ISSN:0037-3796

神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第30回　日本神経化学会大会論文集

Vol. 26 (No. 1), 1987

日本神経化学会

神経化学

第30回日本神経化学会大会論文集

PROCEEDINGS OF THE 30th ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於 東 京

10月28日(水), 10月29日(木), 10月30日(金)

Vol. 26 (No. 1), 1987

日 本 神 経 化 学 会

編集委員（ABC順）

平野修助（東邦大・医・第二生理）
石川紘一（日本大・医・薬理）
高坂新一（慶応大・医・生理）
黒川正則（東京大・医・脳研）
野口鉄也（東邦大・医・第二生理）
高垣玄吉郎（慶応大・医・生理）
高橋良（東京医歯大・医・精神）
戸谷重雄（慶応大・医・脳外）
塚田裕三（代表）（慶応大・医・生理）
植村慶一（埼玉医大・第一生理）

目　次

1. ボツリヌス神経毒素による神経系膜蛋白質のＡＤＰ－リボシル化 …… 25
松岡一郎・首藤文栄*・久保周一郎*
栗原堅三 （北海道大・薬・薬剤，獣*）

2. ラット心室単離細胞におけるIslet-activating proteinによるＡＤＰリボシル化に対するcAMP依存性プロテインキナーゼ活性化の影響 …… 28
渡辺康裕・岩倉克臣・今泉太郎・吉田博
（大阪大・医・第一薬理）

3. ラット終脳α_2-アドレノセプター，ＧＴＰ結合蛋白およびその共役活性の発生・発育変化 …… 31
北村佳久・野村靖幸 （北海道大・薬・薬効）

4. ラットにおけるＧＴＰ結合タンパク質Goの加齢に伴なう濃度変化 …… 34
浅野富子・仙波禮治*・加藤兼房
（愛知県コロニー研・生化，周生期*）

5. ウシ大脳シナプス膜の分子量2.4万のＧＴＰ結合蛋白質の精製と性状 …… 37
菊池章・山下孝之・河田正仁・山本克彦・
池田和人・高井義美 （神戸大・医・第一生化）

6. モルモット脳シナプトソームからのノルエピネフリン遊離に対するC-kinase系及びA-kinase系の作用について …… 40
春藤久人・谷山紘太郎・田中千賀子
（神戸大・医・薬理）

7. Protein kinase Cサブタイプの脳内分布と細胞内局在 …… 43
斎藤尚亮・古瀬明子・伊藤あつ子・細田弘吉・
吉川潮*・西塚泰美*・田中千賀子
（神戸大・医・薬理，第二生化*）

8. ラット脳組織におけるProtein kinase Cのサブタイプの生後発育変化 …… 46
澤村悟・橋本規・阿瀬勝彦・Shearman S.M.,
吉川潮・斎藤尚亮*・田中千賀子*・西塚泰美
（神戸大・医・第二生化，薬理*）

9. モノクローナル抗体による脳のCキナーゼアイソザイム分布に関する解析 …… 49
小野田幸治・渡辺正人・田中利男・吉田利通*・
日高弘義 （三重大・医・薬理，病理*）

10. 4種のヒトチロシン水酸化酵素cDNAの単離と塩基配列の決定 …… 52
金田典雄・小林和人・一瀬　宏・岸　文雄*・
中沢　淳*・黒沢良和**・藤田啓介**・永津俊治
（名古屋大・医・第一生化，山口大・医・第二生化*・
藤田学園保衛大・総医研**）

11. 網膜に特異的なMEKA cDNAクローンの単離 …… 55
郭　哲輝・秋山万里子・三木直正
（金沢大・がん研・薬理）

12. Rat Neuropeptide Y precursor mRNA：cDNAクローニング，組織特異性発現，glucocorticoidsによる調節 …… 58
樋口宗史・Sabol S. L.*（大阪大・医・第一薬理，NIH*）

13. マウス脳Myelin-associated glycoproteinのcDNAクローニング …… 61
藤田信也・佐藤修三・栗原　正*・
犬塚　貴・高橋康夫*・宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科，神経薬理*）

14. チロシン及びトリプトファン水酸化酵素の活性調節タンパク質（14−3−3）のcDNAクローニングと組織分布 …… 64
市村　徹・礒辺俊明・奥山典生・高橋聖之*・
桑野良三**・荒木一明**・高橋康夫**
（都立大・理・化学，高知医大・病理*，新潟大・脳研・神経薬理**）

15. ラット脳Cholecystokinin遺伝子の発現 …… 67
桑野良三・荒木一明・薄井　宏・高橋康夫
（新潟大・脳研・神経薬理）

16. Myelin deficient（mld）マウスにおける重複したMBP遺伝子の構造とプロモーター活性 …… 70
岡野栄之・田村隆明*・三浦正幸・青山淳夫・
池中一裕・御子柴克彦（大阪大・蛋白研，基礎生物研*）

17. Jimpyミュータントマウスにおけるミエリン形成障害の遺伝子解析 …… 73
池中一裕・森口　聡・岩崎靖乃*・鹿川哲史
古市貞一*・岡野栄之・御子柴克彦
（大阪大・蛋白研，基礎生物研*）

18. 培養細胞系を用いたエンケファリン前駆体遺伝子発現の研究：生殖細胞とセルトリ細胞における発現 …… 76
吉川和明・相沢貴子　（都精神研・分子生物）

19. 精神分裂病者の脳障害部位と脳代謝――ポジトロンCTによる研究―― …… 79
小田原 俊 成・岸 本 英 爾・大 野 史 郎・高 津 修・
松 下 正 明 （横浜市大・医・精神）

20. ポジトロンCTによる躁うつ病者の脳代謝の研究 …… 82
東海林 正・岸 本 英 爾・高 津 修・大 野 史 郎・
松 下 正 明 （横浜市大・医・精神）

21. 精神分裂病患者におけるAVP分泌動態について―水中毒発生機序に関連して― …… 85
岸 本 年 史・平 井 基 陽・大 沢 弘 吉・寺 田 誠・
織 部 裕 明・中 井 貴・井 川 玄 朗
（奈良医大・精神）

22. 躁うつ病の中枢性α_2-adrenergic recepter機能 …… 88
馬 目 太 永・金 子 元 久・渡 辺 厚・沼 田 吉 彦・
星 野 仁 彦・菅 野 智 行・本 田 教 一・柳 沼 正 俊・
熊 代 永 （福島県医大・神経精神）

23. うつ病患者，自殺者等の部検脳における神経伝達物質の研究（第一報）
―セロトニン作動性ニューロン系をモデルとして …… 91
粟 野 菊 雄・Michel J. P.*・Deluermoz S.*・
Richard F.*・Kopp N.*・Tommas M.*・浅 尾 博 一**・
播 口 之 朗・西 村 健
（大阪大・医・精神，Alexis Carrel 大・医・神経病理*，
大阪府立中宮病院**）

24. 非ケトーシス型高グリシン血症（グリシン脳症）：臨床型と酵素障害 …… 94
多 田 啓 也・早 坂 清 （東北大・医・小児）

25. サル脳，脳脊髄液および血漿中の内因性MAO阻害物質について …… 97
江 頭 享・金 馬 義 平 （大分医大・薬理）

26. 血漿 acetylcholinesterase 活性測定法の開発と神経疾患における変化 ……100
中 野 智・川 島 信 吾・中 村 重 信・
亀 山 正 邦* （京都大・医・神経内科，住友病院*）

27. Prion protein はCJD発症の必須因子ではない？―発症マウス脳の
分画成分と感染能との相関性の検討 ……103
玉 井 洋 一・小 島 久 子・北 島 理 恵・中 村 和 生・
田 口 文 章*・内 田 紀久枝*・大 谷 義 夫**・
川 口 毅**・三 浦 貞 則**
（北里大・医・生化，衛生・微生*，医・精神**）

28. 加齢動物におけるセロトニンニューロンの8−OH−DPAT結合能と免疫組織化学的変化 …… 106
山口知子（東京女子医大・生化）

29. ラット脳5HT受容体刺激によるphosphoinositide代謝回転のin vivoにおける測定 …… 109
堀田和泉・加藤匡宏・山脇成人
（国立呉病院・臨床研）

30. ラット中枢5−HT_{1A}受容体に対する〔^{3}H〕8−OH−DPATの結合特性と抗うつ薬の作用 …… 112
西崎純・佐藤厚子・朝倉幹雄・塚本徹・
今福淳・伊野美幸・窪田博・中西純一・
新保清・福田光宏・長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神）

31. 抗うつ薬によるβ受容体減少機構とプロテインキナーゼの関与 …… 115
窪田博・朝倉幹雄・塚本徹・今福淳・
伊野美幸・西崎純・佐藤厚子・中西純一・
新保清・福田光宏・柴田牧子・長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神）

32. ラット線条体^{3}H−ジハイドロキシアルプレノロール結合に及ぼすL−DOPAの修飾作用 …… 118
五嶋良郎・久保孝夫・三須良実
（横浜市大・医・薬理）

33. 高血圧自然発症ラットの高血圧発症に関与する脳幹部ノルアドレナリン神経系についての検討 …… 121
八尾博史・松本孝・平野誠・内村英幸・
黒木俊秀・堤哲之・鹿子島裕士・
中原辰雄*・中村薫**・藤島正敏***
（国立肥前療養所，九州大・理・化学*，医・神経精神**；
医・第二内科***）

34. 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞の分泌調節に関わるα-受容体の特質 …… 124
今泉美佳・宮川洋二・熊倉鴻之助（上智大・生命研）

35. ラット前頭葉皮質における興奮性アミノ酸受容体拮抗薬および作動薬のドーパミン神経伝達に対する作用 …… 127
畑直人・西川徹・高橋清久
（国立精神神経センター・神経研）

36. エチルβ－カルボリン－3－カルボキシレートによる脳内GABA$_A$受容体／ベンゾジアゼピン受容体／Cl^-チャンネル複合体の機能的調節 …… 130
田口淳一・廣内雅明・栗山欣弥
（京都府医大・薬理）

37. ラット網膜〔^3H〕グルタミン酸結合部位の可溶化 …… 133
米田幸雄・荻田喜代一 （摂南大・薬・薬理）

38. ラット脳mRNAの注入によりアフリカツメガエルの卵母細胞膜に誘導したカイニン酸レセプターチャネルの性状 …… 136
辻村良太郎・黒田英世*・寺岡宏**
（三重大・医・精神，名古屋大・理・臨海実験所*，塩野義研**）

39. 前シナプスのムスカリン性アセチルコリン受容体の多様性 ―― 神経伝達物質放出における新規M_1アゴニストAF102Bの効果 …… 139
小野聡・岩本佳代子・川西悟生・溝部文夫
（雪印乳業・生科研・神経化学）

40. 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞におけるホスホリパーゼCを介する情報伝達機構に連関したアセチルコリン受容体のムスカリン受容体からニコチン受容体への変換 …… 142
笹川展幸・中木敏夫・山本慧・加藤隆一
（慶応大・医・薬理）

41. 膵酵素分泌系を実験モデルとしたCCK受容体の調節機構に関する研究 …… 145
神谷大雄・本多健治・斉藤亮・武田泰生・
高野行夫・山内武司 （福岡大・薬・薬理）

42. N－ethylmaleimideの中枢Substance P受容体に対する影響 …… 148
平岡千恵・森島義行・仲田義啓・瀬川富朗・
三好理恵*・鬼頭昭三*
（広島大・医・薬効解析，第三内科*）

43. 視床下部室旁核プリンP_2－受容体を介するバゾプレッシン遊離機構 …… 151
森真由美・津島宏美・松田友宏
（名古屋市大・医・薬理）

44. ラット脳の核マトリックスとトポイソメラーゼ …… 154
筒井公子・庄盛敏廉（岡山大・医・脳代謝研・病態生化）

45. ウシ脳可溶性タンパク質の2次元HPLCマッピング …… 157
内田和久・田岡万悟・真鍋敬・礒辺俊明・
奥山典生 （都立大・理・化学）

46. 牛脳コリンアセチルトランスフェレースのモノクローナル抗体カラムによる精製 …… 160
石田　功・市川友行・石井加代子・出口武夫
（都神経研・分子神経生物）

47. 牛副腎髄質より2種類の熱耐性カルモデュリン結合蛋白質の精製 …… 163
神田啓子・藤尾　慈・門脇浩三・祖父江憲治
（大阪大・医・高次研・神経薬理生化）

48. ニワトリ初期胚脳に存在する細胞内レチノイン酸結合タンパク質について …… 166
北本年弘・粕谷淳子・妹尾春樹*・
桃井真理子**・桃井　隆
（国立精神神経センター・神経研，東京医歯大・医・第一解剖*，
自治医大・小児**）

49. ウシ脳組織から分離した非ヒストンDNA結合タンパク質G24（HMG−1）
の一次構造 …… 169
儀辺俊明・高橋信弘*・Putnam F. W.**・
奥山典生
（都立大・理・化学，東燃・総研*・インディアナ大・生物**）

50. 海馬キンドリングラットの海馬・扁桃核における興奮性アミノ酸受容体に連関した
イノシトールリン脂質代謝回転の変化 …… 172
山田了士・秋山一文・森本　清・氏家　寛・
西川　浩・森分　隆・佐藤光源*・
大月三郎　（岡山大・医・神経精神，東北大・医・精神*）

51. 扁桃核キンドリングラットの扁桃核における興奮性アミノ酸受容体に連関する
イノシトールリン脂質代謝回転の変化——長期持続性及び刺激側・反対側別の検討 …… 175
秋山一文・山田了士・氏家　寛・西川　浩・
森本　清・佐藤光源*・大月三郎
（岡山大・医・神経精神，東北大・医・精神*）

52. キノロン系化学療法剤の痙攣発現機序に関する研究 …… 178
堀　誠治・島田甚五郎・宮原　正・
栗岡　晋*・松田　誠**
（慈恵医大・第二内科，機能研究室*，医化学**）

53. Putrescineおよび2−hydroxyputrescineのけいれん抑制作用について …… 181
中尾純治・能登　直・長谷川武史*・
中嶋照夫　（京都府医大・精神，GC−MS研*）

54. Muscimol 及びBaclofen のEl マウス脳内モノアミン代謝に対する影響について …… 184
加太英明・横井功・森昭胤
（岡山大・医・脳代謝研・機能生化）

55. Rolling Mouse Nagoya （RMN）の神経伝達物質受容体 …… 187
小野寺宏・高瀬貞夫・小暮久也・
織田銑一*・祖父江逸郎**
（東北大・医・神経内科，名古屋大・環境医研*，国立中部病院**）

56. ストレス曝露中の攻撃性の表出の有無とラット脳内ノルアドレナリン代謝 …… 190
田中正敏・津田彰・井田能成・白尾一正・
小口雅申・権藤雄二（久留米大・医・薬理）

57. 強制回転ストレスによるラット脳及び肝におけるβ－adrenergic receptor の変動 …… 193
中村豊紀・北山功・辻村良太郎・野村純一
（三重大・医・精神神経）

58. ストレス状況下での脳内各部位ドーパミンニューロンの経時的活動性変化における部位特性 …… 196
井田能成・田中正敏・Roth R. H. *
（久留米大・医・薬理，エール大・医・精神薬理*）

59. マウスMPTPパーキンソニズムにおけるストレスの影響 …… 199
浦上克哉・正木直子・竹島多賀夫・下田光太郎・
西川清方・高橋和郎（鳥取大・医・脳神経内科）

60. 生後ラット中枢コリナージックニューロンの培養とNGFの効果 …… 202
畠中寛・津久井弘子・武井延之・二本松伊都子
（三菱化成生命研）

61. マウス2.5 SNGFの培養神経組織に対する二つの異なった作用について …… 205
林謙一郎・野倉一也・小鹿幸生・山本正彦
（名古屋市大・医・第二内科）

62. 脳損傷修復因子（Cortical Injury-derived Factor, CIDF）の部分精製とその性質 …… 208
武井延之・丸山六三・津久井弘子・畠中寛
（三菱化成生命研）

63. 牛海馬由来神経細胞生存因子の部分精製 …… 211
吉田一成・高坂新一・本多利幸*・
細川斉子*・近藤淳*・長池一博*・
戸谷重雄**・塚田裕三
（慶応大・医・生理，三菱化成・総研*・慶応大・医・脳外**）

64. 大脳皮質神経細胞に対する大脳由来の神経栄養因子 …… 214
山形要人・郭哲輝・三木直正
（金沢大・がん研・薬理）

65. 神経成長因子の効果に及ぼすプロテインキナーゼ阻害剤（K−252a）の影響 …… 217
松田譲（協和発酵・東京研）

66. StaurosporineによるPC12細胞の神経突起伸長 …… 220
橋本誠一・萩野顕彦*（東北歯大・生化，生物*）

67. プロテアーゼ阻害剤のラット中枢神経系培養細胞に対する影響 …… 223
松井和隆・衛藤義勝・石井博*・
下条貞友**・宮原正**
（慈恵医大・小児，解剖*，第二内科**）

68. 培養神経細胞を用いたサイコシンの神経毒性に関する検討 …… 226
井田博幸・衛藤義勝（慈恵医大・小児）

69 3種類のNa，K−ATPase α鎖のmRNAが初代培養ラット中枢ニューロンに存在する …… 229
井上順雄・原諭吉*・中尾真*・
津久井弘子**・畠中寛**・松井英男
（杏林大・医・生化，東京医歯大・医・生化*，三菱化成生命研**）

70. 牛副腎髄質クロマフィン細胞の凍結保存——二次培養での細胞機能 …… 232
宮川洋二・小林恒之*・今泉美佳・
武井延之**・畠中寛**・熊倉鴻之助
（上智大・生命研，文・心理*，三菱化成生命研**）

71. シスプラチン封入リポゾームによる神経芽腫細胞の増殖抑制
—エンドサイトーシスによる選択的取り込み— …… 235
神尾善郎・宮谷真正・加藤浩・
伊藤仁一*・加藤泰治*・田中亮*
（藤田学園保衛大・医・小児外科，名古屋市大・医・生化*）

72. 神経系細胞における細胞表面局在型（ecto⁻型）ガングリオシド依存性
タンパクリン酸化酵素（ecto Gg kinase）の存在とその意義 …… 238
辻　崇一・山下達朗・中島淳子・永井克孝
（東京大・医・第二生化）

73. グルタチオンS－トランスフェラーゼ阻害剤添加により抑制される細胞の増殖 …… 241
千丈雅徳　（倶知安厚生病院・精神神経）

74. GA－1グリオーマ細胞と3T3L1脂肪細胞におけるS100蛋白質の遊離 …… 244
加藤兼房・鈴木富士子・小笠原信明・
加藤泰治*（愛知県コロニー研・生化，名古屋市大・医・生化*）

75. 培養ミクログリアのマクロファージ様機能 …… 247
澤田誠・錫村明生*・山本纊子*・
丸野内棣
（藤田学園保衛大・総医研・応用細胞，医・神経内科*）

76. ヒト脳2′，3′－環状ヌクレオチド3′－フォスフォジエステラーゼの
cDNAクローニング …… 250
栗原正・高橋康夫　（新潟大・脳研・神経薬理）

77. ニワトリ脳の発生過程に出現するタンパク質Drebrinの遺伝子構造と
その発現機構の解析 …… 253
児島伸彦・加藤幸雄*・白尾智明・
小幡邦彦　（群馬大・医・薬理，内分泌研・化学構造*）

78. ラットの発育過程における終脳内コレシストキニンとエンケファリン
前駆体メッセンジャーRNAレベルの変化 …… 256
相沢貴子・吉川和明　（都精神研・分子生物）

79. In situ hybridizationによるミエリン特異蛋白質遺伝子発現の組織学的解析 …… 259
塩田千代・三浦正幸・御子柴克彦（大阪大・蛋白研）

80. モノクローナル抗体により認識されるMAP2の神経細胞内分布 …… 262
山本彰夫・豊島至・正宗研・
佐武明*
（秋田大・医・第一内科，新潟大・脳研・神経化学*）

81. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)法
によるニューロフィラメントとマイクロチュブルとの相互作用の検討 …… 265
武田雅俊・Angelides K. J.*・鈴木英夫・
多田國利・播口之朗・西村　健
(大阪大・医・精神, ベイラー医大・生理*)

82. ニューロフィラメント重合のダイナミックスについて
—螢光標識を用いた重合度の経時的測定法— …… 268
武田雅俊・Angelides K.J.*・中村　祐・工藤　喬・
多田國利・橘口之朗・西村　健
(大阪大・医・精神, ベイラー医大・生理*)

83. ニューロフィラメント輸送に対するβ, β'—イミノジプロピオニトリル(IDPN)
の作用様式 …… 271
小宮義璋 (東京大・医・脳研・生化)

84. チューブリンの軸索内輸送機構—重合・脱重合平衡と安定型微小管 …… 274
田代朋子・小宮義璋・黒川正則
(東京大・医・脳研・生化)

85. ラット大脳シナプス接合部画分中の微小管付随タンパク質の同定 …… 277
鈴木龍雄・田中　亮・佐藤周子*
(名古屋市大・医・第一生化, 愛知県がんセンター・放射線*)

86. 培養中枢ニューロンの凍結保存 …… 280
飯島敏夫・松本　元・津久井弘子*・
畠中　寛* (電子技術総研, 三菱化成生命研*)

87. 培養下の海馬神経細胞における自発的Ca^{2+}濃度振動とシナプス活動 …… 283
小倉明彦・工藤佳久 (三菱化成生命研)

88. PC12細胞における神経成長因子の作用とGTP結合蛋白の役割 …… 286
小池達郎・高島明彦 (佐賀医大・化学)

89. 初代培養神経細胞の成長・分化に伴うβ—シトリル—L—グルタミン酸の変化 …… 289
三宅正治・森野日出緒*
(愛媛大・医・機器センター, 精神*)

90. α-シアロシルコレステロールの細胞膜への作用とラットグリア芽細胞の
DNA合成調節 …… 292
伊藤仁一・加藤泰治・阿部純子・田中　亮
(名古屋市大・医・第一生化)

91. PC12細胞のドーパミン放出におけるホルボルエステルの効果 …… 295
高島明彦・小池達郎 （佐賀医大・化学）

92. 単層培養アストログリアのニューロン突起伸展促進効果について …… 298
井端由紀郎*・高坂新一・吉田一成・戸谷重雄*・
塚田裕三 （慶応大・医・生理，脳外*）

93. ニューロン性細胞とグリア性細胞の96Kタンパク質リン酸化反応 …… 301
野路久仁子・加藤泰治・伊藤仁一・田中亮
（名古屋市大・医・第一生化）

94. ニワトリ胚の終脳胞神経細胞の生存と分化に関与する因子 …… 304
田口隆久・Changeux J. P. *・Henderson C. E. *
（大阪大・基礎工・生物工学，パスツール研*）

95. ウシガエルの視神経再生機構について …… 307
溝渕宗秀・八木康之*・水野有武・
松田誠* （慈恵医大・眼科，医化学*）

96. ヒト正常脳および脳腫瘍におけるtransthyretinの免疫組織化学的検索 …… 310
国塩勝三・白石哲也・三島宣哉・松海信彦・
田宮隆・本田千穂・松本健五・古田知久・
西本詮 （岡山大・医・脳外）

97. モノクロナール抗体Ki−67を用いたヒト脳腫瘍増殖動態の検討
— in vitro and in situ study — …… 313
白石哲也・国塩勝三・三島宣哉・松海信彦・
田宮隆・本田千穂・松本健五・古田知久・
西本詮・田淵和雄*
（岡山大・医・脳外，佐賀医大・脳外*）

98. ヒト脳腫瘍におけるインスリン様成長因子及び上皮成長因子受容体の発現について …… 316
栗原正紀・河野輝昭・森和夫・
Saavedra J.* ・Penar P.** ・Ferrandez L.**
（長崎大・医・脳外，エール大・医・神経薬理*，脳外**）

99. Ethylnitrosourea誘発脳腫瘍に発現したEGF−R関連抗原について …… 319
村上秀樹*・高松研・小山英樹*・
高坂新一・戸谷重雄*・塚田裕三
（慶応大・医・生理，脳外*）

100. 神経疾患における髄液中のＧＴＰ結合蛋白質Goのαサブユニット …… 322
村山知行・高橋　昭・浅野富子*・
加藤兼房*
（名古屋大・医・神経内科，愛知県コロニー研・生化*）

101. ラット脳におけるセロトニン刺激ホスホリパーゼＣの加水分解活性に
およぼすイミプラミンとリチウムの影響 …… 325
水田　正・今井千佳・瀬川富朗*
（明治乳業ヘルスサイエンス研・薬理，広島大・医・薬効解析*）

102. GABA$_B$受容体とCa^{2+}チャンネルおよびＧＴＰ結合蛋白の共軛について …… 328
大森敬之・西川正雄・田口淳一・栗山欣弥
（京都府医大・薬理）

103. ドパミンD_2受容体とＧＴＰ結合蛋白質の相互作用 …… 331
大原浩一*・芳賀達也・市山　新
（浜松医大・第一生化，精神*）

104. ムスカリン性アセチルコリン受容体とＧＴＰ結合蛋白質の
プロテインキナーゼＣによるリン酸化 …… 334
芳賀和子・芳賀達也・西山照正
（浜松医大・第一生化）

105. α_1－Adrenoceptor 刺激によるアラキドン酸放出とイノシトールリン酸生成機構 …… 337
宮本　篤・大鹿英世　（札幌医大・薬理）

106. プロスタグランジンE_1によるイノシトールリン酸放出に関する薬理学的研究：
受容体サブタイプの存在の可能性について …… 340
神庭重信・神庭靖子*・Richelson E.**
（慶応大・医・精神神経，東京女子医大・精神*・
メイヨークリニック・薬理**）

107. ブラジキニンや細胞内に注入したCa^{2+}とイノシトール三リン酸による
アセチールコリンの遊離：培養ＮＧ１０８－１５細胞－筋線維シナプスを用いての研究 … 343
東田陽博　（金沢大・がん研・薬理）

108. 脳のPolyphosphoinositides およびその水解による inositol trisphosphate
の簡便調製法 …… 346
今澤正興・奥村展枝・田口文子・宮本侃治
（国立精神神経センター・神経研）

109. オピオイドアンタゴニスト　ナロキソンによるラット脳発育の阻害 …… 349
鈴木良弘・足立皓岑（国立精神神経センター・神経研）

110. TetrapheylboronによるMPP^+（1−methyl−4−phenylpyridinium）
のシナプトソームにおけるエネルギー代謝阻害への増強 …… 352
相内敏弘・白根喜浩・松永雅美・中谷一泰
中村泰治・杵鞭宏育*・荒井裕一朗*
（昭和大・薬・生物化学，医・第二薬理*）

111. Central hypothermic effects of some analogues of 1−methyl
−4−phenyl−1, 2, 3, 6−tetrahydropyridine（MPTP）and
1−methyl−4−phenylpyridinium ion （MPP^+） …… 355
佐藤信範・米沢章彦・只野武・木皿憲佐・
豊島良枝*・荒井裕一郎*・杵鞭宏育*
（東北薬大・薬理，昭和大・医・第二薬理*）

112. ヨヒンビンによるラット脳内各部位のノルアドレナリン放出亢進作用
—ストレス反応との比較およびモルフィン，ナロキソン，ジアゼパム前投与の影響— …358
小口雅申・井田能成・津田彰・白尾一正・
田中正敏（久留米大・医・薬理）

113. ハロペリドールの亜急性，慢性投与後に認められるDA代謝回転の低下
ならびにDA遊離量の減少について …… 361
原尻慎一郎・山田茂人*・小島秀樹・
高木裕子*・堤哲之・三木浩司・
西山活二・西彰五郎*・稲永和豊
（久留米大・医・精神，脳研*）

114. Ceruletide 末梢投与によるラット線条体ドパミン放出抑制に対する
vagotomy の影響 …… 364
濱村貴史・風早靖子・秋元潔・原田俊樹・
藤原豊・大月三郎・佐藤光源*
（岡山大・医・神経精神，東北大・医・精神*）

115. 脳線条体切片からのDopamine 遊離の real-time monitoring と
その薬理学的応用 …… 367
片岡泰文・小泉修一・牛尾真寿子・
山本勝信*・熊倉鴻之助**・植木昭和
（九州大・薬・薬理，BAS*，上智大・生命研**）

116. ラット線条体における〔^{3}H〕－desmethoxyverapamil 特異結合のイオンによる変化とメトアンフェタミン断薬後における変化 …… 370
盛 政 忠 臣・岡 田 英 俊・金 行 孝 雄・庄 盛 敏 廉
（岡山大・医・脳代謝研・病態生化）

117. フェニールエチラミン尿中排泄に及ぼすメタンフェタミンの影響 …… 373
山 田 茂 人・小 島 秀 樹*・高 木 裕 子・
原 尻 慎一郎*・古 賀 照 邦・猪 口 隆 洋**・
西 彰五郎・稲 永 和 豊*
（久留米大・医・脳研，精神*，GC−MS研**）

118. 必須脂肪酸欠乏食飼育動物における methamphetamine 誘発逆耐性現象の変化と脳内アミンならびに脂肪酸組成の変動 …… 376
小 野 信 文・木 下 博・斎 藤 亮・神 谷 大 雄・
三 輪 博*・山 本 孫兵衛* （福岡大・薬・薬理，薬剤*）

119. Medial septal area の電気凝固によるアルツハイマー病のモデル動物 …… 379
山 崎 り つ・山 下 元 司・岡 田 理 之・高 橋 美 枝・
池 田 久 男 （高知医大・神経精神）

120. Twitcher mouse を用いてのリポゾームによる脳血液関門通過性の検討 …… 382
梅 沢 房 代・井 田 博 幸・伊 藤 文 之・衛 藤 義 勝
（慈恵医大・小児）

121. 脳スライス及びシナプトゾームにおける海産毒マイトトキシンのCa^{2+}チャンネルアゴニストとしての特性 …… 385
植 田 弘 師・田 村 滋 規・高 木 博 司・佐 藤 公 道
（京都大・薬・薬理）

122. ω－conotoxin 受容体の光親和標識 …… 388
阿 部 輝 雄・西 須 英 雄 （新潟大・脳研・神経化学）

123. 家兎骨格筋ジヒドロピリジン感受性Ca チャンネルのサブユニット構造 …… 391
高 橋 正 身*・Seagar M. J.・Jones J. F.・
Reber B. F. X.・Catterall W. A.
（ワシントン大・薬理，三菱化成生命研*）

124. ラット線条体，海馬および血小板への(−)−〔^{3}H〕－desmethoxyverapamil 特異結合に対するカルシウムの影響 …… 394
岡 田 英 俊・盛 政 忠 臣*・金 行 孝 雄*・
庄 盛 敏 廉*
（岡山血液センター，岡山大・医・脳代謝研・病態生化*）

125. ラット脳シナプトゾームにおけるK^+刺激による細胞内Ca^{2+}の濃度変化 …… 397
岡田三津子*・美根和典**・岩崎克典・
藤原道弘
（福岡大・薬・応用薬理，北九州津屋崎病院・心療内科*・
九州大・医・心療内科**）

126. Triton 処理した粗シナプス膜分画に，Ca^{2+}依存性に結合する蛋白質の精製 …… 400
宮本美也子・田中敏彦・岡部登志男・祖父江憲治
（大阪大・医・高次研・神経薬理生化）

127. PC12およびPC12D細胞のプロテオグリカンの解析 …… 403
仙波りつ子・大平敦彦*・佐野護**・
北島哲子**・柏俣重夫
（愛知県コロニー研・周生期，発生*，形態**）

128. ラット神経細胞の初代培養における突起形成と糖脂質との関連 …… 406
小木曽学・大田昌子・平野修助・野口鉄也
（東邦大・医・第二生理）

129 PC12h細胞に対するモノクロナール抗体と反応するフコース含有ガングリオシド …… 409
有賀敏夫・小林和夫・黒田洋一郎*・
宮武正**
（都臨床研，都神経研*，新潟大・脳研・神経内科**）

130. GM_1ガングリオシドに対するモノクローナル抗体の作製ならびにその生化学的性質 …… 412
岩田大二・佐藤若生・蔵本悦郎・島田静雄
（三井製薬・生科研）

131. 末梢神経のガングリオシド—運動・感覚神経のガングリオシド分子種の特徴— …… 415
小川希代子・安部浩司・藤原祐子・阿部敏明・
長島和郎*　（帝京大・医・小児，北海道大・医・病理*）

132. Chloroform-methanol 中におけるProteolipid protein の degradation …… 418
由村健夫・Agrawal D.*・Agrawal H. C.*
（九州大・医・脳研・神経内科，ワシントン大・医・小児*）

133. プロテオリピドアポ蛋白ペプチドによるマウス実験的アレルギー性脳脊髄炎 …… 421
遠藤真澄・国下龍英・田平武
（国立精神神経センター・神経研）

134. Shaking mutant pupにおけるPLP, DM_{20}発現異常：
PLP／DM_{20}発現比について …… 424
柳沢勝彦・Duncan I.D.*・Quales R.H.**
（新潟大・脳研・神経内科，ウィスコンシン大・医*，NIH**）

135. 正常及びStaggerer マウスにおける小脳特異的糖蛋白質（Con A結合性P_{400}）
の発現 …… 427
前田信明・新延道夫・御子柴克彦（大阪大・蛋白研）

136. マウス脳シナプトゾームの高親和性コリン取り込み系における阻害剤の構造特異性 …… 430
田丸政男・Roberts E.*
（藤田学園保衛大・医・生理，ベックマン研・神経生化*）

137. 摘出上頸交感神経節のコリン取り込み系 …… 433
岩田光良・田丸政男・永田豊
（藤田学園保衛大・医・生理）

138. ヒト脳内微小血管の生化学的検討 …… 436
辻輝之・中野智・越村邦夫・三森康世・
中村重信・亀山正邦*
（京都大・医・神経内科，住友病院*）

139. 先天性内分泌異常マウス下垂体VIPの変動と視床下部VIP …… 439
野口鉄也・杉崎哲朗・金松知幸
（東邦大・医・第二生理）

140. Luteinizing Hormone 分泌（とくにLH surge）に対する不確帯
—視床下部dopamine 神経系の関与 …… 442
平野均・水木泰・山田通夫・
平野誠*・松本孝*・内村英幸*・
中原辰雄**
（山口大・医・神経精神，国立肥前療養所*・九州大・理・化学**）

141. ドパミン終末作用薬によるラット線条体メチオニン—エンケファリン濃度の変化 …… 445
田中雅邦・盛政忠臣・金行孝雄*・
庄盛敏廉
（岡山大・医・脳代謝研・病態生化，岡山県立短大*）

142. モノアミン酸化酵素の新たな阻害剤 …… 448
直井信・永津俊治（名古屋大・医・第一生化）

143. Head-twitch inducer p－ハイドロオキシアンフェタミンによる
脳内MAO阻害作用 …… 451
荒井裕一朗・植田孝子・杵鞭宏育・
佐藤信悦*・佐藤信範*・只野武*・
木皿憲佐* （昭和大・医・第二薬理，東北薬大・薬理*）

144. チロシン水酸化酵素の活性調節機構――基質阻害の機構―― …… 454
奥野幸子・藤澤仁 （旭川医大・第一生化）

145. ダントロレンのラット脳トリプトファン水酸化酵素に及ぼす影響 …… 457
岡田尚志郎・筒井公子・庄盛敏廉
（岡山大・医・脳代謝研・病態生化）

146. 1－Methyl－4－phenyl－1，2，3，6－tetrahydropyridine（MPTP）
および1－methyl－4－phenylpridinium ion（MPP^+）によるミトコンドリア
呼吸機能の抑制 …… 460
水野美邦・曽根雄史*・斉藤智彦・
鈴木啓二 （自治医大・神経内科，生化*）

147. 1－Methyl－4－phenyl－1，2，3，6－tetrahydropyridine（MPTP）
の5HTに対する影響 …… 463
福田英俊・原健二・中村重信・
木村宏*・亀山正邦
（京都大・医・神経内科，滋賀医大・第二解剖*）

148. β－フェニルエチルアミン逆耐性現象におけるラット脳内各部位の
モノアミン及び代謝産物の変化 …… 466
黒木俊秀・松本孝・平野誠・堤哲之・
鹿子島裕士・八尾博史・内村英幸・
白石昭雄*・中原辰雄*・中村薫**
（国立肥前療養所，九州大・理*，医・精神**）

149. 2－ヒドロキシプトレスチンのGABOBへの代謝 …… 469
能登直・長谷川武史*・上村宏・
中尾純治・原田博之・中嶋照夫
（京都府医大・精神，同位元素研*）

150. ネコとマウスの網膜及び眼組織内における ornithine aminotransferase
（OAT）活性の分布 …… 472
加藤尚彦・堀田善裕*
（東京大・医・脳研・生化，順天堂大・医・眼科*）

151. ラット脳における〔^{3}H〕ヒスタミン結合部位とその性質について …… 475
小澤光一郎・瀬川富朗（広島大・医・薬効解析）

152. ラット線条体に対するカイニン酸の効果—Calcineurin 免疫染色および逆行性標識法による研究— …… 478
後藤恵・宮本英七*（熊本大・医・脳外，第一薬理*）

153. ラット脳シナプス膜標品中の〔^{3}H〕グルタチオン結合部位の性質 …… 481
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*）

154. 小脳におけるN—acetylaspartylglutamate の生理機能
—神経伝達物質またはシナプス修飾物質としての可能性の検討— …… 484
関口正幸・波間美佐子・岡本浩一（防衛医大・薬理）

155. 褐色脂肪組織の代謝に及ぼす交感神経の調節作用：非アドレナリン作働性物質の関与 … 487
箕越靖彦・斉藤昌之・嶋津孝
（愛媛大・医・第一生化）

156. ^{3}H—(−) Baclofen によるラット脳内のGABA$_B$受容体の性状について
—躁うつ病治療薬との関連を含めて— …… 490
本橋伸高・猪川和興*・中河原通夫・
假屋哲彦（山梨医大・精神神経，都立広尾病院・精神*）

157. 妊娠ラットのアルコール摂取が仔ラット脳に及ぼす影響—その生化学的研究 …… 493
小嶋久子・原田菜穂子・玉井洋一
（北里大・医・生化）

158. β—フェニルエチルアミン逆耐性発現ラットにおける線条体ドーパミン遊離の in vivo brain dialysis による検討 …… 496
堤哲之・松本孝・平野誠・黒木俊秀・
鹿子島裕士・八尾博史・内村英幸・
白石昭雄*・中原辰雄**・中村薫***・
稲永和豊****
（国立肥前療養所，九州大・理・生物*，化学**；医・精神***・
久留米大・医・精神****）

159. Brain Dialysis：無麻酔無拘束ラット脳線条体内におけるアセチルコリン放出の定量と神経科学的研究 …… 499
安島綾子・加藤武（東京工大・生命化学）

160. Methamphetamine 反復投与後のドーパミン自己受容体感受性及び cocaine との交又反応性——ラット脳内透析法による検討—— …… 502
風早靖子・秋元　潔・濱村貴史・藤原　豊・秋山一文・佐藤光源*・大月三郎
（岡山大・医・神経精神，東北大・医・精神*）

161. 虚血モデルラットにおける脳内コリン作動性神経系の生化学的変化 …… 505
熊谷善弘・松井嘉樹　（三共・生物研）

162. 報酬学習と逃避／回避学習におけるラット脳内ノルアドレナリン代謝の差異 …… 508
津田　彰・井田能成・白尾一正・小口雅申・田中正敏　（久留米大・医・薬理）

163. ラット条件回避学習におよぼす cyproheptadine の作用——セロトニン作動神経系の関与 …… 511
松本　明・九穂泰三・芝軒信次・石川紘一
（日本大・医・薬理）

164. マウスの回避学習に及ぼす dithizone の影響 …… 514
村上哲英・根本哲郎　（香川医大・生物）

165. α-リノレン酸の脳内脂質変化と学習行動変化 …… 517
野村正彦・玉井洋一*・奥山治美**・
（藤田学園保衛大・医・生理，北里大・医・生化*・名古屋市大・薬**）

166. 精製GABA$_A$／benzodiazepine 受容体複合体の再構成：$^{36}Cl^-$ influx による解析 …… 520
廣内雅明・田口淳一・栗山欣弥
（京都府医大・薬理）

167. 高親和性〔^{3}H〕Tryptamine 結合部位における酸性脂質の関与について …… 523
勢理客成史・斎藤道子・荻原政彦・石谷良一
（城西大・薬・薬理）

168. 骨格筋，心筋，平滑筋および脳の粗製膜分画における特異的〔^{3}H〕Nitrendipine または〔^{3}H〕PN200−110結合の性質：特に光照射による結合の不可逆性について …… 526
藤末　毅・正田篤弘・岡　弘章・松田成久・市田成志　（近畿大・薬・生物化学）

169. 骨格筋，心筋，平滑筋および脳の粗製膜分画における〔^{3}H〕(＋)PN200−110の特異的結合のphotoaffinity labeling …… 529
正田篤弘・藤末毅・岡弘章・松田成久・市田成志（近畿大・薬・生物化学）

170. 生化学的変化からみたラット線条体神経伝達調節におけるD_1およびD_2受容体の役割 …… 532
芝軒信次・石井豊・今村与志子・石川紘一・多田幸司*（日本大・医・薬理，精神神経*）

171. うつ病患者の血小板における^{3}H−Clonidine結合および^{3}H−Imipramine結合 …… 535
武田俊彦・原田俊樹・藤原豊・山本智之・大月三郎（岡山大・医・神経精神）

172. 哺乳動物線条体における^{3}H−GBR−12935結合部位とその特性 …… 538
白川治・三田達雄・西野直樹・花田進・中井隆・橋本健志・北村登*・平井みどり*・田中千賀子*（神戸大・医・精神神経，薬理*）

173. ラットのwet-dog shakes発現における脊髄5−HT_2受容体の関与 …… 541
越川憲明・Stephenson J. D.*（日本大・歯・薬理，イギリス精神研*）

174. MAM小頭症ラット脳におけるモノアミン量の増加とモノアミン受容体の変化 …… 544
松谷天星丸・永吉道子*・平田ゆかり・渡辺雅幸**・辰沼利彦**・小川加寿子***・間宮群二***（藤田学園保衛大・医・総医研，慶応大・医・生理*・防衛医大・精神**，第一生化***）

175. VIPによるTRHレセプターの調節——異なったセカンドメッセンジャー系の連関—— …… 547
小川紀雄・羽場久美子・曽良由起子・河田牧男（岡山大・医・脳代謝研・機能生化）

176. ストレスによるラット脳内ノルアドレナリン代謝回転亢進に対するエタノールの減弱効果 …… 550
白尾一正・井田能成・津田彰・辻丸秀策・佐藤洋美・小口雅申・権藤雄二・田中正敏・稲永和豊*（久留米大・医・薬理，精神*）

177. マウス松果体インドール化合物の日内変動について……553
東　均・八木昭彦・西村　健・
大和谷　厚*・和田　博*
（大阪大・医・精神，第二薬理*）

178. 乳頭体片側破壊の脳内ヒスタミンレベルにおよぼす影響……556
新川久義・大和谷　厚*・西村　健・
和田　博*・Cacabelos R.（大阪大・医・精神，第二薬理*）

179. Vasopressin-induced histamine response in the CNS.……559
Cacabelos R.・新川久義・大和谷　厚*・
福井裕行*・和田　博*・西村　健
（大阪大・医・精神，第二薬理*）

180. 高血圧短期運動療法実験モデルの検討：SHR（Spontaneously Hypertensive Rat）の血圧及び脳内モノアミン含量に及ぼすフリーランニングの影響……562
松井　啓・水野　智*岡村邦博・
野村正彦　（藤田学園保衛大・医・生理，新潟薬大・薬剤*）

181. 運動ニューロン疾患患者血清中に検出される抗脊髄蛋白抗体について……565
犬塚　貫・佐藤修三・柳澤勝彦・宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科）

182. PO蛋白と免疫系の蛋白との類似性について……568
植村慶一・鈴木　勝・坂本　安・田中早苗・
野村恭一*　（埼玉医大・第一生理，神経内科*）

183. 末梢神経疾患におけるPo蛋白抗体について……571
細川　武・野村恭一・濱口勝彦・坂本　安*・
植村慶一*　（埼玉医大・神経内科，第一生理*）

184. 中枢神経系に存在する強塩基性膜タンパク質：その精製と性質……574
石岡憲昭・栗岡　晋　（慈恵医大・機能研）

185. Formoguanamineによるヒナ盲目症：網膜B_6酵素アイソザイムの変化……577
小原嘉彦・松澤健夫*
（名城大・農・農化，藤田学園保衛大・医・第二生化*）

186. 老齢及び成熟ラットの脳内 superoxide dismutase 活性値及び
それらに及ぼす小柴胡湯合桂枝加芍薬湯の影響について …… 580
平松　緑・枝松　礼・河野雅弘*・
東原慶一・森　昭胤
（岡山大・医・脳代謝研・機能生化，日本電子・ＥＳＲ応用研*）

187. 脳グリコーゲン合成酵素の免疫組織化学的検討 …… 583
井上信博・後藤　恵・松角康彦・
宮本英七*　（熊本大・医・脳外，第一薬理*）

188. 高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器によるラット脳ミトコンドリアの
キヌレニン水酸化酵素活性の測定――肝臓との比較―― …… 586
平井久美子・植村富彦　（都精神研・神経化学）

189. 牛脳ゴルジ体画分中に存在する蛋白質燐酸化酵素について …… 589
宇佐美美穂子・門田朋子・門田　健
（都精神研・神経化学）

190. ラット大脳皮質からの内在性Acetylcholine 遊離の測定 …… 592
山西嘉晴・池田益啓・小笹貴史・山津清實
（エーザイ・筑波研）

191. 老齢ラット脳の choline acetyltransferase（ＣＡＴ）活性と
muscarinic acetylcholine（mACh）受容体に及ぼす
dihydroergotoxine（DHET）投与の影響 …… 595
羽場久美子・小川紀雄・高山晴彦*・
河田牧男・森　昭胤
（岡山大・医・脳代謝研・機能生化，第三内科*）

192. 局所投与したコリン毒ＡＦ６４Ａの長期効果の検討 …… 598
山下元司・山崎りつ・岡田理之・高橋美枝・
池田久男　（高知医大・神経精神）

193. ラット脳シナプトソームから放出されるＡＴＰについて …… 601
都築紀宏　（名古屋市大・医・生化）

194. 大脳皮質切片への〔^{3}H〕グルタミン酸取り込み機構の再評価 …… 604
米田幸雄・荻田喜代一　（摂南大・薬・薬理）

195. 伝達物質ＧＡＢＡの prodrug としての４－アミノブチルアルデヒド …… 607
朝倉　正・池田義孝・松田　誠
（慈恵医大・医化学）

196. Cyclic AMP およびグアニンヌクレオチドによるラット下垂体中葉細胞からの
α-メラノサイト刺激ホルモン（α-MSH）放出の調節 …… 610
山本敏文・古木義弘*・Kebabian J.W.*・
Spatz M.* （三菱化成生命研，NIH*）

197. オキシトシンニューロンのセロトニンおよびGABA性神経支配 …… 613
塩田清二・堀江繁・中井康光
（昭和大・医・第一解剖）

198. Elマウスの痙攣に伴なう脳内 neuropeptides の濃度変化
——Methionine-enkephalin と Vasoactive intestinal polypeptide
を中心に …… 616
金松知幸・平野修助 （東邦大・医・第二生理）

199. 熱侵害刺激に伴うラット後肢足蹠皮下灌流液中での substance P 遊離
および熱浮腫に対する opioids の影響 …… 619
米原典史・今井康夫・渋谷徹*・
猪木令三 （大阪大・歯・薬理，麻酔*）

200. ラット新生児酸素欠之症の脳内コレシストキニンニューロンに及ぼす影響 …… 622
山本秀子・山本敏文*・加藤武
（東京工大・生命化学，三菱化成生命研*）

201. 螢光法による Enzyme-linked immunosorbent assay を用いた
cholecystokinin-octapeptide sulfate の免疫活性測定
——Rat 線条体におけるキノリン酸破壊の影響—— …… 625
滝田正寿・加藤武 （東京工大・生命化学）

202. Capsaicin 処理による substance P の枯渇と自律神経反射機構 …… 628
高野行夫・永島亮・樋口義信・神谷大雄・
黒澤美枝子*・佐藤昭夫*
（福岡大・薬・薬理，都老人研・生理*）

203. 節前および節後神経切断後，鼠上頸部交感神経節内心房性Na利尿ペプチド
含量の変動 …… 631
戎弘志・小出直・田丸政男*・
藤田公和*・永田豊*
（福友会・研究室，藤田学園保衛大・医・生理*）

204. Reeler ミュータントマウスの複合糖質の生化学的解析 …… 634
森田規之・長谷純宏*・池中一裕・
御子柴克彦 （大阪大・蛋白研，理・化学*）

205. 脳ミクロソームにおけるC_{26}極長鎖脂肪酸合成の活性化機構 …… 637
斉藤寿仁・吉田敏・竹下正純
（大分医大・第二生化）

206. 脳ミクロソームの極長鎖脂肪酸伸長酵素活性調節における膜脂質の役割 …… 640
吉田敏・斉藤寿仁・竹下正純
（大分医大・第二生化）

207. 白鼠上頸交感神経節および迷走神経節の脂質組成 …… 643
原厚・武富保・岩田光良*・
安藤正人*・永田豊*
（信州大・医・心脈管研・脂質生化，藤田学園保衛大・医・生理*）

208. ニワトリ胚神経系におけるC系列ガングリオシド及び硫酸化グルクロン酸含有糖脂質の変動——モノクローナル抗体による解析 …… 646
小幡邦彦・平林義雄*・田中英明・
安藤進**
（群馬大・医・薬理，静岡県立大・薬・生化*，都老人研・生化**）

209. ラット脳内酸性および中性糖脂質に及ぼす母体性高Phe血症の影響 …… 649
原田寧・小木曽学・大田昌子・平野修助
（東邦大・医・第二生理）

210. 網膜萎縮症マウス網膜の変性とカルモデュリン …… 652
佐野護・北島哲子・大島章子
（愛知県コロニー研・形態）

211. カルモデュリンのin vitroおよびin vivoにおけるリン酸化の検討 …… 655
中村泰治・中条茂男・増田豊・中谷一泰
（昭和大・薬・生物化学）

1. ボツリヌス神経毒素による神経系膜蛋白質のＡＤＰ－リボシル化

松岡一郎・首藤文栄*・久保周一郎*
栗原堅三　（北海道大・薬・薬剤，獣*）

〔要　約〕

ラット副腎髄質由来の PC12 細胞の膜画分を [^{32}P]NAD存在下で、Ｃ1型あるいはＤ型ボツリヌス神経毒素と反応させると、分子量約 24kd の蛋白質がADP-リボシル化された。また、初代培養により得られた神経細胞を多く含むラット胎児脳細胞の膜画分では、分子量の異なる２種の蛋白質(26kd、25kd)が毒素によりADP-リボシル化された。さらに、種々の神経芽細胞腫（N-18, N1E-115, NS-20Y, NG-108-15）の膜画分では分子量約25kdのタンパク質が、ADP-リボシル化された。一方、C6グリオーマ細胞あるいは脳細胞の継代培養により得られたグリア細胞では、分子量約 24-25kdのタンパク質がADP-リボシル化された。

ボツリヌス神経毒素によるADP-リボシル化反応には、２価カチオンあるいはグアニンヌクレオチド(GTP, GTPγS)のいずれかが必要であった。また、Mg^{2+}存在下の ADP-リボシル化に対して、非水解性の GTPγS は強い阻害効果を示した。　これらの結果は、従来知られているＧs, Ｇi, Ｇo などとは異なる新たな GTP結合タンパク質が神経系に存在し、ボツリヌス神経毒素（Ｃ１およびＤ型）により修飾を受けて、毒素の生理活性が発現することを示唆する。

Key word：　ADP-ribosylation, Botulinum neurotoxin, GTP-binding protein.

Clostridium botulinum の産生するボツリヌス神経毒素は、末梢の運動神経に作用して AChの放出を阻害することが示されている (9)。さらに最近我々は、胎児脳細胞の初代培養系において、ボツリヌスＣ1 型毒素が神経細胞に特異的に結合し、細胞毒性を示すことを見いだした (7)。しかし、ボツリヌス神経毒素によるこれら生理活性発現の作用機序は、ほとんど明らかになっていない。

今回我々は、Ｃ1型およびＤ型ボツリヌス神経毒素が、Mg^{2+} あるいは、グアニンヌクレオチドに依存して、神経組織由来の細胞の膜画分に存在する分子量約 24-26kdのタンパク質を特異的にADP-リボシル化することを見いだした(8)ので報告する。

[材料と方法]

１）毒素：ボツリヌスＣ1型菌 Stockholm株、6813株、Ｄ型菌 south africa株および1873株由来の精製毒素（Cst、C6813、Dsaおよび D1873型毒素）を用いた(3)。

２）初代培養：妊娠16日目のラット胎児より大脳部位を取り出し、トリプシン処理により細胞を分散させた。ポリリジンでコートしたプラスチックシャーレに細胞をまき（2.5×10^5 cells/cm^2）、５％牛胎児血清（FCS）と５％馬血清（HS）を含むDMEM培地を用いて、8-10日間培養した。なお、培養 3-4日目にかけて 10 μM Ara-Cを加えてグリア細胞などの非神経細胞の増殖を抑制し、神経細胞の生存比を高めた(6)。

３）株細胞：ラット副腎髄質由来の PC12細胞およびラットグリオーマ、C6 細胞は、５％ FCS と ５％ HSおよび ２％新生仔牛血清と２％ HSをそれぞれを含むDMEM培地を用いて培養した。また種々の神経芽細胞種は５％ FCS含むDMEM培地を用いて培養した。

５）ADP-リボシル化反応：30 - 250 μg　蛋白を含む細胞ホモジネートまたは超遠心

(10,000 x g, 90 min)により得られた膜画分と0.1 - 1 μg の毒素を10 mM チミジン、2 mM EDTA、2 mM DTT、2 μM [^{32}P]NAD(0.5-2 uCi/tube)、20 mM Hepes-NaOH(pH 7.4)を含む総量 40 μlの反応液中、30°Cで反応させた。20 μlの 1 % SDSで反応停止後、SDS-PAGE (Laemmli法、12% ゲル)、オートラジオグラフィーにより解析した(8)。

[結果]

PC12 細胞の膜画分をDsa型ボツリヌス神経毒素と[^{32}P] NAD および 4 mM MgCl2 存在下で反応させると、毒素の応量および時間依存的に、分子量 約 24kdの単一のタンパク質が ADP-リボシル化された(Fig.1, lanes 4, 5)。一方、初代培養により得られた神経細胞を多く含むラット胎児脳細胞の膜画分においては、分子量の近接した2種のタンパク質(25kd、26kd)が毒素により ADP-リボシル化された(Fig. 1, lanes 6, 7)。種々の神経芽細胞種では、いずれも分子量約 25kdのタンパク質がADP-リボシル化された(Fig. 2)。また、C6グリア細胞あるいは胎児脳細胞の2次培養により得られたグリア細胞の膜画分においては、分子量約 24-25kdの1種類の蛋白のみがDsa毒素によりADP-リボシル化されたが、これら細胞における基質タンパク質の存在量は神経細胞と比較して少ないと推定された。

C6813型毒素もDsa型毒素と同等なADP-リボシル化活性を有していたが、Cst型毒素の活性は非常に弱く、A型毒素(和光純薬)およびD1873型毒素の活性は検出できなかった。

胎児脳細胞の 25kd,26kd 膜タンパク質のADP-リボシル化反応には、2価カチオン(Mg^{2+}、Ca^{2+})あるいはグアニンヌクレオチド(GTP,GTPγS)のいずれかが必要であった(Fig. 3, lanes 5, 6, 7)。また、Mg^{2+}存在下のADP-リボシル化反応に対して、非水解性の GTPγS は強い抑制効果を示した (Fig.3,lane 10)。PC12細胞の膜画分における

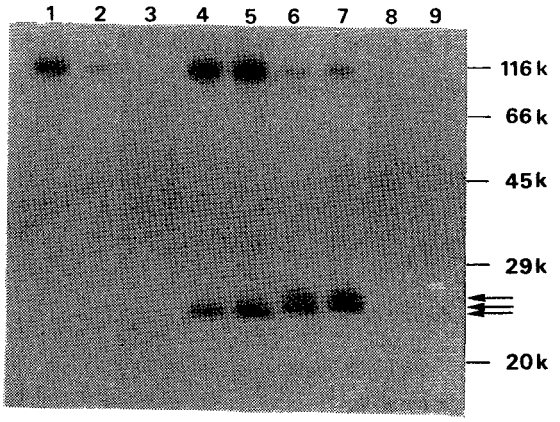


Fig. 1. Comparison of molecular weight of ADP-ribosylation substrates in membranes from different cell sources of rat. Membrane preparations of PC12 cells (70 μg protein; lanes 1, 4, 5), neuron-rich fetal brain cells (50 μg protein; lanes 2, 6, 7) and C6 cells (50 μg protein; lanes 3, 8, 9) were incubated without (lanes 1-3) or with 0.5 μg Dsa toxin (lanes 4-9) in the presence of 2 μM [^{32}P]NAD and 4 mM $MgCl_2$ for 30 min. The reaction mixtures corresponding to lanes 5, 7 and 9 contained 20 μM GTP instead of $MgCl_2$.

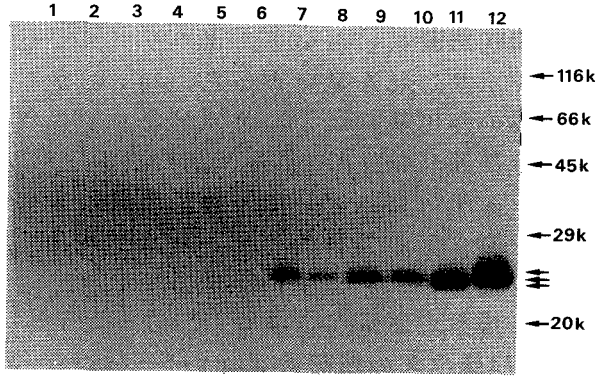


Fig. 2. ADP-ribosylation of 25 kd-protein in different clones of neuroblastoma cells. Membrane preparations of N-18 (120 μg protein; lanes 1, 7), N1E-115 (72 μg protein; lanes 2, 8), NS-20Y (82 μg protein; lanes 3, 9), NG-108-15 (120 μg protein; lanes 4, 10), PC12 cells (31 μg protein; lanes 5, 11), and detergent-extract of rat brain membrane (80 μg protein; lane 6, 12) were incubated without (lanes 1-6) or with 1 μg Dsa toxin (lanes 7-12) in the presence of 2 μM [^{32}P]NAD and 5 mM $MgCl_2$ for 90 min.

ADP-リボシル化反応の２価カチオンおよびヌクレオチドに対する挙動も胎児脳細胞におけると同様であった。

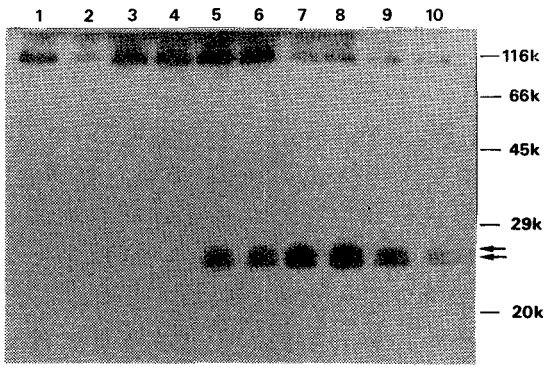


Fig. 3. Effects of $MgCl_2$ and nucleotides on the ADP-ribosylation of the Mr 24,000-26,000 substrates. Membrane preparations of neuron-rich culture of fetal rat brain cells (240 μg protein) were incubated without (lanes 1 and 2) or with 0.5 μg Dsa toxin (lanes 3-10) in the absence (lanes 1, 3-6) or presence of 4 mM $MgCl_2$ (lanes 2, 7-10) for 30 min at 37 °C. The reaction mixtures contained following nucleotides; 20 μM ATP (lanes 4, 8), 20 μM GTP (lanes 5, 9), 20 μM GTPγS (lanes 6, 10). The reaction mixtures also contained 2 μM [^{32}P]NAD.

[考察]

ジフテリア毒素、コレラ毒素、百日咳毒素などの細菌毒素が細胞膜あるいは細胞内の GTP 結合タンパク質を 特異的にADP-リボシル化して、毒素の生理活性を発現することはよく知られている。また最近、C. botulinum C型菌の産生するC2毒素が非筋性のアクチンを ADP-リボシル化することが示された(5)。これらの知見より、ボツリヌス神経毒素も同様な活性を有すると推定されている。

本研究において、ボツリヌス神経毒素がPC12細胞、胎児脳細胞あるいは種々の神経芽細胞種に存在する分子量約 24-26 kdのタンパク質を ADP-リボシル化することが見いだされた。ADP-リボシル化反応がMg^{2+}およびグアニンヌクレオチドに依存していることは、この反応の基質が GTP結合タンパク質であることを強く示唆する。このタンパク質は、既知の GTP結合タンパク質（Gs, Gi, Go, Gtなど；39-45 kd）や、最近報告されたC3あるいはD型毒素がADP-リボシル化する膜タンパク質(20-21kd)(1, 4)とは分子量的に異なっている。一方、各種ホルモンの分泌に対するグアニンヌクレオチドの影響が最近報告されており(2, 10)、本研究で見いだされた24-26 kdのタンパク質は、そのような分泌あるいは伝達物質放出機構に関与する新しいGTP結合タンパク質である可能性が高い。

[謝辞]

本研究を進めるにあたり御助言を頂いた、東京工業大学堅田利明先生並びに大阪府立大学大石巌先生に感謝いたします。

[文献]

(1) Aktories, K. et al. (1987) FEBS Lett. 212, 109-113.
(2) Bittner, M. A. et al. (1986) J. Biol. Chem. 261, 10182-10188.
(3) Oguma, K. et al. (1984) Infect. Immun. 43, 584-588.
(4) Ohashi, Y. & Narumiya, S. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1430-1433.
(5) Ohishi, I. & Tsuyama, S. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 136, 802-806.
(6) 松岡一郎ら (1984) 神経化学、24, 226-228.
(7) Matsuoka, I. et al. (1987) Jap. J. Med. Sci. Biol. 39, 32-33
(8) Matsuoka, I. et al. (1987) FEBS Lett. 216, 295-299.
(9) Simpson, L. L. (1981) Pharmacol. Rev. 33, 155-188.
(10) Vallar, L. et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 5049-5056.

2. ラット心室単離細胞におけるIslet-activating proteinによるADPリボシル化に対するcAMP依存性プロテインキナーゼ活性化の影響

渡辺康裕・岩倉克臣・今泉太郎・吉田　博
（大阪大・医・第一薬理）

〔要　約〕

ラット心室心筋のGTP結合調節蛋白(G)のIslet-activating protein (IAP)によるADP ribosylationに対するadenylate cyclase系活性化処置の影響を観た。ラット心筋単離細胞のβ-adrenergic agonistによるincubate、並びに、forskolin,dibutyryl cyclic AMPによるincubateにより、IAPによる分子量40-41Kの蛋白のADP-ribosylation量は減弱した。また、ラット心室単離細胞膜ホモジネートをMg^{2+} ATP存在下、cAMP-dependent protein kinase catalytic subunitにて処理を行うと、同様に減弱した。これらの結果から、細胞内cAMPの増加による、cAMP dependent protein kinaseの活性化が、ラット心室心筋細胞にて、GのIAPによるADP ribosylationを減弱させると考えられた。GTPγS存在下にて、IAPによるADP-ribosylation量の変化を観たところ、cAMP-dependent protein kinase処理にて、GTPγSによるADP-ribosylation量の減弱は増大した。この結果から、細胞内cAMPの増加、それに伴うcAMP-dependent protein kinase活性化は、Gi subunits 3量体のαi+βγへの解離を促進する可能性、並びに、adenylate cyclase刺激系と、adenylate cyclase抑制系等、他の共役反応系との間のinteraction機構の存在が示唆された。

Key word： Islet-activating protein, ADP-ribosylation, cAMP-dependent protein kinase

抑制性GTP結合調節蛋白質(Gi)のsubunit，αi、β、γは、3量体であるときに、Islet-activating protein (IAP)の触媒するADP-ribosyl transferase反応の基質となる。Goの場合も同様である。(1) 細胞膜Gi 3量体は、Mg^{2+}の存在下に非加水分解性guanylate nucleotide,GTPγSにより、GTPγS-αi,とβγに解離し、その解離は、細胞膜adenylate cyclase活性の抑制と連関する。(2) そこで、種々の条件下におけるIAPによるADP-ribosylation量の増減、並びに、GTPγSによるADP-ribosylation量の変動を観察した。本研究では、ラット心筋単離細胞等を用いて、l-isoproterenolによるincubate, forskolin, dibutylyl cyclic AMP incubate等、adenylate cyclase系の活性化が、それらに、如何なる影響をもたらすかを検討した。

方法）

<u>試料調製</u>　Wisterラット心室を、0.32M庶糖液中でホモゲナイズし、7000G,30分間、上清を100000g,60分間,遠沈し、沈渣を心室膜分画として用いた。または、ラット摘出心臓を、ランゲンドルフ灌流装置を用いて0.06%コラゲナーゼ液にて処理し、心室単離心筋細胞を得、その膜分画を調製した。

<u>ADP-ribosylationの観察</u>　心室膜蛋白、または単離心筋細胞膜分画を、1mM ATP, 10mM thymidine,1mM EDTA,$MgCl_2$ 1.1～5mMを含むtetraethylammonium buffer (50mM, pH 7.4),中で^{32}P-NAD, 1μM,(42Ci/mmol)、IAP(2μg/ml)と、25℃で反応させ、Laemmli(3)のsample bufferに懸濁後、SDS-pageを行い、autoradiographyにて得た40-41 Kのbandの吸光度を、densitometer（島津2波長 chromatoscanner,CS-930）にて測定し、IAPによるADP-ribosylation量を観察した。

結果と考察

心筋単離細胞膜分画におけるIAPによるADPリボシル化のtime course　図1に示すように、心室myocyte膜分画におけるIAPによるADPリボシル化は、反応時間60分間まで直線的に増加し、90分間の時点にて、新たなIAP、又は、^{32}P NADを加えても、ADPリボシル化は、増大せず、反応時間90～120分にて,IAPによるADP-ribosylation化はほぼ飽和に達したと考えられる。

心室膜分画、並びに心室myocyte膜分画のIAPによるADP-ribosyl化を行うと、本実験条件下では、40-41 Kの1本のbandが観察され、ラット心筋での他の報告と同様に、GiのADP-ribosyl化が生じたと考えられる。

β-agonist preincubationの影響　単離心筋細胞を、l-isoproterenol(10^{-5}M, ISO)と37℃30分間incubate後、膜分画を調整し、IAPによるADPリボシル化を行った。図2に示すように、反応時間60分間では、ISO前処置にて、IAPによるGのADP-ribosylation量は抑制された。この際、^{3}H-CGP12177(β-adrenergic antagonist)を用いた結合実験を行うと、その結合部位は約60%に減少し、β-受容体のdown regulationが生じていた。

dibutyryl cAMP、並びにforskolin処置の影響　β-agonist前処置にて、IAPによるGのADPリボシル化の減弱が、β-receptorのdown regulationにより生じたものであるか、細胞内cAMPの増加による結果であるかを観るために、forskolin 100μM、並びに、DBcAMP 1mMにて、単離心筋細胞を30分間37℃ incubate後、そのホモジネートを調製し、IAPによるADPリボシル化を観た。図3に示すように、反応時間120分間にて、IAPによるGのADPリボシル化は、それらの前処置(DBcAMP,forskolin treatment)にて減弱していた。以上より、細胞内のcAMP増加により、IAPによるGのADPリボシル化が減弱したと考えられた。

cAMP-dependent protein kinase処理の影響　次に、cAMP-dependent protein kinaseのcatalytic subunit (PKA・C)と、心筋単離細胞膜をMg^{2+} (4～5mM)、ATP1mM存在下にてincubateし、その影響を観た。(図4) 図に示すように、PKA・C処理により、IAPによるADPリボシル化は減弱した。

GTPγSによる効果　単離心筋細胞膜分画を、$MgCl_2$存在下、GTPγSにて25℃15分間incubateすると、図5に示すように、IAPによるADPリボシル化は減弱した。30分間incubateも同程度の減弱を示した。又、$MgCl_2$の濃度が大となると、IAPによるADPリボシル化は減弱し、また、そのGTPγSによる減弱は増大した。

GTPγS効果に対するPKA・C処置の影響　ラット心室膜分画を、PKA・C処置後、GTPγSによるIAP,ADPリボシル化減少に対する効果を観た。PKA・Cのactivatorである高濃度のDTT存在下では、$MgCl_2$ 4mM存在下でもGTPγSによる減弱は弱くなるが、PKA・C添加をすると、GTPγSによるIAP・ADPリボシル化の減少は増大した。一方、膜分画をGTPγSにより前処理した後、PKA・Cにて処理しても、GTPγSによるADPリボシル化の減弱は増大しなかった。この結果は、PKA・CによるGに対する効果は、G蛋白のsubunit3量体がGTPγSにて解離されると生じない可能性、並びに、PKA・C処理が、Gの3量体から、α+βγへの解離を促進する可能性を示すと思われる。

以上の結果から、ラット心室心筋細胞に於て、adenylate cyclase系が活性化され、細胞内cAMPが増加し、cAMP-dependent protein kinaseが活性化される時に、阻害性GTP調節蛋白のsubunits(α, β, γ)が、リン酸化され、その結果、IAPによるGiのADP-ribosylationが抑制されたと考えられる。GTPγSによるADP-ribosylationの抑制がprotein kinase A のcatalytic subunit処理により増強されたことは、Giのsubunitsのリン酸化が、Gの subunit間の解離を促進する可能性を示唆する。ラット心筋細胞において、阻害性受容体(muscarinic R, adenosine R) adenylate cyclase系等と、β受容体等を介したadenylate cyclase活性化系間において、Giを介したinteractionの可能性が示唆された。

REFERENCE
1.Katada,T.,Oinuma,M. and Ui,M.(1986) J.Biol.Chem.261,8182-8191
2.Katada,T.,Northup,J.K.,Bokoch,G.M., Ui,M. and Gilman A.G.(1984) J.Biol.Chem.259,3578-3584
3.Laemmli,U.K. (1970) Nature 227,680-685

Fig.1

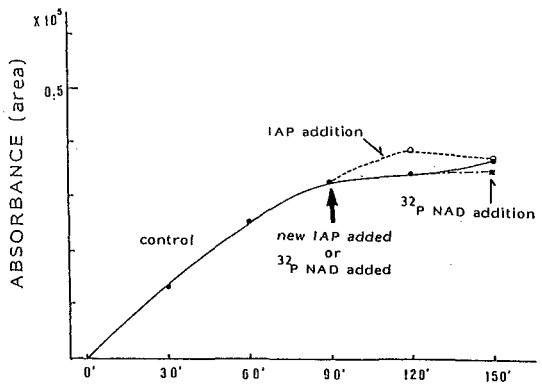


Fig.5

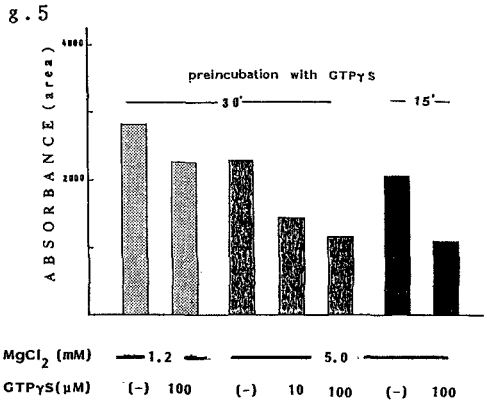


Fig.2

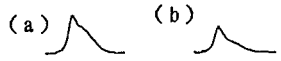


Fig.3

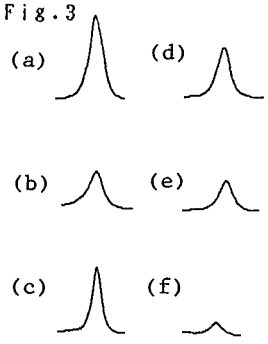


Fig.4

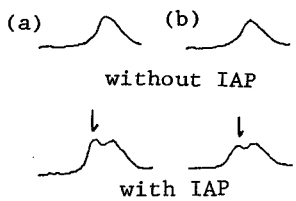


Fig.1

The time course of ADP-ribosylation by IAP on 40-41 K protein. The ADP-ribosylation reaction was started with addition of IAP and ^{32}P-NAD. At reaction time of 90 min., new additional IAP or ^{32}P-NAD was added into the reaction mixtures. The ordinate shows the area of the absorbance of the band 40-41 K protein in the autoradiographied film, estimated by the chromatoscanner (wavelength 500nm).

Fig.2

The effect of pretreatment with β-adrenergic agonist on the ADP-ribosylation by IAP. The rat heart ventricular myocytes were incubated with l-isoproterenol(10 μM) for 30 min. at 37℃ . Then ADP-ribosylation by IAP and ^{32}P-NAD (25℃, for 120 min.) and autoradiography was carried out. (a) : control, (b) : treated with l-isoproterenol. The ordinate shows the absorbance of the 40-41 K band which was estimated with chromatoscanner.

Fig.3

The effects of pretreatment with db-cAMP and forskolin. The rat heart ventricular myocytes were incubated with 1 mM db-cAMP or 100 μM forskolin for 30 min. at 37℃. Then, ADP-ribosylation by IAP (120 min. 25℃) was observed as written in Fig.2. (a,d) : control, (b,e) : treatment with db-cAMP, (c,f) : treatment with forskolin. (a,b,c) : without GTPγS, (d,e,f) : with GTPγS 100 μM in the ADP-ribosylation reaction mixtures.

Fig.4

The effect of addition of cyclic AMP dependent protein kinase catalytic subunit. The membrane fractions of rat heart ventricular myocytes was ADP-ribosylated for 120 min. at 25℃ with IAP and ^{32}P-NAD in the absence (a) or presence (b) of PKA-catalytic unit(50-100 units/tube).

Fig.5

The effects of Mg^{2+} and pretreatment time with GTPγS on ADP-ribosylation by IAP. The membrane fraction of heart ventricular myocytes was pretreated with GTPγS 10 μM, 100 μM for 15 min. or 30 min. at 25℃. and then ADP-ribosylation reaction by IAP was carried out for 120 min. at 25℃. The ordinate shows the area of absorbance of the band 40-41 K.

3. ラット終脳α_2-アドレノセプター，ＧＴＰ結合蛋白およびその共役活性の発生・発育変化

北　村　佳　久・野　村　靖　幸　　（北海道大・薬・薬効）

〔要　約〕

中枢α_2-レセプター，ＧＴＰ結合蛋白およびその共役機構の発生・発育変化について，[^{3}H]クロニジン結合，百日咳毒素あるいはコレラ毒素によるＡＤＰリボシル化，ＧＴＰ結合蛋白（Goα，　Gβ）に対する抗血清を用いたイムノアッセイによって検討した。

１）α_2-レセプター，Ｇｉ/Ｇｏのαサブユニット，β_{36}サブユニットの密度は，胎仔 16 日から発育とともに増加し，生後約４～８日で成熟レベルに達した。

２）Ｇｓのαサブユニットは，生後約 12 日をピークに成熟期で胎仔期レベルまで低下した。

３）β_{35}には，著しい発育変化は認められなかった。

４）α_2-レセプターへの高親和性[^{3}H]クロニジン結合に対するMn^{2+}の増加効果は，発育とともに増加した。

５）α_2-レセプターへの高親和性[^{3}H]クロニジン結合に対するＧＴＰγＳの減少効果は，対照群の約 35 % を示し各発育期において一定であった。

以上のことから，α_2-レセプター，Ｇｉ/Ｇｏ密度の増加にともなって，α_2-レセプター・Ｇ蛋白の共役活性も増加すると推定された。

Key word：　α_2-Adrenoceptor, GTP-binding proteins, Development

Ｉ．　緒言

我々は，中枢α_2-アドレノセプターへのリガンド結合調節に百日咳毒素感受性ＧＴＰ結合蛋白（Ｇ蛋白，おそらくＧｉ）が関与し（１），このレセプターへのＧ蛋白共役は，Na^+やグアニンヌクレオタイドにより抑制，Mn^{2+}により促進され（２），さらにこの共役にはＧ蛋白のα－サブユニットのシステイン残基が関与していること（３），本レセプターのアゴニスト刺激はＧ蛋白を介してアデニル酸シクラーゼ活性を抑制すること（４），またクロニジンによるα_2-レセプターを介した鎮静（運動量減少）作用にもこのＧ蛋白が関与していること（５）をこれまでに報告してきた。今回は，胎仔16日から生後約70日のラット終脳におけるＧ蛋白密度の変化とともにα_2-レセプターとＧ蛋白の共役活性の変化を検討した。

Ｉ Ｉ．　方法

(i) レセプター・Ｇ蛋白標本：　ウィスター系雌雄ラット（胎仔16日～生後約70日）の終脳（皮質，海馬，線条体）を 0.32 M ショ糖を含む緩衝液（10 mM トリス，１μg/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。得られた沈渣を同緩衝液で３回洗浄したものをレセプター・Ｇ蛋白標本とした。

(ii) 結合実験：　レセプター・Ｇ蛋白標本（約 300μg 蛋白量）と 0.5 nM あるいは 15 nM [^{3}H] クロニジンおよび 10 μM GTPγS，1 mM $MnCl_2$ 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。　インキュベート後 GF/B フィルター上に吸引沪過し，洗浄後フィルター上の放射活性を測定した。

(iii) 百日咳毒素およびコレラ毒素処置：　レセプター・Ｇ蛋白標本（50μg 蛋白量）を10μM [^{32}P] ＮＡＤ，10μg/ml百日咳毒素あるいは 100μg/mlコレラ毒素存在下ＡＤＰ－リボシル化し Laemmli の方法（６）に準じてＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）を行なった。その後ＡＤＰ－リボシル化された蛋白の放射活性を測定した。

(iV)Ｇ蛋白の抗血清の作成およびイムノアッセイ：　ブタ大脳皮質から精製した Gi/Goおよび　βγ－ダイマー

を BALB/c マウスに免疫した。得られた抗血清は，Goα＞ Gβと認識するM2と，Gβのみを認識するM3で，これらはブタ脳，ウシ脳，ラット脳のいずれをも同様に交叉反応した。蛋白量50μg の標本をSDS－PAGE後，ニトロセルロース膜にウェスタンブロットした。このニトロセルロース膜を 1% 牛血清アルブミンでブロッキング後，抗血清M2あるいはM3と1～2時間インキュベートさらに HRP標識抗マウス IgGと1時間インキュベートし，4-クロロ-1-ナフトールで発色させたのちデンシトメーターで定量した。

III．結果

[^{3}H]クロニジン結合は，10 nM 以上でその結合が飽和した。また0.5 nMの時の結合は，$MnCl_2$，GTPγSで影響されたことより 15 nMの時の結合をレセプター密度とみなし，0.5 nMの場合の結合を高親和性結合の結合活性とみなした。15 nM のクロニジン結合（レセプター密度）は，胎仔16日から高くなり，生後4日で成熟期のレベルに達した(Fig. 1)。0.5 nMクロニジンの結合（高親和性結合）に対し，$MnCl_2$ の増加効果は1 mMで最大になり，GTPγS の抑制効果は10μM で最低となった。クロニジン結合に対する 1 mM $MnCl_2$ の増加および増加率はともに，発育にともなって増加した。一方，10μM GTPγS の結合抑制効果は発育とともに強められたが，抑制率は，約 65 % と一定であった(TableI)。百日咳毒素によってADP－リボシル化される蛋白（Gi/Go のαサブユニット）の密度は，発育とともに増加し，生後 12 日で成熟レベルに達した（Fig. 2）。（なお，コレラ毒素によってADP-リボシル化されるGs のαサブユニット密度は，生後12日で最大となるが，その後減少して，成熟期では胎仔レベルにまで減少した（データ省略））。次にGi/Go およびβγを抗原として得られたマウス抗血清M2（Goαと強く反応）およびM3（Gβとのみ反応）を用いてGoαおよびGβを定量した。Goαおよびβ_{36}（分子量36 Kのβサブユニット）密度は，生後4～8日で成熟レベルに達したが，β_{35}（分子量 35 K のβサブユニット）密度は著しい変化は認められなかった（Fig. 3）。

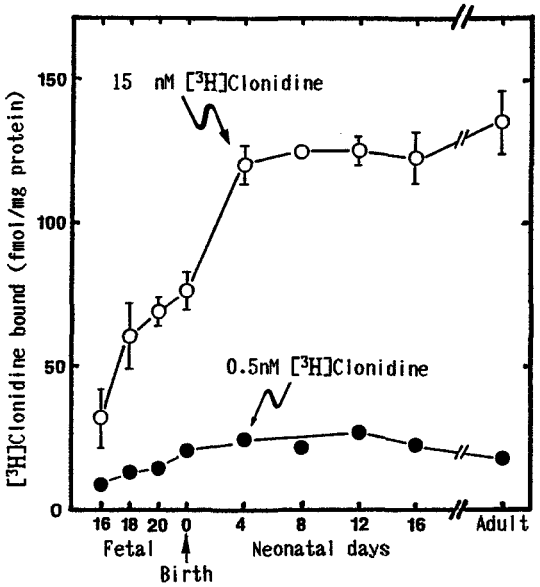


Fig. 1. Developmental changes in the [^{3}H]clonidine binding.

Table I. Developmental changes in Mn^{2+}-induced increase & GTPγS-induced decrease of [^{3}H]clonidine binding in telencephalon.

Age* (n)	Vehicle Bound**	1mM $MnCl_2$ Bound	1mM $MnCl_2$ Increase (%)	10 μM GTPγS Bound	10 μM GTPγS Decrease (%)
F 16 (1)	8.7	10.1	1.4 (16)	3.6	5.1 (59)
F 18 (3)	13.2±0.5	15.7±0.8	2.5 (19)	4.5±0.5	8.7 (66)
F 20 (3)	13.5±0.3	16.4±0.2	2.9 (21)	4.3±0.4	9.2 (68)
N 0 (3)	20.4±0.3	26.3±0.8	5.9 (29)	7.4±0.9	13.0 (64)
N 4 (3)	24.3±0.7	32.3±0.6	8.0 (33)	10.1±0.9	14.2 (58)
N 8 (3)	21.5±0.6	29.7±1.3	8.2 (38)	6.6±0.3	14.9 (69)
N 12 (3)	27.0±0.2	39.6±0.7	12.6 (47)	10.4±2.2	16.6 (61)
N 16 (3)	22.6±0.7	33.3±1.7	10.7 (47)	7.9±0.7	14.7 (65)
Adult (3)	18.0±0.6	30.3±0.3	12.3 (68)	6.4±0.3	11.6 (64)
					(63.8±1.3)

*F, Fetus; N, Neonatal.
**Bound, increase & decrease are expressed as fmol/mg prorein.

IV． 考察

今回，ラット終脳のα_2-レセプター，Gi/Go，とくにそのα，βサブユニット密度の発育途上における変化を各エージにおいて，それぞれ[^{3}H]クロニジン結合，百日咳毒素によるADP－リボシル化，Goα，Gβに対する抗血清を用いたイムノアッセイなどから検討した。その結果，α_2-レセプター，Gi/Go のαサブユニット密度は発育ともに増加することがわかった。一方，βサブユニットは分子量 35 K と 36 K に分れることが見い出

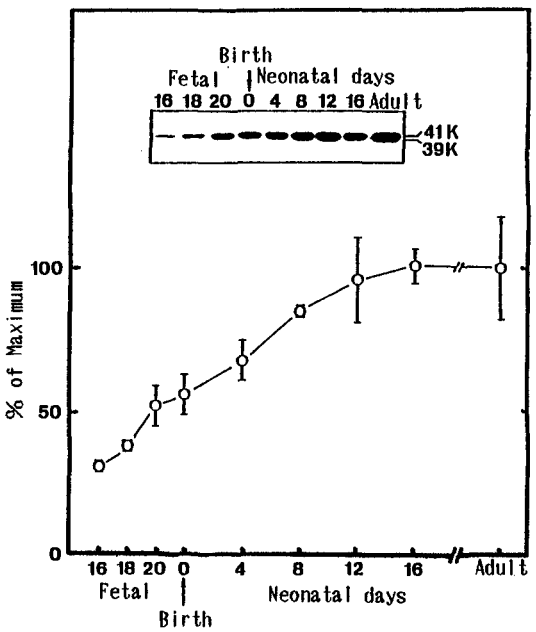


Fig. 2. Developmental changes in ADP-ribosylation of Gi/Go by pertussis toxin

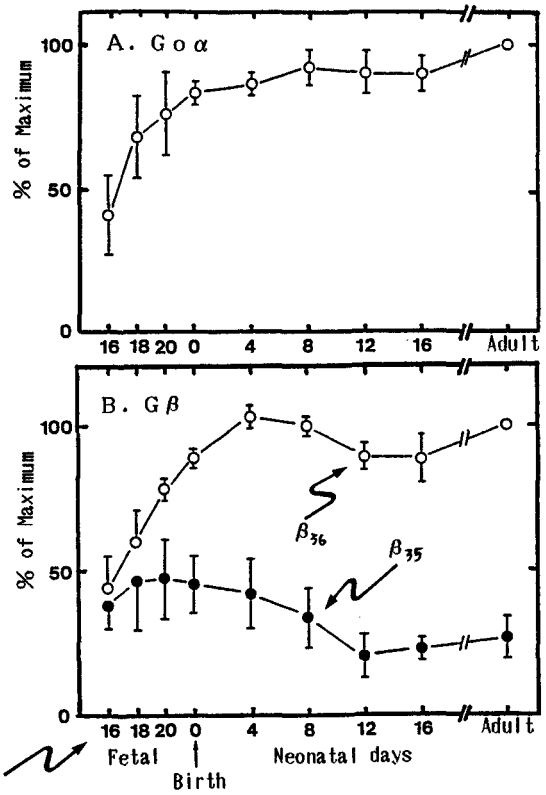


Fig. 3. Immunoblot assay of the subunits of GTP-binding proteins.

され，かつ両者の発育変化に差が認められた。すなわちβ_{35}は著しい変化はなく，β_{36}は発育とともに増加した。β_{35}，β_{36}のアデニル酸シクラーゼ抑制活性は同程度であることの他の機能的意義は不明であるが、発育に差が認められた点，興味深い。また，$MnCl_2$添加による[^{3}H]クロニジン結合増加は発育に伴い増加した。Mn^{2+}は，α_2-レセプター・Gi/Go共役を促進することにより[^{3}H]クロニジン結合増加作用を示すと考えられる（2）ので，本成績はレセプター・Gi/Go共役活性がエージによって促進されることを示唆する。最近，ヒヨコ心臓におけるムスカリン性レセプター，百日咳毒素感受性G蛋白およびカルバミルコリンによるアデニル酸シクラーゼ抑制活性が，平行して発育変化をすることが報告された（7）。なお，GTPγSによる[^{3}H]クロニジン結合抑制にはエージによる差が認められなかった。さらに，コレラ毒素によるADP-リボシル化の方法によりGsのαサブユニットの発生・発育変化も検討したところ，GsαはGi/GoのαサブユニットとI異なる発育変化を示すこともわかった。

V. 謝辞

G蛋白のサブユニットに対する抗血清の作成に関し御助言，御協力くださいました基生研・形態形成の江口吾朗教授，渡辺憲二助教授，児玉隆治博士に感謝致します。

VI. 参考文献

(1) Nomura,Y., Kitamura,Y. and Segawa,T. (1985) J. Neurochem. 44, 364-369.

(2) Nomura,Y., Kawai,M., Mita,K. and Segawa,T. (1984) J. Neurochem. 42, 1240-1245.

(3) Kitamura,Y. and Nomura,Y. (1987) J. Neurochem. in press.

(4) Kitamura,Y., Nomura,Y. and Segawa,T. (1985) J. Neurochem. 45, 1504-1508.

(5) Nomura,Y., Kawata,K., Kitamura,Y. and Watanabe,H. (1987) Eur. J. Pharmacol. 134, 123-130.

(6) Laemmli,U.K. (1970) Nature 227, 680-685.

(7) Liang,B.T., Hellmich,M.R. Neer,E.J. and Galper,J.B. (1986) J. Biol. Chem. 261, 9011-9021.

4. ラットにおけるＧＴＰ結合タンパク質Goの加齢に伴なう濃度変化

浅野富子・仙波禮治*・加藤兼房
（愛知県コロニー研・生化，周生期*）

〔要　約〕

ＧＴＰ結合タンパク質Ｇｏの加齢に伴う濃度変化をラットの脳、心臓、腸管、および肝臓について、免疫化学的および免疫組織化学的方法により検討した。

１）脳においてＧｏのαサブユニット（Ｇｏα）は胎生期より上昇し続け、大脳では生後約20日でほぼ成獣のレベルに達する。一方、小脳では徐々に上昇をし、大脳より遅い発達を示した。

２）βγサブユニットについて同様に測定すると、Ｇｏαと並行した上昇が見られた。幼若ラットの脳ではＧｏαとβγがほぼ同量であるが、成獣に近づくに従ってβγの濃度が高くなった。

３）Ｇｏαは心臓と腸管では生後０日から20日頃まで成獣より数倍高い濃度を示し、その後低下したが、肝臓ではほぼ一定の値であった。

４）Ｇｏαの局在を免疫組織化学的に検討すると、腸管では成獣と同様神経組織が主に染色された。一方、心臓では心筋が染色され、成獣とは異なる局在を示した。幼若ラット心臓のＧｏαの免疫活性をイムノブロット法で検討すると脳のＧｏαと一致したバンドのみが染色された。

Key word： GTP-binding protein, Immunoassay, Ontogeny

Ｇｏは細胞膜受容体と連関するＧＴＰ結合タンパク質（Ｇタンパク）の１つであるが（４）、その機能はまだ解明されていない。我々は、Ｇｏのαサブユニット（Ｇｏα）に対する抗体を作製し、これを用いて高感度エンザイムイムノアッセイ（ＥＩＡ）系を確立し（１）、Ｇｏαのラットにおける生体内分布を免疫化学的および免疫組織化学的に検討した結果、Ｇｏαは主に神経組織に存在し、神経内分泌細胞（５）またはパラニューロン（３）と呼ばれる細胞にもわずかに存在することを明らかにした（２）。今回、ラット脳の加齢に伴うＧｏαの濃度変化を検討したが、最近βγサブユニットに対するＥＩＡ系も確立したので合わせて測定した。また、胎生17日目のラットの免疫組織化学的検索で神経組織やパラニューロン以外に心臓が染色されることを見いだしたので、Ｇｏαの加齢に伴う濃度変化を心臓、腸管、肝臓についても検討した。

［実験方法］

Ｇｏαおよびβγに対する抗体およびＥＩＡ系作製：　ウシ脳Ｇｏαおよびβγサブユニットは既報の方法（１）で精製し、それぞれアジュバントとともにウサギに注射し、抗血清を得た。精製抗Ｇｏα抗体およびそれを用いたＥＩＡ系は既報の方法（１）で作製した。組織抽出液の調製およびＥＩＡ：　胎児および各日齢のWistarラットの脳、心臓、腸管、肝臓を取り出し、-80°Cで保存した。各組織は4.5倍量の20 mM Tris-HCl (pH7.5)/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1Mになるように加え、全量を10倍量とした。再びホモジナイズ、ついで超音波処理し、100,000xg、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(pH7.0)／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10倍（脳は200倍）に希釈後、その10μlをGoαおよびβγの測定系に加えた。GoαのEIAは既に報告した方法（1）で行い、βγについても同様に行った。イムノブロッティング：　サンプルをSDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）の後、ニトロセルロース膜に転写、精製抗Goα抗体と反応させ、次いで［^{125}I］protein Aを用いオートラジオグラフィーをおこなった。免疫組織化学的検索：　精製抗体を用いた酵素抗体間接法にて行った。

［実験結果］

図1は脳におけるGoαおよびβγの加齢に伴う濃度変化をg組織重量あたりで示したものである。胎生17日目と生後0日目は全脳を、以後は大脳と小脳に分けて測定した。Goαは胎生期より上昇し続け、大脳では生後約20日で成獣のレベルに達する。一方、小脳では徐々に上昇し、大脳より遅い発達を示した。同一サンプルでβγサブユニット量を測定すると、Goαとほぼ並行した上昇が見られた。幼若ラットの脳ではGoαとβγの濃度がほぼ同じであるが、成長と共にβγ量が多くなり、成獣の大脳の場合約50%程βγの方が高い値を示した。

一方、末梢組織におけるGoαの変化を腸管、心臓、肝臓について調べた結果を図2に示した。脳とはまったく異なるパターンで、心臓と腸管では生後0-20日頃まで成獣より数倍高い値を示し、その後成長と共に低下した。一方、肝臓ではほとんど変化が見られなかった。免疫組織化学的検索で腸管は幼若ラットでも主に神経組織が、染色され、成獣と同じ傾向を示したが、心臓は心筋が染色され、成獣には見られない局在

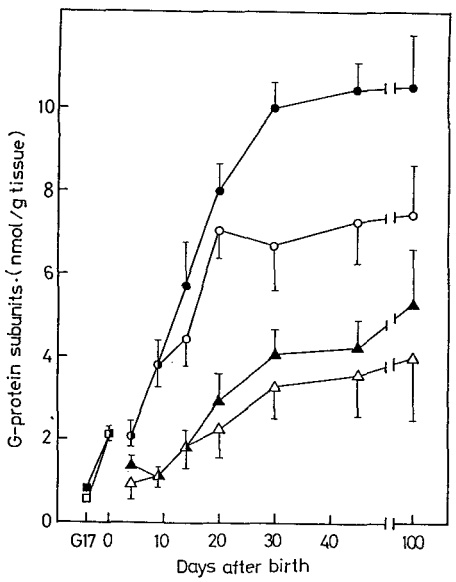


図1　ラット脳におけるGoαとβγサブユニットの加齢に伴う濃度変化
□、■；全脳、　○、●；大脳、
△、▲；小脳、　□、○、△；Goα、
■、●、▲；βγサブユニット
値は5匹のラットの平均値±SD
G17は胎生17日目

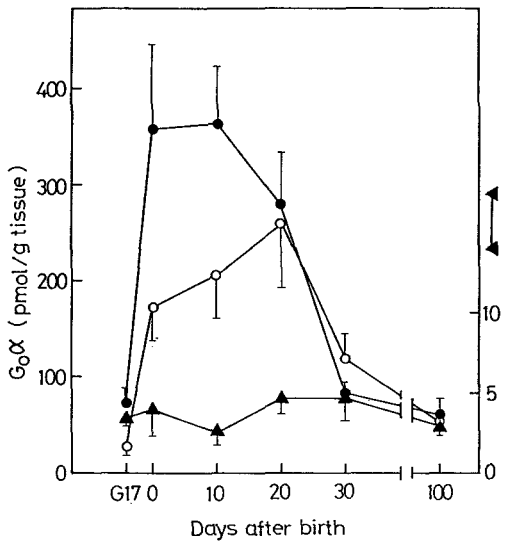


図2　ラット腸管、心臓、肝臓におけるGoαの加齢に伴う濃度変化
○；全腸管（胎生17日、0日齢）または大腸（10日齢以降）、　●；心臓、
▲；肝臓

を示した。この心筋に存在するGoαの免疫活性がGoαによるものかどうかを明らかにするため、0日齢のラットの心臓の抽出液をSDS-PAGEの後、イムノブロッティングを行うと、ウシ脳の精製Goαと同一の39KDaの分子量を示すタンパク質のバンドのみが染色された（図3）。

［考察］

脳におけるGoαおよびβγ濃度の加齢変化の結果より、αとβγは伴って上昇することが明らかになった。βγは他のGタンパクGi，Gsなどとも共通であると考えられているので、生後10日目頃以降よりβγ濃度の方が高くなるという傾向はGo以外のGタンパクの出現が遅いことを示唆しているのではないかと考えられる。

成獣ラットの末梢組織におけるGoα濃度の測定結果（2）では、腸管と心臓は比較的高濃度、肝臓は低濃度のGoαを含んでいる組織で、免疫組織化学的には腸管や心臓では末梢神経組織が主に染色された（2）。今回、幼若ラットの心臓と腸管においてGoα濃度が成獣よりも数倍高いことを見いだしたが、腸管の場合は成獣と同様に主に神経組織が免疫組織化学的に陽性であることから、幼若ラットの腸管は神経組織の占める割合が大きいためではないかと考えられる。一方、心臓は心筋が染色されるという成獣では見られなかった局在を示し、加齢に伴ってGoαの局在が一部変化することが明らかになった。

本研究は会員外研究者、神谷暢子氏と共同で行われた。

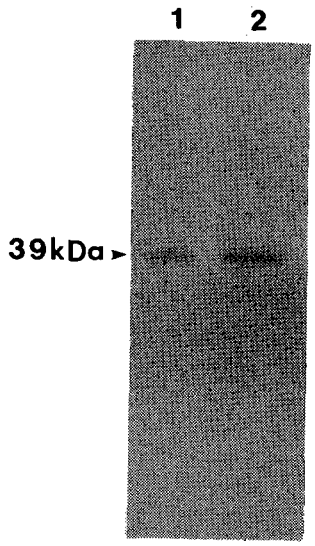


図3　0日齢ラットの心臓のコール酸抽出液とウシ脳精製Goαのイムノブロット
1；ウシ脳Goα、　2；　心臓抽出液

[References]

(1) Asano. T., Semba, R., Ogasawara, N., and Kato, K. (1987) J. Neurochem. **48,** 1617-1623

(2) Asano, T., Semba, R., Kamiya, N., Ogasawara, N., and Kato, K. J. Neurochem. submitted

(3) Fujita, T. (1976) in:Chromaffine, Enterochromaffin and Related Cells (Coupland, R.E. and Fujita, T. eds.) pp.191-208, Elsevier, Amsterdam

(4) Gilman, A.G. (1986) Trends Neurosci. **9,** 460-463

(5) Pearse, A.G.E. and Takor, T.T. (1979) Fed. Proc. **38,** 2288-2294

5. ウシ大脳シナプス膜の分子量2.4万のＧＴＰ結合蛋白質の精製と性状

菊池　章・山下孝之・河田正仁・山本克彦・
池田和人・高井義美　（神戸大・医・第一生化）

〔要　約〕

ＧＴＰ結合蛋白質（Ｇ蛋白質）をウシ大脳のシナプス膜画分よりコール酸で可溶化し、種々のカラムクロマトグラフィーを組合わせて精製した。その結果、少なくとも６種類のＧ蛋白質が分離され、その内の１つはＳＤＳポリアクリルアマイドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）上単一蛋白にまで精製された。このＧ蛋白質はＳＤＳ－ＰＡＧＥ上分子量約２．４万であり、２４ＫＧと名付けた。他の５種類のＧ蛋白質の分子量もＳＤＳ－ＰＡＧＥによって２．１－２．５万と推定された。いずれのＧ蛋白質もＧＴＰγＳとＧＴＰおよびＧＤＰを特異的に結合したが、ＧＭＰ、ＡＴＰ、ＣＴＰ、ＴＴＰとは結合しなかった。２４ＫＧは１分子の蛋白質当り０．８分子のＧＴＰγＳを結合し、そのＫｄは４６ｎＭであった。また、２４ＫＧはＧＴＰａｓｅ活性を有し、その比活性は約４０mmol Pi/ mol of protein/min であった。２４ＫＧはαｓ、αｉ、ADP ribosylation factor 、ras ｐ２１などの既知のＧ蛋白質の抗体と反応しなかった。以上の結果より、私共の精製した２４ＫＧは新しいＧ蛋白質であり、ウシ大脳のシナプス膜には２４ＫＧも含めて少なくとも６種類の低分子量Ｇ蛋白質が存在することが明らかとなった。

Key word： GTP-binding protein, Transducer, Receptor

［緒言］

多くの神経伝達物質やホルモンなどの細胞膜受容伝達機構に種々のＧＴＰ結合蛋白質（Ｇ蛋白質）がトランスデューサーとして関与していることが明らかになっている。これらのＧ蛋白質としてアデニレートシクラーゼ促進性Ｇ蛋白質（Ｇｓ）や抑制性Ｇ蛋白質（Ｇｉ）、ロドプシンとcyclicＧＭＰホスホジエステラーゼを連結させるトランスデューシン（Ｔ）が報告されており、これらはいずれも構造的に類似している(3)。さらに、機能は不明であるが、ウシとラットの大脳より別種のＧ蛋白質であるＧｏの存在も明らかにされている(5,7)。Ｇｓ、Ｇｉ、Ｔ、Ｇｏはすべてα、β、γサブユニットから成る三量体であり、これらのサブユニットの中でβとγサブユニットは４種類のＧ蛋白質で共通であるが、αサブユニットは分子量がそれぞれ４．５万、４．１万、３．９万、３．９万と異なっている。しかし、これらすべてのαサブユニットはＧＴＰ結合能とＧＴＰａｓｅ活性を有している。現在、αサブユニットの違いに基づいたＧ蛋白質の多様性が種々の細胞膜受容伝達機構の制御に関与していると考えられている。

一方、ras 遺伝子産物（ras ｐ２１）は分子量２．１万のＧ蛋白質であることが明らかとなっている(6)。また、最近、KahnとGilman(4)は、コレラ毒素がＧｓをＡＤＰリボシル化する際に必要な因子であるADP ribosylation factor （ＡＲＦ）を精製しているが、このＡＲＦも分子量２．１万のＧ蛋白質である。さらに、Evans ら(2)はヒト胎盤より分子量２．１万のＧ蛋白質（Ｇｐ）を精製している。ＡＲＦとＧｐはras ｐ２１とは異なるＧ蛋白質であることが明らかにされているが、ＡＲＦとＧｐの関係については不明である。また、ＡＲＦとＧｐの生理的役割も明らかになっていないが、分子量約２万の低分子量Ｇ蛋白質に

も多様性があり、既知の高分子量G蛋白質と同様に、種々の細胞膜受容伝達機構に関与している可能性がある。そこで、私共は低分子量G蛋白質の生理的意義を解明する目的で、今回ウシ大脳より本G蛋白質を精製してその性状を解析した。

［実験方法］

シナプス膜は新鮮なウシ大脳からSternweis とRobishawの方法(7) で調製し、１２mg/mlの蛋白濃度で－８０℃で保存した。精製した蛋白質のＧＴＰ結合活性は、[^{35}Ｓ]ＧＴＰγＳを用いてKahnとGilman(4) と同一の条件下で測定した。また、ＧＴＰａｓｅ活性の測定は精製した蛋白質を[γ－^{32}Ｐ]ＧＴＰとともに３０℃、３０分間インキュベートし、放出される^{32}Ｐを定量して測定した。精製した蛋白質とαｓ、αｉ、ＡＲＦ、およびras ｐ２１の抗体との反応性の解析は、本蛋白質をＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った後にニトロセルロース膜上に転写して、これらの抗体を用いたイムノブロット法により行った。αｓの抗体はAlfred G. Gilman博士（テキサス大学）より、αｉの抗体は堅田利明博士（東京工業大学）より、ＡＲＦの抗体はRichard A. Kahn 博士（ＮＩＨ）より、ras ｐ２１の抗体は珠玖洋教授（長崎大学）より、v-K-ras ｐ２１は中野洋文博士（協和発酵工業株式会社）より供与された。

［結果］

Ｇ蛋白質の精製：凍結したシナプス膜を解凍し、一度洗浄した後に、シナプス膜蛋白質をコール酸ナトリウムにより抽出した。この抽出液をUltrogelＡＣＡ－４４を用いてカラムクロマトグラフィーを行ったところ、[^{35}Ｓ]ＧＴＰγＳ結合活性をもつ蛋白質が２つのピークとして溶出された。その内分子量の大きいピークはＧｓ、Ｇｉ、Ｇｏなどの高分子量Ｇ蛋白質であった。分子量の小さいピークをさらにphenyl-Sepharoseでカラムクロマトグラフィーを行ったところ、１つのピークとして溶出された。このピークをhydroxyapatiteでカラムクロマトグラフィーを行ったところ、２つのピークに溶出された。さらに、この最初のピークをMono Q HR5/5でカラムクロマトグラフィーを行ったところ、図１に示すように、５つのピークに分離することができた。この精製方法においてMono Q HR5/5カラムクロマトグラフィーで５番目に溶出されるＧ蛋白質は、図２に示すように、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上分子量約２．４万の単一蛋白にまで精製された。以後、この蛋白質を２４ＫＧと呼び、以下のようにその性状の解析を行った。

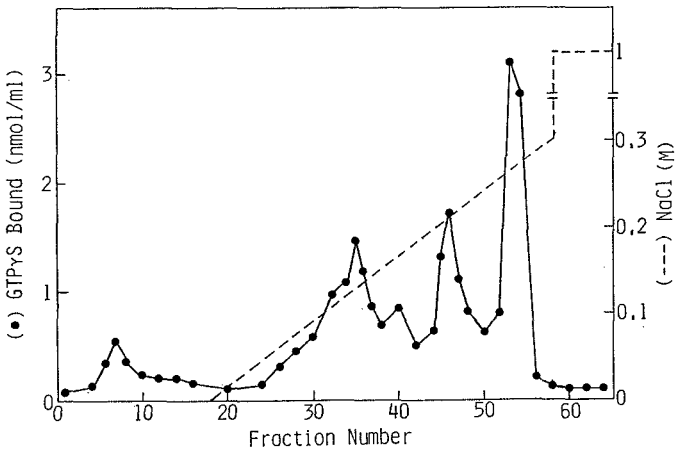


図１．　Mono Q HR5/5　カラムクロマトグラフィー

２４ＫＧのＧＴＰγＳ結合能：２４ＫＧは１分子の蛋白質に最大約０．８分子のＧＴＰγＳを結合し、そのＧＴＰγＳ結合に対するＫｄは４６ｎＭであった。この結合はＧＴＰとＧＤＰによりそれぞれ競合阻害されたが、ＧＭＰ、ＡＴＰ、ＴＴＰ、ＣＴＰでは競合阻害されなかった。本蛋白質はＧＴＰａｓｅ活性を有し、その比活性は約４０mmol Pi/

mol of protein/minであった。ras p21のGTPγS結合能はNEM処理によりほぼ完全に阻害されたが、24KGのそれは同一条件下で約15%阻害された。

他のG蛋白質の抗体との反応性：24KGはαs、αi、ARF、ras p21の抗体とは反応しなかった。

[考察]

今回、私共はウシ大脳シナプス膜より分子量約2.1－2.5万の低分子量G蛋白質を少なくとも6種類分離し、その内の1つをSDS－PAGE上単一蛋白質にまで精製し、24KGと命名した。この24KGは既知のG蛋白質と以下の点で明確に区別できる。

（1）24KGはαs、αi、ARF、ras p21の抗体とは反応しない。

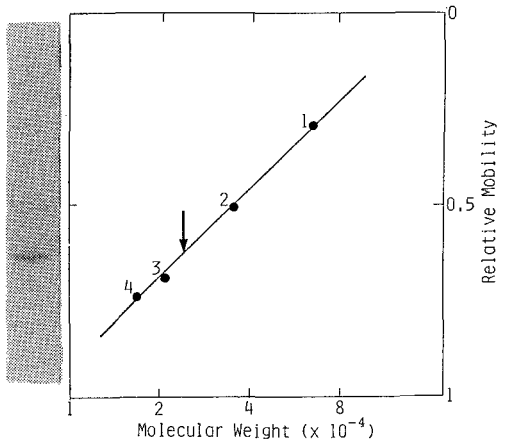


図2. SDS－PAGEでの分子量推定
1, bovine serum albumin (Mr=66,000)
2, glyceroaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Mr=36,000)
3, trypsin inhibitor (Mr=20,700)
4, myoglobin (Mr=17,000)

（2）ARFはGTPase活性が認められないと報告されているが(4)、24KGはGTPase活性を有する。（3）ras p21のGTPγS結合能はNEM処理によりほぼ完全に阻害されるが、24KGのそれは同一条件下に約15%阻害されるのみである。（4）Gpはβγサブユニットとともに精製されることが報告されているが(2)、24KGはβγサブユニットとともに精製されない。これらの実験結果から、私共は24KGは高分子量G蛋白質の分解産物ではなく、またすでに報告されている低分子量G蛋白質とも異なる新しい低分子量G蛋白質であると考えている。一方、私共の部分精製した他の5種類のG蛋白質の1つはras p21の抗体と反応し、c-ras 蛋白質と考えられる。また、他の1つはARFの抗体と反応する。したがって、低分子量G蛋白質にもまた、高分子量G蛋白質のαサブユニットと同様に、多様性があると結論できる。高分子量G蛋白質の多様性が種々の細胞外シグナルの受容伝達機構の制御に関与していると考えられていることから、低分子量G蛋白質の多様性もまた種々の細胞外シグナルの受容伝達機構の制御に対応すると考えられる。

[文献]

1) Brandt, D.R., Asano, T., Pedersen, S.E., and Ross, E.M. (1983) Biochemistry 22, 4357-4362
2) Evans, T., Brown, M.L., Fraser, E.D., and Northup, J.K. (1986) J. Biol. Chem. 261, 7052-7059
3) Gilman, A.G. (1984) Cell 36, 577-579
4) Kahn, R.A., and Gilman, A.G. (1986) J. Biol. Chem. 261, 7906-7911
5) Katada, T., Oinuma, M., and Ui, M. (1986) J. Biol. Chem. 261, 8182-8191
6) Shih, T., Papageorge, A., Stokes, P., Weaks, M., and Scolnick, E. (1980) Nature 287, 688-691
7) Sternweis, P.C., and Robishaw, J.D. (1984) J. Biol. Chem. 259, 13806-13813

6. モルモット脳シナプトソームからのノルエピネフリン遊離に対するC-kinase系及びA-kinase系の作用について

春藤久人・谷山紘太郎・田中千賀子

（神戸大・医・薬理）

〔要　約〕

モルモット大脳皮質シナプトソームをもちいてノルエピネフリン（NE）遊離機構における protein kinase C（C-kinase）の活性化及び cAMP dependent protein kinase（A-kinase）の活性化 の相互作用について検討した。[^{3}H] NE を前負荷したシナプトソーム画分に $CaCl_2$ を含む高 K^+ 液（30 mM KCl）を摘用し、遊離された放射性活性より [^{3}H] NE 刺激遊離を計算した。その結果、1）C-kinaseの活性化物質である 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate（TPA）は自発遊離には影響を与えなかったが、刺激遊離を濃度依存性に増大させた。一方、C-kinase 活性化作用を持たないホルボールエステルである 4α-phorbol-12,13-didecanoate（4α-PDD）は [^{3}H] NE 遊離 に影響を与えなかった。 2）細胞外 $CaCl_2$ 濃度に対する刺激遊離の見かけ上の親和性は TPA により上昇した。 3）C-kinase 阻害薬である polymyxin B は濃度依存性に、TPA による刺激遊離増大作用を抑制した。新たに開発された C-kinase 阻害薬である staurosporine は TPA による刺激遊離増大作用をほぼ完全に抑制した。4）シナプトソーム画分への [^{3}H] NE 取り込みに対して TPA は影響を与えなかった。 5）forskolin 及び dibutyryl cAMP（DBcAMP）はともに刺激遊離を軽度に増大させた。その作用は A-kinase 阻害薬 KT5720 により抑制された。6）TPA の刺激遊離増大作用は forskolin 及び DBcAMP により抑制され、その抑制作用は KT5720 によりほぼ完全に阻害された。以上の所見よりモルモット大脳皮質シナプトソームからの Ca^2 依存性 NE 遊離過程が cAMP-A-kinase 系 diacyl glycerol-C-kinase 系の相互作用により調節されている可能性が示唆された。

Key word： phorbol ester, cyclic AMP, norepinephrine release

［緒言］

Protein kinase C（C-kinase）は広範にわたる細胞系に於て細胞機能の発現や増殖、分化などと関連する生体の基本的な情報伝達系の中心的役割を持つことが示唆されている(6)。本酵素は特に脳に高密度に存在し、末梢及び中枢神経系における C-kinase の生理的機能の一つとして神経伝達物質遊離への関与が示唆されている(7,9)。一方、中枢神経系において神経伝達物質遊離機構に cyclic AMP（cAMP）系による調節機構の存在が示唆されている(4)。そこで今回我々は神経終末からの神経伝達物質遊離過程を検討する上で適したモルモット大脳皮質シナプトソームを用いて NE遊離機構に対する C-kinase の作用及び cAMP-A-kinase 系との相互作用に付いて検討した。

［実験方法］

［^{3}H] NE 遊離実験

モルモットを断頭後,脳を摘出し,大脳皮質に 10 倍量の氷冷 0.22 M サッカロース液を加え、ホモジナイズした後、1,000 g、10 分間遠沈した。得られた上清を 12,500 g、15 分間遠沈し、得られた沈渣（P_2 画分）を 10 ml の栄養液に懸濁して粗シナプトソーム画分とした。粗シナプトソーム画分を 10^{-7} M [^{3}H] NE を含む栄養液で 95 % O_2 - 5 % CO_2 通気下、37℃ にて 20 分間浸漬した後、グラスファイバーフィルター上に摘用し、フィルターホルダー内に装着した。あらかじめ 37℃に保温し、95 % O_2 - 5 % CO_2 を通気させた Ca^{2+} 除去液を毎分 0.3 ml で灌流させ、灌流開始 30 分後より 2 分毎に灌流液を採取し、その中に含まれる放射活性を測定した。刺激には 30 mM KCl 及び種々の濃度の $CaCl_2$ を含む栄養液（高 K^+液）で 1 分間灌流することにより行った。高 K^+液刺激による [^{3}H] NE 遊離は以下の式に従い計算した。

刺激遊離 ＝ (Rst - Rsp)／Rsp (Rst ： 高 K^+液刺激時の灌流液中の放射活性, Rsp ： 自発遊離時の灌流液中の放射活性)

［^{3}H] NE 取り込み実験

NE 取り込みは Coyle と Snyder らの方法(2)に従い、 [^{3}H] NE を用いて、37℃、5 分間及び 0 ℃ 、5 分間での粗シナプトソーム画分への取り込みの差を特異的取り込みと規定して行った。

[結果]

1. [^{3}H] NE 遊離に対するホルボールエステルの作用：TPA は濃度依存性に刺激遊離を増大させ、3 x 10^{-7} M で最大であった。EC_{50} は 15.4 nM であった(図 1)。自発遊離に対しては TPA は影響を与えなかった。一方、C-kinase 活性化作用を持たない 4α-PDD は刺激遊離に影響を与えなかった(表 1)。
2. [^{3}H] NE 遊離の Ca^{2+} 依存性とそれに対する TPA の作用： 高 K^+ 刺激による [^{3}H] NE 遊離は同時に摘用した $CaCl_2$ 濃度依存性であった。TPA の刺激遊離増大作用は $CaCl_2$ 濃度が低い際に著明であった(図 2)。摘用した $CaCl^2$ 濃度に対する刺激遊離のみかけ上の親和性は TPA により上昇した（コントロール： 0.36 ± 0.06 mM vs TPA (10^{-7} M) ： 0.16 ± 0.04 mM, $P < 0.05$)。
3. [^{3}H] NE 遊離に対する C-kinase 阻害薬の作用: C-kinase の阻害薬である polymyxin B (5) は TPA の刺激遊離増大作用を濃度依存性に抑制した。また C-kinase の触媒部位に直接作用してその活性を阻害する Staurosporine (8) は単独では刺激遊離に影響を与えなかったが、TPAの作用を濃度依存性に抑制し、その作用は polymyxin Bよりも強力であった(表1)。
4. [^{3}H] NE 取り込みに対するホルボールエステルの作用: 粗シナプトソーム画分への [^{3}H] NE の取り込みは高親和性及び低親和性取り込みの 2 成分を認めた。TPA はいずれの成分にも影響を与えなかった。
5. [^{3}H] NE 遊離に対する cAMP の作用: Forskolin (10^{-5} M) 及び DBcAMP (10^{-3} M) はともに刺激遊離を約 30 % 増大させた。その作用は A-kinase 阻害薬の KT5720 (8) の前処置によりほぼ完全に抑制された(表 2)。
6. TPA の作用に対する cAMP の作用: TPA (10^{-7} M) により増大した刺激遊離は forskolin (10^{-5} M) 及び DBcAMP(10^{-3} M) の前処置により有意に抑制され、その抑制作用は KT5720 によりほぼ完全に抑制された(表 2)。

[考察]

C-kinase がホルボールエステルレセプターであること (1)、C-kinase の活性化作用を持たない 4α-PDD では作用が認められなかったこと、C-kinase 阻害薬にてその作用が抑制されたことから考えて脱分極による Ca^{2+} 依存性 NE 遊離に対する TPA の増大作用は C-kinase の活性化により遂行されていることが示唆された。また、TPA は NE 取り込みには影響を与えなかったので、C-kinase は神経伝達物質遊離過程へ作用することが示唆された。Staurosporine はこれまでに報告されたリン脂質作用性の阻害薬とは作用機序が異なり、C-kinase の触媒部位に直接作用してその活性を阻害することが報告されている(8)。今回の成績でも 10^{-8} M の低濃度で TPA の作用をほぼ完全に抑制した。細胞内 cAMP 濃度上昇による刺激遊離増大作用は A-kinase 阻害薬である KT5720 (3) により抑制されたことから、cAMP の作用は A-kinase の活性化を介していることが示唆された。TPA の刺激遊離増大作用は細胞内 cAMP 濃度の上昇により抑制され、その抑制作用は KT5720 により阻害されたことからモルモット大脳皮質シナプトソームからの Ca^{2+} 依存性 NE 遊離過程において cAMP-A-kinase 系が単独では促進的に作用する一方、diacylglycerol-C-kinase 系による刺激遊離増大作用に対しては拮抗的に作用していると考えられ、神経終末からの神経伝達物質遊離過程が両セカンドメッセンジャー系の相互作用により調節されている可能性が示唆された。

[謝辞]

Staurosporine 及び KT5720 を御供与下さいました協和醗酵工業に心より感謝します。

[文献]

(1) Castagna, M. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257,7847-7851.
(2) Coyle, J.T. & Snyder, S.H. (1969) J. Pharmacol. Exp. Ther. 170,221-223.
(3) Kase, H. et al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 142, 436-440.
(4) Markstein, R. et al. (1984) Naunyn-Scmiedeberg's Arch. Pharmacol. 325,17-24
(5) Mazzei, G.J. et al. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 109,1129-1133.
(6) Nishizuka, Y. (1986) Science 233,305-312.
(7) Shuntoh, H. & Tanaka, C. (1986) Amer. J. Physiol. 251,C833-840.
(8) Tamaoki, T. et al. (1986) Biochem. Ciophys. Res. Commun. 135,397-402.
(9) Tanaka, C. et al. (1986) FEBS lett. 195,129-134.

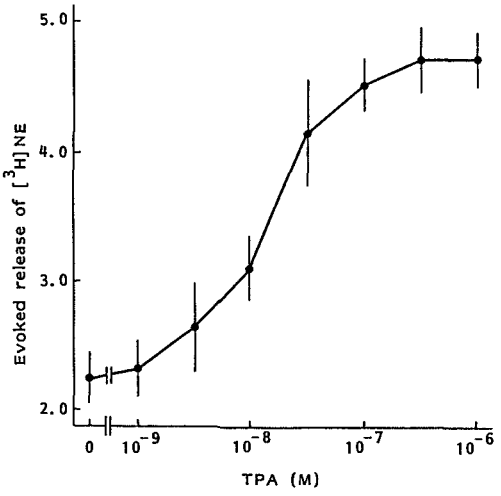


Fig. 1. Effect of TPA on [^{3}H] NE release

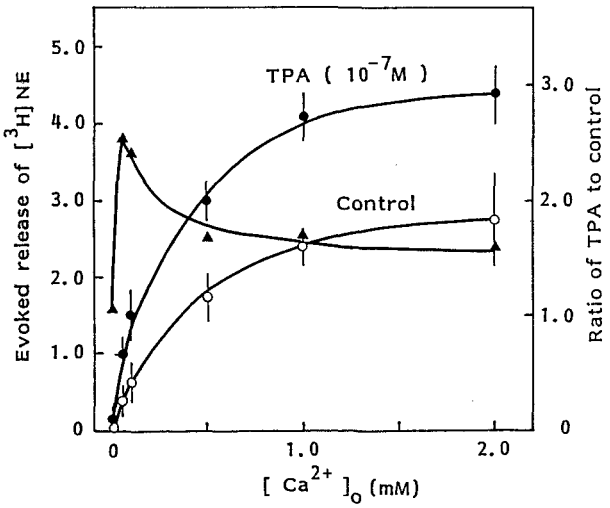


Fig. 2. Effect of TPA on Ca^{2+} dependence of [^{3}H] NE release

TABLE 1. Effect of activator and/or inhibitors of protein kinase C on [^{3}H] NE release.

Treatment	*Evoked release of [^{3}H]NE*	*% of control*
None	2.367 ± 0.103	100
DMSO (0.01%)	2.391 ± 0.413	101
TPA (10^{-7}M)	4.403 ± 0.198*	186
4α-PDD (10^{-6}M)	2.319 ± 0.398	98.0
PMB		
10^{-8}M	2.320 ± 0.351	98.0
10^{-7}M	2.180 ± 0.550	92.1
10^{-6}M	2.012 ± 0.421*	85.0
TPA (10^{-7}M)		
+PMB (10^{-8}M)	3.503 ± 0.701$^+$	148
+PMB (10^{-7}M)	2.888 ± 0.351$^+$	122
+PMB (10^{-6}M)	2.769 ± 0.410$^+$	117
SS(10^{-8}M)	2.315 ± 0.326	97.8
TPA (10^{-7}M)		
+SS (5×10^{-10}M)	4.500 ± 0.074	190
+SS (10^{-9}M)	2.911 ± 0.055$^+$	123
+SS (10^{-8}M)	2.462 ± 0.253$^+$	104

TABLE 2. Effect of TPA, forskolin, DBcAMP and KT5720 on [^{3}H] NE release.

Treatment	*Evoked release of [^{3}H]NE*	*% of control*
None	2.406 ± 0.091	100
TPA (10^{-7}M)	4.515 ± 0.140*	188
ethanol (0.01%)	2.394 ± 0.287	99.5
forskolin(10^{-5}M)	3.104 ± 0.503*	129
forskolin(10^{-5}M)		
+TPA (10^{-7}M)	3.320 ± 0.534$^+$	138
DBcAMP(10^{-3}M)	2.911 ± 0.338*	121
DBcAMP(10^{-3}M)		
+ TPA (10^{-7}M)	3.128 ± 0.323$^+$	133
KT5720 (10^{-7}M)	2.550 ± 0.337	106
KT5720 (10^{-7}M)		
+forskolin(10^{-5}M)	2.478 ± 0.358^{++}	103
KT5720 (10^{-7}M)		
+forskolin(10^{-5}M)		
+TPA(10^{-7}M)	4.547 ± 0.760^{+++}	189

7. Protein kinase Cサブタイプの脳内分布と細胞内局在

斎藤尚亮・古瀬明子・伊藤あつ子・細田弘吉・
吉川　潮*・西塚泰美*・田中千賀子
（神戸大・医・薬理，第二生化*）

〔要　約〕

Protein Kinase C （ＰＫＣ）は種々の受容伝達機構に関与しており、特に中枢神経系においては神経伝達機構に重要な役割を果していることが知られている。近年、ＰＫＣには遺伝子レベルから少なくとも３種類の Subtype が存在することが示されたが各々の Subtype の働きについては明らかにされていない。今回、ラット脳におけるＰＫＣの局在を TypeⅠ ＰＫＣを中心に免疫組織化学を用いて光顕的及び電顕的に検討した。

TypeⅠ ＰＫＣ陽性反応は一般に灰白質に強く、白質あるいはグリア細胞には殆ど認められなかった。特に，olfactory bulb (external plexiform layer), olfactory tuberculum, anterior olfactory nucleus, cerebral cortex (Layer I and Layer IV), pyriform cortex, hippocampus, amygdaloid complex, cerebellar cortex (molecularlayer), dorsal cochlear nucleus, spinal cord (substantia gelatinosa) に強い反応が認められた。更にPurkinje 細胞の細胞内局在を電子顕微鏡で観察すると TypeⅠ ＰＫＣは細胞体、Dendrite 及び Axon のすべての細胞質及び核質に存在し核小体には殆ど認められなかった。また mitochondria, Golgi 装置の外膜と細胞膜も染色された。神経終末においてはシナプス小胞と mitochondria に免疫反応が認められた。これらの結果から、ＰＫＣはラット脳においてシナプス後部ばかりでなくシナプス前部にも存在し、神経伝達機構に深く関与していることが示唆された。

Key word： Protein kinase C, electronmicroscopy, immunocytochemistry

緒言

外界刺激によるイノシトール燐脂質代謝の亢進により生成される産物のうちイノシトール３燐酸は細胞内カルシウムを動員し、一方もう一つの産物であるジアシルグリセロールは Protein kinase C （ＰＫＣ）を活性化し種々の細胞応答を引き起こす(1)。また、ＰＫＣは多くの組織あるいは臓器に存在するが特に脳において高い活性を示すことが示すことが知られている。近年、DNA レベル（α_1, β_1, β_2, γ）(2)及び蛋白質レベル （ TypeⅠ, TypeⅡ, TypeⅢ）(3)からＰＫＣには少なくとも３種類以上の Subtype が存在することが報告されているが、各 Subtype についての研究はまだ十分にはされておらず各 Subtype の意義については現在のところ不明と言ってもよい。今回、我々は Type ＩＰＫＣを中心に免疫組織化学的手法によりラット脳における本酵素の分布を調べ、かつその細胞内局在を電子顕微鏡で観察した。

［方法］

1．ＰＫＣ抗体の作製

ラット大脳可溶性分画から精製したＰＫＣをマウスに免疫したモノクローナル抗体（CKI-97, CKI-33, CKII-90）を作製した。CKI-97 は TypeⅠ ＰＫＣと強く反応し他の二つの抗体は単独では殆ど免疫反応は示さないが CKI-97 による免疫反応を強める作用を持つため今回３種のモノクローナル抗体を混合して用いた(4,5)。

2．免疫染色

Wistar 系ラットを 4 % paraformaldehyde, 0.5 % glutaraldehyde, 0.2 % picric acid を含む燐酸緩衝液で灌流固定し脳を摘出した。後固定後 30 % sucrose 液に浸漬し、光顕観察には Cryostat 切片（20 μm）を、電顕観察には液体窒素による凍結融解後、Vibratome 切片（40 μm）を作製した。Cryostat 切片は 0.3 % トリトンＸを含む燐酸緩衝液にて洗浄後モノクローナル抗体(各 1 μg/ml)を一次抗体として PAP 法で免疫染色した。

Vibratome 切片は燐酸緩衝液中で免疫染色した。

3. 電顕観察

免疫染色を施した Vibratome 切片をオスミウム固定後脱水し Epon 樹脂に平板包埋して小脳皮質及び深部小脳核を含む部位（0.5 x 0.5 mm）を切り出し、 80-90Å の超薄切片を作製しウラン染色後電子顕微鏡で観察した。

［結果と考察］

ＰＫＣ陽性反応はラット脳において特徴的な分布を示した。図１に示すように最も強い免疫反応が olfactory bulb (external plexiform layer), olfactory tuberculum, anterior olfactory nucleus, cerebral cortex (layer I and layer V), pyriform cortex, hippocamupus (stratum radiatum and stratum oriens), amygdaloid complex, cerebellar cortex (molecular layer), dorsal cochlear nucleus, spinal cord (substantia gelatinosa) に認められ、脳幹部及び白質には殆ど反応は認められなかった。ＰＫＣは発癌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働いていると推定されており、ＰＫＣの局在を知るためにホルボールエステルの受容体オートラジオグラフィーが用いられてきた。ＰＫＣ陽性免疫反応の分布は、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分布とほぼ一致し、また今回示した分布は主に TypeⅠ ＰＫＣの分布と考えられることから TypeⅠＰＫＣが脳内においてはＰＫＣの多くを占めると考えられる。しかし Type Ⅰ ＰＫＣの分布は既知の神経伝達物質の分布とは一致せず、Type Ⅰ ＰＫＣは特定の神経伝達物質にのみ関与するのではないことが示唆された。また脳以外の臓器（肝、脾等）と同様の方法で染色しても全く免疫反応は認められなかった。このことからTypeⅠＰＫＣは中枢神経系に限局するＰＫＣ subtype と考えられる。

光顕的に観察するとＰＫＣ陽性反応は種々の神経成分にみられ、特に Purkinje 細胞では殆どすべての細胞成分つまり細胞体細胞質、細胞膜、軸索、樹状突起、神経終末及び核質が染色された（図２A,B）。しかし核小体は染色されなかった。このことから、TypeⅠ ＰＫＣは、Purkinje 細胞においてはシナプス後部（細胞体細胞質、Dendrite）ばかりでなくシナプス前部（神経終末）にも存在することが明かとなった。

更にＰＫＣの Purkinje 細胞における細胞内分布を詳細に検討するため電顕観察を行った（図３）。図３-Aに示すようにＰＫＣは Purkinje 細胞細胞体において、細胞膜、細胞質、細胞内小器官の外膜に存在し軸索（３-Ｂ）、深部小脳核に投射している神経終末内のシナプス小胞（３-Ｃ）に存在した。

以上の結果から、Type Ⅰ ＰＫＣは中枢神経系において特定の神経に存在し、神経伝達物質の受容機構ばかりでなく遊離機構にも関与していることが示唆された。

［文献］

1. Nishizuka Y. (1986) Science 233, 305-312.
2. Parker et al. (1986) Science 233, 853-859.
Coussens et al. (1986) Science 233, 859-866.
Ono et al. (1986) FEBS Lett. 206, 347-352.
Knopf et al. (1986) Cell. 46, 491-502.
Ohno et al. (1987) Nature 325, 161-166.
3. Huang et al. (1986) Pro. Natl. Acad. Sci. 83, 8535-8539.
Kikkawa et al. (1987) FEBS Lett. 217, 227-231.
4. Kitano et al. (1987) J. Neurosci. 7, 1520-1527.
5. Saito et al. (1987) J. Neurosci. in press.

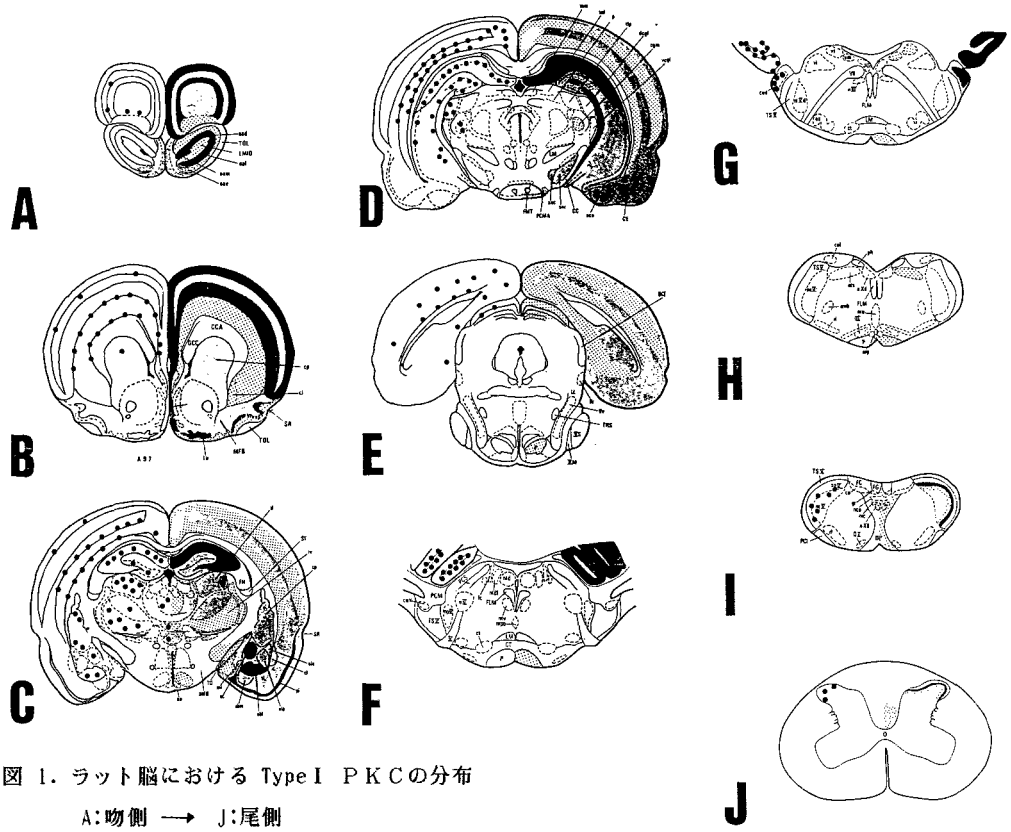


図 1. ラット脳における TypeⅠ ＰＫＣの分布

A:吻側 ⟶ J:尾側

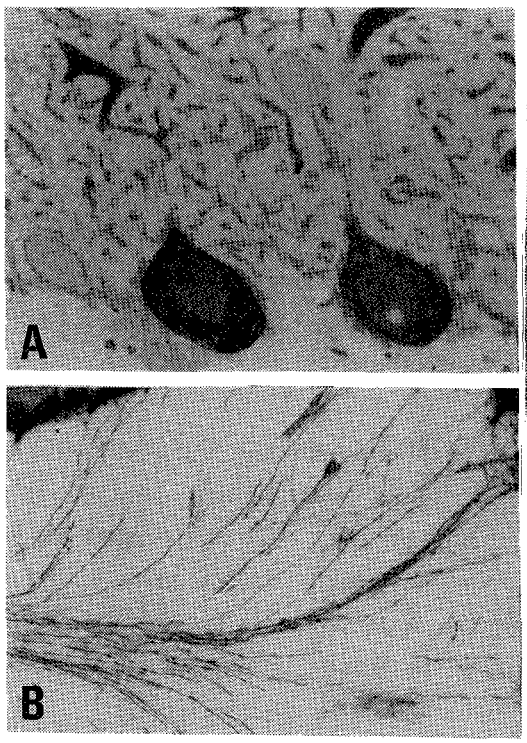


図 2. ＰＫＣ抗体による Purkinje 細胞の免疫染色（光顕像）

A:分子層 ； B:顆粒層

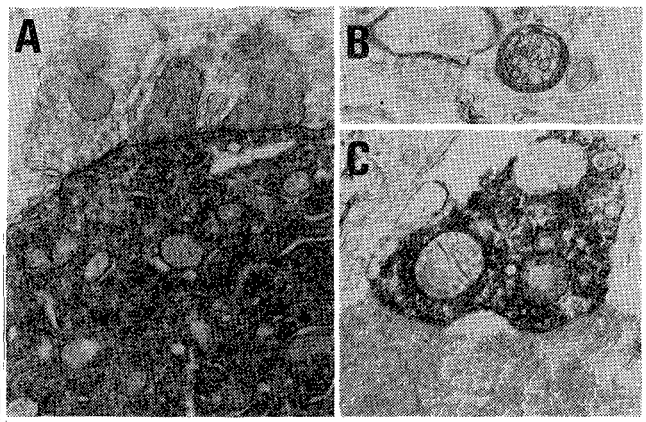


図 3. ＰＫＣ抗体による Purkinje 細胞の免疫染色（電顕像）

A: 細胞体； B: 軸索； C: 神経終末

8. ラット脳組織におけるProtein kinase Cのサブタイプの生後発育変化 ……

澤村　悟・橋本　規・阿瀬勝彦・Shearman S.M.,
吉川　潮・斎藤尚亮*・田中千賀子*・西塚泰美
（神戸大・医・第二生化, *薬理）

〔要　約〕

Protein kinase C は細胞膜の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もっとも大量に存在し、情報伝達に重要な役割を果たしていると推定される。従来、Protein kinase C は単一の酵素蛋白質であると考えられていたが、本酵素には少なくとも３種のサブタイプ、Type Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ が存在する。Type Ⅰは神経組織にのみ特異的に存在する。今回、ラット脳における Protein kinase C のこれら３種のサブタイプの成長に伴なう変化を、本酵素の活性測定、ならびに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により検討を行なった。

ラット大脳組織においては Type Ⅰの酵素活性は、出生直後には認められず生後１週より徐々に増加する。Type Ⅱ の酵素活性は出生時に既に認められ、出生直後より急激に増加し、生後１４日以降２８日で最大活性に達する。Type Ⅲ も出生時に活性を認め、生後７日で最大活性に達する。

一方、Type Ⅰ に特異的な単クローン抗体を用いた免疫染色法により Type Ⅰを大量に含むラット小脳プルキニエ細胞において、Type Ⅰ の Protein kinase C の出生後の発達変化の検討を行なった結果、酵素活性の変動に相当する免疫組織学的変化が観察された。

Key word：　Protein kinase C 、カルシウム、イノシトールリン脂質

〈緒言〉

種々の細胞外シグナルはイノシトールリン脂質の代謝回転を促進する。このリン脂質の加水分解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、ジアシルグリセロールは Protein kinase C を活性化する。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（4）。従来、Protein kinase C は単一の酵素蛋白質であると考えられてきたが、本酵素には異なる cDNA クローン、α、βⅠ、βⅡおよび、γが存在し、また、高速液体クロマトグラフィーにより、ラット大脳の Protein kinase C は３種のサブタイプ、Type Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ に分離され、この Type Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ は各々、γ、βⅠ およびβⅡ、αと対応することが明らかになった（2）。今回、ラット脳組織における Protein kinase C の成長に伴なう変化を、本酵素のサブタイプごとに分離の後、活性測定を行ない、また、単クローン抗体を用いた免疫組織学的方法により、検討を行なった。

〈実験方法〉

① Protein kinase C の精製：各週齢のラット大脳を氷冷下に、20 mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.5、10 mM EGTA、2 mM EDTA、1 mM PMSF、10 μg/ml ロイペプチンを含む、0.25 M サッカロース液中でホモジネートし、100,000 g 、60 分間遠心した。上清をDE－52カラムに添加し、20 mM 塩化ナトリウムを含む Buffer A（20 mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 ， 0.5 mM EGTA ，0.5 mM EDTA，10 mM 2－メルカプトエタノール）にて洗條後、120 mM 塩化ナトリウムを含む Buffer A にて Protein kinase Cを溶出した。得られた溶出液を FPLC に接続したハイドロキシアパタイトカラムに添加し、Buffer B（ 20 mM リン酸緩衝液 pH 7.5，0.5 mM EGTA，0.5 mM EDTA，10% グリセロール、10 mM 2－メルカプトエタノール）にて洗條後 Buffer B 中にて 20 mM から 215 mM のリン酸濃度勾配にて溶出した。

② Protein kinase C の活性測定法：Protein kinase C 活性は 0.5 mM カルシウム、8 μg/ml ホスファチジルセリン 0.8 μg/ml ジオレインの存在下における［γ－^{32}P］ATP より H1 ヒストンへの放射活性の転移により測定した(3)。

③ 免疫沈降法：単クローン抗体による Protein kinase C の免疫沈降は、単クローン抗体、CKI－97 と Protein kinase C との反応の後、Staphylococcus aureus (Cowan I) を加え反応をおこない、反応液の遠心上清中の Protein kinase C 活性の測定により判定した（3）。

④ 免疫染色法：各週齢のラットを 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、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、50 μ_m のビブラトーム切片を作成した。単クローン抗体、CKI－97 を用い、切片をペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ法により免疫染色した。

〈結果および考察〉

DE－52 カラムクロマトグラフィーで溶出されたラット大脳組織中の Protein kinase C 酵素活性はその成長により増加した（図1）。酵素活性は、出生直後は比較的低いが、生後4～14日で急激に増加し、14日目でほぼ最大活性に達した。ハイドロキシアパタイトによる Protein kinase C の分離精製により、3種の Protein kinase C Type Ⅰ, Ⅱ, Ⅲが得られる。この3種について各週齢の酵素活性を検討した結果、 Type Ⅰ は出生時には検出されず、生後1週より徐々に増加した。Type Ⅱ は出生時に既に認められ、生後 14 日以降 28 日で最大活性に達した。Type Ⅱ は成熟ラット脳組織における Protein kinase C の最も多くを占める。Type Ⅲ も出生時にその活性が認められ、生後1週間で最大活性に達した（図2）。

一方、我々は本酵素を特異的に認識する単クローン抗体 CKI－97を得ているが、本抗体の Protein kinase C のサブタイプに対する特異性を検討した結果、CKI－97 は Type Ⅰ に特異的に反応することが明らかとなった。即ち、CKI－97 を用いて Protein kinase C のサブタイプの免疫沈降を行った結果、CKI－97 は Type Ⅰ を特異的に沈降し、 Type Ⅱ, Ⅲ にはほとんど結合しなかった(図3)。また、ウエスタンブロット法にても、CKI－97 は Type Ⅰ を特異的に認識し、Type Ⅱ, Ⅲ は認識しないことが確認された。CKI－97を用いた免疫染色法によりラット脳組織における Type Ⅰ の出生後の変化を検討した（図4）。ラット小脳プルキニエ細胞は Protein kinase C を豊富に含んでいる(3)。そこで、本細胞の免疫染色を行なったところ、成熟ラットではプルキニエ細胞層に強い免疫反応が認められた（図 4 B)。一方、出生直後には、成熟ラットにみられる免疫反応は認められず、ラットの成長に伴ない 、Type Ⅰ の酵素活性の変動と同様にプルキニエ細胞の perikaryon, axon, dendrite において免疫反応は増加した（図4 A, C, D)。

Protein kinase C には、ラット脳組織の cDNA の解析およびその発現の結果から、異なる cDNA クローン、α、βⅠ、βⅡ および γが存在し、ハイドロキシアパタイトを用いた高速液体クロマトグラフィーにより分離精製された本酵素の3種のサブタイプ、Type Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ は各々、γ、βⅠ および βⅡ、αと対応することが明らかとなっている (2)。Turner ら(5)はラット脳組織の Protein kinase C は胎生期にも検出され、出生後速やかに増加すると述べている。また、Huang ら(1) はラット大脳より本酵素を3種に分類し、その性質の検討を行なっている。今回、高速液体クロマトグラフィーによる酵素学的解析および Type Ⅰ に対する特異的な単クローン抗体 CKI－97を用いた免疫組織学的方法により、ラット脳組織では、Type Ⅰ がその成長に伴ない増加することが明らかとなった。また、Type Ⅰ 酵素活性は神経組織に特異的に認められ、一方、単クローン抗体 CKI－97を用いた免疫組織学的方法によっても神経組織においてのみ免疫反応が観察され、他の組織では陽性反応は認められなかった。ラット神経組織において Type Ⅰ が神経組織の発達とともに増加を示すこと、および Type Ⅰ が神経組織に特異的に存在することから Type Ⅰ は神経機能に重要な役割を果たしている可能性が高い。神経組織における Type Ⅰ の機能の解析は今後重要な課題と考えられる。

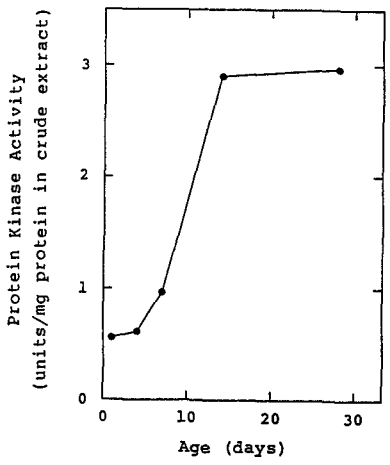


図1．Protein kinase C の生後発育に伴なう変化

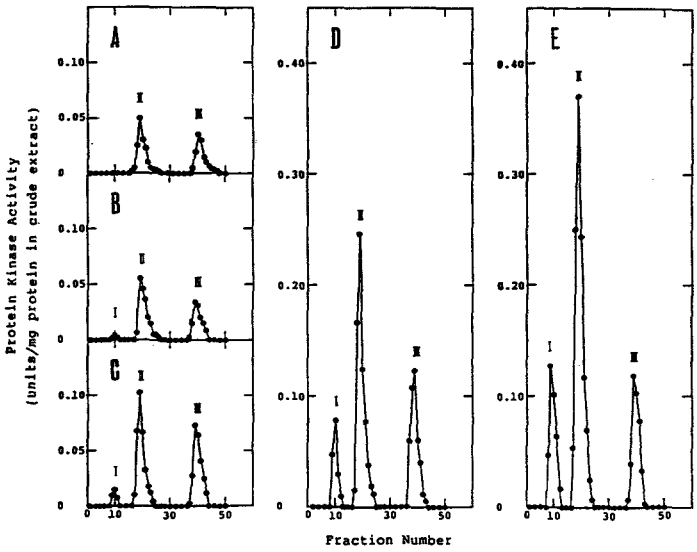


図2．Protein kinase C サブタイプの生後発育に伴なう変化
A；出生後、B；生後4日、C；生後7日、
D；生後14日、E；生後28日
I、II、IIIは各々 Type I、II、IIIを示す

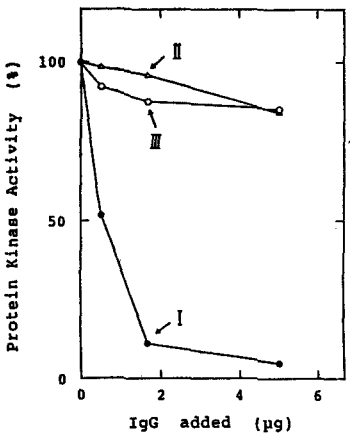


図3．単クローン抗体 CKI−97 による Protein kinase C の免疫沈降　I、II、IIIは各々 Type I、II、IIIを示す

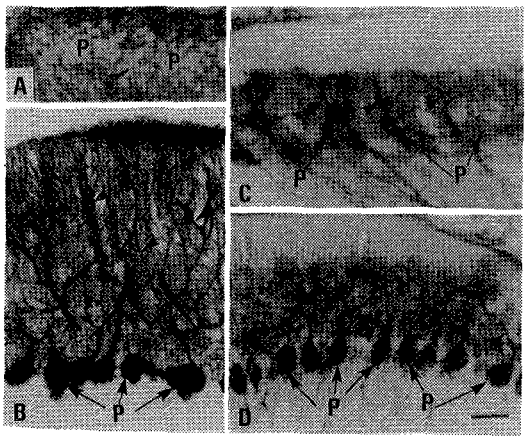


図4．単クローン抗体 CKI−97 によるラット小脳の免疫染色
A；出生後、B；成熟ラット、C；生後7日、D；生後14日
P；プルキニエ細胞、*arrow head*；*dendrite*, bar；100μ_m

〈文献〉

1. Huang, K.−P., Nakabayashi, H., Huang, F.L. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8535−8539
2. Kikkawa, U., Ono, Y., Ogita, K., Fujii, T., Asaoka, Y., Sekiguchi, K., Kosaka, Y., Igarashi, K., Nishizuka, Y. (1987) FEBS Lett. 217, 227−231
3. Kitano, T., Hashimoto, T., Kikkawa, U., Ase, K., Saito, N., Tanaka, C., Ichimori, Y., Tsukamoto, K., Nishizuka, Y. (1987) J. Neurosci. 7, 1520−1525
4. Nishizuka, Y. (1986) Science 233, 305−312
5. Turner, R.S., Raynor, R.L, Mazzei, G.J., Girard, P.R., Kuo, J.F., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3143−3147

9. モノクローナル抗体による脳のCキナーゼアイソザイム分布に関する解析 ……

小野田 幸 治・渡 辺 正 人・田 中 利 男・吉 田 利 通*・
日 高 弘 義 （三重大・医・薬理，病理*）

〔要 約〕

家兎脳より精製したCキナーゼを抗原として、数種のモノクローナル抗体を作製しこれらの抗体を用いて、immunoblot、免疫沈降や免疫組織化学を種々の組織で行なった。その結果脳及び脾臓おいて、組織だけではなく細胞の種類によって、免疫反応が異なるモノクローナル抗体（MC-5、MC-16）を見い出した。①immunoblotにおいて、MC-16は脳の抽出液の分子量約80KDaの蛋白質とのみ反応したが、MC-5は脳及び脾臓の80KDaの蛋白質とも反応した。②MC-5は脳及び脾臓より精製したCキナーゼと免疫沈降を示した。一方、MC-16は脳のCキナーゼとのみ用量依存性にその活性を低下させた。③免疫組織化学的所見では、MC-5は小脳の顆粒細胞と分子層、海馬のstratum oriensとstratum radiatumのneuropil、更に脾臓のwhite palpのperiarteriolar lymphoid sheethに強い免疫反応を認めた。一方、MC-16では小脳のPurkinje細胞、海馬の錐体細胞、歯状回の顆粒細胞、大脳皮質の細胞、扁桃体・視床の神経細胞などに強い陽性所見がみられた。これらの結果をCキナーゼアイソザイムのmRNAの分布と比較検討したところ、我々が報告している家兎Cキナーゼアイソザイム4種類の内、MC-5はαあるいはβタイプ、MC-16はδタイプのアイソザイムを認識していることが強く示唆された。

Key word：
protein kinase C, monoclonal antibody, isozyme,

《緒 言》

Cキナーゼは、ラット脳より発見されて以来、現在生体内の多くの組織、臓器にその分布が認められている。特に、大脳、小脳、脾臓、血小板、リンパ球などに高い酵素活性が見い出されている。又、^{3}H-PDBuオートラジオグラフィー[10]、ポリクローナル抗体[2][9]や、モノクローナル抗体[4]を用いて、ラット脳におけるCキナーゼの局在も報告されている。

Cキナーゼは、我々を含め幾つかの施設より、cDNAが単離され、その一次構造が解析されてきた。その結果、アイソザイムの存在が明らかとなり、又、Northern hybridizationにより、それらアイソザイムの組織特異性発現が報告されている[5]。更に最近、3種類の異なったcDNAプローベを用い、ラット脳及び脾臓において、in situ hybridization histochemistryを行うことにより、CキナーゼアイソザイムのmRNAの分布の細胞レベルでの相違が報告された[1]。我々は、Cキナーゼ阻害剤H-7の誘導体を利用したアフィニティークロマトグラフィーより精製したCキナーゼ[3]を抗原として、数種の異なるモノクローナル抗体を作製した。これらモノクローナル抗体の中にNorthern hybridizationやin situ hybridization histochemistryにより認められたCキナーゼアイソザイムの分布にかなりの相関性を持ったモノクローナル抗体を見い出した。即ち、異なったアイソザイムを認識するモノクローナル抗体（MC-5、MC-16）が得られたので報告する。

《実験方法》

①モノクローナル抗体の作製

Cキナーゼ阻害剤H-7の誘導体をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製したCキナーゼを抗原としてマウスに免疫した。従来の方法[5]に従い、抗Cキナーゼモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製し、マウス腹腔にて増殖させた。

② immunoblot

組織よりの抽出液を蛋白質75μgに合わせ、10%SDSポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。抗原を電気泳動ゲルからニトロセルロースメンブレインにトランスファーさせ、抗体と反応させた後、ベクタスティンABC免疫ペルオキシダーゼ系を使用して検出した。

③ 免疫沈降

部分精製したCキナーゼとモノクローナル抗体を反応させ、この抗原抗体複合体をプロテイン－Aセファロースと免疫沈降させた。そして、その上清のCキナーゼ活性を測定した。

④ 免疫組織化学的方法

体重約2kgの雄性家兎を麻酔下にて、左心室から上行大動脈にカニューレを挿入し、生理食塩水を潅流し、次いで、4%パラホルムアルデヒド、0.1%グルタールアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液にて潅流固定した。脳を摘出し、同固定液にて4℃6時間置き、次ぎに0.1Mリン酸緩衝液にて一晩洗浄、更に、10%、15%、20%サッカロースを含む0.1Mリン酸緩衝液にて順に洗浄した後、15μmの凍結切片を作製した。一方、脾臓に関しては、潅流固定は施行しなかった。凍結切片をモノクローナル抗体とインキュベーションした後、ベクタステインABCペルオキシダーゼ系を用いて免疫染色を行った。

《結果及び考察》

抗Cキナーゼモノクローナル抗体MC-5、MC-16は、immunoblot、免疫沈降、免疫組織化学における検索の結果、異なった性質を示した。すなわち、immunoblotにおいて、MC-5は、脳及び脾臓の抽出液の分子量約80KDa（Cキナーゼ）の蛋白バンドと反応したが、MC-16は、脳のそれのみと反応した。又、MC-5、MC-16共に他の分子量の蛋白バンドは認識しなっかった（図1）。更に、MC-5は、脳及び脾臓より部分精製したCキナーゼと免疫沈降を示し、そのhalf maximal effectはそれぞれ0.4μg/ml、40μg/ml IgGであった。一方MC-16は脳より部分精製したCキナーゼのみを用量依存性に活性を低下させ、0.4μg/ml IgGでそのhalf maximal effectに達した（図2）。

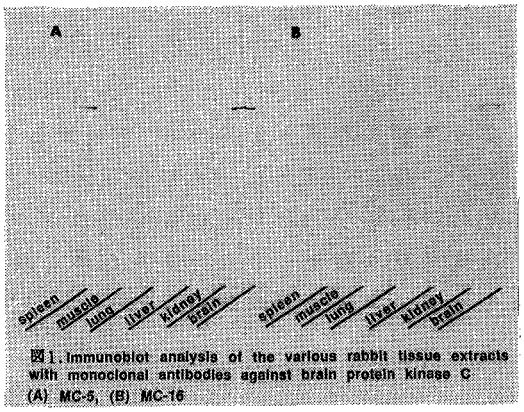


図1. Immunoblot analysis of the various rabbit tissue extracts with monoclonal antibodies against brain protein kinase C (A) MC-5, (B) MC-16

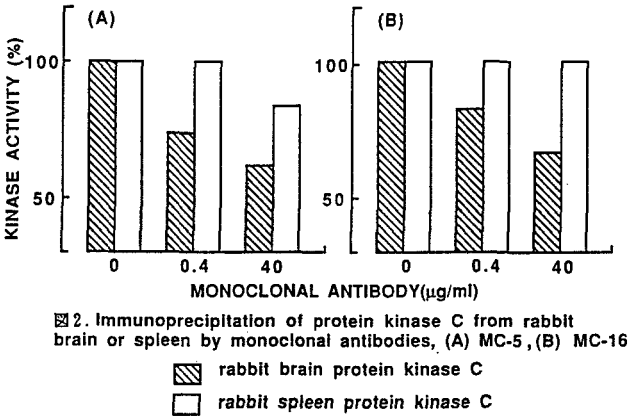


図2. Immunoprecipitation of protein kinase C from rabbit brain or spleen by monoclonal antibodies, (A) MC-5, (B) MC-16

免疫染色(図３)では、MC-5は、小脳の顆粒細胞と分子層、海馬のstratum orieusとstratum radiotumのneupopilに強い免疫反応が認められ、更に脾臓においてはwhite palpのperiarteriolar lymphoid sheethに強い陽性反応が見られた。一方、MC-16では、小脳のPurkinje細胞、海馬の錐体細胞、歯状回の顆粒細胞、大脳皮質の細胞、扁桃体・視床の神経細胞などに強い免疫反応が認められた。しかし、何れの細胞体も核を除く細胞質のみが染色された。以上の所見は、既に報告されている脳内のＣキナーゼ活性の分布[8]ともよく一致している。又、^{3}H-PDBuオートラジオグラフィーの所見との比較では、^{3}H-PDBuの結合部位が異なった細胞体からのaxonやdendriteの分布する領域に一層強く認められている[10]以外は、我々の知見と分布に強い相関を見た。一方、J.F.Kuoらは、抗Ｃキナーゼポリクローナル抗体によるラット脳における免疫染色を行い、細胞体の核及び核周囲のＣキナーゼの局在を示しているが[2][9]、これは我々の知見とは一致しない。T.Kitanoら[4]も指摘しているように、彼らの抗体が認識する80KDa以外の67KDaの蛋白質に問題があるのではないかと推察される。

又、S.J.Brandeらは３種類の異なったcDNAプローベ(ＰＫＣ－Ⅰ、ＰＫＣ－Ⅱ、ＰＫＣ－Ⅲ)を用い、ラット脳及び脾臓において、in situ hybridization histochemistryを行い、ＣキナーゼアイソザイムのmRNAの分布が、細胞の種類によって異なることを報告した[6]が、このＣキナーゼアイソザイムの分布が、我々の見い出した２種類のモノクローナル抗体MC-5、MC-16と強い相関性を持っている。又、我々が家兎脳より単離した４種類のcDNA(α, β, γ, δ)の一次構造、Northern hybridizationの結果[6][7]を合わせもって考えると、MC-5は、脳や脾臓などの免疫系の組織に発現するαあるいはβタイプ(ＰＫＣ－ⅡあるいはＰＫＣ－Ⅲ)、MC-16は脳に特異的に発現すると考えられるδタイプ(ＰＫＣ－Ⅰ)のＣキナーゼアイソザイムを認識していることが強く示唆された。このような異なったＣキナーゼアイソザイムを認識するモノクローナル抗体は、そのアイソザイムの機能を解析する上で重要なtoolとなると考えている。

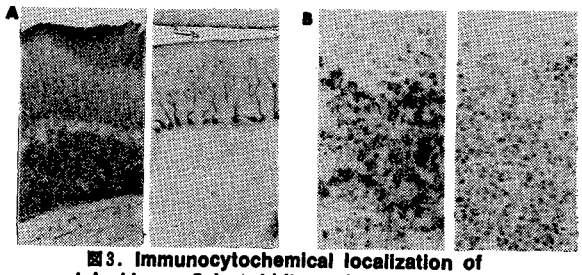


図3. Immunocytochemical localization of protein kinase C in rabbit cerebellum or spleen
(A) rabbit cerebellum left side : MC-5
(B) rabbit spleen right side : MC-16

《文献》

1) Brandt, S., Niedel, J.E., Bell, R.M. and Young, W.S. (1987) Cell. 49, 57-63.
2) Girard, P.R., Mazzei, G.J., Wood, J.G. and Kuo, J.F. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 3030-3034.
3) Inagaki, M., Watanabe, M. and Hidaka, H (1985) J. Biol. Chem. 260, 2922-2925.
4) Kitano, T. and Hashimoto, T., Kikkawa, U., Ase, K., Saito, N., Tanaka, C., Ichimori, Y., Tsukamoto, K. and Nishizuka, Y., (1987) J. Nerosci. 7, 1520-1525.
5) Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Nature. 256, 495-497.
6) Ohno, S., Kawasaki, H. Imajoh, S., Suzuki, K., Inagaki, M., Yokokura, H., Sakoh, T. and Hidaka, H. (1987) Nature. 325, 161-166.
7) 大野茂男 (1987) 実験医学. 5, 615-621.
8) Walaas, S.I., Nair, A.C. and Greengard, P. (1983) J. Neurosci. 3, 302-311.
9) Wood, J.G., Girard, P.R., Mazzei, G.J. and Kuo, J.F. (1986) J. Neurosci. 6, 2571-2577
10) Worley, P.F., Baraban, J.M., Souza, E.B., and Snyder, S.H. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 4053-4057.

10. 4種のヒトチロシン水酸化酵素cDNAの単離と塩基配列の決定

金田典雄・小林和人・一瀬　宏・岸　文雄*・
中沢　淳*・黒沢良和**・藤田啓介**・永津俊治
（名古屋大・医・第一生化，山口大・医・第二生化*・
藤田学園保衛大・総医研**）

〔要　約〕

チロシン水酸化酵素(TH)の一次構造を決定し、活性調節の機構を明らかにするため、cDNAの単離および塩基配列の決定を行った。ヒト褐色細胞腫からλgt 11 cDNAライブラリーを作成し、プローブとしてラットの TH cDNA の塩基配列から23-merのオリゴヌクレオチドを合成し、プラークハイブリダイゼーションを行った。約2 kbpのインサートを持つクローンにつき制限酵素マップ及び5'末端側の塩基配列を決定したところTHcDNAはN末端コーディング領域の一部が異なる4種類(type 1,2,3,4)に分類されることが示された。既にGrimaら(Nature (1987) 326, 707-711)は3種類(type 1,2,3)のヒトTH cDNAを同定しているが、今回我々はfull-lengthの得られていなかったtype 3を含めてすべてのtypeのfull-length cDNAの単離に成功した。その結果、type 4 cDNAはtype 2およびtype 3にそれぞれ特徴的な12 bp及び81 bpからなる93 bpの配列を含んでいることが明らかになった。type4 cDNA及びその両末端側断片をプローブとしてヒトゲノムのSouthern blottingを行ったところ、一種類の遺伝子を含むことが示唆された。以上の結果より、ヒトTHでは単一のprimary transcriptからalternative RNA splicingによりN末端側の異なる4種類のmRNAが形成されると考えられる。

Key word : Tyrosine hydroxylase, cDNA cloning, Alternative RNA splicing

チロシン水酸化酵素(TH)はカテコーラミン生合成の第一律速酵素であり、極めて多様な活性調節を受けていると考えられている。これらの活性調節にはリン酸化をはじめとするタンパク質分子の修飾及びTHタンパクの発現の制御による調節が含まれるが、これらの機構を理解する第一歩としてcDNAを単離し一次構造を決定することは重要である。既にGrimaら(1)によりラットTHのcDNA塩基配列が報告されているが、我々はパーキンソン病等、種々のカテコーラミン系神経疾患と深い関わりがあると考えられるヒトTH のcDNAを単離した(2,3)ので報告する。

［実験方法］

1. cDNAライブラリーの作製: ヒト褐色細胞腫(8 g)よりグアニジンチオシアネート/セシウムクロリド法によりtotal RNAを抽出し、オリゴ(dT)-celluloseカラムを通し、poly(A)$^+$RNA (120 μg)を得た。cDNAの合成はGubler and Hoffmanの方法(4)に従った。Bio-Gel A-50 mにて分画したのち、約1 kbp以上のcDNA断片をλgt 11のEcoRI siteに挿入し、 6 x 10^5クローンからなるライブラリーを作製した。

2. cDNAライブラリーのスクリーニング: すでに報告されているラットのTH mRNAのコーディング領域の一部(ヌクレオチド 481-503)に相補的な23-merのオリゴヌクレオチド、5' GGGAACCAGGGGACCTTGTCC TC3', を合成し、5'末端ラベルし、プローブとした。プラークハイブリダイゼーションは宿主に E.coli Y1088を用い、常法に従った。ハイブリダイゼーションは6 x SSC, 1 x Denhardt's, 0.05%ピロリン酸ナトリウム、tRNA(20 μg/ml)中、30℃ にて12 h 行ない、0.05% ピロリン酸ナトリウムを含む6 x SSCで洗浄後、オートラジオグラフィーを行なった。

3. 制限酵素マップおよび塩基配列の決定: cDNAインサートをBluescript M13 (+), (-)ベクターにsubcloning し、E.coli MV1184を形質転換した。ヘルパーファージ M13 KO7を用い、一本鎖DNAを調製し、dideoxy法により塩基配列を決定した。

4. Southern blotting: ヒト胎盤由来のゲノムDNAをEcoRI, BamHIまたはHindIII で切断し(37℃, 20 h), アガロースゲル電気泳動後、ナイロン膜にトランスファーした。プローブにはfull-length type 4 cDNA, 5'-末端側断片(EcoRI-XhoI, 500 bp)又は3'-末端断片(StuI-EcoRI, 750 bp)をmultiprime

labelling法により標識したものを用いた。ハイブリダイゼーションは50% formamide, 4 x SSPE, 0.5% skim milk, 1% SDS, salmon sperm DNA (500 μg/ml)中、42℃, 12 h 行ない、65℃ にて2 x SSC, 0.1% SDS溶液で洗浄後、オートラジオグラフィーを行なった。

［結果と考察］

3 x 10^5個のプラークをスクリーニングし、28個のポジティブクローンを得た。そのうち約2 kbpのインサートを持つ20個につき制限酵素マップ及び5'-末端側の塩基配列を調べたところ、5'-末端側の構造の異なる４種類(type 1,2,3,4)のcDNAクローン の存在することが明らかになった。これら４種は翻訳開始コドンのATGから90番目までの配列は全てのtypeで共通であったが、その後に各typeに特徴的な配列が挿入されていた(図１)。最近、Grimaら(5)はヒトTH cDNA のクローンを単離し、少なくとも３種類(type 1,2,3)のmRNAが存在することを報告しているが、今回、我々が新たに単離した type 4 cDNAはtype 2及びtype 3に特有のそれぞれ12 bpおよび81 bp配列からなる93 bpの挿入配列を有していた。これらの挿入はどれもtype 1のヌクレオチド90と91の間で起こっており、これらの挿入によってもアミノ酸配列のフレームシフトは起こらない。従ってtype 4 mRNAは最も長いTH分子をコードしていると考えられる。

次にヒトTHの遺伝子が一種類であるかどうかを調べるためにゲノムDNAのSouthern blotting を行なった。図２に示すようにfull-length type 4 cDNAをプローブにした場合、Hind IIIで単一バンドを与えた(a)。EcoRI では 20 kbpと13 kbpの２本となり(a)，各々はtype 4の5'-断片及び3'-断片とハイブリダイズした(b,c)。BamHIではfull-length cDNAの場合、４本(5, 2.4, 2.2, 1.9 kbp)のバンドを示し(a)、そのうち5 kbp のバンドは5'-断片と、また 2.4 kbpと1.9 kbpのバンドは 3'-断片とハイブリダイズした(b,c)。以上の結果はヒトTH遺伝子はハプロイドゲノムあたり一種類であることを示唆している。

一般に真核細胞にみられるalternative RNA splicingには２っの場合が知られている。一つは１個のエキソン内に存在するsplicing site(s)を利用する場合であり、他は独立したエキソン間で起こる場合である。type 4 cDNAの88-96番目の塩基配列 ATG↓GTAAGAはsplicing donor siteのコンセンサス配列として知られている($\begin{smallmatrix}C\\A\end{smallmatrix}$)AG↓GT($\begin{smallmatrix}A\\G\end{smallmatrix}$)AGTに非常に類似している．このことはtype 2及び4にみられる12 bpの配列は，独立したエキソン由来ではなくて，エキソン 1の3'側に由来するものであることを示唆している．一方，type 4の100-108番目および181-189番目の塩基配列は上記のコンセンサス配列との相同性がないことから type 3及び4にみられる81 bp配列は独立したエキソンに由来すると考えられる．

以上の結果をまとめるとヒトTH mRNAは単一のprimary transcriptからalternative RNA splicingによって４種類のmRNAを形成すると考えられる(図３)．それらのsplicingは開始Metからtype 1 における31-32番目のアミノ酸残基の間で起こっており，N末端側にのみ限定されている．THタンパクはN末端側がリン酸化をふくむregulatory domain，c末端側がcatalytic domainと推定されていることから，alternative splicingによる一次構造上の多型性が酵素活性の調節機構に関与していることが示唆される．Grimaら(5)はヒト脳(青斑核，黒質)ではtype 1及び2のみが，また副腎髄質ではtype 1,2,3が発現していることを示している．type 4を含めより詳細なTH subtypeの組織特異性を明らかにしていくことが重要である．今後さらにTH遺伝子の構造を明らかにすること，及び4種のTH分子の機能の違いについて検討していきたい．

［文献］

1. Grima, B. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 617-621.
2. Kaneda, N. et al.; Biochem. Biophys. Res. Comm. (1987) in press
3. Kobayashi, K. et al.; in preparation
4. Gubler, U. and Hoffman, B. J.(1983) Gene 25, 263-269.
5. Grima, B. et al.; Nature (1987) 326, 707-711.

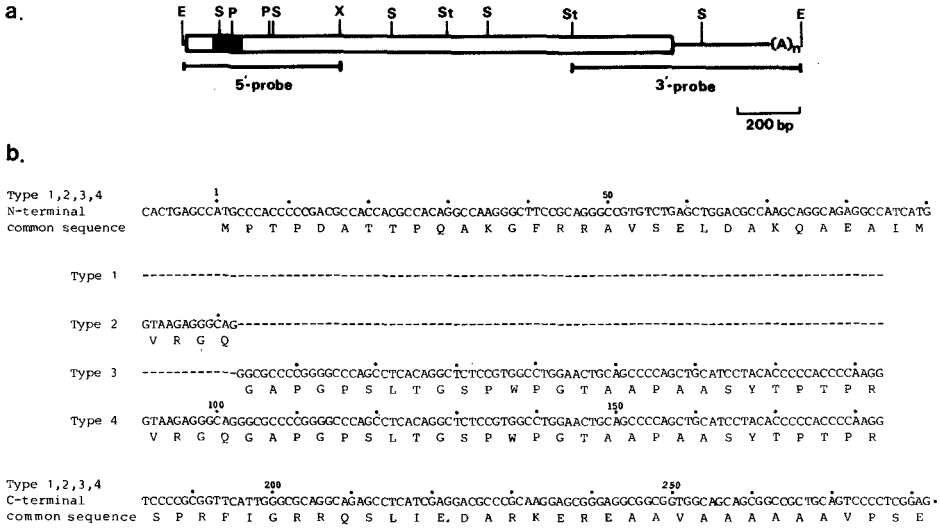


図1. type 4 cDNAの部分制限酵素マップ(a)及びtype 1,2,3,4の5'-末端領域の塩基配列,(b) Southern blottingに用いた5'-及び3'-断片を示した。
E, EcoRI; S, SmaI; P, PstI; X, XhoI; St, StuI

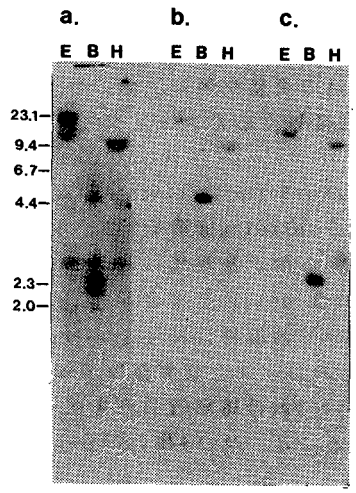


図2. ヒトゲノムDNAのSouthern blotting. プローブ:
full length type 4 (a), 5'-末端断片(b), 3'-末端断片(c),
E, EcoRI; B, BamHI; H, HindIII

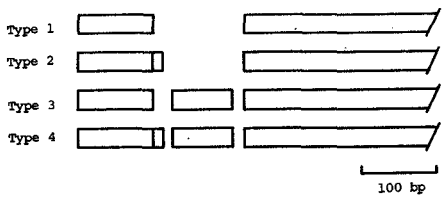


図3. 4種のTH cDNAの5'-末端領域の模式図

11. 網膜に特異的なMEKA cDNAクローンの単離

郭　哲輝・秋山万里子・三木直正
（金沢大・がん研・薬理）

〔要　約〕
1、網膜に特異的なpCR-470 cDNAクローンを脳とのプラスーマイナス法により単離した。これをプローブとしたNorthern hybridizationから、ウシ網膜の14.5S（約1.3 Kbp）mRNAとハイブリダイズするが、脳、肝臓、腎臓より得たmRNAとはハイブリダイズしないことがわかった。
2、Okayama-Berg法で作製したウシ網膜cDNAライブラリーからpCR-470 cDNAをプローブとし、R-23 cDNA（約1.2 kbp)を、更にほぼ完全長のR-27 cDNA（約1.3 kbp)を単離し、これらの塩基配列を決定した。5 非翻訳部分（98 bp),翻訳部分（450 bp）および3 非翻訳部分（688bpに続き75~85 bPのポリA鎖）よりなるR-27は、150アミノ酸残基よりなる可溶性ポリペプチド（分子量： 17.7 kd, pI:9.6)をコードしていた。
3、R-27の塩基配列、及びそのコードするアミノ酸配列のコンピューター解析を行ったが、既知物質とのホモロジーは見つけられなかった。我々は、R-27がコードするポリペプチドのN末端アミノ酸配列が、Met（M)ーGlu（E)ーLys（K)ーAla（A)と続くことから、これをMEKA polypeptideと名づけた。

Key word： Retina, cDNA cloning, MEKA polypeptide

我々は、網膜の機能的役割を明らかにするために、その遺伝子レベルからのアプローチを試みてきた。網膜に特異的なcDNAのクローニングを最初の目的とし、その方法としては脳とのプラスーマイナス法を用いた。その結果、ほぼ完全長のopsin cDNAやtransducin γ-subunit cDNAのクローニングに成功した（2）。これらのことから、網膜に特異的なcDNAのクローニングにプラスーマイナス法が非常に有効な手段であると考えられた。

一方、我々は上記cDNAのクローニング以外に網膜に特異的と考えられるpCR-470 cDNAクローンも単離していた（2）。今回、このpCR-470およびその完全長であるR-27の解析を行い、1）対応するmRNAが網膜に特異的に発現していること、2）R-27 cDNAのコードするポリペプチドが新しい物質(MEKA polypeptide)であることなどを報告する。

［方法］

ウシ網膜cDNAライブラリーの作製、Nick translation,及びColony, Northern, Southern hybridizationについては既報の方法に従った（2）。塩基配列は、M13を用いるdideoxy法（4）により決定した。その他の遺伝子操作は、Molecular Cloning, A laboratory manualにしたがった（3）。

［結果および考察］

G:C tailing法により作製したウシ網膜cDNAライブラリーから単離したpCR-470 cDNAは脳とのプラスーマイナス法に基づいた。

制限酵素PstIで得られるpCR-470の断片DNA(410 bp)をプローブとしたNorthern hybr

idizationの結果を図1に示めす。pCR-470はウシ網膜poly(A)mRNAの14.5S(約1.3 kbp)とハイブリダイズするが、脳、肝臓、腎臓から調整したpoly(A) mRNAとはハイブリダイズしなかった。このことから、pCR-470に対応するmRNAは、網膜に特異的に発現していると考えた。pCR-470に対応する完全長なcDNAは、Okayama-Berg法で作製したcDNAライブラリーから単離した（図2）。R-23 (1.2 kbp)クローンの5 側は、N末端アミノ酸残基の8番目より始まっていた。R-23の5 側 (StuI-AluIで得られる265 bp)をプローブとしてほぼ完全長のR-27 cDNA (1.3 kbp)を得た。全コロニーの約0.3%がcolony hybridizationでpositiveを示したことからその豊富さが想像される。pCR-470は、R-27の775~1184番目に対応しておりその塩基配列は完全に一致していた。またR-27の翻訳部分をプローブとしたNorthern hybridizationも図1と同様な結果を得た。一方ウシgenomeDNAとのSouthern hybridizationの結果から、対応するゲノムはシングルコピーであった。R-27は、5 非翻訳領域(98 bp),翻訳領域(450 bp)および3 非翻訳領域(688 bpに続き75~85 bpのポリA鎖）よりなっている。（図2）。

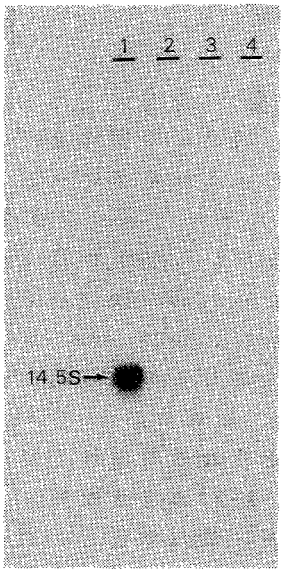


図1、 Northern hybridization
1) 網膜 mRNA, 2) 脳 mRNA
3) 肝臓 mRNA, 4) 腎臓 mRNA

R-27がコードする可溶性ポリペプチドは、150アミノ酸残基よりなり、その分子量は17697ダルトンであった。R-27の塩基配列、およびそのコードするポリペプチドのコ

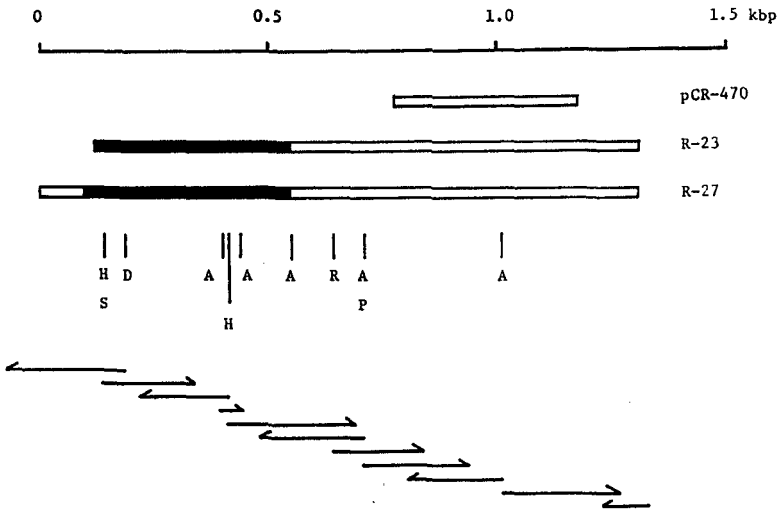


図2、 制限酵素地図と塩基配列決定部位。□は非翻訳領域、■は翻訳領域

ンピューター検索を行ったが既知物質とのホモロジーは見い出せなかった。R-27のコードするポリペプチドのN末端アミノ酸配列がMet (M)ーGlu (E)ーLys (K)ーAla (A)と続くことから、我々はこのポリペプチドをMEKA polypeptideと名づけた。MEKA polypeptideが強い塩基性(pI: 9.6)を示すためか、Expression vectorを用いた実験は成功していない。MEKA polypeptideのアミノ酸組成を図3に示した。Arg, Lysの様な塩基性アミノ酸が多いこと、またSerineが19残基も存在することからMEKA polypeptideがリン酸化の基質になり得るかも知れない。他方、Methionine残基数も多く、その位置がC末端にかたよっているのも一つの特徴である。

現在網膜に特異的と考えられているタンパク質をあげる(1)と、ロドプシンおよび3種類の色覚受容タンパク質、トランスデューシンのαとγサブユニット、フォスフォジエステラーゼのα、β、γ-サブユニット、c-GMP依存性Na^+チャンネル、オプシンキナーゼ、S-アンチゲンなどがあげられる。

Ala	4	Leu	14
Arg	11	Lys	18
Asn	5	Met	10
Asp	11	Phe	6
Cys	3	Pro	4
Gln	8	Ser	19
Glu	12	Thr	1
Gly	6	Trp	3
His	4	Tyr	2
Ile	4	Val	5

図3、 MEKA polypeptideのアミノ酸組成

我々が単離したMEKA cDNAは、網膜に特異的な未知ポリペプチドをコードしていると考えられる。これらを確かめるために、またその生理的役割を明らかにするために、現在 In situ hybridizationの実験を進めている。MEKA polypeptideに対応する合成ペプチドを用い、その抗体の作製も検討中である。

[文献]

1) 郭 哲輝、 三木直正(1987) 遺伝、41, 25-30

2) Kuo, C-H., Yamagata, K., Moyzis, R.K., Bitensky, M.W. and Miki, N. (1986) Mol. Brain Res. 1, 251-260

3) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., (1872) Molecular cloning, A Laboratory Manual, Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

4) Messing, J., (1983) Meth. Enzymol., 101, 20-78

12. Rat Neuropeptide Y precursor mRNA：cDNAクローニング，組織特異性発現，glucocorticoidsによる調節

樋口宗史・Sabol S. L.*（大阪大・医・第一薬理，NIH*）

〔要　約〕

The primary structure of the mRNA coding for the rat neuropeptide Y precursor (prepro-NPY) was determined by sequencing of rat brain cDNA clones. Rat prepro-NPY consists of a 29-residue signal peptide, followed by the 36-residue NPY sequense, a proteolysis/amidation site Gly-Lys-Arg, and finally a 30-residue C-terminal peptide. The strong evolutionary conservation of NPY and C-terminal peptides suggests that both peptides have important physiological activities. In the rat central nervous system, prepro-NPY mRNA (800 bases) is most abundant in the striatum and cortex (6 and 5 pg/ug total RNA, respectively) and moderately abundant in the hippocampus, hypothalamus, and spinal cord. The rat adrenal, spleen, heart, and lung have significant levels of prepro-NPY mRNA. Regulation of the prepro-NPY mRNA abundance was studied in PC12 rat pheochromocytoma and NG108-15 mouse neuroblastoma-rat glioma hybrid cells, which contain 0.25 and 11 pg prepro-NPY mRNA per μg total RNA, respectively. In these cells prepro-NPY mRNA levels were increased by treatment with glucocorticoids, whereas other steroids did not affect prepro-NPY mRNA levels. NPY gene expression is positively regulated by glucocorticoids.

Key word：

Neuropeptide Y mRNA, gene expression, glucocorticoids

Introduction

One of the most abundant neuropeptides, NPY (1) colocalized with mainly catecholamines, or other neurotransmitters/neuropeptides in many neurons (2,3). NPY is involved in the regulation of blood pressure, circadian rhythm, release of hypothalamic hormones,and feeding behavior. One molecular mechanism of NPY on these actions is the inhibition of catecolamine-release from neurons via specific NPY receptors (4,5). The nucleotide sequense of human pheochromocytoma prepro-NPY mRNA (NPY mRNA) and the organization of the human NPY gene have been determined (6,7). However, information about the structure of prepro-NPY of other species and about the regulation of NPY gene expression is currently lacking. We have isolated and sequenced rat prepro-NPY cDNA clones. Using this cDNA as a probe, we have examined the tissue-specific expression and the hormonal regulation of this gene.

Methods

Screening of cDNA libraries. Two libraries constructed from the λ gt11 vector were used; a rat brain cDNA library and a hypothalamic cDNA library . Plaques were screened with 5 -end labeling oligonucleotides or the nick-translated 411 bp fragment of human prepro-NPY cDNA (6, 8). DNA sequencing. Inserts were subcloned into M13 phage DNA and nucleotide sequences were determined by Sanger's method. Preparation of NPY transcript. The rat NPY insert was ligated into the EcoR1 site of the plasmid Bluescribe M13(-) (Stratagene). Transcript by T7 RNA polymerase were purified by phenol extraction. Preparation of cellular RNA. Total cellular RNA was purified as described by Chirgwin et al.. Northern blot analysis. RNA was electrophoresed in 1.6% agarose gels containing 6%

formaldehyde and 0.5 μg/ml ethidium bromide. Quantitation of NPY mRNA. The amounts of NPY mRNA were determined by dot-blot analysis or Northern-blot analysis, using pBL-NPY1 transcripts as a control. Assay of NPY. The NPY content was determined by radioimmunoassay, as described before (9). HPLC analysis of NPY-like immunoreactivity (NPY-IR) demonstrated that NPY-IR eluted in a single peak. Cell culture. PC12 and NG108-15 cells were cultured in DMEM and the endogeneous steroids were removed by charcoal-treatment.

Results

Structure of rat brain NPY mRNA. The 3 independent clones were found to contain regions of identical sequence. No discrepancies were found in nucleotide sequence common to the 3 clones. The sequense of rat brain NPY mRNA and the deduced sequense of its gene product are shown in Fig. 1 and compared with those of human pheochromocytoma NPY mRNA. The nucleotide sequence predicts that the rat brain prepro-NPY is composed of 98 amino acid residues (Mr 11,032) and contains a sequence (30-65) identical to human NPY. A typical hydrophobic sinal peptide, residues 1-29, directly precedes the NPY sequence. A cleavage between Gly29 and Tyr30 would produce pro-NPY (Mr 8,059). The mature active NPY peptide (Mr 4,271) and C-terminal peptide (Mr 3,463) then would be generated from pro-NPY. The extents of amino acid identity in three coding domains are 86%, 100%, and 93% for the signal, NPY, and C-terminal peptides, respectively, between rat and human. The extents of nucledtide identity are 82%, 94%, and 90%, respectively. Tissue-distribution of NPY mRNA. The NPY cDNA probe hybridized with a RNA band having a mean length of approximately 800 bp. As listed in Table 1, the abundances of NPY mRNA are in good agreement with those of NPY-IR in rat brain regions. NPY mRNA was found to be abundant also in the adrenal gland, spleen, heart, and lung. Regulation of NPY gene expression in neural cell lines. PC12 cells possess a low level of NPY mRNA (0.25+ 0.04 pg/μg total RNA). Dexamethasone (Dex) elicited a gradual elevation to 2-3 times the control between 24-96 h . The half maximal and maximal effects were achieved with 17 nM and 10 μM Dex, respectively. Only the glucocorticoid steroids hydrocortisone, corticosterone, and dexamethasone were active at 1 μM, while other steroids were inactive. NG108-15 cells contain remarkably high amounts of NPY mRNA (11+2 μg/μg RNA), as well as a larger species of 7 kb, possibly a primary transcript of the NPY gene. Dex-treatment elevates NPY mRNA level slowly, reaching 70% above the control at 2-3 days (Fig.2). The half-maximal and maximal effects were obtained with 0.3 nM and 10 nM Dex, respectively.

Discussion

The principal conclusions are as follows: (a) The structures of NPY and the C-terminal peptide of pro-NPY are evolutionarily well conserved. (b) The distribution of NPY mRNA in rat brain and peripheral tissues is in most cases similar to that of the NPY peptide content. (c) The rat NPY gene expression is possitively regulated by glucocorticoids. The high conservation of C-terminal peptide suggests the significance of this peptide, althogh no physiolosical activity of this peptide has not yet been identified. The discrepancy between NPY mRNA and NPY peptide levels in the hypothalamus suggests that much of stored NPY in hypothalamus is from extrinsic. The effect of glucocorticoids could be due to increased NPY gene transcription

Fig. 1 Nucleotide sequence of rat brain NPY cDNA and deduced amino acid sequence of rat pro-NPY

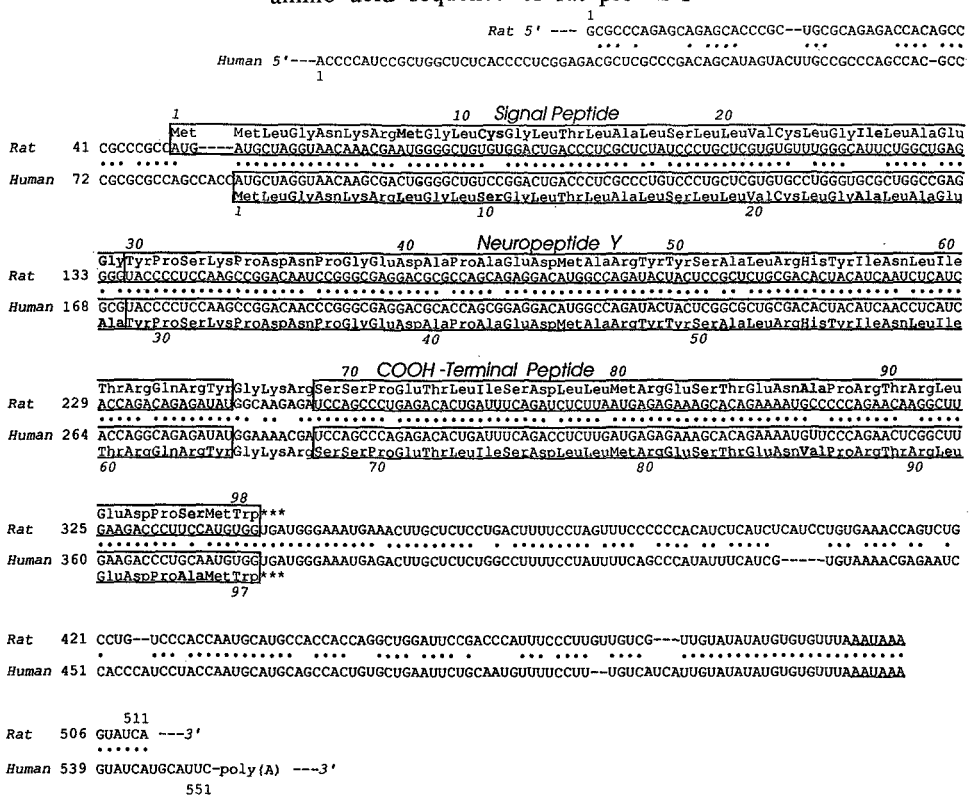
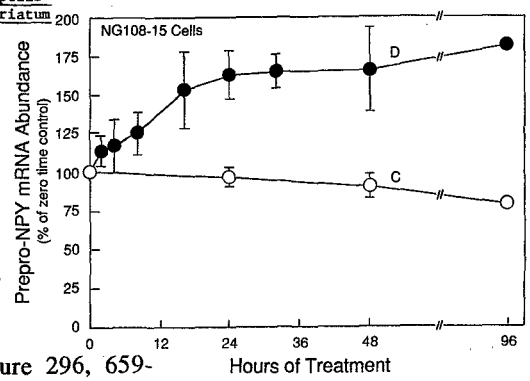


Table 1 The distribution of NPY mRNA and NRY immunoreactivity

Tissue	A. Abundance of NPY mRNA pg/μg RNA	% of striatum	B. Abundance of immunoreactive NPY peptide pmol/g tissue		% of striatum
Central Nervous System					
Striatum	6.1 ± 0.9	100	54 ± 4	(8)	100
Frontal cortex	5.0 ± 0.8	82	55 ± 5	(8)	102
Hippocampus	2.1	34	23 ± 1	(8)	43
Hypothalamus	2.0 ± 0.1	33	120 ± 10	(8)	222
Medulla oblongata	1.1	18	8 ± 1	(10)	15
Midbrain	0.6	10	3 ± 1	(8)	6
Cerebellum	0.4	7	<0.3		<0.6
Spinal cord	1.8	30	7 ± 1	(6)	13

FIG. 2 Time-course of NPY mRNA induction by Dex



References

1. Tatemoto,K., Carlquist,M., and Mutt,V. (1982) Nature 296, 659-660. 2. Everitt,B.J., Hokfelt,T. Ternius,L., Tatemoto,K.,Mutt,V., and Goldstein,M. (1984) Neuroscience 11, 443-462. 3. Fuxe,K., Agnati, L.F., Harfstrand,A., Zini,I. Tatemoto,K., Pich,E.M., Hokfelt,T., Mutt,V.,and Terenius,L. (1983) Acta Physiol. Scand. 118, 189-192. 4. Higuchi,H., Costa,E., and Yang,H.-Y.T. (1987) Fed. Proc. 46, 1448. 5. Higuchi,H., Costa,E., and Yang,H.-Y.T. (1987) J. Pharmacol. Exp. Therapeut., *in press*. 6. Minth,C.D., Bloom,S.R., Polak,J.M., and Dixon,J.E. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 4577-4581. 7. Minth,C.D., Andrews,P.C., and Dixon,J.E. (1986) J. Biol. Chem. 261, 11974-11979. 8. Higuchi,H., Yang,H.-Y.T., and Sabol,S.L. (1987) Fed. Proc. 46, 2182. 9. Higuchi,H., and Yang,H.-Y.T. (1986) J. Neurochem. 46, 1658-1660.

13. マウス脳Myelin-associated glycoprotein のcDNAクローニング

藤田信也・佐藤修三・栗原　正*・
犬塚　貴・高橋康夫*・宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科，神経薬理*）

〔要　約〕

マウス脳myelin-associated glycoprotein (MAG)のcDNAクローニングを行なったので報告する。

マウス脳cDNAライブラリー（λgt11）より，マウス脳MAGcDNA を抗体によるスクリーニングにより得た。得られたcDNAは，1350bpであり，ヌクレオチド配列の解析によりラットMAGcDNA と相同性を得た。得られたcDNAには，終止コドンを含む45bpのexonを含むものであった。ラットにおいては幼若期に分子量の大きなimmature MAGが存在し，成長に伴いalternative splicingによって分子量の小さなMAG となることが知られているが，マウスにおいても同様の機構によりimmature type からmature typeにスイッチされると考えられた。この変化はmyelin形成上重要なステップであろうと考えられ，myelin形成不全や脱髄疾患におけるmyelin再形成障害などの機序を解明する上で興味深い。

Key word :　cDNA cloning, myelin-associated glycoprotein, alternative splicing

Myelin-associated glycoprotein (MAG)は，分子量約100kDdのミエリン膜蛋白である。ミエリン内では，神経軸索周囲に集積しているという分布様式や，neural cell adhesion molecule との交叉抗原性が存在することなどより，神経細胞とミエリン形成細胞との相互作用上重要であり，ミエリン形成に深く関わっていると考えられている[1]。また多発性硬化症(MS)[2]や，進行性多巣性白質脳症(PML) などの脱髄疾患において脱髄周辺において，他のミエリン蛋白に比べてMAG の減少が最も著しいと報告されており[3]，脱髄過程で何らかの役割を担っていると考えられている。一方ラットでは，幼若期に分子量のやや大きなimmature MAGが存在し，成長と共に分子量を減じることが知られており，この変化はミエリン形成に重要だろうと考えられている。ラットでは，この変化はalternative splicingによると報告されている[4]。今回我々は，マウスMAG について，cDNA cloningを試み，一部知見を得たので報告する。

（実験方法）

マウス脳よりNortonらの方法にしたがってミエリンを精製した後，リチウムジヨードサルチル酸法及びSepharose CL-6B によるゲル濾過によりMAG を精製した。精製MAG 250 μgをFreundの完全アジュバンドと共に家兎に3回免疫し，ポリクローナル抗体を得た。

マウス脳cDNAライブラリー（λgt11）は，Clontech Laboratories のものを用いそのスクリーニングは，Huynh [5]らの方法に従った。ただし抗体に反応するプラークの免疫染色は，色原体にクロロナフトールを用い，アビチン－ビオチン－ペルオキシダーゼ複合体(ABC) 法によった。ファージDNA は，Huynh ら，Davis [6]らに従って調整し，DNA のヌクレオチド配列は，Maxam-

Gilbert 法で決定した。

（結果）

マウスcDNAライブラリー（λgt11）を抗マウスMAG 抗体でスクリーニングし，IPTGにより発現する陽性クローン１箇を分離した。このクローンのDNA を調整し，EcoRI 切断でインサートを切り出すと，750bp と600bp に分かれるcDNA断片が得られた（図1，レーン1，2）。これらのcDNA断片の両端を^{32}P でラベルし，Maxam-Gilbert 法でヌクレオチド配列を部分的に決定した（図2）。決定した配列はすべてラットMAG の配列[7)8)]と相同性を持ち，このクローンのインサートがマウスMAG のcDNAであることが判明した。ヌクレオチド配列から，750bpは上流に，600bp は下流に配列された（図 2）。600bp 断片にはポリA シグナルとポリA が存在しており，cDNAの3'末端を含むものであった。これらのcDNA断片はプラスミドにサブクローニングし （図 1，レーン4，5），プラスミドから切り出したcDNAをプローブにしてさらに上流域のcDNAを検索中である。

（考察）

中枢神経内において，MAG のポリペプタイドは分子量 67000と 72000の２つが存在するとされ，後者はimmature MAGに相当すると考えられる。この分子量の差は，mRNAレベルで規定されてきたが[3)]，近年ラットのMAG のcDNAの構造が明らかにされ[7)]，coding region の中に45bpの終止コドンを含むexonが挿入されるか否かにより，２種類のmRNAが存在し，この差により２種類のMAG ポリペプタイドが生じることが明らかになった[4)8)]。我々の得たマウスMAG cDNAクローンには，この45bpが含まれており，マウスにおいてもラットと同様の機構により，２種類のMAG ポリペプタイドが生じると考えられた。

MaturationによるMAG の分子量の変化は，alternative splicingによるものと考えられ，他のミエリン蛋白と類似していることが明らかにされた。また，MAG 分子量の変化により，ミエリンと神経軸索との相互作用が変動する可能性があり，alternative splicingはミエリン形成に深く関わっていると思われ，ミエリン形成不全もしくは，ミエリン再生障害の病態を考える上で重要な機構であると予測される。

（文献）

1. Quarles RH: Myelin associated glycoprotein in development and disease. Dev Neurosci 6:285,1984.

2. Johnson D, Sato S et al: Quantitation of the Myelin-associated glycoprotein in human nervous tissue from control and multiple screrosis patients. J Neurochem 46:1086,1986.

3. Frail DE and Braun PE: Two developmentally regurated messenger RNAs differing in their coding resion may exist for the myelin-associated glycoprotein. J Biol Chem 259:14857,1984.

4. Lai C, Brow MA et al: Two forms of 1B236/myelin-associated glycoprotein, a cell adhesion molecule for postnatal neural development are produced by alternative splicing. Proc Natl Acad Sci USA 84:4337,1987

5. Huyhn TV, Young RA and Davis RW: Constructing and screening cDNA libraries in λgt10 and λgt11 in DNA Cloning (Glover DM Ed.)Vol 1 p.49. IRL Press, Oxford, 1985.

6. Davis RW, Bostein D and Roth JR: Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1980.

7. Arquint M, Roder J et al: Molecular cloning and primary structure of myelin-associated glycoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 84:600, 1987.

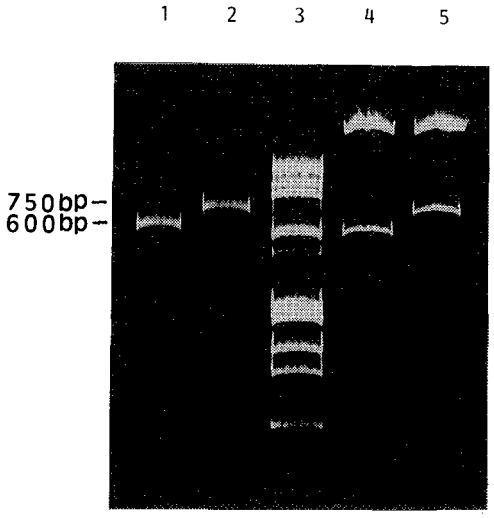


図 1 マウスMAG のcDNA断片750bp （レーン 1）及び600bp （レーン 2）。レーン4, 5はそれぞれサブクローニングしたプラスミドのEcoRI 切断。レーン 3はφX174 DNA のHae Ⅲ切断。

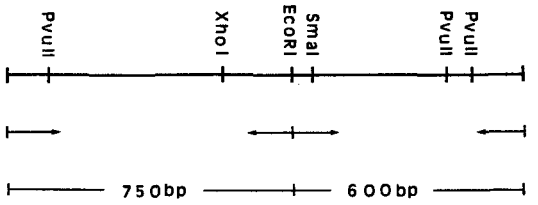


図 2 マウスMAGcDNA の制限酸素地図。
矢印はヌクレオチド配列を決定した箇所と方向を示す。

14. チロシン及びトリプトファン水酸化酵素の活性調節タンパク質（14−3−3）のcDNAクローニングと組織分布

市村　徹・礒辺俊明・奥山典生・高橋聖之*・
桑野良三**・荒木一明**・高橋康夫**
（都立大・理・化学，高知医大・病理*，新潟大・脳研・神経薬理**）

〔要　約〕

ウシ脳から分離した 14-3-3 タンパク質（以下 14-3-3)の cDNA クローニング及びモノクローナル抗体を用いた分析で以下の結論を得た。
1，cDNAの塩基配列から1つの open reading frame の存在が認められ，246 個のアミノ酸から成る分子量 28211のタンパク質が予想された。この構造は，14-3-3の SDS電気泳動による分子量（27kDa），およびアミノ酸組成（相関係数；0.98）と高い相同性を示した。
2，14-3-3のアミノ酸配列は既知タンパク質とは構造類似性を示さなかった。従って 14-3-3 は現在までに知られていない新しいタンパク質ファミリーを構成するものと考えられた。
3，Northern blot 及び，モノクローナル抗体を用いた Western blot 分析から，(i) 14-3-3は脳に高濃度に分布し，また微量ながら（脳の 24%以下）他の組織にも存在した。(ii) 14-3-3 分子種の発現パターンは組織間で異なっていた。(iii) 14-3-3 の組織分布はチロシン水酸化酵素より，むしろカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II（以下キナーゼ II）の分布と相関性を示した。この事は，14-3-3にはキナーゼ II に依存する別の生物活性がある事を示唆している。
4，ヒト神経組織を用いた免疫組織化学により14-3-3の分布は主に神経細胞である事が明らかになった。一方，脳室上衣細胞やChroid plexus の上衣の ciliaがある細胞膜に一致して 14-3-3 の存在が認められた。

ey word：　cDNA cloning / brain-specific 14-3-3 protein / protein kinase

カテコールアミンやセロトニンの合成速度は，律速段階酵素であるチロシン水酸化酵素とトリプトファン水酸化酵素の活性変動により調節されている。この調節機構の1つにカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II（以下，キナーゼ II）による酵素のリン酸化反応が挙げられており[1]，しかもこの活性調節には別のタンパク性因子が必須である事が明らかにされている。我々は一連の脳内タンパク質の研究の過程で，従来脳特異タンパク質の1つとして考えられていた 14-3-3 タンパク質（以下，14-3-3）がこの調節因子と同一物である事を明らかにした[2]。この調節機構を分子レベルで考察するための基礎として 14-3-3 の cDNA クローニングを試みた。また，得られた cDNA プローブを用いた Nothern blot 分析及び 14-3-3 に対する特異抗体による Western blot 分析により 14-3-3 の組織分布について検討した。

（実験方法）<u>14-3-3 の単離</u>：　ウシ脳（20kg）の可溶性画分から硫安分画（50%; pH 7.1 - 85%; pH 4.7)及び DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーによる既報[3]の方法で，14-3-3を分離し，更に TSK-Gel DEAE-5PW を用いた高速液体クロマトグラフィーにより，2種類の 14-3-3（14-3-3 a,b）を単離した。14-3-3 bについては BrCN 分解後，フラグメントを分離精製して一部のアミノ酸配列を決定した。

<u>cDNAクローンの調製と配列決定</u>：　cDNAライブラリーは，ウシ小脳のミクロゾーム画分から SDS/フェノール/クロロホルム 法，さらには オリゴdTセルロース 法で精製した poly(A)RNA より，Land[4]の方法で構築した。このライブラリーを 14-3-3bの部分アミノ酸配列から化学合成した 17 mer のオリゴヌクレオチドプローブでスクリーニングした。合成プローブは 5' 末端を^{32} Pで標識し，ニトロセルロースフィルター上でアルカリ変性，固定したコロニー DNAと37° C でハイブリッド形成した。陽性クローンの塩基配列は Maxam and Gilbertの方法[5]で決定した。

<u>Nothernブロット解析</u>：　Nothern ブロッティング及びハイブリッド形成は Thomas[6]に従った。プローブの DNA断片はニックトランスレイションで^{32}P 標識した。

<u>モノクローナル抗体の調製</u>：　14-3-3 を 0.15M NaCl を含む 0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.2）に溶解（1mg/ml）し，等量の Freund's complete adjuvand と混合後，5 週齢の Balb/c マウス1匹に対し1回の免疫当たり 50 ug投与した。血中抗体価の上昇を ELISA法で確認した後，常法によりヒ細胞とマウス骨髄細胞（P3U1）との細胞融合を行った。 HAT選択培地で増殖した 360個の雑種細胞クローンから 14-3-3 に対し抗体産生能を示したクローンを限界希釈法でクローニングした後，各クローンの細胞を Balb/c マウス腹腔に移植し，その腹水より濃縮抗体を得た。

<u>免疫組織化学</u>：ヒト脳組織のパラフィン切片上で，ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いる染色法を使用した。

（結果と考察） 14-3-3 の cDNA クローニング：ウシ小脳の cDNA ライブラリー（3x10⁴ クローン）を，実験方法に記した手順でスクリーニングしたところ陽性を示すクローンが６個見い出された。制限酵素地図及び合成プローブとのサンブロット分析より，この内の４個は互いにオーバーラップする，すなわち同一種の mRNA から派生したクローンである事がわかった。そこでこの塩基配列を Fig.1に示す方法で決定した。

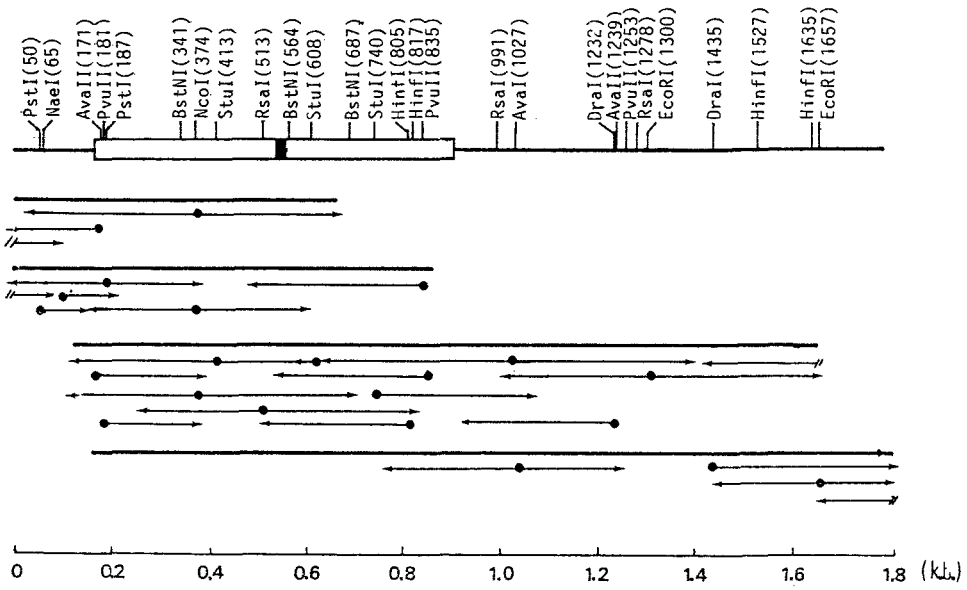


Fig.1 14-3-3 mRNA の制限酵素地図とシークエンスの方法
合成プローブと反応した４つの cDNA クローンを重ねて，14-3-3 mRNA の塩基配列を決定した。
白箱はタンパクコード領域を，黒箱は合成プローブの位置を示す。矢印は配列決定の方向を示す。

決定した配列は 1793 塩基で，3'末端に 97 個の poly(A) 鎖を含んでおり，poly(A) 鎖の 21-26番目上流に AATAAA の poly(A)鎖付加シグナルが認められた。一方，5'末端の 166-169番目の開始コドン（ATG)から 901-903番目の終止コドン（TGA)まで連続した open reading frame が存在した。推定されるタンパク質のアミノ酸残基は 246で，分子量は 28221であった。この値は 14-3-3 の SDS電気泳動による分子量，27kDa と良く一致した。また予想されるアミノ酸組成値は，14-3-3の組成と高い相同性（相関係数：0.98）を示した。14-3-3と既知タンパク質との構造類似性をコンピュータープログラム（NBRF-IDEAS）により検索したが有意な類似性を示す既知タンパク質は見い出されなかった。従って，14-3-3は現在までに知られていない新しいタンパク質ファミリーを構成するものと考えられた。

Nothern ブロッティグ：Fig.2 に cDNA のタンパク質コード領域（PvuII(181)-PvuII(835)）または非コード領域（PstI(50)-PvuII(181)）をプローブとしてノーザンブロットハイブリッド形成を試みた結果を示した。

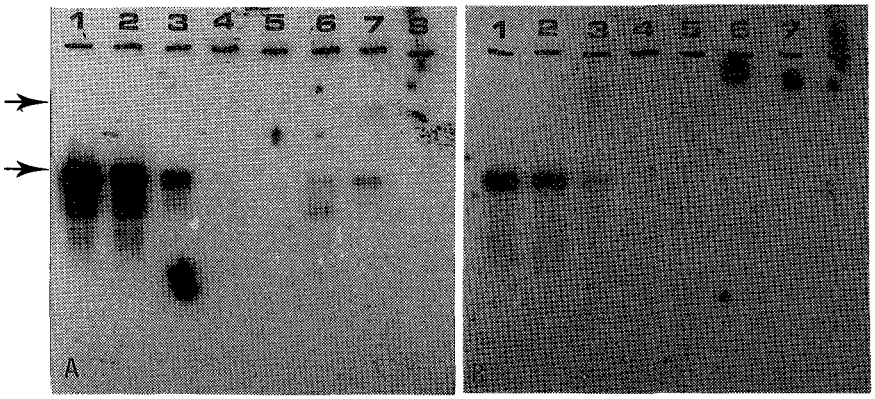


Fig.2 ノーザンハイブリッド形成
A：コード領域プローブ　B：非コード領域プローブ
１，小脳　２，大脳　３，脳幹　４，副腎　５，肝臓　６，心臓　７，骨格筋　８，小腸
矢印は Rat肝臓の 28S RNAと 18S RNAの位置を示す。

コード領域の場合，1800塩基付近の陽性バンドが，大脳，小脳，脳幹，骨格筋を中心に検討したすべての組織に観察された（Fig. 2A）。一方，非コード領域の場合には，大脳，小脳，脳幹からは同一サイズの陽性バンドが観察されたものの，他の組織では有意なバンドは検出されなかった（Fig. 2B）。14-3-3は少なくとも５種類以上の構造類似な分子種の混合物である。コード領域プローブはこれら一連の分子と交差ハイブリッド形成し，非コード領域のプローブは塩基配列を決定した mRNA とのみ反応するものと仮定すれば，以上の結果は，(1) クローニングした mRNA は脳においてのみ発現している14-3-3分子種である。(2) 14-3-3分子種の発現パターンは各組織で異なっているという２つの可能性を示唆している。

モノクローナル抗体の反応性：
モノクローナル抗体（C9-1）の特異性について免疫ブロット法を用いて検定した。二次元電気泳動後のウシ脳可溶性タンパク質画分において，C9-1は 14-3-3 の 27 kDa のポリペプチドとのみ反応し，30 kDaのポリペプチドとは反応しなかった（Fig. 3）。

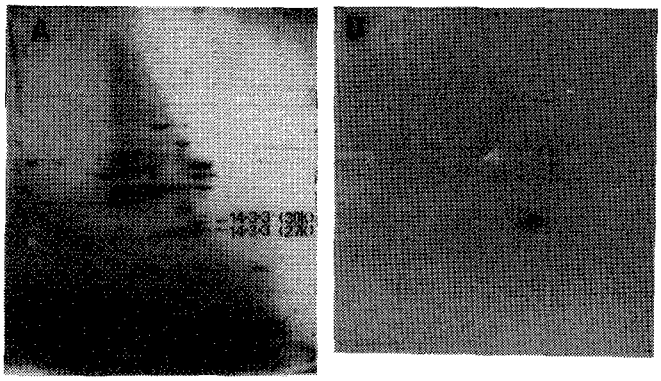


Fig. 3
ウシ脳水抽出物を２次元電気泳動した後
A：ＣＢＢ染色
B： C9-1 による免疫ブロッティング

免疫組織化学：
ヒト脳の各部位における 14-3-3（27 kDa ポリペプチド）を免疫組織化学の手法を用いて検索した。陽性細胞は主に神経細胞で，特に海馬アンモン核の カ粒細胞や橋核の神経細胞が最も強く反応した。一方，脳室上衣や Chroid plexusではその上皮が染色された。興味ある事にこの染色パターンは ciliaがある細胞膜に一致してきわめて強いシグナルを示した。

組織分布：
ウシ各組織からの水抽出物を対象に C9-1 を用いた免疫ブロット法で 14-3-3 量の検索を行った。脳に高濃度に，また他の組織でも微量ながら（脳の 24%以下）検出された（Table 1）。　またその分布は，副腎に多量に（脳の 160%）に存在するチロシン水酸化酵素より，むしろキナーゼIIの分布と相関性を示した。これらの結果は 14-3-3 には，チロシン及びトリプファン水酸化酵素の活性化以外にも，キナーゼ II に依存した別の生物活性がある可能性を示唆している。

Table 1　14-3-3, キナーゼ II，チロシン水酸化酵素の組織分布

Tissue	14-3-3	14-3-3-2[7]	Kinase-II[8]	TyrOHase[9]
Brain (whole)	100	100	100	-
Brain stem	-	-	-	100
Brain cortex	-	-	-	26
Brain cerebellum	-	-	-	10
Adrenal	24	19	9	160
Spleen	-	19	25	7
Heart	2	4	12	1
Skeletal muscle	-	2	4	-
Liver	1	5	<0.1	3
Kidney	6	1	<0.1	-
Large intestine	16	21	-	-
Overy	5	-	-	-

-; = not examined

＜分献＞
1) Yamauchi,T., Nakata,H., and Fujisawa,H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 5404-5409
2) Ichimura,T., Isobe,T., Okuyama,T., Yamauchi,T., and Fujisawa,H. (1987) FEBS Lett. 219, 79-82
3) Kadoya,T., Tamura,A., Ichimura,T., Manabe,T., Isobe,T., Okuyama,T., and Nakajima,T. (1985) Bull. Jap. Neurochem. Soc. 24, 37-39
4) Land,H., Grez,M., Hauser,H., Lindenmaier,W., and Schutz,G. (1981) Nucleic Acids Res. 9,2251-2266
5) Maxam et al. (1980) Methods Enzymol. 65, 499-560
6) Thomas,P.S. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 5201-5205
7) Boston,P., Jacson,P., and Thompson, R.J. (1982) J. Newrochem. 38, 1475-1482
8) Kennedy,M., and Greengard,P (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 1293-1297
9) Nagatsu,T., Levitt,M., and Underfriend,S. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2910-2917

15. ラット脳Cholecystokinin遺伝子の発現

桑野良三・荒木一明・薄井　宏・高橋康夫
（新潟大・脳研・神経薬理）

〔要　約〕

ラットCholecystokininの遺伝子発現を研究するために、遺伝子クローニングを行ないその構造特に転写開始点を含む5'上流域を詳細に検討した。更に遺伝子の発現・転写を調節すると思われるＤＮＡ結合蛋白を検索した。

1）転写開始点の決定をＳ１mapping、Primer Extension法により行なった。少なくとも３箇所から転写が開始することが示唆された。

2）HeLa細胞抽出液を使ったIn Vitro転写系での実験は（１）の結果を支持した。しかし、各々の転写開始点によりその転写活性の強さに差が認められた。

3）プロモーター領域に特異的に結合する因子を調べた。Gel shift分析、Exonuclease Ⅲ分析、およびDNase I Footprintingにより、Cholecystokinin遺伝子上流域と特異的に結合する蛋白がラット脳核抽出液に存在することを見いだした。

Key word：Cholecystokinin, Gene, Transcription

Cholecystokinin(CCK)は中枢神経系、特に大脳に高濃度に存在するペプチドであり高次精神神経活動に重要な役割を担っていると考えられている。ＣＣＫはその局在、放出、電気生理学的研究から神経伝達物質あるいは調節物質として働いていることが示唆されている。また種々の証拠からある種の精神・神経疾患の病態との関連でも興味がもたれている。中枢神経系におけるＣＣＫのさまざまな生理・病態機能を解明するために、我々は遺伝子工学的手法を用いて研究を行なって来た。先ずｃＤＮＡクローニングを行ないＣＣＫ前駆体の全アミノ酸配列を決定した（1)。前駆体は一種類のｍＲＮＡからなり、ｃＤＮＡをプローブに用いた実験からＣＣＫｍＲＮＡは発達に伴って増加すること、成熟ラットでは脳内の各部位に著しい分布の差があることを観察した（2)。次にＣＣＫ遺伝子の発現・転写調節機構を明かにするために、遺伝子のクローニングを行なった（3)。今回、ＣＣＫ遺伝子の転写開始点を決定し無細胞転写実験を行なった。又、転写を制御する因子として５'上流域に特異的に結合する蛋白を検索したので併せて報告する。

［実験方法］

① Primer Extension

ｃＤＮＡのHapⅡ-DdeⅠ(47bp)制限酵素フラグメントをprimerにして逆転写酵素と脳poly(A) ＲＮＡを用いて伸長し、７Ｍ尿素・ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。

② Ｓ１Mapping

転写開始点を含むと思える４２０bpのＤＮＡフラグメント（５’端ラベル）をpoly(A)ＲＮＡとハイブリさせ、Ｓ１ヌクレアーゼ処理し、保護されたバンドを電気泳動で分析した。

③　無細胞転写実験

In Vitro転写実験はＭanley らの方法に従った（4)。HeLa細胞から全細胞抽出液を調製し、上流１Kbを含むＤＮＡを鋳型に用いて、[32P]ＵＴＰを含むＮＴＰと反応を行なった。合成されたＲＮＡをフェノール抽出し、変性ゲル電気泳動により分析した。低濃度のαアマニチンを添加して、RNA polymeraseⅡによる転写産物であることを確認した。

④　ＤＮＡ結合蛋白の検索

ラット脳、肝臓から山本・高橋の方法に従って核を調製した（5)。核抽出液の調製はＢorgmeyerらの方法を一部変更して行なった（6)。特定のＤＮＡを５’端ラベルしKlenow Fr.で修復したもの(0.2ng）を核抽出液と反応し、Gel shift 分析を行なった。一方、反応後、 ExonucleaseⅢあるいは DNaseⅠによる消化で保護されたＤＮＡを電気泳動で分析した。

［実験結果と考察］

Primer Extensionの結果から、ＣＣＫｍＲＮＡの５’上流は DdeⅠ siteから最長１７０ヌクレオチド存在することが示された（図１）。又、数本のバンドの存在はＧＣ含量の多い処で逆転写酵素の反応が中断しているのか、あるいは若干長さの異なるｍＲＮＡの存在を示しているのかもしれない。伸長したバンドはSequencingが出来る程カウントがないので、次にｃＤＮＡからinternal primer(HapⅡ-PvuⅡ）を調製し再度クローニングを試みた。得られた陽性クローンは約２７０bpありSequencingの結果、Primer extensionで最もよくのびたものと一致した。S1 Mappingでも保護されたバンドはやはり数本認められた。最上流のものはPrimer extensionでの最長のものと同じｓｉｚｅであった。これを本実験に於いて転写開始点＋１とした。In Vitro転写実験では、図２に示すように PvuⅡ，BamHⅠで切断したlinearＤＮＡを鋳型として合成した”run off ”転写産物を分析した。 PvuⅡで約２００、BamHⅠで約１６０ヌクレオチドのαアマニチン感受性転写産物が認められた。以上のことからＣＣＫ遺伝子は複数の転写開始点を有し、各々の転写開始には強さの差があるように思われた。

Gel shift 分析の結果からバンドに強弱の差があるものの、互いに共通のバンドと脳核抽出液にだけ存在するバンドが認められた（図３）。フラグメントｂとｄとにあってａとｃには脳に特異的に結合するバンドは存在しなかった。特異性を確認するために阻害実験をした。Competitorとしてｂとｄを用いると脳にSpecificなバンドは強く消失したが、ａとｃを用いた時にはバンドの強さに変化が認められなかった。すなわちｂとｄに共通の－９６から＋２２の領域に結合する因子があると思われた。ＤＮＡに結合する蛋白が存在するとしたら、その結合した蛋白の処で ExonucleaseⅢによる３’端からの消化が止まるという方法を用いた実験結果も、上記のGel shift 分析を支持した。ＤＮＡ上の結合蛋白の位置を DNaseⅠ Footprintingにより確認した。ＣＣＫ遺伝子の、とりわけ脳での発現・転写調節に、この５’上流域に結合する蛋白が

どのような意味をもつかは、今後、更に詳細な検討が必要と考えられる。

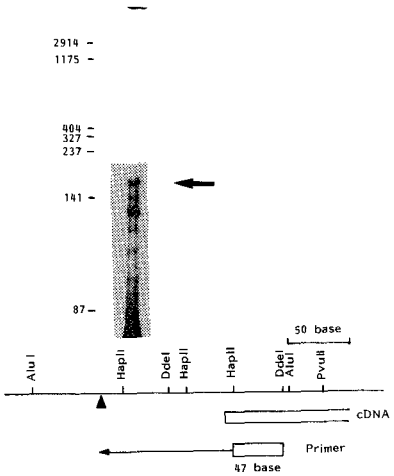


図１　Primer extension分析
▲　転写開始点

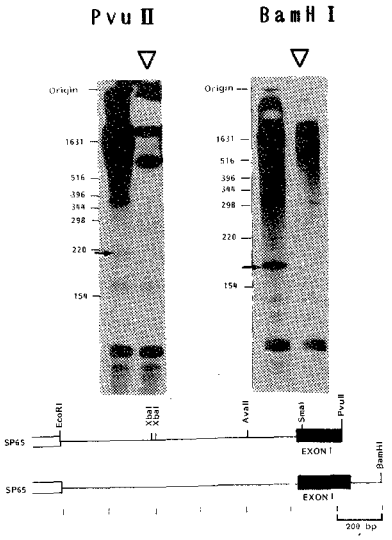
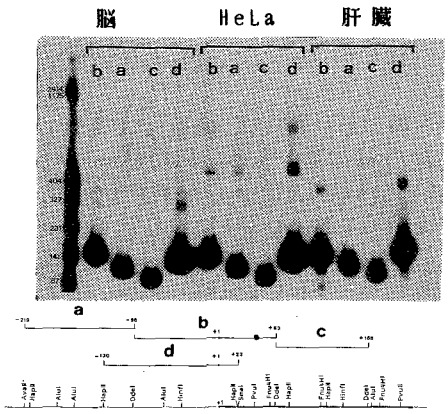


図２　In vitro　転写実験
▽　αアマニチン添加

図３　Gel shift assay



［文献］

(1) Kuwano,R.,et al.,(1984)　J.Biochem. 96,923-926.

(2) Hasegawa,M.,et al.,(1986)　FEBS Lett.,194,224-226.

(3) 薄井宏、他　(1986)　神経化学　27,562-564.

(4) Manley,j.l.,et al.(1980)　Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77,3855-3859.

(5) Yamamoto,H.and Takahashi,Y. (1978) J.Neurochem.31,449-456.

(6) Borgmeyer,U.,et al.,(1984)　Nucleic Acids Res.12,4295-4311.

16. Myelin deficient (mld) マウスにおける重複したMBP遺伝子の構造とプロモーター活性

岡野栄之・田村隆明*・三浦正幸・青山淳夫・池中一裕・御子柴克彦 (大阪大・蛋白研, 基礎生物研*)

〔要　約〕

myelin deficient (mld)は、常染色体劣性の遺伝様式を取るミュータントマウスであり、ミエリン塩基性蛋白質(Myelin Basic Protein; MBP)の発現障害による中枢神経系のミエリン形成不全を特徴とする。また、mldのMBP遺伝子は、重複(正常はsingle gene)しているにも拘らず、そのmRNA量は激減していることを我々は、以前に明らかにしている。これらの因果関係を明らかにするために、重複したmldのMBP遺伝子(gene-1、gene-2と名付ける)のプロモーター領域のクローニングを行った。上流1.3kb(この領域の重要性を我々は、既に確認している)のプロモーター活性を、正常、gene-1、gene-2について無細胞転写系で、測定したところ、3者の間で差が認められなかった。また、上流714bp迄決定した塩基配列は、3者の間で完全に一致した。mldにおけるMBP遺伝子の転写開始部位は、primer extension法により、正しく保たれていることが明らかとなった。また、mldのMBP mRNAは、正確にスプライシングを受け、効率よく翻訳されることも以前、我々は明らかにした。これらのことより、mldにおけるMBP mRNA量の減少を、プロモーター領域の変異または、mRNAの安定性の低下に帰することは、困難であると考えられた。一方、mldのMBP遺伝子の構造は、非常に複雑であり、今回我々は、exon 3が、gene-2の上流約10kb付近に逆向きに存在していることを見いだした。他のグループの報告と併せると、MBP mRNA減少機構として、2つの遺伝子の染色体上での相対的位置関係に起因した、transcriptional interference等の関与が、予想された。

Key word : promoter activity, gene duplication, transcriptinal interference.

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り、ともにオリゴデンドロサイトで特異的に発現している。MBP の発現が特異的に障害されいるミュータントマウスとして、shiverer とmyelin deficient(mld) があり、前者は MBP 遺伝子の欠失変異であり(4, 12)、MBP の発現は、蛋白質レベルでは検出されていない(6, 8)。従って、shiverer は MBP 分子自体のミエリン形成における役割を解析する上で格好の系である。一方、mld においては MBP の発現が部分的に認められており(5, 7, 9)、しかもその発育過程における発現制御は、加令とともに漸増するといった異常を示す。従って、mld は MBP 遺伝子の発現調節機構解析のための良い系であると考えられる。これまでの我々の解析により、報告されているmld におけるMBPの発現の低下の程度は、mRNA量の低下程度に対応し、mld の MBP 遺伝子は、重複変異を起こしていることが明らかとなっている(10, 11, 13)が、両者の関係は不明である。そこで我々は、重複した mldのMBP 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、構造決定とプロモーター活性の測定を行い、若干の知見を得たので報告する。

[実験方法]

1) 転写開始部位の決定：Primer extension 法により行った。MBP の翻訳開始部位より 20base の相補鎖 (5'-GGTCTCTTCTGTGATGCCAT-3')をプライマーとして用いた。

2) プロモーター領域のクローニング：mld の染色体 DNA を EcoRI と BamHI により完全切断し、size fractionation (5-20kb) 後、λgtwest λB'(EcoRI) 又は、Charon 28 (E,B) ベクターと ligation し、in vitro packaging を行い、gene library を作製し正常MBP 遺伝子のプロモーター領域をプローブとしてスクリーニングした。

3) 塩基配列の決定：M13 ベクターに subcloning 後、dideoxy 法により行った。

4) プロモーター活性の測定：Hela whole cell extract (WCE) を用いた無細胞転写系により測定したtemplate は(Fig.-3A)を参照。正常のMBP gene由来のplasmidをClaIで切断したtemplateと測定用plasmidをPvulで切断したtemplateを1:1で混合し、前者によるrun-off産物をinternal controlとした。

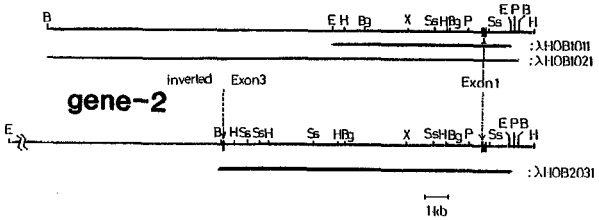
[結果及び考察]

Primer 伸長反応の結果、正常マウスでは68塩基長のmajorなprimer 伸長物が検出された(Fig.-2)。これは正常マウスの転写開始点が翻訳開始部位の 48bp 上流のC残基であることを示す。この転写開始部位点はS1マッピング法により得られたものと一致した。又 mld マウスでは、この転写開始部位は正しく保存されており、この位置から始まる転写産物も正常（生後１８日）の５%以下であると考えられた。この変化は、Northern 法により求められた MBP mRNA 量の変化にほぼ一致するものである。正確な RNA プロセシング、効率良く正確な翻訳(10)が mld において示されており、これは全塩基配列こそ求めていないが、mld の MBP mRNA が構造的に intact な分子であることを示唆する。従って、mld におけるMBP mRNA 量の低下は、mRNA の安定性の低下よりも、転写効率の低下に帰せられると考えられた。mld は、shiverer と染色体上での同坐性を示すため、mld におけるMBP 遺伝子の発現障害は、cis に働く変化によると考えられた。この cis に働く変化を見いだす第一歩として、我々はまずプロモーター領域が mld において正常な構造を有し正常に機能しうるかを検討すべく、プロモーター領域の単離を行った。Southern blot 解析により mld においては、MBP 遺伝子が重複していることが明らかとなっており、既に判明しているそのおおまかな制限酵素地図をもとに、gene libraryを作成した。５' 上流領域が正常と同じ制限酵素パターンを示すものを gene-1 、異なったパターンを示すものを gene-2 と名付けたが、gene-1 は、λgt west λB'ベクターの EcoRI site を用いた library から(λHOB1011)、又 gene-2 は Charon 28 ベクターのEcoRI. BamHI site を用いた library より選択的に単離された(λHOB2031)。これらのクローニング由来の５' 上流 約1.3kb 迄の DNA 断片を用いて、プロモーター活性を測定した。又、この 1.3kb の DNA 断片を５' 側から欠失させた実験より、転写効率を促進させる領域(-251～-105)とTATA box (TTCAAA:-33)やGCbox (CGCCC:-90) を含む basal な転写に重要と思われる領域が観察された。Hela whole cell extract による無細胞転写系(2)と種々の細胞へ導入し４８時間後にβ-ガラクトシダーゼ活性を測定する、いわゆる transient expression assayの両者においてこの-251～-105の領域の重要性が確認された(Miura et al. in preparation)。従って Hela の系での無細胞転写系により、上流 1.3kb 迄の DNA 断片について、mld の MBP 遺伝子の gene-1,2 のプロモーター活性を測定することにした。測定されたプロモーター活性は、予想に反し、gene-1,2 ともに正常のものと差が認められなかった(Fig.-3B)。しかも basal な転写に不可欠と考えられる領域 (+1～-105)、転写効率を促進する領域(-251～-105)、更にその上流の領域(-712迄)の塩基配列を mld MBP gene-1,2について決定を行ったが正常の配列と完全に一致するものであった。我々は mld の重複した MBP 遺伝子は、染色体上（第１８番）のほぼ同じ領域に存在することを見出している(Okano et al. in preparation)。Popko ら(12)は、mld の MBP の一つの遺伝子内において、第３エキソンの上流 2kb 以内で両編成を生じていることを報告している。そこで我々は、上流領域に再編成を伴う gene-2 のクローン(λHOB2031)について、第３エキソンの存在及び逆位の有無を第３エキソン特異的なオリゴヌクレオチドプローブ (5'-CTTGAAGAAATGGACTAC-3') を用いて検索したところ、第３エキソンは BamHI site (Fig.-1)の62bp下流より逆方向に存在していることが明らかとなった(Fig.-4)。

これらの事実及び Popko らの報告により、mld の gene-1 においては５' 上流領域については、正常と同じ構造であるが、遺伝子内では第３エキソンから第７エキソンまでを含む領域が逆位を生じており、第３エキソンの下流約 10kb より gene-2 が存在するということが予想された。mld においては４種の MBP は正常の分子比で存在し、少なくとも１つの intact な MBP 遺伝子が存在するはずであり、gene-2 はおそらく intact な遺伝子と考えられる。一般に２つのシストロンが隣接して存在するとき、片方のプロモーターからの転写は、プロモーターの構造が正常であるにもかかわらずに抑制されることが知られている。特に５' 側のプロモーターによる転写産物が終結する部位より上流から３' 側のプロモーターによる転写が開始する場合、後者の転写効率が低下することが知られており(1, 3)、このような現像は転写干渉(transcriptional interference) と呼ばれている。この mld の場合に、こういった機構が適応できるかどうか今後検討して行きたい。

謝辞；オリゴヌクレオチドの合成をしていただいた泉国辰氏に心から感謝致します。

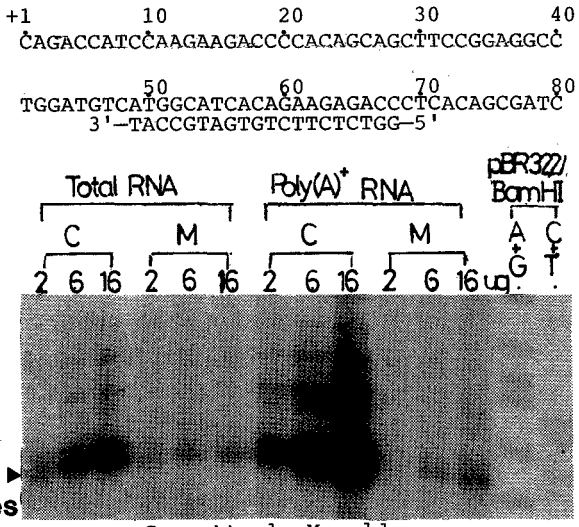
Fig.-1 Structure of 5'-flanking regions of MBP genes in mld



B;BamHI, Bg;BglII, E;EcoRI, H;HindIII
P;PstI, Ss;SstI, X;XbaI.

DNA sequences near the inverted exon3 are shown in Fig.-4.

Fig.-2 Primer extention studies



C; control. M; mld

Fig.-3 In Vitro transcription of MBP genes

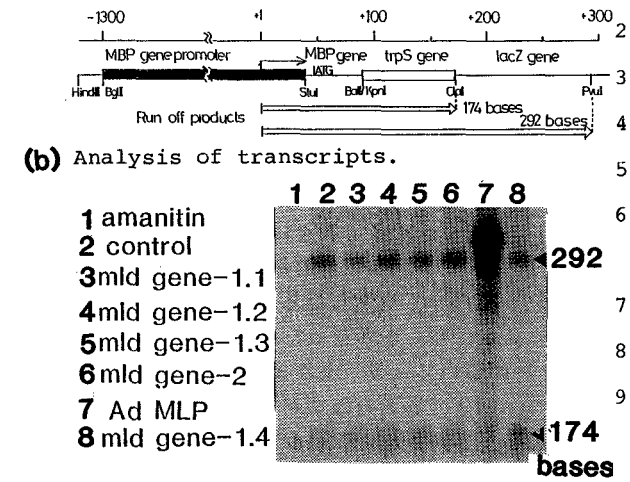
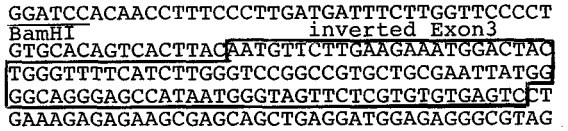


Fig.-4 DNA sequences near the inverted exon 3



REFERENCES

1. Cullen,B.R. et al. (1984) Nature 307 241-245
2. Davison,B.L. et al. (1983) Nature 301, 680-686
3. Emerman,M. and Temin,H.M. (1984) Cell 39, 459-467
4. Kimura,M. et al. (1985) J.Neurochem. 44, 692-696
5. Matthieu,J.M. et al. (1984) Dev. Brain Res.13, 149-158
6. Mikoshiba,K. et al. (1984) In Tsukada (ed.), Genetic Approaches to Developmental Neurobiology, University of Tokyo Press, Tokyo. pp. 195-221
7. Mikoshiba,K. et al. (1987) Dev. Brain Res.in press
8. Miura,M. et al. (1986) Bull. Jpn. Neurochem. Soc.25, 574-576
9. Okano,H. et al. (1986) In Tsukada(ed.) The Ninth Taniguchi Symposium on Brain Science: Molecular Genetics in Developmental Neurobiology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. pp. 187-199
10. Okano,H. et al. (1986) Bull. Jpn. Neurochem. Soc.25, 583-585
11. Okano,H. et al. (1987) J. Neurochem. 48, 470-476
12. Popko,B. et al. (1987) Cell 48, 713-721
13. Roach,A. et al. (1983) Cell 34,799-806

17. Jimpy ミュータントマウスにおけるミエリン形成障害の遺伝子解析

池中一裕・森口　聡・岩崎靖乃*・鹿川哲史
古市貞一*・岡野栄之・御子柴克彦
（大阪大・蛋白研，基礎生物研*）

〔要　約〕

jimpy ミュータントマウスのミエリン形成障害をひきおこす原因をあきらかにするためにX染色体の jimpy locus に局在するプロテオリピド蛋白質(PLP)遺伝子のクローニングと、jimpy の PLP 遺伝子の変異を明らかにするための解析をすすめた。

1）マウスゲノムライブラリーより PLP cDNA をプローブとして PLP 遺伝子をクローニングした結果、PLP 遺伝子には７つのエキソンがふくまれていた。各７つの全塩基配列を決定した。
2）PLP 遺伝子の転写開始部位は、主に３領域に分かれ、合計５つ得られ jimpy と対照との間で差はみられなかった。
3）各エキソンごとに RNase A, RNase T_1 を用いて、RNase マッピングを行い各エキソンに対応する mRNA が合成されているかを調べたところ、jimpy では第５エキソンに相当する mRNA が splice out されていることを明らかにした。

すなわちマウス PLP 遺伝子の第５エキソンは７４塩基対より構成されているため、jimpy では第５エキソン欠失の為、リーディングフレームがずれ、その後の第６、７エキソンに相当する部分のアミノ酸配列が変化して異常な PLP が合成されるものと考えられた。

Key word：　jimpy mutant mouse　　Pelizaeus-Merzbacher disease
proteolipid protein (PLP)

中枢神経系ではオリゴデンドロサイトがその突起を伸ばし、ニューロンの軸索を認識して、ミエリン構成分の分子集合の結果、密なミエリン鞘を形成する。ミエリン形成障害ミュータントのうちで jimpy は、中枢神経系ミエリンに特有な障害をひきおこし、ヒトPelizaeus-Merzbacher 病のモデル動物とされている。昨年度の本学会において、我々は jimpy の神経化学的解析をすすめ、ミエリンの主要構成蛋白質であるプロテオリピド蛋白質（proteolipid protein：PLP）遺伝子の変異と jimpy 変異との相関を明らかにした。本年度は更に研究をすすめ、PLP 遺伝子の第５エキソンが mRNA 合成にあたり splice out され利用されていないことを明らかにしたので報告する。

[材料及び方法]

動物：jimpy(jp/Y) は、当研究室で飼育、繁殖したものを使用した。対照として同腹の +/Y を用いた。

PLP 遺伝子のスクリーニング：Eco RI で部分水解（Charon 4A に組み込んだマウスゲノムライブラリーより、PLP,cDNA をプローブとしてスクリーニングした。

オリゴヌクレオチドの合成：プライマー伸長反応用のプローブでは、DNA合成機(Beckman: System 1E)を用いてメチルフォスフォアミダイト法で合成し、合成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(Urea-PAGE)及び DEAE セルロースにより精製した。

塩基配列解析：M13 ダイデオキシ法に従った。

プライマー伸長反応：poly(A)$^+$RNA、又は全 RNA と ^{32}P 末端標識したプライマーをアニールさせ、dNTP と逆転写酵素を加え反応させた。

RNase マッピング：各エキソン部分を含むゲノム DNA を pSP64 又は pSP65 プラスミドの SP6 プロモーター下流に逆向きにサブクローンし、適当な大きさに切断したものを鋳型とした。これに[α-^{32}P]UTP 存在下に SP6 ポリメラーゼを加え、転写産物をリボプローブとして用いた。脳の全 RNA とリボプローブとをハイブリッド形成させ、RNase A, RNase T_1 で反応後 proteinase K, フェノール抽出、エタノール沈澱させたその沈澱を溶解し、6% シーケンス用アクリルアミドゲル電気泳動後、オートラジオグ

ラフィーにより、RNase で分解されなかったリボプローブの大きさを検定した。

[結果及び考察]

免疫組織化学的な解析により jimpy ではミエリンの主要構成蛋白質である MBP は、検出できるが、PLP は検出できないこと(1)、MBP-RNA 量は jimpy で対照の5%であるが、PLP-RNA は更に減少しており MBP-RNA 量の1/5にすぎないこと(1)、PLP 遺伝子が染色体上で jimpy locus に局在すること(2,3)から PLP 遺伝子に一次的な変異があることを我々は推測した。既にサザンブロット解析により、いずれの制限酵素処理によっても対照と jimpy との間に差がみられなかったので(1,7)、PLP 遺伝子に存在すると考えられる変異は shiverer マウスにおけるような MBP 遺伝子の殆どの欠損というような大きな変異でないことは明らかであった。まず我々は、対照マウスより正常 PLP 遺伝子のクローニングを試みた。

PLP 遺伝子のクローニング：ラット PLP-cDNA の5'側の領域をプローブとしてマウスゲノムライブラリー150万個をスクリーニングして、λ23, λ38 の独立したクローンを得た。それぞれプラスミドにサブクローンした後、サザンブロット解析により、ラット PLP-cDNA にハイブリダイズする領域をきめ、M13ファージに再度サブクローニングして塩基配列を決定した。PLP 遺伝子の第一エキソンはほぼ5'側の非翻訳領域のみから構成され、翻訳開始のメチオニンコドンともう一塩基のみ含まれていた。PLP 遺伝子は7つのエキソンを含むことが明らかとなった。(Fig.1)

転写開始点の検討：第2エキソン中の20塩基及び第一エキソン中24塩基からなるオリゴヌクレオチドをプライマーにして mRNA のプライマー伸長反応を行った。PLP-mRNA の逆転写物は主に3領域に分かれ合計5つ得られた。転写開始点が複数個あることは、RNase マッピングによっても示された。jimpy では PLP mRNA 量は対照の1%程に減少しているが(1)、mRNA の転写開始点を調べたところ、minor なバンドは検出できなかったが、最も5'側にあたる主要な逆転写産物は検出することができ、対照との間に差はみられなかった。(Fig.2,3)

第5エキソン部分が splice out された PLP mRNA：ピリミジン選択的な RNase A とグアニン特異的な RNase T_1 を用いて RNase マッピングを行い、各エキソンごとに変異の有無を検討した。第1エキソンでは minor なバンドが数本でているが、いずれも jimpy と対照とで差をみいださず、第2、第3エキソンでも jimpy でも対照と全く同じ位置にバンドが検出された。第4エキソンでは jimpy は対照より数塩基短い位置にバンドが検出された。第5エキソンでは、jimpy では全くバンドを検出できなかった。以上の結果より第5エキソンは、mRNA 合成にあたり splice out されていることが示唆された。Nave ら(4)は jimpy より得た PLP cDNA は74塩基配列の欠失を報告したが、我々が行った PLP 遺伝子の塩基配列決定により74塩基配列は PLP 遺伝子の第5エキソンに対応していることが明らかとなった。(Fig.4)

正常な PLP mRNA のうち、jimpy では74塩基配列が欠失したため。リーディングフレームがずれて、その後の第6、7エキソンに相当する部分のアミノ酸配列が全て変化する。この領域には4つ目の膜貫通領域が存在するため(5) PLP の安定性が大きく低下したため蛋白質レベルでは検出不能となった可能性も考えられる。又変異したペプチドが細胞に障害を与えうる可能性も考えられる。今回みいだした PLP 遺伝子の変異が jimpy 脳内での病態をどのように引き起こすかを現在解析中である。

謝辞　マウスゲノムライブラリー、PLP cDNA をご恵与頂いた、熊大、島田先生、Scripps Clinic Sutcliffe博士に感謝致します。

【文献】
1. Moriguchi,A. et al. 神経化学 25, 571-573 (1986)
2. Willard,H.F. et al. Science 230, 940-942 (1985)
3. Dautigny,A. et al. Nature 321, 867-869 (1986)
4. Nave,K.-A. et al. PNAS. 83, 9264-9268 (1986)
5. Diehl,H.-J. et al. PNAS. 83, 9807-9811 (1986)
6. Moriguchi,A. et al. Gene in Press
7. Ikenaka,K. et al. in preparation

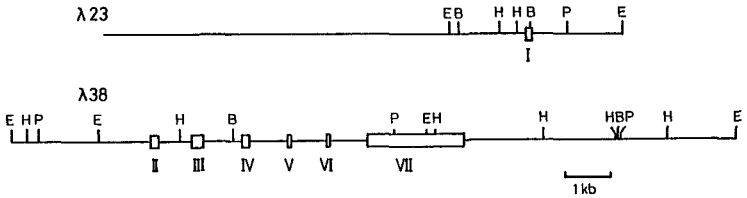


Fig. 1 Restriction map of mouse PLP genome.

Open square represents exon (I-VII)

B:BamHI, E:EcoRI, H:HindIII, P:PstI

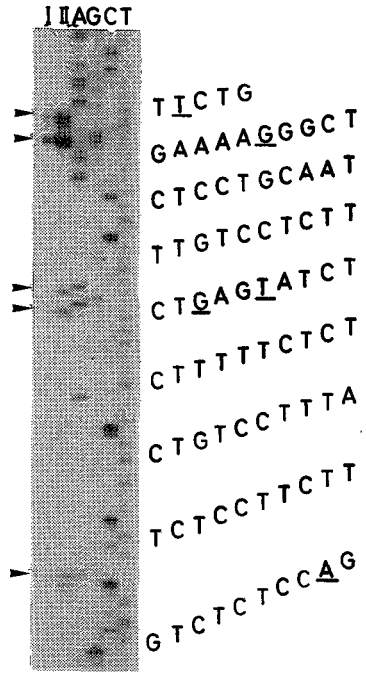
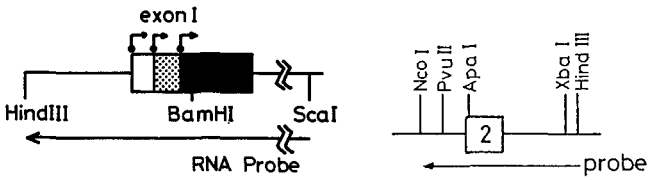


Fig. 2 Primer extension analysis of mouse PLP-mRNA.

Synthetic oligonucleotide primer (24-mer) was annealed to mouse brain total RNA (I;10ug, II;50ug), and was extended by reverse transcriptase. The extended products were analyzed on 6% sequencing gel, together with a sequencing ladder.



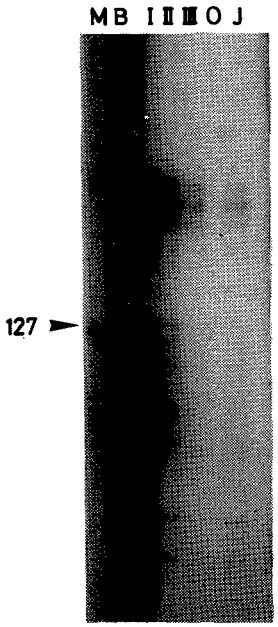


Fig. 3 RNase mapping of the first exon of the PLP gene in normal and jimpy mice

Total RNA was isolated from the control brain (I,20ug; II,5ug; III,lug; 0,no RNA) or from the jimpy brain (J,20ug), hybridized to the first exon specific RNA probe and digested with RNases. The RNase-resistant fragments was analysed by electrophoresis on 6% sequencing gel. Lane B shows degradation products of the probe and lane M show molecular weight marker.

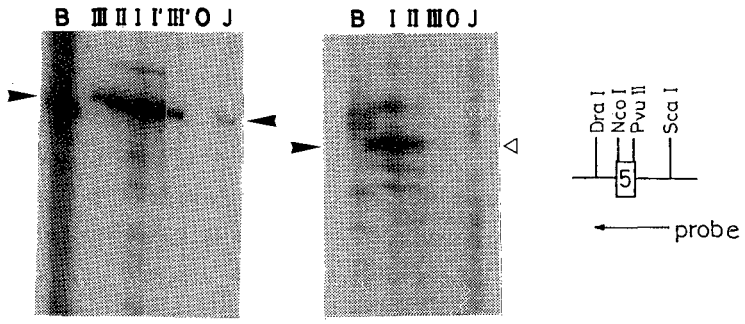


Fig. 4 RNase mapping of the 2nd and 5th exon of the PLP gene in normal and jimpy mice.

Total RNA isolated from the control brain (I,20ug; II, 5ug; III,lug; 0,no RNA) or from the jimpy brain (J,20ug) were hybridized to exon specific RNA probes and digested with RNases. RNase-resistant fragments was analysed by electrophoresis on 6% sequencing gel. Lane B shows degradation products of the probe. Arrowheads indicate positions of protected products from RNases. In jimpy, no detectable bands were observed (◁).

18. 培養細胞系を用いたエンケファリン前駆体遺伝子発現の研究：生殖細胞とセルトリ細胞における発現

吉川和明・相沢貴子　（都精神研・分子生物）

〔要　約〕

ｴﾝｹﾌｧﾘﾝ前駆体（pENK）遺伝子を発現している培養細胞系は、その調節機構を研究する上で有用である。そこで今回は細胞内のpENKを指令するmRNAを測定することによって非腫瘍性培養細胞系を検索した。ﾗｯﾄ精巣では生後30日以降に高濃度のpENK-mRNAが検出された。精巣内のpENK遺伝子を発現している細胞を調べたところ、単離した精子細胞や精母細胞などからなる生殖細胞がpENK-mRNAを高濃度含むことが判明した。生殖細胞内のpENK-mRNAの長さは約1900塩基で、他の組織で発現しているpENK-mRNA（約1500塩基）に比べて長かった。一方、精細管内の体細胞であるｾﾙﾄﾘ細胞を初代培養したところ、非刺激状態では非常にわずかのpENK-mRNAが検出されるのみであったが、ｱﾃﾞﾆﾙ酸ｼｸﾗｰｾﾞの活性化物質であるﾌｫﾙｽｺﾘﾝを添加したところ、突起の進展などの顕著な形態の変化を伴って約1500塩基の長さをもつpENK-mRNAの誘導が起こった。また、ｸﾞﾙｺｺﾙﾁｺｲﾄﾞは単独ではｾﾙﾄﾘ細胞内のpENK-mRNA濃度に影響を与えなかったが、ﾌｫﾙｽｺﾘﾝの効果を増強した。これらの生殖細胞とｾﾙﾄﾘ細胞でのpENK遺伝子の発現は組織特異性や調節機構を研究する上で優れた細胞系と考えられる。

Key word：　Preproenkephalin mRNA/ Germ Cells/ Sertoli Cells

ｴﾝｹﾌｧﾘﾝ（ENK）は中枢神経系に広く分布し、多彩な精神・神経機能の調節に関与していることが推定されている。ENKの生合成は前駆体（pENK）遺伝子の発現によるがその遺伝子発現を調節する因子を明らかにすることはENKの神経系での機能的意義を考える上で重要である。この点でpENKを発現している培養細胞系は種々の調節因子とその作用機構を解析する上で優れた系と考えられる。私達はNG108-15雑種細胞、C6ｸﾞﾘｵｰﾏ細胞などの腫瘍細胞系を用いて、細胞内cAMP濃度を上昇させる神経活性物質、たとえばﾌﾟﾛｽﾀｸﾞﾗﾝｼﾞﾝE_1やﾉﾙｱﾄﾞﾚﾅﾘﾝなどが顕著なpENK-mRNA濃度の上昇を起こし、ｸﾞﾙｺｺﾙﾁｺｲﾄﾞはそれを増強することを見出した（8,9）。今回、pENK遺伝子を発現している非腫瘍性の培養細胞系としてﾗｯﾄ精巣の生殖細胞とｾﾙﾄﾘ細胞について報告する。

【方法】

[ﾗｯﾄ生殖細胞とｾﾙﾄﾘ細胞の単離と培養]

90-116日齢のﾗｯﾄ精巣からShawらの方法（5）によってｺﾗｹﾞﾅｰｾﾞを用いて間質系の細胞成分を除去した精細管を細切後、ﾄﾘﾌﾟｼﾝ処理（0.25%,37℃,15分）によって細胞を分散し、ﾒｯｼｭで濾過したのち培養に移した。培養は7.5%CO_2／10%ｳｼ胎児血清加DMEMﾒｼﾞｳﾑ／34℃で行なった。培養20時間後培養ﾌﾟﾚｰﾄ底に付着しない細胞を遠心によって集め、Irelandらの方法（3）によって不連続ｼｮ糖密度勾配（2%/4%/6%）に重層し、室温で90分放置後中間層（4%層および上下の境界）にある細胞を生殖細胞分画として採取した。生殖細胞分画の細胞成分はｷﾞﾑｻﾞ染色によって形態を観察することによって細胞の同定を行なった。一方、培養ﾌﾟﾚｰﾄ底に付着した細胞成分はｾﾙﾄﾘ細胞分画として更に7-10日間培養を続けた。ｾﾙﾄﾘ細胞は細胞の形態、増殖性、ﾌｫﾙｽｺﾘﾝ投与による

形態変化から同定した。

[pENK-mRNAの測定]

精巣組織、生殖細胞、セルトリ細胞内の全RNAは、Chirgwinらの方法（1）をもとにして微量化した方法で抽出、精製した。pENK-mRNAの測定はノーザン法で行なった。プローブとしてはラット線条体由来のpENK-cDNA（7）をマルチプライム法によって^{32}Pで標識したもの（1-2x10^{9}dpm/μg DNA）を用いた。オートラジオグラフィーは-70℃で2-6時間行なった。

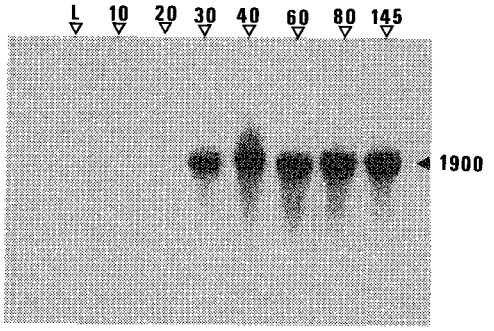


Fig.1 Northern analysis of preproenkephalin mRNA in the rat testes during postnatal development. 5 μg total RNA/lane
▽: days after birth (L:rat liver)
◀:length (bases) of the hybridized RNA

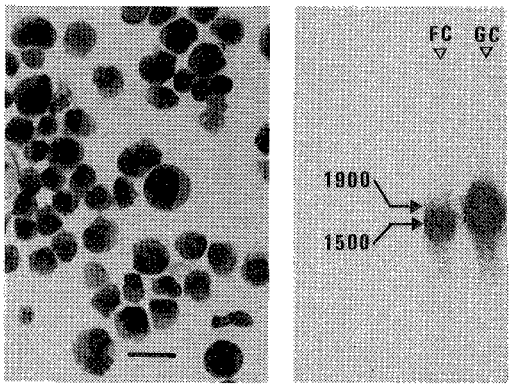


Fig.2 [left] A sample of the germ cells prepared by sucrose density gradient sedimentation (Giemsa staining). Bar: 20 μm
Fig.3 [right] Northern analysis of preproenkephalin mRNA from the germ cells (GC) and frontal cortex (FC) of the rat. 5 μg/lane ▶:length (bases) of the hybridized RNA

【結果】

Kilpatrickら（4）は成熟ラットの精巣にpENK-mRNAが検出されることを報告しているそこで、ラットの発育段階での精巣内のpENK-mRNAレベルを測定した（Fig.1）。生後10-20日までの精巣ではpENK-mRNA濃度は極めて低いが、生後30日以降にはpENK-mRNAの顕著な増加が認められた。精巣のpENKのサイズは既報（4）と同じく約1900塩基であり、他の組織で発現している約1500塩基のものに比べて約400塩基長いものであった。pENK-mRNA濃度は測定した生後30-145日の間はほぼ同程度であった。つぎに、精巣組織のどの細胞がpENK-mRNAを含でいるかを検討した。まず、精細管から生殖細胞（germ cell分画を調製した（Fig.2）。分画中の細胞は精子細胞（spermatid）が約2/3で、残りが精母細胞（spermatocyte）や他の細胞成分であった。この生殖細胞中のpENK-mRNAを測定したところ、対照として用いた前頭皮質内でのレベルより高濃度含まれていることが明らかになった（Fig.3）。また、生殖細胞中のpENK-mRNAのサイズは約1900塩基であり、精巣からのpENK-mRNAのサイズと同じであった。また、生殖細胞中のpENK-mRNAレベルはアデニル酸シクラーゼの活性化物質であるフォルスコリンやグルココルチコイドによって変化しなかった。次に、セルトリ細胞の培養を行ないpENK-mRNAが存在するか否かを検討した。セルトリ細胞が細胞内cAMP濃度の上昇によって形態変化を起こすことは既に報告（6）されているが、フォルスコリンを添加したところ6時間後にはセルトリ細胞は扁平な上皮細胞様の形態から星状の神経細胞様の形態変化を示した（Fig.4）。このセルトリ細胞中のpENK-mRNAを測定したところフォルスコリン非添加の際にはpENK-mRNAは殆ど検出できないが、添加した場合には顕著なpENK-mRNAの誘導が起こった。セルトリ細胞中のpENK-mRNAは約1500塩基で他の組織のも

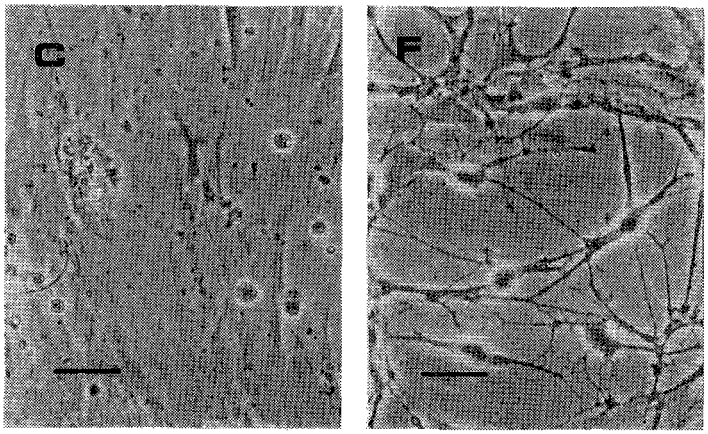


Fig.4 Morphological change of the cultured Sertoli cells after forskolin treatment (phase-contrast micrograph)
C:control F:forskolin treatment, 10 μM, 6 hrs Bar: 50 μm

Fig.5 Northern analysis of preproenkephalin mRNA from the cultured Sertoli cells treated with dexamethasone and forskolin. 5 μg/lane
L: rat liver C: control
D: dexamethasone, 1 μM, 6 hrs
F: forskolin, 10 μM, 6 hrs
DF: dexamethasone + forskolin

のと同じｻｲｽﾞであった。また、ｸﾞﾙｺｺﾙﾁｺｲﾄﾞであるﾃﾞｷｻﾒｻｿﾞﾝは単独ではpENK-mRNAﾚﾍﾞﾙに影響を与えないが、ﾌｫﾙｽｺﾘﾝによるpENK-mRNA上昇効果を増強した。

【考察】

pENK遺伝子は中枢神経系に広範な部位に分布するﾆｭｰﾛﾝで発現しているが、副腎髄質、心室、ﾘﾝﾊﾟ球、精巣などの非神経系組織でも発現していることが報告されている。今回、私達は生殖細胞がpENK-mRNAを高濃度含んでいることを見出した。生殖細胞は発生学的にも血液細胞や神経系細胞に類似し、３種の細胞系で共通の抗原が発現していることも知られている（２）。したがって、生殖細胞、神経細胞、ﾘﾝﾊﾟ球などの３種の細胞系でpENK遺伝子が発現されていることは、神経細胞の発生と分化を考える上からも興味深い点である。一方、精巣内の支持細胞として知られるｾﾙﾄﾘ細胞が細胞内cAMPの上昇によって突起伸展などの著しい形態変化を伴ってpENK-mRNAの誘導を起こすことは、pENK遺伝子の組織特異性発現の機構を考える上で興味深い。生殖細胞とｾﾙﾄﾘ細胞は遊離細胞系や初代培養細胞系としてin vitroの解析が可能であり、生理的なpENK遺伝子発現の研究に有用な細胞系と考えられる。

【謝辞】本研究は文部省科学研究費と病態代謝研究会の補助を受けて行なった。またﾌｫﾙｽｺﾘﾝは㈱日本化薬から供与を受けた。

【文献】

1) Chirgwin,J.M., Przybyla,A.E., MacDonald,R.J., and Rutter,W.J. (1979) Biochemistry 18, 5294-5299
2) Golub,E.S. (1982) Nature 299, 483
3) Ireland,M.E., and Welsh M.J. (1987) Endocrinology 120, 1317-1326
4) Kilpatrick,D.L., Howells,R.D., Noe,M., Bailey,L.C., and Udenfriend,S. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82, 7467-7469
5) Shaw.M.J., Georgopoulos,L.E. and Payne,A.H. (1979) Endocrinology 104, 912-918
6) Spruill,W.A., White,M.G., Steiner,A.L., Tres,L.L., and Kierszenbaum,A.L. (1981) Exp. Cell Res. 131, 131-148
7) Yoshikawa,K., Williams,C.,and Sabol,S.L. (1984) J.Biol.Chem. 259, 14301-14308
8) Yoshikawa,K., and Sabol,S.L. (1986) Biochem.Biophys.Res.Commun. 139, 1-10
9) Yoshikawa,K., and Sabol,S.L. (1986) Mol.Brain Res. 1, 75-83

19. 精神分裂病者の脳障害部位と脳代謝——ポジトロンCTによる研究——

小田原 俊 成・岸 本 英 爾・大 野 史 郎・高 津 修・
松 下 正 明 （横浜市大・医・精神）

〔要 約〕

今回，私共は精神分裂病者の$C^{15}O_2$, $^{15}O_2$, ^{11}C－グルコースによるポジトロンCT（PET）を行ない興味ある所見を得たので報告した。

精神分裂病者のPET画像は図2に示した様に3つの類型に分類された。第1型は図1－bに示した様に両側前頭葉（Brodmann 10領域）が障害されているタイプであり，第2型は図1－cに示した様に右利きの場合主に右頭頂葉（Brodmann 40領域）が障害されているタイプであり，第3型は図1－dに示した様に右利きの場合主に左側頭葉（Brodmann 22～38領域）が障害されるタイプである。これらの障害は脳血流量，脳酸素消費量，脳糖代謝の障害のいずれか，又はその複合障害として画像化される。Brodmann 10, 22～38, 40という領域は連合野と呼ばれ，その多くは猿には存在せず，人類に初めて出現してくる脳回であり，精神分裂病という人類に存在する疾病でその連合野に障害が見られる事に興味が持たれた。今回のポジトロンCTによる脳の画像化で，精神分裂病の全例にいずれかのトレーサーで異常が見出された事は，今後の精神分裂病の研究にある示唆を与えるものと考えられた。

Key word : positron emission tomography (PET), schizophrenia, subtype

ポジトロンCTによる研究は，X線CTやMRIによる画像診断とは異なり，生きている人の脳の働きを動的に画像として描出できるという点で画期的といえる。それは受容体，酵素等脳に存在する物質の画像化のみでなく，脳血流量，脳酸素消費量，アミノ酸，糖等の脳代謝の変化の様を時々刻々画像となしうるからである。

私共は^{11}C, ^{15}Oを用いてポジトロンCTを行っているが，それぞれの被曝量は表1に示した様にテクネシウム（^{99m}Tc）とほぼ同様である。それぞれの半減期は約20分，約2分と極めて短かく，臨床応用には安全なものである事が分かる。

私共は今回，$C^{15}O_2$, $^{15}O_2$, ^{11}C－グルコースを用いて本人及び家族の同意書の得られた精神分裂病者のポジトロンCTを行ない，精神分裂病の病因を解明する上で新しい知見が得られたと思われるのでここに報告したい。

〔対象と方法〕

横浜市立大学医学部病院精神神経科に初診した患者で，精神分裂病と診断された10例を対象とした。患者の性別，年齢，経過年数等は表2の通りである。患者はいづれも身体的には健康で，今迄に向精神薬等を服用しておらず，X線CT上脳に著明な萎縮はなく，脳波上もSpike等を認めていない。一方正常対照者は3名であった。

新しく合成された$C^{15}O_2$または$^{15}O_2$を経鼻的に持続吸入させ，吸入開始約5分後，カウント数がプラトーに達した時より約7分間PET（positron emission tomography）計測を行なった。一方，^{11}C－グルコースは約20 mCiを経口投与し，投与40分後より10分間PET計測を行なった。今回の計測はOM（orbital meatal）ラインに平行なOM 40, 49, 58, 67, 75, 84の頭部各断面について行なった。^{11}C－グルコース投与後の

表　1．放射線吸収量　(m rad/mCi)

組織	放射性薬剤					
	^{11}C	^{15}O	^{18}F	^{131}I	^{123}I	^{99m}Tc
骨髄	39	2	130	200	10	33
卵巣	13	4	43	140	32	8
精巣	10	1	35	85	20	6
膀胱壁	12	2	960	3400	2500	51
甲状腺				800	7500	
全身	12	2	40	470	27	12
半減期	20分	2分	1.8時間	8日	13時間	6.03時間

Brill, A.B. (1982), Iio, M. (1985) より引用

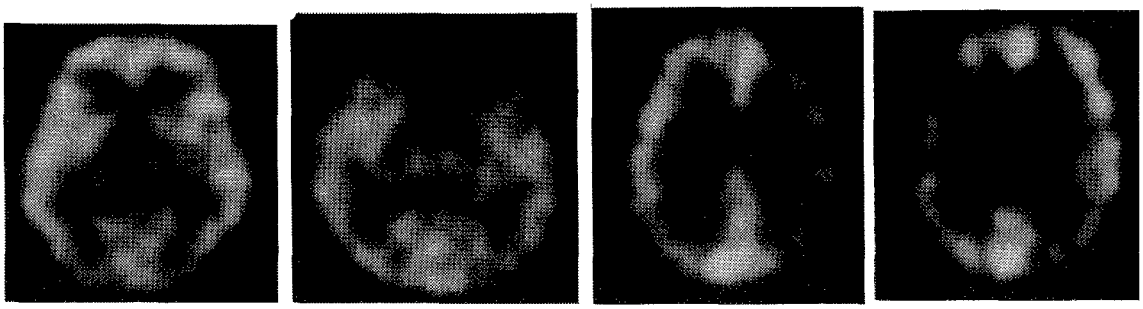
表2．対象精神分裂病者一覧

PET イメージ	氏名	年齢	性	発病年齢	経過年数	利き手
前頭葉型	A	35	女	17	18	右
(第1型)	B	25	男	23	2	右
右頭頂葉型	C	35	男	34	1	右
(第2型)	D	22	女	17	5	右
	E	36	男	20	16	右
	F	22	男	21	1	右
	G	50	女	44	6	右
左側頭葉型	H	59	女	47	12	右
(第3型)	I	42	女	39	3	右
	J	36	男	15	21	右

正常対照者 (N=3)
36 ± 5

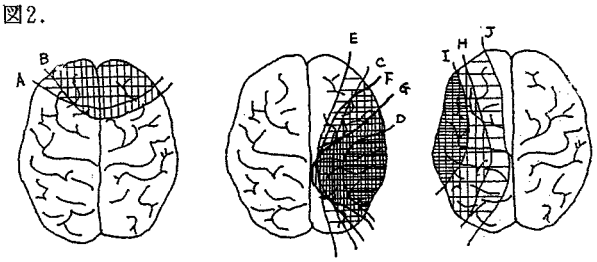
図1.

1－a　　1－b　　1－c　　1－d



正常対照者（糖代謝）　前頭葉型（糖代謝）　右頭頂葉型（糖代謝）　左側頭葉型（酸素消費）

図2.



第1型
前頭葉型

第2型
右頭頂葉型

第3型
左側頭葉型

精神分裂病者の脳障害部位

表　3．^{11}C－glucose による脳各部位カウント数(counts/ μCi)

脳部位	正常者	精神分裂病者		
		前頭葉	右頭頂葉型	左側頭葉型
前頭葉	4480± 480	3490, 3190	4380 ± 380	4490 ± 350
頭頂葉	4370± 460	4640, 4000	3480 ± 390*	4350 ± 380
側頭葉	4390± 420	4630, 3990	4390 ± 360	4230 ± 280
後頭葉	4210± 380	4610, 4170	4230 ± 410	4250 ± 350

前頭葉はBrodmann 10 領域，頭頂葉はBrodmann 40 領域，側頭葉はBrodmann 22 領域，後頭葉はBrodmann 17 領域を計測した．前頭葉，後頭葉は両側の平均値，頭頂葉は右側，側頭葉は左側を計測した．頭頂葉左側，側頭葉右側の計測値は正常者との間に差を認めない．平均値±S.D.　* $P<0.025$

グルコース代謝はＦＤＧ（^{18}Ｆ－デオキシグルコース）とは異なり，次々にアミノ酸に変換し，ＰＥＴ画像の示す37～53％はグルタミン酸，９～17％はグルタミン，９～13％はアスパラギン酸，４～６％はＧＡＢＡ，そして１～２％はアラニンになっていると考えられている。(1) 尚有意差検定はStudent－t testによった。

〔結果と考察〕

正常対照者のＰＥＴイメージは図１－ａに示す様に前頭葉，側頭葉優位の活性を示す，活性の度合いは白い部分が一番高く，灰色，黒の順に活性が低くなっている。

精神分裂病者は３つのタイプに分類された。第１型は図１－ｂに示した様に両側前頭葉が障害されているタイプであり，ＦＤＧを用いてBuchsbaumやFarkasらが示した画像とほぼ同様のものである。このタイプでは，今回は症例数が２例で明確なことはいえないが，１例では両側前頭葉の脳血流量（ＣＢＦ）と脳酸素消費量（$CMRO_2$）が減少しているが，糖代謝は正常であった。一方，もう一例では脳血流量，脳酸素消費量は正常であったが両側前頭葉の糖代謝が減少していた。このタイプの患者の脳障害部位は図２に示した様に両側前頭葉Brodmann 10を中心とした脳領域であった。

第２型は図１－ｃに示したように右利きの場合主に右頭頂葉が障害されているタイプであり，５例ともその部位で脳血流量，脳酸素消費量，糖代謝の低下がみられた。このタイプの患者の脳障害部位は図２に示した様に劣位半球頭頂葉Broadmann 40を中心とした脳領域であった。

第３型は図１－ｄに示したように右利きの場合主に左側頭葉～左頭頂葉が障害されているタイプであり，２例ではその部位の脳血流量，脳酸素消費量の減少を認めたが，糖代謝は正常であった。他の一例では，脳血流量，脳酸素消費量，糖代謝の減少を認めた。このタイプの患者の脳障害部位は図２に示した様に優位半球側頭葉Brodmann 22～38を中心とした脳領域であった。

正常者と精神分裂病者の脳各部位の^{11}Ｃ－グルコースによるカウント数を表３に示した。両側前頭葉が障害されている第１型では平均値で前頭葉のカウント数が低下していた。右頭頂葉が障害されている第２型では右頭頂葉のカウント数が有意の差（$p<0.025$）をもって低下していたが，他の脳領域には異常が認められなかった。左側頭葉が脳血流等で障害されている第３型では脳各領域の^{11}Ｃ－グルコースのカウント数の平均値に異常は認められなかった。

さきに図２に示した脳各障害領域は連合野と呼ばれる脳部位であり，その多くは人類で初めて出現してくる脳回である。Vogtらの研究によれば，これらの脳領域は髄鞘形成の最も遅れる部位とされ，Economoによれば，それらは特別の細胞構築の見られる部位である。これらの諸結果は人類に見られる精神分裂病という疾病の病因との関連で示唆あるものと考えられた。

〔文　献〕

1) Jones, S.C. (1983) Int J Nucl Med Biol 10173

20. ポジトロンCTによる躁うつ病者の脳代謝の研究

東海林　　正・岸　本　英　爾・高　津　　修・大　野　史　郎・
松　下　正　明　　（横浜市大・医・精神）

〔要　約〕

躁うつ病は代表的な内因性，機能性精神病の1つで原因不明であるが，近年の国際的研究はその原因解明に新しい展開をみせつつある。一方民間においては未だ精神病としての偏見が根強く，重症になるまで放置されたり，自殺に至ったりする患者も多い。私共はポジトロンCTを用い，疾病を明瞭に画像化し身体の病気との認識を与え，自殺の防止や早期治療に役立てている。今回横浜市立大学医学部病院精神神経科に入院，外来通院中のDSM－Ⅲにて診断されたうつ病者，躁病者，回復者，正常対象者各々10例，3例，3例，7例に新しく生成された^{11}C－グルコース約20 mCi を経口投与し40分後よりPET（positron emission tomography）計測を行ったのでここに報告する。この結果，うつ病者では約30%の糖代謝の低下（$p<0.025$）を，躁病者では約25%の糖代謝の亢進（$p<0.05$）を大脳皮質に認めた。これよりうつ病者では，大脳皮質全体の糖代謝がほぼ均一に障害されていることが解り，他の精神疾患に比し特徴的所見を示すことが解明された。この代謝障害はアミノ酸プールの障害であることが示唆される。今後ポジトロンCT等の研究により，躁うつ病の生物学的原因に基づく下位分類が可能となるであろう。

Key word： positron emission tomography (PET), affective disorders, glucose

〔はじめに〕

躁うつ病は感情病(affective psychoses)ともよばれ，感情と欲動の障害を主徴とする原因不明の疾患で，精神分裂病と並んで代表的な内因性，機能性精神病とされている。近年，躁うつ病の国際的研究は，躁うつ病の原因解明に新しい展開をみせつつある。

しかし民間には，躁うつ病は精神病であり，不治の病であるとの認識が未だ強く，重症になるまで放置され，又自殺に至る患者も多い。従って病者の疾病を明瞭に画像化する方法は，患者及びその家族に身体の病気であることを認識させ，自殺の防止や早期の治療，正しい疾病の理解，社会的偏見をなくす為に極めて重要なことと考えられる。この様な意味より私共は国立療養所中野病院にて^{11}C－グルコースを用いてポジトロンCTを行っている。ポジトロンCTはこれまで有効な検査手段の乏しかった人間の精神活動を物質レベルで直接捕える新しい方法で，刻一刻変化する脳の物質（糖，アミノ酸，アミン，ペプチド，酵素，受容体等）や代謝を動的に数量化する事を可能とする。本検査における^{11}Cによる被曝量は表1に示す如くテクネシウム（^{99m}Tc)とほぼ同様であり，^{11}Cの半減期は約20分と極めて短かく，臨床応用には安全と思われる。[1] 又新しい基礎医学的成果の臨床応用に当っては，厳格な規制が必要であるが，当所でもそれが遵守されている。即ち，研究に関与しない学識経験者等により構成された委員会で研究計画がチェックされている。この委員会はヘルシンキ宣言でいう独立委員会としての性格をもち，基礎，臨床応用の諸事項を審議している。さらにこの臨床応用にあたっては患者本人とその家族の同意書が必要であり，放射性薬剤の使用，被曝の危険を説明し，同意書のある場合においてのみ，私共は本検査を施行している。

〔対象と方法〕

横浜市立大学医学部病院精神神経科に入院，外来通院中で，DSM−Ⅲによりうつ病，躁病と診断された患者，及び回復者と正常対照者各々10例，3例，3例，7例を対象とした。その性別，年令，経過年数等は表2に示した通りである。患者はいずれも身体的には健康で，X線CT上脳に萎縮はなく，脳波上spike等を認めない。正常対照者はいずれも身体的に健康な者で，患者との間に年令で有為の差を認めない。

新しく生成された^{11}C−グルコース約20 mCiを経口投与し，5分後よりPET（positron emission tomography）計測を開始した。今回の計測はグルコース投与後40分にOM（orbito meatal）ラインに平行な頭部横断面について行ない，同時に継時的に0.5㎖の採血を点滴側管より行ない，ウエルカウンターで血中のカウント数を測定した。

^{11}C−グルコース投与後の脳内グルコース代謝は図1に示す様に，FDG（^{18}F−デオキシグルコース）とは異なり，投与されたグルコースは脳内で次々にアミノ酸に変換し，投与30〜40分後のPET画像の示す37〜53％はグルタミン酸，9〜17％はグルタミン，9〜13％はアスパラギン酸，4〜6％はGABA，そして1〜2％はアラニンになっていると考えられている。[3)]

〔結果と考察〕

正常対照者のPETイメージは図2に示す様に大脳皮質優位の活性を示す。活性の度合いは白い部分が一番高く，黒くなる順に低くなる。うつ病者では^{11}C−グルコースの脳皮質全体のカウント数の低下が，躁病者ではその上昇がみられた。そのカウント数を計測して表示すると，表3の様になる。正常者に比しうつ病者では約30％の糖代謝の低下（$p<0.025$）を大脳皮質全体に認め，躁病者では約25％の糖代謝の亢進（$p<0.05$）を認めた。

^{11}Cカウント数の継時的変化においては図3の様になる。血中^{11}Cカウント数は正常対照者，患者とも同じ様な数値の変化をし，^{11}C−グルコース投与後約40分でプラトーに達する。一方脳中^{11}Cカウント数はうつ病者では全体的な低下が，躁病者ではその上昇がみられた。

以上の結果より，うつ病者では，脳全体の糖代謝が，ほぼ均一に障害されている事がわかった。この〝脳全体の〟という事は初老期精神病，精神分裂病者の脳局部の障害と較べ，[2)] 特徴的なことである。又，本検査の^{11}C−グルコースはグルコース代謝全体を画像化する方法であり，前述の通り80％以上はグルタミン酸を初めとするアミノ酸である。従ってこの代謝障害は，アミノ酸プールの障害である事が示唆される。一方これは，ノルアドレナリン，セロトニン等の神経系が障害されていてそれらの神経系が大脳皮質に広範な投射系をもつ為に，脳皮質全体の代謝が増減している様にPET画像で示されるからかも知れないし，大脳皮質の糖の取り込みが増減しているからかも知れない。

今後は躁うつ病者のポジトロンCTにより例えばノルアドレナリン神経系，セロトニン神経系等や，脳の各受容体，各酵素の画像化が行なわれ，躁うつ病の生物学的原因に基づく分類が可能となる時代がくるであろう。そしてそれぞれの特異的な治療法が確立される事が望まれる。

〔文献〕1) Brill, A.B. (1982) NCRP REPORT No.70.
2) Buchsbaum, M.S. et al (1982) Arch. Gen.Psychiatry, 39, 251
3) Jones, S.C. et al (1983) Int. J. Nucl. Med. Biol. 10, 173

表 1. 放射線吸収量 (m rad/mCi)

組織	放射性薬剤					
	^{11}C	^{15}O	^{18}F	^{131}I	^{123}I	^{99m}Tc
骨髄	39	2	130	200	10	33
卵巣	13	4	43	140	32	8
精巣	10	1	35	85	20	6
膀胱壁	12	2	960	3400	2500	51
甲状腺				800	7500	
全身	12	2	40	470	27	12
半減期	20分	2分	1.8時間	8日	13時間	6.03時間

Brill, A.B. (1982), Iio, M. (1985) より引用

表 2. 対象躁うつ病者一覧

氏名	年齢	性	診断	経過年数	Hamilton score	Beck score
うつ病者						
A	53	男	UD	4	24	32
B	52	男	UD	10	23	18
C	56	女	UD	3	23	14
D	42	男	UD	7	32	24
E	41	女	UD	6	21	17
F	56	男	UD	8	31	24
G	29	男	UD	5	34	28
H	47	男	UD	9	36	22
I	50	男	UD	28	32	36
J	44	男	UD	1	25	24
躁病者						
K	42	女	BM	8		
L	43	男	BM	10		
M	54	女	BM	34		
回復者						
N	57	男	UD	7	8	10
O	63	女	UD	14	7	11
P	43	女	UD	13	6	8

正常対照者 (N=7)
45±4

UD:unipolar depressed BM:bipolar manic

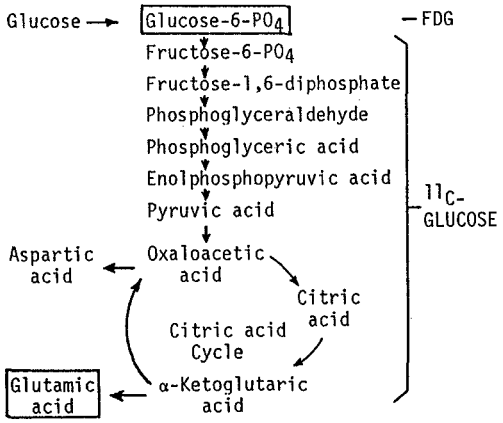
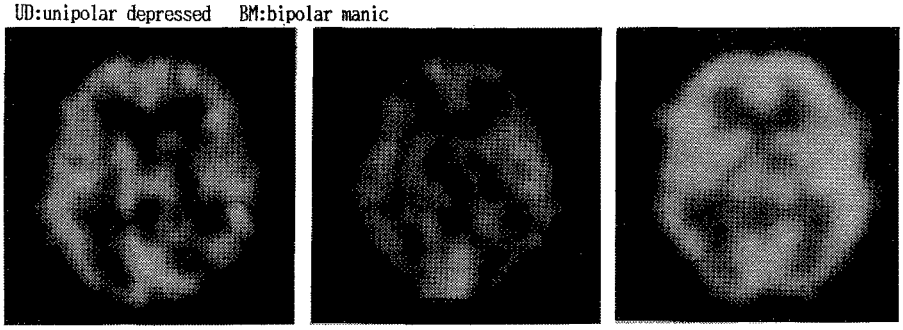


図1. 解糖代謝^{18}F-deoxyglucose(FDG) 法とは異なり, ^{11}C-glucose 法は主に脳glutamic acid を標識する.



正常対照者　うつ病者　躁病者

図 2. 躁うつ病者の^{11}C-glucose PET

表 3. ^{11}C-glucose による脳各部位カウント数(counts/ μCi)

脳部位	正常者	躁うつ病者 うつ病者	躁病者	回復者
前頭葉	4580± 560	3140 ± 380**	5730 ± 720*	4560 ± 450
頭頂葉	4390± 380	3030 ± 340**	5380 ± 530*	4320 ± 410
側頭葉	4480± 530	3090 ± 430**	5640 ± 660*	4430 ± 380
後頭葉	4230± 430	2980 ± 310**	5230 ± 480*	4170 ± 380

前頭葉はBrodmann 10 領域, 頭頂葉はBrodmann 40 領域, 側頭葉はBrodmann 22 領域, 後頭葉はBrodmann 17 領域を計測した. それぞれの値は両側25ピクセルの平均値.

** P<0.025 , * P<0.05

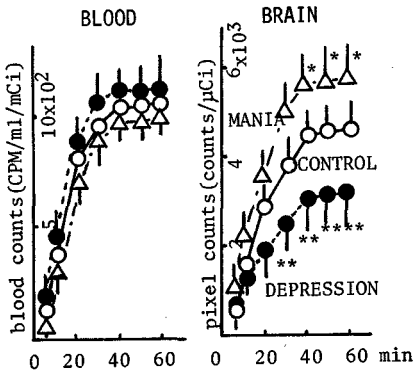


図 3.
正常対象者,躁うつ病者の血中及び脳中^{11}Cカウント数の経時的変化

21. 精神分裂病患者におけるＡＶＰ分泌動態について—水中毒発生機序に関連して—

岸本年史・平井基陽・大沢弘吉・寺田　誠・
織部裕明・中井　貴・井川玄朗
（奈良医大・精神）

〔要　約〕

水中毒をひきおこす精神疾患患者のアルギニンバゾプレッシン（ＡＶＰ）の分泌動態を知る目的で、水中毒の病態である低Na血症を呈している精神分裂病患者17名、低Na血症のない対照精神分裂病患者16名を対象に自由飲水下での血漿ＡＶＰ濃度、血清浸透圧、血清ナトリウム（Na）濃度を測定した。さらに健常対照者22名に水を経口負荷し、患者群と同様に3つの項目を測定し次の知見をえた。

1）健常群、低Na血症患者群、対照患者群のいずれにおいても血清浸透圧と血漿AVP濃度のあいだには正の相関関係が認められた。

2）健常群では認められない低血清浸透圧域（270mOsm／Kg　以下）で、低Na血症患者群、対照患者群両群にAVPの分泌があった。

3）低Na血症患者群、対照患者群では健常群に比して血清浸透圧に対するAVP分泌反応の感度が有意に低かった。また低Na血症患者群と対照患者群とでは、この感度に有意な差はなかった。

4）精神分裂病患者ではAVP分泌の始動点である浸透圧閾値が低下している可能性のあることが示唆された。

Key word：　Water intoxication , Schizophrenia , AVP secretion

近年精神分裂病などの精神疾患患者に、低Na血症、さらにはそれに基づく水中毒の発症が注目されているが、発生要因については一定の見解が得られていない。なんらかの水分調節能の障害が基盤に存在することが想定されているが、ＡＶＰ分泌動態については未だ解明されていない。われわれは一昨年の本学会で向精神薬の慢性投与が血清浸透圧に対するＡＶＰ分泌感度を増加させる可能性のあることを報告した。今回はこれらの結果に基づき、水中毒の病態である低Na血症を呈する精神分裂病患者と低Na血症を呈していない精神分裂病患者についてＡＶＰ分泌動態を比較検討した。

〔対象と方法〕

1）対象は、奈良医大および関連2施設に入院中の最近低Na血症を呈したことのある腎機能の正常な精神分裂病患者17名（48.9±11.4才）、低Na血症のない対照精神分裂病患者16名（34.0±11.1才）である。自由飲水下で起床時、日中、就寝前の3点で採血した。採血90分前より喫煙を禁じた。投与中の薬剤は継続した。患者には研究の趣旨を説明し、了承を得たうえで行った。

2）血漿ＡＶＰの正常値を求めるため健常対照者22名（27.9±5.7才）に、水を経口負荷（20ml／Kg 体重）し、負荷前、負荷後30分、90分で採血を行った。

3）採血後、ただちに血液の一部（約5ml）は氷冷したEDTA-2Naを加えたスピッツに移し、4°C、3000回転にて血漿を分離してＡＶＰの測定に供した。残りの血液（約3ml）は同様に遠沈して血清を分離し、浸透圧およびNaの測定に供した。ＡＶＰ測定用

標品は－20°C で保存した。

4) 血漿AVP濃度の測定は、Sep-Pak C_{18} カートリッジで抽出したのち、三菱油化製キットを用いてRIA（4）にて、採血後1ヶ月以内に行った。血清浸透圧は氷点降下法で、血清Na濃度は炎光光度法にて測定した。

〔結果〕

1) 血清Na濃度と血清浸透圧の関係

血清浸透圧とその主要な決定因子である血清Na濃度のあいだには、低Na血症患者群、対照患者群、健常群のいずれにおいても有意（$p<0.001$）な正の相関がえられ、血清浸透圧は血清Naによって規定されることを確認した（図1）。

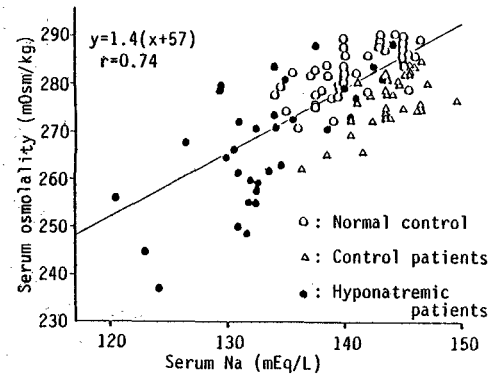


図1. 精神分裂病患者の血清Naと血清浸透圧の関係

2) 血清浸透圧と血漿AVP濃度の関係

横軸に血清浸透圧、縦軸にAVP濃度をとり、その分泌動態を図2に示した。健常群では認められない270mOsm／Kg以下の低血清浸透圧域でも、低Na血症患者群、対照患者群では血漿AVPは測定可能値を示し、AVPが両患者群において不適切に分泌されていることが示唆された。さらに血清浸透圧（XmOsm／Kg）と血漿AVP（Ypg／ml）とのあいだには、いずれの群でも有意な正の相関がえられた。回帰分析を行うと、健常群の回帰直線の勾配は、両患者群各々と有意（$p<0.05$）な差があったが、患者群間に有意な差はなかった。すなわち、低Na血症患者群および対照患者群の血清浸透圧の変動に対する血漿AVPの分泌感度は、健常群に比して有意に低かった。さらに低血清浸透圧域（270mOsm／Kg以下）におけるAVPの不適切な分泌はAVP分泌の始動点である浸透圧閾値が低下している可能性が示唆された。

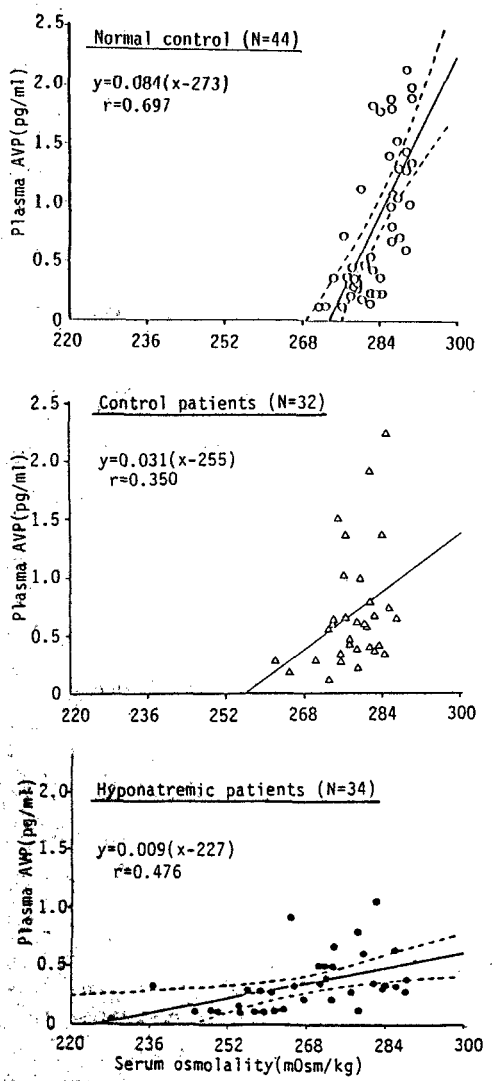


図2. 精神分裂病患者の血清浸透圧と血漿AVPの関係

〔考察〕

水中毒および低Na血症の発生に向精神薬の長期投与が関係しているとの仮説があるが、われわれは一昨年の本学会において、家兎を用いての実験で、向精神薬の慢性投与は血清浸透圧の変動に対するAVPの分泌感度を上昇させる可能性のあることを報告した（1)。今回、われわれは低Na血症の存在の有無にかかわらず精神分裂病患者群では、浸透圧の変動に対するAVPの分泌感度が低下しており、さらに低血清浸透圧域（270mOsm／Kg以下）でもAVPが不適切に分泌されていることを観察した。これらの結果より、精神分裂病者にはAVPの分泌調節異常が存在する可能性が示唆された。AVP分泌感度は、加齢により幾分の上昇があるものの、再現性が高く、遺伝的に規定されるとされている（3)。われわれは、精神分裂病患者のAVP分泌調節異常は中枢神経系の素因的脆弱性と関係している可能性があると考えている。Raskindらは、精神症状の悪化そのものが多飲およびAVPの分泌亢進をきたすと想定したが（2)、今後、多飲をひきおこす液性因子、精神症状との関係、および向精神薬の関与等を含めて浸透圧調節系を中心に追求していきたいと考えている。

AVP測定キットを提供された三菱油化株式会社に深謝致します。

〔文献〕

1) 平井基陽、岸本年史他（1985）神経化学 24, 460－462.
2) Raskind, M. A. et al. (1978) Biological Psychiatry 13, 385－390.
3) Robertson, G. L. et al. (1982) The American Journal of Medicine 72, 339－353.
4) 吉田尚、山田研一他（1987）ホルモンと臨床 35, 127－131.

22. 躁うつ病の中枢性α_2-adrenergic recepter機能

馬目太永・金子元久・渡辺　厚・沼田吉彦・
星野仁彦・菅野智行・本田教一・柳沼正俊・
熊代　永　（福島県医大・神経精神）

〔要　約〕躁うつ病における中枢性α_2-adrenergic receptor（α_2-receptor）の機能を調べる目的で、躁うつ病患者の治療前後に、α_2-receptor agonistであるclonidineを経口投与し、血漿norepinephrine(NE)血漿human growth hormone(HGH)などを経時的に測定した。対象は躁うつ病患者13例（双極型が5例、単極型が8例）である。対照群は健康男子10例である。結果は以下のごとくであった。(1) clonidine負荷後の血漿NEの低下率は、対照群に比しうつ病群の未治療期では有意に小さかった。しかし、寛解期には正常化した。亜型別では、双極型の未治療期では、低下率は小さい傾向を示したが、寛解期には正常化した。単極型では未治療期の低下が寛解期でも正常化せず持続していた。(2) clonidine負荷後の血漿HGHの変化は、対照群では90%が陽性反応を示した。うつ病未治療期では38.5%が陽性反応を示したが寛解期には77%が陽性反応を示し回復した。亜型別にみると、陽性反応は、双極型の未治療期では20%であったのが、寛解期では80%と回復し、単極型では未治療期は50%であったのが寛解期には75%と回復した。以上より、躁うつ病では中枢性presynapticならびにpostsynaptic α_2-receptorの機能低下が示唆された。また、亜型別ではα_2-receptorの機能について、極性の違いを認めた。

Key word：manic-depressive illness, clonidine, α_2-adrenergic receptor

［はじめに］躁うつ病の生化学的成因についてはserotonin仮説(1)とならんでcatecholamine(CA)仮説(3)が有力であり、CA仮説においてはdopamine(DA)やnorepinephrine(NE)の欠乏が想定されている。しかるに、最近monoaminergic receptorについての研究が進むにしたがい、NE neuronにおけるα_2-adrenergic receptor（α_2-receptor）の機能が注目されるようになってきた。そこで今回我々は、躁うつ病患者の治療前と治療後に、選択的なα_2-receptor agonistであるclonidineを負荷投与しこの時の血漿NE濃度や血漿HGH濃度ならびに血圧、脈拍、体温を測定し、躁うつ病患者の中枢性α_2-receptorの感受性について検討したので報告する。［対象と方法］対象は当科及びその関連病院を受診した躁うつ病患者13例である。性別は、男6例、女7例、年齢は21歳から64歳。診断は、Research Diagnostic Criteria(RDC)(4)によって行い、RDCによる亜型別ではBipolar Ⅱ、即ち軽躁状態を伴う双極型うつ病（双極型）が5例（女性5例。年齢は21歳から64歳まで。）と定型うつ病（単極型）が8例（男性6例、女性2例。年齢は32歳から59歳まで。）治療前の服薬の有無については、2例が睡眠薬としてbenzodiazepine系の薬物を服用していたが、他の11例はいかなる薬物も服用していなかった。治療前のclonidine負荷試験の後はamitriptyline や mianserinなどを投与した。正常対照群は、健康な本学男子学生10例であり、年齢は19歳から23歳までである。被検者には、研究の目的、方法、予想される効果、危険性、不快さなどを充分に説明し、また理由や時期を問わず、被検者の希望があれば研究を中止することを約束し、自由意志によ

る同意を得た。clonidine 負荷試験は、治療前のうつ状態期と治療後の寛解期に行った。被検者はclonidine 負荷試験の前日の夕食後より試験終了まで摂食せず、安静を保った。clonidine の投与方法は、午前9時に 3μg/kgのclonidine hydrochloride を経口的に投与した。clonidine 投与前45分、15分、clonidine 投与後30分、60分、 120分、 180分の計6回、血圧、脈拍、体温を測定し、同時に留置針で肘静脈より採血を行い、2本の試験管に採取した。そのうち1本は、EDTA-Na_2 20mgと$Na_2S_2O_3$ 7.5 mgの入った血漿NE測定用で、これに血液5mlを取り混和し、ただちに遠心して上清を－80°C で保存した。他の1本は、EDTA－Na_2 5 mg入りの血漿 HGH測定用で、これに血液2mlを取り混和し、遠心後に上清を－20°C で保存した。血漿NEの測定は、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー（柳本高速液体クロマトグラフィー L-2000 、ボルタンメトリー検出器VMD-101)を用いて、Goldstein ら(2)の方法に準じて行った。また、血漿HGH の測定は、radioimmunoassay法（ダイナボット HGH RIA KIT）により行った。採血より測定までの期間は、血漿NEは1カ月以内、血漿 HGHは3カ月以内とした。［結果］(1)血漿NEの変化：図1に示すごとく、clonidine 負荷15分前の血漿NE値を基準値とすると、まず、対照群では負荷30分後より有意な減少($P<0.05$) が認められ、120 分後に最低値($P<0.01$) となり、この低値は180分後まで持続していた。これに対してうつ病群では、未治療期、寛解期ともに有意な減少は認められなかった。次に図2に示すごとく、clonidine 負荷後の血漿NEの低下率［（基準値－最低値）／基準値］×100(%) をみると対照群に比し全うつ病群($N=13$) の平均では、未治療期は有意に小さい($P<0.05$) が、これが寛解期になると低下率は正常化し、対照群との間に有意差は認められなくなった。次に、うつ病群を亜型別に分けて低下率をみると、対照群に比し双極型の未治療期は小さい傾向($P<0.1$)を示したが、寛解期には正常化した。一方、単極型では未治療期、寛解期ともに有意に小さかった（両群とも $P<0.05$）。(2)血漿 HGHの変化:clonidine負荷による血漿 HGHの分泌反応の判定基準は、負荷後の血漿 HGHの最大値が5ng/ml以上のものを陽性反応（正常反応）とし、5ng/ml未満のものを陰性反応（異常反応）とした。図3に示すごとく、まず対照群では10例中9例（90%）が陽性反応であり、1例(10 %) のみが陰性反応を示した。これに対して、うつ病群の未治療期には13例中5例 (38.5 %) が陽性反応を示したにすぎず、8例(61.5 %) は陰性反応であった。しかし寛解期になると、10例 (77 %) が陽性反応となり、3例(23 %) のみが陰性反応を示した。次に、亜型別にみると、双極型は未治療期には5例中1例(20 %) のみが陽性反応であった。しかし、寛解期になると4例(80 %) が陽性反応を示した。また、単極型では未治療期は8例中4例(50 %) が陽性反応であったが、寛解期には6例(75 %) が陽性反応を示した。［考察］以上より、うつ病の未治療期には、血漿NEの抑制作用の低下(presynaptic α_2-receptorの機能低下）と、血漿HGH 分泌反応の陽性率の低下(postsynaptic α_2-receptorの機能低下）が示唆された。亜型別では双極型においては、寛解期に機能が正常化することなどから、state de-

pendent な要因が考えられた。これに対して、単極型では血漿 NE の変化のごとくpresynaptic α_2-receptorの機能低下は持続し、血漿 HGHの変化のごとくpost-synaptic α_2-receptorの機能については、一部正常化した。したがって、α_2-receptorの機能については、亜型による違いが認められた。そして、以上より、躁うつ病うつ状態では中枢性 presynaptic ならびにpostsynaptic α_2-receptorの機能低下が示唆された。

［文献］(1) Coppen, A. et al. (1965) Brit. J. Psychiat., 111, 105-107. (2) Goldstein, D.S. et al. (1981) Life Sci., 28, 467-475. (3) Schildkraut, J.J. (1965) Am. J. Psychiat., 122, 509-522. (4) Spitzer, R. L. et al. (1978) Arch. Gen. Psychiat., 35, 773-782.

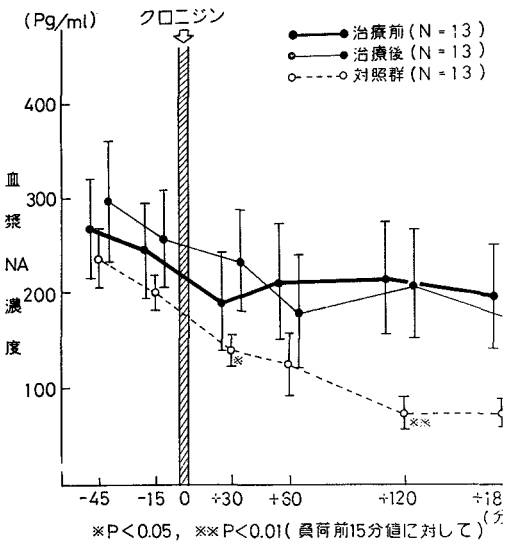


図1.うつ病者の治療前後におけるクロニジン負荷時の血漿ノルアドレナリン(NA)濃度の変化

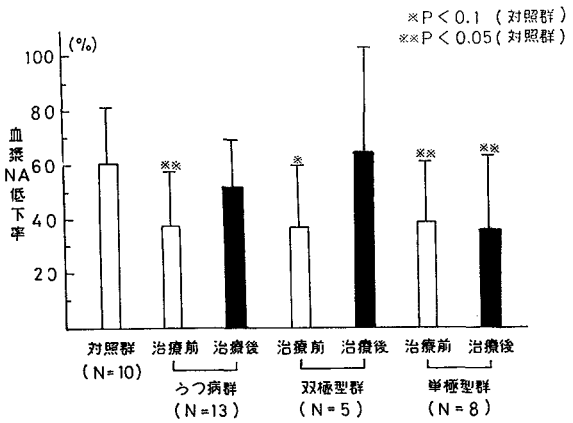


図2.うつ病者の治療前後におけるクロニジン負荷時の血漿ノルアドレナリン(NA)濃度の低下率

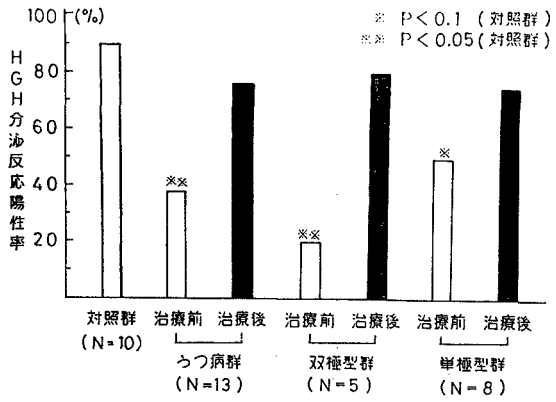


図3.うつ病患者の治療前後におけるクロニジン負荷時の成長ホルモン(HGH)の分泌反応の陽性率

23. うつ病患者，自殺者等の部検脳における神経伝達物質の研究（第一報）
―セロトニン作動性ニューロン系をモデルとして

栗野菊雄・Michel J. P.* ・Deluermoz S.* ・Richard F.* ・Kopp N.* ・Tommas M.* ・浅尾博一**・播口之朗・西村　健
（大阪大・医・精神，Alexis Carrel 大・医・神経病理*，大阪府立中宮病院**）

〔要　約〕

うつ病のセロトニン仮説を検討するために42個の剖検人脳を用いて脳中15部位のセロトニンとその代謝産物を測定した。人脳を試料とした生化学的研究に際して留意すべき諸因子について検討を加えた。5HIAAは5HTに比して長期間組織中に残存していた。生前にうつ状態を呈した患者剖検脳の縫線核群では，Major depression, single episodeの12部位，Bipolar disorder, Depressedの11部位，Major Depression, recurrentの10部位，Atypical Depressionの6部位，その他抑うつ状態を呈した群の10部位において5HT，5HIAA含量がcontrol群に比して低値を示した。

本研究を通じ，剖検脳を用いて神経物質の変化を研究する際には，特に剖検脳が得られた状況，脳の保存状況，病歴や合併症の有無などが測定値に対してかなり大きな変動をもたらし得るということが高度に有意な水準で示された。

Key word：Human brain, serotonin, depression

はじめに：　うつ病の病因については1967年のCoppenのセロトニン仮説（1）に始まり種々の仮説が提出されてきた。最近，抗うつ薬の作用機序に関する研究から神経細胞の膜透過性変化が病因としてとり上げられている(2)。しかし，人脳組織を用いた各仮説の詳細な検証はほとんどなされていない。演者らは，まずセロトニン仮説を検討するために剖検人脳を用いてセロトニンとその代謝産物を測定した。さらに，人脳を試料とした生化学的研究に際して留意すべき諸因子について検討を加えた。

方法：　剖検脳はリヨン法医学研究所，リヨン神経科神経外科学病院，リヨン市ならびに周辺の計5病院で得られた。剖検脳についての諸因子を表1に示す。剖検脳を正

番号	因　子	内　容	番号	因　子	内　容
× 1	性　別 ……	♂＝28，♀＝14	× 11	合併症・病歴 ……	アルコール中毒など
× 2	死亡年齢 ……	18才～85才	× 12	自殺企図歴 ……	有3名
× 3	死亡場所 ……	病院，自宅，他	× 13	医師による蘇生努力 ……	有13名
× 4	死亡時刻 ……	ランダム	× 14	死亡直前の状態 ……	コーマなど
× 5	死亡年月日 ……	1979～1981	× 15	神経学的異常 ……	麻痺など
× 6	遺体保存温度 ……	室温～4℃	× 16	神経病理学的所見 ……	異常の有無
× 7	遺体保存時間 ……	4～119.5時間	× 17	伝統的診断（PICHOT）……	内因性・外因性
× 8	脳保存期間（−55℃）……	1～38カ月	× 18	DSM−Ⅲ診断 ……	296 **が16名
× 9	脳組織保存期間（−20℃）…	25～32カ月	× 19	初発年齢 ……	17才～58才
× 10	直接死因	自殺20名など	× 20	家族歴（うつ病，自殺）…	有5名

Table 1. 剖検脳の諸因子

中右側2 mmのlongitudinal planeで分離し，右半分は10％ホルマリン液中に保存して神経病理学的検査に供し，左半分を生化学的研究用に−55℃で凍結保存した。凍結脳は−8℃，14時間の部分解凍後，図1の16枚のスライスに分けて，N. raphes dorsalis

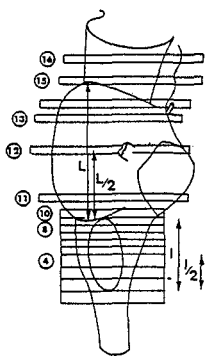


Figure 1.
predissection

をはじめとする縫線核群（11部位）および前頭葉皮質などのterminal領域（4部位），計15部位をパンチした(3)。得られた脳組織は生化学的測定に供するまで－20℃で保存した。各組織のパンチは同一人が人脳マップに基づいて行った(4, 5)。脳組織を図2の手順で処理し，HPLC(Waters, model 510 pump, model U6K injector, μBondapack C_{18}, column, USA)に apply した。mobile phase は Gagnieu(6)らの組成を用いた。5HTと5HIAAの定性定量は electrochemical detector (DEL.1－UNITE Amperometrique PRG, TACUSEL, FRANCE)によって行った。full scale 0.1nA／＋0.75Vの変化まで測定可能とした。タンパク定量はLowryらの方法(7)によった。

各剖検脳の諸因子は，因子の性質に応じて順序統計量として多変量解析と分散分析を大型計算機（富士通M780－3）で行った。解析プログラムはSASを用いた(8)。

結果と考察：(1)表2に全剖検例における脳各部位別の5HT, 5HIAA含量を示す。遺体の保存温度（×6）と保存期間（×7）の積に対する，各脳組織中5HA, 5HIAA含量の散布図から5HIAAが比較的長期間の保存の後にも組織中に残存しているという事が明らかとなった。次の剖検脳の各因子群についての分散分析を行なった結果を表3に示す。とりあげた因子のうち，寄与率が大きくかつ高度に有意だったのは×3，5，7，20であった。×3，×5，×7は，どのような場所でどのような季節に死亡し，かつ遺体としてどの位の期間保存されたかという，互いに関連している状態

	5HT	5HIAA
1) N. raphes dorsalis (r)	0.65 ± 1.20	32.7 ± 22.3
2) __ _____ _____ (c)	0.91 ± 2.29	27.9 ± 32.9
3) N. centralis superior (r)	1.19 ± 1.64	41.7 ± 36.8
4) __ _____ _____ (c)	2.74 ± 3.69	54.8 ± 55.2
5) N. raphes pontis (dorsal)	9.32 ± 9.35	96.2 ± 69.8
6) __ _____ _____ (ventral)	7.91 ± 6.92	112.4 ± 91.1
7) N. raphes magnus	6.10 ± 5.51	45.7 ± 34.4
8) N. raphes obscurus (r)	15.3 ± 10.3	51.5 ± 28.3
9) __ _____ _____ (c)	13.6 ± 7.84	40.3 ± 21.2
10) N. raphes pallidus (r)	3.81 ± 2.87	32.8 ± 20.0
11) __ _____ _____ (c)	1.80 ± 1.88	22.7 ± 12.2
12) Frontal cortex	0.68 ± 1.63	1.27± 1.95
13) Cerebellar cortex	1.19 ± 3.18	2.60± 5.75
14) Putamen	6.91 ± 6.30	19.3 ± 22.6
15) N. dentatus	0.84 ± 2.12	7.60± 4.83

Table 2. (pmol／mg protein ± 1SD)

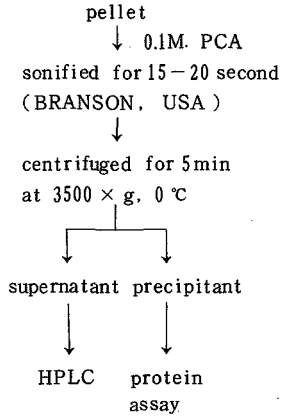


Figure 2.

を表わすと考えられる。また×20は寄与率も大きいが，本因子は例数が少い事に加えて他の因子と交絡している可能性も大きく実際的な寄与は低いものと考えられる。

(2)うつ状態の患者における5HT, 5HIAAの変化：生前の状態から明らかに正常だった剖検脳と，明らかな双極感情障害のうつ病性エピソード（DSM－Ⅲ 296.5×）のうちに死亡した剖検脳のlog（5HT＋5HIAA）の値を表4に示す。表4にみられるように，うつ状態を生前に呈した剖検例ではうつ状態を示さなかった例と比べかなりの部位で5HT＋5HIAAの含量が低値を示した。これまでに，死後脳の脳幹部組織を，

番号	寄与率(%)	有意水準(%)	番号	寄与率(%)	有意水準(%)
× 1	0	0.707	× 11	4.6	0.0001 ***
× 2	5.0	0.005 **	× 12	0	0.2 ***
× 3	1.5	0.0001 ***	× 13	1.3	0.0002 **
× 4	7.5	0.03 *	× 14	1.9	0.005 **
× 5	8.6	0.0001 ***	× 15	3.0	0.003 **
× 6	1.2	0.0005 ***	× 16	0.7	0.02 *
× 7	8.1	0.0001 ***	× 17	2.0	0.005 **
× 8	5.1	0.0001 ***	× 18	3.3	0.0001 ***
× 9	2.6	0.0001 ***	× 19	7.0	0.0001 ***
× 10	1.1	0.01 *	× 20	9.0	0.001 **

（表で寄与率というのは log(5HT+5HIAA)というデータの全変化量の中に占める各因子のそれぞれの寄与の程度を示している。*と**はそれぞれ5%，1%の危険率で有意であることを示している。）

Table 3.

	1)	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)	10)	11)	12)	13)	14)	15)
normal	1.42	1.39	1.39	1.60	1.82	2.06	1.64	1.85	1.84	1.56	1.42	−0.54	0.78	1.21	0.76
296.5×	1.31	1.12	1.40	1.51	2.25	1.82	0.90	1.76	1.56	1.51	1.27	0.01	−1.97	0.35	−0.76

Table 4. (No. はTable 2 の部位を示す。)

homogenate として測定した5HT, 5HIAAはうつ病患者，自殺者で低下していたという知見が示されている。今回の結果は，セロトニン作動性ニューロン系自体においても同様に低値を示す部位が多いという点で，これまでの知見に一致している。剖検脳で得られた5HT, 5HIAAの測定値を生前のこれらの物質のレベルに外挿することは困難であるが，少くともうつ状態の剖検例と，そうでない剖検例との間で差がみられたことは，うつ病のセロトニン仮説を支持する成績として意味があると考えられる。

また今回の研究で有意な寄与因子として認められたものについて，動物実験を行ない，より明確な寄与の程度を求める事やセロトニンの合成系と分解系の酵素を測定し，同様な解析を試みる事も重要であり，今後の課題である。

本研究の統計解析を行うにあたり適確な御指導を下さった松尾嘉郎先生（京都大学農学部土壌学研究室）に謝意を表する。

参考文献：(1) Coppen, A.J. (1967) Br. J. Psychiatry 113, 1407−1411, (2) Honegger, U.E., Roscher, A.A., & Wiesmann, U.N. (1983) J. Pharmacol. Exper. Therap. 225, 436−441, (3) Kopp, N. et al (1978) J. Neurol. Sci., 41, 397−409, (4) Olszewski, J., & Baxter D. (1954) Cytoarchitecture of the Human Brain Stem. (5) Braak, H., (1970) Z. Zellforsch, 107, 123−141, (6) Gagnieu, M.C., et al (1984) Clinica, Chimica Acta, 139, 1−12, (7) Lowry, O.H., et al (1951) J. Biol. Chem., 193, 265, (8) SAS Institute Inc, (1985) SAS User's guide : Statistics, version 5 ed.

24. 非ケトーシス型高グリシン血症（グリシン脳症）：臨床型と酵素障害

多田啓也・早坂　清　（東北大・医・小児）

〔要　約〕

非ケトーシス型高グリシン血症は別名グリシン脳症とも呼ばれ重篤な中枢神経障害を呈する疾患であり，グリシン開裂酵素の障害に基づくことが明らかにされている。本症には新生児期に発症し予后不良の型と乳幼児期に徐々に精神運動機能の発達障害が目立って来る型とが知られている。本研究では本症の乳児型13例，遅発型3例についてグリシン開裂酵素活性及びその成分蛋白（P-蛋白，H-蛋白，T-蛋白，L-蛋白）の分析を行ない，以下の知見を得た。

1. 新生児型では肝のグリシン開裂酵素活性殆んど欠損しているか著明な低値を示した。一方遅発型では若干の残存活性が見出された。すなわち，臨床像の軽重はグリシン開裂酵素の欠損の度合によって決定されるものと推測された。

2. 成分蛋白の分析の結果，新生児型ではP-蛋白の特異的欠損が10例に，T-蛋白の特異的欠損が2例に認められた。一方，遅発型では検索し得た1例に於てT-蛋白の部分欠損が見出された。

3. 脳の分析は剖検例7例で行なわれ，肝の分析結果と一致する成績が得られた。

Key word： Hyperglycinemia, Glycine encephalopathy, Glycine cleavage system.

非ケトーシス型高グリシン血症（NKH）は別名グリシン脳症とも呼ばれ，重篤な中枢神経障害を呈する先天代謝異常症である。本症のprimary lesionがグリシン開裂酵素の欠損であることは多田らにより明らかにされている（2, 3, 4）。既に200例を越える報告例があり先天代謝異常症の中ではそれ程稀存疾患ではない。本症には新生児期に痙攣，意識障害，呼吸障害などの症状を呈し死亡するか，助かっても重篤な脳障害を来たす重症型（新生児型）と新生児期には無症状に経過し乳幼児期に徐々に精神運動機能の発達遅延が目立って来る型（遅発型）とが知られている。

本研究では国内および欧米各国から検索を依頼された本症16例の試料を分析し，臨床型の違いが酵素レベルで如何なる差異に基づくかを検討した。

研究方法

肝及び脳のグリシン開裂反応測定並びにグリシン開裂酵素を構成する成分蛋白の分析は既報(1)の方法に従った。

成　績

本症16例の臨床像を表1に示した。No. 1～13は新生児型であり，筋緊張低下，けいれん，無呼吸発作，嗜眠等の症状が新生児期に出現し，9例は生后8日～22カ月の間に死亡している。生存している4例はいずれも高度の中枢神経系発達障害を呈している。No. 14～16は遅発型でありNo. 14は3カ月で死亡，他2例は15才及び2才で知能障害が認められる。

血漿，尿，髄液中グリシンの上昇が全例に認められ，特に髄液中グリシンの上昇が著明であった。NKH髄液中グリシン濃度は0.54～2.54 mg/dl，正常値（0.022～0.078 mg/dl）

であり，　ケトーシス型高グリシン血症（プロピオン酸血症ないしメチルマロン酸血症）7例の0.12～0.22mg/dlに比し遥かに高値を示した。脳中グリシン濃度もNKHでは高値であった。

グリシン開裂酵素は4つの成分蛋白，すなわち，ピリドキサル燐酸を補酵素とするP-蛋白，リポ酸を含むH-蛋白，テトラヒドロ葉酸を必要とするT-蛋白，lipoamide dehydrogenase作用を有するL-蛋白から構成される複合酵素である。グリシン開裂反応活性並びに各成分蛋白の分析結果を表2に示す。新生児型ではグリシン開裂活性は殆んど欠損しているか著明な低値を示した。それに対し遅発型では若干の残存活性が認められた。すなわち，臨床像の軽重はグリシン開裂酵素の欠損の度合によって決定されるものと推測された。成分蛋白の分析では新生児型13例中10例はP-蛋白の特異的欠損を示し，2例がT蛋白の特異的欠損を示した。遅発型では検索し得た1例に於てT-蛋白の部分欠損が見出された。脳の分析は剖検例7例で行われ，肝の分析結果と一致する成績が得られた。

グリシン開裂酵素活性を本症以外の剖検例で測定した結果，乳児脳では成人脳に比し高値を示し，諸酵素が脳発育に有意義な役割を果していることが示唆された。

文　献

1. Hayasaka, K., Tada, K. Kikuchi, G, etal. (1983) Pediatr. Res. 17：967-970
2. Tada, K., Corbeel, L. M. etal. (1974) Pediatr. Res., 8：720-723
3. Tada, K., and Hayasaka, (1987) Eur. J. Pediatr. 146：221-227
4. Tada, K., Narisawa, K., Yoshida, T., etal. (1969) Tohoku J. exp. Med., 98, 289-296

Table 1.　Clinical findings of the patients with nonketotic hyperglycinemia

Patient	Onset	Muscular hypotonia	Seizures	Apneal attacks	Lethargy or Coma	Outcome
1	2nd day	+	+	+	+	Alive at 30 M, severely retarded
2	2nd day	+	+	+	+	Alive at 17 M, severely retarded
3	2nd day	+	+	+	+	Alive at 14 M, severely retarded
4	1st day	+	+	-	+	Alive at 14 M, severely retarded
5	Neonatal period	+	+	+	+	Died at 9th day
6	3rd day	+	+	+	+	Died at 8th day
7	2nd day	+	+	+	+	Died at 22 M, severely retarded
8	2nd day	+	-	+	+	Died at 11th day
9	1st day	+	+	+	+	Died at 4 M
10	3rd day	+	+	+	+	Died at 12th day
11	3rd day	+	-	+	+	Died at 20th day
12	1st day	+	+	+	+	Died at 10th day
13	3rd day	+	+	+	+	Died at 69th day
14	2 months	+	+	+	+	Died at 3 M
15	6 months		delayed	development		Alive at 15 Y, retarded
16	2nd year		delayed	development		Alive at 27 M, IQ: 44 - 55

Table 2. Activities of the glycine cleavage system and its individual enzyme components in the liver and brain of patients with nonketotic hyperglycinemia

Source of tissue	Type	Activity (umole of product/g protein/h)				
		Glycine cleavage	P-protein	H-protein	T-protein	L-protein
Liver						
Patient 1	N*	0	0	20.1	54.0	3,156
2	N*	0				
3	N*	0.4	0	18.6	54.0	4,362
4	N*	0	0	27.1	51.9	3,588
5	N	0.5	0	14.8	64.0	3,840
6	N	0.1	0	14.4	32.1	1,674
7	N	0.7	10.5	15.1	0	2,874
8	N*	0	0	34.0	84.5	6,550
9	N	0.1	0	30.0	69.5	
10	N	0.3	0	16.1	72.2	4,188
11	N	0.4	7.4	16.2	0.1	3,546
12	N	0	0.1	16.6	35.3	3,805
13	N	0	0	25.8	61.5	
14	L	0.7				
15	L*	1.0	5.7	23.8	0.3	3,042
16	L*	1.4				
Controls		4.4-10.8	4.5-5.7	14.6-18.3	52.1-77.9	3,768-4,728
Brain						
Patient 5		0.2	0	3.8	0.9	
6		0.3	0	3.9	12.2	
7		0.3	0.5	6.8	0	
9		0.03	0	14.0	6.4	
10		0.2	0	3.2	1.4	
11		0.1	0.6	4.2	0	
12		0.01	0	3.6	6.0	
Controls		0.9-1.6	0.4-0.8	3.2-7.8	2.1-4.0	

*Biopsied materials
Others are autopsied materials

N: Neonatal type
L: Late-onset type

25. サル脳，脳脊髄液および血漿中の内因性ＭＡＯ阻害物質について

江頭　亨・金馬義平　（大分医大・薬理）

〔要　約〕

サル脳ミトコンドリアＭＡＯおよび血小板ＭＡＯ活性に対するサル脳、脳脊髄液および血漿からの抽出物の影響をinvitroで検討した。これら３種の物質は、その加えられた量に応じて、サル脳ミトコンドリアＭＡＯを阻害した。特に、Ｂ型ＭＡＯに比較してＡ型ＭＡＯをより強く阻害した。一方、Ｂ型ＭＡＯを特異的に含むサル血小板を酵素材料とした場合、いずれの物質もＭＡＯ活性を阻害した。これら３種の物質によるＭＡＯ阻害様式は、脳ミトコンドリアＭＡＯに対しては、５－ＨＴ基質で競合的、β－ＰＥＡ基質で非競合的であったが、一方、血小板ＭＡＯに対してはβ－ＰＥＡ基質で非競合的であった。３種物質について同一物質であるか否かは、目下検討中であるが、いずれも内因性のＭＡＯ阻害物質であると思われる。また、これらの結果より、生理的条件下では、脳中で合成されたＭＡＯ阻害物質は、脳脊髄液及び血漿中へも逸脱する可能性が示唆される。

Key word：　MAO ，　Monkey ，　Endogenous MAO Inhibitor ，

生体内カテコールアミンやセロトニンの代謝調節は、これら生理的活性アミンを酸化的に脱アミノするMonoamine Oxidase(ＭＡＯ）によって行われている。そのＭＡＯは生体内において種々の化学的、物理的刺激により、容易にその活性が変動することが知られている。しかし、その変動の調節機構として、代謝産物によるフィードバック阻害、リン脂質やポリペプタイドによる酵素修飾、酵素誘導及び内在性の因子による酵素蛋白の構造変化等が推定されているが、未知の点が多い。以前より、ＭＡＯは生理的条件下では、内因性の阻害物質で調節されている事を推測していたが、最近、犬脳脊髄液（ＣＳＦ）に、脳内ＭＡＯ活性を阻害する物質が存在する事を認め[5]、また、この物質がイミプラミン結合能や５－ＨＴの取り込み能を促進することから、内因性の抗精神病薬様物質の存在の可能性を示唆した[6]。今回、サル脳中にもＭＡＯ活性を阻害する物質が存在する事を認めたので、この物質の性質について報告するとともに、本物質とＣＳＦ中及び血漿中のＭＡＯ阻害物質との関連性について検討した。

［　実験材料と方法　］

（内因性ＭＡＯ阻害物質の調整）

脳；サル脳を、５％ＴＣＡでhomogenateし、遠心後、上清をetherで処理した。水層を凍結乾燥し、０．２Ｍ酢酸に溶解し、Biogel P-2 column及びSilica column chromatographyを行い、脳ミトコンドリアＭＡＯ活性を阻害するfractionを集め、粗ＭＡＯ活性阻害物質とした。

脳脊髄液；小脳延髄槽穿刺を行い、サル脳脊髄液を採取した。これを10,000xg、１０分遠心した後、ダイアフローメンブレンＹＭ１０(10,000M.W.)を通し、分子量

10,000以上の物質を取り除いた。この溶液を、脱塩後、濃縮した。

血液：血小板を採取した残りのサル血漿を100,000xg, 60分遠心し、上清を脳脊髄液の場合と同様にYM－10膜に通し、脱塩後、濃縮した。

（酵素材料）　サル脳を0.32M sucrose でhomogenateを作製し、常法に従い[5]、遠心分離法でミトコンドリア分画を得、0.01Mリン酸緩衝液（pH7.2）で懸濁し、これを脳ミトコンドリアMAOの酵素材料とした。また、3.8%クエン酸ソーダで処理したサル血液を1,100rpmで遠心しPRP(platelet rich plasma)を得た。これを再び3,000xgで遠心し、沈査を0.01Mリン酸緩衝液（pH7.2）に懸濁し、これを血小板MAOの酵素材料とした。

（MAO活性測定）　ラジオアイソトープ法[6]で行い、^{14}C－5－HT（100μM）および^{14}C－β－PEA（10μM）を基質とし、37℃で測定した。

（蛋白量の測定）　酵素材料の蛋白量はLowry法で測定した[10]。

［　結果および考察　］

サル脳ミトコンドリア及び血小板MAO活性に対するサル脳、脳脊髄液及び血漿からの抽出物の影響をin vitroで検討した。図1に見られる様に、脳ミトコンドリアをMAO酵素材料とした場合、いずれの物質も反応液中に加えられた量に応じて、MAO活性を阻害した。特にβ－PEAと比べ、5－HTを基質とした場合にその阻害は著明であった。一方、B型MAOを特異的に含むと言われている血小板を酵素材料にした場合も同様に、3種抽出物とも血小板MAO活性を阻害した。また、ヒトCSFを用い、サルCSFの場合と同様に5－HTおよびβ－PEAを基質として比較したところ、ヒトCSFもまたサル脳ミトコンドリアおよび血小板MAO活性を阻害した。この事は、ヒトCSF中にもMAO活性を阻害する物質が含まれている事を示唆した。Lineweaver-Burk plot法によりこれら3種の抽出物によるMAO阻害様式を脳ミトコンドリアおよび血小板MAOを用いて検討した。その結果、脳ミトコンドリアMAOの場合、5－HT基質ではいずれも競合型の阻害様式であったが、β－PEAを基質とした場合は、非競合型であった（図2）。一方、血小板MAOを酵素材料とした場合、β－PEA基質で非競合型の阻害態度を示した（図3）。これらの結果は、犬脳ミトコンドリアMAOに対する犬CSF中に含まれるMAO阻害物質の阻害態度と同様であった[5]。最近、セロトニン作働性神経やカテコールアミン神経系の活性変化と精神病との関連性が示唆されている。特にMAO関係では、分裂病および躁鬱病において小板MAO活性が低下するという数多くの報告があるが[4,11-13]、血小板

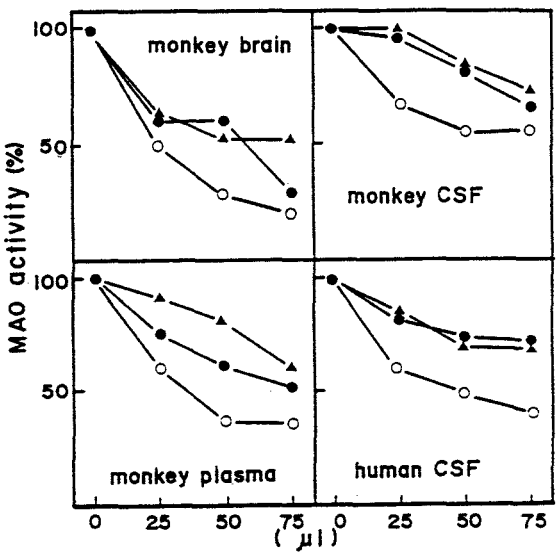


図1．サル脳ミトコンドリア及び血小板MAO活性に対するサル脳、脳脊髄液及び血漿からの抽出物の影響

サル脳ミトコンドリアを酵素材料とし、基質として5－HT（○－○）及びβ－PEA（●－●）を用いた。また、サル血小板の場合は、基質としてβ－PEA（▲－▲）を用いた。

ＭＡＯ活性とそれら精神疾患の診断との生理的関連性についてはほとんどわかっていない。最近、ある種のＭＡＯ活性調節因子が細胞質内[1,9,15]、血漿および尿中[2,7,16]に見出だされているが、その生理的意義は、はっきりしていない。一方、ヒト[8,14]および犬[3]ＣＳＦに、Ａ型及びＢ型ＭＡＯ活性を阻害する物質が存在し[5]、これらの物質は、分子量３，０００～３５，０００のペプタイドか低蛋白質であろうと推定されている。しかしながら、脳中にＭＡＯ活性を阻害する物質が存在するか否かについての報告はない。今回、サル脳の抽出物中にＭＡＯ活性を阻害する物質が存在し、これが脳中ミトコンドリアＭＡＯばかりでなく、血小板ＭＡＯ活性をも阻害した。一方、ＭＡＯ活性を阻害する物質が、サルＣＳＦばかりか血漿中にも認められ、これらの物質もまた、脳ミトコンドリアＭＡＯ及び血小板ＭＡＯ活性を阻害した。また、その阻害様式を検討したところ、いずれの阻害物質も、脳ミトコンドリアＭＡＯおよび血小板ＭＡＯに対して同様な阻害態度を示した。これらの結果は、脳中で合成されたＭＡＯ阻害物質が、ＣＳＦ及び血漿中へも逸脱する可能性を示唆する。このＭＡＯ阻害物質の動態が事実とすれば、精神分裂病やその他の精神疾患において脳ＭＡＯ活性および血小板ＭＡＯ活性が低下したとの報告[4,11-13]は、これらＭＡＯ活性阻害物質が病態に応じて合成され、脳中および血小板ＭＡＯ活性を調節した結果と推察される。また、犬ＣＳＦのＭＡＯ阻害物質は、ＭＡＯ活性を阻害する一方で、イミプラミン結合能や５－ＨＴの取り込みを増加させる作用を有する事[6]から、我々が現在検討している本物質も数種の生理活性物質の集合体であるか、ＭＡＯ活性阻害作用を含む抗精神病薬様物質の可能性も考えられる。しかしながら、これらＭＡＯ阻害物質は、いずれも粗物質であるので確証はなく、目下、脳中ＭＡＯ活性阻害物質と脳脊髄液中および血漿中のそれらとは同一物質であるか否かについて検討中である。

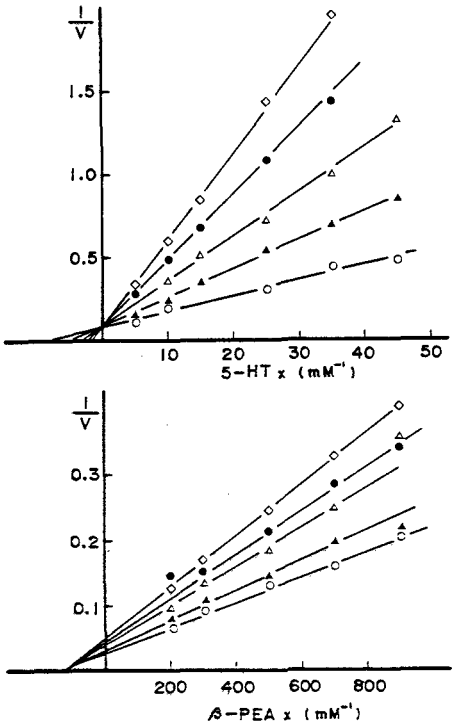


図2．サル脳ミトコンドリアＭＡＯに対する阻害様式
○－○ 阻害物無添加 ▲－▲ monkey CSF
△－△ monkey plasma ●－● human CSF
◇－◇ monkey brain

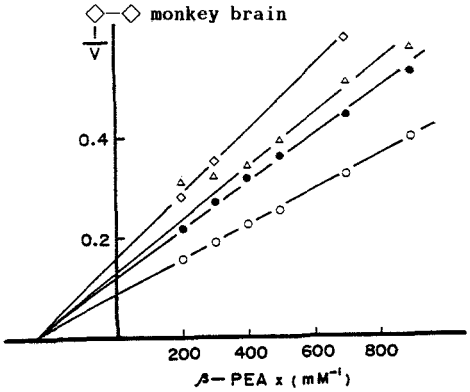


図3．サル血小板ＭＡＯに対する阻害様式
β－ＰＥＡを基質として用いた。図中の記号は図2と同じ。

［ 文献 ］
1)Assad,M.M.and Clarke,D.E.(1978)Biochem.Pharmac.27,751-756. 2)Becker,R.E.and Giambalvo,C.T.(1982)Am.J.Psychiat.139,1567-1570. 3)Becker,R.E.et al.(1983)Science 221,476-478. 4)Davidson,J.R.T.et al.(1980)Archs.Gen.Psychiat.37,771-773. 5)Egashira,T.et al.(1986)Japan.J.Pharmacol.42,583-586. 6)Egashira,T.et al.(1987)Biochem.Pharmac.36,1781-1785. 7)Giambalvo,C.T.& Becker.R.E.(1981)Life Sci.29.2017-2024. 8)Glover.V.et al.(1981)Nature 292.347-349. 9)Ichikawa,K.et al.(1982)Endocrinology 111,1803-1809. 10)Lowry,O.H.et al.(1951)J.biol.Chem.193,265-275. 11)Mann.F.(1979)Psychol.Med.9,729-736. 12)Murphy,D.L.and Weiss,R.(1972)Am.J.Psychiatry 128,1351-1357. 13)Oreland,L.et al.(1981)Psychiat.Res.4,21-29. 14)Petursson.H.et al.(1981)Psychiat.Res.5,335-340. 15)Tong.J.H.and D'Iorio,A.(1976)Endocrinology98,761-766. 16)Yu,P.H.and Alan,A.B.(1978)Life Sci.25,31-36.

26. 血漿 acetylcholinesterase 活性測定法の開発と神経疾患における変化

中野　智・川島信吾・中村重信・
亀山正邦*　（京都大・医・神経内科，住友病院*）

〔要　約〕

血漿中に存在する acetylcholinesterase（AChE）活性を，偽 cholinesterase（PsChE）活性より分離し，測定する方法を開発した。方法は血漿をポリアクリルアミド・ディスクゲルにより電気泳動した後，PsChE に特異な阻害剤の存在下で，AChE の酵素組織化学的な方法を応用し染色した。この方法によって血漿中に2種の AChE アイソザイムが確認された。電気泳動学的挙動により，2種のアイソザイムのうち，主要なものは髄液 AChE と同じ G 4 型であり，他方は赤血球膜に存在する G 2 型 AChE であることが確認された。

血漿 G 4 型 AChE は，神経組織由来と考えられるため，その活性をデンシトメータを使用し，定量化した。血漿 G 4 型 AChE 活性を種々神経疾患で比較した。

結果は，アルツハイマー型痴呆例のうち，65歳以下の若年群で，対照群に比べ有意（$p < 0.002$）に活性の低下を認めた。また，OPCA 型の脊髄小脳変性症においても有意に（$p < 0.03$）活性の低下を認めた。

血漿 G 4 型 AChE 活性が，ある種の神経疾患で変化しており，末梢におけるマーカーとなる可能性がある。

Key word：Plasma acetylcholinesterase, isozyme, neurological diseases

血漿中には多量の PsChE 活性が認められ，その由来組織である肝機能のよい示標となっている。一方，真の AChE 活性も微量ではあるが検出される。血漿 AChE は神経系由来と考えられ，その活性がある種の神経疾患で変化している可能性がある。しかし，その活性の測定は豊富な PsChE 活性，また赤血球由来の AChE 活性に妨害されて困難である。われわれは，ポリアクリルアミド電気泳動法を用い，血漿中 AChE のうち，神経系由来と考えられるアイソザイム（G 4 型 AChE）を分離定量化し，種々の神経疾患例で比較した。

＜対象および方法＞

血漿の電気泳動には，6.9％ T のポリアクリルアミドを展開ゲルとした。血漿 0.1 mℓを3時間電気泳動後，Tago ら(6)の方法に準じ，PsChE に特異的な阻害剤である iso−OMPA（10^{-4} M）の存在下で，AChE 染色を施す。発色ののち，デンシトメータで 600 nm にてスキャンし，ピーク面積を求める。

対象は対照群 42 名（8−92歳），アルツハイマー型痴呆 20 例，血管性痴呆 7 例，パーキンソン病 3 例，OPCA 型の脊髄小脳変性症 6 例，ALS 8 例，その他の神経疾患 15 例である。

血漿 AChE 活性の測定はすべて duplicate または triplicate で行った。統計的処理は Mann−Whitney の U テストを用いた。

＜結　果＞

血漿 AChE アイソザイムの分析

iso−OMPA 存在下で，血漿中には3本のピークが認められる（図1）。陰極側から

AChE－1，AChE－2，Band－3と表す。5.0～9.2％Tのポリアクリルアミドを用い，移動度を比較すると，AChE－1は髄液中のAChEアイソザイムと一致し，AChE－2は赤血球膜上に存在するAChEアイソザイムと一致した。Band－3はヘモグロビンであることが確認された。AChE－1，AChE－2はAChEに特異的な阻害剤であるBW 284 c 51（10^{-5}M）にて消失した（図2）。

年齢による変化

血漿G4型AChE（AChE－1）のピーク面積より，AChE活性を算出した。対照群において，加齢による活性の変化は認められなかった。

神経疾患例と対照群との比較

神経疾患例の対照群としては45歳以上の27名を選んだ。アルツハイマー型痴呆例全体において，血漿G4型AChE活性は有意に低下していた（$p < 0.02$）。特に65歳以下の若年群で低下が著明であった（$n = 7$，$p < 0.002$）。老年群では有意な差は認められなかった。他にOPCA型脊髄小脳変性症で活性は有意に低下していた（$p < 0.03$）。血管性痴呆，筋萎縮性側索硬化症，その他の神経疾患では，活性の有意な変化は認められなかった。なお，少数例であるので，統計の対象外としたが，パーキンソン病でも活性の低下傾向を認めた（図3）。

＜考　察＞

神経・筋より分泌されるAChEはG4型のアイソザイムである（2，4）。髄液中のAChEは主にG4型アイソザイムであり(5)，脳由来と考えられている(3)。今回の結果は，血漿中のAChEの主要なアイソザイムは，髄液と同じG4であり，赤血球由来で

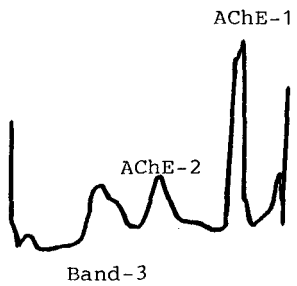


図1　血漿のacetylcholinesteraseアイソザイム

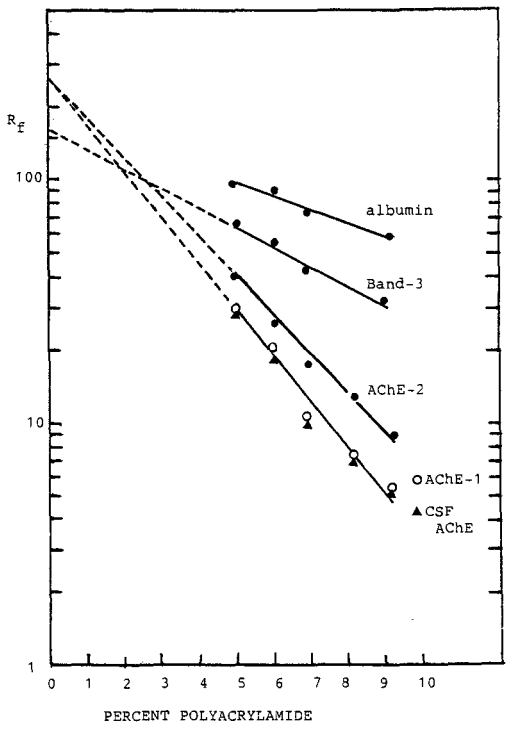


図2 Ferguson plots of various polyacrylamide gel AChE forms. The mobilities (Rf) of each AChE activity band in gels of various polyacrylamide concentration were calculated. Rf=(distance band from origin/distance dye band from origin) x 100.

あるG2型アイソザイムとは分離された。さらに，この血漿G4型AChE活性の測定は再現性もあり，疾患例でのその活性の比較が可能である。

大脳皮質中にはAChEアイソザイムのうち，G4型とG1型が主に存在する。Atackらは，2つのアイソザイムのうち，G4型AChEがアルツハイマー型痴呆例で選択的に低下していることを示した(1)。今回，血漿AChE活性の検討の結果では，血漿G4型AChE活性がアルツハイマー型痴呆例（特に若年群）で低下していた。血漿G4型AChE活性は脳内の活性を反映している可能性がある。

血漿AChEの由来としては，脳のほかに，末梢神経，筋，自律神経節などが考えられる。今回の検討では，症例数が少なく，他の神経疾患において，血漿AChE活性がどのような変動を示すか断言できないが，OPCA型の脊髄小脳変性症で有意な低下を，パーキンソン病で低下傾向を認めており，血漿AChE活性が，ある種の神経疾患において，末梢性マーカーとなる可能性がある。

REFERENCES 1. Atack,J.R. et al. (1983) Neurosci.Lett.,40:199-204
2. Carter,J.L. et al. (1981) J.Neurochem.,36:1018-1025
3. Chubb,I.W. et al. (1976) Neuroscience,1:57-62
4. Lucas,C.A. et al. (1985) Neuroscience,14:349-360
5. Nakano,S. et al. (1986) J.Neurol.Sci.,75:213-223
6. Tago,H. et al. (1986) J.Histochem.Cytochem.,34:1431-1438

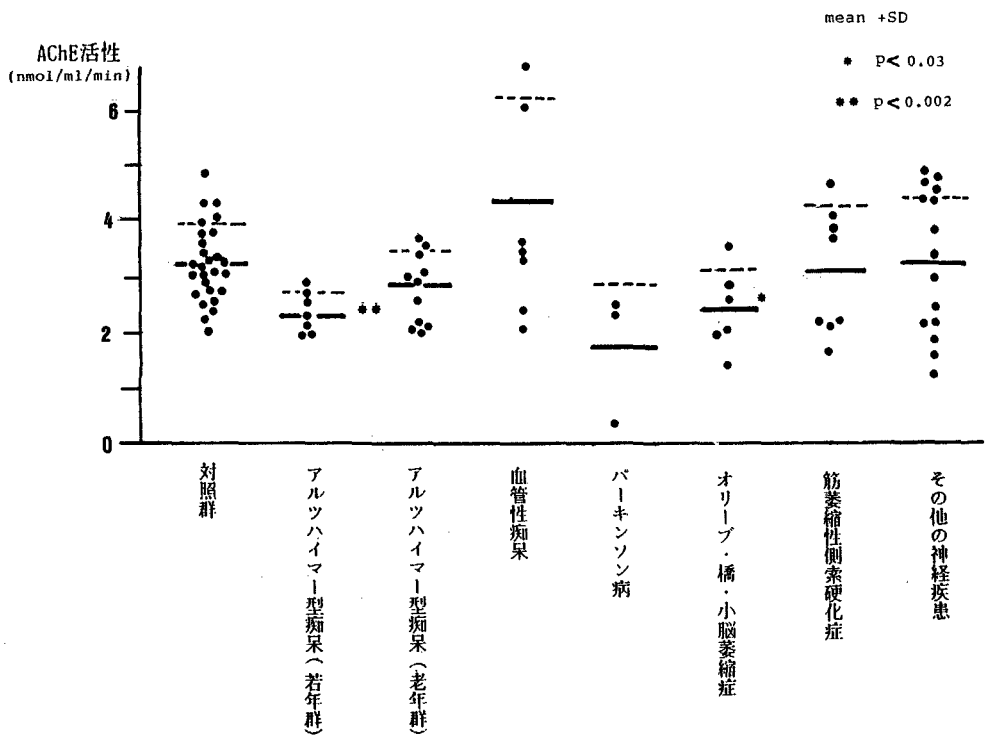


図3　各種神経疾患における血漿AChE活性

27. Prion proteinはCJD発症の必須因子ではない？－発症マウス脳の分画成分と感染能との相関性の検討

玉井洋一・小島久子・北島理恵・中村和生・田口文章*・
内田紀久枝*・大谷義夫**・川口　毅**・三浦貞則**
（北里大・医・生化，衛生・微生*，医・精神**）

Creutzfeldt-Jakob disease(CJD)の発症因子としてSAFあるいはprion説が有力であるが発症因子そのものは未だ不明である。本研究では従来のSAF調製法に沿って分画に伴う感染能の推移及びprion proteinが発症の必須条件か否かを再検討した。CJDマウス脳から10細分画画分を得た。Proteinase K処理後のSDS-PAGEの結果、沈査（SAFあるいはprion画分）には抗合成prion peptide抗体と反応する分子両19K，22K，27Kの3つのバンドが存在したが、同処理前及び処理後上清には、この3成分は存在しなかった。各画分をマウス脳内に接種し感染能を検索した。脳ホモジネートを含む11画分中もっとも高い感染能はproteinase K処理前、同処理後の上清と沈査及び脳ホモジネートに見いだされた。即ち感染能はprion proteinを含まない画分にも高力価で存在することがわかった。これらの実験結果はprion proteinの存在が発症の必須条件であるとする従来の知見とは相反するものである。一方、合成prion peptideと糖脂質との親和性をELISA法で調べたが、両者間に相互関係は見いだされなかった。

Key word：　Creutzfeldt-Jakob disease，transmissible agent，prion protein

Creutzfeldt-Jakob病（CJD）の病原体、いわゆるtransmissible agentがSAFあるいはprionと密接に関係し、これらの精製と共に感染能も上昇するという実験結果に基づき、CJDの感染機序におけるSAFやprionの関わりが強く示唆されて来た[1,3,5]。しかし一方では　prion－proteinをコードする遺伝子が正常動物脳にも存在するという事も明らかにされ[2,4]、CJDの発症因子あるいは発症機序は依然として不明である。本研究はSAF分離過程における感染能の推移、及びSAF画分のタンパク質組成と感染能との間に果してどの程度の相関性があるか、等を再検討する事を目的とした。更に合成prion peptideと糖脂質との関係を免疫学的に調べた。

〔実験方法・結果〕

1．分画　　発症マウス脳の分画は基本的にはDiringerらの方法[3]に準じた。すなわち発症マウス（Balb/C）脳9.3gを10%sarkosyl-リン酸緩衝液（pH7.4）20vol.でホモジナイズし、超音波処理を行った後に22,000 x gで30分間遠心した。沈査を10%NaCl含有1% sarkosyl溶液で処理後、215,000 x g，25時間遠心、沈査を再度同様に処理した後、proteinase K処理を行って最終画分の沈査と上清を得た。以上の過程で脳ホモジネートと10の分画画分が得られた（図1参照）。

2．タンパク質の電気泳動　　P215S-a，P215S-b，及びE2画分のタンパク質組成をSDS-PAGEにより比較した（図2）。P215S-aをproteinase K処理したP215S-bでは分子量27，22，19Kの三つのバンドを主成分とし（矢印）、一方これらのバンドはP215S-aとE2のいずれにも存在しなかった。これらのバンドをニトロセルロース膜

に転写後、抗合成プリオンペプチド抗体（東大・医科研、山内教授より供与）と反応させたところ三成分とも反応した。したがってP215S-aにはいわゆるSAF-proteinあるいはprion-proteinに相当する成分が調製されていると考えられた。

3．感染能の検討　タンパク質量に基づいて接種液を調製し、10倍希釈法にてマウス脳内に接種することにより感染能を測定した。接種タンパク質量1-4μgのオーダーで130-140日を潜伏期間として発症した（図３）。以後希釈とともに潜伏期間が延長し、タンパク質量と潜伏期間の関係は、感染能の強い画分についてはタンパク質量を対数目盛にとった半対数グラフ上で直線関係を示した。もっとも強い感染能を示した画分は脳ホモジネートとP215S-a，E２，P215S-bの３画分であった。とくにproteinase K処理前のP215S-aは、100ngのレベルでは潜伏期間が最も短く、発症率も100%であった。一方proteinase K処理後のP215S-bは同じタンパク質量レベルで潜伏期間がP215S-aよりわずかに延長した。

4．免疫学的検索　ヒトCJD脳に見いだされるガングリオシドの特徴的変化から、合成prion peptideと総ガングリオシド画分との親和性をELISA法にて検索したが、両者間に相互関係は見いだされなかった。現在リン脂質との関係についても検索をすすめている。

〔考察〕

本実験で調製された分画は、ほぼ従来の報告にある画分に相当すると推測される。即ちP215S-b画分に分子量19-27Kの３成分が存在し、しかもこれらが抗合成ペプチド抗体と反応する事からも明らかである。また３成分の分子量はスクレーピーマウス脳のそれに極めて近似していた[5]。図３に示すように、SAF画分（P215S-b）は高い発症率を示している。しかし感染能に関しては、P215S-a：174ng，164日（100%）；P215S-b：130ng，196日（100%）；E２：413ng，202日（100%）の結果からも明らかなよ

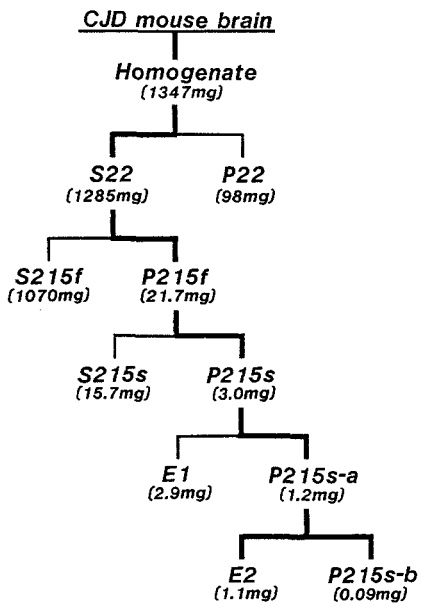


図１　感染マウス脳細分画のフローチャート。（　）内はタンパク質の収量、太線は感染能の推移を示す。

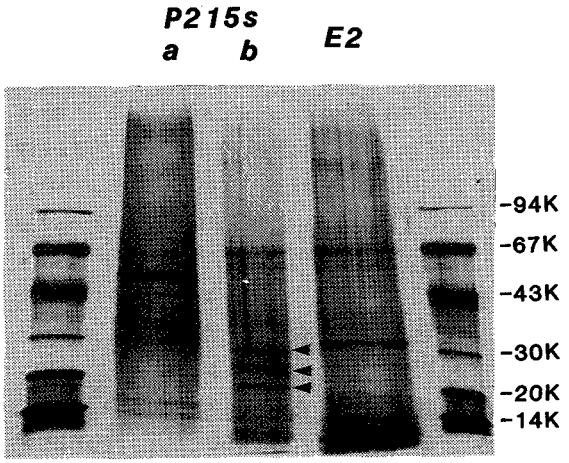


図２　感染マウス脳細分画画分のSDS-PAGE（4-20%）。銀染色．P215S-a，Proteinase K処理前；P215S-b，Proteinase K処理沈査；E２，同上清。

うに、100ngのレベルでは感染因子がP215S-bだけに濃縮しているとは云えない。逆にproteinase K処理後の遠心上清であるE2画分が電気泳動上19-27Kタンパク質を含まないにも関わらず強い発症能を示したことは、19-27Kタンパク質と発症因子との間に直接的な関係があるとは限らないことを示している。本実験結果はprion proteinがCJD感染の必須因子であるとするPrusinerらの考え[5]に疑問を提するものである。

本研究は長崎大学医学部細菌学教室宮本勉教授、土居剛士氏及び同動物実験施設宮田博規氏との共同研究である。合成prion-peptideと同抗体を供与された山内一也教授（東大・医科研）及び感染動物飼育の便宜を与えられた中野健司教授（北里大・医・

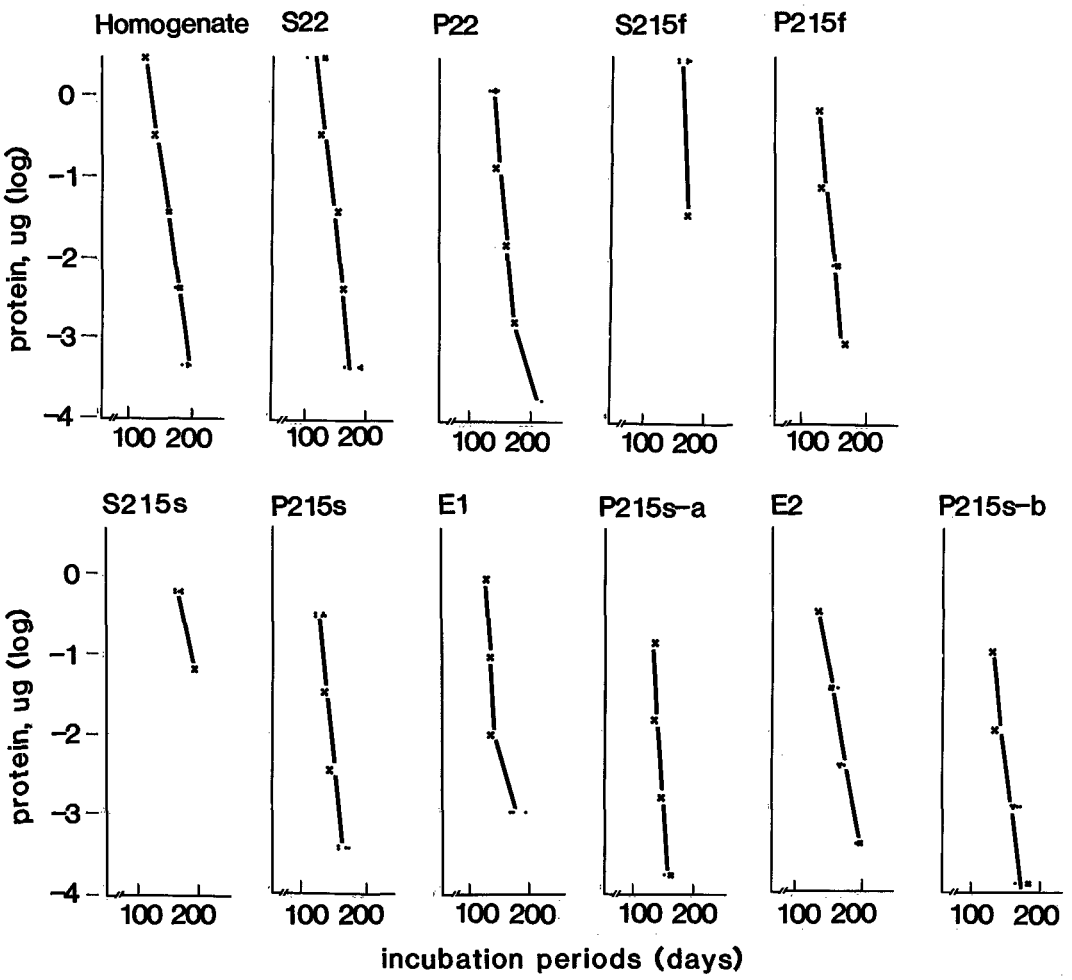


図3 感染マウス脳細分画画分の感染能。接種タンパク量、潜伏期間及び発症率の関係。

実験動物）に深謝する。

[References]
1. Carp,R., Merz,P.A., Kascsak,R.J., Merz,G.S., Wisniewski,H.M.(1985) J. Gen. Virol. 66, 1537-1368
2. Chesebro,B., Race,R., Wehrly,K., Nishio,J.M., Garon,C., Haase,A.(1985) Nature 315, 331-333
3. Hilmert,H., Diringer,H.(1984) Biosci. Rep. 4, 165-170
4. Oesh,B., Westaway,D., Walchli,M., Mckinley,M.P., Kent,S.B.H., Aebersold,R., Barry,R.A., Tempst,P., Teplow,D.B., Hood,L.E. Prusiner,S.B., Weismann,C.(1985) Cell 40, 735-746
5. Prusiner,S.B.(1982) Science 216, 136-144
6. Shinagawa,M., Munekata,E., Doi,S., Takahashi,K., Goto,H., Sato,G.(1986) J. Gen. Virol. 67, 1745-1750

28. 加齢動物におけるセロトニンニューロンの8−OH−DPAT結合能と免疫組織化学的変化

山口知子　（東京女子医大・生化）

〔要　約〕

8-OH-2-（Di-n-Propylamino）Tetralin（DPAT）は海馬におけるセロトニンニューロンの5−HT受容体のサブサイトの5−HT$_{1A}$に結合する特異的リガンドである[1]。この指標によりスンクスでは大脳皮質の膜分画において加齢変化が認められるが、ラットでは加齢脳における結合能の低下がほとんど観察されない。加齢動物の大脳皮質シナップスによるCa^{2+}のとりこみを賦活することが知られているDiaminopyridine(DAP)によって加齢スンクス脳の膜分画へのDPATの結合能は5-HTの結合能の阻害効果とよく一致したモジュレーター効果が示された。スンクスのセロトニンニューロンの加齢による変性は免疫組織化学的にも観察されたが、ラットの加齢脳ではN.raphaeのセロトニンニューロンは比較的細胞構築が保たれ、また5-HT抗体染色性も特に変化が認められないことから実験動物としてスンクスは加齢によるセロトニンニューロンの変性のモデル動物としての有効性が形態学的にも示された。　神経伝達物質に対するモジュレーターの開発にはさまざまな受容体に対する特異的なアゴニストやアンタゴニストの導入が行なわれているが、DPATは海馬においてはセロトニン受容体に対するpostsynapseの5-HT$_{1A}$受容体,また線条体においてはpresynapseのautoreceptorとしてのアゴニストとして、また大脳皮質においては両者の特性を持ち[1]、セロトニンニューロンの神経伝達機構に働くモジュレーターの検索に有用なリガンドと思われる。

Key word： Serotonin receptor, 8-Hydroxy-2-(Di-n-Propylamino)Tetralin (DPAT), Aging neuron

加齢脳におけるニューロンの選択的変化はしばしばヒトの老人性痴呆において見られることが知られている[2].Alzheimer病ではコリン作動性ニューロンの関与が示唆されており、ヒトの加齢脳において、コリン作動性およびセロトニン作動性ニューロンの変性は、痴呆の発生になんらかの相関が示唆されて、その変性に対するモジュレーター因子の検索は加齢現象の解明に役立つものとおもわれる。脳の血液循環やグルコース利用促進効果をもつ薬剤は開発されているが、特異的ニューロンの変性に対するモジュレーターについての知見は十分とはいえない。実験動物として、rodentsとヒトでは必ずしも平行な加齢による変性現象は認められず、ことにセロトニンニューロンの加齢変化はinsectivoreのスンクスがヒトの加齢変化との相関性が高くその研究に有用であることが、その指標となるリガンドの受容体への結合で確かめられた[3].受容体における神経伝達機構は、近年さまざまなリガンドの開発によって解明されつつあるがセロトニンニューロンの受容体には5-HT$_1$および5-HT$_2$に加えて[4]、5-HT$_{1A}$と5-HT$_{1B}$のサブクラス[5]および前シナップスのオートレセプターも区別される[6]。8-Hydroxy-2-(Di-n-Propylamino)Tetralin(DPAT)はセロトニンアゴニストとして開発されたリガンドで線条体ではオートレセプターとして、また海馬では5-HT$_1$部位に結合すると報告され[7],セロトニンニューロンの複雑な機能をさぐるための有効なリガンドであり、加齢動物の脳の膜分画へのDPATの結合能をラットとスンクスで比較検討した。前回報告した5-HTおよびイミプラミンの結合能の消長と3,4,-Diaminopyridine(DAP)のモジュレーター効果も併せて検討した。また免疫組織化学によるN．raphaeのセロトニンニューロンの加齢変化も報告する。

〔実験方法〕

実験動物−Fischer ratは市販の動物を購入し、加齢するまで飼育した。スンクスは実験動物中央研究所から供与された動物を飼育した。

ＤＰＡＴ膜結合実験－大脳の膜分画はRaismanら[8]の方法で調整し、タンパク量として４mg/mlになるように５０mMトリス緩衝液ｐＨ７．４，１２０mMNaCℓ，５mMＫＣℓ中にけん濁試料５０μℓを用いた、8-Hydroxy-ＤＰＡＴ,〔propyl-2,3-ring-1,2,3-^{3}H〕,１５８．４Ci/mmol(ＮＥＮ)を用いての膜結合実験は2nMで、また非特異結合は５-ＨＴcreatinine ５μMの存在下でHallら[1]の方法に従って実施した。 免疫化学実験－５-ＨＴの抗体はBovine Thyroglobulinをキャリアータンパクとして Geffardら[9]の方法でウサギに免疫した抗体を精製し、IgG(a,b')$_2$分画を用いてＰＡＰ法で検索した。Neuron Specific Enolase(ＮＳＥ)の免疫組織化学抗体はＩＢＬのウシ抗原由来の市販品を用いてＰＡＰ法で実施した。ＮＳＥの標本は抗体染色後、ヘマトキシリンで二重染色してある。

〔結　果〕

加齢動物の脳の膜分画への５-ＨＴおよびイミプラミン結合が加齢スンクス脳で観察され、更にこの結合能に及ぼすＤＡＰは１０nMで５-ＨＴ結合能を約２０％低下させるが、イミプラミン結合能は加齢脳で３０％賦活することを報告した[3]。図-１にはＤＰＡＴの脳膜分画への結合能が示されている。５-ＨＴおよびイミプラミンの結合能と同様に、スンクスでは加齢に伴ってＤＰＡＴの結合能が著しく低下している。一方ラットでは同じ加齢では結合能の低下が認められない。ＤＰＡＴの膜分画への結合能におよぼすモジュレーター効果をラットの膜分画で調べたところ１０nMのＤＡＰで結合能の低下が認められ、またホパンテン酸でも同様の効果を認めたが１０nMのＴＲＨでは不変であった(１表)。ＤＡＰのセロトニンニューロンへのＤＰＡＴの受容体結合能に対するモジュレーター効果としては５-ＨＴの効果と一致しpostsynapse膜に対する５-ＨＴanalogの特性を示しているものと思われ、ＤＰＡＴが大脳膜分画ではおそらく５-ＨＴ$_{1A}$サブサイトに結合するというHallら[1]お報告と一致している。

免疫組織化学的検索において、セロトニンニューロンの加齢変化をN.raphaeでラットとスンクスとを比較検討した。加齢による細胞構築の変化と共にスンクスでは５-ＨＴ染色細胞の変性と縮小化とが認められた。しかしラットではセロトニンニューロンの形態学的構築は加齢動物でも比較的保たれていることが示された。一方ニューロン活動に伴うエネルギー代謝の一指標となると思われるＮＳＥの免疫組織化学的検索では両動物において加齢変化がＲＩＡでも認められなかったように[10]、著しい染色性の低下はないものと思われる。

〔考　察〕

Hallら[1]によると8-ＯＨ-ＤＰＡＴは海馬におけるセロトニンニューロンのpostsynapseの５-ＨＴ$_{1A}$受容体に結合するが線条体ではpresynapseのautoreptorに結合し大脳皮質では混合型の結合がみられるという。加齢痴呆脳では海馬におけるニューロンの変性の関与が示唆されて居り[2],加齢動物脳の海馬および大脳皮質におけるセロトニンニューロンの特異的リガンドによる加齢変化およびモジュレーターによる検索は意義あるものと思われる。

セロトニンニューロンの加齢変化のモデル動物とし

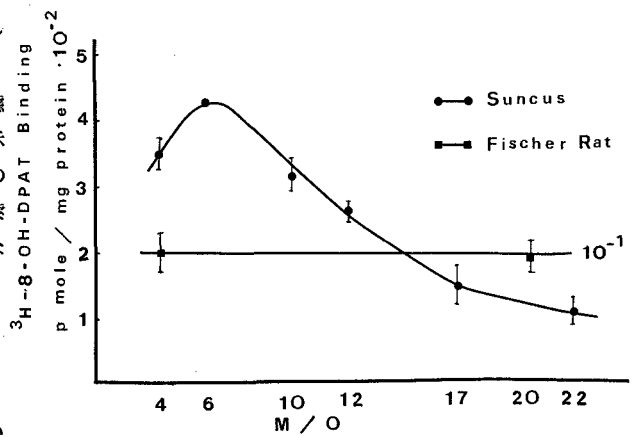


Figure 1. DPAT Binding to the Membrane Fraction of the Brain Cortex in Aging Animals.

TABLE I. Effect of Modulators on DPAT Binding in the Membrane Fraction of Rat brain Cortex.

Modulator(10nM)	7 M/O	20 M/O
	f mole/mg protein	
None	265±32	233±35
Diaminopyrıdine	212±26	176±21
Hopantenate	179±20	176±19
TRH	249±38	220±28

Mean of three experiments ± s.d. in triplicate assays.

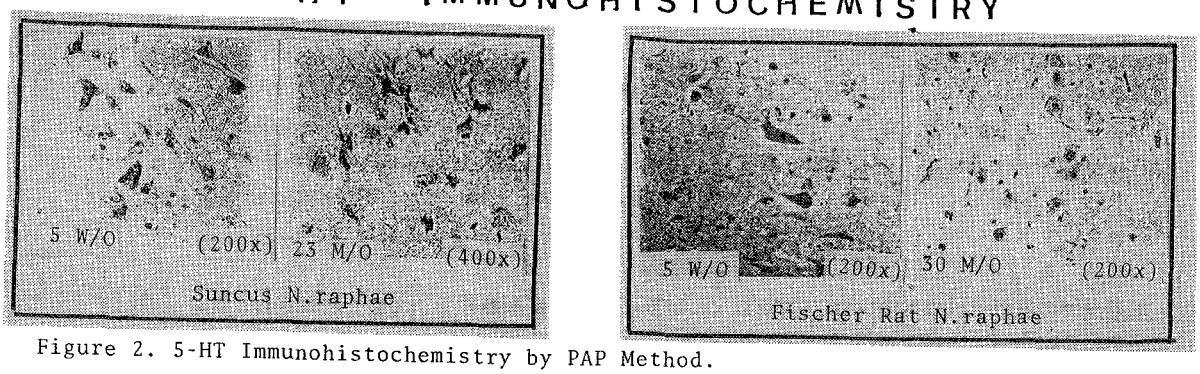
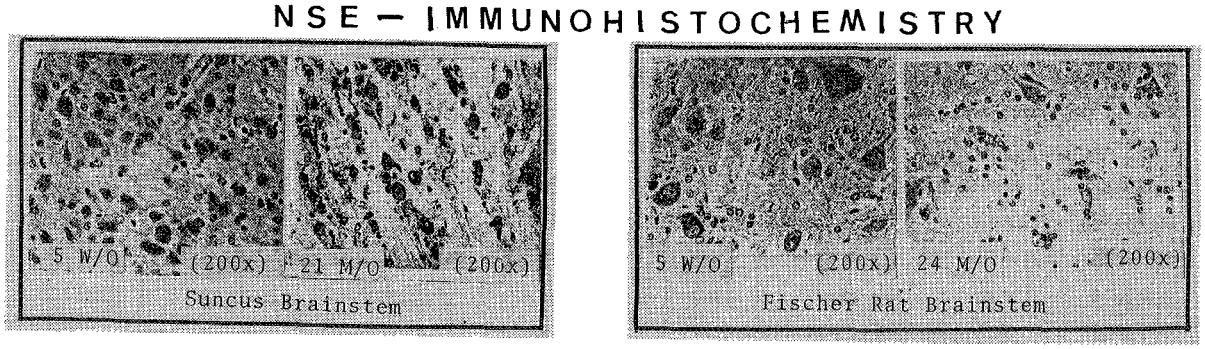


Figure 2. 5-HT Immunohistochemistry by PAP Method.



て有用と思われるスンクスを用い、5-HT$_{1A}$およびautoreceptorに結合するDPATによって加齢変化が示された。既に報告した[3] 5-HTによる結合能の加齢変化およびDAPによるモジュレーター効果は加齢脳の大脳シナップスによるCa^{2+}のとりこみの低下を賦活する効果[11]とあいまって興味ある複雑な調節機構をもっている。

謝辞－5-HT抗体染色法についてご教示いただきました都立精神研　植村富彦先生、山下つや子氏、羽賀知恵氏に深謝いたします。

[References]

1. Hall,M.D.,EI Metikawy,S.,Emerit,M.B.,Pichat,L.,Hamon,M and Gozlan,H. (1985) J.Neurochem. 44,1685-1696.
2. Burtus,R.T.,Dean III,R.L.,Beer,B and Lippa,A.S.(1981) Science 217,408-417.
3. Yamaguchi,T. and Yamaguchi,M.(1987) Neurochem. Res. 12,215-219.
4. Peroutka,S.J. and Snyder,S.H.(1979) Mol. Pharmacol. 16,687-699.
5. Pedigo,N.W.,Yamamura, H.I. and Nelson,D.L.(1983) Adv.Biochem.Psychopharmacol. 37,337-347.
6. Hamon,M.,Bourgoin,S.,EI Metikawy,S. and Goetz,C.(1984) in Handbook of Neurochem. 6, 2nd ed.(Laytha, A. ed.) pp 107-143.
7. Gozlan,H.,EI Metikawy,S.,Pichat,L.,Glowinski,J. and Hamon,M.(1983) Nature 305,140-142.
8. Raisman,R.,Brieley,M. and Langer,S.Z.(1979) Nature,281,148-150.
9. Geffard,M.,Seguela,P. and Buijs,R.M.(1984) Neurosci. Lett. 50,217-222.
10. Yamaguchi,T. and Yamaguchi,M.(1985) Abstract in 'Recent advances in brain development and aging: in vitro model' pp 57.
11. Peterson,C and Gibson G.E.(1983) J.Biol.Chem. 258, 11482-11486.

29. ラット脳5HT受容体刺激によるphosphoinositide代謝回転のin vivoにおける測定

堀田和泉・加藤匡宏・山脇成人
（国立呉病院・臨床研）

〔要　約〕

5HT受容体刺激薬のPI代謝回転に及ぼす効果を、in vivoで脳内phosphoinositide(PI)をラベルする方法を用いて検討した。[^{3}H]inositolをラット側脳室内に投与した2日後にmicrowaveを照射し、前大脳皮質のinositol phosphates(IPs; IP_1、IP_2、IP_3)をHPLCで分離し放射活性を測定した。その結果、LiCl(10mEq/kg)を腹腔内投与すると、[^{3}H]IP_1及び[^{3}H]IP_2が有意に増加した。また、Li前処置ラットにおいて5HT受容体刺激薬である5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine(5MeODMT)の投与15分後には、2mg/kg投与で47%、5mg/kg投与で87%の[^{3}H]IP_1増加が認められ、[^{3}H]IP_2及び[^{3}H]IP_3も有意に増加した。同様の効果がquipazine投与後にも認められた。さらに、5MeODMTによる[^{3}H]IPs量の増加は、$5HT_2$受容体遮断薬であるritanserinによって抑制されたが、$5HT_1$受容体遮断作用をもつ(-)-propranololでは抑制されなかった。以上の結果よりラット前大脳皮質の5HT受容体刺激によるPI代謝回転亢進は$5HT_2$受容体により媒介されることが示唆された。また、この方法はin vivoの状態で5HT受容体活性にともなうPI代謝回転を測定する手段として有用であり、抗うつ薬等の作用機序解明に役立つものと考えられる。

Key word：PI turnover, 5HT receptor, in vivo assay

【緒言】

5HT受容体には1A、1B及び1Cへ細分化されている$5HT_1$受容体と$5HT_2$受容体の亜型が存在することが明かにされている。それらの細胞内情報伝達機構については不明の点が多いが、最近$5HT_{1A}$受容体はadenylate cyclase(ACase)に促進的あるいは抑制的に共役し、一方、$5HT_2$受容体はphosphoinositide(PI)代謝回転を引き起こすことが報告されている[1,6]。しかしながら、中枢におけるPI代謝回転の研究は、多くが脳切片を用いたin vitroの実験であり、in vivoで生じる反応についてはあまり知られていない。そこで今回、[^{3}H]inositolの側脳室内投与であらかじめ脳内のPIをラベルしたラットを用い、5HT受容体刺激薬投与後のPI代謝産物を測定することにより、5HT受容体刺激によるPI代謝回転亢進をin vivoで測定する方法を確立したので報告する。

【実験方法】

実験にはすべて体重150g前後のWistar系雄性ラットを用い、pentobarbital(40mg/kg, i.p.)麻酔下において、[^{3}H]inositol(4μCi)を側脳室内に投与した。投与2日後にラットにmicrowaveを照射し、前大脳皮質を摘出し、5% trichloroacetic acid(TCA)中にてホモジナイズした後12,000gで5分間遠心し、水溶性画分を得た。沈渣には再び5% TCAを加えてホモジナイズし、得られた上清を合わせ、diethyl etherでTCAを除去した後、Irvineらの方法[5]に準拠して陰イオン交換樹脂カラム(TSK gel, DEAE-5pw)を用いた高速液体クロマトグラフィによりinositol phosphates(IPs;IP_1、IP_2、IP_3)を分離し放射活性を測定した。組織の沈渣は、chloroform:methanol:HCl(200:100:1)でホモジナイズし脂質画分の放射活性を測定した。各IPs量は脂質画分およびIPsに含まれる

全[^{3}H]放射活性に対する割合(%)として算出した。Liは一定時間前に腹腔内に投与し、5HT受容体刺激薬である5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine(5MeODMT)及びquipazineはmicrowave照射の15分前に皮下投与した。Ritanserinおよび(-)-propranololはそれぞれ刺激薬の投与90分および45分後に腹腔内投与した。

【結果】

1)[^{3}H]IPs量に及ぼすLiの影響：[^{3}H]inositolの側脳室内投与2日後にPIへの取り込みが最大に達するという報告に基づいて[7]、投与2日後に実験を行った。Li(10mEq/kg)投与1時間後には各[^{3}H]IPs量には変化は認められなかったが、2時間後には[^{3}H]IP$_1$および[^{3}H]IP$_2$量の有意な増加が認められた。なお、Li(10mEq/kg)投与1時間及び2時間後の前大脳皮質のLi濃度は、各々0.58及び1.06mEq/kg脳湿重量であった。また、Li(3mEq/kg)を24及び12時間前に2回投与すると、著しい[^{3}H]IP$_1$量の蓄積が生じた(Fig.1)。

2)5HT刺激薬のPI代謝回転に及ぼす効果：Li無処置ラットにおいて5MeODMT(5mg/kg)投与15分後には[^{3}H]IPs量の増加は認められなかった。しかしながら、Li(10mEq/kg)処置を2時間前に行うと、5MeODMT投与により[^{3}H]IPs量が有意に増加した。[^{3}H]IP$_1$、IP$_2$及びIP$_3$量は5MeODMTの2mg/kgの投与で各々47%、48%、80%、5mg/kgの投与では87%、70%、113%の増加を示した。また、quipazine5mg/kgの投与でも[^{3}H]IP$_1$量の有意な増加が生じた(Table 1)。

3)5HT受容体遮断薬の影響：5HT$_2$受容体遮断薬であるritanserin(1mg/kg及び2mg/kg)を5MeODMT投与2時間前に前処置すると、5MeODMTによる[^{3}H]IP$_1$の蓄積は完全に抑制された。5MeODMTによる[^{3}H]IP$_2$およびIP$_3$の増加もritanserin2mg/kgにより有意に抑制され

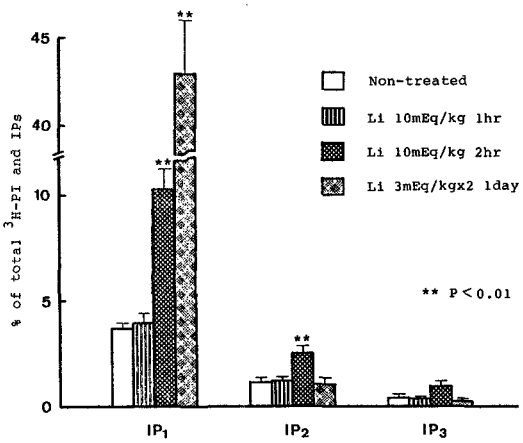


Fig. 1 Effects of Li on inositol phosphate contents

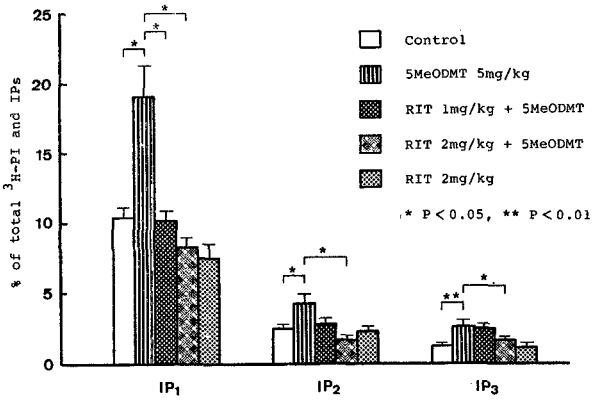


Fig. 2 Effects of ritanserin on 5MeODMT-stimulated PI turnover

Table 1 Effects of 5MeODMT and quipazine on PI turnover

		IP$_1$	IP$_2$	IP$_3$
Saline		10.28 ± 0.83	2.05 ± 0.27	1.23 ± 0.19
5MeODMT	2mg/kg	15.10 ± 2.34*	3.71 ± 0.75	2.22 ± 0.39**
5MeODMT	5mg/kg	19.21 ± 2.28*	4.25 ± 0.72*	2.62 ± 0.44*
Quipazine	2mg/kg	15.90 ± 2.37	3.11 ± 0.29	1.66 ± 0.29
Quipazine	5mg/kg	19.41 ± 2.29**	3.86 ± 0.86	2.21 ± 0.82

* P<0.05, ** P<0.01

た。Ritanserin単独では[^{3}H]IPsの減少傾向が認められたが有意ではなかった(Fig.2)。5HT$_1$受容体遮断作用を有する(-)-propranolol(20mg/kg)を45分前に投与して5MeODMTの効果を調べた結果、5MeODMTによる[^{3}H]IPs増加に対し(-)-propranololは抑制を示さなかった。

【考察】

最近、5HT神経系における情報伝達系に関して、5HT$_{1A}$受容体がACase系と5HT$_2$受容体がPI代謝回転と共役している可能性が示唆されている。中枢5HT$_2$受容体を介するPI代謝回転の研究は、脳切片を用いたin vitroの実験で行われてきたが、この実験系では一定した結果が得られにくく問題があった。一方、in vivoにおけるPI代謝回転についてはこれまでに報告はない。そこで我々は今回、[^{3}H]inositolを側脳室に直接投与し脳内のPIをラベルする方法[7]を用い、in vivoでの5HT受容体刺激によるPI代謝回転の新しい測定方法を開発した。まず、Liの[^{3}H]IPs量に及ぼす効果を調べたところ、Li脳内濃度と作用時間に応じた前大脳皮質の[^{3}H]IP$_1$、IP$_2$の著明な蓄積が認められた。これまでに、LiはIP$_1$からinositolへの変換酵素を阻害することが報告されており[2]、今回の結果からその作用がin vivoにおいて確認できた。さらに、Liを前処置したラットに5HT刺激薬である5MeODMTを投与すると、[^{3}H]IPs量が有意に増加したことから、5HT受容体刺激はPI代謝回転を促進することが明らかになった。さらに、このIPs量増加は5HT$_2$受容体遮断薬であるritanserinによって抑制されたが5HT$_1$受容体遮断作用を有する(-)-propranololによっては抑制されなかったことから、このPI代謝回転の促進は5HT$_2$受容体により媒介されていることが示唆された。

liは躁うつ病治療薬であり、その作用機序に5HT$_2$受容体が関与することが報告されている[3,4,8]。また、PI代謝回転に及ぼすLiの作用が躁うつ病治療効果と関連している可能性が示唆されている[2]。今回報告したin vivoにおける5HT$_2$受容体刺激によるPI代謝回転の測定法は、多くの躁うつ病治療薬の作用機序解明の研究にも広く応用できるものと考えられる。

【謝辞】

[^{3}H]inositolの側脳室内投与に関して御助言いただいた広島大学、瀬川富朗教授ならびに仲田義啓先生に感謝致します。

【参考文献】

(1) Conn, P.J. and Sander-Bush, E. (1985) J.Pharmacol.Exp.Ther. 234, 195-203
(2) Drummond, A.H. (1987) Trend.Pharmacol.Sci. 8, 129-133
(3) 堀田和泉、山脇成人(1985)神経精神薬理 7, 121-123
(4) Hotta, I.,Yamawaki, S. and Segawa,T. (1986) Neuropsychobiol. 16, 19-26
(5) Irvine, R.F. et.al. (1985) Biochem.J. 229, 505-511
(6) Kendall, D.A. and Nahorski S.R.(1985) J.Pharmacol.Exp.Ther. 233, 473-479
(7) 森島義行、仲田義啓、瀬川富朗(1986)神経化学25, 34-36
(8) 山脇成人、柳川耕作、内富庸介、堀田和泉(1986)厚生省神経疾患委託研究費躁うつ病研究班60年度報告書, 65-71

30. ラット中枢5−HT_{1A}受容体に対する〔^3H〕8−OH−DPATの結合特性と抗うつ薬の作用

西崎　純・佐藤厚子・朝倉幹雄・塚本　徹・今福　淳・
伊野美幸・窪田　博・中西純一・新保　清・福田光宏・
長谷川和夫　（聖マリアンナ医大・神経精神）

〔要　約〕

5-HT_{1A} 受容体に対する特異的アゴニスト [^3H]8-OH-DPAT(8-Hydroxy-2-(Di-n-Propylamino)Tetralin) のラット大脳皮質に対する結合実験を種々の条件下で行い，結合特性を検討した．大脳皮質ホモジネートを37°Cでプレインキュベートすると特異的結合は時間と共に増加し20分間で最大結合に達する．この結合の増加は内在性アゴニストによる GTP の消失によるものと考えられる．[^3H]8-OH-DPAT特異的結合は２価陽イオンMn^{2+}，Mg^{2+}，Ca^{2+}で増加し，１価陽イオン Na^+，Li^+で減少する．[^3H]8-OH-DPAT飽和結合は曲線のScatchard plotを示す．Mn^{2+}は この高親和性成分を増加し，GTPとEDTA は減少させるが，いずれも全受容体数の有意な変化を認めない．この5-HT_{1A}受容体結合特性にはGTP結合調節蛋白質を介した2 step reaction ternary complex modelが適用される．これより大脳皮質5-HT_{1A}受容体はGTP結合調節蛋白質との共軛により低親和性から高親和性に変換し得る均一な受容体であると考えられる．5-HT_{1A}受容体に対する結合親和性は非ベンゾジアゼピン系の抗不安薬であるbuspironeが最も高い．抗うつ薬のうちで trazodoneが最も高い親和性を持つが，三環系および四環系抗うつ薬の5-HT_{1A}に対する親和性はきわめて低い．

Key word：　[^3H]8-OH-DPAT　5-HT_{1A}　Trazodone

〔緒言〕

セロトニン(5-HT)受容体は $5HT_1$ と 5-HT_2 受容体に分類され，さらに 5-HT_1受容体は 5-HT_{1A}，5-HT_{1B}，5-HT_{1C}に細分化されている．最近，5-HT_{1A}受容体は非ベンゾジアゼピン系の抗不安薬の作用部位として注目されている．また5-HT_{1A}受容体に対する定型および非定型抗うつ薬の作用は，臨床的抗うつ効果ならびに作用機序を知る上で興味深い．本報告では 5-HT_{1A} 受容体の特異的アゴニスト[^3H]8-OH-DPAT のラット大脳皮質に対する結合特性を知る上で，結合実験条件，さらにプレインキュベーションとその意義を検討した． Peroutka(5)は [^3H]8-OH-DPATのグラスフィルターに対する特異的結合が存在すると報告しているので併せて再検討した．最近5-HT_{1A} 受容体がアデニル酸シクラーゼ抑制系に共軛することが報告されている(3)．[^3H]8-OH-DPAT特異的結合に対する GTP，EDTA，１価および２価陽イオンの影響を調べた．非ベンゾジアゼピン系抗不安薬buspirone，抗うつ薬trazodone，三環系および四環系抗うつ薬の5-HT_{1A}受容体に対する直接作用ならびに慢性投与の作用を検討した

〔方法〕

(1) Wistar系雄性ラットの大脳皮質を用いた．脳組織を20容の50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7，25°C) 中でホモジナイズし，37°C で 0～60 分間プレインキュベートした．50,000 g 10 分間 遠心分離・洗浄を1～3回洗浄を繰り返し，最終沈渣を同bufferに懸濁したものを受容体膜標品とした．(2) 結合飽和実験は，0.1～12.8 nM [^3H]8-OH-DPAT(S.A.157.1～158.4 Ci/mmol) 50 mM Tris-HCl buffer および膜標品(～0.2 mg protein)を25°Cまたは37°C で 5～60 分間インキュベートした後，Whatman GF/Bフィル

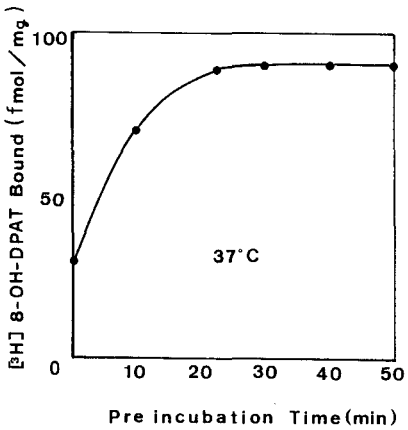


Fig. 1. Effect of preincubation on [^{3}H]8-OH-DPAT binding to rat cortical membranes. Homogenates were preincubated at 37°C for the times shown. Membranes were incubated with [^{3}H]8-OH-DPAT (0.2 nM).

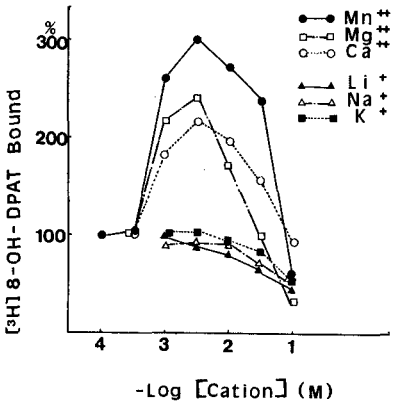


Fig. 2. Effect of cations on [^{3}H]8-OH-DPAT binding to rat cotical membranes. Membranes were incubated with [^{3}H]8-OH-DPAT (0.2 nM) in the presence of increasing concentrations of Mn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Li^+, Na^+, or K^+.

Table 1.
Drug concentration producing 50% inhibition of [^{3}H]8-OH-DPAT binding to rat cerebral cortex.

Drugs	IC_{50} (nM)
5-HT	1.5
Buspirone	13.0
Trazodone	89.3
5,7-DHT	727
Mianserin	796
Ritanserin	3000
Imipramine	17000
Desipramine	18000
Maprotiline	22000
Fluoxetine	60000

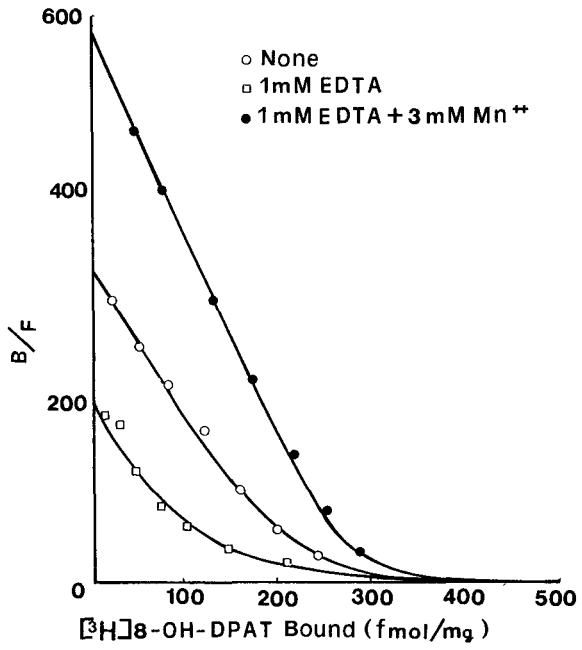


Fig. 3. Scatchard analysis of [^{3}H]8-OH-DPAT (0.1～12.8 nM) binding in the presence or absence of Mn^{2+} (3 mM)+ EDTA (1 mM) or EDTA(1 mM).

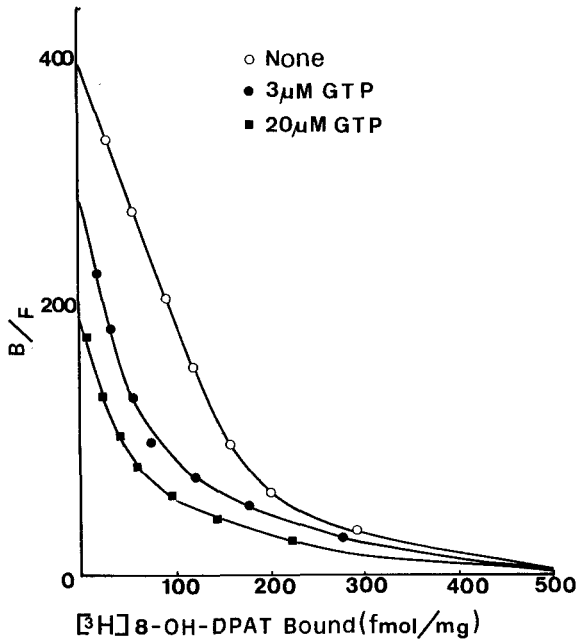


Fig. 4. Scatchard analysis of [^{3}H]8-OH-DPAT (0.1～12.8 nM) binding in the presence or absence of GTP (3μM or 20μM).

ター上に吸引濾過しTris-HCl bufferで洗浄し,液体シンチレーションカウンターでβ線を測定した. 非特異的結合は 10μM 5-HT を用いて測定した. 結合阻害実験には 0.2 nM [^{3}H]8-OH-DPAT を用いた. 曲線の Scatchard plot および各種薬物の阻害曲線は, コンピューターを用い非線形最小二乗法により解析した.

[結果]

(1) 大脳皮質ホモジネートを37°C で 0～60分間プレインキュベートした結果, 0.2nM [^{3}H]8-OH-DPAT特異的結合は時間とともに増加し30分間で最大結合に達した(Fig.1). (2) 0.2 nM [^{3}H]8-OH-DPAT特異的結合は 25°C では 20 分間, 37°C では10 分間で平衡状態に達した. 25°C と 37°C とでは非特異的結合に差はなかった. 25°Cの条件で 50 mM Tris HCl buffer は pH 8.03で最も高い特異的結合が得られた. 非特異的結合はpHの影響は受けなかった. Whatman GF/Bフィルターに対する特異的結合は認められなかった. 0.1% アスコルビン酸存在下においても同様であった.(3) 2 価陽イオンは Mn^{2+} >> Mg^{2+} > Ca^{2+} の順で特異的結合を増加した. 1mM EDTA存在下で Mn^{2+} は約 300 %,Mg^{2+} は約 130 %, Ca^{2+} は約 110% の結合を示した. 一方 GTP, Na^+, K^+,Li^+ および EDTA は用量依存性に特異的結合を低下した(Fig. 2). 曲線のScatchard plot のコンピュータ解析によると, Mn^{2+} は高親和性状態を増加し,GTP, EDTA は減少したが, 全受容体数は変化しなかった(Fig. 3, Fig. 4). (4) 抗うつ薬による結合阻害実験 : 各種抗うつ薬の IC_{50} をtable 1. に示した.

[考察]

プレインキュベーションによる結合の増加の原因の一つとして,内在性5-HTの消失が考えられるが, もう一つの原因として, Bacopoulos(2)らが[^{3}H]ドパミンの結合実験で報告しているように,アゴニストによるGTPの消失によるものと考えられる. すなわち[^{3}H]ドパミン結合は, ドパミンを加えてプレインキュベートすることにより増加するが, これはドパミンによりGTPが消費されるためであると説明している. 5-HT_{1A} 受容体においても同様の機序が示唆された. これは5-HT_{1A}受容体の存在部位が前シナプスであるか後シナプスであるかを知る上で重要な問題である. プレインキュベーションをHallら(4)は37°Cで10分間行っているが,本結果より37°Cで30分間以上する必要があることが示された. Scatchard plots のコンピュータ解析によると Mn^{2+} は高親和性状態を増加し GTP, EDTAにより減少し,全受容体数は変らなかったことから,GTP 結合調節蛋白を介した 2 step reaction ternary complex model が適用され,[^{3}H]8-OH-DPAT により標識される部位はアゴニストに対して２つの親和性状態に互換性を有する均一な部位であると考えられる. すなわち,Mn^{2+} により低親和性状態は高親和性状態に変換し,GTP, EDTA はその効果を抑制すると思われる. この結合特性はα_2受容体に対するアゴニスト [^{3}H]clonidine の 結合特性(1)に極めて類似している.

[文献]

(1) Asakuara, M. et al.(1984), Eur. J. Pharmacol., 106 :141-147.
(2) Bacopoulos, N.G.(1984) Life Sci., 34:307-315
(3) De Vivo, M. and Maayani, S.(1986), J.Pharmacol. Exp.Ther., 238:248-253.
(4) Hall, M.D. et al.,(1985), J. Neurochem., 44:1685-1696
(5) Peroutka S.J. and Demopulos, C.M.(1986) Eur. J. Pharmac., 129:199-200

31. 抗うつ薬によるβ受容体減少機構とプロテインキナーゼの関与

窪田　博・朝倉幹雄・塚本　徹・今福　淳・
伊野美幸・西崎　純・佐藤厚子・中西純一・
新保　清・福田光宏・柴田牧子・長谷川和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神）

〔要　約〕

非定型四環系抗うつ薬mianserin(MIA)、maprotiline(MPR)は従来、β受容体を減少しないとされていたが、MIA 1日2回投与6時間(h)後、β受容体は22%減少し、24h以内に急速に回復し、その減少の維持にセロトニン(5-HT)が必要であることを報告した。

In vitroにおいてβ-AC系の脱感作は、β受容体のリン酸化によるとされており、このリン酸化はβ受容体キナーゼ、Aキナーゼ、Cキナーゼによって起こると報告されている。今回、In vivoにおいて、このような抗うつ薬慢性投与後のβ受容体減少機構における5-HTのイノシトール情報伝達系への関与を検討するため、Cキナーゼ活性化薬フォルボールエステルである12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)、アデニル酸シクラーゼ(AC)の触媒成分活性化薬フォルスコリン、ジブチリルcAMPの脳内投与を行った。1)フォルスコリン、ジブチリルcAMPは、有意なβ受容体の減少は認めなかった。2)TPAはDMIによるβ受容体の減少を有意に促進し、TPA単独投与でも7日後、約23%の減少を示した。本研究より、抗うつ薬によるβ受容体－AC系の減少は、NEの持続的刺激だけではなく、Cキナーゼ系を介した受容体調節を受けている可能性が示唆された。

Key word：　antidepressant　β-receptor down-regulation　protein kinase

【　緒言　】

定型抗うつ薬であるdesipramine(DMI)、imipramine等の慢性投与後のβ受容体の減少、ノルエピネフリン感受性アデニル酸シクラーゼ活性(NE-AC)の低下は、NE増加に対する適応変化と考えられ、一般に“β down-regulation”として知られている。従来、非定型抗うつ薬mianserin(MIA)はNE-AC活性のみ低下し、β受容体は減少しないとされていたが(5)、MIA 1日2回3日投与6時間(h)後、β受容体は明らかに減少し、24h後には速やかに回復することを認めた。さらに、シナプス内セロトニン(5-HT)の増加が、β受容体の減少を促進し、また、β受容体の減少の維持に重要な役割を果たしていることを報告した(1)。従って、β受容体の減少は、NEの増加だけでは説明できず、また、β受容体とNE-ACの変化は必ずしも一致しない。In vitroではβ-AC系の脱感作は、β受容体のリン酸化によるとされており(2)、このリン酸化はβ受容体キナーゼ、cAMP依存性プロテインキナーゼ（Aキナーゼ）、Ca^{2+}-リン脂質依存性プロテインキナーゼ（Cキナーゼ）によって起こると報告されている。In vitroにおけるこのようなリン酸化は速やかに起こるが、β受容体の結合特性は変化しないとされている。本研究では、in vivoにおけるこのような定型、非定型抗うつ薬慢性投与によるβ受容体の減少におけるプロテインキナーゼの作用機構について考察した。

【　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(180-260g)に1日1～2回、desipramine(DMI)10mg/kg、mianserin(MIA)15mg/kgを、1～7日皮下投与し、TPA 1μg/20μl、H-8 100μg/20μl、

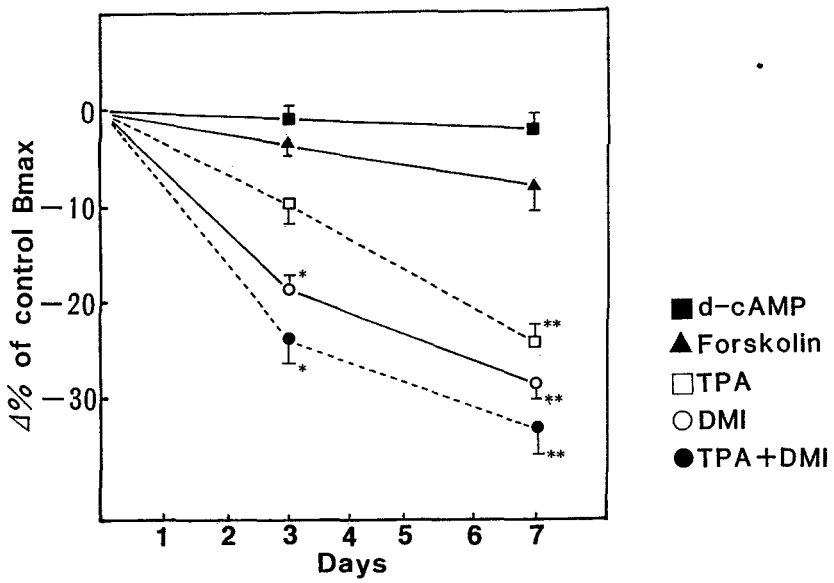


Fig.1 Time course of β-receptor changes in the cerebral cortex after treatments with TPA , d-cAMP or Forskolin as described in methods. Rats were sacrificed 3 days or 7 days after the last doses of each drug. Results are the mean ± S.E. of % changes of the control B_{max} values determined by a 5-point Scatchard analysis. The K_D values of all groups did not differ significantly from control values.
* Significantly different from control B_{max}, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

フォルスコリン 2.5μg/25μ1そして、ジブチリルcAMP 13.36μg/25μ1を、それぞれ、定位脳固定装置を用い1日1回1～2日側脳室内に注入した。対照群には偽処置を施行しvehicleを注入した。最終薬物投与後、ラットは2日～7日後に断頭屠殺し、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、0.05～0.8nMの[^{3}H]CGP-12177([^{3}H]CGP;S.A.49Ci/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1μM aloprenololより決定し、Scatchard解析により β 受容体数(Bmax)と解離定数(Kd)を求めた。

【 結果と考察 】

近年、細胞情報伝達物質として、cAMP、cGMP、ジアシルグリセロール(DG)、イノシトール1,4,5-三リン酸[I(1,4,5)P_3]、Ca^{2+} アラキドン酸等が知られており、以前より、βアドレナリン受容体刺激などにより産生されるcAMPは、その特異的な蛋白質リン酸化酵素cAMP依存性プロテインキナーゼ(Aキナーゼ)を活性化し、細胞機能の調節をしていることがわかっていた。しかし、この環状ヌクレオチドのみでは説明できない多くの現象が見いだされ、cAMP系情報伝達系以外に、イノシトールリン脂質代謝回転・Ca^{2+}-リン脂質依存性プロテインキナーゼ(Cキナーゼ)系等が明らかになってきた。

本研究において、フォルスコリン、ジブチリルcAMPの単独側脳室内投与による細胞内cAMPの上昇は、有意なβ受容体の減少を認めなかった。また、cAMP依存性プロテインキナーゼ(Aキナーゼ)阻害薬 H-8(4)のDMIとの併用においてもβ受容体の減少には影響を与えなかった。

われわれは、抗うつ薬慢性投与後の、ラット大脳皮質β受容体減少機構における5-HTの役割について、一度減少したβ受容体は過剰なNEの刺激がなくても、過剰な5-HTの存在のみで減少し続け、5-HTはβ受容体の減少の維持に重要な役割を持つということを報告した(1)。そこで、次に、5-HTのイノシトールリン脂質代謝回転系に及ぼす影響を検討するため、Cキナーゼ活性化薬 フォルボールエステル(TPA)(3)を側脳室内に注入した。TPAはDMIによるβ受容体の減少を有意に促進し、TPA単独投与7日後でも約23%の減少を示した。以上のことより、5-HTがイノシトールリン脂質代謝系を介して活性化したCキナーゼによって、β受容体の減少が促進される可能性が示唆されたが、しかし、選択的で強力な5-HT_2阻害薬ritanserinをDMIと併用しても最終投与24h後のβ受容体の急速な回復は認められなかった。これらのことは、in vivoにおける5-HTの増加は5-HT_2受容体以外の受容体を介してβ受容体の減少に関与している可能性を示唆している。In vitroにおけるβ受容体のリン酸化によるβ-AC系の脱感作は、β-アドレナージック受容体キナーゼによるアゴニストに依存的なリン酸化、Aキナーゼによるアゴニストに部分的に依存的なリン酸化、そして、Cキナーゼによるアゴニストに非依存的なリン酸化によって起こるとされているが、現時点では、in vivoにおける 抗うつ薬慢性投与後のCキナーゼの作用部位については不明である。

本研究は昭和61、62年度厚生省神経疾患研究委託費、昭和61、62年度文部省科学研究費ならびに昭和61、62年度私学学術研究振興基金の援助を受けている。

【 文献 】

(1)朝倉幹雄、塚本 徹、窪田 博、今福 淳、伊野美幸、西崎 純(1987),神経精神薬理, 9: 331-341.

(2)Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G.,and Lefkowitz, R. J.(1986) Biochemistry, 83: 2797-2801.

(3)Castagna, M.,Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y.(1982)J.Biol.Chem, 257: 7847-7851.

(4)Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., Sasaki, Y.(1984)Biochemistry, 23: 5036-5041.

(5)Mishra, R., Janowsky, A. and Sulser, F. (1980) Neuropharmacology, 19: 983-987.

32. ラット線条体^{3}H－ジハイドロキシアルプレノロール結合に及ぼすL－DOPAの修飾作用

五嶋良郎・久保孝夫・三須良実

（横浜市大・医・薬理）

〔要　約〕

外来投与の低濃度のL－DOPAは、シナプス前β－受容体を介し、ラット線条体及び視床下部切片からのアミン遊離を促進することなどの新知見を既に報告した。これらの結果をふまえ、ラット線条体膜標本において、β－受容体リガンドの^{3}H－ジハイドロキシアルプレノロール（^{3}H－DHA）結合に及ぼすL－DOPAの作用の有無を検討した。ラット線条体膜標本における^{3}H－DHA結合のScatchard plotは直線性を示し、Bmax及びKd値は、各々112.5 ± 4.0 fmol／mg protein，487.2 ± 44.1 pMであった。^{3}H－DHA 500 pM存在下の膜結合^{3}H－DHAに対し、β－作動薬のイソプロテレノールは、置換作用を示す一方、L－DOPAは、無作用であった。L－DOPA存在下に^{3}H－DHAの飽和実験をおこなった結果、L－DOPA 1 μM は、^{3}H－DHAの最大結合能（Bmax）を増大する一方、親和性（Kd）に対しては、有意な作用を示さなかった。以上より、L－DOPAは、β－受容体リガンド、^{3}H－DHAの結合部位を増大することが明らかとなった。L－DOPAは、この修飾作用により、シナプス前β－受容体応答能を活性化し、ラット線条体及び視床下部切片からのアミン遊離を促進するとの薬理学的応答を生ずるものと考えられる。

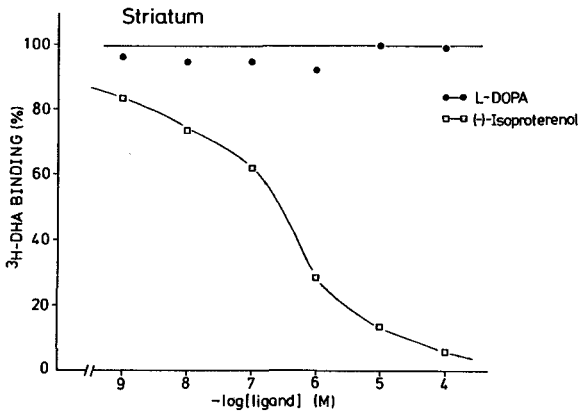
Key word： L－DOPA，　^{3}H－dihydroxyalprenolol，　線条体

昨年の本学会において、L－DOPAが、ドパミンへの変換を経ずに、シナプス前β－及びドパミン受容体を介しラット線条体及び視床下部切片からのアミン遊離を二相性に修飾することを報告した[1-3]。これらの実験結果を踏まえ、今回は、主として、L－DOPAとβ－受容体との関連に焦点を絞り、L－DOPAの、β－受容体に対する結合能の有無及びβ－受容体結合特性に及ぼす効果の有無を、特異的β－受容体リガンドである^{3}H－ジハイドロキシアルプレノロール（^{3}H－DHA）を用いることにより検討した。

（方法）雄性SD系ラット（8 週令）を断頭後、氷冷下に線条体を取り出し、40倍容量の50 mMトリス緩衝液（pH 7.4）中にて、ポリトロンPT－10により懸濁した。懸濁液を4倍に希釈後、50、000gで10分間遠心した。同条件下に膜洗浄操作を繰り返して得た沈さに緩衝液を加え、膜標本とした。^{3}H－DHA（0.05 － 1.5 nM），膜標本及びL－DOPAまたは他の薬物を混合し、50 mMトリス緩衝液（pH 7.4，24 °C）中にて20分間インキュベートした。インキュベーションは、パージリン 10 μM，アスコルビン酸 0.02 %存在下に行なった。膜標本において残存し得るドーパ脱炭酸酵素を阻害するため、さらに同酵素阻害剤であるNSD－1055 10 μMを加えた。アッセイサンプルの最終蛋白濃度は、約120 μg／mlであった。^{3}H－DHAの非特異的結合量は、（－）－プロプラノロール 1 μM 存在下に求めた。特異的結合量の総結合量にたいする割合は、40 － 66 %であった。結合及び非結合リガンドの分離は、Whatman GF／Bフィルターを用い、吸引濾過法により行なった。非特異的吸着を出来るだけ少なくするため、フィルターは予め0.1 %ポリエチレンイミンにより処理した。サンプルは、フィルター上にて氷冷したトリス緩衝液4 mlを4回加えて洗い流し、濾過した。

（結果）１）ラット線条体膜標本における ^{3}H－ＤＨＡの結合は一相性を示し、そのＳｃａｔｃｈａｒｄ　ｐｌｏｔは、直線を示した（図　２、表　１）。Ｓｃａｔｃａｒｄ解析により得られた ^{3}H－ＤＨＡの最大結合能（Ｂｍａｘ）および親和性（Ｋｄ）を表　１に示す。Ｋｄ値付近の ^{3}H－ＤＨＡにおける結合阻害実験において、β－アゴニストのイソプロテレノールは、阻害作用を示す一方、Ｌ－ＤＯＰＡは１００　μＭにおいても無作用であった（図　１）。Ｌ－ＤＯＰＡ存在下に、^{3}H－ＤＨＡの飽和実験を行なった結果、Ｌ－ＤＯＰＡ　１　μＭは、^{3}H－ＤＨＡのＢｍａｘを増大した（図　２、表　１）。Ｌ－ＤＯＰＡは、Ｋｄ値に対しては、有意な作用を示さなかった（図　２、表　１）。

図　１　ラット線条体膜標本における ^{3}H－ＤＨＡ結合に対するＬ－ＤＯＰＡの置換作用



（考察）ラット線条体膜標本における ^{3}H－ＤＨＡ結合のＳｃａｔｃｈａｒｄ　ｐｌｏｔは、直線性を示した。従って、^{3}H－ＤＨＡにより標識される結合部位は、同一の親和性を示すものと考えられる。この解析により得られたＢｍａｘ及びＫｄ値は、他の報告とほぼ一致した[4]。Ｌ－ＤＯＰＡは、ラット線条体膜標本において、β－受容体リガンドの ^{3}H－ＤＨＡ結合に対し、置換作用を示さなかった。この結果は、Ｌ－ＤＯＰＡが、β－受容

図　２　Ｌ－ＤＯＰＡ非存在下および存在下における、^{3}H－ＤＨＡ結合並びにＳｃａｔｃｈａｒｄ　ｐｌｏｔ

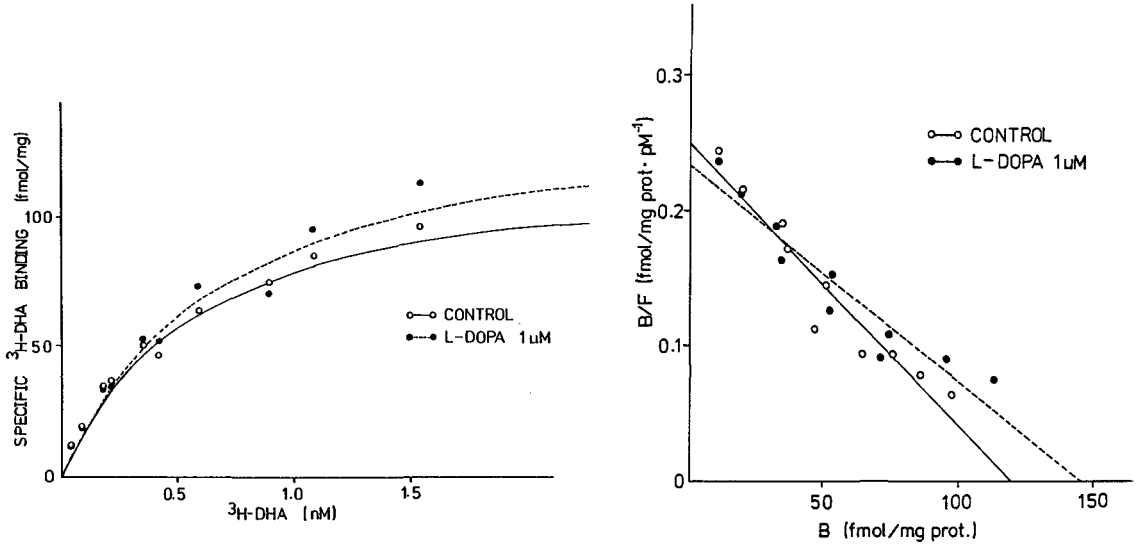


表　1　^{3}H－ＤＨＡの結合特性に及ぼすＬ－ＤＯＰＡの作用

		3H-DHA binding		
		Bmax	Kd	'r'
	n	(fmol/mg prot.)	(pM)	
Control	8	112.5 ± 4.0	487.2 ± 44.1	0.959 ± 0.005
L-DOPA 1 μM	5	140.1 ± 9.1*	700.6 ± 103.3	0.935 ± 0.010

*P < 0.01, compared to control. 'r' coefficient of linear regression for Scatchard plots. Each value represents mean ± S.E.

体の結合部位に直接結合しないことを示している。Ｌ－ＤＯＰＡは、１　μＭにおいて ^{3}Ｈ－ＤＨＡの最大結合能を増大した。この結果は、従来報告のない新知見であり、Ｌ－ＤＯＰＡが、ラット線条体及び視床下部切片からのアミン遊離を、立体特異的にプロプラノロール感受性の、シナプス前β－受容体活性化過程を経て促進するとの、先に報告した我々の実験結果と一致する[1-3]。線条体および視床下部においては、シナプス前β－受容体は、内在性のβ－アゴニストによって緊張性に作動している[5-7]。従って、外来投与のＬ－ＤＯＰＡは、シナプス前β－受容体結合能を増大することを介し、内在性アゴニストによる緊張性のアミン遊離促進作用を増強させるものと考えられる。Ｌ－ＤＯＰＡの、このβ－受容体結合部位増大作用が、シナプス前部のβ－受容体に限局したものであるか否かについては、今後検討が必要と思われる。

以上より、Ｌ－ＤＯＰＡは、ラット線条体膜標本において、β－受容体リガンドの ^{3}Ｈ－ＤＨＡ結合を増大することが明らかとなった。外来投与Ｌ－ＤＯＰＡは、この受容体修飾作用を介し、シナプス前β－受容体を介する薬理学的応答を生ずるものと考えられる。

〔文献〕

1. Goshima, Y., Kubo, T. and Misu, Y. (1986) Br. J. Pharmac., 89, 229 - 234
2. Misu, Y., Goshima, Y. and Kubo, T. (1986) Neurosci. Lett. 72, 194 - 198
3. 五島　良郎・久保　孝夫・三須　良実　１９８６　神経化学　２５：４３６－４３８
4. Yamanaka, K., Oshita, M. and Muramatsu, I. (1985) Brain Res., 348, 241 - 248
5. Reisine, T.D., Chesselet, M.F., Lubetzki, C., Chéramy, A. and Glowinski, J. (1982) Brain Res., 241, 123 - 130
6. Ueda, H., Goshima, Y., Kubo, T. and Misu, Y. (1985) J. Pharmacol. Exp. Ther. 232, 507 - 512
7. Ueda, H., Goshima, Y., Kubo, T. and Misu, Y. (1984) Life Sci. 34, 1087 - 1093

33. 高血圧自然発症ラットの高血圧発症に関与する脳幹部ノルアドレナリン神経系についての検討

八尾博史・松本　孝・平野　誠・内村英幸・黒木俊秀・
堤　哲之・鹿子島裕士・中原辰雄*・中村　薫**・藤島正敏***
（国立肥前療養所，九州大・理・化学*，医・神経精神**，医・第二内科***）

〔要　約〕

高血圧自然発症ラット(SHR)の高血圧発症に関与する神経性因子について検討した。脳幹部の血圧調節に関係すると考えられる部位を凍結切片より切り出し、norepinephrine、dopamine、serotonin、5-hydroxyindoleacetic acidを電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ECD)により測定した。SHRの孤束核(rostral NTS)では4-、8-、16-週令のいずれにおいてもnorepinephrineは減少していた。高血圧発症後の時期(8-、16-週)にはA1、A5領域、巨大細胞性網様核でnorepinephrineの増加がみられた。一方、dopamine、serotoninは一定の変化を示さなかった。ラット孤束核でnorepinephrineは血圧を下降させるよう働くことが知られており、今回の成績からも脳幹部、特に孤束核でのnorepinephrineの減少がSHRの高血圧発症に重要であることが示唆された。

Key word：
Spontaneously hypertensive rat, Nucleus tractus solitarii,
Brain stem noradrenergic neuron

高血圧自然発症ラット(SHR)(1)の高血圧発症には中枢神経系の関与が大きいと言われている(2)が、血圧調節中枢に限局した異常を報告した生化学的研究は少ない。SHRの圧受容体反射に関しては、調圧神経反射はより高い血圧レベルへ偏位し、脳幹部にその原因がある(3)ことが示されている。すなわち、少なくとも急性の血圧上昇に対する降圧機序の障害がSHRの血圧調節中枢に存在することが分かる。そこで今回は高血圧発症前と考えられる4週令、発症期の8週令、発症後高血圧が固定する16週令のSHRで脳幹部の血圧調節に関係すると思われる部位を我々が従来より行ってきた方法を用いて凍結切片より切り出し、モノアミン含量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ECD)により測定し検討を加えた。

＜方法＞　4、8、16週令の雄SHRと対照群として同週令のWistar-Kyoto rat(WKY)を用いた。午後1時から2時の間に断頭し、迅速に脳を取り出し-80℃で凍結後、クライオスタットで300μmの連続切片を作製した。各切片は-20℃のプレート上でPalkovits and Jacobowitzのアトラス(4)に従って脳幹の各部位(Table I参照；A1、A2：0-1.5mm caudal to the obex、NTS、RG、RPC：0.6-1.5mm rostral to the obex、A5、A6)を切り出した。切り出した検体に0.1Mギ酸100μl(400μM $NaHSO_3$、50μM ascorbic acidを含む)を加えホモジナイズし、遠心(17700×g、10分、5℃)後、上澄40μlをHPLC-ECDへ注入し、norepinephrine(NE)、dopamine(DA)、serotonin(5-HT)、5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA)量を同時測定した(5)。蛋白定量にはLowryの方法(6)を用いた。

＜結果＞　TableIに結果を示した。4週令のSHRでの唯一の変化はNTSのNE減少のみであった。NTSのNEは8および16週令のSHRでも減少していた。一方NEの増加(119-130% of WKY)は8週令と16週令のRG、A5及び16週令のA1でみられた。DAは16週令のSHRのA1でのみ増加していた。SHRの5-HTは8週令のA2、16週令のRGで減少していたが、5-HIAAにはSHRとWKYで差を認めなかった。

＜考察＞　今回の実験により以下のことが明らかになった。1)SHRでは非常に早期(4週令)よりNTSのNEが減少している。2)SHRの血圧が上昇もしくは固定する時期にはRG、A1、A5のNEが増加する。3)dopamine、serotoninは今回検討した部位では一定の変化を示さなかった。

高血圧発症後のみにNEの増加がみられたことから、RG、A1、A5で増加したNEは高血圧を維持するために必要なものであるのか、血圧上昇による二次的変化かの二つの可能性がある。血圧維持に必要なvasomotor centerは網様体やC1領域にあり、A1がC1を抑制するという報告がある(7)、(8)。またA5領域が血圧調節に重要との示唆があるが、確立されたものではない(9)。現在のところRG、A1、A5それぞれの機能が十分解明されてないため、それらの部位でのNE増加の理由については解釈が困難である。

SHRのNTSでのNE減少は4週令からみられ8週令、16週令でもその差は有意であった。SHRのNTSに限局したNEの減少の報告は調べ得た範囲ではなかった。De Jong一派の

Table I　Norepinephrine, Dopamine, Serotonin and 5-Hydroxyindoleacetic Acid Concentrations in Brain Stem Nuclei of Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats

	Norepinephrine		Dopamine		Serotonin		5-Hydroxyindoleacetic Acid	
	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
4 weeks								
A1	21.50 ± 0.96	22.21 ± 0.52	1.66 ± 0.11	1.89 ± 0.06	14.66 ± 0.87	13.22 ± 0.67	5.88 ± 0.42	5.47 ± 0.23
A2	48.22 ± 1.89	47.04 ± 5.06	4.97 ± 0.19	5.47 ± 0.55	32.12 ± 0.92	31.21 ± 3.03	6.89 ± 0.20	6.40 ± 0.53
NTS	21.16 ± 1.32	13.21 ± 1.30§	1.56 ± 0.10	1.48 ± 0.12	11.77 ± 0.58	11.98 ± 0.74	4.37 ± 0.22	4.62 ± 0.18
RG	8.18 ± 0.47	9.07 ± 0.64	-	-	13.40 ± 0.55	11.99 ± 0.88	8.14 ± 0.32	9.14 ± 0.84
RPC	12.69 ± 0.50	12.27 ± 0.71	-	-	14.89 ± 0.51	14.60 ± 0.63	6.00 ± 0.22	6.88 ± 0.35
A5	12.80 ± 0.70	13.80 ± 0.62	-	-	23.91 ± 3.20	22.86 ± 2.13	7.76 ± 0.65	8.15 ± 0.47
LC	89.58 ± 4.58	84.48 ± 4.53	4.68 ± 0.37	5.42 ± 0.59	19.13 ± 1.04	19.50 ± 0.88	8.06 ± 0.56	8.23 ± 0.18
8 weeks								
A1	13.73 ± 0.53	13.96 ± 0.63	1.03 ± 0.09	1.09 ± 0.05	8.83 ± 0.45	8.35 ± 0.29	4.29 ± 0.27	4.23 ± 0.23
A2	47.30 ± 1.94	48.76 ± 2.46	5.13 ± 0.12	5.35 ± 0.52	35.45 ± 0.47	30.87 ± 1.74*	6.76 ± 0.45	7.42 ± 0.42
NTS	18.18 ± 1.44	11.73 ± 1.33†	1.22 ± 0.08	1.06 ± 0.09	12.35 ± 0.41	11.57 ± 0.78	4.03 ± 0.06	4.08 ± 0.17
RG	4.87 ± 0.25	6.05 ± 0.33†	-	-	7.32 ± 0.27	6.64 ± 0.12	6.22 ± 0.30	6.41 ± 0.05
RPC	6.89 ± 0.34	7.40 ± 0.13	-	-	9.89 ± 0.37	9.55 ± 0.34	5.18 ± 0.20	5.49 ± 0.24
A5	12.98 ± 0.49	15.51 ± 0.77†	-	-	10.97 ± 0.85	12.82 ± 1.61	4.06 ± 0.33	4.68 ± 0.44
LC	46.68 ± 4.67	46.63 ± 3.23	2.76 ± 0.29	3.20 ± 0.27	11.52 ± 0.35	12.29 ± 0.20	6.94 ± 0.30	7.17 ± 0.30
16 weeks								
A1	14.48 ± 0.43	17.28 ± 0.60§	1.50 ± 0.05	1.81 ± 0.08†	11.67 ± 0.60	9.99 ± 0.55	4.12 ± 0.17	4.11 ± 0.15
A2	39.72 ± 2.40	36.66 ± 1.69	5.09 ± 0.21	5.42 ± 0.39	29.56 ± 1.21	27.68 ± 0.76	5.90 ± 0.20	5.51 ± 0.17
NTS	22.15 ± 1.42	16.01 ± 1.59*	1.88 ± 0.16	2.15 ± 0.18	14.10 ± 0.64	12.65 ± 0.64	3.39 ± 0.18	3.23 ± 0.15
RG	6.03 ± 0.22	7.82 ± 0.40†	-	-	9.81 ± 0.29	8.19 ± 0.44*	5.32 ± 0.18	5.55 ± 0.21
RPC	9.56 ± 0.61	10.28 ± 0.59	-	-	13.86 ± 0.51	12.65 ± 0.94	4.55 ± 0.14	4.58 ± 0.17
A5	8.00 ± 0.21	9.65 ± 0.30§	-	-	17.46 ± 1.71	13.71 ± 1.18	5.26 ± 0.24	5.36 ± 0.21
LC	62.98 ± 5.22	61.76 ± 4.63	4.02 ± 0.26	4.26 ± 0.29	15.45 ± 0.84	15.99 ± 0.51	4.46 ± 0.22	4.84 ± 0.21

Results are expressed as pg/μg protein (mean±SEM, 5-7 determinations).
*p <0.05, †p <0.02, ‡p < 0.01, § p < 0.005 (Student's t-test), SHR vs. WKY.
SHR: Spontaneously Hypertensive Rat, WKY: Wistar-Kyoto Rat, NTS: Nucleus tractus solitarii,
RG: Nucleus reticularis gigantocellularis, RPC: Nucleus reticularis parvocellularis,
LC: Locus coeruleus

Versteegら(10)、Wijnenら(11)はSHRのNTSでのNEの減少をみていないが、16週令のA1、A5領域、網様体でのNEの増加は我々の成績と一致する。NTSでの成績の不一致の理由はよく分からないが、血圧の神経性調節にもっとも重要であるNTSで幼若な時期から成熟するまでSHRにNEの減少を見いだしたことは特筆すべきであると考えられる。血圧が上昇するとその情報は大動脈と頚動脈洞の圧受容体を経てNTSへ伝えられ、NTSはvasomotor centerを抑制し、血圧は下降する。ラットの両側NTS破壊により神経性高血圧が起こり(12)、圧受容体からの求心線維の神経伝達物質と考えられているL-glutamateをNTSへ微量注入すると低血圧となる(13)。興味深いことにDe Jong(14)はラットのNTSへのNE微量注入により血圧が下降することを示し、この反応はαブロッカーのNTSへの前処置により消失することからNTSのα受容体を介してNEは降圧的に働くことを示唆した。以上のような成績を参考にして考察すると、今回の実験で示されたSHRのNTSでのNEの減少は、SHRのNTSでの降圧機構が十分に働き得ないことを意味するのかもしれない。

今回の成績ではdopamineおよびserotonin系の高血圧発症との関連は示されなかったが、最近Kouluら(15)は主に幼若なSHRで縫線核、NTS(A2-C2)、A1-C1、LCでのserotonin代謝回転亢進を報告している。Kouluらと我々の切り出し方法は若干異なり、また今回の実験では縫線核系の検討を行っていない。serotonin系がSHRの高血圧発症に関与するか否かは今回の結果からは明らかでない。

我々の成績はSHRのNTSでのNEの低値が血圧上昇に関与していることを示唆する。すなわちSHRにおいてはNTSのNE減少により降圧機構に異常を来し、このことが高血圧発症の一因となっていると考えられた。NTSを中心とする調圧神経反射弓は急性の血圧変化に対応し、血圧を一定に保つよう働く。このような急性変化に対応する系での異常がどのような過程を経てSHRに見られるような慢性高血圧を引き起こすのかは今後より詳細に検討されなくてはいけない。

<References>

1. Okamoto,K and Aoki,K.,(1963) Jpn.Circulat.J.,27,282-293.
2. Abboud,F.M.,(1982) Hypertension,4(suppl.II),208-225.
3. Gonzalez,E.R.,et al.,(1983) Hypertension,5,346-352.
4. Palkovits,M. and Jacobowitz,D.M.,(1974) J.Comp.Neur.,157,29-42.
5. Kuroki,T.,et al.,(1987) Neuropeptides,9,169-176.
6. Lowry,O.H.,et al.,(1951) J.Biol.Chem.,193,265-275.
7. Iadecola,I.,et al.,(1982) Cerebral Blood Flow.,pp,485-492, Elsevier North Holland.
8. Granata,A.R.,et al.,(1986) Brain Research,377,127-146.
9. Byrum,C.E.,et al.,(1987) J.Comp.Neur.,261,529-542.
10. Versteeg,D.H.G.,et al.,(1976) Brain Research,112,429-434.
11. Wijnen,H.J.L.M.,et al.,(1977) Brain Research,135,180-185.
12. Doba,N. and Reis,D.J.,(1973) Circ.Res.,32,584-593.
13. Talman,W.T.,et al.,(1980) Science,209,813-815.
14. De Jong,W.,(1974) European J. Pharmacol.,29,179-181.
15. Koulu,M.,et al.,(1986) Brain Research,371,177-181.

34. 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞の分泌調節に関わるα-受容体の特質

今泉美佳・宮川洋二・熊倉鴻之助（上智大・生命研）

〔要　約〕

牛副腎髄質から調製した初代培養クロマフィン細胞を用いてAcetylcholine(ACh)刺激によるcatecholamines(CA)分泌を阻害するα$_2$と思われる受容体の特質について検討した。α$_2$-agonistであるclonidine(CLO)はAChによるCA分泌を有意に抑制した。この抑制作用は可逆的であった。しかし、典型的なα$_2$-antagonistとして知られているyohimbine, phenoxybenzamineはこの抑制作用に対して拮抗しなかった。また、α$_1$-やD$_2$-antagonistもCLOの作用には全く影響を与えない。従って、CLOが抑制する際の作用部位はα$_1$やD$_2$受容体ではないことが推察されたが、同時に今まで知られている典型的なα$_2$受容体とは薬理学的に異なっていた。α$_2$受容体は抑制性GTP結合蛋白質(Ni)と共役している可能性が示唆されている。そこで、Niを特異的にリボシル化して脱共役を引き起こすことが知られているislet-activating protein (IAP)によって細胞を処理し、このCLOの抑制作用がどのように変化するかを調べたところ、IAP濃度依存性に抑制作用が解除された。このことから、クロマフィン細胞でのCLOの作用部位はNiと共役する受容体であることが示唆され、この点ではα$_2$受容体と考えることが可能と思われた。

Key word：　Adrenal chromaffin cells, Secretory function, α_2-receptor

牛副腎髄質クロマフィン細胞にはα$_2$-agonistである(^{3}H)-CLOの特異的結合部位が存在し、α$_2$-agonistはcarbacol刺激によるCA分泌を抑制することが報告されている[6]。一方、ラット副腎臓器灌流実験ではα$_2$-antagonistの効果が見られないことからα$_2$受容体はCA分泌を調節していないという反論も出されている[7]。このようにクロマフィン細胞のα$_2$受容体の性質、及びそのCA分泌調節機構への関与については未だ不明な点が多い。これらの点をより明確にする目的で、我々は牛副腎髄質クロマフィン細胞を用いてCA分泌実験を行ない、CLOによる分泌阻害の薬理学的性質を検討した。更に、このα$_2$-agonistによる分泌阻害に対するIAP処理の影響を調べ、阻害機構と抑制性GTP結合蛋白質の関連を検討した。

［実験方法］

1)クロマフィン細胞の培養：クロマフィン細胞は牛副腎髄質から既報[3]のように調製し、浮遊培養した。また、一部の細胞はKilparickら[2]の方法で単層培養した。実験には培養3-10日の細胞を用いた。

2)CA分泌実験とCA定量：

①単層培養細胞による分泌実験：培養細胞を0.5% BSAを含むKrebs-Ringer液で洗浄後、各濃度のCLO、あるいはCLOと各種阻害剤を含むKrebs-Ringer液中で30℃、5分間preincubationした。これら薬物存在下においてACh, KClで3分間分泌刺激を行なった。Krebs-Ringer液中に遊離されたCAと細胞含有CAを0.4M過塩素酸で抽出し、HPLC法によりCA定量を行なった。

②Cell Bed Perfusion-ECD systemを用いたReal-time monitoringは既報[3]の方法に従った。

3)細胞のIAP処理：各濃度のIAP(科研)を培養液中に加えて細胞を20 hr培養した後、実験に用いた。

［結果及び考察］

単層培養細胞を用いて、α_2-agonistとして知られているCLO存在下でACh刺激を行なったところ、10^{-4}M AChによるCA分泌はCLO 3×10^{-5}Mにより54%の阻害を受けた(図1)。なお、自発的なCA分泌及び分泌されたCA中のadrenalineとnoradrenalineの比はCLOによる影響をほとんど受けなかった。一方、56mM KClによるCA分泌は、CLO 3×10^{-5}Mでは全く抑制されなかった(図1)。高濃度のCLO(10^{-4}M)によってもKCl刺激によるCA分泌は抑制されなかったことから、CLOによるCA分泌抑制の作用機序とAch受容体機能の密接な関わり合いが推察された。

このCLOによるCA分泌調節についてCell Bed Perfusion-ECD system[3]を用いて測定したところ、前述のバッチ法と同様CLOによってACh刺激によるCA分泌応答は抑制され、さらにCLOをwashoutすることによりACh刺激によるCA分泌応答は完全に回復した(図2)。このことからCLOによる抑制作用は可逆的なものであることがわかった。

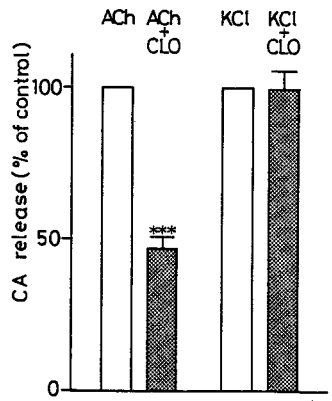


図1. ACh及びKCl刺激によるCA分泌に及ぼすCLOの影響
ACh刺激のみあるいはKCl刺激のみの場合のCA分泌(% of total)をcontrol(100%)とした。
単層培養細胞を用いて刺激後3 min間に外液中に放出されたCAを定量した。
ACh:10^{-4}M, KCl:56mM, CLO:3×10^{-5}M, ***:P<0.001

次にCLOの抑制作用に対するα2-antagonistであるyohimbineの影響を調べたところ、CLOの抑制作用は拮抗されず、むしろyohimbine自身も阻害作用を示した(図3)。図には示さないが、他のα2-antagonistであるphenoxybenzamineもyohimbineと同様の結果となった。またα1-antagonistであるprazosin、及びD2-antagonistであるhaloperidolについても調べたが、いずれもCLOの抑制作用に対しては拮抗作用を示さなかった。従ってクロマフィン細胞においてACh刺激によるCA分泌をCLOが抑制する際の作用部位はα1受容体やD2受容体ではないことが推察されたが、同時に今まで知られている典型的なα2受容体とは薬理学的に異なる可能性も考えられた。

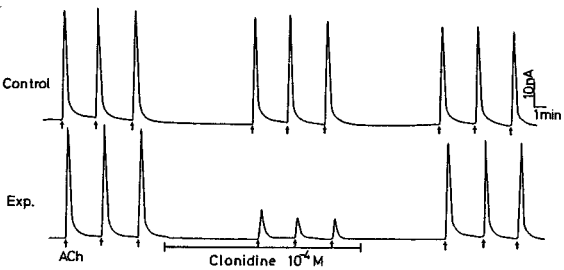


図2. ACh刺激によるCA分泌に及ぼすCLOの阻害作用
この実験はCell Bed Perfusion-ECD system を用いて
ACh(5×10^{-4})によるパルス刺激を行なった。

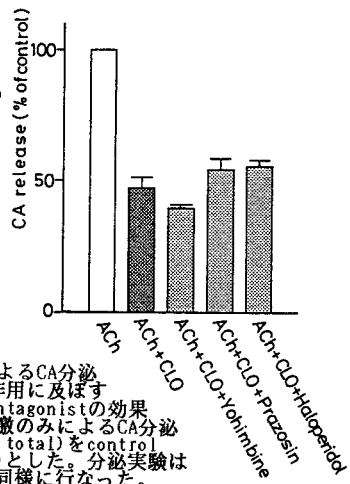


図3. CLOによるCA分泌抑制作用に及ぼす各種antagonistの効果
ACh刺激のみによるCA分泌(% of total)をcontrol(100%)とした。分泌実験は図1と同様に行なった。
ACh:10^{-4}M, CLO:3×10^{-5}M, yohimbine:10^{-6}M, haloperidol:10^{-6}M, prazosin:10^{-6}M

一方、シナプス膜ではα2受容体から効果器への伝達系に抑制性GTP結合蛋白質(Ni)が関与することが示唆されている[5]。そこで、Niを特異的にリボシル化して脱共役を引き起こすことが知られている[1] IAPによって細胞を処理し、ACh刺激によるCA分泌に対するCLOの抑制作用がどのように変化するかを調べた。図4に示すようにACh刺激によるCA分泌はIAP濃度依存性に増大した。このとき自発性CA分泌もIAP非処理細胞に比べて増大し、IAP 20 ng/ml処理の場合2.5倍程度CA分泌(% of total)が増大している。

CLOによる抑制作用は、細胞をIAP処理することにより濃度依存性に解除された。IAP濃度20 ng/mlの場合、最も効果的にCLOのCA分泌抑制作用が解除され、controlの90%のレベルまでCA分泌が回復している(図5)。しかし、ACh受容体のantagonistであるhexamethoniumによるCA分泌阻害はIAP処理によっては全く影響を受けず(図6)、

このIAPの作用はCLOによる抑制の場合に特異的である。

CLOによる分泌阻害の用量反応曲線に及ぼすIAP(20 ng/ml)処理の効果を検討したところ、図7に見られるように曲線が右へシフトする傾向にある。ラット大脳皮質膜では、IAP処理によりα_2受容体とCLOの結合親和性が低下することが報告されている[4]。従って、図7に見られる現象はIAP処理によりクロマフィン細胞の受容体とCLOの親和性が低下した結果とも考えられる。このことから、クロマフィン細胞でのCLOの作用部位は抑制性GTP結合蛋白質と共役する受容体であることが示唆され、この点ではα_2受容体と考えることが可能と思われる。

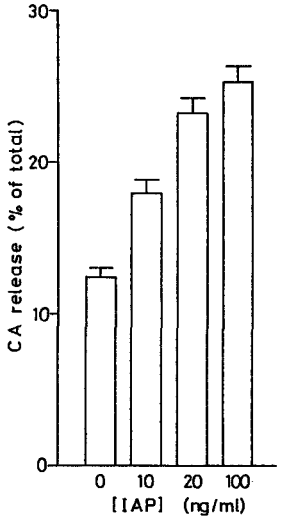


図4. ACh刺激によるCA分泌に及ぼすIAPの効果
IAP処理は20 hr行なった。分泌実験は図1と同様に行なった。 ACh:10^{-4}M

[文献]
1) Katada, T. and Ui, M. (1982) J. Biol. Chem. 257, 7210-7216.
2) Kirpatrick, D. L., Ledbetter, F. H., Carson, K. A., Kirshner, A. G., Slepetis, R., and Kirshner, N. (1980) J. Neurochem. 35, 679-692.
3) Kumakura, K., Ohara, M., Sato, G. P. (1986) J. Neurochem. 46, 1851-1858.
4) Nomura, Y., Kitamura, Y. and Segawa, T. (1985) J. Neurochem. 44, 364-369.
5) Rouot, B. M., U'Prichard, D. C., and Snyder, S. H. (1980) J. Neurochem. 34, 374-384.
6) Sakurai, S., Wada, A., Izumi, F., Kobayashi, H., and Yanagihara, N. (1983) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 324, 15-19.
7) Sharma, T. R., Wakade, T. D., Malhotra, R. K., and Wakade, A. R. (1986) Eur. J. Pharmacol. 122, 167-172.

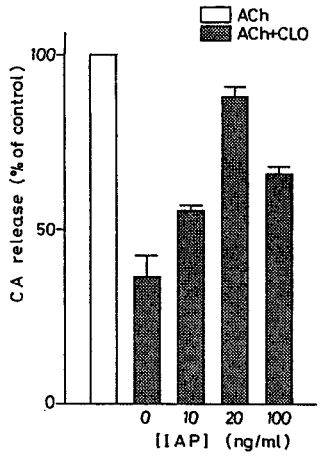


図5. CLOによる分泌阻害に及ぼすIAP処理の効果
－IAP濃度の影響－
各実験群でのACh刺激によるCA分泌(%of total)をそれぞれのcontrol(100%)とした。分泌実験は図1と同様に行なった。
ACh:10^{-4}M, CLO:3×10^{-5}M

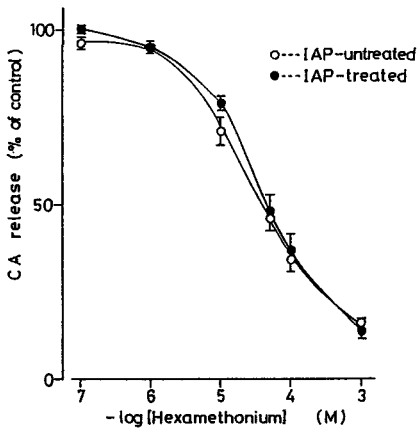


図6. Hexamethonuimによる分泌阻害に及ぼすIAPの効果
この実験はCell Bed Perfusion-ECD system を用いて, ACh(5×10^{-4}M)によるパルス刺激を行なった。AChによるCA分泌をそれぞれのcontrol(100%)とした。
IAP:100 ng/ml for 20hr

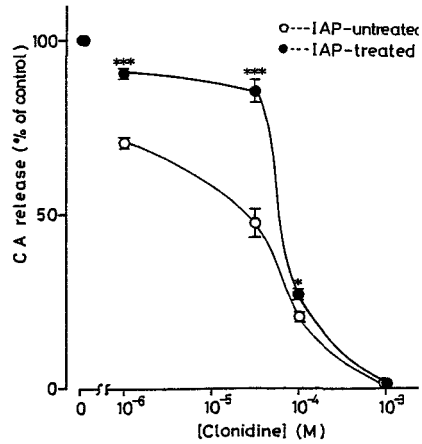


図7. CLOによるCA分泌阻害に及ぼすIAPの効果
－用量反応曲線への影響－
ACh刺激によるCA分泌(%of total)をそれぞれのcontrol(100%)とした。分泌実験は図1と同様に行なった。ACh:10^{-4}M, IAP:20 ng/ml for 20hr, *** P<0.001, * P<0.05

35. ラット前頭葉皮質における興奮性アミノ酸受容体拮抗薬および作動薬のドーパミン神経伝達に対する作用

畑　　直人・西川　　徹・高橋清久

（国立精神神経センター・神経研）

〔要　約〕

前頭葉皮質に分布する興奮性アミノ酸受容体を介する中脳皮質系ドーパミン（DA）ニューロンの調節を明らかにする目的で、ラットの内側前頭葉皮質内に、興奮性アミノ酸受容体拮抗薬あるいは作動薬を局所的に注入し、同部位におけるDA代謝の変化を検討した。N-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体拮抗薬である2-amino-5-phosphonovalerate（APV）は、内側前頭葉皮質内のDA濃度には変化を与えず、3,4-dihydroxyphenylacetic acid（DOPAC）およびDOPAC/DA比を上昇させた。これに対して、NMDAおよびglutamate diethylester（GDEE；quisqualate受容体拮抗薬）はDA、DOPAC濃度を増加させたが、DOPAC/DA比には有意な影響を及ぼさなかった。α-Methyl-p-tyrosineの腹腔内投与により脳内のDA合成を阻害した条件下では、APVおよび2-amino-7-phosphonoheptanoate（NMDA受容体拮抗薬）はDA消費を昂進させたのに対して、GDEE、γ-glutamylaminomethyl sulphonate（quisqualateおよびkainate受容体拮抗薬）やNMDA投与後では対照群と同様のDA消費が認められた。以上の結果から、ラットの内側前頭葉皮質では、NMDA受容体がDA放出のtonicな抑制に関与していることが示唆された。

Key word：　frontal cortex, excitatory amino acid, dopamine metabolism

近年、グルタミン酸、アスパラギン酸などの興奮性アミノ酸を伝達物質とするニューロンおよびその受容体の脳内分布が明らかにされてきている。特に大脳皮質では、皮質下組織への出力線維、皮質内および左右の皮質間の連絡線維、皮質下からの投射線維などに多くの興奮性アミノ酸ニューロンが含まれていることを示す所見が得られており（２）、大脳皮質における興奮性アミノ酸性伝達の生理的機能が注目されている。本研究では、精神分裂病などの精神障害の発現と関係が深いと考えられている中脳皮質系ドーパミン（DA）ニューロン（１）の調節における興奮性アミノ酸の役割を明らかにする目的で、DA神経終末が豊富に存在する内側前頭葉皮質内に興奮性アミノ酸受容体拮抗薬および作動薬を注入し、同部位におけるDA神経伝達の変化を調べた。

［方法］

実験にはWistar系雄ラット（手術時体重：190-250 g）を用いた。

<u>薬物の脳内注入</u>：　脳内注入実験の７日前に、pentobarbital麻酔下（30mg/kg、腹腔内投与（i.p.））でガイドカニューラを内側前頭葉皮質に装着した。実験当日には、手で拘束した無麻酔の動物のガイドカニューラから注入針を挿入し、２μlのリン酸緩衝液／生理食塩水（pH 7.4）に溶解した薬物を、両側の内側前頭葉皮質内（AP +10.5, V+6.3, L±0.8；König & Klippelの図譜）に４分間かけて注入した。注入針はさらに２分間留置した後抜去した。対照群では、溶媒のみを注入した。一部の実験では、脳内のDA合成を阻害した条件下におけるDA消費を検討するため、薬物の注入１分前にチロシン水酸化酵素阻害剤であるα-methyl-p-tyrosine methyl ester hydrochloride（α-MT；250mg/kg, i.p.）を投与した。

生化学的測定：　動物は注入開始あるいはα－MT投与後30分で断頭し、氷上で内側前頭葉皮質を切り出して生化学的測定まで-80 ℃で保存した。DAおよびDOPACは、既報（５）の通りアルミナバッチ法を用いて抽出したのち、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーによって定量した。蛋白量はLowryらの方法（４）に従って測定した。

統計解析：　平均値の差の検定には、Kruskal-Wallis testにもとづく多重比較法（Williams-Wilcoxon型検定）を用いた。

［結果］

１）N-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体の選択的拮抗薬である2-amino-5-phosphono-valerate（APV）（６）5.1 nmol/side投与後では、内側前頭葉皮質内のDAおよびDOPAC量に有意な変化は認められなかったが、51 nmol/side注入後にはDOPAC濃度が31% 増加した（表１）。　Glutamate diethyl ester（GDEE；　quisqualate

表１．興奮性アミノ酸受容体拮抗薬および作動薬局所注入後の内側前頭葉皮質内DA,DOPAC量の変化

Drugs (n mol)	DA (ng/mg prot.)		DOPAC (ng/mg prot.)	
Saline	1.53±0.06	(17)	0.65±0.04	(17)
APV (5.1)	1.51±0.06	(10)	0.74±0.04	(10)
APV (51)	1.39±0.03	(10)	0.85±0.03**	(10)
GDEE (104)	2.04±0.20*	(6)	0.96±0.11**	(6)
NMDA (5.1)	2.36±0.21**	(7)	1.00±0.08**	(7)
NMDA (51)	2.04±0.13**	(8)	1.06±0.09**	(8)

mean±S.E.M.　（）＝n

＊P＜0.05　＊＊P＜0.01

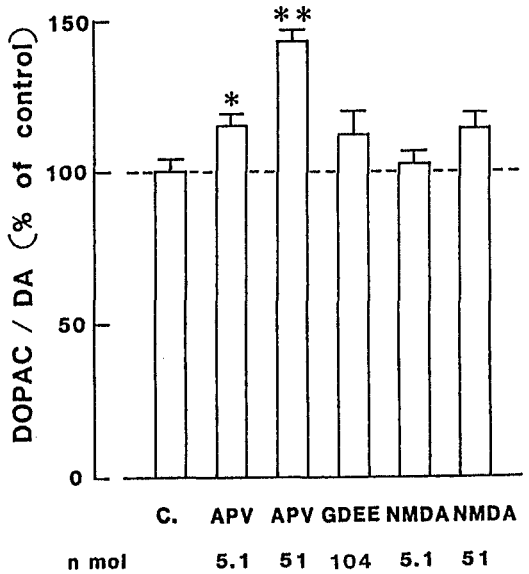


図１．興奮性アミノ酸受容体拮抗薬および作動薬局所注入後の内側前頭葉皮質内DOPAC/DA比の変化
対照群（Ｃ．），0.42±0.02
＊ｐ＜0.05，＊＊ｐ＜0.01　ｎ＝6-17

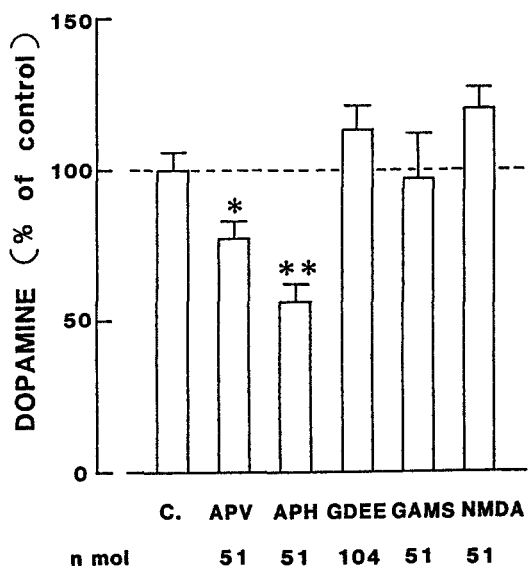


図２．DA合成阻害後の内側前頭葉皮質内DA量に対する興奮性アミノ酸受容体拮抗薬および作動薬の影響：DA値（ng/mg protein）
α-MT未投与群，1.71±0.13　；α-MT投与対照群（Ｃ．），0.67 ±0.04
＊ｐ＜0.05，＊＊ｐ＜0.01　ｎ＝5-16

受容体拮抗薬（６））およびNMDA投与後には、DAおよびDOPAC 量がともに上昇した（表１）。DAの利用率の一指標と考えられているDOPAC/DA比（３）を算出してみると、APV 投与により用量依存的に増大したのに対して、GDEEとNMDAでは対照群と差がなかった（図１）。

２）図２のように、脳内のDA合成が阻害された動物においては、APV や2-amino-7-phosphonoheptanoate （APH ；NMDA受容体拮抗薬（６））投与によって内側前頭葉皮質内のDAが対照群より有意に低い値を示し（APV ,-23% ；APH ,-44% ）、DA消費が促進されていることがわかった。GDEE、γ－glutamylaminomethyl sulphonate（GAMS；quisqualate/kainate 受容体拮抗薬（６））あるいはNMDA投与群では、対照群のDA値と有意な差異を認めなかった。

［考察］

以上の結果から、内側前頭葉皮質内では興奮性アミノ酸受容体に作用する薬物がDA代謝を変化させることが明らかとなり、同部位に投射する中脳皮質系DAニューロンの調節に興奮性アミノ酸ニューロンが関与していることが示唆された。

拮抗薬の作用について見ると、APV およびGDEEはともにDOPAC 濃度を増加させたがDA量やDOPAC/DA比には異なった影響を及ぼしたことから、前頭葉皮質の興奮性アミノ酸受容体はその亜型によってDA性伝達の制御における役割が違う可能性があると思われた。DOPAC/DA比はAPV 注入後に上昇したのに対してGDEEでは変化しなかった所見より、NMDA受容体の選択的遮断後に前頭葉皮質内のDA放出が盛んになりDA利用率が増加すると推測された。このような仮定は、APV やAPH が前頭葉皮質においてDA合成阻害後のDA消費を促進し、NMDA受容体にはほとんど作用しないGDEEおよびGAMSではこの効果が見られないことから支持される。したがって、前頭葉皮質内ではDA放出に対するtonic な抑制機構にNMDA受容体を介する興奮性アミノ酸性伝達が関係すると考えられる。一方、NMDA自身はα-MT 投与後のDA消費やDOPAC/DA比に有意な影響を与えなかったが、この現象はNMDA受容体を介するtonic な抑制作用が今回の実験条件下ではほぼ最大限に発揮されているためと解釈することができよう。

今後はNMDA受容体が関与している前頭葉皮質内のDA抑制機構の神経解剖学的特徴についても検索を進めるとともに、線条体、側坐核などの皮質下DA神経終末部に対する興奮性アミノ酸性調節との比較を行なう必要がある。また、quisqualate あるいはkainate 受容体などNMDA受容体以外の興奮性アミノ酸受容体による中脳皮質系DAニューロンの調節についても、DA合成系や放出系の他の指標を用いてさらに検討を要する。

［文献］

1)Bannon,M.J. and Roth,R.H. (1983) Pharm.Rev. 35,53
2)Cotman,C.W. et al. (1987) TINS 10,273
3)Lavielle,S. et al. (1978) Brain Res. 168,585
4)Lowry,O.H. et al. (1951) J.biol.Chem. 193,265
5)Nishikawa,T. et al. (1983) European J.Pharmacol. 88,195
6)Watkins,J.C. and Olverman,H.J. (1987) TINS 10,265

36. エチルβ－カルボリン－3－カルボキシレートによる脳内GABA$_A$受容体／ベンゾジアゼピン受容体／Cl^-チャンネル複合体の機能的調節

田口淳一・廣内雅明・栗山欣弥

（京都府医大・薬理）

〔要　約〕

エチルβ－カルボリン－3－カルボキシレート（β-ECC）のγ－アミノ酪酸（GABA）$_A$受容体／ベンゾジアゼピン（BZP）受容体／Cl^-チャンネル複合体機能に及ぼす影響を、神経化学的に検討した。β-ECCはBZP受容体拮抗薬であるRo15-1788と同様に[^{3}H]フルニトラゼパム（FLU）結合を有意に阻害したが、その阻害機序はそれぞれ非競合的及び競合的であった。一方、[^{3}H]β-ECC結合に対してクロナゼパムとRo15-1788はそれぞれ非競合的及び競合的阻害を示した。BZP類による[^{3}H]ムシモール（MUS）結合の増大はβ-ECC及びRo15-1788により拮抗され、[^{3}H]β-ECC結合はGABA、MUS及びセコバルビタールによって抑制された。膜分画のデオキシコール酸ナトリウム処置で得られた可溶化分画についてゲル濾過を行なうと、[^{3}H]β-ECC結合部位は[^{3}H]MUSや[^{3}H]FLU結合部位と同じ分子量230,000の位置に溶出された。膜小胞への$^{36}Cl^-$ influxのGABAによる増加は、FLU及びβ-ECCによってそれぞれ増強及び減弱され、これら各効果はRo15-1788で拮抗された。以上のことより、β-ECC結合部位はGABA$_A$受容体／BZP受容体／Cl^-チャンネル複合体上に存在するが、BZP結合部位とは、その存在様式及びGABA受容体やCl^-チャンネル機能への影響の面で異なっていることが考えられる。

Key word : Ethyl β-carboline-3-carboxylate binding site, GABA$_A$ receptor/benzodiazepine receptor/Cl channel complex, $^{36}Cl^-$ influx

哺乳動物の中枢神経系に存在するγ－アミノ酪酸（GABA）受容体のうちGABA$_A$受容体は、マイナートランキライザーであるベンゾジアゼピン（BZP）類に対するBZP受容体のみならずCl^-チャンネルと同一高分子蛋白上に存在し[4-7]、両受容体の機能的共軛の下に、Cl^-チャンネルによるCl^-の細胞内流入が起こると考えられている[3]。このGABA$_A$受容体と機能的に共軛するBZP受容体に対する内因性リガンドとして、これまで各種の物質が報告されたが、これらの中でアルデヒド縮合物の一種であるβ-カルボリン類のBZP受容体に対する親和性が著しく高いことから、最近本物質が最も可能性の高い内因性リガンドと考えられるようになった[1]。しかしながら本物質の行動薬理学的作用は、BZP類とは逆の不安及び痙攣誘発作用であり[2,8]、BZP受容体に対する内因性リガンドと考えにくい点も多い。従って本研究においては、β－カルボリン類のうちBZP受容体に対して最も親和性が高いエチルβ－カルボリン－3-カルボキシレート（β-ECC）のGABA$_A$受容体／BZP受容体／Cl^-チャンネル複合体機能に及ぼす影響を神経化学的に検討した。

［方法］STD-ddy系雄性マウスの全脳をポリトロンでホモジナイズし、その48,000×g沈渣を膜分画として以下の実験に用いた。各種界面活性剤による可溶化は、膜分画を2℃で90分間処置することにより行ない、その105,000×g上清を可溶化分画とした。結合実験はGF/Bガラスフィルターを用いた吸引濾過法により行ない、GABA$_A$受容体、BZP受容体及びCl^-チャンネルに対する各リガンドとして[^{3}H]ムシモール（[^{3}H]MUS, 5nM）、[^{3}H]フルニトラゼパム（[^{3}H]FLU, 0.5nM）及び[^{3}H]t－ブチルビシクロオルトベンゾエート（[^{3}H]TBOB, 2nM）を用い、それぞれ2℃で30分間、60分間及び25℃で60分間

インキュベートすることにより行なった。$^{36}Cl^-$ influxの検討は、ガラスホモジナイザーで得られたウシ大脳皮質の1,000xg 沈渣（膜小胞）へ30℃で3秒間に取り込まれた$^{36}Cl^-$を、GF/Cガラスフィルターで遊離$^{36}Cl^-$と分離することにより行なった。

[結果] [^{3}H]FLU,[^{3}H]β-ECC結合に対するBZP及びβ-ECCの影響　GABA$_A$受容体への[^{3}H]MUS結合、BZP受容体への[^{3}H]FLU結合及びCl^-チャンネルへの[^{3}H]TBOB結合に対するβ-ECCの影響を検討したところ、[^{3}H]MUS結合には影響せず、[^{3}H]TBOB結合についても高濃度でのみ有意な阻害をもたらしたが、[^{3}H]FLU結合に対しては脳内で認められるβ-カルボリン濃度に相当するnMオーダーのβ-ECCにより有意な阻害が招来された(Fig.1)。一方、Scatchard解析によって単一結合様式を示した[^{3}H]β-ECC結合に対しては、代表的な中枢型BZPのクロナゼパム(CLO)及びBZP受容体拮抗薬のRo15-1788によって、β-ECCの場合と同様の著しい阻害がもたらされた。しかしながらこれら薬物による阻害様式をLineweaver-Burk plotを用いて解析したところ、[^{3}H]FLU結合の場合、CLOとRo15-1788はVmax値に著しい変化を与えなかったが(1.31及び1.22pmol/mg protein)、β-ECCの存在下では異なったVmax値(0.76pmol/mg protein)が認められた。一方[^{3}H]β-ECC結合に関しては、β-ECCとRo15-1788の存在によってVmax値に変化は認められなかったが(0.55及び0.63pmol/mg protein)、CLOは異なったVmax値(0.15 pmol/mg protein)をもたらした(Fig.2)。β-ECC結合部位の機能的共軛機構　BZP類が[^{3}H]MUS結合を増強することはよく知られているが、この効果はβ-ECC及びRo 15-1788により拮抗された。一方、GABA$_A$受容体作働薬及びバルビツレートが[^{3}H]FLU結合を増大することもよく知られた事実であるが、[^{3}H]β-ECC結合に対して、これら薬物は逆に有意な抑制をもたらした。β-ECC結合部位の可溶化　膜分画を各種界面活性剤で処置した場合、[^{3}H]FLUおよび[^{3}H]β-ECC結合の可溶化パターンは比較的近似し、またいずれもデオキシコール酸ナトリウム(DOC-Na)処置により最も高い可溶化がもたらされた。このDOC-Na処置で得られた可溶化分画についてSephadex G-200によるゲル濾過を行なうと、[^{3}H]β-ECC結合のピ

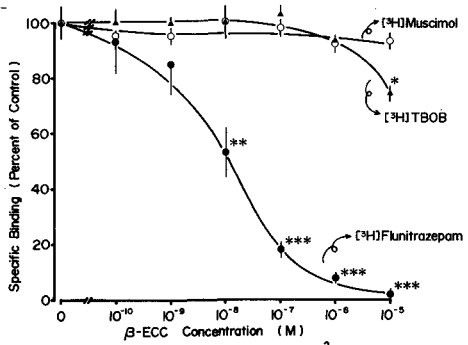


Fig.1 Effect of β-ECC on [^{3}H]muscimol, [^{3}H]flunitrazepam and [^{3}H]TBOB bindings to particulate fraction.
*P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001; as compared with control.

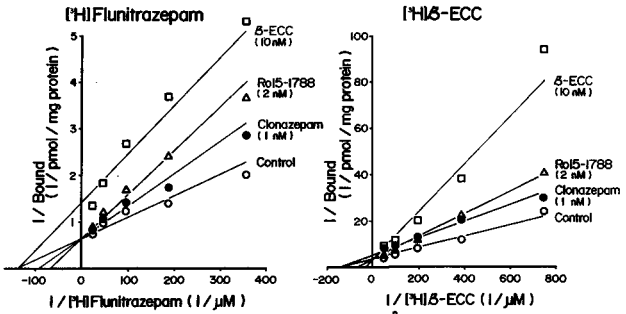


Fig.2 Lineweaver-Burk plots of [^{3}H]flunitrazepam and [^{3}H]β-ECC bindings to particulate fraction.

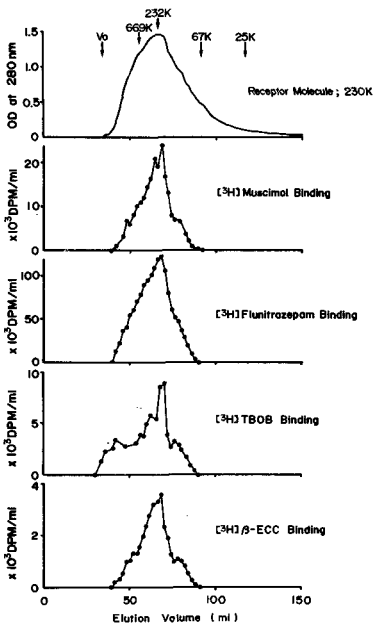


Fig.3 Gel filtration of sodium deoxycholate-solubilized fraction using Sephadex G-200.

ークは[^{3}H]MUS、[^{3}H]FLU及び[^{3}H]TBOB結合のピークと一致した分子量230,000の位置に認められた(Fig.3)。

<u>$^{36}Cl^-$ influxに対するβ－ECCの影響</u>　膜小胞への^{36}Cl influxはGABAによって増加し、この増加はGABA$_A$受容体拮抗薬であるビククリン及びCl^-チャンネル遮断薬であるピクロトキシニンによって拮抗された。この様にGABAによって増加した$^{36}Cl^-$ influxは、FLUにより有意に増強され、一方このFLUの効果は、Ro15-1788のみならずβ-ECCによっても拮抗された。さらにβ-ECCはGABAによる$^{36}Cl^-$ influxの増加を減弱させる傾向にあり、このβ-ECCの効果はRo15-1788により拮抗された(Fig.4)。

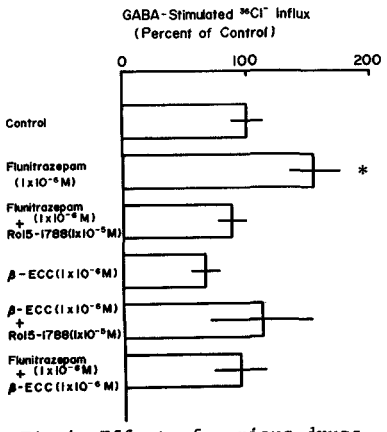


Fig.4 Effect of various drugs on GABA-stimulated $^{36}Cl^-$influx into membrane vesicles. *P<0.05; as compared with control.

[考察] CLOおよびβ-ECCはいずれも[^{3}H]FLUおよび[^{3}H]β-ECC結合を阻害したが、Lineweaver-Burk plotを用いて解析すると、CLOは[^{3}H]β-ECC結合を、一方β-ECCは[^{3}H]FLU結合をいずれも非競合的に阻害することから、[^{3}H]β-ECC結合部位と[^{3}H]FLU結合部位は異なった存在様式を示し、Ro15-1788はいずれの結合に対しても競合的阻害をもたらすことが明らかとなった。またβ-ECCが[^{3}H]MUS結合には影響せずにBZP類による[^{3}H]MUS結合の増大をRo15-1788と同様に抑制したことから、両結合部位は抑制的に作用し合っていることが考えられる。一方[^{3}H]FLU結合部位は、GABA$_A$受容体及びバルビツレート結合部位によって促進的に調節されているが、[^{3}H]β-ECC結合部位はこれら各部位によって抑制的に調節されていること、またDOC-Naで可溶化した分画のゲル濾過を行なうと、[^{3}H]β-ECC結合部位が[^{3}H]MUS、[^{3}H]FLU及び[^{3}H]TBOB結合部位と一致して溶出されたことより、[^{3}H]β-ECC結合部位は[^{3}H]FLU結合部位と同様にGABA$_A$受容体複合体上に存在しているものと考えられる。一方、膜小胞への$^{36}Cl^-$ influxはGABAによって増加したが、この増加がピクロトキシニンのみならずビククリンによって拮抗されたこと、このGABAの効果に対してFLUは有意な増加をもたらし、このFLUの効果がRo15-1788によって拮抗されたことなどから、FLU結合部位はGABA$_A$受容体を介してCl^-チャンネルの活性化をもたらしていることが考えられる。しかしながら、β-ECCは結合実験の結果と一致して、このFLUの効果に対して拮抗するだけでなくGABA単独の効果をも減弱する傾向にあり、またこのGABAに対する効果はRo15-1788によって拮抗されたことから、β-ECC結合部位はFLU結合部位の抑制のみならず、GABA$_A$受容体とCl^-チャンネルの共軛機構に対しても抑制的に働いていることが考えられる。

[文献] 1)Braestrup, C., Nielsen, M. and Olsen, C. E. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 2288-2292. 2)Cowen, P. J., Green, A. R., Nutt, D. J. and Martin, I. L. (1981) Nature 290, 54-55. 3)Harris, A. R. and Allan, A. M (1986) Science 22, 1108-1110. 4)Ito, Y. and Kuriyama, K. (1982) Brain Res. 236, 351-363. 5)King, R. G. and Olsen, R. W. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 530-536. 8)Kuriyama, K. and Taguchi, J. (1987) Neurochem. Int. 10, 253-263. 7)Taguchi, J. and Kuriyama, K. (1984) Brain Res. 323, 219-226. 8)Tenen, S. S. and Hirsch, J. (1980) Nature 288, 609-810.

37. ラット網膜〔^{3}H〕グルタミン酸結合部位の可溶化

米田幸雄・荻田喜代一　　（摂南大・薬・薬理）

〔要　約〕

ラット網膜[^{3}H]グルタミン酸(Glu)結合部位について検討した。網膜膜標品への[^{3}H]Glu結合は、大脳皮質膜標品の場合とは異なり、Cl^-、Ca^{2+}、およびNa^+のいずれのイオンによっても増強されなかった。大脳皮質の場合はアニオン輸送阻害薬によって結合が阻害されたのに対して、網膜の場合は本阻害薬による有意な変化を受けなかった。網膜を Nonidet P-40で処理した上清中には、著しい[^{3}H]Glu結合活性が検出された。この可溶化標品への結合は、用いた蛋白質量に比例して直線的に増加するとともに、反応時間依存性、反応温度依存性、可逆性および構造特異性を示した。可溶化標品中の結合部位は単一成分から構成され、そのKd値は0.25 ± 0.03μM、および Bmax値は57.4 ± 7.9 pmoles/mg proteinであった。Glu受容体の三種のアゴニストのうち、キスカル酸(QA)は濃度依存的な結合阻害作用を発揮したが、N-メチル-D-アスパラギン酸　(NMDA)およびカイニン酸(KA)は結合に著変を与えなかった。各種のアミノホスホン酸の中で、2-アミノ-3-ホスホノプロピオン酸(AP3)のみが本標品への[^{3}H]Glu結合を阻害した。以上の様に、ラット網膜可溶化標品中には、高親和性、構造特異性、温度依存性、可逆性、飽和性およびQA感受性を持つ[^{3}H]Glu結合部位が存在することが明らかとなった。

Key word：　Rat retina, [^{3}H]Glutamate binding, Quisqualic acid

L-Gluは哺乳動物においては、脳ばかりでなく網膜においても興奮性の神経情報伝達物質であると考えられている(2)。事実、そのシナプス受容体の生化学的指標であるNa^+非依存性高親和性[^{3}H]Glu結合は、網膜膜標品に極めて高いことが報告されている(6)。しかしながら、この網膜の[^{3}H]Glu結合部位の生化学的および薬理学的諸性質については、充分に解明されたとは言えないのが現状である。したがって本研究では、まず網膜膜標品と大脳皮質膜標品を用いて、両神経組織中の[^{3}H]Glu結合部位の性質の差異について比較検討した。さらに、網膜内[^{3}H]Glu結合部位の存在を確認するために、本結合部位の可溶化を試みた。

［実験方法］

膜標品の調製：ラットを断頭後、大脳皮質および網膜を摘出した(10)。両組織をともに脱イオン水でホモジナイズしたのち、ホモジネートを50,000xgで30分間遠心分離した。沈渣は50倍量の50mMトリス酢酸緩衝液(pH7.4)で同様に3回洗浄した。最終的に得られた沈渣は、0.32Mショ糖水溶液に懸濁して、-80℃で凍結保存した(5)。凍結標品は用時室温融解し、2回洗浄操作を行ったのち、結合実験に供した。

可溶化標品の調製：凍結標品を融解・洗浄後、0.5% Nonidet P-40と2℃で60分間反応させた(8)。この反応液を100,000 x g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倍量の緩衝液で2℃、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結合実験に供した(9)。

結合実験：膜標品は10 nM [^{3}H]Glu(44.6 Ci/mmol、NEN、陽イオン交換樹脂で精製)と2℃または30℃で60分間反応させたのち、Whatman GF/B グラスフィルターを用いた吸引

濾過法(7)により反応を停止した。可溶化標品の場合、反応停止は0.3%ポリエチレンイミン処理のフィルターを用いて行った(1)。

[実験結果]

膜標品: Cl^-およびCa^{2+}はともに網膜への結合に著変を与えなかったが、Na^+は大脳皮質の場合とは逆に、網膜の結合を有意に阻害した(Fig. 1)。QAは大脳皮質よりも網膜の本結合をより強く濃度依存的に阻害したが、NMDAおよびKAはともに両部位の結合に著しい変動を及ぼさなかった。大脳皮質膜標品に比べて網膜膜標品では、反応温度依存性が高いことが判明した。しかしながら、アニオン輸送阻害薬のDIDSは、大脳皮質への結合の温度依存性成分を有意に阻害したのに対して、網膜の温度依存性成分には著明な影響を与えなかった。

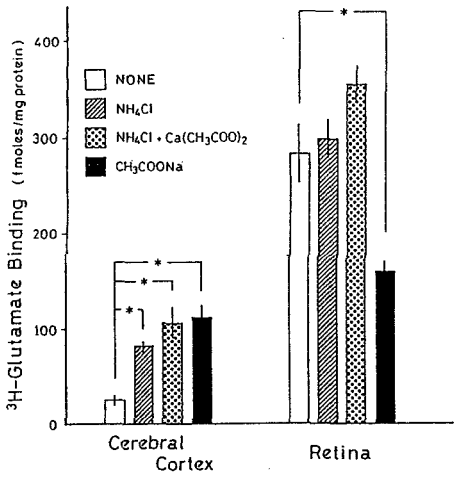


Fig. 1. Comparison of [³H]Glu binding in cerebral cortex and retina.

可溶化標品: 網膜膜標品をNonidet P-40で処理した上清中には、著しい[^{3}H]Glu結合活性が検出された。この可溶化標品への結合は、15μgまでは用いた蛋白質量に比例して直線的に増加した(Fig.2)。本結合は極めて反応温度依存性が高く、反応温度30℃の場合は2℃の場合の5倍以上高い活性が検出された(Fig.3)。いずれの反応温度においても結合は反応時間依存性を示し、反応温度30℃の場合は反応開始後約60分で結合は定常状態に達した。この時、非放射性の1 mM Gluを添加すると結合は速やかに解離し、添加後20分以内に結合は非特異的結合レベルにまで低下した(Fig.3)。リガンド濃度の上昇に伴い結合は増加したが、0.6μM付近で結合は飽和性を示した(Fig.4)。Scatchard解析の結果、可溶化網膜標品中の[^{3}H]Glu結合部位は単一成分から構成されること、およびそのKd値は0.25 ± 0.03μM、Bmax値は57.4 ± 7.9 pmoles/mg proteinであることが判明した。本結合はL-Gluにより濃度

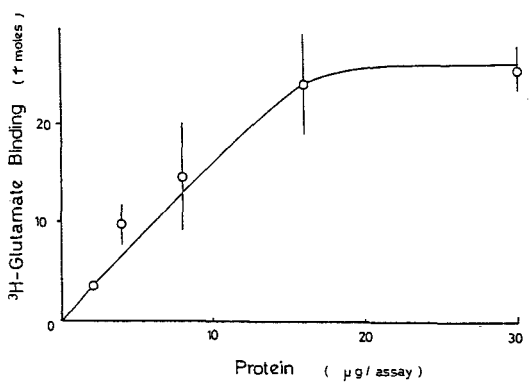


Fig. 2. Effect of protein concentrations of solubilized retinal preparations on [³H]Glu binding.

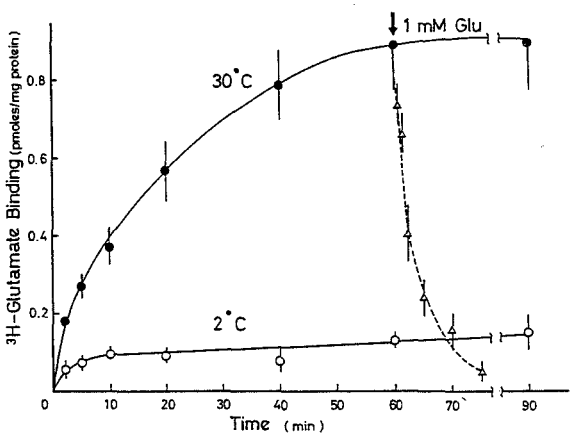


Fig. 3. Effect of incubation time and temperature on [³H]Glu binding in solubilized retina.

依存的に阻害されるばかりでなく、構造類似化合物の中ではL-システインスルフィン酸、L-アスパラギン酸(Asp)およびL-システイン酸などにより阻害された。D-GluおよびD-Aspにはこの様な強い結合阻害作用は見出せなかった。脳内Glu受容体の三種類のアゴニストのうち、QAは濃度依存的に結合を阻害したが、NMDAおよびKAは結合に著変を与えなかった。各種のアミノホスホノ化合物の中で、AP3は本結合を阻害したが、2-アミノ-4-ホスホノ酪酸、2-アミノ-5-ホスホノ吉草酸、2-アミノ-6-ホスホノヘキサン酸および2-アミノ-7-ホスホノヘプタン酸は、同濃度範囲内(10^{-6}-10^{-4} M)では結合に有意な影響をおよぼさなかった。

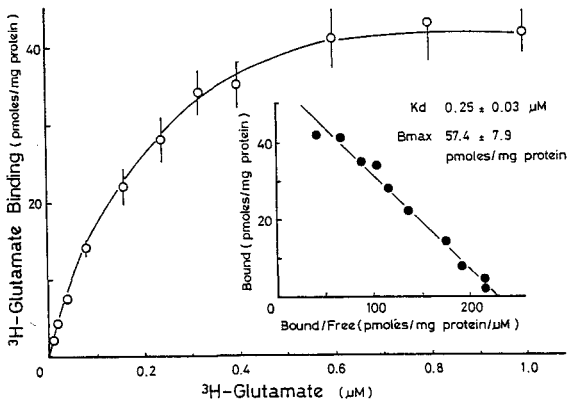


Fig. 4. Scatchard plot of [^{3}H]Glu binding in solubilized retinal preparations.

[考察]

大脳皮質膜標品と網膜膜標品との比較検討により、網膜内の[^{3}H]Glu結合部位の生化学的および薬理学的諸性質は、大脳皮質の場合とは明確に異なることが明らかとなった。すなわち、1) Na^+依存性結合が検出されないこと、2) QAに対する感受性が高いこと、3)反応温度依存性が高いこと、および 4) アニオン輸送阻害薬の阻害を受けないこと、などである。特に、Cl^-が結合を増強しないことを考慮すると、網膜内の[^{3}H]Glu結合部位は「バンド 3」として知られる(4)アニオン輸送蛋白質との間の相互作用(6)を持たない可能性が示唆される。また、Gluが情報伝達物質としての機能を持つにもかかわらず、そのシナプス伝達不活性化機構を反映するものと理解される(3)Na^+依存性結合が、網膜内に検出されない原因も今後早急に解決されなければならない問題の1つである。一方、網膜内[^{3}H]Glu結合部位はNonidet P-40により可溶化され、この可溶化結合部位が構造選択性、温度依存性、蛋白依存性、可逆性、高親和性および飽和性を示すことが明らかとなった。可溶化標品中の[^{3}H]Glu結合で特徴的なことは、各種のアミノホスホノ化合物の中で、AP3が選択的な結合阻害作用を発揮することである。今後、このAP3の薬理学的解析とともに、本結合部位の単離・精製を進める予定である。

[謝辞]

本研究の一部は学校法人大阪工業大学中央研究所一般助成金(87-613)の援助のもとに行った。

[文献]

1. Bruns, S.R., Lawson-Wendling, K. and Pugsley, T.A. (1983) Anal. Biochem. 132, 74-81.
2. Dowling, J. E. and Ripps, H. (1973) Nature 242, 101-103.
3. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1986) Brain Res. 397, 137-144.
4. Ross, A.H. and McConnel, H.M. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4777-4782.
5. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1986) Brain Res. 383, 387-391.
6. Yoneda, Y., Ogita, K., Nakamuta, H., Koida, M., Ohgaki, T. and Meguri, H. (1986) Neurochem. Int. 9, 521-531.
7. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1987) Brain Res. 400, 70-79.
8. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1987) Brain Res. 406, 24-31.
9. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1987) Biochem. Biophys. Res. Comm. 142, 609-616.
10. Yoneda, Y., Ogita, K., Nakamuta, H., Fukuda, Y., Koida, M. and Ogawa, Y. (1987) Biochem. Pharmacol. 36, 772-774.

38. ラット脳mRNAの注入によりアフリカツメガエルの卵母細胞膜に誘導したカイニン酸レセプターチャネルの性状

辻　村　良太郎・黒　田　英　世*・寺　岡　　宏**
（三重大・医・精神，名古屋大・理・臨海実験所*，塩野義研**）

〔要　約〕

アフリカツメガエル卵母細胞の静止膜電位は −50～−60 mV で，静止状態において卵母細胞膜に対して，K^+ イオンのみならず，Na^+ イオン及び Cl^- イオンが透過性をもっている。グルタミン酸，カイニン酸，キスカリン酸及び N−メチル−D−アスパルギン酸は 10^{-3}M の濃度で，ラット脳の mRNA 未注入の卵母細胞の静止膜電位に影響を与えなかった。ラットの大脳皮質，線条体及び海馬より分離抽出した mRNA を注入し，レセプターチャネルを誘導したアフリカツメガエルの卵母細胞のカイニン酸に対する反応を検索した。カイニン酸に対する反応はすべて脱分極性で，(i)投与後，急速に脱分極しそのまま数十分にわたりほとんど再分極しないもの (ii)スパイク状の脱分極及びそれに続くゆっくりしたプラトー状の脱分極よりなる反応 (iii)スパイク状の電位変化のみの三種類の反応が認められた。上記三種類の反応は興奮性アミノ酸の拮抗薬である D−α−アジピン酸，2−アミノ−4−フオスフオノブチル酸，グルタミン酸ジエチルエステル並びに γ−D−グルタミールグリシンの 10^{-3}M の濃度で抑制できなかった。また同一卵母細胞にカイニン酸を繰返し投与しても同一の反応がおこり，カイニン酸に対する反応は脱感作されなかった。

Key word：mRNA, Xenopus oocytes, Kainate receptor-channel

【はじめに】

グルタミン酸は哺乳動物等の中枢神経系シナプス並びに節足動物の神経筋接合部における神経伝達物質として機能しているが，そのレセプターチャネルの研究は遅れている。Miledi 一派により開発された技術を適用し (5)，私達はラット脳より分離抽出した mRNA をアフリカツメガエルの卵母細胞に注入することにより，卵母細胞膜上にレセプターチャネルを誘導し，電気生理学的にレセプターチャネルの性質を調べれば，分子レベルでのグルタミン酸レセプターチャネルの挙動の一端を明らかにすることが出来ると考えて本実験を行った。

【材料および方法】

(1) mRNA の分離抽出：Wistar 系雄ラットの大脳皮質，線条体，海馬より Phenol 法 (2) で全 RNA を抽出し，oligo-(dT)-cellulose カラムクロマトグラフィー (8) により mRNA を分離抽出した。

(2) 卵母細胞への mRNA の注入：成熟雌アフリカツメガエルを冷却麻酔し，卵巣を部分摘出し，stage V～VI の卵母細胞 (3)を単離した。この卵母細胞を室温で 1 時間 collagenase 処理 (1 mg collagenase/1 ml Barth 溶液)し，その卵母細胞に mRNA を 30～50 ng 寺岡らの方法 (10)を改良して注入し，Barth 溶液 (1)の中で 3～4 日間 20℃ で静置培養した。

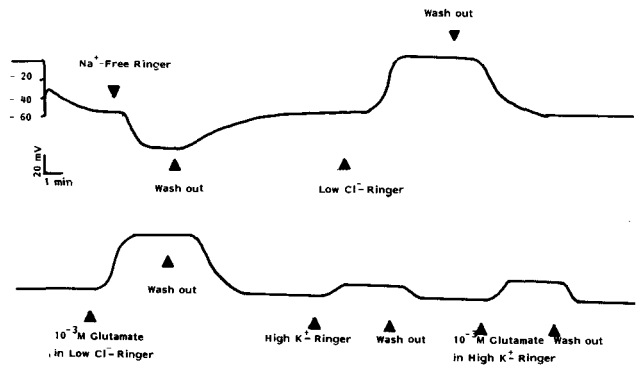
(3) 電気生理学的解析：小さな Chamber (容量 1.2 ml) の底に半球状の穴を作り，そこに卵母細胞を静置固定し，両棲類用 Ringer 溶液を 1 分間 2 ml の速さでかん流し，卵母細胞膜の電気特性及び mRNA により誘導されたグルタミン酸レセプターチャネルの解析を通常の微小電極法で行った。グルタミン酸とそのアナローグ (カイニン酸，キスカ

リン酸，N−メチル−D−アスパルギン酸）並びに拮抗薬物（D−α−アジピン酸，2−アミノ−4−フオスフオノブチル酸，グルタミン酸ジエチルエステル，γ−D−グルタミールグリシン）は Ringer 溶液に溶解してかん流，或はマイクロピペットで卵母細胞膜上に直接投与して反応を検索した。

【結果および考察】

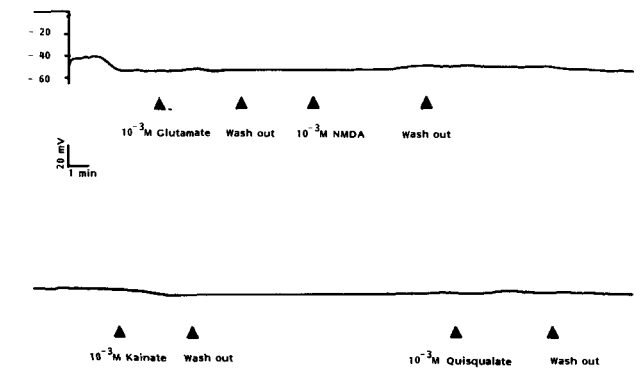
卵母細胞を collagenase 処理すると静止膜電位は深くなるが，アフリカツメガエル卵母細胞の静止膜電位は −50～−60 mV であった。図 1 に示した如く，Na^+-Free Ringer 液でかん流すると膜電位は深くなり過分極側に変動する。Low Cl^--Ringer 液でかん流すると膜電位は浅くなり脱分極側に変動する。これらの所見は K^+ イオンのみならず，Na^+ イオン及び Cl^- イオンが静止状態において，卵母細胞膜に対して透過性をもっていることを示唆している。

Fig. 1 Effects of sodium and chloride ions on resting membrane potential of Xenopus oocytes

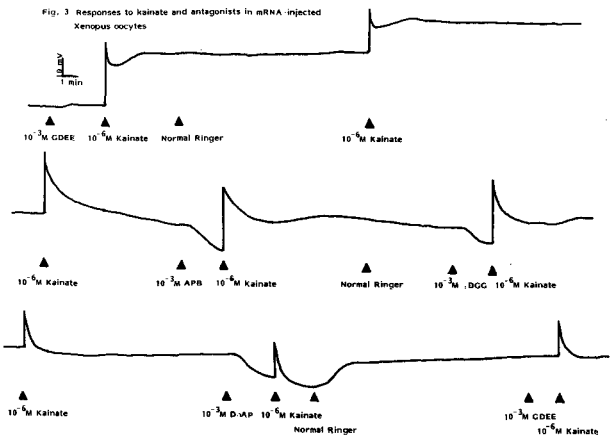


グルタミン酸レセプターは薬理学的，電気生理学的研究から，N−メチル−D−アスパルギン酸型，カイニン酸及びキスカリン酸型の三種類に分類されている（4，11）。従って mRNA の注入により卵母細胞膜上にレセプターチャネルを誘導し，その性状を電気生理学的に調べるにあたり，グルタミン酸，N−メチル−D−アスパルギン酸，カイニン酸及びキスカリン酸に対して，mRNA 未注入の卵母細胞が反応しないことを確認しておく必要がある。図 2 に示した如く，グルタミン酸，カイニン酸，キスカリン酸及び N−メチル−D−アスパルギン酸は 10^{-3}M の高濃度でも mRNA 未注入の卵母細胞の静止膜電位に殆んど影響を与えなかった。従ってラット脳 mRNA を注入した卵母細胞をグルタミン酸とそのアナローグでかん流した時，或いはマイクロピペットで卵母細胞膜上に直接投与した時に生じる電気生理学的反応は mRNA により誘導されたレセプターチャネルの反応と考えることができる。

Fig. 2 Effects of L-glutamate and its analogues on resting membrane potential of Xenopus oocytes



ラット脳より分離抽出した mRNA を注入し，3～4 日間，静置培養した卵母細胞はグルタミン酸，カイニン酸，キスカリン酸並びに，N−メチル−D−アスパルギン酸の 10^{-6}～10^{-8}M の低濃度で膜電位に変化をおこした。多くは静止膜電位（−50～−60 mV）を脱分極の方向に変



化させたが，時には過分極性の変化を示すものもあった。この差が何に起因するのか今のところ不明である。mRNA はラットの大脳皮質，線条体及び海馬より分離抽出したものを用いたが，レセプターチャネルの誘導能に関して脳の部位による差は認められなかった。

今回，私達は mRNA 注入卵母細胞のカイニン酸に対する反応に焦点をあてて検索した。図3に示した如く，カイニン酸に対する反応はすべて脱分極性で，(i)投与後，急速に脱分極しそのまま数十分にわたりほとんど再分極しないもの (Type1) (ii)スパイク状の脱分極及びそれに続くゆっくりしたプラトー状の脱分極よりなる反応 (Type2) (iii)スパイク状の電位変化のみ (Type3) の三種類の反応が認められた。上記三種類の反応は興奮性アミノ酸の拮抗薬である D-α-アジピン酸，2-アミノ-4-フオスフオノブチル酸，グルタミン酸ジエチルエステル並びに γ-D-グルタミールグリシンの 10^{-3}M の濃度で抑制できなかった。また同一卵母細胞にカイニン酸を繰返し投与しても同一の反応がおこり，カイニン酸に対する反応は脱感作されなかった。

レセプターの薬理学的結合実験によるとカイニン酸は二種類の部位を認識すると考えられている (6,7)。一方，山本ら (9) のモルモット海馬切片を用いた電気生理学的研究によると，カイニン酸により二種類のレセプターが活性化され，急速におこるスパイク状の脱分極反応とそれに続くゆっくりしたプラトー状の脱分極よりなる反応を示すことが報告されている。山本らのこの反応は私達の Type 2 の反応に酷似している。私達はラット脳 mRNA を注入培養したアフリカツメガエルの卵母細胞が，カイニン酸に対し三種類の反応をひきおこすことを示したが，Type1 と Type3 はそれぞれ別個の反応で，Type2 は Type1 と Type3 の混合型と考えると，薬理学的結合実験結果並びに山本らの電気生理学的結果とよく一致する。今後，voltage clamp 法を用いて二つの脱分極成分について検討する予定である。

【文献】

1. Barth, L.G., and Barth, L.J. (1959) J. Embryol. Exp. Morphol. 7, 210-222
2. Brawerman, G. (1974) Methods Emzymol. 30, 605-612
3. Dumont, J.N. (1972) J. Morphol. 136, 153-179
4. Foster, A.C., and Fagg, G.E. (1984) Brain Res. Rev. 7, 103-164
5. Gundersen, C.B., Miledi, R., and Parker, I. (1984) Nature 308, 421-424
6. Honore, T., Drejer, J., and Nielsen, M. (1986) Neurosci. Letters 65, 47-52
7. London, E.D., and Coyle, J.T. (1979) Mol. Pharmacol. 15, 492-505
8. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 197-198
9. Sawada, S., and Yamamoto, C. (1984) Brain Res. 324, 279-287
10. 寺岡　宏，玉木幹男，田中兼太郎　(1981)　蛋白質核酸酵素 26, 330-335
11. Watkins, J.C., and Evans, R.H. (1981) Ann. Rev. Pharmacol . Toxicol. 21, 165-204

39. 前シナプスのムスカリン性アセチルコリン受容体の多様性 —— 神経伝達物質放出における新規M_1アゴニストAF102Bの効果

小野　聡・岩本佳代子・川西悟生・溝部文夫
（雪印乳業・生科研・神経化学）

〔要　約〕

前シナプス膜のムスカリン性アセチルコリン受容体は、コリン性神経終末にだけでなく(autoreceptor)、ドーパミン性神経終末にも存在し(heteroreceptor)、神経伝達物質の放出を制御していることが知られている。本研究では、この２種類の受容体のサブタイプの異同を明らかにするために、新規ムスカリン性M_1アゴニストAF102B (SND-5008; cis-2-methylspiro-(1,3-oxathiolane-5,3')-quinuclidine) のラット脳海馬からのアセチルコリン(ACh)放出および線条体からのドーパミン(DA)放出に及ぼす影響について検討した。AF102BおよびオキソトレモリンはDA放出を抑制し、その際、AF102Bはオキソトレモリンより高濃度（約30倍）が必要であった。一方、線条体からの^{3}H-DA放出は、AF102Bまたはオキソトレモリンの存在下で、濃度依存的に促進された。この場合は、AF102Bはオキソトレモリンより低濃度（約1/5)で効果を表わした。ピレンゼピン（選択的M_1アンタゴニスト）によるオキソトレモリン効果の拮抗は、ACh放出よりDA放出においてより低濃度で観察された。以上の結果から、ムスカリン性autoreceptorとheteroreceptorはピレンゼピンだけでなくAF102Bに対しても異なる感受性を示し、両者が異なるサブタイプに属する可能性の高いことが判った。

Key word : neurotransmitter release, presynaptic muscarinic receptors, M_1 agonist

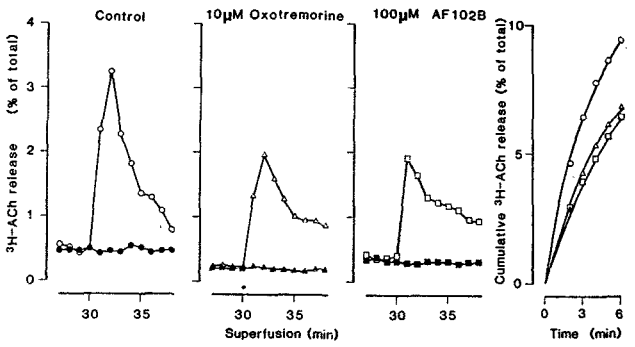
ムスカリン性アセチルコリン受容体は、ピレンゼピンおよびMcN-A-343 に対して高親和性のM_1型と低親和性のM_2型に分類されている (3,1)。ムスカリン性受容体の中枢神経系における機能に関する研究の１つに、神経終末からの伝達物質の放出実験がある。前シナプス膜に存在するムスカリン性受容体には、AChの放出を制御するautoreceptorとDAの放出を制御するheteroreceptorの少なくとも２種類があり、これらを介してムスカリン性アゴニストはACh放出を阻害する一方、DA放出を促進することが報告された。さらに、M_1アンタゴニストであるピレンゼピンに対する両者の感受性の違いから、それぞれは異なるサブタイプに属するとする提案がなされている (6)。そこで本研究では、ラット脳シナプトゾームからの神経伝達物質放出実験を通して、autoreceptorとheteroreceptorに対する新規ムスカリン性M_1アゴニストAF102Bの作用を調べ、両受容体のサブタイプについて検討した。

【方　法】

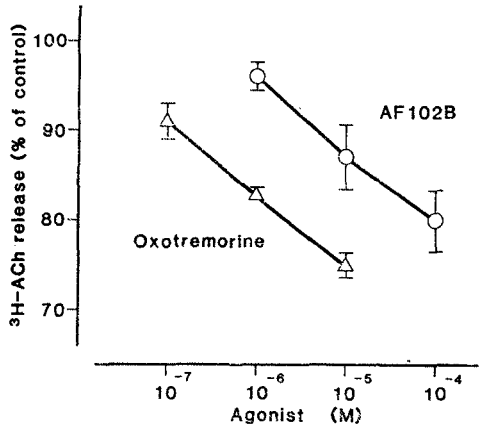
SD系雄性ラットを断頭後、海馬および線条体を切り出し、常法によりシナプトゾームを調製した。海馬シナプトゾームは ^{3}H-コリン(0.8μM)を含む緩衝液中で30℃、6分間インキュベート後、灌流法により^{3}H-ACh放出実験を行なった。20mlの緩衝液で洗浄後、薬物を添加し、25mM K^+を含む緩衝液で刺激したときに放出される^{3}H-ACh量を測定した。同様に、線条体シナプトゾームは^{3}H-DA(0.01μM)を含む緩衝液中で37℃、10分間インキュベートし、刺激は15mM K^+を用いた。^{3}H-ACh と ^{3}H-コリンの分離はMarchiら(5) の方法に従って行ない、放出 ^{3}H-DAの精製・分離は Smithら(7) の方法に従った。

【結　果】

ラット海馬シナプトゾームからの^{3}H-ACh放出はCa^{2+}依存的であった。10μM オキソトレモリンおよび 100μM AF102Bのいずれも 25mM K^+刺激による^{3}H-ACh放出を抑制した（図．１）。これらの抑制は 3μM アトロピンによって拮抗された。AF102Bおよびオキソトレモリンの^{3}H-ACh放出の抑制は濃度依存的であり、その際、AF102Bはオキソトレモリンより高濃度（約30倍）が必要であった（図．２）。



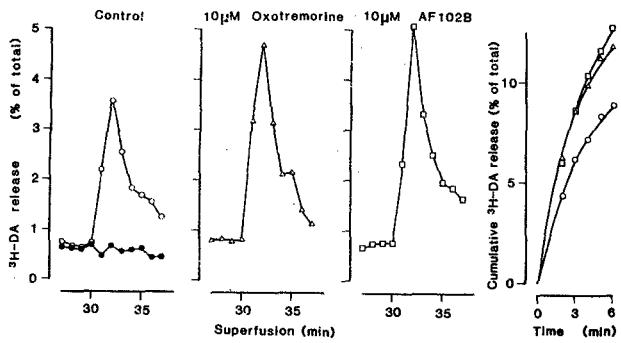
図．１　ムスカリン性アゴニストによる^{3}H-ACh放出の阻害
Basal　（●，▲，■）
K^+-evoked　（○，△，□）



図．２　^{3}H-ACh放出におけるムスカリン性アゴニストの阻害効果の濃度依存曲線

ラット線条体シナプトゾームからの ^{3}H-DA放出もまたCa^{2+}依存的であった。10μM オキソトレモリンおよび10μM AF102Bのいずれも 15mM K^+刺激による ^{3}H-DA放出を促進し（図．３）、それらの促進作用は 5μM アトロピンによって阻害された。AF102Bおよびオキソトレモリンの ^{3}H-DA放出の促進も濃度依存的であった。この場合は、AF102Bはオキソトレモリンより低濃度（約1/5)で効果を表わした（図．４）。

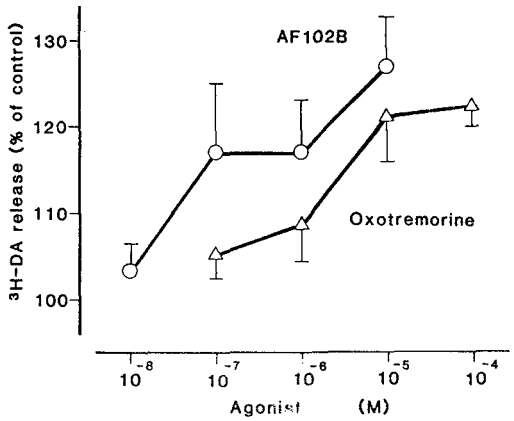
10μM オキソトレモリンによる^{3}H-ACh放出阻害および^{3}H-DA 放出促進、共にピレンゼピンにより濃度依存的に拮抗された。その拮抗作用は、 ACh放出よりDA放出においてより低濃度（約1/70）で観察された（図．５）。



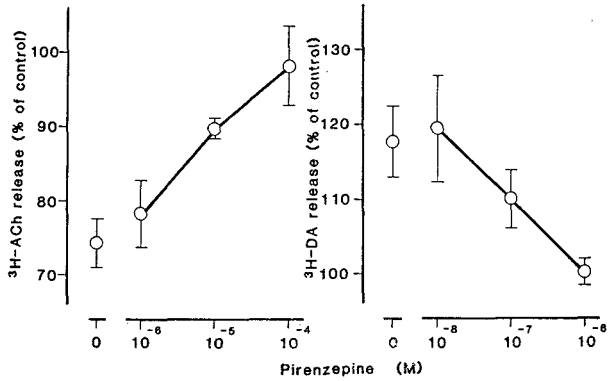
図．３　ムスカリン性アゴニストによる ^{3}H-DA放出の促進

【考　察】

オキソトレモリンとAF102Bは、ラット海馬の前シナプス膜に存在するムスカリン性autoreceptorと線条体の前シナプス膜に存在するheteroreceptorに作用し、それぞれにおいて^{3}H-ACh放出の抑制効果と ^{3}H-DA放出の促進効果を示した。その際のオキソトレモリンの有効濃度と比較すると、AF102Bは、ACh 放出ではより高い（約30倍）、また、DA放出ではより低い（約1/5)濃度で活性を示した。このことは、AF102B



図．4　^{3}H-DA 放出におけるムスカリン性アゴニストの促進効果の濃度依存曲線



図．5　神経伝達物質放出におけるオキソトレモリン効果に対するピレンゼピンの拮抗効果の濃度依存曲線

に対して、heteroreceptorはautoreceptorに比べてきわめてsensitiveであることを示している。AF102Bは^{3}H-QNB結合実験（M_1型受容体に富む前頭葉皮質とM_2型受容体に富む小脳とを使った比較実験）(2) およびウサギ上頸交感神経節での電気生理学的実験(4) により選択的M_1アゴニストであることが明らかにされている。また、heteroreceptorは、オキソトレモリン効果の拮抗作用を示したピレンゼピン（選択的M_1アンタゴニスト）に対しても、autoreceptorより、よりsensitiveであった。これは、Raiteriらの報告 (6)とも一致する。以上の結果は、前シナプス膜に存在するムスカリン性受容体には少なくとも２種類あり、autoreceptorとheteroreceptorがそれぞれM_2とM_1サブタイプに対応するという説を支持するものと考えられる。

【文　献】

1. Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.U., Hulme, E.C., Stockton, J.M. and Zigmond, M.J. (1983) Br. J. Pharmacol. 78; 257-259
2. Fisher, A., Heldman, E., Brandeis, R., Pittel, Z., Dachir, S., Levy, A. and Karton, I. (1986) Soc. Neurosci. Abstr. 12; 702
3. Hammer, R., Berrie, C.P., Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.U. and Hulme, E.C. (1980) Nature 283; 90-92
4. Kobayashi, H., Mochida, S., Mizobe, F. and Katayama, S. (1987) Abstr. for the Third International Symposium on Subtypes of Muscarinic Receptors. Sydney, Australia. (in press)
5. Marchi, M., Paudice, P. and Raiteri, M. (1981) Eur. J. Pharmacol. 73; 75-79
6. Raiteri, M., Leardi, R. and Marchi, M. (1984) J. Pharmacol. Exp. Ther. 228; 209-214
7. Smith, J.E., Lane, J.D., Shea, P.A., McBride, W.J. and Aprison, M.H. (1975) Anal. Biochem. 64; 149-169

40. 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞におけるホスホリパーゼCを介する情報伝達機構に連関したアセチルコリン受容体のムスカリン受容体からニコチン受容体への変換

笹川展幸・中木敏夫・山本　慧・加藤隆一
（慶応大・医・薬理）

〔要　約〕

牛副腎髄質クロマフィン細胞初代培養系を用いイノシトール三燐酸生成と細胞内 Ca^{2+} 動員に連関するアセチルコリン受容体の培養時間に伴う変換について検討した。単離後 0.5日間培養した細胞では、ムスカリンはイノシトール三燐酸生成と細胞内 Ca^{2+} 動員を惹起する効力がニコチンに比べ強かった。しかし、単離後 5日間培養した細胞では、両薬物の効力は逆転した。単離後 0.5 日では、アトロピンはカルバコールによるイノシトール三燐酸生成を強く抑制したが、単離後5 日では、その効果は著しく減弱した。また、ヘキサメソニウム、d－ツボクラリンは単離後 5 日におけるカルバコールによるイノシトール三燐酸生成を単離後 0.5日に比べ強く抑制した。一方、単離後5 日の細胞においてもムスカリン受容体は存在し、 cGMP 生成機能を有していた。これらの結果は、初代培養期間中にイノシトール三燐酸生成と細胞内 Ca^{2+} 動員にいたる情報伝達機構に連関したアセチルコリン受容体がムスカリン受容体からニコチン受容体に変換した事を示唆している。

Key word : Phospholipase C , Cholinergic receptors, Receptor coupling conversion

各種細胞において、イノシトール三燐酸生成が受容体刺激に伴う細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウム遊離に重要であることが指摘されている[1]。我々は以前、培養牛副腎髄質クロマフィン細胞において、ムスカリン受容体ではなくニコチン受容体刺激により細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウム遊離が惹起されることを報告した[2]。この以外な事実の解釈として、1) ニコチン受容体刺激によりイノシトール三燐酸生成が起こり細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウム遊離が惹起される。 2) ニコチン受容体はイノシトール三燐酸生成とは連関しておらず、イノシトール三燐酸生成以外の機構が活性化されカルシウム遊離が惹起される。以上の 2つの可能性が考えられたので、この点について検討した。一方、単離直後の牛副腎髄質クロマフィン細胞では、同一の細胞、同一の方法で細胞内遊離カルシウム濃度を測定しているにも関わらず、我々の結果と異なりムスカリン受容体刺激によりカルシウム遊離が惹起されるという報告がある[3]。我々は初代培養の期間が重要な実験条件ではないかと考え以下の実験を行った。

〔実験方法〕単離後 0.5 及び 5日間培養した牛副腎髄質クロマフィン細胞を用いた。イノシトール三燐酸生成は 12 時間 myo-〔2-^{3}H〕inositolを細胞に取り込ませ、刺激後生成されたイノシトール三燐酸をイオン交換樹脂を用い分離した。イノシトール三燐酸の異性体はイノシトール三燐酸分画をイオン交換高速液体クロマトグラフィーにかけ分離した。細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウム遊離に伴う細胞内遊離カルシウム濃度上昇は、fura-2を取り込ませた細胞をカルシウム除去 Locke's 液中で各作働薬で刺激した時に生じる蛍光強度の変化より算出した。

〔結果及び考察〕　細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウム遊離を惹起するアセチルコリン

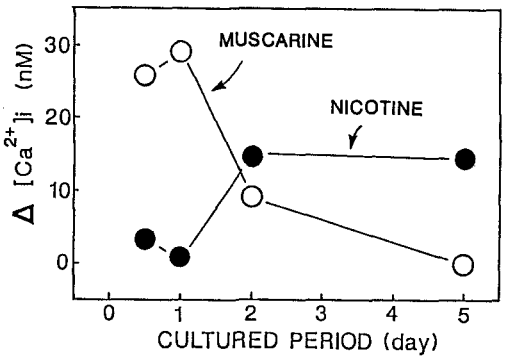


Fig. 1. Changes in muscarine- and nicotine-induced Ca^{2+} release from intracellular stores during the primary culture of adrenal chromaffin cells.
Peak values of net increase in the fluorescence intensity by agonists (excitation at 340 nm and emission at 500 nm) observed at 10-15 s after stimulation were plotted as an augmentation of intracellular Ca^{2+} concn. ($[Ca^{2+}]i$). The basal level of $[Ca^{2+}]$ was about 100 nM throughout the culture periods.

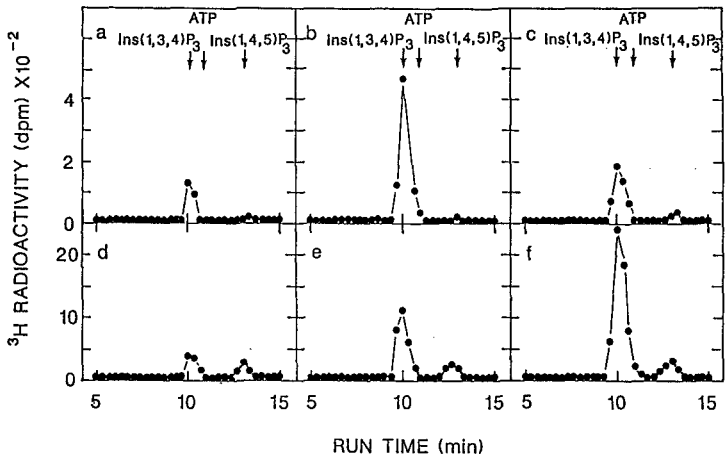


Fig. 2. Separation of isomers of $InsP_3$ by h.p.l.c. in the the adrenal chromaffin cells cultured for 0.5 day (a,b,c) and 5 days (d,e,f).
The cells prelabelled with $[^3H]$inositol were stimulated by muscarine (100 μM) (b,e) or nicotine (100 μM) (c,f) for 2 min. Arrows show the peaks of ATP, authentic $[^3H]Ins(1,4,5)P_3$ (New England Nuclear) and $[^3H]Ins(1,3,4)P_3$. Results from one experiment, which is typical of two that gave similar results, are shown. a and d are data on unstimulated cells.

受容体の種類について培養期間を追って検討した (Fig. 1). 培養の初期 (0.5 - 1日) ではムスカリン受容体作働薬であるムスカリンはニコチン受容体作働薬であるニコチンに比べカルシウム遊離を惹起する効果がおおきかった。しかし、培養の後期 (2 - 5日) ではニコチンの効果が増大した。この結果は培養中に細胞内 Ca^{2+} 動員に連関する受容体がムスカリン受容体からニコチン受容体に変換する事を示しており、以前の報告[2,3] の矛盾を説明するものと思われた。受容体刺激に伴う細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウム遊離には、イノシトール三燐酸生成が密接に関係していると思われるので培養期間が 0.5 日と 5 日の細胞を用いて、イノシトール三燐酸生成を惹起するアセチルコリン受容体の種類について検討した (Fig. 2). カルシウム除去 Locke's 液中においてもアセチルコリン受容体刺激に伴いイノシトール三燐酸生成は有意に増加するが、以後の解析の指標に用いるには小さすぎるので、実験はカルシウム存在下で行った。0.5 日培養した細胞では、ムスカリン (100 μM) はニコチン (100 μM) に比べイノシトール三燐酸生成効果が大きかった。 5日間培養した細胞では、ニコチンの効果はムスカリンに比べ大きく両者の関係は逆転した。どちらの培養期間の細胞においても、刺激後 2分で生成されるイノシトール三燐酸の異性体は主にイノシトール-1,3,4- 三燐酸であった。次にムスカリン受容体とニコチン受容体の特異的な作働薬 (Fig. 3) および拮抗薬 (Fig. 4) のイノシトール三燐酸生成に対する濃度依存性について検討した。0.5 日間培養した細胞では、ムスカリンはニコチンに比べ、より効果的であるが (Fig. 3a) 、 5日間培養した細胞では、ニコチンがより大きな効果を示した (Fig. 3b) 。さらに、0.5 日間培養した細胞では、アトロピンはカルバコールによるイノシトール三燐酸生成を強く抑制したが、ヘキサメソニウムの抑制効果は弱く (Fig. 4a) 、 5日間培養した細胞では、アトロピンによる抑制効果は大きく減弱し、ヘキサメソニウムの抑制

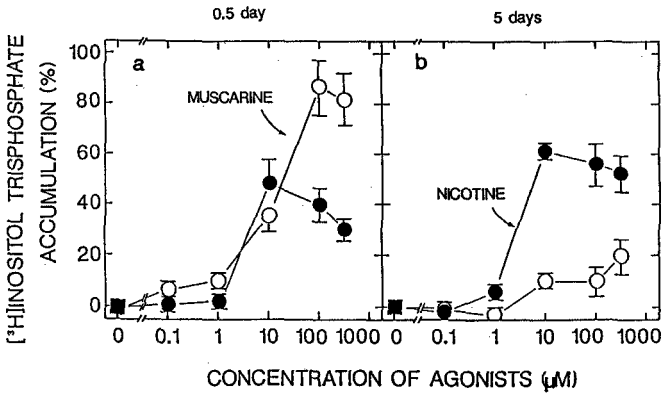


Fig. 3. Effect of muscarinic and nicotinic agonists on $InsP_3$ accumulation in the adrenal chromaffin cells cultured for 0.5 (a) and 5 days (b). [^{3}H]Inositol (10 μCi/dish)-prelabelled cells were stimulated by specific agonists for 2 min. At 0.5 day in culture (a), the basal and the maximal levels of $InsP_3$ were 500±70 and 1,100±60 d.p.m., respectively. At 5 days in culture (b), the basal and the maximal levels were 1,200±400 and 2,900±1080 d.p.m., respectively.

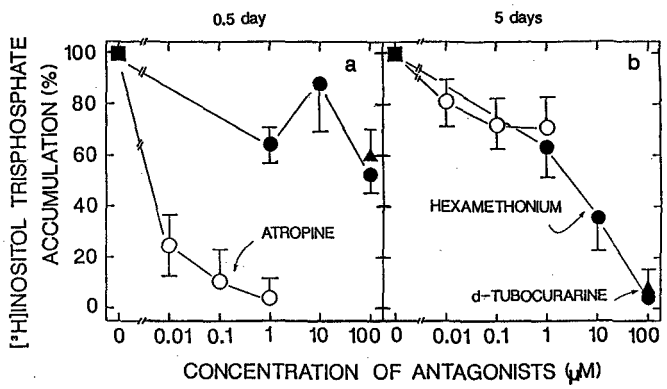


Fig. 4. Effect of muscarinic and nicotinic antagonists on carbachol-induced $InsP_3$ accumulation in the adrenal chromaffin cells cultured for 0.5 (a) and 5 days (b). Antagonists were added 3 min before the addition of carbachol. Incubation with carbachol lasted 2 min. At 0.5 day in culture (a), the basal and the maximal levels of $InsP_3$ were 500±60 and 1,400±300 d.p.m., respectively. At 5 days in culture (b), the basal and the maximal levels were 1,600±400 and 3,700±1100 d.p.m., respectively.

効果は昂進した（Fig. 4b）。また、ニコチン受容体の特異的な拮抗薬であるd－ツボクラリンもヘキサメソニウムと同様の効果を示した（Fig. 4a,b）。 一方、0.5 日および 5日間培養した細胞の膜分画においてムスカリン受容体の結合実験を〔^{3}H〕QNB を用いて行ったが、K_d また B_{max} ともに培養日数による変化は認められなかった。さらに 5日間培養した細胞においてもムスカリン受容体を介した cGMP 生成機能は認められた。

以上の結果から、イノシトール三燐酸生成と連関したアセチルコリン受容体が培養中にムスカリン受容体からニコチン受容体に変換する事が示唆された。更に、イノシトール三燐酸生成を惹起する受容体の変化と細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウム遊離を惹起する受容体の変化が良く一致したことから、単離後5 日間培養した細胞におけるニコチン受容体刺激に伴う細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウム遊離には、イノシトール三燐酸生成が重要な役割を果たしていることが示唆された。

〔参考文献〕

1. Berridg, M. J., and Irvine, R. F. (1984) Nature 312, 351-321
2. Sasakawa, N, Ishii, K., and Kato, R. (1986) Neurosci. Lett. 63, 275-279
3. Kao, L. S., and Schneider, A. S. (1985) J. Biol. Chem. 260, 2019-2022

41. 膵酵素分泌系を実験モデルとしたＣＣＫ受容体の調節機構に関する研究

神谷大雄・本多健治・斉藤　亮・武田泰生・
高野行夫・山内武司　（福岡大・薬・薬理）

〔要　約〕

ラット膵腺房細胞を用いてcholecystokinin octapeptide (CCK-8)によるamylase分泌作用、イノシトール・リン脂質代謝に伴うinositol phosphates (IPs)蓄積、cAMPおよびcGMPの蓄積への影響、並びに3H-CCK-8の膵腺房細胞への結合量とをそれぞれ調べ、CCK受容体結合からamylase分泌に至る細胞内情報伝達機構について検討した。CCK-8によるamylase分泌は、比較的低濃度(2×10^{-12}M～4×10^{-10}M)のCCK-8で急激に上昇し、次いで4×10^{-10}M以上の高濃度では分泌の減少に転じる二相性を示した。このようなCCK-8によるamylase分泌作用の二相性は、cGMP蓄積と殆ど一致した。1×10^{-7}M CCK-8のamylase分泌量は、4×10^{-10}M CCK-8による最大分泌量の50%以下に抑制されたが、この高濃度のCCK-8による分泌の抑制効果はprotein kinase C(PKC)の阻害剤と考えられているpolymyxin Bの添加により消失し、4×10^{-10}M CCK-8による最大分泌量までに回復した。一方、CCK-8によるcAMP蓄積を示す濃度作用関係はamylase分泌およびcGMP蓄積の濃度作用関係に比べ、高濃度のCCK-8で発現し、1×10^{-7}M CCK-8でcAMPは最大蓄積を示した。以上の成績からCCK-8によるamylase分泌は受容体刺激を介するIPs蓄積の上昇、PKCの活性化を伴う細胞内情報伝達機構さらにGTP結合制御タンパク質(G-タンパク質)を介して調節されていることが示唆された。

Key word：cholecystokinin, amylase secretion, transmembrane control

Cholecystokinin(CCK)の生理活性発現に必要な最小分子体がそのC端側８個のアミノ酸残基に相当するCCK octapeptide(CCK-8)であり、これが消化管のほかに脳にも存在することが明らかにされている。脳内に存在するCCK-8は中枢のドパミン性神経機能にも関与することは、著者らも行動薬理学的検討を行ない報告した(5,6)。さらに著者らは^{3}H-propionylated CCK-8(^{3}H-CCK-8)を用いた結合実験から、末梢の膵腺房細胞と大脳皮質を主とする中枢の主要部位でのCCK受容体の性質を比較した(7,8)。　一方、受容体の活性化から生理作用発現に至る細胞内情報伝達の過程にGTP結合制御タンパク質(G-タンパク質)の関与の可能性が、膵腺房細胞CCK受容体についても示唆されている(1,3)。そこで今回は膵腺房細胞を実験モデルに用い、CCKによる酵素分泌系に関連する細胞内情報伝達機構を検討した。

【実験方法】

1)動物：Wistar系雄性ラット(200±20g)を全ての実験に用いた。

2)amylase分泌量の測定：動物を断頭後、膵を摘出し湿重量10～15mgの細切片標本を作り、0.02% bacitracin, 1000KIU/ml aprotininおよび0.2% BSA含有Krebs-Ringer bicarbonate(KRB)溶液(pH7.4)に浸し、Savionらの方法(2)に準じ、一定濃度のCCK-8などの刺激物質を添加後、37℃で20分間反応させた。薬物刺激によりKRB液中に遊離したamylase含量(unit)をアミラーゼ・テスト・ワコー(和光純薬製amylase測定用キット)により測定した。

3)CCK受容体の結合実験：動物を断頭後、膵と脳を摘出した。膵腺房細胞はWilliamsらの方法(9)に準じ、粗ホモジネート膜標品を調製した。大脳皮質は5mM $MgCl_2$含有50mM Tris-HCl溶液(pH 7.4)の粗ホモジネート膜標品を調製した。このようにして得られた膵と脳の膜標品を用い、既法(3)のように22℃で^{3}H-CCK-8結合実験を行った。

4)cAMPおよびcGMPの測定：上記2)の実験で作成し、反応終了後直ちに-80℃で凍結保存した膵切片をSteinerらの方法(4)に従い、6% trichloracetic acid(TCA)でホモジネートし、3,000rpm、10分の遠心分離をした上清を2倍量の水飽和エーテルでTCAの抽出除去操作(3回反復)した後、cAMP及びcGMP含量をそれぞれのYAMASA assay kitを用いて測定した。薬物による刺激時間はcAMPは20分、cGMPは1分とした。

5)イノシトール・リン脂質代謝：既報(8)に準じて、次のように実験した。即ち、膵腺房細胞をKRB液に懸濁し、^{3}H-inositolを37℃で2時間取り込ませた後、10mM Li含有KRB液中でのイノシトール・リン脂質代謝系へのCCK-8による刺激効果を^{3}H-inositol phosphates(^{3}H-IPs)の20分間の蓄積量で調べた。

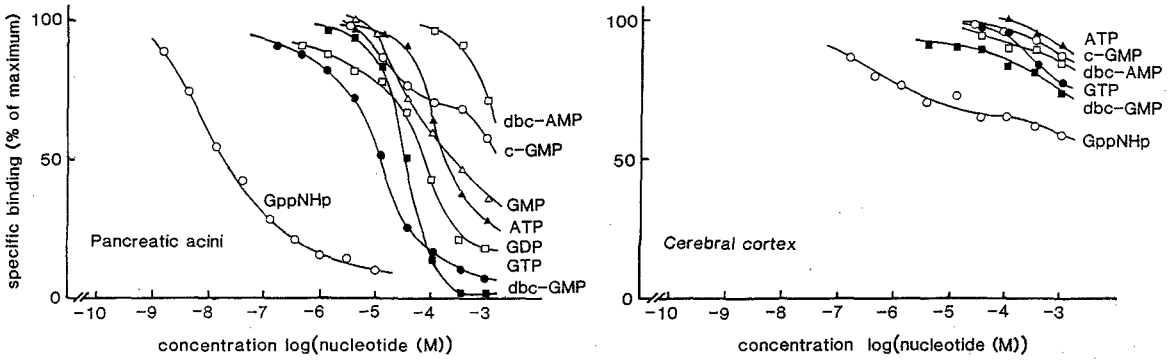


図1. 膵腺房および大脳皮質の各細胞膜への^{3}H-CCK-8特異的結合に及ぼす各種ヌクレオチドの影響

6)百日咳毒素(IAP)の処理：膵腺房細胞を0.1M KCl, 2mM $MgCl_2$, 1mM ATP, 20mM thymidine, 20 mM Tris-HCl液(pH6.8), 10μM NAD^+または^{32}P-NAD^+および2～25μg/mlのIAPを含む溶液中で30℃、20分間反応させた。またIAPによる膜タンパクのADP-リボシル化はSDS電気泳動(12.5% polyacrylamide gel)によって確認した。

【結果・考察】

図1は、既報(7,8)で一部は報告したが,GTPとその関連ヌクレオチドが^{3}H-CCK-8特異的結合を抑制することを示している。このように、膵CCK受容体の活性化に大脳皮質の場合と異なりGTP結合制御タンパク質(G-タンパク質)が関与している可能性が示唆された。

図2は、CCK-8によるamylase分泌、膵腺房胞への0.25nM ^{3}H-CCK-8の特異的結合に対するCCK-8の阻

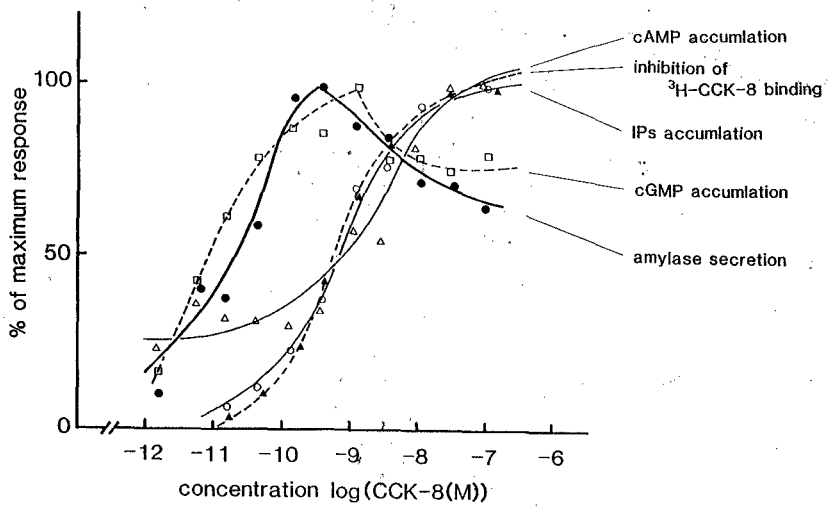


図2. CCK-8濃度と^{3}H-CCK-8特異的結合の阻害,IPs,cAMPおよびcGMPの各蓄積,およびamylase分泌作用との曲線関係の比較

害効果、CCK-8による膵腺房細胞のイノシトール・リン脂質代謝に伴うIPsとcAMPおよびcGMPの蓄積の各濃度作用曲線を示している。amylase分泌は、CCK-8の$2x10^{-12}$Mから増加し、$4x10^{-10}$Mで最大分泌に達した。しかし、このCCK-8による反応は$4x10^{-10}$M以上の高濃度で分泌の減少を示す二相性が観察された。同様に、CCK-8で惹起されるcGMP蓄積量もamylase分泌と同様のCCK-8の濃度域で二相性反応を示した。一方、amylase分泌やcGMP蓄積の上昇を示すCCK-8濃度域ではcAMP蓄積は変化を示さず、むしろ$4x10^{-10}$M以上のCCK-8で上昇し、$1x10^{-7}$Mで最大蓄積に達した。また、CCK-8濃度とCCK-8による^{3}H-CCK-8結合の置換およびIPs蓄積に作用との曲線関係はよく一致し、この事実はCCK受容体結合と共にphospholipase C(PLC)を介するIPs蓄積が進むことを示している。また、CCK-8によるamylase分泌とcGMPの蓄積の変化は、イノシトール・リン脂質代謝を介した細胞内情報伝達機構で起こり、これに対し比較的高濃度のCCK-8により惹起されるcAMPの上昇は、これら2つのパラメーターの変化と異なる機構により発現したと考えられる。

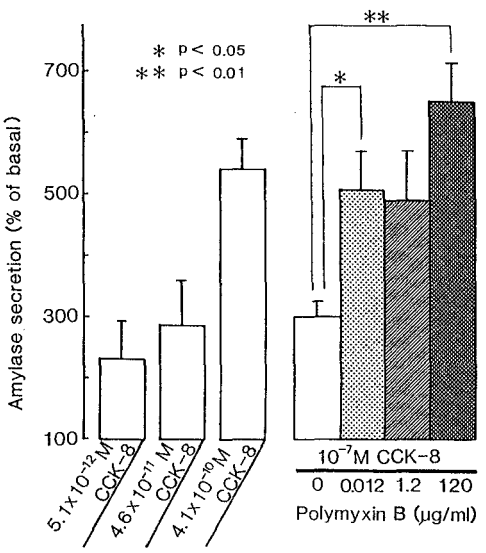


図3. $1x10^{-7}$M CCK-8によるamylase分泌作用に及ぼすpolymyxin Bの影響

膵腺房細胞よりのamylase分泌反応をCCK-8と同じく脳－腸ペプチドであるP物質、およびコリン作働薬のcarbachol(CCh)についてCCK-8と比較した(図略)。CCK-8およびCChはそれぞれの濃度域で二相性のamylase分泌作用を示したが、P物質には殆ど分泌促進作用は認めなかった。　高濃度のCCK-8($1x10^{-7}$M)によるamylase分泌の抑制は、protein kinase C(PKC)の阻害剤と考えられているpolymyxin B(12ng～120μg/ml)の添加により消失し、$4x10^{-10}$M CCK-8によるamylaseの最大分泌までに回復した(図3)。これらの成績からCCK-8によるamylase分泌は膵CCK受容体が活性化し、低濃度ではPLCが活性化され促進的に、そして高濃度ではPKCの活性化により抑制的に効果が発現することが示唆された(図3)。次に、図1で示唆したように膵CCK受容体におけるG-タンパク質の関与について調べる目的で、IAP処理による^{3}H-CCK-8結合へのGppNHp効果に対するIAPの影響を調べた。しかし、各濃度のIAPで処理した膜標品はGppNHp効果に変化を与えず(図略)、従って膵CCK受容体と抑制性G－タンパク質(Gi)とは共役していないことが示唆された。同様の試みをコレラ毒素についても行ない、促進性G-タンパク質(Gs)との関係を明かにすることが、今後さらに必要である。

【 謝辞 】

IAPは、化血研(熊本)の御好意により提供頂き、感謝いたします。

【 文献 】

1)Innis,R. & Snyder,S.H.(1980) Eur.J.Pharmacol.65,123-124　2)Savion,N. & Selinger,Z.(1978) J.Cell.Biol.76,467-482　3)Steigerwalt,R.W. & Williams,J.A.(1981) Endocrinology109,1746-1753　4)Steiner,A.L.,et al.(1972) J.Biol.Chem.247,1114-1120　5)Takeda,Y.,et al.(1986) Japan.J.Pharmacol.40,569-575　6)Takeda,Y.,et al.(1986) Japan.J.Pharmacol.42,142-149　7)武田泰生ら(1986) Peptide Hormons in Pancreas 6(赤沼安夫編),322-331　8)武田泰生ら(1986) 第15回薬物活性シンポジウム講演要旨集,71-76;(1987) J.Pharmacobio-Dyn.10,s-158　9)Williams,J.A.,et al.(1976) Am.J.Physiol.231,1562-1567

42. N−ethylmaleimideの中枢Substance P受容体に対する影響

平岡千恵・森島義行・仲田義啓・瀬川富朗・
三好理恵*・鬼頭昭三*

（広島大・医・薬効解析，第三内科*）

〔要　約〕

中枢 Substance P（以下、ＳＰ）受容体の活性調節機構について、受容体－ＧＴＰ結合調節蛋白(以下、G蛋白)の相互作用に影響を及ぼすＳＨ基アルキル化剤 N-ethylmaleimide（以下、ＮＥＭ）の効果を神経化学的、組織化学的に検討した。

ラット大脳皮質膜画分を、1 μM～10 mM ＮＥＭで 0 ℃，30分間処置すると、[^{3}H]ＳＰ結合は２相性の抑制を示した（Simplex法）が、最大濃度の 10 mM ＮＥＭでも約 55 % の抑制であった。 100 μM ＧＴＰを添加すると、ＳＰ結合は約 55 % に抑制され、低濃度（1～10μM）のＮＥＭにより更にわずかな抑制がみとめられた。ラット大脳皮質をあらかじめ 1 mM ＮＥＭで処置すると、ＳＰ結合のＧＴＰによる抑制が消失し、百日咳毒素（以下、ＩＡＰ）処置と同様の効果がみとめられた。更に、ＮＥＭの効果を明らかにするため、ＮＥＭ処置膜（ 50 μM, 1 mM ）へのＳＰ結合の Scatchard 解析を行った。ＮＥＭ無処置膜では 高－低両親和性部位の存在を示し、50 μM ＮＥＭ処置膜では、高低両親和性部位の親和性の低下と、低親和性部位の全結合量（Bmax）の減少を示した。 1 mM ＮＥＭ処置膜では低親和性部位の全結合量が更に減少していた。ＮＥＭのＳＰ結合に対する抑制効果は、脳切片を用いた [^{125}Ｉ]ＳＰの Autoradiography でも確認された。

以上の結果より、低濃度のＮＥＭ（～50 μM）処置は、以前に我々が示したＩＡＰ処置によるＳＰ結合部位とＧ蛋白の脱共役と同様の効果を誘発すること、 高濃度のＮＥＭはＳＰ結合部位のＳＨ基をアルキル化することにより、結合の阻害を起こすことが明らかとなった。

Key word : Substance P receptor, N-ethylmaleimide, Autoradiography

［緒言］

中枢神経組織の Substance P（以下、ＳＰ）結合部位は、guanine nucleotides の添加により抑制され(3)、その抑制が百日咳毒素（islet activating protein, 以下、ＩＡＰ）で消失するという我々の報告(8) から、ＳＰ結合部位がＩＡＰ基質となるＧＴＰ結合調節蛋白(以下、Ｇ蛋白)と共役していることが示唆されてきている。又、第２９回本学会において、我々はラット大脳皮質膜画分を用いた [^{3}H]ＳＰ と Physalaemin との競合実験の結果から、ＳＰ結合部位が異なる親和性を示す ２種の subtype に分類される可能性を示した。それらはＧＴＰやＮａおよびＭｇイオンにより相互変換可能であることから、ＳＰ受容体の活性調節機構に、Ｇ蛋白や各イオンが重要な役割を演じていることが示唆された(7)。最近、タンパク修飾剤 Phenoxybenzamine によるアルキル化が、末梢(4)，および中枢神経系 (2) の Tachykinin 受容体の subtype に異なる阻害効果を示すことが報告されている。一方、ＳＨ基アルキル化剤 N-ethylmaleimide（以下、ＮＥＭ）は受容体へのアゴニストの結合を抑制したり、受容体とＧ蛋白との脱共役を起こすこと（ 1，5，6 ）が報告されている。今回、ＳＰ受容体の活性調節機構をさらに追求するため、ラット大脳皮質膜画分への [^{3}H]ＳＰ結合、およびラット脳切片への [^{125}Ｉ]ＳＰ結合 に及ぼす ＮＥＭの効果について、Receptor binding assay 法、および Autoradiography 法で検討した。

［実験方法］

動物は Wistar系雄性ラット(体重180-250g)を用いた。

(1) 大脳皮質膜画分への [^{3}H]ＳＰ結合に及ぼすＮＥＭの効果

断頭後、摘出した脳より大脳皮質を分取し、常法に従い 粗ミトコンドリア画分（P_2画分）を調整した。 P_2画分を 0.1 mM GDP，および 100 mM NaCl を含む緩衝液 （ 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4）に懸濁させ、24 ℃，1 時間放置することにより内因性のＳＰを除去した。その後、懸濁液を 20,000 x g，20 分間遠心し、得られた沈さを 3度洗浄し膜標本とした。ＮＥＭ処置は、膜標本を最終濃度 1 μM～10 mM ＮＥＭと 0 ℃，30 分間インキュベートした。最終濃度 1 mM Dithiothreitol を加え反応を停止し、20,000 x g，

10 分間遠心し、沈さを緩衝液で3度洗浄した。得られた沈さを10 mM $MgCl_2$, 0.02 % BSA, および各種 Peptidase 阻害剤 (40 μg/ml Bacitracin, 4 μg/ml Leupeptin, 2 μg/ml Cymostatin, 10 μM Captopril)を含む緩衝液に懸濁し (蛋白濃度約 2.5 mg/ml)、結合実験に用いた。結合実験は、膜標本液を [^{3}H]ＳＰ (41～60 Ci/mmol, Amersham) と、必要に応じ非放射性ＳＰ, およびＧＴＰを共存させて 24 ℃, 1 時間インキュベートした。反応停止は 0.1 % Polyethyleneimine で前処理した Whatman GF/B glass filter 上で吸引ろ過することにより行い、filter 上の放射活性を測定した。[^{3}H]ＳＰ特異的結合量は、1 μM 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。
0.1 nM～6 nM の濃度の [^{3}H]ＳＰ を用いた結合飽和実験より得た Scatchard plot は、Rosenthal 法に基づく非線形最小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。

(2) Autoradiography 法

断頭後、摘出した脳を直ちに ﾄﾞﾗｲｱｲｽ-ｱｾﾄﾝで凍結し、-20℃で 20 μmの Cryostat切片を作製した。ＮＥＭ処置は、切片を 10 μM～1 mM のＮＥＭと 0 ℃, 30 分間インキュベートした。切片は、0.02 % BSA を含む緩衝液中で 24 ℃, 1 分間 洗浄後 [^{125}Ｉ]ＳＰ (2050 Ci/mmol, Amersham), 10 mM $MgCl_2$, 0.02 % BSA, および各種 Peptidase 阻害剤を含む緩衝液中で 24 ℃, 2 時間インキュベートした。 その後、0.02 % BSA を含む緩衝液中で 0 ℃, 各 30 秒間, 3度洗浄し 冷風下で乾燥後 tritium- sensitive film に密着させ露出させた。非特異的結合は、1 μM 非放射性ＳＰ共存下での結合とした。

[結果]

(1) 大脳皮質膜画分の [^{3}H]ＳＰ結合に及ぼすＮＥＭの影響

ラット大脳皮質膜画分への [^{3}H]ＳＰ結合量は 1 μM～100 μM の低濃度のＮＥＭで軽度な抑制を示し、100 μM ＮＥＭ処置により約 15 % の有意な抑制を示した。更にＮＥＭの濃度を上げていくと、濃度依存的な抑制を示し、10 mM ＮＥＭで約 55 % の抑制を示した。 このＳＰ結合量のＮＥＭによる抑制曲線を、非線形最小２乗法 (Simplex法) で検討

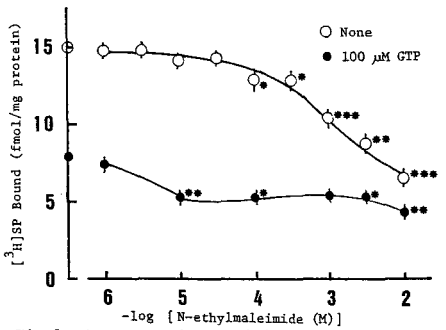


Fig.1. Concentration-inhibition curve of pretreatment with NEM on [^{3}H]SP binding.
* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. NEM no-treatment.

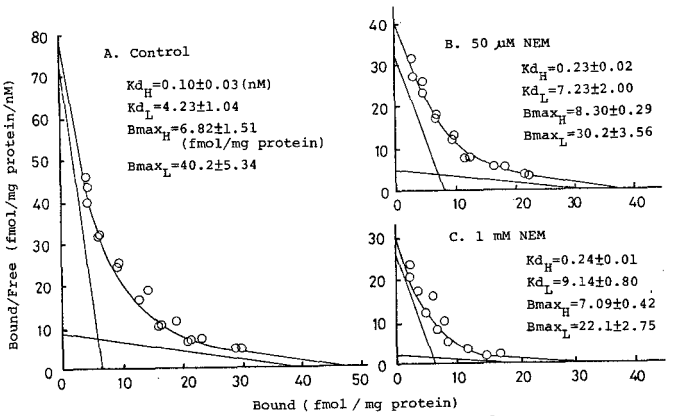


Fig.2. Scatchard plots of cerebral cortical [^{3}H]SP binding and influence of pretreatment with NEM.

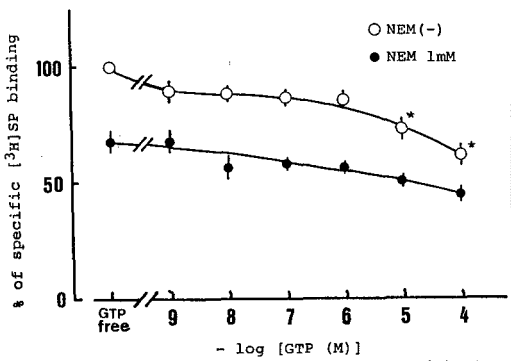


Fig.3. Effects of pretreatment with or without NEM on GTP-induced changes in binding of [^{3}H]SP.
* $p<0.05$ vs. GTP-free, NEM(-)

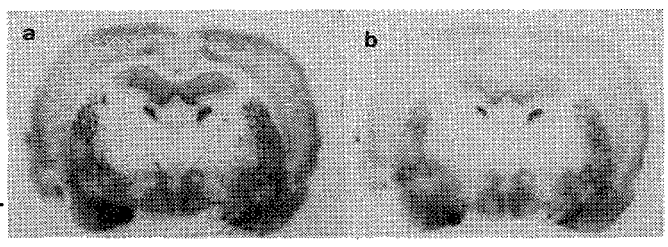


Fig.4. Autoradiograms of [^{125}I]SP binding sites.
a) control. b) pretreated with 100 μM NEM.

すると、2相性であることが明らかとなった。100 μM ＧＴＰ添加により、ＳＰ結合量はＮＥＭ無処置膜で約 55 % に抑制され、低濃度ＮＥＭ処置で更に抑制されたが、ＮＥＭの濃度を上げても変化はなかった (Fig.1)。ＮＥＭ処置による効果を更に詳細に検討するため、Scatchard 解析を行った。 ＮＥＭ無処置膜の Scatchard plot は、 Kd=0.10 nM, Bmax=6.82 fmol/mg protein の高親和性成分 (以下、SP-H)と、Kd=4.23 nM, Bmax=40.2 fmol/mg protein の低親和性成分 (以下、SP-L)より成る2相性を示した。50 μM ＮＥＭ処置膜においては、無処置膜に比べ SP-H は Kd=0.23 nM, Bmax=8.30 fmol/mg protein となり 親和性の低下のみを示したが、SP-L は Kd=7.23 nM, Bmax=30.2 fmol/mg protein となり 親和性の低下とともに全結合量の減少をも示した。1 mM ＮＥＭ処置膜においては SP-H はKd=0.24 nM, Bmax=7.09 fmol/mg protein で、50 μM ＮＥＭ処置膜に比べ変化を示さなかったが SP-L は Kd=9.14 nM, Bmax=22.1 fmol/mg protein で、更に全結合量が減少していた (Fig.2)。また、[^{3}H]ＳＰ結合へのＧＴＰの効果に対するＮＥＭ (1 mM) 処置の影響を検討した(Fig.3)。 1 mM ＮＥＭ処置により、[^{3}H]ＳＰ結合量のＧＴＰによる抑制は消失した。

(2) [^{125}Ｉ]ＳＰを用いた Autoradiography 法によるＮＥＭの効果

[^{125}Ｉ]ＳＰ結合は、1 μM の非放射性ＳＰ存在下ではほとんど認められなかった。10 μM～1 mM のＮＥＭ処置により、大脳皮質部でのＳＰ結合が 濃度依存的に抑制された (Fig.4)。

[考察]

大脳皮質膜画分への [^{3}H]ＳＰ結合は 1 μM～10 mM のＮＥＭにより2相性の抑制を示した。低濃度のＮＥＭは、ＩＡＰによってＡＤＰ-リボシル化される システイン残基をアルキル化して、抑制性受容体とカップルしているＧ蛋白の脱共役を起こすことが示唆されている (1, 5, 6)。 今回 [^{3}H]ＳＰ結合が 低濃度のＮＥＭで抑制されたこと、 およびＧＴＰによる [^{3}H]ＳＰ結合の抑制効果をＮＥＭが消失させたことは、以前我々が報告した、ＳＰ受容体がＩＡＰ基質となるＧ蛋白と共役している可能性を更に支持するものである。高濃度のＮＥＭは、受容体のＳＨ基を直接アルキル化して、受容体とアゴニストの結合を阻害すると考えられ、 ＳＰ結合部位でのＳＨ基の関与が示唆された。 ＮＥＭによるＳＰ結合量の抑制効果は、Autoradiography 法によっても示されたが Bergstrom ら (2) は 1 mM のＮＥＭがラット大脳皮質膜画分への [^{125}Ｉ]ＳＰ結合に影響しないと報告しており、今回の我々の結果と矛盾する。この矛盾は、ＮＥＭ処置の実験条件の違いによるものかもしれない。

一方、中枢 α_2-アドレノセプター(6), およびＧＡＢＡ$_B$受容体(1)へのアゴニスト結合は、1 mM ＮＥＭで ほとんど消失すると報告されているのに対し、今回 10 mMのＮＥＭによっても約 45 % の [^{3}H]ＳＰ結合が阻害されなかったことから、一部ＳＨ基の関与しない部位の存在も同時に示唆された。

実験に御協力いただいた 浜坂 優美子 嬢に感謝する。

[参考文献]

(1) Asano,T. and Ogasawara,N. (1986) Mol. Pharmacol. 29, 244-249.
(2) Bergstrom,L., Beaujouan,J., Torrens,Y., Saffroy,M. and Glowinski,J. (1987) Neuropeptides 9, 151-159.
(3) Cascieri,M.A. and Liang,T. (1982) J. Biol. Chem. 258, 5158-5164.
(4) Growcott,J.W., Jamieson,A., Tarpey,A.V. and Topham,L.P. (1983) Eur. J. Pharmacol. 86, 59-64.
(5) Katada,T. and Ui,M. (1986) 蛋白質 核酸 酵素, 31, 1701-1714.
(6) 北村佳久, 野村靖幸 (1986) 神経化学 25, 262-264.
(7) 森島義行, 仲田義啓, 瀬川富朗 (1986) 神経化学 25, 34-36.
(8) Tanaka,H., Nakata,Y. and Segawa,T. (1986) Eur. J. Pharmacol. 125, 157-158.

43. 視床下部室旁核プリンP_2－受容体を介するバゾプレッシン遊離機構

森　真由美・津島宏美・松田友宏

（名古屋市大・医・薬理）

〔要　約〕

バゾプレッシン作動性ニューロンの細胞体が局在する視床下部室傍核（ＰＶＮ）におけるプリン受容機構とその機能について検討した。ＰＶＮにアデニンヌクレオチド及びそのアナログを微量注入した時、ＡＴＰのγ－Ｐ非代謝性アナログが最も著明な尿流出量の減少をひきおこした（ＡＭＰ－ＰＣＰ＞ＡＭＰ－ＰＮＰ＝ＡＴＰ≧ＡＤＰ＞ＡＭＰ＞adenosine）。従って効果発現にはアデニンヌクレオチドのβ位、γ位のＰが重要であるが、γ位のＰによるリン酸化は関与していないことを示していた。ＡＴＰの抗利尿作用はプリンP_2受容体アンタゴニストであるキニジンのＰＶＮへの微量注入による前処置により拮抗され、用量反応曲線は右方にシフトした。このＡＴＰの抗利尿作用は腎臓に局在するバゾプレッシンV_2－受容体のアンタゴニスト前処置（静注）によりほぼ完全に遮断された。ＡＴＰ微量注入後の最大抗利尿時（２０－３０分後）に断頭採血した血漿バゾプレッシンレベル（ＲＩＡ法）は対照より上昇していた。以上の結果は、ＰＶＮにP_2－受容体が存在してバゾプレッシンの遊離を促進し、このバゾプレッシンが腎臓のV_2－受容体に作用して抗利尿をひきおこしていることを示していた。

Key word : paraventricular nucleus, P_2-purinoceptor, vasopressin

抗利尿ホルモン、バゾプレッシンは視床下部視索上核（supraoptic nucleus, SON）、室傍核（paraventricular nucleus, PVN）に局在するバゾプレッシン作動性ニューロンの細胞体で合成され、下垂体後葉から血中に遊離されたのち、腎臓のバゾプレッシンV_2－受容体に作用して抗利尿をひきおこすことが知られている。我々は上記神経核に各種神経伝達物質候補を微量注入することにより、ＳＯＮ、ＰＶＮに抗利尿作用を惹起するムスカリン様[3]、α－，β－アドレナリン様[5,6]、オピエート受容体[7]が存在することを明らかにしてきた。さらにＡＴＰの微量注入によりＳＯＮにおいてはテオフィリン感受性プリン受容体の介在を示唆した[4]。今回、ＰＶＮにおけるＡＴＰの作用機序を調べるために、ＡＴＰのγ位のＰの非代謝性アナログ、ＡＭＰ－ＰＣＰ，ＡＭＰ－ＰＮＰの微量注入の効果、ならびにP_2－受容体アンタゴニスト、キニジンの前処置の遮断効果を検討した。ＡＴＰの抗利尿作用発現がバゾプレッシン遊離によるものかを証明するため、最大抗利尿時の血漿バゾプレッシンレベルを測定し（ＲＩＡ法）、V_2－受容体のアンタゴニストの前処置（i.v.）によるＡＴＰの作用の遮断を調べた。

［実験方法］尿流出量の測定：ウイ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測定し、注入後１０分間毎の滴数を注入前１０分間の滴数に対する％として表し、これを尿流出量とした。実験中、外頸静脈カニューレから３％エタノール含有ロック液を持続注入（0.1ml/min）し、一定の尿流出量と麻酔状態を維持した。

薬物の投与法：(1)プリン化合物及びキニジンのＰＶＮへの微量注入には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ＰＶＮにカニューレ（外径２００μｍ）を挿入した。薬物は生理食塩水に溶解し、１μｌを３分間で注入した。ＰＶＮへの挿入は前報[3-7]の通り確認した。(2)バゾプレッシンアンタゴニスト、d(CH$_2$)$_5$-D-Tyr(Et)VAVPの注入；外頸静脈カニューレから５０μg/kg（約0.2ml）を３分間で静注し、４０分後にＡＴＰをＰＶＮに微量注入した。血漿バゾプレッシンのＲＩＡ法：最大抗利尿時にラットを断頭・採血した。分離した血漿をアセトン・石油エーテルで抽出した後、N_2ガス下で蒸発乾固させた。この乾固物をリン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解し、ＲＩＡに用いた。intraassay 変動係数は1.3％(25 pg, n=10)、interassay 変動係数は4.0％(n=8)であった。

［実験結果］各種プリン化合物の微量注入による尿流出量の変化：ＡＴＰアナログ100 nmolをＰＶＮに微量注入した時、AMP-PCPはATPよりやや強く、AMP-PNPはATPとほぼ同程度の尿流出量の減少を引き起こした。Fig.1は各種プリン化合物微量注入後２０－３０分時の尿流出量を、注入前１０分間の尿流出量に対する％で表したものである。作用の強さは AMP-PCP ＞ AMP-PNP = ATP ≧ ADP ＞ AMP ＞ adenosine であった。ATP、AMP-PCPの用量反応曲線：AMP-PCP（100 nmol）の尿流出量減少は注入後２０－３０分で最大となり、約７０分で回復するという時間経過を示し、用量依存的であった。その用量反応曲線をFig.2に示した。このアナログのED50は37（30-46）nmolで、ATPのED50値70（44-111）nmolより小であった（（　）内は９５％信頼限界）。ATP微量注入に対するキニジン前処置（微量注入）の影響：キニジン７２nmolをPVNに微量注入して前処置した時、ATP５０nmol注入による抗利尿作用はほぼ完全に拮抗され（Fig. 3）、ATPの用量反応曲線は右方にシフトした（Fig. 4）。キニジン７２nmol単独でも尿流出量の減少が認められた。ATP微量注入に対するバゾプレッシン アンタゴニスト前処置（i.v.）の影響：バゾプレッシンＶ$_2$－受容体のアンタゴニスト、d(CH$_2$)$_5$-D-Tyr(Et)VAVP, 50 μg/kg（約 0.2 ml）を静注し、40分後にATP 100 nmolを微量注入した時、ATPの抗利尿作用はほぼ完全に遮断された（Fig. 5）。このバゾプレッシン アンタゴニスト単独では尿流出量に有意な影響を及ぼさなかった。ATP微量注入による血漿バゾプレッシン レベルの上昇：表１に示すようにATP 100 nmolをPVNに微量注入したラットの血漿バゾプレッシン レベル（注入後 20-30 分）は対照ラットあるいはPVNに生理食塩水を注入したラットのそれに比べて約２倍に上昇していた。

［考察］Burnstockらはプリン化合物の作用順位や拮抗薬の種類によりプリン受容体をＰ$_1$（adenosine ＞ ATP, キサンチン類により拮抗）とＰ$_2$（ATP ＞ adenosine, ANAPP$_3$やキニジンにより拮抗）に分類している[1]。本研究においては、PVNに微量注入したプリン化合物の作用順位がAMP-PCP ＞ ATP ＞ adenosineであること、ATPの作用がキニジンにより抑制されることからＰ$_2$－受容体の介在が示唆された。ATPのγ位のPの非代謝性アナログの実験より、ATPのPVNへの微量注入による抗利尿作用にはβ位、γ位のPの存在が重要であるが、γ位のPによるリン酸化反応は関与しないことが示された。抗利尿発現時には血漿バゾプレッシン レベルが上昇していること、抗利尿作用はバゾプレッシン Ｖ$_2$－受容体のアンタゴニストで完全に遮

されることからバゾプレッシンの遊離を介していることが明かとなった。血漿バゾプレッシン　レベルについては目下sep-pak column　法で確認している。以上の結果より、PVN にはP$_2$－受容体が存在しバゾプレッシンの遊離を促進させていることが示唆された。

［謝辞］バゾプレッシン　アンタゴニストはK.G.Hofbauer　教授（Heidelberg　大、Ciba　Geigy 社）から提供を受けました。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。ここに御礼申し上げます。

［文献］ 1)Burnstock,G.(1978) Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones,p.107, Raven Press,New York. 2)König,G.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) 森真由美、津島宏美、松田友宏 (1986) 神経化学，25,550-552 5)Tsushima,H.,Mori,M. and Matsuda,T.(1985) Japan.J.Pharmacol.39, 365-374 6)Tsushima,H.,Mori,M.and Matsuda,T. (1986)Japan.J.Pharmacol.40,319-328 7) Tsushima,H.,Mori,M.and Matsuda,T.(1986) Japan.J.Pharmacol.42,507-515

Fig.1.Changes in urine outflow by microinjection of adenine nucleotides and their analogues into the PVN

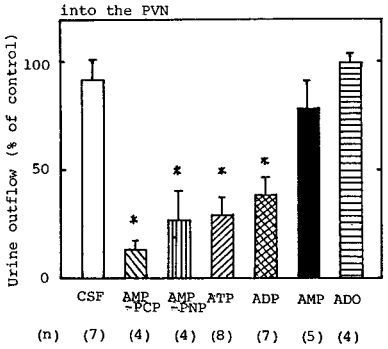


Fig.2.Dose-effect curves of antidiuresis induced by microinjection of ATP and AMP-PCP into the PVN

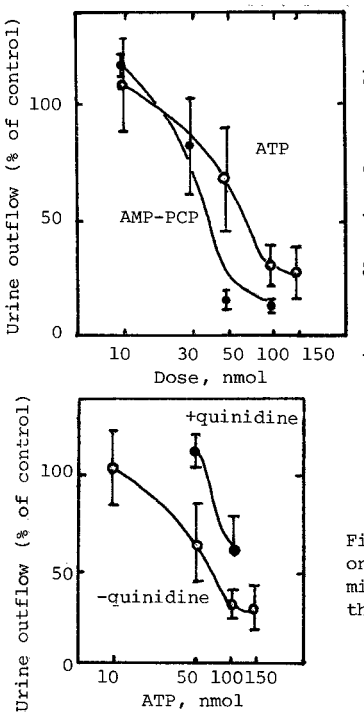


Fig.3.Antagonistic effect of quinidine on antidiuresis by microinjection of ATP into PVN

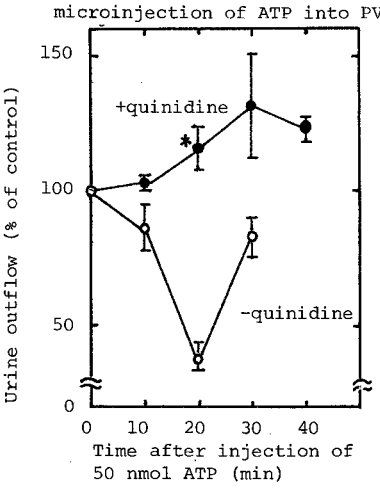


Fig.4. Effect of quinidine on antidiuresis induced by microinjection of ATP into the PVN

Fig.5.Effect of pretreatment with AVP antagonist on antidiuresis by ATP (100 nmol)

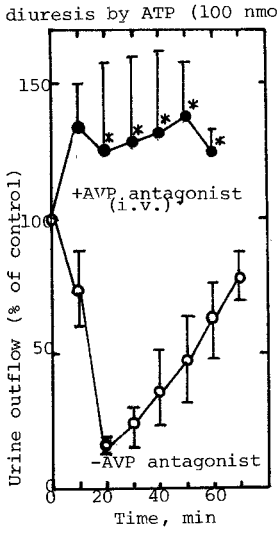


Table 1. Effect of microinjection of ATP into the PVN on plasma vasopressin level

micro-injection	n	dose (nmol)	plasma vasopressin (pg/ml)
none	7	-	5.4 ± 0.4
saline	1	-	4.9
ATP	13	100	10.7 ± 1.3*

* $P<0.05$

44. ラット脳の核マトリックスとトポイソメラーゼ

筒井公子・庄盛敏廉（岡山大・医・脳代謝研・病態生化）

〔要　約〕

ラット脳（小脳を除いたもの）より細胞核を得，ＬＩＳを用いて核マトリックスを調製した．再現性のある核マトリックスを得るためには，ＬＩＳでタンパク質を抽出する前にCu^{2+}イオンで核を処理する必要があり，他の組織（特に培養細胞）では有効な３７℃，１０分の前処理で代用することは出来なかった．得られた核マトリックスは高分子量のペプチドからなっていた．ところでこれまでに，トポイソメラーゼⅡが核マトリックスの主要構成成分の一つであるということが抗体を用いて示されているが，その活性はまだ検出されていない．我々は最近，脳の細胞核，特にニューロンの核にも，トポイソメラーゼⅡ活性の存在する事を示した（７）．得られた脳の核マトリックスにこの酵素活性があるかどうか検討したが，検出されなかった．構成タンパク質の解析を進めるために，成分の可溶化を試みた．ＤＮＡ結合タンパク質のＤＮＡ結合能を指標として，活性を失うことなく抽出される条件を調べたところ，0.5% SDSでゲルフロントにくる分子量の小さいポリペプチドが，0.5% SDS/140 mM 2-mercaptoethanolでほとんどのＤＮＡ結合タンパク質（１６５K，１２０K，７７K，及びゲルフロントにくるポリペプチド）が可溶化される事が明らかになった．

Key word：Nuclear matrix, Topoisomerases, Rat brain

ＤＮＡの複製，転写の場として，核マトリックスが重要な役割を果している可能性は最近の相次ぐ報告から確実なものになりつつある（２，３）．核マトリックスは核内構造物で，難溶性のタンパク質から成るが，その組成はまだ明確ではない．しかし，二本鎖ＤＮＡの切断，再結合を行う酵素であるトポイソメラーゼⅡ（TopoⅡ）がその主要構成成分のひとつであるとの報告がある（１）．これまでにHeLa細胞などの培養細胞，Drosophila melanogaster，ラット肝細胞等から分画が試みられている．しかし，脳の細胞核からの核マトリックス分画の報告はまだない．脳は機能の異なる数種類の細胞から成り，グリア細胞は分裂能を保持しているが，成熟したニューロンは非分裂性細胞である．またニューロンは高いＲＮＡ合成活性を示す事も知られている．我々は最近，グリアだけではなくニューロンにもトポイソメラーゼⅡが存在すること，ニューロンが成熟してもTopoⅡ活性は低下しないことを示した（６，７）．この様な特徴をもつ脳細胞核を，細胞種別に分離し，核マトリックスを分画してその性質を詳細に検討すれば，核マトリックスの生理的役割を推察できるとともに，脳におけるＤＮＡの複製，転写，組換えの様子を探ることが出来るものと思われる．ここではまず，脳の核マトリックスの調製法を検討し，小脳を除いた脳全体から得られた核（由来別に分画していない）のマトリックスについて調べた結果を報告する．

［実験方法］核マトリックスの調製　２週齢のＳＤラットより脳を取り出し，小脳を除き，組織を直接 2.2 M sucrose 中で破壊，70000 x g，1時間遠心して核を得た（７）．以後の処理は原則として Mirkovitch らの方法に従った（５）．核の懸濁液を5 mM $CuSO_4$で４℃，１０分，続いて 25 mM LIS (lithium 3,5-diiodosalicylate)で３０℃，

１０分インキュベートした．2000 x gで１０分遠心して得られた沈査を，マイクロコッカルヌクレアーゼで処理して核マトリックスを得た．

トポイソメラーゼ活性の測定　TopoⅠはｐＢＲ３２２（Ｉ型）ＤＮＡを基質としてＡＴＰ非存在下で，TopoⅡはキネトプラストＤＮＡを基質としてＡＴＰ存在下で活性を測定した（７）．

タンパク質ブロッティングとＤＮＡハイブリダイゼーション　タンパク質を7.5% ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離した後，Durapore membrane 上に電気泳動的にトランスファーした．ブロットされた膜を，スキムミルク処理の後，ｐＢＲ３２２ＤＮＡとインキュベートし，膜上のタンパク質に結合したＤＮＡを^{32}Ｐラベルのｐ ＢＲ３２２ＤＮＡとハイブリダイズさせ（４），オートラジオグラムで検出した．

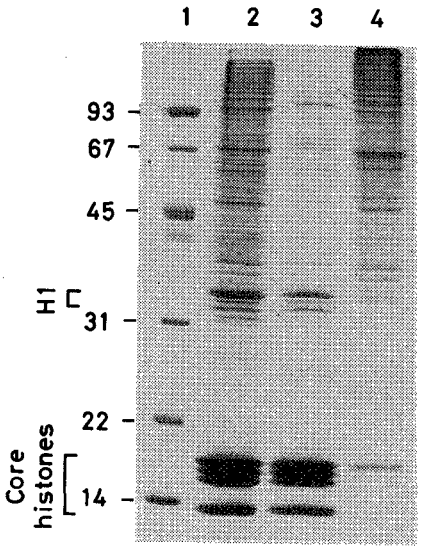


Fig.1 Protein composition of nuclear subfractions. Lane 1, molecular weight marker, lane 2, rat brain nuclei, lane 3, LIS extraction, lane 4, nuclear matrix. proteins were separated on a 14% SDS-acrylamide gel and stained with Coomassie blue.

［結果］　核マトリックスとトポイソメラーゼ　核マトリックスは一般的には，核を detergent, high salt, DNase で処理した後に残るものと定義されるが，得られた核マトリックスのタンパク質組成，生化学的性質などは必ずしも一定しない．おそらく用いられる細胞種の違い，核の分離法の違いに基づくものであろう．ここでは，3 mM $MgCl_2$, 5 mM 2-mercaptoethanol を含む 2.2 M sucrose で分離した核を用いた．核内の主なタンパク質であるヒストン（図１，第２列）は低塩濃度下でＬＩＳを作用させることにより抽出された（図１，第３列）．DNase 処理後に得られた核マトリックスは，図１，第４列に示すように，高分子量のペプチドから成っていた．これらのペプチド中にトポイソメラーゼが含まれているかどうかを調べるため，核マトリックスをTopoⅡバッファー（ＡＴＰを含む）或はこのバッファーからＡＴＰを除いたものとインキュベートし，可溶化されたもの，されなかったもの両者の酵素活性を測定した．図２に示すように（none→ none），キネトプラストＤＮＡのネットワークからのミニサークルの遊離も（TopoⅡ活性），Ｉ型ｐＢＲＤＮＡのＩ'型への弛緩（TopoⅠ活性）も検出されなかった．しかし，バッファー中に70 mM 2-mercaptoethanol を加えると，TopoⅠの活性が回復し，しかも酵素はマトリックスに強く結合していることが分かった（図２，ME→ none）．確認のために，抗TopoⅠ抗体を加えて反応させたところ，TopoⅠ活性は消失した（図２，ME→ α -TopoⅠ）．TopoⅡについては，反応後のミニサークルの量が用いた基質に比べて増えているところから，僅かに認められるとも解釈できるが，2-mercaptoethanol を加えても，Topo

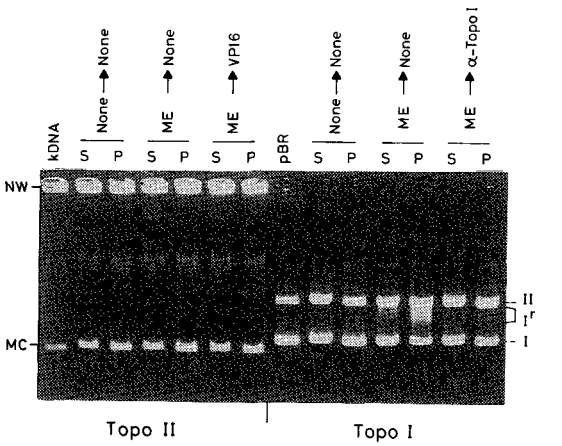


Fig.2 Restoration of topoisomerases activities associated with nuclear matrix.

Ⅱの阻害剤であるVP16を加えても，遊離される量に変化が見られないので（図2，左半分），検出されなかったと考えた．

核マトリックスタンパク質の可溶化

既に述べたように，核マトリックスは難溶性のタンパク質で構成されている．しかし，構成タンパク質について検索を進めるためには，可溶化を試みる必要がある．我々は，脳の核マトリックスに，スーパーコイルしたDNAを特異的に結合するタンパク質が存在することを見いだしている（投稿準備中）．このタンパク質のDNA結合能を指標にして，可溶化の条件を調べた．核マトリックスを0.5% SDSで37℃，10分間処理すると，図3に示すように膨潤し，ゲルフロントにくるほとんどのペプチドが遠心上清に回収された（図4，第2列）．140 mM 2-mercaptoethanol単独では可溶化されるものはなかった（図4，第3列）．しかし，SDSと2-mercaptoethanolを同時に作用させると，核マトリックスは溶解し（図3），ほとんどのDNA結合タンパク質が可溶化された（図4，第4列）．

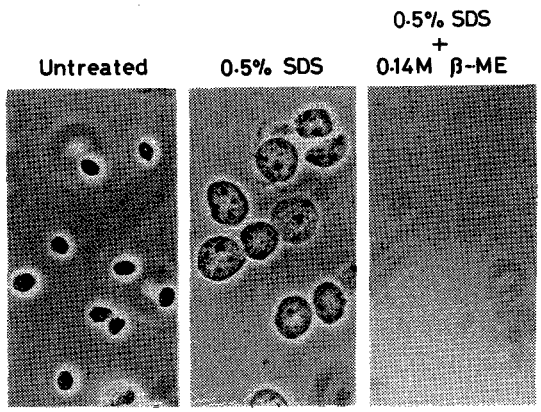


Fig.3 Phase contrast micrograph of nuclear matrix treated with SDS or 2-ME.

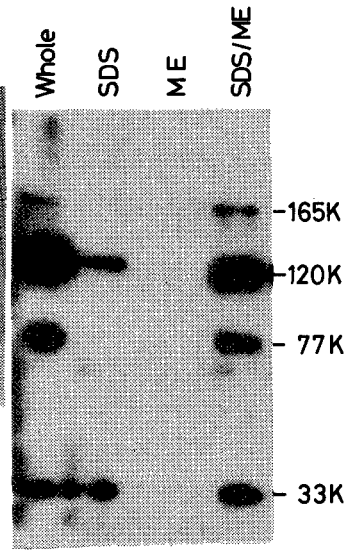


Fig.4 Autoradiogram of DNA-binding proteins associated with nuclear matrix. Proteins were solubilized with 0.5%SDS (SDS), 0.14M 2-ME(ME) or both (SDS/ME). Untreated nuclear matrix was subjected to the left-most lane (Whole). Solubilized proteins were separated on a 7.5% SDS-PAGE and blotted on a membrane, then reacted with pBRDNA (Form I). The protein-bound DNA was detected by hibridization with ^{32}P-pBRDNA.

［考察］ Laemmliらは，LISでタンパク質を抽出する前に，核を37℃，10分インキュベートするか，またはCu^{2+}イオンで処理する必要があると報告している（5）．脳の細胞核から核マトリックスを調製する場合には，Cu^{2+}の前処理が必須であった．Cu^{2+}で前処理をしない場合，得られた核マトリックスは，ラミンを含む数個のポリペプチドからのみ構成され，再現性に乏しく，DNA結合能を失っていた．核マトリックスにTopoⅡが存在することが，抗TopoⅡ抗体を用いて示されているが（1），これまでにTopoⅡ活性は検出されていない．核マトリックス調製の過程で失活している可能性がある．脳から得られた核マトリックスにも，TopoⅡ活性は検出されなかった．しかし，今回の実験で，失活していたTopoⅠが，核マトリックスを2-mercaptoethanolで処理することにより活性を取り戻しているところから，TopoⅡに関しても活性を回復させる条件を探ることにより，脳における核マトリックス及びトポイソメラーゼの役割を明らかにして行くことが出来るのではないかと考えられる．

REFERENCES: 1)Berrios,M., Osheroff,N., and Fisher,P.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 4142-4146. 2)Ciejek,E.M., Tsai,M., and O'Malley,B.W. (1983) Nature 306, 607-609. 3)Dijkwel,P.A., Wenink,P.W., Poddighe,J. (1986) Nucl. Acids Res. 14, 3241-3249. 4)Maniatis,T., Fritsch,E.F., and Sambrook,J. (1982) Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 5)Mirkovitch,J., Mirault,M., and Laemmli,U.K. (1984) Cell 39, 223-232. 6)高松子,福井私子,庄野康雄,高井研,小田敏三(1985) 神経化学 24, 589-594) 7)Tsutsui,K., Tsutsui,K., Sakurai,H., Shohmori,T. and Oda,T. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 1116-1122.

45. ウシ脳可溶性タンパク質の２次元ＨＰＬＣマッピング

内田和久・田岡万悟・真鍋　敬・礒辺俊明・
奥山典生　（都立大・理・化学）

〔要　約〕

脳神経組織に存在するタンパク質を系統的に分離し、組織特異的なタンパク質を検索、同定する目的で、マイクロコンピュータで送液、カラム切り換え、溶離液の濃度変化などの動作をすべて制御する全自動高速２次元液体クロマトグラフィーシステムを試作した。タンパク質試料は、１次元目のイオン交換カラムで段階的に10-20 分画に分離すると同時に順次２次元目の逆相カラムに導入し、アセトニトリルの濃度勾配溶離法でさらに分離した。このシステムを小脳可溶性タンパク質のマッピングに応用すると、カルモデュリンや S100 タンパク質、神経特異エノラーゼ、クレアチンキナーゼなどの既知脳タンパク質を含む約 200のタンパク質が一度に分離できた。同様の結果は大脳可溶性タンパク質を試料とした場合にも得られたが、２つのマップには含量の著しく異なる、それぞれの脳に特異的とも思われるピークがいくつか認められた。以上の結果から、２次元ＨＰＬＣシステムは、組織や細胞中のタンパク質の系統的な分離、分析や組織特異タンパク質の検索だけでなく、組み換えＤＮＡによって産生したタンパク質の分離精製など、多様な目的に対応し得ると結論した。

Key word : protein mapping / two dimensional high performance liquid chromatography / brain

はじめに

神経組織に存在するタンパク質を高分離能，高感度で系統的に分離し、あるいは脳神経に局在するタンパク質を検索する目的で、マイクロコンピュータ制御方式の２次元ＨＰＬＣ装置を作製した。本研究では、このシステムを用いてウシ小脳および大脳に存在する可溶性タンパク質をマッピングして比較し、また一部についてはピークの同定を行った結果を報告する。

材料と方法

＊試料

ウシ小脳および大脳可溶性タンパク質はウシ小脳および大脳抽出液を硫安分画（30% 飽和，pH7.1 から85 % 飽和，pH4.2 ）して調製した。

＊装置およびその動作

システムの構成を図１にしめした。電磁弁（Ｖ１とＶ２，Ｖ３とＶ４）の開閉時間の調節による溶離液組成の変化，Ｃ１とＣ２を連結するための流路切り替えバルブ（３ＷＶ）の動作，２台の送液ポンプ（Ｐ１と２）の作動，停止をマイコン（NEC 8801）プログラムで制御した。

プログラムのスタートによりポンプＰ１，Ｐ２が作動し、カラムＣ１（イオン交換カラム：TSK-gel DEAE-5 PW 0.78x7.5 cm）を溶離液Ｒ１で、カラムＣ２（逆相カラム：TSK-gel Phenyl-5PW RP 0.46x 7.5 cm）を溶離液Ｒ３でそれぞれ平衡化する。平衡化後、Ｐ２が停止し、自動流路切り替えバルブ（３ＷＶ）によりＣ１とＣ２を直列に連結する。これと同時に試料導入装置Ｉ中の試料をＣ１に導入する。一定時間、Ｃ１にＲ１を流した後（Ｃ１の溶離時間Ｔ１）、Ｐ１が停止、Ｐ２が作動する。ここで溶離されたＣ１未吸着画分はＣ２に吸着する。電磁弁Ｖ３とＶ４の開閉時間の調節によりＲ３からＲ４までの直線濃度勾配が形成され（Ｒ３からＲ４までの所要時間Ｔ２）、Ｃ２に吸着していた試料を溶離する。そののちＣ２をＲ３により平衡化する。次に以上の過程をＣ１の溶離液の組成を段階的に変化させ（段階の数Ｎ）繰り返す。この場合の溶離液組成もＶ１とＶ２の開閉時間の調節により行った。なお標準的な分離ではＮ＝１０，Ｔ１＝２０ｍｉｎ，Ｔ２＝４０ｍｉｎに設定した。この場合、マッピングに要する時間は12時間であった。

結果

＊ウシ小脳可溶性タンパク質の２次元ＨＰＬＣマッピング

ウシ小脳可溶性タンパク質画分（タンパク質総量6 mg）のマッピングパターンを図２に示した。図２の溶離条件下（イオン交換カラムでの分画を10段とした時：Ｎ＝10）でマッピングされたタンパク質ピーク数は 198 であった。この数はＮ＝20に設定した場合には245 に増加した。またピークの分離が向上した。これらの数は同じ試料をミクロ二次元電気泳動で展開後、クマシー染色して検出されるスポット数（約400 ）の50

～60％に相当した。

＊ウシ小脳可溶性タンパク質２次元ＨＰＬＣマップ上のピークの同定

２次元ＨＰＬＣマッピング上で分離したタンパク質ピークはＮ末端配列分析やアミノ酸組成分析，特異抗体を用いた免疫化学的な検出など各種の方法で同定が可能である。図３にはウシ小脳可溶性タンパク質を分離後、分取した２種類の主ピークをミクロ２次元電気泳動によって分析した例を示した。２種類の標品はほぼ純粋で、それぞれS-100 タンパク質（Ｓ鎖），カルモジュリン（ＣａＭ），と同定できた。一方、ウシ脳から大量調製法（１）によって精製したカルモジュリン，S-100 タンパク質および市販のアルブミン標品は、マップ上でこれらに対応する位置にそれぞれ溶離した。上記３種のタンパク質を内部標準として、これに大量調製で精製純化した神経特異エノラーゼ（ＮＳＥ），14-3-3タンパク質，クレアチンキナーゼ（ＣＫ），乳酸脱水素酵素（ＬＤＨ）などを混合し、システムに添加し、溶離位置からウシ小脳可溶性タンパク質２次元ＨＰＬＣマップ上のピークの同定をおこなった。結果を図２中に示した。２次元マップの酸性領域に検出された主なピークのほとんどは以上の方法で同定することができた。

＊ウシ大脳可溶性タンパク質の２次元ＨＰＬＣマッピング

ウシ大脳可溶性タンパク質画分（6 mg）を小脳の場合と同様の条件でマッピングした。分離ピークの数は207 であった。S-100 タンパク質やＮＳＥなど図２で同定したピークを含め、小脳で検出されたピークのほとんど全てが大脳のマップ上でも検出された。一方、小脳と大脳で著しく含量が異なり、それぞれの脳にある意味で特異的ともみられるタンパク質ピークも何種類か検出された（図中＊で示した）。

まとめ

マイクロコンピュータ制御２次元ＨＰＬＣ法の特徴は、200 あるいはそれ以上のタンパク質を一度のクロマトグラフィー操作によって、容易に分離し得ることである。本研究で述べた脳内タンパク質のマッピングは脳組織中のタンパク質の系統的分離と組織特異タンパク質の検索を目的とするこの方法の応用ひとつであるが、このような利用の他にも、組み換えＤＮＡ法によって生産したタンパク質の分離精製など多様な応用が考えられる。タンパク質化学や遺伝子工学，モノクローナル抗体の調製などの細胞工学的な手法を併用すれば、培養細胞や微量組織中のタンパク質の総合的な研究も可能である。また、この方法の分離条件の最適化と大量化は遺伝子バンクや細胞バンクに対応する「タンパク質バンク」の設立への一歩とも考えられる。

文献 (1) Ishioka,N.,Isobe,T.,Kadoya,T.,Okuyama,T.,and Nakajima,T. (1984) J.Biochem. (Tokyo), 95, 611-617.

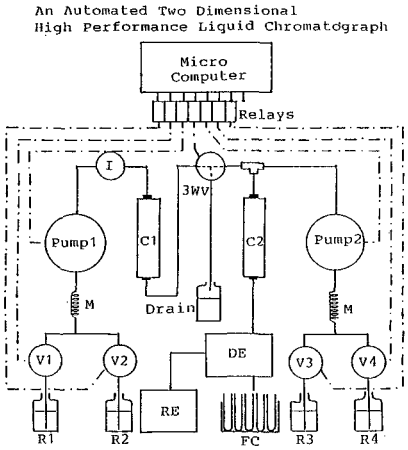


Fig.1

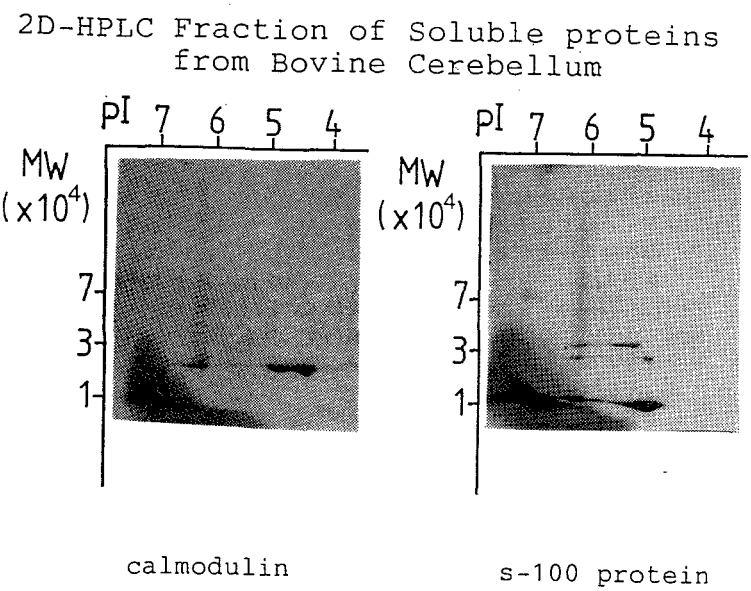
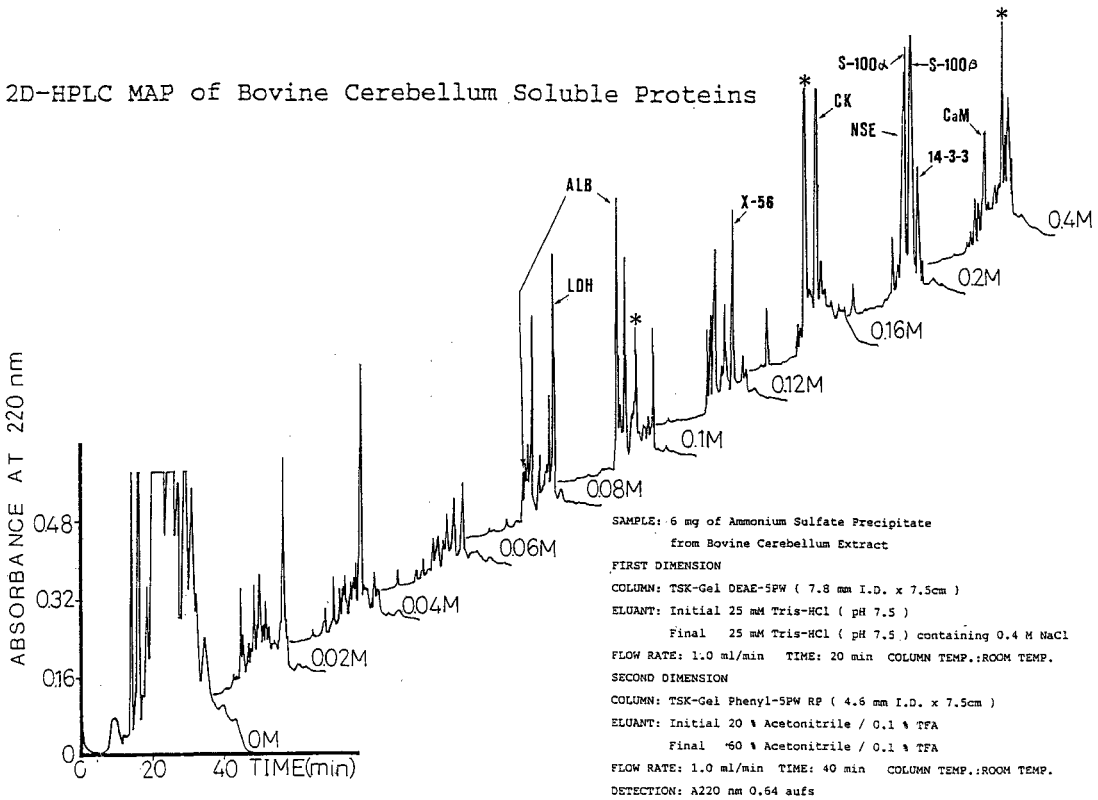


Fig.3


2D-HPLC MAP of Bovine Cerebellum Soluble Proteins
ABSORBANCE AT 220 nm
0.48
0.32
0.16
0
0
20
40 TIME(min)
0M
0.02M
0.04M
0.06M
0.08M
0.1M
0.12M
0.16M
0.2M
0.4M
ALB
LDH
X-56
CK
NSE
S-100α
S-100β
CaM
14-3-3
*
SAMPLE: 6 mg of Ammonium Sulfate Precipitate
from Bovine Cerebellum Extract
FIRST DIMENSION
COLUMN: TSK-Gel DEAE-5PW (7.8 mm I.D. x 7.5cm)
ELUANT: Initial 25 mM Tris-HCl (pH 7.5)
Final 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 0.4 M NaCl
FLOW RATE: 1.0 ml/min TIME: 20 min COLUMN TEMP.:ROOM TEMP.
SECOND DIMENSION
COLUMN: TSK-Gel Phenyl-5PW RP (4.6 mm I.D. x 7.5cm)
ELUANT: Initial 20 % Acetonitrile / 0.1 % TFA
Final 60 % Acetonitrile / 0.1 % TFA
FLOW RATE: 1.0 ml/min TIME: 40 min COLUMN TEMP.:ROOM TEMP.
DETECTION: A220 nm 0.64 aufs

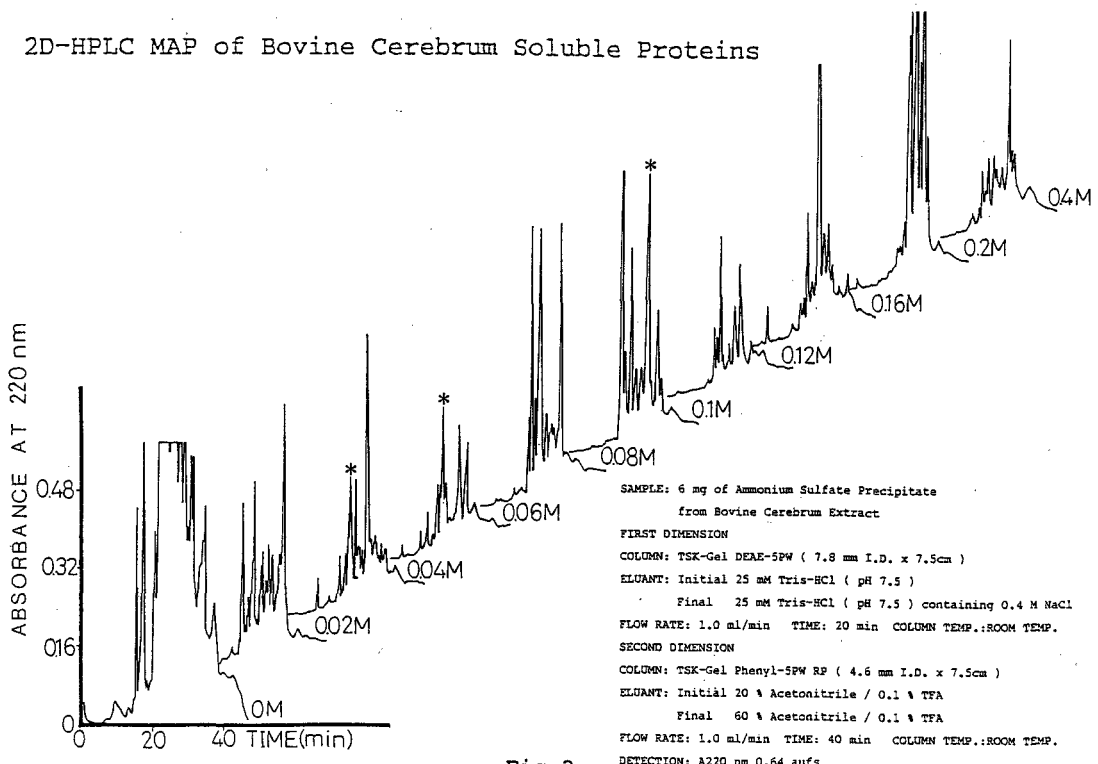

2D-HPLC MAP of Bovine Cerebrum Soluble Proteins
ABSORBANCE AT 220 nm
0.48
0.32
0.16
0
0
20
40 TIME(min)
0M
0.02M
0.04M
0.06M
0.08M
0.1M
0.12M
0.16M
0.2M
0.4M
*
SAMPLE: 6 mg of Ammonium Sulfate Precipitate
from Bovine Cerebrum Extract
FIRST DIMENSION
COLUMN: TSK-Gel DEAE-5PW (7.8 mm I.D. x 7.5cm)
ELUANT: Initial 25 mM Tris-HCl (pH 7.5)
Final 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 0.4 M NaCl
FLOW RATE: 1.0 ml/min TIME: 20 min COLUMN TEMP.:ROOM TEMP.
SECOND DIMENSION
COLUMN: TSK-Gel Phenyl-5PW RP (4.6 mm I.D. x 7.5cm)
ELUANT: Initial 20 % Acetonitrile / 0.1 % TFA
Final 60 % Acetonitrile / 0.1 % TFA
FLOW RATE: 1.0 ml/min TIME: 40 min COLUMN TEMP.:ROOM TEMP.
DETECTION: A220 nm 0.64 aufs

Fig.2

46. 牛脳コリンアセチルトランスフェレースのモノクローナル抗体カラムによる精製

石田　功・市川友行・石井加代子・出口武夫
（都神経研・分子神経生物）

〔要　約〕

牛脳-線条体の choline acetyl transferase（ ChAT ）に対する単クローン抗体を作製し、これをリガンドとしたイムノアフィニティーカラムを用いて ChAT を精製した。

線条体より精製した酵素標品を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ SDS-PAGE ）で分離し、ChAT と考えられる 68-kDa と 66-kDa のバンドを回収した。これを用いて免疫したマウスの脾臓と骨髄腫細胞の融合により、ChAT を認識する抗体を産生するハイブドーマを三種得た。いずれも、68-kDa と 66-kDa の両者を認識し、SDS で変性した ChAT と反応した。これらは、3～6 $\times 10^7$ M^{-1}のアフィニティーを有し、酵素活性を阻害することなく ChAT に結合した。このうち一種の抗体をリガンドとしてイムノアフィニティーカラムを作製し、FPLC MonoS カラムとの二段階操作で、酵素活性のある ChAT を精製する事ができた。イムノブロットの結果より、牛-線条体の ChAT は分子量 68-kDa の単一な蛋白質であり、66-kDa の蛋白質はその分解生成物である事が示唆された。現在 精製した ChAT のアミノ酸配列決定を試みている。又これらの単クローン抗体をプローブとして ChAT cDNA のクローニングを進めている。

Key word： Choline acetyltransferase, monoclonal antibodies, immunoaffinity purification

アセチルコリンの合成酵素である ChAT 活性は、脳や脊髄の培養系で様々なトロフィック因子によって調節される事（ 2－4 ）, 又 交感神経節細胞では培養条件に依存して コリン作動性或はアドレナリン作動性細胞への分化が選択されることも示された（6）。そこで ChAT 蛋白の遺伝子段階での発現調節を調べるため、そのcDNA 又はゲノム DNA を得る事が必要である。我々は、ラット脳の ChAT に対する単クローン抗体を作製したが（5）, これは cDNA 発現ライブラリーのスクリーニングには不適であった。

そこで今回 SDS によって変性した牛 ChAT を認識する単クローン抗体を作製し、更に このイムノアフィニティーカラムを用いて ChAT を精製した。

抗体の作製は以下のように行った。まず 牛-線条体のホモジネートの上清を CoA アガロースカラムとハイドロキシアパタイトカラムにより精製し、ついで SDS-PAGE で分離した。その結果 68-kDa 及び 66-kDa のバンドが得られ、これらは ChAT 分子と考えられた（1）。両者をゲルから回収した後 BALB/C マウスに免疫し、その脾臓と骨髄腫 NS-1 細胞を融合した。培養液を線条体の粗上澄液と反応させ、抗マウス IgG と IgG-sorb を用いて抗体結合物を沈澱除去した後 ChAT 活性を測定することによりスクリーニングを行った。その結果、抗 ChAT 抗

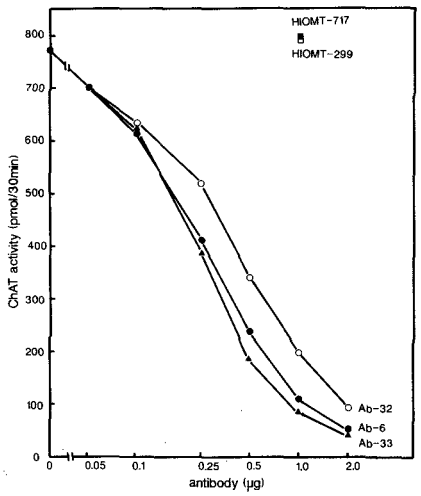


Fig.1 Titration of bovine ChAT with monoclonal antibodies. The crude supernatant of bovine caudate-putamen was incubated with various dose of Ab-6,32&33. As negative controls, monoclonal antibodies to bovine pineal HIOMT was used.

体を産生するハイブリドーマを三種（Ab-6, 32 及び 33）得た。これらはいずれも IgG1 を産生し、牛 ChAT に対し $3\sim6\times10^{7}\ M^{-1}$ のアフィニティを示した（Fig.1）。又 ChAT 活性はこれらの抗体を添加する事のみによっては阻害されず、したがって いずれの抗体も酵素の活性部位を阻害する事なく結合すると考えられる。ヒト、サル及びラットの脳の ChAT に対する交差反応は認められなかった。

抗体の特異性を調べるために、イムノブロットによる解析を行った。まず 牛脳のホモジネートを酢酸酸性（pH 5.5)として生じた沈澱をアセトンで洗浄し、ChAT assay buffer（25mM 燐酸カリウム(pH7.3),0.15M NaCℓ, 1mM EDTA,0.5mM dithiothreitol)で懸濁した。12000g, 40分の遠心より得た上澄を粗上澄液とした。更に これを 40-60% 硫安で分画し、FPLC の MonoS カラムにのせ 0.05-0.5M NaCℓ の linear gradient で溶出し部分精製標品を得た。両標品を SDS-PAGE で分離した後 ニトロセルロースフィルターにトランスファーした。これを各単クローン抗体と反応させ vectastatin ABC キットで染色した。いずれの抗体も部分精製標品では 68-kDa のバンドを検出した。一方 粗上澄液ではなにも検出されなかったが、これは ChAT 含量が極く僅かであるためと考えられる。

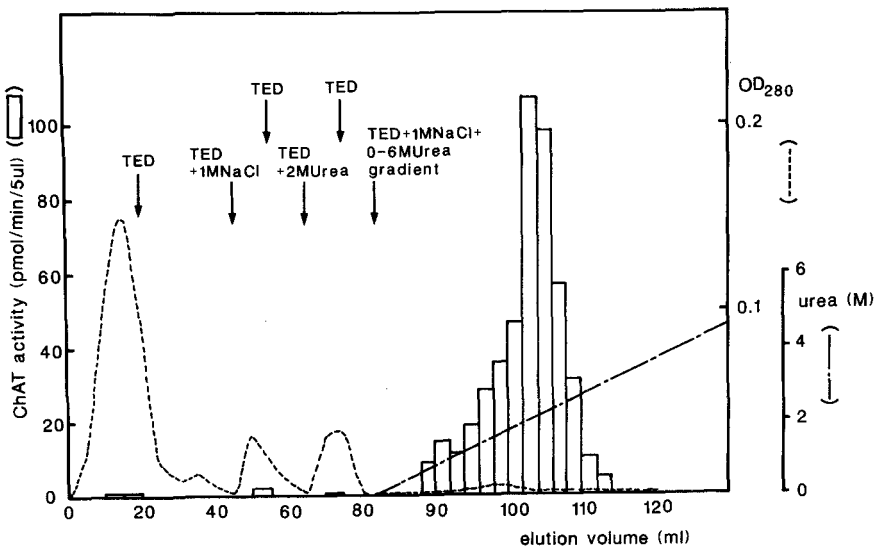


Fig.2 Immunoaffinity chromatography of bovine ChAT.

次に、単クローン抗体 Ab-32 を CN-Br activated Sepharose 4B に固定しイムノアフイニテイーカラムを作製した。牛線条体から上記のように部分精製した標品をこれにアプライした。TED 緩衝液（10mM Tris-HCℓ (pH7.5), 1mM EDTA, 1mM dithiothreitol), TED+1M NaCℓ 及び TED+2M 尿素で洗浄した後、TED+1M NaCℓ に加えて 0-6M 尿素の gradient によってChAT を溶出した（Fig.2）。その酵素比活性は 138μmol/min/mg であり、粗上澄液に比べて精製率 45000倍、回収率 48% であった（Table 1）。各フラクションを SDS-PAGE で解析し（Fig.3a）, 銀

Table I. Purification of bovine ChAT

	Total protein (mg)	Total activity (nmol/min)	Specific activity (umol/min/mg pro.)	Yield (%)	Purification factor
Crude supernatant	176	391	0.002	100	1
Mono S chromatography	1.5	246	0.164	63	82
Immunoaffinity chromatography	0.0013	180	138	48	45000

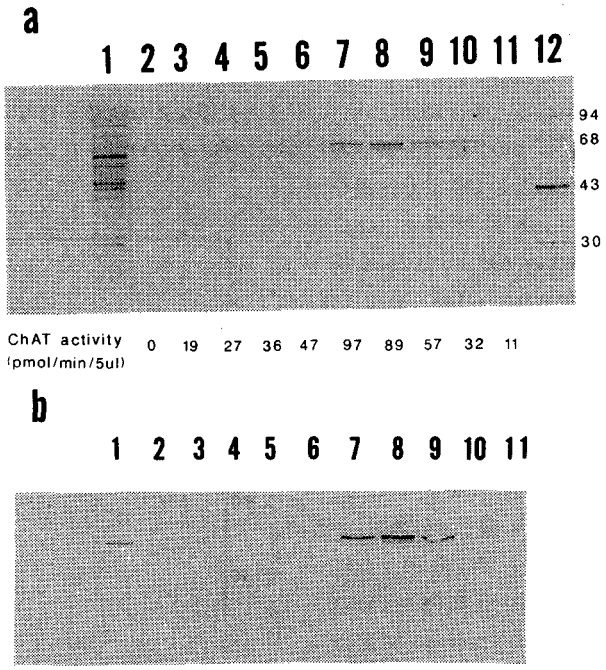


Fig.3
SDS-PAGE and immunoblot analysis of the immunoaffinity-purified ChAT preparation (lane 3-11). Lane 1; 1.5ug of partially purified ChAT. Lane 2; buffer. Lane 12; molecular size marker proteins shown in kDa. a; Silver stain of the gel. b; immunoblot analysis with Ab-33. The lanes were numbered as in a.

染色の結果、68-kDa のバンドと比較的弱い 66-kDa のバンドが認められた。68-kDa のバンドの染色強度と酵素活性との間には比例関係が認められた。68-kDa 及び 66-kDa の両者とも単クローン抗体 Ab-33 で検出された(Fig.3-b)。

このように SDS で変性した ChAT を特異的に検出できる単クローン抗体を作製し、これを用いて ChAT を迅速且つ有効に精製するイムノアフィニティーカラムの系を確立した。

従来 牛の ChAT は同一な免疫活性を有し分子量の異なる (68-kDa, 66-kDa) 二つの蛋白質であると考えられてきた (1)。今回 迅速に処理した部分精製品では 68-kDa の蛋白のみ検出される事から、牛-線条体の ChAT は 68-kDa の単一蛋白質であると考えられる。 66-kDa のバンドも各単クローン抗体で認識されるが、これは 68-kDa 蛋白の分解生成物であると推定される。現在 生成した ChAT のアミノ酸配列を決定中である。又、今回得た単クローン抗体をプローブとして cDNA 発現ライブラリーをスクリーニングし、ChAT cDNA を得る事を試みている。

文 献

1) Cozzari,C.,and Hartman,B.K. (1983) J.Biol.Chem. 258, 10013-10019
2) Ishida,I.,and Deguchi,T. (1983) Dev.Brain Res. 7, 13-23
3) Ishida,I.,and Deguchi,T. (1983) J.Neurosci. 3, 1818-1823
4) Ishida,I.,and Deguchi,T. (1983) J.Neurochem. 43, 42-48
5) Ichikawa,T.,Ishisa,I.,and Deguchi,T. (1983) FEBS Lett. 155, 306-310
6) Patterson,P.H.,and Chun,L.Y. (1974) Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A. 71, 3607-3610

47. 牛副腎髄質より2種類の熱耐性カルモデュリン結合蛋白質の精製

神田啓子・藤尾慈・門脇浩三・祖父江憲治
（大阪大・医・高次研・神経薬理生化）

〔要　約〕
クロマフィン細胞からカテコールアミンが分泌する機作にはCa^{2+}・カルモデュリンが重要な役割を果していると考えられる。今回、副腎髄質よりカルモデュリンの標的となる蛋白質の検索を行った。SDS-PAGE上の分子量77kDa・80kDaの2種類の熱安定なカルモデュリン結合蛋白質を認めこれらを各々精製した。77kDa蛋白質は免疫学的交叉性および物理化学的性質からℓ-カルデスモンであることが明らかになった。80kDa蛋白質は未知の蛋白質であり、副腎中でも皮質には検出されず髄質にのみ存在し、その細胞内分布もクロマフィン顆粒及び膜分画に偏在していることから分泌に重要な役割を果している可能性が考えらる。

Key word：calmodulin, chromaffin granule, caldesmon

［緒言］
副腎髄質のクロマフィン細胞では、アセチルコリンの刺激により細胞内Ca^{2+}濃度の一過性上昇(10^{-6}-10^{-5}M)が起こり、これを引金としてクロマフィン顆粒からカテコールアミンが分泌される(3)。Ca^{2+}濃度の上昇から分泌顆粒が細胞膜と融合しexocytosisが起こるまでの過程で、カルモデュリンはCa^{2+}シグナルのmediatorとして重要な役割を果していると推測される。これまでに、副腎髄質中のカルモデュリン結合蛋白質についてはいくつかの研究室でその同定が行われてきたが、カルモデュリン結合蛋白質を精製し機能を解析するには至っていない(1,2,5,6)。今回、我々は、副腎髄質中のカルモデュリンの標的蛋白質の検索の一環として、77kDaと80kDaの2種類の熱安定性なカルモデュリン結合蛋白質を見い出し精製したので報告する。

［方法］
牛副腎髄質を0.3M KClを含む抽出バッファーでホモジナイズし、沸騰水浴中で3分間処理した後、超遠心を行い抽出液を得た。この抽出液を0-50%の硫安分画でカルモデュリンを除いた後、Ca^{2+}存在下でカルモデュリンアフィニティカラムにアプライした。次いで、Ca^{2+}存在下でイオン強度を上げてカラムを洗浄した後、EGTAで溶出し粗カルモデュリン結合蛋白質分画を得た。この分画中の主要な蛋白質は、SDS-PAGE上77kDaと80kDaの2つであった。そこでこの2つの蛋白質を分離精製するために、カルモデュリン結合蛋白質分画をDEAE-セファロースカラムにアプライし、30-300 mM KClのリニアグラジエントの溶出を行った。得られた2つの蛋白質peakのうち77kDa蛋白質はゲルろ過で80kDa蛋白質はハイドロキシアパタイトカラム及びゲルろ過で精製した。抗体の作

製は家兎を免疫して行った。イムノブロットは^{125}I-protein Aを用いて行った(4)。

［結果］

副腎皮質と髄質で熱安定なカルモデュリン結合蛋白質を比較した（図１）。77kDa蛋白質は髄質・皮質のいずれにも存在するのに対し、80kDa蛋白質は髄質に特異的であった。77kDaと80kDa蛋白質はDEAE-セルロースで２つのpeakに分離した（図２a,b）。精製した80kDa及び77kDa蛋白質の純度はいずれも95%以上であった（図２c,d）。精製した80kDa蛋白質に対する抗体を用いたイムノブロット法で副腎髄質における80kDa蛋白質の細胞内分布を検討した。その結果、クロマフィン顆粒分画と膜分画に特異的に存在することが明らかになった（図３）。77kDa蛋白質は熱安定性、カルモデュリンおよびアクチンとの結合性、DEAE-セファロースにおける溶出パターン、SDS-PAGE上の分子量、カルデスモン抗体との免疫学的交叉性からβ-カルデスモン（低分子型カルデスモン）であることを同定した。

［考察］

クロマフィン顆粒からのカテコールアミン分泌にカルモデュリンの関与が考えられ多くの研究がなされてきたが、いずれも分子レベルで分泌機作を充分に説明するに足りない。今回、我々が精製した80kDaカルモデュリン結合蛋白質は、髄質に特異的であること及びその細胞内分布（分泌顆粒と膜分画）から、分泌に重要な役割を果していると考えられ、現在その機能を検討中である。

［文献］

1) Aunis, D. and Perrin, D. (1984) J. Neurochem. 42, 1558-1569
2) Bader, M.F., Hikita, T. and Trifaro, J.M. (1985) J. Neurochem. 44,526-53
3) Baker, P.F. and Knight, D.E. (1981) Phil.Trans.R.Soc.Ser. B296, 83-103
4) Burnette, W.N. (1981) Analy. Biochem. 112, 195-203
5) Geisow, M.J. and Burgoyne, R.D. (1983) Nature 31, 432-435
6) Sobue, K., Kanda, K., Adachi, J. and Kakiuchi, S. (1983) Proc.Natl.Acad. Sci. USA 80, 6868-6871

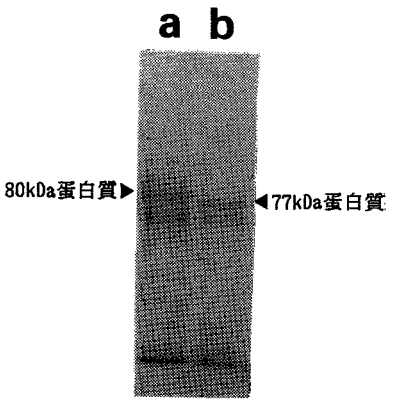


図1　牛副腎髄質(a)および皮質(b)における熱安定なカルモデュリン結合蛋白質の比較

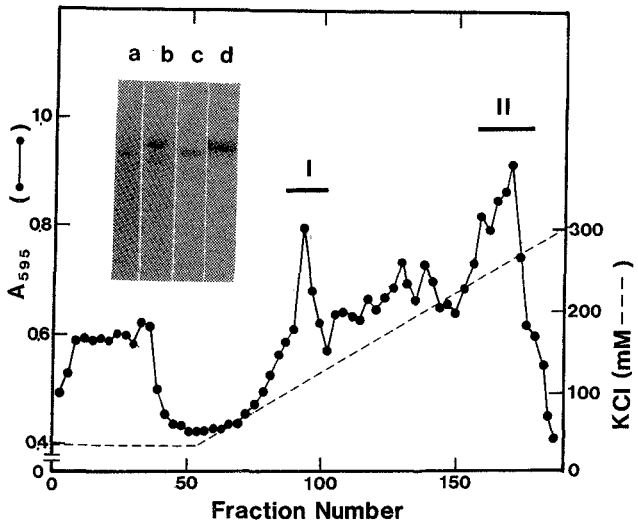


図2　DEAE-セファロース・カラムクロマトグラフィーの溶出パターン
a, peak I　b, peak II　c, 77kDa蛋白質　d, 80kDa蛋白質

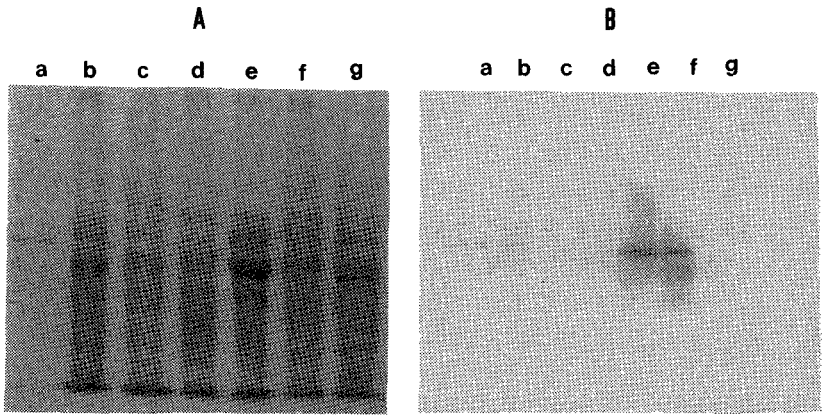


図3　牛副腎髄質の細胞分画：クマシー染色パターン(A)およびイムノブロット(B)
a, 80 kDa 蛋白質　b, ホモジネート　c, 核分画　d, ミトコンドリア分画
e, クロマフィン顆粒分画　f, 膜分画　g, 可溶性分画

48. ニワトリ初期胚脳に存在する細胞内レチノイン酸結合タンパク質について

北本年弘・粕谷淳子・妹尾春樹*・
桃井真理子**・桃井　隆
（国立精神神経センター・神経研，東京医歯大・医・第一解剖*，
自治医大・小児**）

〔要　約〕

ヒト神経芽細胞GotoおよびIMR-32を、10^{-6}M レチノイン酸存在下で培養すると増殖は抑制され、神経突起が著しく伸長した。レチノイン酸が、培養細胞系のみならず、実際の個体発生過程での神経系の分化に関与しているかどうかを知る目的で、ニワトリ初期発生期の脳における細胞内レチノイン酸結合タンパク質（CRABP）の存在および局在を検討した。[^{3}H] レチノイン酸を用いた実験により、4日胚のニワトリ脳には分子量約15K のCRABP が、若鳥睾丸に比べ約90倍量（細胞質画分一定タンパク質あたり）存在することがわかった。さらに抗CRABP 抗体を用いた組織染色により、CRABP は4日胚神経管の下部および左右の特異的領域に局在することが明らかになった。レチノイン酸がテラトカルシノーマ幹細胞のホメオティク遺伝子を活性化すること、およびニワトリ肢芽の形態形成にレチノイン酸が関与していることを示す最近の報告を考え合わせると、本研究の結果は、レチノイン酸がCRABP を介して神経系の分化および形態形成に重要な役割を果たしていることを強く示唆する。

Key word：retinoic acid, cellular retinoic acid bindig protein (CRABP), developmental of the nervous system

ビタミンAの誘導体であるレチノイン酸は、培養細胞系においては、テラトカルシノーマ幹細胞などの分化を誘導する(1)。培養細胞系でのレチノイン酸の作用発現には、細胞内レチノイン酸結合タンパク質(CRABP) が関与していると考えられている(2,3) が、生体内でレチノイン酸およびCRABP が果たす役割については全く不明であった。最近レチノイン酸によってテラトカルシノーマ幹細胞の分化が誘導される際にホメオティク遺伝子が活性化されること(4)、さらにニワトリ肢芽の形態形成にレチノイン酸が特異的な影響を与えること(5) が明らかになり、個体初期発生においてレチノイン酸が重要な役割を果たしている可能性がでてきた。本研究では、神経系の初期発生にレチノイン酸が関与しているかどうかを検討する目的で、まずレチノイン酸が、培養神経芽細胞に与える影響について調べ、さらにニワトリ初期胚の脳におけるCRABP の存在および局在について調べた。

【方法】

ヒト神経芽細胞に対するレチノイン酸の効果

ヒト神経芽細胞GotoおよびIMR-32を10% FCS を含むF-10培地中、10^{-6}M レチノイン酸あるいは、10ng/ml NGF 存在下で培養し、細胞数および形態を観察した。

CRABP の精製と特異抗体の作製

ブタおよびニワトリの睾丸（それぞれ2kg、1kg）よりOng らの方法(6) に従いSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上、単一バンドを示すCRABP をそれぞれ5mg、0.8mg 得た。アジュバンドと混合した後ウサギに免疫し、特異抗体を作製した。硫安沈澱、プロテインA－セファロースカラムクロマトグラフィによりIgG 画分を得、実

験に用いた。

ニワトリ初期発生期の脳におけるCRABP の存在と局在

2 ×10^{-5}M の非放射性レチノイン酸の存在下および非存在下で、ニワトリ4日胚脳の細胞質画分を、4nM [^{3}H] レチノイン酸と4℃で一晩反応させた後セファデックスG-75カラムクロマトグラフィを行ない、CRABP の存在を検討した。ニワトリ4日胚をブアン固定、パラフィン包埋した後作製した切片に、抗CRABP 抗体を反応させCRABP の局在を調べた。発色はパーオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG 抗体およびdiamino-benzidine を用いて行なった。

【結果と考察】

ヒト神経芽細胞、GotoおよびIMR-32を10^{-6}M レチノイン酸の存在下で培養すると増殖が著しく抑制されると共に、培養開始後1－3日以内に神経突起が伸びはじめ神経細胞への分化が誘導された（図1,2)。10^{-6}M レチノイン酸の増殖抑制、分化誘導の効果は、10ng/ml NGF に比べ、より顕著であった。

レチノイン酸が培養神経芽細胞の分化を誘導することが確認されたので、次にレチノイン酸が、実際の個体発生過程での神経系の分化に関与しているかどうかを知る目的で、ニワトリ初期発生期の脳におけるCRABP の存在および局在を検討した。まず生体内でCRABP を最も多く含む臓器である睾丸からCRABP を精製した。ブタおよびニワトリCRABP は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で分子量15K の位置に単一のバンドとして観察された（図3)。次にニワトリ初期胚(stage22-24)の脳から調整した可溶性画分を [^{3}H] レチノイン酸と混合した後、ゲルクロマトグラフィを行なった。睾丸CRABP と同一の溶出位置に現れる [^{3}H] のピークとして、CRABP の存在が確認された（図4）。臓器の中ではCRABP を最も多く含むことが知られている睾丸の場合と比較すると、初期胚脳ではタンパク質あたり約90倍の [^{3}H] レチノイン酸が CRABP 画分に回収された。このように大量に存在するCRABP が、脳神経系の発達の過程でどのような役割を果たしているかは今後の問題である。

さらにCRABP に対する特異抗体を用いて、ニワトリ初期胚(stage22-24)中でのCRABP の局在について検討した。その結果、図5に示すように、神経管の下部および左右の特異的領域が染色され、初期胚中では、CRABP は非常に不均一な分布をしていることが明らかになった。このことは、レチノイン酸とCRABP の分布が神経系の巨視的な形態形成に一つの要因として働らいている可能性を示唆している。

現在のところレチノイン酸は、培養細胞系での”人工的”な分化誘導物質としてとらえられているが、今後はレチノイン酸の生体内での、特に脳神経系の発生過程における役割に注目するべきであろう。そのためにはレチノイン酸およびCRABP が発生の各段階で生体内にどのように分布しているかを明らかにすること、さらに、培養細胞系を用いてレチノイン酸およびCRABP の作用機序を解明することが必要である。

【参考文献】
(1) Strickland,S.,and Mahdavi,V.(1978) Cell 15,393-405
(2) Schindler,J., Matthaei,K.I., and Sherman,M.I.(1981) Proc.Natl.Acad.Sci .USA 78,1077-1080
(3) Wang,S., and Gudas,L.J.(1984) J.Biol.Chem. 259,5899-5906
(4) Hauser,C.A., Joyner,A.L., Klein,R.D., Learned,T.K., Martin,G.R., and Tjian,R.(1985) Cell 43,19-28
(5) Tinkle,C.,Alberts,B.M.,Lee,J., and Wolpert,L.(1982) Nature 296,564-565
(6) Ong,D.E., and Chytil,F.(1978) J.Biol.Chem. 253,4551-4554

図1

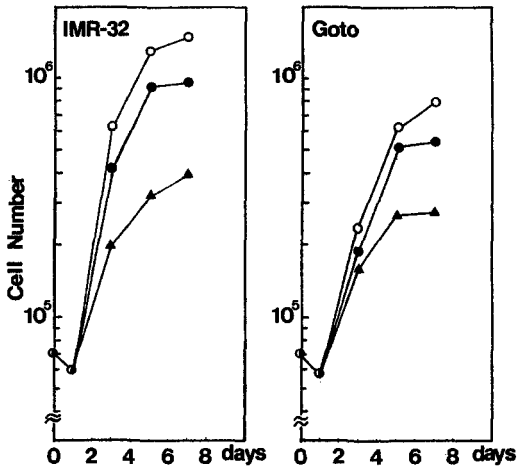


図1.神経芽細胞に対するレチノイン酸の増殖抑制作用
○:control, ●:10ng/ml NGF, ▲:10^{-6}M RA

図2

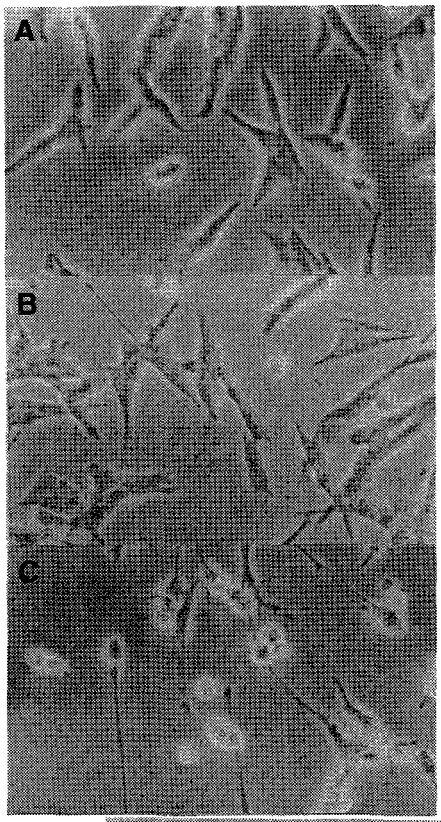


図2.レチノイン酸による神経芽細胞の形態変化
A:control, B:10ng/ml NGF, C:10^{-6}M RA

図3

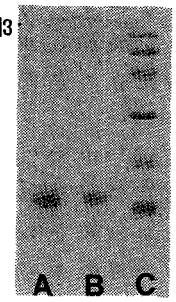


図3.精製CRABP のSDS-ポリアクリル
アミドゲル電気泳動
A:ニワトリCRABP
B:ブタCRABP
C:分子量マーカー

図4

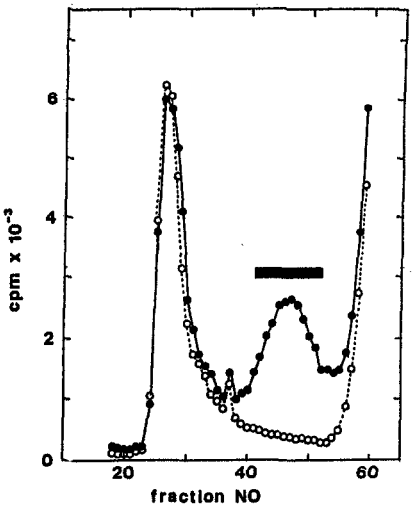


図4.ニワトリ初期胚脳CRABP のセファデックスG-75
カラムからの溶出パターン
非放射性 RA (2×10^{-5}M)存在下 (○),非存在下 (●)

図5

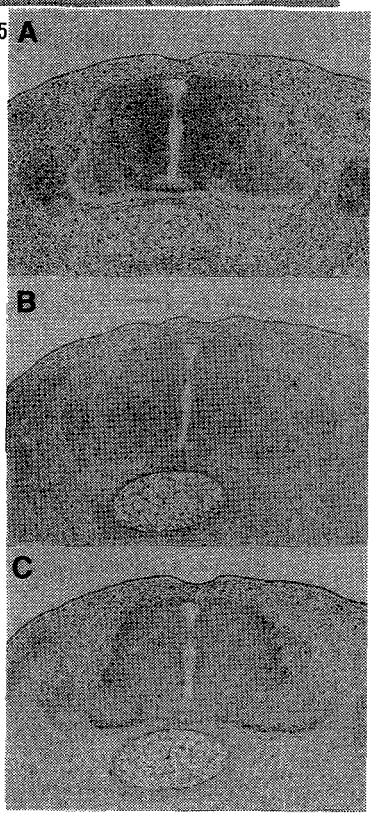


図5.抗CRABP 抗体を用いたニワトリ初期胚の免疫染色
A:ヘマトキシン エオシン染色　B:コントロール抗体
C:抗CRABP 抗体

49. ウシ脳組織から分離した非ヒストンDNA結合タンパク質G24（HMG−1）の一次構造

礒辺俊明・高橋信弘*・Putnam F. W.**・奥山典生

（都立大・理・化学，東燃・総研*・インディアナ大・生物**）

〔要　約〕

ウシ脳可溶性タンパク質画分から、大容量DEAE-Sephadex A-50カラムを用いる大量調製法で分離精製したタンパク質（G24）の一次構造を解析して以下の結果を得た。

(i) G24は214アミノ酸残基から構成される、分子量24,776のポリペプチドであった。2次元電気泳動による分析から、G24は天然の状態ではこのポリペプチドをサブユニットとする3量体として存在していると推定された。等電点は6.2であった。

(ii) G24のアミノ酸配列は、ウシ胸腺由来の非ヒストンDNA結合タンパク質HMG-1の部分配列とよく一致しており、両者は同一のタンパク質と推定された。G24の配列には糖鎖結合のための信号配列が2か所、リン酸化の信号配列が1か所存在した。

(iii) G24のアミノ酸配列には約80残基を単位とする2回の分子内重複が存在した。G24は、I-II-II'-IIIの4つのドメインから構成されるモザイクタンパク質であり、このうちドメインIIIはGlu,Aspのみからなる30残基の特徴的な酸性アミノ酸clusterをC末端に含んでいた。

(iv) ドメインI-IIに至るG24のN末端配列は、Histone H2bや非ヒストンタンパク質HMG-14の対応する配列によく似ており、またドメインIIIの配列はある種のホメオティック遺伝子を含む一連のDNA結合タンパク質の一部の配列などと類似していた。

(v) 以上の結果から、G24では、N末端を含むI-II-II'のヒストン様構造がDNAへの結合部位の一部になっていると推定した。ドメインIIIの役割は不明であるが、例えば遺伝子のpackagingや結合の特異性の決定に関与しているとも考えられる。

Key word : primary structure / non-histone chromosomal protein / brain

［はじめに］

脳神経組織では、他の組織に比べて非常に多くの特異的な遺伝子が発現されており、その産物である脳特異タンパク質と神経系の機能との関連が注目されている。このような組織特異タンパク質の存在は、一方では、生物の発生や分化にも関わる遺伝子の制御の問題としてもとらえられ、生命科学分野の重要な研究課題となっている。

筆者らは、2次元電気泳動や最近開発した2次元HPLC法と、大容量カラムクロマトグラフィーを併用して、特異タンパク質を含む脳内タンパク質を系統的かつ網羅的に分離し、その同定を試みる一方、ここで得られた脳特異タンパク質の特質を、主として生化学的な観点から記述する研究を進めている。

本研究では、このような過程で得られたタンパク質の1つであるG24の一次構造について述べる。構造解析の過程で、G24はWalkerらによってウシ胸腺から分離された非ヒストンDNA結合タンパク質（HMG−1）[6]と同一分子であるらしいことが明らかになった。HMG−1は、核内に約10^6コピー存在して，いわゆる”house-keeping”遺伝子の転写活性を維持、調節しているものと推定されている。

［材料と方法］

G24タンパク質は、脳可溶性タンパク質の系統的大量調製法[3]に基づき、ウシ脳20kgから得た可溶性画分の硫安分画、DEAE-Sephadex A-50、およびSephadex G-75カラムクロマトグラフィーにより精製した。一次構造は、精製標品をピリジルエチル化した後、BrCN、希塩酸、S.aureus V8 protease、lysylendpeptidaseなどで限定分解して得られたペプチドの構造分析を基礎とするタンパク質化学的な方法で決定した。得られた一次構造は、National Biochemical Research Foundation-Protein Identification Resourse (NBRF-PIR)のアミノ酸配列データベースと検索のための各種のComputer Programにより解析した。

［結果と考察］

（I）G24の分離と物理化学的性質

G24タンパク質は、micro glutamic acid-rich protein[4]などと同様、calmodulin溶離後のDEAE-Sephadexカラムをさらに高塩濃度の緩衝液で溶出して得られる”post-calmodulin分画”に検出された。分離精製したG24標品は、各種のHPLC法、変性剤存在下、非存在下での2次元電気泳動、N末端分析を含む一次構造解析で均一であった。2次元

電気泳動で測定したG24の等電点は 6.2、分子量は、SDS存在下で 24,000 、非存在下では約 80,000 であった。また一次構造から計算したポリペプチド分子量は 24,776 であった。したがって、G24は天然の状態では3量体として存在していると推定できる。G24を加水分解して得られたアミノ酸組成は、Lys(20%),Glu(18%),Asp(11%)に富み、これが親水性の高いタンパク質であることを示唆していた。

(II)一次構造

(i) ポリペプチド鎖のアミノ酸配列

ピリジルエチル化したG24を限定分解して得られた各種のフラグメントの構造分析から推定したG24のアミノ酸配列を図1に示した。G24は、214 残基からなる分子量24,776のポリペプチドであった。図1の配列は、ウシ胸腺から分離された非ヒストンDNA結合タンパク質HMG-1の部分アミノ酸配列[5,7]とよく一致しており、両者は同一のタンパク質分子と推定された。G24分子で最も特徴的な配列は、C末端185-214 に存在するGlu, Asp のみからなる30残基の酸性アミノ酸のcluster である。この部分を除けばG24はLys; Arg などに富む、むしろ塩基性のタンパク質であった。分子中に3モル存在するCys 残基はいずれもSH基を持っており、したがってG24分子中には disulfide結合は存在しない。HMG-1に対してはリン酸化やグリコシル化など、多様な転写後修飾が報告されている。図1の配列中には、糖鎖結合のための信号配列 (Asn-X-Ser)が2か所、リン酸化の信号配列が1か所存在したが、対応する残基はいずれも修飾をうけていなかった。また、リボシル化や、核局在のための信号配列は存在しなかった。

(ii)ドメイン構造

G24のアミノ酸配列には分子内重複が存在することが dotmatrix programによる解析で明らかになった(図2)。その構造部分を relate program で配列したのが図3である。約80残基を単位とする2回の繰り返し構造が認められる。2つの配列間の相同姓は、統計的にも有意であった(6.76SD ユニット)。これらの構造部分をそれぞれドメイン II,II' と命名すると、G24の構造は、N末端部分のドメインI、C末端部分のドメインIII を加えてI-II-II'-IIIの4つのドメインから構成されていると考えられる(図6)。

(iii) 他のタンパク質との相同性

G24の配列をN末端から30残基づつのセグメントに分割し、それぞれのセグメントに対して相同性を示すタンパク質を search program で検索した。G24は、全体としては独特なアミノ酸配列を持っていたが、あるセグメントは他のタンパク質と類似の配列を持っていた。結果の一部を図4、5に示した。

ドメイン I-II に至るN末端配列は、Histone H2b や非ヒストンタンパク質 HMG-14 とよく似ており、また、ドメインIII の配列はある種のホメオティック遺伝子産物 (m6) や helix-destabilizing protein などの一連のDNA結合タンパク質、および micro glutamic acid-rich protein や ubiquinol-cytochrome c reductase などのタンパク質の一部の配列と類似していた。ドメイン II'の配列はヒストン H1.3 と類似していたが、その程度は上記の場合に比べると小さかった。

(III) まとめ

G29 (HMG-1) の構造を模式化して図6に示した。G29は4つのドメインからなるモザイクタンパク質であるが、その構造を概観すると、N末端側 I-II-II' のヒストン様構造と、それとは類似性のない独立したC末端構造 IIIから構成されている。分子進化の観点からは、遺伝子重複により形成されたN末端側構造と、C末端側構造をコードする遺伝子の混成 (shuffling)によって生じたタンパク質分子と推定される。ヒストン構造との相同性から、G29は少なくともN末端を含む部分でDNAと結合すると考えられるが、この推定は、HMG-1を限定分解して得られたフラグメントについてDNA結合能を測定したCarballoらの結果[1]とも一致している。HMG-1のアセチル化部位もN末端部分に存在している(図5)。

特徴的な構造を持つドメインIII の機能は不明である。類似の構造をもつタンパク質の多くはDNAとの相互作用に関与している。また、ホメオティック遺伝子に見出される類似の構造について、Hogan[2]は、これが遺伝子の凝縮 (packaging)に関与しているのではないかと推定している。この問題の解決は、遺伝子の転写活性がどのように維持され調節されているか、あるいはある遺伝子の組織特異的発現がどのような機構によって担われているかという問題に対しても基礎的な知見を与えるものと思われる。

文 献 (1) Caballo,M., Puigdomenech,P., and Palau,J. (1983) EMBO J. 2, 1759-1764.
(2) Hogan,B. (1985) Nature, 314, 670-671.
(3) Ishioka,N., Isobe,T., Kadoya,T., Okuyama,T.,and Nakajima,T. (1984) J. Biochem.(Tokyo), 95, 611-617.
(4) Isobe,T., and Okuyama,T. (1985) FEBS Lett. 182, 389-392.
(5) Pentecost,B., and Dixon,G.H. (1984) Biosci. Reports, 4, 49-57.
(6) Reeves,R. (1984) Biochim.Biophys.Acta, 782, 343-393.
(7) Walker,J.M., Gooderham,K., Hastings,R.B., Mayes,E.,and Johns,E.W. (1980) FEBS Lett. 122, 264-270.



図1．ウシ脳G29タンパク質の一次構造
矢印aはアセチル化部位を示し、矢印gとpはそれぞれグリコシル化とリン酸化のための信号配列の位置を示している。

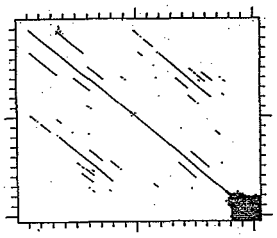


図2．G24のアミノ酸配列の分子内重複を示すドットマトリックスグラフィック表示

図3．ウシ脳G24タンパク質構造中にみられる配列の分子内重複

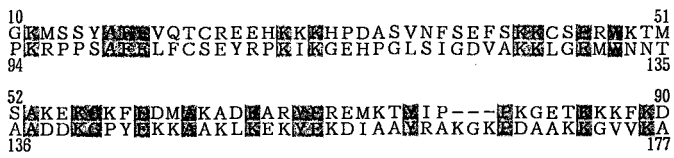


図4．G24N末端配列（ドメイン I-）とヒストン H2B、非ヒストンタンパク質 HMG-14 の位置構造の相同性



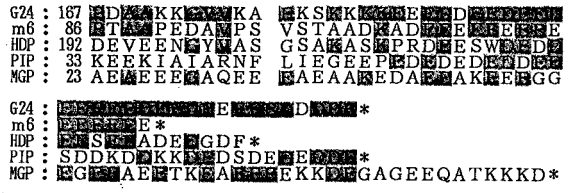


図5．G24 ドメインIII と各種タンパク質の一次構造の相同性

m6;m6 homeotic protein (mouse), HDP;helix-destabilizing protein (T4),
PIP; prehead core component (T4), MGP;micro glutamic acid-rich protein (bovine)

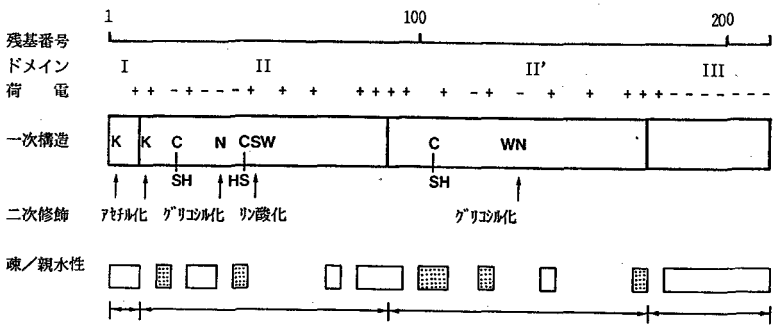


図6．ウシ脳G24タンパク質の一次構造を示す模式図 （■：疎水性、□：親水性）

50. 海馬キンドリングラットの海馬・扁桃核における興奮性アミノ酸受容体に連関したイノシトールリン脂質代謝回転の変化

山田了士・秋山一文・森本　清・氏家　寛・
西川　浩・森分　隆・佐藤光源*・
大月三郎　（岡山大・医・神経精神，東北大・医・精神*）

〔要　約〕

近年キンドリング現象の興奮性機序に興奮性アミノ酸神経伝達機構の変化が注目されている。私どもは昨年の本学会で扁桃核キンドリングラットの扁桃核でグルタミン酸の構造類似体であるイボテン酸添加によるイノシトールリン脂質代謝回転が最終刺激から1週間後で有意に亢進していることを報告した。これは扁桃核が刺激部位である場合の成績であるが，他の脳部位のキンドリングでも同様の変化が扁桃核でおこるかどうかを調べる為に，本研究では海馬キンドリングラットの海馬及び扁桃核において，イボテン酸刺激によるイノシトールリン脂質代謝回転を検討した。海馬キンドリング完成ラットで，最終刺激から24時間後のキンドリング群では，海馬および扁桃核においてイボテン酸10^{-3}M添加時の［^{3}H］inositol-1-phosphate（［^{3}H］IP1）の蓄積がそれぞれ対照の82%（$p<0.01$），91%（$p<0.01$）有意に上回っていた。また最終刺激から120時間後のキンドリング群では海馬，扁桃核でそれぞれ対照を51%（$p<0.05$）、91%（$p<0.001$）有意に上回っていた。これらの成績は，興奮性アミノ酸に連関するイノシトールリン脂質代謝回転の亢進が一次刺激部位である海馬のみならず，非刺激脳部位である扁桃核にも持続している可能性を強く示唆する。

Key word：hippocampal kindling, excitatory amino acids, phsphoinositide hydrolysis.

昨年の本学会で我々は，扁桃核キンドリングラットの扁桃核及び海馬スライスにおいて，グルタミン酸の構造類似体であるイボテン酸添加によるイノシトールリン脂質代謝回転が有意に亢進し，その変化は，扁桃核においてより顕著であり、最終刺激から1週間後でも持続していることを報告した。これらの変化は，従来の受容体結合実験では捉えられない受容体活性化の細胞内伝達系を反映したものであると考えられる。私どもはその後の実験でこの扁桃核での変化が最終刺激から4週間にも及ぶ長期持続性のものであり、しかも刺激（左）側から反対（右）側にも容易に伝播することを見い出した（本学会、秋山ら(2)）。キンドリング痙攣の全般化に扁桃核が重要であることは従来から指摘されているが，より詳細な電気生理学的実験によって，扁桃核－梨状葉皮質が"burst generator"として働くことが知られ(5)，キンドリング現象におけるその重要性が改めて見直されている。そこで他の脳部位のキンドリングにも共通して，扁桃核での変化がキンドリング現象に対応する神経化学的変化として捉えられるかどうかを検討する為に，本研究では扁桃核と並んでキンドリング現象でその生理学的機序が研究されている，海馬キンドリングラットの海馬および扁桃核におけるイボテン酸添加時のイノシトールリン脂質代謝回転の実験を行った。

（対象及び方法）

1）キンドリングラットの作製。

SD系雄性ラット（体重260-290 g）を用い，左側背側海馬（AP -2.6, L 2.4, D 3.2）に慢性深部電極を挿入した。対照群のラットについても全く同様の電極挿入を行った。キンドリング群のラットには，300-400μA, 60Hz, 正弦波の電気刺激を1日2回各1秒間

加えた。運動発作症状は，海馬固有の無動を中心とした段階をstage 0とし，それ以上の発作をRacine(6)の分類に従って５段階に分類した。刺激を続けてstage 4の全身痙攣に至った段階で刺激を１日１回とし、stage 4以上の全身痙攣が少なくとも５回以上連続した時点で海馬キンドリング完成とした。ここでキンドリング群ラットをさらに２群に分け，各々最終刺激から２４時間及び１２０時間経た後にイノシトールリン脂質代謝回転の実験に供した。

２）イノシトールリン脂質代謝回転の測定法。

ラットを断頭後，速やかに切り出した脳組織を350μm×350μmにスライスした。イノシトールリン脂質代謝回転の測定はBerridgeら（３）の方法に準拠し，LiCl存在下にイボテン酸10^{-3}Mまたはbufferを添加して，[^{3}H] IP1を溶出し放射活性を測定した。[^{3}H] IP1蓄積値はfmoles/mg proteinによって表示した。統計的解析はone way ANOVAに依った。

（結果）

キンドリング群のうち，最終刺激から２４時間後に断頭した群と，同１２０時間後に断頭した群との間で，総刺激回数，stage 4以上の全身痙攣の回数，最終刺激時のafter-discharge durationについてそれぞれ有意な差を認めなかった。イノシトールリン脂質代謝回転の結果はFigureに示す。海馬，扁桃核とも基礎値は3群間で有意な差を認めなかった。最終刺激から24時間後のキンドリング群ではイボテン酸添加時の[^{3}H]-IP1蓄積が，海馬，扁桃核でそれぞれ対照を８２％（$p<0.01$），９１％（$p\leq0.01$）有意に上回っていた。最終刺激から120時間後のキンドリング群では、イボテン酸添加時の[^{3}H] IP1蓄積が，海馬，扁桃核でそれぞれ対照を５１％（$p<0.05$），９１％（$p<0.001$）有意に上回っていた。

（考察）

最近Iadalora(4)らは，扁桃核キンドリングラットの海馬スライスで最終刺激から２４時間後でイボテン酸添加時のイノシトールリン脂質代謝回転が亢進することを示した。一方Akiyamaら（１）は扁桃核キンドリングラットでのイボテン酸添加時のイノシトールリン脂質代謝回転について，海馬での変化は一過性であり，むしろ扁桃核での変化がより顕著で，しかも長期持続性であることを示した。しかし扁桃核が直接の電気刺激部位であることが問題となり，また扁桃核での変化が他の脳部位のキンドリングにおいても重要なものであるか否かについても興味がもたれていた。今回の我々の結果では海馬キンドリングラットの海馬，扁桃核の両者で少なくとも１２０時間持続する，イボテン酸刺激によるイノシトールリン脂質代謝回転の有意な亢進がみられた。この変化は扁桃核では２４時間後，１２０時間後で全く同程度であったのに対し，海馬では１２０時間後で，２４時間後に比べて変化がやや減衰する傾向のある可能性が認められた。すなわち痙攣が全般化した海馬キンドリングにおいても，刺激部位の海馬から経シナプス性の変化が扁桃核にもたらされた結果，そこでの興奮性アミノ酸受容体に連関したイノシトールリン脂質代謝回転の亢進が生じているものと考えられた。

電気生理学的研究においては，Kairissら（５）が，キンドリングの部位にかかわらず扁桃核-梨状葉皮質に，"burst generator"が存在していることを指摘しており、またSato（７）は，海馬キンドリングネコで，キンドリング後半の段階で扁桃核発作が加重

される形で進行し，扁桃核に強い転移現象がみられることを報告している。これらの成績は今回の我々の成績によく一致するものであり，キンドリング現象における扁桃核の役割の重要性を裏付けるものである。

一方、海馬は，慢性てんかん源性を獲得し難いといわれ，実際海馬キンドリング完成には多くの刺激回数を必要とする。このことと，今回海馬が直接の刺激部位であるにもかかわらず，１２０時間後でイノシトールリン脂質代謝回転が減衰する可能性がみられたこととには何らかの関係があるものと推測され，今後より長期の時間経過を追い，扁桃核と海馬のどちらの変化がより長期持続性でより本質的な変化なのか，また海馬キンドリングの発展段階のどの時点で扁桃核の変化が始まるのかといった問題について今後さらに検討を重ねていく必要があると考えられる。

（文献）(1)Akiyama, K., Yamada, N. & Sato, M. Exp. Neurol. in press. (2)秋山一文、山田了士、氏家寛、西川浩、森本清、佐藤光源、大月三郎 (1987)神経化学 26 (3)Berridge, M.J., Downes, C.P. & Hanley, M.R.(1982)Biochem. J.,206,587-595 (4) Iadalora, M.J., Nicolletti, F., Naranjo, J. R., Putnum, F. & Costa, E. (1986)J.Neurochem.,40,40-46. (5) Kairiss, E. W., Racine, R. J. & Smith, K. (1984)Brain Res.,322,101-110.(6)Racine, R.,(1972)Electroenceph. Clin. Neurophysiol.,32,281-294.(7)Sato, M.,(1975)Folia Psychiat.Neurol.Jpn.,29,239-250.

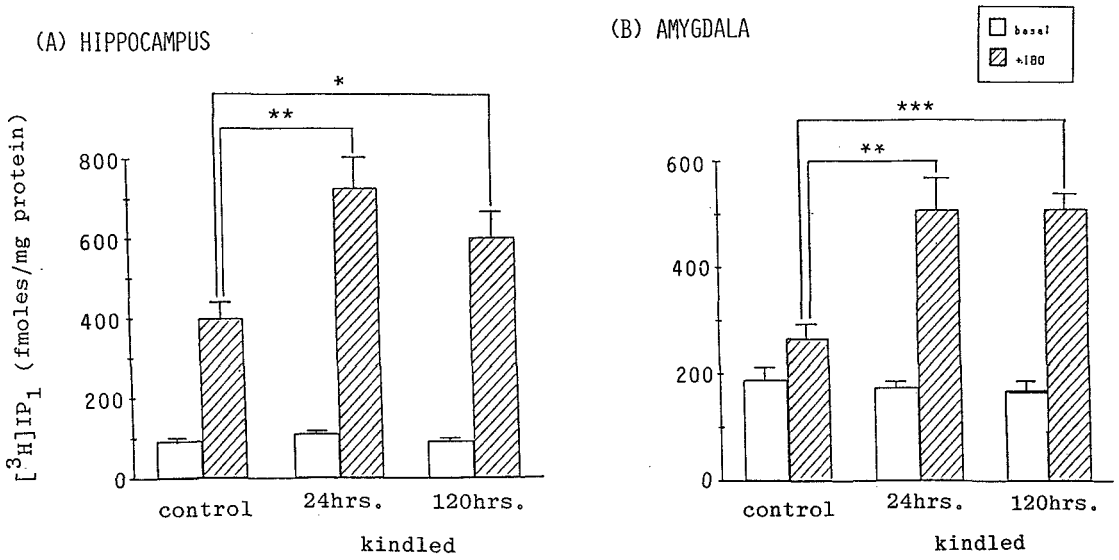


Figure. Formation of $[^3H]IP_1$ elicited by ibotenic acid in slices from hippocampus(A) and amygdala(B) prepared from brains of hippocampal kindled rats.The rats were sacrificed 24 or 120 hours after the last kindled seizures.
Values are expressed as mean ± S.E.M. of 6 determinations.

*** : $p<0.001$,** : $p<0.01$, * :$p<0.05$ as compared to control.

51. 扁桃核キンドリングラットの扁桃核における興奮性アミノ酸受容体に連関するイノシトールリン脂質代謝回転の変化——長期持続性及び刺激側・反対側別の検討

秋山一文・山田了士・氏家　寛・西川　浩・
森本　清・佐藤光源*・大月三郎
（岡山大・医・神経精神，東北大・医・精神*）

〔要　約〕

私どもは、昨年の本学会で扁桃核キンドリングラットの扁桃核及び海馬でグルタミン酸の構造類似体であるイボテン酸添加によるイノシトールリン脂質代謝回転を検討し、最終電気刺激から1週間後で扁桃核での著明な亢進を報告した。この成績は、キンドリング現象で示唆されている興奮性アミノ酸シナプス伝達の亢進が受容体以後の細胞内伝達系で生じていることを示すものと考えられる。今回は、その変化が、①最終電気刺激から1,2,4週間後まで持続しているかどうか、②4週間後で刺激側と反対側で差があるかどうかを検討した。イボテン酸添加時の〔3H〕IP1値は1,2,4週間後のいずれの時点でもキンドリング群で有意な増加がみられた。なお、海馬、deep prepiriform cortexを含む辺縁前脳部では対照群との間で有意差はなかった。最終電気刺激から4週間後、キンドリング群では刺激（左）側のみならず反対（右）側の扁桃核でも、イボテン酸添加時の〔3H〕IP1値は対照群の扁桃核に比べて有意に増加していた。これらの成績は興奮性アミノ酸受容体に連関するイノシトールリン脂質代謝回転の亢進が扁桃核で長期持続性に生じ、しかも刺激側から反対側に容易に伝播することを示しており、キンドリングの痙攣準備状態に対応する重要な知見であると考えられる。

Key word： amygdaloid kindling, excitatory amino acids, phosphoinositide hydrolysis

近年、キンドリングの発達と維持にかかわる興奮性神経伝達機序に関心が向けられている。キンドリングでは、抑制性神経伝達の増大を凌賀するほどの興奮性神経伝達が亢進し、痙攣準備状態につながる経シナプス性変化を構成するものと考えられる。多くの間接的証拠にもかかわらず、興奮性アミノ酸（EAA)シナプスにおける神経化学的変化がキンドリング現象の長期持続性に関係しているとの直接的証拠はまだ得られていなかった。しかし私どもは最近、扁桃核キンドリング完成ラットの扁桃核スライスで、最終電気刺激から２４時間後及び１週間後でグルタミン酸の構造類似体であるイボテン酸添加によるイノシトールリン脂質代謝回転が有意に亢進していることを見いだし(Akiyama et. al. Exp. Neurol. in press)(1)，昨年の本学会で発表した。今回はこのような扁桃核の変化が最終電気刺激の後、長期持続性に認められるかどうか、また、刺激側及び反対側の扁桃核で同様な変化が認められるかどうかを検討した。

（実験方法）

１）キンドリングラットの作製：S.D.系雄性ラットの左側扁桃核に慢性深部電極を植え込み、400μA、60Hzの正弦波で１秒間１日１回刺激した。運動発作症状はRacine(5)の分類に準じて５段階に分類した。実験１としてstage５痙攣が２０日連続してみられるようになったキンドリングラットを最終電気刺激から1、２、４週間後に断頭し、扁桃核、海馬、及びdeep prepiriform cortex(4)を含む辺縁前脳部を切り出した。実験２では、電極挿入の影響を除外するためにキンドリングラット及び対照ラットともに両側の扁桃核に慢性深部電極を植え込み、刺激はキンドリングラットの左側扁桃核のみに加えた。stage５痙攣が１０日連続してみられるようになったキンドリ

ングラットを最終電気刺激から４週間後に断頭し、２匹分の扁桃核を左側と右側に分け、対照群からは１匹分の両側扁桃核を切り出し、実験に供した。

２）イノシトールリン脂質代謝回転：測定は既報(1,2)に依った。〔3H〕inositol 1-phosphate(〔3H〕IP1)を溶出し、値は fmoles/mg protein で表示した。

（結果）

実験１：扁桃核に於ける〔3H〕IP1の基礎値は最終電気刺激後のどの時点でも両群間に有意差はなかったが、キンドリング群でのイボテン酸添加時の値は１、２、４週間後で対照群の値をそれぞれ 90% ($p<0.01$), 110% ($p<0.001$), 73% ($p<0.05$)上回る有意な増加を示した。なお海馬、deep prepiriform cortex(4)を含む辺縁前脳部では両群間に有意差はなかった（Figure 1）。

実験２：最終電気刺激から４週間後、キンドリング群では、刺激（左）側のみならず反対（右）側の扁桃核でも、イボテン酸添加時の〔3H〕IP1値が対照をそれぞれ 83% ($p<0.001$), 63 % ($p<0.01$)上回って有意に増加していた（Figure 2）。基礎値でも、刺激側、反対側ともに対照群に比べ有意に増加していた。なお、刺激側と反対側の間では基礎値、イボテン酸添加時の値ともに有意差はなかった。

（考察）

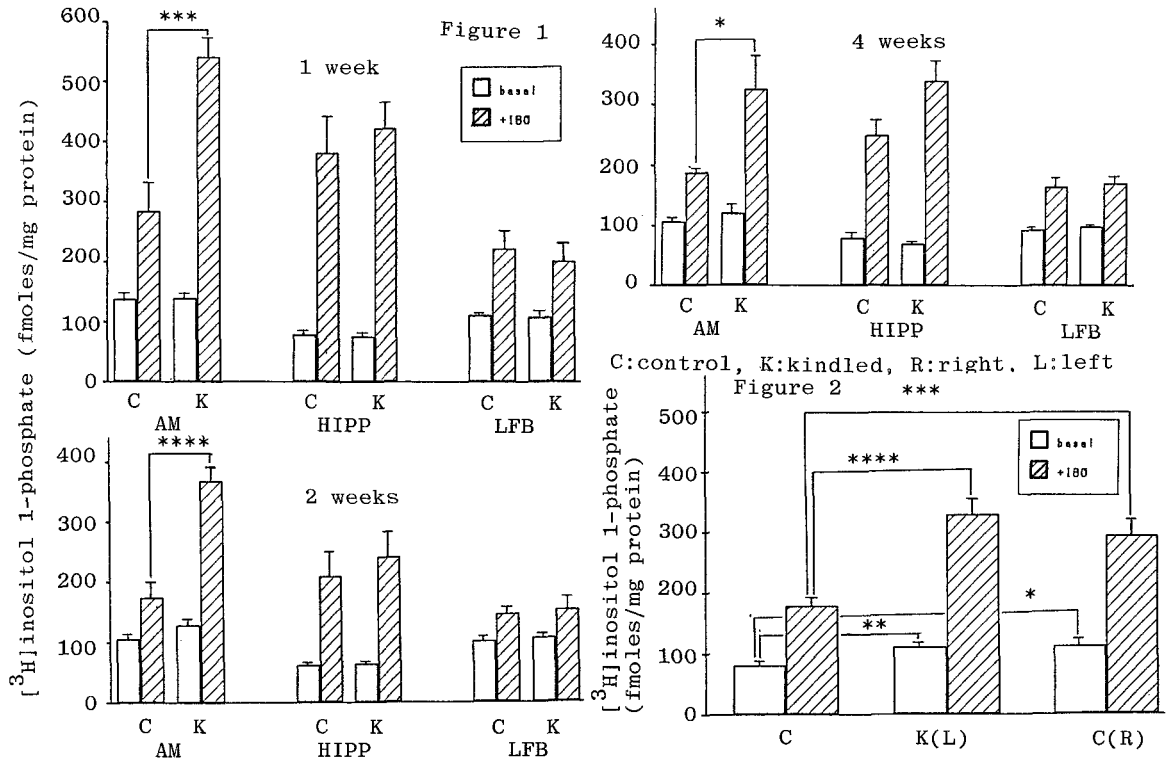
最近，EAA神経伝達機序と痙攣との関係が注目をあびている。中枢神経系では興奮性シナプスの数が抑制性シナプスの数を大きく上回り、特に大脳辺縁系でEAAを神経伝達物質とする投射路が存在する。脳内EAA受容体はquisqualate, kainate, N-methyl-D-aspartate(NMDA)の３亜型に分類されているが、拮抗薬が知られ、その薬理学的、電気生理学的性質が明らかにされているのはNMDA受容体である。即ちNMDA受容体はイオンチャンネルと連結し、脱分極された状態に於いてCaイオンの流入を促し epileptiform burstに重要な役割を果しているといわれる。NMDA拮抗薬が聴覚誘発性発作マウス、光過敏性Papio papioや扁桃核キンドリングラットのような動物の痙攣モデルで抗痙攣効果をもつことが認められている。キンドリング現象に於て、放出，再取込み，L-〔3H〕glutamate結合などのEAAシナプスにおける神経化学的変化が検討されてきたが、同現象の原因または永続化に関与しているとの証拠は得られていなかった(6)。昨年の本学会で、私どもは扁桃核キンドリングラットの扁桃核で最終電気刺激から24時間及び７日後でイボテン酸添加によるイノシトールリン脂質代謝回転が著明に増加する一方、海馬の変化は２４時間後のみに認められる一過性の変化であることを報告した。今回の成績は扁桃核の変化が最終電気刺激から４週間後にも持続している一方、海馬の変化が一過性であることを確認したものである。今回の成績で特に指摘すべきことは、その長期持続性と扁桃核という部位特異性であると考えられる。第一に、最終電気刺激から4週間後も持続する神経化学的変化は殆ど知られておらず、EAA受容体に連関する細胞内情報伝達系を反映するイノシトールリン脂質代謝回転の持続的な亢進が、キンドリングの痙攣準備状態の基盤をなす生理機序、例えば活動電位の群発火であるburst responseとなんらかの関係をもっている可能性がある。第二に、扁桃核と梨状葉皮質が痙攣発現に重要な部位であることが改めて指摘されている。即ち、扁桃核でキンドリング中に於けるinter ictal dischargeが頻発すること、burst responseが著明に延長すること(3)，梨状葉皮質で誘発される痙攣にEAA受容体の活性化が

必要にして十分な条件であること(4)が示されている。今回の扁桃核の変化が電気刺激の直接的な影響でないことは刺激(右)側とほぼ同程度の変化が反対(右)側にも認められる事で証明される。また、電極挿入の影響でもないことは、痙攣が全汎化した海馬キンドリングラットの扁桃核でイボテン酸添加時のイノシトールリン脂質代謝回転がやはり著明に亢進しているという山田ら(7)の成績によっても証明される。これらのことは、一次脳部位でキンドリング現象を形成した後では、反対側半球にまたがるような広範な経シナプス性変化によって二次脳部位のキンドリング現象の形成が促進されること(転移現象)に符合する所見とも解釈される。今後はイボテン酸添加によるイノシトールリン脂質代謝回転がEAA受容体のどの亜型を介するものかを検討していく必要があろう。

(文献) (1)Akiyama, K., Yamada, N. & Sato, M. Exp. Neurol. in press. (2)Berridge, M.J., Downes, C.P. & Hanley, M.R. (1982) Biochem. J. 206:587-595. (3)McIntyre, D.C. & Racine, R.J. (1986) Prog. Neurobiol. 27:1-12. (4) Piredda, S. & Gale, K. (1986) Brain Res. 3777:205-210. (5)Racine, R. (1972) Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 32:281-294. (6)Slevin, J.T., Kasarkis, E.J., Vanaman, T.C. & Zurini, M. (1986) p587-598. In:Excitatory Amino Acids and Epilepsy, Plenum Press, New York. (7)山田了士, 秋山一文, 森本清, 氏家寛, 西川浩, 森分隆, 佐藤光源, 大月三郎 (1987) 神経化学, 26.

Figure 1: [^{3}H]IP$_1$ formation elicited by ibotenic acid (1 mM) in slices of amygdala (AM), hippocampus (HIPP) and limbic forebrain (LFB) prepared from AM kindled rats. The rats were decapitated 1,2,4 weeks after the last kindled seizures.

Figure 2: [^{3}H]IP$_1$ formation elicited by ibotenic acid (1 mM) in slices of AM prepared from AM kindled rats decapitated 4 weeks after the last kindled seizures.



Values are expressed as mean ± S.E.M. of 5-6 determinations.

**** : p<0.001, *** : p<0.01, ** : p 0.02, * : p<0.05 vs control

52. キノロン系化学療法剤の痙攣発現機序に関する研究

堀　誠治・島田甚五郎・宮原　正・
栗岡　晋*・松田　誠**
（慈恵医大・第二内科，機能研究室*，医化学**）

〔要　約〕

近年、キノロン系化学療法剤（キノロン剤）の発展には目覚ましいものがあるが、その反面、副作用、特に中枢神経毒性が問題となっている。キノロン剤と非ステロイド系消炎鎮痛剤（NSAID）との併用時に痙攣の発現をみたという報告がある。そこで、我々は、中枢神経系において抑制性伝達物質と考えられているγ－アミノ酪酸（GABA）の受容体結合に及ぼすキノロン剤及びNSAIDの影響を検討した。

キノロン剤は、nalidixic acidを除き、濃度依存性にGABA受容体結合を阻害し、そのIC_{50}は、norfloxacin，1.2×10^{-5}；ciprofloxacin，1.0×10^{-4}；enoxacin，1.6×10^{-4}；pipemidic acid，8.6×10^{-4}；nalidixic acid，$>10^{-3}$Mであった。また、このGABA受容体結合阻害には、キノロン剤の7位に遊離piperazinyl基が必要であり、この結合阻害は、最大結合量が低下することによることが明らかとなった。さらに、NSAIDの一つであるfenbufen及びその代謝産物で薬理活性を有するbiphenyl acetate共存下では、キノロン剤のGABA受容体結合に及ぼす阻害効果は著しく増強された。

以上より、キノロン剤が、特にNSAID併用時に痙攣を誘発する可能性が示唆された。

Key word：quinolones, convulsions, GABA receptor

近年のキノロン系化学療法剤（キノロン剤）の発展には目を見はるものがあるが、その反面、副作用、特に本系剤の宿命的副作用とも考えられる中枢神経毒性が注目を集めている。キノロン剤の母体とも言えるnalidixic acidで、痙攣が誘発されたとする報告[1,5,6]があり、最近では、キノロン剤の一つであるenoxacinと非ステロイド系消炎鎮痛剤（NSAID）の一つであるfenbufenの併用時に痙攣を誘発したとの報告がある[7]。しかし、その痙攣発現機序に関する研究は皆無といってよい。そこで、我々は、中枢神経系において抑制性伝達物質と考えられているγ－アミノ酪酸（GABA）の受容体結合に及ぼすキノロン剤の影響を検討し、その構造活性相関を明らかとした。また、キノロン剤とNSAIDの相互作用についても検討したので、併せて報告する。

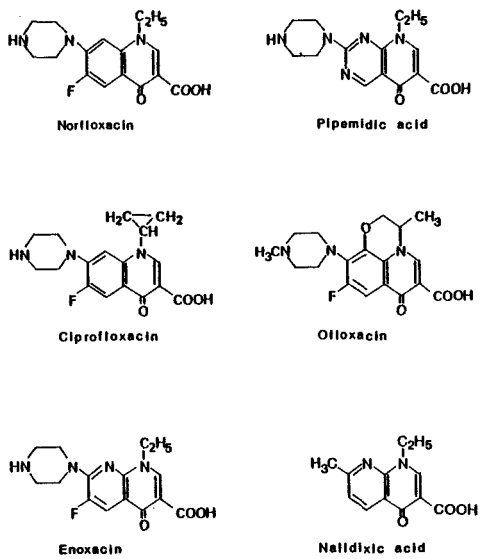


Fig. 1 Structures of quinolones.

－方法－

1）シナプス膜の調製：マウス脳よりZukin[8]らの方法により粗シナプス膜を調製し、さらに、120mM NaClを含む10mMカリウム・リン酸緩衝液にて洗浄し、シナプス膜

として用いた。

2）GABA受容体結合の測定：^{3}H-GABA をリガンドとして用い、遠心法にてその特異的結合量を求め、GABA受容体結合とした[2,3]。

－結果－

キノロン剤であるnorfloxacin (50mg/Kg)、enoxacin (50mg/Kg)、ofloxacin (50mg/Kg)を腹腔内投与しても痙攣は誘発されなかった。しかし、fenbufen (50mg/Kg)を同時投与した場合には、同量のnorfloxacin, enoxacin で痙攣が誘発されたが、ofloxacin では[illegible] は認めなかった。

1）GABA受容体結合に及ぼすキノロン剤の影響

GABA受容体結合に及ぼすキノロン剤（図1）の影響をin vitroで検討した。キノロン剤（nalidixic acidを除く）は濃度依存的にGABA受容体結合を阻害し、そのIC$_{50}$は表1に示す通りであった。キノロン剤の母核を一定とし、7位の置換基を変化させ（表2）、GABA受容体結合阻害に対する構造活性相関を検討した。7位に遊離のpiperazinyl 基を有するものが最も強くGABA受容体結合を阻害し、piperazinyl 基を持たないものでは、阻害効果は認められなかった（表2）。阻害効果の最も強いcompound 2を用いたScatchard analysisにより、本阻害は、GABA受容体の最大結合量の減少によることが明らかとなった（表3）。

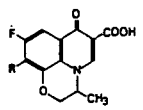
Table 1。 IC$_{50}$ values of quinolones.

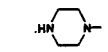
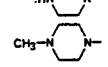
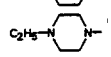
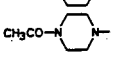
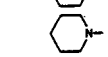
	IC$_{50}$ (M)
norfloxacin	1.2 x 10^{-5}
ciprofloxacin	1.0 x 10^{-4}
enoxacin	1.6 x 10^{-4}
pipemidic acid	8.6 x 10^{-4}
ofloxacin	1.0 x 10^{-3}
nalidixic acid	> 10^{-3}

2）GABA受容体結合に及ぼすキノロン剤とNSAID の相互作用

enoxacin, norfloxacin のGABA受容体結合に及ぼす影響をfenbufen及びその代謝産物で薬理活性を有するbiphenyl acetate、indomethacin、aspirin を始めとする数種のNSAID の共存下に検討した。aspirin を除き、NSAID はenoxacin, norfloxacin のGABA受容体結合に対する阻害効果を増強させ、その効果はbiphenyl acetateにおい顕著であっ

Table 2. Structures of quinolones and their IC$_{50}$ values.



Compound	R	IC$_{50}$ (M) none	IC$_{50}$ (M) BPA(10^{-4}M)
1	H	>10^{-3}	1.0x10^{-3}
2		4.8x10^{-5}	1.7x10^{-8}
3	 (Ofloxacin)	1.0x10^{-3}	9.1x10^{-7}
4		>10^{-3}	3.3x10^{-6}
5		>10^{-3}	N.T.
6		>10^{-3}	N.T.

BPA: biphenyl acetate
N.T.; not tested

Table 3。 Effect of compound 2 on Bmax and Kd of GABA receptor。

	high affinity sites		low affinity sites	
	Kd (10^{-9}M)	Bmax*	Kd (10^{-9}M)	Bmax*
control	18.3±3.7	0.97±0.07	231±15	2.35±0.42
compound 2 (5 x 10^{-5}M)	19.1±3.2	0.45±0.02	259±22	1.92±0.25

*pmol/g brain

た（表４）。そこで、最も増強効果の強かったbiphenyl acetateの存在下にキノロン剤との構造活性相関を検討した。遊離piperazinyl 基を有するものでは、biphenyl acetateの共存により、GABA受容体結合に対する阻害効果は顕著に増強された（表２）。

Table 4. IC_{50} values (M) for enoxacin and norfloxacin in the presence of NSAIDs。

	none	aspirin 10^{-4}M	fenbufen 10^{-4}M	indomethacin 10^{-4}M	flubiprofen 10^{-4}M	biphenyl acetate 10^{-4}M
enoxacin	1.4×10^{-4}	8.3×10^{-5}	1.3×10^{-6}	5.3×10^{-7}	3.3×10^{-8}	1.1×10^{-8}
norfloxacin	1.4×10^{-5}	1.4×10^{-5}	1.2×10^{-7}	1.9×10^{-7}	1.4×10^{-8}	$<10^{-8}$

－考察－

近年、キノロン剤の発展には目を見はるものがあるが、広く使用されるにおよび、本系剤の宿命的副作用とも言える中枢神経毒性が問題となっている。とくに、キノロン剤の一つであるenoxacinとNSAID の一つであるfenbufenの併用時に痙攣が誘発されたという報告[7]がなされてより、その痙攣発現機序が最も大きな問題となっている。

GABA作動性抑制性伝達が阻害された場合には、痙攣が誘発されることは良く知られている。我々は、セフェム系抗生剤により誘発される痙攣において、その痙攣発現機序として、GABA受容体結合の阻害による可能性を示し[2-4]た。今回、我々は、キノロン剤が、特にfenbufenとの同時投与によりマウスに痙攣を誘発し、GABA受容体結合を阻害することを示した（図２）。また、この阻害効果は、７位に遊離piperazinyl 基を有するものに強く認められ、NSAID 、とくにbiphenyl acetateの存在により著しく増強されることが明らかとなった（表２、４）。

以上の結果より、キノロン剤は、ＧＡＢＡ受容体結合を阻害することにより痙攣を誘発し、特にNSAID との併用時には、より低濃度において痙攣を誘発する可能性が示唆された。

－文献－

1) Fraser, A. G. and Harrower, A. D. B. Brit. Med. J. 2, 1518, 1977

2) 堀　誠治，栗岡　晋，松田　誠，嶋田　甚五郎　神経化学，23，385-387，1984

3) Hori S. Kurioka S., Matsuda M. and Shimada J. Antimicrob. Agent Chemother 27, 650-651, 1985

4) Hori S. Shimada J., Kurioka S. and Matsuda M. pp. 2621-2622 in Recent Advances in Chemotherapy (ed. J. Ishigami), University of Tokyo Press, 1985, Tokyo

5) Islam, M. A. and Sreedharan, T., J.A.M.A. 192, 1100-1101, 1965

6) Kemball, M. L. and Davis, P. A., Brit. Med. J. 2, 310, 1967

7) 厚生省薬務局　日本医事新報，No.3263，101-120，1986

8) Zukin S.R., Young A.B. and Snyder S.H. Proc. Natl. Acad. U.S.A. 71, 4802-4807, 1974

53. Putrescine および2－hydroxyputrescine のけいれん抑制作用について

中尾純治・能登　直・長谷川武史*・
中嶋照夫　（京都府医大・精神，GC－MS研*）

〔要　約〕

ラットの下大静脈にカニュレーションしたチューブから，一定速度で持続的にけいれん誘発物質である pentylenetetrazol を投与し，けいれんを誘発する実験系を作成した。この実験系を用い種々の既存の抗けいれん剤の効果を評価した。次に，2－hydroxyputrescine および putrescine を脳室内投与し，けいれんの閾値の継時的変化を測定した。R(－)－2－hydroxyputrescine では24時間付近をピークとして，1～2週にわたる強力なけいれん抑制効果を示したが，S(＋)型ではその作用は弱かった。一方，putrescine 投与の場合，その初期には致死的なけいれんが誘発されることが多くの例で観察されたが，けいれんの閾値自体は1～3日にわたって有意の上昇を示した。また，cyproheptadine i.p. による前処置を加えるとけいれん誘発後の致死作用は予防され，けいれんの閾値はさらに著名に上昇した。このことより，putrescine の脳室内投与によりけいれん抑制効果が生じると同時に，ヒスタミン系もしくは，セロトニン系を介すると考えられるけいれん準備効果という相反する効果を生みだす可能性が示唆された。

Key word：putrescine, 2－hydroxyputrescine, seizure threshold

ポリアミンの中枢神経系における役割りはあまり知られていない。しかしながら spermidine や spermine を実験動物の脳室内に投与すると興奮状態をもたらし，時にけいれん状態に移行することが報告されている(1)。しかし，一方では中枢神経系において抑制性の作用をもつ可能性も示唆されている（8, 9）。この可能性を背景としてジアミンである putrescine(PUT)と，その関連物質として昨年，著者らのグループによりその脳内存在が確認された2－hydroxyputrescine（HO－PUT）(3)について，けいれんの閾値に与える影響を検討したので報告する。

【方法】HO－PUT の合成　1,4－diamino－2－oxo－butane を水素化硼素ナトリウムにて還元し HO－PUT のラセミ体を得た。S(＋)体および R(－)については，Kullnig らの方法(2)，およびラセミ体を D－ショウノウ酸を用いて化学分割した。実験動物の手術　実験には，180～200g のウィスター系雄ラットを用いた。まず，脳室内投与用のガイドカニューレを右側脳室上端より1 mm 上に慢性的に固定した。次にビニールチューブ（PE－20）を大腿静脈より挿入し，その先端を下大静脈中に留置，固定し，後端を PE－50 に接続し皮下を通し，後頭部でガイドカニューレと伴に固定した。けいれん閾値の測定　手術侵襲より十分回復した後，下大静脈中にカニュレーションしたチューブから，infusion pump を用い，生理的食塩水に溶解した 5 mg/ml の pentylenetetrazol(PTZ)を 1.7 ml/min の一定速度で持続的に静脈内に注入し，けいれん誘発までの時間を測定した。けいれんの評価は，Racine のキンドリング形成過程における stage 分類(5)を参考にし，stage 1：First head nodding, stage 2：Rearing and forelimb clonus, stage 3：A full motor seizure with loss of postural control とした。通常は stage 3 に至らしめるのに要する PTZ の量をけいれんの閾値とした。

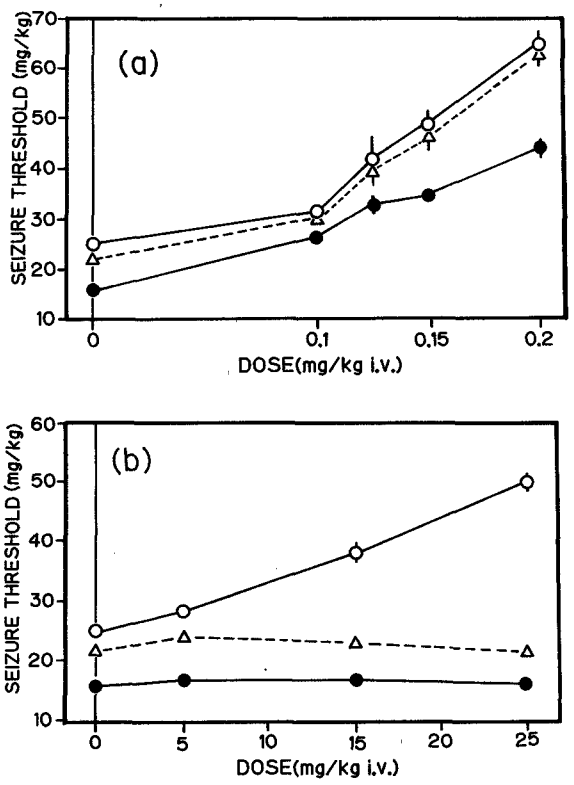


Fig. 1a,b) Dose-response relationship for the effect of diazepam(1-a) or Diphenylhydantoin(1-b) on the threshold of motor seizures of each stage, 5 min after the intravenous administration.
(stage 1 : ○—○, stage 2 : △—△, stage 3 : ●—●)

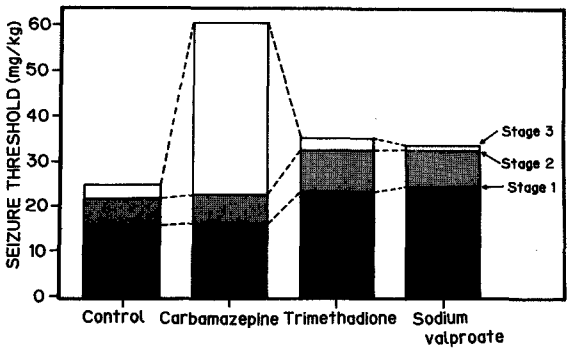


Fig. 2 Effects of anticonvulsants on the dose of PTZ required to produce motor seizures of each stage. Treatment : Carbamazepine(20 mg/kg, i.p., 2 hr before the test.), Trimethadione(250 mg/kg, i.p., 1 hr before the test.), Sodium valproate(200 mg/kg, i.p., 0.5 hr before the test.).

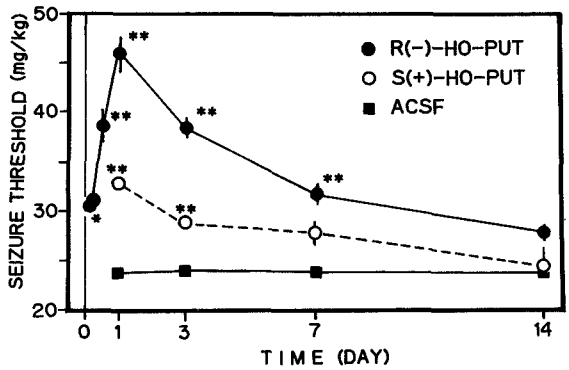


Fig. 3 Time course of anticonvulsive effects of R(−)-HO-PUT and S(+)-HO-PUT(30 μg/15 μl, i.c.v., each). ACSF : artificial cerebrospinal fluid(15 μl, i.c.v.).

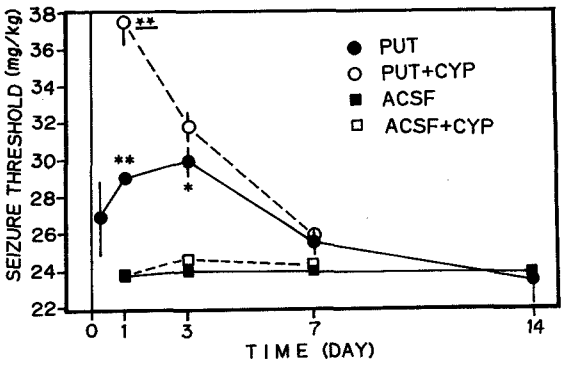


Fig. 4 Time course of anticonvulsive effect of PUT (30 μg/15 μl, i.c.v.) with or without the pretreatment of cyproheptadine(CYP, 1 mg/kg, i.p.).
*P<0.05 and **P<0.01, as compared with the control value. ★★P<0.01, as compared with the PUT i.c.v. value.

【結果および考察】

本実験系における種々の抗けいれん剤の効果の測定　本実験系を用い種々の既存の抗けいれん剤のけいれん閾値に与える影響を調べた。この結果，Diazepam は stage 1 に至るまでの過程と，stage 1 から stage 2 に至るまでの過程を用量依存的に抑制し，抗けいれん作用を発現することが明らかになった(Fig. 1-a)。これに対し，従来，PTZ に対するけいれん予防効果がないといわれてきた Diphenylhydantoin では，stage 2 から stage

3に至る過程を特異的かつ用量依存的に抑制することにより full convulsionに至るのを阻止する効果をもつことが明らかになった（Fig. 1-b）。また，Carbamazepine は Diphenylhydantoinと同じパターンの抑制効果をもち，Trimethadione，Sodium valproate は Diazepamと同じパターンの抑制効果をもつことが予想された（Fig. 2）。R(−)-HO-PUTおよびS(+)-HO-PUT脳室内投与時のけいれん抑制効果の経時的変化　30μgのR(−)-HO-PUT脳室内投与では，24時間付近をピークとした1～2週間の長期にわたる強力なけいれん抑制作用を示した(Fig. 3)。一方，30μgのS(+)-HO-PUTの脳室内投与でも有意なけいれん閾値の上昇を示したが，R(−)に比しその作用は弱かった(Fig 3)。30μgのR(−)-HO-PUTの脳室内投与24時間後の各々のstageに至らしめるのに要するPTZの量は，stage 1：33.7±4.1mg/kg，stage 2：43.7±4.6mg/kg，stage 3：46.1±3.9mg/kgであり（controlでは，stage 1：15.6±2.0mg/kg，stage 2：21.7±0.6mg/kg，stage 3：23.7±0.6mg/kg)，本実験系ではDiazepamに類似した抗けいれん作用のパターンを示した。著者らのグループは，すでにHO-PUTがラット脳内で γ-amino-β-hydroxybutyrate（GABOB）に代謝されることを示した(4)。R(−)-HO-PUTはR(−)-GABOBに代謝されるが，けいれん抑制効果はR(−)-GABOBはS(+)-GABOBに比して強力であるとされている。つまりけいれん抑制作用の強弱について，GABOBの光化学活性はHO-PUTのそれと一致する。従ってHO-PUTの脳室内投与時のけいれん抑制効果は，R(−)-GABOBに代謝されて発現することが予想される。PUT脳室内投与のけいれんの閾値に及ぼす影響　30μgのPUT脳室内投与24時間以内では，一度けいれんが誘発されると死亡する例が多く観察されたが，投与後1～3日にわたって有意ではあるが比較的少量のけいれん閾値の上昇が観察された（Fig 4）。また人工髄液投与群（ACSF）に抗ヒスタミン作用及び抗セロトニン作用を有するcyproheptadineを脳室内投与 3 時間前に前処置（1mg/kg i.p.）しても，けいれん閾値には影響を与えなかったが，PUT脳室内投与群に対しては投与24時間後のけいれん閾値を上昇させるとともに，けいれん誘発後の致死作用をほぼ防止した（Fig 4）。多量のポリアミン投与による致死作用をcyproheptadineが阻止する(6)など，ポリアミンとヒスタミン系もしくはセロトニン系との関連が示唆されている。また，ヒスタミンに関しては，けいれんとの関連も示唆されている(7)。今回の実験で，PUT脳室内投与がもたらすけいれん抑制効果を，cyproheptadineが増強したこと，およびPUT投与早期におけるけいれん誘発後の致死作用も阻止したことより，PUT 脳室内投与はけいれん抑制効果と同時にヒスタミン系，もしくはセロトニン系を介するけいれん準備効果という相反する効果を生じさせることが示唆される。

以上から，ポリアミンのうちでも，PUTおよびその関連物質であるHO-PUTはけいれん抑制的に働らいている可能性が示唆された。

【文献】

1. Anderson, D.J., Crossland, J. and Show, G.G. (1975) Neuropharmacol. 14, 571.
2. Kullnig, R. et al. (1973) J. Biol. Chem. 248, 2487.
3. 能登ら（1986）神経化学 25, 460.
4. 能登ら（1987）神経化学 投稿中
5. Racine, R. J. (1972) Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 32, 281.
6. Rodiochok, L. D. and Friedman, A. H. (1978) Life Sci. 23, 2137.
7. Schwartz, J-C., Garbarg, M. and Polland, H. (1986) in Handbook of Physiology (The Nervous System, Vol. Ⅳ) (Bloom, F.E. ed.) pp. 257, American Physiological Society.
8. Sakurada, T. et al. (1975) Japan. J. Pharmacol. 25, 653.
9. Wedgewood, M. A. and Wolfstencroft, J.H. (1977) Neuropharmacol. 16, 445.

54. Muscimol 及びBaclofenのEl マウス脳内モノアミン代謝に対する影響について

加太英明・横井　功・森　昭胤
（岡山大・医・脳代謝研・機能生化）

〔要　約〕

$GABA_A$ 及び $GABA_B$ レセプターアゴニストの Elマウス脳内モノアミン代謝に対する影響を比較検討するため，$GABA_A$ レセプターアゴニストとして Muscimol を，$GABA_B$ レセプターアゴニストとして Baclofen を腹腔内投与し、1時間後に脳内ドーパミン (DA)，ノルエピネフリン (NE)，ジハイドロキシフエニルアセチックアシッド (DOPAC) ホモバニリン酸 (HVA)，セロトニン (5-HT)，5-ハイドロキシインドールアセチックアシッド (5-HIAA)，を測定し，それらの作用を検討した。

Muscimol 3mg／kgを腹こう内投与すると　モノアミン代謝産物である DOPAC, HVA, 5-HIAAは有意に増加したが，DAには変化が認められなかった。NEは有意ではないが，増加傾向がみられ，5-HTはやはり有意ではないが，減少傾向がみられた。

Baclofen　20mg／kgを腹こう内投与すると，海馬でのみ DOPACが増加し，HVA, 5-HT 5-HIAA には，変化がみられなかった。DAは海馬及び中脳で増加し，NEは有意ではないが，減少の傾向がみられた。以上の結果より，$GABA_A$ 及び $GABA_B$ レセプターの刺激に対応するモノアミンニューロンの反応は，相違しており，特にNEニューロンには逆の影響を与えている可能性のあることが，示唆された。

Key word：　Muscimol, Baclofen, Monoamine

GABA神経系と，その他の神経系との関連に関しての報告が，数多くなされているが(5)GABA レセプターには，$GABA_A$　及び　$GABA_B$　の 2つのサブクラスに区分されている(1, 2) 。Elマウスは，自然発症てんかんモデル動物であり，ほうりあげ刺激により痙攣を誘発することができる(4) が，我々は GABAアゴニストを投与すると，その痙攣が抑制されることを　観察している。　そこで，今回　Elマウスにその痙攣を抑制するのに十分な量の Muscimol，　及び Baclofen を投与して，脳内モノアミン代謝に及ぼす $GABA_A$　及び $GABA_B$　レセプターの影響を比較検討してみた。

《実験方法》

Elマウスは当施設で飼育しているものを用い，生後約 7週齢より，痙攣を誘発させるほうりあげ刺激を 1週間に 2回行ない，連続して 5回以上痙攣をおこしたものを用いた。Muscimol (Sigma ChemicalCo., MO)，及び Baclofen (日本チバガイギー) は，生理食塩水に溶解し，それぞれ 3mg／kg，20mg／kgとなるよう腹こう内投与した。Control には，生理食塩水を投与した。投与 1時間後 microwave照射 (3kW, 0.2秒 Metabostat NJE2601) で固定。氷盤上にて脳を摘出後，Glowinski らの方法(3) に従って　大脳皮質，線条体，海馬，中脳を取り出し，分析開始まで -80℃で保存した。測定には電気化学的分析器付き高速液体クロマトグラフィー(YANACO HPLC system L-4000W)を用いておこない，データーの検定は　Student's t-testを用いておこなった。

《結果》

Muscimol 3mg／kg ip 投与 1時間後において DA は，線条体において増加傾向がみられるものの有意差はなく，他の部位でも変化は観察されなかった。しかし DOPACは，

すべての部位において増加しており，HVAも海馬を除いてすべての部位で増加しており DA 代謝のこう進が，示唆された。 NEは有意差はないものの，すべての部位で増加傾向がみられた（Ｆｉｇ－１）。 5-HTはすべての部位で減少傾向がみられ，5-HIAAは，大脳皮質，線条体，海馬で有意に増加しており， 5-HT 代謝のこう進が示唆された（Ｆｉｇ－２）。

Baclofen 20mg／kg ip 投与 1時間後において DA は，海馬，及び中脳で有意に増加しているが，DOPAC は，海馬でのみ有意に増加し，HVA は変化がみられなかった。また NE は，有意な変化ではないが，減少傾向がみられた（Ｆｉｇ－３）。 5-HT 及び 5-HIAA の変化は観察されなかった （Ｆｉｇ－４）。

HVA/DA を計算してみると，Muscimol投与では，大脳皮質でのみ有意な増加がみられ， Baclofen 投与では，海馬でのみ有意な減少がみられた。

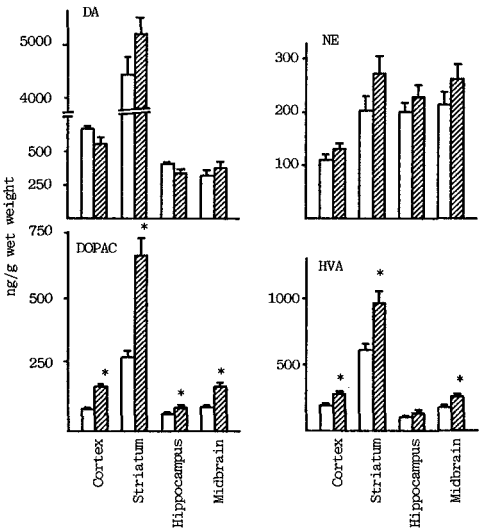


Fig 1 Effects of muscimol (3mg/kg) injected intraperitonelly on DA,NE,DOPAC, and HVA levels in the brain of El mouse. They were measured one hour after injection. Each value represents the mean±SEM obtained from 7-8 samples. *p<0.05;significant difference from the control, determined by Student's t-test.
□ control ▨ muscimol

また， 1度に実験にとって十分な数のElマウスがえられなかったため，Muscimol投与群と Baclofen 投与群とでは別々の時期に実験した。そのため各 Control 間の値に変化がみられ，Elマウスモノアミン含量は，時期により，かなりの変動があることが示唆された。

《考察》

GABA agonist投与によりモノアミン代謝のこう進がみられるという報告がある。今回 $GABA_A$ レセプターに主に結合する agonistとして Muscimol を，$GABA_B$ レセプター agonistとして Baclofen を用い，Elマウスの痙攣を十分に抑制する量を投与し，モノアミン及びそれらの代謝産物を測定したところ，両者の作用に差がみられた。 Muscimol 投与では，DA含量の変化はみられず，その代謝産物である DOPAC, HVAの著しい増加が観察されたのに対して，Baclofen投与では，海馬中脳において DA の上昇が認められ，代謝産物は，海馬で DOPACの増加が認められた他は，変化が見られなかった（Ｔａｂｌｅ 1）。このことは，Muscimolは DAの合成，分解速度を，共に促進せしめているのに対

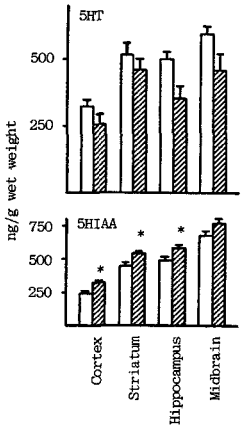


Fig 2 Effects of muscimol (3mg/kg) injected intraperitoneally on 5HT and 5HIAA levels in the brain of El mouse. They were measured one hour after injection. Each value represents the mean±SEM obtained from 7-8 samples. * p<0.05;significant difference from the control, determined by Student's t-test. □ control ▨ muscimol

して，Baclofenは，合成速度を促進せしめるものの，分解速度にはあまり影響を与えないことを示唆している。NEについては，まったく逆の変化を示しており，NEニューロンに対しては，$GABA_A$，$GABA_B$ レセプターはそれぞれ反対の作用を持っているのかもしれない。5-HTについては，Muscimolでは，すべての部位で減少傾向がみられ，5-HIAAは，増加しており，代謝のこう進が示唆されるのに対して，Baclofenは，20mg／kg ip投与では，変化はみられなかった。以上の結論として GABA ニューロンの DA ニューロン，NEニューロン，5-HTニューロンに対する影響が直接的なものか，あるいは間接的なものかは，不明であるが，

1) Muscimol は DA 代謝産物の増加をひきおこしたのに対して，Baclofenは，DA自体の増加をひきおこした。

2) Muscimol は NE を増加させたのに対して，Baclofenは，減少させた。

3) $GABA_A$ 作動系は，DAニューロンに対してと同様5-HTニューロンに対しても，強い作用をおよぼすのに対して，$GABA_B$ 作動系は，5-HTニューロンに対してはDAニューロンに対するほど強い作用をおよぼさないものと思われる。

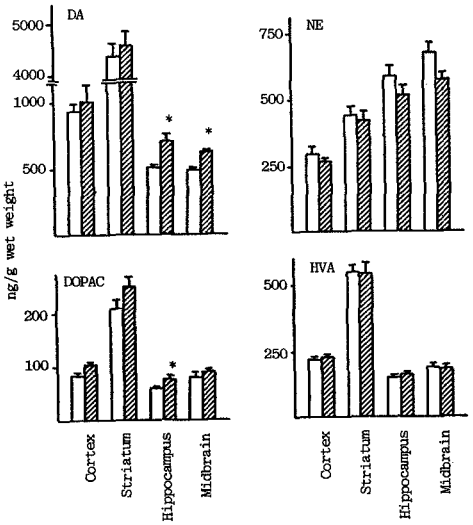


Fig 3 Effects of baclofen (20mg/kg) injected intraperitoneally on DA,NE,DOPAC, and HVA levels in the brain of El mouse. They were measured one hour after injection. Each value represents the mean±SEM obtained from 7-8 samples. * p<0.05;significant difference from the control,determined by *Student's* t-test. control baclofen

	Dopamine		DOPAC		HVA	
	muscimol	baclofen	muscimol	baclofen	muscimol	baclofen
Cortex	-	-	↑	-	↑	-
Striatum	-	-	↑	-	↑	-
Hippocampus	-	↑	↑	↑	-	-
Midbrain	-	↑	↑	-	↑	-

Table 1. Effects of muscimol and baclofen on dopamine and its metabolites levels in El mouse brain

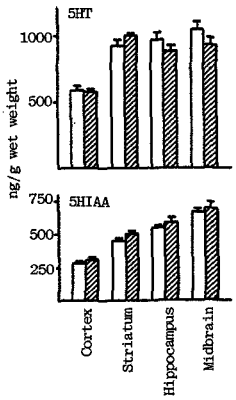


Fig 4 Effects of baclofen (20mg/kg) injected intraperitonelly on 5HT and 5HIAA levels in the brain of El mouse. They were measured one hour after injection. Each value represents the mean±SEM obtained from 7-8 samples. * p<0.05;significant difference from the control, determined by Student's t-test. control baclofen

《文献》

(1) Leonard, B. E. (1984) Neuropharmacology 23 213-218
(2) Bowery, N. G., Hill, D. R., Hudson, A. L., et al (1980) Nature 283 92-94
(3) Bowery, N. G., Price, G. W., et al (1984) Neuropharmacology 23 219-231
(4) 今泉清ら, (1959) 実験動物, 8 610
(5) Glowinski, J., and Iversen, L. L., (1966) J. Neurochemistry 13 655-669

55. Rolling Mouse Nagoya (RMN)の神経伝達物質受容体

小野寺　宏・高瀬貞夫・小暮久也・
織田銑一*・祖父江逸郎**
(東北大・医・神経内科, 名古屋大・環境医研*, 国立中部病院**)

〔要　約〕

Rolling mouse Nagoya (RMN)は遺伝性運動失調症の動物モデルとして病態研究が進められ、TRHによる脊髄小脳変性症治療の観点からも注目を集めている。RMNの小脳は低形成ではあるものの細胞構築異常は軽微とされる。生化学的には小脳や他の部位で、noradrenaline高値、tyrosine hydroxylase, dopamine-β-hydroxylaseの高活性などの異常が報告されている。今回定量的レセプターオートラジオグラフィを用いてRMN脳における種々の神経伝達物質受容体(adenosine A1, GABA-A, opioid, L-glutamate, muscarinic, benzodiazepine受容体)の分布とその密度を検索した。

RMNの小脳皮質では、stratum granulosumにおいてGABA-A及びadenosine A1受容体密度の、stratum moleculareではadenosine A1受容体密度の減少を認めた。benzodiazepine受容体は小脳皮質stratum granulosum, stratum moleculareいずれにおいても対照群と差がなかった。adenosine A1受容体はRMNの大脳皮質、線条体でも有意に減少していた。benzodiazepine受容体は大脳皮質で減少、海馬で増加していた。今回検討した脳各部位ではopioid, L-glutamate受容体密度には異常を認めなかった。RMNの運動異常には錐体外路系の障害が加味されているが、線条体でのadenosine A1受容体の変化等、小脳以外での神経伝達機能異常の関与が示唆された。

Key word : Rolling mouse Nagoya　receptor　adenosine

Rolling mouse Nagoya (RMN)は遺伝性運動失調症の動物モデルとして病態研究が進められており、TRHによる脊髄小脳変性症治療の観点からも注目を集めている。RMNは対照マウスに比して小脳前部が低形成ではあるが、細胞構築異常は殆ど認められないなど形態学的異常は軽微であるという(1)。一方、生化学的には小脳やその他の部位で、noradrenaline、tyrosine hydroxylase、dopamine-β-hydroxylase活性の増加など種々の異常が報告されている(2,3)。又、RMNにおける神経伝達物質受容体密度を対照マウスと比較すると、GABA、TRH、kainic acid受容体に異常が認められるという(4,5,6)。しかしmembrane preparationを用いた受容体結合実験では小脳の各層構造間での受容体密度の相違を知る事は不可能である。鬼頭らは、RMN小脳のGABA受容体密度が減少している事をオートラジオグラフィ法により明らかにした(7)。

今回我々は、定量的レセプターオートラジオグラフィを用いてRMN脳各部位での、adenosine A1, GABA-A, opioid, L-glutamate(主にquisqualate receptor), benzodiazepine, muscarinic receptorの変化を解析した。RMNを対照同腹マウスと比較して、小脳に加えて大脳皮質、線条体等でも神経伝達物質受容体密度の異常を認めたので報告する。

方法

マウスはrolling遺伝子(rol)をC3Hf/HeNemに導入したものを用いた。(rol/rol、N=6)は運動失調の発現により判定し、神経症状のないもの(+/+、+/rol、N=6)を正常同腹対照群とした。標準化昼夜サイクルで飼育し(明期8-20時)、3月令時に断頭屠殺(12-14時)後直ちに脳をドライアイスで凍結、-80°Cで保存した。10μm厚の凍結切片を作成し(-20°C)、既報の方法(8)でオートラジオグラムを得た。トリチウムラベルの各リガンド及び反応条件等はTable 1に示した。非特異的結合は、それぞれTable 1に示した非放射性試薬を加えてインキュベートした隣接切片より得た。冷風流にて乾燥させた切片をトリチウムスタンダードチップとともにLKB-Ultrofilmにコンタクトした。フィルム上の銀粒子密度を画像解析装置により測定し、

非線形最小自乗法を用いて放射活性を算出した。
トリチウムを使用したオートラジオグラムでは、quenching levelの差のため受容体密度算出時に誤差を生ずる可能性がある。しかし非特異的結合算出に供した切片の脳各部位での光学密度はRMNと対照マウス間で有意の差は認められず、RMNと対照群間でのquenching level 補正は行なわなかった。
統計学的処理はStudent's t-testによった。

結果及び考察

Table 2に定量的レセプターオートラジオグラフィのデータを示した。RMNの大脳皮質では、adenosine A1 receptor密度が23%の減少を示し、benzodiazepine receptorも有意に減少していた。線条体では、adenosine A1 receptorの減少を認めたが、他の受容体密度は対照群と差がなかった。海馬CA1領域では、benzodiazepine receptorのみが対照群に比して有意に増加していた。また、歯状回stratum moleculareではmuscarinic cholinergic receptorが有意に減少していた。
小脳皮質では、RMN及び対照群共にGABA-A受容体がstratum granulosumで極めて高密度に分布しているのに対して、stratum moleculareは低い結合部位数を有していた。stratum granulosumでのRMNのGABA-A受容体密度は対照群に比べて低いものの、stratum moleculareでは差を認めなかった。それに対して、adenosine A1 receptorは stratum moleculare、stratum granulosumいずれに於てもそれぞれ36%，44%減少していた。benzodiazepine 受容体は stratum moleculareで高密度、stratum granulosumで低密度と、GABA-A 受容体とは対照的な分布を示したが、RMNと対照マウス間で有意の差は認められなかった。
今回の定量的レセプターオートラジオグラフィによるRMNの神経伝達物質受容体密度は今迄報告されたmembrane preparationを用いた結合実験結果とよく一致するものであった。YamaguchiらはGABA-A受容体が小脳においてBmaxが減少、Kdは不変であったと報告している(4)。小脳でのadenosine A1受容体は主にgramule cell に分布している事をGoodmanらが証明していることから(9)、RMN小脳のgranule cellの異常が運動失調症状発現に重要な役割を演じていると考えられる。
生理学的解析からRMNの行動異常には athetotic movement、hypertoniaなどの錐体外路系障害による成分が含まれるとされる。Katoらは RMNのlocal cerebral glucose utilization(LCGU) を測定し、caudate-putamenでは変化はないものの globus pallidus、subthalamic nucleus、substantia nigraなど線条体と線維連絡を有する部位でのLCGU増加を認めている(10)。線条体で認められたadenosine A1 receptor密度の減少より、RMNの錐体外路症状発現にpurinergic systemの異常が関与している可能性が考えられた。

Table 1. Incubation conditions for receptor autoradiography

Receptor	Ligand (nM)	Preincubation min/temp.	incubation min/temp.	Wash min/temp.	Selective displacer(μM)	Ref
Adenosine A_1	[^{3}H]cyclohexyl-adenosine(5)	no	Buffer A 90/R.T.	Buffer A 1/4°C	L-phenyl-isopropyladenosine (10)	8
$GABA_A$	[^{3}H]muscimol (30)	Buffer B 20/4°C	Buffer B 40/4°C	Buffer B 1/4°C	GABA (10)	11
Opioid	[^{3}H]naloxone (5)	no	Buffer C 90/R.T.	Buffer C 1/4°C	Naloxone (10)	12
L-Glutamate	[^{3}H]L-Glutamate (300)	Buffer A 20/4°C	Buffer D 60/R.T.	Buffer D 10/4°C	L-Glutamate (1000)	13
Benzodiazepine	[^{3}H]flu-nitrazepam(1)	no	Buffer A 40/R.T.	Buffer A 1/4°C	Diazepam (1)	11
Muscarinic cholinergic (total)	[^{3}H]quinuclidinyl-benzilate(1)	no	Buffer E 90/R.T.	Buffer E 5/4°C	Atropine (1)	14

Buffer A:50 mM Tris-HCl(pH 7.4)
Buffer B:50 mM Tris-citrate(pH 7.1)
Buffer C:50 mM Tris-HCl(pH 7.4) and 100mM NaCl
Buffer D:50 mM Tris-HCl(pH 6.8)
Buffer E:50 mM Phosphate(pH 7.4)
R.T.: room temperature

Table 2
Neurotransmitter receptor binding in the Rolling mouse Nagoya(N=6) and control animals(N=6)

	adenosine A1	GABA-A	benzodiazepine	muscarinic	L-glutamate	opioid
cerebcerbral cortex						
(average)						
control	107± 6	312± 6	125± 3	340± 8	241± 7	29.9±1.0
RMN	82± 3*	294± 4	115± 3*	330±20	227±17	27.2±2.0
caudate-putamen						
(average)						
control	104±13	231±14	55± 3	478±17	233±10	62.1±5.3
RMN	67± 7*	220±16	55± 2	439±13	221± 4	54.5±5.0
hippocampus						
CA1						
control	176±10	268±13	104± 3	374±24	336±13	27.4±2.6
RMN	157± 9	266± 8	116± 3*	422±26	349±29	22.5±2.2
CA3						
control	168±10	170±15	94± 7	363±27	247±14	34.4±1.9
RMN	167± 8	180± 7	88± 7	316±16	278±22	30.4±3.0
dentate gyrus						
stratum moleculare						
control	130± 8	284±10	112± 5	405±14	351±11	
RMN	114± 8	306± 5	132± 8	355±12*	330±25	
cerebellum						
stratum moleculare						
control	113± 5	299± 8	83±3		107± 6	7.4±1.0
RMN	72±11*	295±17	98±6		124± 8	6.7±1.4
stratum granulosum						
control	75±2	3109±577	52± 2		119± 7	7.9±1.0
RMN	42± 7**	764±96*	60± 5		132±12	7.5±1.3
(average)						
control				40± 4		
RMN				48± 3		

Results are expressed as means(fmol/cm^2)±S.E.M.
Significant difference from control values: **p<0.01; *p<0.05

References

Nishimura,Y. (1975)Adv. Neurol. Sci. 19:670-6722. 2 Nagatsu, I. et al. (1980)Biomedical Res. 1:88-90. 3 Yamaguchi, T. et l. (1982)Neurochem. Int. 4:491-494. 4 Yamaguchi, T. et al. (1984)Neurochem. Res. 9:485-495. 5Yamaguchi, T. et al. (1984)Neu ochem. Res. (1984)497-505. 6 Yamaguchi, T. et al. Neurochem Res. 9:477-484. 7鬼頭et al. 厚生省班会議(1982). 8 Onodera, H et al. (1985)Brain Res. 345:406-408. 9 Goodmanm, R. et al. (1983)Science. 220:967-969. 10 Kato, M. (1982)J. Cerebral Bloo Flow Metab. 2:385-393. 11 Onodera, H. et al. (1987)J. Cerebral Blood Flow Metab. 7:82-88. 12 Herkenham, M. (1982)J. Neur sci. 2:1129-1149. 13 Onodera, H. et al. (1986)Neurosci. Lett. 68:169-174. 14 Onodera, H. et al. Brain Res. (in press).

56. ストレス曝露中の攻撃性の表出の有無とラット脳内ノルアドレナリン代謝

田中正敏・津田　彰・井田能成・白尾一正・
小口雅申・権藤雄二　（久留米大・医・薬理）

〔要　約〕

ストレス曝露中のラットの攻撃性の表出の有無が脳内noradrenaline(NA)代謝にどう影響するかについて検討した。Wistar系雄性ラットを板の上に仰臥位に置き四肢をテープで固定し、このストレス負荷中に口先に出された割り箸に噛みつくことのできるラット(bite群)と単にストレス負荷のみのラット(non-bite群)を設定し、10分間のストレス負荷直後、ストレスから解放50分後の脳各部位のNA及びその主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO4)含量、血漿corticosterone含量を定量した。拘束ストレス直後にはbiteの有無にかかわらずMHPG-SO4含量、NA含量とも有意な変化はほとんどみられなかった。ストレス解放50分後では、bite群、non-bite群とも視床下部、扁桃核、視床、大脳皮質でMHPG-SO4含量が有意に増加したが、bite群に比べてnon-bite群のMHPG-SO4含量の増加の方が視床下部、扁桃核、視床で有意に大きかった。ストレスによる血漿corticosterone含量の増加がbite群では解放後速やかに回復するのにnon-bite群では解放後も持続した。これらの結果から、同じストレスに曝されても、その間攻撃性を表出できない方が表出できる方に比べて、視床下部、扁桃核、視床などのNA代謝回転の亢進が著しいことが示された。

Key word： Stress, Brain noradrenaline metabolism, Aggression

ヒトでは怒りや攻撃性を表出した場合とそうでない場合とでは、心身症や神経症その他の疾患の発現の仕方が異なってくることが知られている。動物では、ラットに尻尾から電撃を加えた場合、電撃刺激中に互いに戦ったラットの方が、ただ電撃を受けるのみのラットに比べて胃粘膜損傷の程度が有意に軽微であることや(10)、拘束ストレス中にブラシに対して噛みつくことができたラットの方が、拘束ストレスを負荷されたのみのラットより胃粘膜損傷の程度が軽微であることが報告されている(９)。しかし、ストレス曝露中の動物が攻撃性を表出した場合とそうでない場合との違いが、脳内noradrenaline(NA)代謝に対してどう影響するかについて詳細に検討した報告はない。演者らは諸種のストレス状況下におけるラット脳内NA代謝の特性について報告してきたが(５～７)、今回はこのようなストレス曝露中に攻撃性を表出させるか否かという要因がラット脳内NA代謝にどのような影響を与えるかについて検討した。

【方　法】

Wistar系雄性ラット(体重185～210 g)を対象とした。ストレスとして、ラットを木製の板(13×22 cm)上に仰臥位に置き、四肢を粘着テープで固定し、更に胸部から腹部を革の帯で固定する方法を採用し、ストレス負荷時間はすべて10分間とした。ストレス負荷する群を更にbite群とnon-bite群に分けた。実験者が割り箸をラットの口先に突き出し、それに対して噛みつくことのできるラットをbite群とした。biteしている時間をストップ・ウオッチで測定し、10分間のストレス負荷のうち７分以上biteしていたラットをbite群として採用する基準としたが、bite群に割り付けられた10匹のラットでこの基準を満たさなかったのは１匹のみで、このラットは実験から除外した

ただ拘束ストレスを負荷するのみのラットをnon-bite群とした。実験には次の5群を設定した。①対照群、②ストレス負荷中biteさせ、ストレス負荷終了直後に断頭する群、③ストレス負荷中biteさせ、ストレスから解放50分後に断頭する群、④拘束ストレス負荷のみで、ストレス負荷終了直後に断頭する群、⑤拘束ストレス負荷のみで、ストレスから解放50分後に断頭する群。各群のラットは①～③群が8匹、④⑤群が9匹であった。

断頭後採血するとともに速やかに脳を摘出し、青斑核部を除く脳各部位をGispenらの方法(1)により、青斑核部をReisとRossの方法(4)で切り出した。血液は血漿に分離後血漿corticosterone含量をvan der Viesの方法(8)で蛍光法により定量した。各脳部位のNA含量とラット脳におけるNAの主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxy-phenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO4)含量(青斑核部についてはMHPG-SO4含量のみ)を演者らの方法(3)により蛍光法で定量した。統計的解析にはStudent't-test(両側検定)を摘要した。

【結　果】

NA及びMHPG-SO4含量の結果を図1に示す。10分間のストレス直後では扁桃核でbite群のMHPG-SO4含量が有意に増加していたが、他の部位ではbiteの有無にかかわらず、MHPG-SO4含量、NA含量とも有意な変化はみられなかった。ストレスから解放50分後では、bite群では、視床下部、扁桃核、視床、大脳皮質でMHPG-SO4含量が対照群に比べて有意に増加したが、それより顕著なMHPG-SO4含量の増加がみられたのはnon-bite群であった。つまり、non-bite群ではストレスから解放50分後にMHPG-SO4含量は著明に

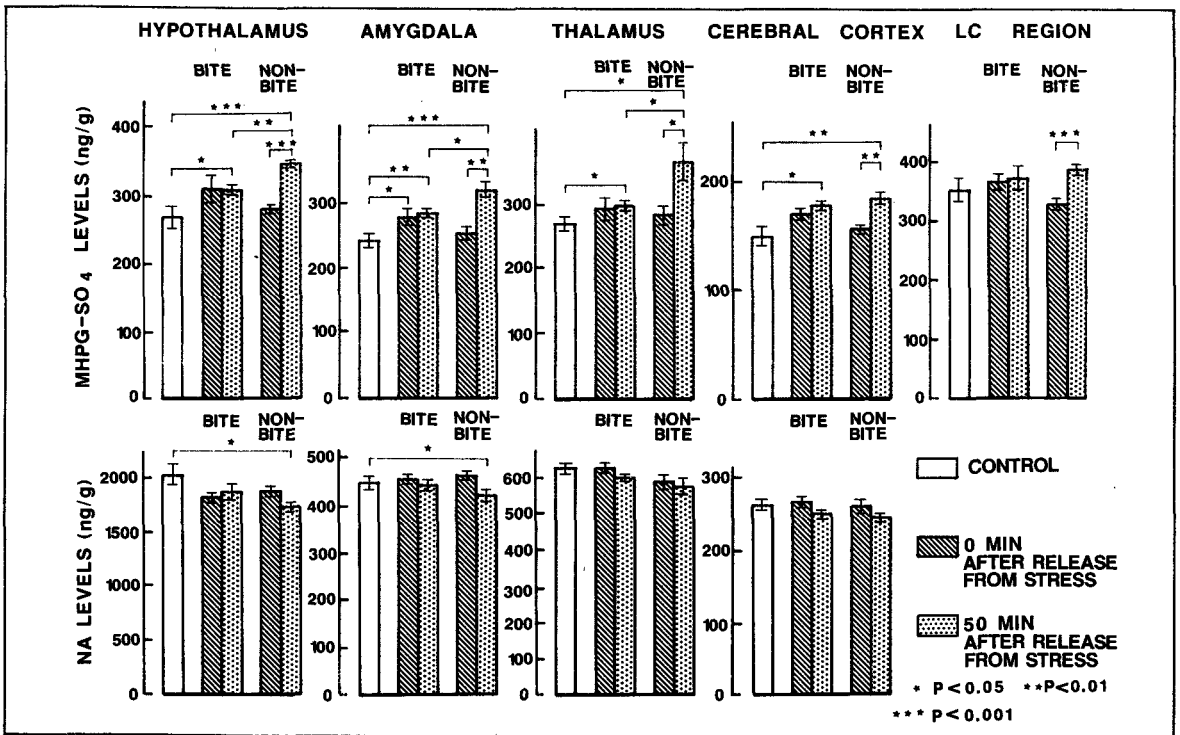


Fig. 1. Changes in noradrenaline (NA) and 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate (MHPG-SO4) levels in the brain regions exposed to 10 min supine restraint stress with (BITE) or without (NON-BITE) being allowed to bite a wood stick. LC REGION: locus coeruleus region.

増加しており、視床下部、扁桃核、視床ではストレス解放50分後のbite群に比べて有意な高値を示示した。大脳皮質、青斑核部ではnon-bite群ではストレス解放直後に比べて解放50分後の方がMHPG-SO4含量は有意に高かった。non-bite群ではストレス解放50分後に視床下部、扁桃核で対照群に比してNA含量が有意に減少した。血漿corticosterone含量は図2に示すようにbiteの有無にかかわらず、ストレス解放直後に有意に増加したが、解放50分後にbite群が速やかに回復するのに対して、non-bite群ではストレス解放50分後も回復していなかった。

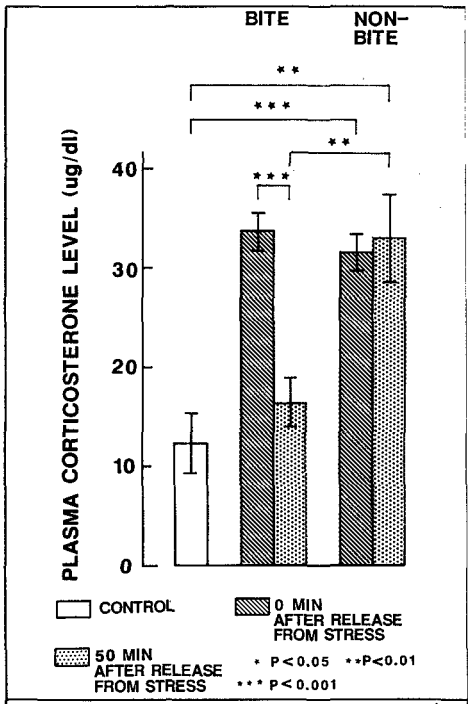


Fig. 2. Changes in plasma corticosterone levels in the rats exposed to stress with (BITE) or without (NON-BITE) being allowed to bite a wood stick.

【考　察】

今回と同様の拘束ストレスを1時間負荷することにより今回検討したような部位でMHPG-SO4含量が増加することから、これらの部位でNA代謝回転が亢進することは既に報告した(2)。しかし、10分間のストレス負荷直後ではMHPG-SO4含量に関してほとんど有意な差はみられないが、ストレス解放50分後にはほとんどの部位でMHPG-SO4含量は増加しており、この時点ではNA代謝回転が亢進していることが示唆される。このような反応のずれはNAからMHPG-SO4が生成されるまでのtime lagによる可能性もあるが、bite群の扁桃核ではストレス直後で既に有意にMHPG-SO4含量が増加していることから考えると、10分間のストレス曝露により一連の脳内の反応がinitiateされた結果である可能性が強い。今回の結果でもっとも興味あるのは、まったく同じストレス状況に曝されているにもかかわらず、その間にbiteするといった攻撃行動がとれるかどうかで脳内NA代謝の変化が異なってくることである。攻撃行動が取れない場合には取れた場合に比べてその後のNA代謝回転の亢進は明らかに著しくなり、特にそれは視床下部、扁桃核、視床などで顕著である。これらの結果はストレス曝露中にブラシを噛んだラットのほうが胃粘膜損傷が軽微であるという結果(9)とも基本的には一致するものであり、non-bite群で血漿corticosterone含量の増加がストレスから解放後も持続している事実から考えると、これらの脳部位のNA代謝回転の亢進はラットの情動と関連していることが示唆される。

【引用文献】

1. Gispen, W.H., et al. (1972) Neuroendocrinology 9:285-296
2. Glavin, G.B., et al. (1983) Pharmacol. Biochem. Behav., 19:287-290
3. Kohno, Y., et al. (1979) Anal. Biochem., 97: 352-358
4. Reis, D.J. and Ross, R.A. (1973) Brain Res., 57:307-326
5. Tanaka, M., et al. (1982) Pharmacol. Biochem. Behav., 16:315-319
6. Tanaka, M., et al. (1982) Life Sci., 30:1663-1669
7. Tanaka, M., et al. (1983) Brain Res., 275:105-115
8. van der Vies, J. (1961) Endocrinol., 38:399-406
9. Vincent, G.P., et al. (1984) Physiol. Behav., 32:265-268
10. Weiss, J.M., et al. (1976) J. Comp. Physiol. Psychol., 99:252-259

57. 強制回転ストレスによるラット脳及び肝におけるβ－adrenergic receptorの変動

中村豊紀・北山　功・辻村良太郎・野村純一
（三重大・医・精神神経）

〔要　約〕

1-day, 3-day及びlong-termの強制回転ストレスをラットに負荷して、β-receptorを^{3}H-dihydroalprenolol(DHA)を用いて、脳内6部位と肝臓で測定した。中脳と視床下部では、1-day stress後からβ-receptorの減少が認められたが、3-day及びlong-term stress後にはコントロールレベルに回復した。大脳皮質と海馬では、β-receptorの減少は3-day stress後から認められ、long-term stress後まで続いた。橋＋延髄では、β-receptorの減少は1-day stress後から認められ、long-term stress後まで続いた。小脳と肝臓では、β-receptorに有意な変化は認められなかった。ストレスによるnoradrenalin(NA)放出に部位差が存在する事は従来から知られているが、β-receptorもストレスにより時間及び部位特異的に変動する事が、今回の実験より示唆された。尚、long-term stress終了後2週間寡動状態が続くbehavioral depression群と、2週間で徐々に自発活動が回復するspontaneous recovery群が認められるため、この2群に於けるβ-receptorも検索した。Behavioral depression群に於て、β-receptorが海馬で減少、肝臓で増加が認められた。鬱病と海馬及び肝脳機能連関との関連で興味深い所見と思われる。

Key word：Forced running stress、β-Adrenergic receptor、Regional characteristics

【緒言】

精神疾患とストレスとは深い関連があり、ストレスによる神経化学的変化を検索することは、鬱病をはじめ各種精神疾患の病態発生解明の上で重要な事と思われる。拘束ストレスや電撃ストレスなど各種のストレスにより、ラット脳内NA系に変化が認められており(1)、当教室でも強制回転ストレスを用いて、NA含量、NA代謝回転、チロシン水酸化酵素活性、α_2-receptorに変動が認められる事を報告してきた(6,9)。今回は、β-receptorをラット脳及び肝において測定し、強制回転ストレスの影響を検討した。また以前から報告しているように(3)、強制回転ストレス終了後に持続的寡動状態に至るラットと、自発活動が自然回復するラットが認められるが、このようなストレス終了後の行動学的差異とβ-receptorとの関連も併せて検討した。

【実験方法】

(1) Forced running stress protocol(Fig.1): Wistar系雄ラット（9週令）を自由回転ケージ内で4週間飼育し、発情周期に一致した規則的な活動周期を確認後、その一部をcontrol群とし、他は毎分5回転の速さで回転するドラムに移し、1-day、3-day及びlong-termの強制回転ストレスに曝した。ストレス4日以後は直腸温を3時間毎に測定し、33°C以下に下降した時24時間の休息を与えた。このストレスと休息の連鎖を3回繰り返し、long-term(平均12日間)のストレスとした。Long-term stress終了後2週間で、約半数のラットは自発活動が自然回復したが、他の半数は自発活動の著明な低下と発情周期の消失を示し前者をspontaneous recovery、後者をbehavioral depressionとした。

(2) β-Adrenergic receptor binding assay: 各群のラットを断頭して脳と肝右葉を取り出

し、脳はGlowinskiらの方法に準じて大脳皮質、視床下部、海馬、小脳、中脳、橋＋延髄に分割した。各組織は50mM Tris-HCl bufferにて、Ultra-Turraxにより25秒ホモゲナイズした。中脳と橋＋延髄では、homogenateを1,000×gで10分間遠心分離し、その上清を再び43,000×gで15分間遠心分離して、沈査を-80℃で保存した。他の部位ではhomogenateを43,000×gで15分間遠心分離し、その沈査を-80℃で保存した。Frozen pelletsに50mM Tris-HCl bufferを加え23℃、10分間放置し解凍後、20秒間ホモゲナイズし43,000×g、15分間遠心分離した。得られた沈査を同bufferに懸濁し受容体膜標品とした。^{3}H-DHA結合実験は、膜標品、^{3}H-DHA(90.3Ci/mmol)と50mM Tris-HCl buffer(pH7.6、23℃)を加え、最終容量500μlとして、23℃で20分間インキュベートした。Assay内容はWhatmann GF/Bフィルター上に吸引沪過し、洗浄後β線を測定した。非特異的結合は10μM l-alprenolol存在下で同様に行った。大脳皮質、海馬、小脳では飽和実験を行いKdとBmaxを求めたが、他の部位では0.7nM ^{3}H-DHAを用い特異結合を求めた。蛋白量はLowryらの方法により測定した。統計学的有意差検定は1元配置分散分析法とTukey-Kramerの多重比較法を適用した。

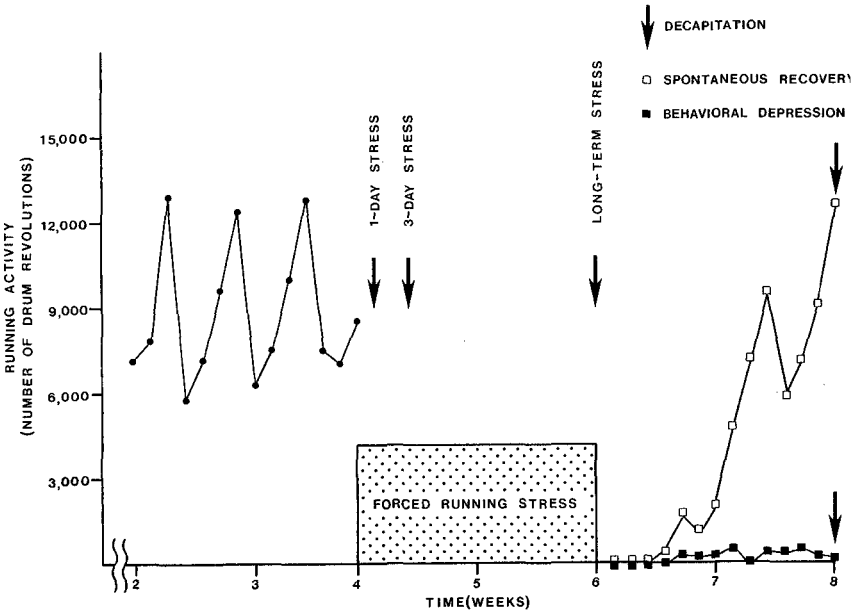


Fig. 1. Forced running stress protocol.

【結果と考察】

(1)ストレスによるβ-receptorの変動(Fig.2)；大脳皮質、海馬、橋＋延髄、視床下部、中脳において、強制回転ストレスによりβ-receptorの有意な減少が認められたが、これら5部位間でβ-receptor減少の時間経過には差が認められた。すなわち、橋＋延髄、視床下部、中脳では、β-receptorの減少は1-day stress後から認められたが、大脳皮質、海馬では、3-day stress後から明かとなった。また、減少したβ-receptorの回復過程にも部位差が認められ、大脳皮質、海馬、橋＋延髄では、long-term stress後も減少したままであったが、中脳、視床下部では、3-day及びlong-term stress後にはβ-receptorはコントロールレベルに回復した。一方、肝臓ではストレス期間中はβ-receptorに変化は認められなかった。小脳では、long-term stress後に、有意差は認められないけれども、β-receptorが増加する傾向にあった。これらの結果から、β-receptorはストレスにより時間及び部位特異的に変動することが示唆され、ストレスによるNA放出の部位差と関連があるのかも知れない(12)。

(2)Long-term stress 終了後の行動学的差異とβ-receptorの関連；long-term stress終了後2週間寡動状態が続くbehavioral depression群と、2週間で徐々に自発活動が回復するspontaneous recovery群が認められるため、この2群に於けるβ-receptorを検索した。Be-

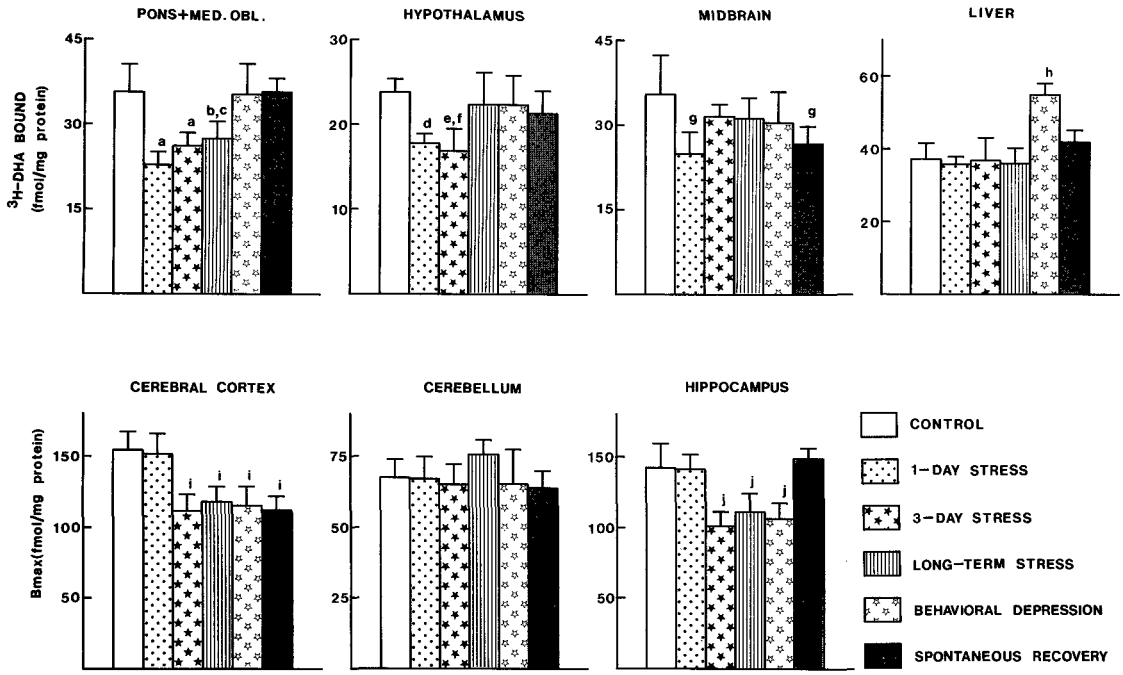


Fig. 2. Effect of forced running stress on β-receptor binding in six brain regions and liver. Values are mean ± S.D. of 4-8 rats. $^{a}P<0.01$ vs. control, behavioral depression and spontaneous recovery; $^{b}P<0.01$ vs. behavioral depression; $^{c}P<0.05$ vs. control and spontaneous recovery; $^{d}P<0.05$ vs. control; $^{e}P<0.01$ vs. control; $^{f}P<0.05$ vs. long-term stress and behavioral depression; $^{g}P<0.05$ vs. control; $^{h}P<0.01$ vs. all the other groups; $^{i}P<0.01$ vs. control and 1-day stress; $^{j}P<0.01$ vs. control, 1-day stress and spontaneous recovery.

havioral depression群に於て、β-receptorが海馬で減少、肝臓で増加が認められた(Fig.2)。他の部位ではこの2群間に有意な差は認められなかった。海馬にNAを注入すると、学習性無力ラットの形成が阻害されるという報告(11)、及びcortisol分泌に海馬が関連しているという報告があり(10)、behavioral depression群で海馬のβ-receptorが減少しているという所見は、海馬と鬱病との関連で興味深いと思われる。一方、肝臓とストレスも密接な関連があり(7)、ストレスにより肝臓の alcohol dehydrogenase(4)、metallothionein(2)、tryptophan pyrrolase(5)、tyrosine aminotransferase(8)等が増加することが報告されているが、behavioral depression群でのβ-receptorの増加も、これらの所見と関連があるのかも知れない。

【 文 献 】

1. Glavin, G.B. (1985) Neurosci.Biobehav.Rev. 9, 233-243
2. Hidalgo, J., Armario, R., Flos, R., and Garvey, J.S. (1986) Experientia 42, 1006-1010
3. 北山 功 (1983) 精神神経学雑誌 85、133-155
4. Mezey, E., Potter, J.J., and Kventnansky (1979) Biochem.Pharmacol. 28, 657-663
5. Nomura, J. (1965) Endocrinology 76, 1190-1194
6. 野村 純一, 原田 雅典, 小森 照久, 村瀬 澄夫ら (1986) 臨床精神医学 15, 1487-1494
7. Nomura, J., Hisamatsu, K. et al. (1979) Psychoneuroendocrinology 4, 47-56
8. Omrani, G.R., Rosner, W., and Loeb, J.N. (1980) J.Steroid Biochem. 13, 719-722
9. 太田 深雪 (1985) 三重医学 29, 253-259
10. Sapolsky, R.M., and McEwen, B.S. (1986) Hippocampus, Vol 3 (Isaacson, R.L. et al. eds) pp.257-278, Plenum Publishing Corp., New York
11. Sherman, A.D., and Petty, F. (1980) Behav.Neur.Biol. 30, 119-134
12. Tanaka, M., Kohno, Y. et al. (1983) Pharmacol.Biochem.Behav. 19, 543-547

58. ストレス状況下での脳内各部位ドーパミンニューロンの経時的活動性変化における部位特性

井田能成・田中正敏・Roth R. H. *
（久留米大・医・薬理，エール大・医・精神薬理＊）

〔要　約〕

拘束ストレス状況下における脳内各部位のdopamine(DA)代謝の経時的変化を脳内noradrenaline(NA)代謝の変化とともに検討した。prefrontal cortex(PFC)のDOPAC含量は、ストレス開始30分後から60分後まで増加が持続したが、90分後および120分後には対照群の値まで回復した。nucleus accumbens(NAC)とseptumのDOPAC含量、hypothalamus(HYP)のtotal MHPG,DHPG含量、cerebral cortexのtotal MHPG含量は、ストレス開始30分後より増加がみられ、120分後まで持続した。検討したその他の9部位のDA代謝の変化は見られなかった。ストレス開始30分以内の経時的変化では、PFCのDOPAC含量はストレス開始10分後より増加し、30分後には減少する方向を示したが、NACのDOPAC含量は20分後より、hypothalamusのtotal MHPG,DHPG含量は10分後より、各々30分後にかけて経時的に増加する方向を示した。以上の結果より、脳内DAニューロンはNAニューロンとは異なり、拘束ストレス状況下での反応性には部位選択性があり、mesoprefrontalおよびmesolimbic DAニューロンのみが活動性亢進を示すこと、なかでもmesoprefrontal DAニューロンの反応性は他のDAニューロンやNAニューロンと異なり、ストレス初期のみにおいて一過性の活動性亢進をおこすことが示唆された。

Key word： rat brain dopamine metabolism, stress duration, regional characteristics

拘束ストレス状況下において、ラット脳内noradrenaline(NA)ニューロンは検討したすべての脳部位で活動性亢進をおこすこと、またその活動性亢進の経時的変化に部位特性が存在することをすでに報告した(6)。一方、各種ストレス状況下において脳内dopamine(DA)ニューロンも活動性亢進をおこすことは知られているが、その活動性亢進の経時的変化における部位特性についてはほとんど知られていない。そこで今回は、ストレス状況下での特異的な反応性および情動との関連性が報告(4,7)されているprefrontal cortex(PFC)を中心に、拘束ストレス状況下での脳内10部位のDA代謝の変化を、脳内NAニューロンの代表的終末部位であるhypothalamus(HYP)とcerebral cortex(CC)のNA代謝の変化とともに経時的に測定することにより、拘束ストレス状況下での脳内DAニューロンの経時的活動性変化における部位特性について検討した。

【方　法】

Sprague-Dawley系雄性ラット(体重280-320g)を対照とした。実験1では、対照群と四つのストレス群に分け、ストレス群は金網による拘束ストレス開始後30分、60分、90分、120分の各時点で断頭した。実験2では、対照群と三つのストレス群に分け、ストレス群は拘束ストレス開始後10分、20分、30分の各時点で断頭した。断頭後、脳を12部位に分割し(2,3)、10部位でのDAおよび3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)含量をHPLC-ECD(5)を用いて、HYPとCCのtotal 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol(MHPG)含量およびtotal 3,4-dihydroxyphenylglycol(DHPG)含量をGC-MS(1)を用いて測定した。統計的解析は一元配置の分散分析とNewman-Keules' testを用いた

【結果と考察】

実験1の結果をFig 1とFig 2に示す。PFCではストレス開始30分後にDOPAC含量の増加のピークが認められ、その増加は60分後まで持続したが、90分後ではすでに有意差はなく、120分後には対照群の値まで回復した。ストレス開始90分後および120分後におけるDOPACの値は、30分後および60分後における値よりも有意に低かった。nucleus accumbens(NAC)とseptum(SEP)ではストレス開始30分後でDOPAC含量の増加がみられ、

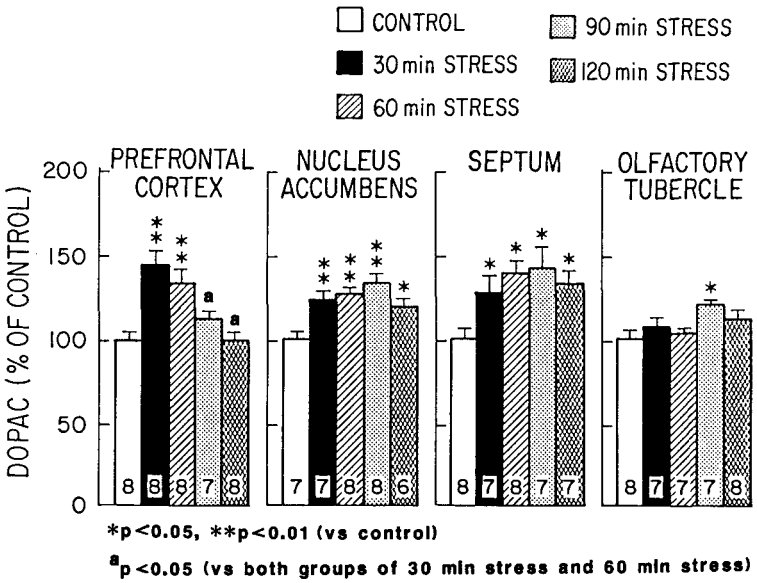


Fig 1. Effects of immobilization stress for various durations on regional DOPAC levels in rats. Each value indicates the mean ± S.E.M of data from rats of the number expressed on bar and are expressed as percentage of the value obtained from untreated control rats.

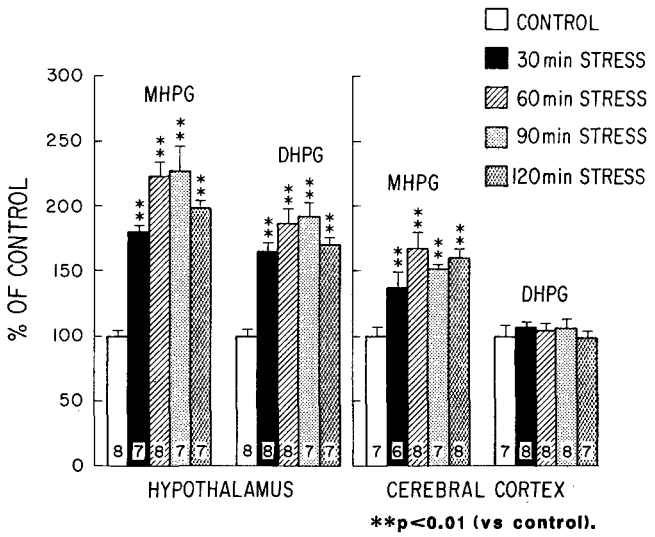


Fig 2. Effects of immobilization stress for various durations on total MHPG and DHPG levels in the hypothalamus and cerebral cortex of rats. Each value indicates the mean ± S.E.M. of data from rats of the number expressed on bar and are expressed as percentage of the value obtained from untreated control rats.

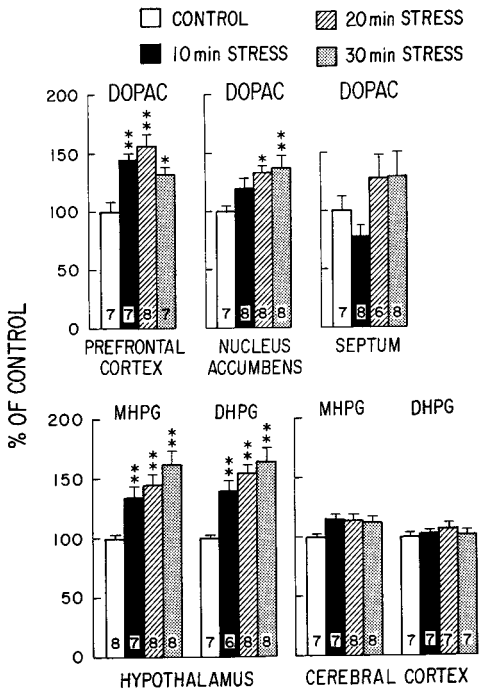


Fig 3. Effects of immobilization stress for various durations on DOPAC or total MHPG and DHPG levels in rat brain regions.

増加のピークは60分後から90分後にあり、120分後もその増加は持続していた。olfactory tubercleでは90分後においてのみDOPAC含量の増加が見られた。cingulate cortex, piriform cortex, entorhinal cortex, striatum, ventral tegmental area, substantia nigraのいずれの部位においても、ストレスによるDA代謝の変化はみられなかった。HYPのtotal MHPGおよびDHPG含量、CCのtotal MHPG含量はストレス開始30分後より増加し、そのピークは60分後から90分後にあり、120分後まで持続した。CCのtotal DHPG含量はストレスによる有意な変化は認められなかった。

実験2の結果をFig 3に示す。PFCではストレス開始10分後よりDOPAC含量の増加が見られ、20分後にピークになり、30分後には減少する方向を示した。NACでは、ストレス開始20分後からDOPAC含量は増加し、HYPでは10分後からtotal MHPGおよびDHPG含量は増加し、いずれも30分後にかけて経時的に増加する方向がみられた。

拘束ストレス開始後、脳内NAニューロンが反応を起こし始める時間は脳部位により異なっており、反応の速い部位はHYPで、遅い部位としてはCCがある(6)。実験1において、ストレス開始30分後でHYPと同様にすでにCCのNA代謝の増加がみられたことから、実験1のストレス状況は脳内のほとんんどの部位のNA代謝の増加が生じさせる程の十分な強さであったと考えられる。そのようなストレス状況下において、検討した脳部位のうちPFC, NAC, SEPのみのDA代謝の増加がストレス開始30分後からみられたことから、脳内DAニューロンは脳内NAニューロンと異なり、mesoprefrontalおよびmesolimbic DA ニューロンといった限られた部位のみでストレスによる活動性の亢進がみられることがわかった。またストレスによるDA代謝の増加の経時的変化おいて明らかな部位差があり、PFCのDOPAC含量の増加は実験1ではストレス開始60分後までしか持続せず、実験2ではストレス開始10分後よりみられ30分後には減少する方向にあることから、mesoprefrontal DAニューロンはmesolimbic DAニューロンや NAニューロンとは異なり、ストレス初期のみにおいて一過性の活動性亢進を示すことが示唆された。実験2においてSEPのDA代謝が増加の方向にありながら有意な変化がみられなかったのは、CCのNA代謝の結果からも推測されるように、実験2のストレス強度が弱かった可能性、さらにストレス状況下でのこの部位のDAニューロンの反応性がPFCやNACのDAニューロンの反応性よりも遅い可能性の両者が考えられる。

mesoprefrontal DAニューロンのストレス状況下における特異的な反応性の機能的意義についてはさらに検討が必要と思われる。

【文献】

1) Elsworth J.D. et al. (1983) J. Neurochem. 41: 786-789.
2) Galloway M.P. et al. (1986) J. Pharmacol. Exp. Ther. 236: 689-698.
3) Gispen W.H. et al. (1972) Neuroendocrinology 9: 285-296.
4) Herman J.P. et al. (1982) Life Sci. 30: 2207-2214.
5) Michaud R.L. et al. (1981) J. Chromatogr. 225: 335-345.
6) Tanaka M. et al. (1983) Pharmacol. Biochem. Behav. 19: 543-547.
7) Thierry A.M. et al. (1976) Nature 263: 242-244.

59. マウスMPTPパーキンソニズムにおけるストレスの影響

浦上克哉・正木直子・竹島多賀夫・下田光太郎・
西川清方・高橋和郎　（鳥取大・医・脳神経内科）

〔要　約〕

C57BL/J マウスに、1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6,-tetrahydropyridine (MPTP)を30 mg/Kg/日を連続３日間投与してパーキンソン病モデルマウスを作成し、その１週間後に水浸拘束ストレスを加えて影響を検討した。MPTP投与群では生食投与群と比較して運動量に差異を認めなかったが，これにストレスを加えるとMPTP投与群では生食投与群に比較して顕著な運動量の減少をみた。線条体のドーパミン(DA)はストレスにより、MPTP投与群で有意な減少($p<0.001$) を認めたが、生食投与群では有意な減少を示さなかった。大脳皮質のDAは、生食投与群、MPTP投与群共にストレスによる有意な変化はなかった。また、MPTP投与群の運動量の回復はストレス解除４時間目より見られるのに比し，線条体のDAの回復は24時間目と遅延していた。線条体のHVA/DA比は、生食投与群でもストレスにより上昇していたが、MPTP投与群にストレスを加えるとより有意に上昇しており($P<0.002$)、線条体におけるDAの代謝回転の亢進が示唆された。以上より、MPTP投与マウスがストレスにより著明な無動に至る理由として、線条体のDAの低下と代謝回転の亢進が考えられ、また同時にこれが臨床上パーキンソン病のストレスによる症状の悪化に対しL-DOPAの増量が有効でない原因と考えられた。

Key word : Parkinson's disease, MPTP, Stress

［緒言］

パーキンソン病（以下パ病と略す）患者は、しばしばストレスにより症状の悪化をみるが、軽度のものではL-DOPAの増量で容易に改善する。しかし、ストレスの程度が強くかつそれが長く尾を引くようなものでは、著明な無動となりL-DOPA治療に反応しない。そこで我々は、1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6,-tetrahydropyridine （以下MPTPと略す）投与により作成したパ病モデルマウスにストレスを加えて、行動観察ならびに脳内アミンを測定し、病態を検討したので報告する。

［実験方法］

1)動物とMPTP投与

８週令のC57BL/J マウス雄(20-30g)を実験に用いた。マウスは実験開始の少なくとも１週間前より飼育した。餌と水は自由に摂取できるようにし、12時間の明暗サイクルを維持した。１群５匹づつとし、以下の４群を作成した：MPTP投与のみの群（MPTP群）、生食投与のみの群（生食群）、MPTP投与１週間後にストレスを加えた群（MPTP＋ストレス群）、生食投与１週間後にストレスを加えた群（生食＋ストレス群）。MPTP塩酸塩(Aldlich社製) 30mg/Kg を朝１日１回連続３日間腹腔内投与して、パ病モデルを作成した(3)。対照群には等量の生理食塩水を腹腔内投与した。

2)ストレス

臨床上無動に至る程の高度のストレスモデルとして、高木らの方法(4)に従い水温25度、約15時間の水浸拘束ストレスを加えた。

3)行動観察

自発運動量の測定には、感応コイルの共鳴回路を利用した自発運動量記録装置(MK-ANIMEX, MUROMACHI KIKAI CO., LTD.)を用い、１群５匹として30分毎にカウント数を測定し約７時間観察した。各群共に３群として、カウント数は３回の平均値とした。

4)脳内アミンの測定

ストレスを加えた群は、ストレス解除後の直後、３時間後、６時間後、24時間後、７日後にマウスを断頭屠殺した。速やかに氷上にて、線条体と大脳皮質を分離し0.1N過塩素酸を加えてホモジナイズした。15,000 X g、20分間遠心分離した後、上清を測定まで-20 度で保存した。ドーパミン(DA)及びその代謝産物（DOPAC, HVA）は、HPLC-ECD法にて測定した。

［結果］

ストレス負荷による死亡例はなかった。また、生食群、MPTP群の全例に胃潰瘍を認め十分なストレスが与えられたことを示した。

1)自発運動量

MPTP群は、生食群と比較して運動量に差異を認めない。生食＋ストレス群では生食群に比べ運動量が低下しているが、MPTP＋ストレス群ではより著明な運動量の低下を認めた。しかし、約４時間の時点で両者間の差は消失している（Fig.1)。

2)脳内アミン

線条体においては、ストレス解除直後のDAは、生食＋ストレス群では生食群に比較して低下傾向があるが有意ではなく、MPTP＋ストレス群ではMPTP群に比較して有意に($p<0.001$) 低下していた（Fig.2)。DOPAC には変化はなく、またHVA は生食＋ストレス群、MPTP＋ストレス群共に上昇傾向を認めたが、有意ではなかった。HVA/DA比は、ストレスにより有意に上昇していたが、MPTP群においてより顕著であった（Fig.3)。またストレス負荷後のDAを経時的に観察すると、ストレス解除後24時間目より負荷前値に復していた（Fig.4)。

一方、大脳皮質においては、DA,DOPAC, HVA 総て有意な変化を示さなかった。

［考察］

Heikkila (2)は、C57BL/J マウスにMPTPを投与すると線条体のDA量及び運動量の低下をきたし、パ病モデルとなりうることを報告した。しかし、Donnanら(1) はMPTP投与マウスは普通の状態では運動量が低下せず、swim test を行なうと運動面での異常を評価できると報告した。我々の結果も、ストレスを加えない場合にはMPTP群と生食群の間に差異を認めないが、ストレスの負荷によりMPTP群に著明な運動量の低下がみられた。行動観察においてもMPTP群はストレスにより著明な無動を呈し、その経過をみると、運動量の増加が生食＋ストレス群では約１時間でみられたが、MPTP＋ストレス群においては約４時間以上を要した。運動量の改善は、生化学的異常の改善よりも早期にみられた。MPTP投与マウスは、普通の状態では線条体のDAは低下していても運動面での異常を示さないが、ストレスのような何らかの負荷により線条体のDAがより減少し代償の効かなくなった状態で運動面の異常がでてきたものと考えられる。

水浸拘束ストレスは98% 胃潰瘍を作成でき、確実且つ安全にストレスを加えることが可能な方法といえる(5) 。パ病モデルにストレスを加えた報告例では、線条体のDAの低下が一定していなかった(2,5).この理由は、彼らの加えたストレスが比較的程度

も軽くまた持続も短いものであったためと思われる。従って今回用いた水浸拘束ストレスでは、線条体のDAの低下に加えてHVA/DA比の上昇を示した。このHVA/DA比の上昇は、DAの代謝回転の亢進を示すものと考えられる。Zigmond ら(5) は、パ病のストレスに対してL-DOPAが有効と報告したが、臨床的にはL-DOPA増量が無効の症例に多く遭遇する。この理由として、代謝回転の亢進はDAの産生と放出が亢進した状態であり、L-DOPAの取り込みと利用が有効に行なわれない可能性が考えられる。

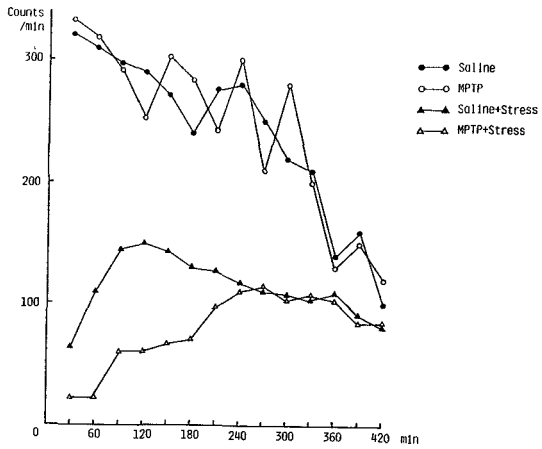


Fig 1. Time course of locomotor activity

以上の実験結果より、パ病患者がストレスにより著明な無動に至り、またL-DOPAが無効な理由として、線条体のDAの低下と代謝回転の亢進が関与しているものと考えられた。

［文献］

1)Donnan GA, Willis GL, Kaczmarczyk SJ, Rowe P.(1987) J Neurol Sci 77, 185-191. 2)Heikkila RE. (1984) Science 224, 1451-1453. 3)Snyder AM, Stricker EM, Zigmond MJ. (1985) Ann Neurol 18, 544-551. 4) 下田光太郎，浦上克哉，西川清方，高橋和郎．(1986) 臨床神経（会） 26, 1430. 5)Takagi K, Kasuya U, Watanabe K. (1964) Chem Pharm Bull 12, 465-472. 6)Zigmond MJ, Stricker EM.(1984) Life Sci 35, 5-18.

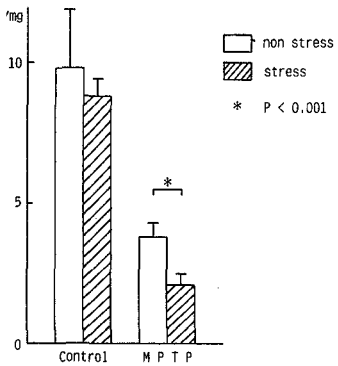


Fig 2. Striatal DA levels at o hour after stress

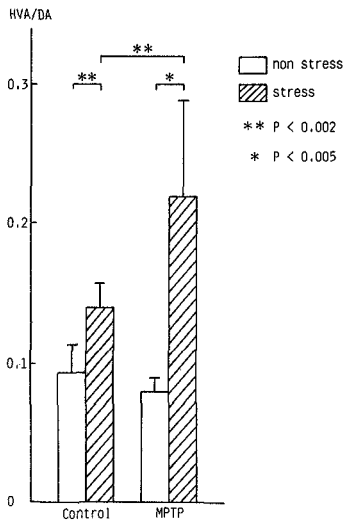


Fig 3. Striatal HVA/DA ratio at o hour after stress

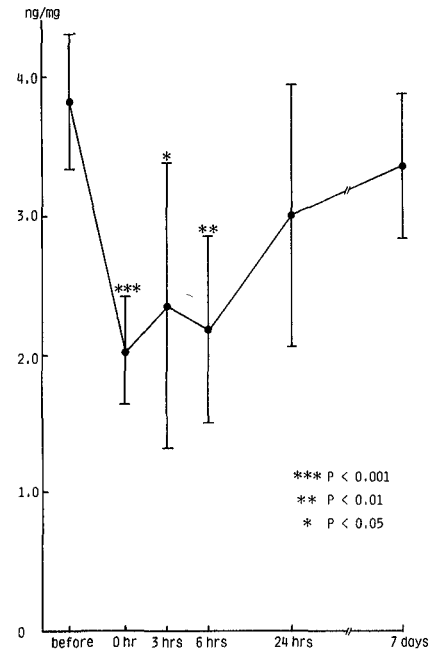


Fig 4. Time course of Striatal DA levels in MPTP + stress group

60. 生後ラット中枢コリナージックニューロンの培養とＮＧＦの効果

畠　中　　寛・津久井　弘　子・武　井　延　之・二本松　伊都子
（三菱化成生命研）

〔要　約〕

①　生後２週までのラット中枢前脳基底野大型コリナージックニューロンを用いて、出生後の日数を変えて単層培養下に移しＮＧＦ（神経成長因子）の効果を調べた。

②　生後２日のラット中隔野コリナージックニューロン（P2 Sep）においては、ＮＧＦは、コリンアセチル基移転酵素（ChAT）活性を著明に増加させた。一方、P14 Sep では、ＮＧＦによる ChAT 活性促進は観察されず、ＮＧＦなしでの培養に見られる ChAT 活性の著しい低下を抑える作用を示した。この結果は P14 Sep ではＮＧＦが ChAT ニューロンの生存を維持している可能性を示唆している。P4,P8 Sep においてはＮＧＦによる作用が P2,P14 Sep で見られた作用の中間の形態を示した。この結果は、中隔野コリナージックニューロンは生後２週間の過程で、ＮＧＦレスポンスが、分化型から生存維持型に変わることを示唆している。

③　P12 Sep を用いて、培養６日後のコリナージックニューロンの生存をアセチルコリンエステラーゼ（AChE）染色で調べた。その結果，ＮＧＦ存在下では AChE 陽性細胞が非存在下に比べ有意に多く、ChAT 活性の変化と同調していた。この結果は、ＮＧＦが P12 Sep コリナージックニューロンの生存維持に働いていることを支持している。

④　中隔野以外にブローカ対角帯核垂直部も培養下において同様のレスポンスを示した。

Key word：Nerve Growth Factor, Septal Cholinergic Neurons, Cultured Postnatal Septal Neurons

ＮＧＦ（神経成長因子）は中枢において、前脳基底野大型コリナージックニューロン系に特異的に存在し機能していることが、ここ数年、次第に明らかになってきている[1,2]。これらのコリナージックニューロンは脳の老化、特にアルツハイマー病と深い関係があることから、ＮＧＦのこれらのニューロンに対する役割に、大きな注目が集められてきている[3,4]。我々は既に、昨年度、一昨年度の本学会において、ラット中隔野コリナージックニューロンを種々の方法で培養し、ＮＧＦを初めとする神経栄養因子候補物質の作用について報告してきた[5]。今回、これらのニューロンに対するＮＧＦの役割が、未分化ニューロンでは分化作用であったのが、既にかなり分化したニューロンでは、生存維持作用に変わることを、生後ラットを用いての培養系で明らかにしたので報告する[6]。

【実験方法】

生後２日から１４日のラット（Wistar 系）から摘出した脳をクリーンベンチ内で実体顕微鏡下に中隔野（Sep）或はブローカ対角帯核垂直部（vDB）を切り出し、O_2 通気 L15 培地中に集めた。パパインで分散した細胞を、48-well プレート上にあらかじめまいておいたアストログリア細胞上に 1～3 x 10^5 cells/cm^2 の濃度でまいた。用いた培地は 5% 準胎児牛血清 / 5% 馬血清 / 1% ラット血清 / 89% DF（DME：F12 = 1：1）培地である[6]。分散細胞中に混在する分裂細胞を除く目的で 1μM のサイトシンアラビノサイドを添加している。培地交換は３日毎行った。

ChAT 活性は Fonnum [7]法を改良し、1.5ml 容チューブを用いる簡易法を用いた[5]。AChE 染色は Hefti ら[8]の改良法を用いた[6]。

【結果と考察】

図１は、生後２、４、８、１４日のラット中隔野コリナージックニューロンの培養下における ChAT 活性の変動をＮＧＦ存在、非存在下で培養日数を追って見たものである。P2 Sep での ChAT 活性は日を追ってなだらかに上昇し、ＮＧＦの添加によって７日で 3.8 倍の活性増大を示した（図１、最上段）。この結果は、培養ラット胚中隔野コリナージックニューロンで見られたＮＧＦによる ChAT 活性の促進とよく似ている。即ち、P2 Sep のコリナージックニューロンでは、ＮＧＦレスポンスは胚の時期と同じ未分化型であり、培養下にＮＧＦによって分化作用を受けるものと思われる。しかし、P14 Sep ではその様子は全く異なった（図１、最下段）。ＮＧＦ非存在下の培養で、ChAT 活性は日を追って次第に減少して行く傾向を示し、ＮＧＦ添加によってその減少はほぼ完全に抑えられた。このＮＧＦによるChAT 活性の変動は後で表１に示すように、コリナージックニューロンの生存数の差に起因していた。　P4 Sep ではＮＧＦの作用はどちらかというと P2 Sep の場合に近く、一方、P8 Sep の場合は、P14 Sep でのＮＧＦ作用に類似していた（図１、中段）。いずれにしても P2 と P14 の間の中間形態を示している。以上の結果は、生後しばらくして、おそらく１～２週間で、中隔野コリナージックニューロンのＮＧＦレスポンスが分化型から生存維持型へと転換することを強く示唆している。

表１は、P12 Sep 及び P12 vDB においてＮＧＦ存在、非存在下で６日間培養後、 ChAT 活性及び AChE 陽性細胞としての生存コリナージックニュー

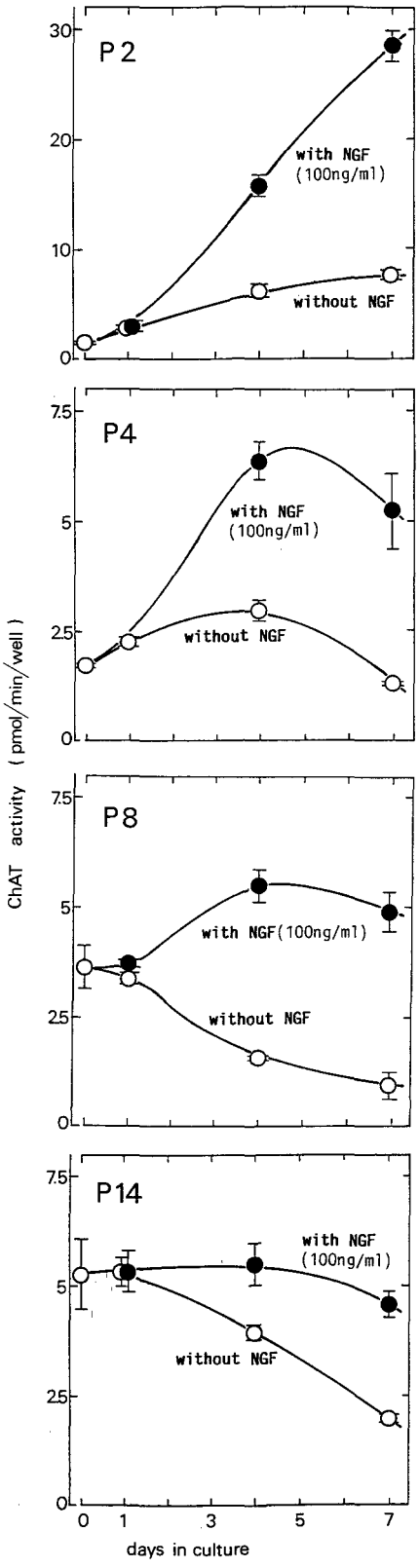


図１　ラット P2～P14 Sep ニューロンにおける ChAT 活性の培養日数に伴う変化

生後ラットからの Sep ニューロンの培養は【実験方法】に述べた通りである。培養０日として、培養前の分散細胞の ChAT 活性を測定し、図では well あたりの活性として表した。培養０日での Sep ニューロンの比活性は、P2,P4,P8,P14 それぞれ 64.3 ± 14.7, 109 ± 27, 167 ± 8, 236 ± 14 pmol/min/mg protein (n=4) であった。●ＮＧＦ(100ng/ml)添加群(n=4) ○対照群(n=4)。測定した ChAT 活性は特異的阻害剤である naphtylvinyl-pyridine 50μM で 80～90% 抑制された。

ロンの数の変化を調べたものである。両者共に、コリナージックニューロン１個当りのChAT活性値はＮＧＦ存在、非存在下での培養においても変わらなかった。即ち、ＮＧＦは両者のニューロン培養系において、生存維持作用を示していることが分かる。

成熟ラットを用いて、in vivoでの中隔から海馬への繊維連絡を破壊した後で起こるSepコリナージックニューロンの逆行変性が、脳室内に投与されたＮＧＦによって、防止されることが、明らかにされている[9-11]。これらの結果は、in vivoでのＮＧＦによるSepコリナージックニューロン生存維持作用を明らかにしたものといえる。一方、我々の結果は、in vitroでそれと同じ結果を見ていることといえよう。我々のin vitroの場合は発生段階を詳細にみることが出来る点で有利である。既に報告されている、ＮＧＦおよびＮＧＦｍＲＮＡの前脳基底野コリナージックニューロン系での発現がラットにおいて生後２～３週で大きく変化するという事実[12,13]は、今回我々のin vitroの系でのＮＧＦレスポンスが生後１～２週で変化するという結果となんらかの対応があるのかも知れない。

表１　培養ラット P12 Sep および vDB ニューロンにおける ChAT 活性および AChE 陽性細胞数におよぼすＮＧＦの効果

生後ラットからの Sep および vDB ニューロンの培養は【実験方法】に述べた通りである。ＮＧＦ(100ng/ml)添加群(n=4)および対照群(n=4)、共に６日間培養した後、ChAT 活性の測定および AChE 陽性細胞数の計測を行った。生存したコリナージックニューロン１個当りの ChAT 活性は最右欄に示すように Sep および vDB 共にＮＧＦ存在、非存在に関わらず同じであった。しかし、vDB の方が Sep に比べ約２倍の高い値を示した。AChE 染色写真を見ると、ＮＧＦ存在下に培養した Sep および vDB コリナージックニューロンは、極めて長く密度の濃い神経突起を伸ばしていた。この結果は、ＮＧＦによって生後中枢ニューロンの神経突起の再生が著しく増大することを示している。

addition	total ChAT activities	number of AChE-positive neurons	cellular ChAT activities
	(pmol/min/well)	(cells/well)	(fmol/min/cell)
P12 Sep neurons in culture			
none	2.16 ± 0.26	16.7 ± 6.0	129
NGF(100ng/ml)	6.16 ± 0.87	47.0 ± 8.6	131
P12 vDB neurons in culture			
none	6.22 ± 0.44	25.6 ± 4.6	243
NGF(100ng/ml)	27.12 ± 3.53	106.5 ± 7.9	255

【謝辞】
ニューロンの培養法について御教授下さいました Prof.Yasuko Nakajima に深く感謝いたします。本研究の遂行に当り、御助力を頂きました川村浩先生に感謝いたします。本研究の一部は、文部省科研費の援助を受けた。

【文献】

1.S.Korshing, G.Auburger, R.Heumann, H.Scott & H.Thoenen, EMBO J., 4, 1389-1393 (1985)
2.D.L.Shelton & L.F.Reichardt, Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 83, 2714-2718 (1986)
3.S.H.Appel, Ann.Neurol., 10, 499-505 (1981)
4.F.Hefti, ibid., 13, 109-110 (1983)
5.H.Hatanaka & H.Tsukui, Develop.Brain Res., 30, 47-56 (1986)
6.H.Hatanaka, H.Tsukui & I.Nihonmatsu, Neurosci.Lett., in press (1987)
7.F.Fonnum, J.Neurochem., 24, 407-409 (1975)
8.F.Hefti, J.Hartikka, F.Eckenstein, H.Gnahn, R.Heumann & M.Schwab, Neurosci., 14, 55-68 (1985)
9.F.Hefti, J.Neurosci., 6, 2155-2162 (1986)
10.L.R.Williams, S.Varon, G.M.Peterson, K.Wictorin, W.Fischer, A.Bjornklund & F.H.Gage, Proc.Natl. Acad.Sci.USA., 83, 9231-9235 (1986)
11.L.F.Kromer, Science, 235, 214-216 (1987)
12.T.H.Large, S.C.Bodary, D.O.Clegg, G.Weskamp, U.Otten & L.F.Reichardt, ibid., 234, 352-355 (1986)
13.G.Auburger, R.Heumann, R.Hellweg, S.Korsching & H.Thoenen, Develop.Biol., 120, 322-328 (1987)

61. マウス2.5 SNGFの培養神経組織に対する二つの異なった作用について

林　謙一郎・野倉一也・小鹿幸生・山本正彦
（名古屋市大・医・第二内科）

〔要　約〕

NGFの作用は標的神経組織により異なる事が類推されているが，不明な点も多い。我々はラット後根神経節および脊髄前角，中隔核，黒質組織を同一条件下で組織培養し，マウス 2.5S-NGF 添加による形態的，生物化学的発育に及ぼす影響を比較検討した。

後根神経節では，NGF 添加により短時間に neurite の伸展が認められ，培養 24，48 時間目の neurite length は，0.25～5.0 ng/ml の濃度で濃度依存性に増大を示し，それ以上の濃度では一定 length を示した（ED_{50}≒0.75 ng/ml）。NGF 無添加群では glia 成分の migration が認められた。また，他の神経組織では，NGF 添加の有無にかかわらずゆっくりした neurite の伸展が認められた。培養中隔核組織の Ach 産生能は NGF 0.25～5.0 ng/ml 添加で濃度依存性に増加を示し，それ以上の濃度で飽和傾向を示した（ED_{50}≒0.75 ng/ml）。また，中隔核組織の Ch-AT および AchE は，NGF 5.0 ng/ml の添加で無添加群に比し Vmax の増加が認められたが，Km は同じであった。中隔核の蛋白量，黒質の Dopamine up take および脊髄前角の Ach 産生能は，NGF 添加により増加を示さなかった。

Key word：NGF，Dorsal Root Ganglia，Medial Septal Nucleus

〔緒言〕NGF は mouse sarcoma が末梢知覚神経と自律神経を発育させ，神経節を肥大させる事から発見された(1)(8)。その後 NGF 分布の検討から中枢神経系にも少量存在する事(3)，in vitro (2)(4)，in vivo (11) に於て中枢神経組織に作用を示す事，更には中枢神経系の NGF に対する receptor (10) や NGF mRNA(7) の分布が明らかとなった。しかし，NGF の中枢神経系に於ける作用は，末梢神経系に対する作用と異なる事が類推されている(2)が，両神経系を同一実験系で検討された報告は少なく，不明な点が多い。本研究はこの点を明らかにする事を目的とする。

〔実験方法〕本実験には wister 系ラット胎児から得た各種神経組織を組織培養し，培養液にマウス 2.5S-NGF（Collaborative Research ）を添加し，その形態的，生物化学的影響を検討した。胎令 14 日目の後根神経節，脊髄前角組織，胎令 15 日目の黒質組織，胎令 16 日目の中隔核組織を先に報告した方法(9)に従って培養した。本研究には 0.3 % の FCS を含む培養液を使用し，NGF は培養直後から添加し，無添加群を対照として生物学的影響を検討した。

a）形態的検討：培養 24，48，72 時間後に，無選択的に各群 7～8 培養組織を写真撮影し，培養組織の中心から伸展する neurite の長さを計測した。最大長の neurite の平均値を neurite lengh とした。

b）生物化学的検討：培養神経組織の choline（ch）uptake および acetylcholine（Ach）産生能の測定は先の報告(9)に従って行なった。uptake された ^{3}H-Ach 量は培養組織片当たりの量 f mol/specimen で表わした。10mM Tris-Hcl（pH 7.4）を緩衝系とする Tyrode 液で培養組織を洗浄後，少量の Tris-Hcl（pH 7.4）中に組織を回収，数秒間 sonication を行ない，

各群の蛋白量を一定に調整した溶液中の Choline acetyl transferase（ChAT）の Ch に対する Km と Vmax を Johnson 等(6)の方法に従って求めた。また，培養組織を PBS で洗浄後，少量の 100mM phosphate buffer（pH 7.4）に回収，前述と同様にして調整した溶液中の acetylcholinesterase（AchE）の kinetic study も実施した。方法は岩田等(5)の microplate spectrophotometry 法に従い，acetyl-β-methylethiocholine に対する Km と Vmax を求めた。

培養黒質組織の Dopamine（DA）uptake は培養組織を glucose（6 mg/ml），0.75mM $Cacl_2$，0.75mM $Mgcl_2$，0.1 mM pargyline を含む PBS（pH7.0）で 2 回洗浄後，上記緩衝液に 25nM 3H-DA を加え 4 ℃または 37 ℃，20 分間 incubation を行なった。incubation 後氷冷 PBS で組織を 4 回洗浄，0.2 % Triton X-100 0.6ml 中に回収，Aquasol 中で放射活性を測定した。uptake された 3H-DA 量は，培養組織片当たりの DA 量 f mol/specimen で表記した。また，37 ℃と 4 ℃で incubation を行なった際の uptake 量の差を真の uptake 量とした。

培養組織の蛋白量の測定は Bradford 法を用い，Bio-Rad 社製 Coomasie Brilliant Blue 原液を 3 倍に稀釈，この 200μl と稀釈組織溶解液 100μl を混合，microphotometer を用い 610nm で吸光度を測定した。標準蛋白には bovine serum albumin を用いた。

〔結果及び考察〕 a)形態的変化：各培養神経組織に 0～10 ng/ml の濃度で NGF を添加した。後根神経節に NGF を添加した際，培養組織は 24 時間以内に著明な neurite outgrowth を示すが，無添加群では neurite outgrowth は乏しく，glia 細胞の migration が認められた（図 1，A，B）。培養 24 時間目と 48 時間目に後根神経節の neurite length を測定した所，いづれの時間に於ても，濃度依存性に増大を示し，NGF 5.0 ng/ml 以上の濃度で一定傾向を示した。ED_{50} は約 0.75ng/ml であった。一方，脊髄前角，中隔核，黒質組織の培養系では，NGF添加と無関係にゆっくりした neurite の outgrowthが観察され（図 1，C，D），48 時間，72 時間目いづれの時間に於ても，各 NGF濃度添加群の neurite length は対照群との間に有意差を認めなかった。

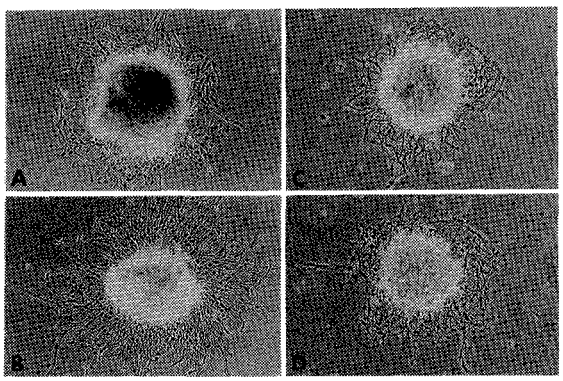


図 1　NGF の組織形態に及ぼす影響

(A)(B)後根神経節，培養 24 時間，(A)対照群
(B) NGF 0.5 ng/ml 添加，(C)(D)中隔核，培養 72 時間，(C)対照群，(D)NGF 5.0 ng/ml 添加

b)生物化学的検討：培養 6 日目の中隔核組織の一組織片当たりの蛋白量は，対照群および NGF 5ng/ml 添加群共に 0.10μg で両群に著明な差は認められなかった。また，培養中隔核に 0 ～ 10.0 ng/ml の NGF を添加し，培養 6 日目に Ch uptake と Ach 産生能を測定した所，Ch uptake は NGF 添加により増加を示さなかった。Ach の産生能は NGF 添加により濃度依存性に増加を示し，NGF 5.0 ng/ml以上で飽和を示した（図 2）。ED_{50} は後根神経節に対する形態的作用と同じ 0.75ng/ml であった。NGF 5.0 ng/ml を添加した中隔核の ChAT Km は，対照群と差を認めず共に 7.1×10^{-6} M であったが，Vmax は 0.53 nmol/l/min で対照群の 0.42 nmol/l/min に比し増加が認められた（図 3 A）。中隔核 AchE の Km は NGF 5.0ng/ml 添加群および対照群共に 9.3 ×

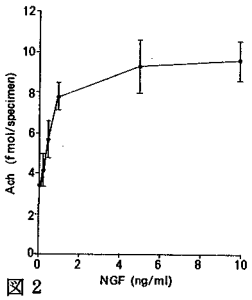


図 2

10^{-5}Mであったが，Vmaxは0.56μmol/l/minで対照群の0.38μmol/l/minに比し増加を示した（図3，B）。

一方，培養6日目の脊髄前角組織のCh uptakeおよびAch産生能は，対照群でそれぞれ28.1±3.3f mol/specimen，12.8±1.6 f mol/specimenであった。0.25～5.0 ng/ml NGF添加群のCh uptakeおよびAch産生能はNGFの各濃度群に於て増加傾向を示さず，対照群との間にも有意差を認めなかった。また，培養6日目の黒質組織のDA uptakeは対照群に於て0.54±0.14 f mol/specimenであった。NGF 0.5ng/ml添加群では0.43±0.07f mol/specimen，5.0ng/ml添加群では0.50±0.11 f mol/specimenで，対照群との間に有意差は認められなかった。

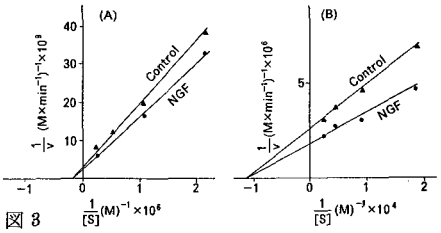


図3

表1：NGFの各種培養神経組織に対する作用

	NGFの生物学的発育促進効果	
	神経突起伸展	生物化学的発育
後根神経節	+	ND
中隔核	-	+
脊髄前角	-	-
黒質	-	-

ND：not determined

以上の各神経組織に対するNGFの作用を表(1)にまとめたが，NGFの作用には組織特異性が認められると共に，少なくとも二つの作用様式が存在するものと思われる。一つは短時間にneuriteを伸長する作用，他は神経組織の生物化学的発育を促進する作用である。この両作用の差異は標的神経組織の差異に基づいていた事から，各標的組織は各々異なる作用発見機構を有している可能性，更には，両作用発現に必要なED$_{50}$は同一であった事から，2.5S-NGFには異なる二つのdomainが存在し，各標的組織には各々のdomainに対する受容体を有している可能性などが考えられる。今後この様な観点からの検討も必要と思われる。

〔文献〕

(1) BUEKER, E.D., Anat. Rec. 102: 369-390, 1948

(2) HEFTI, F., HARTIKA, J., ECKENSTEN, F., et al, Neuroscience 14: 55-68, 1985

(3) HENDRY, I.A., Biochem, J., 128: 1265-1272, 1972

(4) HONEGGER, P., LENOIR, D., Develop. Brain Res., 3: 229-238, 1982

(5) 岩田 悟，小鹿幸生，山本正彦，神経化学 24：547－549，1985

(6) JOHNSON, D., Anal. Biochem., 116: 361-371, 1981

(7) LARGE, T.H., BODARY, S.C., CLEGG, D.O., et al, Science 234: 352-355, 1986

(8) LEVI-MONITALCINI, R., HAMBURGER, V., J. Exper. Zool., 116: 321-362, 1951

(9) OJIKA, K., APPEL, S.H., Proc. natl, Acad. Sci. USA, 81: 2567-2571, 1984

(10) RICHARDSON, P.M., VERGE-ISSA, V.M.K., RIOPELIE, R.J., J. Neurosci., 6: 2312-2321, 1986

(11) WILLIAMS, L.R., VARON, S., PETERSON, G.M., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83: 9231-9235, 1986

62. 脳損傷修復因子（Cortical Injury-derived Factor, CIDF）の部分精製とその性質

武井延之・丸山六三・津久井弘子・畠中寛
（三菱化成生命研）

〔要　約〕

① 生後ラット中隔野コリナージックニューロンの初代培養系を用いて、ニューロンの生存維持作用を持つ新しい因子の単離精製を試みた。培養下のコリナージックニューロンの生き残りの指標としては、コリンアセチル基移転酵素（ChAT）活性の変動を測定した。

② ラット前頭部大脳皮質に埋め込んだジェルフォームより抽出した脳損傷修復因子（Cortical Injury-derived Factor; CIDF）を、ニューロン生存維持活性を手かがりに精製した。まず、粗抽出液を硫安で分画し、その 30～60 % 飽和の画分を Superose 12 カラムを用いた FPLC システムでゲル濾過した。ゲル濾過の結果、活性は 100 K 付近に小さな成分、さらに 20～50 K にメイン成分が溶出した。20～50 K ピーク画分の ChAT 活性維持活性はコントロールに比べ約 2.5 倍であった。

③ メインピークである 20～50 K 画分を部分精製標品として、コリナージックニューロン生存維持に対する用量依存性を調べた。その結果、CIDF は、用量依存的に作用し 10 および 20μg protein/ml では培養下のニューロンの ChAT 活性を有意に高いレベルに維持していた。この効果は NGF（0.1μg/ml）よりもむしろ高い値であった。

Key word : Cortical Injury-derived Factor, Cultured Postnatal Septal Neurons, Nerve Growth Factor

成熟ニューロンは分裂・増殖しない細胞であるが、損傷や変性に対して、ある程度可塑性を持つことが知られてきている。この過程に神経栄養因子が関与している可能性は強い。実際、中隔海馬投射経路の切断による中隔野コリナージックニューロンの変性・脱落を外部から NGF を投与することによって防ぐことが出来たという報告もある[1,2,3]。脳に傷をつけることによって、ニューロンの修復過程に必要な神経栄養因子が出来、蓄積され、周囲のニューロンに作用するということも示唆されている[4,5]。

我々は、損傷によって出来てくる因子を部分精製し、その働きを生後ニューロンの初代培養系の生き残りを手がかりに検討したので報告する。生後１０日前後のラット中隔野コリナージックニューロンは、栄養因子等を補わない培養条件下では、その生存が維持できず、１週間前後の培養期間中に、生存ニューロンは半分以下に減少してしまう。このニューロンの生存を NGF が支えることを、我々は、既に明らかにしている[6]。今回、この系を用いて、成熟ニューロンの生存維持を支える新しい神経栄養因子候補物質の単離精製を試みたので報告する。

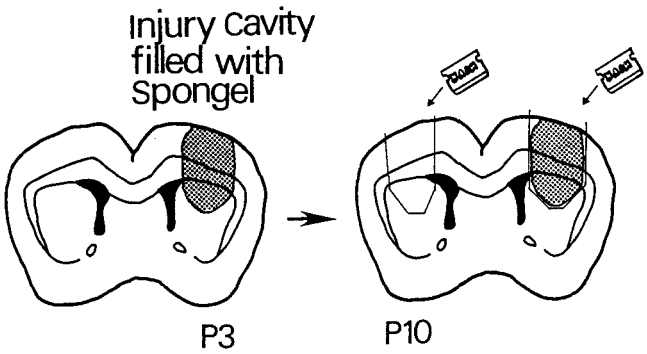
【実験方法】

脳損傷修復因子（Cortical Injury-derived Factor: CIDF）の調製と部分精製

ラット大脳皮質より CIDF を図１の方法で調製した。生後３日目のラットの前頭部皮質に約 2mm 角の穴を開け、ジェルフォーム（スポンジェル、不溶性ゼラチン；山之内製薬）を埋め込む。１週間後に周辺部の組織と共にジェルフォームを取り出し、直ちにドライアイスで凍結させ、調製時まで -80℃で保存した。これに 0.5ml/rat の割合で氷冷 DF 培地

(DME:F12 = 1:1) を加えてホモジナイズした後、4℃で 35万 xg、10分間の超遠心（TL100, Beckman）を行い、その上清を粗抽出 CIDF とした。粗抽出 CIDF を、10～30, 30～60, 60～90 % 飽和の硫安分画にかけた。最も活性の高い画分である 30～60% 飽和の沈澱を Ca^{++},Mg^{++}-free リン酸バッファー（PBS）に溶解し Superose 12 カラムを用いた FPLC システム（Pharmacia）でゲル濾過を行った。溶出バッファーとして PBS を用い、フラクションは 1ml ずつ集めた。

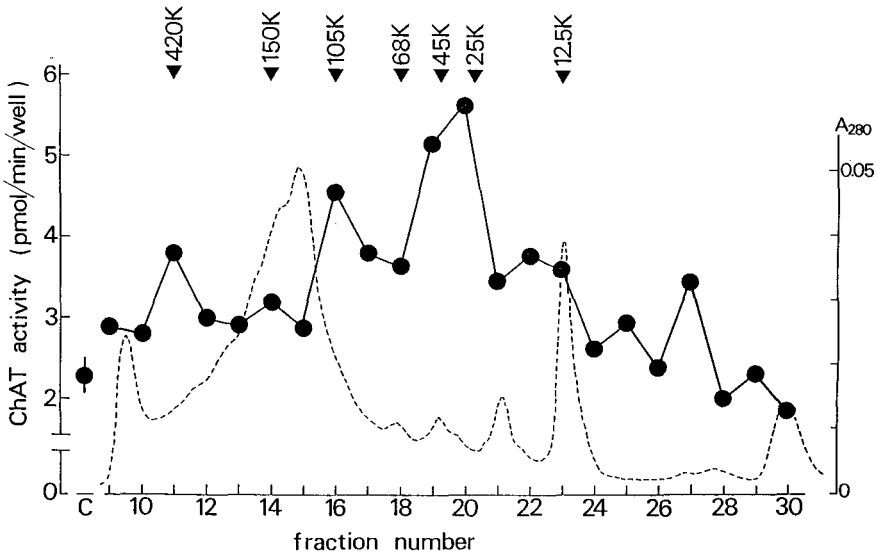
図1　脳損傷修復因子（Cortical Injury-derived Factor, CIDF）の調製



生後ラット中隔野の初代培養と ChAT 活性の測定

CIDF の作用は、既に我々の報告している生後ラットの中隔野コリナージックニューロン初代培養系を用いて調べた[6,7]。生後１０～１４日のラット中隔野を実体顕微鏡下に摘出し、パパインで消化する。これをあらかじめ培養してあるアストロサイト上に、約　2 x 10^5 cells/cm^2 になるようにまいて培養した。CIDF の添加は翌日に行い、培養は通常７日間行った。培地交換は３日毎行った。培地は 5% 準胎児牛血清 / 5% 馬血清 / 1% ラット血清 / 89% DF 培地を用いた。培養には　48-well プレート（Costar）を用い、ChAT 活性の測定は Fonnum 法を改良した 1.5ml のチューブを用いる簡易法で行った[8]。蛋白量の測定は Bradford 法を用いた。

図2　FPLC システムでの Superose 12 カラムゲル濾過による CIDF の精製
CIDF の粗抽出液（図１で示す）を硫安分画し、その 30～60% 飽和画分をゲル濾過に加えた。カラムは Superose 12 （Pharmacia、1 x 30 cm）を用い、流速0.25ml/min、溶出バッファーは PBS で、フラクションとして 1ml ずつ集めた。破線は 280nm の吸収を示している。各フラクションの 1/10 容（n=2）を生後１２日のラット中隔野コリナージックニューロンの生存維持アッセイ系に加えて CIDF 活性を求めた。活性は実線、黒丸で示している。C は無添加コントロールを示し、別に測定した NGF（0.1μg/ml）添加での ChAT 活性は CIDF ピーク画分添加時の ChAT 活性値とほぼ同じであった。ゲル濾過の溶出標準分子量マーカーとして、サイログロブリン（420K）、アルコール脱水素酵素（150K）、フォスフォリラーゼb（105K）、牛血清アルブミン（68K）、卵白アルブミン（45K）、キモトリプシノーゲン（25K）、サイクロームc（12.5K）を用いた。



【結果と考察】

粗抽出の CIDF および硫安分画後のフラクションを PD-10 カラム（Pharmacia）で硫安を

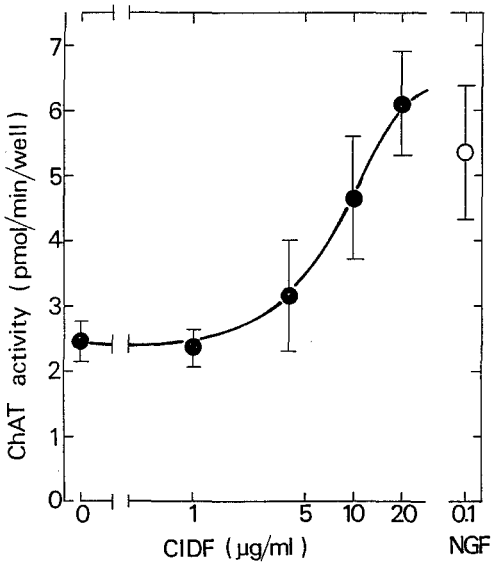


図３　部分精製した CIDF による生後ラット中隔野コリナージックニューロン生存維持作用の用量依存性

ゲル濾過後の20～50K ピーク画分（図２）を横軸に示す（n=4）量加えて、６日間の培養後、ChAT 活性を測定し、CIDF 活性を調べた。NGF（0.1μg/ml）添加での値を 100% ニューロン生存率とした時の CIDF の ED_{50} 値は 6.3μg/ml であった。なお、このアッセイ系での NGF による生存維持活性 ED_{50} は 0.6ng/ml であった。

除き、0.22μm のフィルターで濾過滅菌した後、初代培養アッセイ系に加えた。粗抽出の CIDF は生後ラット中隔野コリナージックニューロンの生存維持に働き、ChAT 活性を高く維持させた。また 30～60% 飽和の硫安画分はその他の画分に比べ ChAT 活性を高く維持させる傾向にあった。図２はゲル濾過の各フラクションを 0.22μm フィルターをもつ Spin-X（Costar）で濾過滅菌した後、培地に 1/10 量（v/v）加えた時の、生後ラット中隔野を用いるアッセイ系での ChAT 活性維持作用を調べたものである。その結果、分子量約 100K に小さなピークと、20～50K にメインピークの２つの活性ピークが見られた。特にこの 20～50K のピークでは ChAT 活性はコントロールに比べ約 2.5 倍の高い値を示した。

図３はメインピークである 20～50K のフラクションをまとめた標品を用いて、用量依存性を調べたものである。ChAT 活性維持作用は用量依存的で、CIDF の 10 および 20μg protein/ml 添加時では ChAT 活性をコントロールに比べ有意な高さに保たせているのが見られた。この高い ChAT 活性の維持は NGF（0.1μg/ml）添加時の効果以上であった。

以上の結果から明らかに生後１０日前後のラット中隔野コリナージックニューロンに対して、NGF や CIDF は ChAT 活性を高く維持する効果を持っている、即ち、脳の損傷によって、培養下のコリナージックニューロンの生存維持に働く新しい因子が出現することが強く示唆された。この CIDF は、損傷の修復、脳の可塑性に関係しているのかもしれない

【謝辞】
本研究の遂行にあたり、御助力を頂いた川村浩先生に感謝いたします。本研究の一部は文部省科研費の援助を受けた。主著者である武井延之は、上智大学理工学研究科の博士過程３年に在学中であり博士研究の一部として本研究は行われた。

【文献】

1.Hefti,F., J.Neurosci., 6, 2155-2162 (1986)
2.Williams,L.R.,et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 83, 9231-9235 (1986)
3.Kromer,L.F., Science, 235, 214-216 (1987)
4.Nieto-Sampedro,M.,et al., ibid., 217, 860-861 (1982)
5.Needels,D.L.,et al., Neurosci., 18, 517-526 (1986)
6.Hatanaka,H.,et al., Neurosci.Lett., in press (1987)
7.畠中　寛、他、神経化学、25巻、430-432 (1986)
8.Hatanaka,H. & Tsukui,H., Develop.Brain Res., 30, 47-56 (1986)

63. 牛海馬由来神経細胞生存因子の部分精製

吉田一成・高坂新一・本多利幸*・
細川斉子*・近藤　淳*・長池一博*・
戸谷重雄**・塚田裕三
（慶応大・医・生理，三菱化成・総研*・慶応大・医・脳外**）

〔要　約〕

我々はこれまで、ラット海馬抽出液中に、ラット胎仔脳初代培養系におけるニューロンの生存促進因子（ＨＮＳＦ）が存在することを見いだし報告してきた。今回は、低血清濃度培地にmethylazoxymethanolを添加したニューロンの選択培養系を確立し、牛海馬を用いＨＮＳＦの部分精製を試みた。ＤＥＡＥセルロースによる分画では、ＨＮＳＦの活性は非吸着分画（Ｐ分画）および200mM NaCl 溶出分画（200分画）に回収された。一方、増殖性細胞に対する増殖促進活性は、50mM NaCl 溶出分画にのみ認められた。Superoseによるゲル濾過では、Ｐ分画のＨＮＳＦ活性は分子量200K以上の、又、200分画では10-30Kの分画に回収された。Ｐ分画は酸処理後に活性がほとんど回収されなかったが、200分画のＨＮＳＦ活性は酸可溶性かつ35-80％硫安分画に回収された（硫安200分画）。硫安200分画に存在するＨＮＳＦのpIを推定するために、各種pHでＤＥＡＥ吸着の有無を検討した。pH 4.5では非吸着分画に、pH 5.5, 6.5, 7.4では200mM NaCl溶出分画に活性が認められた。以上の結果より、牛海馬に存在すると考えられる複数のＨＮＳＦのうち少なくとも一つは、分子量10-30K，pIが約５と推定された。

Key word：Hippocampus, Neuronal Survival Factor, Primary Culture

我々はこれまでラット胎仔脳の初代培養系を用い、中枢神経系のニューロンに作用する神経発育因子の検索を行ってきた。その結果、ラット海馬抽出液にはニューロンの生存促進効果およびアストロサイトの増殖促進効果があり、この内ニューロンの生存促進因子(Hippocampal Neuronal Survival Factor; ＨＮＳＦ)は海馬への入力線維を切断することにより増強されることを見いだした。又このＨＮＳＦはNerve Growth Factorとは異なる蛋白性の因子で、しかも複数存在する可能性も示唆した[3-7]。今回は、更にＨＮＳＦの性状を明らかにする目的で、牛の海馬組織よりＨＮＳＦの部分精製を試みた。

【実験方法】

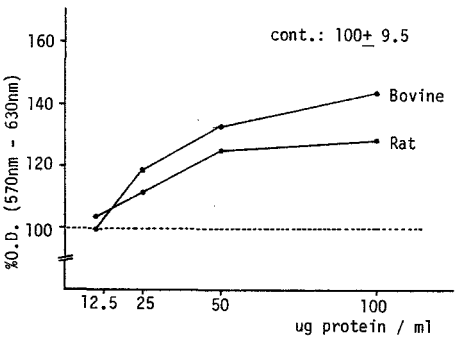
初代培養：ラット胎生１６日大脳半球（主に大脳皮質）を既報のごとく[8]、トリプシン処理により分散し、poly-L-ornithineでコーティングした２４ウェルのプレートで2.5x10^{5}個／1 ml medium/wellの細胞密度で培養した。培地は、既報の[8]15％ＦＣＳ-ＭＥＭ、あるいは 10mg/l insulin, 10mg/l transferrin, 10μg/l selenium, 100μM putrescineおよび２％ＦＣＳを含むＭＥＭ（２％ＦＣＳ－ＩＴＳＰ－ＭＥＭ）を用いた。ＨＮＳＦの検定には後者の培地に培養３日目よりmethylazoxymethanol(ＭＡＭ；20μg/ml)を添加した。生細胞数の同定：生細胞数の測定は、Mosmann[5]の方法に準じて、ＭＴＴ[3-(4,5-di-methylthiozol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]アッセイにより行った。即ち、培地中に0.15mg/mlのＭＴＴを添加し、３７°C，６時間インキュベート後、生成されたformazanをacidic isopropanolにて抽出し、５７０nmにおける吸光度を測定した。牛海馬抽出液の調製及び部分精製：牛海馬を５倍量の0.1mM

ＰＭＳＦを含む蒸留水にてホモゲナイズし、100,000g、６０分遠心後の上清をCrude Extractとした。部分精製は酢酸による酸処理、硫酸アンモニウムによる塩析、ＤＥ－ＡＥセルロース(ＤＥ－５２）を用いたイオン交換により行った。又、Superose-１２を用いゲル濾過による分析も併せ行った。

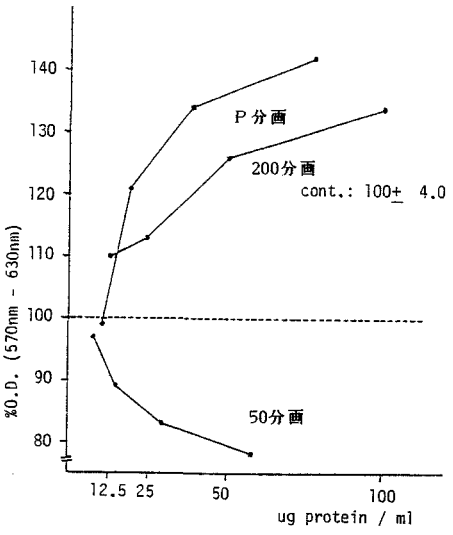
【結果および考察】

15%ＦＣＳ－ＭＥＭを用いた我々の従来のアッセイ系においてはアストログリアの活発な増殖が見られ、海馬抽出液のニューロンに対する効果を検定するには不都合であった。例えば、加藤ら[2]により部分精製されたGlia Maturation Factor（ＧＭＦ）を従来のアッセイ系に添加し、5日間培養した後ＭＴＴアッセイを行うと、著明な細胞数の増加が認められる。しかしながら今回我々が用いた２%ＦＣＳ－ＩＴＳＰ－ＭＥＭ培地で２日間培養した後ＭＡＭを添加し、更に３日間培養するニューロンの選択培養系においてＧＭＦを添加しても、その効果は全く認められなかった。又、このニューロンの選択培養系にラットあるいは牛の海馬抽出液を添加すると図１のごとく、いずれにも高いニューロンの生存促進効果が認められた。このことから上記のアッセイ系によりニューロンの生存促進効果（Neuronal Survival Effect;ＮＳＥ）を特異的に判定することが可能となった。牛海馬抽出液をＤＥ－５２を用いることにより、非吸着分画(Ｐ分画)、50mM NaCl溶出分画(50分画)および200mM NaCl溶出分画(200分画)に分けそれぞれのＮＳＥ活性を検討した。その結果、図２に示した様に、ＮＳＥ活性はＰ分画および200分画に回収された。一方、他の培養細胞（ＳＨＲＧラットグリオーマ、ＳＳＫヒト髄膜腫、ＡＩＢヒトグリオーマ）に対する効果を10%ＦＣＳ－ＭＥＭ系で検索したところ、逆に50分画のみに細胞増殖効果が見られ、Ｐ分画および200分画には活性は見られなかった。このことから、分裂促進因子とＨＮＳＦをこの方法により分離できることが明らかとなった。次にＰ分画および200分画に存在するＨＮＳＦの分子量を推定するために、Superoseによるゲル濾過を行った。Ｐ分画の場合、活性は分子量２０万以上の高分子領域に回収されたのに対し(図３a)、200分画では１－３万の分画に活性が認められた（図３b)。このＰ分画を酢酸により酸処理（pH 4.5）すると，酸沈澱分画に僅かながら活性が回収されたものの、これを再び可溶化することが極めて困難であった。このことからＰ分画の因子は蛋白がアグリゲートしたものである可能性が考えられた。そこで、分子量１-３万という比較的低分子の因子を含む200分画を用いて更に精製を進めた。200分画を酸処理すると、活性は酸

〔図　１〕

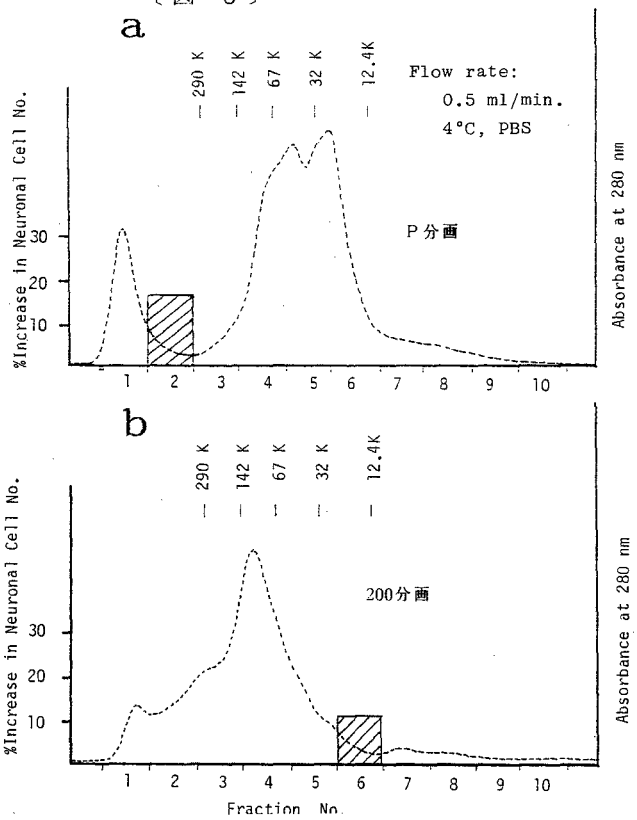


〔図　２〕



可溶性分画にあり、この活性は35－80%硫安分画に回収された。この硫安分画を再度DE-52で分画すると、前段階と同様に200mM NaCl溶出分画に活性が回収された（硫安200分画）。この段階でHNSFのpIを明らかにする目的でpH 4.5, 5.5, 6.5, および7.4の条件におけるDE－52に対する吸着状況を検討してみると、表1に示したごとくpH 5.5前後で吸着、非吸着の動態が変化した。以上の結果より牛海馬には分子量1－3万、pI 5前後のHNSFが存在することが判明した。これまでに中枢神経系からは、GMF, FGF等の増殖因子または主に末梢神経系に作用するneurotrophic factorがいくつか見いだされており[4-6]、又最近ではNGFも中枢神経系に存在しコリン作働性ニューロンの生存維持に重要な働きを担っていることが判明している[1]。我々が検討しているHNSFの標的細胞については今だ明らかではないが、少なくともGABA作働性ニューロンにも効果を有していることから[7]、既知の因子とは全く異なるものであると考えられる。今後DEAE 200mM溶出分画を更に精製し、その性状について検討を加える予定である。

〔図 3〕



〔表 1〕

pH	DEAE P分画 蛋白回収率	NSE	DEAE 200分画 蛋白回収率	NSE
4.5	32%	+24%	32%	(-)
5.5	18%	+ 8%	48%	+16%
6.5	1%	(-)	64%	+15%
7.4	2%	(-)	72%	+29%

NSE: Neuron survival effect, MTTアッセイにおけるcontrolに対する生細胞数の増加

【謝辞】

GMFをご供与下さった名市大・医学部・加藤泰治先生に深謝致します。

【文献】

(1)Hefti, F., J. Neurosci. 6, 2155-2162, 1986. (2)Kato, T., Fukui, Y., Turriff, D. E., et al., Brain Res. 212, 393-402, 1981. (3)高坂新一、吉田一成、大谷光弘、他、神経化学 24、490-492、1985. (4)Johnson, J. E., Barde, Y-A., Schwab, M., et al., J. Neurosci. 6, 3031-3038, 1986. (5)Mosmann, T., J. Immunol. Meth. 65, 55-63, 1983. (6)清水信義、日本臨床 44, 24-34, 1986. (7)吉田一成、高坂新一、高松研、他、神経化学 25, 409-411, 1986. (8)Yoshida, K., Kohsaka, S., Idei, T., et al., Neurosci. Lett. 66, 181-186, 1986.

64. 大脳皮質神経細胞に対する大脳由来の神経栄養因子

山形要人・郭　哲輝・三木直正
（金沢大・がん研・薬理）

〔要　約〕

胚齢６－８日のニワトリ胎児の大脳皮質神経細胞を無血清培地で培養し、その生存に関わる因子について調べた。ニワトリ大脳の抽出物は、強い生存活性を含み、用量依存的ではあったが、突起を伸ばす作用はなかった。その他、眼球、筋胃の抽出物にも同様の活性は認められたが、肝、心、腸などには認められなかった。また既知の成長因子の中でも、トランスフェリンのみが用量依存的に生存率を上げたが、脳内の生存因子は、精製前ですでにトランスフェリンの１０倍以上の活性をもち、それとは異なることが示された。大脳内の生存因子を生存活性を指標に、硫安塩折、DEAE sepharose、Sephadex G100、Red agaroseなどで精製を進めて、最終的には約 5,600倍の精製が可能になった。また、さらに精製の進んだサンプルをSDS-PAGEにかけると約60KDaポリペプチドが主バンドだった。この生存因子は、熱、酸、プロテアーゼにかなり安定であった。標品をトリプシン処理した後、再びTSK G2000 SW カラムにて分離すると、活性ピークは60KDaから約10KDaに移動し、活性ドメインのトリプシン安定性を示唆させた。これらの物理化学的性質より、この因子は、新しい中枢神経細胞に対する生存因子と考えられた。

Key word：neurotrophic factor、cerebrocortical neuron, cell culture

培養下での神経細胞の生存維持には、NGF(2)を始めとして種々の内在性の栄養因子が必要とされている。中枢神経細胞に対する生存因子としては、現在までに，basic FGF(4)、ビルビン酸(5)、Neuroleukin(3)などが知られている。今回我々は、大脳皮質神経細胞に対する生存因子をみつけるために大脳皮質初代培養し、その生存率を計算するアッセイ系を用いて、大脳に強い生存活性が含まれることを見出し、その生存因子の部分精製を行い、その性質を調べたので報告する。

（材料および方法）

培養；胚齢６－８日目のニワトリ胎児より大脳皮質を摘出し、0.2%トリプシン処理した後Ｎ１培地で培養を開始した。生存活性は、培養直後の一定面積内（約2x2mm)生存ニューロン数に対する、20h後の同じ面積内のニューロンの割合で表した。

精製方法：約３０日齢のニワトリ大脳を３倍量のPBS(-)でhomogenizeし35-70%の硫安塩折を行った後、DEAE sepharose CL-6B, Sephadex G-100, Red agaroseなどのカラムクロマトグラフィーにて活性物質の分離を行った。免疫蛍光法：0.5%グルタルアルデヒドにより細胞を固定した後、70Kのニューロフィラメントに対するポリクロナール抗体と反応させ、その後FITC標識した抗ウサギIgG抗体（ヤギ）を加え、蛍光顕微鏡で観察した。

（結果および考察）

胚齢６－８日目の大脳皮質細胞をＮ１培地のみで培養すると、20時間後にはほとんどすべての細胞が死滅してしまう（図1A)。ところが、この培養系に、あらかじめ、大脳の抽出液を加えておくと、20時間経ても生存細胞が認められ（図1B)、その多くは

神経細胞であることが、70Kのニューロフィラメントに対する間接蛍光抗体法を用いて確認された（図1C）。他の臓器の抽出物、特に筋胃や眼球にも同様の活性が認められた。しかし、肝、心、腸などでは、生存活性は認められなかった。また、現在までに知られている成長因子、例えばNGF(10μg/ml),インシュリン(100μg/ml),dBcAMP(400μM)などは全く無効だった。ただトランスフェリンは、100-1000μg/mlのorderで神経細胞の生存を維持した(1)（図２）。しかし、脳内の生存活性は、トランスフェリンによるものではないことは、その用量－反応曲線より明らかだった。（図２）さらに、抗トランスフェリン抗体を用いた、ウエスタンブロッテング法でも、脳内には、極めて少量のトランスフェリンしか含まれていないことがわかった。このように、大脳中には皮質神経細胞に対する生存因子が多量に含まれているので、それを材料として、生存因子の精製を開始した。まず、約３０日目のニワトリ大脳を３倍量のPBS(-)でhomogenizeした後、硫安塩折を行い、35-70%硫安分画をDEAE sepharose CL-6Bにのせた。PBS(-)(pH 7.4)で洗った後、0.14-1M NaClの直線勾配をかけると吸着物質は、２つのピークとして溶出され、生存活性は両ピークに認められた（図３）。そこで比活性の強い、低いイオン強度で溶出するピークをSephadex G100 カラム(3x85cm)にのせた。PBS(-)で溶出すると、蛋白は、２つのピークとして現われ、このうち void部分を含む蛋白のピークに強い生存活性が認められた。そのピークを集め、10mMリン酸緩衝液 (pH 7.4)で透析した後、今度は、Red agarose column (15x4cm)にのせた。活性物質は、素通り分画に溶出した。各ステップで、用量－反応曲線を書き、最大の生存率の50%の生存率を与える蛋白量を基準にその精製度を計算すると、最終のRed agarose標品では、約 5,600倍の精製が可能になった。次いでこの生存因子の性質について弱冠の検討を加えた。まず、熱に対する安定性を確かめるために、試料を100℃ 2分、60℃ 5時間処理した。100℃ 2分間の熱処理では、生存活性の低下は認められなかったが、60℃ 5時間では、約40%失活した。また、トリプシン、α－キモトリプシン、パパイン（共に1mg/ml 20時間）処理を行ったが、活性はいずれも保持されていた。また、insoluble enzymeを用いても、結果は同様だった。さらに酸処理(pH 1.5, 1時間）でも失活しなかったが、アルカリ処理(pH12.0, 1時間）では、完全に活性は消失した。以上のことから、この生存因子は、プロテアーゼ、熱に比較的安定な分子であると考えられた。この因子のトリプシン安定性をさらにたしかめるために、DEAE sepharose CL-6Bの吸着分画をまずTSK G2000 SWにてゲルろ過した。この時生存活性は分子量 60kDaの分画に主として認められた。この分画を集め、濃縮し、トリプシン処理(1 mg/ml,20時間）した後、再びTSK G2000 SWにて分離したところ、生存活性は主として分子量約１万の分画に移動し、活性ドメインが保たれていることがわかった（図４）。現在さらに精製を進めているが、最終段階のsampleをSDS-PAGEにかけると、まだ数本のバンドがみられるものの、分子量60KDaのバンドが主になっていることがわかった。この 主バンド蛋白質が生存活性をもつかどうか確かめるためにゲルからの切り出し実験やモノクロナール抗体の作製などが必要である。分子量数万の神経栄養因子としては、Neuroleukinがあるが、これはMW 56KDa, pI 8.5-9.0の塩基性蛋白質であるが、DEAEカラムに対する吸着パターンからは、我々の精製を進めている生存因子とは異なると考えられる。

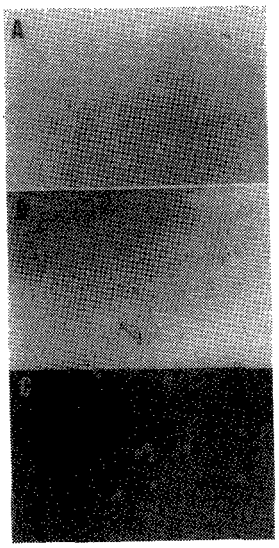


Fig. 1 Primary culture of cortical neurons from 7 day chicken embryo

Cells were cultured at low density (10^3 cells/well, 96 well Falcon plate) in serum-free defined medium for 20hr in humidified 95% air/5% CO_2 at 37°C with no addition (A), with 1mg/ml cerebral extract (B). Cortical neurons were stained with indirect immunofluorescence using anti-70K neurofilament antibody (C). Note that almost all surviving cells are neurons. bar; 10um

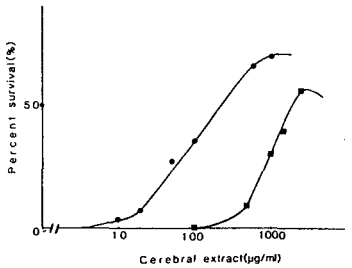


Fig. 2 Dose-response curves for survival activity in cerebral extract and transferrin

Cerebral cortex was dissected from 6 to 8-day embryos and cultured in the serum-free defined medium containing various concentrations of 35-70% ammonium sulfate fraction of cerebral extract (●—●) and transferrin(■—■) (conalbumin). After culture for 20h, the ratio of the surviving neurons to the total neurons at seeding was determined. Each point is the mean of duplicate values obtained from two independent cultures.

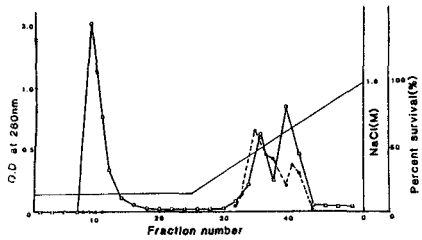


Fig. 3 DEAE sepharose chromatography of the ammonium sulfate fraction

Four milliliters of the ammonium sulfate fractions (180mg) were applied to a DEAE sepharose column (3.0 X 25.0cm) equilibrated with PBS(-) (pH 7.4) and washed with 360ml of the same solution. Then the column was eluted with 600ml of a linear gradient of 0.14 to 1M NaCl in 10mM sodium phosphate buffer (pH7.4) at a flow rate of 18ml/h. Each fraction was monitored at 280nm (□—□) and an aliquot(50ul) of each fraction was analyzed for the survival activity(●—●) as described under Materials and Methods.

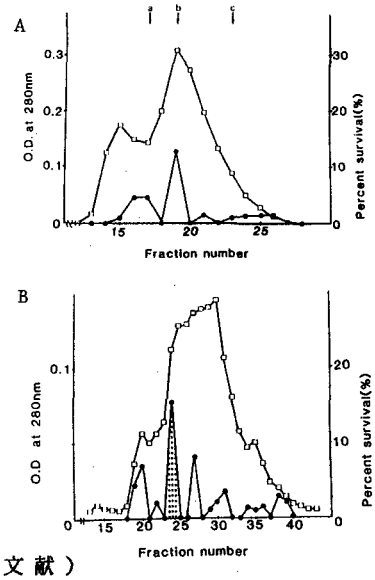


Fig. 4 High performance liquid chromatography of partially purified factor

DEAE fraction of cerebral extract (200ul, 4.7mg/ml) was applied on a TSK G2000 SW column and eluted with 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) at a flow rate of 1 ml/min. Each fraction was monitored at 280nm (□—□) and then bioassyed (●—●)(A). Arrows indicate the elution positions of immumoglobulin (160KDa, a), bovine serum albumin (67KDa, b) and chymotrypsin(25KDa, c). The active fractions (60-70KDa) were treated with trypsin (1mg/ml) for 20hr and applied on a TSK G2000 SW column (B). A dotted peak in B represents active fraction.

（文献）

1. Aizenman, Y. et al. (1986) Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A., 83, 2263-2266
2. Cohen, S. (1960). Proc.Natl. Acad. Sci.U.S.A., 76, 302-311.
3. Gurney, M.E. et al (1986) Science 234, 566-574.
4. Morrison, R.S. et al (1986). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83,7537-754
5. Selak,I. et al (1985). J. Neurosci. 5, 23-28.

65. 神経成長因子の効果に及ぼすプロテインキナーゼ阻害剤（K－２５２ａ）の影響

松田　譲　（協和発酵・東京研）

〔要　約〕

プロテインキナーゼ阻害剤 K-252a は、神経成長因子（ＮＧＦ）の作用に応答して活性化されるPC12細胞の基質特異性の高いＳ６キナーゼを低濃度で阻害する（ＩＣ$_{50}$，約 20 nM)。K-252a は、PC12 細胞の NGF による神経様突起形成を 100 - 200 nM で可逆的に阻害し、すでに形成された突起も 24 時間以内に消失せしめる。しかし、繊維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）や dibutyryl cAMP による突起形成は阻害しない。また、K-252a は、培養ニワトリ胚脊髄神経節細胞のＮＧＦによる神経突起の形成も、より低濃度（50 nMで 100% 阻害）で可逆的に阻害する。さらに、K-252a は、NGF作用に伴ってひきおこされる一連の生化学的変化、例えば、オルニチン脱炭酸酵素の誘導、ホスファチジルイノシトールの分解促進、上皮成長因子（ＥＧＦ）レセプターの heterologous down-regulation も阻害する。この PC12 細胞における、K-252a による阻害作用は、ＲＮＡ合成阻害や NGF のレセプターへの結合阻害、あるいは細胞毒性によってもたらされる結果ではない。K-252aの作用部位については、NGF 特異的プロテインキナーゼであるのかどうかも含めて詳細は不明であるが、その解明は、NGF の作用発現機構の解明に重要な手がかりを与えてくれるものと考えられる。

Key word :
PC12 cells, nerve growth factor (NGF), protein kinase inhibitor

神経成長因子(NGF) は、知覚および交感神経細胞の生存と軸索の伸展に必要な栄養因子である。PC12 細胞は、ラット副腎髄質由来の株細胞であり NGF に応答して神経様突起の形成などの形態的変化や特定の酵素の誘導などの生化学的変化をもたらし、NGF の作用機構の研究に有効なモデル細胞である。PC12 細胞に NGF を作用させるといくつかの細胞内タンパク質のリン酸化度が変動することが知られている(4)。これらのリン酸化反応には、よく知られたキナーゼ類から基質特異性の高い新しいキナーゼに至るまで数多くのキナーゼが、直接および間接的に関与しているものと考えられる。K-252a（図１）は、加瀬らによって見い出された微生物の生産する新規アルカロイド様物質であり、強力なプロテインキナーゼ阻害剤である（６，７）。今回、NGF の作用機構におけるキナーゼの役割を解明する目的で、PC12 細胞及び培養ニワトリ胚脊髄神経節細胞における、NGF 効果に及ぼす K-252a の影響を調べた。

［実験方法］

Ｓ６キナーゼの活性測定は、既報（９、１０）の方法に従って行った。PC12 細胞の培養は、７％ウシ胎児血清、７％ウマ血清を含むDMEMを用い、３７°C，６％ＣＯ$_2$ の条件で行った。ニワトリ胚脊髄神経節細胞（10～12日）の培養は、摘出した神経節から結合組織のカプセルを除去し、２～３片に切るか、またはピペッティングで分散させた後、ポリリジンまたはコラーゲンでコートした培養

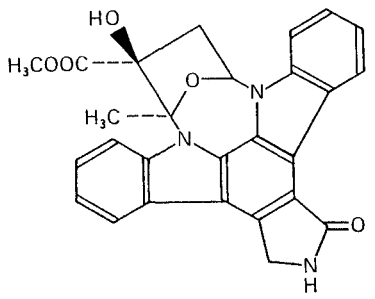


図１、K-252aの構造

皿上に完全無血清培地(ＰＩＴ培地、2)を用い、３７°C，５％CO_2の条件下で行った。K-252aは、ＤＭＳＯに１mg/ml の濃度で溶解して冷暗所保存し、使用直前に培地にて希釈して用いた。オルニチン脱炭酸酵素(ＯＤＣ)活性、ホスファチジルイノシトール分解活性、上皮成長因子(ＥＧＦ)及び NGF の各レセプターへの結合実験は、各々既報(5,1,8,12)の方法に従って行った。

［結　果］

1. Ｓ６キナーゼの阻害活性　K-252a は、NGF の作用に応答して活性化され、リボソームＳ６蛋白質のみを特異的にリン酸化する PC12 細胞のＳ６キナーゼを in vitro で、他のキナーゼ類に対する阻害濃度とほぼ同じ濃度で阻害した(IC_{50}，約20 nM)。

2. PC12 細胞の形態的変化　K-252a は、200 nM で、NGFの作用による神経様突起の形成を完全に阻害した。100 nM では部分的な阻害がみられ、300 nM では細胞毒性を示した。NGF 存在下で、200 nM K-252a により４８時間処理後、NGFのみを含む培地に移して培養を継続すると、再び神経様突起の形成が見られる（図２）事から、K-252a は細胞に損傷を与えていないと考えられる。この事は、200 nM K-252a 処理及び未処理群の細胞間で、〔^{3}H〕uridine のＲＮＡへの取り込み度に変化がないことからも確認された。また、K-252a は、既に形成された突起に対しても、２４時間以内に完全に消失せしめる作用を示した。なお、繊維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）や dibutyryl cyclic AMP も PC12 細胞に対し、見かけ上 NGF 作用と類似した神経様突起の形成を促進する効果を示すが（１１，３），K-252a は、これらの因子による突起形成は阻害しなかった。TPA や EGF は、K-252a の在否にかかわらず全く形態的変化を与えなかった。

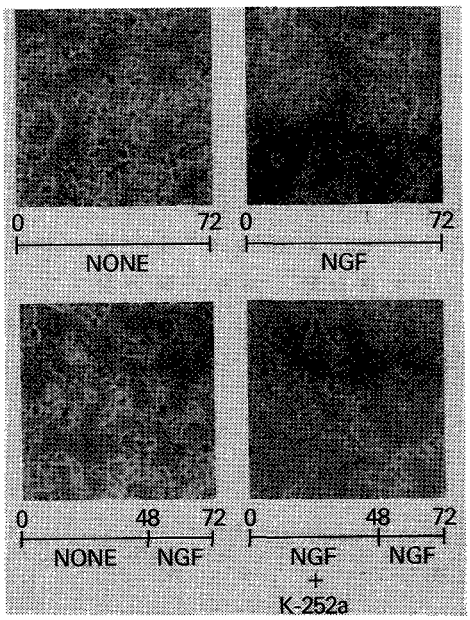


図２，　NGF による PC12 細胞の神経様突起形成に及ぼすK-252aの阻害作用。数字は時間。NGF 及びK-252aの終濃度は、各々50 ng/mlと200 nM。

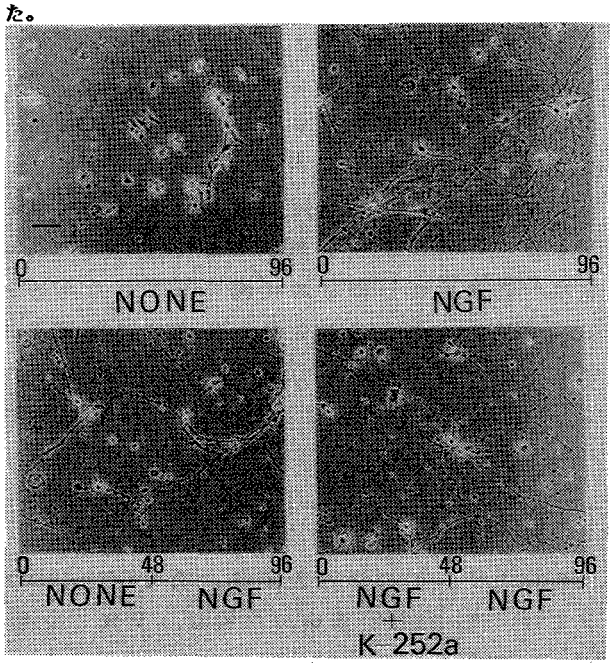


図３，NGF によるニワトリ胚脊髄神経節細胞の神経突起形成に及ぼすK-252aの阻害作用。数字は時間。(7s) NGF 及び K-252aの終濃度は各々 200 ng/ml と 50nM。

3. PC12 細胞の生化学的変化　K-252a (200 nM)は、NGF 作用によるＯＤＣの誘導を完全に阻害した。また、transcription-independent な応答であるホスファチジルイノシトールの分解促進も阻害した。NGF の作用による EGFレセプターの heterologous down-regulation も阻害したが、EGF の作用による homologous down-regulation は阻害しなかった。以上の結果から、K-252a は NGF のレセプターへの結合を阻害している可能性も考えられたが、K-252a にその様な阻害活性は見られなかった。

4. ニワトリ胚脊髄神経節細胞の形態的変化　摘出した脊髄神経節をハサミで分割し、得られたブロック片をそのままアッセイに用いる方法で、K-252a は、PC12 細胞に対する効果と同様に、NGF による神経突起の形成を 50－200 nM の濃度範囲で可逆的に阻害した。支持細胞の影響を除外するために分散した細胞を用いる方法においても、より低濃度で阻害効果を示すという点(50 nMで 100%阻害)を除いて前者の場合と同じ結果が得られた。(図３)

［考　察］

神経成長因子の作用機序を解明する上で、その作用の特異的阻害剤があれば、極めて有効な手段となり得る。K-252a は、in vitro においてはＡＴＰと拮抗する強力なプロテインキナーゼ阻害剤(７)であり、NGF作用による PC12 細胞の一連のレスポンスを阻害する。この阻害効果は、ＲＮＡ合成やエネルギー代謝、あるいは NGF のレセプターへの結合を阻害したり、NGF そのものへの作用や一般的な細胞毒性を示すことによってもたらされるものではないことから、NGF の作用に応答する特異的なキナーゼ(Ｓ６キナーゼ等)を阻害することが第一次作用点であるという事が予想される。しかし、細胞内のＡＴＰ濃度が高いという点を考慮にいれると今後、まだ慎重な検討を要する問題である。いずれにせよ K-252a の作用部位の解明は、NGF の作用機構の解明に重要な手がかりを与えてくれるものと考えられる。

［謝辞］
本研究は、米国 NIH (NICHD)の G. Guroff 研究室との共同研究によるものであり、特に小泉信一博士(NIH)及び加瀬広博士（当社）の御協力に負うところが大きい。また、脊髄神経節細胞の培養法について御教授を賜りました東京大学医学部第一生理学教室の伊藤正男教授及び福田潤助教授に心より感謝申し上げます。

［文献］

1. Contreras, M.L., and Guroff, G. (1987) J. Neurochem. 48, 1466-1472
2. Fukuda, J., Yamaguchi, K., Akimoto, S., et al. (1985) Neurosci. Res. 2, 460-471
3. Gunning, P.W., Landreth, G.E., Bothwell, M., et al. (1981) J. Cell Biol. 89. 240-245
4. Halegoua, S., and Patrick, J. (1980) Cell 22, 571-581
5. Huff, K., End, D., and Guroff, G. (1981) J. Cell Biol. 88, 189-198
6. Kase, H., Iwahashi, K., and Matsuda, Y. (1986) J. Antibiot. 39, 1059-1065
7. Kase, H., Iwahashi, K., Nakanishi, S., et al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 142, 436-440
8. Lazarovici, P., Dickens, G., Kuzuya, H., et al. (1987) J. Cell Biol. (in press)
9. Matsuda, Y., Nakanihsi, N., and Dickens, G., et al. (1986) J. Neurochem. 47, 1728-1734
10. Matsuda, Y., and Guroff, G. (1987) J. Biol. Chem. 262, 2832-2844
11. Togari, A., Dickens, G., Kuzaya, H., et al. (1985) J. Neurosci. 5, 307-316
12. Vale, R.D., and Shooter, E.M. (1985) "Methods in Enzymology" vol. 109, p21-39

66. StaurosporineによるPC12細胞の神経突起伸長

橋本誠一・萩野顕彦*　（東北歯大・生化，生物*）

〔要　約〕

PC12細胞は、神経成長因子（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。私達は、タンパク質リン酸化酵素阻害剤であるstaurosporineが、PC12細胞に作用しNGFとは異なる様式で神経突起を伸長させることを見いだしたので報告する。NGFによるPC12細胞の神経突起形成は、作用24時間後ではまだ認められず、作用発現までに時間的遅れがあり、またactinomycin Dで阻害され、転写依存性の作用である。これに対し、staurosporineによる神経突起形成は、作用1時間後で既に認められ、また、actinomycin Dで阻害されなかった。このように神経突起形成の時間推移および転写依存性においてNGFとstaurosporineでは明らかに異なるが、神経線維を長く伸長させたPC12細胞の光顕レベルにおける形態上の違いは認められなかった。一方、staurosporine存在下で数日間培養したPC12細胞を洗浄後、撤き直してNGFを作用させると、24時間以内に神経突起形成が認められた。この突起形成は、actinomycin Dで阻害されることから、NGFによるものである。即ち、staurosporineによる前処理は、NGFによる神経突起形成に要する時間を短縮させた。

Key word：Neurite Outgrowth　Staurosporine　Nerve Growth Factor

〔はじめに〕　ラット副腎褐色細胞腫瘍由来の株細胞PC12は、NGFに応答して交感神経様細胞へと分化することから、NGF作用の研究に広く用いられている。NGFは、作用初期には増殖促進的に働き、その後分裂を停止させ神経分化へと導く。しかしながら、その作用機構については、ほとんど明らかになっていない。私達は、これまでタンパク質リン酸化の面からNGFの作用発現機構を検討してきた(1,2)。PC12細胞にNGFを作用させると、いくつかの細胞内タンパク質のリン酸化レベルが変化する。このタンパク質リン酸化におけるNGFの作用の少なくとも一部は、タンパク質リン酸化酵素阻害剤であるstaurosporineあるいはK−252aによって阻害されることを見出している。そこで、NGFの代表的な作用である神経突起形成を、これらタンパク質リン酸化酵素阻害剤が阻害するか否か検討した。驚いたことに、staurosporineは、単独でPC12細胞に作用し、神経線維を伸長させた。今回は、NGFおよびstaurosporineによる神経突起形成の相違について報告する。

〔実験方法〕　細胞培養：実験にはPC12h細胞を用いた。培養は、7％ウマ血清を含むDMEMを用い、∅35 mmディッシュあるいは75 cm²フラスコにて37℃、5％CO_2の条件で行った。

〔結果〕　1. Staurosporineによる神経突起形成の時間推移

PC12h細胞にstaurosporine（100nM）を作用させると、作用1時間後には既に短い突起形成が見られた。この神経突起は、時間とともに伸長して24時間後には細胞体直径の2倍を越えるようになり、72時間後には細胞体直径の7～8倍にまで伸びた。これに対し、NGF（50 ng/mℓ）による神経突起形成は、作用24時間後においても認められず、

二、三日後から認められた。このようにNGFとstaurosporineとでは、神経突起形成の時間推移が明らかに異なる。（Fig.1）

2. Staurosporineの作用濃度と神経突起形成能

staurosporineによる神経突起形成は、10nMから認められるが、10nMでは5日間の培養においても長い突起伸長は見られなかった。また、30nM、100nMと濃度に依存して神経突起の長さが長くなった。（省略）

3. Actinomycin Dによる神経突起形成の阻害の有無

NGF(100ng/ml)による神経突起形成は、低濃度のactinomycin D(1nM)によって完全に阻害されたが、staurosporineによる神経突起形成は阻害されなかった。(Fig.2)

4. Staurosporine前処理によるNGFの作用発現時間の短縮

PC12h細胞をstaurosporine(100nM)存在下2日間培養した後、細胞を集めstaurosporineを含まない培地で数度洗浄してから培養皿に撒き直した。4時間後にNGF(10ng/ml)を添加して培養を続けると、NGF添加24時間後には明らかな突起形成が認められた。この突起形成は、actinomycin D(1nM)添加で阻害されたことからNGFによるものである。即ち、PC12h細胞のstaurosporineによる前処理は、NGFの神経突起形成に要する時間を短縮させる作用があることが明らかとなった。（Fig.3）

〔考察〕　PC12細胞内に直接NGFを注入しても神経突起形成が見られないこと、また、NGF抗体を細胞内に注入しても外から与えたNGFの作用を阻害しないこと(3,4)などから、NGFの作用発現には二次伝達物質が関与しているものと考えられている。このような信号変換機構のうち一般的なものとしてタンパク質リン酸化が知られている。事実NGFはPC12細胞のいくつかのタンパク質のリン酸化レベルを変動する。また、NGFによってcyclic AMP依存性およびCa^{2+}／リン脂質依存性タンパク質リン酸化酵素の活性が上昇するという報告もある(5,6)。このようなタンパク質リン酸化酵素活性の変動が遺伝子発現を調節し、神経突起形成の引き金になっている可能性が考えられる。私達がここに示したように、タンパク質リン酸化酵素阻害剤であるstaurosporineがPC12細胞の突起伸長を惹起したことは、タンパク質リン酸化レベルの変動が突起伸長の引き金になる可能性を強く示唆するものと考える。また、恐らくいくつかのタンパク質リン酸化酵素活性の相対的な変動が細胞の形態変化に重要な役割を果たしている可能性があるものと思われる。

〔文献〕

1. Hashimoto,S., Ikeno,T., and Kuzuya,H.(1985)　J.Neurochem. 45, 906-912

2. Hashimoto,S., Iwasaki,C., Kuzuya,H., and Groff,G.(1986)　J.Neurochem. 46, 1599-1604

3. Heumann,R., Schwab,M., and Thoenen,H.(1981)　Nature, 292, 838-840

4. Seeley,P.J., Keith,C.H., Shelanski,M.L., and Greene,L.A.(1983)　J.Neurosci. 3, 1488-1494

5. Cremins,J., Wagner,J.A., and Halegoua,S.(1986)　J.Cell Biol. 103, 887-893

6. Hama,T., Huang,K.-P., and Guroff,G.(1986)　Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83, 2353-2357

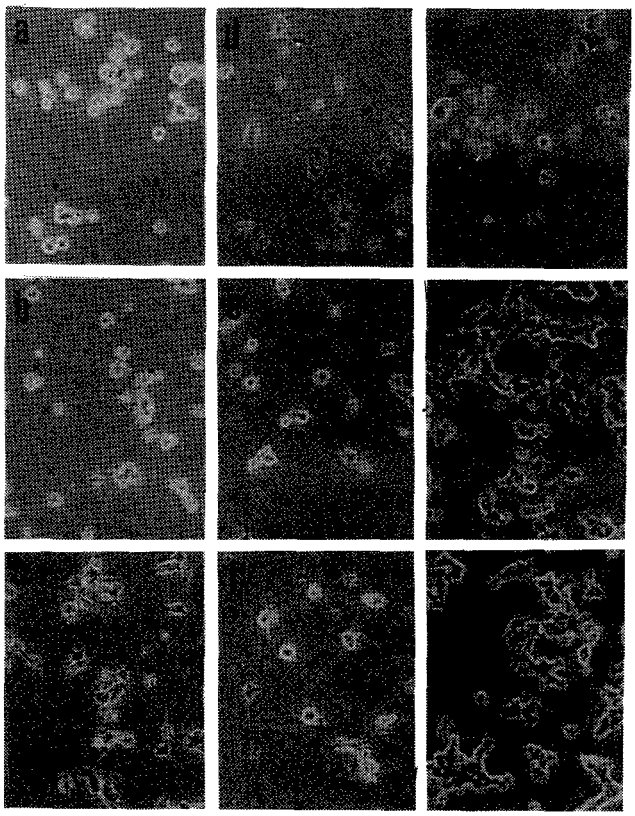
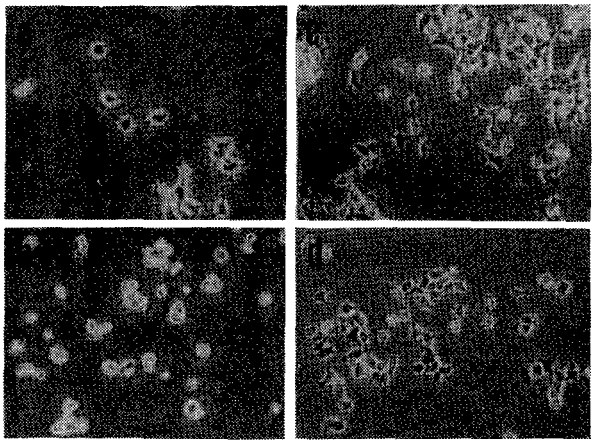


Fig. 1. Time course of the neurite formation induced by staurosporine or by nerve growth factor
PC12h cells were cultured with staurosporine (100nm) for 0 hour (a), 1 hour (b), 8 hours (c), 24 hours (d), 3days (e), or 5 days (f), or with nerve growth factor (50ng/ml) for 24 hours (g), 3 days (h), or 5 days (i).

Fig. 2. Effect of actinomycin D on NGF- or staurosporine-induced neurite outgrowth
PC12h cells were cultured with nerve growth factor (100ng/ml) for 3 days (a), or with nerve growth factor for 3 days and with actinomycin D for the last 2 of the 3 days (b). PC12h cells were cultured with sole staurosporine (100nM) (c) or with staurosporine plus actinomycin D (1nM) (d) for 12 hours.



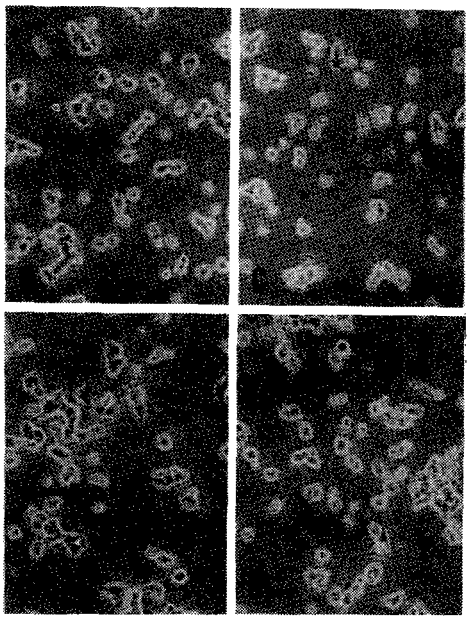


Fig. 3. Effect of pre-treatment with staurosporine on NGF-induced neurite formation
PC12h cells were pre-exposed to staurosporine (100nM) for 2 days, then the cells were subcultured in control medium (a), or with nerve growth factor (10ng/ml) (b), actinomycin D (1nM) (c), or nerve growth factor plus actinomycin D (d) for 24 hours.

67. プロテアーゼ阻害剤のラット中枢神経系培養細胞に対する影響

松井和隆・衛藤義勝・石井　博*・
下条貞友**・宮原　正**
（慈恵医大・小児，解剖*，第二内科**）

〔要　約〕

プロテアーゼ阻害剤であるLeupeptinとE-64は多発性硬化症、クロロキンミオパチー、筋ジストロフィー症などの治療薬として注目されている。各疾患モデルでのプロテアーゼ阻害剤の作用についての研究報告は多いが、正常中枢神経細胞における作用についての報告は少ない。今回我々はラット中枢神経培養細胞におけるプロテアーゼ阻害剤の直接的作用を形態学的、生化学的に検討したので報告する。

Wistar一今道系ラットの胎児（胎生15日令）の脳より得た細胞をEagle's Minimum Essential Medium(EMEM)内で5日間培養したものに10～50μg/mlの濃度のLeupeptinとE-64を添加した後、位相差顕微鏡・電子顕微鏡観察、Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)による蛋白分析、ライソゾーム酵素活性の測定、^{3}H-glucosamine添加によるガングリオシド代謝の分析を施行した。プロテアーゼ阻害剤添加後数日で培養細胞中に多数の細胞内封入体様顆粒の増加を認め、ガングリオシド代謝動態に異常を認めたことより、プロテアーゼ阻害剤の中枢神経細胞に対する影響について考察を加えた。

Key word：　Protease inhibitor, Rat brain, Cell culture

動物細胞内でのタンパク質の分解はライソゾーム関与のものが大部分である。その内cysteine proteinaseの特異的インヒビターとしてLeupeptinやE-64がある。ミエリン内因性プロテアーゼの活性亢進が多発性硬化症にみられミエリン崩壊との関連性が認められ、E-64により抑制されるとの報告がある（5）。また筋ジストロフィー症においては、遺伝的な筋細胞膜の異常に起因した筋蛋白の破壊が筋細胞中のプロテアーゼによりおこることが認められており、E-64はその阻害作用により治療薬として開発が進められている（3、4）。Leupeptinについてもguinea pigのEAEを抑制したとの報告がある（6）。

プロテアーゼ阻害剤は各種疾患の治療薬として研究が進んでいるが、正常中枢神経細胞に対する直接作用に対する研究報告は少ない。今回我々はラット胎児より得た培養中枢神経細胞にLeupeptinとE-64を添加し、非添加時と比較検討し中枢神経細胞の特に脂質代謝と蛋白代謝への影響を検討したので報告する。

〔材料と方法〕

胎生15日令のWister一今道系ラットより大脳半球を採取し、細切後0.25%トリプシン溶液で細胞を単離した。Poly-DL-ornithineでコーティングした35mmシャーレに1dish当り胎児1匹の割合で細胞を撒き、EMEM内で5日間培養後、LeupeptinとE-64を10～50μg／mlの濃度で5日間添加、^{3}H-glucosamineを5μCi／dish2日間添加後、細胞を採取した。生理食塩水で良く洗浄後ペレットにし、0.5mlのDWを加え30秒間超音波にて粉砕、50μlをとり蛋白分析を施行した。またFolch法により抽出した脂質を薄層クロマトグラフィーにて展開し、セレブロシドとサルファタイドを採取し液体

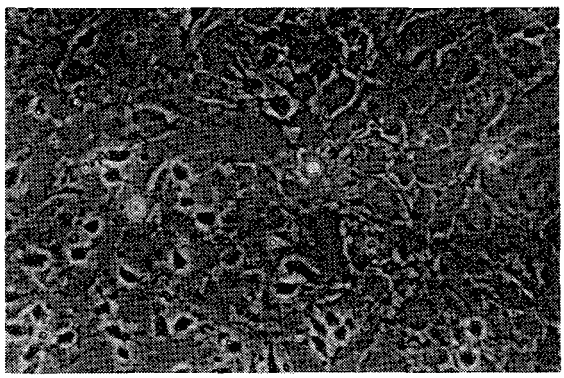
シンチレーションカウンターにて^{3}H-glucosamineの取り込みを測定した。脂質抽出後の上清を透析し、凍結乾燥後薄層クロマトグラフィーで展開し、ガングリオシドの各分画（GD1b, GT1a, GD1a, GD3, GM1, GM2, GM3）毎に採取し液体シンチレーションカウンターにて測定した。蛋白量測定はLowry法によった。ライソゾーム酵素活性は4MU誘導体を基質としてβ-galactosidase, α-D-Mannosidase, β-D-Fucosidase, β-D-glucuronidase, N-acetyl-β-glucosaminidaseについて測定した。細胞は随時、位相差顕微鏡と電子顕微鏡による形態学的観察を施行した。

〔結果〕

位相差顕微鏡による観察で、LeupeptinとE-64を添加した群では非添加群に比べ、培養細胞中に多数の細胞内封入体様顆粒の増加を認めた。（写真1、2）

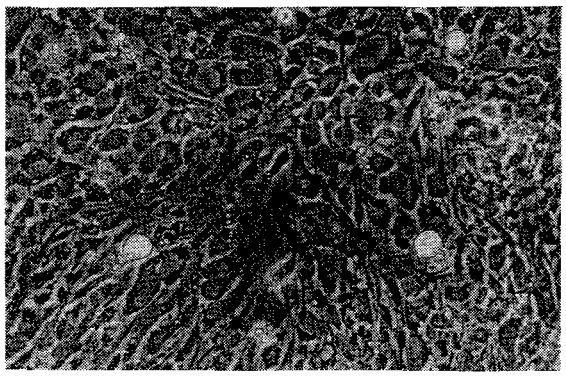
蛋白分析では、4～20%のgradientのSDS-PAGEでは明らかな蛋白の分画の変化はみられず、またライソゾーム酵素活性の明らかな変動も認められなかった。

ガングリオシド分画の分析で、LeupeptinとE-64の添加により総ガングリオシド内への^{3}H-glucosamineの取り込み量が増加する傾向が認められ、Leupeptin 40μg／ml添加では173%、Leupeptin 10～50μg／ml添加の平均でも111%の増加を示し、E-64 30μg／ml添加では148%、40μg／ml添加では217%、E-64 10～50μg／ml添加の平均でも135%の増加がみられた。各ガングリオシド分画内への取り込み量は添加濃度により変動を示し一定の傾向はみられなかったが、Leupeptinを40μg／ml、E-64を40μg／ml添加した群では非添加群よりどの分画でも取り込み量の増加がみられた。



［写真1］EMEM内12日間培養
位相差顕微鏡像
230倍

Dish底面に石垣状の細胞の増殖がみられている部を示す。細胞質内に封入体は認められない。



［写真2］EMEM内5日間培養後、E-64（10μg／ml）7日間添加
位相差顕微鏡像
230倍

コントロールと比較してプロテアーゼ阻害剤を添加すると細胞質内に多数の封入体様顆粒のみられる細胞が多数出現する。

〔考察〕

動物細胞内でのタンパク質の分解はライソゾーム関与のものが大部分であり、ライソゾーム内のプロテアーゼで最も強力なものはcysteine proteinase 群のcathepsin B,H,L,C とaspartate proteinase群のcathepsin D であるが、その活性を阻害することにより正常な細胞代謝が障害されると思われた。

プロテアーゼ阻害剤添加により明らかな細胞内封入体様顆粒の増加がみられることにより、細胞内にタンパク質の異常な蓄積が起こり、ライソゾームの酵素活性が変化することが予想されたが、今回の研究ではＳＤＳ－ＰＡＧＥ上では明らかな蛋白パターンの差異はみられず、ライソゾーム酵素であるβ－galactosidase,α-D-Mannosidase,β-D-Fucosidase,β-D-glucuronidase,N-acetyl-β-glucosaminidase の活性にも明らかな変動は認められなかった。また脂質代謝、ガングリオシド代謝への影響を検討したところ、総ガングリオシド内への^{3}H-glucosamineの取り込みの増加が観察された。ガングリオシドは神経細胞膜やシナプスに局在し細胞の情報伝達の１つの機構を担うと同時に細胞の分化促進作用をもつと想像されている（１、２）。プロテアーゼ阻害剤を添加することにより、ガングリオシド内への^{3}H-glucosamineの取り込み量が変化するということは、プロテアーゼ阻害剤が神経細胞の正常な膜代謝を変化させる可能性があると思われた。脂質代謝では、セレブロシドとサルファタイドの変動を検討したが、^{3}H-glucosamineはほとんど取り込まれず、^{14}Ｃ－galactose 或は各種アイソトープで標識した脂肪酸の投与による再検討が必要と思われた。

プロテアーゼ阻害剤添加により正常中枢神経細胞内に封入体様の顆粒が多数出現し、ガングリオシド代謝動態の変化がみられたため、プロテアーゼ阻害剤が中枢神経細胞に対し毒性を有する可能性を考えたが、ミエリン内在性酵素活性阻害には10μＭ程度のE-64で可能といわれ、今回の添加量はその 3～15倍にあたるため、プロテアーゼ阻害剤の細胞毒性について論ずるには今後低濃度添加実験による検討を加える必要があると思われた。

添加濃度を変化させ、^{14}Ｃ－galactose 或は各種アイソトープで標識した脂肪酸の投与による脂質代謝変動の分析と、電顕観察による形態変化の分析を併せて施行し、プロテアーゼ阻害剤の神経細胞への影響について検討している。

〔文献〕

（１）Ando,S.(1984) 蛋白質　核酸　酵素　29,202-215
（２）Doherty,P.,Dickson,J.G.,et al.(1985) J.Neurochem. 44,1259-1265
（３）Kar,N.C.,and Pearson,C.M.(1976) Clin.Chim.Acta 73,293-297
（４）Miyahara,T.,Simojou,S.,et al.(1985) 臨床薬理 16,357-365
（５）Miyatake,T.,et al. (1986) 神経進歩 30,160-169
（６）Osanai,T.,and Nagai,Y.(1984) Neurochem.Res. 9,1407-1416

68. 培養神経細胞を用いたサイコシンの神経毒性に関する検討

井田博幸・衛藤義勝　（慈恵医大・小児）

〔要　約〕

Krabbe病の生化学的病因物質として重要と考えられているサイコシンの神経毒性について培養神経細胞を用いて検討した。その結果，12.5 nmol/mℓ以上の濃度でのみ神経細胞に変化が認められた。すなわちサイコシンを培養液中に添加すると，位相差顕微鏡における観察では軸索の延長停止，滴状変性，網状構造の破壊，培養細胞のdishからの剝離が認められた。抗ニューロフィラメント抗体を用いた免疫螢光染色においては染色性の低下や一部斑状に染色されているのが観察された。電子顕微鏡における観察ではミトコンドリアが膨化し，クリステが破壊され，微小管やニューロフィラメントは消失していた。以上の結果からサイコシンの神経毒性の機序としては，ミトコンドリアの障害によって生じる呼吸鎖リン酸化の抑制による細胞内構築の破綻が考えられた。

Key word： Psychosine, Krabbe's disease (Globoid cell leukodystrophy), Cultured neuron,

I. 緒言

サイコシンははじめ脳のgalactolipidのアルカリ水解によって得られた物質で，その分解酵素（galactosyl sphingosine galactosyl hydrolase）はKrabbe病（Globoid cell leukodystrophy,以下ＧＬＤと略す）で欠損していることが知られている(5)。またサイコシンがＧＬＤ脳に蓄積しており(8)，さらに最近ではヒトＧＬＤのauthentic modelであるイヌやマウスにおいてもサイコシンが段階的に蓄積することなどが報告され(2)(4)，ＧＬＤの神経症状発現にサイコシンが大きな影響を及ぼしていることが明らかになりつつある。しかしながら，サイコシンの神経毒性の発現機序に関する報告は認められない。しかしながら，サイコシンの神経毒性の発現機序に関する報告は認められない。そこで我々は培養神経細胞を用いて位相差顕微鏡，抗ニューロフィラメント抗体を用いた免疫螢光染色，電子顕微鏡にてサイコシンの神経毒性を検討したので報告する。

II. 対象及び方法

神経培養は，explanted neuron culture及びdissociated neuron cultureの手法を用いて以下のように実験を行なった。explanted cultureについては，ヒト胎児（在胎14週）の後根神経節を無菌的に採取し，これをcollagen coated dishにexplantしEagle's ＭＥＭ（ニッスイ）に0.5％Glucose，10％牛胎児血清を加えたものを培養液として用い37℃，5％CO_2下で3週間培養液中にサイコシン（シグマ社製）を6.25 nmol/mℓ，12.5 nmol/mℓ，50 nmol/mℓとなるように加え，その変化を位

相差顕微鏡，電子顕微鏡にて観察した。dissociated neuron cultureについては，ＤＤＹマウス（４週令）の後根神経節を無菌的に採取した後，collagenaseで結合織を除去し，poly-L-lysine coated glass上に生着させた。explanted nearon cultureと同様の培養条件，実験条件にてその変化を位相差顕微鏡，抗ニューロフィラメント抗体を用いた免疫螢光染色にて観察した。

免疫螢光抗体染色は以下の方法で行なった。すなわちcultured neuronを95％エタノール，５％酢酸で固定した後，ヤギ血清を添加し非特異的反応を防いだ抗マウスニューロフィラメント（ラットIgG分画）を作用させ，これにGoat anti Rat IgG-FITC(Cappel 社製）を反応させ螢光顕微鏡にて観察した。

電子顕微鏡による検討は以下のような手法で行なった。cultured neuronを2.5％グルタールアルデヒドと２％オスミウム酸で二重固定し，エタノール，アセトニンで脱水後，n-butyl glycidyl etherで置換し，Eponに包埋して超薄切片後酢酸ウランと硝酸鉛で二重染色し，日本電子ＪＥＭ－1200ＥＸ型電子顕微鏡で観察した。

Ⅲ. 結果

1. Explant neuron cultureにおけるサイコシンの影響

培養３週間を経過したcultured neuronでは，神経線維が非常に繊細な網目構造をなし，末梢までよく伸びているのが観察された。それに対しサイコシン12.5nmol/mℓ添加したneuronにおいては，網目構造の破壊，cultured neuronのdishからの剝離，神経線維の末梢での延長停止，融解が認められた。サイコシン6.25nmol/mℓ添加のcultured neuronでは上記変化は認められず，50nmol/mℓ添加した時には上記変化はより強く出現し，72時間培養したところほとんどのcultured neuronは死滅した。

2. Dissociated neuron culturedにおけるサイコシンの影響

培養３週間を経過したcultured neuronでは神経細胞間の細目構造がよく発達しているのに対し，サイコシン12.5nmol/mℓ添加したneuronでは細目構造をなす神経線維の変性の結果と思われる消状物が多数観察された。

3. 抗ニューロフィラメント抗体による免疫螢光体染色による検討

dissociated cultured neuronを抗ニューロフィラメント抗体を用いて螢光染色した。サイコシン添加群では染色性の低下や斑状変性したニューロフィラメントが認められた。これら変化は12.5nmol/mℓ以上でのみ認められた。

4. 電子顕微鏡による検討

explant cultured neuronの培養液中にサイコシンを12.5nmol/mℓ添加し，1日経過した時の変化を軸索に注目して電子顕微鏡にて観察した。サイコシン無添加のcultured neuronでは，数本の軸索が緊密に束状をなしその内部にはミトコンドリア，微小管，ニューロフィラメントがintactに存在しているのが観察された。これに対しサイコシン12.5nmol/mℓ添加したcultured neuronの軸索では，ミトコンドリアが膨化し，クリステは破壊されており，微小管やニューロフィラメントは消失していた。

Ⅴ. 考察

サイコシンの細胞毒性は，はじめTaketomiら(9)によって報告され，ついでサイコシンをマウス脳内に注入すると細胞壊死や出血を生じることが示され(7)その神経毒性が注目された。今回の我々の検討により培養神経細胞においてもその細胞障害は明らかでとくにミトコンドリアの障害が著明であった。

サイコシンの毒性が神経特異的かどうかという問題についてはその閾値から考察を加えた。Taketomiら(9)は溶血を指標にしてその毒性を検討しているが，50％溶血を生じるサイコシン濃度は15μg/mlと報告している。Dickermanら(1)は皮膚線維芽細胞における[^{3}H] thymidineのとりこみ抑制率について論じているが，ID_{50}はやはり15μg/mlと報告している。今回の培養神経細胞を用いた我々の実験においても，12.5 nmol/ml（約6.25μg/ml）以下では明確な変化を生じなかったことから，in vitroにおけるサイコシンの毒性の閾値は赤血球皮膚線維芽細胞，培養神経細胞のいずれにおいても6～15μg/ml程度と考えられ神経特異的とは言い難い結果を示していると考えられた。

サイコシンの毒性の発現機序については，最近ラット肝を用いた報告が認められる。すなわちStrasberg(6)らによれば，サイコシンは酸化的リン酸化を完全に抑制するという。Igisuら(3)は，cytochrome C oxidaseがサイコシンによって抑制されると報告している。今回の我々の検討によりサイコシンはミトコンドリアを障害することが形態学的に確認された。以上の結果を報告すると，サイコシンはミトコンドリアに作用し，ついで呼吸鎖リン酸化を障害しこの結果ニューロフィラメント，微小管という細胞骨格が破壊されるというプロセスがサイコシンの神経毒性の発現機序と思われた。

【文献】

1. Dickerman L.H., Kurczynski,T.W. and McBridge, R.G. (1981) J. Neuro.Sci. 50; 181-190.
2. Igisu, H. and Suzuki, K. (1984) Science 224, 753-755.
3. Igisu, H. and Nakamura, M. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 137, 323-327.
4. Kobayashi, T., Shinoda, H., Goto, I., Yamanaka, T. and Suzuki, Y. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 144, 41-46.
5. Miyatake, T. and Suzuki, K. (1972) Biochem. Biophys. Res. commun. 48, 538-543.
6. Strasberg, P. (1986) Biochem. Cell Biol. 64, 485-489.
7. Suzuki, K., Tanaka, H. and Suzuki, K. (1976) Current Trend in Sphingolipids and Allied Diseases, Plenum press, New York, pp 99-114.
8. Svennerholm, L., Vanier, M.T. and Masson, J.E. (1980) J. Lipid Res. 21, 53-54.
9. Taketomi, T. and Nishimura, K. (1964) Japan. J. Exp. Med. 34, 244-265.

69. 3種類のNa, K−ATPase α鎖のmRNAが初代培養ラット中枢ニューロンに存在する

井上順雄・原　諭吉*・中尾　真*・
津久井弘子**・畠中　寛**・松井英男
（杏林大・医・生化，東京医歯大・医・生化*，三菱化成生命研**）

〔要　約〕

3種類のNa,K-ATPaseアイソザイムのα鎖（αⅠ鎖，αⅡ鎖およびαⅢ鎖）のcDNAをプローブとして，ラットの種々の組織，細胞に存在するNa,K-ATPaseα鎖のmRNAの種類をハイブリット形成によって解析した．ノーザンブロット法，ドットブロット法により，成熟ラットの大脳にはαⅠ鎖，αⅡ鎖およびαⅢ鎖のmRNAがすべて存在することがわかった．大脳のαⅠ鎖のmRNAはαⅢ鎖のmRNAよりやや大きく，両者とも28Sよりやや小さく，それぞれ単一であった．αⅡ鎖のmRNAは28Sより大きく単一ではなかった．これに対し，成熟ラットの腎臓にはαⅠ鎖のmRNAのみ存在し，心臓にはαⅠ鎖とαⅡ鎖のmRNAが存在した．一方，16日胚，5日齢のラット大脳にも3種類のα鎖のmRNAが存在した．これは，16日胚の大脳にはジギタリス高感受性のαⅡ型酵素活性がほとんど存在しないのに，αⅡ鎖のmRNAは既に存在することを示す．16日胚から得て11日間初代培養したニューロンにはジギタリス低感受性，高感受性（αⅠ型，αⅡ型）の両酵素活性が存在するが，αⅠ鎖とαⅡ鎖のmRNAに加えαⅢ鎖のmRNAも存在することが明らかとなった．他方，ジギタリス低感受性（αⅠ型）酵素活性のみを持つPC12h細胞にはαⅠ鎖のmRNAしか存在しなかった．

Key word：Na,K-ATPase isozyme ; mRNA ; primary cultured neuron

Na,K-ATPase（Na,K-ポンプ）は神経系では重要であり，特にニューロンでは膜電位維持のためにも必須である．この酵素は，α鎖とβ鎖の2種類のペプチド鎖から成るが，脳には異なるα鎖を持つアイソザイムが存在する(1)．その第1は，腎臓などの他の臓器と共通のα鎖（以下αⅠ鎖）から成るα型（以下αⅠ型）酵素であり，第2は，α(+)鎖（以下αⅡ鎖）から成るα(+)型（以下αⅡ型）酵素である．これらは，ジギタリス感受性などの性質が異なる(1,2)．cDNAの解析によりαⅠ鎖，αⅡ鎖のアミノ酸配列も決定された(3,4)．更に，第3のα鎖，即ちαⅢ鎖が脳に存在することもcDNAの解析により明らかとなった(3,4)．しかし，αⅢ型酵素の存在は蛋白質（あるいは酵素活性）として確認されていないし，その性質も明らかでない．

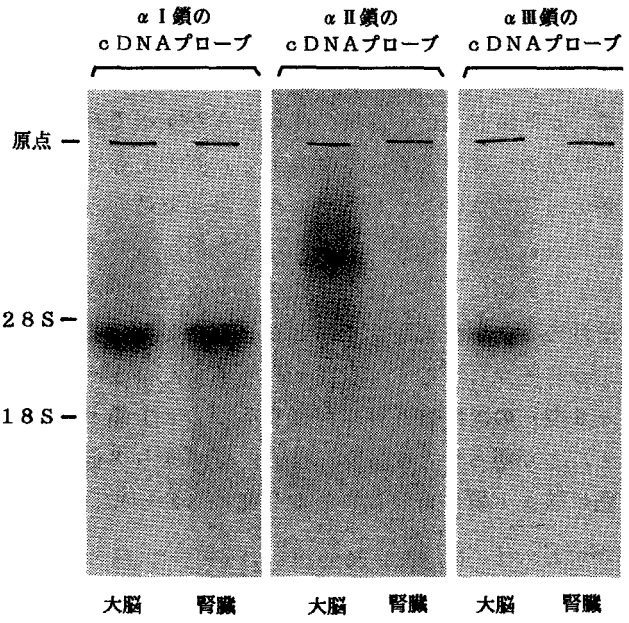
我々は，昨年ラット胚から得た初代培養ニューロンのNa,K-ATPaseを解析し，ジギタリス感受性の相違により分子種を区別した(5)．そして，ニューロンの分化につれ酵素が増加すること，未分化のニューロンはジギタリス低感受性の酵素（αⅠ型酵素）を持つこと，ニューロンの分化につれジギタリス高感受性酵素（αⅡ型酵素）が増加することを示した．そこで，今回我々はNa,K-ATPaseアイソザイムの3種類のα鎖のcDNAプローブを用い，種々の組織，細胞のmRNAを解析した．そして，初代培養中枢ニューロンに3種類のα鎖（αⅠ鎖，αⅡ鎖，αⅢ鎖）のmRNAが存在することを明らかにした．

［実験方法］

ラットの大脳，心臓，腎臓，ラット胚由来の初代培養ニューロン（11日間培養）(5)，および培養神経細胞（PC12h細胞）(2)からChirgwinの方法(6)によりRNAを調整し用いた．得られたRNAは，ノーザンブロット法及びドットブロット法により解析した．ノーザンブロット法では，Thomasの方法(7)でRNAを変性後アガロースゲル電気泳動で分離し，ニトロセルロース膜にブロッ

トした．ドットブロット法では，変性ＲＮＡの希釈系列を作り，ニトロセルロース膜に添加した．ＲＮＡをブロットしたニトロセルロース膜は，加熱処理後，ｃＤＮＡとハイブリッド形成し，洗浄後，オートラジオグラフィーで解析した．αＩのｃＤＮＡプローブはNcoⅠとBam ＨⅠ断片1539 bp（翻訳領域の５'末端側），αⅡのｃＤＮＡプローブはSacⅠとPvuⅡ断片1368 bp（３'-非翻訳領域の５'末端側）αⅢのｃＤＮＡプローブはDdeⅠとApaⅠ断片303 bp（３'-非翻訳領域の５'末端側）を用い，マルチプライムＤＮＡ標識システムにより^{32}Ｐで標識した．

図１．成熟ラットの大脳，腎臓のＲＮＡと３種ｃＤＮＡプローブとのノーザンブロットハイブリット形成．



［実験結果と考察］

図１は，成熟ラットの大脳と腎臓のＲＮＡのノーザンブロットハイブリッド形成の結果を示す．大脳のＲＮＡは３種類のｃＤＮＡプローブとハイブリッド形成するのに対し，腎臓のＲＮＡはαＩのｃＤＮＡプローブとのみハイブリッド形成した．αⅡのｃＤＮＡプローブ，及びαⅢのｃＤＮＡプローブは非翻訳部位を用いているので，それぞれ他の２種類のｃＤＮＡとホモロジーがなく，他のｍＲＮＡとハイブリッド形成する可能性は非常に少ない．これに対してαＩのｃＤＮＡプローブは翻訳部位を用いており，他のｃＤＮＡと約７５％のホモロジーがある．しかし，大脳のＲＮＡで３種類のｃＤＮＡプローブを用いハイブリット形成した時に，それぞれの電気泳動上のバンドの位置が異なるので，我々の実験条件ではαＩのｃＤＮＡプローブは，αⅡ鎖のｍＲＮＡおよびαⅢ鎖のｍＲＮＡとはほとんどハイブリッド形成しないものと結論された．即ち，使用した３種のｃＤＮＡプローブで，３種のｍＲＮＡが選択的に解析できることがわかった．そして，バンドの位置からαＩ鎖のｍＲＮＡは大脳，腎臓とも単一で２８ｓＲＮＡよりわずかに小さく，大脳のαⅡ鎖のｍＲＮＡは単一ではなく２８ｓＲＮＡより大きく，大脳のαⅢ鎖のｍＲＮＡは単一で，αＩ鎖のｍＲＮＡよりさらにわずかに小さいことが明らかとなった．

図２．成熟ラットの大脳，腎臓，心臓のＲＮＡと３種のｃＤＮＡプローブとのドットブロットハイブリット形成．
ＲＮＡ量は上から0.63μg，1.25μg，2.5μg，5.0μg，10μg．

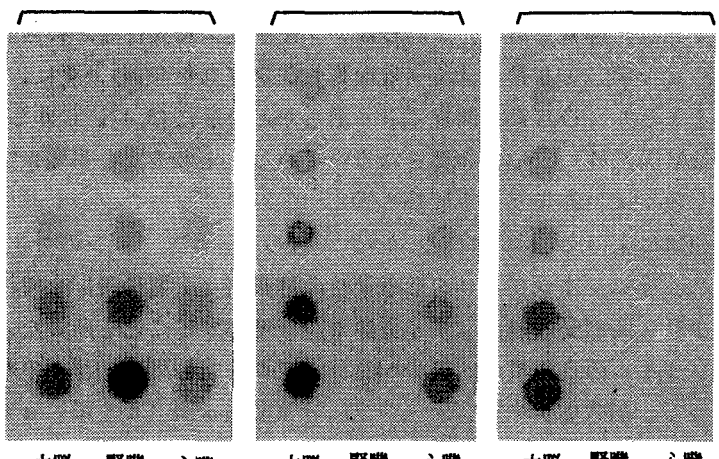
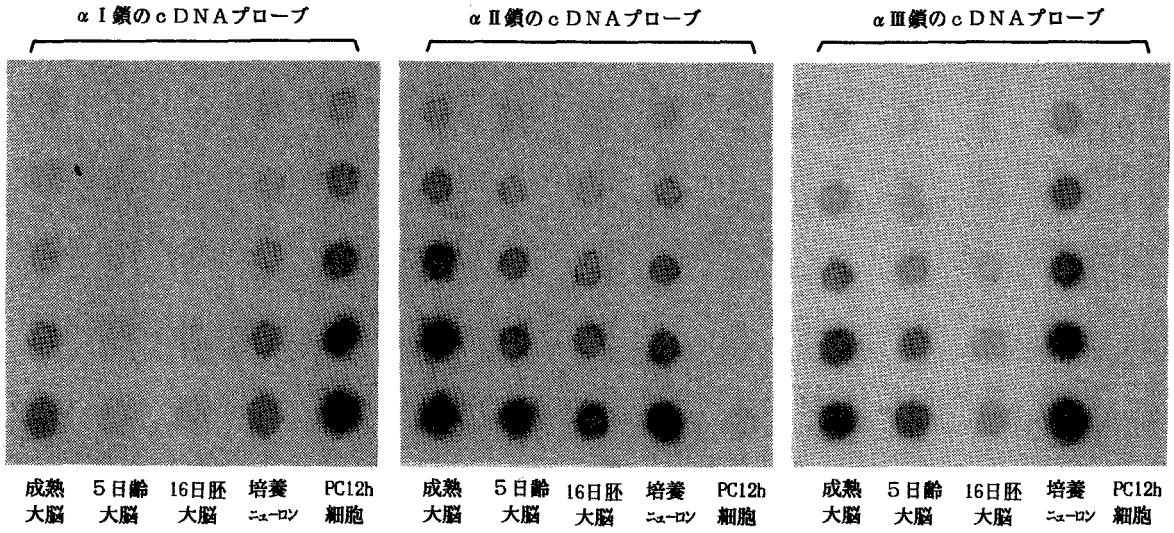


図２は成熟ラットの大脳，腎臓，心臓のＲＮＡのドットブロットハイブリット形成の結果を示す．図１の結果と同様に大脳には３種類のｍＲＮＡが存在し，腎臓にはαＩ鎖のｍＲＮＡのみである事

図3．成熟，5日齢，16日胚ラット大脳，初代培養ラットニューロン，ラット由来PC12h細胞のRNAと3種cDNAプローブとのドットブロットハイブリット形成．
RNA量は上から0.63μg，1.25μg，2.5μg，5.0μg，10μg．



が確かめられた．一方，心臓にはαⅠ鎖とαⅡ鎖，2種類のmRNAが存在する事が明らかとなった．ただし，スポットの濃さはプローブの比放射活性，ハイブリッド形成率などに依存するので，異なったプローブを使用した結果相互の間で量的比較は行えない．

図3は，成熟，5日齢および16日胚ラット大脳，胚由来初代培養ニューロン，PC12h細胞のRNAのドットブロットハイブリット形成の結果である．5日齢および16日胚大脳には成熟大脳と同様に，3種類のmRNAが存在した．この結果は，16日胚の大脳のNa,K-ATPaseにはαⅡ型活性がほとんどなかった(5)ことと考え合わせると興味深い．即ち，その後のニューロンの分化につれαⅡ型酵素の出現，増加する(5)ことに対応して，αⅡ型酵素のmRNAが酵素合成に先行して合成されていることを示しているのであろう．我々はすでに分化した培養ニューロンが，ジギタリス低感受性，高感受性両酵素（αⅠ型，αⅡ型両酵素）を含むことを示した(5)．そして今回，分化したニューロンにはαⅠ鎖とαⅡ鎖に加えαⅢ鎖のmRNAも存在することを明らかにした．これに対し，PC12h細胞にはジギタリス低感受性酵素（αⅠ型酵素）のみが存在するが(2)，mRNAの解析からもαⅠ鎖のみ持つ事が明らかとなった．

今後は，脳さらにニューロンに存在することが明らかになったαⅠ型，αⅡ型，αⅢ型酵素が，脳神経系にどの様に局在するのか，更にそれぞれの酵素の存在様式および機能の相違等が，神経機能の発現にどの様な関わりあいを持つかが重要な問題となろう．

なお，種々の御助言をいただいた三菱化成生命研の山国徹博士に感謝します．

［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. Shull, G.E., Greeb, J., and Lingrel, J.B. (1986) Biochem. 25, 8125-8132.
4. Hara, Y., Urayama, O., Kawakami, K., Nojima, H., Nagamune, H., Kojima, T. Ohta, T., Nagano, K., and Nakao, M. (1987) J. Biochem. 102, 43-58.
5. 井上順雄，松井英男，津久井弘子，畠中寛 (1986) 神経化学 25, 376-378
6. Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., and Rutter, W.J. (1979) Biochem., 18, 5294-5299.
7. Thomas, P.S. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1980) 77, 5201-5205.

70. 牛副腎髄質クロマフィン細胞の凍結保存——二次培養での細胞機能

宮川洋二・小林恒之*・今泉美佳・
武井延之**・畠中寛**・熊倉鴻之助
（上智大・生命研，文・心理*，三菱化成生命研**）

〔要　約〕

我々は、すでに牛副腎髄質細胞の凍結保存-2次培養が可能であることを報告しているが、本実験では、凍結保存-2次培養細胞におけるカテコールアミン（CA）合成能の変化と分泌機能の変化を更に詳しく検討した。凍結保存-2次培養細胞からのCA分泌では、刺激添加後、時間とともに分泌が続く傾向にあり、初代培養系に見られる一過性の分泌とは異なる。この性質は特に、高カリウム刺激によるCA分泌に顕著であった。また、用量反応関係では、CA分泌応答のピークが初代培養細胞より高濃度側で見られ、ここでも初代培養細胞系で見られる高濃度刺激による分泌の低下があまり見られない。合成能の変化に関しては、凍結保存によるCA含量の減少に対するハイドロコルチゾンやアスコルビン酸の効果を検討した。その結果、ハイドロコルチゾンにより、ノルアドレナリン、ドーパミンは増加の傾向を見せたが、アドレナリンの増加は見られなかった。また、アスコルビン酸の影響はほとんどなかった。以上のことから、凍結保存-2次培養細胞の分泌能力は、初代培養細胞に比べ低下していないことが示唆された。この凍結細胞を黒質-線条体ニューロンを破壊したラットの線条体内に移植したところ、異種間移植にもかかわらずアンフェタミンによる回転運動の改善が数例で観察された。この点は凍結保存-2次培養細胞の脳内移植の可能性を示すもので、興味深い。

Key word： Adrenal chromaffin cells, Secondary culture, Secretory function

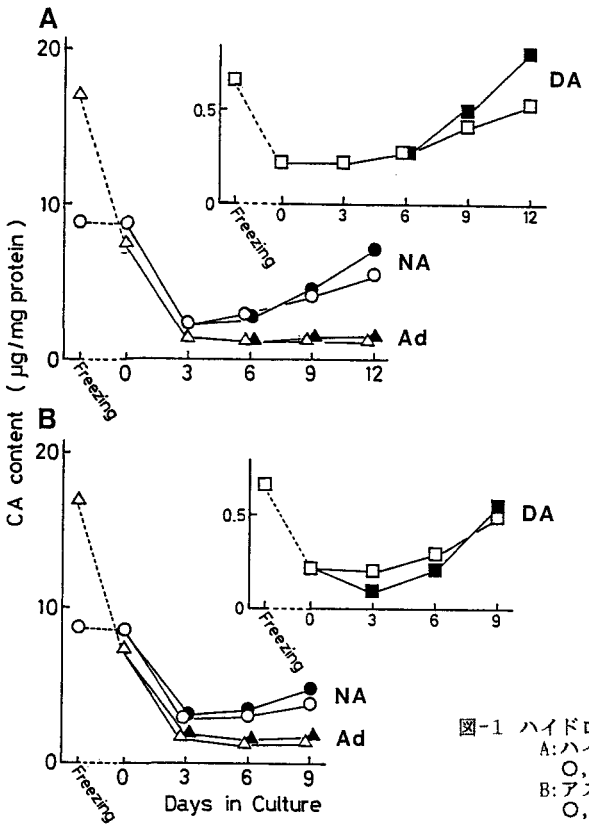
クロマフィン細胞の凍結保存-2次培養法は、細胞のロット差の解消や実験準備の簡便化などにつながる有用な手段と考えられ、我々は、牛副腎髄質細胞から単離したクロマフィン細胞の凍結保存-2次培養法について、既にその可能性を報告している[1]。今回の実験では、さらにカテコールアミン（CA）生合成機能系の検討のために、2次培養系におけるクロマフィン細胞のCA含量に対するハイドロコルチゾンおよびアスコルビン酸の作用を検討した。ついで種々の薬物刺激によるCA分泌応答を初代培養と比較検討して、分泌調節系の変化を調べた。また牛副腎髄質由来の初代培養細胞は、ラット脳室内に移植したのちの生存が知られている[2]。そこで本実験ではこの凍結保存-2次培養細胞を黒質-線条体ニューロンを破壊したラットに線条体内移植した後、回転運動の変化を観察し、移植細胞としての有効性の検討に着手した。

［実験方法］

〔クロマフィン細胞の培養および凍結保存〕… 牛副腎髄質より既報[1]のようにクロマフィン細胞を単離し、SMEM-10%牛胎児血清培地中で3日間浮遊培養した後、遠心して細胞を集め10%DMSOを含む牛準胎児血清に再び懸濁し、分注して凍結した。凍結は発泡スチロール性の容器を用い、-80℃まで一晩かけてゆっくり温度を下げて行ない、その後液体窒素中に保存した。

〔2次培養〕… 凍結細胞を37℃で速やかに融解し5倍量のDF（DMEM／F12＝1：1）の無血清培地に懸濁し、遠心してDMSOを除いた後、5%牛胎児血清-5%非動化馬血清を含むDF培地中で単層培養した。培地交換は3日目ごとに行なった。

〔ハイドロコルチゾンおよびアスコルビン酸の効果〕…ハイドロコルチゾンの実験にはDF-10%NU血清培地[3]を用い、2次培養3日目からハイドロコルチゾ



ンを添加した。アスコルビン酸は解凍当日からDF培地に添加した。

〔CA分泌〕… 細胞は凍結期間を1週間とし2次培養を5日間としたものを用い、0.5%BSAを含む酸素飽和させたKrebs-Ringer液中で分泌刺激を与え、3分間に外液中に放出されたCA量を測定した。CAは0.4N過塩素酸で抽出、遠心で除タンパクした後HPLC-ECD systemにより測定した。タンパク量はBradford法で求めた。

[結果および考察]

図1に示すように凍結保存-2次培養細胞では凍結保存中にCAの含量が激減するが、2次培養の時間とともにアドレナリン(Ad)を除いては回復する傾向にあった。特にドーパミン(DA)の増加は特徴的である。初代培養

図-1 ハイドロコルチゾンおよびアスコルビン酸のCA含量への効果
A:ハイドロコルチゾン(10^{-8}M)を2次培養3日目から加えた。
○,△,□:薬物無添加. ●,▲,■:薬物添加
B:アスコルビン酸(250μM)を解凍当日から加えて培養した。
○,△,□:薬物無添加. ●,▲,■:薬物添加

系ではハイドロコルチゾンにより、Ad含量の増加が見られる[3]が、2次培養系ではハイドロコルチゾンを添加してもほとんどAdの増加は見られなかった。このことからNAからAdへの合成機能が凍結により何らかの変化を受けていると推測される。アスコルビン酸の添加では、著明な影響は見られない。

図2は、25℃、37℃におけるCA分泌のタイムコースを示すが、2次培養細胞では、分泌量が時間とともに増加を続けるという特徴が見られ、分泌機能の調節のうち、抑制的要因に凍結の影響が現れていると思われる。

図3で示す刺激薬物の用量反応曲線では、凍結保存-2次培養細胞の分泌応答のピークが初代培養細胞より高濃度側で見られる。しかし、CA分泌がニコチン性刺激のみによって引き起こされる点は変わらない。このように凍結保存によりCA合成の調節系、さらに分泌の抑制的調節系に初代培養系と比べて変化が見られるが、CA分泌能力は低下していない。この点は、種々のアセチルコリン遮断薬に対する感受性、さらに分泌のCa^{2+}依存性などの点からもさらに検討を続けている。

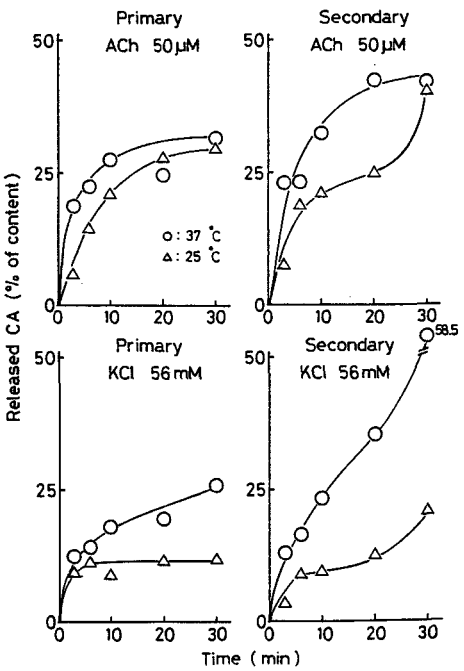


図-2

凍結保存-2次培養細胞からのCA分泌
1分間のpreincubationの後、刺激薬物を加え3分間incubationし上清を測定した。
初代培養細胞は調製日から5-6日目の細胞を用いた。

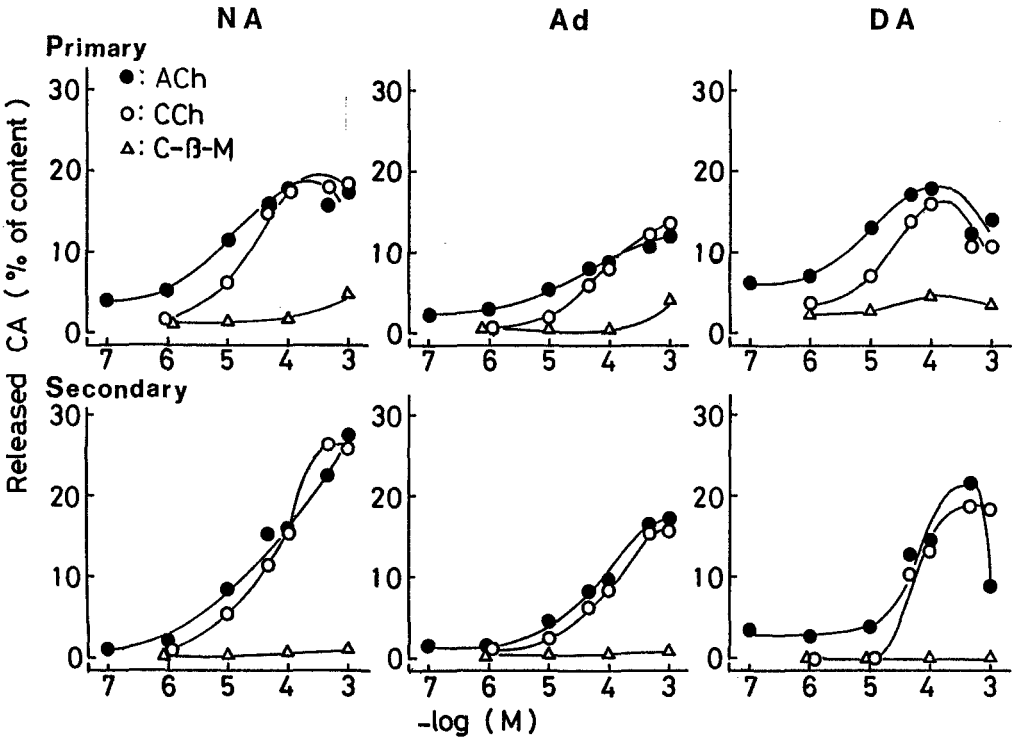


図-3 薬物刺激によるCA分泌に見られる用量反応曲線
●：アセチルコリン（ACh） O：カルバミルコリン（CCh） Δ：カルバミル-β-メチルコリン（C-β-M）

またこの系における凍結保存後の細胞の生存率は約60%であり、充分な値であると思われる。

一方、凍結保存-2次培養細胞のDAの含量が増加するという特徴に注目して、ラットへの脳内移植を試みた。黒質-線条体ニューロンを破壊してラットの線条体内に移植を行なったところ、アンフェタミンによる回転運動の改善が数例観察された。このような脳内移植への可能性が確立されれば、凍結保存-2次培養系は非常に有用な系になると確信している。

[文献]

1. Kumakura, K., Ohara, M., Sato, G. P. (1986). J. Neurochem. 46, 1851-1858.
2. Perlow, M. J., Kumakura, K., Guidotti, A. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5278-5281.
3. 中川豊．小原美佳．関谷真．熊倉鴻之助．(1984)．生化学．56, p926.(2R-p3).
4. 高橋正身．畠中寛．熊倉鴻之助．溝部文夫．(1984)．神経化学．23, 324-326.

71. シスプラチン封入リポゾームによる神経芽腫細胞の増殖抑制
—エンドサイトーシスによる選択的取り込み—

神尾善郎・宮谷真正・加藤　浩・
伊藤仁一*・加藤泰治*・田中　亮*
（藤田学園保衛大・医・小児外科，名古屋市大・医・生化*）

〔要　約〕

神経芽腫細胞IMR-32によるリポソームの細胞内取り込みと代謝経路を検討した。超音波法によりフォスファチジルコリン、フォスファチジルセリン、コレステロールから成るシスプラチン封入リポソームを作成し、IMR-32細胞に24時間作用させたところ、シスプラチン取り込み量は、遊離シスプラチンに比較して約3倍増加した。シスプラチン封入リポソームのIMR-32細胞内への取り込みと代謝経路は、ダンシルカダベリン、クロロキン、アンチマイシンA、コルヒチンなどの代謝阻害剤を用い、リポソームに封入されたシスプラチンのIMR-32に対するDNA合成抑制効果の変化を指標として検討した。ダンシルカダベリン(100μM)、クロロキン(100μM)の前処理にてシスプラチン封入リポソームのDNA合成抑制は、共に有意に抑制された。また、グルコース非存在下では、アンチマイシンA(50nM)の前処理にて著しく抑制された。これらの結果から、我々の作成したリポソームは、主にエンドサイトーシスにより取り込まれた後、ライソゾームを介して代謝され、その過程は、ATP依存性であることがわかった。さらに、コルヒチンによる前処理でシスプラチン封入リポソームのDNA合成抑制が阻害されたことから、その細胞内輸送に微小管が関与しているものと考えられた。

Key word： cisplatin, liposome, endocytosis

人工脂質膜であるリポソームは、癌化学療法の分野でも抗癌剤の効力持続性、細胞への到達性などの向上の可能性から注目されている。抗癌剤封入リポソームの応用を考える上で、リポソームと細胞の相互作用を知ることは重要である。我々は今回、エネルギー代謝阻害剤（アンチマイシンA）やエンドサイトーシスに作用する薬剤（ダンシルカダベリン、クロロキン）、あるいは微小管系に作用する薬剤（コルヒチン）を用い、ヒト神経芽腫細胞IMR-32によるリポソームのエンドサイトーシスとその代謝について検討した。

［実験方法］

1、リポソーム調製法：リポソームはForssenらの方法に若干の改良を加えて作成した。すなわち、窒素ガスにより乾固したフォスファチジルコリン22.7mgにシスプラチン生理食塩水（2mg/ml）1mlを加え、窒素ガス存在下でソニケーション(5min.;80w)した。これを別に乾固したフォスファチジルコリン、フォスファチジルセリン、コレステロール混合物（モル比＝6:2:3)に加え、窒素ガス存在下でソニケーション（5min,;80w)し、薬剤はSephadex G-50 カラムクロマトグラフィーにより除去し、リポソーム画分をえた。

2、封入シスプラチンの定量：リポソームのシスプラチン封入量は、原子吸光光度計による266nm吸光値でのPt定量から算出した。

3、シスプラチン封入リポソームに対する代謝阻害剤の影響：10%FCS/F-10培地で培養したIMR-32に、ダンシルカダベリンあるいはクロロキンの各種濃度(20,50,100μM)で

2時間前処理し洗浄後、シスプラチン封入リポソーム(6μgシスプラチン/ml)、あるいは遊離シスプラチン6μg/mlを2時間作用させた。DNA合成能はMcLeesterの方法(2)に従い[^{3}H]チミジンのDNA内取り込み量を指標として測定した。一方、アンチマイシンA(5,10,20,50nM)、2-デオキシグルコース(50mM)、およびコルヒチン(100,200,500,1000nM)、で30分の前処理後、これらの薬剤の存在下で前述のシスプラチン封入リポソームあるいは遊離シスプラチンを1時間ー2時間作用させ、DNA合成能を検討した。

[結果および考察]

遊離シスプラチンおよびリポソームに封入されたシスプラチンの神経芽腫細胞IMR-32による細胞内取り込みの比較検討を行った(Table 1)。2回の実験において、遊離シスプラチン(3μg/ml)を24時間作用させると、IMR-32細胞によるシスプラチンの取り込みは、0.29-0.46μg/mg proteinであった。一方、シスプラチン封入リポソーム(封入シスプラチン量:3μg/ml)による同様の作用では、1.02-1.37μg/mg protein と約3倍の高い取り込み率を示した。このことから、リポソームに封入されたシスプラチンは、遊離型に比べて有効に細胞内に取り込まれることがわかった。Transglutaminaseの阻害剤であるダンシルカダベリンで細胞を前処理し、シスプラチン封入リポソームのDNA合成抑制効果の変化を検討した(Fig.1)。シスプラチン封入リポソーム(6μgシスプラチン/ml)の2時間作用により対照群(ダンシルカダベリン非処理群)は、98.7%のDNAの合成抑制を示した。これに対し、ダンシルカダベリン前処理群におけるシスプラチン封入リポソーム同条件作用のDNA合成抑制は、20μM前処理群では、97.7%と対照群との差が認められなかったものの、50μM前処理群では64.5%、100μM前処理群では22.8%と漸減した。しかしながら、遊離シスプラチンのDNA合成抑制効果は、ダンシルカダベリンの影響を受けなかった。同様にライソゾームに作用し顆粒内のpH勾配を崩すクロロキンで前処理すると、シスプラチン封入リポソームのIMR-32に対するDNA合成抑制効果は阻害され、クロロキン100μM前処理群では44.7%にとどまった(Fig.2)。これらの結果から、我々の作成したシスプラチン封入リポソームの細胞内取り込み機構は、エンドサイトーシスにもとずくものと考えられ、ライソゾームで分解された後、その効果が発現するものと考えられた。一方、培養液をグルコース非含有Tyrode溶液に交換した後、ミトコンドリア内の電子輸送の阻害剤で

Table 1. INCORPORATION OF PDD-ENCAPSULATED LIPOSOME INTO HUMAN NEUROBLASTOMA CELLS (IMR-32)

	FREE PDD (μg/mg Protein)	PDD-LIPOSOME (μg/mg Protein)	PDD-LIPOSOME / FREE PDD
EXPERIMENT 1 (PDD=3μg/ml)	0.46±0.04	1.37±0.15	2.98
EXPERIMENT 2 (PDD=3μg/ml)	0.29±0.04	1.02±0.05	3.52

(mean ± SD, n=3)

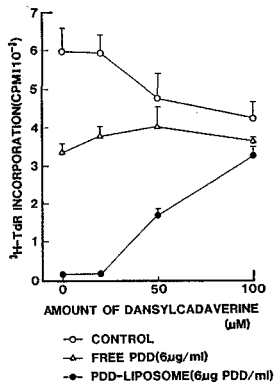


Fig.1 EFFECT OF DANSYLCADAVERINE ON DNA SYNTHESIS OF IMR-32 TREATED BY PDD-LIPOSOME

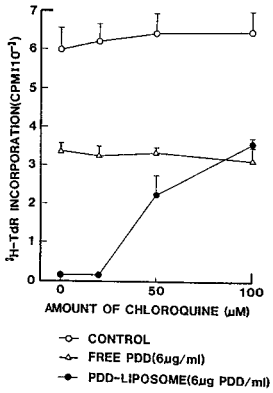


Fig.2 EFFECT OF CHLOROQUINE ON DNA SYNTHESIS OF IMR-32 TREATED BY PDD-LIPOSOME

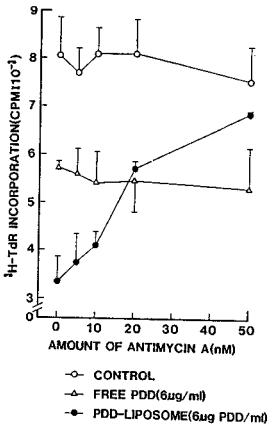


Fig.3 EFFECT OF ANTIMYCIN A ON DNA SYNTHESIS OF IMR-32 TREATED BY PDD-LIPOSOME

あるアンチマイシンAで前処理すると、シスプラチン封入リポソームの抗腫瘍効果は著しく抑制された（Fig.3）。すなわち、シスプラチン封入リポソーム（6μgシスプラチン／ml）の1時間作用により対照群（アンチマイシンA非処理群）は、57.9%のDNA合成抑制を示したのに対し、アンチマイシンA前処理群におけるそのDNA合成抑制効果は、10nM前処理群49.5%、20nM前処理群29.8%、50nM前処理群9.4%と漸減した。しかしながら、10%FCS/F-10培地での同様の検討では、アンチマイシンAを増量してもシスプラチン封入リポソームの抗腫瘍効果は抑制されなかった。そこで、10%FCS/F-10培地において、前処理としてアンチマイシンA 20nMで前処理すると同時に、解糖系からのATP産生を抑制する2－デオキシグルコース50mMを投与すると、IMR-32に対するシスプラチン封入リポソームの抗腫瘍効果は有意に抑制された。尚、遊離シスプラチンのDNA合成抑制効果は、アンチマイシンAおよび2－デオキシグルコースの影響を受けなかった。これらの結果から、シスプラチン封入リポソームの細胞内取り込みおよびその代謝の過程には、呼吸鎖からのATPのみならず解糖系からのATPも関与することが示唆された。さらに、微小管脱重合剤であるコルヒチンで前処理すると、IMR-32に対するシスプラチン封入リポソームのDNA合成抑制効果は阻害された。以上の結果から、我々の作成したシスプラチン封入リポソームは、IMR-32細胞表面に結合後、クラスタリングを介しエンドサイトーシスにより取り込まれる。その後微小管を介す細胞内輸送によりライソゾームに達し、ここで分解された後、シスプラチンの効果が発現する。また、この過程においてATPが関与していることが示唆された。

[文献]

1） Forssen, E. A. et al. (1983). Cancer Res., 43, 546-550

2） McLeester, R. C. et al. (1977), Ann. Biochem., 79, 627-630

72. 神経系細胞における細胞表面局在型（ecto⁻型）ガングリオシド依存性タンパクリン酸化酵素（ecto Gg kinase）の存在とその意義

辻　崇一・山下達朗・中島淳子・永井克孝
（東京大・医・第二生化）

〔要　約〕

神経系におけるガングリオシドの機能を明らかにするために、膜上に局在するタンパクリン酸化酵素とガングリオシドとの関係について様々な検討を行ってきた。その結果、細胞表面局在型（ecto-型）のガングリオシド依存性タンパクリン酸化酵素(ecto-Gg-kinase)の存在を明らかにした。細胞に外からガングリオシドGQ1bを加え、細胞膜表面でタンパクリン酸化反応を行わせると、SDS-電気泳動(4-20% 密度勾配ゲル)で見る限り、GQ1b存在下で有意にリン酸化が促進されるタンパク質が少なくとも二種類(64,60KDa)存在した。このリン酸化反応促進にはガングリオシドとのpreincubationが必要であった。リン酸化されるアミノ酸はSer, Thr であって、Tyrではなかった。トリプシン処理の結果により両タンパク質は細胞表層に存在していると考えられる。ガングリオシド分子種を調べて見てみると、GQ1b＞＞GT1b＞＞GD1a,GM1の順に活性化能が強かった。GQ1bの至適濃度は10 ng/mlであった。これらの結果は、本細胞株に対してガングリオシドが示す神経突起伸展効果とよい対応関係にあることが分かった。

Key word：　ganglioside, neuritogenesis, protein kinase

［序］

ガングリオシドはシアル酸を含む一群のスフィンゴ糖脂質で、生体膜構成成分の一つである。特に神経系組織に多種多量に存在しているため、神経系において何か重要な役割を担っているものと考えられている。しかし、その実体は未だ明らかとはなっておらず、その研究は開始されたばかりである。最近、我々はガングリオシドが幾つかの神経芽腫瘍細胞に対して神経突起伸展作用を持つことを明らかにした。このガングリオシドの作用様式は大きく二つに分けられる。一つは極くかぎられたガングリオシドが特異的にしかも低濃度（nano-モル程度）で作用するもので（N型）、もう一つはこれとは対照的にそれほど分子種を選ばずしかも比較的高濃度（milli-モル程度）で作用するもの（M型）である。ヒト神経芽腫瘍細胞株(GOTO, NB-1)に対するGQ1bはN型の典型であり(1)、他方M型の典型としてマウス神経芽腫瘍細胞株(Neuro2a)に対するガングリオシド群がある(2)。両者のガングリオシドの作用機作は現在検討中であるが、前者のN型の作用においては形質膜画分に存在するある種のタンパクリン酸化機構が重要な役割を演じていると考えられる(3)。さらに我々は膜上に局在するタンパクリン酸化酵素とガングリオシドとの関係を明らかにするために様々な検討を行ってきた。その結果、細胞表面局在型（ecto-型）のガングリオシド依存性タンパクリン酸化酵素(ecto-Gg-kinase)の存在を明らかにし、かつ、ガングリオシドによるN型の神経突起伸展作用との関連を示す知見も得られたのでここに報告する。

［材料・方法］

1．細胞ならびに培養条件：ヒト神経芽腫瘍細胞株(GOTO)を用いた。培養液は RPMI 1640:MEM:FCS = 45:45:10を用い、37°C 5% CO_2存在下で培養した。

2．ecto-Gg-kinaseの活性測定：1 - 5 X 10^5 個の細胞を96穴ポリスチレンプレートに蒔き、翌々日培養液をガングリオシドを含む培養液に置き換え、37°C 5% CO_2 存在下で一定時間(t_1)後 γ-^{32}P-ATP(終濃度 5 μM; 10 μCi/ well)を含む培養液を加え37°C 5% CO_2存在下温置する。t_2 時間後、細胞をPBS で洗浄し SDS で可溶化し、それをSDS-電気泳動(4-20% 密度勾配ゲル)の試料とした。電気泳動後、ゲルを洗浄・乾燥しオートラジオグラフィーに供した。オートラジオグラフィー後、必要に応じてフィルムをデンシトメーターでトレースした。

［結果］

1．GQ1bによるecto-Gg-kinase活性の活性化

細胞に外からガングリオシドGQ1bを加え、細胞膜表面でタンパクリン酸化反応を行わせると、SDS-電気泳動(4-20% 密度勾配ゲル)で見る限り、GQ1b存在下で有意にリン酸化が促進されるタンパク質が少なくとも二種類(64, 60 KDa)存在する(図１)。このリン酸化反応は経時的に進行するがその促進にはガングリオシドとのpreincubationが必要である(図２)。また、リン酸化されるアミノ酸はSer, Thr であって、Tyrではなかった。

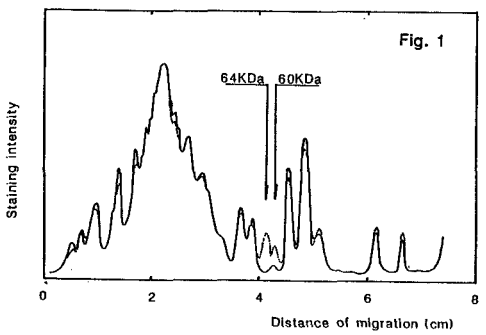


図１．GQ1bによるecto-Gg-kinase活性の活性化
（オートラジオグラム）

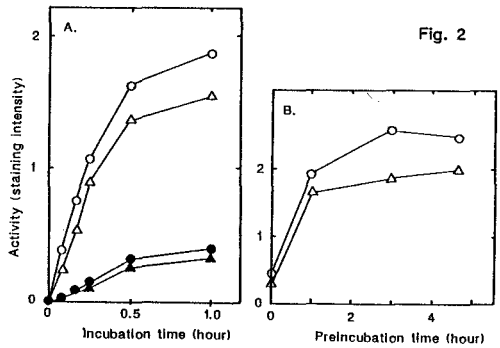


図２．GQ1bによるecto-Gg-kinase活性の活性化（図１の 64, 60KDaのピーク面積をそれぞれ求め縦軸に目盛った。）
A.経時変化；GQ1bによるpreincubationは１時間,○ +GQ1b, 64KDa ● -GQ1b,64KDa △ +GQ1b,60KDa ▲ -GQ1b,60KDa
B.preincubation の効果； ATP添加後の反応時間は 30分, ○ 64KDa △ 60KDa

2．細胞表面局在性

細胞をプレートに接着させたままintactな状態でトリプシンを作用させると、タンパク量の有意な減少が認められはじめるよりもはるか以前に、この 64 並びに 60KDa の両タンパク質は極めて速やかに消失していく(図３:次頁)。従って、両タンパク質は細胞表層に存在していると考えられる。

3．ガングリオシド分子種

TLC 上で単一スポットを与えるまで精製した各々ガングリオシド分子種も、GQ1bと同様に効果を持つものかどうか調べて見てみると、GQ1b＞＞GT1b＞＞GD1a,GM1の順に活性化能が強く、これらガングリオシドの骨格とも言うべきアシアロGM1(GA1)は全く活性を示さなかった(図４)。また、GQ1bの至適濃度は 10 ng/ml であった。これらの結果は本細胞株に対するガングリオシドの神経突起伸展作用の結果と良く対応していた。

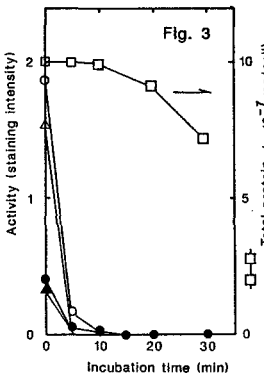


図３．トリプシンの影響
（GQ1bによるpreincubationは１時間，ATP添加後の反応時間は30分，その後、トリプシンを加え経時的に細胞をPBSで洗浄し、SDSで可溶化した後タンパク定量と図１，２と同様の測定を行った。）

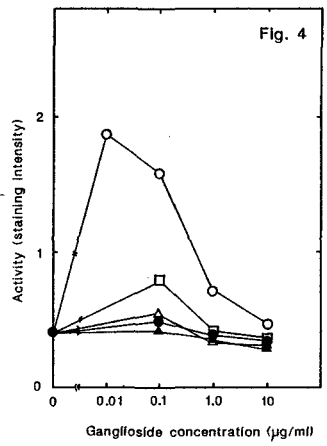


図４．ガングリオシド分子種による促進効果の違い
（それぞれのガングリオシドによるpreincubationは１時間，ATP添加後の反応時間は 30分，その後、細胞をPBSで洗浄しSDSで可溶化しタンパク定量と図１，２と同様の測定を行った.）
○GQ1b，□GT1b，△GD1a，●GM1，▲GA1.

［考察］

我々がここに明らかにした細胞表層型(ecto-型)のタンパクリン酸化活性は、Ehrlich等が神経系由来のハイブリッド細胞株 NG108-15で観察した結果と良く似ている(4)。このリン酸化活性のガングリオシドによる促進効果は、あらかじめガングリオシドと細胞とをpreincubationすることが必要であることから、恐らくガングリオシドが細胞表層に取り込まれることが必要であると考えられる。

シアル酸を多く持つガングリオシドほど活性化能が強く、調べた限りにおいてはGQ1bが一番強かった。このガングリオシド特異性ならびに至適濃度は本細胞株に対するガングリオシドの神経突起伸展作用の結果と良く対応していた。また、ATPの類似化合物を用いてリン酸化活性を阻害する条件下ではGQ1bによる神経突起伸展作用は見られないことから、このリン酸化促進機構と神経突起伸展作用の間には深い関係があるものと考えられるが、今後さらに詳細な検討が必要である。また、細胞表層とATPの局在性の問題も検討が必要である。

［文献］

(1) Tsuji,S., Arita,M. and Nagai,Y. (1983) J. Biochem. 94, 303-306.
(2) Tsuji,S., Yamashita,T., Tanaka,M. and Nagai,Y. (1987) J. Neurochem. submitted
(3) Tsuji,S., Nakajima,J., Sasaki,T. and Nagai,Y. (1985) J. Biochem. 97, 969-972.
(4) Ehrlich,Y.H., Davis,T.B., Bock,E., Kornecki,E. and Lenox,R.H. (1986) Nature 320, 67-70

73. グルタチオンS－トランスフェラーゼ阻害剤添加により抑制される細胞の増殖

千 丈 雅 徳　　（倶知安厚生病院・精神神経）

〔要　約〕

アストログリア系細胞に特異的に局在する(1,2) 脳グルタチオン S- トランスフェラーゼのspecific inhibitorであるethacrynic acid を，ラットアストログリオーマ株細胞C6 細胞の培養液中に添加した。その結果，C6 細胞の増殖は抑制された。更に，C6 細胞をsynchronizedさせた後，各細胞周期に於けるグルタチオン S- トランスフェラーゼの活性を測定すると，2つのピークを示した。これらより，脳グルタチオン S- トランスフェラーゼはアストログリア系細胞の増殖に何等かの役割を有する可能性を示唆する。

Key word :　Glutathione S-transferase, Astroglia, Cell Growth

グルタチオン S- トランスフェラーゼ(EC 2.5.1.18) は各種xenobiotics あるいは生体内で生じる有害物質と還元型グルタチオンとの抱合を触媒する解毒酵素として知られ，2つのsubunitsから成る分子量約45,000の酵素蛋白である。本酵素は解毒作用の他，種々の物質と結合する能力を有し，脳に於いては，一昨年我々が報告した如く，アストログリアに局在を示し(1,2),多様性に富んだ機能が想定されている(3-6) 。更に，グルタチオン S- トランスフェラーゼのうちのある分子種がhepatomaに於いて上昇することが知られており(7),細胞増殖に於けるグルタチオン S- トランスフェラーゼの関与も示唆される。また，アストログリアはニューロンと異なり，種々の条件下で容易に増殖することが知られており，その機序の解明も待たれている。そこで，今回，培養ラットグリオーマ細胞に於けるグルタチオン S- トランスフェラーゼ活性の変化，及び， グルタチオン S- トランスフェラーゼ阻害剤の影響について検討した。得られた知見を報告する。

－－－－－実　験　材　料　と　方　法－－－－－

ラットアストログリオーマC6 細胞は10%ＦＣＳを含むDulbecco's modified minimal essential mediumの下，37℃， 5%CO_2 培養器中で培養した。細胞周期はHydroxyurea

及び過量のthymidine によりS期に同調させた。シャーレ上の全細胞を集め少量のbuffer中で超音波処理した後，蛋白量，及び酵素活性を測定した。グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性の測定はHabig の方法によった。[^{3}H]thymidine uptakeをS期の指標としM期は光顕的に同定した。

------結 果 と 考 察------

グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性は2つのピークを示した(Fig.1) 。更に，グルタチオン S-トランスフェラーゼのspecific inhibitorであるethacrynic acid をmedium中に添加した。control に較べ0.4 mM以上の濃度で明らかな増殖の抑制が観察された(Fig.2) 。0.6 mM ethacrynic acid添加群(Fig.3のD,E,F)は，添加時間の経過とともに(A,D-24h; B,E-48h; C,F-72h),増殖が抑制されている。 ethacrynic acidはグルタチオンS-トランスフェラーゼのspecific inhibitorとして知られるが，leukotriene A4からC4へのtransformationを阻害する。この反応は酵素的なもので，グルタチオン S-トランスフェラーゼが触媒している。又，carcinogenであるbenzo(a)pyreneは，グルタチオンS-トランスフェラーゼによりグルタチオン抱合をうけ，その効果が抑制される。グルタチオン S-トランスフェラーゼはステロイドホルモンとの特異的な親和性を有すること

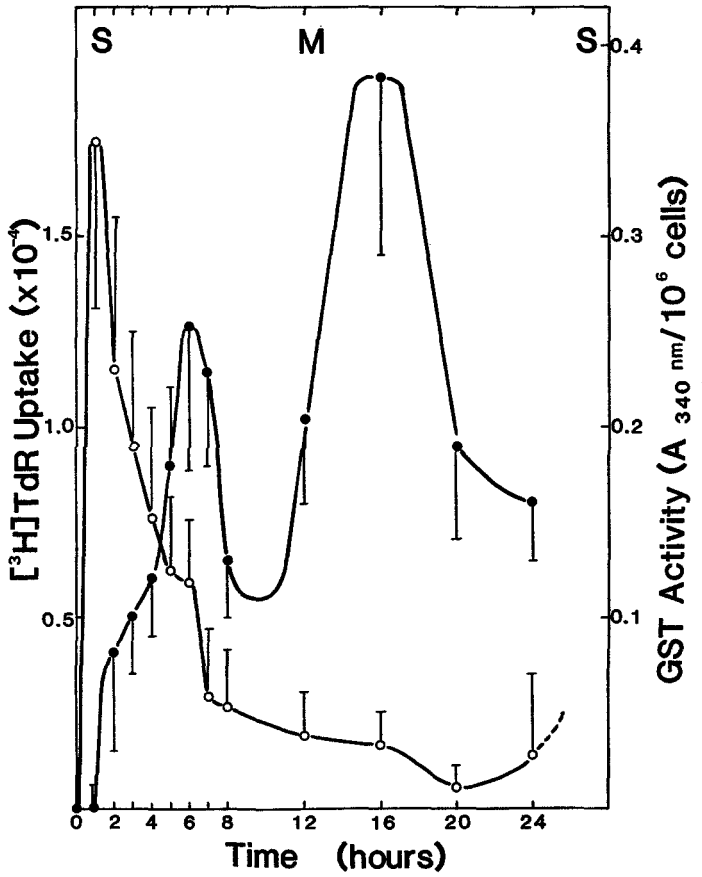
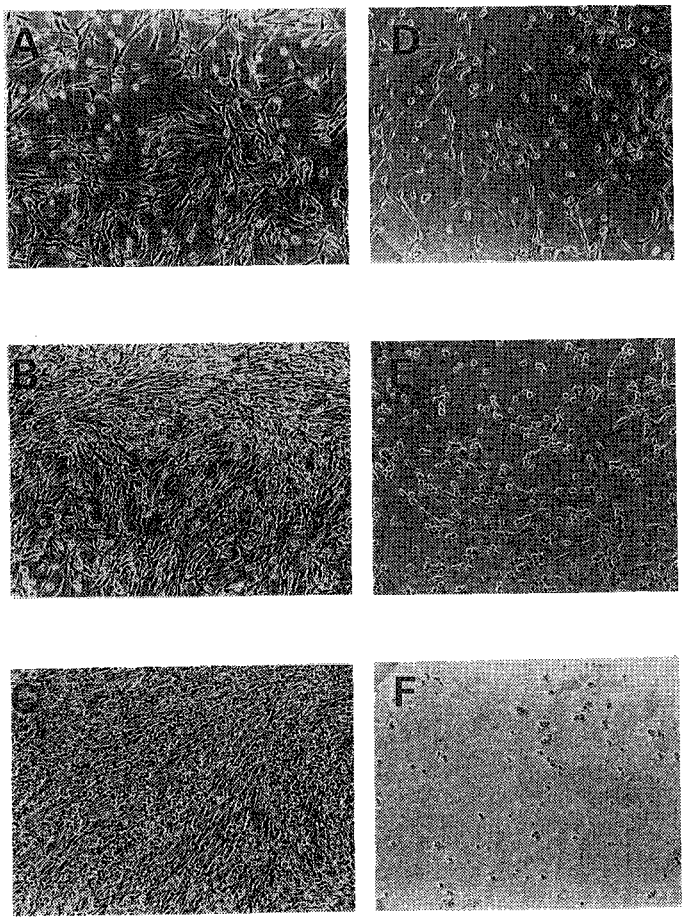


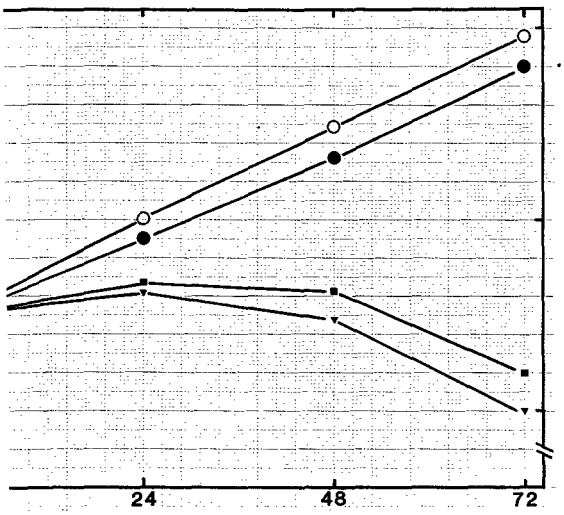
Fig. 1.
Changes of GST Activity
during the Cell Cycle

Fig. 2. Effect of ethacrynic acid

3 and C are controls. D,E and F are grown in the medium supplemented with 0.6 mM ethacrynic acid. 2.0 x 10^5 cells were seeded and otographed after 24h(A,D),48h(B,E) and 1(C,F).



ig. 3. Effect of ethacrynic acid



6 cells were grown in the medium upplemented with 0.2 mM(●), 0.4 M(■), 0.6 mM(▼) or without(○) thacrynic acid.

も知られる。これらの事実より，グルタチオン S- トランスフェラーゼの細胞増殖への関与の可能性が示唆されるが，直接的な証拠がつかめておらず，今後の検討がまたれる。

＜文献＞

1. Senjo,M.et al.:Biomed. Res.6:433-436,1985.
2. Senjo,M.et al.:Biomed. Res.7:19-26,1985.
3. Senjo,M.et al.:J. Biol. Chem.260:9191-9196,1985.
4. Senjo,M.et al.:Neurosci. Lett.66:39-42,1986.
5. Senjo,M.et al.:Neurosci. Lett.66:131-134,1986.
6. Senjo,M.：医学のあゆみ 140:31,1987.
7. Sato,K.et al.:Gann 75:199-202,1984.

74. GA－1グリオーマ細胞と3T3L1脂肪細胞におけるS100蛋白質の遊離

加藤兼房・鈴木富士子・小笠原信明・
加藤泰治*（愛知県コロニー研・生化，名古屋市大・医・生化*）

〔要　約〕

1)マウス3T3L1線維芽細胞をdexamethason(DXM)と1-methyl-3-isobutylxanthine(MIX)で処理して脂肪細胞に分化させると、細胞中のS100は中性脂肪の蓄積に先駆けて増加した。増加したS100の大部分はαα型のS100aoであった。
2)3T3L1脂肪細胞中のS100aoは、ラット脂肪組織のS100bと同様ACTH，ACTH(1-24)フラグメントおよびカテコラミンによりcAMP依存性に細胞外へ遊離した。培地にアルブミンを添加すると遊離は阻止された。
3)一方、ラットGA-1グリオーマ細胞S100bの遊離はACTHによって促進されたが、カテコラミンは無効で、細胞内cAMP増加を介さない機構によるものであった。このS100遊離促進作用は、既知のACTH作用を発揮するACTH(1-24)フラグメントでは起こらず、ACTH(18-39)フラグメント(cortico-tropin-like intermediate-lobe peptide, CLIP)によって発現した。4)GA-1細胞S100のACTHによる遊離は、大部分がホルモン添加後2-3分間に生じ、この時、細胞内では膜結合型S100の顕著な減少を伴うことが分かった。
5)GA-1細胞のS100遊離は、5 mMのATP，GTP，ADPあるいは、EGTAでも促進されたが、この促進作用はカルシウムイオンを加えると抑制された。
6)ACTHまたはCLIPによるS100遊離は幼若ラット脳から調製したglioblastsでも認められた。

Key word： S-100 Protein，　Glioma cells，　Adipocytes

我々はラット脂肪組織を用いて、脂肪細胞中ではS100が遊離脂肪酸(FFA)の担体蛋白質として機能している可能性を示してきた(1)。また，in vivoにおける薬理学的量のエピネフリン投与、あるいは脂肪組織片をin vitroでカテコラミンあるいはACTH存在下でインキュベートすると、脂肪細胞中のS100が遊離し、血中あるいは、反応液中に現れることを報告した(2,3)。また脂肪細胞S100の遊離機序として、ホルモン等の作用により脂肪分解が極度に高進し、細胞内で産生されたFFAが迅速に放出されず、細胞内FFA濃度が増加する時にS100が細胞外へ遊離してくることを明らかにした(4)。
今回は、脂肪細胞に分化する線維芽細胞株3T3L1を用いて、脂肪細胞への分化に伴うS100の発現増量ならびに、分化した脂肪細胞からのS100遊離現象と、グリオーマ細胞株GA-1のS100遊離現象を比較報告する。なお、本研究の一部は日本生化学会大会において発表した。

［実験方法］

JCRBより供給を受けた3T3L1(5)は、10% FCSを含むDulbecco's Modified Eagle Mediumでプラスチック皿(直径3.5 cm)で培養した。confluent状態に達した細胞は0.5 mM MIXと0.25 μM DXMを添加した培地で2-3日間培養し、元の培地に戻してさらに4-5日間培養後、S100遊離実験に供した。GA-1細胞(6)も、上記のプラスチック皿中で、10%FCSを含むHam's F10 Mediumで培養し、confluentに達したものを用いた。細胞はPBSあるいは、FCSを含まない培養液で洗い、無FCS培地で1時間(3T3L1)あるいは、1日間平衡化してからホルモン等を添加した。添加前および一定時間後に培地(2 ml)の一部をとりS100等の濃度を測定した。S100(7,8)およびα-enolase(9)，CK-BB(10)はすでに報告しているEIA法にて測定した。細胞内cAMP濃度はRIAキット（ヤマサ）で測定した。

［結果］

3T3L1線維芽細胞の脂肪細胞への分化とS100の誘導

細胞をDXMとMIXで処理すると、1-2日後にはその一部が脂肪滴を持った脂肪細胞に分化し3-4日後には、50%以上が脂肪細胞に変わった。この間、細胞中の中性脂肪とS100を経時的に測定した結果を図1に示した。S100aoは分化誘導後直線的に増加し4-5日目に20-30 ng/mg ﾀﾝﾊﾟｸのピーク値に達するのに対し、中性脂肪の蓄積は3-4日目から漸増し、8日目には1.5 mg/mg ﾀﾝﾊﾟｸ以上にも達した。誘導

Table 1. Effect of various hormones on S-100 protein release from 3T3L1 adipocytes.

Additions	S-100α released (pg/10^5 cells/0.5 h)	α-enolase released (ng/10^5 cells/0.5 h)
(Exp. 1)		
None (10 μM)	16.6 ± 3.1*	0.27 ± 0.01*
Isopreterenol	48.0 ± 25.2	0.37 ± 0.09
Epinephrine	54.8 ± 15.0	0.37 ± 0.03
Norepinephrine	44.0 ± 10.7	0.34 ± 0.04
(Exp. 2)		
None	6.9 ± 0.04	0.19 ± 0.05
ACTH 10 μM	129 ± 16	0.30 ± 0.01
Bt2cAMP 5 mM	114 ± 21	0.35 ± 0.06
(Exp. 3)		
None (10 μM)	78.6 ± 21.1	0.40 ± 0.02
ACTH (18-39)	126 ± 10	0.38 ± 0.07
ACTH (1-24)	324 ± 10	0.56 ± 0.12
ACTH	355 ± 38	0.63 ± 0.11

*Mean of 3 incubations ± SD.

Table 2. cyclic AMP levels in 3T3L1 adipocytes treated with hormones.

Additions	cAMP (pmol/10^5 cells)
None	0.116 ± 0.007*
ACTH (10 μM)	3.12 ± 0.57
ACTH 1-24 (10 μM)	3.33 ± 0.47
Isopreterenol (10 μM)	0.667 ± 0.142

Mean of 3 incubations ± SD

TABLE 3. Effects of various hormones on the release of S-100 protein from GA-1 glioma cells

Additions	S-100β protein (pg/10^5 cells) in the medium A	B	(B-A)
None	15.1 ± 1.5[a]	14.2 ± 1.3	-0.9 ± 1.4
Norepinephrine (50 μM)	11.2 ± 0.9	12.5 ± 2.2	-1.3 ± 1.4
Epinephrine (50 μM)	10.1 ± 1.3	12.0 ± 2.2	1.9 ± 0.9
Isoproterenol (8 μM)	9.38 ± 0.46	10.8 ± 0.5	1.4 ± 0.9
Acetylcholine (100 μM)	13.0 ± 2.5	11.2 ± 0.8	-1.8 ± 2.3
Dopamine (100 μM)	15.5 ± 4.1	18.9 ± 8.0	3.4 ± 4.4
Glutamic acid (100 μM)	10.2 ± 1.4	13.5 ± 2.9	3.3 ± 1.7
ACTH (8 μM)	11.6 ± 2.3	62.7 ± 8.3	51.1 ± 5.9*
Bt_2cAMP (5 mM)	10.8 ± 1.6	49.6 ± 8.6	38.8 ± 7.0*

S-100 protein contents in the medium before (A) and 15-min after the additions (B) were assayed. Statistically significant (Student's t-test) compared with the control; *$p<0.01$. [a]Mean ± S.E. (n=3).

TABLE 4. Effects of ACTH fragments on the release of S-100 protein from GA-1 glioma cells

Additions	S-100β protein released (pg/10^5 cells/15 min)	Changes (%)[a] in concentrations of creatine kinase BB	α-enolase
None	4.77 ± 1.87[b]	81 ± 18	85 ± 6
$ACTH_{1-24}$ (10 μM)	6.67 ± 1.77	20 ± 3	108 ± 13
$ACTH_{18-39}$ (10 μM)	37.5 ± 7.8	110 ± 25	90 ± 2
ACTH (8 μM)	40.8 ± 8.5	94 ± 12	88 ± 8

S-100 protein released was estimated as in TABLE 3.

[a]$\frac{\text{Concentration in the medium 15-min after the addition}}{\text{Concentration in the medium before the addition}} \times 100$

[b]Mean ± S.E. (n=3).

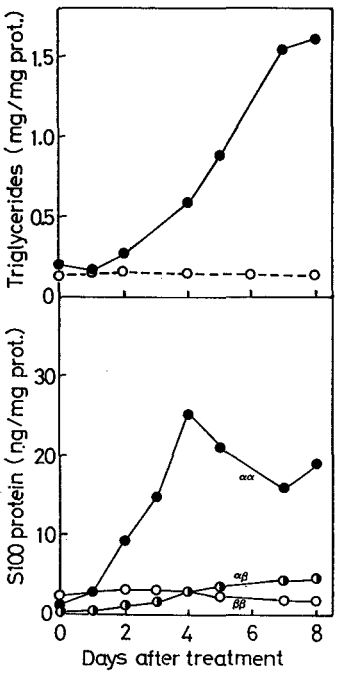


図1. 3T3L1細胞のDXMとMIXによる分化処理後における中性脂肪(A)とS100蛋白質(B)の蓄積

A: ● 、分化誘導細胞； ○ 、未処理細胞

B: ● 、S100ao； ◑ 、S100a； ○ 、S100b

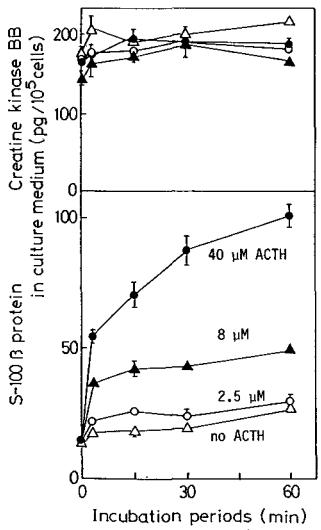


図2. ACTHによるGA-1細胞内S100蛋白質およびcreatine kinase BB (CK-BB)遊離の経時的測定

ACTH濃度： ○, none; △, 2.5 μM; ▲, 8 μM; ●, 40 μM

TABLE 5. Effect of ACTH or $ACTH_{18-39}$ fragment on the release of S-100 protein from glioblasts

Additions	S-100β protein released (pg/10^5 cells/15 min)
None	5.9 ± 0.8[a]
ACTH (8 μM)	23.5 ± 2.2*
$ACTH_{18-39}$ (10 μM)	30.3 ± 1.9*

*$p<0.01$. [a]Mean ± S.E. (n=4).

されるS100は主にαα型のS100aoでαβ型のS100aも多少増加するが、ββ型のS100bはほとんど増加していなかった。マウス脂肪組織のS100はラットやヒトと異なりα鎖よりなるS100が多く占める。マウス由来の3T3L1細胞もこの傾向を維持していると思われた。

3T3L1脂肪細胞からのS100の遊離

脂肪細胞への分化誘導処理後3-4日目の細胞を用いて、無血清培地中で種々のホルモンによるS100の細胞外遊離を調べた結果を表1に示した。ラット脂肪組織S100bの遊離と同様、3T3L1細胞S100aoの遊離はACTHおよびカテコラミンによって促進された。しかし、α-enolaseの遊離は促進されなかった。ACTH、およびACTH(1-24)フラグメントによる作用がカテコラミンによる遊離より大きいのは、レセプターを介する細胞内cAMPの産生量（表2）が反映されていると思われた。ACTH(18-39)フラグメントは無効であった（表1）。ACTHによるS100の遊離はアルブミンを共存させることにより阻止され、ラット脂肪組織で観察された現象のほとんどが3T3L1細胞株で再現された。

GA-1グリオーマ細胞からのS100の遊離

ラットastrogliomaから株化したGA-1細胞はS100bを産生する(11)。GA-1細胞に、無血清培地中で種々のホルモンを作用させたときに遊離するS100量を表3に示した。GA-1細胞のS100も脂肪細胞のS100と同じく、ACTHとBt$_2$cAMPによって遊離が促進されるが、カテコラミンによっては促進されないGA-1にエピネフリンを作用させるとcAMPが著しく増加していること、しかし、ACTHではcAMPの上昇は認められないことから、GA-1細胞のS100遊離は脂肪細胞のそれとは異なる機構によると考えられた。ACTHによる遊離促進はdose-dependentでED$_{50}$は約5μMであった。GA-1細胞S100のACTHによる遊離促進は図2に示すように数分間で減退する。細胞をACTHを加えた新しい培地へ移しても始めに観察されたようなS100遊離は二度と見られないのに対し、15分間反応させた培地を新しい細胞に加えると同じようなS100遊離が観察されることから、細胞の応答性が数分間しか続かないと思われた。また、ACTH処理後はS100のGA-1細胞内局在性に著しい変化が認められた。すなわち、膜結合型S100が対照群の半分以下に減少していた。GA-1細胞S100の遊離は、脂肪細胞の場合と異なり、ACTH(1-24)フラグメントではなく、ACTH(18-39)フラグメントによって起こることから（表4）、ACTHのC末端側の半分子(CLIP)がGA-1細胞S100の遊離に必要であることが推測された。なお、これらの遊離促進はα-enolaseでは認められず、S100に特異的であった。GA-1細胞のS100は5 mMのATP,GTP, ADP および1 mM EGTAによっても遊離されたが、これらはCa^{2+}を加えると抑制された。Bt$_2$cAMPおよびBt$_2$cGMPによる遊離促進機序にるいては不明である。ACTH、あるいはCLIPによるS100遊離促進は、幼若ラット脳より調製したglioblastsでも観察された（表5）。

［考察］

脂肪細胞S100とグリア細胞S100のホルモンによる遊離機構が異なることを示したが、S100遊離の生理的意義は不明である。脂肪細胞S100は、おそらく生理的条件下では遊離することはほとんどないと考えられる(4)。しかし、FFA濃度が細胞内で異常に高くなるとか、血中のFFA/アルブミン比が6以上になるような状態では血中に遊離してくる(4)。血中に遊離したS100が細胞間メッセンジャーとして働いているかどうかは不明である。GA-1細胞では、ACTHによって膜結合型のS100が遊離してくるように思えるが、これを示す直接の証拠はない。Shashouaら(12)も中枢神経組織でグリア細胞からS100が遊離されることを示唆しているが、in vivoで実際に遊離することを示す直接の証拠はない。アストログリア細胞にACTHやCLIPのレセプターが存在することを示す報告もないし、CLIPの生理活性もほとんど分かっていない。しかし、ウシ脳から精製したchick embryo大脳皮質ニューロンの神経突起延長因子の一部分が、S100β鎖の一部と同じアミノ酸配列をもつことを示す Kligman & Marshak(13)の報告はCNSにおけるS100遊離の生理機能の一つを示唆しているかもしれない。

REFERENCES

(1) Haimoto H, Kato K, Suzuki F, Nagura H (1985) Am J Pathol 121, 185-191. **(2)** Kato K, Kimura S, Semba R, Suzuki F, Nakajima T (1983) J Bichem 94, 1009-1011. **(3)** Suzuki F, Kato K, Nakajima T (1984) J Neurochem 43, 1336-1341. **(4)** Suzuki F, Kato K (1986) Biochim Biophys Acta 845, 311-316. **(5)** Green H, Meuth M (1984) Cell 3, 127-133. **(6)** Kano-Tanaka K, Kato T, Ito J, et al. (1986) Proc Japn Acad 62, 109-112. **(7)** Kimura S, Kato K, Semba R, Isobe T (1984) Neurochem Int 6, 513-518. **(8)** Kato K, Haimoto H, Shimizu A, Tanaka J (1987) Biomed Res 8, 119-125. **(9)** Kato K, Suzuki F, Semba R (1981) J Neurochem 37, 998-1005. **(10)** Kato K, Suzuki F, Shimizu A, Shinohara H, Semba R (1986) J Neurochem 46, 1783-1788. **(11)** Ito J, Kato T, Wakabayashi S, et al. (1986) Brain Res 374, 335-341. **(12)** Shashoua VE, Hesse GW, Moore BW (1984) J Neurochem 42, 1536-1541. **(13)** Kligman D, Marshak DR (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82, 7136-7139.

75. 培養ミクログリアのマクロファージ様機能

澤田　誠・錫村明生*・山本纉子*・
丸野内棣
（藤田学園保衛大・総医研・応用細胞，医・神経内科*　）

〔要　約〕

最近、向中枢神経性ウイルス感染やインターフェロン-γの作用によりグリア細胞が免疫調節細胞として働くようになることが報告され、注目を集めている。グリア細胞のうちミクログリアは中枢神経系で単球ーマクロファージ様の作用をする細胞と考えられてきたが、その起源や役割など不明な点が多く、免疫調節機能に関してはほとんど解っていない。我々は今回、新生正常マウス脳の一次培養系から純粋なミクログリアを分離し培養する方法を確立し、その性質について調べアストロサイトや末梢マクロファージと比較した。分離ミクログリアは97-100%均一で、正常培養条件下で1ー2カ月間培養が可能であったが、増殖能は認められなかった。この細胞はFcレセプターや補体レセプターをもち貪食能を有するほか、強い酸性ホスファターゼ活性を示し、NBT還元反応に陽性であった。これにマクロファージ刺激因子のインターフェロン-γやTPAを作用させると、酸性ホスファターゼ活性やNBT還元反応の増大がみられた。この変化はアストロサイトではみられなかった。以上のことからミクログリアは単球ーマクロファージ系の細胞に極めてよく似ていることが明らかになり、中枢神経系で免疫調節細胞として働いている可能性を示唆する。

Key word：
microglia/ brain primary culture/ immunomodulating cell

従来中枢神経系は免疫的統御から免れている特異な器官として考えられてきた。しかし、近年の培養技術の進歩により脳細胞の単離培養が可能になり、純粋な神経細胞やグリア細胞が得られるようになると、ある特定の条件下でこれらの細胞が末梢の単球-マクロファージでみられるような抗原提示を行い細胞性免疫反応の引金を引くことが明らかになってきた。この反応系は中枢神経系に特異性を示すウイルスの感染時や、自己免疫疾患などにみられる神経変性や脱髄などの現象に深く結びついていると考えられる。現在のところ、ウイルス感染時（1,2)やインターフェロン-γ(3)によりアストロサイトがクラスIおよびII抗原を発現し抗原提示をなしうることが報告され、中枢神経系での免疫担当細胞の第一候補と考えられている。しかし、細胞の形態や性質の面から末梢で抗原提示を行うマクロファージにちかいといわれている、ミクログリアの方が有力である可能性もある。ミクログリアは古くから脳内にその存在が知られているが、細胞の起源や機能に関しては全く解っていない。今回我々は、中枢神経系における免疫応答の解析の第一歩として、正常マウス脳のグリア細胞の一次培養からミクログリアを単離培養する方法を確立し、その性質について調べアストロサイトや末梢マクロファージと比較した。

［方法］

新生ICRマウスより無菌条件下に全脳を取り出し、氷冷したハンクス液中で脳膜を除去した後、ナイロンメッシュで細胞をほぐして、10%血清、0.5μg/mlインシュリン、0.2%ブドウ糖を含むMEM培地に懸濁しF75フラスコ中で培養した。２日後に器質に接着

しない細胞を培地ごと除去し、この後３日毎に培地交換を繰り返し、さらに14日間培養を行った。これによりシート状に広がったアストロサイト層の表層に広汎に不整形の細胞が出現するので、その細胞を150rpmの楕円振とうで30分振とうして分離した。遊離細胞のうち短時間で細菌用ペトリディッシュに接着するものをラバーポリスマンで回収し、この細胞をミクログリアとして実験を行った。ミクログリアを振とう分離した後のアストロサイトは、trypsin-DNaseIにより細胞を分離し、酵素を除去した後細菌用ペトリディッシュにまきこみ、短時間では接着しない細胞を回収してプラスチックディッシュにまきこんで培養した。この操作を約１週間毎に４回繰り返して行い得られた細胞を精製アストロサイトとして実験に用いた。実験は形態学的検索およびマクロファージ様機能について1)LPS刺激、2)TPA刺激、3)インターフェロン-γ刺激などのほか、4)アストロサイト培養上清、5)L929線維芽細胞培養上清処理などを行ってその変化を調べた。また、これらの性質を10%プロテオースペプトン処理後３日目に得られる腹腔浸出マクロファージと比較した。更に、ミクログリア細胞の増殖能を無刺激時およびアストロサイト培養上清処理後に ^{3}H-チミジンの取り込みをオートラジオグラフィーにより観察した。

［結果］

今回の方法により1-3x10^{5} cells/flask (original culture は１フラスコあたり２個の脳を用いて作製した)の細胞が得られ、分離細胞はほぼ均質で不整形の接着細胞であった。増殖能は分離培養条件では認められなかったが、プラスチックディッシュ上

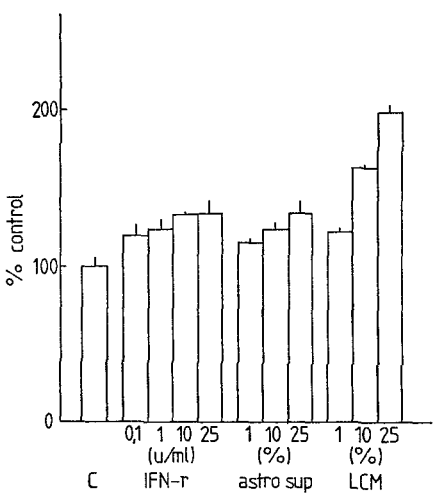


Fig.1 Changes of the acid phosphatase activity in the isolated microglia cells.

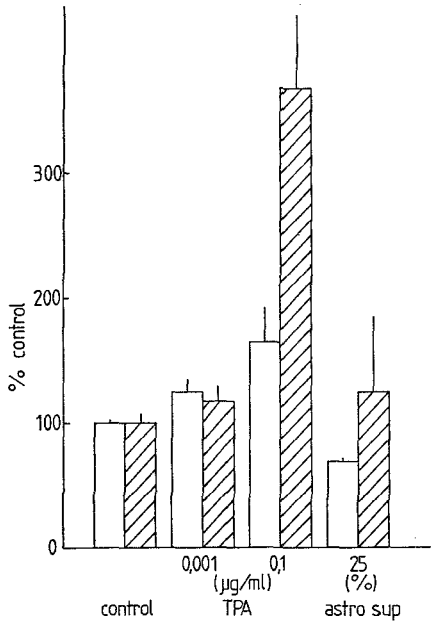


Fig.2 Changes of the NBT reducing activity in the peritoneal macrophage (open columns) and microglia cells (hatched columns).

で１－２カ月間生着していた。得られた細胞はFcレセプター、補体レセプターをもち貪食能を有するほか、強い酸性ホスファターゼ活性を示し、NBT還元反応に陽性となった。以上の性質は腹腔浸出マクロファージに類似しているが、培養時に白血球系細胞の混入はほとんどないと考えられるため、分離細胞はミクログリアであると言える。ミクログリアをTPAやインターフェロン-γで刺激すると酸性ホスファターゼ活性やNBT還元能の増大がみられた。精製アストロサイトではこのような変化は見られなかった。一方、脳内でのミクログリアの分布や形態の多用性に細胞間相互作用が関与するか否かを検討するために、ミクログリアの培地中にアストロサイト培養上清やL929培養上清を添加した。このときミクログリアは顕著な形態変化をしめすとともに、生着細胞の生存率が増大し、酸性ホスファターゼ活性やNBT還元能などの生化学的活性の増大もみられた。この変化は腹腔浸出マクロファージには見られなかった。

［結論］

今回の方法により正常マウス脳から分離培養した細胞はほぼ均質で、形態学的及び機能的にみてミクログリアであると言える。得られたミクログリアはその性質が単球マクロファージ系細胞に極めて類似していた。共同研究者の錫村らは同様の方法で分離培養したミクログリアがインターフェロン-γの刺激でclass II MHC抗原を発現することを報告しており(4)、今回の成績と合わせて、ミクログリアが中枢神経系における免疫応答に免疫調節細胞として重要な役割を持つことを示唆している。更に、アストロサイト培養上清やL929細胞培養上清の添加によりミクログリアの形態や機能が調節されることが明らかになった。アストロサイト培養上清は造血系幹細胞の分化や増殖を調節するインターロイキン-3を含むという報告(5)があり、またL929培養上清はGM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)を含むため、ミクログリアが中枢神経系で造血系細胞に作用するモノカイン類により免疫調節機能や分化増殖、さらにはその形態変化や遊走性をも調節される可能性も考えられる。

［References］

1.Massa,P.T., Dorries,R. and Meulen,V-t.(1986) Nature 320,543-546.

2.Suzumura,A., Lavi,E., Weiss,S.R. and Silberberg,D.H.(1986) Science 232,991-993.

3.Wong,G.H.W., et al. (1984) Nature 310, 688-691.

4.Suzumura,A., Mezitis,S.G.E., Gonatas,N.K. and Silberberg, D.H.(1987) J.Neuroimmunol. 15,263-278.

5.Frei,K., Bodmer.S., Schwerdel,C., and Fontana,A.(1986) J.Immunol. 137, 3521-3527.

76. ヒト脳2′, 3′一環状ヌクレオチド3′一フォスフォジエステラーゼのcDNAクローニング

栗原　正・高橋康夫　（新潟大・脳研・神経薬理）

〔要　約〕

最近我々は，ウシ脳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）のcDNAクローニングを行い，ウシCNPタンパクの全一次構造を解明した。今回我々は，ヒト脳CNPのcDNAを得ることができたので，ここに報告する。

1）ヒト脳CNPのcDNAをλgt11ライブラリーから抗体によるスクリーニングで得た。

2）得られたcDNAは1800 bpで，ヌクレオチド配列の解析をした翻訳領域460 bp全体にわたって，ウシCNPのcDNAと相同性が認められた。

3）cDNA 1800 bpには翻訳領域が全部含まれていると思われる。5′端の17 bpが5′非翻訳領域であった。

Key word：　cDNA　cloning, myelin protein
human　2′, 3′-cyclic-nucleotide 3′-phospodiesterase

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我々は，タンパクとcDNAの両者の配列を解析することにより，ウシ脳CNPの全一次構造を解明した（Kurihara ら 1987）。ウシ脳CNPのcDNAは，エラスターゼで可溶化したCNP（Nishizawa ら 1980，Kurihara ら 1981）のカルボキシ末端領域のアミノ酸配列に基づいて，cDNAライブラリーをオリゴヌクレオチドプローブでスクリーニングして得た。今回は，発現ベクターライブラリーをCNP抗体でスクリーニングすることによってヒト脳CNPのcDNAが得られたので，ここに報告する。

〔実験材料及び実験方法〕

ヒト脳cDNAライブラリー（λgt 11）はClontech Laboratoriesのを用いた。抗ウシCNP血清は既報（Kurihara ら 1981）のようにして調製した。

cDNAライブラリー（λgt 11）のスクリーニングはHuynh ら（1985）に従って行った。ただし抗体に反応するプラークはクロルナフトールを用いてPAP法で染めた。ファージDNAはHuynh ら（1985），Davis ら（1980）に従って調製した。

DNAのヌクレオチド配列はMaxam-Gilbert 法で決定した。

〔実験結果及び考察〕

ヒト脳 $\lambda_{gt}11$ cDNAライブラリーを，抗ウシCNP血清でスクリーニングして，4箇の陽性クローンを得た。これらのファージクローンのDNAからEcoRIでインサートを切り出すと，いずれも300bp及び1500bpのcDNA断片を生じた（図1，レーン1）。ファージDNAから切り出したこれらのcDNA断片について，直接図2のようにしてヌクレオチド配列の解析を試みた。その結果，ヌクレオチド配列の解析をした翻訳領域460bp全体にわたって，ウシCNPのcDNAと相同性が認められ，これらの断片がヒトCNPのcDNAであることが判明した。

ヌクレオチド配列から，300bp断片は上流に，1500bp断片は下流に配置された（図2）。cDNA 1800bpには，ウシcDNAの相当する部分と異なり，EcoRIサイトがある。そのために，ファージDNAから切り出す際に，300bpと1500bpに切断されたと考えられた。ヒトcDNA 1800bpには翻訳領域が全部含まれていると思われる（図2）。5′端の17bpは5′非翻訳領域であった。3′非翻訳領域は全部は含まれていない。

300bp断片及び1500bp断片は別々にプラスミドにサブクローニングし（図1，レーン3，レーン4），全ヌクレオチド配列の解析を準備中である。また，5′非翻訳領域及び3′非翻訳領域の全部を得るために，同じライブラリーをcDNAプローブで再スクリーニングしているところである。

〔文献〕

Davis, R.W., Botstein, D., and Roth, J.R. (1980) Advanced Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

Huynh, T.V., Young, R.A., and Davis, R.W. (1985) DNA Cloning (Glover, D.M., Ed.) Vol. I, pp. 49-78. IRL Press, Oxford

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

Kurihara, T., Fowler, A.V., and Takahashi, Y. (1987) J. Biol. Chem. 262, 3256-3261

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

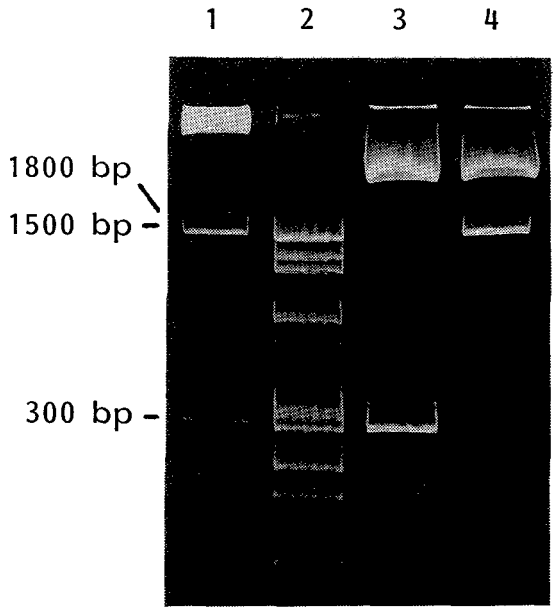


図1　ファージDNA（レーン1）及びサブクローニングしたプラスミドDNA（レーン3，レーン4）のEcoRI切断。ヒトCNPのcDNA断片300bp及び1500 bpを示す。ファージDNA（レーン1）では切り残した1800 bpがうすく見える。ファージ，プラスミドともにEcoRIサイトにcDNAがはいっている。レーン2はサイズマーカーでϕ×174 DNAのHae III切断。ポリアクリルアミドゲル8％の電気泳動。

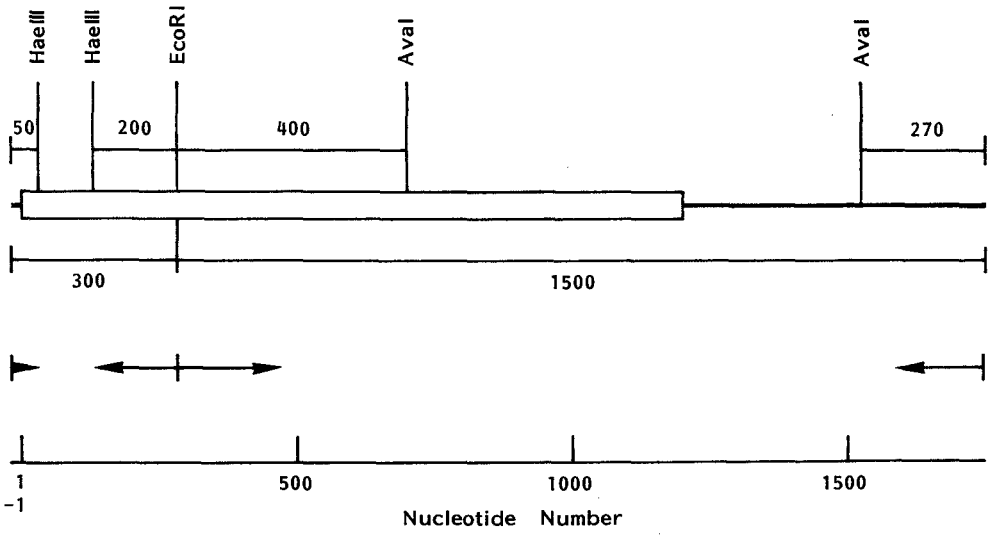


図2　ヒトCNPのcDNA 1800 bpの制限酵素地図。矢印は配列決定を行った箇所と方向を示す。ヌクレオチド番号はウシCNPのcDNA（Kurihara ら 1987）に基づく。□は翻訳領域を示す。

77. ニワトリ脳の発生過程に出現するタンパク質Drebrin の遺伝子構造とその発現機構の解析

児島伸彦・加藤幸雄*・白尾智明・
小幡邦彦　（群馬大・医・薬理, 内分泌研・化学構造*）

〔要　約〕

Drebrin と命名したニワトリ視蓋の発生段階に応じて出現するタンパク質群の遺伝子構造と発現調節の機構を知ることを目的として、cDNA をクローニングし、その塩基配列を決定した。更に発生過程における mRNA の発現と、ゲノム DNA の解析を行った。発現ベクターに組み込んだ cDNA ライブラリーより抗 Drebrin 抗体陽性クローン（gDcw1）を得た。これをプローブとした再スクリーニングを行い、制限酵素（PstI）の切断パターンの異なる 2 種類のクローンが得られた。これらの cDNA の塩基配列を決定してみると、約 130 bp の断片が一方で欠失している以外、両者の配列には極めて高い相同性があった。ニワトリ胚視蓋の Northern blot 解析を行ったところ、Drebrin mRNA は 2.4 から 3.0 kb の複数の分子種からなり、しかも発生段階によりそのサイズが異なっていた。以上の結果から、個々の Drebrin 分子は、翻訳後のプロセッシングまたは修飾といったタンパク質レベルで調節されているのではなく、一群の遺伝子ファミリーから合成されているか、または単一の遺伝子からの、転写開始点や転写後のスプライシング機構の違いによって発現調節されている可能性が示唆された。

Key word :　neural development, chick embryo, cDNA cloning

神経系の発生過程あるいは再生過程に特異的に出現するタンパク質がいくつか報告されており、これらは、その過程における神経回路網の形成に重要な役割を演じていることが予想される。

我々は、ニワトリ視蓋のタンパク質を二次元電気泳動で分析することによって、発生段階に応じて量的変化を示すタンパク質群を同定し（1）、Drebrin（Developmentally regulated brain proteins）と命名した。それぞれ、胚型の E1（S5 から改名）、E2（S6）と 成鶏型の A（S54）と分類された Drebrin は、抗体に対する交差反応性やペプチドマップによる解析から、構造上の類似性が高いと考えられ（2）、遺伝子レベルで相互に関連があると思われるが、それぞれが出現する発生の時期及び組織、細胞レベルでの局在は異なっており、これらのタンパク質は異なる発現調節を受けているか、あるいは翻訳後のプロセッシングないし、タンパク質の修飾機構が異なっていることが予想された。

本研究では、Drebrin 分子の構造と発現調節の機構を調べることを目的として、Drebrin cDNA のクローニングを行って、得られた一部の塩基配列に相違のある 2 種類の cDNA をプローブとして、Drebrin mRNA 及びゲノム DNA の解析を行った。

【実験方法】

Drebrin cDNA のクローニング

発現ベクターλgt11 で作製したふ卵 10 日目のニワトリ胚 cDNA ライブラリーより、Drebrin に対する抗血清を用いてスクリーニングを行った（3）。この結果得られた抗体陽性クローン（gDcw1）のインサート DNA を^{32}P ラベルしたものをプローブとして、更に同ライブラリーをスクリーニングした。

Northern blot 解析

ふ卵 7 日、11日、17 日のニワトリ胚視蓋 mRNA をホルムアルデヒドを含むアガロースゲル電気泳

動により分離し、ナイロン膜に転写した。プローブには、^{32}P ラベルした Drebrin cDNA クローンのインサート DNA を用いた。ハイブリッド形成は、6×SSC、1% SDS を含む Denhardt 溶液中で 68℃で一晩インキュベートした後、0.1×SSC、1% SDS 液中で 42℃で 2 時間洗浄した。

Southern blot 解析

ニワトリ血球核分画から調製したゲノム DNA を制限酵素（HindIII 及び PstI）で切断後、アガロースゲル電気泳動により分離し、0.2N NaOH で変性したのちナイロン膜に転写した。ハイブリッド形成は、Northern blot 解析と同様に行った。

塩基配列の決定

プラスミドベクター pUC119 に組み込んだ Drebrin cDNA について、一方の端からエキソヌクレアーゼ III で部分消化した欠損クローンを作製して、サンガーのジデオキシ法により塩基配列を決定した。

【結果と考察】

Drebrin cDNA クローンの単離

2×10^5 個のクローンから、Drebrin に対する抗血清及び 5 種のモノクローナル抗体のうち 3 種と特異的に反応するクローン（gDcw1）を得た。この cDNA をプローブとして 10×10^5 個のクローンを再スクリーニングすることにより、更に 22 個のクローンが得られた。これらの cDNA をプラスミド（pUC）ベクター に組み込んで、PstI による消化パターンを調べたところ、PstI の認識部位の異なる 2 種類のクローン（それぞれの最長のクローンは pDcw6 および pDcw17）に分けられることがわかった（図 1）。これらのプラスミドが感染した菌の発現タンパク質と抗 Drebrin 抗体との反応性を調べることによって Drebrin をコードしている DNA 鎖の方向を決定した。

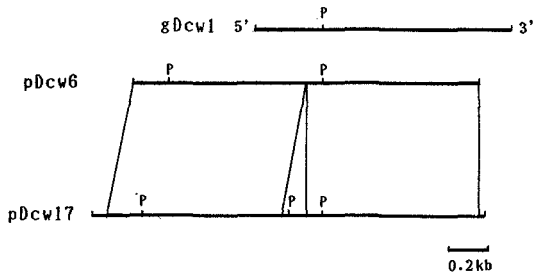


図 1　Drebrin cDNA クローン
Drebrin をコードしている DNA 鎖を示す。決定した pDcw6 と pDcw17 の塩基配列で非常に相同性の高い部分を線で結んだ。P、PstI の認識部位

Drebrin cDNA 塩基配列の決定

2 種類の Drebrin cDNA クローン（pDcw6、1825 bp 及び pDcw17、2077 bp）の全塩基配列を決定した。共に GC 含量が 多い（60 % 以上）ことが特徴である。両者の 5'側の 922 bp 及び 3'側の 920 bp の配列は非常に共通性の高いものであったが、pDcw17 の 999 番から 1127 番目の 129 bp の配列が pDcw6 で欠失していた（図 2）。この配列中には PstI 認識部位が一ヶ所存在しており、両クローンの PstI 消化パターンの違いはこの断片の有無によることが明らかとなった。

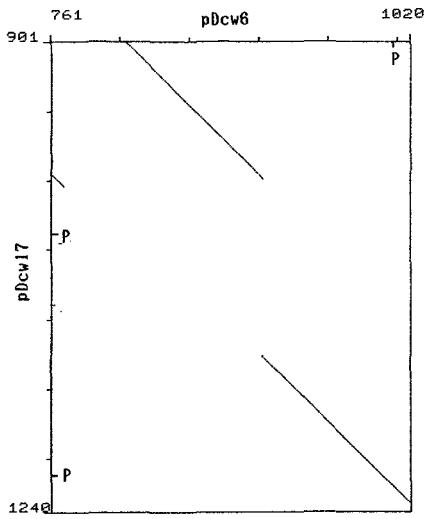


図 2　2 種の cDNA の Harr Plot 解析
pDcw6 と pDcw17 の欠失部分付近の塩基配列を比較した。横軸、pDcw6；縦軸、pDcw17
長さ 10 塩基が完全に一致しているところにドットを打つように設定。

Drebrin mRNA の検出

gDcw1 cDNA をプローブとしてニワトリ胚視蓋の Northern blot 解析を行うことにより、2.4 から 3.0 kb の長さに分布する複数の mRNA が検出された。異なる発生段階で比較すると、Drebrin mRNA のサイズは、経時的に大きくなっていた（ふ卵 7 日では平均 2.5 kb 、ふ卵 11、17 日では平均 2.7 kb）。この結果と 2 種類の Drebrin cDNA クローンが得られたこととを合わせて考えると、Drebrin mRNA 分子種は複数存在する可能性が高く、我々が既に報告している発生過程における個々の Drebrin の量的変化（2）は、翻訳後のタンパク質のプロッシングや修飾による変化ではなく、それぞれの Drebrin mRNAの転写量の変化を反映していると考えられる。なお、異なる 2 種の cDNA （pDcw 6 及び pDcw17）をプローブとして、別々にハイブリッド形成した際の両者のパターンには違いが認められなかった。これは、両 cDNA の塩基配列の相同性が極めて高いために、個々の mRNA 分子を別々に検出できなかったのであろう。Northern blot 解析の結果検出された Drebrin mRNA のサイズと比較して、得られた cDNA クローンは全長には足りないと思われるが、2 種のクローンが、どの Drebrin 分子に対応するのかについては今後の課題である。

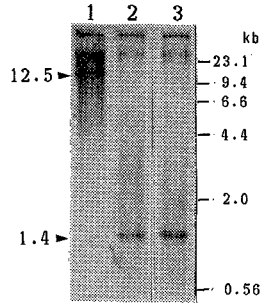


図 3　Southern blot 解析
1、HindIII；2、PstI；
3、HindIII + PstI

Drebrin 遺伝子の検出

ニワトリゲノム DNA を制限酵素で切断し、gDcw1 をプローブとして Southern blot 解析を行ったところ、図 3 に示すように、HindIII では主として 12.5 kb のバンドが、PstI では 1.4 kb のバンドが検出された。ハイブリッド形成の条件を緩和すると、他にもいくつかのバンドが検出された。また、これらのバンドは gDcw1 よりも長い pDcw6 や 17 をプローブとするとより強く検出された。この結果から、まず、gDcw1をプローブとして強く検出されたバンドは、他の cDNA をプローブとしても同様に検出されたので、これらの cDNA クローンで共通性の高い 3’側の配列を含んでいると考えられる。また、gDcw1 では検出されにくい他のいくつかのバンドについては cDNA の 5’側の配列を含んでいることが考えられるが、検出されたバンドは、すべて単一の遺伝子から生じる可能性と、共通性は高いが別の遺伝子に由来する可能性がある。したがって、個々の Drebrin が一群の遺伝子ファミリーから合成されるのか、あるいは、単一の Drebrin 遺伝子から転写開始点や転写後のスプライシング機構の違いによって、個々の Drebrin 分子の発現が調節されているのかについては不明であり、Drebrin 遺伝子の構造を解析することで明らかにしたい。

〔文献〕

1. Shirao, T. and Obata, K. (1985) J. Neurochem. 44 : 1210-1216.
2. Shirao, T. and Obata, K. (1986) Dev. Brain Res. 29 : 233-244.
3. Huynh, T.V., Young, R.A. and Davis, R.W. (1985) in DNA cloning volumeI a practical approach (ed. Glover, D.M.) pp 49-78.

78. ラットの発育過程における終脳内コレシストキニンとエンケファリン前駆体メッセンジャーRNAレベルの変化

相沢貴子・吉川和明　（都精神研・分子生物）

〔要　約〕

ﾗｯﾄの発育過程における終脳の3部位（前頭皮質、海馬、線条体）でのｺﾚｼｽﾄｷﾆﾝ前駆体（pCCK）とｴﾝｹﾌｧﾘﾝ前駆体（pENK）mRNA濃度の変化を検討した。全RNA量あたりのmRNA量では、前頭皮質や海馬内のpCCK-mRNAはpENK-mRNAに比べ増加が速く、生後10-20日で成熟ﾚﾍﾞﾙ近くになった。この時期では各脳部位でのRNA含量が高いため、湿重量あたりで表わしたmRNA量では、前頭皮質と海馬内のpCCK-mRNAはそれぞれ生後10日と20日に一過性のﾋﾟｰｸを示した。一方、pENK-mRNAではpCCK-mRNAの様な明らかなﾋﾟｰｸは認められなかった。線条体ではpENK-mRNAは生後30日まで漸増するが、pCCK-mRNAﾚﾍﾞﾙは生後12日から15日に増加があり、その後減少が認められた。以上の結果、ﾗｯﾄ終脳内のCCK含有ﾆｭｰﾛﾝでは生後10-20日に細胞密度や遺伝子の発現量が増大が起こるものと推定される。

Key word： Neuropeptide Genes/Rat Telencephalon/Postnatal Development

中枢神経内での神経ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ前駆体のmRNAﾚﾍﾞﾙは神経ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ含有ﾆｭｰﾛﾝの細胞体の存在やその密度、さらに神経活動に伴う神経ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞの生合成の変化を知る上で良い指標となる。また神経ﾍﾟﾌﾟﾁﾄ前駆体のmRNAﾚﾍﾞﾙの個体発生過程での変化は、中枢神経系形成過程における神経ﾍﾟﾌﾟﾁﾄ性ﾆｭｰﾛﾝの役割を知る上で重要な情報を与えるものと考えられる。神経ﾍﾟﾌﾟﾁﾄの中でｺﾚｼｽﾄｷﾆﾝ（CCK）やｴﾝｹﾌｧﾘﾝ（ENK）は大脳皮質内に含まれ、高次神経機能の調節に重要な機能を果たしているものと推定される。そこで、今回はﾗｯﾄ終脳の前頭皮質、海馬、線条体の3部位でのｺﾚｼｽﾄｷﾆﾝ前駆体（pCCK）とｴﾝｹﾌｧﾘﾝ前駆体（pENK）遺伝子発現の生後発育過程での変化をmRNA濃度を測定することによって検討した。

【方法】

[ﾗｯﾄ終脳からのRNAの抽出・精製]

各発育段階のWistar系ﾗｯﾄの終脳の各部位（前頭皮質、海馬、線条体）を分離し、重量測定後直ちに組織をｸﾞｱﾆｼﾞﾝ・ﾁｵｼｱﾝ酸溶液中で超音波処理し-20℃で保存した。抽出操作はChirgwinらの方法（1）をもとにして微量化した方法で行なった。

[pCCK-mRNAとpENK-mRNAの定量]

pENK-mRNAとpCCK-mRNAの定量はﾄﾞｯﾄ・ﾌﾞﾛｯﾄによって行なった（6）。ﾌﾟﾛｰﾌﾞとして用いたﾗｯﾄpCCK-cDNAは甲状腺髄様癌cDNAﾗｲﾌﾞﾗﾘｰからｸﾛｰﾝ化されたもの（3）、ﾗｯﾄpENK-cDNAは線条体からｸﾛｰﾝ化されたもの（5）を用いた。pCCK-cDNAは500 bp、pENK-cDNAは950 bpの断片をﾌﾟﾛｰﾌﾞとして用いた。ﾌﾟﾛｰﾌﾞはﾏﾙﾁﾌﾟﾗｲﾑ法により^{32}Pで比活性1～2x10^{9}dpm/μg DNAに標識した。標準RNAとしてpSP6系ﾍﾞｸﾀｰに挿入したpCCK-cDNAと

pENK-cDNAをSP6 RNAﾎﾟﾘﾒﾗｰｾﾞによって合成したものを用いた。定量はｵｰﾄﾗｼﾞｵｸﾞﾗﾑのﾃﾞﾝｼﾄﾒﾄﾘｰによって行なった。ﾉｰｻﾞﾝ法はRNAを1.2%ｱｶﾞﾛｰｽ/6% ﾎﾙﾏﾘﾝｹﾞﾙで電気泳動後ﾅｲﾛﾝ膜（Hybond-N）にﾌﾞﾛｯﾄして行なった。

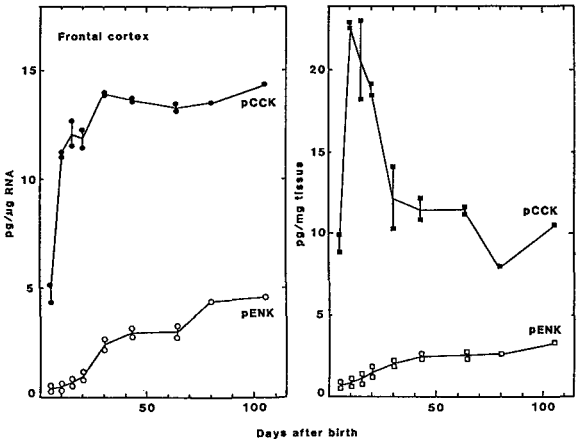


Fig.1 The pCCK- and pENK-mRNA levels in the rat frontal cotex during postnatal development.

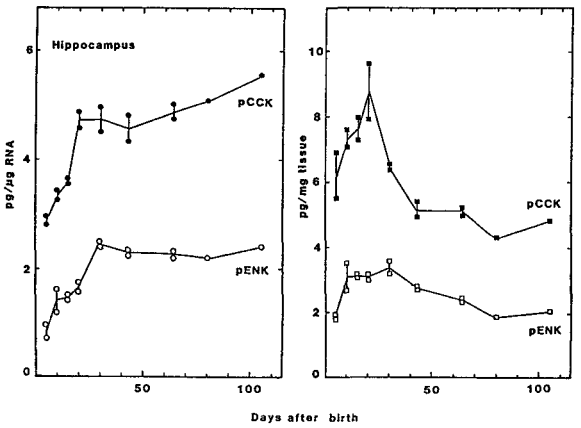


Fig.2 The pCCK- and pENK-mRNA levels in the rat hippocampus during postnatal development.

【結果】

前頭皮質ではpENK-mRNAﾚﾍﾞﾙは成熟期まで除々に増加したが、pCCK-mRNAﾚﾍﾞﾙは生後5日から10日にかけて急激に増加して成熟期ﾚﾍﾞﾙの約80%に達した（Fig.1）。前頭皮質の湿重量あたりの全RNA量は生後5-10日は成熟期の2倍以上であるため、それぞれのmRNA含量を湿重量あたりで表わした場合、pCCK-mRNAは生後10日にﾋﾟｰｸを示し、その後30日まで漸減するﾊﾟﾀｰﾝとなった。一方、pENK-mRNAはpCCK-mRNAの様なﾋﾟｰｸを示さなかった。次に、海馬での両者の発育ﾊﾟﾀｰﾝを比較した（Fig.2）。海馬内のpCCK-mRNAﾚﾍﾞﾙとpENK-mRNAﾚﾍﾞﾙはそれぞれ生後20日と30日には成熟ﾚﾍﾞﾙ近くに達した。湿重量あたりではpCCK-mRNAは生後20日にﾋﾟｰｸをしめしたが、pENK-mRNAは明らかなﾋﾟｰｸを示さなかった。前頭皮質のpCCK-mRNAおよび海馬のpCCK-mRNAとpENK-mRNAの生後5日での湿重量あたりの含量はほぼ成熟期に等しく、発育の途中経過で増加するﾊﾟﾀｰﾝとなった。次に、線条体での両mRNAﾚﾍﾞﾙの発育ﾊﾟﾀｰﾝを検討した（Fig.3）。全RNAあたりのpENK-mRNAﾚﾍﾞﾙは生後5-30日の間に約8倍に増加した。湿重量あたりのpENK-mRNAﾚﾍﾞﾙでは生後43日にﾋﾟｰｸになりその後減少した。一方、pCCK-mRNAﾚﾍﾞﾙは全発育期を通して低かったが、生後15日前後に高くなる例が認められた。しかし同腹の個体間でも顕著な濃度差が存在した。pCCK-mRNAの発育ﾊﾟﾀｰﾝの代表例（Fig.3とは別の群）のﾉｰｻﾞﾝ法の結果を示した（Fig.4）。pCCK-mRNAﾚﾍﾞﾙは生後12日に最大になった後漸減し、60日以降に再び増加した。他の群の分析でもpCCK-mRNAﾚﾍﾞﾙは生後10-15日に最大になる共通性が認められたが、再増加の時期は一定しなかった。

【考察】

CCKﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞは大脳皮質に多く含まれているが、pCCK-mRNAも大脳皮質で高濃度に存在した。前頭皮質や海馬内の湿重量（体積）あたりのpCCK-mRNAﾚﾍﾞﾙは生後10-20日に

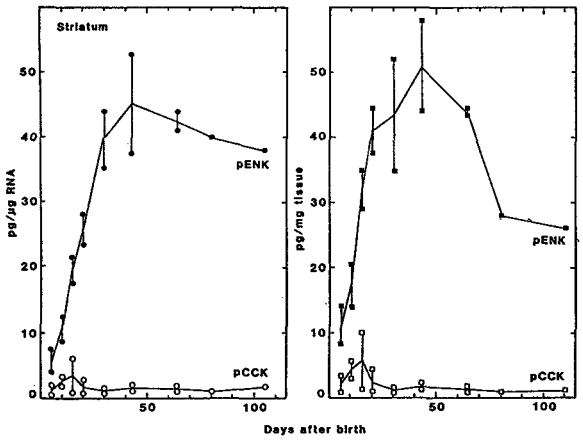


Fig.3 The pCCK- and pENK-mRNA levels in the rat striatum during postnatal development.

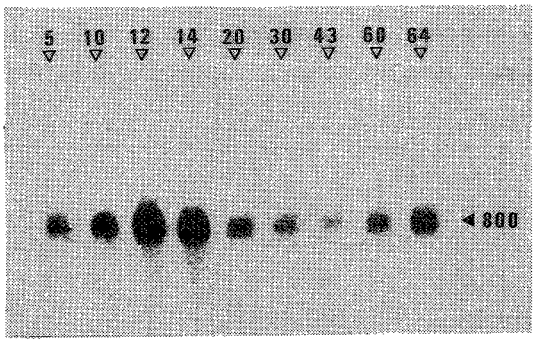


Fig.4 A typical example of Nothern blot analysis on the pCCK-mRNA levels in the striatum during postnatal development.
Numbers on top: postnatal days
◀:Length (bases) of the hybridized RNA

ﾋﾟｰｸとなったのは、その時期に全RNA量の増加の時期と一致して、[1] CCKﾆｭｰﾛﾝ1個あたりの遺伝子発現が増加する、[2] CCKﾆｭｰﾛﾝの細胞密度が高くなる、などの可能性が考えられる。また、線条体でのpCCK-mRNAﾚﾍﾞﾙは生後12～15日に一時的に顕著な増加を来たしたのちに減少した。ｳｻｷﾞの大脳皮質では発生初期にsubplateに出現して、その後消失する細胞群の中にCCK免疫陽性細胞が存在するという報告（2）がある。そのため、ﾗｯﾄ線条体においても、生後発育の初期に存在したCCKﾆｭｰﾛﾝがその後消失する可能性も考えられる。一方、pENK-mRNAﾚﾍﾞﾙはpCCK-mRNAのような明らかなﾋﾟｰｸや発現の消長を示さない。　このことは、発育過程の脳内では神経ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞの種類によって発現の様式が異なることを示唆する。成熟ﾗｯﾄの新皮質ではpCCK-mRNAは第2、3、5、6層、pENK-mRNAは第2層に存在することがin situ ﾊｲﾌﾞﾘﾀﾞｲｾﾞｲｼｮﾝ法で証明されている（4）が、各層での発生過程での細胞の移動や神経回路の完成度、さらに刺激の入力の時期など種々の因子が、神経ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ前駆体遺伝子発現の変化を修飾するものと考えられる。

【謝辞】本研究は文部省科学研究費と病態代謝研究会の補助を受けて行なった。また pCCK-cDNAは米国Purdue大学 Dr.DixonとNIMH Dr.Youngから供与を受けた。

【文献】

1) Chirgwin,J.M., Przybyla,A.E., MacDonald,R.J., and Rutter,W.J. (1979) Biochemistry 18, 5294-5299
2) Chun,J.J.M., Nakamura,M.J., and Shatz,C.J. (1987) Nature 325, 617-620
3) Deschenes,R.J., Lorenz,L.J., Haun,R.S., Roos,B.A., Collier,K.J., and Dixon,J.E. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 726-730
4) Siegel,R.E., and Young III,W.S. (1985) Neuropeptides 6, 573-580
5) Yoshikawa,K., Williams,C.,and Sabol,S.L. (1984) J.Biol.Chem. 259, 14301-14308
6) Yoshikawa,K., Hong,J-S., and Sabol,S.L. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82, 589-593

79. In situ hybridizationによるミエリン特異蛋白質遺伝子発現の組織学的解析

塩田千代・三浦正幸・御子柴克彦（大阪大・蛋白研）

〔要　約〕

マウスの脳におけるミエリン塩基性蛋白質（myelin basic protein:MBP）とproteolipid protein（PLP）の遺伝子発現をcDNAをプローブとしたin situ hybridizationによって組織学的に解析した．生後6日目の正常マウスでは，MBPmRNAは小脳核周辺及び脳幹の一部に認められるにすぎないが，8日目には小脳白質及び脳幹全域に分布するようになり，さらに大脳白質にも検出された．分布域の拡大とともに生後12日目まで脳各部のMBPmRNA密度の増大が認められたが，18日目以降は低下した．PLPmRNAの生後発育過程における発現の組織学的パターンも概ねMBPmRNAのそれと一致していた．さらにミエリン形成不全を呈する突然変異マウスについてもMBP及びPLPmPNAのin situ hybridizationを行ったところ，shiverer突然変異マウスとmld突然変異マウスでは，PLPmRNAのみが，jimpy突然変異マウスではBPmRNAのみが検出された．mld突然変異マウスで僅かに発現しているMBPmRNAならびにjimpy突然変異マウスで僅かに発現しているPLPmRNAは今回のin situ hybridizationでは検出されなかった．以上の結果から，現時点では感度の点でやや問題はあるものの，in situ hybridizationは構造ならびに機能上異質性の高い神経系における遺伝子発現の研究に非常に有用であることが示された．

Key word： In situ hybridization, Myelin basic protein, Proteolipid protein

〔緒言〕

ミエリン塩基性蛋白質（myelin basic protein: MBP）とproteolipid protein (PLP)はともに中枢神経系のミエリンの主要成分で，各々ミエリン全蛋白質の約1/3ずつを占める．我々はこれまでに，これら両蛋白質に特異的なmRNAの生後発育過程における量的変化を全脳を用いて調べ，MBPmRNA,PLPmRNAいずれも全RNAに対する割合は生後5日目から増加し，32日目にピークに達し以後漸減することを報告した[5]．本研究では，さらにMBPmRNA及びPLPmRNAの生後発育過程における発現を組織学的に解析するためにin situ hybridizationを行った．また，ミエリン形成不全を呈する突然変異マウスについてもこれら両mRNAのin situ hybridizationを行ったので，その結果も併せて報告する．

〔材料及び方法〕

動物：実験には生後6，8，12，18，31日齢の正常マウス（ICR系）と，18日齢のshiverer，16日齢のmld，18日齢のjimpyの各突然変異マウスを用いた．

組織切片の作成：4%パラホルムアルデヒド（pH 7.2）で20分間灌流固定後摘出した脳をさらに12～24時間同固定液で後固定し，常法にて小脳矢状面及び大脳前額面を含む6μのパラフィン切片を作成した．

プローブの作成：マウスMBPcDNA（pMBP2：木村博士より譲渡[2]）のstuI-PstI 880 baseフラグメント及びラットPLPcDNA（p27：Sutcliffe博士より譲渡[3]）のPstI 600 baseフラグメントを，^{3}H-dCTPと^{3}H-TTPを用いてマルチプライマー法[1]にて標識

した。

in situ hybridization 及びオートラジオグラフィー：hybridization は Uhl ら[7]の方法に従って行った。オートラジオグラムは切片に乳剤（Kodak NTB2）を塗布し，3～4週間露出して得た。観察は暗視野顕微鏡下で行った。

［結果及び考察］

1）正常マウスの発育過程における MBPmRNA 及び PLPmRNA の発現の消長。

MBPmRNA は生後6日目では小脳核周辺と，橋，延髄の一部に認められるにすぎず，大脳では全く認められなかった（Fig.1aとb）。8日目になると MBPmRNA は小脳白質及び脳幹部全域に分布するようになり，大脳においても白質全域に認められた（Fig.1cとd）。以後31日目まで MBPmRNA の分布に変化は認められなかった（Fig.1e～h）。一方 MBPmRNA の組織中での密度は，小脳，脳幹では6日目から8日目までに，大脳では8日目から12日目までにほぼ最高レベルに達した（Fig.1）。このレベルは18日目まで維持され以後減少した。

PLPmRNA の発現の消長は概ね MBPmRNA のそれと一致していたが（Fig.2），本研究では PLP プローブの非特異的吸着が強く，十分な解析は行えなかった。プローブの比活性，長さ，hybridization 反応時の濃度等に問題があると思われる。

上述の MBP 及び PLPmRNA の発育過程における分布域の拡大のパターンは，ミエリン形成が脳の後部ほど早く始まるという事実と矛盾しない。MBPmRNA の量的変化については，本研究結果は既報[5]の生化学的測定結果と一部一致しなかったが，前者は mRNA の組織中の密度を，後者は全RNAに対する割合を見ているためと考えられる。今後 in situ hybriridization の定量性を増すために，オートラジオグラフィーの標準化の方法を検討する必要があると思われる。

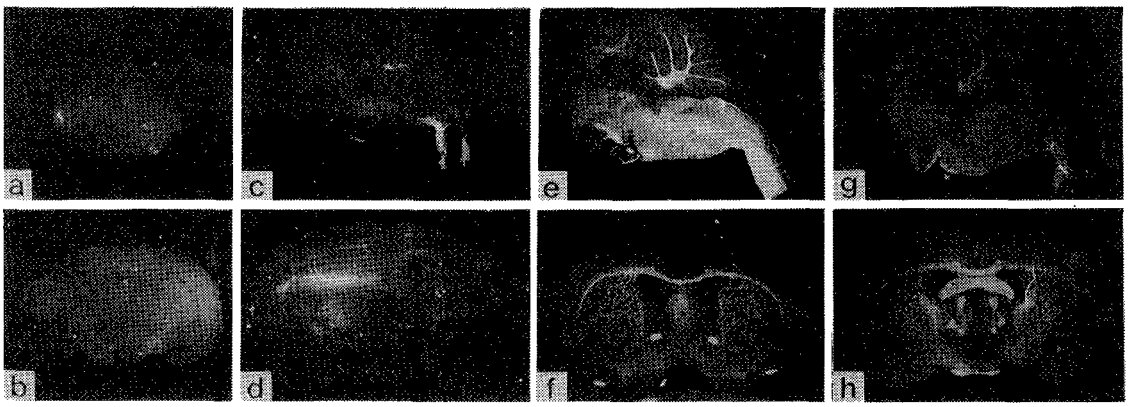


Fig.1. Dark field micrographs of saggital section of cerebeller region (upper) and frontal section of cerebrum (lower) after in situ hybridization for MBPmRNA. a and b:6-day-old mouse. c and d: 8-day-old mouse. e and f:18-day-old mouse. g and h:31-day-old mouse.

2) 突然変異マウスにおける MBPmRNA 及び PLPmRNA の in situ hybridization.

Shiverer突然変異マウスは MBP遺伝子の7つのエキソンのうち，第3～7エキソンを欠損している[2][6]．今回用いた MBPのプローブには shivererのtranscriptにハイブリダイズする部分は含まれていないにもかかわらず，小脳のオートグラムに黒化度の高い部分が認められた（Fig.3a）．これは，プローブの非特異的吸着あるいは乳剤のかぶり等による人工産物であると思われる．PLPmRNAは小脳核周辺に明らかに認められた（Fig.3b）．

mld突然変異マウスでは MBPmRNAは検出できなかったが（Fig.3c），PLPmRNAは小脳白質に認められた（Fig.3d）．mldでは正常マウスの約３％のMBPmRNAが発現していることをRNA dot-blot hybridizationにより確認している[1]が，これは今回行ったin situ hybridizationの検出限界以下であったと思われる．

jimpy突然変異マウスでは，MBPmRNAのみが認められた（Fig.3eとf）．jimpyでは正常マウスの約１％のPLPmRNAが発現していることがRNA dot-blot hybridization より明らかになっているが[4]，mldのMBPmRNA同様，今回のin situ hybridization の検出限界以下であったと思われる．

以上本研究結果から，感度及び特異性に関して更に検討を要するものの，構造ならびに機能上異質性の高い神経系における遺伝子発現の研究にin situ hybridizationは非常に有用な方法であることが示された．

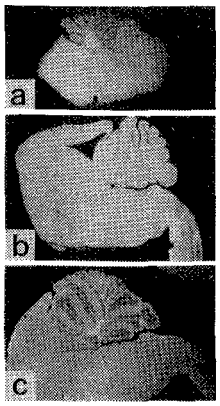


Fig.2. In situ hybridization for PLPmRNA. a: 6-day-old mouse. b:8-day-old mouse. C:12-day-old mouse.

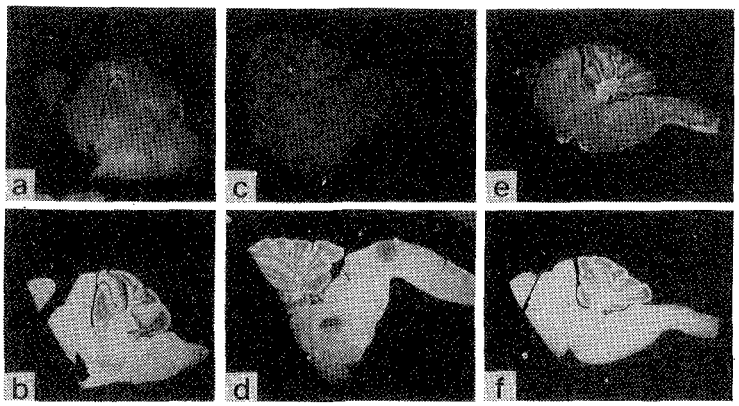


Fig.3. In situ hybridization for MBPmRNA (upper) and PLPmRNA (lower) in mutant mice. a and b:shiverer. c and d:mld. e and f: jimpy.

(References)
(1) Fein Kerg, A.P. et al. (1983) Anal. Biochem. 132,6.
(2) Kimura, M. et al. (1985) J.Neurochem. 44,692.
(3) Milner,R.J. et al. (1985) Cell 42,931.
(4) Moriguchi, A. et al. (1986) Bull. Jap. Neurochem. 25,571.
(5) Okano, H. et al. (1987) J. Neurochem. 48,470.
(6) Roach, A. et al. (1985) Cell 42,149.
(7) Uhl, G.R. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,5555.

80. モノクローナル抗体により認識されるＭＡＰ２の神経細胞内分布

山本彰夫・豊島　至・正宗　研・
佐武　明*
（秋田大・医・第一内科，新潟大・脳研・神経化学*）

〔要　約〕

微小管の構成要素である微小管結合蛋白質(MAPs)について検討し、以下の結果を得た。

１）ウシの高分子量MAPsでBALB/cマウスを免疫し、MAP2と反応した６個(1A1,5C10,7H11,7H2,8A4,9G6)のモノクローナル抗体(MAb)を得た。

２）抗MAP2MAbを用いて免疫組織染色を行った。1A1以外の５個の抗体はウシ脊髄で神経細胞体と樹状突起を、脊髄神経節で一部の神経細胞体のみを染色し、両者で軸索は染色しなかった。一方1A1は脊髄、脊髄神経節の神経細胞の全要素を染色した。

３）1A1は、ウシ脊髄の分子量43,000の蛋白質と強く反応し二次元イムノブロットからアクチンと考えられた。

Key word：Monoclonal Antibody, MAP2

脳の微小管分画にはチューブリン以外に各種の微小管結合蛋白質(MAPs)があり、神経細胞内の分布がそれぞれ異なることが示されている。MAP2は神経細胞体と樹状突起に(2,5)、タウは軸索に(1)局在すると考えられている。しかしMAP2に関しては軸索(　)、あるいはグリア(8)にも存在するという報告があり、一致をみていない。我々は神経細胞におけるMAPsの分布を検討する目的で、MAP2に対するMAbを作製した。

［実験方法］

高分子量 MAPsの精製：ウシ脳から２サイクル重合－脱重合を行い(9)微小管分画を得た。これからDEAE-カラムクロマトグラフィー(3)により、MAP1とMAP2からなる高分子量MAPsを精製した。

MAbの作製：高分子量MAPsで免疫したBALB/cマウスの脾細胞と、ミエローマ細胞(P3-X63-Ag8-6.5.3)をポリエチレングリコール4,000で融合させた。スクリーニングはアビジン－ビオチン法によるELISAを、クローニングは限界希釈法を用いた。

イムノブロット：試料は１サイクル重合－脱重合で得られたウシ脳粗微小管分画とウシ脊髄のR-B(9)ホモジネート10万ｇ上清分画を用いた。SDS-PAGEはLaemliの方法(　)に従った。分離ゲルのアクリルアミド濃度は 4.5%または7.5%とした。二次元電気泳動はO'Farrellの方法(6)を改変して用いた(10)。電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、アビジン－ビオチン法で染色した。

免疫組織染色：ウシ脊髄と脊髄神経節を液体窒素で凍結し、クリオスタットで薄切後、-20° Cアセトンで５分間固定しアビジン－ビオチン法を用い染色した。

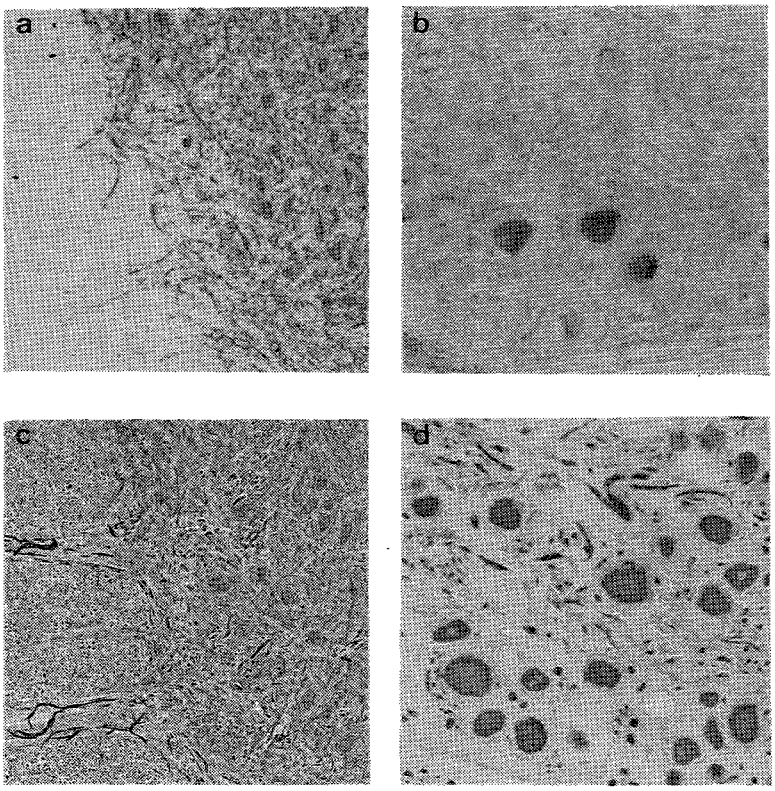


図２
ウシ脊髄(a,c)と脊髄神経節(b,d)のMAb8A4(a,b)と1A1(c,d)による免疫組織染色。他の4個のMAbは8A4と同じ染色パターンだった。

［結果］

MAP2abと反応する６個のMAbが得られた。図１にウシ粗微小管分画に対する各MAbの一次元イムノブロット像を示す。MAP2の下に連なるバンドが各々の分解産物であることは二次元電気泳動のイムノブロットで確認した（図省略）。抗MAP2MAbを用いて、ウシ脊髄と脊髄神経節の免疫組織染色を行った。1A1以外の５個のMAbは、脊髄灰白質の神経細胞体と樹状突起を染色したが、白質と前根の軸索は全く染色されなかった（図２a）。脊髄神経節では神経節細胞体の一部を染めたが、大部分の神経節細胞体は染まらず、軸索は全く染色されなかった（図２b）。1A1は上記に加え脊髄灰白質、白質、前根の軸索も染色し（図２c）、脊髄神経節では全ての神経節細胞体と軸索を染色した（図２d）。1A1と他の抗MAP2MAbの染色パターンの相違を検討するために、ウシ粗微小管分画と、ウシ脊髄10万g上清分画のイムノブロットを行ったところ、1A1は脊髄上清分画の分子量43,000の蛋白質と強く反応したが、粗微小管分画には反応する成分が殆どみられなかった（図３）。分子量43,000の蛋白質を同定するため二次元イムノブロットを行うとチューブリンより塩基性でアクチンに一致するスポットが染色された。（図４）。

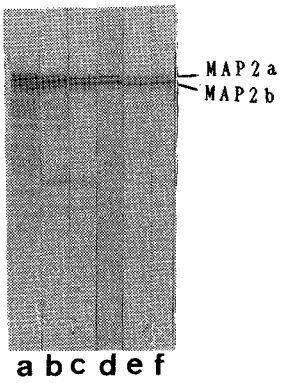


図１
1:ウシ粗微小管分画のMAbによるイムノブロットa,1A1; b,8A4; c,5C10; d,7E11 e,7H2; f,9G6; 4.5%ポリアクリルアミドゲル

［考察］

今回我々は抗MAP2abMAbを６個確立した。このうちの1A1以外の５個は同様の免疫組織染色のパターンを示しウシ脊髄の神経細胞体、樹状突起と脊髄神経節の一部の神経細胞体が染色され、軸索はまったく染色されなかった。これはDe Camilliらの抗MAP2ポリクローナル抗体による結果(2)と一致した。しかしPapasozomenosら(7)は、２個の抗MAP2MAb が脊髄前根と脊髄神経節の軸索の一部と反応したと報告しており、軸索のMAP2の存否について一致しない。軸索にもMAP2が存在するとすれば、今回軸索が染色されなかった理由として、１）軸索内のMAP2が低濃度である、２）軸索MAP2は何らかのmodificationをうけ、我々の抗体が認識するエピトープが変化する、３）MAP2の微小管との結合状態が変化し、エピトープが微小管の表面から隠される、等が考えられる。また軸索にはMAP2が存在しないとすれば、Papasozomenos らの抗体は、軸索内の共通エピトープを有する他の物質と反応したと考えられる。

1A1はイムノブロットでMAP2 と43K蛋白質を認識し、両者に共通抗原性があるものと考えられた。二次元イムノブロットから、この43K蛋白質はアクチンと考えられたが、これまでにアクチンとMAP2 が共通エピトープを有するという報告はみあたらない。

［文献］

1 Binder, L. I., Frankfurter, A. and Rebhun, L. I. (1986) Ann. N. Y. Acad. Sci. 466, 145-166
2 DeCamilli, P., Miller, P. E., Navone, F., Theurkauf, W. E. and Vallee, R. B. (1984) Neurosci. 11, 819-846
3 Kuznetsov, S, A., Rodinov, V. I., Gelfand, V. I. and Rosenblat, V. A. (1981) FEBS lett. 135, 237-240
4 Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685
5 Matus, A. and Riederer, B. (1986) Ann. N. Y. Acad. Sci. 466, 167-179
6 O'Farrell, P. H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007-4021
7 Papasozomenos, S. Ch., Binder, L. I., Bender, P. K. and Payne, M. R. (1985) J. Cell Biol. 100, 74-85
8 Papasozomenos, S. Ch., Binder, L. I. (1986) J. Neurosci. 6, 1748-1756
9 Shelanski, M. L., Gaskin, F. and Cantor, C. R. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 765-768
10 Toyoshima, I., Tanaka, k., Fukuhara, N., Kumamoto, T. and Miyatake, T. (1983) Biomed. Res. 4, 459-466.

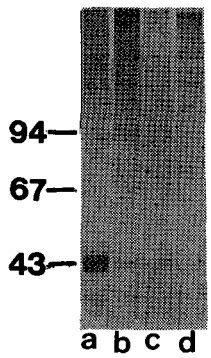


図３： 1A1(a、b)と8A4(c, d)によるウシ脊髄10万g分画 (a, c)と粗微小管分画(b, d)のイムノブロット7.5%ポリアクリルアミドゲル

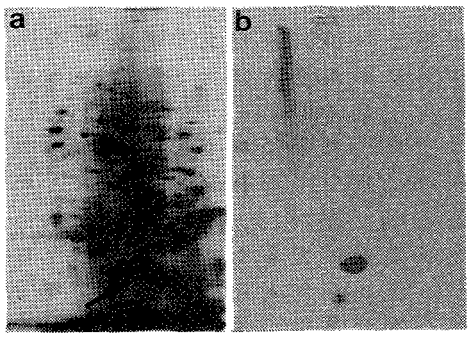


図４：ウシ脊髄10万ｇ上清分画の二次元電気泳動像(a)と1A1によるイムノブロット(b)
矢印が 1A1と反応するスポット

81. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)法によるニューロフィラメントとマイクロチュブルとの相互作用の検討

武田雅俊・Angelides K. J.*・鈴木英夫・
多田國利・播口之朗・西村　健
(大阪大・医・精神, ベイラー医大・生理*)

〔要　約〕

ニューロフィラメント蛋白とマイクロチュブル線維との相互作用を調べる目的で、ニューロフィラメント構成蛋白の中でも最も外側に位置し最も多量にリン酸化を受けている200Kサブユニット(NF200P)とマイクロチュブルの結合を中心に検討した。NF200Pはマイクロチュブル線維とインキュベイトした後の遠沈によりマイクロチュブルと共に沈澱することができ、またヨード化NF200Pをマイクロチュブル蛋白をブロットしたニトロセルロース膜にoverlayした後のオートラジオグラムからは、NF200Pがtubulinと結合していることが示された。更にFluorescence Recovery After Photobleaching(FRAP)法によりニューロフィラメント蛋白とマイクロチュブル線維との結合を測定した。まずマイクロチュブル線維と結合しメッシュ構造をなすと言われているPolyLysineを蛍光標識してのFRAPを行い、この結果を対照としてNF200P及びNF160Pの何れもマイクロチュブル線維と結合することを示した。更にこのような相互作用に対するリン酸化の影響を調べるために脱リン酸化したNF200Pとネィティブな NF200PとのFRAPデータを検討したが、両者に差異は認められなかった。今回のデータは生体内での細胞骨格蛋白の相互作用の研究にFRAP法が有用であることを示している。

Key word : neurofilament , microtubule , interaction

(はじめに)

近年、細胞骨格線維性蛋白の間の相互作用が注目されている(2)。ニューロフィラメント線維は分子量の異なる3種のサブユニットからなり、200K(NF200P)及び160Kサブユニット(NF160P)とは68Kサブユニット(NF68P)からなるコアの周囲に付随していると考えられている。今回、NF200P及びNF160Pがマイクロチュブル線維と結合しうるかどうかを調べるためにFluorescence Recovery After Photobleaching(FRAP)法の適応を検討した。NF200P或はNF160Pを蛍光色素で標識し、マイクロチュブル線維と混合した後の分子拡散速度を蛍光を標識として観察する事によりニューロフィラメント構成サブユニット蛋白のマイクロチュブル線維との相互作用を示し、またNF200Pリン酸化の相互作用への影響を検討した。

(方法)

<u>マイクロチュブルの精製</u>　牛脳からShelanskiの方法に従い、重合・脱重合を3回繰り返してマイクロチュブル蛋白を精製した(7)。

<u>蛍光標識したNF200Pの調整</u>　ニューロフィラメント構成トリプレット蛋白は、axonal floateから尿素により可溶化したニューロフィラメント粗分画をhydroxylapatite,DE52カラムで分離し(4)、精製したNF200P蛋白をtetramethylrhodamine isothiocyanate(TRIC)と室温で2時間反応させた後、ニューロフィラメント重合緩衝液に対して一晩透析し、Sephadex G200カラムでフリーの蛍光色素からラベルされた蛋白を分離した。NF200Pのfluorescein-5-maleimideによる標識、polyLysineのfluorescein isothiocyanate(FITC)による標識もほぼ同様の手法で行った(1)。

<u>NF200P及びNF160Pの脱リン酸化</u>　NF200P或はNF160PをE.coliのalkaline phosphataseと共に一晩透析しながらインキュベイトすることにより脱リン酸化した(3)。脱リン酸化の程度は電気泳動における移動度の変化で確認した。

NF200Pのヨード化　10ulのNF200P(5mg/ml)に20ulの0.5MNaH2PO4(pH8.6)、5ugのlactoperoxidase、20ul $Na^{125}I$(1mCi)、5ulの10^{-6}希釈H_2O_2を加え、更に一分後に5ulH_2O_2を加えてから一分後に反応を止め、SephadexG200カラムでヨード化した蛋白を分離した。

Co-pelleting法　マイクロチュブル蛋白(2.5mg/ml)とNF200P(1mg/ml)とを重合緩衝液中で混合し30分37°Cにてインキュベイトした後40000rpm20分の遠沈により沈めた沈査を電気泳動にて検討した。

Overlay法　電気泳動した7.5%ゲルをニトロセルロース膜にブロットし、1%albumin、0.05%Tween20を含む溶液にて一時間インキュベイトし良く洗浄した後、iodinated-NF200Pと一晩インキュベイトした後、オートラジオグラフィーに供した。

Fluorescence Recovery After Photobleaching(FRAP)法　システム全体の構成を図１に示す(6)。レイザービームをneutral density filter(ND)を通し鏡(M)により蛍光顕微鏡の励起光入射口に導き、レンズ(L1)により最終的に焦点を試料に合わせる。dichroic mirror(DM)はレイザービームを顕微鏡対物レンズ(L2)に導き、試料からの蛍光は上方のphotomultiplier tube(PMT)に透過させる。barrier filter(BF)はDMと共に特定の波長の蛍光のみをPMTに通す。PMTは顕微鏡上方に載せドライアイスをいれた冷却箱の中に-70°Cに保つ。PMTは強いブリーチ光から電磁シャッター(Sr3)により保護されている。 PMTからの蛍光信号は接続したIBMコンピータに送られ解析される。図１のシステム全体は振動による影響を避けるために防振台の上にセットした。diaphragm1(D1)、diaphragm2(D2)、beam splitter1(BS1)、beam splitter2(BS2)、電磁シャッター２(Sr2)とでブリーチ光とモニター光とを同一点に切り替えて照射することができる。Sr2を開くとBS1とBS2とを透過した反射なしの弱化されていないビームがD2を通過する。このビームをブリーチ光として使用する。Sr2を閉じるとBS1及びBS2とで反射した10^{-4}に弱められた光がD2を通過する。PMTの信号は個々のフォトンを検出しコンピュータにより解析される。実際のFRAP測定はx40の対物レンズを用い、試料溶液の蛍光強度を記録した後Sr2を電気的に開くことにより6-600msecの間10^4倍の強いブリーチ光に曝したあとの蛍光の戻りを経時的に記録した。蛍光の回復の時定数($t_{1/2}$)から拡散定数(D)を　$D = w^2 / 4 t_{1/2}$の式により計算した。

（結果）

Co-pelleting法　NF200Pをマイクロチュブルと混合し37°Cにて30分インキュベイトした後遠沈し、ペレット中にNF200Pが含まれるかどうかを調べた所、NF200Pがペレットにマイクロチュブルと共に沈澱することが認められた。

Overlay法　ヨード化NF200Pをマイクロチュブル蛋白をブロットしたニトロセルロース膜とインキュベイトし、オートラジオグラフィーによりNF200Pがどのマイクロチュブル構成蛋白と結合するかどうかを調べると、NF200PはMAPsとは結合せずtubulinと結合していた。

Fluorescence Recovery After Photobleaching(FRAP)法

FITC-labeled Polylysineを用いたマイクロチュブルの重合　PolyLysine溶液のFRAPデータは図２に示すように早い拡散を示すが、重合したマイクロチュブル線維を加えるとその移動度は極端に遅くなる(図３)。これはPolyLysineがマイクロチュブルに結合しその分子運動の早さが制限されるためである。またD値の延長と同時に回復率も低下するが、これはPolyLysineによりマイクロチュブル線維間に架橋形成が起こり、メッシュ構造を生じているものと考えられる。

NF200Pとマイクロチュブルの相互作用　TRIC-NF200P溶液(1mg/ml)のマイクロチュブル重合緩衝液(0.1MMES/1mMEGTA/1mMMgSO4/1mMGTP/pH6.9)中でのFRAPデータは早い分子運動を示すが、マイクロチュブル(2.5mg/ml)とTRIC-NF200Pとを混合し37°Cにて30分インキュベイトした後のFRAPデータは明らかにTRIC-NF200Pの分子運動の遅延を示していた（４B,D)。重合させたマイクロチュブルを再び0°Cにて20分冷却しマイク

ロチュブルが完全に脱重合した後でFRAPを測定するとTRIC-NF200Pの動きは早くなっていた(図4)。同様の実験をfluorescein-5-maleimideにてラベルしたNF200P(Fl-NF200P)を用いて行ったが、FRAPの結果はNF-200Pとマイクロチュブル線維の結合を示していた。

NF200Pとマイクロチュブルの結合に対するリン酸化の影響　NF200P及びalkaline phosphataseにて処理した脱リン酸化したNF200Pを蛍光ラベルしたものとをFRAPにて検討したが、両者に差異を認めなかった。(図4 E,F)

(考察)

ニューロフィラメントとマイクロチュブルなど他の細胞骨格蛋白との相互作用についてはこれまでも報告があり(2)、生体の中で各々の細胞骨格蛋白はお互いに影響を及ぼし合って役割を果たしているものと考えられる。今回はニューロフィラメント蛋白の内でも最もリン酸化を受け易くしかも線維の外側に位置していると考えられているNF200Pについて主にFRAP法を用いて検討した。精製したNF200Pがマイクロチュブルと共に沈澱することを示し、更にオートラジオグラフィーによりNF200Pは、マイクロチュブル構成蛋白の内チュブリンと結合する事を示した。更にFRAP法によりチュブリンと結合することが知られているPolyLysineを蛍光ラベルしたものを使用し、FRAP法により蛋白とマイクロチュブルの結合の検討が可能であることを示した後、NF200PがFRAP法でもマイクロチュブルとの結合を示す事を報告した。NF200Pは生体内でリン酸化されていることが示されており、また病的状態ではニューロフィラメント蛋白が異常にリン酸化されているとの報告がある(5)。今回FRAP法により脱リン酸化したNF200Pを用いてマイクロチュブルとの結合がリン酸化により変化を受けるかどうかを調べてみたが、脱リン酸化したNF200Pもほぼ同じようなD値を示し、差異を検出する事は出来なかった。今回の知見は、生体ニューロン内においても蛍光ラベルしたニューロフィラメントサブユニットを注入し、FRAP法により細胞骨格蛋白との相互作用を検討が可能である事を示している。

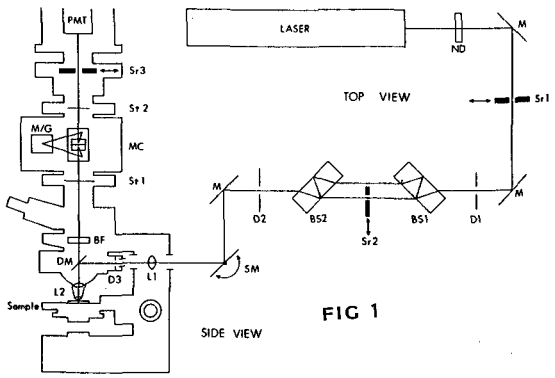
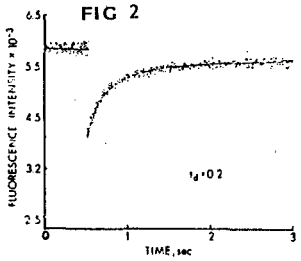
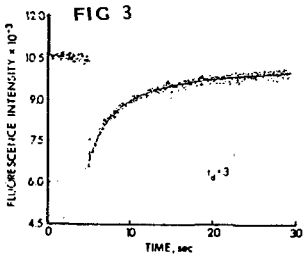
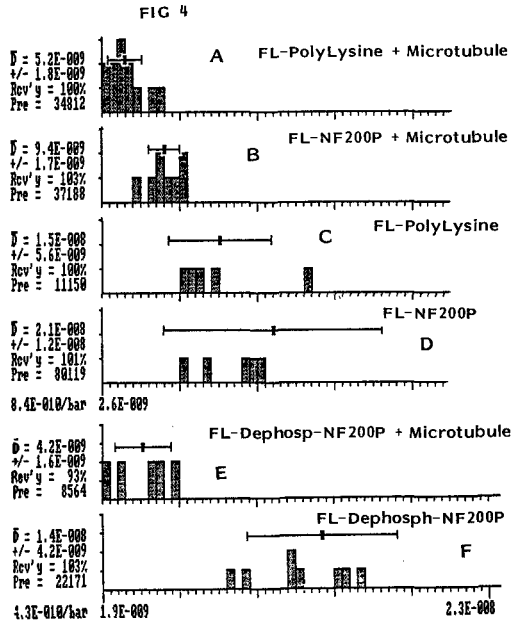


FIG 1







(文献)

1) Arakawa T., Frieden C.(1984) J Biol Chem,259,11730-34

2) Minami Y., Murofishi H., Sakai H.(1982) J Biochem,92,889-98

3) Nixon R.A., Lewis S.E.(1986) J Biol Chem,261,16298-301

4) Scott D.,Smith K.E.,O'Brien B.J.et al(1985) J Biol Chem, 260,10736-47

5) Sternberger N.H.,Sternberger L.A.,Ulrich J.(1985) Pro Nat Acad Sci,82,4274-76

6) Taylor D.L.,Wang Y.(1978) Pro Nat Acad Sci,75,857-61

7) Williams R.C.Jr.,Lee J.C.(1982) Methods in Enzymol,85,376-85

82. ニューロフィラメント重合のダイナミックスについて
—螢光標識を用いた重合度の経時的測定法—

武田雅俊・Angelides K.J.*・中村祐・工藤喬・
多田國利・橘口之朗・西村健
（大阪大・医・精神，ベイラー医大・生理*）

〔要　約〕

ニューロフィラメント線維の動態を調べる目的でin vitroでの68Kサブユニット蛋白重合のダイナミックスを蛍光標識を用いて検討した。68K蛋白のCys残基を蛍光ラベルし、蛍光クェンチングの変化からニューロフィラメントの脱重合・サブユニット交換のキネティックスを測定した。ニューロフィラメント線維はそのサブユニットを互いに交換しており、以前考えられていたよりもダイナミックな性質を持つことが明らかになった。ニューロフィラメントの見かけ上の重合臨界濃度は40ug/mlであり、重合は温度依存性であるが、他のコファクターを必要としない。またbiotinにてラベルした68Kサブユニット蛋白を重合させ電顕にてavidinと結合した金コロイド粒子の分布を調べたところ、サブユニットの交換はフィラメント全体にわたりランダムに起こっていた。以上の結果から、ニューロフィラメント蛋白も他の細胞骨格蛋白と同様、重合していない蛋白のプールが存在しており、このプールと重合状態との間に平衡を生じているものと考えられる。

Key word：　neurofilament , fluorescence labeling , dynamics

チュブリンやアクチンと異なり中間径フィラメントの重合度の経時的測定は未だなされていない。中間径フィラメントの中でもニューロフィラメントは特に安定なものと考えられており、ダイナミックな状態で存在するのではなく合成されたニューロフィラメント蛋白は代謝を受けることなく軸索流によりシナプス部位まで搬送された後Ca依存性プロテアーゼにより分解されると考える人も多い(1)。本報告ではニューロフィラメント線維の中核を成すと考えられている68Kサブユニット蛋白（NF68P）を蛍光標識し、蛍光強度の経時変化の測定によりニューロフィラメント線維の重合度の推定が可能である事を報告したい。知られている一次構造によればNF68Pは321番目に唯一つのCysを有する(2)。従ってSH基を修飾するfluorescein, coumarin, tetramethylrhodamineなどの蛍光色素及びbiotin のmaleimide誘導体で NF68Pをラベルし、その蛍光分光学的及び電顕学的検討からニューロフィラメントのダイナミックスを検討した。

（方法）

蛍光標識したNF68Pの精製　牛脊髄から精製した軸索蛋白粗分画を尿素で可溶化しHydrpxylapatiteのバッチ法によりニューロフィラメント蛋白を更にDE52及びHydrpxylapatiteのクロマトによりNF68Pを精製した(3)。150mMリン酸/8M尿素バッファー(pH7.4)中のNF68P蛋白(1.5-4.0mg/ml)にdimethylsulfoxide溶液中の蛍光色素(fluorescein-5-maleimide,3-(4-maleimidylphenyl) 7-diethylamino-4-methylcoumarin,tetramethylrhodamine maleimide)或はbiotin-maleimideを10倍量の分子比となるように加え、室温で２時間遮光インキュベイトした。 dithiothreitol(1mM)を加え反応を停止した後、重合バッファー(0.1MMES/0.17MMaCl/pH6.5)に対して37°Cで一晩透析し、Bio-Gel A1.5mカラムを通しラベルされた蛋白を精製した。

蛍光エネルギー共鳴に基づいたサブユニット置換の定量法

a) Fluoresceinのself-quenchingを用いる方法　Fluoresceinでラベルした NF68Pを過量の非ラベルNF68Pと混ぜ37°C下での蛍光強度の変化を測定した。蛍光測定は、495nmの励起光にて520nmの蛍光強度を37°

Cに温度を保持した容量150ulのキュベット(0.3x0.3cm)を用いIBM-XTと接続したSLM8000蛍光分光計で測定した。経時変化はGuggenheim法により解析し、置換率は、{(Feq-Fi)/(F*-Fi)} x100により計算した。
Feq＝平衡状態の最終蛍光強度、Fi＝混合直後の蛍光強度、F*＝完全に分離した状態での蛍光強度であり、このF*は重合した線維を1%SDS或はプロテアーゼカクテルで処理した後の蛍光強度から求めた。

b) Donor-Acceptorペアを用いる方法　　Fluoresceinで標識したNF68Pからなるニューロフィラメントとcoumarinで標識したNF68Pからなるニューロフィラメントとを混ぜ合わせた後、520nmでのfluoresceinによる蛍光と、470nmでのcoumarin蛍光の変化を同時に測定した。置換率は、置換率={(Fi-Feq)/(Fi-F*)}x100
の式から算出し、　　Fi=混合直後の蛍光、Feq=混合後約一時間の平衡状態の蛍光、　F*=coumarinラベルとfluoresceinラベルとを１：１に混ぜた物を、8M尿素で可溶化した後再度重合させる事によって得た完全にランダムな共重合体の測定値を使用した。

電顕によるサブユニット置換実験　　ビオチンで標識したNF68Pを過量の非ラベルNF68Pと混ぜインキュベイトした後、1% glutar aldehydeを含む重合液で二分間固定し、150メッシュの炭素でコートしたFormvarのグリッドに乗せた後、アビジンを結合した金コロイド溶液を加えた(5)。緩衝液で十分洗った後、2%uranyl acetateによるネガティブ染色をしPhillips301電顕にて観察した。

（結果）

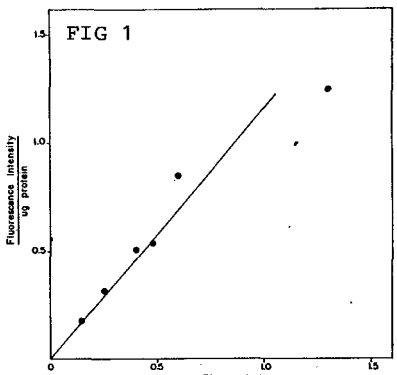
蛍光・ビオチンで修飾したNF68Pの性質　　NF68P中の唯一つのCys残基(321番)のSH基を標識するためにmaleimide誘導体を用いて蛍光標識した。この標識反応は特異的であり、1mM N-ethylmaleimide での前処理で反応は完全に阻害された。蛍光色素とNF68Pとのモル比は8M尿素中での標識ではほぼ１：１であったが、重合後の線維維状態での標識反応では0.25を越えることはなかった。従って、線維状構造物となることにより一部分のSH基が保護されるものと考えられる。ラベルしたNF68Pからなる線維の電顕写真は、修飾しないサブユニットからなる線維と形状・長さいずれも区別できなかった。また、ラベルしたNF68Pを非ラベルNF68Pと種々の比率で混ぜたものを重合させ、遠沈によりニューロフィラメント線維を集め、その蛍光強度を測定すると図１に示すようにラベルしたサブユニットの比率の増加に伴い蛍光強度は上昇した。また、biotinでラベルしたNF68Pを種々の比率で非ラベルNF68Pと混ぜて重合したものを電顕観察すると、金粒子はニューロフィラメント全体に渡りランダムに分布していた（図２）。以上の結果から蛍光色素及びビオチンで修飾したNF68Pは正常NF68Pとその重合に関する性質は共通であると判定した。

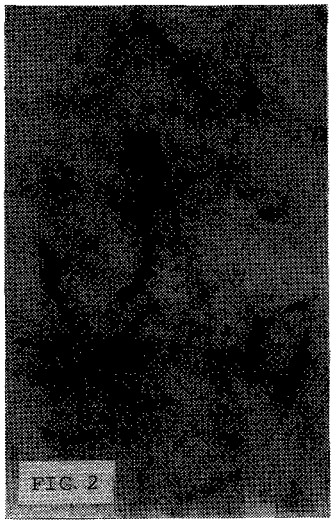
ラベルしたNF68Pの分光学的性質　fluorescein-NF68P, coumarin-NF68P, rhodamine-NF68Pの最大吸光・最大蛍光波長は、各々495nm/520nm、385nm/495nm、565nm/580nmであり、quantum yieldは、各々0.33、0.24、0.25であった。図３に示すようにfluorescein-NF68Pの吸光とcoumarin-NF68Pの蛍光、fluorescein-NF68Pの吸光と蛍光、fluorescein-NF68Pの蛍光とrhodamine-NF68Pの吸光のスペクトラムが重なり合っている。

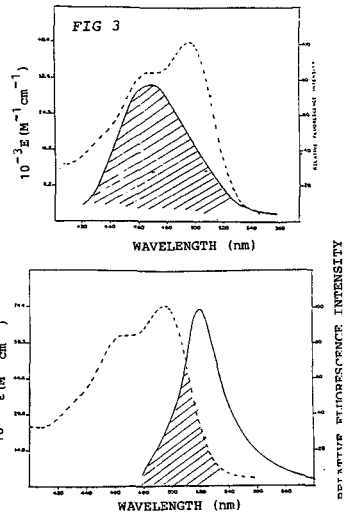
サブユニットの交換　　fluorescein-NF68Pを非ラベルNF68Pと混合した後の蛍光強度は、図４に示すように次第に増加しfluoreseinのquenchingの解除が認められた。次にfluorescein-NF68Pからなる線維とcoumarin-NF68Pからなる線維とを混合すると、fluoresceinの蛍光増加とcoumarinの蛍光減少が観察された(図５)。以上の結果からサブユニット交換の特徴として、１）交換速度は温度依存性であり、37°C、30°C、22°Cでの$t_{1/2}$は各々２分、１２分、１２０分であった。２）交換速度は蛋白濃度0.05-0.74mg/mlの間でラベル比が1:10から1:100の間では一定であり、ラベル比が1:1に近づくと速度は有意に上昇した。３）交換の程度は総蛋白量により変化を示し、濃度が低下するに従い交換率は上昇した。この外挿から交換の臨界濃度を0.04mg/mlと推定した。４）このNF68P交換のキネティクスは210Kや160Kサブユニットの有無には無関係であった。調べた限りでは、緩衝液の種類・pH・塩濃度・コファクターの有無など何れも影響を認めなかった。５）サブユニット交換の様式を知るためにbiotin-NF68Pを用いた電顕にて検討した所、図２に示すように金粒子はフィラメント全体に均一に分布していた。

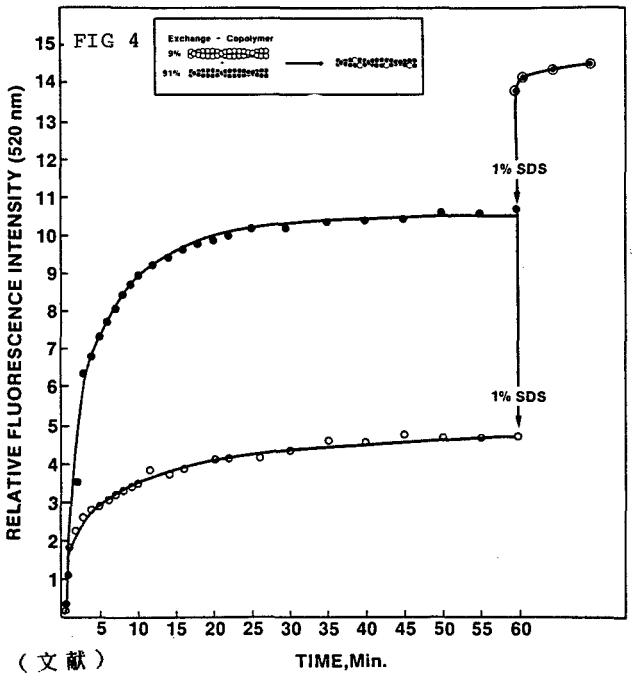
（考察）

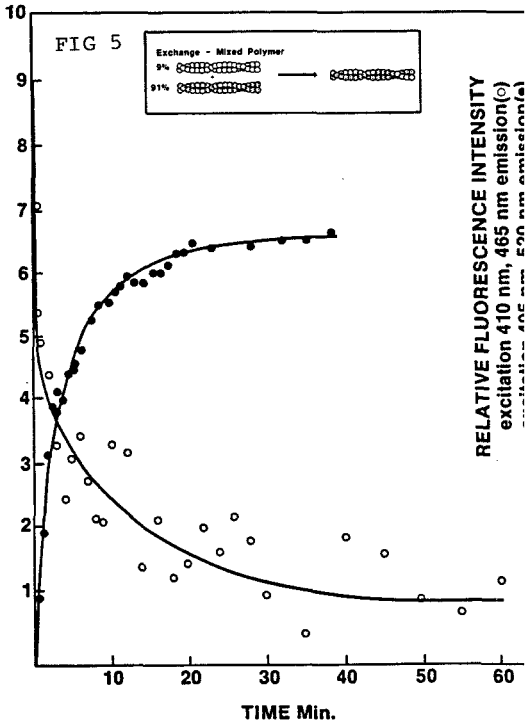
NF68Pの321番Cysを修飾した物は、フィラメントの形成に影響を与えずネィティブNF68Pと同様の性質を示す。蛍光標識したNF68Pを用いたin vitroのサブユニット交換実験の結果は、以前からの想定と異なりサブユニットのプールからフィラメントが形成されている事を推察させる。このNF68Pの重合の臨界蛋白濃度は0.04mg/ml(0.6microM)であり、マイクロチュブルやアクチンと比較するとかなり低い。この事実がニューロフィラメントの安定性を説明するものと考えられる。電顕観察の結果からサブユニットの交換はフィラメント全体にわたりランダムに交換が起こっているものと考えられる。老年痴呆など病的状態でのニューロフィラメントの異常が言われており(4)、今回示したニューロフィラメント蛋白のダイナミックスが病的状態では変化するものかどうか神経細胞内への注入実験により引き続き研究を進めたい。











（文献）

1)Lasek R.J.(1981) Neurosci Res Prog Bull,19,7-31

2)Lewis S.,Cowan J.(1985) J Cell Biol,100,843-850

3)Scott D.,Smith K.E.,O'Brien R.J.et al.(1985) J Biol Chem,260,10736-10747

4)武田,多田, 播口, 西村(1984)神経化学23,180-182

5)Tschopp J.,Podack E.R.,Muller-Ebenhard(1982) Pro Nat Acad Sci,79,7474-7478

83. ニューロフィラメント輸送に対するβ, β'ーイミノジプロピオニトリル（IDPN）の作用様式

小宮義璋　（東京大・医・脳研・生化）

〔要　約〕

β，β'-イミノジプロピオニトリル(IDPN)の作用機構を解明する目的で，ラット坐骨神経運動繊維の軸索内蛋白を[^{35}S]-メチオニン或は[^{32}P]-オルト燐酸(^{32}Pi)で標識し，その軸索内輸送に対するIDPNの効果を長期にわたって調べ，以下の結果を得た。

1. IDPNはニューロフィラメント(NF)輸送のみを特異的に阻害し，チューブリンやアクチンの輸送には殆ど影響を与えない。その阻害様式は投与初期に短い輸送の停止期間があり，その後は対照の約½の遅い速度ながら輸送が継続される。
2. IDPNには1g/kg 体重付近に作用の閾値があり，投与量を3g/kg 体重迄増加してもその作用は変わらない。しかし輸送の停止している期間中に二回目以降の投与がなされると，その投与量が閾値以下でも効果の加算が認められる。
3. 閾値以上のIDPNを一回投与後８ヶ月経っても神経症状の回復は見られないが，NFの輸送速度は投与後約６週間で対照と同程度に回復する。
4. ^{32}PiでNFを標識すると通常の速度より速く移動する部分が見出される。この部分はIDPNによって阻害を受けない。通常の速度で輸送される部分も^{32}Piで標識した場合には^{35}S-メチオニンで標識した場合に比べてIDPNの阻害を受けにくい。

Key word： β,β'-Iminodipropionitrile(IDPN), Neurofilament, Axonal Transport.

β，β'-イミノジプロピオニトリル(IDPN)は各種の動物に2g/kg 体重程度の投与量を１回腹腔内注射するだけで，数日以内に多動を主徴とする特徴的な神経症状を発現する薬物として知られている(1,2)。IDPN による神経学的な異常には回復が殆ど見られず，１年間或はそれ以上にわたって持続する(1)。組織学的な検索では軸索の起始部における腫大とニューロフィラメント(NF)様構造物の蓄積が特徴的である(1,2)。これらの所見から軸索内輸送の，特にNF輸送の異常が疑われてきた(1)が，実際遅い軸索内輸送の阻害がおこる事がその後報告された(3)。筆者はここ数年にわたってIDPNの効果が強くあらわれるラットの坐骨神経運動繊維の系を用いて，その作用機序につき軸索内輸送の面から検討を加えてきた(4,5)のでまとめて報告をする。

〈材料と方法〉

1. 実験動物：ウィスター系SPF 雄ラット，４或は７週齢（長期にわたる，或は投与量の多い実験には主として４週齢）を用いた。
2. IDPNの調整と投与：IDPN(Eastman Kodak) は3g/ml の濃度になる様に生理的食塩水に溶かし，塩酸で中和したのち腹腔内に注射した。
3. 軸索内蛋白の標識と軸索内輸送の分析：エーテル麻酔下に第３～５腰髄部を露出し，その両側前角部に[^{35}S]-メチオニン或は[^{32}P]-オルト燐酸(^{32}Pi,いずれもNew England Nuclear)を全量で50μCi（片側0.2 μl x2）を注入した。標識５週間後に腰髄前角部，前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 電気泳動及びフルオログラフィーにより分析した。

〈結果と考察〉

1.IDPNのNF輸送に対する阻害効果：IDPN(1.5g/kg体重）を7週齢ラットに1回腹腔内注射した場合の時間経過を図1に示す。投与後3～4日で神経症状が出現し，最長観察期間である8ヶ月後でも回復は認められなかった。標識5週間後の軸索内輸送蛋白を分析して見ると，遅い軸索内輸送を構成する蛋白のうちNF蛋白の輸送のみが阻害されていた。IDPNによる阻害はNF輸送の完全な停止ではなく，正常の約½の遅い速度ではあるが輸送は継続されている。しかし投与直後の短い期間は（4日よりはやや長く1週間よりはやや短い程度）完全に停止するらしい。

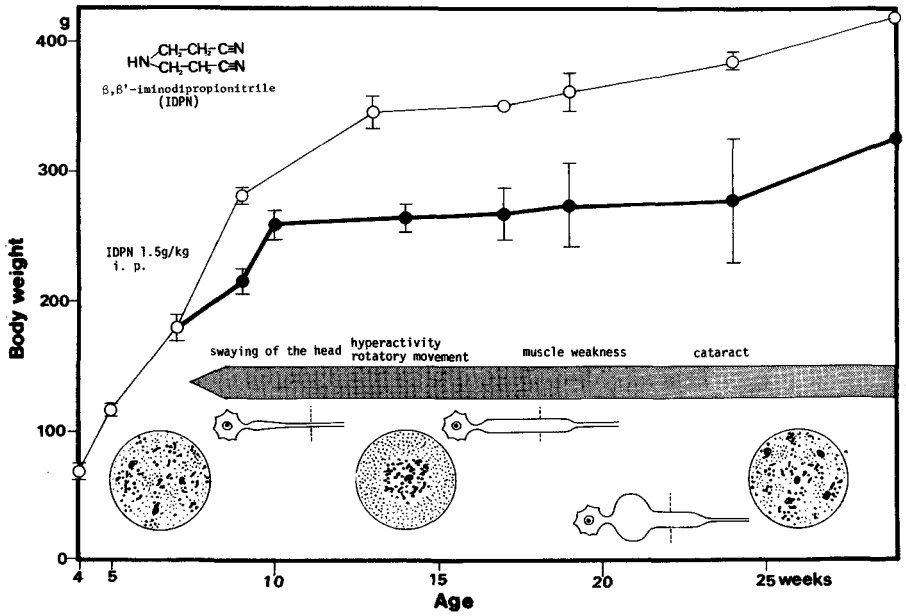


図1．IDPN投与後の体重，神経症状及び組織学的変化の時間経過。7週齢ラットに1.5g/kgを1回腹腔内注射した場合を示す。

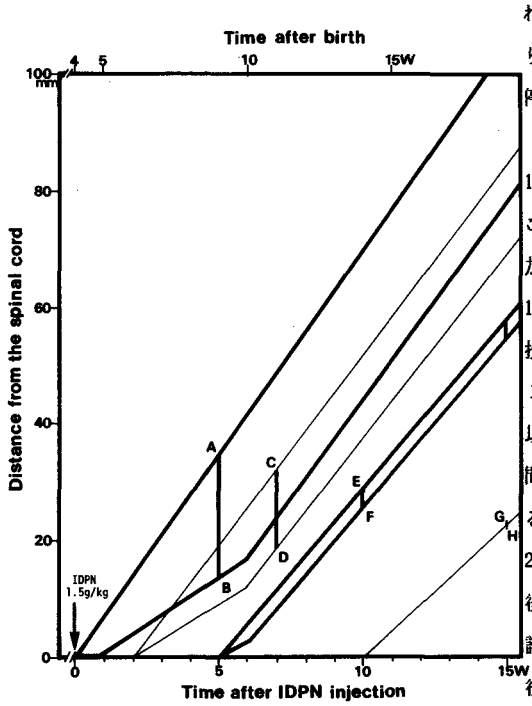


図2．IDPNによるNF輸送の阻害と回復（模式図）。IDPN投与直後，2,5,10週後に標識したNF蛋白の動きを表わす。AB,CD,EF,GHは標識5週後の対照神経との差を示す。

IDPNの投与量を変えてその効果をみたところ1.0g/kg体重付近に閾値のあることを見出した。これ以上3.0g/kgまで投与量を増やしても効果は加算されない。しかし総量は2.0g/kgでもこれを1.0+0.5+0.5g/kgの3回に分割して投与すると，投与間隔が4日の時は効果の加算が認められるが1週間の時には認められない。この結果は二回目以降の投与量が閾値以下でもNF輸送の完全停止期間中にその投与がなされると効果の加算が見られるものと解釈される。

2.IDPNによるNF輸送阻害の回復：IDPNの投与直後，1，2，3，5，10及び15週後に軸索内蛋白を標識して5週後にNF輸送を調べてみると，投与5週後に標識した場合にはまだ阻害が見られるが，10

週後ではもはや対照と区別がつかない。また投与1週間後に標識した場合と2週間後に標識した場合との比較から，投与6週間後にNF輸送の回復が始まると推定される。更に投与直後に標識した場合と1週間後に標識した場合とでも阻害の程度に差が認められることから，投与直後に1週間よりはやや短い輸送の停止期間が示唆される。

この様にIDPNによるNF輸送の阻害は，投与の6週間後には回復するのに，神経症状の回復は8ヶ月経っても認められない。これは神経症状の発現に関与しているニューロンが脊髄前角ニューロンに比べてIDPNに対する感受性が高く，その障害から回復できないためか，或はNF輸送の異常は組織学的変化の原因とはなっても，神経症状の発現には関与していないためと考えられる。

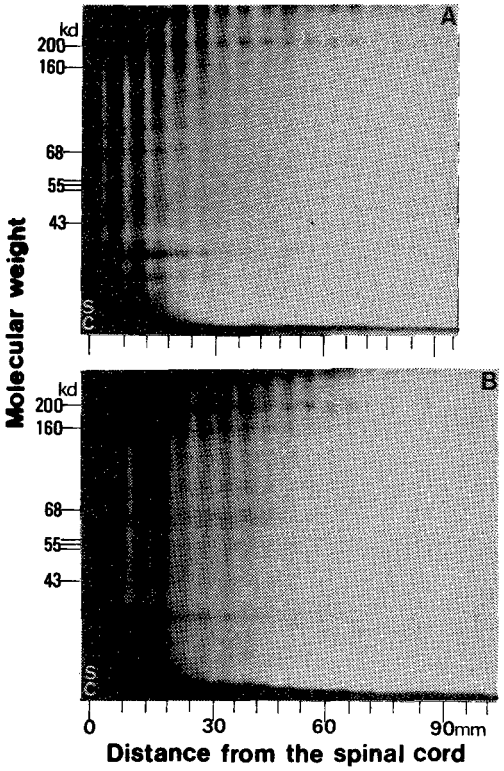


図3．^{32}Piで標識したNF蛋白輸送に対するIDPNの効果。 ^{32}Piで標識した直後にIDPN 1.5g/kg腹腔内投与。A:投与神経，B:対照。

3.^{32}Piで標識したNF蛋白の輸送に対するIDPNの効果：軸索内のNFは燐酸化されていることが知られている(6)。そこで^{32}Piを脊髄前角部に注入して標識し，NFの軸索内輸送を見ると，通常の輸送速度よりはずっと速く輸送される部分が見出される。この部分が実際に移動しているmoving phaseに相当するのではないかという考えを昨年の本学会で提出した(7)。この速く移動する部分に対してはIDPNの阻害効果が全く認められない（図3）。さらに^{32}Piで標識した場合には^{35}S-メチオニンで標識した時に比べて通常のスピードで輸送されるNFに対するIDPNの阻害効果がかなり弱いことが観察される。IDPNの投与により軸索内ではNFが周辺部に，微小管，ミトコンドリア及び小胞体等が中心部へと分布を変えるいわゆる解離現象が見られる(8)。この所見からNF輸送に対するIDPNの阻害機構としては，Hexacarbon neuropathy の際に想定されているような共有化合物の生成よりは，解離に起因するNFと微小管との相互作用の障害を考えた方がよいのではなかろうか。そしてmoving phaseとしての脱重合したNF蛋白が微小管をベースとした機構で輸送されるという我々の仮説から考えると，IDPNの作用はNFの重合した部分(stationary phase)と脱重合した部分(moving phase)との相互変換の障害とも考える事ができる。この点に関して現在検討を加えつつある。

〈参考文献〉

1.Chou,S.M. & Hartman,H.A.(1964) *Acta Neuropathol.*3,428-450. 2.Chou,S.M. & Hartman,H.A.(1965) *Acta Neuropathol.*4,590-603. 3.Griffin,J.W. et.al.(1978) *Science* 202,633-635. 4.Komiya,Y. et al.(1986) *J. Biochem.*100,1241-1246. 5.Komiya,Y. et al.(1987) *J. Biochem.*102 in press. 6.Sternberger,L.A. & Sternberger,N.H.(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80,6126-6130. 7.小宮義璋，田代朋子(1986)神経化学25, 580-582. 8.Papasozomenos,S.Ch. et al.(1981) *J. Cell Biol.*91,866-871.

84. チューブリンの軸索内輸送機構—重合・脱重合平衡と安定型微小管

田代朋子・小宮義璋・黒川正則

（東京大・医・脳研・生化）

〔要　約〕

1．ラット坐骨神経（知覚繊維及び運動繊維）または迷走神経（運動繊維）の各系を用いて、遅い軸索内輸送で運ばれる細胞骨格蛋白を L-[^{35}S]メチオニン標識し、その特徴を調べた。一般の細胞質微小管と異り、坐骨神経では36-48%、迷走神経では68% の軸索チューブリンが低温不溶性である。低温不溶性チューブリンは、カルシウム、コルヒチン、ノコダゾール等の微小管脱重合条件下でも可溶化されず、特殊な安定化型をとっていると考えられる。

2．低温不溶性チューブリンも可溶性チューブリンもともに一定速度で末梢側に輸送されている。

3．微小管安定化作用をもつTaxol を軸索部に局所的に作用させると、チューブリンの輸送を選択的に阻害し、投与部位の近位端にチューブリンの蓄積が生じる。速い軸索内輸送は影響を受けない。

4．以上の結果から、チューブリンが軸索内輸送のレールとして機能するには安定な重合型で存在すれば充分であるが、チューブリン自体の輸送は、脱重合状態で行われると結論される。

Key word： axonal transport, tubulin, microtubule

神経細胞は、多数の突起をはじめその機能と密接に関連した特殊な形態を維持するために、最も分化した細胞骨格系を有している。なかでも軸索部には、終末部への高分子供給、終末部からの情報伝達などを担う軸索内輸送機構が発達しており、軸索微小管が膜顆粒輸送（速い輸送）のレールとして機能していることが近年明らかにされつつある（9）。

軸索チューブリンの一部は、他の細胞質微小管と異なり、低温や薬物で脱重合しない特殊な安定化型をとる。細胞骨格蛋白の流れである遅い軸索内輸送（11）の解析及び微小管安定化剤 Taxol(6,8) の影響分析により、重合ー脱重合平衡状態にあるチューブリンと安定型チューブリンの相互関係を検討し、チューブリンが脱重合状態で輸送されると考えられる結果を得たので報告する。

＜方法＞

細胞骨格蛋白の軸索内輸送　：（A）ラット（7週令、雄）の第4腰髄（L_4）神経節に L-[^{35}S] メチオニン（Met*）30-40 μCi (0.2 μl)を注入し、坐骨神経知覚繊維内を輸送される蛋白を放射標識した。1週または2週後に、坐骨神経及びL_4神経節を摘出し、6mm の連続切片に切断して、その各々について低温Triton抽出を行なった。（B）脊髄前角L_3-L_5 にMet*を注入し、1-4 週後に坐骨神経運動繊維内を輸送される標識蛋白を得た。（C）延髄背側運動核にMet*を注入し、1-2 週後に迷走神経運動繊維内を輸送される標識蛋白を得た。

低温可溶性及び不溶性チューブリンの分別　：標識神経小片をエアー・ハンマーで凍

結破砕し、1% Triton X-100,50mM Tris(pH7.5),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。迷走神経の場合は、2M蔗糖を含む抽出液を等容加え、100,000g、2時間遠心して、低温可溶性分画と不溶性分画を得た。坐骨神経の場合は、ミエリンを大量に含むため、1M蔗糖－0.4M蔗糖から成る不連続密度勾配上にホモジェネートを重層して遠心し、上清の可溶性分画と沈渣の不溶性分画を得た。BioBeads SM-2 樹脂を用いて可溶性分画中のTritonを除去して凍結乾燥した。各分画中の標識蛋白をSDS ゲル電気泳動で分離した後、フルオログラフィーで検出するとともに、チューブリン及びニューロフィラメント(NF)蛋白の3種のサブユニットを各々切りだして、Soluene 350 で溶出して計測した。

神経鞘内へのTaxol の局所的投与：L_4神経節にMet^*注入後、4日、7日、10日目に、坐骨神経を大腿中央部で露出し、神経鞘内に1mM Taxol (10% DMSO 溶液)、0.2 μl×2を注入した。対照側には10% DMSOを同量注入した。Met^*注入 2週間後に坐骨神経及びL_4神経節を摘出した。

＜結果と考察＞

低温不溶性チューブリンと可溶性チューブリン：

坐骨神経の系では軸索内チューブリンの36-48%が低温不溶性である（表 1）。その一部はNFとの相互作用により安定化されていると考えられるが（12）、NFの比較的少い迷走神経の系で低温不溶性チューブリンが68% に及ぶことから、チューブリン自体に

	低温不溶性チューブリン／全チューブリン	NF-L／チューブリン
坐骨神経知覚繊維		
遅い成分	0.48	0.26
速い独立成分	0.36	0
坐骨神経運動繊維	0.41	0.14
迷走神経運動繊維	0.68	0.08

表 1. 全チューブリンに対する低温不溶性チューブリン及びNF-L(68K) の量比

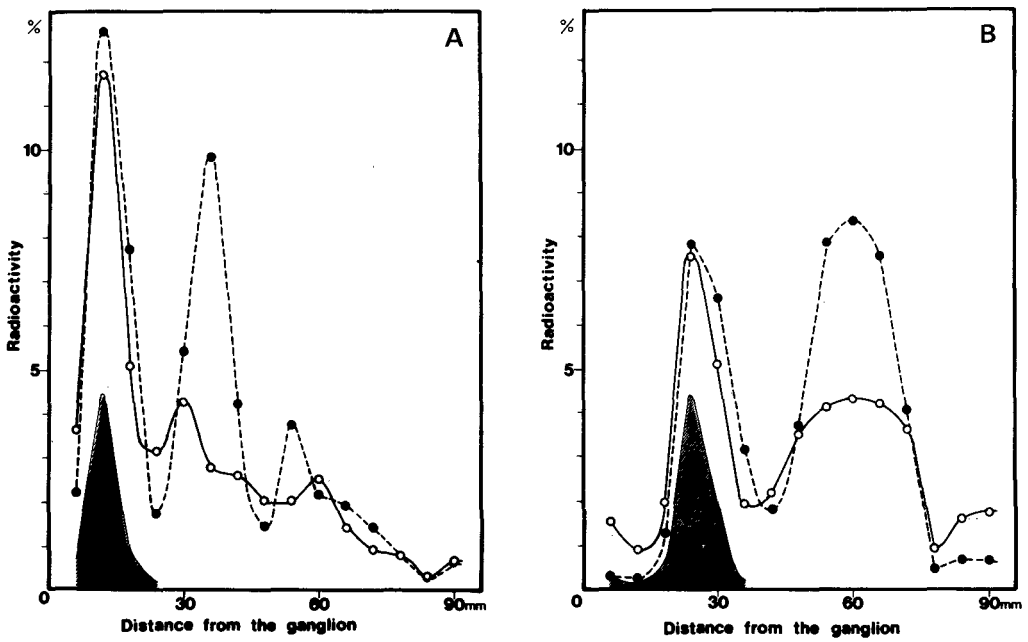


図 1．低温可溶性(----)及び不溶性(——)チューブリンの軸索内輸送：L_4神経節にMet^*を注入、1週(A) 及び 2週(B) 後に坐骨神経知覚繊維内を輸送されている標識蛋白を低温Triton可溶性及び不溶性分画に分別し、電気泳動分離して、チューブリンとNF蛋白サブユニットに含まれる放射能を計測した。斜線部はNF-L(68K) 。

安定化機構が存在すると思われる。不溶性チューブリンは、低温のみでなく、カルシウム（2mM）、コルヒチン（10μM）、ノコダゾール（10μM）等の微小管脱重合条件下でも可溶化されない。

坐骨神経知覚繊維の系を例にとると、チューブリン輸送には、図 1に示すようにNとともに移動する遅い成分とこれより速い独立成分がみられるが（12）、その何れにも低温不溶性と可溶性のチューブリンが混在する。不溶性チューブリンは遅い成分に多いが、両者とも一定速度で末梢側に輸送されていることは図より明らかである。

Taxol によるチューブリン輸送の阻害：

微小管を安定化し、重合促進作用をもつ植物アルカロイドTaxol は、in vivo で細胞質内に大量の微小管を出現させることが知られている（6,8）。坐骨神経知覚繊維の系で、細胞体部の存在する脊髄神経節にTaxol を与えた場合は影響がみられない。ところが、神経節から35-40mm の距離にある神経鞘内に局所的にTaxol を作用させると、図 2に示すようにチューブリンの輸送が選択的に阻害され、注入部位の近位端にチューブリンの蓄積が生じる。遅い輸送の成分中、アクチンは影響を受けていない。

同じ条件下で、膜成分の流れである速い輸送は阻害されず、in vitroにおける膜顆粒輸送の実験結果とも一致している（2）。このように、軸索内輸送のレールとして機能するには安定な微小管が存在すれば充分であるが、チューブリン自体が輸送されるためには脱重合状態をとりうることが必須である。

以上の結果から、チューブリンの輸送は脱重合状態で行われること、従って軸索内チューブリンの大きな部分を占める低温不溶性チューブリンは、何らかの機構で可溶化状態に変換されることが結論される。軸索部には他の部分と異る微小管附随蛋白の存在が知られている（1,7）。チューブリン自体についても、我々の記載した軸索固有のα－チューブリン・サブタイプをはじめ（10）、C 末端チロシン残基の有無（4,5）、アセチル化の有無（3）等、他の部位と異る修飾状態にある可能性が最近報告されている。このような軸索微小管の可逆的安定化機構の解明は神経系の形態形成に関しても重要な知見をあたえるものと期待される。

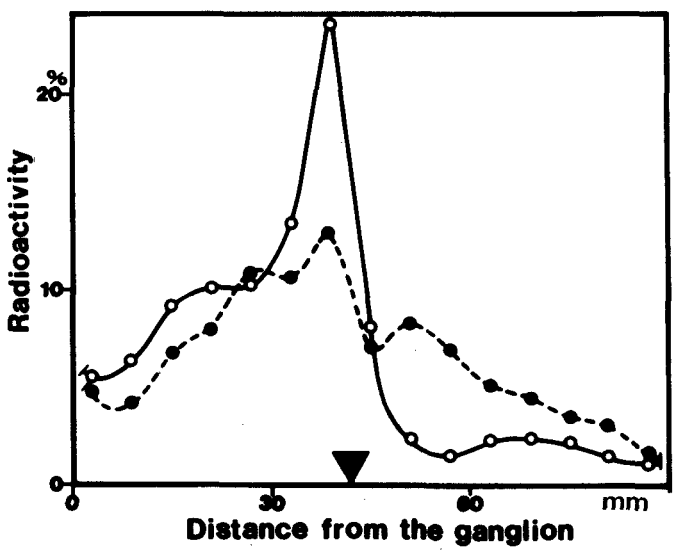


図 2. Taxol によるチューブリン輸送の阻害：L4神経節にMet^{+}注入2週間後に坐骨神経知覚繊維内を輸送されているチューブリンに含まれる放射活性。Met^{+}注入後、4日、2日、10日目に、大腿部坐骨神経を露出し、1mM Taxol を神経鞘内に注入した（——）。対照側（----）には10% DMSOを注入。▼：Taxol またはDMSO注入部位。

REFERENCES

(1)Black,M.M. et al. (1984) *Brain Res.,295,* 255 (2)Brady,S.T. et al. (1985) *Cell Motil.,5,* 81 (3)Cambray-Deakin,M.A. & Burgoyne,R.D. (1987) *J. Cell Biol., 104,* 1569 (4)Cumming,R. et al. (1984) *J. Cell Biol., 98,* 347 (5)Gundersen,G.G. (1986) *Eur. J. Cell Biol., 42,* 288 (6)Masurovsky,E.B. et al. (1983) *Neuroscience, 10,* 491 (7)Peng,I. et al. (1986) *J. Cell Biol., 102,* 252 (8)Röyttä,M. et al. (1984) *J. Neurocytol., 13,* 685 (9)Sheetz,M.P. et al. (1986) *J. Cell Sci. Suppl., 5,* 181 (10)Tashiro,T. & Komiya,Y. (1983) *Neuroscience, 9,* 943 (11)Tashiro,T. & Komiya,Y. (1987) in *Axonal Transport,* (Smith,R.S. & Bisby,M.A. eds.) 201, Alan Riss,inc., New York. (12)Tashiro,T. et al. (1984) *J. Neurochem., 43,* 1220

85. ラット大脳シナプス接合部画分中の微小管付随タンパク質の同定

鈴木龍雄・田中　亮・佐藤周子*
（名古屋市大・医・第一生化，愛知県がんセンター・放射線*）

〔要　約〕

ラット大脳から調製したシナプス接合部(synaptic junction,SJ)画分中に、微小管付随タンパク質1および2(microtubule-associated protein 1および2〔MAP1, MAP2〕)に対する抗体と反応するタンパク質を同定した。SDS-PAGEでMAP1,MAP2領域に泳動されるSJタンパク質を分子量の高いものからP1,P2,P3,P4とした。P1とP2は抗MAP1抗体と反応したが、ペプチドマップはMAP1a,bとMAP1cとは似ていなかった。P3は抗MAP1抗体、抗MAP2抗体のいずれとも反応しない。P4は抗MAP2抗体と反応し、ペプチッドマップもMAP2と似ていることからMAP2であると考えられた。P1,P2,P3,P4のSJ中の含量は高くないがシナプトソーム画分、シナプス膜画分中の含量と比較するとSJ中に高いので、SJあるいはpostsynaptic density(PSD)に局在していることが示唆された。P1,P2,P3,P4のうちSJの内因性のタンパクキナーゼでリン酸化されるのはP2であった。

Key word： synaptic junction, microtubule-associated proteins 1 and 2, immunoblotting

シナプス膜画分をTritonX-100処理することによりSJ画分(Cotman and Taylor, 1972)[4]、あるいはPSD画分(Cohen et al,1977)[2]、と呼ばれる画分が得られる。両画分はPSD構造に富んでいる[6]。PSDを構成するタンパク質として同定されているものは、細胞骨格タンパク質、細胞骨格関連タンパク質、神経伝達物質レセプター、イオンチャンネル、酵素などに分類される(Siekevitz,1985)[11]が、PSD中にはこれらの他に、多くの未同定タンパク質を含んでいる。今回は、微小管付随タンパク質1、および2、(MAP1,MAP2)に対する抗体を用いimmunoblotting法によりSJ画分中の高分子量タンパク質の同定を試みた。

［Ｍｅｔｈｏｄｓ］

SJ画分とSPM(synaptic plasma membrane)画分は、Wistarラット大脳からCotman and Taylor[4]の方法により調製した。Synaptosome画分は、WistarラットよりCotman and Mattews[3]の方法により調製した。微小管はWistarラットから2回の重合脱重合サイクルにより調製した。MAP1とMAP2に対するポリクロナール抗体、anti-(MAP1 & 2)は、ラットの高分子MAPsを含む画分を抗原としてウサギを免疫して得た[7,10]。MAP1およびMAP2に対するmonospecificな抗体は、anti-(MAP1 & 2)から、Girardらの方法[5]で調製した。SDS-PAGEは、Laemmliの方法[8]で4-15%ゲルを用いて行った。一次元ペプチドマップはRittenhouse and Marcus[9]の方法に基ずいて行った。リン酸化反応は0.1M MES-KOH(pH7.0), 5mM $MgCl_2$, 0.5mM DTT, 0.5mM[γ-^{32}P]ATPおよび .mM EGTAないし0.5mM $CaCl_2$+0.59μM calmodulin(CaM)を含む溶液中で、25℃で3分間行った。

［Ｒｅｓｕｌｔｓ］

SJ画分にはSDS-PAGEでMAP1およびMAP2と同程度の泳動度を示す高分子量タンパク質(P1,P2,P3,P4)が含まれる(Fig. 1a, lane 2)。P1,P2,P4はanti-(MAP1 & MAP2)抗体と反応したが、P3は反応しなかった。(Fig. 1b,lane 3)。さらにP1とP2はanti-MAP1抗体と反応し(Fig. 1b,lane 5),P4はanti-MAP2抗体と反応した。(Fig. 1b,lane 4)。一次抗体を加えないコントロールでは、バンドは検出されなかった。(Fig. 1b,lane 6)。P1,P2,P3,P4のペプチド組成をMAP1, MAP2のペプチド組成と比較した(Fig. 2)。MAP2aとMAP2bのペプチド組成はきわめてよく似ていた。P4タンパク質のペプチド組成はMAP2a,bのものとよく似ていたが、P1,P2, P3のペプチド組成は、MAP1a,b, MAP1c, MAP2a,bのいずれとも似ていなかった。

P1,P2,P3,P4のシナプス中の局在をSDS-PAGEおよびimmuno-blottingの方法で調べた(Fig.3)。調べた画分はsynaptosome,SPMおよびSJである。P1,P4タンパクはいずれの画分においても、微量成分である。P2,P3タンパクはsynaptosome,SPMでは微量成分であるが、SJ中には多く含まれていた。Immunoblottingの結果(Fig. 3-2)と考えあわせると、シナプス構造中ではP1,P2, P3,P4のいずれのタンパク質もSJに局在していることが明らかになった。

P1,P2,P3,P4タンパク質の、SJ中に内在するタンパクキナーゼによるリン酸化を調べると、Ca/CaM依存性、非依存性いずれのリン酸化の場合も、P2タンパク質がリン酸化されたが、P1,P3,P4タンパク質のリン酸化はほとんど検出されなかった(Fig. 4)。

［Ｄｉｓｃｕｓｓｉｏｎ］

1）P4タンパク質は抗MAP2抗体と反応し、ペプチドマップもMAP2と似ていたので、MAP2であろうと考えられた。P1,P2は抗原的にはMAP1と共通部分を持つが、構造的に

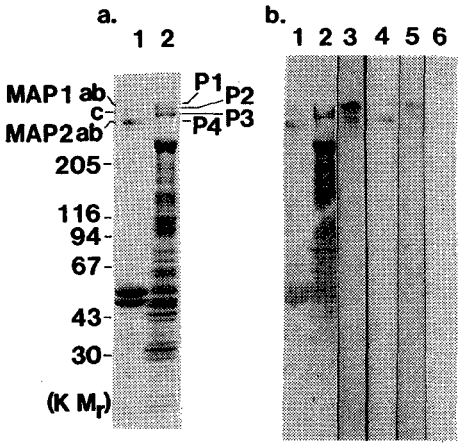


Fig. 1
Identification of MAP1- or MAP2-related protein in SJ
a. Protein stain 1. microtubule proteins 2. SJ
b. Immunoblots 1. microtubule 2.SJ 3-5. SJ protein reacted with anti-(MAP1 & MAP2)(3), anti-MAP2 (4),or anti- MAP1(5). 6. control

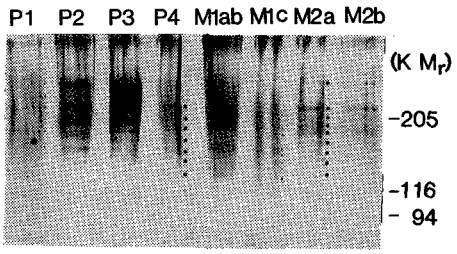


Fig. 2
Peptide Maps of high molecular weight proteins in SJ and MAP1 & MAP2

Gel pieces which contained electrophoretically separated proteins were cut and incubated at 110°C for 45 min in SDS-containing buffer.
Peptide fragments obtained were electrophoresed and visualized by a silver stain.

はMAP1と異なったタンパク質である。P3は抗原的にも構造的にもMAP1,MAP2とは異なるタンパク質である。

2)P1,P2,P3,P4のいずれのタンパク質も、シナプス構造中ではSJに局在していた。SJ画分はPSD構造に富んでいる[6]のでこれらのタンパク質は、シナプス前側ではなく、後側に局在することが考えられた。免疫組織化学的検索ではMAP2はある種のPSDに局在することが示されているので、今回のレポートは、その事実をimmunoblottingの手法で確かめたことになる。しかしSJ画分中のMAP2の量はきわめて少ないこと、また脳組織標本においてanti-MAP2抗体で染まるPSDと染まらないPSDとがある[1]ことから、MAP2は、ある種の限られたシナプスにのみ局在しているのかもしれない。

MAP1類縁タンパク質のシナプス構造中での局在を示したのは、このレポートが最初のものである。

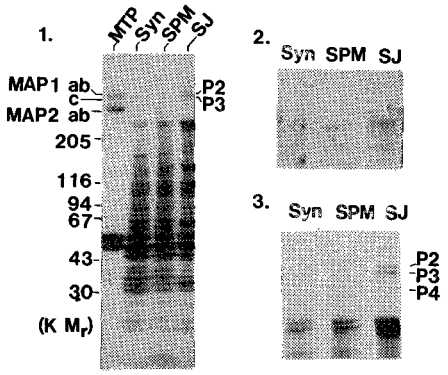


Fig. 3
Detection of MAP1- or MAP2- related proteins

1,3 Protein stain (3, magnified)
2 immunoblotting using anti-(MAP1 & MAP2)

3)一般にMAP2は、いろいろな種類のプロテインキナーゼのよい基質となる。また、MAP2はリン酸化されることにより、微小管重合に対する作用や他種の細胞骨格系タンパク質との相互作用が変化することが知られている。しかるに、シナプス中においては、大脳SJ画分中のMAP2として見る限り、リン酸化は非常に僅かでしかないので、MAP2のリン酸化がシナプス機能に何らかの形で関わっているとは考えにくい。むしろシナプス中ではMAP1類縁タンパク質、P2のリン酸化の方が何らかの作用を担っていることが考えられる。

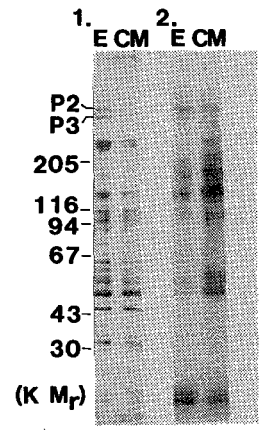


Fig.4
phosphorylation of SJ proteins

1.Protein stain 2. 32P Incorporation E,in the presence of EGTA. CM, in the presence of Ca^{2+} and CaM

[References]

1. Bernhardt R. and Matus A.(1984) J. Comp. Neurol. 226, 203-221
2. Cohen R. S., Blomberg F., Berzins K., and Siekevitz P. (1977) J. Cell Biol. 74,181-203
3. Cotman C.W. and Matthews D.A. (1971) Biochim. biophys. Acta 249, 380-394
4. Cotman C.W. and Taylor D. (1972) J. Cell Biol. 55,696-711
5. Girard P.R., Mazzei G.J., Wood J.G., and Kuo J.F.(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3030-3034
6. Gurd J. W.(1982) In Molecular Approaches to Neurobiology Academic Press, pp. 93-130
7. Kobayashi T.(1982) Academic Press Inc. Tokyo,NeW York.23-31
8. Laemmli U.K.(1970) Nature 227, 680-685
9. Rittenhouse J. and Marcus F.(1984) Anal. Biochem. 138, 442-448
10. Sato C., Nishizawa K.,Nakayama T.,and Kobayashi T. (1985) J. Cell Biol. 100, 748-753
11. Siekevitz P. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,3494-3498

86. 培養中枢ニューロンの凍結保存

飯島敏夫・松本　元・津久井弘子*・
畠中　寛*　（電子技術総研，三菱化成生命研*）

〔要　約〕

培養中枢ニューロンの凍結保存はこれまで無理あるいは極めて困難と考えられてきた。我々は中枢ニューロンをより扱い易い実験材料とする可能性を求め、凍結保存の可能性を探った。ラット胎仔（20日胚）より切り出した海馬を酵素処理により単離し、10%DMSOを含む準胎児血清中で凍結保存した。再び常温に戻した細胞（グリア・ニューロン等混合）の生存率はおよそ40%であった。コラーゲンコートした培養皿にまいた細胞は24時間後にはニューロン様、或はグリア様へと大きな形態変化した。ニューロン様形態の細胞の興奮性を調べると、殆んどの細胞は膜電位をおよそ－40 mVに脱分極させることにより明瞭なaction potentialを発生し、ニューロンであることが裏付けられた。凍結操作なしの海馬の初代培養細胞（コントロール）ではおよそ50%にアセチルコリンリセプターが、又、グルタミン酸リセプターはほぼ100%存在することがFura 2を用いた細胞内Caイオン濃度変化の測定から分かっているが凍結操作したこれらニューロンについて同様の検定を行うとコントロールと殆ど変わらぬ割合で各々の応答が見られ、凍結操作を経てもリセプターの機能は保たれていることが示された。

Key word：Rat Hippocampal Neurons, Storage, Excitability

初代培養した中枢ニューロンを対象に生理学的実験を行う場合、一つの大きな不都合さは、ニューロンの生存期間という時間的制約であろう。又、一定期間毎に初代培養を繰り返し実験材料を得ている場合にも、わずかな操作の差が標本のバラツキに結び付かぬ保証はない。もしニューロンの凍結保存が可能となればこの様な問題は解決される。さらに、凍結保存標本を遠隔の研究室に移し、そこで追試実験する、あるいは新たな研究の展開、ということが可能となろう。中枢神経系研究の重要性がますます認識される中で、ニューロンの凍結保存法の確立は神経研究に大いに貢献すると思われ、又、方法確立の過程そのものが、ニューロンの特性を探ることとなろう。以上の観点から我々は、中枢ニューロンの凍結保存の可能性を追求した。

［方法］

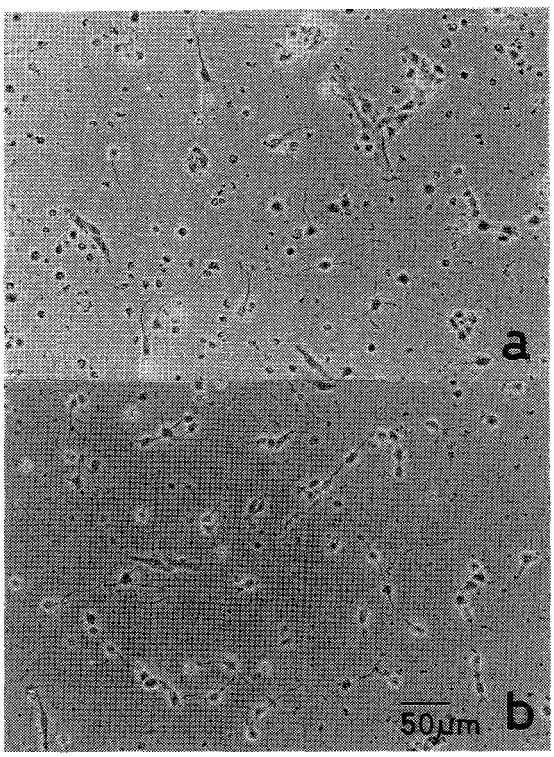
ラット海馬細胞の調製はHatanakaらの方法（1987）で行った。胎仔（20日胚）脳より切り出した海馬をメスにより細断し、PAPAIN（22 u／mg,28mg／ml,Cooper Biochem）およびDNase I（2mg／ml,Sigma）を含むCa^{2+}・Mg^{2+}free phosphate buffer saline（CMF-PBS）液に入れ、15min,37℃，200rpmで振とうする。消化液交換後、再度、同条件で振とうした。5%準胎仔血清、5%非動化馬血清、1%非動化ラット血清、89%DF培地（DME／F12,1:1）（以下5.5.1 DF培地と呼ぶ）中でピペッティングにより細胞を分散させた。回収した細胞の一部は10%DMSOを含む血清に懸濁し分注して凍結した凍結は発泡スチロール性の容器を用い－80℃迄ゆっくりと一日かけて温度を下げ、その後液体窒素に移した。細胞を戻す時は凍結した細胞を速やかに融解し、遠心でDMSOを除いた後、先の5.5.1 DF培地に懸濁し特製dishにまき培養した。このdishは35

mm plastic dish 底に丸穴（φ:8mm）を開け、cover glass を裏から貼りつけたもので、dish 内側の cover glass 円形部分にコラーゲンコートが施されている。この dish により細胞への電気生理学的、光学的アプローチが可能となる。残りの細胞群はコントロールとして細胞数計測後、同様の dish にまき培養した。

〔結果及び考察〕

酵素処理により分散した細胞は球形で、培養皿にまいた直後はニューロンか否か判定できない。しかし培養開始後3時間もすると後にニューロン様形態をとる細胞からは dendrite らしきものの突出が認められるようになる。図1 a は培養開始24時間後の細胞の写真である。ニューロン様形態の細胞の他、偏平に広がるアストログリア細胞らしきものなどが見られる。まいた細胞は一ヶ月間、凍結保存したものであるが、写真 b に見られるコントロール（初代培養開始24時間後）の細胞と比較して、少なくとも形態的差違は認められない。

このニューロン様細胞にパッチ電極を当て、current clamp し、細胞膜電位を約 −40 mV まで脱分極させた時の記録が図2である。Current clamp が不十分（current trace に action potential に同期した fluctuation が見られる）ではあるが、脱分極持続中に明瞭な 3 つの活動電位発生が認められる。この事は、これらニューロンが凍結操作で膜の興奮性を失わなかった事を示している。又、これらニューロンの静止膜電位は −48±4 mV （N＝12, bath solution の主成分は 130 mM NaCl, 5.5 mM KCl で、patch pipette の内部液の主成分は 150 mM KCl）で初代培養細胞（コントロール）の −46±3 mV （N＝33）と良く似た値を示した。



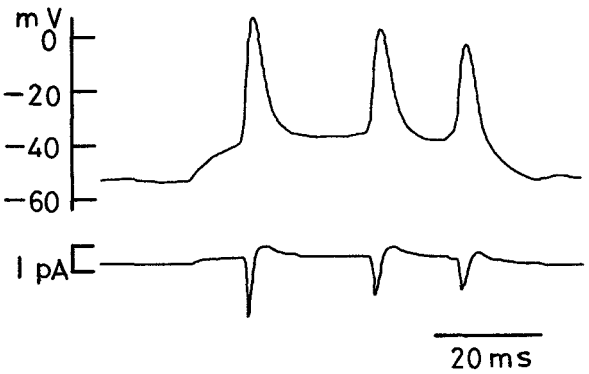


図1　左写真。一ヶ月間の凍結保存後に培養したニューロン（a）と、コントロール（b）。ともに培養開始後 24 時間。

図2　上図。凍結保存後のニューロン（培養 3 日目）の膜興奮。上；膜電位、下；電流。電流記録には電流固定が不十分なため、活動電位に同期した内向き電流が見える。

海馬初代培養細胞のグルタミン酸、あるいはアセチルコリンへの応答は Fura-2 を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度変化から比較的容易に検出できる。同法を用いて、凍結操作を経た培養ニューロンのグルタミン酸およびアセチルコリンに対する応答を調べた。図 3 で横棒線で示した期間中、1×10-5 M のグルタミン酸、アセチルコリンをかん流投与した。ここでは顕微鏡視野中の 3 つのニューロンについて同時測定を行っている a,b,c は各々のニューロンを示し、グルタミン酸、アセチルコリンの順にテストした。その結果、グルタミン酸には 3 細胞とも、アセチルコリンには a,b 2 細胞が応答した。このような結果から凍結操作後もこれら神経伝達物質のリセプターは機能保持されていると言えよう。

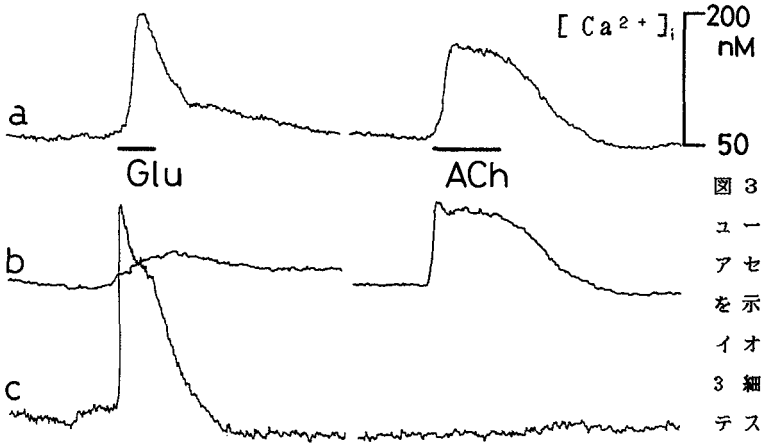


図３　凍結保存（一ヶ月）後のニューロンのグルタミン酸（Glu）、アセチルコリン（ACh）への応答を示す。応答は細胞内カルシウムイオンの上昇として検出される。3 細胞（a,b,c）について同時にテストした。

以上の結果は海馬ニューロンの神経細胞が凍結操作後も生き残るばかりでなく、良くその機能が保たれている事を示している。ニューロンの生理活性が良く保たれた理由の 1 つとして、グリア細胞と一緒に処理された点があるかもしれない。又、酵素により単離、球形化した細胞を凍結した事も有効であったかもしれない。何れにせよ、このような方法で、一度に大量に採ったニューロンを保存し、必要に応じて実験に使用する事が可能となり、初代培養中枢ニューロンでもバッチをそろえる形の実験材料とすることが可能となると期待される。

［文献］

Hatanaka,H.,Tsukui,H. and Nihonmatsu,I.(1987) Neurosci. Lett., in press

87. 培養下の海馬神経細胞における自発的Ca^{2+}濃度振動とシナプス活動

小倉明彦・工藤佳久　（三菱化成生命研）

〔要　約〕

1. ラット胚(18日齢)海馬より単離して培養した神経細胞は自発的な細胞内Caイオン濃度の振動を示す。その振動周期は外液中のK^+濃度に依存して変化した。また外液中のCaイオン濃度にも依存して変化した。これは、Ca濃度振動が興奮性シナプス活動を反映するとする仮説に合致する。
2. 神経細胞各個について、その細胞内部位ごとのCaイオン濃度の振動の時間経過を見ると、一様ではなく、早く上昇する部位と遅れて上昇する部位とがあった。その部位差は、うすいグルタミン酸を細胞全体に投与したときにやはり見られる部位差とよく一致した。
3. Bicucullineを投与すると、Ca濃度振動の周期に変化がみられ、抑制性結合の介在を推測させた。
4. 培養器の基質表面の親水性を加工して、培養神経細胞の選択的な生着と突起伸長を図ることができた。

Key word：　Hippocampal neuron, Synaptic activity, Intracellular calcium

【序】　ラット胎仔脳より酵素的に単離し、培養下においた海馬神経細胞は、培養器内で自発的・周期的に細胞質内Caイオン濃度($[Ca^{2+}]i$)を振動させている(1)。この$[Ca^{2+}]i$振動は、周囲の神経細胞との間でほぼ完全に同期していること、電位固定下で内向き電流のバーストと一致して$[Ca^{2+}]i$の上昇が起きること、興奮伝導遮断薬・受容体拮抗薬・伝達物質放出阻害薬(2)の投与によって、可逆的に抑制されることなどから、神経細胞間に相互に形成された興奮性シナプスの周期的活動を表している可能性が強い。もしこの解釈が正しければ、極めて簡便に、かつ細胞への機械的侵襲を加えることなくシナプスの形成をモニターできることになり、その方法的メリットは小さくない。今回は、その解釈をさらに補う新たな知見をつけ加える。

【方法】　細胞の培養法（18日齢胚海馬全体を用い、トリプシンで処理し、アストログリアのフィーダー上に、$2 \times 10^5/cm^2$でplateする）および蛍光性Ca指示薬fura-2とビデオカメラを利用しての顕微測光法については既に報告した(1)。今回は、これに加えて高倍率でビデオ録画した蛍光像をデジタル演算処理することによって$[Ca^{2+}]i$の細胞内分布を検出する試みを行なった。

【結果】　観測している$[Ca^{2+}]i$振動がシナプス活動に由来するのであれば、外液（測定中、一定の流速で灌流している）のK^+濃度（通常は5.4mM＝培養培地と同じ）を上げ、静止膜電位を脱分極させると、その振動数が増すことが期待される。外液のNaClの一部をKClに置換することによってK^+濃度を変えると、予想通り振動数が変化した（図１）。

次に外液中の$CaCl_2$（通常1.8mM＝培養培地と同じ）を$MgCl_2$に置換してCa^{2+}濃度を 0.3mM以下に下げると、$[Ca^{2+}]i$振動は停止した。このときグルタミン酸への応答性は、消失してい

なかった(図２)。シナプスの遮断に相当する現象と考えられる。

自発的[Ca^{2+}]i振動のさい、１個の神経細胞のうち、とくにどの部位で[Ca^{2+}]iの変動が著しいかを検出する目的で、100倍の油浸対物レンズで強拡大撮影したビデオ画像を８ビットでデジタル記憶し画面間除算を行って、微小[Ca^{2+}]i分布を調べた。その結果、[Ca^{2+}]i上昇の開始直後(0.2 ～ 0.5s程度)は、[Ca^{2+}]iは細胞の至るところで一様ではなく、局所的な差がみられた。時間が経過するとその差は見えなくなる。[Ca^{2+}]i上昇開始部位はそれぞれの細胞については一定だが、多数の細胞を通じての一般的規則性はないようである。同一の細胞に10μMグルタミン酸を灌流投与すると、よく似た局所性がみられた。しかし高K^+(20mM)溶液を灌流投与して脱分極刺激をした場合には、刺激直後にもこうした局所性はなく、ほぼ一様な[Ca^{2+}]i上昇が起こった(図３)。

この[Ca^{2+}]i振動を通じて、興奮性のみならず抑制性のシナプスの結合が観測できないか

図１．　外液中のKCl濃度を変えた場合の[Ca^{2+}]i振動の変化．培養21日後．

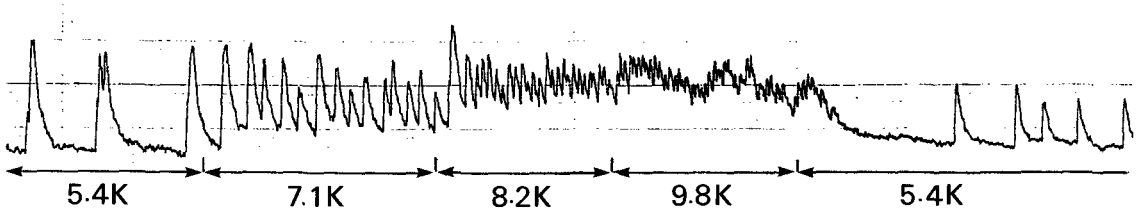


図２．　外液中の$CaCl_2$濃度を変えた場合の[Ca^{2+}]i振動の変化．Gはグルタミン酸の投与．培養10日後．

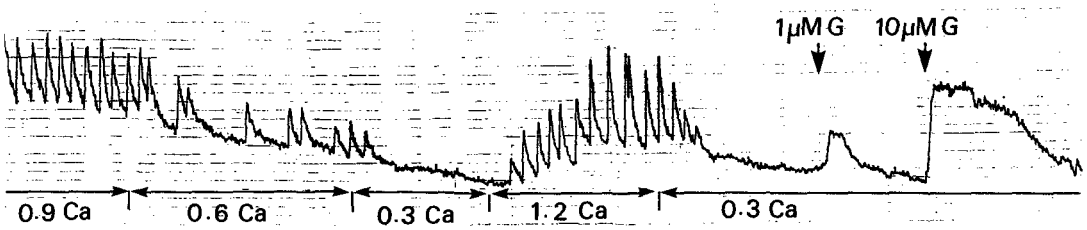
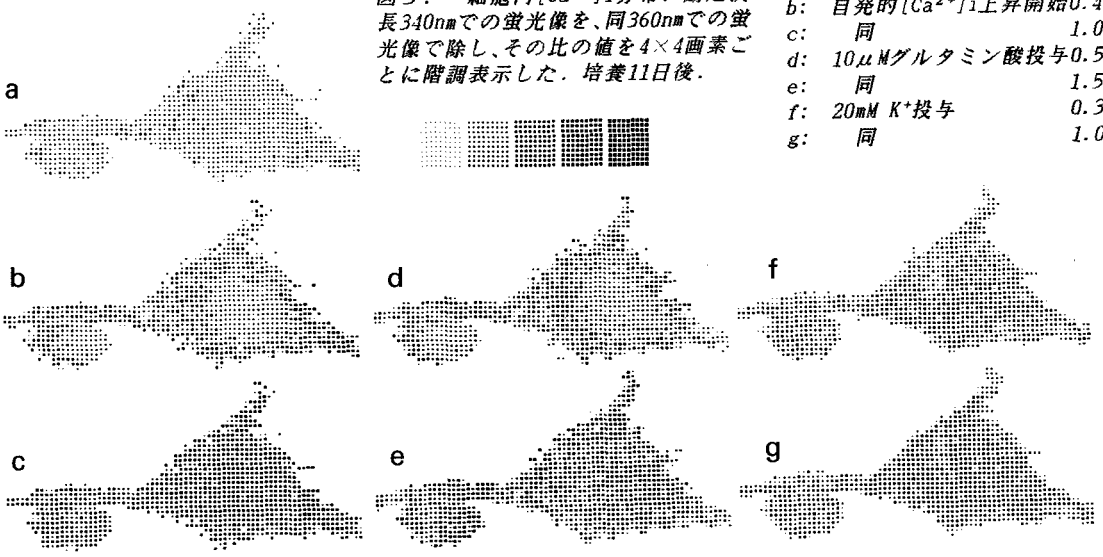


図３．　細胞内[Ca^{2+}]i分布．励起波長340nmでの蛍光像を、同360nmでの蛍光像で除し、その比の値を4×4画素ごとに階調表示した．培養11日後．

a:　静止時
b:　自発的[Ca^{2+}]i上昇開始0.4s後
c:　同　1.0s後
d:　10μMグルタミン酸投与0.5s後
e:　同　1.5s後
f:　20mM K^+投与　0.3s後
g:　同　1.0s後



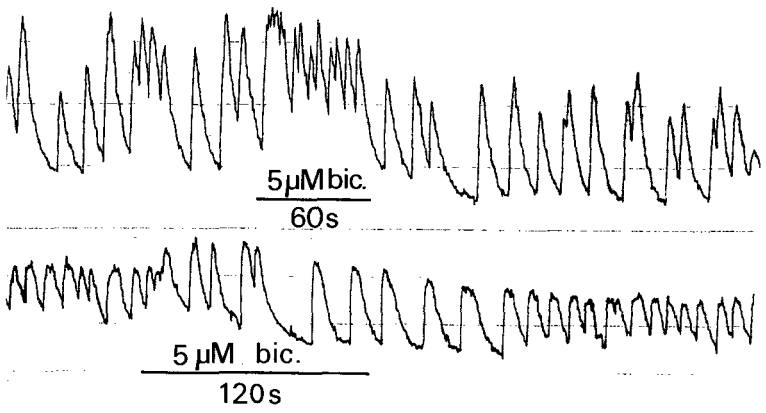


図4．　Bicucullineの投与によって$[Ca^{2+}]i$振動数が増す場合（上）と減ずる場合（下）．培養8日後．

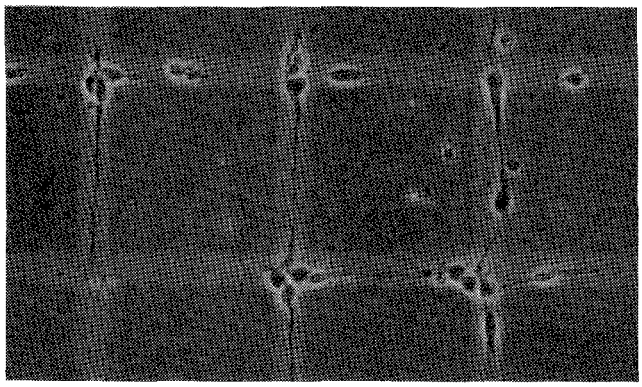


図5．　海馬神経細胞の親水性表面への選択的生着・突起伸長．
親水性プラスチックフィルムに#200電顕グリッドをマスクとしてカーボンをコートし、部分的に疎水性表面を作った．無血清で培養4日後．写真長辺が350μm．

という観点から、$GABA_A$拮抗薬の bicuculline（1 ～ 10μM）を投与したところ、一過性に振動数の増す場合と、むしろ振動数の低下が起こる場合とが見られた（図４）。

【考察】　今回の結果は、蛍光測定によってシナプス活動が観測できるという可能性をさらに強く支持するものであった。この方法を利用して、たとえばシナプス形成に必須な物質、あるいはそれを阻止する物質の検索などが容易に行われるものと信じる。

自発的$[Ca^{2+}]i$上昇の細胞内局所性は、何を表しているのだろうか。シナプス部位にグルタミン酸受容体が集中して分布する一方、高K^+で活性化される電位依存性Ca^{2+}チャネルは細胞全体に分布していると仮定すれば、シナプスの形成部位の局在性を表すことになるが、現時点では即断できない。そのため、逆にシナプスの形成部位を限定する試みとして、図５に記すような方法で容易に神経突起の伸長方向を限定させることに成功した。現在この方法で培養した細胞について、電顕によるシナプス構造の観察と蛍光測定とを試みている。

Bicucullineの効果については、GABA作動性の細胞が振動を作り出す回路に参加していたと考えるか、単にGABAによる過分極が全体にかかっていたと考えるかによって解釈が分かれる。しかし、この蛍光測定によって興奮性結合のみならず抑制性結合の有無も推論できるということまではいえよう。

培養に際しての秋田京子助手の協力に感謝する。

【文献】　(1) Kudo et al, Jpn J Pharmacol 41, 345-351 ('86); Kudo & Ogura, Br J Pharmacol 89, 191-198 ('86); Ogura et al, Neurosci Lett 78, 69-74 ('87).

(2) 黒田洋一郎ら，神経科学学術集会('86).

88. PC12細胞における神経成長因子の作用とGTP結合蛋白の役割

小池達郎・高島明彦　（佐賀医大・化学）

〔要　約〕

ラット副腎髄質由来のPC12細胞は神経成長因子(NGF)により交感神経様細胞に分化することが知られている。最近，OncogeneによるPC12細胞の分化が見いだされ，GTP結合蛋白質の関与が示唆されている。そこでNGF作用によるGTP結合能の変化や電気パルスによるGTPアナログの細胞内導入の突起形成に対する効果を調べた。PC12細胞をNGF処理(1-100ng/ml)した後，膜分画を単離し^{35}S-GTP-γ-Sを用いてGTP結合量を調べた。NGF処理後30分には結合量は対照の142%に増加し，その傾向は2時間程続いたがそれ以降は減少して元のレベルとなった。このGTP結合量の増加はdose dependentであり，1ng/ml(～37pM)で飽和し，1μg/mlではやや減少した。このGTP結合量の増加は200-500ng/mlのEGFやインスリンでは起こらなかったことから，NGF作用に特徴的なものと考えられる。0.1mM,1mMのGTP-γ-Sを含むPBS中でpulse電圧をかけ，GTPアナログを細胞内に導入し，その効果を調べた。24時間後，突起を持つ細胞数を数えると，0.1mM GTP-γ-Sではその効果はみられなかった，1mMでは突起の形成が観察された。GTPアナログの導入による突起の形成は可逆的であり，突起は短かった。

Key word：　神経成長因子、突起形成、GTP結合タンパク質

ラット副腎髄質由来のPC12細胞は神経成長因子(NGF)により交感神経様細胞に分化することが知られている(4)。NGFはPC12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る。私達は，受容体のmodulationとその突起形成との関わりについて報告をした(10-12)。一方，NGFを細胞内に注入しても突起形成などの分化過程は起こらないこと(5,15)から何等かのmessageが核に伝わると考えられる。その候補としてCa^{2+}イオン，cAMP,NGF断片や複合体等が挙がっているが，まだ明確ではない。最近Nodaらは sarcoma virusをPC12細胞にinfectすると細胞が分化することを見いだした(13)。更にFeramiscoらはH-ras oncogene蛋白を微量注入すると突起の成長が起こることを示した(2)。OncogeneによるPC12細胞の分化はV-srcでも見いだされた(1)。これらの現象の生理学的な意味は不明であるが，一つの可能性としてNGF作用による突起形成とG蛋白質との関連が示唆されている。そこでNGF作用によるGTP結合能の変化や電気パルスによるGTPアナログの細胞内導入の突起形成に対する効果を調べた。

［実験方法］

PC12細胞の培養と膜の調製

PC12細胞22a（NGFに対するレスポンスの速い株）はコラーゲン塗布したプレートに既報の通りに培養した(7,9)。マウス顎下腺より単離した，種々の濃度のNGFで細胞を処理した後，グルコースを含むDulbecco's phosphate buffered saline (PBS) pH 7.3で洗い，細胞を回収した。細胞を氷冷5mMヘペスpH7.3で10分処理した後，注射器(19,22,27G)に順次4-5回通して破壊後，核分画を取り除き，1.4-0.6Mの庶糖密度勾配遠心(ベックマン，SW40Ti,32K 90分)にかけ，膜分画を1.0M fractionに回収した。

GTP結合能の測定

^{35}S-GTP-γ-S(NEN)を用いてNorthupらの方法により測定した(14)。

電気パルスによるGTPアナログの細胞内導入

対数期の細胞を0.5mM EDTA処理した後，洗浄回収し，2x10^6 cells/ml PBS(±^{35}S-GTP-γ-S)として，氷冷したキュベットに入れ（0.4cm幅）パルス電圧をかけた。細胞を回収後よく洗い，培地を加えてプレート(96well)にまいた。細胞内への取り込み量はRIを用いて調べた。

突起形成の評価

既報の様に細胞体の径より長い突起を持つ細胞数を数えた(6,7,8)。

［結果と考察］

PC12細胞をNGF処理(1-100ng/ml)した後，膜分画を単離し，^{35}S-GTP-γ-Sを用いてGTP結合量を調べた。図１に示すように処理後30分には結合量は対照の142%に増加し，その傾向は2時間程続いたがそれ以降は減少して元のレベルとなった。このGTP結合量の増加はdose dependentであり，図２に示す様に1ng/ml(～37pM)で飽和し，1μg/mlではやや減少した。このGTP結合量の増加は200-500ng/mlのEGFやインスリンでは起こらなかったことから，NGF作用に特徴的なものと考えられる。更に，NGFによる突起形成との関連を調べる目的でパルス電圧により細胞内にGTP-γ-Sを導入した。図３に電圧及びパルス数を変えた時の^{35}S-GTP-γ-Sの取り込み量を示した。かけた電圧やpulse数に比例して取り込み量は増加した。1500Vではpulse回数を多くすると細胞の生存率は著しく減少した。この条件から0.1mM,1mMのGTP-γ-Sを含むPBS中でpulse電圧をかけ，その効果を調べた（図４）。24時間後，突起を持つ細胞数を数えると，0.1mM GTP-γ-Sではその効果は観られなかった。1mMでは50ng/ml NGFの効果には劣るが突起の形成が観察された。導入による突起の形成は可逆的であり，突起は短かった。又，この効果はanchorage-dependentであった。

GTP-γ-Sの導入による突起の形成はcAMPの上昇による可能性があるが，明らかではない。突起形成のtime courseからは考えにくいと思われる(7)。又H-rasの場合シクロヘキシミドによりその効果は阻害されることから，H-ras蛋白注入による突起形成でのcAMPの関与は否定されている(2)。実際にどの種のG蛋白がどのように突起形成に関与しているかは不明である。現在のところPertussis toxin(100ng/ml)で処理した細胞でもNGFにより突起は形成することが判っている。G蛋白とイノシトールリン酸との関係も明白ではない(3,16)。又NGF受容体との関係について明らかにする必要があると思われ，これらを確かめる実験を行っている。

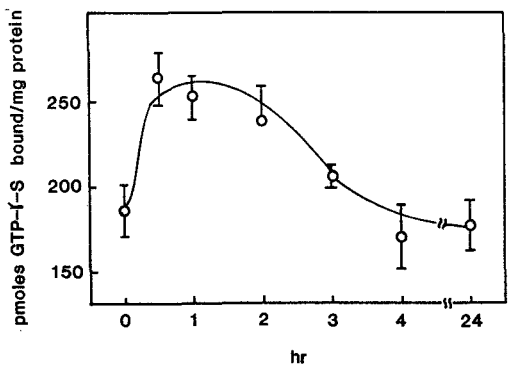


図１　NGF処理による^{35}S-GTP-γ-S結合の増加の時間経過
（ＰＣ１２細胞を１ng/mlNGFで各時間処理した後，膜を単離し，^{35}S-GTP-γ-S結合量を測定した。）

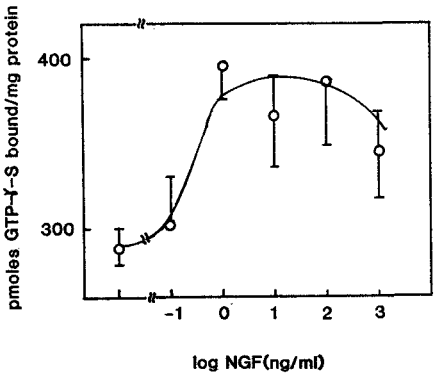
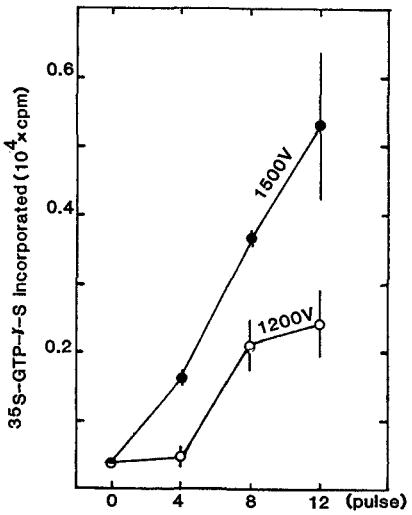


図２　^{35}S-GTP-γ-S結合量に与えるNGF処理の濃度依存性



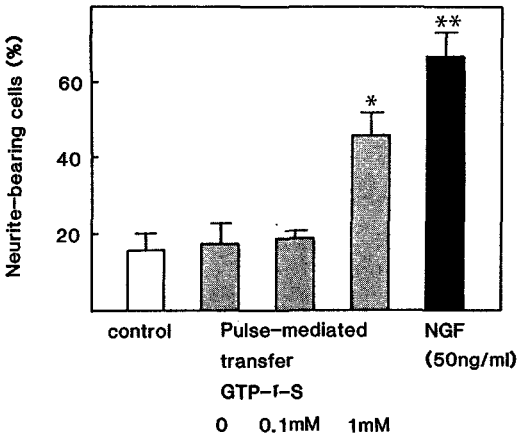


図3（左） ^{35}S-GTP-γ-Sの細胞への取り込み量に及ぼすパルス電圧及びパルス数の効果
（100μM ^{35}S-GTP-γ-Sを含むPBS，pH 7.3中0.5 mlに10^6の細胞をsuspendし，氷冷後パルス電圧をかけた（電極間距離は0.6cm）。終了後，細胞を集め，3回洗浄後取り込み量・生存率を調べた。）

図4（右） パルス電圧で導入したGTP-γ-Sの突起形成に与える効果
（0,0.1,1mM GTP-γ-Sを含むPBS中に細胞をsuspendし，1500V,8回パルス電圧をかけ，GTP-γ-Sを細胞内導入し，突起形成に与える効果を調べた。24時間後突起を持つ細胞の数を4つのpreparationで各約500個数えた（平均とSE）。＊：$p < 0.05$，＊＊：$p < 0.02$）。

REFERENCE

(1) S. Alema et al., Nature 316:557-559 (1985)
(2) D. Bar-Sagi and J.R. Feramisco, Cell 42:841-848 (1985)
(3) M. L. Contreras and G. Guroff, J. Neurochem. 48:1466-1472 (1987)
(4) L.A.Greene and A.S. Tischler, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 73:2424-2428 (1976)
(5) R. Heumaun et. al., Nature 292:838-840 (1981)
(6) T. Koike, Brain Res. 289: 293-303 (1983)
(7) T. Koike, Biochim. Biophys. Acta 763:258-264 (1983)
(8) T. Koike, Cell Biol. Intern. Report 8: 457-462 (1984)
(9) T. Koike and A. Takashima, J. Neurochem., 46: 1493-1500 (1986)
(10) T. Koike, Cell Biol. Intern. Rep. 10: 979-984 (1986)
(11) T. Koike, Cell Biol. Intern. Rep. 11: 423-428 (1987)
(12) T. Koike, J. Neurochem, in press (1987)
(13) M. Noda, et al., Nature 318: 73-75 (1985)
(14) J. K. Northup et al. J. Biol. Chem. 257: 11416-11423 (1982)
(15) P.J. Seeley, et al., J. Neurosci. 3: 1488-1494 (1983)
(16) A. E. Traynor, Develop. Brain Res. 14: 205-210 (1984)

89 初代培養神経細胞の成長・分化に伴うβ－シトリル－Ｌ－グルタミン酸の変化

三宅正治・森野日出緒＊

（愛媛大・医・機器センター，精神＊）

〔要　約〕

1）ニワトリ胚の初代培養視蓋神経細胞の発達過程におけるβ-シトリルグルタミン酸の変化は、in vivo での視蓋の本化合物の変化と著しく類似しており、いずれも神経細胞が著しく成長・分化する時期に高濃度存在し、β-シトリルグルタミン酸の神経細胞の成長・分化における役割を、培養神経細胞を用いて研究できることが示唆された。

2）β-シトリルグルタミン酸はニワトリ胚の中枢神経細胞、特に視蓋の初代培養神経細胞に対して、濃度依存的（20-200 μM）に、生存因子の一つとして働いている可能性が示唆され、in vivo でのβ-シトリルグルタミン酸含量の変化も視蓋が最も著しい変化を示した。　一方末梢培養神経細胞にはβ-シトリルグルタミン酸の添加効果は認められず、本化合物が末梢神経にはほとんど検出されないことと一致する。

3）β-シトリルグルタミン酸分解酵素活性の in vivo における変化は、脳の成長・分化とともに著しく上昇するので、β-シトリルグルタミン酸の脳の成長に伴う減少はこの酵素活性の変化が寄与しているものと推定される。

Key word：　β-Citryl-L-glutamic acid, Cultured neuronal cells, Trophic effects

私達は、幼若ラット脳に高濃度存在し、成長と共に急速に減少する新物質を、発見し、その構造をβ-シトリル-L-グルタミン酸（以下、β-ＣＧと略す）と同定した(1)。　本化合物は、従来自然界に存在の知られなかった物質であり、アミノ酸とエネルギー代謝の主要な中間体であるクエン酸とがアミド結合した独得の構造をしており、生化学的に極めて興味ある化合物である（図１）。　その後この化合物は幼若ラット脳以外に、孵化前のニワトリ眼球および成熟ラット睾丸(2)にも多量存在することがわかり、組織の増殖・分化に関連の深い物質と推定されるが、機能的役割は不明であった。

一方、神経系をとりまく微小環境下では、神経細胞の成長・分化に重要な役割を演ずる神経栄養因子あるいは分化誘導因子が産生されていると考えられている。　しかし、神経成長因子（NGF）以外に、同様な機能をもつ因子の実体は明かではない。

今回、β-ＣＧが神経細胞の増殖・成長・分化にいかなる役割を果たしているかを明らかにする目的で、培養神経細胞の成長・分化に伴う量的変化あるいは培養神経細胞に対する添加効果をしらべ、興味ある知見をえたので報告する。

〈実　験　方　法〉

1）初代神経細胞の培養－孵卵７－１０日目のニワトリ（白色レグホン）胚から摘出した大脳、小脳、視蓋および毛様体神経節を0.1%トリプシンによって分散したのち、ポリオルニチンでコーティングしたプレートにて、1-20 X 10^5 / ml の細胞数で培養した。　培養は、Ｎ１または１０％ウシ胎仔血清を含むＤＭＥを基本培養液とし、５％ CO_2 ／空気を気相として、３７℃の CO_2 インキュベーター中でおこない、培

地は２－３日目毎に交換した。　突起伸展細胞は、細胞体の２倍以上の長さの突起を有する細胞数の生存細胞数に対する百分率で示した。　生存細胞数は、対照プレート中で３日間生存した細胞数を１００％として計算した。

２）β-シトリルグルタミン酸の高速液体クロマトグラフィーによる定量－組織または培養細胞は、既報(2)のごとく抽出、前処理したのち、4.6 mm x 35 cm TSK gel ODS-80 TM カラム（東洋ソーダ）を用い、0.1 % H_2PO_4、pH 2.0（流速 0.6 ml/min）を溶離液として、２１４nm にて検出した。図２に標準物質のクロマトグラムをしめす。β－ＣＧの溶出位置には、β－ＣＧ関連化合物、酸性アミノ酸あるいは種々の TCA サイクル化合物およびその分解産物は溶出されないことを確認した。

３）ニワトリ胚の成長におけるβ－シトリルグルタミン酸およびその分解酵素活性の変化　－β－ＣＧは既報(3)のごとくガスクロマトグラフィーにて定量し、分解酵素活性は既報(4)によった。

〈実　験　結　果　と　考　察〉

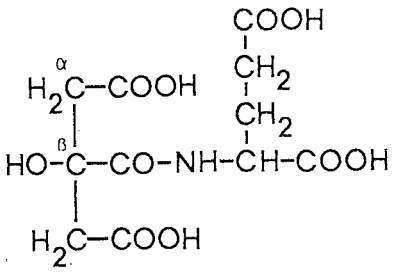
１）β－シトリルグルタミン酸のニワトリ脳の成長に伴う変化－ニワトリ胚の in vivo における成長において、大脳、小脳、脊髄および視蓋のβ－ＣＧの量的変化をしらべた（図３）。いずれの部位においても孵化前に高濃度で、孵化後著しく減少した。なかでも視蓋において、孵卵１３日目頃に最も高濃度であった。これらの変化は、ラットやモルモットのような哺乳動物と同じく(5)、神経細胞の増殖後の成長・分化の時期に一致して、高濃度存在することがわかった。

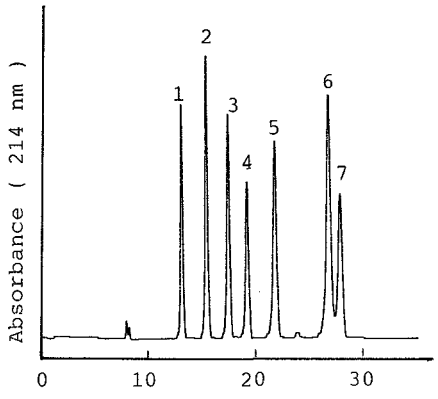
２）初代視蓋神経細胞の発達過程におけるβ－シトリルグルタミン酸含量の変化－初代視蓋神経細胞内のβ－ＣＧ含量の経時変化を高速液体クロマトグラフィーによってしらべた（図４）。　図から明らかなように、培養日数とともに著しく増加し、培養開始６日目頃に最高値に達し、その後減少した。　位相差顕微鏡による観察では、培養６日目には凝集した神経細胞群の間を神経突起網および神経突起の束の形成が顕著で、非神経細胞はほとんど認められなかった。しかし、培養９日目には非神経細胞が、凝集した細胞群の周辺に認められ、１１日目には著しく増加していた。この培養神経細胞の発達に伴うβ－ＣＧ含量の変化は、in vivo において視蓋でみられる変化（図３）に、非常によく似ている。

３）培養神経細胞に対するβ－シトリルグルタミン酸の影響－大脳、小脳、視蓋および毛様体神経節細胞に対するβ－ＣＧの添加効果をしらべた。毛様体神経節細胞には、生存因子作用および突起伸展作用のいずれも認められなかった。いずれの部位の中枢神経細胞にも効果が認められたが、視蓋の細胞に最も大きな効果がみとめられた（図５）。図から明らかなように、β－ＣＧの濃度の増加に依存して、突起保有細胞数と生存細胞数の両方が増加した。　in vivo でも、最も高濃度存在する視蓋の神経細胞に、最も大きな添加効果が認められたのは興味が持たれる。

４）β－シトリルグルタミン酸分解酵素活性の成長に伴う変化－ニワトリ脳の成長に伴うβ－ＣＧ分解酵素活性の変化をしらべた（図６）。視蓋では、孵卵９－２０日目まで著しく増加したが、大脳皮質では、孵卵１５日目頃まで増加するが、その後はほぼ一定値となった。β－ＣＧの合成活性の変化とも合せて考えなければならにが、成長に伴うβ－ＣＧ含量の低下は、分解酵素活性の上昇が寄与していると考えられる

図1　β－シトリル－Ｌ－グルタミン酸の構造





1 N-Formyl-Asp　　5 N-Acetyl-Glu
2 N-Acetyl-Asp　　6 N-Acetyl-Asp-Glu
3 N-Formyl-Glu　　7 ß-Citrylglu
4 Citric Acid

図2　β－シトリルグルタミン酸のＨＰＬＣによる定量

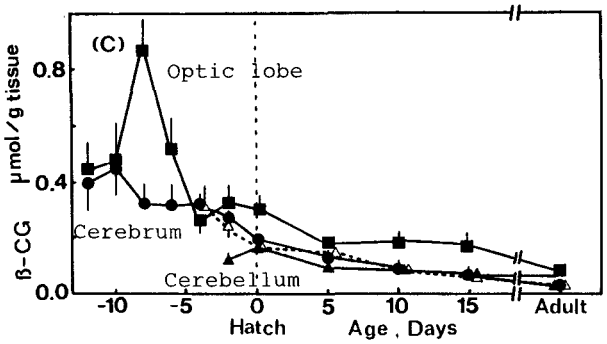


図3　β－シトリルグルタミン酸のニワトリ脳の成長に伴う変化

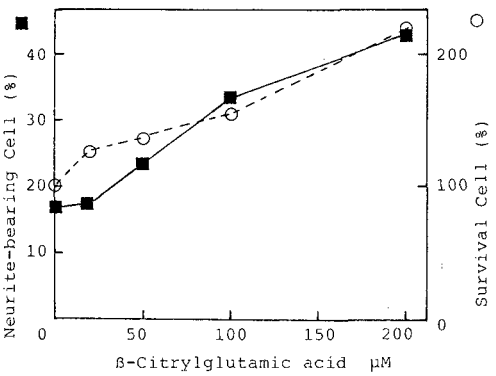
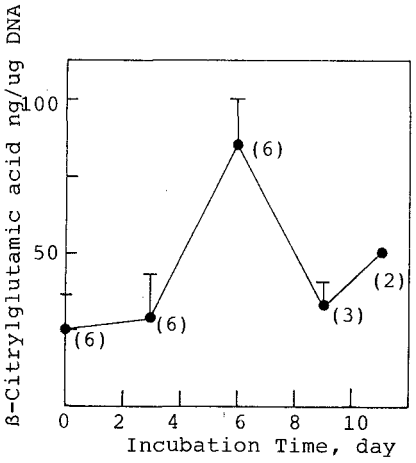


図5
培養視蓋神経細胞に対するβ－シトリルグルタミン酸の効果

図4 培養視蓋神経細胞の発達過程におけるβ－シトリルグルタミン酸含量の変化



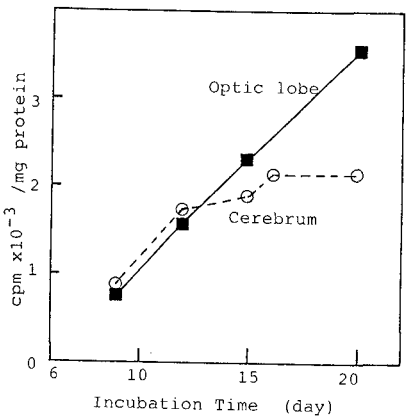


図6 β－シトリルグルタミン酸分解酵素活性の成長に伴う変化

本研究の一部は文部省科学研究費の援助を受けた。

〈文　　献〉

1) Miyake M. et al Biochim. Biophys. Acta 544:656-666(1978)
2) Miyake M. et al Biochim. Biophys. Acta 719:495-500(1982)
3) Miyake M. et al J. Neurochem. 36:804-810(1981)
4) Miyake M. et al Biochim. Biophys. Acta 760:206-214(1983)
5) Miyake M and Kakimoto Y. J. Neurochem. 37:1064-1067(1981)

90. α-シアロシルコレステロールの細胞膜への作用とラットグリア芽細胞のDNA合成調節

伊藤仁一・加藤泰治・阿部純子・田中　亮
（名古屋市大・医・第一生化）

〔文　献〕

正常ラットグリア芽細胞のDNA合成の血清依存性促進に対するα－シアロシルコレステロール（SC）の作用機構につき検討した。α－SCの効果は、培地中ウシ新生児血清（NBS）濃度に大きく依存した。1)．高濃度α－SC（20μg/ml）はDNA合成を抑制するが、この作用は5％以上のNBSにより著しく阻害された。NBSをULTRO－GELカラムで分画するとSC活性を阻害する画分は2つに分かれ、その1つはアルブミンであった。2)．低濃度α－SC（5μg/ml以下）はDNA合成を促進する。促進作用は培地中NBS濃度が2％以上の場合にのみ認められ、0.5％以下ではむしろDNA合成抑制作用を示した。3)．NBS非含有F－10培地において低濃度α－SCでグリア芽細胞を前処理（2μg/ml，1時間）した後、新たに5％NBS含有あるいは非含有F－10で培地交換すると、NBS含有培地のばあいのみグリア芽細胞のDNA合成が促進された。4)．α－SCはまた溶血活性を有するが、その作用はdose-dependentに増強し、NBSにより阻害された。これらの結果より，α－SCは低濃度でグリア芽細胞の細胞膜に直接作用することにより、血清中の成長因子の作用を増強し、DNA合成を促進する可能性が考えられた。

Key word： sialosylcholesterol －glioblast －DNA synthesis regulation

合成シアロシルコレステロール（α－SC；119－4，β－SC；119－3）は10μg/ml以上の濃度では濃度依存的に培養ラットグリア芽細胞のDNA合成を抑制し、dBcAMP同様短時間（刺激後2時間）で形態分化を誘導する。SCにより誘導されるグリア芽細胞の形態分化は、細胞内cAMP含量の著しい減少を伴い、cAMPを介さない機序によるものであることが明らかに示唆された。またSCは2μg/ml以下の低濃度では逆にDNA合成促進作用を示し、濃度に対応してグリア芽細胞のDNA合成を両方向に調節することが分かった。さらにDNA合成に対するSCの効果が培地中の血清濃度に大きく依存していることを見出したので、今回はSC活性に対する血清の影響を検討した。

実験方法

1．グリア芽細胞の培養：在胎17日目のラット胎児大脳を、髄膜除去後トリプシン処理を経て20％FCS／F－10培地で初代培養した。その後10％NBS／F－10培地で1週間二次培養を行い実験に供した[1]。

2．グリア芽細胞のDNA合成測定：培養グリア芽細胞の培地を種々の濃度のNBS含有F－10培地で交換した。24時間培養後、α－SCで刺激し同時に〔^{3}H〕－チミジンを添加し、続けて24時間培養後細胞内に取り込まれた放射能を測定した。

3．薬剤調整：シアロシルコレステロール（α－SC，β－SC）は水で、また硫酸コレステロールはエタノールでそれぞれ1mg/ml の濃度にし実験に使用した[2]。

結果および考察

種々の濃度のＮＢＳ（１，２，５，１０，２０％）含有Ｆ－１０培地で、ラットグリア芽細胞を高濃度α－シアロシルコレステロール（２０μg/ml）で刺激し、そのＤＮＡ合成を〔^{3}Ｈ〕－チミジン取り込み測定により検討した。Ｆｉｇ．１で示すようにグリア芽細胞のＤＮＡ合成はＮＢＳ濃度依存的に促進された。ＮＢＳ濃度が２％以下ではα－ＳＣにより強く抑制されたが、５％以上ではα－ＳＣのＤＮＡ合成抑制効果は減少し、ＤＮＡ合成抑制率は２％ＮＢＳ存在で約８５％であるのに比べ、５％ＮＢＳでは約４０％、１０％ＮＢＳでは約１５％にとどまった。これはＮＢＳ中にα－ＳＣの作用を阻害する物質の存

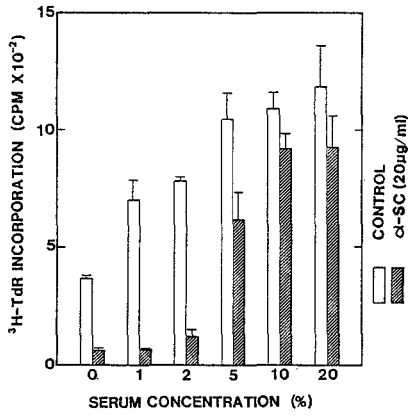


Fig. 1 EFFECT OF SERUM ON α-SC ACTIVITY

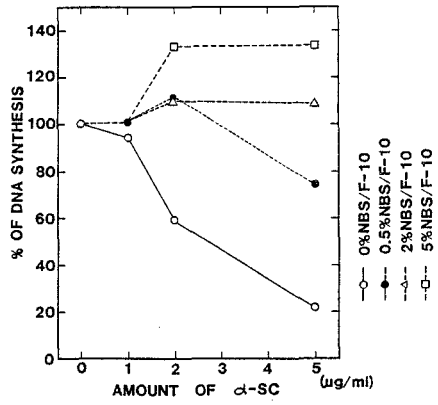


Fig. 2 EFFECT OF SERUM ON ACTIVITY OF LOW CONCENTRATIONS OF α-SC

在を示唆する。ＮＢＳ中のα－ＳＣ活性阻害成分を明らかにするためＮＢＳをＵＬＴＲＯ－ＧＥＬカラムで分画した結果、α－ＳＣ阻害成分は２成分に分かれ低分子画分はアルブミンと同定した。精製ウシアルブミンは濃度依存的にα－ＳＣ活性を阻害し、Ｆ－１０培地のみの場合２０μg/mlα－ＳＣによりグリア芽細胞はＤＮＡ合成が９０％以上抑制されるが、５mg/ml アルブミン存在下では１８％抑制に止まった。

一方、低濃度（５μg/ml以下）のα－ＳＣのＤＮＡ合成促進効果に及ぼすＮＢＳの影響を検討した（Ｆｉｇ．２）。低濃度α－ＳＣ（５μg/ml）で刺激するとＮＢＳ２％濃度あるいは５％では、グリア芽細胞はそれぞれα－ＳＣで刺激しないコントロール細胞の１１０％あるいは１３５％にＤＮＡ合成を促進した。しかしＮＢＳ0.5%および非存在の場合は５μg/mlα－ＳＣ刺激によりそれぞれ８０％および２０％に減少した。このように低濃度α－ＳＣのＤＮＡ合成促進作用は２％以上のＮＢＳ含有培地においてのみ認められ、ＮＢＳとの協調作用でＤＮＡ合成促進作用が発現することが分った。

そこでＤＮＡ合成促進は、培地内におけるα－ＳＣと血清成分との反応物により引き起こされるのか、細胞膜上でα－ＳＣと血清成分とが何らかの機構を刺激することにより起きるのかを検討した。ＮＢＳ非含有Ｆ－１０培地中で細胞を２μg/mlα－ＳＣによって前処理し、新たに５％ＮＢＳ含有あるいは非含有Ｆ－１０で培地交換し〔^{3}Ｈ〕－チミジンの取り込みを測定した。Ｆｉｇ．３で示すように、α－ＳＣで前処理のないコントロール細胞に比べ、１時間以内まで前処理された細胞は〔^{3}Ｈ〕－チミジンの取り込みが約６０％促進された。しかし前処理時間が２時間以上になるとＤＮＡ合成促進効果は消失した。これは前処理時間の延長により細胞へのα－ＳＣ取り込み量が増加し、高濃度α－ＳＣ処理と

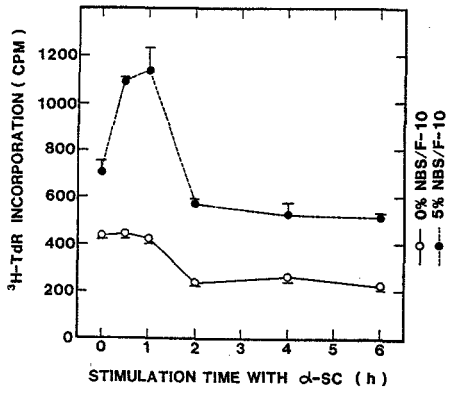


Fig. 3 EFFECT OF PREINCUBATION WITH LOW CONC. OF α-SC ON DNA SYNTHESIS OF GLIOBLASTS

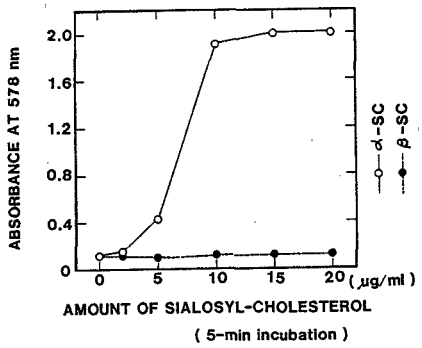


Fig. 4 EFFECTS OF SIALOSYL-CHOLESTEROL ON HEMOLYSIS

同様の効果が生じたものと考えられる。事実5 μg/mlα－ＳＣで１時間前処理した後、５％ＮＢＳ含有Ｆ－１０で培地交換した場合はＤＮＡ合成促進効果は認められなかった。またＮＢＳ非含有Ｆ－１０で培地交換すると１時間以内の前処理でもＤＮＡ合成は促進されなかった。このことから，ＮＢＳ中の成長因子の第１の作用部位である細胞膜にα－ＳＣが何らかの変化を与え、成長因子の作用を増強しＤＮＡ合成を促進すると考えられた。

α－ＳＣが細胞膜に直接作用することを確かめるため、α－ＳＣのヒト赤血球膜に対する作用を検討した。Ｆｉｇ．４に示すように、α－ＳＣを赤血球懸濁液に添加すると、５分間で５μg/ml以上の濃度により溶血が始まり、１０μg/mlでほとんど全ての赤血球が溶血した。なお溶血作用はＮＢＳにより阻害された。このことはα－ＳＣが赤血球に取り込まれた後、膜の荷電、流動性あるいは透過性を変えることにより著しく膜の安定性を破壊することを示唆した。２０μg/mlのβ－ＳＣは５分間の接触時間では溶血作用を示さなかった。しかし１０分間の反応により溶血作用が起こり、また３０μg/mlの濃度では５分間でも溶血したことから、β－ＳＣはα－ＳＣに比べ溶血活性が弱いことが示された。α－ＳＣは、ラットグリア芽細胞に対しＤＮＡ合成抑制作用、形態分化誘導作用、Ｓ－１００タンパク合成促進作用、ｃＡＭＰ合成抑制作用、そしてこの溶血作用とこれまで私たちが検討したすべての作用においてβ－ＳＣより強い活性を示した。以上の結果から、α－ＳＣは低濃度では血清中成長因子の膜レセプターへの作用を増強することによりＤＮＡ合成を促進し、高濃度では細胞膜の安定性と機能の低下さらにＤＮＡ合成抑制を惹起するものと考えられる。

REFERENCES

1. Kato, T. et al.: Biochem. Biophys. Acta, 579, 216 (1979)
2. Tanaka, R. et al.: Bull. Jap. Neurochem., 25, 85 (1986)

91. PC12細胞のドーパミン放出におけるホルボルエステルの効果

高島明彦・小池達郎　（佐賀医大・化学）

〔要　約〕
我々はPC12細胞を用いてPhorbol ester(TPA)の効果を刺激に対するドーパミンの放出に関して調べた。高K^+及びイオノフォア(A23187)刺激によるドーパミンの放出量はTPA前処理によって増大した。しかし、カルバミルコリン刺激によるドーパミンの放出量はTPA前処理によって有意な増加を示さなかった。TPA(10^{-7}M)で37℃，5分間前処理するとTPAに依存した高K^+(50mM KCl)によるドーパミン放出は最大となった(169% of control)。fura-2によって、この時の細胞内Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の高K^+による増大をモニターすると、TPA前処理した細胞では、高K^+による$[Ca^{2+}]_i$の増加は対照の細胞より少なかった。すなわちTPA処理により、刺激放出連関の効率が増大することが明らかになった。更にいくつかの濃度のニカルジピン，ベラパミル，$CdCl_2$，$CoCl_2$の存在下で高K^+刺激を行ない、TPA 前処理細胞及び未処理細胞におけるドーパミン放出を比較した。ニカルジピン，$CdCl_2$，$CoCl_2$はTPA未処理細胞よりもTPA前処理細胞からのドーパミン放出を効率的に抑制した。TPAに依存したドーパミンの放出量の増大はニカルジピン，Cd^{2+},Co^{2+}存在下で完全に抑制された。しかしベラパミルによる抑制の程度は非常に小さかった。これらの結果からプロテインカイネースCがニカルジピン感受性のCa^{2+}チャンネルを修飾することによつて高K^+に応答したドーパミン放出の効率を調節している可能性が示唆された。

Key word： Phorbol ester ; Dopamine release ; PC12 cell

ラットフェオクロモサイトーマPC12細胞は、カテコールアミンを生合成し脱分極剤によって、それらを放出することが知られている。我々は、細胞増殖におけるドーパミンの放出量の調節について調べた。この時50mMKClによるドーパミンの放出量（% of content）をCa^{2+}の取り込み量に対してプロットするとほぼ直線関係になることを先に報告した(2)。しかし、この関係は、対数後期にある細胞では成立しなかった。このことは、刺激－放出連関における効率の調節機構は、細胞外からのCa^{2+}の取り込みだけでは説明することはできず、ドーパミンの放出機構にはCa^{2+}に依存した他の機構も存在することを示唆した。そこで我々はCa^{2+}に依存した機構の一つとしてプロテインカイネースCの関与した機構に注目し、プロテインカイネースCを活性化させるphorbol ester（TPA）を用いて、PC12細胞におけるドーパミンの放出機構に関してその効果を調べた。

〈 方法 〉

細胞培養　PC12 サブクローンNo.1は、37℃ 5% CO_2下で5%牛胎児血清及び10%馬血清を含むダルベッコ改変培地中で培養される。細胞は35mmプラスチックレートに4 × 10^4 細胞／cm^2まき培養3日目の細胞を実験に用いた。

TPA前処理　細胞を、TPAを含むヘペスバッファー（115mM NaCl/5.4mM KCl/1.8mM $CaCl_2$/0.8mM $MgSO_4$/5.5mM glucose/1mM NaH_2PO_4/15mM Hepes (pH 7.2)）中に37℃で数分間インキュベーションすることによりTPA前処理を行った。

ドーパミン放出量の測定　刺激剤（A23187，高K^+，カルバミルコリン）を含むヘペスバッファー中に37℃で5分間のインキュベーションによって放出されたドーパミンはアルミナによって回収され、液クロ／ 電気化学検出器で分離定量を行った。

Fura-2による$[Ca^{2+}]_i$の測定　細胞（10^6cells／ml）を10^{-6}M Fura-2_{AM}を含むヘペスバッファー中

に37℃1時間インキュベートすることにより細胞内にFura-2を取り込ませる。その細胞をキュベットに10^6cell／mlになるように入れ蛍光分光光度計によりFura-2による蛍光信号を測定した。

〈結果及び考察〉

A23187，カルバミルコリン，高K^+に応答したドーパミン放出におけるTPAの効果

TPA（10^{-7}M）で37℃10分間細胞を前処理するとA23187，及び高K^+に応答したドーパミン放出量は有意に増大する（TableⅠ）。TPAで前処理した細胞と未処理の細胞を比較するとA23187（10^{-7}M）ではほぼ2倍に，また50mM KClでは約1.5倍にドーパミンの放出量が増大していた。しかし、カルバミルコリン刺激（0.25-1.0 mM）では有意なドーパミン放出量の増大を示さなかった。

TABLE I

EFFECTS OF PRETREATMENT WITH TPA ON DOPAMINE RELEASE INDUCED BY KCl, CARBAMYLCHOLINE AND A23187 IN PC12 CELLS

The cells were preincubated at 37°C for 10 min in the presence or absence of 10^{-7} M TPA and then stimulated with 50 mM KCl, 0.5 mM carbamylcholine, or 10^{-7} M A23187 for 5 min. Values of the dopamine release are expressed as percent release of the total dopamine (0.315±0.007 nmol/plate, n = 18) and are given as means±S.E. (n = 3).

	Dopamine release (percent release of total dopamine)	
	−TPA	+TPA
KCl (50 mM)	26.1±1.1	38.6±2.4
Carbamylcholine (0.5 mM)	7.9±0.2	7.0±0.9
A23187 (10^{-7} M)	6.2±1.0	12.6±1.6

TPA前処理したPC12細胞の高K^+刺激によるドーパミン放出の特徴

図1は、TPA濃度に対する50mM KClで引き起こされるドーパミン放出の濃度－応答曲線である。TPA濃度を増加するに従ってドーパミンの自発放出は増大した。一方高K^+によって引き起こされるドーパミン放出は10^{-7}M TPAで前処理した時に最大の応答を示した。

高K^+によって引き起こされるドーパミンの放出と$[Ca^{2+}]_i$の増大をTPA（10^{-7}M）での前処理時間を変えて調べた。高K^+によって引き起こされるドーパミンの放出はTPAで前処理するとすぐに増大を示し、5分間前処理で最大となる。この時ドーパミン放出量は対照の169%となる。その後ドーパミンの放出は徐々に減少する（図2A）。一方高K^+による$[Ca^{2+}]_i$の増大はTPAの前処理を行うとすぐに急激な減少を示し10分間前処理で減少は緩やかになり対照の約66%になった（図2B）。

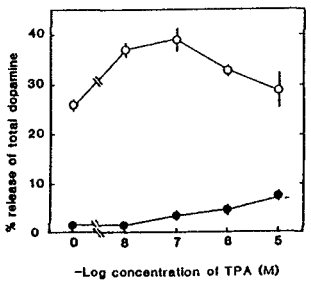


Fig. 1. Effects of various concentrations of TPA on high K^+-evoked dopamine release (open circle) and spontaneous dopamine release (closed circle) in PC12 cells. After the cells were preincubated at 37°C for 10 min in the presence of various concentrations of TPA, they were incubated in Hepes-buffered saline without TPA at 37°C for 5 min, and then stimulated with 50 mM KCl for 5 min. Values for dopamine release are expressed as percent total dopamine (0.322±0.011 nmol/plate, n = 15) and are given as mean±S.E. (n = 3).

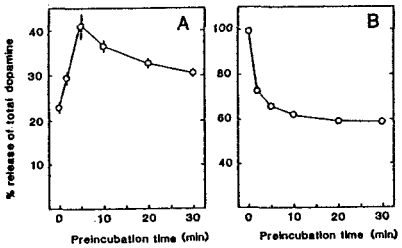


Fig. 2. Dopamine release (A) and the rise in $[Ca^{2+}]_i$ (B) a function of incubation time in the buffer containing TI PC12 cells were preincubated at 37°C for various time int vals in the presence of 10^{-7} M TPA. (A) Dopamine rele stimulated with 50 mM KCl for 5 min was estimated. Val are expressed as percent release of total dopamine (0.434±0.(nmol/plate, n = 18) and are given as mean±S.E. (n = 3). The rise in $[Ca^{2+}]_i$ evoked by 50 mM KCl was estimated us a *fluorescent Ca^{2+} indicator*, fura2. The maximum rise $[Ca^{2+}]_i$ (100% in Fig. 3B) corresponds to the values obser in control cells.

細胞外溶液のKCl濃度を5.4mMから100mMまで変えてそれに応答するドーパミンの放出量をTPA（10^{-7}M）前処理及び未処理の細胞で比較した。両者ともKCl濃度の上昇によって応答するドーパミンの放出量変化は同じ傾向を示した、即ち両者とも25mM以上のKCl濃度でドーパミンの放出応答を示し、75mM KClで最大のドーパミン放出を示した（図3A）。TPA処理細胞と未処理細胞からKClに応答して放出されるドーパミン量の差は、KCl濃度が5.4mM-50mMの間で増大しそれよりも高いKCl濃度では減少した（図3A）。一方、TPA前処理細胞では高K^+によって引き起こされる$[Ca^{2+}]_i$の増加は未処理細胞に較べて少なくその差は、KClの濃度の増大と共に増加した。これと同じことは、$^{45}Ca^{2+}$の取り込みからも確認されている(1)。更にTPA処理細胞における$[Ca^{2+}]_i$の増加とTPA前処理によって増加したドーパミンの放出量は、類似した傾向

を示していた（図3A,3B）。

細胞をニカルジピン（10^{-7}M）を含む高K^+で刺激すると$[Ca^{2+}]_i$の増加はTPA前処理した細胞で観察された$[Ca^{2+}]_i$の増加と同程度の増加量を示し、更にそのKCl濃度(5.4mM - 100mM)に対する応答はTPA全処理細胞と同様な傾向を示した（図3B,4B）。即ち0-50mM KClで増加しその後減少を示した。しかし、ニカルジピン存在下で高K^+に応答して放出されるドーパミン量は25mM-100mMの範囲で対照よりも少なかった。

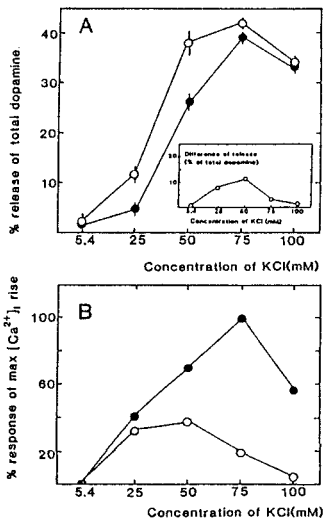


Fig. 3. Effects of TPA on dopamine release (A) and rise in $[Ca^{2+}]_i$ (B) at various concentrations of KCl in PC12 cells. The cells were incubated at 37°C for 10 min in presence (open circle) or absence (closed circle) or 10^{-7} M TPA and then stimulated by various concentrations of KCl (A). The TPA-dependent release of dopamine was estimated at various concentrations of KCl as the difference in the amounts of high-K^+-evoked dopamine release between control cells and the cells treated with TPA (inset). Values are expressed as percent release of the total dopamine (0.394±0.014 nmol/plate) and are given as means±S.E. (n = 3). (B) Rise in $[Ca^{2+}]_i$ in TPA pretreated or untreated cells was estimated at various concentrations of KCl using a fluorescent Ca^{2+} indicator, fura2 (values are given as percent maximum $[Ca^{2+}]_i$ rise). Maximum $[Ca^{2+}]_i$ rise was observed in control cells stimulated with 75 mM KCl.

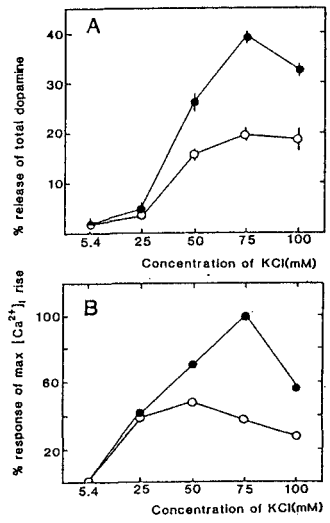


Fig. 4. Effects of nicardipine on dopamine release (A) and rise in $[Ca^{2+}]_i$ (B) at various concentrations of KCl in PC12 cells. The cells were stimulated by various concentrations of KCl in presence (open circle) or absence (closed circle) of nicardipine (10^{-7} M) at 37°C, and the dopamine release was estimated (A). Values are expressed as percent release of the total dopamine (0.319±0.011 nmol/plate, n = 30) and are given as means±S.E. (n = 3). (B) The rise in $[Ca^{2+}]_i$ at various concentrations of KCl in PC12 cells was estimated by the fluorescence technique using fura2 and values are given as percent of maximum $[Ca^{2+}]_i$ rise. Maximum $[Ca^{2+}]_i$ rise was observed when untreated cells were stimulated by 75 mM KCl.)

<u>TPAに依存したドーパミン放出に対するCa^{2+}チャンネルブロッカーの効果</u>

TPAによって増加したドーパミン応答についてCa^{2+}チャンネルブロッカー の効果を調べた。ニカルジピン、$CoCl_2$、$CdCl_2$、存在下におけるドーパミン放出のhalf-inhibition doseはTPA前処理細胞の方がTPA未処理の細胞によって得られた値より小さかった（TableⅡ）。又、ベラパミル存在下ではTPA処理、未処理細胞の間で差異は観られなかった。即ち、ニカルジピン、$CoCl_2$、$CdCl_2$はTPA処理した細胞では高K^+によるドーパミンの放出を未処理の細胞と較べて効率的に抑制することが明らかになった。更に、TPA処理によって増加したドーパミン放出は ニカルジピン(10^{-7}M)、$CoCl_2$(10^{-5}M)、$CdCl_2$(10^{-5}M)の存在下で完全に抑制された。しかし、ベラパミル(10^{-5}M)では、対照の約57%の抑制しか示さなかった。即ち、これらの結果からTPA-sensitiveなCa^{2+}チャンネルはニカルジピンにも感受性がある事を示している。更にTPAに依存したドーパミン放出機構の効率の増大はニカルジピン感受性のCa^{2+}チャンネルを活性化することで行われている可能性を示した。

TABLE II

EFFECTS OF Ca^{2+} CHANNELS BLOCKERS ON HIGH-K^+-EVOKED DOPAMINE RELEASE OF TPA-TREATED OR -UNTREATED PC12 CELLS

The cells were preincubated at 37°C for 10 min in the presence or absence of 10^{-7} M TPA and then stimulated by 50 mM KCl for 5 min in the presence of verapamil (10^{-8}–10^{-5} M), nicardipine (10^{-9}–10^{-6} M), $CdCl_2$ (10^{-7}–10^{-4} M) or $CoCl_2$ (10^{-7}–10^{-4} M). The half-inhibition dose was estimated between these concentration ranges. The control cells released 26.1±1.1% of the total dopamine (means±S.E. (n = 3)) in response to 50 mM KCl and TPA-treated cells released 32.9±1.8% of total dopamine.

Blocker	Half-inhibition dose (M)	
	−TPA	+TPA
Nicardipine	$4.1\cdot10^{-8}$	$3.2\cdot10^{-9}$
Verapamil	$1.3\cdot10^{-7}$	$3.5\cdot10^{-7}$
$CoCl_2$	$3.5\cdot10^{-6}$	$<3.4\cdot10^{-7}$
$CdCl_2$	$1.7\cdot10^{-5}$	$2.3\cdot10^{-6}$

REFERENCE

(1) Harris, K.M., Kongusamut, S., and Miller, R.J. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 140, 990-998

(2) Takashima, A. and Koike, T. (1985) Biochem. Biophys. Acta 84, 101-107

92. 単層培養アストログリアのニューロン突起伸展促進効果について

井端由紀郎*・高坂新一・吉田一成・戸谷重雄*
塚田裕三
（慶応大・医・生理，脳外*）

〔要　約〕

我々はastrogliaのsubculture上でラット胎児脳の初代培養を行うとneuronの突起伸展、および生存が著しく促進され、分裂が抑制されること見いだし、一昨年の本学会で報告した。今回はこれらのastrogliaのneuronに対する作用機序をさらに検討した。Astrogliaのsubcultureの上に置かれたカバースリップ上でneuronを培養しても、その生存は著明に促進され、又、分裂は抑制された。しかし、neuronの突起伸展効果は全く見られなかった。一方、熱処理により死滅させたastroglia上で直接neuronの初代培養を行ってみると、この場合にもneuronの突起伸展効果が認められた。以上よりastrogliaの持つneuronの生存促進効果および分裂抑制効果の発現には液性因子が、又、突起伸展促進効果の発現にはastroglia膜とneuron膜の接触が関与することが示唆された。又、fibroblast、18回継代培養したastroglia（18p）を熱処理し、これをsubcultureとして用いた場合ではneuronはaggregateし、突起伸展の程度は熱処理astrogliaに比し著しく低かった。更にastrogliaとfibroblastについてneuronの接触部位を電顕で検討すると両者に形態的にも差が認められた。これらのことからastrogliaの持つneuronの突起伸展効果はastrogliaに特異的であると考えられた。現在astroglia膜表面に対するモノクローナル抗体を作製し、neuronの突起伸展促進因子について検索を進めている。

Key word： Astroglia, Neurite promoting effect, Cell-cell contact.

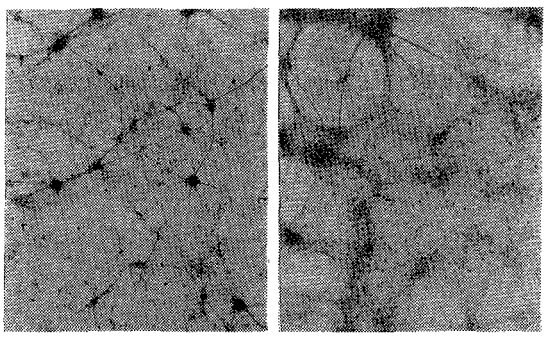
我々は一昨年の本学会においてastroglia単層培養上でラット胎児脳を初代培養した場合、neuronの生存及び突起伸展が著しく促進され、また、neuronの分裂が抑制されることを報告した[4)5)]。これらastrogliaの作用としてastroglia由来の液性因子、及びastroglia膜とneuron膜との接触による効果の二つの可能性が考えられた。そこで今回我々はこれら二つの可能性につき更に検討を加えた結果、neuronの生存および分裂に対する効果は液性因子により、また、突起伸展効果は細胞同志の接触に依ることを見いだしたので報告する。また、このastrogliaの作用の特異性及びastrogliaとneuron間の形態学的特徴につき電顕に依る検索も併せ行った。

［方法］

Astrogliaの単層培養、及びneuronの初代培養は既報の方法[4)]により行った。Astrogliaを6-ウェルプレート中に単層培養し、この上にpoly-L-lysineでコーティングしたカバースリップを乗せ、その上でneuronの初代培養を行い、既報の方法[4)]に従い培養11日目においてneuronの生存および分裂の程度を検索した。また、neuronの突起伸展は胎生16日ラット大脳半球を初代培養後24時間目において位相差顕微鏡により検索した。これらの実験においてはastroglia

（図1）ｶﾊﾞｰｽﾘｯﾌﾟ上のneuronの生存

対照群　　astroglia群



を単層培養していないウェル中にカバースリップを入れこの上でneuronを培養したものを対照群とした。

一方、12ウェルプレートに単層培養したastroglia、fibroblast、18代継代astroglia (18p)を60℃、30分熱処理し、この上に直接 neuron を初代培養して24時間目における突起伸展についても検索を行った。fibroblastは生後一年のラット大脳を継代培養することにより得、これは抗fibronectin 抗体による免疫染色にて陽性であることを確認している。18p は胎生18日齢のラット大脳より得た astrogliaを18回継代することによって得た。得られた細胞は当初はGFAP陽性であったが継代を重ねるうちに陰性化し、これに代わってvimentinが陽性となったが fibronectinは陰性であった。

Astroglia 膜表面に対するモノクローナル抗体はBALB/c mouse を astroglia生細胞 (1×10^6) で 3回腹腔内投与により免疫したのち、P3U1 mouse myeloma cell lineを用い、常法に基ずいて作製した。スクリーニングは96穴の培地に蒔かれた astrogliaあるいは 18pを 4% paraformaldehydeにて固定後、hybridoma の培養上清を添加し、更にperoxidase-conjugated anti-mouse IgGでラベルした後o-phenylene diamineにて発色させその吸光度をImmunoReader NJ-2000 (InterMed) にて測定した。

[結果および考察]

Astroglia の neuron への影響が液性因子によるか接触によっているかを検討するため、astroglia 上に置かれたカバースリップ上で neuron の初代培養を行った。この場合、図1のごとく、neuronの生存は対照群に比し著しく促進された。また、この系において neuron の分裂に対する効果を検討してみると、表1に示したごとく、対照群に比べ分裂は有意に抑制されていた。一方突起の伸展を見てみると、この系においては対照群と有意な差は認められなかった（図2）。以上の結果より astrogliaの持つneuronの生存促進効果および分裂抑制効果は astroglia由来の液性因子が関与することが明らかにされた。また、突起伸展に対する効果は、neuronと astrogliaの接触によりひきおこされている可能性が強く示唆された。そこで更に astro-

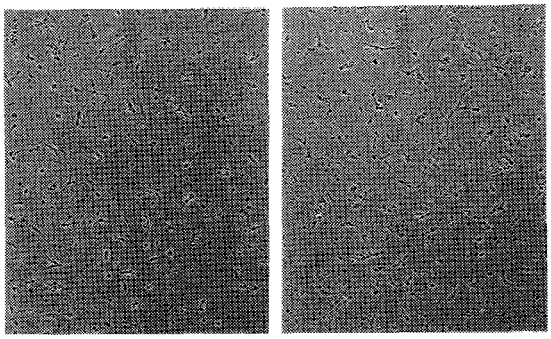
(表1)ｶﾊﾞｰｽﾘｯﾌﾟ上でのneuronの分裂率

ｶﾊﾞｰｽﾘｯﾌﾟ上	
astroglia(+)	8.3± 5.0%
astroglia(-)	15.6± 4.8%
astroglia上	6.1± 2.1%

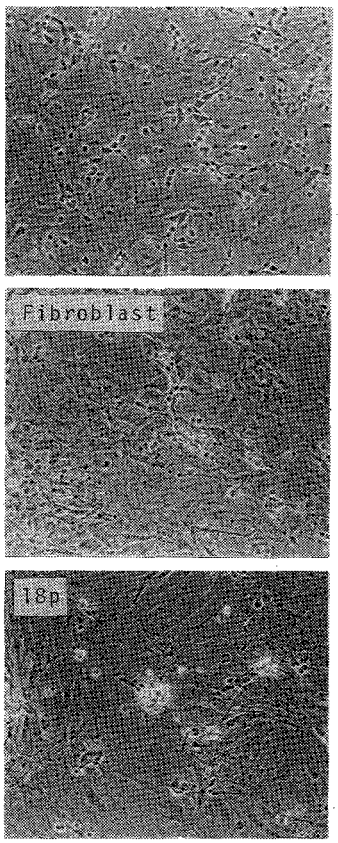
分裂率は既報の方法[4]で測定した。

(図2)ｶﾊﾞｰｽﾘｯﾌﾟ上でのneuronの突起伸展

対照群　　astroglia群



(図3)熱処理各種細胞の突起伸展効果

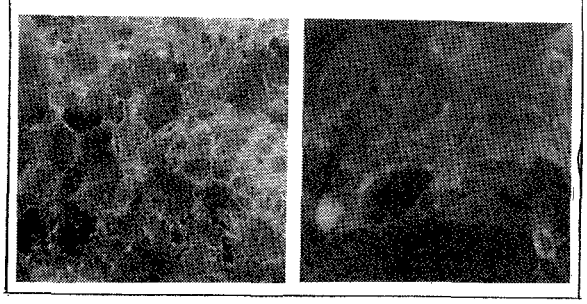


gliaを熱処理により死滅させた後、この上にneuronを蒔きその突起伸展に対する効果を検索した。結果は図３のごとく、死滅した astroglia上においてもneuronの突起伸展は図２に示したカバースリップ上での突起伸展に比べ明らかに促進されていた。このことはneuronに対する astrogliaの突起伸展効果がneuronと astrogliaの細胞接触によって引き起こされていることをさらに支持するものであった。

次ぎに、この astrogliaのneuronの突起伸展に対する効果が astrogliaに特異的な現象か否かを検討するために、熱処理したfibroblastおよび 18pの細胞をsubcultureとして用い、neuronの突起伸展に対する効果を検索した。図３に示すごとく、18p およびfibroblast上にneuronを蒔いた場合には neuron の著明なアグリゲーションが引き起こされ、突起伸展は astrogliaの場合に比べ著明に低下していた。このことからastroglia のneuronの突起伸展効果は astrogliaに特異的な効果であることが示唆された。

次ぎにneuronと astrogliaの接触部位における電顕的検索を行った。電顕所見ではastroglia とneuronは狭い細胞間隙をもって密に接している所が散見され、その部位では両者の膜の electron density が高くなっていた。また、これらの所見はneuronの細胞体でよりも突起部位において頻繁に認められた。一方fibroblastとneuronでは両者の間隙は広く、その間にはcollagen繊維が散在しており、astroglia の場合とは形態学的にも差異が認められた。この電顕所見も考え合わせ、neuronとの接触により突起伸展を促進する astroglia膜表面物質の存在が示唆された。この一つとして近年注目されているNg-CAMの受容体[1]あるいは laminin等が関与する可能性がある[2,3]。しかしながら我々の系では astrogliaは抗-laminin抗体による免疫染色では染色されず、また、astroglia 培養上清中に抗-laminin抗体を添加してもneuronに対する突起伸展効果を阻害しなかったことから lamininの関与は少ないものと考えられる。いずれにしても astroglia膜表面に存在しneuronの突起伸展効果を有する因子については未だ不明な点が多い。そこで我々はneuronに対する突起伸展効果を全く有しない 18pを対照とし、astroglia の膜表面に対するモノクローナル抗体を作製した。現在図４に示したごとく 18pの膜表面には全く反応せず astroglia膜表面を特異的に認識する数種の抗体が得られている。今後これらの抗体を用い、astroglia 膜表面上に存在するneuronの突起伸展因子を明らかにしていきたいと考えている。

(図４)モノクローナル抗体による免疫蛍光染色



[文献]

(1) Edelman,G.M., Gallin,W.J., Delouvee,A., Cunningham,B.A., Thiery,J.-P., Proc.Natl.Acad.Sci. 80,4384-4388,1983. (2) Lander,A.D.,Fujii,D.K.,Reichardt L.F., Proc.Natl.Acad.Sci. 82,2183-2187,1985. (3) Liesi,P., Dahl, Vaheri,D., J.Cell.Viol. 96,920-924,1983. (4) 吉田一成、高坂新一、大谷光弘、戸谷重雄、塚田裕三、 神経化学 24、469-471、1985. (5) Yoshida,K., Kohsaka,S., Nii,S., Idei,T., Otani,M., Toya,S., Tsukada,Y., Neurosci. Lett. 70,34-39,1986

93. ニューロン性細胞とグリア性細胞の96Kタンパク質リン酸化反応

野路 久仁子・加藤 泰治・伊藤 仁一・田中 亮
（名古屋市大・医・第一生化）

〔要 約〕

正常および腫瘍性神経系細胞のタンパク質リン酸化、特に96K タンパク質のリン酸化反応を細胞増殖との関連で検討した。増殖期にある神経芽腫細胞、グリオーマ細胞に共通して、cell-free 系では96K タンパク質リン酸化が最も顕著であった。静止期の正常グリア芽細胞はタンパク質リン酸化活性は低いが、グリア細胞成長因子刺激により96K タンパク質のリン酸化活性が高くなった。このリン酸化は神経芽腫細胞と同様10^{-6} M Ca^{2+}に依存性であったが、活性全体の約1/3 はCa^{2+}非依存性であった。96K タンパク質はintact細胞の場合でも細胞増殖に伴いリン酸化が増大しこのタンパク質のリン酸化と細胞の生理的機能、特に細胞増殖の上昇と関係があるのではないかと思われた。さらに、これは増殖阻害剤の実験からも示唆された。即ち96K タンパク質リン酸化は細胞増殖を阻害する濃度のdiphenylhydantoin で細胞を前処理することにより著しく抑えられ、合成α-sialosylcholesterol前処理によっても阻害された。グリア芽細胞もPC12(7) も、cytosol 画分のみにこのリン酸化が認められた。リン酸化バンドを切り取りペプチドマップを行った結果、グリア芽細胞、C6、PC12の96K タンパク質はおそらく同一種のタンパク質であると思われた。

Key word： Protein phosphorylation, Glioblast, Glia maturation factor

我々は、ニューロン性細胞（PC12、Neuro2a、NG108-15）のホモジェネート中に強いCa^{2+}依存性96K タンパク質リン酸化が共通して見出されることを報告した(7)。このときグリオーマ細胞C6についても同様に96K タンパク質リン酸化が見られたが、Ca^{2+}依存性がニューロン性細胞のそれよりはるかに小さかった。EGF あるいはPDGF刺激による正常線維芽細胞のタンパク質Tyr リン酸化についての報告はあるが、正常グリア芽細胞の成長因子によるタンパク質リン酸化はまだ確認されていない。今回、グリア芽細胞をグリア細胞成長因子（GMF）で長時間刺激して初めてホモジェネート中のタンパク質リン酸化活性が上昇し、中でも96K が顕著であることを認めたので、この96K タンパク質リン酸化反応の性質を他の細胞種と比較して報告する。また、グリア細胞の増殖を抑制する薬物が96K タンパク質リン酸化反応に与える影響についても報告し、このリン酸化の意義を考察する。

【実験方法】

細胞培養：10% ウシ胎児血清を含む培地で、5%CO_2 中37℃で培養した。グリア芽細胞は在胎17日目のラット胎児大脳から一次培養、二次培養を経て得、2%血清に変えてGMF で刺激した。培地はDMEM（神経芽腫細胞）、またはDMEM-HAT(NG108-15)及び F-10（グリア性細胞）を用いた。タンパク質リン酸化反応：培養ディッシュをHEPES-salineで洗って細胞を剥離し、50mMHEPES(pH7.0)、0.5mMMgCl_2 、10mMDTT中にて5 秒間超音波処理してホモジェネートを得た。リン酸化は2mMEGTA 存在下、2mM $CaCl_2$ 有無で、5 μCi（γ-^{32}P)ATP(0.2mM) を加えて25℃、1 分間反応後、SDS を含む反応停止液を加え85℃、5 分間加熱した。SDS-PAGEの後、オートラジオグラフィを行い、ク

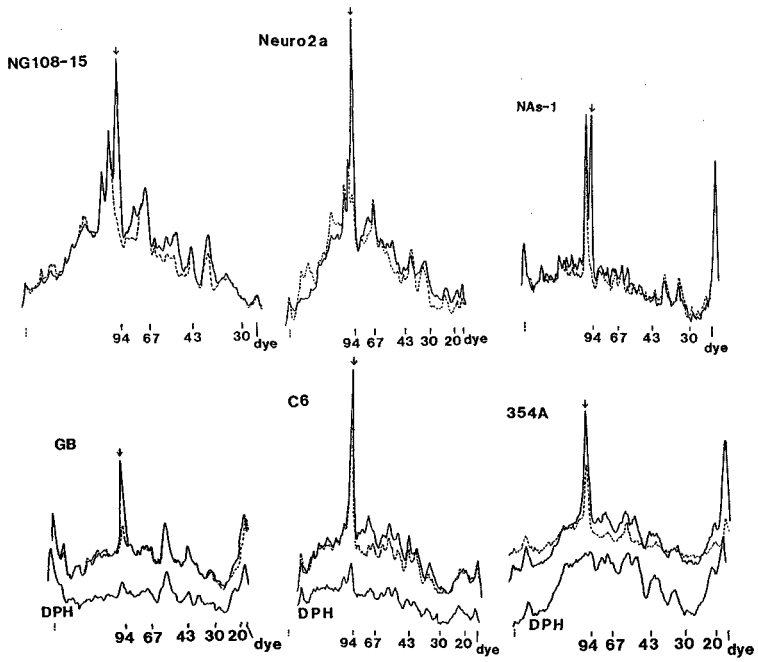


Fig.1 Densitometric profiles of phosphorylated proteins in homogenates of neuroblastoma cells, glioma cells, and glioblasts stimulated by GMF. ↓,96k; DPH,0.3 mM for GB and 354A, 0.4 mM for C6; ——,Ca; ---,EGTA; ¦,origin; numbers, molecular weight.

ロマトスキャナCS-9000 で測定した。ペプチドマップ：リン酸化されたバンドを切り取り、N-chlorosuccinimide で限定分解する方法(4) を用いた。オートラジオグラフィによってリン酸化ペプチドを検出した。

【実験結果】

いくつかの神経芽腫細胞、グリオーマ細胞、GMF 刺激後グリア芽細胞(GB)のホモジェネートのタンパク質リン酸化の比較をFig.1 に示した。どの場合も96K(↓印) が主なリン酸化バンドであった。神経芽腫細胞、特にNG108-15ではEGTAで96K のリン酸化が強く抑制されたが、グリオーマ細胞では抑制がその1/2 以下に停まった。GMF で刺激していないGBでは全体にタンパク質リン酸化活性が弱いが、96K タンパク質リン酸化は刺激後22h には無刺激の場合の約3 倍に増加した。一方グリア性細胞の増殖を抑制することがわかった diphenylhydantoin(DPH、0.3mM)(5)存在下でGMF 刺激をしてからホモジェネートのタンパク質リン酸化を行うと、96K タンパク質リン酸化が強く阻害された(Fig.1、下段)。細胞増殖抑制性の合成α-sialosylcholesterol(15 μg/ml)(3)で前処理してもリン酸化はほぼ完全に抑えられた。同様に細胞増殖を抑制するW-7(50 μM)(6) 処理で38%、puromycin(2 μM)処理で30% 減少した。

次に96K タンパク質リン酸化反応の性質を神経芽腫細胞のそれと比較した。リン酸化のCa^{2+}に対するみかけのKmは、Fig.2 のようにNG108-15は1.1 ×10^{-6} M になり、GBも2 ×10^{-6} M 前後と推定され、ほぼ生理的な濃度の範囲内であった。GBのホモジェネートを10^5 g ×1h遠心して得た上清と沈殿では、上清に96K タンパク質リン酸化がみられ、沈殿にはみられなかった(Fig.3)。PC12も同じ結果になった(7)。96K リン酸化バンドを切り取り、ペプチドマップを行った結果、Fig.4 のようにGB、C6、PC12ともに30K 付近に2 本の主なリン酸化バンドが認められ(*印)、リン酸化ペプチドの分子量は同一であることが示唆された。PC12は^{32}Piを用いたintact細胞のリン酸化実験

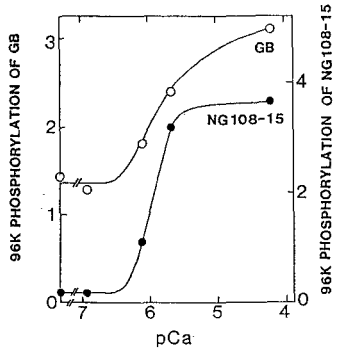


Fig.2 Dependence on Ca^{2+} of 96k protein phosphorylation of GB and NG108-15.

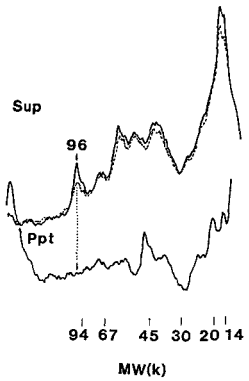


Fig.3 Protein phosphorylation of subcellular fractions of GB. ——,Ca; ---,EGTA.

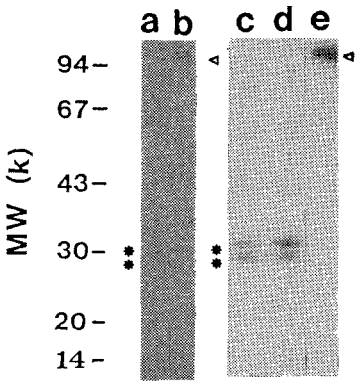


Fig.4 Autoradiogram of 96k peptide maps. ✱,GB(a), C6(c), and PC12(d); ◁,96k proteins of GB(b) and PC12(e).

で、high^{+}KやA23187に応答して96K タンパク質リン酸化が増加した(7)。GMF 刺激後GBも、A23187に応答した96K タンパク質リン酸化の増加がみられた。GMF によるこのリン酸化の増加は24h で約1.5 倍であった。

【考察】

グリア芽細胞をGMF で刺激して短時間(30 分まで)ではintact細胞内でも細胞膜画分でも、顕著なタンパク質リン酸化の増加が認められなかった。しかし、GMF 刺激後22h では細胞ホモジェネート中のタンパク質リン酸化活性は大きく増加した。intact細胞を^{32}Piでパルスラベルした場合でも96K バンドのリン酸化がGMF(24h)により約1.5 倍程度ではあるが増加を認めた。上の実験結果と、今回用いた腫瘍細胞には高い96K タンパク質リン酸化活性があることと、グリア性細胞では増殖阻害剤の前処理によりこのリン酸化が抑えられることなどから、96K タンパク質リン酸化活性は一般に少なくともグリア性細胞の増殖に伴い上昇するのではないかと推察される。細胞内局在、Ca^{2+}に対するみかけのKm値、ペプチドマップから96K タンパク質は実験に用いた細胞種に共通のタンパク質種であろうと思われる。Balb/3T3やC3H/3T3 細胞のC キナーゼでリン酸化される90K タンパク質は細胞膜画分に存在すると報告されている(1)。PC12、C6、GBをTPA 処理しても96K タンパク質リン酸化の増加は認められなかったし、GBにおいてはむしろCa^{2+}依存性96K タンパク質リン酸化は抑えられた。従って96K タンパク質はC キナーゼの基質とは考えられないであろう。

【文献】

(1) Chida,K.et al. (1986) Cancer Res. 46, 1055-1062
(2) Ek,B.et al. (1982) Nature 295, 419-420
(3) 加藤 泰治ら (1986) 神経化学 25, 85-87
(4) Lishwe,M.A. and Ochs,D. (1982) Anal. Chem. 127, 453-457
(5) 野路 久仁子ら (1985) 日本癌学会総会記事 p.238
(6) Okumura-Noji,K.et al. (1983) Brain Res. 273, 17-23
(7) Okumura-Noji,K.et al. (1986) Neurochem. Res.11, 1583-1594

94. ニワトリ胚の終脳胞神経細胞の生存と分化に関与する因子

田口隆久・Changeux J. P. *・Henderson C. E. *
（大阪大・基礎工・生物工学，パスツール研*）

〔要　約〕

除神経したニワトリ筋肉の抽出液が、ニワトリ胚の脊髄培養細胞の神経繊維の伸長に効果のある因子を含んでいる（1）。この抽出液のDEAE－セファロース分画には、この活性のほとんどが残っている。この活性が脊髄以外の培養細胞に効果があるかどうかを試したところ、1μg／mlのDEAE分画の添加によって、5日目のニワトリ胚の終脳胞神経細胞の生存と神経繊維の伸長を促進することが明らかになった。この効果は、6日目のニワトリ胚でも同様にみとめられたが、7日目以降は、徐々に効果が減少した。一方、ニワトリ胚の間脳胞、中脳胞、菱脳胞の培養細胞には顕著な効果はみとめられなかった。神経繊維伸長に対する同様の効果は、比活性は低いものの、新生ニワトリ脳、肝臓、心臓の抽出液に見出されたが、肺の抽出液中にはなかった。この活性を担う因子は、種々の実験から、神経成長因子（NGF）、繊維芽細胞成長因子（FGF）、ラミニン等の既知の神経繊維成長活性をもった因子とは異なり、またBSA、トランスフェリン、インシュリン等のタンパク質とも異なる新しいタンパク質であることが、解った（2）。

Key word： Neurite-promoting factors, telencephalic neurons, embryonic brain culture

序

神経系の発生のいろいろな段階で神経細胞の生存と分化が標的細胞の存在に依存している。このことは、標的細胞あるいはその周辺の細胞が、神経細胞の形態的および機能的分化に必要な成長因子を産生、放出していることを、少なくとも部分的には、反映している。神経筋接合部の発生に関与する因子"Motoneuron growth factors"（MNGFs）が筋肉で合成されているという仮説は以前よりあった。我々は、ニワトリ胚脊髄培養細胞の神経繊維伸長を指標にして、少なくとも2種類のMNGFsを見いだし、その解析を進めてきた（3、4）。この因子が、脊髄以外の中枢神経細胞の生存や分化に効果があるかどうかをニワトリ胚の培養脳細胞を用いて検討した。

方法

神経細胞の培養

ニワトリ胚の脳の異なった部位から取り出した組織を37 Cで15分間トリプシン処理し、ピペットで細胞を解離した後、40，000 cells／well（16 mm）の濃度で、co_2インキュベータ内で培養した。培養液は、Ham's F12にグルタミン、インシュリン、グルコース、ストレプトマイシン、ペニシリンを添加したものを用いた。

組織抽出液の調製

生後8日目のヒヨコの除神経した脚筋肉（除神経後3日目）や他の組織（脳、肺、肝

臓、心臓）を、各種プロテアーゼ阻害剤を含んだＰＢＳ（４ｍｌ　ＰＢＳ／ｇ　組織）中で、ポリトロンを用いてホモゲナイズした後、14,000 gで１時間遠心し、その上清を抽出液とした。各抽出液のＤＥＡＥ分画は、100 mM NaCl,20 mM Bistris-HCl pH 7.0で平衡化したＤＥＡＥ－セファローズに抽出液を流し、同じ溶液で容出液の　２８０ｎｍの吸収がさがるまで洗った後、３００ｍＭ　ＮａＣｌを含む溶液でタンパク質を溶離し、それをＤＥＡＥ分画とした。

アッセイ

段階的に希釈した抽出液とともに解離した細胞を培養し、決められた時間に生存する細胞数と細胞直径の２倍以上の長さの神経繊維をもつ細胞数を顕微鏡下で数えた。生存細胞数は、１時間培養後の生存細胞数に対する相対値とした。

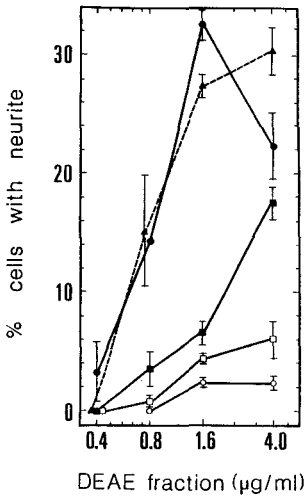


fig.1　ＤＥＡＥ分画に対する神経繊維伸長応答の用量応答曲線．終脳細胞（　●　）、間脳細胞（　○　）、中脳細胞（　□　）、菱脳細胞（　■　）、脊髄細胞（　--▲--　）

結果

５日目ニワトリ胚の終脳、間脳、中脳、菱脳の解離培養細胞に対する除神経筋抽出液のＤＥＡＥ分画の神経繊維伸長活性を調べた結果がｆｉｇ．１に示してある。終脳は、脊髄細胞と同じような用量応答曲線を示したが、他の部位、間脳、中脳、菱脳には効果がなかった。菱脳の場合には、用量を多くすると応答がみえる傾向がある。どの部位の細胞も、ラミニンに対しては神経繊維伸長応答をしめすため、細胞の神経繊維伸長の能力の差が存在するのではない。また、ニワトリ胚の条件培養液には、各部位に対する強い活性は認められなかった。

次にこの部位依存性のＤＥＡＥ分画活性が、胚の時期によって変化するかどうかを調べた結果が、ｆｉｇ．２示してある。５日目から９日目までの範囲で、応答を示したのは終脳胞細胞のみである。終脳の場合も、最もよく応答したのは５日目の胚の細胞で、６日目以降、応答性が漸減した。点線で示したラミニンの効果は、Positive controlである。

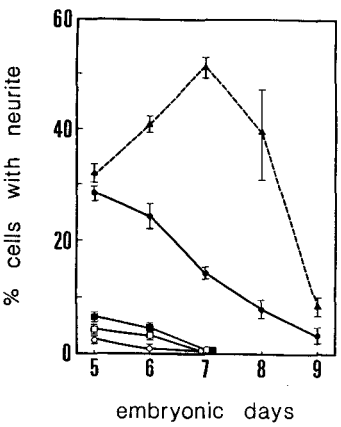


fig.2　ＤＥＡＥ分画とラミニンに対する神経繊維伸長応答の胚齢依存性．終脳（●）、間脳（○）、中脳（□）、菱脳（■）のDEAE分画に対する応答．終脳のラミニンに対する応答（-▲-）．

ＤＥＡＥ分画には、神経繊維伸長活性のほかに神経細胞の生存に対する効果もあることをしめしたのがｆｉｇ．３である。ＤＥＡＥ分画を添加しないと、ほとんどの細胞は４日以内に死滅するのにたいし、その添加によって、４日後に、終脳の場合、５５％以上の細胞が
生存していた。この細胞の生存の効果は、すべえての部位の

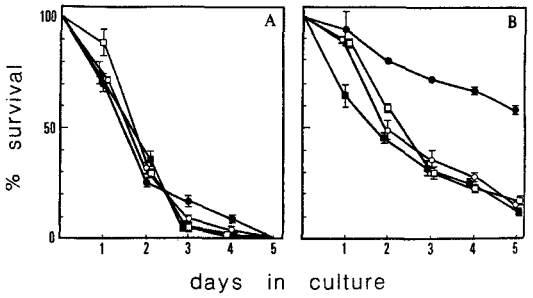


fig.3 DEAE分画の細胞生存に対する選択的効果. (A) DEAE分画なし、(B) DEAE分画を含む. 終脳細胞 (●)、間脳細胞 (○)、中脳細胞 (□)、菱脳細胞 (■).

脳培養細胞に対してあったが、特に終脳細胞に対して大きかった。6日目、7日目の胚から調製した細胞に対しても同様の効果が観察された。

除神経していない筋肉、肝臓、心臓、脳の抽出液中にも比活性は低いものの神経繊維伸長活性が見いだされたが、肺の抽出液中にはなかった。また、20 μg/ml迄のBSA、トランスフェリン、カタラーゼ、インシュリン、 100 ng/mlまでのNGF、2.5 ng/ml迄のFGFには、そのような活性はなかった。

ここで観察されている細胞が神経細胞であることはニューロフィラメントに対する抗体を用いた間接蛍光抗体法で確認した。

考察

筋肉由来の因子が、脳の特定の時期と部位の神経細胞の神経繊維伸長と生存の両面の効果をもつことが明らかになった。この時期は、ニワトリ胚の発生過程において神経細胞の増殖から神経繊維伸長へと変る時期と一致しており、この因子の性質を興味深いものにしている。この因子は単一タンパク質にまで精製されていないため、神経繊維の伸長に関与する因子が、生存に関与するものと異なるタンパク質である可能性もあるが、我々の予備的な実験では、高度に (1000 倍以上) 精製した分画もその両者の活性を有し、さらに終脳と脊髄の両方の培養細胞に対して活性をしめした。

DEAE分画に対する終脳細胞の胚の時期に応じた変化は、神経細胞の応答性の変化と考えられるが、細胞数の増加にともなった応答可能細胞の割合の低下と考えることも可能である。

ここで存在の示された因子の同定、精製や in vivo での局在、機能をあきらかにすることは、神経筋接合部や終脳の神経網形成の機構解明に役立つものと期待される。

参考文献

(1) Henderson,C.E.,et al.(1983) Nature,302,609-611

(2) Taguchi,T.,et al.(1987) Dev.Brain Res. in press

(3) Henderson,C.E.,et al. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,78,2625-2629

(4) Henderson,C.E.,et al. (1984) Dev.Biol.,104,336-347

95. ウシガエルの視神経再生機構について

溝渕宗秀・八木康之*・水野有武・
松田　誠*　（慈恵医大・眼科，医化学*）

〔要　約〕

哺乳類の中枢神経系においては、切断破壊された軸索の伸長、神経の再生は困難であるのに対して、冷血動物においては、神経が再生し機能が回復することが知られている。今回、我々は、ウシガエルの視神経を用いて中枢神経系における神経再生の実験を行い、再生時における網膜内の生化学的変化を遺伝子レベルで検討した。まず、視神経を切断して3カ月後に組織標本を作成したところ、軸索の伸長が認められた。さらに、[^{3}H] leucineを硝子体腔に注入し、視神経、視索及び視蓋部の放射活性を測定することによって軸索輸送が機能的に回復しているかどうか検討したところ、回復が確認された。次に、細胞骨格を構成し、神経の成長・再生にも深く関与しているtubulin、actin遺伝子が、神経再生時に網膜内でどのように発現しているかを検討した。Tubulin mRNAは視神経切断後1時間で著明に増加し、4時間で対照（非神経切断カエル）と同レベルまで減少した。これに対して、actin mRNAには有意な変化を認めなかった。この網膜におけるtubulin遺伝子の発現は視神経再生の初期反応として重要な役割を担っていると思われる。

Key word：　Nerve regeneration, Bull frog, Tubulin mRNA

Cajal以来、数多くの研究者が神経再生という課題に取り組んでいるが、その詳細は未だ明らかになっていない。通常、哺乳類の中枢神経系では、切断された軸索は再生しないとされているのに対して、冷血動物では再生することが知られている（1）。再生可能な中枢神経系の実験材料として金魚の視神経を用いた研究は高坂らの例があり、彼らは視神経を切断し、その後の網膜内での生化学的変化を検討することによって、神経再生機序を生化学的に追求している（2）。今回、我々は、実験材料としてウシガエルの視神経を用いて、中枢神経系である視神経が再生するかどうか検討し、さらに、この時の網膜内での生化学的変化を遺伝子レベルで検討した。

［材料及び方法］

<u>カエル視神経切断方法</u>

用いたウシガエル（Rana catesbeiana）は、体重250-300gで、tricane methanesulfonate（MS-222）で麻酔し、頭部よりアプローチした。眼窩縁に沿って約1cm皮膚切開を行い、十分に止血を行った。つぎに、筋組織に包まれている眼窩内の視神経を出血に注意しながら周囲より鈍的に剥離し、視神経のみを露出させた。さらに、伴走している血管を確認し、これを損傷することなく視神経から剥離し、スプリング剪刀にて視神経だけを球後約3mmの部位で切断した。以上の処置後、発現遺伝子の検討の場合には数時間飼育し、視神経再生の実験の場合には室温にて3ヵ月間飼育した。

<u>視神経切断後の軸索輸送の確認</u>

視神経を切断して3ヶ月後に[^{3}H] leucine 10μCiを硝子体腔に注入し、1週間飼育の後に視神経、視索、視蓋部をそれぞれ個々に摘出した。摘出した組織はPROTOSOLを

1ml加え、40℃で24時間インキュベートすることによって可溶化した。可溶化後は液体シンチレーションカウターにて放射活性を測定した。

RNAの抽出

カエルの視神経を前に述べた方法で切断して、1、2、4時間後に網膜をすばやく採取する。Guanidinium/Cesium chloride法（３）により採取した網膜からRNAを抽出した。ラット脳のRNA抽出も同じ方法で行った。

Northern blot analysis

total RNAを1%formaldehyde agarose gel電気泳動後、nitorocellulose膜にトランスファーし、tubulin、actin cDNAを［α-^{32}P］dCTPでラベルして得られたプローブを用い、hybridizationを行った。tubulin、actin cDNAは、筑波大学、新井先生より譲渡された。

［結果及び考案］

視神経を切断して3ヵ月後にヘマトキシリンーエオジン染色による組織標本を作製した。視神経縦断切片にて、一部空胞変性、間葉系細胞の侵出、切断部位で不規則な走行をした神経線維を認めるものの明らかに軸索の伸長を認めた（Fig.１）。さらに、機能的に軸索輸送が回復しているかどうか、［^{3}H］leucineを硝子体腔に注入し、視神経、　視索及び視蓋部の放射活性を測定することによって検討した。これは、網膜神経節細胞に取り込まれたアイソトープラベルのアミノ酸が蛋白合成時に組み込まれ、軸索輸送により神経節細胞の神経終末である視蓋部まで運ばれることを利用したものである。Fig.２の左グラフが無処置のカエルに［^{3}H］leucine　を注入した場合で視蓋部に10000dpm近い放射活性が認められる。右のグラフは視神経を切断した場合で、やはり、対照と同程度の放射活性が認められる。このことは軸索輸送の回復を示すものである。以上の結果により、中枢神経系である視神経の再生が形態面、及び機能面から証明された。また、このとき視神経での放射活性は対照と比較して有意に増加しているが、現在、［^{3}H］leucine硝子体腔注入後のmicroautoradiographyを行って、この結果について検討している。

actin、tubulinは共に細胞骨格であり、細胞の形を維持するばかりでなく、細胞小器官や小胞の輸送、細胞の分裂や運動、さらには細胞の分化にも深く関与している。特に神経細胞の分化ついては、培養交感神経ニューロンの突起成長を神経成長因子（NGF）で刺激すると、actin、tubulinの新生がみられるという事実（４）や微小管を特異的に破壊するコルヒチンを投与すると神経突起の形成阻害や破壊がみられるという事実からも深い関わりが考えられる。今回我々はこのactinとtubulinについて視神経切断後にどのような挙動を示すかNorthern blotにより検討した。

Northern　blotによる解析の結果、カエル網膜でのactin mRNAの発現は、視神経切断前も切断後も認められるが、その発現量に著明な変化は認められなかった（Fig.3-B）。これに対して、tubulinの場合は切断後1、2時間をピークとしてtubulin mRNAの強い発現が認められた（Fig. 3A, lane 4, 5）。

Burrellらは金魚の視神経をcrushし、一定期間飼育の後、網膜poly(A)-containing RAN を抽出し、その translation product を検討したところ、crush 後4日目よりtubulin の増加がみられたと報告している（５）。今回のカエル視神経を用いた我々

の実験では、tubulin mRNAが視神経切断後のきわめて早い時期に一過性に発現することを認めたが、これは、カエル視神経再生開始の初期反応をとらえたものとして注目している。

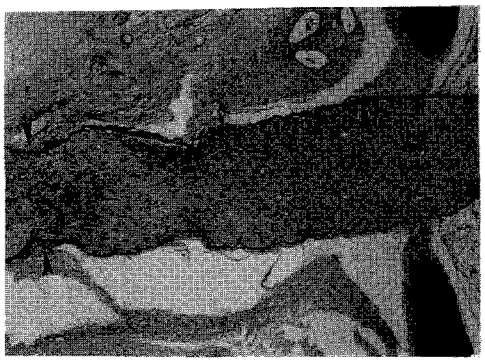


Fig.1. Longitudinal section of optic nerve. The running of nerve bundles are irregular but continuous at the transected region(arrow). H.E. stain. X20

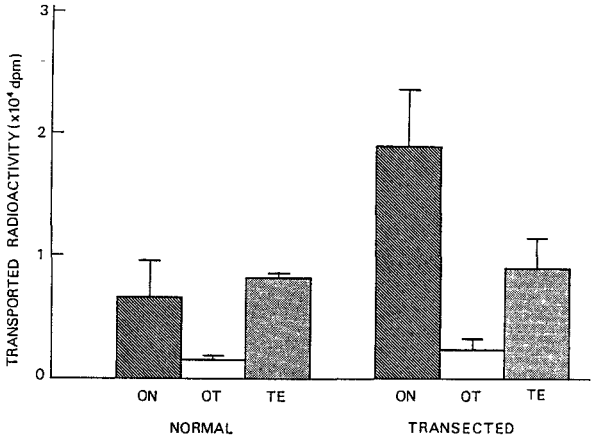


Fig.2. Axonal transport of [^{3}H]leucine labelled protein. ON,optic nerve; OT,optic tract; TE, tectum.

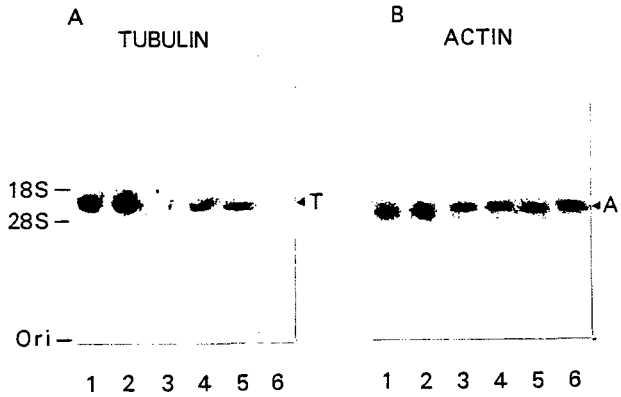


Fig.3. Northern blot analysis of frog retina and rat brain RNA. The optic nerves of bull frogs were not transected(lane 3) and transected(lane 4-6). The retinas of operated frogs were removed at 1 hr(lane 4), 2 hrs(lane 5), and 4 hrs(lane 6) after transection. Rat brain RNA(8μg, lane 1 and 16μg, lane 2) and frog retina RNA (8μg, lane 3-6) were electrophoresed on a 1%formaldehyde agarose gel, transferred to nitrocellulose membrane, and hybridized to the ^{32}P-labelled tubulin DNA(A) and actin DNA(B).

[文献]

1) Attardi, D.G. and Sperry, R.W. (1963) Exp. Neurol. 7, 46-64.

2) 高坂 新一 (1983) 生体の科学 34(6), 466-473

3) Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J. and Goodman, H.M. (1977) Science 196, 1313-1319.

4) Fine, R.E. and Bray, D. (1971) Nature New Biol. 234, 115-118

5) Burrell, H.R., Heacock, A.M., Water, R.D. and Agranoff, B.W. (1979) Brain Res. 168, 628-632

96. ヒト正常脳および脳腫瘍におけるtransthyretinの免疫組織化学的検索

国塩勝三・白石哲也・三島宣哉・松海信彦・
田宮　隆・本田千穂・松本健五・古田知久・
西本　詮　（岡山大・医・脳外）

〔要　約〕

Transthyretin（ＴＴＲ）は、thyroxineおよびretinolの結合タンパクで、肝臓のみならず正常脳脈絡叢においても産生されていると考えられている[1)2)]。

今回我々は、ＴＴＲに対する特異抗体を用いて、ヒト正常脳（特に脈絡叢）および88例のヒト脳腫瘍におけるＴＴＲの有無および局在を免疫組織化学的に検索した。

ヒト正常脳においては、脈絡叢上皮細胞の細胞質に強陽性に染色されたが、脳室上衣細胞、グリア細胞および神経細胞は全て陰性であった。ヒト脳腫瘍においては、正常脈絡叢の形態を模倣するchoroid plexus papillomaの10例全例が陽性所見を呈し、choroid plexus papillomaとの鑑別において問題になるpapillary ependymoma 2例および他の脳腫瘍76例では全て陰性であった。Choroid plexus papillomaでは、ほとんど全ての細胞が陽性反応を呈するものから、一部の細胞が陽性反応を呈するものまで症例毎に異なった染色パターンがみられた。以上の結果より、ＴＴＲは中枢神経系では正常脈絡叢およびchoroid plexus papillomaにおいて特異的に免疫組織化学的に陽性反応を示すことより、これらのマーカーとして有用であると考えられた。

Key word：Transthyretin (TTR), Choroid plexus, Choroid plexus papilloma

（はじめに）

Transthyretin（以下ＴＴＲと略す。なおプレアルブミンと同意語である）は、4種類のサブユニットからなる分子量約55ＫＤのタンパクで、主に肝臓において産生され血中および髄液中に存在する[1)2)]。しかし、ＴＴＲの髄液濃度は血中濃度に比較し異常に高く、脈絡叢においても産生されていると考えられている[2)]。正常脈絡叢におけるＴＴＲを免疫組織化学的に検索した報告[1)2)]は散見されるが、脳腫瘍、特にchoroid plexus papillomaで検索した報告はみられない。

今回我々は、ヒト正常脳（特に脈絡叢）および脳腫瘍においてＴＴＲに対する特異抗体を用いて免疫組織化学的検索を行った。その結果ＴＴＲは脈絡叢およびchoroid plexus papillomaのマーカーとなりうる知見を得たので若干の文献的考察を加えて報告する。

（材料と方法）

ヒト正常脳組織は、当教室において内減圧の目的で切除した脳組織および剖検脳を用いた。

ヒト脳腫瘍組織は、当教室で開頭術により摘出した生検組織を用いた。その内訳は、astrocytoma（8例）、glioblastoma（6例）oligodendroglioma（4例）ependymoma（5例）choroid plexus papilloma（10例）、medulloblastoma（5例）PNET（1例）hemangioblastoma（5例）、neurinoma（4例）、meningioma（5例）pituitary adenoma（7例）、craniopharyngioma（3例）germinoma（3例）、choriocarcinoma（2例）teratoma（2例）、chordoma（2例）malignant lymphoma（2例）、metastatic brain tumor（5例）の88例である。

標本は10%中性ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後8μの切片を作製した。抗体は抗プレアルブミンウサギ血清（DAKO社）をもちいてSternbergerのPAP法によりTTRの局在を免疫組織化学的に検索した。さらに脈絡叢およびchoroid plexus papillomaでは抗glial fibrillary acidic protein（以下GFAPと略す）血清（DAKO社）による免疫組織化学的検索も追加し、TTR染色反応と比較検討した。

なお抗体の特異性はwestern blottingで、約55KDのところに陽性の単一バンドが現れることで確認した。

（結果）

1、ヒト正常脳組織：脈絡叢上皮細胞では全ての細胞が強陽性を呈し、その陽性反応は主に細胞質に観察された（Fig. 1）。他の正常脳組織、すなわち脳室上衣細胞、グリア細胞、神経細胞では陽性反応はみられなかった。なお抗GFAP血清に対し脈絡叢上皮細胞は全く陰性であった。

2、Choroid plexus papilloma：10例全例にTTR陽性細胞が認められ、陽性反応は、主に腫瘍細胞の細胞質に顆粒状に認められた。ほとんど全ての腫瘍細胞に陽性反応がみられるものから（Fig. 2 a）、一部の細胞にのみ反応がみられるもの（Fig. 2 b）まで症例毎に異なった染色パターンを示した。一方、抗GFAP血清に対しては10例中4例に陽性反応を示すものがみられた。陽性反応を示した細胞は、choroid plexus papillomaの腫瘍細胞そのものと思われる細胞、腫瘍組織の中でependymoma様に突起を間質に伸ばし、ciliaを有する細胞　および一部の間質の細胞であり、これらの細胞は抗TTR抗体には陰性であった。

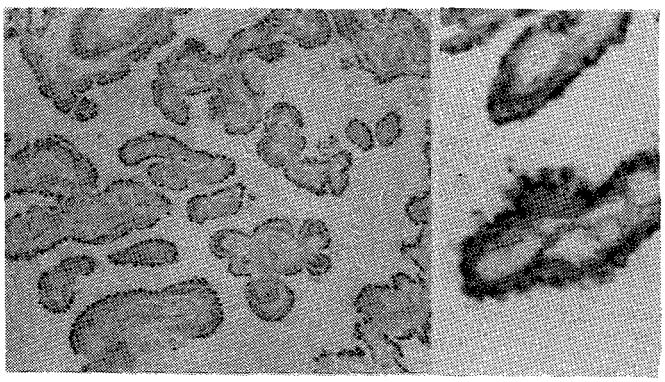


Fig.1 Normal choroid plexus

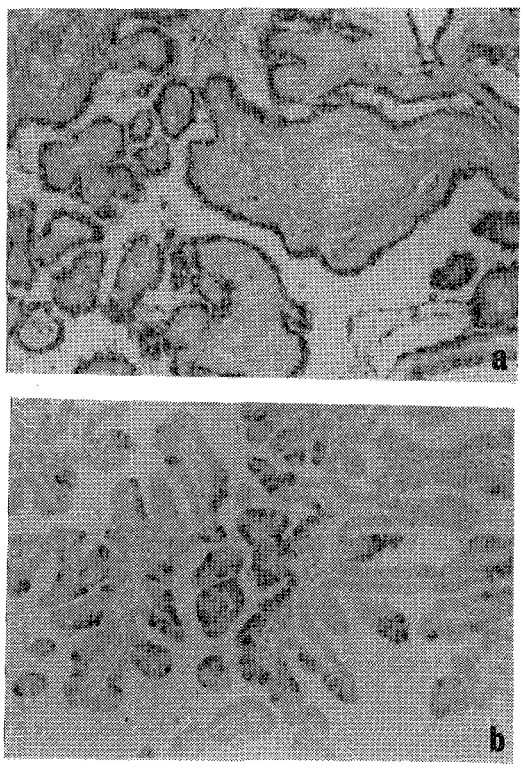


Fig.2 Choroid plexus papilloma

3、その他の脳腫瘍：Choroid plexus papillomaとの鑑別で問題になるpapillary ependymoma（2例）では、抗TTR血清にて全く陰性であった。さらに他の脳腫瘍においても陽性反応は全くみられなかった。

（考案）

TTRは、肝臓で産生される分子量約55KDのタンパク質であるが、髄液中には他のタンパク質と比較して高濃度に存在することが知られており、脈絡叢において血中から髄液中へのTTRの特殊な選択的輸送システムが関係しているものか、新しく産生されるものなのかが問題とされていた。最近、抗プレアルブミン抗体を用いた免疫電顕にて脈絡叢の細胞質、特にendoplasmic reticulumおよびゴルジ装置に陽性反応がみられること[1]、およびin situ hybridization法にてTTRのmRNAが細胞質内に豊富に存在することが確認されたこと[2]より、脈絡叢におけるTTRの産生説が主に受けいられるようになった。

今回の検索においては、脈絡叢のみならずchoroid plexus papillomaの全例がTTR陽性を示すことが明らかとなった。脈絡叢では、全ての上皮細胞がTTR陽性を示し、細胞質内全体が染色された。Choroid plexus papillomaでは、Table 1に示す如くほとんど全ての腫瘍細胞が染色されるものから、一部の腫瘍細胞のみ染色されるものまで症例毎に異なった染色パターンを呈した。一方抗GFAP血清に対しては、脈絡叢では全く陰性で、choroid plexus papillomaでは10例中4例に陽性反応がみられた。しかし、GFAP陽性細胞は抗TTR血清に対して陰性であり、一部逆相関の関係があることが示唆された。

このようにchoroid plexus papillomaにおいてGFAP陽性反応がみられるのは、本腫瘍のglial differentiationもしくはependymal differentiationによるものと考えられる[3][4]。

Choroid plexus papillomaとの鑑別で問題となるpapillary ependymomaでは2例ともTTR陰性であったことより　両者の鑑別の一助となりうるものと考えられた。さらに他の脳腫瘍においても全例陰性であったこと、また脈絡叢以外の他の脳組織では全て陰性であったことより、TTRは脈絡叢およびchoroid plexus papillomaのマーカーとなりうることが証明された。

Table 1
Results of Immunohistochemical Study
on 10 Choroid Plexus Papillomas

Case No.	Age and Sex	Location	Staining grade TTR	GFAP
1	7mos M	?	++	+
2	2yrs M	Rt.L.V.	+	+++
3	6yrs F	Rt.L.V.	+	+
4	12yrs F	IV V.	+	−
5	27yrs F	IV V.	+	−
6	34yrs F	IV V.	+++	−
7	38yrs F	CPA	+++	−
8	44yrs M	IV V.	+++	−
9	49yrs M	IV V.	+	++
10	56yrs F	IV V.	+	−

Location;L.V.:lateral ventricle, IV V.:IVth ventricle,
CPA:cerebellopontine angle,
Staining grade (% of positive staining cells to all tumor cells);+++:>80%, ++:30% to 80%,
+:<30%, − :negative

（文献）

1.Aleshire, S.L. et al.(1983)
J Histochem Cytochem 31:608−612

2.Herbert, J. et al.(1986)
Neurology 36:900−911

3.Rubintein, L.J. et al.(1981)
Acta Neuropathol 53:29−33

4.Taratuto, A.L. et al.(1983)
Acta Neuropathol 59:304−308

97. モノクロナール抗体Ki−67を用いたヒト脳腫瘍増殖動態の検討

— in vitro and in situ study —

白石哲也・国塩勝三・三島宣哉・松海信彦・田宮　隆・
本田千穂・松本健五・古田知久・西本　詮・田淵和雄*
（岡山大・医・脳外，佐賀医大・脳外*）

〔要　約〕

ヒト脳腫瘍の細胞増殖動態を、G_0期以外の増殖細胞の核に陽性像を示すモノクローナル抗体Ki−67を用いて解析した。脳腫瘍培養細胞（ヒト及びラット由来）、ヒト正常大脳組織及び脳腫瘍生検組織23例を対象に、PAP法による酵素抗体法を施行した。その陽性反応は核に局在しているが、個々の細胞により異なった所見を呈した。培養細胞において同調培養法およびbromodeoxyuridine (BUdR) 二重染色を併用した検討の結果、G_1期には主に核小体に顆粒状に、S〜G_2期には核小体と核質に比較的均質に、M期には染色体に染色される傾向が示された。対数増殖期における培養細胞においては、Ki−67陽性率は43.3〜47.8%であった。これはBUdR標識率の29.9〜33.8%及びproliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) 陽性率の31.3〜38.9%よりも約1.3〜1.5倍高値であった。正常脳組織では陽性所見を認めなかった。生検脳腫瘍では0%から22.5%の陽性率を示し、臨床的および病理学的悪性度に比例して、陽性率が高くなる傾向が明らかにされた。Ki−67陽性率は腫瘍の増殖能をよく反映しており、臨床的悪性度をより的確にまた簡便に把握する上で有用であると考えられた。

Key word：　Ki−67　monoclonal　antibody,　cell　cycle,　brain　tumors

［はじめに］

脳腫瘍の悪性度および増殖能を検討することは、患者の治療方針決定及び予後を推定する上で臨床的に非常に重要である。この解析には従来^{3}H−thymidineの標識率や分裂指数などが用いられてきたが、最近では星野ら(3)の抗BUdRモノクローナル抗体を用いる方法や、田淵ら(6)の抗PCNA抗体を用いる方法などが試みられている。

1983年Gerdesら(2)は増殖期の細胞核内に発現される抗原（Ki−67）に対する特異モノクローナル抗体を作成し、これはG_0期以外の細胞周期の核に陽性に染色され、細胞の増殖動態を推定する上で有用であることを報告した。今回我々はこの抗体を用いて脳腫瘍細胞の増殖能をin vitro及びin situで検討し、臨床的悪性度をより的確にまた簡便に把握する上で有用であることが示されたため報告する。

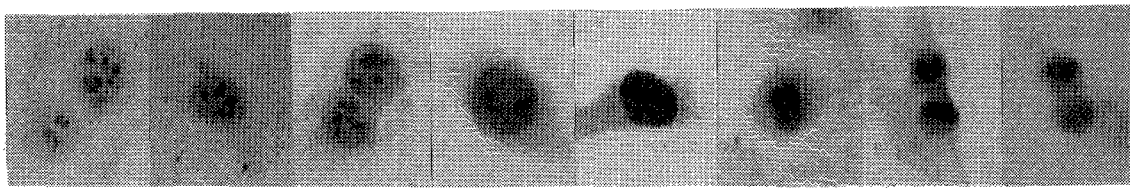
［対象および方法］

In vitroでは当教室で継代しているヒト脳腫瘍細胞培養株（OK,KC）およびラット脳腫瘍細胞株（C-6）を、in situでは手術により摘出されたヒト脳腫瘍23例および内減圧を目的として施行された前頭葉及び側頭葉切除生検材料を対象として用いた。培養細胞はtissue chamber slideで培養し、冷アセトンまたは70%冷エタノール固定後、Ki−67抗体（DAKO−PC）を一次抗体とするSternbergerらのPAP法を施行した。摘出標本はPLP固定後凍結切片を作成し、ABC法またはPAP法による免疫染色を施行したのち、約1000個の細胞をカウントし、Ki−67陽性細胞の比率を求めた。さらに培養細胞においては他の成長解析法と比較するため抗PCNA/cyclin抗体を一次抗体とする間接法、および長島ら(4)の抗BUdR抗体法を施行した。

［結果］

対数増殖期にある培養細胞はラット由来のものも含め全例陽性に染色され、その陽性率は43.3～47.8%であった。同時に行なったBUdR標識率（S期を認識する）は29.9～33.8%、PCNA陽性率（G_1期後半からS期を認識する）は31.3～38.9%であり、Ki−67陽性率のほうが約1.3～1.5倍高値であった（Table 1, Fig. 2）。その局在は細胞核内に限局していたが、個々の細胞により異なった所見を呈した。同調培養法およびBUdR染色との二重染色の併用により、G_1期には主に核小体に顆粒状に、S～G_2期には核小体と核質に比較的均質に、M期には染色体に染色される傾向にあることが示された（Fig. 1）。

ヒト正常前頭葉および側頭葉の組織では陽性所見を認めなかった。脳腫瘍では0%から22.5%の陽性率を示し、臨床的および病理学的悪性度に比例して、陽性率が高くなる傾向が明らかにされた（Table 2）。その陽性所見は培養細胞と同様核小体、核質、および染色体に認められた（Fig. 3）。



G_1　　S ～ G_2　　M

Fig. 1 Immunostaining of cultured OK cells with Ki−67 (PAP x400)

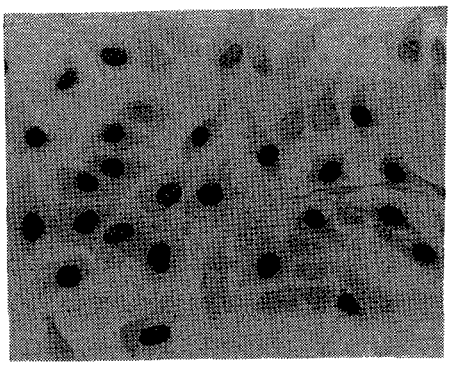


Fig. 2A C−6 BUdR x400

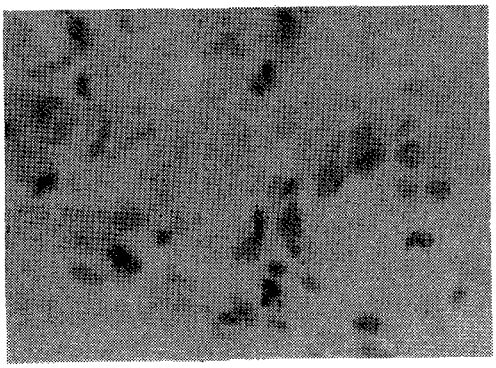


Fig. 3A glioblastoma Ki−67 x400

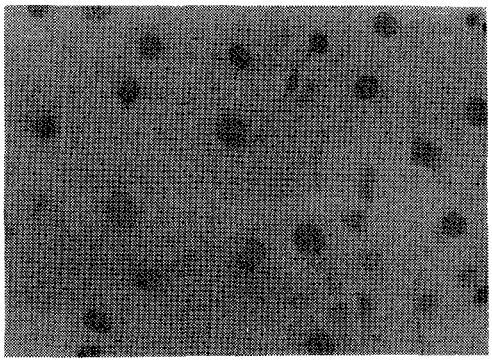


Fig. 2B C−6 PCNA x400

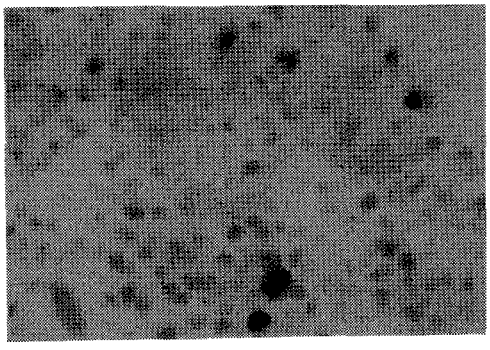


Fig. 3B PNET Ki−67 X400

［考察］

1983年Gerdesら[2]は細胞周期（G_1, S, G_2およびM期）にある全ての細胞を認識するモノクローナル抗体Ki-67を作成し、免疫組織化学的に増殖期細胞の同定が可能であることを報告した。さらにBurgerら[1]および柴田ら[5]は臨床的に脳腫瘍の増殖動態を検索するために、この抗体を用いたPAP染色が有用であるとの報告をしている。しかし、in vitroでの検索は少なく、他の増殖期関連抗原に注目した研究との比較はなされていない。

今回我々は脳腫瘍培養細胞を用いて、細胞周期によるKi−67染色性の変化と抗BUdR抗体法およびPCNA染色法との比較を行い、さらに臨床的に生検脳腫瘍も検索した。BUdR及びPCNAよりもKi−67染色法が優れている点としては①S期以外の細胞周期も認識できるため陽性率が高く、より詳しく細胞増殖能を検索できる。②細胞周期の各期においてその局在を変化させるため、より正確な細胞周期と局在との対比ができれば、組織切片上で細胞周期に関する研究ができる可能性がある。③BUdRのように術前の投与を必要としないため、副作用の心配がない。④抗体が市販されているため容易に入手できる。などが挙げられる。欠点としてはKi−67抗体の抗体価が低いため、固定法、標本の保存状態、染色法およびロットによる抗体価の差などの要因により、陽性率が変動する恐れがある。また、核小体に染色されたものは陽性かどうか判定に苦しむことがあり、研究者によって判定の基準が異なれば、施設間で厳密な比較が出来ないことも考えられる。しかし、個々の施設に於て染色法や判定法などを統一してKi−67陽性率を求めた場合には、その施設内での症例の比較には有用であると考えられた。今後は陽性率と予後との相関に関する研究や術中標本の悪性度迅速判定法などの検討が必要であると思われる。

［文献］

1) Burger P.C., Shibata T., Kleihues P. (1986) Am. J. Surg. Pathol. 10, 611-617

2) Gerdes J., Lemke H., Baisch H., et al (1984) J. Immunol. 133, 1710-1715

3) Hoshino T. et al (1986) J. Neurosurg. 64, 453-459

4) Nagashima T., Hoshino T. (1985) Acta. Neuropathol. 66, 12-17

5) 柴田太一郎, Burger P.C., Kleihues P. (1987) 小児の脳神経 12, 135-140

6) Tabuchi K., Honda C., Nakane P.K. (1987) Neurol. Med. Chir(Tokyo) 17, 1-5

Table 1. Percentage of Ki−67, BUdR and PCNA−positive nuclei in cultured glioma cell lines.

Cell line	Origin	Positive nuclei (%)		
		Ki−67	BUdR	PCNA
C−6	rat glioma	47.8	33.8	38.9
OK	human malignant glioma	46.3	31.0	35.7
KC	human glioblastoma	43.3	29.9	31.3

Table 2. Histological types and Ki−67 immunoreactivity of human brain tumors

Histological types	Number of cases	Ki−67 positive nuclei (%)	
		Range	Mean
astrocytoma	4	2.4 − 9.6	6.1
glioblastoma	2	16.5 − 22.5	19.5
anaplastic ependymoma	2	13.2 − 17.0	15.1
oligodendroglioma	2	0.8 − 1.2	1.0
neurinoma	2	0 − 0.3	0.2
meningioma	8	0 − 5.7	1.6
PNET	1	／	17.0
craniopharyngioma	1	／	0
ganglioglioma	1	／	0

98. ヒト脳腫瘍におけるインスリン様成長因子及び上皮成長因子受容体の発現について

栗原正紀・河野輝昭・森　和夫・
Saavedra J.*・Penar P.**・Ferrandez L.**
（長崎大・医・脳外，エール大・医・神経薬理*，脳外**）

〔要　約〕

定量的オートラジオグラフィー法を用い、術中摘出人脳腫瘍におけるインスリン様成長因子(IGF-I)及び上皮成長因子(EGF)受容体を測定し、その発現について検討した。

21の glioblastoma 標本中 10 標本に於て、対照群(normal cortex)に比べ、高濃度の IGF-I 受容体が存在し、また meningioma 3 例中 3 例共に比較的高い濃度が認められた。EGF 受容体は検索した 19 の glioblastoma 中 10 標本及び、3 例の meningioma さらに 2 例の astrocytomaの全例に高濃度に存在していた。組織切片においては、EGF受容体が瀰漫性に分布するのに比べIGF-I 受容体は、限局性で、glioma では、より悪性度の高い細胞集団に特にその発現が認められた。これらの結果は、EGF 受容体ばかりでなく IGF-I 受容体も脳腫瘍において高濃度に発現することを示し、腫瘍細胞の増殖にこれら成長因子が重要な役割を演じることが示唆される。

Key word：　Brain tumor, Insuline-like growth factor ,Epidermal growth factor

＝　始めに　＝

腫瘍細胞が産生する種々の成長因子がautocrineないしはparacrine mechanismを介し、細胞増殖に深く関与していることが示唆され、とくに sis や erb-B 癌遺伝子産物が、platelet derived growth factor (PDGH) や上皮成長因子 (EGF) 受容体に一致し、また ras 産物が postreceptor signal に関連する等が明かとなり、細胞の癌化及び癌細胞増殖について、これら成長因子の果たす役割が注目されている[2]。近年、脳腫瘍についても、gliomaで上皮成長因子(EGF)受容体の遺伝子に増幅が認められたとの報告がある[3]。しかし、本来、一つの腫瘍においても、とりわけ悪性脳腫瘍は不均一な組織像をていし、これら受容体の発現と細胞の悪性度との関係は未だ明らかでない。そこで今回、我々は、その受容体にEGFのそれと同様チロシンキナーゼ活性を有し、自己リン酸化能を示すインシュリン様成長因子(IGF-I)[6]に着目し術中摘出人脳腫瘍における受容体発現について検討するため、定量的 in vitro autoradiography[5] 法を用いて受容体を測定し、更に EGF受容体と比較した。

＝　対象及び方法　＝

1.対象及び標本：開頭術摘出後、速やかに凍結、-70°Cに保存されたglioblastoma 21標本（7症例）、astrocytoma grade II 3標本（3症例）、meningioma 3標本（2症例）に付いて検索した。対照群(normal cortex)として、難治性てんかん患者(3例）より摘出された前頭葉（2例）及び側頭葉(1例）で明らかな病理学的所見の認められない標本を用いた。なお症例のうち術前病歴に糖尿病を認めるものは除外されている。

2.方法：受容体測定にあたり、-16°C下にて16μmの連続切片を作成し、gelatin-coated slide glassに貼付けた後 4°Cで吸引下に一晩乾燥させた。成長因子受容体は、^{125}I-ligandを用い in vitro にてlabelし、^{3}H-sensitive ultrofilm (LKB)に感光させ autoradiography を作成、micro-densitometer

で像の黒化度を測定し、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により定量した。

(1)インスリン様成長因子(IGF-I)受容体(IGF-type I receptor)の測定：

各標本より作成した16μm 凍結切片を、室温（23°C）下で 10mM $MgCl_2$, 0.1% BSA,1mg/ml baci-tracin (Sigma)含有 25mM Tris-HCl buffer,pH 7.5 にて preincubation 15 分間行い,その後 0.1 nM (3-[^{125}I]iodotyrosyl) insulin-like growth factor-I,[Thr^{59}] (specific activity 1813Ci/mmol,Amersham Corp.) を含む同様の buffer 中で 120 分間室温でincubate した。non-specific binding は 0.1μM 非放射性 IGF-I(Amgen Biological)存在下に incubate することにより得た。その後、4°C,25mM Tris-HCl buffer,pH 7.5 中で各 1 分間 3 回洗浄、冷風下に乾燥させ、^{3}H-sensitive Ultrofilm に 3 日間 感光させ、autoradiogram を得た。

(2)上皮成長因子（EGF）受容体の測定：

IGF-I 受容体測定に用いられた切片に隣接した切片を使用し、0.1%BSA 含有 20mM HEPES buffer,pH 7.4 中で室温下に、15 分間 preincubate した後、1mM EDTA,10mM $MgCl_2$,0.1% BSA 及び 1mM phenylmethylsulfonylfluoride (Sigma) を含む20mM HEPES buffer,pH 7.4 中で 2.0nM[^{125}I]EGF(specific activity 121μCi/μg,Amersham Corp.) と共に室温下、120 分間 incubate した。nonspecific binding は、1.0μM 非放射性 EGF(Collaborative Reseach) 存在下にて同様にincubate した。その後、4°C,50mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 中で、各 2 分間 3 回洗浄、冷風下にて乾燥後、^{3}H-sensitive Ultrofilm に 3 日間感光させた。

＝ 結果 ＝

対照群において IGF-I 受容体は皮質最外層（23±4 fmol/mg protein mean±SEM）及び最内層（35±4 fmol/mg protein）に明らかな境界を持って分布するのに比し、EGF受容体は皮質全体に瀰漫性に分布（42±10 fmol/mg protein）し、白質には両成長因子受容体は存在しなかった。

良性 astrocytoma 標本においては、IGF-I 受容体は対照群と変わりなかった(34±4 fmol/mg protein)。一方、EGF 受容体は対照群に比しほぼ１０倍の高い濃度を示した。両成長因子受容体は共に瀰漫性分布を示した。

glioblastoma multiforme において IGF-I 受容体の濃度は Fig.1 に示すごとく、各標本間で大きな variation を示し、２１標本中６標本は対照群に比し、１０倍以上の受容体が存在し、更に、７症例中５例で高濃度の受容体の存在がみられた。又これら高濃度受容体の切片における分布は非常に限局性で比較的強い悪性所見を呈する細胞集団に一致していた。これに比し、EGF 受容体は、１９標本中１１標本に於て対照群の５倍以上の濃度を示したが、組織切片ではビマン性に分布し細胞特異性はみられなかった。meningiomaでは両成長因子共に対照群より高い濃度の受容体が認められた。なお、これら標本における[^{125}I]IGF-I 結合部位は、非放射性 IGF-I に対し高い親和性を有したのに比べ、インスリンに対しては比較的低親和性を示した（ Fig.2）。

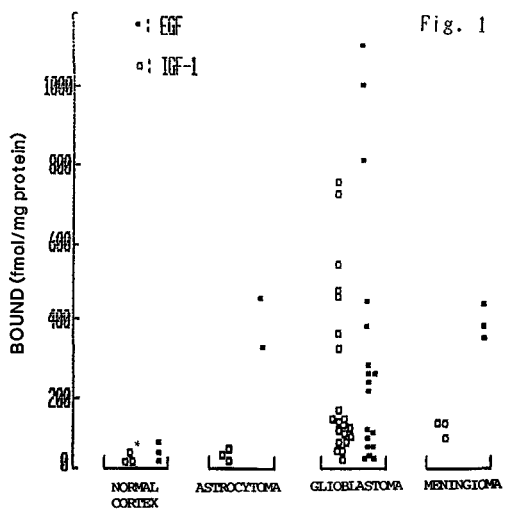


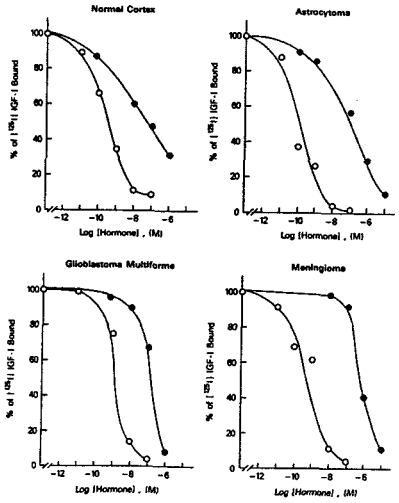
Fig. 1

＝ 考察 ＝

インスリン様成長因子（IGF-I 又は somatomedin C）は、インスリン類似の生理活性を持つほか、種々の培養細胞に対し細胞分化や DNA 合成を促進し

mitogenic に働くことが知られている6)。又その受容体(IGF type I) はインスリンや IGF type II 受容体と同様、脳内に広く分布し、神経組織の発達に関与することが示唆されている1)。我々の結果は、[^{125}I]IGF-I の結合がインスリンに低親和性を示すことより、その結合部位は Nissley and Recklerらの言う構造的にインスリンに類似したIGF type I受容体に一致することを示している6)。近年、Sara[4]らは membrane binding 法を用い、glioblastoma において、チロシンキナーゼ活性を持たない IGF type II受容体の増加が認められ、type I は増加が認められなかったと報告しており、我々の結果と異なるが glioblastoma 組織切片における高濃度 IGF-I 受容体の分布は非常に限局性で極めて悪性度の高い細胞集団に一致する傾向が認められることより、従来の membrane binding では同定できなかったものと思われる。本来組織学的には heterogenity の強いこれら腫瘍の検索には我々の方法がより有用であると思われる。EGF 受容体に関しては、Libermann[3]らの報告と一致し、又その分布は瀰漫性で IGF-I に比べ細胞特異性がないものと思われた。人 fibrosarcoma cell[7]や breast- cancer[8]において、IGF like peptide の産生や、また大腸癌においても9)その mRNA の増幅等が報告されており、インスリン様成長因子が autocrine mechanism を介し、これら癌細胞の tumorgenesis に関与しているであろうことが示唆されている。しかし、脳腫瘍については、未だ IGF-like peptide の産生についての報告はなく、その tumor genesis に IGF がautocrine growth factor として関与するかどうかは明かではない。しかし悪性像を呈する脳腫瘍細胞に限局性に認められた高濃度 IGF-I受容体の存在は、インスリン様成長因子 (IGF-I) が EGF と共に autocrineまたは paracrine mechanism を介し、腫瘍細胞の増殖に重要な関わりを持つことを示唆していると思われる。

Fig. 2



= 文献 =

1. Sara.V.R.,K.Hall,M.Isaki,and L.Fryklund.1983. J.Clin.Invest.71:1084-1094
2. Sporn.M.B.,and A.B.Roberts.1985.Nature(Lond.).313:745-747
3. Libermann.T.A.,H.R.Nusbaum,N.Razon,R. Kris,I. Lax,H. Soreg,N. Whittle,M.D. Waterfield,A. Ullrich,and J.Schlessinger.1985.Nature(Lond.)313:144-147
4. Sara V.R.,P.Prisell,B.Sjogren,L.Persson,J.Boethius,and G.Enberg.1986.Cancer Lett.32:229-234
5. Israel A.,L.M.Plunkett,and J.M.Saavedra.1985.Cell Mol.Neurobiol.5:211-222
6. Nissley S.P.,and M.M.Rechler.1985.Academic press.New York.12:127-203
7. Larco J.E.,and G.J.Todaro.1978.Nature(Lond.).272:356-358
8. Huff K.K.,D.Kaufman,K.H.Gabby,E.M.Spencer,M.E.Lippman,and R.B.Dickson. 1986.Cancer Res.46:4613-4619
9. Tricoli J.V.,L.B.Rall,C.P.Karakousis,L.Herrera,N.J.Petrelli,G.I.Bell,and T.B.Shows.1986.Cancer Res.46:6169-6173

99. Ethylnitrosourea誘発脳腫瘍に発現したEGF－R関連抗原について

村上秀樹*・高松　研・小山英樹*・
高坂新一・戸谷重雄*・塚田裕三
（慶応大・医・生理，脳外*）

〔要　約〕

Ethylnitrosourea(ENU)誘発ラット脳腫瘍のうち、EGF-R抗体と交差するが分子量の異なる185kd蛋白（EGF関連抗原）の発現を認めたmalignant astrocytoma(MA)、malignant neurinoma(MN)について、EGF結合能の測定、EGF-RおよびerbB-2のDNAプローブを用いたNorthern blotとSouthern blotを行い、以下の結果を得た。1）EGF-R関連抗原を発現している腫瘍のEGF結合能は、類上皮癌由来細胞株A431細胞の1/200～500であり、正常脳組織と差がなかった。2）Northern blotでは同腫瘍にEGF-R mRNAは検出されず、erbB-2 mRNAの増加を認めた。3）Southern blotではEGF-R DNAには変化が認められなかったが、erbB-2 DNAには置換変異を伴わない遺伝子増幅を認めた。これらのことから、ENUで誘発されたmalignant astrocytoma、malignant neurinomaではerbB-2が遺伝子増幅を伴って異常に発現していることが明かとなった。また我々が用いたEGF-R抗体は、erbB-2遺伝子産物に交差反応したものと思われた。

Key word：Ethylnitrosourea，EGF-R，erbB-2

発癌イニシエーターであるethylnitrosourea（ENU)を用いてラットに誘発した脳腫瘍について、発癌遺伝子産物に対する抗体により免疫組織化学的に検討し、malignant astrocytoma（MA)とmalignant neurinoma(MN)の一部にEGF-R抗体と反応するものを見い出した(1)。これら腫瘍に発現したEGF-R抗体と反応する抗原ついてimmunoblotにより検討したところ、類上皮癌由来細胞株A431細胞で発現しているEGF-Rとは分子量が異なっていた。一方、EGF-Rと極めて相同性の高い癌遺伝子としてerbB-2が報告され、またその遺伝子産物の分子量が185kdであることが報告されている(2)。そこで、これらの腫瘍についてEGF結合能の測定、EGF-RおよびerbB-2のDNAプローブを用いたSouthern blotとNorthern blotを行い、EGF-R抗体と反応した抗原のerbB-2との異同について検討を加えた。

【実験方法】

妊娠16～17日目のラット(Wistar albino)にENUを50mg/kg尾静脈より投与した。生後1ヶ月から6ヶ月間飼育した後、大脳、小脳、脊髄、第5脳神経を剔出した。腫瘍組織は-70°Cに保存し、以下の実験に用いた。EGF結合能の測定：組織を10倍量の脱イオン水でホモゲナイズし、100000gで1時間遠心した沈査を用いた。反応は、蛋白量として25μgを用い、Cohenらの方法(3)に従って反応を行い、結合したEGFをミリポアフィルター(GHWP)に吸着させ放射活性を測定した。Northern blot：各組織よりRNAをGuanidinium/CsCl法で抽出し、Glyoxal法で電気泳動した後、Nylon Hybridiz N filter(MSI社)に転写した(4)。転写後filterを80°C、2時間加熱処理し、50%formamide存在下で48時間hybridizationを行った。Autoradiographyは-70°Cで3日間行った。Southern blot：

各組織よりDNAをBlinらの方法(5)により抽出し、制限酵素EcoRIで消化した後、0.7%アガロースゲルで電気泳動した。酸処理、アルカリ変性をした後、Geen-Screan filter (Dupon社)に転写した。転写後filterを加熱処理し、hybridizationを行った。DNA probe：DNA probeは国立予防衛生研究所(JCRB遺伝子バンク)より供与されたもので、erbB-2はヒトc-erbB-2のgenomic DNAクローンのpKX044のBamHI消化による0.44kb断片(6)、EGF-Rはヒト EGF-R cDNAクローンpE7のClaI消化による2.4kb断片(7)を用いた。プローブの標識はNick Translation System(NEN社)を用いた。

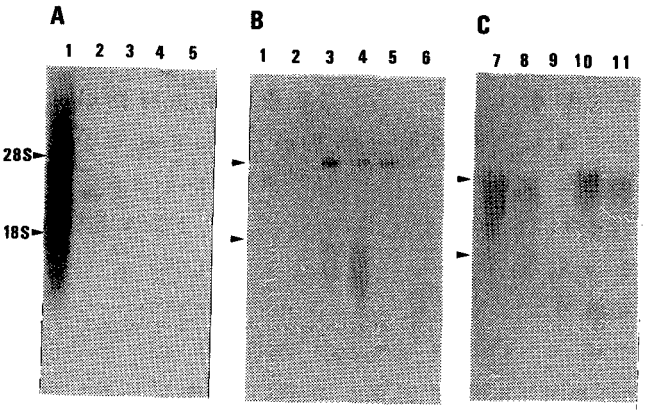
【結果および考察】

ENU誘発脳腫瘍のEGF結合能は、EGF-R抗体による免疫組織化学的染色性にかかわらず1.76～11.1 fmole/mg proteinと低く、EGF-Rを多量に発現しているとされるA-431細胞のEGF結合能の1/200～500の値を示し、正常ラット脳組織のEGF結合能とほぼ同等の値であった(第1表)。既に報告したように(1)、ENU誘発腫瘍においてEGF-R抗体と反応した抗原の分子量は約185kdであり、A-431細胞で発現するEGF-Rの170kdと異なっている。また、erbB-2はEGF-Rと極めて相同性の高い癌遺伝子であり、その遺伝子産物は分子量が185kdでEGF-R抗体によっては交差反応を示すものがあることが報告された(2)。そこで、EGF-RおよびerbB-2それぞれの遺伝子に特異的なDNAプローブを用いて、ENU誘発脳腫瘍組織から得たRNAのnorthern blotを行った(第1図)。A-431細胞では、従来の報告通りEGF-R mRNAの多量の発現を認めた(8)が、erbB-2 mRNAの発現は認めなかった。一方、EGF-R関連抗原を発現していた腫瘍組織では、EGF-R mRNAの発現は認めず、erbB-2 mRNAの発現を認めた。また正常脳組織およびEGF-R関連抗原を発現してい

第1表：ENU誘発脳腫瘍のEGF結合能

	EGF binding (fmol/mg protein)	Immunohistochemical staining(EGF-R antibody)
A431 cell lines	1340±60 (n=3)	+
Normal rat brain	5.46±0.95 (n=3)	−
ENU induced tumors		
MA_1	8.80	+
MA_2	4.58	+
MN_1	1.76	+
MA_6	9.01	−
MA_7	10.50	−
MN_3	11.10	−

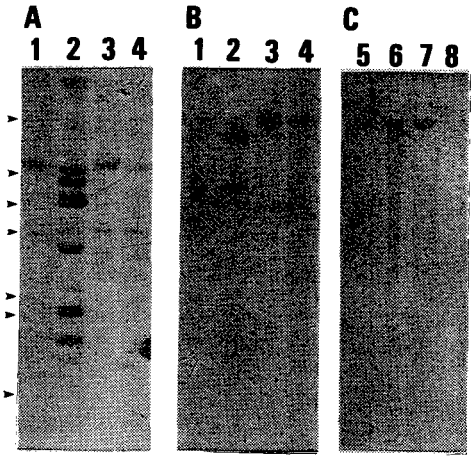
MAはmalignant astrocytoma、MNはmalignant neurinoma、数字は検索した腫瘍番号を示した。数値はmean±S.D.で表した。右欄にEGF-R抗体による免疫組織化学染色での反応性を示した。



第1図：ENU誘発脳腫瘍のNorthern blot

AはEGF-R cDNAを、BとCはc-erbB-2 genomic DNAをプローブとして用いた。各lane、10μgの全RNAを泳動した。lane 1はA431細胞、lane 2は正常ラット脳組織、lane 3,4,7,8,9,10 は malignant astrocytoma (3;MA_1,4;MA_2,7;MA_3,8;MA_4,9;MA_6,10;MA_5)、lane 5, 6,11はmalignant neurinoma(5;MN_1,6;MN_3,11;MN_2)を示す。

なかった腫瘍組織では、いずれも発現していなかった。従って、ENU誘発腫瘍で発現していたEGF-R関連抗原はEGF-Rではなく、erbB-2であり、その遺伝子産物がEGF-R抗体と交差反応したものと思われた。次にこれら腫瘍でのerbB-2の発現機構を検討する目的で、EcoRI消化によるSoutern blotを行った(第2図)。A-431細胞では13.6kbと6.4kbの位置に、正常ラット脳組織では23kb以上の位置にバンドが検出された。ENU誘発腫瘍では、いずれも23kb以上の位置にバンドが認められたが、EGF-R関連抗原を発現していた腫瘍では正常脳組織に比べ強い反応が認められた。したがって、これら腫瘍ではDNAの置換変異を伴わない遺伝子増幅があることが明かとなった。



第2図：ENU誘発脳腫瘍のSouthern blot

AはEGF-R cDNAを、BとCはc-erbB-2 genomic DNAをプローブとして用いた。各組織より抽出したDNAをEcoRI消化しlaneあたり10μgを泳動した。 lane 1は正常ラット脳組織、 lane 2はA431細胞、lane 3,5～7はmalignant astrocytoma(3;MA_1,5;MA_6,6;MA_2,7;MA_3)、lane 4,8はmalignant neurinoma(4;MN_1,8;MN_3)を示す。

第2表：実験結果のまとめ

		Control		Malignant astrocytoma							Malignant neurinoma			Oligodendroglioma		
		A431	Normal Rat Brain	MA_1 (4M)	MA_2 (4M)	MA_3 (4M)	MA_4 (5M)	MA_5 (5M)	MA_6 (5M)	MA_7 (5M)	MN_1 (3M)	MN_2 (4M)	MN_3 (5M)	O_1 (3M)	O_2 (4M)	O_3 (5M)
Immunohisto-chemical staining with EGF-R antibody.		+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−
Immunoblot analysis with EGF-R antibody		170kd	−	185kd	185kd	185kd	N.D.	N.D.	−	−	185kd	185kd	−	−	−	−
EGF binding assay f mol/㎎ protein		1340 ±60 (n=8)	5.46 ±0.95 (n=5)	8.80	4.58	N.D.	N.D.	N.D.	9.01	10.50	1.76	N.D.	11.10	N.D.	N.D.	N.D.
Northern blot analysis	EGF-R	10kb↑ 5.6kb↑ 2.9kb↑	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	N.D.	N.D.	N.D.
	c-erb B-2	−	−	4.6kb↑	4.6kb↑	4.6kb↑	4.6kb↑	4.6kb↑	−	−	4.6kb↑	4.6kb↑	−	N.D.	N.D.	N.D.
Southern blot analysis	EGF-R	8.0, 6.8, 5.5, 3.6, 2.5, 2.0, 1.8, 1.5 kb↑↑	8.0kb 3.6kb	8.0kb 3.6kb	8.0kb 3.6kb	8.0kb 3.6kb	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.0kb 3.6kb	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	c-erb B-2	13kb 6.4kb	23kb	23kb ↑↑	23kb ↑↑	23kb ↑↑	N.D.	N.D.	23kb	N.D.	23kb ↑↑	N.D.	−	N.D.	N.D.	N.D.

−; not detectable N.D.; not determined.

【文献】

1)村上秀樹他，神経化学，25:403-405，1986. 2)Semba,K. et al., Proc.natl.acad. sci.U.S.A., 82:6497-6501, 1985. 3)Cohen,S. et al., J.Biol.Chem., 257:1523-1531, 1982. 4)Chilgwin,J.M. et al.,Biochemistry,18:5294-5299, 1979. 5)Blin,N. et al., Nucleic Acid Res.,3:2303-2309, 1976. 6)Merlino,G.T.,et al., Mol.Cel. Biol., 5:1772-1734, 1985. 7)Yamamoto,T. et al., Nature, 319:230-234, 1986. 8)Ullrich,A. et al., Nature, 309:418-425, 1984

100. 神経疾患における髄液中のGTP結合蛋白質Goのαサブユニット

村山知行・高橋　昭・浅野富子*・
加藤兼房*
（名古屋大・医・神経内科，愛知県コロニー研・生化*）

〔要　約〕

GTP結合蛋白質の一つであるGoのα subunitに対する特異抗体よりなる高感度enzyme immunoassay法（EIA）を用いて、各種神経疾患患者192例の髄液のGoαを測定し、neuron-specific enolase（NSE），S-100b蛋白質（S-100b）と比較検討した。Goαは、脳炎、髄膜炎、脳梗塞などの急性疾患において、NSE・S-100bと同様に高値を示し，異常率においてはNSE・S-100bより高率であった。しかし、変形性脊椎症、脱髄疾患では異なった態度を示した。髄液中のGoα濃度は、NSE濃度と有意の相関を示したが、S-100b濃度とは相関を認めなっかた。Goαは、髄液において神経組織の障害を示す一つの指標となり得、またNSE・S-100bとの同時測定は、疾患の病態を知る上で、てがかりとなり得る可能性が示唆された。

Key word： GTP-binding protein, cerebrospinal fluid
neurological disorders

細胞の膜受容体と連関し、細胞外からのシグナルを細胞内に伝え、細胞の機能調節に関与するGTP結合蛋白質のうち、Goは、1984年Sternweisら（10）、Neerら（8）によってウシ脳に高濃度に存在することが見いだされた。最近になってこのGoは、神経系や神経内分泌細胞に特異的に存在する（1,5）ことが明らかになった。しかしこの蛋白質の機能については現在まで明らかでなく、また髄液中におけるGoの動態について検討した報告も見られない。今回我々は、このGoのα subunit（Goα）に対する特異抗体よりなる高感度enzyme immunoassay（EIA）法（2）を用いて、種々の神経疾患における髄液のGoαを測定し、神経疾患の他の指標とされているneuron-specific enolase（NSE）やS-100b蛋白質（S-100b）と比較検討を行なったので報告する。

対象および方法：各種神経疾患患者192例（年齢0－80歳、平均29.4歳、男116例、女76例）で、その内訳は表1および図1に示した。なおその他の疾患群は、多発性脳神経麻痺、斜頸、Vogt-小柳-原田症候群、内頸動脈海綿静脈洞ろう、神経Behcet病、各1例ずつを含む。髄膜炎脳炎、急性多発性根神経炎（APRN）、髄膜白血病では、2回以上検査を行なった症例が34例あり、検体は合計283であった。対照群は、軽度の頭痛・発熱があるが神経学所見はなく、精査として行なわれた髄液一般検査で特に異常を認めなかった患者50例（年齢0－73歳、平均14.7歳、男31例、女19例）とした。髄液採取は原則として腰椎穿刺で行なったが、脳腫瘍の2例では脳室穿刺液である。赤血球はNSEを含む（4）ため、急性クモ膜下出血を除き血性髄液は検索から除外した。採取した髄液は遠心し、細胞成分を落とした上澄みをグリセリンと混合50％溶液として、測定まで-20°Cで保存した。NSEおよびS-100bの測定系は、それぞれヒト

enolase のγ subunit、ウシS-100 のβ subunitに対する抗体よりなるEIA 系で、標準蛋白質としてヒトγγenolase 、ウシS-100bを用いた。Goαの測定系は、最近確立されたウシGoαに対する抗体を用いたEIA 系(2) で、標準蛋白質としてウシGoαを用いた。測定値は、それぞれ髄液1 mlあたり、ウシGoα(pg)、ヒトγγenolase (ng)、ウシS-100b(pg)等価として表わした。

結果：1)Goα測定系における再現性の検討：同時再現性；同時に低、中、高濃度のGoαを含んだ三つの検体を各々10回ずつ測定した。変動係数(C.V.)は2.3 - 10.5% と良好であった。日差再現性；日をおいて、低、中、高濃度のGoαを含んだ検体を二重測定で10回ずつ測定した。C.V.は4.7 - 15.6% と低濃度で変動が大きかったが、概ね良好であった。2)対照群：測定値は表1 に示した。正常値は対照群のmean±2SD とし、Goα 95.3 pg/ml 、NSE 7.96 ng/ml、S-100b 689 pg/mlを超えるものを異常とした。3)疾患群：測定結果は表1 ・図1 で示した。なお髄膜炎、脳炎、APRN、髄膜白血病で2 回以上測定を行なった症例については最も高い値を示した。無菌性髄膜炎群では、Goαは73例中33例(45%) で、化膿性髄膜炎、脳炎群では9 例全例で異常を示し、NSEやS-100bよりも高率に異常を示した。脳炎群でGoαが1000 pg/mlを超えた3 症例はいずれも予後不良であったのに対し、軽度の上昇にとどまった他の2 例では予後良好であった。急性期脳梗塞群では、Goαは5 例(56%) で異常を示し、NSE やS-100bよりも高率あった。このうち死の転機をとった脳幹梗塞の1 例では、NSE とS-100bは著明な高値を示したが、そのGoαは軽度の上昇にとどまった。多発性硬化症の急性増悪期、APRNではGoαは1 例ずつが軽度の上昇を示したのに対し、NSE･S-100bでは高率に異常を示した。筋萎縮性側索硬化症、Parkinson 病、脊髄小脳変性症の変性疾患群では、Goαは多くが正常であった。変形性脊椎症群ではNSE･S-100bは半数以上で上昇を示したのに対し、Goαは1 例(8%)でのみ異常を示した。脳腫瘍群では、Goαは髄膜腫の一例で高値を示した。髄膜白血病では、4 例(67%) で異常を示した。頭部外傷のうち脳挫傷では、GoαとNSE はかなりの高値を示したが、脳振とうでは異常を示さなかった。その他の疾患では、神経Bechet病でGoαは中等度の上昇を認めた。相関係数を見ると、GoαとNSE とは、0.321 と有意(n=328,P<0.01)な相関を示したが、S-100bとは-0.002で相関を認めなかった。

考察：髄液中のGoαは、無菌性･化膿性髄膜炎，脳炎、脳梗塞、髄膜白血病などの主に急性疾患で上昇し、NSE やS-100bと同様に神経組織の障害の目安となり得ると考えられた。これらの疾患での異常率を見ると、GoαはNSE やS-100bよりも高率であった。また、脳炎群においてGoαが1000 pg/mlを超えた症例はいずれも予後不良であったのに対し、軽度の上昇だった例では予後良好であったことは、予後を知る上でもある程度の目安になると考えられた。相関係数を見ると、NSE と有意な相関を認めたが、S-100bとは全く認めなかったことは、Goαの上昇は、NSE と同様に主に神経細胞の障害を反映していると考えられた。しかし、脳幹梗塞、脱髄疾患では、NSE とはかなり異なった態度を示した。Goα、 NSE、S-100bの三つの蛋白質は神経組織内･細胞内で明らかに異なった分布を示しており、今後症例を増やしこれらの同時測定を進めていくことにより、各種神経疾患の病態の解明に寄与するものと考えられた。

表 1　各種神経疾患における髄液中の Go α, NSE および S-100b 濃度

Diagnosis (n)		Go α (pg／ml)		NSE (ng／ml)		S-100b (pg／ml)	
		mean±SD	range	mean±SD	range	mean±SD	range
Control	(50)	51.9±21.7	23.4～106	4.90±1.53	0.402～8.96	353±168	169～1190
Aseptic Meningitis	(73)	115±94.4	23.4～452	7.08±3.16	1.96～15.6	953±1280	197～7520
Purulent Meningitis	(4)	499±258	276～923	13.3±8.18	6.08～27.1	776±493	176～1540
Encephalitis	(5)	842±625	99.0～1660	9.46±2.98	6.46～14.6	1420±1330	276～3760
SAH	(8)	89.1±64.5	46.0～235			666±531	282～1980
Cerebral Infarct	(9)	111±73.6	25.0～262	9.48±7.34	3.40～26.8	929±928	220～3300
MID	(5)	56.9±6.16	55.0～66.8	6.17±2.19	3.74～9.54	760±418	376～1540
MS (stationary)	(3)	34.3±12.3	23.4～51.0	6.17±1.36	4.34～7.62	357±44.8	294～388
MS (exacerbation)	(3)	73.3±25.3	46.0～107	13.8±6.35	5.23～20.4	972±290	698～1370
APRN	(5)	78.4±13.5	59.0～101	8.68±3.01	4.94～13.0	1330±446	744～2020
ALS	(11)	54.9±15.7	37.0～91.8	6.74±1.95	4.40～10.7	465±175	230～848
Parkinson's Disease	(11)	74.5±23.0	29.0～108	7.45±4.27	0.76～16.0	548±231	210～920
SCD	(7)	69.9±36.5	33.8～130	7.11±1.96	3.20～10.0	341±102	169～500
CS	(12)	67.1±54.3	23.4～240	9.76±3.14	5.48～17.1	817±461	88.0～1890
Brain Tumor	(5)	124±131	23.4～380	4.74±1.42	2.74～6.96	601±288	334～1150
Meningeal Leukemia	(6)	128±66.9	56.0～228	9.35±3.49	5.14～15.8	2550±4.25	226～12040
Febrile Convulsion	(10)	65.8±30.9	36.0～124	3.87±1.18	2.62～4.00	350±145	206～644
NPH	(3)	42.0±24.1	23.4～76.0	5.72±2.25	3.44～8.78	623±148	414～736
Brain Injury	(2)	162±127	34.6, 290	10.4±8.64	1.72, 19.0	207±47.5	159, 254
Oculomotor Palsy	(3)	67.5±19.7	40.0～84.6	9.04±0.582	8.26～9.66	457±106	322～580
Others	(7)	97.3±118	23.4～91.0	6.58±1.96	4.10～9.30	464±153	234～632

Abrevation : SAH ; Subarachnoid Hemorrhage, MID ; Multi-Infarct Dementia
MS ; Multiple Sclerosis, ARPN ; Acute Polyradiculonueritis
SCD ; Spinocerebellar Degeneration, ALS ; Amyotrophic Lateral Sclerosis
CS ; Cervical Spondylosis, NPH ; Normal Pressure Hydrocephalus

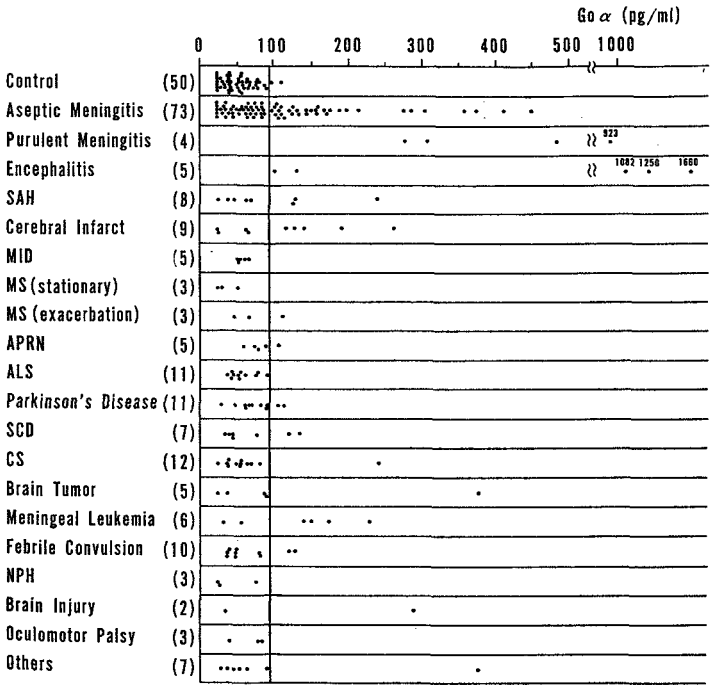


図 1　髄液中の Go 濃度

REFERENCE
1)Asano,T., Semba,R., Kamiya,N., Ogasawara,N. and Kato,K.(1987)J.Neurochem.,submitted. 2)Asano,T., Semba,R., Ogasawara,N., and Kato,K.(1987)J.Neurochem.48,1617-1623 3)Giershick,P., Milligan,G., Pines,M., Goldsmith,P., Condina,J., Klee,W., and Spiegel,A.(1986)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.83,2258-2262 4)Kato,K., Asai,R., Shimizu,A., Suzuki,F., and Ariyoshi,Y.(1983)Clin.Chim.Acta.127,353-363 5)Kato,K., Asano,T., Kamiyama,N., Haimoto,H., Hosoda,S., Nagasaka,A., Ariyoshi,Y. and Ishiguro,Y. Cancer Res, submitted. 6)Kimura,S., Kato,K., Semba,R., and Isobe,T.(1984)Neurochem.Int.6,513-518 7)Mokuno,K., Kato,K., Kawai,K., Matsuoka,Y., Yanagi,T., and Sobue,I.(1983)J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry 60,443-451 8)Neer,E.J., Lok,J.M., and Wolf,L.G.(1984)J.Biol.Chem.259,14222-14229 9)Schmechel,D., Marangos,P.J., Zis,A.P., Brightman,M., and Goodwin,F.K.(1978)Science 199,313-315 10)Sternweis,P.C., and Robinshaw,J.D.(1984)J.Biol.Chem.259,13806-13813 11)Worley,P.F., Baraban,J.M. Dop,C.V., Neer,E.J., and Snyder,S.H.(1986)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.83,4561-4565

101. ラット脳におけるセロトニン刺激ホスホリパーゼCの加水分解活性におよぼすイミプラミンとリチウムの影響

水田　正・今井千佳・瀬川富朗*

（明治乳業ヘルスサイエンス研・薬理，広島大・医・薬効解析*）

〔要　約〕

イミプラミン（ＩＭ）あるいはリチウム（Ｌｉ）を３週間長期連続投与したラット全脳可溶性画分ならびに膜画分を用いて、イノシトール燐脂質類（ＰＩ、ＰＩＰ、ＰＩＰ$_2$）をそれぞれ特異的に加水分解するホスホリパーゼＣ（ＰＬＣ）活性に出現する変化を検索した。

１）ＩＭあるいはＬｉの長期投与はCa^{++} 10^{-6}Ｍあるいは10^{-3}Ｍ存在下で脳可溶性画分ならびに膜画分中のＰＩ、ＰＩＰおよびＰＩＰ$_2$特異的加水分解ＰＬＣ活性に対して何ら影響をおよぼさなかった。　２）脳スライスにセロトニン（５－ＨＴ）10^{-3}Ｍを前処置した場合、Ca^{++} 10^{-6}Ｍあるいは10^{-3}Ｍ存在下で脳可溶性画分のＰＩ、ＰＩＰおよびＰＩＰ$_2$特異的加水分解ＰＬＣ活性にほとんど変化は認められなかった。一方、膜画分中のＰＩおよびＰＩＰ特異的加水分解ＰＬＣ活性は上昇する傾向が認められ、さらにＰＩＰ$_2$特異的加水分解ＰＬＣ活性に有意な上昇が認められた。　３）ＩＭあるいはＬｉの長期投与は脳スライスを用いた５－ＨＴ刺激誘発による膜画分中のＰＩＰ$_2$特異的加水分解ＰＬＣ活性上昇を有意に抑制し、ＰＩＰ$_2$の分解産物であるイノシトール３燐酸（ＩＰ$_3$）を減少させた。

以上の結果から、ＩＭあるいはＬｉの長期連続投与は５－ＨＴ受容体の数の減少(down regulation)を誘発すると、これら受容体に共役したＰＩＰ$_2$に特異的なＰＬＣ活性が抑制され、ＰＩＰ$_2$分解の減少、さらにセカンドメッセンジャーであると思われるＩＰ$_3$産生の低下を起こすことが明らかとなった。この現象は、ＩＭあるいはＬｉの長期投与が５－ＨＴ受容体を介する情報伝達機構にも抑制的に作用することを示唆している。

Key word： Imipramine, Lithium, Phospholipase C

抗うつ薬ＩＭの長期投与はラット脳膜画分において５－ＨＴ$_1$[6]および５－ＨＴ$_2$受容体のdown regulationを誘発させる[5]。一方、躁うつ病治療薬のＬｉについては、長期投与後に海馬における５－ＨＴ$_1$および５－ＨＴ$_2$受容体[7]と大脳皮質前頭葉における５－ＨＴ$_2$受容体のdown regulationを誘発させる[3]。このようにＩＭあるいはＬｉの長期投与はシナプス後膜５－ＨＴ受容体のdown regulationを引き起こすことが認められているので、本研究は受容体以降の膜内情報伝達機構に対する作用解明の一環として、５－ＨＴ$_2$受容体に共役していると示唆[1]されているＰＬＣ活性に対するＩＭならびにＬｉの長期投与による影響の検討を行った。

〔実験方法〕

１）材料と方法；実験には恒温恒湿で飼育したWistar系雄性ラット(180-200g)を用いた。ＩＭは20mg/kg、Ｌｉは2mEq/kg、対照として生理食塩水2ml/kgの容量で１日１回（午前10:00）３週間腹腔内投与した。両薬物ともに最終投与６時間後に断頭し、脳を速やかに取り出した後、直ちに氷冷して、実験に供した。

２）ＰＬＣ活性の測定；Dawson[2]の方法を一部改変して行った。小脳を除く全脳を、1mM dithiothreitolおよび0.25M sucroseを含む50mM imidazole buffer (pH 7.4)にガラス・テフロンホモジナイザーを用い懸濁した後、200000xg、30min遠心し上清（可溶性画分）および沈渣（膜画分）に分けた。得られた上清は可溶性画分標本液（蛋白濃度約5mg/ml）とした。一方、沈渣は1% Triton X-100を含有する50mM imidazole bufferにPolytronを用い十分可溶化した後、再度200000xg、30min遠心して、得られた上清を膜画分標本液（蛋白濃度約8mg/ml）とした。以上の操作で分けた可溶性画分標本液あるいは膜画分標本液50ulに、あらかじめ非放射性ＰＩとchloro-formを加えsonicatorでリポゾーム化した［^{14}Ｃ］ＰＩ（130nmol：270mCi/mmol、Amersham）あるいは非放射性ＰＩＰでリポゾーム化された［^{3}Ｈ］ＰＩＰ（13nmol：1.5Ci/mmol、NEN）あるいは非放射性ＰＩＰ$_2$でリポゾーム化された［^{3}Ｈ］ＰＩＰ$_2$（13nmol：1.5Ci/mmol、NEN）を50ul添加した。次に、10^{-6}Ｍあるいは10^{-3}Ｍの

Ca^{++}－EDTA imidazole buffer (pH 7.4) 400ulを加え、37°C、30min incubationした。ブランクとしてはCa^{++}free－2mM EDTA imidazole bufferをそれぞれに用いた。反応停止は氷冷した5% BSA 50ulを加えて行い、さらに2mM CaCl$_2$を含んだ5% TCA溶液 500ulを加え10min室温放置後1000xg、10min遠心した。得られた上清より、可溶性画分標本液あるいは膜画分標本液中のPLCにより加水分解されたイノシトール燐酸類（IP、IP$_2$、IP$_3$）の全放射能を測定し、その値をPLC活性とした。さらに、Irvine[4]らの方法に準じて陰イオン交換－HPLCを用いてinositol、IP、IP$_2$、IP$_3$の分離を行った。なお、5－HTによる受容体刺激実験では、脳スライスを用いて10^{-3}M 5－HTをKrebs-Ringer buffer中で37°C、1hr前もってincubationし、上記の実験に供した。

〔結果および考察〕

PI、PIPあるいはPIP$_2$を特異的に加水分解するそれぞれのPLC活性は脳可溶性画分あるいは膜画分どちらにおいてもCa^{++}10^{-3}M存在下の方が10^{-6}Mより高く、Ca^{++}濃度に依存していることが示唆された。また、これら3者のPLC活性は膜画分に比べ可溶性画分中に著しく高い活性が存在することが認められた(Fig.1)。

IM (20mg/kg) あるいはLi (2mEq/kg) 3週間連続投与後の小脳を除く全脳をホモジナイズした可溶性画分および膜画分中のPI、PIPならびにPIP$_2$特異的PLC活性は、Ca^{++}10^{-6}Mあるいは10^{-3}M存在下で対照群に比べ有意な差が認められなかった(Fig.1)。

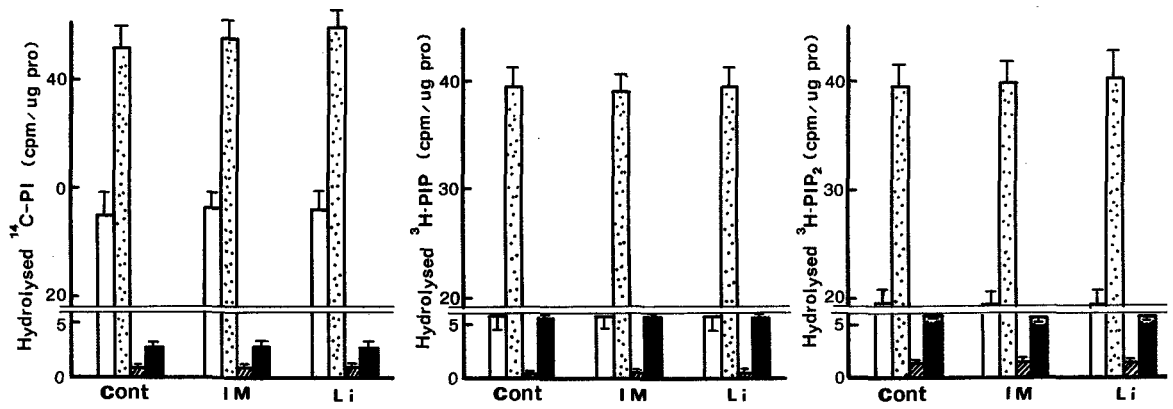


Fig.1. Effects of imipramine (IM, 20mg/kg/day for 3 weeks) and lithium (Li, 2mEq/kg/day for 3 weeks) on hydrolysis of PI, PIP and PIP$_2$ induced by PLC in cytosol (Ca^{++}10^{-6}M, Ca^{++}10^{-3}M) and membrane (Ca^{++}10^{-6}M, Ca^{++}10^{-3}M) of rat whole brain homogenates.(n=5)

次に、脳スライスに5－HT 10^{-3}Mを前処置した場合、PI、PIPあるいはPIP$_2$特異的PLC活性は可溶性画分において、Ca^{++}10^{-6}Mあるいは10^{-3}M存在下で無処置対照群に比べ有意な変化が認められなかった。しかし、膜画分においてPIおよびPIP特異的PLC活性はCa^{++}10^{-6}Mあるいは10^{-3}M存在下で無処置対照群に比べ上昇傾向が認められ、さらにPIP$_2$特異的PLC活性は有意な上昇がみられた(Fig.2)。これらのことは5－HT$_2$受容体に共役したPIP$_2$特異的PLCが不活性型で細胞質中に存在し、5－HTによって受容体が刺激されると活性型に変化して膜中に移行する機構の存在することを支持するものと

思われる。

一方、ＩＭあるいはＬｉ長期投与後の脳スライスにおいては、Ｃａ$^{++}$１０$^{-6}$Ｍあるいは１０$^{-3}$Ｍ存在下で５－ＨＴ １０$^{-3}$Ｍ前処置によって誘発された膜画分中のＰＩ、ＰＩＰおよびＰＩＰ$_2$特異的ＰＬＣ活性の上昇が抑制された。これらのＰＬＣ活性は対照としての生理食塩水投与群とほとんど同程度になり、特にＰＩＰ$_2$特異的ＰＬＣ活性上昇の抑制は有意であった(Fig.2)。

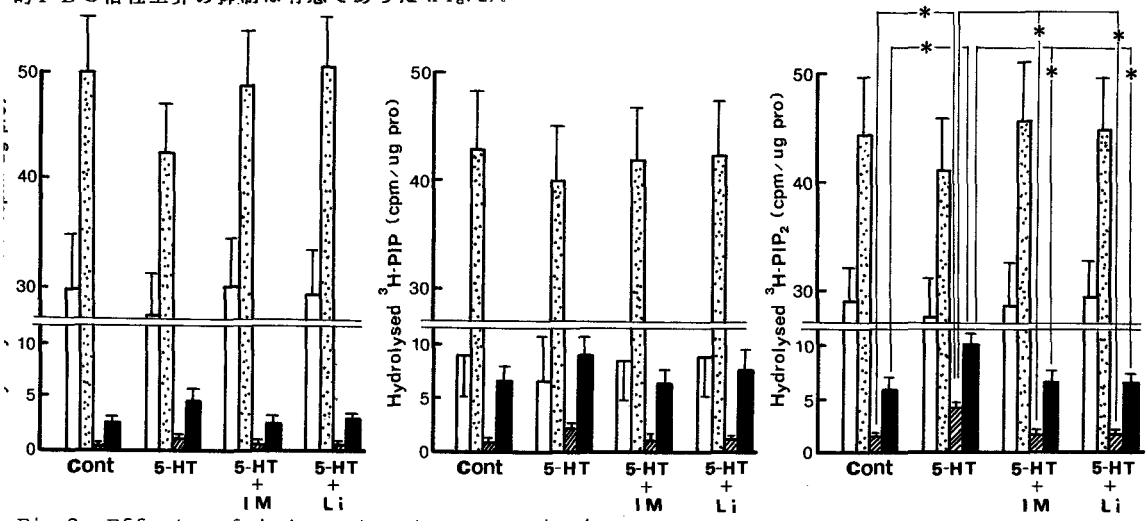


Fig.2. Effects of imipramine (IM, 20mg/kg/day for 3 weeks) and lithium (Li, 2mEq/kg/day for 3 weeks) on 5-HT (10^{-3}M)-stimulated hydrolysis of PI, PIP and PIP_2 induced by PLC in cytosol (□ $Ca^{++}10^{-6}$M, ▨ $Ca^{++}10^{-3}$M) and membrane (▨ $Ca^{++}10^{-6}$M, ■ $Ca^{++}10^{-3}$M) of rat whole brain slices.
* $p<0.05$ (n=5)

また、このうち生理的濃度であるＣａ$^{++}$１０$^{-6}$Ｍにおける膜画分中のＰＩＰ$_2$特異的ＰＬＣにより加水分解された水溶性産物を陰イオン交換－ＨＰＬＣにて分離した結果、５－ＨＴ誘発により上昇したＩＰ$_2$およびＩＰ$_3$は、ＩＭおよびＬｉ長期投与により対照群と同程度まで抑制された。

以上、ＩＭあるいはＬｉの長期投与により５－ＨＴ$_2$受容体のdown regulationが誘発されると、５－ＨＴ$_2$受容体に共役したＰＩＰ$_2$特異的ＰＬＣ活性が抑制され、ＰＩＰ$_2$の加水分解が減少することが認められた。さらにセカンドメッセンジャーであると思われるＩＰ$_3$の減少が認められたことから、これら薬物の長期投与は５－ＨＴニューロン活動の低下を誘発するものと思われる。

〔文　献〕

(1) Conn,P.J. and Sanders-bush,E. (1984) Neuropharmacology 23, 993-996

(2) Dawson,R.M.C. (1958) Biochem. J. 70, 559-568

(3) Hotta,I., Yamawaki, S. and Segawa,T. (1986) Neuropsychobiology 16, 19-26

(4) Irvine,R.F., Anggard,E.E., Letcher,A.J. and Downers,C.P. (1985) Biochem. J. 229, 505-511

(5) Peroutka,S.J. and Snyder,S.H. (1980) Science 210, 88-90

(6) Segawa,T., Mizuta,T. and Nomura,Y. (1979) European J. Pharmacol. 58, 75-83

(7) Treiser,S.L. and Kellar,K.J. (1980) European J. Pharmacol. 64, 183-185

102. $GABA_B$受容体とCa^{2+}チャンネルおよびGTP結合蛋白の共軛について

大森敬之・西川正雄・田口淳一・栗山欣弥
（京都府医大・薬理）

〔要　約〕
γ－アミノ酪酸（GABA）受容体のサブタイプの一つである$GABA_B$受容体とCa^{2+}チャンネルおよびGTP結合蛋白の共軛機構について、脳シナプス膜およびその可溶化分画をいて検討した。シナプス膜における$GABA_B$受容体への[^{3}H]GABA結合はCa^{2+}によって意に増大し、Ca^{2+}チャンネル遮断薬によってさらに増強された。このような$GABA_B$容体結合は各種GTP誘導体によって非競合的に抑制され、また$GABA_B$受容体作働薬あるバクロフェンの$GABA_B$受容体に対する親和性もGTPの存在により低下したが、のGTPの効果はislet-activating protein（IAP）で前処置することにより消失した更にGABAおよびバクロフェンはGTPase活性の増大をもたらしたが、この増加傾向IAP処置によって消失した。一方、シナプス膜のデオキシコール酸ナトリウム処置より得られた可溶化分画では、$GABA_B$受容体結合のCa^{2+}やCa^{2+}チャンネル遮断薬による増大のみならず、GTP誘導体による抑制やGABAおよびバクロフェンによるGTPase性の増加傾向も認められなくなった。以上のことより、$GABA_B$受容体はCa^{2+}チャンネルのみならずGTP結合蛋白のうちNiあるいはNo蛋白と機能的に共軛して居り、これ共軛機構は$GABA_B$受容体の可溶化によって消失することが示唆される。

Key word : $GABA_B$ receptor, Ca^{2+}channel, GTP-binding protein

哺乳動物の中枢神経系に存在するγ－アミノ酪酸（GABA）受容体には、ビククリンに受性を示し、ベンゾジアゼピン受容体のみならずCl^-チャンネルと機能的且つ構造に共軛する$GABA_A$受容体と[5-8]、ビククリンには非感受性でバクロフェンに感受性示し、Ca^{2+}によって活性調節を受ける$GABA_B$受容体[2,9]が存在すると報告されてる。しかしながら、この$GABA_B$受容体との共軛機構に関しては、Ca^{2+}やGTP誘導体よってその結合能が調節されることから、Ca^{2+}チャンネルやGTP結合蛋白との共軛可能性が示唆されている[2,4]が不明の点も多い。従って本研究においては、Ca^{2+}GTP誘導体による$GABA_B$受容体調節機構の本態を明確にすると共に、$GABA_B$受容体可溶化時におけるこれら共軛機構の変化について検討した。

［実験方法］<u>シナプス膜分画の調製とその可溶化</u>　Zukinらの方法[10]に従ってウ大脳皮質から調製したシナプス膜分画を、以下の実験に用いた。$GABA_B$受容体の可化は、シナプス膜分画を各種界面活性剤を含むTris-HCl緩衝液（pH 7.4）と2 ℃で90間インキュベートすることにより行ない、105,000×g で120分間遠心して得られ上清を可溶化分画とした。$GABA_A$及び$GABA_B$受容体への[^{3}H]GABA結合の測定は[^{3}H]GABAと2 ℃で30分間インキュベートしたのち、GF/Bガラスフィルターを用いた引濾過法で行ない、それぞれビククリン（10^{-4}M）およびバクロフェン（10^{-4}M）で置された結合量を算出することにより求めた。<u>GTPase活性の測定</u>　GTPase活性の測は、Brandtらの方法[3]を一部改変し、シナプス膜分画あるいは可溶化分画を[^{3}H]GTと30℃で30分間インキュベートしたのち、メタノールを加えて反応を停止し、薄層ロマトグラフィーによって[^{3}H]GDPを分離、回収することにより行なった。<u>Isle</u>

activating protein (IAP)によるシナプス膜分画の処置　IAP処置は、Bokochらの方法[1]に従い、シナプス膜分画をIAP (250 ng/ml) と30℃で60分間インキュベートすることにより行なった。

[結果] GABA$_B$受容体結合能に対するCa^{2+}およびCa^{2+}チャンネル遮断薬の影響　脳シナプス膜への[^{3}H]GABA結合は、GABA$_A$受容体拮抗薬であるビククリンおよびGABA$_B$受容体作働薬であるバクロフェンによって同程度に阻害され、両者を共存させた場合ほぼ100%阻害された(Fig. 1)。この様なGABA$_A$およびGABA$_B$受容体結合能に対するCa^{2+}の要求性について検討したところ、Ca^{2+}の添加はGABA$_A$受容体結合能に影響を与えなかったが、GABA$_B$受容体結合能の増大をもたらした。またこの様にCa^{2+}で有意に増大したGABA$_B$受容体結合能は、Ca^{2+}チャンネル遮断薬であるニカルジピンおよびジルチアゼムによってさらに増強されるのに対し、カルモジュリン阻害剤であるW-7は増強効果を示さなかった(Fig. 2)。GTP結合蛋白によるGABA$_B$受容体結合能の調節　GABA$_A$およびGABA$_B$受容体への[^{3}H]GABA結合に対するGTPの影響を検討した結果、GABA$_A$受容体結合能には影響を与えなかったが、GABA$_B$受容体結合能はGTPによって用量依存的に抑制され、この効果はGTP誘導体であるGppNHp、GTPγSおよびGDPによっても招来された(Table 1)。また、バクロフェンによるGABA$_B$受容体結合の阻害曲線もGTPにより右にシフトを示した。この様なGTPによるGABA$_B$受容体結合能の阻害をLineweaver-Burk plotを用いて検討してみると、バクロフェンは対照群とほぼ同じVmax値をもたらす競合的阻害であるのに対して、GTPは異なったVmax値をもたらす非競合的阻害を示した(Fig.3)。GABA$_B$受容体によるGTPase活性の調節　脳シナプス膜GTPase活性に対するGABAおよびバクロフェンの効果を調べたところ、GABAによって46%、バクロフェンによって27%の増加傾向を示した(Fig.4)。このGABA$_B$受容体作働薬による効果は、シナプス膜をIAP処置することによって消失した。GABA$_B$受容体結合部位の可溶化とこれに伴う共軛機構の変化　脳シナプス膜を各種界面活性剤で処置したところ、1M KCl存在下においてデオキシコール酸ナトリウム(DOC-Na)で処置した場合に、最も高いGABA$_B$受容体の可溶化がもたらされた(Table 2)。このDOC-Naで可溶化した分画を用いて、シナプス膜分画の場合と同様にGABA$_B$受容体の共軛機構について検討したところ、Ca^{2+}およびCa^{2+}チャンネル遮断薬によ

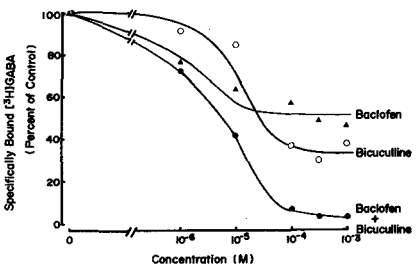


Fig.1 Displacement of [^{3}H]GABA binding to synaptic membrane by GABAergic drugs.

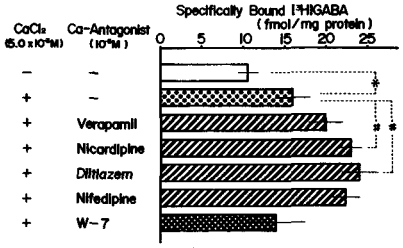


Fig.2 Effect of $CaCl_2$ and Ca-antagonists on baclofen-sensitive [^{3}H]GABA binding to synaptic membrane. *p<0.05,as compared with $CaCl_2$(-) and Ca-antagonists(-), #p<0.05, as compared with $CaCl_2$(+) and Ca-antagonists(-).

Table 1 Effect of GTP analogues on baclofen-sensitive [^{3}H]GABA binding to synaptic membrane.

Drug		[^{3}H]GABA Binding (fmol/mg protein)
Control		23.15 ± 4.52
GTP	(10^{-3} M)	4.17 ± 1.50*
GTPrS	(10^{-4} M)	4.06 ± 3.51*
GppNHp	(10^{-3} M)	9.43 ± 1.84*
GDP	(10^{-3} M)	5.80 ± 1.83*

*p<0.05; Significantly different from control.

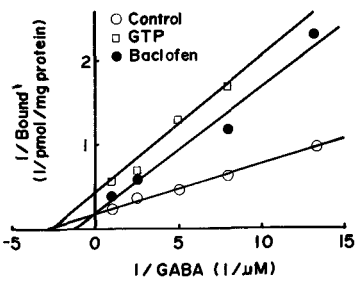


Fig.3 Lineweaver-Burk plots of baclofen-sensitive [^{3}H]GABA binding to synaptic membrane in the presence of GTP(10^{-3}M) and baclofen(10^{-6}M).

るGABA$_B$受容体結合能の有意な増大は認められなくなった。また各種GTP誘導体によるGABA$_B$受容体結合能の抑制のみならず、GABA、バクロフェンによるGTPase活性の増大も可溶化によって消失した。

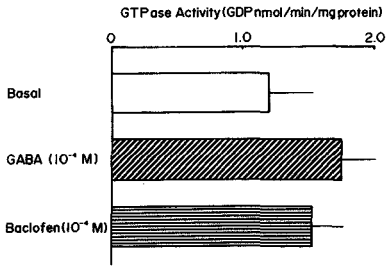


Fig.4 Effect of GABA$_B$ receptor agonists on GTPase activity in synaptic membrane.

[考察] 脳シナプス膜分画において、GABA$_B$受容体への[^{3}H]GABA結合はCa^{2+}の添加によって有意に増大し、Ca^{2+}チャンネル遮断薬によってさらに増強されたことから、GABA$_B$受容体はCa^{2+}チャンネル以外のCa^{2+}作用部位によって促進的に、またCa^{2+}チャンネル自身によって抑制的にそれぞれ活性調節を受けている可能性が示唆される。またこの様なGABA$_B$受容体結合は、各種GTP誘導体によって非競合的に抑制されるとともに、GTPの存在下でGABA$_B$受容体作働薬であるバクロフェンに対する親和性が低下し、しかもこれらのGTP効果がIAP処置により消失したことから、GABA$_B$受容体活性はGTP結合蛋白のうち、特にNiあるいはNo蛋白によって抑制的に調節されている可能性が示唆される。またGABAおよびバクロフェンによるGTPase活性の増大およびIAP処置によるこれら効果の消失は、GABA$_B$受容体が逆にNiあるいはNo蛋白に対して促進的に作用している可能性を示唆しているものと考えられる。一方、GABA$_B$受容体はDOC-Naによって容易に可溶化されたが、この可溶化分画においては、上記のCa^{2+}やCa^{2+}チャンネル遮断薬による[^{3}H]GABA結合の増大、各種GTP誘導体による[^{3}H]GABA結合の抑制、およびGABA$_B$受容体作働薬によるGTPase活性の増大等が認められなくなったことから、GABA$_B$受容体の機能的共軛機構は可溶化によって消失する性質を持つと考えられる。

Table 2 Solubilization of bicuculline-sensitive (A-site) and baclofen-sensitive(B-site) [^{3}H]GABA binding sites from synaptic membrane.

Detergent	Protein (mg)	Specific [^{3}H] GABA Binding* Total Binding (fmol) A-Site	Total Binding (fmol) B-Site	Specific Binding (fmol/mg protein) A-Site	Specific Binding (fmol/mg protein) B-Site	A/B
P_2-Membrane	19.4	105.5	29.4	5.4	1.5	3.5
DOC-Na(0.2%)+KCl(1M)	7.1	99.4	56.5	13.8	7.8	1.7
Triton X-100(1%)	10.2	63.7	31.4	6.2	3.0	2.0
Nonidet P-40(1%)	14.5	43.9	24.1	3.0	1.6	1.8
DOC-Na(0.2%)	6.0	36.3	15.9	5.9	2.6	2.2
CHAPS(1.2%)	4.7	29.2	13.9	6.1	2.9	2.0
Tween 80(1%)	2.3	19.4	7.9	8.1	3.3	2.4
Brij 35(1%)	3.3	0.7	0.4	0.2	0.1	1.5
Digitonin (1%)	4.4	33.0	0	7.5	0	—
Lubrol-PX(0.5%)	7.1	11.4	0	1.5	0	—
Lysolecithin(0.25%)	2.6	6.7	0	2.5	0	—

* Determined in the supernatant fraction

[文献] 1) Bokoch, G. M., Katada, T., Northup, J. K., Ui, M. and Gilman, A. G. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3560-3567. 2) Bowery, N. G., Hill, D. R. and Hudson, A. L. (1983) Br. J. Pharmacol. 78, 191-206. 3) Brandt, D. R., Asano, T., Perderson, S. E. and Ross, E. M. (1983) Biochemistry 22, 4357-4362. 4) Hill, D. R., Bowery, N. G. and Hudson, A. C. (1984) J. Neurochem. 42, 652-657. 5) Kuriyama, K. and Taguchi, J. (1987) Neurochem. Int. 10, 253-263. 6) Olsen, R. W. (1981) J. Neurochem. 37, 1-13. 7) Taguchi, J. and Kuriyama, K.(1984) Brain Res. 323, 219-226. 8) Taguchi, J. and Kuriyama, K. (1987) Neuropharmacology, in press. 9) Wilkin, G. P., Hudson, A. L., Hill, D. R. and Bowery, N. G. (1981) Nature 294, 584-587. 10) Zukin, S. R., Young, A. B. and Suyder, S. H. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4802-4807.

103. ドパミンD_2受容体とGTP結合蛋白質の相互作用

大原浩一*・芳賀達也・市山　新
（浜松医大・第一生化，精神*）

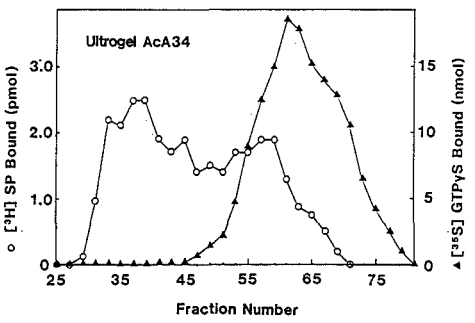
〔要　約〕

ドパミンD_2受容体を，ブタ脳線条体膜分画のコール酸抽出液よりUltrogel AcA 34を用いて部分精製し，2種類のG蛋白質（Gi，Go）を4段階のクロマトグラフィー操作によりブタ大脳膜分画のコール酸抽出液より精製した。両者をリン脂質中で再構成した。[^{3}H]スピペロン（SP）結合の平衡解離定数（K_D）は，膜標品で65 pM，再構成標品で85 pMであり，GTPまたはG蛋白質の有無に影響されなかった。ドパミンによる[^{3}H]SP結合の阻害曲線を，2つの異なる親和性を持つ部位を仮定して解析した。高親和性部位，低親和性部位のK_Dはそれぞれ約1，100 μMであった。高親和性部位の割合は，G蛋白質を加えない時の8%から，加えるG蛋白質の量と共に58～64%まで増大し，GTP添加でG蛋白質の量に関係なく約11%に減少した。Giに比べGoの方がより低濃度で高親和性結合の増加がみられた。G蛋白質をIAP処理後再構成して用いた場合は，GTP依存性の高親和性部位はみられなかった。以上の結果は，部分精製ドパミンD_2受容体の約50%はGi，Goいづれとも相互作用することを示している。

Key word：　D_2 dopamine receptor, GTP-binding protein, reconstitution

D_2受容体はアゴニストに対して高親和性と低親和性の2種の結合の仕方をし，グアニンヌクレオチドにより，高親和性結合は低親和性結合に変わることが知られている。今回われわれは，ブタ脳線条体から得た可溶化D_2ドパミン受容体と精製G蛋白質の再構成系を用いてD_2受容体とG蛋白質が相互作用すること，および数種類あるG蛋白質のうちどのG蛋白質とD_2受容体が相互作用するかという問題を検討した。

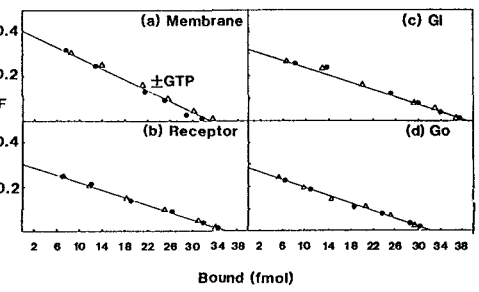
Fig.1. AcA 34 gel chromatography.



I．実験方法

1．ドパミン受容体の部分精製：ブタ線条体膜分画を0.3%コール酸・NaCl混液を用いて可溶化し，Ultrogel AcA 34によるゲル濾過で部分精製した。シナプス分画（19mg/ml蛋白質，170 ml）に溶媒A（1 M NaCl, 1 mM EDTA, 4 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 100μM スルピリド，100 nMケタンセリンを含む20 mM Na-Hepes［pH 8.0］）を加え全量500 mlにし，次に同一溶媒に溶かした0.6%コール酸を同量加えて全量1000 mlにした。4℃で1時間攪拌

Fig.2. Scatchard plot of [^{3}H] SP binding.
open symbols, (-)GTP; closed symbols, (+)GTP



した後，95,000×gで1時間遠心し，上清を可溶化D_2受容体とした。上清を透析チューブに入れ，ポリエチレングリコール（PEG-20,000）で50mlに濃縮した後，溶媒B（1M NaCl，1mM EDTA，4mM $MgCl_2$，1mM DTT，100μMスルピリド，100nMケタンセリン，0.3%コール酸を含む20mM Na-Hepes［pH8.0］）で平衡化したUltrogel AcA 34（1200ml）によるゲル濾過を行い，D_2受容体をG蛋白質から分離した。G蛋白質を含まないD_2受容体分画を集め，PEG-20,000で50mlに濃縮したものを部分精製D_2受容体標品とした。

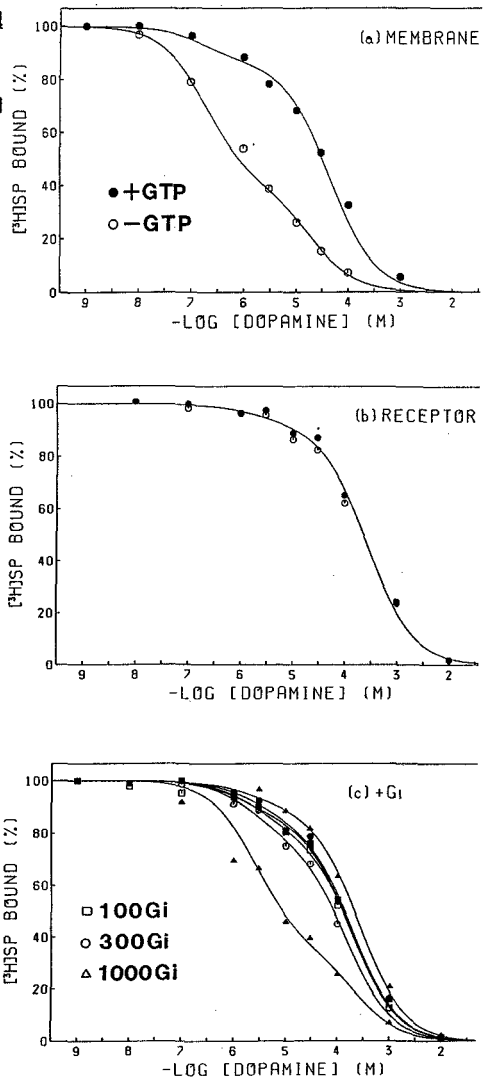
2．G蛋白質の精製：Sternweis and Robishaw (3)に準じてブタ大脳からG蛋白質の混合物を得て，DEAEトヨパールクロマトグラフィーによりGiとGoを分離した(2)。

3．G蛋白質のADPリボシル化：Bokochら(1)に準じて，Gi，GoをIAPによりADPリボシル化した。

4．再構成：部分精製D_2受容体とG蛋白質の再構成は，ムスカリン受容体再構成の方法に準じて行った(2)。脂質，部分精製した可溶化D_2受容体とG蛋白質を混合した後，Sephadex-G50(fine)によるゲル濾過を行い，コール酸とスルピリドを除去したものを再構成標品とした。

5．結合実験：膜および再構成標品の［^{3}H］SP結合活性は30℃で1時間保温した後，セルハーベスターにより結合した［^{3}H］SPをガラス繊維濾紙に集めて測定した。

Fig.3. Dopamine / [^{3}H] SP competition:
open symbols, (-)GTP; closed symbols, (+)GTP



Ⅱ．結果および考察

シナプス分画の可溶化によるD_2受容体の回収率は膜受容体の約30%であった。可溶化したD_2受容体標品のUltrogel AcA 34ゲル濾過クロマトグラフィーによって，D_2受容体とG蛋白質を分離した(Fig.1.)。各々の回収率は，約25%と60%であった。

［^{3}H］SPとの結合の解離定数は，膜標品では65pM，再構成標品では85pMで，GTP，G蛋白質の有無により影響されなかった(Fig.2.)。膜標品でのドパミンによる阻害曲線はGTP添加で右側

に移行したが(Fig.3(a)), 部分精製D_2受容体をリン脂質中に再構成した標品ではGTPの影響はみられなかった(Fig.3(b))。部分精製D_2受容体を精製したG蛋白質と再構成すると, Gi, Goの場合ともG蛋白質の量に依存してドパミンによる阻害曲線は左側に移行した(Fig.3(c))(Fig.3(d))。この結果はD_2受容体とGi, Goが結合すると, D_2受容体だけの時よりもアゴニストに対する親和性が高まることを意味している。この結合阻害曲線はGTP存在下では右側に移行し, G蛋白質を加えない時とほぼ同じになった。この結果は, GTP存在下でD_2受容体とG蛋白質が解離することを意味すると考えられる。ドパミンによる阻害曲線を2種類の親和性を持つ部位を仮定して非線型最小自乗法(SALS)で解析した結果をTable Iに示す。高親和性部位のK_Dは0.92～1.29 μM,低親和性部位のK_Dは55.6～161.7 μM,GTP存在時の高親和性結合の割合は7～15%で, これらの値は加えるG蛋白質の量に依存しなかった。一方, GTPが存在しない時の高親和性結合の割合は8%から58～64%までG蛋白質の量と共に増大した。Giに比べGoの方がより低い濃度で高親和性結合の増大がみられ, D_2受容体はGoにより高い親和性を持つことが示唆された。D_2受容体とGi, GoをIAPで処理した後に再構成した標品ではGTPの影響はみられなかった(Fig.4.)。最近同様のことが脳下垂体のD_2受容体で報告された(4)。D_2受容体が, Gi, Goのいずれとも直接相互作用することは, 生体内でドパミンとD_2受容体が結合すると, Giのみでなく Goも活性化されることを示唆すると考えられた。

Fig.4. Dopamine / [^{3}H] SP competition: Effect of IAP treatment.

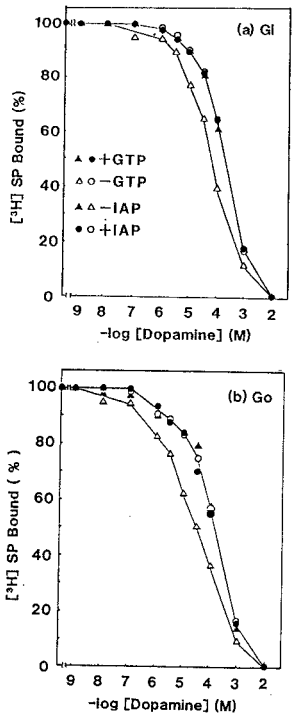


Table I
Analysis of Dopamine / [^{3}H] SP Competition by Two-Site Model.

Condition	(-) GTP K_D (H)	K_D (L)	P*	0.1mM GTP K_D (H)	K_D (L)	P*
	μM		%	μM		%
original membranes	0.08	7.9	60	0.08	16.9	14
reconstituted vesicles ratio of G vs R**						
Gi 0	0.92	97.9	8	0.96	161.7	7
100	1.24	91.9	19	0.74	81.3	14
300	1.06	67.5	22	1.29	89.6	15
1000	1.24	97.9	64	1.15	121.3	10
Go 100	0.87	103.4	29	0.83	112.6	11
300	0.78	124.1	57	1.10	104.8	12
1000	0.74	55.6	58	1.15	145.6	14
average	0.98	91.0		1.03	116.2	11.4
±S.D.	0.21	23.0		0.20	29.9	2.9

* : Proportion of High Affinity Sites.
** : Concentration of Receptor was 5 nM.

参考文献: (1) Bokoch,G.M., Katada,T., Northup,J.K., Ui,M., and Gilman,A.F.: J. Biol. Chem.; 259,3560-3567 (1984) (2) Haga,K.,Haga,T., and Ichiyama,A.: J. Biol. Chem.,261;10133-10140 (1986) (3) Sternweis,P.C., and Robishaw,J.D.: J. Biol. Chem.;259,13806-13813 (1984) (4) Senogles,S.E., Benovic,J.L., Amlaiky,N., Unson,C., Milligan,G., Vinitsky,R., Spiegel,A.M., and Caron,M.G.: J. Biol. Chem.,262;4860-4867 (1987)

104. ムスカリン性アセチルコリン受容体とGTP結合蛋白質のプロテインキナーゼCによるリン酸化

芳賀和子・芳賀達也・西山照正
（浜松医大・第一生化）

〔要　約〕

（1）ブタ大脳から精製したムスカリン性アセチルコリン受容体（ムスカリン受容体、主としてM1サブタイプ）は、同じ組織から精製されたプロテインキナーゼC（Cキナーゼ）によってリン酸化された。1モルの受容体あたり1モル以上のリン酸基が導入され、セリンとスレオニン残基がリン酸化された。反応はCaイオンおよびリン脂質に依存したが、アセチルコリンの存在には影響されなかった。ブタ心房から精製したムスカリン受容体（M2サブタイプ）は同一条件でリン酸化されなかった。

（2）ブタ大脳から精製したGTP結合蛋白質（G蛋白質）Gi、GoのαおよびγサブユニットもCキナーゼによってリン酸化された。αサブユニットのリン酸化はリン脂質に再構成されたG蛋白質で見られ、可溶化G蛋白質では見られなかった。いずれの場合もセリンがリン酸化されたが、リン酸化量は当モル以下であった。

（3）ムスカリン受容体とG蛋白質をリン脂質に再構成させるとGTP依存性の高親和性アセチルコリン結合が見られるが、Cキナーゼによってリン酸化されたムスカリン受容体およびG蛋白質を用いた場合もこの結合は観察された。ずなわち、ムスカリン受容体とG蛋白質の相互作用はCキナーゼによるリン酸化によって影響されない。

Key word：　MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR,　PROTEIN KINASE C,
GTP BINDING PROTEIN

アセチルコリンと結合したムスカリン受容体はG蛋白質を活性化し、活性化されたG蛋白質が種々の酵素あるいはイオンチャンネルを制御すると考えられる。ムスカリン受容体とG蛋白質が直接相互作用することは、ブタ大脳から精製した受容体とG蛋白質（Gi，Go）をリン脂質小胞中に再構成し、GTP依存性高親和性アゴニスト結合を観察することにより確かめられた(2)。

アゴニストの継続的存在下での受容体系の反応性の低下は脱感受性としてよく知られており、受容体特異的（Homologous）なものと非特異的（Heterologous）なものに分けられている。前者では受容体が後者ではG蛋白質以後の成分が何等かの変化をしていると予想される。変化の実体は現在明らかではないが、1つの作業仮説としてリン酸化が考えられる。種々のプロテインキナーゼによる受容体、G蛋白質などのリン酸化の有無、リン酸化による機能喪失あるいは細胞内取込（Internalization）の有無、などが現在検討されるべき課題である。

我々は今回Cキナーゼを取り上げ、Cキナーゼによるムスカリン受容体とG蛋白質のリン酸化、およびリン酸化の受容体・G蛋白質相互作用に及ぼす影響を検討した。

［実験方法］

(1) Cキナーゼの精製：既報(4)に従い、ブタ大脳（60 g）からの抽出液を、DEAE-Cellulose (DE52)、Threonine-Sepharose、Phenyl-Sepharose カラムにかけて精製した。Phenyl-Sepharoseカラムでは2つの活性ピークが得られたので、それぞれを仮にCキナーゼ(1),(2)とした（図1）。いずれもCaイオンおよびリン脂質依存性で、cAMPの影響は見られなかった（図2）。10%グリセロール 0.05% Tween 20 存在

下 -80 ℃に保存した。

(2)リン酸化：ムスカリン受容体は1回のアフィニティークロマトグラフィーで精製した（比活性2-5 nmol/mg protein）(1)。GiとGoは既報に従って精製した(2)。受容体およびG蛋白質を可溶化状態のまま、あるいは粗リン脂質に再構成した後基質として使用した。リン酸化反応は20 mM TrisHCl(pH 7.5), 5mM Mg acetate, 10μg brain extract(Folchi fraction I), 0.2μg diolein, 0.5 mM $CaCl_2$, 10 or 100μM γ(32P)ATP 中で30 ℃で 3-60分行った（反応液量 250μl）。SDS電気泳動後、リン酸化された受容体あるいはG蛋白質画分を溶出し、6M塩酸中 110 ℃ で2時間加水分解後、高圧ろ紙電気泳動（2.5 kV, 30分）でリン酸化アミノ酸を同定した。

(3)受容体とG蛋白質の再構成：再構成の際反応液に5 mM DTTを加えた以外は既報に従った(2)。

［結果］

ムスカリン受容体はCキナーゼによってリン酸化され、このリン酸化にアセチルコリンの有無は影響しなかった（図3）。可溶化状態にあるものよりリン脂質に組み込まれた受容体の方がリン酸化のよい基質となった。Cキナーゼ(1)と(2)ではほとんど差がなかった。10μMγ(32P)ATP, 30 ℃ 1時間の条件で 1molの受容体あたり2.4molのリン酸化が見られた。リン酸化されたアミノ酸はセリンとスレオニンであった。同一条件で心房から精製されたムスカリン受容体（M2サブタイプ）はリン酸化されなかった（図3）。

G蛋白質もCキナーゼによってリン酸化された（図4）。可溶化状態のG蛋白質を基質として用いたときはα, βサブユニットはまったくリン酸化されなかった。γサブユニット、特にGi-γは可溶化状態でもリン酸化された。GTPγSはγサブユニットのリン酸化を促進したがαサブユニットのリン酸化には影響しなかった。Go-αおよびγサブユニットはCキナーゼ(1)に比べCキナーゼ(2)でよくリン酸化されたが、Gi-αでは差がなかった。10μMγ(32P)ATP, 30 ℃ 1時間の条件で0.2 molのα, γサブユニットがリン酸化され、βサブユニットのリン酸化はそれ以下であった。リン酸化される残

図1 Phenyl-Sepharose によるCキナーゼの精製

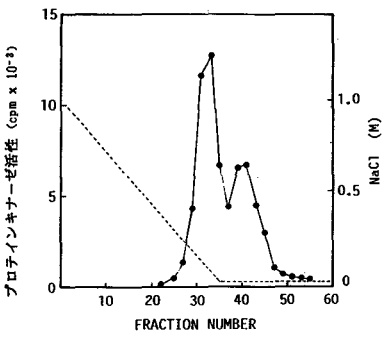


図2 リン脂質、Ca、cAMPの効果

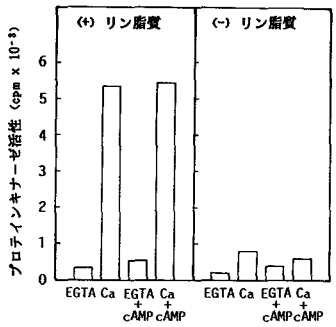


図3 ムスカリン受容体のリン酸化

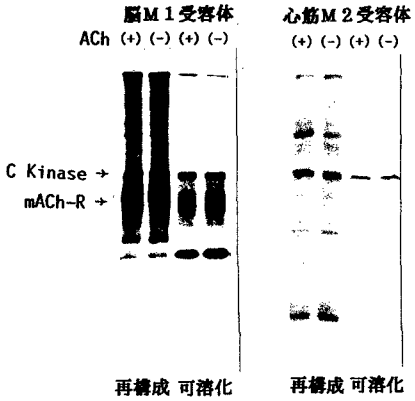
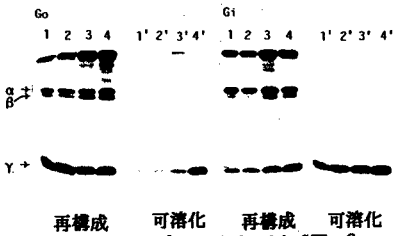


図4 G蛋白質のリン酸化



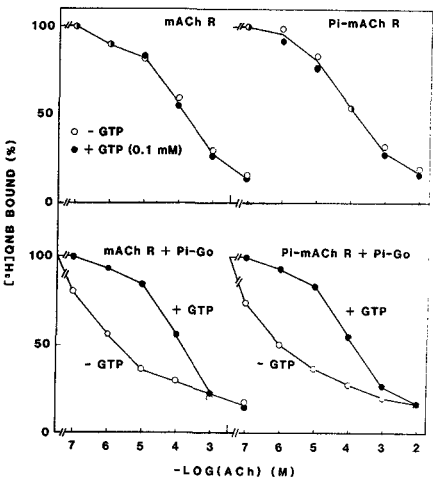
1,2：Cキナーゼ(1) 1,3：(-) GTPγS

3,4：Cキナーゼ(2) 2,4：(+) GTPγS

基はセリンであった。

リン脂質に再構成した受容体あるいは受容体とGoについて、アセチルコリンによる〔^{3}H〕QNB結合の阻害曲線およびそれに対するGTPの効果を調べた（図5）。受容体のリン酸化によって、〔^{3}H〕QNBとの結合能およびアセチルコリンによる〔^{3}H〕QNBの阻害は影響されなかった。受容体とGoまたはGiとの再構成によるGTP依存性高親和性アセチルコリン結合の生成も、受容体またはG蛋白質のリン酸化によって影響されなかった。

図5　ムスカリン受容体とG蛋白質の再構成



［考察］

ムスカリン受容体M1サブタイプはCキナーゼの基質となるが、M2サブタイプは基質とならないことが分った。M1、M2サブタイプのアミノ酸配列はかなり似ているが、セリンあるいはスレオニンを含み、異なる配列の部分も多数存在する(5)。M1サブタイプ中のリン酸化部位の同定、in vivoでのリン酸化の有無は今後の検討に残されている。

今回、Gi、Goのαおよびγサブユニットが Cキナーゼでリン酸化されることが分った。Gi－αのCキナーゼによるリン酸化はすでに報告されているがリン酸化の条件は異なり、αサブユニットをβγサブユニットから分離したときのみリン酸化されるという(3)。我々の実験条件ではG蛋白質が膜に組み込まれている時のみリン酸化された。異なる部位がリン酸化されるのかもしれない。

リン酸化された受容体とG蛋白質を用いて再構成してもGTP依存性高親和性アセチルコリン結合は観察されたので、Cキナーゼによるリン酸化は両者の相互作用に影響しないと考えられる。ただし、生体内においてもリン酸化が両者の相互作用に影響しないとは断定できない。リン酸化されることによって第3者による阻害を受けやすくなるという可能性が考えられるからである。ロドプシンとトランスデューシンの相互作用についての、ロドプシンキナーゼによるリン酸化とアレスチンによる阻害はそのような例と考えられる(7)。培養神経芽細胞のホルボールエステル処理によりムスカリン受容体のInternalizationが促進されると報告されている(7)。今回の実験と合せて考えると、Cキナーゼによるムスカリン受容体のリン酸化がInternalizationの引金になるという可能性が考えられる。

［文献］

(1) Haga, K. et al., J. Biol. Chem., 260,7927-7935 (1985)
(2) Haga, K. et al., J. Biol. Chem., 261,10133-10140 (1986)
(3) Katada, T. et al. Eur. J. Biochem. 151,431-437 (1985)
(4) Kikkawa, U. et al. Biochem. Biophys. Res, Comm. 135,636-643 (1986)
(5) Kubo, T. et al. FEBS Lett. 209,367-372 (1986)
(6) Liles, W.C. et al. J. Biol. Chem. 261,5307-5313 (1986)
(7) Stryer, L. Ann. Rev. Neurosci. 9,87-120 (1986)

105. α_1—Adrenoceptor 刺激によるアラキドン酸放出とイノシトールリン酸生成機構

宮本　篤・大鹿英世　（札幌医大・薬理）

〔要　約〕

[^{3}H]Arachidonic acidおよび[^{3}H]myo-inositolを標識したラット耳下腺遊離細胞を用い、norepinephrine (NE)刺激による arachidonic acid 放出とinositol trisphosphate(IP_3)生成反応における phospholipase C および A_2の関与を検討した。標識耳下腺細胞へのNE (10 uM)の添加は、迅速に[^{3}H]IP_3を生成し、かつ[^{3}H]arachidonic acidを放出した。これらの反応は、phenylephrine (10 uM) 添加によっても認められた。しかし、clonidine (10 uM)は、[^{3}H]IP_3 生成や [^{3}H]arachidonic acid 放出に影響をあたえなかった。NE (10 uM)による[^{3}H]IP_3生成や[^{3}H]arachidonic acid放出は、10 uMのphentolamineや prazosinにより著しく阻害された。しかし、yohimbine(10 uM)は、両反応を共に阻害しなかった。Neomycin (100 uM)の処置は、NE (10 uM)による[^{3}H]IP_3生成反応のみを著しく阻害した。Quinacrine (100 uM)の処置は、NE (10 uM)による両反応を共に著しく阻害した。

以上の成績より、耳下腺細胞における[^{3}H]arachidonic acid 放出および[^{3}H]IP_3生成反応は、主にα_1-adrenoceptorを介して引き起こされ、arachidonic acid の放出およびIP_3の生成にはそれぞれ phospholipase A_2およびphospholipase Cの活性化が関与しているものと考えられた。

Key word： α_1-Adrenoceptor, [^{3}H]Arachidonic acid放出, [^{3}H]Inositol trisphosphate生成,

緒　言

近年、細胞内情報伝達機構の仕組に関する研究が数多く報告されている。我々は、ラット耳下腺細胞のα_1-adrenoceptor結合活性はβ-adrenoceptor と相関関係にあること(１)さらにこの活性がphospholipase C(bacillus cereus)やphospholipase A_2(hog pancreas)より影響を受けることから、活性化調節には細胞膜リン脂質の膜流動性並びに膜粘性が介在していること（２）を報告してきた。

一方、3T3 FibroblastsおよびThyroid cell lineにおけるarachidonic acidの放出反応は、thrombinおよびNE刺激で引き起こされることから受容体刺激に依存した反応であることが報告されている（３，４）。

そこで今回、ラット耳下腺細胞における (³H)arachidonic acidの放出と(³H)IP_3の生成反応に対する内因性phospholipase Cおよびphospholipase A_2の関与を検討した。

方　法

実験には、Wistar系雄性ラット(250-300g)のparotid cellを使用した。

(Ⅰ)Parotid cell aggregatesの調整：Parotid gland slicesは、collagenase (0.6U/ml)とbovine testicular hyaluronidase (2 mg/ml)を含む Hanks' balanced salts solution II (HBSS II, Ca^{2+} and Mg^{2+} omitted, pH 7.4)中で37℃,1 hr incubate後、cell aggregatesを分取し、Hanks' solution I (HBSS I, pH 7.4)中に再浮遊した。

(Ⅱ)(³H)Arachidonic acid releaseと(³H)IP3 formation： Parotid cell aggregatesは、(³H)myo-inositol (10 uCi/ml)および(³H)arachidonic acid (10 uCi/ml)と 37℃ で1 hr incubateすることにより標識した。標識後cell aggregatesをHBSS Iで3回洗浄後、 10 mM LiClを含むHBSS I中でagonistを作用させ、1-5 min間の反応後Berridge（５）の方法に従い、AG1x8 (formate form, 100-200 mesh) 樹脂を用いて(³H)IP_3を分画しその放射活性を測定した。また、(³H)arachidonic acid標識細胞はHBSS Iで3回洗浄後、HBSS I中で ago-

nistを作用させ、1-5 min間の反応後Burchら（４）の方法に従いsilica gel TLC platesで(^{3}H)arachidonic acidを分離しその放射活性を測定した。なおantagonist, neomycinおよびquinacrineの処置は、NE添加10 min前より行なった。

結　果　及　び　考　察

（Ⅰ）NE刺激による(^{3}H)arachidonic acid放出と(^{3}H)-IP$_3$生成の時間経過

(^{3}H)Arachidonic acid放出と(^{3}H)IP3生成に及ぼすNEの効果を検討した（Fig. 1）。NE(10 uM)は、添加直後（1 min以内）より迅速に(^{3}H)IP$_3$生成を増加させ（$P<0.05$）、この効果は測定時間中(5 min間)持続した。また NE（10 uM)の添加は、(^{3}H)arachidonic acidの放出を迅速に増加させ($P<0.05$)、この効果も測定時間中持続した。これらの結果から、耳下腺細胞におけるarachidonic acid放出も、IP$_3$ の生成と同様に α-adrenoceptorの活性化を介して引き起こっているものと考えられた。そこで、これらの受容体活性化反応が、いずれの α-adrenoceptorを介しての作用であるのかを検討した。

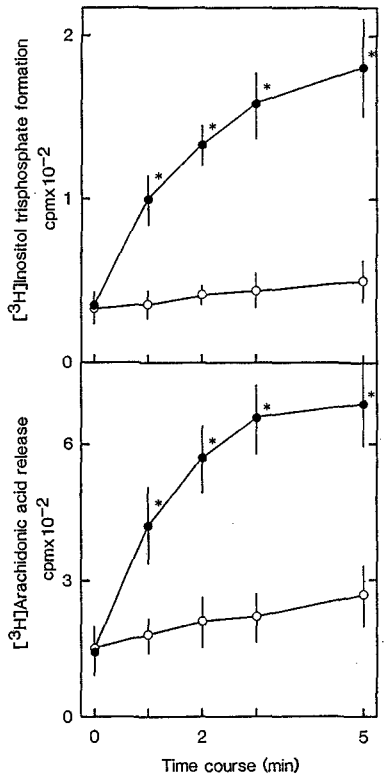


Fig. 1 Time course of [^{3}H]IP$_3$ formation and [^{3}H]AA release in parotid cells.

（Ⅱ）NEによる(^{3}H)arachidonic acid放出および(^{3}H)-IP$_3$生成反応のα-adrenoceptor特異性

NEの(^{3}H)arachidonic acid放出および（^{3}H)IP$_3$生生成反応のα-adrenoceptor特異性を検討した(Fig. 2)。α_1-adrenoceptorの選択的 agonistであるphenylephrine(10 uM)の5 min間の添加は、NE(10 uM)と同様(^{3}H)arachidonic acid放出と（^{3}H)IP$_3$生成を引き起こした($P<0.05$)。しかし、α_2-adrenoceptor agonistのclonidine（10 uM)は両反応を共に刺激しなかった。5 min間のNE（10 uM)による(^{3}H)arachidonic acid 放出および（^{3}H)IP3 生成反応は、α-adrenoceptor antagonistの phentolamine（10 uM)やα_1-adrenoceptorの選択的antagonistのprazosin(10 uM)の前処置により完全に阻害された。しかし、α_2-adrenoceptor antagonistのyohimbine（10 uM)前処置によって、両反応は共に阻害されなかった。以上の結果から、NEによる(^{3}H)arachidonic acid放出および(^{3}H)IP$_3$生成反応は、おもにα_1-adrenoceptor の活性化を介して発現しているものと考えられた。これらの事実が、先の rat thyroid cell lineを用いたNEでの成績（６）と非常によく一致していることから、(^{3}H)arachidonic acid放出反応は内分泌腺ばかりでなく外分泌腺においても様々な分泌機構の調節に関与しているものと推定された。しかし細胞から放出されたarachidonic acidが分泌現象に共役しえないのかどうかは今後の課題である。

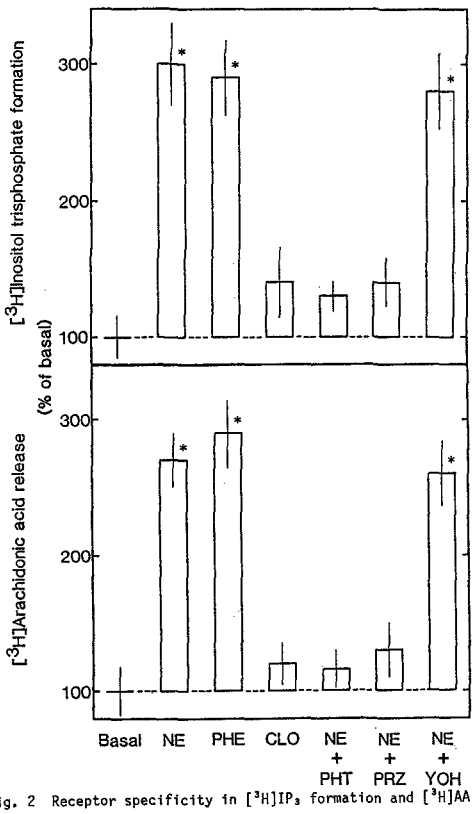


Fig. 2 Receptor specificity in [^{3}H]IP$_3$ formation and [^{3}H]AA release in parotid cells.

(Ⅲ)NEによる(^{3}H)aracidonic acid放出と(^{3}H)IP$_3$生成反応に及ぼすneomycinとquinacrineの影響

Phospholipase C活性を阻害するneomycin(7, 8)およびphospholipase A$_2$活性を阻害するquinacrine(8)を標識細胞に前処置し、NEの反応性を検討した(Fig. 3)。Neomycin (100 uM)の処置は、5 min間のNE (10 uM)による(^{3}H)IP$_3$生成反応を著しく($P<0.05$)阻害したが、(^{3}H)arachidonic acid放出反応には無影響であった。また、quinacrine(100 uM)の処置は、NE (10 uM)による(^{3}H)IP$_3$生成および(^{3}H)-arachidonic acid放出反応を、共に著しく阻害($P<0.05$および$P<0.05$)した。以上の結果より、NEによる(^{3}H)arachidonic acid放出および(^{3}H)IP$_3$生成反応は、異なるphospholipase活性と共役しているものと考えられた。

以上の成績より、耳下腺細胞でのNEによるarachidonic acid放出およびIP$_3$生成反応は、α_1-adrenoceptorの活性化と密接な関係にあり、これらの反応には細胞内phospholipase A$_2$およびphospholipase Cが関与しているものと示唆された。

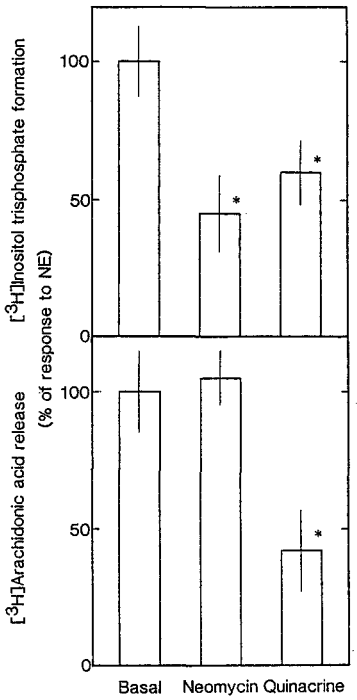


Fig. 3 Inhibitory effects of neomycin and quinacrine on NE-induced [^{3}H]IP$_3$ formation and [^{3}H]AA release.

この研究の一部は、文部省科学研究費(61571097)の援助を受けた。

参考文献

(1) Miyamoto, A., Akino, T., and H. Ohshika. (1986) Japan. J. Pharmacol. 42, 63-70
(2) 宮本 篤, 大鹿英世 (1986) 神経化学 25, 265-267
(3) Maruyama, T. and Ui, M. (1985) J. Biol. Chem. 260, 7226-7233
(4) Burch, R. M., Luini, A., Mais, D. E., Corda, D., Vanderhoek, J. Y., Kohn, L. D. and Axelrod, J. (1986) J. Biol. Chem. 261, 11236-11241
(5) Berridge, M. J., Dawson, R. M. C., Downes, C. P., Heslop, J. P. and Irvine, R. F. (1983) Biochem. J. 212, 473-482
(6) Cockcroft, S. and Gomperts, B. D. (1985) Nature 314, 334-336
(7) Schacht, J. (1976) J. Neurochem. 27, 1119-1124
(8) プロスタグランジンの生化学－室田誠透編 (1982) 東京化学同人

106. プロスタグランジンE_1によるイノシトールリン酸放出に関する薬理学的研究：受容体サブタイプの存在の可能性について

神庭重信・神庭靖子*・Richelson E.**
（慶応大・医・精神神経，東京女子医大・精神*・
メイヨークリニック・薬理**）

〔要　約〕

マウス神経芽細胞腫（N1E−115クローン）において，プロスタグランジン（PG）E_1が，反応時間および濃度依存性にイノシトールリン酸（IP）放出を刺激することを見い出した。PGE_1がcAMP生成を刺激することは以前よりよく知られているが，そのED_{50}（70nM）と，IP放出（1μM）あるいはcGMP生成（2μM）の刺激に対するED_{50}の間には10倍以上の差が見られた。PGE_1が刺激するIP放出およびcGMP生成は，ともに細胞外Caに依存していた。他のPGについて調べた結果，$PGE_2 > PGF_{2\alpha} \geqq PGD_2$はIP放出およびcGMP生成を刺激したが，$PGE_2$のみがcAMP生成を刺激した。これらの結果は，$PGE_1$受容体にサブタイプがあり，高親和性受容体はcAMP生成系と共役し，低親和性受容体はIP放出およびcGMP生成系と共役している可能性を示唆する。また，cAMPレベルを増加する薬物は，IP放出の基礎レベルには影響を与えなかったが，PGE_1が刺激するIP放出を増強した。一方，protein kinase Cの刺激薬，12−0−tetradecanoyl phorbol−13−acetate（TPA）は，PGE_1が刺激するIP放出およびcGMP生成を抑制したが，cAMP生成に対しては逆にこれを増強した。

Key word：Prostaglandine E_1, inositol phosphate, cycilc GMP

PGは中枢神経系にも存在し，摂食，体温，睡眠の調節，抗けいれん作用，ナトリウム排泄調節，視床下部におけるペプチド放出の調節などの生理作用を司っていることが推定されている。PGが個有の受容体を介してadenylate cyclaseを活性化することはよく知られている。また，受容体結合実験法によって中枢神経系にもこれらの受容体の存在が確認され，すでにある種の受容体蛋白質は分離精製されている[1]。しかしながら，これら受容体のサブタイプおよびその細胞内情報伝達における生化学的機構に関してはほとんど研究がなされていない。MatsuzawaとNirenbergは，PGE_1が，N1E−115クローンにおいてcAMPだけでなくcGMPの生成をも刺激することを初めて報告した[2]。しかし，この報告以来，PG受容体−セカンドメッセンジャー系についての詳細な研究は行なわれていない。

一方，現在までに調べられた限りでは，可溶性分画のguanylate cyclaseを活性化する受容体はみなIPの放出を刺激するが，cAMP生成は刺激しない。そこで今回著者らは，PGE_1がIP放出を刺激するかどうか，またcAMP生成を刺激するPGE_1受容体の性質と，他の反応を起こす受容体の性質は異なるかどうかなどについて調べた。

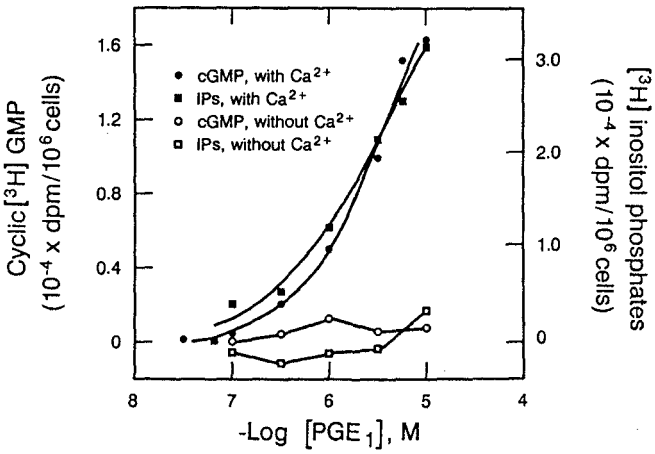
方法

1) Richelsonらの方法に従ってN1E−115細胞を培養し実験に用いた[3]。

2) 細胞を[^{3}H]グアノシンあるいは[^{3}H]アデニンとインキュベート（37℃，45 min）し，等張リン酸バッファーで希釈したのちmultiwell plateへ分配した。この時，各well

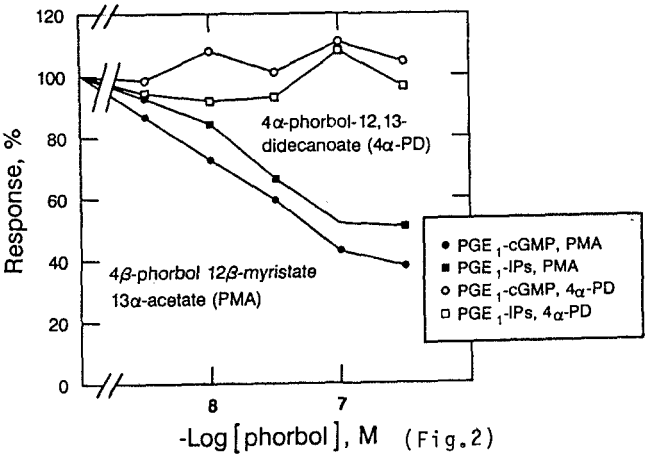
値を示した。PGE_1が刺激するIP放出のefficacyは，この細胞において他の受容体アゴニスト（egカルバコール，ニューロテンシン，アンギオテンシン）のIP放出に対するefficacyの約2倍と高かった。

次に他のPGについて調べたところ，PGE_2のみが有意にcAMP生成を刺激したのに対し，$PGE_2 > PGF_{2\alpha} \geqq PGD_2$のすべてがIP放出およびcGMP生成を刺激した。現在調べられている限りでは，受容体－セカンドメッセンジャー系の法則として（ノルアドレナリン系およびヒスタミン系を例にとってみると），cAMP生成を刺激する受容体サブタイプ（β－アドレナリンおよびヒスタミンH_2受容体）は一般にIP放出やcGMP生成を刺激しない。一方，cGMP生成を刺激する受容体サブタイプ（α_1－アドレナリンおよびヒスタミンH_1受容体）はIP放出を刺激する。以上の結果は，PGE_1受容体にサブタイプがあり，高親和性受容体はcAMP生成系と共役し，低親和性受容体はIP放出ならびにcGMP生成系と共役している可能性を示唆している。以前に，このクローンにおいて，[^{3}H]PGE_1を用いて高親和性結合部位（$K_D \simeq 10$ nM）と低親和性結合部位（$K_D \simeq 100$ nM）とが標識された。このうち低親和性結合部位はcAMP系と共役している受容体（$ED_{50} \simeq 70$nM）に対応していると考えられるが，高親和性結合部位に対応する受容体を介した生物学的反応はいまだ報告されていない。今回著者らは，[^{3}H]PGE_1を用いてcGMP生成およびIP放出系と共役していると考えられる受容体サブタイプの標識を試みた。しかしながら，この部位の親和性が低いこと，および低親和性結合部位との間の親和性の違いが10倍程しかないことなどの理由から信頼性の高い結果が得られなかった。



(Fig. 1)

cAMPによるIP放出に対する負のフィードバックが報告されている。そこでPGE_1が刺激するIP放出に対して，cAMPのレベルを増加する薬物の効果を調べた。表1にあるように，IBMX, forskolin, dibutylyl cAMPはどれもbasal IPレベルには影響を与えなかったが，PGE_1が刺激するIP放出を



(Fig.2)

	IP levels (10^4 dpm/10^6 cells)	
	Basal	PGE_1 (10 μM, 45 min)
Control	1.11 ± 0.06	3.10 ± 0.06 (100%)
IBMX 0.075 mM	1.05 ± 0.08*	3.59 ± 0.01 (116%)**
0.15 Mm	1.01 ± 0.08*	3.86 ± 0.07 (125%)**
Forskolin 10 μM	1.08 ± 0.04*	4.94 ± 0.17 (159%)**
100 μM	1.15 ± 0.02*	4.99 ± 0.06 (161%)**
d-cAMP 0.1 mM	1.14 ± 0.02*	3.65 ± 0.16 (118%)**
1 mM	1.30 ± 0.02*	3.90 ± 0.20 (126%)**

*, NS at $p > 0.05$ **, significantly different from the controls at $p < 0.01$

( ), % of the control value

の細胞密度は4～5×10^5 cell程度とした。次に，IBMX，阻害薬，刺激薬を加え，最終反応容量を300 μℓとした。反応は30 μℓの50％TCAを加え中止した。生成された[^{3}H]ヌクレオチドはイオン交換樹脂を用いて分離定量した[3,4]。

3)[^{3}H]IPアッセイでは，細胞をまず[^{3}H]myo-inositolと反応させ（37℃，60 min），上記と同様にして各試験管へ分配した。次に，LiCl阻害薬，刺激薬を加え，最終反応容量を300 μℓとした。この反応は750 μℓのクロロフォルム／メタノール（1：2）を加えて中止した。生成された[^{3}H]IPはイオン交換樹脂を用いて分離定量した[5]。

結果と考察

PGE_1（10^{-5}M）は，10 mM LiClの存在下においてIP放出を反応時間依存性に刺激し，その最大刺激はおよそ40分後に見られた。LiClを加えない場合には有意義なIPの蓄積は見られなかった。PGE_1は一過性にcGMPの生成を刺激し，そのピークはおよそ2分後に見られた。IBMX（0.15 mM）の存在下では，cGMPの生成は反応時間依存的であった。これらの結果は，この細胞ではIPおよびcGMPの代謝回転が速いことを示唆している。また，PGE_1の刺激するIP放出およびcGMP生成はどちらも細胞外Caに依存的であった（図1）。

PGE_1によるIP放出およびcGMP生成の用量一作用曲線は，それぞれLiClおよびIBMXの存在下ではほぼ同一であり，それぞれのED_{50}は，0.9±0.3 μM，および2.0±0.8 μMであった（図1）。この差は統計学的に有意ではなかった（T＝1.5，df＝6）。一方，PGE_1によるcAMP生成刺激におけるED_{50}は67±10 nMで，10倍以上の低増強した。しかし，これらの薬物はカルバコールが刺激するIP放出に対しては何の効果も持たなかった。この結果は，PGE_1のIP放出刺激のefficauyが他の受容体アゴニストのそれよりも高いことを説明するかも知れない。

次に，protein kinase Cのこれら受容体機能における役割りをTPAを用いて調べた。TPAはPGE_1が刺激するcAMP生成を増強し，そのED_{50}は15±5 nMであった。一方，TPAはPGE_1が刺激するIP放出やcGMP生成に対しては抑制作用を持っていた（図2）。そのIC_{50}は，それぞれ14±4 nMおよび15±4 nMであった。また，不活性型の4α-PDはいずれの作用も欠いていた。これは，PGE_1によるIP放出が過剰に刺激される状況では，protein kinase C活性化を介しcAMPの生成が増強され，逆にPGE_1によるcAMP生成が過剰に刺激される状況では，IP放出も促進される可能性を示唆している。このようにしてこれら2系統のセカンドメッセンジャーは互いにバランスオフしているのかも知れない。

1) Yumoto, N., Watanabe, Y., Watanabe, K., Watanabe, Y., and Hayaishi, O. (1986) J. Neurochem. 46, 125–132.

2) Matsuzawa, H., and Nirenberg, M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sic. USA 72, 3472–3476.

3) Richelson, E., Prendergast, F.G., and Divinetz-Romero, S. (1978) Biochem. Pharmacol. 27, 2039–2048.

4) Stenstrom, S., and Richelson, E. (1982) J. Pharmacol. Exp. Ther. 221, 334–341.

5) Kanba, K. S., and Richelson, E. (1987) Biochem. Pharmacol. 36, 869–874.

107. ブラジキニンや細胞内に注入したCa^{2+}とイノシトール三リン酸による アセチールコリンの遊離：培養NG108−15細胞－筋線維シナプスを用いての研究

東田陽博　（金沢大・がん研・薬理）

〔要　約〕

1．ブラジキニン（BK）とイノシトール1、4、5ー三リン酸（InsP3）とホルボールジブチレート（PDBu）のアセチールコリン（ACh）遊離におよぼす作用を培養神経NG108-15細胞と筋線維間シナプスで電気生理学的に調べた。

2．電気泳動的に投与したBKによって、シナプス反応（m.e.p.p.s）の頻度は40-50秒上昇した。多くのm.e.p.sが細胞の過分極反応中に生じた。

3．Ca^{2+}イオンの細胞内注入によって、m.e.p.p.sは短時間誘発された。

4．電気泳動的に細胞内投与したInsP3はNG108-15細胞の過分極に一致してm.e.p.p.sの頻度を上昇させた。

5．NG108-15細胞の1 μM PDBu処理により3-5分以内にm.e.p.p.sの頻度上昇を観察した。

6．以上の結果はBK依存性プレシナプス促通（Presynaptic facilitation）が2つの細胞内伝達物質の作用（InsP3依存性細胞内Ca^{2+}動員とDG依存性Cーキナーゼによるタンパク質リン酸化）による事を示している。

Key word：　Presynaptic facilitation, second messengers, polyphosphoinositides

ニューロブラストーマ・グリオーマ雑種NG108-15細胞をブラジキニン（BK）で刺激すると、ホスホイノシトール（PI）代謝回転を高め[1]、イノシトール1,4,5ー三リン酸（InsP3）とジアシルグリセロール（DG）を産生する[2]。また横紋筋細胞とシナプスを形成したNG108-15細胞にBKを投与すると、筋線維で記録されるシナプス電位（m.e.p.p.s）の頻度を上昇する[1]。ここでは、InsP3やDGのBKによるプレシナプス促通（Presynaptic facilitation）のセカンドメセンジャーとしての役割を明確にするため、NG108-15細胞内電位と筋細胞内電位を同時記録し、細胞外からのBKの電気泳動的投与、InsP3やCa^{2+}の細胞内微量注入およびホルボールジブチレート（PDBu）投与により誘発されるm.e.p.p.sを測定したので報告する。

（方法）

ジブチリールcAMPやPGE1等で分化したNG108-15細胞を前述のように[3]培養横紋筋胞と同時培養した。50-200 μmの直径をもつNG108-15細胞が筋線維上に直接接していたり、またごく短い突起で結合している細胞対を実験対象として選んだ。その理由は、BKによるInsP3産生部位とアセチールコリン（ACh）遊離部位との距離を短くするためである。細胞内記録は1Mクエン酸カリおよび3M KClを含む微小ガラス管電極をNG108-15および筋線維に刺入し、Axoclamp-2前置増巾器にて記録した。酸性にした0・1mM BKを満たしたガラス管をNG108細胞に近づけ＋の電流にてBKを投与した。水に溶いた0・5mM InsP3および0・5M $CaCl_2$を含むガラス管をそれぞれNG108-15細胞内に刺入し電気泳動的に細胞内注入を行なった[4,5]。

（結果と考察）

BKをNG108-15細胞に投与すると、1-5秒後以内にm.e.p.p.sの頻度上昇を観察した。シナプス反応は、NG108-15細胞膜が過分極している間にすでに見られ（図１）、平均の頻度上昇は6･9倍(n=29)であった。シナプス反応の大きさの分布はBK投与前と後であまり変わらなかった。BK受容体刺激の代わりに、細胞内で生じたと思われるInsP3によるCa^{2+}濃度上昇[6]をCa^{2+}およびInsP3の細胞内注入により復元する目的でNG108-15細胞内にCa^{2+}およびInsP3を注入した。Ca^{2+}注入により短時間m.e.p.p.sがNG108-15細胞の過分極中に誘発された（図２）。InsP3の注入によっても細胞は過分極し、その間に多数のm.e.p.p.sが発生した（図３）。過分極反応はBK受容体刺激により産生したInsP3により引き起こされた細胞内Ca^{2+}濃度上昇によりトリガーされるCa^{2+}依存性k^+電流による事がわかっている[7]。従って、以上の結果は過分極が伝達物質遊離に作用しているのではなしに、細胞内で増加したCa^{2+}がプレシナプス促通を引き起こしている事を示唆している。

m.e.p.p.sの増加はBK刺激によるNG108-15細胞の脱分極中にも見られた（図１）。この脱分極はOAGやPDBuにより再現できた事からDGをセカンドメッセンジャーとするCーキナーゼ活性化による反応と考えられる[7]。シナプス反応はPDBu処理により3-6倍増加した（図４）。

以上の結果は、BKによるホスファチジールイノシトール4,5ビスホスヘート(PIP2)の分解産物であるInsP3とDGがプレシナプス側でセカンドメッセンジャーとして働き、伝達物質（ここではACh）放出促進に直接かかわっている事を示す。現在BKによるシ

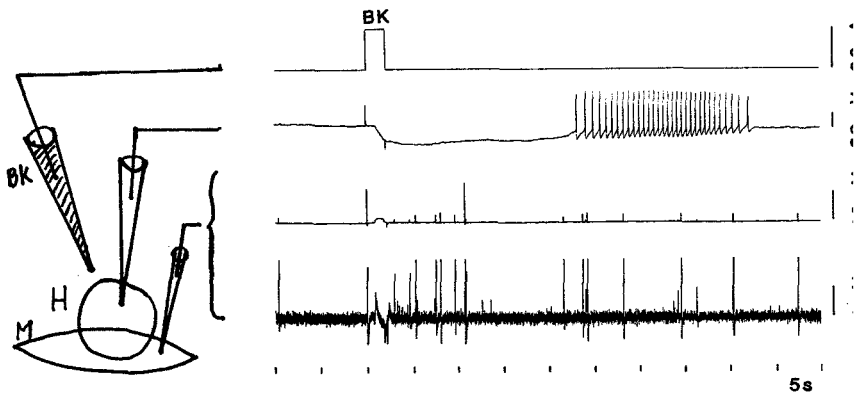


Fig. 1. ACh release accompanied the hybrid cell response to BK. Simultaneous recording from one NG108-15 hybrid and a paired muscle cell connected with short neurite(s). Uppermost record, iontophoretic current of BK application. Upper record, membrane potential of the hybrid cell. Lower two traces, DC- and AC- coupled recordings of the muscle potentials, respectively.

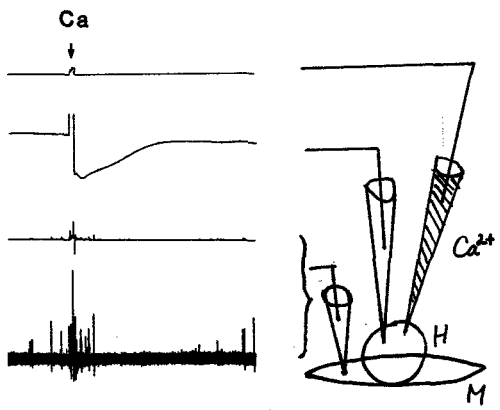


Fig. 2. M.e.p.p.s evoked by intracellular injection of Ca into an NG108-15 cell. Uppermost record, iontophoretic current for Ca injection. Upper record, hybrid cell response after Ca injection. Lower two traces, muscle responses (m.e.p.p.s and action potentials).

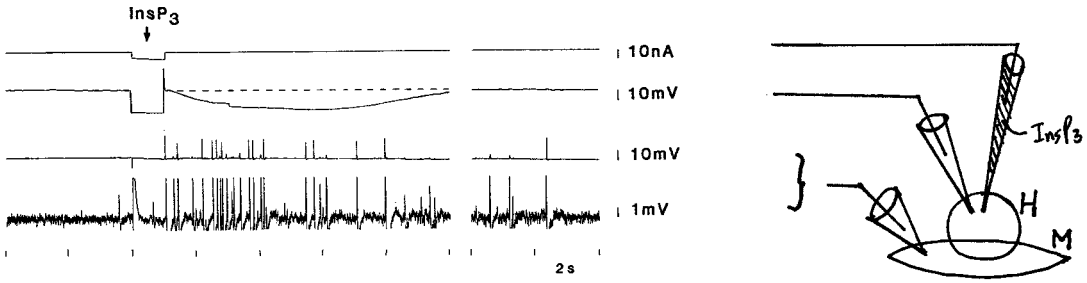


Fig. 3. M.e.p.p.s triggered by InsP3 injection into an NG108-15 hybrid cell. Simultaneous recording of one hybrid-myotube pair. Records show from above downwards: injection current of InsP3; membrane potential of the NG108-15 cell (hyperpolarization); DC- and AC-coupled recordings of the muscle cell. Note that many m.e.p.ps were generated in response to injection of InsP3 during the hyperpolarization.

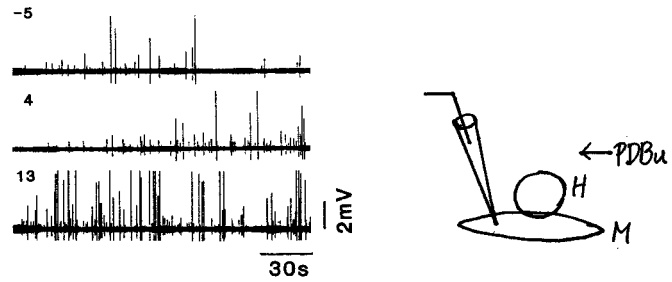


Fig. 4. Effect of phorbol dibutyrate (PDBu) on m.e.p.p.s. An NG108-15 hybrid-myotube pair was exposed to 1 uM PDBu at time zero. Examples of m.e.p.p.s (AC-record) measured at 5 min before(upper), 4 min (middle) and 13 min (lower) after PDBu treatment.

ナプス促通のはやい反応がInsP3の細胞内Ca^{2+}動員にのみ依存して生じるか否かを検討している。

（文献）

1. Yano, K., Higashida, H., Inoue, R. & Nozawa, Y. (1984) J. Biol. Chem., 259, 10201-10207.
2. Yano, K., Higashida, H., Hattori, H. & Nozawa, Y. (1984) FEBS Letters, 181, 403-406.
3. Nirenberg, M. et al. (1983) Science, 222, 794-799.
4. Higashida, H., Streaty, R.A., Klee, W. & Nirenberg, M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 942-946.
5. Higashida, H. & Brown, D.A. (1986) Nature, 323, 333-335.
6. Osugi, T., Imaizumi, T., Mizushima, A., Uchida, S. & Yoshida, H. (1987) J. Pharmacol. Exp. Therap., 240, 617-622.
7. Brown, D.A. & Higashida, H. (1987) J. Physiol. (London), in press.

108. 脳のPolyphosphoinositidesおよびその水解によるinositol trisphosphateの簡便調製法

今澤正興・奥村展枝・田口文子・宮本侃治
（国立精神神経センター・神経研）

〔要　約〕

ラット全脳およびウシ脳幹部より、polyphosphoinositides〔PPI：phosphatidylinositol bisphosphate (PIP_2)と phosphatidylinositol monophosphate (PIP)〕を調製する簡便な方法を確立した。脳組織を酸性 chloroform(C)-methanol(M)抽出し、粗PPI分画を得、さらにCMセルロースカラムクロマトグラフィーを行い、C-M-水系の濃度勾配溶出により、PIP_2, PIPを相互に分離した。凍結乾燥後のPIP_2と PIPの単離収率は g 湿重量当り、ラットの場合1.3mgと0.4mg、ウシの場合1.2mgと0.2mgであった。また同様なクロマトグラフィー操作により、市販の脳 Folch抽出物1の 1gよりそれぞれ約 20mgの PIP_2と PIPが得られた。調製したPPIはいずれも高い arachidon酸組成を示したが、特にマイクロ波固定したラット脳由来のPPIでは、グリセロールの2位の約90%が arachidon酸であった。一方それと比べて得られたウシ脳由来のPPIの arachidon酸組成は有意に低く、2位の脂肪酸の中の 50～55%で、市販のウシ脳PPIでも同様であった。次にPIP_2をアルカリ水解し、イオン交換クロマトグラフィーを行いinositol 1,4,5-trisphosphate〔(1,4,5)IP_3〕とinositol 2,4,5-trisphosphate〔(2,4,5)IP_3〕の混合物を得た。両アイソマーをセルロースカラムを用いたHPLCにより分離し、細胞内貯蔵部位より Ca^{2+}を遊離する second messenger とされる (1,4,5)IP_3を効率よく単離することができた。PIP_2からの (1,4,5)IP_3と(2,4,5)IP_3の単離収率は、それぞれ 70%と15%であり、一回のHPLC打ち込み当り、10mg以上の (1,4,5)IP_3が得られ、本法は(1,4,5)IP_3の優れた調製法である。

Key word：polyphosphoinositides, CM cellulose, inositol trisphosphate

PPIは細胞の情報応答機構における機能が注目されているリン脂質であるが、その非極性基と極性基を併せもつ特異な性質のため調製が容易でなかった。現在までに、Hendricksonら(5)、Kiselev(11), Schachtら(14)、Lowら(12)による報告があるが、いずれもイオン交換クロマトグラフィー後の脱塩操作が必要である。

我々はリン脂質をCMセルロースクロマトグラフィーによりクロロホルム(C)-メタノール(M)-水系の段階的溶出を用いてグループ分けし、さらにHPLCにより各脂質クラスを単離する方法を検討してきた(1,7,8)。今回は、PIP_2と PIPをCMセルロースカラムのみを用いて分離・調製する簡便な方法を開発した。また、得られた PIP_2を加水分解して second messenger とされる (1,4,5)IP_3を効率よく得る方法を検討した。

〔材料および方法〕

(1) 材料：ラットはWistar系、雄(10週令、体重 300-320g)を用い、NJE2603 10KWマイクロ波照射装置により、9KW, 1.1 秒照射後の全脳を用いた。またウシ脳幹部の灰白質部分を除いたものを用いた。

(2) 粗PPI分画の調製：図1に示した方法を用い、4℃以下で操作を行った。pH 5.0緩衝液でリン酸基の第一解離のみを中和して以後の操作に用いた。

(3) CMセルロースカラムクロマトグラフィー：湿重量約 5g の脳組織より得た粗 PPIを、予め C-M(1:1, v/v)で平衡化したCMセルロース(Whatman, CM52, K^+型)カラム(1.5 x 14 cm)に吸着させ、7 bed容量の C

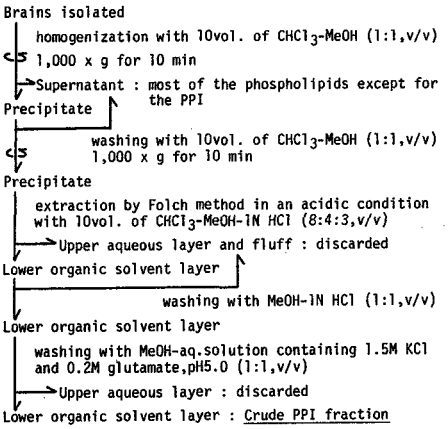


Fig. 1. Extraction of polyphosphoinositides

-M(1:1, v／v)溶出により血色素等の夾雑物を除いた後、C-M(v/v, 1:1)からC-M-水(5:10:4, v/v)への直線濃度勾配溶出(全溶離液量：500mℓ)を行った。流速は、毎時20 mℓとした。ウシ脳幹部 500gを出発材料とした場合には 4.0 x 38 cmのカラムを用い、6.0ℓの溶離液で濃度勾配溶出を行った。リン定量後有機溶媒を留去し、各分画を凍結乾燥した。

(4) (1,4,5)IP_3 の調製 ： PIP_2をIN KOH、30分環留の条件で水解後、DEAEセルロース(Whatmam, DE53)カラムによりピリジン-酢酸系溶出溶媒を用いて、IP_3分画を得た。これを微結晶性セルロースＨＰＬＣカラム(ダイセル、1 x 25 cm)に吸着させ、1% 炭酸アンモニウムを含む 58%エタノールを溶出溶媒として(1,4,5)IP_3 と(2,4,5)IP_3 を分離した。

(5) ガスクロマトグラフィー ： 脂肪酸分析には、Advance DS (改良 DEGS) キャピラリーカラム(0.3mm x 30m)を用い、170℃→215℃の昇温分析を行った。

(6) その他 ： PPI のＴＬＣ分析には、Jollesら(10)の方法を用いた。リン定量は Horecker法(6)によった。ＮＭＲスペクトル測定は GX-400型スペクトロメータにより、D_2O中 pH約9.5で行った。

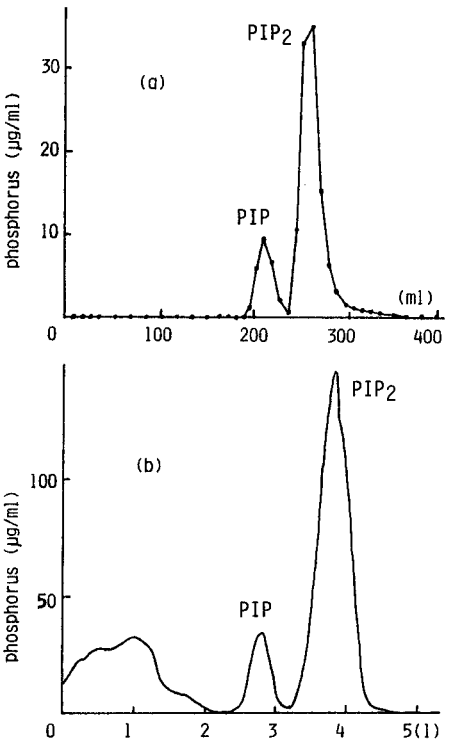


Fig. 2. CM cellulose chromatographic separation of PPI from 5g of rat (a) or 500 g of bovine(b) brain.

〔結果と考察〕

(1) PPIの調製 ： 図２に C-M-水系の濃度勾配溶出を用いたＣＭセルロースカラムクロマトグラフィーによる分離例を示した。本法によるPIP_2 と PIPの収量は g 湿重量当り、マイクロ波照射後ラット全脳からそれぞれ 1.3mgと 0.4 mg であり、ウシ、脳幹部からそれぞれ1.2mgと0.2mgで数百mgの PIP_2を一度の調製で単離することが可能である。また市販のウシ Brain extract(Folch 分画１, Sigma) 1g を出発材料として、同様のクロマトグラフィー操作により、PIP_2と PIPそれぞれ約 20mgを得た。単離したPIP_2, PIPはＴＬＣにより単スポットを示した。

	Rat		Bovine			
	Microwave irradiation		Present preparation		From Sigma	
	PIP_2	PIP	PIP_2	PIP	PIP_2	PIP
			(area %)			
16:0	7.5	7.7	6.1	6.0	5.8	5.9
18:0	37.5	38.9	37.2	36.9	37.4	38.6
18:1	5.5	4.4	13.5	12.9	13.5	12.2
20:4	45.6	45.1	27.3	25.5	27.0	26.8
22:6	1.2	2.3	0.4	0.4	0.4	0.5
Other	2.7	1.6	15.5	18.3	15.9	16.0

Table 1. Fatty acid compositions of brain PPI

本法は脱塩を要しないため簡便であり、収率的にも優れた方法である。PIP_2と PIPの分離能に対するＣＭセルロースのイオン型の影響の検討を行うと、K^+塩型が最も良好で、ついで Na^+型、NH_4^+型の順であった。しかし、Li^+型、Ca^{2+}型では、分離ができなかった。種々の陽イオン交換ポリマーの中で、CM-52がPPIの分離に最も良く、carboxymethyl基、またはセルロース骨格を有しないポリマーでは、PPIの分離ができないことを認めた。ＣＭセルロースによるPPI分離の機構は、一種の順相分配クロマトグラフィーであろうが詳細は不明である。上述の結果からセルロース骨格と carboxymethyl基が極性基として重要な役割を果していると考えられる。

(2) PPIの脂肪酸組成 ： 表1に我々が脳より得た PPIおよび Hendrickson法(5)による市販のウシ脳 PPI (Sigma)の脂肪酸組成を示した。PIP_2および PIPは PIと同様に高い arachidon酸(20:4)組成を示すと言われている(3)が、その報告例は少ない。我々の実験結果でも、得られた全ての PPI試料で高い 20:4 組成が認められた。特にマイクロ波固定したラット脳由来では、約 45% すなわちグリセロール2位の脂肪酸の約 90% が 20:4 であることが認められた。一方、ウシの PPIでは 20:4組成は2位の脂肪酸の中の 50～55% に留まっている。ウシ由来の市販のものと我々の調製したものの間で差は認められず、調製法による差は考えられない。ラットとウシより得られたPPIの 20:4 組成が異なる原因については、死後変化、種差等が考えれるが現在検討中である。

(3) PIP_2より (1,4,5)IP_3の調製 ： PIP_2 のアルカリ水解により(1,4,5)IP_3を得る調製法(4)は以前から知られている。しかし同時に副成する (2,4,5)IP_3との分離法にはペーパークロマトグラフィー(4)、イオン泳動法(15)が用いられてきたため、ごく小スケールの調製にのみ適用可能であった。我々は、セルロースカラムを用いたＨＰＬＣにより、IP_3 両アイソマーを完全に分離できることを認めた(図３)。PIP_2からの(1,4,5)IP_3と (2,4,5)IP_3の 収率は、それぞれ70%と15%であった。凍結乾燥により混在する炭酸アンモニウムを除き、１回のＨＰＬＣ打ち込み当り最大10 mg以上の (1,4,5)IP_3を得ることができた。両IP_3 の純度および構造は、ＮＭＲスペクトル測定により確認した。現在までに(1,4,5)IP_3の調製法は他にも報告されている(2,13)が、いずれもかなりの有機化学的習熟を要するため、生化学の研究室での (1,4,5)IP_3 の調製には本法が最も優れているであろう。また今回副成物として得られた (2,4,5)IP_3は、inositol 1,3,4,5-tetrakis phosphate〔(1,3,4,5)IP_4〕合成酵素である(1,4,5)IP_3 kinase の基質とはならないため、IP_3, IP_4等の細胞内代謝、生理的役割を検索する上で有用な化合物である(9)。今後これらIP_3およびPPIの中枢神経系における生理機能を検討する予定である。

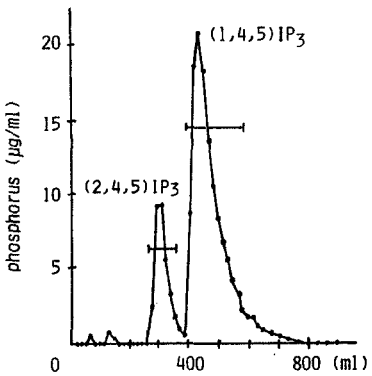


Fig. 3. Separation of (1,4,5)IP3 and (2,4,5)IP3 by HPLC. The flow-rate was 1.0ml/min.

[文献] 1) Abe, K., Kogure, K., Yamamoto, H., Imazawa, M., and Miyamoto, K. (1987) J. Neurochem. 48, 503-509 2) Auchus, R. J., Kaiser, S. L., and Majerus, P. W. (1987) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 84, 1206-1209 3) Baker, R. R., and Thompson, W. (1972) Biochim. Biophys. Acta 270, 489-503 5) Hendrickson, H. S., and Ballou, C. E. (1964) J. Biol. Chem. 239, 1369-1373 6) Horecker, B. L., Ma, T. S., and Haas, E. (1940) J. Biol. Chem. 136, 775-776 7) 今澤正興，宮本侃治 (1983) 神経化学 22, 384-386 8) 今澤正興，田口文子，宮本侃治 (1985) 生化学 57, 1034 9) Irvine, R. F., and Moor, R. M. (1987) Biochem, J. 240, 917-920 10) Jolles, J., Schrama, L. H., and Gispen, W. H. (1981) Biochim. Biophys. Acta 666, 90-98 11) Kiselev, G.V.(1982) Biochim. Biophys. Acta 712, 719-721 12) Low, M. G., Carrol, R. C., and Cox, A. C. (1986) Biochem.J. 237, 139-145 13) Ozaki, S., Watanabe, Y., Ogasawara, T., Kondo, Y., Shiotani, N., Nishi, H., and Matsui, T. (1986) Tetrahedron Letters 27, 3157-3160 14) Schacht, J. (1978) J. Lipid Res. 19, 1063-1067 15) Seiffert, U. B., and Agranoff, B. W. (1965) Biochim. Biophys. Acta 98, 574-581

109. オピオイドアンタゴニスト　ナロキソンによるラット脳発育の阻害

鈴木良弘・足立皓岑（国立精神神経センター・神経研）

〔要　約〕

中枢神経系の発育における neurotransmitter の関与について検討することを目的とし、内在性 opioid antagonist naloxone (NLX) のラット脳の発育に対する作用を調べた。NLX 投与によりラットの大脳および小脳は NLX の用量に依存して発育が障害された。この発育不全は cytosoine arabinoside (AraC) による発育不全とは異なり、体重の著明な減少や小脳の選択的な発育障害も認められず、大脳、小脳いずれも同程度に発育が障害された。また、小脳の細胞構築に変化は認められなかった。　さらに発育を障害された脳の各部位における monoamine および thyrotropin releasing hormone (TRH) の濃度を測定したところ、monoamine は、延髄、橋、大脳皮質、脊髄、線条体で変動が認められたが小脳では変動しなかった。一方、TRH 濃度は小脳で著明に減少したが、monoamine 濃度の変動の著しい脳幹では変動しなかった。　以上の結果から NLX によるラット脳の発育障害は AraC による発育障害とは異なる機序によること、また、その発育障害には monoamine および TRH の変動が関与している可能性が示された。

Key word：　Naloxone, Monoamine, TRH

内在性 opioid peptide とその受容体は哺乳類の中枢神経系の発生初期に出現(1)し、それらの分布および 密度はその発育とともに変動することが報告されている(2)。このことから内在性 opioid系が中枢神経系の発育に関与する可能性が考えられている(3)。現在までに種々の opioid agonist および antagonist が中枢神経細胞の増殖や中枢神経系の発育(4)に影響を与えることが示されているがその機序は明らかにされていない。われわれは今回内在性 opioid の antagonist の一つである naloxone (NLX)がラットの大脳および小脳の発育不全を起こすことを見いだしその機序を調べた。その結果 NLX の中枢神経系の発育に対する作用に monoamine類および thyrotropin releasing hormone (TRH) が関与している可能性を見いだしたので報告する。

（方法）雌雄の Sprague-Dawley ラットに誕生翌日から naloxone hydrochloride (Sigma) 1 および 50mg/kg, cytosine arabinoside (Ara C) （日本新薬）40mg/kg をそれぞれ 21日間および 3日間皮下投与した。control には生食を投与した。生後4週後に体重測定後、断頭により屠殺し脳および脊髄を取り出した。ドライアイス上で脳を大脳皮質、小脳、延髄、橋、線条体、海馬、視床、視床下部に分けそれぞれ秤量した。これらの試料は測定まで -80°Cで保存した。
monoamine類の測定は Meffordらの方法(5)の変法で行った。すなわち、試料を 5倍量の 0.1N perchloric acid (PCA)中でsonication によりホモゲナイズし、遠心によって得られた上清をmonoamine類測定に供した。monoamine類は 0.05mM EDTA, octyl sodium sulfate および acetonitrile を含む 0.1Mクエン酸緩衝液(pH 2.9)を用いてODS 5um カラム (250 x 46 mm I.D.) により分離し、voltammetry により検出した。TRH の定量は満間らの方法(6)により radioimmunoassay (RIA)で行った。
有意差検定は t 検定で行った。

（結果）

NLXのラット体重および脳重量におよぼす効果

Table 1に NLX, Ara Cおよび生食投与ラットの屠殺時の体重および脳重量を示した。 NLX 1mg/kg 投与群では control に比べて体重に差はなかった。 NLX 50mg/kg で 10% の体重減少を認めたが、AraC 投与群の 47% 減少に比べると NLX 投与による体重減少は小さかった。 大脳（小脳を除いた脳全体）湿重量は NLX 投与群では用量依存的に有意に減少し、その程度は AraC 投与群よりも著明であった。 小脳湿重量も NLX の用量に依存して有意に減少し、その程度は大脳における減少の程度よりも1 mg/kg, 50 mg/kg ともに大きかったが、著しい小脳湿重量の減少(56%) が認められた AraC 投与群に比べるとその減少の程度は小さかった。

NLX 投与によるラット中枢神経系(CNS)の monoamine 濃度の変動

Fig.1 に control および NLX 投与群の脳幹部におけるnoradrenaline (NA), 5-hydroxytryptamine (5-HT) および 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) の濃度を示した。 NLX 投与により橋では NA, 5-HT および 5-HIAA のいずれもほぼNLXの用量に依存して有意に増加した。 一方、延髄ではNA, 5-HT および 5-HIAA のいずれも NLXの用量に依存して有意に減少した。 さらに延髄では dopamine 濃度も有意に減少していた(data not shown)。 また大脳皮質で 5-HT が NLX の用量に依存して有意(50 mg/kg 投与群では controlの 60%まで）に減少した。 その他、脊髄において NLX 50 mg/kg 投与群で NA の有意な減少、線条体において 50mg/kg で 5-HT および 5-HIAA の有意な増加を認めた。 それに対して小脳では NA, 5-HT および 5-HIAA のいずれも変動せず、また海馬、視床下部等でも有意な変動は認められなかった(data not shown)。

NLX投与によるラット中枢神経系(CNS)のTRH濃度の変動

Fig.2 に control および NLX 投与群の脳各部位における TRH の濃度を示した。NLX 投与により用量依存的に小脳の TRH 濃度は 1 mg/kg および 50 mg/kg 投与群でそれぞれ controlの 78% および63% に減少した。 また海馬の TRH 濃度も用量依存的に有意に減少（1 mg/kg で control の 75% まで, 50 mg/kgで 63% まで） が認められた。 それに対して著明な NA, 5-HT および 5-HIAA の濃度の変動の認められた脳幹部では TRH は有意な変動を示さなかった。

Table 1 Body weights, wet weights of cerebrum and cerellum of NLX- and AraC- treated rats

	Body weights(g)	Cerebrum weights(mg)	Cerebellum weights(mg)
Control	69.1±3.84 (10)	1048.6±57.0 (10)	196.6 ±17.8 (7)
NLX- treated 1 mg/kg	67.4±11.0 (10)	* 975.8±69.5 (8)	** 167.9±18.4 (8)
50 mg/kg	** 62.1±5.63 (10)	*** 853.8±73.3 (9)	*** 151.5±12.5 (7)
AraC- treated 40 mg/kg	*** 36.4±6.44 (7)	*** 929.6±49.5 (7)	*** 85.8 ±11.5 (8)

Mean S.D. (number of animals)

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

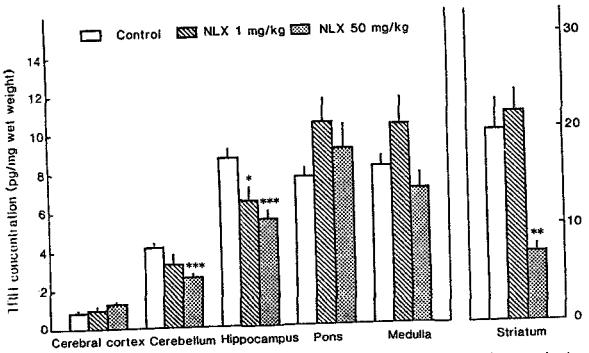


Fig.2 TRH concentrations in various brain regions of naloxone (NLX)-treated rats

Mean S.E. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

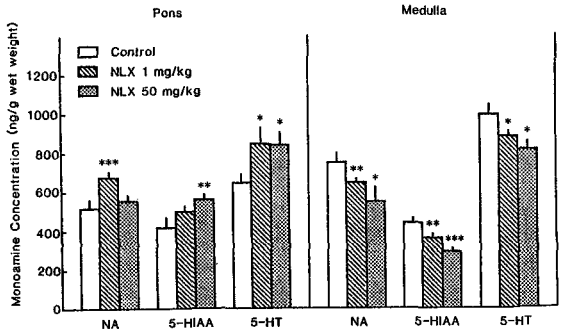


Fig.1 Monoamine concentrations in the brainstem of naloxone (NLX)-treated rats.

Mean S.E. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

（考察）近年、中枢神経系に作用し、NA, 5-HT などの neurotransmitter のバランスを変える薬物が中枢神経系での細胞増殖に影響を与えることが示され、neurotransmitter が中枢神経の発育に関与している可能性が示唆されている(7)。
内在性 opioid peptide もそのような neurotrasmitterの１つであると考えられている (1,4)。　Zagonらは内在性 opioid peptide の antagonist の１つの naltrexone (NTX) 投与によりラットの体重および小脳、大脳、海馬の発育が影響されることを報告している(4)。 NTX は1 mg/kgで発育を抑制し、50 mg/kgで発育を促進すると報告されている。　今回われわれは naltrexone と同様に μ-receptorに対して強く作用する naloxone (NLX)のラット中枢神経系の発育に対する作用を検討した。
NLX 投与により NTX と同様に大脳および小脳の発育不全が認められた。 しかしながら NTX で報告されているようにその用量により発育を抑制または促進するという現象は認められなかった。　この発育不全を cytosine arabinoside (AraC) による発育不全 (8)と比較すると AraC による発育不全では著明な体重減少と小脳の選択的な発育不全が認められるのに対して、NLX 投与による発育不全では大きな体重の減少は認められず、大脳、小脳ともに同程度に発育が障害された。　病理組織学的検討を行ったところNLX投与によって発育が障害された小脳ではその細胞構築に変化は認められず、AraC 投与群にみられる顆粒細胞の変性、脱落が認められなかった。　これらの結果からNLXによる発育不全は AraC によるものとは異なると考えられる。
次にこの発育不全における neurotransmitter の動態を知るために中枢神経系各部位における monoamine および thyrotropin releasing hormone (TRH) 濃度を測定した。　NLX投与により橋、延髄、大脳皮質、脊髄、線条体のmonoamine 濃度に変動が認められた。　これに対して小脳では monoamine 濃度の変動は認められなかった。
一方、TRH 濃度は小脳で著明に減少したが、monoamine 濃度の著しい変動の認められた脳幹では変動しなかった。　これらの変動が多くの場合で NLXの用量に依存して認められたことは これらが NLX の中枢神経系に対する作用と密接に関連していることを示している。
今回われわれは、opioid antagonist NLX の投与によって AraC によるものとは異なるラット中枢神経系の発育不全が惹起されることを見いだした。　また、この発育不全では monoamine および TRH が変動することが明らかとなった。 NLX による発育不全が内在性 opioid peptide の neurotrophic action を阻害した結果であるか、また、今回見いだされた neurotransmitter の変動がそのような opioid system に対する攪乱の結果であるのか等については現在検討中である。
小脳皮質への 入力路の存在およびその活動が、小脳皮質の neuron の分化と形成に何らかの作用を及ぼしていることが考えられる。一例として、その分化発育に下オリーブ核を起源とする climbing fiber が重要であると考えられている (9,10) が その下オリーブ核が存在する延髄で NA, DA, 5-HT および 5-HIAA のいずれもが小脳の発育不全の程度に並行して減少したことは延髄における neurotransmitter の変動が小脳の発育不全と関係がある可能性を示し興味深い。

文献

1. Kent, J., Pert, C. and Herkenham, M. (1982) Dev. Brain Res. 2: 487-504.
2. Bayon, A., Shoemaker, W., Bloom, F., Mauss, A. and Guilleman, R. (1979) Brain Res. 179: 93-101.
3. Loughlin, S. E., Massamiri, T., Kornblum, H. I. and Leslie, F. M. (1985) Neuropeptides 5: 469-472.
4. Zagon, I. S. and McLaughlin, P. J. (1986) Dev. Brain Res. 28: 233-246.
5. Mefford, I. N. and Barchas, J. D. (1980) J. Chromatogr. 181: 187-193.
6. Mituma, T., Hirooka, Y. and Nihei, N. (1976) Acta Endocrinol. 83: 225-235.
7. Patel, A. J., Vertes, Z., Lewis, P. D. and Lai, M. (1980) Brain Res. 202: 415-428.
8. Shimada, M., Wakaizumi, S., Kasubuchi, Y. and Kusunoki, T. (1975) Arch. Neurol. 32: 555-559.
9. Kawaguchi, S., Yamamoto, T., Mizuno, N. and Iwahori, N. (1975) Neurosci. Lett. 1: 301-304.
10. Kornguth, S. E. and Scott, G. (1972) J. comp. Neurol. 146: 61-82.

110. TetrapheylboronによるMPP^+（1－methyl－4－phenylpyridinium）のシナプトソームにおけるエネルギー代謝阻害への増強

相内敏弘・白根喜浩・松永雅美・中谷一泰
中村泰治・杵鞭宏育*・荒井裕一朗*
（昭和大・薬・生物化学，医・第二薬理*）

〔要　約〕
ドーパミンニューロンに対する神経毒であるMPP^+のエネルギー代謝への阻害効果を、マウス全脳シナプトソームを用いて検討した。MPP^+は単独では、酸素消費速度に対しの1mMとかなり高濃度にしても阻害効果は低く、また乳酸産生活性化やATP量の減少も僅かであった。脂溶性陽イオンの膜透過性を上げる事が知られている脂溶性陰イオンTPB^-共存下では、MPP^+は、酸素消費速度を50～100μM程度から阻害した。また、呼吸阻害に対応して顕著な乳酸産生の増加および、ATP量の減少が引き起こされた。
これらの結果は、MPP^+のマウス全脳シナプトソームの形質膜における透過性は良くない事、また細胞内にMPP^+が取り込まれれば毒性を発現する事を示している。MPP^+がドーパミン透過系で選択的に取り込まると言う報告と考え合わせると、ドーパミンニューロン内でMPP^+がエネルギー代謝を阻害し、MPP^+の毒性が選択的にドーパミンニューロンで現れる事になる。

Key word : MPP^+, TPB^-, synaptosomes

MPP^+(1-methyl-4-phenylpyridinium)は、人や猿の黒質線条体のドーパミンニューロンを変性消失させ、パーキンソン病と同じ病態を引き起こすことが知られている[1]。MPP^+の神経毒性の発現機構は、目下完全には解明されていないが有力な説としてミトコンドリアの呼吸阻害による細胞内のATP量の減少により神経細胞の壊死が考えられる[2,3]。MPP^+は、ドーパミン取り込み系で特異的に細胞内に入ると考えられている[1]ので、上述の細胞毒性発現機構の妥当性を検討する為には、ドーパミン系の神経細胞を用いる必要がある。我々は、種々の生体膜系において脂溶性陽イオンの膜透過性を上げる事が知られているTetraphenylboron（TPB^-）が[4,5]、MPP^+のミトコンドリア膜の透過性を上げ、TPB^-共存下では、MPP^+が単独よりもより低濃度からミトコンドリアの呼吸を阻害する事を見いだした[6]。TPB^-が、ドーパミンを取り込まないシナプトソームにおいてもMPP^+の取り込ませられると、エネルギー代謝への効果は実験できると考えられる。本実験では、MPP^+、のマウス全脳シナプトソームの呼吸阻害、乳酸産生およびATP量への効果並びにそれらに対するTPB^-の効果を調べた。

（方法）　全ての実験には、dd系及びC57BL系 マウスを用い常法に従い調整した全脳粗シナプトソーム分画（P_2）を用いた。酸素消費は、Clark型酸素電極で測定した。ATP量は、過塩素酸抽出し、luciferaseによる発光法を用い測定した。乳酸量は、LDHを用いて定量した[7]。膜電位は、TPP^+(tetraphenylphosphonium)陽イオンおよびローダミン6Gを用いた測定した[8,9]。

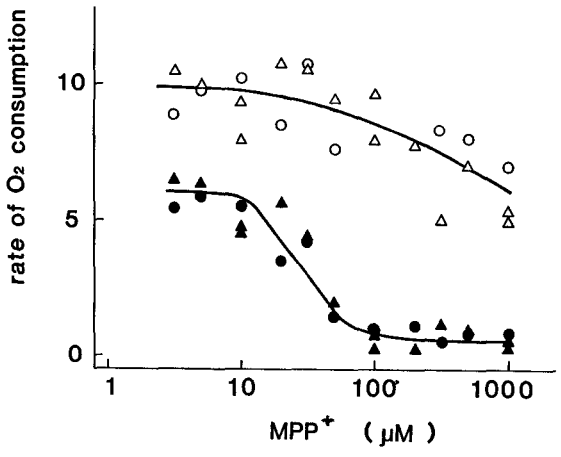


図１　呼吸阻害のＭＰＰ⁺濃度依存．
縦軸の単位は nmolO_2/min・mg protein
（△，▲）dd,（○，●）C57BL
（△，○）MPP⁺,（▲，●）MPP⁺+TPB⁻

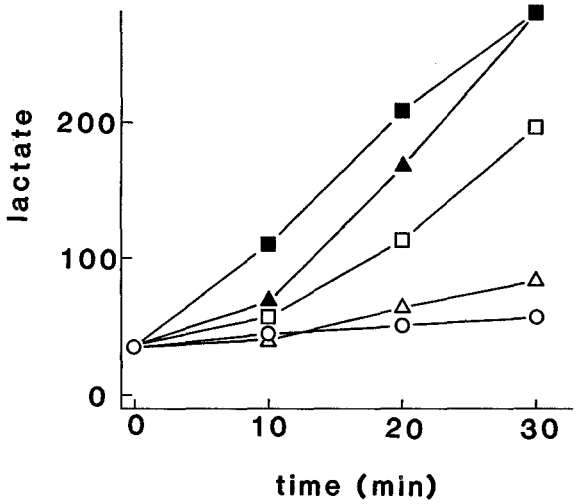


図２　乳酸産生に対するＭＰＰ⁺の効果
縦軸の単位はnmol/mg protein
○;control, △;0.05 mM MPP⁺, □;1 mM MPP+,
▲;0.05 mM MPP⁺+TPB⁻, ■;1 mM MPP⁺+TPB⁻

（結果）

P_2分画を種々の濃度のＭＰＰ⁺と１０分間インキュベートし呼吸基質としてピルビン酸を加えたときの酸素消費速度（○,△）及びさらにＴＰＢ⁻（１０μＭ）を加えた後の酸素消費速度を（●,▲）図１にプロットした。図より分かるようにＭＰＰ⁺の単独では、高濃度でも呼吸阻害効果は、あまり顕著でないがＴＰＢ⁻共存下では、５０μＭ程度で強く呼吸阻害効果が見られた。又、マウスの種を変えても呼吸阻害の程度に差は見られなかった。ミトコンドリアでは、メディウム中の塩濃度を下げるとＭＰＰ⁺の阻害発現時間が顕著に短くなったが、シナプトソームではメディウム中の塩濃度を下げてもＭＰＰ⁺の呼吸阻害効果にはほとんど影響がなかった。メディウムに種々の濃度のＭＰＰ⁺及びＴＰＢ⁻を加えインキュベートした時のメディウム中の乳酸量を図２示した。呼吸阻害の程度に対応して乳酸産生が増加している事が分かる。ＡＴＰ量は、ＭＰＰ⁺（１００μＭ）単独では、減少しないがＴＰＢ⁻共存では、著しく低下した。結果は示していないがＭＰＰ⁺を１ｍＭに上げるとＴＰＢ⁻無しでも有意にＡＴＰを減少させた。膜電位は、ＭＰＰ⁺１ｍＭ単独では１０分間インキュベートしても殆ど変わらなかった。

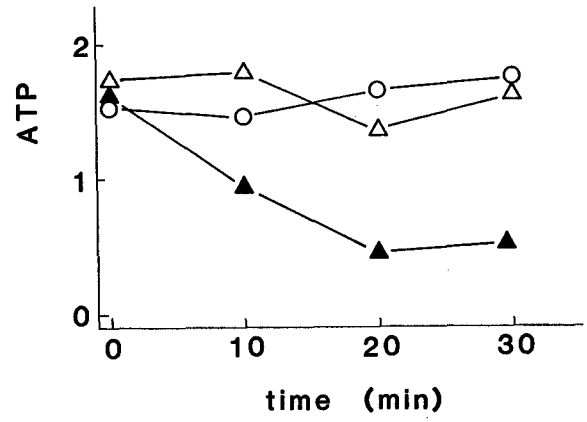


図３　ＡＴＰ含量に対するＭＰＰ⁺の効果
縦軸の単位はnmol/mg protein
○;control, △;0.1 mM MPP⁺,
▲;0.1 mM MPP⁺+TPB⁻

ＴＰＢ⁻存在下では、膜電位はうまく測定できていないので膜電位におけるＴＰＢ⁻の効果は目下評価できていない。

（　考察　）

ＭＰＰ⁺は、単独ではかなり高濃度（１ｍＭ）でも、エネルギー代謝に阻害効果は弱く、ＭＰＰ⁺はシナプトソーム形質膜を殆ど透過しないことを示している。ミトコンドリアにおいてＭＰＰ⁺は、単独でも５００μＭで充分呼吸阻害がみられ[2,3,6]、ＴＢＰ⁻共存化では５μＭでも呼吸阻害をした[6]。　シナプトソームにおいても、ＴＰＢ⁻はＭＰＰ⁺の代謝阻害効果を増強していることは、ＴＰＢ⁻がＭＰＰ⁺の膜透過を高めている事を示している。しかし、ＴＰＢ⁻共存下でもＭＰＰ⁺のシナプトソーム内ミトコンドリアへの呼吸阻害濃度は５０～１００μＭであり。肝臓と脳のミトコンドリアのＭＰＰ⁺による呼吸阻害効果に差は無いと言われているので[3]、ＭＰＰ⁺のシナプトソーム濃度はメディウムの１／１０程度と推定される。ミトコンドリアでは、ＭＰＰ⁺を膜電位依存的に濃縮していると考えられるが[2,6]、シナプトソームでは膜電位があるがＭＰＰ⁺細胞内への濃縮は起こらないと示唆される。シナプトソームをＴＰＢ⁻共存下でＭＰＰ⁺とインキュベートしてもメディウム中のＭＰＰ⁺濃度は殆ど変化しなかった。これらの事因りＭＰＰ⁺のシナプトソーム形質膜の膜透過性は、ミトコンドリア膜のそれよりかなり悪いと考えられる。

酸素消費への阻害効果及び乳酸産生の増加効果への、ＭＰＰ⁺の濃度依存性は、良く対応する（図１、２）。ＭＰＰ⁺により呼吸阻害が起こり、細胞内が嫌気的条件になり解糖系が活性化され乳酸が増加したと考えられる[3]。ＭＰＰ⁺の呼吸阻害の目安として乳酸量の測定も有用であると思われる。ＡＴＰ量は、１時間後でも完全に枯渇しなかった、解糖系で造られた為かとも考えられる。

ＭＰＰ⁺は、ドーパミン透過系で選択的に取り込まれる[1]。本実験の結果は、ＭＰＰ⁺の細胞内濃度が充分上がれば、エネルギー代謝を阻害しＡＴＰ量を下がる事を示している。脳内でＭＰＰ⁺を取り込む特異的ニューロンが、ＭＰＰ⁺により選択的に損傷すると考えることは、妥当であろう。C57BL系マウスは、dd系マウスよりＭＰＰ⁺により神経毒性の感受性が高いが[1]全脳シナプトソームの呼吸阻害効果において差が無かった。それらのマウスのドーパミンニューロン内でのエネルギー代謝やカテコールアミンの代謝においてＭＰＰ⁺の阻害効果の強さに差があるのかもしれない

（参考文献）

1) Langston,J.W. (1985) Trends in Pharmacol. Sci. 6, 375-378.
2) Ramsay,R.R. et al(1986) Life Science 39, 581-588
3) Vyas,I. et al (1986) J. Neurochem. 46, 1501-1507
4) Grinius,L.L. et al (1970) Biochim. Biophys. Acta 216, 1-12
5) Bakeeva,L.E. et al (1970) Biochim. Biophys. Acta 216, 13-21
6) Aiuchi,T. et al 日本薬学会 (1987) manuscript submitted
7) Aiuchi,T. et al (1986) Biochim. Biophys. Acta 843,20-24
8) Aiuchi,T. et al (1882) Biochim. Biophys. Acta 685,289-296
9) 松永ら (1985) 膜 10,195-200

111. Central hypothermic effects of some analogues of 1—methyl—4—phenyl—1, 2, 3, 6—tetrahydropyridine (MPTP) and 1—methyl—4—phenylpyridinium ion (MPP^+)

佐藤信範・米沢章彦・只野　武・木皿憲佐・豊島良枝*・荒井裕一郎*・杵鞭宏育*

(東北薬大・薬理, 昭和大・医・第二薬理*)

〔要　約〕

黒質—線条体の dopamine (DA) ニューロンの神経毒 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)、MAO によるその酸化生成物 1-methyl-4-phenylpyridinum ion (MPP+) とそれらの化学構造類似物質 4-phenylpyridine (PPY)、4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (PTP)、4-phenylpiperidine (PPD) および 4-(4-chloro-phenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine (CPTP) のマウス直腸体温に及ぼす影響について検討を行った。MPTP の急性腹腔内投与 (i.p.) は一過性の体温上昇とそれに続く比較的長い体温下降の二相性の変化を引き起こした。しかし、MPP+ i.p. 投与では体温上昇作用のみ認められ、また両化合物の脳室内投与 (i.c.v.) では i.p. 投与とは反対に体温低下作用のみを示した。一方、両化合物の化学構造類似物質のうち、PPY (25, 50 および 100 mg/kg, i.p.) と PTP (20, 40 および 80 mg/kg, i.p.) では投与後 60-120 分をピークとする体温下降作用のみが認められこの作用は i.c.v. 投与の場合でも同様であった。これら両化合物の体温下降度は i.c.v. 投与に比べ i.p. 投与の方が強力で、さらに、PPY (i.c.v.) による体温下降作用は MAO-A および MAO-B の選択的阻害剤である clorgyline および l-deprenyl の前処理によってそれぞれ抑制された。一方、PTP (i.c.v.) の体温下降作用は clorgyline 前処理では影響を受けず、l-deprenyl 前処理で抑制された。以上の結果から PPY および PTP の体温下降作用は、主として中枢神経系を介して発現されると思われるが、同時に末梢での関与も否定出来ない。また、両化合物は tetrahydropyridine 環に N-メチル基を有しないことから、MPTP および化学構造類似物質の体温下降作用に N-メチル基は必ずしも必要ではない。また、これら化合物による体温変化は DA 神経毒性とは異なり MAO による代謝物への変換が必須条件とは考えにくい。

Key word : MPTP and MPP+, Hypothermia, Some analogues of MPTP and MPP+

MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) は黒質—線条体の dopamine (DA) ニューロンを破壊し、Parkinson 様症状を発現させる化合物として知られている (1,2)。この MPTP の神経毒作用はいわば"慢性"作用の一環としてとらえるべきで、その他多くの急性、亜急性とも呼べる"薬理効果"が生じることが想定される一方、MPTP が黒質—線条体 DA ニューロンの神経毒としての可能性が増すにつれ特発性 Parkinson 病の病因と環境物質との因果関係も指摘され、多くの MPTP 構造類似物質を用いた構造—活性相関の研究が行われている。すでに我々は MPTP およびその MAO-B による酸化物 MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridinum ion) の急性効果としてマウス自発運動の低下と脳内 DA、5-HT およびそれら代謝物の変化について報告した (3)。また前報 (4) では他の急性薬理作用として体温に対する影響も報告した。すなわち、両化合物はいずれも末梢コリン作動性神経を介する体温上昇作用と作用機序の不明な中枢性下降作用を示し、このうち MPTP の中枢性体温下降作用は DA ニューロンに対する神経毒作用とは異なり MPP+ への変換の必要性がないことを指摘した。一方、MPTP の化学構造類似物質である PTP は脳内 MAO-B により MPP+ の構造類似物質である PPY に変換する (5)。さらに PTP (i.c.v.) はマウス新線条体の DA 量を著明に減少させ (6)、PPY にもこれと極めて類似した影響が認められている (7)。そこで今回我々は、MPTP 及び MPP+ による中枢性体温下降作用の機序の解明を試みると共に両化合物の化学構造類似物質によるマウス直腸体温におよぼす影響について検討を加えた。

〈実験材料及び方法〉

実験には全て体重 25±2g の ddY 系雄性マウスを使用し、マウス直腸温は直腸 2cm の深さにサーミスターチューブを挿入し測定した。薬物投与に際しては、あらかじめ体温が 37.0-38.0°c のマウスを選び、室温 (23.0±1°c) の実験室に、1 時間放置したマウスを使用した。本実験に使用した MPTP および MPP+ の化学構造類似物質は、4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (PTP)、4-phenylpyridine (PPY)、4-phenylpiperidine (PPD) および 4-(4-chlorophenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine (CPTP) である。また、clorgyline および l-deprenyl は、MPTP および MPP+ の化学構造類似物質投与 1 時間前に i.p. 処理した。

〈結果および考察〉

1) MPTP および MPP+ 末梢投与および脳室内投与によるマウス体温に及ぼす影響

すでに前報 (4) で一部報告したごとく MPTP (24 mg/kg, i.p.) により、投与後 60 分 (+1.5°C) をピークとする著明な体温上昇作用が認められたが、投与後 180 分頃より体温下降作用へと変化し、投与後 240 分では、約 -1.2°C の最大の体温下降作用が認められた。しかし、この体温下降は投与後 8 時間でほぼ control レベルまで回復した。一方、MPTP (40 および 80 μg/mouse, i.c.v.) 投与では、投与後 120 分 (-2.5°C) をピークとする持続的な体温下降作用のみが認められ i.p. 投与で引き起こされた体温上昇作用は全く認められなかった。一方、MPP+ (12 mg/kg) i.p. 投与では、投与後 30 分 (+2.6°C) をピークとする体温上昇作用のみが認められ、投与後 180 分でこの作用は完全に消失した。さらに、MPP+ (i.c.v.) は MPTP (i.c.v.) 投与の場合と同様に体温下降

作用のみが認められ、投与後 240 分 で control レベルまで回復した（表1)。MPTP (24 mg/kg, i.p.) 投与後 60 分と 240 分での視床下部 DA、DOPAC、HVA、3-MT 値の変化を測定した結果、240 分後の体温上昇作用と並行した 5-HT の増加が認められた。

Table 1. Effects of MPTP and MPP+ on mouse rectal temperature

Drug	Dose	Rectal temperature (°C) 30 min	60 min	240 min
Saline	——	37.5±0.16	37.5±0.16	37.2±0.08
Ringer	——	37.0±0.13	36.9±0.14	36.8±0.11
MPTP	24 mg/kg, i.p.	38.6±0.25[a)]**	38.6±0.25[a)]**	36.3±0.13[a)]**
	40 μg/mouse, i.c.v.	36.2±0.09[b)]*	36.2±0.10[b)]**	35.7±0.13[b)]**
	80 μg/mouse, i.c.v.	35.4±0.12[b)]**	35.4±0.18[b)]**	35.6±0.12[b)]**
MPP+	6 mg/kg, i.p.	39.4±0.27[a)]**	39.2±0.29[a)]**	36.7±0.06[a)]*
	12 mg/kg, i.p.	40.0±0.07[a)]**	39.6±0.17[a)]**	36.6±0.08[a)]*
	5 μg/mouse, i.c.v.	35.0±0.15[b)]**	35.3±0.25[b)]*	36.7±0.10
	10 μg/mouse, i.c.v.	34.6±0.26[b)]**	34.7±0.27[b)]**	36.8±0.12
	20 μg/mouse, i.c.v.	34.1±0.28[b)]**	34.7±0.21[b)]**	36.5±0.14

Results are expressed as the mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.
a): significantly different from saline, b): from MPTP-treated group.
*, p<0.01, **, p<0.05.

2） MPTP および MPP+ 化学構造類似物質末梢投与によるマウス体温に及ぼす影響

MPTP の化学構造類似物質 PPY (25, 50 および 100 mg/kg, i.p.) 投与により投与直後より著明な体温下降作用が見られ、この作用は、投与後 60-120 分 (25 mg/kg;-2.3°C、50 mg/kg;-2.7°C、100 mg/kg;-5.3°C) でピークとなり投与後 480 分でほぼ control レベルまで回復した（図1A)。同様に、MPP+ の化学構造類似物質である PTP (20, 40 および 80 mg/kg, i.p.)の 投与では PPY と同様に、投与直後より体温下降作用が発現し、その作用は投与後 60-120 分 (20 mg/kg;-1.3°C、40 mg/kg;-1.8°C、80 mg/kg;-2.8°C) でピークとなり、投与後 480 分には control レベルまで回復した（図1B)。従って、PPY および PTP では MPTP 投与初期で認められた体温上昇作用が欠如していた。 しかし、MPTP の tetrahydropyridine 環に N-メチル基と二重結合を持たない PPD とメチル基だけを有する CPTP では、マウス体温に対し何らの影響も与えなかった。

3） MPTP および MPP+ 化学構造類似物質脳室内投与によるマウス体温と MAO 阻害剤併用時の効果

i.p. 投与の場合と同様に、PPY (100 および 150 μg/mouse) と PTP (100 および 150 μg/mouse) の i.c.v. 投与では、30 分 から 1 時間をピークとする著明な体温下降作用のみが認められた。すなわち、PPY は 100 μg/mouse 投与で投与 30 分後に体温を -0.5°C、150 μg/mouse 投与で投与 60 分後に -0.7°C 低下させた一方、PTP は 100 μg/mouse 投与で投与 30 後に -1.1°C、150 μg/mouse 投与では 30 分後に -1.5°C の体温下降が見られた また、これら両化合物と MAO-A の選択的阻害剤である clorgyline (0.5 mg/kg)、あるいは MAO-B の選択的阻害剤である l-deprenyl (2.5 mg/kg) を前処理した結果、PPY (100 μg/mouse, i.c.v) による中枢性の体温下降作用はいずれの MAO 阻害薬の場合も完全に抑制された。 しかし、PTP (100 μg/ mouse, i.c.v.) による下降作用は MAO-A の阻害剤 clorgyline では抑制されず、l-deprenyl によってのみ

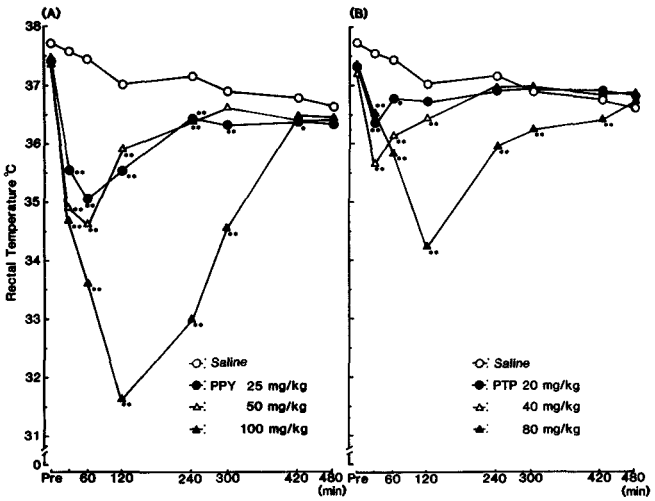


Fig.1. Effects of i.p. administration of PPY (A) and PTP (B) on mouse rectal temperature. Values are means of 10 animals per group. Body temperature was determined at various times indicated after i.p. administration of PPY or PTP. *,p<0.05; **,p<0.01; significantly different from saline control.

抑制された (表2)。 PTP は MAO-B により酸化され PPY へと変化するが、 PPY は MAO によっては酸化されず単に可逆的 MAO-B の阻害作用のみを示す (5)。この PTP の MAO-B による酸化は MPTP が MPP+ へと変化する場合と同様"suicide inhibition" で進行する (5)。PPY の中枢性体温下降作用は MAO-B の阻害剤のみならず MAO-A 阻害剤によっても抑制されるので PTP の体温下降作用が PPY への変換を介して生じる必要があれば PPY の場合と同様に両タイプ MAO の阻害剤によって抑制されなければならない。しかし、PTP の作用は MAO-A 阻害剤 clorgyline によっては抑制されず、これら MAO 阻害剤の中枢性体温下降作用の抑制は MAO 阻害作用以外のメカニズムに基ずく可能性が示唆される。MAO 阻害剤はラット脳シナプトソームにおいてモノアミンの取込みを抑制することが報告されている(8) 。従って、一つの可能性として MAO 阻害剤が PPY か PTP の神経終末への取込みを抑制しその効果を発揮したものと想定される。また、両化合物は tetrahydropyridine 環に N-メチル基を有しないことから、 MPTP および MPP+ の体温下降作用には必ずしも N-メチル基は必要無いことが示唆される。詳細な機序は未だ十分解明されてはいないが、中枢性の体温調節機構に 5-HT、NE、Ach などの神経伝達物質が関与することは良く知られている。本研究では、MPTP 末梢投与により視床下部の 5-HT 量が変化したが MPTP の MAO-B による MPP+ への代謝は主としてこの部位で行われることが報告 (9) されているので、この部位での MPTP の代謝と体温変化の作用が密接に関連している可能性が示唆される。

Table 2. Effect of pretreatment with i.p. clorgyline or l-deprenyl on decrease in mouse rectal temperature induced by i.c.v. PPY or PTP

	Dose (μg/mouse)	Pretreatment (mg/kg)	Rectal temperature (°C) 30 min	60 min
Ringer	——	——	37.0±0.13	36.9±0.14
PPY	100	——	36.5±0.10[a)]**	36.9±0.15
	150	——	36.5±0.20[a)]**	36.3±0.20[a)]**
	100	l-deprenyl 2.5	36.9±0.11[b)]**	37.1±0.18
	100	clorgyline 0.5	37.3±0.15[b)]**	37.2±0.07
PTP	100	——	35.9±0.08[a)]**	36.5±0.21[a)]*
	150	——	35.5±0.22[a)]**	36.3±0.09[a)]**
	100	l-deprenyl 2.5	36.8±0.11[b)]**	36.8±0.11[b)]**
	100	clorgyline 0.5	35.9±0.26[a)]**	36.4±0.13[a)]**

clorgyline or l-deprenyl was administered 1 h prior to i.c.v. injection of PPY or PTP. The estimations of rectal temperature were performed at the times indicated after the last injection and values are expressed as the mean ± S.E.M. for 10 animals in each group. a), Significantly different from Ringer control; b), from PPY or PTP at 100 ug/mouse alone treated group. *; $p<0.05$, **; $p<0.01$.

1) Langston, J.W. (1985) TIPS 6, 375-378
2) Heikkila, R.E., et. al. (1984) Science 224, 1451-1453
3) Tadano, T. et.al. (1987) Life Sci. 40, 1309-1318
4) Satoh, N. et.al. (1987) Japan. J. Pharmacol. 43, 75p
5) Arai, Y. et.al. (1986) Neurosci. Lett. 66, 43-48
6) Cavalla, D. et.al. (1985) Neuropharmacol. 24, 585-586
7) Snyder, S.H. et.al. (1986) Neurology 36, 250-258
8) James, C.K. et.al. (1980) 29, 2763-2767
9) Shen, R-S. et.al. (1986) In MPTP:a neurotoxin producing parkinsonian syndrome Academic Press Ceds Markey, S.R., Castagnoli,N., Trevor, A.N. and Kopiu, I.J. P.563-567

112. ヨヒンビンによるラット脳内各部位のノルアドレナリン放出亢進作用
—ストレス反応との比較およびモルフィン，ナロキソン，ジアゼパム前投与の影響—

小口雅申・井田能成・津田彰・白尾一正・
田中正敏（久留米大・医・薬理）

〔要　約〕

Yohimbine(YOH)がラット脳内各部位のnoradorenaline(NA)代謝に及ぼす影響につき検討した。実験1はYOH0.1,0.5および2.0mg/kgの各溶液をラットに投与し、NAの主要代謝産物3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate含量を測定することにより脳内NA代謝回転の変化を調べ、対照群および拘束ストレス負荷群と比較した。その結果YOHは0.1mg/kg以上で大脳皮質と海馬のNA放出を用量依存的に亢進させたが、視床下部と扁桃核では0.5mg/kg以上で初めてNA放出の亢進が見られ、用量依存性は無かった。拘束ストレスも全部位でNA代謝回転を亢進させたが、その程度は大脳皮質と海馬でYOH投与群より有意に小さく、視床下部と扁桃核ではほぼ等しいなど部位差が見られた。実験2ではmorphine(MOR),naloxone(NAL)およびdiazepam(DZP)の投与がYOの作用に及ぼす影響を調べた。その結果MORは大脳皮質と海馬でYOHによるNA放出を抑制したが、視床下部と扁桃核では増強した。また、NALは扁桃核でYOHの作用を抑制しDZPは影響しなかった。以上の結果からストレス負荷によるNA放出とYOHによる薬理学的NA放出とは、広範な部位で亢進が起こる点は似ているものの部位ごとに比較すると相異が見られ、YOHで起こる不安が生理的なものと異なっている可能性が示唆された

Key word： Immobilization stress, Yohimbine, Noradrenaline turnover

ストレス状況下で脳内NA放出の亢進が生ずることは良く知られている。演者らは金網を用いた拘束ストレスで、視床下部や扁桃核など広範な脳部位でnoradrenaline(NA)放出の亢進が生ずること(6)、またこのNA放出亢進が代表的抗不安薬であるdiazepam(DZP)により減弱されることからストレス状況下におけるNA放出の亢進は不安や恐怖などの情動変化に関係している可能性があることなどを報告した(7)。一方ストレスと同様に、脳内でNA放出亢進を起こすことが知られているα2 adrenoceptor antagonistであるyohimbine(YOH) はヒトに不安や恐怖に似た情動を発現させることが報告されており(2,4)、NAの放出促進と情動変化との関連性が示唆されている(2)。そこで今演者らはYOHと拘束ストレスによる脳内各部位のNA代謝の変化を比較すると共にストレスによる脳内NA放出亢進を抑制するmorphine(MOR)とdiazepam(DZP)、逆に増強するnaloxone(NAL)の、YOHによる脳内NA放出促進作用に及ぼす影響についても検討した。

【方法】Wistar系雄性ラット(体重200-230g)を用い、以下の実験を行った。

実験1：ラットを5群(saline投与群、YOH各0.1、0.5、2.0mg/kg投与群、金網による拘束ストレス負荷群)に分け、それぞれ注射60分後あるいはストレス開始60分後に断頭、採血した。実験2：ラットを9群(saline投与群、YOH0.5mg/kg投与群、YOH0.5mg/kg投与5分前にそれぞれMOR 6mg/kg、NAL 5mg/kg、DZP 5mg/kgを投与する群、YOH2.0mg/kg投与群、YOH2.0mg/kg投与5分前にそれぞれ同様にMOR、NAL、DZPを投与する群)に分け、各群とも最初の注射の65分後に断頭、採血を行った。実験1、2とも断頭後速やかに脳を摘出し、Gispenらの方法(3)により4部位(視床下部、扁桃核海馬、大脳皮質)に分割し、各部位のNAの主要代謝産物、3-methoxy-4-hydroxypheny

ethyleneglycol sulfate (MHPG-SO4)含量をKohnoらの方法(5)で定量した。統計的解析にはStudent's t-testを適用した。

【結果】実験1の結果を図1に示す。大脳皮質、海馬ではYOHの投与により0.1mg/kgから2mg/kgまで用量依存的なMHPG-SO4の増加が見られた。視床下部、扁桃核では、YOH 0.1mg/kgではMHPG-SO4含量に有意な変化が無く、0.5mg/kgおよび2.0mg/kgの用量でMHPG-SO4含量が有意に増加したがその増加には用量依存性は見られなかった。また1時間の拘束ストレスでは検討した4部位ともMHPG-SO4含量の有意な増加を起こしたが、その程度は視床下部と扁桃核ではYOH2.0mg/kgによって生じるMHPG-SO4含量の増加と同程度であったが、大脳皮質と海馬においてはストレスによる増加のほうが少なかった。実験2の結果を図2に示す。MORはYOH投与によるMHPG-SO4含量の増加を視床下部及び扁桃核で増強し、大脳皮質と海馬では逆に抑制した。NALはYOH0.5mg/kg投与によるMHPG-SO4含量の増加を有意に抑制した。検討した各部位においてDZP前投与の影響は認められなかった。

【考察】YOH投与により、検討した4部位でMHPG-SO4含量が有意に増加したことから、YOHは脳内NA放出を促進することが確認された。このYOHによるNA放出促進作用は大脳皮質、海馬において0.1mg/kgから既に出現し、その増加は用量依存的であるのに対し、視床下部、扁桃核では0.5mg/kgの用量で初めてNA放出亢進が生じ、その亢進の程度は2.0mg/kgでも変わらないことから、YOHのNA放出促進作用には部位選択性があることが示唆された。またYOH2mg/kgによるNA放出亢進の程度が大脳皮質や海馬ではストレスよりはるかに強いのに、視床下部と扁桃核では同程度に見られることは、これら2部位におけるストレスによるNA放出亢進の重要性を示唆するものであろう。実験2においてYOHによるNA放出の亢進が視床下部と扁桃核でMORによって増強され、扁桃核ではNAL投与により減弱された。一方大脳皮質と海馬においては、MORによりNA放出亢進の抑制がみられ、NAL投与による影響は見られなかった。脳内α2receptorとopioid receptorとの相互作用の存在についての報告(1)はあるが、今回の結果からその相互作用は部位によって異なる可能性が示唆された。またDZPはNA系に関してYOHと相互作用を示さなかったが、YOHによって引き起こされた不安や恐怖を緩和

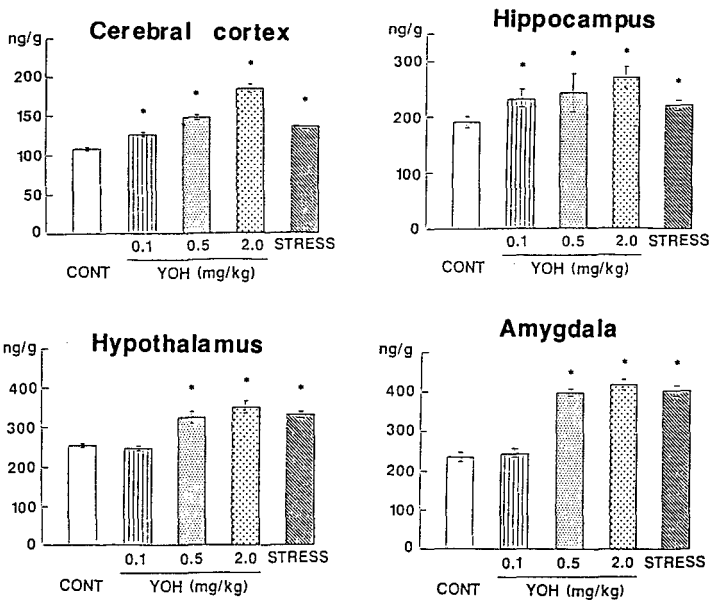


Fig. 1 Regional changes in contents of MHPG-SO4 and stress. $p < 0.05$ vs saline control

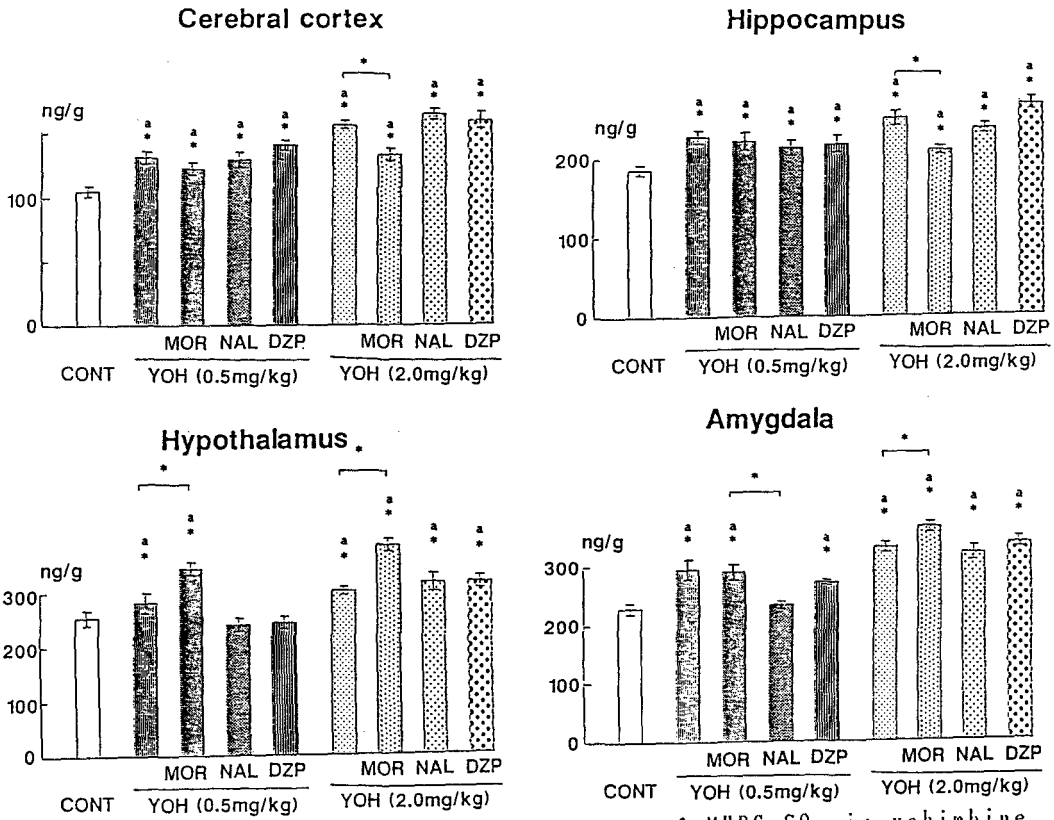


Fig. 2 Regional changes in contents of MHPG-SO_4 in yohimbine with drug modification. a : vs saline control , $p < 0.05$

するという報告(2)があり、今後更に検討を要すると思われる。以上の結果からNAの放出促進により不安などの情動変化を引き起こすと考えられているYOHの脳内NA代謝に及ぼす作用をストレス状況下で生じているNA代謝の変化と比較すると、広範な部位でNA代謝の亢進が生ずる点は類似しているが、部位ごとの変化には差異があることが示唆された。

【文献】

1. Anton,N.M.Schoffelmeer, et al. (1986) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 333, 377-380
2. Dennis,S.Charney, M.D., et al. (1983) Life Sci. 33, 19-29
3. Gispen,W.H., et al. (1972) Neuroendocrinology 9, 285-296
4. Holmberg,G., et al. (1961) Psychopharmacologia 2, 93-106
5. Kohno,Y., et al. (1979) Anal. Biochem. 97, 352-358
6. Masatoshi Tanaka, et al. (1983) Pharmacol. Biochem. & Behavior 19, 543-547
7. Yoshishige Ida, et al. (1985) Life Sci. 37, 2491-2498

113. ハロペリドールの亜急性，慢性投与後に認められるDA代謝回転の低下ならびにDA遊離量の減少について

原尻慎一郎・山田茂人*・小島秀樹・高木裕子*・堤　哲之・
三木浩司・西山活二・西　彰五郎*・稲永和豊
（久留米大・医・精神，脳研*）

〔要　約〕

ハロペリドール（以下、HPDと略す）の亜急性、慢性投与をおこないラット脳内ドーパミン（以下、DAと略す）終末である尾状核ー被殻（CP）及び側坐核（AC）において対照に比して有意なDA代謝産物（DOPAC,HVA）の低下が認められた。しかし、他のDA終末である嗅結節（TO）及び前頭前野内側（FCM）においてDA代謝回転の低下は認められなかつた。このCP及びACのDA代謝回転の低下はHPD投与後、既に3日目より出現していた。さらに、HPD慢性（i.p.及びp.o.）投与後のラット線条体スライスからの内因性DA基礎遊離量を測定し、対照に比して有意にDA遊離量が減少していることが確認された。この線条体スライスに30mM K^+を灌流負荷した場合、双方に特に有意な差は認められなかった。以上の結果より、HPD慢性投与後のDA終末であるCP及びACにおけるDA代謝回転の低下は、必ずしも後部受容体からのlong-loop feedbackの関与がなくても認められることが示唆された。

Key word : Haloperidol, Chronic administration, Dopamine turnover

【目的】

HPDを急性投与するとラット脳内ドーパミン系の代謝回転が亢進することが知られており、このDA代謝回転の亢進はHPDのDA受容体遮断作用であると考えられている(1)(2)。一方、HPDを慢性投与すると、このDA代謝回転の亢進が急性投与時のそれに比して減弱する、つまり耐性が形成されると言われている(3)。

これまでHPD慢性投与実験の多くは、HPDを慢性に投与した後にHPDを急性負荷しており、純粋にHPDの慢性投与のみによるDA代謝回転の変化を観察した報告は少ない。そこで今回、我々は、飲水中に溶かしたHPDを経口的に慢性投与し、微量定量法を用いてラットのCP,AC,TO,FCMのDA及びDA代謝産物（DOPAC,HVA）の濃度の測定ならびにスライス灌流実験装置を用いてラット線条体の内因性DA遊離の測定を併せておこないHPDの亜急性ならびに慢性投与後のDA神経終末における変化を観察したので報告する

【実験方法】

飼育開始時体重200g前後のWistar系雄性ラットを用いた。ラットは1ゲージ2匹とし、恒温（24±10℃）、恒湿（50±10%）の部屋で点灯7:00,消灯19:00の条件下で飼育し、飼料及び飲料水は自由に摂取させた。HPD（大日本製薬、ハロペリドール水溶液、2mg/ml）を飲料水に溶かし、体重と飲水量により1日、1mg/kg服用するように投与した。又、対照群にはHPD溶媒液を同様の方法で投与した。

1)微量定量法による生化学的検索

上記方法にてHPD(1mg/kg/day)を3日、7日、35日間、経口投与し投与終了後、12時間の断薬の後に断頭した。断頭後、速やかに脳を摘出し視交叉部で2分し、Uchimura(3)らの方法に準じて-12℃に保たれたクリオスタットにて200μmの連続切片を作り、-20℃のプレート上にて実体顕微鏡下にmicroknifeを用いてKörnig & Klippelのラット脳アトラス(4)に基ずきCP,AC,TO,FCMを切り出し、各部位のDA及びDA代謝産物、DOPAC(3,4,dihydroxyphenyl acetic acid),HVA(homovanillic acid)の濃度をYokoo(13)らの方法に準じて電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィにて測定した。測定値の統計分析はStudent's t testにて行い、値はcontrol値を100とした時の比としてmean±SEMで表した。尚、蛋白定量はLowry法(5)によった。

2)線条体スライス灌流実験による内因性DA遊離量の検索

上記方法に準じてHPD(1mg/kg/day)の70日間経口投与ならびにHPDの腹腔内投与(1mg/kg,14日間)をそれぞれおこない最終投与終了後,24時間の断薬後に断頭をおこない速やかに脳を摘出後、Yamadaら(1)の方法に準じて線条体のスライス標本を作製しchamberに封入し、0.1mM pargylineを含んだKrebs液で流速0.3ml/minで灌流した。

chamberから流出する灌流液を20分毎に集め、その中に含まれる内因性DAをアルミナ吸着法により抽出し電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィにて測定した。測定値の統計分析はStudent's t testにて行い、DA量はng/chamber/20minの値でmean±SEMで表した。

【結果】

1)HPD(1mg/kg/day)経口投与後、3日、7日、35日目のラット脳各部位におけるDA及びDA代謝産物の濃度の変化

HPD(1mg/kg/day)経口投与後すでに3日目にCP及びACにおいてDOPAC,HVA濃度［CP(72.3±2.9%,60.8±1.9%),AC(73.6±3.5%,59.8±3.6%)］(Fig.1)の有意な低下が、7日目においてもCP,ACにおいてDOPAC,HVA濃度［CP(57.9±1.8%,54.2±2.8%),AC(74.6±6.4%,68.9±5.7%)］(Fig.1)の有意な低下が、さらに35日目においてもCP,ACにてDOPAC,HVA濃度［CP(57.9±6.6%,53.8±3.9%),AC(69.3 ±3.9%,68.2±2.7%)］(Fig.1)の有意な低下が認められた。しかし、Fig.2で示す様にTO,FCMにおけるDOPAC,HVA濃度には有意な変化は認められなかった。尚、すべての測定部位でのDA濃度には対照群に比して有意な変化は認められなかった。

2)HPD(1mg/kg/day)経口70日投与、腹腔内投与14日間後のラット線条体灌流実験による内因性DA遊離量の変化

1; 70日間HPD経口投与群(1mg/kg/day)ならびに14日間HPD腹腔内投与群(1mg/kg)の内因性DA基礎遊離量は対照群に比して25.9±3.1%,33.1±6.5%と有意な減少が認められた。(Fig.3)

2; 14日間、HPD腹腔内投与群(1mg/kg)における30mM K ,20分間の灌流による反応はそれぞれ3.19±0.5,3.22±0.08(ng/chamber/20min)であり双方間に有意な差は認めなかった。

【考察】

HPDの経口投与(1mg/kg/day)ですでに3日目よりDA神経終末であるCP及びACにおいてDA代謝産物の有意な低下を認め、さらにこのDA代謝回転の低下が35日目においても持続して認められた。この結果は従来の報告(2)(5)-(9)を支持するものである。

又、Lindeforsら(9)はDA,D-2選択的遮断薬であるsulprideでも同様にDA代謝回転の低下がCP,ACで認められるが、HPD,sulpiride両方ともにFCMではDA代謝回転の低下は認められないと報告しており、今回の我々の結果もこの報告を支持するものである。

さらに線条体スライス灌流実験において経口70日間ならびに腹腔内14日間投与いずれも内因性DA遊離量の減少が認められたが、もしこの実験系でみられる内因性DA遊離量が、DA神経終末部からのDA遊離を反映しているとすれば、HPD慢性投与においてDA終末部のシナプス間隙へのDA放出の減少を示唆していると考えられる。これはLaneとBlaha(10)らのin vivo voltammetryを用いてHPD慢性投与後のCP,ACのDA基礎遊離量が減少するとの報告を支持するものである。

一方、DA神経細胞体が在るA9,A10では、電気生理学的検索(11)(12)によると、HPD慢性投与にてDA神経細胞体の自然発火頻度の低下が指摘され、この現象をDA神経細胞体の"depolarization inactivation"で説明している。

今回、スライスを使つた本実験はDA神経終末のみを使つており、このことはDA代謝回転の低下ならびにDA遊離の減少には必ずしもlong-loop feedbackの関与は必要でないことを示している。

以上、今回の我々の結果ならびに従来の報告によりHPD慢性投与後に認められる中枢DA系のDA代謝回転の低下およびDA遊離の減少はBunney,Whiteらが指摘している”DA神経細胞膜の興奮性の低下”あるいはSallerらが指摘している”DA神経のautorecepterの過感受性”が想定される。

Fig.1

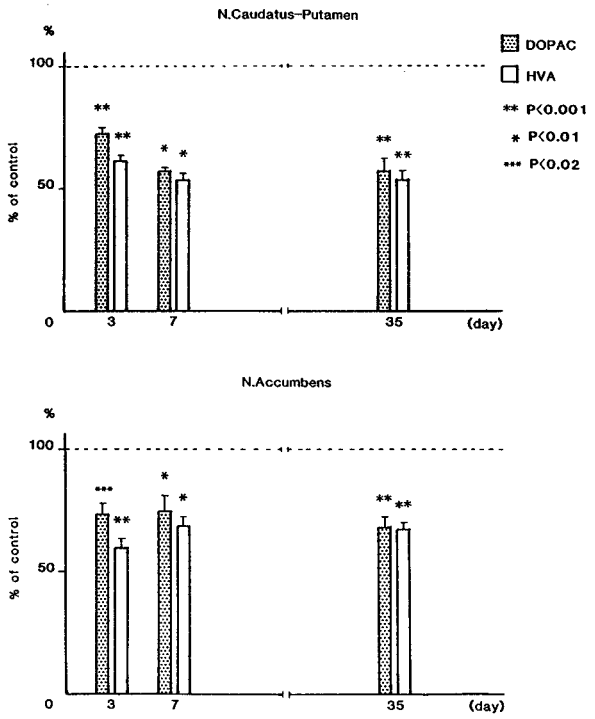


Fig.2

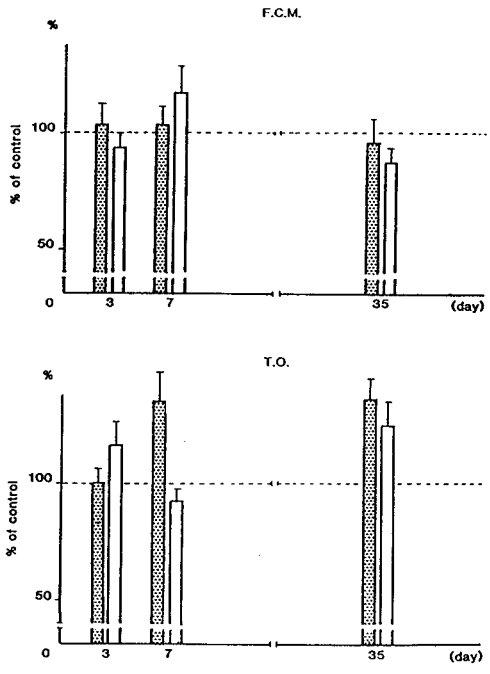
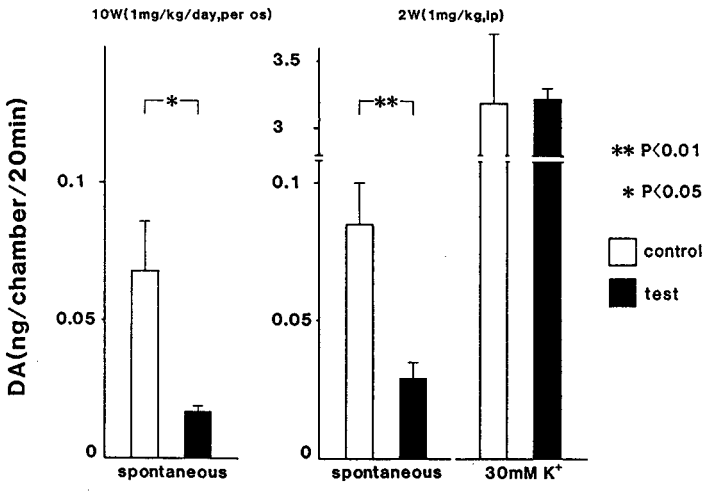


Fig.3



【Fig.1, Fig.2】
HPD慢性経口投与によるラット脳内(CP, AC, FCM, TO)DA系のDA代謝産物(DOPAC, HVA)の時間的変化。縦軸は対照を100とした時の比で示しており、値はmean±SEMで示し、横軸は日数を示している。各、対照群のDOPAC, HVA濃度は以下に示す。

	DOPAC	HVA
CP:	16.62±0.49,	10.27±0.55
AC:	9.06±0.46,	5.06±0.25
FCM:	0.55±0.04,	0.83±0.07
TO:	8.34±0.82,	3.24±0.27

(ng/mg protein)

【Fig.3】
ラットCPスライスにおけるHPD, 10週間(p.o.), 2週間(i.p.)投与後の内因性DA基礎遊離量ならびに、その後の30m K^+負荷によるDA遊離量の変化を示す。縦軸はDA遊離量(ng/chamber/20min)を示し、値はmean±SEMで示す。横軸は自発遊離量及び30m K^+負荷を加えた事を示す。

【文献】

(1)Carlsson, A. and Lindquist, M. (1963). Acta Pharmacol Toxical 20, 140-144 (2)Scatton, B et al (1975) Naunyu-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol 289, 419-434 (3)Uchimura, H. et al (1982) Advances in Dopanine Research 95-106 (4)König, J. F. R. and Klippel, R. A. (1963) The Rat Brain (5)Lowry et al (1951) J. Bio. Chem 193, 265-275 (6)Lerner, P. et al (1977) Science 197, 181-182 (7)Ladinsky, H. et al (1980) Long-term Effects of Neuroleptics, 259-265 (8)Saller, C. F. and Salama, A. I. (1985) Neuropharmacology 24, 123-129 (9)Lindefors, H. et al (1986) Eur. J. Pharmacol. 129, 401-404 (10)Lane, R. F. and Blaha (1987) Brain Res. Bllu. 18, 135-138 (11)Bunny, B. S. and Grace, A. A. (1978) Life Sci, 23, 1715-172 (12)White, F. J. and Wang, R. Y. (1983) Nature 221, 1054-1057 (13)Yokoo, H. et al (1985) Kurume Med. J. 32, 75-80 (14)山田茂人、他 (1986) 神経化学 26, 475-477

114. Ceruletide 末梢投与によるラット線条体ドパミン放出抑制に対するvagotomyの影響

濱村貴史・風早靖子・秋元　潔・原田俊樹・
藤原　豊・大月三郎・佐藤光源*
（岡山大・医・神経精神，東北大・医・精神*）

〔要　約〕
脳内透析法を用い、ceruletide末梢投与のラット線条体ドパミン（DA）放出に与える影響を調べた。さらに、その作用機序を探るためvagotomyによる影響を検討し以下の結果を得た。
1）ceruletide(200μg／kg)腹腔内投与後30分よりDA放出は減少し5時間後も持続していた。最大効果は120-150分で認められ、-29％の減少であった。
2）この効果はvagotomyにより減弱し、DA放出減少が認められたのは60-90分においてのみであった。
3）30分－3時間のDA総放出量は、ceruletide投与で-23％の有意な減少（$p<0.001$）を示したが、vagotomy後の投与では-11％の減少にとどまりceruletideの効果を約50％減弱させた。
4）ceruletide投与後、約40分間認められた腹を床につける行動は、vagotomyによって変化しなかった。　以上の結果より、ceruletide末梢投与によるDA放出抑制効果の一部は迷走神経を介するものと考えられ、又、投与後初期に認められる腹位をとる行動にはDA系が関与していない可能性が示唆された。

Key word：　ceruletide　dopamine release　vagotomy

消化管ペプチドホルモンの一つであるコレシストキニン（CCK）は中枢にも存在し(1)、中脳辺縁系や中脳皮質系ではドパミン(DA)と共存することが明らかになっている(4)。このため主としてそのオクタペプチドであるCCK－8の脳内DA系への影響が研究されてきた(2,3)。一方、ceruletideはCCK－8類似ペプチドで、中枢作用としてはマウスのメタンフェタミンによる運動亢進を抑制し(8)、ラット線条体のDOPAC、HVAを用量依存的に抑制することが知られており(7)、いくつかの神経精神疾患に治療的応用が試みられている(6,9)。特に最近では抗精神病薬慢性投与によって生じる錐体外路障害の一つである遅発性ジスキネジア(TD)への有効性が報告され(10)、その治療的応用に期待が持たれている。　ceruletideの中枢作用の一部は迷走神経切断により減弱することが知られており、迷走神経を介する作用も無視できない(5,12)。このように複雑な神経系を介して中枢作用の一部が発現するならば、実験に際してはより生理的な条件下で行うことが必要であろう。一方、脳内DAの測定は、従来は脳組織をホモジネートした抽出液で行われてきた。しかしこの方法では細胞内外のDAを同時に測定するため、生理的に最も意義のある放出されたDAの変化を知ることはできなかった。またこの方法では動物を屠殺する必要があるため、行動を観察しながら脳内DAの変化を知ることも不可能であった。

今回われわれは、上述の従来の測定法の問題点を解決し、より生理的な条件下で実験を行うためUngerstedtらによって開発された脳内透析法(11)を一部改変して用いた。

（実験材料および方法）

対象には12時間毎の明暗周期下に飼育したSD系雄性ラット（体重290-330g）を用いた。

ラットをdiethyl etherで麻酔し、Pellegrino & Cushman のアトラスに基つきbregmaより前2.4mm、外側3.0mmの位置で、あらかじめ用意した透析プローベの先端が脳表より深さ6.5mmになるように線条体に挿入しデンタルセメントで固定した。

実験は手術より18時間後より開始した。ケージ内を自由に動ける状態で、マイクロインフュージョンポンプを用い、Ringer液（Na 147、K 4、Ca 4.5、Cl 155.5、pH 6.5）を1μl/minで透析チューブを潅流し、30分毎にサンプルチューブに回収した。測定は電気化学検出器つき高速液体クロマトグラフィーを用いた。移動相として、5mg/l Na_2EDTA、180mg/l Na-octanesulfonateおよび15%（v/v）methanolを含む0.1M Na-Dihydrogenphosphate（pH4.9）を用い、カラムは逆相（cosmosil 5 C18、4.6mmφ×250mm）を使用した。この条件のもとでサンプル（30μ/l）の直接注入により、DAを測定した。

透析プローベは2本の23ゲージステンレス管の先端に、6mmの透析チューブ（クラレ製、血漿交換用、内径200μm、厚50μm）を二つ折にして、エポキシ樹脂で接着したものを用いた。なお、補強のため透析チューブの内腔には直径50μmのタングステン線を挿入した。

ceruletide群は、ceruletide 200μg/kgを腹腔内投与し、対象群にはsalineを投与した。 vagotomy群はラットをpentobarbital(50mg/kgi.p.)で麻酔し、横隔膜直下で迷走神経を切断し7日後にceruletide 200μg/kgを腹腔内投与した。DAの値は薬剤投与前の3サンプルを平均したものを基礎値（100%）とし、変化率で表示した。

（結果および考察）

1）ceruletide(200μg/kg)腹腔内投与後30分よりDA放出は有意に減少し5時間後も持続していた。最大効果は120-150分で認められ、-29%の減少であった。（Fig. 1）

2）cerletideの効果はvagotomyにより減弱し、DA放出減少が有意に認められたのは60-90分においてのみであった。（Fig. 1）

3）30分－3時間のDA総放出量は、Fig. 2に示すように、ceruletide投与により-23%の有意な減少（$p < 0.001$）を示したが、vagotomy後の投与では-11%の減少にとどまりceruletideの効果を約50%減弱させた。vagotomy群と他の2群の間には有意差はなかった。

4）ceruletide投与後、約40分間認められた腹を床につける行動は、vagotomyによっても変化しなかった。

ceruletideの臨床効果は長期間持続することが知られているが、一方血液中のceruletideは投与後30分以内に消失するため効果発現機序が問題となってきた。今回Fig. 1に示すように5時間後でもDA放出抑制が認められたことは長期効果を支持するものかもしれない。又、この効果はvagotomyにより減弱したことからDA抑制効果の一部は迷走神経を介するものと考えられ、残存した効果は横隔膜より中枢側の迷走神経を介するものもしれない。ceruletide投与後初期に認められる腹位をとる行動は時間経過の違いとvagotomyに影響を受けない点からDA系は関与していない可能性が示唆された。

Fig.1 time course of DA release

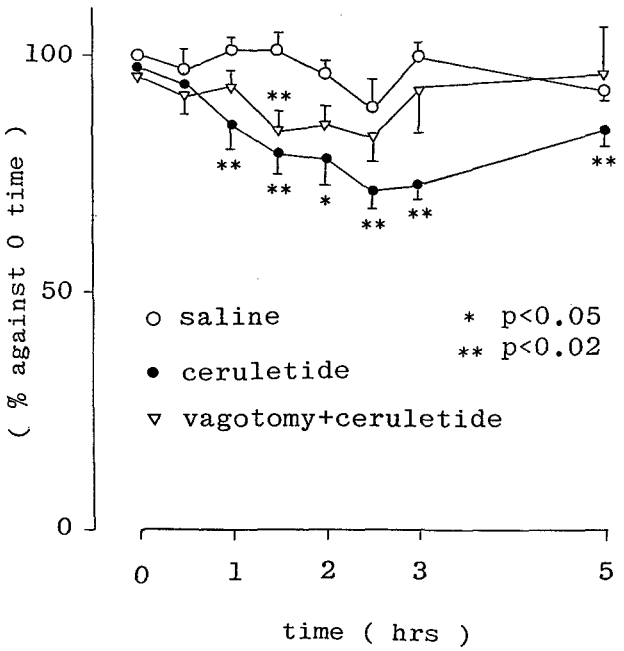
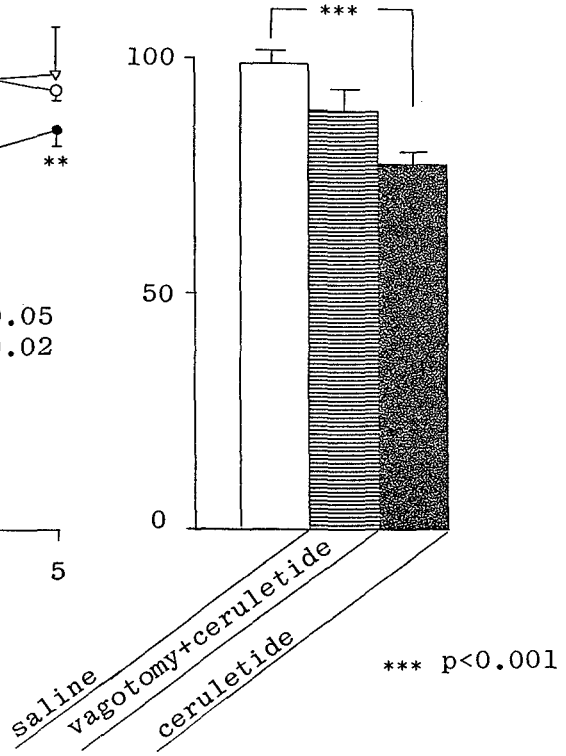


Fig.2 total DA release (0.5-3hrs)



Reference

1) Dockray, G.J. (1976) Nature, 264: 568-570.
2) Fekete, M., Kadar, T., Penke, B., et al. (1981) J.Neural.Transm., 50:81-88
3) Fuxe, K., Andersson, K., Locatelli, V., (1980) Eur.J.Pharmacol., 67:325-331
4) Hokfelt, T., Skirboll, L., Rehfeld, J.F., (1980) Neuroscience, 5:2093-2124
5) Kawasaki, K., Kodama, M., Matsushita, A., (1983) Life Science, 33:1045-1050
6) Lotstra, F., Verbanck, P., Mendlewicz, J., (1984) Biol.Psychiatry, 19:877-882
7) Matsumoto, T., Nakahara, T., Uchimura, H., (1984) Brain Res., 324:195-199
8) Moroji, T., Hagino, Y., Hagino, K., (1982) Neurosci.Lett.Suppl., 9:s100
9) Moroji, T., Watanabe, N., Aoki, N., (1982) Arch.Gen.Psychiatry, 39:485-486
10) Nishikawa, T., Tanaka, M., Koga, I., (1985) Psychopharmacology, 86:43-44
11) Sharp, T., Zetterstrom, T., Ungerstedt.U., (1986) J.Neurochem., 47:113-122
12) Smith, G.P., Jerome, C., Cushin, B.J., (1981) Science, 213:1036-1037

115. 脳線条体切片からのDopamine 遊離のreal-time monitoring とその薬理学的応用

片岡泰文・小泉修一・牛尾真寿子・
山本勝信*・熊倉鴻之助**・植木昭和
（九州大・薬・薬理，ＢＡＳ*，上智大・生命研**）

〔要　約〕

脳組織からの神経伝達物質遊離のreal-time monitoringを確立する目的で、基礎的検討を行った。線条体切片を封入したchamberをKrebs Ringer溶液で灌流し、灌流液を直接電気化学検出器に導いた。組織の刺激には高濃度のKCl溶液を用いた。+450 mVの印加電圧で、遊離されたoxidizable substrateの電解電流を測定し、電流－時間曲線を記録した。この電流値は刺激に用いたKCl濃度に依存した。各刺激に相当する灌流液のfractionを分析した結果、電流値と遊離されたドパミン(DA)量との間に高い相関性が認められた。従って、刺激によって得られた電流－時間曲線は、線条体からのDA遊離の時間的過程を表し、real-time monitoringが可能であることがわかった。次にその薬理学的応用として、灌流液からd-glucoseを除去した場合のDA遊離の変化とそれに及ぼす抗痴呆薬idebenoneの作用を調べた。d-glucose除去により、線条体の刺激応答が阻害された。Idebenone 10^{-6}Mはd-glucoseを含むKrebs Ringer下では作用を現さないのに対して、d-glucoseを除去したKrebs Ringer下では、線条体からのDA遊離を著明に促進するという興味深い知見が、得られた。

Key word： real-time monitoring, dopamine release, nootropic drug

Kumakuraらは、電気化学検出器(ECD)と直接連結したcell bed closed perfusion systemを用いて、培養副腎髄質クロマフィン細胞からのカテコールアミン(CA)遊離のreal-time monitoringが可能であることを報告している[1]。このreal-time monitoringは、これまでの実験法では困難であった神経伝達物質遊離の時間的過程を解析することを可能にし、培養クロマフィン細胞からのCA遊離の微妙な調節機構を解明するために、有用であることがわかっている。そこで我々は、脳組織からの神経伝達物質遊離のreal-time monitoringを確立する目的で、基礎的検討を行った。さらにこの方法の簡便性に着目し、一つの薬理学的応用としてd-glucose除去による脳組織の刺激応答障害に及ぼす抗痴呆薬の影響を調べた。なお実験材料として今回は、高濃度のドパミン(DA)を含有し、遊離実験が容易である脳線条体を用いた。

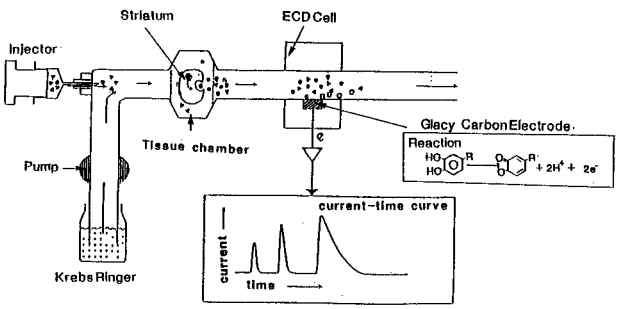


Fig.1. Diagram of real-time monitoring system consisted of perfusion component for the striatal slice enclosed in the chamber and electochemical detector (ECD) component.

〈実験方法〉

1)基礎的実験：実験方法の概略をFig.1 に示す。断頭後、ラット脳を摘出し、線条体を分画した後、原寸約200～500μm^3の切片を作製

した。これを2枚のfilter間に封入し、内容積250 μlのchamberにて保存し、krebs Ringer溶液(pH 7.4)で灌流した。灌流液は37°Cに維持し、95% O_2/5% CO_2 混合ガスでbubblingし流速は1 ml/minとした。刺激には500μlのloop injectorを用いて、10, 20, 30および50mMのKCl溶液を灌流液中へパルス的に注入し、これを20分間隔で反復した。この灌流システムを、直接ECDシステムに連結し、電極に+450mVの固定電位を印加し、脳切片から遊離されるoxidizable substrateの電解電流を測定し、遊離の動態を電流ー時間曲線として記録した。ECDシステム通過後の灌流液を分取し、各刺激応答に相当するfraction中に含まれるCAを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)とECDにより分離定量した。

2)薬理学的実験：2つのchamber内にそれぞれ封入した線条体切片を30分間灌流した後50mM KCl溶液(high K^+)の500μl注入による刺激を20分毎に行った。3回目の刺激直後から、一方はd-glucoseを含む通常のKrebs Ringer溶液((+) d-G Ringer)でそのまま灌流し、他方はd-glucoseを除去したKrebs Ringer溶液((-) d-G Ringer)にきりかえ、30分後よりそれぞれ20分毎にhigh K^+で刺激し、その応答を調べた。さらにこのd-glucose除去による刺激応答障害に対する薬物の作用を検討した。薬物として抗痴呆薬であるidebenone（武田薬品)を用いた。

〈実験結果および考察〉

1)基礎的実験：10, 20, 30および50mMとKclの濃度を上げて刺激すると、その濃度に依存して、得られた電流ー時間曲線は大きくなった。その時のfraction中のCAをHPLCで測定した結果、電流値と遊離されたDA量との間には、極めて高い相関関係があることがわかった。実際に得られた電流ー時間曲線とそのfractionのHPLC分析結果はFig.2に示す通りである。この結果から、刺激後ECDにより測定されたoxidizable substrateの電解電流は、主として遊離されたDAに基因するものであり、記録された電流ー時間曲線は、線条体からのDA遊離の時間的過程を表すものと考えられる。

2)薬理学的実験：d-glucose除去の刺激応答に及ぼす影響は、Fig.4に示す通りである。刺激応答は、3回目のhigh K^+刺激時に得られた電流値に対する各刺激時の電流値の比率(relative response)で表した。これは基礎的実験の結果から、high K^+による線条体からのDA遊離の変化とみなすことができる。(+) d-G Ringer下で

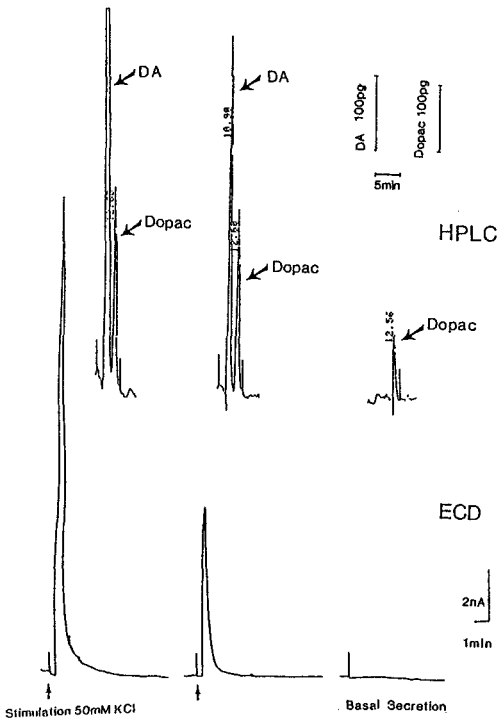


Fig.2. ECD-monitored responses (current-time curve) of the striatal slice to KCl and high performance liquid chromatography chromatogram of catecholames in corresponding peak.

の応答は、刺激を反復するにつれて次第に減少していったが、これは培養クロマフィン細胞を用いたKumakuraらの実験[1]でも同様であり、脳組織のhigh K^+に対するdesensitizationによるものと推測される。実際、刺激により次第に減少していった応答ピークも、刺激間隔の時間を延ばせば、最初の応答ピークと同程度にまで回復した。この(+) d-G Ringer下での応答と比較して、(-) d-G Ringer下では、d-glucose除去後100分より、あきらかに刺激応答は低下していった。刺激応答が極度に低下した後、再び(+) d-G Ringerで灌流しても、その反応は回復しなかった。従って、(-) d-G Ringer下では線条体切片からのDA遊離が、障害されたものと考えられる。そこでこの実験系において、抗痴呆薬であるidebenone 10^{-6}Mを含む(+)d-G Ringerあるいは(-) d-G Ringerで灌流し、その影響を検討した。その結果をFig.4に示す。(+) d-G Ringer下ではidebenone 10^{-6}Mはhigh K^+による刺激応答にほとんど影響を及ぼさなかった(Fig.4.A.)。一方、(-) d-G Ringer下ではidebenone 10^{-6}Mはd-glucose除去後20～60分後の刺激応答を著明に増強した(Fig.4.B.)。しかし2時間後より明らかに認められる機能障害に対しては、ほとんど影響を及ぼさなかった。Idebenone 10^{-6}Mの線条体切片の刺激応答促進作用が、(-) d-G Ringer下においてのみ認められることは興味深い。

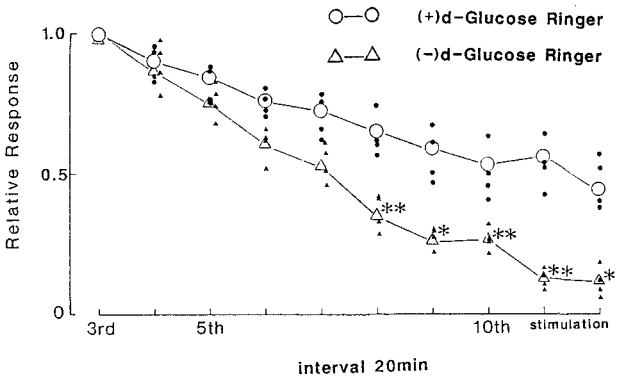
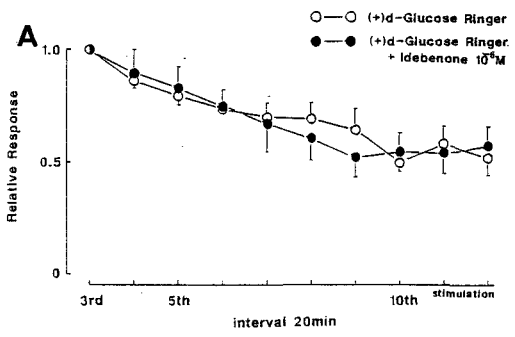


Fig.3. The striatal response to high K^+ stimulation in normal ((+) d-glucose Ringer and d-glucose free Krebs Ringer solution ((-) d-glucose Ringer).



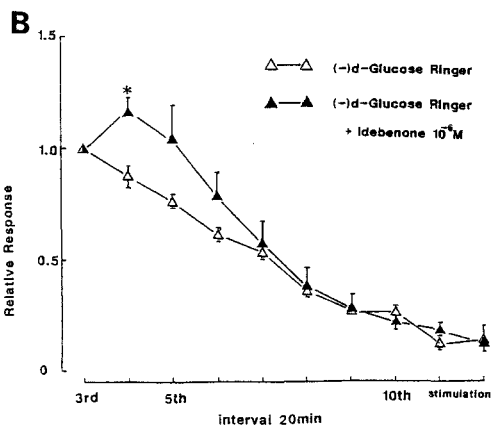


Fig.4. Effect of idebenone on the striatal response to high K^+ stimulation in (+) d-glucose Ringer (A) and (-) d-glucose Ringer(B).

〈文献〉

1) Kumakura, K., Ohara, M., Sato, G.P. (1986) J. Neurochem. 46, 1851-1858

116. ラット線条体における〔^{3}H〕—desmethoxyverapamil特異結合のイオンによる変化とメトアンフェタミン断薬後における変化

盛政忠臣・岡田英俊・金行孝雄・庄盛敏康
（岡山大・医・脳代謝研・病態生化）

〔

ラット線条体におけるカルシウムチャネルの活性調節機構，特に陽イオンの関与を，(-)-[3H]-desmethoxyverapamil([3H]-D888) の結合活性との関係において検討した．さらに，メトアンフェタミン［MAP］断薬後４週間目の steady state について測定し，比較検討を行った．

１】1mM Ca^{++}条件下においては，対照群では [ki] が 2.7×10^{-10}M(20% of total binding)，2.2×10^{-8}M(49%)，7.1×10^{-6}M(15%) の３成分に分離された．それに対して，実験群では 4.9×10^{-9}M(41%)，7.6×10^{-7}M(23%) の２成分に分離された．即ち，実験群においては，２つの高親和性部分がそれぞれ親和性の低下($x10^{1}$)を示し，さらに，２つの高親和性部分の結合活性(% of total binding)に変化(22→41%，52→23%)を認めた．

２】[9mM Mg^{++}+100mM Na^{+}]条件下においては，対照群において 2.3×10^{-10}(17%)，7.9×10^{-9}(49%)，7.1×10^{-7}(11%) の３成分に，実験群において 5.5×10^{-9}(48%)，6.4×10^{-7}(22%) の２成分に分離され，1mM Ca^{++}と同様の結果が得られた．３】9mM Ca^{++}，1-9mM Mg^{++}条件下における，親和性ならびに結合活性は，両群共にほぼ一致して $3\text{-}8\times10^{-9}$(37-61%) および $7\times10^{-8}\text{-}1\times10^{-6}$(15-32%)であった．

以上の結果から，[3H]-D888 の特異結合は，Na^{+},Ca^{++},Mg^{++} による機能制御を受け，1mM Ca^{++},[9mM Mg^{++}+100mM Na^{+}]において open conformationを，9mM Ca^{++}，1-9mM Mg^{++} において closed conformationを示す可能性，さらに，［MAP］断薬後においては後者に類似した状態に変化している可能性が，示唆された．

Key word： rat striatum， Ca^{++} ion channel， methamphetamine

中枢神経系において神経伝達に関与するカルシウムチャネルは，電位依存性に伝達物質の放出に関与するものと，受容体の作動に関与するものに大別されている．しかしながら，これらの分子構造ならびに制御機構に関しては不明な部分が多く残されている．[3H]D888 は，Ca^{++} entry blocker の中でも中枢神経系に対する親和性が最も高く，その結合部位は電位依存性カルシウムチャネルとされている．筆者らは，ラット線条体に対する[3H]D888特異結合のイオンによる影響に検討を加えた．また，モノアミン系伝達物質の放出亢進が示唆されている［MAP］断薬後のラット[1]について同様の検討を加えた．

【実験方法】

Wistar系雄性ラットを用いた．［MAP］は，飲水ビンより経口的に４週間投与(平均10mg/kg/day)した．さらに断薬４週後の steady state ，16週齢の明期４時間目に，対照群と共に断頭処理した．線条体は，黒質からの単独支配を受けている部分をパンチアウトによって得た．この粗膜標品(20μg membrane protein/400μl assay tube)に対して，1nM [3H]D888の特異結合活性の測定を以下の条件で行った．結合阻害剤には，$1\times10^{-11}-1\times10^{-5}$M の (-)desmethoxyverapamilを用いた．イオン条件は； 2mM,10mM Ca^{++}，2mM,10mM Mg^{++}，100mM Na^{+}，10mM Mg^{++}+100mM Na^{+} および無添加の７条件で，その全てに 1mM EDTA acidを加えた(pH 7.5，Tris HCl)．25° C，60分間インキュベートした後， B/F分離は，Whatman GF/C filter に対して同一イオン条件の buffer で吸引濾過して行い，液体シンによってβ線を測定した．実験データは，コンピュータを用いた非線形最小二乗法により解析された．Two-site modelまたは three-site model による解析は， そのcurve fitting が，統計学的に有意($p<0.0001$; F-test) な場合に行い，[ki](M) ならびに [% of total binding]を得た．

【実験結果と考察】

1）[3H]D888特異結合とそれに及ぼすイオンの影響(Table 1)

ラット線条体粗膜標品に対する[3H]D888の特異結合部位は，1mM Ca++の条件下において，[ki]が 2.7x10^{-10}(20% of total binding)，2.2x10^{-8}(50%)，7.1x10^{-6}(15%)M の３成分に分離された．これを， two-site model による２成分に分離すると，３成分に分離した場合の高親和性の２つの成分に一致した結合特異性が示された．即ち，three-site modelによって，さらに低親和性の部位が追加同定された．それに対して， 9 mM Ca^{++} においては２成分（[ki]=7.6x10^{-9}(37%)，1.1x10^{-6}(25%))に分離され，前者とは異なった結合特異性([ki]，% of total binding の何れも）が示された．1mM および9mM Mg^{++}の条件下においては，２成分に分離され，いずれも 9mM Ca^{++} の場合と一致した結合特異性が示された．［9mM Mg^{++}+100mM Na^{+}］条件の場合，２成分または３成分に分離され，そのいずれの場合も，1mM Ca^{++}の場合の結合特異性に一致した結果が示された．100mM Na^{+} の場合２成分に分離されたが，以上の結果とは異なり，［ki]は 1mM Ca^{++}に一致した値，[% of total binding]は 9mM Ca^{++} に一致した結合特異性を示した．これらのイオンを添加しない（１mM EDTA acid のみ） 場合，２成分に分離されたが，高親和性部位の[ki]は他の何れの条件よりも低値を示した．

特異結合量(pmol/mg membrane protein)は，金属イオン非添加の場合に対して，1mM Mg^{++}においてのみ有意な高値を示し，他はいずれも有意な低値を示した．二価イオンの何れの場合においても，高濃度の場合に有意な低値が示された．

以上の結果から，ラット線条体においては，[3H]-D888 の特異結合部位が３部位存在することが示された．Ｒｕｔｈら[2]は，ウシ心筋における[3H]D888の特異結合を２部位測定している．本研究で示された３部位の内高親和性の２部位がそれらの親和性に類似していると考えられた．

		Ki (M) K1	K2	K3	specific binding (pmol/mg protein)
1mM Ca^{++}	C	2.7±2.1x10^{-10}(20±6)	2.2±1.5x10^{-8}(49±7)	7.1±38x10^{-6}(15±24)	0.263±0.011
		[3.1±1.9x10^{-10}(22±5)	3.1±0.9x10^{-8}(52±5)]		
	M-4	4.9±1.3x10^{-9} (41±3)	7.6±6.7x10^{-7}(23±4)		0.242±0.004
9mM Ca^{++}	C	7.6±3.5x10^{-9} (37±6)	1.1±2.0x10^{-6}(25±8)		0.134±0.004
	M-4	7.8±2.4x10^{-9} (48±5)	2.8±5.0x10^{-6}(20±9)		0.149±0.004
1mM Mg^{++}	C	2.9±0.5x10^{-9} (61±4)	3.0±2.7x10^{-7}(20±3)		0.386±0.006
	M-4	2.3±0.4x10^{-9} (48±3)	2.0±1.1x10^{-7}(28±3)		0.405±0.011
9mM Mg^{++}	C	3.9±0.7x10^{-9} (56±4)	5.4±7.4x10^{-7}(15±4)		0.214±0.004
	M-4	1.0±0.3x10^{-9} (40±5)	7.0±3.4x10^{-8}(32±5)		0.264±0.005
9mM Mg^{++} +	C	2.3±2.2x10^{-10}(16±7)	7.9±3.5x10^{-9}(49±6)	7.1±10x10^{-7}(11±4)	0.209±0.004
		[6.5±2.8x10^{-10}(29±6)	2.1±0.7x10^{-8}(44±6)]		
100m MNa^{+}	M-4	5.5±1.3x10^{-9} (48±4)	6.4±6.8x10^{-7}(22±5)		0.211±0.004
100mM Na^{+}	C	1.1±0.8x10^{-9} (23±8)	3.2±1.3x10^{-8}(46±8)		0.189±0.003
	M-4	1.5±1.8x10^{-9} (12±7)	6.1±2.0x10^{-8}(53±7)		0.190±0.008
EDTA acid	C	1.3±0.6x10^{-8} (48±10)	8.2±10 x10^{-7}(29±10)		0.299±0.004
only	M-4	2.5±1.0x10^{-8} (53±9)	1.7±3 x10^{-6}(20±9)		0.294±0.005

Table 1. Computer-assisted nonlinear regression analysis of non-weighted least square method([ki]/M and % of the total binding in the parenthesis) of cation interactions with [3H]D888 binding sites in the rat striatal membranes , either of the controles or M-4 group(see in the text). And the specific binding(pmol/mg membrane protein) of [3H]D888. One mM EDTA acid(pH 7.5) were added in the all assay conditions. Values are indicated as mean±SEM.

一方，低Ca^{++}(1mM) 濃度においては，高濃度の場合に対して，[ki]値が約一桁高親和性に傾き（$7.6x10^{-9}$ →$2.7x10^{-10}$，$1.1x10^{-6}$→$2.2x10^{-8}$），それらの占有率（% of total binding）が逆転（37%→20%，25%→45%）という親和性の変化を示したこと，さらに，特異結合量（pmol/mg protein）が約２倍の高値（0.134-0.263）を示したこと等を総合すると，Ca^{++} entry site （少なくともD888結合部位）は，1mM Ca^{++}においてopen conformation に，9mM Ca^{++}においてclosed conformation に制御されている可能性が示唆された．Mg^{++}ならびにNa^{+} の場合においては，このような変化は認められなかった．[9mM Mg^{++}+100M Na^{+}] において，1mM Ca^{++}に類似した結合特性を示したが，その意義については不明である．

末梢臓器（心筋，骨格筋等）におけるカルシウムチャネルは，D888とそれ以外に分類される Ca^{++} entry blocker がそれぞれ異なった部位に結合して，相互作用を及ぼしているという考え方[3]がある．中枢神経系におけるカルシウムチャネルは，これらの臓器に較べてはるかに多種，多様である可能性[4,5]が考えられるので，慎重な解析が必要であると考えられる．

２）メトアンフェタミン断薬後における[3H]D888結合特異性の変化(Table 1)

メトアンフェタミン断薬後４週間目の steady state(M-4)における，ラット線条体に対する[3H]D888の特異結合部位は，何れのイオン条件においても２成分に分離された．それらの内，2mM Ca^{++}および [9mM Mg^{++} +100mM Na^{+}] の条件下においてのみ，実験群に有意な変化の生じていることが示された．即ち，[ki]は両成分とも対象群に対して一致して一桁低親和性（K1: 4.9,5.5x10^{-9}M; K2: 7.6,6.4x10^{-7}M）に変化を示した．また，それらの占有率(% of total binding)は，対象群の場合に対して逆転した値を（K1:20%→41%,16%→48%; K2:49%→23%,49%→22%）示した．

特異結合量（pmol/mg membrane protein）は，9mM Mg^{++}条件において有意な高値を示した．その他のイオン条件においては有意な変化は示されなかった．

以上の結果から，実験群においては，カルシウムチャネルの数（specific binding）には変化が無いが，結合特性（２つの[ki]ならびにそれらの [% of total binding]）に変化が認められた．この変化は，上述のclosed conformation に類似している．これらの変化がモノアミン伝達の放出亢進の機構1)にどのように関与しているか問題，さらにまた，これらの変化が長期持続的であるための原因機構は何であるかという問題を解明するために，さらに詳細な検討が必要である．

【文献】

1)盛政忠臣他 (1986) 精神薬療基金研究年報 18,212-218
2)P.Ruth,V.Flockerzi et al(1985) Eur.J.Biochem.,150,313-322
3)H.Glossmann,D.R.Ferry et al(1985) Arzneim.-Forsch.,35(11),12a,1917-1935
4)盛政忠臣他 (1986) 神経化学 25(1),37-39
5)松林弘明他 (1985) 神経化学 25(1),40-42

117. フェニールエチラミン尿中排泄に及ぼすメタンフェタミンの影響

山田茂人・小島秀樹*・高木裕子・
原尻慎一郎*・古賀照邦・猪口隆洋**・
西　彰五郎・稲永和豊*
（久留米大・医・脳研, 精神*, GC-MS研**）

〔要　約〕

Methamphetamine(MAP)のphenylethylamine(PEA) 排泄に及ぼす影響を観察するために、宇根らによりMAP 抽出に用いられたExtrelute カラムをPEA 抽出にも応用し、尿中MAP 及びPEA を抽出したのち化学イオン化法でガスクロマトー質量分析計を用いてMAP,PEA の同時定量を行った。この方法は短時間で簡便に両物質を再現性よく抽出、定量でき、その感度はPEA で100 pg/ml, MAPで200 pg/ml 程度であった。　この方法を用いて、代謝ケージに入れたラットに4 mg/kg のMAP を一回投与した後3 日間蓄尿して1 日毎のPEA とMAP の排泄の変動を観察した。　MAP 投与1 日目でPEA 排泄の有意な増加が認められ、3 日目には逆に投与前値より有意な低下が観察された。また3 日間を通じてそれぞれのMAP の排泄量とPEA 排泄量には高い相関が認められた。　次に幻覚妄想状態で入院した覚醒剤中毒患者で、入院3 日目から7 回蓄尿できた一例についてMAP とPEA の排泄をプロットすると、MAP 排泄の減少に伴いPEA 排泄の一過性の減少が認められた。　以上の結果からMAP の急性投与は最初PEA 排泄の増加とそれに引き続くPEA 排泄の有意な減少を伴うことが明らかとなった。

Key word： methamphetamine, phenylethylamine, urinary excretion

（緒言）　Phenylethylamine(PEA) は哺乳動物の脳内に存在する微量アミンであるが、その構造や薬理作用はmethamphetamine(MAP)に類似しており、ある種の精神疾患でCSF 濃度や尿中排泄の偏移が報告されている[2,3]。PEA はBlood-Brain-Barrier を自由に通過する事からその生理的意義や精神疾患の病態の指標としての意義が検討されており、MAP 投与後のPEA 排泄の変化を調べることはMAP 精神病の病態を理解する上で有意義な事とおもわれる。　我々は宇根らが報告したExtrelute カラムによるMAP の抽出法[4]をPEA 抽出にも応用して、尿中PEA ,MAPを同時に抽出し、ガスクロマトー質量分析計により化学イオン化法により両物質の同時定量を行った。　この方法を用いてMAP 急性投与後のPEA 排泄の変化をラット及び覚醒剤中毒患者のPEA 尿中排泄の継時的変化について観察した。

（対象と方法）

1）対象：　Wistar系雄性ラット8 匹（350-400)を代謝ケージの中で5 日間飼育した。飼育条件は12時間の明暗周期で温度、湿度を一定に保ち、水及び餌は自由摂取とした。1 日毎の尿は総量を測定した後1 mlを-70°C で凍結保存した。最初の2 日間の基礎排泄量をみたうえで、3 日目に6 匹に4 mg/kg のMAP を腹腔内投与し、引き続き3 日間尿の採取を行った。残りの2 匹には生食水を投与した。　また幻覚妄想状態で入院した　MAP 中毒患者は入院 3日目より 7回10mlの6N- 塩酸を入れた容器に蓄尿し、1 日排泄量を測定しその1 mlを凍結保存した。

2）試料調整：　試料は解凍後宇根らの方法に基づきMAP,PEA の抽出を行った。すなわち、尿1 mlに50ngのD_4 -PEA と3-phenylpropionic acid (3-PPA)を内部標準物質と

して加えよく攪はんし、30分氷冷下に放置した後100 μl の5N-NaOH を加えpHを13以上として、1 cm（直径）x 6 cm（長さ）のデイスポチップにExtrelute 樹脂を充填したカラムに注ぎ15分放置後6 mlの酢酸エチルでアミン分画を溶出した。溶出液は窒素気流で乾固した後10μlの酢酸エチル、50 μl のpentafluoro propionate anhydrate(PFP)で60°C 30 分で誘導体化したのち溶媒を窒素ガスで飛ばし-20°C で保存した。

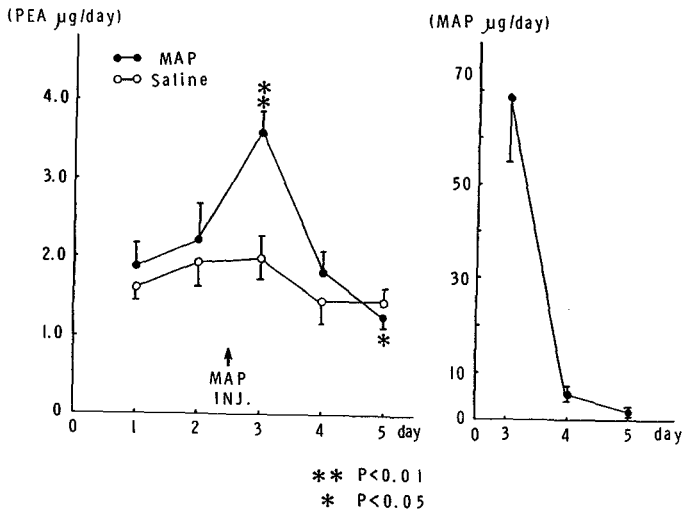


図　1

3）GC-CI-MS : MSはM-0101データ処理装置付き日立M-80B 2 重集束質量分析計を、GCは日立663-30形を使用した。CIガスはイソブタンを3×10^{-6}Torrで使用した。GCのカラム温度は185 °C の定温としOV-1をコーテイングしたキャピラリーカラム（HP社製　25m x 0.2 mm）で試料の分離を行い、それぞれの（M＋1）$^+$ イオン（PEA, m/z 268; D_4-PEA, m/z 272; MAP, m/z 296; 3-PPA, m/z 282）のselected ion monitoring により各イオンをモニターして内部標準物質にたいするピーク面積比からMAP, PEA の定量を行った。（結果）1．PEA及びMAP の定量性については表1 に示す様に同一試料からの抽出によるバラつきは5%以内であり、試料に5 ngを加えた時に得られる値も再現性よく定量できた。　2．MAP 投与前の2 日間の平均PEA排泄量は2.01 ± 0.23 ug/day(mean ± S.E.M.）であり、MAP 投与により初日に3.6 ± 0.27 ug/day（n=6, P<0.01）と有意な増加が認められた。しかし2 日目にはPEA 排泄はMAP 投与前値にまで戻り更に3 日めに1.35 ± 0.14 ug/dayと投与前値に較べ有意な低下が認められた。一方生食投与群では前5 日間を通じ有意な日間変動なかった。MAP の排泄量は投与初日に69.16 ± 15.38

Table 1. Intra-assay reproducibility of PEA determination in human urine

	No. of determinations	Observed concentration mean ± S.E.M. ng/ml	Range ng/ml	Coefficient of variation Percent
urine without addition of PEA	6	11.2 ± 0.20	11.9-10.6	1.8
urine plus 5 ng PEA per ml	6	15.7 ± 0.26	16.4-14.9	4.3

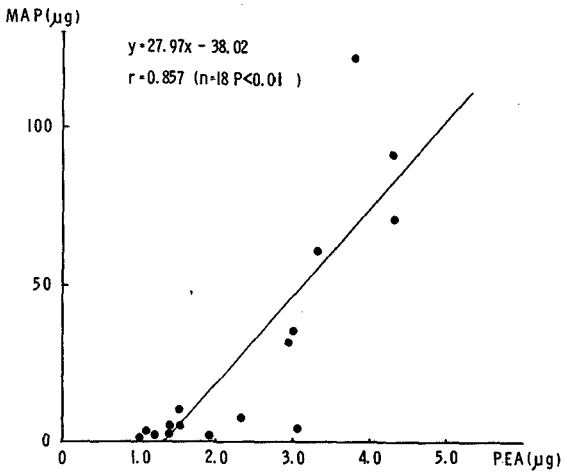


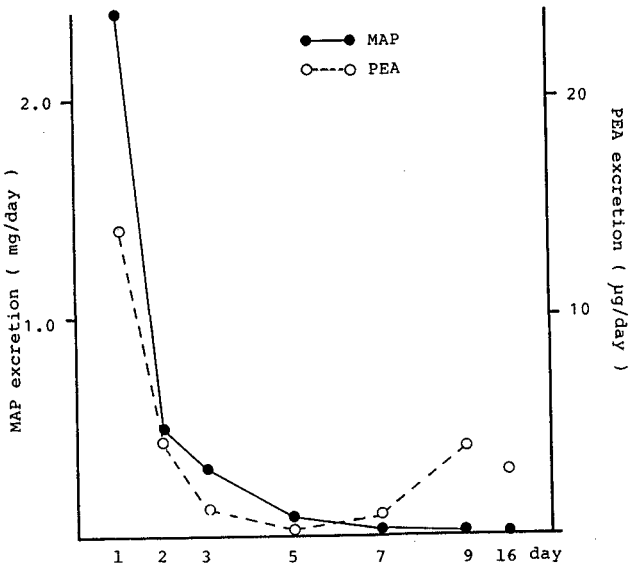
図　2

μg/day, 2 日目は5.66 ± 1.10 μg/day, 3 日目は1.32 ± 0.34 μg/day とMAP 排泄は急激な減少が認められた。各試料のMAP とPEA の排泄量をプロットすると、図2 に示す様に有意な相関がある事が示された。 3）幻覚妄想状態で入院した覚醒剤中毒患者の尿中排泄のPEA とMAP の変化を図3 に示した。PEA 排泄は初日が最も多く、その後漸次減少し、5 日目で最低値に達し、その後軽度上昇傾向が認められるという、U字型の排泄曲線が得られた。

（考察） MAP 投与後のPEA 代謝についてBorison らはMAP 急性投与により約30分後には内因性PEA は一時的な減少が見られるものの、4 時間後にはMAP 投与まえの約4倍に増加すると報告している。[1] また最近Zametkinらは、多動児の治療にamphetamineを投与した場合、24時間のMAP 排泄量とPEA 排泄量に正の高い相関をみいだしている[5]。これは今回の動物を使った実験で投与初日にPEA 排泄量が有意に増加し、PEA 排泄量とMAP 排泄量に高い正の相関が認められた結果とよく一致する。MAP 投与によりPEA 産生と分解が共に増加するという報告も見られる[1]。またPEA はB 型 MAOの基質であり、MAP のMAO 阻害作用がPEA 排泄増加の要因の一つとも考えられる。一方MAO投与3 日目にPEA 排泄量が投与前に較べ有意な低下を示したことは、MAP 中毒患者におけるPEA 排泄の一過性の減少を示した現象に対応するものと考えられる。

この減少はMAP がまだ体内に存在するうちから認められることから、MAP によるMAO阻害作用はある程度残されており、MAP 断薬後のPEA 排泄量の減少にはPEA 分解の増加よりむしろPEA 産生が減少している可能性が強く、今後検討する予定である。

MAP の断薬後にヒトで抑鬱状態が生じることはよく知られている。また動物でも移所運動量の低下が認められ鬱病の動物モデルとなるのではないかとの意見もある。この行動変化に伴う生化学的な変化についてはこれまで動物における線条体dopamine含量の低下やヒトのMHPG排泄の一過性の減少が報告されているが、今回認められたMAP投与後のPEA 排泄の低下もMAP 断薬後の低活動状態に何らかの役割を持つ可能性も考えられる。



daily changes of urinally MAP and PEA

図 3

1) Borison R.L. et al. Life Sci. 15, 1837-1848,1975 2) Fisher E.et al. Biol.Psgchiatr.,5,139-147,1972 3) Potkin S.G. et al.,Science,206, 470-471,1979 4) Une I. et al.,Jpn.J.Legal Med.,37,63-66,1983 5) Zametkin A.J. et al.,Am.J.Psychiatr.,141, 1055-1058 1984

118. 必須脂肪酸欠乏食飼育動物におけるmethamphetamine誘発逆耐性現象の変化と脳内アミンならびに脂肪酸組成の変動

小野信文・木下博・斎藤亮・神谷大雄・三輪博*・山本孫兵衛*（福岡大・薬・薬理，薬剤*）

〔要約〕

methamphetamine(MAP)のマウスへの間欠的反復投与により起こる自発運動興奮作用の逆耐性現象に対して、必須脂肪酸欠乏飼料(EFAD)飼育による影響ならびに脳内モノアミンおよび脂肪酸組成の変動について検討を行った。

正常合成飼料(RD)で飼育した動物は、MAP 1mg/kg s.c. 4および7日間隔反復投与により逆耐性が出現した。EFAD群では自発運動興奮作用は認められたが、逆耐性は出現しなかった。逆耐性出現時、線条体のdopamine(DA)、norepinephrine(NE)、serotonin(5-HT)、5-HIAA量には変化がなかったが、DOPACの有意な減少がみられた。このDOPAC減少はRD群に比較してEFAD群において有意に抑制された。

一方脳内脂肪酸組成は、EFADによる飼育後8週間で、線条体においてリノール酸(C18:2)およびアラキドン酸(C20:4)の有意な減少が認められた。以上の結果より、MAPの逆耐性や脳内カテコールアミン変動に対して、脳内脂肪酸組成の変化が関与すると考えられる。

Key word：methamphetamine, reverse tolerance, essential fatty acid deficiency

EFAD飼育は末梢組織のn-6やn-3系脂肪酸減少を起こし、この脂肪酸欠乏は腎炎性浪瘡の防御(3)、Na依存性高血圧(2)や不妊(1)などと密接に関与していることが知られている。一方、n-6系のC20:4からは各種prostaglandin(PG)が生成される。著者らは、PG $F_{2\alpha}$、E_2ならびにD_2は抗精神病薬のカタレプシー発現に関与する可能性を報告してきており(7,8)、PGの原料となる必須脂肪酸欠乏が中枢神経機能にも影響を及ぼすものと考えているが、未だ明らかでない。他方、覚醒剤のMAP連用は動物では自発運動興奮作用増強即ち逆耐性(reverse tolerance)を示し、これはMAP連用による分裂病様精神障害のモデルの一つとして考えられている。今回は必須脂肪酸欠乏の中枢神経機能に及ぼす影響を明らかにする目的で、MAP反復投与による行動変化を指標とし、合わせて脳内脂肪酸組成と生体アミンを測定したので報告する。

【実験方法】

12時間明暗サイクルのもとで離乳直後のddY系雄性マウス(3週齢)をRDおよびEFAD(Table 1)で8週間飼育し、実験に用いた。

行動変化：MAP 1～5mg/kg s.c.を4および7日間隔で反復投与し、open field法により自発運動量を指標に逆耐性現象を観察した。自発運動量の測定は投与30分前、投

Table 1 Composition of arranged regular and essential fatty acid deficient diets.

	Regular diet		Essential fatty acid deficient diet	
Casein	21	%	21	%
Dextrin	43.85		28.85	
Non-nutritive fiber	3		3	
Sucrose	15		40	
DL-methionine	0.15		0.15	
Vitamine mix	2		2	
Mineral mix	5		5	
Corn oil	5			
Lard	5			

与15、30分、1、2、4、6ならびに24時間後1分間行った。

脳内モノアミンならびに代謝物含量測定：断頭致死後直ちに脳を摘出し、速やかに氷冷上で脳各部位を分割摘出し、0.1M $HClO_4$中ホモジナイズより、アルミナ吸着法によりDA、DOPAC、NEと5-HIAA、5-HT、HVAを分離し、それぞれECD検出器を装着した高速液体クロマトグラフを用いて測定した。

脳内脂肪酸測定：脳内モノアミンと同様の方法で脳各部位を分割摘出し、クロロホルム：メタノール(2:1)の溶媒で脂質を抽出し、TLCによりリン脂質を分離した。次にリン脂質中の脂肪酸をKOHによりけん化して遊離の脂肪酸とし、それを2-ニトロフェニルヒドラジン誘導体として、UV(230nm)検出器により、高速液体クロマトグラフを用いて測定した(6)。

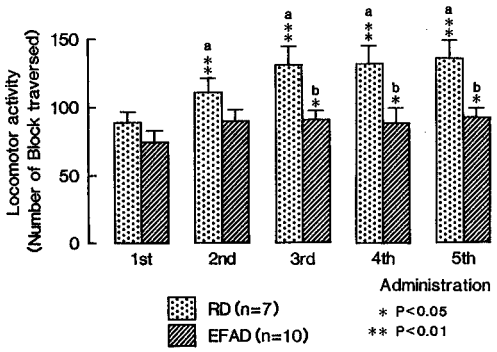


Fig.1 Changes in locomotor-enhancing effect induced by MAP(1mg/kg) given repeatedly at a fixed interval 4 days in mice.
a:compared with 1st administration in RD
b:different from RD
Each value indicates the locomotor activity measured at 30min after administration of MAP, and mean±S.E.M.

【結果】

1] 体重増加：8週間飼育後のRD、EFAD両群の体重はRD群の方がやや重かったが、有意な差はなかった。また飼料の摂取量においても有意な差は認められなかった。

2] 行動変化：MAP投与前の自発運動量は両群に差はなかった。MAP(1 mg/kg s.c.)初回投与により、投与30分後に最大となる自発運動興奮作用を示した。4および7日間隔で反復投与するとRD群では投与回数に応じ、その自発運動興奮作用に逆耐性が出現したが、EFAD群ではMAPの自発運動興奮作用の発現にもかかわらず、逆耐性現象は全く現れなかった(Fig.1)。

3] 脳内モノアミンならびに代謝物含量：MAP (1 mg/kg s.c.)を4および7日間隔6回反復投与によりRD、EFAD両群とも線条体において有意なDOPACの減少が認められ、その減少の度合はRD群に比較し、EFAD群の方が有意に小さかった(Fig.2)。またHVAならびに5-HTはEFAD群のみ有意な減少を示した。一方、視床下部ではDAがEFAD群においてのみ有意に減少したが、5-HTならびに5-HIAAについては著明な変化は認められなかった。

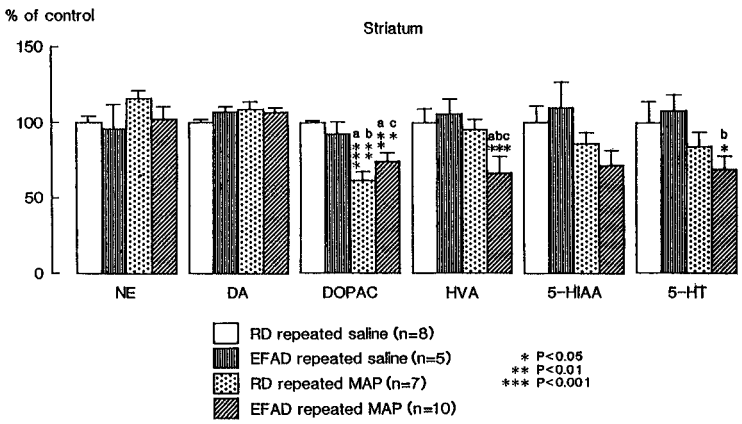


Fig.2 The levels of catecholamine, indoleamine and their metabolites in striatum at 30min after 6th administration of MAP(1mg/kg) in mice fed RD or EFAD.
a:compared with RD repeated saline
b:compared with EFAD repeated saline
c:different from RD repeated MAP
Each value indicates mean±S.E.M.

4] 脂肪酸組成：線条体リン脂質の脂肪酸組成はRD、EFADによる8週間飼育により、EFAD群においてC18:2ならびにC20:4の有意な減少がみられた(Fig.3)。また皮質ならびに視床下部ではC18:2の有意な減少が認められたが、C20:4は減少傾向を示した。一方、これらの脂肪酸減少は肝臓で最も著明であった。

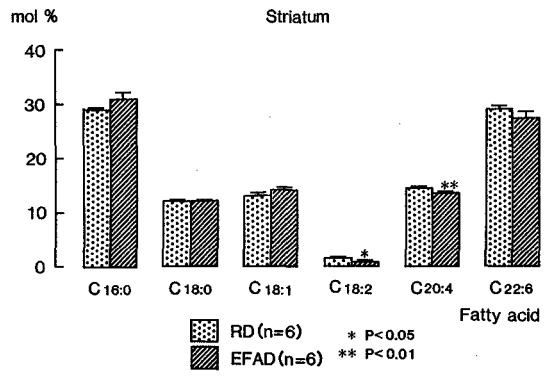


Fig.3 Influence of essential fatty acid deprivation on the fatty acid composition in mice striatum.
Each value indicates mean±S.E.M.

【考察】

MAPの間欠的反復投与による自発運動量増加に対する逆耐性はEFAD群において発現しないことが本研究により、初めて明らかになった。この逆耐性形成には脳内カテコールアミンの動態についてLynchらは、DA量には変化ないがDOPACの減少を認めている(5)。本研究においても、RD群で類似の結果が得られた。さらに6回目のMAP投与30分後に最も自発運動量が高い時点におけるDOPAC減少は、RD群に比較しEFAD群が少ないことから、MAPによるDAの代謝回転の低下を抑制することによって逆耐性の発現を抑制したと考えられる。一方、膜リン脂質中の脂肪酸組成について、EFAD群の脳各部位においてC18:2の減少ならびに線条体におけるC20:4の減少が認められた。したがって、これらの中枢神経系における脂肪酸組成変化は逆耐性不形成やMAPによるDOPAC減少の抑制作用に関与する可能性が示唆された。また本研究よりEFAD群におけるC20:4の減少度が脳に比較して、肝臓ではさらに強かったが、Lefkowithらも類似の結果を報告し、肝臓が生体内C20:4の主な供給源と考えられている(4)。したがって、脳各部位においてC20:4の減少程度が少ないのはこのためと考えられる。さらにC18:2はC20:4の原料であり、C20:4はPGの前駆物質であるので、この逆耐性の不形成にPG類が何らかの意義を持つ可能性があり、今後さらに検討する必要がある。

【文献】

(1)Burr,G.O.and Burr,M.M.(1930) J.Biol.Chem. 86, 587-621
(2)Cox,J.W. et al.(1982) Circ.Res. 51, 694-702
(3)Hurd,E.R. et al.(1981) J.Clin.Invest. 67, 476-485
(4)Lefkowith,J.B. et al.(1985) J.Biol.Chem. 260, 15736-15744
(5)Lynch,M. et al.(1977) J.Neurosci.Res. 3, 295-300
(6)Miwa,H.and Yamamoto,M.(1986) J.Chromatogr. 351, 275-282
(7)Ono,N. et al.(1986) Pharmacol.Biochem.Behav. 25, 463-467
(8)Saito,R. et al.(1987) Pharmacol.Biochem.Behav. 26, 543-546

119. Medial septal areaの電気凝固によるアルツハイマー病のモデル動物

山崎りつ・山下元司・岡田理之・高橋美枝・
池田久男　（高知医大・神経精神）

〔要　約〕

ラットでcholine性神経の基始核であるmedial septal areaを電気凝固した後，(1) Oltonらの八方向放射状迷路によって新しい学習の形成に対する影響を検討するとともに(2) cholineの神経支配をうけている脳部位であるfrontal cortexとhippocampusでcholine acetyltransferase (CAT) 活性とdopamine (DA), noradrenaline (NA) を測定した．結果は (1) 対照群に比較して処置群で有意の学習形成の低下を認めた．とくに処置群では10試行行った後でも学習達成の基準に達した動物はいなかった．(2) CAT活性は破壊部位からcholine性の投射をうけているhippocampusでのみ有意に低下し，frontal cortexでは変化を認めなかった．DAとNAはfrontal cortex, hippocampusのいずれでも変化を認めなかった．以上より本動物で認めた学習の低下は脳内choline系なかでもhippocampusのcholine系の機能低下によりもたらされたものと考えられた．これは従来の学習記憶にcholine系機能が関与するとの説を改めて支持すると同時に，近年アルツハイマー病における複数の神経伝達物質の欠損という条件を再現しなくても動物に学習の低下を引き起こすことが出来ることを示した点で注目すべきことである．この動物はアルツハイマー型痴呆の病態モデル動物として利用できる可能性がある．

Key word：Animal model, Alzheimer type dementia, cholinergic hypofunction

〔始めに〕

Alzheimer型痴呆（Alzheimer type dementia, ATD）における脳内choline系の機能低下は広く認められた事実である。これを動物に再現する目的で脳内choline系なかでもhippocampusにcholine性線維を送っているとされるmedial septal area（MSA）を物理的に破壊しその効果を行動学的，生化学的に検討することとした。

〔実験方法〕

破壊方法：麻酔下で脳定位的にMSAに単極の白金電極を挿入し12V直流電流を5秒間流して電気凝固を行った。対象群では同様の処置を行い電流は流さなかった。実験終了後脳の固定標本を検討し凝固が確実に行われたことを確認した。

対象：手術時11週齢のWister系雄ラット。

迷路学習：予め十分なハンドリングを行い3日間迷路に慣らした後手術を行った。迷路はOltonらの高架式八方向放射状迷路を用いた。装置は光量，温度などを一定にした静かな専用の部屋に設置した。各アームの先端には径2cmの給餌用カップにスキナボックス用特殊ペレット（室町機械）を1個ずつ置いた。術後10日間の回復期間は自由に給餌，給水を行った。その後給餌制限を行い，実験期間中は体重を手術前の約80%に維持した。術後12日目より学習実験を開始した。実験は，夜間の同じ時間帯に，各個体1日1試行を行った。すべてのアームに餌を置いた後中央のプラットホームにラットを置いて自由に各アームに入って餌を取るようにさせ，選択したアームの位置と，8つ総てのアームの餌を取り終わるまでに要した時間を記録した。ラットが総てのアームの餌を取り終わるか，5分間経過した時点で学習を中止しこれ

を1試行とした。学習終了直後に給餌を行い,翌日の学習の直前にはラッが空腹になるようにした。

CAT測定： Mantioneらの方法によった。これはFonnumの方法の抽出方法のみを簡便化したもので37℃で15 min反応させた反応液200μlに0.5mlの氷冷、50M NaP,pH7.4,0.5mlを加えて反応停止させ、75 mg/ml Na[B(C6H5)4]/3−heptanone溶液750μlを加えて10秒攪拌した後3000 rpmで5分間遠沈し、上澄みのうち400μlを抽出し液体シンチレーションカウンターで得られた放射能活性をもとにCAT活性を求めた。反応液の中に1 nM のNVPを加えた場合はCAT活性は95%以上低下することを確認済みである。

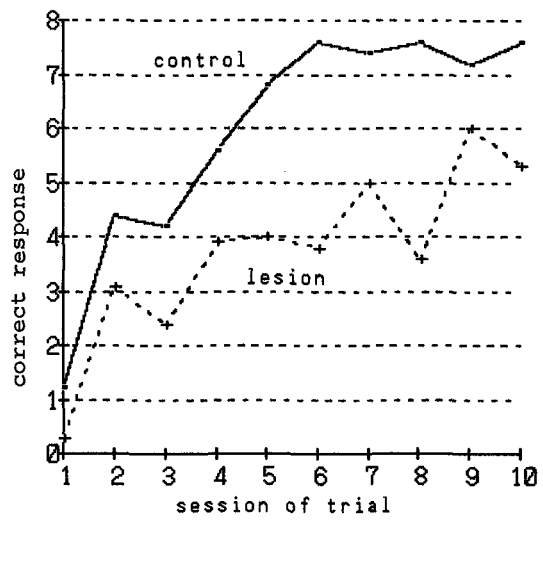
catecholamine測定：高速液体クロマトグラフィーにより測定した。ポンプは日本分光器のTri−Rotor 2を、電気化学検出器には島津のL−ECD−6Aを使用した。測定条件としては,カラムは半井化学のCosmosil−packed colum(ODS) 4.6×150 mm,移動相は0.1M酸緩衝液を用いた。noradrenalineの測定にはイオンペア剤として1−heptanesulfonate sodiumを加えた。

[実験結果]

<実験1 迷路学習>

餌を取れた場合を正選択,餌がとれなかった場合を誤選択とした。1試行で最初の8選択中正選択が7以上あれば学習が達成されたとした。最初の8試行の正選択数を経時的に比較すると,図1aの結果となった。対照群は6試行目で正選択数の平均が7をこえ,学習が達成されたが処置群では10試行目においても正選択数の平均が6以下で学習は達成されなかった。

最後の5試行を平均すると処置群では正選択が4.429 ±1.593(平均±標準誤差),対照群7.520 ±0.179で処置群の正選択数が有意に低値であった(P<0.01)



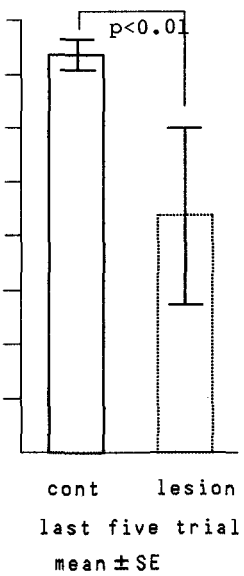
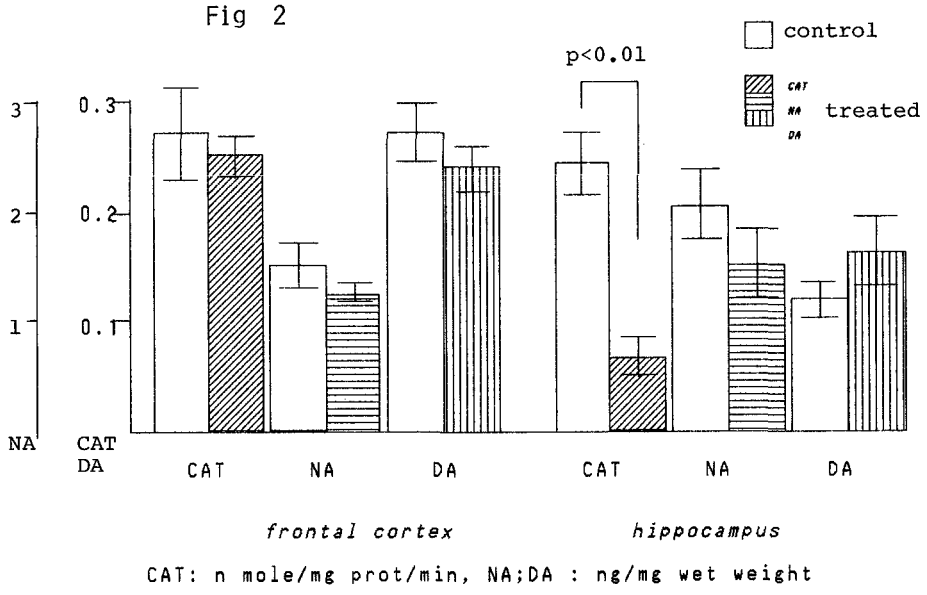


Fig 1a 正解数の平均の比較
control n=7, lesion n=5

Fig 1b 後半の5試行の平均
処置群で学習獲得の有意の
低下を認めた.

Fig 2



障害後6週の脳部位別（frontal cortex,hippocampus）のCAT,NA,DA活性
hippocampusでCATが有意に低下した.

）（図1b）。脳の破壊の程度はMSAに限局したものであることを確認した。

＜実験2　　CAT測定＞

手術後6週目のCAT活性は図2の通りである。frontal cortexでは処置群と対照群との間に差は認められなかった。hippocampusでは処置群で0.075 n mole/mg prot/min,対照群で0.246±0.030 n mole/mg prot/minと,処置群でCATの有意の低値を認めた（$p<0.01$）。

＜実験3　　catecholamine 測定＞

frontal cortexとhippocampusでdopamine,noradrenalineを測定した結果は図2のとおりで，処置群と対照群の間に差は認めなかった。

［考察］

medial septal areaの破壊により行動量の変化は伴わずに新しい学習の獲得の障害をひきおこすことができその生化学的基盤についてはcholine系の機能低下が主たる役割を果たしていることが推定された。近年抗痴呆薬の開発が急がれているがこのためには標準化されたモデル動物で検定を行うことが重要であり,今後使用する動物の種類,障害方法,行動評価の方法などについて標準化を行うことが重要であろう。

［参考文献］

1）池田　久男　1986 高齢者痴呆等の医学医療に関する研究業績年報　2巻　印刷中
2）Mantione CR 1983 J Neurochem 41:251－255. 3）Olton DS 1976 Animal Behavior Process 2:97－116. 4）Osumi Y 1977 Europian J Pharmacol. 41:47

120. Twitcher mouseを用いてのリポゾームによる脳血液関門通過性の検討

梅沢房代・井田博幸・伊藤文之・衛藤義勝
（慈恵医大・小児）

〔要　約〕

ヒトKrabbe病のmodel mouse であるTwitcher mouseを用いて，リポゾームによる脳血液関門（ＢＢＢ）の通過に関して検討し，治療の可能性を試みた。

【結果】従来のサルファタイドによるリポゾームでは肝への取り込みがみられたが脳内に取り込みがみられなかった為，マンノースによるリポゾームを作成した所脳への取り込みがみられ，ＢＢＢ通過には，マンノースを介したreceptor の存在が示唆された。又，脳で細胞内小器官別にradioactvityを検討した所，24時間をピークに全体の30％の活性がライソゾーム分画に認められた。更に，脳細胞分画別に同様の事を検討した所，グリア細胞に20~50％のradioactivity が認められ，神経細胞より常に高値を示した。

以上より，このリポゾームはＢＢＢを通過し得るばかりか，ライソゾーム及びグリアにも取り込まれる可能性があり，局所でのリポゾーム内酵素の動態によっては，中枢神経系の蓄積物質のクリアランスも可能と思われた。

Key word： Liposomal therapy, Krabbe's disease,

ヒトKrabbe病は，乳児期の4－5ケ月に痙攣，嘔吐，易刺激性等で発症し2才以内に死亡する予後不良の遺伝性脳変性疾患である。本症の原因としては，脳のmyelinに多く存在するgalactocerebrosideの分解を司るcerebroside β-galactosidase の酵素欠損による事が明らかにされている。しかし，脱髄のメカニズム及び治療法に関してはまだ確定的なものがない。

このヒトKrabbe病に代表されるライソゾーム病の治療法としては，(1)欠損酵素を補い，(2)蓄積物質を排除する事が目的とされる。実際，Gaucher病など肝蓄積性の疾患は，臓器移植や骨髄移植によりこの目的を果たしている。しかし，中枢神経系に障害を有する疾患の場合，補充する酵素が脳血液関門（Blood-brain barrier，ＢＢＢ）を通過し得るか否かが大きな問題となりこの障害を改善する事が不可欠とされている。そこで我々は，ヒトKrabbe病のgenetic model として紹介されているTwitcher mouseを用いて，リポゾームの膜の組成によるＢＢＢの通過性の差並びに脳内での動態に関して検討したので報告する。

【方法】使用したmouseは，米国ジャクソン社より入手したB6/CE Strainで，heterozygote同士の交配よりhomozygoteを得た。Mouseの診断は，小林らの方法(1)により生後2週目までの尾のcerebroside β-galactosidase活性を測定する事により行った。

リポゾームは八木らの方法(2)により，レシチン：コレステロール：サルファタイド＝7：2：1（V/V/V）をC:M=2:1にて溶解した後，rotary evaporat

にて均一の膜を作成した。この中に，β-galactosidase を包埋し懸濁後超音波処理し，超遠心にてリポゾーム分画を沈澱させ，洗浄後ＰＢＳに懸濁した。このリポゾーム以外に，サルファタイドの代わりとして各種オリゴ糖誘導体を用い同様にリポゾームを作成した。又リポゾームの marker として ^{3}H-galactocerebrosideを膜表面にラベルした。これら種々のリポゾームを mouse 腹腔内に注射し，継時的に mouse 臓器に於ける β-galactosidase活性又は radioactivity を測定した。

In vitroの系として，妊娠後期の mouse fetus の脊髄後根神経節（dorsal root ganglion,ＤＲＧ）を collagen bed上で 4 週間培養したものを用いた。培養液は，ＮＧＦと30％ＦＣＳを含むＭＥＭ溶液で 37℃，5％CO_2の条件下とした。

脳の細胞分画は Sellinger の方法により行った。

【結果】(1) 酵素の選択

まず使用する β-galactosidase の選択だが，Jack beans, Aspergillus, bovine liver 由来のものに比し，ホラ貝由来の β-galactosidase は 10倍以上の活性を有し，又酵素蛋白当りに関しても 0.1㎎ という微量でも直線関係を示した事より，このホラ貝由来の β-galactosidase を用いる事とした。

(2) 各種リポゾームの取り込み

サルファタイドによるリポゾームの正常マウスへの注射では，肝・脾に於ける cerebroside β-galactosidase活性は投与後 24-48 時間で 10×10^{3} cpm/㎎ protein/hr まで上昇した。これは投与前のほぼ 2 倍で，酵素の直接注射より効果はあると思われたが，脳に於ては活性の変化がなく，このリポゾームはＢＢＢを通過し得ない事が判明した（Fig. 1）。

次に，サルファタイドに代わり各種オリゴ糖誘導体を用いたリポゾームを正常マウスに投与し，同様に取り込みを検討した。その結果，マンノースによるリポゾームに於て，脳で 10×10^{4} cpm/g wet tissue という高い radioactivity を認めた。この radioactivity は全投与量の 10％で，peak time は投与後48時間であった。一方，肝・脾では脳の6-8倍量の取り込みがみられ，peak time は投与後 12 時間と早期であった（Fig. 2）。In vitro に於ては，24時間を peak マンノース及びガラクトース誘導体で取り込みが高かった。

更に，このマンノースよりなるリポゾーム投与後の脳での細胞成分及び細胞小器官別の取り込みの差を検討した。細胞小器官分画に於ては，上清分画に 40-60％の高い radioactivity が持続的に認められたが，lysosome 分画にも 10-30％認められた。Peak time は 24時間であった。又，細胞成分別による radioactivity と同様に検討した所，グリア細胞分画には全体の 26-50％，神経細胞分画には 10-30％と，グリア細胞分画が常に高い割合を示した。

(3) リポゾーム内酵素の動態

外来性に ^{3}H-galactocerebrosideを投与し蓄積させた後，β-galactosidase を含むリポゾームを投与し，蓄積した ^{3}H-gal-cer がどの様な動態をたどるか検討した。

まず，初期の蓄積は，normal mouse に比し homozygote mouse では 50-100 倍量の蓄積を認めた。この値は，酵素を含むリポゾームの投与により 60％程まで

Fig. 1 Time course of cerebroside beta-galactosidase activity in normal mice organs after intraperitoneal injection of charonia lampas

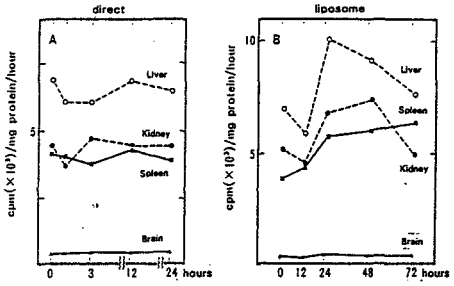


Fig. 2 Incorporation of ^{3}H-galactocerebroside labeled liposomes into normal mice tissues

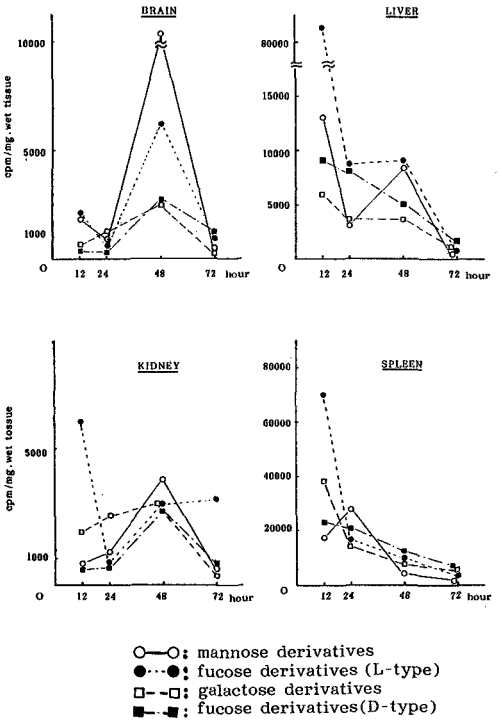


Fig. 3 Accumulation and degradation of ^{3}H-galactocerebroside bearing liposomes with or without administration of charonia lumpas beta-galactosidase containing liposomes in normal and twithcer mice tissues.

tissues	24 hours β-galactosidase −	24 hours β-galactosidase +	48 hours β-galactosidase −	48 hours β-galactosidase +
Normal liver	458	209	211	135
Twitcher liver	25670	8859	39141	8547
Normal spleen	2092	871	924	616
Twitcher spleen	53929	38721	96771	36098
Normal kidney	150	120	95	82
Twitcher kidney	262	555	606	200
Normal brain	130	91	59	113
Twitcher brain	79	86	97	78

Values are expressed as cpm per 100 mg wet tissues.
First, ^{3}H-galactocerebroside containing liposomes(20x10^{3} cpm) were injected intraperitoneally into normal and twithcer mice. Subsequently, β-galactosidase trapped in liposomes was injected 2 days after and remaining radioactivity of ^{3}H-galactocerebroside was chased after 24 and 48 hours. The injected amount of charonia lumpas β-galactosidase was 0.05 unit into each mouse.

低下したが，酵素を含まないリポゾームの投与では逆に上昇傾向を示した。故に，蓄積した^{3}H-galactocerebrosideが，リポゾーム内酵素によりクリアランスされている可能性が示唆された（Fig. 3）。

【考案】ライソゾーム病の治療法の一つとしての酵素補充療法は1960年代より試みられているが，外来性酵素が目的とする臓器に取り込まれ，かつ作用が発現されるにはいくつかの段階で制限がある。そこで我々は，酵素を人工膜に包埋し，膜の組成を変えることによりＢＢＢの通過性を高める事を試みた。これにより，マンノース誘導体により作成したリポゾームが脳へ高くとりこまれ，又代謝物質の蓄積の場であるライソゾームやグリアにも高い割合で取り込まれる事が判明した。前者のメカニズムは，マンノースに対するレセプターが脳血管上皮内に存在し，これを介してリポゾームがＢＢＢを通過したと考えられるが，後者のメカニズムに関しては不明で今後の検討が必要である。

又，投与したリポゾーム内酵素が非自己の組織内でどの様な動態をたどるかに関しての検討では，従来外来性の酵素は非自己の組織内では速やかに貪食されるか或いは分解され，たとえ分解を受けなくても利用されないといわれていたのに対し，組織内で少なからず活性を有することが判明し，これもリポゾームの効果と思われる。今後は，更にこのリポゾームを利用して早期よりの補充療法を行い治療に結びつけていきたいと思う。

【文献】Naoi M. and Yagi K. (1982) Biochem. and Biophys. Acta 215:157-162

121. 脳スライス及びシナプトゾームにおける海産毒マイトトキシンのCa^{2+}チャンネルアゴニストとしての特性

植田弘師・田村滋規・高木博司・佐藤公道
（京都大・薬・薬理）

〔要　約〕

強力な海産毒素であるマイトトキシン（ＭＴＸ）の脳スライス及びシナプトゾーム標本におけるCa^{2+}チャンネルアゴニストとしての特性について調べた。モルモット大脳皮質スライスにおいてＭＴＸは用量依存性に$^{45}Ca^{2+}$のとりこみを増大させ、この作用は、Co^{2+}，La^{3+}などにより完全拮抗されたが、ニトレンジピン、ベラパミルによっては部分拮抗しかされなかった。Ｆｕｒａ-ＩＩ蛍光測定によるシナプトゾームないCa^{2+}濃度をＭＴＸは増大させたが、この作用はベラパミルにより殆ど拮抗されなかった。一方、resealedシナプトゾーム標品において、Na^{+}-Ca^{2+}交換輸送系及びＡＴＰ依存性のCa^{2+}輸送系に対してもＭＴＸはなんら影響を及ぼさなかった。また、脳スライス標品におけるＭＴＸの$^{45}Ca^{2+}$取り込み作用をＯＡＧが増大させ、その増大作用をポリミキシンＢが拮抗した。以上の結果より、ＭＴＸはいわゆるＬ型及びＮ型のCa^{2+}チャンネルアゴニストであり、また、神経終末標品では、Ca^{2+}チャンネルはＮ型が優位であること、さらにはＬ、Ｎ型の区別は未決定であるが、Ｃ-キナーゼにより活性化を受けることなどが明らかとなった。

Key word：

マイトトキシン、Ca^{2+}チャンネルサブタイプ、Ｃ-キナーゼ

はじめに　近年数多くのCa^{2+}依存性の生理活性タンパクが発見され、Ca^{2+}が細胞内情報伝達物質として重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。Ca^{2+}の細胞内流入に最も重要な機能を果たしているのがCa^{2+}チャンネルであるが、最近では後根神経節細胞などにおいて最も代表的なジヒドロピリジン誘導体の拮抗薬に抵抗性のあるものなど、少なくとも３種類の異なるタイプのCa^{2+}チャンネルが存在することが報告されている（１）。一方、脳組織においてもいくつかの異なるタイプのCa^{2+}チャンネルが存在することが報告されている（２）。本研究においては、強力な海産毒素であるマイトトキシン（３）が脳スライス及びシナプトゾーム標本においてCa^{2+}チャンネルアゴニストとして作用することを明らかにするとともにそのチャンネルサブタイプ特性について調べた。

実験方法

実験には、全て体重２５０－３００ｇの雄性モルモット大脳皮質を用いた。

モルモット大脳皮質スライスでの$^{45}Ca^{2+}$取り込み実験　モルモット大脳皮質より0.5ｍｍ^{3}のスライスを作成し標本とした。各々1-2ｍｇタンパクを400μｌのＫｒｅｂｓ－ＨＥＰＥＳ緩衝液（ＫＨ-メジウム）に懸濁し３７℃、１０分間インキュベート後　100μｌの　$^{45}Ca^{2+}$（0.2μＣｉ）、ＭＴＸ及び各種薬物を加えさらに一定時間インキュベート行った。　ＫＨ-メジウムの組成は、ＮａＣｌ　132(mM)、ＫＣｌ　4.8、$MgSO_4$　2.4、$CaCl_2$　1、ｇｌｕｃｏｓｅ　10、ＨＥＰＥＳ　20、pH7.4である。反応の停止は、Ca^{2+}のかわりに5mM　ＥＧＴＡを加えた氷冷ＫＨ-メジウム3mlを加え、減圧下でGC-50フィルターを用いてろ過することによった。フィ

ルターは、ＥＧＴＡ-ＫＨ-メジウム3ｍｌでさらに２回洗浄し、その放射活性を測定した。

Na^+-Ca^{2+} 交換輸送実験　モルモット大脳皮質シナプトゾームを 5ｍＭ Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ，ｐＨ7.4 （0.5ｍｇ／ｍｌ）に懸濁し、ホモジェナイズした後、20,000 ｘ ｇ 10分間遠心し、そのペレットをNa^+-メジウム(160ｍＭ ＮａＣｌ、20ｍＭ Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ，ｐＨ 7.4）に懸濁（5ｍｇ／ｍｌ）して-70℃にて凍結した。一部を解凍してNa^+-メジウム 或は、sucrose-メジウム （270ｍＭ sucrose、ＮａＣｌ 5.3ｍＭ、20ｍＭ Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ，ｐＨ7．4）にて200倍に希釈した。この標品を各ｔｕｂｅに900μｌとり、37℃ 10分間プレインキュベートした後、40μＭ $CaCl_2$（0.2μＣｉ $^{45}Ca^{2+}$を含む）100μｌを加えてさらに一定時間インキュベートを行った。反応の停止は、5ｍＭ-ＥＧＴＡを含むNa^+-メジウム3ｍｌを加えてＧＣ－５０にてろ過することによった。

ＡＴＰ依存性Ca^{2+}取り込み実験　実験には Na^+-Ca^{2+} 交換実験に用いた凍結標品を用い、200倍の1ｍＭ $MgCl_2$ 或は、1 ｍＭ $MgCl_2$ 及び1ｍＭ ＡＴＰを含むNa^+-メジウムに懸濁して同様の実験を行った。

シナプトゾームでのＦｕｒａ-ＩＩによるCa^{2+}蛍光測定　モルモット大脳皮質P_2画分をCa^{2+} ｆｒｅｅ-ＫＨメジウムで洗浄後、同メジウムに懸濁し（2.5ｍｇ／ｍｌ）、うち500μｌを取りＦｕｒａ-ＩＩ・ＡＭ（2μＭ）を加え，37℃ 15分間インキュベートし，Ca^{2+}, ｆｒｅｅ-ＫＨメジウム6ｍｌをさらに加え，20,000 ｘ ｇ 10分間遠心を行った。 沈査を1ｍＭ $CaCl_2$を含む1ｍｌ ＫＨメジウムに懸濁し、うち100μｌを同メジウムにて10倍希釈して37℃にて、335ｎｍ 励起、500ｎｍ 蛍光波長にて測定した。

実験結果および考察

１．マイトトキシン（ＭＴＸ）は，モルモット大脳皮質スライスへの$^{45}Ca^{2+}$取り込みを用量依存的（10-100ｎｇ／ｍｌ）かつ，時間依存的に増大させた。しかし、ジヒドロピリジン誘導体のCa^{2+}チャンネルアゴニストであるＢａｙＫ-８６４４（10μＭ）は無影響であった（Fig.1）。

２．ＭＴＸによるスライスへの$^{45}Ca^{2+}$取り込み増大作用は、テトロドトキシン（ＴＴＸ）（300ｎＭ）によっては、全く影響をうけなかった。 一方、無機イオンCa^{2+}チャンネルブロッカーであるCo^{2+}、La^{3+}（1ｍＭ）によりその作用は完全に消失した。しかし、有機Ca^{2+}チャンネルブロッカーであるベラパミル、ニトレンジピンによっては、100μｌという高濃度によっても部分的な拮抗しかみられなかった(Table 1)。

３．ＭＴＸは、モルモット大脳皮質 lyzed synaptosomal membrane vesicle標本における、Na^+-Ca^{2+}交換輸送及び、Mg^{2+}- ＡＴＰ依存性Ca^{2+}輸送のいずれにも影響を及ぼさなかった。

４．ＭＴＸのCa^{2+}取り込み作用は、モルモット大脳皮質シナプトゾーム（P_2）標本を用いた、Ｆｕｒａ-IIによる細胞内Ca^{2+}蛍光測定実験においても認められた。また、この標本においてもＭＴＸの作用は、細胞外Ca^{2+}濃度に依存性であり、Co^{2+}により完全に消失したが、ベラパミル（100μＭ）により殆ど拮抗されなかった(Fig.2)。

５．ＭＴＸによるモルモット大脳皮質スライスへの$^{45}Ca^{2+}$の増大作用は，プロティンキナーゼＣのactivatorである 1-オレオイル-2-アセチルグリセロール（ＯＡＧ）(10-100μＭ）により増強され，そのＯＡＧの作用はポリミキシンＢに

Fig.1

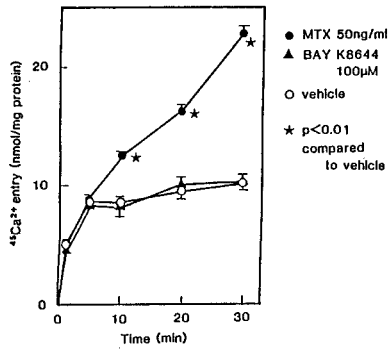


Table 1

		n	$^{45}Ca^{2+}$ entry (nmol/mg protein/20 min) basal	MTX(50ng/ml)	MTX-evoked
Control		12	9.6 ± 0.3	16.2 ± 0.8	6.6 ± 0.6
$CoCl_2$	1 mM	3	8.3 ± 0.4 *	8.8 ± 0.6	0.5 ± 0.2 *
$LaCl_3$	1 mM	3	5.7 ± 0.01 *	6.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1 *
Verapamil	10μM	3	9.9 ± 0.3	15.9 ± 0.7	6.1 ± 0.4
	100μM	5	9.2 ± 0.1	12.7 ± 0.3	3.4 ± 0.1 *
Nitrendipine	10μM	4	10.6 ± 0.5	15.0 ± 0.4	4.4 ± 0.4 *
	100μM	4	8.9 ± 0.1	12.9 ± 0.3	3.9 ± 0.3 *
TTX	0.3μM	5	9.4 ± 0.3	16.6 ± 0.3	7.2 ± 0.1

* : $p < 0.05$ (t-test), compared to the control.

Fig.2

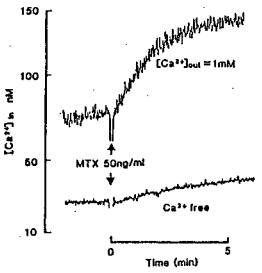
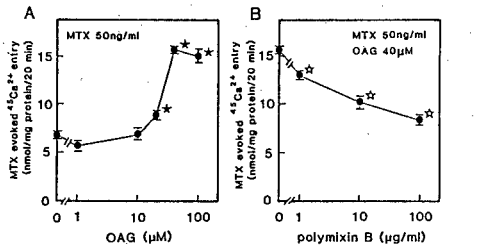


Fig.3



★ : $p < 0.05$ (t-test) compared to the control in the absence of OAG. ☆ : $p < 0.05$ (t-test) compared to the control in the absence of polymixin B.

よって拮抗された(Fig.3)。

以上のことによりＭＴＸは他のＣａ$^{2+}$輸送系に影響を与えない選択的なＣａ$^{2+}$チャンネルアゴニストであることが示された。さらに各種有機Ｃａ$^{2+}$チャンネル拮抗薬に対して感受性が低いタイプのＣａ$^{2+}$チャンネル、たとえば、Nowyckyらの報告（１）にあるＮ-型にも作用することが明らかになった。とくに、神経終末標本（シナプトゾーム）では、脱分極によるＣａ$^{2+}$取り込みがジヒドロピリジン誘導体の拮抗薬やベラパミルなどに抵抗性を示すが、本実験においてもＭＴＸによるシナプトゾーム内のＣａ$^{2+}$濃度上昇がベラパミルにより殆ど拮抗されなかったことなどから、神経終末標本ではいわゆるＮ型のＣａ$^{2+}$チャンネルが多く存在し、そのチャンネルに対してもＭＴＸはアゴニストとして作用していると考えられる。従って、ＭＴＸはＮ型及びＬ型（ジヒドロピリジン拮抗薬感受性）ともにＣａ$^{2+}$チャンネルアゴニストとして作用することが明らかとなった。また、ＭＴＸによるスライスへのＣａ$^{2+}$取り込みがＯＡＧにより増強されることより、Ｃ-キナーゼがＣａ$^{2+}$チャンネルの活性化に寄与していることが示唆された。しかし、そのサブタイプ特異性については今後の課題であり、シナプトゾーム標本での同様の実験が待たれる。

最後に、マイトトキシンを提供いただいた東北大学農学部　安元健教授に感謝いたします。

参考文献　1. Nowycky, M.C. et al. Nature (1985) 316, 440-443.
2. Miller, R.J. Science (1987) 235, 46-52.
3. 安元健、医学のあゆみ(1980) 112, 886-892.

122. ω－conotoxin 受容体の光親和標識

阿部輝雄・西須英雄　（新潟大・脳研・神経化学）

〔要　約〕

ω－Conotoxin GVIA（GVIA）は、神経系のL型およびN型のCaチャンネルを阻害する。今回、^{125}Iで標識したGVIAのアジドニトロベンゾイル誘導体を用いて、ラット脳シナプス膜におけるGVIAの受容体（おそらくCaチャンネル成分）を光親和標識によって同定した。その結果、分子量が約 310 kDa、230 kDa および34 kDaの 3種の成分が特異的に標識された。これら 3種の成分の光親和標識の性質は、金属イオンによる阻害、各種Caアゴニストおよびアンタゴニストの効果などの点において、GVIAのラット脳シナプス膜への特異的結合とよく一致した。また、これら 3成分の細胞下分画における分布は、GVIAの特異的結合の分布と平行して、主としてシナプス膜分画に存在していた。これらの結果は、この 3成分がGVIAの受容体であることを示し、したがって、これらの成分がおそらく脳Caチャンネルの成分であることを示唆する。人間の赤血球膜の光親和標識では、特異的な標識は観察されなかった。それゆえ、赤血球の膜には GVIA 感受性のCaチャンネルは存在しないものと考えられる。

Key word：ω-conotoxin, Ca channel, photoaffinity labeling

神経系の電位依存性Caチャンネルを通じてのCa^{2+}の流入は、神経細胞内の遊離のCa^{2+}濃度を瞬時に上昇させ、神経伝達物質の放出、スパイクの発生、カルモデュリンを介する多くの反応などを導く。したがって、Caチャンネルの活性の制御は神経細胞の機能にとってきわめて重要である。従来、Caチャンネル分子の研究は、主としてジヒドロピリジン系薬剤を用いて行なわれて来たが、最近の研究によって、神経系には、ジヒドロピリジン感受性のCaチャンネル（L型）の他に、非感受性のN型およびT型の Ca チャンネルが存在することが知られている（1）。アンボイナ貝(Conus geographus)の産生する神経毒ペプチド、ω－conotoxin GVIA（GVIA）は、N型およびL型を阻害し、T型にはほとんど作用しない（2,3）。我々は、すでに、^{125}I－GVIAが、ラット脳シナプス膜において、ジヒドロピリジン、ジルチアゼム、ベラパミル等の薬剤とは異なる部位に特異的に結合することを示した（4）。したがって、GVIAはジヒドロピリジンとならんで、神経系の Ca チャンネルを研究する上で、有用である。今回、^{125}I－GVIAのアジドベンゾイル誘導体(ANB-^{125}I-GVIA)を用いて、ラット脳シナプス膜のGVIA受容体（おそらくCaチャンネル成分）の光親和標識を試みた。

［実験方法］

^{125}I－GVIAを0.1%ウシ血清アルブミン(BSA) 存在下で、N-5-アジド-2- ニトロベンゾイルオキシスクシニイミド(ANB-NOS) と、0.1 M $NaHCO_3$緩衝液(pH 9.0)中で、室温 4時間、暗闇で反応させ、0.1% BSAを含む20 mM Hepes-NaOH、pH 7.5で希釈した。この希釈液に250-500 μgの蛋白質を含むシナプス膜分画を加え、4°C で90分間

反応させた。20 mM Hepes-NaOH-0.2M NaCl-0.1% BSA、pH 7.5を加えた後、未結合の ANB-^{125}I-GVIA を遠心で除去した。沈殿を少量の同溶液に懸濁し、5 cmの距離から、波長 350 nm の光を15分間照射し、BSA を遠心除去後、SDS 電気泳動を行い、オートラジオグラフィーでバンドを検出した。非特異的標識は、1 μMのGVIAの存在下で求めた。P_2 分画（粗ミトコンドリア分画）は、ラット脳の10% ホモジェネート(0.32 M sucrose/5 mM Hepes/5 mM EDTA/1 mM iodoacetamide/0.1 mM PMSF/1 μM pepstatin A/2 μM leupeptin, pH 7.4) を1,000 g で10分遠心後の上清を1.5 x 10^4 g、30分遠心して得られた沈殿を 1度洗って、同じ溶液に懸濁して直ちに用いた。^{125}I－GVIAおよびANB-^{125}I-GVIAのシナプス膜への特異的結合は既報 (4)の方法によって測定した。

［結果と考察］

ANB-NOS とBSA + ^{125}I－GVIAの反応性アミノ基のモル比が 0.5－1.0 の間で、特異的標識には差がなく、モル比が大きくなる程、非特異的標識が増加した。このため、モル比 0.5を用いた。図1 に示す様に、ANB-^{125}I-GVIAのシナプス膜からの解離は、^{125}I－GVIAのそれと同様に (4)、きわめて遅い。光照射した場合の解離は、調べた全時点で、光照射しないサンプルの 50－60% であった。光照射自身は、^{125}I－GVIAの解離には影響しないので、図1 の結果は、シナプス膜に特異的に結合した ANB-^{125}I-GVIAの 40－50% が光照射によって、膜に共有結合されたことを示している。図2 に示される様に、分子量約310 kDa および230 kDa の成分が、光標識される主成分であった。これらの成分の光標識は、1 μMのGVIAの存在下では全く観察されないので、GVIAを特異的に結合している成分を反映しているものと考えられる。また、これらの他に、37 kDa のバンドも弱いながら特異的に標識された。1分子当たり 1分子のGVIAが結合すると仮定すると、この成分の分子量は34 kDaとなる。これら 3成分の光親和標識は、^{125}I－GVIAおよび ANB-^{125}I-GVIAのシナプス膜への特異的結合と同様に、低濃度の Ca^{2+}, Cd^{2+}あるいはLa^{3+}などの金属イオン、ω－conotoxin GVIIA およびGVIIB（同じアンボイナ貝が産生するCaチャンネル毒素でGVIAとはアミノ酸配列がかなり異なる）によって抑制され、ジヒドロピリジン、ベラパミル、ジルチアゼム等の薬剤によって影響されない（図 2）。シナプス膜はプロテアーゼ阻害剤の非存在下で長時間かかって調製されてい

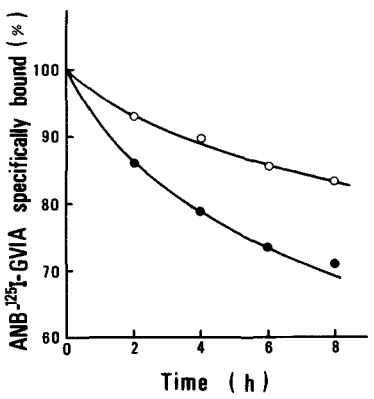


図 1 ANB-^{125}I-GVIAのシナプス膜からの解離に対する光照射の効果
シナプス膜を1 nMのANB-^{125}I-GVIAとインキュベートし、未結合ANB-^{125}I-GVIAを遠心除去後、光照射 (○)、あるいは暗闇に保持した (●)。その後 1 μM のGVIAを加えて、解離を 4°Cで測定した。

るので、上記の標識3成分も分解産物である可能性がある。これをチェックするため各種プロテアーゼ阻害剤存在下で短時間で調製したラット脳P_2分画の光親和標識を行なった。その結果、シナプス膜にみられた3成分が特異的に標識された。したがって、これら3成分はおそらくプロテアーゼによる分解産物ではないと考えられる。

表1に示す様に、細胞下分画における$ANB\text{-}^{125}I\text{-}GVIA$の特異的結合は、$^{125}I-GVIA$のそれとよく一致して、Fraction 1（主としてミエリン）あるいはFraction 3（主としてミトコンドリア）に比較して、Fraction 2（主としてシナプス形質膜）に圧倒的に多かった。各分画の光親和標識を行なうと、Fraction 2のみが上記の3成分の特異的標識を示し、他の分画では、調べた露出時間内に、特異的標識は全くみられなかった。

以上の結果は、$ANB\text{-}^{125}I\text{-}GVIA$による光親和標識が$^{125}I\text{-}GVIA$の特異的結合とよく一致していることを示す。したがって、上記の3成分はGVIAの受容体であると考えられる。これら3成分が複合体を形成しているか否かは不明である。

人間の赤血球のゴーストには$^{125}I\text{-}GVIA$および$ANB\text{-}^{125}I\text{-}GVIA$の特異的結合は有意に存在せず、光親和標識も全く観察されなかった。このことは赤血球膜にはGVIA感受性のCaチャンネルが存在しないことを示すものと考えられる。

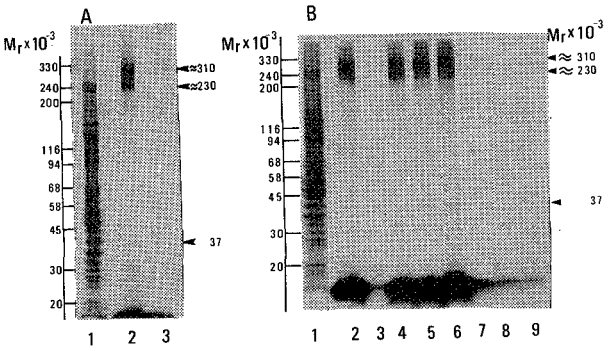


図2 標識成分のSDS-PAGEによる解析
シナプス膜を1 nMの$ANB\text{-}^{125}I\text{-}GVIA$とインキュベート後、光照射した。(A),(B)ともlane 1, CBB染色；lane 2, 非標識GVIAの非存在下；lane 3, 1 μM非標識GVIA存在下のオートラジオグラフ。(B) 諸物質の影響。lane 4-6, それぞれ40 μMのニトレンジピン、ベラパミルおよびジルチアゼム；lane 7, 1 mM $CaCl_2$；lane 8, 1 μM GVIIA; lane 9, 1μM GVIIB。

表1 細胞下分画における分布

Fraction	Sucrose (% w/w)	Relative specific binding $^{125}I\text{-}GVIA$	Relative specific binding $ANB\text{-}^{125}I\text{-}GVIA$
		%	
1	10	10.9 ± 2.4	7.8 ± 2.1
2	28.5	100.0 ± 11.8	100.0 ± 13.3
3	34	16.9 ± 4.3	13.3 ± 5.0

ラット脳P_2分画を低張処理してJones & Matusの方法(5)にしたがって分画した。Fraction 2の値を100%として示してある。

[文献]

1) Nowycky, M.C. et al., Nature 316, 440 (1985)
2) Kasai, H. et al., Neurosci. Res. 4, 228 (1987)
3) McCleskey, E.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4327 (1987)
4) Abe, T. et al., Neurosci. Lett. 71, 203 (1986)
5) Jones, D.H. & Matus, A.I., Biochim. Biophys. Acta 356, 276 (1974)

123. 家兎骨格筋ジヒドロピリジン感受性Caチャンネルのサブユニット構造

高橋正身*・Seagar M. J.・Jones J. F.・
Reber B. F. X.・Catterall W. A.
（ワシントン大・薬理，三菱化成生命研*）

〔要　約〕
家兎骨格筋 T 管膜から精製したジヒドロピリジン感受性の Ca チャンネルはα(分子量167,000)、β(同 54,000) 及びγ(同 30,000) のサブユニットから成り立っていると報告されていた。しかし、-S-S- 結合を切断するとα成分は二つの異なるポリペプチド(α_1及びα_2)に分離し、さらに新たな分子量 24,000～27,000 の成分δが見いだされた。α_1にはジヒドロピリジン結合部位や cAMP 依存性プロテインキナーゼによってリン酸化を受ける部位があり、かつ疎水性に富んだ構造を多く持っている。α_2は N-グリコシド結合で結びつけられた糖鎖を分子量の約 25% 含んでいるが、α_1に特徴的な性質は何も持っていない。α_2は糖蛋白であるδと -S-S- 結合で結びついている。βは cAMP 依存性のキナーゼによってリン酸化を受けるが糖蛋白ではなく、また疎水性部分に乏しい構造をしている。γは分子量の約 30% が糖鎖の糖蛋白で疎水性部分に富んでいる。α_1に特異的な抗体やα_2に特異的に結合するレンチルレクチンを用いて各サブユニットの会合状態を調べると、ジヒドロピリジン結合能が保たれているジギトニンや CHAPS 中では$\alpha_1\alpha_2\beta\gamma\delta$は一つの複合体として存在するが、ジヒドロピリジン結合能を失うトライトン X-100 中では$\alpha_2\delta$は$\alpha_1\beta\gamma$複合体から解離していた。これらの知見を基に骨格筋 Ca チャンネル構造のモデルを提出した。
Key word：calcium antagonists/protein phosphorylation/glycoproteins

ジヒドロピリジン感受性の Ca チャンネルは哺乳類骨格筋からほぼ均一なまでに精製され[1]、精製した標品を人工膜上に組み込むとジヒドロピリジン感受性の Ca チャンネル機能が再構成されることや、サブユニットがリン酸化を受けるとチャンネル開口の確率が増加することなどが報告されている[2,3]。当初の報告では骨格筋 Ca チャンネルはα、β、γの三種のサブユニット構造を持っていると結論されていたが、今回我々はαと呼ばれていた成分が二つの異なる成分の混合物であることを見いだした[4]。

【実験方法】 T 管膜、Ca チャンネルは家兎骨格筋から精製した[1]。SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemli の方法に従い 20mM NEM 或は 20mM DTT 存在下で行った。

【結果と考察】 精製した Ca チャンネルを SDS-PAGE で分析するとアルキル化条件下では図1-1 に示す様にα、β、γの三成分が認められたが、-S-S- 結合を DTT 処理によって切断するとαは分子量 175,000 のα_1及び 143,000 のα_2の二成分に分離した（図1-2)。α_1とα_2は免疫学的に区別され、精製した Ca チャンネルで免疫したマウスから得た抗血清 PAC-10 はニトロセルロース膜上に移した各成分のうちα_1のみを特異的に認識した（図1-3)。可溶化したシヒドロピリジン感受性 Ca チャンネルは種々のレクチンに結合するのでレクチンカラムはその精製のための有力な手段となっている。^{125}I で標識した ConA や wheat germ agglutinin (WGA) がどの成分に結合するかを調べると 図1-4 に示す様に ConA はα_2のみに、図1-5 に示す様に WGA はα_2、γ及びδに結合した

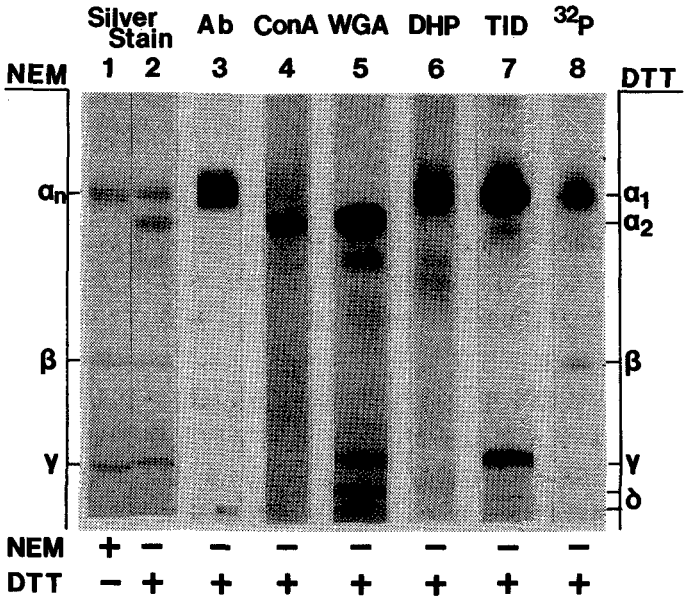


図1　種々の選択的試薬による Ca チャンネル各サブユニットの識別。
精製した Ca チャンネルを SDS-PAGE で分離した後、
1 及び 2、銀染色；3、抗体；4、^{125}I-ConA；5、^{125}I-WGA；6、^{3}H-アジドピン；7、^{125}I-TID；8、リン酸化で標識した
1 は NEM 存在下、2～8 は DTT 存在下。

が、α_1 及び β にはどちらのレクチンも結合しなかった。ニューラミダーゼとエンドグリコシダーゼ F を用いて糖鎖を除去すると α_2 及び γ の分子量はそれぞれ 105,000 及び 20,000 に減少したが、α_1、β の分子量には変化がみられなかった。従って蛋白部分のみの分子量を比較した場合 α_1 と α_2 の間には 70,000 もの差が存在することになる。ジヒドロピリジン結合部位がどの成分上にあるかを調べるため、光反応性の誘導体である

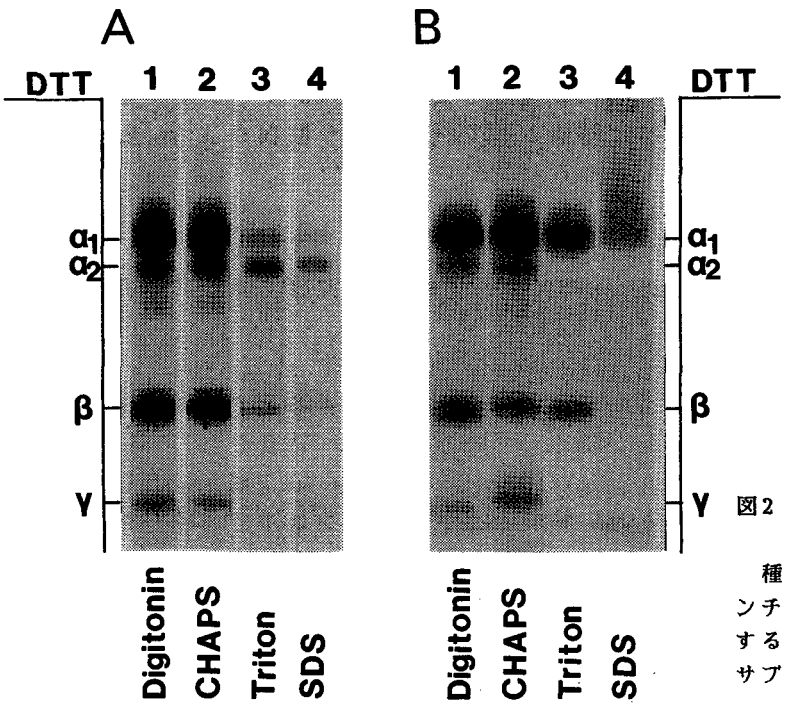


図2　Ca チャンネルサブユニットの会合。
種々の界面活性剤存在下で　A、レンチルレクチン、B、抗 α_1 抗体に結合する ^{125}I で標識した Ca チャンネルサブユニットを SDS-PAGE で分析した

アジドピンで標識すると 図1-6 に示す様に α_1 のみが特異的に標識された。イオンチャンネルを形成する蛋白質には脂質膜をつらぬく疎水性に富んだ部分が多く存在するので疎水性部分に選択的に取り込まれる TID 試薬で、その部分が特異的に標識される。図1-7 に示す様に各成分のうち α_1 及び γ が TID 試薬で著しく標識され α_2 はわずかにしか、また β はほとんど標識されなかった。骨格筋Ca チャンネルの機能は cAMP 依存性のプロテインキナーゼによるリン酸化によって調節を受けているが、図1-8 に示す様に二種の α 成分のうちリン酸化を受けるのは α_1 のみで α_2 はリン酸化されなかった。以上の様に α_1 と α_2 は多くの点で異なる性質を持っているが α_1 はイオンチャンネル形成に必要な疎水性部分に富んでいる他、ジヒドロピリジン結合部位、リン酸化部位も持っているので α_1 が Ca チャンネルの主要な部分を構成していると推察された。

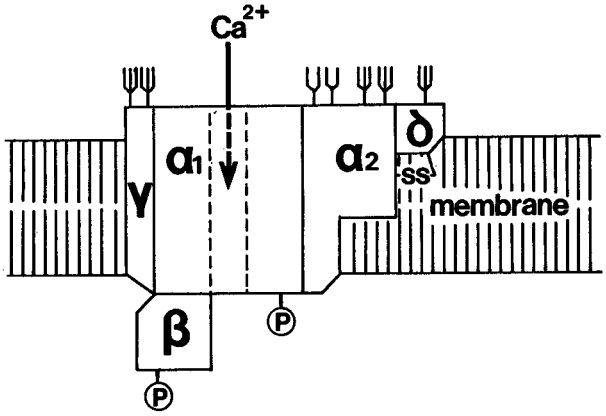


図3 骨格筋 Ca チャンネルの構造モデル。
Ψ Ψ は糖鎖を Ⓟ はリン酸化部位を表す。

各成分の会合状態を調べるため ConA と同じ結合特異性を持つレンチルレクチン及び α_1 に特異的な抗体を用いて以下の実験を行った（図2)。Ca チャンネルを ^{125}I で標識し種々の界面活性剤存在下でレンチルレクチンに特異的に結合する成分を SDS-PAGE で調べるとジヒドロピリジン結合活性が保たれるジギトニンや CHAPS 中では全ての成分がレンチルレクチンに結合したが（図2A-1、2) Ca チャンネルをあらかじめ 1% SDS、100℃ で処理しサブユニットを解離させておいた場合には α_2 のみが結合した（図2A-4)。まだジヒドロピリジン結合活性が失われるトライトン X-100 中でも α_2 のみが結合した（図2A-3)。一方 α_1 特異抗体を用いて免疫沈降を行うとジギトニンや CHAPS 中では全ての成分が沈降するのに対し（図2B-1、2) トライトン中では α_1、β 及び一部の γ のみが（図2b-3)、SDS で前処理した場合には α_1 のみが（図2B-4) それぞれ沈降した。これらの結果はジギトニンや CHAPS 中では $\alpha_1\alpha_2\beta\gamma$ の全ての成分が会合して複合体を形成していることを示している。さらにジヒドロピリジン結合活性そしておそらくは Ca チャンネル機能の発現にはこれらのサブユニット間の正常な相互作用が重要であることを示唆している。以上の様な成果を基に図3 の様な骨格筋 Ca チャンネル構造のモデルを提出した。

【文献】

1) Curtis, Catterall (1984) Biochemistry 23, 2113.
2) Curtis, Catterall (1986) Biochemistry 25, 3077.
3) Flockerzi et al. (1986) Nature 323, 66.
4) Takahashi et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press.

124. ラット線条体，海馬および血小板への(−)−〔^{3}H〕−desmethoxyverapamil 特異結合に対するカルシウムの影響

岡田英俊・盛政忠臣*・金行孝雄*・庄盛敏廉*
（岡山血液センター，岡山大・医・脳代謝研・病態生化*）

〔要　約〕

Ca entry blockers のうちの phenylalkylamine 誘導体のひとつである(-)-[3H]-desmethoxyverapamil(D888)を用いて，ラット線条体，海馬および血小板粗膜分画への競合阻害実験を 0.1 mM, 1 mM, 10 mM Ca2+ の 3 条件下で行った．

0.1 mM Ca2+ 存在下での(-)-[3H]D888の特異結合部位は線条体で [Ki]= 1.7 nM(12 % of total binding), 46 nM(58 %), 20,000 nM(18 %)の three sites に，海馬で[Ki]= 77 nM(66 %), 53,000 nM(33 %)のtwo sites に，血小板では [Ki]= 223 nM(50 %), 15,000 nM(33 %) の two sites に各々解析された．Ca2+ 濃度を 1 mM 以上に上昇させると，線条体および血小板では affinity site 数の減少が，海馬ではlow affinity site の結合分率(% of total binding)の増加が認められた．これらの変化に伴い各々の組織へ特異結合量(p moles/mg membrane protein)も 40-50 %に低下した．

以上のことより(-)-D888 でラベルされるカルシウムチャネルはカルシウムイオンによる活性制御を受けることが示唆された．また，カルシウムイオンにより異なった活性制御を受けるカルシウムチャネルのサブタイプの分布は脳と血小板という組織間のみならず脳部位間でさえ異なることが示された．

Key word :　rat brain, platelet, Ca^{++} channel

【 はじめに 】

カルシウムチャネルは，電位依存性と受容体作動性のカルシウムチャネルに大別されているが，主に骨格筋，心筋および平滑筋などの末梢神経系の知見に基づくものであり，中枢神経系をも含めた他の細胞組織系におけるカルシウムチャネルの細分化についての報告は少ない（１）．電位依存性カルシウムチャネルの阻害剤として開発されたカルシウム流入阻害剤(Ca entry blockers)は，受容体作動性カルシウムチャネルをも抑制することが示されており，カルシウムチャネルの性質を分子レベル で解明するために繁用されているがその活性制御機構についてはいまだ明らかではない．

本研究では，Ca entry blockers のうちの phenylalkylamine 誘導体のひとつである (-)-[3H]-desmethoxy-verapamilをリガンドとして用いラット脳線条体および海馬，さらに血小板における特異結合をCa2+の存在に注目しながら解析し，カルシウムチャネルの活性調節機構およびサブタイプに検討を加えた．

【 実験方法 】

ウィスター系雄性ラット（体重約 200 g）を麻酔後開腹し腹部下大静脈より採血（クエン酸添加）した後，直ちに液体窒素にて冷凍後断頭し全脳を摘出した．全血より遠心分離にて血小板を，全脳より凍結下パンチアウト（２）により線条体および海馬を得た．これらを20容量の50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)でホモジナイズした後，遠心分離(x15,000g,20min)により粗膜標品を得た．(-)-[3H]-desmethoxyverapamil (D888) の結合実験は，リガンド濃度を 1 nMとしてディスプレサーに(-)-D888(1×10^{-11}-5×10^{-5} M)を用いた場合の特異結合を triplicate にて測定した．反応条件は粗膜標品の蛋白量をbuffer(50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTAacid, pH 7.5)にて 20 μg/assay tubeに調整した後，Ca2+存在下(0.1 mM, 1 mM, 10 mM)にて 25 ℃, 60分間 incubate した．B/F分離は 0.3% polyethylene imineで前処置したWhatmann GF/Cフィルターを用いた吸引ろ過法により行った．

データの解析は，コンピュータを用いた非線形最小二乗法により行った．Two-site modelまたは three-site

model による解析は，その curve fitting が，統計学的に有意($p<0.0001$; F-test)な場合に行い，Ki(nM)および % of total binding (%) を算出した．

【 結果および考察 】

(-)-[3H]D888のラット脳線条体および海馬さらに血小板の粗膜標品への競合阻害実験を3種のカルシウムイオン条件下で行うことにより，各々の標品において特徴的なsingle site から three sites までの特異結合特性が示された(Table 1.)． 線条体では Ca2+ 0.1mM 存在下で Ki がそれぞれ 1.7 nM, 46 nM, 20,000 nMの three sites が存在するが 1 mM では Ki が 21 nM および 8,000 nM の two sites へと変化し，さらに 10 mM まで引き上げると high affinity site の Ki 値が約 4 倍増加し low affinity site の % of total binding が 26% から 17% へと減少した．海馬では two sites のみ解析され，1 mM 以上の Ca2+ で high affinity site の % of total binding が 66 % から 50 % へと減少し，low affinity site は 10 mM 以上の Ca2+ で Ki が増大し affinity の著しい低下が認められた．血小板でも two sites のみが解析され 0.1 mM と 1 mM Ca2+ 条件下では近似した displacement curve を示したが，10 mM Ca2+ では low affininy の single site へと変化した．これらの変化に伴い (-)-[3H]D888 特異結合量(pmol/mg membrane protein)は，Ca2+ 濃度が上昇するにつれ減少した(Fig. 1; 海馬と血小板のデータは省略)．これはカルシウムイオンと Ca entry blockers がカルシウムチャネルの共通の site を競合しているためと解釈されているが（3），カルシウムイオン濃度の上昇につれaffinity site 数の減少や Ki 値の右方移動が認められることから，カルシウムイオンがカルシウムチャネルの活性制御機構，臨界点の Ca2+ 濃度を指摘することはできないが，おそらくチャネルの open-close 機構に影響を与えている可能性を示唆するものであろう．

カルシウムチャネルは種々な組織において多様性をもつて存在していると考えられているが，その細分化については現在のところあまり成果が得られていない．(-)-D888の結合部位は，ウシ心筋では two affinity states

Table 1. Computer-assisted nonlinear regression analysis of calucium interaction with (-)-[3H]D888 binding sites in the rat striatal, hippocampal and platelet membranes.

Tissues	Ca2+	K1	K2	K3
Stria.	0.1	20,000±41,000(18±11%)	46±24(58±12%)	1.7±4.0(12±12%)
	1	8,000±6,000 (26±5%)	21±4 (54±3%)	
	10	7,000±14,000(17±8%)	75±28(52±8%)	
Hippo.	0.1	53,000±250,000(33±75%)	77±24(66±7%)	
	1	18,000±15,000 (38±9%)	51±12(49±4%)	
	10	180,000±1,000,000(82±365%)	84±22(50±4%)	
Plate.	0.1	15,000±17,000(33±8%)	223±74(50±8%)	
	1	13,000±7,000 (51±6%)	121±43(35±5%)	
	10	4,000±760 (61±4%)	Not detected	

Displacement study was performed over concentration range of $1x10^{-11}$-$5x10^{-6}$.Computer-assisted non-linear regression analysis of non-weighted least squaremethod was used to determine the Ki(K1,K2,K3: nM) values and % of total binding of each binding site in the parenthesis. Data are mean±SE values of triplicate assays.

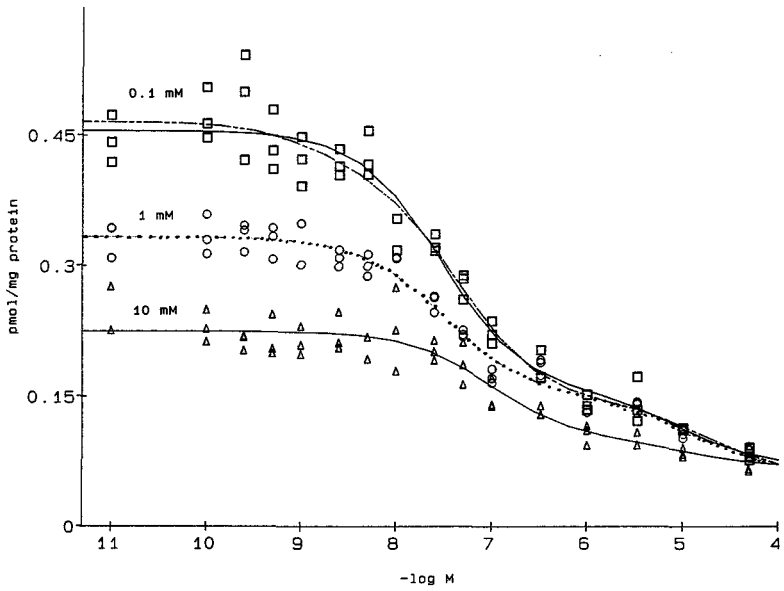


Fig.1 Calucium interaction with (-)-[3H]D888 binding in rat striatal membrane. Displacement of 1 nM (-)-[3H]D888 binding by (-)-D888 was observed in three calucium concentrations: 0.1 mM (□ : two-site or three-site model), 1 mM (○) and 10 mM (△). Fitting curves of computer-assisted non-linear regression analysis and each triplicate-assay points were shown.

で（3），ブタ骨格筋や海馬では single affinity state で（4，5）存在することが報告されている．今回の実験では結合実験をカルシウムイオン存在下で行うことによりラット線条体では two sitesと three sites が海馬では two sites が，さらに血小板で single sites と two sites が存在し，その affinity level は 線条体>海馬>血小板の順であることが解析できた．この様に脳と血小板という組織間のみならず，脳の部位間にさえカルシウムチャネルは多様性を示すことがわかった．

一方，今回用いた(-)-D888をも含めた phenylalkylamine 誘導体は，カルシウムチャネルのみならずα-adrenergic レセプター （1）や 5-HT2 レセプター（6）にも結合することが知られており，今後この観点からもカルシウムチャネルのサブタイプならびにそれらの制御機構を検討する必要があろう．

【 文献 】

1. Glossmann, H. et al (1985) Arzeimittelforschung 35, 1917-1935.
2. 盛政忠臣ら (1985) 神経化学 24, 118-120.
3. Ruth, P. et al (1985) Eur. J. Biochem. 150, 313-322.
4. Goll, A. et al (1984) FEBS Lett. 176, 371-377.
5. Ferry, D. R. et al (1984) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 327, 183-187.
6. Taylor, J. E., Defeudis, F. V. (1985) Eur. J. Pharmac. 106, 215-216.

125. ラット脳シナプトゾームにおけるK^+刺激による細胞内Ca^{2+}の濃度変化

岡田三津子*・美根和典**・岩崎克典・蔦原道弘
（福岡大・薬・応用薬理，北九州津屋崎病院・心療内科*・ 九州大・医・心療内科**）

〔要　約〕

ラット脳シナプトゾームの$[Ca^{2+}]_i$は30mM K^+刺激によって、3相性の上昇パターンを示した。このpeak timeは、それぞれ10、60、180sec.であった。このK^+刺激による$[Ca^{2+}]_i$の上昇は、Ca free溶液、および100μM La^{3+}によっていずれ相においても約90%抑制された。第1相における$[Ca^{2+}]_i$の上昇は、La^{3+}（20μM）およびacidosis（pH7.4 → 7.0,6.7）によって著明に抑制された。一方、第3相は、diltiazem（1-100μM）およびhypoxiaによって著明に抑制され、La^{3+}（20μM）およびacidosisでは全く影響をうけなかった。

以上の結果より、少なくとも第1相と第3相のK^+刺激による$[Ca^{2+}]_i$の上昇機序には違いがある事が判った。第3相目の$[Ca^{2+}]_i$の上昇にはCa^{2+}流入に続いて生じる、細胞内Ca貯蔵部位からのCa^{2+}放出も関与していると考えられる。

Key word：　synaptosomes,　calcium,　calcium channel blocker

細胞内のCa^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の上昇がexcitation-secretion couplingの引金になることはよく知られている[6]。従来、脱分極による$[Ca^{2+}]_i$上昇は、細胞外からのCa^{2+}流入によるものとされてきた[3]。しかしながら血管平滑筋収縮におけるCaの役割として、細胞内Ca貯蔵部位からのCa^{2+}の放出が関与しているという報告がある[2]。中枢神経において、この細胞内Ca貯蔵部位の関与の有無については未だ明かではない。そこで、我々は神経終末においてもCa貯蔵部位が$[Ca^{2+}]_i$上昇に関与しているかどうか検討した。

（方法、ならびに結果）　Wistar系雄性ラットの全脳シナプトゾームを調製し、Ashley & Whittakerらの方法[1]に従って、Ca^{2+}-indicator、Quin-2を負荷した。Quin-2を負荷したシナプトゾームを30mM K^+で刺激し、脱分極後の$[Ca^{2+}]_i$の変化を経時的に測定した。また$[Ca^{2+}]_i$の上昇に対するCa free溶液および種々のcalcium channel blockerの効果を検討した。20分間のhypoxiaおよびacidosis（pH 7.0,6.7）の効果も併せて検討した。

Fig.1は30mM K^+刺激によるラット脳シナプトゾームの$[Ca^{2+}]_i$の変化を示している。$[Ca^{2+}]_i$はK^+刺激後、10,60,180秒をpeak timeとした三相性の上昇パターンを呈した。

そこで各相の特性を検討する目的でK^+刺激

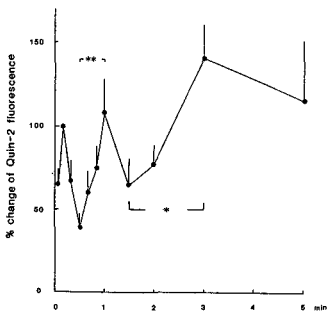


Fig.1 The change of Quin-2 fluorescence after high K^+ stimulation
* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

による［Ca^{2+}］$_i$の上昇に及ぼす各種calcium channel blockerの影響を調べた。なおK$^+$刺激は各々のcalcium channel blockerを3分間前処置した後に行った。その結果はFig.2に示すように、細胞外からのCa^{2+}流入を阻害するとされているLa^{3+}（20μM）は第1相だけを約50%有意に抑制した（$p<0.05$, vs. 5μM La^{3+}群）が、La^{3+}濃度を100μMに増加すると、いずれの相とも約50%抑制し、nifedipine、およびverapamil、diltiazemの1-10μMの濃度をそれぞれ3分間の前処置しても、いずれの相にも影響を与えなかった。しかし、diltiazemを100μMに増加すると、第2相および第3相の上昇をそれぞれ約50%および90%抑制した。

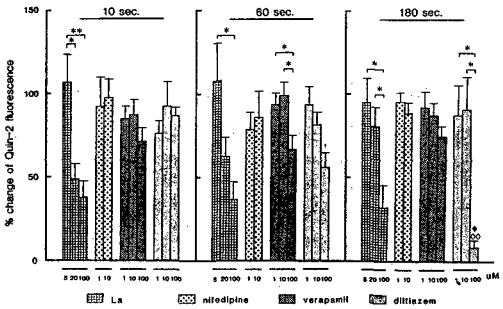


Fig.2 The effect of Ca^{2+} free medium and calcium channel blocker on the augmentation of $[Ca^{2+}]$ i induced by high K$^+$ stimuli (incubation time 3 minutes)

* p < 0.05, ** p < 0.01
\+ p < 0.05 (10sec. vs. 60 sec.)
◇◇ p < 0.01 (10sec. vs. 180 sec.)
◆ P < 0.05 (60sec. vs. 180 sec.)

次にcalcium channel blockerの前処置時間を20分に延長した場合、各々の相に如何なる影響を及ぼすか調べた。また、200μM EGTA付加により外液Ca free条件における変化とも比較検討した。その結果、Fig.3に示すように、nifedipine（1-10μM）は前処置時間を3分から20分に延長しても、［Ca^{2+}］$_i$の上昇を抑制することはなかったが、verapamilおよびdiltiazemはいずれの相においても顕著な抑制効果を示した。特に、diltiazem 1μMの用量では、第1相の［Ca^{2+}］$_i$の上昇をほとんど抑制することはなかったが、第2相と第3相における上昇を約40%抑制し、第1相と第3相には有意な差が認められた（$p<0.05$）。一方、Ca free溶液中では、K$^+$刺激による［Ca^{2+}］$_i$の上昇はいずれの相においても約90%以上の著明な抑制が認められた。

さらに、［Ca^{2+}］$_i$の上昇に及ぼすacidosis、及びhypoxiaの影響について調べた。その結果、Fig.4に示す様にincubation mediumのpHを7.4から7.0-6.7に下げる事によって第1相だけが特異的に抑制された。また20分間のhypoxiaによって［Ca^{2+}］$_i$の上昇はすべての相において抑制された。この抑制効果は特に第3相において顕著であった。

（考察） 30 mM K$^+$刺激による［Ca^{2+}］$_i$の上昇は、3相性のパターンを示した。この上昇はCa free溶液あるいは100μM La^{3+}の20分間前処置によってCa^{2+}流入を不可能にすると約90%抑制された。このことはK$^+$刺激による［Ca^{2+}］$_i$の上昇のほとんどはCa^{2+}の流入によるものであることをを示唆している。中でも、第1相は低濃度のLa^{3+}よって抑制されること、さらにこの相だけが膜電位に関係の深いpHの低下によって抑制された。第1相目の［Ca^{2+}］$_i$上昇は、他の相と比べて、主に細胞外からのCa^{2+}流入に依存するものであることが推定された。

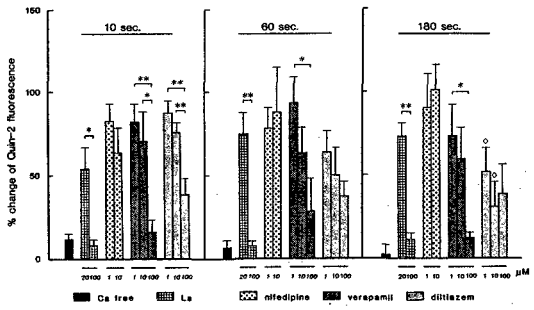


Fig.3 The effect of Ca^{2+} free medium and calcium channel blocker on the augmentation of $[Ca^{2+}]$ i induced by high K$^+$ stimuli (incubation time 20 minutes)

* p < 0.05, ** p < 0.01
◇ p < 0.05 (10sec. vs. 180 sec.)

一方、第3相目の$[Ca^{2+}]_i$上昇は、La^{3+}よりむしろdiltiazemによって強く抑制され、acidosisの影響は全くうけず、hypoxiaによって著しく抑制された。このことから、第1相と第3相における$[Ca^{2+}]_i$上昇の機序に違いがあることがわかった。

現在、神経終末には、2種以上の性質の異なったcalcium channelの存在が、知られている[7]。しかし、第3相目の$[Ca^{2+}]_i$上昇のpeak timeは、180秒とかなり遅いため、この$[Ca^{2+}]_i$の上昇はcalcium channelのactivationを直接反映したものではなく、その後に続いて生じる別の機構によるものだと考えられる。今回用いたcalcium channel blockerは細胞外からのCa^{2+}流入の他にミトコンドリアからのCa^{2+}放出を阻害する作用を有している。外液からのCa^{2+}の取り込み抑制作用が最も強いのが、nifedipineであり、続いて、verapamil＞diltiazemの順である[4]。これに対して、ミトコンドリアからのCa^{2+}放出の抑制作用の強さは、diltiazem ＞ verapamilの順であり、nifedipineにはこの作用は認められないことが知られている[5]。本実験の結果から、diltiazemが第3相目の$[Ca^{2+}]_i$上昇を最も著明に抑制すること、またこの抑制作用は前処置時間を延長することによってさらに増強することから、これらの薬物の作用点は細胞内にあるのではないかと思われた。$[Ca^{2+}]_i$の上昇がhypoxiaによって、第3相において特に強く抑制されることも、エネルギー代謝と密接に関連したミトコンドリアの関与を示唆するものであろう。

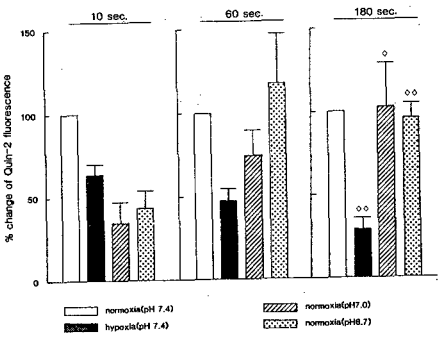


Fig.4 The effect of hypoxia and decreased pH on the augmentation of $[Ca^{2+}]_i$ induced by high K^+ stimuli

◇ $p < 0.05$, ◇◇ $p < 0.01$ (10sec. vs. 180 sec.)

以上、K^+刺激による$[Ca^{2+}]_i$の上昇は、calcium channelからのCa^{2+}の流入によるものだけでなく、その後に続く細胞内Ca貯蔵部位からのCa^{2+}放出も関与している可能性がある。

(reference)

1) Ashley,R.H.,Marchbanks,R.,Whittaker,V.P.,Biochem.J.,219,149-158(1984)

2) Kobayashi,S.,Kanaide,H.,Nakamura,M.,Science,229,553-556(1985)

3) Leslie,S.W.,Woodward,J.,Wilcox,R.E.,Brain Res.,325,99-105(1985)

4) Turner,T.J.,Goldin,S.M.,J.neuroscience,5,841-849(1985)

5) Vaghy,P.L.,Schwartz,A.Z.,J.Biol.Chem.,257,6000-6002(1982)

6) Yarom,M.,Zurgil,N.,Zisapel,N.,J.Biol.Chem.,260,16286-16293(1985)

7) Yarri,Y.,Hamon,B.,Lux,H.D.,Science,235,680-682(1987)

126. Triton 処理した粗シナプス膜分画に，Ca^{2+} 依存性に結合する蛋白質の精製

宮 本 美也子・田 中 敏 彦・岡 部 登志男・祖父江 憲 治
（大阪大・医・高次研・神経薬理生化）

〔要　約〕

神経系におけるCa^{2+}の役割を追究する目的で、シナプス膜にCa^{2+}依存性に結合する蛋白質の検索を行った。Triton処理したウシ大脳皮質粗シナプス膜分画に Ca^{2+}依存性に結合する68kDa，38kDa,32-34kDa,17kDa蛋白質を見い出した。17kDa蛋白質は、Ca^{2+}存否による電気泳動上の易動度の差異からカルモデュリンであることが同定された。68kDa及び32-34kDa蛋白質は、DEAE-セルロース・硫安分画・等電点沈澱・ブルーセファロースを用いて精製した。さらに、精製した68K蛋白質を^{125}Iでラベルし、Triton処理粗シナプス膜分画への結合性を検討した結果、最大３ μg/mg膜蛋白質が結合することが示された。

Key word：　calmodulin, Ca^{2+}-binding protein, synaptic membrane

［緒言］

神経伝達、神経軸索流をはじめとする神経機能に、Ca^{2+}が重要な役割を演じているこの、Ca^{2+}シグナルメディエーターとして、カルモデュリン以外にも一群のCa^{2+}結合蛋白質の存在が知られるようになり(3)、これらCa^{2+}結合蛋白質を介する細胞機能も次第に明らかになりつつある。今回、私たちは、ウシ大脳皮質粗シナプス膜分画へCa^{2+}依存性に結合する蛋白質を見い出し、次いで２種類の蛋白質を精製したので報告する。

［方法］

Ca^{2+}依存性シナプス膜結合蛋白質の精製：Ca^{2+}存在下でウシ大脳皮質より粗シナプス膜分画を調整し、さらにTriton処理した残査からEGTAにより抽出される蛋白質群を得た。この抽出液を、DEAEーセルロース・硫酸アンモニウムによる塩折・等電点沈澱・ブルーセファロースを用いて精製を行った。

Ca^{2+}依存性シナプス膜結合蛋白質とTriton処理粗シナプス膜との結合：^{125}Iでラベルした精製蛋白質とEGTAで充分洗った粗シナプス膜（Triton処理済）を25℃で20分間インキュベートした後、フィルター法により粗シナプス膜への結合量を測定した(10)。^{125}Iによる蛋白質ラベルはMarchalonisの方法に従った(6)。

［結果］

図１は、Ca^{2+}存在下でTriton処理し調整した粗シナプス膜分画を5 mM EGTAまたは1 mM $CaCl_2$を含む緩衝液[25 mM Tris･HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 mM DTT, 0.3 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5μg/ml leupeptin]で抽出し、SDSゲル電気泳動により抽出された蛋白質を分析した。検出された蛋白質のうち、Ca^{2+}依存

性に抽出されたものは分子量68kDa,38kDa,32-34kDa,17kDaの４種類の蛋白質であった。17kDa蛋白質はCa^{2+}存否による電気泳動上の易動度の差より、カルモデュリンであることが同定された。残りの３つの蛋白質は、カルモデュリンの存否にかかわりなく、Triton処理粗シナプス膜分画よりCa^{2+}依存性に抽出された。

上記３種類の蛋白質のなかでも量的に比較的豊富な 68kDaと32-34kDa蛋白質の精製を行った。Triton処理粗シナプス膜分画のEGTA抽出を、DEAE－セルロースカラムにより50-400 mM KCl濃度勾配溶出を行った。図２にその溶出パターンを示す。68kDa及び32-34kDa蛋白質の豊富な分画を集め、硫酸アンモニウム分画、さらに等電点沈澱を行った。68kDa蛋白質は沈澱分画、32-34kDa蛋白質は上清分画に回収された。沈澱分画はTris緩衝液にて抽出し、ブルーセファロースにより95 %以上の純度で精製された（図３，ａ）。32-34kDa蛋白質は透析により硫酸アンモニウムを除いた後、DEAE－セルロースにて再び分画した。しかし、この段階でも68kDa,36kDa,20kDaなどの蛋白質がわずかに混在していた（図３，ｂ）。

次に、精製した68kDa蛋白質のTriton処理粗シナプス膜分画への結合性を検討した（図４）。68kDa蛋白質はTriton処理粗シナプス膜分画にCa^{2+}存在下においてのみ濃度依存性に結合した。68kDa蛋白質の最大結合量は3μg/mg膜蛋白質であった。

［考察］

近年、副腎髄質(2)、小腸繊毛上皮(4)、砂ノウ平滑筋(8)、肝臓(11)、リンパ球(7)などよりカルモデュリンとは異なる新しいクラスのCa^{2+}結合蛋白質の存在が知られるようになってきた。この中で、32-36kDa蛋白質は$pp60^{src}$チロジンキナーゼあるいはEGF受容体キナーゼの基質となること(1,9)、またホスホリパーゼA_2阻害蛋白質であることなどが明らかになり(5)、signaltransductionにおける役割が注目されている。我々の精製した68kDa及び32-34kDa蛋白質が、他組織で見い出された67kDa蛋白質[砂ノウ平滑筋のcalcimedin(8),発電器官のcalelectrin(12),副腎髄質のchromobidin(2)]と同種のものであるかいなかは明かでなく、現在その免疫学的交叉性につき検討中である。また、従来上記Ca^{2+}結合蛋白質の作用点については、calpactin(36+10kDa蛋白質)がアクチンフィラメントとカルスペクチン（フォドリン又は非赤血球性スペクトリン様蛋白質）とCa^{2+}依存性に結合すること以外に標的蛋白質に関する報告は見られない(4)。今回、我々は68kDa蛋白質がTriton処理した粗シナプス膜分画にCa^{2+}依存性に結合することを見い出した。現在、Triton処理粗シナプス膜における68kDa蛋白質の標的の同定を検討中である。

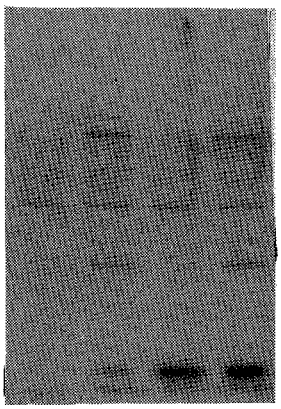


図１　Triton処理粗シナプス膜分画抽出液のSDSゲル電気泳動像
Triton処理した粗シナプス膜分画を1 mM $CaCl_2$(a), 5 mM EGTA(b), $CaCl_2$+CaM(c)あるいは EGTA+CaM(d)を含む緩衝液でホモジナイズし、105,000 xg, 30分間遠心して抽出液を得た。

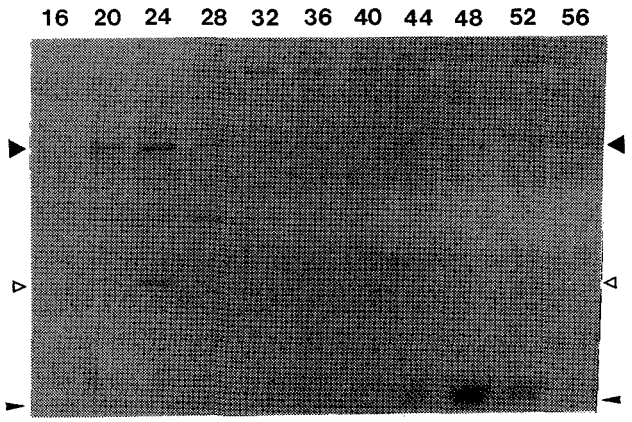


図2　DEAE-セルロースカラムの溶出パターン
(12.5% SDSゲル電気泳動像，数字はフラクション番号を示す)
▶,68kDa蛋白質　▷,32-34kDa蛋白質　►,calmodulin

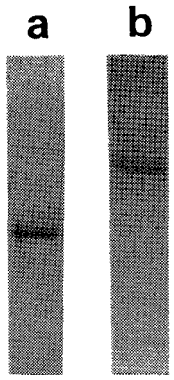


図3　68kDa蛋白質(a)および
32-34kDa蛋白質(b)の精製
(a,9%　b,12.5% SDSゲル

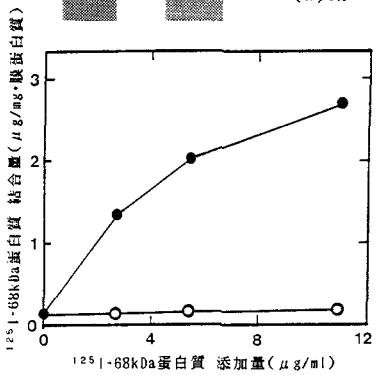


図4　フィルター法による^{125}I-68kDa蛋白質と
Triton処理シナプス膜分画との結合
●−● 1 mM $CaCl_2$　○−○ 5 mM EGTA

1) Erickson, E., Shealy, D.J. and Erickson, R.L. (1981) J.Biol.Chem. 256, 11381-11384
2) Geisow, M.J., Childs, J., Dash, B., Harris, A., Panayotu, G., Sudhof, T. and Walker, J.H. (1984) EMBO J. 3, 2969-2974
3) Geisow, M.J. and Walker, J.H. (1986) Trends in Biochem. Sci. 11, 420-422
4) Gerke, V. and Weber, K. (1984) EMBO J. 3, 227-233
5) Huang, K., Wallner, B.P., Mattallano, R.J., Tizard,R., Burne,C.,Frey,A., Hession, C., McGray, P., Sinclair, L.K., Chow, E.P., Browning, J.L., Ramachandran, K.L., Tang, J., Smart, J.E. and Pepinsky, R.B. (1986) Cell 46, 191-199
6) Marchalonis, J.J. (1969) Biochem. J. 113, 299-305
7) Mathew, J.K., Krolak, J.M. and Dedman, J.R. (1986) J. Cell Biochem. 32, 223-234
8) Moore, P.B. and Dedman, J.R. (1982) J. Biol. Chem. 257, 9663-9667
9) Radke, K. and Martin, G.S.(1979) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 5212-5216
10) Sobue, K., Muramoto, Y., Yamazaki, R. and Kakiuchi, S. (1979) FEBS Lett. 105, 105-109
11) Sudhof, T.C., Ebbecke, M., Walker, J.H., Fritsche, U. and Bousted, C. (1984) Biochemistry 23, 1103-1105
12) Walker, J. H. (1982) J. Neurochem. 39, 815-823

127. PC12およびPC12D細胞のプロテオグリカンの解析

仙波 りつ子・大平 敦彦*・佐野 護**・
北島 哲子**・柏俣 重夫
（愛知県コロニー研・周生期，発生*，形態**）

〔要 約〕

我々の確立したPC12D細胞はNGF，cAMP上昇試薬いずれにも反応し，突起形成の開始が早く、細胞形態は偏平である。この偏平な細胞形態に着目し、細胞の形態変化や接着に関与すると言われる細胞表層物質の一つ，プロテオグリカン（PG）の糖鎖部分（GAG）の分析を行ったところ、細胞層のGAG含量がコンドロイチン硫酸（CS），ヘパラン硫酸（HS）ともに通常のPC12細胞の約2倍であった。そこで，次に両細胞のPGの性質を比較検討した。細胞層にはHS-PG，CS-PGがあり、Sepharose CL-6Bによるそれらの分子サイズは両細胞で変化がなかった（Kav=約0.4と0.44）。一方，培養液中には二種類の大きさの異なるCS-PGがあり、大きい方はSepharose CL-6BでKav=0.33と両細胞で同じであったが、もう一つは、Sephadex G-200でKav=0.21（PC12），Kav=0.33（PC12D）と後者で小さかった。細胞層のCS-PGのGAGは15K，HS-PGのそれは10K-12Kであったが、両細胞間で有意差はなかった。これに対し，培養液中の二種類のCS-PGのGAGはPC12D細胞でいずれも小さかった。細胞層，培養液のCSは圧倒的にCS-4Sが多かった。この結果はPC12，PC12D細胞ではGAGの量的差異のみならず、培養液中のCS-PG、CSの構造に差異がみられ、細胞分化に伴いプロテオグリカンの性質に変化が起きていることを示唆している。

Key word： PC12 Cells, Proteoglycan, Glycosaminoglycan

我々は、昨年の本大会で神経成長因子（NGF），cAMP上昇試薬に反応して神経様突起を形成するラット副腎髄質クロマフィン細胞由来のPC12細胞の亜株，PC12D細胞について報告した（2）。PC12D細胞は次の点で通常のPC12細胞と異なっている。1）PC12D細胞はcAMP上昇試薬でも突起を形成をする。2）NGF、cAMP上昇試薬添加後の突起形成の開始が早い。3）細胞形態が偏平である。これらの諸性質は，通常のPC12細胞をあらかじめNGFで処理（priming）した細胞の性質に近く，PC12D細胞はやや分化の進んだ細胞と考えられた。ところで、一般に丸い細胞から偏平な細胞への形態変化には細胞表層物質の変化が伴うと言われる。また、細胞の分化過程で細胞表層物質の質的、量的変化があることは大いに予想できることである。そこで、丸い細胞形態を持つ通常のPC12細胞と偏平な形態を持つPC12D細胞を用いて、細胞の形態，接着性に深く関与すると言われる細胞表層物質の一つ、プロテオグリカン（PG）の分析を試みたところ、糖鎖部分であるグリコサミノグリカン（GAG）がPC12D細胞で約2倍高いことが明らかになった（8）。次にこれらの細胞を用いてPGの解析を行ったので報告する。

＜実験方法＞

PC12細胞はダルベッコ改変培地に10%馬血清（HS），5%牛胎児血清（FCS）の存在下で、PC12D細胞は5%FCS、5μg/mlインシュリン存在下で増殖させ、実験は5%HS，10%FCS存在下で行った。培養48時間後に［^{35}S］無機硫酸を添加し，さらに48時間培養した。細胞層、培養液のPGの抽出、粗分画は大平らの方法に従った（7）。粗PGを尿素存在下でDEAEセルロースカラムにかけ、得られたPG分画はセファデックスG-200，セファロースCL-6Bで分子ふるいを行った。これらの過程にはプロテアーゼ阻害剤として1mM N-

エチルマレイミド、2mM EDTA、0.2mM フェニルメタンスルホニルフルオリドを常時用いた。糖鎖の長さの決定にはPGをプロナーゼ、0.4M NaOHで処理した標品を用いた。

<結果>

SDSで可溶化した高分子画分をDEAEカラムにかけ，[^{35}S]でPGの溶出位置を調べた。[^{35}S]は大きく分けて、未吸着画分、0.25M NaCl,0.4M NaCl付近の3つの位置に溶出されたが、PGは最も塩濃度の高い画分に回収された。培養液、細胞層ともにPC12細胞と、PC12D細胞では溶出パターンに質的な差異はほとんどみられなかったが、培養液のPGは細胞層のそれに比して低硫酸化している傾向がみられた。図1はDEAEから溶出された培養液のPG画分をセファデックスG-200で分子ふるいをしたものである。PGは少なくとも二種類の大きさに分かれ、プロナーゼ、アルカリでその分子量が小さくなること、コンドロイチナーゼ（CHase）消化によりカラムのtotal volume (Vt)に溶出されることから、いずれもコンドロイチン硫酸（CS）のPGであることが分かった。大きい方のCS-PGはセファロースCL-6BでPC12，PC12D細胞ともKav=0.33と同じ位置に溶出されたが、小さい方のCS-PGはセファデックスG-200での溶出位置がPC12細胞でKav=0.21、PC12D細胞でKav=0.33とPC12D細胞でかなり小さかった。一方、細胞層のPG（図2）にはヘパラン硫酸（HS）のPG,CS-PGがあることがGAGの解析（8）から予想されていたので、DEAEから溶出されたPG画分をそれぞれ、CHase、ヘパリチナーゼ（HSase）処理した後セファロースCL-6Bカラムにかけた。PC12,PC12D細胞とも未処理のPGはKav=0.4付近に、HS-PGはKav=0.39-0.42、CS-PGはKav=0.44に溶出され、全く差がなかった。HS-PG、CS-PGはともに未処理のPGと溶出位置が近似していることから、二種類の

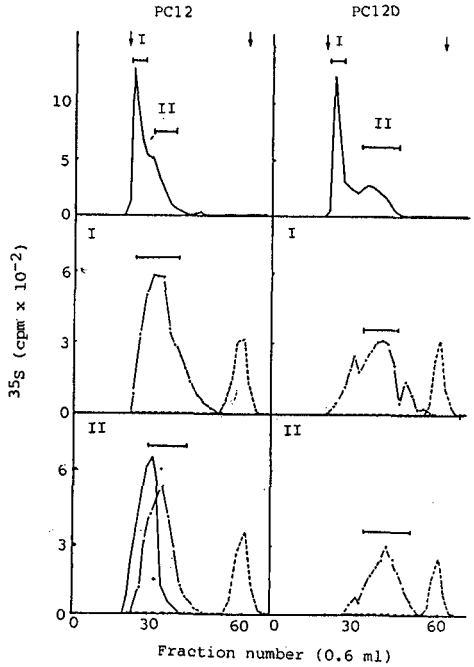


Fig. 1 Sephadex G-200 gel filtration of partially purified sulfated materials in the medium from PC12 and PC12D cells. —— no treatment, –·– pronase and alkaline digestion, --- CHase treatment

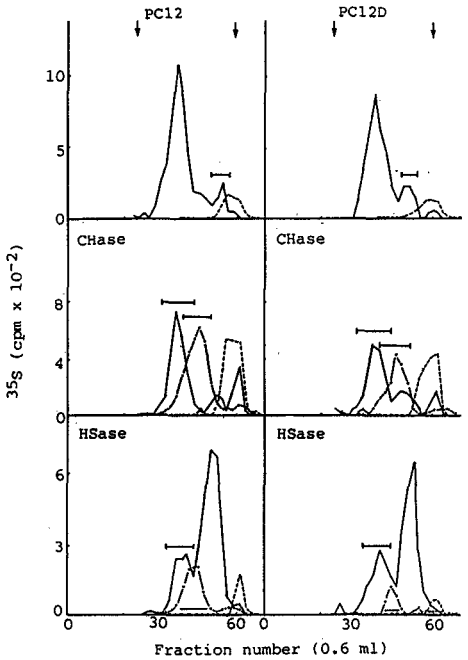


Fig. 2 Sepharose CL-6B gel filtration of partially purified sulfated materials from PC12 and PC12D cells. —— no, CHase or HSase treatment, –·– pronase and alkaline digestion, --- CHase or HSase and $NaNO_2$ treatment

PGが存在することが明らかになった。これらのPGはいずれもプロナーゼ、アルカリ処理で分子サイズの小さい位置に溶出され、HSase, $NaNO_2$、あるいはCHase処理でさらにVt近くに溶出されるようになることから、HS-PG、CS-PGであることが確認された。またHS-PGとCS-PGの含量はPC12細胞で5:2、PC12D細胞で8:1とGAGの分析結果と非常によく一致した。表1はPG、およびGAGの分子サイズをまとめたものである。細胞層のHS-PG、CS-PGのGAGはそれぞれ10-12K, 15Kと、両細胞でほとんど同じであったが、培養液中のCS-PGのGAGは、PC12細胞で24K、18K、PC12D細胞で12K, 9Kといずれの CS-PGについても小さかった。CSには4および6の位置で硫酸化されるものがある。表2にそれらの量比を示した。培養液、細胞層ともに圧倒的にCS-4S多いが、PC12D細胞ではCS-6Sの含量がややPC12細胞に比べ多いことが明らかになった。

Table I. Apparent molecular sizes of proteoglycans (PG) and their glycosaminoglycan moieties (GAG) synthesized by PC12 and PC12D cells.

		Kav			
		PC12		PC12D	
Cells (CL-6B)		HS	CS	HS	CS
	PG	0.39	0.44	0.42	0.44
	GAG	0.61	0.56	0.64	0.56
		(12000)	(15000)	(10000)	(15000)
Medium (G-200)					
I	PG	-	void (0.33*)	-	void (0.33*)
	GAG	-	0.23		0.49
			(24000)	-	(11000)
II	PG	-	0.21		0.33
	GAG	-	0.30		0.55
			(18000)		(9000)

The values in parentheses indicate apparent molecular weights. *,Sepharose CL-6B.

Table II. Relative contents of chondroitin 4- and 6-sulfate units sulfates sythesized by PC12 and PC12D cells.

		6-sulfate	4-sulfate
Cells			
PC12		< 2	98
PC12D		13	87
Medium			
PC12	I	< 3	97
	II	< 3	97
PC12D	I	6	94
	II	8	92

＜考察＞

神経のプロテオグリカンに関する報告はまだ少ないが（1, 3, 4, 5）、ラット脳のCS-PGにはセファロースCL-6Bを通過する大きさの分子からKav=0.3付近に溶出される小さい分子まで数種類あることが報告されている（6）。PC12細胞のCS-PGの分子サイズは細胞層、培養液いずれも脳の小さい方のCS-PGに近いか、あるいはそれよりも小さかった。脳における解析はいずれにしても、神経およびグリア細胞由来のPGの混合物の結果であり、神経細胞とグリア細胞のPGの分子サイズが異なる可能性も大いに考えられる。この点については今後の問題である。PC12, PC12D細胞GAGの分析結果（6）およびPGの性質の解析結果は、培養液中に放出されるCS-PGが質的、量的に異なり、細胞層の保持するPGが量的に異なることを示しており、PC12D細胞の形態が偏平であることの一部は細胞表層のプロテオグリカンの変化によって説明できると思われる。またPC12D細胞がNGFでprimingしたPC12細胞に近いことを考えればPC12細胞の分化に伴いPGあるいはGAGの質的、量的変化が起こりうる可能性を示唆している。

＜文献＞

1. Aquino, D.A., Margolis, R.U., and Margolis, R.K. (1984) J. Cell. Biol., 99, 1130-1139.
2. Katoh-Semba, R., Kitajima, S., Yamazaki, Y., and Sano, S. (1987) J. Neurosci. Res., 17, 36-44.
3. Klinger, M.M., Margolis, R.U., and Margolis, R.K. (1985) J. biol. Chem., 260, 4082-4090.
4. Margolis, R.K., Salton, S.R.J., and Margolis, R.U. (1983) J. biol. Chem. 258, 4110-4117.
5. Matthew, W.D., Greenspan, R.J., Lander, A.D., and Reihardt, R.F. (1985) J. Neurosci., 5 1842-1850.
6. 大平敦彦（1987）脳、「器官形成ー基礎と応用」、器官形成研究編、培風館、印刷中
7. Oohira, A., Wight, T.N., and Bornstein, P. (1983) J. biol. Chem., 258, 2014-2021.
8. 仙波りつ子、大平敦彦、佐野譲、渡辺貴美、北島哲子、柏俣重夫（1987）生化学、59巻、8号

128. ラット神経細胞の初代培養における突起形成と糖脂質との関連

小木曽　学・大田昌子・平野修助・野口鉄也
（東邦大・医・第二生理）

〔要　約〕

ラット胎仔の大脳皮質細胞を無血清培地により初代培養を行ない、神経細胞の突起形成における糖脂質および細胞骨格蛋白質の役割について生化学的に追究した。この培養系に細胞骨格毒であるコルヒチンを添加し、突起形成を阻害するとともに糖脂質、細胞骨格成分を対照と比較検討した。糖脂質は DEAE-セファデックスカラムにより中性と酸性分画に分離し、それぞれを検討した。中性分画ではコルヒチンによる突起形成阻害に伴う脂質の量的、質的変化は認められなかった。ガングリオシドを主成分とする酸性分画では、特に GD1a ガングリオシドが減少し、レゾルシノール－塩酸試薬に黄色の発色を呈する成分が突起形成阻害とともに増加した。一方、細胞骨格蛋白質についてはチューブリンの微小管への重合阻害、微小管からの脱重合がコルヒチン処理により引き起こされたが、同時にチューブリンの合成阻害も生じている可能性が示唆された。

Key word：　primary culture, gangliosides, colchicine.

神経細胞の神経突起および成長円錐の形成における細胞骨格と膜表面の糖脂質との関連について、無血清培地を用いた初代培養系で再検討を行なった。細胞骨格毒であるコルヒチンを培養開始と同時に培地中に加え、突起伸長に及ぼす影響を細胞骨格成分および中性、酸性糖脂質において解析を試みた。従来の血清を含む培地では、神経細胞だけでなく若干のグリア細胞が混在、増殖することから、無血清培地での今回の知見はより重要であると考える。

＜実験方法＞

（１）神経細胞の初代培養：胎生１７日目のラット胎仔の大脳半球を取り出し、Asouらの方法(2)により神経細胞を単離した。単離した細胞は poly-D-Lysine でコートしたプラスチックシャーレに播種し、インスリン、プトレシン、トランスフェリン、エストラジオール、プロゲステロン、セレン塩を加えた DMEM (SF-DMEM)、および味の素株式会社より市販されている ASF101、301 培地中で１～２日間培養した。

（２）脂質の抽出と分画：培養細胞は PBS で洗浄後、クロロホルム－メタノール（CM）(21)、CM (1:2) により総脂質を抽出した。その後、DEAE-セファデックスカラムにより酸性と中性脂質画分に分画し、それぞれを HPTLC により分離し、レゾルシノール－塩酸試薬、オルシノール－硫酸試薬により発色した。

（３）細胞骨格蛋白質の単離：培養細胞を PBS で洗浄後、0.2% トリトンX-100 を含む 0.1M PIPES、2M グリセロール、1mM MgSO4、2mM EGTA、pH6.9 で重合していないチューブリンを、E

TAを除いた上記緩衝液で微小管を形成するチューブリンを分離した。得られた蛋白質は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により解析を行なった。チューブリンの同定は抗チューブリン抗体を用いたイムノブロッティングにより免疫学的に同定した。

＜結果と考察＞

胎生17日目のラットからの神経細胞の初代培養系において、血清含有培地を用いた場合グリア細胞の増殖が時間の経過とともに進み、mixed culture となる。今回用いた 3 種類の無血清培地のうち、ASF 101 培地では血清含有培地と同様にグリア細胞の増殖が認められた。そこでグリア細胞がほとんど認められない SF-DEME、ASF 301 培地を用い以下の実験を行なった。コルヒチンの培地への添加はその濃度が 10^{-7}M を境として神経突起の形成阻害をもたらすことが認められたが、この時の中性および酸性脂質分画に含まれる脂質成分の差異について HPTLC により解析した。Fig.1 に示す様に中性分画では現在まだ同定を行なっていない一つの成分が検出されたが、突起形成阻害による差異については明かではない。一方、ガングリオシドを主とする酸性分画で半定量的に TLC を行なった結果、総ガングリオシドの減少、特に GD1a と Rf 値を等しくするガングリオシド分子種の量的減少が示唆された。ポリシアロガングリオシドではこれらの差異はあまり認められなかった。以上のことから、神経細胞の発生段階における著しい突起伸展が観察されるとき、モノ、ジシアロガングリオシドの合成が活発に進んでいることが予想される。Ando(1) によれば GD1a は樹状突起形成に関連があると言われており、この報告とも一致する。また、この分画にはレゾルシノール－塩酸試薬と反応し、黄色を呈するガングリオシドではない２つの成分が検出された。この成分のうち、Rf 値の高い方はコルヒチン処理により有意に増加する。もう一方は中性分画にも同じ Rf 値を示すものが存在することより中性糖脂質であると思われる。これらの中性および酸性脂質の同定、定量は現在進行中であり、今後の結果を待たねばならない。

次に、神経突起伸展における細胞骨格蛋白質の動態について検討を加えた。一般にコルヒチンはチューブリン分子と結合し、微小管の形成阻害を引き起こすと言われている。今回の無血清培地を用いた初代培養系の場合、10^{-8}M のコルヒチン濃度では対照と比較して同程度の突起伸展を認めたが、その濃度を 10^{-6}M とした場合ほぼ完全に阻害を引き起こし、まったく突起の伸展は認められなかった。この細胞を直接 SDS-PAGE のサンプル緩衝液で可溶化し、SDS-PAGE で解析し、デンシトメーターにより定量化した結果を Fig.2 に示す。コルヒチン処理により、チューブリンに相当するバンドが減少している傾向が見られ、突起形成阻害と並行してチューブリンがコルヒチンの濃度に依存して減少することが示唆された。ところでこのチューブリンの減少が細胞骨格にどのような影響を与えているかを検討するため、前述した方法に従い、微小管分画を分離した。その結果、微小管分画ではコルヒチンにより重合阻害が引き起こされ量的にチューブリンが減少している知見が得られた。しかし、重合していないチューブリンを含む 0.2% トリトン X-100 可溶性分画においても、コルヒチンにより脱重合されたチューブリンの増加は見られなかった。この事実はコルヒチンにより微小管の重合阻害、脱重合が起

こるだけでなく、チューブリンの合成系あるいは分解系にも何らかの作用が及んでいることが推測される。他の主要蛋白質であるアクチン、ヒストンの含量には、コルヒチンの影響はほとんど認められず、合成あるいは分解系への作用がチューブリンに特異的であることが示唆された。この可能性を調べるため、[^{14}C]ロイシンを無血清培地に添加し48時間培養後、SDS-PAGEによりチューブリンへの取り込みをオートラジオグラフィーにより解析した。現在定量まで進んではいないが、コルヒチンによりチューブリンへのロイシンの取り込みは減少する徴候を示した。また、チューブリンの重合過程においてチューブリン分子の修飾が起こることが報告されているが、この in vitro の神経細胞の系を用いてコルヒチンによる阻害機構を解明し、重合過程を明かにすべく、現在実験を進行中である。

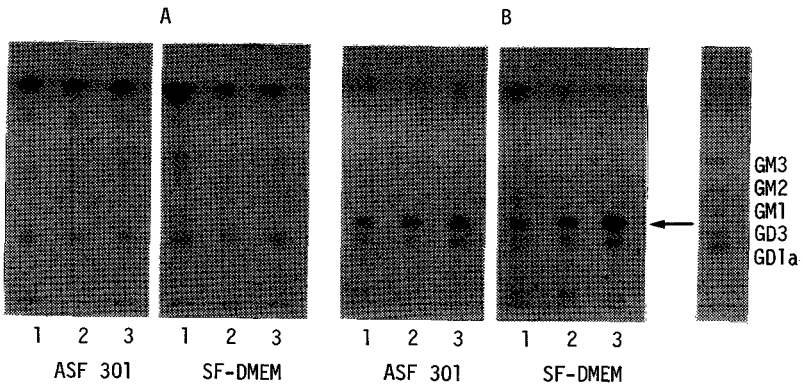
今回神経細胞の発生過程における突起伸展という神経機能に対して細胞骨格毒により障害を与えた結果、その糖脂質に質的、量的な変化を見たことは中枢神経系の機能が糖脂質を含めた膜構造に深く関わっているものと思われる。

＜文献＞

(1) Ando,S.(1983) Neurochem.Int., 5, 507-537.

(2) Asou,H. et al. (1986) Neurosci.Res., 3, 364-370.

Fig. 1 HPTLC profiles of neutral (A) and acidic (B) glycolipids.



1; none, 2; colchicine 10^{-8}M, 3; colchicine 10^{-7}M.

The arrow indicates yellow band.

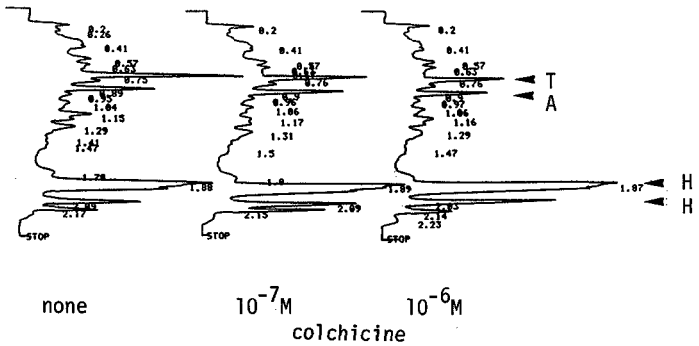


Fig. 2 SDS-PAGE of neuron extracts. The gels were stained with Coomassie brilliant blue and densitometrically scanned. T; tubulin, A; actin, H; histones.

129 PC12h細胞に対するモノクロナール抗体と反応するフコース含有ガングリオシド

有賀敏夫・小林和夫・黒田洋一郎*・
宮武　正**
（都臨床研，都神経研*，新潟大・脳研・神経内科**）

〔要　約〕

PC 12h細胞をラット皮下に移植後、腫瘍組織からPC 12細胞由来の４種のフコース含有ガングリオシド(G5，G6，G10，G11)をDEAE-Sephadexおよびlatrobeadsカラムクロマトグラフィーにより、それぞれ単離した。ガスクロマトグラフィー(GLC)，高分解能質量分析(FAB-MS)，高分解能核磁気共鳴(NMR)，完全メチル化分析，糖脂質の特異抗体による薄層クロマトグラフィー(TLC)免疫染色法等により構造解析した。G6およびG11はPC 12h細胞およびヒト血液型Ｂ型物質に対するマウスのモノクローナル抗体と反応し、末端にＢ型決定基を有するガングリオシドであると推定した。

G6: Fucα1-2(Galα1-3)Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1'Cer

G11: Fucα1-2(Galα1-3)Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-8NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1'Cer

PC 12h細胞に対するマウスモノクローナル抗体とこれら特異ガングリオシドとの結合にはＢ型決定基とガングリオテトラオース構造が重要と思われた。一方、G5，G10はFucosyl GM1，Fucosyl GD1bであった。またこの腫瘍は血中のノルエピネフリン，ドーパミンが高値を示すことからこの腫瘍はCatecholamineを産生すると推定された。

Key word：PC 12 Pheochromocytoma cells，fucogangliosides，Blood group B determinant

PC 12細胞(pheochromocytoma cells)はラット副腎由来のクロム親和性細胞のクローン細胞である。Catecholamine産生細胞であり、神経成長因子(NGF)により、形態学的に変化することが知られ、しかも正常の副腎由来のchromaffin細胞にみられる機能を有することから、神経細胞のモデルとして注目されている(1)。PC 12細胞の膜構成成分についてはMargolisらが糖蛋白の構造と最近フコースをもつガングリオシドの存在を報告している(2)が殆どわかっていない。我々はNGF処理によりPC 12細胞ガングリオシドが２倍に増加することを報告した。しかし、PC 12細胞のガングリオシドは中枢系のものとはＴＬＣ上移動度が著しく異なり、これはフコースを含むためと推定されたが細胞レベルでの構造解析は不可能であった(3)。今回我々は畠中らによりSubcloneされたPC 12h細胞(4)をラットの皮下に移植することに成功し、得られた腫瘍組織からPC 12細胞特異ガングリオシドを精製しその構造解析をしたので報告する。

〔方法〕

PC 12h細胞約１×１０^{7}cellsをNEDH系ラット(200-300g)の皮下に注入した。約２ヶ月後に直径2.5cm位の黒褐色の腫瘍が形成された。心臓採血後腫瘍組織を摘出した。血中のCatecholamine量は高速液体クロマトグラフィーによる電気検出法で測定した。腫瘍組織約100gから１０倍量のクロロホルム－メタノール(C:M; 2:1，1:1，1:2)で総脂質を抽出した。溶媒を留去後、残渣をC:M:水(30:60:4.5)にとかし、DEAE-Sephadex A-25カラムにかけ、中性脂質を除去後、酢酸ナトリウム入りメタノールの濃度連続勾配法により、モノ，ジ，トリシアロガングリオシド画分を得た。各画分を透析脱塩後、latrobeadsカラムにかけ、６つのモノシアロガングリオシド(G1-6)および５つのジシ

アロガングリオシド(G7-11)を単離した。G5，G6，G10およびG11はPC 12細胞由来の特異ガングリオシドで、これらについて構造解析した。

〔分析〕構成糖，塩基および脂肪酸組成はキャピラリーGLCで分析した。糖鎖の結合様式は完全メチル誘導体とした後、メチル糖アルコールとしGLC-MSで分析した。分子量の測定，糖鎖の結合順序は負イオンーFAB-MS（日本電子HX 100型）で測定した。アノマー分析，構成糖の組成はNMR（日本電子400 MHz）で解析した。

〔TLC免疫染色法〕PC 12h細胞をマウスに免疫してモノクローナル抗体を作製した。詳細については先に報告した(5)。ヒト血液型B型物質に対するマウスモノクローナル抗体，抗GM1抗体，ビオチン化２次抗体，およびアビジン・ビオチン化試薬は市販のものを使用した。抗アシアロGM1抗体は当研究室の鈴木明身先生から提供された。TLC免疫染色法はMagnaniらの変法(6)に従い行った。

〔結果および考察〕

PC 12h 細胞移植により、ラット血中ノルエピネフリンおよびドーパミン量は正常の１５倍および５０倍に上昇し、得られた腫瘍もCatecholamine産生と推定された。腫瘍組織のシアル酸量は約100μg/g湿重量であった。モノ，ジ，およびトリシアロガングリオシドのシアル酸量はそれぞれ5.4mg，2.8mgおよび1.7mgであった。G5，G6，G10およびG11の収量はそれぞれ7.0mg，10.0mg，1.5mgおよび1,9mgであった。G5はTLC上で標準物質のFucosyl GM1と同じ移動度を示した。図１に示すようにG6およびG11はPC 12h細胞に対するモノクローナル抗体と強く反応した。また、これらガングリオシドはヒト血液型B型物質に対するモノクローナル抗体とも強く反応した。しかし、G5およびG10はいずれとも反応しなかった。従ってG6およびG11はB型物質と同じ抗原決定基を分子内に持っていると推定された。FAB-MSでは図２に示すように分子イオンは（M－H）⁻として観察された。いずれも脂肪酸C16:0からC24:0およびC18スフィンゴシンの分子種からなることが証明された。セラミド部分を保持する解裂が優先し、糖鎖の結合順序が推定できた。GLCおよびNMRの分析結果からG5およびG10はフコース(Fuc)，グルコース(Glc)，ガラクトース(Gal)，Ｎ－アセチルガラクトサミン(GalNAc)，シアル酸(NeuAc)およびスフィンゴシン塩基からなり、それぞれのモル比は1:1:2:1:1:1および1:1:2:1:2:1であった。G6およびG11は更に１モルのGalを含み、セラミドペプタサッカライドおよびセラミドオクタサッカライドを推定された。NMRによる化学シフトおよび結合定数の測定からG5，G10ではFucはα位で、他の中性糖およびアミノ糖はいずれもβ位でついていることが推定された。G6およびG11ではこれらシグナルに加え、α-Galに相当する

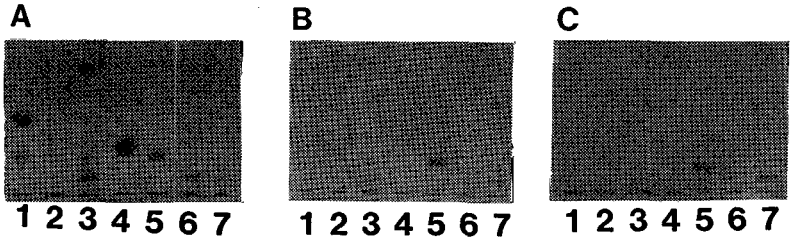


図１　Thin-layer chromatograms of gangliosides, G5, G6, G10 and G11, from the transplanted tumor tissue. Plate A was stained with the orcinol-sulfuric acid reagent. Plates B and C were immunostained with the monoclonal antibodies to PC 12h cells and blood group B, respectively. Lane 1, gangliosides from human brain grey matter; 2 and 3, gangliosides from PC 12 cells and tumor tissues, respectively; 4 to 7, gangliosides, G5, G6, G10 and G11 isolated from the tumor tissue. The plates were developed with n-propanol:2.5N ammonia:water (75:5:25, v/v).

シグナルが観察された。図2 G6をα-galactosidase (Jack beans)で処理するとG5になったことによりG6はG5に更に1分子α-Galがついていることが推定された。G5およびG6はDetergentなしでは、シアリダーゼ(Cl. perfringens)で分解されなかった。一方G10およびG11はこの条件でG5およびG6になった。また完全メチル化分析では、G5, G10からは-0Fuc-, -2Gal-, -3GalNAc-, -3,4Gal-および-4Glc-が同定された。G6, G11では-2Gal-のかわりに-2,3Gal-が、また新たに-0Gal-が検出された。以上の結果からG5, G6はFucosyl GM1およびFucosyl GD1bと推定された。G6, G11については要約で示すように、更にGalαがG5およびG6に1分子ついたヒト血液型B型物質の抗原決定基を持つ構造と推定された。なおG6はHolmesらにより、N-2-acetylamino-fluoreneを注入して得た、ラットヘパトーマの主要ガングリオシドと同じ構造であった(7)。最近G6のアシアロ化合物が滝らによりラットGranuloma, macrophageに報告されている(8)。PC 12h細胞に対するモノクローナル抗体で検索したところ、小腸、胸腺、脾臓等で正常ラットでも極めて微量のG6, G11が検出された。従ってこれら糖脂質はガン特異抗原と考えられ、細胞の粘着、細胞間の認識等に深く関与していると推定される。

〔謝辞〕本研究を行うに当たり、協力いただいた本研究所・鈴木明身, 鈴木實, 稲垣冬彦,北川恒代諸先生, エール大・医・Dr. Yuに深謝いたします。またCatecholamineの測定をしていただいた山梨医大・辻本豪三先生, 国立医療センター・峰岸明美先生, FAB-MSを測定していただいたエーザイ筑波研・津野昌紀先生, 動物を提供していただいた山ノ内製薬・本田一男先生に感謝いたします。

〔文献〕

1. Greene, L. and Tischler, A (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2424-2428
2. Margolis, R. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258, 4110-4117
3. Yu, R.K. et al. (1985) J. Neurochem. 44, S52
4. Hatanaka, H. (1981) Brain Res. 222, 225-233
5. 小林和夫, 黒田洋一郎 (1982) 神経科学 21, 378-380
6. Sekine, M. et al. (1987) J. Biochem. 101, 553-562
7. Holmes, H. and Hakomori, S. (1982) J. Biol. Chem. 257, 7698-7703
8. Taki, T. et al. (1985) J. Biol. Chem. 260, 6219-6225

130. GM_1ガングリオシドに対するモノクローナル抗体の作製ならびにその生化学的性質

岩田大二・佐藤若生・蔵本悦郎・島田静雄
（三井製薬・生科研）

〔要　約〕

神経系の主要なガングリオシドであるGM1に対するモノクローナル抗体（MAb）を取得するため、サルモネラ菌固定GM1で免疫されたBALB/cマウスの脾細胞を、NS-1ミエローマと融合した。クローニングの結果、1クローンのハイブリドーマを確立し、MAbを得た。その特異性を、計14種類の糖脂質を用いて検討した。酵素免疫測定（ELISA）では、得られたMAbはGM1のみに反応した。さらに、TLC-immunostainingで検討したところ、抗GM1抗体として、これ迄使用されてきたウサギポリクローナル抗体（PAb）は、GM1以外にもアシアロGM1とGD1bに反応したのに対して、MAbはGM1のみに反応した。また、薄層クロマトグラム上でGM1をA. ureafaciens由来ノイラミニダーゼ処理すると、MAbに対する反応は消失した。さらに、ウサギPAbは、N-アセチルノイラミン酸型のGM1およびN-グリコリルノイラミン酸型のGM1のいずれにも反応したのに対して、MAbは前者のみに反応した。

以上の結果から、今回取得したMAbは、シアル酸分子内部の微細な構造の差異をも識別し、N-アセチルノイラミン酸型のGM1に特異的なMAbであることが示された。

Key word：glycolipids, GM1 ganglioside, monoclonal antibody

GM1は神経系の主要なガングリオシドである。近年、ガングリオシドを始めとする糖脂質は細胞分化のマーカーとして注目されており、その研究には特異的な抗体の使用が不可欠となっている。GM1に対する抗体として、これ迄使用されてきたものは、GM1をウサギに免疫して得られる抗血清由来のPAbであり、特異性の点で優位性を有すると考えられるMAbの取得が望まれてきた。GM1はラット、マウスでは神経系のみならず、Tリンパ球等の一部の免疫担当細胞を始めとして、種々の細胞、組織にも存在することが知られ、それらの動物に対しては殆ど免疫原性を示さない。それ故、これ迄その作製成功の報告は、ただ一つ、M. M. Rapportら(1)によるものがあるのみである。しかしながら、それには、得られたMAbの特異性に関しては、酵素免疫測定（ELISA）で検討されたものが報告されているのみで、それ以上の詳細な特異性の検討は、なされていない。

先に、我々は中性糖脂質アシアロGM1に対するMAbを取得した(3)。続いて今回は、抗GM1 MAbの作製を試みた。その結果、GM1に対する特異的MAb産生ハイブリドーマを取得することができ、産生されるMAbの特異性を詳細に検討したので報告する。

〔実験方法〕

1）糖脂質：ウシ脳由来GM1、GD1a、GD1b、GT1b、GQ1b、GM2、GM3、アシアロGM1、アシアロGM2、CDH、CMH、さらにヒト赤血球由来CTH、globoside、paragloboside を用いた。2）免疫：箱守らの原法(4)を一部改変した。サルモネラ菌に固定したGM1を、初回に5 μg、4日後に10 μg、7日後に15 μg、その後2週毎に20 μgをBALB/cマウスに頻回免疫した。

3）ハイブリドーマの取得：マウス脾細胞をNS－1ミエローマと融合の後、クローニングを行なった。4）MAb：ハイブリドーマをヌードマウスに移植し、得られた腹水を抗体として用いた。5）ウサギ抗GM1 PAb：GM1をメチル化BSAとフロイントの完全アジュバントと共にNZWウサギに免疫し、得られた抗血清を硫安分画したものを用いた。6）抗体価の測定：ELISA法を用いた。即ち、GM1を固定した96穴プレートのウエルに検体を反応させ、さらにパーオキシダーゼ標識抗マウスIg抗体を反応させた。ABTSを基質として発色を行なわせ、O.D.414nmの値を測定し抗体価とした。7）TLC－immunostaining：各糖脂質をシリカゲルの薄層上に展開後、抗GM1 MAbを反応させた。続いてパーオキシダーゼ標識抗マウスIg抗体を反応させ、クロロナフトールを基質として発色を行なった。

〔結果〕

1）抗GM1 MAbの取得：GM1を免疫後、抗体価が血中に出現したマウスの脾細胞を用いて細胞融合を行ない、クローニングの結果、抗GM1 MAb産生ハイブリドーマ1クローンを確立し、抗GM1 MAb（IgM）を得た。

2）ELISAによる特異性：得られたMAbはGM1のみに反応した（Fig. 1）。

3）TLC－immunostainingによる特異性：得られたMAbはGM1のみに反応した（Fig.2に一部の結果を示す）。ウサギ抗GM1 PAbはGM1以外にアシアロGM1とGD1bにも反応した。GM1を薄層クロマトグラムの上でA. ureafaciens由来ノイラミニダーゼで処理(2)すると、MAbのGM1に対する反応性は失なわれた。それに、抗アシアロGM1 MAb(3)を作用させたところ、GM1に相当するバンドに反応がみられた（Fig.3）。

4）シアル酸特異性：n－プロパノール－28％アンモニア水－水（75：5：25,v/v/v）を展開溶媒としたTLCでは、N－アセチルノイラミン酸型GM1とN－グリコリルノイラミン酸型のGM1は異なる位置に展開される。その系で、MAbはN－アセチルノイラミン酸型GM1にのみ反応した（Fig. 4）。ウサギ抗GM1 PAbは、いずれにも反応した。

〔考察〕

今回、GM1に特異的なMAbを得た。そのMAbは、N－アセチル型のシアル酸を有するGM1にのみ反応し、それが認識するエピトープには、厳密な構造特異性が存在することが示された。従来使用されてきたウサギPAbとの特異性の比較においても、今回のMAbの優位性が明らかにされた。

近年、神経系あるいは免疫系における分化ならびに脱分化の研究において、糖脂質の存在、およびその意義が注目されている。それ故、今回のMAbは、我々が先に取得した抗アシアロGM1 MAbと共に、優れた有用性を持つものと考えられる。

〔文献〕

1) Mahadik, S.P., Laev, H. and Rapport, M.M.(1986) J. Neurochem. 47, 1172－1175.
2) Saito, M., Kasai, N. and Yu, R.K. (1985) Anal. Biochem. 148, 54－58.
3) Shimada, S. and Iwata, D. (1987) Microbiol. Immunol. in press.
4) Young, W.W., Jr., MacDonald, E.M.S., Nowinski, R.C. and Hakomori, S. (1979) J. Exp. Med. 150, 1008－1019.

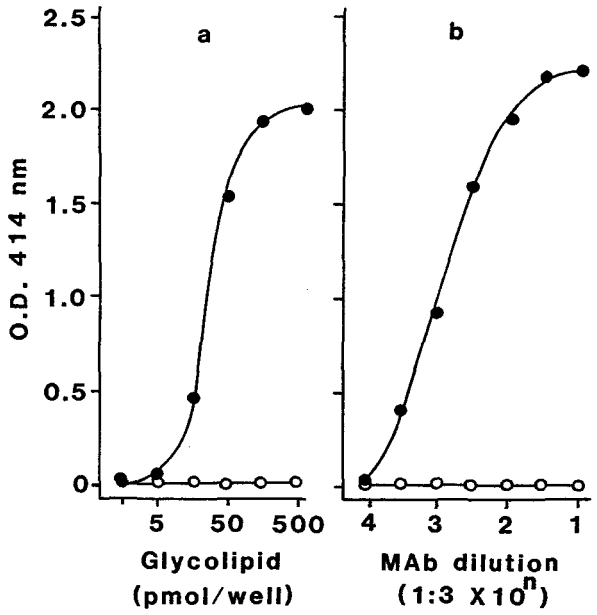


Fig. 1 Specificity of Anti-GM1 MAb by ELISA (●—● GM1, o—o Other glycolipids)

a: MAb dil. 1:400 (2.75 µg/ml)
b: 400 pmol glycolipid/well

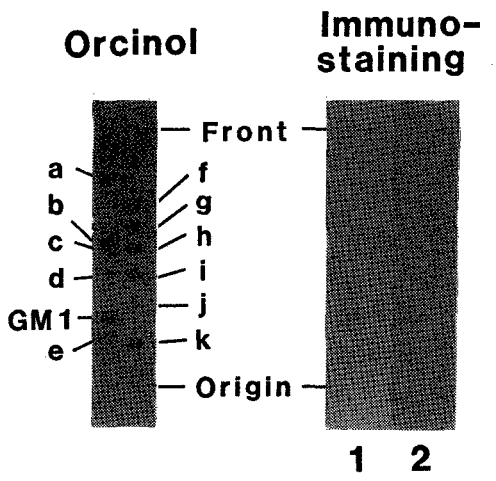


Fig. 2 TLC-Immunostaining with Anti-GM1 MAb (1) and Rabbit Anti-GM1 PAb (2)

a: CMH, b: asialo GM2, c: paragloboside, d: GM3, e: GD1a, f: CDH, g: CTH, h: globoside, i: asialo GM1, j: GM2, k: GD1b.

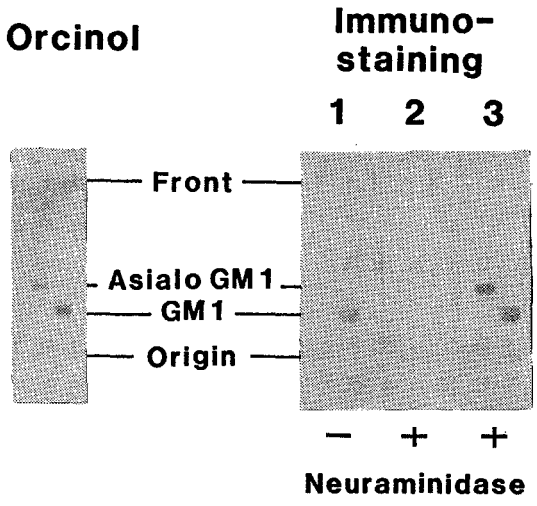


Fig. 3 TLC-Immunostaining with Anti-GM1 MAb (1 and 2) and Anti-Asialo GM1 MAb (3) before and after Treatment with Neuraminidase

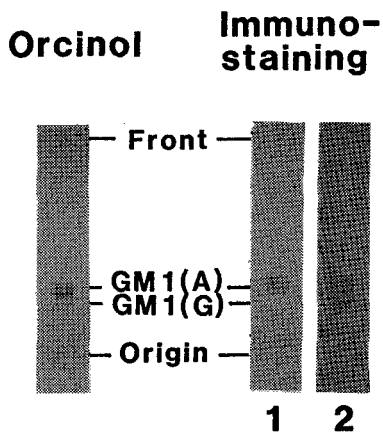


Fig. 4 Reactivity of Anti-GM1 MAb (1) and Rabbit Anti-GM1 PAb (2) with GM1(A) and GM1(G) by TLC-Immunostaining

GM1(A): N-Acetylneuraminic Acid Containing GM1
GM1(G): N-Glycolylneuraminic Acid Containing GM1

131. 末梢神経のガングリオシド—運動・感覚神経のガングリオシド分子種の特徴—

小川希代子・安部浩司・藤原祐子・阿部敏明・
長島和郎*　（帝京大・医・小児，北海道大・医・病理*）

〔要　約〕

末梢神経系のうち運動神経と感覚神経の脂質生化学的解析により，両神経のガングリオシドの疎水性部分の違いを明らかにした。運動神経，感覚神経の水分含量，脂質含量，ガングリオシド含量，ガングリオシドパターンについては両者の間で大きな差異は認められなかった。各ガングリオシドを単離し構成成分を分析すると，特にGDIaについて脂肪酸組成が両神経で大きく異なっていた。既ち，運動神経由来のGDIaの脂肪酸はC18−0が50％以上を占めC22，24等の長鎖脂肪酸が少なく，大脳のGDIaのそれと近い組成を示した。これに対し，感覚神経のGDIaはC22−0，24−0，24−1が主要構成脂肪酸であった。一方，LMIの脂肪酸組成については，運動，感覚神経共にC16，18，24を主成分として互いに似ており，GDIaの様な特徴的差異はみられなかった。以上の様に，ミエリン由来とされるLMIは両神経で差異がなく，軸索突起由来と考えられるGDIaの脂肪酸部分に違いが見い出された。末梢神経のガングリオシドの特徴は，各々の突起由来細胞の性質を部分的に反映しているものと推察できる。

Key word：peripheral nerve, ganglioside, fatty acid

細胞膜構成成分の1つである糖脂質に関する研究が活発となり，糖脂質の細胞表面マーカーあるいは表面抗原，癌関連抗原，各種リガンドに対するレセプターとしての役割が明らかとなってきている。又，シアル酸を含む一連の酸性糖脂質であるガングリオシドは，神経系に多く存在し，そのNGF様作用，神経伝達物質に対する作用等の神経系における様々な機能が注目され，末梢神経系においても，神経切断後の修復にガングリオシド投与が効果のある等の報告がなされている。末梢神経のうち，運動神経と感覚神経は，遠心性と求心性という互いに異なる方向の刺激伝達路である。両者に関する障害は多くあり，その障害の起こり方に関して感覚神経優位あるいは運動神経優位という様に明らかな差異が存在する。この点より，筆者らは，感覚神経及び運動神経の各々を特徴づける物質レベルでの違いを想定し，脂質生化学的解析により主にガングリオシドについて検索を行った。最近，Polyneuropathy with paraproteinemiaの患者血清にはMAG(Myelin associated glycoprotein）に対するモノクローナル抗体が産生され，この抗体は末梢神経由来の酸性糖脂質をも認識する事が明らかにされた(1)。本研究ではこの抗MAG抗体と反応する糖脂質についても検討を加える。

〔方法〕

1. 材料　ヒト末梢神経は神経系疾患以外の剖検例より前根（運動神経），後根（感覚神経），及び坐骨神経を切除し，分析に供した。

2. 脂質の抽出・精製　末梢神経よりの脂質の抽出は既法(2)に従い，DEAE−Sephadex (A−25)カラムの濃度勾配溶出（0.02−0.2M CH_3COONH_4）によりモノシアロ，ジシアロ，

トリシアロガングリオシド分画を得た。更に 0.5MCH$_3$COONH$_4$にて強酸性糖脂質分画を得た。各分画よりのガングリオシドは調整用ＴＬＣにより単離した。

3.分析　ガングリオシドの定量はレゾルシノール一塩酸法(3)で行った。ガングリオシド組成比はＴＬＣのデンシトメトリーにより求めた。精製ガングリオシドはメタノリシス後，ＴＭＳ－メチル化糖としてＧＣにて糖組成分析（Capillary OV101)を行った。脂肪酸組成はＧＣ（Capillary PEG 20Mカラム及びOV101カラム）により求めた。

4.　糖脂質の免疫染色　抗ＭＡＧ血清による糖脂質の染色は，Higashi らの方法(4)に従い行った。

〔結果及び考察〕

1.　脂質組成比

運動神経，感覚神経及び坐骨神経の水分含量，脂質含量等については大きな差異はなく（表１），脂質結合性シアル酸含量も有意な量的差異は認められなかった。リン脂質組成比についても３者の中で特徴的パターンを示したものはなかった。

2.　ガングリオシドパターン

ガングリオシド組成比について比較したところ，表２に示した主要構成ガングリオシドについて運動，感覚，坐骨神経の間で顕著な差異は認められず，３者ともLMI, GMI GDIa等を主要構成要素としていた。２次元ＴＬＣを行い，微量成分について分析すると各神経で未同定のガングリオシドについて差異が見られた。主要ガングリオシドの組成比については３種類の神経で大きな差異はみられなかったが，各ガングリオシド特にGDIaについてＴＬＣ上の移動度が，感覚神経及び運動神経で大きく異なっていた（図１）為，これらガングリオシドを精製し検討を加えた。

3.　各ガングリオシドの脂肪酸組成

感覚神経及び運動神経より得たGDIaは各々シアリダーゼ処理（*Cl. perfringens*）によりGMI へ分解された。糖組成分析の結果等よりGDIaである事を確認した。脂肪酸組成を比較したところ（図３）運動神経のGDIaはC18−0

Table 1. Composition of human peripheral nerves.

	motor nerve	sensory nerve	sciatic nerve	cerebral white matter
fresh wet tissue(mg)	100	100	100	100
water content (mg)	74	74	73	72
non-lipid residue(mg)	13	13	14	12
lipid content (mg)	13	13	12	16
lipid bound NANA (μg)	4	4	4	48
myelin (mg)	2	3	3	15

Table 2. Ganglioside composition of human peripheral nerves.

	motor nerve	sensory nerve	sciatic nerve	cerebral white matter
GM3 (%)	5	3	6	-
LM1	29	30	28	-
GM1	9	6	6	27
GD3	7	11	14	10
GD1a	24	23	25	26
GD2+GT1a	7	9	9	2
GD1b	12	11	9	22
GT1b	7	10	6	13

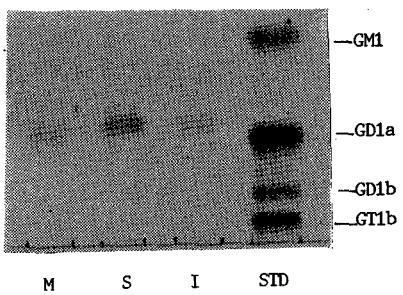


Figure 1. Isolated GD1a gangliosides from motor(M), sensory(S) and sciatic (I) nerves.

が50%以上をしめ，C22, 24等の長鎖脂肪酸が少なく，感覚神経のG_{D1a}はC20, 22, 24が60%以上をしめるという結果を得た。この脂肪酸組成比の違いはTLC上での移動度と対応するものと考えられる。又，L_{M1}について同様に分析すると，G_{D1a}の場合の様な差はみられなかった。L_{M1}はミエリン由来のガングリオシドと考えられ(5)，G_{D1a}を軸索由来とすると，運動，感覚両神経のミエリンではなく軸索突起のガングリオシドに質的な差が認められた事になる。TLC上，感覚神経由来のG_{D1a}と脊髄神経節のG_{D1a}は同じRf値を示し，運動神経，大脳のG_{D1a}より速く移動する事より，脊髄神経節のG_{D1a}の脂肪酸も感覚神経のそれと同様の傾向である事が類推される。神経線維のガングリオシドの特徴はその突起由来細胞の性質を部分的に反映しているものと推察される。今後，神経線維より軸索を分離して詳細な検討を進める必要があると思われる。

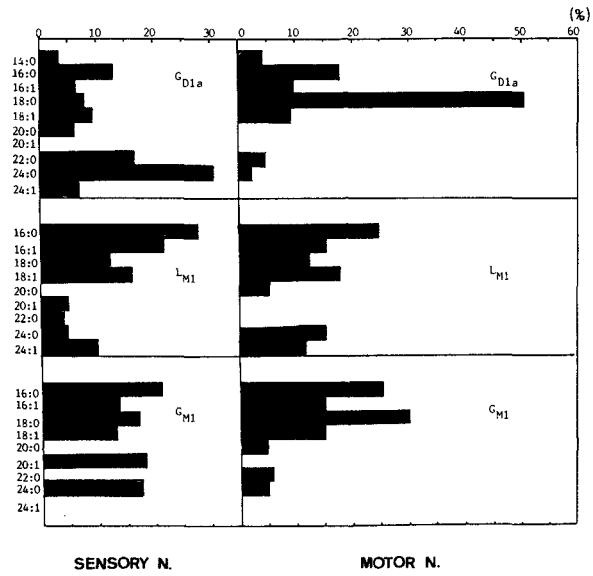


Figure 2. Fatty acid composition of ganglioside from human peipheral nerves.

4. 抗MAG抗体の認識する糖脂質

感覚，運動，坐骨の各神経の0.5M酢酸アンモニウム分画中の酸性糖脂質と抗MAG抗体との反応性についてTLC上で比較した。感覚，運動の両神経ともにSGPG(sulfated glucuronyl paragloboside)，に対応する位置にバンドが検出された。両神経の間で抗MAG抗体の反応性の差を示す顕著な傾向は認められなかった。

以上の様に運動神経と感覚神経では各々のニューロンの違いと対応する差が，G_{D1a}ガングリオシドの疎水性部分にある事が明らかとなった。今後更に詳細な検討を加えて特徴づけを行うと共に，各神経に特異的な糖脂質の検索を続ける予定である。

References

(1) Chou, K.H. et al B.B.R.C., 128, 383−388 (1985)
(2) Ogawa, K. et al B.B.A., 878, 292−295 (1986)
(3) Svennerholm, L. B.B.A., 24, 604−611 (1957)
(4) Higashi, H. et al J.Biochem., 95, 1517−1520 (1982)
(5) Chou, KH. et al J.Neurochem., 44, 1898−1912 (1985)

132. Chloroform-methanol 中における Proteolipid protein の degradation

由村 健夫・Agrawal D.*・Agrawal H. C.*
（九州大・医・脳研・神経内科，ワシントン大・医・小児*）

〔要　約〕

Proteolipid protein (PLP) はラット全脳ホモジエネイトから chloroform-methanol (2：1, V／V, CM) で抽出中に degradation をおこした。ホモジエネイトに蛋白分解酵素阻害剤を加えることにより抑制されたため、enzyme mediated と推定された。特に trasylol で抑制効果は著明であったが、PLP degradation をおこす酵素は特定できなかった。また degradation はホモジエネイト濾過後あるいは PLP の主な局在である中枢神経ミエリン中では生じなかった。すなわち酵素活性は CM に不溶であり、ミエリン外にあると考えられた。分解産物の一部は CM 不溶となり、一部は可溶で、約 5 K あるいはそれ以下のペプチドとなっている可能性が考えられた。Degradation は加齢につれて減少した。ウサギでも同様の現象がみられた。20 mM Tris-HCl buffer, 0.32 M sucrose 中では PLP は減少せず、PLP degradation には PLP の溶解状態が必要条件と思われた。

Key word： Proteolipid protein、degradation、chloroform-methanol

PLP は Folch & Lees (3) によって初めて記載された蛋白質で、その後中枢神経系ミエリンおよびオリゴデンドログリアに局在していることが示された (2)。PLP は疎水性蛋白であって水には不溶で、その抽出には chloroform- methanol (2：1, V／V, 以下 CM) が用いられる。ミエリン塩基性蛋白と異なり、PLP は蛋白分解酵素に抵抗性であるとされてきた (4)。今回我々は PLP がラット全脳から CM で抽出中に速やかに分解されることを見い出したので報告する。

「方法」

動物を断頭後速やかに全脳を取り出し、Folch の方法 (3) により 19 vol. の CM でホモジエナイズし、そのホモジエネイトを適当な時間 magnet stirrer で撹拌した。種々の蛋白分解酵素阻害剤は 0.01 vol の水で suspension または solution とし、ホモジエナイズ直後に加えた。コントロールとして 1 mg／ml の NaCl を加えた。ホモジエネイトは濾過後 0. 2 vol の水を加えて partition し、theoretical upper phase で 3 度 lower phase を洗った。Lower phase の蛋白は Sephadex LH-60 でゲル濾過した後、またはゲル濾過せずに直接 SDS に溶解し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけた。ミエリンは新鮮脳から Agrawal ら (1) の方法により分離し、ただちに 19 vol の CM を加え、適当な時間撹拌し、0.05 vol の 1 M KCl によりミエリン塩基性蛋白を沈澱させた後、PLP を抽出した。

「結果および考案」

生後 21 日の SD ラットの全脳ホモジエネイトを CM 中で撹拌すると、経時的に PLP は減少し、24 時間後にはほぼ完全に消失した (Fig. 1)。PLP の減少が酵素によるものか、そうとすればいかなる酵素が関与しているかを調べるため種々の蛋白分解酵素阻害剤を加えた。24 時間後の PLP の残存

率は trasylol で 52 %、EDTA で 28 %であった(Fig. 2)。Trasylol は各種の蛋白分解酵素に対して抑制作用を有しており、特定の酵素は決定できなかったが、EDTA でも抑制が見られたことは Ca^{++} dependent の酵素の関与が示唆された。アミノグリコシド系、セフエム系の抗生物質では degradation は抑制できなかった。6カ月の SD ラットでは24時間後も PLP は残存しており(Fig. 3 A)、PLP の degradation は年齢に依存していた。また全脳ホモジエネイトは濾過後では degradation が進行せず、21日の SD ラットのミエリンから PLP を抽出する段階でも degradation は起らなかった(Fig. 3A)。すなわち酵素活性はミエリン中には存在せず、CM 可溶でもないと考えられた。酵素はそれ自身が不溶な種々の有機溶媒中でも活性をもっていることは Zaks らにより示されている(5)。20 mM Tris-HCl, pH 7.4 あるいは 0.32 M sucrose 中では PLP は減少を示さず、PLP の可溶な状態が degradation には必要であると推定された。New Zealand white ウサギでも SD ラットと同様の結果が得られ、ラットに特異的な現象ではなかった。

21日 SD ラット全脳ホモジエネイト濾過後の partition による upper phase, lower phase の蛋白量の変化をみると、lower phase の蛋白は撹拌時間とともに減少したが、upper phase ではほとんど変化しなかった(Fig. 4)。すなわち PLP 分解産物の一部は CM 不溶となって濾過されなくなったと考えられた。また lower phase の蛋白を Sephadex LH-60 によってゲル濾過すると、24時間撹拌では 0 時間ではみられなかった小さな peak (II)が main peak(I)の後に出現し (Fig. 5A)、Peak II の電気泳動では 5k 付近の少なくとも 2 つの band として確認された。すなわち分解産物の一部は依然として CM 可溶であり、5k かそれ以下のペプチドとなったことが示唆された。Peak II に存在するペプチドの N 末端

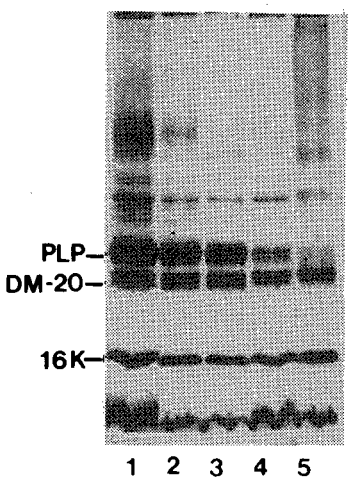


Fig.1 Degradation of whole brain PLP from 21-day-old rat. Homogenized brain was stirred in CM for 0, 5, 15 min, 4 h and 24 h in lanes 1-5, respectively. Each lane contains 50 ug proteins

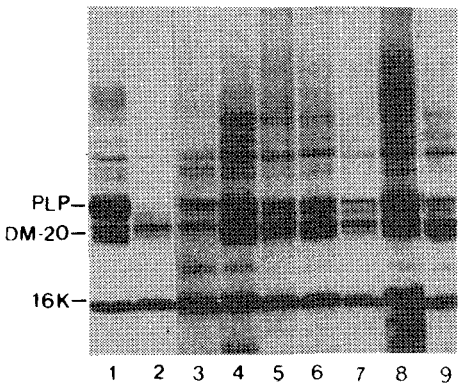


Fig.2 Effect of various protease inhibitors on degradation of PLP from 21-day-old rat brain. Lanes 1-9 represent 0 min, 24 h control, 24 h with benzamidine (1mg/ml), EDTA(1mg/ml), leupeptin(10ug/ml), phenylmethylsulfonylfluoride(0.52mg/ml), pepstatin A(10ug/ml), trasylol(100IU/ml) and soybean trypsin inhibitor(10ug/ml), respectively.

のアミノ酸分析でも2コ以上のアミノ酸が確認され、これらのペプチドは同一N末端を有していなかった。従ってPLPの切断部位の検討には今後個々のペプチドをpurificationする必要がある。

脱髄性疾患には一次的にしろ二次的にしろミエリン蛋白に対して分解酵素が作用していると考えらている。PLPも同様に蛋白分解酵素によって分解を受けると思われ、CM中で活性を持つ酵素が何らかの役割を果している可能性がある。

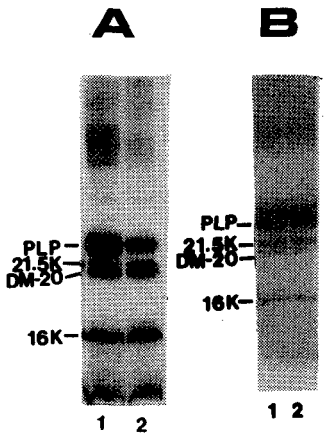


Fig.3 (A) 6-month-old rat whole brain PLP (B) PLP from myelin of 21-day-old rat. Lanes 1 and 2 were stirred in CM for 0 and 24 h, respectively.

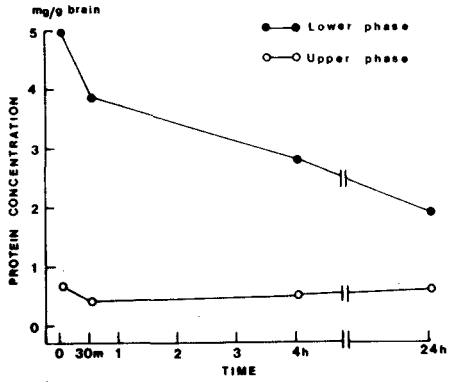
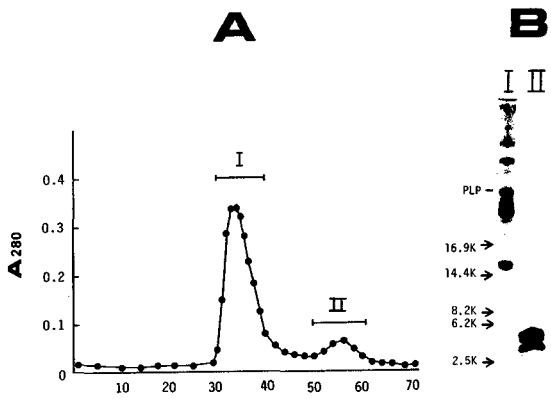


Fig.4 Concentration of proteins the upper and lower phases after filtration of brain homogenate from 21-day-old rat.

Fig.5 Separation of the lower molecular weight peptides from 21-day-old rat whole brain PLP by (A) Sephadex LH-60, and (B) 20% polyacrylamide SDS gel electrophoresis.



(1) Agrawal,H.C.,Burton,R,M.,Fishman,M.A.,Mitchell,R.F.and Prensky,A.L. (1972) J.Neurochem.19, 2083-2089
(2) Agrawal,H.C.,Hartman,B.K.,Shearer,W.T.,Kalmbach,S. and Margolis,F. (1977) J.Neurochem.28, 495-508
(3) Folch,J. and Lees,M. (1951) J.Biol.Chem. 191,807-817
(4) Folch-Pi,J. and Stoffyn,P.J. (1972) Ann.N.Y.Acad.Sci. 195,86-107
(5) Zaks,A. and Klibanov,A.M. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 82,3192-3196

133. プロテオリピドアポ蛋白ペプチドによるマウス実験的アレルギー性脳脊髄炎

遠藤真澄・国下龍英・田平　武

（国立精神神経センター・神経研）

〔要　約〕

プロテオリピドアポ蛋白（ＰＬＰ）による実験的アレルギー性脳脊髄炎（ＥＡＥ）の発症率を多種系統を用いて比較するとともに、フラグメントを用いて起炎部位の決定を行なった。その結果、以下の知見を得た。

1．　ウシＰＬＰを感作した結果、ＳＪＬ／Ｊ，Ｃ３Ｈ／Ｈｅ，ＣＢＡ／Ｊ，Ａ／ＪにＥＡＥが高頻度に発症し、Ｈ－２^{b}系マウスおよびＢ１０コンジェニック系マウスの発症率が低かった。

2．　ＳＪＬ／Ｊマウス（Ｈ－２^{s}）は、ＤＭ－２０およびフラグメント１８１－２７６で発症を認めず、フラグメント１－１４４、１－２０４で発症を認めた。したがって、ＳＪＬ／Ｊの起炎部位は１００－１４０であると考えられる。

3．　Ｃ３Ｈ／Ｈｅ（Ｈ－２^{k}）およびＢＡＬＢ／ｃ（Ｈ－２^{d}）マウスは、フラグメント１－２０４、１８１－２７６で発症を認め、フラグメント１－１４４、２１２－２７６で発症を認めなかった。したがって、起炎部位は、１８１－２０４であると考えられる。

以上より、ＰＬＰによるＥＡＥ発症率および起炎部位は、系統により異なる事が明らかとなった。

Key word：Proteolipid apoprotein, Encephalitogenic determinant, Mouse

我々はこれまでに、プロテオリピドアポ蛋白（ＰＬＰ）がマウスにおいても実験的アレルギー性脳脊髄炎（ＥＡＥ）の自己抗原となり得、その発症は細胞性免疫を介していることを明らかにした（1、2）。そこで今回は、ＰＬＰを多種系統マウスに感作して、発症のmajor histocompatibility complex（ＭＨＣ）拘束性を検討するとともに、ＰＬＰの起炎部位をマウスを用いて検討した。

［材料および方法］

抗原およびフラグメントの精製：　ＰＬＰ、major ＰＬＰおよびＤＭ－２０は、既報の方法に準じて精製した（1）。フラグメントは、ＣＮＢｒおよびＢＮＰＳ－skatolを用いてＭｅｔ、Ｔｒｐ部位を切断した後ゲルろ過および逆相カラムを用いて精製し、フラグメント１－２０４、１－１４４、１８１－２７６、２１２－２７６を得た（3）。

感作：　各種系統マウス（雌、６－１０週齢）に抗原１００μｇまたは４００μｇ、フラグメントは１００μｇをＣＦＡと共に２回、１週間間隔で腹部皮下に数箇所免疫した。一部のマウスには、Ｘ線照射およびcyclophosphamide投与の前処置を行なった。

臨床評価方法：　正常を０、尾緊張の低下または軽い歩行困難を１、中程度の歩行困難を２、四肢緊張の低下または回転運動を３、完全対麻ひを４、死亡を５とした。

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成した。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成した。

抗体価の測定：　抗原またはフラグメント感作後適宜に血清を採取し、マイクロプレートを用いたＥＬＩＳＡにて行なった。

［結果］

多種系統マウスにウシＰＬＰ１００μｇを感作した結果、ＳＪＬ／Ｊ，Ｃ３Ｈ／Ｈｅ，ＣＢＡ／Ｊ，Ａ／Ｊ等にＥＡＥが高頻度に発症する事が明らかとなった（Ｔａｂｌｅ１）。発症時期およびＥＡＥの重症度も系統により差が見られ、Ｈ－2^k のマウスは遅発型であり、ＳＪＬ／Ｊ，Ｃ３Ｈ／Ｈｅのほぼ全例が完全対麻ひにまで進行した。この条件でＥＡＥを起こしにくかった５系統のマウスに高用量のＰＬＰの感作、およびcyclophosphamide投与、Ｘ線照射の前処置を行なったが、発症率に変化はなかった（Ｔａｂｌｅ２）。しかし、組織所見を検討してみると、Ｂ１０．ＢＲおよびＢ１０．Ｄ２の２系統に限り高頻度に細胞浸潤を認めた。一方、臨床症状を呈したマウスは血管周囲性単核細胞浸潤と共に脱髄が下部脊髄から大脳まで広範に認められた。ウシＰＬＰをmajor ＰＬＰおよびＤＭ－２０の２つのコンポーネントに分離して各々を感作した結果、Ｃ３Ｈ／Ｈｅ，ＣＢＡ／Ｊ，ＢＡＬＢ／ｃ，Ａ／Ｊはmajor ＰＬＰ，ＤＭ－２０の両者でＥＡＥが発症したが、ＳＪＬ／ＪおよびＡ系コンジェニックのうちＡ．ＳＷ，Ａ．ＴＨはmajor ＰＬＰのみでしか、発症を認めなかった（Ｔａｂｌｅ３）。各種フラグメントの純度は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびアミノ酸分析にて確認した（３）。このフラグメントをＳＪＬ／Ｊ，Ｃ３Ｈ／Ｈｅ，ＢＡＬＢ／ｃの３種に感作した結果、Ｎ末端１－２０４は全系統で、１－１４４はＳＪＬ／ＪのみでＥＡＥの発症を認めた（Ｔａｂｌｅ４）。一方、Ｃ末端１８１－２７６はＣ３Ｈ／Ｈｅ，ＢＡＬＢ／ｃで発症を認めたが、ＳＪＬ／Ｊでは発症しなかった。また２１２－２７６はいずれの系統でも発症を認めなかった。フラグメント感作により臨床症状を呈しなかったマウスは何ら組織所見を認めなかった。ＰＬＰに対する血清中の抗体価は、いずれの系統のマウスにおいても上昇が認められたが、臨床症状と抗体価の間には相関が見られなかった。

［考察］

ＰＬＰによるＥＡＥは、Ｈ－2^b マウスでは臨床症状を認めず、またＢ１０コンジェニック系マウスは起こしにくい傾向にあった。したがって、ＰＬＰによるＥＡＥの感受性はＨ－２の拘束を受けているという確かな結果は得られなかった。ＳＪＬ／ＪおよびＣ３Ｈ／Ｈｅマウスでは、非常に重度のＥＡＥに進行し発症率も高かったが、発症時期に大きな差を見た。この差が何に起因するものか、今後検討する必要がある。低容量のＸ線照射およびcyclophosphamide投与によって、natural suppressorの抑制およびＢＢＢの血管透過性を増す事により、ＥＡＥの発症率が上昇するという報告があるが（４）、ＰＬＰによるＥＡＥにおいては、これらの処置は何ら効果を認めなかった。起炎部位の検討においては、ＳＪＬ／Ｊマウスはmajor ＰＬＰのみでしか発症を認めず、Ｃ３Ｈ／Ｈｅ，ＢＡＬＢ／ｃはmajor ＰＬＰ、ＤＭ－２０の両者でＥＡＥの発症を認めた。ＤＭ－２０のアミノ酸組成はmajor ＰＬＰの１００から１４０の４１残基が欠損したものである事より（５）、ＳＪＬ／Ｊの起炎部位はこの４１残基である事が推察され、フラグメントを用いた結果もこれを支持するものであった。一方、Ｃ３Ｈ／Ｈｅ，ＢＡＬＢ／ｃにおてはフラグメント１－２０４および１８１－２７６で発症を認め、フラグメント　１－１４４、２１２－２７６では発症を認めなかった事より、１８１－２０４が起炎部位であると推察された。このように、起炎部位が系統により異なる事が明らかとなったが、Ｈ－２の拘束を受けているかどうかは、今回の結果のみでは明らかとされなかった。抗体価の検討を行なった結果、ＰＬＰに対する液性免疫応答はＨ－２に拘束されていない事が明らかとなり、臨床症状との相関も見られなかった。今後は、合成ペプチドを用いた詳細な検討が必要である。

［文献］

1. Endoh, M., Tabira, T., Kunishita, T., Sakai, K., Yamamura, T. and Taketomi, T.(1986) J.Immunol.

137, 3832-3835

2. Satoh, J., Sakai, K., Endoh, M., Kunishita, T., Koike, F., Yamamura, T. and Tabira, T. (1987) J. Immunol. 138, 179-184

3. Endoh, M., Kunishita, T. and Tabira, T. (in preparation)

4. Lando, Z., Teitelbaum, D. and Arnon, R.(1980) Nature 287, 551-552

5. Triffilief, F., Skalidis, G., Helynck, G., Lepage, P., Sorokine, O. and Dorsselaer, AV.(1985) C.R Seances Acad.Sci. 300, 241-247

Table I Induction of EAE in mice by bovine PLP

strain	H-2	EAE*	Day of onset-range (mean)	Clinical Grade**
SJL/J	s	17/19	13 - 21 (17.0)	3.8
ASW/Sn	s	4/5	25 - 47 (33.3)	2.7
C3H/He	k	5/5	31 - 81 (67.2)	4.0
CBA/J	k	4/5	34 - 67 (47.5)	2.6
AKR/J	k	3/5	84 - 160(117.3)	2.1
B10.BR	k	1/5	71	2.0
BALB/CCr	d	3/7	21 - 29 (26.3)	3.0
BALB/CAn	d	3/5	29 - 33 (31.7)	3.3
DBA/2	d	0/5	-	-
B10.D2	d	0/5	-	-
C57BL/10	b	0/5	-	-
C57BL/6	b	0/5	-	-
A/J	a	5/5	58 - 121(80.0)	2.6
B10.A	a	1/5	57	2.0

*Number with clinical disease / number injected.
**Average of maximum clinical grade of diseased animals.

Table II Efect of high-does PLP , cyclophosphamide and irradiation on EAE induction

strain	H-2	high-does			CY*+ R**		
		EAE	onset	grade	EAE	onset	grade
B10.BR	k	1/5	65	3.0	0/5	-	-
DBA/2	d	0/5	-	-	0/5	-	-
B10.D2	d	1/5	116	2.0	0/5	-	-
C57BL/10	b	0/5	-	-	0/5	-	-
C57BL/6	b	0/5	-	-	0/5	-	-

* Cyclophosphamide (20mg/kg b.w.) was injected 2 days before EAE induction.
** Mice were exposed to whole body irradiation (350R) at 2 days before EAE induction.

Table III Induction of EAE in mice by bovine major PLP and DM-20

strain	H-2				major PLP	DM-20	
	K	A	E	D	100 μg	100 μg	400 μg
C3H/He	k	k	k	k	5/5	5/5	N.T.
CBA/J	k	k	k	k	3/5	4/5	
BALB/CCr	d	d	d	d	3/5	14/22	
A/J	k	k	k	d	4/5	4/5	
SJL/J	s	s	(s)	s	5/5	0/10	0/12*
A.SW	s	s	(s)	s	3/4	1/14	0/7
A.TH	s	s	(s)	d	3/5	0/5	0/4
A.TL	s	k	k	d	3/5	4/5	-

* 8 mice were exposed to irradiation (350R) and injected cyclophosphamide (20mg/kg) at 2 days before EAE induction.

Table IV Induction of EAE in mice by fragments of bovine PLP

fragment	mouse strain		
	SJL/J(H-2^s)	C3H/He(H-2^k)	BALB/C(H-2^d)
1 - 205	4/4	6/8	3/7
1 - 144	3/4	0/4	0/6
181 - 211	0/4	3/5	6/12
212 - 276			
mixture			
212 - 276	N.T.	0/5	0/4

134. Shaking mutant pupにおけるPLP, DM_{20}発現異常：PLP／DM_{20}発現比について

柳沢勝彦・Duncan I.D.*・Quales R.H.**
（新潟大・脳研・神経内科，ウィスコンシン大・医*，NIH**）

〔要　約〕

shaking pup は伴性劣性遺伝を示すイヌの中枢神経myelin形成不全mutantである（1, 2）。本mutantにおいて，proteolipid protein (PLP)および DM-20 の定量を抗PLP 抗体を用いたWestern blotのdensitometric scanningにより行なった。mutant脊髄において，PLP はcontrol level の 0.8%にとどまり，この値は他のmyelin蛋白の減少率(3)に比較して著しく低かった。control 脊髄においてPLP はDM-20 に比較して著しく濃染し，その量比は16.7であった。一方mutant脊髄においてはPLP とDM-20 の染色性は同程度であり，量比は 0.9であった。mutant脳においては，PLP, DM-20いずれも検出されなかった。

PLP の選択的欠損より，本mutationの一次的異常がPLP 遺伝子の発現と関与している可能性が示唆された。また，PLP/DM-20 発現比の異常はこれまで報告がなく，これらの蛋白の発現を理解する上で重要な所見と考えられた。

Key word：　shaking pup mutant, proteolipid protein, DM-20

（はじめに）

伴性劣性遺伝を示すmyelin形成不全には，jimpy mice, myelin deficient ratがあり，ヒトの疾患ではPelizaeus-Merzbacher's diseaseが知られている。これらのmutantにおいて，myelin形成異常は中枢神経に限られること，myelin蛋白のうち中枢神経にのみ存在するproteolipid protein (PLP) が選択的に欠損していることから，その一次的異常はPLP 遺伝子の発現と関与している可能性が推察されてきた。1985年にWillard とRiordan(7)がPLP 遺伝子のX-chromosome上における局在を発表して以来，研究はさらに進み，最近Naveらによりjimpy miceにおけるPLPmRNA のdeletionが明らかにされるに至った（5, 6）。

shaking pup はイヌの中枢神経myelin形成不全である。今回，本mutantにおけるPLP, DM-20の発現を検討することを目的に実験を行なった。

（実験方法）

生後４週のcontrol およびshaking mutant pupより脳および脊髄を摘出し，生化学的解析に供するまで－70℃に保存した。脳および脊髄の 0.32M sucrose 5% (w/v) homogenate をhand homogenizerにて作製した。Homogenate蛋白濃度をbovine serum albumin をstandardとしたLowry 法にて検定したのち，一定量をSDS-polyacrylamide gel electrophoresisにて分離した。Blotを抗ウシPLP 抗体を用い免疫染色し，densitometric scanningにて定量した。

（結果）

(1) PLP 検量線

Blot上のPLP intensity はcontrol 脊髄homogenateの総蛋白 0.25 μgから 1.0μgの範囲で直線的に増加した。試料中のPLP 定量は同範囲内で行なった。

(2) shaking pup 脊髄における解析

shaking pup mutantにおけるPLP はcontrol level の 0.8%であった。この値は同mutantにおける他の中枢神経myelin蛋白, myelin basic protein (MBP)(4%), myelin associated glycoprotein (MAG)(14%) , 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) (11%) (3) に比較し著しく低かった。

control 脊髄においてPLP/DM-20 の量比は16.7であったが, shaking pup においては 0.9であった。(Fig.1)

(3) shaking pup 脳における解析

shaking pup 脳においてはPLP, DM-20いずれも検出されず (Fig.2), 本法のPLP 検出限界がcontrol 脳level の 0.5%であるところから, shaking pup 脳におけるPLP は仮に存在しているとしてもcontrol level の 0.5%以下と考えられた。これは, 脊髄同様MBP (6%), MAG(9%), CNP(15 %)(3)に比較して著しく低かった。

(考察)

shaking mutant pupにおいても, PLP の選択的欠損が認められたことは, 本mutationが他の伴性劣性遺伝の中枢神経myelin形成不全mutationと同様, PLP 遺伝子の欠損に関与している可能性を示唆している。

DM-20 とPLP はX-chromosome上の単一のPLP 遺伝子より発現され, 個体発生上両者は量的に一定の関係を保っていることが最近報告された(6) 。本mutantにおいてPLP/DM-20 発現比が大きくcontrol と相違したことは, jimpy miceに関し最近報告されたPLP, DM-20両者のmRNAの共通のdeletion(6) では説明できず, 本mutationの本質に関わる特異な現象と思われる。

Naveら(5) が推測したjimpy miceのPLP は34個のC末端側アミノ酸が欠落しているのに対し, 今回shaking pup 脊髄に認められたPLP はblot上分子量においてcontrol と差がなかったことは, mRNAのdeletionよりもmRNA自体の不安定性ないしは他のpost-transcriptionalな異常の存在を示唆しているものと思われる。

我々はこれまでjimpy mice脳(8), myelin deficient rat 脳および脊髄(9) において同様の実験を行なったが, これらのmutantにおいてはPLP, DM-20はいずれも検出されなかった。これまで知られている伴性劣性遺伝のmyelin形成不全mutantは, 症状面, 生化学的所見および組織学的所見の上で類似性を有する反面, その欠損遺伝子の効果は個々のmutantの間で異なるものと思われる。

shaking pup mutationの詳細を明らかにするためには, shaking pup からのPLP-cDNA cloningおよびその解析が今後必要と考えられる。

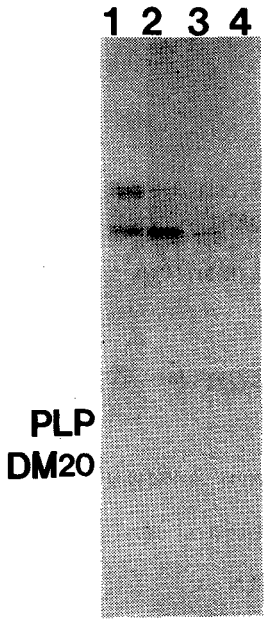


Fig. 1
Western blot of control and shaking pup spinal cord homogenate. Lane 1 to 3 contained 0.25, 0.5 and 1.0 ug protein of control spinal cord, whereas lane 4 contained 75 ug protein of shaking pup spinal cord.

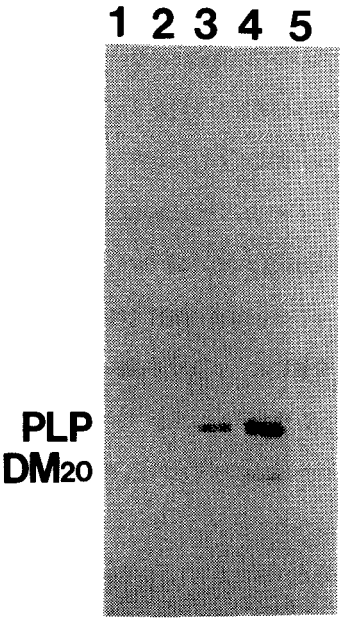


Fig. 2
Western blot of control and shaking pup brain homogenate. Lane 1 to 4 contained 1, 2.5, 5 and 15 ug protein of control brain homogenate and lane 5 contained 200 ug protein of shaking pup brain homogenate.

（文献）

1) Bay,G.M., Duncan,I.D. and Griffiths.I.R.(1983) Neuropath.Appl.Neurobiol. 9 369.
2) Duncan,I.D., Griffiths,I.R. and Munz,M. (1983) Neuropath.Appl.Neurobiol. 9 355.
3) Inuzuka,K., Duncan,I.D. and Quarles,R.H. (1986) Dev.Brain.Res. 27 43.
4) Kerner,A-L and Carson,J.H. (1984) J.Neurochem. 43 1706.
5) Nave,K-A, Lai,C., Bloom,F.E. and Milner,R.J. (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83 9264.
6) Nave,K-A, Lai,C., Bloom,F.E. and Milner,R.J. (1987) J.Neurochem. 48 Suppl. S130.
7) Willard,H.F. and Riordan,J.R. (1985) Science 230 940.
8) Yanagisawa,K. and Quarles,R.H. (1986) J.Neurochem. 47 322.
9) Yanagisawa,K., Duncan,I.D., Hammang,J.R. and Quarles,R.H. (1986) J.Neurochem. 47 1901.

135. 正常及びStaggerer マウスにおける小脳特異的糖蛋白質（Con A結合性P_{400}）の発現

前田信明・新延道夫・御子柴克彦（大阪大・蛋白研）

〔要　約〕

小脳に特異的な糖蛋白質である Con A 結合性P_{400} に対するモノクローン抗体を作製し、これを用いて正常及び staggerer マウスの脳組織における当蛋白質の発現を解析した。

正常マウスの小脳においては、Con A 結合性P_{400} の発現は生後３日目頃から、生後２１日目まで著明に増大した。免疫組織学的な解析により、Con A 結合性P_{400} の発現の増大は、プルキンエ細胞のみでおこり、その樹状突起の発達と共に進行することが観察された。大脳及び脳幹部においても Western blot 法により、ごくわずかな Con A 結合性P_{400} の発現が見られたが、これらの部位においては、その発現量は、生後の発達過程で殆ど変化しなかった。staggerer マウスにおいては、大脳及び脳幹部における Con A 結合性P_{400} の発現は、正常動物と同様であったが、小脳においては当蛋白質の発現の増大は観察されなかった。

以上の結果から、Con A 結合性P_{400} の小脳における発現量の増大は、プルキンエ細胞の樹状突起形成と関連していること、及び staggerer マウスの異常は、プルキンエ細胞の Con A 結合性P_{400} の発現調節異常であるということが示唆された。

Key word： P400 protein, staggerer mutant mouse, cerebellum

小脳に特異的な分子量 250K の蛋白質である P_{400} は、concanavalin A に対する結合性に従って、２種類に分類される（Con A 結合性、-非結合性P_{400}）(2)。プルキンエ細胞の樹状突起形成及び、平行線維とのシナプス形成異常を示す staggerer マウスの小脳においては、P_{400} が著減しておりプルキンエ細胞の形態形成と P_{400} の機能との関連が示唆されている(3,4)。今回、我々は Con A 結合性P_{400} に対するモノクローン抗体を作製し、当蛋白質の発現を発達途上にあるマウス小脳及び、staggerer マウスの脳について解析したので報告する。

［方　法］

１）モノクローン抗体の作製

部分精製した P_{400} （約100μg）を８週令 Lewis rat に、Freund's complete adjuvant と共に腹腔内注射した。半量の P_{400} を Freund's incomplete adjuvant と共に、５回追加免疫し、最終免疫の３日後に脾臓細胞を採取し、常法(1)に従って、マウスミエローマ細胞（Sp2/0Ag14）との細胞融合を行なった。抗体産生細胞は Western blot法により選択し、限界稀釈法により３回クローニングを行なった。

２）免疫組織化学

正常及び staggerer マウスを４％パラホルムアルデヒドで灌流固定後、脳組織を摘出し、パラフィン包埋した。4μm の切片を作製した後、3,3'-diaminobenzidine を chromogen とした Avidin-biotin-peroxydase complex (ABC) 法により、染色し、光顕的に観察した。

３）Western blotting

Laemmli の方法により、５％ポリアクリルアミド濃度で、SDS-PAGE を行なった後、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。

[結果と考察]

Con A 結合性P_{400} に対するモノクローン抗体（4C11）を作製し、発達途上にあるマウス小脳での当蛋白質の発現を Western blot 法により解析した。図1に示すように、生後0日目(P0)の小脳においては Con A 結合性P_{400} の発現はほとんど見られないが、P3 から P21 にかけて著名な発現の増大が認められた。4C11 による小脳切片の免疫組織化学の結果、P0 の小脳においては染色される細胞は存在しなかったが、P5 の小脳においてはプルキンエ細胞の伸長しつつある樹状突起が濃染された(図2,a,b)。P21 の小脳ではプルキンエ細胞の樹状突起、細胞体及び軸索が著明に染色され、このような染色性は成熟マウス小脳においても保持されていた(図2,c)。生後マウスの大脳及び脳幹部においては調べた限り、染色される細胞は存在しなかったが、Western blot 法によると大脳部及び脳幹部においても、ごく少量ながら、4C11 に反応する蛋白質が検出された(図3)。当蛋白質は、小脳の Con A 結合性P_{400} と同じ電気泳動度を示し、4C11 以外の2種類の Con A 結合性P_{400} に対するモノクローン抗体とも反応することが Western blot 法で示された。従って、これらの蛋白質は同一のものであると考えられる。staggerer マウスにおいては、大脳及び脳幹部では正常マウスと同程度の Con A 結合性P_{400} の発現が見られるが、小脳では正常マウスで見られるような著明な発現の増大は観察されず、大脳や脳幹部とほぼ同程度の発現しか見られなかった（図-3）。免疫組織化学でも staggerer マウスのプルキンエ細胞は染色されなかった（図-2）。以上のように Con A 結合性P_{400} は、小脳のみならず脳全体に少量ながら存在するが、プルキンエ細胞においてはその樹状突起形成期に一致して発現が著明に増大すること、また staggerer マウスにおいては、このプルキンエ細胞による発現増大が起こらないことが示された。このことは、Con A 結合性 P_{400} がプルキンエ細胞の形態形成に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

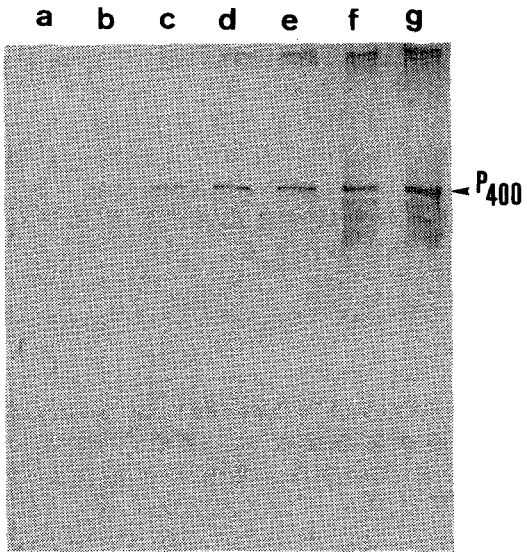


Fig. 1 Expression of Con A-binding P_{400} protein in mouse cerebellum was studied developmentally by immunoblot method with 4C11 monoclonal antibody. The samples are the particulate fractions from a, postnatal day 0 (P0);b, P3; c, P5;d, P7;e, P10;f, P15;g, P21 cerebellum.

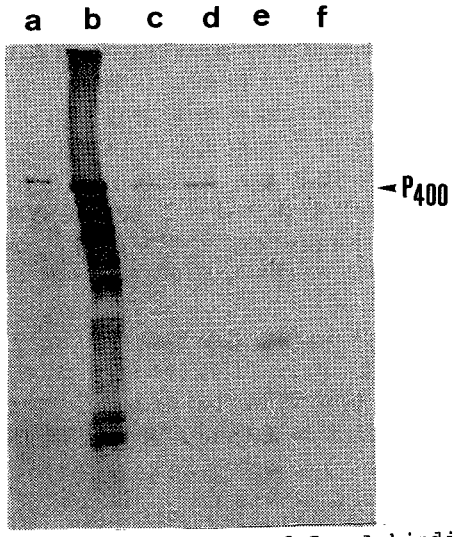


Fig. 3 Expression of Con A-binding P_{400} protein in the brains of normal and staggerer mutant mice were studied by immunoblot method with 4C11 monoclonal antibody.

The samples are P3 fractions from the cerebrum (a), the cerebellum (b) and the brain sten (c) of 23-day-old normal mouse, and from the cerebrum (d), cerebellum (e) and the brain stem (f) of 25-day-old staggerer mutant mouse.

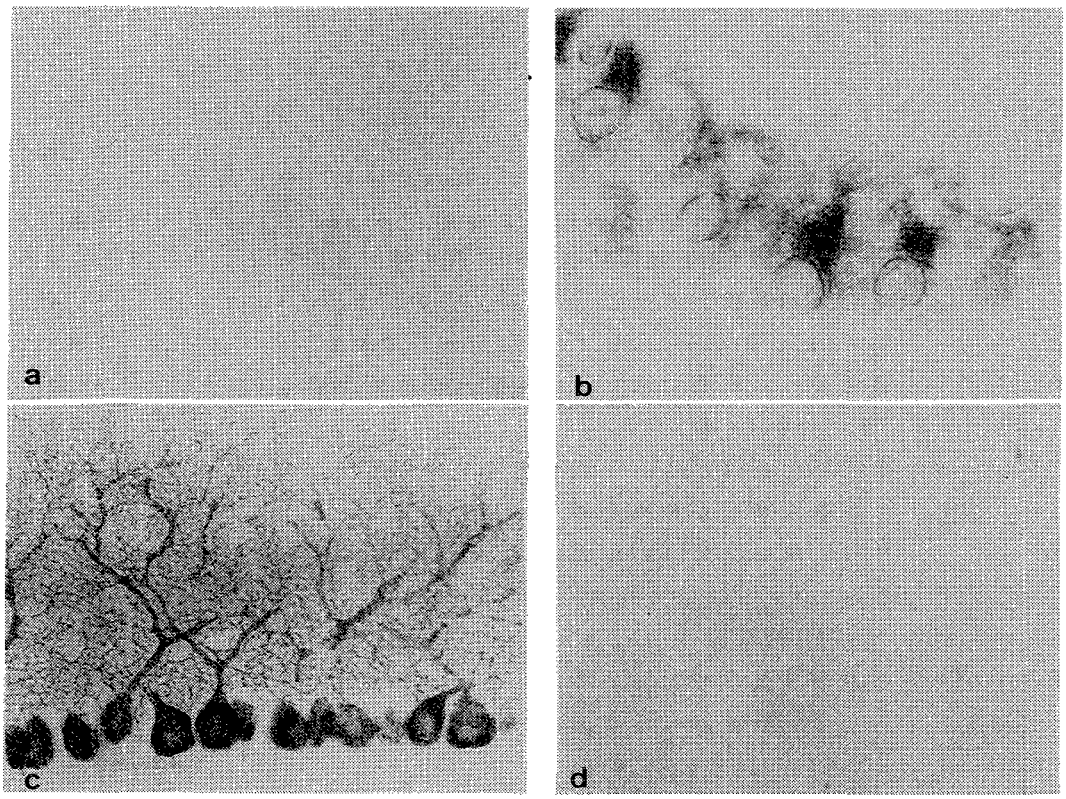


Fig. 2 Sections of normal mouse cerebella of various ages were stained by ABC method with 4C11 monoclonal antibody.
The samples are from a, postnatal day 0 (P0);b, P5;c, P21 cerebellum.
A section of the cerebellum of adult staggerer mutant mouse was also stained similarly (d).
a, c, and d, X100. b, X250.

REFERENCES

(1)Galfre,G., Howe,S.C., Milstein, D., Butcher,G.W., and Howard, J.G. (1977) Nature 266, 550-552
(2)Maeda,N., Nakahira,K., Niinobe,M., and Mikoshiba,K. (1986) 神経化学 25, 235-237
(3)Mikoshiba,K., Huchet,M., and Changeux,J.-P. (1979) Dev. Neurosci. 2, 254-275
(4)Mikoshiba,K., Okano,H., and Tsukada,Y. (1985) Dev. Neurosci. 7, 179-187

136. マウス脳シナプトゾームの高親和性コリン取り込み系における阻害剤の構造特異性

田丸政男・Roberts E.*

（藤田学園保衛大・医・生理，ベックマン研・神経生化*）

〔要　約〕

Na^+依存性高親和性コリン取り込み（HAChU）系の阻害剤の構造特異性について，マウス脳のシナプトゾームを用いてin vitroで検索し，carrierのモデルを推測した。

1)4級アンモニウム(QA)のN原子を荷電のない炭素又はシリコン原子で置換した場合，あるいはコリンのN-methyl基数を減少させて3級アミンにするとHAChUの親和性が著明に減少した。　2)Tetraalkylammonium塩では，alkyl基鎖が2以下の場合はやや強い拮抗阻害を，3以上では親和性が著明に減少した非拮抗型阻害を示した。　3)Trimethylalkylammonium塩では，alkyl基鎖が10-12で強い拮抗阻害を，14以上では親和性が減少した非拮抗阻害を示した。4)コリン分子の水酸基を他の原子団で置換すると親和性が著明に減少した。水酸基を含まない疎水基を持つQA塩では，強力な拮抗阻害を示した。5)疎水基を持つモノQA塩は，ビスQA塩のHemicholinium-3と同じ親和性(IC50=21nM)の強力な拮抗阻害を示した。　以上の結果から，HAChUのcarrierはTetraethylammoniumとほぼ同程度の大きさの2つのanionic sites，及び10-12のalkyl基鎖に相当する疎水性部分を持ち，水酸基はコリン分子の認識にとって重要であり，疎水基を持つQA塩の阻害効果にとっては，水酸基は必須因子ではないことが示唆された。

Key word：　High affinity choline uptake, Inhibition studies, Mouse brain synaptosomes

神経組織のコリンの取り込み機構には，Low affinity choline uptakeとSodium-dependent high affinity choline uptake(HAChU)系の存在が知られており[3]，アセチルコリン(ACh)は後者のHAChU系で取り込まれたコリンから合成されると考えられている[5)7)8)]。又，HAChU系は，阻害物質及び基質に対しての構造特異性の存在が知られており[4)8)]，4級アンモニウム(QA)及び水酸基が阻害効果の重要な因子であるとの報告[1)]や，一方水酸基は必須因子ではないとの報告[4)12)]もある。また，Hemicholinium-3(HC-3)及び1-Pyrene butylcholineのように疎水基を持つQA塩が，強い阻害効果を示すことから，疎水基の存在が阻害効果に関係することが示唆されている[4)]が，不明な点も多い。そこで，本実験では，QA，水酸基又は疎水基の有無がHAChUの阻害に如何なる影響を及ぼすかについて更に検討し，HAChUのcarrierモデルを推測した。

〔実験材料ならびに方法〕

Swiss系の成熟雌マウスの全脳を0.25M庶糖液中で磨砕し，1,000xg，10分間遠心し粗核分画を除き，更に上清を17,000xg，15分間遠心して得られた粗ミトコンドリア分画(P2)を，コリンの取り込み実験に供した。HAChUのmediumは既報[10)]に準じKrebs-Ringerリン酸緩衝液を用いた。　P2懸濁液（約0,4mg蛋白量）を基質を除いたmedium中で37℃，4分間振盪し，[^{3}H]-コリン（終濃度1.0μM）及び阻害剤を添加し更に37℃，4分間振盪した。反応はミリポアフィルター（0.65μm）にP2をトラップする方法で停止し，フィルターはコリンを含まないmediumで3回洗浄した後，　取り込まれた放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。蛋白量はLowryら[9)]の方法に従って定量した。

〔実験結果及び考察〕

1)QAの必要性　コリン(C1:図表中の化合物番号)又はC3のN原子を，プラス荷電のない炭素(C2)又はシリコン(C4)原子で置換すると，それぞれC1又はC3に比し著しい親和性の低下が見られた。又，C1,C5,C6,C7では一分子のメチル基の減少当りIC$_{50}$は約10^2ずつ増加し(表1)，3級アミンより荷電の強いQAの方が阻害効果が強かった。これらはQAのN原子がcarrierとの結合に必要であるという報告[4)11)]と一致し，結合部位のanionic site(s)の存在が示唆された。

2)Tetraalkylammonium塩の阻害効果　表2(右)には，種々のTetraalkylammonium塩のIC$_{50}$を示した。n=1,2は比較的強い拮抗阻害剤であったが，n=3,4では著しく阻害効果が低下した非拮抗阻害剤であった。このことは，荷電したN原子が結合するcarrierのanionic site(s)(ポケット)の大きさが，Tetraethylammonium分子とほぼ同程度と推測された。n=5,6の親和性の上昇は，carrier蛋白の可溶化による阻害効果の増強と考えられた。

3)Trimethylalkylammonium塩の阻害効果　表2(左)は種々のTrimethylalkylammonium塩のIC$_{50}$を示した。n≧6ではalkyl基の増加と共に親和性が上昇し，n=12でIC$_{50}$が最も小さく，n≧14では再び親和性が低下した。n≦12の化合物は全て拮抗阻害であり，n≧14では非拮抗阻害を示した。また2つのN原子の間に10分子のalkyl基を持つC9は，6分子のC10よりも約100倍も阻害効果が強かった(表1)。Holdenら[6)]は，C9と同じ骨格であるがN原子間に18分子のmethyl基を持つ化合物が，HC-3と同程度の親和性を持つ拮抗阻害剤と報告している。この場合は，alkyl基が半分の9 methyl基の所で折れて二重になった疎水基が，carrierの疎水性部分と結合し，強力な阻害効果を発揮したのかも知れない。このことから，既に報告[3)4)]されている様に阻害剤における疎水基の存在が重要な因子になること，及びその分子の大きさが10～12のalkyl基とほぼ同程度であることが示唆された。

4)水酸基の必要性　阻害剤の水酸基の必要性については，相反する報告[4)11)12)]があるが，水酸基を持たないC19(表2)は，それを持つコリン(C1：表1)よりも親和性が約40倍も低下した。又，表1のC13-C17はコリンの水酸基を他の原子団で置換したもので，著明な親和性の低下が示された。一方，C9,C11,C23,C24は水酸基はないが疎水基を持つQA塩で，非常に阻害効果が強かった。このことから疎水基を持たない化合物では，水酸基の存在がcarrierとの親和性に強く関与していることと，疎水基を持つ化合物では水酸基は必要ないことが示された。carrierの基

表1．IC$_{50}$ values of choline and its analogues

C-No.		IC$_{50}$(μM)
C1	$HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N^+(CH_3)_3$	0.68
C2	$HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}C(CH_3)_3$	>10000
C3	$C_6H_5\text{-}N^+(CH_3)_3$	75
C4	$C_6H_5\text{-}Si(CH_3)_3$	>1000
C5	$HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N(CH_3)_2$	55
C6	$HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NHCH_3$	3800
C7	$HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_2$	>10000
C8	Hemicholinium-3(HC-3)	0.021
C9	$(CH_3)_3N^+\text{-}(CH_2)_{10}\text{-}N^+(CH_3)_3$	1.5
C10	$(CH_3)_3N^+\text{-}(CH_2)_6\text{-}N^+(CH_3)_3$	130
C11	Troxopiperidinium	0.021
C12	Hemicholinium-15(HC-15)	6.8
C13	$CH_3\text{-}CO\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N^+(CH_3)_3$	190
C14	$CH_3\text{-}O\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N^+(CH_3)_3$	270
C15	$CH_3\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N^+(CH_3)_3$	340
C16	$H_2O_3P\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N^+(CH_3)_3$	>1000
C17	$O^-\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}N^+(CH_3)_3$	>1000

C-No. : Compound number

表2．IC$_{50}$ values of quaternary alkyl ammonium compounds

n	$(CH_3)_3NC_nH_{2n+1}$ C-No.	(μM)		$(C_nH_{2n+1})_4N$ C-No.	(μM)	
1	C18	30	(+)	C18	30	(+)
2	C19	24	(+)	C28	24	(+)
3				C29	260	(-)
4				C30	1050	(-)
5				C31	98	(-)
6	C20	70	(+)	C32	11	(-)
8	C21	24	(+)			
9	C22	15	(+)			
10	C23	4.2	(+)			
12	C24	3.4	(+)			
14	C25	17	(-)			
16	C26	15	(-)			
18	C27	32	(-)			

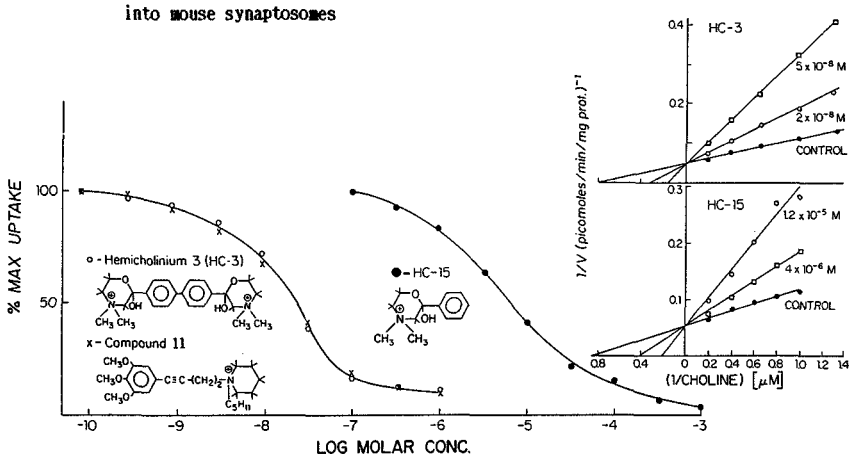
C-No. :Compound number. (+) or (-): competitive inhibitor or not

質特異性に関しては，水酸基のないAchがHAChUで輸送されないこと及びコリンのN-O distanceが4 metyl基以上になると輸送もされないし阻害効果も低下するとの報告[1)2)4)]がある。

5)ビスQA塩及びHC-3 analogueの阻害効果

モノQA塩のC11及びビスQA塩のHC-3の阻害曲線（図）とIC_{50}（表1）が同じであることから，HC-3の2つの窒素原子は2つのcarrierにまたがって結合するのではなく，1つのcarrierが2つのanionic sitesを持つと考えられた。従って疎水基を含むQA塩では，2つのN原子は必要ないことが示された。しかし，HC-3の半分の分子であるHC-15は，拮抗阻害剤であるが親和性がHC-3の約1/300（表1）に低下することから，モノQA塩であってもC11程度の大きさの疎水基を持つことが必要であると示唆された。

図　Inhibitoy effects of HC-3, HC-15 and Compound 11 on HAChU into mouse synaptosomes



以上の阻害実験から，HAChUのcarrierは2つのanionic sites（ポケット）を持ち，その大きさはほぼTetraethylammonium塩と同程度であること，更に10-12のalkyl基鎖に相当する疎水性部分を持つモデルが推測された。水酸基はコリンの認識及び輸送に重要な因子で，carrier中のanionic siteに隣接しているものと思われる。一方，疎水基を持つQA塩においては，水酸基は阻害効果の必須因子でないことが示された。おそらく疎水基を持つQA塩は，carrierの疎水性部分に結合して，carrierの構造変化を不可能にする為に，輸送されないものと思われる。

〔参考文献〕

1) Baztold, F. et. al. (1980) Biochem. Pharmacol. 29: 2413-2416. 2) Collier, B. (1981) J. Neurochem. 36: 1292-1294. 3) Dowdall, M. J. et. al. (1976) J. Neurochem. 27: 1253-1255. 4) Fisher, A. & Hanin, I. (1980) Life Sci. 27: 1615-1634. 5) Haga, T. & Noda, H. (1973) Biochem. Biophy. Acta 291: 564-575. 6) Holden, J. T. et. al. (1975) Mol. Pharmacol. 11: 19-27. 7) Jope, R. (1979) Brain Res. Reviews 1: 313-344. 8) Kuhar, M. J. & Murrin, L. C. (1978) J. Neurochem. 30: 15-21. 9) Lowry, O. H. et. al. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275. 10) Riker, D. K. et. al. (1979) Mol. Pharmacol. 16: 886-899. 11) Simon, J. R. et. al. (1975) Biochem. Pharmacol. 24: 1139-1142. 12) Sterling, G. H. et. al. (1986) J. Neurochem. 46: 1170-1175. 13) Yamamura, H. I. & Snyder, S. H. (1973) J. Neurochem. 21: 1355-1374.

137. 摘出上頸交感神経節のコリン取り込み系

岩田光良・田丸政男・永田　豊
（藤田学園保衛大・医・生理）

〔要　約〕

摘出上頸部交感神経節(superior cervical ganglia, SCG)の高親和性コリン取込み(high affinity choline uptake: HAChU)と，低親和性コリン取込み(low affinity choline uptake: LAChU)について，節前神経切断(denervation)，節後神経切断(axotomy)，Na^+-依存性，および Hemicholinium-3(HC-3)感受性を検討した。1)，摘出SCGのHAChUは見かけ上ほとんど認められなかった。2)，denervation 後一週間で cholinergic nerve terminalが完全に変性したSCGでは，intact SCGと比べてHAChU の減少は全く認められなかった。また，ニューロンの逆行性変性をおこした axotomyzed SCGでも，やはりChU系に変動はみられなかった。3)，コリン取り込み抑制剤のHC-3はSCGのHAChUをLAChUよりも著明に抑制した。4)，生後一週間の鼠のSCGでは，HC-3(100μM)によるChUの変動は全く認められなかったが，生育と共に LAChUよりもHAChUで著明に抑制が示された。5)，HAChU のNa^+依存性は，denervationやaxotomy後のSCGでintact SCGと比較してほとんど変動が見出されなかった。従って，cholinergic transmission と密接に関連しているといわれる Na^+-依存性HAChU系は，鼠SCGにはほとんど見出されず，そのACh合成系と密接に共役しているとは考えにくい。

Key word： Na^+ dependent high affinity choline uptake (NaDHAChU), hemicholinium-3 (HC-3), superior cervical sympathetic ganglia (SCG).

コリン作動性シナプスでその伝達物質のアセチルコリン(acetylcholine, ACh)の生合成がおこなわれるためには，神経終末部内へコリン基質の能動的な取り込みが必須である。このコリン取り込み系(choline uptake (ChU) system)はNa^+依存性高親和性過程(Na^+ dependent high affinity choline uptake: NaDHAChU)で，hemicholinium-3(HC-3)によって特異的に抑制されることがよく知られている[8]。このようなChUの特徴は主として新鮮動物脳組織より調整したシナプトソーム分画を用いて詳細に研究されてきた。しかし，脳シナプトソームは決して純粋なcholinergic synapseのみから成立っているものではなく，他の神経伝達物質を介するシナプスをも種々の割合に含んでいる。そこで，我々はコリン作動性シナプスを含む代表的臓器である上頸部交感神経節(superior cervical ganglion, SCG)について NaDHAChU系を調べ，節前(denervation)あるいは節後神経切断(axotomy)手術を行ったあと神経末端あるいは神経節ニューロンの変性をひきおこしたSCGで，このChU系がどのように変動するかを，またHC-3によるChUの抑制性あるいはNa^+依存性が鼠の生後発育に伴ってどのように変動するかを検討した。

〔実験材料ならびに方法〕

SCG のdenervationおよびaxotomy手術は，Wistar系成熟白鼠を用いて既報[1)2)]に従って実施した。SCG標本の摘出はやはり既報の如く，生後1，2，3，4週齢ならびに成熟白鼠の頸部を切開しておこない，周囲に付着している結合織を注意深く除去した。SCGへのChUは，preincubation 30分後に^{3}H-cholineおよびcarrierの2.5μM-choline

(HAChU)あるいは 50μM-choline (low affinity choline uptake: LAChU)を含む生理溶液 (standard bathing solusion SBS)溶液中で37℃, 20分間好気的にインキュベーションを行った。その後, SCGを "cold"SBS中で30秒間洗浄して組織周囲のRI汚染を除去した後，ホモゲナイズしてHagaの方法[7]でコリンを抽出して，その放射能を測定してSCG内へのChU量を測定した。SCGの蛋白量は Lowryらの方法[9]で定量した。

〔実験結果および考察〕

1)，SCGのコリン取り込みにおよぼす，denervationあるいは axotomyの影響：溶液中のコリン濃度を変化させてインキュベーションした場合，SCG内へのコリンの能動的取り込み量をdouble reciprocal plottingすると一直線上にのり，脳シナプトゾームの場合とは異なってHAChU成分は認められなかった（図1）。denervation手術一週間後に摘出したSCGでは，そのACh生合成酵素(choline acetyltransfelase, ChAT)活性はほとんど消失しており[1]，cholinergic nerve terminal (ChNT)の変性・消失がおこっていると考えられる。このdenervated SCGを2.5μMコリンを含む溶液中でインキュベートすると，そのHAChUはChNTを含んでいるintact SCGのものと比べてほとんど変化が認められなかった（表1，2）。この実験成績は，HAChUが ChNTに特異的に局在して見出されると言う脳シナプトゾームを用いた実験諸成績[8]とは異なっている。そして，これは SCGの

Fig 1: Double Reciprocal Plots of Choline Uptake in SCG

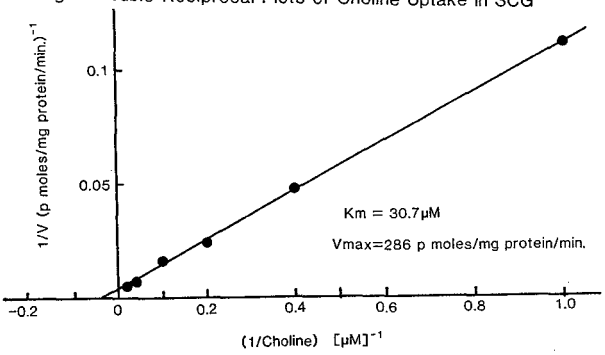


Table 1: HC-3 Sensitivity on HAChU in SCG

HC-3 concentration		Intact SCG	Denervated SCG	Axotomized SCG
0μM		26.6±2.89(4)	26.5±4.39(4)	28.6±3.51(3)
100μM		16.1±1.92(4)	15.5±2.69(4)	16.1±1.83(4)
per cent change from no HC-3 addition		60.5	58.5	56.3
per cent change from intact SCG	HC-3			
	0 μM	100	99.6	107.5
	100μM	100	96.3	100.0

Values are p mol choline uptake /mg protein ±SEM , with number of experiments in parentheses. Rats were killed at 2 weeks after operation. Isolated SCG were incubated in standard bathing solution containing 2.5μM-^{3}H-and carrier choline for 20min at 37℃

Fig 2: Dose-dependent HC-3 Inhibition in SCG

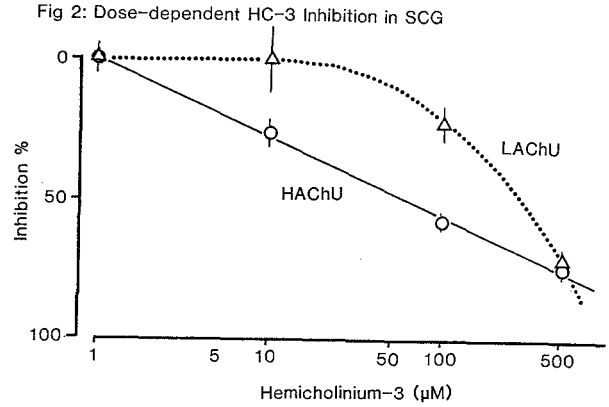
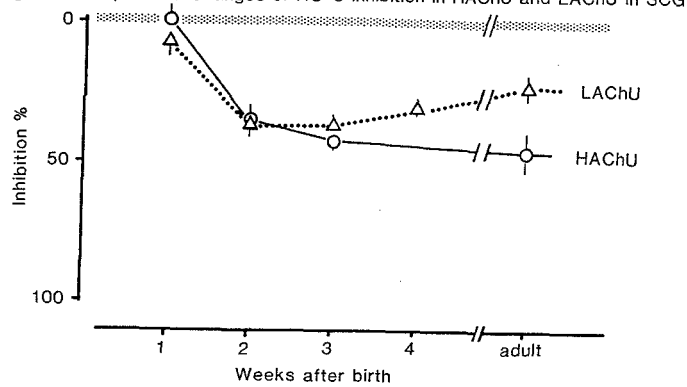


Fig 3: Developmental Changes of HC-3 Inhibition in HAChU and LAChU in SCG



ChNTには毛様神経節の場合と同様にHAChU系が存在しないか，あるいはほんの一部しか見出されないという報告とも一致している[3)4)11)]。

Table 2: Sodium Dependency on HAChU in SCG

Na^+-concentration		Intact SCG	Denervated SCG	Axotomized SCG
0 mM		11.99±0.48(4)	13.54±0.48(4)	14.91±0.66(3)
25 mM		28.75±0.70(4)		
150 mM		29.89±2.01(4)	30.31±4.67(3)	28.57±0.76(4)
Na^+-dependent uptake		17.90	16.77	13.66
per cent change from intact SCG	Na^+cont			
	0 mM	100	112.9	124.3
	150mM	100	101.4	95.6

Values are p mol choline uptake /mg protein ±SEM, with number of experiments in parentheses. Rats were killed at 1 weeks after operation. Isolated SCG were incubated in standard bathing solution containing 2.5μM-^{3}H-and carrier choline for 20min at 37℃.

2), HC-3によるSCGのChU系の抑制: コリンの能動的取り込み系の特異的・競合的阻害剤，hemicholinium-3[5)]は，濃度依存性に摘出SCG内へのHAChUを抑制した。しかし溶液中に50μMコリンを含むLAChU系に対しては，HC-3濃度が50-100μMの間でHAChUの抑制よりも少なかった（図２）。そこでHAChUとLAChUを区別できるHC-3濃度100μMで実験をおこなった。SCGのChUに対するHC-3による抑制は，生後一週間の鼠のSCGでは全く認められなかった。しかしHC-3のHAChUの抑制は発育と共に強まり，成熟SCGでは50%に達した。一方，LAChUのHC-3による抑制は生後二週間目でHAChUと同程度であったが，成熟SCGでは約20%に留まった。また，HC-3によるHAChUの抑制は，denervationあるいはaxotomy手術をおこなったSCGでは，intact SCGと比較して有意の変動は認められなかった。

3), SCGのHAChUのNa$^+$依存性: cholinergic synapseにおけるHAChUの特徴の一つとして，Na$^+$依存性があげられる[7)]。しかし，intact SCGのNa$^+$ dependent choline uptake (NaDChU)は認められるけれども，denervationあるいはaxotomy手術によってnerve terminalあるいは神経節ニューロンの脱落をひきおこしても，わずかに減少の傾向が認められたにすぎなかった（表２）。これは，鼠脳のcholinergic septum－hippocampus間の伝導路の切断後，海馬シナプトゾームのNaDHAChUが著明に減少したとする報告[10)]とは異なっている。

以上の実験成績から，神経系のcholinergic transmissionと密接に関連してはたらいていると考えられているNaDHAChU系は，鼠SCGでは一部しか認められず，それが組織内でのACh生合成と密接に共役して活動している可能性は低いと思われる。

〔参考文献〕

1) Ando, M. et. al. (1983) Brain Res. 267: 313-321. 2) Ando, M. et. al. (1984) J. Neurochem. 42: 94-100. 3) Bowery, N.G. & Neal, M.J. (1975) Brit. J. Pharmacol. 55: 278. 4) Collier, B. & Katz, H.S. (1974) J. Physiol. 238: 639-655. 5) Diamond, I. & Milfay, D. (1972) J. Neurochem. 19: 1899-1909. 6) Haga, T. (1971) J. Neurochem. 18: 781-798. 7) Haga, T. & Noda, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta. 291: 564-575. 8) Kuhar, M.J. & Murrin, L.C. (1978) J. Neurochem. 30:(Minireview) 15-21. 9) Lowry, O.H. et. al. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275. 10) Simon, j.r. et. al. (1986) J. Neurochem. 26: 909-922. 11) Suzkiw, J.B. et. al. (1976) J. Neurochem. 26: 1123-1131.

138. ヒト脳内微小血管の生化学的検討

辻　輝之・中野　智・越村邦夫・三森康世・
中村重信・亀山正邦*
（京都大・医・神経内科，住友病院*）

〔要　約〕

凍結保存されたヒト剖検脳より、arteriole中心の大きい血管(L)とcapillary中心の血管(S)の二種類の微小血管を分離し、その各々について5'-nucleotidase(5'-N), adenylate cyclase, 3'-5'-phosphodiesterase(PDE), acetylcholinesterase(AChE), choline acetyltransferase(ChAT)の各酵素活性を検討した。AChEについてはそのisozymeを検討した。5'-Nは脳実質に比べ血管で有意に低値であった。PDEは血管(L)>(S)に比べ有意に高値であったが、血管と脳実質で差はなかった。これに対しadenylate cyclaseは血管で極めて低値であった。AChEは血管で高値であり両血管分画間では(S)で(L)に比べ有意に高値であった。これに対しChATは血管では殆ど検出されず、両者の値に極端な解離をみとめた。従って、脳内血管に対するcholinergic neuronのinnervationはあっても僅かであり、AChEのoriginがこれとは異なることが示唆された。脳血管のAChE isozymeは脳homogenate(G4)と異なり、分子量の大きいものが中心であった。

Key word：human cerebral microvessels, acetylcholinesterase, phosphodiesterase

［はじめに］

脳内微小血管は脳血液関門を構成すると共に脳循環代謝に果たす役割も大きい。近年脳内血管を分離することが可能になり、その生化学的特質が明らかにされつつあるしかしこれらの大部分が動物実験に限られ、ヒトでの検討は殆どみられない。動物実験の結果にみられる種族差を考えるとヒトでの検討が重要であることは言をまたない加えて豊富なstocked brainを使用できるよう我々は凍結保存脳からの血管分離を考案した。今回は脳血流や血管透過性との関連が考えられているadenosine, cyclic AMP関連酵素である5'-N, PDE, adenylate cyclase及び、ChAT, AChEについて検討した。

［方法］

脳内血管の分離法(8)

-80℃に凍結保存した脳を半解凍して、pia arachnoid membraneを剝離し、3-4gの小片に分け、再び凍結保存した。stainnless steel bladeで細切し、Earle's medium中にsuspendした後、225μmのnylon meshを通す。mesh上のmaterialを同medium中にresuspendし、hand driveでhomogenizeした後、73μmのmesh上に集めた。150μmのmeshを用いてmesh上に残ったものを(L)、ろ過されたものを(S)とした。両者を0.5mm径のglass beads columnを通し、beadsに吸着されたvesselを0.25M sucroseで洗い出した。3500g 10分間遠沈したあと、discontinuous sucrose density gradient(1.5, 1.3, 1.0 M)上で58000g, 60分間遠沈し、沈査を集めた。

測定方法

γGTP: γ-glutamyl-p-N-hydroxyethyl aminoanillidを基質として用いた。

cerebroside: Folchi法にて脂質を抽出し、cerebroside中のgalactoseをorcinol反応により定量した(Hess et al)[4]。

5'-nucleotidase：^{14}C-5'-AMPを基質として37℃，15分間反応させ、生じた^{14}C-adenosineをcountした(Nakamura)[5]。

adenylate cyclase:ATPを基質として反応させ生じたcAMPをradioimmunoasseyにて測定した(Hegstrand et al)[3]。

3'-5'-phosphodiesrerase: ^{14}C-cyclic AMPを基質として30℃で反応させた後、snake venomを加え再び30℃で反応させ生じた^{14}C-adenosineを測定した(Pichard et al)[7]。

AchE: acetylthiocholineを基質として37℃で反応を行い、生成した5-thio-2-nitro-benzoateを412nmで吸光度を測定した。偽ChE活性はbutyrylthiocholineを基質として測定し、AchE活性をacetylcholine分解速度ー butyrylcholine分解速度/1.75で求めた(Nakano et al)[6]。

ChAT: ^{3}H-acetyl CoAより生じた^{3}H-acetylcholineの放射能で測定した(Fonnum)[2]。

AChE isozyme:シヨ糖密度勾配法にて測定した。

[結果]

分離した脳内血管の二つの分画はそのつど位相差顕微鏡にて観察した。(L)は一部capillaryを含むが中心はarterioleであった。(S)は大部分をcapillaryが占めた。このpreparationの生化学的指標として用いたγGTPは血管で脳実質(H)に比べ数倍から数十倍の高値であり(Fig.1a)逆にcerebrosideは血管での値は(H)の数％の低値であった(Fig.1b)。5'-Nは(L)が8.4±1.90(nmol/min/mg prot),(S)6.77±1.90といずれも(H)の11.81±2.10に比べ有意に低値を示した (Fig.2a)。PDEは(L)では54.5±16.7(pmol/ min/mg prot)と(S)の29.44±14.4に比べ有意に高値であったが血管と脳実質で差はなかった(Fig.2b)。adenylate cyclaseは(L)3.37±2.93、(S)8.20±6.29と(H)55.3±26.0に比べ血管で極端に低値であった(Fig.2c)。AChEは(L)で6.54±1.25(nmol/min/mg prot),(S)で8.89±1.63と(H)の4.28±1.36に比べ血管で高値を示した(Fig.3)。ChATは血管で(H)に比べ極端に低値であった(Fig.3)。血管のisozymeの検討では、脳実質では大部分をG4が占めるのに対し、血管AChEでは高分子量のfractionに最大のpeakがあり、両者のpatternに大きな相違を認めた(Fig.4)。

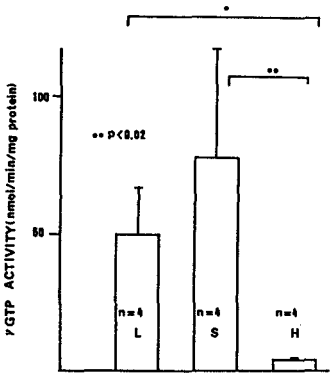


Fig.1a

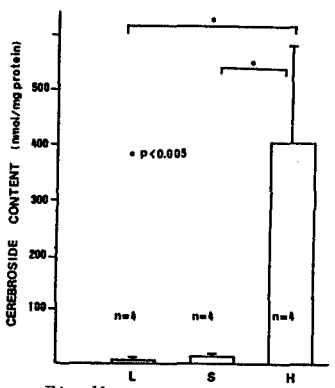


Fig.1b

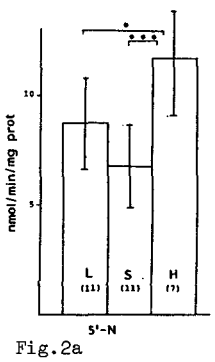


Fig.2a

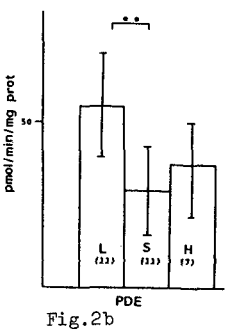


Fig.2b

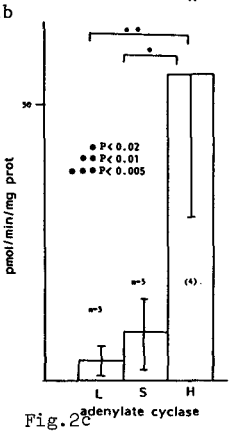


Fig.2c

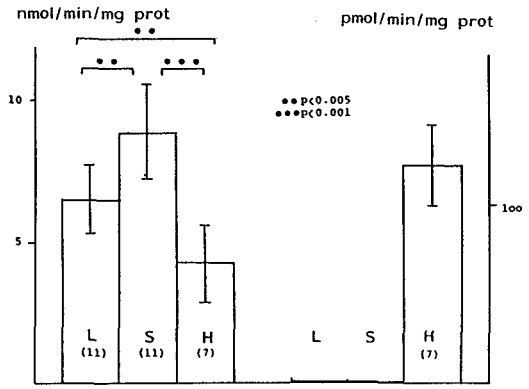


Fig.3

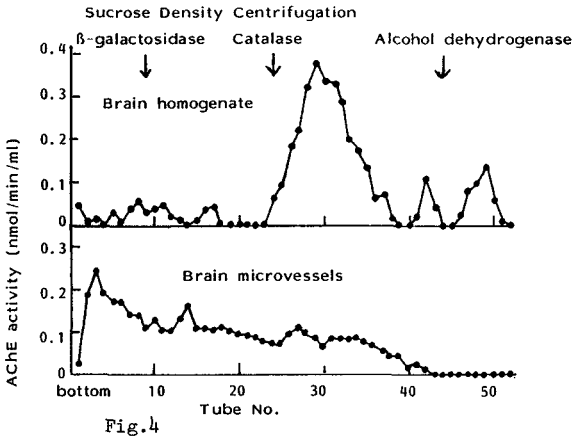


Fig.4

[考察]

ヒト脳内微小血管を凍結保存脳より分離した。形態観察及びγGTP、cerebroside値より、周囲組織の混入は軽微であった。5'-Nは組織化学的には、脳血管の基底膜に存在し、血管周囲のadenosine濃度の変化に関与している可能性がある。今回のヒト正常老人脳では血管での5'-Nは脳実質に比べ有意に低値であった。一方cyclic AMPに関しては、分解酵素のPDEは脳実質と大差なかったが、合成酵素のadenylate cyclaseは血管で極端に低く、cyclic AMP調節のmechanismに脳実質と血管で相違のあることが示唆された。ヒト脳内血管ではChATは低く、周囲組織の混入を除外できなかった。動物実験では、脳血管のChAT、muscarinic receptorが同定されているが、ヒトではその存在を疑問視する報告がみられる[1]。今回の結果でもヒトでは脳血管のChAT活性はないか、あっても僅かなものと考えられる。これに対し血管のAChEは脳実質に比べ高値を示した。これは、ChATとの解離から、血管に対するcholinergic neuron由来のものではないと考えられる。isozymeの検討からこの血管にみられるAChEが脳内に主としてみられるG4とは異なりより分子量の大きいもの(A12)が中心である可能性が示され

文献

1)Ferrari-Dileo,G. and Potter,L.T.(1985)J.Cereb.Blood Flow Metabol.,5,465-468
2)Fonnum,F.(1975)J.Neurochem.,24,407-409.
3)Hegstrand,L.R.,Kanof,P.D.,and Greengard,P.(i976)Nature 260,163-165.
4)Hess,H.,and Lewin,E.(1965)J.Neurochem.,12,205-211.
5)Nakamura,S.(1976)Biochem.Biophys.Acta.,426,339-347.
6)Nakano,S.,Kato,T.,Nakamura,S.,and Kameyama,M.(1986)J.Neurol.Sci.,75,218-223
7)Pichard,A.L.,and Chung,W.Y.(1976)J.Biol.Chem.,251,5726-5737
8)Tsuji,T.,Mimori Y.,Nakamura,S.,and Kameyama,M. J.Neurochem. (in press)

139. 先天性内分泌異常マウス下垂体ＶＩＰの変動と視床下部ＶＩＰ

野口鉄也・杉崎哲朗・金松知幸

（東邦大・医・第二生理）

〔要　約〕

Vasoactive intestinal peptide (VIP)は視床下部に分布し、下垂体門脈系の血中に含まれ、脳室内に注入すると下垂体前葉ホルモンの分泌が刺激され、培養プロラクチン(PRL)細胞に添加するとPRLが分泌され、かつ、産生も増加し、電顕的にPRLとVIPが細胞内に共存していることなどが知られている。そこでSnell下垂体性小人症マウス(dw)、成長ホルモン(GH)単独欠損症Littleマウス(lit)と先天性甲状腺機能低下症マウス(hyt)を用いて、VIPとmethionine-enkephalin(met-Enk)の脳内、下垂体内分布とPRLの存在とを比較検討した。その結果、(1) 正常対照群の雌マウス下垂体は雄マウスのそれに比較してVIP含量が高かった。(2) 40日齢の各ミュータントマウスで下垂体内でのVIP含量が正常対照群に比較して極度に減少していたが、met-Enkには異常が無かった。(3) いずれのミュータントマウスでも下垂体内PRL含量は極度に減少していた。(4) 脳内VIP濃度はhytマウスのFrontal cortexとdwマウスのHippocampusで有意に増加していたが、Hypothalamusではいずれのミュータントマウスでも正常対照群と差が無かった。(5) met-Enk濃度はいずれのミュータントマウスでも異常が認められなかった。以上のことから、先天的にPRL分泌に障害をもつdw, litマウスに加えてhytマウスでもPRL分泌に障害のあることが明らかとなった。更に、下垂体VIPが視床下部VIPと無関係に存在し生理機能を発現している可能性と、dwマウスとlitマウスは小頭症を示すことから、脳の多くの部位でpeptidergic神経細胞の発育成長が障害を受けいることも示唆された。

Key word：VIP concentration, Pituitary, Hypothalamus.

【序文】

Vasoactive intestinal peptide (VIP) は視床下部に分布し(2)、下垂体門脈系の血中に多量に含まれている(19)。VIPを脳室内に注入すると下垂体前葉ホルモンの分泌が刺激され(6)、培養プロラクチン(PRL)細胞にVIPを添加するとPRLが分泌され(5)、産生も増加すること(18)などが知られている。他方、Morelら(9)は免疫電顕によりVIPとPRLが共存していることを報告している。ラット脳ではVIP含量が出生後に著しく増加する(8)。先天性内分泌異常ミュータントマウスのうちSnell下垂体性小人症マウス(dw)と成長ホルモン(GH)単独欠損症Littleマウス(lit)は出生後の神経細胞の発育成長に障害を受けている(11、12)。そこで今回は上記二種のミュータントマウスに加えて、先天性甲状腺機能低下症マウス(hyt)を用い、ニューロペプチドの脳内、下垂体内分布を比較し、更にPRLの存在と含量に就いても検討を加えた。

【材料と方法】

動物：40日齢のdw,lit,hytマウスを実験に用いた。各動物はジャクソン研究所より購入し、既報の方法(13、15、16)にしたがって自家繁殖した。**VIPとmetionine-enkephalin (met-Enk)のラジオイムノアッセイ(RIA)**：ヨード化VIP,ヨード化met-Enk及びそれぞれの抗体をAmersham社から、VIPとmet-Enkの純品はそれぞれPeninsula社、蛋白質研究奨励会から購入し、脳各部位をGlowinskiとIversenの方法(4)で分け、下垂体は前葉後葉を一緒にして、ペプチドを２Ｍの酢酸で抽出し、測定を行った。**スラブゲル電気泳動法**：10%アクリルアミドスラブゲルpH 9.5をOrnstein(17)とDavis(3)の方法にしたがって作製し、各動物の下垂体ホモジェネートを泳動した。PRLのバンドはNIADDKより恵与をうけたmPRL抗体を用いてWestern blotし、同定した。

【結果】

VIPとmet-Enkの下垂体内濃度：40日齢の各ミュータントマウスと正常対照群の雌雄の下垂体につきVIPとmet-Enk濃度を測定した。met-Enkは各種マウスで正常対照群とミュータントマウスの間及びそれ

ぞれの雌雄の間に差は全く認められなかった。しかし、VIPについて見ると、いずれのマウスの正常対照群でも雌マウスでその濃度は高く、かつ、ミュータントマウスで著しく減少していた(表-1)。**下垂体の免疫組織学的所見**：各種マウスの雌雄の下垂体につき、VIP,met-Enk,PRLの抗体を用いて免疫組織学的に染色した。いずれのミュータントマウスでもVIP陽性及びPRL陽性細胞は減少していた。又、met-Enk陽性繊維は下垂体後葉にのみ認められ、各種マウスでの正常対照群とミュータントマウスとの間には差は見られなかった。更に、ウシ下垂体を用いてVIPとPRLの二重染色法を行ったところ、両者の明らかな共存が認められた(写真を省く)。**下垂体スラブゲル電気泳動像**：3種の動物の正常対照群とミュータントマウスの雌雄の下垂体ホモジェネートを電気泳動にかけた。ミュータントマウス雌雄いずれの下垂体でもPRLは著名に減少していた(図)。**VIPとmet-Enkの脳各部位の濃度**：40日齢の各種マウスの脳各部位のVIP(表-2)とmet-Enk濃度を測定した。但し、これらの濃度に雌雄の差が見られなかったので、雌雄合わせた値を記載した。VIP濃度では、hyt/hytマウスのFrontal cortexと、dw/dwマウスのHippocampusで有意に増加していたが、他の部位、特にHypothalamusでは有意な差は見られなかった。met-Enk濃度は、脳の各部位で正常対照群とミュータントマウスとの間に差は無かった。

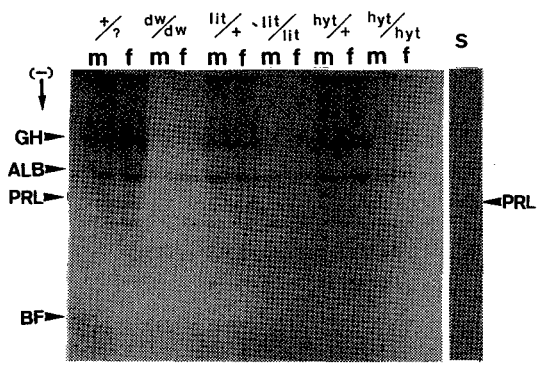
(表-1)

TISSUE WEIGHT AND VIP CONCENTRATION OF HORMONE(S)-DEFICIENT MUTANT MOUSE PITUITARY

Mouse	Pituitary Weight (mg)	VIP Concentration (pg/mg wet weight)
Snell Dwarf		
+/? Male	1.08 ± 0.11 (16)	114 ± 14 (6)
+/? Female		474 ± 98 (6)
dw/dw Male	0.40 ± 0.03 (16)	10.9 ± 0.1 (6)
dw/dw Female		8.28 ± 2.1 (6)
Little		
lit/+ Male	1.15 ± 0.12 (15)	6.47 ± 1.31 (6)
lit/+ Female		23.4 ± 9.0 (6)
lit/lit Male	0.34 ± 0.05 (15)	1.09 ± 0.81 (6)
lit/lit Female		0.01 ± 0.01 (6)
Hypothyroid		
hyt/+ Male	1.14 ± 0.13 (15)	33.9 ± 11.5 (6)
hyt/+ Female		236 ± 98 (6)
hyt/hyt Male	0.88 ± 0.12 (15)	4.88 ± 1.82 (6)
hyt/hyt Female		5.13 ± 0.98 (6)

Values are expressed as mean + S.D. with the number of animals in parentheses. Statistical significance was determined by Student's t-test. *: $p<0.01$.

(図)



HOMOGENATE OF WHOLE PITUITARY GLANDS IN 10% ACRYLAMIDE GELS.
GH: growth hormone; ALB: albumin; PRL: prolactin; BF: buffer front; S: standard; m: male; f: female.

【考察】

dw/dwマウス、lit/litマウスで下垂体前葉PRLが欠損していることは既に知られている(1,7)。hyt/hytマウスの下垂体前葉をみるとGH細胞は脱顆粒し同時にその数も減少し、多くのThyroidectomy cellsと嫌色素性細胞で占められている(10)。このことはhyt/hytマウス下垂体前葉でもPRL細胞の減少を疑わせたが、今回行った実験からPRLの減少は明らかとなった。したがって、下垂体でのVIPの減少はPRL細胞の減少によるものと考えられた。他方、下垂体でのmet-Enk濃度がいずれのミュータントでも変化を示さなかった事は、これらの動物の下垂体後葉が正常に機能していることを示すものと思われた。又、脳各部位のmet-Enk濃度が各種動物の正常対照群とミュータントマウスとの間で差が見られなかった事は、内分泌異常が及ばない胎生期にmet-Enkが脳内に既に出現してしまうことによると解釈される。他方、VIPが視床下部より門脈系を通って下垂体前葉に働きPRLの分泌を調節しているとの考えがある。しかし、我々が検索した結

果からはいずれの種類の動物でも視床下部のVIP濃度に異常は全く認められなかった。このことはin vitroのみでVIPがPRL細胞に対して直接働くのか、あるいは、Prolactin releasing factorと異なった機序によって働くのか今後の課題として残される。又、下垂体VIPが脳内VIPとは無関係にPRL細胞に働いている可能性も考えられる。しかし、我々は、視床下部全体を取り出し、VIP濃度を測定しており、ある特定の神経核でのVIP濃度の変化は捕らえることができてはいない。このため、今後更に免疫組織学的に詳細な検討が必要であろう。又、hyt/hytマウスのFrontal cortexで、dw/dwマウスのHippocampusでのVIPの増加の機序については現在のところ不明である。しかし、既報のごとくdw/dwマウス大脳は正常マウスに比較して脳重が60-70%に減少していること(14)、又、lit/litマウスでは80%に減少していること(15)から両ミュータントマウス脳では多くの部位でpeptidergic神経細胞の発育成長が障害を受けている可能性が示唆される。

VIP CONCENTRATION OF HORMONE-DEFICIENT MUTANT MOUSE BRAIN (pg/mg wet weight) (表-2)

	Frontal Cortex	Caudate Nucleus	Hypothalamus	Hippocampus	Brain Stem
Snell Dwarf					
+/?	37.3 ± 5.7 (12)	17.4 ± 6.3 (12)	87.7 ± 29.8 (12)	28.3 ± 2.0 (12)	9.48 ± 1.71 (12)
dw/dw	34.0 ± 3.6 (12)	19.8 ± 7.4 (12)	69.1 ± 19.8 (12)	45.8 ± 7.2 (12)*	10.5 ± 1.4 (12)
Little					
lit/+	36.0 ± 5.0 (12)	15.6 ± 6.1 (12)	88.3 ± 14.5 (12)	33.4 ± 6.1 (12)	10.3 ± 3.0 (12)
lit/lit	35.0 ± 6.9 (12)	14.9 ± 3.5 (12)	87.5 ± 15.4 (12)	32.7 ± 3.7 (12)	9.87 ± 2.82 (12)
Hypothyroid					
hyt/+	25.1 ± 3.9 (12)	12.1 ± 4.3 (12)	80.1 ± 19.8 (12)	30.2 ± 1.7 (12)	9.95 ± 1.69 (12)
hyt/hyt	36.7 ± 7.3 (12)*	12.3 ± 3.5 (12)	78.6 ± 29.1 (12)	26.8 ± 5.6 (12)	8.78 ± 2.23 (12)

Values are expressed as mean + S.D. with the number of animals in parentheses. All differences from control data are significant Student's t-test. *: <0.01

【文献】

1)Beamer,W.G. and Eicher,E.M.(1976)J.Endocrinol.71,37-45. 2)Besson,J.,Rotsztejin,W.,Laburthe,M.,Epelbaum,J.,Beaudet,A.,Kordon,C. and Rosselin,G.(1979)Brain Res.165,79-85. 3)Davis,B.J.(1964)Ann.NY Acad.Sci.121,404-427. 4)Glowinski,J. and Iversen,L.L.(1966)J.Neurochem.13,655-669. 5)Gourdji,D.,Bataille,D.,Vauclin,N.,Grouselle,D.,Rosselin,G. and Tixier-Vidal,A.(1979)FEBS Lett.104,165-168. 6)Kato,Y.,Iwasaki,I.,Iwasaki,J.,Abe,H. and Yanaihara,N.(1978)Endocrinol.103,554-558. 7)Lewis,U.J.(1967)in Endocrine genetics,pp179-188. 8)McGregor,G.P.,Woodhams,P.L.,O'Shaughnessy,D.J.,Ghatei,M.A.,Polak,J.M. and Bloom,S.R.(1982)Neurosci.Lett.28,21-27. 9)Morel,G.,Besson,J.,Rosselin,G. and Dubois,P.M.(1982)Neuroendocrinol.34,85-89. 10)Noguchi,T.,Kudo,M.,Sugisaki,T. and Satoh,I.(1986)J.Endocrinol.109,163-168. 11)Noguchi,T.,Sekiguchi,M.,Sugisaki,T.,Tsukada,Y. and Shimai,K.(1983)Dev.Brain Res.10,125-138. 12)Noguchi,T. and Sugisaki,T.(1985)Exp.Neurol.89,274-278. 13)Noguchi,T., and Sugisaki,T.(1984)J.Neurochem.42,891-893. 14)Noguchi,T.,Sugisaki,T.,Takamatsu,K. and Tsukada,Y.(1982)J.Neurochem.39,1693-1699. 15)Noguchi,T.,Sugisaki,T. and Tsukada,Y.(1985)Neurochem.Res.10,1097-1106. 16)Noguchi,T.,Sugisaki,T. and Tsukada,Y.(1982)J.Neurochem.38,257-263. 17)Ornstein,L.(1964)Ann.NY Acad.Sci.121,321-349. 18)Rotsztejin,L.,Benoit,L.,Besson,J.,Beraud,G.,Bluet-Pajot,M.T.,Kordon,L.,Rosselin,G. and Duval,J.(1980)Neuroendocrinol.31,282-286. 19)Said,S.I. and Porter,J.C.(1979)Life Sci.24,227-230.

140. Luteinizing Hormone 分泌（とくにLH surge）に対する不確帯
—視床下部dopamine 神経系の関与

平野　均・水木　泰・山田通夫・平野　誠*・
松本　孝*・内村英幸*・中原辰雄**
（山口大・医・神経精神，国立肥前療養所*・九州大・理・化学**）

〔要　約〕

Luteinizing Hormone (LH) 分泌に対する不確帯－視床下部 (IH)-dopamine (DA) 神経系の関与のメカニズムを解明するために，まず卵巣摘出ラットに estradiol (E_2; 30μg/rat/sesame oil) を投与し，留置カテーテルより採血を行い，15時から18時にかけて出現するLH surgeのパターンを明らかにした。次に，卵巣摘出ラットにE_2 (E群) および溶媒 (V群) を投与し，9時，15時，18時に断頭し，E群でLH surgeの出現を確認した。また，両群の摘出脳から次の5部位〔室周囲核：PPE，内側視束前核：POM，視束前核視交叉上部－視交叉上核：POSC-SCN，内側不確帯－視床下部背内側核：MZI-DM，視床下部前核：AH〕を切り出し，DA，DOPAC，HVAをHPLC-ECD法により測定した。その結果，E群では，POSC-SCNのDOPACおよびAHのHVAが9時に比較し18時で有意の高値を示した。さらに，V群と比較し，9時では，POM，POSC-SCNでDOPACが有意の低値を示し，MZI-DMでHVAが有意の高値を示した。15時では，PPEでDOPAC・HVAが有意の低値を示した。18時では，PPE，POM，POSC-SCNでDOPACが有意の低値を示し，逆にAHでHVAが有意の高値を示した。これらの結果から，E_2によりもたらされた特定の時刻におけるIH-DA神経系の特定の部位での活動の変化が，LH surgeの発現に関与している可能性が示唆された。

Key word：Luteinizing Hormone, Estradiol
Incerto-hypothalamic dopaminergic system

正常雌性ラットでは，性周期における発情前期の午後にLuteinizing Hormone (LH) surgeが起きる[2),13)]。卵巣摘出によりこのLH surgeは消失する一方，20分から30分を一周期とする挿話的な分泌が繰り返し出現し，LHの基礎分泌値は上昇する[14)]。さらに，この卵巣摘出ラットにestrogen (E) を投与すると即座にLH基礎分泌値は低下しはじめ挿話的分泌パターンは消失し，2～3日後から発情前期の正常ラットと酷似するLH surgeが出現し，サーカディアン・リズムを形成する[7),12)]。このように，EはLH分泌に対し基礎分泌を抑制し，LH surge発現を促進するという2面的作用を持つ。一方，不確帯－視床下部 (IH)-dopamine (DA) 神経系は，発情前期のLH surgeと排卵に対し促進的に作用するという報告[11),6)]があるが，その生化学的メカニズムは未だ十分には解明されていない。そこで，今回LH分泌に対するこのDA神経系の関与を検討するために，卵巣摘出後estradiol (E_2) および溶媒を投与した2群のラットにおいて，血中LHおよび特定の脳部位でのDAとDOPAC，HVAを経時的に測定した。

【方法】第4週齢のWister系雌性ラットを12時間（点燈6時）の明暗周期，恒温・湿の一定条件下で約2か月間飼育した。pentobarbital-Na (50mg/kg, ip) 麻酔下で両側卵巣を摘出し，2週間の治癒期間をおいた。〔実験1〕上記ラットに，ゴマ油に溶かしたE_2 (30μg/rat/200μl, sc) を13時に投与した（第0日）。第2日目，同麻酔下で右頚動脈より右心室内へカテーテルを留置し，第3日目に無麻酔下で9時から1時間あるいは2時間間隔で採血を行った。血球成分はheparin含有生食水を加え，直ちにラットに戻した。血漿を用い，E_2およびLHを2抗体法によるRIA法 (E_2: Estradiol I-125 kit, Commissariat A L'Energie Atomique, LH: NIADDK kit, NIADDK-rLH-RP-2) で測定した。〔実験2〕上記ラットにE_2 (E群) と溶媒 (V群) を投与した（第0日）。3日目の9時，15時，18時に断頭し，摘出脳を直ちに−80℃で凍結した。後日クリオスタッ

トで 300 μm の連続切片を作成し，König と Klippel のアトラス[8]に従い，−25℃のコールドプレート上で，室周囲核（視束前核－視床下部前核レベル：PPE），内側視束前核（POM），視束前核視交叉上部－視交叉上核(POSC-SCN)，内側不確帯－視床下部背内側核 (MZI-DM)，視床下部前核 (AH) の 5 部位を切り出した。DA, DOPAC, HVA は既報[5]のとおり HPLC-ECD 法で同時定量した。各組織に 400 μM $NaHSO_3$, 30 μM ascorbate, 4−O−MeDA（内部標準分質）を含む 0.1M HCOOH を加えホモジナイズし，上清をカラムに注入した。蛋白定量は，Lowry らの方法[10]で行った。

血清を用い，上述の方法で E_2 および LH を測定した。

【結果】実験 1 で得た E_2 と LH の経時変化を Fig. 1 に示す。E_2 は全測定時間を通じほぼ一定の値を示し有意差は認められなかった。LH は 15 時から 18 時にかけて著しい高値を示した。実験 2 で得た E_2 と LH 濃度を Fig. 2 に示す。E_2 は V 群では E 群と比較し 9 時，15 時で有意の低値を示し，15 時と比較し 18 時で有意の高値を示す経時変化が認められたが，E 群では経時変化は認められなかった。LH は V 群では E 群と比較し 9 時，15 時で有意の高値を示し，15 時と比較し 18 時で有意の低値を示す経時変化が認められた。E 群では 9 時と比較し 15 時，18 時で有意の高値を示した。各脳部位における DA および代謝産物の含量を table. 1 に示す。

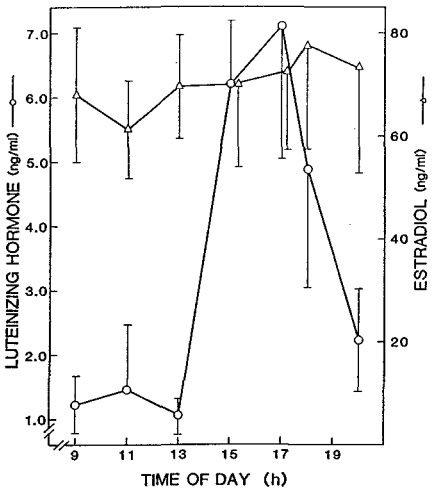


Fig.1 Pattern of E_2 and LH levels in OVX E_2(30μg/200μl sesame oil/rat)-treated rat. In seven of ten animals, blood sampling was permitted. See the method and result section for details.

V 群では，測定のできなかった MZI-DM を除いた総ての部位で DOPAC, HVA とも 15 時と比較し 18 時で有意の高値，あるいは高値の傾向を示した。E 群では，POSC-SCN と AH を除いた総ての部位で DOPAC, HVA とも 9 時と比較し 15 時，18 時のうち少なくとも 1 つの測定時刻で有意の低値，あるいは低値の傾向を示した。一方，POSC-SCN では DOPAC が，また AH では HVA が逆に 9 時と比較し 15 時，18 時（AH は 18 時のみ）で有意の高値を示した。さらに E 群では V 群と比較した場合，9 時では POM，POSC-SCN で DOPAC が有意の低値を示し，また MZI-DM で HVA が有意の高値を示した。15 時では，PPE で DOPAC, HVA が有意の低値を示した。18 時では PPE, POM, POSC-SCN で DOPAC が有意の低値を示し，AH で HVA が有意の高値を示した。

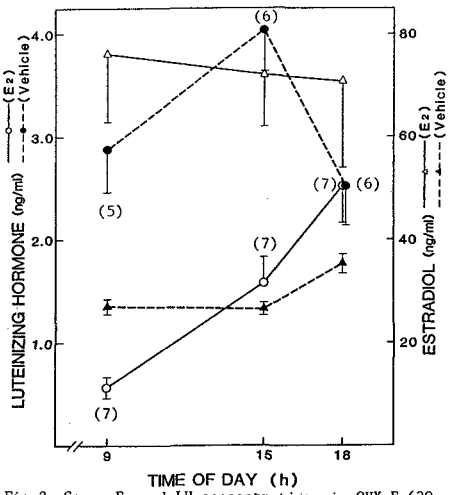


Fig.2 Serum E_2 and LH concentrations in OVX E_2(30 μg/200μl sesame oil/rat) or vehicle-injected rats. Numbers in parentheses indicate the number of rats per group. See the method and result section for details.

【考察】実験 1 および 2 で，ともに E_2 投与ラットで 15 時から 18 時にかけて LH surge の出現を確認した。これは，E 投与により LH surge が数日後の午後に出現するというこれまでの報告[15]と一致する。今回実験 2 で，V 群と比較して E 群において，MZI-DM で 9 時に HVA が，またさらに AH で 18 時に HVA が有意に高値を示した事は興味深い。IH-DA 神経系は，吻側および尾側の構成々分からなり，吻側部は A_{14} (PPE) の神経細胞体から POM, POSC へ投射し，尾側部は A_{13} (MZI) の神経細胞体から不確体 (ZI), AH, DM へ投射することが報告[1),9)]されている。MacKenzie

Table 1 Contents of DA and its metabolites in discrete brain areas of OVX vehicle (V) or E_2(E)-injected rats

CNS areas	Time of day (h)	DA		DOPAC		HVA	
		V	E	V	E	V	E
PPE	09	5.07±0.32(4)	7.69±0.45(5)**	1.49±0.16(5)	1.76±0.12(6)	0.57±0.10(5)	0.56±0.08(6)
	15	6.81±0.30(5)[b]	5.49±0.28(7)[a]*	1.59±0.08(6)[d]	1.30±0.05(6)[c]**	0.52±0.02(6)[c]	0.32±0.04(4)**
	18	4.83±0.20(4)	5.05±0.22(7)[a]	1.90±0.12(5)	1.43±0.05(5)[d]**	0.83±0.05(6)	0.62±0.09(3)
POM	09	2.78±0.20(5)	2.92±0.23(3)	1.23±0.09(4)	0.80±0.04(3)**	0.91±0.10(4)	1.83±0.91(3)
	15	2.54±0.16(6)	2.54±0.08(7)	0.66±0.09(5)[d]	0.59±0.05(6)[d]	0.56±0.06(6)	0.63±0.12(6)[b]
	18	2.46±0.11(8)	0.85±0.11(5)[a]**	0.93±0.06(5)	0.70±0.05(5)*	0.66±0.05(7)	0.56±0.05(7)[b]
POSC-SCN	09	4.25±0.50(3)	4.54±0.18(8)	2.00±0.19(5)	1.36±0.06(6)**	1.15±0.14(3)	1.17±0.12(7)
	15	3.39±0.40(5)	4.17±0.24(5)	2.36±0.19(6)[d]	1.92±0.13(7)[c]	0.88±0.10(3)	0.93±0.06(6)
	18	4.23±0.40(4)	3.27±0.34(6)	3.01±0.16(5)	1.98±0.08(5)[c]**	1.95±0.57(3)	
MZI-DM	09	3.69±0.25(5)	4.94±0.17(9)**	0.49±0.04(5)	0.55±0.04(8)	0.32±0.01(4)	0.50±0.03(7)**
	15	3.98±0.25(5)[b]	3.66±0.15(8)[a]	0.39±0.03(3)	0.54±0.06(6)	0.35±0.02(3)	0.34±0.03(6)[a]
	18	2.81±0.08(6)	4.14±0.20(6)[c]**		0.45±0.04(3)		
AH	09	3.05±0.12(5)	3.88±0.11(7)**	0.83±0.13(3)	0.75±0.04(6)	1.12±0.12(4)	1.20±0.14(7)
	15	3.13±0.06(6)	2.97±0.15(6)[a]	0.56±0.04(4)		1.11±0.04(5)[d]	1.17±0.07(5)
	18	2.97±0.10(7)	3.02±0.22(6)[a]	0.63±0.07(6)	0.59±0.04(3)	1.37±0.10(6)	2.15±0.33(6)[b]*

All animals were ovariectomized 2 weeks previously: E_2 or vehicle injections were conducted on day 0, and decapitation was carried out on day 3. All values are the mean±SEM (ng/mg protein). Numbers in parentheses indicate the number of determinations per group.

[a]$P<0.01$, [b]$P<0.05$ when compared with 09h (E) or 18h (V) by Scheffe's test.
[c]$P<0.005$, [d]$P<0.025$ when compared with 09h (E) or 18h (V) by Student's t-test.
**$P<0.005$, *$P<0.025$ when compared between E and V by Student's t-test.

ら[11]は，pentobarbitalで抑制された排卵が発情前期にZIあるいはAHにDAを注射することにより誘発され，視束前野への注射では誘発されなかった事，さらに卵巣摘出後E_2を投与したラットのZIにDAを注射するとLH分泌が亢進した事を報告し，IH-DA神経系の尾側構成々分がLH surgeに促進的に働くことを示唆した。今回の実験でも，E_2投与によりDA神経活動は吻側部で低下したのに対し，尾側部では亢進した。この尾側部でのDA神経活動の亢進が，LH surge発現に対し促進的作用を果たしたのではないかと推察される。LH surge発現時の18時にHVAが9時と比較し有意に増加したのは，AHだけであることもその可能性を支持するものと考えられる。今回さらに，V群では血清LHとDOPACまたはHVAは逆相関することが明らかとなった。これは，卵巣摘出ラットでDAがLH分泌に抑制的に作用する可能性を示唆するが，これまでにもGallo[4]やDrouva[3]は卵巣摘出ラットにDAやapomorphineを投与し，挿話的LH分泌が抑制されたことを報告しており，今回の結果と矛盾しない。LH分泌に対するDAの関与は複雑であり，未だ一定の見解に達していない。その理由として，LH分泌に関与するDA神経系は単一ではなく，他のDA神経系も関与している可能性が考えられる。それ故，今後さらに隆起-漏斗，あるいは中脳-辺縁系DA神経系に対しても，同様の手法を用いて検討していきたい。

【文献】 1. Björklund, A. et al. (1975) Brain Res., 89: 29-42.
2. Butcher, R. L. et al. (1974) Endocrinology, 94: 1704-1708.
3. Drouva, S. V. et al. (1976) Endocrinology, 99: 651-658.
4. Gallo, R. V. et al. (1979) Neuroendocrinology, 29: 149-162.
5. 平野 均他. (1986) 神経化学, 25: 451-453.
6. James, M. D. et al. (1987) Neuroendocrinology, 45: 384-355.
7. Johnston, C. A. et al. (1984) Brain Res. Bull., 13: 363-369.
8. König, J.F.R. et al. (1963) Williams and Wilkins.
9. Lookingland, K. J. et al. (1984) Brain Res., 304: 329-338.
10. Lowry, O. H. et al. (1951) J. Biol. Chem., 193: 265-275.
11. MacKenzie, F. J. et al. (1984) Neuroendocrinology, 39: 289-295.
12. Neill, J. D. (1972) Endocrinology, 90: 1154-1159.
13. Smith, M. S. et al. (1975) Endocrinology, 96: 219-226.
14. Weiner, R. I. et al. (1978) Physiol. Rev., 58: 905-976.
15. Wise, P. M. (1984) Endocrinology, 115: 801-809.

141. ドパミン終末作用薬によるラット線条体メチオニン—エンケファリン濃度の変化

田中雅邦・盛政忠臣・金行孝雄*・
庄盛敏廉
（岡山大・医・脳代謝研・病態生化，岡山県立短大*　）

〔要　約〕

メチオニン—エンケファリン(Met-ENK)作動性ノイロンのドパミン(DA)終末に対する関与を調べる目的で、種々のDA終末作用薬を投与したラット線条体におけるMet-ENK濃度ならびにDAとその代謝産物を測定して検討を加えた。

DA受容体遮断剤（Fluphenazine・Depot; FLU,10mg/kg/1week,2週間投与）は、Met-ENK濃度を上昇させた。DA終末刺激剤（Methamphetamine;MAP,2週間経口投与）によっても同様なMet-ENK濃度の上昇が認められた。一方、ドパミンアゴニスト（Apomorphine;APO,25mg/kg/day)、1週間ならびに急性(2-16hr)）投与の場合においては、Met-ENK濃度は慢性投与の場合低下し、急性投与の場合変化は認められなかった。同一サンプルから測定されたDA代謝（放出利用）は，APO慢性投与の場合においてのみ有意な亢進が認められた．GABA濃度は、APO慢性投与の場合にのみ、有意な増加が認められた。

以上の結果から、Met-ENKノイロンはDA放出機構に対して、GABAノイロンの関与を含めた長時間性ないしは遷延性の節前性抑制作用を有することが示唆された。

Key word：Methionine-enkephalin,apomorphine,methamphethamine

［はじめに］

ラット脳のいくつかの領域においては、エンケファリン作動性ノイロンとDA作動性ノイロンとの間に密接な相互関係がある、ということが示唆されている。Hongら(2)は、ラットの線条体や側坐核におけるMet-ENK含量が、DA受容体遮断剤であるハロペリドールやクロルプロマジンなどの抗精神病薬の慢性投与によって増加する、ということを報告した。この所見は、エンケファリン作動性ノイロンがDA作動性ノイロンによって調節される可能性を示唆するものであるが、その調節機能の詳細は不明である。

本研究においては、種々のDA作用薬（DA受容体遮断剤、DA終末刺激剤ならびにDAアゴニスト）の慢性ならびに急性投与によるラット線条体Met-ENK濃度の変化を測定比較することによって、DA終末におけるMet-ENK作動性ノイロンの位置づけについて検討を加えた。

［方法］

Wistar系雄性ラットを実験に用いた。動物はAPO急性投与群と同剤慢性投与群に分けた。さらに前者は生理食塩水（生食水）を一回投与されて2時間後に断頭される対照群(C)、APO(25mg/kg)をi.p.投与されて2時間後に断頭される群(APO-2hr)、同剤投与8時間後に断頭される群(APO-8hr)、及び16時間後に断頭される群(APO-16hr)、加えてMAP(5mg/kg)をi.p.投与されて16時間後に断頭される群(MAP-16hr)の5群に分けられた。後者は、APOか生食水を一日一回で7日間連続してi.p.投与され、最終投与16時間後に断頭される2群(APO-chrとC)に分けられた。

FLUの慢性投与群は、FLUをデポー剤として10mg/kgを断頭の7及び14日前の2回皮下注射された群(FLU-chr)であり、MAP慢性投与群は、MAPを飲み水に混ぜて2週間与えられ断頭される群(MAP-chr)、及びMAPを2週間連投後1週間断薬される群(MAP-draw)に分けられた。

動物は全身を液体窒素で急速冷凍された後断頭し、脳が素早く摘出されて、直ちにドライアイス上で冷凍されてから-80°Cで保存された。冷凍保存された脳は後に、厚さ1mmの切片に前額断されてから、目指す脳部位がパンチアウト法(5)によって分割された。

Met-ENK様免疫活性はHongら(2)やGrosら(1)のラジオイムノアッセイ法に準じて測定した。モノアミン濃度とGABA濃度は、既報(6)の電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー法によってモノアミンを測定し、酵素蛍光法によってGABA濃度を測定した。タンパク質の定量はLowry法により、また統計処理はStuden't T-testにより行った。

［結果］

Fig.1は薬物投与によるME-ENK濃度の変化を各対照群に対する百分率で示している。左端の4カラムは、左から対照群(C)、FLU慢性投与群(FLU-chr)、MAP慢性投与群(MAP-chr)及び同剤慢性投与中断1週間後群(MAP-draw)のペプチド濃度を示しており、薬物処理群はいずれも有意な増加を示している。中央の5カラムはAPOとMAPの急性投与群の結果を示し、左から対照群(C)、APO-2hr群、APO-8hr群、APO-16hr群及びMAP群(MAP-16hr)である。いずれの処置群もペプチド濃度の有意な変化を示していない。右端の2カラムは、APO慢性投与の結果であり、対照群(C)に対して慢性投与群(APO-chr)はペプチド濃度の有意な減少を示している。

Fig.2は、薬物によるDAとその代謝産物の濃度、及び[DOPAC+HVA]/[DA+DOPAC+HVA]比（DA利用率）(6)の変動を示しており、各カラムの並びはFig.1のそれと同じである。いずれの薬物も代謝になんらかの影響を与えている。APO投与実験の成績をみると、一回投与2時間後にDA濃度の増加、HVA濃度の低下、DA利用率の低下が認められる。8時間後にHVA濃度が増加しているが、DA利用率には変化は認められない。APOの慢性投与によって、DAとHVAの濃度に変化はないが、DOPAC濃度が上昇してDA利用率が増加している。既報の成績であるが、FLUとMAPの慢性投与は両者とも、DA利用率の低下をきたすが、覚醒剤中断1週間後には利用率は対照値に有意差を示さなくなる。

［考察］

線条体におけるMet-ENK濃度は、ハロペリドール、クロルプロマジン及びピモザイド(2)などのみならずレセルピン(4)の慢性投与により上昇する、ということが報告されている。このペプチド濃度はさらに、黒質線条体DA作動性神経路の、片側切断(4)や6-hydroxydopamine局所注射(8)による変性によっても上昇する、ということも報告されている。これらをまとめれば、DA作動性神経伝達の遮断または抑制が線条体Met-ENK濃度上昇をもたらす、ということになる。ハロペリドールに関しては、Hongら(3,7)は一連の実験を行って、ハロペリドールが主に前駆体mRNA活性を増加させるということによって線条体Met-ENK含量を上昇させる、ということを示唆している。私達が得たFLU慢性投与によるラット線条体Met-ENK含量の上昇という現象は、Hongら(2)の結果と同じ作用機構を想定することができる。APO慢性投与によるラット線条体Met-ENK含量の低下という、私達の結果は、この薬物がハロペリドールとは反対にDA作動性受容体を直接刺激するという推論に基づけば、予想された通りである。ところが、MAP慢性投与が線条体Met-ENK濃度を上昇させた、という所見は、どのような機構に基づくのだろうか。MAPもAPO同様にDA作動系神経伝達を刺激するとされるが、Fig.2に示されているDA利用率から見ると、MAPとAPOとは互いに反対の方向を指し、またFLUとMAPとは同じ方向を指している。これらはすなわち、後者は、結果としてDAの放出利用を亢進させる点で共通しており、一方、APOは結果として逆に、DAの放出利用を抑制していることを反映したものと考えら

れる。したがって、Met-ENK活性は、ドパミンニウロン節前側の放出活性との密接な関与の可能性が示唆された。

実験結果の一部は第9回日本生物学的精神医学会（札幌）において発表した。

［文献］

1) Gros, C. et al. (1978) J. Neurochem., 31;29-39 2) Hong, J. S. et al. (1978) J. Pharmacol. Exp. Ther., 205;141-147 3) Hong, J. S. et al. (1979) Brain Res., 160;192-195 4) Hong, J. S. et al. (1985) Fed. Proc., 44;2535-25395) 盛政忠臣ら (1985)神経化学24;118-120 6) 盛政忠臣ら(1987)精神薬療基金研究年報18;212-217 7) Sabol, S. L. et al. (1983) Biochem. Biophys. Res. Comm., 113;391-399 8) Thal, L. J. et al. (1983) Biochem. Pharmacol., 32;3297-3301

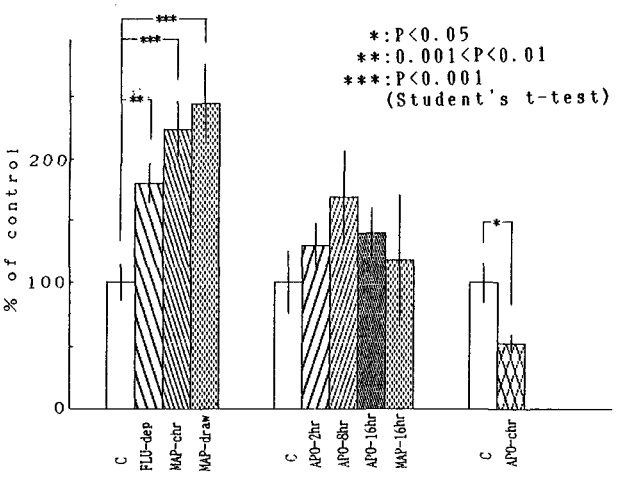


Fig. 1 Met-enkephalin levels after acute and chronic drug treatments

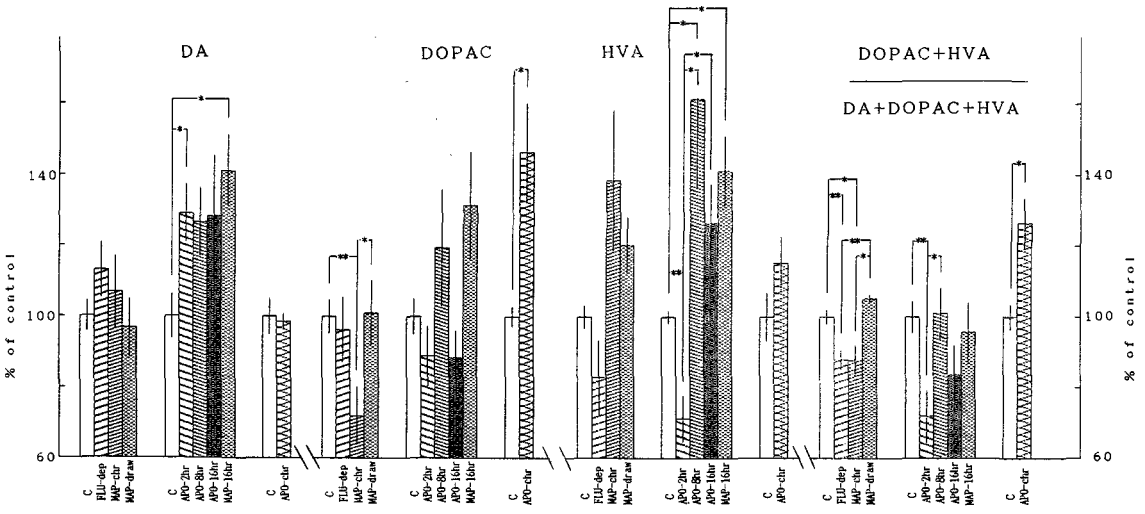


Fig. 2 Monoamine metabolism after acute and chronic drug treatments
*:P<0.05, **:0.001<P<0.01, ***:P<0.001(Student's t-test)

142. モノアミン酸化酵素の新たな阻害剤

直井　信・永津俊治　（名古屋大・医・第一生化）

〔要　約〕

モノアミン酸化酵素(MAO)のA型、B型を選択的に阻害する一連の物質を新たに発見した。ヒト脳シナプトゾーム、肝ミトコンドリアを、MAO A型とB型のヒト胎盤ミトコンドリア、ラット褐色細胞腫PC12h細胞をMAO-A、酵素標品として用いた。3,4-dihydroxyphenyl-alanine, -serine, N-methyl-serineはMAO-Aと-Bを，D, L, threo, erythroなどの立体構造により競合的または非競合的に阻害した。この阻害はいづれも可逆的であった。またquinoline誘導体はMAOを阻害し、特にA型を基質と競合して阻害したが、N-methyl-isoquinoline, quinaldineが特に低いKi値を示した。一方MAO-Bに対しては約10倍の高いKi値を示し、阻害も非競合的であった。また1,4-benzoquinoneもA型を特に低濃度で阻害し、競合的で可逆的な阻害を示した。神経毒として知られているquinolinic acidはB型を基質と競合し阻害したのが、A型は阻害しなかった。またmethylene側鎖の長さを変えた一連の4-(o-benzylphenoxy)-N-methyl-alkylamineを用い阻害剤の構造とA型・B型への阻害剤の親和性と阻害の型との関連を検討した。これら総ての阻害剤を通して3,4-dihydroxyphenyl, quinoline, pyridine, o-benzylphenoxyなどのhydrophobic nucleusと，amino, N-methyl-amino, imino基などのnucleophilic siteが必要で両者間に存在するmethylene側鎖のhydrophobicityと長さがA型、B型への親和性と阻害の型を決定することが明らかとなった。

Key word： Monoamine oxidase, Specific inhibitor, Type of inhibition

モノアミン酸化酵素(MAO)はA型とB型(MAO-A, -B)に分離され、この酵素活性が特に脳内カテコールアミン濃度を決定する一因子であることが知られている。MAO-A, または-Bに対する選択的な阻害剤が種々報告されており、臨床的にも応用されている。一方、N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)はパーキンソン病様症状を起こす神経毒として知られている(1)。MPTPがカテコールアミン生合成の律速段階酵素であるチロシン水酸化酵素(TH)を阻害するだけでなく(2)，MAOも阻害することが明らかとなった(3)。阻害がN-methylisoquinolineなどでも構造と阻害の相関関係がTHとMAOに共通に認められた(4,5)。この事から天然に存在する新しいMAOの阻害剤の中から神経毒として何らかの疾患の発症の原因になる物質を見い出そうと考えた。今回3,4-dihydrophenyl-L-alanine誘導体，quinoline誘導体，quinolinic acid, 1,4-benzoquinoneなどの新たなMAOの阻害剤を見いだしたので報告する。

［実験材料及び方法］

MAO-Aとしてヒト胎盤ミトコンドリア、ラット褐色細胞腫からクローン化したPC12h細胞、MAO-Aと-Bとしてヒト脳シナプトゾーム内ミトコンドリア、肝ミトコンドリアを用い、後者のA,B活性は、1μM deprenylとclorgylineで前処理して測定した。MAO活性はkynuramineを基質とする蛍光法により(6)，タンパク定量はBradford法によった(7)。

［結果］

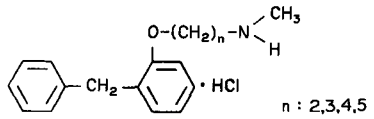
表1に示すごとく、3,4-dihydroxyphenyl(DOP)誘導体はヒト胎盤ミトコンドリア内のMAO-Aを阻害した。L-ならびにD-DOP alanineは、MAO-Aを非拮抗的に阻害し、DOP-L-及びD-threo-serine (DOPS)，DOP-L-ならびにD-erythro-N-methylserine (ADCA)は拮抗的に阻害した。一方erythro-DOPS，threo-ADCAは非拮抗的にMAO-Aを阻害した。またこれらの阻害はいづれも可逆的であった。quinolineならびにisoquinoline誘導体の胎盤ミトコンドリア内のMAO-Aならびにヒト脳シナプトゾーム内のMAO-A，*Bへの阻害を表2に示

した。いづれもMAO-AをMAO-Bより低濃度で阻害した。N-methylisoquinolineがその内最小のKi値をMAO-Aに示した。またquinolineまたはisoquinolineの構造が阻害に必要であり、carboxyl化したものや、1,2,3,4-または5,6,7,8 tetrahydro化したものは阻害をしないことが明らかとなった。一方1,2-benzoquinoneもMAO-Aを拮抗的に阻害し、Ki値は胎盤ミトコンドリアのMAO-Aに対し、3μMと得られ、MAO-Bに対しは約10倍大きなKi値となった。MAOの阻害と阻害剤の構造との関係をより明らかにするために、一連のN-(O-benzylphenoxy)-N-methyl-alkylamine(BPM-)誘導体を用い検討した。図1にその構造をMAO-A,-Bの選択的阻害剤であるclorgyline, deprenylの構造と共に示す。図2に示すごとくBPM-alkylamineはいづれもMAO-Aを拮抗的に阻害し、butylamine誘導体が最小のKi値を示した。一方MAO-Bではmethylene側鎖数が2,3のものは拮抗的、4,5のものは非拮抗的に阻害した。

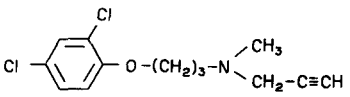
その他の物質ではexcitotoxinとして知られるquinolinic acidがMAO-Bを拮抗的に阻害することが明らかとなった。

図1

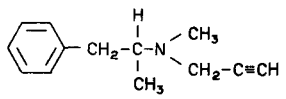
Structure of BP-N-Methyl- alkylamines, Clorgyline and Deprenyl



4-(O-Benzylphenoxy)-N-methyl-alkylamines HCL (BP-N-Methyl-butylamine, Bifemelane)



Clorgyline



(−) Deprenyl

［考察］

これら今回見出したMAOの阻害剤の多くは、天然に存在しており、特にN-methyl-isoquinolinium ionはβ-phenethylamineの、quinolinic acidはtryptophanの代謝産物として知られている。最近2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolineや、1,2,3,4-tetrahydroisoquinolineはヒト脳内に存在することが知られ、特に後者がパーキンソン病の脳内で増加していることが明らかとなった(8)。このことがこれらquinolineまたはisoquinoline誘導体などの物質が脳内に蓄積し、MAOまたはチロシン水酸化系の酵素を阻害し脳内カテコールアミン代謝に影響を与えていることが示唆される。

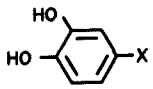
なおMAOの阻害剤としての構造にはhydrophobic nucleus, nucleophile/electrophilic partが必要であり、この両者間のhydrophobic side chainが必要であること、このchainの長さがMAO-A, -Bのいづれかに特異性を示し、阻害が競合的，または非競合的なのかを決定していることが明らかとなった。更にMAO-Aの活性部位がMAO-Bのそれより広いことが分かり、モノアミン酸化酵素のA型,B型の活性部位の構造の差が明らかとなった。

［文献］

1) Langston, J.W., et al.; Science, 219, 979-980 (1983)
2) Hirata, Y. and Nagatsu, T.; Brain Res. 337, 193-196 (1985)
3) Takamidoh, H., et al.; Neurosci. Lett. 73, 293-297 (1987)
4) Hirata, Y., et al.; Brain Res. 397, 341-344 (1986)
5) Naoi, M., et al.; J. Neurochem. 48, 709-712 (1987)
6) Kraml, M.; Biochem. Pharmacol. 14, 709-712 (1965)
7) Bradford, M.M.; Anal. Biochem. 72, 248-245 (1976)
8) Niwa, T., et al.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 144, 1084-1089 (1978)

表1

Effect of derivatives of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-alanine or -serine on monoamine oxidase



Compounds	X	Ki (μM)	Inhibition Type
DOPA	$-CH_2CH(NH_2)COOH$		
	L-	154 ± 21*	Noncompetitive
	D-	133 ± 30	Noncompetitive
L-α-Methyl-DOPA	$-CH_2C(CH_3)(NH_2)COOH$	121 ± 40	Competitive
DOPS	$-CH(OH)CH(NH_2)COOH$		
	L-threo-	68 ± 3	Competitive
	D-threo-	125 ± 16	Competitive
	L-erythro-	106 ± 12	Noncompetitive
	D-erythro-	106 ± 6	Noncompetitive
L-threo-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-N-methylserine, L-threo-adrenaline-carboxylic acid	$-CH(OH)CH(NHCH_3)COOH$		
	L-threo-	124 ± 15	Noncompetitive
	D-threo-	92 ± 8	Noncompetitive
	L-erythro-	91 ± 13	Competitive
	D-erythro-	79 ± 12	Competitive

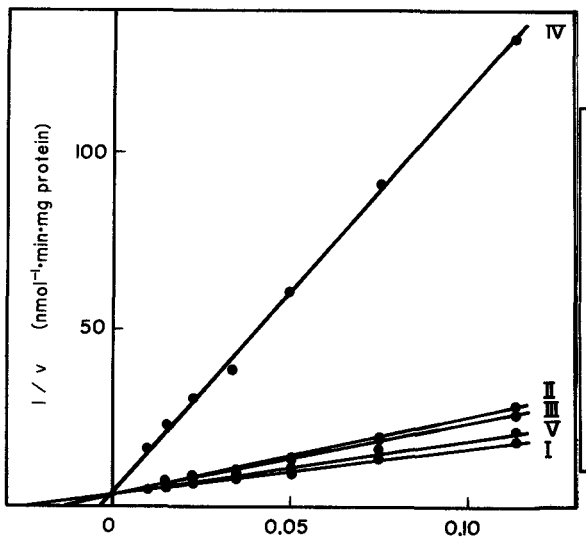
* The value is the mean and S.D. of triplicate measurements of three experiments.

表2

Effects of quinoline and isoquinoline derivatives on Type A and B MAO

Compounds	Ki for MAO: Placental mitochondria MAO-A	Brain Synaptosomal Mitochondria MAO-A	Brain Synaptosomal Mitochondria MAO-B
N-Methylquinoline	54.6 ± 4.5 μM		
N-Methylisoquinoline	20.4 ± 1.1 μM	40.5 ± 4.9 μM	2846 ± 9.5 μM
Quinoline	28.4 ± 1.3 μM	31.7 ± 1.5 μM	1360 ± 181 μM*
Quinaldine	48.2 ± 4.3 μM	14.1 ± 0.6 μM	633 ± 73 μM*
Isoquinoline	35.7 ± 2.0 μM*	62.2 ± 4.3*	60.7 ± 49*
Quinazoline	30.5 ± 6 μM	169 ± 17	51.7 ± 10.5*
Quinaldic acid	No inhibition		
Quinoline-3-carboxylic acid	No inhibition		
Quinoline-4-carboxylic acid	No inhibition		
1,2,3,4-Tetrahydroquinoline	No inhibition		
1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline	No inhibition		

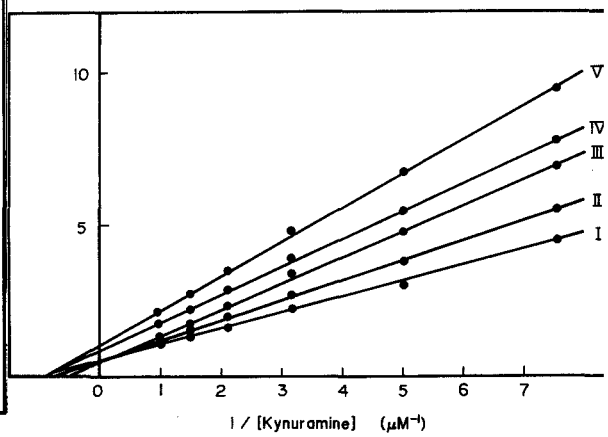
図2 **Effects of BP-N-Methyl-alkylamines on MAO-A in Human Brain Synaptosomes**



Ⅰ : Control
Ⅱ : BP-N-methyl-ethylamine (33.3μM)
Ⅲ : BP-N-methyl-propylamine (33.3μM)
Ⅳ : BP-N-methyl-butylamine (33.3μM)
Ⅴ : BP-N-methyl-pentanylamine (33.3μM)

図3

Effects of BP-N-Methyl-alkylamines on MAO-B in Human Brain Synaptosomes



Ⅰ : Control
Ⅱ : BP-N-methyl-ethylamine (33.3μM)
Ⅲ : BP-N-methyl-propylamine (33.3μM)
Ⅳ : BP-N-methyl-butylamine (33.3μM)
Ⅴ : BP-N-methyl-pentanylamine (33.3μM)

143. Head-twitch inducer p－ハイドロオキシアンフェタミンによる脳内ＭＡＯ阻害作用

荒井裕一朗・植田孝子・杵鞭宏育・佐藤信悦*・
佐藤信範*・只野　武*・木皿憲佐*
（昭和大・医・第二薬理，東北薬大・薬理*）

〔要　約〕

Amphetamine の代謝産物 p-hydroxyamphetamine (p-OHA) と p-hydroxynorephedrine (p-OHN)のマウス及びラット脳内Monoamine oxidase (MAO) に対する阻害作用を検討した。その結果、いずれもMAO-A に対して選択的で強力な阻害作用を示したがMAO-B に対してはほとんど阻害作用は認められなかつた。また、p-OHA のMAO-A 阻害作用は p-OHNのそれよりも強力であつた。また、両化合物によるMAO-A, -B 阻害作用はpreincubation を60分間行なっても全く影響されなかった。もし両化合物がMAO の基質であればpreincubation により濃度は減少し、MAO 阻害作用は減弱する筈である。従ってこれら両化合物はMAO の基質と考えるよりは、むしろ可逆的で選択的MAO-A 阻害薬である可能性が示唆される。Lineweaver-Burk plot法によりMAO-A に対する阻害作用の様式を検討した結果、 p-OHA,p-OHN いずれもcompetitive な阻害作用を示した。これらの結果とp-OHA による5-HTニューロン活動の促進による行動、head-twitch responseとの関係について考察を加えた。

Key word：
p-hydroxyamphetamine,　p-hydroxynorephedrine,　MAO,

Amphetamine (Am) の代謝産物p-hydroxyamphetamine (p-OHA)はAm投与後脳内各部位でその存在が認められ、線条体以外ではdopamine-beta-hydroxylase (DBH) によりp-hydroxynorephedrine (p-OHN) へと更に変化する(1).これら両代謝産物はいずれも間接的なsympathomimetic amine として作用するので、脳内カテコールアミンレベルの変動や、さらにアミン取り込み阻害作用、tyrosine hydroxylase活性の阻害など、多彩な作用が知られている(2-4)。また、p-OHA はAmと同様強力に線条体へのDA uptake を阻害する(4,5) のでAmによる種々の薬理作用のうち少なくともその一部はこれら代謝産物による可能性が示唆される。

既に我々はp-OHA をマウス脳内に直接投与(i.c.v.)すると種々の行動変化が出現し、その内中枢性5-HTニューロンの活動促進に起因する行動、head-twitch response (HTR)が著明に増加する事を報告した(6-8)．しかし、p-OHA のbeta水酸化物p-OHNではこのような反応は出現しない(6)。HTR はp-OHA のみならずAm投与でも認められ(2)、この作用はp-OHA へと変化し発現する可能性が高い。一般に、HTR は5-HT(i.c.v.)自身を含め各種5-HT agonistや 5-HTP投与により増大し、反対に5-HT antagonistにより減弱または阻止される(9,10)。更にHTR は5-HT合成阻害薬のほか、reserpine, 6-hydroxydopamine、DBH 阻害薬、少量の5-HTP との併用で増大し、反対にalph-adrenergic agonistで減弱する。従って5-HTニューロンのみならず中枢性noradrenline ニューロンにより制御されている可能性が示唆される(7,10)。今回、我々はp-HA によるHTR の発生にMAO 阻害作用、特に5-HT代謝を担うMAO-A の阻害作用が関与している可能性を推定し、in vitroで検討を行なった。Amの代謝は動物の種により相

達する(11)ので、本実験ではマウスとラット脳 MAOを用い比較検討を行なった。

実験材料および方法

酵素標品の作成：実験には体重23-26 g の雄性ddY 系マウスおよび230-270 g 雄性Sprague-Dawley系ラットを使用した。MAO の酵素標本には両動物を断頭後、それぞれのforebrain を冷却下素早く摘出し9 倍量の0.32 M sucrose溶液を加えて10% homogenateを作成し実験に使用した。

MAO 活性の測定：MAO-A 活性の測定には最終濃度0.1 mM ^{14}C -5-HT、MAO-B では 0.1mM ^{14}C -benzylamine (BZ)をそれぞれの基質として使用し、37℃ 5分間の酵素反応で生成する ^{14}C -代謝物を有機溶媒で抽出し放射活性を計測するradiometric assay法 (12) で行なった。また、preincubation の影響を検討する場合には目的の化合物を酵素標本と37℃ 60 分間preincubate し、各基質を添加し各MAO 活性を測定した

実験成績および考察

5-HT (0.1 mM) およびBZ (0.1 mM) を基質として使用し、p-OHA, p-OHNのマウスおよびラット MAOに対する影響を検討した。その結果、p-OHA はいずれの酵素標本の場合もMAO-A を強く阻害したが、MAO-B に対してはほとんど阻害作用は認められなかった(Fig. 1, left)。一方、p-OHN でも同様にMAO-A を選択的に阻害する作用が認められたがその作用はp-OHA に比しはるかに軽度であった (Fig. 1, right)。

これらの成績はAmを含め多くのphenylethylamineのalpha-メチル誘導体が選択的MAO-A 阻害薬である事実(13)とよく一致する。しかし、本実験に使用した化合物はいずれもアミン誘導体であるのでMAO,特にMAO-A の基質となる可能性も否定出来ない。そこでこれら化合物をMAO 標品と60分間preincubate し、その後のMAO 活性を測定した。その結果、酵素活性の阻害率には全く変化は見られなかった。もし、両化合物がMAO の基質であれば、preincubation により代謝され阻害率は減少する筈である。従って両化合物は基質と言うよりは、可逆的MAO-A の阻害薬である可能性が示唆される

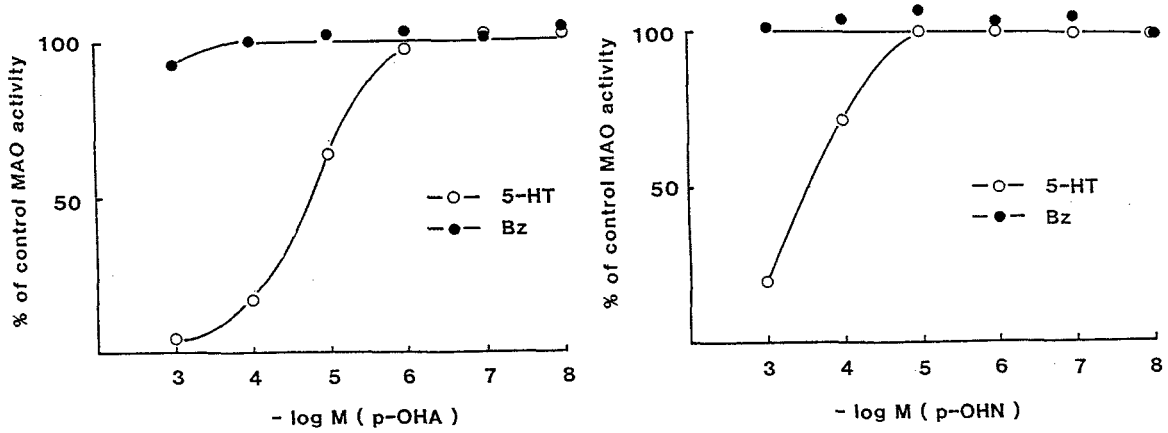


Fig. 1. Inhibition curves of MAO-A and MAO-B by p-OHA and p-OHN.

両化合物のMAO-A 阻害様式をLineweaver-Burk plot法により検討した結果、いずれもcompetitive な阻害作用を示した。本実験で得られたIC50, Ki値をまとめてTable 1 に示した。 p-OHA i.c.v. 投与によるHTR の発生頻度は非選択的 MAO阻害薬isocarb

xazide投与により著明に促進される(6)。また、tranylcypromine, pheniprazine, iproniazid 等の非選択的MAO 阻害薬も5-HTP 投与により誘発されるHTR を著しく促進する(14)。一方、脳内MAO の分布はニューロンがいかなるアミンを神経伝達物質とするかに拘らずMAO-A は主としてニューロン内に、反対にMAO-B はニューロン外に存在することが知られている(15)。生理的濃度の5-HTと NE は主としてMAO-A により代謝されるので、MAO-A 阻害薬の急性効果としてニューロン内の両アミン濃度は急激に増加する事が考えられる。前述のごとくp-OHA はカテコールアミンニューロンに対して諸種の作用を示す事が明らかになつている。しかし、5-HTニューロンに対してはその作用は全く不明である。もし、このニューロンに対しても同様の作用を示すとするとHTR の発現はp-OHA 自身5-HTニューロン内に取り込まれMAO-A を阻害し、5-HT代謝を阻止し、増加した5-HTを遊離させる機序が推測される。恐らくこれに加えて5-HT uptake の阻害作用も関与するであろう。p-OHA の代謝物p-OHN にはHTR 誘発作用は認められないが、これは選択的MAO-A 阻害作用が比較的弱いことがその一因と思われる。

Table 1.

	IC50 (μM) of MAO-A		Ki values (μM) of MAO-A	
	mouse	rat	mouse	rat
p-OHA	20	24	7	9
p-OHN	220	170	60	70

References

1) Jori,A. and Caccia,S. (1974) J. Pharm. Pharmacol. 26,746-748
2) Taylor,W.A. and Sulser,F. (1973) J. Pharm. Exp. Ther. 185,620-632
3) Wenger, G.R. and Rutledge, C.O. (1974) ibid 189,725-732
4) Cho,A.K., Fischer,J.F. and Schaeffer,J. (1977) Biochem. Pharmacol. 26, 1367-1372
5) Harris,J.E. and Baldessarini, R.J. (1973) Neuropharmacol. 12,669-679
6) 桜田 忍 (1975) 日薬理誌 71,779-787
7) Satoh,S., Satoh,N., Tadano,T., and Kisara,K. (1985) Res.Commun. Sub. Abuse 6, 213-219
8) Kisara,K.,Tadano,T.,Satoh,S. and Kinemuchi,H. (1985)Neuropsychopharmacol. p.273-278, Humana Press.
9) Handley,S.L. and Brown,J. (1982) Neuropharmacol. 21, 507-510
10) Satoh,S., Satoh,N.,Tadano,T., Kisara,K.,Arai,Y. and Kinemuchi H.(1987) ibid in press
11) Dring,L.G., Smith,R.L. and Williams,R.T. (1970) Biochem. J. 116,425-435
12) Kinemuchi,H. Arai,Y. and Toyoshima,Y. (1985) Neurosci. Lett. 58,195-200
13) Arai,Y.,Toyoshima,Y. and Kinemuchi,H. (1986) Jpn.J.Pharmacol. 41,191-197
14) Corne,S.J., et al. (1963) Br.J.Pharmacol.20, 106-120
15) Oreland,L.,Arai, Y., et al. MAO and its selective inhibitors,p. 246-254

144. チロシン水酸化酵素の活性調節機構——基質阻害の機構——

奥野幸子・藤澤　仁　（旭川医大・第一生化）

〔要　約〕

チロシン水酸化酵素の基質阻害機構を検討し、以下の結果を得た。

① チロシン水酸化酵素は生体内のチロシン濃度で基質阻害が認められるが、この阻害は天然補酵素（BPH4）を用いた場合にのみ認められ、合成補酵素（6MPH4）を用いた場合には認められない。また天然補酵素を用いた場合でも基質阻害は生理的 pH と考えられる中性付近で活性を測定した時に認められるが、pH5 の酸性領域では認められない。

② 基質阻害と同様な作用を示す物質を探したところ、DL-6-Fl-Trp, および DL-p-Cl-Phe が、6MPH4 を用いた場合には活性に大きな変化は示さないが、BPH4 を用いると pH7 での活性を抑制した。DL-6-Fl-Trp を用いて検討すると BPH4 を用いても pH 5 では阻害が認められず、基質阻害と類似の性質を示した。

③ DL-6-Fl-Trp による活性阻害様式を検討した結果、補酵素 BPH4 に uncompetitive な阻害であることが明らかになり、DL-6-Fl-Trp は酵素と BPH4 の複合体に結合すると考えられた。

以上の結果からチロシン水酸化酵素の基質阻害は、チロシンが酵素-補酵素複合体に結合することによって引き起こされるものと考えられる。

Key word： tyrosine hydroxylase, substrate inhibition, 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin

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行い、酵素が自ら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転換されることを見出し、不活性型と活性型の相互転換によって活性が調節されている可能性を示した（5,6,7,8）。チロシン水酸化酵素は反応産物によるばかりでなく、基質であるチロシンによっても活性が阻害され、この基質阻害は生体内のチロシン濃度で認められることが報告されている。このことから基質による活性阻害も生体内での酵素活性の調節に重要な役割を果している可能性が推定される。そこで基質による活性阻害機構について検討を進めたところ、以下のような興味ある結果を得たので報告する。

［ 実験方法 ］

チロシン水酸化酵素の調製　ラット副腎の超遠心上清から、硫安分画、ゲル沪過、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（3）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標品は中性に至適 pH を示す活性型酵素である。

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 酢酸緩衝液、pH 7.0 での測定には 0.1M Hepes を用い、補酵素として 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin（BPH4）または DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin（6MPH4）を用いて 30℃で 3分間 酵素反応を行い、非酵素的脱炭酸法（4,6）により測定した。1 unit はこの測定条件で 1 分間に 1 nmol のドーパを生成する活性として示した。

［ 結果および考察 ］

チロシン水酸化酵素活性を、補酵素として 1 mM BPH4 あるいは 1 mM 6MPH4 を用いて pH 7 および pH5 で、種々の濃度の基質チロシンを用いて測定した。図 1 はその結果を Lineweaver-Burk のプロットで示したものである。補酵素として BPH4 を用い、pH7 で酵素活性を測定した場合にのみ、チロシン濃度 25 μM 以上で基質阻害が認められたが、6MPH4 を用いた場合や、BPH4 を用いても pH5 で活性を測定した場合にはチロシンによる顕著な阻害作用は認められなかった。このように基質阻害は生理的 pH である中性で、また天然の補酵素と考えられている BPH4 を使用した場合にのみ認められ、しかも生体内に存在するチロシン濃度（約 0.1 mM）で引き起こされるという結果は、この基質阻害が生体内での酵素活性の調節に関与している可能性を考えさせ、興味深く思われた。そこで基質チロシンによる活性阻害機構を明かにするために、チロシンと同様な阻害作用をもつ物質について調べた。表 1 には種々のチロシン類縁化合物を用いて pH7 での酵素活性の阻害作用を調べた結果を示した。種々の化合物のなかで DL-p-chloro-phenylalanine (DL-p-Cl-Phe) と 6-fluoro-tryptophan (DL-6-Fl-Trp) は、補酵素として 6MPH4 を用いた場合には活性に大きな影響を与えないが、BPH4 を用いた場合には顕著な活性阻害を示した。この DL-6-Fl-Trp による酵素活性の阻害は基質チロシンによる場合と同様に、補酵素として BPH4 を用いて pH7 で活性を測定した場合には認められるが、pH5 では認められなかった。また酵素とのインキュベーションも不必要であり、反応液に添加しただけで直ちに活性は低下した。これらの結果から DL-6-Fl-Trp は高濃度の基質チロシンを添加した場合と同様な機構で酵素蛋白質に作用し、活性を低下させているものと考えられた。そこで DL-6-Fl-Trp を用いてその阻害様式について検討した。図 2 は DL-6-Fl-Trp 100 μM を添加あるいは

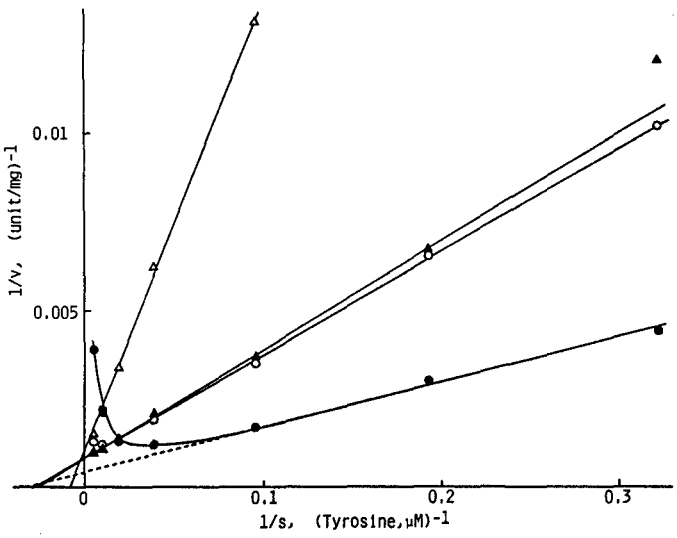
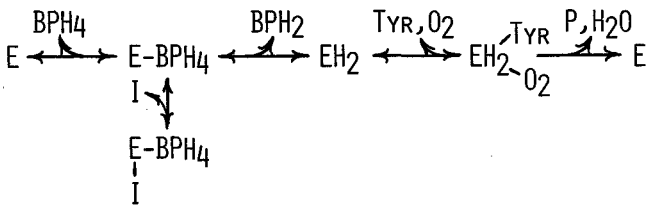


図 1　Lineweaver-Burk plots
1 mM BPH4 存在下, pH 5.0（○） 1 mM BPH4 存在下, pH 7.0（●）
1 mM 6MPH4 存在下, pH 5.0（△） 1 mM 6MPH4 存在下, pH 7.0（▲）で酵素反応を行った。

addition ＼ electron donor		BPH_4	$6MPH_4$
	μM	%	%
—		100	100
L-Ala	500	84	83
L-Phe	500	32	37
L-Trp	500	53	67
D-Tyr	500	82	76
D-Phe	500	79	76
D-Trp	500	101	83
DL-o-Tyr	500	60	75
DL-m-Tyr	500	100	88
L-α-Me-p-Tyr	1	71	80
	10	13	40
L-3-I-Tyr	0.1	30	52
	1	4	12
DL-p-Cl-Phe	100	75	101
	500	47	80
DL-4-Fl-Trp	500	75	83
DL-5-Fl-Trp	500	80	95
DL-6-Fl-Trp	100	58	105
	200	55	102
	500	31	77
L-Dopa	500	15	21
L-5HTP	500	15	17
Tyramine	500	81	83

表 1　チロシン類縁化合物による酵素活性の阻害
BPH4 または 6MPH4 1 mMを用い pH 7 で活性を測定した。

無添加で種々の濃度の BPH4 を用いて pH7 で酵素活性を測定し、s：s/v をプロットしたものである。DL-6-Fl-Trp 添加および無添加の場合、互いに y 軸切片で交叉する直線となり、この結果は DL-6-Fl-Trp による阻害は補酵素 BPH4 に対して uncompetitive 型の阻害であることを示している(1)。チロシン水酸化酵素の反応は、先ず BPH4 が酵素に結合し、酵素が BPH4 によって還元され、酵素から BPH2 が離れた後に基質チロシンが還元型酵素に結合するピンポンメカニズムによって進むと考えられている(2)。従って、DL-6-Fl-Trp（Ⅰ）は次式に示すように酵素（E）と BPH4 の複合体（E-BPH4）



に作用して E-BPH4-I の三者複合体を形成して酵素活性を阻害するものと考えられる。以上の実験結果から チロシン水酸化酵素の基質阻害はチロシンが酵素と BPH4 複合体に結合して三者複合体を形成して引き起こされるものと推定される。

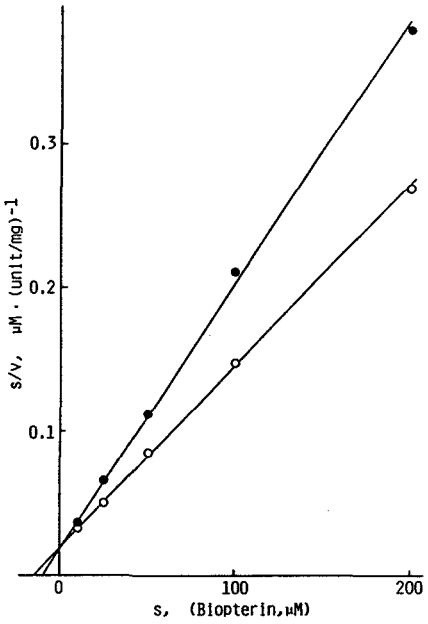


図2 DL-6-Fl-Trp によるチロシン水酸化酵素活性の阻害様式
DL-6-Fl-Trp 100 μM 添加（●）および無添加(○)で酵素活性を測定した。

［文献］

1 Dixon, M. & Webb, E. C. (1979) Enzymes 3rd Ed., Longman Green, London
2 Kaufman, S. & Fisher, D. B. (1974) in Molecular Mechanisms of Oxygen Activtion (Hayaishi, O. ed.) pp 285-369, Academic Press, New York
3 Okuno, S. & Fujisawa, H. (1982) Eur. J. Biochem. 122, 49-55
4 Okuno, S. & Fujisawa, H. (1983) Anal. Biochem. 129, 405-411
5 奥野幸子、藤澤仁 (1984) 神経化学 23, 469-471
6 Okuno, S. & Fujisawa, H. (1985) J. Biol. Chem. 260, 2633-2635
7 奥野幸子、藤澤仁 (1986) 神経化学 25, 205-207
8 奥野幸子、山内卓、藤澤仁 (1985) 神経化学 24, 265-267

145. ダントロレンのラット脳トリプトファン水酸化酵素に及ぼす影響

岡田尚志郎・筒井公子・庄盛敏廉
（岡山大・医・脳代謝研・病態生化）

〔要　約〕
近年、悪性症候群の治療に使用されるようになったダントロレンのラット脳トリプトファン水酸化酵素に及ぼす影響を検討した。ダントロレン20mg/kgを、ラットの腹腔内に投与し、2時間後、脳のトリプトファン水酸化酵素活性を測定したところ、活性は対照群に対して有意に増加し、約1.3倍の比活性を示した。ダントロレン投与後、シナプトソーム粗分画を分離し、神経終末に分布する酵素の活性を調べたところ、やはり対照群の約1.2倍の比活性を示した。

In vitroにおけるダントロレンのトリプトファン水酸化酵素に及ぼす作用を調べるため、ラット脳より調製した酵素標品に種々の濃度のダントロレンを添加し反応をおこなったところ、5-25 μMのダントロレン存在下で酵素活性は上昇し、30 μM以上の濃度では活性上昇はみられなかった。酵素標品とダントロレンをプレインキュベートしてもしなくても、得られた活性は同一レベルであった。以上の結果から、ダントロレンは腹腔内投与後脳へ移行し、トリプトファン水酸化酵素の活性に影響を及ぼしていることがわかった。

Key word：dantrolene, tryptophan-hydroxylase, central nervous system

向精神薬による副作用の中で、最も重篤かつ致死的なものの一つである悪性症候群に対して、近年、ダントロレンを使用し、有効であったとする報告が相次いでなされている(8)。従来、ダントロレンは、筋弛緩薬として臨床応用されており、その主たる薬理効果は、骨格筋の筋小胞体からのCa^{2+}の異常遊離の抑制であると推定されている(6)。しかし、悪性症候群のダントロレン有効例においては、著明な脳波変化や、髄液中のモノアミン代謝産物の変化が報告されており、また、構造上、脂溶性であることからも、脳への移行が考えられる。従ってダントロレンの薬理作用として、骨格筋に対する作用だけでなく、何らかの中枢神経作用も存在する可能性が示唆されるが、これまで中枢神経系への作用はあまり知られていない。本研究において、我々は、ダントロレンの中枢作用に着目し、ラット脳トリプトファン水酸化酵素活性に及ぼす影響を検討したので報告する。

（方法）

1）実験動物

オスSDラット(150-200g)にダントロレン20mg/kgを腹腔内投与し、2時間後、すみやかに断頭し、全脳を取り出し、小脳を除いた後、実験に用いた。対照群には、同量の生理食塩水を投与した。

2）トリプトファン水酸化酵素標品の調製

①脳全体からの酵素標品：オスSDラットの脳（全脳より小脳を除いたもの）に、4倍容の50mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.6, 2mM DTT, 2mM PMSFを含む)を加え、ポリトロンで破砕した。このホモジネートを39,000×g 40分間遠心し、上清を得た。

②神経終末由来の酵素標品: Cotmanら(2)の方法に準じて、シナプトソーム粗画分を調製した。3匹のラットから取り出した脳（小脳を除く）をポッター型ホモジナイザーでホモジナイズしたあと、低速遠心により未破砕細胞を除き、得られた上清を17,000×gで遠心して粗シナプトソーム画分を沈渣として得た。これを低張液に懸濁し、ポリトロンで破砕、39,000×g 40分間遠心して、この画分に含まれる酵素を上清に回収し、神経終末由来の酵素標品として使用した。

3）トリプトファン水酸化酵素活性の測定

Friedmanら(3)の方法を用いて、反応生成物の5HTPを測定した。反応は酵素標品と基質のL-Trpを含む反応液に、補酵素($6MPH_4$)を添加することにより開始した。37°C，20分間インキュベートし、60%過塩素酸を加えて、反応を停止した。コントロールには、基質として、L-Trpのかわりに、D-Trpを用いた。活性は、pmol/min/mg proteinで表わした。

（結果）

In vivo投与によるダントロレンの効果　ダントロレン20mg/kgをラット腹腔内投与したあと2時間後の脳トリプトファン水酸化酵素活性は76.6 pmol/min/mg proteinで、対照群の58.9 pmol/min/mg proteinに対して、約1.3倍増加していた。この増加はStudent Tテストで、0.1%以下の危険率で、有意であると認められた(Fig 1)。腹腔内投与の量をかえて、その効果を調べたところ、通常の臨床用量である5mg/kg,10mg/kgの投与では、酵素活性の変化を認めなかったが、20mg/kg, 40mg/kgの投与により、活性が増加することがわかった。トリプトファン水酸化酵素は、細胞体で合成されるが、神経終末に分布していることがすでに知られている(4, 5)。ダントロレン投与群において、脳全体からの酵素標品の比活性が増加していたことから、神経終末においても同様に上昇しているかどうかを調べるため、ダントロレン腹腔内投与後、方法の項に述べたように、神経終末に由来する酵素標品を調製し、その活性を測定した。ダントロレン投与群の酵素活性は21.6±3.7pmol/min/mg protein (mean±S.E.M.)であり、対照群の活性18.0±3.6 pmol/min/mg protein (mean±S.E.M.)に対して、約1.2倍に増加していたが、Student Tテストにより有意な増加とは認められなかった。この神経終末に由来する酵素標品の総蛋白質は、粗ホモジネートに含まれる総蛋白質の約10%で、標品間のバラツキはほとんどみられなかったが、酵素の比活性にはバラツキが認められた。比活性が未分画のものに比べて約1/3.5に低下していること、この酵素が失活しやすい酵素であることを考え合わせると、粗シナプトソーム分画操作の過程で酵素の失活がおこり、その程度が調製により一定でないために、ダントロレンの効果が有意なものとして認められなかったものと考えられる。ダントロレン腹腔内投与後の脳トリプトファン水酸化酵素活性を経時的に調べたところ、活性は投与後30分、2時間で上昇、12時間後には効果はみられずコントロール群と同一レベルの活性に低下していた。

In vitroにおけるダントロレンの効果　未処置のラット脳から、酵素標品を調製し、酵素反応液中に、種々の濃度のダントロレンを添加して効果を調べた。酵素標品(1.1mg protein)を含む250μlの反応液中に、ダントロレンを0.6-60μM添加し、濃度と酵素活性の関係を検討したところ、5-25μMのダントロレン存在下で活性の上昇が認められ、7.5μM存在下で最大の活性を示した(Fig. 2)。以後の実験には、最も活性を増加

させる7.5μmのダントロレンを使用した。酵素標品とダントロレンを、37°C 5分間プレインキュベーションしてダントロレンの効果が増強されるかどうか検討したところ、酵素活性の上昇の程度にはプレインキュベーションは何ら影響を与えないことが明らかになった。

（考察）

すでに述べたように、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は、セロトニンニューロン細胞体で合成され、神経終末へ軸索流により運ばれることが示唆されている(4, 5)。ダントロレンの腹腔内投与によりこの酵素活性が増加していたことから、この薬物投与により脳内セロトニンニューロン系に影響が及ぶ可能性が示唆された。抑制性ニューロンである脳内GABAニューロン活動が、ダントロレンにより増加した(7)とする報告もあり、ニューロン間の活動のバランスの点からも興味深い。In vivoで認められたトリプトファン水酸化酵素の活性上昇が、どのような機序によるものであるか現時点では不明である。ダントロレンがCa^{2+}-カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ等を活性化して間接的に作用しているのか、あるいは酵素の三次構造を変える等の直接作用をしているのか明確ではないが、in vitroで酵素活性を上昇させたことから後者の可能性が強く示唆された。ダントロレンの血中濃度半減期が約6時間である(1)という点から、投与後から断頭するまでの時間について更に検討する必要があると思われる。今回、ダントロレンの腹腔内投与により、ラット脳トリプトファン水酸化酵素活性の増加が示されたことは、単に骨格筋のみならず、中枢神

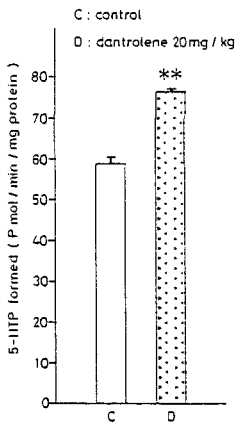


Fig.1 Effect of dantrolene on the rat brain Tryptophan-hydroxylase activity (whole brain - cerebellum) (values are mean ± s.e.m. N=6) ** p < 0.001 (Student's t-test)

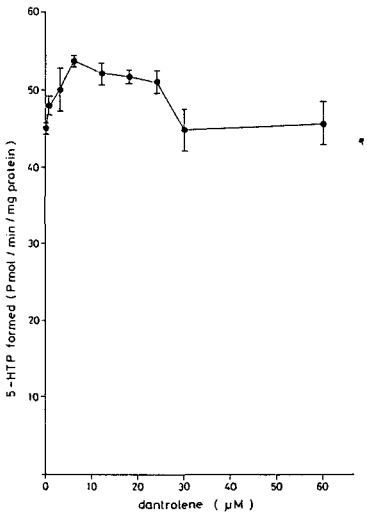


Fig.2 Activation of Tryptophan-hydroxylase by dantrolene added into reaction mixture (values are mean ± s.e.m. N=3)

（文献）1)浅利遥ら(1984)麻酔と蘇生 20,255-266 2)Cotman, C.W. and Matthew, P.A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 249, 380-394 3)Friedman, P.A., Kappelman, A.H. and Kaufman, S. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4165-4173 4)Kuhar, M.J., Roth. R.H. and Aghajanian, G.K. (1971) Brain Res. 35, 167-176 5)Meek, J.L. and Neff, N.H. (1972) J. Neurochem. 19, 1519-1525 6)Morgan, K.G. and Bryant S.H. (1977) J. Pharmacol. Exp. Ther. 201, 138-147 7)Patti, F., Giammona, G., Reggio, A., Maccagnano, C., Rampello, L. et al (1981) Acta Neurologica 36, 384-388 8)山脇成人(1986) 精神科治療学 1, 413-422

146. 1－Methyl－4－phenyl－1, 2, 3, 6－tetrahydropyridine（MPTP）および1－methyl－4－phenylpridinium ion（MPP^+）によるミトコンドリア呼吸機能の抑制

水野美邦・曽根勇史*・斉藤智彦・
鈴木啓二　（自治医大・神経内科，生化*）

〔要　約〕

1－Methyl－4－phenyl－1，2，3，6－tetrahydropyridine（MPTP）による実験的パーキンソニズムの神経細胞変性機序を研究する目的で，MPTPの代謝物で，毒性の原因とされている1－methyl－4－phenylpyridinium ion（MPP^+）のミトコンドリア呼吸に与える影響を検討した。C57BLマウス全脳より調整したミトコンドリア浮遊液を用い，最初にこれを凍結融解して電子伝達系の酵素複合体活性に与えるMPTPおよびMPP^+の影響を検討した所，complex Iのみが抑制を受けた。しかしIC_{50}はそれぞれ0·76 mM，3·2 mMとかなり高かった。そこで次に生のミトコンドリアを用い酸素電極で酸素消費を測定したサンプルでcomplex Iの活性を測定するとglutamate＋malateを基質とした場合state 3の呼吸は，0·05 mMのMPP^+にて著明に抑制され，complex Iの活性は対照の約50％に抑制された。又ATPの生成も有意に低下していた。TCAサイクルのNAD^+を補酵素とする脱水素酵素への影響も検討したが，alpha－ketoglutarate dehydrogenaseのみがMPP^+により著明に抑制された。MPTPによる黒質の選択的障害は，ドーパミン取り込み機構を通じてMPP^+が黒質内に濃縮されることによって説明でき，黒質ニューロン内ではミトコンドリアに蓄積されて呼吸を抑制することが，細胞変性の重要な因子と考えられる。

Key word：1－Methyl－4－phenyl－1，2，3，6－tetrahydropyridine（MPTP），Parkinsonism，Mitochondria.

1－Methyl－4－phenyl－1，2，3，6－tetrahydropyridine（MPTP）はピリジン誘導体の一種であるが，麻薬に混在していたMPTPを麻薬と一緒に注射した中毒者に，パーキンソン病に極めて類似した症状が発生したことが端緒となり(4)，動物モデルが作成可能となり（1，3），このモデルはパーキンソン病の最もよいモデルと考えられるに致っている。我々はMPTPによるパーキンソニズムの神経細胞変性機序を研究することにより，パーキンソン病の発症機序研究の手掛りが得られることを期待して，MPTPの代謝物で，黒質ドーパミンニューロン障害の主役を為していると考えられている1－methyl－4－phenylpyridinium ion（MPP^+）(5)のミトコンドリアの呼吸機能に与える影響を検討した。

〔方法〕C57BLマウス全脳よりOzawaら（9）の方法でミトコンドリア浮遊液を調整し，それを一回凍結融解した後に，電子伝達系酵素複合体（complex Ⅰ～Ⅳ）活性に対するMPTPおよびMPP^+の影響を検討した。尚方法の詳細は文献（6～8）に記してある。次に生のミトコンドリア浮遊液にて，酸素消費量をClark型酸素電極にて測定し，MPP^+の影響を検討した。次にその浮遊液の一部にてcomplex I〔EC 1，6，5，3〕の活性を測定，又別の一部は凍結融解を行った後にcomplex Iの活性を測定した。又一部の実験では，ADPより生成したATPを測定した。次に元のミトコンドリア浮遊液を一回凍結融解後Triton X－100を加え（0·25％），それを用いてTCAサイクルのNAD^+を補酵素とする脱水系酵素に対するMPP^+の影響を検討した。蛋白はLowryらの方法で測定した。結果はStudentのt－testで検定した。

〔結果〕電子伝達系酵素の中でComplex Iのみが MPTP およびMPP^+によって抑制を受

けた（図1）。MPTPのIC_{50}は0.76 mM，MPP^+のIC_{50}は3.2 mMであった。凍結融解を行ったミトコンドリアをMPTP又はMPP^+と30分迄preincubateしても抑制の程度には大きな変化はなかった。又これらの抑制は可逆的であり，MPTPはNADHに対してnon－competitive，ubiquinoneに対してuncompetitive，MPP^+はNADHに対しuncompetitive ubiquinoneに対してnon－competitive inhibitionを示した（図2）。

Polarographyの結果は表1に示したが0.05 mMのMPP^+によりglutamate＋malate，pyruvate＋malate，alpha－ketoglutarateを基質とした時のstate 3およびstate 4の呼吸が著明に抑制され，示してないがATP産生も低下していた。succinateの酸化は全く影響を受けなかった。MPTPは0.05 mMの濃度では影響はなかった。次にpolarographyを行ったサンプルでのcomplex I活性の結果を表2に示すが，0.05 mMのMPP^+とincubateしたミトコンドリアのcomplex Iの活性は対照の約50％に抑制されていた。次にstate 3およびstate 4の酸素消費とcomplex Iの活性の比をとって見ると表3に示したが，MPP^+とincubateしたサンプルの比は対照に比し有意に低かった。次にTCAサイクルの酵素活性へのMPP^+の影響を表4に示したが，alpha－ketoglutarate dehydrogenaseがMPP^+により著明に抑制を受けた。この抑制はreversibleであり，NAD^+に対しcompetitive inhibitionを示した。

〔考察〕Ramsayら（10）はミトコンドリアにMPP^+をactiveにとり込む機構の存在を示したが，MPP^+のcomplex I活性に与える影響を，凍結融解を行ったミトコンドリアではIC_{50}が3.2 mMであったのに対し，生のミトコンドリアをpreincubateすると0.05 mMのMPP^+にてcomplex I活性は約50％に低下していた。MPP^+によりドーパミンニューロ

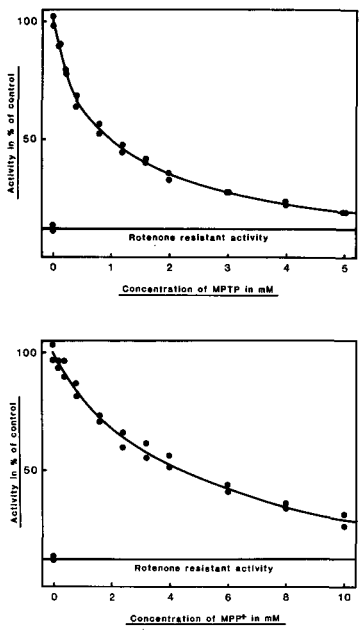


図1　MPTPおよびMPP^+による Complex Iの抑制

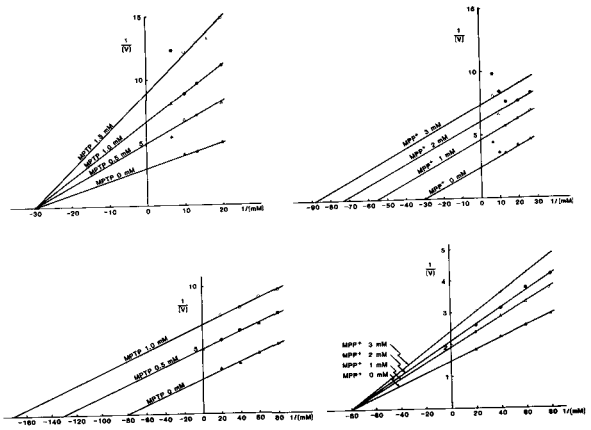


図2　MPTP（左）およびMPP^+（右）による Complex Iの抑制。上はNADHの濃度を，下はubiquinoneの濃度を変化させてある。

EFFECTS OF MPP^+ ON MITOCHONDRIAL RERSPIRATION

Substrate	State 3		State 4	
	Control	MPP^+(0.05 mM)	Control	MPP^+(0.05 mM)
Glutamate - Malate	102.5 ± 15.3	11.4 ± 3.2***	20.8 ± 1.5	6.4 ± 2.5***
Pyruvate - Malate	88.3 ± 7.8	12.8 ± 2.0***	21.1 ± 1.1	6.8 ± 0.8***
Alpha-ketoglutarate	53.0 ± 6.1	11.4 ± 2.2***	19.9 ± 1.5	5.8 ± 1.2***
Succinate - Rotenone	113.1 ± 18.2	108.0 ± 9.5	34.7 ± 3.7	33.6 ± 2.4

Expressed as nanomoles of oxygen utilized/min mg protein, mean ± SE, (n=4).
***: P<0.001

表　1

EFFECTS OF MPP^+ ON ACTIVITY OF COMPLEX I

	Glutamate + Malate		Alpha-Ketoglutarate	
	Control	MPP^+	Control	MPP^+
Non-frozen	57.0 ± 12.5	27.2 ± 5.9***	58.8 ± 10.3	28.8 ± 5.8***
Freeze-thawed	246.5 ± 52.3	150.6 ± 38.2***	254.0 ± 42.6	164.9 ± 37.5***

Expressed as nanomoles of NADH oxydized/min mg protein, mean ± SE (n = 9)
***: non-paired t-test, as compared with control, P<0.001.

表　2

RATIO OF OXYGEN CONSUMPTION TO ACTIVITY OF COMPLEX I

	Glutamate + Malate		Alpha-Ketoglutarate	
	Control	MPP^+	Control	MPP^+
State 3	3.26 ± 0.64	0.79 ± 0.16***	1.71 ± 0.23	0.74 ± 0.16***
State 4	0.69 ± 0.12	0.41 ± 0.10***	0.67 ± 0.14	0.37 ± 0.07***

Expressed as nanoatoms of oxygen/min mg protein/nanomoles of NADH oxidized/min mg protein, mean ± SE (n=9), ***: non-paired t-test, as compared with control, P<0.001.

表　3

EFFECTS OF MPP^+ ON ACTIVITIES OF NAD^+- OR $NADP^+$- LINKED ENZYMES

	Control	MPP^+(2mM)
Isocitrate dehydrogenase (NAD^+-linked)	269.2 ± 47.4	253.3 ± 41.5
Isocitrate dehydrogenase ($NADP^+$-linked)	97.0 ± 11.7	89.2 ± 16.7
Glutamate dehydrogenase (NADH-linked)	550.7 ± 62.6	537.4 ± 47.8
Glutamate dehydrogenase (NADPH-linked)	329.1 ± 24.3	307.8 ± 41.8
Alpha-ketoglutarate dehydrogenase	32.9 + 5.9	18.5 ± 3.3**
Malate dehydrogenase	4625 ± 568	4607 ± 886

Expressed as nanomoles of respective nucleotide oxidized or reduced/min mg protein, Mean ± SE (n=4). **: P<0.01.

表　4

ンが選択的に障害を受ける機序は，ドーパミンとり込み機構を通じてMPP^+が濃縮されること（2）によって説明される。ドーパミンニューロンの中では更にミトコンドリア内に濃縮されて，ミトコンドリア呼吸を阻害し，energy crisis を起して神経細胞の変性を招くことが考えられた。

〔文献〕

1　Burns, R. S., Chiueh, C. C., Markey, S., Ebert, M. H., Jascobowitz, D. and Kopin, I. J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80, 4546 - 4550.

2. Chiba, K., Trevor, A. J. and Castagnoli, N., Jr. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 128, 1229 - 1232.

3. Heikkila, R. E., Hess, A. and Duvoisin, R. C. (1984) Science 224, 1451 - 1453.

4. Langston, J. W., Ballard, P., Terud, J. W. and Irwin, I. (1983) Science 219, 979 - 980.

5. Langston, J. W., Irwin, I., Langston, E. B. and Forno, L. S. (1984) Neurosci. Lett. 48, 87 - 92.

6. Mizuno, Y., Sone, N. and Saitoh, T. (1987) J. Neurochem. 48, 1787 - 1793.

7. Mizuno, Y., Saitoh, T. and Sone, N. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 143, 294 - 299.

8. Mizuno, Y., Saitoh, T. and Sone, N. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 143, 971 - 976.

9. Ozawa, K., Seta, K. Takeda, H. Ando, K., Handa, H. and Araki, C. (1966) J. Biol. Chem. 59. 501 - 510.

10. Ramsay, R. R. and Singer, T. P. (1986) J. Biol. 261, 7585 - 7587.

147. 1−Methyl−4−phenyl−1, 2, 3, 6−tetrahydropyridine（MPTP）の5HTに対する影響

福田英俊・原　健二・中村重信・
木村　宏*・亀山正邦
（京都大・医・神経内科，滋賀医大・第二解剖*）

〔要　約〕

1−methyl−4−phenyl−1, 2, 3, 6−tetrahydropyridine（MPTP）はヒト・サルにParkinson病（PD）様症候をきたす物質として知られている。PDと5HT神経細胞の関連を検索する目的で，マウス線条体の5HTに対するMPTPの影響を検討した。

マウスにMPTP 30 mg/kgを7日間注射し，一部にはpargyline 100 mg/kgを断頭直前に注射した。断頭後，線条体を切り出し，線条体monoamine濃度はHPLCで，線条体tryptophan hydroxylase（TPH）活性は^3H_2Oの放出で測定した。

線条体5HT量はMPTP群で1週後に有意に減少していたが，4週後には対照値まで回復しており，5HIAA量は1週後，4週後とも増加していた。MPTP投与後1週目の5HT量は，pargyline投与により3.07倍に増加したが，対照群では2.10倍であった。線条体TPH活性は，1週目から4週目までMPTP群で有意に上昇し，特に1週目は顕著に上昇していた。これらの結果よりMPTPはcatecholamine神経細胞のみならず，TPH活性を通じて5HT神経細胞にも作用し，その代謝回転を促進していると考えられた。

Key word：1−methyl−4−phenyl−1, 2, 3, 6−tetrahydropyridine（MPTP），5HT, tryptophan hydroxylase

PDは，黒質線条体を中心とするdopamine（DA）量の低下，noradrenaline（NA）量の低下，さらには5HT神経細胞をも含めた，より広範な変性疾患であるとする考えがあり，現在PDと5HT神経細胞の関連が注目されている。

MPTPは，ヒト・サルでPDと区別がつかない臨床症候を発現させ，病理学的に黒質緻密質の神経細胞の著明な変性・脱落をおこす。マウスでは永続的な行動異常はみられないが，線条体のDA量の低下，線条体・前頭葉皮質のNA量の低下（2）及び黒質の病理所見（4）が報告されている。これまでに，実験動物を用いてMPTPの脳5HTに対する影響は多数研究されているが，その結果は一致をみていない。

私たちはPDと5HT神経細胞の関連を検索する目的で，マウス線条体の5HTに対するMPTPの影響を検討した（3）ので報告する。

【方法】12週齢の雄性ICRマウスにMPTP 30 mg/kgを，対照群には生理食塩水0.1 mlを連続7日間腹腔内に注射した。それぞれの群の一部に，pargyline 100 mg/kgを断頭前日及び90分前に腹腔内注射した。注射後1～12週にて断頭し，新鮮脳を直ちに凍結，クリオスタットを用いて前額断切片を作製し，線条体を切り出した。組織中のmonoamine濃度測定のためには，組織を30 v/wの0.1N過塩素酸中でホモゲナイズし，TPH活性測定のためには10 v/wの0.25Mショ糖液中でホモゲナイズし，それぞれを−80℃で保存した。

線条体monoamine及びその代謝産物の濃度はZaczekとCoyleの方法（7）により，HPLCで分離し電気化学検出器により定量した。線条体TPH活性はBeeversらの方法（1）に従い，^3H−tryptophanを基質として生じた^3H_2Oより測定した。

Table I

Effect of MPTP on striatal contents of DA, DOPAC, HVA, 5HT and 5HIAA in mice.

	N	DA		DOPAC	HVA	5HT		5HIAA	
control(1 w)	5	13.87 ± 2.04	***	3.51 ± 2.27	1.139 ± 0.219	0.477 ± 0.076	*	0.275 ± 0.032	***
MPTP (1 w)	7	3.00 ± 1.06		1.99 ± 1.22	0.908 ± 0.175	0.367 ± 0.086		0.492 ± 0.097	
control(4 w)	7	14.05 ± 1.73	***	3.89 ± 2.03	1.205 ± 0.259	0.451 ± 0.076		0.293 ± 0.040	**
MPTP (4 w)	6	6.79 ± 2.60		3.94 ± 1.79	1.204 ± 0.475	0.502 ± 0.190		0.514 ± 0.169	
control(8 w)	6	16.11 ± 2.20	***	4.95 ± 1.21	1.410 ± 0.200	0.665 ± 0.111		0.257 ± 0.097	
MPTP (8 w)	7	7.31 ± 1.28		3.13 ± 0.48	1.100 ± 0.240	0.643 ± 0.147		0.282 ± 0.105	
control(12 w)	5	15.54 ± 1.74	***	4.66 ± 0.64	1.280 ± 0.260	0.529 ± 0.056		0.288 ± 0.058	
MPTP (12 w)	6	9.62 ± 0.82		3.42 ± 0.30	1.097 ± 0.226	0.583 ± 0.047		0.362 ± 0.077	

Mean ± S.D.(ng/mg w.w.), N = number of mice, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

【結果】注射後1週目の線条体DA量はMPTP処置群で有意に低下し，12週後も軽度であるが同様に有意の低下がみられた。線条体5HT量はMPTP注射後1週目で有意に低下していた。しかし，4週以降の5HT量は対照群と差がなかった。5HIAA量は，1週後・4週後でMPTP群で有意に上昇していた（Table I）。

断頭前にpargylineを投与すると対照群，MPTP群のいずれもDA量は増加し，pargyline投与群と非投与群におけるDA量の増加率は，MPTP群・対照群を問わずほぼ等しかった。MPTP投与後1週目の5HT量はpargyline投与により3.07倍に増加したが，対照群では2.10倍であった。しかし4週後では両群とも約2倍の増加を示し，差はみられなかった（Fig. 1）。

線条体TPH活性は，MPTP投与後1～4週目までいずれも有意に上昇し，上昇の程

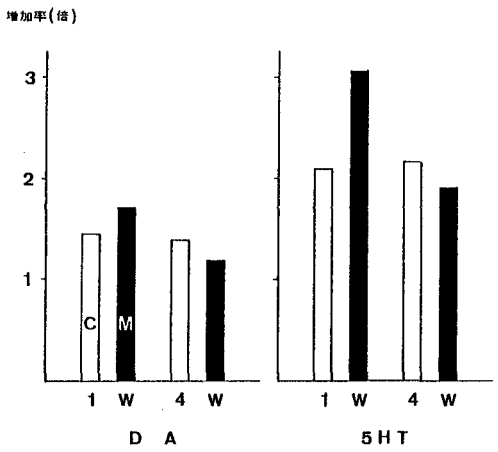


Fig.1 pargyline投与群／非投与群

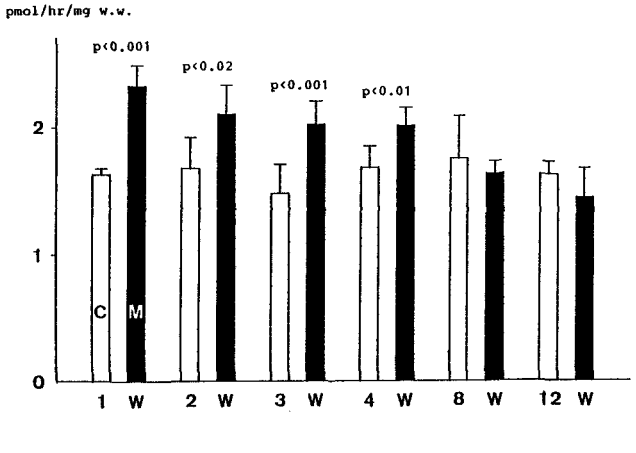


Fig.2 Effect of MPTP on striatal activity of TPH in mice.

度は1週目が最も著明であった。8週後，12週後では対照群との間に差は認められなかった（Fig. 2）。

【考察】線条体5HT量はMPTP投与後1週目では低下していたが4週後には対照値まで回復しており，5HIAA量は4週後まで上昇していた。一方，MAO阻害薬pargylineを断頭直前に投与したところ，5HT量の増加率はMPTP処置1週後のマウスで著明であった。これらの結果は，MPTPの投与により線条体5HTの合成・分解，すなわち代謝回転が亢進していることを示唆している。これは5HT合成の律速酵素であるTPH活性がMPTP投与後少なくとも4週間上昇していることで裏づけられた。一方，Matsudaら（6）はラット線条体のTPH活性はMPTP投与により変化しないと報告しており，私たちの結果と一致しない。これには，実験動物の種差，MPTP投与法及びassay法の違いが関与していると思われた。

MPTPは主としてMAO－Bにより代謝され，その代謝産物が神経毒性を発現すると考えられている。MAO－Bは中枢神経系では主にastrocyteと5HT神経細胞に存在していることから，MPTPの一部は5HT神経細胞にはいり，そこで代謝されると同時に直接TPH活性を亢進させる可能性がある。また，今回の実験で対照群の線条体DA量はモル濃度で約100 μMであり，MPTP処置群で約20－60 μMであった。in vitroで，10 μMDAがTPHを阻害することが報告(5)されており，これがin vivoでも事実であるならば，MPTPによってDA量が低下することでTPHへの阻害が減少し，TPH活性の上昇がもたらされるとも考えられる。しかし，MPTP注射後8週目，12週目で線条体DA量が50－60 μMであるにもかかわらず，TPH活性は対照群とほとんど差がなく，DA量の変化だけではTPH活性の亢進をひきおこせないと思われる。

今回の検討では，MPTPあるいはその代謝産物がDA神経細胞，NA神経細胞に影響するばかりでなく，TPH活性を通じて5HT神経細胞にも機能的に作用し代謝亢進をひきおこすと考えられた。

【文献】

1. Beevers,S.J., Knowles,R.G. and Pogson,C.I. (1983) J.Neurochem. 40, 894-897.
2. Hallman,H., Olson,L. and Jonsson,G. (1984) Eur.J.Pharmacol. 97, 133-136.
3. Hara,K., Tohyama,I., Kimura,H., Fukuda,H., Nakamura,S. and Kameyama,M. (1987) Brain Res. 410, 371-374.
4. Heikkila,R.E., Hess,A. and Duvoisin,R.C. (1984) Science 224, 1451-1453.
5. Knowles,R.G. and Pogson,C.I. (1984) J.Neurochem. 42, 677-684.
6. Matsuda,L.A., Schmidt,C.J., Hanson,G.R. and Gibb,J.W. (1986) Neuropharmacology 25, 249-255.
7. Zaczek,R. and Coyle,J.T. (1982) J.Neural Transm. 53, 1-5.

148. β-フェニルエチルアミン逆耐性現象におけるラット脳内各部位のモノアミン及び代謝産物の変化

黒木俊秀・松本　孝・平野　誠・堤　哲之・鹿子島裕士・八尾博史・内村英幸・白石昭雄*・中原辰雄*・中村　薫
（国立肥前療養所，九州大・理*，医・精神**）

〔要　約〕

β-phenylethylamine(PEA)をラットに反復投与（50mg/kg i.p., 28日間）すると，7日間の休薬後もPEAの再投与(50mg/kg, i.p.)により休薬前の増強した常同行動が再現する．このPEAによる逆耐性行動発現時（投与後15分）の脳内部位別のモノアミン関連物質の変化をHPLC-ECD法により同時測定した．逆耐性発現群（PP群）と急性投与群（SP群）では対照（SS群）に比して尾状核－被殻，側坐核，嗅結節などの部位でDAの増加，DOPACの減少3MTの著明な増加，前頭前野でNEの減少，normetanephrine(NM)の著明な増加，MHPGの増加，5HTの増加を認めた．これらの結果からPEAがDAの放出促進と取り込み阻害，NEの放出促進を生じていることが示唆された．しかしながらPP群とSP群間で発現した常同行動には差がみられたにもかかわらず，両群の各モノアミン系の変化には差がなかった．一方，PEA慢性投与後休薬時の状態をみたPS群では，嗅結節と側坐核でDA及びDOPACの減少，又はその傾向がみられ，過敏反応性の準備状態においては中脳辺縁系のDAニューロン系の活動性が抑制された状態にあることが注目された．

Key word：　ß-phenylethylamine, behavioral sensitization, mesolimbic dopamine neuron systems

β-phenylethylamine(PEA)は哺乳動物の脳内に存在する微量アミンの一つであり，amphetamineと類似した化学構造と行動薬理作用を有することで知られている(2)．一方，PEAの尿中排泄量が妄想型精神分裂病患者では高値を示す(7)ことなどから，PEAの精神分裂病の病態への関与が示唆されている．先に我々は，ラットにPEAを反復投与(50mg/kg i.p., 28日間)することによって，常同行動に対する過敏性が形成されることを確認し，同時にPEA反復投与群のHVAレベルが最終投与後60分で中脳辺縁系を中心とした各部位において急性投与群に比して有意に増加していることを見出だし，生化学的にもDAニューロン系のsensitizationが生じていることを示唆した(3)．更にPEA(50mg/kg, i.p.)を28日間反復投与し，7日間の休薬期間を置いた後も，PEA 50mg/kgの再投与によって休薬前の増強した常同行動が再現することを認め，methamphetamine(MAP)逆耐性と同様の現象が内在性物質の投与によっても形成されることを明らかにした(8)．そこで今回は，休薬後のPEA再投与で，常同行動が最も強く発現する投与後15分の時点での脳内諸部位における各モノアミンとその代謝産物の変化をHPLC-ECDを用いた同時定量法によって測定することにより，PEAによる逆耐性現象を生化学的に検討した．

［方法］Wistar系雄性ラット（体重280～330g，生後6週齢）を用い，次の4群を作成した．まずPEA投与群は，PEA(50mg/kg, i.p.)を1日1回，28日間投与し，7日間の休薬後2群に分け，1群にはPEA(50mg/kg, i.p.)を再投与し（逆耐性発現群，PP群），他に1群には生食水を腹腔内に投与し，PEA慢性投与後休薬時の状態をみた(PS群)．他方，上記と同様の方法で生食水を28日間投与し，7日間の休薬後2群に分け，1群にはPEA(50mg／

kg, i.p.) を投与し，PEA の急性投与の効果をみた（SP群）．他の1群には生食水を投与し，対照とした（SS群）．各群は注射後15分時にBorison らの評価尺度(1) に準じて行動評価を行い，直後に断頭した．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300 μmの連続切片を作製した．各切片は-20 ℃のプレート上で既報(3) と同様に各部位を切り出した．各モノアミン関連物質は，既報(5) のHPLC-ECD法によって同時に測定した．切り出した各組織は，内部標準物質（isoproterenol)を含む0.1 Mギ酸でホモジナイズ後，遠沈（17,700 ×g,10分，5℃）し，上清をHPLC-ECDに注入し，NE, NM, MHPG, DA, DOPAC, 3MT, HVA, 5HT 5HIAA を同時測定した．

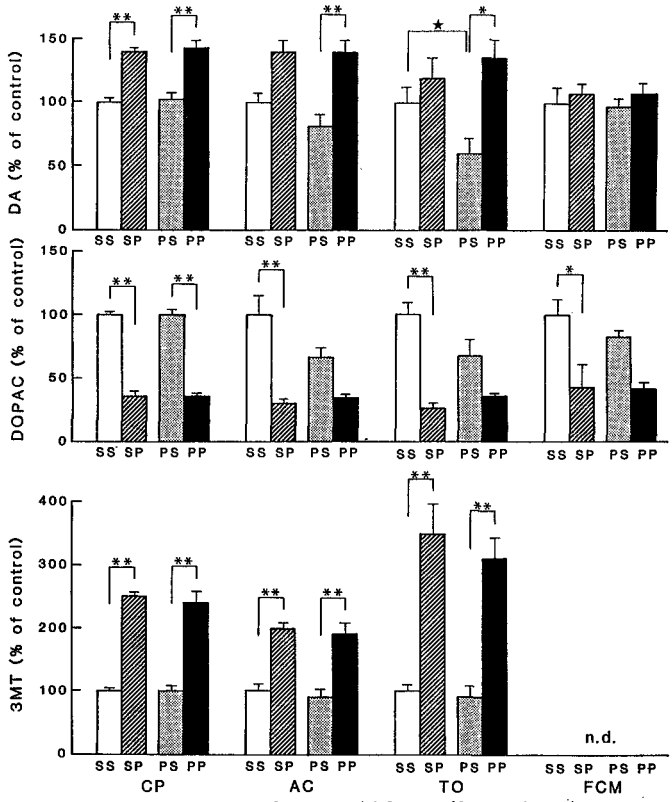


Figure 1. Effects of PEA (50 mg/kg, i.p.) on DA and its metabolites in discrete regions of rat brain withdrawal from chronic treatment (28 days, 50 mg/kg, i.p.) The results are expressed as % of control: SS (mean±S.E.M.). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ by Scheffe's test, ★ $p<0.025$ by Student's t test. The DA, DOPAC and 3MT levels in controls are; CP, 127.39±4.36, 33.87±0.76, 2.88±0.11; AC, 65.88±5.13, 28.75±4.24, 2.11±0.21; TO, 56.82±6.73, 35.93±3.12, 1.77±0.19; FCM, 1.24±0.15, 0.74±0.09, n.d. (ng/mg protein), respectively.

［結果及び考察］PEA 再投与後15分時の常同行動のスコア（mean± S.E.M., n =7～8 ）は，SS群が0.07± 0.07，SP群が3.5 ± 0.38，PS群が0.31± 0.09，PP群が4.7 ± 0.10で，PP群がSP群に比して有意に増加（Scheffe's test $p < 0.01$）していることを確認した．

Figure 1に尾状核－被殻(CP)，側坐核(AC)，嗅結節(TO)及び前頭前野内側部(FCM) におけるDAとその代謝産物の変化を示した．PP群とSP群では，SS群に比してCP，ACでDAの増加（＋40～43%），DOPAC の減少（－64～70%）及び3MT の増加（＋92～152 %）がみられ，TOでもDOPAC の減少（－64～76%）と3MT の著明な増加（＋212 ～250 %）がみられた．またFCM でもDOPAC が減少（－58%）していた．HVA は測定した全部位で対照と比べて各群とも有意な変化はなかった．以上のようなPEA 投与後15分でのDA代謝産物の変化は，経時変化を検討した既報(3) の結果とも一致しており，PEA によるDA放出と再取り込み阻害が生じていることが推定される．DAの増加について，Karoumら(4) もPEA 20mg/kg 投与後7.5 分で尾状核のDAが減少，20分で増加したと報告しており，DAプールがPEA によって涸渇した結果，DAの合成が促進される可能性が考えられる．一方，SP群とPP群間では発現し

た常同行動に評価スコア上差があったにもかかわらず，両群間でDAとその代謝産物のレベルはいずれの部位でも差はなかった．この理由として，今回のPEA負荷(50mg/kg)が生化学的変化をとらえるには高用量過ぎた可能性，或は投与後15分時よりも更に早期の変化が逆耐性の発現に関連がある可能性が考えられる．むしろ注目すべき所見としては，PS群でTOのDAが低下（－39%），DOPACが減少傾向にあり，ACのDA，DOPACにも減少傾向がみられた．これらのことから過敏反応性の準備状態といえるPS群では，中脳辺縁系のDAニューロン系のsteady stateの活動性が抑制されていることが示唆される．その状態に対して受容体レベルに何らかの代償性の変化が生じている可能性も考えられるので，今後はDA受容体の変化を検討することも必要であろう．

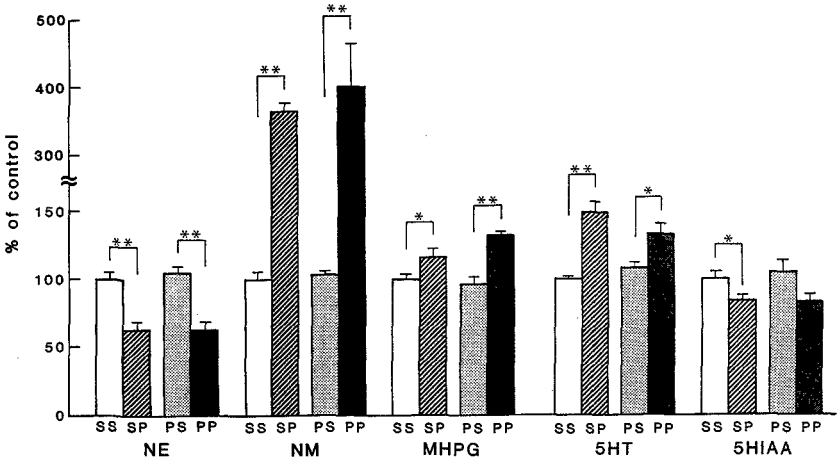


Figure 2. Effects of PEA (50 mg/kg, i.p.) on NE, 5HT and thier metabolites in prefrontal cortex lateral field of rat brain. The results are expressed as % of control: SS (mean±S.E.M.). *p<0.025, **p<0.005 by Student's t test. The contorl values are; NE, 3.15±0.12; NM, 0.35±0.03; MHPG, 0.36±0.01; 5HT, 7.20±0.15; 5HIAA, 3.68±0.19 (ng/mg protein), respectively.

Figure 2に前頭前野外側部でのNEと5HT及びその代謝産物の変化を示した．NE系はSP群とPP群で前頭前野極部，内側部及び外側部においてNEの減少（－22～38%），NMの著明な増加（＋240～304%），MHPGの増加がみられた．NEのCOMT代謝産物であるNMはNE放出を直接に反映していると考えられ(9)，その増加は放出の促進を示している．今回の結果は先にPEA投与後60分でみられたNEの減少(3)がNE放出促進によることを裏づけるものである．しかしながらCOMTは断頭後も活性を保ち，3MT同様NMも死後変化が大きい可能性がある(6)．現在，マイクロウェーブを照射したラット脳内のNMをGC－MSを用いて測定することによって，断頭による影響を検討中である．今後NMをNE放出の指標としてPEAのNE系に対する影響を検討することが有効ではないかと思われる．一方，5HT系はSP群とPP群で前頭前野の5HTの増加（＋33～60%）がみられ，5HIAAは外側部でのみ減少（－17%）していた．NE系，5HT系ともにSP群とPP群間に有意の差はなく，PS群もTOで5HTが有意に減少（－30%，Scheffe's test $p < 0.01$）した他は，対照と比較して差はなかった．NE系，5HT系のPEA逆耐性形成への関与は明らかではないが，PEA投与による常同行動の発現にはこれら各モノアミン系が相互に作用していると考えられる．

[文献] 1)Borison,R.L.,et al.(1977)Life Sci.,21;117. 2)Braestrup,C.,et al.(1978)in Noncatecholic Phenylethylamines,Marcel Dekker Inc.,N.Y.pp.245. 3)石橋賢治，他(1985)神経化学,24;559. 4)Karoum,F.,et al.(1982)J.Pharmacol Exp.Ther.,223;432. 5)Kuroki,T.,et al.(1987)Neuropeptides 9;169.6)Mocchetti,I.,et al.(1981)J.Neurochem.,37;1607 7)Potkin,S.G.,et al.(1979)Science,206;470. 8) 白石昭雄，他(1987)薬物・精神・行動7;83. 9)Wood,P.L.,et al.(1987) J.Neurochem.,48;574.

149. 2ーヒドロキシプトレスチンのGABOBへの代謝

能登　直・長谷川武史*・上村　宏・
中尾純治・原田博之・中嶋照夫
（京都府医大・精神，同位元素研*）

〔要　約〕

中枢神経系において2ーヒドロキシプトレスチンからGABOBが生合成されるか否かを検討した。この研究を行うために、2-Oxo-diaminobutane·2HClと[^{3}H]sodium boro-hydrideより[^{3}H]2-ヒドロキシプトレスチンをラット脳室内投与後、脳を取り出し[^{3}H]GABOBと考えられる分画を分離した。Amberlite CG 120によるカラムクロマトグラフィー、高圧濾紙電気泳動、再結晶法にて分離した[^{3}H]GABOB分画がAuthentic GABOBと一致することが明らかになった。

Key word： GABOB, Hydroxyputrescine, Putrescine

ジアミンであるプトレスチンは主としてポリアミンに代謝されるが、一部はGABA(12,15,20)および2-ヒドロキシプトレスチンに代謝される(11)。プトレスチンより生成されるGABAは中枢神経系の部位間でその生成量に差があるばかりでなく、high K^+ solutionによりReleaseが促進されることが明らかになっている(15,16)。プトレスチンは中枢神経系に広く分布し、各部位の間で濃度差が存在し(13,17)その代謝物である2-ヒドロキシプトレスチンも脳内に広く分布し、プトレスチン同様、脳内部位間で濃度に差がある(14)。プトレスチンおよび2-ヒドロキシプトレスチンの中枢神経系での役割を明かにする一環として、Fig.1に示したプトレスチンからGABAへの代謝と同様の機作で2-ヒドロキシプトレスチンからGABOBが生合成されるのではないかと考え今回の研究を行った。

[実験方法] 実験動物および手術　180gのウィ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。脳室内への薬物投与用のガイドカニューレの、慢性固定手術はMyers(8)の方法によりペントバルビタール麻酔下で行った。実験は手術後1週間経た時点で行った。

[^{3}H]2-ヒドロキシプトレスチンの合成　40μlの90%メタノール中で5μgの2-Oxo-diaminobutane·2HClと5mCi [^{3}H]sodium borohydride (19.5Ci/mmol)を氷冷下で1時間、引き続き室温下で1時間反応させた後、30μlの酢酸を加え反応を止めた。反応液をN_2気流下で乾燥させた後、小量の水で溶解し0.5mlのAmberlite IR 120, H^+型、100-200 meshに通し、5mlの水および5mlの1M pyridineでカラムを洗った後、10mlの3M NH_4OHで[^{3}H]2-ヒドロキシプトレスチンを溶出した。溶出液を乾固した後10mlのAmberlite CG

120, NH_4型、100-200meshに通し、3M NH_4OHでクロマトグラフィーを展開し,2-ヒドロキシプトレスチンを得、以下の実験に用いた。尚、この合成反応は定量的に行われることが予備実験で確かめられているので得られた[^{3}H]2-ヒドロキシプトレスチンのspecific activityは4.9Ci/mmolである。

[^{3}H]γ-amino-β-hydroxybutric acid(GABOB)の抽出　GABA transaminaseのinhibitorであるAminoxyacetic acid(5mg/kg)をラット腹腔内投与1時間後に10μCiの[^{3}H]2-ヒドロキシプトレスチンを脳室内に投与した。投与3時間後に断頭し、脳を取り出し10% TCAにてホモジナイズし、遠沈にて上清を得た。上清を水で2倍に薄めて、5mlのAmberlite CG120,100-200mesh, H^+ formに通した。カラムは25mlの水で洗った後、25mlの1Mピリジンで溶出し、溶出液を乾固した(1Mピリジン Fr.)。

[結果]　[^{3}H]GABOBの同定　①カラムクロマトグラフィー　1x15cmのAmberlite CG 120,100-200 mesh, H^+ formのカラムを用いて、1Mピリジン Fr. のカラムクロマトグラフィーを行った。カラムの展開は0.2 N HClを用い、溶出液は15mlづつ集めた。15mlのうちの0.5mlを用いて放射能の測定を行った。同じカラム、同じ溶出液を用いて5mgのAuthentic GABOBクロマトグラフィーを行った。15mlのうちの200μlをNaOHの入ったデシケーター内で減圧して乾固した。このサンプルをDubinの方法(3)を用い発色させ比色法にてGABOBの量を測った(Fig. 2)。[^{3}H]GABOBのクロマトグラフィーのパターンとGABOBのクロマトグラフィーのパターンはよく一致している(Fig. 2)。

②高圧濾紙電気泳動　上記の[^{3}H]GABOBのクロマトグラフィーのNo.20-No.29を乾固しその1/100と10μgのAuthentic GABOBを混じたものと10μgのAuthentic GABOBを一枚の濾紙に塗布して高圧濾紙電気泳動を行った。高圧濾紙電気泳動の条件は以下の通りである。緩衝液、pyridine-acetic acid-water (50:5:945, pH 3.4) ; potential gradient,20 V/cm·展開時間、1時間。1時間の泳動後濾紙を40℃で乾燥し、0.2%ニンヒドリン・アセトン溶液を噴霧し、発色させた。発色後1cm幅に切り、シンチレーターバイアルに入れ、50%エタノール溶液で放射性物質を溶出し、シンチレーターを加え放射能を測定した。その結果をFig.3に示した。放射能の存在する泳動部位とGABOBの泳動部位はよく一致している。

③再結晶－①のNo20-No29の乾固物の1/2にGABOB 25mgを加え小量の水で溶かし、微量のエタノールを滴下し、冷蔵庫内に1-2日保存した。析出した結晶を乾燥し、重量測定した後、500μlの水で溶かしその内の50μlの放射能を測定した。残りは乾固し、再び小量の水で溶かし再結晶させる。この操作を4度行いGABOBのspecific activityを求めた。Tableに示すように後3回のspecific activityはほぼ一定の値であった。

[考察]　GABOBの脳内濃度に関しては1959年に牛で4.08μmoles/g(18)、ラットで0.48μmoles/g (6)との報告があるが、その後より正確な方法で検討された結果ほとんど存在しないか、存在したとしても0.01μ moles/g以下であるとの結論が出されている(2,4,7)。しかし、一方ではその生体内存在の有無にかかわらずその薬理作用に関しては多くの報告がある。抗けいれん作用(10)、生長ホルモン、プロラクチン、コーチゾール放出作用(5)等が報告されている。GABOBの生合成経路についても主としてin vivoで研究されて、Hydroxyprorine,GABA,hydroxyglutamic acidから生合成されるとの報告がある(1,19)。今回の研究で明かになった2-ヒドロキシプトレスチンからのGABOB

生合成経路は全く新しい経路であり、しかもin vivoで明かになったことに意義があると思われる。2ーヒドロキシプトレスチンの脳室内投与で抗けいれん作用が発現している(9)ので今後この経路がますます重要になる可能性がある。

[文献] 1.Bouthillier,L.P.,Canad.J.Biochem.,44,171(1966) 2.Cooper,J.R.et al,in the Biochemical Basis of Neuropharmacology,pp249,Oxford Univ. Press, New York(1982) 3.Dubin,D.T.,J.Biol.Chem.,235,783(1960) 4.Elliot,K.A.,Jap.J. Brain Physiol.,84,4(1967) 5.Fioretti,et al.,J.Clin.Endocrinol.Metab.,47, 1336(1978) 6.Hayashi,T.,J.Physiol.,145,570(1959) 7.Mitoma,C.,in Inhibition in the Nervous system and Gamma-aminobutyric acid(Roberts,E.et al ed)pp236, Pergamon Press, NewYork(1960) 8.Myers.R.D.,in Method in Psychobiology,Vol. 2(Myers,R.D. ed)pp169,Academic Press(1972) 9.中尾純治ら、神経化学、26(1987) 投稿中 10.Noto,T.et al.J.Biochem.(Tokyo),83,543(1978) 12.能登 直ら・神経化学、23,360(1984) 13. 能登 直ら.神経化学、24,109(1985) 14.能登 直ら.神経化学,25,0(1986) 15.Noto,T.et al J.Neurochem,46,1877(1986) 16.Noto,T.et al Anal.N.Y.Acad.Sci,473,499 (1986) 17.Noto T.et al J.Neurochem.(1987) 18.Ohara,K.et al Science,129,1225 (1959) 19.Radhakrishnan,A.N.,J.Biol.Chem., 226,559(1957) 20.Seiler,N. et al Brain Res.,28,317(1971)

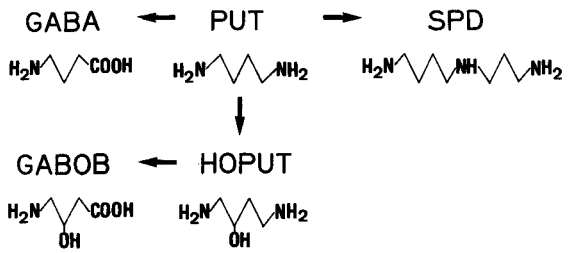


Fig. 1 metabolic pathway of PUT & HOPUT

PUT:putrescine, SPD:spermidine, HOPUT:2-hydroxyputrescine

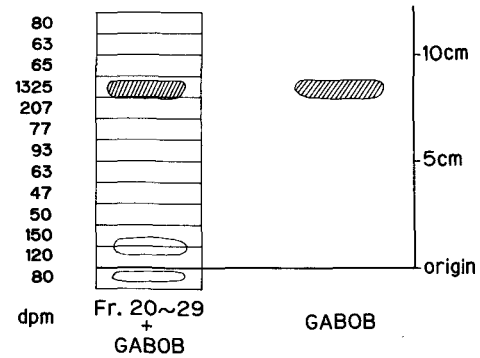


Fig. 3 high-voltage paper electrophoresis

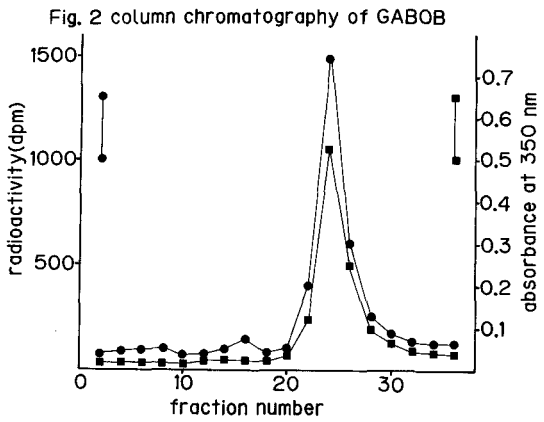


Table Re-Crystallization of [^{3}H]GABOB with Authentic GABOB

Number of Crystallzation	Specific Activity (dpm/mg)
1st	2328
2nd	2013
3rd	2018
4th	2019

150. ネコとマウスの網膜及び眼組織内における ornithine aminotransferase (OAT)活性の分布

加藤尚彦・堀田善裕*

(東京大・医・脳研・生化, 順天堂大・医・眼科*)

〔要　約〕

脳回転状脈絡網膜萎縮症で欠損するミトコンドリア酵素, ornithine aminotransferase (OAT)の微量測定法を工夫し, ネコとマウスの網膜, 及びネコの眼組織内での OAT 活性の分布を調べた.

(1) OAT 反応により生成されるグルタミン酸を測定する新微量測定法は, OAT 活性を特異的に測定でき, 従来の比色法の 10,000 倍以上の感度を持つ.

(2) ネコの眼組織では, OAT 活性は神経網膜, 網膜色素上皮, 虹彩及び毛様体の上皮などの外はい葉性上衣細胞由来の細胞に著しく高かった. また脈絡膜や毛様体の血管層などの内はい葉性細胞にもかなりの活性が見出された. 角膜, 強膜, 視神経束には, 低い活性が見られ, レンズには活性は認められなかった.

(3) ネコ及びマウスの網膜では, OAT 活性は内網状層にピーク持ち, 外網状層から神経節細胞層または神経線維層にわたって広く分布した. また視細胞(光受容細胞)の内節にも高い活性が見いだされた. ネコ網膜の外節にも内節と同程度の活性が見られ, マウス網膜の外節には, 内節の 1/4 の活性が認められた.

Key word : retina, ornithine aminotransferase, gyrate atrophy

脳回転状脈絡網膜萎縮症 (gyrate atrophy of the choroid and retina) は, 常染色体劣性遺伝を示す先天性脈絡網膜変性疾患であり(13), 患者には ornithine aminotransferase (OAT, EC 2.6.1.13) の欠損による高オルニチン血症が見られる(2,3,9,12,14).もし眼組織とくに網膜内での OAT の分布が解かれば, OAT 欠損時の高オルニチン濃度による影響(10)を受け易い細胞や, 細胞の部分構造を知り, gyrate atrophy の病態を明らかに出来ると思われる. そこで新たに OAT の微量測定法を工夫し, 網膜及び眼組織から切り出した各構造の微量試料の OAT 活性を測定した.

＜実験方法＞

[凍結乾燥組織試料] ネコ(オス, 3.5-5 kg, 2匹)とマウス(C57BL, オス, 6週齢, 22-24 g , 3匹)の眼球を凍結し, 厚さ 7-14 μm の凍結乾燥切片を調製した(7).図1, 2に示す種々の組織片を顕微鏡下で切り出して試料とした(0.3-6.8 μg 乾燥重量). 網膜凍結乾燥切片からは, 図3, 4に示す網膜層や, 層構造を更に分割して切り出して試料とした(10-68 ng). 試料を直接 OAT 反応液に加えて, その活性を測定した.

[OAT 活性測定法] OAT は次の反応を触媒する. [オルニチン + 2－オキソグルタル酸 = グルタミン酸－γ－セミアルデヒド + グルタミン酸] 試料内の OAT により生成されたグルタミン酸を, 過剰量の NAD^+ の存在下でグルタミン酸脱水素酵素(GDH, EC 1.4.1.3)により NADH に転換し, この NADHを測定する. 従って試料に内在するグルタミン酸と OAT により生成されたグルタミン酸の和が測定されるので, OAT 活性測定値の平均と, 酵素反応を塩酸を加えて止めて測った内在性のグルタミン酸濃度の平均値の差を OAT 平均活性とした(図参照). μg 試料は, 1.45 μl の反応液(100 mM トリス塩酸, pH 8.5; 5 mM 2-オキソグルタル酸; 10 mM オルニチン; 200 μM ピリドキサル燐酸)に加えて 38 °C で 30 分－1時間反応後, 0.27 μl の 1 M HCl-H_2O_2 を加えて 92 °C, 30 分加熱して, 試料中の酵素を変性させると同時に, 未反応の2－オキソグルタル酸を破壊する. 次に 4.3 μl の GDH 反応液(最終濃度, 100 mM トリス塩酸,

pH 8.5；400 μM NAD^+；200 μM ADP ；100 μM ジチオスレイトール；150 μg/ml GDH；1 μg/ml カタラーゼ）を加えて 38 °C で 30 分反応させた．続いて 0.49 μl の 2.6 M NaOHを加えて 70 °Cで 30 分加熱し，NADH を保存したまま未反応の NAD^+ を破壊した後，アリコット1.0 μl を 50 μl の NAD サイクリング反応液に加えて，NADH を 2,500-5,000 倍に増幅して蛍光測定した(6).ng試料には，96 nlの OAT 反応液，22 nl の HCl- H_2O_2,2.2 μl の GDH 反応液，300 nlの NaOH 溶液を用い，全混合液中の NADH を NAD サイクリングにより 1,500-3,000 倍に増幅して測定した．

＜結果及び考察＞

［OAT 活性測定法の特徴］ 測定条件が至適反応条件で，生成されるグルタミン酸－γ－セミアルデヒドは，自動的に$^1\Delta$－ピロリン－５－カルボン酸（ P5C ）となる．o-アミノベンツアルデヒドを用いる従来の比色測定(8) 法でこの P5C を測定した時のラット肝ミトコンドリア（Ｍｔ）抽出液の活性値［ 424±24 mmol/kg蛋白/時（測定試料数，10）］は，本方法による測定値 ［ 444±38 (13) ］とよく一致した．また OAT の特異的阻害物質であるカナリン［ NH_2-O-CH_2-CH_2-CN(NH_2)-COOH ］により，本方法で測定したＭｔ抽出液の活性は，10^{-5} M で 97 % 阻害された．比色法では測定の為に 0.5 mg 湿重量のマウス脳ホモジェネートが必要であるが，本方法では 50 ng で充分であり， 10,000 倍以上の感度が得られた．

［ネコ眼組織内の OAT 活性分布］ ネコの網膜の外側には，網膜（厚さ 100 μm ）の 2/3 の厚さの輝板（ tapetum ）が存在する．色素上皮は一層の細胞層で，神経網膜を分割する時輝板に付着して，試料として分離出来なかった（試料の写真供覧）．網膜は高い OAT 活性を示し，色素上皮を付着する輝板，虹彩，脈絡膜は網膜の 1/3 の活性を持っていた（図１）．角膜，強膜，視神経束には低い活性が見られたが，レンズには活性は認められなかった．虹彩を色素上皮と基質に分けて測定すると，OAT 活性は上皮に局在したが，毛様体を突起と血管層に分けても，同程度の活性が見られた（図２）．図３の輝板の脈絡膜側（ TP-Ch，脈絡膜は切除する ）と色素上皮側（ TP-PE，色素上皮が付着し，全試料の 1/10 以下を占める）を比較すると，TP-PE が２倍近い活性を示し，この差の活性は色素上皮に局在すると考えられるので，色素上皮の活性は著しく高いと推測出来る．つまり OAT は眼組織を構成する血管系の内はい葉細胞群（脈絡膜と毛様体の血管層），及び発生学的に外はい葉性の上衣細胞より由来する細胞群（網膜，毛様体上皮，虹彩上皮，網膜色素上皮）に多く含まれ，従来の微量測定法によらない生化学的分析結果(1,4) 及び，最近の免疫組織化学的染色法の結果(5) とよく一致している．

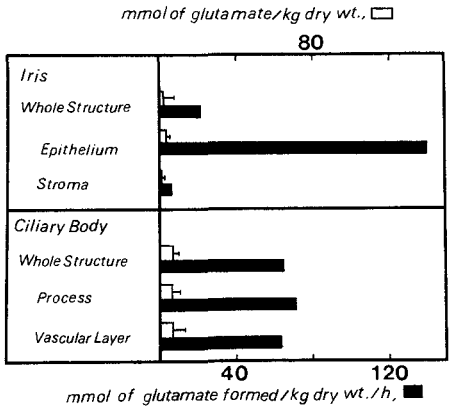


図２．ネコの虹彩と毛様体の OAT 活性

虹彩と毛様体を上皮と基質部分に分けて，活性を測定した．活性の表現法については，図１の説明参照．測定試料数は 8-19 ．

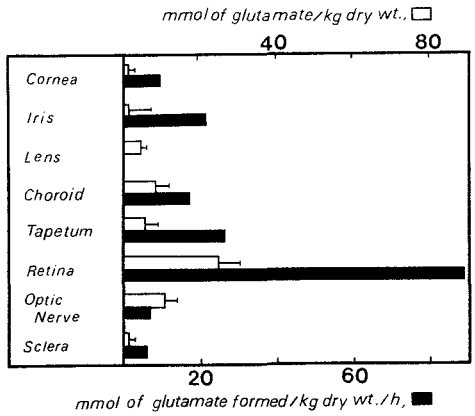


図１．ネコの眼組織内の OAT 活性

平均活性値（■）は，OAT 測定平均値から内在性グルタミン酸濃度の平均値（□）を差し引いて求めた（測定法参照；以下同様）測定試料数は 16-20で，—|—は SEM を表わす．

［ネコ及びマウスの網膜内での OAT 活性分布］ ネコとマウスの網膜では，内網状（ＩＰ）層を中心に外網状（ＯＰ）層

から神経節細胞（ＧＣ）層にかけて，広く OAT 活性が分布する（図３，４）．神経線維（Ｆｂ）層のとれるネコの網膜では，その活性はＧＣ層より低かった．両方の網膜とも視細胞（光受容細胞）の細胞体を含む外か粒（ＯＮ）層では活性は低く，これと対照的に視細胞の内節が著しく高い活性を示した．ネコの外節は内節と同程度の活性を持つのに反し，マウスの外節は内節の 1/4 の活性を示した．

免疫組織化学的染色法によると，ラット網膜では主に Müller 細胞の細胞核（ＩＮ層に在る）より内側の細胞体が染まり，他のニューロンは殆ど染まらないと報告されている(5).OAT はミトコンドリア酵素(8,11)であり，Müller細胞の細胞体は核より内側，とく外限界膜に近い脚部（ foot-plate ）にミトコンドリアを多く含む．従って図３と４の結果は，Müller細胞の OAT 活性を表わすと考えると，ＩＮ層より内側の活性については免疫染色法の結果と矛盾しない．視細胞の内節にはミトコンドリアが集中しており，図３と４はこれらのミトコンドリアが高い OAT 活性を持つ事を示している．しかし免疫染色法では，内節には免疫反応性は認められず(5),恐らく染色時に抗体がこれらのミトコンドリアに到達し得ない為と考えられ，免疫染色法の限界を示しているものと思われる．

一方外節にも OAT 活性が見い出されるが（図３，４），外節が円板（ optic disk ）より成りミトコンドリアを含まない事を考えると，本結果は一般的な予想に反している．内外節の微量試料はそれらの境界を顕微鏡下で分割して得られるので，当然相互の混入は避けられないが，その程度は顕微鏡的には多くとも 10 % 以下と考えられる．従って，特にネコの外節における高活性は，たんなる混入としては説明できない．現在まで動物の gyrate atrophy としてネコの一例が報告されており(15)，ネコの外節に OAT 活性が高く，高オルニチン血症の影響を外節が受けやすいとすれば，図３，４の結果は興味深い．

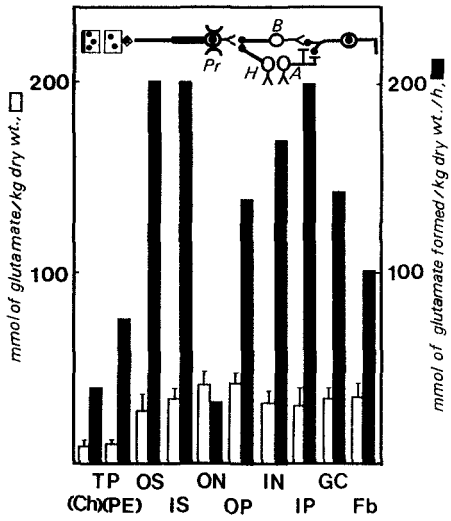


図３．ネコの網膜内の OAT 活性分布

網膜を，脈絡膜側輝板(TP-Ch)；色素上皮側輝板(TP-PE；色素上皮を付着する)；外節(OS)；内節(IS)；外か粒(ON)；外網状(OP)；内か粒(IN)；内網状(IP)；神経節細胞(GC)；及び神経線維(Fb)の 10 層に分割して活性を測定した．活性の表現法については図１参照．上部に網膜の構成細胞を示す：光受容細胞(Pr)；水平細胞(H)；双極細胞(B)；アマクリン細胞(A)．測定試料数は 12-14.

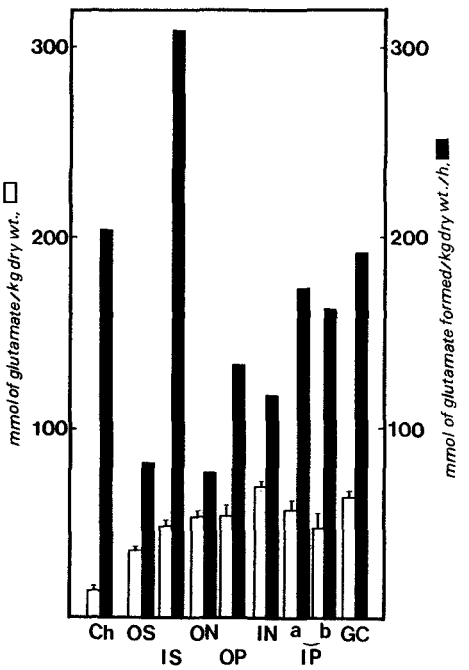


図４．マウス網膜内の OAT 活性分布

網膜を脈絡膜(Ch，色素上皮細胞を付着する）や，図３に示した各層に分割して，OAT 活性を測定した．活性の表現法については，図１参照．測定試料数は 10-14.

［ 文 献 ］

1)Baich,A. and Ratzlaff,K.(1980)Invest.Ophthalmol.Vis. Sci.19,411-414. 2)Berson,E.L. et al.(1976)Brit.J.Ophthal.60,142-147. 3)O'Donnell,J.J. et al.(1978)Science, 200,200-201. 4)Hayasaka,S. et al.(1980)Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.19,1457-1460. 5)Kasahara,M. et al.(1986)J. Histchem.Cytochem.34,1385-1388. 6)Kato,T. et al(1973) Anal.Biochem.53,86-97. 7)Kato,T.et al.(1987)Neurochem.Res. 12,529-535. 8)Katunuma,N. et al.(1964)J.Biochem.56, 499-503. 9)Keiser-Kupfer,M.I. et al.(1978)Am.J.Ophthalmol.85,200-204. 10)Kuwabara,T. et al.(1991)Ophthalmol. 88,331-334. 11)Periano,C. and Pitot,H.C.(1963)Biochim. Biophys.Acta,73,222-231. 12)Shih,V.E. et al.(1978)Am. J.Hum.Gen.30,174-179. 13)Takki,T.(1974)Brit.J.Ophthal. 58,3-23. 14)Trijbels,J.M.F. et al.(1977)Clin.Chim.Acta, 79,371-377. 15)Valle,D.L. et al.(1981) Invest.Ophthalmol.Vis.Sci. 20,251-254.

151. ラット脳における〔^{3}H〕ヒスタミン結合部位とその性質について

小澤光一郎・瀬川富朗　（広島大・医・薬効解析）

〔要　約〕

ラット脳における[^{3}H]ヒスタミン結合について検討した。[^{3}H]ヒスタミンは2 μM メピラミン存在下において、大脳皮質膜に飽和性に、高・低両親和性をもって結合した。H_2ーアゴニストおよびアンタゴニストによる[^{3}H]ヒスタミン特異的結合のIC_{50}値は、それぞれ薬理学的EC_{50}値あるいはpA_2値に近似していた。GTPは[^{3}H]ヒスタミン結合を濃度依存的に抑制した。GTPの効果を明らかにするため、[^{3}H]ヒスタミン結合のScatchard解析を行った結果、10 mM $MgCl_2$存在下で低親和性結合はほとんど消失し、高親和性結合が増加した。一方、100 μM GTP添加により高親和性結合は減少し、低親和性結合が増加した。脳内において、[^{3}H]ヒスタミン結合は線条体に最も高く、以下大脳皮質、視床下部、中脳、海馬、橋・延髄、小脳の順に低下した。内側前脳束の電気的破壊により、破壊側の大脳皮質において、ヒスチジン脱炭酸酵素活性は反対側と比較して51%減少し、[^{3}H]ヒスタミン結合は23%増加した。以上の結果より、メピラミン共存下で[^{3}H]ヒスタミンはラット脳内H_2ー受容体に特異的に結合することが推定され、この[^{3}H]ヒスタミン結合部位がG蛋白によって結合調節をうけている可能性が示唆された。

Key word : [^{3}H]histamine binding, H_2-receptors, rat brain.

近年、ヒスタミンが哺乳動物の中枢神経系において、神経伝達物質として働いていることを示唆する報告が多くなされている。また、レセプターアッセイの開発と発展にともない、H_1およびH_3受容体に関する生化学的研究も数多く行われている。しかしながら、H_2受容体については有用なリガンドの開発がなされておらず、いまだその生化学的性質はほとんど知られていない。そこで、我々はH_2受容体に対するレセプターアッセイの開発を目的として、メピラミンによりH_1受容体への結合を阻害した条件下において[^{3}H]ヒスタミンをラット大脳皮質膜標本に結合させ、H_2受容体結合実験を試みた。

［実験方法］

1）受容体標本：Wistar系雄性ラット大脳皮質より、EnnaとSnyder[1]の方法に従いP_2画分を調整した。このP_2画分を10 mM $MgCl_2$を含む50 mM Tris-H_2SO_4 buffer (pH 7.48)に懸濁させ、37 ℃で30分間インキュベートし内因性のヒスタミンの除去を行い充分に洗浄後、受容体標本として[^{3}H]ヒスタミン結合実験に使用した。

2）[^{3}H]ヒスタミン結合実験：上記方法により調整した受容体標本を2 μM のメピラミンを含む100 mM Tris-H_2SO_4 /10 mM $MgCl_2$ /1 mM EDTA buffer (pH 7.48) に懸濁(蛋白量 0.6-0.8 mg/ml)させ、その0.8 ml に2 nM [^{3}H]ヒスタミンおよび各種薬物を加え、30 ℃で45分間インキュベートした。膜に結合した[^{3}H]ヒスタミンは、0.3 %ポリエチレンイミン処理 GF/B フィルター上に減圧ろ過することにより回収した。全結合量より100 μM ヒスタミン存在下での非特異的結合量を差し引いて特異的結合量を求めた。

3）内側前脳束破壊実験およびヒスチジン脱炭酸酵素活性の測定：Garbargら[2]の方法に従い一側の内側前脳束を電気的に破壊した。破壊10日後に断頭し、脳を摘出し破壊部位の確認の後、大脳皮質を分取し実験に使用した。ヒスチジン脱炭酸酵素活性はGarbargら[2]の方法に従い、[^{3}H]ヒスチジンより生成される[^{3}H]ヒスタミンを陽イオン交換樹脂で分離精製することにより行った。

［実験結果］

[^{3}H]ヒスタミンは2 μM メピラミン存在$MgCl_2$非存在下において、ラット大脳皮質膜に飽和性に結合した(Fig. 1)。[^{3}H]ヒスタミン結合のScatchard解析の結果、高親和性(Kd=1.1±0.1 nM, Bmax=20.6±2.0 fmol/mg protein)および低親和性(Kd=21.8±2.0 nM, Bmax=140±12.0 fmol/mg protein)結合が認められた(Fig. 1)。次に、各種薬物の[^{3}H]ヒスタミン結合に対する影響を検討した結果、Table 1に示すように、H_2-アゴニストおよびアンタゴニストの[^{3}H]ヒスタミン結合阻害のIC_{50}値は、H_2受容体に対する薬理学的EC_{50}値あるいはpA_2値に近似していた。しかしながら、H_2作動薬以外の薬物は[^{3}H]-ヒスタミン結合に対してほとんど影響しなかった(Table 1)。次に、[^{3}H]ヒスタミン結合に対する$MgCl_2$およびGTPの影響を検討した。その結果、10 mM $MgCl_2$は[^{3}H]ヒスタミン結合を30％増加させた(Fig. 2)。一方、GTPは10 mM $MgCl_2$存在下において、1 μMより濃度依存的に[^{3}H]ヒスタミン結合を抑制したが、$MgCl_2$非存在下においては100 μM以上の高濃度でのみ抑制した(Fig. 2)。Scatchard解析の結果、10 mM $MgCl_2$添加により低親和性結合がほとんど消失し、高親和性結合のBmax値が21 fmol/mg proteinから100 fmol/mg proteinに有意に増加していた。さらに、100 μM GTP添加により低親和性結合が再び認められ(Kd=19.9 nM, Bmax=125 fmol/mg protein)、高親和性結合のBmax値は17 fmol/mg proteinに減少していた。次に、ラット脳をGlowinskiとIversen[3]の方

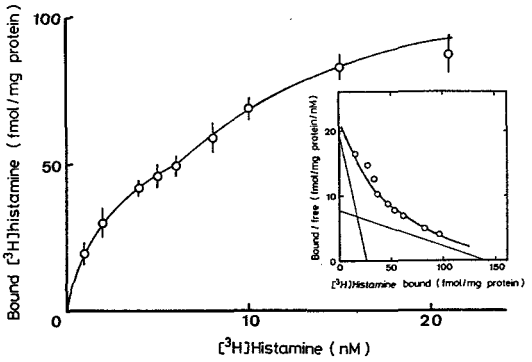


Fig. 1 Binding of [^{3}H]histamine to rat cerebral cortex in the presence of 2 μM mepyramine.

Table 1 Inhibition of [^{3}H]histamine binding by various agents in rat cerebral cortex in the presence of 2 μM mepyramine

Agent	-log IC_{50} (M)	nH	Pharmacological potency
A. Histamine agonists			-log EC_{50} (M)
Histamine	8.19 ± 0.03	1.10 ± 0.04(6)	6.02[a]
Impromidine	7.34 ± 0.16	0.99 ± 0.12(6)	7.64[b]
Dimaprit	5.84 ± 0.05	0.83 ± 0.05(4)	5.81[c]
2-PEA	4.65 ± 0.46	0.79 ± 0.12(3)	4.36[d]
B. Histamine antagonists			pA_2
Famotidine	7.18 ± 0.70	0.76 ± 0.10(3)	7.65[a]
Cimetidine	6.00 ± 0.06	0.60 ± 0.10(3)	6.31[a]
Metiamide	5.94 ± 0.60	0.65 ± 0.08(3)	6.07[a]
Diphenhydramine	3.42 ± 0.11	1.06 ± 0.12(3)	
C. Antidepressant drugs			Ki (μM)
Amitriptyline	3.85 ± 0.35	2.04 ± 0.30(3)	7.28[e]
Imipramine	4.12 ± 0.50	1.68 ± 0.21(3)	6.80[e]
Desipramine	3.84 ± 0.30	1.61 ± 0.15(3)	

D. Inactive agents ($IC_{50}>10^{-3}$ M)
5-Hydroxytryptamine, Dopamine, Noradrenaline, Acethylcholine, γ-Aminobutyric acid, Imidazoleacetic acid, L-Histidine, Ketanserin, Yohimbine, Clonidin, Isoproterenol, Prazosin, Phenylephrine, Mianserin

a) Gajtkowski et al.(1983). b) Durant et al. (1978). c) Parsons(1972). d) Ganellin(1980). e) Kanof and Greengard(1978).

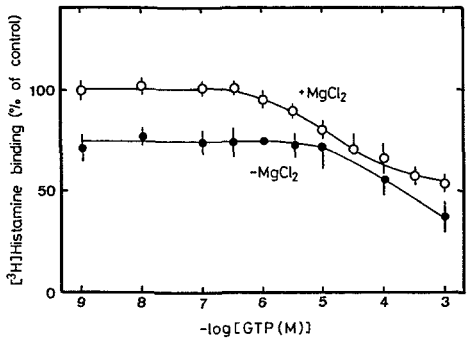


Fig. 2 Effect of GTP on [^{3}H]histamine binding in rat cerebral cortex in the presence of 2 μM mepyramine.

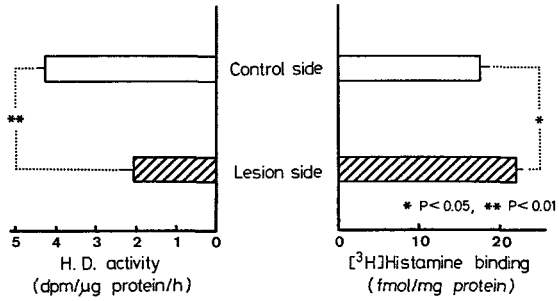


Fig. 3 [^{3}H]Histamine binding in rat cerebral cortex following unilateral legion of the medial forebrain bundle in the presence of 40 nM mepyramine (rats were killed 10 days after the lesion)

法に従い7つの部位に分け脳内における[^{3}H]ヒスタミン結合能の分布を検討した。その結果、[^{3}H]ヒスタミン結合能は線条体が最も高く、次いで大脳皮質、視床下部、中脳、海馬、橋・延髄の順に低くなり、小脳においてはほとんど認められなかった。さらに、ラット大脳皮質へのヒスタミン神経入力はすべて内側前脳束を経由していることが知られているため[2,5]、内側前脳束破壊によるヒスタミン神経切断の[^{3}H]ヒスタミン結合に対する影響を検討した。その結果、内側前脳束の破壊により、破壊側の大脳皮質のヒスチジン脱炭酸酵素活性は反対側に比較して51%減少したが、[^{3}H]ヒスタミン結合量は23%と軽度ではあるが有意に増加した(Fig. 3)。

[考察]

各種薬物の[^{3}H]ヒスタミン結合阻害作用の結果より、メピラミン存在下での[^{3}H]ヒスタミン結合はH_2受容体への結合を表していることが推定された。内側前脳束の破壊により神経線維を切断すると、大脳皮質における[^{3}H]ヒスタミン結合量の増加が認められた。このことは[^{3}H]ヒスタミン結合部位がシナプス後部に存在することを示唆しており、今回の実験条件下において、[^{3}H]ヒスタミンはH_3受容体には結合しないことが推定された。一方、GTPおよび$MgCl_2$により[^{3}H]ヒスタミン結合の高・低両親和性結合間での親和性の変化が認められた。このことより、[^{3}H]ヒスタミン結合部位がGTP結合調節蛋白(G蛋白, おそらくGs[4])により結合調節されていることが推定された。[^{3}H]ヒスタミン結合活性の脳内分布は、Watanabeら[5]によるヒスタミン神経線維の走行ともよく一致していた。以上の結果から、我々の用いた条件下において、[^{3}H]ヒスタミンはH_2受容体に選択的に結合することが推定され、さらに、G蛋白によりH_2受容体が結合調節されている可能性が示唆された。また、H_2受容体のラット脳内分布を明らかにすることが出来た。今後、中枢H_2受容体の諸性質について、さらに検討する予定である。

[参考文献]

1) Enna, S. J. and Snyder, S. H. (1977) Mol. Pharmacol 13, 442-453.
2) Garbarg, et al.(1976) Brain Res. 106, 333-348.
3) Glowinski, J. and Iversen, L. L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669.
4) Johnson, C. L. (1982) Pharmacology of Histamine Receptors, pp.146-216.
5) Watanabe, T., et al. (1984) Brain Res. 295, 13-25.

152. ラット線条体に対するカイニン酸の効果—Calcineurin 免疫染色および逆行性標識法による研究—

後藤　恵・宮本英七*（熊本大・医・脳外，第一薬理*）

〔要　約〕

Calcineurin (CaN)は，大脳基底核内において特徴的な局在を示し，線条体神経細胞及びその遠心性線維に特異的に存在している。本研究では，Kainic acid (KA)のラット線条体における撰択的神経毒性につき，CaN免疫染色及びhorseradish peroxidase (HRP)逆行性標識法を用いて検索した。一側線条体内にKAを注入後8日間生存させたラット脳につきNissl染色を施すと，患側の線条体神経細胞の著明な脱落及びgliosisが認められた。CaN免疫治性は患側線条体において著しく減じており，CaN陽性神経細胞(medium size spiny neuron)の注入部を中心とする消失が認められた。また，これに伴い，黒質網状部のCaN陽性神経線維は著明に減少していた。これに対して，同時期の線条体障害ラットにおいて患側線条体内にHRPを注入すると，同側の黒質緻密部神経細胞体が逆行性に標識されるのが観察された。

これらの所見は，線条体注入時のKAの撰択的神経毒性，即ち，線条体—黒質系の傷害及び黒質—線条体系の温存(striatonigral lesioning and nigrostriatal sparing)を示唆するものと考えられる。

Key word：　Kainic acid, Striatum, Calcineurin

〔緒言〕L—グルタミン酸類似体であるKAは，強力な神経毒性物質の1つであり，それを線条体内に注入した際にみられる大脳基底核内の神経変性及び神経生化学的変化は，ハンチントン舞踏病のそれと極めて類似しているとされている。また，KAの神経毒性は撰択的であり，投与部位の神経細胞体及びその突起は傷害に陥いるが，同部位を通過する，あるいは，同部位に到達する軸索は無傷に温存されると考えられている。このKAの撰択的神経毒性をラット大脳基底核内において直接的に証明する目的で，以下の実験を行った。

〔方法〕抱水クロラール(0.4g/kg, i.p.)麻酔下のWistar系ラット(約200g)をstereotaxic frameに固定し，burr holeを通じ0.3㎜ Hamilton cannulaを線条体に挿入した(A, 7.9; L, 2.4; V, 4.0㎜)。その後，KA(2.5μg)を5分以上かけて注入した。7日間の生存の後，同側の線条体に前述の方法で5％ horseradish peroxidase (HRP)—wheatgerm agglutinin (WGA) con-

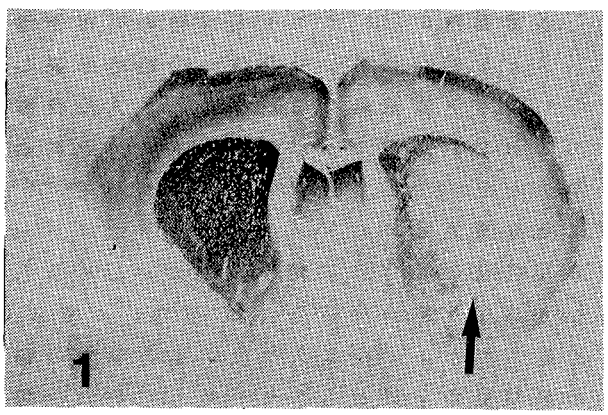
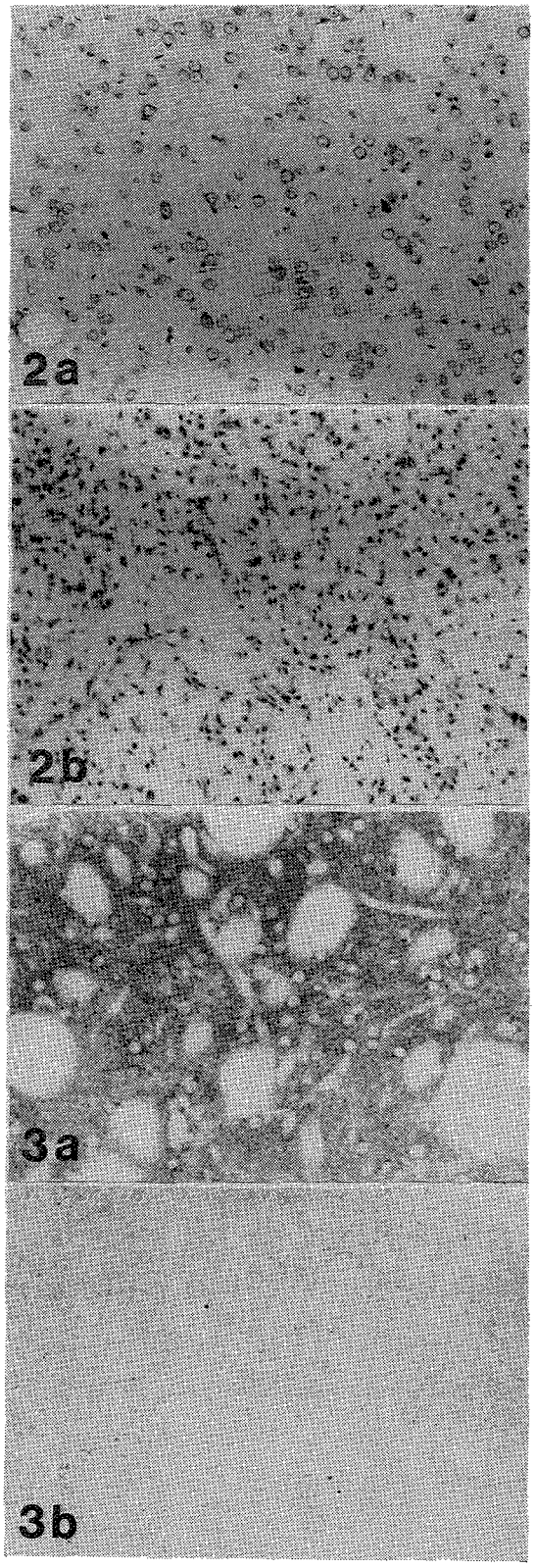


Fig.1. Calcineurin immunostaining of the KA lesioned rat forebrain. Arrow; ipsilateral side.
Fig.2. Light microscopic findings of the KA lesioned rat striatum. Nissl staining. (a) contralateral side, (b) ipsilateral side. (x200)
Fig.3. Light microscopic findings of the KA lesioned rat striatum. Calcineurin immunostaining. (a) contralateral side, (b) ipsilateral side.
Fig.4. Calcineurin immunostained section through the midbrain of a rat 8 days after the intra striatal injection of KA.
Fig.5. Several neurons labeled by the retrograde transport in the pars compacta of substantia nigra. (x250).

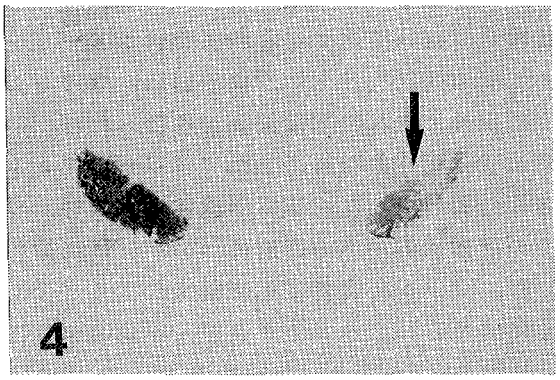
jugateを0.5μl注入した。HRP−WGA注入24時間後，麻酔下にて経心的に中性ホルマリンにて灌流固定を行った。摘出脳は，氷冷下の同固定液にて24時間浸漬固定を行った後，一部は凍結切片作製に，また一部はパラフィン切片作製に用いた。抗CaN抗体の特異性及びその酵素抗体法への応用については既に報告した。尚，本研究では免疫組織化学はABC法にて行った。ペルオキシダーゼ組織化学は，凍結切片を0.1Mリン酸緩衝液にて30分洗浄後，新鮮なGraham-Karnovsky溶液に室温下30分間浸漬にて行った。

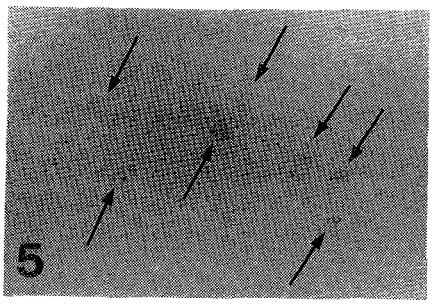
〔結果〕KA注入により，同側の線条体神経細胞は変性に陥り，注入部位を中心とする半径1.6㎜の円内では，ほぼ完全に消失していた。Fig. 1は，.KA傷害ラット前脳前額断のCaN免疫染色像である。患側(矢印で示す)では線条体及び深部大脳皮質のCaN免疫活性が著しく減少しており，KAによる傷害部位を明瞭に描出している。Nissl染色光顕像では，健側(Fig. 2a)に比して明らかなように，患側では著明な神経細胞の変性消失及びそれに伴うgliosisが観察された(Fig. 2b)。種々の形態学的検索の結果から，線条体CaN陽性細胞の殆んど全てはmedium size spiny neuronに属すると考えられるが(Fig. 3a)，患側においては，これらのCaN陽性神経細胞体及びその突起は，ほぼ完全に消失している(Fig. 3b)。尚，少数のCaN免疫活性を有さないlarge neuronの残存も観察された。黒質のCaN免疫活性は網状部にのみ認められ，それは線条体遠心性線維(striatonigral pathway)に由来するものである。黒質に存在する神経細胞体はCaN免疫活性を有していない。KAによる線条体CaN陽性細胞の変性脱落に伴い，同側の黒質網状部のCaN免疫活性が著しく減少しているのが認められた(Fig. 4)。一方，患側線条体にHRP−WGAを注入したところ，逆行性に黒質緻密部の神経細胞体が標識され(Fig. 5)，このことは，KA傷害線条体において黒質−線条体系



は温存されていることを示すものである。

〔考察〕KAによる線条体破壊ラットは，ハンチントン舞踏病の動物モデルとしてよく知られている。以前，我々は，ハンチントン舞踏病を有するヒト剖検脳につきCaN免疫染色を施し，その変化の有無につき検索を行ったが，その結果は今回の実験で得られたものと非常に類似していた。つまり，線条体神経細胞の変性脱落に伴う遠心性線維(striatopallidal & striatonigral pathway)の減少である。ハンチントン舞踏病においては，major projection neuronである，medium size spiny neuronが優位に変性に陥いっているとの報告もあり，これらの所見は興味深いものと考えられる。また，本研究では，HRP逆行性標識法を用い，KA傷害線条体内においてnigrostriatal pathwayが温存されていることを示した。以上の所見より，従来から論じられているKAの撰択的神経毒性を直接的に証明し得たものと考えられる。





References
1. Olney JW et al. Brain Res. 77, 507-512 (1974)
2. Coyle JT & Schwarcz R. Nature 263, 244-246 (1976)
3. McGeer EG & McGeer PL. Nature 263, 517-519 (1976)
4. Schwarcz R & Coyle JT. Brain Res. 127, 235-249 (1977)
5. Coyle JT et al. J. Comp. Neurol. 180, 301-324 (1978)
6. Goto S et al. J. Neurochem. 45, 276-283 (1985)
7. Goto S et al. Brain Res. 371, 237-243 (1986)
8. Goto S et al. Brain Res. 397, 161-172 (1986)
9. Goto S et al. Acta Neuropathol. 72, 150-156 (1986)
10. Miyamoto E et al. Advances in Protein Phosphatases, vol.3 pp.187-200 (1986)
11. Goto S et al. Neuroscience (in press)
12. Goto S et al. Exp. Brain Res. (in press)

153. ラット脳シナプス膜標品中の〔^{3}H〕グルタチオン結合部位の性質

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中の[^{3}H]グルタチオン(GSH)結合部位の性質について検討を加えた。L-グルタミン酸(Glu)受容体の多様性の証明に用いられる化合物のなかで、キスカル酸(QA)と2-アミノ-4-ホスホノ酪酸(AP4)は高濃度(1 mM)で本結合を有意に阻害したが、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)およびカイニン酸(KA)には著明な作用は見出せなかった。GSH構成アミノ酸の中で、Gluおよびグリシン(Gly)は弱い結合阻害作用を示したが、L-システイン(CySH)は濃度依存的な強い結合増強作用を発揮した。他のSH化合物やアミノ酸はいずれも、[^{3}H]GSH結合に著変を与えなかった。Scatchard 解析により、[^{3}H]GSH結合部位は見かけ上二種類の異なった親和力を持つ成分から構成されることが判明した。CySH添加に伴い、低親和性成分の最大結合部位数が著明に増加した。反応温度を低下させると、二種類の構成成分のうち低親和性成分が完全に消失した。以上の結果より、脳シナプス膜標品中の[^{3}H]GSH結合部位には温度依存性成分と温度非依存性成分の二種類が存在すること、およびCySHが両者の結合能を調節すること、などの可能性が示唆される。

Key word：[^{3}H]Glutathione binding, L-Glutamate, L-Cysteine

L-Glu含有の内在性ペプチドであるGSHは広く生体内に分布するが、その中枢神経系における特異的役割に関しては殆ど解析されていないのが現状である。GSHと同様にL-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-グルタミン酸(NAAG)は、L-GluやL-アスパラギン酸(Asp)と同等度の強い神経細胞興奮作用を示すこと(8)、あるいは[^{3}H]Glu結合を濃度依存的に阻害すること(2)などから、脳内特定部位における神経情報伝達物質としての可能性を示唆されている(1)。筆者らは、脳内Glu結合部位の生化学的および薬理学的性質を追究する過程で、ラット脳シナプス膜標品へのNa$^+$依存性および非依存性[^{3}H]Glu結合が、GSHおよびその酸化型のGSSGにより生理的濃度範囲内で濃度依存的に阻害されることを見出した(6)。これらの結果は、ラット脳内のGlu作動性シナプス伝達機構において、これらのペプチドが何らかの生理的役割を演じている可能性を示唆するものである。事実、シナプス膜標品中には、高親和性、構造選択性、温度依存性および飽和性を持つ[^{3}H]GSH結合部位が存在することが明らかとなった(5)。この[^{3}H]GSH結合は、SH基を持たないGSH誘導体により強く阻害されるばかりでなく、[^{3}H]Glu結合阻害能を持つペプチドによっても濃度依存的に阻害された(7)。したがって本研究では、ラット脳シナプス膜標品中の[^{3}H]GSH結合部位の生化学的・薬理学的諸性質について検索を進めた。

[実験方法]

シナプス膜標品の調製：Wistar 系雄性ラット(200-250 g)の全脳から粗シナプス膜標品(9)を調製したのち、50倍量の 50 mM トリス酢酸緩衝液(pH7.4)に懸濁して、50,000 xg、30分間の遠心分離を行った。この洗浄操作を3回繰り返したのち得られた沈渣を、

0.32 Mショ糖水溶液に懸濁して-80℃で凍結保存した(3)。使用時には室温融解後、上記洗浄操作をさらに2回行った。

[^{3}H]GSH結合実験：シナプス膜標品(約 400 μg 蛋白)を通常は30℃で、100 nM [^{3}H]GSH (NEN,1 Ci/mmol)と50 mM トリス酢酸緩衝液中で60分間反応させた。反応をWhatman GF/B グラスフィルターを用いた吸引濾過法(4)で停止させたのち、フィルター上の放射活性を液体シンチレーション法により測定した。

[実験結果]

脳内Glu受容体のアゴニストの中でQAは高濃度で結合を有意に阻害したが、NMDA や KA にはこの様な作用は見出せなかった(Fig.1)。さらに、第4番目のサブタイプのアンタゴニストとされるAP4も、高濃度でのみ[^{3}H]GSH結合を阻害した。次いで、GSH構成アミノ酸の作用について検索を進めた。L-GluおよびL-Glyは弱い結合阻害作用を発揮したが、L-CySHは濃度依存的な強い結合増強作用を示した(Fig.2)。しかしながら、他のSH化合物やCySH関連化合物には有意な作用は見出せなかった。また、約20種の他のアミノ酸も[^{3}H]GSH結合に著変を与えなかった。Scatchard解析により、シナプス膜標品中の[^{3}H]GSH結合部位は見かけ上二種類の成分から構成されることが判明した。1 mM CySH の添加は、この二つの成分のうち低親和性結合部位の最大数を著しく増加させることが明らかとなった(Fig.3)。反応温度を30℃から2℃に低下させると、[^{3}H]GSH結合量は約1/2となった。この反応温度依存性をScatchard plot で解析したところ、反応温度2℃では低親和性成分は消失し、高親和性成分のみが観察された(Fig.4)。反応温度2℃の場合、CySH非存在下では高濃度非放射性GSH添加に伴い、[^{3}H]GSH結合は速やかに解離したが、CySH存在下では非放射性GSHを添加しても[^{3}H]GSH結合の解離は起らなかった。一方、反応温度30℃の場合は、CySHの存在にかかわらず非放射性GSHによる解離は誘発されなかった。

[考察]

高濃度ではあるが、Glu受容体のアゴニストやアンタゴニストが本結合を阻害したことから考えて、本結合部位がGlu結合部位との間に何らかの相互作用を持つ可能性が示唆される。[^{3}H]Glu結合がGSHにより阻害されること(6)も、この可能性を支持するもの

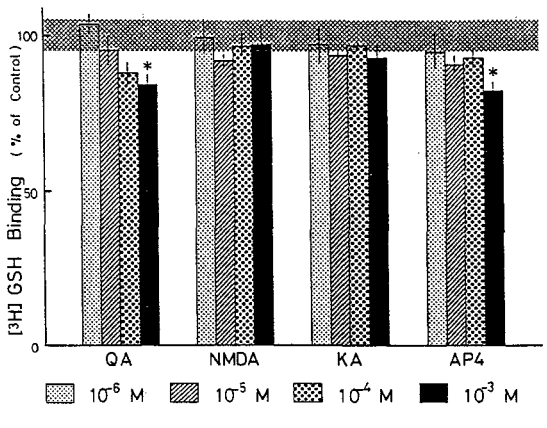


Fig. 1. Effect of Glu agonists and antagonist on [^{3}H]GSH binding.

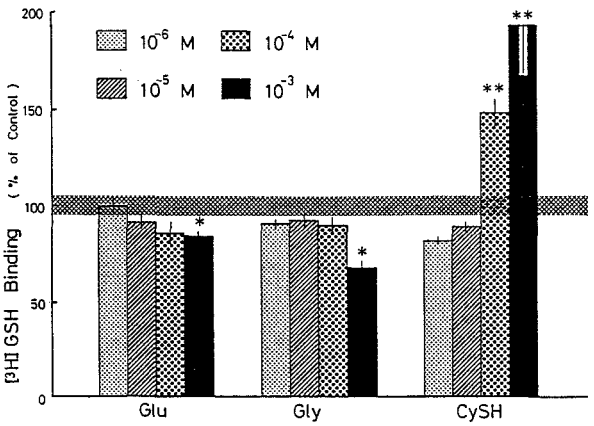


Fig. 2. Effect of Glu, Gly and CySH on [^{3}H]GSH binding.

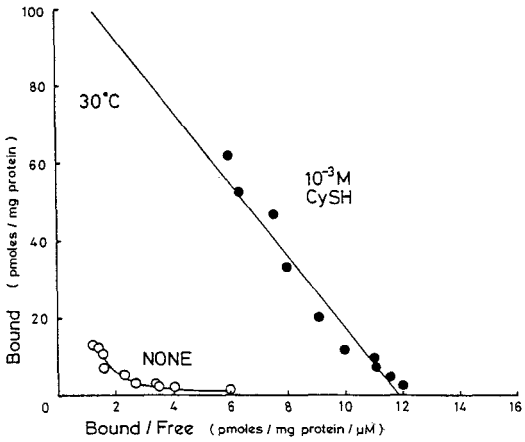


Fig. 3. Effect of CySH on [³H]GSH binding.

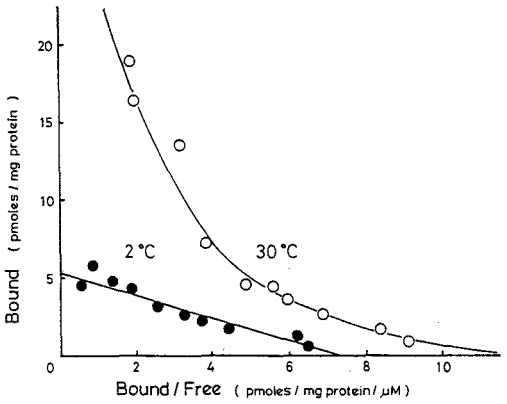


Fig. 4. Effect of incubation temperature on [³H]GSH binding.

である。[³H]GSH結合部位と相互作用を持つGlu受容体のサブタイプに関しては、阻害実験結果を考慮すると、QA型受容体である可能性が高い。シナプス膜標品中には、二種類の異なった親和力を持つ[³H]GSH結合部位が存在することが明らかとなったが、低親和性成分が温度依存性を示すのに対して、高親和性成分は低温度反応条件下でも検出が可能であった。CySHが両者のうちで、低親和性成分を選択的に増加させる作用を持つことは極めて興味深い。非放射性GSHによる解離実験結果などを考慮すると、低親和性成分が[³H]GSH取り込み部位を反映する可能性は充分に考えられるものである。今後、これら両成分の生理的意義の追究とともに、CySHの結合増強作用機序の解明は早急に解決されなければならない。

[謝辞]

本研究の一部は文部省科学研究費(62771981)の援助のもとに行った。

[文献]

1. Ffrench-Mullen, J.M.H., Koller, K., Zaczek, R., Coyle, J.T., Hori, N. and Carpenter, D.O. (1985) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3897-3900.
2. Koller, K.J. and Coyle, J.T.(1984) Eur. J. Pharmacol. 98, 193-199.
3. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1986) Brain Res. 397, 137-144.
4. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1986) Neurosci. Res. 4, 129-142.
5. Ogita, K., Kitago, T. and Yoneda, Y. (1986) Contemporary Themes in Biochemistry (Kon, O.L., et al. eds.), ICSU Press, Cambridge, 580-581.
6. Ogita, K., Kitago, T., Nakamuta, H., Fukuda, Y., Koida, M., Ogawa, Y. and Yoneda, Y. (1986) Life Sci. 39, 2411-2418.
7. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1987) Neurosci. Res. in press.
8. Zaczek, R., Koller, K., Cotter, R., Heller, D. and Coyle, J.T. (1983) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 80, 1116-1119.
9. Zukin, S.R., Young, A.B. and Snyder, S.H. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4802-4807.

154. 小脳におけるN－acetylaspartylglutamateの生理機能
――神経伝達物質またはシナプス修飾物質としての可能性の検討――

関口正幸・波間美佐子・岡本浩一（防衛医大・薬理）

〔要　約〕

1. 中枢神経系の興奮性神経伝達物質の一つではないかと推測されている N-acetyl-aspartylglutamate(NAAG) の放出と取り込み、および興奮性アミノ酸伝達物質の放出と取り込みに対するNAAGの作用について、モルモット小脳を用いて検討した。
2. ^{3}H-NAAG の小脳スライスへの取り込みは、約30分で平衡に達し、tissue / medium ratio = 1.8 になるが、^{3}H-Gluや^{3}H-Aspに比べると、かなり遅く、しかも少ない。
3. ^{3}H-NAAG は小脳 P2 分画から高カリウム刺激によって放出されるが、そのほとんどはCa^{2+}非依存性である。　内因性 NAAG は小脳スライスから高カリウム刺激によりほとんど放出されず、Ca^{2+}依存傾向もみられない。
4. NAAGは^{3}H-Gluあるいは^{3}H-Aspの高カリウム刺激による小脳 P2 分画からの放出を用量依存性に抑制することが見いだされたが、^{3}H-GABA の放出には影響を与えない。
5. NAAGは^{3}H-Aspの小脳スライスへの取り込みを用量依存性に増加させる。
6. 以上の神経化学的所見は、NAAGが伝達物質であるよりは、シナプス伝達修飾物質である可能性を示唆しており、興奮性アミノ酸伝達物質の再取り込みを促進して、シナプス伝達を抑制的に修飾する作用がその生理機能の一つではないかと推測される。

Key word：
Cerebellar uptake and release of NAAG, Modulator, Glutamate and aspartate

N-Acetylaspartylglutamate(NAAG) は中枢神経系にのみ比較的高濃度に分布しているペプチドである。　1983年、Zaczek (9)らは NAAG が大脳の glutamate(Glu) 受容体に高い親和性をもつことを、1985年 ffrench-Mullen ら(2) は NAAG が外側嗅索ニューロンの神経伝達物質である可能性が高いことを報告し、NAAGの中枢シナプスにおける伝達物質としての役割が示唆された。　しかしながら、NAAGが神経化学的に神経伝達物質としての条件を満たすかどうかは未だに充分な検討がなされていない。　一方、Cangroら(1) は NAAG は伝達物質として神経終末に貯蔵される Gluの量を調節する物質であるとし、NAAGの神経興奮作用が Gluに比べて弱いこと(8)、NAAGはシナプトゾーム画分のほぼ２倍量ミトコンドリア画分に分布していること(6) 等の従来の知見もあわせて、NAAGそのものが神経伝達物質であることには消極的である。　我々はすでに NAAG は小脳プルキンエ細胞を興奮させ、興奮性アミノ酸伝達物質候補である aspartate(Asp)や Glu、特に Aspと本質的に差のない電気生理学的性質を有することを報告したが(7)、今回は、小脳においてNAAGが神経伝達物質またはシナプス伝達修飾物質のどちらに近い挙動を示すかについて神経化学的側面から検討した。

［方法］取り込み実験：モルモット小脳からマイクロスライサを用いて調製した長方体型スライス(3 x 3 x 0.3 mm)を Krebs-Ringer bicarbonate medium(normal medium : NaCl 125, KCl 5, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1, NaH_2PO_4 1, $NaHCO_3$ 24, glucose 11 (mM), pH 7.4, 95% O_2 /5% CO_2 飽和）中で 37 ℃、10分間 preincubationした後、 RI 標識化合物 (1.67 μCi) を含む normal medium(0.5 ml)中で 37 ℃で incubation した。一定時間後、スライスを取り出し、5 秒間 normal mediumで洗い、シンチレータ(ACSII

)に溶解し計数した。^{3}H-Asp の取り込みに対する NAAG の作用は、取り込み開始 5 分後に 5μl の NAAG 溶液を加えた後の変化を、5μl の normal mediumを加えた場合を対照として調べた。

放出実験：小脳スライス(0.8-1.1 mg protein)を小型カラム(gel vol. = 1 ml) 内で Sephadex G-15 層で挟み、normal medium を灌流し(1.5 ml/min)、30分後に自発放出を求めるため 4分間溶出液を分取した。35分目から 4分間、0.1mM Ca^{2+}/12 mM Mg^{2+}/50 mM K^{+} mediumを灌流、40分目から 4分間 2 mM Ca^{2+}/1 mM Mg^{2+}/50 mM K^{+} medium を灌流し溶出液を各々分取した。溶出液の一部(300μl)をAmberite CG-400 (formate form) の小型カラム(1φx4 cm)に通し、Miyakeらの方法(4) によって、酸性アミノ酸とNAAGを分画し、アミノ酸自動分析計とHPLCでそれぞれ定量した (7)。

^{3}H-Glu, ^{3}H-Aspの放出及びそれに対するNAAGの作用の検討には、Grayら(3) の方法に従って小脳より調製したP2分画を15分間 normal medium中で preincubationした後、fresh normal medium (5 ml)に 5μCiの^{3}H-Gluまたは^{3}H-Aspを加えて 37 ℃、30分間 incubationし取り込みを行なった。遠心(8,000 X g,20 分間) して集めたP2分画をグラスフィルタに吸着させ、灌流用セル(5) に装填し、normal medium で15分間灌流後、2 mMあるいは0 mM Ca^{2+}を含んだ 50 mM K^{+} mediumで15分間灌流し(2ml/min) 、1 分毎に分画した各溶出液に ACSIIを加え計数した。アミノ酸の放出に対するNAAGの作用の検討には、0.1 mMあるいは 1 mM の NAAG を上記の 50 mM K^{+} mediumに添加した。

[結果および考察] ^{3}H-NAAG はNa^{+} 依存性にスライスに取り込まれたが、その速度は遅く、^{3}H-Asp、^{3}H-Gluの取り込みが 5分で平衡に達するのに対し(Fig.1A)、約30分後に tissue/medium ratio = 1.8で平衡に達した(Fig.1B)。

内因性 Asp、Glu は、高カリウム刺激によりスライスからCa^{2+}依存性にかなり大量に放出されるのに対し、内因性NAAGはほとんど放出されず(Fig. 2)、しかもCa^{2+}依存性はみられなかった(Fig. 2)。 このように、Asp や Gluに対するような迅速な取り込み系がないこと、Ca^{2+}依存性放出が起こらないことは、NAAGが小脳において神経伝達物質として機能している可能性が低いことを示唆していると思われる。

一方、P2分画からの高カリウム刺激による^{3}H-Gluや^{3}H-AspのCa^{2+}依存性放出はNAAGにより用量依存的に抑制された(Fig. 3)。 0.1及び 1 mMの NAAG は^{3}H-Glu放出を各々 7%,52% 抑制した。 また、小脳スライスへの^{3}H-Aspの取り込みが平衡に達した時点(5分後) で、10μM - 1 mMのNAAGを加えると、その後の^{3}H-Aspの取り込み量は有意に増加した(EC50 = 2.4 μM)(Fig. 4)。 従って、P2分画からの^{3}H-Gluや^{3}H-Aspの放出がNAAGにより減少する理由は、主にNAAGがいったん放出された^{3}H-Gluや^{3}H-Aspの P2分画への再取り込みを促進するためであると思われる。 なお、興奮性アミノ酸取り込み系により特異的に取り込まれる D-Aspを medium に加えるとスライスへの^{3}H-Asp の取り込みは減少すること、NAAGをスライスと37℃、15分間incubationしてもmedium中のNAAGの有意な分解は認められないことを TLC assayにより確認している。

以上の結果、即ち、NAAGが Gluや Aspの放出を抑制するということは、先に報告したシナプス後受容体に働いて脱分極を起こす作用に加えて、NAAGは伝達物質の再取り込みを促進することによって、神経伝達を修飾する物質である可能性を示唆するものと思われる。また、外因性 Gluの電気生理学的作用はNAAGによってほとんど影響を受

けないことがすでにわかっているので、上記のNAAGの修飾作用はpresynaptic なものと推測される。現在作用機序について検討中である。

［まとめ］(1) 小脳において NAAG が古典的な神経伝達物質として機能している可能性は少ない。 (2) NAAGは興奮性アミノ酸の取り込みを促進し、これらのシナプス性放出を抑制する。 このことは、NAAGの神経伝達修飾物質としての可能性を提起するものと思われる。

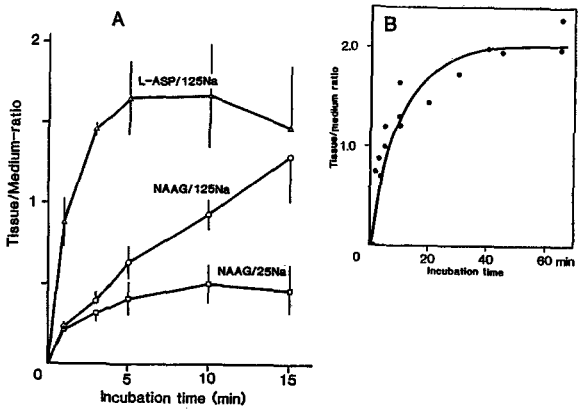


Fig.1. Time course of the uptake of ^{3}H-NAAG and ^{3}H-L-aspartate by cerebellar slices, and the Na^{+}-dependence of the NAAG uptake. A:O,^{3}H-NAAG(64nM) in 125mM Na^{+}: □,^{3}H-NAAG in 25mM Na^{+}; △,^{3}H-L-aspartate(224nM) in 125mM Na^{+}. n=3-4, mean±s.e.m. B: ^{3}H-NAAG(86μM) in 125mM Na^{+}

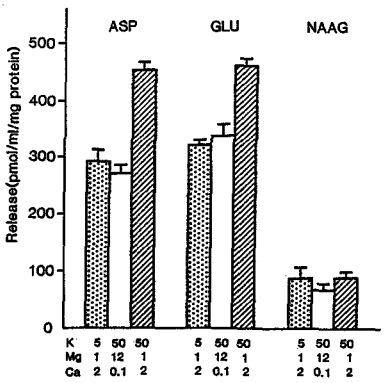


Fig.2.High-K^{+}-evoked release of endogenous aspartate(ASP),glutamate(GLU) and NAAG from cerebellar slices. Dotted column:2mM-Ca^{2+}/1mM-Mg^{2+}/5mM-K^{+}; open column:0.1mM-Ca^{2+}/12-Mg^{2+}/50-K^{+}: shaded column:2-Ca^{2+}/1-Mg^{2+}/50-K^{+}. n=4. mean±s.e.m.

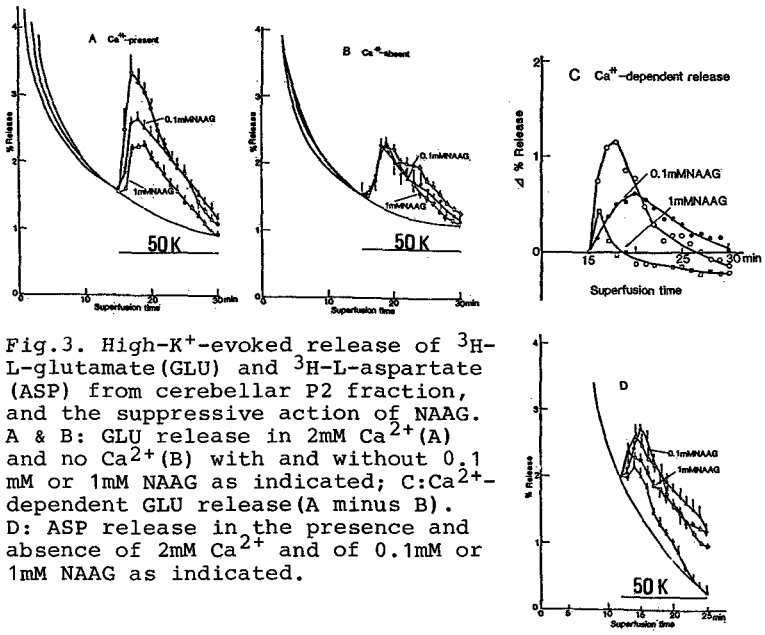


Fig.3. High-K^{+}-evoked release of ^{3}H-L-glutamate(GLU) and ^{3}H-L-aspartate (ASP) from cerebellar P2 fraction, and the suppressive action of NAAG. A & B: GLU release in 2mM Ca^{2+}(A) and no Ca^{2+}(B) with and without 0.1 mM or 1mM NAAG as indicated; C:Ca^{2+}-dependent GLU release(A minus B). D: ASP release in the presence and absence of 2mM Ca^{2+} and of 0.1mM or 1mM NAAG as indicated.

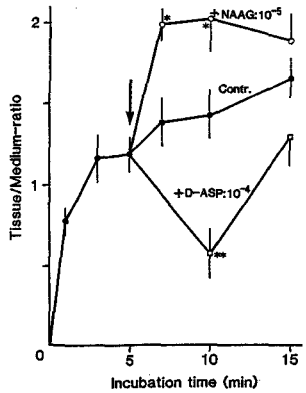


Fig.4. Effects of NAAG and D-aspartate(D-ASP) on the uptake of ^{3}H-L-aspartate by cerebellar slices. 10μM NAAG (○),Ringer(●) or 100 μM D-ASP(□) was added at the arrow. *,$p<0.05$ **,$p<0.01$ from the control. n=5-8.

1.Cangro,C.B.et al., J.Neurochem.,in press. 2.ffrench-Mullen,J.M.H.et al.,Proc. Natl.Acad.Sci.USA.,82(1985)3897-3900. 3.Gray,E.G.et al.,J.Anat.(London),96(1962) 1409-1416. 4.Miyake,et al.,J.Neurochem.,36(1981)804-810. 5.Namima,M.et al.,J. Neurochem.,40(1983)1-9. 6.Reichelt,K.L.et al.,J.Neurochem.,16(1969)1409-1416. 7.Sekiguchi,M.et al.,Brain Res.,in press. 8.Westbrook,G.L.,et al.,J.Neurosci., 6(1986)3385-3392. 9.Zaczek,R.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,80(1983)1116-1119.

155. 褐色脂肪組織の代謝に及ぼす交感神経の調節作用：非アドレナリン作働性物質の関与

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）の脂肪合成に及ぼす交感神経の調節作用について検討した。BATに分布する交感神経を1分毎に20秒間刺激する場合(ordinary pattern)やノルエピネフリン（NE）を経静脈的に投与すると，$^{3}H_2O$からのBATの脂肪への^{3}Hの取り込みはグリセロール部分（GLY）のみで亢進し，脂肪酸部分（FA）では全く変化しなかった。これに対して，2秒間の電気刺激を3分毎に行う（burst pattern)と，GLYのみならずFAにも^{3}Hの取り込みが亢進し脂肪合成の促進することがわかった。このNE投与によるGLYへの^{3}Hの取り込みの亢進は，α及びβ遮断剤の前投与によって抑制されたが，burst patternで神経刺激を行なった時の脂肪合成の促進は影響を受けなかった。また，ordinary patternで神経を刺激した場合も遮断剤を前投与しておくとGLY，FA共に^{3}Hの取り込みが亢進し，脂肪合成の促進することが明らかとなった。以上のことから，交感神経を電気的に刺激すると，NEだけでなくNE以外の作用物質も分泌され，BATの脂肪合成を支配，調節している可能性が高い。

Key word： brown adipose tissue, sympathetic nerve, lipid synthesis

褐色脂肪組織（brown adipose tissue，BAT）は，交感神経の直接の支配を受け，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）を電気的に刺激してもBATでの熱産生が亢進することが明らかにされ(3)，VMH－交感神経系による調節作用が注目されてきた。我々は，VMHを電気的に刺激すると，BATでの熱産生だけでなく脂肪合成もまたその組織で特異的に亢進することを明らかにしている(4)。このVMHの刺激作用はBATに分布する交感神経を外科的に切除すると抑えられることから，交感神経の作用を介していると考えられる(2)。本研究ではBATでの脂肪合成活性が，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，BATに分布する交感神経を直近で電気的に刺激，BATでの脂肪合成活性に及ぼす影響を調べた。

〔実験方法〕

体重200－250gのSD系雌ラットを用い，実験はすべて29±1℃の恒温箱の中で行なった。

1）脂肪合成活性の測定　ラットにアトロピン0.3mg／kgを投与した後，ネンブタールで麻酔，肩甲間BATに分布する交感神経をその組織の直近で電気的に刺激した。求心性神経の刺激を避けるため，刺激部位より中枢側をあらかじめ外科的に切断しておいた。交感神経への刺激は，20V，2ミリ秒の刺激パルスを0.5－40Hzの頻度で，1分毎に20秒間ずつ（ordinary pattern），または3分毎に2秒間（burst pattern）行なった。刺激を開始して3分後，5mCiの$^{3}H_2O$を腹腔内に投与し，30分後ラットを屠殺，肩甲間BATを取

り出して，脂肪分画ならびにその脂肪酸部分（ＦＡ）とグリセロール部分（ＧＬＹ）への^{3}Hの取り込み量を調べた。ノルエピネフリン（ＮＥ）の投与は，ラット右外頸静脈より右心房にカテーテルを挿入し，ポンプを用いて8 μg／100 g B·W·／30 min（(−)− norepinephrine）を連続的に投与，以下同様にして各脂肪分画へのアイソトープの取り込み量を調べた。

2）α及びβ遮断剤の投与，交感神経を刺激または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（pbz，5 mg／kg）とプロプラノロール（prop，ＤＬ type，20 mg／kg）を腹腔内に投与して1）と同様の実験を行なった。

〔結果と考察〕

図１は，ＢＡＴに分布する交感神経を１分毎に20秒間刺激した時（ordinary pattern）のＧＬＹ及びＦＡへのアイソトープの取り込みを調べたものである。ＧＬＹへのアイソトープの取り込みは，刺激頻度に応じて亢進し，10Hz で最大となるのに対して，ＦＡへのアイソトープの取り込みはほとんど変化せず，10及び20Hz ではむしろ抑制される傾向があった。一方，３分毎に２秒間の刺激を行う（burst pattern）と，ＧＬＹ，ＦＡともにアイソトープの取り込みが刺激頻度に応じて亢進し，脂肪合成を促進した（図２）。これらの結果から，ＢＡＴの脂肪合成に及ぼす交感神経の調節作用は，その刺激パターンによって大きく異なることが明らかとなった。

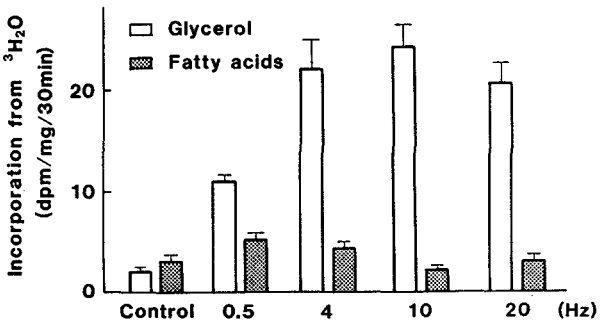


図１　交感神経をordinary pattern で刺激した時のＢＡＴの脂肪合成の変化

交感神経を電気刺激（20 V，0.5－20 Hz，２ミリ秒の刺激を１分間隔で20秒間行う）し，$^{3}H_2O$（5 mCi）から30分間に取り込まれた^{3}Hの放射能を，脂肪酸グクセロールについて調べた。対照には非刺激動物を用いた。

次に，このような神経の刺激作用に，交感神経から分泌されるＮＥがどのような調節作用を営んでいるかを明らかにするため，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投与してその影響を調べた（図３）。ＮＥを投与するとＧＬＹ合成のみが亢進し，ＦＡ合成は全く変化しない。また，ＮＥ遮断剤の投与によってこの反応は大きく低下した。これに対して，burst pattern の刺激（10Hz）を行った時のＦＡ合成の亢進は遮断剤を投与しても全く影響を受けず，ＧＬＹ合成も一部低下するのみであった。ま

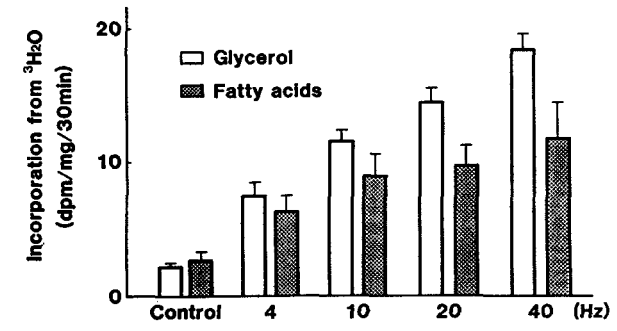


図２　交感神経をburst pattern で刺激した時のＢＡＴの脂肪合成の変化

交感神経を電気刺激（20 V，4－40 Hz，２ミリ秒の刺激を３分間隔で２秒間行う）し，$^{3}H_2O$（5 mCi）から30分間に取り込まれた^{3}Hの放射能を調べた。

た，ordinary pattern では，遮断剤を投与するとＧＬＹ合成は一部低下するもののＦＡ合成は逆に約５倍に亢進することがわかった。更に，ordinary pattern において，ＮＥ遮断剤の影響を0.5－20 Hzの刺激頻度で調べてみると，ＧＬＹ及びＦＡへのアイソトープの取り込みは刺激頻度に応じて亢進することが明らかとなった（図４）。以上の実験結果から，ＢＡＴを支配する交感神経を電気的に刺激すると，ＮＥと共にＮＥ以外の作用物質も分泌され，これがＢＡＴの脂肪合成を亢進させるものと考えることができる。

最近，交感神経内にはＮＥ以外にも多くの神経ペプチドが共存していることが明らかにされているが，一般にこれらの神経ペプチドはＮＥに比べ作用持続時間が長く，そのため burst pattern の刺激を行うとＮＥよりも神経ペプチドの作用が出現してくることが知られている（1）。本研究例でも，おそらくＮＥと共にＮＥとは別の作用物質が分泌され，burst pattern の刺激によってその作用が発現，脂肪合成を亢進させたものと考えられる。特に，ordinary pattern の刺激でも，ＮＥ遮断剤をあらかじめ投与しておくと，burst pattern の刺激と同様脂肪合成が亢進するという本研究結果は，ＮＥ以外の作用物質の存在を強く示唆している。我々は，先に，ＶＭＨを電気的に刺激すると交感神経の作用を介してＢＡＴの脂肪合成が亢進することを明らかにした（2）が，このＶＭＨの刺激作用もまた，ＮＥとは別の作用物質によっている可能性が高い。

〔参考文献〕

1) Andersson, P. O. (1982) J. Physiol. 322, 469 - 483

2) Minokoshi, Y. et al. (1986) Am. J. Physiol. 251, R1005 - R1008

3) Perkins, M. N. et al. (1981) Nature London 289, 401 - 402

4) Shimazu, T. and Takahashi, A. (1980) Nature London 284, 62 - 63

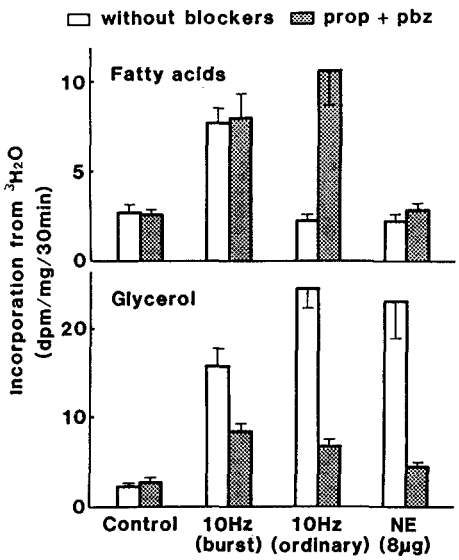


図３　脂肪合成に及ぼすフェノキシベンザミン及びプロプラノロールの影響

交感神経をburstあるいはordinary patternで刺激（10Ｈｚ），またはＮＥ（８μg／100 g Ｂ．Ｗ）を投与した時のＮＥ遮断剤の影響を調べた。

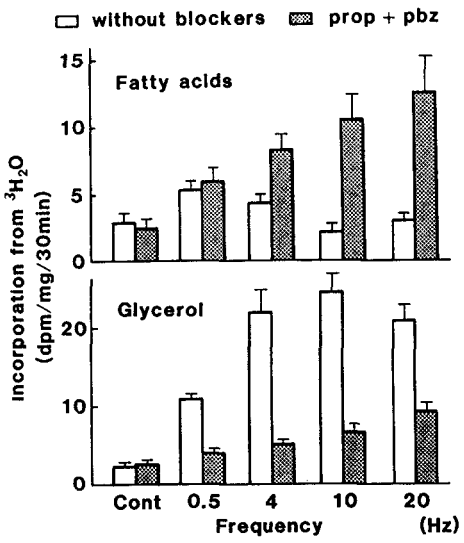


図４　交感神経をordinary patternで刺激した時のＮＥ遮断剤の効果

交感神経をordinary patternで刺激した時のプロプラノロール（prop）及びフェノキシベンザミン（pbz）の影響を調べた。

156. ^{3}H−(−)Baclofenによるラット脳内のGABA$_B$受容体の性状について
——躁うつ病治療薬との関連を含めて——

本橋伸高・猪川和興*・中河原通夫・
假屋哲彦　（山梨医大・精神神経，都立広尾病院・精神*）

〔要　約〕

^{3}H-(−)Baclofenをリガンドとし、急速吸引ろ過法によるラット脳内GABA$_B$受容体の標識化を試みた。この結合部位はCa^{2+}に依存しており、結合阻害実験からは、GABA，(-)baclofen，(±)baclofenのIC_{50}値はほぼ同じで(10～100nM)、(+)baclofenのIC_{50}値はこれらより1000倍大きかった。大脳皮質での結合部位は単一成分からなり、最大結合数は502.2fmol/mg protein，解離定数は32.8nMであった。これらの結果は従来の遠心法の結果と同様であった。Pargylineの慢性投与はラット大脳皮質の^{3}H-(−)baclofen結合部位を有意に増加させた。Reserpineでは同部位の減少傾向が認められた。Desipramine，lithium，carbamazepineの慢性投与によっては、前頭皮質では有意な変化を示さなかったが、視床と海馬では有意に増加していた。視床を用いたScatchard解析の結果は、この変化が解離定数ではなく、最大結合数に基ずくことを示唆している。以上の結果より、吸引ろ過法による^{3}H-(-)baclofen結合実験法は脳内GABA$_B$受容体の標識に適しており、また、躁うつ病治療薬の作用機序にGABA$_B$受容体を介するものがある可能性が示された。

Key word：^{3}H-(−)baclofen，　GABA$_B$ receptor，　manic-depressive disorders

γ−アミノ酪酸（GABA）は、哺乳類の中枢神経系で最も重要な抑制系神経伝達物質の一つである。その異常が種々の精神神経疾患で報告されている。

近年、GABAの受容体にbicuculline-sensitiveなGABA$_A$とbicuculline-insensitiveなGABA$_B$の2つのサブタイプのあることが明らかにされた(2)。BaclofenはGABA$_B$受容体の選択的なアゴニストであり、中枢神経でのdopamine，norepinephrine，serotoninなどの放出を抑制する(2)。GABA$_B$受容体の標識化には、これまで、^{3}H-GABA，^{3}H-(±)baclofen，^{3}H-(−)baclofenが用いられてきたが(1,4)、いずれも遠心法によるものであり、繁雑さはまぬがれなかった。

今回我々は、^{3}H-(−)baclofenをリガンドとし、急速吸引ろ過法によるラット脳内GABA$_B$受容体の結合実験法を開発し、基礎実験のデータを従来の報告と比較した。さらに、アミン枯渇剤であるreserpine，monoamine oxidase(MAO)阻害剤であるpargyline、躁うつ病治療薬であるdesipramine，lithium，carbamazepineの慢性投与がラット脳内GABA$_B$受容体に与える影響を検討した。

＜方法＞

実験動物はWistar系雄性ラット(200～300g)を用いた。^{3}H-(−)Baclofen (S.A.39.2～46.4Ci／mmol)を使用した。断頭後ラットの脳を取り出し、氷上で各部位に分け、−80℃で保存した。膜標品の作成はHerschelとBaldessariniの方法(3)に準じた。結合実験に際しては、−20℃保存しておいたペレットを解凍し、2.5 mM $CaCl_2$を含む 50 mM Tris-HClバッファー，pH7.4に懸濁し、39,000g，10分間の遠心を2回繰り返した。再び同バッファーに懸濁したものを結合実験に用いた。インキュベートの条件は、20

℃，20分とした。Whatmann GF／Bフィルターで吸引下にろ過し、氷冷した5mlのバッファーで3回洗浄した。乾燥させたフィルターは液体シンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで測定した。非特異的結合は10μM GABA存在下のものとした。

Ca^{2+}依存性、結合阻害実験ではリガンドの濃度を5 nMとし、ラット大脳皮質を用いた。薬物慢性投与実験ではリガンドの濃度を10 nMとし、Scatchard解析には5～80 nMの^{3}H-(－)baclofenを用いた。

Reserpine(1mg／kg),pargyline(25mg／kg)を1日1回7日間腹腔内に投与し、最終投与24時間後に断頭した。Desipramine(7.5mg／kg)，LiCl(1.5mEq／kg)，carbamazepine(50mg／kg)を一日一回14日間腹腔内に投与し、最終投与72時間後に断頭した。対照群には生理的食塩水を投与した。蛋白定量は、Lowryらの方法(7)によった。統計的処理はANOVAに引続きDuncanの方法を用いた。

<結果>

1.Ca^{2+}依存性。Fig 1に示すように特異的^{3}H-(-)baclofen結合にはCa^{2+}依存性が認められた。

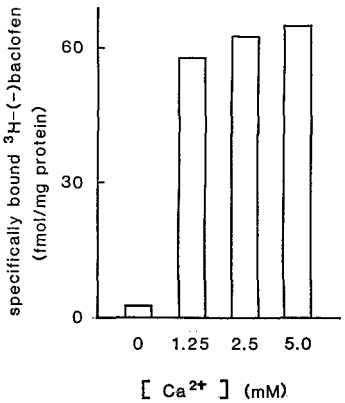


Fig 1 Ca^{2+} dependency of ^{3}H-(-)baclofen binding.

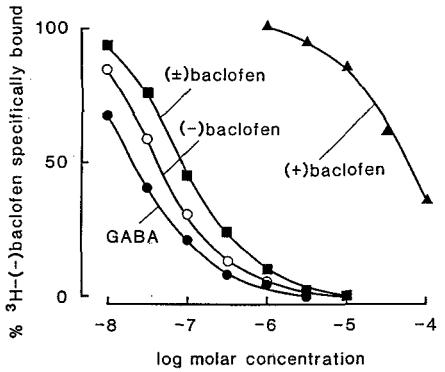


Fig 2 Inhibition of ^{3}H-(-)baclofen binding by GABA and baclofen.

2.結合阻害実験。GABA，(±)baclofenのIC_{50}値は、それぞれ21±3，79±4nMであった。(－)baclofenのIC_{50}値は41nMであり、(＋)baclofenのそれは48μMであり、stereospecificityが認められた(fig 2)。これらの値は従来の遠心法の結果と似ている(1,4)。また、CahopatenateのIC_{50}値は26μMであったが、desipramine，carbamazepine，lithium，sodium valproate，isoguvacineのIC_{50}値はいずれも100μMより大きかった。

3.Scatchard解析。ラット大脳皮質の最大結合数(Bmax)は502.2fmol/mg protein，解離定数(Kd)は32.8nM，Hill numberは0.99であった。この結合部位は単一成分から成ると考えられる。Bmax，Kdの値は、これまでの遠心法を用いた報告での高親和性部位の値に一致している(1)。

4.reserpine，pargylineの慢性投与。大脳皮質の^{3}H-(－)baclofen結合は、pargyline投与群では有意に増加し(＋14 %)，reserpine投与群では減少傾向(－10 %)を示した(Fig 3)。

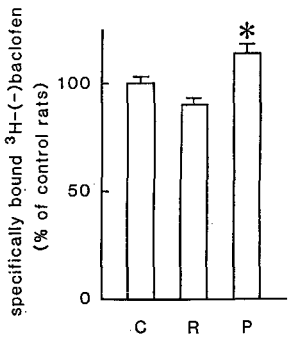


Fig 3 Effects of chronic treatment with reserpine(R) or pargyline(P) on ^{3}H-(-)baclofen binding sites in the cerebral cortex. Mean±SEM of eight rats are expressed. Control(C) values are 89.7±2.4fmol/mg protein. *:$p<0.05$.

5.躁うつ病治療薬慢性投与。前頭皮質の^{3}H-(－)baclofen結合は有意な変化を認めなかったが、視床と海馬ではいずれの群でも対照群に比し有意な増加を示した(＋30～50%

Fig 4)。視床の膜標品を用いてScatchard解析を行ったところ、Fig 5に示したように、KdではなくB_{max}の変化を反映しているものと考えられた。

＜考察＞

急速吸引ろ過法を用い、^{3}H-(-)baclofenをリガンドとしたGABA$_B$受容体の性質は、これまでの遠心法を用いたGABA$_B$受容体と同様の性質を示している。

Lloydらは、三環系、非三環系の抗うつ剤、MAO阻害剤、電気ショックの慢性適用によりラット前頭葉のGABA$_B$受容体が増加することを^{3}H-GABAを用いて示し、抗うつ効果とGABAの関連性を指摘した。同時に、reserpineの慢性投与でGABA$_B$結合部位が減少したと報告している(6)。今回の我々のreserpine, pargyline慢性投与の結果は、彼らの結果をほぼ再現している。Desipramine慢性投与の結果は、海馬では一致していた。前頭皮質で有意差がでなかったのは、投与方法の違い(ミニポンプと腹腔内投与)が関係しているかもしれない。Desipramineのみならず、lithiumやcarbamazepineの慢性投与でも海馬、視床の^{3}H-(−)baclofen結合部位が増加したことは興味深い。少なくとも視床での変化はB_{max}のものであると思われる。GABA$_B$アゴニストはnorepinephrine, adenosine, vasoactive intestinal polypeptide等によるcyclic AMPの生成を増強することが知られており(5)、今回の結果はこれら躁うつ病治療薬の作用機序を考えるうえで参考になることと思われる。

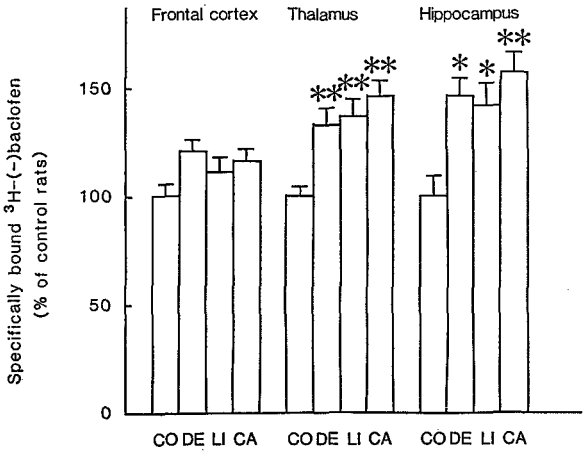


Fig 4 Changes in ^{3}H-(-)baclofen binding sites following chronic treatment with desipramine(DE), lithium(LI) or carbamazepine(CA). Control(CO) values are 135.8±7.7fmol/mg protein in the frontal cortex, 57.3±2.2 in the thalamus and 30.8±2.6 in the hippocampus. Each group consists of eight rats. *:$p<0.05$, **:$p<0.01$.

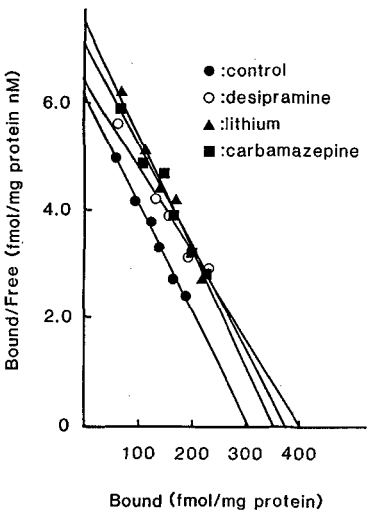


Fig 5 Scatchard plots of ^{3}H-(-)baclofen binding to thalamus membranes from rats receiving chronic drug administration. Pooled tissues from three rats were used.

＜文献＞

1.Bowery, N.G. et al.(1985) Neuropharmacology, 24, 207-210. 2.Bowery, N.G. et al.(1980) Nature, 283, 92-94. 3.Herschel, M. and Baldessarini, R.J.(1979) Life Sci., 24, 1849-1854. 4.Hill, D.R. and Bowery,N.G.(1981) Nature, 290, 149-152. 5.Karbon, E.W. and Enna, S.J.(1985) Mol. Pharmacol., 27, 53-59. 6.Lloyd, K.G. et al.(1985) J. Pharmacol. Exp. Ther., 235, 191-199. 7.Lowry, O.H. et al.(1951) J. Biol. Chem., 193, 265-275.

157. 妊娠ラットのアルコール摂取が仔ラット脳に及ぼす影響——その生化学的研究

小嶋久子・原田菜穂子・玉井洋一

（北里大・医・生化）

〔要　約〕

胎児性アルコール症候群に関する神経化学的情報を得ることを目的として次の実験を行った。　1．妊娠ラットに体重あたりのエタノール量を正確に定めて連日腹腔内投与した。投与開始は妊娠1週目と2週目の2つに分け投与量も変化させた。出生後47日目に脳を採取し、その細胞分画画分の生化学的性質を調べた。2．出生数と脳重量については、投与群と対照群との間に差はなかったが、早期より投与量の多かった群について僅かに体重減少を認めた。3．ミエリンの2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase(CNPase)活性は投与開始時期や投与量に関係なく対照群の70%程度にまで低下した。4．神経終末、ミクロソーム画分のAcetylcholinesterase活性が早期投与開始群で低下し、投与量が多い程低下の度合が著しかった。しかし、投与開始の遅い群では対照群との差が殆どなかった。5．ミエリンのタンパク質組成をSDS-PAGEで調べた結果、Wolfgram protein(WP)の割合が減少していた。6．ミエリンの糖脂質には異常がなかった。　以上の結果よりグリア細胞と神経細胞ではエタノールに対する感受性の差が質的にも量的にも異なる事、CNPaseの活性低下は酵素タンパク質の減少によるものである事などが示唆された。

Key word：

Fetal alcohol syndrome　Brain　Membrane marker enzymes

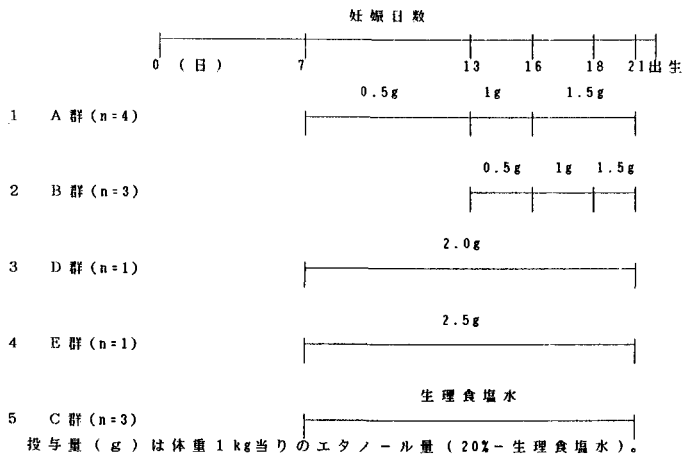
アルコールは強い催奇性物質である。とくに妊娠中の母親のエタノール摂取は胎児に精神運動発達遅延や各種の奇形を惹起することが知られている（いわゆる胎児性アルコール症候群）[1,2,7]。最近、ラット脳の組織学的研究により母体のエタノール摂取により仔ラット大脳皮質の神経細胞の増殖や移動が障害をうけることが証明されてきている[6]。生化学的に脳の発育障害を解明する研究は未だ少ないが、Lankasterらはエタノールによるミエリン形成開始の遅延[5]、鈴木らは[8,9,10]エタノール投与群におけるcarbonic anhydrase活性の上昇、全脳CNPase活性、DNA、RNA量の変化を示唆している。本研究は胎児性アルコール症候群の神経化学的情報を得ることを目的とし、体重あたりのエタノール投与量を正確にさだめて妊娠ラットに投与し、出産後、仔ラット脳の細胞分画を行い、各画分の標識酵素活性及びミエリン糖脂質組成を分析した。

〔実験方法〕

1．<u>エタノール投与法</u>　妊娠Wistar系ラットを図1に示すスケジュールに従って腹腔内注射によりエタノール（20%生食溶液）を投与した。腹腔内注入法を取った理由は、自由飲水法とは異なり体重当りのエタノール摂取量を正確に定められ事ができるからである。ホルモン制御の変わる妊娠日数12日目は投与をしなかった。各群間の哺乳条件を一定にする為に、出産後、一腹の仔の数を雌雄4匹ずつに揃えた。

2．<u>亜細胞分画法と生化学的分析</u>　出生後47日目にエーテル麻酔下に心臓より生食灌流後、断頭して脳を採取した。A，B，C，D，E各群のうち同一母親からの雌雄一匹ずつ計2個体分の大脳を合し、各々について以下の分析をすすめた。亜細胞分画は基本的にはEichbergらの方法[3]に従った。各顆粒画分はcross-contaminationが少な

図1　エタノール投与のスケジュール



投与量（g）は体重1kg当りのエタノール量（20%－生理食塩水）。
連日腹腔内注射。

く純度が高い事を電顕観察により確認した。ミエリンはP1、P2画分を合わせて分析に供した。CNPase，5'-Nucleotidase，Acetylcholinesterase(AchE)，Na,K-ATPase活性及びミエリン糖脂質脂肪酸のGC分析は概ね既報に準じた[4-11]。膜タンパクの電気泳動はSDS－ポリアクリルアミドの12%均一ゲルを用いた。

〔実験結果〕

1．出生数、外部形態、体重、脳重　出生数を表1に示した。着床数と出生数及び性比は各群間に差は見られなかった。仔ラットの体重増加はA，B群と対照群との差異は認められなかったが、DとE群では軽度の体重減少傾向があった。脳重量は条件の強いD，E群についてのみ測定したが、表2に示すように大脳、小脳とも殆ど差はないと判断した。また、アルコール投与群に外部形態や行動の異常は観察されなかった。

2．酵素活性　調製した4つの膜画分につき4種の標識酵素活性を測定した（表3）。CNPase：ホモジネートは活性が低い為明確な差を指摘しにくいが、ミエリンにおける活性はA，B，D，E，群とも約70%に低下した。AchE：ミクロソームにおける活性がA，D，E群において軽度減少し、神経終末ではA群で63%，D，E群では30－40%にまで低下していた。一方、B群では対照群と殆ど差がなかった。Na,K-ATPase：A，D，E群は、ミクロソーム、ミトコンドリア、及びミエリンでの活性が低下していたが、B群では比較的良く保たれていた。但し、神経終末での活性はA，B，D，Eの4群とも低下した。5'-Nucleotidase：A，B両群ともミエリンとミクロソームの活性がやや低下していた。

表1　着床数と出生数

実験群 母ラット		着床数	出生数 ♂	出生数 ♀	吸収数
A	1	13	5	6	2
	2	13	6	3	4
	3	10	5	4	1
	4	15	10	4	1
B	1	14	7	5	2
	2	13	8	2	3
	3	14	5	7	2
D	2	17	7	6	1
E	3	12	2	4	6*
C	2	14	7	3	4
	3	14	6	4	4
	4	16	9	7	0

A，B，D，エタノール投与群（図1　参照）
C，　生食投与群
*　うち胎児死亡　3

表2　エチルアルコール投与D群およびE群仔ラットの脳重量（49日令）

	大脳 ♂	大脳 ♀	小脳 ♂	小脳 ♀
D－2	1.24±0.04(4)	1.26±0.07(4)	0.26±0.02	0.27±0.02
E－3	1.29　(2)	1.22±0.02(4)	0.23	0.23±0.02
対照	1.30±0.03(4)	1.27±0.04(4)	0.26±0.01	0.24±0.01

3．ミエリンタンパクのSDS-PAGE　ミエリンCNPaseの活性低下が顕著であった為、SDS-PAGEによりミエリンのタンパク組成を検討した。PLPを指標にWP/PLP比をデンシトメトリーで求めると、C群が0.75に対して、A群が0.53（70%）、B群　0.56（75%）と有意に低

表3　亜細胞画分の酵素活性

	A	B	D	E	C
CNPase（μmol/min/mg Protein）					
Homogenate	4.38±0.39	3.68±0.10	3.20±0.20	2.10±0.42	4.25±0.60
Myelin	17.57±1.25	14.60±0.84	18.53±0.96	13.87±1.08	21.68±1.40
AchE（μmol/hr/mg Protein）					
Homogenate	4.71±1.14	4.82±0.21	5.15±1.21	4.41±0.34	5.61±0.49
Microsome	6.60±0.90	9.40±0.67	6.92±0.90	7.23±0.80	8.26±1.39
Nerve Ending	4.29±0.83	6.35±1.53	2.72±0.95	1.90±0.34	6.73±1.29
Na, K－ATPase（μmol/hr/mg Protein）					
Homogenate	5.50±0.78	6.10±1.15	6.75±0.61	4.40±0.76	4.66±0.84
Microsome	14.57±1.50	19.73±2.25	14.43±2.12	13.64±1.73	17.90±2.46
Mitochondria	9.10±1.23	12.38±2.19	3.74±0.99	5.97±0.72	12.69±2.29
Myelin	1.66±0.47	3.42±0.43	1.53±0.39	2.03±0.32	4.76±1.65
Nerve Ending	5.29±0.53	5.51±0.87	3.82±1.11	1.71±0.29	9.64±2.60
5'－Nucleotidase（μmol/hr/mg Protein）					
microsome	0.80±0.13	0.86±0.11			0.96±0.06
Myelin	1.56±0.14	1.44±0.32			2.00±0.22

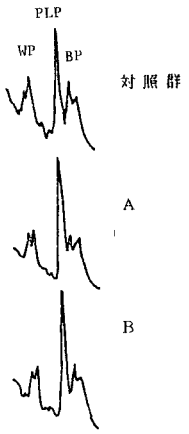


図2.
ミエリンのSDS-PAGEタンパク組成
（シマズ CS-910 クロマトスキャナー）

下していた（図２）。これはCNPase活性の低下と対応する知見であった。

4. 糖脂質の組成　ミエリンに現れる酵素タンパクの異常が糖脂質にも起こっているか否かを知るためミエリンのセレブロシドとスルファチド及び全脳ガングリオシドの組成を分析したが、アルコール群と対照群との間に差は全く見られなかった。

〔考察〕

本研究結果は妊娠ラットのエタノール摂取が、仔ラットに形態異常を惹き起こす以前に、既に脳機能を担う基本的な酵素活性に異常が起こっていること、及びその異常が各酵素に特徴的であることを示している。即ちCNPase活性は投与時期や投与量に関係なく影響を受けるが、AchEはエタノール摂取が妊娠早期である程、またその量が多い程影響も大きいことが明らかとなった。これはグリア細胞と神経細胞ではエタノールに対する感受性の程度が量的にも質的にも異なることを示唆している。またWPの量的低下はCNPase活性の低下が酵素蛋白量の減少によるものであることを示唆している。一方、ミエリンの糖脂質組成は本条件下では異常が見られず、糖脂質合成酵素は大きな影響を受けないと考えられた。

〔謝辞〕有益なご助言を賜りました古館専一博士（北里大・医・実験動物）に感謝します。本研究の一部は原田菜穂子の卒業研究（１９８３年、衛生学部産業衛生学科、今宮俊一郎教授）として行われた。

〔References〕

1. Clarren,K.S. & Smith,W.D.(1978) New England J. Med. 298, 1063-10672. 2. Clarren,K.S. et al.(1978)J.Pediatrics 92 64-69 3.Eichberg,J.et al.(1964) Biochem.J. 92,91-100 4. Kojima,H. et al.(1980)J.Biochem. 88,1615-1622 5.Lancaster,E.F.et al.(1982)Brain res. 235,105-113 6.Miller,W.M.(1986) Science 233,1308-1311 7.Streissguth,P.A. et al.(1980)Science 209,353-361 8.鈴木伸幸ら(1980) 脳神経 32,1136-1142 9.鈴木伸幸ら(1981) 脳神経 33,1207-1211 10.鈴木伸幸ら(1983) 脳神経 35,243-247 11.Tamai,Y. & Abe,K.(1986) Neurochem. Int.8,187-197

158. β-フェニルエチルアミン逆耐性発現ラットにおける線条体ドーパミン遊離の in vivo brain dialysis による検討

堤　哲之・松本　孝・平野　誠・黒木俊秀・
鹿子島裕士・八尾博史・内村英幸・
白石昭雄*・中原辰雄**・中村　薫***・
稲永和豊****
（国立肥前療養所，九州大・理・生物*，化学**；医・精神***・
久留米大・医・精神****）

〔要　約〕

PEA反復投与（14日間）後休薬期間をおいてPEAを再投与すると、覚醒剤反復投与と同様に常同行動に対する逆耐性現象が出現することを見いだした。このPEA逆耐性現象出現ラットにおける線条体DAニューロンの生化学的変化をbrain dialysis法を用いて経時的に検討した。常同行動の最も強い時間帯（PEA投与後：10-20分）において、逆耐性出現ラットにおいては著明なDAの増加（約1500%）がみられ、対照であるPEA 1回投与群との間に有意な差を認めた。今回の実験から、PEA再投与後のDA遊離の経時変化が常同行動の推移とよく対応していることが明らかになった。このPEAでみられる常同行動は、線条体におけるシナプス終末からのDA放出によるもので、反復投与による逆耐性現象の背景として、DAの放出機構が低濃度のPEAの刺激に対して過剰に反応していることから、前シナプスニューロンの何らかの変化が示唆された。

Key word：　PEA, brain dialysis, DA release

前々回、内在性微量アミンであるβ-フェニルエチルアミン（PEA）の反復投与により常同行動に対する過敏性を形成したラットで、dopamine（DA）の代謝産物であるホモバニリン酸（HVA）を指標にして生化学的にDAニューロンのsensitizationが起こることを報告した（3）。臨床生化学的知見として、PEAの利用障害と慢性の妄想型分裂病あるいは急性増悪期の病態との関連が示唆されている。従来、分裂病の病態モデルとしてメタンフェタミン反復投与ラットに於ける常同行動に対する逆耐性現象が考えられているが、筆者らは、PEAを14日間反復投与後休薬期間をおいてPEAを再投与した際、覚醒剤反復投与後と同様な逆耐性現象が出現することを見いだした。今回、Ungerstedtらによって考案されたbrain dialysis法（5）を用いて、PEA逆耐性形成ラットにおけるPEA再投与時の常同行動変化と線条体DAニューロンの生化学的変化の経時的な相関について検討を行った。

【方法】

1)薬物投与スケジュール：　Wistar系雄性ラット(250-300 g)を使用した。PEA投与群には、PEA 50 mg/kgを1日1回、14日間腹腔内投与し（PEA群）、対照には、生理的食塩水をPEA群と同様のスケジュールで投与した（生食群）。最終投与後、7日間の休薬期間を置いて、brain dialysisによる実験に使用した。

2)In vivo brain dialysis：1)で作製したラットを抱水クロラール（400 mg/kg)で麻酔し、定位脳固定装置に固定した。頭蓋骨を露出させ、König & Klippelのアトラスに基ずき、Bregmaより前方0.6 mm、側方2.5 mmの位置で、ドリルで孔を穿

ち、脳硬膜を除去した後、透析用プローベの先端を、脳表面より 4.5 mm の深さで、線条体内に刺入した。実験終了後には、脳切片を作り先端の刺入部位を確認した。透析プローベの頭蓋骨外の部分は歯科用セメントを用いて固定した。術後麻酔が醒めるのを数時間待って、リンガー液（147 mM Na，2.3 mM Ca，4 mM K，155.6 mM Cl）を毎分2μlで灌流させ、1N PCA 5μlを入れたテストチューブに10分毎に回収した。その全量を電気化学検出器を備えた高速液体クロマトグラフィーに注入して、DAとその代謝産物を測定した。連続して3つのフラクションの基準値が安定していることを確認した後、PEA 25 mg/kgを腹腔内投与し、同時に常同行動をBorisonらの評価尺度（1）を用いて5分毎に観察した。灌流液の測定は薬物投与後120分まで行った。結果は薬物投与前3つの基礎値を平均しコントロール値として用い、それに対する各フラクション値を％コントロールで表した。

【結果及び考察】

7日間の休薬期間後にPEA（25mg/kg）を再投与すると、PEA群、生食群共に行動変化が認められたが、PEA群の方が生食群に比して、常同行動の評価上では高値を示した（Figure 1a）。メタンフェタミン反復投与等でみられるような逆耐性現象が内在性微量アミンであるPEA（14日間投与）でも形成されることを確認した。

Figure 1bにPEA投与後の線条体内灌流液中のDAの経時変化を示した。常同行動の最も強い時間（10～20分）のPEA群灌流液で、著明なDAの増加（1586 ± 572 %）が認められた。生食群でもDA増加はみられた（357.3 ± 67.4 %）が、PEA群に比

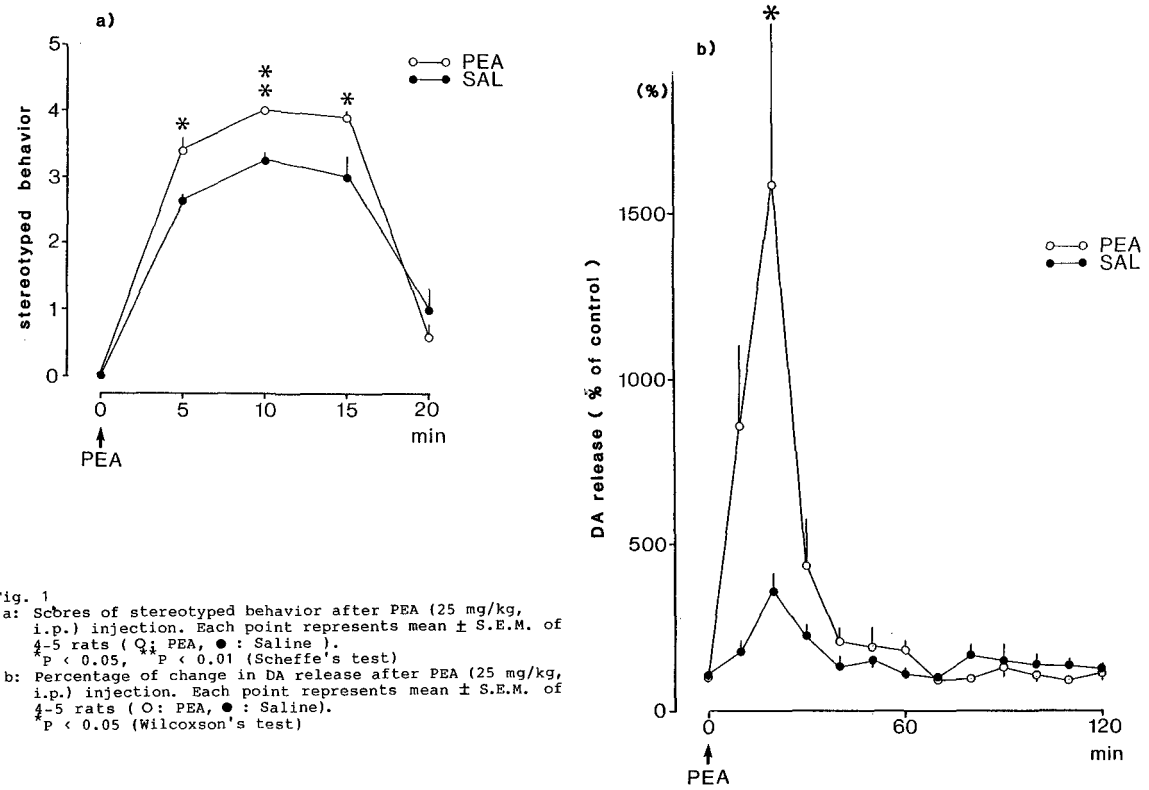


Fig. 1
a: Scores of stereotyped behavior after PEA (25 mg/kg, i.p.) injection. Each point represents mean ± S.E.M. of 4-5 rats (○: PEA, ● : Saline).
*P < 0.05, **P < 0.01 (Scheffe's test)
b: Percentage of change in DA release after PEA (25 mg/kg, i.p.) injection. Each point represents mean ± S.E.M. of 4-5 rats (○: PEA, ● : Saline).
*P < 0.05 (Wilcoxson's test)

して低かった。次の時間帯の灌流液中のDAは急激に減少していた。

今回の結果から、PEAでみられる常同行動は、線条体におけるシナプス終末からのDA放出によることが示唆された。また、PEA逆耐性形成ラットにおいて、PEA再投与による常同行動増強時には、DAの放出機構が低濃度のPEAの刺激に対して、過剰に反応している可能性が示唆された。以前、われわれは、PEA反復投与による常同行動の過敏性形成ラットにおいて、PEA最終投与後60分時のHVAの変化から生化学的にもDAニューロンにsensitizationが起こっていることを報告した（3）。今回の結果によって、7日間の休薬期間をおいてもPEAに対するDAニューロンのsensitizationが持続していること、また、PEA再投与後のDA遊離の経時的変化が常同行動の推移とよく対応していることが明らかになった。メタンフェタミン反復投与によるDAニューロンのsensitizationについては報告（2、7）されているが、内在性物質であるPEAでも同様の現象がみられた今回の結果は興味深い。常同行動の最も強い時間の灌流液中のDA遊離はPEA群において個体差が大きかった。行動の変化とDA遊離について個々に詳細に検討すると、DA遊離が大きいラットでは、常同行動発現時間が早く、しかも行動評価も高い傾向がみられた。今後、実験動物の数を増やし、より詳細な行動評価尺度を用いて検討したい。

PEA反復投与によるDAニューロンの変化については、まだ不明な点が多いが、今回DAの遊離亢進がみられたということから、前シナプス・ニューロンの何らかの変化が示唆される。PEAについては、その化学構造の類似性からアンフェタミンと類似した作用機序が考えられているが、DAの遊離に対しては、アンフェタミンが神経伝導に関係しない（6）といわれているのに対して、PEAはより反応しやすいという報告（4）もあり、その違いも指摘されている。今後、この遊離促進の機序に関してシナプス前受容体の関与、或は再取り込み機序との関連性について検討を重ねる必要があると思われる。

【文献】

1) Borison, R.L., Havdala, H.S. and Diamond, B.I. (1977) Life Sci., 21, 117-122.
2) 市川淳二, 小山司, 三国雅彦, 山下格 (1986) 神経化学, 25, 280-282.
3) 石橋賢治, 松本孝, 平野誠, 平野均, 中村薫, 中原辰雄, 内村英幸 (1985) 神経化学, 24, 559-561.
4) Niddam, R. et al. (1985) Eur. J. Pharm., 110, 121-123.
5) Ungerstedt et al. (1982) Advances in the Bioscience, 37, 219-231.
6) Westerink, B.H.C. et al. (1987) Eur. J. Pharm., 135, 123-128.
7) 山田茂人 他, (1986) 神経化学, 25, 475-477.

159. Brain Dialysis：無麻酔無拘束ラット脳線条体内における アセチルコリン放出の定量と神経科学的研究

安島綾子・加藤　武　（東京工大・生命化学）

〔要　約〕

中枢神経系におけるアセチルコリンの神経伝達物質としての役割を探るため，Brain Dialysis法を用いて無麻酔無拘束ラット脳線条体内のアセチルコリンを連続的に測定する方法を確立した。ループ型透析チューブをラット脳線条体内に挿入し、リンゲル液を2.6 μl／minの速度で灌流し、20分毎に透析液を逆相 HPLC-ECD による一液式アセチルコリン測定システムで定量した。脳内にアセチルコリンエステラーゼの特異的な阻害剤であるエゼリンを投与することにより、アセチルコリンを有意に測定し、5日間連続して測定することが出来た。この方法を用いてアセチルコリンニューロンと他のニューロンとの相互作用を解明するため薬物投与を行った。アセチルコリンレセプターのアンタゴニストであるアトロピンを投与したところ、アセチルコリン量が 2-3 倍に増加した。高濃度のカリウムイオンで刺激すると、アセチルコリン量が可逆的に減少する様子が観察された。

Key word：　Brain Dialysis, Acetylcholine, Eserine,

中枢神経系のコリン作動性のニューロンは全脳から脊髄まで広範に分布し、ことに線条体とマイネルト基底核には大型神経細胞として多く存在する。これらコリン作動性ニューロンは、学習や記憶の機序に重要な役割を演じているばかりでなく(2,6)、近年は特に Alzheimer 病、痴呆、老化、精神病などの疾患との関係も注目を集めている(4,10)。

近年脳内のアセチルコリンは HPLC-ECD 法で容易に測定できるようになった(7)。当研究室では、神経科学研究への応用をめざして Brain Dialysis 法を用いて、ラット脳線条体内カテコラミンの動的変化を測定している(8)。今回は、Brain Dialysis 法により無麻酔無拘束ラット脳線条体内のアセチルコリンを連続的に測定する方法を確立したので報告する(1)。

（方法）

対象は、Wistar系雄性ラット（体重 190-250 g, 6-7週齢）を用い、ループ型透析チューブ(3)を Bregma より A, 0.0, L, 2.7, V, -6.0 mm の位置に埋め込んだ(9)。手術後、18時間後に測定を開始し、測定時ラットは、24 x 16 x 21 cm のアクリル性の透明な箱の中で、無麻酔無拘束の状態に置いた。灌流液は、エゼリンを 100 μM 含んだリンゲル液を用い、2.6 μl／min の速度で流した。

透析液は、20分毎に分取し、そのうち 20 μl をアセチルコリン分析用 HPLC-ECD (Bioanalytical System) で定量した。電極は白金電極を用い、分離用のカラムは 8 μm の逆相ODS(styrene polymer chromatographic column, PLRP-S, 4.6 x 100 mm, Bioanalytical System) を用い、1 mM EDTA, 40 μM オクタンスルホン酸ナトリウム

を含む 50 mM のリン酸溶液（pH 8.5）を流出液とした。カラムに吸着したエゼリンを除くために、数日に一回ガードカラム（PLRP-S）をメタノールで洗浄し実験を行った。

薬剤投与は 1 mM のアトロピン、または高濃度のカリウムイオン（50 mM）を含む灌流液を一定時間灌流した。試験管内での回収率は、100 μM アセチルコリンを含むリンゲル液から、透析チューブを通して灌流液にどの位アセチルコリンが回収されるかで測定し、灌流速度が 2.6μl／min では 4-7 % 程度であった。

（結果と考察）

Fig. 1 に示したのは高速液体クロマトグラフィーを用いたアセチルコリンのクロマトグラムで、A は 2 pmole のコリン、エチルホモコリン、アセチルコリンを含む標準溶液、B は 100 μM エゼリンを含むリンゲル液を流した際の灌流液の溶出パターンである。C はエゼリンを含まないリンゲル液を流した灌流液で、D は B と同様であるが固定化酵素カラムの代わりに樹脂のみを詰めたカラムを通した溶出パターンを示した。これらの結果から、エゼリンを 100 μM 程度加えると有為に線条体内アセチルコリンを測定することが出来、コリンエステラーゼとコリンオキシダーゼの固定化酵素カラムを用いないと定量できないことから、アセチルコリンであることが確認された。また、このパターンは、約 10 時間程度の測定時間内でほぼ一定値を示すことも確認している。アセチルコリン量はエゼリンの 1 μM から 100 μM 迄の濃度に依存して増加する。しかし、低濃度のエゼリンでは時間と共にアセチルコリン量が減少し、長時間の実験が出来ない。最近 Damsma らは、Brain Dialysis によるアセチルコリンの測定法を報告したが(5)、彼らの方法はイオン交換樹脂を用いて分離するため、エゼリン

Fig. 1

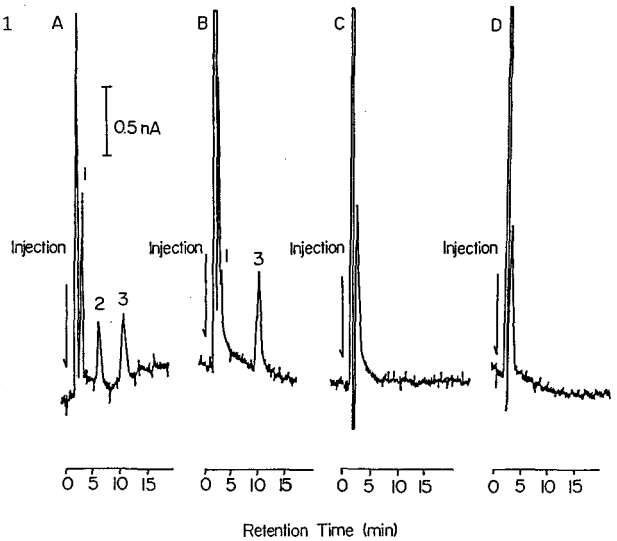


Fig. 2

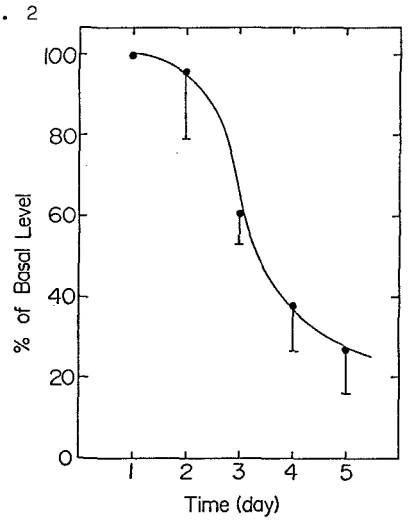


Fig. 1 Chromatograms of acetylcholine in the perfusate of the rat striatum. A; standard solution contained 2 pmol of choline (peak 1), ethylhomocholine (peak 2) and acetylcholine (peak 3). B; 20 μl of perfusate with Ringer solution containing eserine. C; 20 μl of perfusate with Ringer alone. D; perfusate same as B using non enzyme column instead of enzyme immobilized column.
Fig. 2 Time dependent change of acetylcholine outputs. Results are means with SEM of 4 rats.

が溶出してしまう。そのためエゼリンを 10 μM 以下でしか使用できず、私達のような連続測定には適さない。Fig. 2 では、エゼリンを含むリンゲル液を灌流している間は、5 日間程度は連続してアセチルコリンが測定できることを示している。日を追

Fig. 3

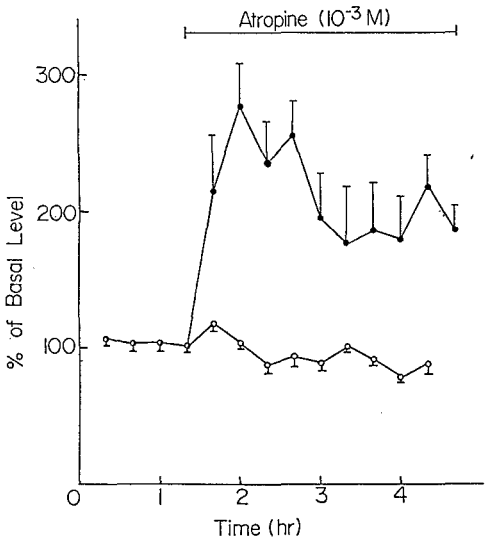


Fig. 4

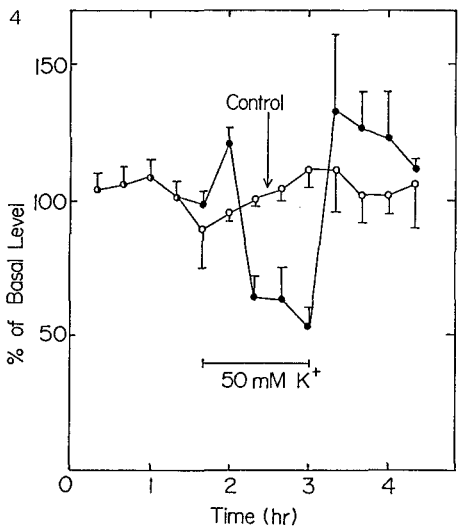


Fig. 3 Effect of Atropine on acetylcholine outputs. Results are means with SEM of 3 rats. Open circles; Control. Closed circles; 10^{-3} M Atropine.
Fig. 4 Effect of high concentration of potassium on acetylcholine outputs. Results are means with SEM of 3 rats. Open circles; Control. Closed circles; 50 mM potassium ion.

ってアセチルコリンが減少していくのは透析チューブの回りが、グリア細胞などに依って覆われてしまうためではないかと考えられる。4-5 日目にはアセチルコリン量が少なくなるが、5 日間連続して測定できることが判ったので投薬後 2 日目、3 日目の変化を調べることが出来るのではないかと考えている。

Fig. 3, Fig. 4 では、それぞれアトロピン、高濃度カリウムイオンの影響を示してある。アトロピンを投与すると、アセチルコリン量が 2-3 倍に増加することが判る。これはアトロピンがアセチルコリンのムスカリン性レセプターを pre あるいは post synaptic にブロックするため、遊離のアセチルコリン量が一時的に増加したと考えられる。高濃度カリウムイオンに関しては、一過性にアセチルコリン量は増加するが、その後減少し、カリウムイオン濃度を平常に戻すと、コントロール値迄回復することが判る。このことから、カリウムイオンによる刺激は可逆的なもので、細胞へのダメージに依るものではないことが示唆される。

今後、様々な薬剤を投与することによって線条体内のアセチルコリン量の変化を連続的に測定すると同時に、カテコラミンニューロンの変化も同時に調べ、in vivo の実験で、アセチルコリンニューロンとドーパミンニューロンの関連性等について調べていきたい。

（文献）

1. Ajima A. and Kato T., Neurosci. Lett., in press.
2. Bartus R. T. and Johnson H. R., Pharmacol. Biochem. Behav., 5 (1976) 39-46
3. Clemens J. A. and Phebus L. A., Life Sci., 35 (1984) 671-677
4. Collerton D., Neuroscience, 19 (1986) 1-28
5. Damsma G., Westerink B. H. C., de Vries J. B., Van den Berg C. J., and Horn A. S., J. Neurochem., 48 (1987) 1523-1528
6. Deutsh J. A., Science, 174 (1971) 788-794
7. Fujimori K., and Yamamoto K., J. Chromatogr., 414 (1987) 167-173
8. Kato T., Dong B., Ishii K., and Kinemuchi H., J. Neurochem., 46 (1986) 1277-1282
9. König J. F. R., and Klippel R. A., The Rat Brain, Williams and Wilkins, Baltimore (1963)
10. Price D. L., Ann. Rev. Neurosci., 9 (1986) 489-512

160. Methamphetamine 反復投与後のドーパミン自己受容体感受性及び cocaine との交叉反応性——ラット脳内透析法による検討——

風早靖子・秋元　潔・濱村貴史・藤原　豊・
秋山一文・佐藤光源*・大月三郎
（岡山大・医・神経精神，東北大・医・精神*）

〔要　約〕

ラットにmethamphetamine（ＭＡＰ）4mg/kg/日を14日間反復投与(i.p.)して逆耐性を形成、対照群には同様に生理食塩水を投与した後、休薬7日目に脳内透析法を用いてドーパミン（ＤＡ）自己受容体感受性およびcocaineとの交叉反応性について検討した。休薬6日目に麻酔下に線条体内にループ状の透析膜チューブを挿入固定した。休薬7日目にapomorphine 100μg/kg(i.p.)により自己受容体を刺激し、その前後でチューブを灌流させ回収した液中のＤＡとその代謝産物を20分ごとに測定した。またＤＡ再取り込みを阻害するcocaine 20mg/kgを投与(i.p.)し同様の測定を行なった。

Apomorphine投与後細胞外液中のＤＡは減少したが、減少率は両群間に差はなく，ＤＡ放出を調節する自己受容体の低感受性は示唆されなかった。　Cocaine投与後ＭＡＰ群は行動上交叉逆耐性を示し、細胞外液中のＤＡ上昇は対照群より有意に大きかった。このことから逆耐性の発現にはＭＡＰとcocaineとに共通する機序が関与する可能性が示された。

Key word： methamphetamine, in vivo brain dialysis, dopamine

Methamphetamine（以下ＭＡＰ）の動物への反復投与によりbehavioral sensitization（所謂逆耐性現象）が生じるが、これはヒトでのＭＡＰ乱用が精神分裂病類似の症状を惹きおこすことからとくに注目され研究されてきた。その機序として、当初シナプス後ドーパミン（以下ＤＡ）受容体の過感受性が想定されたが、否定的な報告も多い。代わってシナプス前の変化が注目されるようになり、自己受容体によるＤＡ放出抑制やＤＡの再とりこみなどにつき多様な研究が行なわれてきた。自己受容体については受容体結合実験から低感受性(5)が提起されたが、これまでに行なわれた行動及びＤＡ合成調節に関する実験(2,4)からは証拠に乏しい。再取り込み機能については増大しているとの報告(7)がある。しかしＤＡ神経機能は複雑なフィードバック機構の総和でありいずれの方法にも限界がある。脳内透析法は行動とin vivoの脳内生化学的変化、しかも細胞外の伝達物質を同時に観察することが可能であるという利点を持つ。最近これにより、逆耐性ラットでＭＡＰ再投与時の細胞外液ＤＡ上昇の有意な増大が示されている(3)。この方法を用いてまずＭＡＰ反復投与後の自己受容体のＤＡ放出抑制機能の変化について調べた。さらに再とりこみ機能の検討の一法として、ＭＡＰによる逆耐性形成後cocaineを負荷し、脳内ＤＡ系の反応を検討した。

［対象と方法］

ＳＤ系雄ラット28匹を2群に分け、1群には秋山（1）の方法に従いＭＡＰ（4mg／kg i.p.）を14日投与、これをＭＡＰ群とし、1群には同容量の生理食塩水を投与し対照群とした。断薬６日目にpentobarbitalまたはdiethylether麻酔下にラットを脳定位装置に固定し、ループ状の透析膜チューブを線条体内に挿入した。翌日これにRinger

液2μl/minを灌流させ20分ごとに回収、液中のＤＡ,DOPAC,HVAをECD-HPLCにより測定した。連続3サンプルで基礎値の安定を確認し、実験１としてシナプス前自己受容体を選択的に刺激するといわれる量のapomorphine（以下ＡＰＯ）（100μg/kg,i.p.）を投与した。実験２では、カテコールアミン再取り込み阻害を主作用とするcocaine（20mg/kg,i.p.）を投与した。薬剤投与後実験１では2時間後、実験２では3時間後までの灌流液の測定を行なった。投与前3サンプルの値を平均して100%とし、これに対する各サンプルの割合を求めた。統計処理は、Mann-WhitneyのU-testを用いて行なった。

［結果］

実験１．APO投与直後から全てのラットに運動量の減少がみられた。線条体灌流液中のＤＡ量も減少し、20-40分のサンプルで最低値、即ちＭＡＰ群 59.7±4.6%、対照群 67.3±3.0%(mean±s.e.m. 各n=7)を示し、以後次第に前値に復した。Fig.1 に前半1時間の結果を示すが、各時点の値には両群間で有意差はなかった。DOPAC, HVAも減少後前値に復したが、減少の程度は両群間で有意差はなかった。

実験２．Cocaine 20mg/kgの投与後ＭＡＰ群では対照群よりも強い常同行動を示し逆耐性が認められた。灌流液中のＤＡは投与直後の0-20分のサンプルで最高値を示し以後急速に前値に復した（Fig.2）。対照群では80分以降むしろ前値より低値を示した。最高値はＭＡＰ群196.4±9.8%、対照群141.6±8.2%（mean±s.e.m. 各n=7）でＭＡＰ群で有意に高値を示した。DOPAC,HVAはcocaine投与後僅かに減少を示すにとどまった。

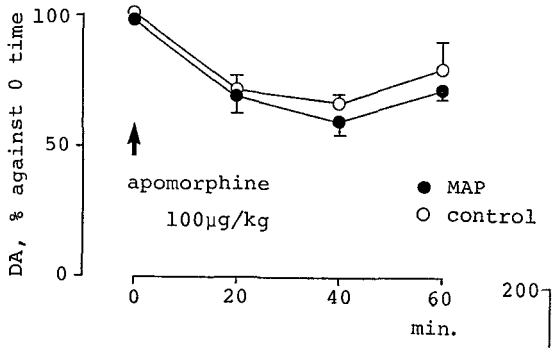


Fig.1 Apomorphine投与後の線条体細胞外液ドーパミン濃度の変化

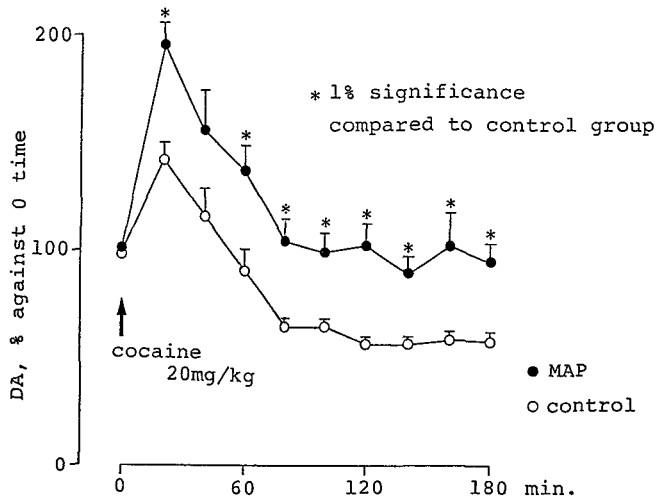


Fig.2 Cocaine投与後の線条体細胞外液ドーパミン濃度の変化

［考察］

実験１の結果から、ＤＡ放出調節に関わる自己受容体機能はＭＡＰ反復投与によっては変化していないことが示唆された。最近これにつき同様に脳内透析法を用いた実験が報告され（市川ら　生物学的精神医学会　1987.5.札幌）、自己受容体低感受性が示されている。本実験との相違点はＭＡＰ反復投与の方法で、10mg/kg,2回/日までの漸増法をとっていることである。今回の投与法も逆耐性を起こすことは確かめられているが、この投与法の差が結果の相違を招いた可能性もある。また自己受容体の調節を受けるのはimpulse flow-dependentな放出でありＭＡＰによる放出とは異なるとの批判もある(6)。

実験２では従来いわれているように　行動上ＭＡＰとcocaineとは交叉逆耐性を示した。ＭＡＰはカテコールアミンの再取り込み阻害作用もあるが放出促進作用が中心であるのに対し、Cocaineの薬理作用は主に再取り込み阻害作用である。Cocaineは行動上多動や常同行動を惹き起こし、さらに脳内透析法の結果は，ＭＡＰより程度は小さいものの細胞外液中のＤＡの増加を惹き起した。この場合にもＭＡＰ再投与時(3)と同じくＤＡ増加の程度が対照群に比べてＭＡＰ群で大きかったことから、逆耐性現象の基盤となるのは細胞外液ＤＡ濃度の増加であることがさらに確かめられた。このことからＭＡＰによる逆耐性形成によりcocaineの作用起点であるＤＡ再取り込み機構に何らかの変化が生じる可能性が考えられた。

文献

1. 秋山一文 (1982) 精神経誌 84, 227-242
2. Conway, P.G. and Uretsky, N.J. (1982) J.Pharmacol.Exp.Ther. 221, 650-655
3. 市川淳二、小山司、三国雅彦、山下格 (1986) 神経化学 25, 280-282
4. Kaneno,S., Watanabe,A., Takahashi,R. (1986) Eur.J.Pharmacol. 123, 287-294
5. Muller, P. and Seeman, P. (1979) Eur.J.Pharmacol. 55, 149-157
6. Robinson, T.E. and Becker, J.B. (1986) Brain Res.Rev. 11, 157-198
7. 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 (1986) 神経化学 25, 475-477

161. 虚血モデルラットにおける脳内コリン作動性神経系の生化学的変化

熊谷善弘・松井嘉樹　（三共・生物研）

〔要　約〕

四血管閉塞モデルラットを用い、脳虚血時の脳内コリン作働性神経系の生化学的変化について検討した。海馬・線状体・大脳皮質において、虚血により ACh 含量は低下し、６０分の虚血により有意に低下した。この虚血による ACh 含量の低下は再開通により回復して行くが、海馬・線状体においては再開通５時間後において対照より有意に増大し、再開通２日後においても海馬では高い値を示したが、線状体では対照レベルと差はなかった。Ch 含量は虚血初期から著しい増大を示した。この増大した Ch は再開通により減少していくが、線状体においては再開通後５時間後と２日後においても対照レベルまでには戻らなかった。海馬切片におけるグルコースからの ACh 合成能は、高濃度 KCl により刺激しない場合、虚血６０分後では変化せず、再開通２日後で有意な低下を示した。高濃度 KCl により刺激した場合の合成能には変化は認められなかった。再開通２日後の m-AChR 結合には変化はなかった。

以上の結果から、脳内コリン作働性神経系は脳虚血により障害を受ける事が示唆され、虚血・再開通による ACh 含量の変化は、合成と遊離の平衡の崩れによると考えられる。

Key word： transient forebrain ischemia , acetylcholine , choline

〔緒　言〕

老年痴呆には脳血管障害に由来するもの（血管性痴呆）が多く存在し、また脳内コリン作働性神経系は記憶・学習と密接な関係にある事が示唆されている。そこで、脳虚血時の脳内コリン作働性神経系の動態をさぐる事は脳血管障害の病態を明らかにする上で重要であると考えられる。しかし、虚血と脳内コリン作働性神経系の関係については不明な点が多い。そこで今回、両側椎骨動脈と両側総頸動脈の四血管を閉塞した脳虚血モデルラットを作製し、虚血による機能障害の原因の一つと考えられる異常な Ca の蓄積を引き起す条件[4]（椎骨動脈焼灼３日＋１時間総頸動脈結紮＋再開通２日）において、アセチルコリン（ ACh ）とコリン（ Ch ）の含量、ムスカリン性 ACh 受容体（ m-AChR ）結合、そしてグルコースからの ACh の合成能とCO_2の産生について検討した。

〔実験方法〕

虚血モデルの作製：250－300g の STD-Wistar 系雄性ラットを用いた。ペントバルビタール麻酔下で両側椎骨動脈を電気焼灼し、３日後にハロセン麻酔下で両側総頸動脈を露出し、覚醒後クリップにて両側総頸動脈を閉塞した。再開通実験においては６０分間の総頸動脈結紮後に血流を再開した。

ACh と Ch の定量：ラットをマイクロウエーブ（4.2kw 2.4秒間）を用いて殺し、摘出した脳各部位を１０倍量の 0.2N PCA（0.01% EDTA と内部標準として 1 μM の ethylhomocholine を含む）でホモジェナイズし、10000 g 20 分間遠心分離した。その上清をメンブランフィルター（ポアサイズ 0.2μm）でろ過し、ろ液中の ACh と Ch を、Fujimori らの方法[1]により、電気化学検出器付き高速液

体クロマトグラフィーで測定した。

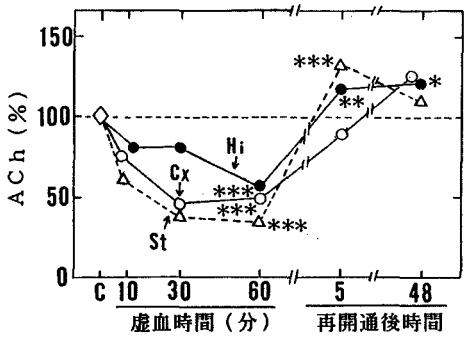
m-AChR 結合：断頭後直ちに摘出した脳各部位を５０倍量の assay buffer（50 mM phosphate buffer pH 7.4）でホモジェナイズした。20000g 15 分間遠心分離した pellet を同量の assay buffer にサスペンドし、さらに１０倍に希釈して膜標品とした。^{3}H-QNB（quinuclidinylbenzylate 42.6Ci/mmol NEN）をリガンドとし Luthin の方法[3]を一部改変して実験した。非特異的結合は atropine（1μM）存在下で測定した。

グルコースからの ACh の生合成とCO_2の産生：断頭後直ちに摘出した脳各部位より厚さ0.3mmの切片を作製し、^{14}C-glucose を基質としPeterson らの方法[5]を一部改変して用いた。すなわち、脳切片をフラスコ（気相を９５％O_2＋５％CO_2で置換）中にて^{14}C-glucose（5μCi、5mM）と 37℃ 1 時間反応させ、生成した^{14}C-ACh は ion-pair法により抽出し、^{14}C-CO_2はハイアミンにトラップして、それぞれの放射活性を測定した。

〔結　果〕

虚血・再開通による ACh 含量の変化

三部位において、虚血により経時的に ACh 含量は低下し、６０分間の虚血により有意に減少した（対照に比べて海馬で 57% 、大脳皮質で 50%、線状体で35%）（ Fig. 1 ）。しかし、６０分間虚血後再開通すると、５時間後において海馬と線状体では対照より有意に増加しており、２日後においても海馬では有意に増加していたが、線状体では対照レベルにもどった。



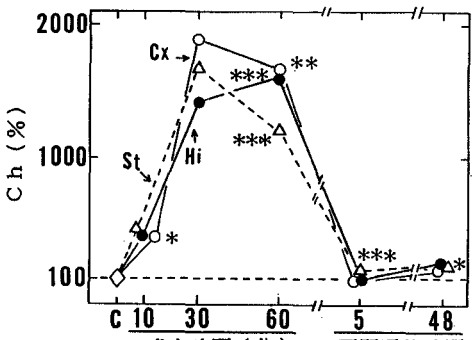
C：対照

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

Fig.1 虚血・再開通によるＡＣｈ含量の変化

虚血・再開通による Ch 含量の変化

Ch は、虚血によりその初期より著明に増大し（１０分間の虚血により三部位とも対照の約４倍）、３０分から６０分にかけて非常に高い値が持続した（対照の約１０－２０倍）（Fig.2）。この Ch の増大は血流再開通により回復して行き、海馬と大脳皮質では再開通５時間ですでに対照レベルにまで回復した。線状体においては２日後においても対照レベルまでには回復しなかった。



C：対照

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

Fig.2 虚血・再開通によるＣｈ含量の変化

虚血・再開通後の海馬切片におけるグルコースからの ACh 合成とCO_2の産生

６０分虚血直後と再開通２日後において海馬切片を作製し、グルコースからの ACh の生合成能とグルコースの代謝（CO_2の産生で表される）を測定した。３１mM の KCl により刺激した場合は、いずれの時間においても ACh の合成能とグルコース

Table 1 海馬切片における高濃度ＫＣｌの場合のグルコースからのＡＣｈ合成とグルコースの代謝に対する虚血・再開通の効果

	ACh合成	CO_2産生
対照	0.680±0.019	46.9±2.0
虚血60分後	0.684±0.029	41.3±1.7
再開通2日後	0.699±0.026	46.4±1.7

ＫＣｌは３１mM。
単位は、ＡＣｈ合成が nmol/mg protein/hr であり、CO_2 が nmol of glucose converted to CO_2/mg protein/hr である。例数は１０－１４例。

の代謝は変化しなかった（Table 1）。5 mM の KCl を用いた場合においては、60分の虚血ではグルコースの代謝は有意に低下し、再開通2日後においては、AChの合成能・グルコースの代謝ともに有意に低下した（Table 2）。

Table 2 海馬切片における通常のKCl濃度の場合のグルコースからのACh合成とグルコースの代謝に対する虚血・再開通の効果

	ACh合成	CO_2産生
対照	0.308±0.010	24.1±0.8
虚血60分後	0.293±0.010	22.0±0.5 *
再開通2日後	0.241±0.007 ***	18.8±1.2 **

KClは5mM。
*p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001（それぞれの対照と比較して）。
例数は全て12例。

虚血&再開通後の m-AChR 結合

postsynapse に対する作用として、m-AChR 結合に対する虚血&再開通の効果を検討した（Table 3）。しかし、再開通2日後において、海馬・線状体・大脳皮質における m-AChR 結合のKd 値とBmax は、線状体における Kd 値に減少の傾向が認められる他は、変化なかった。

Table 3 虚血&再開通後の m−AChR 結合

	Kd値		Bmax	
	対照	再開通2日後	対照	再開通2日後
海馬	50±5	50±3	1.1±0.1	1.0±0.1
大脳皮質	52±2	47±3	1.1±0.1	1.1±0.1
線状体	64±8	44±3	1.2±0.1	1.1±0.2

単位は、Kd値が pM で、Bmaxが pmol/mg protein である。
例数は全て3例。

〔考　察〕

虚血により ACh 含量の低下と Ch 含量の著しい増大が認められ、海馬と線状体においては再開通により ACh 含量が逆に対照レベル以上に増大する事が明らかとなった。虚血による ACh 含量の低下は、脳切片を用いた in vitro の実験において ACh の合成が低酸素により低下する事が示されている(2)事を考え合せると、in vivo においても虚血中は ACh 合成が低下している可能性が考えられる。さらに、その ACh 含量は60分間の虚血でも完全には無くならない事から、虚血中は ACh の遊離も同時に低下していると推測される。しかし、ACh のコンパートメントの違いの可能性は否定できない。虚血60分後のグルコースからの ACh の生合成は、in vitro で反応させる時に気相を95%酸素で置換して行っているため、虚血中の状態よりむしろ再開通した場合の ACh の合成の能力を表していると考えられるが、この合成能は虚血60分直後において全く変化しなかった。よって、再開通5時間後における海馬・線状体での ACh 含量の増大の原因として、遊離量が合成量を下回った可能性が考えられる。また、再開通2日後での海馬切片におけるグルコースからの ACh 合成は低下しており、これは再開通2日後における脳内コリン作働性神経系の障害を示唆するものと考えられる。

以上の様に、脳内コリン作働性神経系は虚血中だけでなく再開通後も障害を受ける事が示唆された。そして、虚血・再開通時の ACh 含量の変化は合成と遊離の平衡の崩れによると考えられ、今後更に詳細な検討を行う予定である。

〔引用文献〕

(1) Fujimori,K.and Yamamoto,K. (1987) J.Cromatogra. 414, 167-173
(2) Ksiezak,H.J. and Gibson,G.E. (1981) J.Neurochem. 40, 305-314
(3) Luthin,G.R. (1984) J.Pharmacol.Exp.Ther. 228, 648-655
(4) Matsui,Y.,Yamagami,I.,and Iwata,N. (1987) Japan.J.Pharmacol. 43, 58P

162. 報酬学習と逃避／回避学習におけるラット脳内ノルアドレナリン代謝の差異

津田　彰・井田能成・白尾一正・小口雅申・
田中正敏　（久留米大・医・薬理）

〔要　約〕

学習と脳内noradrenaline(NA)代謝との関連性について検討するために、餌強化による報酬学習と電撃からの逃避/回避学習をWistar系雄性ラットに1時間行わせた後、脳各部位におけるNAの主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO_4)の含量を蛍光法で定量した。餌を強化子、回転カゴの輪回しを強化反応とした報酬学習では、強化随伴性があった実験群にのみ学習の成立を認めたが、MHPG-SO_4含量は測定した脳部位(視床下部、扁桃核、海馬 etc.)で、実験群、ヨークト群(反応と関係のない強化を受ける)と対照群(強化を受けない)間で異ならなかった。電撃を強化子、輪回しを強化反応とした逃避/回避学習では、実験群にのみ学習成立を認めた。しかし、この時の実験群及びヨークト群のMHPG-SO_4含量は対照群と比べて、また報酬学習条件と比べて、測定した総ての脳部位で有意に増加した。特に海馬では、実験群のMHPG-SO_4含量はヨークト群のそれよりも有意に高かった。これらの結果より、脳内NA作動性神経活動の関与の仕方が学習課題、つまり強化子の違いによって異なることが示唆された。

Key word：Rat brain noradrenaline turnover, MHPG-SO_4, Learning and/or memory

記憶と学習の神経生物学的機構に関する研究が、現在様々な角度から盛んに試みられているが、そのアプローチ法の1つに、学習に伴う脳内の神経伝達物質の変化を調べることによって記憶と学習の脳内過程を解明しようとする研究がある(6)。Kovácsら(5)は、受動的回避学習に伴い大脳辺縁系(歯状回、扁桃核)のnoradrenaline(NA)代謝回転が亢進することを、我々も同様に、フリーオペラント逃避/回避学習の初期に、実験群の視床下部などのNA代謝回転がヨークト群と比べて、選択的に亢進することを見出だした(7)。このような知見は、脳内NA作動性神経系の機能を低下させる薬物が記憶・学習を阻害するという報告(1)と一致しており、脳内NAがオペラント学習の習得段階に重要な役割を果たしていることを示唆している。しかし、学習に伴う脳内NA代謝回転の変動が学習課題の性質ーすなわち、生体が餌などの強化子を求めようとする報酬学習か、電撃などの強化子から逃れようとする逃避/回避学習かーとどのような相互作用を有しているのか、ほとんど検討されていない。そこで今回、脳内NA作動性神経系の学習過程への関与をさらに明らかにするために、回転カゴによる報酬学習と逃避/回避学習後の脳各部位のNA代謝回転の変化を比較検討した。

【　方　法　】

被験体と装置

Wistar系雄性ラット(200-230g)48匹を被験体とした(1群8匹)。装置はステンレス鋼棒を3cm間隔で格子床にしたアクリル製回転カゴ(直径36cm、幅12cm)を2台使用した(室町機械株式会社)。回転カゴの輪回し反応は近接スイッチによって検出され、強化数

と同様にして、カウンターに表示された。

学習獲得手続き

餌を強化子、輪回しを強化反応とする報酬学習条件と電撃を強化子、輪回しを強化反応とする逃避/回避学習条件の2つを設定し、ラットを次の3群に分類した：実験群－自らの輪回し反応が餌あるいは電撃停止の強化をもたらす；ヨークト群－実験群のパートナーとして、反応にかかわらず、実験群ラットが餌あるいは電撃を得たときに同じ強化を受ける；対照群－装置に入れられるだけで、強化を受けない。報酬学習条件では、実験群による5回の輪回し反応に対して餌粒(45mg)を1個、食物ディスペンサーを通じて実験群とヨークト群の餌皿に落とした。逃避/回避学習条件では、実験群ラットによる1回の輪回し反応によって床格子電撃(1mA, 0.5sec持続時間, 5secパルス間隔)の開始と停止がコントロールされ(反応-電撃間隔 20sec)、実験群とヨークト群は同じ時期に同じ回数、同じ強度の電撃を受けた。

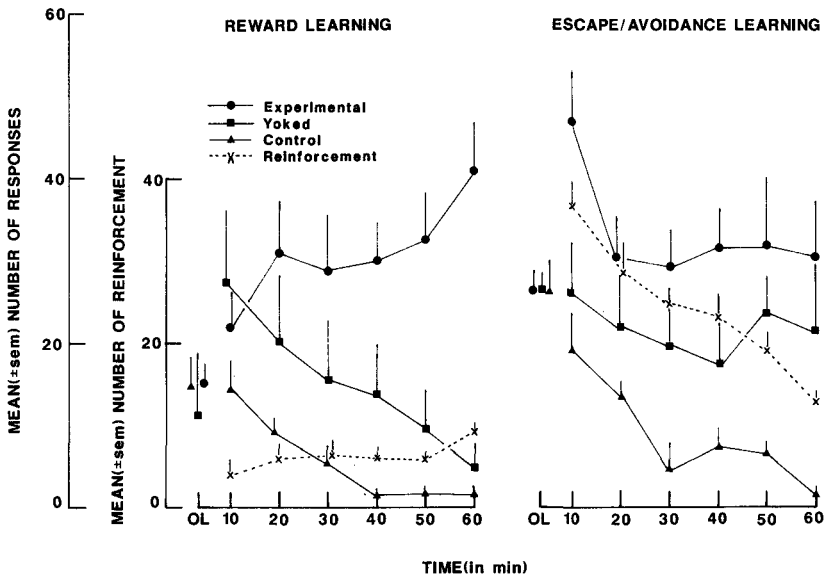


Figure 1. Mean (± sem) number of running responses emitted by the experimental, yoked and control groups and mean (± sem) number of reinforcements received by the experimental and yoked groups during a 1-hr acquisition session preceded by a 5-min operant level (OL) period in the reward learning and escape/avoidance learning conditions.

生化学的定量

1時間の学習獲得セッション終了後、ラットを断頭し、脳をGispenらの方法(3)に準じて視床下部、視床、扁桃核、青斑核部、海馬、大脳皮質、中脳、基底核に分割した。これら脳部位の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)。統計的有意差検定には、3元配置(学習条件×群×時間)分散分析(ANOVA)とTukeyの多重比較法($p<0.05$)を適用した。

【 結果と考察 】

ANOVA分析によれば、反応-強化随伴性を有していた実験群ラットにのみ、輪回し反応による報酬学習と逃避/回避学習が成立したことが示された(図1)。報酬学習条件ではセッションの進行とともに、実験群ラットによる輪回し反応数と餌強化数の増加、逃避/回避学習条件では反応の安定維持と被電撃数の減少が認められた。これに対して、強化随伴性の無いヨークト群と強化を受けなかった対照群の反応は両条件ともに

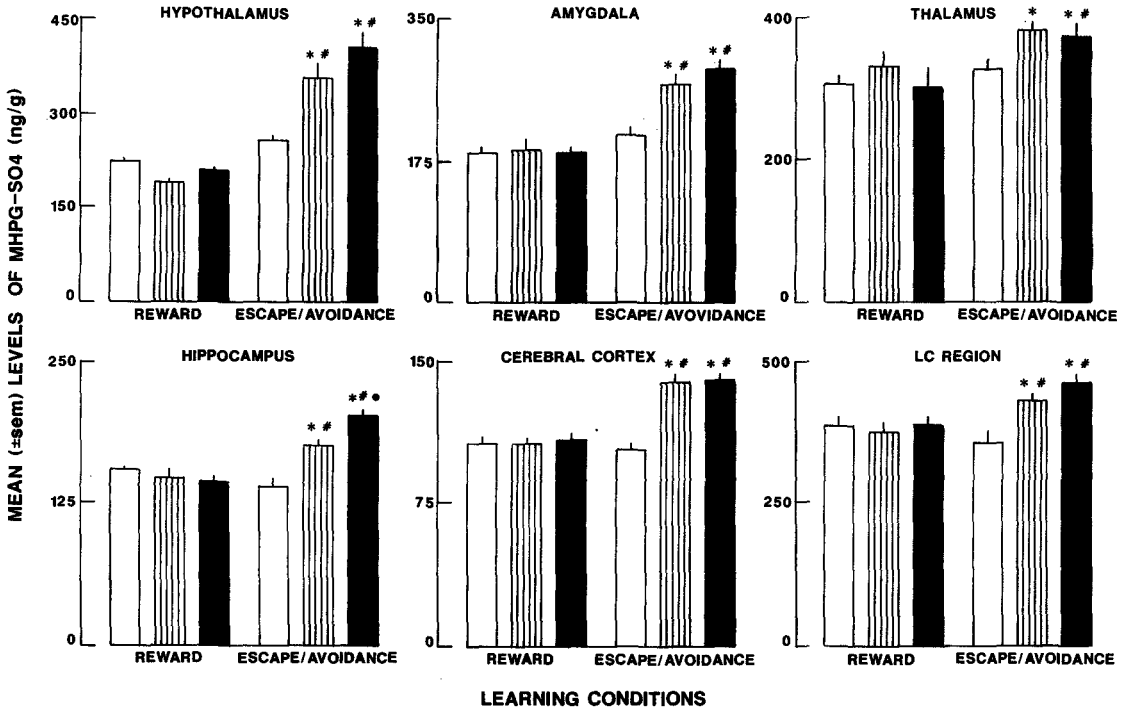


Figure 2. Mean (±sem) levels of MHPG-SO_4 in various brain regions of the experimental (■), yoked (▥) and control rats (□) after a 1-hr reward learning and a 1-hr escape/avoidance learning.
* vs. control group, ● vs. yoked group, # vs. respective reward learning condition ($p < 0.05$).

漸次減少した。図2から明らかなように、MHPG-SO_4含量には報酬学習後の実験群、ヨークト群、対照群間に測定した脳部位すべてで有意な差を認めず、脳内NA代謝回転の大きな変化は報酬学習後には認められないという前の結果と一致した(2)。一方、逃避/回避学習後のMHPG-SO_4含量の変化は対照群と比べて、実験群とヨークト群のすべての部位で有意に増加し、この増加は報酬学習のそれと比べても有意であった。また実験群のMHPG-SO_4含量は、ヨークト群より一般に高値を示し、特に海馬では有意に高かった。これらの結果より、学習獲得に伴う脳内NA代謝回転の変動は報酬学習と比べて逃避/回避学習で著しいこと、しかもその変動の程度には部位差が存在すること、強化随伴性を反映した群間差が見られることなどが明らかにされた。

【 引用文献 】

(1) Anisman H 1978 In Psychopharmacology of aversively motivated behavior (H Anisman & G Bignami eds.), Plenum: New York, Pp.1-62. (2) de Castro JM & Duncan G 1985 Pharmacol Biochem Behav 23: 495-500. (3) Gispen WH et al. 1972 Neuroendocrinology 9: 285-296. (4) Kohno Y et al. 1979 Analyt Biochem 97: 352-358. (5) Kovács GL et al. 1981 Life Sci 28: 1109-1116. (6) Marler P & Terrace HS (eds.) 1984 The biology of learning, Springer: Berlin. (7) Tsuda A & Tanaka M 1985 Behav Neurosci 99: 802-817.

《本研究は、昭和60～62年度文部省科学研究費補助奨励研究(A)(課題番号60710097, 61710096, 62710095)による援助を受けた。》

163. ラット条件回避学習におよぼすcyproheptadineの作用
——セロトニン作動神経系の関与

松本　明・九穂泰三・芝軒信次・石川紘一
（日本大・医・薬理）

〔要　約〕

ラットにシャトル・ボックス型の明暗弁別回避学習を90試行行わせ，暗室内で1.0 mAの電撃ショックが加わり，明室内に回避することを習得させた。この習得過程の終了直後に脳内 5-hydroxytryptamine (5-HT) の競合拮抗剤である cyproheptadine を投与すると，3 週間後に行った保持テストの正解率が用量依存的に低下した。薬物の投与を習得過程が終了してから2 時間後に行った場合には，正解率の低下は認められなかった。ラットに門脈—大静脈吻合を行うと，脳内の芳香族アミノ酸は増加し，この際に脳内の 5-HT 代謝産物である5-HIAAは有意に増加し，5-HTの代謝回転速度も有意に増加していた。一方門脈—大静脈吻合を施したラットに回避学習を行わせたところ，無処置動物と同様な学習曲線で回避行動を習得した。この動物にcyproheptadineを投与したところ，無処置動物では保持テストの正解率を抑制するような用量でも抑制は認められず，薬物の用量を増加した場合に正解率は有意に低下した。この場合にも薬物の投与時期が影響し，習得過程の終了直後に投与した場合には抑制されたが，2 時間後に投与した場合には抑制は起こらなかった。これらの結果は，ラット明暗弁別回避学習の習得に，脳内セロトニン作働神経系が関与していることを意味している。

Key word：　Discrimination learning, Rats, Serotonergic system.

我々は既に，ラット明暗弁別学習を用いた実験で，学習終了直後海馬5-HT活性が一過性に上昇し，学習終了1 時間後にはコントロール・レベルにまで回復することを明らかにした[1]。また他の研究施設で行われた哺乳動物を用いた実験においても，セロトニン作働神経系が学習・記憶に関係している可能性を示唆する結果が数多く発表されている[2-4]。そこで今回の実験は，記憶の形成に対するセロトニン作働神経系の関与について，新たな証拠を示す目的で，5-HTの競合拮抗剤とされている cyproheptadine (CYP) の条件回避学習におよぼす作用を検討し，同時に脳内5-HTの代謝に重大な影響をおよぼすことが知られている，門脈—大静脈吻合 (PCA)の影響について研究を行った。

<<実験方法>>

実験には体重約200gのWistar系雄性ラットを使用した。動物は外界からのストレスを極力避ける目的で，恒温・恒湿の部屋で飼育後実験に供した。CYP は Sigma (St. Louis, MO, USA) より購入し，この薬物の投与にあったては ethanolに溶解して腹腔内に投与した。PCA は Funovics 等の方法[5] に準じて腹部正中切開後門脈断端と下大静脈の間に端側吻合を形成し，手術終了後2 週間を経過した後実験に供した。

学習にはシャトル・ボックス型の明暗弁別回避学習装置を用いた。この装置は20 x 25 x 20 cm のコンパートメントをU-字型をしたゲートでつなぎ，明室と暗室とにわけた。動物を学習装置の中に入れ10分間放置後，動物のいない側のコンパートメントを明室として学習を開始し，点灯10秒後に暗室に1.0 mAの直流電流が流れるようにセットした。この間に動物が明室に移動した場合正解とし，不正解試行となった場合には，動物が逃避するまで（最長60秒）電撃を続けた。動物が回避または逃避すると，その後60秒間電球を消し，休憩とした。その後再び動物のいない側のコンパートメントを明室として学習を繰り返した。この学習は90試行ずつ行った。保持テストは3 週後に30試行ずつ行った。これら学習および保持テストはすべてコンピュータで制御されており，装置内での運動量等行動学的指標はすべてモニターした。

脳内モノアミン関連物質の定量は，既に発表した電気化学検出器を装着した高速液体クロマトグラフィーで行った[6]。この方法により，脳内のモノアミン伝達物質である noradrenaline (NA)，dopamine (DA)および 5-HT をその前駆アミノ酸および代謝産物と同時に定量することが可能であった。なおこの定量に用いた脳試料は，microwave 照射後 Glowinski and Iversen[7] の方法に準じて得られたものである。またモノアミン伝達物質の代謝回転速度は75 mg/kgの pargylineを腹腔内に投与し，2 時間後のアミンの増加率より測定した。

<<実験結果>>

①明暗弁別学習について：獲得試行は90回行ったが，これを10試行ずつの9 セッションに分けて検討したところ，正解率は第3 セッションより増加し，第7 セッションあたりでほぼプラトーとなった。この時の正解率は約90% であり，この値は無処置動物においても，PCA 動物においても同様であった。予備実験として，獲得試行終了後1 日目，1，3，12，24週目に保持テストを行ったところ，12週目までの間隔では，獲得試行時の正解率と保持テストの時の正解率の間に有意の差は認められず，24週後の保持テストにおいて有意の低下が認められた。このことを確認した上で獲得試行終了直後にCYP を投与し3 週後に保持テストを行ったところ，無処置動物の場合0.1 mg/kg では正解率に有意の差は認められなかったが，1 mg/kg 以上の投与量では正解率が有意に低下した (Fig. 1)。一方同様の比較をPCA ラットについて行ったところ，1 mg/kg のCYP では正解率に有意の差を認めず，さらに増量して10または30 mg/kgを投与した場合に有意の差が認められた。つぎにCYP の投与を獲得試行終了2 時間後に行った場合，無処置動物 (1 mg/kg)でもPCA 動物 (30 mg/kg) でも正解率に有意の低下は認められなかった (Fig. 2)。

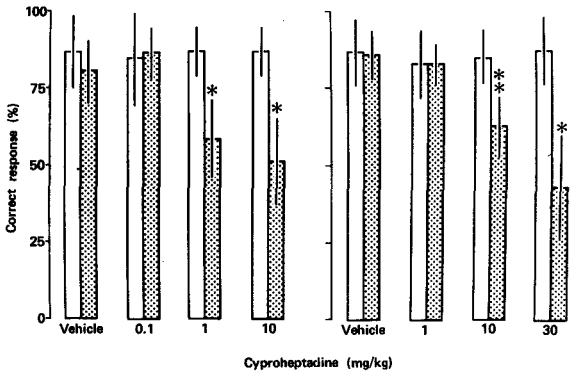


Fig. 1. Effects of cyproheptadine on the retention of avoidance in intact (left) and PCA (right) rats. The corresponding pairs of columns show the final correct response in acquisition (open column) and in the retention trial (shadowed column). * and ** show significant difference from the acquisition at P<0.01 and P<0.05, respectively (t-test).

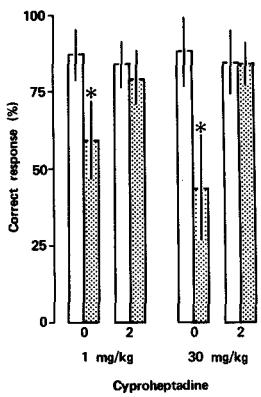


Fig. 2. Time dependent effects of cyproheptadine on avoidance in intact (left) and PCA (right) rats. * Significantly different from acquisition (open column) at P<0.01 (t-test).

②脳内モノアミン関連物質の変化について：PCA を行った動物においては脳内各部位のモノアミン前駆アミノ酸，すなわちチロシンおよびトリプトファンが著しく上昇していた。モノアミン伝達物質であるNA，DAおよび5-HT濃度は著しい変化はなく，一部の部位で5-HTに有意の差が認められた程度であった。これに対して代謝産物の変化は特徴的で，カテコールアミンの代謝産物には有意の差がなかったのに対して，5-HTの代謝産物である5-HIAAは測定を行ったすべての部位においてPCA 動物の方が有意に高い値を示した (Table 1)。また5-HTの代謝回転速度においても，脳内諸部位で有意に高くなっていた (Table 1)。

<<考察>>

CYP を獲得試行終了直後に投与すると保持テストの正解率が低下した。しかし，同用量の薬物を獲得試行終了2 時間後に投与した場合，正解率の低下は認められなかった。Hunter等は学習行動に対する薬物の影響

Table 1. Effect of portacaval anastomosis on the serotonergic activity in dissected brain regions of rats.

Region	Treatment	Concentration (ng/g wet tissue)			Turnover (ng/g/hr)
		Tryptophan	5-HT	5-HIAA	
Hippocampus	Sham	3557± 392	528±20	556± 48	441± 46
	PCA	9471± 984*	556±48	794± 86*	627± 91*
Striatum	Sham	3510± 333	577±52	539± 32	512± 36
	PCA	9500±1422*	583±48	787± 51*	552± 50
Hypothalamus	Sham	3632± 343	819±23	661± 56	734± 31
	PCA	7499± 954*	913±62	890± 31*	1166± 91*
Midbrain	Sham	3761± 776	796±54	604± 51	763± 79
	PCA	10396±1254*	921±58*	1051±105*	1323±219*

*Significantly different from sham group ($P < 0.01$).

を検討し，今回のように獲得試行終了直後に影響し，一定時間後に投与した場合には影響がないような薬物の作用を consolidation過程に対するものであろうと結論している[8]。したがって今回の結果は，CYP がこの過程を障害したためと考えることができる。CYP は5-HT受容体の競合拮抗剤であるから，consolidation の阻害作用がセロトニン作働神経系を介して発現したと考えられる。この結果はこれまでの生化学的[1] または薬理学的[2-4] 結果と一致するものである。PCA を行うとこの学習習得過程に対するCYP の阻害作用は減弱した。PCA を行うと肝臓における芳香族アミノ酸の分解が抑制され，生体内の tyrosine や tryptopohanの増加が起こる。これらのアミノ酸はカテコールアミンやインドールアミンの前駆物質となっているが，カテコールアミン合成系においてはその律速酵素であるチロシン水酸化酵素が基質で飽和されており，tyrosine が増加しても脳内の NA や DA は増加しない。しかし，5-HTの合成系においては生体内で基質は不飽和状態にあり，tryptophanの増加に伴い脳内5-HTの増加が起こるものと考えられる。この結果，脳内5-HTの代謝回転が促進し，5-HTの遊離が増加したため，CYP の受容体遮断作用が抑制されたものであろう。このことは，CYP の投与量を増加すれば学習の習得は抑制され，薬理学的にみれば用量—作用曲線の右方移動を示すもので，この事実からもこの仮説は支持される。以上のようにセロトニン作働神経系が，ラット条件回避学習の習得に重要な意義をもつものと考えられる。

<<文　献>>

1. Shibanoki, S. et al. (1982) Neurosciences 8, 333-337.
2. Archer, T. et al. (1981) Neurosci. Lett. 25, 75-81.
3. Altman, H.J. et al. (1984) Psychopharmacology 84, 495-502.
4. Ogren, S.D. (1985) Acta Physiol. Scand. [suppl.] 544, 1-71.
5. Funovics, J.M. et al. (1975) Surgery 77, 661-664.
6. Glowinski, J. and Iversen, L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669.
7. Ishikawa, K. and Shibanoki, S. (1985) Anal. Biochem. 147, 441-450.
8. Hunter, B. et al. (1977) Handbook of Psychopharmacology (Iversen, L.L., Iversen, S.D. and Snyder, S.H. eds.) pp. 139-166.

164. マウスの回避学習に及ぼすdithizoneの影響

村上哲英・根本哲郎　　（香川医大・生物）

〔要　約〕

先に我々はマウスの腹腔内にヂチゾンを投与すると，Timm法による組織化学的亜鉛反応が一過的に陰性になり，同時に慢性的に海馬に植え込んだ双極電極から誘導した海馬脳波も一過的に消失し，その後両者共に次第に回復し始めることを報告して来た今回我々は回避学習用実験動物として開発を続けているddN系マウスを用い，jump-boxによる回避学習に及ぼすヂチゾンの影響を調べた。同時に移動活性度，血糖値及び原子吸光光度計による全脳及び海馬の亜鉛及び銅含有量に及ぼす影響を調べた。ヂチゾン100mg/kg，50mg/kgを腹腔内投与すると，移動活性度は10分以内に急激に減少し，うずくまる様になる。ヂチゾン100mg/kg腹腔内投与による血糖値の減少は投与後１２０分の間全く認められなかった。又，全脳及び海馬の亜鉛及び銅の含有量は，ヂチゾン投与により，海馬で亜鉛がわずかに増加した。回避学習直前に50mg/kgのヂチゾンを投与し，５分間10試行を行うと，学習の成立は僅かに抑制されたが，１週間後の再学習では記憶の保持が著しく阻害されていた。しかし，５分間10試行の直後の投与では，１週間後の再学習では対照と差が認められなかった。この事は，ヂチゾンは記憶の固定過程を阻害しているのではないかと考えられる。

Key word：　dithizone, zinc, avoidance task.

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。そして，この亜鉛は海馬領域の苔状線維の終末に存在し，苔状線維のシナプス伝達に関与しているのではないかと考えられる実験結果が次第に多くなって来ている。先に我々は[2,3]，ddN系マウスを用い，重金属のキレート剤の一種であるヂチゾンを腹腔内に投与すると，組織化学的にはTimm反応が一過的に完全に消失し，このTimm反応の陰性化とほぼ一致して，海馬脳波も完全に消失する。そして，脳波の回復はTimm反応が先行して現れる。又，脳波の消失している時期に酢酸亜鉛を腹腔内に投与すると，脳波は直ちに回復し始めるが，Timm反応は依然として陰性のままであることを報告した。今回は，ddN系マウスを用いjump-boxによる回避学習を行い，学習直前と学習直後にヂチゾンを投与し，脳波の一過的な消失やTimm反応の一過的な陰性化に伴う，亜鉛の関与する神経回路網の失活が，学習の成立や記憶の保持に如何に関与しているかを調べた。その結果，学習開始直前にヂチゾンを投与した場合，一週間後の再学習による記憶の保持は著しく阻害されているのに対し，学習直後にヂチゾンを投与して，一週間後の再学習による記憶の保持には何等の影響も与えない事を見出した。この事は，ヂチゾンは記憶の固定過程を阻害しているのではないかと考えられるので，ここに報告する。

実験方法

回避学習用の実験動物として近交系の育成を続けているddN系マウス F50代以上の雌雄を用いた。実験開始時，生後2～3ヶ月，体重25～35gであった。

dithizone（和光特級）は前報[2,3]に従ってアンモニア性エノール型として用いた。

ヂチゾン100mg/kg,50mg/kg及び25mg/kgを腹腔内に投与後，5,10,30,60,90,120分の各時間にPérez-Clausell[4]とDanscher法に従い，Timm反応による組織化学的亜鉛の消長を調べた。又，ヂチゾン100mg/kg及び50mg/kgを腹腔内に投与し，直ちに室町機械社製MK-Animex SE型で5分間隔で移動活性度を測定した。更に，無処理のマウスを対照とし，ヂチゾン100mg/kgを腹腔内に投与し，30分後に断頭し，速やかに脳を摘出し，全脳，及び6匹分の脳を正中で矢状断にし，海馬領域を摘出し，石英坩堝中で110°C 16時間乾燥の後 550°Cで20時間灰化，3M HNO に溶解の後，島津社製原子吸光光度計AA 630-01 型を用いて亜鉛及び銅の湿重量当りの含有量の変化を測定した。又ヂチゾン投与により，低血糖を来し，昏睡により脳波の消失が生じたのではないかと考えられる事から，マイルス・三共株式会社製デキストロステックスを用いて，血中ブドウ糖の測定を行った。測定には，マウスにヂチゾン100mg/kgを腹腔内に投与し，投与前を対照とし，10分後及び30分間隔でマウスの尾部を切断し採血して行った。

回避学習は既報[1]のようなjump-boxを用いて行った。条件刺激のみで回避した場合には正の解答とし，無条件刺激を受けて回避した場合には負の解答とする。1試行30秒で連続10試行，計5分間を行う。ヂチゾンは毒性が高く，もし100mg/kgを腹腔内に投与すると，24時間以内に死亡する，LD50は 50mg/kgであった。そこで，無処置のマウスを対照とし，学習開始直前にヂチゾン 50mg/kgを腹腔内に投与し，直ちに第一回目の10試行を行い，学習の成立に及ぼすヂチゾンの影響を調べた。続いて一週間後に再学習の10試行を行い，記憶の保持に及ぼすヂチゾンの影響を調べた。又，第一回目の10試行を行った直後にヂチゾン 50mg/kgを腹腔内に投与し，一週間後に再学習の10試行を行い，記憶の保持に及ぼす影響を調べた。

実験成績並びに考察

Timm反応による脳内の亜鉛の分布は，既報[2]のように海馬のCA3,CA4,歯状回門の放射層に強陽性に認められる。ヂチゾン25mg/kg 以上を腹腔内に投与すると，投与後5分で既に海馬の CA3の放射層からTimm反応は陰性に転じて来る。10分後には CA4の放射層も陰性に転じ，歯状回門のみが陽性である。30分後には全ての部分が陰性となる。60分後には歯状回門から陽性に回復し始め，90分後には全て陽性となる。

移動活性度はヂチゾン100mg/kg,50mg/kgを投与すると，最初の10分以内に共に急激な移動活性度の低下が見られる（$P<0.001$）。この時間的変動を図1に示す。ヂチゾン100mg/kg投与による血糖値の時間的経過を表2に示す。血糖値の減少は認められず，既報[2]のヂチゾン投与による海馬脳波の消失は低血糖による昏睡に起因しているものでない事を実証したものと考えられる。ヂチゾン100mg/kgを投与すると，Timm反応は全ての海馬領域で陰性となる事から，全脳及び海馬領域の亜鉛含有量の変化を測定した結果を表1に示す。全脳ではヂチゾン投与による亜鉛含有量の変化は認められず，海馬領域の亜鉛含有量がわずかに増加していた。この事はキレートされた亜鉛は細胞内に留まっていて，細胞外に移動し難いのではないかと考えられる。

回避学習による学習の成立と，一週間後の再学習による記憶の保持に対するヂチゾン 50mg/kg投与の影響を調べた結果を図2に示す。対照の第一回目10試行の成績は .9±1.0(3) であるのに対し，ヂチゾン 50mg/kg投与の場合は 2.6±1.8(1)で有意に（$P<0.01$）に学習の成立が阻害されている。これは移動活性度の低下に起因している

図 1

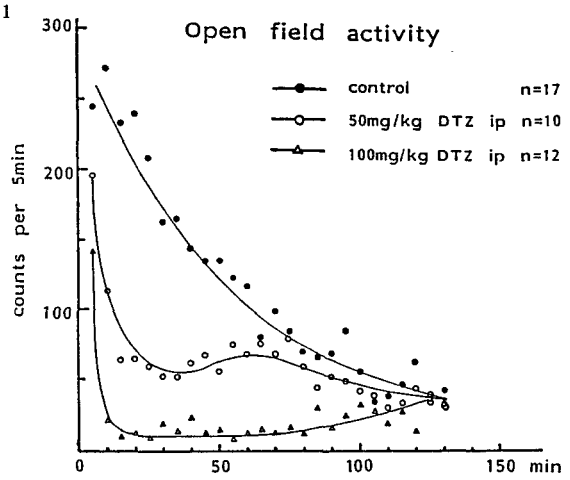


図 2

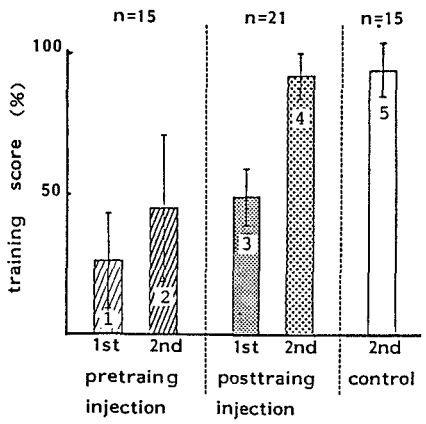


表 1

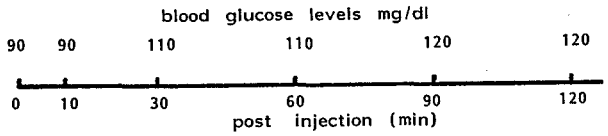
Whole brain

	n	Zn(μg/g)	Cu(μg/g)
Control	6	11.4±1.4	2.2±0.25
DTZ 100mg/Kg,30min.	6	11.4±1.6	2.8±0.31

Hippocampus

	Zn(μg/g)	Cu(μg/g)
Control	11.8	3.5
DTZ 100mg/Kg,30min.	14.0	4.2

表 2



と思われる。そして，一週間後の第二回目の成績(2)は，対照の第一回目の成績(3)との間に差は認められない。これは学習の成立が不充分であったためとも考えられるが，最初の正反応を示した時点で学習を中止し（平均6試行目），一週間後の再試行の成績ではすでにこの間に学習は成立している成績を得ている（未発表）。即ち，学習前投与による成績は(1)(2)，移動活性度低下による学習成績の低下の他，記憶の保持が阻害されたのではないかと考えることが出来る。第一回目の10試行直後にヂチゾンを投与し，一週間後に第二回目の10試行を行った成績は9.3±0.8（4)で，これは対照の9.4±0.7(5)と差は認められない。学習前，学習後にヂチゾンを投与した時間差は5分間であり，この間に記銘が行われたのではないかと考えられる。ヂチゾン投与による一過的なTimm反応の陰性化や脳波の消失は，学習が一旦成立してしまえば記憶の保持には大きな影響を及ぼさないのではないかと考えられる。

図の説明

図1．移動活性度の測定結果。図2．(1)(2)学習前投与，(2)は(1)の一週間後の再学習の成績，(3)(4)学習後投与，(4)は(3)の一週間後の再学習の成績，(5)対照，再学習の成績。表1．亜鉛含有量の変化。表2，血糖値の変化。

参考文献

1．村上哲英（1980）神経進歩，24，948-961．　2．根木哲郎・村上哲英（1986）神経化学，25，547-549．　3．根木哲郎（1986）日本生理誌，48，673-684．
4．Pérez-Clausell,J. & Danscher,G.(1985) Brain Res., 337, 91-98.

165. α-リノレン酸の脳内脂質変化と学習行動変化

野村正彦・玉井洋一*・奥山治美**・
（藤田学園保衛大・医・生理，北里大・医・生化*・
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、調合飼料で飼育したラットの学習実験を行った。調合飼料はリノール酸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）を使用した。そして、ラットの二世代目に、脳内脂質分析およびオペラント型明度弁別学習成績の変化を検索した。

二種の餌間での脳内総脂質含有量、糖脂質組成（Ceramide monohexoside, Sulfatide, Ganglioside）、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、ＰＥ餌群はリン脂質の脂肪酸組成では、α－リノレン酸（ｎ－３）系列の脂肪酸含有量が高く、糖脂質ではSulfatideの18:1が高かった。

学習成績はＳＡ餌群がＰＥ餌群よりも、負の反応数が高かった。したがって、全学習課題３０日間の正反応率はＳＡ餌群が５９％と低く、ＰＥ餌群が６６％と学習成績に有意差を示した。これは、普通飼料飼育群の６３％を上回る成績であった。

即ち、α－リノレン酸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可能性が考えられる。

Key word：Alpha-linolenata, Glycolipids, Discrimination Learning.

脳を構成する活性物質を、量的に変化させる事ができれば、容易に実験モデル動物の作製が可能である。即ち、動物を飼育する餌の組成を変える事により、容易に活性物質を変動させた実験動物ができる。そして、これら実験動物の脳の高次機能の一つである弁別学習能力を調べて、活性物質の変動に対応した機能変化を学習成績を指標に調べる事が可能である。今回はラットの脳内脂質構成を変える為に、餌に含まれるの脂質組成を変えて飼育し（1,2）、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構成脂質の機能の一端を明らかにしようとした。

〔方法〕

１．実験動物：Donryu系ラットを、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もこれらの餌の下で飼育し、１２週齢になって以下の実験を始めた。各３群はともに、１０匹ずつの個体を使用した。

２．飼料：実験群の脂質源としてSafflower oilおよびPerilla oil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（オリエンタル製ＭＦ）を用いた。各飼料の脂肪酸組成はＳＡが飽和脂肪酸：１１％、モノエン酸：１０％、リノール酸７８％、α－リノレン酸：０．０５％、に対して、ＰＥが飽和脂肪酸：１１％、モノエン酸：１０％、リノール酸：１２．８％、α－リノレン酸：６４％、であった（11）。

３．脂質の分析：脳はchloroform/methanolで総脂質を抽出した。さらに、DEAE-SEPHAROSE, IATROBEADS, PREPARATIVE TLC, SEPHADEX G-25等により各種脂質を単離精製した（8）。Ceramide monohexoside, Cerebroside sulfate ester (sulfatide) は chloroform/methanol/28 %NH_4OH (32:8:1)、また Ganglioside は chloroform/methanol/water(5:5:1)、で

抽出した。Ceramide monohexoside および sulfatide は薄層クロマトグラフィー上で、２Ｎオルチノールスプレイ後、540/700 ｎｍでクロマトスキャンナーによるデンシノメトリで定量した。そして、Ganglioside は resorcinol 試薬で、N-acetylneuramic acid として定量した。また各糖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分析定量した。

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。学習課題はスキナー箱にある明度呈示窓に、１０００対１の明度差を弁別させる Multiple VI-15 Seconds Extinction 下 (5,10) 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－)］ｘ１００で比較した。

［結果及び考察］

表－１　Glycolipid compositions of brains of rats fed the safflower diet or perilla diet

Part of brain	Glycolipids	Glycolipid contents (mg/g wet weight) Safflower		Perilla	
Cerebrum	Ceramide monohexoside	13.2±1.0	(n=2x3)	13.8±0.9	(n=2x3)
	Sulfatide	3.5±0.5	(n=2x3)	3.5±0.6	(n=2x3)
	Gangliosides	1.1±0.2	(n=3x1)	1.2±0.1	(n=3x1)
Cerebellum	Ceramide monohexoside	16.6±1.1	(n=2x3)	15.8±1.4	(n=2x3)
	Sulfatide	3.8±0.4	(n=2x3)	3.9±0.6	(n=2x3)
	Gangliosides	0.6±0.1	(n=3x1)	0.6±0.0	(n=2x1)

(means ± s.e.)

ＳＡ餌およびＰＥ餌飼育条件下での脳内糖脂質の分析の結果は、表－１に示した。大脳および小脳はともに、Ceramide monohexosideが高濃度存在し、ついで sulfatide で、Ganglioside はさらに低かった。しかし、ＳＡ餌群とＰＥ餌群間の含有量には、大脳および小脳ともに差はなかった。

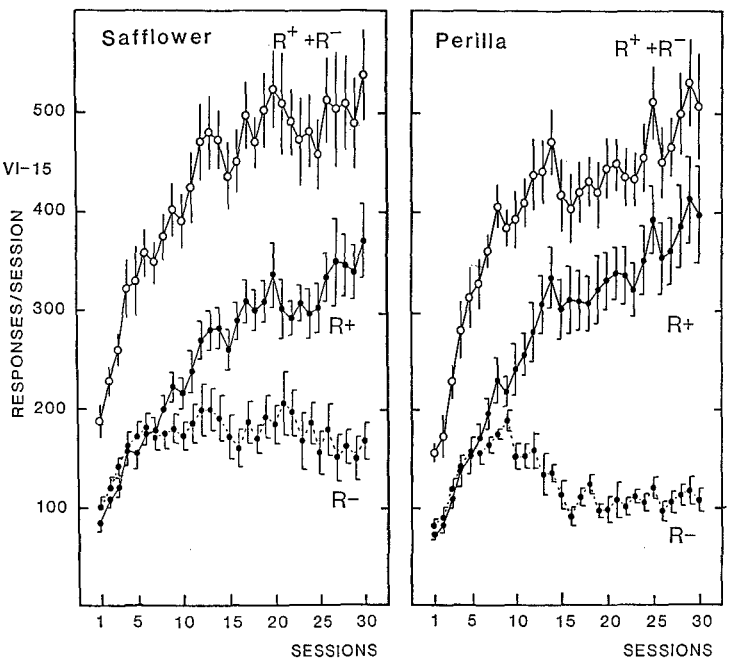
表－２．ＳＡ餌およびＰＥ餌飼育ラットの大脳糖脂質の脂肪酸組成

Fatty acid	Ceramide monohexoside Safflower (n=2x3)	Ceramide monohexoside Perilla (n=2x3)	Sulfatide Safflower (n=2x3)		Sulfatide Perilla (n=2x3)		Ganglioside Safflower (n=2x3)		Ganglioside Perilla (n=2x3)	
16 : 0	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.0	2.5 ± 0.2	*	3.0 ± 0.2		1.5 ± 0.1	*	1.5 ± 0.1	
16 : 1	–	–	–		–		–	*	–	
18 : 0	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.1	4.0 ± 0.5		3.0 ± 0.2		87.1 ± 0.7		86.6 ± 0.2	
18 : 1	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	2.4 ± 0.1↓	*	5.4 ± 0.3		0.9 ± 0.3	*	1.6 ± 0.1	
20 : 0	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1		1.3 ± 0.1		7.5 ± 0.5	*	7.4 ± 0.0	
20 : 1	–	–	1.0 ± 0.1		0.9 ± 0.0		–	*	–	
22 : 0	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	3.8 ± 0.5		3.2 ± 0.3		1.0 ± 0.1		0.9 ± 0.0	
22 : 1	–	–	6.5 ± 0.3↑	*	3.7 ± 0.2		–	*	–	
23 : 0	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1		1.4 ± 0.0		1.3 ± 0.2		1.1 ± 0.0	
23 : 1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.2		0.3 ± 0.0		–		–	
24 : 0	7.2 ± 0.8	6.8 ± 0.5	12.6 ± 0.6	*	12.8 ± 0.4		0.5 ± 0.0		0.5 ± 0.0	
24 : 1	10.7 ± 0.3	9.9 ± 0.3	15.4 ± 0.6	*	15.0 ± 0.4		0.4 ± 0.3	*	0.4 ± 0.2	
25 : 0	tr.	0.3 ± 0.3	1.0 ± 0.1		1.2 ± 0.0		–		–	
25 : 1	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.1		1.1 ± 0.1		–		–	
26 : 0	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.3	1.0 ± 0.3		1.2 ± 0.3		–		–	
26 : 1	1.2 ± 0.5	1.1 ± 0.7	0.5 ± 0.4		2.0 ± 0.4		–		–	
20h: 0	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.5 ± 0.1		0.5 ± 0.0		–		–	
20h: 1	–	–	–		–		–		–	
22h: 0	11.0 ± 0.4	11.0 ± 0.4	5.6 ± 0.3		5.5 ± 0.2		–		–	
22h: 1	tr.	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0		0.2 ± 0.1		–		–	
23h: 0	10.3 ± 0.4	10.4 ± 0.4	6.0 ± 1.1		5.8 ± 0.6		–		–	
24h: 0	31.0 ± 0.9	32.1 ± 2.4	21.4 ± 2.1		21.1 ± 1.6		–		–	
24h: 1	15.1 ± 0.6	14.7 ± 0.7	8.5 ± 0.3		8.0 ± 0.2		–		–	
25h: 1	2.3 ± 0.3	2.3 ± 0.3	1.8 ± 0.3		2.2 ± 0.1		–		–	
26h: 1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.2		1.4 ± 0.1		–		–	

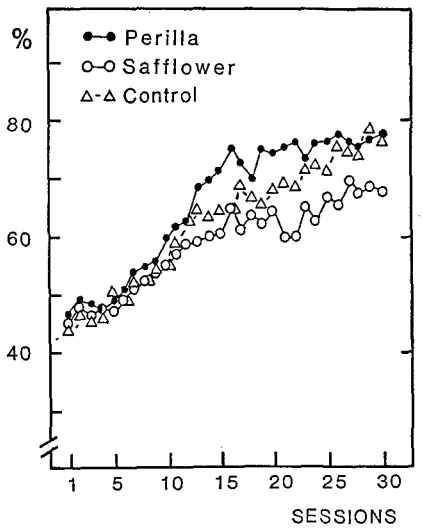
以上の大脳での３種の糖脂質の脂肪酸組成を表－２に示した。Ceramide monohexoside および Ganglioside の脂肪酸組成はＳＡ餌とＰＥ餌群間では、全く差はなかった。Sulfatide の脂肪酸組成は、ＳＡ餌群は１８：１で低く、２２：１で高かった。しかし他の脂肪酸は両者間に差はなかった。また小脳での脂肪酸組成は大脳のそれと多少変化を認めた（表－２の＊印）。

次に、ＳＡ餌およびＰＥ餌群の弁別学習成績を図－１に示した。ＳＡ餌群は（Ｒ＋）および（Ｒ－）それぞれの反応数は高く、対照群に近い数値であったが、（Ｒ－）は第１

図－１．ＳＡ餌およびＰＥ餌飼育ラットの明度弁別学習成績．



図－２．普通餌、ＳＡ餌およびＰＥ餌飼育ラット３群間の明度弁別学習成績の正反応率



試行日以降全く減少を示さず、平行状態であった。また、ＰＥ餌群はＳＡ餌群より（Ｒ＋）および（Ｒ－）ともに反応数は低く、（Ｒ－）の減少は第９試行日以降に著しかった。３群間の正反応率を比較して図－２に示した。即ち、ＰＥ餌群はＳＡ餌群よりも、正反応率から見ると明らかに高値を示した。そして、対照群を上回る成績を示した。有意差検定では、第１４試行日以後から、ＰＥ餌群はＳＡ餌群よりも有意に成績が高かった。これは必須脂肪酸であるα－リノレン酸の少ない餌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 (3) 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餌群が明らかな学習成績が有意に高かった事は、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、前報 (6,7) に報告したごとく、弁別学習能力が悪いと考えられる高血圧自然発症ラットにその効果を示し、学習成績の改善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 (4)、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 (9)。

［ 文 献 ］

1. Bivins,B.A., Bell,R.M., Rapp,R.P., and Griffen,W.O.Jr.(1983) J. Parenter. Enteral Nutr. 7, 473-478 2. Holman,R.T., Johnson,S.B., and Hatch,T.F.(1982) Am. J. Cli. Nutr. 34, 617-623 3. Lamptey,M.S., and Walker,B.L.(1976) J. Nutr. 106, 86-93 4. Murase,S., and Okuyama,H.(1985) J. Biol. Chem. 260, 262-265 5. Nomura,M.(1984) Res. Commun. Psychol. Psychiat. Behav. 9, 373-384 6. Nomura,M., and Ohtsuji,M.(1982) Hypertensive Mechanism (Schattauer pub.) pp.658-661 7. 野村正彦．奥山治美．(1986) 神経化学 25 499-501 8. Tamai,Y., and Abe,K.(1986) Neurochem. Internat. 8, 187-197 9. Tinco, J. (1982) Prog. Lipid Res. 13, 6-17 10. Tsukada,Y., Nomura,M., Nagai,K., Kohsaka,S., Kawahata,S., Ito,M., and Matsutani,T.(1977) Behavioral Neurochemistry (Spectrum pub.) pp.63-84 11. Yamamoto,N., Saitoh,M., Moriuchi,A., Nomura,M., and Okuyama,H.(1987) J. Lipid Res. 28, 144-151

166. 精製GABA$_A$／benzodiazepine 受容体複合体の再構成：$^{36}Cl^-$ influx による解析

廣内雅明・田口淳一・栗山欣弥

（京都府医大・薬理）

〔要　約〕

可溶化および精製γ－アミノ酪酸(GABA)$_A$/ベンゾジアゼピン(BZP) 受容体複合体の機能を検討するため、牛の大脳皮質より調製した膜小胞および可溶化とBZP アフィニティーカラムによる精製を行ったGABA$_A$ 受容体をリン脂質膜中に組込むことにより再構成した標品への$^{36}Cl^-$ influx実験を行った。膜小胞および再構成標品への$^{36}Cl^-$ influxを測定したところ、GABAは$^{36}Cl^-$ influxを増加し、この増加はGABA$_A$ 受容体拮抗薬であるビククリンおよびCl^- チャンネル遮断薬であるピクロトキシニンにより拮抗された。またBZP 受容体作働薬であるフルニトラゼパムは直接$^{36}Cl^-$ influxに影響を及ぼさなかったが、GABAにより増加した$^{36}Cl^-$ influxを更に増強した。以上の成績から、① GABA$_A$受容体の活性化がCl^- チャンネルの活性化を引き起こし、$^{36}Cl^-$ influxの促進が起こること、② BZP受容体は直接$^{36}Cl^-$ influxを引き起こさないが、機能的に共軛しているGABA$_A$ 受容体の活性化を介して$^{36}Cl^-$ influxを促進させること、および③精製したGABA$_A$/BZP 受容体複合体のリン脂質膜への再構成が可能であり、この精製受容体は受容体結合能とその薬理学的特性を有するのみならず、Cl^- チャンネルと共軛して機能し得ることが示唆される。

Key word： GABA$_A$/benzodiazepine receptor complex, $^{36}Cl^-$ influx, Reconstitution

γ－アミノ酪酸(GABA)$_A$ 受容体は、ベンゾジアゼピン(BZP) 受容体およびCl^- チャンネルと共軛して、脳シナプス膜上に存在すると推測されている(7)。我々はBZP アフィニティーカラムを用いることにより、牛大脳皮質からGABA$_A$/BZP 受容体複合体をCl^- チャンネルと共軛した形で精製できることを報告してきた(3)。今回はこれらの精製GABA$_A$/BZP 受容体複合体の機能的役割を明確にするために、精製GABA$_A$/BZP 受容体/Cl^-チャンネルをリン脂質膜中に組込むことにより本受容体の再構成を試みると共に、Cl^- チャンネルのCl^- 透過性について検討を加えた。

［実験方法］

1.牛大脳皮質GABA$_A$/BZP 受容体複合体の膜小胞からの可溶化と精製　Harris and Allan (2)およびObata and Yamamuraの方法(6) に従い、牛大脳皮質より膜小胞を調製した。可溶化は膜小胞を1.5% CHAPS/0.15% asolectin 処置することにより行い(8)、従来より報告してきたBZP アフィニティーカラム(9) を応用して、上記の可溶化分画よりGABA$_A$ 受容体複合体の精製を行った。さらに BZP により溶出した分画について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い、GABA$_A$/BZP 受容体複合体を得た(9)。

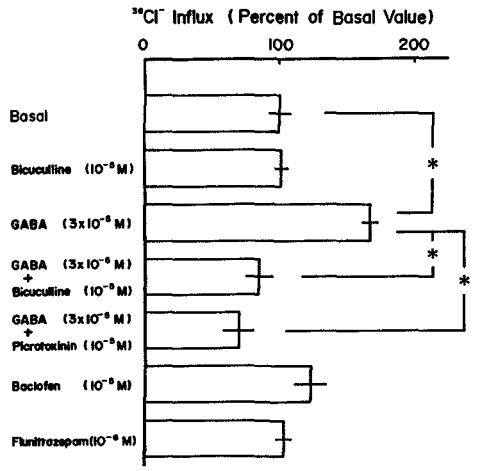


Fig.1 Effect of various drugs on $^{36}Cl^-$ influx into membrane vesicles from bovine cerebral cortex. *$p < 0.001$, as compared with each value as indicated, respectively.

2.可溶化および精製受容体標品のリン脂質膜による再構成　再構成標品の作製はHagaらの方法(1)に従い、受容体標品とフォスファチジルコリンを主体としたリン脂質を混和したのち、Sephadex G-50を用いたゲル濾過法により得られたvoid volume分画を再構成標品とした。

3.$^{36}Cl^-$ influxの測定　Obata and Yamamuraの方法(6)に従い、膜小胞あるいは再構成標品を30℃、10分間プレインキュベートしたのち、$^{36}Cl^-$とGABAとを同時に添加し作用させ、3秒後に取り込まれた$^{36}Cl^-$をワットマンGF/Cフィルターを用いたfiltration法により測定した。

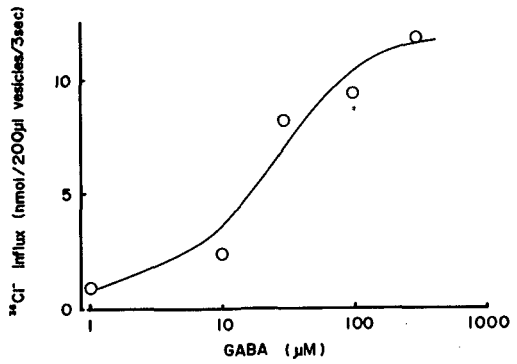


Fig.2 Concentration dependency of GABA-stimulated $^{36}Cl^-$ influx into reconstituted vesicles of solubilized fraction from bovine cerebral cortex.

4.[^{3}H]muscimol結合と[^{3}H]TBOB結合の測定　$GABA_A$受容体への[^{3}H]muscimol結合およびCl^-チャンネルへの[^{3}H]TBOB結合の測定は、それぞれKuriyama and Taguchi (3)およびLawrenceらの方法(5)に従って行った。

[結果]

$GABA_A$/BZP受容体複合体に作用する種々の薬物を用いて、先づ牛の大脳皮質より調製した膜小胞への$^{36}Cl^-$ influxに対する影響を検討した(Fig. 1)。$GABA_A$受容体作働薬であるGABAを$^{36}Cl^-$と同時に添加し作用させたところ、$^{36}Cl^-$ influxの有意な増加が認められた。この作用は、$GABA_A$受容体拮抗薬であるピククリンおよびCl^-チャンネル遮断薬であるピクロトキシニンにより抑制された。またBZP受容体作働薬であるフルニトラゼパムは、直接$^{36}Cl^-$ influxに変化を与えなかった。しかしながらフルニトラゼパムはGABA誘発性$^{36}Cl^-$ influxの増加をさらに増強させた。そしてこの増強作用は、BZP受容体拮抗薬であるRo15-1788によって拮抗された。

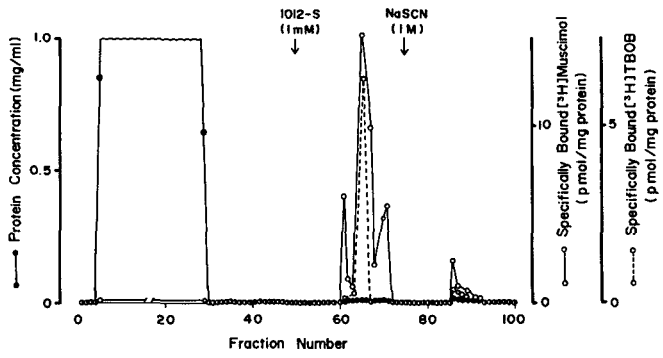


Fig.3 Affinity column chromatography using 1012-S-acetamide adipic hydrazide Sepharose 4B of 1.5%CHAPS/0.15%asolectin-solubilized fraction of bovine cerebral cortex.

次に膜小胞よりasolectinの存在下に1.5% CHAPSで可溶化した受容体標品をリン脂質膜中へ組込み、この再構成標品への$^{36}Cl^-$ influxを検討したところ、膜小胞の場合と同様にGABAの添加により$^{36}Cl^-$ influxの濃度依存的な増加が認められた(Fig. 2)。次いでこの可溶化標品をBZPアフィニティーカラムクロマトグラフィーに適用することにより、[^{3}H]muscimol結合および[^{3}H]TBOB結合活性を保持する精製標品を得た(Fig. 3)。なおBZP受容体への[^{3}H]flunitrazepam結合は、更に陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行うことにより出現した。この精製標品を用いて再構成を行い、電子顕微鏡下においてnegative staining法により観察したところ、直径500-2000Å程度のvesicleの存在が確認された。この精製標品を用いた再構成系においても、GABAは$^{36}Cl^-$ influxを増加さ

せ、ビククリンはその作用を抑制した(Fig. 4)。またフルニトラゼパムはGABAにより増加した$^{36}Cl^-$ influxをさらに増強し、この増強はRo15-1788により抑制された。

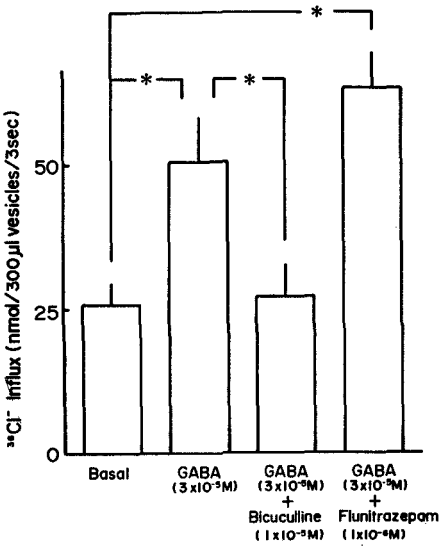


Fig.4 Effect of various drugs on $^{36}Cl^-$ influx into reconstituted vesicles of purified $GABA_A$/benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex. *$p<0.05$, as compared with each value as indicated, respectively.

[考察]

牛大脳皮質より調製した膜小胞を用いて$^{36}Cl^-$ influx実験を行ったところ(Fig. 1)、GABAにより増加した$^{36}Cl^-$ influxがビククリンやピクロトキシニンによって抑制され、一方、$GABA_B$受容体作働薬であるバクロフェンは$^{36}Cl^-$ influxに変化を与えなかったことから、GABAにより増加した$^{36}Cl^-$ influxは$GABA_A$受容体を介した作用によると考えられる。またBZP受容体は直接$^{36}Cl^-$ influxを変化させるのではなく、このBZP受容体と機能的に共軛している$GABA_A$受容体を介して$^{36}Cl^-$ influxを変化させたものと考えられる。これらの結果は、結合実験において認められるような$GABA_A$受容体とBZP受容体の間の共軛機構の存在(4)と一致するものである。

膜小胞より得られた可溶化および精製$GABA_A$受容体標品のリン脂質膜における再構成が可能であることが認められ、また精製した$GABA_A$受容体が直接Cl^-チャンネルと共軛して居り、しかもBZP受容体はこれらの機能を修飾し得ると考えられる結果を得た。更に本実験結果は、精製した$GABA_A$/BZP受容体複合体が受容体結合能とその薬理学的特性を有するのみならず(3,9)、Cl^-チャンネルと共軛して機能し得ることを示唆する。

[文献]

1) Haga, K., Haga, T., Ichiyama, A., Katada, T., Kurose, H. and Ui, M. (1985) Nature (Lond.) 316, 731-733.

2) Harris, R.A. and Allan, A.M. (1985) Science 228, 1108-1110.

3) Kuriyama, K. and Taguchi, J. (1987) Neurochem. Int. 10, 253-263.

4) Kuriyama, K. and Taguchi, J. (1987) J. Neurochem. 48, 1897-1903.

5) Lawrence, L.J., Palmer, C.J., Gee, K.W., Wang, X., Yamamura, H.I. and Casida, J.E. (1985) J. Neurochem. 45, 798-804.

6) Obata, T. and Yamamura, H.I. (1986) Biochem. Biophys Res. Commun. 141, 1-6.

7) Olsen, R.W. (1981) J. Neurochem. 37, 1-13.

8) Sigel, E. and Barnard, E.A. (1984) J. Biol. Chem. 259, 7219-7223.

9) Taguchi, J. and Kuriyama, K. (1984) Brain Res. 323, 219-226.

167. 高親和性〔^{3}H〕Tryptamine 結合部位における酸性脂質の関与について

勢理客 成 史・斎 藤 道 子・荻 原 政 彦・石 谷 良 一
（城西大・薬・薬理）

〔要 約〕
本実験では、我々が新規に見出した温度－感受性高親和性[^{3}H]tryptamine結合部位（４）への酸性脂質の関与の可能性について詳細に検討した。以下得られた結果をまとめると：１）In vitoro 系での脂質再構成実験からは、phosphatidylserine(PS)とsulphatides(CS)からなる再構成系が[^{3}H]tryptamineに対して高親和性結合能(K_D = 3, 10 nM) を示した。２）各種脂質修飾試薬にて処理後のシナプス膜に対する[^{3}H]-tryptamine結合能を検討した結果は、Azure A および phospholipase A_2 は同結合能を減少させるが、phospholipase D は何らの作用も示さなかった。３）Phospholipase A_2 および D 処理後のシナプス膜での脂質分析の結果、[^{3}H]tryptamine結合能とPSとの間に相関関係が認めらた。４）Azure A および phospholipase A_2 処理後のシナプス膜に対する[^{3}H]tryptamine結合のScatchard 解析からは、Azure A は低親和性と高親和性結合部位のB_{max}値のみを同程度に減少させる事、然るに phospholipase A_2 は高親和性結合部位のK_D値を選択的に増大させる事が判明した。　以上の結果から、特定の酸性脂質（即ち、PS, CS）が高親和性[^{3}H]tryptamine結合部位において、認識部位または調節因子としての役割を担っている可能性が示唆されよう。

Key word：tryptamine, acidic lipids, 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）。我々も、ラット全脳由来の[^{3}H]tryptamine結合部位が熱因子にて一種のup-regulation(即ち、温度－感受性高親和性結合部位の存在）を受ける事およびその機構について報告してきたが（４，７）、本実験では同高親和性[^{3}H]tryptamine結合部位への特定脂質の関与について検討する事を目的とした。

［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、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を得た。同膜成分は最終的に0.05 M Tris-HCl buffer(pH 7.4)に懸濁し、液体窒素下急速凍結させ-75°Cにて保存した。凍結膜試料を急速解凍後、各種脂質修飾試薬（Azure A, phospholipase A_2 および D ）共存下の膜懸濁液(2 mg protein/ml) を 37°C 55分間 pre-incubate（up-regulation 操作を兼ねる）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, 10 μM 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：10 μM 非放射性tryptamine共存下での結合量］で得られた値とした。　尚、脂質再構成系との結合実験はSe-

phadex LH_{20} による column chromatography（５）にて行った。ラット全脳より単離精製（３）した脂質群をbutanol-water 混液（14% water,v/v)に可溶化させた後、一定濃度の[^{3}H]tryptamineと室温下20分間incubateした。Incubation終了後、反応混液をSephadex LH_{20} カラムに重層し、chloroform-methanol(10:1, 9:1)溶媒によるstep-wise溶出法にて結合型[^{3}H]ligand量を計測した。シナプス膜からの粗脂質の抽出はNortonとPoduslo の方法に準じ、個々の脂質はTLC 法にて分離定量（６）した。

［結果および考察］

１）脂質再構成系に対する[^{3}H]tryptamineの結合

３種酸性脂質、PS,CS,PIから成る種々の脂質再構成系の[^{3}H]tryptamineに対する結合能を検討した結果、Fig.1 に示すようにPS-CS 系が飽和性の有る結合能（K_D = 3,10 nM）を保持する事が判明した。更に、同系はtryptamineおよび5-methoxytryptamineにのみ親和性を示し、他のindoleamine analogues や神経伝達物質には何らの結合能も示さなかった。

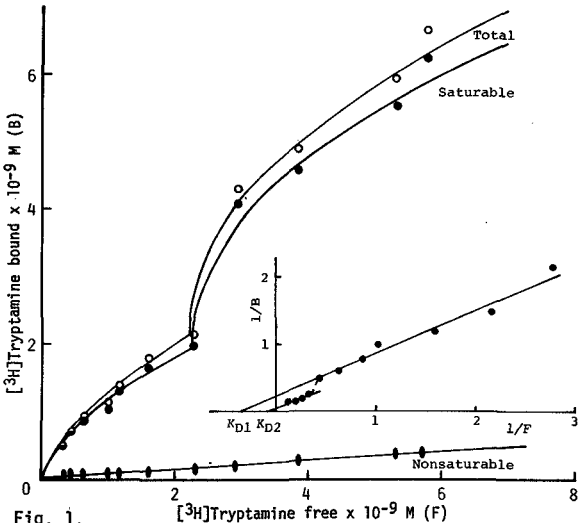


Fig. 1.
Binding curves and double reciprocal plot of [^{3}H]tryptamine to the reconstituted fraction with PS and CS. Saturable binding was defined as the total binding minus binding in the presence of 500 μM unlabelled tryptamine (i.e., non-saturable binding). K_{D1}, 3 nM & K_{D2}, 10 nM.

２）高親和性[^{3}H]tryptamine結合部位に対する各種脂質修飾試薬の影響

完全なin vitroでの脂質再構成系－実験からは、[^{3}H]tryptamine結合能と特定酸性脂質群との間に何らかの相互関係の可能性が示唆された。そこで上記可能性をより明白にすべく、種々の脂質修飾試薬にて処理後のシナプス膜に対する[^{3}H]tryptamine結合能を検討した。結果は、CSと特異的な親和性を有するAzure A（８）およびphospholipase A_2は同結合能を著しく減少させるが、phospholipase D は何らの作用も示さなかった。更にphospholipase A_2処理後のシナプス膜中の脂質分析を行い、[^{3}H]-tryptamine結合能との関連性について検討しFig.2 に示す結果を得た。即ち、[^{3}H]-tryptamine結合能と、PS並びにcholine phosphatides（PC）の減少率には相関関係が認められたが、ethanolamine phosphatides（PE）との間には何らの関連性も想定出来なかった。上記観察をより明白にすべく、phospholipase D 処理後のシナプス膜に関し同様の検討を試みた。その結果、[^{3}H]tryptamine結合能へのPS（PC, PEと比較して）の関与がより一層強く示唆された。

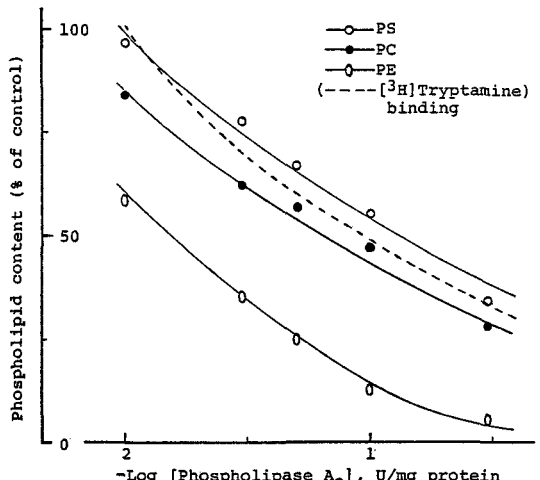


Fig. 2.
Effect of phospholipase A_2 on the phospholipid content of synaptic plasma membranes. After pretreatment, all the membrane preparations were further incubated with 1 % BSA. The data are expressed as a percent of the control value.

[^{3}H]Tryptamine結合能への特定酸性脂質（PS, CS）の関与の可能性が判明したが、更に結合部位の分子構築との相互関係について、Scatchard 解析にて検討を試みた。Azure A および phospholipase A_2 処理後のシナプス膜に対する[^{3}H]tryptamine結合のScatchard プロットをFig.3 に示した。いずれのプロットも非直線性（即ち、一箇所以上の結合部位が存在する）を呈し、Azure A は見掛け上 noncompetitive 型の、phospholipase A_2 は mixed 型の[^{3}H]tryptamine結合抑制作用を示す事が明らかになった。更に、同プロットを nonlinear regression 解析し以下の結果を得た。シナプス膜には、少なくとも高親和性（K_D = 0.45 nM）と低親和性（K_D = 31.9 nM）の２つの[^{3}H]tryptamine結合部位が存在し、それぞれの B_{max} 値は 106.8 および 656.9 fmoles/mg protein であった。Azure A は両者の B_{max} 値を濃度依存的に同程度に減少させるが（非選択的）、K_D 値には何らの影響もおよぼさなかった。然るに、phospholipase A_2 は低親和性結合部位の K_D 値には何らの作用も示さず、高親和性結合部位の K_D 値を顕著に増大（0.1 U/mg proteinで約２倍に）させる事が判明した。

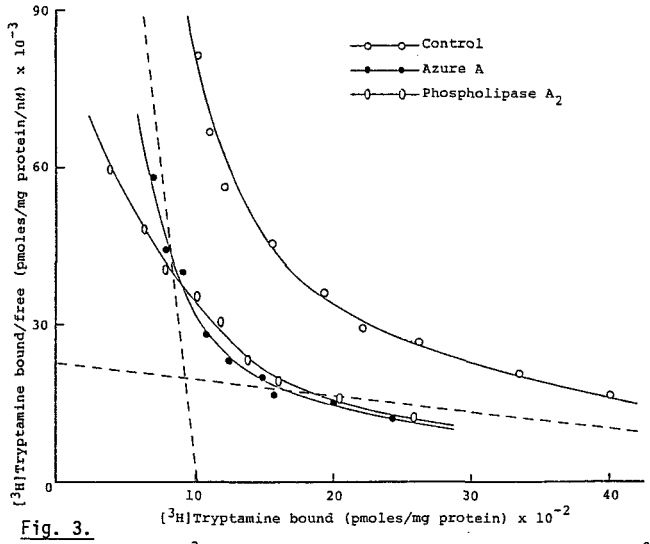


Fig. 3.
Scatchard plots of [^{3}H]tryptamine binding: effect of Azure A (5 x 10^{-9} M) and phospholipase A_2 (0.1 U/mg protein) pretreatment. The phospholipase A_2-pretreated membranes were further incubated with 1 % BSA. The computer-generated curves were derived from nonlinear regression analysis and the two broken lines were drawn theoretically from the curvilinear plot of control using a two-site model.

以上の結果を総括すると、脂質再構成系－実験並びに脂質修飾試薬であるAzure A, phospholipase A_2 および D との阻害実験から、特定の酸性脂質（PS, CS）が高親和性[^{3}H]tryptamine結合部位において、認識部位または調節因子としての役割を担うことが示唆された。（尚、高親和性[^{3}H]tryptamine結合部位の神経薬理学的特性についても言及する。）

[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., Yoshikawa, S., Miyakawa, A., Nishi, A. and Ishitani, R. (1983) J. Chromatogr. 260, 513-516

4) Karasawa, A., Serikyaku, S. and Ishitani, R. (1986) Life Sciences 38, 1331-1337

5) Miyakawa, A. and Ishitani, R. (1982) Life Sciences 31, 1427-1434

6) Nishi, A., Karasawa, A., Yoshikawa, S. and Ishitani, R. (1985) Japan. J. Pharmacol. 38, 411-417

7) Serikyaku, S. and Ishitani, R. (1987) Life Sciences in press

8) Yoshikawa, S. and Ishitani, R. (1985) Life Sciences 36, 485-492

168. 骨格筋，心筋，平滑筋および脳の粗製膜分画における特異的〔^{3}H〕Nitrendipine または〔^{3}H〕PN200−110結合の性質：特に光照射による結合の不可逆性について

藤末　毅・正田篤弘・岡　弘章・松田成久・市田成志
（近畿大・薬・生物化学）

〔要　約〕

ラットの骨格筋，心筋，平滑筋　（子宮）　および　全脳より調製した粗製膜分画を用いて，1,4-dihydropyridine誘導体系Ca拮抗薬である[^{3}H]nitrendipine(Nit) または[^{3}H](+)PN200-110(PN)の特異的結合の性質を調べた．

特に，光照射によりこれらの特異的結合が部分的に不可逆となることを認めたので報告する．

1）各々の粗製膜分画の調製およびNit またはPNの特異的結合反応はprotease inhibitorの存在下で行った．

2）いずれの粗製膜分画においてもNit またはPNの特異的結合は飽和性を示し，また可逆的であった．Nit に関するKd値は骨格筋の場合26nMでそれ以外は4-11nMであった．一方，PNに関するKd値は5-8nM であった．

3）特異的Nit またはPN結合は，いずれの粗製膜分画においても，さまざまな非放射性Ca拮抗薬により抑制された．その抑制効果の程度は特異的Nit 結合の場合，Nit ≧ (+)PN≧(-)PN>>BayK8644>verapamil >diltiazemであり，骨格筋と子宮ではPNに関して立体特異性が認められた．特異的PN結合の場合，いずれの粗製膜分画においても抑制効果の程度は(+)PN >Nit≧(-)PN>BayK8644>>verapamil≧diltiazem となり，PNに関して立体特異性が認められた．

4）いずれの粗製膜分画においても，光照射をすることにより過剰量の非放射性Nit （20μM)またはPN (5 μM)の添加によって生ずる［^{3}H］Nit または［^{3}H］PN結合量の減少は［^{3}H］Nit 結合の場合ほとんど完全に，［^{3}H］PN結合の場合部分的に抑制（不可逆化）されることが明らかとなった．

Key word：
特異的[^{3}H]Nitrendipine結合　，特異的[^{3}H]PN200-110 結合　，光照射

周知のごとく，カルシウムイオン（Ca^{2+}）は細胞内情報伝達物質として重要な役割を演じている．細胞内のCa^{2+}は種々の生理活性物質によって上昇するが，この上昇は大別して２つの機構によると考えられている．その一つはCaチャンネルの活性化を介した細胞外Ca^{2+}の細胞内への流入で，他の１つは細胞内貯蔵Ca^{2+}の遊離である(1)．

1,4-Dihydropyridine 誘導体系Ca拮抗薬は種々の興奮性細胞における電位依存性－Caチャンネルを抑制することが知られている(1,2)．

今回，私達は電位依存性－Caチャンネルの性質を明らかにするため，ラットの骨格筋，心筋，平滑筋（子宮）および全脳より調製した粗製膜分画を用いて，1,4-dihydropyridine 誘導体系Ca拮抗薬である[^{3}H]nitrendipine (Nit)または［^{3}H](+) PN200-110 [(+)PN] の特異的結合の性質を比較，検討した．　特に，1,4-dihydropyridine 誘導体系Ca拮抗薬は光に対して不安定であることが知られている(3) ので，光照射により特異的[^{3}H]Nit またはPNの結合が不可逆的になるかどうかを調べた．

［方法］

(1) 粗製膜分画の調製

ラットWistar系雄または雌８週齢の骨格筋，心筋，全脳，子宮筋を用いた．子宮筋だけは摘出の36時間毎に3 回17β－エストラジオールをｉ．ｓ．投与したラットを用いた．これらの試料からそれぞれの粗製膜分画をFig.1 の方法に従って調製した．これらの試料は血液や結合組織などを除いた後，Solution A　(Fig.1 に示すごとく，種々のprotease inhibitors を含む）の存在下で切片化，ホモジネートおよび遠心分画を行った．

沈渣を最後にTris-HCl（pH7.4 at30℃）10mM+PMSF0.5mM　でサスペンドし，これを各々の粗製膜分画とした．

(2) 結合実験

［^{3}H]Nit または［^{3}H](+)PN をリガンドとして用い（通常，どちらも5nM を使用した），反応は両結合実験とも通常Tris-HCl(pH7.4 at 30℃）50mM，PMSF　0.5mM，NaCl0.15M，$CaCl_2$ 1mM の条件下，30℃50分間行った．反応の停止は，各々の試料溶液をWhatman GF/C　filter上で吸引濾過することにより行い，次にfilter洗浄後filterの放射活性を測定した．結合反応は全て安全光の下で行った．20μM 非放射性Nit または[^{3}H]PN濃度の1000倍高濃度の非放射性(+)PN 存在下における結合を非特異的結合とした．

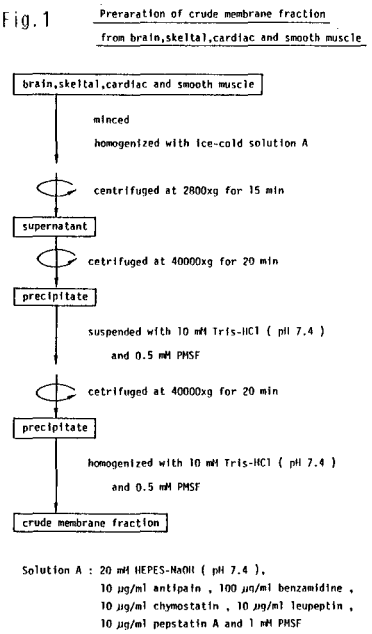
光照射によって不可逆的になるかどうかを調べる場合，いずれの粗製膜分画においても，[^{3}H]Nit または(+)PNの結合反応（各々5nM，30 ℃　50 分間）を行った後，ice-bathに移し次いで高圧水銀灯（500w，　水銀灯表面の温度は

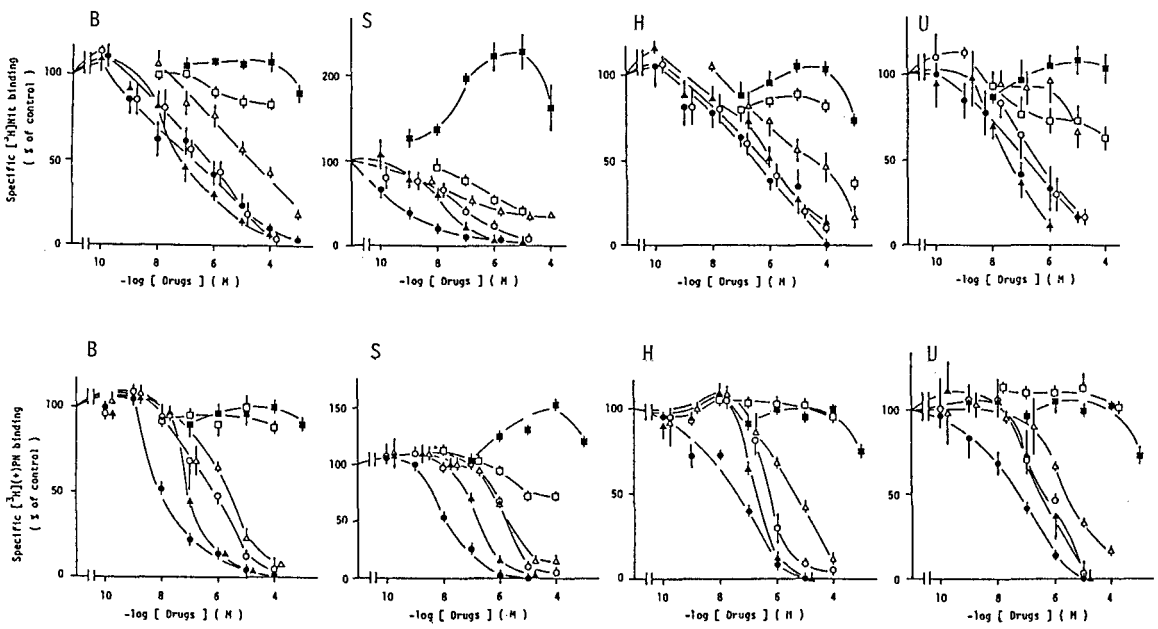
25℃ 以下に冷却）で80または20分間光照射を行った．次に30℃ に戻した後，過剰量の非放射性Nit （20μM ）または(+)PN(5 μM)を添加し， さらに一定時間インキュベートすることによって不可逆的性質の有無を調べた．

［結果］

いずれの粗製膜分画においても，[³ H]Nit または(+)PN の特異的結合は飽和性を示した．Scatchard prot解析を行うと，骨格筋， 心筋， 全脳，子宮筋の粗製膜分画における特異的[³ H]Nit 結合はともに一本の直線を示し，Kd値はそれぞれ26.3, 11.1, 4.6, 5.1 nM で， B max はそれぞれ 11.43, 4.35, 1.35, 1.12 pmol/mg of proteinであった．一方特異的[³ H](+)PN 結合に関するScatchard protはいずれの場合も上に凸形の曲線を示した． 特異的(+)PN 結合のsaturation curveより平衡状態における結合量は骨格筋， 心筋， 全脳， 子宮筋の粗製膜分画においてそれぞれ 16.25, 4.05, 0.78, 1.05 pmol/mg of protein であり， このcurve より求められた50% 飽和の結合量を示す[³ H](+)PN の濃度（Kd値）はそれぞれ 8.0, 7.0, 5.0, 8.0 nM であった． また，Hill係数はそれぞれ1.8, 1.3, 1.3, 1.5 であった． これ以後，特異的[³ H]Nit またはPN結合反応にはいずれも 5nM を用いた． 特異的 [³ H]Nit 結合に対する$CaCl_2$ 1mM およびNaCl 0.15Mの効果を調べたところ，骨格筋を除く粗製膜分画においては$CaCl_2$ 1mM + NaCl 0.15M の存在下で結合量が最大となった．同様な傾向は特異的 [³ H]PN結合の場合にも認められたが，$CaCl_2$ + NaCl の効果は特異的[³ H]Nit 結合の場合ほど著明ではなかった． いずれの粗製膜分画においても特異的 [³ H]Nit またはPN結合は種々のCa拮抗薬により抑制された(Fig. 2)．その抑制効果の程度は特異的 [³ H]Nit 結合の場合，概ねNit ≧ (+)PN ≧(-)PN ≫ Bay K8644(Bay)>verapamil(Ver)>diltiazem(Dil)であった．骨格筋および子宮筋において，特異的 [³ H]Nit 結合に対する(+) または(-)PN の抑制効果の程度は(+)PN>(-)PN となり，立体特異性が認められた．また，Dil (10^{-7}～10^{-3} M)は骨格筋における特異的 [³ H]Nit 結合量を著明に増大し，子宮筋においても程度の差は小さいが

Fig.1





ig.2 特異的[³ H]Nit および[³ H](+)PN 結合に対するCa antagonistsおよびCa agonistの効果

B:脳， S:骨格筋， H:心筋， U:子宮筋

(●):(+)PN200-110, (○):(-)PN200-110, (▲):Nitrendipine, (△):BayK8644, (■):Diltiazem, (□):Verapamil

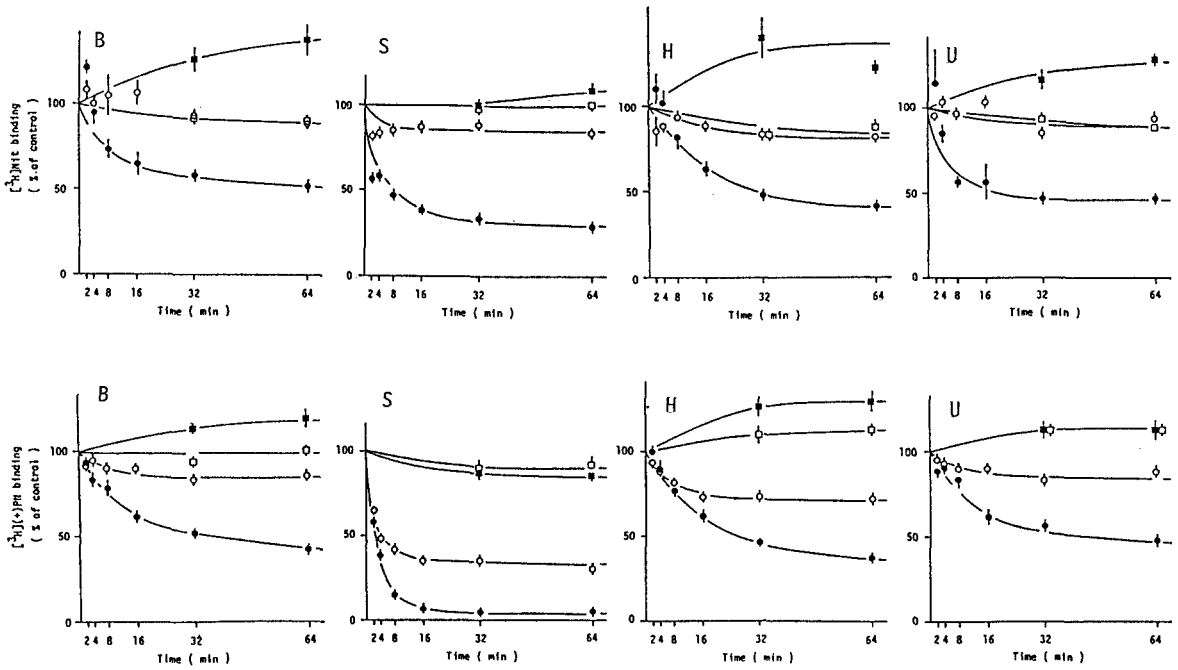


Fig.3　光照射による特異的[³ H]Nit および[³ H](+)PN 結合の不可逆化

B:脳,　S:骨格筋,　H:心筋,　U:子宮筋

(●, ■) 未照射, (○, □) 照射, (●, ○) 非放射性Nit(20μM)または(+)PN(5 μM)の添加あり,

(■, □) 非放射性Nit(20μM)または(+)PN(5 μM)の添加なし

同様な傾向が認められた．一方，特異的[³ H]PN結合の場合，いずれの粗製膜分画においても様々なCa拮抗薬の抑制効果の程度は概ね(+)PN>Nit ≧(-)PN>Bay≫Ver ≧Dil であった．どの粗製膜分画においても，(+) または(-)PN の抑制効果の程度は(+)PN ≫ (-)PN となり著明な立体特異性が認められた．骨格筋における特異的[³ H]PN結合量はDil (10^{-6} ～10^{-3} M)によって著明に増大されることを認めた．いずれの粗製膜分画においても，光照射をすることにより過剰量の非放射性Nit (20 μM)または(+)PN (5μM)の添加によって生ずる[³ H]Nit または[³ H](+)PN 結合量の減少は[³ H] Nit 結合の場合ほとんど完全に，[³ H](+)PN 結合の場合部分的に，抑制（すなわち，不可逆化）されることが明らかとなった(Fig.3)．

［考察］

Nit とPNは同じ1,4-dihydropyridine誘導体系Ca拮抗薬であるが，骨格筋，心筋，全脳および子宮筋の粗製膜分画における特異的[³ H]Nit またはPN結合の性質は多少異なっているように思われる．[³ H]Nit およびPN結合とも，骨格筋ではDil によってその結合量が著明に増大され，この点に関しては両結合量とも性質は類似していた．　しかし，次の点に関しては多少の差が認められた．　①いずれの粗製膜分画でも，Scatchard plotは特異的[³ H]Nit 結合の場合直線となったが，[³ H](+)PN の場合凸形の曲線を示した．　②$CaCl_2$ 1mM およびNaCl 0.15Mの効果に関して，骨格筋を除く粗製膜分画において，特異的[³ H]Nit 結合量は$CaCl_2$ 1mM + NaCl 0.15M の存在下で最大となったが，[³ H](+)PN では，この両イオンの効果は著明でなかった．　③いずれの粗製膜分画でも，[³ H]Nit または (+)PN結合に対するBay, Ver, Dil の抑制効果の程度は同じ傾向を示した．　しかし，(+)PN と(-)PN による抑制効果の差（すなわち，立体特異性の程度の差）は[³ H](+)PN 結合の場合どの粗製膜分画においても認められ，しかもその差は[³ H]Nit 結合の場合よりも大きかった．　[³ H]Nit 結合の場合では骨格筋と子宮筋にだけPNに関する立体特異性が観察された．

このように，いずれの粗製膜分画においても光射照をすることによって[³ H]Nit またはPN結合が不可逆的になることを観察し得たので，次に光照射したこれらの粗製膜分画をSDS-電気泳動にかけた後，フルオログラフィーにより，[³ H]Nit またはPNでラベルされた結合部位の性質を明らかにし，今後電位依存性－Caチャンネルとの関連性を検討する予定である．

［文献］

(1)Reuter,H.et al.(1985) Trends NeuroSci.8, 396-400 (2)Greenberg,D.A.(1987) Annals of Neurology,21, 317-330
(3)Ebel,S.et al.(1978) Arzneim.Forsch.28, 2188-2193

169. 骨格筋，心筋，平滑筋および脳の粗製膜分画における〔^{3}H〕(＋)PN200－110の特異的結合のphotoaffinity labeling

正田篤弘・藤末毅・岡弘章・松田成久・市田成志
（近畿大・薬・生物化学）

〔要　約〕

ラットの骨格筋，心筋，平滑筋（回腸および子宮）および全脳から調製した粗製膜分画を用いて1,4-dihydropyridine 誘導体系Ca拮抗薬である[^{3}H](+)PN 200-110[(+)PN]の特異的結合部位のphotoaffinity labelingを試みたので報告する．

1）いずれの膜分画も，protease inhibitors の存在下，特異的[^{3}H](+) PN結合を行った後，高圧水銀灯(500W)を用いて照射した．　照射後，SDS 電気泳動に次いでフルオログラフィーを行った．

2）いずれの膜分画も，[^{3}H](+) PNは光照射により30～35k のバンドに最も強くラベルされた．このバンドへのラベル化は過剰量の非放射性(+)PN により抑制された．　心筋を除く他の膜分画では，30～35K 以外にも2 ～3 のバンドが特異的にラベルされた．　回腸において[^{3}H](+) PNは光照射により全くラベルされなかった．　いずれの粗製膜分画の場合も[^{3}H]BayK8644(Bay) は光照射により全くラベルされなかった．

3）照射時間は，いずれの膜分画も，20分が最適であった．

4）[^{3}H](+) PNのラベリングに対するCa拮抗薬［(+) PN，nitrendipine(Nit),(-) PN，Bay は20μM ，verapamil (Ver),diltiazem (Dil) は1mM 使用］の効果を調べた所，心筋の場合Ver,Dil により30K Daへのラベリングはやや抑制され，(-)PN,Bay によってわずかに抑制された．　しかし，Nit によりほとんど抑制されなかった．　(+) と(-) PNに関しては立体特異性が認められた．　他の粗製膜分画に関しても，心筋の場合ほど明確ではなかったが，おもに30K Daへのラベリングに関して各種Ca拮抗薬による抑制の傾向は類似していた．

Key word：特異的[^{3}H]PN200-110 結合，　photoaffinity labeling

細胞内情報伝達物質としてカルシウムイオン（Ca^{2+}）が重要であることはよく知られている．　興奮性細胞の種類により異なるが，生理活性物質による細胞内Ca^{2+}濃度の上昇に関与する機構の一部は細胞外Ca^{2+}の細胞内への流入によっており，この細胞内へのCa^{2+}流入には種々のCaチャンネルが関与していると考えられている(1).

1,4-dihydropyridine （DHP)誘導体系Ca拮抗薬は興奮性細胞の電位依存性－Caチャンネルを抑制することが明らかにされている(2).

私達はラットの骨格筋，心筋，平滑筋（子宮）および全脳より調製した粗製膜分画において，DHP 誘導体系Ca拮抗薬である[^{3}H]nitrendipine (Nit)または[^{3}H](+)PN200-110[(+)PN] の特異結合は光照射により不可逆的になることを本学会において報告した(3).

今回，私達はラットの骨格筋，心筋，平滑筋（子宮または回腸）または全脳から調製した粗製膜分画を用いて，[^{3}H](+)PN による特異的[^{3}H](+)PN 結合部位の光親和性標識を試みたので報告する．

［方法］

（１）粗製膜分画の調製

ラット骨格筋，心筋，全脳，子宮筋，回腸の粗製膜分画の調製は前報に準じて行った(3).

（２）結合実験および光親和性標識

[^{3}H](+)PN または[^{3}H]BayK8644(Bay) をリガンドとして用いた（通常，どちらも20nM）．　反応は通常Tris- HCl(pH7.4 at 30 ℃)50mM,PMSF　0.5mM,NaCl 0.15 M,$CaCl_2$　1mMの条件下で30℃50分間おこなった．　次に，ice-bathに移し約10分間放置後，そのままの状態で高圧水銀灯（500W，水銀灯表面の温度は25℃以下に冷却）を用い20分間光照射を行った．　使用した[^{3}H](+)PN または[^{3}H]Bay 濃度よりも1000倍高濃度の非放射性(+)PN またはBay （通常，どちらも20μM)存在下（他の条件は全く同じ）における結合を非特異的結合とした．　照射後，反応液の一定量を遠心管にとり40000xg 20分間遠心後，その沈渣を一定量のTris-HCl (pH6.8 at 30 ℃) 10 mM でサスペンドし，さらにこれと同量のSDS 可溶化剤を加え，100 ℃5 分間加熱し，SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)用のサンプルとした．　結合反応から光照射を経てSDS 可溶化剤を添加するまでの全操作は安全光の下で行った．

（３）SDS-PAGEとフルオログラフィー

SDS-PAGE(ポリアクリルアミドゲルの濃度は通常10%)はLaemmli の方法に準じて行い，フルオログラフィーは千秋の

方法(4) に従って行った． なお，ゲルの前処理はAMPLYFY (Amersham) を，X線フィルムはKodak X-OMAT AR (Kodak) を使用した．

［結果］

骨格筋，心筋，全脳，子宮筋より調製した粗製膜分画において，[^{3}H](+)PN20nM は光照射により通常約30K Da のバンドに最も強くラベルされたが，回腸において全く[^{3}H](+)PN はラベルされなかった(Fig. 1)． この30K Da への[^{3}H](+)PN のラベリングは過剰量の非放射性(+)PN 20μM の存在によって抑制された． 通常，心筋を除く他の膜分画では，30 K Da 以外にも2-3 のバンドが特異的にラベルされた． すなわち，骨格筋では40,50,60-70K Da，脳では40,50,60 K Da，子宮筋では40,46-50 K Da のバンドがそれぞれラベルされた． これらのラベリングはすべて，過剰量の非放射性(+)PN の存在によって抑制された． いずれの粗製膜分画の場合も[^{3}H]Bay は光照射により全くラベルされなかった． また，光照射をしない場合，いずれの粗製膜分画においても[^{3}H](+)PN は全くラベルされなかった．いずれの粗製膜分画の場合も，[^{3}H](+)PN のラベリングのされかたは光照射の時間に依存しており，20分で最大となった．

また，このラベリングは[^{3}H](+)PN の濃度に依存しており，20nMが最適であった．

[^{3}H](+)PN のラベリングに対するイオン($CaCl_2$ 1 mMおよびNaCl 0.15 M)の効果を調べたところ，これらのイオンによってラベリングはあまり影響されなかった．

[^{3}H](+)PN のラベリングに対するCa拮抗薬[(+)PN, (-)PN, Nit, BayK8644(Bay)(それぞれ20μM)および verapamil (Ver),diltiazem (Dil) (それぞれ1mM)] の効果を調べたところ，心筋の場合Ver, Dilにより30K Daへのラベリングはやや抑制され，(-)PN,Bay によってわずかに抑制された． しかし，Nit により全く抑制されなかった．

また，[^{3}H](+)PN のラベリングに対する抑制の程度は(+)PN の方が(-)PN よりも強く，立体特異性が認められた． 他の粗製膜分画に関しても，心筋の場合ほど明確ではなかったが，おもに30K Daへのラベリングに関して各種Ca拮抗薬による抑制の傾向は類似していた．

［考察］

いずれの粗製膜分画においても，光照射により[^{3}H](+)PN は30K Daにラベルされ，心筋以外ではその他2-3 のバンドにもラベルされることが明らかとなった．

最近，Campbell et al.(5)およびSarmiento et al.(6) は骨格筋，心筋，平滑筋において光照射によって[^{3}H]Nit

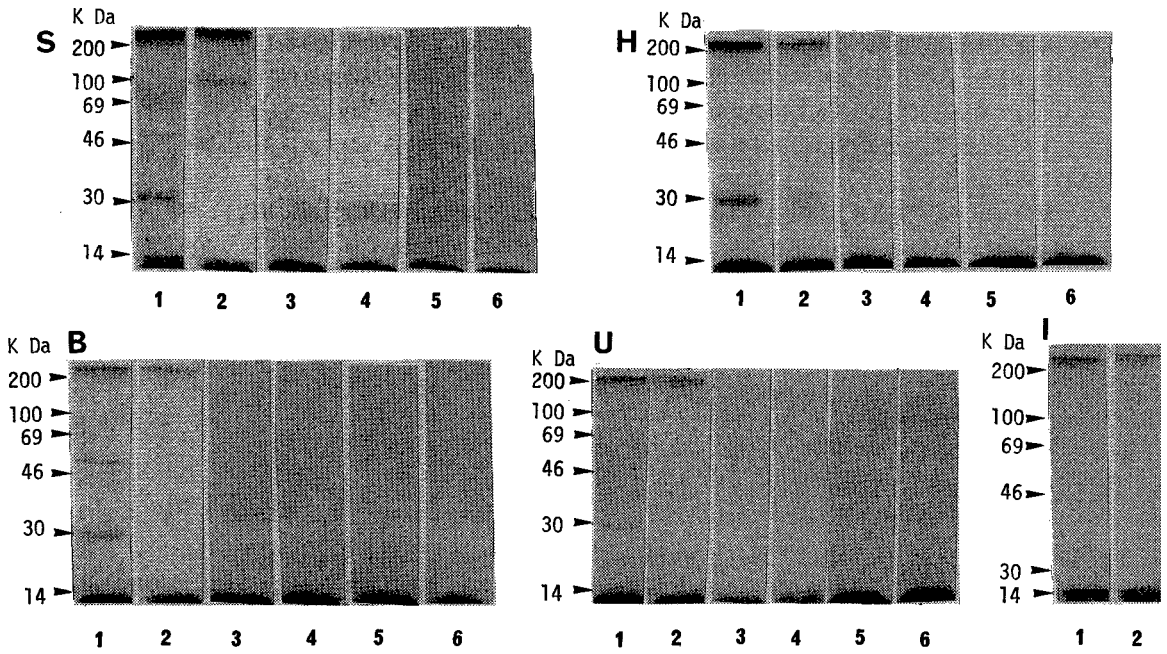


Fig.1 骨格筋，心筋，脳，子宮筋および回腸の粗製膜分画における[^{3}H](+)PN のphotoaffity labeling

1:[^{3}H](+)PN20nM, 2:[^{3}H](+)PN20nM+非放射性(+)PN20 μM, 3:1 と同じ条件，ただし未照射，
4:2 と同じ条件，ただし未照射， 5:[^{3}H]Bay20nM, 6:[^{3}H]Bay20nM+非放射性Bay 20μM, S：骨格筋，
H：心筋， B：全脳， U：子宮筋， I：回腸

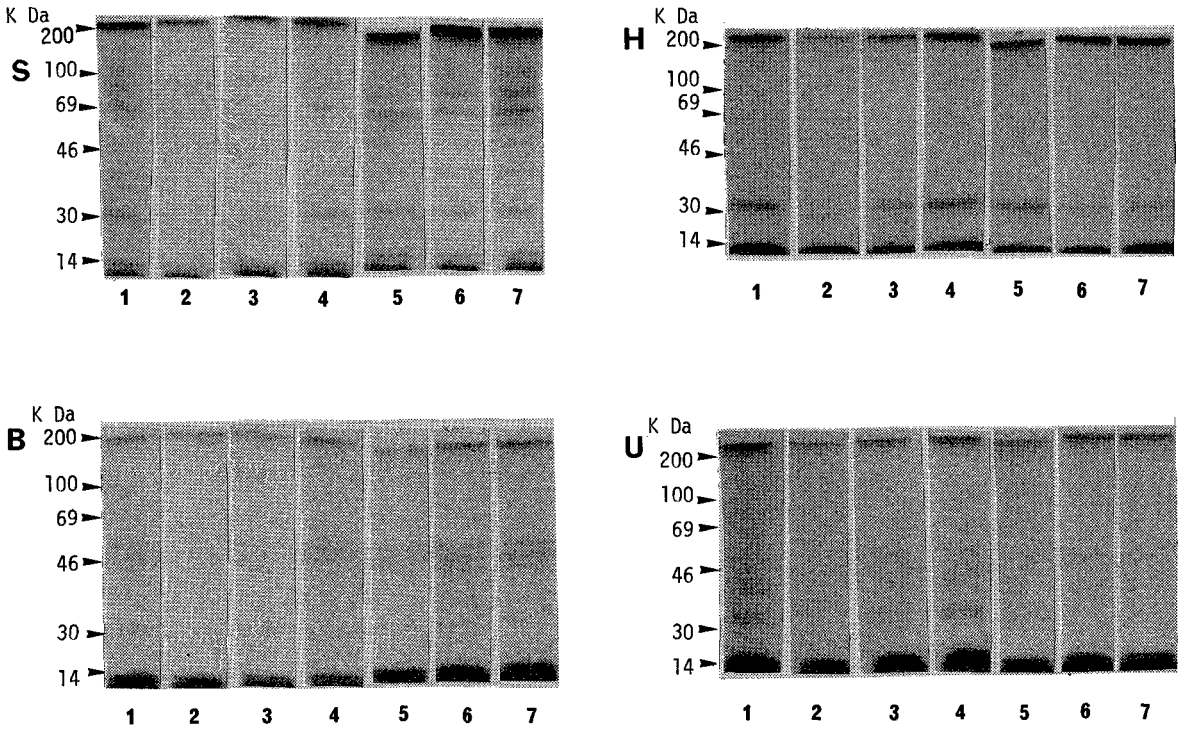


Fig.2 [^{3}H](+)PN のphotoaffinity labelingに対する各種Ca拮抗薬の効果

1:Control, 2:(+)PN20 μM, 3:(-)PN20nM, 4:Nit20 μM, 5:Bay20 μM, 6:Ver1mM, 7:Dil1mM,
S：骨格筋, H：心筋, B：全脳, U：子宮筋

および[^{125}I]BayP8857が 32K Daおよび32-35K Da のバンドにラベルされることを報告しており，今回の結果と類似していた． 一方，Gallizi et al.(7) は骨格筋において[^{3}H](+)PN が主に170K Da のバンドにラベルされることを報告している．

いずれの粗製膜分画においても，①ラベリングおよび特異的[^{3}H](+)PN 結合とも，$CaCl_2$ 1 mM およびNaCl 0.15Mによってあまり影響されなかった． ②また，種々のCa拮抗薬による抑制の程度の順番は ラベリングと特異的[^{3}H](+)PN 結合で類似していた． それ故に光照射による[^{3}H](+)PN の30K Da付近へのラベリングは特異的[^{3}H](+)PN 結合の性質をかなり反映していると思われる． ただし，いずれの粗製膜分画においても，ラベリングの場合，非放射性Nit によって全く抑制されなかった． この点は特異的[^{3}H](+)PN 結合と違っており，その理由はまだ不明である．

回腸においては，他の組織と同じ条件で光照射を行ったにもかかわらず，全く[^{3}H](+)PN のラベリングを認めることが出来なかった．このことは逆に，光照射によって[^{3}H](+)PN が常にラベルされるものではないことを示している．[^{3}H]Bay はDHP 誘導体でCaチャンネルに対してagonist の性質を持つことが知られている(8)． この[^{3}H]Bay を用いて[^{3}H](+)PN の場合と同じ条件で光照射をしたが，いずれの粗製膜分画においても[^{3}H]Bay はラベルされなかった． このことは，光照射によるラベリングが非常にわずかなリガンドの構造の変化によって影響されることを示している．

今回，光照射による[^{3}H](+)PN のラベリングが種々の興奮性組織で行なえることが示されたので，今後，Caチャンネルの性質を明らかにして行くうえで[^{3}H](+)PN を用いた光親和性標識は非常に有用になると思われる．

［謝辞］
フルオログラフィー法を御指導くださいました千秋達雄博士（東京都 老人総合研究所）に感謝いたします．

［文献］

(1)Reuter,et al.(1985)Trends NeuroSci.8,396-400 (2)Greenberg,D.A.(1987)Annals of Neurology,21,317-330
(3) 正田篤弘ら,(1987) 神経化学,26,印刷中 (4)千秋達雄,(1987) 続生化学実験講座,2,57-70
(5)Campbell,K.P.et al.(1984)J.Biol.Chem.259,5384-5387 (6)Sarmiento,J.G.et al.(1985)Fed.Proc.44,164
(7)Gallizi,J.D.et al,(1986)J.Biol.Chem.261,1391-1397 (8)Broun,A.M.et al(1984)Nature,311,570-572

170. 生化学的変化からみたラット線条体神経伝達調節におけるD_1およびD_2受容体の役割

芝軒信次・石井　豊・今村与志子・石川紘一・
多田幸司*　（日本大・医・薬理，精神神経*）

〔要　約〕

Dopamine（DA）受容体に対する作働薬・拮抗薬を組み合せて投与後，マイクロウエーヴを照射してラットを屠殺し，線条体を取り出し，DAとその代謝産物であるDOPAC，HVAをACh と同一試料について測定した。D_2受容体の選択的拮抗薬であるYM-09151-2を投与するとDOPAC およびHVA が著しく増加し（約5 倍），その際にACh 濃度の減少が認められた。これに対して，D_1受容体の選択的拮抗薬であるSCH-23390 はDA代謝産物に対してYM程強い作用は示さず，ACh 濃度に対してはYMとは逆に増加が見られた。一方D_1受容体の選択的作働薬であるSKF-38393 ではDA関連物質濃度にも，ACh 濃度にも有意の変化を引き起こさなかった。またD_2受容体の作働薬であるLY-171555 を投与した場合，DA自身の濃度が増加すると同時に，その代謝産物であるDOPAC およびHVA が減少し，ACh 濃度は増加した。SKF とYMを併用するとDOPAC およびHVA の著しい増加とAChの低下が，またSKF とSCH と併用した場合にはDOPAC，HVAの増加とともに，ACh の増加が認められた。LYとYMの併用では，DA関連物質およびACh 濃度に有意の著しい変化を引き起こさず，LYとSCH の併用によっては，DAの増加，DOPAC およびHVA の減少とともにACh の著明な増加が認められた。これらの結果について，DA受容体のサブタイプであるD_1，D_2の機能との関連性について発表する。

Key word：　Dopamine receptors,　Acetylcholine,　Striatum of rats

電気化学検出器を装着した高速液体クロマトグラフィーが，モノアミン関連物質の定量に有効であることは既に多くの報告によって明らかである[1-3]。一方，この方法がアセチルコリンの定量にも応用されるようになってきた[4]。そこで適当な抽出法を組み合せると，脳内の古典的伝達物質とされているnoradrenaline（NA），dopamine（DA），5-hydroxytryptamine（5-HT），acetylcholine（ACh）と，これらの代謝産物を同時に定量することができ，これらのバランスによって維持されている神経系の機能を明らかにすることができると考えられる。

線条体においてドパミン作働神経系とコリン作働神経系が相互作用をしていることはよく知られている[5]。またこの相互作用においてDA受容体のサブタイプD_1およびD_2がどのように働いているかについても明らかになりつつある。そこで，高速液体クロマトグラフィーを用いて，D_1・D_2受容体に対する作働薬および拮抗薬のACh 代謝に及ぼす作用をモノアミン関連物質と同時に測定して，線条体における古典的伝達物質の相互作用を検討した。

<<実験方法>>

体重約250gのWistar系雄性ラットを使用した。実験に用いた薬物は SKF-38393（Research Biochemicals）LY-171555（Lilly Laboratories）SCH-23390（Schering），YM-09151-2（Yamanouchi）および haloperidol（HAL，Sigma）の 5薬物であった。これらの薬物は0.1%アスコルビン酸を含んだ生理食塩液に溶解して，尾静脈より投与した。薬物を単独または組み合せて投与し，一定時間後（結果の項で示す）頭部にマイクロウエーヴを照射（5 KW,1.3秒）して動物を屠殺後速やかに脳を取りだし，Glowinski and Iversen の方法[6] に準じて脳を分割し，線条体試料を得た。この試料は定量を行うまで-80℃ の超低温槽に保存した。

Monoamine 類とその代謝産物およびACh は電気化学検出器を装着した高速液体クロマトグラフィーで同一

の試料より測定した。抽出方法は既に発表した Ishikawa and Shibanoki の方法[2] であるが，ACh を測定するため一部改変して用いた。簡単に述べると，内部標準物質を含んだ 0.025 N HCl中で脳組織をホモジナイズし，遠心後上清の一部をACh 定量用とし，限外濾過膜で濾過後高速液体クロマトグラフィーに注入した。また上清の一部は別に MOPEGの定量に用い，残りのホモジネートはn-butanol 抽出を行った後monoamine 類と酸性代謝産物の定量に用いた。

<<実験結果および考察>>

DA受容体の拮抗剤であるSCH，YMおよび HALを投与し，線条体 ACh濃度を比較した（Fig. 1）。各薬物共 0.001 mg/kgの投与では，溶媒を投与した対照動物と比較して有意の差異を認めなかった。これに対してD_2受容体の遮断剤であるYMの場合には 0.01 mg/kg 以上でACh 濃度を有意に減少させた。一方 D_1 遮断剤であるSCH では0.01 mg/kg以上で ACh 濃度は用量依存的に増加した。混合タイプのDA遮断剤であるHAL は，YM同様用量依存的にACh 濃度を減少させたが，その作用はYMに比較して弱かった。これらのDA受容体遮断剤を投与して，monoamine 類とそれらの代謝産物を定量したが，NA，DA，5-HTといったmonoamine 伝達物質濃度は影響を受けなかった。YMを投与すると線条体のDA代謝産物DOPAC およびHVA は対照群の約5 倍に増加した。しかし，SCH を投与してもDA代謝産物の濃度は約1.5 倍に増加した程度で，D_1遮断剤とD_2遮断剤のDA代謝に対する作用は全く異質のものであった。D_2受容体は2 つの部位に存在すると考えられている。その1 つはドパミン作働神経のシナップス前部であり，この受容体の興奮によってDAの遊離は抑制されると言われている。今回の実験でD_2受容体の遮断剤を投与すると，DAの遊離は促進しDOPAC やHVA といったDA代謝産物が増加したものである。もう1 つのD_2受容体は，コリン作働性のインターニューロンに存在するもので，ACh の遊離を抑制している。YMの投与によってACh が増加したのはこの受容体を介した作用で，ACh の遊離が促進され線条体内での濃度が減少したものと考えられる。一方D_1受容体はインターニューロン上にも存在し，ACh の遊離を促進する作用をもっているとされている。D_1受容体遮断剤であるSCH はACH の遊離を阻害し，ACh 濃度を上昇させたものと考えることができる。

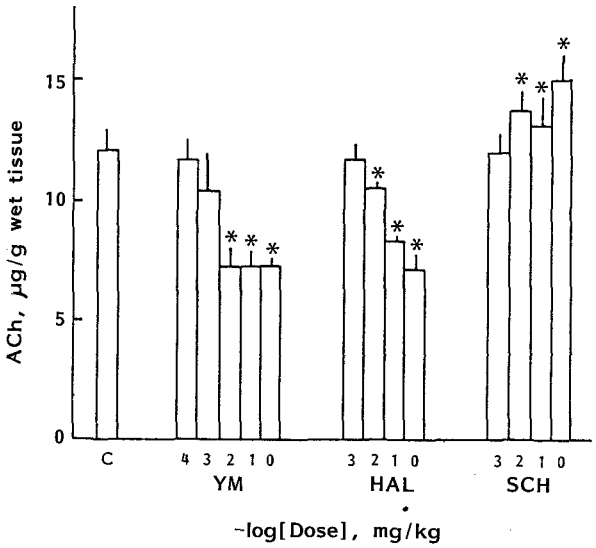


Fig. 1. Effects of YM, HAL and SCH on the concentration of ACh in the striatum of rats. *Significantly different from control ($P<0.05$)

D_2受容体の作働薬である LY 1mg/kgを投与すると，線条体のDAは有意に増加し，その代謝産物DOPAC とHVA は有意に減少した。このことは，D_2受容体の興奮によりDAの遊離が抑制されることから容易に説明することができる。またこの用量のLYによってACh も有意に増加していた。この結果も，コリン作働性インターニューロン上のD_2受容体に対する興奮作用にもとずくもので，ACh の遊離の抑制によるものである。このLYの作用に対してYM 0.01 mg/kg は抑制作用を示した。一方 SCH 1mg/kg はLYのACh 濃度に対する作用を増強していた。これはコリン作働性インターニューロン上にD_1，D_2の2 つの異なった受容体が存在し，その一方（D_1）を抑制することにより，残った一方の作用が増強されたためと考えることができる。

SKF はD_1受容体の作働薬である。この薬物を 2または20 mg/kgを投与しても，DAおよびその代謝産物に有

意の変化は認められなかった。この結果は，SCH 投与によってDA代謝産物の変動が小さかったこととも一致し，D_1受容体はDAの遊離に影響しないことを示している。したがってD_1受容体はシナップス後部に存在すると結論できる。ところでSKF は線条体ACh 濃度に対して有意の変化を起こさなかった。この結果はD_1遮断剤であるSCH を投与した場合の結果とは相反するものである。2 mg/kg のSKF と1 mg/kg のSCH を併用したところ，DAの遊離は促進された（DOPAC およびHVA の増加が認められた）。SCH がD_1受容体の遮断剤であることを考慮すると，この結果の解釈は非常に難しく，異なった性質をもったD_1受容体の存在を含めて，さらに詳細な研究が必要となる。またD_2遮断剤であるYM 0.01 mg/kg を併用すると，DAの遊離が増加したのと同時にACh の減少が起り，この伝達物質の遊離が促進していた。このことはコリン作働性インターニューロン上でACh の遊離に対してD_1，D_2受容体が互いに拮抗する作用をしていることを示しているものと考えることができる。しかし，線条体におけるDAとACh の相互作用に対しては，非コリン作働性の神経回路についても考慮する必要があり，今回のような生化学的作用の解析を複雑にしている。

Table 1. Effects of combined administrations of DA agonists and antagonists on the concentrations of DA and its metabolites, and ACh in the striatum

Treatment	ng/g wet tissue			
	DA	DOPAC	HVA	ACh
Control	9993±1128	1116± 53	605± 12	12637±1231
SKF	11749± 667	1279± 74	680±102	13713±1285
SKF+YM	9661±1036	4569±443**	2299±192**	8637±1276*
SKF+SCH	10712± 474	1844±142**	1015± 88**	15007±1067*
LY	12621± 888*	841± 33*	352± 46**	15842± 760*
LY+YM	10917±1024	1300± 79	1002± 87*	11158±1610
LY+SCH	13241± 897*	833± 60*	385± 55**	17235±1022**

Doses used; SKF, 2; LY, 1; SCH, 1; YM, 0.01 mg/kg.
*,** Significantly different from control group, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively.

<<文　献>>

1. Kissinger, P.T. (1977) Anal. Chem. 49, 447A-451A.
2. Ishikawa, K. and Shibanoki, S. (1985) Anal. Biochem. 147, 441-450.
3. Adams, R.N. and Marsden, C.A. (1982) Handbook of Psychopharmacology (Iversen, L.L., Iversen, S.D. and Snyder, S.H., eds.) pp.1-74.
4. Potter, P.E., Meek, L.J. and Neff, N.H. (1983) J. Neurochem. 41, 188-194.
5. Arbilla, S., Nowak, J.Z. and Langer, S.Z. (1987) Neurotransmitter interaction in the basal ganglia (Sandler, M., Feuerstein, C. and Scatton, B. eds.) pp.111-120.
6. Glowinski, J. and Iversen, L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669

171. うつ病患者の血小板における^{3}H−Clonidine結合および^{3}H−Imipramine結合

武田俊彦・原田俊樹・藤原豊・山本智之・大月三郎（岡山大・医・神経精神）

〔要　約〕

未治療うつ病者および健常者を対象に、血小板^{3}H-Clonidine結合能、^{3}H-Imipramine結合能を同時に測定した。健常群に比べうつ病群は、最大結合能（Bmax）が、^{3}H-Clonidine結合では高値を、^{3}H-Imipramine結合では低値を示した。解離定数（Kd）は、^{3}H-Imipramine結合では両群で有意差なく、^{3}H-Clonidine結合ではうつ病群が高値を示した。^{3}H-Clonidine結合と^{3}H-Imipramine結合のBmaxの相関は、健常群では正の相関の傾向を示し、うつ病群では相関がみられなかった。Hamilton depression rating scaleの17項目の合計点と^{3}H-Clonidine結合のBmaxは相関を示したが、^{3}H-Imipramine結合の方は有意な相関を示さなかった。また^{3}H-Clonidine結合のBmaxは、年齢とも有意な正の相関を示した。以上より、うつ病群の血小板^{3}H-Imipramine結合能と、^{3}H-Clonidine結合能は臨床的に異なる側面を示す生物学的指標であり、^{3}H-Clonidine結合の方がより state marker的性格が強いと思われた。

Key word：Depression　platelet ^{3}H-Imipramine binding　platelet ^{3}H-Clonidine binding

うつ病の病因解明の手段の一つとして、血小板の受容体研究が行われている。その中でも、α_2アドレナリン受容体とイミプラミン結合部位は、血小板にも中枢にも存在し、その生化学的、薬理学的類似性が示唆されている(1.5)。血小板α_2アドレナリン受容体はうつ病に於て、その高親和性部位のBmaxが増加しているとの報告が多い(2.3.6)。またイミプラミン結合部位は、うつ病群でその高親和性部位のBmaxが低下しているとの報告も多い(5.9)が、最近変化がないとの報告も増えつつある(4)。またそれぞれがうつ病のmarkerとして、trait markerなのかstate markerなのか、お互いの関係はどうなっているのかはまだ議論の余地のあるところである。今回我々は、うつ病群12名、健常群13名に対して、血小板のα_2アドレナリン結合能と、イミプラミン結合能を同時に測定できたので、症状との相関、結合能どうしの関係など検討し報告する。

（方法）

対象：うつ病患者群は、DSM-Ⅲ診断基準によりMajor Depressive Episodeの基準を満たす14名（年齢18-62歳、男6、女8）で、全て少なくとも採血前2カ月は未治療である。健常群は、精神疾患の既往がなく何ら薬物を服用していない17名（年齢21-56歳、男10、女7）である。うつ病群は診断の後 Hamilton depression rating scale(HDRS)をとり、同日の14-16時の間に採血した。

受容体膜標本の作製：EDTA加全血を、930×g・5分遠沈しPRPを得、それを1700×g・15分遠沈してpellet状にして-80℃で凍結保存した。そのpelletを hypotonic buffer（5mM Tris-HCl, 5mM EDTA, PH 7.5, 0℃）に resuspendし、45分間 sonicateした後

glass homogenizerでさらに破砕した。50mM Tris-HCl buffer(PH 7.5, 0℃)で2回洗浄した後37℃、30分間 preincubationし、それを遠沈し沈渣を当日の実験に供した。

α_2アドレナリン受容体結合実験: 方法は、Garciaら(2)を参考にした。buffer(50mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, PH 7.5)に沈渣を resuspendし、incubation(25℃, 20分)した後、whatman GF/C filterで急速沪過した。同 buffer 3mlで4回洗浄した後液シンで放射活性を測定した。^{3}H-リガンドは^{3}H-Clonidine(CLO)を用い、濃度は1nM-10nMの4点を用いた。displacerとして 10μMのCLOを使用した。

イミプラミン結合実験: 方法は、Raismanら(7)を参考にした。buffer (50mM Tris-HCl, 120mM NaCl, 5mM KCl, PH 7.5)に沈渣を resuspendしincubation(0℃, 60分)した後、0.1%PEIを添加した whatman GF/B filterで急速沪過した。同 buffer 3mlで4回洗浄した後液シンで放射活性を測定した。^{3}H-リガンドは ^{3}H-Imipramine(IMP)を用い、濃度は 0.5-4nMの4点を用いた。displacerとして 100μMのdesipramineを使用した。いずれの結合実験も蛋白定量はLowry法で行い、Scatchard analysisでBmax, Kdを求めた。

(結果)

うつ病群と健常群の年齢に有意差はなかった。結合実験の結果は Table1に示した。うつ病群は健常群に比べ、^{3}H-CLOのBmaxとKdはそれぞれ有意に高値を、^{3}H-IMPのBmaxは有意な低値を示したが、^{3}H-IMPのKdは両群で有意差がなかった。^{3}H-CLOと^{3}H-IMPのBmaxの相関をしらべると、健常群では正の相関傾向を示し($P<0.1$)、うつ病群では相関がみられなかった(Fig.1)。 年齢との相関は、健常群で ^{3}H-CLO のBmaxとの間に有意な正の相関($p<0.05$)がみられたが、うつ病群では有意な負の相関($p<0.05$)がみられた(Table.2)。^{3}H-IMPのBmaxと年齢との間には、両群で有意な相関はみられなかった。症状との相関は、Table3 のようにHDRSの関連のある複数の項目の合計点とBmaxとの相関でみた。その結果^{3}H-CLO結合は有意な相関の見られる症状が多いのに対し、^{3}H-IMP結合はいずれの症状とも相関がなかった。

(考察)

これまでうつ病者の血小板^{3}H-CLO結合や^{3}H-IMP結合の結果が報告されており、それぞれstate markerであることが示唆されている(3.8)が、同一の患者で両者を見たものはほとんどない。両者を測定した我々の結果では、^{3}H-CLO結合の方が^{3}H-IMP結合より多くの症状が相関し、よりstate markerとしての性格が強いことが明らかとなった。また^{3}H-CLOのBmaxと^{3}H-IMPのBmaxは、健常群では正の相関傾向を示したが、うつ病群では相関がなかった。 この理由は判然としないが、いずれにせようつ病に関して^{3}H-CLOと^{3}H-IMPは異なる生物学的指標であることを示している。

^{3}H-CLO結合実験に於て、Bmaxと年齢の相関が健常群とうつ病群で正負逆になっている。今回抽出したうつ病群では、年齢と症状(HDRS 1-17items)の相関が $r_s=-0.624$ ($P<0.02$, Spearman)と、負の相関を示している。このことと、^{3}H-CLO結合のstate dependentな傾向が、うつ病群での年齢との負の相関出現に多いに影響したと思われる。

我々の実験では、健常群に較べてうつ病群で^{3}H-CLO結合のKdが高値を示した。同様の結果を示し、それをα_2アドレナリン受容体のdesensitizationと関連付けている報告もある(3)。しかし、現在のところその原因の詳細は不明である。

Table 1. ^{3}H-CLO and ^{3}H-IMP Binding between Depressed Patients and Normal Controls

	Depressed	Controls
^{3}H-CLO	N=14	N=14
Bmax (fmole/mg protein)	48.40±16.98 $_{a}$	35.72±9.66
Kd (nM)	9.32±2.52 $_{b}$	7.21±2.32
^{3}H-IMI	N=12	N=16
Bmax	544.88±70.17 $_{b}$	633.84±177.54
Kd	0.839±0.215	0.728±0.199

mean ± S.D. a: $p<0.03$ b: $p<0.04$

Table 2. Statistical Correlations among ^{3}H-CLO Bmax, ^{3}H-IMP Bmax and Age

	Depressed	Controls
^{3}H-CLO (n=14)	-0.589_{a}	0.465_{a}
^{3}H-IMP (n=12)	0.284	0.309

a: $p<0.05$ (Spearman's correlation)

Table 3. Statistical Correlations among ^{3}H-CLO Bmax, ^{3}H-IMP Bmax and Symptoms

	HDRS	^{3}H-CLO	^{3}H-IMP
total score	1-17	0.482_{a}	-0.064
depressive mood	1.2.3.	0.287	-0.040
insomnia	4.5.6.	0.303	-0.066
retardation	7.8.	0.474_{b}	-0.012
agitation and anxiety	9.10.	0.122	-0.236
somatic symptoms	11-16.	0.532_{a}	-0.080
melancholia	1.2.6.8.9. 12.16.	0.289	-0.065

a: $p<0.05$
b: $p<0.1$ (Spearman's correlation)

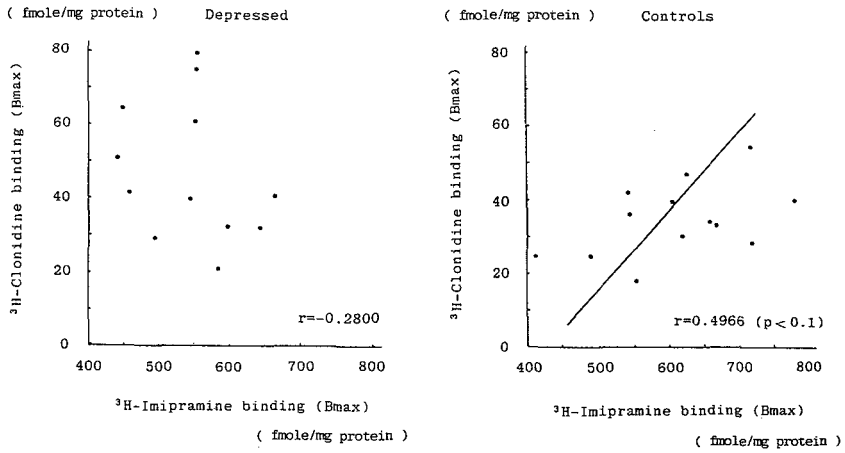


Fig. 1. Statistical Correlations between ^{3}H-CLO binding and ^{3}H-IMP binding

（文献）

1) Byland, DB. (1983) Int Rev Neurobiol 24;343 2) Garcia-Sevilla, JA. (1981) Arch Gen Psychiatry 38;132 3) Garcia-Sevilla, JA. (1986) Arch Gen Psychiatry 43;51 4) Kanof, PD. (1987) Biol Psychiatry 22;278 5) Langer, SZ. (1981) Life Sciences 29; 211 6) Piletz, JE. (1986) Life Sciences 39;1589 7) Raisman, R. (1980) Eur J Pharmacol 61;373 8) Suranyi-Cadotte, BE. (1982) Eur J Pharmacol 85;357 9) Lewis, DA. (1985) Arch Gen Psychiatry 42;458

172. 哺乳動物線条体における^{3}H−GBR−12935結合部位とその特性

白川　治・三田達雄・西野直樹・花田　進・中井　隆・
橋本健志・北村　登*・平井みどり*・田中千賀子*
（神戸大・医・精神神経，薬理*）

〔要　約〕

中枢神経系におけるドーパミン取り込み部位の生理的意義及び病態との関連を明らかにする目的で、^{3}H-｛1-[2-(diphenylmethoxy)ethyl]-4-(3-phenylpropyl)-piperazine｝(^{3}H-GBR-12935)を用いて、哺乳動物線条体においてその結合部位を同定した。その結果、１）^{3}H-GBR-12935結合に対するドーパミン取り込み阻害薬の阻害能には種差がみられ、マウス、ラット、モルモットではMazindol，Nomifensineが強い阻害能を示したのに対して、ヒト、ウシでは部分的な阻害しか示さなかった。Benztropineの阻害能には種差はみられなかった。　２）モルモット線条体では、NaCl に依存して^{3}H-GBR-12935結合は増加し、最大でNaCl非存在下の約３倍となった。一方、ヒト線条体では、NaClによる結合量の明らかな増加はみられなかった。　３）パーキンソン病被殻において 5μM Mazindolで規定される^{3}H-GBR-12935結合は、正常対照群の約４５％と明らかな減少を示したが、20μM Benztropineで規定される結合量は対照群と有意な差はみられなかった。一方、精神分裂病被殻における^{3}H-GBR-12935結合は、5μM Mazindolを用いた場合に対照群に比べて増加傾向を示したものの有意な差は認められなかった。以上のように、^{3}H-GBR-12935結合特性には種差が存在し、ヒトやウシでは、GBR-12935はドーパミン神経に存在すると考えられる高親和性ドーパミン取り込み部位以外にも結合することが明らかになった。

Key word：　dopamine uptake，　GBR-12935，　species differences

ドーパミンは中枢神経系における神経伝達物質として、種々の精神神経疾患の病態との関連が示唆されている。神経終末におけるドーパミンの不活化機構は主として再取り込みによることはよく知られているが、その生理的意義および病態との関連については未だ不明な点が多い。今回我々は、ドーパミン取り込み部位を選択的に標識するとされる1-[2-(diphenylmethoxy)ethyl]-4-(3-phenylpropyl)-piperazine(GBR-12935)を用いて(1)、マウス、ラット、モルモット、ウシおよびヒト線条体においてその結合部位を同定し、結合特性を解析した。さらに、パーキンソン病および精神分裂病におけるGBR-12935結合部位の変化についても検討を加えた。

[実験方法]

膜分画の調製：線条体を 120 mM NaClを含む 50mM Tris/HCl,pH7.4 で38,000g,15分間遠心、再浮遊を３回繰り返して得られた粗膜標品を膜分画とした。ヒト死後脳からは被殻を用いて同様の方法で膜分画を調製した。精神神経疾患の既往のない症例を正常対照群とした。

^{3}H-GBR-12935結合実験：120mM NaClおよび0.01%ウシ血清アルブミンを含む 50mM Tris/HCl,pH7.4中で、25℃、45分間インキュベーション後、 0.3%ポリエチレニミン前処置ガラス繊維濾紙を用いる減圧下急速濾過法によった。

[実験結果]

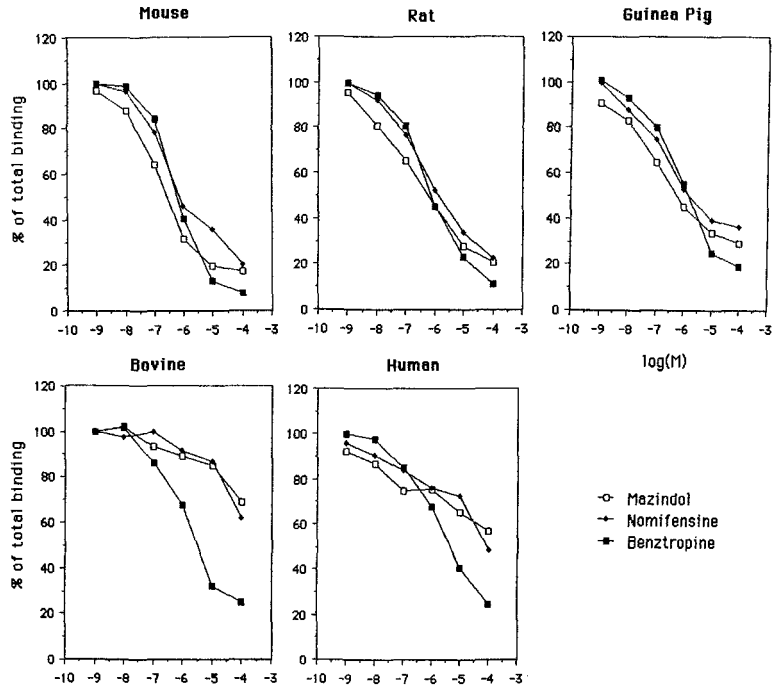
１、^{3}H-GBR-12935結合に対するMazindol，NomifensineおよびBenztropineの阻害能 (Fig.1)

^{3}H-GBR-12935結合 (1 nM) に対して、Mazindol，Nomifensineは マウス、ラット、モルモットでは、Benztropine より強い阻害能を示したのに対して、ウシおよびヒトでは部分的な阻害しか示さなかった。一方、Benztropine の阻害能には、このような種差は認められず、ほぼ等しい親和性を示した。Atropineによる阻害は、種差を問わずみられなかった。

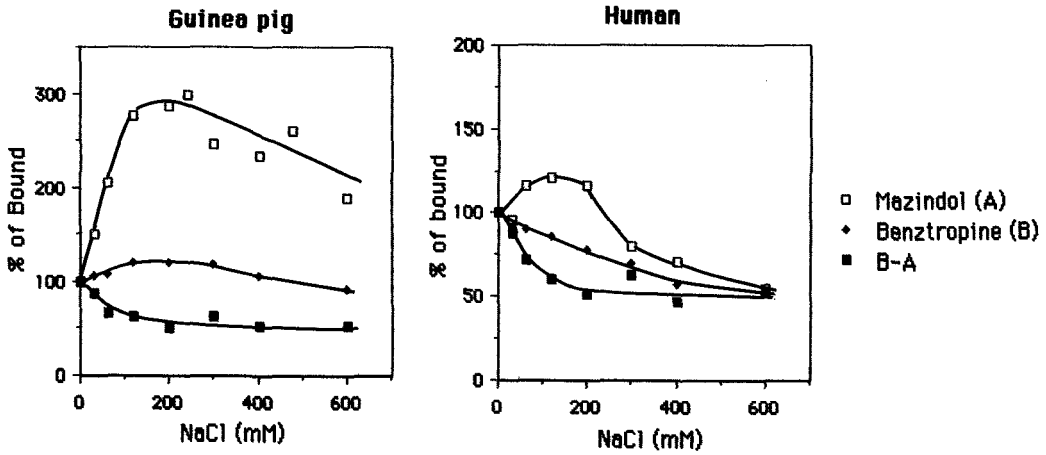
２、^{3}H-GBR-12935結合のNa^+依存性 (Fig.2)

中枢神経系の高親和性ドーパミン取り込みは、Na^+依存性であることが知られている。従って、^{3}H-GBR-12935結合のNa^+依存性の有無は、高親和性ドーパミン取り込み標識の指標になると考えられる。Mazindol，Nomifensineに高親和性を示す動物の代

Fuguire1. Inhibition of ^{3}H-GBR-12935 binding by mazindol, nomifensine and benztropine in mammalian striatal membranes



Figuire 2. Sodium dependency of ^{3}H-GBR-12935 binding to guinea pig and human striatal membranes



表例として、モルモット線条体における^{3}H-GBR-12935結合(1 nM) のNa^{+}依存性を検討した。非特異的結合を規定する薬物として 5μM Mazindolを用いた場合(A)、約 200 mMまでNa^{+}に依存して結合量は増加し、最大でNa^{+}非存在下の約3倍となったが、高濃度のNaClは逆に阻害的にはたらく傾向がみられた。一方、非特異的結合として 20μM Benztropineを用いた場合(B)、NaClによる明らかな結合量の増加はみられず、Benztropineによって阻害される部分のみに着目すると(B-A)、逆にNaClによる阻害傾向がみられた。MazindolやNomifensineが部分的な阻害しか示さないヒト線条体においては、5μM Mazindolを用いて非

Table 1. Specific ^{3}H-GBR-12935 binding sites (0.5 nM) in the putamen from controls, parkinsonians and schizophrenics

	drug for nonspecific binding	
	20 μM Benztropine	5 μM Mazindol
Control	626 ± 40 (n=16)	89.6 ± 8.2 (n=13)
Parkinson	726 ± 76 (n=7)	40.3 ± 7.4* (n=6)
Schizophrenia	627 ± 44 (n=9)	100.3 ± 5.7 (n=14)

* ($P < 0.005$)

特異的結合を規定した場合に、NaClの濃度が200 mMまででわずかな結合量の増加がみられるのみで、それ以外の場合では結合量はNaClの濃度依存的に減少する傾向を示した。

3、パーキンソン病および精神分裂病におけるGBR-12935結合部位の変化（Table 1）

GBR-12935結合の生理的意義を明らかにする目的で、natural lesion study のモデルとしてパーキンソン病死後脳における^{3}H-GBR-12935結合部位（0.5 nM）の変化を調べた。被殻において 5μM Mazindolで規定されるGBR-12935結合（40.3±7.4 fmol/mg protein, n=6）は、正常対照群（89.6±8.2 fmol/mg protein, n=13）の約４５％と明らかな減少を示した。しかし、20μM Benztropineで規定されるGBR-12935結合（726±76 fmol/mg protein, n=7)は、対照群（626±40 fmol/mg protein, n=16）に比べて高値を示したものの有意差は認められなかった。一方、精神分裂病死後脳の被殻における^{3}H-GBR-12935結合（0.5 nM）は、非特異的結合として 5μM Mazindolを用いた場合（100.3±5.7 fmol/mgprotein, n=13）に対照群に比べて増加傾向をしめしたものの、有意差は認められなかった。

[考察]

我々は、前回マウスニューロブラストーマN1E115に、MazindolやNomifensineでは阻害されず Benztropineによって置換される^{3}H-GBR-12935結合部位が存在することを報告した(2)。今回、同様の性質の結合部位が、ヒトおよびウシ線条体にも多く存在することを見いだした。こうしたBenztropineで置換されるGBR-12935結合部位は、ドーパミン神経の変性脱落が明らかなパーキンソン病死後脳（被殻）においても減少がみられないことから、ドーパミン神経終末に存在するとされる高親和性ドーパミン取り込み部位とは異なる部位を標識していると考えられる。最近、グリアにおいても高親和性のモノアミン取り込み機構の存在が報告されており(3)、GBR-12935がこうした神経以外のモノアミン取り込み部位にも結合する可能性がある。一方、^{3}H-GBR-12935結合に対するMazindol, NomifensineおよびBenztropineの阻害能に種差がみられることから、ドーパミン取り込み部位そのものに種差があるとも考えられる。すなわち、ウシやヒトのドーパミン取り込み部位ではマウス、ラット、モルモットとは異なり、GBR-12935やBenztropineの結合部位が、MazindolやNomifensineの結合部位と同一ではないのかもしれない。

以上のように、^{3}H-GBR-12935結合特性には種差が存在し、ヒトやウシではドーパミン神経終末に存在するとされる高親和性ドーパミン取り込み部位以外にも結合することが明らかとなった。

[文献]

1)Janowsky,A.,Berger,P.,Vocci,F.,Labarca,R.,Skolnick,P., and Paul,S.M. (1986) J. Neurochem. 46: 1272-1276

2)白川 治、平井 みどり、田中 千賀子 (1986) 神経化学 25: 49-51

3)Kimelberg,H.K. (1986) Biochem.Pharmacol. 35: 2273-2281

173. ラットのwet-dog shakes 発現における脊髄5−HT_2受容体の関与

越川憲明・Stephenson J. D. *

（日本大・歯・薬理，イギリス精神研＊）

〔要　約〕

Phenelzine前処置ラットにparoxetineを投与するとWDSの発現と急速（3時間以内）な皮質5-HT_2受容体のdown-regulationが惹き起こされる。この時点で再度paroxetineを投与してもWDSは出現せず、耐性現象が認められる。今回は、WDS発現には脊髄が深く関与しているとの報告を考慮し、spinal ratを用いてWDSの発現およびその耐性現象について実験を行った。また脊髄における5-HT_2受容体についても[^{3}H]-Ketanserinを用いて結合実験を行った。その結果spinal ratにおいてもWDSは出現し、3時間後には耐性現象が認められた。この時点では脊髄5-HT_2受容体数の減少（37％のBmaxの減少）が認められ、その減少は24時間後においても認められた。また脳幹部においても同様に5-HT_2受容体の減少が認められた。耐性現象が観察された時点でWDSを発現するに十分な量の5-HTが存在していなかった可能性を考慮し、その時点で5-HTPを投与したがWDSの発現は認められなかった。以上の結果より、WDS発現における耐性現象は主に脊髄の5-HT_2受容体数の減少によるものであることが示された。

Key word： wet-dog shakes、5-HT_2 receptors、spinal rats

〔緒言〕

Monoamine oxidase阻害薬（phenelzine）前処置ラットに5-HT uptake阻害薬のparoxetineを投与するとwet-dog shakes（WDS）が発現する。このWDSは5-HT_2受容体のantagonistによって選択的に拮抗されるところから5-HT_2受容体依存性と考えられている（4）。またparoxetine投与後3時間では30％の皮質5-HT_2受容体数の減少が認められており、この時点で再度paroxetineを投与してもWDSの発現は認められない（4）。このWDS発現に関する耐性現象は5-HT_2受容体のdown-regulationによってもたらされたものと推測されるが、WDSの発現には皮質よりも脳幹（1）および脊髄（7）が深く関与しているものとの報告があるので、おそらくそれらの部位においても5-HT_2受容体のdown-regulationが同時に起こっており、このことによってWDSの耐性現象が認められたものと考えられる。すでに演者らはラットの脊髄反射を指標として脊髄における5-HT_2受容体の変化について検討を行った結果、5-methoxy-N,N-dimethyltryptamineで促進される5-HT_2受容体依存性の単および多シナップス反射が、phenelzine前処置後paroxetineを投与し、24時間経過したラット（この時点でも皮質5-HT_2受容体は依然として減少している（3））においては認められないことを報告し（5）、脊髄においても5-HT_2受容体のdesensitizationが起こっていることを認めている。今回はWDSの発現と脊髄における5-HT_2受容体とのより直接的な関連性について明らかにするため、spinal ratを用いてWDSの発現およびその耐性現象について検討した。また従来、結合実験では難しいとされていた脊髄の5-HT_2受容体（6）についても検討を行い、そのdown-regulationを確認したので報告する。

［実験方法］

WDSの測定　Wistar系雄性ラット（体重250-300g）を使用し、halothane麻酔下で脊髄をC_1レベルで切断した。麻酔中止後人工呼吸下でWDSの測定を行った。WDSの測定間隔は15分とし、各時点の前5分間における1匹当りのWDS出現回数をカウントした。脊髄切断処置を行っていないラットにおけるWDSの測定も同じ測定間隔で行った。phenelzineの前処置はMarley and Wozniak（７）の報告に従いparoxetine（11.6mg/kg）投与前18h（46.8mg/kg）と1.5h（11.7mg/kg）に行った。薬物はすべて腹腔内に投与した。

5-HT_2受容体の結合実験　ラットを断頭屠殺後脳幹および脊髄を取り出し、50mM Tris-HCl buffer（pH7.7）を用いてホモジナイズした。ホモジネートを1000xg、4℃で10分間2回遠心し、cell debris（ここには特異的結合がほとんど認められない）を取り除いた後、上清を48000xg、4℃で15分間遠心した。得られたペレットを同じ条件で3度洗浄後受容体結合実験の試料とした。放射性リガンドはLeysenら（６）に従って[^{3}H]-ketanserin（0.03-0.35nM）を用い、最終容量を0.5ml（5mg original tissue）とし、37℃で15分間インキュベートした後、1% polyethylenimineを含む50mM Tris-HCl bufferに浸積したGF/Bフィルターで濾過し、さらにcold buffer 5mlで3回洗浄後液体シンチレーションカウンターで測定した。なお濾過面積を小さくし、直径は1cmとした。特異的結合量は全結合量より1μMのmethysergide存在下で得られた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 liner plots（２）によりBmaxおよびKdの値を算出した。

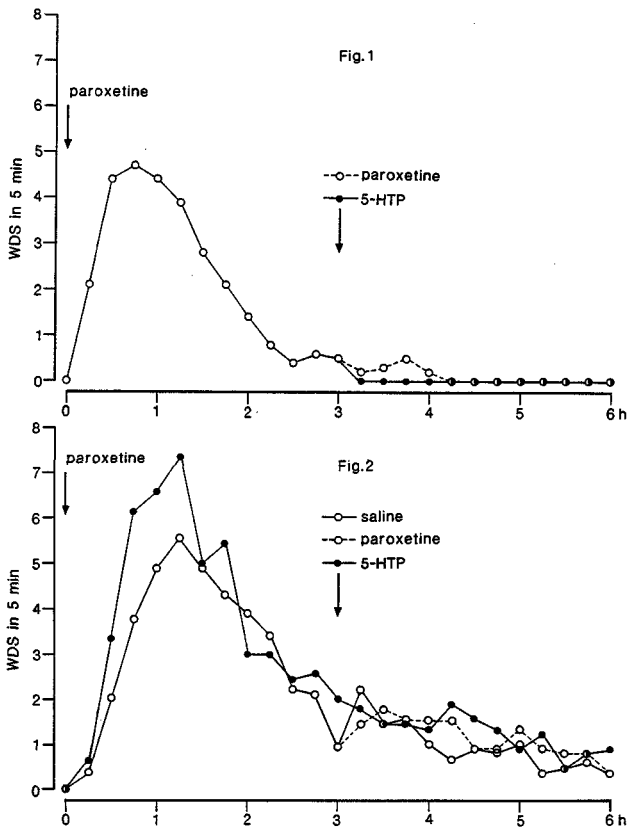


Fig. 1
Mean numbers of WDS occorring in spinal rats pretreated with phenelzine (46.8 mg/kg 18 h and 11.7 mg/kg 1.5 h previously) and given paroxetine (11.6 mg/kg) at zero time and 5-HTP (5 mg/kg, n=6) or paroxetine (11.6 mg/kg, n=6) at 3 h.

Fig. 2
Mean numbers of WDS occorring in intact rats pretreated with phenelzine (46.8 mg/kg 18 h and 11.7 mg/kg 1.5 h previously) and given paroxetine (11.6 mg/kg) at zero time and saline (n=9), paroxetine (11.6 mg/kg, n=9) or 5-HTP (5 mg/kg, n=9) at 3 h. One group of rats (●) received carbidopa (25 mg/kg) 45 min before paroxetine.

Table 1 Effects of paroxetine on [^{3}H]-Ketanserin binding to th spinal cord and brain stem of rats pretreared with phenelzin (46.8 mg/kg 18h and 11.7 mg/kg 1.5h previously)

time	treatment	spinal cord Bmax (f mol/mg tissue)	spinal cord Kd (nM)	brain stem Bmax (f mol/mg tissue)	brain stem Kd (nM)
3h	saline (n=8)	0.59±0.07	0.25±0.05	0.49±0.04	0.19±0.02
	paroxetine (n=8)	0.37±0.04‡	0.21±0.04	0.30±0.04‡‡	0.19±0.02
24h	saline (n=8)	0.59±0.06	0.26±0.02	0.52±0.05	0.21±0.02
	paroxetine (n=8)	0.36±0.05‡	0.24±0.04	0.33±0.04‡‡	0.20±0.03

‡P<0.05　‡‡P<0.01　The results are expressed as mean ± SEM.

［結果および考察］

Fig.1に示すように、spinal ratにおいてphenelzine前処置後にparoxetineを投与するとWDSが発現した。また3時間後に再度paroxetineを投与してもWDSは発現しなかった。この理由として、受容体に惹き起こされた変化以外に、2度目のparoxetine投与の時点ではすでに機能をはたすに十分な量の5-HTが存在していなかったことが考えられるので、5-HTP（5mg/kg）を代わりに投与したがWDSの発現は認められなかった。この5-HTPの投与量（5mg/kg）はphenelzine処置ラットにおいてWDSを多発させる量として知られている（３）。脊髄を切断していないラットにおいても同様に5-HTPの効果について検討したが、3時間の時点での5-HTP投与はWDSを発現しなかった（Fig.2）。なおこの時点での5-HTP投与はラットの全身状態を著しく悪化させ、数例が死亡した。これはcarbidopa（25mg/kg）を前投与することで抑えられたので末梢的な原因によるものと考えられる。Spinal ratとそうでないものとの間にWDSの出現時間に差があり、spinal ratにおいてはWDSが早い時点で認められなくなった。このことは、これらのWDSが必ずしも同一視できるものではないことを示しているが、少なくともspinal ratでWDSが発現する事実は脊髄がその発現に必須であることを示している。

WDS発現における耐性現象が脊髄における5-HT_2受容体のdown-regulationによるものとするには、脊髄において5-HT_2受容体数の減少が起こっているという直接的な証明が必要であったが、従来脊髄には5-HT_2受容体が少ないとされ（６）、それを結合実験で確認することは容易ではなかった。今回演者らは濾過面積を小さくし、また1% polyethylenimineを用いることによってfilterへの非特異的結合を減らして、[^{3}H]-Ketanserin 0.03～0.35 nMの範囲では全結合量に対し43～54%の特異的結合を得ることができた。その結果Table 1に示すようにparoxetine投与3時間後で37%のBmaxの減少が認められ、Kd値には変化が認められなかった。同様の変化は24時間後においても認められた。また脳幹においても3時間後、24時間後共に脊髄の場合と同程度のBmaxの減少が認められた（Table 1）。

以上の結果から、本実験で観察されたWDS発現における耐性現象は、主に脊髄の5-HT_2受容体のdown-regulationの結果によるものであることが示された。

［文献］

(1)Bedard, P. and Pycock, C. J. (1977) Neuropharmacol., 16, 663-670
(2)Eisenthal, R. and Cornish-Bowden, A. (1974) Biochem. J., 139, 715-720
(3)Koshikawa, F., Koshikawa, N. and Stephenson, J. D. (1985) Europ. J. Pharmacol., 118, 273-281
(4)Koshikawa, N., Smokcum, R. W. J. and Stephenson, J. D. (1985) Neuroscience Lett., 55, 279-282
(5)Koshikawa, N. and Stephenson, J.D. (1987) British. J. Pharmacol., 90, 247P
(6)Leysen, J. E., Niemegeers, C.J.E., Van Nueten, J. M. and Laduron P.M. (1982) Mol. Pharmacol, 21, 301-314
(7)Marley, E. and Wozniak, K. (1984) J. Psychiat. Res., 18, 173-189

174. MAM小頭症ラット脳におけるモノアミン量の増加とモノアミン受容体の変化

松谷天星丸・永吉道子*・平田ゆかり・渡辺雅幸**・
辰沼利彦**・小川加寿子***・間宮群二***
（藤田学園保衛大・医・総医研，慶応大・医・生理*・
防衛医大・精神**；第一生化***）

〔要　約〕

Methylazoxymethanol acetate(MAM)を胎生15日に投与されたラットは、生後3ヶ月における大脳重量が対照の約50%に減少した。このラット(♂)脳では、dopamine(DA)量が大脳新皮質前半部、同後半部及び線条体の順に、それぞれ対照の3.5,5.6,3.0倍に、norepinephrine(NE)量は、3.3,3.5,4,8倍に、serotonin(5-HT)量は1.6,1.9,3.1倍に増加した。生後60日で線条体のDA受容体(D_1及びD_2)及び大脳新皮質前半部のserotonin受容体(S_2)の検索を行った。測定はそれぞれ^{3}H-ligandとしてD_1は^{3}H-SCH23390,D_2は^{3}H-Spiperone,S_2は^{3}H-ketanserinを用いて受容体のScatchard解析を行った。MAM群では、D_2,S_2両受容体のBmax値(受容体の数)が対照群に比して約30%の有意($p<0.01$)の減少を示した。一方、D_1受容体数(Bmax)及び、D_1,D_2,S_2 のaffinity(K_D値)は、何れもMAM群と対照群の間に差を認めなかった。MAM群は行動面で易刺激的であり、FR30,FI60"複合スケジュールによるオペラント弁別学習テストにおいて、高い行動活性を示したが、弁別能力は保持されていた。しかし、逆転学習によって、明らかな障害を示した。

Kev word：
Methylazoxymethanol　D_2 receptor　S_2 receptor

Methylazoxymethanol ― 細胞分裂阻害物質 ― を胎生15日に投与されたラットは、神経細胞の脱落によって、大脳の低形成をひきおこす。このラット脳ではモノアミン量(湿重量当り)が有意に増加する事を既に報告した(4)。更に私共はMAM投与ラットの行動面の異常と大脳におけるモノアミン量の増加との関連について研究を進めてきたが、本実験では、モノアミン量の増加が後シナプスに及ぼす影響を探るためにモノアミン受容体の検索を行った。

実験方法：動物はWistar-Imamichi系白鼠を用い、Methylazoxymethanol acetate(MAM)(ASH.Inc.Detroit Mishigan)20mg/kgを妊娠15日目の母ラットに一回腹腔内注射し、自然分娩による仔動物を用いた。雄ラットを午前10時に屠殺の時間を揃え、瀉血断頭により脳を摘出した。組織はGlowinskiら(3)の方法に準じて大脳皮質、線条体を切り出し、大脳皮質は前交連と視交叉を結ぶ線で前半部と後半部(以下anteriorとposteriorと称す)に分け、古皮質を除いた。組織は直ちに冷凍後、重量を測定し-80℃で保存し以下の実験に供した。

モノアミン量の測定(11)：組織を15倍量の0.1N-PCAでhomogenize(9.000r.p.m. 30秒)し、16.000g 20分遠沈上清をポアーサイズ0.22μmフィルターで遠沈沪過しその上清10~40μlをHPLCにより内部標準法を用い電気化学的に分離測定した。

レセプター結合実験：組織を解凍後氷冷buffer中で、Biotronにより20秒間homogenizeし20.000g 30分遠沈後沈渣をbufferに懸濁したものを膜標品とした。Bufferの組成はD_1,D_2測定時には50mM Tris-HCl(pH7.4 at 20℃), 1mM EDTA, 4mM $MgCl_2$, 1.5mM $CaCl_2$, 5mM KCl, 120mM NaClを使用し、S_2測定に際してはNaの阻害(7)をさけるため、上記bufferからNaClを除いたものを使用した。D_1,D_2測定には線条体1mg o.w.w./assayを、S_2測定には大脳皮

質前半部2mg o.w.w./assayを用い、最終量1.5mlで室温(20℃)2時間incubate後cell harvesterにより吸引沪過後、沪紙上にtrapされたβ線を測定した。各受容体について次のScatchard解析を行った。D_2測定には^{3}H-spiperone(25.6ci/m mol)をligandとし0.01～0.7nMの7点の濃度を使用し、10μM(-)sulpirideにより阻害される結合を特異的結合とした。D_1測定には^{3}H-SCH23390(70ci/m molを、cold SCH23390で25ci/m molに希釈して使用)の0.02～1.5nMの7点を使用し、10μM(+)butaclamolをbaselineとして、特異的結合を求めた,S_2測定には、^{3}H-Ketanserin(61.8ci/m mol)の0.1～1.5nMの7点を使用し、10μM cinanserinをbaselineとして特異的結合を求めた。全実験はtriplicateで行った。

学習テスト：FR30(fixed ratio)強化とFI60"(fixed interval)強化の複合スケジュールを用いた(5),テスト開始前に体重を調整し、形成訓練(shaping)を施した後本実験を1日1 session,24 session行った。有意差検定はt検定を用いた。

実験結果及び考察

図1は、湿重量当りのモノアミン量を示した。DA量は新皮質前半部、後半部、線条体の順にそれぞれ対照の3.5,5.6,3.0倍に、NE量は3.3,3.5,4.8倍に、5-HT量は1.6,1.9,3.1倍に増加した。私共は既に、MAMラットの大脳半球におけるDA,NE,5-HT量の増加は、神経化学的定量及び蛍光組織化学像の検索の結果が、低形成された大脳半球でモノアミン作動性神経終末の濃縮された存在状態を物語ることを報告した(4)。今回は更に部位を細かく分け、線条体、新皮質についてその分布状態をより詳細に確かめた。次に各アミンの受容体の変化について検討を加えた。図2に示す如く、MAM群はD_2,S_2両受容体のBmax値(受容体数)がいづれも対照群に比して約30%の減少を示した。一方D_1受容体数(Bmax)は有意差を示さなかった。Affinity(K_D値)はD_1,D_2,S_2共にMAM群と対照群の間に差を認めなかった。このD_2,S_2受容体数の減少は、前述のようにMAM群においてはセロトニン及びドパミン作動性神経終末が濃縮した状態で存在し、シナプス部でのモノアミン放出量が増加しているため、シナプス後D_2,S_2受容体がdown-regulation(8,9)をうけその数が減少したものと考えられる。

Beaulieu &Coyle(1)はMAMラットで、アドレナージックβ受容体における、down-regulationを見出し、これに6-OHDA投与によってBmax(受容体数)の回復する事を報告している。他方、apomorphine投与によって対照ラットに見られるstereotypyは、MAMラットではその出現が軽度になる事を報告した(10)。このことから彼らはMAMラットではシナプス後D_2受容体に低感受性のある事を行動面から示唆しており、今回の私共の実験結果はこれを裏付けるものともいえる。一方、D_1受容体数が変化しなかった理由は明らかではないが、分裂病脳ではD_1に変化がなくD_2は増加するという報告(12)また動物への抗精神病薬の投与によってもD_2のみが増加するなどの報告(6)と今回の結果を併せ考えるとD_1とD_2には異なった調節機構の存在が示唆される。図3,aに示すようにMAM群はFRとFIの弁別は可能であったが対照群に比しFRを短時間で遂行し累積曲線は急峻な勾配を示した,これは行動活性が高いためと考えられる。Cannon Spoor & Freed(2)も、MAMラットのavoidance testでMAMラットがhyperactivityを示すことを報告している。しかし、図3,bに示すように、逆転学習を行うことによって、MAM群は対照群に比し、明らかな障害を示した。このことは、原学習に対する固執性の強い事を物語るものと考える。何れにしても、MAMラット脳ではDA,NE,5-HTが共に増加しているのでその行動異常との関連について意味づけが困難であるが今後シナプス後受容体D_2,S_2の減少との関連を更に詳細に検討する必要がある。

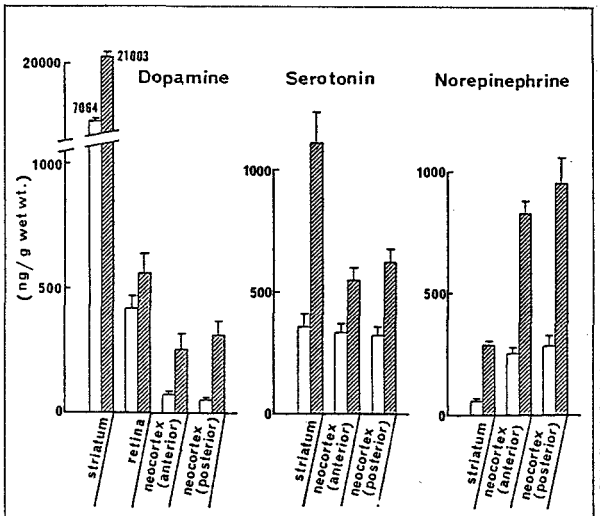


Fig. 1 Elevated monoamine contents in various regions of MAM-treated rats CNS.

Each bar represents the mean±S.D. of 3 to 6 animals. The animals were killed at 3 months of age. ☐ Control ▨ MAM 15 :rats were given methylazoxymethanol acetate (20mg/kg) on 15th day of gestation.

The tests were started with 5 littermates at the age of 80 days. Original learning:displays are result of the 15th session, Reversal learning:displays are result of the 10th session.

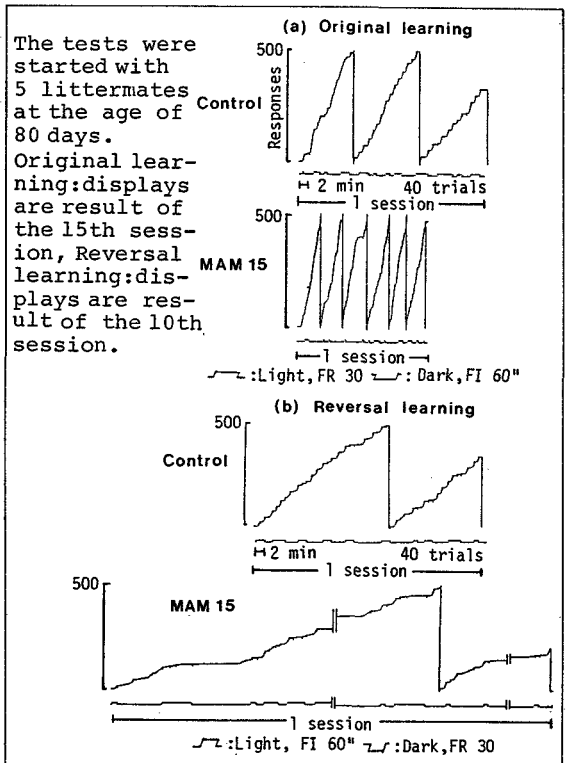


Fig. 3 Cumulative records of responses on the FR 30, FI 60" reinforcement schedule.

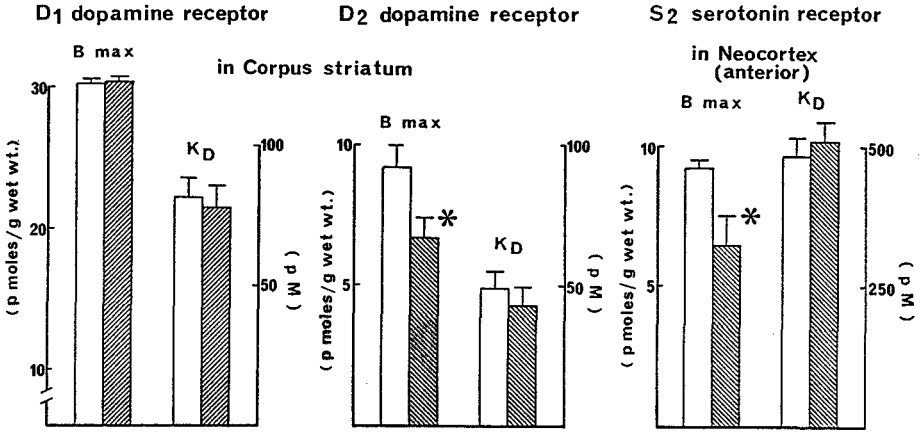


Fig. 2 Changes of monoaminergic receptors in MAM-treated rats.

Each bar represents the mean±S.D. of 4 animals. The animals were killed at 60 days after birth. ☐ Control ▨ MAM 15 :rats were given methylazoxymethanol acetate (20mg/kg) on 15th day of gestation. *P<0.01

文献

(1)Beaulieu,M.and Coyle,J.T.(1982)Develop.Brain Res.4:491-494
(2)Cannon-Spoor,H.E.and Freed,W.(1984)Pharmacol.Biochem.Behav.20:189-193
(3)Glowinski,J.and Iversen,L.L.(1966)J.Neurochem.13:655-669 (4)Matsutani,T.et al (1980)J.Neurochem.34:950-956 (5)松谷雅(1984)厚生省神経疾患委託研究 昭和58年度研究成果報告書:37-45
(6)Mackenzie,R.G.et.al.(1985)Eur.J.Pharmacol.113:159-163 (7)Niznik,H.B.et al. (1985)Naunyn-Schnicedeberg's Arch.Pharmacol.329:333-343 (8)Seeman,P.(1980) Pharmacol.Rev.32:229-313 (9)Stiles,G.L.et al.(1984)Physiol.Rev.64:661-743
(10)Sanberg,P.R.et al.(1985)Neuropharmacology 24:1057-1062 (11)Wagner,J.et al. (1982)J.Neurochem.38:1241-1254 (12)渡辺慶幸他(1987)最新医学42:928-937

175. VIPによるTRHレセプターの調節——異なったセカンドメッセンジャー系の連関——

小川紀雄・羽場久美子・曽良由起子・河田牧男
（岡山大・医・脳代謝研・機能生化）

〔要　約〕

二種の神経ペプチド、vasoactive intestinal peptide (VIP) と thyrotropin releasing hormone (TRH) の相互関係を検討した。実験系を単純化するためにGH3細胞を用い、intact cell と膜分画に調整した場合とでTRHレセプター結合能を調べた。intact cell を VIP, forskolin あるいは dibutylyl cyclic AMP と preincubate しておくとTRH結合能は低下したが、膜分画を用いた場合には VIP, forskolin, dibutylyl cyclic AMP は無効で、cyclic AMP dependent protein kinase（A－kinase）のみがTRHレセプター結合を減少させた。これらの成績はアデニレートサイクラーゼ系が活性化されてA－kinaseが増加するとイノシトールりん脂質系と連関しているTRHレセプターの結合能が抑制的に制御されることを示しており、細胞内の二つの重要な刺激伝導系の間に、細胞質の要素（おそらくはA－kinase）を介する連絡のルートのあること示唆している。また、今回の成績は細胞の構築を保ったままでの実験系の重要性を意味している。

Key word : TRH-receptor, cyclic AMP dependent protein kinase, GH_3 cell

〔はじめに〕

同一の神経細胞に古典的神経伝達物質と神経ペプチドの共存することが報告され[4]、さらに、神経ペプチドどうしの共存が明らかにされたことから[8]、これら広義の神経伝達物質の相互作用が注目を集めている。しかし、「共存」に関する研究報告の大部分は単に共存しているということを述べているだけのものが多く、生理学的意義にまで言及しているものはまだ少ない。このような同一神経細胞での「共存」現象の存在は、さらには異なったfamilyに属する神経ペプチドどうしの相互作用に興味を湧かせるものである。今回の研究では、実験系を簡単にするために、GH3細胞を用いてvasoactive intestinal peptide（VIP）とthyrotropin releasing hormone（TRH）との相互関係、ことに前者のTRHレセプターに対する作用を検討した。この二者を選んだ理由はVIPがアデニレートサイクラーゼ系を[6]、TRHがイノシトールりん脂質系を[3][7]それぞれセカンドメッセンジャーとする代表的な神経ペプチドだからである。

〔方法〕

1）GH3細胞の調整

GH3細胞は常法に従ってRPMI-1640（RPMI）に牛胎児血清を10%添加してCO_2インキュベーターで培養した。intact cellを目的とする場合には血清を含まない冷RPMIで二回洗浄した（1,000rpm, 5 min）後、10^{-6}個／mlになるように調整した。GH3細胞の細胞膜分画は－70・Cで保存してあった

ＧＨ3細胞をホモゲナイズし、12,000 Ｇで２０分遠心（２回）した後 0.5 mg protein/mlとなるようにＲＰＭＩに再懸濁した。

２）レセプター・アッセイ

mediumとしては、ＲＰＭＩにaprotinine 200 KIU/ml, bacitracin 50 ug/ml, 0.5% BSA を添加したものを用いた。ＧＨ3細胞サスペンジョンあるいは膜分画懸濁液0.5 mlと３７・Ｃで種々の薬剤(0.1 ml)とを１５分間 preincubateし、次いで[^{3}Ｈ]ＭｅＴＲＨを添加し（総incubation volume : 0.8 ml）３０分間レセプター結合実験を行った。Ｂ・Ｆの分離は吸引ろ過法に依った。非特異的結合は 10 μM ＴＲＨ存在下での放射活性とした。

[結 果]

intact cellを用いた実験結果をＦｉｇ. １に示す。ＶＩＰと preincubate すると、用量依存的にＴＲＨレセプター結合が抑制された。forskolin (10 μM)あるいは dibutylyl cyclic AMP (cAMP; 100 μM)と preincubate した場合にもＴＲＨレセプター結合は低下した。ＧＨ3細胞はホルモン産生細胞であるので、放出されたホルモンによってＴＲＨレセプターが影響を受ける可能性がある。そこで上記の薬剤とＧＨ3細胞とを１５分間incubate した後、遠心・洗浄によって薬剤とホルモンとを取り除くために medium を新しいものと交換してＴＲＨのレセプター結合を調べたが、Ｆｉｇ. １と同様の結果であった。これらの薬剤はいずれもアデニレートサイクラーゼ依存系に関係があるので、その代表として dibutylyl cAMP 処置によるＴＲＨレセプター結合の Scatchard 解析を行ったところＴＲＨ結合の低下はＢmax の減少に由来するものであった。さらに、phorbol 12,13-dibutylate(phorbol)によってもＴＲＨレセプター結合は低下した（Ｆｉｇ. １）

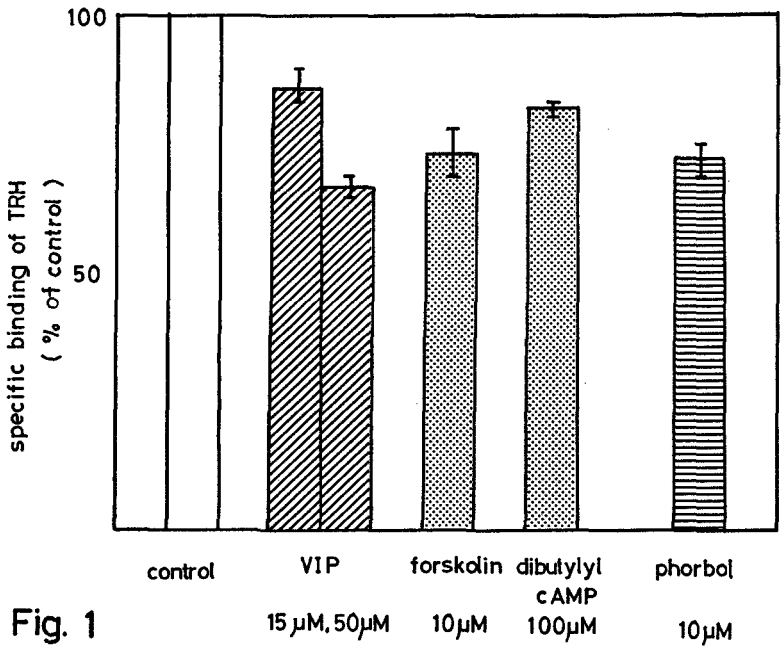


Fig. 1

これに反して、ＧＨ3細胞の膜分画を用いるとＶＩＰ, forskolin, dibutylyl cAMP あるいは phorbol との preincubation はいずれもＴＲＨレセプター結合になんらの影響も示さなかった。しかし、cAMP dependent protein kinase（Ａ－ｋｉｎａｓｅ）によってのみＴＲＨ結合は低下した。また、GTP,GppNHp, D-myo-inositol 1,4,5-trisphsphate あるいは IAP などは、intact cell を用いても膜分画を用いてもＴＲＨレセプター結合にはなんら影響を示さなかった。

［考察］

ＧＨ3細胞のＴＲＨレセプターはイノシトールりん脂質系に連関しているとされている[3)7)]。しかし、今回の検討で、アデニレートサイクラーゼ依存系が活性化されるとＴＲＨ結合能が低下することが明らかになった。しかもこの現象の発現には細胞質の存在が必要で、アデニレートサイクラーゼ系のうちでも A-kinase によってもたらされると推定された。beta-アドレナリン・レセプターに関して、同種脱感作は cAMP やＡ－ｋｉｎａｓｅに非依存性の燐酸化によって生ずるとされ[10)]、異種脱感作はbeta-アドレナリン・レセプターが cAMP によって燐酸化するが、その燐酸化に対応してアデニレートサイクラーゼ活性化能が低下することが報告されている[9)]。いずれにしても、beta-アドレナリン・レセプターの脱感作に関しては本来連関しているアデニレートサイクラーゼ系とのつながりである。今回の成績で興味のある点は、アデニレートサイクラーゼ依存系がイノシトールりん脂質系と連関しているＴＲＨレセプターを制御していることで、細胞内の二つの重要な刺激伝達系間に相互作用のルートが存在するという点である。なお、phorbol によっても intact cell ではＴＲＨ結合が減少するが、膜分画では無効であることから、作用発現には細胞質が必要である。phorbol が cAMP やＡ－ｋｉｎａｓｅを上昇させるという最近の報告[1)2)5)]を考え併せると、phorbol のＴＲＨレセプターに対する作用もＡ－ｋｉｎａｓｅを介するものと一応の理解ができる。

［文献］

1. Bell, J.D., and Brunton, L.L. (1986) J. Biol. Chem. 261:12036-12046.
2. Cronin, M.J., Summers, S.T., Sartino, M.A., and Hewlett, E.L. (1986) J. Biol. Chem. 261:13932-13935.
3. Drust, D.S., and Martin, T.F.J. (1984) J. Biol. Chem. 259:14520-14530.
4. Hökfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, Å., Lundberg, J.M., and Schultzberg, M. (1980) Nature 284:515-521.
5. Karbon, E.W., Shenolikar, S., and Enna, S.J. (1986) J. Neurochem. 47:1566-1575.
6. Langshore, M.A., and Makman, M.H. (1981) Eur. J. Pharmacol. 70:237-240.
7. Macphee, C.H., and Drummond, A.H. (1984) Mol. Pharmacol. 25:193-200.
8. O'Donohue, T.L., Millington, W.R., Handelman, G.E., Contreras,P.C.,and Choronwall, B.M. (1985) TIPS 6:305-308.
9. Sibley, D.R., Peters, J.R., Nambi, P., Caron, M.C., and Lefkowitz, R.J. (1984) J. Biol. Chem. 259:9742-9749.
0. Sibley, D.R., Strasser, R.H., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1985) J. Biol. Chem. 260:3883-3886.

176. ストレスによるラット脳内ノルアドレナリン代謝回転亢進に対するエタノールの減弱効果

白尾一正・井田能成・津田彰・辻丸秀策・
佐藤洋美・小口雅申・権藤雄二・田中正敏・
稲永和豊*
（久留米大・医・薬理，精神*）

〔要　約〕

ラット脳内noradrenaline(NA)の主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxy-phenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO4)含量を定量することにより、拘束ストレスと心理的ストレス(直接に電撃は受けず、周囲のラットが電撃を受けるたびに示す鳴き声、跳び上り、臭いなどにさらされる)によって引き起こされるラット脳内NA代謝回転亢進に及ぼすethanolの急性投与の影響について検討した。1時間の拘束ストレスにより検討した5部位、つまり視床下部、扁桃核、海馬、大脳皮質、青斑核部においてMHPG-SO_4含量が有意に増加した。このMHPG-SO_4含量の増加に対してethanolは視床下部、海馬、大脳皮質では影響を与えなかったが、扁桃核と青斑核部で特異的な抑制作用を示した。又、1時間の心理的ストレス負荷によっても視床下部、扁桃核でMHPG-SO_4含量が有意に増加した。心理的ストレス状況下においてethanolは視床下部では非ストレス状況下で投与した時と同程度MHPG-SO_4含量を増加させたが、扁桃核では心理的ストレスによるMHPG-SO_4含量の増加を抑制した。これらの結果から、ストレスによって生じるNA代謝回転亢進に対して、ethanolは扁桃核という限られた脳部位でのみ特異的に抑制作用を示すことが示唆された。

Key word： ethanol, stress, noradrenaline.

拘束ストレスによりラットの広範な脳部位で、noradrenaline(NA)の代謝回転が亢進する(6,7,8)。この拘束ストレスによるNA代謝回転亢進は視床下部、扁桃核、海馬では強力なopiateであるmorphine(9)や代表的抗不安薬であるdiazepamにより抑制される(2)。一方、心理的ストレスにより視床下部、扁桃核、青斑核(locus coeruleus, LC)部でNAの代謝回転が亢進する(3,10,11,12)。この心理的ストレスによるNA代謝回転亢進をmorphineは抑制しないが、diazepamはこれら3部位において抑制する(10)。今回はこれら2つのストレス負荷によるNA代謝回転亢進に対するethanolの影響について検討した。

【方　法】

実験1　体重170-190 gのWistar系雄性ラット48匹を対象とし、saline(SAL)、ethanol 0.5 g/kg、ethanol 2 g/kgのいずれかをストレス負荷5分前に腹腔内に投与し、おのおの半数に1時間の金網による拘束ストレスを負荷した。

実験2　体重250-280 gのWistar系雄性ラット32匹を対象とした。心理的ストレスには透明なアクリル板で25の区画に仕切られた箱を用い、SAL、ethanol 0.5 g/kg、ethanol 2 g/kgのいずれかをストレス負荷5分前に腹腔内に投与した。心理的ストレスを受けるラットは、床のグリッドから電撃を受けるたびに周囲のラットが示す鳴き声や跳び上り、臭いなどに1時間さらされるようにした。controlのラットは周囲のラットに電撃を与えることなくSAL投与後同じ箱に1時間放置した。

各操作終了後、脳を摘出し、実験1ではLC部をReisとRossの方法(5)で、視床下部、扁桃核、海馬、大脳皮質はGipsenらの方法(1)で切り出した。実験2では同様に視床

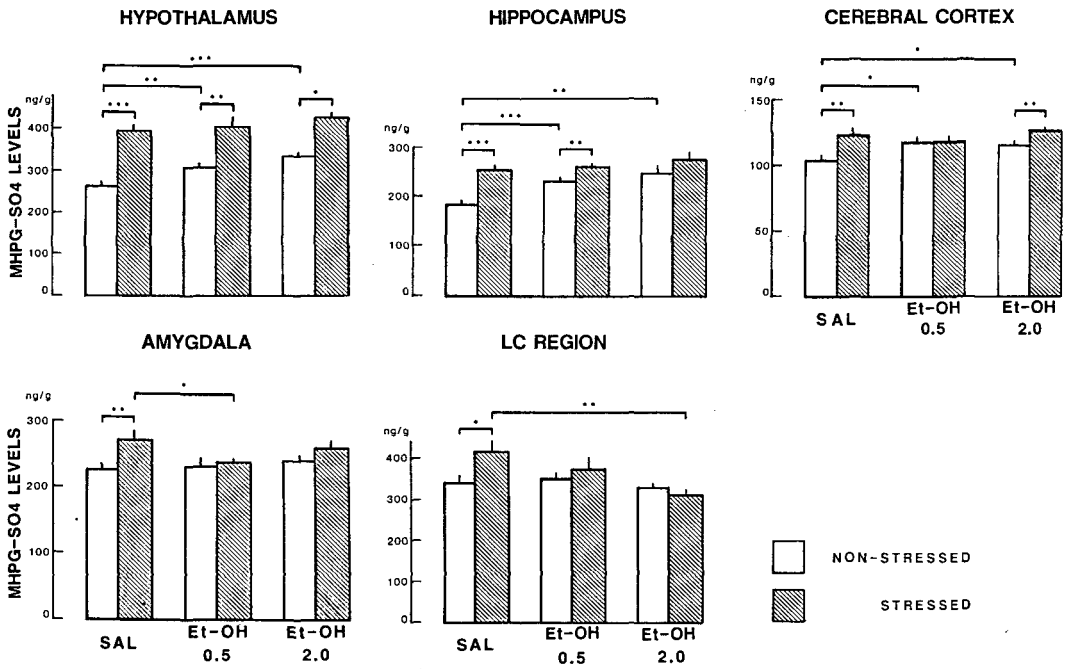


Fig.1. Effect of ethanol on 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO4) levels(ng/g) in brain regions in non-stressed and immobilization-stressed rats. Each value indicates the mean ± S.E.M. SAL, saline: Et-OH 0.5, ethanol 0.5 g/kg: Et-OH 2.0, ethanol 2.0 g/kg. Levels of statistical significance are: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

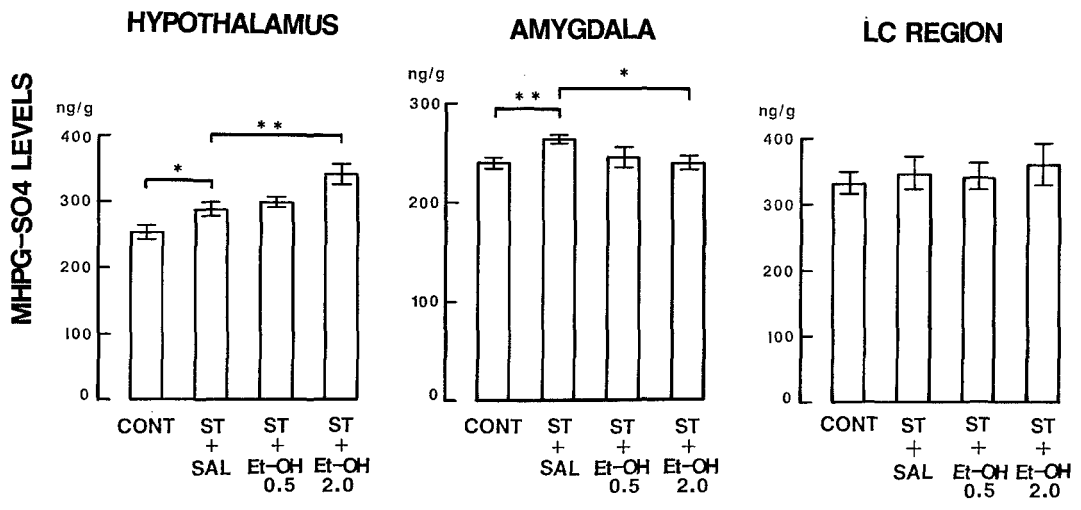


Fig.2. Effect of ethanol on MHPG-SO4 levels(ng/g) in the hypothalamus, anygdala and locus coeruleus (LC) region in rats in the psychological stress situation. Each value indicates the mean ± S.E.M. SAL, saline: Et-OH 0.5, ethanol 0.5 g/kg: Et-OH 2.0, ethanol 2.0 g/kg: ST, psychological stress. Levels of statistical significance are: *p<0.05, **p<0.01

下部、扁桃核、青斑核部を切り出した。各部位のMHPG-SO_4含量を演者らの方法(4)で蛍光法により測定した。統計学的解析にはStudent's t-test(両側検定)を適用した。

【 結 果 と 考 察 】

実験1の結果をFig.1に示す。1時間の拘束ストレスにより検討したすべての部位でMHPG-SO_4含量が増加し、NA代謝回転が亢進することが示唆された。視床下部、海馬、大脳皮質では非ストレス状況下でのethanol投与でMHPG-SO_4含量が増加したが、拘束ストレスによるMHPG-SO_4含量の増加に対しては影響を与えなかった。一方、扁桃核と青斑核部では非ストレス状況下でethanolは影響を与えなかったが、ストレスによるMHPG-SO_4含量の増加をそれぞれ0.5 g/kg、2 g/kg で抑制した。実験2の結果をFig. 2に示す。1時間の心理的ストレス負荷により視床下部、扁桃核、青斑核部でMHPG-SO_4含量が増加することをすでに報告したが、今回は視床下部、扁桃核でのみそのような増加が認められた。視床下部ではethanolはmorphineと同様(9)に心理的ストレス負荷により非ストレス状況下での投与と同じ程度のMHPG-SO_4含量の増加を示した。しかし、扁桃核においてはethanolはdiazepam同様(2)、心理的ストレス負荷によるMHPG-SO_4含量の増加を抑制した。

以上の結果よりethanolのラット脳内NA代謝回転に及ぼす影響は 1) ストレス状況に置かれたか否か、あるいはそのストレス状況の種類により異なること。2) それらの条件の他に、脳部位によっても異なり、ストレスによって生じる脳内NA代謝回転亢進に対しては、不安や恐怖といった情動と深い関係があるといわれる扁桃核において特異的な抑制作用を示すことが示唆された。

【 引 用 文 献 】

1. Gipsen, W. H. et al.(1972) Neuroendocrinology., 9: 285-296.
2. Ida, Y. et al. (1985) Life Sci., 37: 2491-2498.
3. Iimori, K. et al. (1982) Pharmacol. Biochem. Behav. 16: 637-640.
4. Kohno, Y. et al. (1981) J. Neurochem., 36: 286-289.
5. Reis, D. J. and R. A. Ross (1973) Brain Research., 153: 307-326.
6. Tanaka, M. et al. (1982) Pharmacol. Biochem. Behav., 16(2): 315-319.
7. Tanaka, M. et al. (1982) Life Sci., 30: 1663-1669.
8. Tanaka, M. et al. (1983) Pharmacol. Biochem. Behav., 19: 543-549.
9. Tanaka, M. et al. (1983) Brain Research., 275: 105-115.
10. 田中正敏, et al. (1985) 神経化学, 24: 121-123.
11. Tsuda, A. et al. (1986) Pharmacol. Biochem. Behav., 24: 115-119.
12. 津田 彰, et al. (1984) 神経化学, 23: 96-98.

177. マウス松果体インドール化合物の日内変動について

東　　均・八木昭彦・西村　　健・
大和谷　厚*・和田　博*
（大阪大・医・精神，第二薬理*）

〔要　約〕
高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）－蛍光法を用いて、マウス松果体のインドール化合物の日内変動について検討した。

9時～21時を明、21時～9時を暗とする明暗条件下で2週間飼育した9週齢のddY系雄マウスを24時間にわたって4時間毎に断頭して松果体を取り出し、インドール化合物を系統的に定量した。1群は5匹とし、暗期には写真用赤外線ランプのみの照明下で断頭した。マウス松果体では、serotonin(5HT)、5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA)、tryptophan(TRP)、5-hydroxytryptophol(5HTOL)、N-acetylserotonin (NAc5HT)の5種類のインドール化合物が分別定量できたが、melatonin(MLT)は明暗いずれの時期にも検出されず、ddYマウスは、C57BL/6J，BALB/Cマウスなどと同様に、MLTを欠いていると考えられる。

マウス松果体のインドール化合物の日内変動を検討したところ、5HTのみが明期に高く暗期に低い日内変動を示したのに対し、5HIAA，5HTOL，NAc5HTは、暗期にピークをもつ日内変動を示し、特に 5HIAA，5HTOLは、明暗に対する変化が、ラットでの従来の報告と逆であった。

Key word：
indole derivatives，　pineal gland，　mouse

【はじめに】　松果体は、生体のリズムの調節に重要な役割を果たしている。特に松果体のメラトニンは、その含量が著明な日内変動を示すことが知られており、種々の動物について、様々の面から研究されている。一方、松果体には、メラトニン以外に、5-hydroxytryptophol、5-methoxytryptophol、N-acetylserotoninなどのインドール化合物が含まれている。従来、これらの化合物は、メラトニン合成の中間代謝物であると考えられていたが、近年、これらが独自の生理的意義を持つのではないかとの報告も見られるようになってきている（2、4）。しかし、定量法など方法論上の制約もあって、メラトニンに比べると、その研究は進んでいない。

ところで、最近、ある種のマウスでは、遺伝的に、松果体のメラトニンを欠いていることが、報告されている（1）。このようなマウスの松果体でのインドール化合物の代謝を研究することは、メラトニン以外のインドール化合物の生理的意義を検討する上で、興味深い。

我々は、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）－蛍光法を用いて、ddYマウス松果体のインドール化合物を系統的に定量し、その日内変動について検討した。

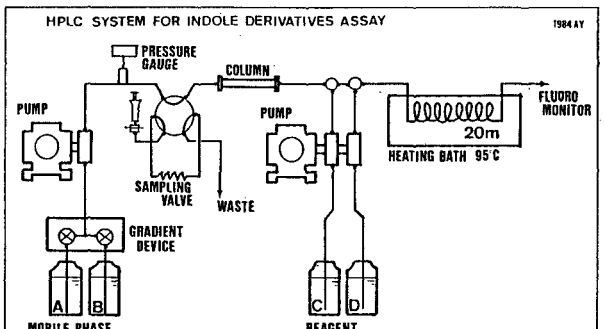


Fig.1 HPLC system for indole derivatives assay

【対象と方法】　実験には雄のddYマウスを用いた。7週齢のマウスを購入し、9時～21時を明、21時～9時を暗とする明暗恒温条件下で3週間飼育した後、実験に供した。食物、水は自由に摂取させた。実験当日、15時から翌日11時まで、4時間毎にマウスを断頭致死せしめ、速やかに、氷上で、松果体を直上の頭骨と共に取り出し、測定まで、－80℃で凍結保存した。一群は5匹とした。なお、暗期には写真用赤外線ランプのみの照明下で断頭した。

インドール化合物の定量には、ＨＰＬＣ－蛍光法を用いた。松果体に3％過塩素酸（0.1％アスコルビン酸含有）50μlを加え、超音波破砕、遠沈後、その上清の一部をＨＰＬＣに注入した。

ＨＰＬＣの固定相には逆相系充てん剤、移動相には酢酸ナトリウム緩衝液とメタノールを混合した液を用い、メタノール濃度10％～50％への30分間の直線勾配溶出を行った。カラムからの溶出液にオンラインでオルトフタルアルデヒドおよび硫酸を加え、テフロンチューブ内で加熱して、インドール化合物に特有なMaichel and Miller（3）の発蛍光反応を行わせ、生じる蛍光を蛍光計で測定した。Fig.1にシステムの概要を、Fig.2に標準品の分析チャートを、Fig.3にマウス松果体の分析チャートの一例を示す。

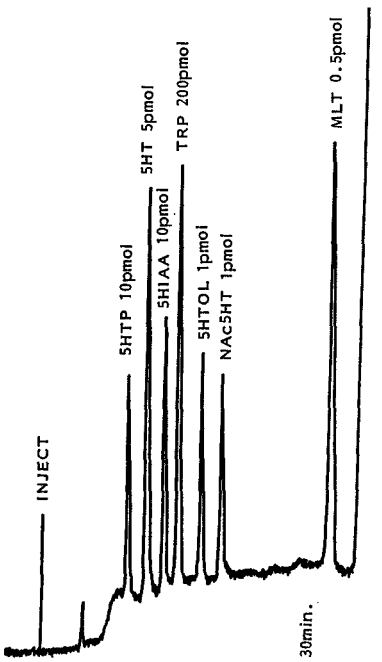


Fig.2 Chromatogram of indole derivatives (standard sample)

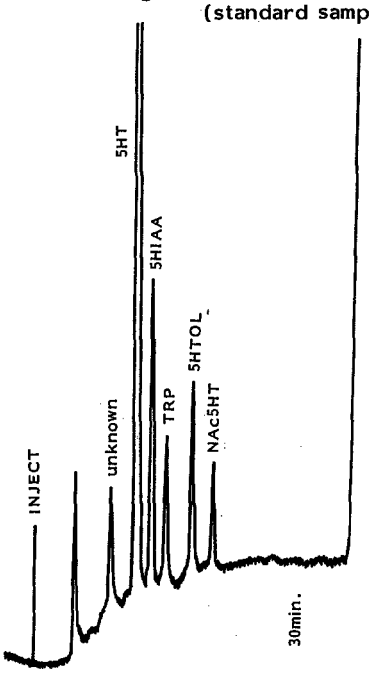


Fig.3 Chromatogram of indole derivatives (mouse pineal gland)

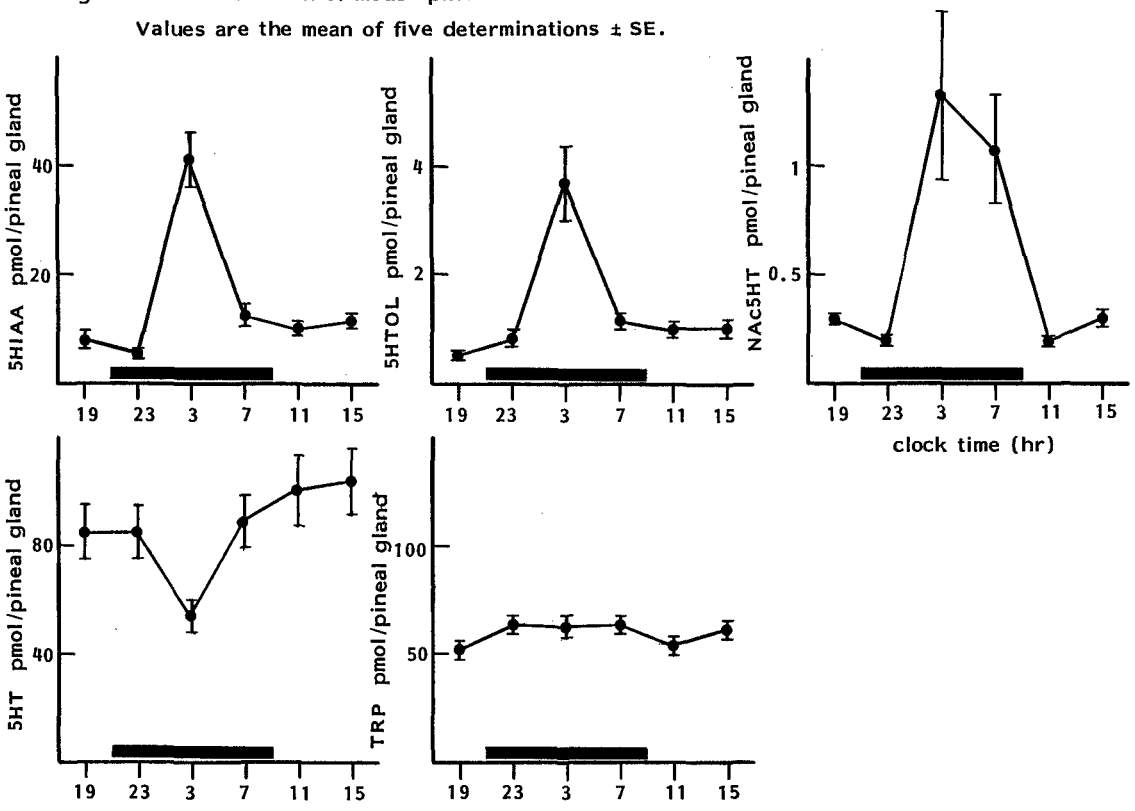
【結果および考察】　マウスの松果体では、serotonin(5ＨＴ)、5-hydroxyindoleacetic acid(5ＨＩＡＡ)、tryptophan(ＴＲＰ)、5-hydroxy-tryptophol(5ＨＴＯＬ)、N-acetylserotonin(ＮＡｃ5ＨＴ)の5種類のインドール化合物が分別定量された。melatonin(ＭＬＴ)は明期あるいは暗期のいずれの時刻にも検出されず、ddYマウスはＭＬＴを欠いていると考えられる（Fig.3）。Ebiharaら（1）は、多くの系統のマウスについてＭＬＴの有無を検討し、野生のマウスでは松果体にＭＬＴを有しているが、40年以上前に分離され近交系として確立されているC57BL/6J、BALB/Cなどの系のマウスではＭＬＴを欠いていると報告している。彼らは、更にC57BL/6Jマウスについて、ＭＬＴの合成酵素であるN-acetyltransferase（ＮＡＴ）、hydroxyindole-O-methyltransferase（ＨＩＯＭＴ）の酵素活性を測定

し、遺伝的に規定されるこの両酵素の活性が極めて低いことがＭＬＴを欠く理由であるとしている。今回、我々が実験に用いたddY系マウスは、1910年頃にドイツから日本にもたらされたdd系に起源をもつとされているが、やはりＭＬＴを欠いていることが明らかになった。しかし、ＮＡｃ５ＨＴは存在することから、ＮＡＴ活性はあるものと考えられ、ＨＩＯＭＴのみが欠損している可能性が想定される。

Fig.4には、ddYマウスの松果体のインドール化合物の日内変動を検討した結果を示した。ＴＲＰを除いて、いずれの松果体インドール化合物にも日内変動が見られた。ところで、ラットにおける報告（５）では、５ＨＴ、５ＨＩＡＡ、５ＨＴＯＬ、ＴＲＰが、明期に高く暗期に低い日内変動を示し、ＮＡｃ５ＨＴ、ＭＬＴはこれとは逆に明期に低く暗期に高い日内変動を示すとされている。今回のマウスの結果では、５ＨＴのみが明期に高く暗期に低い日内変動を示したのに対し、５ＨＩＡＡ、５ＨＴＯＬ、ＮＡｃ５ＨＴは暗期にピークをもつ日内変動を示しており、５ＨＩＡＡ、５ＨＴＯＬの動きがラットの場合とは逆になっている。従来、松果体の５ＨＴＯＬ、ＮＡｃ５ＨＴ、５ＨＩＡＡなどは、ＭＬＴ合成上の中間産物あるいは代謝物であるとされ、その生理的意義についてはあまり注目されていない。しかし、ＭＬＴを欠くマウスで、これらの物質が暗期に高値を示したことは、これらのうちのいずれかが、マウスではＭＬＴに代わる作用を営んでいる可能性も考えられる。

【文献】 1. Ebihara,S.,Marks,T.,Hudson,D.J.& Menaker,M.(1986) Science.231,491
2. Foley,P.B.& Cairncross,K.D.(1987) J.Pineal Res.4,107
3. Miller,F.P.& Maickel,R.P.(1970) Life sciences.9,747
4. Smith,I.(1983) Psychoneuroendocrinology.8,41
5. Young,S.N.& Anderson,G.M.(1982) Neuroendocrinology.35,464

Fig.4 Diurnal variation of mouse pineal indoles.
Values are the mean of five determinations ± SE.



178. 乳頭体片側破壊の脳内ヒスタミンレベルにおよぼす影響

新川久義・大和谷　厚*・西村　健・
和田　博*・Cacabelos R.（大阪大・医・精神，第二薬理*）

〔要　約〕

ＨＡは，視床下部後部から起こって視床下部前部に至る（a)視床下部－視床下部経路，視床下部後部から正中隆起に至る（b)視床下部－漏斗部経路および視床下部後部から神経性下垂体に至る（c)視床下部－神経下垂体経路の主な３つの視床下部経路を通してその神経内分泌作用を発揮するという仮説を明白にするため，乳頭体部の片側障害が脳の障害側および反対側のＨＡレベルに及ぼす変化の検討を試みた．ヒスタミン（ＨＡ）分泌ニューロンが局在している乳頭体のイボテン酸による片側障害は，視床下部後部（40～60%），視床下部前部(45%）および前頭葉(30%）のＨＡレベルを両側性に低下し，海馬のＨＡレベルを障害側で低下した(45%）．反対側海馬と両側の正中隆起および腺性下垂体のＨＡレベルの変化は有意でなかった．しかし，神経性下垂体のＨＡレベルは両側性に上昇した(80%）．これらの結果は，視床下部前部や前頭葉へ向かう上向性のＨＡ経路は両側の乳頭体から線維を送っているが，海馬へのＨＡ経路は主に同側の乳頭体から線維を送っていることを示唆している．このことはさらに，視床下部内ＨＡ経路が，神経内分泌機能や神経自律機能と関連している可能性を示唆している．

Key word：
Histamine, Ibotenic Acid, Intrahypothalamic Pathway

［序論］ヒスチジン脱炭酸酵素[14]やヒスタミン（ＨＡ）[9,11]に対する抗体を用いた渡辺ら[14]，Panulaら[9]およびSteinbuch とMulder[11]の報告にみられるようにＨＡは神経内分泌機能[2,4,10,12,15]，神経自律機能[4,10]および中枢機能[3]にとって何らかの重要な役割を担っていることが示唆されている．我々の最近の研究は，コルチコトロピン作動系[5]やバソプレッシン作動系[6]が正常に作用するためには、ＨＡ代謝経路が無傷であることが必要であることを示唆している．

以上のような神経化学的研究を基礎として[2,5,6,7]，我々は，ＨＡが視床下部後部から起こって視床下部前部に至る（a)視床下部－視床下部経路，視床下部後部から正中隆起に至る（b)視床下部－漏斗部経路および視床下部後部から神経正性下垂体に至る（c)視床下部－神経下垂体経路の主な３つの視床下部経路を通してその神経内分泌作用を発揮するという仮説を提唱してきた[2,5,6]．形態学的研究はこの神経化学的仮説を支持しているが[11]，この主張をさらに明白にするためにはさらなる研究が必要である．そこで今回，我々は，ＨＡニューロンの局在する乳頭体部の片側障害が脳の障害側および反対側のＨＡレベルにどのように影響するか，検討を試みた．

［方法］ 150～200 grの雄性ウィスターラット(N = 10)（日本動物，大阪，日本）をネンブタール(40 mg/Kg, i.p.)で麻酔し，0.9%生理食塩水2.5 ulに溶解した2.5 ugイボテン酸(Sigma,St.Louis,MO,USA）を左または右の乳頭体にステレオ下に注入した．対照ラットには同量の生理食塩水を投与した．７日間の回復期間の後，午前９時から12時の間に断頭し，脳を左右の視床下部前部，左右の視床下部後部，正中隆起，腺性下垂体，神経性下垂体，左右の海馬および左右の前頭葉にステレオマイクロスコープ

(KONAN CAMERA, R & I, K-380)下で分離した，サンプルは計量後冷却した5 mM EDTA-Na2 含有3%次亜塩素酸中でSonication (10 V/W) によりホモジネートし，遠沈(4°C,10000 xg , 15分) し，上清を得た．ＨＡはCation exchanger(TSK gel SP-2SW, 5um; Toyo. Soda, Japan)とfluorometric detection system (Model 650-102C, Hitachi, Tokyo, Japan) を用いた高速液クロ(HPLC)を用いて既に述べた方法で測定した[16]．

［結果］乳頭体の右片側破壊によってＨＡレベルは，右の視床下部後部で3.13±0.21から1.76±0.19 nmol/g (p<0.005) に，左の視床下部後部で 3.05 ±0.21から1.78±0.18 nmol/g に低下し(p<0.005) （図１ｂ），視床下部前部のＨＡレベルは両側で45～50% 減少した（図１ａ）．正中隆起と腺性下垂体では有意な変化はみられなかった（図１ｃ）（図１ｄ）．しかし，神経性下垂体ではＨＡレベルが3.54±0.94から6.08±1.35 nmol/g へ上昇した(p<0.005) （図１ｅ）．ＨＡレベルは前頭葉で障害側と反対側で約30% 減少した（図１ｆ）．それと比べて，右側乳頭体破壊は，反対側海馬のＨＡレベルに変化を生ぜず，障害側海馬のＨＡレベルを40% 減少した（図１ｇ）．乳頭体の左片側破壊は，右側破壊で得た結果と丁度ミラーイメージを呈していた．

［討論］以上の結果は，視床下部前部や前頭葉へ向かう上向性のＨＡ経路[14]は乳頭体部の両側から線維を送っているが，海馬へのＨＡ経路は主に同側から線維を送っているということを示唆するものである．この結果は竹田ら[13]が報告したデータと一致している．即ち，彼らは，視床下部後部吻側の片側切断が結果として，障害側が有意ではあるものの，両側皮質でＨＡ線維の免疫染色性を減少したことから，視床下部後部から大脳皮質に投射するＨＡニューロンは，両側性支配であると報告している[13]．海馬へ行く腹側と背側線維の切断が，海馬のＨＡ含量とヒスチジン脱炭酸酵素活性を減少することから[1] ，渡辺ら[14]の免疫組織学的報告でも明らかなように，この領域にＨＡ線維が投射していることを示している．前脳束の破壊は皮質のヒスチジン脱炭酸酵素の活性を50% 減少することから，ＨＡ線維は前脳束を通して大脳皮質に達しているようである[8] ．今回見られた視床下部後部の両側性ＨＡ減少は，イボテン酸の反対側への浸透あるいは投与部位のＨＡ細胞障害がもたらす対側ＨＡ細胞の変性によるものかも知れない．

SteinbuschとMulder[11]は正中隆起の内層と外層に豊富なＨＡ線維を見い出した．おそらく漏斗部と神経下垂体の経路に所属しているこれらの線維は，バソプレシン作動系[6] やコルチコトロピン作動系[5] の神経修飾の為に機能しているものと想像される[2,4] ．乳頭体のＨＡ細胞破壊後，ＨＡは血液・脳関門の外に位置している正中隆起や神経性下垂体で上昇する傾向にあったのに対し，腺性下垂体のＨＡ含量は減少する傾向にあった．これは，ＨＡ作動性の腺性下垂体調節機構と神経性下垂体調節機構は明らかに異なっているという考えを間接的に強化するものである[2,4,5,6] ．正中隆起と神経性下垂体の逆説的上昇は，ＨＡ細胞体破壊に基づく終末からのＨＡ放出障害によるものかも知れない．視床下部－下垂体系のＨＡ合成阻害は，バソプレッシン，オキシトシンおよびＣＲＦ－ＡＣＴＨの放出の明白な障害をもたらすことから[5,6] ，視床下部内ＨＡ経路が，主に神経内分泌や神経自律機能と関連しているということを示唆している．前頭葉や海馬におけるＨＡの機能はまだ明らかではなく，さらに研究を要すると考えられる．

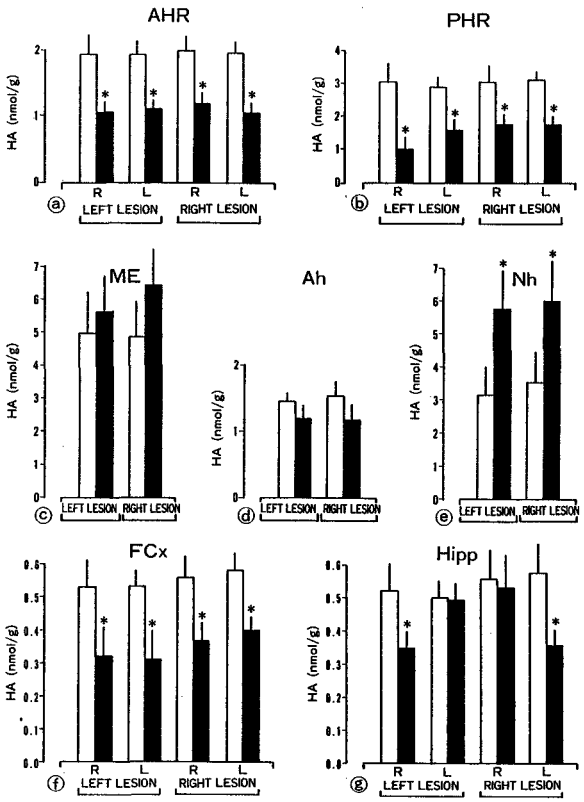


Figure 1. Effects of lesions with ibotenic acid in the mammillary bodies on the content of histamine in the anterior hypothalamus (a), posterior hypothalamus (b), median eminence (c), adenohypophysis (d), neurohypophysis (e), frontal cortex (f), and hippocampus (g). N = 10 rats. White bars = controls; black bars = lesions; *p<0.005.

[1] Barbin, G. et al. J. Neurochem. 26: 259-263 (1976)
[2] Cacabelos, R. JANO Med. Hum. 638: 46-61 (1984)
[3] Cacabelos, R. JANO Med. Hum. 638: 62-85 (1984)
[4] Cacabelos, R. Med.Clin. (Barc.). 84:524-527 (1985)
[5] Cacabelos, R. et al. Biogenic Amines, 3: 9-19 (1985)
[6] Cacabelos, R. et al. Neuroendocrinology, 45: 368-375 (1987)
[7] Cacabelos, R. et al. Tohoku J. exp. Med. 151:429-442 (1987)
[8] Garbarg, M. et al. Science, 186: 833-834 (1974)
[9] Panula, P. et al. Proc. Natl. Acod. Sci. USA. 81: 2572-2576 (1984)
[10] Robarts, F. et al. Neuroscience, 9: 721-739 (1983)
[11] Steinbusch, H.W.M. et al. Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol.3: 126-140 (1984)
[12] Tuomisto, J. et al. Pharmacol. Rev. 37: 249-332 (1985)
[13] Takeda, N. et al. Brain Res. 323:55-63 (1984)
[14] Watanabe, T. et al. Brain Res. 295: 13-25 (1984)
[15] Weiner, R.I. et al. Physiol. Rev. 58: 905-976 (1978)
[16] Yamatodani, A. et al. J.Chromat. 344: 115-123 (1985)

179. Vasopressin-induced histamine response in the CNS.

Cacabelos R.・新 川 久 義・大和谷 厚*・
福 井 裕 行*・和 田 博*・西 村 健
(大阪大・医・精神, 第二薬理*)

〔要 約〕

On the basis of neurochemical, pharmacological, and immunocytochemical data, it has been postulated that histamine (HA) acts as a neuromodulator of the neuroendocrine system. It is apparent that the corticotropinergic (CTS) and vasopressinergic systems (VPS) are mostly influenced by neuronal HA. Indeed, recent studies revealed that brain HA is essential for the normal functioning of the CTS and VPS. In the present study, the effects of centrally- and peripherally-administered vasopressin (VP) on HA in several regions of the hypothalamo-hypophyseal system, hippocampus, and frontal cortex have been investigated in an attempt to demonstrate reciprocal influences between VP and HA in the CNS. The i.c.v. administration of VP (0.1 mU) induced time-dependent changes in the concentration of HA, as measured by HPLC, in the anterior hypothalamus (AH), posterior hypothalamus (PH), median eminence (ME), adenohypophysis (Ah), neurohypophysis (Nh), hippocampus (HC), and frontal cortex (FC). The levels of HA decreased in the AH and PH from 1.99 ± 0.27 to 0.82 ± 0.09 nmol/g ($p<0.005$) and from 2.90 ± 0.55 to 1.40 ± 0.06 nmol/g ($p<0.005$), respectively, 10 minutes after injection. In the ME, a biphasic response with a peak at 5 minutes (5.11 ± 0.50 vs. 10.43 ± 2.61 nmol/g, $p<0.005$) and a fall to 3.55 ± 0.91 nmol/g ($p<0.005$) 10 minutes later was observed. In the Nh, the levels of HA gradually increased from 5 to 30 minutes, while in the Ah the content of HA tended to decrease. In the FC and HC, the content of HA diminished 5 minutes after injection and remained lower for at least 15 minutes. The i.p. administration of VP (1.0 mU) generated similar changes in the levels of HA in most of the areas studied, except in the Nh in which no changes were detected. In general, the VP-induced HA responses following the i.p. administration of the neuropeptide were slightly delayed in time with respect to those responses obtained by i.c.v. VP in areas located inside the blood-brain barrier. The chronic administration of VP (1.0 mU, i.p.) decreased the number of H-1 receptors in the AH and FC, and increased the total amount of H-1 receptors in the Ah.

These results clearly indicate that VP (i.p./i.c.v.) can induce time-dependent changes in the levels of HA in specific areas of the brain. This fact provides further support to the view that HA and VP interact at the central level to regulate each other in eliciting neuroendocrine responses.

Key word : Histamine, Vasopressin, Hypothalamo-hypophyseal System,

INTRODUCTION

Neurochemical and morphological data provide a firm support to the view that histamine (HA) acts as a neuromodulator of the neuroendocrine system (1,2,3). It has been demonstrated that i.p. and i.c.v. administrations of HA induced time- and dose-dependent increases in plasma and CSF VP (4,5,6). The chronic administration of the HA precursor, L-histidine, at a dose capable of increasing the levels of endogenous HA in brain, induces marked changes in the concentration of VP in specific areas of the hypothalamo-hypophyseal system (HhS) and other brain regions (7). The peripheral administration of HA also elicits changes in the levels of VP in the septum (8), frontal cortex, and different regions of the HhS (7). These changes are area- and receptor-specific according to neurochemical and pharmacological studies in which differential evaluation of HA-induced VP responses in the brain were tested with H-1 (mepyramine) and H-1 (famotidine) antagonists (7). Furthermore, neuronal HA appears to be essential for the normal functioning of the vasopressinergic system (VPS) (7) and corticotropinergic system (CTS) (9). Since VP and corticotropin-releasing factor (CRF) coexist in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (10,11) and act synergistically to elicit the optimal secretion of ACTH (12,13), it has been postulated that HA may act as a co-modulator between the CTS and VPS (9,14). However, to assume that HA is a neuromodulator of the VPS some additional criteria must be fulfilled, such as that VP influences the release of HA in specific regions of the CNS.

In the present study, the effects of peripherally- and centrally-administered VP on brain HA are investigated in order to elucidate possible reciprocal links between VP and HA at the central level.

MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats (Nihon Dobutsu, Osaka) weighing 150-200 g were housed in an air-conditioned room at 20° ± 0.5°C and 50-60% humidity with 12-hr lighting from 7 a.m. to 7 p.m. and commercial rat chow and tap water available ad libitum. The animals were anesthesized with Nembutal (40 mg/Kg, i.p.) and a stainless steel cannula (G-30) was implanted into their right lateral ventricle (coordinates: 0.6 mm posterior to bregma; 1.85 mm lateral to the medial suture; and 3.00 mm ventral to the dorsal surface of the skull). After a 7-day recovery period, the animals received 0.1 mU of arginine-vasopressin (VP; Sigma. Chemical Co., MO, USA) in a total volume of 5 µl (i.c.v.) between 10 and 11 a.m., and were sacrificed by decapitation 5, 10, 15 or 30 min later (N = 5-7 rats/group). Control animals received the same amount of vehicle (5 µl 0.9% saline, i.c.v.). The brains were removed and the anterior hypothalamus (AH), posterior hypothalamus (PH), median eminence (ME), adenohypophysis (Ah), neurohypophysis (Nh), hippocampus (HC), and frontal cortex (FC) were separated under a stereomicroscope. Samples were weighed, homogenized in 10 v/w of ice-cold 3% perchloric acid containing 5 mM EDTA-Na_2, and centrifuged at 10,000 xg for 15 min at 4°C. The supernatants were stored at -80°C for analysis. HA was measured by HPLC with a cation exchanger and a fluorometric detection system equipped with a chromatographic data processor as previously described (15).

A second group of rats was given 1.0 mU of VP (i.p.) or saline (100 µl, i.p.). The animals were sacrificed 5, 10, 15 or 30 min later (N = 5-7 rats/group); and HA was determined in brain samples as described above.

A third group of rats was treated with VP (1.0 mU, i.p.) for 7 days, and HA H-1 receptors in the HhS and FC were measured 30 min after the last treatment as described previously (9,14).

Experimental data were analyzed statistically by the Student's t test, ANOVA and Mann-Withney test using an NEC PC-9801 computer running scientific medical software.

RESULTS

The i.c.v. administration of VP induced a clear time-dependent decrease in the levels of HA in the AH, PH, Ah, HC, and FC. In the AH (Fig.1a), the minimum HA peak was observed 10 min after injection (1.99 ± 0.27 -control value- vs. 0.82 ± 0.09 nmol/g, $p<0.005$) and HA levels tended to recover thereafter. In the PH (Fig.1b), the maximum fall in the levels of HA was also observed at 10 min (2.90 ± 0.55 vs. 1.40 ± 0.06 nmol/g, $p<0.005$). However, in the HC (Fig.1f) and FC (Fig.1g), the content of HA decreased 5 min after injection, and while in the HC the levels of HA reverted at 30 min, FC HA remained lower for at least 30 min (Fig.1g). In the ME (Fig.1c), the concentration of HA increased 5 min after injection (5.11 + 0.50 vs. 10.43 ± 2.61 nmol/g, $p<0.005$) to drop 10 min later to values of 3.53 ± 0.91 nmol/g ($p<0.005$), reaching normal values at 30 min. In contrast, in the Nh (Fig.1e), the levels of HA gradually increased from 5 to 30 min, whereas HA levels tended to decrease in the Ah (Fig. 1d) with a minimum peak at 30 min (0.81 ± 0.12 vs. 0.38 ± 0.03 nmol/g, $p<0.005$).

The i.p. administration of VP generated changes in the levels of HA in the AH, PH, HC, FC, and Ah similar to those observed after the i.c.v. injection of the neuropeptide, though the magnitude of the response was slightly different. In the ME no rebound effect was detected; and in the Nh, i.p. VP did not modify the levels of HA. Unlike changes induced by i.c.v. VP, the response of HA to i.p. VP was more rapid in areas located outside the blood-brain barrier (bbb), such as the ME and Ah, and slower in the AH and HC, with similar time-dependent changes in the PH and FC (Fig.1).

The chronic administration of VP resulted in a decrease in the number of H-1 receptors in the AH (13.25 ± 0.85 vs. 10.15 ± 1.25 fmol/mg prot., $p<0.005$) and FC (19.5 ± 1.70 vs. 13.15 ± 0.75 fmol/mg prot., $p<0.005$), and an increase in ^{3}H-mepyramine binding in the Ah (18.40 ± 6.80 vs. 64.10 ± 14.90 fmol/mg prot., $p<0.005$). No changes were detected in the PH, ME, and Nh. Under the same experimental conditions, the levels of HA decreased in the AH, PH, ME, Ah, and FC (Table I).

DISCUSSION

Our results clearly show that VP induces time-dependent changes in the levels of HA in several regions of the CNS. These changes are area-specific. Thus, in neural areas located inside the bbb, the main effect of VP seems to be inhibitory in quantitative terms. Whether VP inhibits HA synthesis or enhances HA release, it giving rise to a decrease in the levels of the amine, is still a matter to be elucidated. The primary HA burst observed in the ME 5 min after injection of i.c.v. VP may be responsible for the subsequent increase of HA in the Nh, assuming that a portion of the Nh HA comes from the PH following a hypothalamo-neurohypophyseal tract through the internal layer of the ME (7,16). The opposite response of HA to VP in the Ah and Nh suggests that the effect of VP on HA as well as the influence of VP on adenohypophyseal (e.g. ACTH secretion, stimulation of inositol phosphate accumulation, 17) and neurohypophyseal functions (e.g. osmotic and volemic responses, 18) are regulated by different mechanisms of action in which HA seems to be directly or indirectly involved.

Since i.c.v. and i.p. administrations of VP led to similar HA responses in the hypothalamus, HC, and FC, with a variation of 5-10 min, it is likely that peripherally-administered VP reaches the brain to some extent or induces changes in brain HA through an indirect mechanism linked to the cardiovascular and/or nephrogenic systems (19). Although there are many pitfalls associated with the experimental approach used to study this question, the fact that the number of H-1 receptors in the AH and FC varies after chronic administration of i.p. VP provides some indirect support to the hypothesis of a centrally-mediated interaction between VP and HA.

Changes in the concentration of catecholamines and noradrenaline utilization in response to i.c.v. and i.p. VP in microdissected brain nuclei which are part of structures implicated in the control of memory, neuroendocrine and autonomic processes have also been reported by several authors (20). However, there is little information, if any, on this subject concerning interactions with brain HA. Recent neurochemical studies revealed that HA increases the levels of VP in the PH, ME, Ah, and FC (7). In the present study, VP induced just the opposite effect on HA in the same regions (fig.1). Therefore, it seems likely that HA and VP reciprocally interact at the central level through an intrahypothalamic short negative feedback loop to regulate each other and mediate neuroendocrine and neurovegetative functions. The conformity of this theory is by no means confirmed by the present results -but neither is it disproved. Much work remains to be done before a better judgment can be made.

REFERENCES

(1) Roberts, F. & Calcut, C.R. Neuroscience 9:721-739 (1983).
(2) Cacabelos, R. JANO Med. Hum., 638:46-61 (1984).
(3) Tuomisto, J. & Mannisto, P. Pharmacol. Rev., 37:249-332 (1985).
(4) Dogterom, J. et al., Experientia 32:659-660 (1976).
(5) Mens, W.B.J. et al., Neuroendocrinology 35:418-423 (1982).
(6) Mens, W.B.J. et al., Brain Res. Bull., 8:555-557 (1982).
(7) Cacabelos, R. et al., Neuroendocrinology 45:368-375 (1987).
(8) Mens, W.B.J. et al., Pharmacol. Biochem. Behav., 19:587-591 (1983).
(9) Cacabelos, R. et al., Biogenic Amines 3:9-19 (1985).
(10) Kiss, J.Z. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1854-1858 (1984).

(11) Sawchenko, P.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1883-1887 (1984).
(12) Gilles, G.E. et al., Nature 299:355-357 (1982).
(13) Norman, L.J. & Challis, J.R.G. Endocrinology 120:1052-1058 (1987).
(14) Cacabelos, R. Histaminergic modulation of the neuroendocrine system. Santiago University Press, Santiago de Compostela, Spain (1985).
(15) Yamatodani, A. et al., J. Chromat., 344:115-123 (1985).
(16) Steinbusch, H.W.M. & Mulder, A.H. In: Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol.3, Part II, Bjorlund, A., Hokfelt, T. & Kuhar, J.M. Eds., Elsevier, Amsterdam (1984).
(17) Todd, K. & Lightman, S.L. Neuroendocrinology 45:212-218 (1987).
(18) Jhamandas, J.H. & Renaud, L.P. Can. J. Neurol. Sci., 14:17-24 (1987).
(19) King, K.A. & Pang, C.C.Y. Br. J. Pharmac., 90:531-536 (1987).
(20) Versteeg, D.H.G. Neuropeptides and Behavior 2:55-83 (1986).

TABLE I. Effects of chronic administration of i.p. vasopressin on brain histamine

AREA	Control	VP (1.0 mU/day x 7 days; i.p.)
Anterior hypothalamus	1.86 ± 0.56	0.81 ± 0.03*
Posterior hypothalamus	2.91 ± 0.65	1.62 ± 0.08*
Median eminence	5.10 ± 0.52	3.36 ± 0.48*
Adenohypophysis	0.80 ± 0.11	0.35 ± 0.07*
Neurohypophysis	4.49 ± 0.11	5.62 ± 1.35
Hippocampus	1.20 ± 0.26	1.15 ± 0.30
Frontal cortex	0.62 + 0.07	0.12 ± 0.01*

The animals were sacrificed 30 min after the last injection of vasopressin (VP; 1.0 mU) and histamine was determined by HPLC as described in Materials and Methods. Units: nmol/g
*p<0.005 vs. control

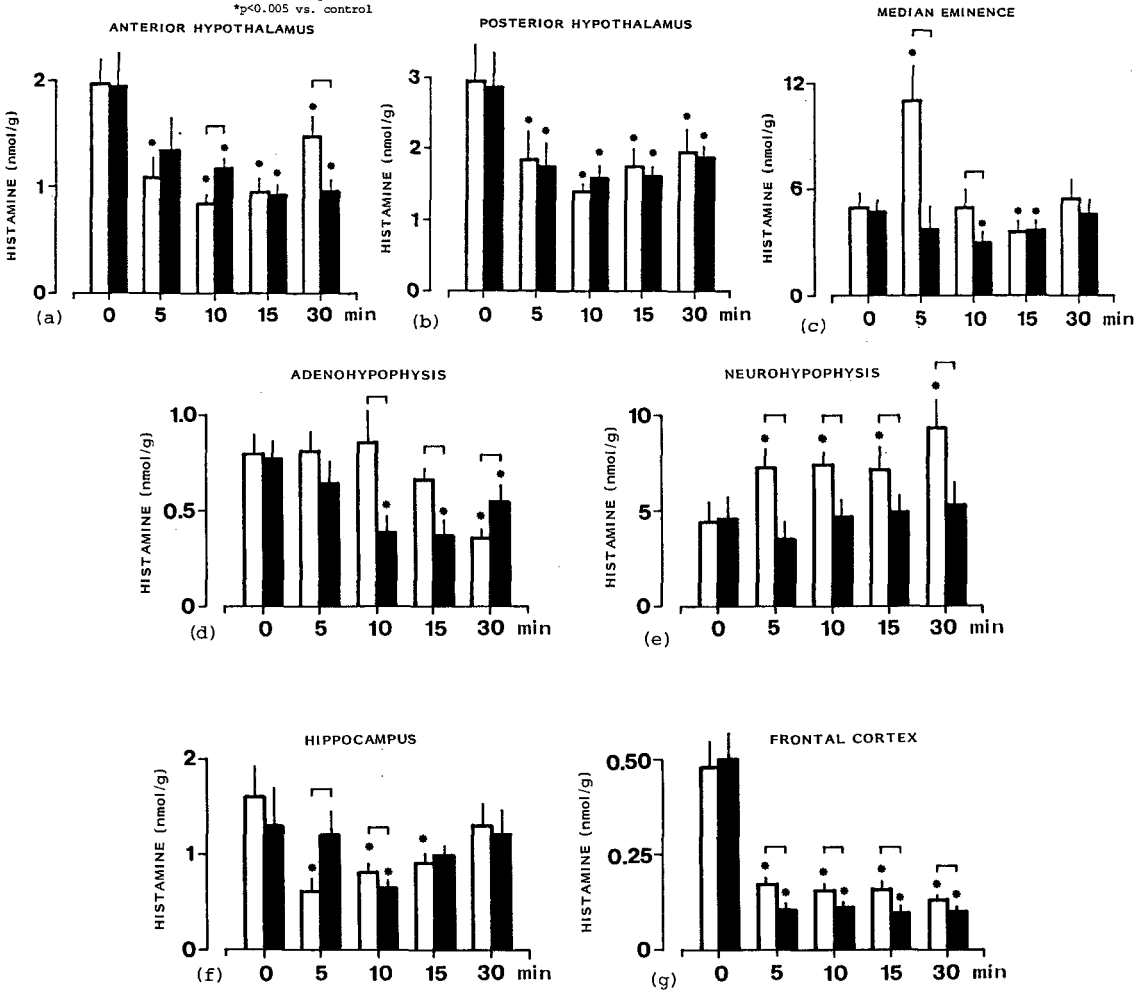


Figura 1. Effects of intraperitoneal (dark bars) and intracerebroventricular (white bars) administrations of arginine-vasopressin (1.0 mU, i.p.; 0.1 mU, i.c.v.) on the levels of histamine in the anterior hypothalamus, posterior hypothalamus, median eminence, adenohypophysis, neurohypophysis, hippocampus, and frontal cortex. *p<0.005 vs. control (0); — p<0.005 i.p.VP vs. i.c.v.VP; (N = 5-7 rats/group).

180. 高血圧短期運動療法実験モデルの検討：SHR（Spontaneously Hypertensive Rat）の血圧及び脳内モノアミン含量に及ぼすフリーランニングの影響

松井　啓・水野　智*・岡村邦博・
野村正彦　（藤田学園保衛大・医・生理，新潟薬大・薬剤*）

〔要　約〕
Running Wheelを用いたSHRの運動療法実験モデルが可能か否かを明らかにする目的で10日間連続及び隔日（5日間）のフリーランニングを行い，血圧，心拍数，体重，回転数（走行距離）及び脳内モノアミン含量を測定した。10日間連続夜間運動群（A群），一日おき（5日間）運動群（B群），対照群（C群）の血圧，心拍数はC群では運動前3日間，運動後3日間も含めて大きな変動を示さなかった。A群では血圧は運動開始5日目までは低下の傾向を示し，その後上昇し，運動開始9日目以後は有意に高値を示した。心拍数は運動期間中有意の減少を認めた。B群では7日目までは血圧低下の傾向を示したが，運動休止日では前値のレベルまで上昇し心拍数も同様の傾向を示した。延髄では，A群はC群と比較してNEが有意に増加し，B群ではC群に比べほぼ同様もしくは僅かに低下の傾向が認められた。一方，DA，DOPACはA群B群ともにC群に比べ有意に増加もしくは増加する傾向が認められ，最終代謝産物であるHVAはともに低下する傾向が認められた。間脳では，A群はC群と比較して，5HT及び5HIAAの減少を認めた他は顕著な変化は認められなかった。

Key word：exercise, monoamine, spontaneously hypertensive rats(SHR)

高血圧の非薬物療法には，食事療法，減量療法，運動療法などがあり，軽症高血圧治療に有効であると言われている。ヒトの運動療法に関しては，1984年荒川らによって好気的運動の有効性が報告[1]されている。しかし，運動による血圧低下の機序に関する詳細な検討はなされておらず運動療法による確かな治療指針は作られていない。一方実験動物を用いた検討では，近年Suzuki[7]，Overton[6]らにより，running wheelを用いた長期（10週以上の）フリーラニングによって，SHRに有意の降圧の得られることが示されたが，対照と比較して有意な体重減少を伴っており[6]，これらの実験条件下での降圧は運動療法に加えて減量療法による効果も否定できない。そこで今回我々は，高血圧運動療法実験モデルの確立を目的とし短期間の運動により降圧が可能か否かを検討した。また運動による血圧調節の中枢性機序を明らかにする目的で，運動療法施行後の脳内モノアミン含量を測定した。

［実験方法］実験動物には体重270-320gの雄性SHR（日本Charles River社）を用いた。実験開始当日まで及び実験期間を通して，室温23℃，10時から22時までを明期，22時より翌日10時までを暗期とした室内にて飼育した。餌と水は自由摂取とした。運動はSHRをrunning activityの高い[4]暗期にのみrunning wheelに入れ，自由運動により行った。個別飼いによる血圧上昇の可能性を防ぐ目的で，明期にはラットは1ケージに3匹ずつ飼育した。running wheel内でも餌と水は自由摂取とした。本研究においては，運動期間は10日間とし，10日間連続夜間運動群（A群）一日おき（5日間）運動群（B群），及びrunning wheelに入れずに通常飼育（1ケージ3匹）を行う対照群（C

Fig.1 Effect of Voluntary Exercise on Changes of Blood Plessure Level and Heart Rate

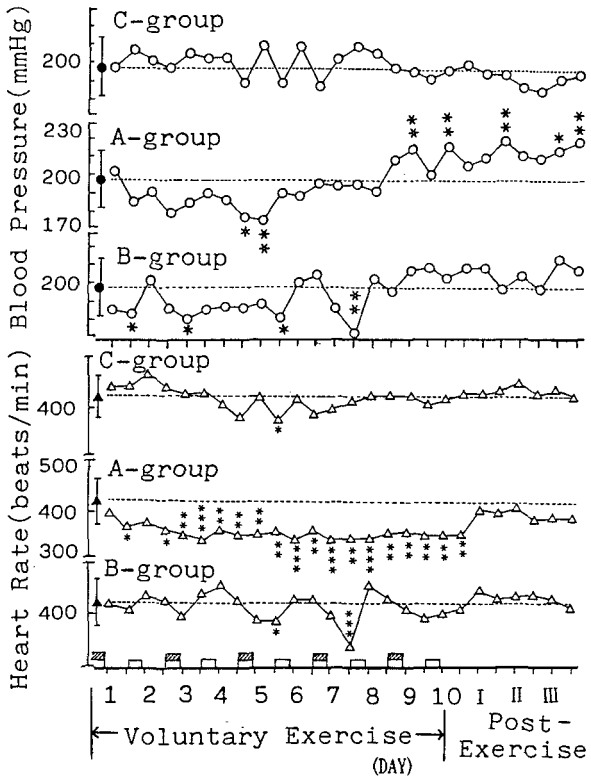
A Group
every nocturnal exercise for 10 days
B Group
every other nocturnal exercise for 10 days
C Group
control

:Basal levels before voluntary exercise

:Running period for A Group
:Running period for B Group

Each open symbol shows the mean value of six SHRs.

*:p<0.05
*:p<0.01
*:p<0.001



群）の3群，各6匹について実験を行った。血圧（尾動脈圧）[2]，心拍数，体重は運動開始3日前から10日間の運動期間中及び終了後3日間について，毎日AM10:00とPM10:00の2回測定した。血圧，心拍数，及び体重の最終測定の後12時間後に各群のラットを断頭し，素早く脳を取り出し，Glowinskiらの方法[3]に準じ，延髄と間脳を摘出した。各組織のモノアミン含量を（NE;Norepinephrine, DOPAC;3.4-Dihydroxyphenylacetic acid, DA;Dopamine, HVA;Homovanillic acid, 5HT;Serotonine5HIAA;5-Hydoroxyindoleacetic acid)HPLC-ECD法により測定した[5]。

［結果と考察］（1）<u>血圧，心拍数，及び体重の運動開始前値</u>：運動開始前3日間の午前及び午後10時の各測定値をTable 1.に示した。血圧は測定開始一日目で午前と午後の測定値に有意差が認められたが，その差は僅かであった。また，一日目の午後の血圧は2日目，3日目の午後に比べて高い値を示したが，その差は僅かなものであった。従って，少なくとも測定開始2日目以後血圧は安定していると考えられ，運動前値として3日目の午後の値を用いた。心拍数と体重は，前値3日間では，午前も午後も互いに有意差は認められず，ほぼ安定していると考えられ，血圧と同様，3日目の午後の値を前値とした。

Table.1 Baseline Data before Voluntary Exercise

Parameters	Day[a)]	A.M.	P.M.
Blood Pressure (mmHg)	-3	200±9	207±9
	-2	196±13	191±12
	-1	201±11	198±15
Heart Rate (beats/min)	-3	442±43	399±55
	-2	410±48	409±59
	-1	442±46	429±41
Body Weight (g)	-3	296±22	297±23
	-2	293±22	290±20
	-1	297±22	290±20

a)The day before voluntary exercise　　*:p<0.05
(Means±S.D., n=18)

（2）<u>血圧，心拍数，及び体重に及ぼすフリーランニングの影響</u>：Fig.1に運動期間

(10日間) 及びその後3日間の血圧と心拍数の平均値を，10日間夜間連続運動群(A群)，一日おき運動群(B群)及び対照群(C群)について示した。体重は，全ての群について実験期間を通して，ほぼ一定の値であった。C群の血圧と心拍数は大きな変動が全実験期間を通して認められなかった。しかし，A群では運動開始5日目まで血圧は低下傾向を示し，その後上昇し，運動開始9日目以後は前値に比べ有意に高い値を示した。また，心拍数は運動中は前値に比べ有意に低く，ほぼ一定の値を示したが，運動終了後に前値のレベルに近づいた。B群では，運動開始7日目までは運動後12時間後の血圧に前値に比べ有意に低下あるいは低下の傾向が認められたが，運動休止日の血圧は上昇の傾向を示した。心拍数はA群ほど顕著な低下は認められなかった。以上の結果より，本実験で用いた二種の運動療法計画では，平均値で検討する限りでは血圧が期待しうる程低下する効果は得られなかったが，A群において心拍数の持続した低下が認められ，短期の運動療法の一種の実験モデルとなりうる可能性が考えられた。一方，運動により血圧に一過性とは考えがたい変動が認めらたので，この変動が中枢にいかなる影響を及ぼしているかを検討した。

(3) 延髄・間脳におけるモノアミン含量: 測定した脳内モノアミン含量が顕著な変化を示したものをTable.2に示した。延髄ではA群はC群と比較してNE量は有意に増加し，B群ではC群に比べほぼ同様か僅かに低下傾向が認められた。一方，DA，DOPAC量はA群B群ともにC群に比べ有意に増加もしくは増加する傾向が認められ，DAの最終代謝産物のHVAもやはり低下する傾向にあった。A群ではC群と比較して間脳内5HT及び5HIAA量は減少した他は，顕著な変化がみられなかった。このような血管運動中枢を含む延髄・間脳における数種のモノアミン含量の変動が，運動療法期間中の血圧と心拍数の変動となんらかの関係があるとも考えられ，今後検討していく予定である。また，延髄内NE含量と回転運動における走行距離 ($r=0.898$, $P<0.01$)，DA含量と走行距離 ($r=0.876$, $P<0.01$) の間にそれぞれ高い相関が認められているので今後数種の運動療法による血圧変動をより詳細に検討して行く予定である。

Table 2 Effect of Voluntary Exercise on Monoamine Contents in Two Rat Brain Regions
(A) Pons Medulla Oblongata
(B) Diencephalon (Mean±S.D.)

	C-group	A-group	B-group
	(A)		
NE (ng/g)	487±78 (n=6)	607±65* (n=6)	466±78 (n=5)
DA (ng/g)	38.5±7.1 (n=6)	55.8±7.5** (n=6)	43.3±2.6 (n=5)
DOPAC (ng/g)	22.5±4.9 (n=6)	32.3±7.5* (n=6)	31.8±6.9* (n=5)
HVA (ng/g)	51.7±17 (n=3)	26.7±11 (n=6)	25.6±3.9 (n=5)
	(B)		
5HT (ng/g)	549±156 (n=6)	292±197* (n=6)	557±81 (n=6)
5HIAA (ng/g)	490±119 (n=6)	259±187* (n=6)	488±88 (n=6)

*:P<0.05 **:P<0.01

文献

(1)荒川規矩男(1984)高血圧,7,13-20(2)Bunag, Ruden D.(1973)J.Appl.Physiol.,34,279-282 (3)Glowinski J. and Iversen L.L.(1966)J.Neurochem.,13,655-669 (4)松井啓,岡村邦博,野村正彦(1986)日本生理学会 生理学中部談話会予稿集,20 (5)岡村邦博，水野智，松井啓，野村正彦(1986)神経化学,25,286-288 (6)Overton,J.M., C.M.Tipton, et al.(1986)J.Appl.Physiol. (7)Suzuki,S.,S.Oshima,et al.(1979)Jpn.Heart J.20,Suppl.1,365-368

181. 運動ニューロン疾患患者血清中に検出される抗脊髄蛋白抗体について

犬塚　貫・佐藤修三・柳澤勝彦・宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科）

〔要　約〕

運動ニューロン疾患は運動ニューロンが選択的におかされる病気であるが，その原因は不明である。本症は自己免疫疾患とは考えられていないが，近年開発された免疫ブロット法や免疫組織化学的手法を駆使して患者血清中に抗神経抗体が検出されたとする報告がある。我々はヒト脊髄の水溶性蛋白と不溶性蛋白をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動し，ニトロセルロース膜に電気的に転写した後，100倍希釈した被検血清でアビジン・ビオチン法を用いて免疫ブロットを試みた。筋萎縮性側索硬化症(ALS)44例中5例(5/44),球脊髄性筋萎縮症2/9，痙性対麻痺1/17,その他の神経疾患6/36で各々分子量の異なる反応バンドが得られた。ALSの一例のみが不溶性蛋白と反応し，遠心による粗核亜分画と反応した。その他は全て水溶性蛋白と反応した。このように検出抗原は水溶性蛋白が殆んどで，症例によって異種であり，抗体の感度も比較的に低く，本疾患の一義的病因とするよりも障害をうけた神経組織への二次的な反応と考えるのが妥当と思われた。しかし本疾患は多様性であり症例によっては血中に生じた抗脊髄蛋白抗体が病気の進行を促進したり，回復過程を阻害し本疾患の病像を修飾している可能性は否定できない。

Key word : motor neuron disease , auto antibody , spinal cord

運動ニューロン疾患(MND)において，運動ニューロンを含む脊髄に対する抗体の病因としての可能性を検討するために，免疫ブロット法を用いて本疾患および他の神経疾患患者血清中の抗ヒト脊髄蛋白抗体の検出を試みた。

〔材料・方法〕

非神経疾患剖検例から死後3時間後に得られたヒト脊髄，肝，腎を0.32M Sucroseでホモジネートを作り，100,000gで60分遠心し水溶性分画(S)と不溶性分画(P)に分離した。それぞれ蛋白50μgを11%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動し，ニトロセルロース膜に電気的に転写した後，ブロットを3%BSA／0.9%NaCl／10mM Tris-HCl pH7.5でブロッキングした。その後100倍希釈した被検血清を2時間ブロット上にマウントした。一部は200～1000倍希釈血清でも試みた。水洗後ビオチン化抗ヒトIgGまたはIgM抗体,ペルオキシダーゼ標識アビジン・ビオチン結合物の順で反応させ，4-クロロナフトールで発色させた。(Fig.1)不溶性分画と反応した血清については，Fig.2に示すような遠心亜分画との反応を同様に免疫ブロット法で調べた。被検血清はTable 1に示すようにMNDとその他の神経疾患および健康人から採取し-70℃に凍結保存してあるものを用いた。

〔結果〕

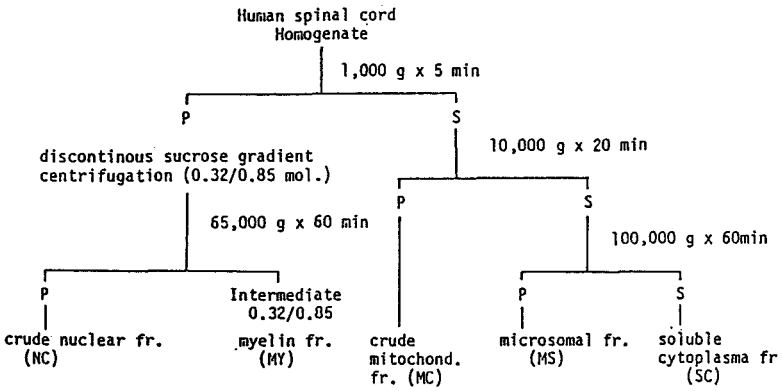
脊髄蛋白ブロット上で筋萎縮性側索硬化症(ALS)44例中5例(5/44)，球脊髄性筋萎縮症(KAS)2/9，痙性対麻痺(SSP)1/17，その他の神経疾患6/36(多発性硬化症MS 2，重症筋無力症MG 2，パーキンソン病PAK 2)が各々分子量の異なる反応バンドを得た。(Table 2) ALSの一例(ALS-1)のみが脊髄不溶性蛋白分画の65,66kd蛋白

と反応した。この蛋白は粗核分画に含まれるものであった。(Fig.3)その他の陽性例は全て水溶性蛋白分画中の蛋白と反応した。(Fig.4)反応した抗体は全例IgGであった。血清希釈は200倍以上ではバンドの示現が困難で100倍希釈血清を用いて判定した。肝および腎蛋白ブロット上では脊髄蛋白ブロット上でみられたような反応バンドはみられなかった。血清中の抗体が検出された症例において年令，罹病期間に一定傾向はなかった。

Fig.1 Immunostaining of blot

11% SDS-PAGE
↓
Electrical blotting
↓
Blocking with 3% BSA/0.9% NaCl/ 10mM Tris(pH 7.4)
↓
Patient's serum in 3% BSA saline (1:100)
↓
Washing
↓
Biotinylated anti human IgG or IgM (1:200)
↓
Washing
↓
Peroxidase conjugated avidin-biotin complex
↓
Washing
↓
Developing with 4-chloro 1-naphtol

Fig.2 Differential centrifugation scheme for subfractionation of spinal cord



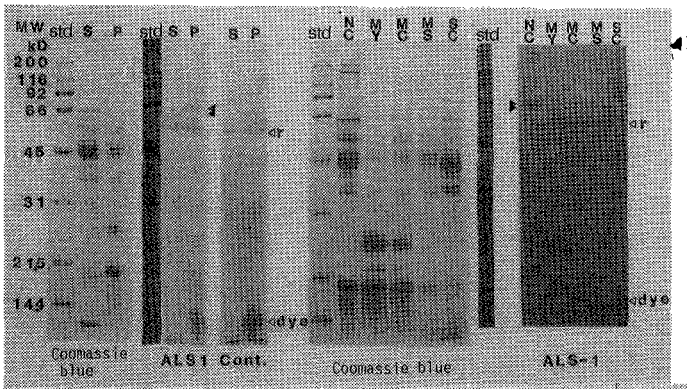
Pellets and intermediate fractions are washed and recentrifuged for analytical work.

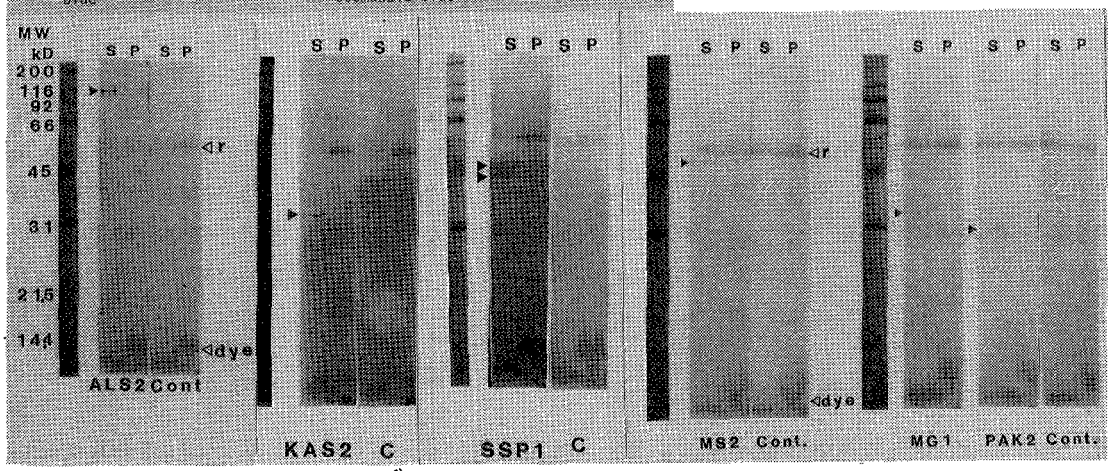
Table 1 Numbers of sera which was examined and detected antibody to spinal cord

Disease	Immunoblot positive	Total cases examined
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	5	44
Bulbar-spinal muscular atrophy (Kennedy-Alter-Sung, KAS)	2	7
Spastic paraplegia (SSP)	1	17
Olivo-ponto-cerebellar degeneration	0	7
Cerebro vascular disease	0	6
Multiple sclerosis (MS)	2	6
Myasthenia gravis (MG)	2	5
Parkinson's disease (PAK)	2	4
Viral encephalitis	0	2
Other neurological diseases	0	6
Healthy control (Cont, C)	0	6

Table 2 Sera reacted with spinal cord

Case	MW(kD)		Age	Sex	Duration
ALS-1	65,66	(P)	59	F	3y10m
ALS-2	115	(S)	50	M	7m
ALS-3	66	(S)	61	F	1y 1m
ALS-4	57	(S)	62	M	6m
ALS-5	50	(S)	62	M	2y 3m
ALS-6	35	(S)	38	M	5m
KAS-1	40-45	(S)	52	M	3y 0m
KAS-2	37	(S)	47	M	4y 0m
SSP-1	42-48	(S)	52	F	9m
MS-1	61,62	(S)	34	F	3y 6m
MS-2	52	(S)	45	F	10y 0m
MG-1	33	(S)	52	M	9m
MG-2	33	(S)	30	F	6m
PAK-1	34	(S)	52	F	4y 3m
PAK-2	29	(S)	66	M	2y 0m





◀Fig.3 Fig.4▼

Representative immunoblots

Each lane of blot was loaded with 50 ug protein.
Coomassie blue stained gel contained 20 ug protein in each lane.
Top: S, supernatant, P, pellet of spinal cord homogenate.
NC, MY, MC, MS, SC; subfractionation (see Fig.2)
Bottom: used serum (see Table 2)
▶-immunostained band, ▷r-chain.

〔考按〕 これまでBrownら[1]はマウスの脊髄蛋白ブロットに20倍希釈血清を反応させたところALS，対照ともに52kd，70kd，150～200kd蛋白と反応したがALS血清の方が反応する率が高かったと報告している。またこれらの蛋白はマウス脳，小脳，肝でも同様に検出されたがミエリンでは検出されず，新鮮マウス脊髄の免疫組織化学的検索ではニューロフィラメント（NF）と細胞核膜が反応したとしている。Klettら[2]は運動ニューロンと後根神経節の免疫ブロット法でALS 30/36と対照 6/30において 140kd に二重バンドが検出されたとしている。Steffansonら[3]は各種神経組織の免疫ブロット法で神経疾患群及び対象群の90%以上に200kdのNFに対する抗体を検出したと報告している。その他アルツハイマー病，パーキンソン病，小舞踏病，ハンチントン舞踏病などの変性疾患で，それぞれ抗神経抗体が検出された報告例がある。我々の実験では血清中の抗体は肝，腎蛋白とは反応せず症例によって分子量の異なる脊髄蛋白と反応した。また他の報告例同様，ＭＮＤの一部にのみ検出され，一方その他の神経疾患でも検出され，抗体の感度が比較的低く，罹病期間などと一定の関係はみられなかった。これは用いた脊髄の蛋白の死後変化による影響を除去しえないが，血清中の抗脊髄蛋白抗体は本症の一義的病因とするよりも障害をうけた神経組織への二次的な反応と考えるのが妥当と思われる。臨床的にも血漿変換療法や免疫抑制法は今までのところ無効であることもこれを支持すると思われる。しかし本疾患は多様性であり症例によっては，血中に生じた抗脊髄蛋白抗体が病気の進行を促進したり，回復過程を阻害し本疾患の病像を修飾している可能性は否定できない。

〔文献〕 1) Brown,RH.et al.(1987) Neurology 37,152-155. 3) Steffanson,K.et al.(1985) Science 228,1117
2) Klett,NB.et al.(1984) Neurology 34,A238.

182. ＰＯ蛋白と免疫系の蛋白との類似性について

植村慶一・鈴木　勝・坂本　安・田中早苗・
野村恭一*　（埼玉医大・第一生理，神経内科*）

〔要　約〕

ＰＯ蛋白は末梢神経ミエリン膜の主要な内在性糖蛋白であり、最近その全アミノ酸配列が決定された。今回、ＰＯ蛋白と免疫系の蛋白との類似性を、免疫学的方法および構造上の相同性分析によって検討を行なった。精製ＰＯ蛋白は、イムノブロット法およびＥＬＩＳＡ法によって、ヒトの Natural Killar 細胞の表面抗原に対するＨＮＫ１モノクローナル抗体および抗ＭＡＧ（Myelin associated glycoprotein）ポリクローナル抗体と陽性反応を示し、ＰＯ蛋白がリンパ球抗原（ＨＮＫ１）およびＭＡＧと共通のエピトープを持つ可能性が示された。さらにＨＮＫ１抗体をＰＯ蛋白の糖ペプチドで吸収すると反応性が低下することから、このエピトープは糖鎖部分に存在する可能性が示唆された。

ＰＯ蛋白のアミノ酸配列について、既知の蛋白のアミノ酸配列と比較検討した結果、ＰＯ蛋白は免疫グロブリン－細胞接着因子のスーパーファミリーに属すると推定された。即ち、ＰＯ蛋白はＮ末端の124 残基のドメイン中に75残基の間隔で２個の Cys 基を含み、その付近に数箇所の特徴的な配列構造を示し、高次構造の予測でも beta 構造の存在が示唆された。相同性の検索と検定の結果、ＰＯ蛋白は免疫グロブリンＨ鎖のＶ領域およびＴ細胞表面レセプターＹＴ３５と高い相同性を示し、ＭＡＧおよびＮＣＡＭと部分的な類似を示した。

Key word : Myelin Protein, Immunoglobulin, Cell Adhesion Molecule

最近、神経組織には免疫系と類似性を示す蛋白や糖脂質がいくつか見いだされ、それらの共通反応性が神経疾患や免疫疾患の発生機序に関与する可能性が考えられている。ＰＯ蛋白は末梢神経ミエリン膜の主要な内在性糖蛋白であり、最近その全アミノ酸配列が決定された（９，１１）。一方、リンパ球の Natural Killar 細胞の表面に対するモノクローナル抗体であるＨＮＫ１抗体はＭＡＧと共に、末梢神経ミエリンの低分子糖蛋白群と陽性反応を示すことが明らかにされた（４）。しかし、ＨＮＫ１抗体とＰＯ蛋白との関係はまだ明確ではない。そこで、免疫学的な方法によって、ＨＮＫ１抗体とＰＯ蛋白との関係の解明を試みた。また、ＰＯ蛋白の一次構造が決定されたことから、既知の蛋白とコンピューターによるアミノ酸配列上の相同性の検索を行ない、ＰＯ蛋白が免疫グロブリン－細胞接着因子のスーパーファミリーに属する可能性を検討した。

［実験方法］

ウシ馬尾神経および脊髄より既報の方法（６，８）によって、ミエリン、ＰＯ、Ｐ２およびＭＢＰ蛋白を精製した。ＰＯ蛋白の糖ペプチドは（７）の方法によって、プロナーゼ分解とゲルロカ法によって調製した。抗ＨＮＫ１モノクローナル抗体は、Becton-Dickinson社より購入、抗ＭＡＧポリクローナル抗体は、新大宮武教授より恵与（１２）を受け、抗ＰＯポリクローナル抗体は研究室で作成した。

イムノブロッティングは、原理的にTowbinらの方法（１３）に従った。ＥＬＩＳＡは Engvall（３）の方法に従った。蛋白の高次構造の推測は Chou & Fasman の方法（１５）によった。

アミノ酸配列の相同性の検索と検定には、 Miyata の Parameter を用いた方法（１０）と Kanehisa の開発した IDEAS: SEQDP プログラム（５）を利用して行なった。

［実験結果と考察］

図１－Ａにミエリン画分、精製したＰ０とＰ２蛋白のＳＤＳ電気泳動ゲル蛋白染色パターン、図１－Ｂにブロッテングした膜の蛋白染色、図１－Ｃにそれらの ＨＮＫ１抗体による イムノブロッテング染色パターンを示した。ＨＮＫ１抗体によって、末梢神経ミエリンの多くの蛋白が染色された（図１－Ｃ１）。最も強い染色はＰ０とＰ２の中間の２０Ｋ付近に見られ、これはInuzuka らの既報の報告（４）と一致した。その他にＰ０蛋白に一致する２８Ｋにも明らかな染色がみられた。ミエリンで染色されたバンドの多くは酸およびクロロホルムーメタノールによる抽出後も消失せず、染色されるものは脂質や塩基性蛋白ではなく、内在性蛋白であることが示された。精製されたミエリン蛋白の中では、Ｐ０蛋白のみがＨＮＫ１抗体と反応した。Ｐ０蛋白は Coomassie 染色によって、一般に巾広いバンドとして検出されるが、抗体ではより狭いバンドとして染色された。この原因として、疎水性の高いＰ０蛋白が transfer されにくいこと（図１－Ｂ）とＰ０蛋白が Microheterogeneity を示すので、ある特異な成分とのみ反応する可能性が考えられる。最近、ＨＮＫ１抗体が硫酸基を含む糖脂質を認識すると報告されている（１）が、Ｐ０蛋白にも糖鎖に硫酸基を含むものがあることを確認しており興味深い。図１－Ｄには抗ＭＡＧ抗体による末梢ミエリン蛋白の染色パターンを示した。抗ＭＡＧ抗体もまた精製Ｐ０蛋白と陽性反応を示したが、Ｐ２蛋白との反応は陰性であった。ミエリンにおいてもＰ０蛋白に相当する染色バンドが観察された。これらの結果はＰ０蛋白がＨＮＫ１抗体に反応するＭＡＧ，ＮＣＡＭ，Ｌ２などの糖蛋白の Family に属する可能性を示唆する。 ＥＬＩＳＡ法によっても、ＨＮＫ１抗体とＰ０蛋白との反応が認められ、この反応はＰ０蛋白による吸収によって、完全に抑制された。また、Ｐ０蛋白の糖ペプチド画分によって、５０％程度の抑制が認められた（図２）。Ｐ０蛋白の抗原性は熱（100℃, 10 min ）に抵抗性であり、変性条件で Endoglycosidase F 処理によって、失なはれた。これらの結果は、Ｐ０蛋白の糖鎖がＨＮＫ１抗体によって認識されることを示している。 Ｐ０蛋白は構造的に免疫グロブリンー細胞接着因子のスーパーファミリー（２，１４）に属する可能性を検討した。

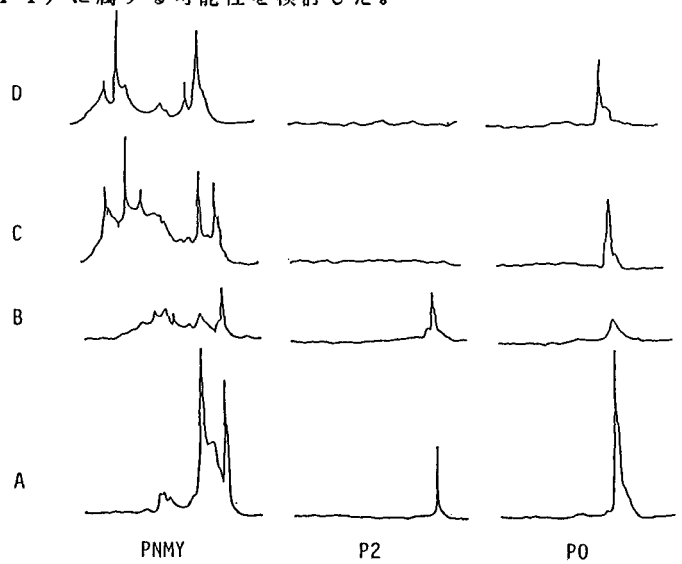


図１　末梢ミエリン蛋白のイムノブロッテングパターン。
左より末梢ミエリン（ＰＮＭＹ）、Ｐ２蛋白（Ｐ２）、Ｐ０蛋白（Ｐ０）。
Ａ：ＳＤＳ電気泳動ゲル蛋白染色、Ｂ：ブロッテングした膜の蛋白染色、
Ｃ：ＨＮＫ１抗体によるイムノブロッテング染色、
Ｄ：抗ＭＡＧ抗体によるイムノブロッテング染色。

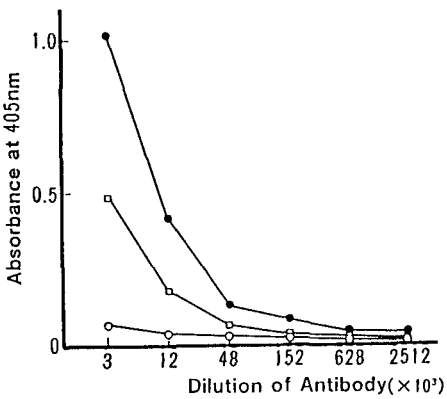


図２　ＥＬＩＳＡによるＰ０蛋白とＨＮＫ１抗体との反応の吸収試験による抑制。
無処置のＨＮＫ１抗体（●），Ｐ０蛋白で吸収したＨＮＫ１抗体（○），Ｐ０蛋白由来の糖ペプチドで吸収したＨＮＫ１抗体（□）。

表1　P0蛋白と免疫グロブリン－細胞接着因子スーパーファミリーとの相同性の検定。

PROTEIN	REGION	IDENTITIES		P0 REGION	SD UNIT
IGKV	1-100			1-124	1.54
IGKV	4- 24	5/21	23.8(%)	2- 22	5.21
IGKV	103-123	5/21	23.8	38- 58	4.69
IGKV	177-196	4/20	20.0	81-100	5.94
IGHV	1-113			1-124	4.85
IGHV	42- 61	5/20	25.0	67- 86	4.64
NCAM	93-185			1-124	2.56
NCAM	231-265	8/34	23.5	71-105	7.48
NCAM	433-453	5/21	23.8	149-169	4.14
NCAM	439-463	10/25	40.0	119-143	4.83
NCAM	721-744	3/24	12.5	91-114	4.31
MAG	5- 24	4/22	18.2	185-204	4.13
MAG	85-107	5/23	21.7	66- 88	5.44
MAG	241-267	8/27	29.6	1- 27	5.94
MAG	290-311	3/22	13.6	83-104	4.06
MAG	306-325	6/20	30.0	173-192	5.13
MAG	418-439	4/20	20.0	38- 59	4.31
YT35	1-312			1-124	6.28
YT35	23- 47	7/25	28.0	2- 26	4.68
YT35	173-192	3/20	15.0	30- 49	4.27
THY1	70- 92	4/23	17.3	83-105	5.61
PolyIGR	70-89	5/20	25.0	86-105	3.71

IGKV:Immunoglobulin kappa chain V region; IGHV:Immunoglobulin H chain V region; NCAM:Neural cell adhesion molecule; MAG:Myelin associated glycoprotin; YT35:Human T cell receptor; THY1:Thy 1 antigen; PolyIGR:Polymeric immunoglobulin receptor.

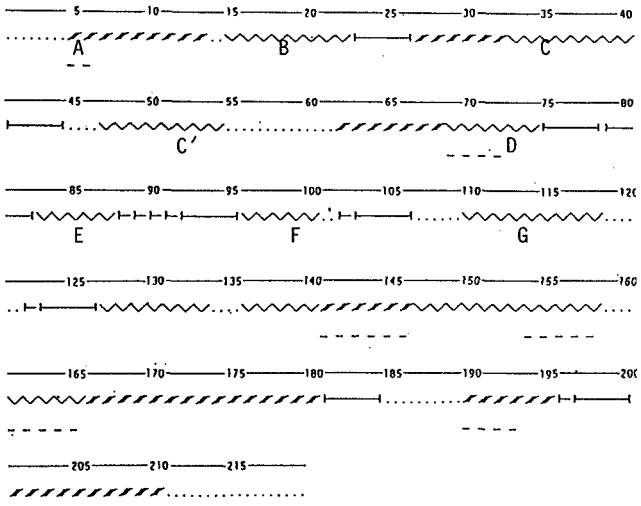


図3．P0蛋白の高次構造の推測。

Coil:……, Helix:𝒻𝒻𝒻𝒻𝒻𝒻𝒻𝒻, Beta sheet:𝒲𝒲𝒲𝒲𝒲𝒲, Helix or Beta sheet:𝒻𝒻𝒻𝒻𝒻𝒻, Reverse turn: ————

P0蛋白は、N末端の125残基程度のドメイン中に77残基離れた2個のCys基が存在し、高次構造の予測でもA，B，C，C'，E，F，Gの7箇所におよぶbeta strandの存在が示唆された（図3）。尚、2個のCysの間のSS結合の確認が必要であるが、これらの特徴にくわえて、Leu(19)XaaCys(21), Trp(37), Gln(40), Arg(69), Phe(96)XaaCys, といった特徴的な配列はP0蛋白が免疫グロブリン－細胞接着因子スーパーファミリーに属すこと示している（図4）。アミノ酸配列の相同性の検定の結果、P0蛋白は免疫グロブリンH鎖のV領域やT細胞表面レセプターYT35と高い相同性を示し、MAGおよびNCAMと部分的な類似を示した。これらの結果は、P0蛋白が原始的な免疫グロブリン前駆体より分化した可能性を示唆する。最近、ある種のニューロパチー患者でP0蛋白の抗体の見いだされた例があり[16]、神経系と免疫系の共通抗原性はこのような疾病の病因に関与する可能性もある。P0蛋白の機能も含めて、さらに検討を進めていきたい。

図4　P0蛋白と免疫グロブリンのV領域とのアミノ酸配列上の相同性。

```
                  * *                 * *
IGLV  AVVTQESALTTSPGET-VT-LTCRSSTGAVTT---SNY-ANWVQQKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPA----
BPO   IVVYTDKEVHGAVGSQ-VT-LYCSFWSSEWVSDDLSFT---WRIQ-PEGGRDAISIFHYAKGQPYIDEVG-
RPO   IVVYTDREVYGAVGSQ-VT-LYCSFWSSEWVSDDISFT---WRIQ-PEGGRDAISIFHYAKGQPYIDEVG-
IGHV  EVKLEES-GGGLVQPGRSMKLSCVASGFTF------SNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIR-LKSHNYAIHYAE

          *                   * * *
IGLV  ----RFSGSLIGNKAALTITGAQT--EDEAIYFCALWYSNHWVFGGG--TKLTVLGQP
BPO   TFKERIQWVGDPHRKDGSIVIHNLDYGDNGTFTCDVKNPPDIVGKTSQVTLYVFEKVPTRY
RPO   TFKERIQWVGDPHRKDGSIVIHNLDYGDNGTFTCDVKNPPDIVGKTSQVTLYVFEKVPTRY
IGHV  SVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCST-GFPSWGPG-----TLVTV
```

*:Conservative sequences in immunoglobulin superfamily.
IGLV:Immunoglobulin lamda chain V region; BPO:Bovine PO protein; RBP:Rat PO protein; IGHV:Immunoglobulin H chain V region.

［文献］

1) Chou,D.K.H., Hovious,J. and Jungalwala,F.B. (1987) J.Neurochem. 48 (Suppl.) S83. 2) Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., Prediger, E.A., Brackenbury,R. and Edelman,G.M.(1987) Science 236, 799-806. 3) Engvall, E. (1980) Methods Enzymol. 70. pp 419-439. 4) Inuzuka,T., Quarles,R.H., Noronha,A.B., Dobersen,M.J. and Brady,R.O. (1984) Neurosci. Lett. 51, 105-111. 5) Kanehisa,M. (1982) Nucleic Acid Res. 10, 183-196. 6) Kitamura,K., Yamanaka,T. ahd Uyemura,K. (1975) Biochim. Biophys. Acta 379, 582-591. 7) Kitamura,K., Suzuki,A., Suzuki,M. and Uyemura,K. (1979) FEBS Lett. 100, 67-70. 8) Kitamura,K.,Suzuki,M. and Uyemura,K. (1976) Biochim. Biophys. Acta 455, 806-816. 9) Lemke,G. and Axel,R. (1985) Cell 40, 501-508. 10) Miyata,T., Miyazawa,S. and Yasunaga,T. J. Mol. Evol. 12, 219-236. 11) Sakamoto,Y., Kitamura,K., Yoshimura,K., Nishizima,T. and Uyemura, K. (1987) J. Biol. Chem. 25, 4208-4214. 12) Sato,S., Tanaka,M., Miyatani,N., Baba,H. and Miyatake,T. (1985) J.Neuroimmunol. 7, 287-298.13) Towbin,H., Staehelin,T. and Gordon,J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354. 14) Williams, A.F. (1984) Nature 308, 12-13. 15) Chou,P.Y. and Fasman,G.D. (1978) Adv. Enzymol. 47, 45-148. 16)細川武ら(1987)本誌投稿中

183. 末梢神経疾患におけるPo蛋白抗体について

細川　武・野村恭一・濱口勝彦・坂本　安*
植村慶一*　（埼玉医大・神経内科，第一生理*）

〔要　約〕

P_0蛋白は，末梢神経髄鞘の主要な糖蛋白であり，髄鞘の層状構造に重要な役割をはたしていると考えられている．そこで末梢神経疾患における抗P_0蛋白抗体活性を検討した．

抗P_0蛋白抗体活性は，酵素抗体法およびイムノブロット法を用い，IgMλ型M蛋白血症を伴う慢性多発ニューロパチー　1例，急性特発性多発根神経炎　9例，慢性特発性多発神経炎　2例，神経症状を伴わないIgMパラプロテイン血症　1例，対照　12例を対象とした．酵素抗体法では，IgMλ型M蛋白血症を伴う慢性多発ニューロパチー症例においてのみP_0蛋白抗体活性が異常高値を示した．イムノブロット法では，SDSゲルよりニトロセルロース膜に転写されたP_0蛋白に，IgMλ型M蛋白血症を伴う慢性多発ニューロパチー症例の血清（IgM）のみが反応することを，アビチン・ビオチン法を用いて確認した．　同一患者の腓腹神経の電顕像において，外側の髄鞘の主周期線間距離の拡大を認めた事も考慮すると，M蛋白（IgM）がP_0蛋白抗体活性を有し，末梢神経の脱髄の機序に関与している可能性が示唆された．

Key word：
IgM paraproteinemia, anti P_0 protein antibody, demyelinating neuropathy

近年末梢神経髄鞘蛋白が，分離精製されるようになり，それらのアミノ酸の配列が明らかにされ，髄鞘での局在や機能が徐々に解明されてきている．末梢神経の髄鞘の主要な糖蛋白であるP_0蛋白（分子量 28 kd）については，膜内在性である事から髄鞘の層状構造の形成に重要な役割をはたしている事が推定されてきている．

また末梢の髄鞘だけが破壊される脱髄性末梢神経炎において，末梢神経系にのみ存在するP_0蛋白に対して自己免疫的機序が成立しているかどうか検討する事は，大変興味深い

今回我々は，末梢神経疾患において抗P_0蛋白抗体の存在の有無について検討する．

実　験　方　法

〔対象〕IgMλ型M蛋白血症を伴う慢性多発ニューロパチー　1例，急性特発性多発根神経炎（AIP）9例，慢性特発性多発神経炎（CIP）2例，神経症状を伴わないIgMパラプロテイン血症　1例，対照　12例　を検討した．

〔方法〕1）P_0蛋白の調整：P_0蛋白は，すみやかに採取したウシ馬尾神経よりミエリンを分画し，ミエリン分画の希酸抽出残渣よりSDS抽出とSDSゲル濾過法によって精製した[1]．

2）抗P_0蛋白抗体の検討

イ）ELISA法による検討：microplateの各wellにP_0蛋白を 2.0 μg/ml coating し，一次抗体として100 倍に希釈した血清を，二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgM血清を反応させた．その後，ABTSにて発色させ，15分後にムルチスキャンにて405nm での吸光度（以下OD）の測定をおこなった．

さらに抗体の特異性を検討するため抑制試験として，血清とウシP$_0$蛋白をincubationした後，上述の方法で吸光度を測定した．

ロ）Immunoblot法による検討：12.5% SDS-PAGEを作製し，P$_0$蛋白を泳動後，ウエスタン・ブロット法によりニトロセルロース膜に転写した．つぎに転写した蛋白を，1%ゼラチンにてブロックした後，一次抗体として50倍に希釈した血清を，二次抗体としてビオチン化抗ヒトIgM血清を，さらにペルオキシダーゼ標識アビジンを反応させた．その後4－クロロナフトールにて発色させ，抗P$_0$蛋白抗体を検索した．

結　　果

1）ELISA法による抗P$_0$蛋白抗体活性

対照のODは，0.154±0.012（Mean±SD）であった．また急性特発性多発根神経炎では，0.176±0.054，慢性特発性多発神経炎では，0.184，神経症状を伴わないIgMパラプロテイン血症では，0.173で，IgMλ型M蛋白血症を伴う慢性多発ニューロパチーのみ，ODの異常高値（1.04）を示した（図　1）．

抗体の特異性を検討するため，抑制試験を実施した結果，血清15μlとウシP$_0$蛋白300 pmoleのincubationにおいて，ODは71.2%の抑制がみられた（図　2）．

2）Immunoblot法による抗P$_0$蛋白抗体活性

12.5% SDS-PAGEより転写されたP$_0$蛋白に対して，IgMλ型M蛋白血症を伴う慢性多発ニューロパチー症例の血清（IgM）のみが反応した（図　3）．

考　　案

P$_0$蛋白は，末梢神経髄鞘の主要な糖蛋白であり，近年その一次構造が明らかにされた．アミノ酸219残基よりなり，120～150残基付近は疎水性度の高さとアミノ酸の数から細胞膜を貫通する領域であると考えられる．この疎水性領域よりN－末端部約120残基は細胞表面に露出し，ミエリン層状構造における外膜同士の接着によるintraperiod lineの形成に，また疎水性領域よりC－末端部は，親水性かつ塩基性の領域を形成し，内膜同士の接着によるMajor dense lineの形成に関与していると推定される[3]．

P$_0$蛋白抗体活性を有していたIgMλ型M蛋白血症を伴う慢性多発ニューロパチー患者に1）MAG抗体も見出された事，2）腓腹神経の電顕像において，有髄線維の髄鞘外周部に主周期線間距離の拡大を認めた事[2]も考慮すると，主周期線間距離の拡大がひきおこされる過程でいずれかの抗体がintraperiod lineの形成を障害したと推定される．

MAGは末梢神経にも中枢神経にも存在すること，IgMλ型M蛋白血症を伴う慢性多発ニューロパチー患者の症状は，末梢神経系に限局している事から，本患者の血清中にみられた抗体のうち，P$_0$蛋白抗体の方が末梢神経の脱髄の機序により密接に関与している可能性が考えられた．

文　　献

1）Kitamura.K. et al. (1979) FEBS Lett. 100. 67.

2）野村恭一ら（1987）臨床神経（投稿中）

3）Sakamoto.Y. et al. (1987) J.B.C. 262. 4208.

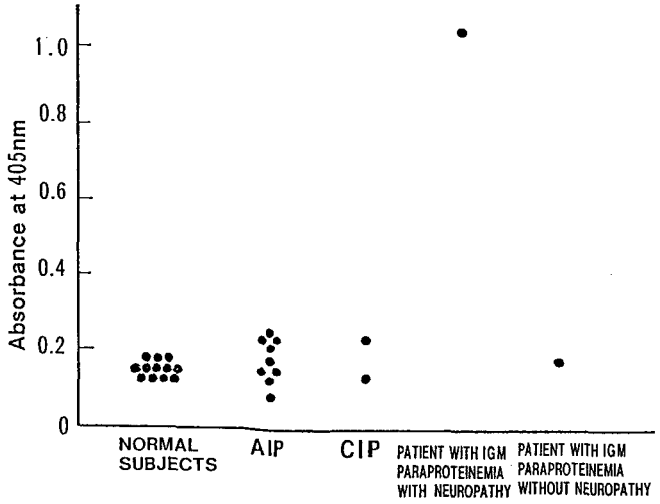


図　1　ＥＬＩＳＡ法による各疾患のＰ$_0$蛋白抗体活性

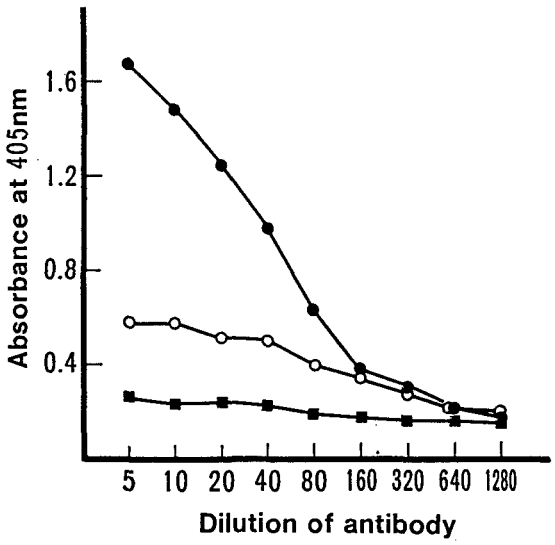


図　2　IgMλ型M蛋白血症を伴う慢性多発ニューロパチー患者血清中の抗Ｐ$_0$蛋白抗体の抑制試験

●：患者血清、○：ウシP0蛋白による吸収後の患者血清、
■：正常血清

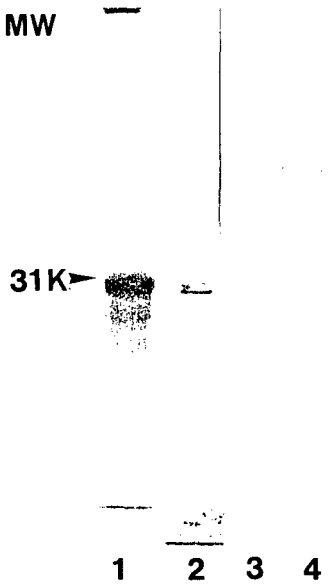


図　3　Immunoblot法によるＰ$_0$蛋白に対する患者血清の反応

1：Ｐ$_0$蛋白のＳＤＳゲル電気泳動像
2：IgMλ型M蛋白血症を伴う慢性多発ニューロパチー患者血清
3：急性特発性多発神経炎患者血清
4：対照者血清

184. 中枢神経系に存在する強塩基性膜タンパク質：その精製と性質

石岡憲昭・栗岡　晋　（慈恵医大・機能研）

〔要　約〕

GABAのアゴニストであるムシモール及びトランキライザー系薬物の一つであるニトラゼパムをリガンドとしたアフィニティーゲルを作製し、ラット脳P2分画から得た可溶化膜タンパク質のアフィニティークロマトグラフィーを行った。その結果GABA受容体構成成分以外に主として分子量17K、21Kのタンパク質画分を得た。17K、21Kのタンパク質はイオン交換及び逆相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）との組合せにより分離精製することができた。二次元電気泳動法による分析は、17K、21K いずれもが強塩基性（pI 11-12）タンパク質であることを示した。ラット脳シナプス膜に対するGABA受容結合への影響を検討した結果、これらのタンパク質が濃度依存的にGABA受容結合を阻害し、約10μMで50%の阻害活性をもつことが分かった。またGABA、フルニトラゼパムと結合することがアイソトープを用いたゲルろ過法によって示唆された。更に、同様な性質を有するタンパク質がウシ脳からも分離精製されている。以上の結果はこれらの強塩基性タンパク質が抑制性伝達物質と結合することにより抑制性神経機能の発現を調節している可能性を示唆していた。

Key word：　inhibitory neuron, membrane basic protein, endogeneous inhibitor

抑制性神経伝達物質の一つであるγ-アミノ酪酸(GABA)は、シナプス後膜の受容体と結合し抑制性の神経機能を発現している。脳内GABA濃度の低下は異常興奮としてのけいれんを誘発し、特にHuntington病では大脳基底核のGABA含量の低下が見られる。更にトランキライザーとして著名なベンゾジアゼピン系薬物の薬理作用と受容体との密接な関連が示唆されており、病態との関連も含めて多くの研究がある（1, 4）。しかしながらGABAとの結合様式、作用機序等いくつかの点において未だ不明である。近年GABAの受容結合を阻害する内在性の物質や薬物の存在が報告されており（6, 7）、これらの物質によるGABAの抑制性の情報伝達を調節している可能性が示唆されている。本研究では脳の膜タンパク質からアフィニティクロマトグラフィー法及び高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法によりGABA受容結合阻害活性を示すタンパク質（分子量17K, 21K）を分離精製し、これらのタンパク質について諸性質の比較検討を行ったので報告する。

【実験方法】

(1) アフィニティーゲルの作製と溶離条件：アフィニティーゲルは、図1に示したようにCMセルロファインを担体として、18-20オングストロームのスペーサーにそれぞれ合成したムシモール及びCMニトラゼパムを結合させた。平衡化は、0.1% Lubrol PX、2mM EGTA、0.3mM PMSF、2mM ME、0,01% NaN_3を含む75mMリン酸カリウム溶液（pH 7.5）により行い、5-20mMムシモール及びニトラゼパムを含む上記平衡化溶液による特異的溶出、1M NaSCNによる溶出方法を用いた。

(2) 可溶化膜タンパク質標品の調製：ラット脳P2分画画分を0℃で、60分間5倍容の1% Lubrol PX、1M KCl、3mM EGTA、0.3mM PMSF、1mM DTTを含む0.32M Sucrose溶液中で撹はん後、100,000 x g、60分間超遠心した（3）。得られた上清は、アフィニティーゲル平衡化溶液で平衡化したGH25mカラムにより脱塩、脱GABAを行い最終的に100,000 x g、30分間超遠心して得られる上

清を可溶化標品とした。

(3) HPLCによる分離精製: イオン交換カラムは、TSK CM-3SW(7.5 x 75mm)を用い、10mMトリス酢酸溶液(pH 4.0)から1M KClを含む0.5Mトリス酢酸溶液(pH 4.0)まで直線的にイオン強度を上昇させる方法で溶出した。逆相系カラムは、Bio-Rad RP-304(4.6 x 250mm)を用い、0.1%TFA溶液中のアセトニトリルの濃度を直線的に上昇させる方法で溶出した。

(4) その他の方法: 二次元電気泳動は、既報の方法(5)を基に膜タンパク質に適した条件を検討し、その方法を用いた。ラット脳シナプス膜に対するGABA受容結合の阻害活性は、[^{3}H]GABAを用い遠心法(2)により測定した。

【結　果】

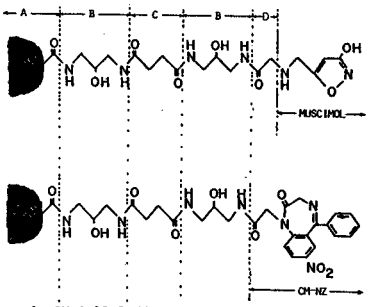
(Ⅰ)強塩基性タンパク質の分離精製: 図2-Aにムシモールアフィニティーカラムの溶出パターンを示した。ムシモールにより特異的に溶出した画分には、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、主として分子量17K及び21Kのタンパク質が検出された。また1M NaSCNで溶出された画分には、特異的溶出の場合と同様に17K、21Kタンパク質が検出され、それ以外にマイナータンパク質バンドが見いだされた(図2-B)。特異的溶出画分の二次元電気泳動の結果は、17K、21Kタンパク質がpI 11-12の強塩基性タンパク質であることを示していた(図3)。アフィニティークロマトグラフィーによって得られた強塩基性タンパク質画分は、脱塩、濃縮後、イオン交換HPLCを行った。図4-Aにその溶離パターンを示した。主として3個のピークが得られたが、電気泳動の結果から2種類の塩基性タンパク質が3番目のピーク(図中No.3)に同時に溶離されてくることが分かった。そこでピーク3の溶離画分を直接逆相系カラムHPLCに添加し17K、21Kタンパク質の分離を試みた。図4-Bに示したように二つのほぼ完全に分離したピークが得られた。電気泳動の結果(図4-C)、1番目のピークは17Kにまた2番めのピークが21Kにそれぞれ相当することが分かり、2種類のタンパク質を完全に分離精製することができた。図4-Cには、ウシ脳より分離精製した強塩基性21Kタンパク質を比較のために示した。

(Ⅱ)17K、21K強塩基性タンパク質のGABA受容結合に及ぼす影響: ラット脳シナプス膜に対するGABA受容結合への影響をラット脳17K及びウシ脳21Kタンパク質を用いて比較検討した。ラット脳17Kタンパク質は、濃度依存的にGABA受容結合を阻害した。ウシ脳21Kタンパク質も同様の結果をあたえ、それぞれ10μMで50%の阻害活性能を示した(図5)。またGABA、フルニトラゼパムに対する結合能に関しての予備的な実験は、アイソトープを用いたゲルろ過法によって行い、17K、21K共に結合能を有することを示唆する結果を得た(図6)。

【考　察】

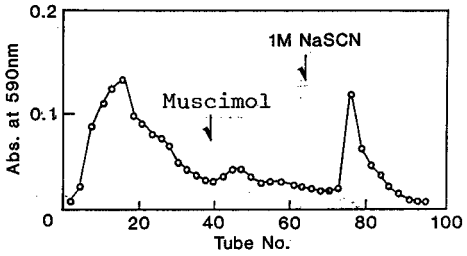
ラット脳可溶化膜タンパク質画分からGABAのアゴニスト、トランキライザー系薬物をリガンドとしたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより2種類の強塩基性タンパク質を同定し、HPLCによって分離精製することができた。この2種類のタンパク質がそれぞれGABA受容に対する阻害能及びGABA、フルニトラゼパムとの結合能を有することが示唆され、これらのタンパク質が伝達物質を介してGABA作動性神経を調節している可能性が考えられた。ウシ脳中にも同様な性質を有するタンパク質が存在すること、また、いくつかのタンパク質性、非タンパク質性の内在性阻害物質の報告(6, 7)があることから抑制性神経の機能発現にさいしてこれら一連の内在性物質が関与しているものと思われる。更に、これらのタンパク質がアフィニティーカラムから受容体構成成分と同様な条件下で溶出されてくることから受容体関連物質とも考えられ、今後、化学構造等の解析によりGABA及びGABA受容体との関連、結合機構などが明らかになるものと思われる。

図 1. アフィニティーゲル用リガンドの構造



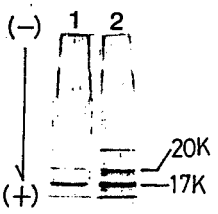
A: CM-Cellulofine
B: 1,3-Diamino-2-hydroxypropane
C: Succinate (Succinic anhydride)
D: Acetate (Bromoacetate)

図 2-A. ラット脳可溶化膜タンパク質のアフィニティークロマトグラフィー



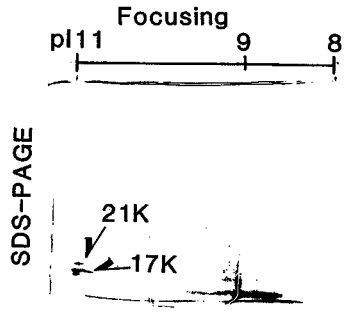
カラム：ムシモールセルロファイン
特異溶出：20mM ムシモール
非特異溶出：1M NaSCN

図 2-B. SDS-PAGE



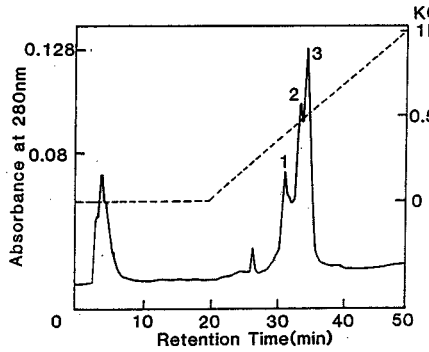
1. 特異溶出画分
2. 非特異溶出画分

図 3. 強塩基性タンパク質の二次元電気泳動



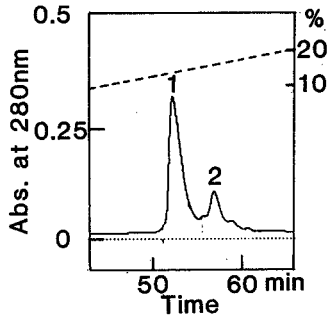
1st gel:4%
pI range:
8-11
2nd gel:
4-17%

図 4-A. 強塩基性タンパク質のイオン交換HPLC



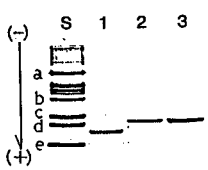
カラム：TSK CM-3SW
(7.5x75mm)
溶出：A→B 30min
linear gradient
A;10mM Tris-
Acetate(pH4.0)
B;1M KCl in 0.5M
Tris-Acetate(pH4.0)
流速：0.6ml/min

図 4-B. 逆相系カラムHPLCによる17K, 21Kの分離



カラム：Bio-Rad RP-304(4.6x250mm)
溶出：A→B 80min linear gradient
A;10%CH3CN in 0.1%TFA
B;75%CH3CN in 0.1%TFA
流速：0.7ml/min

図 4-C. SDS-PAGE



1. ピーク1
2. ピーク2
3. ウシ脳21K
S. MW marker
a:67K b:29K
c:24K d:20K
e:14K

図 5. GABA受容結合阻害活性

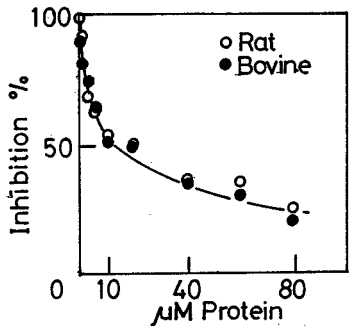
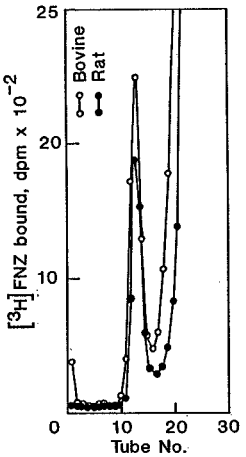


図 6. PD10ゲルろ過によるFNZ結合



FNZ:フルニトラゼパム

【文　献】

1) Braestrup, C. and Squires, R. F. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 3805-3809
2) Kurioka, S., Kimura, Y. and Matsuda, M. (1981) J. Neurochem. 37, 418-421
3) 栗岡　晋、堀　誠治、松田　誠　(1982)　神経化学 21, 351-353
4) Lloyd, K. G., Dreksler, S. and Bird, E. D. (1977) Life Sci. 21, 747-754
5) O'Farrell, P. H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007-4021
6) Toffano, G., Guidotti, A. and Costa, E. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 4024-4028
7) Yoneda, Y. and Kuriyama, K. (1980) Nature 285, 670-673

185. Formoguanamineによるヒナ盲目症：網膜B_6酵素アイソザイムの変化

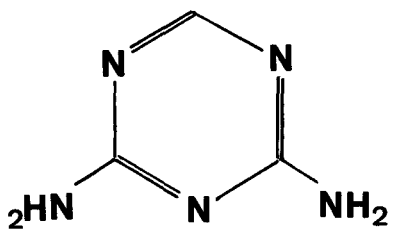
小原嘉彦・松澤健夫*
（名城大・農・農化，藤田学園保衛大・医・第二生化*）

〔要　約〕

Formoguanamine（ＦＧ）投与により盲目になったニワトリヒナ網膜中のアスパラギン酸アミノ基転移酵素（ＧＯＴ），アラニンアミノ基転移酵素（ＧＰＴ）活性及びビタミンB_6含量について検討した。網膜中のＧＯＴ，ＧＰＴisozymes(GOTs,GOTm; GPTs,GPTm)は遠心分画法により分離した。ＦＧ投与後のＧＯＴ比活性は有意な減少を示し、その減少は既報のオルニチンアミノ基転移酵素（ＯＡＴ）の変化とは異なり二相性ではなかった。ＦＧ投与により先ずＧＯＴｓ比活性が減少し、それに続いてＧＯＴｍ比活性が減少した。ＧＰＴアイソザイムではＧＰＴｓ比活性は影響を受けなかったが、ＧＰＴｍ比活性はＧＯＴｍと同様に減少した。網膜中のビタミンB_6含量はＦＧ投与後２－４日目に一時的に有意な減少を示し、ＧＯＴ，ＧＰＴアイソザイムの変動と一致した。以上の所見はＦＧはふ化直後のヒナ眼球に対して、ビタミンB_6の低下を起こし、アミノ酸代謝の重篤な障害を惹起するものと思われる。

Key word：　Formoguanamine,　GOT isozyme,　Vitamin B_6,

緒言



formoguanamine (FG)

Formoguanamine（ＦＧ）はふ化直後のニワトリヒナに盲目症を惹起せしめるs-Ｔｒｉａｚｉｎｅ化合物であることを我々は見出したが[3]、ＦＧはすでに古典的利尿剤として知られている。しかしニワトリヒナ網膜に対する特異的親和性とその障害作用はＮａ共輸送系阻害作用のみでは説明できない、興味深い現象である。

我々はＦＧ投与により発症するニワトリヒナ盲目症の発生機序を解明するために実験を行なってきた。光顕・電顕所見によるとＦＧ投与群では網膜色素上皮内のメラニン顆粒は縮小沈下し、微絨毛は消失し、ミトコンドリア膜は不明瞭となり、視細胞内・外節の崩壊蓄積がみられ、ついに網膜の亀裂分離が生じて盲目にいたる所見が認められた。また網膜細胞のミトコンドリアに局在するオルニチンアミノ基転移酵素（ＯＡＴ）活性の有意な減少が起こることも見出した[4]。本報告ではさらに網膜に存在する他のB_6酵素（GOT及びGPTのisozymes）への影響及びB_6含量を酵素法で測定した結果を報告する。

実験方法

実験動物と薬物投与法：ニワトリヒナはＦＧに感受性の高いWarren-Sex-Sal-Link G

雄を使用した。ヒナは29±3°Cに保ったダンボール箱中で集団で飼育し、餌は市販配合飼料を自由に摂取させた。FGはBambergerらの方法により合成し、塩酸で中和し塩酸塩（FG・HCl）とした。FG・HClの50mg／ml水溶液を作成し、ふ化後12、24、36、48時間目に体重40g当たり0.2mlを注射し、計4回ヒナ脚部皮下に投与した。盲目症の発生はペンライトによる瞳孔対光反射の有無で判定した。餌付はふ化後12時間より開始した。

酵素活性測定法：FG投与により発症したヒナ2羽を一群として眼球を摘出し、角膜、レンズ、虹彩、硝子体を除いた眼球後半部を0.25M庶糖－0.01Mリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）でホモゲナイズし、10KHz5分間超音波処理し、8500xg10分間遠心した上清を検液とした。GOT及びGPTisozymesは遠心分画法により上清画分（GOTs，GPTs）とミトコンドリア画分（GOTm，GPTm）に分離した。GOTおよびGPT活性はKarmen法に準じてrate assayにより測定し、蛋白はビュレット法により定量した。GOTisozymeはGOTm抗血清を用いて分離定量した。即ち、ニワトリGOTmは肝より分離精製し[1]、完全アジュバントと共にウサギに注射して抗血清を得、粗酵素液に反応させ残存GOT活性からGOTs活性を求め、GOTisozymeの組成を測定した。

網膜ビタミンB6の定量：3羽分の眼球後半部を一群として5%過塩素酸でホモゲナイズし、暗所で50°C30分間抽出し、3000rpm10分間遠心した上清を30%KOHで中和し、PLP定量用検体とした。PLPの定量は細菌apo-OATを用いた酵素法によった。

実験結果と考察

GOT，GPTアイソザイムの変化：既報[4]において網膜のOATの比活性はFG投与後4日目に有意な減少（対照の約60%まで減少）が見られ、その後対照と同様に増加してゆく、二相性の変化を示したので、同じB6酵素であるGOT，GPTisozymeの変化をしらべた（図1）。GOTsの比活性は対照群では日令と共に増加傾向を示したが、FG投与群では2日目以降増加せず、2日目以降有意な低下を示した。GOTmの比活性は対照群では4、6、9日目と顕著な増加を示したが、FG投与群では2日目以降全く増加しなかった。一方GPTs比活性では対照とFG投与間に差は見られなかったが、GPTmの比活性は対照はふ化後一定であるに対し、FG投与群は4日目から急激に減少した（図1）。

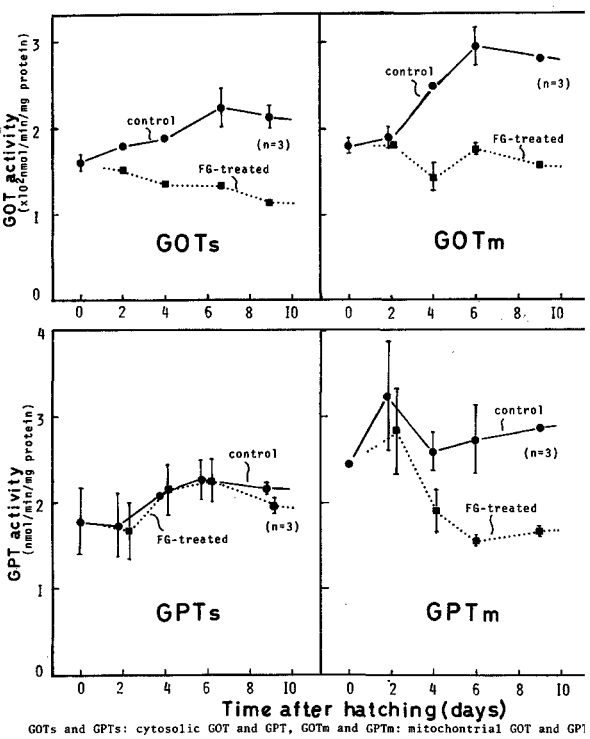


図1．FG投与後の網膜GOT，GPTアイソザイムの経日変化

ＦＧ投与後２８－３２時間で対光反射が消失し、盲目となるが、今回時間的に対光反射の消失する２日目に相当して、ＧＯＴｓ比活性の増加が停止する現象を証明した。これは後述する様にＧＯＴｓタンパク合成の停止によって起こってくるものと考えられる。また、この時期に一致して網膜内のＢ6含量の減少が起こることも見出した。ミトコンドリア分画のアイソザイムは少し遅れて４日目以降に合成停止が起こると考えられる。

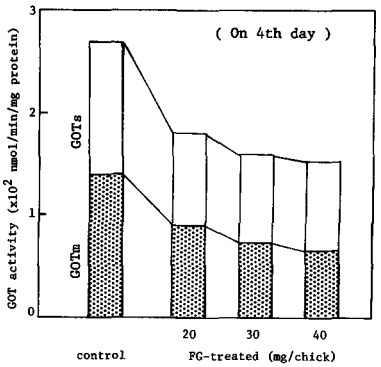


図２．ＦＧ投与後の全ＧＯＴ活性及びＧＯＴisozymeの変化

抗ＧＯＴm血清によるＧＯＴisozymeの分別定量：ニワトリ肝から精製したG.ＯＴmに対する抗血清はＣＭセルローズで分別したＧＯＴmと反応し、ＧＯＴｓとは全く反応しなかった。この抗血清によってＧＯＴisozymeを酵素蛋白として分別できる。ＦＧ・ＨＣｌをヒナ一羽当たり２０、３０、４０ｍｇ投与した４日目の網膜の全ＧＯＴ活性及びＧＯＴisozymeの組成を測定した（図２）。全ＧＯＴ活性はＦＧ量の増加に伴って、その比活性は対照群の６６％，６０％，５６％と減少した。一方ＧＯＴｓ：ＧＯＴm比は対照群が４８：５２に対して、２０ｍｇ投与で５０：５０，３０ｍｇ投与で５４：４６，４０ｍｇ投与で５７：４３とＧＯＴｓが増加し、ＧＯＴmが減少した。以上の知見よりＦＧ投与で起こるＧＯＴｓ，ＧＯＴm活性の変化は酵素蛋白量の変化を反映していることが明らかである。

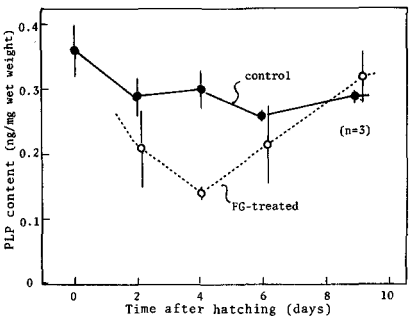


図３．ＦＧ投与後の網膜Ｂ6含量の経日変化

網膜中のビタミンＢ6含量の変化：細菌ａｐｏ－ＯＡＴを用いる酵素法によるピリドキサールりん酸（ＰＬＰ）の定量は、ＰＬＰ濃度１０－１００ｎｇ／ｍｌの範囲で定量的に測定可能であった。網膜中のビタミンＢ6含量は対照群ではふ化直後やや減少するが、０．３ｎｇ／ｍｇのレベルを９日まで保っている。ＦＧ投与群ではまず２日目で減少傾向が見られ、対照の６０－７０％の値を示し、４日目で顕著となり対照の約５０％に減少した。６日後再び増加し、９日目に対照群と同レベルとなった（図３）。このＰＬＰレベルの変化の前半の減少は明らかにＦＧによるものであるが、後半の増加はＦＧ投与による二次的変化と考えられるblood-retinal barrierの破壊によるものと推定される。

以上の知見によれば、ＦＧ投与による盲目症はＦＧによるＮａ共輸送系阻害によって網膜の水分やＢ6の欠乏などが急速に起こり、アミノ酸蛋白代謝の障害が引き起こされるためと推定される。ＧＯＴｓとＧＯＴmは網膜で共に内節に分布し、それ以外の層では異なった分布をしていることが報告されている(2)。今後ＦＧによってＢ6の減少が起こる機構を追及したい。

(1) Gehring,H. et al (1977) J.Mol.Biol. 115,97-101
(2) Inagaki,N. et al (1985) Brain Res. 325,336-339
(3) 松原弘道，小原嘉彦，久葉　昇 (1975) 農化. 49, 505-511
(4) Obara,Y. et al (1985) Exp.Eye Res. 41,519-526

186. 老齢及び成熟ラットの脳内 superoxide dismutase 活性値及びそれらに及ぼす小柴胡湯合桂枝加芍薬湯の影響について

平松　緑・枝松　礼・河野雅弘*・
東原慶一・森　昭胤
（岡山大・医・脳代謝研・機能生化，日本電子・ＥＳＲ応用研*）

〔要　約〕
成熟ラット（２ヶ月）及び老齢ラット（24ヶ月）に小柴胡湯合桂枝加芍薬湯(TJ-960，5%溶液）を４ヶ月間経口投与後，大脳皮質，海馬，線条体，視床下部，中脳，橋延髄及び小脳のsuperoxide dismutase(SOD) 活性をelectron spin resonance (ESR) spectrometryを用いて測定し，次のことを明らかにした。
(1)老齢ラット脳の mitchondria分画の SOD活性は，大脳皮質，海馬，線条体，視床下部，中脳及び小脳のすべての部位において，成熟ラット脳に比べて著明に増加していた。また，老齢ラット脳の postmicrosome分画の SOD活性は，視床下部を除くこれらの部位において，成熟ラットに比べて有意に増加していた。
(2)TJ-960は，老齢ラット脳の mitchondria分画の SOD活性を線条体において僅かながら低下させたが，postmicrosome分画の SOD活性を海馬と視床下部において増加させた。
(3)TJ-960は，成熟ラット脳の postmicrosome分画の SOD活性を大脳皮質において，僅かながら増加させた。
以上より，TJ-960は，脳内 postmicrosome分画の SOD活性を僅かながら亢進させる傾向のあること，及びその作用は，老齢ラットにおいてやや著明であることが明らかとなった。

Key word：Brain superoxide dismutase, ageing, Shosaikoto-Go-Keishikashakuyakuto

先に，我々は，小柴胡湯合桂枝加芍薬湯（TJ-960）が，hydroxyl radical（・OH）superoxide anion(O_2^-)及び1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical を消去することをelectron spin resonance (ESR) spectrometryを用いて明らかにした(4,6)。また我々はTJ-960が老齢ラット脳内の過酸化中間体radical 及び thiobarbiturate反応物質(MDA) を減少させること(3) を見出すと共に，TJ-960は老齢ラット視床下部の norepinephrine 値を上昇させること(5) 及び老齢ラット大脳皮質のtaurine, serine 及びalanine 値を上昇させること(7) を明らかにした。今回は，TJ-960の成熟及び老齢ラットの脳内superoxide dismutase(SOD) 活性に及ぼす影響について検索を行った。

〔実験方法〕
(1)実験動物：成熟（２ヶ月）及び老齢（24-27 ヶ月）のラット（Wistar，雄）を使用し，室温24℃，湿度55%で飼育した。飼料は，MF（オリエンタル酵母）を使用し，水は給水ビンで自由に摂取させた。
(2)TJ-960：サイコ 7.0，ハンゲ 5.0，オウゴン 3.0，タイソウ 4.0，ニンジン 3.0，カンゾウ 2.0，ショウキョウ 1.0，シャクヤク 6.0，ケイヒ 4.0の割合で混合した生薬の抽出エキス（津村順天堂）を用いた。
(3)TJ-960の投与方法：TJ-960(5%水溶液）を給水ビンに入れ，４ヶ月間連続投与を行った（約1g/kg/day)。対照には水のみを摂取させた。
(4)SOD 活性の測定方法：ラットを断頭後，脳を素早く摘出し，Glowinski & Iversen (6) の方法に従い，氷上にて大脳皮質，線条体，海馬，中脳，視床下部，橋延髄，小脳に部位別した。次いで各組織に 9～45倍量の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.8）を加えてホモゲナイズし，1,600xg，0℃で15分間遠心した。次いで上清を11,000xg 30分間遠心後，得られた沈査を0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.8)に懸濁させて

Table 1 SOD activity in the brain of adult and aged rats

	SOD activity (Unit/mg protein)			
	Mitchondria fraction		Postmicrosome fraction	
	Adult	Aged	Adult	Aged
Cortex	1.44±0.15(13)	16.66±1.01(15)[b]	12.35±0.76(12)	17.17±1.04(13)[a]
Hippocampus	0.53±0.13(12)	3.93±0.43(13)[b]	10.28±0.52(14)	17.61±0.60(15)[b]
Striatum	0.69±0.08(14)	4.82±0.27(15)[b]	10.35±0.44(14)	24.29±0.83(15)[b]
Hypothalamus	1.67±0.17(12)	2.83±0.27(15)[b]	16.86±0.88(14)	18.34±0.52(14)[b]
Midbrain	1.74±0.13(14)	13.97±0.82(13)[b]	41.06±2.46(14)	57.75±2.05(13)[b]
Pons-medulla oblongata	0.89±0.08(13)	8.27±0.69(15)[b]	24.48±1.50(14)	53.09±2.65(15)[b]
Cerebellum	1.61±0.18(13)	8.86±0.62(15)[b]	17.68±0.71(14)	30.65±0.61(12)[b]

The values repreesnt the means±SEM with animal number in parentheses.
[a] $p<0.01$ compared with adult rat, [b] $p<0.001$ compared with adult rat.

SOD 試料(mitchondria分画) とした。上清はさらに105,000xg, 0℃で60分間遠心し, 得られた上清を SOD試料(postmicrosome分画) とした。これらの試料は-80 ℃に保存した。

次いで, 試験管に 2mM hypoxanthine 50μl, 5.5mM DETAPAC 35μl, 試料50μl, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO) 15μl を加え, さらにxanthine oxidase (XOD, 0.272 unit/ml)を50μl 加えたのち, 攪拌し, XOD 添加45秒後よりESR でDMPO・O_2^- spin adductを分析した。尚, ESR 測定条件は平松らの方法(8) に従った。

〔実験結果〕

(1)老齢ラット脳内のSOD 活性：mitchondoria分画の SOD活性は, 成熟ラットに比べて, 大脳皮質, 海馬, 線条体, 視床下部, 中脳, 橋延髄及び小脳の7部位において著明に増加していた (表1)。

(2)TJ-960の影響：老齢ラットにおいては, TJ-960は線条体の mitchondria分画のSOD 活性を低下させたが, 海馬及び視床下部の postmicrosome分画の SOD活性を上昇させた (表2)。しかし, 成熟ラットにおいては, TJ-960は, 大脳皮質のpostmicrosome 分画の SOD活性を僅かに上昇させるのみであった (表3)。

〔考察〕

SOD には2つのisozyme が存在し, Cu,Zn-SOD は, 細胞質上清に存在し, Mn-SODは mitchondria のマトリックスに存在する。老齢ラットにおいては脳組織のmitchondria 分画のSOD 活性又はMn-SOD活性が増加している(1,9) ことが報告されている。老化の

Table 2 Effect of TJ-960 on SOD activity in the brain of aged rats

	SOD activity (Unit/mg protein)			
	Mitchondria fraction		Postmicrosome fraction	
	Control	TJ-960	Control	TJ-960
Cortex	16.66±1.01(15)	17.99±1.04(15)	17.17±1.04(13)	18.68±0.89(13)
Hippocampus	3.93±0.43(13)	3.57±0.45(12)	17.61±0.60(15)	19.52±0.61(15)[a]
Striatum	4.82±0.27(15)	3.92±0.30(14)[a]	24.29±0.83(15)	22.26±0.79(13)
Hypothalamus	2.83±0.27(15)	2.58±0.18(14)	18.34±0.52(14)	21.44±0.81(14)[b]
Midbrain	13.97±0.82(13)	13.70±0.63(13)	57.75±2.05(13)	61.39±3.35(14)
Pons-medulla oblongata	8.27±0.69(15)	9.65±0.26(15)	53.09±2.65(15)	58.34±2.14(14)
Cerebellum	8.86±0.62(15)	8.77±0.25(15)	30.65±0.61(12)	31.52±1.04(12)

The values represent the means±SEM with animal number in parentheses.
[a] $p<0.05$ compared with control, [b] $p<0.005$ compared with control.

原因の１つに，mitochondriaからのradical の過剰発生が想定されているので，mitochondria分画の SOD活性の亢進は過剰に発生したradical に対応するものと考えられる。今までに老齢ラットの脳の postmicrosome分画の SOD活性は，増加，不変又は低下，と種々の報告があり，一致した結論が得られていない。今回用いた SOD活性の測定方法は，O_2^-をDMPO-O_2^- spin adduct として直接 ESRで捕えているので，従来のSOD 活性の測定方法に比し， SOD活性の測定値は信頼性が高いと考えられる。

TJ-960は，OH radical及びO_2^-を消去させること(6, 4)，及び老齢ラット脳の過酸化中間体radical 並びに MDAを減少させること(3) が明らかにされている。今回，TJ-960 は，老齢ラット脳に対して postmicrosome分画の SOD活性を亢進させる傾向を示した。これらのTJ-960のラジカル消去作用及び SOD活性亢進はTJ-960の特異な成分によるものか，あるいは漢方薬の特殊な配合によるものかについては今後検討を行いたい。

Table 3 Effect of TJ-960 on SOD activity in the brain of adult rats

	SOD activity (Unit/mg protein)			
	Mitchondria fraction		Postmicrosome fraction	
	Control	TJ-960	Control	TJ-960
Cortex	1.44±0.15(13)	1.80±0.26(14)	12.35±0.76(12)	14.65±0.75(13)[a]
Hippocampus	0.53±0.13(12)	0.43±0.07(12)	10.28±0.52(14)	10.45±0.54(13)
Striatum	0.69±0.08(14)	0.88±0.09(14)	10.35±0.44(14)	11.15±0.60(13)
Hypothalamus	1.67±0.17(12)	1.28±0.11(12)	16.86±0.88(14)	16.45±0.86(14)
Midbrain	1.74±0.13(14)	1.78±0.13(14)	41.06±2.46(14)	39.21±3.26(13)
Pons-medulla oblongata	0.89±0.08(13)	0.86±0.08(13)	24.48±1.50(14)	24.54±1.08(14)
Cerebellum	1.61±0.18(13)	1.80±0.16(14)	17.68±0.71(14)	17.48±0.57(14)

The values repreesnt the means±SEM with animal number in parentheses.
[a] $p<0.05$ compared with control.

〔参考文献〕

1. Danh, H.C., Benedetti, M.S. and Dostert, P. (1983) J. Neurochem. 40, 100-1007 2. Glowinski, J. and Iversen, L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669 3. 平松 緑，枝松 礼，加太英明，森 昭胤，河野雅弘，石毛 敦 (1985) 神経化学 24 106-108 4. Hiramatsu, M., Edamatsu, R., Kohno, M. and Mori, A. (1986) Jpn, J. Psychiat. Neurol. 40, 345-348 5. Hiramatau, M., Kabuto, H. and Mori, A. (1986) IRCS Med. Sci. 14, 189-190 6. 平松 緑，枝松 礼，福島正登，權 重桂，森 昭胤 (1987) NEUROSCIENCES 13, 139-141 7. Hiramatsu, M., Kabuto, H. and Mori, A. (1987) NEUROSCIENCES 13, 印刷中 8. Hiramatsu, M. an Kohno, M. (1987) JEOL News 23, 7-8 9. Vanella, A., Geremia, E., D'Urso, et al. (1982) Gerontology 28, 108-113

187. 脳グリコーゲン合成酵素の免疫組織化学的検討

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

〔要　旨〕

犬脳よりグリコーゲン合成酵素（ＧＳ）を，部分精製した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で易動したＧＳ蛋白質バンドを得，家兎に注射して，定法により酵素に対するポリクローン抗体を作製した。抗体は，イムノブロット上，脳ＧＳサブユニットである88ＫDa蛋白質バンドのみと交叉反応した。この反応は，脳ホモジェネートの上清分画を用いても認められた。抗体の特異性については，1）ＨＰＬＣで分離した分画でのＧＳ活性とＥＩＡ法による免疫活性の一致，2）カルモデュリンキナーゼによりリン酸化されたＧＳが免疫沈殿により回収されることによって確かめた。本抗体を用いた免疫組織化学的検索では，脳内に広汎に存在していたが，海馬，大脳皮質，線条体，小脳皮質では，比較的高い免疫活性が認められた。光顕レベルでの観察では，ニューロン系，グリア系細胞のいずれにも認められたが，細胞間での免疫活性の差も観察された。
ニューロン系では，脳幹網様体の神経節細胞が特に高い免疫活性を示した。グリア系細胞では，脳室上皮細胞，脈絡叢細胞，オリゴデンドログリア，アストロサイトなどに免疫活性を認めた。

Key word： glycogen synthase, immunohistochemistry, brain.

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る。脳グリコーゲン代謝に関与するホスホリラーゼ，グリコーゲン合成酵素は，ｃＡＭＰやCa^{2+}により，その活性が調節されていることが報告されている。[6) 7)]　我々は，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）によってリン酸化され[3)]，リン酸化反応に伴なって酵素が不活性化されることを報告した[4)]。さらに部分精製した脳ＧＳが，ＣａＭキナーゼにより，リン酸化され，不活性化されることを報告した[2)]。しかし脳ＧＳは，分子量，トリプシン処理ペプチド，トリプシン処理リン酸化ペプチドなど骨格筋ＧＳのパターンと異なっており，他臓器（肝臓，骨格筋）酵素とは異なっている可能性が示唆された。今回我々は，脳ＧＳに対する抗体を作製し，免疫組織化学法により脳内での本酵素の分布を検討した。

〔実験材料と方法〕

ＧＳは，犬大脳の細胞上清分画から既報[2)]に従い部分精製した。均質な免疫抗原を得るために，部分精製したＧＳの，ＳＤＳ－ＰＡＧＥを行ない，染色後，88ＫDa の蛋白質バンドを切り取り，ホモジェナイズした。約１㎎の蛋白質を家兎を用い，約２週間間隔で，５回注射して抗血清を得た。犬及びラットの脳は，摘出後，水冷の10％中性ホルマリン液にて約20時間固定し，パラフィン包埋した。免疫染色には，４㎛厚の切片上で，３・３′－ジアミノベンチジンを基質として，ＡＢＣ法，ＦＩＴＣを用いた蛍光抗体法にて行なった。脳のＣａＭキナーゼは，既報[1)]の方法に従い精製し，ＧＳのリン酸化反応は，既報[2)]に従い行なった。リン酸化ＧＳの免疫沈殿を行ないオートラジオ

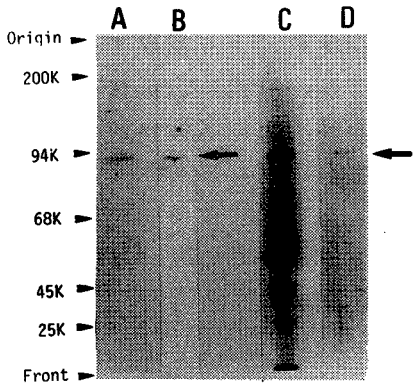
グラフィーを施行した。 イムノブロット法は，Towbin ら[9] の方法に従った。酵素免疫測定法（ＥＩＡ）は，ＨＰＬＣにて分離した各分画に対し，ペルオキシダーゼ結合の二次抗体を用い，Ｏ－フェニレンジアミンを基質とし，492nmでの吸光度を測定した。

〔実験結果〕

1）抗体の特異性：既報[2] に基づき部分精製した脳ＧＳは，ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上，88KDa の単一バンドを示した（Fig 1－Ａ矢印）。抗体は，88ＫDaバンドのみを認識し，（Fig 1－Ｂ），脳ホモジェネートの上清（Fig 1－Ｃ）中からも同一のバンドを認識した（Fig 1－Ｄ）。さらに脳ＧＳに対する抗体の特異性を確認するために，ＨＰＬＣ分離後の各分画におけるＥＩＡ（○－•－○）とＧＳ活性（●――●）を測定すると各々のピークの一致をみた。ピーク分画でのＧＳを，CaMキナーゼでリン酸化し，免疫沈殿を試みると，Fig－2 挿入図の如く，88ＫDa蛋白質のみが，オートラジオグラフィーにて検出された。

Fig.1

IMMUNOBLOT ANALYSIS OF ANTISERA TO BRAIN GLYCOGEN SYNTHASE



2）ＧＳの脳内分布：脳内に広汎に存在したが，海馬，大脳皮質，線条体，小脳皮質に比較的高い免疫活性を認めた（Fig 3）。細胞のタイプでは，ニューロン，グリア系細胞の細胞体，突起内いずれにも存在し，核には認めなかった（Fig 4，5）。ニューロンの中では，特に脳幹網様体の神経節細胞に高い免疫活性を示したが（Fig 4），他の部位でのニューロンに明らかな免疫活性の差はなかった。 グリア細胞は，脈絡叢細胞，脳室上皮細胞などに中等度の免疫活性を認め，オリゴデンドログリアにも免疫活性を検出した(Fig 5)。 概してニューロン細胞は，グリア細胞に比して，高い免疫活性を有していた。

Fig.2

COINCIDENCE OF GLYCOGEN SYNTHASE ACTIVITY WITH IMMUNOSTAINING INTENSITY

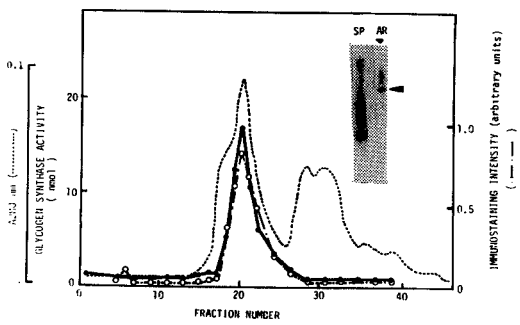
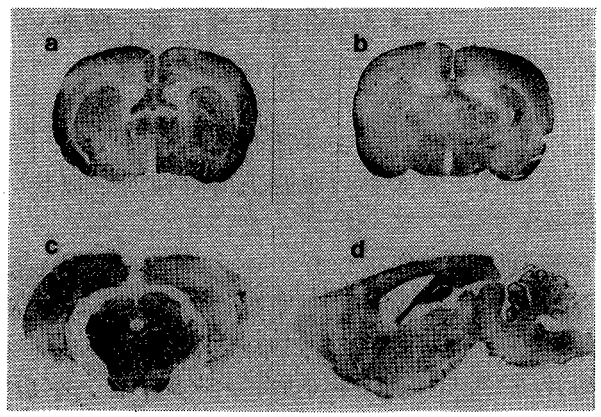


Fig.3

IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF GLYCOGEN SYNTHASE IN RAT BRAIN



〔考察〕

これまで，骨格筋ＧＳに対する抗血清により，イムノブロット上，各臓器のＧＳの比較検討の報告はあるが[5]，脳ＧＳに対する抗体を作製し，イムノブロット上，免疫組織化学的検討を行なった報告はない。　すでに報告した通り[2]，脳と骨格筋ＧＳは物理化学的性質が異なっていた。脳ＧＳに対して得られた抗体が，他臓器ＧＳと交叉反応するかどうかは現在検討中である。　ＧＳの脳内局在については，従来の酵素組織化学法で得られた知見[8]と類似していた。広汎に存在し，ニューロン，グリアのいずれにも認められ，著明な局在を示す部位はなかった。　このことは，ＧＳが脳の各部位で必要な酵素としての役割を演じていることを示している。　細胞間に認められた免疫活性の差は，ＧＳ含量の差，ひいては，細胞間の機能の差を反映していると考えられる。　酵素組織化学に比べた利点として，１）必らずしもＧＳ活性の保たれていないホルマリン固定パラフィン包埋切片でも検出可能であること，２）酵素そのものをとらえるので直接的な所見として考えられること。　３）操作の手技が簡易であることがあげられる。　本研究で開発された免疫組織化学的方法は，今後，脳の生理的，病的状態におけるグリコーゲン代謝の解析に有用な手段となると考えられる。

Fig.4 IMMUNOFLUORESCENCE OF GLYCOGEN SYNTHASE IN CANINE BRAIN
a: Brainstem　b: Cerebellar cortex

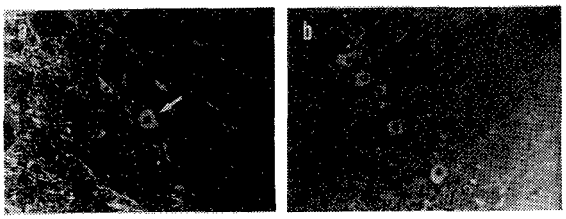
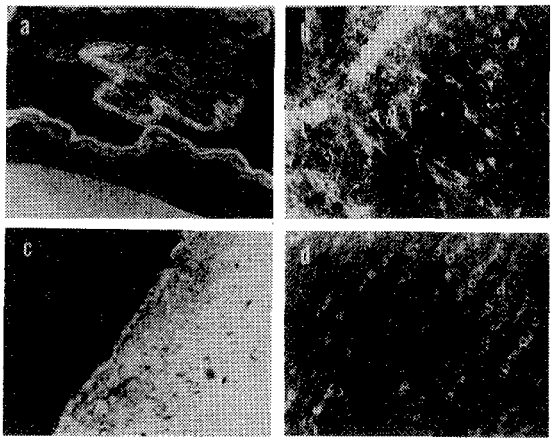


Fig.5 a: Choroid plexus cells　b: Astrocytes
c: Ependymal cells　d: Oligodendrocytes



REFERENCES

1) Fukunaga K., Yamamoto H., Matsui K., Higashi K., & Miyamoto E. (1982) J. Neurochem. 39, 1607−1617.
2) Inoue N., Iwasa T., Fukunaga K., Matsukado Y., & Miyamoto E. (1987) J. Neurochem. 48, 981−988.
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) Kaslow H. R., & Lesikar D. D. (1984) FEBS Lett. 172, 294−298.
6) Passonneau J. V., & Crites S. K. (1980) Mol Pharmacol. 17, 301−308.
7) Quach T. T., Rose C., & Schwartz J.C. (1978) J. Neurochem. 30, 1335−1341.
8) Takeuchi T. (1965) Recent Adv in Res of the nervous system (in Japanese). 9, 695−699.
9) Towbin H., Staehelin T., & Gordon J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350−4354.

188. 高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器によるラット脳ミトコンドリアのキヌレニン水酸化酵素活性の測定——肝臓との比較——

平井 久美子・植村 富彦　　（都精神研・神経化学）

〔要　約〕

ミトコンドリア外膜に局在するキヌレニン水酸化酵素活性の高感度定量化を試みた。即ち、反応停止後、反応液を強陽イオン交換樹脂（Dowex-50 W-X4）に通すことにより生成した3－ハイドロキシキヌレニン（3-OHKYN）を分離し、高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器（HPLC-ECD）を用いて3-OHKYNを定量した。肝ミトコンドリアでは、蛋白量に比例した活性の増加が見られ、最小使用蛋白量の限界は、約2.5μgであった。これは、従来の測定方法で使用される蛋白量の約1/500であり、非常に高感度で反応生成物を定量できる事が判明した。この方法を脳ミトコンドリアに適用した所、反応条件、カラム条件等は、肝ミトコンドリアの活性測定時と全く同一条件であるにもかかわらず、蛋白量に依存した酵素活性の上昇（linearity）が得られなかった。即ち、蛋白濃度が低いほど、比活性の上昇がみられた。この原因については、目下検討中である。また、私共が精製したセロトニン由来の黄色物質（6-hydroxy-3,4-dihydro-β-carboline）は、ミトコンドリアのキヌレニン水酸化酵素活性を阻害した。阻害形式や、阻害定数の決定および還元型Y.S.の阻害作用との比較は、現在検討中である。

Key word：**HPLC-ECD, Mitochondrial Kynurenine Hydroxylase, Yellow Substance(6-Hydroxy-3,4-dihydro-β-carboline)**

〔序論〕ミトコンドリア外膜に存在するキヌレニン水酸化酵素活性の測定は、従来(1) NADPHの消費を分光学的に340nmで追う方法〔11,12,14〕、(2)酸素消費量を測定する方法〔3〕、(3)反応生成物である3-OHKYNをペーパークロマトグラフィーにて分離抽出後、368nmの吸光度を測るか〔8,14〕、^{14}C-KYNから生成された^{14}C-3-OHKYNを測る方法が行われてきた〔12〕。しかし、いずれの方法も、肝臓ミトコンドリアには適応されているが、脳ミトコンドリアの活性は、今日までこれらの方法では感度が低い為か、操作の煩雑な為か、測定されていない。私共は、HPLC-ECDによる本酵素活性の高感度定量化を考案し、ラット脳ミトコンドリアの本酵素活性の測定を試みたので報告する。なお昨年の本大会で報告したセロトニン由来のYellow Substance (Y.S.)〔16〕による本酵素活性の阻害も見出したので、併せ報告する。

〔実験方法〕肝臓ミトコンドリアの調製：文献(1)に従った。脳ミトコンドリアの調製：文献(2)に従った。反応系：KYN水酸化酵素活性の測定は、終濃度0.1 M Tris-Actate buffer、pH 8.1、0.01 M KCl、1.5 mM NADPH、5 mM G6P、3.5 U G6PDH、5 mM $MgCl_2$、肝（脳）ミトコンドリアより成る反応液（全量1.2 mℓ）を、37℃、7分間preincubation後、0.3 mM L-KYNを加えて反応を開始する。一定時間後（肝では30分、脳では90分）、エタノール2.0 mℓにて反応を停止し、既知標準として、肝（脳）ミトコンドリアに500 pmolの3-OHKYNを加える。ブランクとして、boiled enzymeあるいはNADPH無添加を使用。全反応液に60%過塩素酸50μℓ、内部標準としてα-MDを加え、0℃、15分間放置後、15000 rpm、10分間遠沈し上澄をDowex 50 W-X4 (H^+, 200-400 mesh; Column size, 0.4 x 2.5 cm)にかける。カラムを蒸留水50mℓで洗浄後、

脚註：キヌレニン(KYN)；3-ハイドロキシキヌレニン(3-OHKYN)；α－メチルドーパ（α-MD)；トリプトファン(TRP)；モノアミン酸化酵素(MAO)；グルコース6リン酸(G6P)；グルコース6リン酸脱水素酵素(G6PDH)；インドールアミンジオキシゲナーゼ(IDO)；3-ハイドロキシアントラニール酸ジオキシゲナーゼ(3-OHAADO)；キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(QAPRT)；Yellow Substance (Y.S.)

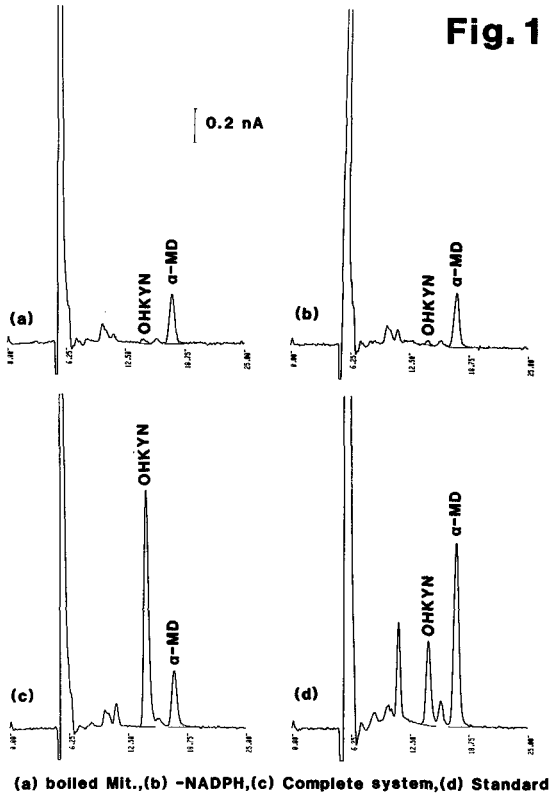
5N HCl 10 mℓにて溶出。溶出液をrotary evaporator にて濃縮し、HPLC移動相0.5 mℓ（肝）または0.2 mℓ（脳）に溶解後、0.45μm フィルターに通し、その5～10μℓを注入し反応生成物である3-OHKYN を定量。HPLC-ECD： BAS社LC 4B detector、電極TL-5A Glassy Carbon Electrode を使用。電位＋600 mV、この電位ではKYN は検知されないが、3-OHKYN は検知される〔10〕。カラム ODS 5μ、（4.6 x 250 mm）、移動相0.1 M クエン酸buffer、0.05 mM EDTA-Na_2、Sodium octyl sulfate 150mg／ℓ、0.06% diethylamine 、5％ CH_3CNにて測定。Flow 0.5mℓ／min 。Y.S.の精製と濃度決定：既に報告した方法に従い精製した〔16〕。Y.S.の濃度は、分子吸光係数 ε=8,800 $M^{-1}cm^{-1}$（酸性水溶液、400 nm）〔17〕を用いて決定した。

〔結果〕肝臓ミトコンドリアの酵素活性：図1は、ラット肝ミトコンドリアのKYN 水酸化酵素活性を示している。(c) Complete System、(a)熱処理したミトコンドリア、(b) NADPH無添加、(d)既知スタンダードで、各サンプルともα-MD を内部標準として添加。(c)では良く3-OHKYN が生成されており、(a)(b)ではほとんど生成されていない。図2は、水酸化酵素活性が、ミトコンドリア蛋白濃度に比例している事を示している。蛋白濃度0.5 mg以上まで直線性があった（図2a）。蛋白濃度を希釈してゆくと、0.0025mgでも測定可能であった（図2b）。この感度は、従来の方法による使用ミトコンドリアの最小蛋白量の約1/500 なので、既存の方法より少なくとも約500 倍感度が良いことになる。脳ミトコンドリアの酵素活性：後述の如く、脳の活性は、肝臓に比べかなり低いので、得られた値が真に酵素反応に由来するか否かが問題になる。図3は、ラット脳ミトコンドリアのKYN 水酸化酵素活性を示している。(c) Complete System、(a)熱処理したミトコンドリア、(b) NADPH無添加、(d)既知スタンダードで、各サンプルともα-MD を内部標準として添加。(c)では良く3-OHKYN が生成されている。(a)(b)でも非酵素的に3-OHKYN の位置にpeakが出現するので、(c)より(a)または(b)を差し引いた値が、酵素により生成された3-OHKYN 量と考えられる（表1）。蛋白濃度に対する酵素活性の変化（直線性）に関しては、Dowex50カラム処理前のサンプルでは、蛋白量1～4 mgの範囲で直線性が得られたが、カラム処理後のサンプルでは良い直線性は得られなかった。Y.S.による酵素活性の阻害：フラビン酵素であるMAO のβ-carbolineによる阻害については、既に報告されている〔9〕。従って、私共の精製した3,4-dihydro-β-carbolineの一種であるY.S.〔16〕の本酵素に及ぼす作用を検討した所、Y.S.は、本酵素活性を阻害した。この阻害が、NADPH 再生系に用いたG6PDH の阻害によるものではない事は、直接NADPH を添加した系でも阻害されることにより確かめられた。

〔考察〕脳および肝臓の本酵素活性の比較：脳内でTRP からニコチン酸に至る経路は、明らかにされていないが、初段階を司る IDO〔7〕および、3-OHKYN 以後のstepを司る二酵素、即ち、3-OHAADO〔5〕と QAPRT〔4〕のラット脳内存在が報告されている。しかし、KYN 水酸化酵素は、脳内でかなりactiveという報告〔7〕にもかかわらず、脳ミトコンドリアを用いて、本酵素活性を測定した報告は見当たらない。今回私共は、HPLC-ECDを用いた高感度定量法によりラット脳ミトコンドリアの酵素活性を測定し得た。Gál とSherman は、in vivo で〔^{14}C〕-L-TRPを腹腔内投与後、脳内の〔^{14}C〕3-OHKYN の合成速度を測定し、0.47 nmol/g/hrと報告している〔6〕。この値は、直接KYN 水酸化酵素活性を反映したものではないが、1g の脳からとれるミトコンドリアの収量は、私共の方法では約10mgであるので、彼等の値は、約0.78 pmol/mg protein/minと換算される。これらは、in vivo とin vitroでの測定方法の相異にもかかわらず、かなり近似した値である。脳の場合、蛋白量に比例した活性の増加がカラム処理後では得られぬ原因は、product が酸化されやすいためと考えられ、目下、抗酸化剤存在下で直線性を調べている。Y.S.による阻害について：β-carbolineの脳内存在が報告されており〔13, 15〕、また種々のβ-carbolineによるMAO 阻害が報告されている〔9〕。MAO とその局在やprothetic group (FAD) を同じくする本酵素が、Y.S.により阻害された事は興味深い。目下、その阻害形式と阻害定数の決定および還元型Y.S.による阻害との比較を検討中である。

Rat Liver Mitochondria

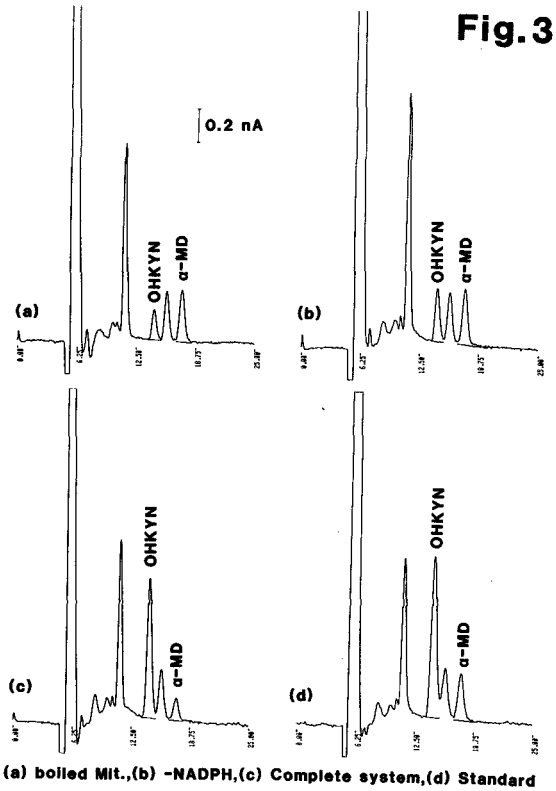
Fig. 1



(a) boiled Mit.,(b) -NADPH,(c) Complete system,(d) Standard

Rat Brain Mitochondria

Fig. 3



(a) boiled Mit.,(b) -NADPH,(c) Complete system,(d) Standard

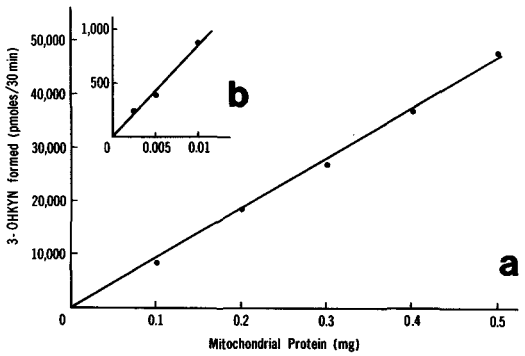


Fig. 2

Table 1

Kynurenine Hydroxylase Activity in Rat Brain Mitochondria

	Total 3-OHKYN formed pmoles/90 min	Specific Activity pmol/min/mg protein
(a) boiled Mitochondria	57.1	—
(b) -NADPH generating system	42.7	—
(c) Complete System	992.5	2.11

An amount of 5 mg of mitochondrial protein was used.
A typical example of the three experiments was presented in the table

〔文献〕
[1] Beattie, D. S. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 901-907 [2] Booth, R. F. G. and Clark, J. B. (1978) Biochem. J. 176, 365-379 [3] Cammer, W. and Moore, C. L. (1969) Arch. Biochem. Biophys.134, 290-301 [4] Foster, A. C., Zinkand, W. C. and Schwarcz, R. (1985) J. Neurochem. 44, 446-454 [5] Foster, A. C., White, R. J. and Schwarcz, R. (1986) J. Neurochem. 47, 23-30 [6] Gal, E. M. and Sherman, A. D. (1978) J. Neurochem. 30, 607-613 [7] Gal, E. M. and Sherman, A. D. (1980) Neurochem. Res. 5, 223-239 [8] Hayaishi, O. (1962) in Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (Eds.) Methods in Enzymol. V., Academic Press [9] Ho, B. T. (1972) J. Pharm. Sci. 61, 821-837 [10] Naito, J., Ishiguro, I., Murazumi, T. and Morimoto, M. (1987) Anal. Biochem. 161, 16-19 [11] Okamoto, H., Yamamoto, S., Nozaki, M. and Hayaishi, O. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 309-314 [12] Okamoto, H. and Hayaishi, O. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 394-399 [13] Rommelspacher, H., Honecker, H., Barbey, M. and Meinke, B. (1979) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 310, 35-41 [14] Saito, Y., Hayaishi, O. and Rothberg, S. (1957) J. Biol. Chem. 229, 921-934 [15] Susilo, R. (1984) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 325, R 76 [16] Uemura, T., Hirai, K., Yamano, T., Miura, R., Kanashiro, K. and Miyake, Y. (1986) Bull. Jap. Neurochem. Soc. 25, 301-303 [17] Yamano, T., Miura, R., Kanashiro, K. and Uemura, T. (1987) Bioorg. Chem., submitted.

189. 牛脳ゴルジ体画分中に存在する蛋白質燐酸化酵素について

宇佐美 美穂子・門 田 朋 子・門 田 健
（都精神研・神経化学）

〔要 約〕

1．牛大脳皮質よりゴルジ体に富む画分を分離した。この画分中にはゴルジ体標識酵素である galactosyl transferase, sialyl transferase活性がホモジネートに比較して各々13倍，14倍濃縮されていた。

2．ゴルジ体画分中にはMgイオン依存性，cAMP 依存性，Ca－カルモジュリン依存性の三種類の蛋白質燐酸化酵素が含まれていた。

3．Mgイオン依存性の酵素はホスビチンを燐酸化すること，低いMgイオン濃度でスペルミンにより活性化されることなどより，カゼインキナーゼIIであると考えられる。

4．cAMP依存性に燐酸化される内在性蛋白質は分子量13万，10万，8.6万および 8万のものであった。

5．Ca－カルモジュリン依存性酵素によって，特異的に燐酸化されるバンドは分子量 9.5万，5.2万であった。またCa－カルモジュリン依存性の燐酸化はカルモジュリン阻害剤であるトリフルオペラジン添加により増加した。

6．ゴルジ体画分中には脱燐酸化酵素（protein phosphatase 1,2A,2B,2C）の活性は検出されなかった。

Key word： cerebral cortex, Golgi apparatus, protein kinases

ゴルジ体は糖蛋白質の糖鎖合成や細胞内輸送において多様な機能を担っている細胞内小器官である。昨年度の本学会大会において私たちは，牛大脳皮質より分離したゴルジ体に富む画分が蛋白質燐酸化酵素活性を含むことを発表した[5]。今回は蛋白質燐酸化酵素の性質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］

1．牛脳よりゴルジ体の分離：牛大脳皮質を 0.5 M蔗糖，1% デキストラン（pH6.5)中でワーリングブレンダーを用いてゆるくホモジナイズしたのち600g，5 分間遠心分離し得た上清画分をさらに3,000g，10分間遠心した。得られた上清画分を38% 蔗糖層上にのせ90,000g，45 分間遠心分離を行った。サンプルと38% 蔗糖との層間を採取し蔗糖濃度を 0.25Mに合せたのち，42% 蔗糖層上にのせ5,000g 15 分間遠心し層間を採取した。ゴルジ体標識酵素であるgalactosyl transferase および sialyl transferaseはホモジネートに比して各々13.3± 1.19,12.13 ± 3.55 倍精製されていた。

2．ゴルジ体標識酵素活性の測定：(1) galactosyl transferase:ovomucoidを基質にしてBletz の方法[1] で測定した。(2) sialyl transferase:asialo- -acid glycoprotein を基質にしてPaulsonの方法[4] で測定した。

3．燐酸化酵素活性の測定：ゴルジ体画分を20mM Tris-HCl(pH7.0)，5mM $MgCl_2$，6μM [γ-^{32}P]ATP存在下30°Cでインキュベートし，SDS 液を添加して反応を停止した。燐酸化活性はSDS 電気泳動にかけた後オートラジオグラフィーおよびデンシトメータで検出した。

4．脱燐酸化活性の測定：上記のとうり燐酸化を行い，20mM MES(pH6.5) に対し透析したゴルジ体画分について(1) phosphatase 1:1mM ATP-1mM $Mg(Ac)_2$ (2) phosphatase 2A: 2mM $MnCl_2$ (3) phosphatase 2B:1.72mM $CaCl_2$，20μg calmodulin(CaM),1mM EGTA(4) phosphatase 2C:10mM $MgCl_2$，1mM EGTA存在下で各々反応を行い測定した。

［結果と考察］

牛脳ゴルジ体画分中には少くとも三種類の蛋白質燐酸化酵素活性が存在していた（図1）。すなわち1つはMgイオン依存性の酵素であり，外から加えたホスビチンを燐酸化した（図1A,B-a）。cAMP依存性酵素（図1A,B-b）および，若干弱くはあるがCa-カルモジュリン依存性の酵素活性も存在していた（図1A,B-c）。しかしCa，燐脂質依存性の酵素は強力な活性化剤であるホルボールエステルを用いても検出されなかった。これら三種類の酵素で燐酸化される蛋白質を比較すると，共通すると思われるいくつかのバンドがみられた。しかし分子量13万，10万，8.6万および 8万などcAMP存在時のみにみられるもの（図1B-b＊）や， 9.5万 ，5.2万などカルモジュリン添加時のみにみられるバンド（図1B-c＊＊）も見出され，これら三種類の酵素の機能の相違を示唆しているものと考えられる。反応液にトライトン-X100 を加えるとこれら酵素の燐酸化活性は 2-3倍上昇した（図 2）。このことはこれら酵素の活性部位が膜に埋めこまれて存在することを示めしている。昨年報告したようにホスビチンの燐酸化はヘパリン添加により阻害されたことから、ゴルジ体画分中にはカゼインキナーゼIIが含まれていると考えられた。そこでポリアミンであるスペルミンの効果を調べた図3に見られるように，低いMgイオン(0.5mM) 存在下でスペルミンを添加すると濃度に依存して燐酸化活性が上昇した。またスペルミジンでも同様な効果が見られた。ゴルジ体がカゼインキナーゼを含むことは乳腺で報告されており[6] その機能は乳汁カゼインの燐酸化であるとされているが，脳においても存在することよりそれ以外にも何らかの役割をもつことが示唆される。

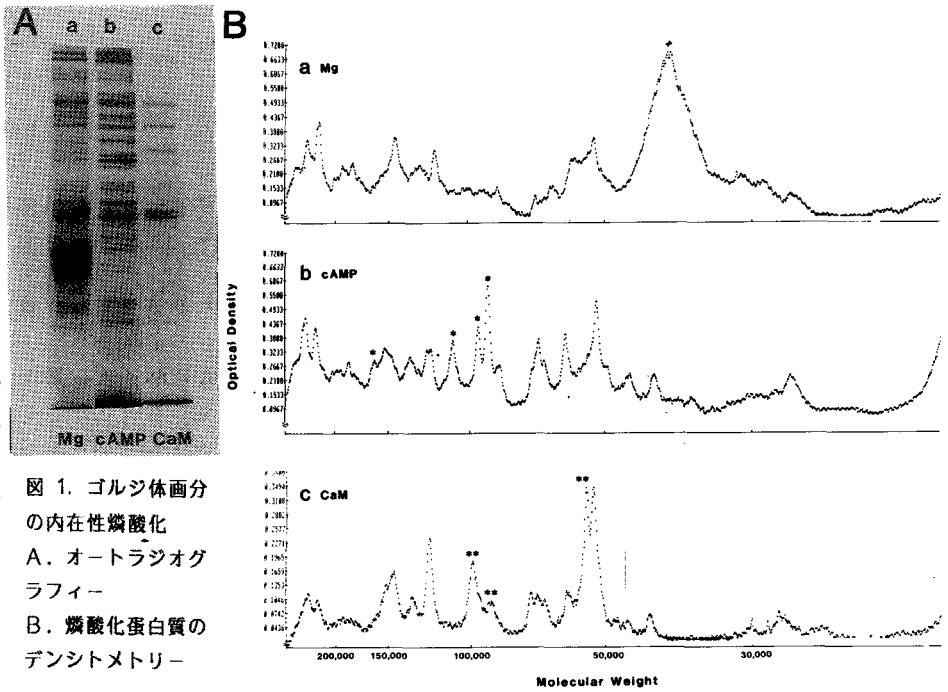


図 1. ゴルジ体画分の内在性燐酸化
A．オートラジオグラフィー
B．燐酸化蛋白質のデンシトメトリー

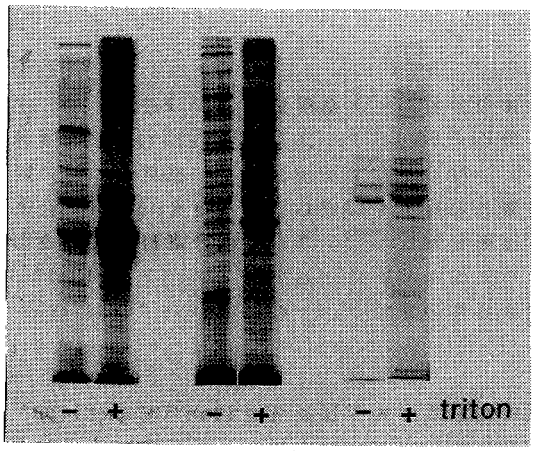


図 2. 内在性燐酸化におよぼすトライトンの効果

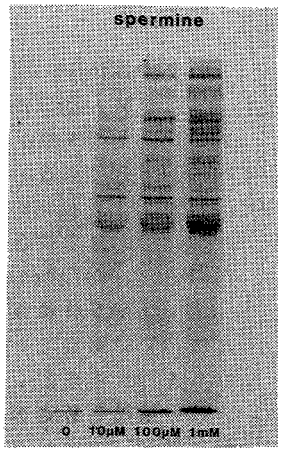


図 3. スペルミンの効果

ゴルジ体蛋白質の燐酸化とゴルジ体機能との関係を調べた。燐酸化により糖鎖付加酵素であるgalactosyl transferaseやsialyl transferaseの活性は変化しなかった。また，ゴルジ体を経由してプロセシングされることが知られているarylsulfatase や β-grucuronidaseのようなリソゾーム酵素は燐酸化されていることが報告されている[3,2] ので，これら酵素の燐酸化がゴルジ体で行われている可能性もあると考え検討したが，燐酸化は生じなかった。しかしすでに完全に燐酸化されている標本を用いたため新たな燐酸化がおこらなかった可能性もある。さらにゴルジ体内での物質の輸送と燐酸化の関係を見るためにモネンシン，ニゲリシンを添加して検討したが変化は見られなかった。現在のところゴルジ体機能との関係は不明である。

phosphoproteins	assay conditions for phosphatases			
	type 1	type 2A	type 2B	type 2C
Mg-dependent	103	104	103	101
cAMP-dependent	94	111	104	98
CaM-dependent	103	104	94	110

表 1. ゴルジ体画分中の脱燐酸化活性
ゴルジ体画分をMgイオン，cAMP，Ca-カルモジュリン存在下で各々燐酸化を行い透析した標本の放射活性を100%として表示した。

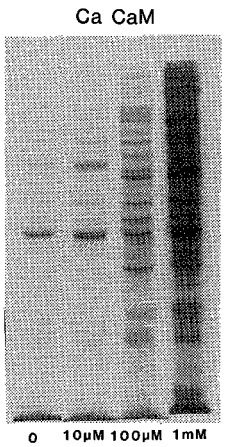


図 4. トリフルオペラジンの効果

カルモジュリン阻害剤であるトリフルオペラジンはカルモジュリン依存性の燐酸化を減少せず，むしろ用量依存性に増加させた（図 4）。そこでトリフルオペラジンはCa-カルモジュリン依存性の脱燐酸化酵素(protein phosphatase 2B)に対して働き，これを阻害するために見かけ上燐酸化が増加したのではないかと考えゴルジ体画分中の脱燐酸化酵素の活性を４種類の条件で測定した。表１に見られるように，脱燐酸化活性はほとんど検出されなかった。またSDS 電気泳動で個々の蛋白の燐酸化度も調べたところ変化は見られなかった。

[参考文献]
1. Bletz, R. and Stäubli, W. (1977) Eur. J. Biochem., 77, 181-192
2. Fjita, M.,Taniguchi, N., Miyata, A., Ono, M. and Oikawa, W. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun., 126, 818-824
3. Gasa, S. and Miyata, A. (1983) J. Biol. Chem., 258, 5034-5039
4. Paulson, J. C., Bernek, W. E., and Hill, R. L. (1977) J. Biol. Chem., 252, 2356-2362
5. 宇佐美美穂子，門田朋子，門田健 (1986) 神経化学， 25, 226-228
6. Stein, B. S., Bensch, K. G. and. Sussman, H. H.(1984) J. Biol. Chem., 259, 14762-14772
7. West, D. W. and Clegg, R. A. (1983) Eur. J. Biochem., 137, 215-220

190. ラット大脳皮質からの内在性Acetylcholine 遊離の測定

山西嘉晴・池田益啓・小笹貴史・山津清實
（エーザイ・筑波研）

〔要　約〕

液体クロマトグライー（HPLC）と酵素反応リアクターを組み合せた高感度ACh 測定法を用いて、In vitroでのsuperfusion 法によるラット大脳皮質切片から遊離される内在性ACh を測定した．

1）大脳皮質切片からのACh の自発遊離は63pmol/g・minであった．高KCl のkrebs 溶液で灌流すると、20mM KClでは271pmol/g・min 、50mM KClでは2309pmol/g・min とKCl 濃度を増すにしたがって、ACh の遊離は著明に増加した．

2）Nucleus basalis of magnocellularis(NBM) 両側破壊したラットの大脳皮質切片から遊離されるACh について調べた．NBM 破壊ラットの大脳皮質のACh 含量はShamラットの約70% と低値を示した．NBM 破壊ラットのACh 自発遊離は45 pmol/g・minとShamラットの約1/2 であった．また高KCl 溶液により惹起されるACh 遊離増加もShamラットに比較して約1/3 と著しく低下していた．

Key word：

ACh release, cerebral cortex, HPLC-immobilized emzyme reactor

In vitro での脳切片からのACh 遊離に関する実験は、これまでラジオアイソトープ標識choline (ch)が用いられてきた．ラベルChを脳組織取り込み機構によって脳切片に取り込ませ、ラベルACh の遊離を測定する方法が高感度であるという点から、広く用いられている．[1] しかしながら、この方法はラベルChの神経終末への取り込みの特異性、ラベルACh が内在性ACh プールと同一に存在しているか、ラベルACh 遊離が内在性ACh と同じ挙動を示すかなどいくつかの問題点がある．従って、内在性ACh の遊離を測定することが望ましい．最近、高速液体クロマトグラフィーと酵素反応リアクターを組み合わせたACh の高感度測定法が開発されている．[2]

我々はラット大脳皮質切片を灌流し、遊離された灌流液中ACh を本測定法を用いて直接定量し、内在性ACh の遊離に関する基礎的検討を行った．更に、NBM 両側破壊ラットの大脳皮質切片からのACh 遊離についても検討した．

「実験方法」　灌流法

ラットを断頭し、全脳を摘出した．大脳皮質前部を切り取り、秤量（170-200mg）後、Mcllwain tissue chopper にて、切片（400μm）を作成した．3 時間以上混合ガス（95%O_2+5%CO_2）を通じたKrebs-Henseleit bicarborate(KHB) medium （組成mM,NaCl: 118.4, KCl: 4.7, NaH_2PO_4:1.19, $NaHCO_3$:25.0, $CaCl_2$:2.52, $MgSO_4$: 0.6,Glucose: 11）に切片を投入し、通気しながら60分間インキュベートした．その後、切片をsuperfusion chamber に移し、30μM eserine sulfate を含むKHB mediumにて10分間灌流したのちフラクション（1ml/min・tube)を回収し始めた．試験管には100nmol

EDTA・2Na 及び100pmol の内標（エチルホモコリン、EHC)を加えておいた．一定時間後、20-50mM KCl を含むKHB mediumにて切片を刺激し、ACh 遊離を惹起した．各フラクションは凍結乾燥後50μl の蒸留水に再溶解し、不溶物を遠心分離にて除去した．上清15-20μlを直接HPLCに注入した．

ＨＰＬＣ条件

著者らの既報[6] に従った．分離カラムとしてメタクリレート系カラムDE-613(6mm IDX15cm、shodex)を用い、移動相として1.2mM tetramethyl ammonium chloride(TMA)およびsodium octylsulfate (SOS) 500mg/l 含有の0.1M-phosphate buffer(pH8.3)を流速1ml/min で流した．酵素カラム(2.1mm IDx7.5cm)は、1 本当りACh esterase (80U)、choline oxidase(40U) を固定化し、分離カラムの後端に接続した．電気化学検出器の引加電圧を0.5V(vs Ag/AgCl)とした．

ＮＢＭの破壊

Wistar系雄性ラット(200-250g)を使用した．Nembtal(50mg/Kg i.p.) 麻酔下、ラット頭部を脳固定装置に固定し、Paxinos & Watson[5] の脳図譜に従い、両側のNBM にｲﾎﾞﾃﾝ酸(6μg/0.5ml/side) を注入した．ｲﾎﾞﾃﾝ酸は phoshate buffered saline (PH 7.4)に溶解し、0.1μl/minの注入速度で0.5μlを注入した．なお、偽手術ラットには注入針の刺入だけを行った．手術操作2-4 週間後に実験を行った．一部の動物については既報の方法[6] にしたがい大脳皮質中ACh 含量を測定した．

［実験結果及び考察］　灌流液中ACh の測定

Fig.1 にstandard溶液及びラット大脳皮質灌流液中ACh, EHC, のクロマトグラムを示した．本実験に使用したACh 測定の感度は2-5pmol/injection であった．自発遊離された灌流液中ACh 測定は十分可能であった．灌流実験で用いるeserine は分離カラムにトラップされるため、酵素カラム内のACh esterase活性は全く阻害されず、ACh 測定は全く影響を受けないことを確認した．

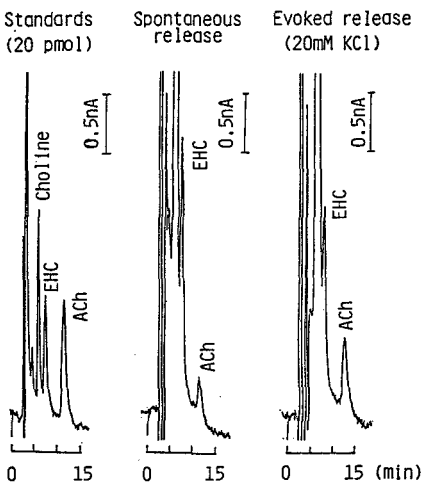


Fig.1 Typical chromatograms

ラット大脳皮質からのAch 遊離

Table1に示した．ラット大脳皮質からのACh 自発遊離は63pmol/g・minであった．次に、高KCl を含むKrebs 溶液で灌流すると、20mM KClでは271pmol/g・min と自発遊離の約4 倍に遊離量が増加した．更に、50mM KClでは2309pmol/g・minと自発遊離の36倍と増加した．

ＮＢＭ破壊ラット大脳皮質中のACh 含量及び遊離

結果をTable 2, Fig 2, 3 に示した．NBM 破壊ラットの大脳皮質中ACh 含量はshamラットの約70% と低値を示した．NBM 破壊ラットのACh 自発遊離は45pmol/g・minと

shamラットの場合の48%に減少していた．また、50mM KClで惹起したACh遊離のピーク時の値はshamラットで2808.5±148.8，NBM破壊ラットで806.0 ±117.6pmol/g・minであり、破壊ラットのACh遊離量はshamラットの約29%と著しく減少した．これらAChの遊離量の変化とACh含量の変化を比較すると、ACh含量低下よりも大脳皮質からのACh遊離の低下の方が顕著であった．NBM破壊ラット大脳皮質からのACh遊離は自発遊離のみならず、高K⁺によって惹起されるACh遊離もまた著しく低下していた．この結果はGardinerらの報告[3]と一致している．ラットの両側NBMへのｲﾎﾞﾃﾝ酸注入により、NBMが破壊され、投射路としての大脳皮質ACh含量が低下し[4]、それと共に神経終末からのACh遊離も著しく阻害されていることが示された．我々はHPLC一酵素反応リアクターを用いてラット大脳皮質切片からの内在性ACh遊離の測定法を確立した．煩雑な抽出操作を必要とせず濃縮液を直接液クロに注入することによりACh定量が可能であり、極めて有用な方法と考えられる．

Table 1. Release of endogenous ACh from slices of rat frontal cortex evoked by various concentrations of KCl.

	N	ACh released(pmol/g.min)
Spontaneous(4.7mM KCl)	7	63.4 ± 18.0
Evoked(20mM KCl)	3	271.3 ± 4.6
Evoked(50mM KCl)	3	2308.5 ± 148.8

Data are mean ± SD values.

Table 2. Effect of ibotenic acid-induced lesion of nucleus basalis magnocellularis on the K^+-evoked release of endogenous ACh from slices of rat frontal cortex.

		ACh released(pmol/g.min)	
	N	Sham-operated	NBM-lesioned
Spontaneous	15	95.6 ± 26.7	45.9 ± 22.5*
Evoked	3	2308.5 ± 148.8	806.0 ± 117.6*
Ratio(evoked/spontaneous)		24.1	17.6

Data are mean ± SD values.
*p < 0.01 versus sham-operated groups.

Table 3.
Effect of ibotenic acid-induced lesion of nucleus basalis magnocellularis on ACh content in frontal cortex of rat.

	N	ACh content(nmol/g)
Sham-operated	10	16.0 ± 2.3
NBM-lesioned	11	11.1 ± 1.8*

Data are mean ± SD values.
*p<0.01 versus sham-operated groups.

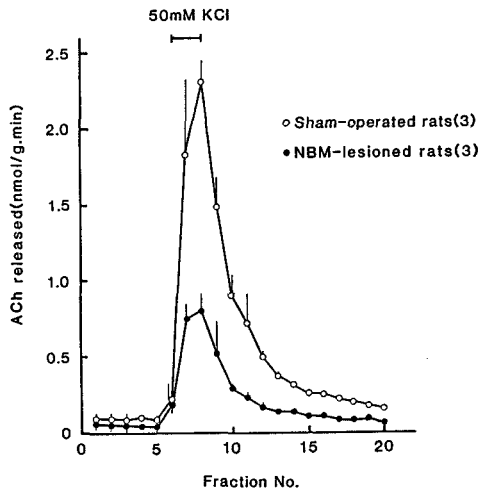


Fig.2 Effect of ibotenic acid-induced lesion of NBM on the K^+-evoked release of endogenous ACh from slices of rat frontal cortex.

[文献]
1) Beani, L. et.al (1984) Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 328, 119-126 2) Damsma, G. et.al (1985) J. Neurochem. 45, 1649-1652 3) Gardiner, I.M. et.al (1987) Brain Research 407, 263-271 4) Johnston, M.V. et.al (1979) Proc, Natl. Acod. Sci USA 76, 5392-5396 5) Paxinos, G. et.al (1986) The Rat Brain in Stere otaxic Cordinates, Academic Press 6) 山西嘉晴ら (1986) 神経化学 250-252

191. 老齢ラット脳の choline acetyltransferase（CAT）活性と muscarinic acetylcholine（mACh）受容体に及ぼす dihydroergotoxine（DHET）投与の影響

羽場 久美子・小川 紀雄・高山 晴彦*・河田 牧男・森 昭胤

（岡山大・医・脳代謝研・機能生化，第三内科*）

〔要 約〕

acetylcholine(ACh)系神経機構においてシナプス前部の指標であるcholine acetyltransferase(CAT)活性とシナプス後部の指標であるmuscarinic acetylcholine(mACh)受容体とを同一試料から並行測定する方法を検討した。特にCAT活性測定はFonnumによる従来の方法をより簡略化しておこなった。さらに老年者の精神活動低下の治療剤として広く臨床応用されているdihydroergotoxine(DHET)を老齢ラットに1mg/kg, 1日1回14日間、腹くう内に投与し、この並行測定法を応用してCAT活性およびmACh受容体を測定した。その結果、老齢ラット脳のCAT活性は有意差がみられなかったにもかかわらず、mACh受容体は老齢ラットにおいて著しく減少しておりDHET投与によって著明な回復が認められた。今回の成績は、記憶に非常に関係の深いmAChに対するDHETの改善効果を認めたもので、本薬剤の作用機序がACh神経機構に関係していることを示唆しているだけでなく、中枢神経作用薬のスクリーニングや作用機序の検討にはシナプス前・後部両方の指標物質の測定が必要であるという従来の我々の主張を裏付けている。

Key word： choline acetyltransferase (CAT) activity, muscarinic acetylcholine (mACh) receptor, dihydroergotoxine (DHET)

〔はじめに〕

従来、脳の機能やそれに対する薬剤の効果の判定はシナプス前部に存在する神経伝達物質の量の増減を測定することによって主になされ、この結果から全ての現象を説明しようと試みられてきた。しかし、神経伝達物質の量は、合成・貯蔵・放出の総和を示しているにすぎず、実際に放出され機能に関与している神経伝達物質の量のみを測定することは難しい。そこで、我々はシナプス前部の指標としての神経伝達物質の含量とシナプス膜上に限局してその機能を敏感に反映する受容体の両方を並行して測定することの必要性を主張してきた。[5] 今回我々はacetylcholine(ACh)系神経機構に関してシナプス前部の指標であるcholine acetyltransferase(CAT)活性とシナプス後部の指標であるmuscarinic acetylcholine(mACh)受容体の測定を行った。とくに同一出発試料で両者の並行測定を可能にする方法を検討し、さらにこれを応用して老年者の精神活動低下の治療剤として臨床応用されているdihydroergotoxine(DHET)[4]を用いて老齢ラットにおけるこれら指標物質の変化とDHETによる効果を検討した。

〔方法〕

(1) 実験動物：測定法の検討のためにはSD系雄ラット（体重約250g）を用いた。また、加齢の影響を調べるためにはFischer系雄ラット24ヵ月（老齢ラット）と、その対照としてはFischer系雄ラットの3ヵ月齢（若壮年ラット）を使用した。それぞれを2群に分け一方にはDHET1mg/kgを1日1回腹くう内に14日間投与した。対照群には同量のvehicleを同様に14日間注射した。最終注射から24時間後にラットを断頭屠殺した。

(2) 試料の調製：全脳または部位分けした脳組織を10容量のTris緩衝液(50mM-Tris/HCl緩衝液, pH7.6) 中でホモゲナイズし、その一部に等量のEDTA緩衝液(10mM-EDTA緩衝液、pH7.4)、15容量の2.5%Triton X-100溶液を加え氷中に15分間放置した後遠沈し、上清をCAT活性測定用の試料とした。また、残りのホモジネートに等量のTris緩衝液を加え10000gで15分間遠沈による洗浄を2回行い、その沈さを150容量のTris緩衝液に再懸濁し、mACh用の試料とした。

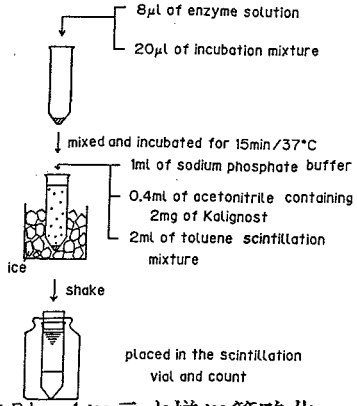


Fig. 1

(3) 測定方法

(i) CAT活性測定法：FonnumらによるCAT活性測定法[3]をFig. 1に示す様に簡略化して測定を行った。調製した試料をEDTA緩衝液で4倍に希釈しenzyme solutionとした。incubation mixtureとしては0.2mM-[^{3}H]acetyl-CoA、300mM-NaCl、50mM-sodium phosphate buffer, pH7.4, 8mM-choline bromide, 20mM-EDTAbuffer, pH7.4, and 0.1mM-physostigmineを使用した。enzyme solution 8μl, incubationmixture20μlをミニカウンティングバイアル (15mm×55mm) に入れ、十分混和した後、37℃で15分間incubateした。そのあと氷水中につけ、1mlリン酸緩衝液(10mM-sodium phosphate buffer , pH7.4) acetonitrile (2mgのKalignost試薬を含む) 0.4ml、及びシンチレーター2mlを加えて軽く振とうし、静置して有機層と水層の2層に分離した状態でカウントを行った。

(ii) mACh受容体結合の測定：リガンドとしては[^{3}H]-QNB、非特異的結合には1μM-atropineを用い、既に報告した方法[3]に準じて行った。

[結果と考察]

A：CAT活性測定方法の基礎的検討

(1) CAT活性測定の至適条件の決定 (i) Total volumeの検討:Fonnumによるとenzyme solution 2μl, incubation mixture 5μlをmicrotube (23mm×2mm) 中でincubateした後、microtubeごとscincillation vialに入れ、5mlのリン酸緩衝液、2mlのacetonitrile、10mlのシンチレーターを加えて測定している。我々はenzyme solution, incubation mixture以外の量を1/5量に減らすことにより、最初からミニカウンティングバイアル中でincubateし、洗浄のステップを省略することを可能にし、この方法においても同様の結果が得られることを確認した。(ii)Enzyme solution, incubation mixture量の検討：上記の方法では使用するミニカウンティングバイアルの体積に対しenzyme solution, incubation mixtureの量が非常に小さく十分混和できないおそれがある。そこで、enzyme solution, incubation mixtureをそれぞれ2倍、3倍、4倍、5倍に希釈し、2倍量、3倍量、4倍量、5倍量を用いてincubateした。その結果、原法通りの量では測定値にばらつきがみられたが、量を増加

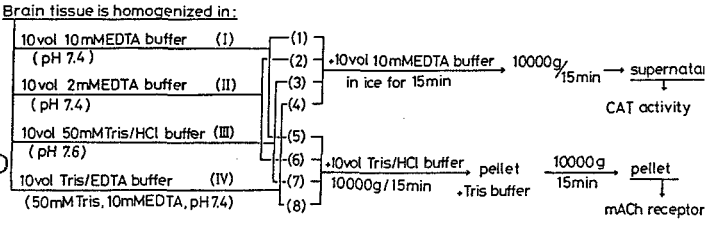


Fig. 2

させるとばらつきが小さくなった。また、反応生成物の抽出効率は量の増減にさほど左右されないが、今回得た結果では4倍量が最も良い結果となっているので、以下の実験は「方法」に示したように4倍量でCAT活性の測定を行った。本法の利点を挙げると、原法に比べmicrotube内の反応混合物をscintillation vialにwash outする段階を省いているのでそれに伴う手順の煩雑さが解消され、誤差が生じる可能性がより小さくなったことである。

Table 1.

	QNB-binding		CAT activity
	Kd(nM)	Bmax(pM/tube)	CAT(nmoles /mg protein/h)
(I)	0.38±0.02	0.180±0.015	15.24±0.25
(II)	0.35±0.02	0.177±0.011	10.94±0.32
(III)	0.22±0.03	0.229±0.028	17.32±0.51
(IV)	0.28±0.02	0.179±0.033	13.90±0.60

Values are the means± SEM
(I)-(IV) are adopted from fig. 2

(2)同一出発材料によるCAT活性とmACh受容体の並行アッセイの検討: 従来、CAT活性測定用の試料調製には、EDTA緩衝液のみが[3]、またmACh受容体結合測定用にはTris緩衝液が用いられてきたが、今回両アッセイのいずれにも使用できる試料の調製法をFig. 2に示した方法で検討した。その結果、CAT活性、mACh受容体の測定いずれについてもTris緩衝液をホモゲナイズに用いた(III)で優れた結果が得られた。(Table. 1)

Table 2

Brain region	Bmax(pmol/tube)	Kd(nM)	(N)
Frontal cortex			
(1)	0.137±0.026	0.487±0.042	(4)
(2)	0.136±0.022	0.467±0.013	(4)
(3)	0.025±0.005*	0.277±0.011	(5)
(4)	0.145±0.022+	0.300±0.055	(5)
Temporal cortex			
(1)	0.309±0.083	0.338±0.052	(4)
(2)	0.395±0.051	0.356±0.091	(4)
(3)	0.089±0.016*	0.408±0.012	(5)
(4)	0.301±0.045+	0.359±0.074	(5)
Hippocampus			
(1)	0.137±0.021	0.373±0.017	(4)
(2)	0.142±0.018	0.386±0.018	(4)
(3)	0.022±0.001*	0.395±0.022	(5)
(4)	0.122±0.012+	0.401±0.012	(5)

(1)Young adult+vehicle (2)Young adult+DHET
(3)Aged+vehicle (4)Aged+DHET
Values are the means±SEM
*:p<0.01 vs.young adult, +:p<0.01 vs. aged

以上のようにして、CAT活性とmACh受容体の並行測定法を確立した。

B. 老齢ラット脳におけるCAT活性とmACh受容体結合の並行アッセイ

知的機能や情動に最も関係の深い脳部位である海馬、大脳皮質(前頭葉、側頭葉)のCAT活性は、若壮年、老齢との間にも、更にはそれぞれにDHETを14日間注射したいずれの群においてもCAT活性の有意な変化はみられなかった。Alzheimer病患者脳においてはCAT活性は著しく減少する[1]といわれており、また老化によっても従来の方法ではやや減少する[2]との報告もある。今回の我々の老齢ラットを用いた実験でほとんど変化が認められなかったのは種差、あるいは疾患による痴呆と単なる生理的な老化との差異であるのかは明かではない。

一方、QNB結合で検出したmACh受容体数は若壮年に比べ老齢は著しく減少していた。DHETを注射すると若壮年では効果がなく老齢ラットにおいては受容体の著しい回復効果がみられた(Table. 2)。従来よりDHETは長年臨床で使用されてきたが、その作用機序は必ずしも明かではなかった。我々は既に同量のDHET投与によって減少している大脳皮質のTRH受容体やenkephalin受容体がやや回復することを報告したが、[7]今回の成績は記憶に重要な役割を果しているmACh受容体の加令による減少がDHETにより改善することを認めたもので、おそらくは本薬剤の臨床効果の発現機序の根幹をなすものであろう。

(1) Bowen, D.M., Smith, C.B., White, P., et al. (1976) Brain, 99, 459 (2) Frolkis, V.V., Benzrukov, V. V., Duplenki, Y.K., et al. (1973) Gerontologia, 19, 45 (3) Fonnum, F. (1975) J. Neurochem., 24, 407-409 (4) Hollister, L.E. and Yesavage, J.A. (1984) Ann. Intern. Med., 100 894-898 (5) Ogawa, N., Hirose, Y. and Nomura, M. (1986) Recent Research on Neurotransmitter Receptors. (Amsterdam) 56 (6) Ogawa, N., Mizuno, S., Nukina, I., Tsukamoto, S. and Mori, A. (1983) Brain Res., 263, 348-350 (7) Ogawa, M., Mizuno, S., Mori, A. and Kuroda, H. (1984) Peptides, 5, 53-56 (8) Yamamura, H. I. and Snyder, S.H. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 1925

192. 局所投与したコリン毒AF64Aの長期効果の検討

山下元司・山崎りつ・岡田理之・高橋美枝・
池田久男
（高知医大・神経精神）

〔要　約〕

選択的choline毒として知られているethylcholine mustard azuridinium ion (AF64A) をbasal forebrain nucleiのうちのmedial septal area (MSA) とnucleus basalis of Meynert (nbM) に投与してその長期効果をみた．指標としてはcholine性神経のマーカーであるcholine acetyl transferase (CAT) を用いた．1 n moleのAF64Aを投与し1週後に脳部位別 (frontal cortex,striatum,hippocampus) のCATを測定した結果はMSA投与ではhippocampusでのみCATの有意の低下を認め他の部位では変化を認めなかった．またnbM投与ではfrontal cortexでのみCATの有意の低下を認め他の部位では変化を認めなかった．投与3週後にはいずれの群でも1週後と同様のCATの有意の低下を認めた．しかしながら12週後にはこの変化は消失していた．AF64Aはirreversible cholinergic neurotoxinとされているが神経投射部位のCATを指標にする限り回復が認められることが明らかとなった．Oltonの八方向放射状迷路学習を獲得した動物のMSAにAF64Aを投与してその影響を検討したが獲得された学習の保持に若干の低下を認めたのみであった．

Key word： AF64A , cholinergic neurotoxin , dementia

はじめに　AF64Aはspecific irreversible cholinergic neurotoxinとして知られており中枢神経choline系の研究に広く用いられるようになってきている．このAF64Aを脳室内あるいは脳局所に投与することにより脳内choline系の機能低下をおこすことが知られておりこうした動物がアルツハイマー病のモデル動物になるのではないかと期待されている．ところでこのcholine系の機能低下の持続についての報告はいまだなされていない．そこで長期効果を検討するとともに，獲得された記憶に対する効果について迷路学習を用いて検討した．

対象と方法　生化学的検討の場合は手術時8週齢のWister系雄ラット，学習の検討の場合は手術時12週齢のWister系雄ラットを用いた．Af64AはMantioneの方法によりacetycholine mustard hydrochloride (IIBR) から合成した．AF64Aの濃度については iodine−thiosulphate titrationにより検討したが理論値の74％の合成が確認され，これには再現性があった．脳局所への投与方法は1 μ 1のHamilton microsyringeをstereotaxicに直接脳内に挿入し1部位10分かけて注入し5分静置した後抜去した．CATの測定はMantioneの方法によった．これはFonnumの方法の最後の抽出方法を変更したものである．mediumに1 mMのN−hydroxyethyl 1−4−(1−naphthylvinyl) pyridine bromideを加えた結果では活性は95％以上低下していた．迷路学習はOltonらの八方向放射状迷路を用いた．迷路の先端に一個ずつスキナボックス用の餌を置きラットが迷路の餌を全て取り終えるか5分を経過した時点で学習を中断した．最初の八試行が得点になり満点は8点である．水分は自由に取らせ給餌制限により体重を手術前の80％になるようにした．実験は夜間のほぼ同じ時間帯に行った．

Fig 1 MSA,1W

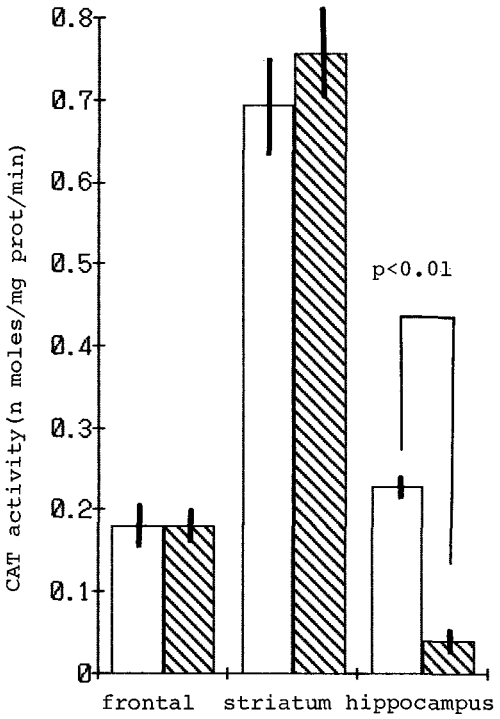


Fig 2 MSA, 3W&12W

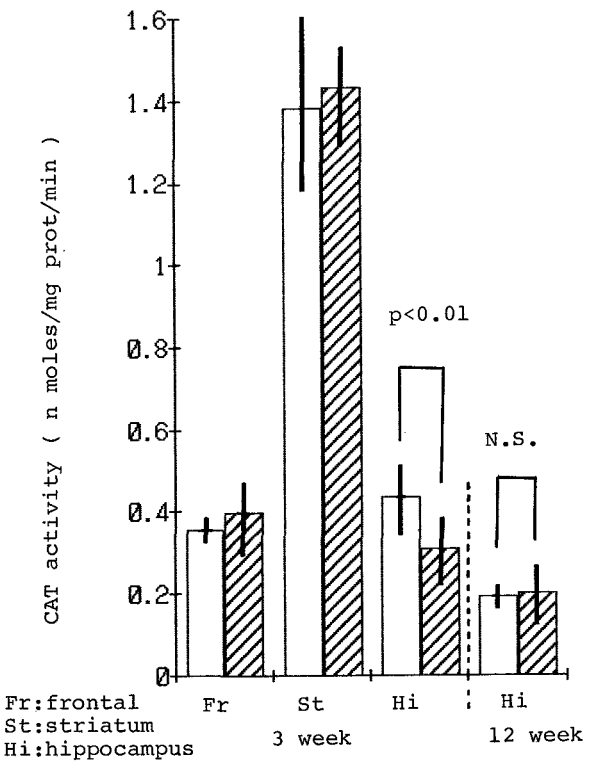


Fig 3 nbM,1W

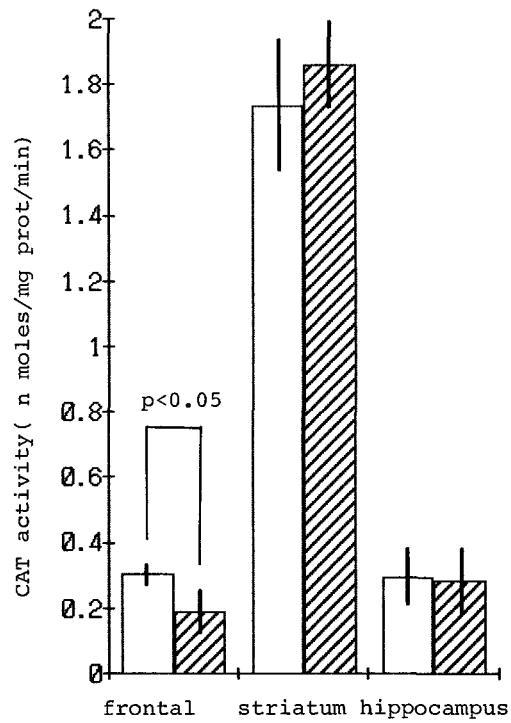
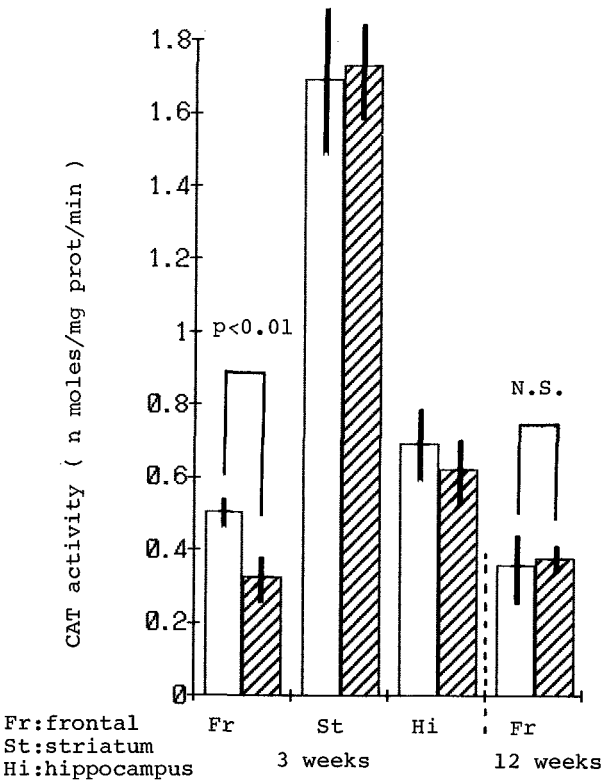


Fig 4 nbM, 3W&12W



結果 1．AF64A（1n mole,1 mM in 1μl）のMSA投与により1週後にMSAからcholine性の神経投射をうけているとされるhippocampusでCATの有意（$p<0.01$）の低下を認めた．他の部位では変化を認めなかった（Fig1）．3週後と，12週後の変化についても検討した．3週後には1週後と同様にhippocampusでのみCATの有意の低下を認めたが他の部位では変化を認めなかった．12週後にはこのhippocampusでの変化は消失していた（Fig2）．

2．AF64A（1 n mole,1 mM in 1μl）のnbM投与によって1週後にnbMからcholine性の投射をうけているとされるfrontal cortexでCATの有意（$p<0.05$）の低下を認めたが他の部位では変化を認めなかった（Fig3）．3週後と12週後での検討では，3週後では同様にfrontal cortexでCATの有意の低下（$p<0.01$）を認めたが他の部位では変化を認めなかった．また12週後にはこのfrontal cortexでの変化も消失していた（Fig4）．

3．AF64Aの MSA投与の学習の保持に与える影響．手術前の正解数の平均（baseline）はcontrol7.5（n=9），処置群7.6（n=10）であった．手術1週と3週後の成績では処置群での正解数の平均がそれぞれ7.3と低下傾向を認めるのに対して対照群はbaselineの値を保った．しかし処置群も3週後になるとbaselineの値に回復した（Table1）．

Table 1 獲得された迷路学習への影響（最初の8試行の得点）

	n	baseline	1W	2W	3W
control	9	7.5	7.5	7.5	7.5
AF64A	10	7.6	7.3	7.3	7.6

考察 AF64Aは非可逆的な選択的choline毒とされている．これを利用すると動物にcholine選択的な機能低下をおこすことが出来，アルツハイマー病の動物モデルが作成できるのではないかと考えられている．しかしその長期効果についてはWalshらの脳室内投与で120日後にもfrontal cortex,hippocampusでacetylcholineの低下が持続していたという報告以外ない．われわれのモデルは局所投与によるためにfrontal cortex, hippocampusにそれぞれ独立したcholine系の機能低下をおこすことができ，それぞれのcholine系の働きを調べることが出来る利点がある．アルツハイマー病の初期病変については，これまでの前頭葉皮質から，頭頂葉皮質あるいは海馬病変に興味が移りつつありこのモデルのように目的とした部位だけのcholine系を低下させることが出来るモデルはこうした研究に適しているということが出来よう．この一方でnbMに投与した場合はるいそうや食欲低下がおこり学習能力の評価を行うことは困難であり問題を残している．

もうひとつの問題としてcholine系の機能低下の指標としてはCATよりもacetylcholineそのものを測定するほうが機能状態を正確に反映すると考えられる．これについては現在検討中である．

参考文献 1）Chrobak JJ et al（1987）Brain Res.414,15－21．
2）池田 久男（1986）高齢者痴呆などの医学医療に関する研究業績年報 2,印刷中
3）Olton DS et al（1976）Animal Behavior Process 2,97－116．
4）Mantione CR et al（1983）J Neurochem 41,251－255．
5）Walsh TJ et al（1984）Brain Res.321,91－102．

193. ラット脳シナプトソームから放出されるATPについて

都築紀宏　（名古屋市大・医・生化）

〔要　約〕

(I). シナプトソーム標品をラット脳・粗ミトコンドリア分画よりPercoll密度勾配遠心法で調製し、ATP含量をluciferin-luciferase(L.L.)系による発光法で求めた。Ca^{2+}を含むmedium中では呼吸調節能(ATP合成)は停止し、ATP含量は半減した。標品を氷中保存した場合、調製後3-4時間はほぼ一定のATP含量(9-12nmol ATP/mg prot.)を示したが、24時間後には約1/10に減少した。標品中のATPはKCl又はveratridineによる脱分極で放出された(2-3% of total)。後者による放出は必ずしもCa^{2+}を必要とせず、またcarboxyatractyloside (inhibitor of mitochondrial ATP translocation) の影響を受けなかった。この放出は24時間保存後も観察されたが、放出量の低下が見られた。

(II). シナプス小胞を調製し、そのATP含量を同様に求めた。この小胞中のATPは低張液中でも、膜可溶化剤添加後もL.L.系と反応せず、検出には酸抽出操作が必要であった(20-22pmol ATP/mg prot.)。小胞標品を氷中保存した場合、ATP含量は24時間後でも殆ど減少していなかった。

(III). これらの結果から判断すると、veratridineで脱分極後放出されるATPの放出源は単一ではなくcytosol部分に含まれるATPにも由来する可能性が強いと思われる。

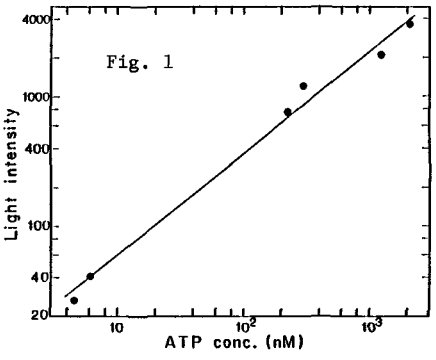
Key word :　Synaptosome, ATP-release, Veratridine

緒言：　神経を刺激するとカテコルアミン、アセチルコリンなどの典型的神経伝達物質の他にATPの放出も見られ、その生理学的意義も種々考察されている。この現象（又はATPの由来）を伝達物質放出機構の面から見ると、1.神経終末シナプス小胞に伝達物質と一緒に含まれるATPが開口放出される場合と、2.cytosolに含まれるATPが放出される場合とが考えられる。今回の報告では神経伝達物質の放出機構を明らかにする目的で、ラット脳神経終末のATP含量、ATP放出について実験を行なった。コリン作動性神経ではアセチルコリンの放出とATPの放出には相関関係はないと報告されている(1)。

実験材料及び方法

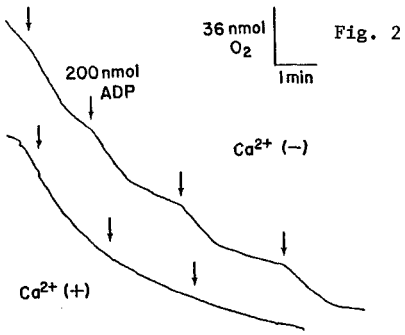
シナプトソーム：Wistar系5週齢雄性ラット脳よりP_2分画を調製し、5%(w/w)Percoll, 10mM Tris-HCl,pH7.4, 0.1mM EDTAを含む0.25M sucroseに懸濁す(8-10mg prot./ml)。10%,16% Percollを含む上記0.25M sucrose液を日立RPS-27ローター用遠心チューブに重層後P_2懸濁液を上乗せし、11,000rpmで30分遠心した。10-16% Percoll境界面上のシナプトソームを回収し、saline (160mM NaCl,2mM KCl,1.2mM $MgCl_2$,16mM Na-phosphate, pH7.4,20mM glucose) で希釈後遠心(9,000rpm)しPercollを除いた。シナプトソームは10mM Tris-HCl、pH7.4、0.1mM EDTAを含む0.32M sucroseに懸濁した(1.8-2.0mg prot./ml)。調製には屠殺後約3時間要した(2)。シナプス小胞：P_2分画を氷冷蒸留水中で低張処理後20,000rpm、30min遠心し膜成分を除去した。上清を35,000rpm、60min遠沈後小胞分画(ペレット)を10mM Tris-HCl、pH7.4、0.1mM EDTAを含む0.32M sucroseに懸濁した(1.0mg prot./ml)。呼吸：シナプトソームの酸素呼吸量はmalate-glutamateを基質にし、クラーク型酸素電極を用いて測定した。ATP測定：Luciferin-luciferase(L.L.)系による

ATPの定量は、ラボサイエンス社製TD-4000 lumiphotometerを使用した。反応液 0.3mlはbuf. 0.1ml; L.L. 0.1ml; sample 0.1mlより成る。試薬: Carboxyatractyloside from Boeringer Man., Percoll from Pharmacia、veratridine from Sigma., L.L.及び膜可溶化剤（組成不明）はラボサイエンス社製を用いた。Fig.1 には標準ATP量と発光量との関係が示してある。



結果

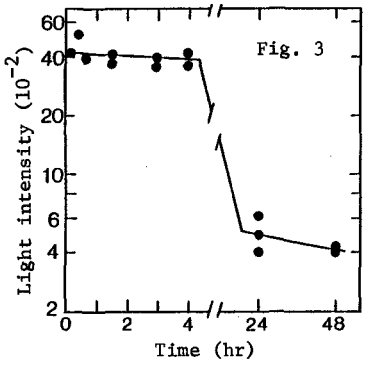
ATP合成: シナプトソーム内にはミトコンドリアが含まれ酸素呼吸の結果ATPを合成している。Fig.2 に示した様にmalate-glutamateを基質にしてその酸化的燐酸化能を測定することが出来る。56mM KClを添加した脱分極状態でも、O_2-uptakeが少し活性化されるのみで呼吸調節能は保持されていた。しかし更に1.2mM Ca^{2+}を添加するとこの呼吸調節能は直ちに消失した。Krebs-Ringer液中でもこれは同様であった。



次にこの様に呼吸調節能が消失した場合、実際にATP含量も低下するか否かを検討した。表 I には呼吸反応後測定したATP含量が示してあるが、ATP含量はCa^{2+}添加で50%近く低下していることが知られた。

Respiratory control: 220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5.5 mM glutamate, 3 mM malate, 56 mM KCl, and 1.8 mg prot. of synaptosomes in 1.8 ml. 1.2 mM Ca^{++} added at 30°c.

氷中保存: シナプトソーム調製には0-2°Cで2-3時間を要した。この間のATP含量の変移を推定する目的で標品を氷中保存した場合、ATP含量がどの様に変化するかを調べた。Fig.3 に示してある様に3-4時間はほぼ一定のATP値を示したが、24時間後には約1/10に低下していた。この結果から判断すると標品調製中にはATP含量の低下は殆ど起こっていないと思われる。



Change in ATP content when stored on ice. Ordinate, amount of ATP (Fig.1).

Veratridine (verat)によるATPの放出: 非脱分極状態のシナプトソーム標品のATP発光量は、全体（膜可溶化剤添加時）の2-3%であった。しかし、Fig.4 に示す様に56mM KCl又は0.37mM veratで脱分極させると発光量は増大し、ATPの放出が起こったことが確認された。Veratの場合は必ずしもCa^{2+}を必要とせず、一度の脱分極で放出されるATP量は全体の1-3% の範囲である。発光はほぼ1分以内に完了しているがfree ATPの場合でも同様の発光パターンを示すので、このパターンが放出パターンを反映しているとは必ずしも言えない。

Table I.
ATP during respiration

min	Ca (−)	(+)
0	4000	3773
18	1423	615
30	1468	665

Table II.
ATP in S.V.

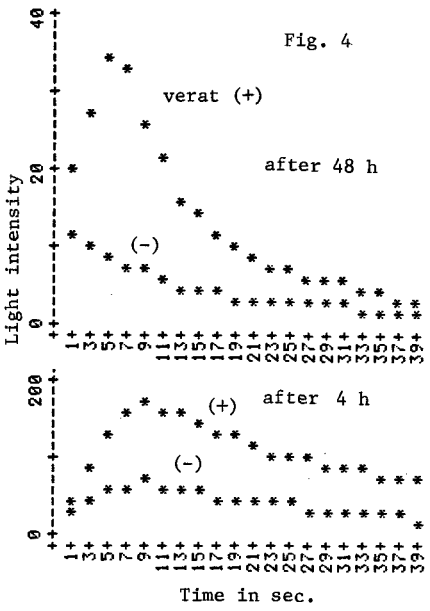
hour	
2	28.3
24	22.6

* values in light intensity unit
** S.V., synaptic vesicles

24時間氷中保存したシナプトソームでもhigh KClやveratに依るATP放出は可能であった。この場合上述の如く全ATP含量は低下しているので、放出されるATP量の低下も見られた。

Carboxyatractyloside(carbox)の影響：分離したミトコンドリアには多量のATPが含まれ、L.L.法で検出される。またシナプトソーム標品にはfreeミトコンドリアの夾雑している恐れがあるので、ミトコンドリアのATP-ADP輸送阻害剤であるcarbox(3.4mM)で標品を0°、20min処理後 veratに依るATP放出を試みた。しかしcarboxの影響は全く見られなかった。この結果より判断すると、放出されるATPは夾雑ミトコンドリアには由来しないこと、carboxはATPのシナプトソーム膜通過を阻害しないことなどが示唆された。

シナプス小胞のATP：シナプス小胞を調製し膜可溶化剤を添加後、又は低張処理後L.L.系と反応させてもATPの検出は出来なかった。しかし0.15N TCAで酸抽出後中和しL.L.と反応させると初めて発光が見られた。またシナプス小胞を氷中保存した場合そのATP含量は表IIに示す様に24時間後も殆ど減少していなかった。これらの結果は、シナプス小胞中のATPはシナプトソームやミトコンドリアの場合と異なり、かなり安定化された状態で含まれていると思われる。



ATP release by veratridine from fresh and 2-day-old synaptosomes. Ordinate; amount of ATP released. Magnitude of the scale is different. Buffer; Krebs-Ringer, 16 mM Tris-HCl, pH 7.4, minus $CaCl_2$. Veratridine, 0.37 mM.

考察

神経刺激に応じて放出されるATPはneurotransmitter又はmodulatorとしての働きが考察されているが、その放出機構に関して典型的神経伝達物質と同じか否かは充分論じられていない。ATPは神経終末内ではcytosol、synaptic vesicle、mitochondriaなどに含まれる。MitochondriaのATPは前二者へ供給されるが直接の放出源には成らないだろう。Synaptic vesicle中のATP量は氷中保存中も殆ど変化せず、また膜可溶化剤添加後も安定性を示した。一方verat刺激で放出されるATP量はシナプトソーム中のATP量に応じて減少する傾向を示した。これらの結果から推定すると、放出されたATPの放出源は必ずしも単一ではなくcytosol中のATPにも由来していると思われる。

Veratによる ATPの放出には必ずしもCa^{2+}を必要としなかった。Transmitterの放出機構と異なるとも考えられる。同じ条件下でのtransmitterの放出を検討中である。24時間保存後でもveratによる放出が見られた事は驚くべき事であった。

KCl,Ca^{2+}脱分極下でもシナプトソームのO_2-uptakeは見られるが、ATPの合成は停止しATP量は半減していた。解釈は異なるが同様の現象はすでに報告されている(3)。神経終末を用いた伝達物質放出機構の研究はこれと似た条件下で行われているので、ATP含量とtransmitterの放出がどのような関係にあるか、更に検討する必要がある。

文献

(1) White,T., Potter,P., and Wonnacott,S.(1980) J. Neurochem.34, 1109-1112
(2) Nagy,A. and Delgado-Escueta,A.V.(1984) J. Neurochem.43, 1114-1123
(3) Bradford,H.F.(1969) J. Neurochem.16, 675-684

194. 大脳皮質切片への〔^{3}H〕グルタミン酸取り込み機構の再評価

米田幸雄・荻田喜代一　（摂南大・薬・薬理）

〔要　約〕

ラット大脳皮質切片への[^{3}H]グルタミン酸(Glu)の取り込み機構について検討を加えた。本取り込みは反応温度依存性を示し、反応温度30℃では2分まで直線的に増加したのに対して、反応温度2℃では有意な取り込みは全く認められなかった。反応液中の塩化ナトリウムを塩化コリンに置換すると、[^{3}H]Gluの蓄積は反応温度にかかわらず完全に消失した。また、酸化的リン酸化反応の阻害薬や脱分極剤の添加によりこの取り込みは有意に抑制された。D-アスパラギン酸(Asp)はL-Aspと同等度の阻害作用を示したが、D-Gluにはこの様な有意な阻害効果は見出せなかった。構造類似化合物はいずれも取り込みを阻害したが、L-システインも高濃度(10^{-3}M)で強い抑制作用を発揮した。Glu受容体の三種類のアゴニストのうち、カイニン酸(KA)のみが有意に放射活性の蓄積を阻害した。塩素イオン依存性[^{3}H]Glu結合を強く阻害する化合物(2-アミノ-4-ホスホノ酪酸(AP4)、DIDS、エタクリン酸、キスカル酸(QA))はいずれも、この取り込みに対して著変を与えなかった。以上の結果より、ラット大脳皮質切片に塩素イオン依存性[^{3}H]Glu取り込み機構が存在する可能性は低いものと思われる。

Key word：[^{3}H]Glutamate uptake, Sodium dependency, Cysteine

哺乳動物中枢神経系において、興奮性神経情報伝達物質であるL-Gluのシナプス伝達後の不活性化には、Na^+依存性高親和性取り込み機構の関与が示唆されており(2)、脳シナプス膜標品へのNa^+依存性高親和性[^{3}H]Glu結合が、この取り込み機構を反映するものと理解されている(7,10)。一方、Na^+非依存性高親和性[^{3}H]Glu結合は、Gluのシナプス受容体への結合とよく相関するが(3,8)、この結合は塩素イオンにより著明に増強される(6)。この塩素イオン依存性結合の生理的意義としては、アニオン駆動性[^{3}H]Glu取り込み機構が現在最も有力視されているが、その存在については証明されるに至っていない。ラット脳シナプス膜小胞を用いた研究では、[^{3}H]Gluの取り込みは外液中のNa^+に依存して出現し、アニオン依存性成分の存在は見出されていない(5)。したがって本研究では、ラット大脳皮質切片を用いて、アニオン依存性[^{3}H]Glu取り込み機構の存在の可能性について追究した。さらに、塩素イオン依存性[^{3}H]Glu結合を選択的に阻害する各種化合物の、[^{3}H]Glu取り込みに対する効果についても検索を進めた。

[実験方法]

Wistar系雄性ラット(200-250g)の断頭致死後、Glowinski and Iversenの方法(4)に従い、大脳皮質を摘出した。Cross-chopped slicesを作成後、95% O_2-5% CO_2で飽和したKrebs-Ringer bicarbonate 緩衝液(pH7.4)中で、30℃、30分間preincubation を行った。この操作を3回行ったのち、通常は5 mgの切片を1μM [^{3}H]Glu(44.6 Ci/mmol、陽イオン交換樹脂により精製)と 95% O_2-5% CO_2 飽和 Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液中で、30℃、2分間反応させた。反応を氷冷した緩衝液の添加により停止したのち、反応液はただちに Whatman GF/B グラスフィルター上で吸引濾過した(5 mmHg)。さらに、フィル

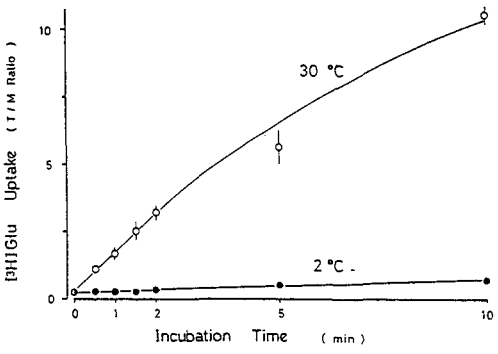


Fig. 1. Effect of incubation time on [^{3}H]Glu uptake in cerebral cortical slices.

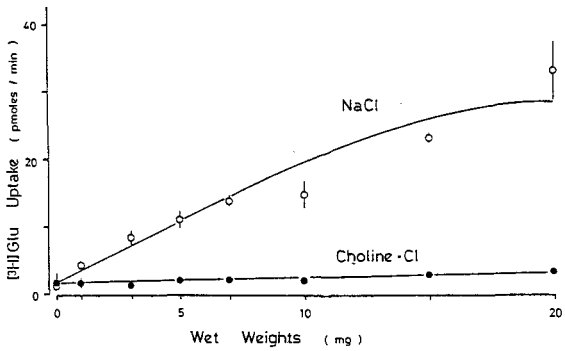


Fig. 2. Sodium dependency of [^{3}H]Glu uptake in cerebral cortical slices.

ターを氷冷緩衝液で3回洗浄後、フィルター上の放射活性を液体シンチレーション法により測定した。反応時間ゼロの場合に得られた放射活性(約 500 dpm)を、反応後の切片中の全放射活性(約8,000 dpm)から差し引くことにより、切片内に蓄積された放射活性を算出した。取り込まれた[^{3}H]Gluは、切片1 g中に蓄積された放射活性/溶媒1 ml中の放射活性(T/M 比)の値から求めた。

[実験結果]

ラット大脳皮質切片への[^{3}H]Gluの蓄積は著しい反応温度依存性を示し、反応温度30℃の場合は反応開始後2分までは直線的に増加したが、その後も漸次増加した(Fig.1)。一方、反応温度2℃の場合は有意な放射活性の蓄積は認められなかった。反応液中に塩化ナトリウムが存在すると、用いた切片量に比例して放射活性の蓄積が観察されたが、塩化ナトリウムを同濃度の塩化コリンで置換すると、[^{3}H]Gluの蓄積は全く見られなかった(Fig.2)。したがって本実験条件下で検出される放射活性の蓄積は、切片内への[^{3}H]Gluの取り込みを意味するものと思われる。事実、この放射活性の蓄積はミトコンドリア内の酸化的リン酸化反応の阻害能を持つ、CCCPやバリノマイシンの添加(10^{-5}-10^{-4}M)により有意に抑制された。また、種々の神経組織において、膜電位依存性ナトリウムチャンネルの活性化作用を持つグラヤノトキシンIII(GTX-III)も有意な抑制作用を発揮したが、この抑制作用はテトロドトキシンの添加により回復した。さらに、D-AspはL-Aspと同等度の強い抑制作用を示したが、D-Gluはこの放射活性の蓄積に対して著変を与えなかった。L-システインスルフィン酸およびシステイン酸はともに、濃度依存的に[^{3}H]Glu取り込みを阻害した。さらに、L-システインも高濃度(10^{-3}M)で本取り込みを有意に抑制したが、他の含硫化合物にはこの様な作用は見出せなかった。N-メチル-D-アスパラギン酸およびQAはともに、[^{3}H]Gluの取り込みには

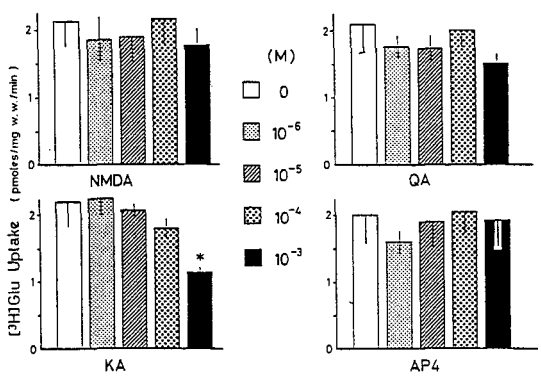


Fig. 3. Effect of agonists and antagonist on [^{3}H]Glu uptake.

著明な影響を与えなかったが、KAは高濃度(10^{-3}M)で取り込みを有意に抑制した。さらに、第4番目のサブタイプのアンタゴニストであり、塩素イオン依存性[^{3}H]Glu結合を選択的に阻害するAP4は、大脳皮質切片の[^{3}H]Glu取り込みに有意な影響を及ぼさなかった。(Fig.3)。アニオン輸送阻害薬のDIDSおよびエタクリン酸はともに、[^{3}H]Glu結合の中でも特に、塩素イオン依存性結合およびカルシウムイオン刺激性結合の両者を選択的に阻害したが、[^{3}H]Glu取り込みに対しては著しい効果を与えなかった(Fig.4)。カルモジュリン阻害能を持つW-5とW-7はともに、[^{3}H]Glu取り込み阻害作用を発揮した。この阻害作用を詳細に検討すると、W-7の方がW-5に比べてより強力に取り込みを抑制することが判明した。

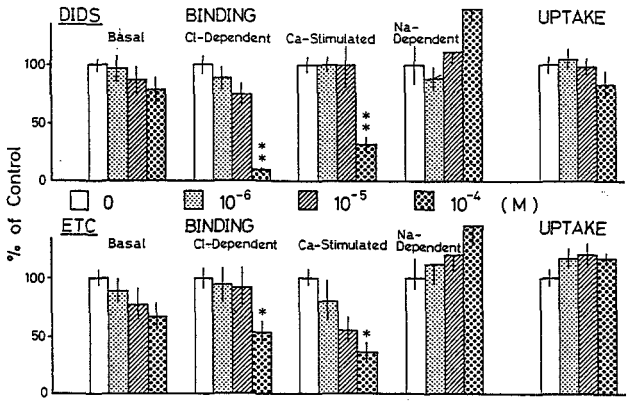


Fig. 4. Effect of anion transport inhibitors on binding and uptake of [^{3}H]Glu.

［考察］

酸化的リン酸化阻害薬および膜脱分極薬感受性、反応温度依存性、外液Na^+依存性およびD-Asp感受性などから判断して、本実験条件下で検出される放射活性の蓄積が、切片内への[^{3}H]Gluの取り込みを反映することは明らかである。しかしながら、この取り込みは外液Na^+に完全に依存して出現し、塩素イオン依存性成分の存在は見出せなかった。塩素イオンは、シナプス膜標品への[^{3}H]Glu結合を著明に増強する性質を持ち、この増強は膜標品中に混在する小胞成分へのアニオン駆動性[^{3}H]Glu取り込みを意味するものと解釈されている。さらに、塩素イオン依存性結合を選択的に阻害する化合物(1,11)は、いずれも[^{3}H]Glu取り込みに著変を与えなかった。本研究結果とシナプス膜小胞を用いた研究結果(5)を総括すると、ラット脳内にアニオン駆動性[^{3}H]Glu取り込み機構が存在する可能性は低いものと思われる。一方、[^{3}H]Glu結合は塩素イオンばかりでなく他のアニオンによっても増強されるが、それらはすべてアニオンチャンネル透過性を持つものばかりで、透過性を持たないアニオンは結合増強作用を示さない(11)。アニオン輸送阻害薬がこの塩素イオン依存性結合を選択的に阻害することなども考え合わせると、塩素イオン依存性結合がGlu結合部位とアニオン輸送担体(9)との相互作用に起因する可能性も充分に考えられるものである。今後、この塩素イオン依存性結合の生理的意義について、さらに詳細な検索を進める予定である。

［文献］

1. Fagg, G.E., Foster, A.C., Mena, E.E. and Cotman, C.W. (1982) J. Neurosci. 2, 958-964.
2. Fonnum, F. (1984) J. Neurochem. 42, 1-11.
3. Foster, A.C. and Fagg, G.E. (1984) Brain Res. Rev. 7, 103-164.
4. Glowinski, J. and Iversen, L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669.
5. Kanner, B.I. and Sharon, I. (1978) Biochemistry 17, 3949-3953.
6. Mena, E.E., Fagg, G.E. and Cotman, C.W. (1982) Brain Res. 243, 378-381.
7. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1986) Brain Res. 397, 137-144.
8. Roberts, P.J. (1974) Nature 252, 399-401.
9. Ross, A.H. and McConnel, H.M. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4777-4782.
10. Vincent, S.R. and McGeer, E. (1980) Brain Res. 184, 99-108.
11. Yoneda, Y., Ogita, K., Nakamuta, H., Koida, M., Ohgaki, T. and Meguri, H. (1986) Neurochem. Int. 9, 521-531.

195. 伝達物質GABAのprodrugとしての4ーアミノブチルアルデヒド

朝倉　正・池田義孝・松田　誠

（慈恵医大・医化学）

〔要　約〕

4-アミノブチルアルデヒド(ABAL)より生成されたGABAが脳内で伝達物質として機能的に働き得るかどうかを検討するために、GABAergicニューロンの神経終末においてABALからGABAが合成されるかどうか、さらに脱分極刺激に応じてこの合成されたGABAが放出されるかどうかを調べた。

①マウス脳よりシナプトゾーム(syn)を調製し、さらにsucroseの密度勾配遠心法によりGABAergic、cholinergic synに分画し、各分画のABAL脱水素酵素（ABALからGABAへの合成酵素）活性を調べると、GABAergic synの分画にかなり多く分布し，GABAへの変換効率の高いことが示唆された。

②〔^{3}H〕ABALのsyn内への取込みは各分画ともほぼ同程度であったが、合成された〔^{3}H〕GABAの蓄積はGABAergic synに多く存在し、内在性GABAの分布ともよく一致した。

③〔^{3}H〕ABALから合成された〔^{3}H〕GABAを含有するGABAergic synを灌流法により脱分極刺激(56mM K^+＋2.5mM Ca^{2+})を行うとこの〔^{3}H〕GABAの放出が認められた。

以上のことから、ABALは伝達物質としての機能を有するGABAに変化し得るprodrugとして有効であると思われた。

Key word：　4-Aminobutyraldehyde, GABA release, GABAergic synaptosome

種々の不随意性疾患、例えばハンチントン舞踏病においては抑制性伝達物質GABAの減少が特徴とされている(8)。また、ビタミンB_6欠乏性痙攣発作においてもGABAの減少に伴う同発作の誘発が知られており、この場合はビタミンB_6の投与によりGABA量は回復しそれと同時に発作も阻止される(1)。このようなことから、GABAを増加させ神経機能を抑制させる工夫が色々と試みられているが(4,7)、GABAやその前駆体であるグルタミン酸は血液-脳関門を通過しないため(15)満足すべき方法は提出されていない。そこで、血液-脳関門を通過後GABAに変化しその際にGABA以外の成分を生じない物質として4-アミノブチルアルデヒド(ABAL)を提案した(11-14)。この研究では、脳内でABALより生成されたGABAが実際にGABAergicニューロンの神経終末に存在するかどうか、さらに脱分極刺激に応じてこのGABAの放出が見られるかどうかを調べることにより、ABALが伝達物質GABAのprodrugとしての可能性を検討した。

［実験方法］

ABALの調製：ABALはABAL diethylacetalを加水分解後Dowex50(H+)カラムにapplyし水洗により加水分解で生じたエタノールを除去した後、1N HClでABALを溶出させる。また、〔^{3}H〕ABALは〔^{3}H〕putrescineよりSugahara(11)の方法により調製する。

GABAergicシナプトゾームの調製：マウス(DD系，雄，5週齢)脳よりSellströmら(10)の方法に準じてFicoll-sucroseの密度勾配遠心法によりシナプトゾーム(syn)を調製しさらにsucrose(0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4M)の同遠心法(63,000xg,60min)によりGABAergicおよびcholiergic synを分離する（Inouyeら(6)の方法に一部準ずる）。

GABAergic synのマーカー測定：内在性GABAとグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)をGABA-

ergic synのマーカーとし測定する。内在性GABAはAsakuraら(2)の方法に準じてgas chromatographにより定量する。また、GAD活性は(14C)glutamic acid(10mM)を基質として0.1mM pyridoxal phosphate共存下で37℃，30分反応後(14C)GABAの生成量から求める。(14C)GABAと(14C)glutamic acidの分離はDowex1(CH_3COO^-)で行う。

Cholinergic synのマーカー測定：アセチルコリンエステラーゼ(AChE)活性をcholinergic synのマーカーとし測定する。acetylthiocholine(0.75mM)を基質としてdithiobisnitrobenzoic acidとthiocholineより生じたチオールの吸光度(OD412)より求める。

ABAL脱水素酵素活性の測定：(3H)ABAL(1mM)を基質として2mM NAD共存下で37℃、30分反応し(3H)GABAの生成量から求める。反応後，除蛋白しpHを3-4に調整したサンプルをDowex50(Na^+)カラム(5x15mm)にapplyし 10mM acetate buffer(pH3.5)，0.1M phosphate buffer(pH6.5)，6N HClを各2mlずつ流すことによりそれぞれGABAの代謝産物、GABA、ABALが溶出される。

Syn内への(3H)ABALの取込み、(3H)GABA合成および(3H)-GABA放出：分画したsynに(3H)ABAL(1.0mM)を添加し37℃で種々の時間反応後、遠心(23,000xg，10min)沈殿の3Hカウントを(3H)ABALの取込みとする。さらに、この沈殿を除蛋白後上記のDowex50(Na^+)カラムにより(3H)GABAを分離測定し合成(3H)GABA量とする。synからの(3H)GABAの放出は(3H)ABALを取り込ませたsynを灌流法(3，5，9)により脱分極刺激(56mM K^+ + 2.5mM Ca^{2+})による(3H)GABAの放出量を測定する。

[結果および考察]

Synをさらにsucroseの密度勾配遠心法により5分画(Fr.1-Fr.5)に分けGABAergic synのマーカーとして内在性GABAおよびGAD活性の測定、cholinergic synのマーカーとしてAChE活性の測定を行うと、図1aに示すようにGABAergic synはFr.4にcholinergic synはFr.3にそれぞれ分離できた。ここでR.S.A.はsyn分画前後のmg蛋白当りのGABA量あるいは酵素活性の比であり次式で表される。

R.S.A.＝（分画後の比活性）／（分画前の比活性）

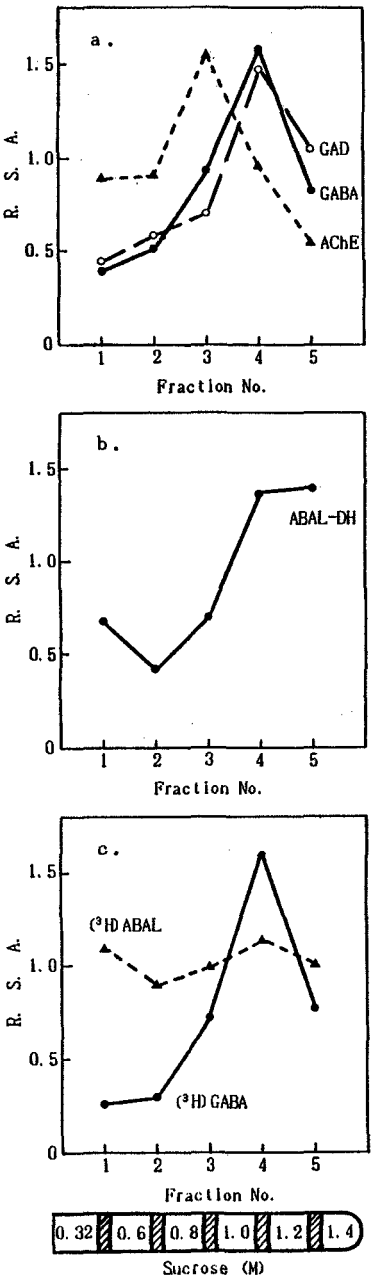


図1 (a)GABAergicおよびCholinergic synのマーカーの測定. (b)ABAL脱水素酵素の分布. (c) (3H)ABALの取込みおよび合成(3H)GABA量.

ABAL脱水素酵素活性の分布は、図1bに示すようにFr.5にかなり多いもののGABAergic synにも多く存在しておりcholinergic synには非常に少ないという興味ある結果が得られた。つまり、取り込まれたABALはGABAergic synにおいて選択的にGABAに合成される可能性を示している。

〔^{3}H〕ABALのsynへの取込みおよび〔^{3}H〕GABA合成

分画したsyn(Fr.1-5)に〔^{3}H〕ABAL(1mM)を添加すると図1cに示すように各分画における〔^{3}H〕ABALの取込みには特異性がなくどの分画もほぼ同程度であったが、各syn内で合成された〔^{3}H〕GABAはFr.4のGABAergic synに特異的に蓄積され時間と共に増加した（図2）。この〔^{3}H〕GABAの蓄積量は5nmol/mg proteinにも達しており内在性GABAは13.6nmol/mg proteinであるから約1.4倍にもGABAを増加した。ABAL脱水素酵素活性はFr.4よりもFr.5の方が多いにもかかわらずsyn内の〔^{3}H〕GABAがFr.4に多くなった理由として、取り込まれた〔^{3}H〕ABALがFr.5ではABAL脱水素酵素の局在部位にまで取り込まれなかったか、あるいは合成された〔^{3}H〕GABAが速やかに代謝されてしまったことが考えられる。いずれにしろGABAergic synに〔^{3}H〕ABALから合成された〔^{3}H〕GABAが蓄積しているということはこのGABAに伝達物質としての機能を充分期待できることを示している。

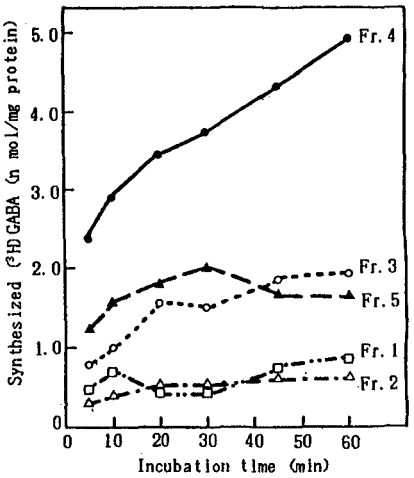


図2 各分画syn内での(^{3}H)ABALから合成された(^{3}H)GABAの蓄積量の時間変化.

合成〔^{3}H〕GABAのGABAergic synからの放出

〔^{3}H〕ABALを取り込ませたGABAergic synを灌流法により脱分極刺激を行い放出された〔^{3}H〕GABAをDowex50(Na^+)カラムで分離測定した。図3に示すように刺激に応じて〔^{3}H〕GABAは放出されこの量はGABAergic syn内に存在する〔^{3}H〕GABAのほぼ9％でありこの値は内在性GABAの放出量にほぼ近いものであった。また、刺激により〔^{3}H〕GABAのみが放出されておりGABAの代謝産物や〔^{3}H〕ABALの放出の増加はなかった。

以上のことから，synへの〔^{3}H〕ABALの添加により効率よくGABAergic syn内で〔^{3}H〕GABAに変換され、syn内のGABA量を1.4倍にも増加し得る。この際，GABA以外の成分は全く遊離されないので他の物質による蓄積・薬理作用等を考慮に入れる必要はない。さらに、この合成された〔^{3}H〕GABAは脱分極刺激によりGABAergic synから内在性GABAと同様に放出されるので、伝達物質GABAのprodrugとして充分有用性があるように思われる。

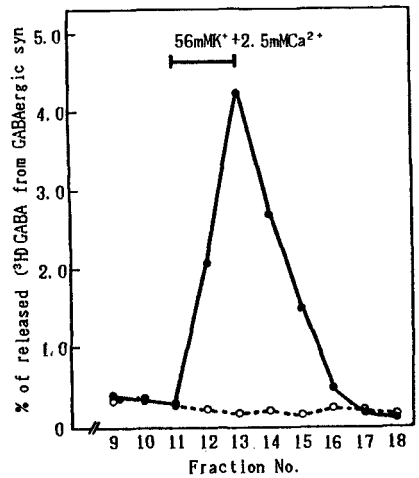


図3 合成(^{3}H)GABAのGABAergic synからの脱分極刺激による放出パターン.

尚、本研究の一部は上原記念生命科学財団の助成によるものである。

［文献］

1. Abe, M. et al. (1982) Jikeikai Med. J., 29:233-238.
2. Asakura T. et al. (1980) Jikeikai Med. J., 27:63-69.
3. Asakura T. et al. (1982) J. Biochem., 92:1919-1923.
4. Frey H.-H. et al. (1982) Neuropharmacol., 19:217-220.
5. Hoshino M. et al. (1979) J. Nutr. Sci. Vitaminol., 25:367-374.
6. Inouye A. et al. (1963) Biochim. Biophys. Acta, 71:491-493.
7. Kaplan J.-P. et al. (1980) J. Med. Chem., 23:702-704.
8. Perry T.L. et al. (1973) New Engl. J. Med., 288:337-342.
9. Raiteri M. et al. (1974) Eur. J. Pharmacol., 25:411-414.
10. Sellström A. et al. (1975) J. Neurochem., 25:393-398.
11. Sugahara M. (1983) J. Biochem., 93:1337-1342.
12. Sugahara M. et al. (1983) J. Neurochem., 40:294-296.
13. Sugahara M. et al. (1984) Jikeikai Med. J., 31:1-6.
14. Tago K. et al. (1982) J. Neurtochem., 39:803-809.
15. Van Gelder N.M. et al. (1958) J. Neurochem., 3:139-143.

196. Cyclic AMPおよびグアニンヌクレオチドによるラット下垂体中葉細胞からのα-メラノサイト刺激ホルモン(α-MSH)放出の調節

山本敏文・古木義弘*・Kebabian J.W.*・Spatz M.*
(三菱化成生命研, NIH*)

〔要　約〕

ラット下垂体中葉細胞からのα-メラノサイト刺激ホルモン(α-MSH)放出に対するcAMPの作用を高電圧パルスでpermeabilizeした細胞を用い調べた。非水解GTPアナログのGTPγSとcAMPは、Caで引き起こされたα-MSHの放出を増強した。同様な放出の促進作用は、GTPおよびGppNHpでも認められ作用程度は同一であった。Mgはこの作用に必須であり、GTPγSおよびcAMP単独ではいずれも作用を示さなかった。また、同時に添加されたGDPβSはこの促進作用を完全に消失させた。8-Br cAMPおよびdibutyryl cAMPも同様にα-MSHの放出を促進した。NeomycinおよびcolchicineはcAMPとGTPγSによるα-MSH放出の促進作用には影響しなかった。これらの結果は下垂体中葉細胞におけるα-MSHの放出機構の中で、細胞内の遊離Ca濃度が上昇した後、cAMPにより調節されるステップが存在すること、さらには新たなGTP結合部位がこのステップに存在することを強く示唆している。

Key word : α-MSH secretion, GTP binding, cyclic AMP

[諸言]

下垂体中葉細胞はβ受容体及びD-2ドーパミン受容体を有し、細胞からのα-メラノサイト刺激ホルモン(α-MSH)の放出を調節している。これらの受容体は中葉遊離細胞系において、アデニレート・シクラーゼと共役し、β受容体の刺激によりcAMP合成が増加しα-MSHの放出が促進される一方、D-2受容体の刺激によりα-MSHの放出が抑制されることが知られている(3、4、7)。これまで我々はcAMPがα-MSHの放出を調節していることを報告してきたがcAMPの作用がCaの移動を介するものか、直接放出に関与しているものかは明らかではなかった。今回、細胞を高電圧パルスによりpermeabilizeする方法を下垂体中葉細胞に適用することができ、細胞内の条件を調節し直接細胞内へ導入されたcAMP等、低分子量物質のα-MSH放出への作用を調べたので報告する

[実験方法]

Sprague-Dawley ラット(250-300 g)の下垂体中葉細胞は既報の方法(5)により遊離細胞とした。遊離細胞は、Knight and Bakerの方法(6)を下垂体中葉細胞に適する様に改良し用いた(9)。遊離細胞は Permeabilizing buffer (146 mM sodium acetate, 5 mM KCl, 1 mM Na_2HPO_4, 5 mM HEPES, 7.8 mM glucose, 1.5 mM $CaCl_2$ (or 1 mM EGTA), pH7.4に、8-10x10^6cells/mlの濃度で懸濁し高電圧パルス (0.8 - 2.0 kV/cm, 200μsec)を 2回通じた。細胞を直ちに遠心し、再び同一溶液に分散させたのちα-MSH放出実験に用いた。Assay は1.5 mM $CaCl_2$存在下、またはCa-EGTA buffer中で遊離Caを調節した同一溶液中で各チューブ0.8-1.0 x10^5cells を用い、30℃ 5分間反応を行ない、細胞外に放出されたα-MSHはRIA により測定した。各測定はtriplicateで行な

った。

[実験結果]

Fig. 1に示した様にα-MSHの放出は、遊離Ca濃度に依存して起こり cAMP(1μM)及び GTPγS(100μM) によりその EC(50) 値を変えることなく約 2倍増加した。このcAMP によるα-MSH放出促進作用は、Ca^{2+}の存在下さらに Mg^{2+} および GTPγS の存在を必要とし、この効果は同時に添加された GDPγS により完全に消失した(Fig. 2)。GTP およびGppNHpは GTPγS と同様にcAMPによる放出促進を引き起こしたが(Fig. 3) GDP, GMP,cGMP は作用しなかった。他のヌクレオチドも ATPを除き作用はなかった。GTPアナログは、いずれも 100μMでほぼ最大の効果を示しEC(50)値は約 5μMであった。

cAMP のアナログである8-Br cAMP di-But cAMP のいずれもcAMP同様、MgGTP γS 存在下α-MSHの放出を促進し、cAMPおよびdi-But cAMP は約 1μM に最大作用のピークを持つ一方8-Br cAMP は1-10 μMで最大に達する結果を得た(Fig.4) 。ホスファチジルイノシトールの水解を阻害する neomycin(100μM)ははα-MSHの放出を全体にわずか低下させたが、cAMPと GTPγS による放出促進作用には影響しなかった。一方、colchicine(1mM) はα-MSHの放出には全く影響しなかった。

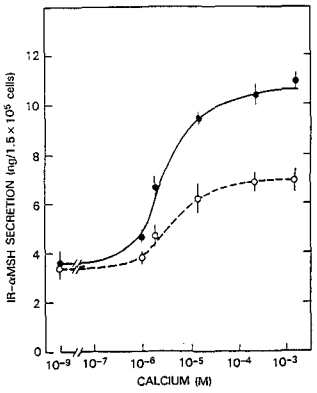
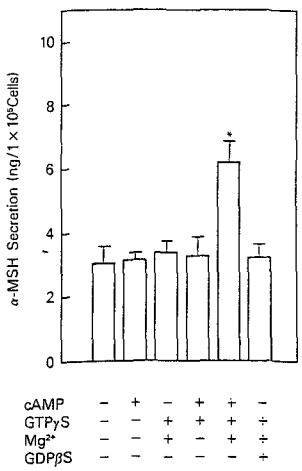


Fig. 1. Ca^{2+} -dependence of α-MSH secretion from permeabilized IL cells.
(○) None, (●) 1μM cyclic AMP and 100μM GTPγS.

Fig. 2. Effect of Mg on the potentiated secretion of α-MSH by cyclic AMP (1μM) and GTPγS (100 μM) in the presence of 1.5 mM $CaCl_2$.
*p<0.05 by Student's t-test.



[考察]

この方法は、細胞内条件を一部調節出来る点で特にexocitosisでの細胞内変化を研究するうえで非常に有効な手段である。既に報告した様に高電圧パルスによりpermeabilizeされた細胞は正常な遊離細胞と同様な分泌機能を有し(9) 、今回の結果はCaにより引き起こされるα-MSHの放出がcAMPによりさらに増加することを示した。cAMPによるα-MSH放出はCa Caによる親和性には影響せず放出量のみを増加させた。本実験系では、細胞内外の Ca 濃度はCa-EGTA bufferあるいは高濃度 (1.5 mM) に調節されているため、Caの流入・移動系の影響は無いものと考えられる。従って、今回報告したcAMPによるα-MSH放出の促進作用は細胞内のCa濃度が上昇した後に起こる現象を見ているものと考えられる。我々は既に、下垂体中葉細胞の膜分画にcAMP依存性プロテインキナーゼの基質となるタンパク質を認めており、本研究で得られた結果はα-MSH放出機構にこの系が関与している可能性をさらに示唆するものである。

さらに興味深い点は、cAMPの作用の発現にはMg,GTPが必須であるという結果であるGTP アナログは受容体－アデニレートシクラーゼ、ホスファチジルイノシトール、そしてイオンチャネル系等の中で、その調節タンパク（GTP 調節タンパク）へ結合し、作用を示していることは良く知られている(1,2,8)。また、微小管の重合等においてもGTP の作用は良く知られている。しかしながら、明らかにcAMPまたはGTP アナログ

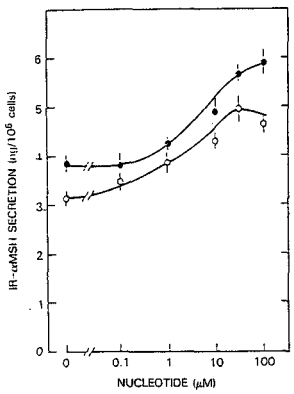


Fig. 3. Effects of GTP analogues on α-MSH secretion. Permeabilized cells were incubated for 5 min at 30°C, in the presence of 1 μM cyclic AMP and various concentrations of GTPγS (●) and GppNHp (○). Each value is the mean ± SE for three determinations.

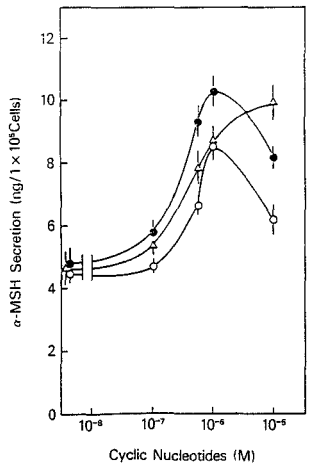


Fig. 4. Effects of cyclic AMP analogues on α-MSH secretion. Assay were performed in the presence of GTPγS(100 μM) and 1.5 mM $CaCl_2$. (○) cyclic AMP; (△) 8-Br cAMP; (●) dibutyryl cAMP.

は単独での作用は認められず、しかもその作用の出現は数分以内に起こる速い反応である点からアデニレートシクラーゼ系への作用は除外される一方で、ホスファチジルイノシトール系、イオンチャネル系への作用もneomycinおよびcolchicineの影響がない点、および細胞内の条件を調節出来る本実験系においては同様に影響は除外されるものと考えられる。

従って、本研究の結果は、exocitosisの過程の中にcAMPによるリン酸化、および新しいGTP 結合タンパクの関与するステップが存在する可能性を強く示唆するものである。

REFERENCES

1. Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1984) Nature, 312, 315-321.
2. Cockcroft, S. and Gomperts, B.D. (1985) Nature, 314, 534-536.
3. Cote, T.E., Grewe, C.W. and Kebabian, J.W.(1981) Endocrinology 108, 420-426.
4. Cote, T.E., Munemura M, Eskay, R.L. and Kebabian, J.W. (1980) Endocrinology 107, 108-116.
5. Goldman, M.E., Beaulieu,M., Kebabian,J.W. and Eskay, R.L. (1983) Endocronology 112, 435-441.
6. Knight, D.E. and Baker, P.F. (1982). J. Membrane Biol. 68, 107-140.
7. Munemura, M., Eskay,R.L. and Kebabian. J.W. (1980) Endocrinology 106, 1795-1803.
8. Rodbell, M. (1980) Nature 284, 17-22.
9. Yamamoto, T., Furuki, Y.,Guild, S. and Kebabian, J.W. (1987) Biochem. Biophys. Res.Comm. 143, 107

197. オキシトシンニューロンのセロトニンおよびGABA性神経支配

塩田清二・堀江　繁・中井康光
（昭和大・医・第一解剖）

〔要　約〕

ラット視床下部下垂体後葉系オキシトシンニューロンへのセロトニン（5－HT）およびGABAニューロンのシナプス入力を、光顕と電顕レベルの2重免疫染色法を用いて調べた。光顕的には5－HTおよびGABA抗体を用いてディアミノベンチジン（DAB）と硫酸ニッケルを基質としてPAP法による免疫染色を行ない，一方オキシトシン（OT）とその担体蛋白であるニューロフィジンI（NPI）に対する抗体を用いてDAB単独でPAP法による免疫染色を行なった。その結果，5－HTあるいはGABA免疫陽性の終末が，OTとNPI免疫陽性の細胞体や突起に直接接している像がところどころでみられた。電顕的には，5－HTおよびGABA抗体を用いた包埋前PAP法とOTおよびNPI抗体を用いた包埋後金コロイド法の組み合わせ法により観察した。その結果，5－HTおよびGABA免疫陽性終末が，OTおよびNPI免疫陽性の細胞体や突起に直接シナプスを形成している像がみられた。以上の所見から，視床下部下垂体後葉系オキシトシンニューロンは，5－HTならびにGABA作動性ニューロンの神経支配をうけている可能性が示唆された。

Key word： Oxytocin, synaptic input, hypothalamus

視床下部下垂体後葉系に属する大細胞性のオキシトシン（OT）ニューロンは，主に室傍核の腹外側部と視索上核の背側部に細胞体が分布し，その軸索は正中隆起内層を経て下垂体後葉に投射している。室傍核や視索上核にはカテコールアミン，5－HT，ACTH，アセチルコリンなどを含有する神経終末が投射していることが，いろいろな組織化学的観察によって証明されている（4，5，6，8）。OTの分泌が，カテコールアミン，5－HT，アセチルコリン，GABAなどの伝達物質によって調節されていることが生化学的研究により明らかにされている（1，2）。しかし，電顕レベルでこれら伝達物質を含むニューロンがOTニューロンにシナプスを形成していることを証明した報告は少ない。カテコールアミン性シナプス入力についてはオートラジオグラフィーあるいは 5-hydroxydopamine 標識法と包埋前PAP法による免疫染色の組み合わせ法によって証明されている（3）。GABA性シナプス入力については，GABAそのものに対する抗体を用いた証明はないが、GABA合成酵素である glutamate decarboxylase（GAD）に対する抗体を用いてGAD陽性終末がOTニューロンにシナプス形成しているのが観察されている（9）。しかし，その他のニューロンのオキシトシンニューロンへのシナプス入力について直接証明した報告はない。今回，5－HTおよびGABAに対する抗体を用いて，5－HTならびにGABA線維とOTニューロンとの相関を光顕と電顕（7）レベルの2重免疫染色法によって調べた。

（材料と方法）

1)光顕レベルの免疫染色法

コルヒチン処理あるいは無処理の Wistar 系成熟雄ラットを用い，４％パラホルムアルデヒドと０４％グルタールアルデヒドの混合溶液を用いて灌流固定した。その後，凍結切片（２０μｍ）を作成し，５－ＨＴ抗体（１：４０００－１：８０００）およびＧＡＢＡ抗体（１：４００0－１：５０００）を用いてディアミノベンチジン（ＤＡＢ）と硫酸ニッケルを含む基質液に浸漬し、ＰＡＰ法による免疫染色を行なった。続いて同一切片をＰＢＳで洗浄後，ＯＴ抗体（１：２０００－１：５０００）あるいはＮＰＩ抗体（１：５０００－１：１０００００）を用いてＤＡＢ単独の基質液に浸漬し，ＰＡＰ法による免疫染色を行ない観察した。

2)電顕レベルの免疫染色法

光顕と同様の方法で固定した動物の脳を摘出後，ビブラトーム切片（３０－４０μｍ）を作成し，５－ＨＴ抗体およびＧＡＢＡ抗体を用いてＰＡＰ法による免疫染色を行ない，２％オスミウム酸で４℃１時間固定し，エタノール系列脱水を経て Epon-Aralditeに包埋した。超薄切片を作成し，メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液で２０℃１時間処理した後，ＯＴ抗体とＮＰＩ抗体を４℃で２４時間，金コロイド標識抗ウサギヤギ抗体（１：２５－１：４０）を２０℃で１時間反応させて免疫染色を行なった。すべての超薄切片は，酢酸ウランとクエン酸鉛溶液を用いて電子染色を施し，電顕的に観察した。

〈結果と考察〉

光顕レベルで免疫組織化学的に視床下部を検索した結果，５－ＨＴ免疫陽性終末は室傍核では腹外側部に，視索上核では腹側部よりも背側部に多くみられた。ＧＡＢＡ陽性終末は室傍核と視索上核において広く分布していた。同一切片上で２重免疫染色を施した切片を光顕で観察した結果，５－ＨＴおよびＧＡＢＡ免疫陽性を示す青色に染まる神経終末と，ＯＴあるいはＮＰＩ免疫陽性を示す褐色に染まる神経細胞体や突起が区別された。同一切片上で観察すると，５－ＨＴあるいはＧＡＢＡ免疫陽性終末がＯＴやＮＰＩ陽性ニューロンの近傍に多数みられ，ときにこれらのニューロンが直接接しているような像がみられた。

電顕レベルで包埋前ＰＡＰ法にて５－ＨＴおよびＧＡＢＡ免疫陽性線維あるいは終末を観察した結果，５－ＨＴあるいはＧＡＢＡ免疫陽性反応を示す反応産物は，ニューロン内の小型の暗調顆粒（直径約８０ｎｍ）にみられた。しかし，明るい小型のシナプス小胞（直径４０－５０ｎｍ）内には反応陽性産物はみられなかった。一方，ＯＴあるいはＮＰＩ免疫陽性を示すニューロンの細胞体や突起では，直径１００－２００ｎｍの神経分泌顆粒に一致して多数の金粒子が限局してみられた。包埋前ＰＡＰ法と包埋後金コロイド法で２重免疫染色を施した超薄切片を電顕的に観察した結果，５－ＨＴおよびＧＡＢＡ（Ｆｉｇ．１）をそれぞれ含む免疫陽性終末が，ＯＴあるいはＮＰＩ免疫陽性を示す細胞体や突起にシナプスを多数形成しているのが観察された。以上の所見から，視床下部下垂体後葉系ＯＴニューロンは，カテコールアミン性神経支配を受けているほかに，セロトニンならびにＧＡＢＡ性の神経支配を受けている可能性が示唆された。

〈文献〉

1. Bridges, T.E., Hillhouse, E.W. & Jones, M.T. (1976) J. Physiol. 260

647-666

2. Moos, F. & Richard, P. (1979) Neuroendocrinol. 28 138-144
3. Nakai, Y., Shioda, S., Ochiai, H. and Kozasa, K. (1986) Current Topics in Neuroendocrinol. 7 135-160
4. Piekut, D.T. (1985) Peptides 6 883-890
5. Sawchenko, P.E., Swanson, L.W. & Joseph, S.A. (1982) Brain Res. 232 365-374
6. Sawchenko, P.E., Swanson, L.W., Steinbusch, H.W.M. & Verhofstad, A.A.J. (1983) Brain Res. 277 355-360
7. Shioda, S., Kohara, H. & Nakai, Y. (1987) Brain Res. 402 355-358
8. Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Berod, A., Hartman, B.K., Helle, K.B. & Vanorden, D.E. (1981) J. Comp. Neurol. 196 271-285
9. Theodosis, D.T., Paut, L. & Tappaz, M.L. (1986) Neuroscience 19 207-222

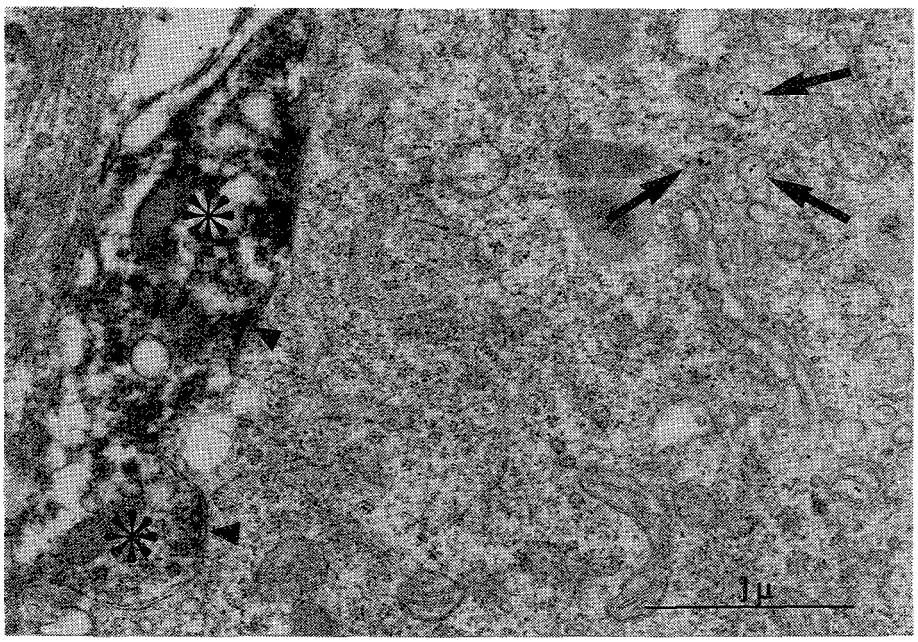


Fig.1. Double labeling pre-embedding PAP and post-embedding immunocolloidal gold staining (IGS). GABA-like immunoreactive terminals (asterisk) making synaptic contact (arrowheads) with an OT-like immunoreactive perikaryon containing IGS-immunoreactive granules (arrows).

198. E1マウスの痙攣に伴なう脳内 neuropeptides の濃度変化
——Methionine-enkephalin と Vasoactive intestinal polypeptide を中心に

金松知幸・平野修助　（東邦大・医・第二生理）

〔要　約〕

脳内の methionine-enkephalin (ME) および vasoactive intestinal polypeptide (VIP) が痙攣とどのように関連しているのかを調べた。まず遺伝性てんかんマウス (El) とその母系である ddY および、放り投げ訓練を受けて痙攣準備性を持った El(+) の各脳部位別 ME, VIP 濃度を比較した。

また、El の痙攣後の経時的な脳部位別 ME, VIP 濃度を測定し ddY における電撃発作 (ECS) に伴う、それら peptides の経時的脳部位別変化と比較検討した。その結果、(1) 放り投げ訓練を一度も受けていない El(-) では ddY に比べ caudate nucleus (CN) と hippocampus (Hip) で ME 濃度が低値を示し、brain stem (BS) で VIP 濃度が高値をそれぞれ示した。(2) 放り投げ訓練を受け痙攣準備性を持った El(+) では El(-) に比べ ME は CN で高値を、BS で低値を、また VIP は CN と hypothalamus (Hyp) で低値をそれぞれ示した。(3) El の痙攣に伴う peptides 濃度変化を経時的に調べると、El(+) に比べ ME は、CN と Hip で、痙攣中に濃度が低下し CN では痙攣後 9 時間目まで低値を示した。また VIP は CN で痙攣後 3 時間目に低値を示し、Hyp で痙攣後 9 時間目に高値を示し、El(-) とほぼ等しい値を示した。(4) ddY の電撃発作では、ME が CN と Hyp で上昇し、VIP は Hyp と Hip で減少した。以上のことから El の放り投げ痙攣によっても、脳内 neuropeptides 濃度がそれぞれ、脳部位別に、異なったパターンで変動していること、また、その変動の仕方は電撃発作とは異なることが明らかとなった。

Key word：　El mouse, Methionine-enkephalin, Vasoactive intestinal polypeptide,

脳室内に opiate peptides を投与すると、脳波上で痙攣波が記録されるという報告[2,5]や、脳波上の痙攣波は、弱い行動上の痙攣、すなわち wet dog shakes, myoclonic twithes や immobilityなどを随伴するとの報告[3,10]もあり、また、脳の局部に繰り返し opiate peptides を投与することによって全身性の痙攣が惹起される[1]との報告などから opiate peptides が、脳波および全身性の痙攣に関与していると考えられている。一方、電気刺激、カイニン酸や pentylenetetrazol (PTZ) の投与および、amygdaloid kindling などにより誘発された全身痙攣の後に、脳内 opiate peptides 濃度が著しく変化することも知られており[6,9,12]、また、カイニン酸投与や amygdaloid kindling によって痙攣を誘発すると opiate peptides 以外の cholecystokinin, somatostatin, substance I や neurotensin が、脳内で変化することも知られている[7,11]。そこで今回、我々は、痙攣と脳内の neuropeptides との関連性を調べるために、遺伝性てんかんマウス (El) を用い、methionine-enkephalin (ME) および vasoactive intestinal polypeptide (VIP) の濃度を、痙攣後、経時的に脳部位別に測定した。また、ddY を用い電気刺激を与え電撃発作後の ME と VIP の濃度の変化をも経時的に調べ、El の痙攣変化と比較した。

【 実験方法 】

実験動物：El およびその母系である ddY を用いた。El は、生後 4 週目より放り投げ訓練を行った。すなわち、1 回の訓練時に 80 回の放り投げを行い、この訓練を 3 日おきに 1 日 1 回行った。3～5 回目の訓練時に、ほぼすべての El は最初の痙攣を生じたが、その後も 3 日おきに 3～5 回連続して痙攣を生じさせ、最後の痙攣中および痙攣後 1 時間、3 時間、9 時間そして 96時間［それぞれEl(+-0h), El(+-1h), El(+-3h), El(+-9h), El(+)とした。］目に脳を取り出した。一度も放り投げ訓練を行わなかった El を El(-) とした。また、El の放り投げ刺激のかわりに ddY に 3 日おきに電気刺激を与え 3 回電撃発作を生じさせた後、4 回目の痙攣中および痙攣後 1 時間、9 時間目にそれぞれ脳を取り出した。脳は摘出後 Glowinski & Iverson の方法[4]に従い部位別にし、ラジオイムノ

アッセイ（RIA）のサンプルとした。 RIA：組織からの peptides の抽出法は既報[8]に従った。^{125}I-ME, ^{125}I-VIP およびそれぞれの抗血清は Amersham 社から購入した。

【結果】

El(-) と ddY および El(+) との比較：脳部位別 ME 濃度；El(-) と ddY とを比べると、El(-) で caudate nucleus (CN) と hippocampus (Hip) の ME 濃度が、おのおの、ddY の 80%、78% と有意に低値を示した。また、El(-) と放り投げ訓練で痙攣準備性を獲得した El(+) とを比べると、CN で El(-) の 110% と僅かではあるが、有意の高値を示し、brain stem (BS) で有意の低値を示した (Table 1)。脳部位別 VIP 濃度；El(-)と ddY とを比べると、ME と同様に El(-) の CN と Hipで、低値の傾向を示したが、有意の差は認められなかった(p=0.107、p=0.062)。しかし、BS の部位で有意に高値を示した。また、El(-) と El(+) とを比べると、El(+) の CN と hypothalamus (Hyp) で有意に低値を示していた(Table 2)。

Table 1　Met-enkephalin-like immunoreactivity of various brain regions in ddY, El(-) and El(+)

Brain region	Met-enkephalin-like immunoreactivity (p mole/g) ddY	El(-)	El(+)
Frontal cortex	463 ± 33 (11)	386 ± 31 (17)	362 ± 26 (17)
Caudate nucleus	4980 ± 220 (17)	4020 ± 140[a] (24)	4450 ± 130[b] (17)
Hypothalamus	1220 ± 43 (12)	1120 ± 30 (16)	1090 ± 27 (17)
Hippocampus	339 ± 11 (12)	265 ± 6[a] (16)	266 ± 7 (16)
Brain stem	1010 ± 30 (11)	1070 ± 20 (17)	985 ± 20[c] (17)
Pituitary※	2510 ± 160 (12)	2280 ± 90 (17)	2110 ± 80 (16)

Each value is the mean ± SEM with the numbers of experiments in parentheses.
Levels of significance were calculated using Student's t-test:
[a]$P < 0.001$; compared with ddY. [b]$P < 0.05$, [c]$P < 0.01$; compared with El(-)
※ p mole/lobe

El の痙攣発作後における脳内 ME, VIP 濃度の経時的変化：脳部位別 ME 濃度；El(+) に比べ、El(+-0h)で、CN と Hip に有意の濃度減少が認められ、CN では痙攣後 9 時間まで低値を示していた (Fig.1-A)が、その他の部位では変化は認められなかった。脳部位別 VIP 濃度；El(+) に比べ、CN の部位で、El(+-3h) に有意の低値を示した。また、Hypで El(+-9h) に有意の高値を示しその値は、El(-) の値にほぼ等しく、これらの変化は ME の場合と異なっていた。また、その他の部位、時間では変化は認められなっかた(Fig.1-B)。

Table 2　Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity of various brain regions in ddY, El(-) and El(+)

Brain region	VIP-like immunoreactivity (ng/g w.w.) ddY	El(-)	El(+)
Frontal cortex	40.5 ± 2.2 (11)	40.2 ± 2.3 (24)	43.9 ± 1.6 (17)
Caudate nucleus	19.6 ± 2.2 (12)	15.4 ± 1.0 (21)	11.3 ± 1.0[b] (16)
Hypothalamus	76.3 ± 4.9 (12)	87.5 ± 5.6 (17)	61.7 ± 3.9[c] (16)
Hippocampus	30.0 ± 1.6 (18)	25.9 ± 1.5 (24)	24.8 ± 1.1 (17)
Brain stem	10.1 ± 0.9 (16)	15.6 ± 0.7[a] (18)	14.7 ± 0.6 (16)
Pituitary※	379 ± 37 (12)	379 ± 33 (17)	284 ± 45 (15)

Each value is the mean ± SEM with the numbers of experiments in parentheses.
Levels of significance were calculated using Student's t-test:
[a]$P < 0.001$; compared with ddY. [b]$P < 0.01$, [c]$P < 0.001$; compared with El(-)
※ pg/lobe

ddY の電気刺激に伴う痙攣と脳内 ME, VIP 濃度の経時的変化：脳部位別 ME 濃度；CN で痙攣後 9 時間目に、また Hyp では、痙攣中および後、1 時間、9 時間目にそれぞれ有意の濃度上昇を示した。脳部位別 VIP 濃度；Hyp で痙攣中に、Hip で痙攣後 1 時間、9 時間目に、それぞれ有意の低値を示した(Table 3)。

【考察】

脳内の opiate peptides の濃度が実験的全身痙攣に伴い変化することが知られているが、近年、opiate peptides 以外の数種の neuropeptides も痙攣後に脳内で濃度変化を示すことが知られ、neuropeptides と痙攣との関連性が注目されている。

El(-) の CN と Hip の部位で、ME 濃度が ddY に比べ有意に低く、しかもこれらの部位で、痙攣中 [El(+-0h)] に ME 濃度が、El(+) よりも減少すること、また、El(+) において CN で ME 濃度が上昇していることなどから、CN, Hip で ME が痙攣発生機構と密接に関係しているものと思われる。

VIP 濃度は、El(-)において、BS で ddY に比べ有意に高値を示していたが、痙攣に伴う変化は認められなかった。ddY と比べ差の認められない El の Hyp の部位で痙攣後 9 時間目に El(+) よりも高値を示したこと、また、ddY に比べ低値の傾向を示している El の CN と Hip の部位の内、CN では痙攣後、3 時間目に著しい濃度低下を示し、9 時間目には El(-) とほぼ等しい値を示したのに対し、Hip では、痙攣に伴う変化は認められないこと

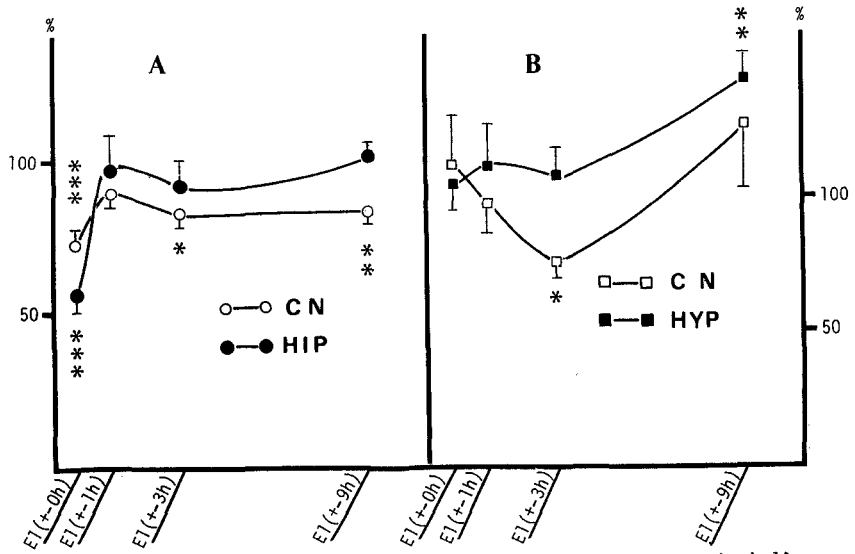


Figure 1 Time course of changes in several brain regional met-enkephalin-like(A) and vasoactive intestinal polypeptide-like(B) immunoreactivity levels of El mice after seizures induced by stimulations of throwing up. The values are presented as percentage of the respective El(+) group ± SEM of 4~6 mice. Levels of significance were calculated using Student's t-test: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. CN: caudate nucleus, HIP: hippocampus, HYP: hypothalamus

などから、VIP もやはり El の痙攣と密接な関係があり、しかもその作用は、ME の場合と異なるものと思われる。一方、ddY において、電撃発作後に、ME 濃度が脳のほぼすべての部位で上昇する傾

Table 3 Time course of changes in several brain regional met-enkephalin-like and vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity levels after ECS

		Brain region					
	Time(h)	Frontal cortex	Caudate nucleus	Hypothalamus	Hippocampus	Brain stem	Pituitary
ME-like	Cont	504 ± 17	5120 ± 300	1450 ± 49	355 ± 38	880 ± 93	2700 ± 130
(p mole/g w.w.)	0	531 ± 44	5580 ± 180	1910 ± 190*	404 ± 34	1080 ± 120	3380 ± 640
	1	560 ± 46	5370 ± 230	1980 ± 200*	363 ± 14	1120 ± 110	2950 ± 420
	9	549 ± 49	6100 ± 340*	1910 ± 122*	446 ± 17	1130 ± 100	2690 ± 390
VIP-like	Cont	55.6 ± 4.9	24.8 ± 2.4	95.2 ± 13.0	38.0 ± 1.5	16.7 ± 1.7	329 ± 39
(ng /g w.w.)	0	61.6 ± 6.6	33.0 ± 3.9	56.2 ± 6.5*	38.6 ± 3.4	16.8 ± 0.8	342 ± 55
	1	58.1 ± 3.4	27.9 ± 3.2	87.3 ± 9.7	30.0 ± 2.5*	18.2 ± 0.4	297 ± 40
	9	61.3 ± 5.7	29.8 ± 5.3	110 ± 14	32.8 ± 1.4*	17.4 ± 1.5	275 ± 66

ECS was performed every four day. ddY mice were decapitated 0,1, and 9 hour after the fourth ECS. Each value is the mean ± SEM of 5~7 mice. Levels of significance were calculated using Student's t-test: $^{*}P < 0.05$

向を示し、特に、Hyp で発作中より有意の高値を示し、また VIP 濃度は、Hip で発作後に低値を示すなど、これらの変化は、El の痙攣に伴う変化と明らかに異なっており、痙攣と neuropeptidesとの相関性を知るうえで興味ある結果と思われる。

【 文献 】 (1)Cain,D.P. & Corcoran,M.E.(1985) Brain Res. 338, 327-336. (2)Elazar,Z. et al.(1982) Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol. 54, 91-95. (3)Frenk,H. et al.(1978) Science 200, 335-337. (4)Glowinski,J. & Iversen,L.L.(1966) J.Neurochem. 13, 665-669. (5)Henriksen,S. et al.(1978) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 75, 5221-5225. (6)Hong,J.S. et al.(1979) Brain Res. 177, 273-278. (7)Iadrola,M.J. et al.(1986) Brain Res. 365, 185-191. (8)Kanamatsu,T. et al.(1986) J.Neurosci. 6, 644-649. (9)Lason,W. et al.(1983) Neuropeptides 3, 399-404. (10)Lee,R.J. et al.(1983) Life Sci. 33, 567-570. (11)Meyer,D.K. et al.(1986) Neurosci. Letters 69, 208-211. (12)Vindrola,O. et al.(1981) Neurosci. Letters 26, 125-130.

199. 熱侵害刺激に伴うラット後肢足蹠皮下灌流液中でのsubstance P遊離および熱浮腫に対するopioidsの影響

米原典史・今井康夫・渋谷　徹*・
猪木令三　（大阪大・歯・薬理, 麻酔*）

〔要　約〕

一次細径求心性線維の中枢端と末梢端の間の機能的差異について検討するため、二重同軸灌流法を用い、熱侵害刺激時、ラット後肢皮下灌流液中に遊離されるsubstance P（SP）および熱浮腫に対するopioids、opioid peptideの影響について調べた。

1．熱侵害刺激（47℃）により、著明なSP遊離増加ならびに浮腫が観察された。

2．この熱侵害刺激に伴うSP遊離増加は、morphine（μ agonist）およびethylketocyclazocine（κ agonist）の局所投与（動脈内投与）により投与量に依存して抑制された。これらのopioidsの抑制効果は、各opioid受容体サブタイプに特異性を有する拮抗薬、N-methyl levallorphan（末梢性μ antagonist）およびWin 44,441-3（κ antagonist）の前処置により有意に拮抗された。内因性opioid peptideの類似体である[D-Ala^2,Met^5]enkephalinamideの動脈内投与もまたSP遊離増加を抑制した。

3．熱浮腫は、SP遊離と同様、opioids動脈内投与により著明に抑制され、その効果は拮抗薬により阻害された。以上の結果は、一次細径求心性線維の末梢端に、中枢端と同様opioidsの作用部位が存在すること、本部位の活性化は、侵害刺激に伴うSP遊離の抑制を惹き起こし、その結果炎症反応の調節を行っていることを示唆している。

Key word： substance P, opioid and opioid peptide, edema.

一次細径求心性線維は、後根神経節内に細胞体を有する双極性ニューロンであり、一端は脊髄後角に投射し痛み感覚を中枢に伝え、他方は末梢に投射している。一次細径求心性線維の遠心性作用に関し、Goltz（1）およびStricker（6）らは、すでに100年以上前に一次細径求心性線維の刺激により血管拡張、血管透過性亢進等の炎症反応が惹き起こされることを報告している。1927年 Lewisらにより（4）、一次細径求心性線維の刺激に伴う炎症反応は神経末端より遊離される因子によって惹起される可能性が示唆され、それ以来数多くの物質が提唱されてきた。1953年 Lembeckは（5）、substance P（SP）が一次細径求心性線維の伝達物質であるとの仮説を提出した。以後この仮説は、免疫組織化学、薬理学、生化学の幅広い領域の研究により支持されつつある。我々は、一次細径求心性線維に含まれるSPの生理的意義を解明する一端として、ラット後肢同軸灌流法を用い、熱侵害刺激時、一次細径求心性線維末端よりSPが遊離されること、この遊離SPが熱炎症反応に密接に関与することを明らかにし本学会において報告した（7）。また雄性家兎を用い、in vivo 実験より歯髄電気刺激に伴い三叉神経脊髄路核尾側亜核浅層領域（一次細径求心性線維の中枢端）よりSPが遊離されること、このSP遊離がopioids およびopioid peptideによって抑制されることを見い出し、一次細径求心性線維の中枢端には痛み刺激に伴うSP遊離を調節するopioidの作用部位が存在することを報告した（8）。本研究は、一次細径求心性線維の中枢端と末梢端の間の機能的差異について検討を行う目的で、熱侵害刺激時、遊離されるSPおよび熱浮腫に対するopioids およびopioid peptideの影響について調べた。

〔実験方法〕

1．ラット足蹠皮下灌流：体重 120～150 g SD系雄性ラットを用い、urethane麻酔後後肢足蹠皮下に二重同軸チューブを大腿外側より脛足根骨関節の靱帯下を通し挿入、その尖端を足背皮下に到達させた。細径チューブよりbestatin（3 mg/100 ml 生理食塩水）を含む灌流液を1 ml/10 min の流速にてperistaltic pumpでpushし、太径チューブ（直径4 mm）より滴下液を10分間隔で氷冷下採集した。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．薬物投与：薬物は生理食塩水に溶解後、腹腔内投与（全身投与）ならびに動脈内投与（局所投与）の2通りの方法により投与した。腹腔内投与は刺激開始30分前に行った。動脈内投与は、灌流側足蹠とは反対側のcommon iliac artery に挿入したポリエチレンチューブを介し灌流側足蹠へ0.1 ml/200 secの流速で刺激10分前から刺激終了まで、40分間持続注入を行った。

3．炎症反応：炎症反応は、足蹠容積測定装置（MK-500、室町機械、東京）を用い経時的に測定し、次式より浮腫率を求めた。（S post－S pre）／S pre × 100；S post およびS pre は、それぞれ熱刺激後、刺激前の足蹠容積を示す。

〔実験結果〕

1．熱侵害刺激に伴う足蹠灌流液中へのSP遊離ならびに熱浮腫：灌流開始直後、高いSPレベルが観察され、以後急激に減少し、30分後にはほぼ一定値を示した。熱侵害刺激に伴い著明なSP遊離増加が観察された。刺激前および刺激中の各々3 fraction（1 fraction /10 min）に遊離されたSP量の1 fractionあたりの平均値は、2.18±0.3 fmole および 35.96±2.4 fmole/10 minであった。足蹠容積の変動はSP遊離量の変動と平行し、熱侵害刺激に伴い著明な浮腫が観察された。　2．熱侵害刺激に伴うSP遊離に対するopioids、opioid peptide の動脈内投与による影響：morphine（μ agonist 、10～100 μmole/kg)およびethylketocyclazocine (EKC)（κ agonist、30～100 μmole/kg)は投与量に依存し熱侵害刺激に伴うSP遊離を抑制した。morphine、EKC のSP遊離に対する抑制効果は、それぞれN-methyl levallorphan（末梢性μ antagonist、10 mg/kg i.p.)およびWin 44,441-3（κ antagonist、10 mg/kg i.p.）の前処置により拮抗された（図1、図2）。[D-Ala^2,Met^5] enkephalinamide(μ、δ agonist、100 μmole/kg)もまた熱侵害刺激に伴うSP遊離増加を抑制した（図3）。今回検討されたopioids、opioid peptide のSP遊離抑制作用の強さは、EKC > [D-Ala^2,Met^5] enkephalinamide > morphine の順であった。　3．熱侵害刺激に伴う浮腫に対するopioids の動脈内投与の影響：morphineおよびEKC は熱侵害刺激に伴う浮腫を著明に抑制した。これらopioids の浮腫抑制作用は、SP遊離の場合と同様、N-methyl levallorphan およびWin 44,441-3により著明に拮抗された（図4、図5）。

〔考察〕

一次求心性線維は、後根神経節内に細胞体を有し脊髄後角と末梢に神経終末を投射する双極性ニューロンである。最近の免疫組織化学は、SPが一次求心性線維、特に細径神経の中枢端のみならず末梢端にも分布していることを明らかにしている（3)。疼

痛刺激に対応して一次細径求心性線維の中枢端からSPが遊離されること、このSP遊離が鎮痛作用を有するopioids、opioid peptide により抑制される等の事実より、中枢端に存在するSPは痛覚情報伝達の役割を担っているのではないかと考えられている(2)。一方末梢端に存在するSPの生理作用に関し、我々は、後肢同軸灌流法を用い、侵害刺激に伴い中枢端と同様末梢端でもSPが遊離されること、このSP遊離が炎症反応に密接に関与していることをすでに報告している(7)。本研究において、熱侵害刺激に伴うSP遊離が、opioids、opioid peptide の局所投与により抑制され、これらopioidsの抑制作用が、各opioid受容体サブタイプに特異性を有するantagonistにより拮抗されたことは、一次細径求心性線維末梢端にも数種類のopioid受容体が存在することを示唆している。特にmorphineの抑制作用が、構造式中に4級窒素を含み、blood brain barrier を通過しがたいN-methyl levallorphan により拮抗されたことは、末梢端でのopioid受容体の存在を強く示唆するものである。加えて、opioids がSP遊離の抑制と平行して浮腫も抑制したことより、一次細径求心性線維末梢端に存在すると考えられるopioid受容体の活性化は、侵害刺激に伴うSP遊離増加の抑制を介し、炎症反応の調節に関与しているものと思われる。

〔文献〕

1) Goltz, F. (1874) Pflügers Arch. Ges. Physiol. 9, 174-197
2) Henry, J. L. (1980) Trends in Neurosciences 3, 95-97
3) Hökfelt et al. (1975) Brain Res. 100, 235-252
4) Lewis, T. et al. (1927) Heart 14, 27-46
5) Lembeck, F. (1953) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmakol. 219, 197-213
6) Stricker, S. (1876) Sitz.-Ber. Kaiserl. Akad. Wiss. (Wien) 3, 173-185
7) 米原典史, 他 (1986) 神経化学 25, 184-186
8) Yonehara, N. et al. (1986) Eur. J. Pharmacol. 129, 209-216

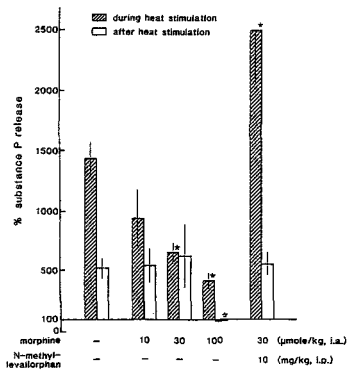


図1．Morphine動脈内投与による熱刺激に伴うSP遊離への影響

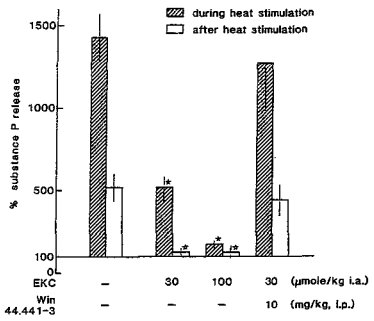


図2．Ethylketocyclazocine (EKC)動脈内投与による熱刺激に伴うSP遊離への影響

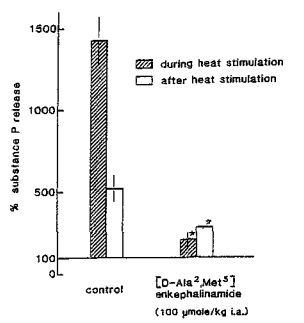


図3．[D-Ala²,Met⁵] enkephalinamide 動脈内投与による熱刺激に伴うSP遊離への影響

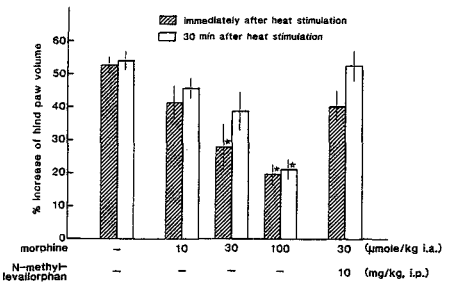


図4．Morphine動脈内投与による浮腫に対する影響

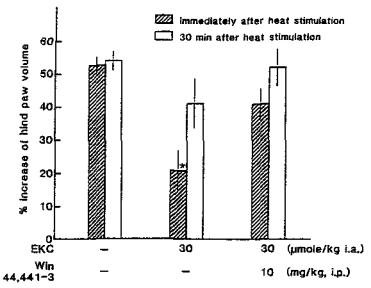


図5．Ethylketocyclazocine (EKC)動脈内投与による浮腫に対する影響

200. ラット新生児酸素欠之症の脳内コレシストキニンニューロンに及ぼす影響

山本秀子・山本敏文*・加藤　武

（東京工大・生命化学，三菱化成生命研*）

〔要　約〕

ラット新生児に酸素欠乏を経験させると成長過程において一過性の運動量の昂進と迷路学習能力の低下を起こすことがしられている。ラット新生児を無酸素下25分置き1ケ月及び3ケ月後に断頭し、脳内コレシストキニン及びベンゾジアゼピン受容体をradio binding assayによって測定した。生後1ケ月のラットではコレシストキニンに対する解離定数（Kd）に変化はみられなかったが、側坐核の最大結合数（Bmax）が増加した。一方、生後3ケ月のラットでは前大脳皮質のBmaxが有意に減少し、同じくKd値は変化しなかった。これに対し、ベンゾジアゼピン受容体のBmax値に変化は見られなかったが、生後1ケ月のラットで扁桃体のKd値はわずかに減少した。側坐核は自発運動と深く関係する処であり、またコレシストキニンとドーパミンが単一ニューロンに存在する事が報告されている。此処で受容体数が増加する事と新生児酸素欠乏症による自発運動量増加との関連が推測された。また、前大脳皮質は特にassociate learningと関連し、此処での受容体数減少が学習能力の低下に何らかの役割を果たしている可能性があることが示唆される。

Key word：

Neonatal anoxia, Cholecystokinin receptor, Rat brain

出生後または分娩時の酸素欠乏が学習能力の低下や情緒障害等を含む脳機能に影響を及ぼす事はよく知られている。またこの酸素欠乏がAttention deficit disorderの惹起因子である可能性も指摘されている。そこで我々はHershkowitzら（2）の報告した実験的新生児酸素欠乏症ラットの脳内コレシストキニンオクタペプチド（CCK-8S）量を測定し、生後1ケ月及び2ケ月半の大脳辺縁系では減少するが、海馬、黒質では変化しないこととドーパミン、セロトニン、ノルエピネフリン、それらの代謝物含量も変化しない事をみいだした（7）。これは低酸素に長時間さらした動物ではTyrosine hydroxylaseとTryptophan hydroxylaseの活性が低下する事が報告されているが、完全な無酸素にさらした場合には、全脳での神経アミンは変化しないという報告と一致する。しかし、Hershkowitzらによるとラットの行動異常特に運動量昂進は生後20-25日に頂点に達し、以後正常に戻る。仮に新生児酸素欠乏によるCCK-8S量の低下がこれらの行動異常に関連するならば、CCK-8S量の回復が期待されるがこの低下は成獣でもみられる事より、CCK-8Sに対する受容体の異常が考えられた。また脳内ベンゾジアゼピン受容体はγ-アミノ酪酸（GABA）のClイオンチャンネルとの共存が知られており、大脳皮質と海馬に存在するコレシストキニンニューロンはすべてGABAを含む事等より、ベンゾジアゼピン受容体の測定も同時に行なった。

【方法】　妊娠Sprague-Dawleyラットより得た生後1日以内の仔を窒素気流下に25分静置後、1ケ月、3ケ月まで飼育し、測定に用いた。断頭後、直ちに脳を取りだし、氷上で部位分けを行ない、－70℃で保存した。

CCK-8Sの受容体結合実験はSaitoらの方法（4）を一部、改変して行なった。組織を

20容量の氷冷 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 でホモジナイズし20,000xgで20分間遠心分離した。得られた沈査を同一bufferで3回洗浄し、最終沈査を1 mg/ml になるように懸濁し、受容体標品とした。[^{125}I] Bolton-Hunter CCK-8S (10-500pM) をリガンドとして用いた。標品とリガンドは 1mM EGTA, 0.25mg/ml バシトラシンを含む、200 μlのKrebs-HEPES buffer (130mM NaCl, 4.7mM KCl, 5mM $MgCl_2$,10mM HEPES, pH 6.5)に懸濁し、非特異吸着を避けるためにマイクロタイタープレート中、25℃で 2時間インキュベートした後、Schleicher and Schuell #30グラスフィルター上に吸引ろ過し、洗浄後γカウンターで測定した。1 μM CCK-8S 存在下の放射活性を非特異結合として CCK受容体の解離定数 (Kd) と最大結合数 (Bmax) を Scatchardの方法で求めた。なお、対照群として同一条件下にて飼育したラットを用い、Student's t-test , paired t-test にて検定を行なった。ベンゾジアゼピン受容体結合実験はMohlerらの方法(3) に従って行なった。リガンドとして [^{3}H] Ro 15-1788 を用いて、受容体標品と共に 200μlのKrebs-Tris buffer (118mM NaCl, 4.8mM KCl, 1.2mM $CaCl_2$, 1.2mM $MgCl_2$, 15mM Tris-HCl buffer, pH7.4) 中で 0℃、60分インキュベートし、#30 グラスフィルター上にろ過した後、洗浄し、液体シンチレーションカウンターで測定した。非特異結合は1 μMの Clonazepam の存在下で測定した。計算は CCK 受容体と同様に行なった。

Table 1. Effects of neonatal anoxia on the binding of [125I](BH)CCK-8 to membranes of the rat brain at 28 days of age.

	Control		Anoxia	
	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)
Frontal cortex	0.186±0.015	33.5±4.2	0.222±0.054	32.2±4.5
Nucleus Accumbens	0.212±0.005	29.7±9.8	0.355±0.084	37.0±11.6**
Striatum	0.254±0.033	19.4±2.2	0.277±0.033	17.6±1.7
Amygdala	0.208±0.032	16.3±1.6	0.432±0.141	22.6±1.7
Hippocampus	0.246±0.088	6.43±1.43	0.430±0.147	8.78±1.86

The Bmax and Kd values were determined by Scatchard analysis of [125I](BH)CCK-8 binding. The values represent the means ± S.E.M. of 3 experiments with 5-6 animals per experiment. Statistical comparisons were determined by paired t-test. **, $p<0.01$.

Table 2. Effects of neonatal anoxia on the binding of [125I](BH)CCK-8 to membranes of the rat brain at 84 days of age.

	Control		Anoxia	
	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)
Frontal cortex	0.208±0.019	33.2±1.9	0.174±0.039	23.0±0.1*
Nucleus accumbens	0.256±0.049	43.7±11.5	0.342±0.146	39.1±13.9
Striatum	0.196±0.023	30.2±3.2	0.238±0.057	27.3±1.8
Amygdala	0.427±0.256	31.3±10.7	0.325±0.168	16.9±3.9
Hippocampus	0.378±0.110	8.92±0.48	0.293±0.109	8.79±3.66

The Bmax and Kd value were determined by Scatchard analysis of [125I](BH)CCK-8 binding. The values represent the means±S.E.M. of 3 experiments with 5-6 animals per experiment. Statistical comparisons were determined by Student's two-tailed t-test or paired t-test. *, $p<0.05$.

【結果と考察】 表1には新生児ラットの酸素欠乏処置が生後1ケ月の脳内 CCK受容体に及ぼす影響を示した。受容体の親和性は処置群と対照群とで変化はみられなかったが、受容体数は側坐核においてのみ有意に上昇した。側坐核内に投与されたコレシストキニンは、ドーパミンのアゴニストであるアポモルフィン投与によりひきおこされる運動量増加を押さえる(6) と報告されているが、側坐核内の部位によっては増加させる(1) という報告もある。また側坐核は下位運動中枢を通じて自発運動に影響を及ぼすとされる(5)。新生児酸素欠乏症が幼若ラットまたは成獣の大脳辺縁系のCCK-8S含量を低下させる事(7) と、今回の側坐核のCCK 受容体数の増加を考え合わせると、側坐核における一過性の CCK受容体のup-regulation がラットの一過性の運動量昂進

に関与している可能性が考えられる。　次に此の処置が3ケ月令のラット脳内受容体に及ぼす影響を表2に示した。CCK受容体の親和性は1ケ月令と同様に変化はみられなかったが、前大脳皮質の受容体数が処置群で低下した。前大脳皮質は複雑な学習に重要な意義を持つ部位とされている。新生児酸素欠乏症ラットは迷路学習能力の低下を示す事が報告されており(2)、この部位で CCK-8S 含量の減少(7) と CCK受容体数の低下は CCKニューロンが学習機能に関連する可能性が考えられ、今後更に検討する必要があると思われる。

最後に此の処置が1ケ月3ケ月令の脳内ベンゾジアゼピン受容体の及ぼす影響について示した。受容体の親和性及び受容体数はほとんど変化しなかったが、1ケ月令の扁桃体でわずかにKd値が低下した。ベンゾジアゼピン受容体は不安とも関係し、興味深いがここではあまり意味を持たないのではないかと考えられる。

Table 3.　Effects of neonatal anoxia on the binding of [3H] Ro 15-1788 to membranes of the rat brain at 28 days and 84 days of age.

		Control		Anoxia	
	age (day)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)
Frontal cortex	28	0.674±0.069	1520±263	0.630±0.085	1519±159
	84	0.749±0.083	1708±375	0.665±0.102	1425±234
Nucleus accumbens	28	0.708±0.030	735±125	0.585±0.036	735±92
	84	0.705±0.036	705±101	0.627±0.059	669±133
Striatum	28	1.011±0.120	470±75	0.801±0.061	444±35
	84	0.786±0.079	444±49	0.698±0.080	473±46
Amygdala	28	0.868±0.026	874±198	0.713±0.047*	919±170
	84	0.749±0.013	969±239	0.704±0.014	835±167
Hippocampus	28	0.741±0.030	1117±412	0.760±0.021	1363±392
	84	0.768±0.031	1224±327	0.742±0.009	1274±361

The Bmax and Kd values were determined by Scatchard analysis of [3H] Ro 15-1788 binding. The values represent the means ± S.E.M. of 3 experiments with 5-6 animals per experiment. Statistical comparisons were determined by Student's t-test. *, $p<0.05$.

以上のことから、新生児期の酸素欠乏症は幼若ラットに一過性の CCK受容体の up-regulationをもたらし、一過性の運動量増加に関与している可能性が示唆された。

【文献】

1. Crawley, J.N., Hommer, D.W. and Skirboll, L.R.(1985) Brain Res. 335, 337-341.
2. Hershkowitz, M., Grimm, V.E. and Speiser, Z.(1983) Dev.Brain Res. 7, 147-155.
3. Mohler, H., Burkard, W.P., Keller, H.H., Richards, J.G. and Haefely, W. (1981) J.Neurochem. 37, 714-722.
4. Saito, A., Goldfine, I.D. and Williams, J.A.(1981) J.Neurochem. 37, 483-490.
5. Swerdlow, N.R., Swanson, L.W. and Koob, G.F.(1984) Brain Res. 306,141-148.
6. Van Ree, J.M., Gaffori, O. and De Wied, D.(1983) Eur.J.Pharmacol. 93, 63-78.
7. Yamamoto, H.and Kato, T.(1986) Dev.Brain Res. 268, 285-288.

201. 螢光法によるEnzyme-linked immunosorbent assayを用いたcholecystokinin-octapeptide sulfateの免疫活性測定
——Rat 線条体におけるキノリン酸破壊の影響——

滝田正寿・加藤　武　（東京工大・生命化学）

〔要　約〕

今回、蛍光法による Enzyme-Linked Immunosorbent Assay（Fluorometric ELISA）を用いた Cholecystokinin-octapeptide sulfate 様免疫活性（CCK8sIR）測定法を確立した。固相化抗原作製法として、牛血清アルブミンに CCK8s をグルタールアルデヒド法で架橋した抗原をもちいた（CCK8s-BSA）。この結果マイクロプレートへ高収率かつ安定に吸着させることが可能であった。固相化 CCK8s-BSA と試料中の CCK8sIR は抗体と競合的に結合するが、プレート上に結合した抗体を peroxidase 標識第二抗体と反応させ peroxidase 活性を蛍光基質を用いて測定し CCK8s の定量を行った。検出感度は 5pg/well であった。CCK8s と CCK4 又は CCK non-sulfate との交差反応は 50% 阻害においてそれぞれ 2% と 3% であった。本法は高感度かつ CCK8s に対し特異性が高いことが認められた。intra-及びinterassayの変動係数はおのおの 3.2 - 6.05%, 4.1 - 7.7%であった。

本法の有用性を検討する目的で、一側性にキノリン酸（100μg/0.5μl/10min）を線条体へ注入し、4日後 CCK8sIR を測定した。健側に対し線条体で 113%、黒質で 97% 増加したが内側前頭葉皮質、外側前頭葉皮質、側座核、扁桃体では変化がなかった。今後この方法を用いて神経科学的な研究を更に進めていく。

Key word : Fluorometoric ELISA, Cholecystokinin-octapeptide sulfate, Quinolinic acid.

種々の生体成分の微量分析として、Radioimmunoassay（RIA）の占めてきた位置は大きい。測定試料数が多くなると放射能汚染問題が大きい　測定装置は高価等様々な制約が随伴する。一方近年開発された Enzymeimmunoassay（EIA）は放射性物質を使用することなくRIAと同程度の感度が得られ RIA に伴う問題を解消するものである。CCK8s は脳神経系に多く存在し、その機能について、近年様々な知見が集積されながらもその生理的意義には不明な点が多い。これを解明するためには CCK8s の微量分析が必要とされる。第 27 回日本神経化学会において山本らは、比色法を用いた CCK8sIR の ELISA を報告した(5)。今回我々は、固相化抗原の別途作製法を行い、また酵素活性測定に蛍光法を用いた結果高感度かつ簡便な CCK8sIR の ELISA を確立したので報告する。

キノリン酸（Quinolinic acid: QUIN）は、トリプトファンの代謝産物であり生体内に存在することが知られている。また、グルタミン酸様受容体を介した神経過剰興奮による細胞破壊を行うが、Somatostatin や Neuropeptide Y の様に NADPH - diphorase を含む神経を破壊しないといわれている(2)。線条体には CCK8s の上行性及び下行性ニューロンが存在すると言われている。QUIN をラットの線条体へ一側性に微量注入し、この測定法を用いて脳内CCK8sIR の変化を計測した。

［方法］

実験には 170 - 200g の Wistar 系雄性ラットを用いた。QUIN（100μ/0.5μl/10min）を一側性に線条体（Anterior to bregma,0.2mm; Lateral,right3.0mm; Ventral,5.5mm）注入した。4 日後断頭し 5 秒間液体窒素に浸した後全脳を取り出し -70℃ の冷凍庫内で保存した。次にミクロトームを用いて 450μm の連続切片を作製し、コールドボックス（-2

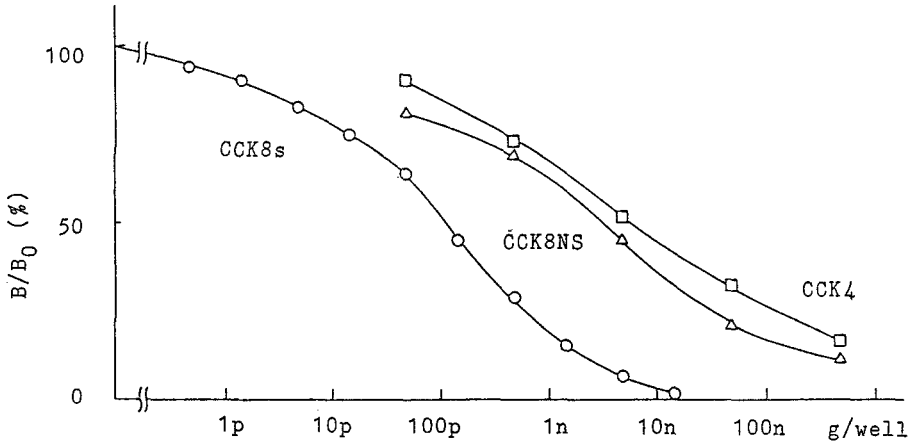


Fig.1 Standard curve of ELISA for CCK8s,CCK4 and CCK8NS.

0℃）において、内側前頭葉皮質、外側前頭葉皮質、側坐核、線条体、扁桃体、黒質をアトラスに従いパンチアウトもしくはマイクロナイフで切り出した。脳組織は、氷上 90%メタノール中超音波破砕し、1000xg上清を減圧乾固して保存した。

測定操作；<1> 固相化抗原の作製； CCK8s 50μgに 100μlの BSA 1mg/ml 10mM リン酸緩衝液 pH7.4と 10μl の 0.5% Glutaraldehyde を加え 15 分間かくはんした。次に 875μl の 10mM リン酸緩衝液 pH7.4 と 10μl の 10%NaN_3 溶液を加え一晩 4℃ で放置した。放置後 5μl の 10mM lysine を加えて反応を終了した。 <2> 抗原固相化マイクロプレートの作製； <1>で作製した固相化抗原液を 10mM リン酸緩衝液 pH7.4 で 1万倍希釈し、CCK8s として 5ng/ml の溶液とした。この溶液をマイクロプレート（ Nunc immunoplate 1, 96穴）中に 50μl/well ずつ分注し、室温で 3 時間放置後、Assay Buffer【10mM リン酸水素化二ナトリウム，1mM EDTA-2Na，0.9% NaCl，0.05% Tween 20(v/v)】で洗浄した。次に 1% BSA-Assay Bufferを満たし 4℃ で2時間放置後、Assay Bufferで一度洗浄した。

<3> 試料測定 保存しておいた試料に 1 万倍希釈抗体(抗血清からの希釈率 5.5 万倍)を加え、4℃で 1 時間反応させた。ここから 50μl ずつマイクロプレートに分注し、16 時間から 20 時間反応させた。反応後洗浄し、peroxidase 結合抗兎 IgG(山羊)を室温で 3 時間反応させた。これを 50mM Tris-HCl pH 7.6 で洗浄し、固相上のperoxidase活性を測定した。基質には 0.1% p-cresolと 0.05% H_2O_2 を含んだ 10mM リン酸緩衝液を用い、室温で一時間反応後 0.5N NaOH と 5% NaN_3 を含む溶液 30μl を加えて反応を停止させ、300μl の 10mM リン酸緩衝液 pH8.2 を加えた(4)。反応液は Ext.324nm， Em.415nm でその蛍光強度を測定した。蛋白測定は lowry 法に依った。

［結果と考察］

前回用いた poly-L-Glutamic acid (poly-GLU) と CCK8s のカルボジイミド法による固相化抗原は、3 日程透析した上凍結乾燥しなければならなかったが、今回の固相化抗原作製法は操作法が簡便で再現性もよかった。また、前回と比較し約 300 倍高収率であった。固相化抗原として、CCK8s-poly-GLU は 2ヶ月未満で劣化したが、CCK8s - BSA は3ヶ月以上使用可能であった。前法では比色濃度が薄いと色素が分解されやすく、逆に酵素反応が進み過ぎて比色濃度が濃くなると感度が落ち、操作に経験が必要であった。本法ではこ

の蛍光物質が安定な為その様な問題はなく、24時間以内測定可能であった．また CCK 4と CCK8 non-sulfate との交差性は 50% 阻害でそれぞれ 2% と 3% とであった。最少検出感度は 5pg/well であった (Fig.1)。再現性は intra- 及び interassay の変動係数がおのおの 3.2 - 6.05% ,4.1 - 7.7% であった。

キノリン酸を一側性に線条体へ注入した4日後、線条体内の CCK8sIR は健側と比較して 112% 増加した。黒質においても 96% 増加していたが他の部位では著しい変化傾向は認められなかった (Fig.2)。線条体自体には CCK 神経の細胞体は少なく、大脳皮質、特に梨状葉、前障、海馬、扁桃体からの投射を受けていると言われている (6)。また黒質、腹側被蓋野からも投射があり、これらは Dopamine と CCK8s が共存していると言われている (1)。今回の実験からも線条体に存在する CCK8s の大部分が神経終末由来であることを示唆した。内側前頭葉皮質、外側前頭葉皮質、扁桃体では CCK8sIR の変化はなく黒質で増加したのは興味深く、今回得られた結果は線条体－黒質路を通過する神経繊維の影響を反映していると推測できる。一方、同様な実験を行い線条体での DOPAC/DA が増大した報告がある (3) が、線条体における DA と CCK8s の関係は肯定するものと否定するものがあり、どの様な機構で今回の結果が得られたのか検討する必要がある。

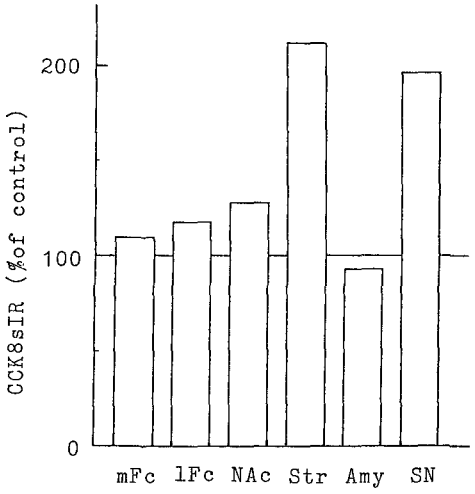


Fig.2 Concentration of CCK8sIR at 4days after infusion of QUIN 100μg into right striatum.
Values are expressed as percentage differences from those detected in the intact control side. The mean control value of CCK8sIR content(ng/mg protein)are mFc;medial Frontal cortex 3.27,lFc;lateral Frontal cortex 3.0,NAc;Nucleus Accumbens 4.0, Str;Striatum 2.13,Amy;Amygdala 4.05, SN;Substantia nigra 1.0. n=2

[参考文献]

(1) Hokfelt, T.et al. (1980) Neurosci. ５,2093

(2) Koh, J.-Y., Peters, S. and Choi, D. W.(1986) Science ２３４,73-76

(3) Mazzari,S. et al. (1986) Brain Res. ３８０,309-316

(4) 野口拓郎　樋口輝彦　五十嵐良雄　渡辺倫子　永木茂　加藤進昌(1984)精神分裂病の生物学的成因及び病態に関する研究　昭和 58 年度報告書　79 - 109

(5) 山本秀子　恵美安裕　加藤武　(1984) 日本神経化学会　２３,394-396

(6) Zaborszky, L. et al. (1985) Neurosci. １４,2,427-453

202. Capsaicin処理によるsubstance Pの枯渇と自律神経反射機構

高野行夫・永島　亮・樋口義信・神谷大雄・
黒澤美枝子*・佐藤昭夫*
（福岡大・薬・薬理，都老人研・生理*）

〔要　約〕

Capsaicin(8-methyl-N-vanillyl-6-nonamide)は一次知覚神経の無髄性神経のC線維を非可逆的に変性することが知られている。今回の実験は、capsaicin(50mg/kg s.c.)を生後2日目に投置したラットを用いて、まず中枢各部位のsubstance P様免疫活性(SP-LI)含量に及ぼす影響を調べた。その結果、一次知覚神経終末部にあたる脊髄後角(dorsal horn:DH)や延髄・三叉神経脊髄路核(spinal trigeminal tract and nucleus:TSV)、また迷走神経(X)や舌咽神経(IX)の末部にあたる孤束核(nucleus tractus solitarii:NTS)で、対照群に対して40～50%にSP-LI含の有意な減少が認められた。そこでこれら求心性神経にかかわりの深い、圧受容器および化学受容器反射や体性－自律神経反射に及ぼすcapsaicin処置の影響を、腎臓交感神経活動(renal nerve activity:RNA)、血圧(BP)および拍数(HR)を指標にして調べた。その結果、いずれの自律神経反射においてもcapsaicin処置の効果は認められなかった。以上のことから、capsaicinによってSPを含む求心性神経の一部が変性した後でも、これら求心性神経を介した自律神経反射の機能は維持されていることが示唆された。

Key word： substance P, nucleus tractus solitarii, autonomic nervous system.

Capsaicinはハンガリー産赤コショウの辛味成分で、新生ラットに処置すると一次知覚神経無髄性神経であるC線維が非可逆的に変性することが知られている。そしてcapsaicinは、主求心性神経終末部位においてsubstance P(SP)などの神経性ペプチド含量を減少させる。一方SPは中枢神経系の黒質、延髄の孤束核や脊髄の後角などに密に分布し、その生理的役割が注されている(3～6)。そこで今回、新生ラットにcapsaicin(50mg/kg)を皮下投与し、SP含量の少とそれに伴う自律神経系の反射機構への影響を調べ、検討した。

【実験方法】

[1] capsaicinの投与法：　capsaicinの投与はGamse(2)の方法に従い行った。即ちcapsaicは10%ethanolおよび10%Tween80を含むsalineに溶解し、生後2日目のWistar系ラットに50mg/皮下投与した。同時にcapsaicinの溶媒をvehicleとして同様の方法で投与した。[2] SPのラオイムノアッセイ(RIA)法：　capsaicinあるいはvehicle処置から11～17週後に断頭し、脊髄び脳の凍結切片より脳および脊髄各部位をマイクロパンクチャー法にて採取した。SP含量はに報告したSPの抗血清(FP03)を用いてRIAで行った(6)。[3] 圧受容器および化学受容器反射capsaicinおよびvehicleを処置したラットを、ウレタン麻酔下(900mg/kg i.p.)で人工呼吸をい、圧受容器および化学受容器反射を調べた。圧受容器反射はphenylephrine(20～100μg/ki.p.)を投与した時の血圧上昇に対する拍数(HR)の減少および腎臓交感神経活動(renal nervactivity:RNA)の変化を記録した。化学受容器反射は、上記ラットの呼吸中の酸素分圧を14～%の範囲で段階的に低下させて、その時に起こる腎臓交感神経活動(RNA)、血圧(BP)および拍(HR)の変化を測定した。なお、化学受容器反射の実験では圧受容器反射による影響を除去す目的で迷走神経を切断して行った。[4] 体性－自律神経反射：　佐藤ら(1)の方法に従い、

記ラットを麻酔下で、20秒間後肢を鉗子で鋏み、侵害性刺激を加えた。その時の交感神経活動、血圧及び拍数の変化を調べた。

表1. 中枢各部位のSP-LI含量に及ぼすcapsaicinの影響

	Substance P	
	Vehicle	Capsaicin
Cortex	0.52 ± 0.10 (4)	0.45 ± 0.10 (4)
Nucleus accumbens	2.46 ± 0.20 (5)	2.48 ± 0.20 (5)
Striatum		
Central	1.71 ± 0.18 (5)	1.33 ± 0.23 (4)
Dorsolateral	1.32 ± 0.19 (5)	1.00 ± 0.13 (5)
Globus pallidus	1.93 ± 0.38 (5)	1.46 ± 0.23 (5)
Hypothalamus		
LH	4.51 ± 0.59 (5)	3.41 ± 0.50 (5)
VMH	2.86 ± 0.34 (7)	3.59 ± 0.62 (5)
Nucleus Habenula	4.39 ± 0.27 (8)	5.08 ± 0.61 (9)
Substantia nigra (SN)	13.4 ± 1.85 (5)	11.3 ± 2.15 (9)
Ventral tegmental area (VTA)	2.56 ± 0.52 (9)	1.82 ± 0.40 (7)
Interpedunculus nucleus (IP)	9.44 ± 1.97 (8)	9.50 ± 2.44 (8)
Nucleus tructus solitarii (NTS)	8.99 ± 0.95 (19)	4.50 ± 0.56 (20)***
Spinal trigeminal tract and nucleus (TSV)	1.68 ± 0.32 (14)	0.78 ± 0.16 (14)*
Spinal		
Dorsal horn (DH)	6.93 ± 0.90 (9)	2.79 ± 0.36 (12)**
IML	2.35 ± 0.23 (9)	2.24 ± 0.34 (7)

Values in pg/μg protein are means ± S.E.M. for the numbers of rats shown in parentheses.(*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001;Student's two-tailed t-test)

【結果・考察】

生後2日目にcapsaicin処置したラットの鎮痛効果をhot-plate法を用いて検討した。その結果、4週、7週、10週齢のいずれにおいても、capsaicin処置したラットで有意な鎮痛効果が認められた。次にcapsaicinによる脳および脊髄内のSP-LI含量の変化を調べた結果、一次知覚神経終末にあたる脊髄後角(DH)では約40%、延髄・三叉神経脊髄路核(TSV)では約46%に、SP-LI含量が有意に減少した。さらに興味深いことに、迷走神経や舌咽神経などの血圧反射を司る求心性神経が投射する延髄・孤束核(NTS)でのSP-LI含量も約50%に減少した(表1)。そこでcapsaicinの処置が、求心性神経を介する圧受容器および化学受容器反射または体性－自律神経反射などの生理機能に及ぼす影響を、腎臓交感神経活動(RNA)、血圧(BP)および拍数(HR)を指標にして調べた。圧受容器反射においては、phenylephrineによる血圧の上昇に依存して、腎臓交感神経活動(RNA)および拍数(HR)の減少が見られた。しかしvehicle群とcapsaicin群で有意な差は見られなかった(図1)。また化学受容器反射においては吸気中の酸素分圧の低下に伴って、腎臓交感神経活動(RNA)、血圧(BP)および拍数(HR)の増加が認められた。しかしこの変化

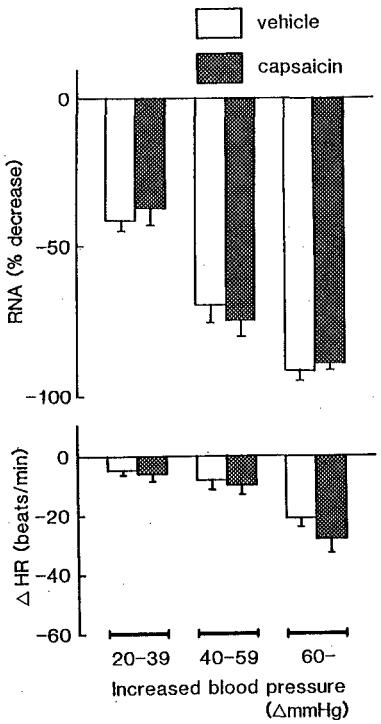


図1. 圧受容器反射に及ぼすcapsaicinの影響

においてもvehicle群とcapsaicin群で差は認められなかった(図2)。さらに体性－自律神経反射はラットの後肢に侵害性刺激を与えることにより、腎臓交感神経活動(RNA)、血圧(BP)および拍数(HR)はいずれも上昇が見られた。しかしcapsaicin処置の効果は認められなかった(図3)。以上のように新生ラットにcapsaicinを処置した結果、求心性神経終末部位にあたる脊髄後角(DH)や延髄・三叉神経脊髄路核(TSV)または延髄・孤束核(NTS)においてSP-LI含量の減少が見られた。しかし、capsaicin処置によっても、これら求心性神経を介した自律神経系反射の機能は維持されていることが示唆された。このことは、capsaicinによって求心性のC線維が一部破壊された場合でも、残された神経線維で自律神経反射の機能を十分に代償し得ることが考えられる。また代償効果について、SP含量の減少に伴った受容体の性質の変化や他の神経伝達物質の関与に関する問題するは今後の課題である。

本研究は文部省科研費 #61480120,#61570113により行った。

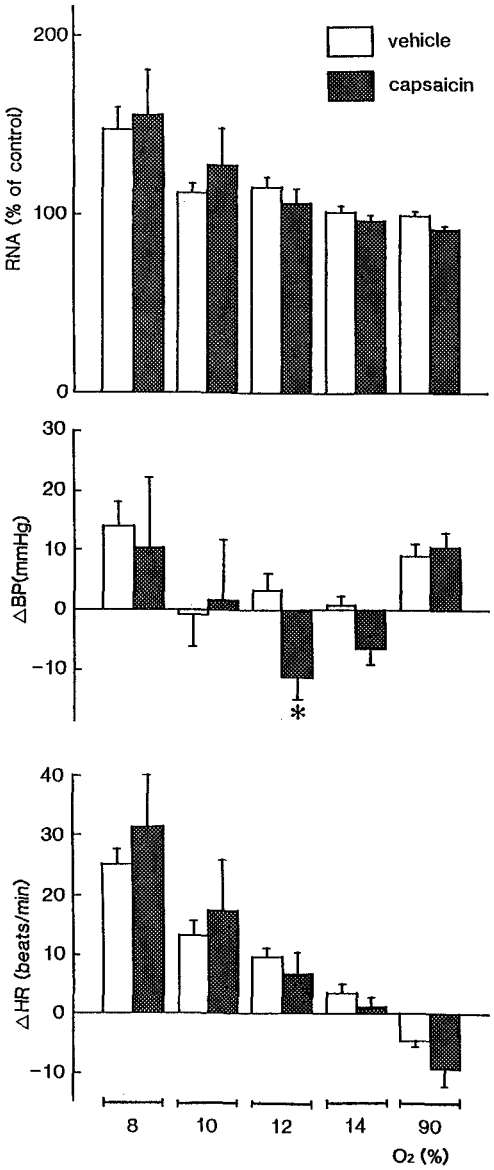


図2. 化学受容器反射に及ぼすcapsaicinの影響

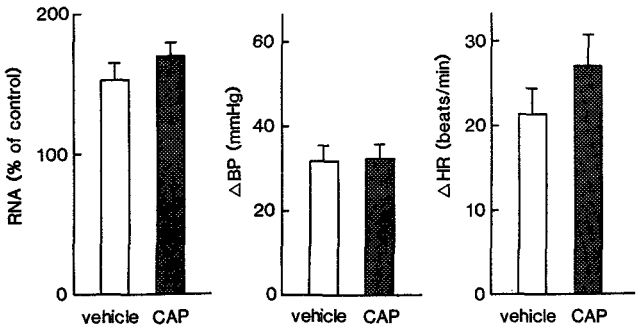


図3. 体性－自律神経反射に及ぼすcapsaicinの影響

【文献】

1) Araki,T., Ito,K., Kurosawa,M. and Sato,A. (1984) Neurosciences 12, 289-299
2) Games,R., Holzer,P. and Lembeck,F. (1980) Br.J.Pharmacol. 68, 207-213
3) Nagashima,A., Takano,Y., Masui,H. and Kamiya,H. (1987) Neurosci. Lett. 77, 103-108
4) Takano,Y., Sawyer,W.B. and Loewy,A.D. (1985) Brain Res. 334, 106-116
5) Takano,Y., Takeda,Y., Yamada,K. and Kamiya,H. (1985) Life Sci. 37, 2507-2514
6) Takano,Y., Nagashima,A., Masui,H., Kuromizu,K. and Kamiya,H. (1986) Brain Res. 369, 400-404

203. 節前および節後神経切断後，鼠上頸部交感神経節内心房性Na利尿ペプチド含量の変動

戎　弘志・小出　直・田丸政男*・
藤田公和*・永田　豊*
（福友会・研究室，藤田学園保衛大・医・生理*）

〔要　約〕

心房性Na利尿ペプチド(atrial natriuretic peptide, ANP)は哺乳動物心房筋より抽出，精製された，利尿・降圧作用をもつ体液性因子であり，その免疫抗体を用いたRadioimmunoassay(RIA)が確立されている。われわれはRIAによる鼠体内のANP分布を調べたところ，上頸部交感神経節(Superior cervical sympathetic ganglia, SCG)内に比較的多量(768pg/mg湿重量)のANPが含まれるのを認めた。SCG内ANP値は生後1週齢では低い（成熟SCGの1/3）が，2週目には倍増し，以後発育と共にゆるやかに増加して成熟SCGの値に達した。節前神経切断(denervation)すると，SCG内ANP量は急激に減少し，3時間後には非手術SCGの1/2に，6時間後には1/3に，そして9時間後にはほぼ0にまで低下した。これはdenervation後のACh合成酵素(ChAT)活性減少の時間的経過と類似しており，ANPがcholinergic synaptic transmission過程と密接に関連している可能性が考えられた。一方，節後神経切断(axotomy)後3時間まではSCG内ANP量は対照と変わらないが，6時間後には2/3に，9時間後には1/10にまで急速に低下した。SCGから交感性ニューロンの支配臓器の眼球および顎下腺を摘出して，6時間後には，SCG内ANP量はaxotomy後の変動と同じ低値を示し，軸索内逆行輸送が示唆された。

Key word：atrial natriuretic peptide (ANP), superior cervical sympathetic ganglia (SCG), denervation and axotomy

心房性ナトリウム利尿ペプチド(atrial natriuretic peptide, ANP)は哺乳動物の心房筋細胞より分泌される体液性因子で，利尿による血圧低下作用，平滑筋弛緩作用，レニン・アンギオテンシンの分泌抑制作用などを示すことが知られている[4]。近年このANPは心房筋組織より抽出，精製され，そのアミノ酸構成が明らかにされており，このペプチドの免疫抗体を用いた高感度放射免疫測定法(Radioimmunoassay, RIA)が開発されてきた[10]。この方法を用いて鼠体内のANP分布を調べると，心房筋や血漿中のみならず，中枢神経組織の視床下部[6]，末梢神経組織の上頸部交感神経節（Superior cervical sympathetic ganglia, SCG)内にもかなり多量のANPが見出されていることから，神経機能とこのペプチド因子との密接な関連が強く示唆されている[7]。そこで今回われわれは，鼠SCGの節前あるいは節後神経繊維を切断したときに，SCG内ANP含量が経時的にどのような変動を示すかを調べて，SCG内ANPの由来を探ろうと試みた。

〔実験材料と方法〕

実験動物は主としてWistar系雌成熟鼠（体重200g前後）を使用した。ウレタン麻酔（1.5g/kg体重）下に鼠両側頸部より神経節(SCG)を摘出し，その周囲の結合織を注意深く除去した。発育に伴うSCG内ANP量の測定のために，生後1，2，3，4週令の鼠を用いた。節前神経切断(denervation)および節後神経切断(axotomy)[1]ならびに眼球摘出および顎下腺摘出[8]手術は，ペントバルビタール麻酔（40mg/kg体重）下におこなった。組織内のANP量の測定は，組織重量を電子天秤で測定後，10倍量の0.1M-酢酸中で磨細，100℃，5分間熱処理をしてから遠沈(15,000 rpm/15分間)，その上清をrat ANP

用RIA kitで測定した[5]。

〔実験結果と考察〕

1）鼠体内各組織中のANP含量および，SCG内ANP含量の発育に伴う変動：既に知られている如く[3]，ANPはその産生組織である心房筋内に極めて高濃度に見出されているが，心室筋内にも心房筋の約1/4量が存在する。また，ANPは中枢神経組織中に比較的高濃度に見出され，視床下部や脳幹部組織中には心房筋の1/5～1/10量が測定された（表1）。鼠に高濃度の食塩を摂取させたときには，その心房や血漿中のANP濃度が著明に増加してNa^+利尿を促進するが，視床下部のANP量は減少することが報告されており[10]，ANPが血圧や体液浸透圧の調節機能に重要な役割を果していることが示唆されている。また末梢神経節のSCG内にもANPはかなりの量（768pg/mg-湿重量）が含まれている。生後1週齢鼠のSCG内ANP量は約300pg/mg湿重量であったが，2週齢になるとほぼ2倍に増量して，成熟鼠の値に達した（図1）。

2）節前神経切断後，SCG内ANP含量の経時的変動：成熟鼠の節前コリン作動性神経軸索を切断（denervation）するとSCG内のコリン作動性神経末端の変性がおこるが，これに対応してANP量は時間とともに急激に減少して，3時間後にはintact SCG値のほぼ1/2に達し，その後も減少を続け，9時間後にはほぼ0に近づくまで低下するのが認められた。

近年ANPは，ニューロンのneurotransmitterあるいはneuromodulatorとして重要な機能を持つことが示唆されている[10]。特にANPとそのreceptorとの特異的結合によって，細胞のguanylate cyclaseを刺激して，cyclic GMPの蓄積とそのprotein kinase系の活性化がひきおこされると推定されている[2]。このdenervation後のSCG内の急激なANP量の減少は，そのACh生合成酵素（choline acetyltransferase；ChAT）活性の減少過程[1]と時間

Table 1：ANP Content in Various Rat Tissues

Tissues	pg/mg-wet weight
Atrium	12,365±2630(8)
Ventricle	2,746± 194(6)
Forebrain	1,094± 256(8)
Cerebral cortex	900± 212(5)
Pons-medulla	1,173± 130(6)
Hypothalamus	2,811± 595(7)
SCG	765± 101(4)
Nodose ganglia	301± 52(3)
Plasma (pg/ml)	257± 68(4)

Values are mean±SEM, with number of experiments in parentheses.

Fig.1:Developmental Changes of ANP Content in Rat SCG

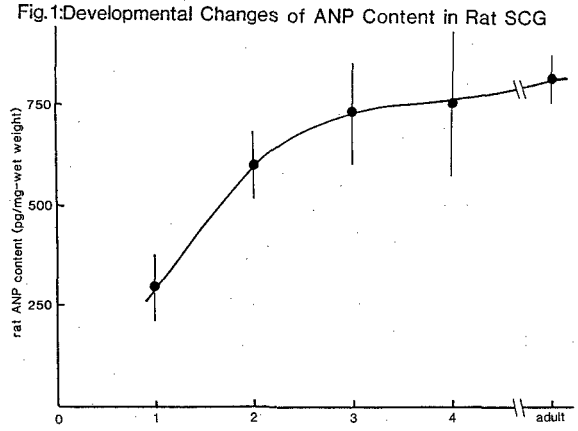


Fig.2: Time Course of the Changes of ANP Content in Rat SCG after Denervation & Axotomy

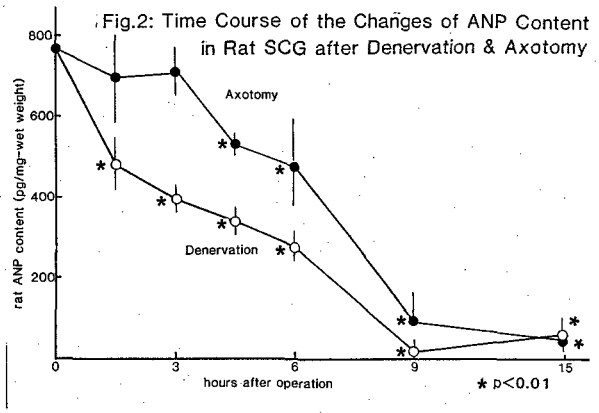


Table 2：Effect of Enuclation and Sialoadenectomy on ANP Content in Rat SCG

	Rat ANP Content (pg/mg-w.w.)
Intact SCG	773± 29.0(4)
Hemi-enucleation + Sialoadenectomy	
ipsilateral SCG	538± 89.5(4)*
contralateral SCG	754± 58.5(4)
Bi-enucleation + Sialoadenectomy	505± 82.0(4)*

SCG were removed and analyzed 6h after operations.
Values are mean ± SEM. $p<0.05$

経過が一致していることから，コリン作動性シナプス伝達系とANPとの密接な機能的関連が示唆される。

3）節後神経切断後，SCG内ANP含量の経時的変動：節後神経切断(axotomy)手術3時間後までは，SCG内ANP量はほとんど変動しなかったが，以後時間と共に急激に減少がおこり15時間後にはほとんど消失した（図2）。SCGからの神経軸索が支配している臓器の眼球と顎下腺を摘出してから6時間経過すると，SCG内ANP含量は著明に減少して intact SCG値のほぼ2/3にまで低下した（表2）。眼の毛様体あるいは顎下腺組織内にはかなりの量のANPが含有されていることが報告されており[9]，そこで作られたANPは交感神経軸索を逆行性に輸送されてSCGニューロン内に蓄積されている可能性が考えられる。

SCG内におけるANPの細胞内局在やそこでのシナプス伝達の際の生理的役割は未だ不明な点が多い。今後免疫組織化学その他生理化学的研究によって，ANPとシナプス伝達との関連を追求していきたい。

〔参考文献〕

1) Ando, M. et. al. (1983) Brain Res. 267: 313-321
2) Fiscus, R. R. et. al. (1987) J. Neurochem. 48: 522-528
3) DeBold, A. J. (1982) Can. J. Physiol. Pharmacol. 60: 324-330
4) DeBold, A. J. (1982) Science. 230: 767-770
5) Kangawa, K. & Matuo, H. (1984) B.B.R.C. 118: 131-139
6) Kawata, M. et. al. (1985) Neuroscience,16: 521-546
7) Morii, N. et. al, (1985) B.B.R.C. 127: 413-419
8) Nagata, Y. et. al. (1987) J. Neurochem. 49: 201-207
9) Sugawara, A. et. al. (1985) B.B.R.C. 129: 439-446
10) Tanaka, I. et. al. (1984) B.B.R.C. 124: 663-668

204. Reeler ミュータントマウスの複合糖質の生化学的解析

森田規之・長谷純宏*・池中一裕・
御子柴克彦　（大阪大・蛋白研，理・化学*）

〔要　約〕

reeler は神経芽細胞の移動障害により小脳、大脳皮質など層構造を有する部位で細胞構築の乱れたミュータントマウスであり、その小脳においてガラクトース転移酵素（以下 GalTase）の活性が正常マウスの約 1/2 に低下していることが報告されている。そこで我々は脳 GalTase を中心に複合糖質生化学的解析を行い以下の結果を得た

脳内糖蛋白質の N- 結合型糖鎖を切り出して蛍光標識し、シアル酸残基をはずした後、二次元 HPLC で分析する新しい方法が、ミュータントの解析に利用できることを明らかにし、この方法で reeler と正常マウスを比較解析したところ両者の HPLC 溶出パターンは良好な一致を示した。この結果は reeler 小脳で GalTase 活性が低下しているという報告とは相容れないため、GalTase 活性測定法に検討を加えた後 reeler と正常マウスの脳内 GalTase 活性を比較測定した。N- アセチルグルコサミンを受容体とした場合の活性は両者で有意差はなかったが、脳内在性糖蛋白質へのガラクトース転移は reeler の小脳において正常マウスの約 1/5 に低下していた。

Key word : reeler mutant mouse, galactosyltransferase, N-linked sugar chains

【緒言】

reeler ミュータントマウスは、中枢神経系のうちでも大脳皮質、小脳皮質、海馬など層構造を有する部位で著しい細胞構築異常が認められ、このミュータントを解析することが皮質形成、並びに神経細胞の移動の機構の解明につながるものと期待される[4]。

近年、reeler の小脳におけるガラクトース転移酵素（以下 GalTase）の活性が正常マウスの約1/2に低下していることが Shur[7] により報告された。GalTase はゴルジ装置に局在して糖蛋白質、糖脂質の糖鎖生合成に関与する[1]だけでなく、細胞表層の分子として細胞接着、移動、及び細胞間認識に与る[5][6]ことが知られている。我々は先ず、GalTase の糖蛋白質糖鎖修飾機能に着目して、reeler と正常マウスの脳内糖蛋白質の N- 結合型糖鎖の構造を比較解析した。さらに、N- アセチルグルコサミン（以下 GlcNAc）、及び脳内在性糖蛋白質を受容体として脳内 GalTase 活性を測定し若干の知見を得たので報告する。

【材料と方法】

1)動物；ミュータントマウス reeler 、及び対照としての BALB/c は当研究室にて飼育、繁殖したものを用いた。

2)蛍光標識アシアロ N- 結合型糖鎖の調製；凍結乾燥したマウス小脳、及び大脳（1.5 mg）をヒドラジン分解、N- アセチル化して N- 結合型糖鎖を遊離させた。得られた糖鎖の還元末端をピリジルアミノ（PA）化して蛍光標識した後、N- アセチルノイラミニダーゼ処理してシアル酸残基をはずした[2]。

3) PA 化糖鎖の HPLC による分析；MicroPak AX-5 カラムでサイズ分画 HPLC[3] を行い、得られた画分は、各々さらに Cosmosil 5C18-P カラムによる逆相 HPLC[3] で分析した。

4) GalTase の活性測定；小脳、及び大脳は、各々 15 倍量の 1.0% Triton X-100 を含む緩衝液（ 130mM NaCl； 5.4mM KCl； 20mM Hepes pH7.2 ）を加えてホモジナイズし、この一部を基質 UDP-［$U^{14}C$］-Gal（ 0.125uCi, 220uM ）、受容体 GlcNAc（ 20mM ）、を含む反応液（ 130mM NaCl； 5.4mMKCl； 20mM Hepes pH7.2； 10mM $MnCl_2$ ）と 37℃ で 45 分間インキュベートした。Tris-EDTA を加えて反応停止後、これを高圧濾紙電気泳動にかけて、生成物を未反応の UDP-［$U^{14}C$］-Gal 、及びその分解物と分離し、液体シンチレーションで計数した。

【結果と考察】

1)脳内糖蛋白質のアシアロ N- 結合型糖鎖の分析；複数の正常マウス（ 7-8 週齢 ）について小脳、及び大脳由来のアシアロ N- 結合型糖鎖の HPLC 溶出パターンを比較したところ個体差はほとんど認められず、蛋白質の二次元電気泳動の様にミュータントの解析に利用できることが明かとなった。この方法は極く小量の試量にも適用でき、放射ラベル体を使用しないにもかかわらず高感度であり、逆相 HPLC を用いた分離能の高い解析が可能である。そこで reeler（ 7-9 週齢 ）についても同様に解析したところ、正常マウスのパターンと良好な一致を示した（ 図1a,b ）。このことは reeler の脳における主要な糖蛋白質の N- 結合型糖鎖の生成が、層構造部位の細胞構築異常にもかかわらず、ほぼ正常に行われていることを示唆する。

2) GalTase の活性測定； N- 結合型糖鎖の分析結果は Shur の報告とは相容れないため GalTase 活性測定法に検討を加えた。転移反応生成物の N- アセチルラクトサミンをホウ酸緩衝液（ pH10.8 ）を用いて高圧濾紙電気泳動したところ、その移動度はスクロースとラクトースの間であり、ガラクトースを取り込んだ脳内在性糖蛋白質、UDP-Gal、及びその分解物と分離することができた。これにより一度の泳動で GlcNAc と脳内在性糖蛋白質の各々に対するガラクトース転移量が測定可能となった。次に脳内 GalTase 活性の濃度依存性と時間依存性を検討したところ 図2 に示す様に、一反応あたり 0-100ug の蛋白量の範囲で、また反応時間 60 分までは良好な直線関係が得られた。したがって、蛋白質濃度 50ug/アッセイ、反応時間 45分の条件で以後の測定を行った。120分間反応させたものではガラクトースの遊離が確認され、UDP-Gal もしくは生成物が分解されたため直線性を失ったと考えられた。

3)脳内 GalTase 活性；上述の系を用いて reeler と正常マウス（ 8-12 週齢 ）の小脳、及び大脳の GalTase 活性を測定した結果を図3 に示した。受容体として GlcNAc を用いた場合、小脳、大脳のいずれにおいても reeler と正常マウスの間に有意な差異は認められなかった。ところが脳内在性糖蛋白質に対するガラクトース転移は、小脳においてのみ reeler の活性が正常マウスの約 1/5 にまで低下していた。GalTase 全体の活性はほぼ同じでありながら、小脳内在性糖蛋白質へのガラクトース転移にこのような差が認められたのは、ガラクトースを受容可能な糖鎖をもつ糖蛋白質が reeler の小脳で減少しているためと考えられた。現在、ガラクトース受容体となった糖蛋白質の解析を行っている。

【謝辞】
本研究を進めるにあたり、終始、御指導、御助言いただきました大阪大学理学部池中徳治教授に深く感謝致します。

【文献】

(1) Beyer, T.A., Sadler, J.E., Rearick, J.I., Paulson, J.C., and Hill, R.L. (1981) *Adv. Enzymol.* 52, 23-175
(2) Hase, S., Ibuki, T., and Ikenaka, T. (1984) *J. Biochem.* 95, 197-203
(3) Hase, S., Koyama, S., Daiyasu, H., Takemoto, H., Hara, S., Kobayashi, Y., Kyogoku, Y., and Ikenaka, T. (1986) *J. Biochem.* 100, 1-10
(4) Mikoshiba, K., Okano, H., and Tsukada, Y. (1984) *Protein, Nucleic Acid and Enzyme* 29, 1633-1658
(5) Pierce, M., Turley, E.A., and Roth, S. (1980) *Intern. Rev. Cytol.* 65, 1-47
(6) Runyan, R.B., Maxwell, G.D., and Shur, B.D. (1986) *J. Cell Biol.* 102, 432-441
(7) Shur, B.D. (1982) *J. Neurochem.* 39, 201-209

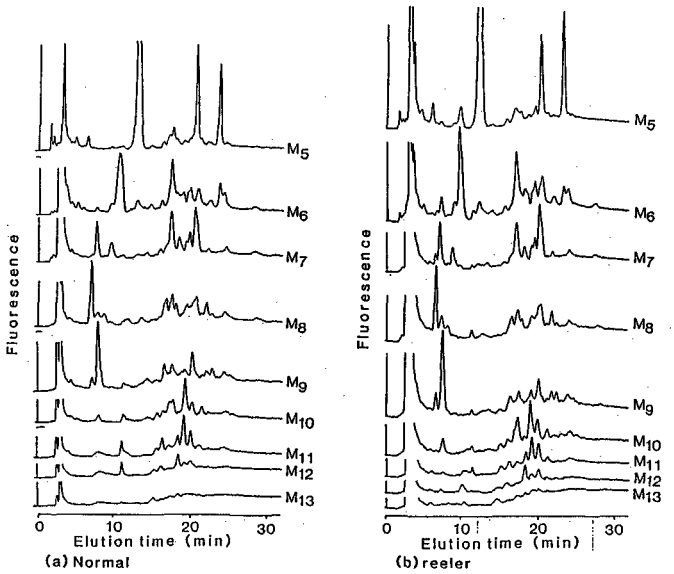


Fig.1 Reversed-phase HPLC patterns of PA-sugar chains in fractions obtained by size-fractionation HPLC. PA-sugar chains of normal (a) and reeler cerebrum (b).

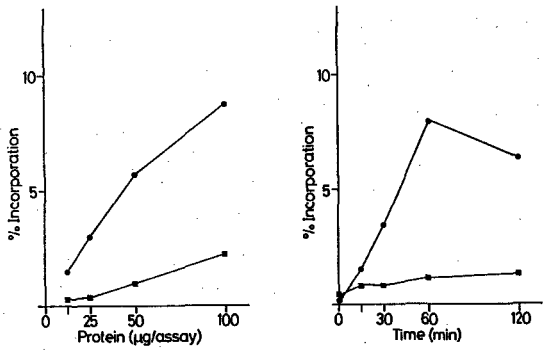


Fig.2 Dose and time dependency of GalTase activity in normal mouse brain. Galactosylation of GlcNAc (●) and endogenous acceptors (■).

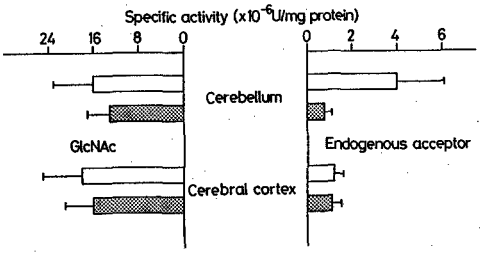


Fig.3 GalTase activity towards GlcNAc (left) and towards endogenous acceptors (right) in cerebellum or cerebrum. Mean±SD of 6 normal mice (□) or 5 reeler mice (▨).

205. 脳ミクロソームにおけるC_{26}極長鎖脂肪酸合成の活性化機構

斉藤寿仁・吉田　敏・竹下正純
（大分医大・第二生化）

〔要　約〕

ブタ脳ミクロソームでのicosenoyl -CoA(20:1-CoA) 鎖長伸長反応の検討をした。0.6mM N-ethylmaleimide(NEM)存在下で活性が出現し，通常の条件では活性が非常に微弱な，hexacosenoic-acid(26:1)への鎖長伸長反応の特徴を明らかにするため，20:1-CoAの伸長反応の部分反応である縮合反応へのNEMの影響，伸長反応の時間経過，非放射化tetracosenoil-CoA(24:1-CoA)による希釈効果，SH基阻害剤p-chloromercuriphenyl sulfonic acid(PCMPS)の作用の検討を行った。縮合反応へのNEMの影響は0.6mM NEMにより,20:1-CoAの縮合活性はやや低下し,22:1-CoAや24:1-CoA縮合活性は各々，140%，170%に上昇した。伸長反応複合酵素系で律速段階とされる縮合反応酵素にNEMが影響を与えて26:1が出現することが示唆され，0.3mM PCMPSを用いた場合にも26:1への鎖長伸長がおこる点や，NEM及びPCMPSの相互作用の結果から，縮合酵素のSH基が修飾されることで26:1が出現することが示された。非放射化24:1-CoAによる希釈効果が，26:1合成反応に認められぬ事実，伸長反応の時間経過の結果，昨年報告した結果，から20:1-CoAより22:1，24:1，26:1までの合成反応には三通りの異なる反応系が存在することが示唆された。

Key word： brain microsomes, hexacosenoic acid,
very-long-chain acyl-CoA elongation

〔緒　言〕

ミエリン形成の機序解明に重要な極長鎖脂肪酸合成酵素系の反応機構を明らかにする目的で，我々は前回の本学会で，ブタ脳ミクロソームで,20:1-CoA elongationの反応系にNEMを作用させることで26:1の合成が顕著に増強される事を報告した。今回は20:1-CoAから26:1への伸長反応経路の解明，および，縮合酵素へのSH基阻害剤の作用機序について，検討した。ALDなどの脱髄性疾患で報告されている極長鎖脂肪酸の分解及び合成異常と，伸長酵素の構造変化によるC26の脂肪酸合成の活性化との関連も考慮する必要がある。

〔実験方法〕

(1) 生後5ないし6ケ月の成熟ブタの脳ミクロソーム(Ms)の調整は既に報告された方法によった。(2)

(2) 縮合活性，伸長活性測定のための反応液調整，反応条件の設定は既に報告された事例をもとにした。(3)

(3) 伸長反応の時間経過の検討では反応液にMs液を加える直前にSH基阻害剤を添加した。NEM,PCMPSの相互作用の検討では0.6mM PCMPSを添加した上でNEMの濃度依存性を調べた。また，SH基阻害剤を添加せず反応を進行し，途中にNEMを添加し，一定時間経過後，26:1合成活性を測定する実験も行った。

(4) 希釈効果の実験は，反応液中，0.6mM NEM存在下で,非放射化tetracosenoil-CoA(24:1-CoA)の添加濃度を変化させ,20:1-CoAからの生成物(26:1)の放射活性を測定した。

(5) 縮合活性，伸長活性の測定は各々，既に報告した方法によった。(4,5)

〔結果と考察〕

20:1-CoAを外部基質とし，0.6mM NEM存在下での伸長反応時間経過を図1に示した。22:1, 24:1への伸長は互いにほぼ同様の時間依存性を示し，一方26:1への伸長では，time-lagがみられた。各々の生成物量は30分で一定となった。同様の反応系に非放射化24:1-CoAの濃度を変えて加え，伸長活性の変化を測定した希釈効果の結果を図2に示した。生成物である放射化26:1の量は非放射化24:1-CoA添加で低下しなかったので，26:1への反応途中にできる「^{14}C」24:1-CoAが，一旦反応液中に遊離することなしに伸長反応が進行することがうかがわれる。これらの結果から20:1-CoAを基質とし26:1への伸長反応の経路は次のような三種類の異ったものと推定される。

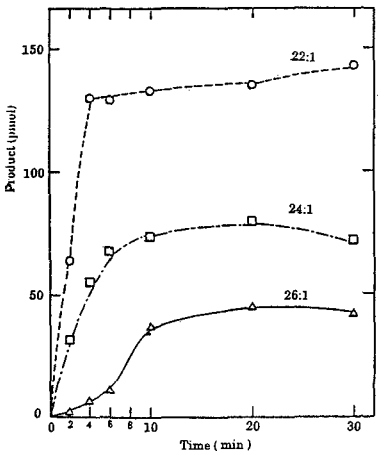


Fig.1. The time course of synthesis of 22:1,24:1 and 26:1 from 20:1-CoA as an exogenous substrate in the presence of 0.6mM N-ethylmaleimide in swine cerebral microsomes

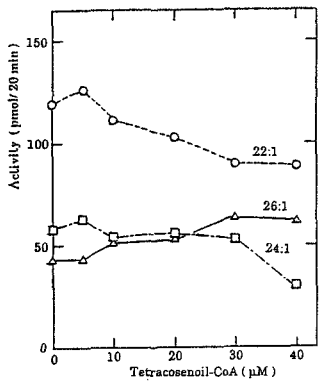


Fig.2. Dilution experiment with the addition of "cold" non-radio-labelled 24:1-CoA in the reaction of elongation of 20:1-CoA.

(1) 20:1 → 22:1

(2) 20:1 → (22:1)[1] → 24:1 ([1]カッコ内のものは酵素外液に出てこない。)

(3) 20:1 → (22:1) → (24:1) → 26:1 (0.6mM NEMで活性が出現。)

縮合反応へのNEMの影響を図3に示した。(A)は20:1-CoAからの21:1-2-one，(B)は22:1-CoAからの23:1-2-one，(C)は24:1-CoAからの25:1-2-oneを示している。点線，破線は内在性基質16:0-CoAからの17:0-2-one, 20:4-CoAからの21:4-2-oneを各々示している。22:1-CoA, 24:1-CoAを基質とする縮合活性が低濃度NEMで増大し，20:1-CoAの縮合活性は低下した。内在性基質の縮合活性はNEMにより著明に低下した。縮合反応はブタ脳Ms極長鎖脂肪酸伸長の律速段階であること(4,5)から，NEMにより，26:1合成活性の増加が見られたのは，24:1 → 26:1の段階の縮合活性が，NEMにより増加した事によると考えられる。

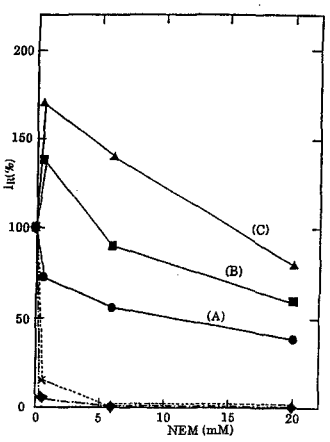


Fig.3. Effect of N-ethylmaleimide on the codensation of 20:1-CoA (A), 22:1-CoA (B) and 24:1-CoA (C) in swine cerebral microsomes.

SH基阻害剤(NEM, PCMPS)の濃度と伸長活性との関係は図4のごとくなり，0.3mM PCMPSによっても26:1への伸長活性が出現した。図5は0.6mM PCMPSを反応液に加えた場合のNEMによる伸長活性の変化である。NEMが低濃度の場合，NEMによる26:1合成の増強は観察されなかった。また，このPCMPS存在下では，2mM NEMにより26:1

合成は最大活性の15％阻害されたが，PCMPSなしでは40％以上阻害されていることから，比較的高濃度でおこる伸長活性の低下をPCMPSが抑制している傾向がうかがわれる。これらのことから，26:1への伸長活性の増強は縮合酵素に存在するSH基への阻害剤の作用でおこり，NEMとPCMPSとは同一部位に作用することが示された。

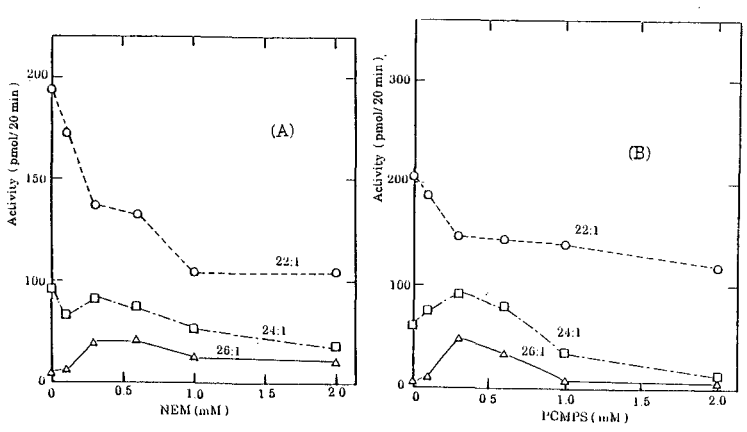


Fig.4. Effect of N-ethylmaleimide (A) and P-chloromercuriphenyl sulfonic acid (PCMPS) (B) concentration on the elongation of 20:1-CoA in swine cerebral microsomes.

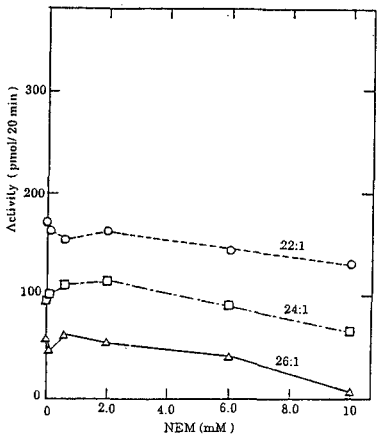


Fig.5. Effect of N-ethylmaleimide concentration on the elongation of 20:1-CoA in the presence of 0.6mM PCMPS in swine cerebral microsome.

20:1−CoAを基質として26:1への伸長活性がSH基阻害剤で増大する原因を我々は次のごとく(A)と(B)の可能性を考えた。

(A) 24:1から26:1への伸長反応系の縮合酵素では普段は活性が低くおさえられているがSH阻害剤により酵素の構造変化がおこり活性が増大した。あるいは，

（B）縮合酵素の近傍に24:1− CoA縮合を抑制するタンパク質が存在し，そのタンパク質にSH基阻害剤が作用し抑制が消失した。

20:1− CoAを外基質とし伸長酵素反応を一定時間行なわせた後に0.6mM NEMを添加し，26:1への伸長活性の変化を検討したところ，22:1，24:1への伸長反応の継続時間が長い程（２分から10分程度），26:1への伸長が低下した。これは20:1−CoAから22:1, 24:1への伸長反応が進行している状態では，NEMとの反応性の低い構造が安定していると考えられ，NEMによる26:1合成系の増強はおこりにくくなっているものと推定される。

20:0−CoAを基質とする飽和系の反応においても0.6 mM NEMを作用させると26:0の出現をみた。炭素数26の極長鎖脂肪酸が増加する疾患（ALDなど）(1)でC 26までの伸長反応系の酵素に構造変化がおこり活性化している可能性も検討する必要がある。c 20からc 26への伸長経路が三種類と推定したが以前に報告した方法による(6)、コンピュ-タシュミレ-ションの結果とも一致していた。(当日供覧) 縮合活性はβ-keto体が脱炭酸されたmethyl ketone生成量で測定した(4)。

〔文　献〕

(1) Tsuji, S., Ohno, T., Miyatake, T., Suzuki, A., Yamakawa, T. (1984) J. Biocnem. 96, 1241−1247.
(2) 吉田　敏，竹下正純（1984）神経化学　23, 192−194.
(3) Yoshida, S. and Takeshita, M. (1984) Biochem. Biophys. Acta. 795, 137−146.
(4) Yoshida, S. and Takeshita, M. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 254, 170−179.
(5) Yoshida, S. and Takeshita, M. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 254, 180−187.
(6) Yoshida, S. and Takeshita, M. (1986) J. Neurochem. 46, 1353-1358.

206. 脳ミクロソームの極長鎖脂肪酸伸長酵素活性調節における膜脂質の役割

吉田　敏・斉藤寿仁・竹下正純

（大分医大・第二生化）

〔要　約〕

ブタ脳ミクロソーム(Ms)のarachidoyl-CoA (20:0-CoA)伸長反応の律速酵素である縮合酵素活性に及ぼす脂肪酸や種々のホスホリパーゼ(PLase)、Ca^{2+}イオンの効果を研究し、oligodendroglia(OLG)でのセレブロシド合成の不活性化機構との関係を検討した。

脳Msに20 nmol/mg程度のstearic acid (18:0)を加えると、膜の相変化が起こるが（昨年報告）、80 nmol/mgでも活性の低下は小さかった。Oleic acid (18:1)では、大きな活性の低下が見られ、16:0-CoA縮合反応ではArrhenius breakは消失し活性化エネルギー(Ea)も低下し、20:4-CoAでもEaが顕著に低下したが、20:0-CoA縮合酵素の活性は低下したもののEaは変化しなかった。PLase A_2, C (Cereus), C (Welchii), Dの作用を見た所、中性で1 mM Ca^{2+}存在下では、どの基質に対する縮合活性も、A_2の場合大きく低下したが、他のPLaseでは変化は小さかった。一方、Ca^{2+}イオンは0.5～1 mMで、16:0-CoAと20:4-CoA縮合活性を2～3倍活性化したが、20:0-CoA縮合活性は可逆的に顕著に阻害された。また、ブタ脳白質より精製したOLGのMsの20:0-CoA縮合活性は元の白質から直接得たMsの比活性の6%程度にまで不活性化されており、膜構造変化との関連に言及する。

Key word： Very-long-chain fatty acyl-CoA, Condensation, Phospholipases,

昨年の本大会で、ブタ脳ミクロソーム(Ms)の膜は相分離状態にあり、内在性16:0-CoAに対する縮合酵素は、16℃付近で相転移を起こす柔らかい脂質相に存在して、20:0-CoA縮合酵素は比較的堅い脂質環境にあると予想した。また、ホスホリパーゼA_2(PLase A_2)によって縮合酵素活性は速やかに失活するが、16:0-CoA縮合酵素はより顕著であった。これらは、膜脂質組成変化によって脂肪酸伸長活性が調節されることを示している。一方、ミエリン形成細胞であるoligodendroglia(OLG)やschwann cellで、組織から単離し培養に移すと、4～15日頃までセレブロシドの合成が低下してくる事が報告されており(1,2)その調節の詳細は不明であるが、種々の脱髄性疾患の病因を追及する上で注目すべき現象である。セレブロシド合成の低下の調節にはいくつかの段階が考えられるが、C22, C24といった極長鎖脂肪酸合成調節の観点から検討したい。本研究では、まず、細胞内代謝調節に深く関わっているホスホリパーゼやCa^{2+}イオン、また遊離脂肪酸が、20:0-CoA伸長反応の律速酵素である縮合酵素活性に及ぼす影響について研究した。

〈方法〉

ブタ脳ミクロソームの精製、アシルCoAとマロニルCoAとの縮合酵素活性のGC-MS法によるアッセイは、既報に従って行った(3,4)。脂肪酸のミクロソーム(Ms)へのとりこみと、その後の活性測定は、0.1 mlのMs suspension (1.1 mg)と、N_2 gasによってdry upした一定量のstearateやoleateと混ぜ、sonicationを20 sec室温にて行い室温に1時間放置後、その0.08 mlを活性測定系に加えアッセイした。ホスホリパーゼの縮合活性への影響は、phospholipase (PLase) A_2, PLase C (from C. Welchii), PLase C (B.

Cereus)、PLase D (Peanut)はSigmaのを用い、同一ユニット量を、縮合反応系 (37℃ 20 min)に加え影響を見た。反応液は0.1 M tris-HCl (pH7.4), 1 mM $CaCl_2$存在下で行った。なお、前回PLA_2の影響を見た時は、25℃で15-16 sec Msと反応後、Msをwashし、ショ糖密度勾配遠心によりMsを回収して通常の反応系で活性を測定した。

〈結果と考察〉

遊離脂肪酸としてstearate (18:0)と、oleate (18:1)、またdioleinの、縮合酵素活性への影響を見た所、20:0-CoAと内在性の20:4-CoAの縮合活性では、18:0とdioleinでは、大きな活性の低下はなかったがFig. 1に示すように18:1では、有意に低下した。16:0-CoA縮合活性ではどの場合も低下したが、oleateの時低下が顕著であった。oleate存在下での、脂質相の酵素活性への影響を見るためにArrhenius plotを試みると、Fig. 2に示すように、16:0-CoA縮合活性は、controlで、16～17℃にbreakを持っているが、18:1濃度が高くなると、活性は低下し、breakも消失し、活性化エネルギー(Ea)は低下し、酵素近傍がより「柔らかい」相になってきていることを示している。また、20:4-CoA縮合活性も、18:1が高濃度の時、Eaの大きな低下が起こることをFig. 2は示している。しかし、20:0-CoA縮合活性は、活性の低下はあるものの、Ea自体には変化は見られず、この酵素は前回にも報告したように、より「堅い」相にあって、18:1の添加によっても、その酵素近傍の脂質相は「堅い」状態のままであるものと思われる。高濃度の18:1存在下では、20:0-CoAなどacyl-CoAとの拮抗も予想され、活性の低下をもたらしているものと考えられる。これらの事実は、脳ミクロソーム膜は相分離状態にあり、16:0-CoA, 20:4-CoA, 20:0-CoAに対する縮合酵素周辺の脂質環境は異なっており、oleateのように、膜の流動性を上げる脂肪酸によっても、各酵素に対する作用の仕方が異なっていることを示している。

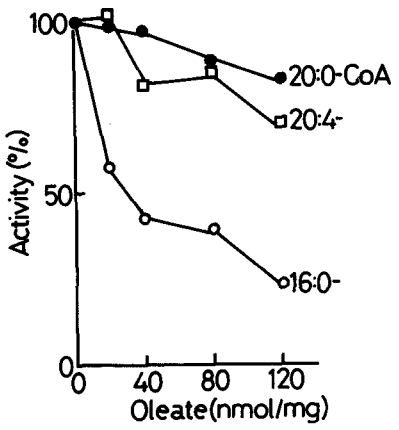


Fig.1. Effect of oleate on the activity of condensation of 20:0-CoA(●), 20:4-CoA(□), and 16:0-CoA(○). The assay mixture contained 0.1M phosphate buffer(pH 7.4), 0.8mM ATP, 1mM $MgCl_2$, 40 μM 20:0-CoA, 52 μM malonyl-CoA and the oleate-incorporated microsomes(0.8mg protein) in a total of 0.5 ml.

一方、種々のPLaseの影響を見た結果をFig. 3で示した。各PLaseはどれも0.005 unit加えてある。各酵素の至適pHは、PLase A_2はアルカリ側、PLase Cは7付近、PLase Dは酸性側と異なっているが、pH 7.4で1 mM $CaCl_2$存在下の同一条件での比較を行った。反応は、縮合反応と共に37℃ 20 min行ったので、室温での膜の状態より流動性が上昇し、PLase

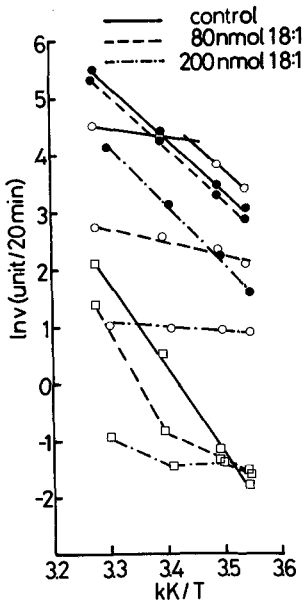


Fig.2. Arrhenius plot of the condensation activity for 20:0-CoA(●), 20:4-CoA(□), and 16:0-CoA(○), with various amount of oleate incorporated. The activity was expressed in unit per 20 min.

との反応性も高まっていると考えられる。各PLaseの中で、PLase A_2 が顕著に活性を阻害したが、PLase CやDは、阻害の程度は低かった。ただ、20:0-CoA縮合活性はPLase C (from Cereus)で、PLase C (Welchii) よりも比較的強く阻害されている。これらの活性は、1mM $CaCl_2$存在下で測定しているので、$CaCl_2$自体の縮合活性への影響を見たのが、Fig.4である。興味深いことに16:0-CoA, 20:4-CoA縮合活性は、2倍以上大きくなったが、20:0-CoA縮合活性は40%程度にまで阻害された。$CaCl_2$が5 mM以上では、Msのaggregationが起こるために、活性が急激に低下している。1 mM前後での$CaCl_2$でのこれらの活性の変化は、膜脂質の相分離状態の変化によるものと思われる。

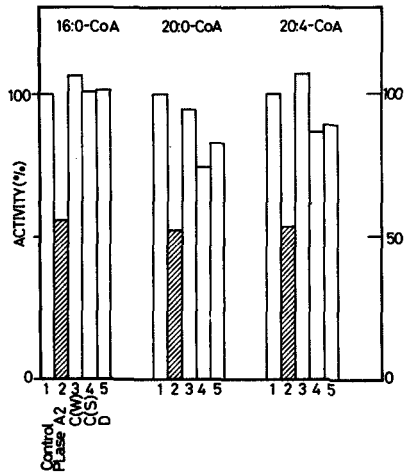


Fig.3. Effect phospholipases on the condensation of 16:0-CoA, 20:0-CoA, and 20:4-CoA. The phospholipases(Sigma) used were phospholipase A_2(from pig pancreas),C(W)(from Welchii), C(S)(from Cereus), and D(from peanut) and each 0.005 unit of the enzyme was added in the reaction mixture with 0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 1 mM $CaCl_2$, 0.8mM ATP, 1 mM $MgCl_2$, 40 μM 20:0-CoA, 52 μM malonyl-CoA at 37°C for 20 min.

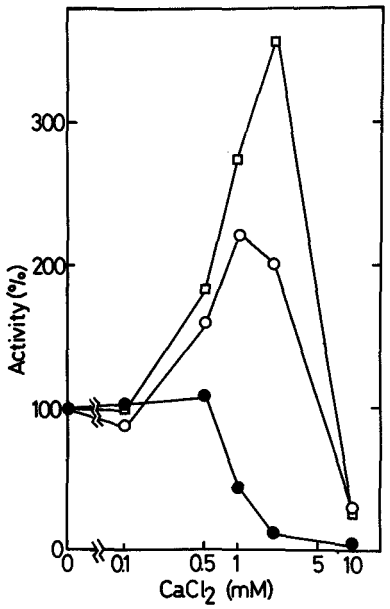


Fig.4. Effect of calcium ion on the condensation of 20:0-CoA(●), 16:0-CoA(○), and 20:4-CoA(□). The reaction mixture was the same as in Fig.3

ところで、ブタ脳白質より、Althausらの方法(5)で、Percollを用いOLGを調整し、それからMsを精製し、20:0-CoA縮合活性を測定した所、28.1 unit/mg/20 minしかな同時に調整した白質のMsの活性445.5 unit/mg/20 minのわずか6%に低下していた。他の細胞画分は、33% Percoll以下の画分に出てくるが、そのMsの活性は、OLG活性の2%以下であった。したがって、OLGの細胞精製の過程で、20:0-CoA縮合活性の急激な低下が起こったことが考えられる。培養系に移したOLGやschwann cellでセレブロシド成の低下が起きた原因の一つに、極長鎖脂肪酸伸長酵素不活性化が考えられる。細胞内代謝変動には種々のPLaseが関与することが、いくつかの例で証明されているが、Lase A_2による伸長酵素の不可逆的阻害が、この単離細胞初期のセレブロシド合成不化に何らかの役割を果している可能性を考えて更に実験をすすめて行く予定である。

（文献）

1. Szuchet,S., Yim,S.H. and Monsma,S.(1983)Pro.Natl.Acad.Sci. 80, 7019-7023
2. Sobue, G., Shuman, S. and Pleasure, D. (1986) Brain Res. 362, 23-32.
3. Yoshida, S. and Takeshita, M. (1986) J. Neurochem. 46, 1353-1358.
4. Yoshida, S. and Takeshita, M. (1987) Arch.Biochem. Biophys. 254, 170-179
5. Gebicke-Härter, P.J.,Althaus,H.H., et al.(1984)J.Neurochem. 42, 357-368.

207. 白鼠上頸交感神経節および迷走神経節の脂質組成

原　　厚・武　富　　保・岩　田　光　良*・
安　藤　正　人*・永　田　　豊*
（信州大・医・心脈管研・脂質生化，藤田学園保衛大・医・生理*）

〔要　約〕

白鼠上頸交感神経節（ＳＣＧ）は神経成長因子（ＮＧＦ）により、また、迷走神経節（ＮＧ）はグリア細胞成長因子（ＧＭＦ）によりアミノ酸輸送系が刺激を受ける。また、ＧＭ１－ガングリオシドはＮＧでのアミノ酸の取り込み及びNa^{+},K^{+}-ATPase 活性を促進するが、ＳＣＧでは僅かに阻害が見られる。このような反応性の違いを研究するために両神経節の構成脂質（ガングリオシド、燐脂質及び糖脂質）の分析を行った。１、ガングリオシドはＮＧに比べ、ＳＣＧでより高濃度に存在した（単位燐脂質量当りでは約３倍）。構成成分としては、ＧＭ３、ＧＤ３、ＧＤ１ｂ、及びＧＴ１ｂが両神経節とも主要なガングリオシドであった。注目されることとしては、ＮＧにはシアロシルパラグロボシドが１０％程度存在するのに対し、ＳＣＧには検出されないことであった。２、燐脂質ではエタノールアミンプラスマローゲンがＳＣＧに比べＮＧには多く存在した。３、ＮＧではセレブロシド及びスルファチド含量が高い値を示した。一方、ＳＣＧではこの両者の含量は低いが、セレブロシドはスルファチドよりも低レベルであることが注目された。

ＮＧとＳＣＧでは脂質構成が異なっており、このことは両神経節の膜の性質が互いに異なっていることを意味しており、興味ある結果が得られた。

Key word：
neuronal lipids,　superior cervical ganglion,　nodose ganglion

摘出白鼠ＳＣＧ及びＮＧはin vitro，好気的条件下でそれぞれＮＧＦ及びＧＭＦにより刺激を受け、アミノ酸の能動的取り込みが著しく促進される（１，５）。また、中枢神経系より調製したガングリオシドとこれらの神経節を incubate すると、ＮＧでは、アミノ酸輸送系が著明に亢進し、他方、ＳＣＧでは、抑制的に働いた。ガングリオシドからシアル酸を除いた asialo GM1 や Forssman Glycolipid では刺激効果はみられないことから、シアル酸は不可欠であった（３）。本研究では、ガングリオシドによって刺激される神経節ニューロンに存在するガングリオシドの組成はどのようになっているか、また、ＳＣＧとＮＧでは、その組成に違いがあるのか否かを検討した。また、神経系の細胞膜を構成するガングリオシド以外の脂質（燐脂質、セレブロシド、及びスルファチドなど）についても検討を加えた。

〔実験材料及び方法〕

ＳＣＧ（４５ mg 湿重量）及びＮＧ（72 mg 湿重量）は Wistar 系成熟白鼠から得た。常法に従って、クロロホルム／メタノール（Ｃ／Ｍ）（２：１、ｖ／ｖ）及び５％水含有のＣ／Ｍ（１：２）で順次、脂質を抽出し、全脂質を得た。全脂質は Ladisch と Gillard(4) の方法に従い、ジイソプロピルエーテル／n-ブタノール（６：４）と５０ mM NaClで分配した後、下層からSep-Pak C18 カートリッジにより、ガングリオシドを得た。一方、上層からはガングリオシドを除く総脂質を得た。ガングリオシドはレゾルシノール塩酸法、燐脂質はBartlett 法、糖脂質はガスクロマトグラフにより定量した。

〔結果〕

ＳＣＧ及びＮＧのガングリオシドをＴＬＣ分析し、そのデンシトメーターによるパター

ンを Fig 1 に示した。SCGとNGでの相違点は、NGに存在するシアロシルパラグロボシド（LM1）に相当するピークがSCGには存在しない点である。その他の成分に関しては、それぞれ該当するピークが検出された。TABLE I にガングリオシドのシアル酸含量及び各ガングリオシドの組成を示した。SCGはNGに比べ、シアル酸含量が高値を示した。燐脂質量当りでは、SCGはNGのほぼ3倍近くを占めた。NGはシアル酸含量及び組成とも迷走神経線維（Vf）及び脊髄後根神経節（DRG）と類似していた。SCGとNGのガングリオシド組成をみると主要ガングリオシドとしてはGM3、GD3、GD1b、及びGT1b

TABLE I
Ganglioside Contents and Compositions in SCG and NG of Rats

	SCG	D-SCG	A-SCG	NG	Vf	DRG
μg NeuAc /g tissue	125	76	95	82	88	71
μg NeuAc /μmol phospholipid	4.51	3.02	3.45	1.50	1.82	0.88
(%)						
GM3	20	20	26	15	22	15
LM1	-	-	(GM1)4	11	13	13
GD3	9	10	13	16	14	13
X-1	-	-	9	-	-	-
GD1a	7	9	10	9	10	15
GD1b	21	19	14	20	17	14
X-2	8	8	4	9	8	14
GT1b	35	34	20	20	16	16

D:Denervated, A:Axotomized, Vf:Vagus fiber, DRG:Dorsal root ganglion

Fig 1 TLC Densitometric Scan of Gangliosides in SCG and NG of Rats

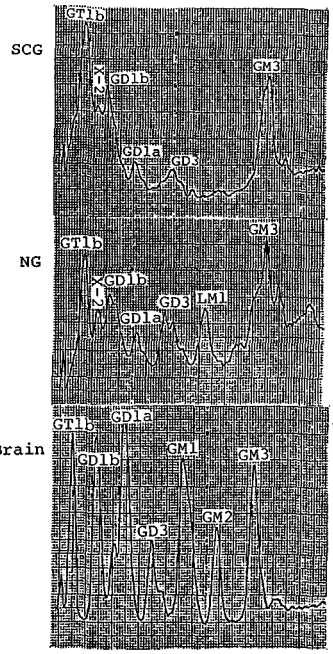
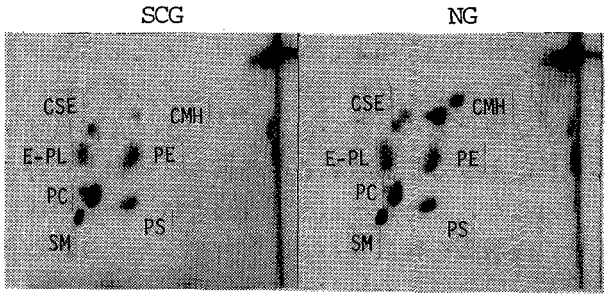


Fig 2 TLC of Phospholipids in SCG and NG of Rats



Solvent for the first dimension : Chloroform/Methanol/2.5N Ammonium Hydroxide(60:35:6, by vol.)

Solvent for the second dimension : Chloroform/Methanol/Acetone/Acetic Acid/Water (70:15:30:15:7.5, by vol.)

TABLE II
Phospholipid Contents and Compositions in SCG and NG of Rats

	SCG	D-SCG	A-SCG	NG	Vf	DRG
μmol phospholipid /g tissue	27.7	25.2	27.5	54.6	48.4	80.4
(%)						
Phosphatidylethanolamine	12			9	7	7
Ethanolamine-plasmalogen	17			29	32	31
Phosphatidylcholine	50			38	33	33
Sphingomyelin	12			15	16	17
Phosphatidylserine	9			9	12	12

D:Denervated, A:Axotomized, Vf:Vagus fiber, DRG:Dorsal root ganglion

TABLE III
Cerebroside and Sulfotide Contents in SCG and NG of Rats

	SCG	NG	Vf	DRG
μmol/g tissue				
Cerebroside	0.72	10.8	11.6	16.4
Sulfatide	1.56	5.10	6.00	11.2
μmol/μmol phospholipid				
Cerebroside	0.03	0.20	0.24	0.20
Sulfatide	0.06	0.09	0.12	0.14
(%)				
Cerebroside	31.6	67.9	65.8	59.6
Sulfatide	68.4	32.1	34.2	40.4

Vf:Vagus fiber, DRG:Dorsal root ganglion

が共通して存在したが、NGでは約１０％を占めるシアロシルパラグロボシド（LM1）の存在が特徴的であった。神経節摘出１週間前に軸索を切断されたSCG（A－SCG）では、反応性グリア細胞に伴うガングリオシド組成に変化がみられた。

次に、燐脂質及び糖脂質の２次元TLCをFig 2 に示した。NGでは、エタノールアミンプラスマローゲンがフォスファチジルコリンより多く、一方、SCGでは、これらはほぼ等量存在し

ているのがわかる。糖脂質では、セレブロシド及びスルファチドの含量が燐脂質のスポットに比べ、ＳＣＧでは少なく、ＮＧでは多いことが注目された。TABLE II に燐脂質含量とその組成を示した。全燐脂質含量はＮＧに比較して、ＳＣＧではより低い値を示した。燐脂質組成では、ＮＧはＶｆ及びＤＲＧと同様にエタノールアミンプラスマローゲンの存在比がＳＣＧに比較して約７０％増となっていた。次に、セレブロシド及びスルファチドの定量値をTable III に示した。ＮＧはセレブロシド及びスルファチドとも、ＳＣＧに比べ、多量に存在しており、前者では約１５倍、後者は約３倍含有していた。ＮＧでのこれらの脂質の組成はＶｆ及びＤＲＧと比較しても違いは認められなかった。ＳＣＧでは、セレブロシド含量がスルファチド含量のほぼ半分しか存在しないことが特徴的であった。この量的関係はＮＧ、Ｖｆ、及びＤＲＧの場合と逆関係の特徴あるパターンを示していた。

〔考察〕

ＳＣＧは単位燐脂質当りのガングリオシド量が高く、他方、セレブロシド、スルファチド、エタノールアミンプラスマローゲンなどは低く、中枢神経系の神経細胞の脂質組成と類似していた。それとは対照的に、ＮＧはガングリオシド量は比較的低く、エタノールアミンプラスマローゲン、セレブロシド、及びスルファチドに富み、神経細胞というより、むしろミエリンに類似した組成を示していた。ＳＣＧの節後線維は無髄であるのに対し、ＮＧでは有髄のため、ＮＧの脂質組成にミエリンの影響が出ていることは否定できない。また、ラットの座骨神経では、ミエリンの主要ガングリオシドとしてＬＭ１が報告されている（２）。ＮＧでＬＭ１が特異的に存在するのは、このＬＭ１がＮＧの節後線維のミエリンに含まれている可能性も同様に考えられる。しかしながら、ＳＣＧ及びＮＧの両神経節の節前線維は両方とも有髄なのに、ＳＣＧではミエリン脂質の影響がほとんどないことから、ＮＧでの脂質組成が節後線維のミエリンの影響を強く受けているとは考えにくく、むしろ、ニューロンの脂質組成をほぼ正しく示していると考えた方が妥当と思われる。細胞分画によって細胞膜からミエリンを除くと明確な答が得られるものと考えられる。次に、燐脂質量が低い値をとっているが、これは、神経節内に存在する結合組織の影響と考えられる。ＳＣＧでは特に結合組織の多いことが示唆された。次に、ＳＣＧのセレブロシド及びスルファチドの相互の量的関係であるが、通常のミエリンでの関係と異り、セレブロシドの方が量的に少なくなっている。これは、神経節内で量的に多い結合組織に由来しているのか、それとも、ニューロンの本来の構成脂質なのか明確ではないが、ミエリン脂質としては希な組成比をとっており、興味深い。

ＳＣＧとＮＧの脂質組成に違いがみられ、両神経節の膜の性質が顕著に異なることが示された。両神経節の機能的な相違と考え合せると興味深い。

〔文献〕

1. Ando,M.,Kato,T.,Tanaka,R.,& Nagata,Y.(1986) Brain Res.,373,359-364
2. Chou,K.H.,Nolan,C.E.& Jungalwala,F.B.(1985) J.Neurochem.,44,1898-1912
3. 岩田光良，安藤正人，永田豊，原厚，武富保 (1986) 神経化学,25,394-396
4. Ladisch,S.& Gillard,B.(1985) Analy.Biochem.,146,220-231
5. Nagata,Y.,Ando,M.,& Hori,S.(1985) Neurochem.Res.,10,1173-1185

208. ニワトリ胚神経系におけるC系列ガングリオシド及び硫酸化グルクロン酸含有糖脂質の変動——モノクローナル抗体による解析

小幡邦彦・平林義雄*・田中英明・安藤　進**
（群馬大・医・薬理，静岡県立大・薬・生化*，都老人研・生化**）

〔要　約〕
ニワトリ胚組織の粗膜画分を免疫原として、神経組織で特徴的な結合パターンを示すモノクローナル抗体を作製した。精製された糖脂質を用いて抗原の同定を行い、抗体M6703とM6704はC系列ガングリオシドのG_{T3}とG_{T2}を、M7103はG_{T1C}とG_{Q1C}を、M6733とM6764は硫酸化グルクロン酸含有糖脂質を認識することがわかった。これらの抗体によりニワトリ胚及びヒヨコの神経管と周辺組織及び網膜について免疫組織化学を行った。神経管が形成されるとまもなく、M6703、04は神経管と末梢神経のすべての細胞表面を染めた。M7103による染色はやや遅れて、神経管の周辺部と末梢神経に出現し、中心管周囲の未分化細胞は染まらなかった。網膜でふ化前にはこの3種の抗体はいずれも視神経層を強く染めたが、ふ化後はM6703、04が全層をうすく染めるのに対し、M7103は内網状層のみを強く染めた。M6733、64は初期には神経冠細胞とそれに由来する末梢神経のみを染めたが、やがて中枢神経組織も一様に染まるようになった。C系列ガングリオシドは魚類と鳥類胚でのみ見出されているが、M6703、6704、7103はサル脳ガングリオシドの未同定の微量画分に結合したので、哺乳類にも存在するものと考えられる。

Key word : Monoclonal antibodies: Gangliosides: Developmental changes

糖蛋白質や糖脂質の糖鎖は神経系の発生にともなって変化していき、独自の役割を演じていると考えられている。神経性細胞接着分子N-CAMは胎児型から成熟型に変化すると、そのシアル酸含量が低下し、細胞接着能は上昇する。ガングリオシドのパターンが発生過程で変動することはよくしられており（ニワトリ視葉については(7)）、そのうちいくつかのものは培養下で神経成長を促進する。

われわれは発生過程の神経組織に存在する特異的物質を見出すために、モノクローナル抗体技術を用いているが、糖脂質を認識する3種の抗体が得られたので、その抗原の同定及びそのニワトリ神経系における発生にともなう変化を報告する。

魚類及び発生過程の鳥類では、ガングリオシドの生合成経路に哺乳類にみられるA経路、B経路のほかに、C経路がある。すなわちG_{D3}からG_{D2}が合成されるほかに、G_{T3}が作られ、それから順次、G_{T2}、G_{T1C}、G_{Q1C}、G_{P1}が合成される（総説として(1)）。モノクローナル抗体M6703、M6704はともにG_{T3}、G_{T2}を認識し、M7103はG_{T1C}、G_{Q1C}を認識した。また最近、ポリニューロパチーをともなうIgM paraproteinemia患者のIgM-M蛋白の抗原分子の一つとして硫酸化グロクロン酸含有糖脂質、SGPG (sulfated glucuronic acid containing paragloboside) が発見された(3,4)。われわれの得たモノクローナル抗体M6733とM6764もSGPGを認識した。

〔方法〕

<u>モノクローナル抗体の作製</u>　M67シリーズはふ卵3日目ニワトリ胚の神経管及び体節の粗膜画分（100,000xg 沈渣）でBalb/Cマウスを免疫して得られた。M7103はふ卵17日目胚の小脳の粗膜画分を免疫原とした。ミエローマはX63-Ag8-653を用いた。限界稀釈法

によりクローニングし、抗体としては培養上清をそのままたは腹水を200倍稀釈して用いた。

薄層クロマトグラフィー（TLC）／酵素抗体法及びドットブロット解析　ガングリオシドはサル脳およびタラ脳より既法(2)にしたがって分離、精製したものを用いた。既知量の各ガングリオシドをTLCで展開した後、抗体を作用させた。またニトロセルロース膜に糖脂質混合物や未同定標品をスポットして抗体を加えた。HRPでラベルした抗マウス血清を二次抗体として発色させ、それをデンシトメーターによって定量した。

免疫組織化学　各発生段階のニワトリ胚とふ化後4週までのニワトリをホルマリン固定し、凍結切片を作製した。ふ化後のものはエーテルで麻酔し、心臓より固定液を灌流した。FITCでラベルした抗マウス血清を用いて、間接螢光抗体法を行った。

〔結果〕

2回のモノクローナル抗体作製実験（M67シリーズとM71シリーズ）で得られ、免疫組織化学により神経系を特徴的に染める抗体約30を選んだ。サル脳の15種の精製されたガングリオシドと未同定のマイナーな成分の混合物及びタラのガングリオシド標品（混合物）についてドットブロットを行った。サル脳の既知ガングリオシドに結合する抗体はなかった。抗体M6703、M6704、M7103はサル脳の未同定のマイナー成分及びタラのガングリオシドに結合した。抗体M6733、M6764はタラのガングリオシド標品に結合した。

この5個のモノクローナル抗体につき、TLC／酵素抗体法により抗原の同定を行った。図1に示すごとく、M6704とM6703はG_{T3}に強く結合しG_{T1C}（図示せず）、G_{Q1C}、G_{P1C}に弱く結合した。G_{T2}はその中間であった。G_{M3}、G_{M2}、G_{M1}、G_{Gla}、G_{Dlb}、G_{Tlb}、G_{D3}、G_{D2}(□)にはまったく結合しなかった。逆にM7103はG_{T1C}、G_{Q1C}に強く結合し、G_{T3}、G_{T2}にはほとんど結合しなかった。

M6733とM6764はウシ坐骨神経から精製されたSGPGに結合し、いずれのガングリオシドとも結合しなかった。

これらの抗体及びG_{D3}に対するモノクローナル抗体R24 (6)を用いて免疫組織化学を行った。R24では一様にうすく染色され、特徴は見出されなかった。M6703とM6704は神経管が形成されると、腹側から始まってしだいに全体に及び、中枢及び末梢神経系の細胞表面を強く染めた。日令とともに染色性が下った。M7103は神経管の発生が進むと前角部及び脊髄周辺部と末梢神経の細胞表面を染めた。神経管腔周辺の未分化細胞は染まらなかった。

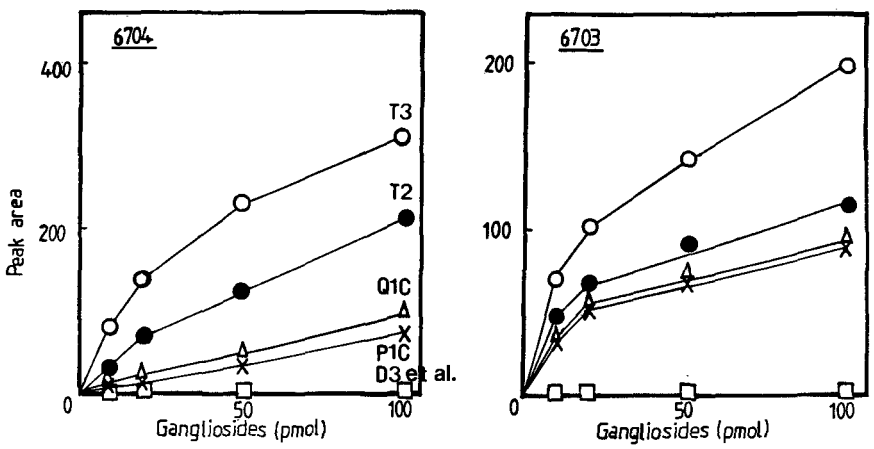


図1。モノクローナル抗体M6704とM6703のガングリオシドに対する結合。TLC／酵素抗体法により発色したスポットをデンシトメーターで定量した。□は8種のガングリオシド（本文）について。

染色パターンのめざましい変動が網膜でみられた（図2）。各層が形成されるとまもなく、M6703、M6764、M7103とも視神経線維層（OFL）を強く染めたが、やがてこの染色性は失われた。前2者の染色性は全体的に低下したが、M7103は代って内網状層（IPL）を強く染めた。

M6733とM6764は初期には神経管細胞及びそれに由来する末梢神経のみを染めたが後にはすべての中枢神経組織も染めた。

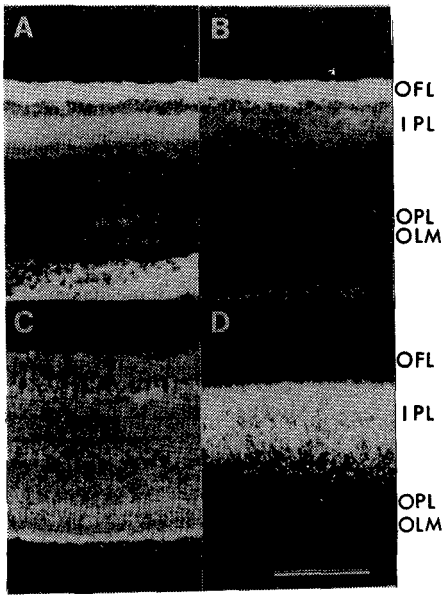


図2。抗体M6703（A、C）とM7103（B、D）による網膜の免疫組織化学。A、Bは16日目のニワトリ胚。C、Dはふ化後2週間のヒヨコ。バーは100 μm。

〔考察〕

Rösner(7)はG_{T3}、G_{T2}、G_{T1C}のC系列ガングリオシドがニワトリ胚視葉に存在し、ふ化後1週までに消失することを示した。われわれの抗体を用いたTLC／酵素抗体法でもニワトリ視蓋について確認されたが（平林ら、未発表）、網膜では存在パターンを変えて残存することが免疫組織化学で見出された。成熟哺乳動物ではC系列ガングリオシドの存在は報告されていないが、成熟サル脳の未同定成分にこれらの抗体が結合することはC系列ガングリオシドまたは他の抗原決定基を同じくするものが存在することを示す。また哺乳類でも胎児期には多いかどうか今後の検討が必要である。

Nirenbergらの得たモノクローナル抗体18B8は認識する複数の抗原の一つがG_{T3}である。この網膜における染色はシナプス層に限られ(5)、M6703、M6704の染色パターンとは異なる。Henke-Fahleの得た抗体Q211は、抗原がニワトリ胚脳の各種ポリシアロガングリオシド画分としか述べられていないが(8)、その免疫組織化学のパターンはM7103のものに似ている。

〔謝辞〕SGPGを提供していただいたDr.R.K.Yu（Yale Univ.）及びR24を供与されたDr.K.Lloyd（Sloan Kettering Cancer Center）に感謝する。

〔文献〕

1. 安藤　進（1984）蛋白質核酸酵素　29, 1146-1159.
2. Ando,S. and Yu,R.K. (1977) J. biol. Chem. 252, 6247-6250.
3. Ariga,T. et al. (1987) J. biol. Chem. 262, 848-853.
4. Chou,K.H. et al. (1985) Biochem.Biophys.Res.Commun. 128, 383-388.
5. Grunwald,G.B.et al. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82, 4008-4012.
6. Pukel,C.S. et al. (1982) J. exp. Med. 155, 1133-1147.
7. Rösner,H. (1982) Brain Res. 236, 49-61.
8. Rösner,H. et al. (1985) Dev. Brain Res. 18, 85-95.

209 ラット脳内酸性および中性糖脂質に及ぼす母体性高Phe血症の影響

原田　寧・小木曽　学・大田昌子・平野修助
（東邦大・医・第二生理）

〔要　約〕

母体性高Phe血症ラットにおける脳内ガングリオシドは加齢に伴った変化を示し、成熟ラットにおいてシナプスおよびデンドライトの低形成を示唆する。このガングリオシドの分子種内subspeciesの構成について、および中性糖脂質の変化について詳細な検討を加えたところ大脳皮質および線条体のGD1a、GM1のsubspeciesに変動が認められた。また、中性糖脂質においてもガラクトセレブロシドの減少ならびにサルファチドの著明な減少が認められ、他にも同定されない多糖成分の脂質の減少が見られた。これらの膜構成糖脂質の減少がシナプス、デンドライトなどの特殊に分化した膜の形成不全に係わっている可能性があるものと推測された。

Key word：　maternal hyperphenylalaninemia,　gangliosides,　neutral glycolipids

緒言

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(4)。本モデル動物はミエリンの低形成が、CNPase活性の低下により示唆されたが、前回までの研究でシナプスあるいはデンドライトの低形成も示唆され(3)、特異的に分化した膜の構成成分変化あるいは膜のmicroheterogeneityについて解析する手掛りを得た。これらについて糖脂質の面から詳細に検討すべく酸性および中性糖脂質を抽出し、解析したので報告する。

I　実験方法

I-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(9:00, 14:00, 19:00)強制経口投与し、出生した雄動物を用いた。なお、交尾の確認された日を妊娠０日とした。分娩は自然分娩とし、生後４日に同腹仔数を８匹に調整した。離乳は生後21日に行ない、以後雌雄別にリッターごと飼育した。飼(日本クレア株式会社、ＣＥ－２)、水は自由に摂取させ、温度23±１℃、湿度50±５％の空調を施した動物室で午前６時から午後６時までの12時間人工照明下で飼育した。

I-2　脳重量：生後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、Glowinski & Iversenの方法(1)に従って大脳皮質、海馬、線条体、視床下部を採取して重量を測定した。

I-3　糖脂質の抽出：クロロホルム・メタノール（ＣＭ）により総糖脂質画分を抽出後、Ledeenらの方法(6)に従ってDEAE-Sephadexによるイオン交換クロマトグラフィで酸性と中性糖脂質を分離した。酸性糖脂質画分はアルカリ処理して脂肪を除去した。

I-4　ガングリオシドの定量：酸性糖脂質画分についてWarrenの方法(9)でN-アセチルノイラミン酸を測定しガングリオシドの量とした。

I-5　糖脂質のHPTLCによる展開：酸性・中性脂質ともＣＭに溶解してHPTLCに載せ、C:M:0.25%$CaCl_2$＝55:45:10の溶媒(A)で展開した。発色試薬は酸性にはレゾルシノール塩酸、中性に

はオルシノール硫酸を用いた。

I-6 ガングリオシド・マッピング：酸性糖脂質についてはIwamoriらの方法(5)に準拠して酢酸型DEAE-Sephadex、0.05-0.45M酢酸アンモニウム連続濃度勾配による分画を行ない、それぞれを連続的にHPTLCにスポットして上記展開溶媒 Aで展開し発色し比較した。

I-7 2次元TLC：酸性糖脂質についてはさらに、Ledeenらの方法(7)に従って2次元TLCを行なった。展開溶媒は A液およびC：M：2.5^{N}アンモニア水＝60:40:9を用いた。

II 結果と考察

PKU 群の大脳皮質および海馬湿重量は正常対照群と比較して低値を示したが、他の部位には特に重量低下は認められなかった。

PKU 群の各部位における中性糖脂質のHPTLCスキャンニング・パターンを見ると大脳皮質部および海馬でサルファチドの減少が認められた。ガラクトセレブロシドは全ての部位で減少が認められた。また、多糖性の分子種が２つ認められたが、これらもPKU 群では減少しており、現在それらの同定を急いでいる(Fig. 1)。

PKU 群の各部位におけるガングリオシドのHPTLCデンシトメトリック・パターンを見るとGD1aおよびGM1は２峰性のピークを示し、大脳皮質部ではその比率が減少し、線条体ではその比率が増加しているのが示された(Fig. 2)。海馬では差は見られなかった。

ガングリオシド・マッピング(Fig. 3)および２次元TLC(Fig. 4)により大脳皮質部について詳細に検討したところGM1の増加したsubspesiesはfucoseおよびN-glycolylneuramic acidsを含有する分子と推定された。GD1aのsubspeciesについてもほぼ同様の分画が認められ、PKU 群ではこの分画の量が増加した。

GD1aは神経細胞、シナプスなどに豊富に存在し(11)、GM1はニューロン、シナプスおよびミエリンにも存在している(10)。一方ガラクトセレブロシドについてはオリゴデンドロサイトのマーカーとして用いられ(9)、サルファチドもミエリン膜に多いとされている(2)。以上のことからPKU 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るが、脳の部位別に変動の認められることの意義について、また、神経細胞の膜にしても細胞体部と突起部、突起部も軸索と樹状突起で構成糖脂質に変化があるかどうか、さらに検討する必要があるものと思われる。特に今回明らかとなったシアル酸の分子種変異が細胞間認識の上で意味のあることか、あるいは代謝的な異常を反映した結果なのか極めて興味深い。

文献

(1) Glowinski,J. and Iversen,L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 655. (2) Goldberg,I.H. (1961) J. Lipid Res. 2, 103.(3) 原田寧 (1987) 東邦医会誌 34, 16. (4) Hirano,S., Takagi,Y., Kanamatsu,T., Nakai,K.(1987) Neurochem. Res. 10, 1071. (5) Iwamori,M. and Nagai,Y. (1978) Biochim. Biophys. Acta 528, 257. (6) Ledeen,R.W., Yu,R.K. and Eng,L.F.(1973) J. Neurochem. 21, 829. (7) Ledeen,R.W., Haley,J.E., and Skrivanek,J.A. (1980) Anal. Biochem. 112, 135. (8) Raff,M.C., Fields,K.L., Hakomori,S., Mirsky,R., Pruss,R.M., and Winter,J. (1979) Brain Res. 174, 283. (9) Warren,L. (1959) J. Biol. Chem. 234, 1971. (10) Willinger,M., and Schachner,M.(1980) Dev. Biol. 74, 101. (11) Yusuf,H.K.M., Dickerson,J.W.T.(1978) Biochem. J. 174, 655.

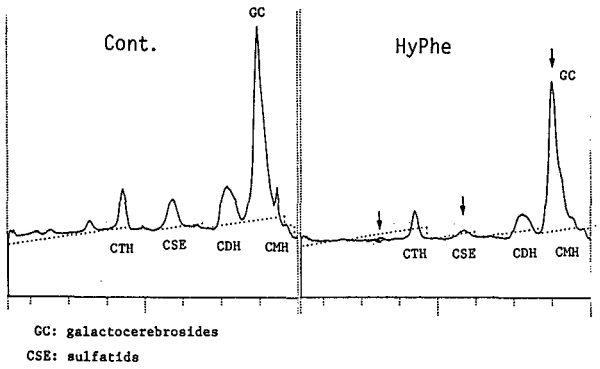


Fig. 1.
Densitometric pattern of neutral glycolipids in the cerebral cortex. Arrows indicate decreased fractions in HyPhe rat.

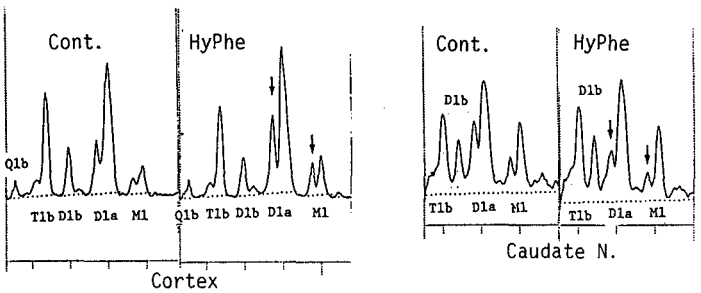


Fig. 2.
Densitometric pattern of gangliosides in the cerebral cortex and caudate nucleus.
Arrows indicate altered fractions in HyPhe rat.

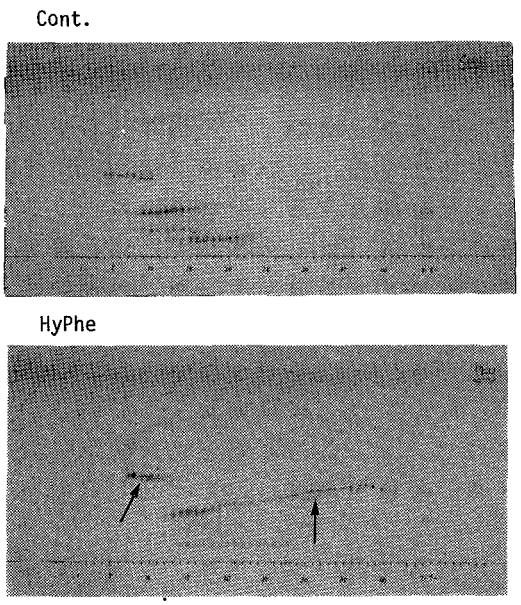


Fig. 3.
Ganglioside mapping.
Gangliosides were fractioned using DEAE-Sephadex column by the continuous elution of 0.05 - 0.45 M ammonium acetate in methanol. Aliquots of each fractions was spotted on the HPTLC plate.
Solvent, C:M:0.25%$CaCl_2$ = 55:45:10

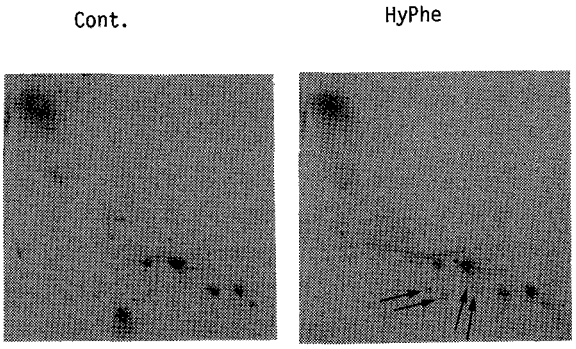


Fig. 4.
Two-dimensional TLC for gangliosides.
Solvent,
1; C:M:0.25%$CaCl_2$ = 55:45:10

2; C:M:2.5^{N}ammonia= 60:40:9
Arrows indicate altered spots in HyPhe rat's cerebral cortex.

210. 網膜萎縮症マウス網膜の変性とカルモデュリン

佐野　護・北島哲子・大島章子

（愛知県コロニー研・形態）

〔要　約〕

遺伝的網膜変性症（イヌ）の網膜では，カルモデュリン(CaM) 量の低下が認められ，病因との関連性が指摘されている．　マウスでも同様の遺伝的網膜変性症の系統(C3H) が知られている．　このマウスの網膜の変性に於けるCaM の動態を免疫組織化学的に検討したところ，　[1] 網膜の変性は，形態学的には，光受容層の選択的消失であるのに対して，CaM はそれ以外の層，特に視神経，神経節細胞，内，外網状層などに局在が見られた．　[2] 変性の進行に従い，CaM の染色度の低下が認められ，CaM 量の低下が示唆された．　[3] マウスの網膜に於ける神経特異性エノラーゼの局在はCaM のそれと酷似しているが，エノラーゼの場合正常および疾患網膜とも生後 2週あたりから，染色度が急増する点で，CaM の場合と異なっている．　[4] ウエスターンブロッティング法により，相対的ではあるが，正常および疾患網膜で網膜全体のCaM 量を比較したが，蛋白質あたりの量に差は認められなかった．しかし変性の進行した網膜ではCaM の少ない光受容層が欠損しているので，むしろ蛋白質あたりの量は増加しても良い．免疫組織化学の結果と考え合わせると，疾患網膜ではCaM の局在する層でCaM 量の低下が起きていると考えられる．

Key word：　Calmodulin, Retinal dystrophy, Neuron-specific enolase

CaM は全ての有核細胞に存在し，多様な生理的機能に関与する事が知られているが，脳神経系では一般組織に比べ5-10倍も多量のCaM を含有する．　これまで脳神経組織でCaM の局在を免疫組織化学的に調べた結果，CaM は神経細胞とその繊維に特異的と言える局在を認めてきた(1,6,7)．　遺伝的網膜変性症のイヌの網膜では，CaM 量の低下が指摘されている (3)．　変性は主として光受容層の急激な崩壊であり，それに伴なって１部の蛋白質や酵素が低下しても不思議では無い訳であるが，一体，網膜の何処にCaM が存在し，疾患の進行に於いてどの様に低下するのか明らかでは無い．

そこで類似した遺伝的網膜変性症のマウス(C3H) を用いて，網膜の変性過程に於けるCaM の動態を，CaM 抗体を用いた免疫組織学的方法により検討を行なった．　またウエスターンブロッティング法により，用いた抗体のマウス網膜に対する特異性の検定を行なうと同時に，網膜のCaM 量の変化を調べた．　また神経細胞に特異的に存在する酵素 γ－エノラーゼについても網膜の変性時の状態を調べ，CaM と比較検討した．

［実験方法］

免疫組織化学：　抗CaM 抗体，抗 γ－エノラーゼ抗体，抗S100抗体は，ウシ大脳より精製した抗原に対しウサギを用いて作製し，特異IgG 分画をアフィニティー精製した標品を用いた（2)．　網膜変性症のマウス(C3H) および対照としてC57BL の眼球を摘出し，レンズ側から切目を入れ，　3.7% パラホルムアルデヒド，50 mM 燐酸緩衝液(pH7.4) 中に 2-3週間固定後，通常の方法でパラフィン切片を作製した．　脱パラフィン後，10% ヤギ血清を含むBSA-Tris-Salin (1% BSA,0.9% NaCl,20 mM Tris-HCl, pH 7.4) で処理し，一次抗体(8ug IgG) および２次抗体として抗ウサギIgG ヤギ抗体パーオキシダーゼ標識(MILES-YEDA 製）で順に処理しジアミノベンチジンによる発色

により観察した．方法の詳細は他の報告中に示した（4,5）．

ウエスターンブロッティング法：　マウス網膜(5-10 頭）を顕微鏡下で分離し，-80度で保存後，0.5% Lubrol-PX, 10mM$MgCl_2$, 5mM EGTA, 0.15M NaCl, 300mM Sucroseおよび2mM のBenzamidin, 2mM のPMSFを含む20 mM Tris-HCl溶液中，超音波破砕によってホモゲナイズし，ポリアクリルアミド(7.5%)スラブ電気泳動を行う．　0.7% 酢酸溶液中，1V/cm,48hr，アクリルアミドゲルよりニトロセルロース膜へ電気的に転写した．　ニトロセルロース上のCaM は免疫組織化学と全く同様の方法で発色させた．

［実験結果］

正常マウス(C57BL) 及び網膜変性症のマウス(C3H) ホモジネートを電気泳動で分離，ニトロセルロース膜に転写し，CaM 抗体で免疫染色を行なった．　マウスの種，週齢に拘わらず，対照に示した精製CaM と同じ分子量の部分のみに発色が見られた．　この事実は，マウス網膜に於いてCaM の免疫組織化学を行なった実験条件，および用いた抗体の妥当性を示している．

正常マウス網膜を各種抗体を用いて免疫染色を行なった．　非免疫IgG では全く発色が見られず，S100　抗体の場合も視神経繊維の一部にわずかな染色を認めるのみであった．　一方，CaM およびγ－エノラーゼ抗体の場合は神経節細胞層と内，外網状層に染色が見られた．　網膜変性症の発生を形態学的に観察すると，光受容層，外顆粒層，外網状層等の確認出来る様になる10日頃までは，正常網膜と殆んど区別出来ないが，生後 2-3週の間に，光受容層，外顆粒層が完全に消失する．　CaM はこれら消失する部域には少ない為，萎縮の進行した網膜では対照に比較してCaM 染色陽性の部域が広い．（図１）　しかしCaM の染色の程度は低く不明瞭さが見られた．

ウエスターンブロッティングの結果は，蛋白質あたりのCaM 量の比較を表すが，C3H およびC57BL の網膜の発生に於いて，その差は認められなかった．　但し，いずれの場合も１週目は低くその後増加が認められた．

C3H マウス網膜の変性過程に於いて，神経特異性γ－エノラーゼの局在の変化についても調べた．（図２）　網膜変性の起る生後 2-3週にかけて染色度が増加し，また網膜の変性の進行によっても低下しない様に思われ，CaM の場合とは異なった．

［考察］

CaM は網膜に於いても，特に神経細胞に局在し，神経特異性γ－エノラーゼと酷似した分布が認められたが，エノラーゼはCaM より遅れて誘導される事実から，CaM が神経細胞のより基本的な機能に役割を果している可能性が推察される．

CaM は網膜の変性の際，変性の見られない部域に局在している．　しかし，それらの部分でもCaM の低下の可能性が，免疫組織化学およびウエスターンブロッティングの実験結果から示唆された．　光受容層が崩壊すると，その他の層にも何らかの変化が生じ，CaM の低下もその一つであるとも解釈される．　しかし，γ－エノラーゼの場合，光受容層の変化と無関係に増加が見られ，必ずしも網膜全体に変性が生じているのでは無い事を示唆している．　神経系では一部の重要な細胞の異常によって決定的な機能障害が生じ得る．　網膜は比較的少数に分類される細胞群から構成されているが，同じアマクリン細胞も機能的には20以上にも分類されると言われる．　CaM の低下が特定の細胞の消失であるのか，細胞あたりの含量の低下であるのか今後の検討が必要とされる．

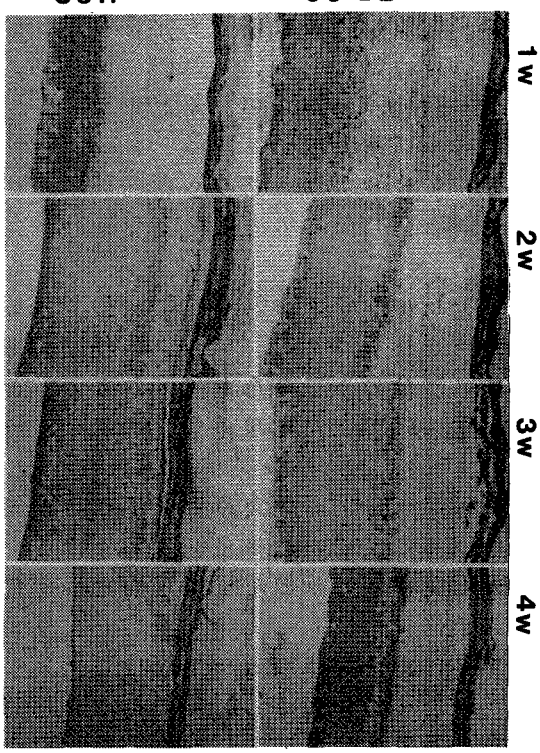


図１．網膜の発生とカルモデュリンの分布．網膜変性症(C3H) と正常マウス(C57BL) 生後（ 1-4週）の網膜パラフィン切片について，間接パーオキシダーゼ法によりカルモデュリンの染色を行なった．

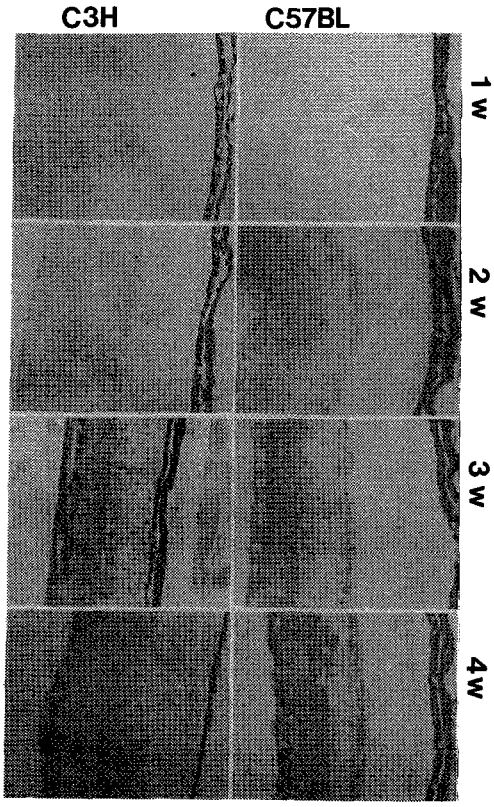


図２．網膜の発生と －エノラーゼの分布．網膜変性症(C3H) と正常マウス(C57BL) の生後（ 1-4週）の網膜パラフィン切片について，γ－エノラーゼの染色を行なった．

謝辞： この研究に用いたS100およびγ－エノラーゼ抗体を恵与戴いた愛知県コロニー，生化学部，加藤兼房先生，また標本の作成に技術提供戴いた同共同研究科，河村則子氏に深謝致します．

［文献］

(1) 大島章子，北島哲子，佐野護 (1984) 蛋白質，核酸，酵素，26:1508-1518
(2) Kitajima,S.,Seto-Ohshima, A.,Sano,M.,Mizutani,A.(1983) J.Biochem.,94,559-564
(3) Liu,Y.P.,Krishina,G.,A,Aguirre,G.,Chader,G.J.(1979) Nature ,280,62-64
(4) Sano,M.,Seto-Ohshima,A.,Kitajima,S.,Mizutani,A.(1987) J.Exptl.Zool., 241 51-59
(5) Sano,M.,Seto-Ohshima,A.,Kitajima,S.,Kato,K.(1987) Method in Enzymol., 139, 595-504
(6) Seto-Ohshima,A.,Kitajima,S.,Sano,M.,Mizutani,A.(1983) Histochemistry,79 251-257
(7) Seto-Ohshima,A.,Yamazaki,Y.,Kawamura,N.,Kitajima,S.,Sano, M.,Mizutani.,A (1987) Histochemistry,86,337-342

211. カルモデュリンの in vitro および in vivo におけるリン酸化の検討

中村泰治・中条茂男・増田　豊・中谷一泰
（昭和大・薬・生物化学）

〔要　約〕

Calmodulin(CaM) が casein kinase 2(CK 2)によりin vitroでリン酸化されることをすでに報告した(1)。本実験では、in vitroおよびin vivo におけるCaM のリン酸化反応について、さらに詳細な検討を行い、以下の結果を得た。

in vitro実験

1) CaM のCK 2によるリン酸化反応はsubstoichiometryで、CaM 1分子に0.01 molのリン酸基の取り込みしか見られなかった。
2) CaM のCK 2によるリン酸化部位はSer-101 であった。

in vivo 実験

3) 可溶性画分(S2)および膜画分(P2)とも、リン酸化された主要な蛋白質はSDS-PAGE上CaM とほぼ同じ移動度を示したが、fluphenazine-Sepharose column に吸着しないことからCaM とは異なる蛋白質であると考えられた。
4) Fluphenazine-Sepharose column に吸着したCaM への^{32}P の有意な取り込みは認められなかった。

Key word : **calmodulin, casein kinase, phosphorylation**

CaM はこれまでにin vitroで CK 2(1),phosphorylase kinase(2)およびsrc-kinase(3)によりリン酸化されることが報告されているが、そのリン酸化部位や反応の詳細については明らかにされていない。また、CaM のin vivo におけるリン酸化反応について解析した結果、S2およびP2画分にSDS-PAGE上CaM とほぼ同じ移動度を示した蛋白質のバンドに一致して^{32}P の強い取り込みが認められた。この蛋白質は、S2およびP2両画分をlithiumdiiodosalycylate(LIS)で処理後、フェノール抽出を行うことによって部分精製することができた。その性質についても併せて報告する。

［実験方法］

CaM のリン酸化反応、およびラット腹水肝癌細胞AH-66 からのCK 2の精製は既報(4)に従って行った。CaM の精製およびLIS-フェノール抽出は既報に準じて行った(5)。ペプチドマップは酵素分解後、ODS-120Tカラム(7.5 x 250 mm)を用いたHPLCにかけ、5-70 %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を行い作成した（1 ml/min）。in vivo におけるリン酸化反応は、マウスの脳室内に[^{32}P]H_3PO_4(20-30 uCi)を直接注入後S2, P2を調製し、SDS-PAGEを用いて解析した。アミノ酸配列は気相シークエンサー(Applied Biosystems 470 A)により分析した。

［結果］

CaM はin vitroでCK 2によりリン酸化され、リン酸基の取り込み量はnative CaM 1分子あたり0.01 molであった（図１）。しかし、あらかじめアルカリ溶液中で熱処理したCaM を基質として用いると、32P の取り込み量は顕著に増加した。Native CaMのCK 2によるリン酸化部位を解析するため、リン酸化ペプチドの単離を行った。リン酸化CaM をlysylendopeptidase消化後、ODS-120Tカラムを用いてペプチドマッピングしたところ、１本のピークのみが^{32}P でラベルされていた。さらに、このリン酸化ペプチドをtrypsin 分解を行い同様にペプチドマップを作成した（図２）。リン酸化ペプチドはピーク１にのみ認められ、このペプチドのアミノ酸配列はCaM のN 末端から95-107のペプチドに相当していた。このペプチドは唯一つのSer(101)を含み、リン酸化アミノ酸分析によりリン酸化Ser のみが検出されたことから、CK 2のCaM のリン酸化部位がドメインIIIに位置するSer-101 であることが明らかになった。

マウス脳室内に[^{32}P]H_3PO_4を投与し、CaM がin vivo でリン酸化されるかどうかを調べた。投与２時間後、全脳を摘出してS2，P2を調製しリン酸化ペプチドをSDS-PAGEにより解析した結果、主要なリン酸化蛋白質はCaM と同じ移動度を示した。そこで、S2、P2をLIS-フェノール抽出し得られた水層を直接SDS-PAGE（図３）、あるいはfluphenazine-Sepharoseカラムを用いて解析した。S2,P2 画分から部分精製したこの主要なリン酸化蛋白質は両者とも同カラムには吸着しなかった。一方、吸着したCaM への有意な^{32}P の取り込みは認められなかった（図４）。

［考察］

CaM のCK 2によるin vitroのリン酸化がsubstoichiometryであること、および in vivoにおいてCaM が有意なリン酸化を受けないことから、CaM がCK 2の生理的基質である可能性は少ないと考えられた。また、in vivo でリン酸化されCaM と同じ移動度を示した蛋白質の本態は今のところ不明であるが、すでに本学会で報告したSPM-23(5) やミオシン軽鎖である可能性が考えられ、これらについては現在検討中である。

［文献］

1) Nakajo, S., Hayashi, K., Daimatsu, T., Tanaka, M., Nakaya, K. & Nakamura, Y. (1986) Biochem. Int., 13, 687-693.
2) Plancke, Y. D. & Lazarides, E. (1983) Mol. Cell. Biol., 3, 1412-1420.
3) Fukami, Y., Nakamura, T., Nakayama, A., & Kanehisa, T. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 4190-4193.
4) Nakajo, S., Shinkawa, K., Shimizu, T., Nakaya, K. & Nakamura, Y. (1985) J. Biochem., 96, 1575-1585.
5) 中村ら 神経化学 (1986) 25, 361-363.

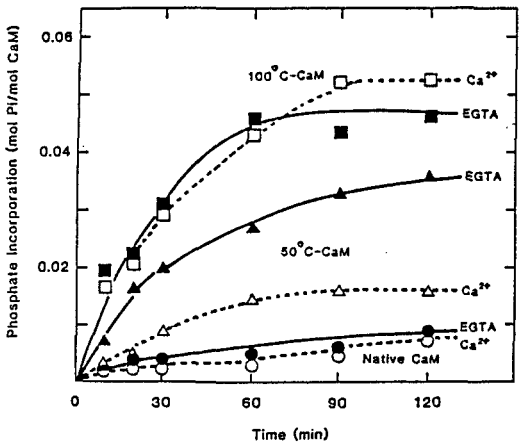


図1　CaM のCK 2によるリン酸化反応の経時変化
Native CaM (50 μg) (○,●), 0.1N NaOH 100°C で処理した CaM(□,■)　および50°Cで処理した CaM (△,▲) を160 単位のCK 2でリン酸化した。破線は0.2 mM $CaCl_2$実線は0.4 mM EGTA を含む。

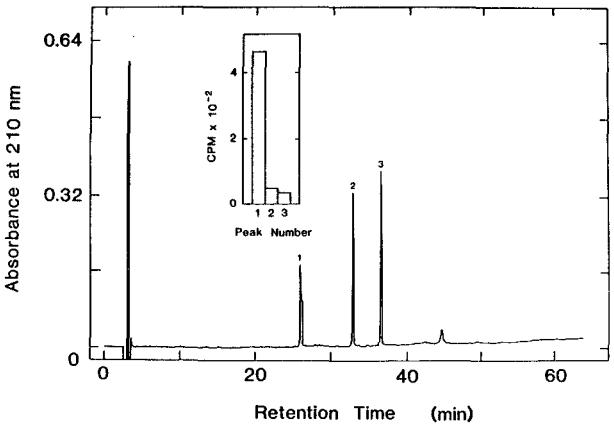


図2　リン酸化 CaM　のペプチドマップ
CK 2でリン酸化した CaMをlysylendopeptidaseで消化後、ODS-120Tカラムを用いたHPLCによりフラグメントを分離し、リン酸化されたペプチドを分取し、トリプシン分解後同様のHPLCによりペプチドマップを作製した。
挿入図は各ピークの放射性リン酸基のカウント。

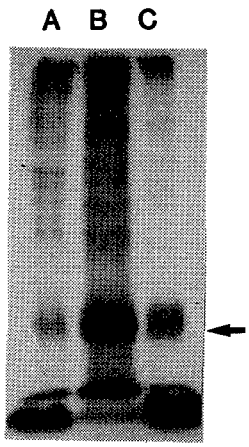


図3　P2, S2をLIS-フェノール抽出した分画のSDS-PAGE後のオートラジオグラム。
A; LIS- フェノール抽出前のS2
B; S2
C; P2
矢印はCaM の移動度を示す。

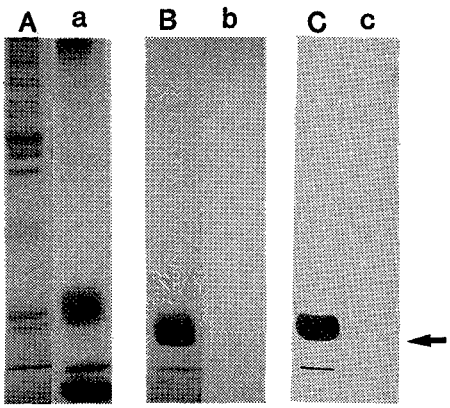


図4　Fuluphenazine-Sepharose カラムによるP2およびS2の分析。
A; P2の未吸着分画(CBB染色)
B; P2の吸着分画 (CBB 染色)
C; S2の吸着分画(CBB染色)
a-c; A-C のオートラジオグラム。
矢印はCaM の移動度を示す。

人名索引 (ABC順)

〔数字は掲載ページを示す〕

(A)

安部浩司……415
阿部純子……292
阿部輝雄……388
阿部敏明……415
足立皓岑……349
相内敏弘……352
相沢貴子……76・250
安島綾子……499
秋元潔……364・502
秋山一文……172・175・502
秋山万里子……55
安藤正人……643
安藤進……646
青山淳夫……70
荒井裕一朗……352・355・451
荒木一明……64・67
有賀敏夫……409
朝倉幹雄……112・115
朝倉正……607
浅野富子……34・322
浅尾博一……91
阿瀬勝彦……46
粟野菊雄……91
東均……553
Agrawal, D. ……418
Agrawal, H.C. ……418
Angelides, E.J. ……265・268

(C)

Cacabelos, R……556・559
Catterall, W. A. ……391
Changeux, J. P. ……304

(D)

出口武夫……160
Deluermoz, S. ……91
Duncan, I. D. ……424

(E)

戎弘志……631
枝松礼……580
江頭亨……97
遠藤真澄……421
衛藤義勝……223・226・382

(F)

藤尾慈……163
藤澤仁……454
藤島正敏……121
藤末毅……526・529
藤田啓介……52
藤田公和……631
藤田信也……61
藤原道弘……397
藤原豊……364・502・535
藤原祐子……415
福田英俊……463
福田光宏……112・115
福井裕行……559
古市貞一……73
古木義弘……610
古田知久……310・313
Fernandez, L. ……316

(G)

権藤雄二……190・550
五嶋良郎……118
後藤恵……478・583

(H)

羽場久美子……547・595
芳賀和子……334
芳賀達也……331・334
萩野顕彦……220
濱口勝彦……571
濱村貴史……364・502
花田進……538
原厚……643
原健二……463
原諭吉……229
原田博之……469
原田菜穂子……493
原田俊樹……364・535
原田寧……649
原尻慎一郎……361・373
播口之朗……91・265・268
長谷純宏……634
長谷川和夫……112・115
長谷川武史……181・469
橋本規……46
橋本健志……538
橋本誠一……220
畑直人……127
畠中寛……202・208・229・232・280
早坂清……94
林謙一郎……205
日高弘義……49
東原慶一……580
東田陽博……343
樋口宗史……58

樋口義信……628
平林義雄……646
平井久美子……586
平井みどり……538
平井基陽……85
平松緑……586
平野均……442
平野誠……121·442·466·496
平野修助……406·616·649
平岡千恵……148
平田ゆかり……544
廣内雅明……130·520
本田千穂……310·313
本田教一……88
本多健治……145
本多利幸……211
堀誠治……178
堀江繁……613
星野仁彦……88
細田弘吉……43
細川斉子……211
細川武……571
堀田和泉……109
堀田善裕……472
Henderson, C. E.……304

(I)

井端由紀郎……298
市田成志……526·529
市川友行……160
市村徹……64
一瀬宏……52
市山新……331
井田博幸……226·382
井田能成……190·196·358·508·550
飯島敏夫……280
井川玄朗……85
猪川和興……490
池田久男……379·598
池田和人……37
池田益啓……592
池田義孝……607
池中一裕……70·73·634
今福淳……112·115
今井千佳……325
今井康夫……619
今泉美佳……124·322
今泉太郎……28
今村与志子……532
今澤正興……346
稲永和豊……361·373·496·550
伊野美幸……112·115
猪木令三……619
猪口隆洋……373
井上信博……583
井上順雄……229
犬塚貴……61·565
石田功……160
石井加代子……160
石井豊……532
石川博……223
石川紘一……511·532
石岡憲昭……574
石谷良一……523
礒辺俊明……64·157·169
伊藤あつ子……43
伊藤文之……382
伊藤仁一……235·292·301
岩倉克臣……28
岩本佳代子……139
岩崎克典……397
岩崎靖乃……73
岩田大二……412
岩田光良……433·643

(J)

Jones, J. F.……391

(K)

加太英明……184
門田健……589
門田朋子……589
門脇浩三……163
鹿川哲史……73
鹿子島裕士……121·466·496
神庭靖子……340
神庭重信……340
亀山正邦……100·436·463
上村宏……469
神尾善郎……235
神谷大雄……145·376·628
金松知幸……439·616
神田啓子……163
金田典雄……52
金子元久……88
金行孝雄……370·394·445
菅野智行……88
假屋哲彦……490
柏俣重夫……403
粕谷淳子……166
片岡泰文……367
加藤浩……235
加藤兼房……84·244·322
加藤隆一……142
加藤武……499·622·625
加藤匡宏……109
加藤尚彦……472

加藤泰治……235·244·292·301
加藤幸雄……253
川口毅……103
川西悟生……139
河野雅弘……580
河野輝昭……316
川嶋信吾……100
河田正仁……37
河田牧男……547·595
風早靖子……364·502
吉川潮……43·46
菊地章……37
金馬義平……97
木村宏……463
杵鞭宏育……352·355·451
木下博……376
木皿憲佐……355·451
岸文雄……52
岸本英爾……79·82
岸本年史……85
北島理恵……103
北島哲子……403·652
北本年弘……166
北村登……538
北村佳久……31
北山功……193
鬼頭昭三……148
小林和人……52·409
小林恒之……232
古賀照邦……373
小暮久也……187
高坂新一……211·298·319
小出直……631
小池達郎……286·295
小泉修一……367
小島秀樹……361·373
小嶋久子……103·493
児島伸彦……253
小宮義璋……271·274
近藤淳……211
小笹貴史……592
古瀬明子……43
越川憲明……541
越村邦夫……436
小山英樹……319
九穂泰三……511
久保周一郎……25
久保孝夫……118
窪田博……112·115
工藤佳久……283
工藤喬……268
熊谷善弘……505
熊倉鴻之助……124·232·367
熊代永……88
国塩勝三……310·313
国下龍英……421
郭哲輝……55·214
蔵本悦郎……412
栗原堅三……25
栗原正紀……316
栗原正……61·250
栗岡晋……178·574
栗山欣弥……130·328·520
黒田英世……136
黒田洋一郎……406
黒川正則……274
黒木俊秀……121·466·496
黒澤美枝子……628
黒沢良和……52
桑野良三……64·67
Kebabian, J. W.……610
Kopp, N.……91

（M）

前田信明……427
間宮群二……544
真鍋敬……157
馬目太永……88
丸野内棣……247
丸山六三……208
正田篤弘……526·529
正木直子……199
正宗研……262
増田豊……655
松田誠……178·307·607
松田成久……526·529
松田友宏……151
松田譲……217
松井啓……562
松井英男……229
松井和隆……223
松井嘉樹……505
松角康彦……583
松海信彦……310·313
松本明……511
松本元……280
松本健五……310·313
松本孝……121·442·466·496
松永雅美……352
松岡一郎……25
松下正明……49·82
松谷天星丸……544
松澤健夫……577
三木浩司……361
三木直正……55·214
御子柴克彦……70·73·259·427·634

三森康世……436
美根和典……397
箕越靖彦……487
三島宣哉……310・313
三須良実……118
三田達雄……538
三浦正幸……70・259
三浦貞則……103
三輪博……376
宮原正……178・223
宮川洋二……124・232
三宅正治……289
宮本篤……337
宮本英七……478・583
宮本侃治……346
宮本美也子……400
宮武正……61・409・565
宮谷真正……235
三好理恵……148
溝部文夫……139
溝渕宗秀……307
水木泰……442
水野有武……307
水野智……562
水野美邦……460
水田正……325
桃井真里子……166
桃井隆……166
森昭胤……184・580・595
森和夫……316
森真由美……151
森口聡……73
盛政忠臣……370・394・445
森本清……172・175
森野日出緒……289
森島義行……148
森田規之……634
森分隆……172
本橋伸高……490
村上秀樹……319
村上哲英……514
村山知行……322
Michel, J. P. ……91

(N)

永井克孝……238
長池一博……211
永島亮……628
長嶋和郎……415
永田豊……433・631・643
永津俊治……52・448
永吉道子……544
中河原通夫……490
中原辰雄……121・442・466・496
中井貴……85
中井隆……538
中井康光……613
中島淳子……238
中嶋照夫……181・469
中条茂男……655
中木敏夫……142
中村薫……121・466・496
中村重信……100・436・463
中村豊紀……193
中村祐……268
中村泰治……352・655
中村和生……103
中西純一……112・115
中野智……100・436
中尾純治……181・469
中尾真……229
仲田義啓……148
中谷一泰……352・655
中沢淳……52
波間美佐子……484
直井信……448
根木哲郎……514
二本松伊都子……202
新川久義……556・559
新延道夫……427
西彰五郎……361・373
西川浩……172・175
西川正雄……328
西川清方……199
西川徹……127
西本詮……310・313
西村健……91・265・268・553・556・559
西野直樹……538
西山活二……361
西山照正……334
西崎純……112・115
西塚泰美……43・46
野口鉄也……406・439
野路久仁子……301
野倉一也……205
野村純一……193
野村恭一……568・571
野村正彦……517・562
野村靖幸……31
能登直……181・469
沼田吉彦……88

(O)

小原嘉彦……577
小幡邦彦……253・646
織田銑一……187
小田原俊成……79
小笠原信明……244

小川加寿子……544
小川希代子……415
小川紀雄……547·595
荻原政彦……523
小木曽学……406·649
荻田喜代一……133·481·604
小口雅申……190·358·502·550
小倉明彦……283
大原浩一……331
大垣孝雄……481
大森敬之……328
大野史郎……79·82
大鹿英世……337
大島章子……652
大田昌子……406·649
大谷義夫……103
小鹿幸生……205
岡弘章……526·529
岡部登志男……400
岡田英俊……370·394
岡田三津子……397
岡田理之……379·598
岡田尚志郎……457
岡本浩一……484
岡村邦博……562
岡野栄之……70·73
奥村展枝……346
奥野幸子……454
奥山治美……517
奥山典生……64·157·169
小野信文……376
小野聡……139
小野田幸治……49
小野寺宏……187
大平敦彦……403
織部裕明……85
大沢弘吉……85
大月三郎……172·175·364·502·535
小澤光一郎……175

(P)

Penar, P. ……316
Putnam, F.W. ……169

(Q)

Quarles, R.H. ……424

(R)

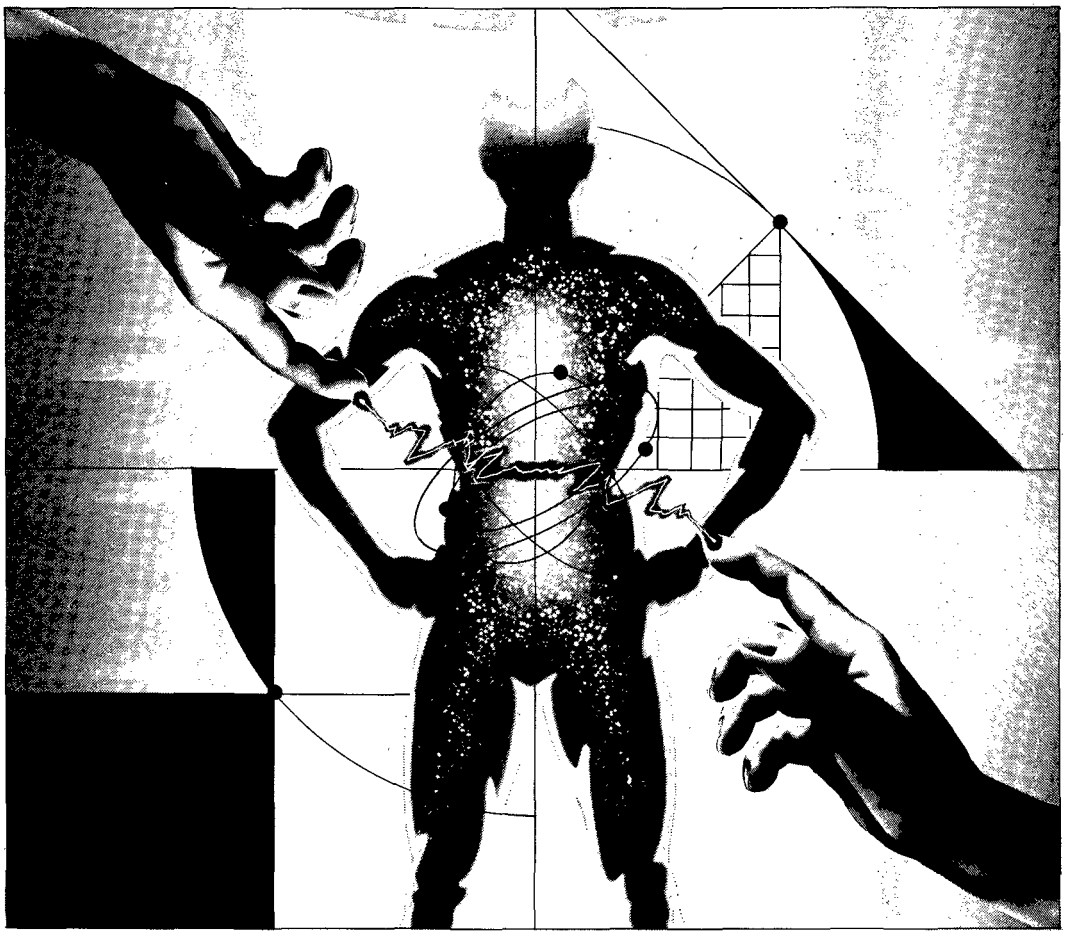
Reber, B.F.X. ……391
Richard, F. ……91
Richelson, E. ……340
Roberts, E. ……430
Roth, R.H. ……196

(S)

西須英雄……388
斎藤昌之……487
斎藤道子……523
斎藤尚亮……43·46
斎藤亮……145·376
斎藤寿仁……637·640
斎藤智彦……460
坂本安……568·571
佐野護……403·652
笹川展幸……142
佐竹明……262
佐藤厚子……112·115
佐藤昭夫……628
佐藤周子……277
佐藤洋美……550
佐藤光源……172·175·364·502
佐藤公道……385
佐藤信悦……451
佐藤信範……355·451
佐藤修三……61·565
佐藤若生……412
澤田誠……247
澤村悟……46
瀬川富朗……148·325·478
関口正幸……484
仙波りつ子……403
仙波礼治……34
千丈雅徳……241
妹尾春樹……166
勢理客成史……523
芝軒信次……511·532
柴田牧子……115
渋谷徹……619
嶋田甚五郎……178
島田静雄……412
嶋津孝……487
下田光太郎……199
下条貞友……223
新保清……112·115
塩田清二……613
塩田千代……253
白石昭雄……466·496
白石哲也……310·313
白川治……538
白根喜浩……352
白尾一正……190·358·508·550
白尾智明……253
庄盛敏廉……154·370·394·445·457
春藤久人……40
祖父江逸郎……187
祖父江憲治……163·400
曽根寿史……460

曽良由起子……547
杉崎哲朗……439
鈴木富士子……244
鈴木英夫……265
鈴木啓二……460
鈴木勝……568
鈴木龍雄……277
鈴木良弘……349
錫村明生……247
首藤文栄……25
Saavedra, J.M. ……316
Sabol, S.L. ……58
Seagar, M.J. ……391
Shearman, S.M. ……46
Spatz, M. ……610
Stephenson, J.D. ……541
(T)
田平武……421
田淵和雄……313
多田啓也……94
多田幸司……532
多田國利……265·268
只野武……355·451
田口文子……346
田口文章……103
田口淳一……130·328·520
田口隆久……304
髙木博司……385
髙木裕子……361·373
髙橋昭……322
髙橋清久……127
髙橋聖之……64
髙橋和郎……199
髙橋正身……391
髙橋美枝……379·598
髙橋信弘……169
高橋康夫……61·64·67·250
高井義美……37
高松研……319
高野行夫……145·628
高瀬貞夫……187
高島明彦……286·295
高津修……79·82
高山晴彦……595
武田雅俊……265·268
武田俊彦……535
武田泰生……145
武井延之……202·208·232
竹島多賀夫……199
竹下正純……637·640
武富保……643
滝田正寿……625
玉井洋一……103·493·517
田丸政男……430·433·631
田宮隆……310·313
田村滋規……385
田村隆明……70
田中千賀子……40·43·46·538
田中英明……646
田中雅邦……445
田中正敏……190·196·358·502·550
田中亮……235·277·292·301
田中早苗……568
田中敏彦……400
田中利男……49
谷山紘太郎……40
田岡万悟……137
田代朋子……274
辰沼利彦……544
寺田誠……85
寺岡宏……136
東海林正……82
戸谷重雄……211·298·319
豊島至……262
豊島良枝……355
津田彰……190·358·508·555
辻崇一……238
辻丸秀策……550
辻輝之……436
辻村良太郎……136·193
塚田裕三……211·298·319
塚本徹……253·256
津久井弘子……202·206·229·280
津島宏美……151
筒井公子……154·457
堤哲之……121·361·466·496
都築紀宏……601
Tommasi, M. ……91
(U)
内田紀久枝……103
内田和久……157
内村英幸……121·442·466·496
植田弘師……385
植田孝子……451
植木昭和……367
植村慶一……568·571
植村富彦……586
氏家寛……172·175
梅沢房代……382
浦上克哉……199
宇佐美美穂子……586

牛尾真寿子……367
薄井　宏……67
（W）
和田　博……553・556・559
渡辺　厚……88
渡辺雅幸……544
渡辺正人……49
渡辺康裕……28
（Y）
八木昭彦……553
八木康之……307
柳沼正俊……88
山田通夫……442
山田了士……172・177
山田茂人……361・373
山形要人……214
山口知子……106
山本彰夫……262
山本纊子……247
山本秀子……622
山本克彦……37
山本勝信……367
山本正彦……205
山本孫兵衛……376
山本慧……142
山本智之……335
山本敏文……610・622
山西嘉晴……592
山崎りつ……379・598
山下元司……379・598
山下孝之……37
山下達朗……238
大和谷厚……553・556・559
山津清實……592
山内武司……145
山脇成人……109
柳澤勝彦……424・565
八尾博史……121・466・496
横井功……184
米田幸雄……133・481・604
米原典史……619
米沢章彦……355
吉田博……28
吉田一成……211・298
吉田敏……637・640
吉田利通……49
吉川和明……76・256
由村健夫……418



誕生。SERODIA-ATLA

成人T細胞白血病関連抗原(ATLA)の抗体診断薬が誕生しました。

セロディアーATLAは、特に抗ATLA抗体のスクリーニングに非常に適した、粒子凝集法(Particle Agglutination Test：PA法)を用いましたので、次の様な多くの特長を有しています。

〔特長〕

1. 検査術式が非常に簡単(マイクロタイター法)で、特別な分析機器を要しません。
2. 反応時間が短く、3時間後に肉眼で判定できます。
3. 自社開発した新しい人工担体(ゼラチン粒子)を用いているため、非特異凝集がほとんどありません。
4. 検査コストが非常に安価です。
5. 同一アッセイ系での確認試験は必要ありません。

セロディア-ATLAの誕生により、ヒトT細胞白血病ウィルス(HTLV-1)の感染診断が可能となりました。私達は、この製品が医学の更なる発展に貢献できることを心から願っております。



SERODIA®-ATLA

セロディア-ATLA	PA反応による マイクロタイター法	550検体 (110検体×5)
		220検体 (55検体×4)

この製品についてのお問い合わせは：富士レビオ株式会社本社学術課
〒163 東京都新宿区西新宿2-7-1 新宿第一生命ビル12階
私書箱5032号 TEL.03(348)0691(代表)

富士レビオ株式会社

新発売

革新的 高速電気泳動システム

PhastSystem™

WHERE ALL SCIENCE BEGINS LIFE

電気泳動法に新時代を切り開く、プログラマブル全自動システムです。



わずか1時間で泳動と染色ができます。

・迅速な電気泳動

泳動・固定・染色・脱色がわずか1時間で終了します。

・4種の分離手法

SDS-PAGE, Native-PAGE, IEF およびタイトレーションカーブが行えます。

・複雑な染色もワンタッチ

クーマシーおよび銀染色が、至適化された全自動システムで行え、またオートラジオグラフィーやザイモグラムも可能です。

・優れた再現性

すべての操作は、完全自動で行われ、ゲルも既に作成済ですので、いつでも、誰でも再現性のある結果が得られます。

Pharmacia LKB Biotechnology

Pharmacia ファルマシア株式会社
ファルマシア LKB バイオテクノロジー

本 社:〒150 東京都渋谷区恵比寿1-8-11 スカイエビスビル (03) 444-4811
大 阪:〒532 大阪市淀川区西中島5-14-5 新大阪INビル3F (06) 305-3484
名古屋:〒460 名古屋市中区千代田5-11-11 熊崎ビル4F (052)264-4657
福 岡:〒813 福岡市東区松島3-34-33 (092)461-2195

LKB

ETI Eugene Tech International, Inc.

NEW

神経伝達物質研究用試薬

A カテコラミン生合成酵素関連抗体

〈免疫組織化学用〉

- ANTI-Tyrosine Hydroxylase (TH)
- ANTI-Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (AADC)
- ANTI-Dopamine β-Hydroxylase (DBH)
- ANTI-Phenylethanolamine N-Methyltransferase (PNMT)

B 神経伝達物質関連抗体

〈免疫組織化学用〉

- ANTI-Serotonin (Rat)
- ANTI-Serotonin (Rabbit)
- ANTI-GABA (Rat)
- ANTI-Dopamine (Rat)
- ANTI-Neuropeptide Y (Rabbit)
- ANTI-Substance P (Rabbit)

※詳しい資料、価格についてお問い合せ下さい。

フナコシのライフサイエンス研究用試薬と機器

日本総代理店

フナコシ

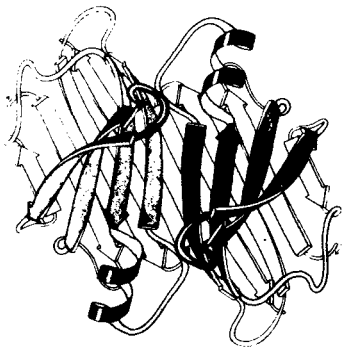
フナコシ薬品株式会社

〒101 東京都千代田区神田駿河台2-3

サイエンス事業部／研究機材販売部☎03(293)2352(代表)・学術部☎03(295)5548(直通)

Tutorials in Molecular and Cell Biology

PROTEIN ENGINEERING



Prealbumin Dimer

Dale L. Oxender
C. Fred Fox
Editors

Contents

METHODS FOR DETERMINING PROTEIN STRUCTURE
BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL METHODS IN PROTEIN MODIFICATION
ENERGETICS AND PROTEIN DESIGN
PURPOSELY MODIFIED PROTEINS AND THEIR PROPERTIES
APPENDIX:
COLOR AND COLOR STEREO REPRESENTATIONS

16 pages of color • 384 pages,
Publication: April 1987 • ¥8,640

A MAJOR NEW JOURNAL

GLIA

Volume 1, 1988
Bimonthly

Bruce R. Ransom
Helmut Kettenmann
Editors–in–Chief

Interest in research on neuroglia cells has increased greatly in the last decade, due in part to the fact that these ubiquitous cells have been shown to play an important role in normal and abnormal brain function. Since the study of neuroglia is crucial to an understanding of the functions of the nervous system, there is a need for a single comprehensive publication that examines exclusively this rapidly expanding branch of biomedical investigation.

GLIA is an international journal devoted primarily to the study of the form and function of neuroglia cells in health and disease. Providing a forum for a rich diversity of research disciplines, including anatomy, physiology, pharmacology, pathology, biochemistry, and clinical neurology, **GLIA** will cover a broad range of experimental topics related to research on glia.

The journal's bimonthly appearance assures the prompt publication of full-length original research articles, reviews, and short communications. The journal will use a large page format insuring that figures and photomicrographs will be reproduced with the greatest possible fidelity. Preference is given to articles that have broad cross-disciplinary interest and impact. Manuscripts will be judged on their originality, soundness of method and interpretation, and organization.

Alan R. Liss, Inc., New York.
日本総代理店　医学書院洋書部
113　東京・文京・本郷1—28—36鳳明ビル　☎東京(03)817—5670～1振替東京1-53233

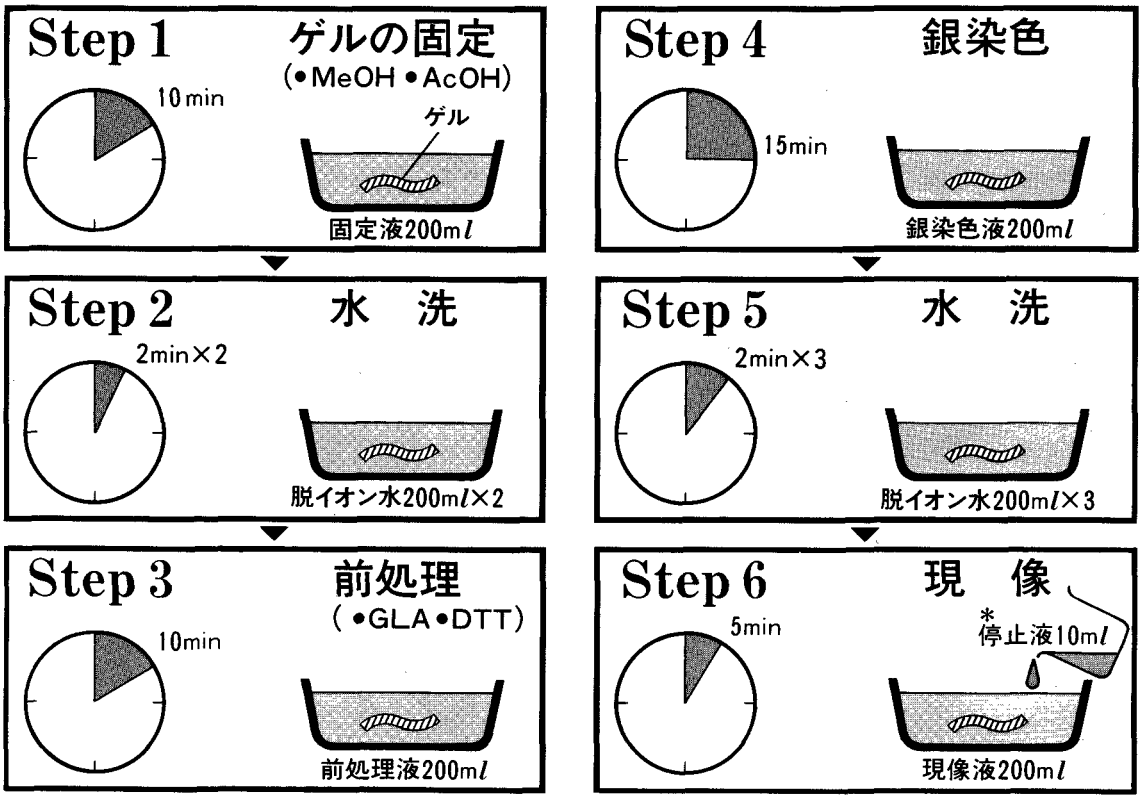
銀染色試薬にニュータイプ登場!!

2D-銀染色試薬「第一」

特許出願中

- グルタルアルデヒド、ジチオスライトールを処方し、前処理から染色停止までの操作法を固定、単純化しました。
- 電気泳動後、1時間以内に高感度に染色できます。

染色操作法



＊適度な染色像が得られたら(～5分)注ぎます。

適応：スラブ型PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)後のタンパク質・核酸の染色

包装：10枚用（スラブゲル：14cm×14cm×1.0mmを基準として）

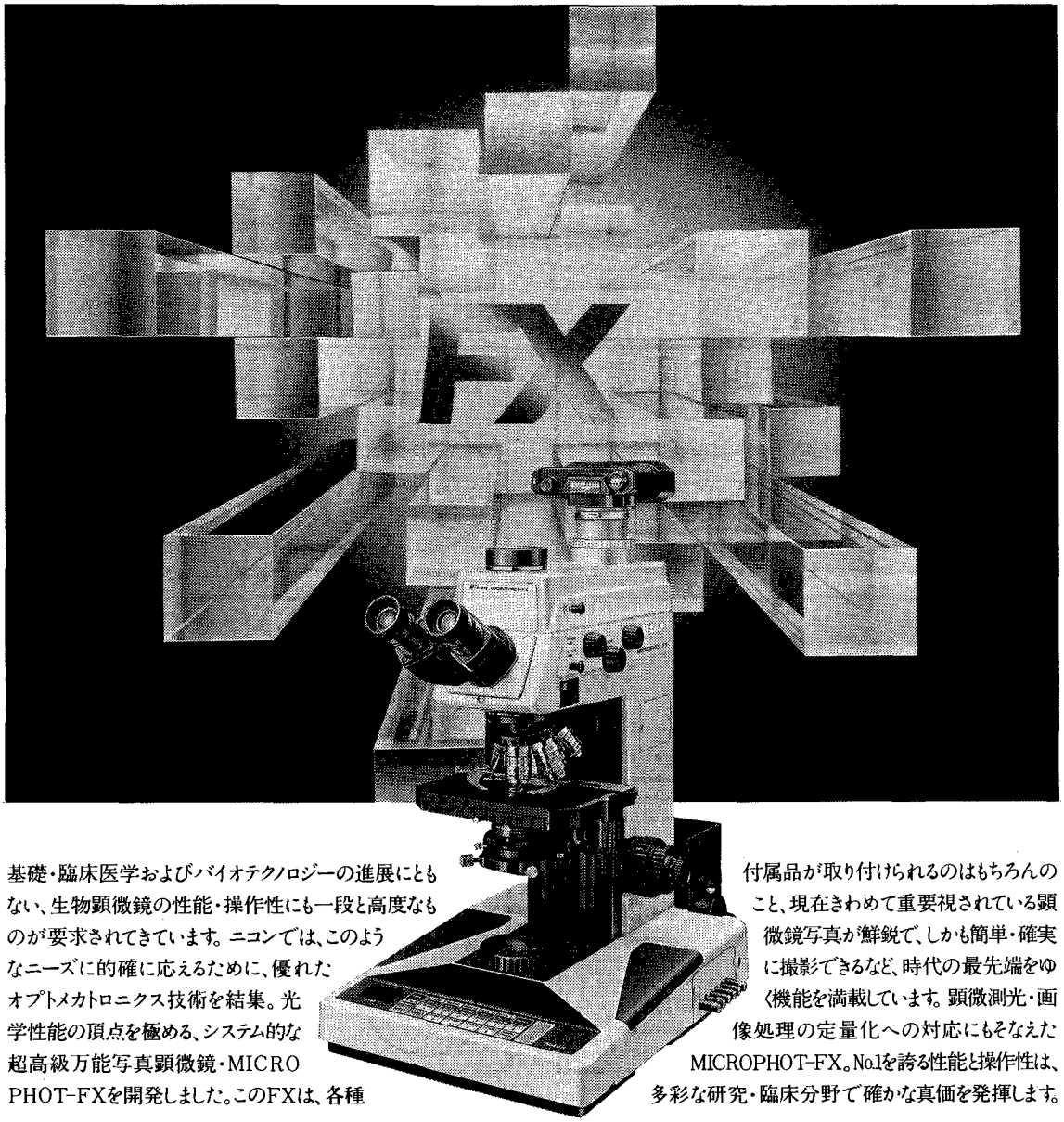
第一化学薬品株式会社

本　社　東京都中央区日本橋三丁目13番5号
TEL.03(272)0681(試薬部)
営業所　東京第一・第二、大阪、福岡、札幌

Nikon

光学性能の頂点を極めたNo.1顕微鏡

超高級万能写真顕微鏡MICROPHOT-FX



基礎・臨床医学およびバイオテクノロジーの進展にともない、生物顕微鏡の性能・操作性にも一段と高度なものが要求されてきています。ニコンでは、このようなニーズに的確に応えるために、優れたオプトメカトロニクス技術を結集。光学性能の頂点を極める、システム的な超高級万能写真顕微鏡・MICRO PHOT-FXを開発しました。このFXは、各種付属品が取り付けられるのはもちろんのこと、現在きわめて重要視されている顕微鏡写真が鮮鋭で、しかも簡単・確実に撮影できるなど、時代の最先端をゆく機能を満載しています。顕微測光・画像処理の定量化への対応にもそなえたMICROPHOT-FX。No.1を誇る性能と操作性は、多彩な研究・臨床分野で確かな真価を発揮します。

8-78A

Nikon 日本光学工業株式会社

本社・100東京都千代田区丸の内3-2-3(富士ビル)(03)214-5311(大代表)

大阪営業所・542大阪市南区南船場2-11-20(興国ビル)(06)251-7023(代表) ●カタログをお送りいたします。ご希望のかたは誌名と製品をご明記のうえ本社宣伝課までどうぞ。

Nikon 顕微鏡特約店

北海道ニコン機器販売株式会社	001・札幌市北区北11条西4-1-40	(011)746-9381	株式会社 京都コーガク	606・京都市左京区田中西樋ノ口町80	(075)781-1170
株式会社 アオバサイエンス	980・仙台市国分町3-8-3(新産ビル)	(022)224-1701	株式会社 コーガク	530・大阪市北区梅田1-12-17(梅田ビル)	(06)345-6031
株式会社 三啓	113・東京都文京区湯島3-20-12(ツナシマ第2ビル)	(03)834-7331	株式会社 猪原商会	730・広島市中区大手町3-6-1	(082)244-2703
オザワ科学株式会社	460・名古屋市中区錦3-9-22	(052)951-5331	株式会社 大熊商会	813・福岡市東区多の津1-1-5流通団地内	(092)622-3060

日本分光 CAF-100型 細胞内カルシウム測定専用装置



国内唯一の細胞内カルシウム濃度測定専用機です

各種細胞機能に関与しているCa^{2+}の制御機能を解明するために　細胞質のCa^{2+}濃度およびその変化を測定することが重要となっています

CAF-100型は　従来法では分析が不十分であったさまざまな問題を解消した新しい細胞内カルシウム濃度測定専用システムです

特　長

- 1台の装置でQuinⅡ, FuraⅡ, Aequorinいずれの試薬の測定もできます
- FuraⅡの場合　2波長励起による比測定がリアルタイムでできます
- 血小板凝集能も同時測定できます
- 垂直照射法による固体試料測定ユニットが用意されていますので　組織や付着細胞への応用が可能です
- ペルチェ式温度コントロール，可変式試料撹拌，励起光照射時間のON・OFFコントロール，専用ミクロ試験管，刺激剤注入，セル内ガス置換などの機能を内蔵し　専用機として細心の配慮がなされています

JascoおよびJascoは日本分光工業株式会社の登録商標です

分析機器の専門メーカー
日本分光

Jasco
日本分光工業株式会社
本社 192東京都八王子市石川町2967-5
TEL (0426)46-4111代表

東京(03)294-0341　名古屋(052)452-2671
西東京(0426)46-7001　大阪(06)312-9173
札幌(011)741-5285　広島(082)244-5019
筑波(0298)22-7342　九州(092)474-1215
神奈川(0427)49-1352

資料請求券

総代理店
コロンビヤ貿易株式会社
本社101東京都千代田区猿楽町1-2-1
TEL(03)291-0647
土浦(0298)22-7339　大阪(06)361-7804
神奈川(0427)49-1362　広島(082)244-0545
名古屋(052)452-5945　福岡(092)474-6277

分析機器の専門メーカー
日本分光

Jasco
日本分光工業株式会社
本社192東京都八王子市石川町2967-5
TEL(0426)46-4111代表
詳しい資料ご希望の方はコロンビヤ貿易へ

資料請求券

神経化学　第26巻　第1号

昭和62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　株式会社　中央商会