理して得た。合成物は質量分析により同定した。これを、BSA または keyhole limpet hemocyanin（KLH）と conjugate して家兎に免疫した(9)。

◎免疫組織化学；4％パラホルムアルデヒド（pH7.2）にて灌流固定後摘出した神経組織を更に同液にて3時間後固定し6 μmのパラフィン切片を常法にて作製した。抗体として上記 PLP 抗体と MBP 抗体（BP−4）(8)を用いて ABC 法（ベクスタイン）で行った。

◎ Northern blot，Dot blot；Guanidinium/Cesium Chloride法で抽出した脳の全 RNA を Formaldehyde agarose ゲルで泳動し、ニトロセルロースフィルターにトランスファーした。又、種々の濃度の RNA をニトロセルロースフィルターにスポットした。プローブとしては、rat-PLP cDNA（p27，Dr. Sutcliffe より譲渡(7)）、mouse-MBP cDNA（pMBP2、木村博士より譲渡(4)）、chicken-β-actin cDNA(1)を用いた。以下常法に準じた。

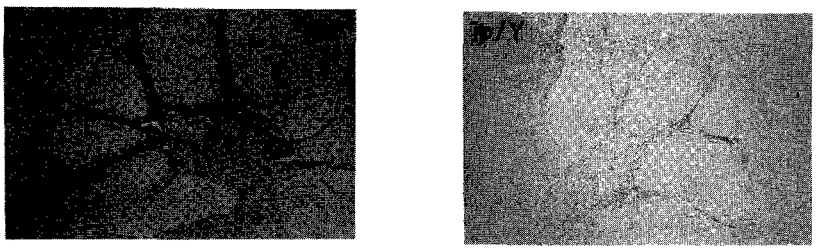
◎ Southern blot ; Blinらの方法で肝臓より抽出した染色体DNAを制限酵素で切断し、泳動後アルカリでナイロンフィルターにトランスファーした。以下常法に準じた。

〔結果及び考察〕

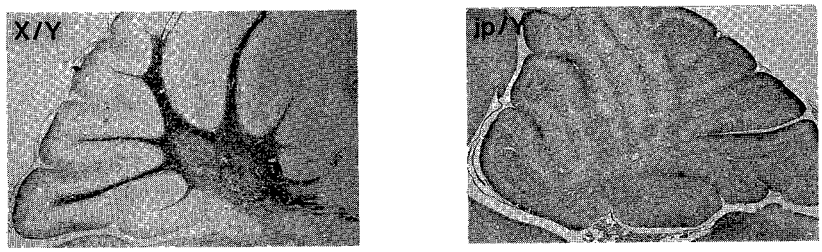
我々は以前本学会で、*jimpy*では中枢神経系のみで、ほとんどすべてのミエリン成分が著減していることを報告した(5，6)。そこで、中枢神経系のミエリンで特異的に発現しているPLPについて詳細に検討を進めるために必要なPLP抗体を、合成ペプチドを抗原として得た。合成ペプチドは、PLPアミノ酸シークエンス（7）上、かつHydrophobicity profileよりextracellular domainと考えられるアミノ末端から186アミノ酸より201アミノ酸までの16merを用いた。このPLP抗体及び、同様に合成ペプチドを抗原として得たMBP抗体（BP−4）を用いて免疫組織化学を行ったところ、対照では白質部分に強い染色がみられたが、*jimpy*においてはPLPの発現が認められなかった(Fig.1)。MBPはわずかではあるが陽性反応を示した。

次にRNAレベルで検討を加えた。β−actin，PLP及びMBPのcDNAをプローブとしてDot-blotを行ったところ、β−actinでは*jimpy*と対照とで差がなかったが、MBPとPLPは*jimpy*において低下しており発症とともに漸減し、MBPは生後21日で対照の5％、PLPは約1％と非常に少いが検出された(Fig.2)。Northern blotにおいては、いずれも対照と同じ大きさのバンドが、MBPでは1本（2.3 kb）、PLPでは2本（3.7，2.6 kb）検出された(Fig.3)。この様に、*jimpy*では、蛋白レベルでもRNAレベルでもMBPに比べてPLPに、より大きな変化が認められた。PLPのSouthern blotでは、EcoRI・HindⅢ・BamHI・PstIについては、cDNAのいろいろな領域をプローブにしても差を認められなかった（Fig.4）。

この様に、中枢神経系のミエリンにのみ障害が限られている*jimpy*においては、1)免疫組織化学的手法により、MBPは検出できるが、PLPは検出できない事、2) RNA Dot blotでPLPはより著明な低下を示す事、3)MBPの遺伝子は第18染色体上に局在するが、PLPはX染色体上に局在する事（2，11）、4)*jimpy*の末梢神経系でMBPは含量において正常と同程度検出できる事(5)より、MBPの遺伝子は正常であり、PLPの遺伝子に変異があるために、MBPは二次的に低下していることが予想される。そしてこのPLP遺伝子の転写障害を伴った変異は、*shiverer*におけるMBPの欠失という様な大きな変異ではなく、point mutation等の小さな変異であると思われる。今後さらに、PLP RNAの減少の機構に関して解析して行きたい。



a) the immunohistochemical reaction by the antiserum against MBP



b) the immunohistochemical reaction by the antiserum against PLP

Fig.1 Immunohistochemical localization of MBP and PLP in the cerebellum from the jimpy and control

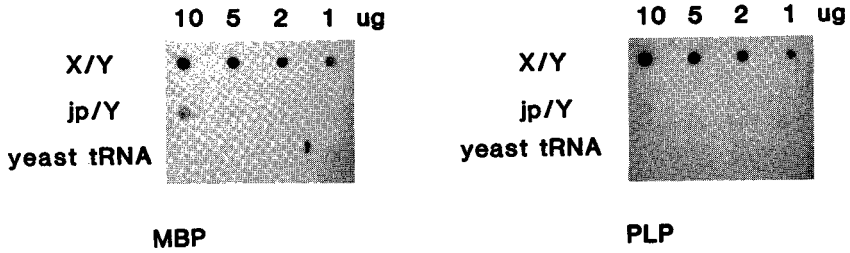
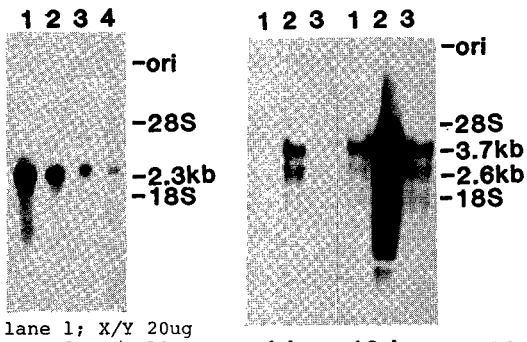


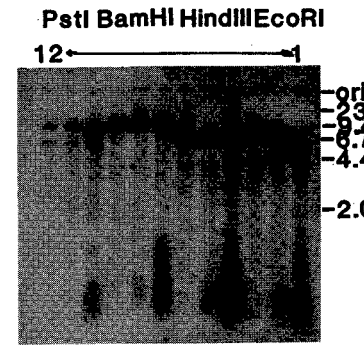
Fig.2 Dot hybridization analysis of MBP and PLP mRNA from mouse brains.



lane 1; X/Y 20ug
lane 2; X/Y 10ug
lane 3; jp/Y 20ug
lane 4; jp/Y 10ug
MBP

lane 1,3; jp/Y 20ug
lane 2; X/Y 20ug
PLP

Fig.3 Northern blot analysis of RNA from the brains of the jimpy and the control.



lane 1,4,7,10; X/Y 10ug
lane 2,3,5,6,8,9,11,12; jp/Y 10ug

Fig.4 Southern blot analysis of the jimpy DNA

[Reference]
(1) Cleveland, D.W. et al. (1980) Cell, 20: 95
(2) Dautigny, A. et al. (1986) Nature, 231: 867
(3) Hogan, E.L. & Greenfield, S. in Myelin (ed. Morell, P.) 489-499 (Plenum, New York, 1984)
(4) Kimura, M. et al. (1985) J. Neurochem., 44: 692
(5) Mikoshiba, K. et al. (1982) Bull. Jap. Neurochem. Soc., 21: 267
(6) Mikoshiba, K. et al. (1985) J. Neurochem., 44: 686
(7) Milner, R.J. et al. (1985) Cell, 42: 931
(8) Miura, M. et al. (1986) Bull. Jap. Neurochem. Soc., 25: in press
(9) Richardson, C.D. et al. (1985) J. Virol., 54: 186
(10) Stoffel, W. et al. (1985) Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 366: 627
(11) Willard, H.F. & Riordan, J.R. (1984) Science, 230: 940

184. シバラーミュータントマウスにおけるミエリン塩基性タンパク質遺伝子の第1エキソンの転写と翻訳

三浦正幸・池中一裕・岡野栄之・塩田千代・塚田裕三*
御子柴克彦　（大阪大・蛋白研・慶大・医・生理*）

〔要　約〕 *Shiverer* 突然変異マウスはミエリン形成不全を示し、ミエリン主要タンパク質の一つであるミエリン塩基性タンパク質（MBP）遺伝子が欠失変異をおこしていることが知られている。*Shiverer* は7つのエキソンのうち第1、第2エキソンは野生型の遺伝子を持っているにもかかわらず抗MBP抗体と反応する分子が検出されないことから遺伝子発現調節における3′側の役割をみる上で *Shiverer* でのMBP遺伝子発現の解析は重要であると考えられる。MBPのN末端から16コのアミノ酸を固相法により合成し、第1エキソン特異的抗体を得て翻訳機構の解析に用いた。またMBP cDNA のATGコドンの約10bp下流に oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis で Hind III site を導入し、この部位より上流領域の直鎖RNAをSP6 RNA ポリメラーゼを用い *in vitro* transcription により合成したものを、第1エキソンの転写活性を調べるためのRNAプローブとした。作製したRNAプローブを用いたNorthern blot解析の結果 *Shiverer* においてheterogeneousなサイズのRNAが検出され、その量は野生型の約50％に相当した。また抗体により翻訳産物をWestern blot，免疫組織化学的に検索を行なったが何れの方法によっても反応する分子は検出できなかった。以上の結果より *Shiverer* でMBP第1エキソンは転写されるがその翻訳はされないことが明らかとなった。

Key word：Shiverer, MBP expression, oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis, SP6 transcription, peptide antigen

〔はじめに〕

ミエリン形成不全を示す *Shiverer* 突然変異マウスは、オリゴデンドロサイト自身に障害があり、さらにミエリン形成に重要な役割を持ちオリゴンドロサイト特異的に発現するミエリン塩基性タンパク質（MBP）が欠損していることが知られている。[5][4] MBP遺伝子は7つのエキソンからなりalternative splicingにより4つのmRNAを産生することが明らかとなった。[8][1] *Shiverer* でのMBP欠損はその構造遺伝子の欠失によることがKimuraら[3]、あるいはRoachら[7]により報告されており、第1・第2エキソンと第2・第3エキソン間の一部を残して3′側はすべて欠損している（Fig.1）。MBP発現調節機構の解析はオリゴデンドロサイトの分化、ミエリン形成機構の解明に重要であることから、第1エキソン特異的なRNAプローブと、第1エキソンに対応するペプチドの抗体を作製し *Shiverer* でのMBP遺伝子の転写活性並びに翻訳過程につき解析を加えた（Fig.2）。

〔実験材料と方法〕

実験動物：*Shiverer*，BALB／c，ICRは当研究室にて飼育・繁殖したものを使用した。

抗体の作製：MBPのN末端から16アミノ酸残基を固相法により合成しフッ化水素処理により樹脂からの切り離しおよび脱保護を行った。得られたペプチドを質量分析により同定し、HPLCにより純度検定した。合成ペプチドをKLHあるいはBSAと水溶性カルボディイミドによりカップリングさせ家兎に免疫した。1回の免疫にはconjugate約5 mgを使用し、3週間後に3 mgのブースターをかけた。1週間後に抗体価をはかり抗体価の認められたものにつき抗体の精製を行なった。

抗体の精製：抗体の精製はRichardsonらの方法によった。[6]（一次精製）：血清をpro-

teinA Sepharose CL−4B(Pharmacia)に通しIgG画分を得た。(二次精製):抗体作製に用いたペプチドをAffiGel10(Bio-Rad)にカップリングさせペプチドアフィニティーカラムを作製した。このカラムにIgG画分を通し結合した抗体を0.1Mクエン酸緩衝液pH2.5, 1M NaClで溶出したのち、限外ろ過で濃縮し抗体標品とした。以下BSA conjugateを免疫して得た抗体をBP−3,KLH conjugateのものをBP−4とする。

Western blot及び免疫組織化学:*Shiverer*, BALB/cからのミエリン画分、および全脳からタンパク質を抽出し5−20%SDS-PAGEにかけたのち、デュラポアフィルターにトランスファーした。脳の切片は4%パラホルムアルデヒド固定のパラフィン切片を用いた。第1エキソン特異的な抗体(BP−4)を用い、ABC法で抗体と反応する抗原を検索した。

オリゴヌクレオチド合成:オリゴヌクレオチドはベックマン社のSystem-1自動合成機を用いて合成した。樹脂から合成品を切り離し脱保護した後、VlasukとInoueの方法に準じてPAGEで精製した[9]。精製品の純度はウォーターズ社のラジアルパックC−18カラムHPLCで検定した。

第1エキソン特異的プローブの作製:pSP64のBamH1 siteにMBP cDNA(pMBP−2)のPstI 1.8 kbフラグメントをSP6プロモーターに対し逆向きに組み込みpHOb'161を構築した。pMBP-2は東海大、木村博士より譲渡された。MBPのATGコドンの12bp下流にCTTを挿入した配列をもつオリゴヌクレオチド20merを合成しpHOb'161プラスミド上にCTT挿入突然変異を誘発した。この二重鎖プラスミドDNAを用いるsite-specific mutagenesisはInoueらの方法に準じた[2]。この結果作られたHindIII site(MBP ATGの約10bp下流)よりMBP cDNAの3'側を欠失させたプラスミドを用いSP6 RNAポリメラーゼによりMBP cDNA 5'側の逆鎖RNAを合成した。α-^{32}P UTPを用いてRNAを標識し比活性約1×10^{9} cpm/μgのプローブを得た。

RNA抽出:*Shiverer*およびICR脳からのRNA抽出はGuanidium-CsClにより行なった。

Northern blot:*Shiverer*およびICRマウスより抽出したtotal RNAをホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動により分画し、ニトロセルロースフィルターにトランスファーして上記RNAプローブとハイブリダイズさせた。Dot blotはtotal RNAをニトロセルロースフィルターにスポットし同様にハイブリダイゼーションを行なった。

〔結果と考察〕

シバラーMBP遺伝子の第1エキソンの転写:Dot blot法により*Shiverer*での第1エキソンを含むRNA量の定量を第1エキソン特異的プローブを用いて行なったところ、野生型に比べ約50%のtranscriptが検出された(Fig.3)。これまでDot blotでは*Shiverer*のMBP transcriptは検出されなかったが、前回の方法ではMBP cDNAの全長をプローブとしていたためstringencyの高い状態でハイブリダイゼーション及び洗いを行なっており、ハイブリダイズする領域の短い*Shiverer*のtranscriptが洗いながされてしまい検出できなかったものと考えられる。第1エキソン特異的なプローブを用いた本実験より、*Shiverer*でのMBP転写開始量は正常の5割に近いことが示され、MBP遺伝子の転写開始に関しては3'側の配列は不可欠ではないことが示唆された。Northern blotにより転写されているRNAのサイズを検討したが*Shiverer*では明瞭なバンドは観察されずスミアになっていた(Fig.3)。これは3'側がないため正常な転写終結ができないか、あるいは

転写終結はしても第2エキソンのacceptorがないため、スプライシングに支障をきたした結果としてheterogeneousなサイズのRNAができてしまうことなどによるものと考えられる。

シバラーMBP遺伝子の転写された第1エキソンの翻訳：現在までポリクローナルな抗体を用いた実験においてはWestern blot，あるいは免疫組織化学的に抗MBP抗体と反応する分子種を検出することができなかった。今回、*Shiverer*で第1エキソンを含むheterogeneousなRNAが転写されていることが明らかとなったのでこの分子種が翻訳されているのかを詳しくみるため、第1エキソン特異的な抗体を用いWestern blot，免疫組織化学を行なったが、反応する分子を検出するにはいたらなかった(Fig.4)。野生型マウス中枢神経系の白質とは強い反応を示した。すなわち上記の結果より*Shiverer*においては第1エキソンを含むRNAが正常の50%程度転写されているがこの分子種は翻訳されていないか、もしくは翻訳されても分解されてしまうことが考えられた。

(Reference)
(1) Ferra, F. et al. (1985) Cell, 43: 721
(2) Inouye, S. and Inouye, M. (in press.) DNA and RNA synthesis (ed. S. Narang). Academic Press.
(3) Kimura, M. et al. (1985) J. Neurochem., 44: 692
(4) Mikoshiba, K. et al. (1980) J. Neurochem., 35: 465
(5) Mikoshiba, K. et al. (1982) Nature, 299: 352
(6) Richardson, C.D. et al. (1985) J. Virol., 54: 186
(7) Roach, A. et al. (1985) Cell, 42: 149
(8) Takahashi, N. et al. (1985) Cell, 42: 139
(9) Vlasuk, G.P. and Inouye, S. (1983) Experimental Manipulation of Gene Expression (ed. M. Inouye). Academic Press.

Fig.1 Structure of MBP gene

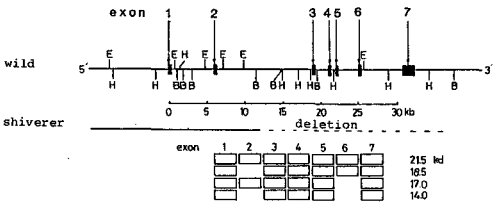


Fig.2 a) 1st exon specific RNA probe
b) Synthetic peptide

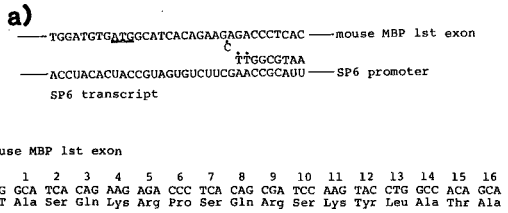


Fig.3 a) Dot blot hybridization
b) Northern blot hybridization

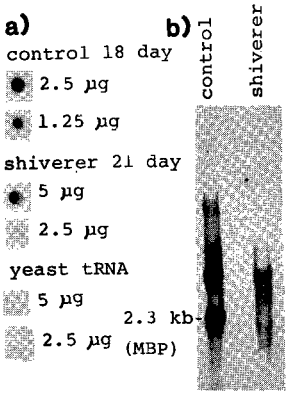
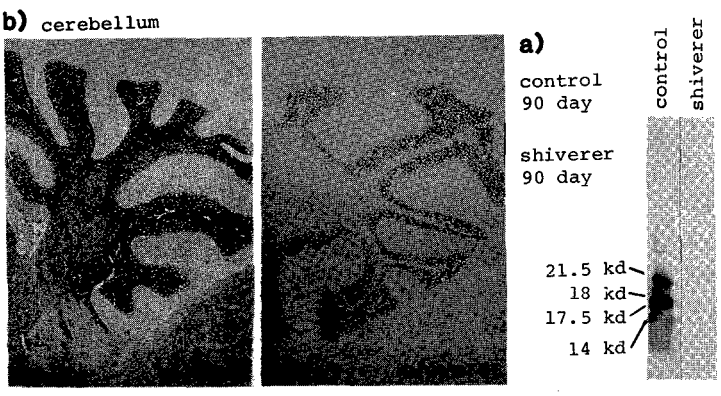


Fig.4 a) Western blot
b) Immunohistochemical analysis



185. 培養細胞へ導入したミエリン塩基性蛋白質遺伝子の発現

芋川　浩・三浦正幸・池中一裕・岡野栄之・御子柴克彦
（大阪大・蛋白研）

〔要　約〕

ミエリンは、神経細胞の軸索を取り囲む層状の密な膜構造であり、神経系の高次機能の形成に重要な役割を果している。ミエリンの形成・維持には、オリゴデンドロサイトに特異的に発現するミエリン塩基性蛋白質（MBP）が必須であると思われる。我々はMBPの細胞内における機能と局在を明らかにするため、NIH3T3，Ψ2の培養細胞系を用い、MBP遺伝子を導入し発現とそれに伴う形態変化につき検討を加えた。種々の細胞への遺伝子導入に際しては、レトロウイルスベクターpZIPneoSV(X)−1のBamHI siteに1.81 kbのMBP cDNAを挿入し（pKIb140）、リン酸カルシウム法によりΨ2細胞にpKIb140を取り込ませた。得られたG418耐性クローンのいくつかは細胞が紡錘状となり、細長い細胞突起を伸ばした上、重層するというMBP遺伝子導入前のNIH3T3細胞やΨ2細胞には見られない形態変化を示した。クローンのうちいくつかはNorthern blot及びWestern blotによる解析で、導入したMBP遺伝子が転写され翻訳されていることが確認された。

Key word：　myelin basic protein, Ψ2 cells, pZIPneoSV(X)−1

〔はじめに〕

哺乳類中枢神経系におけるミエリン形成には、オリゴデンドロサイトに特異的に発現するミエリン塩基性蛋白質（MBP）が重要な働きをしていると考えられている。しかしながらオリゴデンドロサイトのMBP発現とミエリン形成の関係は依然不明な点が多い。我々は種々の細胞へMBP遺伝子（MBP cDNA）を導入し、MBPを発現させ細胞内での分子集合過程、更にはどのような局在を示すかを明らかにし、MBPの細胞内における機能を解析しつつある。MBPを発現させるためプロモーターとしてLTRを、優性選択マーカーとしてNeoを持ち1.81 kb マウスMBP cDNA（14kMBPに対応）[3)4)]を組み込んだレトロウイルスpZIPneoSV(X)−1[1)7)9)]を用いた。このベクターをΨ2細胞[8)]（NIH3T3細胞由来）に導入し、MBPを発現させることに成功し、それに伴う形態変化について若干の知見を得たので報告する。

〔材料及び方法〕

(1)培養：培養細胞株はNIH3T3 細胞及びΨ2細胞[8)]（NIH3T3細胞由来でウイルス増殖に必要な蛋白質gag,pol,envは産生するが、ウイルスのパッケージングシグナルを欠いているため、感染性ウイルスを産生しない）を用い、Dulbecco's MEMで培養した。

(2)ベクターDNA：マウスMBP cDNA（pMBP−2）[3)4)]のPst I fragment 1.81 kbの両端をBamHI siteに変換し、レトロウイルスベクターpZIPneoSV(X)−1(Fig.1)[1)7)9)]のBamHI siteに導入して、pKIb140を構築した。

(3)cDNA導入法：ベクターDNAはリン酸カルシウム法により細胞へ導入した。

(4)免疫組織化学：培養細胞を10%ホルマリンで30分間固定後、マウスMBP第1エクソンに対応するアミノ酸配列（N末端から16番目まで）に特異的な抗体（BP−4抗体）を使用し、ABC法により抗原の検出を行なった。

(5) RNA及び蛋白質の抽出：細胞のRNA及び蛋白質の抽出はすべて10cmディッシュにconfluentになったものを使用した。RNA抽出はグアニジウムイソチオシアネート－塩化セシウム法[2]により行なった。蛋白質抽出は細胞をLaemmliのSDS－sample buffer[5]中で100℃5分間処理し、可溶化することによって行なった。

(6) Northern blot：RNAの電気泳動はLehrach[6]の方法に従った。電気泳動後ニトロセルロースフィルターにトランスファーし、pMBP－2[3)4)] PstI-StuI 0.34 kb断片をニックトランスレーションして得られたプローブを用い、ハイブリダイゼーションを行なった。

(7) Western blot：上述の方法で得られた蛋白質を12.5%SDS－PAGE[6]で分離し、デュラポアフィルターにトランスファーした後、BP－4抗体を用い、ABC法で検出した。

〔結果及び考察〕

(1) リン酸カルシウム法による培養細胞への外来遺伝子の導入に伴う形態変化：リン酸カルシウム法でpKIb140を3×10^5個のΨ2細胞に導入したところ、約50～100個のG418耐性コロニーが得られた（$1.7\sim3.3\times10^{-4}$の効率）。得られた72クローン中24クローンにおいては、transfection前のΨ2細胞と比較して細胞が紡錘状となり、細長い細胞突起を伸ばし、更に重層する所見もみられた(Fig.2)。このクローンのうちいくつかは継代を重ねるうちに元の形態に戻るものもあった。

(2) Ψ2細胞での導入遺伝子の発現

a) Northern blotによる解析：1.81 kbのMBP cDNAを挿入されたpKIb140が導入され、Neo遺伝子の発現によりG418耐性となったΨ2細胞を集めてRNAを抽出した。我々はRNAをNorthern transferし、pMBP－2 PstI–StuI site 0.34 kbをプローブとして、MBP cDNAの転写を調べたところ、8クローン中5クローンにおいてMBP cDNAが導入されたpKIb140より転写されたRNA（以下、組換えレトロウイルスRNA）の発現が認められ、残り3クローンについてはその発現が全く認められなかった(Fig.3)。組換えレトロウイルスRNAが発現した5クローンすべてにおいて、そのRNAのサイズは6 kbであり、この大きさはMBP cDNAを組み込んだレトロウイルス全長と一致した。今回Ψ2細胞に導入した遺伝子はMBP cDNAにLTRをつないだものであることから、組換えレトロウイルスRNAを発現したクローンは、MBP cDNAを挿入したpKIb140のLTR間すべてを転写したことを示していると考えられた。組換えレトロウイルスRNAを発現していない3クローンについては挿入されたMBP cDNA部分がスプライスアウトされること(Fig.1)や細胞内での導入遺伝子のrearrangementが起きている可能性などが考えられた。pKIb140の導入されたΨ2細胞での組換えレトロウイルスRNAの発現量は野生型マウス全脳からの2.3 kb MBP mRNAの発現量と比較してかなり低いものであった。MBP cDNAにウイルスのプロモーターがつないであるにもかかわらず、正常脳組織におけるMBP mRNA発現より低値であったことは、MBP遺伝子の転写制御がプロモーターから転写開始以降の段階にもある可能性、除去したイントロンの中に転写活性を高める因子が存在していた可能性あるいはpKIb140から転写された組換えレトロウイルスRNAが不安定であった可能性などが考えられた。

b) Western blotによる解析：我々が遺伝子導入に用いたMBP cDNA[3)4)]は翻訳開始コドンの上流域を8 bpしか含んでいない。そこでこのMBP cDNAから合成されたRNAが翻訳可能であるか否かを検討するために、SP6 RNAポリメラーゼにより*in vitro*系でMBP cDNAに対応するRNAを合成し、Wheat germ系により*in vitro* translationを行なって得た蛋白質を　抗ニワトリMBP抗体（BP－2抗体）を用い免疫沈殿させた。Fig.4のごとく、MBPが産生されることが確認されたことから、導入されたMBP cDNAからの転写産物は翻訳可能であることが示された。BP－4抗体を用いて遺伝子導入により合成されたMBPの局在を明らかにするため、組換えレトロウイルスRNAを発現しているクローンについてABC法で細胞を染色したが、充分に強い反応は検出できなかった。しかし組換えレトロウイルスRNAを発現しているクローンをSDSにより可溶化し、SDS－PAGEにより分画後Western blotしたところ、14k MBPの位置にMBPの発現が認められた(Fig.5)。

以上の結果より、レトロウイルスベクターpKIb140は、Ψ2細胞では転写及び翻訳を行ない、MBPを発現しうることが明らかとなった。Ψ2細胞にpZIPneoSV(X)−1誘導体を導入することによりレトロウイルス粒子が培地中に放出されることが知られている。pKIb140を導入したΨ2細胞の培地を他の培養細胞（NIH3T3細胞、C6グリオーマ）に添加したところ、高い頻度でG418耐性クローン（形態変化するもの有り）を得ることができた。現在、これらの細胞についてもMBP遺伝子の発現を検討中である。このように神経組織に特異的に発現している蛋白質を培養細胞で発現できる系が確立されたので、それぞれの蛋白質の細胞内局在や機能について有用な知見が得られるものと期待される。しかしながらまだ発現量が*in vitro*の状態のオリゴデントロサイトと比べて少ないため、他のプロモーターを用いるか、あるいは挿入すべきMBP cDNA断片の大きさを変えるなどして細胞内でのMBPの発現量を上げるよう検討中である。

〔謝　辞〕

R. Mann博士の承諾の上、Ψ2細胞を供与してくださった野田亮博士、pZIPneoSV(X)−1を供与してくださったR. C. Mulligan博士、pMBP−2を供与してくださった木村穣博士に心より感謝いたします。

[Reference]
(1) Cepko, C.L. et al. (1984) Cell 37, 1053-1062
(2) Glisin, V. et al. (1974) Biochemistry 13, 2633-2637
(3) Kimura, M. et al. (1985) J. Neurochem. 44, 692-695
(4) Kimura, M. et al. in the nineth Taniguchi Symposium on Brain Science. University of Tokyo Press. in press.
(5) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685
(6) Lehrach, H. et al. (1977) Biochemistry 16, 4743-4751
(7) 小川鈞一郎 (1985) 蛋白質・核酸・酵素 9月号, 1097-1114
(8) Mann, R. et al. (1983) Cell 33, 153-159
(9) Shimotohno, K. and Temin, H.M. (1982) Nature 299, 265-268

Fig.1 Construction of pKIb140.

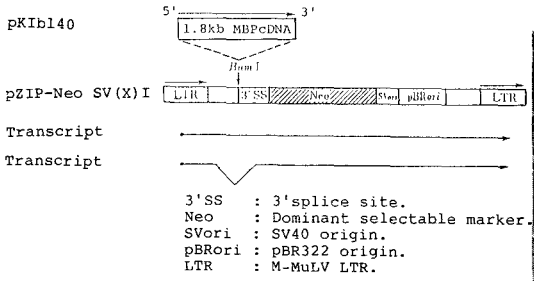


Fig.2 Morphological changes of ψ2 cells transfomed with pKIb140. (a) Untransfomed. (b) ψ2/pZIP-Neo SV(X)1. (c) ψ2/pKIb140.

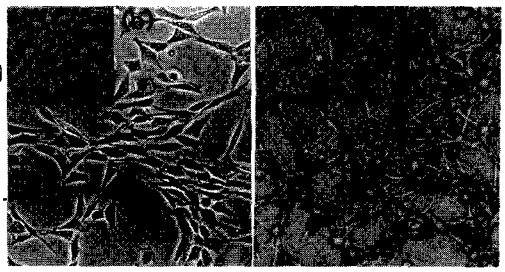


Fig.3 Northern blot analysis of ψ2 cells transformed with pKIb140. lane 1: 18 days old mouse brain, long exposure. lane 2: 18 days old mouse brain, short exposure. lane 3-10: ψ2/pKIb140. lane 11: ψ2/pZIP-Neo SV(X)1.

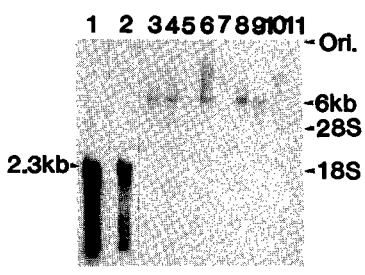


Fig.4 In vitro SP6-transcription and in vitro translation of MBPcDNA. lane 1: RNA (+). lane 2: RNA (-). lane 3: RNA (+), immunoprecipitation. lane 4: RNA (-), immunoprecipitation.

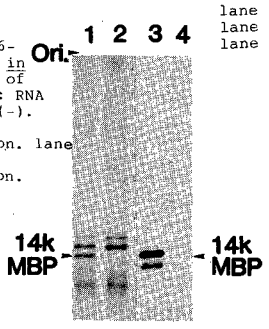
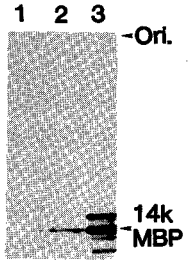


Fig.5 Western blot analysis of ψ2 cells transformed with pKIb140.
lane 1: ψ2/pZIP-Neo SV(X)1.
lane 2: ψ2/pKIb140.
lane 3: purified MBP.



186. ニューロフィラメントの軸索内輸送機構—燐酸化による解析—

小宮義璋・田代朋子　　(東京大・医・脳研・生化)

〔要　約〕

軸索内のニューロフィラメントはTriton可溶性分画に相当するmoving phaseのみが速い軸索内輸送と同じ機構により輸送されている。Moving phaseと不溶性分画に相当するstationary phaseとの間には相互変換があり，その変換はサブユニットの燐酸化によって調節されているという仮説を提案する。

1.^{32}P-オルト燐酸をラットの第4腰髄後根神経節に注入し，燐酸化された蛋白の軸索内輸送を調べた。遅い軸索内輸送で運ばれる主な蛋白はニューロフィラメントの200K及び160Kサブユニットで，^{32}Pでラベルした場合には通常の輸送速度よりかなり速い速度で移動する部分が認められる。この部分の輸送速度には中枢枝と末梢枝との間で差は見られない。

2.軸索内のニューロフィラメントにはTriton不溶性と可溶性の二種類のpopulationが区別される。後者は^{32}Pでラベルした時に多く検出され，前者とは異なるサブユニット構成を持つと推定される。

3.坐骨神経の神経鞘内に^{32}P-オルト燐酸を注入すると，ニューロフィラメントの200Kと160Kサブユニットが燐酸化され，時間の経過と共に遠位側にのみ輸送される。

Key word： Axonal Transport, Neurofilament, Phosphorylation.

燐酸化された蛋白の軸索内輸送としては既にTakenakaら(6)によりMAPSの輸送が報告されている。しかし軸索内のニューロフィラメント(NF)蛋白は，特に200Kサブユニット(NFH)は高度に，160Kサブユニット(NFM)は中等度に，燐酸化されている事が知られている(2,5)。一般にNF蛋白は細胞体で合成された後燐酸化されてから軸索内へと送り出されると考えられる(1)。そこで^{32}P-オルト燐酸(^{32}Pi)で標識して遅い軸索内輸送を調べてみたところ，NFH及びNFMの一部がNFの通常の速度より遥かに早く輸送されているのを見出した。また神経鞘内に^{32}Piを注入するとその部位でNFH及びNFMが燐酸化されて順行性にのみ輸送される。これらの結果について報告すると共に遅い軸索内輸送の輸送機構についても検討を加えてみたい。

〈材料と方法〉

1.<u>^{32}Pによる軸索内蛋白の標識とその輸送</u>：　ウィスター系ラット(7週齢雄)の第4腰髄(L_4)神経節をエーテル麻酔下に露出し，^{32}Piを50μCi(0.2μl×2)注入した。その1.5時間～3週間後にL_4神経節，L_4後根及び坐骨神経を取り出し，3mmの連続切片に切断した。各小片をSDS電気泳動，二次元電気泳動及びオートラジオグラフィーにより分析した。

2.<u>^{32}Pによる軸索内蛋白のin situにおける標識</u>：　エーテル麻酔下に坐骨神経を大腿中央部で露出し，神経鞘内に^{32}Piを50μCi(20μl×2)注入した。その3時間～1週間後にL_4神経節及び坐骨神経を取り出し，3mmの連続切片に切断した後軸索内輸送と同様に分析した。

＜結果＞

1．燐酸化されたNF蛋白の軸索内輸送：^{32}PiでL_4神経節を標識した1週間後のフローパターンを図1Bに示す。主な標識蛋白は分子量200Kと160Kの蛋白で，ほかに数本の弱い標識バンドが認められる。分子量200Kと160Kの主要標識蛋白と弱く標識される分子量68Kの蛋白は，^{35}S-メチオニン(Met)で標識したNF蛋白と共にSDS電気泳動（図3）及び二次元電気泳動した結果（図省略）からNF蛋白と同定した。^{32}Pで標識したNF蛋白はNFHが最も強くラベルされる（図1）。またMetで標識した時に比べて，僅かに速く輸送される部分が認められ（図1B），この部分は標識1日後に既に軸索内に積み出されている（図1A）。この速く輸送される部分は通常の速度で輸送されるNF蛋白とは異なり中枢枝と末梢枝との間に速度の差が見られない（図1A）。

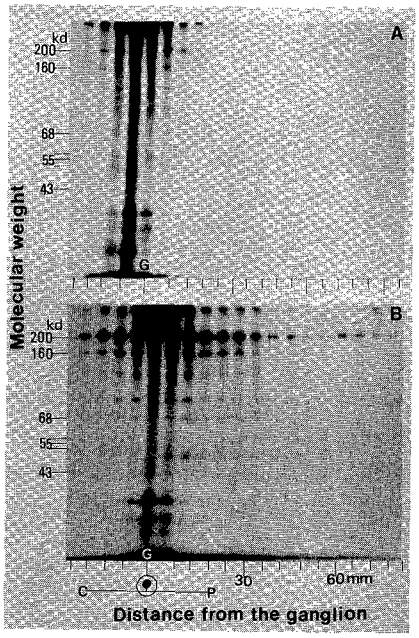


図1．^{32}P-標識蛋白の軸索内輸送
A：標識1日後．B：標識1週間後

^{32}Piで標識1週間後に軸索を凍結破砕し，Triton X-100処理により可溶性及び不溶性分画に分けると，可溶性分画は不溶性分画とほぼ同じ位回収されるが，^{35}S-Metで標識した場合には可溶性分画は殆ど認められない程少量である。また^{32}P標識NF蛋白のサブユニット比を見ると可溶性分画ではNFHが最も多くNFLは極く僅かであるのに対して，不溶性分画ではNFLが最も多い。

2．軸索内におけるNF蛋白の燐酸化とその輸送：坐骨神経の神経鞘内に^{32}Piを注入した2日後には注入部位より遠位側にNFH及びNFMと思われるバンドが現われ，時間と共に遠位側に移動する（図2）。このバンドは^{35}S-Metで標識したNF蛋白とSDSゲル電気泳動で同一の行動を示す事からNFH及びNFMと考えられる（図3）。またこのバンドは切りだした坐骨神経をin

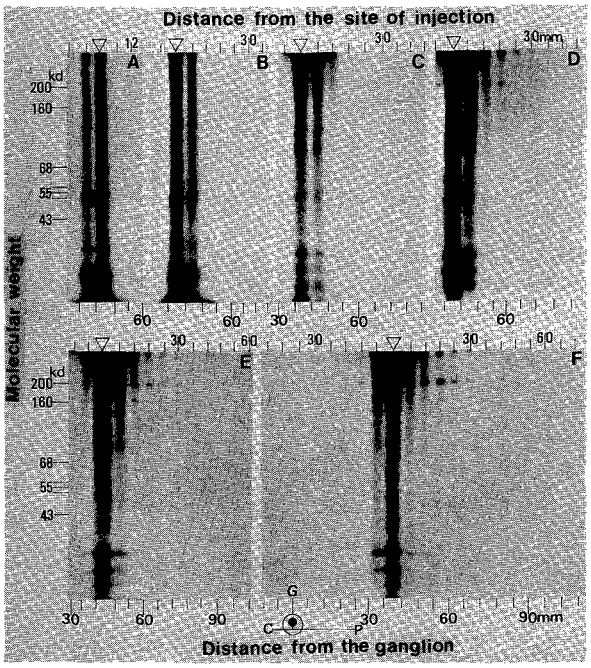


図2．軸索内NF蛋白の燐酸化と輸送．▽：注入部位
A：3時間，B：6時間，C：1日，D：2日，E：4日，F：1週間後

vitro で^{32}Piと3時間incubateしても見出されない(図4)。

<検討>

軸索内のNFはTriton処理により可溶化される部分と可溶化されない部分の二つのpopulationに分けられる。前者はゲルの染色像の上では殆ど検出出来ない程少量であるが，^{32}Pで標識した場合には後者に匹敵する量が回収される。これら二つの部分を比較して見ると幾つかの重要な違いが見出される。先ず^{32}P標識Triton可溶性分画，同不溶性分画及び^{35}S-Metで標識したNF蛋白の輸送速度はそのピークの位置から判断してこの順に遅いと考えられる。また燐酸化される部位の数を考慮に入れても可溶性分画はNFHを不溶性分画より多く含むサブユニット構成を持っている。そして^{32}Pで標識した時のみ^{35}Sで標識した時には検出し得ない特に速く輸送される部分が見られる事(図1)から，Triton可溶性分画が実際に輸送されているmoving phaseに，不溶性分画がNF構造に組み込まれたstationary phaseに相当すると推定される。^{35}Sでラベルした NF蛋白も遅い速度ながら徐々に遠位側に輸送される事から，一度stationary phaseに組み込まれてもまたmoving phaseに戻って移動する事が可能と思われる。神経鞘内に^{32}Piを注入するとNF蛋白が燐酸化され，輸送される事(図2)から，軸索内を輸送されているNF蛋白は実際に燐酸化及び脱燐酸を繰り返していて，これにより両phaseの間の相互変換が調節されていると思われる。Moving phaseの輸送機構は速い軸索内輸送のそれと同じく，微小管をベースとした機構(4)を利用していると考えればよく，^{32}P標識NFの遅い速度で輸送される部分の中枢枝と末梢枝における輸送速度が等しい事(図1A)もこの考えを支持する。Moving phaseの輸送速度は速い輸送の速度と同じと考えてよく，これ迄観察されていた遅い輸送の速度はmovingとstationaryの両phaseに留まる時間比，或は両方の量比で決定される平均値に相当する。同様の考えはチューブリンやアクチンの輸送にも当てはめられる。Stationary phaseが重合した繊維状構造をとっていると想定するのは容易であるが，それではmoving phaseは一体どんな形に相当するのであろうか。In vitroのvimentinで見出されているようなoligomer(3)に似た形は一つの候補ではあろうが，その実態は今後の研究に待たねばならない。

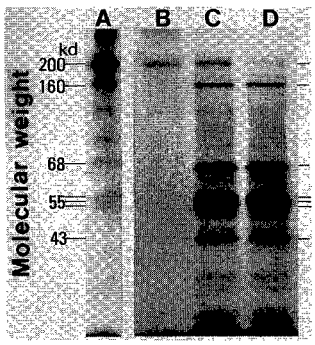


図3.NF蛋白の同定
A:^{32}P-軸索内輸送蛋白
B:^{32}P-軸索内標識蛋白
C: B + D
D:^{35}S-軸索内輸送蛋白

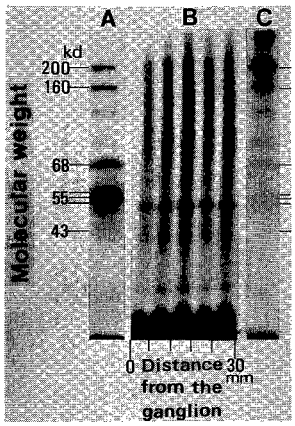


図4.in vitroの燐酸化
A:^{35}S-,C:^{32}P-軸索輸送蛋白，B:in vitro燐酸化蛋白

<参考文献>

1.Bennett,GS,& DiLullo,C.(1985):*J.Cell Biol.*100:1799. 2.Julien, JP.& Mushynski,WE.(1982):*J.Biol.Chem.*257:10467. 3.Potschka,M.(1986):*Biophys.J.*49:129. 4.Schnapp,BJ.,Vale,RD.et al.(1985): *Cell*,40:455. 5.Sternberger,LA.& Sternberger,NH.(1983):*Proc. Natl.Acad.Sci.USA.*80:6126. 6.Takenaka,T.& Inomata,K.(1981):*J. Neurobiol.*12:479.

187. myelin deficient (mld) マウスにおける ミエリン塩基性蛋白質の発現調節機構と遺伝子重複について

岡野栄之・三浦正幸・池中一裕・塚田裕三*・御子柴克彦
(大阪大・蛋白研, 慶大・医・生理*)

〔要　約〕

myelin deficient (以下mld)は、ミエリン塩基性蛋白質(Myelin Basic Protein: MBP)の著しい減少を特徴とするミュータントマウスである。我々は、本大会においてNorthern blot解析により、mldのMBP著減が転写障害に基いていることを既に報告したが(14)、さらに解析を進め以下のことを明らかにした。

1.mldにおけるMBP遺伝子の転写産物は、翻訳可能な分子であり、抗原性を共有する4種のMBPの分子比は、正常と大きな差はない。

2.mldでは、MBP-mRNA量が、生後32日あたりまで、漸増傾向を示し、それ以降は、ほぼ一定であった（正常ではそれ以降減少する）。これは、mldの発育後期にみられるMBPの蛋白量の回復傾向に対応するものと考えられた。

3.正常のMBP遺伝子は、single gene(3,16)と考えられているが、mldではこれが、重複していた。その制限酵素地図(BamHI, BglII, EcoRI, PstI, PvuII)において、構造遺伝子領域及び3'下流約8kb迄は、正常と同じであった。5'上流領域については、重複した遺伝子の双方とも上流約1.4kb(HindIII site)迄は、正常と、同じマップであったが、それより上流域のマップについては、片方の遺伝子では正常と同じであり、他方では異なっていた。

Key word : myelin deficient (mld), Myelin Basic Protein (MBP), gene duplication

ミエリン塩基性蛋白質(Myelin Basic Protein: MBP)は、Proteolipid protein(PLP)と並ぶ中枢ミエリンの主要構成成分である。MBPの著減を特徴とする突然変異マウスには、null typeのshiverer(9)と、部分発現の認められるmyelin deficient (mld) (6,7)があり、たがいにalleleであることが知られている(1,2)。

以前、我々は本学会にて(10)、mldの成熟体（生後約９０日）では、免疫組織化学的に髄鞘に局在するMBPの部分発現がモザイク状にみられること、オリゴデンドロサイトの内膜同士の融合したmajor dense lineが、shivererでは全く観察されない(9)のに対して、mldでは部分的に観察されることを報告している(10,11)。これらのことは、自己凝集しやすい性質を持つMBPの発現量の低下と対応した変化として考えられている。また、生後１８日のmld脳内において、MBPmRNAは正常の約３％に減少し、正常と同じ大きさ(約2.3kb)であったことより、mldでみられたMBPの減少は、転写障害に基くであろうと推論された(14,15)。そこで、我々は、mldにおけるMBPの発現とミエリン形成を関連付けるために、生後発育過程を追って、MBP mRNAの発現量の変化を解析した。又、転写障害の機構解明の第一歩として、MBP cDNAのさまざまな部分をprobeとしてSouthern blot解析をおこない、若干の知見を得たので報告する。

［実験材料及び方法］1) 動物； 突然変異マウスのshiverer(shi/shi), mld(mld/mld)及び対照としてのBALB/c(+/+)は、当研究室にて繁殖したものを用いた。但し、５日齢のmld(mld/mld)は、勝木博士が人工授精法により得たものの提供を受けた。2) Plasmids; マウスMBP cDNAクローン(pMBP-2)は、Kimuraら(3)により単離されたものを用いた。ラットPLP cDNAクローン(p20, p27)は、Sutcliffe博士(12)により供与されたものである。 3) in vitro translation及び免疫沈澱； 生後１８日の正常及びmldマウスのpoly(A)+ RNAによるin vitro translationは、^{35}S-メチオニンを用い、wheat germの系(5)で行った。産物と抗ニワトリMBP血清を反応させ、Pansorbinを用いて沈降させ、SDSにて可溶化し、SDS-PAGEによる解析を行った。対照として非免疫血清を用いた（図－１）。4) Western blot解析；マウスM

BP遺伝子の第１エキソン中の一部のアミノ酸配列（N末端から、16アミノ酸残基）に対する血清を用いて、図－２中に示した動物について常法に従い行った。5)MBP及びPLP mRNA量の発育過程における変化；生後5，12，18，32，40，75日齢の対照及びmldマウス脳の全RNAについて、マウスMBPおよびラットPLP cDNAをprobeとして、dot hybridizationを行った。それぞれのspotを切り出し、放射活性を測定し、32日後の正常マウスの値を1.0として、各時期のMBPまたは、PLPのmRNAの量を求めplotした（図－3A）。　5) Probe及びSouthern blot解析；　pMBP-2 (3)は、ほぼ全長に相当するマウスMBP cDNA 1.9 kbをPstI siteに挿入している。1.2 kbのPstI断片(probe-1)、 0.6 kbのPstI断片(probe-2)、0.34 kbのPstI-StuI断片(probe-3)（図－3B）を、^{32}P-α-dCTP(3000Ci/mmol)を用いて、ニックトランスレーション法によりラベル化し、1 x 10^8 - 2 x 10^8cpm/ ugのprobe DNAが得られた。これらをprobeとしてmldと正常のDNAについてSouthern blot解析を行った。probe-1,2を用いて、HindIII，PvuIIにより消化されたDNA（図－４A）、probe-2を用いてEcoRI+HindIII，BglII，EcoRI+BamHIにより消化されたDNA（図－ 4B）、probe-3をもちいてBamHI（図－ 4C），EcoRIにより消化されたDNAとhybridizationを行った。

［結果及び考察］

in vitro translation（図－１）の結果、MBPの分子量に相当する免疫沈降物が、対照ばかりでなく、mldにおいても観察された。しかし、その量はmldにおいて、著しく減少していた。このことは、mldにおけるMBPmRNAが、翻訳可能な分子であり、mldにおけるMBPのde novo合成障害が、translatable MBPmRNAの減少によることを示している。従ってNorthern blotの結果(14,15)と併せて考えると、MBP遺伝子の転写障害が、mldにおけるprimary な変化と思われた。Western blot解析にて、mldにおけるMBP量が、生後９０日では、正常の１／４程度に迄回復していることがあきらかとなった。これは、従来のMatthieuらの報告(8)と一致するものである。マウスMBPには、抗原性を共有する４つの分子がある。分子量が、18.5Kと14Kのものが、majorであり、21.5Kと17Kのものが、minorである。これら４種のMBPは、alternative splicingにより、１つのMBP遺伝子から生成される４種のmRNAより翻訳されてくると考えられている(4，16，17)。mldでは、生後１８、９０日のいずれにおいても、この分子比は、正常のものと大きな差はなく、mldにおけるMBPの蓄減が、異常なsplicing patternによる訳ではないと考えられた。正常のMBPmRNA量は、もう１つの中枢ミエリン主要蛋白のPLPのmRNA量とほぼ協調的にミエリン形成期に増加し、生後３２日目にピークに達し、以降漸減した（図－3B)。mldでは、一方生後３２日目に迄漸増し、それ以降は、減少する事なく、ほぼ一定値を示した。これは、Matthieuらにより報告されているmldのMBP量の加齢に伴う漸増傾向(8)に対応していると思われた。又、mldにおけるPLPのmRNA量は、発育過程を通して、正常より僅かに減少している程度（対照の60-80%）であった。これは、mldにおけるMBP mRNA量の減少が、オリゴデンドロサイトの変性、脱落によるものではないことを示唆する。以上のことは、mldのMBP遺伝子が、発育過程を通して異常な転写調節を受けている事を示しているが、そのDNA上での責任領域を見いだすための第一歩として、MBP cDNAをprobeとしたSouthern blot解析を行った。図－3Bのprobe-1及びprobe-2によるPvuII，HindIIIで消化したDNAのSouthern blot解析の結果、生じたbandの大きさは、mldでは、対照のものと等しかった(HindIII: 6.0，3.2，3.1 kb，PvuII: 3.3，0.85，0.80 kb)（図－ 4A）。また、probe-2を用いて、EcoRI+HindIII，EcoRI+BamHI，BglIIによる消化産物について、解析した場合も、mldと対照は、等しい大きさのbandを生じた(E+H: 5.4 kb，E+B: 13.5 kb，BglII: 12.5 kb)（図－ 4B）。しかしながら、何れの場合でも、bandの強度は、mldで対照の約２倍となっていた。probe-1の5'端は、マウスMBP遺伝子の第１エキソン内にあり、probe-2全体は、第７エキソン（最も3'側のエキソン）内に位置することが、従来の報告より明らかなため、mldでは、MBP遺伝子全領域を含む範囲で、重複している事が示唆された。また、cDNAクローンの5'側のprobe-3を用いると、BamHI（図－ 4C），EcoRI消

化により、正常で見られるもの(BamHI：4.1 kb, 11.0 kb. EcoRI:7.6 kb, 17 kb)以外に新たなbandが出現した(BamHI:9.0 kb, EcoRI:25.0 kb)。更に、double digestionを行った実験結果からも、mldにおいて重複した遺伝子の片方は、5'上流少なくとも1.4 kb (HindIII siteより上流) 以上、約25.0kb以下 (新しいEcoRI site) の範囲で正常MBP遺伝子と異なる配列を有することが示された。以上のことをまとめてマップをしめすと、図ー5 のようになる。今後、mldにおけるMBP遺伝子の転写制御の異常と遺伝子重複の関係を明らかにして行きたい。

[謝辞] 貴重な御助言を頂いた東大・医 ・生化学の高橋博士、東海大・医・細胞生物学の勝木、木村、両博士に深謝致します。

Fig-1 1 2 3

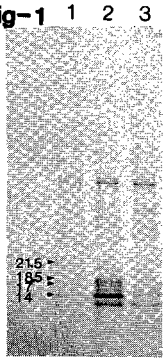


Fig-2

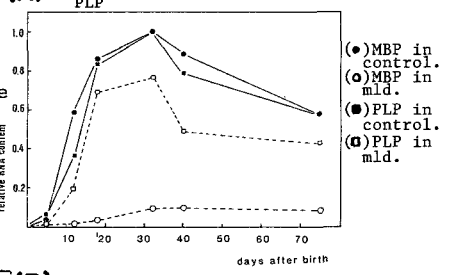


◄ Fig.1 Fluorograms of immunoprecipitated MBPs synthesized in vitro using poly(A)+ RNA from control(lanel:non-immune serum, lane2: anti-MBP serum) and mld(lane3: anti-MBP serum)mice brains.

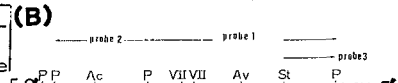
Fig.2 Western blot analysis of total brain homogenates with anti-MBP serum (BP-4) (13) from 90-day-old control (lanel), 19-day-old mld (lane2) and 75-day-old (lane3) mice. The arrows indicate the four forms of MBPs (21.5, 18.5, 17, and 14 kilo daltons).

Fig-3

(A) Developmental mRNA profile of MBP and PLP



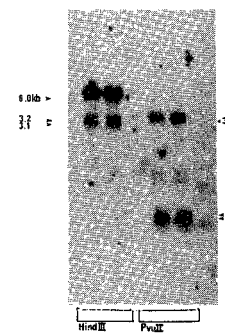
(B)



Restriction map of mouse MBP cDNA probe(3).

Fig-4

(A)



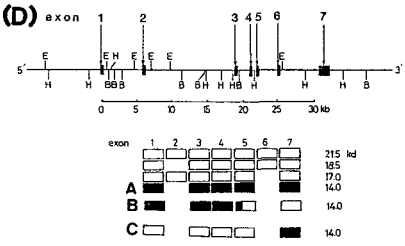
(B)



(C)

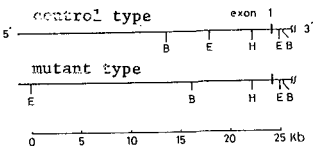


(D)



◄ Fig.4 Southern blot analysis of mld DNA with (A)probe-1 and -2, (B)probe-2, (C)probe-3. (D); Location in the the MBP gene (17,18) of cDNA probes used in Fig.4-A,B,C.

Fig-5 Structure of 5' end of MBP gene in mld



REFERENCES 1)Bourre J.M. et al. J.Neurochem.(1980) 35,458; 2)Cowen J. Mouse News Lett.(1980)65,17; 3)Kimura M. et al. J.Neurochem.(1985)44,692; 4)Kimura M. et al.,in the nineth Taniguchi Symposium on Brain Science. University of Tokyo Press. in press. 5)Marcu K.H. and Dudock B. Nucl.Acids. (1974)1,1358; 6)Matthieu J.M. et al. Brain Res.(1981) 214, 219; 7)Matthieu J.M. et al. Neurochem.Pathol.(1984)2, 115; 8)Matthieu J.M. et al. Dev.Brain Res.(1984)13,149; 9)Mikoshiba K.et al. J.Neurochem.(1980)35,465; 10)Mikoshiba K. et al.,Bul. Japanese Neurochem. (1984)23,288; 11)Mikoshiba K. et al., Dev.Brain Res. (1986) in press; 12)Milner R.J. et al. Cell 42, 931; 13)Miura M. et al. Bul.Japanese Neurochem.(1986) submitted; 14)Okano H.et al. Bul.Japanese Neurochem.(1984)23, 15)Okano H. et al. J.Neurochem. in press; 16)Roach A. et al.Cell (1985) 42, 149; 17)Takahashi N. et al. Cell (1985) 42, 139; 18)Ferra F. et al. Cell (1985) 42, 139

188. Drosophila Melanogaster 頭部における環状ヌクレオチド PDE の分子薬理学的解析

西塔正広・広川佳史・山川　薫・吉岡　亨*
堀田凱樹**・日高弘義
(三重大・医・薬理, 横浜市立大・医・第一生理*, 東京大・理**)

〔要　約〕

キイロショウジョウバエ (Drosophila Melanogaster)の学習能力が低下した突然変異株 dunce mutation の系において、cAMP・PDE が欠落していることが正常な系との比較から明らかになり (1—5) 、dunce gene, cAMP・PDE , 学習能力の三者の関係が注目されているが、その詳細は不明である。そこで我々は、まず Drosophila では脳～頭部に環状ヌクレオチドPDE が多いこともあり (4) 頭部を材料にして種々の環状ヌクレオチドPDE の阻害剤を用いて、正常な系の Drosophila 頭部から調製したPDE の特性をヒト血小板から調製した PDEと比較検討した。すなわち、Drosophila 頭部よりDEAE-cellulose chromatography にて、二つの環状ヌクレオチドPDE の活性peakを分離し、得られた各peakが、cAMP及び cGMP を基質にする PDE、cAMPのみを基質にする PDEであることを同定した。得られた二つの環状ヌクレオチドPDE に対する阻害剤の影響は、theophyllineなどはヒト血小板の場合と異なり、peak IのPDE により強い阻害作用を示し、ヒト血小板 PDEに強い阻害効果を示すOPC-13013, MY-5445 などは、Drosophila PDEでは全く効果を認めないことから、Drosophila PDEとヒト血小板 PDEとが、その活性部位においてかなり異なる構造を有することが示唆された。

Key word : Drosophila Melanogaster, cAMP・PDE, cyclic nucleotide PDE inhibitors

環状ヌクレオチド PDEは、周知の如く基質である環状ヌクレオチド (cAMP, cGMP) を加水分解することで、様々な生理反応に関与していることが知られているが、その詳細は不明な点が多く残されている。それ故、環状ヌクレオチド代謝とその生理機能との関係を解析することは非常に重要であると考えられる。我々は既に、独自に合成した環状ヌクレオチド PDEの選択的阻害剤を用いて、ヒト血小板における環状ヌクレオチド PDEの役割を解析してきた (6) 。今回、我々があつかったDrosophila Melanogasterは、系統的な突然変異の利用できる系の一つとしてよく用いられており、このハエには、cGMP 及び cAMP を基質とする分子量約１７万の PDEと、cAMPのみを基質とする分子量約７万の PDE、さらにCa^{2+}感受性を有する PDEが存在することが報告されており、最近このハエの学習能力の低下した系 dunceにおいてcAMP・PDE が欠落していることが、正常な系 (wild type)との比較によって明らかにされるに及び (1－5) 、Drosophilaにおける環状ヌクレオチド代謝が注目されているが、PDE 酵素自身の活性部位に関しては、今まで充分な検討がなされていない。そこで今回、我々の合成したPDE 阻害剤及び既知の caffeine,theophyllin などのPDE 阻害剤を用いて、Drosophilaの PDEについてヒト血小板 PDEと比較しながら分子薬理学的解析を試みた。

〔実験方法〕

"Drosophila Melanogaster (wild type)頭部の環状ヌクレオチド PDEの調製"

キイロショウジョウバエ頭部は、生きているハエを低温 (－２５℃) でアセトン処理し顕微解剖して得た。このハエ頭部 200 mg を 10 mlの buffer A (50 mM Tris・HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 2 mM 2-ME, 100 mg/L Leupeptin) で homo-

genizeし、(glass-teflon homogenizerと sonicator を用いて)、105,000 × g, 60分間超遠心後の上清を、予め buffer B (50 mM Tris・HCl pH 7.5, 10mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 2 mM 2-ME, 10 mg/L Leupeptin)で平衡化した DEAE column (0.6 × 4.0 cm) にapply し、その後columnを buffer B にて wash, A_{280} < 0.01を確認した後、カラムに吸着した環状ヌクレオチド PDEを buffer B 中 0 ⟶ 0.5 M の NaCl を含む液にて溶出させた。各フラクションは、予め 10 mg/ml のBSA 100 μl をいれた tube に 0.9 mlずつ溶出液を集めた。

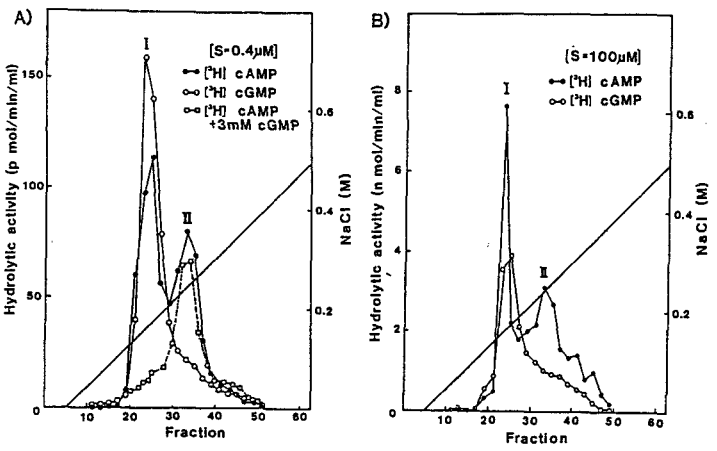
"ヒト血小板環状ヌクレオチド PDEの調整"

ヒト血小板環状ヌクレオチド PDEの調製はおおむね日高らの方法 (7) に従った。ヒト血小板7 g を 40 mlの上記 buffer A にて同様にhomogenizeし、105,000 × g 60分間 超遠心後の上清を予め buffer C (50 mM Tris-acetate pH 6.0, 3.75 mM 2-ME, 1 mM EGTA)にて平衡化した DEAE column にapply し、wash後、吸着した環状ヌクレオチド PDEを上記 buffer C 中 0 ⟶ 0.6 M の sodium acetate を含む液にて溶出させた。これらキイロショウジョウバエ及びヒト血小板の環状ヌクレオチド PDE の活性は、日高らの方法 (8) に従って測定した。なお、上記 homogenization, column chromatographyは全て 4 ℃ 以下で行った。

〔結果及び考察〕

Drosophila頭部の環状ヌクレオチド PDEは、図1に示した如く、I及びIIの2つの PDE活性のpeakとして、DEAE-cellulose chromatography にて分離された。各 peak は、peak Iが、cAMP及びcGMPを、 peak IIが cAMP のみを基質としており、Davis ら (9) が報告している whole flyでの elution profile とよく相関していた。またヒト血小板環状ヌクレオチド PDEは日高らの報告の如く (7) 3つの peak からなり、各々cGMP・PDE, Ca^{2+} activated ・calmodulin dependent PDE, cAMP・PDE であることを確認した。ヒト血小板に認められるpeak IIの様なCa^{2+} ・calmodulin依存性のPDE は、Drosophilaの場合認められなかった。しかしながら Kauvar(3) やSolti(5)は、Ca^{2+}・カルモデュリンによって活性化される酵素の存在を報告しており、この点に関しては更に検討を加える予定である。また、dunce mutation のDrosophilaの頭部の場合は、105,000 × g, 60分間の超遠心上清中にcAMP・PDE 活性が正常のDrosophilaの場合と比較して約10～20%

図1. DEAE-cellulose chromatography of Drosophila Melanogaster heads



程度に減じていることが明らかとなった（1－5）。

"各種環状ヌクレオチド PDE阻害剤の効果"

表1に示したように、theophylline, caffeine, papaverine, dipyridamole 等は、いずれも血小板の PDEに対する阻害効果と Drosophila の PDEに対するそれとを比較すると、IC_{50} 値のpeak I/peak II の比が、全て逆転していることが明らかとなった。またヒト血小板の PDEに対し、強力かつ選択的に阻害効果を示す、cAMP-PDE 及び、cGMP・PDE の阻害剤、OPC-13013 及び MY-5445 は Drosophila の PDEに対して全く阻害作用を示さないことが判明した。すなわち、OPC-13013 や MY-5445 は哺乳類、特にヒト血小板に特異的に阻害効果を示し（6）、theophylline など vasodilator としての作用が知られているPDE 阻害剤は、Drosophilaの PDEに対して peak I PDE により強い阻害作用を示しているということである。このことは、ヒト血小板のPDE と Drosophila の PDEとが、その酵素活性部位において、かなり異なった構造を有していることを示唆している。また、さらにcGMPは 昆虫における孵化時の体動、また脊椎動物における光受容体において重要な役割を演じていることが知られており、今回の PDE阻害剤の影響を考え合わせると、cAMP・PDE のみならず peak I PDE のDrosophila における役割を様々な方面からさらに検討する必要があると考えられる。たとえば餌にこれら PDE阻害剤を含ませ、それによる Drosophila の行動に対する影響を調べることは、Drosophilaにおける環状ヌクレオチド代謝と学習能力を含めた行動様式との関係を探る上で有益であると考えられる。今回はその第一歩としてDrosophila PDEに対する阻害剤の効果を in vitro で検討した。

Table 1. Effects of various PDE inhibitors on Drosophila and human platelet cyclic nucleotide PDEs

	IC_{50} (μM)			
	Peak I		Peak II (cAMP・PDE) III	
	Drosophila head	Human platelet	Drosophila head	Human platelet
theophylline	240	220	440	130
caffeine	440	>500	>500	300
papaverine	9	2	37	0.6
dipyridamole	>500	1	15	20
OPC-13013	>500	30	>500	0.7
MY-5445	>500	3	>500	90
W－7	>500	>500	>500	>500

REFERENCES

1. Byers, D., Davis, R.L.,and Kiger, J.A. Jr. (1981) Nature 289, 79-81
2. Davis, R.L., and Kiger, J.A. Jr. (1981) J. Cell Biol. 90, 101-107
3. Kauvar, L.M. (1982) J. Neurosci. 2, 1347-1358
4. Shotwell, S.L. (1983) J. Neurosci. 3, 739-747
5. Solti, M., Dévay, P., Kiss, I., Londesborough, J., and Friedrich, P.(1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 111, 652-658
6. Hidaka, H., and Endo, T. (1984) in Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research (ed. by S.J. Strada & W.J. Thompson) Raven Press, New York, 245-259
7. Hidaka, H., and Asano, T. (1976) Biochem. Biophys. Acta 429, 485-497
8. Hidaka, H., and Shibuya, M. (1974) Biochem. Med. 10, 301-311
9. Davis, R.L., and Kiger, J.A. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 203, 412-421

189. ラット脳における極長鎖脂肪酸α—hydroxylation ：チトクロムb$_5$関与の可能性

竹下正純・田村　実　　（大分医大・生化）

〔要　約〕

幼若ラット脳ミクロソームにおける極長鎖脂肪酸の α-hydroxylation について、[1－^{14}C] リグノセリン酸(24:0)を用いて検討した。反応の時間経過は60分までほぼ直線的に進行した。ミクロソームの活性はpostnuclear fraction に比べてタンパク当たりで約1.3 倍上昇した。反応には還元型pyridin nucleotide が必要であり、NADH とNADPH はほぼ同程度に有効であった。ATP 及びCoA はα-hydroxylation を促進せずむしろ抑制した。一方、CoA の添加により水溶性成分の放射活性の増加を認めた。ミクロソームをtrypsin 処理することにより、ミクロソーム電子伝達系の成分である NADH-cytochrome b$_5$ 還元酵素及び、NADPH-cytochrome c 還元酵素活性、cytochrome b$_5$ 含量などが低下し、更にα-hydroxylation 活性の減少を示したが、これに牛肝より detergent で可溶化し、精製した cytochrome b$_5$ を加えることにより、α-hydroxylation 活性の回復を認めた。　以上の結果からリグノセリン酸の α-hydroxylation にミクロソームの電子伝達系が関与するものと考えられる。

Key word： α-hydroxylation, lignoceric acid, cytochrome b$_5$

中枢神経系のミエリン形成に関連するセレブロシド、スルファチドなどの糖脂質は極長鎖脂肪酸と共にα位に水酸基をもった脂肪酸を多量に含有することを特徴とする(1)。脳における脂肪酸のhydroxylation に関しては、Kishimoto らにより以前から数多くの報告がなされており、極長鎖脂肪酸のhydroxylation が脳ミクロソームで起こり、cytosolic のheat-stable factor 及びheat-labile factor を必要とするとされている(4)。

我々は体細胞ミクロソームのcytochrome b$_5$ 還元酵素が欠損するメトヘモグロビン血症知能障害型の病因に関連して、脳ミクロソームの電子伝達系が脂肪酸伸長に関与することを明らかにしてきた(6)。ミクロソームの電子伝達系は脂肪酸不飽和化、脂肪酸伸長、コレステロール生合成などに関与することが知られているが、長鎖脂肪酸のhydroxylation に関しては知られていない。Hirono は、上記疾患の剖検による脳脂肪酸の分析例でα-hydroxy 脂肪酸に変化をきたすことを報告している(1)。このことは、脳における脂肪酸の α-hydroxylation にミクロソームの電子伝達系が関与する可能性を示唆する。この点を明らかにするためにリグノセリン酸(24:0)を基質とする脂肪酸のα-hydroxylation について検索した。

［実験材料と方法］

酵素源はα-hydroxylation 活性が最も高くなる 25日～30日 ラットの脳を用いた。Postnuclear fraction は、Hoshi と Kishimoto (2) の方法に従い 20mM Bicin, 1mM EGTA, 1mM $MgCl_2$, 0.154M KCl, pH7.5, 2 vol.中で脳をhomogenize し、1000 x g 10 min の上清を用いた。

脳ミクロソームは，上記ラット脳からAkanuma と Kishimoto の方法をModify して調整した。脳を9 vol. のBuffer A' (0.08M KPB, 2mM EDTA, 20% glycerol (v/v), pH7.4) でhomogenize し、12,000 x g 30min 遠心した上清を更に77,000 x g 90min 遠心したpellet を少量のBuffer A' にsuspend し、-80℃で保存した。

Heat stable factor (HSF) はブタ小脳からKishimoto (3) に従って調整した。

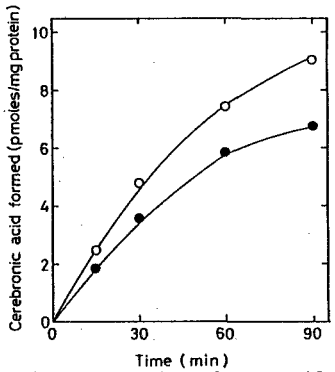
Detergent-solubilized cytochrome b_5 は牛肝ミクロソームより主としてSpatz と Strittmatter (5) の方法に従って調整した。

α-Hydroxylation 活性測定の反応系は、Celite 10mg (chloroform:methanol 2:1 suspend) に [1−^{14}C] リグノセリン酸 (150,000 cpm) をcoat し、Buffer B'(20 mM Bicine, 1mM EGTA, 1mM $MgCl_2$, 0.154M KCl, pH7.8) 0.1ml, HSF 0.03ml, NADPH and/or NADH 2mM, microsome fraction (Ms) (5mg protein) を加えて全量 0.5mlとし37℃ で 150 stroke/min shake した。 Postnuclear fraction (PN) の場合は、0.2 ml (5mg protein) を加え、Buffer B' をのぞいた。 Chloroform:methanol 1:1 8ml で反応を止め、Hoshi とKishimoto (2) の方法で測定した。

Trypsin 処理: Microsome 32mg protein (2ml) にBuffer B' 0.2ml を加え、trypsin 1mg を0.25ml に溶かした液を加え 25℃ 30min 反応させた後、trypsin inhibitor 1mg をBuffer A' に溶かして加え全量10ml として100,200 x g 60min 遠心した。Pellet を少量のBuffer A' にsuspend した。

[結果]

図1に Ms と PN によるリグノセリン酸α-hydroxylation の時間的経過を示した。いずれもおおむね60分までは直線的に反応が進行した。Ms はタンパク当たりで PN の約1.3倍の活性を示した。



Time course of cerebronic acid formation from lignoceric acid by microsomes and postnuclear fraction.

α-Hydroxylation には還元型 pyridine nucleotide を必要とし、NADH とNADPH はほぼ同程度の活性を示した(Table I)。

ATP(0.8mM) はα-hydroxylation 反応を 約1/3 にまで抑制し、CoA(50μM) は更に阻害した。両者を加えたものでは殆ど活性を示さなかった(Table II)。同じ反応系の水抽出物では CoA 添加で放射活性の著しい増加を認めた。ATP では減少傾向を示した。

Microsome を trypsin 処理することにより、NADH cytochrome b_5 還元酵素、NADPH-cytochrome c 還元酵素の活性及び cytochrome b_5 含量の低下を認め、α-hydroxylation 活性の減少を示したが、これに detergent で可溶化した cytochrome b_5 を加えることにより、cytochrome b_5 の濃度に応じてα-hydroxylation 活性の回復を認めた(Table III)。

Table I. Pyridine nucleotide requirements for α-hydroxylation of lignoceric acid

Incubation mixture	Cerebronic acid formed
	(p mol/mg protein/hr)
Complete minus pyridine nucleotide	0.35 ± 0.09
NADH (0.4 mM)	6.29 ± 1.23
NADPH (0.4 mM)	5.61 ± 1.54

Table II. Effect of ATP and CoA on α-hydroxylation of lignoceric acid

Incubation mixture	Cerebronic acid formed
	(p mol/mg protein/hr)
Complete	1.49
plus ATP (0.8 mM)	0.48
plus CoA (50 μM)	0.09
plus ATP, CoA (0.8 mM, 50 μM)	0.02

Table III. Effect of detergent solubilized cytochrome b_5 on α-hydroxylation of lignoceric acid

Condition	Cerebronic acid formed
	(p mol/mg protein/hr)
Microsomes not treated	1.49
trypsin treated	0.08
trypsin treated plus cyt. b_5 (0.4 μM)	0.24
plus cyt. b_5 (2.1 μM)	0.75
plus cyt. b_5 (4.3 μM)	0.81
plus cyt. b_5 (12.8 μM)	1.12

［考察］

長鎖脂肪酸elongationでは、ATP及びCoAは反応に関与するCoA化合物の生成をうながして、伸長反応の促進を見た。しかし、α-hydroxylationではこれらはむしろ反応を抑制した。α-Hydroxylationは脂肪酸、脂肪酸CoAどちらでも基質になりうるとされているが、生成されたCoA化合物が他の代謝系へながれいっている可能性が強い。このことは、CoAの添加によって反応生成物の水溶性画分の放射活性が増すことからも考えることができる。

遺伝性メトヘモグロビン血症知能障害型の場合、cytochrome b_5 還元酵素欠損による障害が肝などの臓器に強くなく、脳だけに強く現れる理由の1つは、myelin形成に特徴的なα-hydroxylationにこの酵素系が関係する,と考えることである程度説明がつく。今後、ミクロソーム電子伝達系成分の抗体によるα-hydroxylationの反応機構の解析、及びミクロソーム電子伝達系の抑制によるα-hydroxylation-cerebroside合成系の変動について検討していきたい。

1) Hirono, H. (1979) Lipids 15, 272-275
2) Hoshi, M. AND Kishimoto, Y. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4123-4130
3) Kishimoto, Y. (1978) Methods in Enzymol. (Fleischer, S. and Packer, L., ed) vol. 52, pp310-318, Academic Press, New York
4) Shimeno, H., Wali, A., AND Kishimoto, Y. (1984) Neurochem. Res. 9, 181-194
5) Spatz, L. AND Strittmatter, P. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1042-1046
6) Takeshita, M., Tamura, M., Yoshida, S., AND Yubisui, T. (1985) J. Neurochem. 45, 1390-1395

190. 白鼠上頸神経節への神経成長因子の逆行性輸送

高浜和也・岩田光良・安藤正人・永田　豊・堀真一郎*
加藤兼房**　（藤田学園保健衛生大・医・生理，
東京都神経研・神経生化*，愛知県コロニー研・生化**）

〔要　約〕

ラット上頸部交感神経節（superior cervical sympathetic ganglion, SCG）へ逆行性に輸送される神経成長因子（nerve growth factor, NGF）の起源を探るために，2本の節後神経のうち内頸動脈神経（ICN）または，外頸動脈神経（ECN）の切断，あるいは眼球または顎下腺の摘出手術を施行した後，SCG内NGF含有量を高感度酵素免疫測定法を用いて定量し，その変動を経時的に追求した。①ICN切断よりもECN切断による方が，より著明なSCG内NGFの減少を引き起こした。またECNを切断せず節前線維とICNの両方を切断すると，SCG内NGF含量は一過性に上昇したが，ICNを切断せず節前線維とECNを同時に切断した場合には，神経節のNGF含量は逆に有意に低下した。②ECNの支配臓器の顎下腺を片側摘出した後では，同側のSCG内NGF含量は有意に低下したが，反対側の神経節内NGFの減少はより少なかった。また，ICNの支配臓器の虹彩を含む眼球を片側摘出すると，反対側SCG内NGF量は，ほとんど変化しなかったが，同側の神経節内のNGFレベルは有意に低下した。しかし，その減少度は顎下腺摘出後よりも軽度であった。この様な実験成績から，NGFの一部は眼球で作られICN軸索を遂行性に輸送されるが，大部分は顎下腺で生成されて，同側のECNを主として移送されて，SCG内に蓄積されると考えられた。

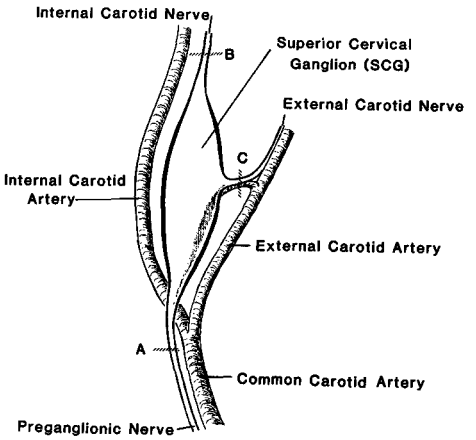
Key word： nerve growth factor (NGF), superior cervical ganglion (SCG), retrograde axonal transport.

神経成長因子（NGF）は，交感神経系細胞の生存と分化に必須なポリペプチドで，そのアミノ酸構成もよく解明されている。[5] 既にHeumann[3]らやHendryら[2]の報告によって，ラット上頸部交感神経節におけるNGFは，交感神経の支配臓器組織で生合成されてそこから逆行性に軸索輸送され蓄積されていると考えられている。前報で我々は，SCGの節前神経切断術（denervetion）又は，節後神経切断術（axotomy）を施行した後SCG内NGF含量を高感度酵素免疫測定法（EIA）を用いて定量した結果，NGFの逆行性輸送によるSCG内蓄積を報告した。[4] 今回は，このNGFの逆行性輸送が，二本の節後神経のうち外頸動脈神経（ECN）あるいは内頸動脈神経（ICN）のいずれを通ってSCGにまで達して，そこに蓄積されるのを明らかにするために，それぞれの神経の切断術を施行した後，EIAを用いてSCG内NGF含量を定量して，その変動を調べた。さらに，ECNあるいはICNのそれぞれの代表的支配臓器と考えられる顎下腺あるいは眼球の摘出手術を施行した後，SCG内NGFの変化を調べて，両組織からのNGF輸送の割合を調べて比較した。

《実験材料と方法》

a）すべての実験には，成熟雌ラット（体重 180–220g）を使用した。b）節後神経のECN，ICN切断術は，ラット腹腔内にペントバルビタール（40mg/kg）を注射して麻酔したのち，無菌的操作下にSCGを露出して，その節前神経またはECNあるいはICNのいずれか，あるいは両者を切断し（図1），皮膚縫合して回復させた。c）顎下腺または，眼球摘出術は，ラットをペントバルビタール麻酔下にて無菌的に顎下腺または眼球を片側あるいは両側で摘出し

図 1

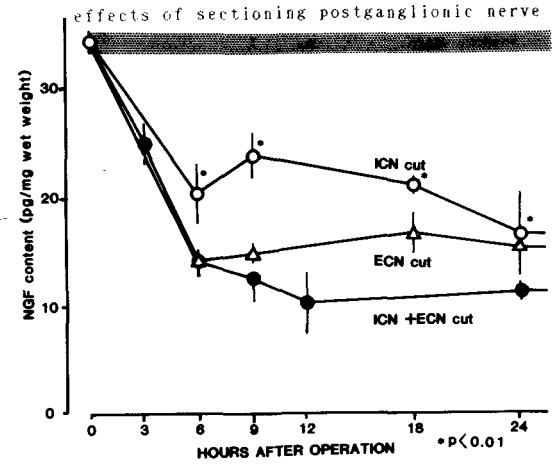


た。d）ＳＣＧの摘出は，ウレタン麻酔下に行い，周囲の結合組織を注意深く除去した標本を実験に使用した。[①] e）ＮＧＦ含量の測定は，摘出したＳＣＧの湿重量を秤量後，微小glass-glass homogenizerを用いて，ゼラチン加水分解物を含むbuffer中で磨砕した後，遠心（15000rpm，45分）上清を試料として，サンドイッチ型のＥＩＡを用いて定量した。

《結果と考察》

先回我々は，ＳＣＧの両節後神経（ＥＣＮ，ＩＣＮ）を切断したのち，経時的にＳＣＧを摘出してそのＮＧＦ含量をＥＩＡ法で定量して，ＮＧＦの逆行性輸送現象を直接的に証明した。今回は，ＮＧＦのＳＣＧ内への輸送量が二本の節後神経のうちＥＣＮかＩＣＮのいずれを経由してより多く認められるかを調べた。ＥＣＮを切断すると，術後3時間目より非手術ＳＣＧに比べて約½まで有意に組織内ＮＧＦ含量は低下し，以後その低い値に留った。ＩＣＮ切断にても，やはりＳＣＧ内ＮＧＦ含量は低下し対照組織の約⅔に達したが，ＥＣＮ切断時よりも低下量は少なかった。またＥＣＮとＩＣＮ両方とも切断した後では，さらに対照の約⅓にまで減少するのが見られた（図2）。

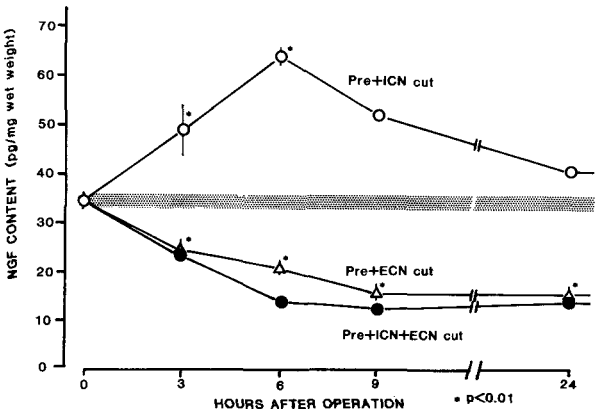
図 2



ＥＣＮを切断せずにＩＣＮと節前神経を共に切断すると，ＳＣＧ内ＮＧＦ濃度は上昇し術後約6時間で対照のほぼ2倍に増加したが24時間後には，ほぼ元の値に戻った。しかしＩＣＮを切断せずにＥＣＮと節前神経を一緒に切断すると，ＳＣＧ内ＮＧＦレベルは逆に低下がみられ，術後6～9時間で対照の約½に達した。このような成績は，ＩＣＮよりもＥＣＮを通ってより多くのＮＧＦがＳＣＧに逆行性に移送されて，そこに蓄積され，さらにシナプス間隙を越えて節前神経軸索内をも逆行性輸送がおこっていることを強く示唆している。しかし両節後神経と節前神経とをすべて切断した後でも，ＳＣＧ内ＮＧＦレベルは，完全に0まで減少しなかった。HeumannらはＳＣＧ内にＮＧＦのｍＲＮＡはほとんど見出されないと言っている[⑤]が，今回の実験成績はわずかながらもＳＣＧ組織内で，ＮＧＦが生合成される可能性を示唆している。また軸索内輸送ばかりでなく，交感神経標的器官から血行性に移送されて，ＳＣＧ内に蓄積することも考えられる（図3）。

そこで，ＥＣＮの支配臓器である顎下腺を，片側摘出した後に，ＳＣＧ内ＮＧＦ含量の経時的変動を調べると，6時間後には同側のＳＣＧでＮＧＦレベルは対照の約½に減少した。しかし，反対側のＳＣＧ内ＮＧＦ含量は，対照群に比して，前者ほどは減少せず，対照の⅔の値に留った。両側顎下腺を摘出した後のＳＣＧ内ＮＧＦ含量はさらに減少し，対照の約⅓に達した。このような結果から，顎下腺で生成されたＮＧＦは主として同側の支配神経の軸索を逆行性に移送されてＳＣＧ内に蓄積されるが，一部は血行性に移送されて対側のＳＣＧにも達する可能性が示唆された（図4）。ＩＣＮの主な支配臓器でもある虹彩を含む眼球を片側摘出すると，24時間後には同側のＳＣＧ内Ｎ

図 3 effects of sectioning pre- and postganglionic nerves



ＧＦ含量には，有意な減少が認められたが，その量は対照の¼にすぎなかった。しかし，反対側のＳＣＧでは，やや減少傾向を認めるが，対照群に比し有意な差ではなかった。両側の眼球摘出術を施行すると，ＳＣＧ内ＮＧＦ含量はより一層の低下がみられたが，唾液腺摘出の時の変化よりも少なかった。しかし，前報で示した如く④雌ラットの虹彩および顎下腺内のＮＧＦ含量は極めてわずかであった。したがって，ＮＧＦは眼球筋よりも，顎下腺組織で主として生合成されると直ちにＳＣＧの節後神経のうちＩＣＮよりもＥＣＮの軸索内を輸送されて，ＳＣＧ内に蓄積されることが明らかにされた。

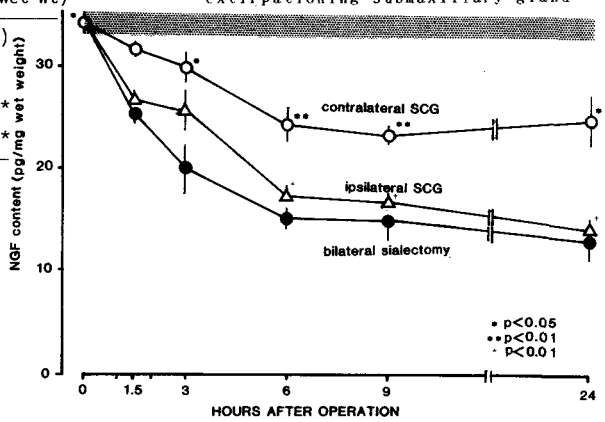
表 1

NGF CONTENT IN SCG 24 h AFTER UNI- & BILATERAL ENUCLEATION OF EYEBALL

Treatment	NGF content (pg/mg-wet wt)
In control SCG	34.3 ± 1.14 (10)
Unilateral enucleation	
in contralateral SCG	32 6 ± 2.92 (3)
in ipsilateral SCG	26.6 ± 2.94 (3)*
Bilateral enucleation	25.6 ± 1.94 (3)*

Mean ± SEM, *p < 0.01

図 4 effects of bi- and unilateral extirpationing submaxillary gland



《文　献》

1) Ando, M., Nanba, T., Okuya, M., and Nagata, Y. (1988) Brain Res. 267, 313 − 321.

2) Hendry, I, A., Stokel, K., Thoenen, H., and Iversen, L.L. (1974) Brain Res. 68, 103 − 121.

3) Heumann, R., Korsching, S., Scott, J., and Thoenen, H. (1985) J. Neurochem. 44 (Suppl) S 139.

4) 高浜和也・岩田光良・安藤正人・永田豊・堀真一郎・加藤兼房 (1985) 神経化学 24, 382 − 384.

5) Thoenen, H, and Barde, Y.-A. (1980) Physiol. Rev. 60, 1284 − 1335.

191. アフリカツメガエル坐骨神経におけるグリセロリン脂質及び蛋白質の軸索内輸送

五十嵐道弘・小宮義璋・黒川正則

（東京大・医・脳研・生化学）

〔要　約〕

1）グリセロリン脂質の軸索内輸送を解析するため、[^{3}H]グリセロール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5 mmの連続分節に切った。各分節を5%トリクロル酢酸で処理後、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。その結果、主要なグリセロリン脂質であるフォスファチジルコリンは約80mm/日で輸送されており、フォスファチジルエタノールアミンもほぼ同様の速度で移動している事が明らかとなった。これらの輸送速度はCMP-シアル酸及びガングリオシドG_{D1} αの速度に比べて著しく速いため、CMP-シアル酸及びガングリオシドG_{D1} αはグリセロリン脂質の大部分とは異なる分画で輸送されるものと考えられる。

2）[^{35}S]メチオニンで蛋白質を標識し、アフリカツメガエル坐骨神経における蛋白質の軸索内輸送を解析した所、CMP-シアル酸及びガングリオシドG_{D1} αと同程度の輸送速度で移動する蛋白質をそれぞれ見出した。両者ともSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動上、分子量約55Kの蛋白質であった。

Key word：Axonal transport, Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine

アフリカツメガエル坐骨神経（知覚線維）において、CMP-シアル酸（シアル酸供与体）及びガングリオシドG_{D1} αは15℃で8mm/日，2mm/日という速度でそれぞれ軸索内輸送を受ける（6,7）。従来ガングリオシドの輸送は各種動物の視神経軸索において検討され、「速い」軸索内輸送に属すると報告されているが（3,4,8,9）、G_{D1} αの移動はQ_{10}を考慮しても、「速い」軸索内輸送とはみなし難い。一方、グリセロリン脂質は各種の軸索で速く移動することが知られている（1,5,10,11）。そこで本実験ではアフリカツメガエルの知覚軸索でグリセロリン脂質の輸送を調べてG_{D1} αの輸送と比較し、両者が異なる輸送系に属することを確認した。同時にG_{D1} α、CMP-シアル酸のそれぞれと同等の速度で輸送される蛋白質について予備的な検討を行った。

（方法）1）グリセロリン脂質の軸索内輸送：アフリカツメガエル（Xenopus laevis）の成体の第IX神経節を露出し、[^{3}H]グリセロール（200 μCi/0.4 μl）を注入した。15℃で一定期間飼育の後、坐骨神経を摘出し、5 mmの連続分節に切った。0℃、3時間の5%トリクロル酢酸（TCA）で処理した後、各分節よりクロロホルム－メタノール（C/M）2:1（v/v）及び1:2（v/v）で脂質を抽出・濃縮した。これを薄層クロマトグラフィーにかけて、C/M/15 N NH_4OH（65:35:5, v/v/v）にて展開後、フルオログラフィーを作成した。又、C/M抽出液の一部の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

2）蛋白質の軸索内輸送：第IX神経節にL-[^{35}S]メチオニン（200 μCi/0.4 μl）を注入した後、5 mmの神経分節を作り、各々より抽出した蛋白質を10% SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。この電気泳動ゲルよりフルオログラムを作成し

た。

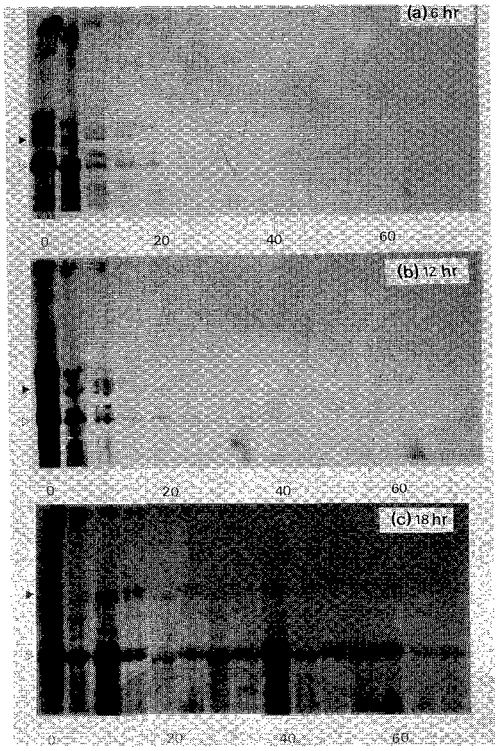
（結果）1）グリセロリン脂質の軸索内輸送：フルオログラフィー上、6時間で既に2つのバンドの移動が確認された（図1）。標準のリン脂質とRfを比較することにより、Rfの大きい方がフォスファチジルエタノールアミン（PE）、小さい方がフォスファチジルコリン（PC）と考えられる。PCの移動速度は約80 mm/日（15 ℃）であり、PEの輸送速度もほぼ同程度と推定される。PC,PE以外のリン脂質に関しては、移動の明確な証拠が得られなかった。グリセロリン脂質分画全体の移動速度は各成分の輸送速度の平均として、約60 mm/日である（図2）。結紮実験により、この移動は拡散や局所的なとりこみでなく、軸索内輸送であることが確認された。CMP-シアル酸及びガングリオシド$G_{D1}\alpha$と類似の速度で移動するグリセロリン脂質は、フルオログラフィー上は見出されなかった。

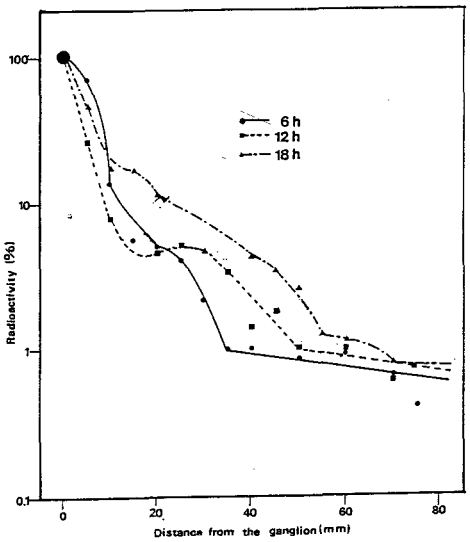
2）蛋白質の軸索内輸送：CMP-シアル酸及びガングリオシド$G_{D1}\alpha$と同程度の移動速度を示す蛋白質をフルオログラフィーにて検索したところ、それぞれ少なくとも1つずつの蛋白質が、約8 mm/日及び約2 mm/日で移動していることが観察された。「遅い軸索内輸送」で移動するラットの蛋白質をマーカーとして比較すると、これらの蛋白質の分子量は約55Kであった。

（考察）アフリカツメガエル坐骨神経リン脂質の主要成分と考えられるPC及びPEは、いずれも1日当り80mmの速度で軸索内を移動することが示された。これはQ_{10}を考慮すると（1）、従来の知見通り「速い」軸索内輸送に対応するものと考えられる。一方、CMP-シアル酸及びガングリオシド$G_{D1}\alpha$は、これらに比べて、はるかに遅く移動している。PC及びPEは膜分画の主要構成成分であり、速い輸送の主体は膜分画である（1,12）。以上のことは、CMP-シアル酸及びガングリオシド$G_{D1}\alpha$は膜分画以外の細胞内構造と共に輸送されていることを強く示唆する。この両者と同程度の速度をもつグリセロリン脂質の移動が見出されないことも、この解釈を支持している。われわれの実験では、ミトコンドリアに特異的なリン脂質であるカルジオリピン（DPG）の移動（2）をとらえることはできなかった。DPGはラットにおいても、合成・輸送時の放射活性がPC及びPEに比べてかなり少ない上（11）、リン脂質全体の合成の放射活性もカエルではラットの数分の一しか認められないため、カエル坐骨神経の系ではこれらの微量成分の輸送をとらえるのは困難であると考えられる。

PCに比べ、PEの移動はやや不明確であるが、これはPEの軸索形質膜及びミエリンとの交換・蓄積の程度が、PCとはかなり異なることによるものであり（11）、PEもまた速い輸送で移動している事は確実であろう。

一方、CMP-シアル酸及びガングリオシド$G_{D1}\alpha$と共輸送の可能性をもつ蛋白質がそれぞれ見出された。両者とも分子量は約55 Kであり、$G_{D1}\alpha$と共輸送されうる蛋白はチューブリンの可能性もありうるが、既知蛋白との異同及び両者間の異同に関してはさらに検討を加えるべき必要がある。また、これらの蛋白質をマーカーとして、CMP-シアル酸及びガングリオシド$G_{D1}\alpha$の輸送形態に対応する細胞内構造を解明することが必要となろう。





（図２）[^{3}H]グリセロール注入後のグリセロリン脂質の放射活性。
●：６時間、■：12時間、▲：18時間

（図１）[^{3}H]グリセロール注入後、(a)6時間、(b)12時間、(c)18時間でのフルオログラム。（数字は神経節からの距離(mm)）
▷：フォスファチジルコリン、　▶：フォスファチジルエタノールアミン

[References] 1) Abe, T., Haga, T., & Kurokawa, M. (1973) Biochem. J. 136: 731-740. 2) Blaker, W.D. & Morell, P. (1981) J. Cell Biol. 89: 579-584. 3) Forman, D.S. & Ledeen, R.W. (1972) Science 177: 630-633. 4) Gammon, C.M., Goodrum, J.F., Toews, A.D., Okabe, A., & Morell, P. (1985) J. Neurochem. 44: 376-387. 5) Grafstein, B., Miller, J.A., Ledeen, R.W., Haley, J.,& Specht, S.C. (1975) Exp. Neurol. 46: 261-281. 6) Igarashi, M., Komiya, Y., & Kurokawa, M. (1985) FEBS Lett. 192: 239-242. 7) Igarashi, M., Komiya, Y., & Kurokawa, M. (1986) J. Neurochem. (in press) 8) Landa, C.A., Maccioni, H.J.F., & Caputto, R. (1978) J. Neurochem. 33: 825-838. 9) Rosner, H. & Merz, G. (1982) Brain Res. 236: 63-75. 10) Toews, A.D., Goodrum, J.F., & Morell, P. (1979) J. Neurochem. 32: 1165-1173. 11) Toews, A.D., Saunders, B.F., Blaker, W.D., & Morell, P. (1983) J. Neurochem. 40: 555-562. 12) Tsukita, S.& Ishikawa, H. (1980) J. Cell Biol. 84: 513-530.

人名索引 (ABC順)

［数字は掲載ページを示す］

(A)

阿部輝雄…… 553・556
阿部哲夫…… 283
足立香代…… 94
相内敏弘…… 406
秋山一文…… 133・484
天野武彦…… 109
安藤正人…… 208・394・592
安藤進…… 112・400
青木英子…… 466
青野景也…… 223
青野幸子…… 244
Appel, H. S. …… 412
荒井宏司…… 193
荒井裕一朗…… 382
荒木一明…… 562
荒木伸…… 250
有賀敏夫…… 79
麻川武雄…… 154
朝倉幹雄…… 46・136・397
浅野富子…… 157
阿相皓晃…… 508

(B)

馬場広子…… 73・349・502
Berstein, G. …… 253
武家尾拓司…… 82
Busto, R. …… 310

(C)

Cacabelos, R. …… 271・298
Castro, M. …… 55
千頭孝史…… 490
Cole, M. G. …… 397

(E)

枝松礼…… 217・496
遠藤真澄…… 505
榎本恵一…… 154

(F)

藤村一…… 142
藤尾慈…… 124
藤沢仁…… 127・205
藤田精一郎…… 487
藤原豊…… 481
福田賢司…… 481
福井弘幸…… 271
福永浩司…… 115・358・379
古川宏…… 139
古川昭栄…… 337
古川美子…… 337
古田知久…… 82
古塚大介…… 490
不破野誠一…… 187

(G)

Ginsberg, D. M. …… 310
Gorio, A. …… 511
五嶋良郎…… 436
後藤昇…… 295
後藤恵…… 67・115

(H)

芳賀達也…… 253
花田進…… 313
原厚…… 385・394
原田雅典…… 523
原田寧…… 508
原田豊…… 529
原尻慎一郎…… 475
播口之朗…… 172・298
長谷川和夫…… 46・136・397
長谷川まこと…… 562
長谷川武史…… 460
橋本泰道…… 460
橋本誠一…… 427
橋本規…… 370
畑典男…… 55
波多江靖之…… 307
畠中寛…… 376・430
早石修…… 289
林恭三…… 337
林要喜知…… 340
狭間秀文…… 529
日高弘義…… 586
東原慶和…… 493
平林義夫…… 85
平井久美子…… 301
平井みどり…… 49
平松緑…… 217・493・496
平野均…… 451・463
平野誠…… 199・451・463
平野修助…… 508
平田洋子…… 70
平山栄一…… 490
広上貢…… 532
広川佳史…… 586
本田千穂…… 88・418
本多健治…… 259・307
堀真一郎…… 592
堀田凱樹…… 586
保住功…… 79

(I)

茨木正明…… 190・325
井端由紀郎…… 409
市川宏伸…… 538
市川淳二…… 280
市村徹…… 352
五十嵐道弘…… 595
飯島敏夫…… 109
池田典秋…… 337
池田益啓…… 310
池中一裕……571・574・577・583
今福淳…… 46・136・397
今井康夫…… 184
今泉美佳…… 292
今澤正興…… 238
芋川浩…… 577
井村裕夫…… 193
稲永和豊…… 277・475
印南敏彦…… 355
稲生英俊…… 229
伊野美幸…… 46・136・397
井ノ川雅恵…… 439
猪木令三…… 184
井上敦子…… 31
井上桂…… 523
井上信博…… 67・379
井上順雄…… 376
井上雄吉…… 565
犬塚貴…… 349・502
石田信一…… 214
石田外樹…… 469
石井毅…… 343
石川和宏…… 139
石川紘一…… 295・457
石川巧一…… 319
石谷良一…… 25
磯辺俊明…… 247・352
伊藤裕…… 193
伊藤仁一…… 85・334・415
伊藤和幸…… 121
岩佐隆史…… 379
岩崎光芳…… 457
岩田光良…… 208・394・592
岩田悟…… 166

(J)

Jonsson, G. …… 511

(K)

門田健…… 226
門田朋子…… 226
門脇浩三…… 121
鏡山博行…… 289
鹿子島裕士…… 199・451・463
梶田三郎…… 478・481
垣花満…… 196
柿本泰男…… 202
亀山正邦…… 58・160・163
亀山勉…… 139
上村宏…… 460
神谷大雄…… 259・307
金丸恭子…… 400
金城勝…… 301
神田啓子…… 124
金松知幸…… 514
金野滋…… 283
金行孝雄…… 37・517
笠原正男…… 373
柏俣重夫…… 244・247・466
粕谷淳子…… 433
片岡泰文…… 292
片山容一…… 457
加藤浩紀…… 196
加藤兼房……157・241・247・352・592
加藤聖…… 469
加藤泰治…… 85・334・415
加藤尚彦…… 76
加藤智信…… 163
加藤佳也…… 172
川端昌弘…… 61
川北幸男…… 487・490
河野輝昭…… 190
川嶋信吾…… 163
吉川潮…… 370
城守美佐…… 103
杵鞭宏育…… 382
木皿憲佐…… 382
岸正孝…… 103
北島哲子…… 421
北村勝…… 559
北村登…… 313
北村佳久…… 262
北山功…… 523
北沢信子…… 385
鬼頭昭三…… 40・52・439
小林和夫…… 541
小林清史…… 61
小暮久也…… 43
河本純子…… 370
河野雅弘…… 217
小出典男…… 496
小池達郎…… 331
小島秀樹…… 475・511
小松秀邦…… 283
小宮義璋…… 232・580・595
小森照久…… 523
近一夫…… 112・400
近藤敏弘…… 367

紺野邦夫…… 316
高坂新一…… 91・403・409
小笹貴史…… 250
越川憲明…… 268
越村邦夫…… 160
越谷和雄…… 274
胡谷和彦…… 202
小山司…… 280・304
古谷野好…… 553
Kream, R. …… 472
久保孝夫…… 436
窪田篤彦…… 250
窪田博…… 46・136
工藤佳久…… 109
空閑茂樹…… 511
久我哲郎…… 445
熊倉鴻之助…… 292
熊代永…… 214
公文明…… 367
国元憲文…… 529
国下龍英…… 505
倉本進賢…… 511
倉岡幸令…… 316
倉田ランス…… 322
栗原正…… 565
栗山欣弥…… 100・103・145
黒田洋一郎…… 541
黒川正則…… 232・595
黒木俊秀…… 199・451・463
櫛谷悦子…… 568
桑野良三…… 562
葛谷博磁…… 427

(M)

前田信明…… 229・235
前田利長…… 562
前久保邦昭…… 487
松原繁広…… 304
松林弘明…… 40・52・439
松田友宏…… 535・550
松井英男…… 376
松井宏晃…… 46・136・397
松井啓…… 286
松角康彦…… 67・379
松海信彦…… 82
松本健五…… 82
松本亮…… 85
松本孝…… 199・451・463
松村末夫…… 367
松村敏弘…… 382
松永雅美…… 406
松浦英夫…… 184
松澤健夫…… 373
Miczek, A. K. …… 472
三木直正…… 340
御子柴克彦……229・235・571・574・577・583
三国雅彦…… 280・304
三森康世…… 58
南勝…… 532
南正康…… 70
箕越靖彦…… 442・544
三須良実…… 436
三田達雄…… 313
三井宏美…… 568
三ツ汐洋…… 55・538
光田慶一…… 217
三浦正幸……571・574・577・583
三浦冽…… 301
宮川洋二…… 292
三宅侃…… 298
三宅正治…… 355
三宅可浩…… 301
宮本篤…… 265
宮本歩…… 229
宮本英七…… 67・115・118・358・379
宮本侃治…… 238
宮下理…… 187
宮武正…… 73・79・349・502・565
宮谷信行…… 73
宮崎修平…… 457
三好理絵…… 40・52
水川六郎…… 529
水野智…… 286
水島淳…… 130
桃井真理子…… 433
桃井隆…… 433
森昭胤…… 217・493・496
森秀樹…… 304
森和夫…… 190
森浩一…… 487・490
森眞由美…… 535・550
森口聡…… 571
森口幸栄…… 400
森井成人…… 193
盛政忠臣…… 37・517
森島義行…… 34
守山英二…… 82
諸井佳代子…… 445
本橋伸高…… 256
撫井弘二…… 490
向山政志…… 193
村上秀樹…… 403
村上哲英…… 547
村越和子…… 298

(N)

鍋島俊隆…… 139
永井克孝…… 97

永岡明伸…… 196
永島亮…… 307
永田豊…… 208·394·592
永津俊治…… 64·70·223
中原辰雄…… 199·451·463
中橋徹…… 211
中平健祐…… 235
中井隆…… 313
中井康光…… 316
中嶋一行…… 238
中嶋照夫…… 460
中条茂男…… 361
中村薫…… 199·463
中村京子…… 73
中村重信…… 58·160·163
中村泰治…… 361·406
中野智…… 163
中野重行…… 37·517
中尾純治…… 460
中尾一和…… 193
中島誠…… 478·481
仲田義啓…… 31·34
中谷一泰…… 361·406
直井信…… 64·223
成実重彦…… 196
根木哲郎…… 547
根岸晃六…… 469
新川久義…… 298
新延道夫…… 229·235
西彰五郎…… 475·511
西川清方…… 169
西川徹…… 538
西本詮…… 82
西村健…… 172·271·298
西野直樹…… 313
西尾廣昭…… 526
西内祐二…… 553
西崎純…… 46·136
西沢正豊…… 79·349
西塚泰美…… 370
丹羽正美…… 190·325
丹羽雅之…… 142
野田恭平…… 472
野口鉄也…… 322·514
野路久仁子…… 85
野村純一…… 523
野村正彦…… 286·499
野村政夫…… 121
野村靖幸…… 106·262
能登直…… 460
野崎正勝…… 142

(O)

小田垣雄二…… 304
小笠原信明…… 157
小片寛…… 55
小川篤子…… 538
小川一寿…… 493
小川紀雄…… 478·481
荻田喜代一…… 28·148
荻田浩司…… 370
小口雅申…… 277·448·520
小倉明彦…… 109
小倉博雄…… 250
小鹿幸生…… 166·412
岡部登志男…… 121
岡田文彦…… 151
岡田英俊…… 37
岡田和洋…… 511
岡田尚志郎…… 61
岡本右滋…… 511
岡村邦博…… 286
岡野栄之…… 571·574·577·583
奥田正英…… 187
奥野幸子…… 205
奥山治美…… 499
奥山典生…… 352
小俣久美子…… 361
小野寺宏…… 43
大垣孝雄…… 28
大口嘉子…… 541
大熊誠太郎…… 100·103
大森斉…… 367
太本堯史…… 88
大鹿英世…… 265
大島由香…… 568
大楫弘順…… 433
太田尚…… 325
太田宗一郎…… 142
大谷光弘…… 91·403·409
大月三郎…… 133·478·481·484
尾崎正若…… 190·325

(P)

Parvez, H. …… 532

(S)

西須英雄…… 553
斉藤秀哉…… 532
西塔正広…… 586
斉藤昌之…… 442·544
斉藤尚亮…… 313·370
斉藤寿仁…… 388·391
斉藤能彦…… 193
斉藤義樹…… 118
榊原俊平…… 553
坂本誠…… 193
坂本安…… 346·358
崎村建司…… 568
迫昭子…… 364

桜井弘子…… 61
佐野輝…… 202
佐野護…… 421・424
佐武明…… 556
佐藤厚子…… 46・136
佐藤元…… 43
佐藤洋美…… 277・448・520
佐藤浩…… 244
佐藤光源……133・478・481・484
佐藤信範…… 382
佐藤修三…… 73・349・502
里吉栄二郎…… 337
Scatton, B. …… 256
瀬川富朗…… 31・34・526
関谷真…… 364
仙波禮治……157・244・247・352・466
仙波りつ子…… 421・424
千丈雅徳…… 532
妹尾英男…… 523
勢理客成史…… 25
芝軒信次…… 457
渋谷徹…… 184
渋谷治男…… 181
重森稔…… 511
島田明範…… 316
嶋津孝…… 442・544
清水温子…… 241・352
清水浩光…… 55
下田光太郎…… 169
下村登規夫…… 169
下山政憲…… 439
新保清…… 46・136
塩田清二…… 316
塩野尚三…… 193
塩田千代…… 229・571・574
白石昭雄…… 199・451・463
白石哲也…… 82
白川治…… 49
白尾一正…… 277・448・520
庄盛敏廉…… 37・61・517
秀野武彦…… 283
祖父江憲治…… 121・124
曽我部肇…… 526
曽根三郎…… 559
Stephenson, D. J.…… 268
嘗原照…… 193
杉崎哲朗…… 322・514
寿野正広…… 196
鈴木英夫…… 172
鈴木勝…… 358
鈴木光雄…… 319
鈴木周平…… 289
鈴木龍雄…… 220
鈴木康夫…… 85
（T）
田平武…… 505
田渕和雄…… 82・88・418
多田國利…… 172・298
只野武…… 382
田口淳一…… 145
高木裕子…… 475
高木博司…… 175・178
高浜和也…… 592
高橋和郎…… 169
高橋清久…… 538
高橋良…… 181・283
高橋康夫…… 562・565・568
高松研…… 403・409
高御堂弘…… 64
高宮至昭…… 91
高野正子…… 154
高野行夫…… 259・307
高嶋瑞夫…… 538
高島敏伸…… 367
竹田二美代…… 316
武田雅俊…… 172・271
竹田稔…… 316
武田泰生…… 259・307
武井延之…… 430
竹島多賀夫…… 169
竹下正純…… 388・391・589
武富保…… 385・394
田宮隆…… 82
田村潤一…… 460
田村実…… 589
田中千賀子…… 49・313・370
田中英明…… 328
田中潤也…… 298
田中喜久子…… 343
田中誠…… 97
田中正美…… 349
田中正敏…… 277・448・520
田中亮…… 85・220・334・412・415
田中敏彦…… 124
田中康一…… 112・400
谷浦秀夫…… 340
田代朋子…… 580・232
Timiras, S. P. …… 397
富樫俊二…… 187
東田道久…… 106
徳光幸子…… 151
徳武哲…… 343
友納昭一…… 100
融道男…… 55
戸谷重雄…… 91・403・409
坪川孝志…… 457

土田高宏…… 82
土橋宣昭…… 214
津田彰…… 277・448・520
辻崇一…… 97
辻丸秀策…… 277・520
塚田裕三…… 91・403・409・574・583
塚本卓治…… 211
塚本徹…… 46・136・397
津久井弘子…… 376・430
鶴見介登…… 142
津島宏美…… 535・550
堤圭介…… 190・325
都築紀宏…… 94

(U)

内田修次…… 130
内村英幸…… 199・451・463
植田弘師…… 175・178
植木昭和…… 292
植松直道…… 487
植村慶一…… 346・358
植村富彦…… 301
上野修一…… 202
宇井理生…… 151
氏家寛……133・478・481・484
浦上克哉…… 169
宇佐美美穂子…… 226
薄井宏…… 562

(W)

和知学…… 187
和田博…… 271
若林隆…… 94
若穂囲徹…… 187
渡部繁男…… 295
渡辺明子…… 181
渡辺康裕…… 130
渡辺恭良…… 289
亘弘…… 391

(Y)

山田彰子…… 307
山田了士…… 133・484
山田茂人…… 475・511
山田敬行…… 193
山上栄…… 487・490
山口和政…… 139
山口仁…… 454
山口知子…… 454
山川薫…… 586
山国徹…… 565
山本秀幸…… 118・358
山本正彦…… 166
山西嘉晴…… 250
山野俊雄…… 301
山下格…… 280・304
山下公三郎…… 478・481
山下正…… 172
山下達朗…… 97
大和谷厚…… 271
山津清實…… 250
山内武司…… 259・307
山内卓…… 127
山崎則子…… 532
柳川右千夫…… 556
八尾博史…… 199・451・463
安田誠治…… 367
米田幸雄…… 28・148
米原典史…… 184
吉田博…… 130
吉田一成…… 409
吉田敏…… 388・391
吉田伸一…… 310
吉田智浩…… 52
吉原良浩…… 175・178
吉村和法…… 346
吉岡亨…… 586
湯浅龍彦…… 73

(Z)

周暁明…… 130

CIBA-GEIGY



向精神作用性てんかん治療剤

テグレトール® 錠・細粒

(要指)

カルバマゼピン

●部分発作のファートチョイス ●鎮静作用のない向精神作用性てんかん治療剤

(複雑部分発作、単純部分発作、二次的全般化大発作)

〔組　　成〕
テグレトール錠は1錠中に日本薬局方カルバマゼピン 200mgを含有する白色の裸錠である。
テグレトール細粒は1g中に日本薬局方カルバマゼピン 500mgを含有する白色の細粒である。
〔効能・効果〕
○三叉神経痛
○てんかん
—精神運動発作
—てんかん性格及びてんかんに伴う精神障害
—痙攣発作
強直間代発作(全般痙攣発作、大発作)

〔用法・用量〕○三叉神経痛には　カルバマゼピンとして通常成人、最初1日量200～400mg(錠剤1～2錠又は細粒0.4～0.8g)からはじめ、通常1日600mg(3錠又は1.2g)までを分割経口投与するが、症状により1日800mg(4錠又は1.6g)まで増量することができる。小児に対しては、年齢、症状に応じて適宜減量する。
○てんかんには　カルバマゼピンとして通常成人、最初1日量200～400mg(1～2錠又は0.4～0.8g)を1～2回に分割経口投与し、至適効果が得られるまで〔通常1日600mg(3錠又は1.2g)〕徐々に増量する。症状により1日1200mg(6錠又は2.4g)まで増量することができる。小児に対しては、年齢、症状に応じて、通常1日100～600mg(½～3錠又は0.2～1.2g)を分割経口投与する。

※詳細につきましては、製品の添付文書をご覧ください。

日本チバガイギー株式会社　　宝塚市美幸町10番66号

神経安定剤

(要指)ニューレプチル®

(プロペリシアジン)

NEULEPTIL (プロペリシアジン) は、フェノチアジン誘導体の一つであり、その薬理作用も概ねクロルプロマジンのそれに類似する。

■すぐれた情動調整作用を有し、患者の衝動性・反抗性を減じ、適応性・接触性を改善する。
■精神療法的働きかけを受け入れやすくする。
■行動面の抑制を伴うことが少なく、院内活動や外来治療を行いやすい。

■効能・効果 精神分裂病

■用法・用量 プロペリシアジンとして、通常成人1日10～60mgを分割経口投与する。なお、年齢・症状により適宜増減する。

■包　　装
錠　5mg：1000錠，PTS 1000錠　(劇)(指)散　1%：500g
10mg：1000錠，PTS 1000錠　(劇)(指)細粒 10%：100g，500g
25mg：500錠，PTS 1000錠　(劇)(指)液　1%：500ml

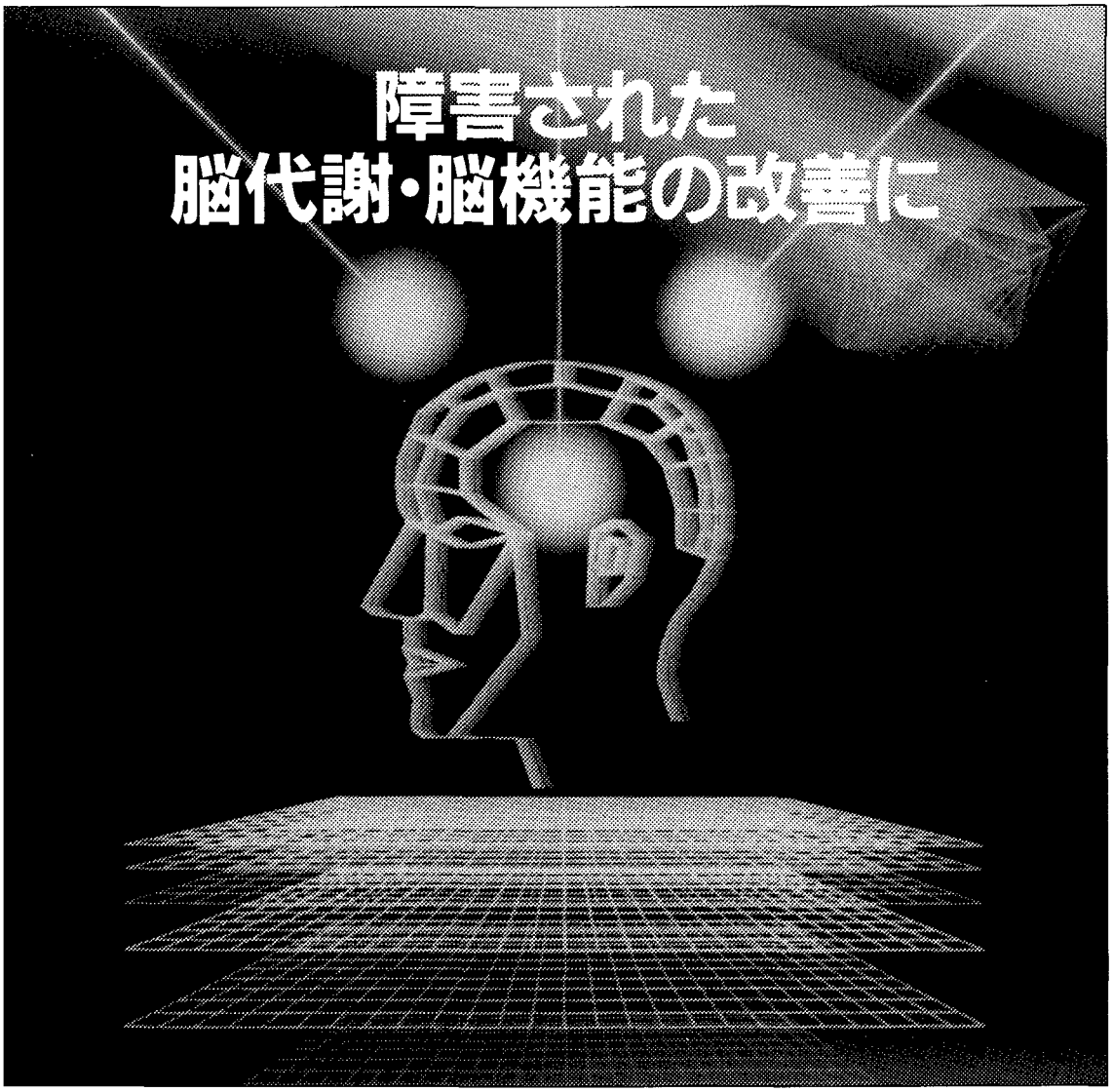
■添付文書の「使用上の注意」をご参照下さい。

●本剤を含むphenothiazine系向精神薬の副作用・安全性・相互作用に関する小冊子[1)2)]を用意いたしております。ご入用の折りには シオノギ製薬製品部ニューレプチル係宛お申し越し下さい。

文献 1) 酒井正雄, 木下 潤：向精神薬の副作用Ⅰ. Phenothiazine系薬物および類似の構造を持つ薬物, 改訂版, 塩野義製薬, 1978
2) 酒井正雄, 向精神薬の相互作用

®：登録商標

シオノギ製薬
大阪市東区道修町3-12 〒541



■作用特性

●脳幹網様体に作用し，低下した意識水準を高める
●グルコースの脳内移行を促進させ，脳内での代謝を亢進させる
●脳血流量を増加させる
●脳の低酸素状態に対し防御的に働く
●脳の神経細胞およびグリア細胞内リポフスチンを融解ないし減少させる
●脳内コリン量を増加させる

■効能・効果

錠・錠200mg：
下記疾患の慢性期における症状（不安感，頭重，記憶障害，見当識障害）の改善
　脳出血（発症後2年以上の症例）
　脳動脈硬化症（発症後1年以上の症例）
頭部外傷後遺症におけるめまい
注射用：
脳術後・脳卒中の意識障害
頭部外傷の急性期における意識障害
頭部外傷後遺症におけるめまい

■薬価基準収載

※用法・用量，使用上の注意，取扱い上の注意等は添付文書をご参照ください．

■組成

錠：1錠中 塩酸メクロフェノキサート100mg含有．
錠200mg：1錠中 塩酸メクロフェノキサート200mg含有．
注射用：1バイアル中 塩酸メクロフェノキサート250mgまたは750mg含有．

LUCIDRIL

脳代謝機能改善剤

ルシドリール®

LUCIDRIL®

ルシドリール錠
ルシドリール錠200mg
注射用ルシドリール

〈塩酸メクロフェノキサート製剤〉

大日本製薬
大阪市東区道修町3－25
提携　アンファー社（フランス）

神経化学　第25巻　第1号

昭和61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　西日本法規出版株式会社