ISSN:0037-3796

神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第31回　日本神経化学会大会論文集

Vol. 27 (No. 1), 1988

日本神経化学会

神経化学

第31回日本神経化学会大会論文集

PROCEEDINGS OF THE 31th ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於　仙　台

10月26日(水)，10月27日(木)，10月28日(金)

Vol. 27 (No. 1), 1988

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　（慶応大・医・生理）
植村慶一　（埼玉医大・第一生理）

目　次

1. 分子量2.5万のGTP結合蛋白質（*smg*-25A蛋白質）の構造決定と組織分布 …… 24
菊池　章，松井　泰*，佐野　公彦**，高井　義美
（神戸大・医・第一生化，小児科**，三菱化成総研*）

2. 神経組織および神経系培養細胞におけるGTP結合蛋白質 Gi_2 …… 26
森下　理香，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*）

3. 百日咳毒素によるG蛋白のADP-ribosylationに対するLithiumの効果 …… 28
川本　日出雄*，渡辺　康裕，今泉　太郎，三崎　尚之，大柳　光正*，
岩崎　忠昭*，吉田　博
（大阪大・医・第一薬理，兵庫医大・第一内科*）

4. Cキナーゼの神経網膜における機能的意義――特にドーパミンの放出促進作用について …… 30
加藤　聖，石田　外樹，根岸　晃六　（金沢大・医・神経情報研伝達）

5. *In vitro* Phosphorylation of Cerebellar Neuronal Membrane Proteins by Purified Protein Kinase C Subspecies …… 32
Mark S. Shearman, Tomiichiro Oda, Ushio Kikkawa,
Yasutomi Nishizuka
(Kobe University School of Medicine, Department of Biochemistry, Kobe)

6. 培養グリオーマ細胞に及ぼすプロテインキナーゼ阻害剤staurosporineの影響 …… 34
白石　哲也，峯田　寿裕，桃崎　宣明，高木　勝至，田淵　和雄
（佐賀医大・脳神経外科）

7. 正常及びquakingマウス脳における2′, 3′-環状ヌクレオチド3′-フォスフォジエステラーゼmRNAの発現 …… 36
栗原　正，高橋　康夫，藤田　信也*，佐藤　修三*，宮武　正*
（新潟大・脳研・神経薬理，神経内科*）

8. 正常及びQuakingマウスにおけるMyelin-associated glycoprotein (MAG) mRNAの発現 …… 38

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

9. ミエリン塩基性蛋白（MBP）遺伝子の 2nd（upstream）プロモーターの存在について …… 40
北村　邦男，Newman S.*，Campagnoni C.*，Campagnoni A.T.*
（埼玉医大・第1生理，UCLA・医*）

10. mld マウスにおける anti-MBP RNA の検出 …… 42
岡野　栄之，池中　一裕，御子柴　克彦　（大阪大・蛋白研）

11. *Shiverer* 及び *jimpy* マウスにおけるミエリン特異蛋白質遺伝子発現の *in situ* hybridization による組織学的解析 …… 44
塩田　千代，御子柴　克彦　（大阪大・蛋白研）

12. マウス小脳の Purkinje 細胞に特異的な蛋白質 P_{400} の cDNA クローニング …… 46
古市　貞一*，前田　信明**，吉川　真悟*,**，和田　健太郎**，
新延　道夫**，御子柴　克彦*,**
（基礎生物学研究所・行動制御*，大阪大・蛋白研・機能制御**）

13. アミン再吸収阻害薬のアミン代謝に及ぼす影響 …… 48
高橋　啓，多田　幸司，石川　紘一*　（日大・精神神経，薬理*）

14. ダントロレンによるトリプトファン水酸化酵素の活性化機構 …… 50
岡田　尚志郎，筒井　公子，庄盛　敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化）

15. N-Methyl-4-phenylpyridinium ion（MPP^+）のラット褐色細胞腫 PC12h 細胞におけるカテコールアミン代謝に及ぼす影響 …… 52
直井　信，高橋　勤*，一瀬　宏，永津　俊治
（名大・医・生化第一・江南女短大*）

16. 牛副腎髄質クロマフィン細胞の分泌調節に関わるイミダゾール誘導体の作用 …… 54
今泉　美佳，武田　京子，熊倉　鴻之助（上智大・生命研・神経化学）

17. Brain microdialysis：インスリン低血糖と視床下部外側野モノアミン代謝 …… 56
清水　弘行，下村　洋之助，小林　功，小林　節雄，George A. Bray*

（群馬大・内分泌内・一内，南カリフォルニア大・糖尿病科*）

18. Methamphetamine 及び p-Chloroamphetamine 投与によるラット側坐核中モノアミン代謝物と locomotor activity の経時的変化。— in vivo brain dialysis 法による検討 — …… 58
杉田　倫太郎，澤　温*，野村　総一郎，山内　惟光
（藤田学園保衛大・医・精神，さわ病院*）

19. 小脳特異的 P_{400} 蛋白質の細胞内局在 …… 60
前田　信明，宮脇　敦史，新延　道夫，御子柴　克彦
（大阪大・蛋白研）

20. cAMP および Ca^{2+}，カルモデュリン依存性の小脳特異的 P_{400} 蛋白質リン酸化反応 …… 62
山本　秀幸，前田　信明*，新延　道夫*，宮本　英七，御子柴　克彦*
（熊本大・医・第一薬理，大阪大・蛋白研・機能制御*）

21. 脳マイクロソームにおけるミエリン Proteolipid protein のアシル化 …… 64
由村　健夫，小林　卓郎，後藤　幾生　（九州大・医・脳研・神経内科）

22. 一部の中枢ニューロンを染める抗体群 …… 66
藤田　忍，林　基治*，松村　道一*
（群馬大・医・薬理，京大・霊長類研*）

23. ウシ脳膜分画より平滑筋 α-アクチニン抗体と免疫学的交叉性を示す2種類の蛋白質の精製 …… 68
小澤　健太郎，祖父江　憲治　（大阪大・バイオ・神経生化）

24. 副腎髄質より精製された 74 kD-アクチン調節蛋白質 …… 70
前川　昌平　（東大・理・生化）

25. 網膜における MEKA 蛋白質の局在 …… 72
郭　哲輝，秋山　万里子，三木　直正　（金沢大・がん研・薬理部）

26. 脳におけるレチノールおよびレチノイン酸結合蛋白について …… 74
北本　年弘，熊谷　博道*，桃井　隆
（国立精神神経センター，旭硝子*）

27. 牛脊髄アセトン粉末よりのグリア線維蛋白質の精製および再構成した線維の形態について …… 76

田中　潤也，村越　和子，多田　國利，武田　雅俊，西村　健
（大阪大・医・精神神経科）

28．ヒト血清中の抗GFAP抗体の認識するGFAP分子上の抗原決定部位の検討 …… 78
田中　潤也，村越　和子，武田　雅俊，多田　國利，播口　之朗，
西村　健　（大阪大・医・精神神経科）

29．ヒト白血病ウイルスI型（HTLV-I）遺伝子によるラットグリオーマの形質転換 …… 80
澤田　誠，錫村　明生*，倉田　のり，吉田　光昭**，丸野内　棣
（藤田学園保健衛生大・医・応用細胞，神経内科*，癌研ウイルス腫瘍**）

30．Spot 35蛋白遺伝子の発現 …… 82
山国　徹*，今村　幸治**，三井　宏美**，荒木　一明，桑野　良三，
高橋　康夫
（新潟大・脳研・神経薬理，新潟大・理・生物**，現所属：三菱化成生命研*）

31．新しい脳特異的13.5Kタンパク質の性質と分布について …… 84
中村　泰治，中井　康光*，落合　英彦*，小俣　久美子，中条　茂男，
中谷　一泰　（昭和大・薬・生物化学，医・解剖*）

32．ラット及びマウス脊髄のコリンアセチルトランスフェレース；cDNAクローニングと細胞内発現 …… 86
石井　加代子，小田　恵夫，出口　武夫
（東京都神経科学総合研・分子神経生物）

33．ミトコンドリア脳筋症細胞の分子遺伝学的検索 …… 88
下泉　秀夫，中三川　晃利，桃井　真里子　（自治医科大・小児科）

34．PC12D細胞を用いたNGFのバイオアッセイ …… 90
佐野　護，加藤　兼房*，仙波　りつ子**
（愛知県コロニー研・形態，生化*，周生期**）

35．PC12細胞のグリコサミノグリカン：神経成長因子による突起形成に伴う変化 …… 92
仙波　りつ子，大平　敦彦*，柏俣　重夫
（愛知県コロニー研・周生期，発生*）

36. 横紋筋の神経成長因子の産生と調節 …… 94
天野　武彦，山国　徹，山本　敏文，岡部　紀子　（三菱化成生命研）

37. アストログリア膜表面におけるニューロン突起伸展促進物質の検討 …… 96
井端　由起郎*，高坂　新一，山村　初雄**，阿相　皓晃，戸谷　重雄*，
塚田　裕三　（慶大・医・生理，脳外科*，アサヒビール中央研**）

38. ウシ脳由来の酸性線維芽細胞成長因子に対する抗体作製とその免疫組織化学的応用 …… 98
遠山　育夫，原　靖*，安原　治**，木村　宏
（滋賀医大・解剖，脳外科*，京大・医・神経内科**）

39. ラット中隔野培養細胞に対するα-MSH およびACTH 誘導体（HOE 427）の神経栄養作用 …… 100
松本　智明，大島　健一，宮本　亜紀，桜井　真夫，後藤　正義，
林　昌亮　（ヘキストジャパン・医薬研・薬理）

40. Ca-カルモジュリンによるグリア細胞成長因子（GMF）の細胞分化誘導調節 …… 102
伊藤　仁一，加藤　泰治，田中　亮　（名市大・医・第一生化）

41. ニューロン培養上清に含まれるオリゴデンドロサイト成熟促進物質の部分精製について …… 104
中嶋　一行，今澤　正興，宮本　侃治
（国立精神・神経センター・神経研）

42. 神経細胞の in vivo および in vitro における加齢 …… 106
山口　知子，山口　仁*　（東女医大・生化，南八街病院*）

43. E-64（チオールプロテアーゼ阻害剤）のラット脳初代培養細胞の蛋白代謝に及ぼす影響 …… 108
松井　和隆，衛藤　義勝，石川　博*，下条　貞友**，宮原　正**
（慈恵医大・小児科，解剖*，第二内科**）

44. 培養中枢コリナージックニューロンの脳内移植 …… 110
久永　欣哉*,**，武井　延之*，津久井　弘子*,***，畠中　寛*,***
（三菱化成生命研・脳神経*，東北大・医・神経内科**，大阪大・蛋白研***）

45. 培養中隔核コリン作動性神経の発育分化に対する血清の作用について …… 112
野倉　一也，林　謙一郎*，小鹿　幸生*，新美　達司，山本　正彦*

（名古屋厚生院内科，名古屋市大・医・第2内科*）

46．シナプス形成を阻害するモノクローナル抗体のスクリーニング…培養海馬ニューロンシナプス形成系へのモノクローナル抗体長期添加の影響 ……114
黒田　洋一郎，小林　和夫，村本　和世，小倉　明彦*，工藤　佳久*
（都神経研・神経生化学，三菱化成生命研・脳神経薬理*）

47．単離成長円錐画分の脂質構成 ……116
五十嵐　道弘　（自治医大・生化学第二）

48．カルスペクチン・α-アクチニン・アクチンの成長円錐における局在変化と機能 ……118
祖父江　憲治，神田　啓子　（大阪大・医・バイオ・神経生化）

49．線条体におけるドパミン-アセチルコリン相互作用 ……120
小林　清史，川端　昌弘，庄盛　敏廉　（岡山大・医・脳研・病態生化）

50．ラット線条体内におけるニウロンの相互関係 ……122
盛政　忠臣，田中　雅邦，金行　孝雄，岡田　英俊，庄盛　敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化学）

51．NMDA receptor agonist及びantagonist脳室内投与によるラット線条体ドーパミン及びセロトニン代謝産物の変動 ……124
加太　英明，横井　功，戸田　洋子，森　昭胤
（岡山大・医・脳代謝研・機能生化）

52．皮質線条体路またはカテコールアミンニューロン破壊後におけるラット脳内PCP受容体結合の変化 ……126
吉田　幸宏*,**，西川　徹**，高橋　清久**
（旭川医大・精神*，国立精神神経センター・神経・疾病研・第3部**）

53．肝臓の交感神経密度とギャップ結合の含量は逆相関する ……128
竹田　晃，嶋津　孝　（愛媛大・医・第一生化；臨床検査）

54．Guinea pig海馬膜標品における5-HT感受性adenylate cyclase活性の検討 ……130
小田垣　雄二，小山　司，大森　哲郎，松原　良次，中山　誠，井上　猛，
村木　彰，山下　格　（北大・医・精神医学）

55．ラット脳セロトニン受容体サブタイプのG蛋白との共役とそれに対す

る N-ethylmaleimide の効果 ……132
今井　伸一，北村　佳久，野村　靖幸　（北大・薬・薬効）

56. [^{3}H] ヒスタミンを用いたラット脳 H_2 受容体の結合調節機構の検討 ……134
小澤　光一郎，瀬川　富朗　（広島大・医・薬効解析）

57. In vivo における [^{3}H] pyrilamine のヒスタミン H-1 受容体への特異的結合 ―― PET によるヒスタミン H-1 受容体測定のための基礎的研究 ―― ……136
谷内　一彦*，渡邉　建彦*，松澤　大樹**,***，伊藤　正敏**，
畑澤　順**，石渡　喜一**，井戸　達雄**
（東北大・医・第一薬理*，サイクロトロン RI センター**，抗研・放射線***）

58. ヒト脳脊髄液中のアセチルコリン及びコリンの定量（HPLC を用いて） ……138
奥山　真司，池田　淑夫，藤木　嘉明，友田　桂子，大城　公恵，
伊藤　哲一彦，山内　惟光　（藤田学園保衛大・医・精神）

59. 老齢及び成熟ラットの脳内 choline　acetyltransferase 活性に及ぼす TJ-960 の影響について ……140
平松　緑，羽場　久美子，枝松　礼，濱田　一，森　昭胤
（岡山大・医・脳代謝研・機能生化）

60. 初代培養大脳皮質神経細胞におけるムスカリン受容体の Up-および Down-regulation について ……142
岸　正孝，大熊　誠太郎，馬　福海，栗山　欣弥　（京都府医大・薬理）

61. カルシウム拮抗剤のムスカリン性受容体に対する影響 ……144
片山　禎夫，鬼頭　昭三，三好　理絵　（広島大・医・第 3 内科）

62. コリン作働性神経の神経化学的ならびに行動科学的検索 ……146
野村　正彦，庄田　基，神野　哲夫
（藤田学園保衛大・医・生理・脳神経外科）

63. マウスの回避学習に及ぼすキレート剤の影響（II） ……148
村上　哲英，根木　哲郎　（香川医大・生物）

64. 脊髄性筋萎縮症患者の筋肉抽出液の運動神経成長因子活性阻害 ……150
田口　隆久，J.P. Changeux*，C.E. Henderson*
（大阪大・基礎工学部生物工学科，Unité Neurobiologie moléculaire, Institut Pasteur*）

65. ウシガエルの視神経再生機構について（続報） ……152
溝渕　宗秀，八木　康之，水野　有武，松田　誠 （慈恵医大・医化学）

66. マウス視覚系における IGF-II の存在について ……154
野口　鉄也，杉崎　哲朗 （東邦大・医・第二生理）

67. 脳損傷修復にかかわる因子 ……156
濱　登希子*，武井　延之*，宮本　真美*，津久井　弘子*,**，
西尾　チカ**，畠中　寛*,**
（三菱化成生命研・脳神経科学*，大阪大学・蛋白研**）

68. マウス横紋筋クローン細胞 G8 の神経成長因子（NGF）合成，分泌の調節 ……158
山本　敏文，山国　徹，天野　武彦 （三菱化成生科研）

69. Staurosporine による神経成長因子の作用の阻害 ……160
橋本　誠一，萩野　顕彦* （東北歯大・生化，生物*）

70. 標識・同定した海馬投射前脳基底野ニューロンの生存に対する神経成長因子の効果 ……162
有松　靖温，宮本　真美，津久井　弘子*，畠中　寛*
（三菱化成生科研・脳神経科学，*現：大阪大・蛋白研）

71. 神経成長因子（NGF）による PC12 細胞の突起形成 —— NGF 受容体と G 蛋白質の関与 —— ……164
田中　秀逸，小池　達郎 （佐賀医大・化学）

72. 初代培養中枢神経細胞の acetylcholine（ACh）量に対する神経成長因子（NGF）の作用および ACh 代謝回転測定の試み ……166
垣花　満，寿野　正広 （武田薬品・中央研究所・生物研究所）

73. 成熟ラット中枢ニューロンの定量的培養の可能性 ……168
畠中　寛*,**，久永　欣哉**,***，津久井　弘子*,**，西尾　チカ*
（大阪大・蛋白研・生合成*，三菱化成生命研**，東北大・医・神内***）

74. β-シトリルグルタミン酸の培養神経細胞での生合成と分解 ……170
三宅　正治 （愛媛大・医・機器センター）

75. プロテアーゼ阻害剤（Ac-Leu-Leu-Nle-al）による PC12 細胞の突起形成の誘導 ……172

斎藤　祐見子，川島　誠一　（都老人研・生化学部）

76. 合成シアル酸化合物による神経突起伸展作用の解析――α-，β-シアリルコレステロールの細胞へのとりこみとその作用――　……174
山下　達朗*，辻　崇一*，永井　克孝*,**
（東大・医・第二生化*，新潟大・脳研・神経生物**）

77. 脳および下乗体におけるインショリン様成長因子（IGF-I）受容体の分布　……176
栗原　正紀，松尾　圭一*，丹羽　正美**，重松　和人***，山下　俊一*，尾崎　正若**，長瀧　重信*，森　和夫
（長崎大・脳外・一内*，二薬理**，二病理***）

78. ヒト recombinant EGF（rEGF）の神経栄養効果について　……178
莚井　武，山田　和雄，早川　徹，木下　章，片岡　和夫，松本　勝美，甲村　英二，岡崎　宏司*，最上　平太郎
（大阪大・医・脳外，大塚製薬・徳島研*）

79. 脳虚血周囲組織に出現する神経栄養因子の部分精製　……180
山田　和雄，早川　徹，片岡　和夫，木下　章，莚井　武，松本　勝美，岡崎　宏司*，最上　平太郎　（大阪大・医・脳外，大塚製薬・徳島研*）

80. 軸索細胞骨格の動態：安定型ポリマーとダイナミック型ポリマー　……182
田代　朋子，小宮　義璋　（東大・医・脳研・生化学）

81. Taxol を用いた軸索内細胞骨格蛋白輸送の分析　……184
小宮　義璋，田代　朋子　（東大・医・脳研・生化学）

82. 大脳皮質アデニレートシクラーゼ系GTP-結合蛋白質に及ぼすエタノールの影響　……186
八田　慎一，大鹿　英世，高畑　直彦*，斉藤　利和
（札幌医大・薬理，神経精神医学*）

83. ラット脳神経終末標品の glutathione S-transferases について――ドーパミン結合蛋白との同一性――　……188
都築　紀宏，後藤　香糸子　（名古屋市大・医・生化・共同研）

84. ラット脳から精製された 4-Aminobutyraldehyde を酸化する酵素の性質と鶏胚発生に伴う同酵素の動態について　……190
阿部　俊夫，高田　耕司，大川　清，朝倉　正，松田　誠

（慈恵医大・医化学）

85. 実験的神経原線維変化を生じた家兎脳における Cathepsin D の酵素学的検討 ……192
鈴木　英夫，武田　雅俊，中村　祐，多田　國利，播口　之朗，西村　健
（大阪大・精神医学）

86. ラット脳ホスホリパーゼDによるホスファチジルエタノールの産生とホスホリパーゼDの脳内分布 ……194
小林　睦博，武富　保*，J.N. Kanfer**
（信州大・老年科，脂質生化学*，マニトバ大・生化学**）

87. モルモット神経組織の細胞核を認識するモノクローナル抗体について ……196
吉村　和法，赤川　公朗，植村　慶一　（埼玉医大・医・第一生理）

88. Choroid plexus papilloma における隣接切片法を用いた transthyretin 陽性細胞の超微構造の検討 ……198
国塩　勝三，三島　宣哉，松久　卓，津野　和幸，松海　信彦，佐藤　透，
松本　健五，古田　知久，西本　詮　（岡山大・医・脳外）

89. 抗 DNA polymerase α モノクローナル抗体を用いたヒト脳腫瘍増殖動態の検討 ……200
国塩　勝三，三島　宣哉，松久　卓，津野　和幸，松海　信彦，佐藤　透，
松本　健五，古田　知久，西本　詮　（岡山大・医・脳外）

90. 2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid の脳内動態とその ATP 及びクレアチンリン酸に及ぼす影響 —— IN VIVO ^{31}P NMR による観察 —— ……202
森　昭胤，横井　功，加太　英明，平松　緑，松下　和弘*，林　英之*
（岡山大・医・脳研・機能生化，日本電子研究開発部*）

91. in vivo ^{31}P MRS による脳内グルコース取り込みと酸化的リン酸化について ……204
古賀　けい子，三浦　巌　（大塚製薬・徳島研）

92. ラット脳微小循環自動調節における prostaglandin 脳室内投与による影響 ……206
小野　信文，大塚　正征，神谷　大雄　（福岡大・薬・薬理）

93. 局所脳虚血ラットに対する GM_1-Ganglioside の効果 —— 脳皮質および線条体の monoamine とその代謝産物への影響 —— ……208

古賀　照邦*，小島　秀樹，山田　茂人，西　彰五郎，稲永　和豊，庄司
紘史*，加地　正郎*，G. Jonsson**，G. Toffano***
（久留米大・脳研，第一内科*，Karolinska Ins. (Sweden)**，Fidia Res.
Lab. (Italy)***）

94．慢性脳血流低下動物モデルに於ける脳蛋白質・行動の変化 ……210
工藤　喬，多田　國利，山下　正，新川　久義，門田　永治*，
服部　英幸*，武田　雅俊，播口　之朗，西村　健
（大阪大・精神科，近畿大・医・第二病理*）

95．脳虚血後の海馬における Protein kinase C ……212
小野寺　宏，荒木　努，小暮　久也　（東北大・医・神経内科）

96．扁桃核キンドリングラットの扁桃核・海馬における[^{3}H] 3-(2-
Carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid ([^{3}H] CPP) 特異的結合 ……214
秋山　一文，山田　了士，西川　浩，曽根　一郎*，大月　三郎
（岡山大・神経精神医学，国立療養所山陽荘病院*）

97．El マウス脳の Poly (A) mRNA の complexity ——cDNA による
分析—— ……216
撫井　弘二，山上　栄，平山　栄一，古塚　大介，大西　博，
川北　幸男　（大阪市立大・神経精神科）

98．El マウス脳におけるオピオイド δ レセプターの変化 ……218
相馬　俊子，大西　博，小出　誠司，山上　栄，川北　幸男
（大阪市立大・神経精神科）

99．ビタミン B_6 拮抗剤投与によるマウス脳内 c-fos mRNA 発現について ……220
水野　有武，溝渕　宗秀，石橋　由朗，松田　誠　（慈恵医大・医化学）

100．脳ライソゾームに対するアルミニウムの作用 ……222
中村　祐，武田　雅俊，鈴木　英夫，森田　仁，多田　国利，
播口　之朗，西村　健　（大阪大・医・精神医学）

101．アルツハイマー病脳中におけるアミロイド前駆体タンパク各部（sub-
sequence）の老人斑内局在 ……224
亀谷　富由樹，羽賀　誠一*，田中　喜久子，佐藤　麿人，石井　毅*
（東京都精神医総合研・分子生物，超微形態*）

102. リポゾーム封入による抗てんかん薬の持続的抑制効果発現と毒性軽減 ……226
森　則夫，太田　聖一，黒河内　彰，熊代　永
（福島医大・神経精神科）

103. 高血圧短期運動療法モデルの検討II：中枢及び末梢モノアミン含量に及ぼすフリーランニングの影響 ……228
松井　啓，水野　智*，岡村　邦博，野村　正彦
（藤田学園保健衛生大・医・生理，新潟薬科大・薬剤*）

104. Parkinson病惹起物質1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine及び1-methyl-4-phenylpyridinium ionのマウス体温に及ぼす影響 ……230
佐藤　信範，只野　武，木皿　憲佐，荒井　裕一朗*，杵鞭　宏育*
（東北薬科大・薬理，昭和大・医・第二薬理*）

105. マイネルト基底核破壊の受動的回避行動およびストレス反応ペプチドに及ぼす影響 ……232
新川　久義，Ramon Cacabelos，播口　之朗，西村　健
（大阪大，医・精神医学）

106. イボテン酸によるNucleas Basalis of Magnocellularis破壊による学習記憶障害モデル動物作成の試み ……234
山崎　りつ，岡田　理之，田口　浩資郎，高橋　美枝，山下　元司，
池田　久男　（高知医大，神経精神科）

107. S-Adenosyl-L-methionine（SAMe）の海馬神経細胞壊死抑制効果 ……236
佐藤　博美，森口　幸栄　（富士化学工業・研究部）

108. 実験的脳虚血における脳内アセチルコリン（ACh）レベルおよびモノアミン代謝の変化に及ぼす各種薬剤の効果 ……238
羽場　久美子，小川　紀雄，森　昭胤
（岡山大・医・脳代謝研・機能生化）

109. HPLC-ECDを用いたモノアミン同時定量法の検討：多要因実験とシュミレーションによる最適化 ……240
中川　照丈，久保　里子，増田　千春，鵜飼　清治
（科研製薬・中研・薬理）

110. メタンフェタミン投与による中枢モノアミン及び代謝産物の変化：神経終末及び細胞体における影響の相違 ……242

楯林　義寛，平野　誠，松本　孝，黒木　俊秀，堤　哲之，西山　浩二，
大星　博明，内村　英幸，白石　照雄*，中原　辰雄**，中村　薫***（国
立肥前療養所，九州大・理・生物*，化学**，大牟田労災病院***）

111. N-Methylisoquinolinium ion のドーパミンニューロンにおよぼす影響 ……244
平田　洋子，南　正康，直井　信*，永津　俊治*
（日本医大・衛生，名大・医・生化一*）

112. ラット脳セロトニン$_{1A}$受容体-G蛋白共役系に対する可逆的SH基修飾試薬の効果 ……246
北村　佳久，今井　伸一，野村　靖幸　（北大・薬・薬効）

113. ヒト死後脳 phencyclidine 結合部位に対する L-グルタミン酸，グリシンおよび Mg^{2+} の影響 ……248
白川　治，中井　隆，北村　登，橋本　健志，西野　直樹，三田　達雄
（神戸大・精神神経科）

114. ラット脳神経伝達物質に対する dantrolene の作用 ……250
竹内　潤一，木内　祐二*，小林　利雄，清水　浩光，小片　寛，
融　道男　（信州大・精神医学，昭和大・第二薬理学*）

115. ウシ脳組織から分離したモノアミン生合成活性化タンパク質(14-3-3)の不均一性 ……252
市村　徹，礒辺　俊明，奥山　典生　（都立大・理・化学）

116. シナプトソーム膜タンパク質の分離分析 ……254
石岡　憲昭，名竹　洋子，栗岡　晋　（慈恵医大・医科研・生化学）

117. ラット小脳の成熟にともなうタンパク質変動の二次元 HPLC による解析 ……256
田岡　万悟，礒辺　俊明，真鍋　敬，奥山　典生，山国　徹*
（都立大・理・化，三菱化成生命研*）

118. ヒト脳型グリコーゲンホスホリラーゼ：脳からの精製，特異抗体の作成，EIA 法の確立，組織分布 ……258
加藤　兼房，清水　温子，黒部　直美　（愛知県コロニー・研・生化）

119. 脳プロテインホスファターゼ 2A に対する抗体の性質とラット脳における免疫組織化学的検索 ……260

斎藤　義樹，山本　秀幸*，生塩　之敬，宮本　英七*
（熊本大・医・脳外科，第一薬理*）

120．ラット小脳におけるビリルビン結合タンパク ……262
青野　幸子，仙波　禮治，佐藤　浩，柏俣　重夫
（愛知県コロニー・研究所・周生期）

121．キョートルフィンによるシナプス膜からのカルシウム動員と IP_3 産生を介する作用機序 —— GTP 結合タンパクの関与 —— ……264
田村　滋規，植田　弘師，佐藤　公道　（京都大・薬・薬理）

122．脳由来 δ-オピオイドセプターと GTP 結合蛋白のシグナル伝達を伴わない連関様式について —— 再構成実験による考察 —— ……266
植田　弘師，三澤　日出巳，原田　淳，佐藤　公道
（京都大・薬・薬理）

123．クモ毒 NSTX-3 アナログ〔^{35}S〕(NSTX-3)-Met の合成とラット脳組織における特異的結合 ……268
稲生　英俊，新廷　道夫，豊島　正*，芝　哲夫*，川合　述史**，
御子柴　克彦　（大阪大・蛋白研，理学部*，都立神経研**）

124．ハチ毒 MCD ペプチドの化学合成とその生理作用 ……270
近藤　哲朗，相本　三郎，北條　裕信，伊藤　憲一，加藤　宏司，
池中　一裕，御子柴　克彦
（大阪大・蛋白研，山形大・医・第二生理）

125．脳内微小透析法を用いたコレシストキニンの測定 ……272
滝田　正寿，鶴田　智也，大橋　美浩，加藤　武
（東京工大・生命化学）

126．脳内微小透析法による蛋白質・ペプチドの解析 ……274
中村　光夫*，板野　俊文，山口　文徳，徳田　雅明，松井　秀樹，
細川　清*，畠瀬　修　（香川医大・第一生理，精神神経*）

127．Neuropeptide　Y 前駆体 mRNA 発現 —— 加令及び降圧剤（Reserpine）の影響 ……276
樋口　宗史，岩佐　厚*，吉田　博　（大阪大・医・第一薬理，泌尿器*）

128．タキキニン・ペプチド二量体アナログの生理作用と受容体特異性 ……278
高野　行夫，樋口　義信，野中　重幸，本多　健治，斎藤　亮，

神谷　大雄，下東　康幸*，坂口　和靖*，松本　宏志*，児玉　浩明*，
脇　道典*　（福岡大・薬・薬理，九州大・理・化学*）

129. Methamphetamine投与によるラット脳内Substance P受容体，
TRH受容体の変化におよぼすD-1，D-2遮断薬の効果 ……280
尾上　太一，氏家　寛，中島　誠，柏原　健一，秋山　一文，岡本　基，
大月　三郎，小川　紀雄*　（岡山大・医・神経精神，脳研機能生化*）

130. Alzheimer型痴呆脳におけるAcetylcholinesterseの異常 ……282
川嶋　信吾，中野　智，辻　輝之，荒木　亘，中村　重信
（京都大・神経内科）

131. ニューロンの生存や突起形成を抑制する因子――アルツハイマー病
との関連―― ……284
内田　洋子，朝長　正徳　（老人研・臨床病理，東大・脳研病理）

132. 加齢に伴う神経組織特異蛋白質の脳での変動 ……286
鈴木　富士子，森下　理香，浅野　富子，加藤　兼房，佐藤　秩子
（愛知県コロニー・研・生化，愛知医大・加齢研*）

133. Zellweger症候群のperoxisome異常について ……288
相川　純一郎，成沢　邦明*，多田　啓也
（東北大・医・小児科，病態代謝*）

134. シアリドーシス「TYPE 2」例の脳に蓄積したシアル酸化合物の検討 ……290
横田　司*，六川　千秋，飯田　静夫
（東京医科歯大・分子医科学，神経内科*）

135. Wriggle Mouse Sagamiに関する神経化学的検討 ……292
池田　正行*，西川　徹，三国　雅彦，高橋　清久
（国立精神神経センター神経疾病研3部，現旭中央病院神経内科*）

136. マウスMPTPパーキンソニスムにおけるストレスの影響――各種
薬剤による検討―― ……294
浦上　克哉*，正木　直子，足立　芳樹，栗木　悦子，西川　清方，
高橋　和郎　（高尾病院神経内科*，鳥取大・脳神経内科）

137. パーキンソン病モデルイヌにおける日内リズム異常 ……296
日根野　尚，溝渕　睦彦，柿本　泰男，平谷　勝彦*
（愛媛大・医・神経精神科，第一外科*）

138. ラット脳内ノルアドレナリン代謝に及ぼす短時間拘束と持続拘束ストレスの影響の差 ……298
権藤　雄二，津田　彰，井田　能成，末吉　圭子，小口　雅申，
田中　正敏　（久留米大・医・薬理）

139. 恐怖条件づけによる脳内カテコールアミンニューロンの活動性亢進とdiazepamの抑制作用 ……300
井田　能成，津田　彰，末吉　圭子，権藤　雄二，田中　正敏
（久留米大・医・薬理）

140. 抗うつ薬・ラット大脳皮質プロテインキナーゼAおよびプロティンキナーゼC活性 ……302
長田　賢一，朝倉　幹雄，塚本　徹，柴田　牧子，今福　淳，窪田　博，
西崎　純，佐藤　厚子，中西　純一，長谷川　和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神）

141. 脳mRNA移入卵母細胞のセロトニン電流応答に対する抗うつ薬とくにイミプラミンの抑制効果 ……304
東田　道久，高須　俊行，野村　靖幸　（北大・薬・薬効）

142. 海馬キンドリングにおけ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の変化——その長期持続性の検討—— ……306
山田　了士，秋山　一文，大源　明宏，西川　浩，氏家　寛，森分　隆，
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*）

143. 悪性症候群の病態と治療に関する実験的研究（第2報）——病態モデル動物の作成—— ……308
小山　司，松原　良次，井上　猛，中山　誠，小田垣　雄二，山下　格
（北海道大・医・精神医学）

144. 新生マウスに対する銅投与の効果 ……310
笠間　透，田中　晴美
（国立精神神経センター・神経・疾病研第二部）

145. 脳シナプス膜標品への〔^{3}H〕MK-801結合 ……312
米田　幸雄，萩田　喜代一　（摂南大・薬・薬理）

146. NMDA感受性〔^{3}H〕グルタミン酸結合 ……314
萩田　喜代一，米田　幸雄　（摂南大・薬・薬理）

147. 高カリウム刺激によるラット脳シナプトゾーム内の Ca^{2+} 濃度上昇に対する N-methyl-D-artate antagonist の効果 ……316
岡田　三津子，美根　和典*，岩崎　克典，藤原　道弘
（福大・薬・応用薬理，九州大・医・心療内科*）

148. $GABA_B$ 受容体と細胞内情報伝達系の機能的共軛について ……318
大森　敬之，西川　正雄，上羽　毅，田口　淳一，栗山　欣弥
（京都府立医大・薬理）

149. 分化ヒト白血病（HL-60）細胞膜の PI レスポンスに及ぼす cAMP 依存性プロテインキナーゼ活性化の影響 ……320
三崎　尚之，渡辺　康裕，今泉　太郎，吉田　博
（大阪大・医・第一薬理）

150. ヒト血小板 α-2 アドレナリン性受容体を介したイノシトールリン脂質代謝 —— Bt2 cAMP および 8 Br cGMP の効果 ……322
森　秀樹，三国　雅彦*，小山　司**，山下　格**
（小樽第2病院・精神神経，国立精神神経センター*，北大・医・精神**）

151. 培養上頸交感神経節細胞にみられる3種のイオンチャンネル ……324
飯島　敏夫，関口　達彦*，松本　元
（電総研アナログ情報，三洋筑波研*）

152. Ca^{2+}/カルモデュリン依存性キナーゼ II の細胞内自己リン酸化反応の解析 ……326
太田　安隆，大場　隆，福永　浩司，宮本　英七
（熊本大・医・第一薬理）

153. ラット脳 Ca^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の自己燐酸化によって誘起された Ca^{2+}/CaM 非依存活性と分子内生成物阻害 ……328
加藤　剛志，藤澤　仁　（旭川医大・第一生化）

154. L 型 Ca チャンネルに対するモノクローナル抗体 ……330
高橋　正身　（三菱化成生命研・脳神経化学）

155. ラット脳膜分画における非ラベル 1, 4-ジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬の結合動態の解析 ……332
伊原　正樹，倉田　立子，鈴木　国夫，矢野　光夫
（萬有製薬㈱中央研・生化学）

156. ω-conotoxin 受容体（Ca チャンネル成分）の可溶化 ……334
山口　徹，西須　英雄，三井　宏美*，阿部　輝雄
（新潟大・脳研・神経化学，理学部・生物*）

157. ヤリイカ巨大軸索膜裏打ち構造と Na チャンネルゲーティング ……336
松本　元，市川　道教，新井　孝夫*，月田　承一郎**
（電子技術総合研究所，筑波大基礎医学系*，東京都臨床医学総合研究所**）

158. ラット脳 NaK-ATPase α-3 サブユニット cDNA の 3T3 細胞への導入と Na ポンプ活性の発現 ……338
原　諭吉，二家本　晃，小島　利之，松本　暁子，中尾　真
（東京医歯大・医・生化）

159. グルタミン酸によるニューロンの Na ポンプ活性の上昇 ……340
井上　順雄，松井　英男　（杏林大・医・生化学）

160. In vivo におけるラット線条体からの acetylcholine の放出に及ぼす cerulein の影響 ……342
下山　政憲，鬼頭　昭三　（広島大・医・第三内科）

161. ラット線条体 Cyclic-AMP 及び monoamime metabolites に及ぼす Caerulein の影響 ……344
森田　勇二，小長谷　正明，小長谷　陽子，高柳　哲也
（奈良医大・神経内科）

162. 海馬培養神経細胞における somatostatin の細胞内カルシウム濃度上昇作用について ……346
三好　理絵，鬼頭　昭三，山下　さゆり　（広島大・医・第三内科）

163. 上頚部交感神経節内心房性 Na 利尿ペプチドの存在様式と節前および節後神経切断による変動 ……348
戎　弘志，小出　直，田丸　政男*，藤田　公和*，永田　豊*
（福友会医学研究所，藤田学園保健衛生大・医・生理学*）

164. 卵胞刺激ホルモン（FSH）による培養セルトリ細胞内エンケファリン前駆体遺伝子発現の調節 ……350
相沢　貴子，山本　明広，野沢　明美，吉川　和明
（東京都精神医学総合研・分子生物研）

165. 視床下部視索上核における δ-オピオイドペプチドの作用 ……352
津島　宏美，森　真由美，松田　友宏　（名古屋市立大・医・薬理）

166. ウシ下垂体後葉分泌顆粒の Enkephalin について ……354
竹田　二美代，竹田　稔，島田　明範，倉岡　幸令，紺野　邦夫，
塩田　清二，中井　康光*　（昭和大・医・生化学，解剖 1*）

167. 細胞内シグナル変換系の相互作用によるエンケファリン前駆体遺伝子
発現の調節：アルツハイマー病アミロイド蛋白遺伝子との比較 ……356
吉川　和明，相沢　貴子，山本　明広，野沢　明美
（東京都精神医学総合研・分子生物）

168. アルツハイマー病アミロイド蛋白メッセンジャーRNA のラット中枢
神経内分布：ソフトスタチンおよびコレシストキニン前駆体メッセン
ジャーRNA との比較 ……358
山本　明宏，相沢　貴子，野沢　明美，吉川　和明
（東京都精神医学総合研・分子生物）

169. 出血性ショック時における脳内神経ペプチドの変化 ……360
小野　剛，小川　紀雄，羽場　久美子，森　昭胤
（岡山大・医・脳代謝・機能生化）

170. ヒト血小板トロンビン刺激によるイノシトールリン脂質代謝回転に及
ぼす Chlorpromazine の作用 ……362
若田部　博文，塚原　敏正，石郷岡　純，大貫　裕子*，永田　悦子**，
笠原　友幸，大谷　義夫，三浦　貞則
（北里大・医・精神科，生物化学系*，東病院研究系**）

171. M電流のないニューロブラストーマ細胞ではブラジキニン刺激はイノ
シトール三リン酸依存性過分極を生じる ……364
東田　陽博，星　直人，横山　茂，岡野　幸雄*，野沢　義則*
（金沢大・医・神経情報研・神経物性，岐阜大・医・生化*）

172. リチウムの細胞内情報伝達系に対する作用発現調節におけるナトリウ
ムチャンネルの関与 ……366
神庭　重信，八木　剛平，加藤　隆一*，Elliott Richelson**
（慶応大・医・精神神経，薬理*，メイヨ・クリニック，薬理**）

173. リチウムとカルバマゼピンのラット脳内 GABA 受容体に与える影響 ……368
本橋　伸高，假屋　哲彦　（山梨医大・精神神経科）

174. 脳ミクロソーム極長鎖脂肪酸伸長反応酵素系の特徴 ……370
斉藤　寿仁，吉田　敏*，竹下　正純
（大分医大・生化学，実験センター*）

175. 脳ミクロソームの長鎖脂肪酸伸長活性と膜の微細構造に及ぼす Ca^{2+} の影響 ……372
吉田　敏，斎藤　寿仁*，竹下　正純*
（大分医大・実験センター，生化学*）

176. ヒト脳総脂質の脂肪酸・脂肪アルデヒド・コレステロールの GC 及び GC-MS 分析による脳組織の病態解析 ……374
武富　保，原　厚　（信大・医・心脈管研・脂質生化）

177. Adrenoleukodystrophy における極長鎖脂肪酸代謝異常およびオレイン酸添加による治療効果の検討 ……376
小池　亮子，辻　省次，大野　司，宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科）

178. ヒト運動神経，感覚神経のガングリオシドのセラミド分子種及びその局在 ……378
小川　希代子，藤原　祐子，山川　淳子，舟本　規明，菅又　久美子，阿部　敏明，長嶋　和郎*　（帝京大・医・小児科，北大・医・病理*）

179. 胎生期高 Phe 血症ラット脳組織の各部位におけるガングリオシド ……380
小木曾　学，原田　寧，大田　昌子，平野　修助
（東邦大・医・第二生理）

180. ヒト脳における免疫染色を用いた asialo GM_1 の検索 ……382
岩本　典彦，羽賀　千恵，牧野　裕*，小阪　憲司
（東京都精神医学総合研・神経病理，東京都立松沢病院*）

181. PC12h 細胞に蓄積する Gal $\alpha 1 \rightarrow 3$ 残基を有する中性糖脂質 ……384
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**）

182. 無麻酔無拘束ラット線条体におけるドーパミン放出と代謝に対する M1. M2 ムスカリン受容体の調節作用 ……386
徐　曼，溝部　文夫，山本　敏文，加藤　武
（東工大・生命化学・雪印乳業）

183. Effect of Lipid Environment on the Affiinities of cerebral and atrial purified muscarinic acetylcholine receptors for pirenzepine ……388
Gabriel Berstein, Tatsuya Haga, Arata Ichiyama
(Department of Biochemistry, Hamamatsu University School of Medicine)

184. ブタ心房ムスカリン受容体とG蛋白質の相互作用 ……390
芳賀　和子，芳賀　達也 （浜松医大・生化学，現東大・医・脳研生化）

185. CCK伝達機構に対するシナプス前DA受容体機能について ……392
深間内　文彦，吉川　武男，渋谷　治男，高橋　良
（東京医歯大・医・神経精神）

186. 受容体固相化法による中枢セロトニン受容体の検索 ……394
高見　正雄，今井　千佳，水田　正，瀬川　富朗*
（明治乳業ヘルスサイエンス研究所・生化，広島大・医・薬効解析*）

187. N-エチルマレイミドによる α_1-アドレナリン受容体――ホスホリパーゼC系の修飾 ……396
宮本　篤，木村　永一，大鹿　英世 （札幌医大・薬理）

188. 牛脳ゴルジ体画分で見られる α_2 アドレナリン受容体 ……398
宇佐美　美穂子，門田　朋子*，門田　健
（東京都精神研・神経化学，千葉大・医・解剖*）

189. ウシ脳コート小胞で見られる α_2 アドレナリン受容体 ……400
諸井　佳代子，門田　健*，久我　哲郎
（千葉大・医・高次研・高次神経，東京都精神研，神経化学*）

190. NMDA感受性［^{3}H］グルタミン酸結合に対するGTPの阻害作用 ……402
大垣　孝雄*，荻田　喜代一，米田　幸雄
（錦秀会臨検学院*，摂南大・薬・薬理）

191. 温度依存性および非依存性［^{3}H］グルタチオン結合活性 ……404
荻田　喜代一，鈴木　竹雄，米田　幸雄 （摂南大・薬・薬理）

192. ストリキニーネ非感受性［^{3}H］グリシン結合 ……406
米田　幸雄，荻田　喜代一，鈴木　竹雄 （摂南大・薬・薬理）

193. ［^{3}H］CPPによるNMDA受容体の標識 ……408

米田　幸雄，荻田　喜代一，香田　知子　　（摂南大・薬・薬理）

194．2-deoxyglucose（DG）と 2-Deoxyglucose-6-P(DG6P）の超微量測定法 ……410
赤林　朗，加藤　尚彦　　（東大・医・脳研）

195．脳微小血管培養細胞の炭水化物代謝に及ぼす神経伝達物質の影響 ……412
山本　秀子，M. Spatz*，N. Merkel*，J. Bembry*，B. Wroblewska*，
三国　雅彦，高橋　清久
（国立精神神経センター・疾病3部，NIH・NINCDS*）

196．シナプトゾーム内 GABA のコンパートメントについて ……414
朝倉　正，松田　誠　　（慈恵医大，医化学）

197．牛脳内遊離アミノ酸分画からの5種のメチルアミノ酸と β-アラニルハイプシンの単離精製及び同定 ……416
胡谷　和彦，柿本　泰男　　（愛媛大・医・精神神経科）

198．ラット延髄グルタミン酸神経の伝達物質合成における aspartate aminotransferase の関与 ……418
木原　実，久保　孝史，三須　良実　　（横浜市立大・医・薬理）

199．新生児期 glutamate の明暗弁別学習に及ぼす影響 ……420
小平　隆太郎，九穂　泰三，松本　明，芝軒　信次，小暮　美樹，
石川　紘一　　（日本大・医・薬理学）

200．ラット脳における［^{3}H］8-OH-DPAT 結合部位の多様性 ……422
横田　則夫，山脇　成人*，早川　浩**，吉田　玲夫，更井　啓介
（広島大・精神，国立呉病院・臨床研究部*，早川病院**）

201．視床下部スライスからのヒスタミン及びカテコラミン放出に対するカルシウム拮抗薬の抑制効果 ……424
竹村　基彦，岸野　淳三，望月　貴年，大和谷　厚，和田　博
（大阪大・医・第二薬理）

202．ラット脳シナプトソーム内 Ca^{2+} 濃度上昇に対する Ca^{2+} 拮抗薬と dantrolene の効果 ……426
加藤　匡宏，山脇　成人，松林　弘明
（国立呉病院臨床研究部精神神経科学）

203. シナプスでの内因性コリン産生とアセチルコリン合成 ……428
田中　康一，安藤　進，E. Yavin*
（東京都老人総合研究所・生化学，Weizmann Institute of Science Neurology Israel*）

204. 摘出上頸部交感神経節のコリン取り込みおよび代謝系 ……430
岩田　光良，田丸　政男，中島　雄三，永田　豊
（藤田学園保衛大・医・生理学）

205. カルモデュリン依在性プロテインキナーゼ II の cDNA の発現と性質 ……432
山内　卓，大迫　俊二　（東京都神経科学総合研・神経生化学）

1　分子量２．５万のＧＴＰ結合蛋白質（smg-25A 蛋白質）の構造決定と組織分布

菊池　章、松井　泰*、佐野公彦**、高井義美
（神戸大・医・第一生化、小児科**・三菱化成総研*）

〔要約〕
ウシ大脳粗膜画分より分子量約２．５万のＧＴＰ結合蛋白質（Ｇ蛋白質）を単一蛋白質にまで精製し、そのｃＤＮＡを単離して構造を決定した(smg-25A)。本Ｇ蛋白質は決定した塩基配列から２２０個のアミノ酸残基よりなり、その分子量は２４，９５４と計算された。さらに、smg-25A ｃＤＮＡを単離する過程で、本ｃＤＮＡと高い相同性を示す２種類のｃＤＮＡを単離した(smg-25Bとsmg-25C)。これら３つのsmg-25蛋白質のＣ末端の３個のアミノ酸残基はras やyptl蛋白質のＣ末端の構造とは異なったCys-X-Cys の共通な構造を有していた。Northernブロット法によりsmg-25A 蛋白質のラットにおける組織分布を解析したところ、大脳にはsmg-25A ｍＲＮＡが検出されたが、甲状腺、肺、心、肝、腸管、腎等の組織には認められなかった。ラット褐色細胞腫であるＰＣ１２細胞にもsmg-25A ｍＲＮＡが検出され、さらに、ＰＣ１２細胞を神経成長因子やジブチリルサイクリックＡＭＰで神経細胞様細胞に分化させると、そのｍＲＮＡ量が増加した。以上の結果から、smg-25A 蛋白質はras やyptl蛋白質などのファミリーとは異なる新しいＧ蛋白質のファミリーであり、本Ｇ蛋白質は神経組織に特異的に存在し、神経機能に関与していることが示唆された。

〔緒言〕
最近、分子量約２万のＧＴＰ結合蛋白質（Ｇ蛋白質）が神経組織で重要な働きをしていることが示唆されている。たとえば、ras 蛋白質は分子量２．１万のＧ蛋白質であるが、ras 蛋白質をＰＣ１２細胞に注入すると、神経成長因子（ＮＧＦ）と同様に神経細胞様細胞への分化を誘導することが報告されている（２）。また、ボツリヌス毒素が大脳や副腎の分子量２．０－２．６万のＧ蛋白質をＡＤＰリボシル化することも明らかとなっている（７、８、１０）。さらに、ＡＤＰリボシル化因子（ＡＲＦ）と呼ばれる分子量２．１万のＧ蛋白質がウシ大脳粗膜画分から精製されている（４）。一方、ras 蛋白質やARF 以外にも種々の哺乳組織で、分子量約２万のＧ蛋白質をコードするrho 、ral 、rab2、yptl遺伝子が同定されている（１、３、１１）。最近、私共は分子量約２万のＧ蛋白質（低分子量Ｇ蛋白質）をウシ大脳粗膜画分から少なくとも１５種類分離し、そのうち５種類を単一蛋白質にまで精製している（５、６、１２、１３）。５種類の精製蛋白質のうち、分子量約２．５万のＧ蛋白質（smg-25A 蛋白質）の精製方法と酵素学的性状については昨年度の本会で報告したが、今回は本Ｇ蛋白質のｃＤＮＡをクローニングしてその構造決定を行い、また本Ｇ蛋白質の組織分布と神経分化との関連を解析したので、その結果を報告する。

〔実験方法〕
既報の方法（６）に従って精製したsmg-25A 蛋白質の部分アミノ酸配列を決定し、それに基づいて合成した２種類のオリゴヌクレオチドをプローブとしてsmg-25A ｃＤＮＡを単離した。本Ｇ蛋白質のラットの種々の組織におけるｍＲＮＡの発現の解析はNorthernブロット法により行った。ＰＣ１２細胞は１０％牛胎仔血清と５％馬血清を含むＤＭＥＭ培地を用いて培養し、１００ｎｇ／ｍｌ　ＮＧＦと１ｍＭ　ジブチリルサイクリックＡＭＰ（ｄｂｃＡＭＰ）により神経細胞様細胞への分化を誘導した。

〔結果と考察〕
（１）smg-25A 蛋白質のｃＤＮＡクローニングとその構造決定 ― smg-25A ｃＤＮＡを単離してその塩基配

列を決定した。その塩基配列から本G蛋白質は２２０個のアミノ酸残基よりなり、その分子量は２４，９５４と計算された。また、smg-25A ｃＤＮＡを単離した際に、本ｃＤＮＡと高い相同性を示す別の２種類のｃＤＮＡも単離した。これらのｃＤＮＡがコードするG蛋白質は２１９個と２２７個のアミノ酸残基からなり、その分子量はそれぞれ２４，７６６と２５，９７５であった。私共はこれらのG蛋白質をそれぞれsmg-25B 蛋白質とsmg-25C 蛋白質と名付けた。３種類のsmg-25蛋白質は共にＧＴＰ結合活性とＧＴＰase 活性を示す共通配列を有しており、相互間のアミノ酸配列の相同性は７７－８５％であった。また、smg-25A 蛋白質とHa-ras、rho 、ral 、R-ras 、rab2、ypt1、SEC4蛋白質とのアミノ酸配列の相同性はそれぞれ約２８、２０、２８、２６、３８、４４、４６％であった。Ha-ras、Ki-ras、N-ras 、R-ras 、rho 、ral 蛋白質のＣ末端配列はCys-X-X-X であり、ypt1、YPT1、SEC4蛋白質のＣ末端配列はCys-Cys であることが知られているが（１、３、９）、smg-25A 蛋白質のＣ末端配列はこれらのG蛋白質とは異なり、Cys-X-Cys であった。ras やYPT1蛋白質のＣ末端側のシステイン残基はパルミチン酸化されており、このパルミチン酸を介して細胞膜と結合していると考えられている（１、９）。したがって、３種類のsmg-25蛋白質もシステイン残基がパルミチン酸化され、パルミチン酸を介して細胞膜と結合している可能性が考えられ、現在解析中である。

（２）smg-25A 蛋白質の組織分布 — smg-25A 蛋白質のラットの種々の組織におけるｍＲＮＡの発現量をNorthernブロット法で解析したところ、smg-25A ｍＲＮＡは大脳に検出されたが、甲状腺、肺、心、肝、腸管、腎等の組織には検出されなかった。また、smg-25A ｍＲＮＡはウシ副腎髄質には検出されたが、副腎皮質には検出されなかった。smg-25A 蛋白質が大脳において神経細胞かグリア細胞のいずれに存在するかは現在のところ不明であるが、本G蛋白質がウシの副腎髄質にも存在することから、smg-25A 蛋白質は少なくとも神経細胞に存在する可能性が強い。

（３）ＰＣ１２細胞の分化に伴うsmg-25A 蛋白質の変化 — ＰＣ１２細胞にＮＧＦとｄｂｃＡＭＰをそれぞれ７日間と２日間作用させると、従来の報告通り神経細胞様細胞に分化した。ＰＣ１２細胞は未分化の状態でもsmg-25A 蛋白質のｍＲＮＡが検出されたが、分化に従いsmg-25A ｍＲＮＡ量が増加した。smg-25A ｍＲＮＡがＰＣ１２細胞の神経細胞様細胞への分化に比例して増加することの意味は不明であるが、smg-25A 蛋白質が神経組織において重要な働きをしている可能性が強い。なお、本研究は三菱化成総研の近藤淳博士、菱田忠士博士、寺西豊博士との共同研究で行った。

[文献]

1) Barbacid, M. (1987) Annu. Rev. Biochem. 56, 779-827
2) Bar-Sagi, D., and Feramisco, J.R. (1985) Cell 42, 841-848
3) Haubruck, H., Disela, C., Wagner, P., and Gallwitz, D. (1987) EMBO J. 6, 4049-4053
4) Kahn, R.A., and Gilman, A.G. (1986) J. Biol. Chem. 261, 7906-7911
5) Kawata, M., Matsui, Y., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y., and Takai, Y. J. Biol. Chem. in press
6) Kikuchi, A., Yamashita, T., Kawata, M., Yamamoto, K., Ikeda, K., Tanimoto, T., and Takai, Y. (1988) J. Biol. Chem. 263, 2897-2904
7) Kikuchi, A., Yamamoto, K., Fujita, T., and Takai, Y. J. Biol. Chem. in press
8) Matsuoka, I., Syuto, B., Kurihara, K., and Kubo, S. (1987) FEBS Lett. 216, 295-299
9) Molenaar, C.M.T., Prange, R., and Gallwitz, D. (1988) EMBO J. 7, 971-976
10) Ohashi, Y., and Narumiya, S. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1430-1433
11) Touchot, N., Chardin, P., and Tavitian, A. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 8210-8214
12) Yamamoto, K., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y., and Takai, Y. J. Biol. Chem. in press
13) Yamashita, T., Yamamoto, K., Kikuchi, A., Kawata, M., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y., Shiku, H., and Takai, Y. J. Biol. Chem. in press

2　神経組織および神経系培養細胞における GTP結合蛋白質Gi2

森下理香、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結合蛋白質Gi2のαサブユニット（Gi2α）に対する抗体およびイムノアッセイ法を用いて、神経組織および神経系培養細胞におけるGi2の局在と発育、分化にともなう濃度変化を調べ、Goのαサブユニット（Goα）と比較検討した。

1) ウシ脳各部位におけるGi2αの濃度を測定すると、いずれの部位においてもGoαより低く、またGoαより部位間の差が小さかった。免疫組織化学的にはGi2αはGoαと同様 neuropil に局在していた。

2) ラット脳におけるGi2αの発育にともなう濃度変化を検討すると、Goαが胎生期より著しく上昇するのとは対照的に、胎児から成獣に至るまでほとんど一定であった。

3) C6グリオーマ細胞中にはかなり高濃度のGi2αと、その１０分の１程度のGoαが含まれていた。forskolinで分化させた細胞と未分化の細胞中のこれらの蛋白質の濃度を比較すると、Gi2α、Goαともに分化させたものの方が２倍程高い値を示した。一方、βサブユニットをイムノアッセイ法で測定すると両細胞にほとんど差が見られなかった。

細胞膜受容体と連関するGTP結合蛋白質（G蛋白質）にはGs、Gi、Go、トランスデューシンなどが知られており、Giはさらに相同性の高い3つの分子種（Gi1、Gi2、Gi3）の存在が報告されている（1-3）。これらのうち脳には現在までにGs、Gi1、Gi2、Goの存在が示されているが、Goは神経系および神経内分泌細胞にほぼ特異的な蛋白質であることが免疫学的手法により明らかにされた（4）。最近我々は、Gi2をウシ肺より精製し、そのαサブユニット（Gi2α）に対する抗体を作製し（5）、これを用いてエンザイムイムノアッセイ（ＥＩＡ）系を確立した。Gi2αの生体内分布を検討するとGoαと異なり、調べたいずれの組織にも存在していた。そこで今回神経組織および神経系培養細胞におけるGi2αの局在と発育、分化にともなう濃度変化を調べ、Goαと比較検討した。

［実験方法］

G蛋白質の精製と抗体およびＥＩＡ系の作製：ウシ脳Goα、βγ（6）およびウシ肺Gi2α（5）は既報の方法で精製し、それぞれをウサギに注射し、抗血清を得た。精製抗体およびそれを用いたＥＩＡ系は既報の方法で作製した（6、7）。

細胞培養：C6グリオーマ細胞は 10% FCS を含む DMEM を用いプラスチック皿（直径５cm）で培養した。

組織および細胞抽出液の調製とＥＩＡ：ウシおよびラット（Wistar）の脳は９倍量の、培養細胞は150-200μlの20 mM Tris-HCl (pH 7.5)／1 mM EDTA／5 mM β-メルカプトエタノール／1 M NaCl／2% コール酸ナトリウム（可溶化 buffer）中でホモジナイズし、ついで超音波処理し、100,000 x g、１時間遠心した。上清を10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0)／0.1% ウシ血清アルブミン／0.5% ゼラチン水解物／0.3 M NaCl／1 mM $MgCl_2$／0.1% NaN_3（buffer G）で希釈し、既報（6,7）のＥＩＡ法でGi2α、Goα、βの測定を行った。

［実験結果］

Table 1 はウシ脳各部位のコール酸抽出液中のGi2α濃度を pmol/mg 蛋白質で示したもので、比較のためGoα濃度（6,7）も合わせて示した。いずれの部位でもGoαより低い値を示し、特に大脳皮質ではGoαの10% 程度であった。Goαは大脳皮質、海馬、小脳皮質などに高濃度存在していた（6,7）が、Gi2αではそのような顕著な部位間の差は認められずむしろ均一に存在していた。免疫組織化学的に検討すると、Gi2αはGoαと同様、neuropil に局在することが明らかになった。Fig. 1 はラット脳におけるGi2αの発育にともなう濃度変化を、Goαの結果（8）と合わせて示した。Goαの場合は胎生期から生後20日頃まで著しい上昇がみられたが、Gi2αは胎児から成獣までほとんど一定であった。

つぎに、各種神経系培養細胞中のGi2αとGoαの濃度を測定すると、ニューロン性細胞ではGi2αがGoαとほぼ同量存

Table 1
Regional distribution of $G_{i2}\alpha$ and $G_o\alpha$ in bovine brain

Region	$G_{i2}\alpha$	$G_o\alpha$
	(pmol/mg protein)	
Cerebral cortex	14.0 ± 2.87	104 ± 8
Cerebral white matter	11.1 ± 2.09	37.1 ± 4.7
Hippocampus	13.2 ± 1.89	89.4 ± 19.6
Thalamus	11.2 ± 1.02	69.6 ± 9.3
Nucleus caudatus	11.4 ± 2.42	69.5 ± 10.1
Superior colliculus	8.44 ± 1.66	54.7 ± 9.6
Inferior colliculus	10.6 ± 2.57	52.3 ± 7.9
Cerebellar cortex	13.6 ± 3.85	82.9 ± 20.9
Cerebellar white matter	8.10 ± 1.68	23.6 ± 4.8
Medulla oblongata	10.2 ± 3.31	23.6 ± 3.8
Optic tract	8.96 ± 1.03	26.0 ± 7.7
Spinal cord	9.87 ± 1.53	17.7 ± 1.5

Data are mean ± SD values from 5 animals.

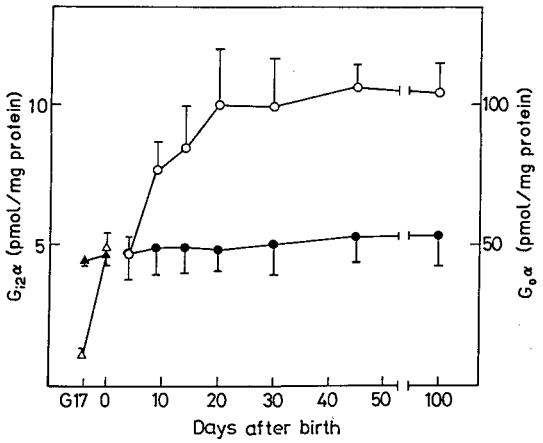


Fig. 1. Ontogeny of $G_{i2}\alpha$ and $G_o\alpha$ in rat brain. △ ▲ ;whole brain, ○ ● ;cerebral cortex, ▲ ● ;$G_{i2}\alpha$, △ ○ ;$G_o\alpha$

在するのに対し、グリア性細胞ではGoαにくらべGi2αの濃度がはるかに高かった。そこでC6グリオーマ細胞を用いてこれらのG蛋白質についてさらに詳しく検討した。forskolinで分化誘導させたC6細胞と未分化の細胞のコール酸抽出液中のGi2α、Goαおよび36kDaβをＥＩＡで測定した結果をTable 2 に示した。Gi2αおよびGoαの濃度はforskolin により約２倍に上昇したが、対照の細胞はほとんど一定の濃度を示した。一方、36kDaβサブユニットは両細胞でほとんど差が見られなかった。

［考察］

Gi2αの脳内分布と発育にともなう濃度変化はGoαの結果と比較するとかなり対照的であった。まず脳内分布ではGoαが大脳皮質、海馬、小脳皮質など神経細胞の多い部位に高濃度存在しているのに対し、Gi2αはほとんど均一に分布していた。またGoαの発育にともなう濃度変化は、胎生期より生後20日頃まで著しい上昇を示しており、シナプス形成の時期と同調しているが、Gi2αの場合、胎児から成獣までほぼ一定の濃度を示した。Gi2がすべての末梢組織に存在することを考え合わせると、Gi2は神経伝達よりむしろ細胞に共通の機能に関与しているのではないかと考えられる。各種腫瘍性培養細胞を用いた実験結果から、Gi2αはニューロンよりグリアに多く存在していることが示唆された。またC6グリオーマ細胞において分化した細胞ではGi2α、Goαとも未分化のものより高くなったが、36kDaβはほとんど変化しなかった。この結果は、ラットの脳において、発育にともなって上昇するGoαにほぼ同調してβも上昇した（8）結果とは対照的で、グリオーマ細胞ではαサブユニットの増加にβサブユニットは同調しないと考えられる。

Table 2. Induction of α subunits of G proteins by forskolin in C6 glioma cells

Addition	$G_{i2}\alpha$	$G_o\alpha$	36kDa β
	(pmol/mg protein)		
None	8.70 ± 1.95	0.546 ± 0.137	5.04 ± 0.68
Forskolin	17.4 ± 2.9	1.04 ± 0.18	5.93 ± 0.34

［文献］

[1] Gilman, A.G. (1987) Annu. Rev. Biochem. **56**, 615-649 [2] Suki, W.N., Abramowitz. J., Mattera, R., Codian, J., and Birnbaumer, L. (1987) J. Biol. Chem. **262**, 14241-14249 [3] Itoh, H., Toyama, R., Kozasa, T., Tsukamoto, T., Matsuoka, M., and Kaziro, Y. (1988) J. Biol. Chem. **263**, 6656-6664 [4] Asano, T., Semba, R., Kamiya, N., Ogasawara, N., and Kato, K. (1988) J. Neurochem. **50**, 1164-1169 [5] Morishita, R., Kato, K., and Asano, T. (1988) Eur. J. Biochem. **174**, 87-94 [6] Asano, T., Kamiya, N., Morishita, R., and Kato, K. (1988) J. Biochem. **103**, 950-953 [7] Asano, T., Semba, R., Ogasawara, N., and Kato, K. (1987) J. Neurochem. **48**, 1617-1623 [8] Asano, T., Kamiya, N., Semba, R., and Kato, K. J. Neurochem. in press.

3　百日咳毒素によるG蛋白のADP-ribosylationに対するLithiumの効果

川本日出雄[2]、渡辺康裕[1]、今泉太郎[1]、三崎尚之[1]、
大柳光正[2]、岩崎忠昭[2]、吉田博[1]
（大阪大・医・第一薬理[1]、兵庫医大・第一内科[2]）

〔要約〕ラット単離心筋細胞を用いて、40-41K蛋白（GTP結合蛋白－G蛋白）の百日咳毒素（IAP）によるADP-ribosylationに対するLiClの効果を観た。40-41K蛋白におけるADP-ribosylationは、GTPγS(1～100 mM)存在下減弱し、G蛋白におけるものであると考えられた。次にLiCl(1～10 mM)をADP-ribosylation反応液(1 mM ATP, 10 mM thymidine, 1 mM EDTA)に加えると濃度依存性にADP-ribosylation量を減弱させた。このLithiumの減弱効果は他の一価カチオンと比較して、特異的であった。また、Lithium慢性投与ラットの心筋細胞でもコントロールラットと比べ、ADP-ribosylation量は減弱していた。LiClがG蛋白に直接作用することを明らかにするため精製Giを用いてIAPによるADP-ribosylationを検討したが、LiCl 2 mM にて減少した。以上より、Lithiumはラット単離心筋細胞膜及び、精製Giにおいて、IAPによるG蛋白のADP-ribosylation量を減少させ、LithiumがG蛋白に作用点を有し、G蛋白に少なくとも質的変動をもたらすと考えられた。

Key words: lithium, Gi, ADP-ribosylation, islet-activating protein, rat cardiac cell

［目的］

Lithiumは躁鬱病の治療薬として用いられるが、その作用機序はいまだ不明である。従来よりLithiumは、phosphatidyl inositol turnover を抑制することや(1)、刺激時のadenylate cyclase 活性を抑制すること(2)が知られている。さらにラット大脳皮質膜で、Lithiumはアドレナリン、コリン受容体刺激時のGTP 結合の増加を抑制し、G蛋白とguanine nucleotide 結合を減弱させるとの報告(3)もなされている。本研究では、Lithiumの作用機序を解明するため、ラットの心室細胞膜及び、精製Giを用いて、40-41K蛋白のIAPによるADP-ribosylationに対するLiClの効果を観た。さらに、LiCl慢性投与の影響を検討した。

［方法］

試料調製

Wister ラット摘出心臓をランゲンドルフ潅流装置を用いて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。Giは宇井、堅田等の方法(4)により、ラットの脳より部分精製した。

ADP-ribosylationの観察

単離心筋細胞膜分画(10μg/tube)を、1 mM ATP, 10 mM thymidine, 1 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$ を含むtriethanolamine-HCl buffer (50 mM, pH 7.4)中で、1μM ^{32}P-NAD, IAP (2μg/tube)と 25℃で反応させ、Laemmli(5)のsample buffer に懸濁後、SDS-PAGEを行い、autoradiographyにて得た、40-41Kのbandの吸光度をdensitometer(島津２波長chromatoscanner, CS-930)にて判定し、IAPによるADP-ribosylation量を観察した(6)。

Lithium 慢性投与

5-7 mg/body weight/day のLiClを12-20日間腹腔内投与したラットの心室心筋細胞を得た。この時ラットの血中Lithium レベルは、0.6-1.0 mM の治療的有効濃度であった。

［成績］

単離心筋細胞膜ホモジネートにおけるIAPによるADP-リボシル化

IAPによる40-41K蛋白のADPリボシル化反応は約90分にてほぼ飽和に達し（図１）、Mg^{2+} 2mM, GTPγS存在下にて減弱し、この蛋白は、GTP結合蛋白と考えられた(6)。

ADP-リボシル化反応液へのLi添加の影響

反応液中にLiCl 2 mM を添加すると、IAPによるADPリボシル化は抑制された（図１）。このLiClの抑制効果は濃度依存性(1-10 mM)であり、ED_{50}値は約 2 mM であった。次にGTPγSも2 mM $MgCl_2$存在下で、40-41K蛋白のADPリボシル化を減弱させ、その効果は濃度依存性(1-100 mM)であった。しかしこれにLiCl 2 mM を加えても、ADPリボシル化はさらに減弱することはなく、LiCl の効果とGTPγSの効果とは相加性を示さなかった。次に、LiClのADPリボシル化の減弱効果の特異性を観るために、種々の一価カチオンを用いて検討した（図２）。その結果、LiCl (2 mM) は単離心筋細胞膜におけるIAPによる40-41K蛋白のADPリボシル化を特異的に抑制することが明らかとなった。

精製ＧｉのIAPによるADPリボシル化に対するLiの効果

同様に、ADPリボシル化反応液中へのLi添加は、IAPによる部分精製ＧｉのADP-ribosylation量を減弱させた。

Li慢性投与の影響

最後にLithium慢性投与ラットを用いて、ex vivoでLithiumの効果を観た。表１に示すように、Lithium慢性投与ラット心筋細胞膜ホモジネートではIAPによる40-41K蛋白のADPリボシル化量は、コントロールに比し、減少していた。

［考察］

抑制性GTP結合調節蛋白質（Ｇｉ）はαi,β,γの３量体として存在している時、IAPの触媒するADP-ribosyl transferase 反応の基質となる(4)。細胞膜Ｇｉ３量体は Mg^{2+}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、ADPリボシル化量の増減と相関していると考えられている。今回Liは、治療的有効量においてin vitro、ex vivoの実験系共にIAPによる心筋細胞膜ホモジネートの40-41K蛋白のADPリボシル化量を減弱した。これは精製Ｇｉでも観られた。以上の結果よりLithiumがＧ蛋白に直接に作用し、少なくともその質的変動をもたらすと考えられた。

References
1. Hallcher, L.M. and Sherman, W.R. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10896-10901
2. Ebstein, R., Belmaker, R.H., Grunhaus, L. and Rimon, R. (1976) Nature. 259, 411-413
3. Avissar, S., Schreiben, G., Danon, A. and Belmaker, R.H. (1988) Nature. 331, 440-442
4. Katada, T., Oinuma, M. and Ui, M. (1986) J. Biol. Chem. 261, 8182-8191
5. Laemmli, U.K. (1970) Nature. 227, 680-685
6. Watanabe, Y., Iwakura, K., Imaizumi, T. and Yoshida, H. (1987) 神経化学 26, 28-30

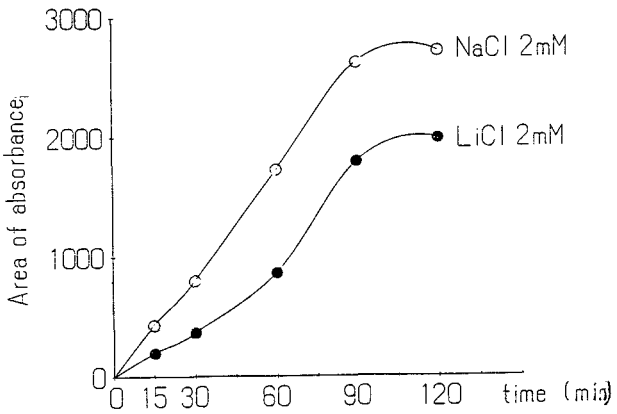


図1　心筋膜ホモジネート40-41K蛋白のIAPによるADP-ribosylationに対するLiClの影響

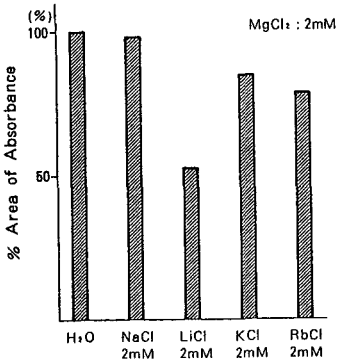


図2　種々一価カチオンの効果

	Area of band (densitometric unit) exp. 1.	exp. 2.
Without Lithium	1454	766
With Lithium	469	243
% control	32.3%	38.3%

表1　Li慢性投与の心筋細胞における影響

4 Cキナーゼの神経網膜における機能的意義 ―特にドーパミンの放出促進作用について

加藤　聖，石田外樹，根岸晃六
（金沢大・医・神経情報研伝達）

〔要約〕

コイ網膜よりイオン交換・ゲル濾過クロマトグラフィー法にてCキナーゼを部分精製し，酵素の諸性質を調べたところ，発癌プロモーター（TPA）や合成ジグリセリド（OAG）で活性化され，脳その他における本酵素と同じ性質を有することが確認された。次いで免疫組織化学を行ない本酵素のα，βサブユニットの局在を調べたところ桿体性双極細胞とドーパミン性層間細胞が染めだされた。次いで遊離神経細胞分画を用い［^{3}H］ドーパミンの放出実験を行なったところ，TPA，OAGによりCa^{2+}依存性に［^{3}H］ドーパミンの放出が促進され，阻害剤であるH_7で抑制された。網膜可溶性分画・膜分画を用い，γ-ATP^{32}，Cキナーゼにより in vitro リン酸化を行なわせたところ，40kd，100kd前後の2本のバンドが確認された。

（序）神経網膜にはカルシウム，フォスフォリピド依存性プロテインキナーゼ（以下Cキナーゼ）の高い活性が報告されているが，その機能的意義については不明である。そこで我々はコイ網膜を用い，モノクロナール抗体による本酵素の細胞局在や，部分精製酵素を用いた in vitro リン酸化による基質タンパクの同定等を試みた。

（実験方法）1．<u>酵素の部分精製</u>　成熟コイ網膜から，吉川らの方法（3）により，CキナーゼをDEAE52イオン交換，セルロファインGCL-300mゲル濾過クロマトグラフィにより部分精製し，この粗標品を酵素の諸性質並びにリン酸化実験に供した。　2．<u>免疫組織化学</u>　Cキナーゼのα，βサブユニットに対するモノクロナール抗体（Amersham製クローンMC5）を用い間接免疫蛍光法にて網膜における局在を調べた。　3．<u>伝達物質の放出実験</u>　ドーパミン細胞を含む大きな神経細胞に富む網膜遊離細胞標本をディスパーゼ処理・メトリザマイド密度遠心勾配法（1）にて作成し，あらかじめ［^{3}H］ドーパミンやGABAを取り込ませフィルター上に移し灌流法にて種々の薬物による刺激実験を行ない放出されるカウント数を計測した（2）。　4．<u>リン酸化実験</u>　網膜可溶性・膜分画と，γ-ATP^{32}，部分精製Cキナーゼとをインキュベートし，SDS-PAGE後オートラジオグラフィを行なった。

（実験結果）イオン交換・ゲル濾過クロマトグラフィにより部分精製されたCキナーゼは発癌プロモーター（TPA）や合成ジグリセリド（OAG）でよく活性化され，又，Cキナーゼ阻害剤であるH_7で抑えられた（Fig. 1 & Table 1）。モノクロナール抗体による免疫組織化学の結果，桿体性双極細胞とドーパミン層間細胞が染め出された。このドーパミン細胞はチロシンハイドロキシラーゼの二重蛍光染色により確認同定した（4）。なお，このモノクロナール抗体はイムノブロットの結果80kdのCキナーゼのバンドと反応した。ドーパミン細胞にCキナーゼの局在が認められたので網膜遊離神経細胞分画を用い［^{3}H］ドーパミンの放出実験を行なったところ，TPA（10^{-9}g），OAG（10^{-5}M）により有意にドーパミンの放出が促進され，H_7（50μM）で両者の誘導放出が抑えられた（Fig. 2）。又，［^{3}H］GABA，D-Aspの放出にはTPAやOAGは無効であった。次いで部分精製Cキナーゼを用いリン酸化実験を行なったところ，40kd，および100kd前後の2本のバンドが，Ca^{2+}，フォスフォリピド依存性にリン酸化された。

（考察）神経網膜にも脳のCキナーゼと諸性質を同じくするCキナーゼの存在が確認され，更にそのα，βサブユニットの局在がドーパミン細胞に存在し，本酵素の活性化により有意にかつ，特異的に［^{3}H］ドーパミン放出が促進された。神経網膜の伝達物質ドーパミンの遊離放出機構にCキナーゼが関与していることが示唆された。

(文献) 1. Ishita et al. (1988) J. Neurochem. 50, 1-6.
2. Kato et al. (1982) J. Neurochem. 39, 493-498.
3. Kikkawa et al. (1982) J. Biol. Chem. 257, 13341-13348.
4. Negishi et al. (1988) Neurosci. Lett. (in press).

Table 1. コイ網膜Cキナーゼの諸性質

Activation of C-kinase	(%)
Complete system	100
− PS	30
− Ca, − PS	24
+ H7 (5×10^{-5}M)	35
TPA (g)	
10^{-11}	42
10^{-10}	69
10^{-9}	110
+ H7	35

Fig. 1. コイ網膜Cキナーゼの部分精製

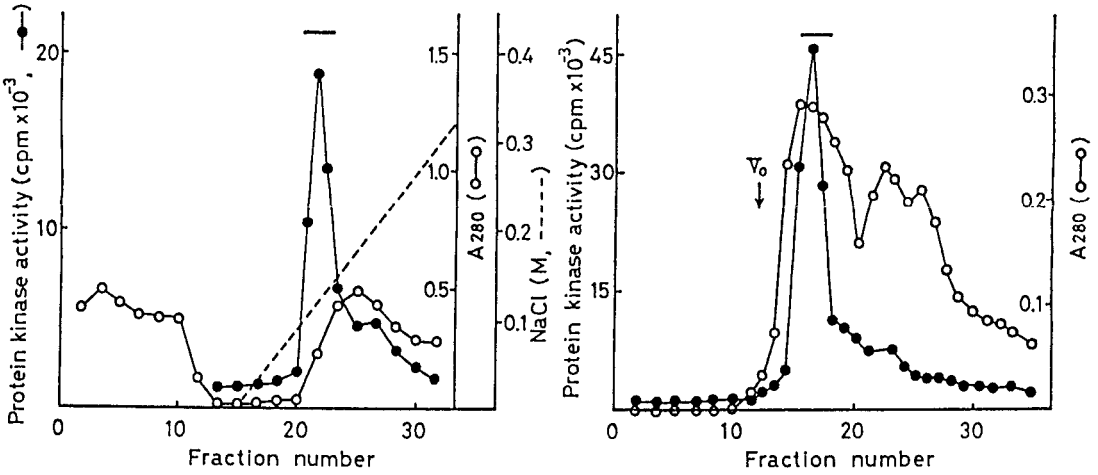
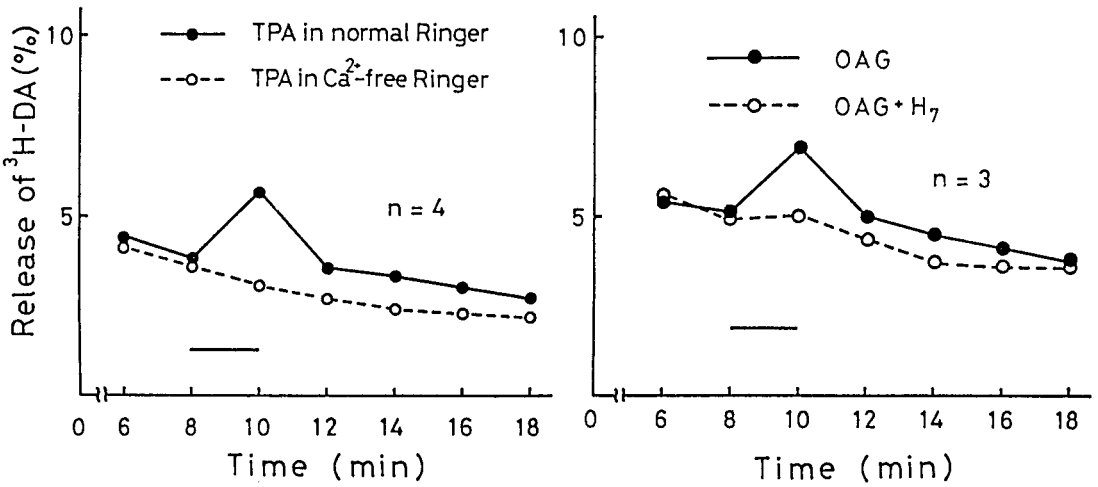


Fig. 2. TPA, OAGによる [^{3}H] ドーパミン放出の促進



5 In Vitro Phosphorylation of Cerebellar Neuronal Membrane Proteins by Purified Protein Kinase C Subspecies.

Mark S. Shearman, Tomiichiro Oda, Ushio Kikkawa and Yasutomi Nishizuka, Kobe University School of Medicine, Department of Biochemistry, Kobe 650.

SUMMARY

A distinct level of expression and cellular distribution of the α, β, and γ group of protein kinase C (PKC) subspecies has been reported in cerebellum tissue. In particular, Purkinje cells express type I(γ) and type III(α) subspecies, whereas granule cells express type II(βI) and type III(α) subspecies. In this study, membrane fractions from Purkinje and granule cell bodies were isolated from bovine cerebellum, and used as substrates for in vitro phosphorylation experiments with the α, β(I+II) and γ PKC subspecies purified to near homogeneity from the same tissue. The two cell types were found to contain a number of proteins which are phosphorylated by the PKC subspecies, with Purkinje cells having a protein of approx. 50 kilodaltons that is preferentially phosphorylated by the γ-type enzyme.

KEYWORDS: Protein kinase C subspecies; cerebellar neurones; substrate phosphorylation.

INTRODUCTION

To date, molecular cloning analysis has predicted the existence, in a number of mammalian tissues, of up to seven different PKC enzyme subspecies, designated (using the generally accepted nomenclature (1)), α, βI, βII, γ, δ, ε and ζ. The PKC subspecies can arbitrarily be divided into two groups namely, α, βI, βII & γ, and δ, ε & ζ, on the basis of their structural characteristics. The mode of activation and catalytic properties of the first group, isolated from rat brain, have been studied extensively (2). In addition, their distribution in brain and other tissues has been investigated. Cerebellum tissue is interesting in this respect, as although it contains α, β(I+II) and γ subspecies, it is a particularly rich source for the γ-type, which is apparently expressed only in central nervous tissues (3). Immunohistochemical analysis has revealed these subspecies to show a distinct cell-specific expression within the cerebellum (4-6). Purkinje cells express γ-type and α-type PKC, whereas granule cells express βI-type and α-type PKC. An important aspect of the resolved enzyme subspecies yet to be studied in any detail, is their ability to phosphorylate neuronal membrane proteins. In this study, the kinase activity, toward membrane proteins from Purkinje and granule cells, of α, β(I+II) and γ PKC subspecies purified from bovine cerebellum was studied under defined biochemical conditions, which were designed to allow a qualitative and quantitative comparison of their catalytic activity.

METHODS

(i) Purification and resolution of PKC subspecies - PKC enzyme activity from bovine cerebellum tissue soluble and particulate fractions was purified to near homogeneity by a method described previously (2), with minor modifications. The purified enzyme was then resolved into three distinct fractions by chromatography on an hydroxyapatite column coupled to an FPLC system, as described for rat brain tissue (3). Enzyme activity was assayed with calf thymus H1 histone as the substrate.

(ii) Isolation of cerebellar neuronal populations - A pure population of granule cell bodies and a fraction highly enriched in Purkinje cell bodies were prepared from bovine cerebellum using a modification of a method described previously (7). Briefly, cerebellum tissue (approx. 10g) was minced with a razor blade, placed in two vols. of ice-cold buffer (7.5% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 1% (w/v) BSA, 3.8mM $CaCl_2$ and 0.01% (w/v) DNAse) and forced through nylon mesh of decreasing diameter (333μm/224μm/ 110μm/74μm), with two passes through each mesh. The tissue suspension was then loaded onto a 4-step discontinuous sucrose density gradient (prepared in 20mM Tris-HCl, pH 7.5, and 1% (w/v) BSA) and centrifuged as shown in figure 1. The morphologically identified cells were recovered from the gradients, and subsequently used to prepare membrane fractions, as described in (3). The membranes were resuspended finally in 20mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.32M sucrose and 0.1mM DTT, at a concentration of 4mg membrane protein /ml, and stored at -80°C.

(iii) In vitro phosphorylation experiments - Membranes (40μg protein) and purified enzyme subspecies (20 pmol/min. activity under standard assay conditions) were incubated at 30°C in 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM $MgCl_2$ and 0.1mM Na_3VO_4, containing 2μM [^{32}P]ATP (8000 cpm/pmol), in the presence on various concentrations of phosphatidylserine. 1,2-diolein and $CaCl_2$, or 2.5mM EGTA (total volume 60μl). Assays were terminated by the addition of 30μl ice-cold Laemmli sample buffer, followed by heating at 95°C for 5 min. Samples were then separated on SDS-polyacrylamide gels (11%) and the dried gels subjected to autoradiographic analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2 shows the resolution of a purified PKC enzyme preparation from bovine cerebellum into three separate fractions by chromatography on an hydroxyapatite column. These peak fractions were identified as type I(γ), type II(βI + βII) and typeIII (α) PKC subspecies using specific monoclonal and polyclonal antibodies raised against the corresponding rat brain enzymes. The mode of activation and catalytic properties of these enzymes, together with their relative activities in this tissue, were found to be very similar to the rat brain subspecies (2). Purkinje cell and granule cell membrane proteins were found to exhibit a quite different profile when separated on polyacrylamide gels (Fig. 3). Granule cell membranes contain a number of proteins that are phosphorylated by the type II(βI + βII) and type III(α) enzymes in a calcium- and phospholipid-dependent manner. Under the conditions shown, no obvious qualitative differences between the two enzyme activities were observed, although more detailed analysis has shown some quantitative ones. In contrast to this, Purkinje cell membranes were found to contain fewer in vitro substrates. A protein of particular interest, with a molecular mass of approx. 50 kilodaltons, is preferentially phosphorylated by the type I(γ) enzyme when compared to the type III(α) enzyme under identical asay conditions, and may represent a novel substrate for the type I(γ) enzyme present in Purkinje cells. The molecular properties of this protein, and it's possible relationship to other reported neuronal phosphoproteins are under further investigation.

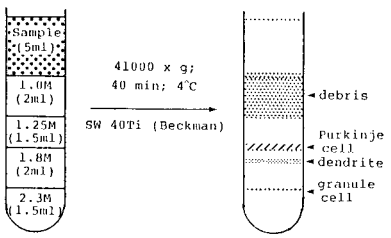


Figure 1 . Preparation of cerebellar neurone fractions by sucrose density gradient centrifugation - Samples of bovine cerebellum tissue suspension were loaded onto 4-step sucrose density gradients and centrifuged as shown. The morphologically identified cell populations were recovered from the gradients, and subsequently used to prepare membrane fractions, as described under 'Methods'.

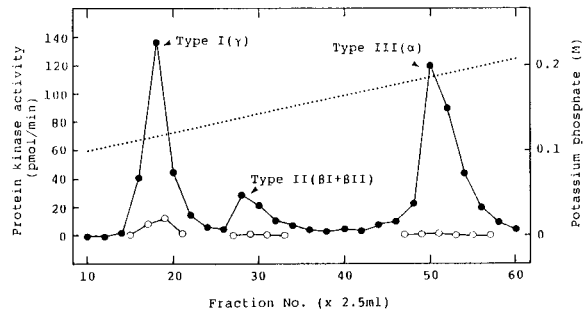


Figure 2 . Resolution of PKC enzyme activity purified from bovine cerebellum - PKC activity was purified and resolved into three enzyme subspecies by hydroxyapatite column chromatography. The identity of the enzyme fractions was confirmed by Western blotting analysis with subspecies-specific antibodies. ●, PS (8µg/ml), DO (0.8µg/ml), $CaCl_2$ (0.3mM); ○, 0.5mM EGTA.

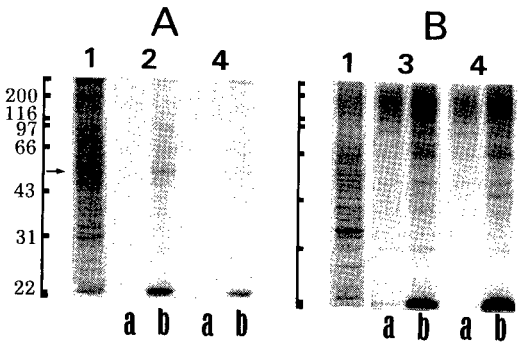


Figure 3 . In vitro phosphorylation of membrane proteins from cerebellar neurones by purified PKC subspecies - Purified enzyme subspecies and membrane fractions from Purkinje and granule cells were incubated together at 30°C for 2.5min., as described in the 'Methods' section. Membrane proteins were then separated by SDS-PAGE (11%) and the radioactivity incorporated assessed by autoradiography. Panel A, Purkinje cells; panel B, granule cells. Lane 1, Coomassie-blue stained gel; lane 2, type I(γ) enzyme; lane 3, type II(βI + βII); lane 4, type III(α). a, EGTA (0.5mM); b, phosphatidylserine (8.3µg/ml), 1,2-diolein (0.8µg/ml) and $CaCl_2$ (0.4mM). Scale, molecular weight markers.

REFERENCES

(1) Ono, Y. and Kikkawa, U. (1987) Trends Biochem. 12, 421-423.
(2) Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ase, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1988) J. Biochem. 103, 759-765.
(3) Shearman, M.S., Naor, Z., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 147, 911-919.
(4) Huang, F.L., Yoshida, Y., Nakabayashi, H., Knopf, J.L., Young III, W.S. and Huang, K-P. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 149, 946-952.
(5) Hidaka, H., Tanaka, T., Onoda, K., Hagiwara, M., Watanabe, M., Ohta, H., Ito, Y., Tsurudome, M. and Yoshida, T. (1988) J. Biol. Chem. 263, 4523-4526.
(6) Ase, K. et al., (1988) J. Neurosci., in the press.
(7) Sellinger, O.Z., Legrand, J., Clos, J. and Ohlsson, W.G. (1974) J. Neurochem. 23, 1137-1144.

6 培養グリオーマ細胞に及ぼすプロテインキナーゼ阻害剤staurosporineの影響

白石哲也、峯田寿裕、桃崎宣明、高木勝至、田淵和雄
（佐賀医大・脳神経外科）

〔要約〕

Staurosporineは、C kinaseのみならずA kinaseおよびG kinaseに直接結合することにより強力にかつ選択的にその阻害作用を発現し、培養神経芽細胞に対する分化誘導作用や培養腫瘍細胞に対する増殖抑制作用が認められている。今回、我々は培養ラットグリオーマ細胞(C6)においても濃度および時間依存性の増殖抑制作用を認めた。{IC_{50}:1.6×10^{-7}M(1hr exposure),1.5×10^{-8}M(72hr exposure)}その形態変化は低濃度では細胞突起の進展、高濃度では細胞核の多核化が認められ、これは電顕にて細胞質分裂の阻害によるものと考えられ、比較的特異な現象と考えられる。細胞内カルシウム濃度は高濃度のstaurosporine処置後短時間で上昇し、処置中止後は緩徐に減少した。Staurosporine処置による細胞機能の変化を詳細に解明することは、グリオーマ細胞の増殖機構の解明に重要な手がかりを与えてくれるものであり、今後各種growth factorとの関連や他のprotein kinase inhibitorsとの比較を含めてさらに検討が必要と考えている。

〔はじめに〕

ホルモンや神経伝達物質の遊離、増殖・分化など細胞の多彩な機能発現には、細胞蛋白のリン酸化が重要な役割を果たしていることが示唆されている。Staurosporineは1977年Omuraら(3)によって抗真菌剤として見いだされた微生物アルカロイドであり、現在報告されている化合物の中で最も強力なプロテインキナーゼ阻害作用を有する。Staurosporineの培養グリオーマ細胞に及ぼす影響を、細胞増殖、形態変化および細胞内カルシウム濃度の変化などの観点から検討し、プロテインキナーゼがグリオーマの増殖に果たしている役割を研究することを目的とした。

〔材料・方法〕

使用した細胞株はラットグリオーマ細胞C6を用い、10%牛胎児血清および抗生物質を含むEagle's minimum essential mediumを培養液とし、Falconプラスチックシャーレを用いて、37℃、5%炭酸ガス中で静置培養を行なった。Staurosporineはジメチルスルホキシドに溶解し、使用直前に培養液中に加えて、ミリポアフィルターで滅菌して用いた。まず、staurosporineの細胞増殖に及ぼす影響を検討した。2.5×10^4の細胞をシャーレに接種し、24時間後にstaurosporineを含む培養液に交換し、1時間(pulse exposure)または72時間(continuous exposure)後に正常培養液に交換してさらに24時間培養後、細胞数を算定して増殖曲線を作成した。次にコロニー形成法により、staurosporineの殺細胞効果を判定した。対数増殖期の細胞を、72時間staurosporineを含む培養液に交換し、24時間培養した後、コロニー形成能をみた。さらに、staurosporine処置後の細胞の形態変化を、位相差顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した。単一細胞内カルシウム濃度の測定には工藤ら(1)の方法に準じて行なった。すなわち培養細胞を5μMのfura2/AMを含む培養液で10分間放置し、蛍光顕微鏡により得られる細胞の蛍光像をモニターブラウン管上に撮像し、その輝度の変化を記録し、340nmと360nmで得た信号の比をとることによって定量した。

〔結果〕

Staurosporineの増殖抑制効果はFig.1のごとく、濃度および作用時間に依存して認められ、50%抑制濃度(IC_{50})は1時間で約1.6×10^{-7}M、72時間で約1.5×10^{-8}Mであった。コロニー形成法による殺細胞効果の検討では、72時間の作用時間でも生細胞率に有意な低下は見られなかった。細胞の形態変化は1時間処置系では高濃度でもほとんど認めないが、72時間処置系では著明な変化が見られた。すなわち、濃度依存性に細胞突起の著明な進展(Fig.2)および細胞核の多核

化(Fig.3)を来した。核が二核を呈している細胞を電顕観察すると、ミトコンドリア、ゴルジ、粗面小胞体等の細胞内小器官が著明に増加しており(Fig.4)、細胞質分裂の障害の所見と考えられた。細胞内カルシウム濃度は低濃度の処置ではほとんど変化が見られなかったが、高濃度では処置後数分で前値の約3倍に増加し、処置中は高値を示したままで、処置を中止すると処置前の約2倍の値まで緩徐に減少した。

[考察]

Staurosporineが細胞増殖と分化に及ぼす影響に関する研究としては培養神経芽腫細胞(PC12)の分化誘導作用(2)や培養腫瘍細胞(HeLa S3)の増殖抑制作用(4)等が報告されている。今回のラットグリオーマ細胞における検討では低濃度の処置では可逆的な増殖抑制作用と細胞突起の進展などの形態変化が見られ、従来の報告と同様の所見であった。しかし、高濃度長時間処置では細胞質分裂阻害による多核化などの不可逆性の形態変化が認められ、比較的特異な現象と考えられる。さらに高濃度staurosporine処置によって起こる細胞内カルシウム濃度の上昇は、種々のプロテインキナーゼ阻害の結果起こる複雑な細胞応答によるものと思われ、増殖抑制および形態変化に関係した現象と考えられる。細胞内カルシウム濃度に関しては今後さらに検討を加えてゆきたい。Staurosporine処置による細胞機能の変化を詳細に検討することは、グリオーマ細胞の増殖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る。

[文献]

1. 工藤 (1985) 生体の科学 36, 380-383
2. Morioka H. et al (1985) Agric. Biol. Chem. 49, 1959-1963
3. Omura S. et al (1977) J. Antibiotics 30, 275
4. Tamaoki T. et al (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 135(2),397-402

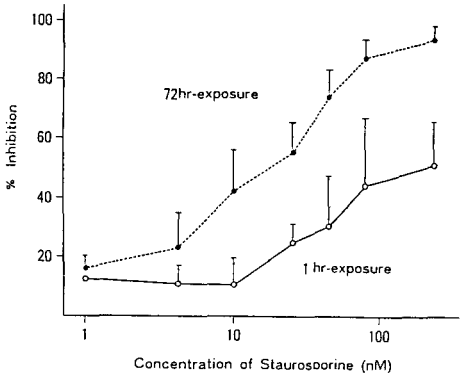


Fig. 1 Effect of staurosporine on the growth of C6 cells.

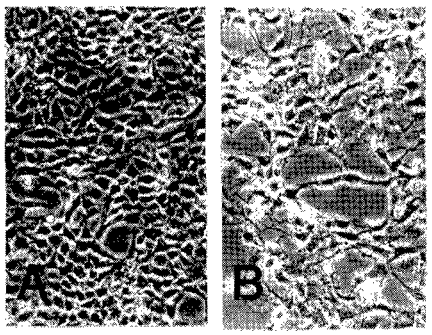


Fig. 2 Morphological cytoplasmic changes of C6 cells (phase contrast, x 200) (A) control (B) 72hr with 80nM of staurosporine.

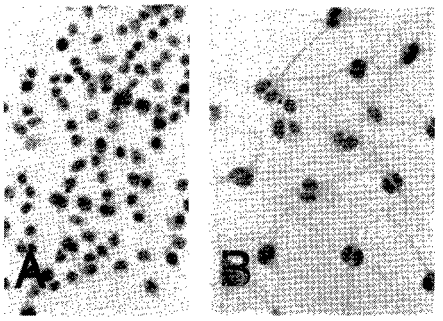


Fig. 3 Morphological nuclear changes of C6 cells (hematoxylin staining, x 200) (A) control (B) 72hr with 80nM of staurosporine.



Fig. 4 Electron micrograph of a binucleated C6 cell treated with 160nM of staurosporine for 72 hrs. (X 25,000)

7　正常及びｑｕａｋｉｎｇマウス脳における 2', 3'-環状ヌクレオチド 3'-フォスフォジエステラーゼ mRNA の発現

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

〔要約〕

最近ウシ，ラット及びヒトの 2', 3'-環状ヌクレオチド 3'-フォスフォジエステラーゼ（ＣＮＰ）（EC 3.1.4.37）の ｃＤＮＡ が相次いでクローニングされ，ヌクレオチド配列が決定された。今回我々はマウスＣＮＰの ｃＤＮＡ をクローニングし，これをプローブに用いて正常及び quaking マウス脳におけるＣＮＰ ｍＲＮＡ の発現を発育のいろいろな段階で検索した。

1）ヒトＣＮＰの ｃＤＮＡ をプローブに用いて，マウスＣＮＰの ｃＤＮＡ 断片 440 bp を分離した。

2）この断片をプローブに用いた正常及び quaking マウス脳のノーザンハイブリッド形成の結果から，以下のことが判明した。 a）マウスＣＮＰ ｍＲＮＡ はラットと同様に大きさがちがう２種のＲＮＡから成る。 b）マウスＣＮＰ ｍＲＮＡ の発現はミエリン形成期にピークに達する。 c）quaking マウスでは，どの発育時期を見ても，ＣＮＰ ｍＲＮＡ の発現量が減少している。

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の３番目に多い構成タンパクである。しかし，ＣＮＰの生理的機能，神経疾患の成因に果たしているかもしれないＣＮＰの役割は不明である。最近ウシ，ラット及びヒトＣＮＰの ｃＤＮＡ が相次いでクローニングされ，ヌクレオチド配列が決定された（Kurihara et al., 1987; Vogel and Thompson, 1987; Bernier et al., 1987; Kurihara et al., 1988）。その結果，ウシ，ラット及びヒトＣＮＰについて全アミノ酸配列が解明された。今回我々はマウスＣＮＰの ｃＤＮＡ をクローニングし，これをプローブに用いて正常及び quaking マウス脳におけるＣＮＰ ｍＲＮＡ の発現を発育のいろいろな段階で検索した。

＜実験方法＞

マウス脳 ｃＤＮＡ ライブラリーは Clontech Laboratoties のを使用した。このライブラリーを，ヒト ｃＤＮＡ の EcoRI 断片 300 bp （Kurihara et al., 1988）をプローブにしてスクリーニングした。ノーザンハイブリッド形成は Fujita et al.（1988）と同様な手順で行なった。ヌクレオチド配列は Maxam-Gilbert 法で決定した。quaking マウスは Jackson Laboratory より得た。

＜実験結果及び考察＞

ヒトＣＮＰの ｃＤＮＡ をプローブに用いて，マウスＣＮＰの ｃＤＮＡ 断片 440 bp が分離された。ヌクレオチド配列を決定したところ，マウスＣＮＰの ｃＤＮＡ 断片はヒトＣＮＰ ｃＤＮＡ のヌクレオチド 184 番から 623 番（Kurihara et al., 1988）に対応していた。ヌクレオチド配列は 90 % が，アミノ酸配列では93 % が，ヒトの ｃＤＮＡ と同一であった。

次に，マウスＣＮＰの ｃＤＮＡ 断片 440 bp をプローブに用いて，マウス脳 ポリ（A）$^{+}$ＲＮＡ のノーザンハイブリッド形成を行なった。ウシやヒトでは ｍＲＮＡ バンドは１本しか認められないが（Kurihara et al., 1987, 1988），ラットでは近接した２本のバンドが認められる（Bernier et al., 1987）。マウスでは，ラットと同様に，近接した２本の ｍＲＮＡ バンドが存在することがわかった（図１）。これら２種の ｍＲＮＡ は生後１０日頃から検出され，ミエリン形成期の生後１５－２５日に最も多く発現し，その後次第に少なくなっていくことが判明した。２種の ｍＲＮＡ を相互に比較すると，幼若期では量的にほぼ等しく，成熟期では小さい方の ｍＲＮＡ が優勢であった。

quaking マウスでは，ＣＮＰ活性の減少（Kurihara et al., 1970）に対応して，ＣＮＰ mＲＮＡ の発現量が減少していた（図１）。しかし発育過程における変化は正常マウスと同じで，ＣＮＰ mＲＮＡ はミエリン形成期にピークに達した。また，２種の mＲＮＡ が幼若期には量的にほぼ等しく，成熟期では小さい方の mＲＮＡ が優勢になる点も正常マウスと同様であった。正常マウスとちがう点は，いずれの時期を見てもmＲＮＡの発現量が低下していることであった。

ラットに見られる２種の mＲＮＡ は翻訳開始点付近の alternative splicing によって生ずると推定されているが（Bernier et al., 1987），ｃＤＮＡ は現在までのところ１種類しか得られていない。最近我々は翻訳領域の全長を含むマウスＣＮＰ ｃＤＮＡ を分離することができた。現在我々はそのヌクレオチド配列を解析するとともに，２種の ｃＤＮＡ が分離できるかどうか検索中である。

＜文献＞

Bernier, L., Alvarez, F., Norgard, E.M., Raible, D.W., Mentaberry, A., Schembri, J.G., Sabatini, D.D., and Colman, D.R. (1987) J.Neurosci. 7, 2703-2710

Fujita, N., Sato, S., Kurihara, T., Inuzuka, T., Takahashi, Y., and Miyatake, T. (1988) FEBS Lett. 232, 323-327

Kurihara, T., Nussbaum, J.L., and Mandel, P. (1970) J.Neurochem. 17, 993-997

Kurihara, T., Fowler, A.V., and Takahashi, Y. (1987) J.Biol.Chem. 262, 3256-3261

Kurihara, T., Takahashi, Y., Nishiyama, A., and Kumanishi, T. (1988) Biochem.Biophy.Res.Commun. 152, 837-842

Vogel, U.S., and Thompson, R.J. (1987) FEBS Lett. 218, 261-265

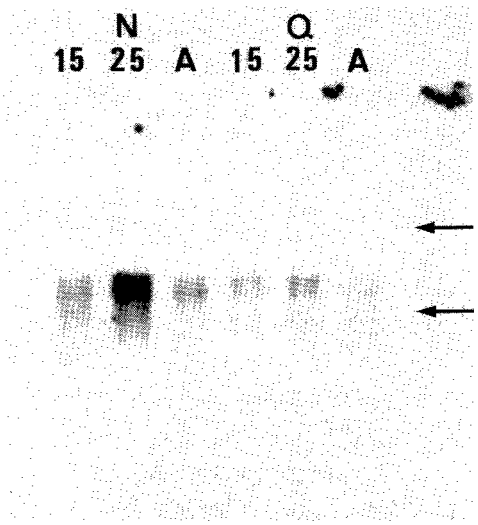


図１　正常（Ｎ）及び quaking （Ｑ）マウス脳 ポリ（A）$^{+}$ＲＮＡ
のノーザンハイブリッド形成
１５，生後１５日；　２５，生後２５日；　Ａ，Ａｄｕｌｔ．
矢印はそれぞれ 28S 及び 18S ｒＲＮＡ の位置を示す。

8　正常及び Quaking マウスにおける Myelin-associated glycoprotein (MAG) mRNA の発現

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

〔要約〕

正常及び Quaking マウスについて発育に伴う myelin-associated glycoprotein (MAG) の mRNA の発現の変化を検討した。ラットの MAG では、coding region の中に終止コドンを含む 45nt の exon が挿入されるか否かにより２種類の mRNA が存在するとされている。これら２種類の mRNA にそれぞれ特異的に反応する合成プローブとマウス MAG cDNA をプローブにして northern blotting と slot blotting による解析を行った。正常マウスでは、45nt の exon を含まない mRNA がミエリン形成期に最も多く発現し、45nt の exon を含む mRNA はそれより遅れて発現のピークを認めた。Quaking マウスでは、すべての発育段階を通じて 45nt の exon を含むものしか発現していなかった。これらのことより、幼若期に 45nt の exon が splice out される機構がミエリン形成に重要な役割を果していると思われた。

Myelin-associated glycoprotein (MAG) は、分子量約１０万のミエリンの糖蛋白で、神経軸索とミエリンの相互作用上重要である。ラットでは、発育に伴い分子量が減じることが知られており、この変化がミエリン形成の上で必要であると考えられている[1,2]。最近ラットの MAG cDNA の構造が明らかにされ[3,4]、coding region の中に45ntの終止コドンを含む exon の有無により２種類の mRNA が存在し、この差により２種類のポリペプチドが生じると考えられる。

Quaking マウスは、生後１２日ごろより始まる体幹の振戦を特徴とする常染色体劣性遺伝形式をとるミエリン形成不全マウスで、染色体17番にある遺伝子の変異である。今回我々は、マウス MAG cDNA と２種の mRNA に特異的な合成プローブを使い、正常及び Quaking マウスの各発育段階での mRNA の発現を検討した[5]。

＜方法＞

既に報告したマウス MAG cDNA[6] より切り出した約200nt の断片 (Fig.1-a,b) を、２種類の mRNA に共通なプローブとして用いた。45nt の exon と相補配列の合成プローブを Probe45 とし、45nt の外側の両方を合わせた25nt の合成プローブを Probe25 とした (Fig.1-c)。各発育段階の正常及び Quaking マウス脳より Chirgwin らの方法[7]で total RNA を調製し、oligo(dT)-cellulose クロマトグラフィーを使って Poly(A)$^+$RNA を調製し、上記の３種類のプローブを使ってnorthern blotting とslot blotting により mRNA の発現を検索した。

＜結果＞

各発育段階の正常マウス脳より total RNA を調製し slot blotting を行うと、Probe25 プローブでは幼若期（生後15日）に、Probe45 プローブではより成熟期（生後40日）に強い発現を認め、cDNAプローブでは、その両者を合わせた形の発現を認めた。

次にミエリン形成不全マウスである Quaking マウス脳から total RNA と polyA$^+$ RNA を調製し、正常マウスと MAG mRNA の発育に伴う発現のちがいを比較した。Quakingマウスでは発症時の生後15日目から、正常マウスに比較して過剰のmRNAの発現を認めた。しかし正常マウスで認められる Probe 25 プローブによるハイブリッド形成はほとんど認められず、Quaking マウスで幼若期から過剰に発現されている mRNA のほとんどは、成熟期型の mRNA であった (Fig.２)。

＜考按＞

最近ラットの MAG cDNA の構造が明らかにされ[3,4]、coding region の中に 45nt の終止コドンを含む exon の有無により２種類の mRNA が存在し、この差により２種類ポリペプチドが生じると考えられる。我々の得たマウス MAG cDNA クローンには、ラット MAG で報告されている終止コドンを含む 45nt が含まれており、マウスにおいてもラットと同様な機序により２種類の MAG のポリペプチドが生じると考えられた。各々の mRNA に特異

に反応するプローブを使うことにより、各々のmRNAの発現を検索することが可能であり、45bp の exon が挿入されないものがミエリン形成のもっとも盛んな頃に、挿入されたものはそれより遅れた時期に優位に発現されることを今回明らかにすることができた。

ミエリン形成不全マウスである Quaking マウスでは、以前より正常マウスより分子量の大きな MAG が存在するなどの異常が指摘されていた[8]。今回の我々の結果より幼若期に既に成熟期型の mRNA が過剰に発現し、幼若期型の mRNA が発現していないという異常があることが示された。このような発現の異常はほかのミエリン蛋白ではみられず、 MAG に特異な現象と思われるがその機序は不明である。最近 MAG 遺伝子は、 Quaking 遺伝子と異なり、マウス染色体７番にあることが報告された[9]。幼若期に MAG 遺伝子の 45bp の exon が splice out される機構がミエリンの形成に重要な役割を果たしていると思われる。

1) Quarles,R.H.(1984) Dev.Neurosci. 6, 285-303

2) Frail,D. and Braun,P. (1984) J.Biol.Chem. 259, 14857-14862

3) Salzer,J.L., Holmes,W.P. and Colman,D.R. (1987) J.Cell Biol. 104,957-965

4) Lai,C., Brow,A.B., Nave,K.A, Noronha,A.B.,Quarles,R.H.,Bloom,F.E.,Milner,R.J. and Sutcliffe,J.G. (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,4337-4341

5) Fujita,N., Sato,S., Kurihara,T., Inuzuka,T., Takahashi,Y.and Miyatake,T. (1988) FEBS Letters 232, 323-327

6) 藤田信也、佐藤修三、栗原正、犬塚貴、高橋康夫、宮武正 (1987) 神経化学 26,61-63

7) Chirgwin,J.M.,Przybyla,A.E., McDonald,R.J. and Rutter,W.J. (1979) Biochemistry 18,5294-5299

8) Matthieu,J.M., Brady,R.O. and Quarles,R.H.(1974) J.Neurochem.22,291-296

9) D'Eustachio,P., Colman,D.R. and Salzer,J.L. (1988) J.Neurochem.50,589-593

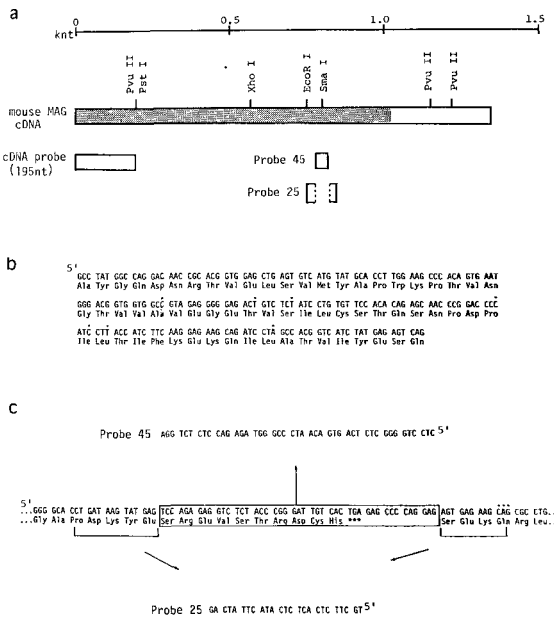


Fig.1 Mouse MAG cDNA and probes. a: Restriction map of mouse MAG cDNA. b: Sequence of 195nt cDNA. c: Sequence of 45nt exon and adjacent portions.

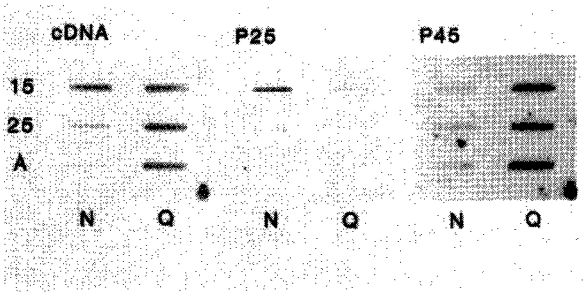


Fig.2 Slot blot analysis of MAG mRNA in the quaking mouse. Total RNA (15ug each) from brains of 15,25 days old and adult(A) quaking mice was blotted.
The filter was probed first with Probe 25, second with Probe 45 and finally with the cDNA probe.

9 ミエリン塩基性蛋白(ＭＢＰ)遺伝子の 2nd(upstream)プロモーターの存在について

北村 邦男・Newman S.[x]・Campagnoni C.[x]・Campagnoni A.T.[x]
(埼玉医大・医・第一生理、ＵＣＬＡ・医[x])

〔要約〕
生後18日のマウス(C57BL/6J) 脳 poly(A)$^+$mRNA より作製したファージλgt11 cDNA library から 50個のミエリン塩基性蛋白(MBP) cDNAs を得た。その内の１つ(M41)は14K MBP をコードするが、異常に長い 5'上流領域をもち、その配列の中に MBP 遺伝子のプロモーター配列が見出された。遺伝子ライブラリーより得た MBP プロモーター含有クローンの塩基配列を決定し、それと比較したところ、M41 の 5'末端部分(138 bp)は splicing によって更に別のエクソン(Exon 0 と命名)から由来するものであると考えられた。M41 の 5'上流領域特異的 (MBP 遺伝子のプロモーターは含まれる) プローブ(TRT)を用いて遺伝子ライブラリーから Exon 0 を含むクローンを得、塩基配列分析をしてこのことを確かめるとともに、MBP 遺伝子の 2nd プロモーターの存在を明らかにした。

中枢神経ミエリンに存在する塩基性たんぱく(Myelin Basic Protein;MBP)についてはミエリンの形成や脱髄疾患との関連から多くの研究がなされている。マウスでは、１つのMBP遺伝子より alternative splicingの結果４種のMBP(21.5K-, 18.5K-, 17K-, および14K-MBP)をコードするmRNAが作られることが知られている。しかしながら、幾つかの報告では、その他のMBP関連蛋白の存在が示唆されており[1,2]、また異常に大きなsizeのMBP関連 mRNAが認められる[2]等説明がつかない結果が得られている。これらの現象の解決の糸口を得る為、我々はMBP cDNA ライブラリーを詳細に検討し、昨年第５番目のMBP mRNAの存在を報告した[3]。今回、30万のマウス脳cDNA libraryから１つの異常なMBP cDNA クローンを得、その分析の結果、従来より知られているMBP 遺伝子のプロモーター[4]とは異なる第２のプロモーターの存在を明らかにしたので報告する。

[実験方法]

14K MBP をコードする cDNA(pp535)[5] をプローブとして、生後18日のマウス(C57BL/6J) 脳 poly(A)$^+$mRNA より作製したファージλgt11 cDNA library(プラーク数30万)より50個の陽性クローンを得た。その内 sizeが最も大きい(2.3kb)クローン(M41)についてM13をベクターとするdideoxy法で全塩基配列を決定した。マウスgenomic libraryは、BamHIで限定的に分解したものをλJ1に組込ませたものを使用した。genomic libraryスクリーニング用ならびにNorthern blot分析にはM41の Eco RI-Sma I fragment (5'領域 1～298; TRTと命名)を使用した。

[結果および考察]

MBP cDNAクローンのinsert sizeは通常 2.1kb 以下であったが、2.3kb size のinsertをもつクローンを１つ見出したので、このもの(M41)について全塩基配列(2274bp)を決定した(5'領域のみを図１に示す)。M41はexon 2およびexon 6部分を欠いた14K MBPをコードするクローンであったが、その5'領域249～350(351の"C"が転写開始点と報告されている[4])はTakahashiら[4]によって報告されているMBP遺伝子のプロモータ部分そのものであった。M41はその3'末端に$poly(A)_{14}$をもっていたが、クローニング操作中の人工産物である可能性もあったので、遺伝子ライブラリーよりMBPプロモーターを含有するクローン(cc201)を得、そのHind III-Eco RI fragment(2.6kb)の塩基配列を決定した(図１にプロモーター部分の配列を示す)。M41の5'領域の138以下の配列は完全に遺伝子構造と一致したが、1～137 部分は全く異なっていた。137～140(AGGG)はsplicing acceptor siteであると考えられたので、更に上流にあると考えられるエクソンを調べる為に、M41のEco RI-Sma I fragment(1～298; TRT)をプローブとして遺伝子ライブラリーをスクリーニングし、陽性クローン(cc257)を得た。cc257の Hind III-Hind III fragment(4.4kb)のrestriction mapに基づきTRT 陽性のPvu II-Pvu II(1.1kb) 部分の全塩基配列を決定した。その結果、予想されたように M41の1～138 部分の配列が見出された (図２)。従って、M41 は人工産物ではないことは明白であり、M41typeの14K MBP mRNAの発現のプロモーター、即ち MBP遺伝子の 2nd プロモーターはこの Pvu II-Pvu II 部分(Exon 0 と命名) にあると考えられた。

現在までのところ、M41 typeのmRNAが MBP mRNA の約１％と少ない為、Primer extension法、S1 nuclease mapping法で転写開始点の同定に成功していないが、図２に示したように M41の5'末端より 50 base上流に TATA Box 様配列が認められ、また 110(逆配列)ならびに141 base上流にCCAAT様の CCACTT配列が存在する。このCCACTT配列は Takahashiら[4]により MBP 遺伝子プロモーター (1st プロモーターと呼ぶ)のCCAAT様配列として報告されており興味深い。また、Exon 0 の 5'領域には GC rich なT-TGGGC-C-T 配列が重複して存在する。この様に、Exon 0領域はプロモーターとしての性質を備ていた。従って、少なくとも14K MBP mRNAの転写は、従来より知られている 1st (downstream) プロモーターに由来する遺伝子発現と2nd(upstream)プロモーターに由来する遺伝子発現により行なわれることが明らかとなった(図３)。１つの遺伝子に２つのプロモーターが存在する場合、Upstreamプロモーターがdownstreamプロモーターに対し抑制的に、あるいは促進的に作用し遺伝子発現の調節に関与することが報告されているので、今回報告した2nd (upstream)プロモーターがMBP遺伝子発現においても重要な働きを担っていることが予想される。Okanoらは、myelin deficient mutant mouse(mld)には正常なMBP遺伝子の上流に異常なMBP遺伝子が存在することを見出し、これらのmld MBP遺伝子のプロモーター部分の塩基配列および in vitroのプロモーター活性は正常なmouseのものと差異がないにもかかわらず、mld mouseにおけるMBP遺伝子発現が抑制されていることを報告している[8]。その理由としてtranscriptional interferenceを予想しているが、もし Exon 0の存在が MBP 遺伝子の発現に不可欠であるならば、mld mouse の MBP遺伝子が発現されないことの原因であることも考えられよう。MBP遺伝子の発現機構を考える上で 2nd プロモーターの存在は新たな視点を与えると思われる。

最後に、今研究を遂行するにあたり御援助ならびに有益な御助言を与えて下さいました植村慶一教授に感謝致します。
また、常に適切な助言を与えてくれたDr. H.J.Roth (現在 NIH)に感謝いたします。



図１．M41 cDNA clone (上段)およびgenomic clone(cc201)より得たHind III-Eco RI fragment (下段)の部分塩基配列。＊で示した塩基および小さい[ ]で囲った部分はTakahashiら[4]によって報告された転写開始点およびMBP遺伝子プロモーターのTATA Box, CCAATT様配列。これらの配列がM41 cDNA clone中に存在することに注意。5'上流領域ではM41の138より上流でHomologyが無くなる(Homologyが無くなる部分の一方を小文字で記した)。M41の296～301のSma I siteを切断することにより1～298のTRT プローブが得られる。各配列の上下の線により本文中に記載された部分を示した。

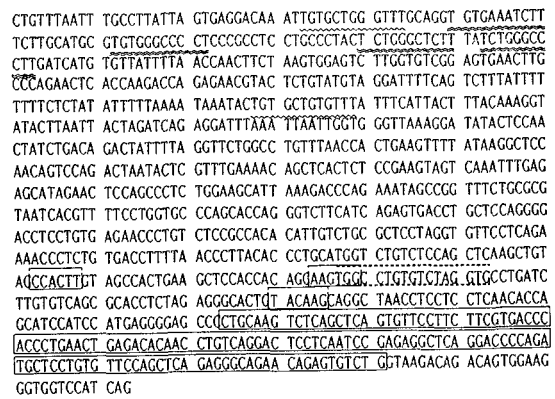


図２．Exon 0 部分の構造； Genomic clone, cc257より得たPvu II-Pvu II (1.1kb) fragmentの全塩基配列。864～1001までの[ ]で囲った部分は図１のM41の[ ]で囲った1～138部分と一致する。小さい[ ]はTATA Box およびCCAATT様配列。～～～, ……, ～～～で示した部分は相互に似た配列を持つ。

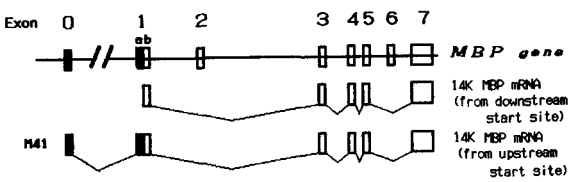


図３.MBP遺伝子構造と14K MBP mRNAのスプライシング

[文献]
1)Carson,J.H. et al.(1983) Dev.Biol.,96,485-492
2)Zeller,N.K. et al.(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.,81,18-22
3)Newman,S. et al.(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.,84,886-890
4)Takahashi,N. et al.(1985)Cell,42,139-148
5)Roth,H.J. et al.(1985)J. Neurochem.,45,5732-580
6)Biswas,T.K. and Getz,G.S.(1988)J.Biol.Chem.,263,4844-4851
7)Moss,T.(1983)Nature,302,223-228
8)Okano,H. et al.(1988)EMBO J.,77-83

10 mldマウスにおけるanti-MBP RNAの検出

岡野栄之，池中一裕，　御子柴克彦

（大阪大学・蛋白質研究所）

〔要約〕

myelin deficient (mld) は、常染色体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) 遺伝子の発現障害によると考えられる中枢神経系のミエリン形成不全を特徴とする。mldマウスのMBP遺伝子は、同一染色体上で全領域にわたり重複変異をおこしており上流に位置する遺伝子内で、exon 3 から exon 7 までのDNA領域の逆位を伴う再編成が生じていると考えられている。本研究では、逆転したDNA領域に相当する exon 3, 7 に相補的なアンチセンスRNAが生成されていることを、RNase protection 法により明かにした。また、この上流遺伝子からの異常な転写産物の伸長は、下流の遺伝子の転写開始部位に達していることが示された。この異常な転写産物の検出は、mld における MBP 遺伝子の抑制機構を考える上で重要であると考えられた。

ミエリン塩基性蛋白質 (Myelin Basic Protein; MBP) は、中枢神経ミエリンの主要構成蛋白質の一つであり、オリゴデンドロサイトで、特異的に発現している。中枢神経系のミエリン形成不全を伴う多くのミュータントマウスの系統が分離されており、この内、shiverer と myelin deficient (mld)という２つのたがいに allelic な ミュータントマウスは、MBP 遺伝子の発現異常を特徴としている。mld の MBP 遺伝子の構造と発現調節機構は、遺伝子の3' 側の大きな欠失を伴うshiverer(8)とは大きく異なり、MBP 遺伝子は重複変異を起こしており、部分的な MBP の発現が認められている(4,5,6)。また、mld における MBP の発現障害は、mRNA の量により規定されていると考えられている(4)。我々の以前の解析結果より、mld における MBP mRNA の減少は、MBP 遺伝子のプロモーター領域の欠陥によらず、MBP 遺伝子座の複雑な構造と関係があることが示唆されている(5)。我々の以前の結果(5)と他のグループの報告(1,6)により、mld の MBP 遺伝子には、再編成を伴うもの (gene-1) と、intact なもの (gene-2)が１コピーずつあり、gene-1内では、exon3 から 7 までをふくむ領域が逆転しており、その下流に gene-2が存在していることが考えられている(図-1 参照)。極めて最近、Popko らも、コスミドを用いたgene walking により、この遺伝子構造を報告している(7)。この遺伝子構造より、MBP 遺伝子のアンチセンス RNA が生成することと、上流 (gene-1) からの転写産物が終結せずに、下流のgene-2の転写開始部位に到達していることが予想された。本研究では、これらの異常な転写産物の検出を試みた。

［実験方法］　１つのエキソン (exon 1, 3, または 7) を含む DNA 領域を pSP64 または、pGEM4 プラスミドに挿入した (図-1)。これらを、鋳型として、[^{32}P] UTP (800Ci/mmol, Amersham) 存在下において、sense または、anti-sense RNAプローブを SP6 または、T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成した(probe-1,2,3; 図-1参照)。5 x 10^6 cpm の RNA プローブをmldと対照の脳由来の全 RNA を、ハイブリダイズさせ、Melton らの方法(2)に従って、RNase protection 実験を行った。

［結果及び考察］ 遺伝子構造から考えられる異常な RNA 分子は、非常に長い分子であることが予想されたが、Northern blot 解析において、nick translation 法による２本鎖 DNA プローブ (4)や、１本鎖 RNAプローブ (probe-2; 未発表データー)のいずれを用いても、明瞭なバンドを検出することができなかった。これは、この異常な RNA が、エキソンの方向が逆であるためなどにより、非常に不安定であるためと考えられた。次に、検出感度をあげるために、RNase protection 解析を試みた。exon 7 に相補的な RNA を検出すると考えられる probe-1、exon 3 に相補的な RNA を検出する と考えられるprobe-2 を用いて解析を行ったところ、mld マウスの脳の RNA をもちいた実験においてのみ (図 - 2a, b)、予想される相補的 RNA を検出することができた。また、図－１に示すprobe-3 をもちいて、上流 (gene-1) からの転写産物が、下流の遺伝子 (gene-2) の転写開始部位に到達しているかどうかの検討を行った(図-2c)。図-2c においては、多くの protect されるバンドが、検出された。 これらを簡単にまとめると、図-3のようになる。即ち、矢印 (▽) は、exon 1 の 5' 端より開始するRNA (推定 218 bases)、矢印 (▼) は exon 1a (3)の5' 端より開始する RNA 分子 (推定430 bases)、矢印 (▽) は、上流 (gene-1) から gene-2 に到達する転写産物 (推定 610 bases)によって protect された RNA のバンド、そして、矢印 (▲) は、protectされていない full-length の RNA プローブのバンド(628 bases) を示すと考えられた。各実験(図- 2a,b,c)ともにRNaseの消化を行っていないprobe を、1 x 10^4 cpm相当量を、apply しており、これらのバンドの相対的強度より考えて、

gene-1から、gene-2 の転写開始部位に到達している転写産物の定常量は、exon 3, 7に相補的な転写産物の定常量に比較して、約1/10 程度に減少していることが明かとなった。このことは、gene-1 からの転写の伸長が大部分、gene-2の exon 1に到達する以前に終結しているか、或は、gene-1 からの転写産物が、分子内に相補的な部分を持つために、stem and loopのような高次構造を形成していることなどによると思われる。内在性のアンチセンス RNA が検出されたのは、3' 側の overlapping gene の例(9, 10)を除けば、本研究が真核細胞において最初の例である。mld における MBP 遺伝子の発現抑制機構として、上流からの異常な転写産物が、下流のintact な遺伝子の転写開始を抑制するという転写干渉 (transcriptional interference)によるものか、アンチセンス RNA によるものか、或は、両者の相加・相乗作用によるものかを今後さらに検討する余地があると考えられた。

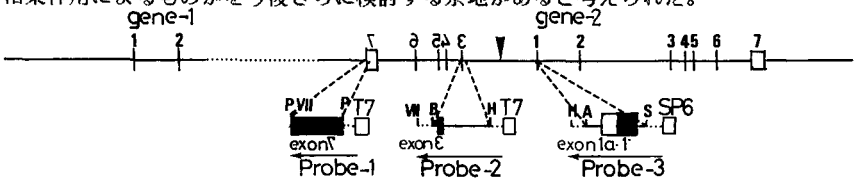
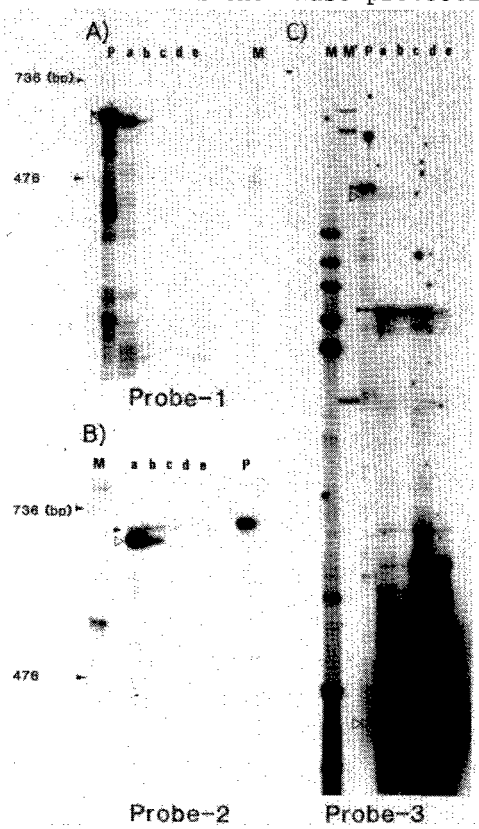


Fig.-1 Genomic organization of the mld MBP genes and localization of probes used in the RNase protection studies.



◀ Fig.- 2 RNase mapping of MBP transcripts in mld and control mice. Total RNA was isolated from the 18-day-old control brain (c, 20 µg; d, 5 µg; e, no RNA) or from the 32-day-old mld brain (a, 20 µg; b, 5 µg), hybridized to exon specific sense (probe 1,2) RNA probes and digested with RNase A and T1. The length of RNase-resistant RNA-RNA hybrids was analyzed by electrophoresis on urea PAGE. The molecular weights of bands are indicated in the left side of the Fig.-3A,B. In panel c), 5'-end labelled pBR322/ HaeIII (lane M; bands with lengths of 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234 and 213 bp are observed) and pBR322/ Bst NI (lane M'; bands with lengths of 1060, 929 and 383 bp are observed) are used as molecular weight markers.

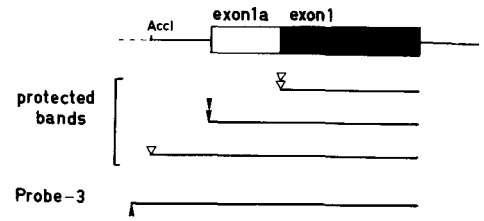


Fig.-3 The schematization of the origins of RNA molecules protected with probe-3. They are indicated with identical arrowheads with those used in Fig.-3c.

【文献】
1. Akowitz, A.A. et al. (1987) Genetics 116, 447-464
2. Melton, D.A. et al. (1984) Nucl. Acid. Res. 12, 7035-7056
3. Newman, S. et al. (1988) Trans. Am. Soc. Neurochem. 19, 134
4. Okano, H. et al. (1987) J. Neurochem. 48, 470-476
5. Okano, H. et al. (1988) EMBO J. 7, 77-83
6. Popko, B. et al. (1987) Cell 48, 713-721
7. Popko, B. et al. (1988) Neuron 1, 221-225
8. Roach, A. et al. (1987) Cell 42, 799-806
9. Spencer, C.A. et al. (1986) Nature 332, 279-281
10. Williams, T. & Friede, M. (1986) Nature 332, 275-278

11 shiverer 及び jimpy マウスにおけるミエリン特異蛋白質遺伝子発現の in situ hybridization による組織学的解析

塩田千代*、御子柴克彦
（大阪大・蛋白研）

〔要約〕

ミエリン形成不全を呈する shiverer 突然変異マウス及び jimpy 突然変異マウスの脳におけるミエリン特異蛋白質遺伝子の発現を in situ hybridization 法により組織学的に解析した。ミエリン塩基性蛋白質（myelin basic protein:MBP）遺伝子の一部を欠失する shiverer では、proteolipid protein（PLP）mRNA の発現パターンは、生後30日目までは正常マウスのそれと一致した。正常マウスではミエリン形成完了後に PLP mRNA 量が減少するのに対し、shiverer では生後 90日目に至るまで、PLP mRNA 量の減少は認められなかった。PLP mRNA のスプライシングに障害のある jimpy では、脳各部位における PLP 及び MBP mRNA の発現の開始時期は shiverer 同様正常マウスのそれと一致するが、細胞当りの両 mRNA 量の減少及び両 mRNA を発現する細胞数の減少が認められた。

proteolipid protein（PLP）とミエリン塩基性蛋白質（myelin basic protein:MBP）はともに中枢神経系のミエリンの主要構成成分で、これら蛋白質の欠失あるいは変性は shiverer 突然変異マウスや jimpy 突然変異マウスなどに見られるように重篤なミエリン形成不全を引き起こす。我々はこれまでに、正常マウスにおけるこれら両蛋白質の遺伝子発現を in situ hybridization 法で組織学的に解析し、昨年の本学会で報告した。今回はさらに shiverer 及び jimpy についても同様の解析を行い、二、三の知見を得たので報告する。

〔材料及び方法〕

動物： 実験には生後 6、9、12、18、30、90日齢の shiverer と 6、9、12、18日齢の jimpy を使用し、対照には ICR 系マウスを用いた。

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、常法にてパラフィン包埋したのち、矢状面の切片を作成した。

プローブの作成： ラット PLP cDNA（p27: Sutcliffe 博士より譲渡[3]）の 867 base の PstI 断片及びマウス MBP cDNA（pMBP2[2]）の 590 base の PstI-PstI 断片を deoxycytidine 5'-［[^{35}S] thio］triphosphate を用いランダムプライマー法にて標識した。

in situ hybridization： in situ hybridization は Hafen ら[1]の方法に従って行った。

〔結果及び考察〕

shiverer 突然変異マウスにおける PLP mRNA の発現： 正常マウスでは、PLP 及び MBP mRNA は生後 3日目にまず延髄、小脳脚に発現し、その後脳の前方へと順次分布域が拡大するとともに、18～30日目まで各部位における両 mRNA 密度の増大が認められる[6]。PLP cDNA プローブよる in situ hybridization によって、shiverer における PLP mRNA の発現パターンは生後 30日目まで正常マウスのそれにほぼ一致することが明らかになった（図1）。しかし、正常マウスではミエリン形成完了後（生後 2 ヶ月目以降）PLP mRNA 量は著しく減少するのに対し、shiverer では生後 90日目になっても生後 30日目の RNA 量が保持されていた（図1e）。shiverer では MBP 遺伝子の第 3～7 エキソンを含む大部分が欠失しており、Western blot、免疫組織化学的検索いずれにおいても MBP は検出されない[4]。PLP の減少も認められているが、これは同蛋白質の合成の低下によるのかあるいは分解の促進によるのかは不明である。いずれにせよ、正常マウスではミエリン形成の完了によって作動する PLP mRNA 量の調節機構が、ミエリン形成不全の shiverer では働いていないと考えられる。我々はこれまでに MBP 第 1 エキソン特異的プローブを用いた Northern blot 解析によって shiverer において heterogeneous なサイズの MBP mRNA の発現を認めている[4]が、今回は第 1・2 エキソンを含まない cDNA 断片をプローブとして用いたので、shiverer における MBP mRNA の発現については解析できなかった。

jimpy 突然変異マウスにおける PLP 及び MBP mRNA の発現： shiverer 同様、jimpy においても PLP 及び MBP

mRNA の脳各部位における発現開始時期は正常マウスのそれと一致していた。しかし、PLP、MBP いずれの mRNA 量も正常マウスに比べて少なく、発育過程に伴う mRNA 量の増加もわずかしか認められなかった（図2）。jimpy では、スプライシング障害のために PLP mRNA の第 5 エキソンがスプライスアウトされ、第 5 エキソンに対応するアミノ酸配列を欠失した正常とは異なる PLP が合成されている[5]。この異常な PLP がどのように関与しているかは不明であるが、jimpy ではミエリン形成を開始したオリゴデンドロサイトがやがて変性脱落することが報告されている[7]。jimpy において PLP 及び MBP mRNA 量の増加が認められなかったのは、オリゴデンドロサイトの脱落によるものと考えられる。さらに、詳細な観察の結果、jimpy における PLP 及び MBP mRNA 量の低下は、オリゴデンドロサイト数の減少と同時に各オリゴデンドロサイトにおける発現量の低にもよることが明かとなった。また正常マウスの成熟したオリゴデンドロサイトでは MBP mRNA は細胞突起に存在するが、jimpy では生後 18日目になって MBP mRNA は細胞体に局在することが明らかになったが、これは 変性に伴い新たに分裂した幼若オリゴデンドロサイトが jimpy 脳では大部分を占めていることを意味するものと考えられた。

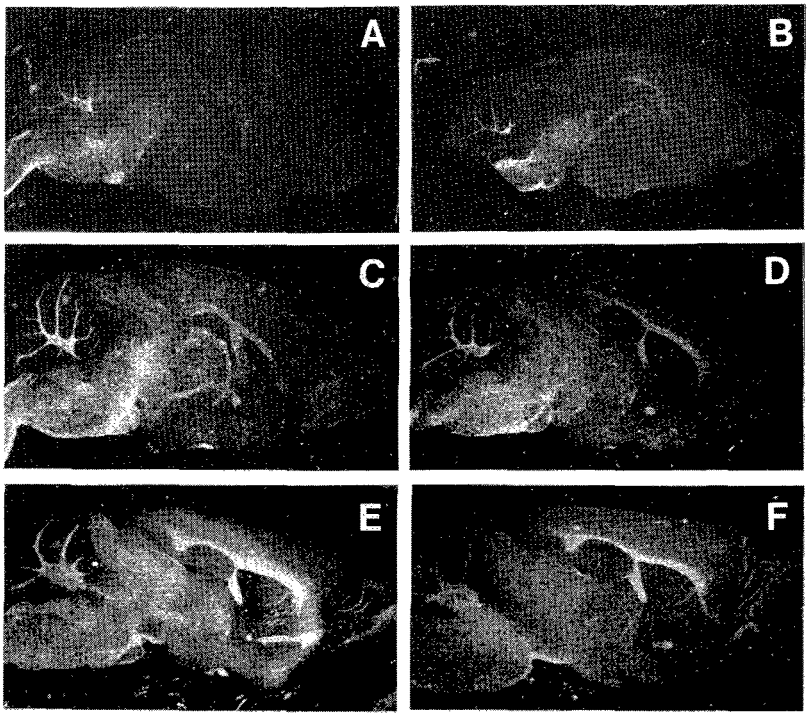


図1． shiverer （A,C,E）及び ICR （B,D,F）マウスにおける PLP mRNA の発現。
A,B: 9日齢。 C,D: 18日齢。 E,F: 90日齢。

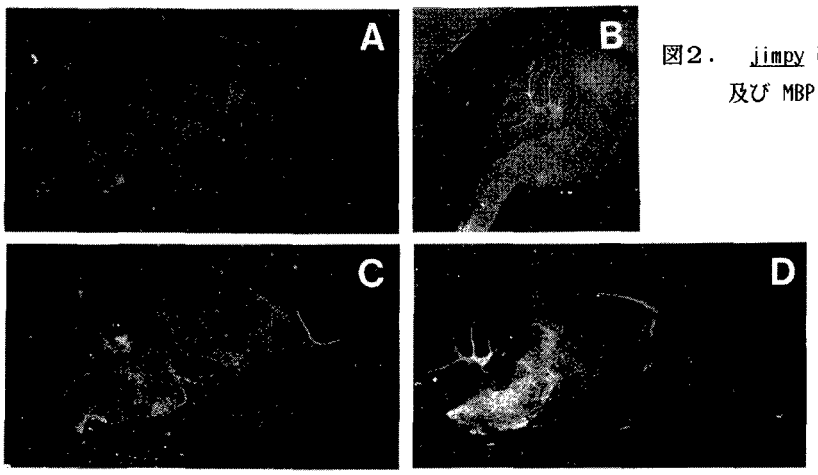


図2． jimpy における PLP mRNA（A,B）及び MBP mRNA（C）発現。
A: 9日齢。
B: 18日齢。
C: 9日齢。
D: 9日齢 ICR における MBP mRNA の発現。

【文献】(1) Hafen, E. et al.(1983) EMBO J. 2,617.
(2) Kimura, M. et al.(1985) J.Neurochem. 44,692.
(3) Milner,R.J. et al.(1985) Cell 42,931.
(4) Miura, M. et al.(1986) 神経化学 2,574.
(5) Moriguchi, A. et al.(1987) Gene 55,333.
(6) Shiota, C. et al.(1987) 神経化学 26,259.
(7) Skoff, P. et al.(1982) Brain Res. 248,19.

12　マウス小脳のＰｕｒｋｉｎｊｅ細胞に特異的な蛋白質Ｐ400のｃＤＮＡクローニング

古市貞一*、前田信明**、吉川真悟*、**、和田健太郎**、新延道夫**、御子柴克彦*、**
（基礎生物学研究所・行動制御*、大阪大学・蛋白質研究所・機能制御**）

[要約]

P_{400} は、小脳に特異的に存在する分子量２５０Kdの蛋白質である。我々は、最近作製したP_{400} に対するモノクローナル抗体を用い、P_{400}cDNAのクローニングを行なった。２～３週令のマウス小脳より調整したpoly(A)$^+$ RNA 、または23S以上の高分子poly(A)$^+$RNAよりcDNAを作製し、発現ベクターλgt11に連結して、cDNA library とした。このlibraryを、３種類のP_{400}モノクローナル抗体でscreeningして、P_{400}cDNAを得た。Northern blot hybridization実験より、P_{400}のmRNAは約９.５kbであることがわかつた。cDNAの塩基配列を調べた結果、３’末端のpolyadenylation siteの違う２種類のP_{400}mRNAの存在が確認された。また、小脳の組織切片を用いたin situ hybridization実験から、P_{400}mRNAは分子層のPurkinje細胞でのみ転写されることが明かとなった。

[はじめに]

P_{400}蛋白質は、小脳のPurkinje細胞に特異的に局在する（１）。P_{400}は、糖の付加とリン酸化を受け、その分子量は２５０kdである（１、２）。staggerer変異マウスでは、この蛋白質の欠損が知られており（１）、その機能に興味が持たれる。今回、我々はP_{400}に対するモノクローナル抗体（３）をもちいて、P_{400}cDNAのクローニングとその解析を行なったので報告する。

[実験材料と方法]

１）　λgt11cDNA libraryの作製　　２～３週令のマウス（ICR）の小脳からRNAを抽出し、poly(A)$^+$RNA として、基本的にGublerとHoffmanの方法（４）でcDNAを作製した。cDNAは、Huynhらの方法（５）で　λgt11に連結し、libraryとした。oligo d(T)をprimerとしてpoly(A)$^+$RNAからcDNAを作製したもの（λCbl）と、ショ糖密度勾配遠心で２３S以上のpoly(A)$^+$RNA をrandom hexamerをprimerとしてcDNAを作製したもの（λ23S）の２種類を用いた。

２）　screeningとクローニング　　P_{400}モノクローナル抗体10A6、18A10、4C11（３）を用い、Huyhnら（５）の変法によってimmunoscreeningを行なった。陽性クローンは、Maniatisらの方法（６）によって以後の全長cDNAのクローニングなどに用いた。

３）　その他の方法　　DNA sequencingは、pUC118と119を用いたdideoxy chain termination法で行なった。Western blot及びNorthern blot解析は、常法に従った。

[結果と考察]

３種類の抗体（mAb18A10、4C11、10A6）を用い、λ23S libraryをimmunoscreeningして、多数の陽性クローンを得た。そのうち９種のクローンからβ-gal fusion proteinを調整し、抗体との反応を再度検定した。fusion proteinをSDS-PAGEで分画後（図１・Ａ）、Western blot解析をしたのが図１・Ｂで、強く反応するクローンを以後の実験に使用した（mAb18A10はクローン23-2.-9、4C11は23-5.-15、10A6は23-12）。これらのクローンのcDNA部分をprobeにしてNorthern blot解析をしたところ、23-2、-5、-12S、及び-15いずれも約９.５kbのRNAとhybridizeすることから、これらのクローンは同じmRNAからreverse transcribeされたものと考えられた。従って、P_{400}のmRNAは約９.５kbとかなり長いものと示唆された。これらのクローンからcDNAをpUC118と119にsubcloningしsequencingすると共に、cDNAをprobeとして、λ23SとλCbl libraryを再度screeningして、ほぼ全長のcDNAを単離し、同様にsequencingした。図３は、得られたcDNAの制限酵素切断地図で、ほぼ全長に近いものと考えられる。cDNAは、３’末端のpolyadenylation siteが異なることによる２種類のサイズのものが得られた。また、３種の抗体のepitopeとなるアミノ酸配列は、図３の点で示す領域に存在することがわかった。ところで、P_{400}蛋白質は、小脳のPurkinje細胞に局在することが免疫組織学的に確認されている（３）。そこで、P_{400}遺伝子がPurkinje細胞でのみ発現する事が、その局在性と一致するのか調

べてみた。図4は、クローン23-2のcDNAをprobeにしてマウス小脳の組織切片中のmRNAとin situ hybridization実験を行なったものである。強い陽性反応が分子層のPurkinje細胞にのみ検出された。これは、P_{400}遺伝子がPurkinje細胞で特異的に発現している事を示している。現在、得られたcDNAの塩基配列から推定されるP_{400}蛋白質のアミノ酸配列の解析等を行なうことにより、P_{400}の構造上の特徴を研究中である。

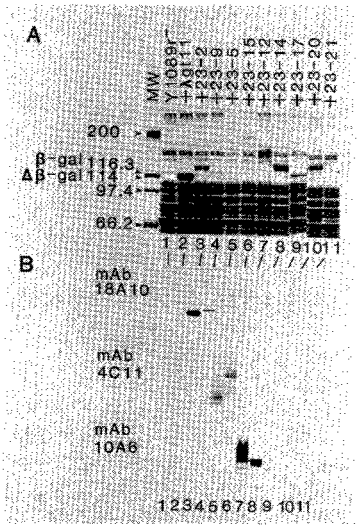


図1　λgt11クローンから得られるβ-gal fusion proteinの解析
（A）SDS-PAGE/CBB染色後のfusion proteinの泳動パターン。lane 1はE.coli Y1089r⁻のtotal protein、lane 2はλgt11溶原菌、lane 3-11はλ23S libraryより得られたphageクローンの溶原菌のtotal protein。
（B）モノクローナル抗体18A10、4C11、10A6 とfusion proteinとのWestern blot解析で、HRP-DAB法で検出した。

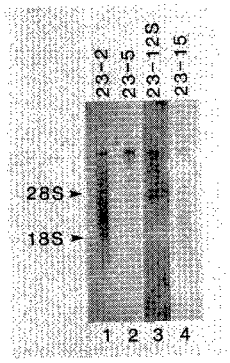


図2　Northern blot解析
マウス小脳のpoly(A)⁺RNAを電気泳動後、filterにblotし、クローン23-2、-5、-12S、-15のcDNAをprobeとしてhybridizationを行なった。



図3　P_{400} cDNAの制限酵素切断地図
地図の上に、モノクローナル抗体（4C11、10A6、18A10）と反応するアミノ酸配列を持つと考えられる領域を四角く点で示してある。poly(A)が付加される場所を矢印で示してある。

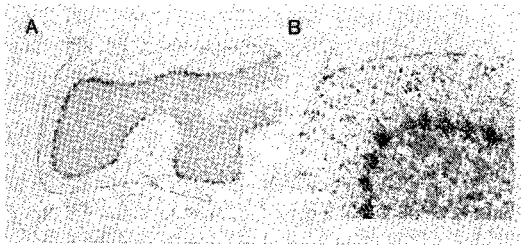


図4　In situ hybridizationによるP_{400} mRNAの検出
マウス小脳の組織切片と^{35}SでラベルしたcDNA（クローン23-2）を用いた。感光後、カウンター染色してあるため、分子層及び顆粒層の細胞が染色されてみえる。mRNAのシグナルはPurkinje細胞体にのみ観察される。
（B）は（A）の拡大図である。

[文献]

（1）Mikoshiba, K., Huchet, M., and Changeux, J.-P. (1979) Dev. Neurosci. 2, 254-275
（2）Mikoshiba, K., Okano, H., and Tsukada, Y. (1985) Dev. Neurosci. 7, 179-187
（3）前田信明、新延道夫、御子柴克彦. (1987) 神経化学 26, 427-429
（4）Gubler, U., and Hoffman, B.J. (1983) Gene 25, 263-269
（5）Huynh, T.V., Young, R.A., and Davis, R.W. (1985) in DNA Cloning Techniques: A Practical Approach (Glover, D., ed.) pp49-78, IRL Press, Oxford
（6）Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

13　アミン再吸収阻害薬のアミン代謝に及ぼす影響

高橋啓、多田幸司、石川紘一*

（日本大・医・精神神経、*薬理）

〔要約〕

Aromatic-L-amino acid decarboxylase 阻害薬 NSD1015 によって起こる DOPA の蓄積を DA 合成の指標とする in vivo の実験系を用いて、DA 再吸収阻害薬 nomifensine のDA合成に及ぼす影響を、ラット線条体、前頭前野、扁桃体の３領域について調べた。 Nomifensine (0.3, 1, 3mg/kg) は線条体、扁頭体において有意にDOPAの蓄積を阻害していた。しかし、前頭前野では nomifensine によるDOPAの有意な低下は観察されなかった。次に、zimelidine の 5-HT 合成に及ぼす影響を NSD1015 によって起こる5-HTPの蓄積を指標として調べた。Zimelidine (1,3mg/kg)は海馬、前頭前野、扁頭体、線条体の４領域で有意に5-HTPの蓄積を阻害していた。 NomifensineによるDA合成の低下は、synthesis modulating autoreceptorを介したものと推測された。

Zimelidineによる5-HT合成の低下に5-HTreceptorのどのsubtypeが関与しているのかは今回の実験からは明らかに出来なかった。

アミンの再吸収阻害作用を有する薬物はシナプス間隙の神経伝達物質の量を増加させ、その結果シナプス後部の受容体に対する神経伝達を増強することが知られている。また、それと同時に、シナプス間隙における神経伝達物質の増加は、シナプス前部の受容体にも影響を及ぼすと考えられている。すでにWolfら[6]はラットの線条体切片を用いたin vitroの実験系でDA再吸収阻害作用をもつ抗うつ薬 nomifensine がDAの合成を抑制すると報告し、これはDA自己受容体を介した作用であると述べている。一方、Bannonら[1]はDA作動性神経の中でも中脳皮質DA系は他のDA系と異なりDA自己受容体が欠如していると述べている。

そこで我々はAromatic-L-amino acid decarboxylase阻害薬 NSD1015 によって起こるDOPAの蓄積をDA合成の指標とするin vivoの実験系を用いてDA再吸収阻害薬 nomifensine のDA合成に及ぼす影響を、自己受容体の存在すると考えられている線条体，扁桃体，および自己受容体が欠如していると推測されている前頭前野の３つの脳領域について調べた。

また、NSD1015よって起こる5-HTPの蓄積は5-HT神経の活動性の生化学的指標となることがCarlssonら[2]によって確かめられている。

我々は、5-HTの選択的再吸収阻害薬 zimelidine の5-HTの合成に及ぼす影響についても同様の方法を用いて調べた。

＜方法＞

実験には体重約 250～300g の Wister 系雄性ラットを使用した。

実験に使用した nomifensine (Hoechst), zimelidine (Fujisawa) は使用直前に生理的食塩水に溶解した。

Aromatic- L-amino acid decarboxylase の阻害薬 NSD1015 を腹腔内投与し、その１０分後に nomifensine 、zimelidine 、imipramine (0.3, 1, 3mg/kg)を尾静脈より注入した。NSD1015 投与60分後、頭部にマイクロウェーブを照射(5kw, 1.3秒) して屠殺し、速やかに脳を取り出し、線条体、海馬、前頭前野、扁桃体に分割した。前頭前野としては松果体より10.5cm吻側で forceps minor に挟まれた部分を用いた。 線条体、海馬、扁桃体は Glowbinski and Iversen の方法に準じて脳を分割し、試料を得た。Amine 及びその代謝産物の測定はHPLCを用いたIshikawaら[3]の方法を用いて測定した。。

＜結果＞

図１左にNSD1015によるＤＡの減少率を各脳領域別に示した。前頭前野では他の脳領域に比べＤＡの含有量が著しく減少していた。 一方、NSD1015 は測定した４領域間でほぼ同様の割合で 5-HT を減少させていた（図１右）。NSD1015 によって起こるDOPAの蓄積にたいするnomifensineの作用を図２左に示した。 Nomifensine は線条体ではいずれの濃度でもDOPAの合成を有意に抑制していた。一方、前頭前野ではDOPAのは低下傾向を示しているものの、control 群との間に有意差は認められなかった（図２右）。また、 nomifensine は扁桃体においてもDOPAを有意に減少させていた。 Nomifensine はいずれの脳領域でも NSD1015との併用時DA、5-HT、5-HTPの濃度を変化させなかった。

NSD1015によって起こる 5-HTP の蓄積に対する zimelidine の作用を図３に示した。1, および3mg/kgのzimelidine はhyppocampus及びpre-frontal cortexの5-HTPの合成を有意に抑制していた。同様の事は striatum, amygdalaでも観察された。

Zimelidineはいずれの脳領域でもNSD1015との併用時DA、5-HT、DOPAの濃度を変化させなかった。

＜考察＞

今回の実験では NSD1015投与1時間後のDA減少率は前頭前野で最も高かったが、これはNSD1015によるDAの減少率を線条体と前頭前野で継時的に比較したBannonらの実験結果と一致している。 さらに彼らはr-GBLによってDA神経系の神経伝達を抑制するとDA放出が減少するため、線条体ではDOPAの合成が増加するが、前頭前野ではDOPAの増加

がみられないという事実を見いだし、前頭前野ではsynthesis modulating autorecepterが存在しないという考え方を提唱している[1]。 この実験でも nomifensine は線条体のDA合成を有意に抑制していたが、この減少は前頭前野では観察されなかった。これは Wolf ら[6]の in vitro の実験結果と一致する所見であり、Bannon ら[1]の仮説を間接的に支持する所見と言える。

中枢神経系における自己受容体の研究は、主として DA 系についてなされてきたが、近年、5-HT 系についても autoreceptor の存在を示唆する所見が集積されてきている。 これまでにラットの視床下部シナプス分画、大脳皮質切片、海馬シナプス分画などで、外部刺激による〔^{3}H〕5-HT の遊離を外因性の 5-HT が抑制することが確認されており、シナプス前膜には 5-HT_{1B} に属する release modulating autoreceptorが存在すると考えられている[4]。

今回の実験で 5-HT の選択的再吸収阻害薬である zimelidine が海馬、前頭前野、線条体で 5-HT の合成を抑制しているデータが得られた。このような zimelidine の 5-HT 合成抑制作用は、次のように説明できる： 細胞間隙に存在する5-HT の量が増加した結果、1）神経終末に存在する synthesis modurating autoreceptor が刺激された、2）recurrent inhibition に関与している somatodentritic autoreceptor が刺激され、5-HT 細胞の活動性が低下した、3）post-syneptic receptor が刺激され、それが他の神経系を介し 5-HT 細胞の活動性を低下させた。

今回の実験では上記の三つの説明のうちどの可能性が最も高いかを明らかにすることはできなかった。しかし、Neale ら[5]は5-HTP の蓄積を 5-HT 合成の指標とする実験系において、5-HT_{1A} agonist である 8-OH-DPAT の方が 5-HT_{1B} agonist である CGS12066B より、より強く 5-HT の合成を抑制することを見い出し、 5-HT の合成には 5-HT_{1A} receptor の方がより密接に関与していると述べている。

今後は zimelidine の 5-HT 合成抑制作用が 5-HT receptor のどの subtypeを介したものかについて研究を進めていく必要があろう。

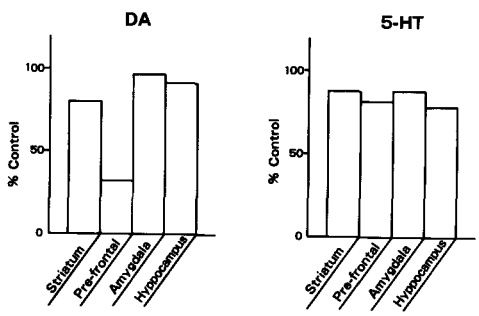


図１・NSD1025によるDA及び5-HTの減少率

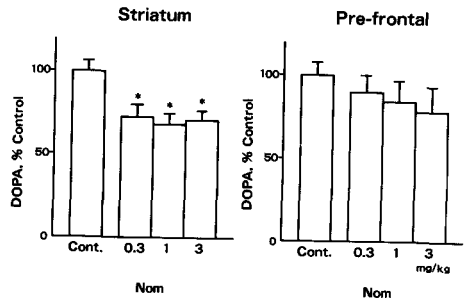


図２・NSD1015によるDOPAの蓄積に及ぼすnomifensine の影響 mean+SEM ＊ P < 0.05

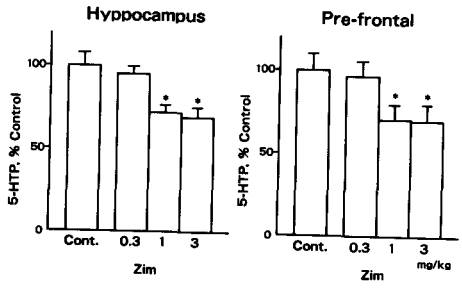


図３・NSD1015による5-HTPの蓄積に及ぼすzimelidine の影響 mean+SEM ＊ P < 0.05

＜文献＞

1. Bannon,M.J.et.al.(1980)Mol.Pharmacol.19, 270-275.
2. Carlsson,A.et.al.(1972)Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol.275,153-168.
3. Ishikawa,K.et.al.(1985)Anal.Biochem.147, 441-450.
4. Langer,S.Z.(1987)Psychopharmacology. The Third Generation of Progress, edited by H.Y. Meltzer,pp.151-157.Raven Press,NewYork.
5. Neale,R.F.et.al.(1987)Eur.J.Pharmacol.136, 1-9.
6. Wolf,W.A.et.al.(1985)Eur.J.Pharmacol.109, 381-387.

14 ダントロレンによるトリプトファン水酸化酵素の活性化機構

岡田尚志郎，筒井公子，生盛敏廉
（岡山大学医学部脳研・病態生化学）

〔要約〕
悪性症候群の治療に用いられているダントロレンがラット脳トリプトファン水酸化酵素の活性を上昇させることはすでに報告した（３）。ラットの脳幹より調製した酵素標品を用いて、酵素の速度論的解析を行ないダントロレンの影響を検討した。ダントロレンは、トリプトファン水酸化酵素の補酵素（６ＭＰＨ$_4$）に対する親和性を増大させるが、基質に対する親和性は変化させなかった。ジメチルプテリンをリガンドとしたアフィニティカラムによって部分精製されたトリプトファン水酸化酵素は、ダントロレンを添加しても活性の上昇を示さなかった。以上の結果から、ダントロレンは、トリプトファン水酸化酵素の補酵素結合部位に作用していることが示唆された。

Dantrolene sodium;1-{[5-(p-nitrophenyl)furfurylidene] amino} hydantoin sodium hydrate（以下 ダントロレン）は、従来末梢の筋弛緩剤として使用されてきたが、向精神薬投与中に生じる重篤な副作用である悪性症候群に対しても応用され、その有効性が広く認められつつある。昨年の本大会で、我々は、ラット脳のセロトニン生合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素活性に及ぼすダントロレンの影響を検討し、ラット腹腔内に投与されたダントロレンが脳内へ移行し、本酵素の活性を対照群に対して、約１．３倍に増加させること、および未処置のラット脳から調整したトリプトファン水酸化酵素標品を含む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ところ、５－２５μMのダントロレン存在下で酵素活性は上昇し、６μM存在下で最大の活性を示すことを報告した。我々は、この酵素活性の上昇機構をさらに詳細に検討する目的で、ラットの脳幹より調整した酵素標品を用いて、ダントロレン存在下のトリプトファン水酸化酵素活性を、補酵素（ DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterine: 以下 ６ＭＰＨ$_4$）あるいは基質（L-トリプトファン: 以下 Ｌ－Ｔｒｐ）の濃度を変えて調べたので報告する。

〈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、脳幹を切り出して実験に用いた。コントロール群には、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

オスＳＤラットの脳幹に、４倍容の ５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－塩酸緩衝液 （ｐＨ７．６、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、３９，０００ｘｇ、４０分間遠心し、上清を得た。

３）トリプトファン水酸化酵素活性の測定

Ｆｒｉｅｄｍａｎらの方法を用いて、反応生成物の５ハイドロキシトリプトファンを測定した。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℃、２０分間インキュベートし、６０％の過塩素酸を加えて反応を停止させた。コントロールには、基質としてＬ－Ｔｒｐの代わりに、Ｄ－Ｔｒｐを用いた。活性は、pmole / min / mg protein で表した。

〈結果〉

ラット脳の脳幹より調製した酵素標品を用いて、方法の項で示した条件でトリプトファン水酸化酵素の活性を、種々の濃度の補酵素（６ＭＰＨ$_4$）あるいは基質（Ｌ－Ｔｒｐ）の存在下で測定し、Ｋｍ値およびＶｍａｘ値を、Ｌｉｎｅｗｅａｖｅｒ－Ｂｕｒｋの逆数プロットから求めた（表１）。 コントロール群のラットのトリプトファン水酸化酵素標品を用い、４００μMの基質（Ｌ－Ｔｒｐ）の存在下で、補酵素の６ＭＰＨ$_4$の濃度を変化させて酵素活性を測定したところ、補酵素に対するＫｍ値は、１８３．５±６．５μMであった。これに対して、ダントロレン２０ｍｇ／ｋｇをラット腹腔内に投与した後、脳幹から調製したトリプトファン水酸化酵素標品の補酵素に対するＫｍ値は、１２２．０±１１μMで、コントロール群に比べて６７％に低下していた。 しかし、Ｖｍａｘ値には変化がみられなかった。 次に、２００μMの補酵素（６ＭＰＨ$_4$）の存在下で、基質Ｌ－Ｔｒｐの濃度を変えて反応を行ったところ、基質に対するＫｍ値はダントロレン投与群でも非投与群でも差は認められなかった。ただし、Ｖｍａｘ値は、ダントロレン投与群から得られた酵素標品では上昇しており、コントロール群の１．２倍であった。

未処理のラット脳から得られたトリプトファン水酸化酵素標品を用いて、ダントロレン存在下（６μＭ）と非存在下でそれぞれ補酵素あるいは基質に対するＫｍ値、Ｖｍａｘ値を求めた（表１）。４００μMのＬ－Ｔｒｐ

存在下で、補酵素（$6MPH_4$）を変化させた場合、Ｋｍ値はダントロレン存在下で１７２．０μＭから１２５．０μＭに低下した。しかし、Ｖｍａｘ値は変化しなかった。　一方、２００μＭ の $6MPH_4$ 存在下で、　基質Ｌ－Ｔｒｐに対するＫｍ値はダントロレン添加により影響を受けなかったが、Ｖｍａｘ値はダントロレン存在下では１．４倍に増加していた。

ダントロレンのトリプトファン水酸化酵素に及ぼす効果をさらに詳細に検討するために、中田ら（２）の方法に従ってジメチルプテリンをリガンドとしたアフィニティカラムを調製し、ラット脳トリプトファン水酸化酵素の部分精製を試みた（図１）。　１３匹のラット脳から得られた粗酵素標品である遠心上清を５０％硫安で分画し、この硫安画分をアフィニティカラムにかけた。カラムを十分にリンスした後、１０ｍＭ $NaHCO_3$／ＮａＯＨ緩衝液（ｐＨ１０．８）により酵素を溶出した。得られた酵素標品は２０．２ nmole / min / mg protein （３７℃）の比活性を示し、約１３０倍に精製されていた。回収率は約１０％であった。反応液２５０μｌ中にこの酵素標品を２０－６０μｌの範囲で加えたところ、活性との間に直線関係を認めた。そこで酵素標品４０μｌを含む反応液中に、ダントロレンを最終濃度０．６、６、１８、３０μＭとなるように添加し活性を測定した。図２に示すように、アフィニティカラム溶出後の酵素標品では、ダントロレンによる活性の上昇は認められなかった。

〈考察〉

ダントロレンによるトリプトファン水酸化酵素の活性化は、補酵素に対する親和性の増大によるものであることが明確になった。一般に補酵素に対する親和性の変化による活性の調節は、酵素活性の急性変化をもたらす機構の一つであると考えられている。ホスファチジルセリンによるトリプトファン水酸化酵素の活性化の場合にも、合成補酵素に対する親和性が２倍に増大することが報告されているが（１）、ダントロレンとホスファチジルセリンは類似の作用機構を持っている可能性がある。アフィニティカラムで部分精製したトリプトファン水酸化酵素はダントロレンにより、活性上昇を示さなかった。この酵素のダントロレンに対する反応性が失われたのは、① 活性化に必要な他の生体因子が精製操作の過程で取り除かれた、② アフィニティカラムからの溶出の際、酵素に何らかの変性がおこりダントロレンに反応しなくなった等の原因が考えられる。これについてはさらに検討を加えたいと考えている。

REFERENCES : 1) Hamon, M., Bourgoin, S., Hery, F., and Simmonet, G. (1978) Biochem. Pharmac. 27, 915-922. 2) Nakata, H., and Fujisawa, H. (1982) Eur. J. Biochem. 122, 41-47. 3) 岡田尚志郎, 筒井公子, 庄盛敏廉 (1987) 神経化学 26, 457-459.

表１　ダントロレンのトリプトファン水酸化酵素の動力学的性質に及ぼす影響

	cofactor		substrate	
	$6MPH_4$		L-Trp	
	D(-)	D(+)	D(-)	D(+)
In vivo				
Km(μM)	183.5±6.5	122.0±11	201.3	201.3
Vmax	0.224±0.02	0.224±0.02	0.176±0.02	0.217±0.03
In vitro				
Km(μM)	172.0	125.0	250	250
Vmax	0.187±0.06	0.187±0.06	0.256	0.364

In vivo :　ダントロレン（２０ｍｇ／ｋｇ）を断頭２時間前に腹腔内に投与した。Ｄ（－）:生理食塩水投与群, Ｄ（＋）:ダントロレン投与群.　In vitro :　未処理のラット脳より粗酵素標品を調製した。Ｄ（－）:ダントロレン非存在下, Ｄ（＋）:６μＭダントロレン存在下.

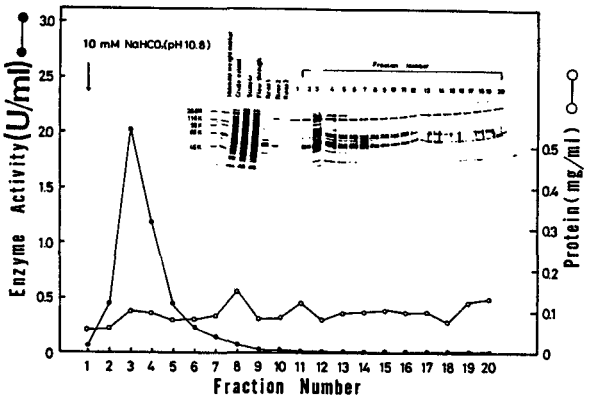


図１　Me_2PteH_4－アガロースカラムによるアフィニティクロマトグラフィー

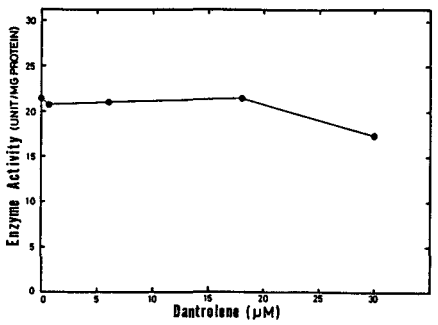


図２　部分精製したトリプトファン水酸化酵素に及ぼすダントロレンの影響

15 N-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) のラット褐色細胞腫 PC12h 細胞におけるカテコールアミン代謝におよぼす影響

直井 信[1]，高橋 勤[2]，一瀬 宏[1]，永津 俊治[1]
（[1]名大・医・生化第一，[2]江南女短大）

〔要約〕

N-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) の細胞レベルでのカテコールアミン代謝への影響を検討した。PC12h 細胞の培養系に 1mM-100nMのMPP⁺を添加し、カテコールアミン量と代謝に関与する酵素系の変化を測定した。チロシン水酸化酵素(TH)、ドーパ脱炭酸酵素(DDC)、モノアミン酵素(MAO) の活性は、いずれもMPP⁺濃度に従い低下した。DDC は100nM の MPP⁺ により活性が低下し、MPP⁺濃度による活性低下はDDC, MAO, TH の順であった。また細胞タンパクは1mM と100μM の MPP⁺ により減少した。細胞内と培養液内のドーパミン(DA),L-DOPA, ジヒドロフェニル酢酸(DOPAC) の総和は MPP⁺ により著しく低下し、TH活性の低下と一致した。しかし細胞内DA濃度はMPP⁺ 10μM 以下ではよく保たれた。DOPAC は培養液内に主に認められ、1μM 以上の MPP⁺ により低下し MAO 活性の低下を示した。一方、DDC活性の変化は、酵素タンパクの低下によるものでなく、酵素タンパクの構造変化による補酵素、ピリドキサールリン酸(PLP) への親和性の変化によるものと考えられた。この結果は MPP⁺ がカテコールアミン代謝に関与する酵素活性を選択的に低下させることを示している。

〔目的〕

MPP⁺ が黒質線状体系の DAニューロンを選択的に破壊し、パーキンソン病様の症状をもたらすことはよく知られており、その病態発症の機序も明らかになりつつある[1,2]。 MPP⁺ は DA 生成系の律速段階である TH [3]と分解系の MAO [6]を阻害することを以前報告したが、最近 MPP⁺ が DDC を補酵素 PLP と競合して阻害することを報告した[7]。MPP⁺ によるこれら酵素の阻害が細胞内のカテコールアミンレベルにどの様に反映して行くかを PC12h 細胞を DA ニューロンのモデルとして用い検討した。

〔方法〕

PC12h 細胞は、1mM-100nM の MPP⁺ を添加した5% ウシ胎児血清を含む Cosmedium-001 にて６日間培養し、３日目に培養液を交換した。細胞内の TH活性[8]、MAO活性[5]、DDC活性[7]は既報の方法によった。細胞内、培養液内カテコールアミンの定量は HPLC-ECD法によった。

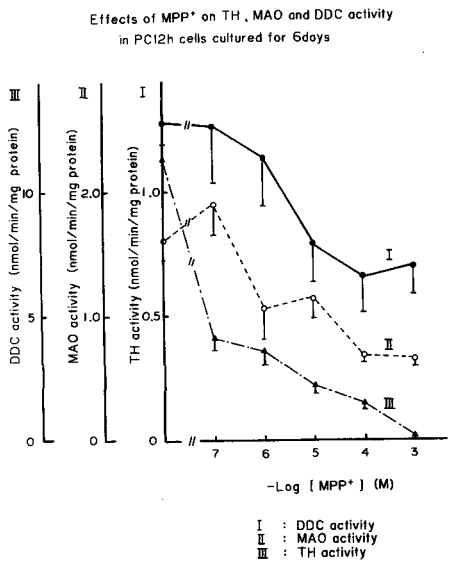
〔結果と考察〕

Fig. 1にMPP⁺添加培養６日後のTH, MAO, DDC活性とMPP⁺濃度の関係を示す。TH活性は、10μMより高濃度のMPP⁺により低下し MAO は1μMより低下したが、DDCが最もMPP⁺により影響を受け 100nMのMPP⁺によりコントロールの１／３となった。これらの酵素活性は過剰の基質と補酵素の存在下で測定されており、細胞内に蓄積されているMPP⁺の活性測定に対する影響は否定出来る。

PC12h細胞のタンパク量と非特異的な酵素，β－ガラクトシダーゼ活性の変化を Fig. 2 によって示す。1mMと100μM MPP⁺において両者の低下がみられ、細胞が高濃度 MPP⁺ により壊死に至ることを示している。

Table 1に細胞内と培養液内のDA, L-DOPA, DOPACの量を示す。MPP⁺ が1μM 以上の濃度でこの三者の総和を著明に減少させており、これは培養３日より６日目のカテコールアミン合成量即ちTH活性を反映していると考えられる。DOPACは主に培養液内に存在したが

Figure 1

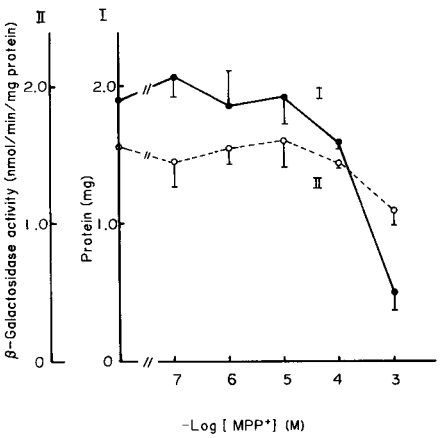


1μM 以上の MPP^+ により著しく減少してMAO活性の低下を反映した。細胞内のDA量が比較的保たれたのはこのMAO活性の低下の為か、DAの細胞内コンパートメンテイションによると考えられる。L-DOPAは1mM MPP^+ の存在下で総アミンの約40%となり、DDCの活性低下を示し、他のMPP^+ 濃度では培養液内L-DOPA量の低下が有意に認められた。

MPP^+ のこれらの酵素に対する阻害の機構としてTHにおいては、リン酸化の阻害が認められている[4]。MAOとDDCにおいては非可逆的な阻害があり、MAOでは基質への Kmが増大して[6]酵素タンパクの構造変化が考えられた。DDCにおいては、抗DDC抗体を用いたimmunobinding法によりDDCタンパクの定量を行ったが、MPP^+存在下で培養したPC12h細胞内の DDCタンパクの減少は認められず、またPLP濃度も変化しなかった。しかし、PLPに対するKm値が約3倍に増大し、PLPへの親和性が変化したことが明かとなった。MPP^+が細胞死をもたらすことなく低濃度でこれらの酵素を選択的に阻害することが明かとなった。

Figure 2

Effects of MPP^+ on protein amount, β-galactosidase activity in PC12h cells cultured for 6 days



I : Protein amount
II : β-Galactosidase activity

Table 1 Catecholamine amounts in PC12h cells cultured for 6 days in the presence of MPP^+

	DA	L-DOPA (nmoles)	DOPAC	Total amount
A, in PC12h cells				
Control	21.28 ± 1.46	0.25 ± 0.02	0.48 ± 0.03	22.01 (50.98)*
+MPP^+				
1 mM	0.32 ± 0.1[a]	0.25 ± 0.03[NS]	0.01 ± 0.01[a]	0.58 (1.53)
100 μM	8.73 ± 1.13[a]	0.01 ± 0.01[a]	0.05 ± 0.01[a]	8.79 (11.40)
10 μM	18.80 ± 0.40[b]	0.02 ± 0.01[a]	0.07 ± 0.01[a]	18.89 (23.23)
1 μM	21.21 ± 3.18[NS]	0.01 ± 0.01[a]	0.07 ± 0.01[a]	21.29 (27.00)
100 nM	25.09 ± 4.21[c]	0.02 ± 0.01[a]	0.33 ± 0.01[a]	25.44 (47.74)
B, in culture medium				
Control	1.80 ± 0.16	2.77 ± 0.11	24.4 ± 1.32	28.97
+MPP^+				
1 mM	0.43 ± 0.1[a]	0.37 ± 0.01[a]	0.15 ± 0.07[a]	0.95
100 μM	0.95 ± 0.23[a]	1.22 ± 0.03[a]	0.44 ± 0.07[a]	2.61
10 μM	1.37 ± 0.14[a]	1.18 ± 0.01[a]	1.79 ± 0.29[a]	4.34
1 μM	1.59 ± 0.31[a]	1.13 ± 0.04[a]	2.99 ± 0.25[a]	5.71
100 nM	3.58 ± 0.92[b]	2.09 ± 0.01[a]	16.63 ± 0.98[a]	22.30

Each value represents mean and SD of duplicate measurements of two experiments.

* Number in parenthesis is the sum total of DA, L-DOPA and DOPAC content in the cells and the culture medium.

Significant difference from control: [a]P<0.001, [b]P<0.01, [c]P<0.05, student's t test. NS; nosignificant change was observed.

〔文献〕

1. Burns, R. S., Chiveh, C. C., Markey, S. P., Ebort, M. H., Jacobowitz, D. M. and Kopin, L. T. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4546-4550
2. Chiba, K., Trovor, A. J. and Castagroli, J. N. (1984) Biochem. Biophy. Res. Commun. 120, 574-570
3. Hirata, Y. and Nagatsu, T. (1985) Neurosci. Lett. 57, 301-305
4. Kiuchi, K., Hagiwara, M., Hidaka, H. and Nagatsu, T. (1988) Neurosci. Lett. 89, 209-215
5. Naoi, M. and Nagatsu, T. (1986) J. Neurochem. 47, 604-607
6. Naoi, M., Suzuki, H., Kiuchi, K., Takahashi, T. and Nagatsu, T. (1987) J. Neurochem. 48, 1912-1916
7. Naoi, M., Takahashi, T., Ichinose, H. and Nagatsu, T. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 152, 15-21
8. Naoi, M., Takahashi, T. and Nagatsu, T. (1988) J. Chromot. 427, 229-238

16 牛副腎髄質クロマフィン細胞の分泌調節に関わるイミダゾール誘導体の作用

今泉美佳，武田京子，熊倉鴻之助
（上智大・生命研・神経化学）

〔要約〕

牛副腎髄質クロマフィン細胞を用いて、中枢および末梢でclonidine(CLO)様作用が知られているイミダゾール誘導体とグアニジン誘導体のcatecholamine(CA)分泌への調節作用について検討した。CLO,oxymetazoline,phentolamine,chlorpheniramine,guanabenzはAcetylcholine(ACh)刺激によるCA分泌を用量依存性に抑制したが、high-K^+刺激によるCA分泌に対しては作用を示さなかった。CLO,guanabenzによる抑制作用はイミダゾール構造又はグアニジン構造を持たないα_2-antagonist、yohimbine,phenoxybenzamineでは拮抗されないが、イミダゾール系のα_2-antagonist tolazolineと同じく誘導体でH_2-antagonistでもあるcimetidineはこれらの抑制作用に対して有意に拮抗作用を示した。これらの作用はhistamine受容体を介する作用とは異なると推察されることから、最近脳などで報告されているimidazoline-preferring受容体を介して選択的にACh受容体機能を修飾した結果と考えられる。さらに、tolazolineのみの存在下ではAChによるCA分泌は用量依存性に増強されたが、high-K^+刺激によるCA分泌は全く増強されなかった。このことから、脳で報告されている内在性のCLO様活性物質(CDS)がクロマフィン細胞にも存在し、imidazoline-preferring受容体を介してCA分泌を調節していると推察される。

イミダゾール誘導体であるCLOは、α_2-agonistとして知られており、牛副腎髄質クロマフィン細胞ではACh刺激によるCA分泌を抑制するが、その抑制作用が代表的なα_2-antagonistによって拮抗されないことから、最近その作用機序にはα_2受容体は関与しないと考えられるようになった。我々はこれまでにCLOが、従来知られているα_2受容体とは異なるがIAP感受性GTP結合蛋白質と共役する特異的部位を介して、ACh受容体機能に選択的に修飾作用を及ぼす可能性を示唆している[7]。一方、脳においてはCLOの降圧作用はその一部分がα_2受容体以外の作用部位を介していると言われており、近年、その作用部位としてventrolateral medulla(VLM)[3]や腎のbasolateral membranes[1]などにイミダゾール誘導体とグアニジン誘導体に特異的なimidazoline-preferring受容体(imidazole binding site)の存在が明らかにされつつある。さらに、このimidazoline-preferring受容体に特異的結合能をもち、CLOの特異的結合を阻害する内在性の低分子量物質、CLO displacing substance(CDS)が牛脳から部分精製され、このCDSはVLMへのmicroinjectionによりCLOと同様の降圧作用を示すことが報告された[6]。また、CDSはヒトのplasma中にもあり、血小板の凝集に影響を及ぼす[2]など、末梢におけるCDSの生理活性も報告されて来ている。今回我々は、脳のimidazoline-preferring受容体においてCLO displacing activity が報告されている各種イミダゾール誘導体とグアニジン誘導体のCA分泌への調節作用を調べ、クロマフィン細胞におけるCLOの分泌抑制作用がVLM等に見られると同様のimidazoline-preferring受容体を介している可能性を検討した。

［実験方法］

浮遊培養クロマフィン細胞は牛副腎髄質から既報[4]のように調製し、実験には培養3-10日の細胞を用いた。CA分泌実験には Cell Bed Perfusion-ECD systemを用い、既報[4]の方法に従って real-time monotoringを行った。

［結果及び考察］

イミダゾール誘導体としてCLOの他に、chlorpheniramine,oxymetazoline, phentolamine、グアニジン誘導体としてguanabenzを用い、まずAChによるCA分泌に対するこれらの化合物の効果を検討した。イミダゾール誘導体とguanabenzはすべてACh5×10^{-4} MによるCA分泌を用量依存性に抑制した(図1-A)。chlorpheniramine,oxymeta-

zolineとguanabenzのAChによるCA分泌阻害のIC_{50}は約10^{-5} Mであり、CLOとphentolamineのIC_{50}は約3×10^{-5} Mであった。一方、100 mM KClによるCA分泌に対しては作用を示さなかった(図1-B)。用いたイミダゾール誘導体のうち、chlorpheniramineはH_1-antagonistであるにも関わらず、図1に示すようにAChによるCA分泌を著名に抑制する。一方、同じくイミダゾール誘導体であるHistamineはクロマフィン細胞からH_1受容体を介してCA分泌を引き起こすが[5]、CLOはこの分泌を全く抑制しないことから(図2)、図1で見られたchlorpheniramineの抑制作用はH_1受容体を介する作用とはその機序が異なることが示唆される。さらに、ACh用量反応曲線に与えるこれらのイミダゾール誘導体およびguanabenzの作用を調べると、いずれもAChの作用を非拮抗的に抑制した。従ってこれらのイミダゾール誘導体およびguanabenzの抑制作用はimidazoline-preferring受容体を介して選択的にACh受容体機能を修飾した結果と考えられる。

図1.

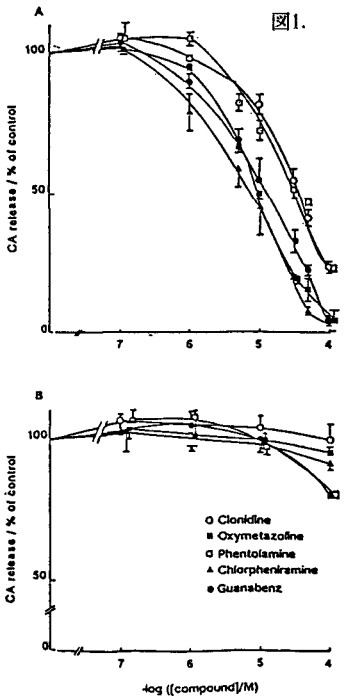
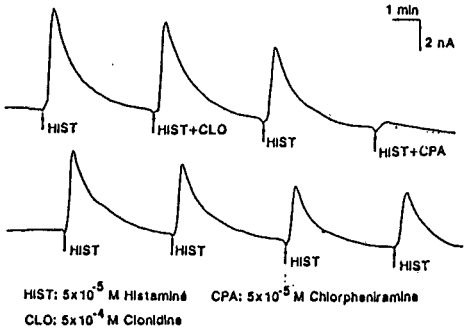


図1. ACh(A)及びKCl(B)によるCA分泌に及ぼすｲﾐﾀﾞｿﾞｰﾙ誘導体、ｸﾞｱﾆｼﾞﾝ誘導体の作用:各薬物存在下で5×10^{-4} M AChあるいは100 mM KCl溶液 50 μlをﾊﾟﾙｽ的に与えた。薬物非存在下での分泌をそれぞれのcontrolとした。

図2. HistamineによるCA分泌に対するClonidineおよびChlorpheniramineの作用:代表的な分泌動態を示す。矢印の時点で各薬物溶液 50 μlをﾊﾟﾙｽ的に与えた。

図2.



CLO, guanabenzによる抑制作用はイミダゾール構造またはグアニジン構造を持たないα_2-antagonist、yohimbineとphenoxybenzamineによって拮抗されない。しかしながら、イミダゾリン系α_2-antagonistであるtolazolineはこれらの抑制作用に対して有意な拮抗作用を示し、また、H_2-antagonistでもあるイミダゾール誘導体cimetidineもtolazoline同様、CLOによる抑制作用に対して拮抗作用を示した。脳のimidazole binding siteではyohimbineはCLO displacing activityを示さないが、cimetidineはCLO displacing activityを示すことが報告されている[3]。また、tolazolineは腎basolateral membranesのimidazoline binding siteに高い親和性を持つことが報告されている[1]。これらの報告と我々の結果はよく一致しており、上に述べたimidazoline binding site関与の可能性を支持する。一方、tolazolineのみの存在下ではAChによるCA分泌は用量依存性に増強されたが、high-K^+によるCA分泌は全く増強されなかった(図3)。このことから内在性CLO様活性物質CDSがクロマフィン細胞にも存在し、細胞に対してimidazoline-preferring受容体を介してCA分泌を調節している可能性が推察され、現在、我々はMeeleyら[6]の方法を用いCDSを部分精製してCA分泌への調節作用の検討を行っている。

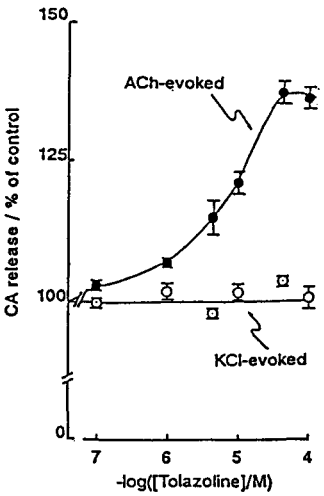


図3. AChおよびKClによるCA分泌に対するTolazolineの作用:Tolazoline非存在下での5×10^{-4}M AChおよび100 mM KClによるCA分泌をそれぞれのcontrolとした。

[文献]

1) Coupry, I., Podevin, R. A., Dausse, J., and Parini, A. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 147, 1055-1060
2) Diamant, S., Eldor, A., and Atlas, D. (1987) Eur. J. Pharmacol. 144, 247-255
3) Ernsberger, P., Meeley, M. P., Mann, J. J., Reis, D. J. (1987) Eur. J. Pharmacol. 134, 1-13
4) Kumakura, K., Ohara, M., Sato, G. P. (1986) J. Neurochem. 46, 1851-1858
5) Livett, B. G., and Marley, P. D. (1986) Br. J. Pharmacol. 89, 327-334
6) Meeley, M. P., Ernsberger, P. R., Granata, A. R., and Reis, D. J. (1986) Life sci. 38, 1119-1126
7) Ohara-Imaizumi, M., Miyakawa, Y., and Kumakura, K. (1988) Neurosci. Lett. in press.

17 Brain microdialysis：インスリン低血糖と視床下部外側野モノアミン代謝

清水　弘行，下村洋之助，小林　　功，小林　節雄，George A. Bray*
（群馬大・内分泌内，一内，南カリフォルニア大・糖尿病科*）

〔要約〕
脳内の微小な部位を充分に観察可能なmicrodialysis cannulaを作製し，インスリン低血糖状態から回復後も摂食亢進状態にある動物の脳内，特に摂食と重要な関連を有する視床下部外側野（ＬＨＡ）のモノアミン代謝変化について検討した。
カニューレ先端の開放部（長さ0.5㎜，角度180°）に透析膜を（M.W.cut-off; 12,000－14,000）付着したmicrodialysis cannulaをLHA内に固定し，0.41 μl／minの流速で人工的脳脊髄液にて還流し，体外にて透析液を回収，HPLC－ECDによりモノアミン濃度を測定した。
1）regular insulin（8U／kg, ip）投与後6時間の絶食により，ＬHA内のNE，ＭＨＰＧの放出増大とともに，5－HT，5－ＨＩＡＡの増加を認めたが，ＤＯＰＡＣには有意な変化を認めなかった。
2）摂食の再開とともに，NEは低下傾向，MHPG，5－HTは対照群レベルにまでの低下を示し，5－ＨＩＡＡは更に対照群以下まで抑制された。

インスリン投与による低血糖刺激は，2－deoxy－D－Glucoseと同様に，脳内においてブドウ糖欠乏状態を惹起し，動物の摂食行動を亢進させると考えられている（8）。しかしながら，Ritterら（4）は，インスリン末梢投与6時間後，すなわち実験動物がすでに低血糖状態より回復している状態においても，インスリン投与による摂食の亢進を認めたことを報告し，低血糖自体の直接的な影響だけでは説明できないと結論づけている。従来より，種々の行動変化において，脳内のモノアミン作動性ニューロンが重要な役割を果たしていることがよく知られており，インスリン低血糖下においても，視床下部切片にてノルエピネフリン放出異常が認められたという成績も示されている（5）。
一方，脳内の神経伝達物質の代謝変化を単一個体において，自由運動下で経時的に観察しようとする動きがあり，その1つの新しい方法として，microdialysis法があげられるであろう（10）。私達は，以前より脳内の微小な部位，特に視床下部内の核をも選択的に還流可能なmicrodialysis cannulaを考案し，良好な成績を得ている（6）。今回私達は，この新しい方法を用いて，実験動物がインスリン投与による低血糖状態から回復するとされている投与6時間後の脳内モノアミン代謝異常について，特に摂食や自律神経活動と深いつながりを有する視床下部外側野（ＬＨＡ）において検討した。

〔方法〕

1）microdialysis cannulaの構造。
カニューレは，一方を盲端とした26 gauge stainless steel tubing内を33 gauge stainless steel tubing を通して還流し，外筒の開放端より流出してくる透析液を体外にて経時的に回収し，測定する方式とした。透析部分は，Hernandezら（1）により考案されたカニューレよりも脳実質との接触面積を少なくするため，外筒の先端近くに長さ0.5㎜，開放角度約180°の側孔を作製し，この部分に透析膜（M.W. cut off; 12,000－14,000）を付着し，微小還流域とした。還流液には，人工的脳脊髄液（2）を使用し，還流速度は，0.41 μl／min. とした。

2）モノアミン濃度測定。
回収した透析液10 μlを用いて，電気化学検出器付き高速液体クロマトグラムにより，norepinephrine（NE），4－hydroxy－3－methoxyphenylglycol（MHPG），3, 4－dihydroxyphenylacetic acid（DOPAC），5－hydroxytryptamine（5－HT）と5－hydroxyindoleacetic acid（5－HIAA）を測定した。移動相には，0.15 mM Chloracetic acid，250㎎ ＥＤＴＡ，80㎎ sodium octyl sulfate（pH; 3.0，3％ methanol）を用い，カラムは，C_{18}，5 μm，15 ㎝×4.6㎜（Altex）を使用した。

3）動物
体重200－250ｇの雄性Sprague－Dawley ratを用いた。ペントバルビタール麻酔下にて，カニューレを左側ＬＨＡ内に固定し，手術終了後3～7日目に実験に供した。regular insulin（8U／㎏）または0.5％ＢＳＡ加生食水をam 8：00に腹腔内投与し，以後6時間絶食とした。インスリン投与4時間後より還流を開始し，モノアミン流出濃度が安定化したことを確認した後，6時間後より前値を回収した。30分間にて前値の検体を回収後，摂食を再開させ，以後60分間のモノアミン代謝の変化を測定した。また，別群において，インスリン投与6時間後，血糖値が正常に復していることを再確認した。
また，統計学的検定には，分散分析およびStudentのｔ検定を用いた。

〔結果〕

1）血糖値と摂食量。

インスリン投与6時間後，血糖値は，インスリン投与群139.7±4.7mg／dl，対照群130.0±5.6mg／dlとインスリン末梢投与による低血糖からは既に回復していたが，6時間絶食後の60分間摂食量は，インスリン投与群3.4±0.7g，対照群1.0±0.4g（$p<0.05$）と依然，インスリン投与による摂食亢進作用が認められた。

2）LHA内モノアミン代謝。

インスリン投与による低血糖状態より回復後においても，NE，MHPG，5－HIAAと5－HTの流出増大を認めた（Fig.1a，c）が，DOPACの流出は低下傾向を示した（Fig.1b）。摂食の再開により，MHPG，5－HTの流出濃度はすみやかに対照群レベルにまで下降し，5－HIAA流出は60分後対照群より更に抑制された。またNE流出も低下傾向を認めたが，摂食再開60分後においても依然対照群より高いレベルにあった。DOPACについては，有意な変化は観察されなかった。

〔考察〕

動物がインスリン投与による低血糖状態から完全に回復した状態においても，明らかに動物の摂食行動は亢進した状態にあるというRitterらの報告を再確認するとともに，摂食や自律神経の中枢部位として重要な役割を果たしているLHA内において，明らかなモノアミン代謝の異常が認められた。

一般にLHA内に投与されたNEは，摂食行動を抑制する（3）と考えられていたが，近年，白石らにより更に低濃度のNEをLHA内に微量投与すると摂食量の増大を認めたという報告（7）もなされており，動物の摂食行動との関連を考える上で非常に興味深い。本研究においてインスリン投与後6時間の絶食の後に，NEとMHPG流出濃度の増大を認め，摂食再開とともに低下傾向を示すという現象より，インスリン投与後の摂食亢進には，LHA内のNE放出増大，すなわちNE作動性ニューロンの活性化が重要な意味を有しているものと考えられる。

一方，5－HTは，視床下部内側へ選択的に微量投与されると摂食を抑制すると考えられている（9）が，LHAにおける詳細な働きについては不明な部分が多い。このような点から，今回得られた5－HT，5－HIAAの変化については，今後更に詳細な研究を要するものと思われる。

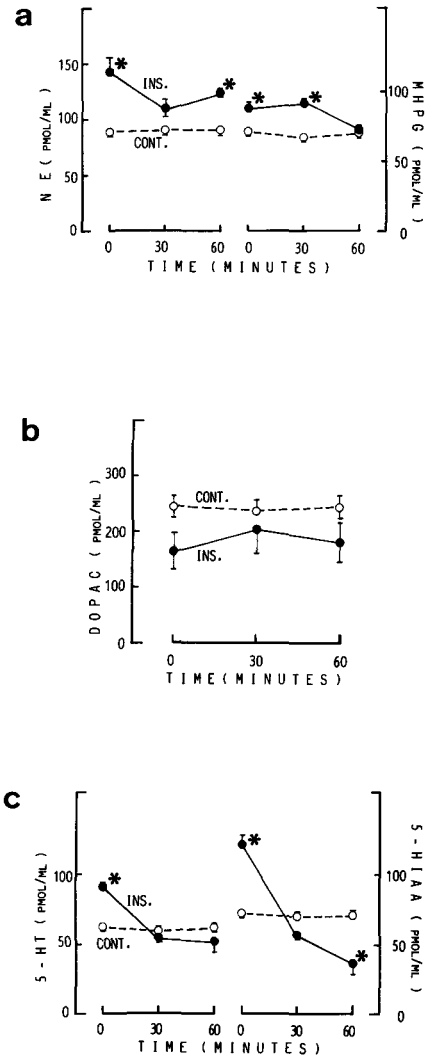


Fig. 1 : changes in monoamine concentration in the dialysates from the LHA. Results are expressed as mean±S.E.M.. *;$p<0.05$ compared with controls.

〔文献〕

（1）Hernandez, L., Stanley, B.G. and Hoebel, B.G.（1986）Life Sciences 39, 2629－2637.

（2）Johnson, R.D. and Justice, J.B.（1983）Brain Res Bull 10, 567－571.

（3）Leibowitz, S.F. and Rossakis, C.（1978）Neuropharmacology 17, 691－702.

（4）Ritter, R.C., Roelke, M. and Neville, M.I.（1978）Am J Physiol 234, E 617－E 621.

（5）Sauter, A., Goldstein, M., Engel, J. and Ueta, K.（1983）Brain Res 260, 330－333.

（6）Shimizu, H. and Bray, G.A.（1988）Clin Res 36, 160 A.

（7）白石武昌（1986）肥満 7, 116－117.

（8）Smith, G.P. and Epstein, A.N.（1969）Am J Physiol 217, 1083－1087.

（9）Weiss, G.F., Papadakos, P., Knudson, K. and Leibowitz, S.F.（1986）Pharmacol Biochem Behav 25, 1223－1230.

（10）Zetterström, T. and Ungerstedt, U.（1984）Eur J Pharmacol 97, 29－36.

18 Methamphetamine及びp-Chloroamphetamine投与によるラット側坐核中モノアミン代謝物とlocomotor activityの経時的変化。－in vivo brain dialysis法による検討－

杉田倫太郎，澤　温*，野村総一郎，山内惟光
（藤田学園保衛大・医・精神　*さわ病院）

〔要約〕
Methamphetamine(MAP)はdopamine(DA)の放出を促し、p-chloroamphetamine(PCA)はserotonin(5-HT)の放出を促すとされ、またMAP及びPCAをラットに投与するとlocomotor activityの増加を引き起こすことは以前よりよく知られている。MAP及びPCAをラットに各々2mg/kg腹腔内投与して、ラット側坐核に脳内透析プローブを装着しdihydroxyphenylacetic acid(DOPAC),homovanillic acid(HVA)および5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA)の経時的推移と同時にlocomotor activityを測定した。MAP投与実験ではlocomotor activityの変化率の経時的変動は投与後1時間目において対照群（生食投与群）に比べて有意に増加した。DOPACは投与後1,2,3,4時間目において有意にMAP投与群が減少した。HVAは投与後2時間目で有意にMAP投与群が減少した。5-HIAAは有意差を認めなかった。PCA投与実験ではlocomotor activityは投与後1,2,4,6時間目において対照群に比べ有意に増加した。DOPAC,HVA及び5-HIAAの経時的変動には有意差を認めなかった。以上の結果よりDA放出によるhyperactivityに側坐核は強く関与していることが示唆され、5-HTの放出によるhyperactivityには密接には関与していないことが示唆された。

＜緒言＞MAPはcatecholamineを放出させ、小動物にMAPを投与すると一定範囲の用量ではlocomotor activityを増加させる。またPCAは5-HTに対するreleaserとして使用され、hyperactivityを含む5-HTbehaviorを惹起することは以前より報告されている(7)。一方側坐核は中脳辺縁系ドーパミン神経の終末核の一つでありlocomotor activityの発現に深く関与していることを示唆する報告は多数認められる。今回我々は側坐核のDA,5-HT代謝とlocomotor activityとの関連を調べる目的でHutsonらの方法(1)に従って作製された脳内透析プローブをラット側坐核に装着し、MAP及びPCA投与後のモノアミン代謝物すなわちdihydroxyphenylacetic acid(DOPAC),homovanillic acid(HVA)および5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA)とlocomotor activityの経時的変化について検討した。

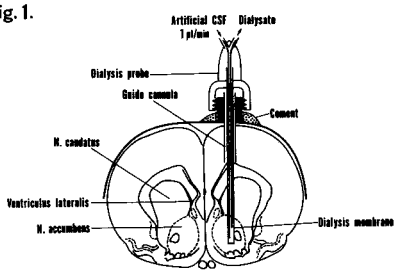
＜方法＞対象は4週令より昼夜逆転（6:00～18:00の暗期 18:00～6:00の明期）した明暗周期下に飼育した8週令（体重250g～330g）のWistar系雄ラットを用い、MAP投与群（7匹）PCA投与群（7匹）、対照群（生食投与7匹）として行った。　手術は7週令時のラットをpentobarbital麻酔下に脳定位固定装置に固定した後、透析プローブ装着時には側坐核の中心に透析部分が固定される様にガイドカニューレをKonig and Klippelのアトラス(3)に基づき線条体（A＝9.2㎜ H＝+2.0㎜ L＝1.3㎜）まで挿入しデンタルアクリルで固定した。　透析実験は手術1週間後に行った。自由行動下の状態でHutsonらの方法に従って作製された透析プローブ（バイオリサーチ社製）を装着後(Fig.1)、Johnson & Justiceらの組成(2)に従った灌流液を1μl/minで灌流した。30分毎連続3回の透析液を採取し（前値）MAP及びPCA投与群には2mg/kg i.p.を対照群には生理食塩水を同様に投与した。その後1時間毎6時間まで透析液を採取した。採取した透析液は、0.1%システイン10μl（前値は5μl）と混和後、測定まで-75℃にて保存した。　実験終了後、脳をホルマリン灌流固定し脳切片で透析プローブの位置を確認した。透析液中のDOPACとHVA（酸水解後の抱合体を含めたtotalとして測定）および5-HIAAの測定はSarnaらの方法(4)に従って電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーにて測定した。　投与前値を算術平均し、その値に対する投与後6時間までの各時間の値の変化率を算出して、分散分析後t-検定を用いて検定した。

＜結果＞MAP投与実験ではlocomotor activityの変化率の経時的変動は投与後1時間目において対照群（生食投与群）に比べて有意に増加した。DOPACは投与後1,2,3,4時間目において有意にMAP投与群が減少した。HVAは投与後2時間目で有意にMAP投与群が減少した。5-HIAAは有意差を認めなかった(Fig.2)。　PCA投与実験ではlocomotor activityは投与後1,2,4,6時間目において対照群に比べ有意に増加した(Fig.3)。　DOPAC,HVA及び5-HIAAの経時的変動には有意差を認めなかった。

＜考察＞Sharpらはamphetamineをラットに投与して脳内透析法により線条体と側坐核のDAの経時的変化と同時にlocomotor activityを測定したが、側坐核のDAの増加とlocomotor activityの増加は特に低用量において高い相関を示したと報告している(6)。またSharpらはPCA(5mg/kg)投与後のラット線条体の脳内透析を行い5-HTの増加に伴いDAも

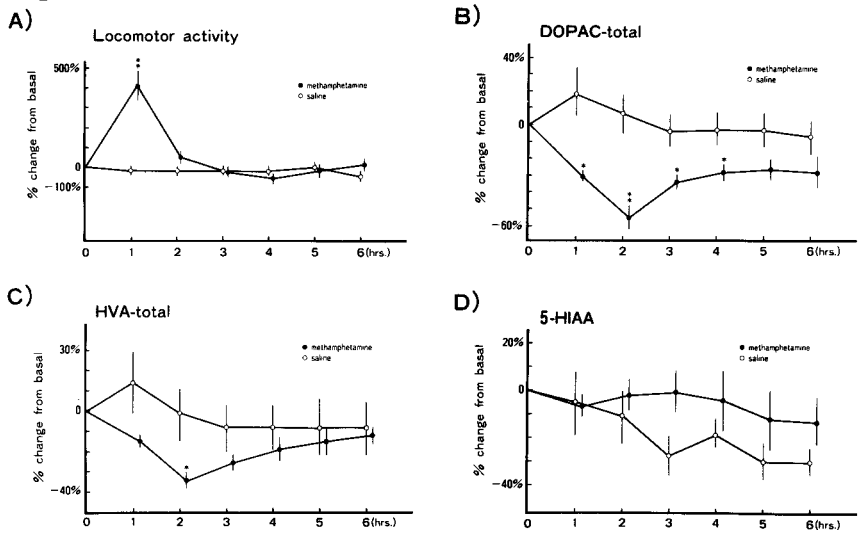
増加すると報告している(5)。今回我々はMAP及びPCA(2mg/kg i.p.)をラットに投与して自由行動下の状態でlocomotor activityと側坐核のモノアミン代謝物の経時的変化について検討したが、MAP投与実験においてはhyperactivityが出現する投与後1時間目よりDOPACは有意に減少を示し、HVAも2時間目に減少を示した。この結果は側坐核はDAの放出により惹起されると考えられるhyperactivityに強く関与しているとするSharpらの報告を支持している。また5-HIAAに有意差を認めなかったことは2mg/kgという低用量では著明なhyperactivityの出現にもかかわらず5-HT系には影響を及ぼしていないことが示唆された。一方PCA投与実験においても著明なhyperactivityを認めたがモノアミン代謝物に有意差を認めなかったことはPCAによって放出されると考えられる5-HTによる hyperactivityには側坐核が密接には関与していないことを示唆するものと考えられた。今後はDA,5-HTを測定するとともに他の薬物を使用してin vivoにおける側坐核のモノアミン代謝と行動との関係をより詳細に検討していきたい。

Fig.1.



Schematic drawing of a dialysis probe inserted into the nucleus accumbens.

Fig.2.

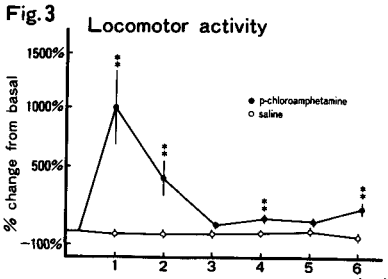


The time course after administration of methamphetamine (2mg kg i.p.). Each value is expessed as a percentage (mean±S.E E.M.) from basal level. ** $p<0.01$ * $p<0.05$

＜文献＞

1) Hutson, P.H., Sarna, G.S., Kantamaneni, B.D. and Curzon, G. (1985) J. Neurochem., 44, 1266-1273.
2) Johnson, R.D. and Justice, J.B. (1983) Brain Res. Bull., 10, 567-571.
3) Konig, J.F. and Klippel, R.A. (1963) The Rat Brain, Williams and Wilkins, Baltimore.
4) Sarna, G.S., Hutson, P.H. and Curzon, G. (1984) Eur. J. Pharmac., 100, 343-350.
5) Sharp, T., Zetterstrom, T., Christmanson, L. and Ungerstedt, U. (1986) Neurosci. Lett., 72, 320-324.
6) Sharp, T., Zetterstrom, T., Ljungberg, T. and Ungerstedt, U. (1987) Brain Res., 401, 322-330.
7) Trulson, M.E. and Jacobs, B.L. (1976) Eur. J. Pharmac., 36, 149-154.

Fig.3



The time course of locomotor activity of rats after administration of p-chloroamphetamine (2mg kg i.p.). Each value is expressed as a percentage (mean±S. E.M.) from basal level. ** $p<0.01$

19 小脳特異的P400蛋白質の細胞内局在

前田信明、宮脇敦史、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P400蛋白質に対する3種類のモノクローン抗体（4C11,18A10,10A6)を用いて，当蛋白質の細胞内局在を解析した。これらのモノクローン抗体は、小脳の組織切片上では、プルキンエ細胞を免疫組織化学的に濃染する。しかしながら、小脳の初代培養系を用いて、未固定の生きたプルキンエ細胞を抗体と反応させると、18A10のみがプルキンエ細胞表面に結合した。また、小脳のミクロソーム画分を用いてP400蛋白質の可溶化条件を検討したところ、高塩濃度条件や酸性条件では、P400蛋白質は可溶化されなかったが、Triton X-100では部分的に可溶化された。このことは、P400蛋白質が 膜内在性の蛋白質であることを示唆している。さらに、細胞分画法及び、immunoblot法により、P400蛋白質は小脳のミクロソーム画分、シナプトソーム画分、シナプス結合部画分に検出されたが、シナプス結合部画分に特に濃縮されていることが明らかとなった。これらのことより、P400蛋白質は、その一部分を細胞外に突出させたプルキンエ細胞の細胞膜やシナプスに局在する膜内在性の糖蛋白質であると考えられる。

P400蛋白質は、小脳に特異的に存在する分子量250Kの糖蛋白質である。P400蛋白質はプルキンエ細胞に多量に発現しており、その樹状突起形成期及びシナプス形成期に一致して発現量が増大することが知られている(1)。また樹状突起の低形成と平行線維とのシナプス欠損を示すstaggererマウスのプルキンエ細胞においては、P400蛋白質の発現増大が起こらない(1,2)。これらのことからP400蛋白質とプルキンエ細胞の突起形成、及びシナプス形成との関連が示唆されている。さらに最近、P400蛋白質がcAMP依存性プロテインキナーゼにより、強くリン酸化されることが明らかとなった(3)。今回、我々はP400蛋白質に対するモノクローン抗体を用いて、当蛋白質の細胞内局在を解析したので報告する。

［方法］
P400蛋白質は既報の方法(4)により精製した。モノクローン抗体は既報(1)の方法により調製した。小脳の初代培養は、Weberらの方法(5)により、細胞分画はCotmanらの方法(6)により行なった。免疫組織化学は、Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)法により行なった。

［結果と考察］
P400蛋白質に対する3種類のモノクローン抗体(4C11,10A6,18A10)を作製した。これらの抗体は精製したP400蛋白質と強く反応する（Fig.1,A)。しかしながら、P400蛋白質をStaphylococcus aureus V8 プロテアーゼで部分分解し、分解産物に対する抗体の反応をimmunoblot法で分析すると、それぞれ異なったペプチドに反応することが明らかとなった（Fig.1,B)。このことから、これらの抗体は、P400蛋白質上の異なった抗原決定部位を認識することが明らかである。

次に、小脳の初代培養系を用いて免疫組織化学を行なった。細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、Triton X-100で細胞膜を透過性にした場合には、3種類の抗体は、プルキンエ細胞を濃染した（Fig.2,A,B)。それに対して、未固定の生きた細胞と抗体を反応させた場合には、18A10のみがプルキンエ細胞に結合した（Fig.2,C,D)。この条件では、抗体は細胞膜を透過できないため、18A10は、P400蛋白質の細胞外に突出した部分を認識すると考えられる。

マウス小脳からミクロソーム画分を調製し、1.0 M KCl, 0.5% Triton X-100を含む緩衝液または、pH 2.5のglycine-HCl 緩衝液中で 60分間、処理した。遠心後、上清及び沈澱中のP400蛋白質をimmunoblot法で検出したところ、Triton X-100 処理の場合には、一部が可溶化されていたが、その他の場合は、全く可溶化されていなかった。このことは、P400蛋白質が、内在性の膜蛋白質であることを示唆する。

次に、細胞分画法によってP400蛋白質の細胞内局在を検討した。immunoblot法により、マウス小脳より調製した各画分中のP400蛋白質を検出したところ、ミクロソーム画分、シナプトソーム画分、シナプス膜画分、シナプス結合部画分にその存在が確認された（Fig.3)。中でもシナプス結合部画分に最も濃縮されていた。プルキンエ細胞の細胞膜上に存在するP400蛋白質は、ミクロソーム画分に回収されると考えられるが、それに加えて、シナプス部位にもP400蛋白質が豊富に存在することが明らかである。

以上のようにP400蛋白質は、プルキンエ細胞の細胞膜及びシナプス部位に局在し、その一部が細胞外に突出した膜内在性の糖蛋白質であると考えられる。このことは、P400蛋白質がプルキンエ細胞のシナプス形成に重要な役割を演じているという仮説を支持するが、その機能については依然、不明である。今後、遺伝子工学的な手法を用いたP400蛋白質の機能解析が必要となると考えられる。

[文献]

1. Maeda,N.,Niinobe,M.,and Mikoshiba,K. (1987) 神経化学 26、427-429.
2. Mikoshiba,K.,Huchet,M.,and Changeux,J.P. (1979) Dev.Neurosci. 2, 254-275.
3. Yamamoto,H.,Maeda,N.,Niinobe,M.,Miyamoto,E.,and Mikoshiba,K. (1988) 神経化学.
4. Maeda,N.,Nakahira,K.,Niinobe,M.,and Mikoshiba,K. (1988) J.Neurochem.,in press.
5. Weber,A.,and Shachner,M. (1984) Brain Res. 311, 119-130.
6. Cotman,C.W.,and Taylor,D. (1972) J.Cell Biol. 55, 696-711.

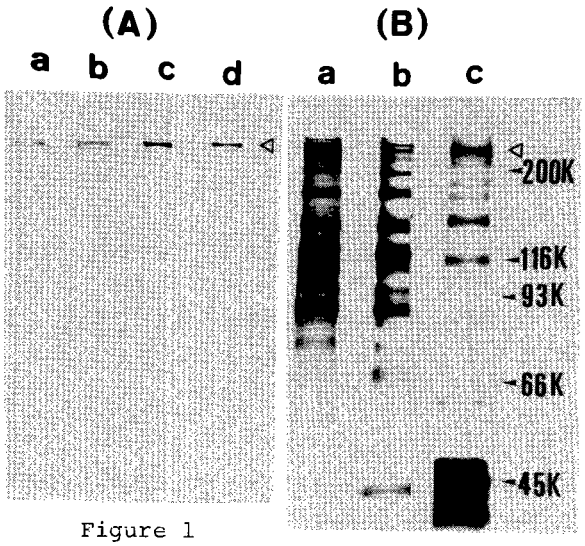


Figure 1

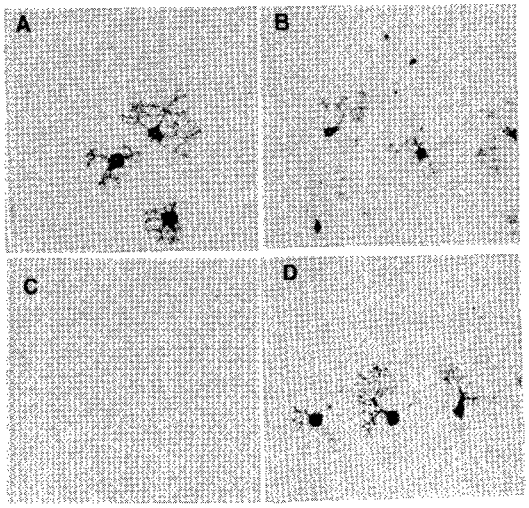


Figure 2

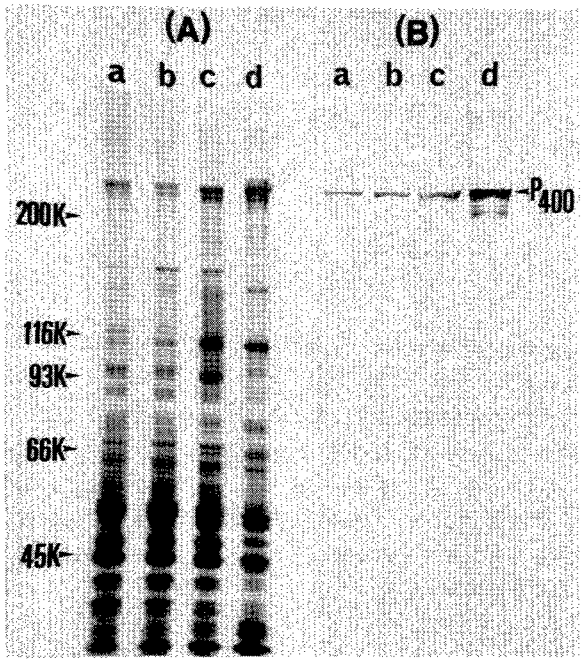


Figure 3

Fig.1.Three different monoclonal antibodies against P400 protein.
A:Immunoblot analysis of the purified P400 protein.
a;Coomassie brilliant blue-stain, b;4C11,c;10A6,d;18A10.
B:Immunoblot analysis of partially digested P400 protein.
a;4C11,b;10A6,c;18A10.

Fig.2. Immunohistochemistry of cultured Purkinje cells. Cerebellar cultures were fixed and permeabilized with Triton X-100, and immunostained by 4C11 (A) or 18A10 (B). Live cultured cells were treated with 4C11 (C) or 18A10 (D) and then stained by ABC method.

Fig.3. Subcellular localization of P400 protein. Microsome(a),synaptosome (b),synaptic membrane(c),and synaptic junction(d) fractions were prepared from mouse cerebella. The proteins were analyzed with SDS-PAGE(A) and immunoblotting with 10A6(B).

20 cAMP および Ca^{2+}、カルモデュリン依存性の小脳特異的 P_{400} 蛋白質リン酸化反応

○山本秀幸、前田信明＊、新延道夫＊、宮本英七、御子柴克彦＊
（熊本大・医・第一薬理、＊大阪大・蛋白研・機能制御）

〔要約〕

マウス小脳から精製した P_{400} 蛋白質は、ラット脳から精製した cAMP 依存性プロテインキナーゼ（Aキナーゼ）の触媒サブユニットと Ca^{2+}、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡ（CaM キナーゼⅡ）によってリン酸化を受けた。小脳の膜分画を用いると、P_{400} 蛋白質は、添加した触媒サブユニットにより、強くリン酸化された。本反応は大脳の膜分画では認められなかった。膜分画中の P_{400} 蛋白質は CaM キナーゼⅡにより軽度にリン酸化された。P_{400} 蛋白質に対する単クローン抗体を用いた免疫沈降実験により、両キナーゼによる P_{400} 蛋白質のリン酸化反応が確認された。Aキナーゼによるリン酸化反応は約 10分でプラトーに達したが、CaM キナーゼⅡによるリン酸化反応は 60分まで増加した。小脳の初代培養系を用いた実験により、生細胞内での P_{400} 蛋白質リン酸化反応が確認された。

これらの結果は、cAMP と Ca^{2+}、カルモデュリン依存性蛋白質リン酸化反応により、P_{400} 蛋白質の機能が調節されていることを示唆している。

小脳特異的 P_{400} 蛋白質はプルキンエ細胞に多量に存在する分子量 250K の膜蛋白質であり、小脳失調マウスを用いた解析により、シナプス形成に重要な役割を演じていることが示唆されている（1、2）。最近、我々は P_{400} 蛋白質の精製と本蛋白質に対する単クローン抗体の作製に成功した（3、4）。さらに単クローン抗体を用いたイムノブロット法と細胞分画法により、P_{400} 蛋白質が、シナプス膜分画に多量に存在することが明らかとなった（10）。今回、in vitro と小脳神経細胞の初代培養系での P_{400} 蛋白質のリン酸化反応について検討した。

【実験材料と方法】

実験材料： P_{400} 蛋白質はマウス小脳より既報（3）の方法に従い精製した。Ca^{2+}、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡ（CaM キナーゼⅡ）はラット脳より既報（5）の方法により精製した。ラット脳 cAMP 依存性プロテインキナーゼ（Aキナーゼ）の触媒サブユニットは既報（6）の方法により精製した。マウス脳の膜分画（P2、P3 分画）は既報（7）の方法により調製した後、EGTA を含む溶液でホモジナイズと遠心を繰り返すことにより、P2、P3 分画に内在するカルモデュリンを除去し、実験に用いた。

実験方法： 蛋白質リン酸化反応は既報（5）の方法、単クローン抗体を用いたイムノブロットは既報（4）の方法により行なった。リン酸化アミノ酸の分析は既報（8）の方法、小脳神経細胞の初代培養は Weber と Schachner の方法（9）に従った。実験には、21日から 32日間培養した細胞を使用した。

【実験結果と考察】

1）精製した P_{400} 蛋白質のAキナーゼと CaM キナーゼⅡによるリン酸化反応： 精製した P_{400} 蛋白質は、触媒サブユニットと CaM キナーゼⅡにより、リン酸化された。オートラジオグラフィーによる解析では、P_{400} 蛋白質は CaM キナーゼⅡにより、強くリン酸化を受けた。

2）P2、P3 分画での P_{400} 蛋白質のリン酸化反応： P_{400} 蛋白質は、膜内在性の糖蛋白質であり、可溶化された状態での立体構造は膜内在性の状態を反映していない可能性がある。次に、小脳の P2、P3 分画を用いて以下の実験を行なった。 a）小脳の P2、P3 分画に [γ-^{32}P]ATP を加えてリン酸化反応を行なうと P_{400} 蛋白質は軽度にリン酸化された（図1）。本反応は cAMP と触媒サブユニットの添加により著しく増強された。触媒サブユニットの添加でリン酸化反応が増加したのは2、3のバンドに限られており、P_{400} 蛋白質はAキナーゼの特異的な基質であることが示唆された。CaM キナーゼⅡと Ca^{2+}、カルモデュリンの添加では P_{400} 蛋白質のリン酸化は軽度に増加した。b）大脳の P2、P3 分画のリン酸化反応を行なうと P_{400} 蛋白質のリン酸化反応は認められなかった。 c）小脳の P2、P3 分画のリン酸化反応の後、単クローン抗体を用いて免疫沈降実験を行なうことにより、触媒サブユニットと CaM キナーゼⅡによる P_{400} 蛋白質のリン酸化反応が確認された。両キナーゼによるリン酸化反応の時間経過を図2に示す。触媒サブユニットによる P_{400} 蛋白質のリン酸化反応は 10分でほぼプラトーに達したが、CaM キナーゼⅡによるリン酸化反応は 60分後も増加し、リン酸化反応の程度も触媒サブユニットに比べ低値を示した。これらの

結果より、P2、P3 分画中の P_{400} 蛋白質は、CaM キナーゼⅡに比べ、Aキナーゼのより良い基質であることが示唆された。 d) 触媒サブユニットによりリン酸化された P_{400} 蛋白質のバンドを切り取り、リン酸化されたアミノ酸を調べると、セリン残基のみがリン酸化を受けることがわかった。本実験条件下では、スレオニンとチロシン残基のリン酸化反応は認められなかった。

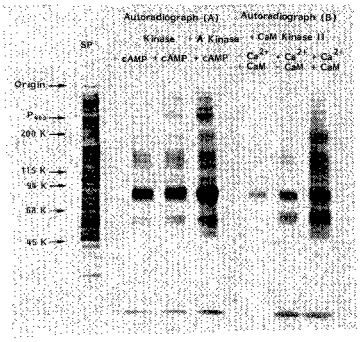


図1

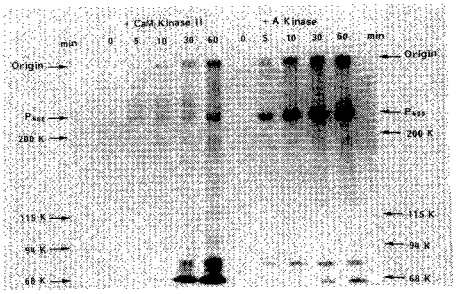


図2

3) 小脳神経細胞の初代培養系での P_{400} 蛋白質のリン酸化反応: 培養神経細胞での P_{400} 蛋白質の発現とリン酸化反応について以下の実験を行なった。a) 細胞全蛋白質を SDS-PAGE にて分離した後、単クローン抗体を用いてイムノブロットを行なうと、小脳の P_{400} 蛋白質の分子量に一致した P_{400} 蛋白質の存在が確認された。免疫組織化学により、小脳の初代培養系でも、プルキンエ細胞のみが強く染色された。 b) 培養細胞を ^{32}P-正リン酸で 18時間ラベルした後、1 mM のジブチリル cAMP の添加後 20分での P_{400} 蛋白質のリン酸化反応について検討した (図3)。単クローン抗体 (mAb) を用いて免疫沈降実験を行なうと P_{400} 蛋白質のリン酸化反応が認められた。本反応は非特異的γ-グロブリンを用いた場合 (control) には認められなかった。本実験条件下ではジブチリル cAMP の効果は認められなかった。

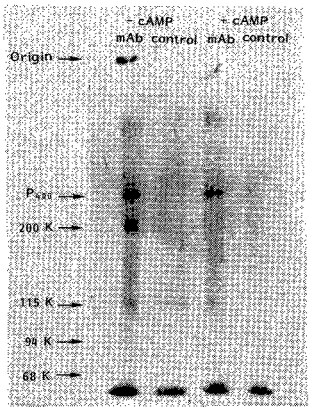


図3

以上の結果より、小脳特異的 P_{400} 蛋白質が、膜に存在する状態で、Aキナーゼと CaM キナーゼⅡによりリン酸化を受けることが明らかとなった。両キナーゼは神経細胞の可溶性分画と同様に、シナプス膜にも多量に存在することが知られており、両キナーゼが P_{400} 蛋白質のリン酸化反応を介してシナプス機能を調節している可能性が考えられ、P_{400} 蛋白質の機能とリン酸化反応との関連についてのより詳しい解析が必要と思われる。本研究の一部は、第61回日本生化学会総会で報告した。

【REFERENCES】

1) Mallet, J., Huchet, M., Pougeois, R., and Changeux, J.P. (1976) Brain Res. 103, 291-312
2) Mikoshiba, K., Huchet, M., and Changeux, J.P. (1979) Dev. Neurosci. 2, 254-275
3) Maeda, N., Nakahira, K., Niinobe, M., and Mikoshiba, K., (1988) J. Neurochem. in press
4) Maeda, N., Niinobe, M., and Mikoshiba, K. (1987) 神経化学 26, 427-429
5) Fukunaga, K., Yamamoto, H., Matsui, K., Higashi, K., and Miyamoto, E. (1982) J. Neurochem. 39, 1607-1617
6) Miyamoto, E., Petzold, G.L., Kuo, J.F., and Greengard, P. (1973) J. Biol. Chem. 248, 179-189
7) Mikoshiba, K., Nagaike, K., and Tsukada, Y. (1980) J. Neurochem. 35, 465-470
8) Yamamoto, H., Fukunaga, K., Goto, S., Tanaka, E., and Miyamoto, E. (1985) J. Neurochem. 44, 759-768
9) Weber, A., and Schachner, M. (1984) Brain Res. 311, 119-130
10) Maeda, N., Miyawaki, A., Niinobe, M., and Mikoshiba, K. (1988) 神経化学

図の説明

図1. 小脳 P2、P3 分画の触媒サブユニットと CaM キナーゼⅡによるリン酸化反応. Autoradiograph (A) と (B) ではオートラジオグラフィーの時間が異なる。

図2. 小脳 P2、P3 分画内での P_{400} 蛋白質のリン酸化反応の時間経過

図3. 小脳神経細胞初代培養系での P_{400} 蛋白質リン酸化反応

21 脳マイクロソームにおけるミエリン PROTEOLIPID PROTEIN のアシル化

由村 健夫　小林 卓郎　後藤 幾生
(九州大学 医 脳研 神経内科)

〔要約〕

中枢神経系ミエリンのproteolipid protein (PLP)はミエリン内でアシル化されることが知られており、PLPのアシル化に特異な酵素がミエリンに存在する可能性が考えられている。しかし、精製したPLPを脳マイクロソームの存在下で[^{3}H]palmitic acidとともにインキュベーションしてもPLPはアシル化され、その程度は脳マイクロソームのfatty acid:CoA ligase活性と平行していた。高いfatty acid:CoA ligase活性を持つ肝マイクロソームとともにインキュベーションするとさらに強くアシル化された。従って少なくともin vitroではPLPは非特異的にアシル化されその程度はfatty acid:CoA ligase活性に依存していることが考えられた。脳マイクロソームのfatty acid:CoA ligase活性はTriton X-100処理では不変で、trypsin処理により50 %に低下したことから、膜の外側(cytosol side)に存在すると思われ、膜の内側(luminal side)にあると想定されるPLPのアシル化アミノ酸に対しては効率的には働かない可能性が示唆された。

PLPはオリゴデンドログリアでpeptide backboneが合成され、小胞体とゴルジ装置を通過したのちミエリンに運ばれることが知られている（１）。PLPの唯一の化学修飾であアシル化はオリゴデンドログリア内ではなく、ミエリンに至ってはじめて起こる（１－３）。In vitroの系においてPLPが[^{3}H]palmitic acidでアシル化される際に、lipidはラベルされなかったことから、PLPに特異的なアシル化酵素がミエリンに存在する可能性が想定された（４）。今回我々は、脂質に対するfatty acid:CoA ligase、acyltransferaseが存在する脳マイクロソームについてPLPのアシル化活性を調べた。

［方法］

１。PLPの精製：ウシ脊髄をchloroform:methanol (2:1)でホモジネートし、可溶成分中のPLPと脂質をchloroform:methanol:0.1M HCl(10:10:1)を溶媒としてSephadex LH-60カラムで分離した。精製したPLPは溶媒を徐々に水に換え水溶性とした。

２．マイクロソームの分離：ラット脳からは0.32 Mの、肝からは0.25 Mのsucroseを用いて、1440xg、10分遠心後の上清をさらに18000xg、10分遠心し、その上清を90000xg、60分遠心して沈澱とし、マイクロソーム分画とした。

３．アシル化活性：100 μgマイクロソーム、100 μg PLPを2 mM ATP, 50 μM CoA, 10 mM $MgCl_2$, 5 μCi [^{3}H]palmitic acidを含む20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4中で２時間インキュベーションした。インキュベーション後アセトンで蛋白を沈澱させ、SDSポリアクリルアミド電気泳動にかけた。ゲル上のPLPバンドをデンシトメーターで定量した後、放射活性を測定した。アシル化活性は、放射活性(dpm)/PLPバンド面積で表した。

４．Fatty acid:CoA ligase活性：100 μgマイクロソームを、2 mM ATP, 50 μM CoA, 10 mM $MgCl_2$, 0.1 μCi [^{3}H]palmitic acidを含む20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4中で20分間インキュベーションした。その後の方法は（５）によった。酵素活性の局在実験ではbufferは0.32 M sucroseを含む20 mM Tris-HCl, pH7.4を用いた。

５．Thiamine pyrophosphatase (TPPase)活性：Tannekoonらの方法（６）によった。

［結果］

1．PLPは脳マイクロソーム存在下で[^{3}H]palmitic acidによりアシル化された。アシル化はCoA濃度に依存性でありCoA濃度の増加とともにアシル化も増加した。またアシル化は脳マイクロソームのfatty acid:CoA ligaseの活性と平行した（図1）。

2．脳マイクロソーム存在下でのPLPのアシル化はcomplete system (ATP, CoA, $MgCl_2$を含む）を100 %とすると、−ATPで 3.8 %、−CoAで 39 %、−$MgCl_2$で 27 % であり、fatty acid:CoA ligaseは、−ATPで 7.2 %, −CoAで 42 % −$MgCl_2$で 15 % であって、PLPのアシル化とfatty acid:CoA ligase活性はほぼ平行した。また肝マイクロソームのfatty acid:CoA ligase活性は脳のそれの4.3倍を示し、PLPのアシル化も3.2倍であった（図2）。ミエリンにもfatty acid:CoA ligase活性は存在し、脳マイクロソームの52 %であった。

3．Fatty acid:CoA ligaseの局在：脳マイクロソーム膜の内側に存在していることがわかっているTPPaseの活性は0.3 % Triton X-100 処理により増加し、trypsin(protein:enzyme=40:1)処理によっては不変であった。Triton X-100, trypsinの同時によりTPPase活性は低下した。従って、取り出した脳マイクロソームは膜内外で正常のオリエンテーションをとっていることが示された。同じマイクロソームにおいてfatty acid:CoA ligaseはTritonX-100で不変trypsinで50 %に低下した。これらから、fatty acid:CoA ligase は膜の外側(cytosol side)に存在すると考えられた(表1)。

［考察］

PLPはfatty acid:CoA ligaseによって活性化されたacyl-CoAにより非特異的にアシル化されることが示された。PLPはミエリンへの移送過程でfatty acid:CoA ligase活性の高い小胞体とゴルジ装置を通過するがアシル化はされない。蛋白のアシル化アミノ酸は細胞膜の外側に出ていると一般に考えられているから、小胞体、ゴルジ装置では膜の内側にあることが想定される。従って、fatty acid:CoA ligaseはそのエステル化されるべきアミノ酸には働かない可能性がある。

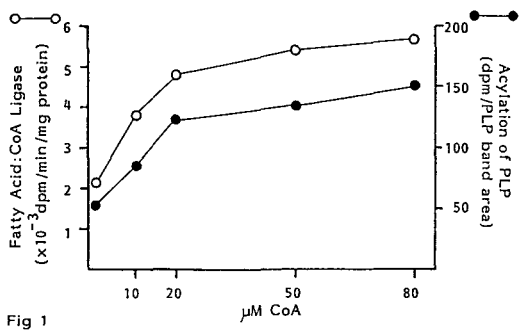


Fig 1

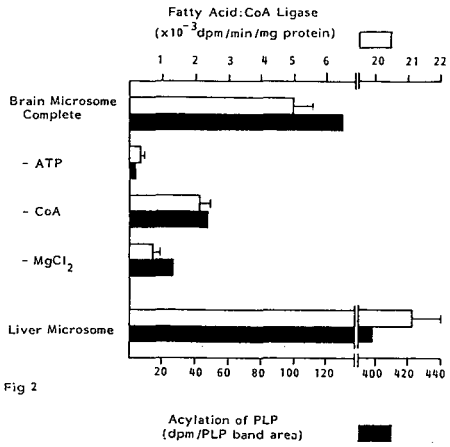


Fig 2

Table 1

	TTPase (nmol/min/mg protein)	Fatty Acid:CoA Ligase (dpm/min/mg protein)
Brain Microsome		
Complete	7.06 (100 %)	4840 (100 %)
+ Triton X-100 (0.3 %)	11.57 (164)	4862 (100)
+ Trypsin	7.34 (103)	2437 (50)
+ Triton X-100 + Trypsin	2.54 (36)	1301 (27)

1) Townsend, L.E., Agrawal, D., Benjamins, J.A. and Agrawal, H.C. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2975
2) Yoshimura, T., Agrawal, D. and Agrawal, H.C. (1987) Biochem. J. 246, 611 3) Bizzozero, O.A., McGarry, J.F. and Lees, M.B. (1987) J. Biol. Chem. 262, 2138 4) Bizzozero, O.A. and Lees, M.B. (1986) J. Neurochem. 46, 630 5) Murphy, M.G. and Spence, M.W. (1980) J. Neurochem. 34, 367 6) Tannekoon, G. Zaruba, M. and Wolinsky, J. (1983) J. Cell Biol. 97, 1107

22 一部の中枢ニューロンを染める抗体群

藤田　忍、林　基治*、松村道一*
（群馬大・医・薬理、*京大・霊長類研）

〔要約〕
サル大脳より調製した免疫原を用い哺乳類中枢神経系において一部のニューロンの周囲を染める3抗体473，376，528が得られた。抗体528陽性のニューロンは抗体473陽性ニューロンに含まれるのに対し、抗体473と376は一部重複はするが異なるニューロン群を染色する。3抗体ともラット胎児軟骨を染色し、ニューロンと軟骨の染色性はともにコンドロイチナーゼ処理によって消失する。これらの結果は、ムコ多糖様の物質が中枢ニューロンの周囲に存在し、そのムコ多糖エピトープの組成によって中枢ニューロンが何らかのサブタイプに分かれることを示唆している。

ハイブリドーマ技術を利用して組織化学的に特異な分布をなす物質をモノクローナル抗体（MAb）を手がかりに検索することができる（1）。そこで脊椎動物におけるニューロンの分子的多様性とその神経構築における意義を解析することを目的として、我々は神経組織のホモジネート等を免疫原として神経組織切片に対する免疫組織化学的スクリーニングにより特異な結合分布を示す抗体を採集してきた（2）。一部の中枢ニューロン表面を染色するMAb473についてはすでに報告した（3）。このような抗体は他にもいくつか報告されているが（4,5）、複数の抗体によって異なるニューロンのサブタイプを直接示し得た報告はない。今回我々は、さらに２個のMAb376と528を発見し、異なるサブタイプの染め分けを見い出し、抗原物質の性質について手がかりを得たので報告する。

方法

〔抗体の作製〕MAb376はサル大脳皮質ホモジネート、MAb528は473と同様サル大脳の2N酢酸抽出物を免疫原とし、通常のハイブリドーマ実験において、サル脳切片に対する間接蛍光抗体法によるスクリーニングによって発見された。MAb473はIgA、他の2者はIgMである。〔組織化学〕ニホンザルはザンボーニ液で、他は3.5%ホルムアルデヒド／リン酸バッファで灌流固定後、とり出した神経組織を20%庶糖／PBSに沈め、12μmの凍結切片とした。FITCまたはローダミン標識抗マウスIg（カッペル社）を用い間接蛍光抗体法により免疫染色した。組織切片のコンドロイチナーゼABC（プロテアーゼフリー、生化学工業）処理は、0.1M NaCl，50 mM 酢酸ナトリウム、0.1% BSAを含む0.1M トリスバッファーpH8中に1U／mlとした液を37℃2時間作用させて行った。

結果

MAb473，376，528はサル大脳皮質において一部のニューロンを染色する（図A-C）。陽性ニューロンは細胞体と近位の樹状突起の全周に微顆粒状の免疫活性を示し、その染色の強弱はニューロンにより異なるが個々のニューロンでは全周にわたってほぼ一様である。陽性ニューロンの皮質層内分布はサル視覚領において、MAb473陽性（473^+）ニューロンはIII層からVI層にかけて広く分布するのに対し、376^+ニューロンは主としてIII層とVI層に見られる。さらに同一切片上の二重染色によって比較すると（図D,E）、III層に多くの473^+・376^+ニューロンが見られるが、より浅い層では473^-・376^+ニューロンが、より深い層では473^+・376^-ニューロンが認められる。528^+ニューロンはいずれも473^+であり、473^+ニューロン群の一部分をなす。3抗体はいずれもラット脳において反応し、473^+ニューロンと376^+ニューロンはそれぞれ特徴的な分布を示す。たとえば大脳帯状皮質では473^+・376^+ニューロンが多数みられるのに対し、赤核などは多くのニューロンが473^+・376^-であり、一方大脳側頭腹側部（内嗅領）では473^+ニューロンは皆無で、比較的小数の376^+ニューロンが見られるのみである。3抗体ともニワトリ脳では免疫活性はみられなかった。

これらの抗体は多くの末梢臓器を染色しないが、ラット胎児およびニワトリ胚の一部の軟骨細胞を強く染色する。そこ

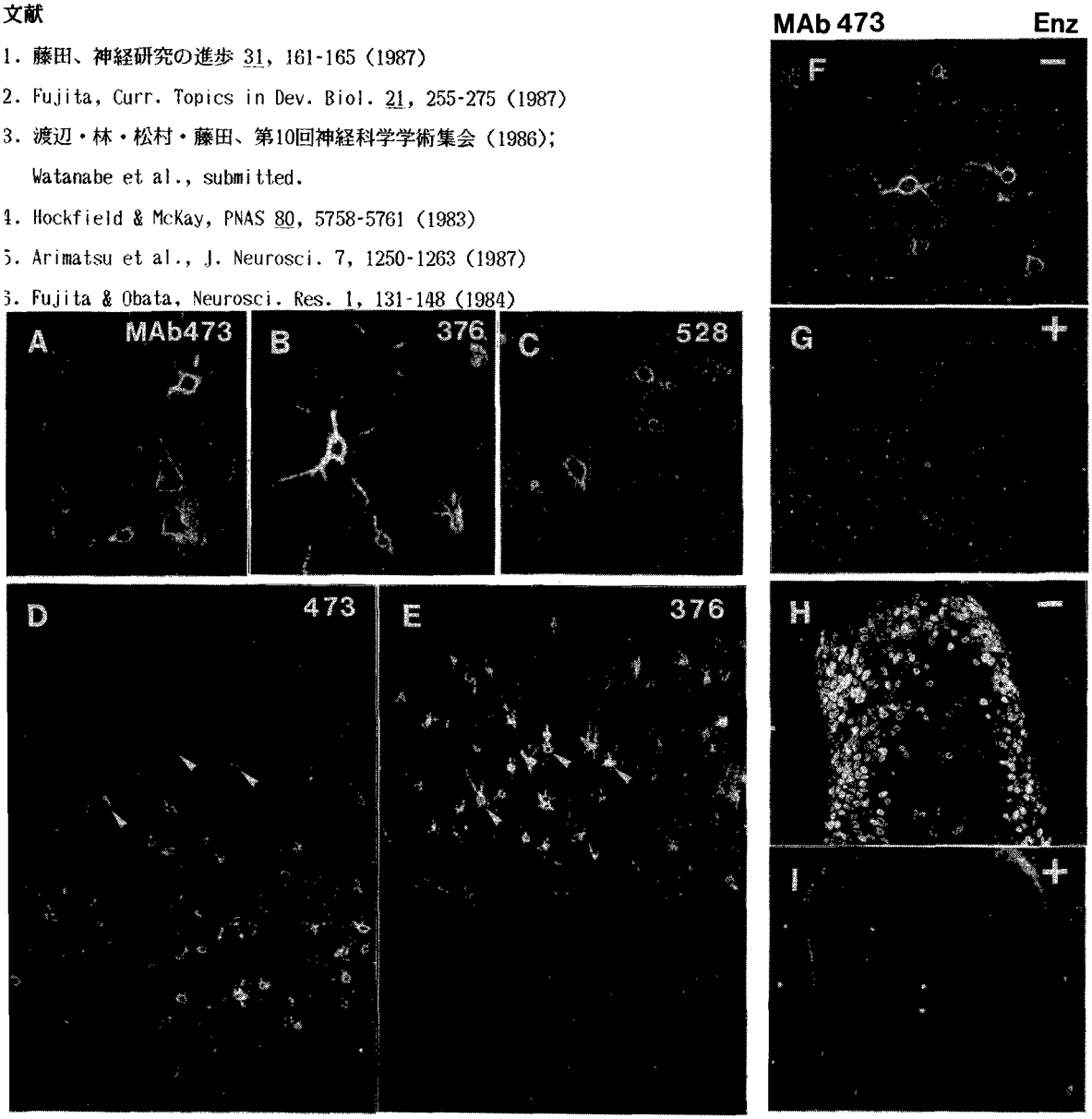
でプロテオグリカンを考え、コンドロイチナーゼABCによって切片を処理したところ、MAb473については軟骨細胞のみならずニューロンの免疫活性も消失した（図F-I）。MAb376についても同様であったが、MAb528ではニューロンの染色性はほぼ消失したが軟骨の染色性は逆に増強した。このことはMAb528のエピトープがMAb473と異なることを示す。コントロールとしたMAb95H2（6）では酵素処理によって変化を認めなかった。

考察

MAb473，376，528はサル・ネコ脳における陽性ニューロンの分布より、すでに報告されているCAT-301（4）、VC1.1およびVC5.1（5）と異なると考えられる。MAb473と376の同一切片上の二重染色によって、脊椎動物中枢神経系において表面抗原の異なるニューロンのサブタイプが存在することが初めて示された。両抗体ともそれぞれ10-20%程度のニューロンしか染色しないことから考えて、中枢ニューロンの多様なサブタイプの存在が予想され、それを明らかにする抗体の作製が期待される。3抗体ともその染色性がコンドロイチナーゼ処理によって著しい変化を受けることから、エピトープはムコ多糖様物質であることが示唆される。このような視点から脳における多糖類の意義を再検討する必要がある。

文献

1. 藤田、神経研究の進歩 31，161-165（1987）
2. Fujita, Curr. Topics in Dev. Biol. 21, 255-275 (1987)
3. 渡辺・林・松村・藤田、第10回神経科学学術集会（1986）;
   Watanabe et al., submitted.
4. Hockfield & McKay, PNAS 80, 5758-5761 (1983)
5. Arimatsu et al., J. Neurosci. 7, 1250-1263 (1987)
6. Fujita & Obata, Neurosci. Res. 1, 131-148 (1984)



23　ウシ脳膜分画より平滑筋α－アクチニン抗体と免疫学的交叉性を示す２種類の蛋白質の精製

小澤健太郎、祖父江憲治
（阪大・医・バイオ・神経生化）

〔要約〕
神経系におけるシナプスの形成およびその維持には、細胞骨格系が重要な役割を果している。我々は、ウシ大脳皮質粗シナプス膜のTriton 不溶性画分を低イオン強度で抽出するとこの抽出した抽出液中に、平滑筋α－アクチニン抗体と免疫学的交叉性を示す２種類の蛋白質が存在することを見い出した。この２種の蛋白質を、セファロースCL-6Bカラム、ハイドロキシルアパタイトカラム、セファクリルS-300カラムを用いて分離、精製した。この２種類の蛋白質は、SDS-PAGE上分子量約100kDaであり、このいずれもがアクチンとの結合性を示した。分子量、免疫学的交叉性、アクチンとの結合性より、この２種類の蛋白質はウシ脳に由来するα－アクチニン関連蛋白質であると考えられる。

シナプスの構造維持およびその機能発現にとって、細胞骨格の必要性が認識されてきている。殊に、近年シナプス部での分子解剖学的解析が進展するにつれ、シナプス膜と細胞骨格系をつなぐ接点蛋白質の存在が重要視されている。これまでに、カルスペクチン（非赤血球スペクトリンまたはフォドリン）・4.1蛋白質(4)・アンキリン様蛋白質(2)などの存在が報告されている。今回我々は、ウシ大脳皮質シナプス膜分画のTriton 不溶性画分からカルスペクチンを抽出する過程で、ニワトリ砂嚢平滑筋α－アクチニン抗体と免疫学的交叉性を示す２種類の分子量約100kDaの蛋白質が大量に抽出されてくることを見い出し、この蛋白質を精製した。

［方法］100kDa蛋白質の精製：ウシ大脳皮質よりシナプス膜分画を調整し、Tritonで処理した後、Triton不溶性画分を低イオン強度で抽出した。この抽出液よりセファロースCL-6Bカラム・ハイドロキシルアパタイトカラム・セファクリルS-300カラムを用いて２種類の蛋白質を精製した。

アクチン：Spudich & Wattの方法により、ウサギ骨格筋より精製した(7)。

イムノブロット法：ニワトリ砂嚢平滑筋α－アクチニン抗体を用いて、既報(4)に準じて行った。

α－アクチニン抗体：ニワトリ砂嚢平滑筋より精製したα－アクチニンを家兎に免疫し、得られた抗血清より、精製α－アクチニンをカップルしたアフィニティカラムでα－アクチニン特異抗体を精製した。SDS-PAGEはLaemmliの方法で行った(5)。

［結果］図１はセファロースCL-6Bカラムの

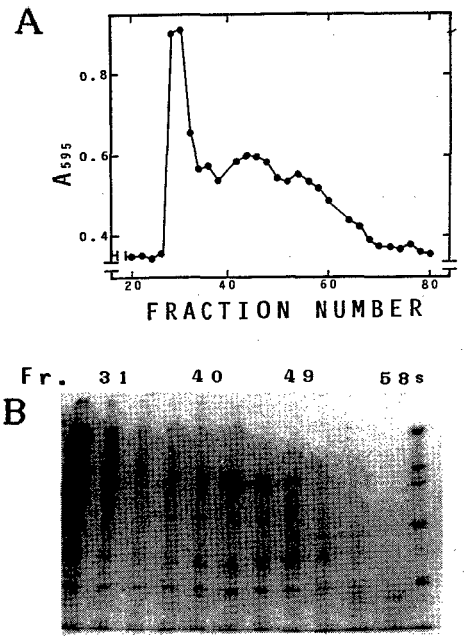


図１．Sepharose CL-6B gel chromatography A，蛋白質溶出パターン；B，SDS-PAGE (S)MWマーカー

溶出パターンを示す。SDS-PAGE上、分子量100kDaに相当する分画（フラクションNo.40-47）を集めHPLCのハイドロキシルアパタイトカラムにアプライし、10-350mMのphosphate linear gradientで溶出した。100kDa蛋白質は２つのピークに分離された（図２）。各ピークをさらに、セファクリルS-300ゲルクロマトグラフィーを行って精製した。得られた２種類の蛋白質の分子量は、SDS-PAGE上大むね100kDaと算定されるが、両者を詳細に検討するとわずかに易動度の差を認めた。最終的に精製した２種の蛋白質のいずれもが、イムノブロット法で平滑筋α－アクチニンと免疫学的交叉性を示した（図３）。また、両蛋白質ともに遠心法でＦ－アクチンと結合することが証明された。

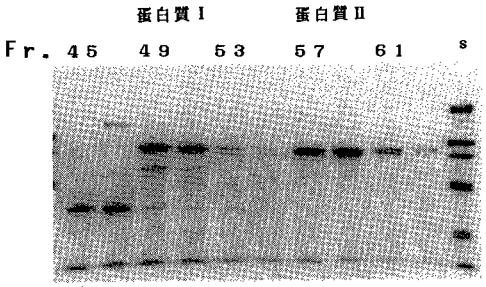


図２．hydroxylapatite column chromatography溶出分画のSDS-PAGE (S) MWマーカー

［考察］近年、α－アクチニンが種々の非筋肉細胞（Hela細胞(4)、血小板(5)、ニワトリ脳(6)）にも存在することが報告されている。興味深いことに、これら非筋肉細胞のα－アクチニンはアクチンとの相互作用において Ca^{++} 感受性を示すことである。特にHela細胞では２種類のα－アクチニンの存在が報告されている。今回、我々は、ウシ脳膜分画より、平滑筋α－アクチニン抗体と免疫学的交叉性を示す２種類の分子量約100kDa (SDS-PAGE上)の蛋白質を精製した。分子量、免疫学的交叉性、アクチンとの相互作用から２種類の100kDa蛋白質はウシ脳α－アクチニンであると考えられる。現在その性質についてさらに詳細な検討を行っている。また、予備実験の結果では、いずれの蛋白質もアクチンとの相互作用において、Ca^{++} 感受性を示した。

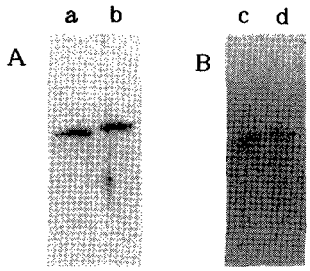


図３．精製した２種の100kDa蛋白質と平滑筋α－アクチニン抗体との免疫学的交叉性（イムノブロット法）
A,SDS-PAGE; B,immunoreplica
a,c,蛋白質Ⅰ； b,d,蛋白質Ⅱ

［文献］

(1)Burridge, K. and Feramisco, J. R. (1981) Nature 294, 565-567
(2)Davis, J. Q. and Bennett, V. (1984) J. Biol. Chem. 259, 1874-1881
(3)Duhaiman, A. S. and Bamberg, J. R. (1984) Biochemistry 23, 1600-1608
(4)Kanda, K., Tanaka, T., and Sobue, K. (1986) Biochim. Biochem. Res. Commun. 140, 1051-1058
(5)Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685
(6)Rosenberg, S., Stracher, A., and Burridge, K. (1981) J. Biol. Chem. 256, 12986-12991
(7)Spudich, J. A. and Watt, S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4866-4871

24 副腎髄質より精製された 74kD－アクチン調節蛋白質

前川昌平

（東大、理、生物化学）

〔要約〕 副腎髄質中のアクチン調節蛋白質をDNase I Affinity カラムを用いて検索し、その内分子量74,000の蛋白質（74k蛋白質）を精製した。アクチンに対しこの蛋白質は low shear の粘度を減少させ、Ca^{++}イオン存在下で臨界濃度を増加させ、monomerからの重合を促進する。Ca^{++}イオン存在下でこの蛋白質がアクチン繊維を切断することが high shear粘度計、超遠心、並びに電子顕微鏡観察より確かめられた。この蛋白質がアクチン繊維に結合することとbarbed endからの繊維の伸張を阻害することから、Ca^{++}存在下でこの蛋白質はアクチン繊維の barbed endに結合しその端をcapすると考えられる。従ってこの蛋白質のアクチンに対する作用はgelsolinの作用とよく似ているが物理化学的並びに免疫学的性質、あるいはアクチンと強い結合体を作らない点でgelsolinとは明らかに異なっている。

「目的」 副腎髄質クロム親和細胞よりのカテコラミン放出にクロム親和顆粒をとりまくアクチン繊維の脱重合が重要な役割を担うと考えられている(1,2)。この細胞中にはgelsolin様の蛋白質の存在が知られているがアクチン繊維の重合状態の調節機構は現在のところ不明である(3)。そこで我々はまず副腎髄質中のアクチン調節蛋白質を検索することを試みた。

「方法」 ウシ副腎髄質よりEGTA存在下、低イオン強度溶液を用いて可溶性画分を得、これを一晩 透析後 Ca^{++}, Mg^{++}存在下で DNase-I カラムにかけ、Ca^{++}存在下、高イオン強度液で洗った後 EGTAで蛋白質を溶出した。得られた画分を次にhydroxyappatiteに吸着させ、リン酸溶液の勾配をかけて蛋白質を溶出した。目的とする画分を続いてDEAE cellulose,及びHPLCによるゲル濾過にかけ最終産物を得た。純度の測定は SDS-PAGEで行い、粘度の測定には low shear粘度計を用いた。
抗体の作製は 精製した蛋白質をSDS-PAGE後対応するbandsを切り出しadjuvantと混合し兎に注射し抗血清を得た。この抗血清を Durapore膜に結合した蛋白質を用いaffinity精製し実験に用いた。
「結果」 DNase I カラムよりEGTAで溶出した画分はSDS-PAGEで数本のbandsを示す。 この内、分子量(MW)84000の蛋白質は抗gelsolin抗体と反応すること、並びにMW42000の蛋白質はアクチンであることは既に知られている。そこで今回MW74000のband（74k蛋白質）を精製することを試み、DNase-I affinityカラム後、上記のカラムを用いることによりこの蛋白質はほぼ均一なbandを示すまでに精製できた。収量は100gの組織より約60 ugであり、74k蛋白質の溶出とアクチン繊維のfalling ball粘度に及ぼす活性は一致しており、この活性は他の蛋白質の混在によるものでは無いと考えられた。

この蛋白質のStokes半径は3.9 nm，S値は4.5Sを示し、推定分子量は74000，SDS-PAGEでも74000のみかけの分子量を示すことより monomerであると考えられる。

Gelsolinと74k蛋白質は免疫学的に区別され、組織分布の違いや物理化学的性質の違いも考え、互いに異なる蛋白質であると結論した。74k蛋白質は他の組織に比較して副腎髄質に多いことがimmunoblottingにより明らかになった。

アクチンに対する効果ー上述した様にこの蛋白質はアクチンのfalling ball粘度を減少させる。DNase I 阻害法でアクチンの臨界濃度を測定すると Ca^{2+}存在下で数倍に増加させることがわかった。High shear粘度計を用いて長さの変化をしらべてみると Ca^{2+}依存的に繊維の長さを短くすることがわかり(図1) この結果は超遠心法、並びに電子顕微鏡観察によっても裏付けられた。 Monomerに加えたときにはCa^{2+}存在下で アクチンの重合を促進することが紫外部での吸収変化やpyrene-labelしたアクチンの蛍光変化によって示された。

Ca^{2+}存在下で 74k蛋白質によってアクチン繊維を切断後ゲル濾過を行ってみると、この蛋白質はアクチン繊維と結合していることがわかった。Ca^{2+}イオン並びに74k蛋白質存在下でアクチン繊維の伸張をみると、barbed endからの伸張が阻害されていた。これらの結果は 74k蛋白質が Ca^{2+}存在下でアクチン繊維を切断し、そのbarbed endをcapすることを示しているが、アクチン分子と強固な結合体を作らない点で すでに知られているgelsolinとは異なっている。

「考察」 副腎髄質よりCa^{2+}依存性のアクチン繊維切断因子を精製した。この作用はgelsolinと類似のものであるがこの蛋白質はgelsolinの様にアクチン分子と強固な結合体を作ることはない。また物理化学的にも免疫化学的にも両者は区別される。Gelsolin-actin複合体はアクチン繊維のbarbed endをcapする作用を持つが切断する活性は示さないことが知られている。74k蛋白質がアクチン分子と強固な結合体をつくらないことはこの因子がCa^{2+}濃度の変化に応じ繰り返し使用されうることを意味し、伝達刺激に応じた分泌という機構に関与するには好都合であると考えられる。

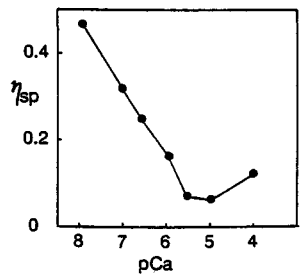


図1．74k蛋白質によるアクチン繊維の粘度変化のCa^{2+}依存性。アクチン、2400nM．74k蛋白質、170nM．

「文献」

1. Cheeck,T.R. and Burgoyne,R.D.(1986) FEBS lett. 207 110-114
2. Cheeck,T.R. and Burgoyne,R.D.(1987) J.Biol.Chem. 262 11663-11666
3. Bader,M-F., Trifaro,J-M., Lanbley,O.K., Thierse,D. and Aunis,D. (1986) J.Cell Biol. 102 636-646

25 網膜におけるＭＥＫＡ蛋白質の局在

郭哲輝・秋山万里子・三木直正
（金沢大学・がん研・薬理部）

網膜に特異的なMEKA cDNAを発現ベクター pEX 1のcro-β-galactosidaseの下流部分に組み込み、MEKA fusion 蛋白質を大腸菌内で合成した。本蛋白質を抗原とし、得られた抗体との組織化学からMEKA蛋白質が光受容細胞に特異的に発現していることがわかった。

網膜と脳とのdifferentialコロニーハイブリダイゼーションにより網膜に特異的なオプシン及びトランスデューシンγcDNAなどを単離し、その性質などを報告してきた(1)。これらとは別のpCR470 cDNAは網膜に特異的なクローンでその塩基配列とアミノ酸配列から本cDNAクローンが未知蛋白質をコードしていることがわかった(2)。この蛋白質のＮ末端のアミノ酸配列がM-E-K-Aと始まることより本蛋白質をMEKA蛋白質と名づけた。MEKA 蛋白質の分子量は、17697(150アミノ酸残基)でそのpIは9.6を示す可溶性蛋白質である。今回、MEKA cDNAを発現ベクター pEX1に組み込みMEKA fusion蛋白質の合成、抗体の作製、組織化学を行なった。

「結果及び考察」

1) PEX1-MEKA plasmidの作製 ； 発現ベクターpEX1-3はStanleyとLuzio(3)から供与された。バクテリオファージλのP_Rプロモーターが挿入されているcro-lacZ gene のfusion plasmidから117 kdの蛋白質が合成される。β-galactosidaseとMEKA蛋白質のリーディングフレームを合わせるためにpEX1 plasmidを用いた。β-galactosidaseのＣ末端をコードする領域のSmaI部位に、MEKA cDNA のStuI-PvuII断片(MEKA 蛋白質のアミノ酸18番目からＣ末端までを含み、分子量約15 kd に相応する) を挿入した。pEX1-MEKA plasmidの作製方法とその接合領域の塩基配列を図１に示す。宿主細胞にはNF1(E. Coli K12△H1△trplacZamλNam7Nam53CI857△H1)を使用し、アンピシリン存在下で発育させた。

2) cro-β-galactosidase-MEKA fusion蛋白質の合成 ； 菌体(pEX1-MEKA plasmid)を30℃で50μg/mlのアンピシリンを含むL broth メディウムで発育させた(A_{550}=0.2)のち、さらに42℃ 2時間の振盪を行なった。fusion蛋白質の解析は5%のSDS-PAGEで行なった (図2左). pEX1によるcro-β-galactosidaseの分子量は約120 kdを示すが、PEX1-MEKA plasmid (lane AとB)によるそれは約135 kdを示した。ゲルから蛋白質を切り出し、抽出、回収し(4)、7.5%のSDS-PAGEによる解析の結果を図2右のlane 6に示す。本蛋白質を抗原とし、ウサギより抗MEKA血清を得た。MEKA fusion蛋白質の合成量と時間経過を図2右のlane 1～5 に示した。

3) 抗MEKA血清を用いた組織化学 ； ウシ網膜の切片を、抗MEKA血清と反応させた結果を図3に示す。網膜組織の光受容細胞にのみMEKA蛋白質が発現していることがわかる。光受容細胞内の局在は、opsin蛋白と同様に外節に強い反応が、またouter plexiform layerにもMEKA蛋白質が存在することが認められた。このanti-MEKA血清を菌体/PEX1蛋白質で前処理しても同様な結果が得られた。同様の組織化学実験からニワトリ、ラット、マウスの網膜光受容細胞にもMEKA蛋白質様物質が局在することが認められた。

以上のことより、MEKA蛋白質が光受容細胞に特異的に存在していることがわかった。今後、組織化学、MEKA 蛋白質の精製及びその生理機能を明らかにしていきたい。

「文献」

1 Kuo, C-H. et al. (1986) Mol. Brain Res. 1, 251-260
2 郭哲輝ら (1987) 神経化学 26, 55-57
3 Stanley, K.K. and Luzio, J.P. (1984) EMBO J. 3, 1429-1434
4 White, R.A.H. and Wilcox, M. (1984) Cell. 19, 163-171

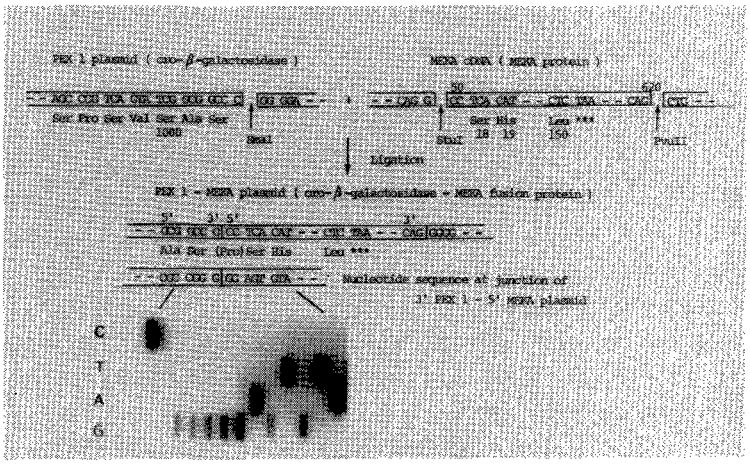


図1. pEX1-MEKA plasmidの作製
発現ベクターpEX1のSmaI部位にMEKA cDNAを挿入した。塩基配列はpEX1とMEKA cDNAの接合部位を示す。

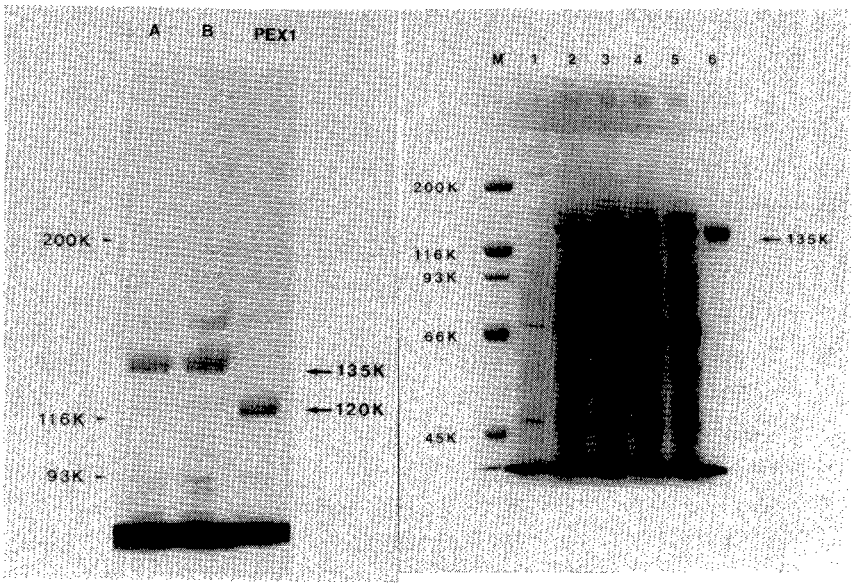


図2. MEKA fusion蛋白質の合成
左) A,B; MEKA fusion蛋白質
pEX1; cro-β-galactosidase
右) lane 1～5; 42℃での振盪時間(0, 1/2, 1, 2, 4 hr)とMEKA fusion蛋白質の合成
lane 6; 回収MEKA蛋白質

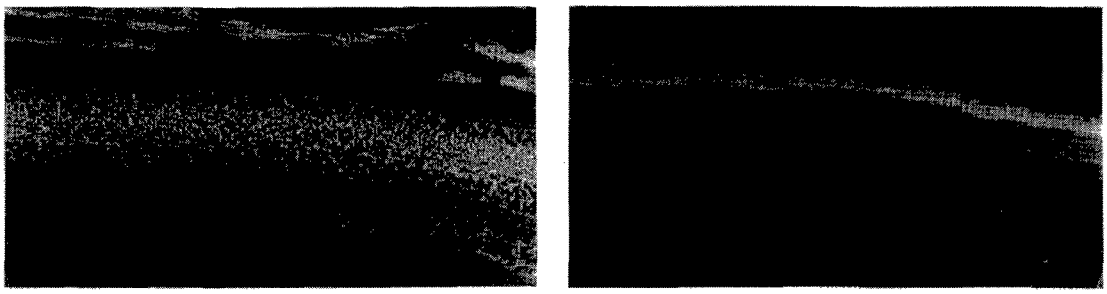


図3. 抗MEKA 血清を用いたウシ網膜切片の組織化学

26 脳におけるレチノールおよびレチノイン酸結合蛋白について

北本年弘1、熊谷博道2、桃井隆1
（国立精神神経センター1、旭硝子2）

〔要約〕 ヒト神経芽細胞ＩMR－３２には、分子量１５Ｋの細胞内レチノイン酸結合蛋白（ＣRABP）以外に、レチノイン酸に特異的に結合する未知の高分子量蛋白（HM－RABP）が存在していた。ＣRABPは、ヒトグリオブラストーマ（MGC）及び、ラットアストログリオーマ（C６）では検出されないのに対し、HM－RABPは双方に検出された。
マウス腹腔にレチノール（レチノイン酸前駆体）を負荷すると、速やかに脳に移行することから、脳におけるＣRBP、ＣRABP及び、HM－RABPを検索した。脳ではＣRBPはこう丸、肝臓と同様に存在しており、ＣRABPもこう丸の１／２０－１／５０、HM－RABPは１／２－１／４存在していることが判明した。 レチノイン酸は細胞培養系でのみ有効な薬物ではなく、血中のレチノールが脳に運搬され、ＣRBPおよびＣRABPを介して、レチノイン酸が合成され、脳細胞の分化増殖及び維持に働いている可能性が示唆された。

［目的］
レチノイン酸は細胞培養系において神経芽細胞を含む各種癌細胞を分化誘導するだけでなく、最近、個体発生過程におけるモルフォジェンとしての機能が知られるようになった(1)。昨年の本学会で、我々は、ニワトリ神経形成過程におけるレチノイン酸特異的結合蛋白の発現と局在に付ついて報告した。 今回、我々は、レチノイドの神経系における生理機能を調べる目的で、培養細胞以外に、マウス脳におけるレチノールおよびレチノイン酸特異的蛋白の検索を行った。また、ブタ脳より、これら結合蛋白の精製を行い、ＣRABPおよびＣRBPの特異抗体を用いて、その同定を行った。

［方法］
①レチノールおよびレチノイン酸結合蛋白の検出：ヒト神経芽細胞（ＩMR－３２）、ヒトおよびラットグリオーマ細胞（MGC、C６）、およびマウス脳から０．５MNａＣｌを含む２０mMＴｒｉｓHＣｌ（ｐＨ７．５）で抽出を行い、０．５M抽出液５００ｕｌに１０nM^{3}Ｈ－レチノール、あるいはレチノイン酸をくわえ、４°C、８時間インキュベーションした後、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ２００、あるいはＳ３００を用いてレチノール、レチノイン酸結合蛋白の存在を調べた。
②ブタ脳よりのＣRBP、ＣRABPおよびHM－RABPの精製：ＣRBPおよびＣRABPは、ブタ脳（１ｋｇ）の０．１MNａＣｌ抽出液より、HM－RABPは、０．５M抽出液より、ＤＥ５２、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ-Ｓ２００、Ｓ３００、ｐｈｅｎｙｌ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ等を用いて精製を行った。
③イムノブロット：ブタ脳におけるレチノール、レチノイン酸結合蛋白の同定は、ブタこう丸より精製したＣRBPおよびＣRABPの抗体、また、レチノイン酸レセプターのＤＮＡ配列より推定して作成した合成ペプチドの抗体を用いてイムノブロット法により解析した。

［結果］
レチノイン酸により分化誘導され、神経突起を伸長するヒト神経芽細胞ＩMR－３２には分子量１５ＫのＣRABP以外に、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ-Ｓ２００のゲル濾過にて高分子量（９０－１００Ｋ）を示す未知のレチノイン酸特異的結合蛋白、HM－RABPが存在していた（図１）。HM－RABPはMGC，C６などのグリオブラストーマにも同様に検出されたが、ＣRABPは検出されなかった。レチノイン酸が培養細胞以外の実際の神経系においても何等かの生理作用をしている可能性を調べる目的で、マウス腹腔に^{3}Ｈ－レチノールを負荷したところ、こう丸の約１／１００であったが、１５分以内に脳に運搬された（図２）。 マウス脳におけるレチノール及びレチノイン酸結合蛋白を検索したところ、ＩMR－３２細胞にみられるレチノイン酸に特異的に結合する分子量１５ＫのＣRABPと高分子量蛋白HM－RABPが存在していた。これら蛋白の量はこう丸ＣRABPの１／２０－１／５０、HM－RABPの１／２－１／４であった（図３）

。また、レチノール結合蛋白ＣＲＢＰは肝臓およびこう丸とほぼ同量存在していた。

脳におけるこれら結合蛋白は、ブタこう丸より精製したＣＲＢＰおよびＣＲＡＢＰの特異抗体を用いて、イムノブロット法にて確認され、ブタ脳より精製されたこれら結合蛋白のＮ端のアミノ酸配列はブタこう丸のＣＲＢＰ及びＣＲＡＢＰと同一であった。また、部分精製されたＨＭ－ＲＡＢＰはＣＲＢＰおよびＣＲＡＢＰの抗体とは反応しなかった。

［考察］レチノイン酸は培養細胞系での神経芽細胞の分化誘導を促すが、実際の神経系における生理作用は不明であり、脳の機能とどの様に関連しているかは明かではない。本研究により血中のレチノールが脳血液関門に影響を受けずに脳へと運搬されることが判明した。また、レチノールやレチノイン酸に特異的に結合するＣＲＢＰやＣＲＡＢＰが存在することから、脳に運搬されたレチノールがレチノイン酸へと変換され、何等かの神経機能に関与しているものと推測される。また、本実験中に発見された新たなレチノイン酸結合蛋白ＨＭ－ＲＡＢＰは、ＣＲＢＰ、ＣＲＡＢＰとも異なることから、最近その存在が示唆された核内レチノイン酸受容体との関連が問題となるが(2)、レチノイン酸受容体遺伝子から推測される分子量と対応しないことから、現在受容体の一部のアミノ酸配列を合成し、特異抗体を作成しその反応性を検討している。

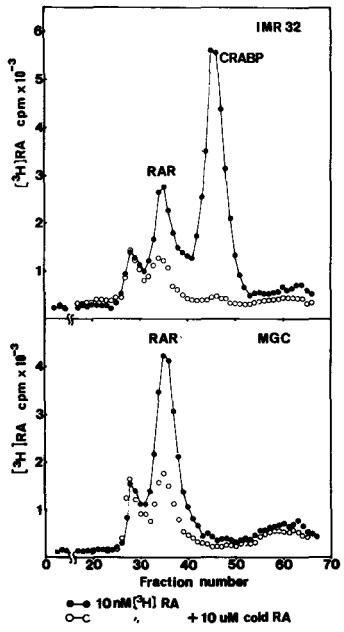


図１：ヒト神経芽細胞における
レチノイン酸結合蛋白

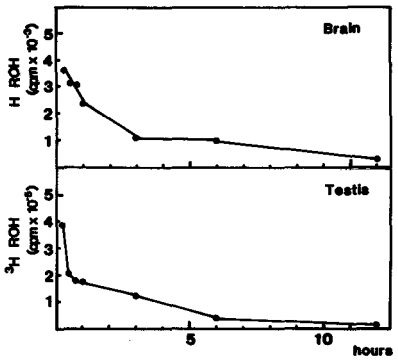


図２：脳およびこう丸へのレチノールの取り込み

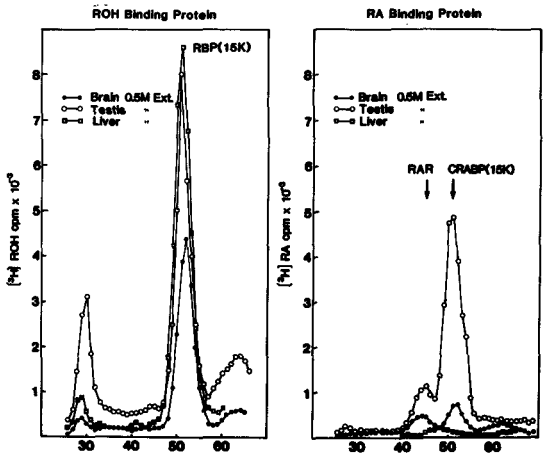


図３：各臓器におけるレチノール、レチノイン酸結合蛋白

［文献］

(1) Tickle, C., Lee, J. and Eichele, G. (1985) Devel. Biol. 109, 82-95.

(2) Petkovich, M., Brand, N.J., Krust, A. and Chambon, P. (1987) Nature 330, 444-450.

27　牛脊髄アセトン粉末よりのグリア線維蛋白質の精製および再構成した線維の形態について

田中潤也　村越和子　多田國利　武田雅俊　西村健
大阪大学　医学部　精神神経科

〔要約〕
牛脊髄アセトン粉末より、0．1M PIPES buffer（pH 6．9）と1M 酢酸を用いて、Crude Neurofilamentを抽出し、これよりDE－52イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて、グリア線維酸性蛋白質とニューロフィラメント蛋白質を精製した。このようにして得たふたつの中間径線維蛋白質は、SDS－PAGE、Western blotting、および再構成した線維に対する電子顕微鏡による観察等によりnativeな性質が保たれていることを示した。今回我々が考案した、アセトン粉末よりのCrude Neurofilamentの調製法は良好な収率をもち、またアセトン粉末が長期間にわたり安定であること、えられたCrude Neurofilamentに中性プロテアーゼ活性が含まれていないこと、さらに超遠心機やテフロンホモジェナイザーを使わず作業の遂行が容易などの利点がある。また、再構成したグリア線維について、複数の線維がより合わさってらせん構造をとるなどさまざまな形態を呈することを示した。

我々は、さきにアルツハイマー病と一部の変性性神経疾患の患者血清中に、抗グリア線維酸性蛋白質（GFAP）抗体が存在していることを報告し、その抗体価の測定はこれらの疾患の診断に有用である可能性を示した［1］。しかし、抗体価の測定に必須なGFAPの精製は必ずしも容易ではなかった。そこで、我々は出発材料を安定な牛脊髄のアセトン粉末とすることができないか検討し、アセトン粉末よりGFAPを分離精製できることを見いだしたので報告する。

材料と方法

i）Crude Neurofilament（C－Nf）の調製；牛脊髄アセトン粉末に0．1M PIPES buffer pH6．9（2mM EGTA，1mM $MgSO_4$，2mM 2－メルカプトエタノールを含む）を10倍量加えポリトロンでホモジナイズし、4℃で1時間攪拌する。次に、これを2万gで遠心し沈渣をとり、10倍量の1M酢酸（2mM EDTAを含む）を加えホモジナイズし1時間攪拌する。これを、遠心して沈渣をとり、更に10倍量の1M酢酸を加えホモジナイズし1時間攪拌、ついで遠心し上清と沈渣をとる。上清は、もう一度遠心して不溶物を除去してから、5M NaOHを攪拌しつつゆっくり滴下してpHを6．8に調節する。沈渣には同様に酢酸の添加、攪拌、遠心を行なって上清をとり、NaOHにて中和する。pH6．8に調節した2回分の上清をまとめて遠心する。得られた沈渣をC－Nfとして－80℃で保存しておく。

ii）DE－52 イオン交換カラムクロマトグラフィー；i）で得たC－Nfを、8M尿素を含む10mM Bis－Tris buffer pH6．5に溶解し、DE－52を充塡したカラムにのせた。溶出は、このbuffer500ml中に、0mMから250mMまでのNaClの濃度勾配を作成し行なった。

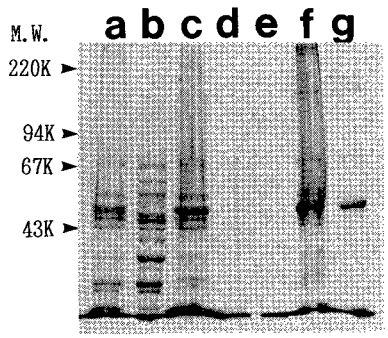
iii）Western blotting；SDS－8%PAGEで精製した蛋白を展開したあと、ニトロセルロース膜に転写し、モノクローナルの抗Nf200K，160K，68K抗体および抗GFAP抗体を第一抗体として反応させ、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識兎抗マウスIgG抗体をもちい4－クロロ－1－ナフトールを基質として発色させた。

iv）線維の再構成と電子顕微鏡による観察；精製したGFAPおよびNf triplet を、それぞれ10mM りん酸buffer pH6．8に対して透析して再構成した線維を得た。これを、2%酢酸ウランで陰性染色し、電子顕微鏡で観察した。

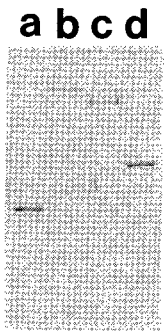
結果

Fig．1にアセトン粉末から、C－Nfが得られるまでの過程を電気泳動像として表した。新鮮な牛脊髄50gから、アセトン粉末は約20g得られた。さらに、20gのアセトン粉末から、約500mgのレーンgのようなC－Nfが得られた。DE－52 カラムクロマトグラフィーでは、GFAP、200K、160K、68K Nf蛋白質の順に溶出された（Fig．2）。Western blottingで、各蛋白の抗原性が維持されているかどうかみたものがFig．3であるが、いずれもそれぞれの蛋白に対するモノクローナル抗体によく反応している。Fig．4は、再構成した線維に対する電子顕微鏡による観察

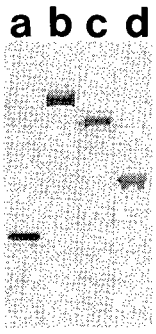
結果を示す。(a)は、グリア線維の像であるが、ｉｎ　ｖｉｖｏでみられるものよりもやや太く、また側鎖やねじれも一部にみられる。(b)も同じくグリア線維のものであるが、いくつかの１０nmフィラメントが集合してねじれ構造をもつ太い線維を形成しているように見える。(c)は、Ｎｆの像で多くの過去の報告のものとほぼ同様である。



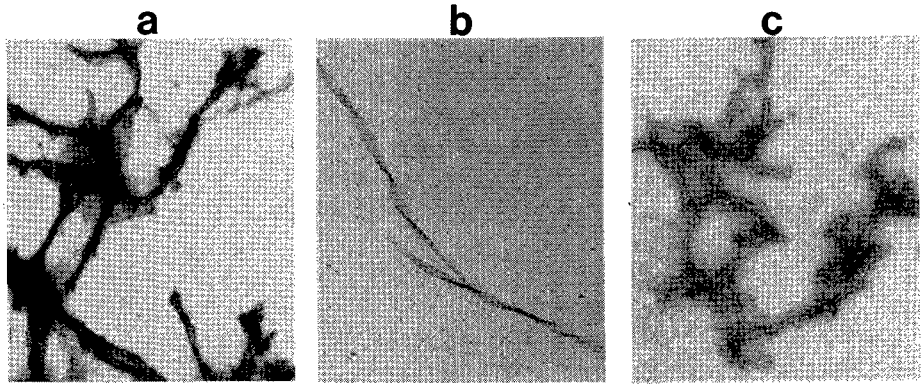
Ｆｉｇｕｒｅ　１
精製過程を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥ
ａ；牛脊髄のアセトン粉末
ｂ；ＰＩＰＥＳｂｕｆｆｅｒで抽出した上清
ｃ；ＰＩＰＥＳｂｕｆｆｅｒで抽出した沈渣
ｄ；酢酸抽出２回目の上清
ｅ；酢酸抽出３回目の上清
ｆ；酢酸抽出したあとの沈渣
ｇ；Ｃ－Ｎｆ



Ｆｉｇｕｒｅ　２
精製したＧＦＡＰと
Ｎｆｔｒｉｐｌｅｔ
（クマシー青染色）
ａ；ＧＦＡＰ
ｂ；Ｎｆ　２００Ｋ
ｃ；Ｎｆ　１６０Ｋ
ｄ；Ｎｆ　６８Ｋ



Ｆｉｇｕｒｅ　３
Ｗｅｓｔｅｒｎ
ｂｌｏｔｔｉｎｇ
ａ；ＧＦＡＰ
ｂ；Ｎｆ　２００Ｋ
ｃ；Ｎｆ　１６０Ｋ
ｄ；Ｎｆ　６８Ｋ



Ｆｉｇｕｒｅ　４
電子顕微鏡写真
ａ；ＧＦＡＰ
ｂ；ＧＦＡＰ
ｃ；Ｎｆ

考察

今回我々が報告したアセトン粉末からの調製法で、新鮮な牛脊髄５０ｇから約５００mgのＣ－Ｎｆが得られており、この収率は良好な数値と考えている。我々は、中間径線維蛋白の重要な性質として、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの線維の再構成能を取り上げ検討し、Ｆｉｇ．４にあるように今回得た中間径線維蛋白は線維の再構成能を保っていることをみた。しかし、Ｎｆ蛋白質については、ほぼ１０nmの線維を再構成することをみたが、ＧＦＡＰはおもに約２０nmの線維を作り、しかも線維にねじれをともなう像がしばしばみられたが（Ｆｉｇ．４ｂ）、これはアルツハイマー病脳にみられるＰＨＦがニューロフィラメント由来であるとの説に関連して興味がもたれる点である。Ｆｉｇ．３に得られた中間径線維蛋白質に対するＷｅｓｔｅｒｎ　ｂｌｏｔｔｉｎｇの結果を示したが、免疫反応性に変化はなかった。更にＡｌｚｈｅｉｍｅｒ病患者血清もやはりＧＦＡＰと反応し、またＧＦＡＰをＣＮＢｒ分解してえられるペプチドマップは従来報告されているものと同一であった［２］。

参考文献　1 Tanaka J.et al, 1988 Biomed Res 9;in press
2 田中ら 1988 神経化学 vol.27 投稿中

28　ヒト血清中の抗ＧＦＡＰ抗体の認識するＧＦＡＰ分子上の抗原決定部位の検討

田中潤也　村越和子　武田雅俊　多田國利　播口之朗　西村健
大阪大学　医学部　精神神経科

〔要約〕

人血清中のグリア線維酸性蛋白質（ＧＦＡＰ）に対する一種の自己抗体が認識する、ＧＦＡＰ分子上の抗原決定部位を調べた。精製したＧＦＡＰをＣＮＢｒで分解し、これを抗原とし、人血清を第一抗血清としてＷｅｓｔｅｒｎ　ｂｌｏｔｔｉｎｇを行ない、ヒトＩｇＧまたはＩｇＭの認識するＧＦＡＰの分解産物をしらべた。また、アルツハイマー型痴呆、多発梗塞性痴呆、および対照群血清のあいだに認識するペプチドにちがいがあるかどうか、さらに陽性率についてもみた。その結果、分子量２万の分解ペプチドが、殆どの場合ヒト血清の認識するものの最小であり、また、ＩｇＭの場合はより大きなペプチドしか認識しない傾向が強かった。ＩｇＭの陽性反応は、全被験血清のうち８５％にみられたが、ＩｇＧでは、５６％であった。疾患別では、若年型アルツハイマー病血清ＩｇＧの陽性率が高く、とくに分子量２万のペプチドをしばしば認識した。これらの結果から、抗ＧＦＡＰ－ＩｇＧとＩｇＭを産生するＢ　ｃｅｌｌクローンは同一ではないこと、ＧＦＡＰは胸腺非依存性抗原として作用し得る可能性があること、またアルツハイマー病患者に免疫系の異常が存在することなどを考察した。

ヒト血清中には、細胞骨格蛋白に対する自己抗体が存在することを示す多くの報告がある。我々も、ヒト血清中に中間径線維蛋白のひとつであるＧＦＡＰに対する自己抗体が存在することを報告した。さらに、ＩｇＧクラスの抗ＧＦＡＰ抗体価が、とくにアルツハイマー病で上昇していることを示した［１］。今回、我々は、ヒト抗ＧＦＡＰ抗体の認識するＧＦＡＰ分子上の抗原決定部位についてＧＦＡＰの化学分解産物に対するＩｍｍｕｎｏｂｉｏｔｔｉｎｇを行ない検討した。

材料と方法

ｉ）ＧＦＡＰの精製；牛脊髄アセトン粉末からＰＩＰＥＳ　ｂｕｆｆｅｒと酢酸を用いてＣｒｕｄｅ　Ｎｅｕｒｏｆｉｌａｍｅｎｔ分画を調製し、これよりＧＦＡＰをＤＥ－５２カラムクロマトで精製した［２］。

ii）ＣＮＢｒ分解；精製した牛ＧＦＡＰ１㎎を７０％ぎ酸１㎖に溶かし、これに８０㎎のＣＮＢｒを加え、３７℃で２４時間反応させたあと１０倍量の水を加えて凍結乾燥させた。

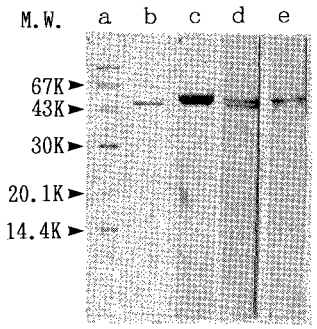
iii）ヒト血清；若年型アルツハイマー病２０例（ＡＤ）、アルツハイマー型老年痴呆１３例（ＳＤＡＴ），多発梗塞性痴呆１８例（ＭＩＤ）、ＡＤにほぼａｇｅ－ｍａｔｃｈさせた対照群３５例（Ｃｏｎｔｒｏｌ）の血清を集めた。

iv）ＳＤＳ－ＰＡＧＥとＷｅｓｔｅｒｎ　ｂｌｏｔｔｉｎｇ；ii）でえたペプチドを、１５％ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、これをニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を、短冊に切り、５％スキムミルクートリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）でブロッキングした。ヒト血清を６５倍希釈し（全量３．２５㎖）、短冊とともに小試験管中にいれ、室温で１２時間以上十分に免疫反応を行なわせた。１％スキムミルク－０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０－ＴＢＳで洗浄ののち、第二抗血清として、抗ヒトＩｇＧまたはＩｇＭペルオキシダーゼ標識ヤギＩｇＧ（ＫＰＬ）を１０００倍希釈して室温で２時間反応させた。同様に洗浄ののち、４－クロロ－１－ナフトールを基質として発色させた。なお、第一抗血清として、モノクローナルのマウス抗ＧＦＡＰ抗体（Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈ）およびポリクローナルのウサギ抗ＧＦＡＰ抗体（コスモバイオ）も用いた。

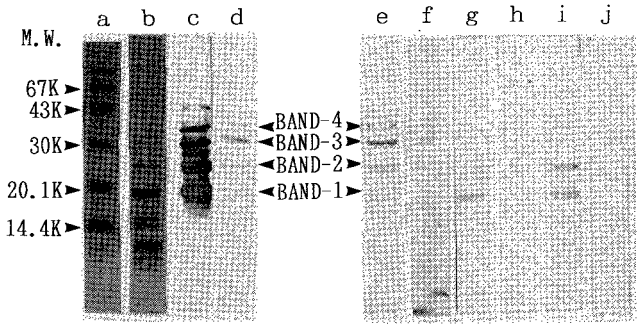
結果

精製した牛ＧＦＡＰの、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ像とＡＤ血清による免疫染色の結果をＦｉｇ．１に示した。ＡＤ血清中のＩｇＧとＩｇＭがともに、モノクローナル抗ＧＦＡＰ抗体の認識するＧＦＡＰのバンドを染めているが、ＩｇＧのほうがＩｇＭよりも強く反応している。多くの他のヒト血清でも同様にＩｇＧの反応のほうが強かった。Ｆｉｇ．２では、ＣＮＢｒ分解したＧＦＡＰのＳＤＳ－ＰＡＧＥ像と、ポリクローナルとモノクローナル抗ＧＦＡＰ抗体およびヒト血清による免疫染色の結果を示している。ポリクローナル抗体がわずかに分子量２０ＫＤ以下のバンドと反応しているが、モノクローナル抗体もヒト血清も反応する最小のバンドは２０ＫＤのＢＡＮＤ－１までであった。これは、過去の報告におけるモノクローナル抗体を用いた検

索結果と一致している［３］。また、ＩｇＧは主にＢＡＮＤ－１と、ＩｇＭはＢＡＮＤ－２および３と反応する。ＩｇＭの反応はやはりＩｇＧに比べ多くの場合弱い。疾患別では、ＡＤ血清のＩｇＧがＢＡＮＤ－１を認識する率が高く、またＳＤＡＴ血清の陽性率が低かった（Ｔａｂｌｅ）。ＭＩＤとＣｏｎｔｒｏｌの陽性率は同程度であった。ＩｇＭの場合、全被験血清をあわせた陽性率は、８４．９％におよび、きわめて一般的に存在する抗体であることがわかる。一方ＩｇＧについては、５５．８％の陽性率であった。



Ｆｉｇｕｒｅ－１
牛ＧＦＡＰに対する
Ｉｍｍｕｎｏｂｌｏｔｔｉｎｇ
ａ；分子量マーカー　ｂ；ＧＦＡＰのクマシー青染色　ｃ；モノクローナル抗体による免疫染色　ｄ，ｅ；ＡＤ患者血清による染色（ｄ；ＩｇＧ，ｅ；ＩｇＭ）



Ｆｉｇｕｒｅ－２
ＣＮＢｒ分解したＧＦＡＰに対するＩｍｍｕｎｏｂｌｏｔｔｉｎｇ
ａ；分子量マーカー　ｂ；ＣＮＢｒ分解したＧＦＡＰのクマシー青染色　ｃ；ポリクローナル抗体による免疫染色　ｄ；モノクローナル抗体による免疫染色：この抗体が染めだすおもな４本のバンドを分子量の小さいものから順にBAND-1,2,3,4,とした。分子量は順に20K,24K,30K,35Kである。ｅ；ＡＤ患者血清による染色で、ＩｇＧを検出しているが、モノクローナル抗体とほぼ同様の反応をしている。ｆ；ｅと同じ患者血清でＩｇＭを検出しているが、反応は弱くBAND-2,3とのみ反応している。ｇ，ｈ；別のＡＤ患者による染色でｇはＩｇＧ、ｈはＩｇＭの反応である。この例ではＩｇＧはほぼBAND-1のみを、ＩｇＭはBAND-2のみを染めている。ｉ，ｊ；対照血清による染色例であり、同様にｉはＩｇＧ，ｊはＩｇＭを検出している。

Ｔａｂｌｅ－１　ＩｇＧの陽性率

Ｇｒｏｕｐ	ｎ	Band-1	Band-2	Band-3	Band-4	IgG総陽性率
ＡＤ	20	70.0	45.0	20.0	20.0	80.0
ＳＤＡＴ	13	30.8	23.1	7.7	0.0	30.8
ＭＩＤ	18	44.4	44.4	22.2	5.6	50.0
Control	35	48.6	42.9	5.7	8.6	54.3
総計	86	48.8	40.7	12.8	9.3	55.8

Ｔａｂｌｅ－２　ＩｇＭの陽性率

Ｇｒｏｕｐ	ｎ	Band-1	Band-2	Band-3	Band-4	IgM総陽性率
ＡＤ	20	20.0	80.0	60.0	15.0	85.0
ＳＤＡＴ	13	23.1	76.9	38.5	7.7	76.9
ＭＩＤ	18	11.1	88.9	44.4	5.6	88.9
Control	35	42.9	85.7	31.4	5.7	85.7
総計	86	27.9	83.7	41.9	8.1	84.9

Ｔａｂｌｅ－１，２　被験者のグループごとの４本のバンドに対する免疫反応の陽性率（％）
Band-1,2,3,4については、Ｆｉｇ．２で説明した。Band-1のＩｇＧの陽性率をみると、ＡＤでは７０％であるが、その他のグループでは５０％以下である。また、全８６例の集計において、ＩｇＧではBAND-1,2の陽性率が比較的高いのにたいし、ＩｇＭはおもにBAND-2と反応している。

考察

Ｗｅｓｔｅｒｎ　ｂｌｏｔ法を用いて今回の実験のように十分にヒト血清を反応させると、非常に高い頻度で、抗ＧＦＡＰ抗体が検出されることがわかった。Ｓｔｅｆａｎｓｓｏｎらは［４］、ヒト血清の９０％以上に抗ニューロフィラメント抗体（ＩｇＧ、ＩｇＭとも）が検出されたことを報告しているが、我々もこの事実を確認している。ＧＦＡＰはしかしニューロフィラメントとは異なり、ＩｇＭは高い頻度でみられるもののＩｇＧは被験血清の約半数でしか陽性でなく、さらにアルツハイマー病で陽性率が高いという特長がある。ＩｇＭクラスの抗ＧＦＡＰ抗体はその陽性率の高さ、大きなペプチドとしか反応しない点、反応自体の弱さなどから考えてかなり特異性の低い抗体ではないかと考えられる。また、中間径線維蛋白自体がポリクローナルＢ　ｃｅｌｌアクチベーターとして作用し、ＩｇＭクラスの抗体の産生は胸腺非依存性に行なわれ、ニューロフィラメントなど他の中間径線維蛋白とも交差する可能性がある。一方、ＩｇＧについては多くの場合認識するバンドがＩｇＭと異なることから、ＩｇＭからのクラススイッチによって生じてくるものではないと考えられる。さらにＩｇＧ抗体の頻度がアルツハイマー病で高く、また抗体価もかなり特異的に高いことから［１］、ＩｇＧクラスの抗ＧＦＡＰ抗体にはなんらかの病理学的背景－Ｔ　ｃｅｌｌ系の異常や外来抗原による刺激など－の存在が推定される。

参考文献
１、Tanaka J et al,1988 Biomed Res 9;in press　２、田中ら、1988 神経化学　vol.27 投稿中
３、羽賀ら、1985 神経化学　vol.24;235-237　４、Stefansson K.et al 1985 Science 228;1117-1119

29 ヒト白血病ウイルスⅠ型（HTLV－Ⅰ）遺伝子によるラットグリオーマの形質転換

澤田誠[1)]、錫村明生[2)]、倉田のり[1)]、吉田光昭[3)]、丸野内棣[1)]
[1)]藤田学園保健衛生大学医学部応用細胞、[2)]同神経内科、[3)]癌研ウイルス腫瘍

〔要約〕

HAM(HTLV-I-associated myelopathy) はヒト白血病ウイルスⅠ型(HTLV-I)の中枢神経系感染により生じる新しい神経疾患で、白血病による二次感染で生じる神経障害とは明らかに異なる性質を持つ。病体としては脱髄を中心とする変性が脊髄に見られ、グリア細胞系の障害が大きい。我々はHTLV-I遺伝子のうちトランス調節性タンパクをコードするpX遺伝子をラットグリオーマに導入し、その形質変化を調べた。pXの発現ベクターのpMTCXdbをラットグリオーマのC6,GA-1,GE12 にリン酸カルシウム法の変法により導入し、得られた形質転換細胞能勢異質を調べたところ、クラスⅠMHC抗原の発現が増大していた。これはメタロチオネインプロモーターの誘導によりさらに増大した。ネオマイシン耐性遺伝子を持つN2プラスミドとのcotransfectionで得られたstable transformantでも同様に変化がみられた。この結果はHTLV-Iの中枢神経感染およびHAM 発症のメカニズムに何らかの関連を持つと考えられる。

【目的】 最近、ヒト白血病ウイルスⅠ型(HTLV-I)は血液中のＴ細胞に感染して癌化を引き起こすばかりでなく特定の神経疾患にも関与することが報告され、HAM(HTLV-I-associated myelopathy)と命名された(1)。HAM の臨床症状としては歩行障害、排尿障害、感覚障害などがあり、剖検例では単核球系細胞の浸潤を伴う脱髄を中心とした病態が脊髄でみられることより、グリア細胞への特異的な作用が考えられている。しかし神経細胞やグリア細胞へのウイルスの直接の感染は報告されていない。一方、HTLV-IウイルスはpX遺伝子を持つトランス調節型のウイルスで、この遺伝子の作用により感染細胞の遺伝子を活性化しその生物学的性質を変えることが知られている(2)。我々はグリア細胞へのpXの作用を調べる目的でラットグリオーマにpX発現ベクターを導入し形質変化について調べた。

【方法】 pX遺伝子を発現するプラスミドとしてpMTCXdb(2)を用いた。pMTCXdbはpX遺伝子の第一第二エクソンにdeletionがあって効率よくpX^{40}タンパクを発現し、さらに重金属やLPSなどにより発現を増大することができる。この遺伝子を用いてtransient expressionでのpXタンパクの作用の解析とselection markerとしてNeo^{r}遺伝子を持つN2プラスミドをcotransfectして得られたクローンでの解析を行った。dishあたり5x10^{5}個でseedし一晩培養したラットグリオーマ(C6,GA-1,GE-12)に10-20μgのDNA をChen and Okayama(3)の方法に従いtransformationを行った。transient expression系では一晩培養後洗浄し、誘導試薬存在下または非存在下でさらに２日培養した後、実験に用いた。N2をcotransfectionした細胞は洗浄後、２日間培養した後split しG418を加えてselectionし10-15個のクローンをえた。得られた細胞を誘導試薬やグリア細胞刺激因子で刺激し実験に用いた。細胞内でのpXタンパクの発現はpLTR-CATをレポーター遺伝子として用い、CAT 活性を指標にして調べた。

【結果および考察】 transient expression系およびstable transformant の両者でpX遺伝子を発

現させると３種類のラットグリオーマのクラスＩMHC 抗原の発現が促進された。これはZn^{2+}やLPSなどの誘導試薬でより増強された。このときの細胞増殖は変化しなかった。またpX遺伝子の発現によってcrude lymphokines によるクラスＩMHC 抗原の誘導が増強した。

pX遺伝子はtat geneとして知られており、IL2 レセプター遺伝子のプロモーター領域に作用してその発現を誘導することが知られている。今回我々の報告によりpX遺伝子はグリア細胞系でMHC の発現にも影響することが明らかになった。最近、HTLV-I感染でATLLが発症する場合とHAM が発祥する場合にHLA のハプロタイプにそれぞれ特有のものがあると報告され(4),今回のpXタンパクによるMHC 誘導には何らかの意義があるものと考えられる。またグリア細胞のうちのアストロサイトは刺激によりcytotoxic factorを放出するのでpXにより液性因子の放出にも誘導がかかればHAM で見られる脱髄のメカニズムについてある程度説明ができることになる。この点については現在検討中である。

HTLV-Iの脳内感染については現在までに剖検例が少なく、神経細胞やグリア細胞中にウイルスは見いだされていない。しかし今回の報告でグリア細胞系の細胞にウイルス遺伝子を導入するとMHCなどの発現に変化がみられ何らかの形質転換が起こることが明らかになったことから、ウイルスのグリア細胞への直接感染も考えられる。

【文献】

1.Osame et al. Lancet i, 1031 (1986).

2.Inoue et al. EMBO J. 5, 2833 (1986).

3.Chen and Okayama Mol.Cell.Biol. 7, 2745 (1987).

4.Usuku et al. Ann,Neurol. 23,S143 (1988),

30 Spot 35蛋白遺伝子の発現

山国 徹[*] 今村幸治[**] 三井宏美[**] 荒木一明, 桑野良三, 高橋康夫

(新潟大学脳研, 神経薬理, 新潟大学理学部, 生物[**], [*]現所属：三菱化成生命研)

〔要約〕

小脳Ca結合蛋白, Spot 35のcDNAをプローブとして以下の様な実験結果を得た。

(1) Spot 35 mRNAのサイズはラットで約1500bであり, 牛ではそれより少し大きい。

(2) 発達時のラット小脳のpoly(A)$^+$RNAのdot blot分析によりSpot 35 mRNAが生後1−20日の間に急上昇することを見出した。

(3) Spot 35 mRNAは小脳のみに存在し, 大脳皮質, 海馬, 線状体などには存在しない。

(4) ラット遺伝子DNAのSouthern blot分析によると1本或は2本のバンドが見出され単一コピー遺伝子であることが明らかになった。

(5) Spot 35遺伝子のクローニングに成功しその構造を検討した。

約10年前に二次元電気泳動法によって小脳に特異的に局在する蛋白を発見し, Spot 35蛋白と名付けて現在まで研究を続けて来た。その間この蛋白の精製とその性質の研究を行いCa結合蛋白であることを見出すと共に, 免疫組織化学によるその分布, 小脳発達時のその変化, cDNAクローニングによるその一次構造の解明などを行って来た。[1-7] 今回はその後の研究について報告したい。即ち得られたcDNAをプローブとして検討したNorthern blot分析, dot blot分析, Southern blot分析, 遺伝子解析などの結果について述べたい。

方　　法

プローブとしてはSpot 35 cDNA(pRS 35−7)からEcoR I−Pvu II断片(800 bp)を切り出し^{32}Pラベルして使用した。

RNAはラット小脳, 大脳皮質, 海馬, 線状体などの各部位の細胞質分画からフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール法で抽出した。poly(A)$^+$RNAは細胞質RNAよりOligo(dT)セルローズクロマトグラフィーで分離した。

Northern blot分析にはホルムアミド処理した後, poly(A)$^+$RNAをアガロース電気泳動を行いニトロセルローズフィルターにblotしてから^{32}P cDNAとhybridizeした。大体Thomasの方法に従った。

RNAのdot blot分析はpoly(A)$^+$RNA或は細胞質RNAを直接ニトロセルローズフィルターにスポットしてThomasの方法に従って行った。

Southern blot分析はラット脳から抽出した遺伝子DNAを各種制限酵素で切断後, アガロース電気泳動を行いニトロセルローズフィルターにblotしてから^{32}P Spot 35 cDNAとhybridizeさせた。大体Southernの方法に従った。

遺伝子DNAのクローニングはラット遺伝子DNAライブラリーをSpot 35 cDNAをプローブとしてplaque hybridization法(Benton-Davis法)によってスクリーニングを行い陽性プラークを見出しそれよりDNAを抽出し制限酵素マップを作製すると共にMaxam−Gilbert法, Sanger−Messing法によって塩基配列の決定を行った。

実験結果と考察

Spot 35 mRNAのサイズ —— ラット及び牛の小脳のpoly(A)$^+$RNAのNorthern blot分析の結果, ラットの

Spot 35 mRNAのサイズは約1900bであり牛はそれより少し大きかった。恐らくnoncoding領域の長さの差によるのであろう。

発達期の小脳のSpot 35 mRNAレベルの変化── 生後1, 5, 10, 20, 30, 40, 60日のラットの小脳の細胞質RNAのdot blot分析の結果はSpot 35 mRNAが1－20日の間に急速に増加することを示している（図1）。このデータは免疫組織化学の成績や網状赤血球ライゼートによる翻訳系での実験データとよく一致していた。

ラット脳各部位におけるSpot 35 mRNAの分布──大脳皮質，小脳，海馬，線状体の細胞質RNA及び肝臓rRNAのdot blot分析の結果はSpot 35 mRNAが小脳にのみ局在することを示した（図2）。この成績は以前の二次元電気泳動法による蛋白分析の結果ともよく一致していた。

Southern blot分析──ラット遺伝子DNAをEco R1, Bam H I, Pst I, Hind Ⅲで切断してからSpot 35 cDNAをプローブとしてSouthern blot分析を行ってみると前二者の場合は1本，後二者の場合は2本のバンドが見出された。このことはSpot 35遺伝子がハプロイドあたり単一コピーとして存在することを示している。そこで遺伝子DNAのクローニングを行うと考えた。

遺伝子DNAクローニング──ラット遺伝子ライブラリーをSpot 35 cDNAをプローブとしてスクリーニングすると現在までに2コのファージクローンが得られた。現在これらのクローンから得られたDNAの制限酵素地図を作成すると共に塩基配列の決定を行っているのでエクソン・イントロン配置や遺伝子のサイズなどのデータは間もなく得られるであろう。また最近発表された鶏小腸のCa結合蛋白（Calbindin）の遺伝子構造との比較についても検討されるであろう。

文　　献

(1) Y. Yoshida & Y. Takahashi : Neurochem. Res. 5, 81－96 (1980)

(2) T. Yamakuni et al : Neurosci, Lett., 45, 235－240 (1984)

(3) T. Yamakuni et al : FEBS Lett., 188, 127－130 (1985)

(4) H. Takahashi-Iwanaga et al : Dev. Brain Res. 29, 225－231 (1986)

(5) T. Yamakuni et al : Nucleic Acids Res. 14, 6768 (1986)

(6) T. Yamakuni et al : J. Neurochem. 48, 1590－1596 (1987)

(7) T. Yamakuni et al : J. Neurochem. 50, 282－284 (1988)

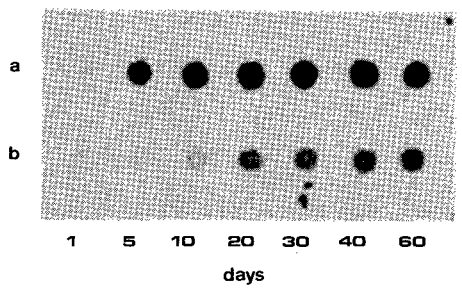


FIG. 1. Developmental changes of mRNA for spot 35 in rat cerebella. Cytoplasmic poly(A) RNA from developing rat cerebella (postnatal, 1–60 days) was spotted onto a nitrocellulose membrane and hybridized with [^{32}P]cDNA, as described in the text. The probe used was the same as in Fig. 2. The concentrations of RNA were 1 μg (a) and 0.3 μg (b).

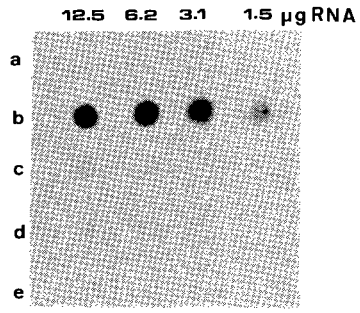


FIG. 2. Regional distribution of spot 35 mRNA in rat brains. The cytoplasmic RNA from various regions of rat brains was analyzed by dot-blot hybridization using [^{32}P]cDNA of spot 35. The probe used was the same as in Fig. 2. a, cerebral cortex; b, cerebellum; c, hippocampus; d, striatum; and e, liver rRNA.

31 新しい脳特異的13,5Kタンパク質の性質と分布について

○中村泰治，中井康光*，落合英彦*，小俣久美子，中条茂男，中谷一泰（昭和大・薬・生物化学，医・解剖*）

〔要約〕

ラットおよび牛脳から新しい酸性タンパク質を単離した。その分子量は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによると13,500で、ゲルろ過法によると55,000であり４量体として存在していると考えられる。グルタミン酸を多く含み、ｐＩは４．３である。アミノ酸１１３残基からなっており、Ｎ末端アミノ酸は、ブロックされている。Ｃ末端より３０残基以内にグルタミン酸の半数以上と全プロリンが局在している。このタンパク質の一次構造のホモロジーを検索したが、今迄報告されているタンパク質とのホモロジーはなかった。本タンパク質の抗体を兎より調整し、オクテルロニー法により体内および脳内分布を調べ、また免疫組織化学的手法により脳および細胞内分布をしらべた。本タンパク質は、（人脳も含む）脳のみに存在していた。脳内には免疫陽性のニューロンが比較的広く分布している。小脳では、プルキンエ細胞の細胞体は陰性で、免疫陽性の軸索終末がプルキンエ細胞体および免疫陰性の神経繊維にシナプス様結合しているのが観察された。

脳にはＳ１００、１４－３－３、neuron specific protein などの酸性タンパク質が特異的に存在することが報告されている。我々は、脳の可溶性分画に新しい酸性タンパク質（１３．５Ｋ）が存在することを既に報告したが（１）、本実験ではその化学的性質を明らかにし、さらに１３．５Ｋタンパク質に対する抗体を作製し体内および脳内分布を調べた。

［方法］　分離精製は前回と同じ方法で行った。１３．５Ｋタンパク質を免疫した家兎より抗体を調整した。アミノ酸配列は、気相シークエンサー（Applied Biosystems 470A）により行った。組織分布は各臓器の可溶性画分を部分精製し、その一定量を用いオクテルロニー法により調査した。脳内分布は、脳切片を非標識酵素抗体法により染色し光顕および電顕を用い調べた。　　［結果と考察］　牛脳から精製した１３．５Ｋを逆相カラムクロマトグラフィーにかけると図１に示すように単一のピークが得られた。このピークを回収し試料としＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析すると、分子量は１３．５ｋＤａと算出された（図２）。ゲルろ過より求めた分子量は５５ｋＤａであることより、水溶液中では四量体として存在すると考えられる。等電点は、４．３であった。表１にそのアミノ酸組成を、酸性アミノ酸である１４－３－３およびカルモデュリンと比較して示したが、グルタミン酸とプロリンが多く、アスパラギン酸とアルギニンが少ないのが特徴である。このタンパク質をリジルエンドペプチダーゼで処理しＨＰＬＣによりペプチドマップを作製し、その各ピークの、アミノ酸配列を決定した。また同様にトリプシンで処理しペプチドマップを作製し、各ピークのアミノ酸配列を決定した。Ｎ末端は、ブロックされていたので、Ｎ末端を含むペプチドに Acylamino acid releasing enzyme を作用させた後アミノ酸配列の解析とアミノ酸分析を行い決定した。これらの結果を綜合し１１３残基の全アミノ酸配列を決定した。図３に本タンパク質のアミノ酸の荷電分布と J.Keite & R.F.Doolittle の方法により求めた Hydropathic index を示した。特色としては、Ｃ末端は親水性に富みグルタミン酸の半数以上（９個）がＣ末端より３０残基以内に存在している。またこの領域には５個の全プロリンが局在している。ＩＤＥＡＳによるホモロジー検索の結果、本タンパク質と同じアミノ酸配列を持つタンパク質は報告されていない。このタンパク質の分布をラットの各組織を用いてオクテルロニー法により調べたところ、脳以外の組織では検出されなかった。人の組織でも脳に存在し、胎盤には見られなっかた（図４）。脳内では、免疫反応産物は、一部の神経細胞にのみ観察された。淡蒼球では暗調顆粒を持ったニューロンに検出された。しかし、プルキニエ細胞の細胞体には見られず、それにシナプス様結合する軸索終末に検出された。我々は更に詳細に脳

図1 HPLC (TMS-250)

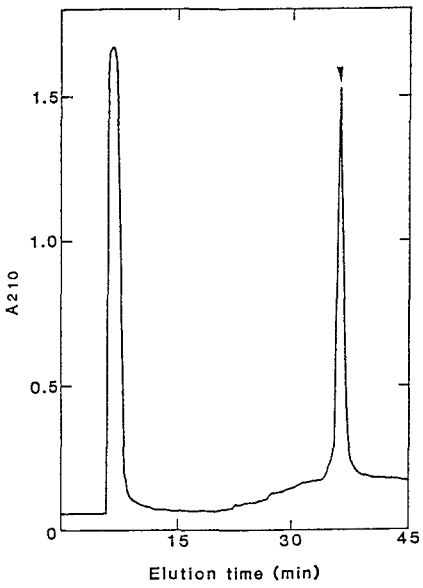
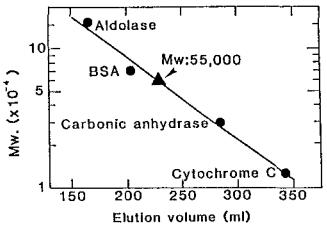


図2 Gel filtration



SDS-PAGE

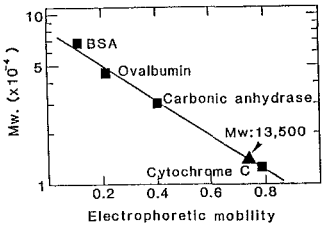


表1 Amino acid compositions of acidic proteins

Amino acid	13.5K	14-3-3(a)	CaM
	mol (%)		
Asp	3.8	11.9	15.1
Thr	5.6	4.5	7.5
Ser	5.3	6.4	3.1
Glu	19.8	19.0	18.2
Pro	6.7	2.5	1.3
Gly	3.7	4.5	7.5
Ala	16.3	8.4	7.5
Cys	-	-	0
Val	10.7	4.5	5.0
Met	3.0	2.6	6.3
Ile	1.8	4.0	5.0
Leu	5.6	9.7	6.3
Tyr	1.8	4.4	1.3
Phe	2.2	2.6	5.0
Lys	12.3	9.2	5.0
His	1.2	1.0	0.6
Arg	0.3	5.1	4.4

図3

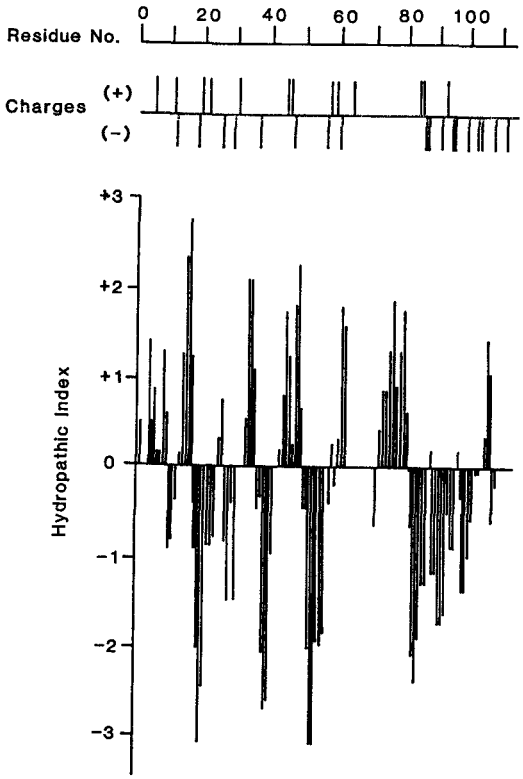
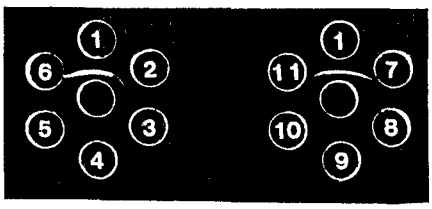


図4 Ouchterlony Method



1: 13.5K Protein
2: Brain
3: Testis
4: Liver
5: Kidney
6: Preimmune serum
7: Lung
8: Heart
9: Spleen
10: Thymus
11: S. muscle

内分布を明らかにすることにより本タンパク質の機能を推定することを意図している。また本タンパク質は、Ca^{2+}結合能はなくＰＤＥ活性可能もないが、さらに他の酵素および機能タンパク質との関連についても検討している。

[文献] 1）中村ら （１９８６） 神経化学 25，３６１

32 ラット及びマウス脊髄のコリンアセチルトランスフェレース；cDNAクローニングと細胞内発現

石井加代子＊，小田恵夫，出口武夫

（東京都神経科学総合研究所・分子神経生物）

〔要約〕

ラット及びマウス脊髄の choline acetyltransferase (ChAT) の cDNA をクローニングし、これを培養細胞に導入して ChAT 活性を発現させた。すなわち、ブタの ChAT cDNA の配列を基に作成したオリゴヌクレオチドをプローブとして、ラット及びマウス脊髄の cDNA-λgt10 ライブラリーをスクリーニングし、それぞれ全翻訳領域を含む cDNA クローンを得、その全塩基配列を決定した。これらの塩基配列は ブタの ChAT cDNA と高い相同性を示し、又 ラットとマウス間では非常に高い相同性があった。Northern blotting 解析を行なったところ、いずれも脊髄の poly(A)⁺RNA のうち 4.4kb のものとのみ反応した。これらの cDNA を発現ベクター pcDL1 に組み込み CHO や N1E115 細胞に導入したところ順方向に組み込んだクローンが顕著で特異的な ChAT 活性を示した。

［目的］ 我々はこれまでに、マウス脊髄運動神経の初代培養系を用い、グリア細胞や筋線維から放出される蛋白性因子や脱分極剤によって choline acetyltransferase (ChAT) の活性が増大し、これが ChAT 分子の増加によるものであることを明らかにした(1～3)。又 交感神経節細胞は培養条件に依存してアドレナリン作動性或はコリン作動性細胞へと分化することが知られている(4)。そこで、コリン作動性神経の分化や機能動態を遺伝子レベルで解明するため ChAT の cDNA 及びゲノム DNA のクローニングとその発現機序を解析することを試みてきた。

［方法］ 我々はウシ脳の ChAT に対する単クローン抗体を用い、ウシ脊髄の cDNA-λgt11 ライブラリーをスクリーニングし、幾つか陽性クローンを得て、その解析を行ってきた［昨年度本学会報告］。最近 Mallet 等(5)はブタの ChAT cDNA をクローニングし、その塩基配列を決定したが、その翻訳領域の5’及び3’末端に相当する51merのオリゴヌクレオチドを作成した。これをプローブとして、ラット及びマウス脊髄の cDNA-λgt10 ライブラリーをスクリーニングし、それぞれ全翻訳領域を含む cDNA クローンを得た。

［結果］ ラットの cDNA は 2.3kb、マウスの cDNA は 2.7 及び 3.6kb であり、制限酵素地図は図１の様になった。これらの塩基配列を解析したところ ブタの ChAT cDNA と高い相同性を示し、又 ラットとマウスの間では非常に高い相同性があった。翻訳領域は 1920bp で 640個のアミノ酸をコードしていた。ラットとマウスの種々の臓器よりpoly(A)⁺RNA を調製し、Northern blotting を行なったところ、両動物種とも脊髄に

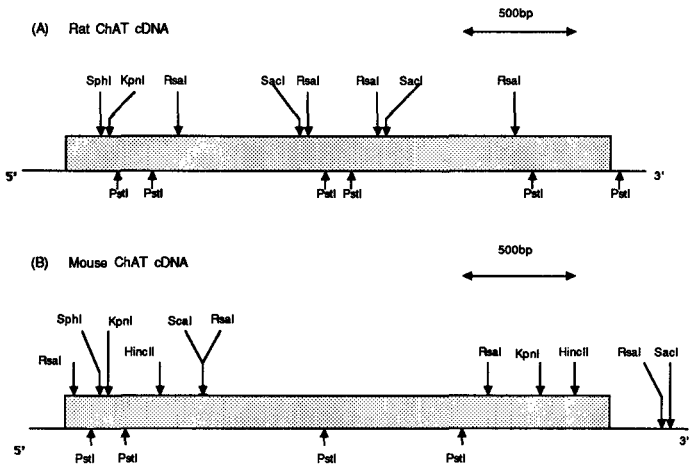


図1 ラット(A) 及び マウス(B) ChAT cDNA の 制限酵素地図

ついて 4.4kb のバンドを検出した。マウスの cDNA は 脳の poly(A)⁺RNA についても微弱ではあるが同様に 4.4kb のバンドを検出した。その他 肝臓、腎臓、肺の poly(A)⁺RNA には cDNA と反応するものはなかった。

これら cDNA のコードする蛋白が ChAT の活性を有するものかを調べるため CHO 細胞を用いて発現実験を行なった。cDNA インサートを発現ベクター pcDL1 に組み込み、CHO-K1 細胞に導入した。3日間の培養の後、一過性に発現した ChAT 活性を測定し、一方 Geneticin(1mg/ml) で選択し2週間培養した後 継続的に発現した活性を測定した（表1）。一過性のものでは cDNA を順方向に組み込んだクローンのみが顕著な ChAT 活性を示し これは本酵素の阻害剤である NVP によって抑えられた。継続的な発現では、順方向の ChAT 活性が著しく増大するとともに、逆方向でも活性が認められるクローンが幾つか得られた。

表1 ラット ChAT cDNA の CHO細胞 での発現

	ChAT activity (n mol /30 min /mg protein)			
	Transient		Stable	
	-NVP	+NVP	-NVP	+NVP
pSV2 neo alone	<0.02	0		
ChAT cDNA, Reverse	<0.03	0	43 - 0	0
ChAT cDNA, Order	5.4	0	1570	<0.01

表2 ラットおよびマウスChAT cDNA のN1E115での発現

	ChAT activity (n mol/ 30min/dish)	
	Rat	Mouse
Reverse	—	0
Order	2.4	1.1

アドレナリン作動性とコリン作動性の神経は、正-副交感神経系での拮抗的な相互作用に止まらず、分化の段階でも両者の択一的な選択が行なわれる可能性が考えられる(4)。このような神経細胞でのアドレナリン系とコリン系の関わりあいを調べる目的で N1E115 細胞をモデルとして選び ChAT の発現実験を行なった。この細胞は、マウスの neuroblastoma 由来で 本来アドレナリン作動性であり ChAT 活性を有さない。ところがマウスやラットの ChAT cDNA を上述のように導入したところ、一過性の ChAT 活性の発現が認められた（表2）。

［考察］ 現在 継続的に発現する neuroblastoma 細胞株のクローニングを行なっており、ChAT 蛋白の発現に伴って 細胞の特性に変化が生じるか、また ChAT cDNA の導入によって合成されるアセチルコリンが神経伝達に利用されるかどうかなどを検討してゆく予定である。さらにマウスの ChAT についてゲノム DNA のクローニングもおこなっているが、ことに5’上流のプロモーター領域のクローニングと同定を行い、これを用いてコリン作動性ニューロンの分化のメカニズムを分子レベルで明らかにしたいと考えている。

［文献］

1. Ishida, I., and Deguchi, T. (1983) Dev. Brain Res. 7, 13-23.
2. Ishida, I., and Deguchi, T. (1983) J. Neurosci. 3, 1818-1823.
3. Ishida, I., and Deguchi, T. (1983) J. Neurochem. 43, 42-48.
4. Patterson, P. H., and Chun, L. Y. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 3607-3610.
5. Berrard. S., Brice, A., Lottspeich, F, Braun. A., Barde, Y-A., and Mallet, J., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9280-9280.

33 ミトコンドリア脳筋症細胞の分子遺伝学的検索

下泉秀夫、中三川晃利、桃井真里子
（自治医科大学、小児科）

〔要約〕
チトクロームｃ酸化酵素部分欠損を示したＭＥＬＡＳ細胞骨格筋の初代培養系に複製起始部欠損SV40・DNAを導入し、形質転換した細胞をクローン化し、酵素活性正常細胞と、欠損細胞を得、部分欠損は、これら細胞の組織内モザイクによるものであることが明らかになった。これら形質転換細胞は、永久継代培養系であり、高増殖能を示し、ミトコンドリア遺伝子の解析を可能にした。ミトコンドリア遺伝子のチトクロームｃ酸化酵素サブユニット領域を含むプローブを用いての検索では、酵素活性欠損細胞に於けるミトコンドリア遺伝子に大きな欠失は検出されなかった。ミトコンドリア遺伝子による蛋白合成を検討した結果、欠損細胞においては、チトクロームｃ酸化酵素サブユニットＩＩ、ＩＩＩ、ＡＴＰ合成酵素サブユニット６の量が著明に減少していた。これは、ミトコンドリア遺伝子上にあり、これらサブユニットに相当する遺伝子領域の発現調節を司る遺伝子部位の変異が想定された。

［目的］ミトコンドリア脳筋症はその臨床像が多彩であると同時に、病理上も、組織特異性、組織内モザイクなどの多様性を示し、欠損酵素も、完全欠損、部分欠損、複数の酵素欠損、複数のサブユニット欠損など多彩な病態を示す。　これらの多様性と関連して、ミトコンドリア酵素の一部は核遺伝子支配のサブユニットと、ミトコンドリア遺伝子支配のサブユニットからなることから、疾患の遺伝子異常の解析が注目されている。臨床的に母性遺伝を示す例が存在することと、ミトコンドリア遺伝子は核遺伝子と異なり、母性遺伝を示すことから、少なくとも一部はミトコンドリア遺伝子異常によるであろうことが推定されていた。　最近、ミトコンドリア・ミオパチーの一部に筋組織のミトコンドリア遺伝子にのみ欠失が存在することが明らかにされた(1)。本研究では、臨床的には常染色体劣性遺伝を示し、筋組織においてチトクロームｃ酸化酵素（ＣＣＯ）部分欠損を示すミトコンドリア脳筋症の症例の初代培養系を、遺伝子検索を可能にするために、発ガン遺伝子導入による形質転換細胞を作成し、酵素欠損の病態を解析した。

［方法］

①培養：ＭＥＬＡＳと診断された１９才男子生検筋の初代培養にＧｌｕｚｍａｎらの複製起始部欠損SV40・DNA(2)を燐酸カルシウム共沈澱法にて導入し、すでに報告した、形質転換細胞のうち合成無血清培地中で多核細胞形成、Ｍ型ＣＫisomerを発現するものを筋由来とし、クローン化した(3)。筋ミトコンドリア画分の電子伝達系酵素はすべて正常活性を示した。クローン化細胞はSeligmanの変法(4)にてＣＣＯ活性染色した。

②　ＨｅＬａ細胞のミトコンドリアＤＮＡのＨｉｎｄＩＩＩ－ＳａｃＩフラグメントをプローブとして、クローン化細胞のＤＮＡをＢａｍＨＩ切断後サザン・ハイブリダイゼーションした。　③細胞をエメチン（150ug/ml）処理し核遺伝子の発現を抑制し、^{35}S-methionineラベルし、12.5%ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上にて、ミトコンドリア遺伝子支配の蛋白合成を検討した。

［結果］

①図１に示すように、線維芽細胞はＣＣＯ活性陽性であり筋細胞は、陽性細胞３クローン、陰性細胞８クローンを確立した。細胞化学染色でのＣＣＯ活性陰性細胞は細胞のミトコンドリア画分の活性測定にて、全欠損であり、部分欠損値を示すクローンは無かった。　細胞のdoubling　time　は陽性細胞で２１時間、陰性細胞で３３、３６時間であった。②ミトコンドリア遺伝子はＢａｍＨＩ切断にてはフラグメントに陽性細胞、陰性細胞間に差はなく（図２）、陰性細胞のミトコンドリア遺伝子量に減少はなく、ＣＣＯ領域に大きな欠失はないであろうことが推定された。　③エメチン処理後の蛋白合成の検討では、活性欠損細胞はＣＣＯサブユニットＩＩ，ＩＩＩ、ＡＴＰ合成酵素サブユニット６の合成低下が検出された（図３）。

［考察］

ミトコンドリア脳筋症におけるＣＣＯ部分欠損は、組織内における正常細胞と酵素活性欠損細胞のモザイクの結果であることが細胞のクローン化によって明らかになった。また、電子伝達系酵素欠損が形質転換後も保存され、通常培養条件下でdoubling　time　約３０時間という増殖性を維持していることは、ミトコンドリア脳筋症の単一の解析系として、発ガン遺伝子導入の本法が有用であること、酵素欠損細胞も正常細胞と同一条件下で高増殖性を示しミトコンドリア分離などに必要な量の供給が可能であること、組織内部分欠損

を単一遺伝子系に変換して検索し得ることを示した。　ミトコンドリア遺伝子のＣＣＯ領域に検出し得る欠失はなかったが、ミトコンドリア遺伝子上に縦列するＣＣＯサブユニットＩＩ，ＩＩＩ、ＡＴＰ合成酵素サブユニット６の発現量の低下が、酵素活性欠損細胞に検出された。このことは、この部位の遺伝子の発現調節機構の異常を示唆し、新たなミトコンドリア遺伝子の病態、さらには、ミトコンドリア遺伝子発現調節機構の解明につながる視点から重要であると考えられる。

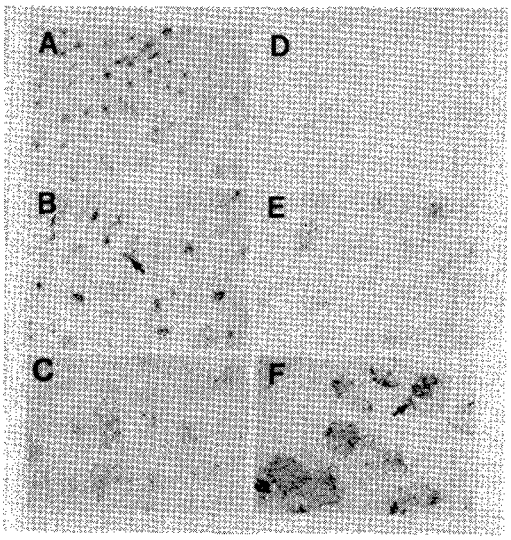


図１

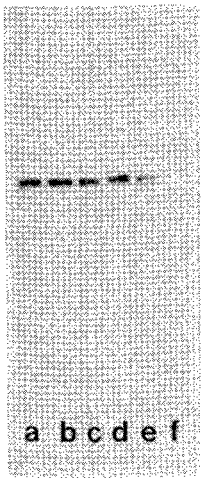


図２

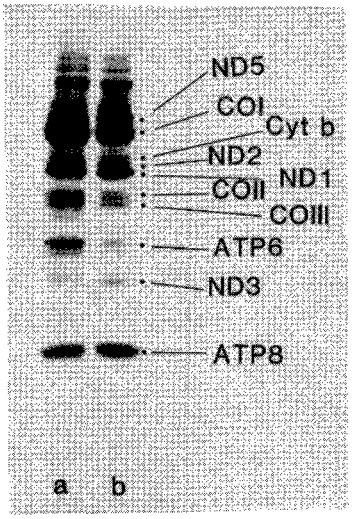


図３

図１：　クローン化細胞のＣＣＯ活性染色
ＣＣＯ陽性クローン（Ａ，Ｂ）、ＣＣＯ陽性クローンのＮａＮ3処理後の染色（Ｃ），ＣＣＯ陰性クローン（Ｄ，Ｅ）、同一患者の培養線維芽細胞　（Ｆ）。

図２：　ミトコンドリアＤＮＡのＢａｍＨＩフラグメントのサザン・ブロット
ＣＣＯ陽性クローン（ａ）、陰性クローン（ｂ，ｃ，ｄ，ｅ）

図３：　ミトコンドリア遺伝子支配による蛋白合成
ＣＣＯ陽性クローン（ａ）、陰性クローン（ｂ）、をエメチン処理し、35 Ｓ－メチオニンでラベル後、蛋白分画を１２．５％ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル上で泳動し、オートラジオグラムで検出した。

［文献］

(1) Holt, I.J., Harding, A.E.& Morgan-Hughes, J.A. (1988) Nature, 331, 717-719
(2) Gluzman, Y., Frisque, R.J.& Sambrook, J. (1980) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. , 44, 293-300
(3) Nakanigawa, T., Momoi, Y.M., Momoi, T., & Yanagisawa, M. (1988) J. Neurosci. 83, 305-319
(4) Seligman, A.M., Karnovsky, M.J., Wasserrkrug, H.L. & Hanker, J.S. (1968) J. Cell Biol. 38, 1-14

34

ＰＣ１２Ｄ 細胞を用いたＮＧＦのバイオアッセイ

佐野 護1)、 加藤兼房2)、 仙波りつ子3)
(愛知県コロニー研、 形態1)、生化2)、周生期3))

〔要約〕

PC12細胞は、神経成長因子(NGF) に反応し、神経突起の伸張を含む交感神経様細胞分化が誘導される貴重な株細胞である。 しかしNGF のバイオアッセイに利用するには、反応に時間のかかるという欠点があり、鶏胚知覚神経節を用いた方法が一般に利用される事が多い。最近我々の樹立した亜株PC12D 細胞は、従来のPC12に比較して敏速にNGF に反応し、24時間以内に長い神経突起の誘導が観察される。この細胞の特質は NGFのバイオアッセイに応用出来る。定量の感度は、従来用いられている鶏胚知覚神経節や通常のPC12細胞の場合と同様であった。 NGF の精製にもそのまま利用可能である事示された。 また筋ジストロフィーマウス顎下腺の NGF含量の低下についても、このバイオアッセイとイムノアッセイの両者からほぼ同様の結果が得られ、本アッセイ系の妥当性が証明された。

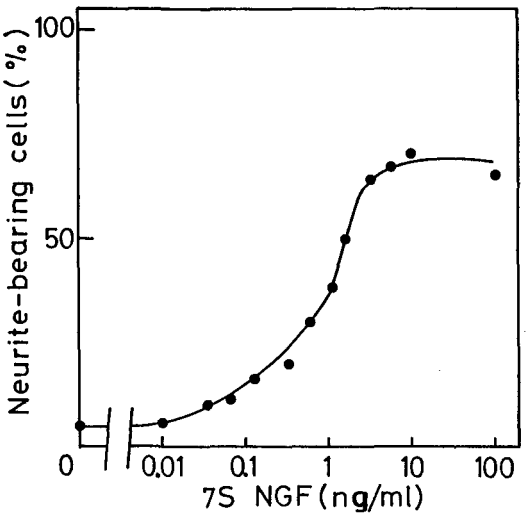
神経成長因子 (NGF)の生物活性は、その発見以来、培養した鶏胚知覚神経節に対する神経突起誘導活性をもって表されてきた。 短時間で正確に測定出来る事から現在も使用されているが、鶏胚を常に準備しなくてはならない難点は避けることが出来ない。ラット褐色細胞腫由来のPC12細胞は、NGF に反応して、神経突起の伸張を含む交感神経細胞様分化の誘導される特長をそなえた株細胞として、樹立され (2)、神経細胞の分化モデルとして広く利用されて来た。

PC12細胞のNGF による神経突起伸張に関する反応性は、鶏胚知覚神経節に比較して遅く、充分な突起の伸張には約５日間もかかる。 従って、 NGFの生物活性の定量には利用し難い。 しかし、PC12細胞は、予め NGFで前処理すると (primed cell)、新たな NGF添加に対し、素早く反応し24時間以内に突起の再生が起こる。この現象は NGFの活性測定に好適として報告されている (3)。 primed cellを凍結保存し、NGF の定量に用いる方法も報告されている (7)。 最近、我々は PC12 の亜株 PC12Dを樹立し報告した (6)。 PC12D は、 primed cellと同様 NGF処理によって、素早く神経突起の伸張が見られる事から、 NGFの活性測定に利用可能と考えられ、以下にその検討を行なった。

［ 方 法 ］ ポリリジンをコートした96穴の培養プレートに 5,000 cells/well の割合で PC12 細胞を植え、NGF を含む100ul のテストメディウムに交換し、24時間後 PBSで洗い、1%グルタールアルデヒドを含むPBS で固定し、突起の伸張が見られる細胞の比率を位相差顕微鏡下でカウントした。 細胞の直径の 2倍以上の突起を持つ細胞を突起を有する細胞として数えた。 マウス顎下腺 7S NGF の精製は、Varon らの方法に従った (8)。 2.5S NGFは、7S NGFより、FPLCの monoQカラムで精製した。 用いたNGF 標品は電気泳動的に単一であった。 NGF 定量の為、マウス顎下腺は、39倍量 (vol/w)の1% BSAを含む20mM 燐酸バッファー (pH7.4)でホモゲナイズし、10,000xg, 20 分の遠心上清を取り、濾過滅菌後、培養メディウムで希釈し試料とした。 イムノアッセイによる2.5S NGFの定量は、Nagataら (5)の方法を用いた。

［ 結 果 と 考 察 ］ PC12D 細胞は、NGF 添加後24時間で殆どの細胞に長い突起が誘導される。 図１は、7S NGFの濃度変化に対する突起誘導の程度を調べた結果である。 0.1ng/mlのNGF 濃度が検知可能であった。 0.8-0.9 ng/ml の 7S NGF によって、最大値の50% にあたる突起誘導が示された。 未知の試料の場合、連続的に希釈した試料を調べ、この50% の反応を示す濃度を 1 ユニット／ml とした。実際に組織抽出液などでも、利用可能か否かを示す意味で、雄マウス顎下腺より NGFの精製に応用を試みた。 顎下腺抽出液を濃縮したものを、セファデックス G-100の

図1、PC12D 細胞の突起形成と NGF濃度



NGF添加24時間後、1 点 200以上の細胞を 3回カウントした平均値

表1、ジストロフィーマウス顎下腺 NGF含量

マウス		生物活性 10^4 unit/g	2.5S NGF mg/g
+/?	male	105 ± 7	3.24± 0.44
	female	1.3± 0.4	0.98± 0.14
dy/dy	male	15 ± 3	0.036 ± 0.004
	female	N.D.	0.0005 ± 0.0001

3 ヵ月齢の正常(dy/?),ジストロフィー(dy/dy)マウス 顎下腺を40vol の溶液で超音波破砕し、10,000xg上清をとり、希釈して用いた。

カラムでゲル濾過したフラクションについて、PC12D を用いたバイオアッセイとイムノアッセイを同時に行なった。NGF のバイオアッセイによって得られたピークとイムノアッセイによって得られたピークは完全に一致した。 7S NGF の精製には、更に DE23 、セファデックス G-150 カラムを順に用いたが、各カラムからの NGF活性の溶出パターンも、このバイオアッセイを用いて検出できた。 筋ジストロフィーマウスは、顎下腺の NGF活性が有意に低下しているとの報告がある (1)。この現象の追試を兼ねて、ジストロフィーマウスと対照のマウス顎下腺の NGF活性をPC12D を用いて測定した (表1) 。 正常なマウスの雄では雌に比べて、100 倍近い活性が認められた。同じ齢期のジストロフィーマウスの場合、雄で正常マウスの約 1/7程度しかなく、雌では測定限界以下しかなかった。 イムノアッセイからも同様の傾向を示す結果が得られた。 顎下腺の NGF量は成育に従って急激に増加する事が知られているので (4)、ジストロフィーマウスの NGF量低下は、発育の遅れの結果と理解される。 ここでは生理的意義を考えるより、PC12D 細胞を用いた NGFのバイオアッセイが利用可能である証拠に留めたい。 抗体を用いた NGFのイムノアッセイは、これまで特異性に問題があるなど、必ずしも安心出来る成果をあげて来なかった。 また蛋白質としての量とは別にその生理活性を知る必要性は常に存在する。 今後、NGF のバイオアッセイの手段として、PC12D 細胞は簡便な系を提供し得るものと考えられる。

[文 献] (1) Furukawa, S., Nishitani, H., and Hayashi, K. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76, 1202-1206. (2) Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2424-2428 (3) Greene, L.A. (1977) *Brain* Res, *133*, 350-353. (4) Hendry, I.A. (1972) *Biochem.* J., 128, 1265-1272 (5) Nagata, Y., Ando, M., Takahama, K., Iwata, M., Hori, S., and Kato, K. (1987) *J.Neurochem.*,**49**, 296-302. (6) Katoh-Semba, R., Kitajima, S., Yamazaki, Y., and Sano, M. (1987) J. *Neurosci. Res.*, 17, 36-44 (7) Rukenstein, A., and Greene, L.*A. (1983)* Brain Res., 263, 177-180. (8) Varon, S., Nomura, J., and Shooter, .M. (1967) *Biochemistry*, **6**, 2202-2209.

35 PC12細胞のグリコサミノグリカン：神経成長因子による突起形成に伴う変化

仙波りつ子[1]、大平敦彦[2]、柏俣重夫[1]

（愛知県コロニー・研究所・ [1]周生期、[2]発生）

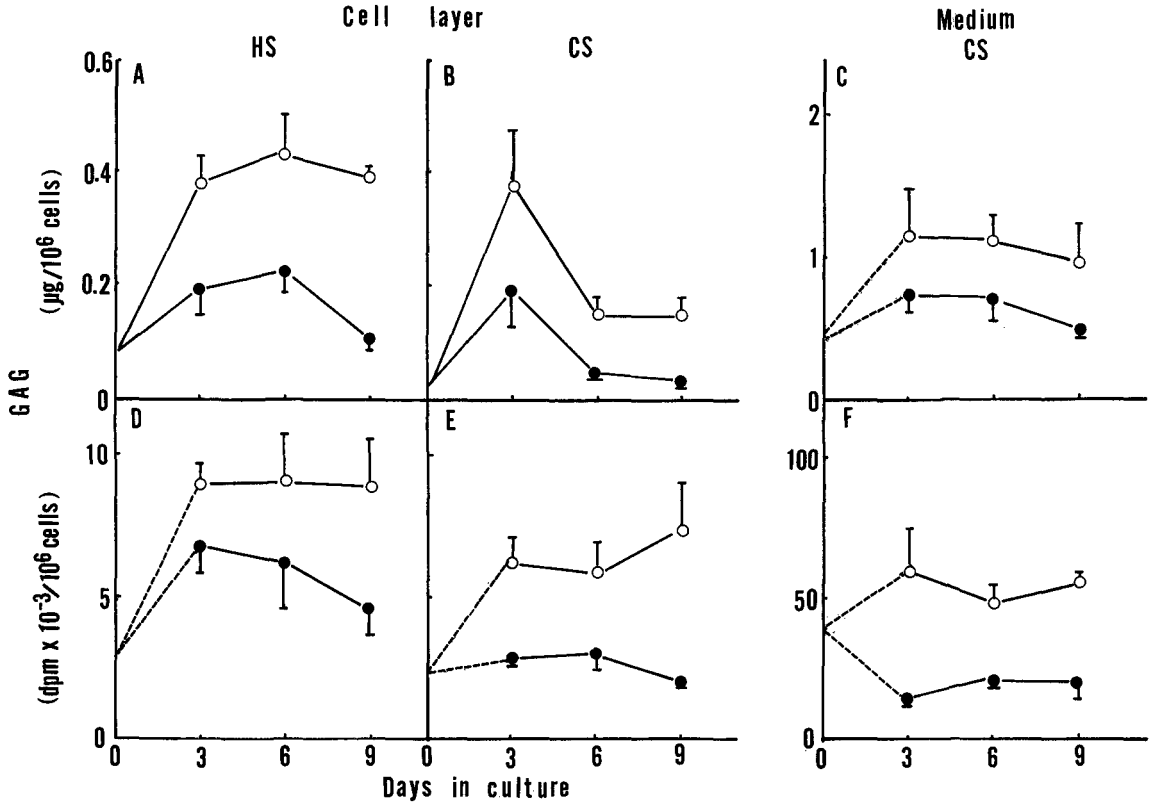
〔要約〕

神経成長因子(NGF)によるPC12細胞の突起形成過程におけるグリコサミノグリカン(GAG)の変化について分析した。1）PC12細胞はNGF存在下で、培養4日頃から神経様突起を伸長しはじめ、6日で約30%、9日で 60%以上の細胞が突起を有した。 2）NGFにより突起形成を開始したPC12細胞では対照群に比べ、細胞当りのコンドロイチン硫酸(CS)、ヘパラン硫酸(HS)量が細胞層、培養液ともに培養3日ですでに高くなり、9日でも同様の傾向を示した。3）突起伸長に伴い細胞当りのリン脂質量も急激に増加する。リン脂質当りで GAG量を表すと、CS量は細胞当りとよく似た結果を示した。一方、HS量はNGFを作用させた培養3日の細胞で高かったが、6日では差がなかった。 4）[^{35}S] 無機硫酸のGAGへの取り込みもNGF存在下で有意に増加したが、HS/CSの比はNGFにより細胞形態が変化すると減少した。5）CSはNGF存在下、非存在下いずれの条件下でも4硫酸単位に富んでいた。 6）これらの結果から、PC12細胞の突起形成にともないGAGの量的な増加がみられることが明らかとなった。とくにHSは突起伸長に先立って、細胞に蓄積する傾向を示した。

神経系の発達はニューロン・グリアが互いに相互作用をおよぼし合って達成されると言われるが、その物質的背景は必ずしも明らかとは言えない。ところで、神経系の三次元的な形態形成には、神経細胞あるいはグリア細胞が産生するプロテオグリカンのような細胞間物質が重要な役割を果たしていると推定されている（1）。しかしながら、神経系のプロテオグリカンに関する研究成果は少なく、神経細胞、グリア細胞のおのおのが産生するプロテオグリカンの性質すらほとんどわかっていない。ましてや、それらの生物作用も推察の域をでない。神経系の発達におけるプロテオグリカンの作用を知る目的で、まず、神経細胞の分化にともなうプロテオグリカンの変化について検索した。われわれは分化のより進んだと考えられるPC12D細胞で、プロテオグリカンの量的、質的変化がみられることをすでに見いだした（2, 3）。そこで、神経細胞としてPC12細胞を用い、プロテオグリカンの糖鎖部分であるグリコサミノグリカン(GAG)が NGFによる突起形成過程においてどのように変化するかを調べた。

［実験方法］ PC12細胞の培養には、10% 馬血清、5%牛胎仔血清、100 U/mlペニシリンを含むダルベッコ改変培地（ビルビン酸含有）を用いた。ポリリジンコートした100 mmの培養皿に5 x 10^5個の細胞を蒔き、NGF存在下、非存在下で培養した。細胞を集めるに先立ち、48時間 [^{35}S] 無機硫酸でラベルし、培養3日、6日、9日目で細胞層、培養液から粗GAGを大平ら（4）の方法により調製した。さらに、畑ら（5）の方法によって個々のGAGを定量分析した。リン脂質はBartlett（7）の方法によって定量した。

［結果と考察］ PC12細胞はNGFの添加により24時間以内に偏平な形態になり、培養4日頃から短い突起をもちはじめ、6日で約30%、9日で60%以上の細胞が長い神経様突起を有した。一方、NGF非存在下では、doubling time 2日で増殖した。NGF非存在下におけるPC12細胞のリン脂質は10^6個の細胞当り72μgであったが、NGFによって形態変化した細胞では、培養3日で92μg、6日で154μg、9日で170μgと突起の伸長開始に伴い急激に増加した。細胞層には、ヘパラン硫酸(HS)、コンドロイチン硫酸(CS)の二種類の GAGがいづれの条件下でも検出されたが、培養液中には、3日、6日でCSのみ、9日でHS、CSの両者が検出された。図A,B,Cは細胞層、培養液中のGAG量を細胞当りで表したものである。細胞をポリリジンコートした培養皿を用い、NGF存在下で培養を開始するとHSの含量はやや増加したが、細胞集密期に近い培養9日では、培養前の細胞が保持するHSの値（図Aの値）ときわめてよく一致した。一方、CSは培養3日で一過性に高い値を示したが、6日、9日では培養前の値により近かった。NGF存在下では、細胞の形態にかかわらずHS、CSとも対照群に比べ高い値を示した。培養液のCSについても同様であった。大半のGAGは細胞膜とassociateしていること



NGF存在下（○）、非存在下（●）の培養３、６、９日目における細胞当りのGAG量（A,B,C）および［^{35}S］無機硫酸（D,E,F）の取り込み： A,Bの０日の値は培養直前の細胞が持つGAG量である。また、C,D,E,Fの０日の値は細胞を浮遊状態で２日間培養したの後の値であり、この条件下では、NGFによる突起形成は起きない。

（３）から、細胞層のGAG量をリン脂質当りで表してみると、CSについては細胞当りのパターンとよく似た結果が得られた。HSでは培養３日の細胞で NGFによる有意な増加がみられたが、６日では対照群との間に差はなかった。この結果から、PC12細胞は長い神経様突起を伸長するに先立ち、HSの蓄積をすることが明らかになった。また、この事実は偏平な細胞形態を示す、やや分化の進んだと考えられるPC12D細胞でGAG含量が高いこととも一致する（２）。［^{35}S］無機硫酸の取り込み量もまたNGF存在下で有意に高かった。 とくに培養９日の長い突起を有する細胞ではHSが約２倍、CSが約４倍に増加していた。 NGF非存在下の細胞では、HS/CSの比が2.2であったがNGFにより細胞形態が変化するにつれて1.5から1.2と減少した。このことはCSへの［^{35}S］の取り込みがNGFにより依存的であり、細胞の分化とGAGの合成活性になんらかの関係があることを示唆している。CSはいずれの細胞においてもほとんどが４硫酸単位として存在していた。突起形成過程におけるGAGの明らかな量的変化が観察されたが、GAGを含むプロテオグリカンの構造の変化については今後の問題である。神経系のプロテオグリカンの生物作用はいろいろ推察されているが、神経細胞の産生するプロテオグリカンがグリア細胞に、逆にグリア細胞の産生するプロテオグリカンが神経細胞にどのような影響をおよぼすかについては興味あるところである。

［文献］1）大平敦彦 （1988） 生体の科学 39(4), 55-68. 2）仙波りつ子、大平敦彦、佐野護、渡辺貴美、北島哲子、柏俣重夫（1987）生化学 59(8), 729. 3）仙波りつ子、大平敦彦、佐野護、渡辺貴美、北島哲子、柏俣重夫（1987）神経化学 26, 403-405. 4）Oohira A., Matsui F., Matsuda. and Shoji R. (1986) J. Neurochem. 47, 588-593. 5）Hata R. and Nagai Y. (1978) Biochim. Biophys. Acta 543, 149-155. 6） Bartlett G.R. (1959) J. Biol. Chem. 234, 466-468.

36 横紋筋の神経成長因子の産生と調節

天野武彦、山国　徹、山本敏文、岡部紀子
（三菱化成生命科学研究所）

〔要約〕

1. ラット横紋筋で Northern Blot 法を用いて神経成長因子（NGF）に相当する 1.3 Kb のメッセンジャーRNA（mRNA）を見出した。
2. 横紋筋を支配する座骨神経を挫滅すると横紋筋の mRNA は 2 日後急速に数倍増加し、以後緩やかに 14 日後に減少した。
3. 酵素免疫法（EIA）によっても 500 pg/mg 蛋白以上の免疫反応性分子を検出した。
4. マウス横紋筋クローン細胞 G8 を用いて NGF の mRNA の存在を Northern Blot 法で確かめると共に培地中に免疫反応性分子を放出していることを見出した（数百 pg/ml）。
5. G8 細胞に種々の薬剤を加えて細胞の mRNA の変動を調べた。NGF の mRNA の量は Myotube の方が Myoblast より数倍高い。カルバミルコリン（10 μM）は mRNA の量をやや減少させ、ジブチリルサイクリックGMP（dbt^2-cGMP）1 mM は mRNA の量を増加させ、A23178（2 μM）は減少させた。脱分極剤ベラトリジン（1 μM）は減少させた。

以上の結果は横紋筋に NGF の mRNA が存在し標的器官の NGF の産生が神経回路の活動によって調節されることを示した最初の報告と考える。

神経成長因子（NGF）は神経回路の中で標的細胞により分泌され、神経細胞の生存と機能の維持に重要な役割を果たしていると考えられている（1,2）。主要な運動回路の標的筋細胞においては何らかの成長因子（trophic factor）の存在が報告されているが生物学的性質が異なることにより NGF とはまったく異なる分子と予想されている（3-6）。我々は NGF 遺伝子配列中、homologous 50ケのヌクレオチド配列をプローブとして用い、マウス由来横紋筋細胞クローン G8 を用いて NGF の mRNA の存在を確かめ、ついでラット横紋筋が NGF の mRNA を産生し且つ特異的な酵素免疫法によっても免疫反応性蛋白分子を見出したので報告する（7）。

〔実験方法〕 Northern Blot Hybridization 法はすでに報告した方法を用いた（8）。雌ラット下肢骨格筋で座骨神経の支配する前脛骨筋を用い RNA はグアニジンイソチオシアネート中でポリトロンで粉砕し Chirgwin の方法で超遠心後分離した RNA を Oligo d(T) カラムで精製したものを用いた（9）。EIA 用の筋のホモジネートは PBS/1 mM EDTA/2 mM EGTA でポリトリンでホモジナイズし 170,000 g、60' 遠心後の上清を用いた。EIA は Veskamp, Otten の変法を用いた（10）。使用したマウス顎下腺由来の NGF に対するモノクローナル抗体は Zimmermann らの方法を用いてラット × マウス（SP 2/0）ハイブリドーマを 2 回クローニングし、ハイブリドーマを無血清培養したものより IgG 分画を精製ビオチン化したものを用いた（11）。G8-1 細胞は 5% 新生牛血清（中標津、三菱化成）、5% 馬血清（Gibco）を用い、Myoblast（12）としては増殖期の細胞を、Myotube としては Confluent になった細胞を高密度で培養4日後の 20% 以上の細胞が Myotube を形成しているものを用いた。Carbamylcholine 等の薬剤は 24 時間作用させた後 Poly(A)RNA を精製した。

〔実験結果〕 成熟ラット筋より Oligo(dT) カラムより精製した Poly(A)RNA をフォルムアルデヒド存在下で泳動しニトロセルローズにトランスファー後 [α-^{32}P] dATP でプローブをラベルしハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフを行った。Fig. 1 のごとく Control(-), Control(+) と比べて明らかに 1.3 Kb に一致して濃いバンドが認められコンピューターによる定量化により除神経後3倍以上の mRNA の増加が認められた。mRNA の増加は一週間くらい続き、以後緩やかに減少する傾向が見られた。筋のホモジネートの上清をアビジンビオチン法を用いた EIA で測定すると約 500 pg/mg 蛋白の immunoreactive 分子を検出した。神経挫滅後の筋では手術後増加傾向が見られるが統計的に有意の差は見られなかった（データー省略）。これは G8 細胞において NGF の分泌が増加する場合、細胞の mRNA は明らかに増加するにもかかわらず細胞体の ir-protein は増加しない実験結果と一致する。G8 細胞では Myoblast よりも Myotube に NGF

の mRNA は多く運動神経の伝達物質であるアセチルコリン(この実験では Carbamylcholine) は mRNA を抑制、dbt^2-cGMP は増加させ、dTC/Carb., atropine/Carb. では抑制効果が見られた。Ca^{2+} イオノフォアの A23187 は明らかに抑制的に作用した (Fig. 2)。ベラトリジン (2 μM)、デカメトニウム (10 μM) は抑制的であった。マウス NGF に対するラットモノクロナル抗体は2次元電気泳動法による Western Blotting 法で等電点 9.3、分子量 14,000 のほかに高分子(等電点 6.5、分子量 120 K)のスポットとも結合する (データー省略)。我々は EIA で G8 細胞の分泌する蛋白は高分子であることを見出しており (13)、現在この蛋白を精製中である。以上の結果は今まで骨格筋には全く無いと考えらていた NGF 分子の存在を２つの特異的な方法で証明し、NGF の産生がトランスミッターあるいは回路の中の神経細胞の活動によって調節されていることを示唆する。

〔文献〕 1) Levi-Montalcini, R. and Angelleti, P.U., Physiol. Rev. 48, 534 (1968). 2) Heumann, R., Korsching, S., Scott, J. and Thoenen, H., EMBO J. 3, 3183 (1984). 3) Brown, M.C. and Holland, R.L., Ann. Rev. Neurosci. 4, 17 (1981). 4) Obata, K. and Tanaka, H., Neuroscience Letts. 16, 27 (1980). 5) Henderson, C.E., Huchet, M. and Changeux, J.-P., Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 2625 (1981). 6) Smith, R.G. and Appel, S.H., Science 219, 1079 (1983). 7) Amano, T., Yamamoto, T. and Yamakuni, T., 第１１回神経科学学術集会 (1987). 8) Yakamuni, T., et al., FEBS Letts. 223, 117 (1987). 9) Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J., Biochemistry 18, 5294 (1979). 10) Weskamp, G. and Otten, U., J. Neurochem. 48, 1779 (1987). 11) Zimmermann, A., Sutter, A. and Shooter, E.M., Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 4611 (1981). 12) Christian, C.N., Nelson, P.G., Peacock, J. and Nirenberg, M., Science, 196, 995 (1977). 13) Yamamoto, T., Yamakuni, T. and Amano, T., 第６１回日本生化学会 (1988).

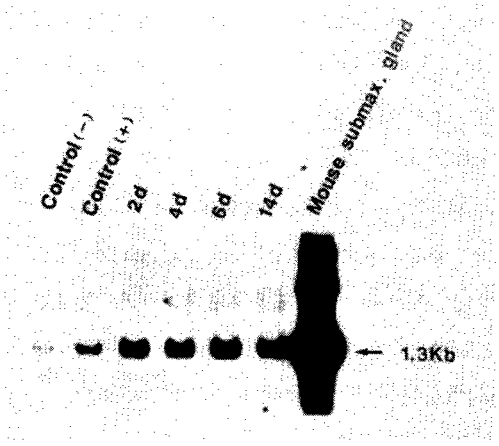


Fig. 1. 骨格筋 (M. tibiale anterior) Poly(A)RNA の Northern Blotting
Control(−)：何も処理しない筋、Control(+)：sham operation を加えたもの、2d：座骨神経挫滅後 2日、4d：同 4日、6d：同 6日、14d：同 14日
マウス顎下腺(1μg)、いずれも poly(A)RNA 20 μg
1.3 Kb のバンドの濃度をコンピューター処理し、マウス顎下腺を 100 とすれば Control(−)：1.48、Control(+)：2.41、2d：8.71、4d：7.78、6d：7.46、14d：5.21 となる。

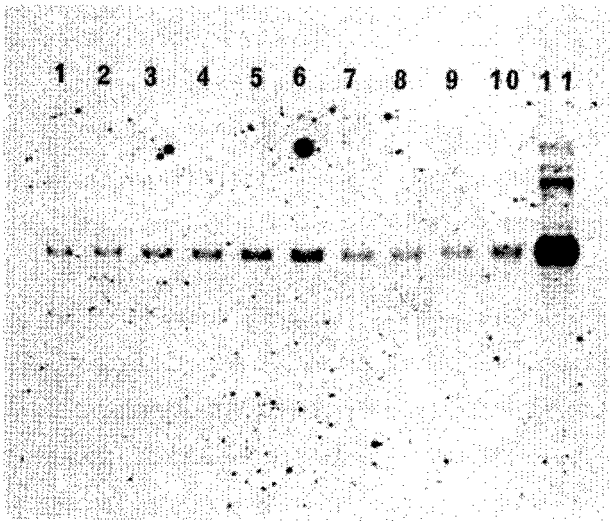


Fig. 2. G8 細胞の各種薬剤の mRNA に対する影響
G8 の Myotube 形成 (20%) したものの poly(A)RNA 20 μg を用いたマウス顎下腺は 2 μg をプローブで Northern Blot 法で hybridize した。 1. Carbamylcholine 10μM 2. d-tubocurarine 10μM 3. Control 4. Carbamylcholine 10μM 5. dibutyryl cyclic AMP 1mM 6. dibutyryl cGMP 1mM 7. d-tubocurarine 10μM/carbamylcholine 10μM 8. atropine 10μM/carbamylcholine 10μM 9. A23187, 2μM 10. Forskolin 2μM 11. mouse submax gland

37 アストログリア膜表面におけるニューロン突起伸展促進物質の検討

井端由紀郎[2)]，高坂新一[1)]，山村初雄[3)]，阿相皓晃[1)]，戸谷重雄[2)]，塚田裕三[1)]

[1)]慶大，医，生理，[2)]慶大，医，脳外科，[3)]アサヒビール中央研究所

〔要約〕

Astroglia 膜表面に存在するneuronの突起伸展促進因子(ASNPF) の性状を明らかにするため astrogliaと関連すると考えられる既知の物質である laminin、 asialoGM$_1$、および NgCAM(L1)の突起伸展に及ぼす影響につき検討した。更にastroglia 膜を sialidase、 N-glycanase、あるいはphospholipase C で処理し、その影響についても検討した。 laminin、asialoGM$_1$、 L1の内laminin においてのみneuronの突起伸展活性が抗体により部分的に抑制された。酵素処理実験においては sialidase処理で部分抑制が認められた。しかし何れの場合も活性は完全には抑制されず、他により重要な機能を担っているASNPF の存在が示唆された。

ラット胎仔大脳半球より得られたneuronを astroglia上で培養した場合、neuronの突起伸展が促進される。およびその効果は熱処理によって死滅させた astrogliaを用いた系においても同様にみられることを見いだし既に報告した[1)]。これらの結果は astrogliaの膜表面上にneuronの突起伸展活性を有する物質(ASNPF) が存在することを示唆している。そこで今回はこの活性物質の性状を明らかにする目的でまず astrogliaと密接な関連性を有していると考えられる既知の物質の関与につき検討を加え、更にastroglia膜を各種の酵素にて処理し、その影響についても検索をおこなった。

（方法） Neuronおよびastrogliaの培養法は既報に従った[5)]。 12 well culture plate中のcoverslipに単層培養したastroglia を60℃、60分熱処理した後、その上に胎生16日ラット大脳半球より得たneuron(1×10^5cells/well)を蒔き、24時間後にtubulin抗体で免疫染色後、蛍光顕微鏡下に0.25mm^{2}あたりのneuronの数、および突起の伸展度を計測した。突起の伸展度は突起を全く伸ばさないもの、50μm以下、50μm以上の3段階に分け、それぞれのneuronの割合を計算した。既知の物質の検定としてはastrogliaをlaminin抗体、およびasialoGM$_1$抗血清（各々IgG量として100μg/ml、1mg/ml）にて37℃、1時間処理し、その後、neuronを蒔き、24時間後の生着neuron数、および突起伸展度を計測した。また、poly-L-lysineでcoat後、5μg/mlのlaminin、あるいは10μgのasialoGM$_1$をcoatしたcoverslipを同様に各々の抗体で処理した系においてもneuronの突起伸展度を計測した。L1抗体（5μg/ml）の場合はneuronをastroglia上に蒔いて 3時間後に抗体を培地中に添加し、さらに24時間培養後、同様に生着neuron数および突起伸展の程度を計測した。astrogliaを sialidase (100mU/ml)、N-glycanase(100mU/ml)、およびphospholipase C(25U/ml)にて37℃、1～2時間処理し、その後、neuronを添加し、同様に生着neuron数および突起伸展の程度を計測した。諸酵素のastroglia膜に対する有効性はPNA、ConAの結合をABC法による染色性の変化で調べるか、SDS電気泳動による蛋白パターンの変化により判定した。

（結果および考察） まずlaminin の neuronに対する突起伸展活性を検討した。[3)]。Laminin(5μg/ml)をcoatしたcoverslip上で培養したneuronは24時間後において poly-L-lysine のみをcoatした場合に比し著明に突起を伸展し、これは laminin 抗体で完全に抑制された。次に熱処理した astroglia を laminin 抗体で同様に処理し、その上でneuronを培養した系においては24時間後の生着neuron数は正常ウサギ血清を加えた系と比べて若干低下したが有意差ではなかった(図1a)。一方、突起長が50μm以上の占める割合(45%)はcontrol(57%)に比べ有意に減少したが(図2a)、その効果は極めて弱かった。次にastroglia膜に豊富に存在することが知られている中性糖脂質の一つであるasialoGM$_1$の関与につき

検討を加えた[4]。coverslip上にcoatされたasialoGM1上ではneuronの突起伸展はcontrolと差異はみられなかった。またasialoGM1抗血清で処理したastroglia上ではcontrolに比し、生着neuron数および突起の伸展度に有意な差は認められなかった(図1b,2b)。近年、Ng-CAM(L1)はneuron-glia間の接着因子として注目を集めていることから[2]、L1の効果につき検討を加えた。L1抗体を添加した群ではcontrol群に比べ24時間後のneuronの突起伸展度に有意な差は認められなかった(図2c)。生着neuron数に関してはcontrolに比べむしろ増加傾向を認めたが、有意差とはいえなかった(図1c)。次にASNPFの性状を知る目的で熱処理astrogliaを各種の酵素にて処理し、neuronの生着数および突起伸展の度合を検討した。PNAとの結合能が無い熱処理astrogliaは、sialidase処理によりPNA結合能を有するようになる。同様にConA 結合においては熱処理astrogliaをN-glycanaseで処理するとConAの結合能は明らかに低下した。さらに、astroglia 膜分画のSDS-PAGEを行った結果、phospholipase Cを含めた各酵素処理により蛋白パターンの変化が認められた。Sialidaseを作用させた熱処理astroglia上でのneuronの生着数はcontrolとの間に有意な差が認められなかった(図1d)。しかし、neuronの突起伸展度を比較すると、突起長が50μm 以上の群の占める割合 (35%) は control群(44%)に比べ有意に低下していた($p<0.02$)(図2d)。一方、N-glycanaseで処理した場合には、neuronの生着数はcontrolと比べ増加傾向にあったが、突起伸展度には有意な差はみられなかった(図1e,2e)。また、phospholipase Cで処理した場合にもneuronの生着数及び突起伸展度に有意な差は認められなかった(図1f,2f)。Astrogliaと密接な関連性があると考えられているlaminin、asialo-GM1,NgCAMのうち我々の実験系においてはlamininが少なくとも突起伸展活性のごく一部を担っているものと考えられるが他にもより重要な役割を担う未知物質の関与が示唆される。今回我々はastrogliaの持つこの突起伸展活性にsialic acidおよび糖鎖の関与を予想し実験を行った。しかし、sialic acidの部分関与の可能性は示されたが、糖鎖自体の直接的関与は証明され得なかった。しかし本実験系では酵素により糖鎖が完全に切断されていない可能性も残されており、この残存する糖鎖が活性を示していることも考えられる。この点に関しては、さらに詳細な検討を要するものと考える。

(文献) (1) 井端由紀郎、他、神経化学 26、298-300、1987. (2) Grumet,M.S., et al., Proc.Natl.Acad.Sci. 81, 7989-7993,1984.(3) Lander,A.D.,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci. 82,2183-2187,1985. (4) Neskovic,N.M., et al., J. Neurochem. 37,1613-1370,1981.(5) Yoshida,K.,et al.,Neurosci.Lett. 70,34-39,1986

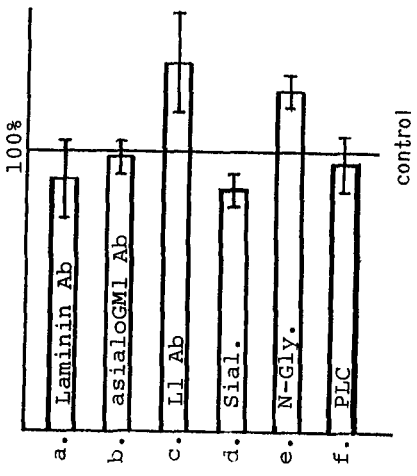


図 1

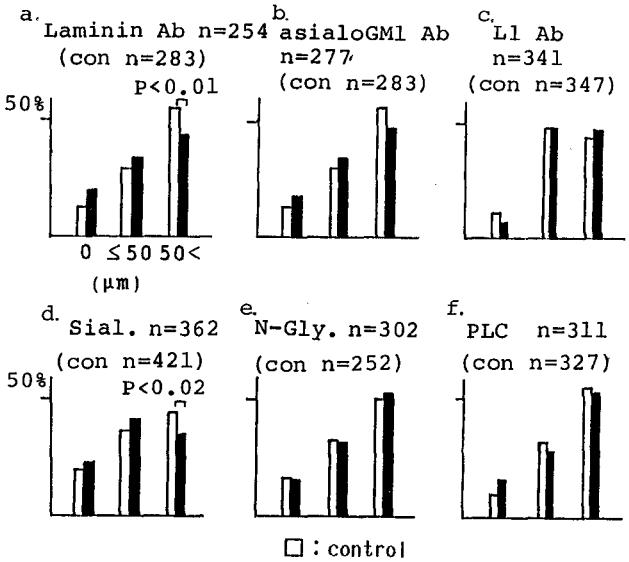


図 2 全neuron数に対する割合

38 ウシ脳由来の酸性線維芽細胞成長因子に対する抗体作製とその免疫組織化学的応用

遠山育夫，原靖＊，安原治＊＊，木村宏

（滋賀医大・解剖、脳外科＊、京大・医・神内＊＊）

〔要約〕
酸性線維芽細胞成長因子（ａＦＧＦ）をウシ脳５０頭分より抽出・精製した。得られたペプチドがａＦＧＦ活性を有しているのを確認のうえ、家兎に免疫したところ高力価の特異的抗血清が得られた。この抗体を免疫組織化学法に用いてラット脳内におけるａＦＧＦ様免疫活性物質の局在について検索した。その結果ａＦＧＦ様免疫活性物質は一部のグリア細胞のほか、主として脳室壁の上衣細胞およびタニサイトに観察された。したがって、ａＦＧＦは後者の脳室周囲器官を舞台として、脳実質と脳脊髄液との間に分泌－受容連関をもつことが示唆された。

〔緒言〕
酸性線維芽細胞成長因子（ａＦＧＦ）は脳内に豊富に分布することから、脳機能に果たす役割が重要視されている。なかでも最近、大村らが明らかにした脳内ａＦＧＦと食欲調節機構との密接な関連は注目される（１）。しかしながら、その詳細については不明な点が多い。その理由の一つとして、脳内ａＦＧＦが不安定でバイオアッセイ以外に有効な検出方法が確立していないために、ａＦＧＦの脳内での局在などの基礎的知見が得られていないことが挙げられる。そこで本研究ではウシ脳よりａＦＧＦを抽出し、その精製したａＦＧＦを用いて抗体を作製し、免疫組織化学的にラット脳内におけるａＦＧＦ様免疫活性物質の局在について検索した。

〔方法〕
ａＦＧＦの抗体作製：　５０頭分のウシ脳を用いた。Bohlenらの方法（２）に準じて、硫安分画の後、Sephadex C-50 クロマトグラフィー、Heparin-Sepharose アフィニテイクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーを順次行い、3.5 mg のａＦＧＦを抽出・精製した。ａＦＧＦ活性をヒドラを用いるバイオアッセイで確認したのち、これを家兎に免疫して抗血清を得た。抗体の特異性および力価はスポットテスト法（３）にて検定した。すなわち，ニトロセルロース膜に5 pmolesから0.8 pmolesのａＦＧＦまたはbasic ＦＧＦを含む溶液1μlをスポットし，2％ゼラチン溶液中に30分浸透させてブロッキングを行った後，ａＦＧＦ抗体と反応させ発色反応の強弱により抗体価を測定した。

ａＦＧＦの免疫組織化学：　Wistar系雄ラット（150－250 g）を用いた。 0.9% NaClを含む10 mM燐酸緩衝液（pH7.4）を経心的に灌流して脱血後，引続き4%パラホルムアルデヒド、0.35%グルタールアルデヒド、0.2%ピクリン酸を含む燐酸緩衝液で灌流固定した。摘出脳を厚さ5 mmの前額断に切断し、パラホルムアルデヒドとピクリン酸の混液に浸漬し２日間の後固定を行った。その後15％庶糖液で数回洗浄し，20μｍのクリオスッタト連続切片とし，この切片を浮遊状態でＡＢＣ免疫組織染色に供した。

〔結果〕
得られたａＦＧＦ抗体を１万倍希釈でスポットテストに用いた場合 0.08 pmolesのａＦＧＦが十分な感度で検出されたが、basic ＦＧＦとは5 pmolesの高濃度を用いても反応しなかった（Fig. 1）。したがって、この抗体のbasic ＦＧＦとの交叉率は2%以下と考えられた。

ラット脳における免疫組織化学ではａＦＧＦ様免疫活性物質は一部のグリア細胞のほか、脳室壁の上衣細胞やタニサイトなどに観察された（Fig. 2）。陽性グリア（Fig. 2-A）は連珠様の突起を有しているのが観察された。これら陽性グリアとその突起は脳内に広く分布していたが、視床下部や中脳、橋、延髄に多い傾向がみられた。陽性上衣細胞（Fig. 2-B）は第三脳室壁や中脳水道壁に散在して分布するのが観察された。さらに第三脳室周辺の脳実質内ではタニサイトの突起が明瞭に認められた（Fig. 2-C,D）。

〔考察〕
今回作製したａＦＧＦ抗体は特異性および力価が高く、免疫組織化学法に応用すると光顕レベルでの陽性細胞の種類の同定ならびに脳内分布の詳細を検索することができた．なかでも脳室壁の上衣細胞やタニサイトなどの脳室周囲器官系に属する細胞に多く陽性反応が認められたことから、脳脊髄液との接触という解剖学的事実が重視される。すなわち，脳室周囲器官を舞台として、脳実質と脳脊髄液との間にａＦＧＦの分泌－受容連関が存在するものと想定される。こうしたａＦＧＦ様免疫活性物質が脳室周囲器官で産生されているのか、脳脊髄液中より吸収

されたものかは in situ hybridization 法によって明らかにできるものと思われる。

aFGFの生理活性については，このペプチド様物質が脳内の特定の細胞群に局在していることから、単に成長因子としてばかりでなく，なんらかの脳機能との関連が考えられる。この点，血糖値の急激な増加操作によりラット第三脳室内の脳脊髄液中にaFGF活性が著明に上昇するという報告（1）は、aFGFが中枢食欲調節機構に重要な役割を果たす可能性を示しており注目に値する。basic FGFにおいて活性フラグメントが同定されたと同様に（4）、aFGFについても活性部位を明らかにし、脳内のaFGFリセプターを解明することなどにより，詳細な生理的意義が明かになるものと思われる。

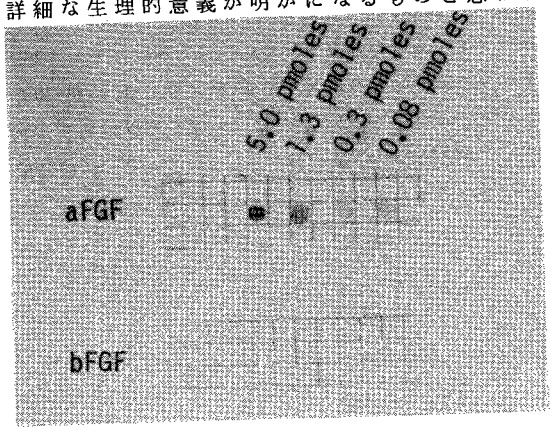


Fig. 1.
Immuno-spot test of antiserum against acidic (upper) and basic (lower) fibroblast growth factor.

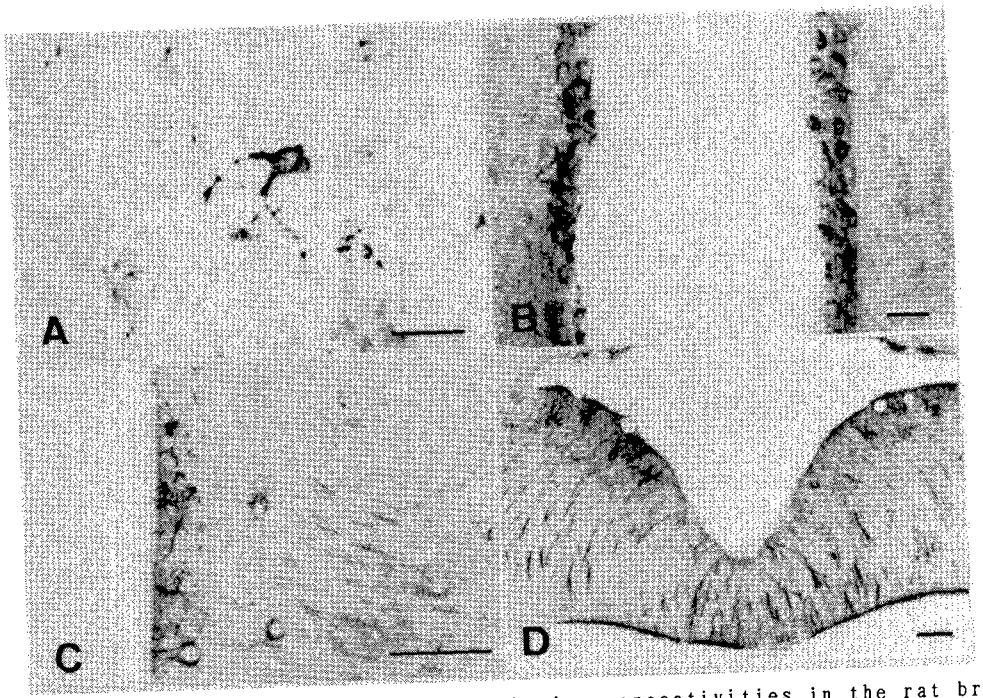


Fig. 2 Acidic fibroblast growth factor-like-immunoreactivities in the rat brain. In addition to glial calls (A), ependymal cells (B,C) and tanycytes stained positively for aFGF. A and B; Bar = 20 μm, C and D; Bar = 50 μm

〔文献〕

1)大村裕、小山純正 (1988) 代謝, 25, 3-18
2)Bohlen P, Esch F, Baird A, Gospodarowicz D(1985) EMBO J., 4, 1951-1956
3)Tomida Y, Kimura H (1987) Acta Histochem. Cytochem., 20, 31-40
4)Baird A, Schubert D, Ling N, Guillemin R (1988) Proc.Natl.Acad.Sci. 85, 2324-2328

39 ラット中隔野培養細胞に対するα－ＭＳＨおよびＡＣＴＨ誘導体（ＨＯＥ　４２７）の神経栄養作用

松本智明、大島健一、宮本亜紀、桜井真夫、後藤正義、林　昌亮
（ヘキストジャパン・医薬研・薬理）

〔要約〕 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH)および adrenocorticotropic hormone (ACTH)は、末梢神経損傷後の再生に効果を示す事が知られている。中枢神経系に対するその効果を明らかにする一環として、ラット胎仔由来の培養下中隔野細胞の神経突起の伸展およびコリン作動性神経細胞の発育に対するα-MSH および ACTH 誘導体（HOE 427）の効果を自動画像解析装置を用いて検討した。α-MSHは 1 pmol/mlの濃度において有意な突起伸展活性を示し、対照に比較して、約30%の突起長の増加を示した。一方、HOE 427は 3～100 pmol/mlの範囲において同様の効果が認められた。これら２つのペプチドの用量反応曲線は類似し、高濃度添加によりその最大反応を維持させることはできなかった。さらに、acetylcholinesterase(AChE)染色を行ない、HOE 427のAChE陽性神経突起の伸展に対する効果を検討した結果、さきの突起伸展活性を持つ濃度範囲においてその効果を認めた。これらの結果は、α-MSHおよびHOE 427が、ラット胎仔由来の培養下中隔野神経細胞の分化・発育を亢進させることを明確に示すものである。

Key Words : Neurotrophic melanocortin; Septal neuron culture; Neurite outgrowth; Cholinergic development

〔緒言〕

末梢神経損傷時に150kDのニューロフィラメントからα-MSH様のペプチドが生成し、その再生に関与していることが示唆されている(1)。さらに、外因的に投与されたα-MSH、ACTHまたはそれらの誘導体がその再生および機能回復を促進させることが明らかにされている(5,7,8)。一方、中枢神経系においては、広範な部位に ACTH/MSH 様ペプチドが存在することが報告されているが(3)、 in vivoにおいてそれらの生理的役割を直接的に証明することは、困難を要する。本研究においては、その検索の一環としてラット胎仔由来の培養下中隔野細胞に対するα-MSHの神経突起伸展作用について検討するとともに、薬剤としての適用の可能性に対して、$ACTH_{4-9}$誘導体であるHOE 427の効果を比較検討した。

〔材料および方法〕

17日令ラット胎仔脳より中隔野を摘出し、初代分散培養を行なった。トリプシン処理により分散させた細胞をpoly-L-lysineでコーティングしたプラスチック製ディッシュに 2～3x10⁴cell/cm²の密度で接着させた。この細胞を無血清完全合成培地(modified N2 medium)(4)を用いて、37℃、5%CO_2下に６日間培養した。なお、培地は隔日に全量を交換した。α-MSHは Sigma社より購入し、HOE 427(Fig. 1)は Prof. Geiger(Hoechst A.G.)より譲り受けた。海馬抽出液は Ojikaら(4)の方法に従い、２週令ラットよりsodium/potassium phosphate-buffered saline(PBS)を用いて調製した。これらの被検添加物は、１、２および４日目の培養系にその 0.1mlを添加した。AChEに対する染色はTagoら(6)の方法により行なった。

細胞数および神経突起の長さの測定は、Matsumotoら(2)の方法により自動画像解析装置(Luzex II D^R,Nireco)を用いて行なった。AChE陽性神経突起の長さは、そのモニター上の画像をトレースすることにより測定した。得られたデータは、それぞれのディッシュについて細胞当りの値に換算し、PBS添加の対照群との比較において効果判定を行なった。

〔結果および考察〕

本培養系に海馬抽出液を添加すると著明な神経突起の伸展およびAChE陽性神経細胞の発育が認められる(Fig. 2)。しかしながら、ACTH/α-MSH関連ペプチドの作用は比較的微弱であり、単なる写真上の比較では客観的な判断を下すことは困難であった。そこで、自動画像解析装置を用いディッシュ当り任意の15-20画面を解析し、細胞当りの神経突起の長さの平均値を算出することにより突起伸展活性に対する定量的な評価を行なった。

Fig. 3 にα-MSHおよび HOE 427の神経突起伸展活性を、対照群に対する %changeで表した用量反応曲線を示す。これら２つのペプチドの用量反応曲線は類似し、高濃度においてその活性は消失した。また、α-MSHは、HOE 427に比較し1/100

H-Met(O_2)-Glu-His-Phe-D-Lys-Phe-NH-$(CH_2)_8$-NH_2

Fig. 1. Amino acid sequence of HOE 427

の濃度で作用を発現すると考えられるが、その活性はむしろ HOE 427の方が強い傾向を示し、α-MSHが129%の最大反応を示したのに対し、HOE 427のそれは141%であった。それぞれの対照群との比較においてα-MSHは1 pmol/mlで、一方HOE427は 3～100 pmol/mlの濃度においてその有意な作用が認められた。なお、本系において海馬抽出液は、約300%の最大反応を示す。さらに、AChE染色陽性神経細胞の分化・発育に対する HOE 427の効果を検討した(Table 1)。HOE 427はその陽性細胞数には影響を与えず、神経突起伸展活性を示す用量範囲において同様に AChE陽性突起の伸展を亢進させた。

これらの結果は、α-MSHおよびHOE 427が発達段階にあるラット胎仔由来の培養下中隔野細胞に対し神経栄養効果を有することを明確に示すものであるとともに、α-MSHの中枢神経系における生理的役割の一つとして神経の再生に関与している可能性を示唆するものである。また、HOE 427はα-MSH類似の神経栄養作用を示すことから、中枢の神経変性疾患に対する有効性が期待される。

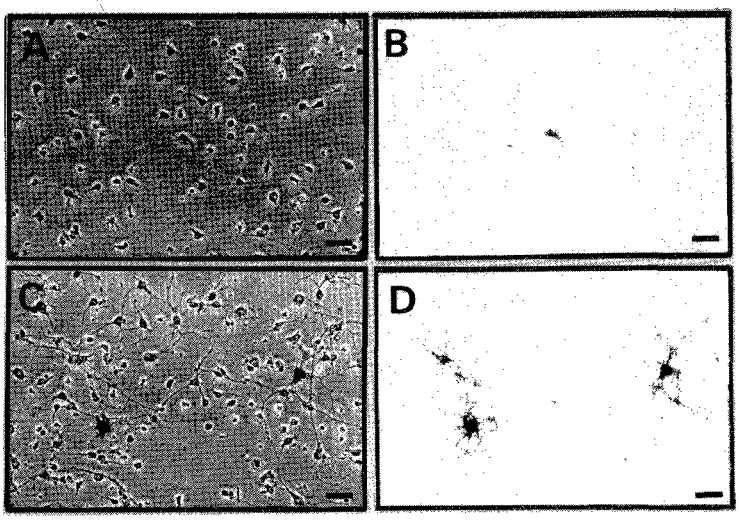


Fig. 2. Microscopic observation of neurotrophic activities in hippocampal extract. Representative phase-contrast (A, C) and light (B, D) microphotographs of septal cultures stained for acetylcholinesterase were taken. A and B illustrate control conditions, and C and D show the effect of hippocampal extract (final protein concentration; 35.5 μg/ml). Bar=100 μm.

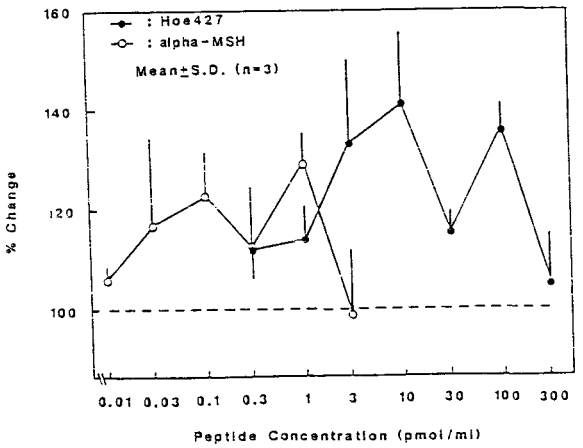


Fig. 3. Determination of alpha-MSH and HOE 427 concentrations necessary for neurite outgrowth.

Table 1 Effect of HOE 427 on acetylcholinesterase (AChE)-positive neurons in dissociated septal culture

HOE 427 added (pmol/ml)	No. of positive neurons (No./dish)	Positive neurite length (μm/cell)
Control (PBS)	222 ± 8	97.9 ± 13.2
Positive control (Hipp.-extract)	1246 ± 127*	160.1 ± 16.5*
0.3 (n=2)	229	109.9
1.0	210 ± 45	121.1 ± 11.8
3.0 (n=2)	276	121.7
10.0	247 ± 31	134.5 ± 16.6*
30.0	232 ± 29	104.2 ± 16.4

The values represent the mean±S.D. of 3 culture dishes. Statistical analysis was performed by Student's t-test (*$p < 0.05$). AChE-positive neurons with the positive neurites longer than one cell diameter were examined for the neurite length. The final protein concentration of the hippocampal extract was 35.5 μg/ml in medium.

[文献]

1. Edwards, P.M., and Gispen, W.H. (1985) In Senile Dementia of Alzheimer Type (Traber and Gispen eds.), pp231-240. 2. Matsumoto, T., Oshima, K., Miyamoto, A., Sakurai, M., and Hayashi, S. (in preparation). 3. O'Donohue, T.L., Miller, R.L., and Jacobowitz, D.M. (1979) Brain Res. 176, 101-123. 4. Ojika, K., and Appel, S.H. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 2567-2571. 5. Strand, F.L., and Kung, T.T. (1980) Peptides 1, 135-138. 6. Tago, H., Kimura, H., and Maeda, T. (1986) J. Histochem. Cytochem. 34, 1431-1438. 7. Verhaagen, J., Edwards, P.M., Jennekens, F.G.I., Schot-man, P., and Gispen, W.H. (1986) Exp. Neurol. 92, 451-454. 8. Verhaagen, J., Edwards, P.M., Jennekens, F.G.I., Schot-man, P., and Gispen, W.H. (1987) Brain Res. 404, 142-152.

40 Ｃａ－カルモジュリンによるグリア細胞成長因子（ＧＭＦ）の細胞分化誘導調節

伊藤仁一・加藤泰治・田中　亮
名市大・医・第一生化

〔要約〕
グリア細胞成長因子(GMF) により誘導されるグリア芽細胞の形態分化に及ぼす細胞内Caとカルモジュリンの作用を検討した。
GMF によりグリア芽細胞の形態分化は、GMF 刺激後24時間から48時間にかけて誘導され、10μM 以上のW-7 は濃度依存的にこれを促進し、逆に1mM $CaCl_2$ と 4μM A23187は阻害した。$CaCl_2$ 、A23187とW-7 を同時に作用させるとGMF の形態分化誘導作用は発現されることから、細胞内Ca濃度が上昇するとカルモジュリンを介して形態分化誘導を阻害することが示唆された。一方GMF 刺激後24時間ではグリア芽細胞の$^{45}Ca^{2+}$の取り込みがコントロール細胞の65～75％に減少し、カルシウム拮抗剤であるニフェジピン・ベラパミルにより形態分化が促進された。これらの事実は、GMF 刺激により、形態分化誘導前に細胞内Ca濃度が減少し、これがカルモジュリン機能を抑制し、グリア芽細胞の形態分化誘導へとつながることを示唆した。

グリア細胞成長因子(glia maturation factor,GMF)で刺激されたラットグリア芽細胞はDNA 合成・細胞増殖促進に続いて、24時間以降にアストロサイト様形態に分化誘導される。形態分化したグリア（芽）細胞では、ストレスファイバーの消失、マイクロフィラメントの裏打ち構造形成・グリアフィラメントおよび微小管の束化が観察される①。またGMF により誘導される形態分化は、先行するＤＮＡ合成過程には依存せず、刺激後30時間以降に促進されるタンパク質合成過程に強く依存した②。一方dBcAMPはタンパク質合成過程に非依存的に２時間でグリア芽細胞の形態分化を誘導した。このようにGMF はdBcAMPとは異なる作用機序を介してグリア芽細胞の形態分化を誘導することが示唆された。今回は、GMF の形態分化誘導作用に及ぼす細胞内 Ca-カルモジュリンの効果をdBcAMPの形態分化誘導作用におけるそれと比較検討した。

［実験方法］

１．ラットグリア芽細胞の培養
在胎17日目のラット胎児より大脳を無菌的に摘出し、血ペイと髄膜を除去し細片後、0.1%トリプシン含有Tyrode液処理を経て20%FCS含有F-10培地にて一次培養した。一週間後0.1%トリプシン液にて細胞を採取し、10%NBS含有F-10培地にて一週間二次培養し実験に供した。

２．ＧＭＦの精製
牛大脳を0.02MTris HCl buffer/saline,pH7.5,でホモジナイズし、遠心上清を透折後凍結乾燥したGMF 粗粉末をエタノール処理後、DEAE-Sephacel,Bio-Gel P-200 により部分精製し実験に用いた。

３．グリア芽細胞による$^{45}Ca^{2+}$取り込み測定
二次培養グリア芽細胞を2%NBC/F-10で培地交換し、24時間後GMF で刺激した。さらに24時間後、Tyrodeで３回細胞を洗浄し、$^{45}Ca^{2+}$含有Tyrodeを添加し各incubation time 後にTyrodeで細胞を３回洗浄し、細胞に取り込まれた$^{45}Ca^{2+}$をＲＩカウントした。

４．細胞骨格の蛍光染色
昨年報告した方法に従い、マイクロフィラメントに対してはNBD-ファラシジン、グリアフィラメントに対しては抗GFAP抗血清を用いて間接蛍光抗体法にてそれぞれの細胞骨格線維を蛍光染色した。

［結果および考察］

GMF 刺激後40時間にW-7 を添加し、２時間インキュベートすると、ラットグリア芽細胞の形態分化は10μM 以上のW-7 により　濃度依存的に促進された(Table 1) 。逆に1mM $CaCl_2$ と 4μM A23187は、GMF による形態分化を強く阻害したが、W-7 が共存すると形態分化は回復した。同様にW-7 存在下で２時間dBcAMP(2mM) を作用させるとグリ　ア芽細胞の形態分化は強く促進され、$CaCl_2$ およびA23187により抑制された。このように、GMF の形　態分化誘導作用は、dBcAMPのそれと同様細胞内Ca濃度の上昇により強く阻害されたが、カルモジュリ　ン機能を抑制することにより細胞内Caの阻害作用は消去された。細胞骨格の蛍光染色観察によると、ストレスファイバーを消失させるGMF の機能はW-7 により促進され、またA23187とCaにより抑制された。同様にGMF のグリアフィラメントの束化作用はW-7 により促進されA23187とCaにより抑制された。これらの事実は細胞内Caの形態分化阻害作用がカ

Table 1 EFFECT OF W-7 WITH OR WITHOUT Ca AND A23187 ON MORPHOLOGICAL DIFFERENTIATION OF GLIOBLASTS TREATED WITH GMF OR dBcAMP

stimulant	concentration of W-7 (uM) 0	10	25	50
GMF (%)	70	80	90	100
+ Ca, A23187	5	10	20	65
dBcAMP	40	60	70	70
+ Ca, A23187	15	30	60	55

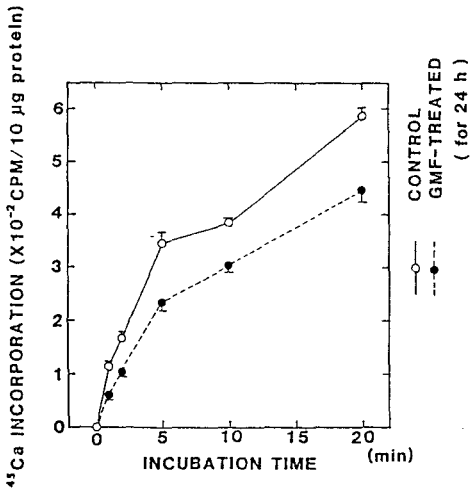


Fig. 1 $^{45}Ca^{2+}$ INCORPORATION BY GLIOBLASTS TREATED WITH GMF

Table 2 EFFECTS OF Ca ANTAGONISTS ON $^{45}Ca^{2+}$ UPTAKE AND MORPHOLOGICAL DIFFERENTIATION OF GMF-TREATED GLIOBLASTS

stimulants	$^{45}Ca^{2+}$ uptake (cpm/10 μg protein)	morpho. differen. (%)
control	290 ± 65	-
GMF	208 ± 16	25
GMF + verapamil (10^{-5}M)	194 ± 3	45
GMF + nifedipine(10^{-5}M)	180 ± 9	55

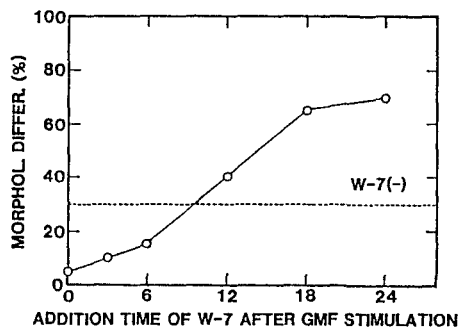


Fig.2 EFFECT OF ADDITION TIME OF W-7 AFTER GMF STIMULATION ON MORPHOLOGICAL DIFFERENTIATION

ルモジュリンを介していることを意味し、またGMF 刺激により誘導される形態分化には、これに先行して細胞内Ca濃度の減少する過程が存在することを示唆した。そこでGMF 刺激後24時間にグリア芽細胞の$^{45}Ca^{2+}$取り込み実験を行うと、Fig,1 に示すように、コントロールに比べ、GMF 刺激された細胞は$^{45}Ca^{2+}$取り込みが25～35% 減少した。またカルシウム拮抗剤であるニフェジピン、ベラパミルにより$^{45}Ca^{2+}$の取り込みは減少し、GMF の形態分化誘導作用は促進された(Table2)。これらの知見より、GMF で刺激されたグリア芽細胞は形態分化に先行して細胞内Ca濃度が減少していることが示唆された。先に我々はGMF のDNA 合成促進作用が細胞内カルモジュリンを介して発現することを報告した③。さらに今回のW-7 (50 μM) がGMF 刺激12時間以降に添加された時のみGMF の形態分化誘導作用を促進する(Fig. 2) 事実を考え合わせることにより、GMF のDNA 合成促進作用と形態分化誘導作用という二種の異なる生物活性が、共にCa- カルモジュリンにより調節されている可能性が示された。

①田中亮ら，1986，神経化学，25,334-336
②伊藤仁一ら，1986，神経化学，25,415-417
③K. Okumura et. al.,1982,Develop.Brain Res., 3,662-667

41 ニューロン培養上清に含まれるオリゴデンドロサイト成熟促進物質の部分精製について

中嶋一行、今澤正興、宮本侃治

(国立精神・神経センター、神経研)

〔要約〕

ニワトリ胚脳より単離したオリゴデンドロサイトにニューロンの培養上清を添加、培養すると、MBP量およびCNP活性が2-3倍増加した。また形態的にもオリゴデンドロサイトの突起伸長のよいことが観察された。これらより、ニューロンの培養上清にはオリゴデンドロサイトの成熟を促進する活性が含まれることが示された。

このオリゴデンドロサイトの成熟促進活性は熱や酸に不安定であり、タンパク性の物質と推定された。

オリゴデンドロサイトの成熟促進活性の分離を試み、それはハイドロキシアパタイトの非吸着、CMセルロースの吸着画分に回収された。またセファロースCL-6Bによるゲルロ過においては、活性は分子量数万の位置に溶出した。

中枢神経系のミエリン形成細胞としてのオリゴデンドロサイト(OLG)はミエリン特異タンパクであるミエリン塩基性タンパク(MBP)(1)や2',3'サイクリックヌクレオチド3'ホスホジエステラーゼ(CNP)(4)を生成することが知られている。我々はMBP量、CNP活性の増加を指標に培養OLGの成熟およびミエリン形成過程を検討してきた。OLGの成熟化に対する他の神経系細胞の作用を検討した中で特にニューロン(Neu)が強い影響を与えたため、その効果について調べた。今回、Neuの培養上清に含まれ、単離OLGの成熟を促進する液性因子の存在を認め、その分離を試みたので報告する。

〔方法〕

<u>オリゴデンドロサイトの分離と培養</u>：OLGはふ卵14日のニワトリ胚脳よりパーコール遠心法により分離した(3)。培養には 5%馬血清を含むイーグルMEMを用いた。

<u>ニューロンの分離、培養と培養上清の調製</u>：Neuとしてはふ卵7日のニワトリ胚脳より分離した細胞を用いた(2)。培養開始後1日間は 5%馬血清を含む培地(ダルベッコの MEM/ハムF12(1:1))で培養し、次に血清を含まない培地で充分洗浄後、5μg/mlインシュリン、20nMプロゲステロン、100μMプトレッシンおよび30nMセレナイトを含む上記混合培地により4日間培養した。回収した培地は遠心後、Neuの培養上清として透析または硫安沈澱を行って使用した。

<u>MBP量とCNP活性の測定</u>：MBPの測定はエンザイムイムノアッセイ法(5)により、CNP活性の測定はSprinkleらの方法(6)により行った。

〔結果および考察〕

<u>培養オリゴデンドロサイトに対するニューロン培養上清の効果</u>：ふ卵14日脳より分離したOLGにNeuの培養上清を20%量添加した場合、MBP量および CNP活性はそれぞれ、1.3倍、1.9倍増加した(表1、上段)。また硫安沈澱を行って10倍濃縮した培養上清を添加した場合は、MBP量、CNP活性はそれぞれ3.1倍、2.3倍増加した(表1、下段)。

顕微鏡下の観察によると、無添加 OLGに較べて Neuの培養上清を添加した OLGは突起伸展のよいことが認められた(図1)。この形態の差は約2週間以上観察された。このようにNeuの培養上清の添加により OLGの成熟促進は、形態的、生化学的に認められた。

<u>ニューロン培養上清の性質</u>：Neuの培養上清の活性について性質を検討しところ、100℃、10分の加熱処理により活性は完全に消失すること、酸(pH3.0)処理および凍結融解などにより活性が30% 以下に低下すること、また飽和硫安により沈澱として回収されることなどからタンパク性のものと推定した。

Table 1 Promotion effect of the neuronal conditioned medium on the maturation of oligodendrocytes

	MBP (ng)	CNP (n mole/min)
A		
OLG	1.44	9.6
OLG + Nsup(20%)	1.89	18.6
B		
OLG	1.67	12.2
OLG + Nsup(20%)	5.17	28.8

Neuronal conditioned medium(A) or tenfold concentrated neuronal conditioned medium(B) was added to oligodendrocytes and the cultures were maintained for 5 days.

Table 2 Partial purification of the maturation activity on Hydroxyapatite and CM cellulose column

	MBP (ng)	CNP (n mole/min)
HAP		
OLG	0.90	11.2
OLG + HAP-1	1.21	17.5
OLG + HAP-2	0.93	11.1
CM		
OLG	0.92	12.6
OLG + CM-1	0.94	12.1
OLG + CM-2	1.31	16.6

HAP-1; non-adsorbed fractions
HAP-2; fractions eluted with 0.5M potassium phosphate buffer
CM-1; non-adsorbed fractions
CM-2; fractions eluted with 1.0M NaCl solution

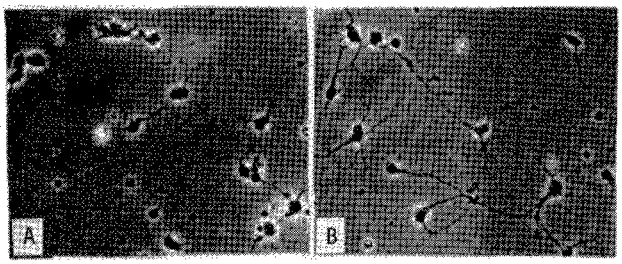


Fig 1 Effect of the neuronal conditioned medium on the process extension of oligodendrocytes

A; control B; + neuronal conditioned medium

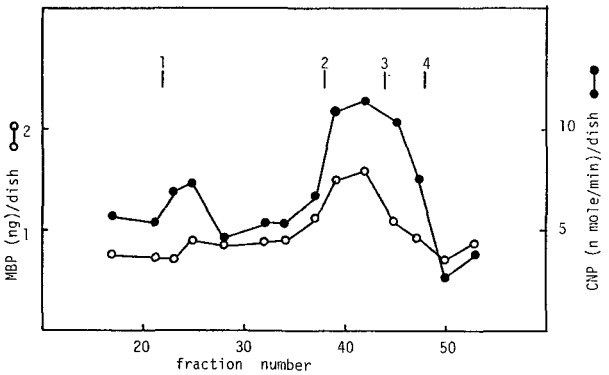


Fig 2 Elution profiles of the maturation activity on a Sepharose CL-6B column chromatography

1; void volume 2; aldolase(158K) 3; chymotrypsinogen (25K) 4; cytochrome c (12.5K)

ニューロンの培養上清に含まれる活性成分の分離：Neuの培養上清を硫安90%飽和で濃縮し、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)に透析後、同緩衝液で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(1.0x8cm)にアプライした。カラムを同緩衝液で洗浄後、0.5Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)によるステップワイズ法により溶出した。素通り画分(HAP-1)と0.5M溶出画分(HAP-2)をそれぞれ集めOLGに添加し、MBP増加効果により活性を調べた。その結果、活性はほとんど素通り画分に回収された(表2)。次にこの画分をCM緩衝液(10mMトリスHCl(pH7.3), 0.1M Nacl)に透析し、同緩衝液で平衡化したCM52カラム(1.0x8cm)にアプライした。カラムは洗浄後、1.0M NaClを含むCM緩衝液を用いてステップワイズ法により溶出を行った。素通り画分(CM-1)と1.0M溶出画分(CM-2)をそれぞれ集め活性を調べると大部分はCM-2に回収された(表2)。次にこのCM-2画分をセファロースCL-6Bカラム(1.0x30cm)によりゲルロ過を行った。各画分のMBP増加活性を調べたところ、分画番号39-44にピークが出現した。CNP活性も同様なピークを与えた(図2)。このピークの位置は標準タンパクの溶出位置から数万と推定された。

活性成分の純度および分子量を調べる目的でCM-2画分のセファロースCL-6B精製後の活性ピークをSDS-PAGEにより分析し、画分39-44に特徴的に存在するバンドとして15Kと16Kが認められたが、これらが活性成分の本態であるかは不明である。この活性成分についてはさらに精製を進める予定である。

〔文献〕

1) Bhat, S., Barbarese, E. and Pfeiffer, S.E. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1283-1278
2) Bologa, L., Aizenman, Y., Chiappelli, F. and de Vellis, J. (1986) J. Neurosci. Res. 15, 521-528
3) Kumagai, H., Imazawa, M. and Miyamoto, K. (1986) Dev. Brain Res. 27, 270-274
4) McCarthy, K.D. and de Vellis, J. (1980) J. Cell Biol. 85, 890-902
5) Shinomiya, Y., Kato, N., Imazawa, M. and Miyamoto, K. (1982) J. Neurochem. 39, 1291-1296
6) Sprinkle, T.J., Zaruba, M.E. and Mckinann, G.M. (1978) J. Neurochem. 30, 309-314

42 神経細胞のｉｎ ｖｉｖｏおよびｉｎ ｖｉｔｒｏにおける加齢

山口知子＊、 山口仁＊
（東女医大・生化，＊南八街病院）

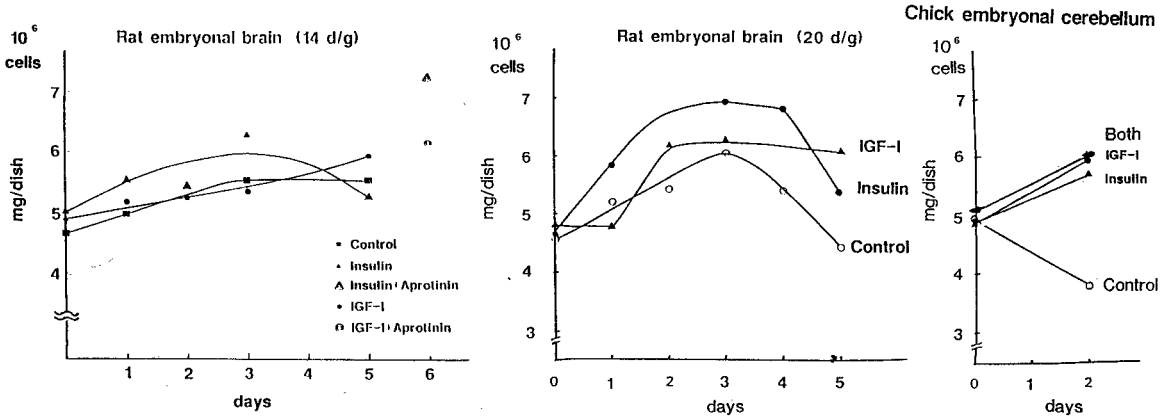
〔要約〕

神経細胞の加齢による変化の研究は、動物を加齢させるに要する年月と費用を考慮すると実験材料の入手において容易ならざる困難があるが、生理的な脳の加齢による変化を捕えることには一つの欠くべからざる方法である。このようにして加齢させた動物のニューロンの変化は必ずしもヒトの加齢脳のモデルにはならないにしても、観点をしぼればモデルとしての共通性がある。加齢動物の大脳や海馬におけるアセチルコリンの著しい減少は、コリン作動性ニューロンの加齢による変性の研究材料として有用であろう。一方、培養系におけるニューロンの成熟ないし生存系の無血清培地の確立は、研究モデルとしてより実用性のあるものとして望ましいが、未だ、中枢神経ニューロン初代培養の無血清培地は確立されていない。培養系の検討に、今回、われわれは、ニワトリ胚の大脳および小脳のニューロンおよびラットの胎生大脳ニューロンを無血清培地で培養し、インシュリンおよびインシュリン様成長因子Ⅰ（ＩＧＦ－Ⅰ）のカテコールアミンニューロン系の成熟ないしは活動におよぼす影響を検索したところ、ニワトリ胚ではインシュリンもＩＧＦ－Ⅰも同様に培養系でのＮＡの合成を促進したが、ラット胎生脳ではＩＧＦ－Ⅰの効果の方がＮＡニューロンの発現により特異的因子であることが認められた。

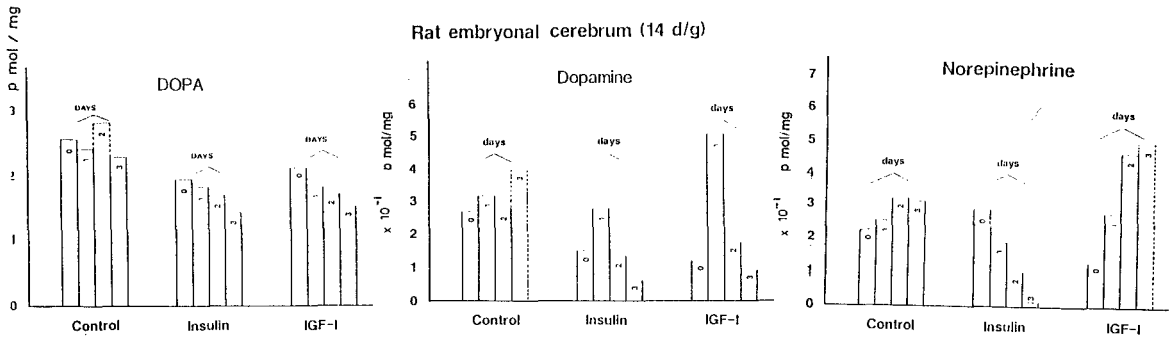
〔実験方法〕

加齢動物脳は三年齢のラットおよび二年齢のスンクスの大脳、海馬、および小脳のホモジネートを10^{-6}Mのネオスチグミン存在下で調整し、除タンパク上清を試料としてアセチルコリンの分析をおこなった。内部標準としてエチルホモコリンを加え、イオン交換－酵素カラム（ＴＯＡ－ＰＣＴ－８０１）法によるＨＰＬＣ／ＧＣ／ＥＣＤにて分析した。胎生ニワトリおよびラットの脳は無菌的にとりだして基本培養液（Ｈａｍ’ｓ Ｆ－１２：Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ ＭＥＭ＝１：１，Ｎａ－Ｈｅｐｅｓ ｂｕｆｆｅｒ １５ｍＭ，Ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ １００μｇ／ｍｌ）中にけん濁してナイロンメッシュを通過させて（１９０μｍと１３０μｍ）細胞をばらしてから、軽く遠心してふたたび７０μｍのメッシュを通過させてｐｏｌｙ－Ｌ－Ｌｙｓでコートした２．５Ｘ２ ｃｍのカバースライドを入れた３．５ｍｍの培養ディッシュ中に２．５ｍｌの培養液あたり約10^{6} ケの細胞を播いて３７℃，O_2 ９５％，CO_2 ５％のインキュベーター中で２－６日培養した。インシュリンは５ｕｇ／ｍｌ，ＩＧＦ－１は１００ｎｇ／ｍｌ，アプロチニンは１０μｇ／ｍｌ加えて培養したのち、ホモジネートを調製してタンパクはＬｏｗｒｙ法で測定した。カテコールアミンの測定は、除タンパク上清をＨＰＬＣ／ＧＣ／ＥＣＤにて分離測定した。

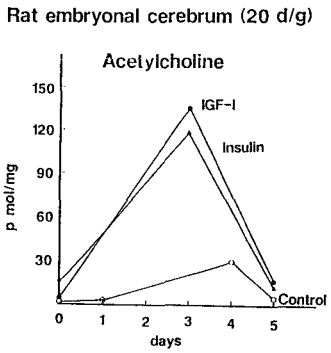
〔結果〕



ｉｎ　ｖｉｖｏにおける加齢動物の大脳および海馬におけるアセチルコリン（Ａｃｈ）の著しい減少がラットおよびスンクスで認められたが小脳では加齢による減少はほとんど認められず、ヒトの大脳中隔野や海馬でのＡｃｈニューロンの痴呆脳における変性は実験動物における生理的加齢脳においても認められＡｃｈニューロン変性のモデルになるが、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　におけるＡｃｈニューロンの発現は遅く、現在、培養系での検討は難しい。一方、胎生脳の無血清培地での成熟ないし生存はラットの大脳では三日まではいずれの培地でもタンパクの増加がみられるが、ニワトリ胚の小脳では基本培地だけでは生存不可能であった。これらの培地におけるＣＡの分析結果の一例が１４日齢のラットの大脳の培養系でしめされている。ＤＯＰＡは基本培地では培養期間中不変であったが、インシュリン培地（Ｉ培地）やＩＧＦ－Ｉ培地では次第に減少してゆくが、Ｄｏｐａｍｉｎｅは Ｉ培地、特にＩＧＦ－Ｉ培地での二日目で増加して、以降減少した。ＮＥの消長は培地差が特異的でＩ培地では著しく減少してゆきＩＧＦ－Ｉ培地では細胞の生存期間中増加が認められた。



右図には胎生２０日ラットの大脳の培養系における三日目のＡｃｈの増加がインシュリンあるいはＩＧＦ－Ｉをふくむ培地系で示された。しかし胎生１４日のラットの大脳の培養ではいずれの培地においてもＡｃｈの発現は認められなかった。



〔考察〕

中枢神経ニューロンの成熟、機能ならびに生存をモジュレートする因子としてグリア由来のＢＤＮＦや血清中のＩＧＦ－Ｉなど種々の分子候補が挙げられているが、いずれにしてもそれらの作用機序に関しては分子としての特性が明らかにされていない。無血清培地でこれらの因子を特定して培養できる系が確立されれば、更に多くの因子の導入とそれらの作用機序を明らかにすることができる。血清およびグリアのない培地にインシュリンないしＩＧＦ－Ｉを加えるとラット胎生脳の培養が６日間、トランスフェリン存在下で可能であるとのＡｉｚｅｎｍａｎ[1]　らの報告に基ずき、ニワトリおよびラットの胎生脳の培養を試みて、ＣＡ系ならびにＡｃｈ系の発現を検索したところ、ＣＡ系の発現には種差がありＮＡの増加はラットではＩＧＦ－Ｉが特異的であったことは発生学的にみて興味ある結果と思われる。

またニューロンの発生が遅いと思われるＡｃｈ系の培養実験には胎生後期の、あるいは生後の幼弱脳ないしは加齢脳の培養系での生存の条件の確立が望まれる。セリンプロテアーゼのアプロチニンは培養期間中のタンパクの増加には有効であったが、それらのニューロン系の発達や生存との関係は今後の問題と思われる。

〔文献〕

1) Y.Aizenman and J.de Vellis: Brain Res. 406, 32-42 (1987)

43　E－64（チオールプロテアーゼ阻害剤）のラット脳初代培養細胞の蛋白代謝に及ぼす影響

松井和隆，衛藤義勝，石川博＊，下条貞友＊＊
宮原正＊＊
慈恵医大・小児科，解剖＊，第二内科＊＊

〔要約〕
チオールプロテアーゼ阻害剤であるE－64は筋ジストロフィー症や多発性硬化症などの治療薬として注目されている。前回の本学会において我々は、ラット脳初代培養細胞に1μg／ml以上の濃度のE－64を投与すると細胞内に封入体が出現することを示し、プロテアーゼ阻害剤のライソゾーム酵素活性、ガングリオシド代謝、脂質代謝に対する分析結果を報告した。今回我々は、^{14}C-Leucine と3μg／mlの濃度のE－64を添加後、Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 並びにAutoradiography を施行し、蛋白合成に及ぼす影響を検討した。また、ライソゾーム酵素であるAcid phosphataseの染色を行った。E－64添加にて細胞内Acid phosphatase活性を示す顆粒の増加を認め、蛋白合成に差異が認められた。

プロテアーゼの活性の異常と各種疾患との関連性についての報告は多く、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（4）。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（2，3）、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。しかし、1984年、Ivyらはチオールプロテアーゼ阻害剤であるLeupeptin をラットの脳室内に直接投与すると、大脳皮質運動野の錘体細胞や小脳のプルキンエ細胞に封入体が出現すると報告した（1）。我々はプロテアーゼ阻害剤のラット脳細胞に対する直接的作用をみるため、Leupeptin とE－64の添加実験を施行したところ細胞内に封入体が出現したため前回の本学会にて報告を行った。封入体出現には蛋白代謝変化が関与していると予想される。今回我々はE－64作用時の蛋白代謝について検討したので報告する。

〔実験方法〕

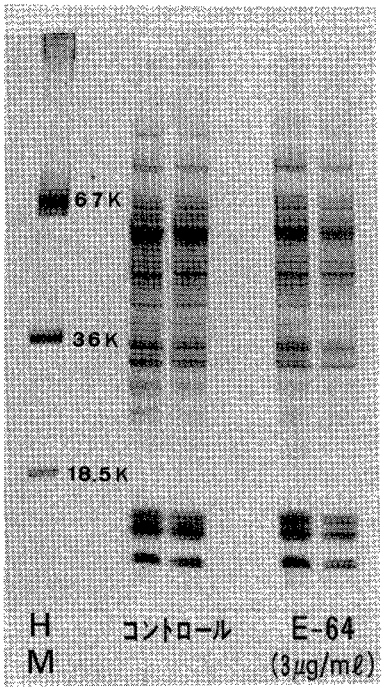
胎生15日令のWistar－今道ラットより大脳半球を採取し、細切後、210μm、140μm、25μmのナイロンメッシュを通し細胞を単離した。Poly-DL-ornithine でコーティングした100mmシャーレに単離した細胞を5×10^5／ml の濃度で撒き、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 内で5日間培養後、3μg／mlの濃度のE－64と^{14}C-Leucine を5μCi5日間添加後細胞を採取し、SDS-PAGEを施行した。ゲルを乾燥後autoradiography （3週間露出）を施行した。フィルムはデンシトメーター（Shimazu wavelength TLC scanner,CS-930）にて分析した。一方、あらかじめPoly-DL-ornithine でコーティングした直径18mmのカバーガラスの入った35mmシャーレに細胞を撒き、EMEM内で5日間培養後3μg／mlの濃度のE－64を5日間添加、カバーガラスを取り出しacid phosphatase染色を施行した。

〔結果〕

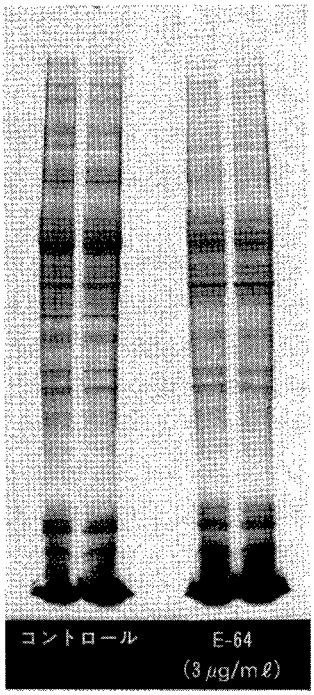


（写真1）E－64を5日間投与した細胞の電顕写真

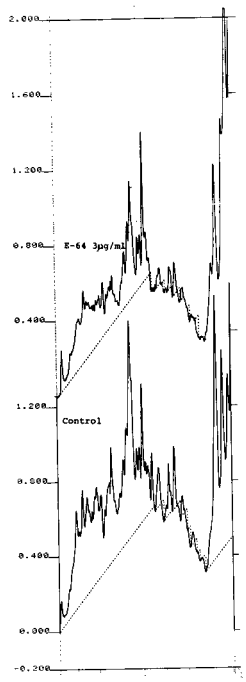
写真1はE－64投与により出現してくる封入体（矢印）を示した電顕写真である。この封入体は一重の膜で包まれており内部に小顆粒状の物質の集積がみられる。写真2はSDS-PAGEの結果を示す。大きな差異はみられない。写真3は細胞に^{14}C-Leucine を添加し取り込ませた後にautoradiography を施行した結果を示す。多くのバンドで差がみられデンシトメーター解析（写真4）ではパターンの差が明かである。写真5はacid phosphatase染色の光顕写真である。細胞質内に、コントロール細胞（5a）と比較してE－64投与細胞（5b）にはacid phosphatase 活性を示す顆粒が多数出現しているのが明かである。



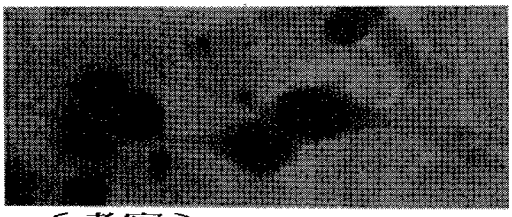
（写真２）ＳＤＳ－ＰＡＧＥ



（写真３）Autoradiography

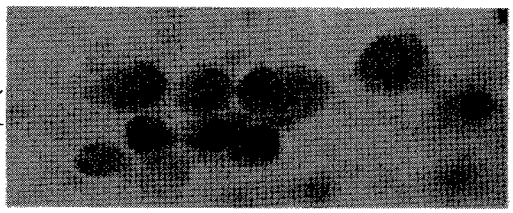


（写真４）Densitmetric analysis



（写真５ａ）
コントロール

（写真５ｂ）
Ｅ－６４



〔考察〕

現在、セリンプロテアーゼ阻害剤は膵炎に対する治療に非常に有用である。プロテアーゼ活性の異常が原因とされる疾患がみられ、膵炎のみならずプロテアーゼ活性亢進を抑えることにより治療ができる疾患は今後増えていくことが期待される。血清や組織液中のプロテアーゼ活性亢進を抑えるのではなく細胞内の活性を抑えるときは、特にどの様な影響を薬剤が細胞に与えるのかを正確に把握することが重要と思われる。

プロテアーゼ阻害剤投与により細胞内代謝系のどのような変化が起こり封入体が出現するのだろうか。電顕写真上、細胞内に一重の膜で包まれる封入体がみられた。ライソゾーム内に存在するacid phosphataseはライソゾーム部に一致して染色されてみえてくるが、Ｅ－６４を投与するとコントロールと比べてacid phosphatase活性を示す顆粒が多数出現してきた。電顕写真と合わせるとこの封入体はライソゾームである可能性が高いと思われた。^{14}C-Leucine を添加し蛋白合成をみると、コントロールと明らかな差が出現した。コントロールで強くみられるバンドもありＥ－６４投与により分解が阻害され物質が蓄積するだけではなく、合成系にまで影響が及んでいる可能性が示唆された。

蛋白質の分解過程については生体内プロテアーゼは非常に広い特異性をもつため、どのプロテアーゼがどの蛋白質を分解するのか厳密に推定できていない。差が出現した蛋白質の同定ができればチオールプロテアーゼの関与する蛋白質が多少明かになることが期待される。

現在、Ｅ－６４投与による蛋白代謝の変化を時間を追って検索中である。

〔文献〕

（１）Ivy,G.O.,et al(1984)Science 226,985-987
（２）Kar,N.C.,and Pearson,C.M.(1976) Clin.Chim.Acta 73,293-297
（３）Miyahara,T.,Simojou,S.,et al.(1985) 臨床薬理 16,357-365
（４）Miyatake,T.,et al. (1986) 神経進歩 30,160-169

44 培養中枢コリナージックニューロンの脳内移植

久永欣哉[***]、武井延之[*]、津久井弘子[***]、畠中寛[***]
([*]三菱化成生命研・脳神経科学、[**]東北大学・医・神経内科、[***]大阪大学・蛋白研)

〔要約〕
ラット胚の中隔野コリナージックニューロンを無血清完全合成培地で6～8日間培養した後、再分散し、あらかじめ中隔－海馬経路（fimbria-fornix; f－f）を切断しておいたラットの海馬に移植した。4～6週間後、アセチルコリンエステラーゼ（AChE）染色により、組織化学的検索を行ったところ、28例中すべてにおいて、コリナージックニューロンの生着とホスト組織内への突起の伸展が認められた。また、移植によって海馬の萎縮を防止、あるいは回復する傾向が認められた。培養中の神経成長因子（NGF）の添加は、移植後の生着や神経突起の成長には影響を与えないようであった。一方、生後のニューロンは一般に移植困難とされるが、生後4日のラット中隔野コリナージックニューロンをNGFを含む血清培地で5日間培養した後、同様に移植したところ3例中1例で生着を認めた。

ニューロンの脳内移植はその分化・成長・再生や神経回路網の再構築の研究の有用な方法である。本報告では、グラフトに培養ニューロンを用いることによって、細胞レベルでの研究がより容易になると考え[1]、グリア細胞をほとんど含まない無血清完全合成培地で培養した、ラット胚中隔野コリナージックニューロン[4]の脳内移植を試みた。培養の際、NGFの添加、無添加の効果も調べ[2]、その後、予めf－f切断によりコリナージック神経支配を断っておいたラット海馬内へ移植し、その生着と突起伸展を調べた。

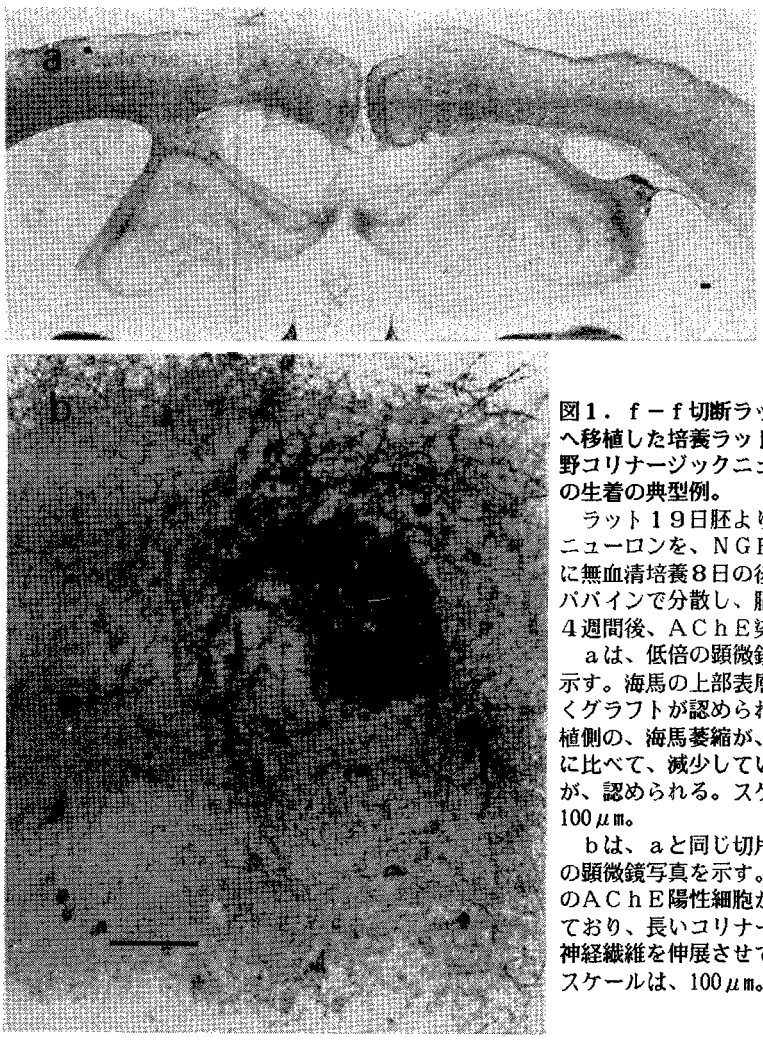


図1．f－f切断ラット海馬へ移植した培養ラット胚中隔野コリナージックニューロンの生着の典型例。
ラット19日胚より中隔野ニューロンを、NGF存在下に無血清培養8日の後、再度パパインで分散し、脳内移植4週間後、AChE染色した。
aは、低倍の顕微鏡写真を示す。海馬の上部表層に大きくグラフトが認められる。移植側の、海馬萎縮が、反対側に比べて、減少していることが、認められる。スケールは、100μm。
bは、aと同じ切片の高倍の顕微鏡写真を示す。高密度のAChE陽性細胞が生着しており、長いコリナージック神経繊維を伸展させている。スケールは、100μm。

【実験方法】

胎生17～19日のラット（Wistar）の脳より中隔野を切り出し、パパインで分散後[3]、無血清完全合成培地[4]で6～8日間、NGF存在下および非存在下に培養した。培

養ニューロンは移植手術直前にパパインで再分散し、細胞懸濁液とした。また、シスターカルチャーを行い、コリンアセチル基移転酵素（ＣｈＡＴ）活性を測定した。ホストとして用いたラット（Wistar ♂、９～１２週齢、体重２５０～３５０g）は、予め６～９日前に両側のｆ-ｆをナイフで切断しておいたものを用い、右側海馬に細胞の移植を行った。細胞懸濁液は１～２×１０^6 cells／５μｌで１０分以上かけて、ポンプを用い一定スピードで注入した。４～６週間後、ホストの脳を４％ＰＦＡで灌流固定し、２０μｍの cryostat 切片をＡＣｈＥ染色して、コリナージックニューロンの生着を調べた。

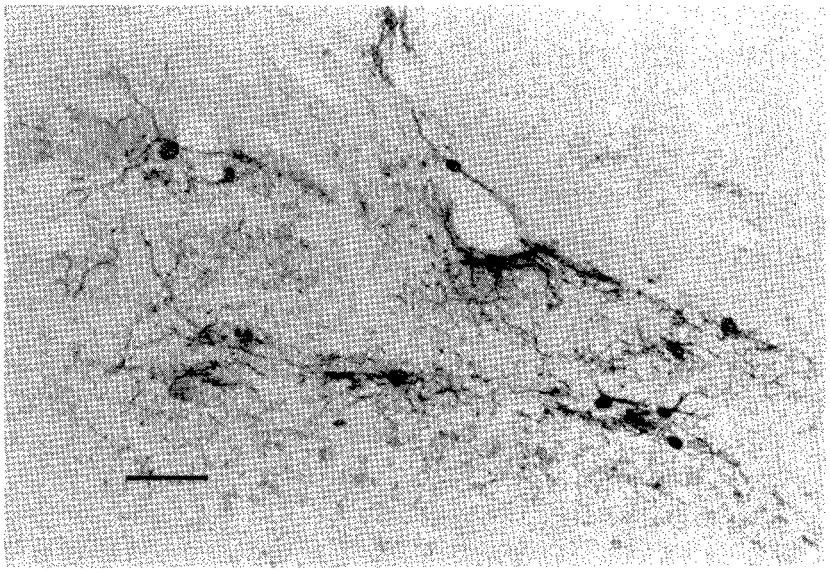


図２．ｆ－ｆ切断ラット海馬へ移植した培養生後４日ラット中隔野コリナージックニューロンの生着の例。
生後４日のラットより中隔野ニューロンを、ＮＧＦ存在下に血清存在での培養５日間の後、再度、パパインで分散し、脳内移植４週間後の、ＡＣｈＥ染色像を示す。移植されたコリナージックニューロンは、海馬の層に沿って、点在していることが認められる。スケールは、100μｍ。

【結果と考察】

移植を行った２８例中全例で生着と突起の伸展が認められた。海馬実質中（１２例）、海馬の上部表層（１１例）（Fig. 1 a,b）、海馬近傍の脳弓（１９例）にそれぞれ大きなグラフトが認められた。残りの３例でも小さなグラフトが注入針の跡にそって見られた。また、ＡＣｈＥ染色の染色性が海馬から皮質まで全体に強くなっているのが観察された（Fig. 1 a）。一方、半数以上の例で移植した側の海馬が反対側に比べ大きく海馬の萎縮が予防されたか、または回復した可能性を示していた。このことは移植細胞によるトロフィック作用を示唆するものかも知れない。シスターカルチャーではＮＧＦによってＣｈＡＴ活性は５５９％に増大していた（－ＮＧＦ；9.97±0.92、＋ＮＧＦ；55.76±2.73（mean±SD,n=4）pmol/min/well）。しかし、培養下に、ＮＧＦを添加してもしなくても移植後の生存や突起の伸展には影響が無いようにみえた。

また、従来困難とされていた生後ニューロンの場合でも、血清とＮＧＦを含む培地で培養した生後４日のラットからの中隔野のニューロンが３例中１例ではあるが生着していた（Fig. 2）。

以上に示した初代培養ニューロンの脳内移植の成功は、培養下にコントロールしたニューロン群をグラフトとできるため、ニューロンを予め遺伝子操作あるいは細胞工学的操作を施すことも可能となり、脳機能解明手段としての脳移植テクニックの可能性を高めたものと言える[1]。

【謝辞】 本研究遂行に当たり、種々ご援助ご討論戴きました川村浩、工藤佳久、池上司郎、二本松伊都子諸先生（三菱化成生命研）および小暮久也先生（東北大・医）に深く感謝致します。

【文献】 1. 武井延之、久永欣哉、畠中寛、(1988) 神経進歩、印刷中. 2. Hisanaga, K., Tsukui, H., Takei, N. & Hatanaka, H., (1988) Brain Ras., in press. 3. Hatanaka, H., Tsukui, H. & Nihonmatsu, I.(1988) Dev. Brain Res., 39: 85-95. 4. Hatanaka, H. & Tsukui, H. (1986) Dev. Brain Res., 30: 47-56.

45　培養中隔核コリン作動性神経の発育分化に対する血清の作用について

野倉一也*、林　謙一郎**、小鹿幸生**、新美達司*、山本正彦**
名古屋市厚生院内科*、　名古屋市立大学医学部第２内科**

〔要約〕

胎齢16日目のRat 中隔核組織片を小鹿らの方法により培養し、培養液に血清 (serum) 、laminin 、fibronectin および NGFを種々の濃度で添加することにより、それらの作用を形態的及び生物化学的に検討した。 serum 中にはneurite のdensity を増加させ、acetylcholine (Ach) 合成能を促進する因子が存在することが示された。この因子は濃度依存性と飽和効果を示し、年齢とともにserum 中に増加する傾向を示した。一方laminin はneurite lengthを増大させる傾向を示したがAch の合成能を増加させる効果は認められなかった。fibronectin 及びNGF は単独でも、またserum の飽和濃度にさらに添加してもAch 合成能を促進する効果があり、特に後者は著明であった。以上より培養中隔核組織に対し形態的、生物化学的促進効果を示すserum 中の因子はlaminin , fibronectin , NGF のいずれとも異なる物質であると考えられた。serum の熱処理（60℃, 95℃）、酢酸処理(0.2～0.025N) による検討で、serum 中の因子は熱変性し易く、弱酸中では比較的安定であることが示唆された。

緒言：Kaufman は脊髄前角細胞の発育分化を促進する因子が血清中に存在することを(1) 、さらに小鹿らは海馬組織中の神経栄養因子の検討から、海馬不溶性因子と血清（以下serum ）が類似した作用を示すことを報告している(2)(3)。このようなことから、我々は血清の培養中隔核組織に対する形態的、生物化学的影響と既存物質、Laminin fibronectin およびNGF の作用との異同、さらに血清中因子の加齢による変化や加熱、酢酸などによる物理化学的処理による作用の変化を検討した。

方法：胎齢16日のSD系rat 脳から中隔中心核を摘出し0.3 ～0.4 mmの細片組織を得、小鹿ら(4) のserum-free de-find medium を使用して組織培養を行った。この際、fetal calf serum (FCS,Gibuco) 、年齢の異なる ratからのserum 、laminin (Sigma,EHS-sarcoma) 、fibronectin (Sigma) 、およびNGF (Collaborative Research,2.5S,mouse submaxillary glands)を種々の濃度で培養液に加え、３日目に写真撮影によりneurite outgrowth を観察、培養６日目に H-ch を用い、先に報告した方法(4) に従ってAch の合成能を測定し、産生されたAch 量を単位組織片当たりの量で表した。さらにFCS を60℃および95℃で0 ～40分間加熱処理したもの、0 ～0.2Nの酢酸処理を加えたものを使用して同様に検討した。

結果および考察：［serum 単独添加による影響］ 培養３日目の形態的観察では、1%のserum 添加群は、無添加のcontrol 群に比し、neurite の先端部まで密なneurite network が認められた。また、培養組織のAch の合成能は濃度依存性に増加し、0.6%以上のserum 濃度で飽和を示した(Fig.1) 。さらに新生10日から180 日までのrat serum を0.4%の濃度で培養液に添加し、各年齢のserum がAch 合成能に及ぼす影響を検討したところ、Fig.2 の如くAch 合成能と年齢とは有意な正の相関を示した（r=0.72,p<0.01)。これらのことから、serum 中には培養中隔核組織の形態的生物化学的発育を促進するsaturable な因子群が存在し、年齢とともに血清中に増加する可能性が示唆された。

Fig.1　Dose Effect of Serum on Ach Synthesis

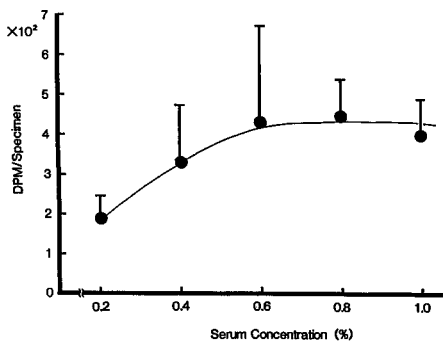
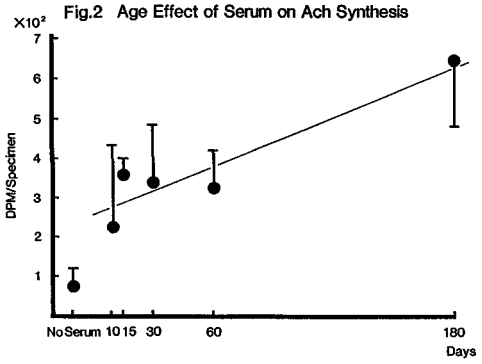


Fig.2　Age Effect of Serum on Ach Synthesis

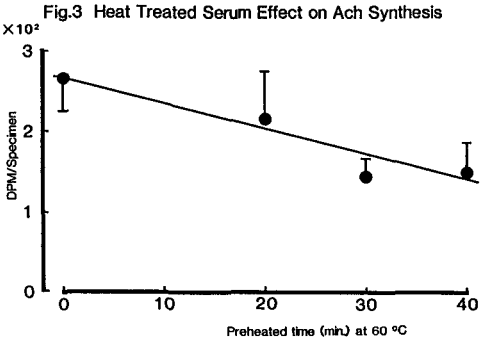


［既存栄養因子との異同の検討］serum 中の因子とlaminin 、fibronectin 、NGF との異同を明らかにする目的でこれらの既存因子単独添加群と、飽和量のserum を同時に添加した群が中隔核培養組織に及ぼす影響を比較検討した。形態的にはlaminin またはfibronectin を単独で投与した際のneurite outgrowth は、共に直線的にneurite を伸長させる傾向があり、1%serum 添加時に観察された密なneurite network は観察されなかった。laminin を6.7 μg/ml添加した際の培養組織片よりの最大線維長は304 ±71μmmであり、1%serum 添加の213 ±50μmmに比較し、線維長の増大傾向が認められた。しかしfibronectin には類似した作用は認められなかった。Ach 合成能促進作用は、laminin 単独投与群では低濃度、高濃度共に認められず、fibronectin 単独投与では軽度な増加が認められたが、serum を同時に添加した際には、両者を単独で添加した際の総和に近似した値を示した。また、NGF を単独で添加した際には、濃度依存性にAch の合成能は増加を示し飽和量のserum を同時に添加すると、それぞれ両者単独で添加した際の総和またはそれ以上の合成能を示した（Table1）。以上の結果からserum 中の中隔核培養組織に促進的影響を及ぼす因子はこれらの既存因子とは異なるものと考えられた。

Table 1. The effect of each substances on Ach synthesis of medial septal nucleus culture in vitro. Values are percentages compared with the control value of 100%.

Added substances	Added value	Ach synthesis(%)
no serum control		100
1% serum		791
laminin	0.67(g/ml)	99
	6.7	96
1% serum+laminin	0.67	703
	6.7	748
1% serum		909
Fibronectin	0.67	128
	6.7	146
1%serum+Fibronectin	0.67	1051
	6.7	993
1% serum		1807
NGF	0.5 (ng/ml)	221
	5	264
1% serum+NGF	0.5	2156
	5	3924

Fig.3 Heat Treated Serum Effect on Ach Synthesis



［serum 因子の物理化学的性質］未処理serum 0.5%添加時の培養組織のAch 合成能は372 ±146 DPM/specimenであったが、95℃ 5 分間加熱処理をし、同濃度で添加した群では、108 ±29DPM ／specimenと著明にその活性は減少した。また、60℃による加熱処理では、処理時間とAch 合成能とは負の相関を示した(Fig.3) 。serum に酢酸を0.025N、0.2Nとなるように添加、4 ℃で15時間放置後凍結乾燥を実施、純水で再溶解後培養液にserum 濃度0.5%となるように添加し培養組織への影響を検討した。各々の酢酸濃度で処理をした群の中隔核培養組織のAch 合成能は244 ±22、285 ±67DPM/specimenであり、未処理群の216 ±17DPM/specimentin に類似した値を示した。以上よりserum 中の因子は熱変性を受け易いが、弱酸性溶液中では比較的安定な因子と考えられた。

Kaufman 等によるserum 中の脊髄前角細胞発育促進因子はその分子量が55000 daltonであること(1) から、neuroleukinとの類似性が指摘されている(5) がneuroleukin の中隔核コリン作動性神経に対する作用については明確ではない。今後この様な点を含め、血清因子の物理的、化学的性質をさらに明らかにすると共に、作用神経特異性についても検討する必要があると思われる。

文献

1. Kaufman, L.M. et al.,Serum factor supporting long-term survival of rat central neurons in culture. Science 220: 1394. 1983.
2. 小鹿幸生他、海馬可溶性神経発育促進因子のpartial purificationについて、神経化学、24:493,1985.
3. 小鹿幸生、海馬の神経発育促進因子、薬物、精神、行動 7:447,1987.
4. Ojika, K. et al.,Neurotrophic effects of hippocampal extracts on medial septal nucleus in vitro.Prc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 2567, 1984.
5. Gruney, M. E. et al., molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons. Science 234, 566, 1986.

46 シナプス形成を阻害するモノクローナル抗体のスクリーニング-----培養海馬ニューロンシナプス形成系へのモノクローナル抗体長期添加の影響

黒田洋一郎、小林和夫、村本和世、小倉明彦*、工藤佳久*
東京都神経科学総合研究所・神経生化学、
*三菱化成生命科学研究所・脳神経薬理

〔要約〕

1．シナプス形成を阻害するモノクローナル抗体をスクリーニングする目的でラット海馬ニューロンの初代培養シナプス形成系にモノクローナル抗体を長期添加した。

2．4日間以上の培養で海馬ニューロンは相互にシナプスをつくり、ニューロン回路網中に含まれる自発発火ニューロンの活動に同期した興奮を繰り返し、それにともなってニューロン内に流入したCa^{2+}による細胞内Ca^{2+}イオン濃度の増大が同期する。いくつかのモノクローナル抗体の長期添加はこの細胞内Ca^{2+}の同期増大を消滅させた。、

3．これらの抗体のうちには、自発発火ニューロンの活動は観察され、短期投与ではシナプス伝達を阻害しない抗体があり、この系はシナプス形成を阻害するモノクローナル抗体のスクリーニングに有効であることが解った。

［はじめに］

神経系の発生分化、記憶などの脳機能の可塑性の基本にあるシナプス形成過程の分子レベルの解析と機能分子の同定は、神経科学の最も興味深いテーマの一つであるばかりでなく、脳の疾患、障害、老化の治療、改善の為の基礎研究としても重要である。シナプス形成過程に関与する分子には発芽因子リセプター、成長錐の基質接着因子、特異性決定因子、シナプス接着因子など細胞表面に存在すると考えられるものが多い。この様に、物質的に未知のものが多い神経機能分子の研究には、特異的な阻害剤が重要なことは、従来、α－ブンガロトキシン、テトロドトキシンなど特異的な阻害剤がリセプターやチャンネルの分子レベルの研究を飛躍的に進歩させてきたことでも明らかである。しかしながら、シナプス形成に関しては、このような天然の神経毒は現在のところ知られていないので、新しいstrategy が必要である。一般にポリクローナル抗体が抗原分子の機能を阻害することが知られており、そのなかには抗原分子の機能を特異的に阻害するモノクローナル抗体が含まれている。幸い、モノクローナル抗体は抗原を精製しなくても抗体が得られる利点があるので、良いスクリーニング系さえあれば、抗原群のモノクローナル抗体ライブラリーから目的の機能分子にたいする機能阻害モノクローナル抗体をスクリーニングすることができる（1）。

本研究は、我々が1982年以来作り上げてきたラットPC－12細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体ライブラリー（2）を、工藤らによって開発された細胞内カルシウム蛍光ビデオモニター装置（3）により、ラット海馬培養ニューロン間シナプス形成アッセイ系（4）で機能スクリーニングし、シナプス形成を阻害する機能阻害モノクローナル抗体を得ようとする試みである。

［材料と方法］

神経成長因子で分化させたPC－12細胞表面抗原モノクローナル抗体ライブラリー（5）は既報のものを用いた。胎生18日のラット海馬ニューロンの培養はCowanらの方法（6）を若干変更して行い、4日間以上の培養でシナプス形成を行わせた。モノクローナル抗体は培養上清および腹水から硫安分画で精製したものを、PBSで10倍以上希釈したものを用い、濾過滅菌後培養液に添加した。培養液の交換時には等濃度になるように抗体を加えた。4－10日後培養液を除き、BSS液に替えfura-2AMを添加し、30－60分後に蛍光ビデオ装置を使って細胞内Ca^{2+}濃度の変化を既報のようにアッセイした（4）。アッセイは原則として、1つの培養から数視野をランダムに選び、ビデオテープに同時記録し、ビデオを再生することにより、1視野から約30以上のニューロンから蛍光変化をペンレコーダーに記録した。既に知られているように、fura-2はニューロンに選択的に取り込まれるが、観察後高カリウム刺激を行い、細胞内Ca^{2+}濃度が上昇する細胞をニューロンと判定した。

［実験結果と考察］

1。自発発火ニューロンの検出

4－8日間培養した海馬ニューロンで見られる自発性、かつ同期したfura-2による蛍光強度の変化は、TTX（1μM），2-aminophosphonovaleric acid（1－10μM）の添加、外液のCa^{2+}濃度を低下させることなどで可逆的に消失する。従って、これらの現象は、培養された海馬ニューロンが主としてグルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスを相互に形成し、このニューロン回路網中に含まれる自発発火ニューロンがpacemakerとなって回路内のニューロンを周期的に興奮させていると考えられる（4）。培養10日目の海馬ニューロンをもちい、

通常のCa^{2+}濃度で同期した多数のニューロン活動をモニター後、外液のCa^{2+}濃度を0．3mMに下げ、同視野中の28個のニューロンの活動を蛍光強度の変化でモニターしたところ、ほとんどのニューロンでは蛍光の増大が見られなくなったが、2個のニューロンで独立の周期を持つ同期しない蛍光の増大がみられた。シナプス伝達が阻害されたことにより、自発発火ニューロンの活動だけが観察されたと考えられる。

2．抗体の長期添加の影響

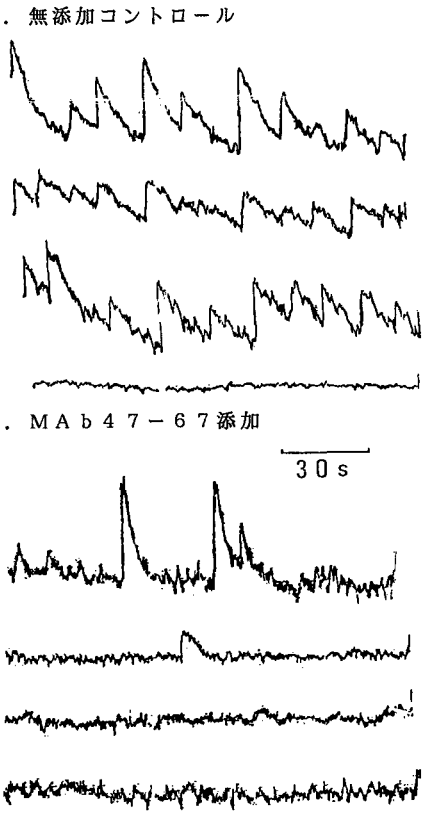
モノクローナル抗体の長期添加によるシナプス形成への影響として、抗体による発芽因子リセプターや成長錐の伸展の阻害により、突起の形成が見られなかったり、不十分だったりする光学顕微鏡で観察できる変化がある（表A群）が、現在までのところそのようなモノクローナル抗体は得られていない。抗ラミニンポリクローナル抗体（お茶の水女子大・林　正男先生より恵与）はグリア細胞の変化によると思われる形態変化を起こしたが、このとき、細胞内Ca^{2+}の同期増大はみられ、シナプスは形成されていた。

多くのモノクローナル抗体の長期添加は細胞内Ca^{2+}の同期増大に影響を与えなかった（表B群）。実験に用いられた濃度範囲において、我々の方法で調製したモノクローナル抗体標品が、非特異的にシナプス形成を阻害することはなかった。しかしながら、抗体無添加のcontrol cultureで細胞内Ca^{2+}の同期増大を確認した（図A）ときのsister cultureにおいて、いくつかのモノクローナル抗体の長期添加は濃度依存的に細胞内Ca^{2+}の同期増大を消滅させた。このとき、視野中のニューロンを多数観察してみると、多くの例では観察した全てのニューロンで細胞内Ca^{2+}は有意に変化していなかったが　（表C群）、自発発火と考えられる非同期性の細胞内Ca^{2+}の増大がみられるニューロンが少数見つかる場合があった（図B）。後者の例は、抗体の長期添加が自発発火ニューロンの活動を消滅させたために見かけ上、自発的な細胞内Ca^{2+}の同期増大が見られなかった可能性を否定するものである。この抗体を灌流により短期投与しても自発的な細胞内Ca^{2+}の同期増大には影響が見られない（表E群）ので、シナプス伝達や細胞内へのCa^{2+}流入を直接阻害している可能性も否定できる。このE抗体群にシナプス形成を阻害する抗体がふくまれているので、さらに検討中である。表D群に含まれるシナプス伝達を直接阻害するモノクローナル抗体については既に報告した（7）。

表　PC－12細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体の培養海馬ニューロンへの長期添加の影響による分類

影響		分類
1．形態変化を	起こす	A群
	起こさない	2．
2．細胞内Ca^{2+}の増大の同期	あり	B群
	なし	3．
3．自発発火ニューロン観察	されず	C群
	された	4．
4．短期投与効果	あり	D群
	なし	E群

図　モノクローナル抗体の海馬ニューロン細胞内Ca^{2+}同期増大に対する影響



縦軸は340nmの蛍光強度。8日間培養の同一視野から4つのニューロンの記録を選んだ。A．コントロール：ほとんどのニューロンで同期増大が見られるが（上3例）、少数の増大を示さないニューロンもあった（下1例）。B．モノクローナル抗体47－67添加：ほとんど全てのニューロンで蛍光の増大が見られなかった（下2例）が、同期しない増大を示したニューロンが存在した（上2例）。

[文献] 1）黒田洋一郎、他：神経研究の進歩、31：224（1987）　2）小林和夫、他：神経化学、21：378（1982）　3）小倉明彦、工藤佳久：生体の科学、36：380（1985）　4）Ogura, et al：Neurosci.Let.78：69（1987）5）小林和夫、他：87年神経科学学術集会 6）Banker,G.A. & Cowan,W.M.:Brain Res.:126：397（1977）　7）Y. Kuroda et al ：Society for Neurosci. Abst.:12：27　（1986）

47 単離成長円錐画分の脂質構成

五十嵐道弘
（自治医大・生化学第二）

〔要約〕

ラット胎児脳（胎生 17 日目）より神経成長円錐画分を Pfenninger らの方法に基き、ショ糖密度勾配遠心法を利用して単離し、その脂質構成を検討した。電顕による観察から、本法の再現性が確認された。ガングリオシドの含量は 7.68 μg シアル酸／ mg 蛋白で、成熟脳シナプトソームでの値のほぼ半量であった。ガングリオシド組成では、GD3 が19.2 %と最も多く、次いで GD1a、GT （構造検討中）の順であった。同時期の大脳皮質に比べ、蛋白当りのガングリオシド含量はかなり高く、組成の面でも GM1が高値を示していた。（リン脂質／コレステロール）のモル比は、 1.27 で、シナプトソームのそれと比較すると著しく低値を示した。

神経成長円錐は、幼若神経細胞の軸索及び樹状突起の先端に存在する特殊構造で、高度の運動性と認識能を有して、正確な神経結合の形成を担う部位と考えられている。このような成長円錐の機能は、その特殊な物質構成によるものと推測されるが、現在まで、その生化学的特性は殆ど解明されていない。今回、演者は成長円錐の膜表面の特性を明らかにするため、 Pfenninger らが開発した成長円錐の生化学的単離法を用いて、この画分の脂質構成を検討したので報告する。

（方法）

① 成長円錐画分の単離： Pfenninger (2,4) らの開発した方法を若干改変して行った。ラット胎児脳（胎生 17 日目; E17) を 8倍容の 0.32 M ショ糖溶液でホモジェナイズし、1,700 g で 15 分間遠心する。上清を、0.75 M及び 1.0 Mショ糖溶液の勾配上に重層し、284,000 g で 120分間遠心した後、0.32 M/ 0.75 Mの界面を採取した。これを更に、18,000 g で 60 分間遠心して、沈渣を以下の分析に用いた。

② 成長円錐画分の電顕的観察：採取した成長円錐画分は、通常の方法で固定・脱水・包埋を行い(2,5)、 電子顕微鏡で観察した。6,000 倍で観察した写真をもとに形態学的計測を行い、volume density を決定した (4,7)。

③ ガングリオシドの分析：採取した成長円錐画分より、蛋白含量 1 mg 程度に相当する部分から、安藤らの方法に基いてガングリオシドを精製した (1)。シアル酸含量は、80℃で 1時間加熱した後、TBA 法により決定した 。ガングリオシド組成は、薄層クロマトグラフィー(TLC) 展開、レゾルシノール試薬で発色後、デンシトメトリーによって測定した。

④ リン脂質・コレステロールの分析： Folch法により分画した下層を用い、コレステロールの定量は Zak法の変法、総リン脂質量は Bartlett 法によって測定した(6)。

（結果）

① 単離成長円錐画分の超微形態学的観察：得られた画分を電顕で観察すると、ほぼ一定の大きさ・電子密度・形態を有する粒子が均一に出現した像が得られた（図１）。これらの粒子は、成長円錐に特有の clear vesicles を多数含有していることから、 Pfenninger らの growth cone particles (GCPs) に相当するものと考えられる (4)。GCPs の volume density は約 75 %で、Pfenningerらの原法によるものに極めて近い値が得られた。

② 成長円錐画分の生化学的分析：

a) 蛋白含量：ホモジェネートに対して、0.31 %の蛋白質を含有しており、文献での報告値に近い値が得られた(2)。

b) ガングリオシド：ガングリオシドのシアル酸含量は、7.68± 1.58 μg/ mg of protein (n=4) であった。この値は

成熟ラット脳シナプトソーム画分での値のほぼ半量であったが、E 17の大脳皮質で得られた値よりはかなり多量であった（表1）。組成に関しては（表2、図2）、GD3 が最も多く、次いでGD1a、GT（構造は検討中）であった。同時期のラット胎児大脳皮質のガングリオシド組成と比較すると、GM1 の含量が成長円錐画分で高かった。

c）リン脂質及びコレステロール：成長円錐画分での、（リン脂質/ コレステロール）のモル比（PL/Ch)は、1.27 ± 0.14 (n=4)であった。これは成熟脳シナプトソームでの値（ 3.02 ± 0.22, n=4)に比べ、有意に低値を示した。ラット胎児脳（胎生 17 日目）での値は 2.36 であった。

（考察）

Pfenningerらの原法を若干改変したが、形態学的観察及び蛋白定量から得られたデータは、原法による報告値とほぼ同様の値を示した。これにより、成長円錐画分の単離法は十分な再現性が得られるものと考えられる。

胎生 17 日目由来の成長円錐画分のガングリオシド組成に関しては、GD3 が最も主要な分子種であったことから、従来、細胞の増殖に関係が深いと考えられていた GD3が、増殖停止後の移動の過程にも強く関与している可能性が示唆された。また、この画分での、(PL/Ch)比は 1.27と、ミエリンに近い低値(3) であった。これが、成長円錐画分を低比重にしている一つの要因と考えられる。以上の点を更に追求するためには、(a)いくつかの時点で採取された、成長円錐画分での分析 (b)成長円錐膜分画の単離 (c)抗体を用いた微量分子種の追跡、等が課題となるものと考えられる。

（追記）本抄録投稿後、Pfenningerら(8) によって同様の研究が報告されたが、いくつかの点で本研究と異なっている。

本研究に関して、有益な御助言と御討論を賜った、安藤　進（都老人研・生化学）、斎藤多久馬（自治医大・解剖学第一）、小宮義璋（東京大・医・脳研・生化学）、溝部文夫（雪印乳業・生物科学研）の諸先生方に深謝する。

[REFERENCES]

1) Ando, S., Waki, H., and Kon, K. (1987) *J. Chromatogr.* 405: 125-134.
2) Ellis, L., Wallis, I., Abreu, E., and Pfenninger, K.H. (1985) *J.Cell Biol.* 101: 1977-1989.
3) Norton, W.T. and Poduslo, S.E. (1973) *J. Neurochem.* 21: 759-764.
4) Pfenninger, K.H., Ellis, L., Johnson, M.P., Friedman, L.B., and Somlo, S. (1983) *Cell* 35: 573-584.
5) Pfenninger, K.H. and Maylié-Pfenninger, M.F. (1981) *J. Cell Biol.* 89: 536-546.
6) 玉井洋一(1973) 生化学実験講座（第3巻） pp.543-556.
7) Weibel, E.R. and Bolender, R.P. (1973) In:*Principles and Techniques of Electron Microscopy*, vol. 3, pp. 239-291.
8) Sbaschnig-Agler, M., Pfenninger, K., & Ledeen, R.W. (1988) J. Neurochem. 51: 212-220.

成長円錐画分	7.68± 1.58 (n=4)
シナプトソーム	13.2 ± 1.84 (n=4)
E 17 大脳皮質	1.63± 0.45 (n=4)

表1　ガングリオシド含量
（単位：μg シアル酸／ mg 蛋白）

図1　成長円錐画分の電顕像

（倍率： 10,000 倍）

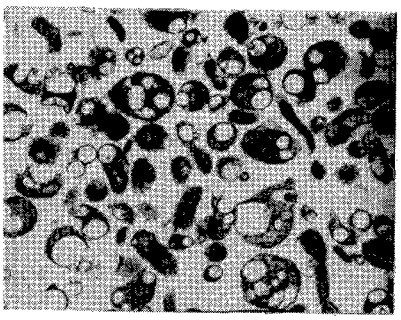


表2　ガングリオシド組成
（単位：% ； n= 4, 括弧内は SD）

	GCP	E17 BRAIN
GM3	6.7(0.7)	5.4
GM1	7.3(0.5)	2.6(0.7)
GD3	19.2(3.2)	17.4(3.4)
GD1a	14.2(1.5)	14.2(1.4)
GD2	12.7(2.4)	10.6(2.7)
GD1b	13.2(0.5)	15.1(2.0)
GT1	14.1(2.0)	19.1(4.3)
GQ1	12.6(1.8)	15.6(2.2)

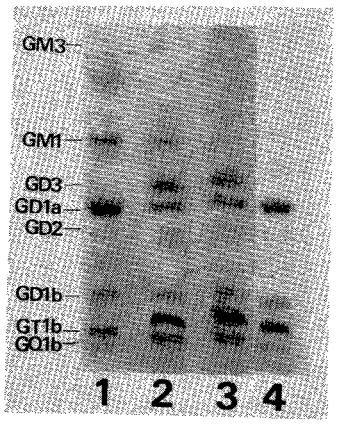


図2　ガングリオシドパターン
展開溶媒： Chloroform/ Methanol/ 0.22 % $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ = 55: 45: 10
発色： Resorcinol-HCl reagent
Lane 1: adult rat brain
Lane 2: growth cone fraction
Lane 3: E 17 rat brain
Lane 4: adult synaptosome

48　カルスベクチン・α－アクチニン・アクチンの成長円錐における局在変化と機能

祖父江憲治・神田啓子
（阪大・医・バイオ・神経生化）

〔要約〕成長円錐(growth cone)は、シナプス形成や神経細胞可塑性に重要な役割を果している。形態学的観察から、growth coneは細胞運動性が極めて高い動的構造物であり、この運動性に細胞骨格の関与することが示唆されている。われわれは、細胞膜主要裏打ち蛋白質であるカルスベクチン（非赤血球スペクトリンまたはフォドリン）・α－アクチニン・アクチンのgrowth coneにおける局在変化と機能を検討した。その結果、α－アクチニンとアクチンはgrowth cone先端部であるphilopodiaとlamellipodiaに局在しており、殊にphilopodiaにおける高い運動性に関与している可能性が示唆された。カルスベクチンはgrowth cone体部に局在し、growth coneと基質との接点を形成する役割に関与しているものと考えられる。

神経細胞伸長端に相当するgrowth coneは、シナプス形成や神経細胞の可塑性に重要な役割を果している。growth coneは、起始部に相当する体部と先端部のphilopodia及びlamellipodiaに分けられる。中でもphilopodiaの運動性は高く、神経突起伸長の維持と伸長方向認識の役割を担っていると考えられる(3)。近年、このgrowth coneの運動性にミクロフィラメントと微小管などの細胞骨格の関与が示唆されている(4)。

いっぽう細胞運動性発現の要となるのが、細胞膜と細胞骨格をつなぐ細胞膜裏打ち構造である。これまで一般細胞において、カルスベクチン、α－アクチニン、ビンキュリン、ターリンなど主要細胞膜裏打ち蛋白質の細胞運動への関与が報告されてきた(6)。今回われわれは、growth coneにおけるカルスベクチン、α－アクチンおよびアクチンの局在変化とその機能について検討を行った。

［方法］カルスベクチン（牛大脳皮質）とα－アクチニン（ニワトリ砂嚢）抗体は、各アフィニティを用いて精製した。カルスベクチンとα－アクチニンの局在は、細胞を各抗体とFITCで標識した二次抗体で染色し、蛍光顕微鏡観察により検討した。アクチンは、ローダミンで標識したファロイジン（R-ph）で染色した。干渉屈折顕微鏡観察（interference-reflection microscopy, IRM）は、Izaardの方法に従った(2)。

［結果］PC12細胞はNGFにより著明な突起形成や活動電位を示すようになり、交感神経細胞へと分化する(1)。この分化したPC12細胞突起伸長端のgrowth coneは比較的大きく、形態観察にとって有利である。

カルスベクチンは核を除く細胞体に瀰慢性分布を示すとともに、細胞辺縁部及び神経突起部にかけて局在する。α－アクチニンとアクチンは細胞体部にもわずかに存在するが、神経突起部殊に先端部に著明な局在を示した。次に、growth coneでの上記三種類蛋白質の局在を二重染色法により検討した（図１）。カルスベクチンは神経突起部よりgrowth cone体部にかけて分布し、アクチンはphilopodiaとlamellipodiaに局在していた。IRMで、カルスベクチン局在部位に一致してgrey-black areaが認められた。これはカルスベクチン存在部位が基質との接点に相当することを示唆する。いっぽう、α－アクチニンは、philopodiaとlamellipodiaに相当量局在し、一部growth cone体部にも存在する。また、philopodiaとlamellipodiaのα－アクチンは、アクチンと一致した局在を示した。しかし、IRMで両蛋白質の局在部位にgrey-black areaは認められず、両蛋白質の存在部位が基質との接点では

ないことを示した。NGFにより分化したPC12細胞よりNGFを除去すると、神経突起の退縮が起こる。特に、philopodiaとlamellipodiaの退縮は著明で、growth coneは球状を呈するようになる。この細胞で、カルスペクチンはgrowth cone基部に濃染された。いっぽう、アクチンはgrowth cone球状部の全体にわたる広汎な分布を示した。α－アクチニンもgrowth cone球状部でアクチン同様広汎な分布を示した。

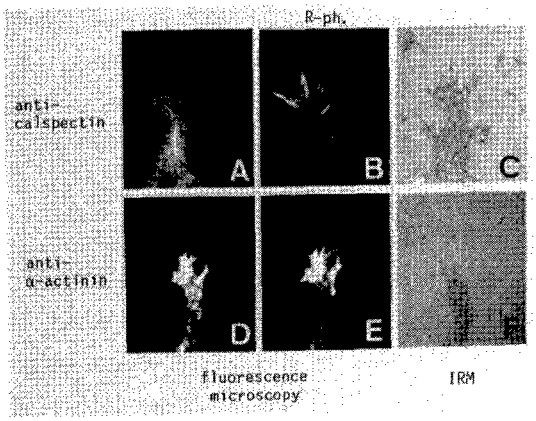


図１．growth coneにおけるカルスペクチン・α－アクチニン・アクチンの局在

［考察］図２に、growth coneにおけるカルスペクチン・α－アクチニン・アクチンの局在をまとめた。カルスペクチンはgrowth cone体部と基質との接着部細胞膜内側面に、α－アクチニンとアクチンはphilopodiaとlamellipodiaに局在する。growth coneの中でもphilopodiaにおけるCa^{2+}濃度は高く、活発な運動性の根拠にもなっている(5)。今回の結果に加えて、予備実験でPC-12細胞のα－アクチニンがCa^{2+}感受性を示すこと・Ca^{2+}イオノフォアがphilopodiaの伸展を促進することを見い出しており、これらの結果も、両蛋白質のCa^{2+}による制御が、philopodiaの細胞運動性の高さと水先案内の役割の一端を説明しうるものである。また、カルスペクチンの基質接点部への局在は、他細胞系で細胞運動時に一時的に形成される基質と細胞の一時的接点へのカルスペクチンの集積と一致し(7)、動的構築物と基質の接点でこの蛋白質が機能することを示している。

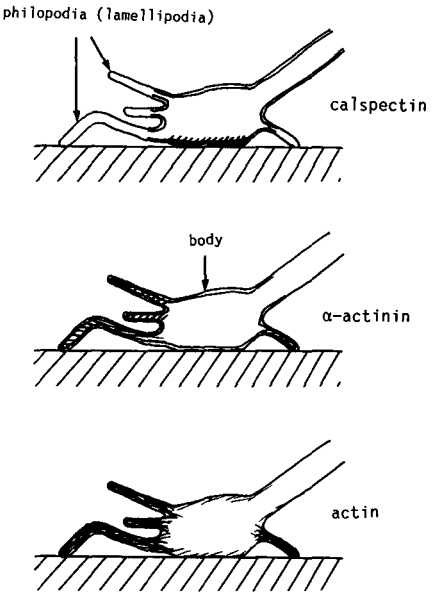


図２．カルスペクチン・α－アクチニン・アクチンのgrowth cone中の局在モデル

［文献］

(1)Greene, L. A. and Tischler, A. S. (1982) Adv. Cell. Neurobiol. 3, 373-414

(2)Izzard, C. S. and Lochner, L. R. (1976) J. Cell Sci. 21, 129-139

(3)Landis, S. C. (1983) Ann. Rev. Physiol. 45, 567-580

(4)Letourneau, P. C., Shattuck, T. A., and Ressler, A. H. (1987) Cell Motil. Cytoskeleton 8, 193-209

(5)Mattson, M. P. and Kater, S. B. (1987) J. Neurosci. 7, 4034-4043

(6)Sobue, K., Okabe, T., Itoh, K., Kadowaki, K., Tanaka, T., Kanda, K., Ueki, N., and Fujio, Y. (1987) Biomed. Res. 8, 13-22

(7)Sobue, K., Fujio, Y. and Kanda, K. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 482-486

49 線条体におけるドパミン－アセチルコリン相互作用

小林清史，川端昌弘，庄盛敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化）

〔要約〕
線条体に存在するアセチルコリン(ACh)ニューロンの活動制御にシナプス後ドパミン(DA)受容体の内 D_1 受容体と D_2 受容体のいずれが重要な役割を果しているかを検討する目的で，ラットに DA agonist および antagonist を投与した際の線条体 ACh 濃度の変化を調べた．DA agonist である apomorphine(APO)の投与では ACh 濃度が有意に増加する一方，D_1 および D_2 受容体遮断薬である haloperidol(HPL)の投与では逆に低下し，D_2 受容体の特異的遮断薬とされる sulpiride(SUL)の投与では ACh 濃度は低下するもののその割合は HPL に比べて有意に低かった．一方，antagonist 前処置ラットに APO を付加投与した際には，HPL 前処置群では APO による ACh 濃度の増加が著明に抑制されたにも関わらず，SUL 前処置群ではその変化は軽度であった．以上の成績は，線条体内 ACh ニューロン活動の調節には D_1 受容体がより重要な役割を果していることを示唆するものと考えられた．

線条体においては DA ニューロンと介在性 ACh ニューロンとがシナプスを形成し，運動機能の調節や抗精神病薬による副作用の発現などに重要な働きをしていることがよく知られている．一方，シナプス後 DA 受容体には，D_1 受容体と D_2 受容体が存在するとされているが，これらの局在に関してはなお十分明らかにされているとはいえない．私たちは線条体における DA-ACh 相互作用についての検討を進めているが，本研究ではまず DA agonist および antagonist をラットに投与した際の線条体 ACh 濃度の変化を調べ，この点に関する若干の知見を得たので報告する．

［方　法］
実験には体重約 200 g の Sprague-Dawley 系雄ラットを使用した．用いた薬物は，APO(2.5 mg/kg, sc)，HPL (0.5 mg/kg, ip) および SUL(100 mg/kg, ip) であり，これらを単独または併用投与した．併用投与では，HPL または SUL 前処置ラットに APO を付加投与し，対照群には生理食塩水を投与した．APO 投与 20 分後あるいは antagonist 投与 60 分後に，マイクロウェーブ照射(4.5 kw, 1.5 秒）によりラット脳を固定し，直ちに線条体を切り出して，測定まで -80℃の冷凍庫内に保存した．測定に際しては，脳組織に EDTA·2Na 飽和 1N ギ酸－アセトン溶液(15:85) 1 ml および内部標準物質として ethylhomocholine(1 nmol)と isoproterenol(100 ng)を加えて Polytron でホモゲナイズし，30 分間冷却した後 20,000 g, 15 分間遠沈して上清を得た．同一試料から ACh 系および DA 系物質を測定するため，ACh と choline(Ch) の測定用には，上清 0.5 ml に diethyl ether 1 ml を加えて振盪・遠沈した後，得られた水相を遠心型エバポレータを用いて真空乾固した．DA およびその代謝物である DOPAC と HVA の測定用には，上清 0.3 ml をそのまま真空乾固した．残査をそれぞれ 50 μl の蒸留水または 150 μl の測定用緩衝液で溶解し，その 10 μl を高速液体クロマトグラフに注入した．測定には高速液体クロマトグラフィー／電気化学検出器(HPLC-ECD)法を用い，ACh 系はカラム温度を 33℃とした．得られたデータの有意差検定には Student's t-test を用いた．

［成　績］
今回の実験で得られた測定成績を表１にまとめて示した．対照群の ACh 濃度は，Korf ら(1)や Sethy(2)の報告値とほぼ一致しているが，他の諸報告に比べるとかなり高い値である．対照値に比較して，DA agonist である APO 投与群では有意な増加(約35%）が認められた．この際 DA 濃度には変化がなく，その代謝物である DOPAC と

表1 DA agonist および antagonist の線条体 DA と ACh 代謝に及ぼす影響

	n	DA	DOPAC	HVA	Ch	ACh
		ng/ mg protein			pmol/mg protein	
Control	28	107.15±4.57	10.44±0.48	9.99±0.44	255.70±13.49	730.82±27.20
HPL(0.5 mg/kg)	14	90.56±3.16*	41.43±2.06***	31.30±1.13***	207.45± 7.17*	377.35± 7.33***
SUL(100 mg/kg)	14	106.82±2.96	22.44±1.05***	16.60±0.80***	227.73±11.81	533.31±10.14***
APO(2.5 mg/kg)	10	109.81±4.85	4.51±0.52***	6.91±0.55***	259.72±21.30	986.37±78.23***
HPL + APO	20	88.49±3.27**	18.48±0.98***	22.05±0.72***	283.01±23.32	620.33±28.80**
SUL + APO	16	101.32±2.85	6.36±0.44***	8.61±0.54	327.14±29.93*	832.95±45.49*

Mean±SEM　　*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control

HVA 濃度は有意に低下を示した．D_1 および D_2 受容体の遮断薬とされる HPL では ACh 濃度の有意な減少(約48%)が認められる一方，D_2 受容体の特異的遮断薬とされる SUL でも有意な減少(約27%)がみられたものの，減少の割合は HPL に比べて有意に低かった．いずれの薬物でも DA 代謝物は著明に増加したが，その程度は HPL で有意に高い．つぎに antagonist 前処置ラットに APO を付加投与した場合には，APO 単独投与群に比べて HPL 前処置群では有意な ACh 濃度の減少(約37%)が認められた一方，SUL 前処置群では軽度の減少(約16%)がみられたのみで有意差はなかった．HPL 前処置群と SUL 前処置群の ACh 濃度には有意差が認められている(図1)．

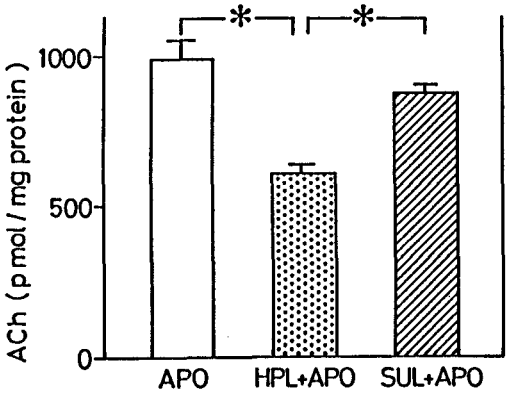


図1 APO による ACh 濃度の増加に対する HPL と SUL の拮抗作用
(Mean±SEM, *p<0.001)

［考　察］

これまでにも本研究と同様の検討がなされているが，これらはすべて D_2 受容体が線条体内の ACh ニューロンの活動調節に重要な役割を果しているとしている(2,3,4)．本研究でも DA agonist および antagonist を用いた実験から，線条体における cholinergic function に対して DA が強力な調節作用を有することを確認した．しかし，これに対するシナプス後 DA 受容体亜型の役割については全く逆の結果が得られた．すなわち，D_1 および D_2 受容体の遮断薬である HPL では ACh 濃度の著明な減少が認められたのに対して，D_2 受容体のみを SUL で遮断した際には ACh 濃度の減少はより軽度であった．さらに，antagonist で前処置した動物に APO を投与した際にも，HPL 前処置群では APO による ACh 濃度の上昇が著明に抑制されたのに対して，SUL 前処置群ではその程度がはるかに低く，両者間に有意差が認められている．このことは cholinergic function の調節には主として D_1 受容体を介するルートが重要であることを示すものであり，ACh ニューロンの細胞体には主として D_1 受容体が存在することを推測させるものと考えられる．諸報告との間に相違を生じさせた原因は明らかでないが，本研究では D_1 受容体の特異的遮断薬などを用いていないので，これらについてもさらに検討を加えて報告したい．なお本研究では，HPL と SUL の投与量を Seeman(5)による D_2 受容体に対する阻害力価および臨床力価を参考にして 1:200 としたが，その比率を 1:100 とした前報(6)と同様に DA 代謝物濃度の増加は HPL 投与群で有意に高いという結果を得た．このことはシナプス前 DA 受容体に対する遮断作用が SUL より HPL で強く，DA antagonist 投与時における DA 代謝回転の亢進にシナプス前 DA 受容体が大きな役割を果しているとした私たちの成績をさらに支持するものと考えられる．

［文　献］

1) Korf, J., Sebens, J.B., Flentge, F. and van der Werf, J.F. (1985) J. Neurochem. 44, 314-318. 2) Sethy, V.H. (1979) Eur. J. Pharmacol. 60, 397-398. 3) Scatton, B. (1982) Life Sci. 31, 2883-2890. 4) Forloni, G., Bidzinski, A., Fusi, R., Ladinsky, H. and Consolo, S. (1987) Life Sci. 41, 1717-1723. 5) Seeman, P. (1981) Pharmacol. Rev. 32, 229-313. 6) 小林清史，川端昌弘，庄盛敏廉，今津好秀 (1986) Neurosciences 12, 152-153.

50　ラット線条体内におけるニウロンの相互関係

盛政忠臣，田中雅邦，金行孝雄，岡田英俊，庄盛敏廉
（岡山大学・医学部，脳研，病態生化学）

〔要約〕
神経終末に対する各種選択的作用薬(Apomorphine;dopamine D2, Diazepam;GABA-A, bethanechol;muscarinic M2)または拮抗薬(QNB; muscarinic M1)投与後，30-60分のラット線条体において；　1）D2刺激により，ドパミン（ＤＡ）の放出抑制およびアセチルコリン（Ａｃｈ）の放出亢進が認められた．　2）M1の抑制により，Ａｃｈの放出亢進および Met-Enk（Ｅｎｋ）放出亢進を反映する結果が得られた．　3）M2刺激により，セロトニン（５ＨＴ）とＧＡＢＡ量の変化が認められた．　4）GABA-A類刺激により，ＤＡ放出抑制が認められた．

以上の結果を従来の知見と合わせると，ラット線条体内においては，ＤＡ（黒質）→(D2)Ａｃｈ，Ａｃｈ→(M1)Ｅｎｋ，Ａｃｈ→(M2)５ＨＴ（節前，背側縫線核由来），Ａｃｈ→(M2)ＧＡＢＡ，ＧＡＢＡ→(GABA-A)ＤＡ（節前，黒質由来）の神経回路［ニウロン→(受容体)ニウロン］の存在が示唆された．

【目的】
大脳基底核は，運動機能の制御に重要な役割を果しており，線条体は，その中で主要な神経核である．線条体は，黒質・大脳皮質・背側縫線核等から種々の投射を受けている．また，線条体内には，ＧＡＢＡ・アセチルコリンや，エンケファリン等のペプチド伝達物質を含む介在ニウロンの存在が知られている．
しかしながら，これらのニウロンが形成する神経回路網の［ニウロン→ニウロン］構成に関する報告(5)は少ない．本研究においては，これらの神経回路網の構成について，神経化学的な検討を加えた．

【実験方法】
実験動物は，ＳＤ系雄性ラット９週齢である．用いた薬物は，apomorphine (D2 agonist, 10mg/kg,ip)，ＱＮＢ (muscarinergic M1 antagonist, 0.5mg/kg,ip)，bethanechol Cl(M2 antagonist, 12mg/kg,ip)，diazepam (GABA-A agonist-like, 2.5mg/kg,ip) である．薬物投与後それぞれ 30,60,90分後，2,3,6,12,24時間後に，マイクロ波固定し，パンチアウト法(4) により，線条体背外側領野を得た．各脳サンプルから，Met-Enk(RIA),monoamines(HPLC-ECD),acetylcholine(HPLC-ECD,enzyme-colomu),GABA(enzyme-cycling,fluorometry)を一斉測定した．

【実験結果と考察】
１）apomorphine 投与群(Table 1)；投与30分後の，DOPAC(20%; 対照群に対して，以下同じ),HVA(33%),[DA+DOPAC+HVA]値(67%)に有意な低下が認められた．これは，ＤＡの放出ならびに生合成の抑制を反映する

Table. 1　Apomorphine 10mg/kg i.p.　(% of control)

min	Met-ENK	DA	DOPAC	HVA	DOPAC+HVA	DA+DOPAC+HVA	5-HT	5-HIAA	5-HT+5-HIAA	ACh	Ch	ACh+Ch	GABA
30	103 ± 16	85 ± 10	20 ± 2 *** ↓	33 ± 4 *** ↓	26 ± 3 *** ↓	67 ± 8 * ↓	101 ± 9	90 ± 10	95 ± 10	131 ± 11 ** ↑	116 ± 4 * ↑	128 ± 4 ** ↑	109 ± 3
60	108 ± 13	112 ± 13	36 ± 4 *** ↓	25 ± 3 *** ↓	30 ± 3 *** ↓	83 ± 9	116 ± 6	94 ± 12	103 ± 8	133 ± 5 ** ↑	117 ± 12	130 ± 5 ** ↑	93 ± 3
90	120 ± 23	129 ± 9	71 ± 11	56 ± 13 * ↓	71 ± 13	107 ± 7	95 ± 5	96 ± 2	96 ± 2	102 ± 2	98 ± 6	101 ± 1	95 ± 5

Mean±S. E. M　*:p<0. 05　**:p<0. 01　***:p<0. 001(Student's t-tst)

Table. 2　QNB 0. 5mg/kg i. p.　(% of control)

min	Met-ENK	DA	DOPAC	HVA	DOPAC+HVA	DA+DOPAC+HVA	5-HT	5-HIAA	5-HT+5-HIAA	ACh	Ch	ACh+Ch	GABA
30	28 ± 13 ** ↓	91 ± 6	85 ± 3	87 ± 4	86 ± 3	89 ± 4	88 ± 1	100 ± 2	95 ± 1	87 ± 1	155 ± 14 * ↑	100 ± 14	90 ± 3
60	66 ± 19	110 ± 8	109 ± 13	128 ± 14	118 ± 14	109 ± 8	110 ± 6	119 ± 10	116 ± 8	110 ± 6	95 ± 4	93 ± 8	99 ± 7
90	109 ± 6	111 ± 5	100 ± 7	110 ± 7	115 ± 6	109 ± 5	96 ± 4	95 ± 2	96 ± 3	96 ± 4	83 ± 7	92 ± 4	100 ± 4

Mean±S. E. M.　*: $p<0.05$　**: $p<0.01$　(Student's t-test)

結果と考えられ，投与後２時間までその傾向が認められた．一方，Ach(131%),choline(116%)，[Ach+choline]値(128%)は，有意な増加を示した．これは，Ach の放出と生合成の亢進を反映する結果と考えられ，投与後60分まで継続した．

以上の結果は，ＤＡ D2 受容体刺激により，節前性にＤＡ終末が抑制された結果(2) と考えられる．D2受容体刺激により，Ａｃｈ終末活性に顕著な変化がしめされたことは，Ａｃｈが節後性であるとする従来の多くの報告(1) と一致した結果と考えられる．しかしながら，D2受容体が抑制性であるとする従来の知見(1) とは反した結果であった点については，今後の検討を要する．

２）ＱＮＢ (3-quinuclidinyl benzilate) 投与群(Table 2)；　投与30分後において，choline(155%)の有意な増加と，Met-Enk(28%)の有意な低下が認められた．

Choline の増加は，M1受容体遮断に伴う節前性に対する何らかのフィードバックの結果と考えられる．Met-Enk値の顕著な低下は，ＥｎｋニウロンがＡｃｈニウロンに対して２次性であることを示唆する結果と考えられた．Met-Enk量の低下が，Ｅｎｋニウロン終末の活性亢進の結果であるとすると，ＱＮＢがM1受容体に対しては興奮抑制性であることに反したことになり，この点に関しても今後の検討を要する．

３）bethanechol 投与群(データ省略)；　投与30分後において，5HT量(80%)とGABA量(85%) の低下を認めた．

これらは，５ＨＴ（背側縫線核からの投射）終末節前側(3) ならびにＧＡＢＡ介在ニウロンに対する，抑制性M2受容体を介した結果と考えられた．

４）diazepam投与群(データ省略)；　投与30分後において，DOPAC(70%)，HVA(79%)ならびに[DA+DOPAC+HVA]値(78%)の有意な低下を認めた．

この結果は，ＤＡ終末に対するGABA-A受容体を介した抑制性支配を反映する結果と考えられた．

５）以上の結果から，要約に示したごとくの［ニウロン→ニウロン］の神経接合，即ち，神経回路が推測された．但し，これらは，以下の仮定に基づくものである；変化を示したものは，major pathway であるとした．他の神経核からの入力は，黒質からのDA，背側縫線核からの5HT に限って，ここでは考慮にいれた．

薬物投与後90-120分後においては，それぞれ異なった伝達物質の変化も認められ，これらが，さらに次に連接するニウロンの可能性が考えられた．

線条体のような神経核内における，このような解析の妥当性については，その他のagonists，antagonists を用いた実験を重ねることによって，さらに検討を加えたい．

【文献】

(1)Bartholini,G.& Stadler,H.(1977). Neuropharmacology.16:343-347. (2)Carlsson,A.(1975).In:Pre-and Post Synaptic Receptors (ed.Usdin & Bunney) Marcel Dekker 49-66. (3)Euvrard,C.,Javoy,F.,Herbert,A.,& Glowinsky,J.(1977). Eur. J. Pharmacol.,41: 281-289. (4)盛政忠臣ら.(1985) 神経化学. 24: 118-120. (5)Scatton,B.(1987)In;Neurotransmitter Interactions in the Basal Ganglia(ed.Sandler,M.et al) Raven Press. 121-131

51 NMDA receptor agonist 及び antagonist 脳室内投与による
ラット線条体ドーパミン及びセロトニン代謝産物の変動

加太 英明、 横井 功、 戸田 洋子、 森 昭胤
(岡山大・医・脳代謝研・機能生化)

〔要約〕
脳内透析法を用いて N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)及びそのreceptor antagonist である3-(2-carboxy-piperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP)脳室内投与によるラット線条体におけるdopamine(DA)及びserotonin(5-HT)放出に与える影響を検討した。

NMDA 10nmol脳室内投与によりDOPACは投与20分後より60分間増加した。HVAは投与20分後より120分間増加した。5-HIAAには、有意な変化は見られなかった。 CPP 1nmol脳室内投与により、DOPAC,HVA,5-HIAA共に有意な変化は見られなかった。 NMDA 10nmolと CPP 1nmolとの同時脳室内投与により、DOPACは投与直後より、40分間有意に上昇し、HVAは投与直後より、60分間有意に上昇した。 5-HIAAには、有意な変化は認められなかった。

以上の結果より、NMDAは、ラット線条体において、DAの放出を促進すること、5-HT neuronには、影響を与えないこと、 CPPは、NMDAによるDAの放出を抑制すること、また、NMDA receptorに対してNMDAよりも親和性が高いことが示唆された。

NMDAをラットneclues accumbensに投与することにより locomotor activityが高まること、そしてそれはDA合成阻害剤であるα-methyl-p-tyrosineやDA receptor blockerのhaloperidolにより抑制されることが報告されている(1)。また脳切片を用いた実験においては、DAの放出を促進するという報告(2)と、変化しないという報告(3)が共になされている。 そこで今回我々は、NMDA 及びその antagonistと考えられているCPP(4)をラット脳室内に投与し、脳内透析法を用いて、線条体におけるDOPAC,HVA,5-HIAAの経時的変化を測定したので、報告する。

[方法]

Sprague-Dawley rat(♂、250-400g)を用い、エーテル麻酔下に気管内挿管し人工呼吸下にサクシニルコリンにて非動化した後、Konig & Klippelの脳図譜に従って、自作した透析プローブ(5)を線条体に挿入し、生理食塩水で灌流(3μl/min) した。Samplingは20分ごとに行い、透析開始2時間後に、脳室内に、10μl に溶解した各薬物を投与した。NMDA及びCPPは生理食塩水に溶解しNaOHにてpH7に調整した後使用した。Monoamine代謝産物の測定値は、HPLC-ECDを用いて行い、薬物脳室内投与直前のものを100として計算した。有意差検定には、 U-testを用いて 5%以下のものを有意と判定した。

[結果]

DOPAC：CPP 1nmol投与においては、生理食塩水投与群と同様の変化を示した。NMDA 10nmol投与においては、投与20後より80分後までに集めたサンプルにおいて有意に増加していた。CPP 1nmol, NMDA 10nmol同時投与においては、投与直後より40分後までのサンプルにおいて増加していた (Fig-1) 。

HVA： CPP 1nmol投与においては、DOPACと同様時間と共にやや減少するが、この変化は、生理食塩水投与群と、同様であった。 NMDA 10nmol投与においては、投与20分後より140分後までのサンプルにおいて有意に増加していた。NMDA 10nmol,CPP 1nmol同時投与においては、投与直後より60分後までのサンプルにおいて、有意に増加していた (Fig-2)。

5-HIAA：5-HIAAについては、NMDA,CPP,NMDA+CPP投与群共に、生理食塩水投与群との間に有意な変化はなく、かつ投与前の値とも変化はみられなかった。

［考察］

興奮性アミノ酸レセプターは3つのサブタイプにわけられている(6)。そのうちの1つであるNMDA親和性のレセプターに対するantagonistとして、従来 AP-5, AP-7などが知られているが(7)近年、AP-7のアナログとして合成されたCPPが、強力な NMDA receptor antagonistとして報告された(8)。またCPPは、DBA/2マウスのけいれんを抑制すること、NMDAによるマウスのrunning fitを抑制すること、NMDAにより誘導されるアセチルコリンの放出を抑制することなどが報告されている(9)。今回我々は、脳透析法を用いて、NMDAによる DA releaseへの影響を経時的にみると共に CPP同時投与による効果を観察した。

NMDA投与によりDOPAC量は増加しており、これは、DAの放出が増加したためと考えられる。HVAも同様に増加しているが、これもDAの放出の増加によるものと考えられ、NMDAはラット脳線条体の DAのreleaseを増加さすものと考えられる。5-HIAAには変化はなく、NMDAは、5-HT releaseには影響を与えないものと考えられる。CPP投与では、DOPAC, HVA, 5-HIAA共に変化はなく、DA, 5-HT releaseに影響は与えていないと考えられる。 NMDA,CPP同時投与により DOPAC,HVAは上昇するが、NMDA単独投与に比べ早くその値が下がる。これは量的に勝るNMDAがまず NMDA receptorに結合し、DA のreleaseを加させるが、CPPの方がNMDA receptorに対して親和性が高いため、NMDAとおきかわるためであると考えられる。

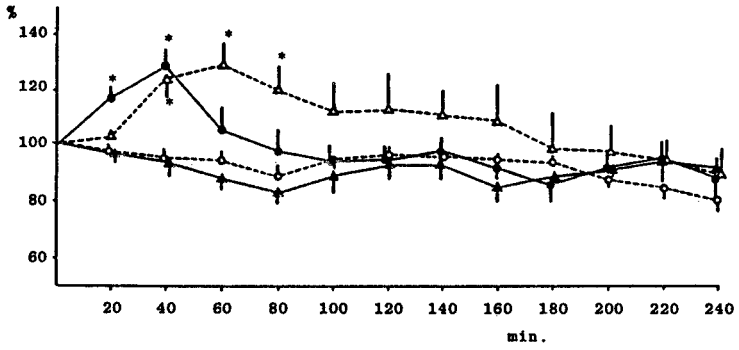


Fig 1 The time-dependent changes (mean±SEM) in the levels of DOPAC after intraventricular administration of NMDA (10 nmol) and CCP (1 nmol). Data are expressed as percent changes from the value of the sample just prior to treatment. The 100% Value (mean±SEM) of DOPAC is 43.6±3.95 ng/ml.

o----o ;control (n=6)　　△----△ ;NMDA (n=5)
▲——▲ ;CPP (n=5)　　●——● ;NMDA+CPP (n=5)

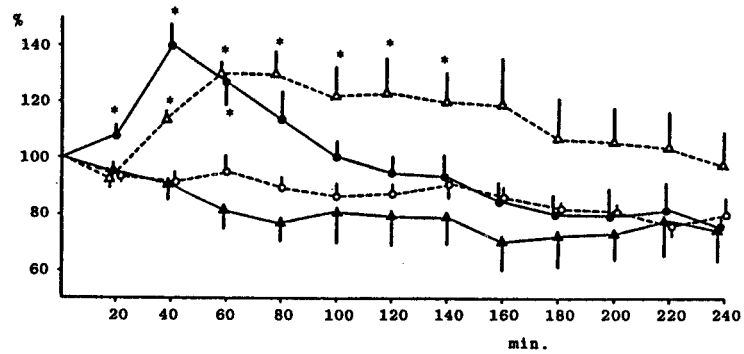


Fig 2 The time-dependent changes (mean±SEM) in the levels of HVA after intraventricular administration of NMDA (10 nmol) and CPP (1 nmol). Data are expressed as percent changes from the value of the sample just prior to treatment. The 100% value (mean±SEM) of HVA is 41.4±3.81 ng/ml.

o----o ;control (n=6)　　△----△ ;NMDA (n=5)
▲——▲ ;CPP (n=5)　　●——● ;NMDA=CPP (n=5)

［参考文献］

(1)Donzanti B.A. and Uretsky N.J.(1983)Neuropharm.22,971-981(2)Jones S.M.,et al.(1987)Neuropharm.26,173-179 (3)Boldry R.C. and Uretsky N.J.(1988)Neuropharm.27,569-577 (4)Davies J.,et al.(1986)Brain Res.382,169-173 (5)Sandberg M. and Lindstrom S.(1983)J.Neurosci.Method 9,65-74 (6)Watkins J.C.(1981)Ann.Rev.Pharmacol. Toxicol.21,165-204 (7)Meldrum B.S.,et al.(1983)Neurosci.9, 925-930 (8)Lehmann J.,et.al.(1986)J.Pharmacol. Exp.Ther.240, 737-746

52 皮質線条体路またはカテコールアミンニューロン破壊後におけるラット脳内ＰＣＰ受容体結合の変化

吉田幸宏[1,2]，西川徹[2]，高橋清久[2]
（旭川医大・精神[1]，国立精神神経センター・神経研究所疾病研究第３部[2]）

〔要約〕
ラットを用い、皮質線条体路の破壊による興奮性アミノ酸(EAA) 性伝達の遮断およびカテコールアミン(CA)線維の破壊が、N-(1-[2-thienyl]cyclohexyl)[^{3}H]piperidine([^{3}H]TCP)によってラベルされる脳内 Phencyclidine(PCP) 受容体に及ぼす影響について検討した。皮質摘除術および皮質線条体路切断術後の５－７日目に、線条体と中脳辺縁領域で [^{3}H]TCP(5nM) の結合が有意に減少していた。皮質摘除７日後の線条体では、[^{3}H]TCPの最大結合数には変化がみられなかったが結合親和性が有意に低下していた。皮質摘除の３、14および28日後では [^{3}H]TCP結合の変化は観察されなかった。内側前脳束へ 6-hydroxydopamine(6-OHDA)を注入し、ドーパミン(DA)神経線維を破壊したところ、線条体と中脳辺縁領域では [^{3}H]TCP結合量が有意に減少したが、内側前頭葉皮質と海馬では変化しなかった。6-OHDAによる背側ノルアドレナリン(NA)束の破壊では、上記４部位のいずれにおいても [^{3}H]TCP結合量は変化しなかった。
以上の結果から、脳内 PCP受容体は EAA線維の除神経後一過性にアゴニストに対する親和性が低下すること、線条体および中脳辺縁領域では PCP受容体の一部がDA神経終末上に存在する可能性があること、が示唆された。

精神異常発現薬である PCPは、脳内で PCP受容体／N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体複合体に作用し、NMDA受容体を介する EAA性伝達を非競合的に抑制し(3)、その結果CA神経伝達に対して強い影響を及ぼしていることが知られている(2,10)。そこで、PCP受容体／NMDA受容体複合体の調節機構およびCAニューロンとの関係を探る目的で、EAA性伝達の遮断およびCA線維の破壊を行い、PCP受容体の変化を調べた。

［方法］　実験にはWistar系雄性ラット（手術時体重：250-280g）を用いた。膜標品の調整：ラットを断頭後、氷上で脳の各部位を取り出し、-80℃で保存した。脳組織は、5mMトリス塩酸緩衝液(pH7.7) とともにポリトロンでホモジナイズし、35000g、15分間の遠心を３回繰り返した。最終沈査を 100倍容の同緩衝液に懸濁し、膜標品として用いた。
[^{3}H]TCP 結合実験：[^{3}H]TCP(必要に応じ 1-4点の濃度) と最終濃度30 μM のL-Glu(膜標品中の EAA濃度にかかわらず、最大の結合量を観察するため。文献(4) を参照。)を含む 5mMトリス塩酸緩衝液に膜標品を加え、25℃で90分間反応させた後、Whatman GF/Cグラスフィルター上に吸引濾過し、濾紙上の結合型[^{3}H]TCP のβ線を測定した。非特異結合は、100 μM PCP 存在化での結合量として求めた。基礎的検討で、測定を行った脳内４部位で、[^{3}H]TCP結合は結合飽和性を示すひとつの成分からなることを確認した。皮質線条体路の破壊：皮質摘除術では、両側前頭葉皮質を水流ポンプにつないだ注射針で吸引した。皮質線条体路の切断は、McGeerら(6) の脳座標に従い、ナイフを用いて行った。
対照群では脳破壊以外の手術手技を行った。DA線維および背側NA束の破壊：それぞれ右内側前脳束(AP -4.0,V +8.4,L +1.3；Paxinous & Watson の図譜)と両側上小脳脚(AP -8.0,V +7.0,L ±1.4) に１$\mu\ell$の生理食塩水に溶解した6-OHDA２μg を注入し、２週間後に断頭した。前者では6-OHDA注入の30分前にdesipramine(25mg/kg,ip) を投与した。対照群では溶媒のみを注入した。生化学的測定：DAとNA含量は既報(7) の通り、高速液体クロマトグラフィーによって測定した。 Glu含量はNitschら(8) に従い、酵素蛍光法によって測定した。蛋白量は Lowryらの方法(5) に従って測定した。統計解析：平均値の差の検定には、Student's t-testあるいは Mann-Whitney U-testを用いた。

［結果］　１）図１に示したように、皮質摘除術の５および７日後、線条体で [^{3}H]TCP(5nM) の結合量は対照群に比べて有意に減少していた。３、14および28日後では有意な変化は認められなかった。中脳辺縁領域でも、７日後にのみ有意な減少が観察された。 Glu含量は、線条体では術後３日目ですでに有意に減少し、28日目まで減少が持続していたが、中脳辺縁領域では変化は認められなかった。皮質摘除７日後の線条体を用いて結合飽和実験を行い Scatchard 解析したところ、[^{3}H]TCP の最大結合数に変化はなく、結合親和性が有意に低下していた(Fig.2)。海馬では７日後でも結合量に変化は認められなかった。２）皮質線条体路の切断でも、術後７日目の線条体および中脳辺縁領域で [^{3}H]TCPの結合親和性が低下していることを示す所見が得られた。すなわち結合量の減少はリガンドが高濃度(30nM)の場合より、低濃度(3.5nM) のときにより明らかだった。 Glu含量は、線条体では対照群と比べて大きく減少し、中脳辺縁領域でも減少が認められた(Table 1)。３）DA線維の破壊により、線条体では対照群と比べ [^{3}H]TCP(4およ

び33nM）結合量は有意に減少したが（それぞれ -6%;P<0.05,-12%;P<0.05)、内側前頭葉皮質と海馬では変化は認められなかった。中脳辺縁領域では、破壊群の6-OHDA注入側と対照群を比較すると差は認められなかったが、破壊群の6-OHDA注入側（右側）では健側(左側)に比べ有意に結合量(4nM[^{3}H]TCP存在下でのみ測定)が減少していた（-11%;P<0.05)。DA量は、破壊群の線条体では対照群の13%(P<0.01)に、破壊群の右中脳辺縁領域では左側の24%(P<0.01)に減少していた。4）背束NA束の破壊では、いずれの部位でも [^{3}H]TCPの最大結合数および結合親和性に変化は認められなかった（data省略）。NA量は、破壊群の中脳辺縁領域で対照群の12%に減少していた(P<0.01)。

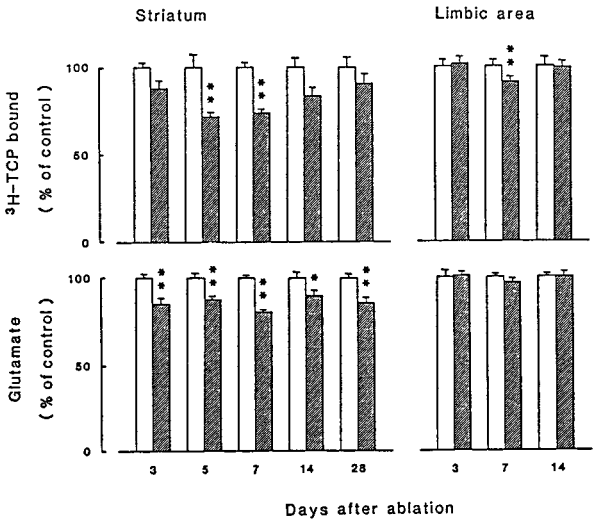


Fig.1 Time-course of the changes in ^{3}H-TCP binding and glutamate leveles in the striatum and mesolimbic area following cortical ablation.Animals were killed 3-28 days after bilateral ablation of the frontal cortex(hatched column) or sham operation(open column).Results are mean with S.E.M. of the data obtained from 5-9 animals per group and expressed as the % of the related control values. ^{3}H-TCP binding was determined in the presence of 5nM of the tritiated ligand. * P<0.05,** P<0.01 compared to sham-operated controls.

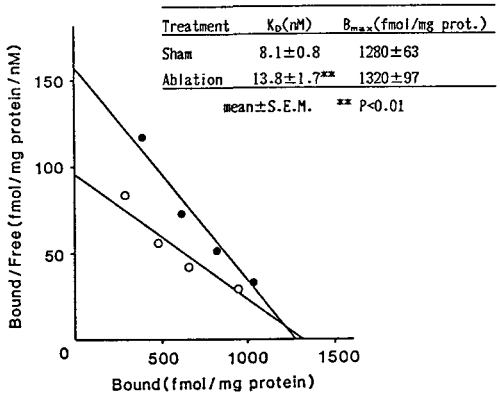
［考察］　皮質線条体路の破壊による EAA性伝達の遮断により、線条体および中脳辺縁領域では[^{3}H]TCPの結合親和性が低下することがわかった。PCP受容体作動薬がNMDA受容体に拮抗的に作用することから、PCP受容体の親和性低下は、NMDA受容体を介するEAA性伝達の低下を代償する変化であると考えられる。前頭葉皮質からの EAA性入力を受けない海馬では、[^{3}H]TCP結合の変化は認められなかった。 PCP受容体の変化が一過性にのみ観察される理由を明らかにするためには、PCP受容体／NMDA受容体複合体としての変化をさらに検討する必要がある。線条体と中脳辺縁領域では、PCP受容体がDA放出の前シナプス性調節に関与していると報告されている(10)。Frenchら(1) は、中脳辺縁系DA線維を破壊すると側座核で[^{3}H]PCPの最大結合数が減少することを報告し、この部位のDA神経終末上に PCP受容体が存在すると考察している。本実験でも、これを支持する結果が得られた。一方、黒質線条体DA線維を破壊しても線条体の[^{3}H]PCP 結合量は変化しないと報告されているのに対して(9)、本実験では [^{3}H]TCP結合が減少し、黒質線条体DA神経終末上にも PCP受容体が存在している可能性があると示唆された。しかし、DA神経の破壊が EAA性伝達を修飾し、二次的に PCP受容体の変化をひきおこす可能性もあり、DA神経破壊後の [^{3}H]TCP結合について結合定数の解析とその経時的変化をさらに検討する必要がある。

Table 1 Section of the cortico-striatal projections reduces [^{3}H]TCP binding and glutamate leveles in the striatum and mesolimbic area.

	Striatum		Mesolimbic area	
	Sham	Lesion	Sham	Lesion
[^{3}H]TCP bound (fmol/mg prot.)				
3.5nM	287± 7	182± 9**	363 ±18	287±13**
	(100)	(63)	(100)	(79)
30.0nM	809±20	666±43*	829 ±22	710±56
	(100)	(82)	(100)	(86)
Glutamate	85± 2	52± 3**	109 ± 2	97± 1**
(nmol/mg prot.)	(100)	(61)	(100)	(89)

Values are means±S.E.M. of the data obtained from 5-6 determinations per group.The numbers in parentheses show the % of respective control values. * P<0.05,** P<0.01 compared to sham-operated controls.

Fig.2 Scatchard plots of striatal [^{3}H]TCP binding 7 days after cortical ablation(○) or sham operation(●) at 3.5-31nM [^{3}H]TCP. Each point represents the mean of 8 individual Scatchard analysis.



［文献］　1)French,E.D. et al.(1985) Eur.J.Pharmacol. 116,1-9. 2)Jones,S.M. et al.(1987) J.Pharmacol.Exp.Ther. 240,492-497. 3)Kemp,J.A. et al.(1987) TINS 10, 294-298. 4)Loo,P. et al.(1986) Eur.J.Pharmacol. 123,467-468. 5)Lowry,O.H. et al.(1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275. 6)McGeer,P.L. et al.(1977) Brain Res. 128,369-373. 7)Nishikawa,T. et al.(1983) Eur.J.Pharmacol. 88,195-203. 8)Nitsch,C. et al.(1979) Neurosci.Lett. 11,295-299. 9)Snell,L.D. et al.(1984) J.Pharmacol. Exp.Ther. 231,261-269. 10)Snell,L.D. and Johnson,K.M.(1986) J.Pharmacol.Exp.Ther. 238,938-946.

53 肝臓の交感神経密度とギャップ結合の含量は逆相関する

竹田　晃、嶋津　孝
（愛媛大・医・第一生化；臨床検査医学）

〔要約〕

肝臓の交感神経支配の程度を、ノルエピネフリン含量を指標として高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器を用いて測定したところ、ラット、マウスではウサギ、モルモットに比べて 1/4 ～ 1/5 と著しく低値であった。他方、肝臓のギャップ結合蛋白質濃度を独自に作成したモノクローナル抗体を用いた定量的ドットイムノブロット法で測定したところ、ラットやマウスではウサギやモルモットに比べて逆に２～３倍高いことが判明した。肝臓のギャップ結合は細胞間連絡によって代謝を同調的に調節していると考えられているので、この実験結果は交感神経の直接的な支配が稀薄なラットやマウスの肝臓では、神経シグナルを受け取った少数の肝細胞が豊富なギャップ結合を介して隣接する細胞群へシグナルを効率良く伝え、そのことによって交感神経の代謝調節作用を補っている可能性が強いことを示している。

＜序論＞

肝臓は代謝の中心的臓器であり、液性因子による調節以外に神経による直接的な調節を受けているが、肝臓の交感神経分布の程度は種差が大きいことが知られている (5) 。しかし交感神経分布の少ないラットやマウスなどでは、形態学的観察から、ギャップ結合を多く備えることによって少ない神経シグナルをギャップ結合を介した細胞間連絡で補っているとする考えがある (1,6) 。この仮説を実証するため、本研究ではノルエピネフリン（ＮＥ）含量を指標にして肝臓の交感神経密度を測定し、他方、ギャップ結合の主要構成蛋白質である 32K 蛋白質の濃度を指標としてギャップ結合を定量して、両者の関係を比較生物学的に検討した。

＜実験方法＞

実験には、ラット (Wistar) 、マウス (ICR) 、ウサギ (日本白色) 、モルモット (Hartley) の雄を用いた。

①ＮＥ含量の定量：肝臓の一部を直ちに抗酸化剤を含む 0.2N 過塩素酸でホモゲナイズし、遠心後その上清からＮＥをアルミナで抽出した。抽出したＮＥは高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器を用いて定量した。なおＮＥの回収率（約80% ）は、3,4-dihydroxybenzylamine を内部標準に用いて求めた。②ギャップ結合に対するモノクローナル抗体 (MAb) の作成：ラット肝から Hertzberg のアルカリ処理法 (3) に従ってギャップ結合を精製した。このギャップ結合を抗原として、 Galfre と Milstein らの方法 (2) に従ってモノクローナル抗体を作成した。得られた３つの抗体のうち、４種の動物の肝臓から精製したギャップ結合蛋白質 (32K 蛋白質) のいずれとも同程度に特異的に反応する MAb 6-3G11 をギャップ結合蛋白質の定量に用いた。③定量的ドットイムノブロット：既知量の精製ギャップ結合をニトロセルロース膜にドットし、 一次抗体として MAb 6-3G11 を、二次抗体としてウサギ抗マウス IgG 抗体を反応させ、続いて ^{125}I-protein A と反応させた後オートラジオグラフィーとドットの放射活性測定を行った。肝臓中のギャップ結合蛋白質の濃度は、組織を直接アルカリ処理して得た膜分画を同様にドットイムノブロットし、その放射活性を標準曲線に照合して求めた。

＜結果＞

４種の動物から精製した肝ギャップ結合標品を SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後ニトロセルロース膜に転写し、6-3G11 抗体およびペルオキシダーゼ結合二次抗体と反応させ、発色させると、Fig. 1 に示すように、32K ギャップ結合蛋白質と特異的に反応した。この抗体を用いて肝ギャップ結合蛋白質の定量的ドットイムノブロットを行ったところ、その標

準曲線は Fig. 2 に示すようにギャップ結合蛋白質が 12.5 ～ 100 ng の範囲では放射活性と比例関係が得られた。各肝臓標品をこの範囲内で測定できるように希釈し、ギャップ結合蛋白質量を定量した結果、ラット、マウス肝ではウサギ、モルモットに比べて高濃度にギャップ結合が存在することが判明した（Table I）。他方、肝のノルエピネフリン含量は、ウサギ、モルモットでラット、マウスに比べ4～5倍高い値が得られた。

＜考察＞

ラット、マウスでは肝臓のノルエピネフリン含量はウサギ、モルモットのそれと比較して著しく低い。つまり、ラット、マウスでは肝臓の交感神経支配がウサギやモルモットのそれに比べて乏しいと言える。このことは Forssmann らによる肝臓の交感神経終末に関する電子顕微鏡観察の結果とよく一致している（1,4）。しかし、ラット、マウスでは逆にギャップ結合を高濃度に含んでいることが明らかになった。肝臓のギャップ結合の機能についてはなお不明確な点もあるが、ギャップ結合を介した細胞間連絡によって肝細胞の代謝を同調的に調節するのに働いていると考えられる。従って、ラットやマウスでは肝臓の交感神経支配が乏しいにもかかわらず、神経シグナルを受け取った少数の肝細胞がギャップ結合を介して隣接する細胞群に効率良くそのシグナルを伝播することによって、補完的に交感神経による肝臓の代謝調節を助けていると思われる。

＜文献＞

1) Forssmann, W. G., Ito, S. (1977) J. Cell Biol., 74, 299 - 313.

2) Galfre, G., Milstein, C. (1981) Methods Enzymol., 73, 3 - 46.

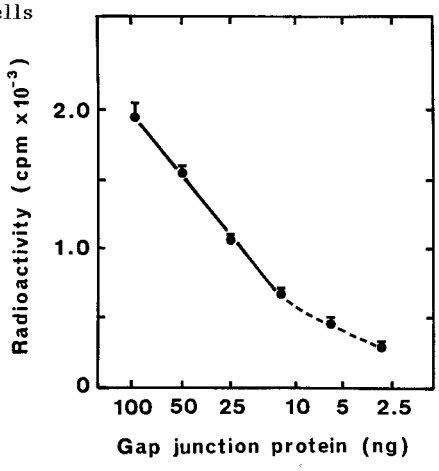
3) Hertzberg, E. L. (1984) J. Biol. Chem., 259, 9936 - 9943.

4) Metz, W., Forssmann, W. G. (1980) Communications of Liver Cells (Popper, H., et al., Eds.), MTP Press, pp.121 - 127.

5) Shimazu, T. (1983) Adv. Metabolic Disorders, 10, 355 - 384.

6) Shimazu, T. (1987) Diabetes/Metabolism Rev., 3, 185 - 206.

Fig. 2. Calibration curve for quantitative dot immunobot of liver gap junction protein.



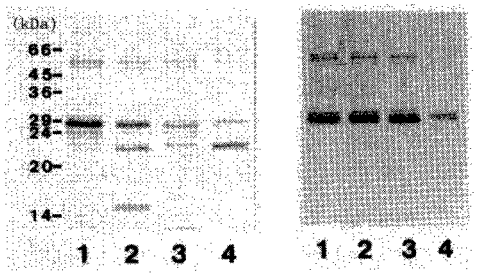


Fig. 1. Immunoblot analysis of purified liver gap junctions with a monoclonal antibody. (Left), A 15 % polyacrylamide gel stained with Coomassie Blue. (Right), Its corresponding immunoblot. Rat (lane 1), mouse (lane 2), rabbit (lane 3), guinea pig (lane 4).

Table I. NE and gap junction protein concentration of livers from different species

Species (n)	NE (ng/g)	Gap junction prtein (μg/g)
Rat (7)	57 ± 4	9.3 ± 1.4
Mouse (5)	65 ± 9	9.2 ± 1.3
Rabbit (5)	256 ± 38[a,b]	4.0 ± 0.2[a,b]
Guinea pig (5)	273 ± 33[a,b]	3.4 ± 0.2[a,b]

Values are indicated as mean ± SEM. [a]Significantly different from the value in rats ($P < .01$). [b]Significantly different from the value in mice ($P < .01$).

54 Guinea pig海馬膜標品における5-HT感受性adenylate cyclase活性の検討

小田垣雄二，小山　司，大森哲郎，松原良次，
中山　誠，井上　猛，村木　彰，山下　格
（北海道大学医学部・精神医学教室）

〔要約〕
5-HT受容体と連関した細胞内情報伝達機構の一端を解明することを目的に，guinea pigの海馬膜標品を用いて5-HT感受性adenylate cyclase(AC) 活性を測定した。10μM の5-HT刺激によるAC活性化はGTP またはGpp(NH)p非存在下では認められず，guanine nucleotides 依存性が示された。10μM のGTP 存在下では，5-HTおよび8-OH-DPAT 刺激に対する濃度依存的なACの活性化が認められ，EC_{50}とVmaxはそれぞれ162，34.6nM および73.5，34.3pmole/min/mg proteinであった。他のagonist(dopamine，isoproterenol，norepinephrine，epinephrine，histamine)刺激によるAC活性上昇との間には相加的な関係があった。1 μM の5-HT刺激によるAC活性の上昇は10μM のspiperone により完全に抑制されたが，10μM のketanserinではほとんど抑制を受けなかった。以上の結果から，5-HT刺激がGTP 結合蛋白質を介してACを活性化すること，その受容体として少なくとも一部に5-HT_{1A}受容体が関与している可能性があることが示唆された。

〔はじめに〕
中枢神経系における5-hydroxytryptamine(serotonin，5-HT)受容体は5-HT_1および5-HT_2受容体に大別されていた(5)が，5-HT_1受容体については5-HT_{1A}，5-HT_{1B}，5-HT_{1C}および5-HT_{1D}とさらに細分化される傾向にある(2,4)。これらの5-HT受容体各亜型と細胞内情報伝達機構との対応については未解決の問題が少なくない。最近，Shenker ら(7) はguinea pig 海馬における5-HT刺激によるadenylate cyclase(AC) の活性化の一部が5-HT_{1A}受容体を介したものであることを報告した。一方，forskolin 刺激に対しては5-HT_{1A}受容体がAC活性に抑制的に関与しているとの報告(1) もある。今回われわれは，guinea pigの海馬膜標品を用いて5-HT感受性AC活性の測定を行い，time course，guanine nucleotides 依存性，濃度反応関係，他のagonist 併用の影響，antagonistによる抑制等につき検討を加えたので報告する。

〔実験方法〕
350-500gの雄性guinea pigを断頭後，海馬を切り出し，5mM EDTAおよび0.25M sucrose を含む50mM Tris HCl 緩衝液(pH 7.7) 9mℓ中でhomogenizeし，39,000xgにて10分間遠心して得られた沈渣を12mℓの50mM Tris HCl 緩衝液(pH 7.4)に懸濁したものを膜標品とした。AC活性の測定はShenker ら(7) の方法に従い，〔α^{32}P〕ATP から産生された〔^{32}P〕cAMPをDowex AG W-X4(200-400 mesh) とneutral alumina の二重カラムで分離して(6)，その放射活性を測定して算出した。蛋白量の測定は Lowry ら(3) の方法によった。

〔結果と考察〕
GTP およびGpp(NH)pはAC活性を濃度依存的に増大させた(Fig.1)。その効果はGTP よりGpp(NH)pで顕著であったが，10μM の5-HT刺激によるACの活性化はむしろGTP 存在下の方が大きかった(Fig.1)。また，両guanine nucleotides 非存在下では5-HT刺激によるAC活性の上昇は認められず，5-HT感受性AC活性にGTP 結合蛋白質が関与していることが示唆された。Fig.1 の結果から，以後の5-HT感受性AC活性の検討は10μM のGTP 存在下で施行した。

GTP 非存在下の基礎活性，10μM GTP 添加時および10μM GTP+10μM 5-HT添加時のcAMP産生量はいずれも約10分までincubation time に比例して直線的に増加し，その後徐々に増加率は減少した。そこで，incubation time としては直線性を十分に満足する2.5 分間を選択した。

以上の条件下で，5-HTおよび5-HT_{1A}受容体の選択的agonist である8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin(8-OH-DPAT) によるACの活性化を検討すると，Fig.2 のような濃度依存性が認められた。pEC_{50} はそれぞれ6.79±0.35および

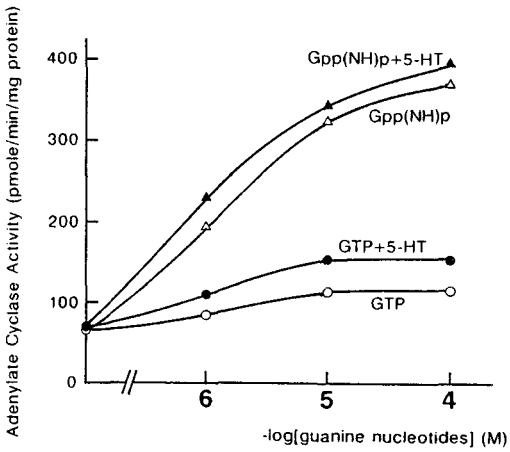


Fig.1. Effect of guanine nucleotides (GTP and Gpp(NH)p) on the adenylate cyclase activity in the absence or presence of 10 μM 5-HT in guinea pig hippocampal membranes.

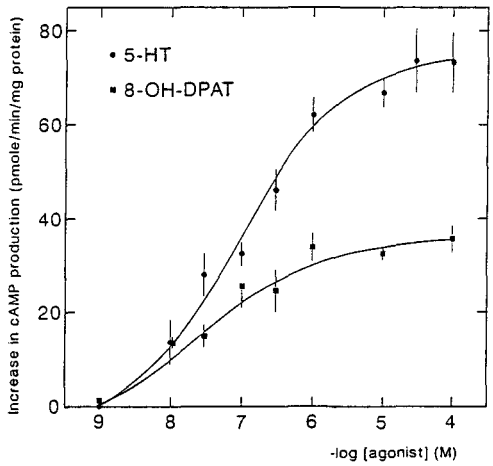


Fig.2. Stimulation of adenylate cyclase activity by 5-HT(●) and 8-OH-DPAT(■). Results are means±SEM of three independent experiments.

7.46±0.23 (平均±SEM, n=3) であり，平均のEC_{50}は162nM および34.6nMであった。Vmaxは5-HT刺激の73.5pmole/min/mg proteinに比べ，8-OH-DPAT 刺激の場合は34.3pmole/min/mg proteinと約1/2 にすぎなかった。

他のagonist(100 μM dopamine, 100 μM isoproterenol, 100μM norepinephrine, 100 μM epinephrine および1 mM histamine) 刺激によるAC活性の上昇と10μM の5-HT刺激によるACの活性化との間には，完全ではないが相加的な関係が認められた。

1 μM の5-HT刺激によるAC活性に対し，spiperone およびketanserinは濃度依存的な抑制を示した(Fig.3) 。Ketanserin は10μM の高濃度でもほとんど抑制しなかったが，spiperone は10μM ではほぼ完全に5-HT刺激によるAC活性の上昇を抑制した。10μM より高濃度のspiperone は5-HT非存在下でのAC活性値よりさらに低下させるが，その理由については明らかではない。

以上の結果から，guinea pigの海馬においては5-HT刺激がGTP 結合蛋白質を介してACの活性化を濃度依存的に引き起こすこと，この反応を介する5-HT受容体として少なくともその一部に5-HT_{1A}受容体が関与している可能性があることが示唆された。

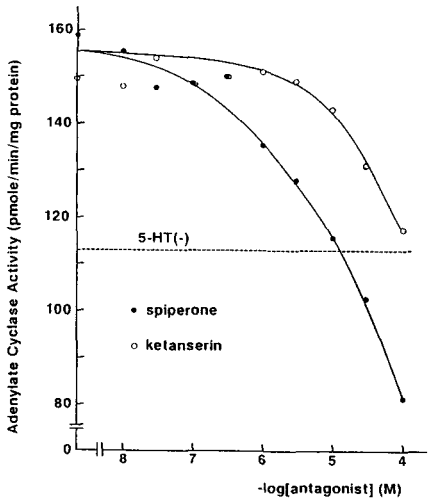


Fig.3. Antagonism of the 5-HT-sensitive adenylate cyclase activity by spiperone(●) and ketanserin(○). Adenylate cyclase was stimulated by 10 μM GTP and 1 μM 5-HT.

〔文献〕

1. De Vivo, M., and Maayani, S. (1986) *J. Pharmacol. Exp. Ther., 238,* 248-253
2. Heuring, R. E., and Peroutka, S. H. (1987) *J. Neurosci., 7,* 894-903
3. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem., 193,* 265-275
4. Peroutka, S. H. (1986) *J. Neurochem., 47,* 529-540
5. Peroutka, S. H., and Snyder, S. H. (1979) *Mol. Pharmacol., 16,* 687-699
6. Salomon, Y. (1979) *Adv. Cyclic Nucleotide Res., 10,* 35-55
7. Shenker, A., Maayani, S., Weinstein, H., and Green, J. P. (1987) *Mol. Pharmacol., 31,* 357-367

55 ラット脳セロトニン受容体サブタイプのG蛋白との共役とそれに対するN-ethylmaleimideの効果

今井伸一、北村佳久、野村靖幸
〈北大・薬・薬効〉

〔要約〕

脳セロトニン(5-HT)受容体サブタイプに対するGTP結合蛋白質（G蛋白）の共役の有無、およびそれらの性質を明らかにするため、各サブタイプへの選択的リガンド結合に及ぼすN-ethylmaleimide(NEM)の効果について検討した。

1） ラット脳膜画分への[^{3}H]8-OH-DPAT（5-HT$_{1A}$受容体アゴニスト）特異的結合は、GTPγS、NEMまたは百日咳毒素(IAP)によって減少した。NEMによる結合抑制は精製Gαの添加により回復した。

2） [^{125}I]Iodocyanopindolol（CYP,5-HT$_{1B}$受容体アンタゴニスト）結合に対する5-HTの抑制効果の性質をその置換曲線より検討したところ、GTPγSにより5-HTの高親和性結合数が減少することがわかった。NEM前処置は高、低両親和性結合部位数に何ら影響を及ぼさず、またGTPγS効果にも影響しなかった。

3） [^{3}H]Ketanserin（5-HT$_2$アンタゴニスト）結合に対する5-HTの抑制効果の性質を、その置換曲線より検討したところ、GTPγS効果が認められた。NEM処置膜においては、高親和性結合部位数が有意に増加し、かつ、GTPγS効果も認められた。

以上より、5-HT$_{1A}$、5-HT$_{1B}$ならびに5-HT$_2$受容体サブタイプは、それぞれG蛋白と共役しているが、NEMの作用が異なることから、各受容体サブタイプに共役するG蛋白は異なることが推定された。

〈緒言〉

5-HT受容体には5-HT$_{1A}$、5-HT$_{1B}$、5-HT$_{1C}$、5-HT$_{1D}$、5-HT$_2$、5-HT$_3$の６種のサブタイプが存在することが報告されている(3)。各受容体サブタイプの機能的役割として、5-HT$_{1A}$、5-HT$_{1B}$はアデニル酸シクラーゼの抑制、5-HT$_{1C}$、5-HT$_2$はホスホリパーゼCの活性化、5-HT$_3$はニコチン様の脱分極を導くことが報告されている(2, 3)。しかし、これら各受容体サブタイプの分子的諸性質は不明である。今回、受容体サブタイプとG蛋白の共役を明らかにするため、ラット脳膜画分5-HT受容体サブタイプへの選択的リガンド結合活性に対するSH基修飾試薬であるNEMの効果を検討した。

〈実験方法〉

Donryu系雄性ラットの全脳（小脳を除く）ホモジネートより脳膜画分を調製し受容体標本とした。NEM処置は NEM（最終濃度30μM～1 mM）を受容体標本と４℃、30分間、IAP処置は IAP（最終濃度1～100μg/ml）を1 mM NAD存在下で受容体標本と30 ℃、60分間それぞれインキュベートし、３回洗浄することにより行なった。また、Katadaらの方法(4)に準じてα$_{41}$、α$_{39}$を精製した。結合実験は、5-HT$_{1A}$受容体については0.2 nM [^{3}H]8-OH-DPAT（非特異的結合は10μM 5-HT存在下での結合）、5-HT$_{1B}$受容体については30μM Isoproterenol存在下、0.1 nM [^{125}I]CYP（非特異的結合は10μM 5-HT存在下での結合）、5-HT$_2$受容体については1 nM [^{3}H]Ketanserin（非特異的結合は10μM Methysergide存在下での結合）と30 ℃、40分間インキュベートし結合実験を行った。得られた置換曲線から、コンピューター解析により高、低両親和性結合成分のIC$_{50}$値、および構成比(%)を算出した。

〈結果〉

[^{3}H]8-OH-DPAT特異的結合において、NEM、またはIAPは濃度依存的に抑制を示した。0.3 mM NEMおよび100μg/ml IAP処置は、20μM GTPγS添加と同程度の抑制を示した(Fig.1)。0.3 mM NEM処置後の膜標本にIAP基質のα-サブユニットα$_{41}$、またはα$_{39}$を添加したところ[^{3}H]8-OH-DPAT結合は回復し、その効果はα$_{41}$の方が強かった。次に、[^{125}I]CYP結合に対する5-HT(Fig.2A)およびTFMPP（図省略）の置換曲線は、20μM GTPγSの添加により右にシフトした。置換曲線を２相性解析すると高親和性結合数が減少することがわかった(Table.1)。0.3 mM NEM処置しても、対照群に比し何ら差は認められなかった(Fig.2B)。また、[^{3}H]Ketanserin結合に対する

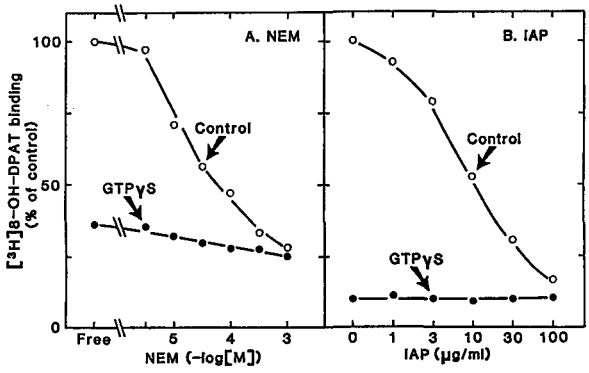


Fig.1 Effect of NEM or IAP on [^{3}H]8-OH-DPAT binding.

5-HTの置換曲線においても、20μM GTPγSによる高親和性結合数が減少することがわかった(Fig.3A, Table.2)。しかし、0.1 mM NEM処置膜においては5-HT置換曲線が未処置膜に比べて左にシフトした(Fig.3)。これを2相性解析したところ、処置膜において高親和性結合数が有意に増加していた(Table.2)。このNEM処置膜においてもGTPγS効果は認められた(Fig.3B, Table.2)。

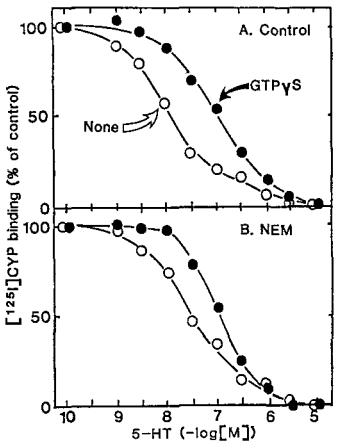


Fig.2
Effect of NEM pretreatment on [125I]CYP binding.

Table.1 Parameters of [125I]CYP binding in NEM-treated or control membranes.

Treatment	Addition	R_H (%)	R_H (nM)	R_L (%)	R_L (nM)
Control	None	67	10	33	1700
	20μM GTPγS	29	14	71	241
0.3mM NEM	None	55	11	45	311
	20μM GTPγS	21	16	79	187

Table.2 Parameters of [3H]Ketanserin binding in NEM-treated or control membranes.

Treatment	Addition	R_H (%)	R_H (μM)	R_L (%)	R_L (μM)
Control	None	8.4	0.37	91.6	10.5
	20μM GTPγS	—	—	100	16.6
0.1mM NEM	None	32	0.18	68	13.4
	20μM GTPγS	—	—	100	10.9

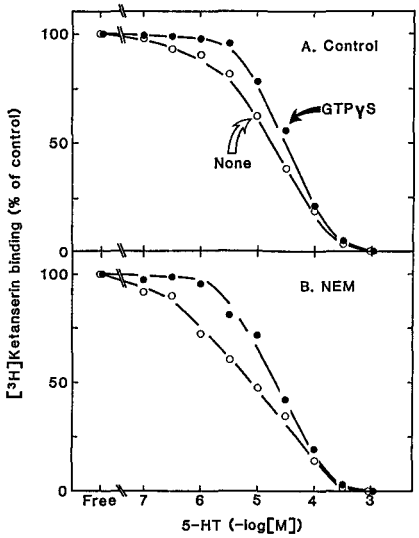


Fig.3
Effect of NEM pretreatment on [3H]Ketanserin binding.

〈考察〉

脳α_2受容体(5)およびGABA$_B$受容体(1)のようにIAP感受性G蛋白と共役する受容体において、NEMはG蛋白の受容体との共役ドメインのSH基を修飾することにより、受容体－G蛋白の脱共役をおこす。また、心臓ムスカリン様アセチルコリン受容体(mAChR)は、SH基修飾試薬のDTNBにより、低親和性結合部位が高親和性結合部位へシフトする(6)。このように受容体およびそれと共役するG蛋白の種類によりSH基の役割が異なっていると推定される。そこで今回SH基修飾試薬の作用に注目し、NEMを使用して、5-HT受容体サブタイプの分類について検討した。5-HT$_{1A}$受容体はα_2受容体やGABA$_B$受容体と同様のIAP基質と共役しており、NEMにより脱共役をおこすことが示された。また、5-HT$_2$受容体は心臓mAChRと同様、NEMによって低親和性結合部位の高親和性結合部位へのシフトが認められた。しかし、5-HT$_{1B}$受容体においてはNEMによる変化が認められなかった。以上より、5-HT$_{1A}$、5-HT$_{1B}$および5-HT$_2$受容体は、それぞれ異なったG蛋白と共役することが推定された。

〈参考文献〉

(1) Asano,T., and Ogasawara,N. (1986) Mol. Pharmacol. 29, 244-249.
(2) Dumus,A., Sebben,M., and Bockaert,J. (1988) Mol. Pharmacol. 33, 178-186.
(3) Fozard,J.R. (1987) Trends Pharmacol. Sci. 8, 501-506.
(4) Katada,T., Oinuma,M., and Ui,M. (1986) J. Biol. Chem. 261, 8182-8191.
(5) Kitamura,Y., and Nomura,Y. (1987) J. Neurochem. 49, 1894-1901.
(6) Mizushima,A., Uchida,S., Zhou,X-M., Kagiya,T., and Yoshida,H. (1987) Eur. J. Pharmacol. 135, 403-409.

56 [³H] ヒスタミンを用いたラット脳H₂受容体の結合調節機構の検討

小澤　光一郎、瀬川　富朗
（広島大・医・薬効解析）

〔要約〕
[³H]ヒスタミンを用いて、ラット脳H₂受容体の結合調節機構について検討した。GTPとGTPγSは大脳皮質膜H₂受容体への[³H]ヒスタミンの結合を濃度依存的に抑制した。一方、$MgCl_2$と $MnCl_2$は大脳皮質膜への[³H]ヒスタミンの結合を増加させ、 NaCl と LiCl は逆に減少させた。 [³H]ヒスタミン結合のScatchard解析の結果、$MgCl_2$は高親和性結合の最大結合量（Bmax）を増加させ、GTP は低親和性結合のBmax値を増加させることが明かになった。また、LiClの添加により[³H]ヒスタミン結合に対するGTPおよび$MgCl_2$の効果は消失した。一方、ラット大脳皮質膜を 100 μMのS-adenosylmethionineとインキュベートし、シナプス膜リン脂質のN－メチル化反応を促進させることにより、[³H]ヒスタミン結合の高親和性結合のBmax値は増加した。以上の結果より、ラット脳シナプス膜において、G蛋白質がH₂ 受容体への[³H]ヒスタミンの結合を調節している可能性が示唆された。さらに、シナプス膜リン脂質のN－メチル化反応も、H₂受容体への[³H]ヒスタミンの結合を調節している可能性が示唆された。

ヒスタミンH₂受容体は、G蛋白質に共役しアデニル酸シクラーゼを活性化させることが知られている。しかしながら、H₂受容体のリガンド結合調節機構については、いまだほとんど明らかにされていない。一方、われわれは、第30回日本神経化学会において、[³H]ヒスタミンが低濃度のメピラミンの存在下で、H₂受容体に選択的に結合することを報告した。今回、この結合定量法を用いラット脳におけるH₂ 受容体の結合調節機構、特に、G蛋白質とシナプス膜リン脂質のN－メチル化反応の関与について検討した。

[方 法]

Wistar 系雄性ラット大脳皮質より、常法に従いP₂画分を調製した。このP₂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した。最終的に得られた沈渣を40 nM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) に懸濁させ、その0.8 mlに2 nM [³H]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。全結合量より100 μM ヒスタミン存在下での結合（非特異的結合）量を差し引いて特異的結合量を求めた。

[成 績]

ラット大脳皮質膜標本への[³H]ヒスタミン結合に対する各種ヌクレオチドの影響を検討した結果、GTPと非水解性のGTP誘導体であるGTPγSは濃度依存的に[³H]ヒスタミン結合を抑制した(Fig. 1)。$MgCl_2$ と $MnCl_2$ は濃度依存的に[³H]ヒスタミン結合を増加させ、NaClとLiClは逆に減少させた。Scatchard解析の結果、$MgCl_2$ 添加により[³H]ヒスタミン結合の低親和性結合のBmax 値は減少し、逆に高親和性結合のBmax 値は増加すること、さらに、GTP 添加により、低親和性結合のBmax 値は増加し、高親和性結合の

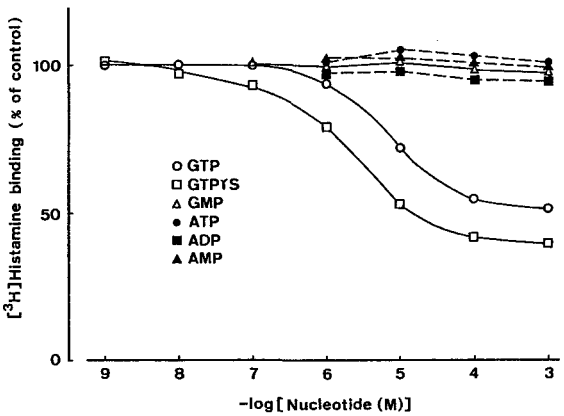


Fig. 1 Effect of nucleotides on [³H]histamine binding in the presence of 10 mM $MgCl_2$.

Bmax値は減少することが明らかになった。このとき高親和性結合および低親和性結合のBmax値の総和あるいは平衡解離定数（Kd）には、いずれの場合も著明な変化は認められなかった。LiCl添加により、GTPの[^{3}H]-ヒスタミン結合抑制効果は消失した（Fig. 2）。次に、[^{3}H]ヒスタミン結合に対するシナプス膜リン脂質のN-メチル化反応の影響を検討した結果、大脳皮質膜を100 μMのS-adenosylmethionine(SAM) 存在下で37 ℃, 30分間インキュベートし、シナプス膜リン脂質のN-メチル化反応を促進させると、[^{3}H]ヒスタミン結合の高親和性成分のBmax値のみが増加した（Fig. 3）。さらに、SAM処理によるBmax値の変化は、リン脂質N-メチル化反応の阻害剤である S-adenosylhomocysteine (SAH) の添加により消失した（Fig. 3）。

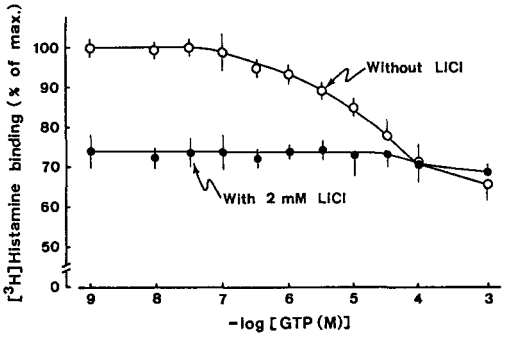


Fig. 2 Effect of GTP and LiCl on [^{3}H]histamine binding in the presence of 2 mM $MgCl_2$.

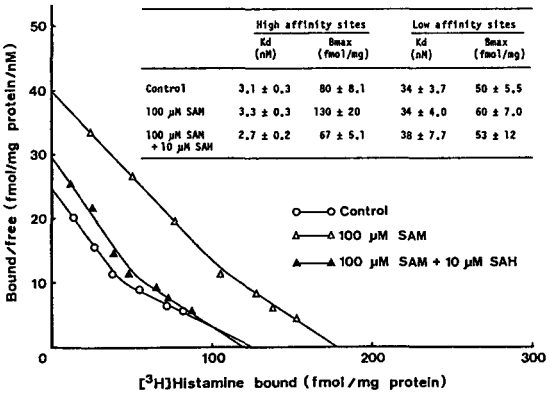


Fig. 3 Effect of phospholipid methylation on [^{3}H]-histamine binding in the presence of 10 mM $MgCl_2$.

[考 察]

各種ヌクレオチドのうちGTPとGTPγSのみが、大脳皮質膜への[^{3}H]ヒスタミンの結合を抑制し、その効力は非水解性の誘導体であるGTPγSの方が高かった。この結果は、G 蛋白質に共役した他の受容体についての報告(2,4)と一致しており、GTPあるいは GTPγSがG蛋白質を介してH_2 受容体への[^{3}H]ヒスタミンの結合を調節していることが推定された。また、Mg^{2+}あるいは Mn^{2+} が[^{3}H]ヒスタミン結合を増加させ、Na^+ が減少させたこともG蛋白質に共役する他の受容体での報告(3,6)とよく一致しており、H_2受容体とG蛋白質との共役が示唆された。さらに、Scatchard解析の結果から、Mg^{2+}あるいは GTPはG蛋白質を介してH_2受容体の高親和性結合と低親和性結合の間の相互変換を引き起こすことが推定された。Fig. 2の結果より、LiClがH_2受容体とG蛋白質との共役を阻害することが示唆された。同様の結果は Avissarら(1)により報告されている。以上の結果より、ラット脳シナプス膜において、G蛋白質がH_2受容体のアゴニスト結合を調節している可能性が示唆された。

われわれはラット脳において、膜リン脂質のN－メチル化反応がH_2受容体を介してのアデニル酸シクラーゼの活性化過程に重要な役割を果していることをすでに報告(5)している。Fig. 3に示すように、膜リン脂質のN－メチル化反応の促進により、H_2受容体への[^{3}H]ヒスタミン結合の高親和性成分のBmax値が増加したことから、今回さらに、膜リン脂質のN-メチル化反応がH_2 受容体のアゴニスト結合をも調節している可能性が示唆された。

[文 献]

1) Avissar, S. et al., Nature **331**, 440-442 (1988).
2) Harden, T. K. et al., Mol. Pharmacol. **21**, 570-580 (1982).
3) Kitamura, Y. et al., Eur. J. Pharmacol. **123**, 263-270 (1986).
4) Nukada, T. et al., Mol. Pharmacol. **24**, 366-373 (1983).
5) Ozawa, K. and Segawa, T., J. Neurochem. **50**, 1551-1558 (1988).
6) Sibley, D. R. and Creese, I., J. Biol. Chem. **258**, 4957-4965 (1983).

57 In vivoにおける〔^{3}H〕pyrilamineのヒスタミンH-1受容体への特異的結合

－PET によるヒスタミンH-1受容体測定のための基礎的研究－

谷内一彦[1]，渡邉建彦[1]，松澤大樹[2,3]，伊藤正敏[2]，畑澤順[2]，石渡喜一[2]，井戸達雄[2]

[1]東北大医・第一薬理，[2]東北大サイクロトロンRIセンター，[3]東北大・抗研・放射線

〔要約〕

PET によるヒスタミンH-1受容体の測定法の確立のため，〔^{3}H〕pyrilamineの“true” in vivo における特異的結合をguinea pig brainを用いて調べた。In vivo で〔^{3}H〕pyrilamineを投与すると H-1受容体の多い小脳，視床に〔^{3}H〕放射能の貯留が認められ，H-1 受容体の少ない線条体では〔^{3}H〕放射能は急速にwashoutされた。投与60分の脳内分布はin vitroでのH-1 受容体の分布と一致した。このbinding はchlorpheniramineによってdisplaceされるが，stereoselective で，ED_{50}は*d*体で25 μg/kg，*l*体で>1500 μg/kgであった。脳，血漿中の代謝物の測定をおこない，補正した値で3コンパートメントモデル解析をおこなった。C_3 compartment(H-1受容体結合量) は，小脳と線条体との差，あるいは doxepin (2 mg/kg)でblockingした値とその対照との差より大きく，このモデルで解析した場合，C_3には非特異的結合が含まれると考えられ，他のモデルで評価する必要性が示唆された。

- 目的- PETによる神経受容体測定法は生きている人間の，任意の時間に神経受容体を測定することが可能で最近大きな注目を集めている。多くのneuron系のPET による測定法が開発されているが，histamine neuron系でのPET による測定は報告されていない。Yanai et al.はヒスタミンH-1 受容体 antagonist である pyrilamine をcarbon-11 で標識し，その分布がマウスにおいて標識ligandによって明らかされたH-1 受容体に一致することを報告した(4) 。我々は今回,PETによる人脳でのH-1 受容体の測定の第一歩として，人のH-1 受容体のK_D に近似しているguinea pig brainを用いて基礎的検討をおこなった。

- 方法- Hartley guinea pig (male 280-320 g)をpentobarbital(20 mg/kg) 麻酔下に大腿動脈，および外頚静脈にcannulation をおこない，静脈側より5 μCi(180 pmol)の〔^{3}H〕pyrilamineを投与した。一定時間後氷上にて脳を細分し，重量測定後 protosolに溶解し液体シンチレーションカウンターにて測定した。代謝物測定はμ-Bondapack C-18 を用い,acetonitrile:water(0.2 M ammonium formate)=50:50 で溶出するHPLCでおこなった。

- 結果- 1.脳内分布: guinea pig brain (K_D = 0.8 nM) における脳内分布を図1 に示す。guinea pig brainでH-1 受容体の多い小脳，視床には〔^{3}H〕放射能はretention するが，H-1 受容体の少ない線条体，大脳では〔^{3}H〕放射能は急速にwashout される。投与後30分以後の脳内分布はin vitroでのH-1 受容体の分布と一致する。K_Dの大きいddY mouse brain (3.6 nM)ではどの部位も急速にwashout するが，H-1 受容体少ない部位との比(対小脳比) でplotするとmouseで報告されている脳内分布と一致する (1)。これらの特異的集積はguinea pig，mouse とも多量のH-1 antagonistsでblockされ消失する。下垂体は高度に集積するが，多量のH-1 antagonists によってdisplaceされずH-1受容体によらない結合と思われた。2.Stereoselectivity: 〔^{3}H〕pyrilamineの結合がstereoselective であるかどうか，*d*-，および*l*-chlorpheniramine を用いて検討した(図 2) 。guinea pigの小脳，視床とも*d*体，*l*体によってblock され，そのED$_{50}$はそれぞれ25 μg/kg，>1500 μg/kgであった。またpyrilamine自身によるED$_{50}$は15 μg/kgであった。*d*-，*l*-chlorpheniramineによるstereoselectivity はmouse でも認められた。3.Metabolitesの測定:図3に脳，血漿の全放射能中に含まれる〔^{3}H〕pyrilamineの割合を示した。脳内では投与後60分で94%,90分で83%が〔^{3}H〕

図1

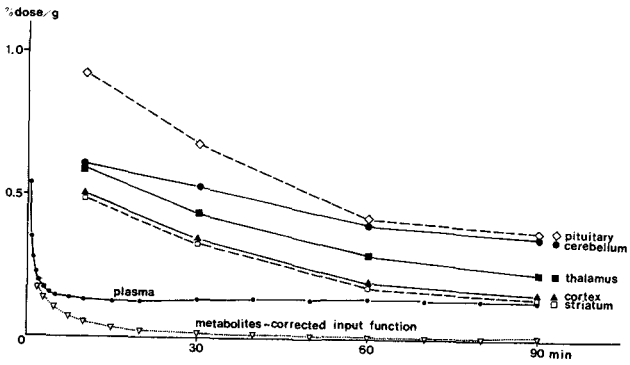
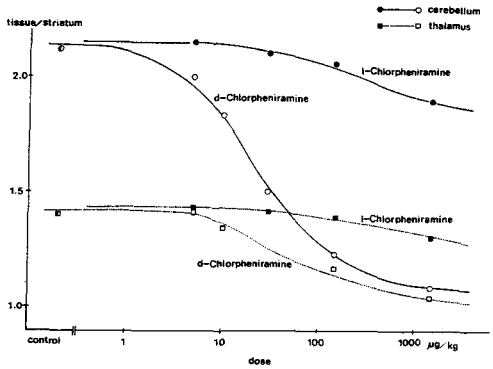


図2



pyrilamineとして存在するのに対し，血漿では指数関数的に減少し10分で34%，90分で6.7%のみが〔^{3}H〕pyrilamineとして存在した。4.Kinetic approach: 測定した〔^{3}H〕pyrilamineの割合を用いて3コンパートメントモデル解析(図4)をおこなった。計算されたC_3は，小脳と線条体との差あるいは,doxepin 2 mg/kgでblock した場合と対照との差よりも大きくC_3に非特異的結合が含まれてしまう可能性が考えられた。5.In vivo saturation法による定量: 様々な比放射能の〔^{3}H〕pyrilamineを投与し，小脳と線条体の差が一定になる60分の値を用いてを測定した(表1)。この方法で測定した場合in vitro法の値よりもB_{max}で30% ，K_D で12倍大きくなる。K_D が大きいのは正確なfreeでの濃度が不明で線条体の濃度をfreeとしているためであり，B_{max} が高いのはhomogenization等のH-1受容体が失活する操作がないためと考えられた。

表1 小脳

	B_{max}	K_D	B_{max}/K_D
in vitro	12pmol/g	0.8nM	15
in vivo saturation	16pmol/g	9.4nM	1.7
in vivo kinetic	-	-	2.9(=K_3/K_4)

- 考察- Diffley(2) やQuach(3)らがin vivo においてH-1 受容体を測定しているが，実際にはex vivo であり，しかも投与後3 分で屠殺したり，あるいは投与量が多いなど，PET の基礎データとはならない。我々は"true" in vivo において〔^{3}H〕pyrilamineがH-1 受容体に結合していることを証明した。人脳のH-1 受容体のK_D がguinea pigのそれに近いことから，〔^{11}C〕Pyrilamineにより人脳においてH-1 受容体がイメージングできることが予想され，様々な病態においてその役割が解明されることが期待される。

図3

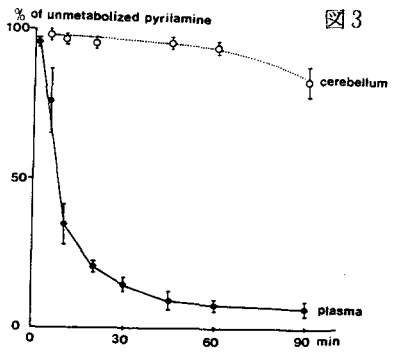
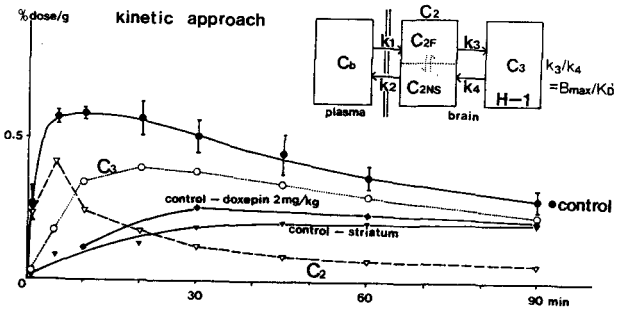


図4



- 文献- (1)Chang, R. S. L., Tran, V. T., and Snyder, S. H.(1979) *J. Neurochem.* 32, 1653-1663
(2)Diffley, D., Tran, V. T., and Snyder, S. H.(1980) *Eur. J. Pharmacol* . 64, 177-181
(3)Guach, T. T., Duchemin, A. M., Rose, C., and Schwartz, J. C.(1980) *Neurosci. lett.* 17, 49-54
(4)Yanai, K., Dannals, R. F., Wilson, A. A., Ravert, H. T., Scheffel, U., Tanada, S., and Wagner, H. N. Jr.(1987) *J. Nucl. Med.* 28, 624-625

58　ヒト脳脊髄液中のアセチルコリン及びコリンの定量（ＨＰＬＣを用いて）

奥山　真司、池田　淑夫、藤木嘉明、友田　桂子、大城　公恵
伊藤　哲一彦、山内　惟光、
（藤田学園　保衛大　医　精神）

〔要約〕　ヒト脳脊髄液（ＣＳＦ）中のアセチルコリン（ＡＣｈ）及びコリン（Ｃｈ）濃度を、固定化酵素法及び電気化学検出法を用いた高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）により測定をした。これまでＣＳＦ中のＡＣｈ濃度は生物学的測定法及びガスクロマトグラフィー／マススペクトロメトリー法（ＧＣ／ＭＳ）によって測定されている。ＨＰＬＣによる測定は本測定法が初めてのものであるが特異性が高く簡便かつ迅速であり極めて有用な測定法である。対象は、精神疾患及び神経疾患を有さない正常群23名と妊娠群 4名及びてんかん群 2名である。正常群は年齢に従い三群に大別し比較検討を行なった。又、妊娠群とてんかん群は同年齢層の正常群と比較検討を行った，既報との比較において正常群のＡＣｈ，Ｃｈの平均値等は大差ない値をえた。てんかん群の傾向も既報と同様の結果を示しており本測定法は有用な測定法と思われた。

Ⅰ　目的　ＡＣｈは1929年、Daleらの同定により最初の神経伝達物質となった古典的伝達物質である。近年、老人性痴呆及び Alzheimer病において、その痴呆症状発現に関与している主要な伝達物質のひとつとして注目を浴びている。さらにＣＳＦ中のＡＣｈ濃度に関する報告は、1949年Tower らの報告をはじめとしてその歴史は古い。しかし、従来の報告はすべて生物学的測定法及びＧＣ／ＭＳによりなされておりＨＰＬＣによる測定は困難であった。我々は採取時にフィゾスチグミンを添加したヒトＣＳＦに液体陽イオン交換法による抽出操作を加えたＨＰＬＣによるＡＣｈ濃度及びＣｈ濃度の測定法を確立した。今回、精神疾患及び神経疾患を伴わない正常群と妊娠群及びてんかん群のＣＳＦについてＡＣｈ濃度及びＣｈ濃度を測定した。これらの結果を既報と比較し、本測定法の有用性を検討した。

Ⅱ　対象と方法　対象として、研究の主旨を良く説明し充分な同意を得た被検者26名より腰椎穿刺にて得られた脳脊髄液（採取した最初の 2ml）を用いた。被検者は精神疾患ならびに神経疾患を伴っていない正常群20名と妊娠群 4名及びてんかん群 2名であった。尚、ＣＳＦは最初の 2mlを用い一般所見が臨床的に異常なものは対象から除外した。又、正常群をその年齢をもとに60才以上の老年群(4名）と40～60才の壮年群(9名）及び20才～40才の若年群(7名)の三群に大別した。又、妊娠群とてんかん群は、各々同年齢層の正常群を対照に用いた。　ＣＳＦ採取は、フィゾスチグミン（10-3M ）を入れたプラスチック試験管で行ない、最初の 2mlを採液後素早く撹拌し、抽出まで、4 ° Ｃで保存し採取後12時間以内に抽出操作を加えた。　ＣＳＦ中よりのＡＣｈ及びＣｈの抽出は、図１に示すごとく、液体陽イオン交換法　（Fonnum，1969年）に従って行なった。プラスチック試験管に採取したＣＳＦを定量し、内部標準物質としてＥＨＣ 2.5nmolを添加する。これを、テトラフェニールボロンを10mg/ml の割合で 3－ヘプタノンに溶解した液１mlに加え、10分間振とうを行なった後、1500× gにて20分間冷却遠心（ 4° Ｃ）する。分離したヘプタノン層 500μl をとり0.4N 塩酸 500μl に加え、１分間振とうした後に、1500× gで 5分間冷却遠心（ 4° Ｃ）する。分離したヘプタノン層を除去し塩酸層約 400μl を凍結乾燥する。得られた試料は 4° Ｃで保存する。測定時に35μl の蒸留水にて溶解し、その20μl をＨＰＬＣ－ＥＣＤsystemに注入、分析した。　ＨＰＬＣ－ＥＣＤのダイアグラムを図 2に示す。使用した機器は以下のごとくである。ポンプEP-10，ＥＣＤアンプECD-100，作用電極〔白金〕WE-PT，分離カラムEicompak AC-ODS，分析カラムＡＣ－Enzympak，プレカラム　Prepak（エイコム），インジェクター　7125（ Rheodyne ）。ＨＰＬＣ－ＥＣＤの測定条件を表に示す。　測定 により得られたＣＳＦ中のＡＣｈ及びＣｈ濃度についての検定はWilcoxonの順位和検定によっておこなった。

Ⅲ　結果

１．回収率及び最低検出限界　ＡＣｈ，Ｃｈ，ＥＨＣ標準物質のクロマトグラム及び、ヒトＣＳＦ抽出物のクロマトグラムの一例を、図 3に示す。図の如く標準物質、ＣＳＦ抽出物ともにＣｈ，ＥＨＣ，ＡＣｈの分離は良好でありＡＣｈ，Ｃｈの同時測定が可能である。ヒトＣＳＦにおけるＡＣｈの最低検出濃度は 5pmol/ml であった。回収率はＡＣｈ　91.7±1.0 、Ｃｈ 106.7±1.8 、ＥＨＣ　88.5±0.5 との均一な抽出を認めた（ｎ＝３）。

２．ヒトＣＳＦ中のＡＣｈ濃度　正常群全20例のＡＣｈ濃度の最低値～最高値は21～199pmol/ mlであり、その平均値と標準偏誤差は80.2±49.1pmol/ml であった。ＡＣｈ濃度の年齢による変化を、図4左に示す。前記したように正常群20名を年齢に従い三群に大別し比較をおこなった。各々の平均値と標準偏差は、老年群：58.3±30.4　壮年群：66.3±30.6　若年群：149.8±52.9pmol/ml であった。老年群及び壮年群のＡＣｈ濃度を若年群のそれと比較すると、Wilcoxonの順位和検定において各々5%以下の危険率で有意の低下を認めた。老年群と壮年群との間には有意な差をみとめなかった。妊娠群の平均値と標準偏差は178.5±93.2pmol/mlで対照群のそれと比較して有意な差を認めなかった。（図5左）てんかん群の平均値と標準偏差は386±253.1pmol/ml で対照群のそれと比較すると5%以下の危険率で有意の増加を認めた。（図5右）

３．ヒトＣＳＦ中のＣｈ濃度　正常群全20例のＣｈ濃度の最低値～最高値は352～4293pmol/ mlであり、その平均値と標準偏差は2167.2±1136.7pmol/ml であった。Ｃｈ濃度の年齢による変化を図4右に示す。

前記したように正常群20名を年齢に従い三群に大別し比較をおこなった。各々の平均値と標準偏差は老年群：2886.3±905.0　壮年群：1960.2±1216.5　若年群：1374.3±651.7pmol/ml であった。三群の間には有意な差をみとめなかった。妊娠群の平均値と標準偏差は1983.8±703.1pmol/ml で対照群との比較において有意な差を認めなかった。てんかん群の平均値と標準偏差は3530.5±2438.8pmol/ml で対照群との比較において有意な差を認めなかった。

Ⅳ　考察　今回、我々は液体陽イオン交換法にもとづく抽出法と、固定化酵素法及び電気化学検出法を用いたＨＰＬＣを組み合わせ、ヒトＣＳＦ中のＡＣｈを測定し得た。従来の報告においてヒトＣＳＦ中のＡＣｈ濃度の測定は主にカエル腹直筋やヒル背筋等を用いた生物学的測定法及びＧＣ／ＭＳ法によりなされてきた。生物学的測定法を用いた報告のなかにDuvoisinらの報告があり、彼らはカエル腹直筋を用いてヒトＣＳＦ中のＡＣｈ濃度を全例（64例）において測定できたことを報告している。彼らは著明な神経疾患を認めない16例について、そのＡＣｈ濃度の平均値及び標準誤差は0.11±0.04μＭ であったと報告している。又、てんかん患者（4名）において高値を認めたとしている。一方、ＧＣ／ＭＳ法を用いてWelch らはハンチントン舞踏病及びパーキンソン病を含む69例のＣＳＦ中のＡＣｈ濃度及びＣｈ濃度を報告している。その中で神経疾患を伴わない10例をコントロール群とし、この群のＡＣｈの平均及び標準偏差は0.07±0.02μＭ でありＣｈのそれは3.35±0.38μＭあったとしている。今回の我々が得た結果は、これら既報値と比較して著しい差異を認めなかった。又、脳内コリン作動系ニューロンは加齢にともない活性低下するとされている。これはラット等の動物実験における脳内ＡＣｈ含量の変化においても合致する結果が報告されている。ＣＳＦ中ＡＣｈ濃度の老、壮年群における低下もこれらに合致した結果といえる。以上の結果は本法が高い有用性を備えていることを示唆していると思われ、日常臨床を含め多方面での使用が期待される。

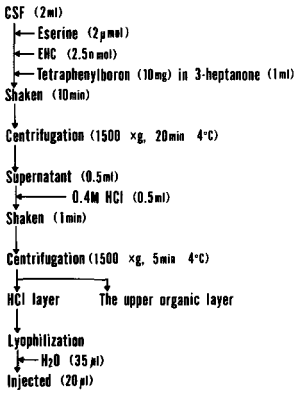


Fig 1. Extraction of ACh and Ch from CSF

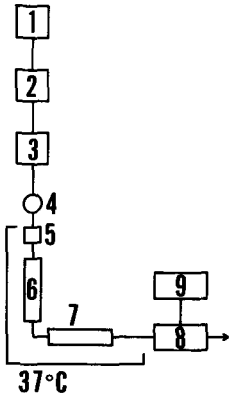


Fig 2. Diagram of HPLC 1. Solvent Reservoir 2. Degasser 3. Pump 4. Injector 5. Precolumn 6. Column 7. Enzyme Column 8. ECD 9. Recorder

Injection volume :	20μl of each sample dissolved with 35μl of distilled water.
Mobile phase :	0.1M phosphate buffer pH 8.3 containing 1.2mM tetramethy ammonium chloride and 300mg/L 1-decanesulfonic acid sodium salt.
Column pressure :	30~50kg/cm²
Flow rate :	1.0ml/min
Applied potential :	+450mV vs Ag/AgCl electrode

Tab. Condition of HPLC

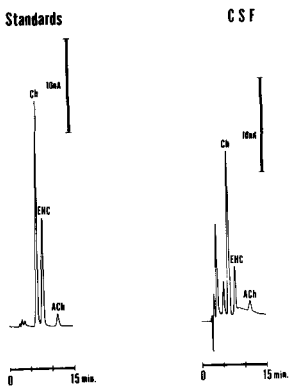


Fig 3. Chromatograms of STD(ACh:15.6 Ch,EHC:156pmol) and CSF (EHC:2.5nmol)

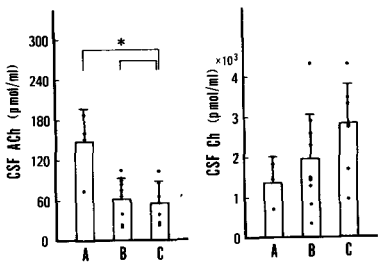


Fig 4. Concentration of ACh and Ch in CSF
A:20～40 Y.O. B:40～60 Y.O.
C:60～ Y.O. (* P<0.05)

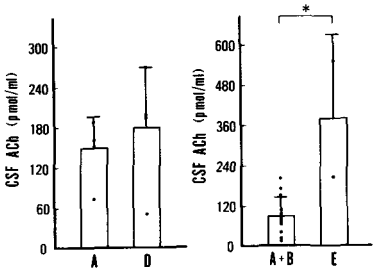


Fig 5. Concentration of ACh in CSF
D:Labor E:Epilepsy
(* P<0.05)

59 老齢及び成熟ラットの脳内choline acetyltransferase活性に及ぼすTJ－960の影響について

平松 緑、羽場久美子、枝松 礼、濱田 一、森 昭胤 （岡山大・医・脳代謝研・機能生化）

〔要約〕

老齢ラット(24ヶ月齢）及び成熟ラット(3.5ヶ月齢）に小柴胡湯合桂枝加しゃく薬湯（TJ-960、5%溶液）を3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 choline acetyltransferase (CAT) 活性を測定し、次のことを明かにした。(1)老齢ラット脳のCAT活性は、成熟ラット脳に比べて、海馬、線条体及び橋延髄において有意に低下していたが、小脳においては逆に有意に増加していた。(2)老齢ラット脳のCAT活性は、5%TJ-960投与3ヶ月後には海馬と線条体において有意に増加していた。しかし成熟ラットのCAT活性は、TJ-960投与によっても変化が認められなかった。以上より、TJ-960は、老齢ラットの海馬と線条体において低下したCAT活性を回復させることが明かとなった。

［緒言］

先に、我々は、小柴胡湯合桂枝加しゃく薬湯（TJ-960）が、活性酸素ラジカルを消去することをelectron spin resonance (ESR) spectromtryを用いて明かにした(4)。ついで、TJ-960は、老齢ラット脳内の過酸化中間体ラジカル及びthiobarbiturate反応物質（malondialdehyde）を減少させる(2)と共に、細胞質上清分画のsuperoxide dismutase (SOD) 活性を増加させること(5)を見出した。また、TJ-960は、老齢ラット視床下部のnorepinephrine値を上昇させ、さらに大脳皮質のtaurine、serine及びalanineを上昇させることを明かにした(3,6)。今回は、TJ-960の老齢及び成熟ラットの脳内choline acetyltransferase (CAT)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（3.5ヶ月齢）及び老齢（24ヶ月齢）のラット（Wistar、雄）を使用し、室温24°C、湿度55%で飼育した。飼料は、MF（オリエンタル酵母）を使用し、水は給水ビンを用いて自由に摂取させた。

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（株式会社ツムラ）を用いた。

3．TJ-960 の投与方法：TJ-960（5%水溶液）を吸水ビンに入れ、3ヶ月間連続経口投与を行った。対照には水のみを摂取させた。

4．CAT活性の測定：ラットを断頭後、脳を素早く摘出し、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。CAT活性の測定は、Haba et al.(7)の方法に従って行った。すなわち、脳組織に20倍量の10mM EDTA (pH 7.4) bufferを加えてホモジェナイズした。ついでホモジェネートに 0.2vol. の2.5% Triton-100 を加え、10−15分氷中放置後、10,000g にて15分間冷却遠心をした。得られた上清8μlに、基質調整液20μlを加え、37°Cにて15分間インキュベーションを行った。ついで氷中にて10mM sodium phosphate bufferを1ml、0.5% kalignost／acetonitrile 溶液を0.4ml 加え、シンチレーターを2ml 加えたのち、軽くかくはんして静置後、放射能の測定を行った。なお基質調整液は、choline bromide、硫酸エゼリン、acetyl-CoA 及び［^{3}H］acetylCoA を、30mM NaCl及び20mM EDTAを含んだ50mM sodiumphosphate buffer (pH 7.4) に溶かしたものを使用した。

Table 1

Effect of TJ-960 on brain choline acetyltransferase activity (nmol/h/mg protein)

		Control	TJ-960
Cortex	adult	6.33±0.94(11)	5.22±0.58(11)
	aged	5.60±0.84(8)	5.79±0.79(8)
Midbrain	adult	11.05±0.72(12)	11.27±0.85(11)
	aged	10.30±1.02(8)	10.40±1.25(8)
Hippocampus	adult	9.03±0.68(12)^{c}	8.67±0.75(11)^{a}
	aged	7.80±0.49(8)	8.43±0.44(8)
Hypothalamus	adult	3.19±0.82(12)	2.93±0.74(11)
	aged	3.43±0.68(8)	3.01±0.73(8)
Pons-medulla oblongata	adult	18.67±1.19(12)^{b}	17.78±3.01(11)
	aged	15.72±1.45(8)	16.35±1.65(8)
Cerebellum	adult	1.37±0.19(10)^{b}	1.30±0.18(10)
	aged	1.86±0.29(8)	1.81±0.45(8)
Striatum	adult	7.88±0.78(12)^{c}	8.49±0.55(11)^{a}
	aged	6.02±0.52(7)	7.23±0.94(8)

The values are expressed as the mean±SD with the number of animals in parentheses.
$^{a}p<0.025$ vs aged control, $^{b}p<0.005$, $^{c}p<0.001$ vs adult control (by Student's t-test).

[結果と考察]

老齢ラット脳のCAT活性は、成熟ラットに比べて、海馬、線条体及び橋延髄において有意に低下していたが、小脳においては逆に有意に増加していた。また老齢ラット大脳皮質のCAT活性には有意差が認められなかった。老齢ラット脳のCAT活性は、TJ-960投与後には、海馬と線条体において、有意に増加していた。しかし成熟ラットのCAT活性は、5% TJ-960 溶液を3ヶ月間投与後しても、変化が認められなかった（表1）。

TJ-960の5%溶液を3ヶ月間経口投与した際、投与後の老齢ラットの体重は、対照群の499.1g に対してTJ-960 投与群は488.9g であり、TJ-960投与による体重への影響は認められなかった。またこの時のTJ-960の平均摂取量は一日当り一匹ラットに対して1.25g、kg当り2.5gであった。Alzheimer病患者の大脳皮質、海馬、尾状核及び被殻のCAT活性は低下していること（1,8,9）及び老齢ラットの大脳皮質及び線条体のCAT活性は低下していることが知られている（7）。今回の実験において、老齢ラットの海馬、線条体及び橋延髄にCAT活性の低下が認められたが、TJ-960投与により老齢ラットの海馬及び線条体のCAT活性が増加していたことは興味深い。

1．Brown,D.M.,Allen,S.J.,Benton,J.S. et al.(1983)J. Neurochem. 41,266-272. 2．平松 緑、枝松 礼、加太英明ら（1985）神経化学 24,106-108. 3．Hiramatsu,M.,Kabuto,H. and Mori,A.（1986）IRCS Med. Sci. 14,189-190. 4．平松 緑、枝松 礼、福島正登ら(1987) Neurosciences 13,139-141. 5．平松 緑、枝松 礼、河野雅弘ら （1987)神経化学 26,580-582. 6．Hiramatsu,M.,Kabuto,H.and Mori,A.（1987) Neurosciences 13, 351-356. 7．Haba,K.,Ogawa,N.,Kawata,M. et al. Neurochem. Res. in press. 8．Palmer,A.M.,Francis,P.T.,Benton,J.S. et al.(1987)J. Neurochem. 48,8-15. 9．Reisine,T.D.,Yamamura,H.I.,Bird,E.D. et al.(1978) Brain Res. 159,477-481.

60 初代培養大脳皮質神経細胞におけるムスカリン受容体のUp-および Down-regulationについて

岸　正孝，大熊誠太郎，馬　福海，栗山欣弥
京都府立医大・薬理

〔要約〕マウスの15日目胎児大脳皮質より採取した初代培養神経細胞を用い、ムスカリン受容体作用薬への長期曝露に伴うムスカリン受容体の変化について検討を行った。ムスカリン受容体の作働薬である carbacholおよび拮抗薬である atropineへの 1-5日の曝露は、有意な[^{3}H]quinuclidinyl benzilate(QNB)結合の変化を招来した。すなわち、各薬物への 5日間の曝露を行った場合、carbachol では10^{-7}～10^{-6} Mで有意な [^{3}H]QNB結合の減少が、atropineの場合には10^{-9}～10^{-6} Mで有意な [^{3}H]QNB結合の増大がみられた。 Carbacholによる [^{3}H]QNB結合の減少はBmax値の低下に、またatropineによる [^{3}H]QNB結合の増加は、Bmax値とKd値の上昇に起因することが判明した。さらに、carbachol およびatropineへの 5日間の曝露により変化をうけた [^{3}H]QNB結合は、いずれもatropineにより用量依存的に拮抗された。以上の結果から、初代培養神経細胞のムスカリン受容体は up-および down-regulation機構を有し、そのメカニズムの解析に有用な実験系と考えられる。

[目的] ムスカリン受容体をムスカリン受容体作働薬に長期間曝露すると、その受容体数が減少することが報告されている (1-2)が、そのメカニズムについては、astrocytoma を用いた研究(3) においては、受容体が作働薬への曝露により internalizationを引き起すこと、chick heart を用いた研究(4) においては、受容体自身がリン酸化されることにより受容体機能が変化すること、などが報告されているが、その詳細については不明な点が多い。一方、ムスカリン受容体拮抗薬に曝露するとその受容体数が増加することも知られているが、その機序についても詳細は不明である。従って、本研究ではこれらのメカニズムの解明を目的として、マウスの15日目胎児大脳皮質より採取した初代培養神経細胞を用い、ムスカリン受容体作用薬への長期曝露に伴うムスカリン受容体の変化について検討を加えた。

[方法] 初代培養に用いた大脳皮質神経細胞は、ddy系マウスの15日目胎児の新皮質を細切し、trypsin 処置、ナイロンメッシュによる濾過、遠沈操作などを行うことにより得た(5)。得られた沈渣を再浮遊させ、poly-L-lysineにより前処置した培養皿に接種したのち、15% ウシ胎児血清含有 modified Eagle's minimum essential medium (MEM)中で 3日間培養した。次いで20 μM cytosine arabinosideに細胞を24時間曝露したのちに、培養液を 15%ウマ血清含有 MEMに変更し、培養を継続した。

上記の培養神経細胞をムスカリン受容体の作働薬である carbachol 及び拮抗薬であるatropineに培養 8日目より 5日間曝露したのち、細胞を培養皿より剥離し、particulate fractionを調製した。得られたparticulate fraction中に含まれるムスカリン受容体の数と親和性について、放射性リガンドとして [^{3}H]QNBを用いて測定を行なった(6)。なお、ムスカリン

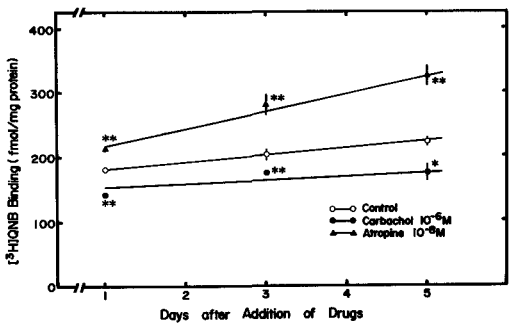


Fig.1 Changes of [^{3}H]quinuclidinyl benzilate ([^{3}H]QNB) binding in mouse cerebral cortical neurons in primary culture following long-term exposures (1-5 days) to carbachol and atropine.*p<0.02, **p<0.01, compared with each control value.

受容体への特異的結合量は、総結合量から10 μM atropine存在下で得られた非特異的結合量を差し引くことにより算出した。

[結果及び考察] Carbachol 10^{-6} M及びatropine 10^{-8} Mに培養 8日目より 1日、3日及び 5日間曝露したところ、carbachol 曝露では [^{3}H]QNB結合が減少し、atropine曝露では [^{3}H]QNB結合が増加することが判明した(Fig.1)。これらの実験結果より、以後の実験における曝露日数を 1日,3日,5日の中で最も大きな差を生じた 5日とした。Carbachol 及びatropine効果の用量依存性について検討したところ、carbacholは用量依存的に [^{3}H]QNB結合を減少させた。一方、atropineは用量依存的に [^{3}H]QNB結合を増加させたが、10^{-5} M以上の濃度では逆に減少を示した(Fig.2)。 以上のように carbacholおよびatropineに神経細胞を 5日間曝露すると、[^{3}H]QNB結合部位が変化することが確認されたが、これらの変化した [^{3}H]QNB結合部位が薬理学的特性を有するか否かをみるため、諸種の濃度のatropine存在下で [^{3}H]QNB結合を検討したところ、carbachol あるいはatropineへの 5日間曝露により変化した [^{3}H]QNB結合は、いずれもatropineにより用量依存的に阻害されたことより、薬理学的特性を有するムスカリン受容体であると考えられる。Carbachol 及びatropineに 5日間曝露した細胞への [^{3}H]QNB結合について Scatchard解析を行ったところ(Fig.3)、control、atropine曝露および carbachol曝露の三者共に、単一の高親和性結合部位のみよりなることが判明した。また Scatchard解析により kinetic parameterを求めたところ、controlと比較して carbacholに曝露した細胞ではBmax値のみが有意な減少を示したのに対し、atropineに曝露した細胞ではKd値およびBmax値の両者が有意な増加を示すことが観察された。以上の結果より、初代培養神経細胞のムスカリン受容体は up-および down-regulation機構を有し、そのメカニズムの生化学・薬理学的解析に有用な実験系になり得ると考えられる。

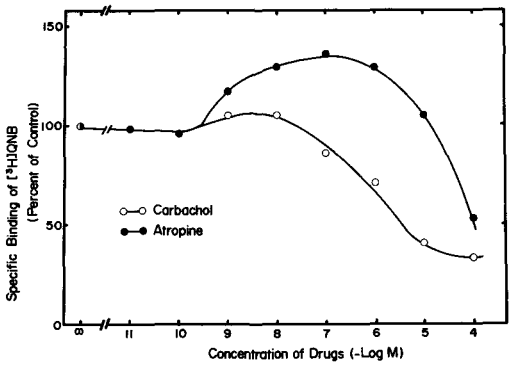


Fig.2 Effect of long-term exposures (5 days) to carbachol and atropine on [^{3}H]quinuclidinyl benzilate([^{3}H]QNB) binding in mouse cerebral cortical neurons in primary culture. Control value: 224.3 ± 3.7 fmol/mg protein.

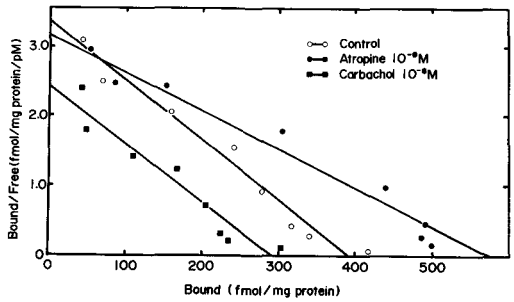


Fig.3 Scatchard plot of [^{3}H]quinuclidinyl benzilate binding to particulate fraction of mouse cerebral cortical neurons in primary culture following long-term (5 days) exposures to carbachol and atropine.

[文献]

1) Galper,J.B.and Smith,T.W.(1978) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 75,5831-5835. 2) Siman, R.G.and Klein, W.L. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 76,4141-4145. 3) Harden,T.K., Petch,L.A., Traynelis,S.F. and Waldo,G.L. (1985) J.Biol.Chem. 260,13060-13066. 4) Kwatra,M.M., Leung,E., Moon,A.C., McMahon,K.K., Ptasienski,J., Green,R.D. and Hosey,M.M. (1987) J.Biol.Chem. 262,16314-16321. 5) Ohkuma,S., Tomono,S., Tanaka,Y., Kuriyama,K. and Mukainaka,T. (1986) Int.J.Devl.Neurosci. 4,383-395. 6) Yamamura,H.I. and Snyder,S.H.(1974) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 71,1725-1729.

61 カルシウム拮抗剤のムスカリン性受容体に対する影響

片山禎夫、鬼頭昭三、三好理絵
（広島大学・第三内科）

〔要約〕

L型カルシウムチャンネルに特異的に結合するニカルジピンがムスカリン性受容体に対してどのような作用を示すのか、またムスカリン性受容体のサブタイプによって影響に違いがあるのかを結合実験を通じて検討した。ニカルジピンは^{3}H-QNB結合の飽和実験に対しBmax 値に影響を与えず、Kd 値をニカルジピンの濃度依存性に上昇させた。この結果からSchildプロットを求めたところ競合的拮抗関係にあると仮定した直線からニカルジピンの濃度依存性に解離していった。また、ムスカリン性受容体サブタイプそれぞれに特異的に結合するリガンドの結合に対するニカルジピンの結合阻害実験を施行したところ、ニカルジピンはＭ１よりもＭ２に１０倍の解離定数Ki を示した。これらのことより、神経細胞膜上でL型カルシウムチャンネルがムスカリン性受容体の近傍に存在している可能性が示唆される。さらに、ニカルジピンはムスカリン性受容体サブタイプであるＭ２により特異的であることが明らかになった。

Ｋｅｙ　Ｗｏｒｄ：　ニカルジピン、ムスカリン性受容体サブタイプ、アロステリック阻害作用

【緒言】

膜電位依存性のカルシウムチャンネルは、細胞膜に存在し、細胞内へのカルシウムイオンの流入を制御することによって、カルシウムに依存した様々な細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。カルシウム拮抗剤の一つであるジヒドロピリジン誘導体がL型カルシウムチャンネルに特異的に作用し、非常に高い親和性で脳の特異的な部位に結合することが見いだされている。しかしながら、カルシウムチャンネルと神経伝達物質受容体との膜内における相互の機能的および位置的関係は未だほとんど明らかでない。筆者らは、ラット脳粗シナプス膜を用いた結合実験により、L型カルシウムチャンネルとムスカリン性受容体の神経細胞膜における共存関係を示唆し（１）、さらにジヒドロピリジン誘導体であるにニカルジピンが^{3}H-QNB結合に対し特異的に阻害することを明らかにしてきた（２）。一方、ムスカリン性受容体に構造的サブタイプが存在することが明らかにされ、それぞれの機能的相異が活発に検索されている。

そこで筆者らは、L型カルシウムチャンネルとムスカリン性受容体のサブタイプそれぞれとの関係を検索する目的で、(1) ニカルジピンの^{3}H-QNB結合に対する阻害様式を、(2) ムスカリン性受容体サブタイプそれぞれに高親和性をもって結合するリガンドを用いて、ニカルジピンがそれらリガンド結合にどのように影響するかを検索した。

【実験方法】

Wistar系雄ラット（180-250g）大脳皮質より調整した粗シナプス膜を実験に用いた。リガンドとして、総ムスカリン性受容体を標識するために^{3}H-QNB(42.2 Ci/mmol,NEN)を、ムスカリン性受容体サブタイプであるＭ１を標識するために^{3}H-pirenzepine(PZ)(76.0 Ci/mmol,NEN)を、Ｍ２を標識するために^{3}H-AF-DX 116(62.0 Ci/mmol,NEN)を用いた。インキュベーション条件は、従来の報告とおなじものを用いた(1,2)。 ^{3}H-AF-DX 116を用いる条件は、粗シナプス膜の調整も含めてWangらの方法に従った(3) 。インキュベーションは総て、sodium 光下で行った。インキュベーション後、Whatman GF/Bフィルターを用いて急速吸引沪過法により反応を停止させてＢ／Ｆ分離を行った。

【実験結果】

（１） ニカルジピンとムスカリン性受容体の相互作用を検討する目的で、^{3}H-QNB飽和実験に、ニカルジピン4×10^{-5}、2×10^{-5}、1×10^{-5}、2×10^{-6}、1×10^{-6}、3×10^{-7}Mを加えて、Scatchardプロットを求めたところ、Bmax値に変化はなく、Kd値のみニカルジピンの濃度依存性に上昇を示した。さらに、この結果よりSchildプロットを求めたところ、競合的拮抗関係にあると仮定した場合の直線からニカルジピンの濃度依存性に解離していった。そこで、ニカルジピンはムスカリン性受容体とは異なる部位に結合し、しかもムスカリン性受容体に対してアロステリックな作用を示す部位に結合すると考えられる。

（２）次に、^{3}H-QNB結合、 ^{3}H-PZ結合および^{3}H-AF-DX 116結合に対するニカルジピンの結合阻害実験を行ったところ、ニカルジピン1×10^{-4} Mでそれぞれほぼ１００%抑制した。また、結合阻害曲線より解離定数Ki およびHill係数を求めたところ、それぞれ、^{3}H-QNB結合に対しては4.28×10^{-6} および1.03、 ^{3}H-PZ結合に対しては7.36×10^{-6} および0.80、^{3}H-AF-DX 116結合に対しては7.87×10^{-7} および0.75であった。

【考察】

L型カルシウムチャンネルを特異的に標識するニカルジピンがムスカリン性受容体のアロステリックな作用をする部位に結合することが示唆された。このことは、神経細胞膜上でL型カルシウムチャンネルがムスカリン性受容体の近傍に存在し、ニカルジピンがL型カルシウムチャンネルに結合することにより膜上にコンフォーメーションの変化が生じ、その結果ムスカリン性受容体の親和性が変化する可能性が推定される。さらに、ニカルジピンはムスカリン性受容体のサブタイプであるＭ１，Ｍ２の両方に作用した。さらに、Ｍ１よりもＭ２に対して解離定数が１０倍低値を示した。このことは、ムスカリン性受容体のサブタイプによりL型カルシウムチャンネルとの関係が異なることが示唆される。

【参考文献】

１．片山禎夫ら （1985） 神経化学 ２４、511—513

２．Katayama,S et al （1987） Brain Res. 422、168—171

３．Wang,W.R. et al （1987） Life Sci. 41、1751—1760

62 コリン作働性神経の神経化学的ならびに行動科学的検索

野村正彦，庄田　基，神野哲夫
（藤田学園保健衛生大・医・生理，脳神経外科）

〔要約〕
脳内アセチールコリン作働性神経系が制御している中枢機能のうち、高次神経機能の一つと考えられる学習と記憶への影響を調べるために、コリン作働性神経核であるマイネルト核を中心とした神経細胞群を破壊したラットを作製した。神経核を中心にして破壊した１ヶ月後、学習能力をオペラント型明度弁別学習課題下に検索した。そして、学習能力の著明な低下と学習完成の不全を認めた。また、学習実験終了後、コリン作働性神経核の変性と脱落を組織学的検索で確認した。　また、コリン作働性神経系の指標として、アセチールコリン転換酵素（ＣｈＡＴ）および分解酵素（ＡｃｈＥ）の活性測定を行ない、脳全般へのコリン作働性神経の変性を裏づける両酵素活性値の低下を認めた。

〔目的〕　脳内アセチールコリン作働性神経系は、種々の中枢機能を制御しているが、なかでも学習と記憶の障害が、これらの神経系の機能低下に起因しているものと考えられる。一つには、老化による脳内アセチールコリン作働性神経核であるマイネルト核を中心とした神経細胞の変性と脱落であり、また一つには、これらの部位への何等かの外傷性損傷あるいは薬物による侵襲である。　今回は、アセチールコリン作働性神経核のあるマイネルト核を中心とした神経核細胞群の破壊を、神経毒であるイボテン酸を注入する事で作製した。そして、これらの実験動物が示す脳内損傷と学習能力を同時に検索することによって、コリン作働性神経系の持つ高次神経機能の一端を調べた。

〔方法〕

実験動物：　３ヶ月齢の WISTAR ラットの両側の脳実質内に、Ibotenic acid(10 mg/mlの濃度を 0.5ul) を infussion pump で注入して作製した。脳部位は図布によりステレオタキシックに、A 6.4, L 2.8, H 1.8 を用いた (4)。対照群は vehicle を同量同部位に投与した。

学習実験：　対照群および Ibotenic acid 投与ラットを４ヶ月齢時に、飽食時体重の８５％まで餌を制限して、明度弁別学習課題下に学習能力を検索した (5)。明るい明度呈示時にラットがレバーを押せば餌が強化され（Ｒ＋）、暗い明度呈示時にレバーを押せしても餌が強化されない（Ｒ－）、Multiple VI 15 Seconds Extinction 課題で３０日間連続して行なった(7)。

脳内伝達物質の定量：Glowinski らの方法 (3) で大脳を６部位に分けて、それぞれの組織について以下の定量を行なった。

（１）．　モノアミン含有量の測定　ＨＰＬＣ－ＥＣＤによる直接注入法で、Norepinephrine (NE)、 Dopamine (DA)、3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、および Homovanillic acid (HVA) を測定した。

（２）．　アセチールコリン転換酵素および分解酵素の測定

１）、ChAT の定量は Rossier らの方法 (6) で、基質としてアセチル CoA [^{14}C] から合成された [^{14}C] -Ach 量を測定して定量した。

２）、AchE の定量は Ellaman らの方法 (1) で、Thiocholine の生成速度を測定して定量した。

〔成績〕

（１）．　学習成績　明度弁別学習課題下に学習を行なった。対照群は第１試行日にはＲ＋およびＲ－ともに９０回（１０匹平均）で、第１０試行日にはＲ＋は１８８回、Ｒ－は１１５回で、第２０試行日にはＲ＋は２１０回、Ｒ－は６７回で、第３０試行日にはＲ＋は２６０回、Ｒ－は６１回であった。従って、正反応率は図－１のごとく、５０％から試行日数の進行に伴い、第１０試行日には６７％、第２０試行日には８６％および第３０試行日には９１％を示した。

これに対して、実験群は第１試行日にはＲ＋は５４回、Ｒ－は６０回（７匹平均）で、第１０試行日にはＲ＋は１２６回、Ｒ－は８２回で、第２０試行日にはＲ＋は１５８回、Ｒ－は７５回で、第３０試行日にはＲ＋は１７８回、Ｒ－は８３回であった。従って、正反応率は図－１のごとく、４８％から試行日数の進行に伴い、第１０試行日には６２％、第２０試行日には６３％および第

３０試行日には６６％を示した。

（２）．１）　モノアミン含有量

脳の６部位のうち特に変化の著明であったのは、線条体で対照の NE は 0.205(μg/ g. wet.wt)に対して、実験群は 0.37、DA は 6.95 に対して 11.6、また代謝産物である HVA は 0.498 に対して 0.794、DOPAC は 1.25 に対して 1.01 であった。

２）　アセチールコリン転換酵素

脳の６部位の酵素活性値を図－２に示した。いずれの部位においても、実験群は著明な低下を示した。

３）　アセチールコリン分解酵素

脳の６部位のうち延髄、海馬、脳幹部、および後部大脳皮質で、実験群は著明な低下を示した。

［考察］

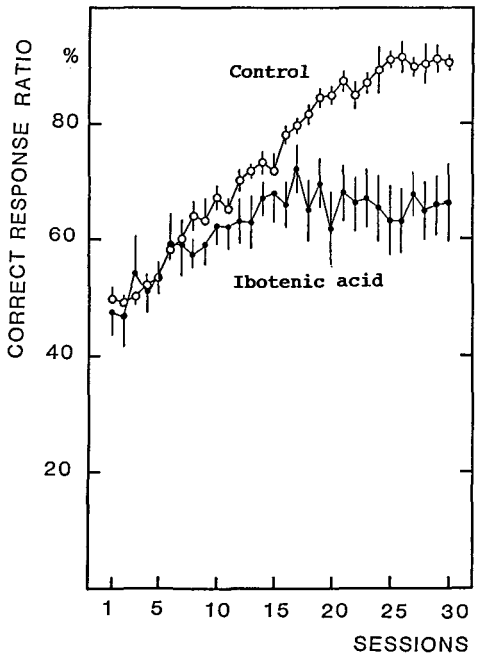
Ibotenic acid 投与によるマイネルト核を中心とした神経核細胞群の破壊を行なったラットが、明度弁別学習課題下での学習形成不全と学習成績の著明な低下を認めた。これは、神経毒である Ibotenic acid による変性が、マイネルト核を中心としたコリン作働性神経系を介して、大脳全般にわたり起こり、高次神経機能の重要な課題の一つである学習行動に影響を与えたものと考えられる。

この事は、アセチールコリン合成酵素である ChAT の活性値が、脳の部位別に見ると、大脳全般の広範域に低下している事が認められた事からも推察される（2)。また、これらの変化がコリン作働性神経系のみならず、モノアミン作働性神経系、特に NE系 や DA 系にも認められる（8）事から、更に詳細な脳全般にわたる作働性神経系列との相関性を、同時に検討する必要性がある事が示唆された。

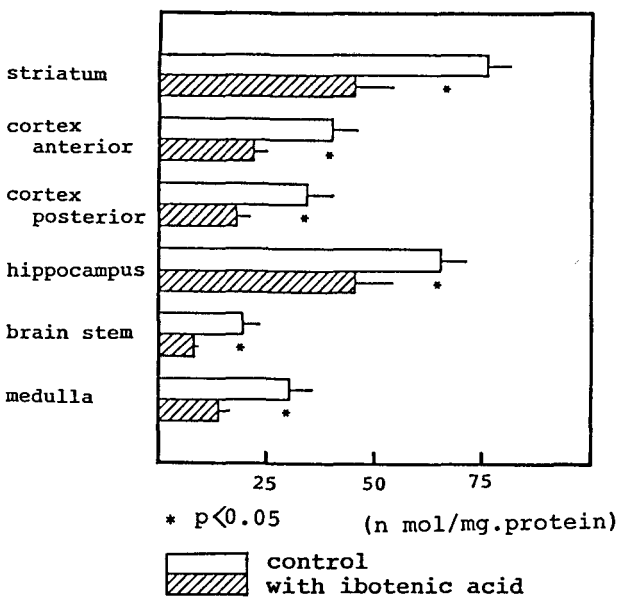
［文献］

1.Ellman,GL.,Courtney,D & Anderes, V.(1961) Biochem.Pharmac.,9,88-99. 2.Fine,A.,Dunnell,SB.,Bjorklund,A. & Iversen,SD.(1985) Proc.Natl.Acad. Sci.USA.,82,5227-5230. 3.Glowinski, L. & Iversen,LC.(1966) J.Neurochem. 13,655-669. 4.Miyamoto,M.,Shintani, M.,Nagaoka,A. & Nagawa,Y.(1985) Brain Res.,328,97-104. 5.Nomura,M. (1984) Res.Commun.Psychol.Psychiat. Behav.,9,373-384. 6.Rossier,K., Bauman,A. & Benda,P.(1973) Arch. Biochem.Biophs.,32,231-234. 7. Tsukada,Y.,Nomura,M.,Nagai,K., Kohsaka,S.,Kawahata,H.,Ito,M. & Matsutani,T.(1977) Behavioral Neuro-chemistry.(spectrum pub.).pp.63-84. 8.Winn,P.,Tarbuck,A & Dunnett,SB. (1984) Neurosci.,12,225-240.

図－１　明度弁別学習成績の正反応率



図－２　脳の部位別アセチールコリン転換酵素活性値
＊：P<0.05



63 マウスの回避学習に及ぼすキレート剤の影響（II）

村上哲英・根木哲郎

（香川医大・生物）

〔要約〕
マウスやラットの海馬領域の苔状線維終末に亜鉛が高濃度に存在することはよく知られている．先に我々は，マウスを用いて，亜鉛のキレート剤の一種であるdithizone（DTZ）を腹腔内に投与すると，一過的に海馬脳波の消失と，組織化学的亜鉛反応である Timm 反応が陰性になることを報告した[2,4,5]．更に，DTZ を回避学習直前に腹腔内に投与し5分間中に10試行の学習を行い，一週間後に再学習を行うと，記憶の保持が阻害されている．これに反し，5分間10試行を行った直後の投与では，無投与の対照と差がないことを報告した[3]．今回は DTZ の他，diethyldithiocarbamate （DEDTC）を用い，学習直前，或は学習直後に投与し，一週間後の再学習に消去実験を試みたところ，一週間後の再学習よりも，より顕著に学習に及ぼす影響が測定された．即ち，キレート剤を学習の直前に投与し，一週間後に消去学習を行うと著明に記憶の保持が阻害されているのに対し，学習直後の投与では対照と大差のないことが判明した．学習前投与と学習後投与の時間差は5分間であり，この5分以内に記憶の固定が行われるのではないかと考えられる．そして，一旦記憶が固定されると，その後のキレート剤による一過的な脳波の消失や，Timm 反応の陰性化は記憶の保持に対しては大きな影響を与えないのではないかと考えられる．

先の報告で，キレート剤の一種である DTZ を 25mg/kg 以上マウスの腹腔内に投与すると，Timm 反応が投与後5分で既に海馬の CA3 の放射層から陰性に転じ始め，30分後には海馬領域全体が陰性となる．そして60分後には歯状回門から陽性に回復し始めること．又，脳を灰化後，原子吸光法で亜鉛の含有量を測定したところ，DTZ 100mg/kg 投与でも変化が認められないこと．又，血糖値の変化も DTZ 投与後120分の間では認められないこと．更に海馬脳波は DTZ 50mg/kg 投与後約7分すると著しい振幅の低下と除波化が認められ，100mg/kg 投与では脳波の平坦化が見られ，これが約6分間続き，投与後約12分から次第に回復し始めること．又，DTZ 50mg/kg 投与後約10分を過ぎる頃からうずくまりが生じ移動活性度は著減するが，5分以内では対照と差のないこと等を報告した．回避学習に関しては学習直前に DTZ 50mg/kg を投与し，5分間に10試行（平均約３の正反応）を行い，一週間後の再学習は著しく学習成績が阻害されているのに対し，5分間10試行（平均約４の正反応）後の投与では，一週間後の再学習の成績は対照と差のないことを報告した．今回は DTZ の他，同じく亜鉛のキレート剤で，DTZ より毒性の少ない DEDTC を用いて，移動活性度の減少しない投与後5分以内に計3回の正反応を示したところで学習を停止し，一週間後に消去学習を行ったところ，学習前投与では記憶の保持が著明に阻害されているのに対し，学習後投与では対照と差のない結果を得た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 系マウスの 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．DTZ（和光特級）は先報と同じくアンモニア性エノール型として用い，20，50mg/kg を，DEDTC（同仁化学）は水溶液とし，100，250，500，1,000mg/kgとして夫に腹腔内に投与した．回避学習には既報[1]の jump-box を用いた．学習実験前にマウスは handling を5分間，及び jump-box 内で5分間の順応を行った．回避学習は既報のように，先ず条件刺激として光とブザー音が与えられ，3秒後に無条件刺激として床に40Vの交流電激が与えられる．するとマウスは床から10cm上に張り巡らされた網に逃避する．逃避すると床の電激も断たれる．20秒後に手でマウスを床上に戻し，計30秒後から次の試行が開始される．これを繰り返し，条件刺激のみで回避した場合を正の反応とし，無条件刺激を受けて逃避した場合を負の反応とした．学習を開始し正の反応が計3回得られたところで学習は終了する．そして一週間後に最初の1試行は，もし条件刺激のみで回避しなければ無条件刺激を与え，第2試行からは条件刺激のみの消去実験を10試行行った．キレート剤の投与は学習直前，或は正の反応が計3回得られた学習直後に行い，一週間後に上述のような消去実験を行った．

実験成績及び考察

DTZ を50，100mg/kg腹腔内に投与すると，10分後には急激に移動活性度が減少し，うずくまるようになる．又，DEDTC も250mg/kg以上の量を投与すると5分を過ぎる頃から投与量に比例して移動活性度の減少があり，うずくまるようになる．今，移動活性度を1分間隔で測定すると，いずれの濃度においても5分以内では対照と差が認められない．学習実験に関しては，キレート剤を投与しない対照群では，第1回目の学習で正の反応を1回示した時点で学習を停止し，一週間後の再学習の成績は約70%の正の成績を示した．今回は正の成績を3回示した時点で学習を停止し，一週間後の消去学習で約90%の正の成績を示したことから，3回の正反応を示した時点で学習は充分成立していると考えられる．DTZ 50，25mg/kg を学習前，及び学習後に投与し，一週間後の消去実験の成績を図１に示す．DTZ 50mg/kgを学習直前に投与すると，著明に（$p<0.001$）記憶の保持が阻害されているのに対し，学習後の投与では対照との間に差は認められない．又，　DTZ 25mg/kgでは学習前投与，学習後投与いずれの場合にも対照と差がなくなる．DEDTC に関しての結果を図２に示した．DEDTC を学習前に1000，500，250mg/kgをそれぞれ

投与し，一週間後の消去学習の結果は著明な（$p<0.001$）記憶の保持の阻害が認められたのに対し，学習後投与では1,000mg/kgの量で（$p<0.01$）阻害が認められるが，500mg/kg以下の量を投与した場合は差が認められない．100mg/kg投与では両者共に差が認められなくなる．Timm 反応は DTZ では25mg/kg投与後30分で完全に陰性となるが90分を経ると元に復す．DEDTC は100mg/kg投与では影響が認められないが，250mg/kg以上の投与では5分後に陰性化が始まり，投与量に比例して陰性化の時間は長びく．脳波は DTZ では100mg/kg，DEDTC では500mg/kg以上の投与で，投与約7分後から約5分間平坦化が見られ，DTZ 50mg/kg，DEDTC250mg/kg投与では著しい振幅の減少と，除波化が認められるが，DTZ 25mg/kg，DEDTC 100mg/kg投与では著明な変動は認められない．学習前投与と，学習後投与との差は5分以内であり，この間に記銘が行われているのではないかと考えられる．そして，一旦記銘が完了すれば，Timm 反応の陰性化や，脳波の平坦化，除波化等の機能的障害を受けても，記憶の保持には大きな影響は及ぼさないのではないかと考えられる．最近 protein kinase C 活性化の促進剤が海馬の電気活動を長期増強する報告や[6]，protein kinase C 活性が適量の亜鉛を添加することによって賦活されることが報告[7]されており，亜鉛と記憶との間に密接な関係があるのではないかと考えられる．

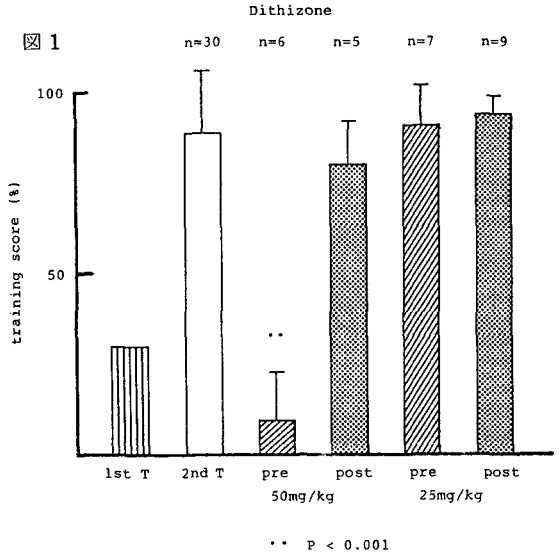


図１．第１回目の学習で正の回避反応を計３回示した時点で学習を停止し，一週間後に消去学習を行った結果を示してある．DTZ 50mg/kgを学習前に腹腔内に投与し一週間後の消去実験の成績は著明に（$p<0.001$）記憶の保持が阻害されている．これに対し，学習後の投与では無処置の対照と差が認められない．又，25mg/kgの投与では，学習前，学習後のいずれの投与でも，対照と差が認められない．

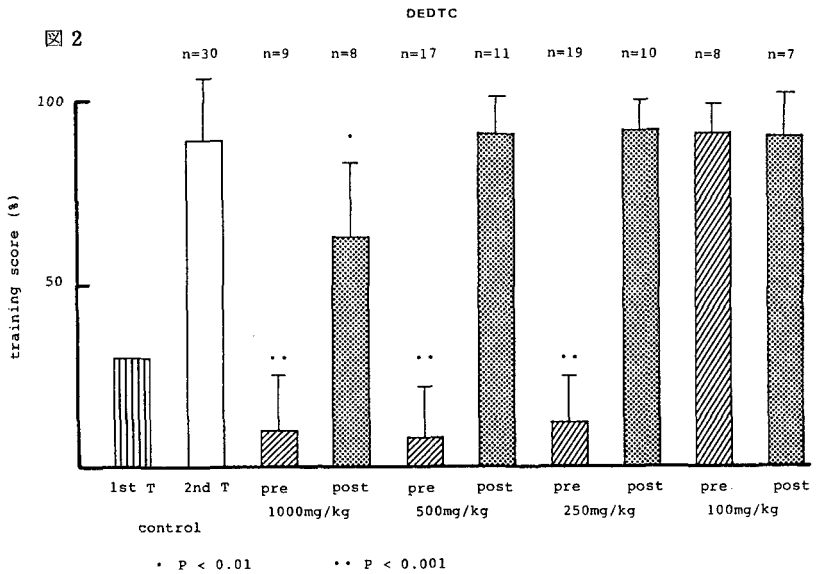


図２．図１と同様の方法で，DEDTCを投与した結果を示してある．DEDTC 1,000，500,250mg/kgを実習直前に投与し，一週間後の消去実験では有意に（$p<0.001$）記憶の保持の阻害が認められる．学習直後の投与では1,000mg/kg投与の場合では（$p<0.01$）記憶の保持の阻害が認められるが，DEDTC 500mg/kg以下の量の投与では差が認められなくなる．又，100mg/kgとなると，いずれの場合も対照と差がなくなる．

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．村上哲英・根木哲郎（1987）神経化学，26，514-516，4．4．根木哲郎（1986）日本生理誌，48，673-684．
5．根木等（1987）日本生理誌，49，674-681．6．Lovinger,D.M. and Bouttenberg,A.（1988）J.Physiol.，400,321-333.7．Csermely,P.,et al.（1988）J.Biol.Chem.,263,6487-6490.

64 脊髄性筋萎縮症患者の筋肉抽出液の運動神経成長因子活性阻害

田口隆久°* J.-P. Changeux* C. E. Henderson*
°大阪大学基礎工学部生物工学科、 *Unité Neurobiologie moléculaire, Institut Pasteur

〔要約〕

ニワトリ胚の脊髄の培養細胞を用いて神経繊維伸長活性を調べることが出来る。このバイオアッセイ系を用いて、ニワトリ胚の脚筋の細胞培養から得られた条件培養液と誕生後３日目のヒヨコの脚筋肉の抽出液中にそのような活性が存在することが明らかになった。この活性は、蛋白質に起因するもので、これを運動神経成長因子（motoneuron growth factors; MNGFs ）と呼ぶことにした。この培養系に、脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy ）患者から試験切除した筋肉の抽出液を加えると、条件培養液中のＭＮＧＦ活性には何等影響を及ぼさなかったが、筋肉抽出液中の活性は阻害することが認められた。２０例の生検について調べた結果、コントロールに較べて有意な差が存在した。この結果は、脊髄性筋萎縮症患者が筋肉の抽出液のＭＮＧＦに対する特異的な阻害物質の産生を示唆しているが、イムノブロットによる検討では、患者に共通の抗体産生は認められなかった。部分精製の結果は、この抽出液中のＭＮＧＦは、分子量約５０，０００の蛋白質であることを示している。

はじめに

脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy ）は、病因の解明されていない遺伝性の運動神経疾患であり、 幼時期あるいは、若年期の脊髄前角の変性と萎縮を特徴とする。一方、脊髄の運動ニューロンの生存や正常な分化は標的である筋肉細胞からの成長因子（運動神経成長因子、motoneuron growth factors, ＭＮＧＦｓ）に依存している（1）。このことから、脊髄性筋萎縮症の病因を、運動神経と筋肉細胞との相互作用の異常、例えば、ＭＮＧＦ産生あるいは分泌の低下、ＭＮＧＦに対する阻害物質の産生、あるいは、終末に於けるＭＮＧＦの軸索への取り込みや軸索輸送の低下に求めることができる。これまでの研究から、我々は既に２種類のＭＮＧＦｓを見いだしている（2）（3）。１つは、ニワトリ胚脚筋の細胞培養で調製した条件培養液に含まれる蛋白性ＭＮＧＦ（embryonic ＭＮＧＦ）、もう１つは、生後３日目のヒヨコ脚筋の抽出液の中に含まれる蛋白性のＭＮＧＦ（neonatal ＭＮＧＦ）である。そこで、これらのＭＮＧＦｓの活性の対する脊髄性筋萎縮症患者の試験切除した筋肉の抽出液の影響を見ることに依って、この疾患の病因について検討を加えた。

方法

バイオアッセイ　ｓｔａｇｅ２５のニワトリ胚の脊髄を切り出し、後根神経節を除き、運動神経の比率を上げるためにその腹側を、 ３７°Ｃで６０分間トリプシンで処理し、ピペットで細胞を解離した後、５％CO_2 存在下でＦ１２中で２２時間培養し、顕微鏡下で生存している細胞数と細胞直径の２倍以上の長さの神経繊維を持つ細胞数を数えた。

embryonic ＭＮＧＦの調製　胚齢１１日のニワトリ脚から筋芽細胞を調製し、５％CO_2 存在下で７日間培養した。最後の３日間は、無血清培地で培養し、条件培養液を得た。

neonatal ＭＮＧＦの調製　生後３日目のヒヨコ脚筋にプロテアーゼ阻害剤を含んだＰＢＳ（1ml ／ 0.25 mg muscle ）を加えて、ポリトロンでホモゲナイズして、超遠心の上清を抽出液とした。

試験切除した患者の筋肉の抽出液　neonatal ＭＮＧＦとほぼ同じ（くわえたＰＢＳの量比が大きい）方法で調製した。

結果と考察

２種類の運動神経成長因子、embryonic MNGFと neonatal MNGF をバイオアッセイ系に有効濃度加えておき、そこに患者の筋肉の抽出液をいろいろな濃度で加えて、培養後の神経繊維の伸長について計測した。図１に示したように、添加した抽出液の増加とともに、neonatal MNGFによる神経繊維伸長活性が阻害されている。一方、embryonic MNGFの活性に対しては阻害効果がない。この結果は、脊髄性筋萎縮症の患者が neonatal MNGFに対する何らかの阻害物質を産生しているという仮説を支持するものである。このような実験を患者の生検２０例、コントロールとして２０例についておこなった結果をまとめたのが図２である。Inhibitory coefficient とは、図１に於て、水平な点線 より上の実線領域から下のそれを引いた値で、負で絶対値が大きいほど阻害効果が高いことを示している。患者によって程度の差はあるが、明らかに、コントロールにおいては embryonic と neonatal MNGFの両者に対して阻害効果がないが、 患者の生検群では、有意に neonatal MNGFの活性を阻害している（4）。この実験の患者の分類は、Werdnig-Hoffman type ４例、Intermediate type ５例、Kungelberg-Welander type ４例となっている。

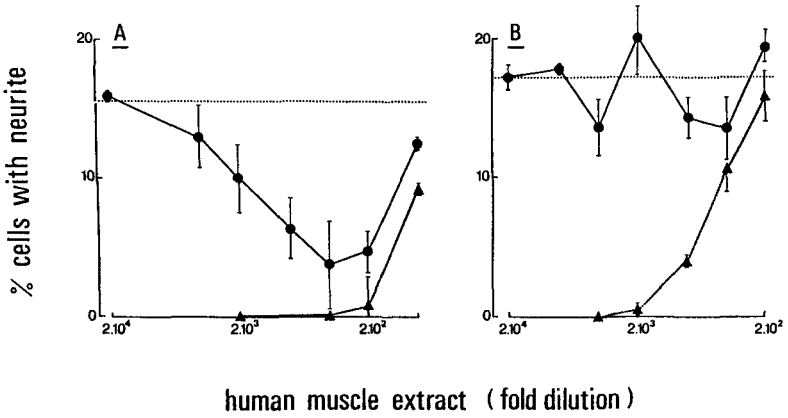


図１ neonatal (A) と embryonic (B) MNGF に対する患者生検抽出液の効果
（▲----▲ は、抽出液のみの効果）

患者の血清を用いて、共通の抗体産生がみられるかどうか、イムノブロット法で調べたが、それを支持する結果はえられなかった。すなわち、自己免疫疾患の証拠は、現在のところない。

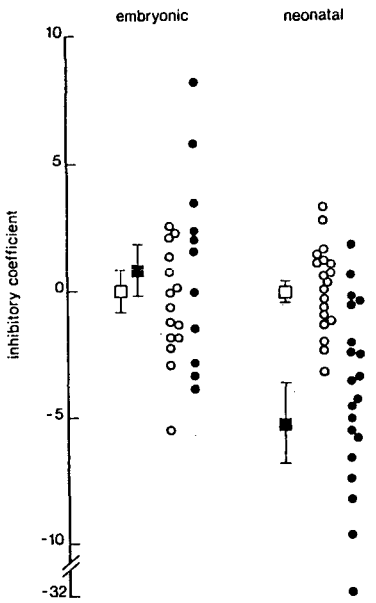


図２ 生検２０例（●）と コントロール２０例（○）のMNGF活性に対する効果のまとめ

一方、neonatal MNGFの実体を明らかにするために、バイオアッセイをもちいた神経繊維伸長活性を手がかりに、この因子の精製を試みた。最終的な精製には至っていないが、等電点沈澱、陰イオン交換クロマトグラフィ、クロマトフォーカシング、ゲル濾過で 約１０，０００倍に精製した結果、この因子は、分子量約５０，０００の蛋白質らしい。種々の性質から、強力な神経繊維伸長活性をもつラミニンとは全く異なる分子である。

参考文献

（1）Berg,D.K. (1984) Ann.Rev.Neurosci. 7, 149-170

（2）Henderson,C.E. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78, 2625-2629

（3）Henderson,C.E. (1984) Dev.Biol. 104, 336-347

（4）Henderson,C.E. (1987) Neurology 37, 1361-1364

65　ウシガエルの視神経再生機構について（続報）

溝渕　宗秀・八木　康之・水野　有武・松田　誠
（慈恵医大・医化学）

〔要約〕

昨年の日本神経化学会において、我々は、中枢神経系であるウシガエルの視神経が再生することを確認し、さらに、視神経切断後に網膜 RNA を抽出し Northern blot による解析を行ったところ、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ることを報告した。今回は、それ以降の tubulin mRNA の発現量の変化について経時的に検討した。その結果、視神経切断後 5 日目より tubulin mRNAが再び増加することが分かった。この tubulin mRNA の増加は、Burrell らの報告とほぼ一致するものであり、おそらく、軸索伸長に必要な構築材料のチューブリン蛋白を合成するために網膜神経節細胞で induce されたと考えられる。

［目的］

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、変温動物では比較的容易に再生することが知られている。昨年の日本神経化学会において、我々は、中枢神経系であるウシガエルの視神経が再生することを確認し、さらにこの時に視神経の細胞体が存在する網膜ではどのような生化学的変化がおきているか遺伝子レベルで検討した結果を報告した。その結果、視神経を切断して 1、2、4 時間後に網膜 RNA を抽出し、α-tubulin，actin cDNA を probe として Northern blot を行ったところ、actin mRNA の発現量には著明な変化を認めなかったが、α-tubulin mRNA の場合には視神経切断後 1，2 時間の時点で強い発現があることを見いだした（2）。今回、我々は、視神経切断後の網膜内 α-tubulin，β-tubulin mRNAの発現量の変化を 1 ヵ月間経時的に観察して興味ある結果が得られたので報告する。

［方法］

カエル視神経切断方法

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、同時になるべく出血しないよう十分注意した。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剝離し、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剝離し、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。

網膜 RNA の抽出方法

視神経を切断して 30分，1，2，4，24 時間，2，3，5，7，14，28 日後に網膜をすばやく採取する。Guanidinium/Cesium chloride 法により採取した網膜から RNA を抽出した。

ノーザンブロット及びドットブロット法

ノーザンブロット法は、全 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トランスファーした。さらに、加熱処理後、α、β-tubulin 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。ドットブロット法も同様に全 RNA をニトロセルロース膜に添加した後、hybridization を行った。tubulin cDND は、筑波大学 新井先生より譲渡された。

［結果及び考案］

昨年の日本神経化学会において、我々は、視神経切断後、1，2 時間の時点で網膜内に α-tubulin mRNA の強い発現が一過性にみられることを報告した。 Fig. 1は、さらに、切断して、30 分後，24 時間後のものを加えて Northern blot を行った結果である。前回の報告と同様に 1，2 時間目（lane 4，5）に強い発現が認められる。さらに、切断して 2日目から 28 日目までの網膜 RNA について Northern blot による解析を行った結果が Fig. 2 に示されている。切断後 2，3 日（lane 3，4）の α-tubulin mRNA の発現量には、著明な変化が認められないが、5 日目からはその発現量が再び増大し 28日目で著明となった（lane 5，6，7，8)。Fig. 3 はこの結果をドットブロットよって確認したものである。また、β-tubulin mRNA の発現量についても経時的変化を追跡したが、α-tubulin の場合とほぼ同様の結果が得られた。 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 RNA 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（1）。切断して 5 日以降に tubulin mRNA の強い発現がみられた今回の結果は、実験材料としてカエル視神経を用いたことの違いはあるが、ほぼ同様な再生のメカニズムを表現しているものと考えられる。おそらく、魚類や両生類のような視神経再生可能な下等脊椎動物においては、軸索伸長のために必要な構築材料としてのチューブリン蛋白を供給するために網膜神経節細胞で tubulin mRNA が induce されたものと考えられる。また、前回報告した視神経切断後の早期で一過性の tubulin mRNAの発現は、今回のものとは発現時間も異なり、何か違った現象をとらえたものと考えられる。生化学的意味は不明である。axotomy に対する網膜神経節細胞の初期反応、たとえば、神経線維再生に必要な神経節細胞体での準備体制を整えるための反応としてとらえることもできる。

また、現在これら tubulin mRNA の発現が本当に視神経の細胞体である網膜神経節細胞でおきているのか、あるいはグリア細胞を含めた全く別の細胞によるものかを検討するために組織切片中の核酸を特異的に検出する in situ hybridization を行っている。

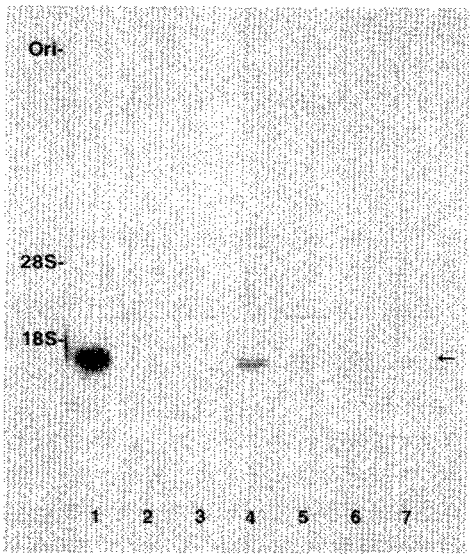


Fig. 1. Northern blot analysis of frog retina and rat brain RNA. The optic nerves of bullfrogs were not transected (lane 2) and transected(lane 3-7). The retinas of operated frogs were excised at 0.5h(lane 3), 1h(lane 4), 2h(lane 5) 4h(lane 6) and 24h(lane 7) after transection. Rat brain RNA(9μg, lane 1) and frog retina RNA(9μg, lane 2-7) were fractionated on a formaldehyde-agarose gel, transferred to nitrocellulose, and hybridized to ^{32}P-labeled α-tubulin DNA.

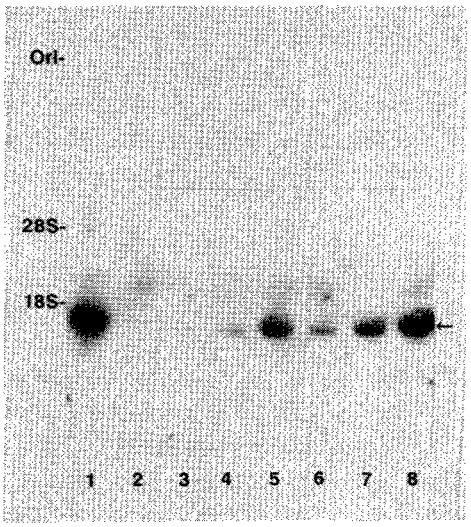
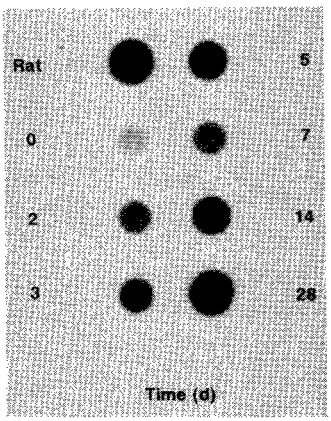


Fig. 2. Northern blot analysis of frog retina and rat brain RNA. The optic nerves of frogs were not transeced(lane 2) and transected(lane 3-8). The retinas of operated frog were excised at 2d(lane 3), 3d(lane 4), 5d(lane 5), 7d(lane 6), 14d (lane 7) and 28d(lane 8) after transection. Rat brain RNA(9μg, lane 1) and frog retina RNA(9μg, lane 2-8) were fractionated on a formaldehyde-agarose gel, transferred to nitrocellulose, and hybridized to ^{32}P-labeled α-tubulin DNA.

Fig.3. Dot blot analysis of frog retina and rat brain RNA. Rat:rat brain RNA. Numbers:days after optic nerve transection. 9μg of total RNA was loaded into well, vacuum filtered, and hybridized to ^{32}P-labeled α-tubulin DNA.



[文献]

1) Burrell, H.R. et al. (1979) Brain Res. 168, 628-632.
2) Mizobuchi, T. et al. (1988) Neurosci. Lett. 86, 144-146.

66 マウス視覚系におけるIGF-IIの存在について

野口鉄也、　杉崎哲朗
（東邦大・医・第二生理）

〔要約〕

ABC法を用いて、免疫組織学的にrat Insulin-like Growth Factor II (rIGF-II) 抗血清に交叉する物質(rIGF-II-IRS) のマウス脳内の局在につき検討した。その結果、rIGF-II-IRSは視覚路に存在することが明らかとなった。即ち、rIGF-II-IRSは網膜では神経線維層の線維群、ガングリオン細胞細胞質、内網状層中の線維、内果粒層の水平細胞細胞質、次いで、視神経、脳内では視索、視放線、上丘の遠心路と求心路及び副視索に存在していた。更に、Snell下垂体性小人症マウス(dw)の網膜と脳につき同様の検索を行ったところ、rIGF-II-IRSは正常マウスと全く同一の部位と線維群に存在していた。このことはrIGF-IIはneurotransmitterあるいはneuromodulatorとして神経系内に存在し、末梢血流中の成長ホルモンとは無関係に網膜中で産生され、視神経を経て、脳内視覚路に輸送されているものと考えられた。しかし、網膜内のどの細胞がIGF-IIを産生しているかは未だ不明である。

目的：

Haselbacherら(4)はヒト脳のInsulin-like Growth Factor II (IGF-II) 含量を部位別に測定し、脳内に広く分布していること、さらにシナプトソーム分画から分子量の異なるIGF-IIが抽出されることを報告した。また、IGF-IIは髄液中に存在することも報告されている(1、2、3)。Smithら(7)はIGF-II受容体のラット脳での部位別分布を報告し、IGF-IIが神経細胞の機能の一端を担っているニューロペプチドであることを示唆している。他方、我々(5)はヒトソマトメジンC(IGF-I)抗体を用いて、マウス脳のIGF-Iの局在を検討し、IGF-Iが脳の広い部位の神経細胞内に分布し、かつ、成長ホルモン(GH)とは無関係に脳内で産生され、neurotransmitterあるいはneuromodulatorとして作用している可能性を示唆する結果を報告した。今回はIGF-IIが果たして神経系のどこで作られ、どの部位に存在し、その産生が末梢血流中のGHと無関係であるか否かを検討するため正常マウス(+/?)とSnell下垂体性小人症マウス(dw/dw)を用いて免疫組織学的に検索した。その結果、ラットIGF-II免疫反応物質(rIGF-II-IRS)は視覚系に存在し、かつ、GHとは無関係に産生され、neurotransmitterあるいはneuromodulatorとして働いている可能性が明らかとなった。方法：

抗rIGF-II抗体#775はDr.P.Nissley(NIH,USA) (8) より恵与を受け、Vectastain ABCキットはVector Laboratoryより購入した。40日齢の+/?マウスとdw/dwマウスをPBSで、さらにBouin液で還流固定後、眼球、視神経、脳、下垂体を摘出、Bouin液で3日間4°Cでさらに固定、パラフィン包埋を行い、脳は6μmの連続切片を、下垂体、眼球、視神経は4μmの切片を作製した。免疫組織学的手技は既報の方法(6)によった。尚、抗rIGF-II抗体はPBSで500倍に希釈して用いた。

成績：

+/?マウスの網膜をrIGF-II抗体で染めると、rIGF-II-IRSは神経線維層の線維、ガングリオン細胞の細胞質、内網状層の線維、内果粒層に存在する細胞の細胞質に、さらに、近位内節部にも存在していた。しかし、外果粒層には陽性細胞は全く認められなかった。dw/dwマウス網膜の検索の結果は+/?マウスのそれと全く同じであった(図１)。また、視神経も両マウスでrIGF-II抗体に対して全く同様に染まった。+/?マウス脳では、視覚路の線維群にrIGF-II-IRSが認められた。即ち、視索、視放線、上丘の求心性線維及び遠心性線維がrIGF-II-IRS陽性線維であった。しかし、上丘及び外側膝状体には陽性細胞は認められなかった。副視索としては、大脳脚と上乳頭交叉が強く染め出されていた。これらの免疫組織学的検索の結果はdw/dwマウスでも同様に得られた（図２）。下垂体を抗rIGF-II抗体で染めると、+/?マウスでは多数の陽性細胞が見られたが、dw/dwマウスでは全く存在しなかった。

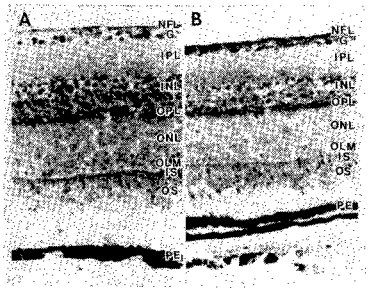
考察：

今回のマウス脳内IGF-II分布の免疫組織学的検索から、rIGF-II-IRSは視覚系に存在していることが明らかとなった。従って、IGF-IIが視覚系の中でneurotransmitterあるいはneuromodulatorとしての役割を果たしている可能性が強く示唆された。しかし、現在のところ網膜のどの細胞がIGF-IIを産生しているかは不明である。

文献：

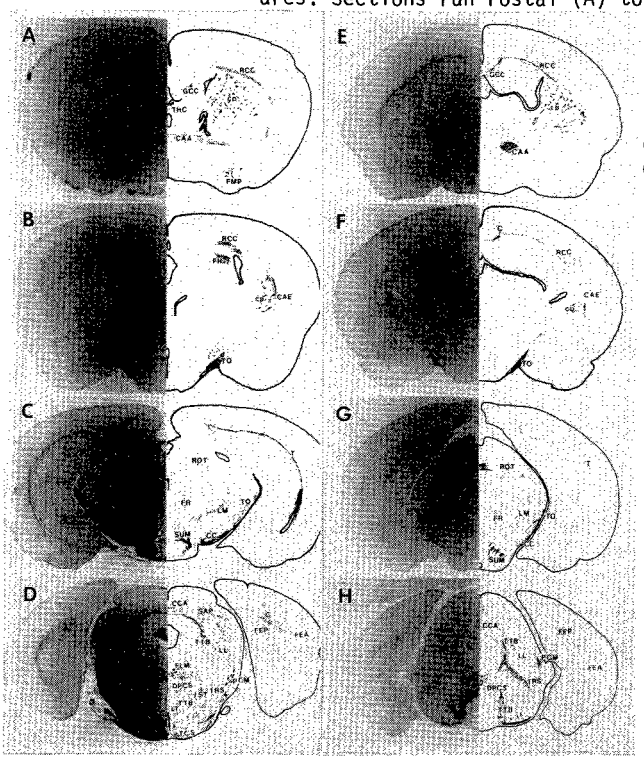
(1)Backstrom,M.,Hall,K.& Sara,V.(1984) Acta Endocrinol.107,171-178.(2)Beaton,G.R.,Sagel,J.& Distiller,I.A.(1975) J.clin.Endocrinol.Metab.10,1736-1737.(3)Haselbacher,G.& Humbel,R.(1982) Endocrinol.110,1822-1824.(4)Haselbacher,G.K.,Schwab,M.E.,Pasi,A.& Humbel,R.E.(1985) Proc.natn.Acad.Sci.USA 82,2153-2157.(5)Noguchi,T.,Kurata,L.M.& Sugisaki,T.(1987) Neuroendocrinol.46,277-282.(6)Noguchi,T.,Sugisaki,T.,Kanamatsu,T.& Satoh,I.(1988) J.Endocr.118,in press.(7)Smith,M.,Clemens,J.,Kerchner,G.A.& Mendelsohn,G.(1988) Brain Res.445,241-246.(8)Yang,Y.W.-H.,Romanus,J.A.,Liu,F.Y.,Nissley,S.P.& Rechler,M.M.(1985) J.biol.Chem.260,2570-2577.

(図1)



Comparison of the retinas of the +/? (A) and dw/dw (B) mice immunohistochemically stained for rIGF-II. In both the +/? and dw/dw retinas, rIGF-II-IRS is detected in the nerve fiber layer, the cytoplasm of ganglion cells, nerve fibers in the inner plexiform layer, the cytoplasm of horizontal cells in the inner nuclear layer, and the proximal regions of the inner segments of photoreceptor cells. NFL=nerve fiber layer; G=ganglion cell layer; IPL =inner plexifirm layer; INL=inner nuclear layer; OPL=outer plexiform layer; ONL=outer nuclear layer; OLM=outer limiting membrane; IS=inner segments; OS=outer segments; PE=pigment epithelium. Original magnification: X100.

(図2) Semischematic drawings of coronal sections of 40-day-old normal (+/?) and Snell pituitary dwarf (dw/dw) mice showing the location of fibers containing rIGF-II-IRS. The left side of each diagram is a section stained for rIGF-II and the right side is a drawing of the corresponding brain stractures. Sections run rostal (A) to caudal (D) in the +/? brain and rostal (E) to caudal (H) in the dw/dw brain. C= cingulum; CAA=commissura anterior, pars anterior; CAE=capsula externa; CC=crus cerebri; CCA=commissura colliculorum anteriorum; cp=nucleus caudatus/putamen; DPCS= decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum; FEA=fibrae entorhinohippocampales; FH=fimbria hippocampi; FLM=fasciculus longtudinalis medialis; FMP=fasciculus medialis prosencephali; FR=fasciculus retroflexus; GCC=genu corporis callosi; LL=lemniscus lateralis; LM=lemniscus medialis; LT= lemniscus trigeminalis; PCM=peduclus cerebellris medius; RCC=radiatio corporis callosi; ROT=radiatio optica thalami; SAP= stratum album profundum colliculi; SUM= decussatio supramammilaris; T=tapetum; TCS =tractus corticospinalis; THC=tractus hippocampocorticalis; TO=tractus opticus; TRS=tractus rubrospinalis; TST=tractus spinotectalis; TTB=tractus tectobulbaris. Original magnification: X5.



67 脳損傷修復にかかわる因子

濱登希子*、武井延之*、宮本真美*、津久井弘子*,**、
西尾チカ**、畠中　寛*,**
（三菱化成生命研・脳神経科学*、大阪大学・蛋白研**）

〔要約〕

脳の損傷修復にかかわる因子を検索する目的で脳損傷修復因子（Cortical Injury-derived Factor: CIDF）の精製をすすめると共に、生体防御反応に関与しているリンホカインについて調べた。ラット前頭部大脳皮質抽出液より、Superose 12 によるゲル沪過、および Mono S によるイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し、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生存維持活性を指標として調べたところ、神経成長因子（NGF）の溶出位置とは異なる分画に生存維持活性を見ることが出来た。さらに、生体防御反応との関連で調べたところリンホカインのうち、インターロイキン-6（IL-6）にも生後中隔野コリナージックニューロンへの生存維持活性があった。

成熟ニューロンはその生存維持に栄養因子を必要とし、中枢神経系にもそのような因子が存在することが近年明らかになりつつある。また、損傷や変性に対してもある程度の可塑性があり、この過程にも何等かの栄養因子が関与している可能性が示唆されてきている (4,5)。 我々は生後中隔野コリナージックニューロンの培養を用い、成熟ニューロンに対する栄養因子を検出するシステムにより、新しい栄養因子の検索を行ってきた。そして、損傷によって出現する因子の精製を行い、NGF とは異なるフラクションに生後コリナージックニューロンへの生存維持活性があることが明らかとなった。また、損傷時にまず出現する IL-1 により、グリア細胞で生成されることが示唆されている IL-6 にも生存維持活性を見ることが出来たので、併せて報告する。

【実験方法】

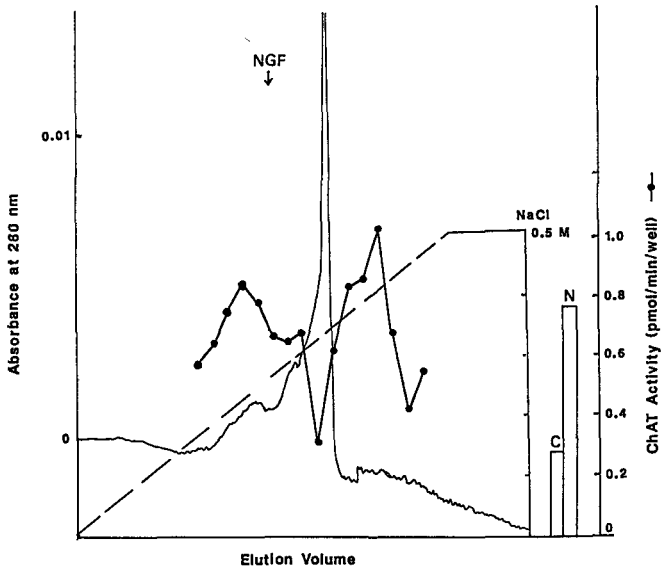
生後 10～14 日のラット中隔野を用いる初代培養は、前報に従った (1)。因子の添加は翌日に行い、3日毎に培地を交換し、7日間培養した。コリンアセチル基移転酵素（ChAT）活性は Fonnum 法を改良し、蛋白量の測定は Lowry 法によった。コリナージックニューロンの生存維持活性は ChAT 活性の変動と平行していることは、前回報告した通りである (1)。

CIDF は武井らが報告している方法により (6)、約 100 匹のラットから集め、－80℃ に凍結保存したものから調整した。硫安分画 30～60 %、FPLC システムを用いた Superose 12 によるゲル沪過 Mono S によるイオン交換クロマトグラフィーを行った。

IL-6 は大阪大学細胞工学センター平野俊夫先生、岸本忠三先生との共同研究により、供与して頂いたものを用いた (2,3)。

【結果と考察】

硫安 30～60 % 飽和画分を Ca^{2+},Mg^{2+}-free リン酸バッファー（CMF-PBS）に溶解し、同じ溶液で平衡化した Superose 12 カラムにより、FPLC システムでゲル沪過を行った。溶出パターンは前報 (6) と大きな差はなかったが、推定分子量が前回と少し異なった。分子量約10万の溶出位置に小さなピーク、そして分子量約1万4千の溶出位置に強い生存維持活性を持つピークが溶出された。この分子量 2万～1万 の活性画分を 50 mM 酢酸バッファー、pH 5.0 と 1:1 に混合し、同じバッファーで平衡化された Mono S カラムを用い、FPLC システムでイオン交換クロマトグラフィーを行った（図1）。溶出は 0～0.5 M NaCl の濃度勾配で行った。



CIDF 抽出液の硫安30～60% 飽和画分を Superose 12 (Pharmacia, 1 x 30cm) のカラムを用い、流速 0.5 ml/min で、CMF-PBS を用いて溶出した。その分子量 2万～1万 に相当する活性画分を、50 mM 酢酸バッファー、pH 5.0 と 1:1 に混合し、同じ酢酸バッファーで平衡化した Mono S カラムにのせた。溶出は0～0.5 M NaCl の Linear gradient で行った。流速は 0.5 ml/min で 0.5 ml ずつフラクションを集めた。同じカラムで、同一条件で NGF を溶出した時の溶出位置を矢印で示した。アッセイは生後 10 日ラット中隔野コリナージックニューロンの初代培養を用い、C は無添加コントロール、N はNGF を 100 ng/ml 添加し、同時にアッセイした時の生存維持の指標としての ChAT 活性を示した。細い実線は 280 nm での吸収、太い実線は ChAT活性を示す。

図1．CIDF の Mono S カラムによる FPLC システムを用いたイオン交換クロマトグラフィー

あらかじめ、マウス顎下腺より調整した ＮＧＦ を同じ方法で、Mono Ｓ カラムクロマトグラフィーを行ったところ、０．２５ Ｍ ＮａＣｌ で溶出された。ところが ＣＩＤＦ は、０．２ Ｍ で溶出される小さいピークと、０．４ Ｍ で溶出される大きなピークとに分かれ、０．４ Ｍ で溶出されるピークの方がより強い生存維持活性を示した。ＣＩＤＦ は分子量的にも Mono Ｓ による溶出位置からも ＮＧＦ と異なった物質として生存維持活性を持っていることが示された。

しかし、この物質がニューロンへ直接作用しているのか、また、共存しているアストログリアを経由して作用しているかについては、明らかでない。ＩＬ-1 刺激により、アストログリア細胞により生産される ＩＬ-６ も中隔野コリナージックニューロンに生存維持活性を持つことが明らかとなった。ＩＬ-６、５ ｎｇ/ｍｌ、２５ ｎｇ/ｍｌ を培地に添加し、６日間培養したところ無添加の約 ２．５ 倍の高い ＣｈＡＴ 活性を残存し、生存維持活性があることが示された。ＩＬ-１ は生体防御反応の第一段階として、脳ではミクログリアより生産される。今後、ＣＩＤＦ がどの様な物質であるかを明らかにし、既知因子との比較検討を行っていきたい。

【文献】

1. Hatanaka, H., et al., Develop. Brain Res., 39, 47-56 (1988).
2. Hirano, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 5490-5494 (1985).
3. Hirano, T., et al., Nature, 324, 73-76 (1986).
4. Needels, D.L., et al., Neurosci., 18, 517-526 (1986).
5. Nieto-Sampedro, M., et al., Science, 217, 860-861 (1982).
6. 武井延之 他、神経化学、26, 208-210 (1987).

【謝辞】

この研究を行うにあたり、御討論頂いた丸山六三先生（三菱化成生命研）に深く感謝致します。また、ＩＬ-６ を快く御供与頂きました平野俊夫先生、岸本忠三先生（大阪大学細胞工学センター）に深く感謝致します。

68 マウス横紋筋クローン細胞Ｇ８の神経成長因子（ＮＧＦ）合成、分泌の調節

山本敏文、山国　徹、天野武彦
（三菱化成生命科学研究所）

〔要約〕

マウス横紋筋クローン細胞 G8 は、神経成長因子 (NGF) の合成、分泌を行っており、エピネフリンによりその合成、分泌が促進された。一方、アセチルコリン及びカルバミルコリンは、逆に合成、分泌を抑制し、ニコチン性拮抗薬、d-ツボクラリン及びヘキサメトニウムにより合成、分泌は促進された。また、Forskolin、dibutyryl cAMP、及びカルシウムイオノフォアにより細胞内 cAMP、Ca^{++} レベルを上げることにより、NGF の合成、分泌は著しく減少した。以上の結果は、筋細胞由来 G8 細胞のNGF合成、分泌は、エピネフリン系と共にアセチルコリン系により調節され、それらは、細胞内 cAMP 及び Ca^{++} の変動を介して行われる可能性を示唆するものである。

〔緒言〕

神経成長因子 (NGF) は、培養末梢組織でも合成、分泌されることが報告され (1)、さらには各種細胞系（マウス L 細胞、3T3 細胞など）でも認められている (2)。NGF の交感神経節や知覚神経節の神経細胞に対する分化、成長促進作用は、その標的細胞由来であると考えられている。しかし、これらの細胞の NGF の合成、分泌がどの様な調節を受けるのか、また NGF の持つ生理作用を、その神経細胞に及ぼすのかはまだ解明されていない。

我々は、マウス横紋筋クローン細胞 G8 に NGF 産生があること、さらには NGFmRNA が発現していることを認めた (3)。今回は、NGF の合成、分泌の制御機構を明らかにすることを目的として、G8 細胞での NGF 合成、分泌に対するコリン系薬物及び、Forskolin、カルシウムイオノフォアの作用を調べたので報告する。

〔方法〕

G8 細胞は、10% 牛胎児血清を含む DMEM で、37℃、5% CO_2 存在下で培養した。細胞は 24 穴プレート上に細胞密度 2×10^4 cells/ml となる様に分散させ、培養 3 日後培地を交換し、各種薬物で処理した。24時間で培養上清中に放出された NGF 免疫活性を Weskamp and Otten の方法(4)に準じ、モノクローナル抗体を用いたアビジン、ビオチン酵素免疫測定法 (ELISA) で行った。Forskolin は、95% EtOH 溶液に、カルシウムイオノフォア (A23187) は DMSO に、10 mM 濃度で調整し、使用直前に培地にて希釈して用いた。Northern blot Hybridization は G8 細胞より poly(A)RNA を精製して行った。エピネフリンは 24 時間作用させ、プローブは既報の方法によった。

〔結果及び考察〕

G8 細胞の NGF 合成、分泌はエピネフリンにより促進された (図1)。NGF 合成、分泌は未分化 G8 細胞 (myoblast) が、分化した細胞 (myotube) に比べ約 5 倍高い一方、エピネフリン反応性が強いが、NGF 合成、分泌レベルは共に同程度であった。NGF 合成、分泌へのエピネフリンの作用は、古川らにより、マウス L-M 細胞で報告されている (5) がマウス筋細胞由来、G8 細胞も同様にエピネフリンにより促進することが明かとなった。このことは Northern Blot 法により確かめられた。また、未分化細胞での NGF 合成、分泌が高く、分化した後低下していることは、エピネフリンによる促進作用が逆相関していることと併せて、筋細胞の分化の調節機構の中でのNGFの関与を考える上で興味深い知見である。

筋細胞はコリン作働性神経に支配を受けていることから、筋細胞でのNGF合成、分泌に及ぼすコリン系薬物の作用を検討した。G8 細胞 (myoblast) にコリン作動薬、アセチルコリン、及びカルバミルコリンを作用させると、共に、有意な合成、分泌抑制を示した。またコリン拮抗薬である、アトロピンは高濃度でのみ抑制を示し、d-ツボクラリン、ヘキサメトニウムは共に促進効果を示した (図2)。D-ツボクラリンの作用は、二相性に現れ、高濃度でアトロピン同様、抑制が見られた。

しかし、ニコチン性作動薬であるデカメトニウム、ニコチン、共にNGF合成、分泌には作用がなくエピネフリンの作用機序と同様、これらコリン系薬物の作用機序の詳細は、今後の検討を要すると思われる。さらに、筋細胞クローン G8 細胞で、NGF 合成、分泌がカルバミルコリン／d-ツボクラリン併用で抑制的であるが、カルバミルコリン（図2）に比して少なく（データー省略）ニコチン性拮抗薬では促進される結果を得た。現在この結果を検討中である。

さらに、G8 細胞での NGF 合成、分泌は Forskolin 及び,Ca^{++} イオノフォア（A23187）により強く抑制された（図-3)。これら薬物の作用は強く、EC_{50} 値は 50 μM, 0.1 μM であった。また、dibutylyl cAMP も抑制を示した。これらの結果は、cAMP 及び Ca^{2+} の上昇が、細胞内での NGF 合成、分泌を抑制していることを強く示唆するものである。

以上の結果はエピネフリンやコリン系薬物による NGF 合成、分泌の調節がその中間ステップとして、細胞内 cAMP 及び Ca^{2+} レベルの変動を会して行われる可能性を示唆している。

〔文献〕

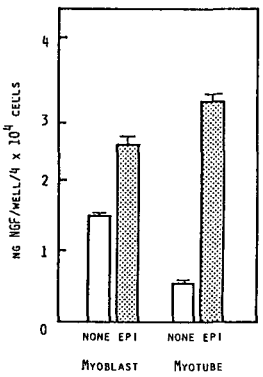
(1) Thoenen, H. and Barde, Y.-A., Physiol. Rev., 60, 1284-1335 (1980).

(2) Furukawa, Y., Furukawa, S., Satoyoshi, E. and Hayashi, K., J.B.C., 261, 6039-6047 (1986).

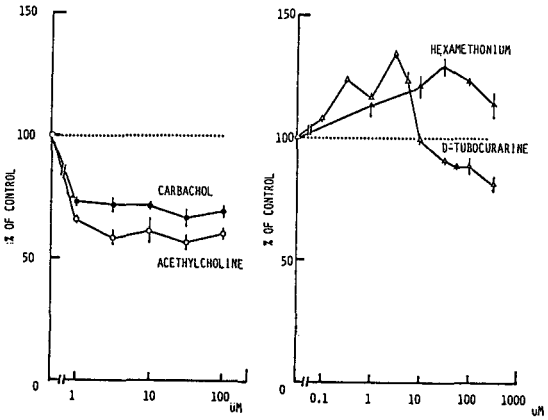
(3) 天野武彦、山本敏文、山国徹、第１１回神経科学学術集会、要旨集、p129 (1987)

(4) Weskamp, G. and Otten, U., J. Neurochem., 48, 1779-1786 (1987).

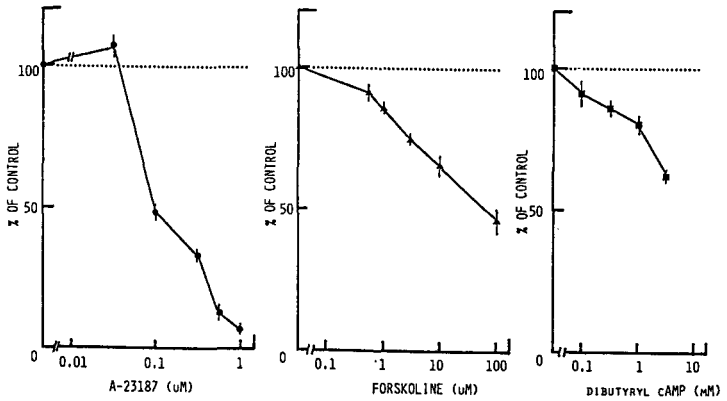
(5) Furukawa, Y., Furukawa, S., Ikeda, F., Satoyoshi, E. and Hayashi, K., FEBS Letter., 208, 258-262 (1986)



(図1) G8 細胞での NGF 合成へのエピネフリンの効果
myoblast 細胞及び、tube 形成後の myotube 細胞は各々エピネフリン 100 μM 非存在、存在下に処理。(mean±SE, n=3) （方法の項参照）



(図2) G8 細胞 (myoblast) へのアセチルコリン系薬物の効果
薬物を添加後、24 時間中に培養上清に放出された NGF を測定。(mean±SE, n=3)



(図3) G8 細胞 (myoblast) への A23187、Forskolin、dibutyryl cAMPの効果
図2 と同条件。(mean±SE, n=3)

69 Staurosporineによる神経成長因子の作用の阻害

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。強力なタンパク質リン酸化酵素阻害剤であるstaurosporineは10nMの濃度でNGFによるPC12細胞の神経突起形成をほぼ完全に阻害した。NGFによるPC12細胞の神経突起形成には転写依存性のコンポーネントと転写非依存性のコンポーネントの少なくとも2つのコンポーネントが関与することが知られている。そこで、staurosporineがどちらのコンポーネントを阻害してNGFの神経突起形成作用を阻害するか検討した。PC12細胞をNGFでprimingする際にstaurosporine(10nM)を存在させると、NGFによる神経突起再生は認められなかった。即ち、staurosporineはNGFの転写依存性のコンポーネントを阻害した。一方、NGFでprimingしたPC12細胞に再度NGFを作用させて転写非依存性の神経突起を再生させる際にstaurosporine(10nM)を存在させても、見かけ上NGFによる神経突起の再生は阻害されなかった。しかしながら、NGFでprimingされたPC12細胞にstaurosporine(10nM)を単独で作用させても神経突起の再生が認められたことから、この実験系でstaurosporineがNGFによる転写非依存性のコンポーネントを阻害するか否かは明らかでなかった。また、staurosporine単独でNGFによる転写非依存性のコンポーネントの活性化と同様の作用を示すことが明らかとなった。
Key word: Staurosporine, Nerve growth factor, Neurite Outgrowth

ラット副腎褐色細胞腫場由来の株細胞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の作用の研究および神経分化のモデルとして広く用いられている。これまでNGFの作用については多数の報告があるが、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(2,3)。最近、Koizumiらは、強力なタンパク質リン酸化酵素阻害剤であるK-252aが、NGFによる神経突起形成、オルニチン脱炭酸酵素の誘導、phosphoinositidesの分解作用などを阻害することを報告した(5)。私達も、K-252aが転写依存性および非依存性の2つのコンポーネントをともに阻害することによりNGFの神経突起形成作用を阻害すること、また、NGFによる細胞内タンパク質のリン酸化の変動作用を阻害することを報告した(4)。このようにタンパク質リン酸化酵素阻害剤であるK-252aが、検討されたNGFの作用を全て阻害したことから、NGFの作用発現機構の初期の段階にK-252aによって阻害を受けるタンパク質リン酸化酵素が関与していると思われる。そこで、K-252aと構造が類似し、K-252aよりも強力なタンパク質リン酸化酵素阻害剤であるstaurosporineを用いてNGFの神経突起形成作用を阻害するか否か検討した。

〔実験方法〕細胞培養：実験にはPC12h細胞を用いた。培養は、7%ウシ胎仔血清および7%ウマ血清を含むDMEMを用いφ35mmディッシュあるいは75cm²フラスコにて37℃、5%CO_2の条件で行った。

〔結果〕1. NGFによる神経突起形成に対するstaurosporineの影響

PC12h細胞をNGF(50ng/ml)存在下7日間培養すると神経突起を長く伸ばすが、staurosporineの1～10nMを同時に添加すると作用濃度に依存してNGFによる神経突起形成が阻害された。Staurosporineの10nMでNGFの神経突起形成はほぼ完全に阻害され短い突起が見られるだけであった。また、PC12h細胞にstaurosporine(10nM)を単独で作用させても短い突起の形成が見られた(Fig.1)。ところでNGFによるPC12細胞の神経突起形成には転写依存性と非依存性の少なくとも2つのコンポーネントが関与しており、神経突起形成には2つのコンポーネントがともに活性化される必要がある。従ってNGFによるPC12細胞の神経突起形成はactinomycin Dで阻害されるが、予めNGFで長期間処理されたPC12細胞(NGF-primed cells)からのNGFによる神経突起再生はactinomicin Dで阻害されず、NGFによる転写依存性のコンポーネントの活性化を必要としないことが明らかとなっている。そこで、staurosporineが、転写依存性あるいは非依存性のコンポーネントのどちらを阻害することによりNGFの神経突起形成作用を阻害するのかを明らかにするために、NGFによるprimingおよび神経突起再生におけるstaurosporineの影響を検討した。

2. PC12h細胞のNGF primingに対するstaurosporineの影響

NGF(100ng/ml)およびstaurosporine(10nM)存在下PC12h細胞を12日間培養した後、細胞を集めて培養液で3度洗浄し撒き直した。NGF(50ng/ml)を加えてさらに24時間培養すると神経突起の形成が見られたが、この神経突起の形成はactinomycin Dの添加で完全に阻害された。従って、この神経突起の形成は転写依存性であり、primingされた細胞で見られる神経突起の再生ではない。即ち、staurosporine(10nM)は、転写依存性のコンポーネントを阻害することによりNGFのpriming効果を消失させた。

3. NGFによる神経突起再生に対するstaurosporineの影響

NGF(100ng/ml)存在下PC12h細胞を13日間培養した後、細胞を洗浄し撒き直した。NGF(50ng/ml)を加

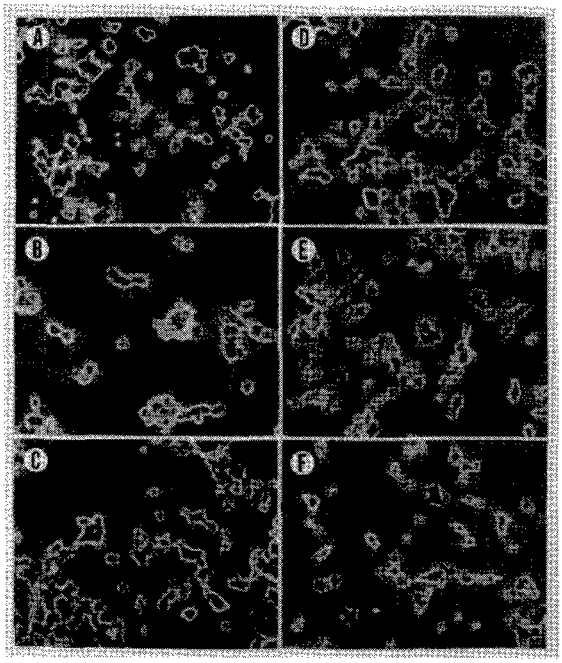


Fig. 1. Effect of staurosporine on NGF-promoted neurite outgrowth
PC12h cells were cultured in normal culture medium (A), with NGF (50 ng/ml) (B), with NGF (50 ng/ml) plus staurosporine (1 nM) (C), with NGF (50 ng/ml) plus staurosporine (3 nM) (D), with NGF (50 ng/ml) plus staurosporine (10 nM) (E), or with staurosporine (10 nM) (F), for 7 days. Bar, 50 μm.

Fig. 2. Effect of staurosporine on NGF-promoted regeneration of neurites from NGF-primed cells
PC12h cells that had been pretreated or primed with NGF (100 ng/ml) for 13 days were triturated to remove their neurites and they subcultured in normal culture medium (A), with NGF (50 ng/ml) (B), with NGF (50 ng/ml) plus actinomycin D (1 nM) (C), with NGF (50 ng/ml) plus staurosporine (10 nM) (D), or with staurosporine (10 nM) alone (E), for 24 hours. Bar, 50 μm.

えてさらに24時間培養すると長い神経突起の再生が見られた(Fig.2.B)。この神経突起の再生はactinomycin Dでは阻害されず転写非依存性である(Fig.2.C)。また、staurosporine(10nM)の添加によっても神経突起の再生は阻害されなかった(Fig.2.D)。しかしながら、primingされたPC12h細胞にstaurosporine(10nM)を単独で作用させても同様の神経突起の再生が見られた(Fig.2.E)。従ってこの実験系ではstaurosporineがNGFによる転写非依存性のコンポーネントの活性化を阻害するか否か明らかにならなかったが、staurosporine単独でNGFによる転写非依存性のコンポーネントの活性化と同様の作用を示すことが認められた。

〔考察〕

既に報告した様にK-252aは、100nMの濃度でNGFによる神経突起形成をほぼ完全に阻害した。また、この阻害は、転写依存性・非依存性の2つのコンポーネントをどちらも阻害することによる。一方、staurosporineは、より低い濃度(10nM)でNGFによる神経突起形成をほぼ完全に阻害した。StaurosporineもK-252aもともに強力なタンパク質リン酸化酵素阻害剤であり、またその阻害強度に応じてNGFの作用を阻害していることからみて、NGFによる神経突起形成の作用発現機構にはタンパク質リン酸化酵素が含まれ、その酵素の活性化をstaurosporineおよびK-252aが阻害することによってNGFの作用を阻害するものと考えられる。また、K-252aには見られずstaurosporineに認められるprimed PC12h細胞からの神経突起再生作用は、既に報告したstaurosporineの高濃度でのPC12細胞の神経突起形成作用(1)と関連した作用機作によるものと思われる。

〔文献〕

1. 橋本誠一，萩野顕彦(1987) 神経化学 26, 220-222
2. Hashimoto,S., Ikeno,T., and Kuzuya,H. (1985) J. Neurochem. 45, 906-912
3. Hashimoto,S., Iwasaki,C., Kuzuya,H., and Guroff,G. (1986) J. Neurochem. 46, 1599-1604
4. Hashimoto,S. (1988) J. Cell Biol. in press
5. Koizumi,S., Contrerus,M.L., Matsuda,Y., Hama,T., Lazarovici,P., and Guroff,G. (1988) J. Neurosci. 8, 715-721

70 標識・同定した海馬投射前脳基底野ニューロンの生存に対する神経成長因子の効果

有松靖温、宮本真美、津久井弘子＊、畠中　寛＊
（三菱化成生科研・脳神経科学、＊現阪大・蛋白研）

〔要約〕

予めローダミンマイクロスフェアーで標識・同定した生後ラットの中隔／対角帯領域の海馬投射ニューロンを培養し、その生存に対する神経成長因子の効果を調べた。 生後４日目のラットの海馬にローダミンマイクロスフェアーを注入すると、中隔内側核と Broca の対角帯核垂直部の海馬に投射しているニューロンの細胞体が、逆行性に標識された。これらの細胞体を含む領域を切り出して単層培養系に移し、標識されたニューロンを蛍光顕微鏡下に同定した。培地に 100 ng/ml の NGF を添加して培養すると、培養開始３日目と５日目のローダミンマイクロスフェアー標識ニューロンの生存率が高まった。また、アセチルコリンエステラーゼ染色や抗-GABA 抗体による免疫染色を組み合わせた実験により、NGF は海馬に投射するコリナージックニューロンのみならず、海馬投射の GABA 作動性ニューロンの生存も高めることが示唆された。

神経成長因子（NGF）は前脳基底野に存在するコリナージックニューロンに対してその生存を高める作用を有することが示唆されている。例えば、成熟ラットの Fimbria-Fornix を切断すると、中隔野に存在するコリナージックニューロンは逆行変性におちいるが、この時脳室に NGF を投与すると、変性が抑制されるという(3,5,6)。また我々は、生後１２日のラットより中隔野と Broca の対角帯核垂直部を切り出して単層培養した時、培地に NGF を添加すると、非添加時に比べて、生存しているアセチルコリンエステラーゼ陽性ニューロンの数が増大することを見いだした(1,2)。このような前脳基底野コリナージックニューロンに対する NGF の生存維持作用をさらに明らかにするため、中隔／対角帯領域の海馬投射ニューロンをローダミンマイクロスフェアー(4)で逆行標識し、単層培養系に移して、その生存に対する NGF の効果を調べた。

【方法】

生後４日の Wistar 系ラットの海馬にローダミンマイクロスフェアーを微量注入すると、２０時間後には、内側中隔核と Broca の対角帯核垂直部に存在する海馬投射ニューロンの細胞体が逆行標識された。そこで合計７－９頭のラットの両側海馬に、各ラット４点、１００ nl／点の割合でローダミンマイクロスフェアーを注入し、２０－２４時間後に標識ニューロンを含む領域を切り出して、培養系に移した。 マイクロスライサーにより厚さ ０.４ mm の脳組織スライスを作製し、実体顕微鏡下に中隔／対角帯垂直部領域を切り出した。１２ unit/ml のパパインで分散した後、予めプラスチックの培養皿に調製したラット胎仔大脳皮質由来のアストログリア細胞層の上にプレーティングした。培地は、５％牛準胎仔血清、５％熱非働化馬血清および１％熱非働化ラット血清を含む DMEM 培地と Ham の F12 培地の等量混液を用いた。プレーティング直後に、半数の培養皿に１００ ng/mlの 2.5S NGF を添加した。培養３日目あるいは５日目に４％パラホルムアルデヒドで固定し、PBSで洗浄後、蛍光顕微鏡下にローダミン標識ニューロンの数をカウントした。一部の細胞は４％パラホルムアルデヒド固定後、Koelle の変法によりアセチルコリンエステラーゼ染色をほどこした。また別の実験で、４％パラホルムアルデヒド、０.１％グルタルアルデヒド、０.２％ピクリン酸混液で固定後、ウサギ抗-GABA 抗体と FITC標識抗-ウサギIgG（ヤギ）を用いて免疫染色した。

【結果】

培養されたローダミンマイクロスフェアー標識ニューロンは蛍光顕微鏡下に明瞭に同定することができた（図１）。培養３日目と５日目で標識ニューロンの数をカウントしたところ、培地に１００ ng/ml の NGF を添加した群では、非添加群に比べて有意に多数の生存細胞を認めた。３日目の NGF 群は４７.５±４.３／培養皿（ｎ＝４）、対照群

は２３．５±１．２／培養皿（ｎ＝４）であった（Ｐ＜０．０１）。５日目の NGF 群は４２．５±５．４／培養皿（ｎ＝４）、対照群は１６．０±２．９／培養皿（ｎ＝４）であった（Ｐ＜０．０１）。別の実験では、培養３日目で細胞を固定し、アセチルコリンエステラーゼ染色をほどこした。図２Ａに示すように、ローダミンマイクロスフェアー標識ニューロンは、アセチルコリンエステラーゼ陽性のものも、陰性のものも共に、NGF 添加した時、有意に多く生存していた（Ｐｓ＜０．０１）。第３の実験では、同じく培養３日目で細胞を固定し、抗-GABA 抗体で免疫染色した。図２Ｂに示すように、ローダミンマイクロスフェアー標識ニューロンは、GABA 免疫活性陽性のものも、陰性のものも共に、NGF 添加した時、有意に多く生存していた（Ｐｓ＜０．０１）。

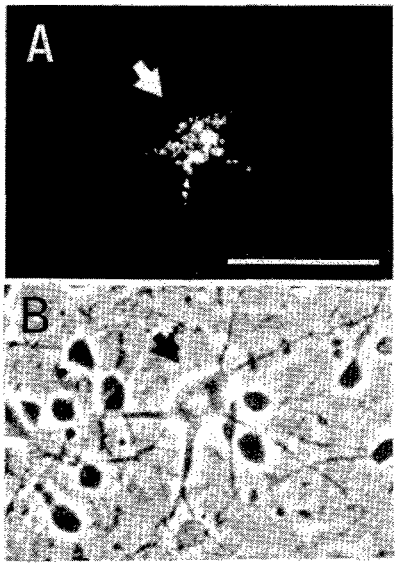


図１。培養３日目のローダミンマイクロスフェアー標識ニューロン。Ａ蛍光写真。Ｂ、位相差写真。スケール、０．１ ㎜。

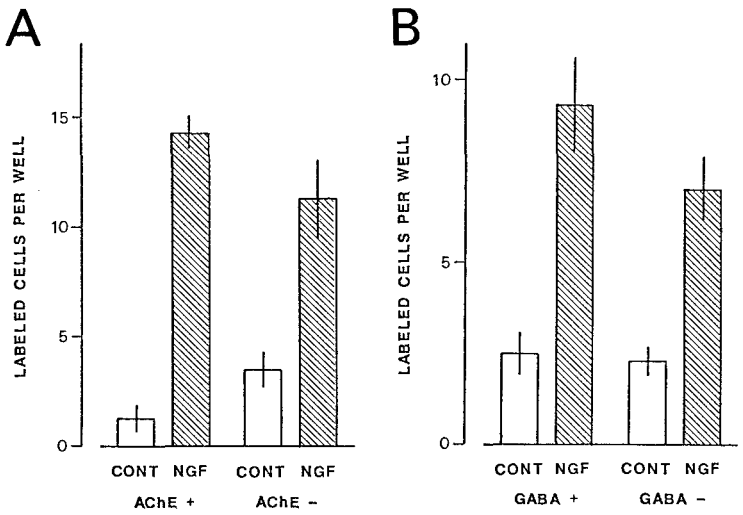


図２。培養したローダミンマイクロスフェアー標識ニューロンの生存に対する NGF の効果。Ａ、アセチルコリンエステラーゼ陽性、陰性ニューロンを区別してカウントした。Ｂ、GABA 陽性、陰性ニューロンを区別してカウントした。各群　ｎ＝４。ＡとＢはそれぞれ別の実験の成績。

【考察】

従来、アセチルコリンエステラーゼ染色陽性細胞やコリンアセチルトランスフェラーゼ免疫陽性細胞の数をカウントすることにより、前脳基底野コリナージックニューロンに対する生存維持効果が in vivo と in vitro の実験系で示唆されてきた。我々は今回、海馬に投射する中隔／対角帯領域のニューロンをローダミンマイクロスフェアーを用いて標識・同定し、その生存に対するNGFの効果を、より厳密に明らかにすることができた。また今回の実験結果は、海馬投射のコリナージックニューロンのみならず、海馬投射の GABA 作動性ニューロンの生存も NGF に依存していることを強く示唆している。

【文献】

1. Hatanaka, H., Tsukui, H. and Nihonmatsu, I. (1987) Neurosci. Lett. 79, 85-90.
2. Hatanaka, H., Tsukui, H. and Nihonmatsu, I. (1988) Develop. Brain Res. 39, 85-95.
3. Hefti, F. (1986) J. Neurosci. 6, 2155-2162.
4. Katz, L. (1984) Nature 310, 498-500.
5. Kromer, L. F. (1987) Science 235, 214-216.
6. Williams, L. R. et al. (1987) Proc. Nat. Acad. Sci. 83, 9231-9235.

71 神経成長因子(ＮＧＦ)によるＰＣ１２細胞の突起形成
－ＮＧＦ受容体とＧ蛋白質の関与－

田中秀逸，小池達郎
（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）の作用により突起を形成し交感神経様細胞に分化することが知られている。我々は細胞分化におけるGTP結合蛋白質（G蛋白質）の働きを調べる為、パルス電圧法によりGTPγSをPC12細胞内に導入し、細胞へのNGFの結合、及び突起形成に対する細胞内GTPγSの影響を調べた。細胞を^{35}S-GTPγSを含むPBSに懸濁しパルス電圧をかけると、パルスの回数，強さ及びPBS中のGTPγS濃度に比例して^{35}S-GTPγSの細胞内取り込み量が増加した。異なるGTPγS濃度（1-100μM）下で、2000V/cm・15回のパルス電圧をかけた後、細胞への^{125}I-NGF（100pM）の結合量を測定した。細胞表面の^{125}I-NGF結合量は、処理したGTPγS濃度に依存して増加し、30μMのGTPγSで対照の142%となった。しかし、GTPγSの濃度を100μMまで上げると^{125}I-NGFの結合量は減少した。このようなGTPγSの効果は、GDPやATPには見られなかった。更に、GTPγSを導入した細胞をNGF（10ng/ml）で１時間処理した後、その細胞の突起形成率を調べた。10μMのGTPγS存在下、2000V/cm・15回パルスの条件でGTPγSを導入した細胞の突起形成率は、対照の153%であった。

PC12細胞は、ラット副腎髄質由来の株細胞である。この細胞を神経成長因子（NGF）で処理すると交感神経様細胞に分化する（3）。NGFはPC12細胞膜上の受容体と結合し、receptor-mediated endocytosisにより細胞内へ取り込まれる。しかし、NGFを細胞内に直接注入しても突起形成が起こらないこと（4,7）から何等かのsecond messengerの存在が示唆された。近年、H-ras oncogene蛋白質やV-srcといったG蛋白質のPC12細胞内への微量注入が突起の形成を誘導することが見いだされた（1,2）。このことは、NGF作用による突起形成にG蛋白質が関与する可能性を示唆している。昨年度の本大会で、PC12細胞をNGF処理することにより細胞膜へのGTPγSの結合量が増加することを報告し、NGFにより誘導される細胞分化の過程でG蛋白質が関与する事を示唆した。今回は、G蛋白質の作用機序を更に明らかにする為、パルス電圧法によりGTPアナログを細胞内に導入し、その突起形成に対する効果について調べたので報告する。

［実験方法］

PC12細胞の培養と細胞の回収：PC12細胞22aは、37℃・5%CO_2下で５%牛胎児血清及び10%馬血清を含むDulbeccoの改変培地中で培養した。対数増殖期にある細胞を、グルコースを含むDulbecco's phosphate buffered saline（PBS；pH7.3）を用いてはがし、PBSで数回洗浄後実験に使用した。

パルス電圧法によるGTPγSの細胞内導入：集めた細胞2～3×10^6個/mlはGTPγSを含むPBSに懸濁し、氷冷したキューベット（１cm幅）に入れパルス電圧をかけた。終了後は、PBSで２回洗浄した。細胞内への取り込み量は^{35}S-GTPγSを用いて調べた。

突起形成の評価：細胞体の径より長い突起を持つ細胞を突起形成細胞と判断した。

NGFの^{125}Iによる標識：Mobleyらの方法（5）に従いマウス顎下腺より精製したNGFをEnzymo-Beads（immobilized glucose oxidase and lactoperoxidase）法により^{125}I標識を行った。

^{125}I-NGFのPC12細胞との結合量測定：PBSで洗浄した細胞を、20mM HEPES bufferで5倍希釈したDulbeccoの改変培地で再び洗浄した。同培地に懸濁後、コラーゲンコートしたφ3.5cmペトリ皿にまき、37℃・5%CO_2下で前培養した。1時間後、ペトリ皿を同培地で洗い、^{125}I-NGF（100pM）を含む同培地0.8mlを加え、30℃で1時間細胞と^{125}I-NGFとを反応させた。反応後、ペトリ皿を氷上で冷やし、PBSで3回洗った。非特異的結合は、1000倍量の非標識NGF存在下での^{125}I-NGFの結合量から見積った。細胞表面に結合した^{125}I-NGF量はOlefskyとKaoの方法（6）に従って求めた。

［結果と考察］

細胞内にGTPγSを導入する為のパルス電圧の条件を^{35}S-GTPγSを用いて調べた。^{35}S-GTPγSを含むPBSに細胞を懸濁しパルス電圧をかけたところ、導入された細胞内^{35}S-GTPγS量はパルスの回数(6-18回）、パルスの強さ（1000-2500V）及び細胞懸濁液のGTPγS濃度(10nM-100μM）に比例して増加した。そこで、2000V/cm・15回のパルス条件を用い以下の実験を試みた。まず、^{125}I-NGFの細胞への結合における細胞内GTPγSの影響を調べた。細胞内へのGTPγSの導入量は細胞懸濁液中のGTPγSの濃度により調節した。^{125}I-NGFの細胞表面への結合量は、GTPγSの濃度に伴って増加し、30μMで対照の142±12%となったが、100μMでは減少した（図1）。GDPやATPを同様に細胞内に導入してみたが、これらはNGFの結合量を増加させなかった。細胞へのNGF結合量が、導入されたGTPγS量に影響をうけることから、GTPγS導入後のNGF処理による細胞の突起形成率を調べた。種々の濃度のGTPγS存在下で細胞にパルス電圧をかけた後PBSで数回洗い、5×10^{4}個ずつコラーゲンコートしたφ3.5cmペトリ皿にまいた。10ng/mlのNGFを含む培地中で1時間培養（37℃・5%CO_2）した後NGFを除き、37℃・5%CO_2下で48時間培養後突起形成率を調べた（図2）。突起形成率は10μMのGTPγSの時最も高く、無処理の細胞の153±17%であった。これらの結果は、NGFによるPC12細胞の分化過程においてG蛋白質が関与していると言うこれまでの報告を強く支持している。

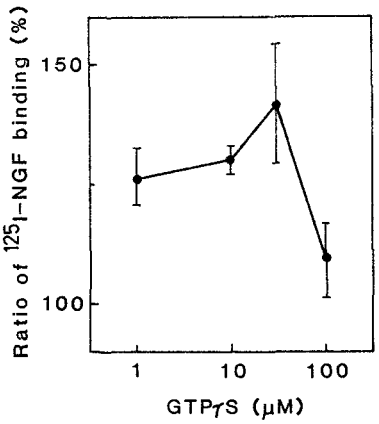


図1．パルス電圧で導入したGTPγSの突起形成に与える効果

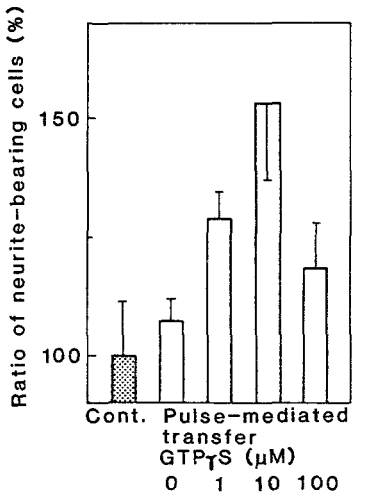


図2．パルス電圧で導入したGTPγSの^{125}I-NGFの結合に与える効果

［参考文献］

1. Alema, S. et al. (1985) Nature 316, 557-559
2. Bar-Sagi, D. and Feramisco, J.R. (1985) Cell 42, 841-848
3. Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 2424-2428
4. Heumaun, R. et al. (1981) Nature 292, 838-840
5. Mobley, W.C. et al. (1976) Biochem. 15, 5543-5551
6. Olefsky, J.M. and Kao, M. (1982) J. Biol. Chem. 257, 8667-8673
7. Seeley, P.J. et al. (1983) J. Neurosci. 3, 1488-1494

72　初代培養中枢神経細胞の acetylcholine (ACh) 量に対する神経成長因子 (NGF) の作用および ACh 代謝回転測定の試み

垣花 満、 寿野 正広
（武田薬品工業株式会社・中央研究所・生物研究所）

〔要約〕
胎生 17 日あるいは 19 日目のラット胎仔脳より採取した諸種脳部位の神経細胞を無血清完全合成培養液を用いて初代培養した。培養神経細胞の ACh 量および ACh 代謝回転の測定を試み、これらに対する NGF の作用を調べた。大脳皮質、海馬、線条体、中隔野および前脳基底部のいずれにおいても ACh 量の測定が可能であった。 NGF (100 ng/ml)は、中隔野および前脳基底部の ACh 量を著明に増加させたが、他の部位の ACh 量に対しては影響を与えなかった。この時、どの脳部位においても蛋白量は変化しなかった。中隔野神経細胞の ACh 量は、測定した 7日目まで経日的に増加し、NGF の ACh 量増加作用の発現には 24 時間以上の培養が必要であった。また、NGF は用量依存的に ACh 量を増加させ、その ED_{50} 値は約 1 ng/mlであった。 培養 4日目、中隔野神経細胞の培養液に ACh 分解阻害剤 eserine (10^{-4}M) を添加したところ、ACh 量は経時的に，特に30分後までは直線的に増加した。すなわち、本培養条件下において活発な ACh の合成・分解（代謝回転）が認められた。しかし、NGF はこの代謝回転には影響を与えなかった。以上、初代培養中枢神経細胞の ACh 量を指標にして、 NGF が中隔野および前脳基底部 ACh 神経細胞の分化を促進することを示した。また、この神経細胞において活発な ACh 代謝回転が認められ、その測定系として利用し得る可能性が示唆された。

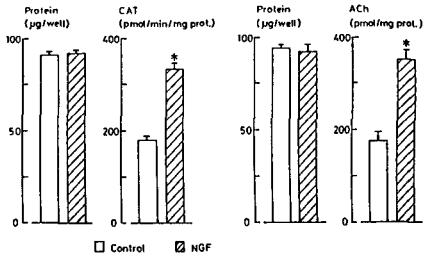
［目的］ 中枢神経作用薬の作用機序を明らかにするための神経化学的研究手段の１つとして、諸種神経伝達物質の脳内含量のみならずそれらの代謝回転に対する作用を測定することが重要である。我々は先に HPLC/ECD を用いた脳内 ACh 代謝回転測定法を報告した(3)。最近の培養技術の発達は、中枢神経細胞の培養を可能にし、その神経化学的研究手段としての有用性が明らかとなってきている(6)。一方、末梢神経系の神経栄養因子 (NTF)である NGF は、脳内にも存在し(4)、中隔野および前脳基底部 ACh 神経細胞に対する NTF であることが報告されている(5)。本研究では、初代培養神経細胞を用いた、in vitro ACh 代謝回転測定系を確立する目的で、まず、培養神経細胞における ACh 量および ACh 分解酵素阻害剤 eserine 添加後の ACh 量の増加率を指標に ACh 代謝回転の測定を試み、これらに対する NGF の作用を調べた。

［方法］ 大脳皮質、線条体、中隔野および前脳基底部神経細胞は17日目の、海馬神経細胞は19日目のラット胎仔脳より採取した。trypsin 処理、沪過、および遠心操作により単離神経細胞を得た(2)。これらの細胞を poly-L-ornithine (100μg/ml) で前処理した 24-wellあるいは 48-wellプレートに約 $1x10^6$ cells/cm^2 の割合で seeding した。無血清・ホルモン添加の DME/F12/N2 培養液(1) を用いて、37℃、 5% CO_2 -95% air の条件下で培養した。NGF は， 0.1% ovalbumin/PBS 溶液で希釈し seeding 時に添加した。1 日置きに medium を交換し，NGF を添加した。CAT 活性は、畠中および津久井の方法(2) を用いて測定した。ACh 量の測定は、経日変化を調べた以外は、4 日目に行った。培養液を吸引除去後直ちに、氷冷した 0.3 N PCA 500μl および内標 EHC 10-40 pmol/10-20 μl を添加した。20-30 分放置後、この PCA 溶液 500μl を測定に供した。以後既報(3) に従い操作した。 HPLC/ECD は、BAS 社製 ACh analyzer を用いた。移動相には 300 mg/ml sodium decansulfonate（東京化成）および 65 mg/ml TMA （和光）を含む 0.1 M phosphate buffer(pH 8.0) を、分離用カラムには AC-gel (Eicom社) を、固定化酵素カラムには AC-enzyme pack (Eicom 社) を用いた。ACh 抽出後の細胞を 1 N NaOH 0.4-1.0 mlで溶解後、 Bio-Rad Protein Assay を用いて蛋白量の測定を行った。

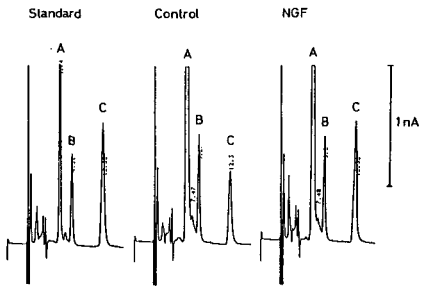
［結果および考察］ 中隔野神経細胞の CAT 活性および ACh 量に対する NGF (100 ng/ml)の作用を図－１に示した。NGF は蛋白量に影響を与えることなく、CAT 活性および ACh 量を増加させた。ACh 測定時の代表的なクロマトグラムを図－２に示した。NGF は前脳基底部の ACh 量も増加させたが、大脳皮質、海馬、および線条体の ACh 量には影響を与えなかった（図－３）。いずれの脳部位の蛋白量も NGF の添加により変化しなかった。中隔野神経細

Abbreviations: ACh, acetylcholine; CAT, choline acetyltransferase; EHC, ethylhomocholine; HPLC/ECD, high performance liquid chromatography/electrochemical detector; HG-CM , hippocampal glia-conditioned medium NGF , nerve growth factor; NTF, neurotrophic factor; PCA , perchloric acid; TMA, tetramethylammonium

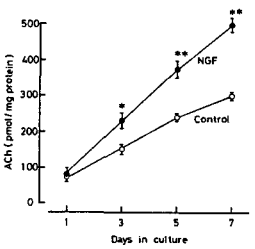
胞を用いて NGF の ACh 量および CAT 活性増加作用の経日変化および用量依存性を調べた。ACh 量は経日的に増加し、NGF の ACh 量（図－４）および CAT 活性増加作用の発現には 24 時間以上必要であった。培養 4日目に測定した ACh 量（図－５）および CAT 活性増加作用の ED_{50} 値は、各々約 1 ng/ml であった。NGF と海馬グリア細胞条件培養液 (HG-CM) の作用を比較した。HG-CM は NGF とは異なり、測定した中隔野、前脳基底部、海馬、および線条体のすべての ACh 量を増加あるいは増加させる傾向であった。その作用は海馬で著明であった。次に、ACh 代謝回転について調べた。NGF (100 ng/ml) 存在下あるいは非存在下に中隔野神経細胞を 4日間培養した。Eserine (10^{-4}M)添加後の ACh 量の変化を図－６に示した。NGF 添加および非添加群共に ACh 量は経時的に，特に 30 分後までは直線的に増加した。この 30 分後の ACh 量の添加前 ACh 量に対する増加率を代謝回転の指標とした。NGF の ACh 代謝回転に対する作用を表－１にまとめて示した。NGF は steady-state な ACh 量は増加さｖせたが、eserine 添加後の ACh 量の増加率を促進することはなかった。以上、初代培養中枢神経細胞の ACh 量および CAT 活性を測定し、NGF が中隔野および前脳基底部 ACh 神経細胞の分化を促進することを示した。また、この培養 ACh 神経細胞において、活発な ACh の合成・分解が観察され in vitro ACh 代謝回転測定系として利用し得る可能性が示唆された。



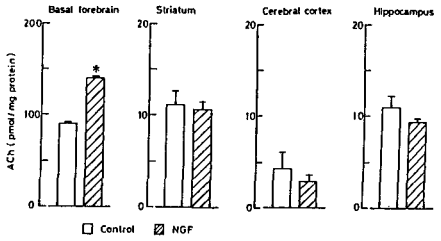
図－１ 中隔野神経細胞の ACh量および CAT 活性に対する NGFの作用
* P<0.01. Mean±SEM (n=3-4).



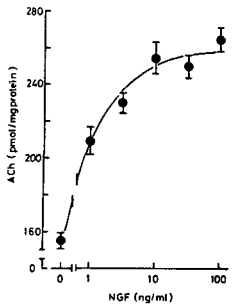
図－２ クロマトグラム
A, choline; B, EHC; C, ACh



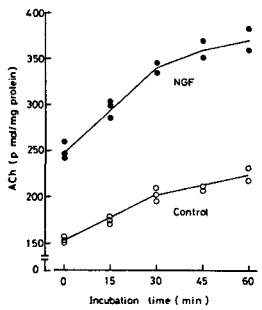
図－４ 経日変化
* P<0.05, ** p<0.01.
Mean±SEM (n=3).



図－３ 諸種脳部位の ACh量に対する NGFの作用
* p<0.01. Mean±SEM (n=4).



図－５ 用量依存性
Mean±SEM (n=4).



図－６ Eserine 添加後の ACh量の変化

表－１ ACh 代謝回転に対する NGFの作用

	Time (min) after addition of eserine		
	0	30	
	ACh content (p mol/mg protein)		% increase
Exp. I			
Control	152.7±0.7 (N=3)	204.0±4.3 (N=3)	33.4
NGF 100 ng/ml	247.9±5.9 (N=3)	340.0±6.4 (N=2)	37.2
Exp. II			
Control	101.9±1.9 (N=3)	151.6±1.6 (N=4)	48.8
NGF 100 ng/ml	161.2±8.1 (N=4)	213.2±2.1 (N=4)	32.3
Exp. III			
Control	153.6±3.2 (N=5)	225.8±3.3 (N=4)	44.5
NGF 100 ng/ml	226.4±4.2 (N=4)	304.8±5.1 (N=4)	34.6

[文献] 1) Bottenstein, J.B. and Sato, G.H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 514-517 (1979) 2)Hatanaka, H. and Tsukui, H., Develop. Brain Res. 30, 47-56 (1986) 3)Kakihana, M. et al., Bull. Jpn. Soc. Neurochem. 23, 54-56 (1984) 4) Korsching, S. et al., EMBO J. 4, 1389-1393 (1985) 5) Thoenen, H. et al., Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 109, 145-178 (1987) 6)Thomas, W.E., Life Sci. 38, 297-308(1986)

73 成熟ラット中枢ニューロンの定量的培養の可能性

畠中　寛[*]、久永欣哉[**]、津久井弘子[***]、西尾千力[*]

([*]大阪大学蛋白質研究所・蛋白質生合成部門、[**]三菱化成生命科学研究所・脳神経科学研究部、[***]東北大学・医学部・神経内科)

〔要約〕

生後２～４週齢のラット前脳基底野コリナージックニューロンを定量的に培養することを試みた。コリナージックニューロンの培養下の生存は、神経成長因子（NGF）の存在が必須であることを我々は既に明らかにしている。さらに、この培養には、組織断片を活性化パパインで消化することと共に、十分な酸素通気が必要であった。今回、エーテル麻酔下のラットからの脳の摘出によって生じる虚血に伴うニューロンの損傷回復過程について、さらに詳細に調べた結果、生後約２週齢のラットの場合は、１０数分間の虚血状態があっても培養は可能であることが分かった。中隔野コリナージックニューロンの海馬へのシナプス形成は、出生前から始まり、生後２週齢頃で終わるとされている。この時期を越えてさらに成熟したニューロンの培養では、全てのニューロンが生存できる程の定量的な培養は極めて困難となり、NGF 存在下でもわずかなコリナージックニューロンの生存しか図れなかった。

成熟動物の中枢ニューロンについて、細胞レベルでの研究をおこなおうとするとき、成熟ニューロンを培養下に移せないことが、大きな障害となっている。従来、中枢ニューロンは、まだ脳が低酸素要求性の時期で、細胞分裂の終わった直後頃を用いないと困難であるといわれていた[1]。未分化ニューロンを用いても、そしてたとえ、長期間培養することによって、ニューロンを成熟させたとしても、実際の成熟ニューロンの性質を類推することには、限界がある。私達は、昨年の本学会において、生後2、4、8、１４日齢のラットから、中隔野を切り出して、培養下に移す試みを報告し、コリナージックニューロンの培養下での生存が、NGFによって支えられていることを報告した[3),5)]。今回さらに、培養法を工夫し、成熟中枢ニューロンの培養を試みたので報告する。

【実験方法】

胎生および生後のラット脳からの、中隔野（Sep）、ブローカ対角帯核（vDB）ニューロンの培養法の詳細は、既に津久井ら[8)]によって記載されている通りである。用いたラットは、Wistar系 ST（♂、♀）であり、胎生ではプラグ確認の日を１日とし、生後は出生日を１日として数えた。コリンアセチル基移転酵素（ChAT）活性の測定は、

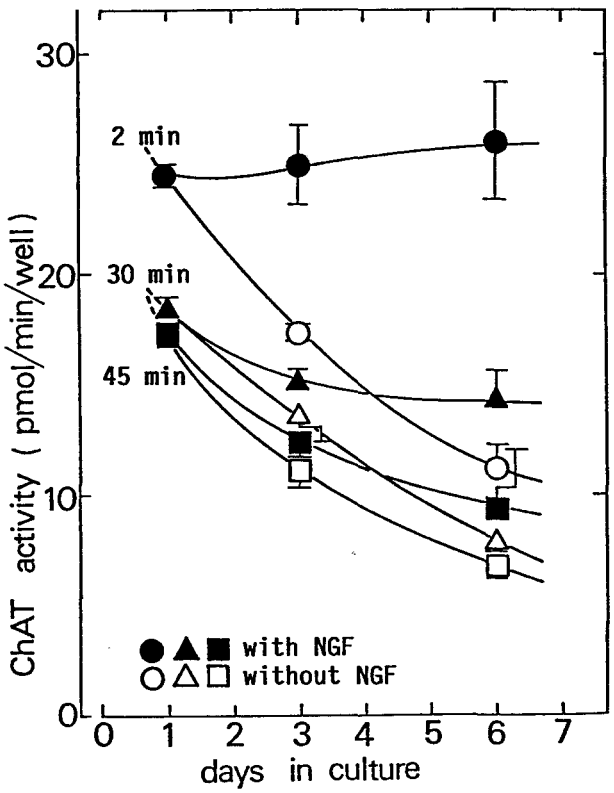


図１．培養ラットＰ１６ Sep,vDBコリナージックニューロンのNGFによる生存維持作用：摘出脳の37℃放置による虚血時間の影響。

P16ラット脳を摘出してから、Sep,vDB領域を細断し、酸素通気 L15培地に移すまでの時間を、2, 30, 45分間と変えて、その後、常法通りパパイン消化を行った。プレートとして、４８－ウェルをポリエチレンイミンでコートしたものを用いた。黒丸：NGF (100ng/ml)添加群。白丸：対照群。

前報どおり簡易法を用いた[2]。生後の場合、ラット脳から実体顕微鏡下で Sepと vDBを切り出し、細断後、酸素を十分に通気した氷冷 L15培地に一時集め、その後酵素処理を行った[3]。

【結果と考察】

図1は、生後16日齢のラットを、エーテル麻酔の後、無菌的に摘出した脳を、ほぼすぐ、37℃に 30分近くあるいは45分近くおいた後、顕微鏡下に Sepと vDBを切り出し細断し、酸素を十分に通気した氷冷L15培地に移した。パパイン処理後、分散細胞を、ラット血清を含む培地で、ポリエチレンイミンでコートしたプレートにまき、NGF存在および非存在で培養した。ChAT活性が、生存コリナージックニューロンの数にほぼ比例すること[3-5]を利用し、日を追って ChAT活性を測定した。30分間、摘出脳を虚血状態に置いても培養は可能で NGF応答性も十分にみられる。しかし、45分間放置では、NGFの存在でもニューロンの生存は悪かった。2分間の場合を正常の応答とすると、別に行った実験での結果では、10あるいは 15分の摘出脳の放置は、正常応答性を示した。再現性に乏しかったが、時に 30分間、摘出脳を 0℃に放置した後、培養すると NGF応答性が日を追って顕著に高まり、培養1週間で元の ChAT活性の 1.5倍近くになるケースもあった。

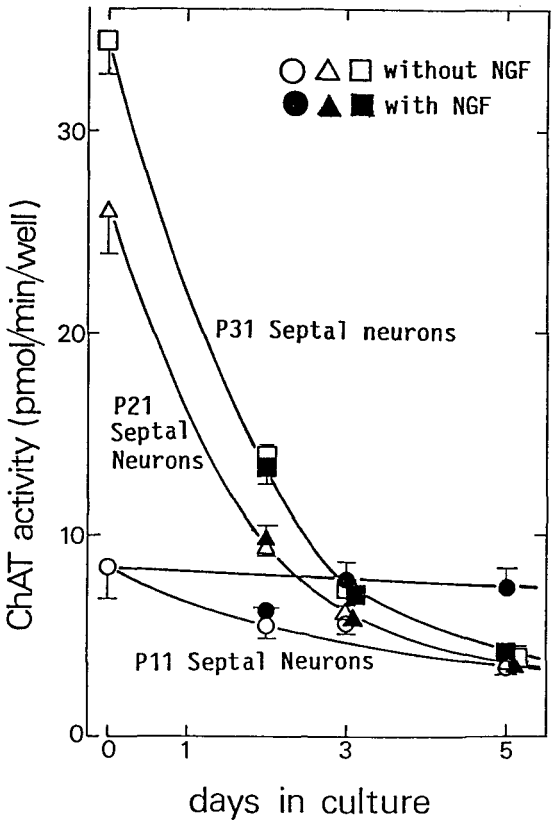


図2．培養ラットP11、P21、P31 Sepコリナージックニューロンの NGFによる生存維持作用
脳の摘出後、速やかに Sepを、細断し、酸素通気 L15培地に移し、パパイン消化を行った。プレートとして、48－ウェルをアストログリア細胞でフィーダー層を作っておいてから、まいて培養した。黒丸：NGF(100ng/ml)添加群。白丸：対照群。

図2は、生後11、21、31日齢のラットからの Sepの培養である。摘出脳は、速やかに冷やし 2分以内に、細断 Sepとして、酸素通気の L15培地に移している。生後21、31日では、11日と比較し、極めて培養が困難であることが分かる。生後3～4週齢の実験は、数回試みたが、結果は同じであった。この結果は、パパイン分散法がシナプス形成の完成する生後約2週齢[6]が培養できる限界であることを意味しているのかも知れない。現在、他の処理法も試みており、また中枢の他の領域についても培養出来る可能性を検討している。

一方、胚を用いてのトリプシン分散法では、細胞分裂の終わる17日胚[1]を2～3日越えると、培養は困難となる。しかし、この場合は、パパインを用いれば、可能となる。このことから、生後3週齢を越えて、培養を可能とする別の消化酵素があるのかも知れないとも考えられる。

前脳基底野大型コリナージックニューロンは、脳の老化との関連で注目されている[4,7]ことを考えると、培養下での成熟ニューロンの細胞レベルでの性質を明らかにすることは、ますます重要と思われる。

【文献】 1) S.A.Bayer, J.Comp.Neurol., 183 (1979) 89-106. 2) H.Hatanaka & H.Tsukui, Devlop.Brain Res., 30 (1986) 47-56. 3) H.Hatanaka, H.Tsukui & I.Nihonmatsu, Devlop.Brain Res., 39 (1988) 85-95. 4) 畠中 寛、池上司郎、有松靖温共著「脳の老化」(1988) 共立出版 東京、印刷中. 5) 畠中 寛、生体の科学、39 (1988) 48-56. 6) T.A.Milner, R.Roy & D.G.Amaral, Develop.Brain Res., 8 (1983) 343-371. 7) 久永欣哉、畠中 寛、BIOmedica, 3 (1988) 483-487. 8) 津久井弘子、有松靖温、武井延之、畠中 寛、組織培養研究、6 (1988) 23-29.

74 β－シトリルグルタミン酸の培養神経細胞での生合成と分解

三宅正治
（愛媛大・医・機器センター）

〔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（β-CG）の変化を、神経特異物質であるN-アセチルアスパラギン酸（NAA）、N-アセチルアスパラチルグルタミン酸（NAAG）のそれと比較検討した。 NAAGはβ-CGと同じく神経細胞が著しく成長・分化する時期に高濃度存在するが、NAAは前二者よりさらに成長の初期から急速に増加し、in vivo での変化とは大きく異なった。
2）初代培養視蓋神経細胞の発達過程におけるβ-CGの生合成および分解活性の変化をしらべた。 放射性ピルビン酸およびアラニンからβ-CGへの放射能の取り込みは、培養3－6日目にかけて著しく増加し、その後一定となるが、逆に放射性グルタミンあるいはグルタミン酸からの取り込みは、培養3日目までは低く、その後培養12日目まで徐々に増加した。 一方β-CGの分解酵素活性は、培養3日目までは低い値であったが、その後培養12日目まで急速に増加した。

β-シトリルグルタミン酸は従来自然界に存在の知られなかった物質であり、グルタミン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た強い酸性化合物である（1）。 この化合物は最初幼若ラット脳で発見され、その後成熟ラット睾丸（2）やレンズ（3）にも高濃度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、その生理的役割は不明であった。 最近、ニワトリ胚の中枢神経細胞に対して生存因子あるいは突起伸展因子作用がみとめられたが（4）、その詳細は不明である。 そこで今回は、本化合物の培養視蓋神経細胞の成長・分化における詳細な量的変化、生合成および分解酵素活性の変化を検討したので報告する。

＜実験方法＞

初代視蓋神経細胞の培養およびβ-CG，NAAおよびNAAGの定量は既報（4）を改良しておこなった。 β-CGの生合成活性は、培養直後、3、6、9、12日目の培養神経細胞に^{14}C-ピルビン酸および^{3}H-アラニン、-グルタミン、-グルタミン酸を添加後2時間培養し、β-CGへの放射能の取り込みを高速液体クロマトグラフィー（4）にて分離後測定した。 β-CG特異的分解酵素活性の測定は、培養神経細胞の顆粒画分を用いて、既報（5）にしたがって測定した。

＜実験結果と考察＞

1）初代培養視蓋神経細胞の発達過程におけるβ-CGとNAAおよびNAAG濃度の変化

図1に示すごとく、β-CGは培養6日目頃に最高値に達し、12日目にやや減少した。 従来より神経系に特異的に局在することが知られ、最近神経伝達物質の1つとも考えられているNAAGもβ-CGとほぼ同様の変化を示し、神経細胞が著しく成長・分化する時期に高値を示した。 一方神経特異的で高濃度（約10mM）存在することが知られているが、その生理的役割が明確ではないNAAは、前二者よりもさらに早く、培養3日目に最高値の70%に 達し、さらに9日目まで増加し、その後減少した。 NAAはin vivo では、ほぼシナプス形成が終わりミエリン化の時期に急速に増加するこが知られているので（6）、この培養神経細胞での変化とは大きく異なる。 また最高濃度も in vivo のそれの約20%程度であった。

2）初代培養視蓋神経細胞の発達過程におけるβ-ＣＧの生合成および分解酵素活性の変化

図２に示すごとく、^{14}Ｃ-ピルビン酸および^{3}Ｈ-アラニンからのβ-ＣＧへの放射能の取り込みは、培養３日目にはすでにほぼ最高値に達し、その後培養１２日目までほぼ一定であった。一方^{3}Ｈグルタミンおよびグルタミン酸からの取り込みは、培養３日目までは低く、その後１２日目まで徐々に増加した。前二者はβ-ＣＧのクエン酸部、後二者はグルタミン酸部への取り込みが主と考えられ、２つの部分での放射能の取り込みが、神経細胞の成長・分化の時期で大きく異なるのは興味が持たれるが、その詳細は不明である。また、各前駆体の細胞内濃度についても検討の必要がある。一方図３に示すごとく、β-ＣＧ分解酵素活性は、培養直後から３日目までは低い値であったが、その後は１２日目まで急速に増加した。β-ＣＧの濃度が培養６日目にかけて上昇するのはクエン酸部分の合成活性が増加したためであり、その後生合成活性はほぼ一定で、分解酵素活性が急速に増加するため、β-ＣＧ濃度が低下するのであろう。またβ-ＣＧのグルタミン酸部分への放射能の取り込みの増加はこの培養条件下で、９日目～１２日目に増加するグリア細胞によるのかもしれない。

＜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 Morino H. and Miyake M. 未発表

4 Miyake M. and Morino H. 神経化学 26:289-291(1987)

5 Miyake M. et al Biochim. Biophys. Acta 760:206-214(1983)

6 Miyake M. and Kakimoto Y. J.Neurochem.37:1064-1067(1981)

図１ β-ＣＧ、ＮＡＡ、ＮＡＡＧの濃度変化

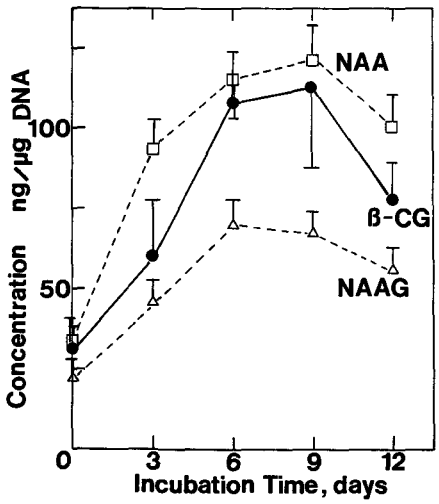


図２ β-ＣＧの生合成活性の変化

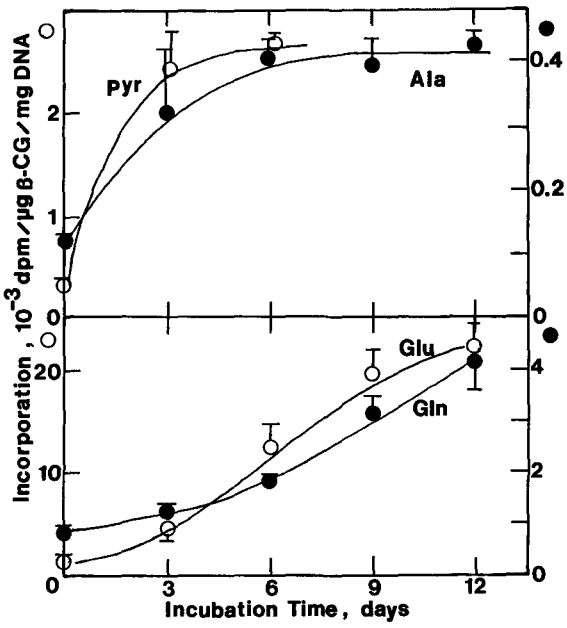
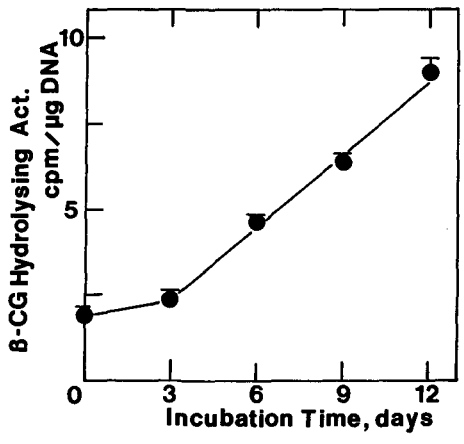


図３ β-ＣＧ分解酵素活性の変化



75　プロテアーゼ阻害剤(Ac-Leu-Leu-Nle-al)によるPC12細胞の突起形成の誘導

斎藤祐見子、川島誠一
（都老人研、生化学部）

〔要約〕

ＰC12細胞は神経成長因子(ＮＧＦ)に反応して神経突起の形成、特定の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。我々はプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチン誘導体、Ac-Leu-Leu-Nle-al（ＡＬＬＮａｌ）が単独でＰC12細胞に作用し、ＮＧＦによるものとは異なった形態の突起伸長を一時的ながらも引き起こし、また、アセチルコリンエステラーゼ(ＡｃｈＥ)活性の上昇も誘導することを見いだしたので報告する。この効果は、神経芽細胞や脊髄神経節の突起伸長を引き起こすと報告されているヒルジン、ダイズトリプシンインヒビター（ＳＴＩ）、ロイペプチン（Ac-Leu-Leu-Arg-al）では見られず、また強力なセリンプロテアーゼ阻害剤であるジイソプロピルフルオロリン酸（ＤＦＰ）やチオールプロテアーゼ阻害剤のＥ６４ｃ、Ｅ６４ｄでも起こらなかった。以上の結果は、神経細胞分化に対して調節的な役割を持つ新しいタイプのプロテアーゼが存在することを示している。

神経芽細胞や末梢神経培養細胞における神経突起伸長の調節に、セリンプロテアーゼであるトロンビン、プラスミノーゲンアクチベーター（ＰＡ）などのプロテアーゼとその阻害物質が関与しているとの報告がある(1,2)。ＰC12細胞はＮＧＦに応答して増殖を停止し、交感神経様へと分化することから、神経細胞分化の初期モデルとみられている(3)。この系においては、プロテアーゼとその阻害物質が突起の形成に関与していることを示す報告はなされていない。そこでＰC12細胞の培養液中に種々のプロテアーゼ阻害剤を単独に加えて、突起形成を誘導するかどうかを検討した。セリン、およびチオールプロテアーゼの阻害剤を含む11種のプロテアーゼ阻害剤について調べたところ、ロイペプチン類似体である Ac-Leu-Leu-Nle-al（ＡＬＬＮａｌ）ただ１種のみ突起形成作用が見られた。ＮＧＦおよびＡＬＬＮａｌによる神経突起形成作用の違いについても報告する。

[実験方法] 細胞培養：ＰC12h細胞(4)をコラーゲン塗布したプレートにまき、無血清合成培地(N2)を用いて、37°C, 5% CO_2のの条件で行なった。　突起形成の評価：細胞体の径より長い突起を持つ細胞数を数えた。1つの細胞体よりでる突起の数については、1本、2本、2本以上をそれぞれmono-, bi-, multipolar typeとして評価した。突起の長さの測定については既報の様に、neurite length distribution patternとして分析した(5)。　ＡｃｈＥ．活性測定：Rieger(6)らの方法に従い測定した。蛋白濃度測定はLowry法に従った。この測定には、ＡＬＬＮａｌまたはＮＧＦ作用後48hrの細胞を用いた。

[結果と考察]（１）ＰC12細胞に種々のプロテアーゼ阻害剤－ＳＴＩ、ＤＦＰ、ヒルジン、アプロチニン、アミノカプロン酸、ペプスタチン、Ｅ６４ｃ，Ｅ６４ｄ、ロイペプチン、ＡＬＬＮａｌ、Ac-Leu-Leu-Met-al（商品名:calpain inhibitor I,II）－を様々な濃度で加え、48hr後に観察したところ、ＡＬＬＮａｌのみが突起形成を引き起こした。この効果は0.6 μM より見られ、1.6 μMまで濃度依存的に突起形成をする細胞の割合が増したが、2 μM以上では細胞毒性を示した。ＡＬＬＮａｌは疎水性アミノ酸から構成されている。そこで突起形成が細胞膜と疎水性部分との物理化学的な相互作用によるものかどうかを知る為に、ＡＬＬＮａｌを還元して、プロテアーゼ阻害活性の発現に重要なアルデヒド基をアルコールへと置換した。ＦＡＢ－ＭＳにより分子量に関する情報を求め、この置換が完全に行なわれたことを確認した。またカルシウム依存性中性プロテアーゼ（ＣＡＮＰ）のインヒビターアッセイを行ない還元したＡＬＬＮａｌの活性が、前のものに比べ、かなり減少していることも確認した。この還

元したＡＬＬＮａｌはＰＣ１２細胞に対する突起形成能を失っていた。従って、ＡＬＬＮａｌは非特異的な作用ではなくて、プロテアーゼ阻害剤として効果を発揮すると考えられる。（２）ＰＣ12細胞にＡＬＬＮａｌ(1.6μM)を作用させると、作用12hr後には全体の約14%の細胞で突起形成が見られた。この突起形成率は時間とともに増加して、48hr後には約50%の細胞で突起形成が見られた。しかし、その後、その割合は除々に減少し、6-7日後には、神経突起を有する細胞はほとんど見られなくなった。これに対し、ＮＧＦ(40ng/ml)による突起形成は12hr後において約7%の細胞にしか見られ無いが、その後、除々に増加し、5日後には、約65%に達した。此の様に、ＡＬＬＮａｌによる突起形成はＮＧＦによるものと比較して早く起こり、一時的な時間推移をたどる。ＡＬＬＮａｌとＮＧＦを同時に作用させると、既報(5)の様に非常に効果的であり、作用48hr後においても、その効果は維持される。ＡＬＬＮａｌにより誘導された突起は、ＮＧＦによる突起と同様にgrowth coneやbranching pointを有する(Fig. 1c)が、細胞体からでる突起と突起の長さについて、明らかな違いが見られる。すなわちＡＬＬＮａｌによる突起の数は、ＮＧＦによるものと比べて、multipolar typeが減少し、monopolar typeが増加する。突起の長さについても、ＡＬＬＮａｌによるものはＮＧＦによるものとは有意に異なり、ＡＬＬＮａｌによる方が長い傾向にある。以上の結果から、ＡＬＬＮａｌによる突起形成は、ＮＧＦによるものとは異なった系を経て起こることが予想される。（３）ＰＣ12細胞のＡｃｈＥ.活性はＮＧＦ刺激により上昇することが知られている(6)が、ＡＬＬＮａｌはＮＧＦと同程度にその活性を誘導した。このＡＬＬＮａｌによる作用は濃度依存的であった。ＡＬＬＮａｌとＮＧＦを同時に加えた場合に相加効果はみられなかった。

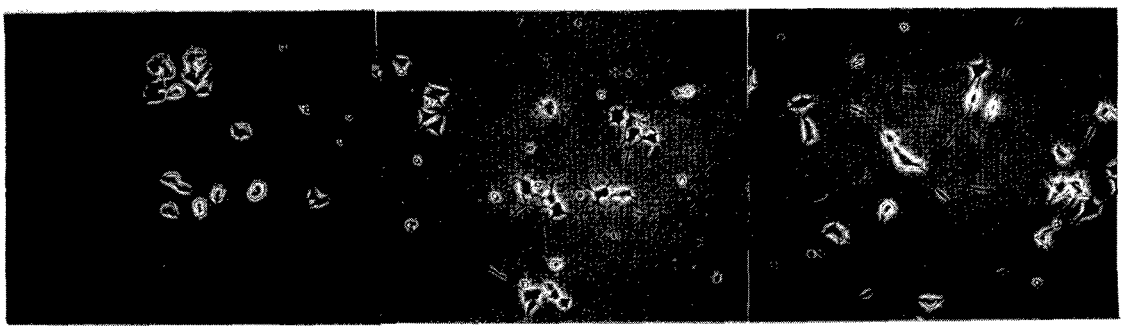
ＡＬＬＮａｌの標的プロテアーゼの候補としては、まず第一にＣＡＮＰがあげられる。しかし、ＡＬＬＮａｌは他のプロテアーゼを阻害する可能性も有り、実際にどのようなプロテアーゼが突起形成に調節的な役割を果たしているのか不明である。しかし、それは今まで報告されていたようなトロンビンやＰＡ様なものとは明らかに異なり、神経細胞への分化の初期に存在する新しいタイプのプロテアーゼの可能性がある。現在、種々のＡＬＬＮａｌ類似体を合成し、その効果から標的プロテアーゼの性質を探る実験を行なっている。

[謝辞]ＦＡＢ－ＭＳによるＡＬＬＮａｌならびに還元したＡＬＬＮａｌの分子量の解析をしていただいた本研究所の近一夫氏、田中康一氏にお礼申し上げます。また、ＣＡＮＰを提供して下さった猪股光司氏に感謝致します。

[文献]1. Monard,D.,et al. Prog.Brain Res.,58 (1983) 359-364. 2. Pittman,R.N.and Patterson,P.H. J.Neurosci.,7 (1987) 2644-2673. 3. Guroff,G., Cell culture in the neuroscience, Plenum, NY,1985, pp245-257. 4. Hatanaka,H., Brain Res., 222 (1981) 225-233. 5. Saito,Y.and Kawashima,S., Neurosci Lett., 89 (1988) 102-107. 6. Rieger., etal. Dev. Biol., 76 (1980) 238-248.

Fig.1 Phase contrast micrographs of PC12h cells grown for 48hr.

a. No addition b. 40ng/ml NGF c. 1.6μM ALLNal



76 合成シアル酸化合物による神経突起伸展作用の解析
α－，β－シアリルコレステロールの細胞への取り込みとその作用

山下達朗*，辻　崇一*，永井克孝*,**
*（東大・医・第二生化）　**（新潟大・脳研・神経生物）

〔要約〕
合成シアル酸化合物であるシアリルコレステロール（SC）の神経突起伸展作用の解析のため、^{14}C で標識したSCを用いて細胞への取り込みと、SC自体の細胞への作用を調べた。その結果、α-，β-SC とも60分以内では経時的に、6 μM 以下の濃度では濃度依存的にそれぞれ細胞内への取り込みは増加した。さらに、取り込まれたα-，β- SCが膜に対してどのような作用を及ぼすのかを検討した結果、Ca^{2+}のinflux,efluxについては、α-，β- SCとも濃度によってかなり影響を与えるのに対し、シアル酸（NANA）、コレステロール単独では、それぞれ影響がなかった。これらの現象は濃度依存性などから、SCによる神経突起伸展作用とほぼ同等であった。従ってSCは細　胞（膜）にとりこまれた後その透過性を大きく変え、Ca^{2+}をはじめとして物質の細胞内外での移動に変化を与えて、神経突起伸展作用の一つの要因になっているものと考えられる。

はじめに

神経系培養細胞に対して神経突起伸展作用を誘導する物質は、NGF をはじめとしていくつか知られている。シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドにも神経突起伸展作用があることが最近明らかになってきた(1)。マウス神経芽腫瘍細胞株 Neuro2a　の場合、天然に存在するガングリオシド分子種のみならずシアル酸を持つ合成両親媒性化合物の中にもガングリオシドと同等の神経突起伸展作用を持つ化合物が存在することを我々は明らかにした。代表的な化合物としてはα-，β- シアリルコレステロール(SC)があり、濃度依存的に神経突起伸展活性を有する。さらに、これらの物質の作用は、基本的にはシアル酸の結合がα体のほうがβ体よりも活性が強く、血清存在下では活性が抑制されること、またこの作用はc-AMP を介するものではないことを明らかにした(2)。SCによる神経突起伸展作用を分子レベルで解明することを目的として、^{14}C ラベルのSC等を用いて様々な検討を行なってきた。その結果、若干の知見を得たのでここに報告する。

材料・方法

1. 細胞・培養条件：マウス神経芽腫瘍細胞株 Neuro2a　は名古屋市立大学の加藤泰治博士から分与されたものを使用した。FCS を10% 含むDMEM培地を用い、37°C，5%CO_2 存在下で継代培養を行なった。
2. ^{14}C-α，β-SC　：第一化学薬品（株）で合成し、コレステロールの４位の Cを標識したものを用いた。純度は TLC により、　ワンスポットであることを確認した。比活性はどちらも 78 μCi/mgであった。
3. α，β-SC の細胞へのとりこみの測定：　2～5x10^5 個／35mmプレートの細胞に対して、所定濃度の^{14}C-α，β-SC を含むDMEM培地で一定時間培養後、細胞にとりこまれた^{14}C-SCを測定した。
4. Ca^{2+}の細胞内へのinflux，あるいは細胞外へのeflux の測定：96穴のポリスチレンプレートを用い、10^5 個／well の細胞に対して目的の物質を所定濃度含むDMEM培地で一定時間培養後、$^{45}Ca^{2+}$を含むDMEM培地（ 1 μCi／well）に交換し、20分間37°Cに温置した。培地除去後、細胞にとりこまれた$^{45}Ca^{2+}$を測定した。
   eflux については10^5 個／wellの細胞に対して$^{45}Ca^{2+}$を含むDMEM培地（ 4 μCi／well）で 6時間、もしくは一晩37°Cに温置した後、目的の物質を所定の濃度になるよう加え、一定時間後に細胞内から外へ出るCa^{2+}の流出速度を測定した。

結果

1. α-,β-SC の細胞内へのとりこみ：α-，β-SC どちらも60分以内は経時的に増加し、以降はほぼプラトーに達した。α-，β-SC の濃度を変えて、3時間における細胞内へのとりこみを調べたところ、どちらも 6 μM までは濃度依存的に増加したが、さらに高濃度では若干の減少傾向が認められた（図1,2）。

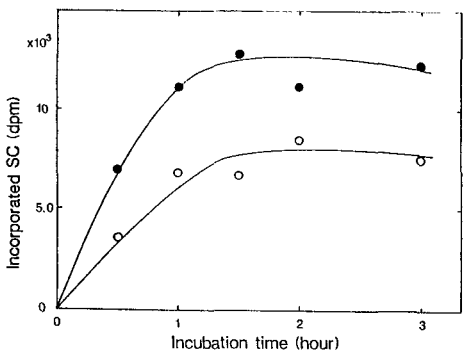


図 1　SCの細胞への取り込みの経時的変化

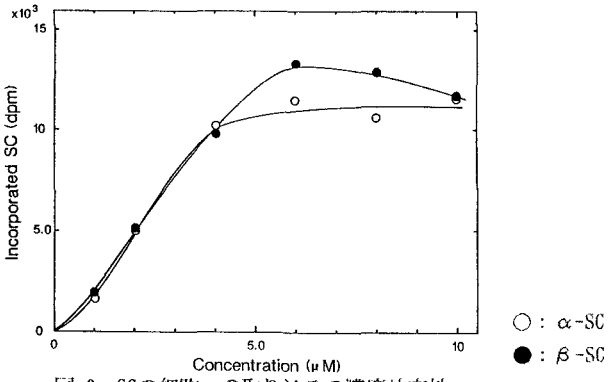


図 2　SCの細胞への取り込みの濃度依存性

2. Ca^{2+}のinflux,efluxについて：細胞に取り込まれたSCがどのような作用を及ぼすかを調べたところ、Ca^{2+}のinflux,efluxに変化を生じとがわかった。influxについては、0.01～10μM の範囲で、α-,β-SC とも濃度依存的にCa^{2+}の細胞内への取り込みを増加させたが、シアル酸（NANA)、コレステロール、それぞれ単独では、こうした変化は認められなかった。また、eflux については$^{45}Ca^{2+}$をとりむ時間が 6時間の場合、α-,β-SC との接触時間が長くなるに従い、流出速度も速くなる傾向が認められた（表1)。

表 1　各物質のCa^{2+}influx,efluxへの影響

Reagent	Conc.(μM)	Influx rate[a)]	Efflux rate[b)]
α-SC	0.14	3.12	2.08
	14	8.20	4.21
β-SC	0.14	2.40	1.46
	14	5.03	2.76
GM1	0.15	2.20	4.01
	15	1.85	2.08
A-23187	0.05	4.07	2.61
cont.		1.00	1.00

#コントロールに対する比で示した。

a）各物質を 1時間作用させた後の$^{45}Ca^{2+}$の取り込み速度。

b）$^{45}Ca^{2+}$を 6時間とりこませた後、各物質を 1時間作用させその後のeflux 速度。

考察

α，β-SC は神経突起伸展作用のみならず、特にα体の方は培養グリア細胞をアストロサイト様の細胞に分化させる作用を持っていることも報告されている(3) 。このうち神経突起伸展作用の解明のため、今回、我々はα- ，β-SC の Neuro2a へのとりこみについて調べたところ、^{3}Hで標識されたガングリオシドGM_3,GM_1 等の培養細胞へのとりこみ結果(4,5) と類似した結果が得られた。我々は、まだ予備的ではあるが、細胞に取り込まれたα- ，β-SC はほとんど代謝されないという結果を得ている。このことから、細胞に何らかの様式で取り込まれたSCがそのまま作用しているものと考えられる。従って、SCによる神経突起伸展作用は代謝産物によるものとは考えにくい。またSCが取り込まれることにより、少なくともCa^{2+}の細胞内外での移動が大きく変化することから、細胞膜の透過性を著しく変えることが明らかになった。この効果は、濃度依存性などから見る限り、SCによる神経突起伸展作用とほぼ同等である。従って細胞（膜）にSCが取り込まれ、その透過性を大きく変えることが神経突起伸展作用の少なくとも一つの要因ではないかと考えられる。

参考文献

(1).Tsuji,S., Arita,M., Nagai,Y. (1983) J.Biochem., 94, 303-306 .

(2).Tsuji,S., Yamashita,T., Tanaka,M., Nagai,Y. (1988) J.Neurochem., 50, 414-423.

(3).Kato,T., Ito,J., Tanaka,R., Suzuki,Y., Hirabayashi,Y., Matsumoto,M., Ogura,H., Kato,K., Brain Research, (1988) 438, 277-285.

(4).Keenan,T., Franke,W.W.,and Wiegandt,H., (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355 ,1543-1548.

(5).中村，荻野，野尻，北川，斉藤．(1988) 脂質生化学研究，東京．125-128.

77　脳および下垂体におけるインシュリン様成長因子（ＩＧＦ－Ｉ）受容体の分布

栗原正紀，松尾圭一*，丹羽正美*,**重松和人**,***山下俊一*，尾崎正若**，長瀧重信*，森　和夫

（長崎大・脳外，*一内，**二薬理，***二病理）

〔要約〕

定量的autoradiography 法を用いてラット前脳および下垂体におけるインスリン様成長因子(IGF-I) 結合部位の局在と、その結合特異性につき検索し、中枢における IGF-Iの役割について検討した。 IGF-I特異結合部位は、median eminenceをはじめとする視床下部、olfactory bulbを含むlimbic areas、下垂体前葉を主に、その他、脳室周囲器官、choroid plexus、視床、大脳皮質に局在していた。また、これら IGF-I結合部位は、insulin が低親和性を持つことより、type I 受容体であることが示唆された。これらの所見は、血中IGF-I が視床下部－下垂体系を介して成長ホルモン分泌に関与していることを裏付けると共に、中枢における内因性IGF-I systemの局在を示唆すると思われた。

IGF-I は、脂肪細胞や筋細胞に対してインシュリンとほぼ同様の作用を持つほか、骨・軟骨組織に対して DNA合成や細胞増殖促進作用を有し、成長ホルモン(GH)の作用を仲介することにより個体の成長に深く関与するペプチドである。また、その血中濃度はGH分泌量に依存することが知られている(1) 。さらに、血中IGF-I が、下垂体からのGH分泌に関し、下垂体前葉に存在する IGF-I受容体を介し、あるいは、視床下部におけるsomatostatinの分泌を促進することによりnegative feed backを成していることが示唆されている(2) 。中枢においては、神経細胞や繊維の発達を促進させるなど成長因子としての役割のほか、神経ペプチドとして主に摂食行動に関与する可能性が示唆されている(3) 。そこで、今回、我々はin vitro定量的 autoradiography法(4) を用いてラット脳および下垂体における IGF-I特異結合部位の分布を解析し、 IGF-I受容体の中枢における役割について検討した。

（方法）　雄性Sprague-Dawley rat(250-300g)の脳および下垂体を速やかに摘出し、 -30℃にて凍結後、24時間以内に16μmの連続凍結切片を作成し検体とした。さらに、死後６時間以内に行われた剖検時に得られたヒト下垂体、脳葉切除術により摘出されたヒト前、側頭葉およびbovine,mouse,guinea pig の下垂体についてもあわせて検討した。検体(16μm凍結切片）を、23℃下で10mM $MgCl_2$、0.1% BSA、1mg/ml Bacitracin (Sigma) 含有25mM Tris-HCL buffer 、pH7.5 にて preincubationを15分間行い、その後、0.1nM (3-[^{125}I]iodotyrosyl)insulin-like growth factor を含む同様のbuffer中にて、種々の濃度の非標識IGF-I (Amersham)存在下で23℃、 120分間incubateした。その後、４℃下、25mM Tris-HCl buffer 、pH7.5 中で、各１分間３回洗浄、冷風下に乾燥させ、3H-sensitive Ultrofilmに３日間感光して、autoradiogram を得た。得られた autoradiogramより、computer装着 microdensitometerにてoptical density (OD)を測定し、同時に得られた ^{125}I-standard (Amersham) のODと比較することにより結合部位を定量した。BmaxおよびKdについては、Scatchard analysisを行った(5) 。

（結果）１）0.1nM[^{125}I]-IGF-Iで得られた特異結合部位の分布：　ラット脳においては、高濃度 IGF-I特異結合部位(4-6fmol/mg)は、median eminence 、olfactory bulb、choroid plexus、および hippocampusやamygdalaなどのlimbic areaに局在していた。また、比較的高い濃度は、大脳皮質、視床(ventroposterior、paraventricular thalamic nucleus)、視床下部(paraventricular、supraoptic、suprachiasmatic nucleus)、および脳室周囲器官(subfornical

organ 、organum vasculosum lamina terminalis) などに認められた。また、ヒト大脳皮質においても主に第２層および４層に限局して存在していた。その他、ヒト、rat 、bovine、guinea pig、mouse の下垂体前葉に高濃度の IGF-I結合部位の局在が認められた。 Fig.1にラット下垂体（前葉：APi 、後葉：PPi ）およびmedian eminence (me)における IGF-I 特異結合を示す(sagittal section 上段： H&E染色、中段：total binding 、下段：nonspecific binding)。

2）[^{125}I]IGF-I 結合特異性：[^{125}I]IGF-I 結合に対しては、非標識IGF-I が、強い抑制を示し[IC50=olfactory bulb (OB):3.9,choroid plexus (CP):6.9,median eminence (me):5.9,anterior pituitary (APi):5.6nM]、insulin も高濃度においてのみ結合抑制を示した(Fig.2) 。Scatchard analysisでは、各結合部位には、single classの高親和性受容体の存在が示唆された。[Kd=OB:2.7,CP:4.2,Me:2.3,APi:2.7nM]

（考察） 脳においても、末梢臓器同様 IGF受容体には、構造上異なる２種類（type Ⅰ& typeⅡ）が存在することが知られている(6) 。Type Ⅰ受容体には、 IGF-Iが最も親和性が高く、さらにIGF-Ⅱも受容体を認識するのみならず、高濃度のinsulin も親和性を持つことが知られている。一方、typeⅡは、insulin が親和性を持たないことが結合特異性上異なるとされている。我々の結果は、 [^{125}I]IGF-I結合が高濃度のinslulinにより抑制されることより、その結合部位はtype Ⅰ IGF受容体であることを示唆している。中枢における IGF-Iの働きについては、Berelowitzらが、in vitroの実験で IGF-Iが視床下部からのsomatostatinの遊離を促進すること、さらにGHRH刺激による下垂体からのGHの遊離を抑制することを報告している(2) 。我々の視床下部における IGF-I結合部位の局在は、somatostatin免疫反応細胞の分布とよく一致しており (7)、 IGF-Iによる視床下部ー下垂体におけるnegative feed backの存在を裏付けるものである。さらに、Tannenbaumらは IGF-Iをラットの脳室内に注入して、food intake が抑制されたことより、 IGF-Iが中枢におけるbody weight regulationに関与していると報告しているが(3) 、殊にolfactory bulbを含むlimbic system におけるIGF-I 結合部位の分布は、その作用部位を示唆するものと思われる。今だ中枢神経系の IGF-Iに関して詳細な免疫組織学的検討はなされていないが、 IGF-I mRNA が脳に存在すること(8) と共に脳内に IGF-I特異結合部位が分布していることは内因性IGF-I systemの存在を強く示唆する。

References
1.Zapf J,et al:Curr Top Cell Regul 19:257-304,1981
2.Berelowitz M,et al:Science 212:1279-1281,1981
3.Tannenbaum GS,et al:Science 220:77-79,1983
4.Kurihara M,et al:Brain Res 408:31-39,1987
5.Munson JP:Methods in Enzymology 92:543-576,1983
6.Rechler MM,et al:Ann Rev Physiol 47:425-442,1985
7.Alpert LC,et al:Endocrinology 98:255-258,1976
8.Rall L,et al:Clin Res 34:135A,1986

Fig. 1

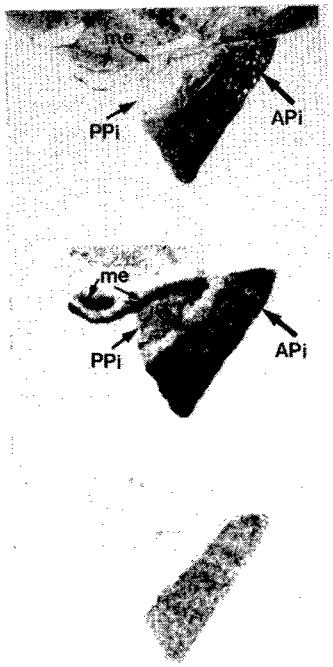
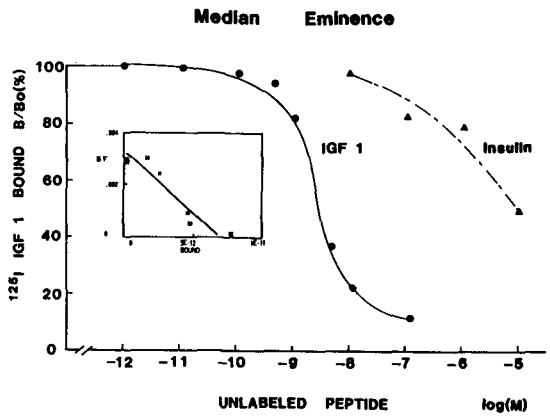


Fig. 2



78　ヒト recombinant EGF（rEGF）の神経栄養効果について

莚井　武，山田和雄，早川　徹，木下　章，片岡和夫
松本勝美，甲村英二，岡崎宏司*，最上平太郎
（大阪大・医・脳外、大塚製薬・徳島研*）

〔要約〕

遺伝子組換え技術により合成されたヒトrecombinant EGF(rEGF)の神経栄養効果を胎性第17日のラットより得た初代培養細胞を用いて検討した。その結果、rEGFは大脳皮質及びsubneocortical telencepharon neuronに対し神経栄養効果を示した。さらに、大脳皮質のニューロンではその無酸素性傷害を改善した。この栄養効果及び改善効果の一部はアストロサイトを介して発現されると考えられた。一方、telencepharonのneuronでは無酸素性神経細胞傷害は明らかではなかった。

上皮成長因子(EGF)は種々の作用を持つ細胞成長因子の一つであるが，神経栄養因子として中枢性ニューロンにも働いていることが最近明らかとなった[1]。ヒトのEGFは最近遺伝子組換え技術により合成されているが、このヒトrEGFにも神経栄養効果が存在するか否かを培養ニューロンを用いて検討した。またこのrEGFが無酸素性神経細胞傷害を改善し得るか否かを培養ニューロンを用いたアノキシアモデルにより検討した。

【実験方法】胎生第17日のラット大脳皮質及びtelencepharonから得たニューロンをメッシュを通して単細胞化(3x10^5/ml)し，poly-L-lysineでコーティングした24 well上に3.75 x 10^4cells/wellの割合でseedingした。これを10%FCS添加MEM培地により24時間培養した後，無血清培地(DME/F-12,N1 但し putrescineを除く)と交換し、同時にrEGF（アース製薬より提供）を100ng/ml，10ng/ml，1ng/mlの濃度で添加した。また無酸素負荷はViblsreth、Heftiらの方法[2]に準じて24 wellをanoxic chamberに入れ95%N_2 5%CO_2で満たし、４時間の無酸素状態を保つことにより行った。実験系として以下の９系を組んだ。

(1)cortex neuronを用いてAraC非存在下にrEGFを添加し５日間培養した系
(2)cortex neuronを用いてAraC非存在下に無酸素負荷後rEGFを添加し５日間培養した系
(3)cortex neuronを用いてAraC非存在下にrEGFを添加し３日間培養後、無酸素負荷をかけさらに２日間培養した系
(4)cortex neuronを用いてAraC(1μM)存在下にrEGFを添加し５日間培養した系
(5)cortex neuronを用いてAraC(1μM)存在下に無酸素負荷後rEGFを添加し５日間培養した系
(6)cortex neuronを用いてAraC(1μM)存在下にrEGFを添加し３日間培養後、無酸素負荷をかけさらに２日間培養した系
(7)telencepharon neuronを用いてAraC(3μM)存在下にrEGFを添加し５日間培養した系
(8)telencepharon neuronを用いてAraC(3μM)存在下に無酸素負荷後rEGFを添加し５日間培養した系
(9)telencepharon neuronを用いてAraC(3μM)存在下にrEGFを添加し３日間培養後、無酸素負荷をかけさらに２日間培養した系

それぞれの系の実験終了後２%Paraformaldehydeで細胞を固定し，位相差顕微鏡でニューロンとアストロサイトを計数した。ニューロンは明るい核を持ち100μm以上の長い突起を持つものを算定した。

【結果及び考察】

１．(1),(2),(3)の実験系について（図１）
(1)群においては10ng/mlの濃度で明らかなニューロンの生存延長効果がみられた。(3)群ではrEGF無添加の場合生存するニューロンの数は(1)群の10分の1以下に低下したが，rEGFを添加することにより容量依存的にこの無酸素性神経細胞傷害を改善することができた。しかし、rEGF添加に先だって無酸素負荷を行った(2)群ではニューロンの数は半減したがrEGFに対する容量依存曲線は両群の中間に位置していた。rEGFを添加することによりアストロサイトも増加する傾向にある（図２）が、無酸素負荷の有無に関わらずほぼ一定の反応性を示した。

２．(4),(5),(6)の実験系について（図３）
アストロサイトを介した神経栄養効果を除外するためにAraCを添加したこれらの系でもほぼ同様の所見を得ることができた。しかし、その効果はAraC非存在下の場合ほど明らかではなく、とくに(6)群では明らかにrEGFによる無酸素性神経細胞傷害の改善効果は低下していた。これらの事実からrEGFの無酸素性細胞傷害に対する改善効果はニューロンに対する直接的な効果とアストロサイトを介した間接的な効果の両方があることが示唆された。しかしアス

トロサイトを介した効果が単にアストロサイトの物理的な作用でないことは、アストロサイトが無酸素負荷に反応しないこと（図２）や、rEGFに対しそれ自身集合して増加する傾向にあり、アストロサイトの存在していない部分でも無酸素負荷に抵抗してニューロンが生存している（図５）ことからも明らかである。

３．(7),(8),(9)の実験系について（図４）

telencepharonのneuronを用いたこれらの群では無酸素負荷による神経細胞傷害は大脳皮質のニューロンほど明らかではなかったが、rEGFの容量依存曲線は(4),(5),(6)の系と近似していた。Morrisonらの報告ではtelencephalonのニューロンでAraC存在下にEGFの神経栄養効果があったと報告されており[2]、またその根拠としてtelencepharonに免疫組織化学でEGFが多く検出されたとの報告[3)4)5)]を引用している。しかし一方では大脳皮質や海馬のニューロンにEGF受容体が多く存在しているとの報告[6]もあり、この結果からすれば今回大脳皮質ニューロンで、rEGFの神経栄養効果が認められたことは妥当と考えられる。またtelencepharonのニューロンが無酸素負荷に対して大脳皮質ニューロンよりも抵抗性を持つことはニューロンの種類による差として興味深い。

【謝辞】本研究の一部は文部省科学研究費補助金の援助によりなされた。

【文献】

1.Morrison R.S. et al., Science 238, 72 (1987)
2.Viblsreth S. et al., Brain Res. 422, 303 (1987)
3.Fallon J.H. et al., Science 224, 1107 (1984)
4.Seroogy K.B. et al., Anat. Rec. 211, 173A (1985)
5.Lakshmanan J.et al., J. Neurochem. 46, 1081 (1986)
6.Werner M.H. et al., J. Histchem. Cytochem. 36, 81 (1988)

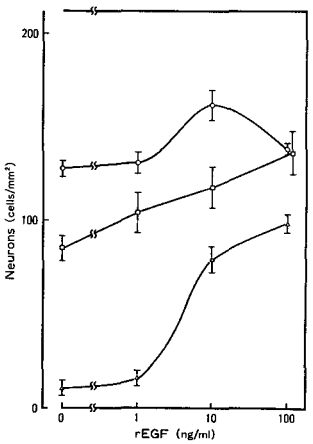


図１(1),(2),(3)の実験系
(cortex neuron)について
○→(1)
□→(2)
△→(3)

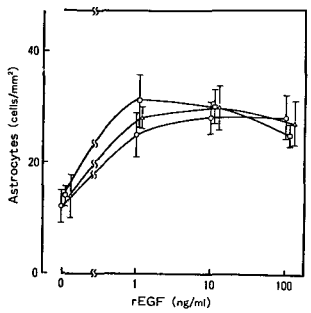


図２(1),(2),(3)の実験系
(cortex astrocyte)
について
○→(1)
□→(2)
△→(3)

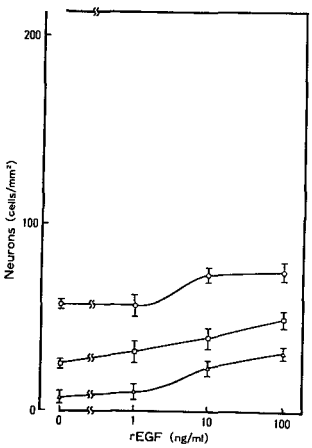


図３(4),(5),(6)の実験系
(cortex neuron)について
○→(4)
□→(5)
△→(6)

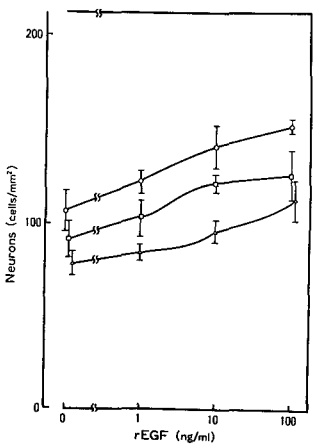


図４(7),(8),(9)の実験系
(telencepharon neuron)
について
○→(7)
□→(8)
△→(9)

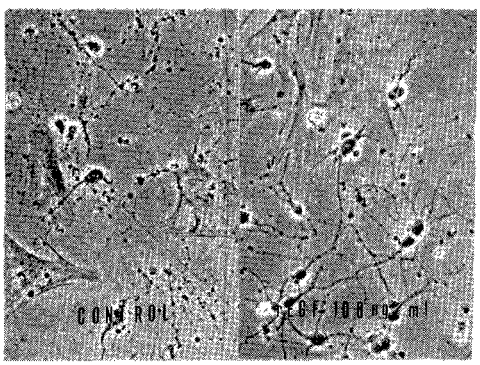


図５cortex neuron & astrocyteの実体顕微鏡像(×100)
アストロサイトは集合して増加する傾向にあり、
アストロサイトの存在していない部分でもニューロンが生存している。

79　脳虚血周囲組織に出現する神経栄養因子の部分精製

山田和雄，早川　徹，片岡和夫，木下　章，
莚井　武，松本勝美，岡崎宏司*，最上平太郎
（大阪大・医・脳外，大塚製薬・徳島研*）

〔要約〕

脳虚血周囲組織には神経栄養活性が存在することを明らかにするとともに，活性物質の部分精製を試みた．ラットの中大脳動脈を閉塞して局所脳虚血を作成し，12日後に虚血巣周囲および対側の大脳皮質をサンプリングした．これをホモジネートし超遠心した上清を粗抽出液とした．虚血側から得た粗抽出液には胎生第17日の大脳皮質より得た初代培養ニューロンの生存を維持する作用がみられた．粗抽出液を硫安で分画すると，30%以下の飽和分画でこの活性が認められた．そこでこの分画をSuperose12カラムでゲル濾過すると67kD付近に神経栄養活性を持つ部分が同定できた．この活性は虚血巣周囲の大脳皮質からえた抽出液にのみ認められ，対側皮質の抽出液には認められないことから，虚血性脳損傷によって生成が促進された栄養因子であることが示唆された．

ラットの中大脳動脈を閉塞後1-2週間すると，虚血側の視床ニューロンは虚血による軸索損傷により逆行性変性に陥るが，同側の大脳皮質のニューロンは同じように虚血性軸索損傷を受けるにもかかわらず生存し続ける（図1）．このような軸索損傷による逆行性変性は中隔野のコリナージックニューロンにおいてすでに明らかにされており，NGFを脳室内投与することによって逆行性変性が防止できるとも報告されている[1,2]．したがって，虚血性軸索損傷によって逆行性変性に陥らない虚血周囲の皮質ニューロンにもある種の神経栄養因子が働いている可能性が示唆される．これを胎仔大脳ニューロンの初代培養系を用いて明らかにするとともに，この栄養因子の部分精製を試みた．

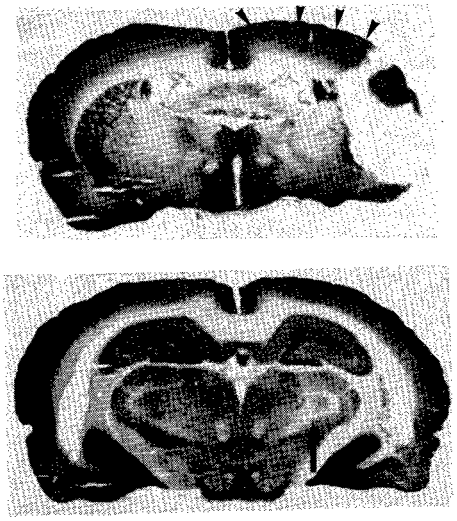


図1　ラット中大脳動脈閉塞による局所脳虚血モデル
虚血3カ月後にコハク酸脱水素酵素の組織化学的染色を行うと，虚血周囲の大脳皮質（矢頭）では染色性に左右差がみられず，ニューロンが生存し続けることが示されたが，同側の視床（矢印）には萎縮がみられた．HRPの逆行性ラベリングにおいてはこの大脳皮質と視床ニューロンはいずれも虚血による軸索損傷を受けていることが明かとなっている．

【実験方法】

大脳ニューロンの初代培養

胎生第17日のラット大脳半球（おもに大脳皮質）より得た神経細胞をメッシュを通して単細胞化し，2.1 x 10^4cells/cm^2となるように24 wellにseedingし，10%FCS添加MEM培地で培養した．24時間後に無血清培地(DME/F12,N1)と交換し培地の4分の1量の脳組織抽出液やその部分精製したものを加え，さらに3日間培養した後固定し，100 μm以上の突起を持つ細胞数を計測した．

脳組織抽出液の作成とその部分精製

ラットの中大脳動脈をTamuraらの方法で閉塞し[3]，大脳皮質と尾状被殻に虚血巣を作成した．12日後に脳を取り出し，図1の矢頭に示す範囲の虚血周囲皮質と対側の皮質をサンプリングした．これに10倍量のDME/F12を加えてホモジネートし，100,000g 90分間超遠心(TL100, Beckman)した後，その上澄を粗抽出液とした．これを30%以下，30-60%，60-90%飽和の硫安分画に分け，PD-10カラム(Pharmacia)で硫安を除いたのち，活性の認められる30%以下の飽和分画につ

いてPBSで溶解し,武井，畠中らの方法[4]に準じて Superose 12を用いたカラムでゲル濾過を行った．PBSで溶出した1 mlごとのフラクションを0.22μmのフィルターで濾過滅菌し，無血清培地に1/4容の割合で添加した．各フラクションの蛋白量はBradford法で測定した．

【結果と考察】

虚血巣周囲の大脳皮質の粗抽出液には胎仔皮質ニューロンの生存維持を促進する作用が認められたが，対側大脳皮質から得た抽出液にはこのような作用は認められなかった（図2）．この生存維持作用は5μg/mlの蛋白濃度の時に最も強く認められ，25μg/mlではむしろその効果は減少した．これは生存抑制因子が混在した結果であることが示唆されたが[5]，このような抑制因子を除外するため硫安分画を行った．その結果30%飽和以下の分画において培養ニューロンの生存維持効果を認めたが，30-60%飽和の分画においては生存維持効果は明かではなかった．このことから硫安の30%以下の飽和分画に活性部分が存在することが示唆されたので，この分画をsuperose12でゲル濾過すると，67K付近に神経栄養活性をもつ部分が同定された（図3）．また対側皮質の抽出液を同様に処理したがこのような栄養活性のピークはみられなかった．これらの事実から脳虚血巣周囲の大脳皮質には皮質ニューロンの生存維持を促進する活性物質が認められ，67K前後の分子量を持つことが示唆された．この物質は従来報告されている外傷後の組織修復因子[4,5]とはやや異なった性質を示し，虚血巣周囲の大脳皮質にのみ存在し，対側には認められないことから虚血性損傷によって生成が促進された神経栄養因子である可能性がある．このような因子が虚血性軸索損傷をうけた大脳皮質ニューロンの逆行性変性を防止していることも考えられ，虚血性脳損傷を最小限にくいとめ，修復を促進する働きを持つことが示唆される．

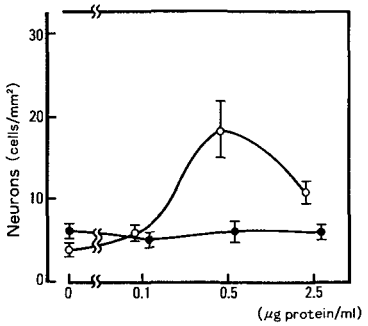


図2 脳皮質粗抽出液の生存維持効果

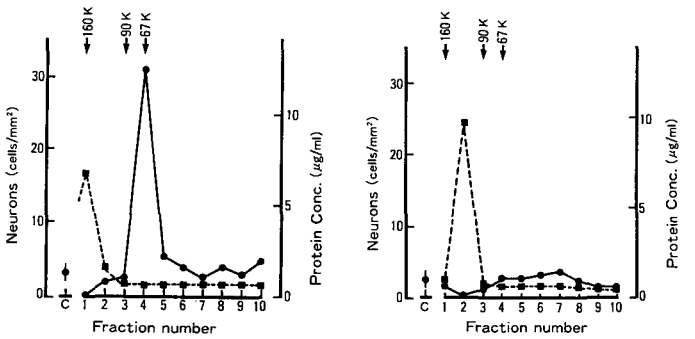


図3 Superose 12ゲル濾過による神経栄養因子の部分精製
ラット大脳皮質(n=5)より得た粗抽出液の30%以下硫安飽和分画を，Superose 12を充填したミニガラスカラム(0.8 x 15 cm)を用いてゲル濾過した．溶出にはPBSを用い，各フラクション1 mlづつ採取した．これを滅菌し0.125mlを培地0.5mlに添加し3日間培養した．実線は生存ニューロン数を，破線は各フラクションの蛋白濃度を示す．蛋白はNo.1ないし2のフラクションに多量に存在するが，他のフラクションには微量に存在するのみである．しかしながら虚血側の大脳皮質においては67k付近に培養ニューロンの生存促進効果をもつ分画が存在し，対側の大脳皮質にはこのような分画が存在しない．分子量のマーカーとして，牛血清アルブミン(67k)，人トランスフェリン(90k),牛血清γグロブリン(160k)を用いた．

【謝辞】本研究の一部は文部省科学研究費補助金の援助によりなされた．

【文献】

1. Varon, S., et al., Prog. Brain Res., 71, 191-201 (1987)
2. Hefti, F., J. Neurosci., 6, 2155-2162 (1986)
3. Tamura, A., et al., J. Cereb. Blood Flow Metabol., 1, 53-60 (1981)
4. 武井延之，他，神経化学 26, 208-210 (1987)
5. Manthorpe, M., et al., Brain Res., 267, 47-56, (1983)

80 軸索細胞骨格の動態：安定型ポリマーとダイナミック型ポリマー

田代朋子・小宮義璋
（東京大学医学部脳研究施設生化学部門）

〔要約〕 ラット脊髄前角L_3-L_5にL-[^{35}S] メチオニンを注入し、1-4 週後に坐骨神経内を輸送される標識細胞骨格蛋白の速度及び溶解度分布を調べた。

1.チューブリンは、低温Triton可溶性分画と不溶性分画の双方に分布する。不溶性分画は、Ca^{2+}その他の脱重合剤に耐性を示す安定重合相である。時間経過とともに、1.5mm/日の速度をもつ主ピークが拡がり、約 2倍の速度で移動する新たなピークが分離・出現する。このピークでは、主ピークに比して可溶性チューブリンの割合が高い。

2.アクチンも同様に可溶性、不溶性両分画に存在する。移動するアクチンの先端および二つのピークの位置はチューブリンのそれとよく一致するが、アクチンの方が溶解度が高く、より速いピークに属する部分が多い。

3.NF蛋白はほとんど不溶性でかつ遅い速度成分に限局している。

軸索細胞骨格は形態維持とともに細胞体からの高分子供給過程である軸索内輸送機構に中心的な役割を果たしている。細胞骨格蛋白自体も1日数mmの速度をもつ遅い軸索内輸送で運ばれているので、細胞体部分に標識アミノ酸を注入し、合成された標識蛋白の移動を解析することにより、我々は軸索細胞骨格の動態や成分間の相互作用を明らかにしてきた (6,7)。今回、これらの分析に加え、溶解性に基づいて標識蛋白を分画することにより、各々の細胞骨格成分に安定型ポリマーとモノマーと平衡にあるダイナミック型ポリマーとの二つの重合相が存在し、後者が主な輸送型であることを示す結果を得たので報告する。これまで、微小管－NFネットワークとアクチンを含む構造という二つの異る構造体の流れであるとされてきた遅い軸索内輸送の二つの速度成分(ｸﾞﾙｰﾌﾟIV または SCbとｸﾞﾙｰﾌﾟV または SCa; ref.2,4) は、これら二相の存在を反映するものと考えられる。

＜方法＞

ラット(7週令、雄) の脊髄前角L_3-L_5 に L-[^{35}S]メチオニン50μCi(0.2μlx2)を注入し、1-4 週後に坐骨神経を摘出して6mm の連続切片にした。各切片を凍結破砕後、1% Triton、50mM Tris(pH 7.5)、25 mM KCl、10mM $MgCl_2$、5mM EGTA、5mMβ-ﾒﾙｶﾌﾟﾄｴﾀﾉｰﾙ を含む抽出液でホモジェナイズし、1M蔗糖－0.4M蔗糖から成る不連続密度勾配に重層して67,000g、2時間遠心し、可溶性分画(S)、ミエリン分画(M)、不溶性分画(P) を得た。BioBeads SM-2 樹脂で S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、NF蛋白、アクチンを各々切り出して、Soluene 350 で溶出し、放射活性を計測した。

＜結果と考察＞

<u>安定重合型とダイナミック型微小管</u>： S、M、Pの各分画は、固有の蛋白組成を示す。NF蛋白は大部分P分画に集中し、チューブリンとアクチンは三分画に分布している。チューブリンの50-70%は不溶性分画(M+P) に含まれるが、これは低温のみでなく、Ca^{2+}その他の微小管脱重合剤に耐性を示し、軸索内で形態的に観察されている微小管の短い安定化フラグメント(1,5) に相当すると考えられる。

低温可溶性分画(S) と不溶性分画(M+P) に含まれるチューブリンの移動を各々プロットしたのが図1である。時間の経過に伴い、可溶性分画では、主ピークの拡がりとこれより生ずる新たな速いピークが観察される。視神経を用いた実験から遅い軸索内輸送の二つの速度成分(ｸﾞﾙｰﾌﾟIV またはSCb とｸﾞﾙ

-ブV またはSCa)が定義されており、主ピークはグループV に、新たに形成される速いピークはグループIVに対応すると考えられる。不溶性分画でも、時間とともに主ピークの拡がりがみられる。1,2 週で移動するチューブリンの先端部、及び、その後分離するグループIVピークでは可溶性チューブリンが多く、可溶性／不溶性の比が1.4-2.7 であるのに対し、主ピークでは0.5-0.9 である。

輸送されるアクチン及びNF蛋白の溶解度：

チューブリン同様アクチンも低温Triton可溶性と不溶性の両分画に分布する。輸送速度でみると、グループIVに属する部分がアクチンの場合にはより多く、二相性が顕著である。どの時点においても移動するアクチンの先端及び二つのピークの位置はチューブリンのそれとよく一致している。グループIVとグループV の分離が完了する標識 3週後の時点におけるアクチンとチューブリンの分布を図 2に示す。この時点でアクチンの43% とチューブリンの29% がグループIVに、アクチンの41% とチューブリンの58% がグループV に属している。可溶性／不溶性比はグループIVアクチンで 2.9、グループV アクチンで 1.5となり、グループIVの溶解度が高い。

NF蛋白については、可溶性分画には微量の高分子量サブユニット(NF-H)が検出されるのみで、グループIVに属する部分は存在しない。然しながら、メチオニンでなくリン酸ラベルを用いた場合にはグループIVに相当する速度成分が検出されることから(3)、NF 蛋白にも少量ではあるが溶解度が高く速度の速い成分が存在することが示唆される。

以上のように、細胞骨格蛋白は、安定型重合相（低温Triton不溶性）及び重合－脱重合平衡にあるダイナミック相（可溶性）の二つの存在形態をとる。これら二つの型の分子構造とその相互変換機構の解明は、細胞骨格構造の調節機構を明らかにし、神経の発芽・成長・再生などの過程を理解する上で重要な手がかりを与えるものと考えられる。

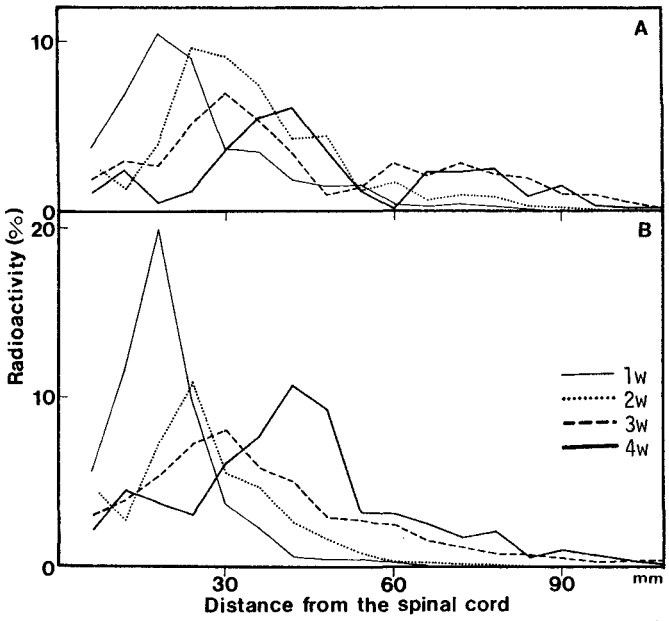


図.1 低温Triton可溶性(A) および不溶性(B) チューブリンの軸索内輸送。

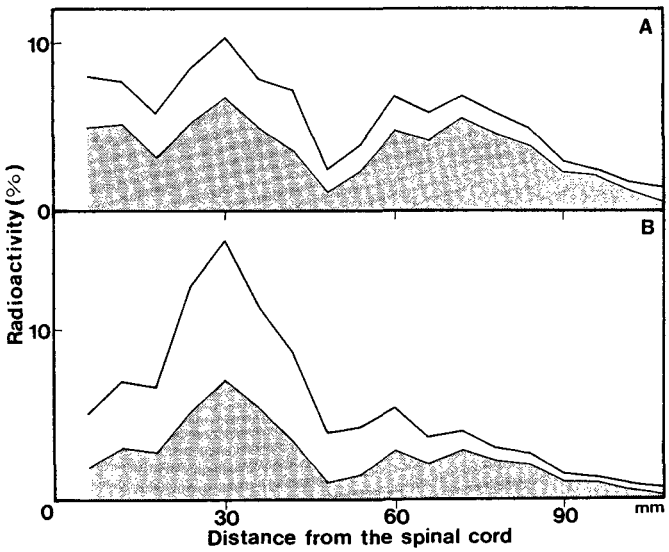


図.2 放射標識 3週後におけるアクチン(A) とチューブリン(B) の軸索内分布。 ▨ ：低温Triton可溶性分画、 □ ：低温Triton不溶性分画

文献：

(1) Baas,P.W. & Heidemann,S.R. (1986) J. Cell Biol., 103, 917-927 (2) Black,M.M. & Lasek,R.J. (1980) J. Cell Biol., 86, 616-623 (3) Komiya,Y., Tashiro,T. & Kurokawa,M. (1986) Biomed. Res., 7, 359-363 (4) Levine,J. & Willard,M. (1980) Brain Res., 194, 137-154 (5) Sahenk,Z. & Brady,S.T. (1987) Cell Motil. Cytoskel., 8, 155-164 (6) Tashiro,T. & Komiya,Y. (1987) in Axonal Transport, (R.S.Smith & M.A.Bisby, eds.), pp. 201-221, Alan R. Liss Inc., New York (7) Tashiro,T., Kurokawa,M. & Komiya,Y. (1984) J. Neurochem., 43, 1220-1225

81

Taxolを用いた軸索内細胞骨格蛋白輸送の分析

小宮義璋・田代朋子

（東京大学医学部脳研究施設生化学部門）

〔要約〕ラット坐骨神経鞘内にTaxol を注入し，軸索内細胞骨格蛋白の輸送に対する影響を調べた。

1.Taxol はチューブリン及びアクチンの輸送をほぼ完全に阻害するが，ニューロフィラメント蛋白の輸送には影響を与えない。

2.Taxol は速い軸索内輸送を阻害しない。

3.Taxol の注入部位に蓄積するチューブリンは大部分脱重合相と動的平衡状態にあるダイナミック型重合相である。

4.アクチンの輸送阻害は速やかに回復するが，チューブリンのそれは回復に長時間を要する。

Taxol は最初抗腫瘍作用を有する植物成分として得られた(13)が，その後in vitroにおけるチューブリンの重合を促進し，Ca^{2+}，低温或はコルヒチン等の脱重合剤による微小管の脱重合を防ぐ作用が見出された(1,2,4,7,10-12)。培養神経細胞に投与すると，細胞質内に大量の微小管が出現することが観察され(5,6)，また in vivoでラットの坐骨神経鞘内に注入すると，注入部位の軸索内及びSchwann 細胞の細胞質内に微小管が蓄積する(8,9)。この所見からチューブリンの軸索内輸送がなんらかの影響を受けると考えられた。そこでラットの坐骨神経を用いてその神経鞘内にTaxol を注入し，放射標識した軸索内蛋白の輸送に対する効果を見た(3)。

〈材料と方法〉

7週齢雄ラットの第4腰髄神経節或は第3～5腰髄前角部を[^{35}S]-メチオニンで標識した。その直後或は一定時間後に10% ジメチルスルフォキシドに1 mMに溶かしたTaxol 0.2 μl を大腿中央部坐骨神経鞘内に2回注入した。注入後1～7週間で坐骨神経を取り出し，電気泳動により標識軸索蛋白の輸送を分析した。

軸索内細胞骨格蛋白の分画は液体窒素で凍結した軸索小片をエアーハンマーで破砕し，1% Triton X-100 を含む緩衝液でホモジェナイズした後，0.25 M蔗糖を含む同じ緩衝液に重層して遠心し，可溶性画分と不溶性画分とを得た。

〈結果〉

1.遅い軸索内輸送に対するTaxol の効果：神経鞘内に注入したTaxol はチューブリン及びアクチンの輸送をほぼ完全に阻害する（図1)が，ニューロフィラメントの輸送は全く影響を受けない（図2)。

2.速い軸索内輸送に対するTaxol の効果：速い輸送に対してTaxol は阻害効果を示さない。しかしTaxol の注入1 ～3 週後では注入部の近位側に少量ではあるが有意の放射活性の蓄積が見られる。これは大量に形成された微小管による二次的な通過障害であろう。

3.Taxol 注入部位に蓄積する微小管の性質：軸索内の細胞骨格蛋白には低温でTriton処理することにより安定型重合相と，脱重合相と動的な平衡状態にあるダイナミック型重合相とが区別される。Taxol 注入部位に蓄積する微小管蛋白は大部分がダイナミック型重合相であり，同様にこの部位のアクチンも安定型重合相は僅かである。

4.Taxol による効果の持続性：Taxol 注入部位におけるチューブリンの蓄積はおよそ数週間以上にわたって観察される。この間に安定型重合相への移行は見られない。一方アクチンの蓄積は短期間のうちに見られなくなる。

〈考察〉

Taxol による微小管の蓄積は注入部位へ次から次へと輸送されてくる脱重合相にあるチューブリンがTaxol の影響で強制的に重合し，しかも重合した状態では輸送され得ないため，その部位に長期間留まることによりおこると考えられる。アクチンの蓄積機構はチューブリンのそれとはやや異なり重合相にある微小管との相互作用を通じて短期間そこに留まるのではないかと思われる。チューブリンと同様にアクチンの輸送もTaxol の影響を強く受けることは，軸索の中で両者が従来考えていたよりもはるかに密接な関連性を有していることを示唆しているのであろう。以上の結果はニューロフィラメントを含む軸索内細胞骨格蛋白は常に重合・脱重合をくりかえしている平衡状態にあり，脱重合した状態でのみ輸送されるという我々の仮説を強く支持すると考えられる。

〈参考文献〉

1. De Brabander, M. et al. : Proc. NAS., 78: 5608(1981). 2. Hamel, E. et al. : J. Biol. Chem., 256:11887(1981). 3. Komiya, Y. & Tashiro, T. : Cell Motil. Cytoskel., in press (1988). 4. Kumar, N. : J. Biol. Chem., 256: 10453(1981). 5. Masurovsky, E. B. et al. : Brain Res., 217:392(1981). 6. Masurovsky, E. B. et al. : Neuroscience, 10:491(1983). 7. Parness, J. & Horwitz, S. B. : J. Cell Biol., 91:479(1981). 8. Röytta, M. et al. : J. Neurocytol., 13:685(1984). 9. Röytta, M. & Raine C. S. : J. Neurocytol., 14:157(1985). 10. Schiff, P. B. et al. : Nature, 277:665(1979). 11. Schiff, P. B. & Horwitz, S. B. : Proc. Nas., 77:1561(1980). 12. Schiff, P. B. & Horwitz, S. B. : Biochemistry, 20:3247(1981). 13. Wani, M. C. et al. : J. Amer. Chem. Soc., 93:2325 (1971).

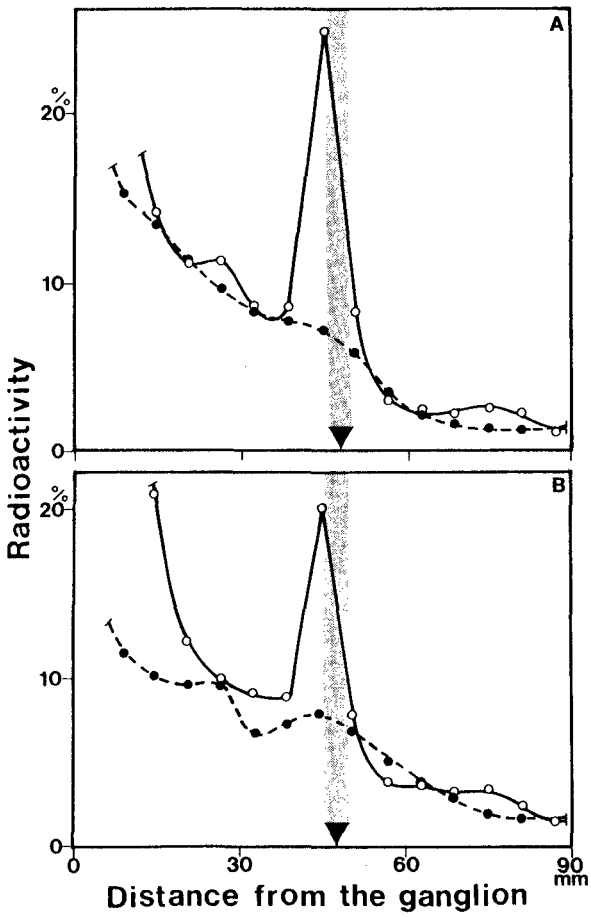


図１．Taxol によるチューブリン及びアクチンの輸送阻害．
A:チューブリン．B:アクチン．　実線:Taxol処理神経，破線:対照神経．Taxol 注入部位は陰影で示す．

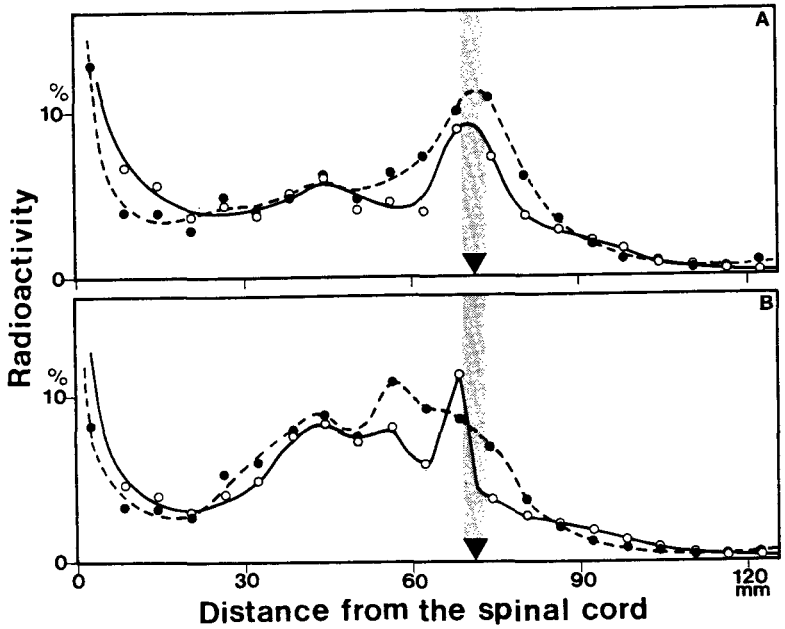


図２．Taxol の ニューロフィラメント輸送に対する影響．
A:ニューロフィラメント，B:チューブリン．
実線:Taxol処理神経．破線:対照神経．Taxol 注入部位は陰影で示す．

82　大脳皮質アデニレートシクラーゼ系ＧＴＰ－結合蛋白質に及ぼすエタノールの影響

八田愼一、大鹿英世、高畑直彦*、斉藤利和*
（札幌医科大学・薬理、神経精神医学*）

〔要約〕　エタノール（EtOH）の、アデニレートシクラーゼ（ＡＣ）系ＧＴＰ－結合蛋白質（Ｇｓ、Ｇｉ）に対する影響について、ラット大脳膜標品を用いたin vitroの系で検討した。ＡＣ活性は ^{32}P-ATPを基質として、EtOHの存在および非存在下で測定した。EtOH（100、250、500 mM）を処置した際、EtOHの濃度に伴って　GppNHp（10^{-8}～10^{-4} M）刺激性ＡＣ活性の増強が観られた。Hanes-Woolf plotによって解析した、ＡＣのGppNHpに対するＥＣ$_{50}$値はEtOHによって低下し、またVmax 値も上昇した。GppNHpによる forskolin（100 μM）　刺激性ＡＣ活性の抑制について検討した結果、GppNHpによる抑制様式で、EtOHによる著しい変化はなかったが、Hanes-Woolf plotによって解析したＡＣ活性の50%抑制に必要なGppNHpの濃度はEtOHの処置によって減少した。^{32}P-NAD とコレラ毒素あるいは百日咳毒素を用いたＡＤＰ－リボシル化反応では、EtOHによる見かけ上の変化はなかった。これらの結果から、ラット大脳皮質においてEtOHはＧｓ、Ｇｉの両方に影響していることが示唆された。

【目的】　我々はこれまでにマウス大脳皮質(3、4)およびヒト血小板（5)を用いて、ＡＣ系へのEtOHの影響について検討し、EtOHの主作用点が促進性ＧＴＰ－結合蛋白質（Ｇｓ）であり、EtOHはＧｓの活性化を促進して cAMP の生成を増強していることを報告した。一方、ＡＣ活性は抑制性ＧＴＰ－結合蛋白質（Ｇｉ）によっても調節されていることが知られているが、ヒト血小板（5)ではEtOHによるＧｉ機能の変化は観察されなかった。しかしながら、EtOHのＧｉに対する影響についてはまだ不明な点が多く残されており、今回、我々はこの点についてさらに検討を加えた。

【方法】　実験には雄性 Wistar 系ラットおよび C57BL/6系マウスを用いた。大脳皮質膜は以下の方法によって調製した。動物を断頭後、大脳皮質を切り出し、2 mM Tris-HCl(pH 7.4)/ 2 mM EGTA溶液中でホモジナイズ後、遠沈分離し、粗膜分画を調製した。ＡＣ活性はEtOHの存在および非存在下で、^{32}P-ATP を基質として用い、先に報告した方法（1)を一部改変して測定した。ＡＣ活性の変化は Hanes-Woolf plot によって解析した。

【結果】　ラット大脳皮質膜標品をEtOH（100、250、500 mM）で処理（30 ℃、10 分間）した際、対照と比較して、EtOH濃度の増加に伴った、basal ＡＣ活性の上昇と10^{-8}～10^{-4} MのGppNHpによる活性刺激の増強が観られた(Fig.1)。GppNHpによるＡＣ活性の変化をHanes-Woolf plotによって解析した結果、EtOH処理群で、GppNHpに対するＥＣ$_{50}$の低下とVmax の上昇が認められた（Table 1)。 さらにMn（20 mM）で刺激した際のＡＣ活性値でもEtOH処理による増強が観察された（EtOH 0 mM、ＡＣ活性515.8 pmol/mg protein/min; 100 mM、557.2; 250 mM、653.1; 500 mM、717.1）。しかしながら、EtOH処理によるＡＣ活性の増加率では、basal よりもGppNHp存在下での方が低かった（結果は提示していない）。さらに forskolin刺激性ＡＣ活性の、GppNHpによる抑制反応を検討した結果、抑制様式で EtOH による著しい変化はなかった(Fig. 2)が、Hanes-Woolf plotで求めた“50%抑制に必要な

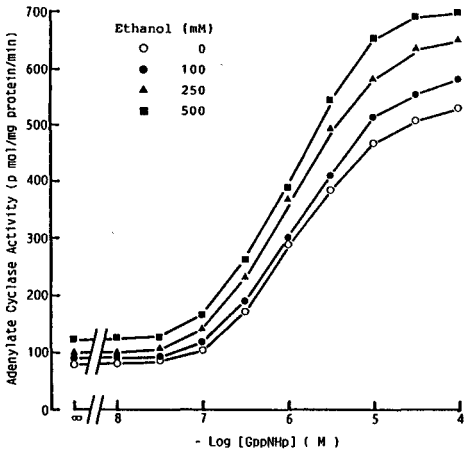


Fig. 1　Effect of ethanol on GppNHp-stimulated adenylate cyclase activity in rat cerebral cortical membranes.

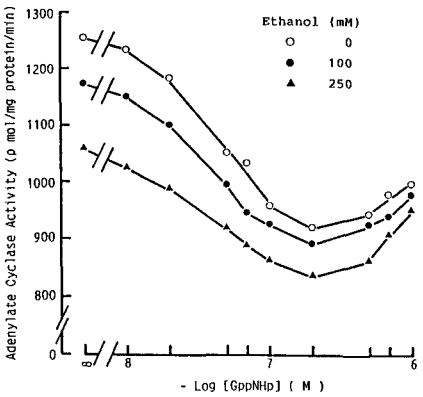


Fig. 2 Effect of ethanol on GppNHp inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in rat cerebral cortical membranes.

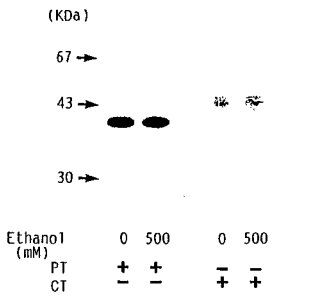


Fig. 3 Pertussis toxin- and cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation of rat cerebral cortical membranes.

Table 1
Effects of Ethanol on EC_{50} and Vmax for GppNHp

Ethanol (mM)	EC_{50}(uM)	Vmax
0	1.55±0.04	462.4±32.4
100	1.31±0.10*	483.0±93.4
250	1.17±0.06**	576.0±22.2*
500	1.04±0.01**	586.0±66.2

*, **: P<0.05, P<0.01 vs Ethanol 0 mM

Table 2
The Concentration of GppNHp required for Half-maximal Inhibition of AC

Ethanol (mM)	"$GppNHp_{50}$" (nM)
0	76.92±3.17
100	52.16±6.65**
250	36.27±6.33**
500	27.01±1.44**

**: P<0.01 vs Ethanol 0 mM

GppNHpの濃度”はEtOH処理群での低下が観察された（Table 2)。しかし、EtOHによるこの効果はマウス大脳膜標品では観察されなかった（結果は提示していない）。ラット大脳膜標品での、百日咳毒素あるいはコレラ毒素と ^{32}P-NADを用いたＡＤＰ－リボシル化反応では、EtOHによる見かけ上の変化はなかった(Fig. 3)。

【考察】 中枢神経系のノルアドレナリン性受容体－ＡＣ系情報伝達機構の変化が、EtOHによる身体依存の形成に関与していることをMelchior et al. は示唆した（2)。我々もこれまでにマウス大脳皮質膜標品を用いて、EtOHの中枢ＡＣ系での主作用点はＧｓで、EtOHは急性期にはＧｓと、ＡＣの触媒部位（Ｃ）の活性化を生じる(3、4)が、慢性期では逆にＧｓの機能低下をもたらす（6)ことを報告し、これらの事はヒト血小板を用いた実験結果でも一致していた(5、7)。今回のラット大脳皮質膜標品を用いたin vitroの系での結果でも、GppNHp刺激性、およびMn刺激性ＡＣ活性のEtOHによる増強が観察され、先に報告したマウスでの場合と同様に、EtOHによるＧｓおよびＣの活性化が示唆された。

ＡＣ活性の調節にはＧｉも関与していることが知られている。今回の実験では forskolin刺激性ＡＣ活性の、GppNHpによる抑制反応からＧｉ機能を検討したが、マウス大脳皮質膜標品ではＧｉ機能のEtOHによる変化は観られなかった。一方、ラットでは50%抑制に必要なGppNHpの濃度でEtOHによる低下が観察され、EtOHはＧｉの機能を活性化していることが推測された。

これらの結果から、エタノールは大脳皮質ＡＣ系のＧｓとＧｉの両方の機能に影響を与える可能性が示された。ラットとマウスでのＧｉ機能に関するエタノールの効果の違いが、どのような要因によるのか現時点では明かでなく、動物種間でのエタノールに対する感受性の違いなどとの関連性も含めて、さらに検討が必要である。

【文献】 (1) Hatta, S., Marcus, M.M., and Rasenick, M.M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5439-5443 (2) Melchior, C.L. and Tabakoff, B. (1981) J. Pharmacol. Exp. Ther. 219, 175-180 (3) Saito, T., Lee, J.M., and Tabakoff, B. (1985) J. Neurochem. 44, 1037-1044 (4) Saito, T., Lee, J.M., Hoffman, P.L., and Tabakoff, B. (1987) J. Neurochem. 48, 1817-1822 (5) Saito, T., Ozawa, H., Tsuchiya, F., Ishizawa, H., and Tabakoff, B. (1987) in Adv. Biomed. Alc. Res. (Kiianmaa, K. ed.) pp 761-765, Pergamon Press (6) Saito, T., Luthin, G.R., Lee, J.M., Hoffman, P.L., and Tabakoff, B. (1987) Japan. J. Pharmacol. 43, 133-141 (7) 土屋文明、白坂知信、池田官司、八田優子、渡辺正行、斉藤利和 (1987)アルコール研究と薬物依存 22, 366-372

83 ラット脳神経終末標品の glutathione S-transferases について
－ドーパミン結合蛋白との同一性－

○ 都 築 紀 宏、後 藤 香 糸 子
（名古屋市大・医・生化・共同研）

〔要約〕

ラット脳より得た神経終末標品の可溶性分画にはglutathione S-transferase(GST)活性が見られたので、神経細胞由来のGSTとして性質を調べた。酸性：中性分子種はほぼ6：4の割で検出されたが、ligandin-typeの塩基性分子は殆ど見られなかった。活性の至適pHは6.5-7.0に有り、bilirubin, ethacrynic acid, desoxycholateで阻害された。Lipid peroxidesに対するGSH-peroxidase活性は(肝GSTと異なり)観察されなかった。Glutathione-affinity columnを用いて分離すると酵素はほぼ単一になり、Ybに相当するsubunitsを示した。Ya-subunitに相当する成分は見出されなかった。交感神経節と同一起源の副腎髄質の可溶性分画にもGST活性は認められたので、これらの結果から判断すると神経細胞にもGSTは存在すると思われる。また演者が依然報告した神経終末のドーパミン結合性蛋白は酸性GSTs(の一部)と同一の可能性が示された。

［序］ Glutathione S-transferases(GSTs)は殊に肝臓のcytosolに多く含まれ、発癌物質などxenobioticsや代謝産物のelectrophilicな場所にglutathione(GSH)を導入する酵素で、解毒機構に関与している。またepoxidesにもGSHを導入できるので、leukotrieneの生合成や過酸化脂質の処理にも関係している。分子量は約45,000で２個のsubunitsから成り、酸性、塩基性、中性の分子種が見られる。Ya(Mr=22,000)、Yb(23,000)、Yc(25,000)の3種類のsubunitsがある。他方、肝cytosolにはheme, bilirubinなどと良く結合するligandin(Mr=45,0000)と呼ばれる塩基性蛋白質が含まれるが、現在ではligandinと塩基性GSTsとは同一物であることが判明している。また一般に肝GSTは、本来のGST活性の外にGSH-peroxidase活性を持つことが知られている。

［目的］ 脳組織のGSTはglia系細胞に分布し、神経細胞には見られないと報告されている(1,2)。しかし、我々は最近ラット脳の神経終末cytosolに強いGST活性を見出したので、神経細胞由来のGSTとしてその性質を調べた。

［材料と方法］ 神経終末cytosol：雄Wistar rat脳より得た粗ミトコン分画をPercoll or sucrose gradient遠心に掛け終末標品を調製した。この標品を低張処理しその10^5g遠心上清を神経終末cytosolとして酵素源に用いた。牛副腎髄質cytosol：4倍量の0.32 M sucrose中で髄質をhomogenizeしその10^5g遠心上清を用いた。 酵素活性：1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)とGSHの抱合反応を340nmで測定した。 GSH-affinity column： epoxy-activated Sepharose 6BとGSHの結合はSimons & Vander Jagt(3)に従った。過酸化脂質：linoleic acid peroxideはsoybean lipoxidaseを用いて合成した。

［結果］ 神経終末cytosolの50-70%硫安飽和分画にはほぼ全GST活性が含まれ Sephadex G-75でゲル濾過すると、活性はovalbumin(M.W.45,000)の溶出場所に現われた。活性分画を集めpH 7.4でDEAE-Toyopearlに掛けると約60%は吸着され、40%は素通りした。吸着成分を0-0.3 M KClでstepwiseに溶出すると、3-4の活性ピークが得られた(Fig.1)。素通り分画はpH 7.0でCM-celluloseにも吸着せず、この分画の酵素は中性と思われた。よって神経終末には酸性と中性酵素がほぼ6：4の比で含まれ、ligandin様の塩基性分子種は見られなかった。 至適pH：酸性酵素はpH 6.5に、中性酵素はpH 7.0に最大活性を持つ。活性阻害： 肝GSTはbilirubinで阻害される。神経終末GSTもbilirubin、ethacrynic acid、deoxycholateで阻害されたが(Table I)、linoleate & cumene peroxidesに対する

GSH-peroxidase活性は見られなかった。GSH-affinity column: DEAE溶出分画の比活性は低く夾雑蛋白も有ったので、各分画をGSH-affinity column(1.3x12 cm)に通し 吸着成分を10 mM GSH /10mM Tris-HCl, pH 9.0で溶出した。活性が20倍程上昇した酸性分画IIのelution patternを示す(Fig.2)。SDS-PAGE：これら酵素のsubunits組成を12%SDS-PAGEで分析すると、酸性分子種ではMr=24,000の主成分の他に 23,000と26,500のsubunitsが少量見られた。中性分子では23,000のsubunitのみが検出された(Fig.3)。また既知の様に脳にはYa(22,000)に相当するsubunitは見られなかった。

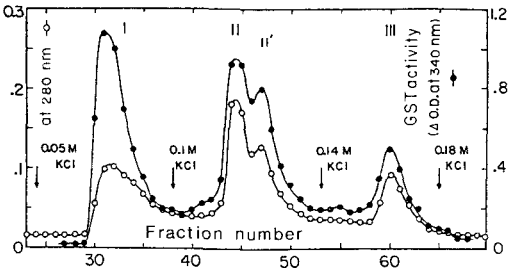


Fig.1. Chromatography on DEAE-Toyopearl, w/ 10 mM Na-phosphate, pH 7.4, and 0-0.3 M KCl. 4.5 ml fractions.

Whole brain GST： whole brain cytosolを同様にゲル濾過すると、void volumeとovalbumin溶出相当の2ヶ所に酵素活性が見られた。ovalb. peakについては終末GSTとほぼ同じ属性を示したが、void vol.のGSTは総て酸性種で、Mr=26,500のsubunitのみを示した。

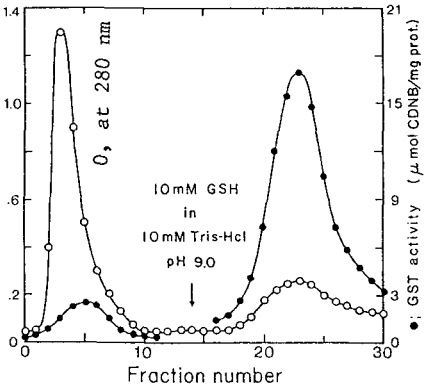


Fig.2. Elution pattern of fract. II + II' from GSH-affinity column.

牛副腎髄質のGST活性： 副腎髄質クロマフィン細胞は本来交感神経節後神経細胞であり、この細胞にGSTが含まれるか否か調べた。牛副腎髄質の0.32 Mショ糖homogenate上清には0.12 μM CDNB/min/mg protのGST活性が見られた。 ドーパミン(DA)の結合： 我々はラット脳神経終末cytosolにDAとよく結合する分子量約45,000の酸性蛋白を見出し、その生理機能を調べてきた(4)。この蛋白に結合したDA (Km=9.1-10 μM)はMAOの作用を受け難く(MAOのDAに対するKm=0.1-1.0 mM)、Ca^{2+}の作用で蛋白から遊離する。今回の実験で酸性GSTsもDAをよく結合する事が示され、上のDA結合性蛋白は酸性GSTと同一と思われるに到った。

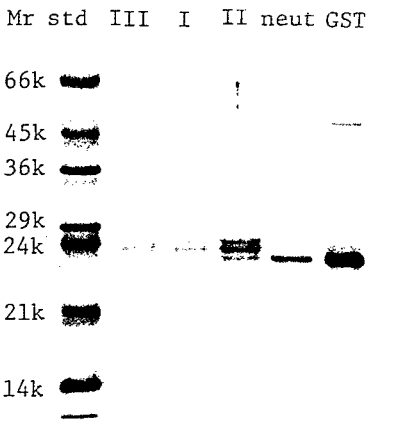


Fig.3. 12% SDS-PAGE of GSTs. std, MW standards; I-III, acidic GSTs; neut, neutral one; GST, commercial enzyme w/ Mr=23,000;

[考察] 神経細胞にもGSTが存在する可能性を示したが、subunitsはYbに相当する成分(Mr=23,000 & 24,000)が多く見られた。神経終末には肝GST(Yb)抗体では免疫染色されないGSTsが在る可能性を示唆している。脳GSTはlipid peroxideに対してGSH-peroxidase活性を示さなかったので、過酸化物処理には関与していないかも知れない。GSTはこの他に、ミトコンドリアからミクロソームへのhemeの運搬(5)、bilirubinによるミトコンドリアの呼吸阻害の抑制(6)などの働きが報告されている。今回神経終末ではカテコールアミンの貯蔵、放出及びreuptake機構にも関与している可能性が得られた。

Table I. Inhibition of synaptosomal GSTs.

GSTs	Control activity μmolCDNB/mg/min	Residual activity(%) bilirub. 45μM	ethac.acid 10μM	DOC 2mM
I	0.76	51	40	67
II + II'	0.45	63	50	70
III	0.31	64	55	--
Neutral	1.74	57	41	63

References

1) Asaoka,K. & Takahashi,K.(1983) J. Biochem. 94, 1191-1199. 2) Senjo,M. & Ishibashi,T. (1985) Biomed. Res. 6, 433-436. 3) Simons,P.C. & Vander Jagt,D.L.(1977) Anal. Biochem. 82, 334-341. 4) Tsudzuki,T.(1983) J. Biochem. 93, 599-606. 5) Senjo,M., Ishibashi,T., & Imai,Y.(1985) J. Biol. Chem. 260, 9191-9196. 6) Kamisaka,K., Gatmaitan,Z., Moore,C.L., & Arias,I.M.(1975) Pediat. Res. 9, 903-905.

84 ラット脳から精製された4-Aminobutyraldehydeを酸化する酵素の性質と鶏胚発生に伴う同酵素の動態について

阿部俊夫、高田耕司、大川　清、朝倉　正、松田　誠
（慈恵医大・医化学）

〔要約〕ラットなどに投与した4-Aminobutyraldehyde（ABAL）は、脳でGABAに酸化される。この反応を触媒する酵素を各種クロマトグラフィーを用いラット脳から精製したところ、等電点5～6間でわずかに異なるpIを有する3種類の画分標品（11A、21A、31A）を得た。21AはABALに対する基質特異性が高いが、11AはABALよりもsuccinate semialdehydeを、31AはABALよりもacetaldehydeやbutyraldehyde等を効率よく酸化する。ゲル濾過とSDS-PAGEの結果から、3種とも分子量40k subunitの4量体からなるMr150～170k蛋白質であると示唆された。21Aを抗原に用いて兎で作成したポリクローナル抗体は、Western blotで3標品のMr40k bandと結合する。また、同方法でラット、マウスおよび鶏各脳粗抽出物のMr40k成分のみが検出された。鶏10日胚から孵化後5日にかけてABALを酸化する酵素の単位蛋白質あたりの活性は上昇し、Western blotで検出されるMr40k成分も同様の傾向を示した。以上から、ラット、マウス、鶏の脳には、よく似たABALを酸化する酵素が存在し、これが中枢神経系の発生や機能に何等かの役割を担っているのではないかと考えている。

［目的］4-Aminobutyraldehyde（ABAL）は、血液脳関門を通過し脳でGABAに代謝されるpro-drugとして注目される（1-3）。ABALを酸化しGABAを生成する酵素としては、ラット脳からABALに対する基質特異性が高いと思われる成分が粗精製されている（4）が、その性質の詳細は不明である。本研究では、この酵素を精製し諸性質を明らかにするとともに、精製標品に対する抗体も利用して、鶏中枢神経系の発生に伴う本酵素の動態に関する知見を得ることを目的とした。

［方法］

①精製：ラット脳600gを50mMリン酸カリウム緩衝液（K-PB），1mM mercaptoethanol（ME）pH7.0で抽出し、60%飽和硫安分画にした後、5mM K-PB pH7.0，1mM MEで平衡化したDE52カラム（内径25x長300-400mm）を用い0～0.2M KClのgradient溶出で分画した。活性画分は、30mM Histidine-HCl pH6.5，1mM MEに平衡化したPBE94カラム（10x500mm）と9倍希釈Polybuffer-HCl pH6.5，1mM MEを用いたchromatofocusing（CF）で精製した。3種のCF精製画分に対しては、Sephacryl S300（16x1040mm）やHPLCのG3000SW（7.5x600mm）を用い、50mM K-PB，250mM NaCl pH6.7-7.0，0-1mM MEの溶出液でゲル濾過を行なった。

②活性測定：精製標品の分析の際、ABALや他のアルデヒドを酸化する酵素の活性は、2mM 基質，2.5mM NAD，0-50mM ME，100mM K-PB pH8.0，37℃の条件下で、A_{340}の経時変化が示すNADH生成量から求めた。

③密度勾配等電点電気泳動：15x200mmのガラスカラムに、5～50% sucrose，2.5% Pharmalyte 3-10，1mM MEの泳動用緩衝液と60% sucrose，40mM H_3PO_4および20mM triethylamineの電極液を用い4℃で3日間400-900V通電し行なった。

④分子量見積：未変性分子の分子量はG3000SWでの保持容量を用いて、また、MEで還元した試料の分子量はSDS-PAGE（5）でのRf値を用い、各々を標準蛋白質の較正直線にあてはめることで求めた。SDS-PAGEではbandの検出に銀染色を用いた。

⑤抗体作成：精製標品21Aを抗原に用いリンパ節免疫法（6）で兎から抗血清を得た。初回免疫に抗原0.05mgを投与し、その後、0.025-0.1mgを用いた追加免疫を1ケ月おきに3回繰返した。

⑥Western blot：MEで還元した試料のSDS-PAGEをimmunoblot（7）で分析した。一次抗体は100倍希釈で用いた。

⑦鶏脳粗抽出液の活性測定：全脳の10%ホモジネートを5mM K-PB pH7.2で調製し粗抽出液とした。［1,4-^{14}C］-Putrescineから、diamine oxidaseを用い^{14}C-ABALを合成し、その1μmol（1μCi）と0.4ml粗抽出液を37℃，30min反応させた。酵素により^{14}C-ABALから生成された^{14}C-GABAをDowex50（Na^+型）を用いたクロマトで分離後定量することで、活性を求めた（8,9）。

［結果と考察］

ラット脳の60%飽和硫安分画（A1A）をDE52のカラムクロマトで分画し活性分画（AD1A）を得た。AD1Aを密度勾配等電点電気泳動で分析すると活性がpH5～6に集中する（Fig.1）。そこで、CFを用いpI 5～6間の成分の分離を試みた。その結果、わずかに等電点の異なる3分画を得た（Fig.2のa,b,c）。これらをSephacryl S-300のゲル濾過後、より塩基性のpIをもつものから順に、11A、21A、31Aと名付けた。A1Aに対して各標品の活性精製率は14-64倍、総活性回収率は約2%となった（Table 1）。このような精製効率の低さは、CFの過程で試料の一部が失活したためと思われる。21AはABALに対する基質特異性が高いが、11AはABALよりもsuccinate semialdehydeを、31Aはacetaldehydeやbutyraldehydeなどをより効率よく酸化した（Fig.3）。G3000SWの溶出結果（Fig.4：21Aのみ図示）から、3標品の活性成分はMr150～170kであると見積もられた。一方、各標品は、SDS-PAGEでいずれも主にMr40k bandを示した（Fig.5）。この結果、精製標品（特に21A）が比較的高純度であることと、それらの主成分がMr40k subunitの4量体からなることが示された。ラットやヒトの脳・肝のアルデヒド類の脱水素酵素もこのような4量体構造をとるが、分子量は精製標品のものと一致しない（10,11,12）。21Aを抗原に用い作成したポリクローナル

抗体は、Western blotによる分析で3標品全てのMr40k成分と結合した（Fig.6）。この抗体は3標品を識別しないと思われる。また、本抗体は、ラット、マウス、鶏胚の各脳粗抽出液においてもMr40k成分のみを検出した（Fig.6）。

鶏10日胚から孵化後5日にかけて、ABALを酸化しGABAを生成する酵素活性（単位蛋白質あたり）は、孵化日数を追って上昇した（Fig.7）。同様の検討を前述のWestern blotで行なったところ、先の抗体で検出されるMr40k bandは孵化の経過とともに濃発色し、抗体認識成分の量が発生に伴い増加することが示された（Fig.6）。

以上精製標品の諸性質とその抗体を用いた検討から、ABALを酸化する酵素は既知の脱水素酵素とは異なるものであり、マウスや鶏の脳にもラットのものと似た成分が存在することが明らかとなった。また、鶏胚発生の際にこの成分が酵素活性と平行して増加することから、中枢神経系の発生や機能にABALを酸化する酵素が何等かの役割を担っているのではないかと考えている。これらを十分に検討するため、本酵素と抗体認識成分との関係について分析を進めている。

［文献］

1. Sugahara, M. (1983) J. Biochem., 93: 1337-1342.
2. Sugahara, M. et al. (1983) J. Neurochem., 40: 294-296.
3. Sugahara, M. et al. (1984) Jikeikai Med. J., 31: 1-6.
4. Tago, K. et al. (1982) J. Neurochem., 39: 803-809.
5. Lugtenberg, B. et al. (1975) FEBS Lett., 58: 254-258.
6. Goudie, R. B. et al. (1966) Lancet, ii: 1224-1226.
7. Towbin, H. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350-4354.
8. Yamada, H. et al. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun., 29: 723-727.
9. Asakura, T. et al. (1987) Jikeikai Med. J., 35: 23-31.
10. Senior, D. J. et al. (1988) Arch. Biochem. Biophys., 262: 221-220.
11. Ryzlak, M. T. et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 255: 409-418.
12. Forte-McRobbie, C. M. et al. (1986) J. Biol. Chem., 261: 2156-2163.

Table 1

Fraction	protein (mg)	relative activity (nmol/min/mg)	total activity (nmol/min)
A1A	8270	0.546	4520
AD1A	140	14.0	1950
11A	2.60	7.79	20.3
21A	1.05	34.7	36.4
31A	2.82	10.9	30.7

Fig.1

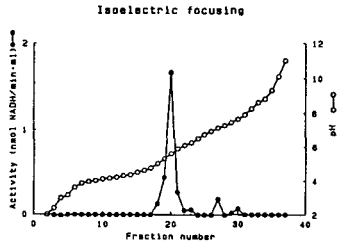


Fig.2

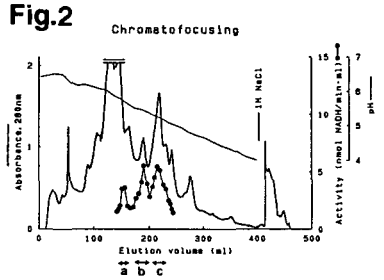
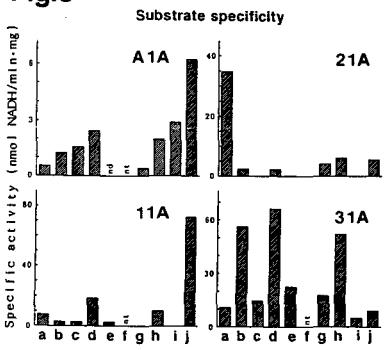


Fig.3



a:ABAL; b:acetaldehyde; c:benzaldehyde; d:butyraldehyde; e:glyceraldehyde-3-phosphate; f:imidazole acetaldehyde; g:indole-3-acetaldehyde; h:propionaldehyde; i:Δ¹-pyrroline-5-carboxylate; j:succinate semialdehyde
(nd:not detectable; nt:not tested)

Fig.4

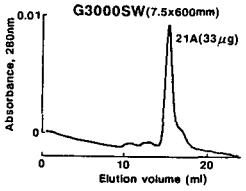


Fig.7

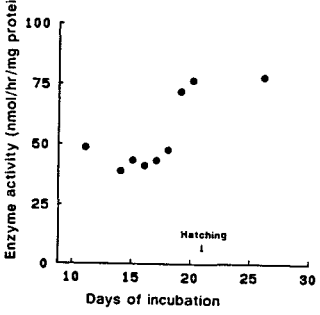
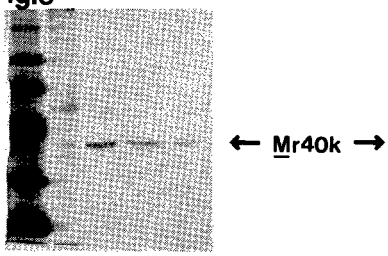
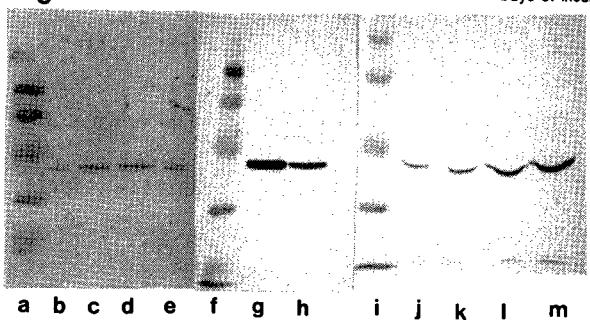


Fig.5



a: marker proteins
b: A1A (16 ug)
c: 11A (1 ug)
d: 21A (1 ug)
e: 31A (1 ug)

Fig.6



a,f,i: marker proteins; b: A1A (16 ug); c: 11A (1 ug); d: 21A (1 ug); e: 31A (1 ug); g: rat (12 ug protein); h: mouse (160 ug p.); j: 8 days chick embryo (50 ug p.); k: 11 days chick embryo (50 ug p.); l: 18 days chick embryo (50 ug p.); m: 5 days-old chick (50 ug p.)

85 実験的神経原線維変化を生じた家兎脳における Cathepsin Dの酵素学的検討

鈴木英夫、武田雅俊、中村　祐、多田國利、播口之朗、西村　健
大阪大学医学部精神医学教室

〔要約〕

大脳実質内にアルミニウム(Al)を注入し実験的神経原線維変化(ENFC)を生じた家兎脳と対照脳からcathepsin Dを精製し酵素学的に検討した（以下それぞれの 脳 cathepsin Dを "control" "ENFC" と略す)。"control"と比較して"ENFC" ではhomogenate extractではspecific activityが約27%上昇していたが、精製酵素のspecific activityは約14%の活性低下していた。heat stability pattern はlinear("control") biphasic ("ENFC") であった。分子量、至適pH、Km値では著しい差異はなかった。ENFCを生じた家兎脳ではAlにより酵素蛋白合成は賦活化されるが、Alによる何らかの障害によりnormally active enzymeではなくpartially active enzyme がつくられると考えられ、細胞骨格代謝に重要な働きをする cathepsin Dが質的に変化するため正常細胞骨格代謝が効率良く進まずに遅延し、ENFCとして蓄積する可能性が示唆された。

アルツハイマー病では自然発生的な実験モデルが得られないため、家兎脳内にAl塩を注入して得られる実験的神経原線維変化(ENFC)が神経原線維変化(NFC)の実験モデルとして用いられている。我々はこのモデル動物を用いて、脳内lysosome酵素の変化について、とくにcathepsin D 活性の組織蛋白当りの上昇を報告[4]した。cathepsin D は中枢神経内蛋白の正常代謝や病的変化に関与するといわれ、とりわけ neurofilament[5] microtuble, GFA などの細胞骨格は良い基質となりうる。以前から、neurofilamentはENFCの構成成分とされており[2]、細胞骨格蛋白代謝に関与するcathepsin DがENFC形成に何らかの役割を果たすと考えられる。今回、ENFCを形成する家兎脳cathepsin D の特徴を酵素学的に検討した。

（方法）

1）実験的神経原線維変化(ENFC)の作製：成熟家兎の大脳実質内にHolt's adjuvant 0.25mlを注入し(対照脳には生食)、約10日後に失調状態となった家兎の脳脊髄を摘出した。ENFCは光顕および電顕観察にて確認した。

2）Enzyme assay ：cathepsin D活性は山本らの変法[6]に従って、buffered hemoglobin (1.25% w/v in 0.2M acetate buffer,pH3.1) を基質として測定した。１Ｕは1分間当り1μgのチロシンの遊離と定義した。

3）脳 cathepsin D の精製：Benuckらの方法[1]に従いpepstatinをligandとするaffinity chromatographyによって精製した。

4）Heat stability of cathepsin D：46°C の加温条件で行った。

（結果）

1）脳 cathepsin D の精製(Table 1,2)：精製蛋白当りの活性は "ENFC" cathepsin D は "control" cathepsin D よりも14% 低下していた。

2）分子量：SDS-PAGE によって検討した。"control" "ENFC" cathepsin D ともに約43Kであった(Fig-1)。

3）至適pH："control" "ENFC" cathepsin D ともにpH3.1であった。

4）基質濃度の影響(Kmの決定)：pH3.1で測定した酵素活性に対する基質濃度の影響を Fig2-A に示す。Lineweaver-Burk plot(Fig2-B) から、1.7mg/ml("control")、1.9mg/ml("ENFC") と計算された。

5）Heat stability :Fig 3 に示す如くheat stability pattern は linear ("control"), biphasic ("ENFC") であった。

（考察）

neurofilament は ENFC の構成成分であると以前からいわれている[2]が、ENFCの蓄積がみられることと、neurofilamentを分解するcathepsin Dの組織蛋白当り約27%の活性上昇は一見相反するものである。測定にcrude homogenate extract を用いたので、この活性の上昇が酵素量の増加なのか、altered enzymeの出現によるものかがはっきりとしない。そこでこのことを明らかにするために、脳 cathepsin Dを精製し酵素学

的に検討したところ、"control"と比較して "ENFC" cathepsin Dでは酵素蛋白当り約14%の活性低下がみられた。分子量、至適pH、Km では著しい差異はなかった。これらのこととheat stability でみられた "ENFC" cathepsin D の biphasic patternからAlにより酵素蛋白合成は賦活化されるが、Alによる何らかの障害により normally active enzymeではなく partially active enzyme がつくられると考えられる。老化に伴って normally active enzymeではなく partially active enzyme が出現するという報告は多い[3)]。今回我々の得た成績は、Alの老化に及ぼす影響が示唆され興味深い。Alによる何らかの障害とは、糖鎖のリン酸化などのprocessing における障害などが考えられるが今後の検討課題である。以上のように細胞骨格代謝に重要な働きをするcathepsin Dが実験的神経原線維変化のみられる家兎ではAlにより質的に変化するため正常細胞骨格代謝が効率良く進まずに遅延し、ENFCとして蓄積するのではないかと推測している。

(文献)

1)Benuck,M.et al.(1977) Brain Res.143,181-185. 2)Crapper,D.R. et al.(1973) Science,80,511-513. 3)Rothstein M.(1977) Mech. Ageing Develop. 6,241-257. 4)Suzuki,H.et al.(1988) Neurosci. Lett. 89, 234-239. 5)Suzuki,H.et al.(1988) Neurosci. Lett. 89,240-245. 6)Yamamoto,K.et al.(1978) Eur.J. Biochem. 92,499-508.

(図表)

Table 1 Purification of cathepsin D from control rabbit brain

Purification steps	*Total protein (mg)*	*Total enzyme activity (units)*	*Specific activity (units/mg protein)*	*Yield (%)*	*Fold (−fold)*
1. Homogenate	8594	6288	0.73	100	1
2. Supernatant	770	3488	4.5	55	6.2
3. 35%—70% $(NH_4)_2SO_4$	79	1110	14.0	18	19.2
4. Agarose-pepstatin	0.3	490	1630	7.8	2230

Table 2 Purification of cathepsin D from rabbit brain with ENFC

Purification steps	*Total protein (mg)*	*Total enzyme activity (units)*	*Specific activity (units/mg protein)*	*Yield (%)*	*Fold (−fold)*
1. Homogenate	8757	8173	0.93	100	1
2. Supernatant	784	4413	5.6	54	6.0
3. 35%—70% $(NH_4)_2SO_4$	95	1570	16.5	19	17.7
4. Agarose-pepstatin	0.36	516	1430	6.3	1540

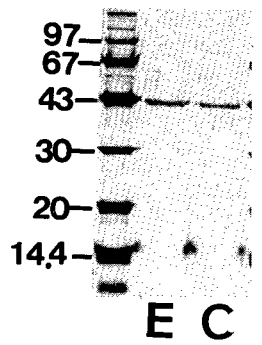


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. The gel was visualized with silver staining. C: "control" , E: "ENFC"

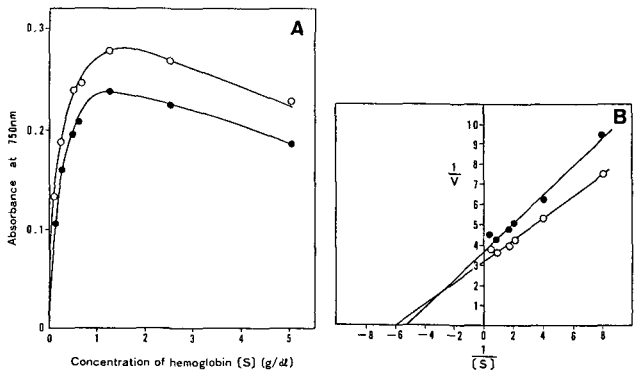


Fig. 2. Effect of substrate concentration on the enzyme activity. (A) Effect of concentration of hemoglobin on the enzyme activity; (B) Lineweaver-Burk plots for the hydrolysis of hemoglobin by the enzyme, which were determined by employing substrate concentrations up to 2.5%. ○: "control" , ●: "ENFC"

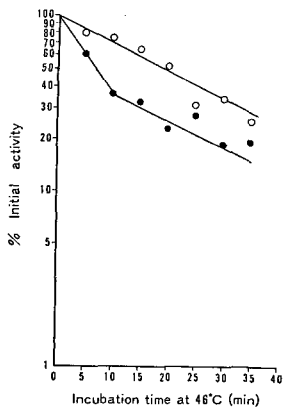


Fig. 3. Heat stability at 46°C. ○: "control" , ●: "ENFC"

86　ラット脳ホスホリパーゼDによるホスファチジルエタノールの産生とホスホリパーゼDの脳内分布

小林睦博*、武富　保**、 J,N,Kanfer***
（信州大学老年科*、脂質生化学**, マニトバ大学生化学***）

〔要約〕

ラット脳シナプトソーム分画を用い、そのホスホリパーゼD（PL-D）のホスファチジル転移活性により、エタノール存在下でホスファチジルエタノール（Peth）が産生されることを証明した。Peth産生には特定の活性化因子の存在が必要で、不飽和脂肪酸が特に有効であった。オレイン酸のその最大活性化能を発揮する濃度は、基質であるホスファチジルコリン（PC）の濃度と共に変化した。種々の界面活性剤は、不飽和脂肪酸に比し、非常に弱い活性化能しか示さず、また、Peth産生は2価イオン非要求性であった。リン脂質の中でPCが最も有効な基質であった。ラット脳細胞分画ではシナプス膜分画が最大活性を有し、種々の組織の12,000xg－100,000xg顆粒分画では心、肺、脂肪組織が脳と同様の高活性を有していた。PL-Dのラット脳の各部位でのPC分解活性を測定した。海馬が最大活性を有し、小脳で最も低い活性を示した。

［目的］

エタノール投与時に、ラットの腎、脳その他の組織に正常では検出されない酸性リン脂質であるPethが産生されることが近年報告された（1）。このPethが、PL-Dのホスファチジル転移活性により産生されうることを、ラット脳シナプトソーム分画を用い検討した。

また、PL-D活性はその加水分解活性により、PCから、コリンを産生するが、このコリンがアセチルコリン合成の基質になりうることが近年証明された（2）。我々はラット脳の各部位でのPL-D活性を測定した。

［実験方法］

標準Pethの合成

標準PethはDawsonの方法（3）の変法を用い、キャベツのPL-Dと卵黄レシチンから合成した。インキュベーション後、Folchらの方法（4）で脂質を抽出し、ケイ酸カラムで2度精製した。

Peth産生の標準アッセイ法

[^{14}C] Peth産生は、最終濃度2.5mM [14C]-PC（2-[^{14}C] oleoyl-PC）（1.67Ci／mol）；50mM β-ジメチルグルタル酸緩衝液（pH6.5）；10mM EDTA；400mMエタノール及び膜蛋白分画で総量120ul。30 C、90分間のインキュベーション後2mlクロロホルム、1mlメタノールで反応を停止、ホスファチジン酸（PA）及びPethをキャリアーとして加え、その後Folchらの方法（4）で脂質を抽出した。抽出物は、シリカゲル60薄層プレートを用い、クロロホルム／メタノール／アセトン／酢酸／水（50:15:15:10:5 v／v）の溶媒系で分離、ヨード蒸気で脂質を同定後、Peth及びPAの放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。時に抽出脂質は中性脂質分離目的のため、n-ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（70:30:1 v／v）の溶媒で、標準ジグリセリド（DG）及びオレイン酸を用い、分離同定し、その放射活性を測定した。基質として種々のリン脂質を用いた実験ではインキュベーション総量を600ulとし、以後同様の抽出分離操作後、掻き取ったシリカゲル中の無機リン量をBartlettの方法（5）で測定した。

PL-D活性の測定

PL-DのPC水解活性は上記Peth産生測定法のエタノールを除いたアッセイ系でPA産生を測定した。

その他蛋白量　の測定はLowryらの方法（6）でラット脳の切除はGrowinskiとIrvinsonの方法で行った。

［結果］

1）Peth産生は少くなくとも時間的には90分まで、また蛋白量では80μgまで直線的な増加を示した。

２）Peth産生は４００mMのエタノール濃度で最大となり、それより高い濃度では抑制された。Lineweaver-Burkプロットを用い、見かけのエタノールに対するKm値は２００mMでVmaxは８４nmol／mg蛋白／hと計算された。４００mM以下のエタノール濃度では、PethとＰＡとＤＧの総和は変化しなかった。

３）Peth産生はＰＣ濃度依存性に増加したが、その増加はＳ状曲線を示した。Vmaxは８１．９nmol／mg蛋白／hと計算され、上記２）で得られた値と同じであった。

４）Peth産生の至適pHは６．５で２価イオンは活性に不要であった。

５）種々の界面活性剤のうちタウロコール酸のみが軽度の活性化を示したが他は活性化しなかった。

６）種々の脂肪酸のうち、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸が著明な活性化を示した。アラキドン酸による活性化は、他の３つの脂肪酸より低濃度で活性化が最大を示した。

７）pCMPS及びＤＴＮＢなどのＳＨ酸化剤は著明なPeth産生抑制を示したが、ＤＴＴはその抑制を解除した。

８）種々のリン脂質の中で、ＰＣが最も有効な基質であった。

９）ラット脳各分画のPeth産生活性はシナプス膜分画が最大で、ミトコンドリア分画、ミエリン分画及び細胞質分画で非常な低値を示した。

１０）ラットの種々の臓器の１２,０００xg-１００,０００xg顆粒分画でのPeth産生活性測定では、肺、脂肪組織、心、脳が高活性を示し、肝、膵は非常に低活性であった。

１１）ラット脳各切除部分におけるＰＬ-ＤのＰＣ水解活性の測定で、海馬が最も高い活性を示し小脳が最も低い活性を示した。

［考察］

ＰＬ-Ｄは、水解活性とともにホスファチジル転移活性を示す。水解活性によりＰＡとコリンを生じ、ＰＡはさらにＰＡホスファターゼによりＤＧに分解される。ＰＡ及びＤＧはともに細胞応答の刺激伝達機構として重要な役割を持っている。最近、種々の細胞刺激物質がイノシトールリン脂質代謝回転だけでなくＰＣ代謝も促進させ、その少なくとも一部がＰＬ-Ｄによるものであることが示されている（７）。また一方、産生されたコリンが脳ではアセチルコリン合成の基質となりうることも示されている（２）。従ってＰＬ-Ｄは、脳のコリンの貯蔵源と考えられているＰＣからアセチルコリン合成に必要なコリンを供給するのに重要な役割を持っているのかもしれない。ＰＬ-Ｄのホスファチジル転移活性の生理的意義は不明であるが、エタノール投与時にできるPethはエタノールの組織への効果の一部を担っているのかもしれない。またこのホスファチジル転移活性によってできるPethは通常組織に検出されないので、ＰＬ-Ｄ活性の検出に非常に有用と考えられた。

［文献］

１．Alling C.,Gustavsson L.,Anggard E.(1983) ＦＥＢＳ Lett. 152, 24-28.

２．Hattori H., and Kanfer J.N.(1985) J.Neurochem.45, 1578-1584.

３．Dawson R.M.C.(1967) Biochem.J. 102, 205-210.

４．Folch J.,Lees M.,and Sloane-Stanley G.H.(1957) J.Biol.Chem.226, 497-509

５．Bartlett G.R. (1959) J.Biol.Chem. 234, 466-468

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

７．Bocckino S.B.,Blackmore P.F.,Wilson P.B.,and Exton J.H.(1987) J.Biol.Chem.262, 15309-15315

87　モルモット神経組織の細胞核を認識するモノクローナル抗体について

吉村和法・赤川公朗・植村慶一
（埼玉医大・医・第一生理）

〔要約〕脳の遺伝情報の発現の調節に関与する因子を検索する目的で細胞核構成成分のモノクローナル抗体による分析を行った。モルモット脳組織の細胞核画分から0.35M NaCl抽出を行い、その残渣を6MUrea抽出して得た画分を抗原材料として免疫組織化学的に検索し、神経細胞の核を認識する３種のモノクローナル抗体（５Ｅ５、２Ｆ７，７Ｆ１０）を得た。抗体５Ｅ５は心臓、肝臓、腸、腎臓、筋肉などの組織とは反応せず、中枢神経の一部の神経細胞の核にのみ反応した。また免疫電顕の結果からヘテロクロマチンを認識していることが明らかになった。一方、抗体２Ｆ７は神経組織と骨格筋組織の細胞の核膜と特異的な反応を示し、イムノブロット上、分子量６８Ｋの蛋白と反応を示した。抗体７Ｆ１０は検索したすべての組織の細胞核を認識し、イムノブロットの結果より１８Ｋと３６Ｋのヒストン蛋白を認識していることが明らかになった。今後これらの抗体を用いて抗原の分析を進めたい。

（目的）中枢神経組織は高度に分化し、形態学的にも生理学的にも非常に不均一な細胞集団からなっている。この不均一性は各細胞タイプにおいて発現される分子的多様性を反映しており、この分子的多様性は核内での組織特異的な遺伝子発現によるものと考えられる。われわれはモノクローナル抗体法を用いて組織の特異的な因子を含む神経組織の細胞核の細画分を抗原として、モノクローナル抗体作成を試みた。

（実験方法）抗原の調製：モルモット脳から植村ら（5）の方法に従い、粗核画分を得たのち、それを0.35M NaCl,1 mM PMSF,1% DMSO を含む10mM Tris-HCl (pH 7.4) bufferに懸濁したのち、12,000g,10min遠心し、その沈澱を6M Urea を含む10mM Tris-HCl(pH7.4)に懸濁させ、65,000g,1h遠心して組織特異的因子を含むことが予想される上清画分を得て抗原とした。

免疫組織化学：赤川らの方法（1）に従い、免疫組織化学的にモルモットおよびラット脳、その他の組織の凍結切片を用いて神経組織の細胞核に反応する抗体を分泌しているハイブリドーマを検索した。

酵素処理：得られた抗体を用いて凍結切片上、trypsin(17-100units/ml),pronase(5-50ug/ml),DNase-I(0.2-5units/ml),RNase(0.2-5units/ml)等の酵素で室温で、30-60min処理した。

電気泳動とイムノブロット：Laemmli（4）の方法に従い電気泳動後、イムノブロットを行い、蛋白染色はコマジーで、免疫染色は二次抗体としてパーオキシダーゼをもちいた間接抗体法でＤＡＢで発色させた。

免疫電顕：赤川らの方法(2)に従いVector社のＡＢＣキットで染色した。

（結果と考察）図１にモルモット大脳皮質を抗体５Ｅ５で間接蛍光抗体法を用いて染色した像を示した。神経細胞のない第一層には陽性な細胞はみられないが第二層以下の神経細胞を含む層は神経細胞の核が多数染色されており、第五層付近を拡大してみると大型の錐体細胞は染まらず、小型の神経細胞の核の選択的な染色が見られた。核内の斑点状の構造物が染色され、クロマチンと推定された。５Ｅ５が核内に浸透しない可能性も考えられたので、TritonX-100で処理したが結果は同じだったので５Ｅ５は特定の神経細胞群の細胞核を認識してるものと推定される。またモルモット小脳ではすべてのpurkinje細胞と顆粒層の神経細胞の一部の細胞核が強く染色された。また中枢神経以外の組織（表１）では通常濃度の抗体では染まらなかったが、通常の100倍濃度の抗体を用いると肝臓、心臓、腎臓などの他の組織でも弱く染色された。この抗原は神経組織には他の組織と比べて特異的に多量に存在すると推定された。さらに詳細に検討するために免疫電顕をラット小脳について行ったところ、核内のヘテロクロマチン様の構造物を５Ｅ５が認識していることが明らかになった。以上のことから５Ｅ５は特定の神経細胞群の細胞核を認識する抗ヘテロクロマチン抗体であることが示唆された。また凍結切片上で各種の酵素処理を行うとDNaseで抗原性の消失が、またpronaseで抗原性の減少傾向が観察されたが、精製ＤＮＡとは反応を示さなかった。従って抗体５Ｅ５の抗原は蛋白あ

るいはＤＮＡ－蛋白複合体である可能性が示唆された。さらにこの抗原は生後すでに発現されており、５－６週の成熟ラットでピークとなり、２６ヶ月の老齢ラットの神経細胞ではほとんど反応性が消失していた。この結果この抗原は神経細胞の活動性に関与する可能性が推測された。次に抗体２Ｆ７でモルモット大脳皮質を染色した結果、第一層のグリアと思われる細胞の核膜と第二層以下の神経細胞とグリアの核膜が認識され、かつ神経細胞の核膜がグリア細胞の核膜より強く反応した（図２）。また小脳では分子層とpurkinje細胞と顆粒層の細胞の核膜が染まり、しかも顆粒層の細胞の核膜は上記の５Ｅ５と比べて、陽性の細胞の密度が高く、すべての神経細胞の核膜と陽性反応すると推測された。また他の組織中では骨格筋だけが陽性であった（表１）。また２Ｆ７抗体によるウエスタンブロット上では分子量６８Ｋに陽性バンドがみられた。細胞核膜の蛋白としてGeraceら（3）が分子量６７Ｋの ラミンＢを報告しているが、ラミンＢの組織特異性について不明であり、２Ｆ７抗体の抗原とラミンＢの関係について更に詳細な検討が必要である。一方抗体７Ｆ１０は調べた全ての組織の細胞核を認識し（表１）、 ウエスタンブロットで牛胸腺ヒストンの３６Ｋと１８Ｋの蛋白に反応したことから７Ｆ１０は抗ヒストン抗体であることが示された。今後これらの抗体の抗原物質の同定を行うと共に、細胞核の未知の特異分子の検索を進める予定である。

（文献）1)Akagawa,K. and Barnstable,C.J.(1986) Brain Res.,383,110-120 2)Akagawa,K.,Nishimura,Y.,Sakamoto,Y.,Uyemura,K.,Matoh,M. and Barnstable,C.J.(1988)Biomedical Research.,9(2)161-168 3)Gerace,L. and Blobel,G.(1980) Cell.,19,277-287 4)Laemmli,U.K.(1970) Nature.,227,680-685 5)Uyemura,K.,Nakyama,T.,Kitamura,K.,Yamanaka,T. and Hirano,S.(1974) J.Neurochem.,23,65-70

表１

Localization of the nuclear antigens in various tissues of guinea pig and rat

		5E5	2F7	7F10
cerebrum	G	+++[1]	+++[2]	+++[4]
	W	±	+	+++
cerebellum	G	+++	+++	+++
	W	±	+	+++
spinal cord	G	+++	+++	+++
	W	±	+	+++
adrenal medulla		±	−	+++
heart		±[3]	−	+++
liver		±	±	+++
small intestine		±	−	+++
colon		±	−	+++
kidney		±	±	+++
spleen		±	−	+++
ovary		±	−	
muscle		±	+++	+++
antigens		?	68K	18K,36K

G:gray matter W:white matter
1:subpopulation of neurons
2:neurons and glia
3:weakly positive with higher concentration (>100) antibody
4:all cells

図１ モルモット大脳皮質

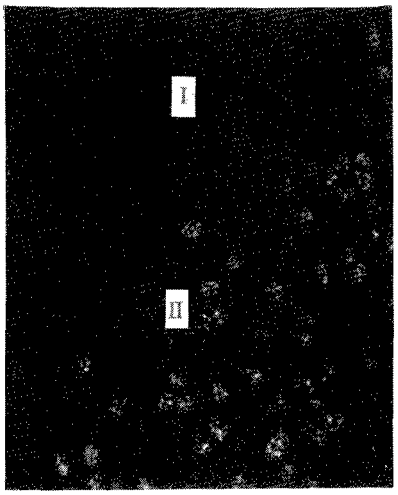


図２ モルモット 大脳皮質

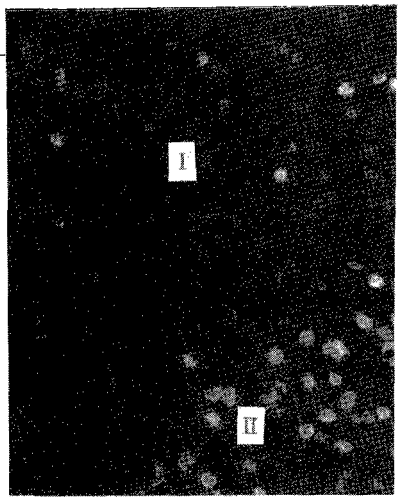


図１： 抗体５Ｅ５による間接蛍光抗体法による染色
Ⅰ：第一層 Ⅱ：第二層 Ｘ１００

図２：抗体２Ｆ７による間接蛍光抗体法による染色
Ⅰ：第一層 Ⅱ：第二層 Ｘ５０

88 Choroid plexus papillomaにおける隣接切片法を用いたtransthyretin陽性細胞の超微構造の検討

国塩勝三、三島宣哉、松久　卓、津野和幸、松海信彦、佐藤　透、松本健五、
古田知久、西本　詮
（岡山大・医・脳外）

〔要約〕

既に我々は、choroid plexus papilloma（ＣＰＰ）および正常脈絡叢が免疫組織化学的にtransthyretin（ＴＴＲ）陽性反応を呈し、ＴＴＲが中枢神経系では脈絡叢およびＣＰＰのマーカーとして有用であると報告した[3]。正常脈絡叢においては、免疫電顕[1]およびin situ hybridization法[2]にてＴＴＲが産生されていることが証明されているが、ＣＰＰではいまだ検討されていない。そこで今回我々は、通常の電顕観察用に包埋された試料のsemithin sectionにおいて免疫染色した光顕用標本と隣接thin sectionの通常電顕標本とを対比検討[4]し、ＣＰＰにおけるＴＴＲ陽性細胞の超微構造の特徴を分析した。その結果ＴＴＲはＣＰＰの細胞質内の分泌顆粒に局在し、粗面小胞体およびゴルジ装置の発達した細胞に陽性反応がみられたことよりＣＰＰにおいてもＴＴＲが産生されている可能性が示唆された。

Key word : transthyretin, choroid plexus papilloma, immunohistochemistry, ultrastructure

【はじめに】　既に我々は昨年の本学会において、正常脈絡叢で産生されているtransthyretin（ＴＴＲ）[1][2]が、choroid plexus papilloma（ＣＰＰ）においても免疫組織化学的に陽性反応を示し、中枢神経系では脈絡叢およびＣＰＰのマーカーとして有用であることを報告した[3]。今回、正常脈絡叢と同様にＣＰＰにおいてもＴＴＲが産生されているのかどうかを検討し、さらにＴＴＲ陽性細胞の超微構造の分析をするため隣接切片法を用いた検索を行なった。

【材料および方法】　対象は、当教室において開頭術により摘出し、組織学的にＣＰＰと診断された44歳、男性例である。手術時に得られた組織を2.5%グルタールアルデヒドで前固定し、1%オスミウム酸で後固定後エポン包埋した。エポン包埋試料より1～2μ切片（semithin section）および隣接切片（thin section）を作製した。ＴＴＲに対する抗体としては、抗プレアルブミンウサギ血清（ＤＡＫＯ）を用いた。Semithin sectionをアルブミン塗布スライドの上にのせ乾燥させ、ＫＯＨ飽和エタノール溶液にて脱エポン後洗浄し、正常ブタ血清で処理した後、抗プレアルブミンウサギ血清を一次抗体とし、ＰＡＰ染色を施行した。ヘマトキシリンで後染色させ、光顕にてＴＴＲ陽性反応を観察した。この陽性細胞を隣接thin section上で捜し、電顕写真撮影し対比観察した。

【結　果】　Semithin sectionでは、抗プレアルブミン血清に特異的な免疫組織化学的陽性反応を認め、正常ウサギ血清による対照染色は陰性であった。ＴＴＲ陽性細胞は散在性にみられ、その細胞内局在は主に細胞質内で大部分塊状ないし顆粒状に認められた（Fig. 1A）。このようなＴＴＲ陽性細胞を電顕で対比、観察するとそれらの多くは細胞質内小器官が発達しており、特に粗面小胞体、ゴルジ装置が豊富であった。さらに分泌顆粒を比較的多く認める細胞では、ＴＴＲ陽性反応はこのような分泌顆粒とほぼ一致してみられた（Fig. 1B,C）。以上の所見より、ＴＴＲ陽性所見は粗面小胞体、ゴルジ装置の発達および細胞内分泌顆粒と相関関係がみられた。

【考　案】　ＴＴＲは主に肝臓で産生されるが、正常脈絡叢においても産生されている。正常脈絡叢上皮細胞においては、免疫電顕にて粗面小胞体およびゴルジ装置に陽性反応がみられること[1]、またin situ hybridization法[2]で

ＴＴＲｍＲＮＡが細胞質内に豊富に存在することなどが証明されており、このことが脈絡叢細胞自体がＴＴＲを産生していることを示している。一方、ＣＰＰでは既に報告した如く免疫組織化学的方法にてＴＴＲ陽性反応を認めてはいる[3]ものの、正常脈絡叢と同様にＴＴＲが産生されているかどうかは、いまだ十分検討されていない。今回の検討により、ＴＴＲがＣＰＰの細胞質内の分泌顆粒に局在すること、さらに粗面小胞体およびゴルジ装置の発達した細胞にＴＴＲ陽性反応が認められたことは、ＣＰＰにおいても正常脈絡叢と同様にＴＴＲが産生されている可能性を示唆するものと考えられた。

【文　献】　1) Aleshire SL et al. (1983) J. Histochem. Cytochem. 31 : 608－612　2) Herbert J et al. (1986) Neurology 36 : 900－911　3) 国塩勝三ら (1987) 第30回日本神経化学会大会論文集26 : 313－315　4) 円谷　勝ら (1983) Neurol. Med. Chir. 23 : 103－108

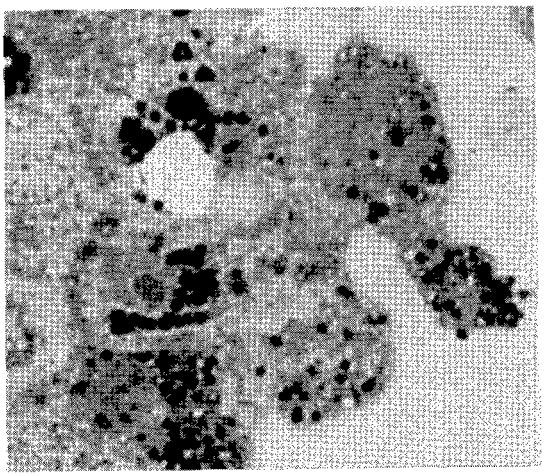


Fig. 1 A : CPP. PAP immunostainig for TTR on a semithin section.

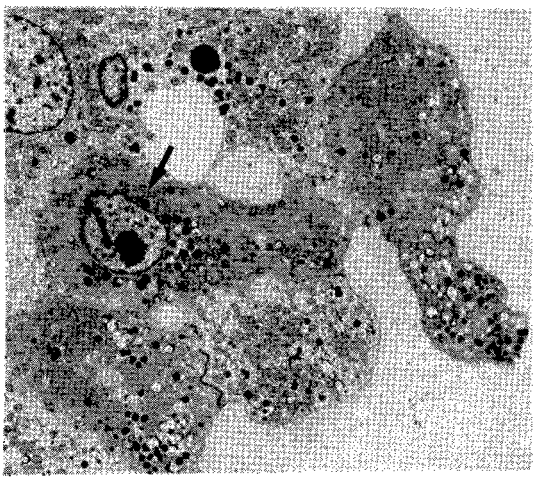


Fig. 1 B : CPP. Electronmicrographs of the adjacent section.

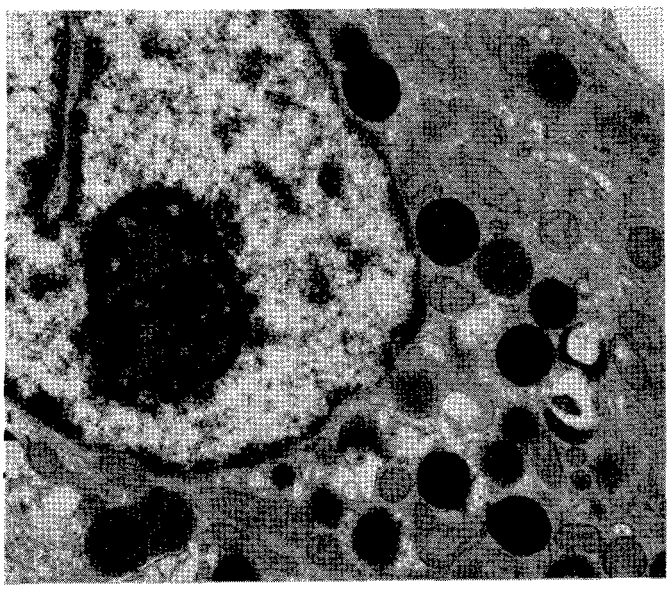


Fig. 1 C : Magnification of the area indicated by an arrow.

89 抗ＤＮＡpolymerase αモノクローナル抗体を用いたヒト脳腫瘍増殖動態の検討

国塩勝三、三島宣哉、松久　卓、津野和幸、松海信彦、佐藤　透、松本健五、
古田知久、西本　詮
（岡山大・医・脳外）

〔要約〕

ヒト脳腫瘍の細胞増殖動態をＤＮＡ polymerase α（Pol. α）に対するモノクローナル抗体[5]を用いて解析した。脳腫瘍培養細胞、ヒト正常脳組織および脳腫瘍生検組織30例を対象にＰＡＰ法による免疫染色を施行した。培養細胞では同調培養法およびbromodeoxyuridine（BrdU）との２重染色を併用した結果、その陽性反応はG_1～Ｓ期には主に核小体を除いた核質に斑紋状にみられ、G_2期には彌慢性に、Ｍ期には細胞質に染色された。対数増殖期における培養細胞ではPol. α陽性率は72.0～77.2%で、他の増殖能のマーカーと比較し、Pol. α陽性率が最も高かった。正常脳組織では陽性反応はみられなかった。生検脳腫瘍組織では0～52.8%の陽性率で、Ki−67陽性率よりもやや高く、病理学的悪性度にほぼ相関していた。以上よりPol. α陽性率はヒト脳腫瘍増殖動態をより的確・簡便に把握するうえで有用であり、Ki-67に比べ腫瘍細胞のgrowth fractionをよりよく反映している可能性が示唆された。

Key word : DNA polymerase α, immunohistochemistry, brain tumor, cell cycle

【はじめに】　昨年の本学会で、我々は増殖期の核内に発現されるKi−67 モノクローナル抗体を用いて、ヒト脳腫瘍増殖動態をin vitro, in situ で検討し報告した[2)8)]。今回、抗ＤＮＡ polymerase α（Pol. α）抗体[5)]を用い脳腫瘍の増殖動態をin vitro, in situ で検討し、他の方法（Ki−67、PCNA、BrdU）とも比較した結果、本法が病理組織学的悪性度をより簡単的確に把握する上で有用であるとの結論を得たので報告する。

【対象および方法】　対象は、グリオーマ由来継代培養株（KH, OK）および手術により摘出された脳腫瘍30例、正常脳腫瘍組織2例である。対数増殖期の培養細胞を70%冷メタノール固定後、仔牛胸腺のPol. αに対するモノクローナル抗体（CL−22−2−48）（MBL）を一次抗体とするPAP法を施行した。さらにＭ期、Ｓ期同調培養およびBrdU染色法との２重染色を施行し、cell cycle の各phaseにおける染色像を求めた。また細胞内のより詳細な局在を観察するため免疫電顕も行った。さらに抗PCNA抗体法[9)]、抗BrdU抗体法[4)7)]、Ki−67抗体法[1)8)]も施行し、それぞれの陽性率を比較検討した。一方、脳腫瘍摘出標本はＰＬＰ固定後、凍結切片を作製し、PAP法による免疫染色を施行し、約500個の細胞をカウントし陽性率を求めた。

【結　果】　対数増殖期の培養細胞での陽性率はPol. α：72.0～77.2%、Ki−67：43.4～59.4%、PCNA：30.9～41.4%、BrdU：28.6～39.3%であった。このうちPol. αが最も陽性率が高値であった。Pol. αの染色像は比較的多彩で、G_1期からＳ期では主に核小体を除いた核質に斑紋状に染色され、G_2期には彌慢性に、Ｍ期には細胞質に染色された（Fig. 1）。さらに免疫電顕でも光顕所見を裏付ける結果が得られた（Fig. 2）。ヒト正常脳では陽性反応はみられなかった。脳腫瘍では0%～52.8%の陽性率を示し（Fig.3）、Ki−67陽性率よりもやや高く、病理学的悪性度との相関関係が認められた（Table 1）。

【考　案】　従来、脳腫瘍の増殖能の検索には分裂指数、3H−thymidine標識率[3)]、BrdUにたいするモノクローナル抗体を用いた方法[4)7)]が行われてきた。最近では、このような方法に変わるものとしてPCNA抗体[9)]およびモノクローナル抗体Ki−67[1)8)]を用いた免疫組織化学的方法が行われるようになってきた。

一方、Pol. αはＤＮＡ複製の中心的な役割を担う酵素であり、その活性レベルは細胞の増殖能と密接な関連を有すると考えられている[5]。今回、このようなPol. αに対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的方法[5][6]を用いてin vitroおよびin situで検討した。その結果、Pol. α陽性率は病理学的悪性度とよく相関しており、その陽性率は他の方法と比較して最も高く、ヒト脳腫瘍増殖細胞の同定に簡便でより有用な方法と考えられた。Pol. αは増殖期の全細胞周期に出現すると考えられ、いわゆるgrowth fraction（ＧＦ）を表している可能性がある。しかし、対数増殖期の培養細胞ではPol. α陽性率は72.0～77.2%とBrdU標識率の約2.4倍高値を示していたものの、BrdU分割投与により求めたＧＦの97.0%よりは低値であり、この点に関してはさらに検討を要すると考えている。

【文　献】 1) Burger PC et al. (1986) Am J Surg Pathol 10：611－617　2) Gerdes J et al. (1984) J Immunol 133：1710－1715　3) Hoshino T (1984) J Neurosurg 61：895－900　4) Hoshino T et al. (1986) J Neurosurg 64：453－459　5) Masaki S et al. (1982) Nucleic Acids Res 10：4703－4713　6) Nakamura H et al. (1984) Exp Cell Res 151：123－133　7) Nagashima T et al. (1985) Acta Neuropathol 66：12－17　8) 白石哲也ら (1987) 第30回日本神経化学会大会論文集 26:313－315　9) Tabuchi K et al. (1987) Neurol Med Chir (Tokyo) 17：1－5

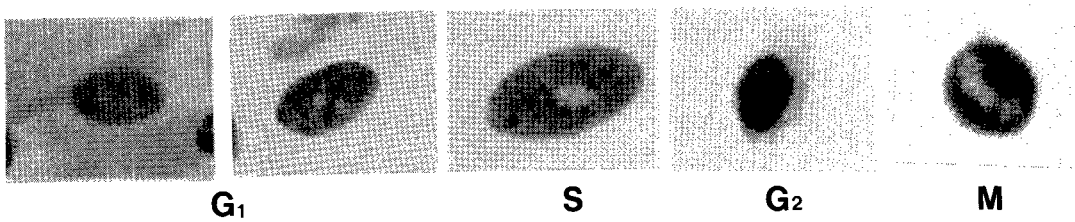


Fig. 1 : Immunohistochemical localization of Pol.α in cultured KH cells.

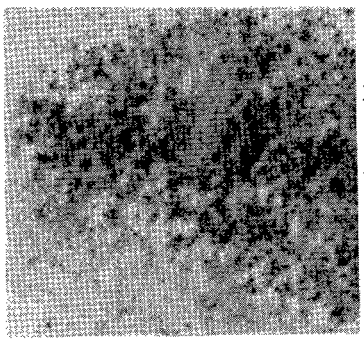


Fig. 2 : Ultrastructural immunohistochemical localization of Pol. α in KH cells.

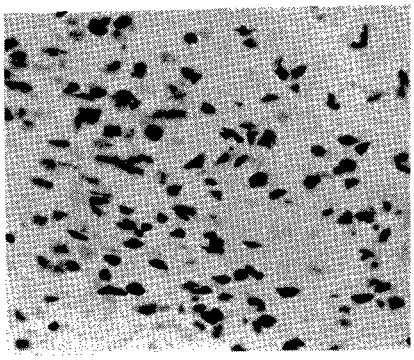


Fig. 3 A : High-grade astrocytoma (Pol.α,× 400)

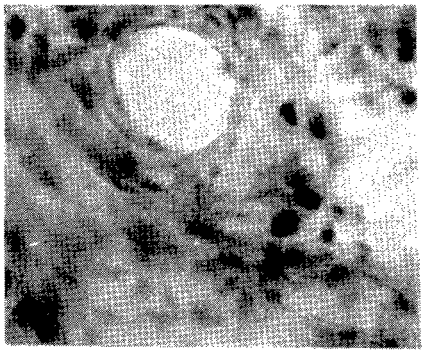


Fig. 3 B : Meningioma (Pol.α,× 400)

TABLE.1 DNA polymerase α and Ki-67 positive cells in human brain tumors

Pathology	No. of cases	Pol.α positive cells (%) Range	Mean	Ki-67 positive cells (%) Range	Mean
Glioblastoma multiforme	2	4.7-36.2	20.4	16.5-22.5	16.1
High-grade astrocytoma	4	16.9-50.2	31.5	4.0-14.0	6.7
Low-grade astrocytoma	3	3.7-15.4	8.3	0-3.0	1.8
Oligodendroglioma	2	0-5.4	2.7	0-1.2	0.6
Ependymoma	1	15.6	—	17.0	—
Medulloblastoma	1	19.6	—	15.2	—
PNET	1	52.8	—	30.1	—
Meningioma	5	0-3.4	1.4	0-3.7	1.6
Neurinoma	5	0-17.0	3.6	0-3.0	1.0
Pituitary adenoma	2	0.6-1.8	1.2	0.4-2.0	1.2
Malignant lymphoma	1	45.3	—	36.7	—
Metastatic tumor	3	36.2-49.5	40.8	22.0-31.2	25.2

PNET: primitive neuroectodermal tumor　Pol.α: DNA polymerase α

90 2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid の脳内動態とそのATP及びクレアチンリン酸に及ぼす影響－IN VIVO ^{31}P NMR による観察－

森 昭胤、横井 功、加太 英明、平松 緑 （岡山大・医・脳代謝研・ 機能生化）
松下 和弘、林 英之 （日本電子研究開発部）

［要約］ N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)レセプターアンタゴニストの1つであるD(-)-2-Amino-7-phosphono-heptanoic acid (D-AP7)をddYマウスに腹腔内注入した後、高分解生体NMR (Sectional Magnetic Resonance Spectroscopy)測定により、脳内D-AP7の動態を無侵襲観察するとともに、同時に脳内に存在するアデノシン-3-リン酸(ATP)、クレアチンリン酸(CrP)及び無機リン酸(Pi)に及ぼす影響を検討した。その結果、腹腔内に注入されたD-AP7 (60-120mg/kg)は、投与10分以内に脳内に移行し、60-70分後までそのシグナルが観察できた。そのさい、ATP及びCrPシグナルの一過性の減少が認められた。D-AP7(90mg/kg)とNMDA(200mg/kg)とを同時に腹腔内注入すると、D-AP7のシグナルはD-AP7単独投与に比し著しく増強し、同時にATP及びCrPのシグナルの著明な減少とPiの増強が認められた。

最近、サーフェイスコイルを用いて、生体内の特定核種を無侵襲測定することが可能となり、^{31}P核のサーフェイスコイルによるNMR測定では、ATPやCrPなどの高エネルギーリン酸化合物をNMRスペクトルとして観測し、分子の挙動を直接追跡できるようになった(1,2,4)。我々は興奮性アミノ酸レセプターの1つNMDAレセプターのアンタゴニストD-AP7をマウス腹腔内に注入したのち、脳内に分布したD-AP7の^{31}Pをsectional magnetic resonance (SMR)法により観測するとともに、内在性の高エネルギーリン酸化合物であるATPやCrPを同時に測定し、興味ある結果を得たので報告する。

［実験方法］

実験動物：ddYマウス(18-20g)を使用し、エーテル軽麻酔下で計測筒内に固定した。^{31}P-NMR分析法：^{31}Pの計測はJEOL GSX270WP NMR spectrometerで行った。本装置は超電動マグネットを有し、中心強度は、6.3 teslaである。^{31}P核の共鳴周波数は109.14MHzを用いた。核シグナルの検出コイルは直径8mm3回巻のサーフェイスコイルを使用し、マウスの頭皮上に密着固定した。その他の計測条件は、90° パルス幅：17.0μsec, 繰り返し時間：1.0sec. 積算回数：300である。

［成績］

1.D-AP7腹腔内投与後の脳内D-AP7-^{31}P-NMRシグナルの経時的変化：D-AP7 (60-120mg/kg)投与5分後の測定で、D-AP7のシグナルが検出され、以後60分後の測定時まで検出された。尚これらの測定において、同時に脳の内因性の ATP(α,β,γ-リン酸)、クレアチンリン酸(CrP)、無機リン酸(Pi)、及び糖リン酸(Sugar-P)が観察され、ATP及びCrPの一過性の減少が認められた。図1にその一例として、対照及びD-AP7(90mg/kg)投与20及び60分後の脳の^{31}P-NMRシグナルを示す。

2.D-AP7とNMDA同時投与後の脳内^{31}P-NMRシグナルの経時的変化：D-AP7(90mg/kg)とNMDA(200mg/kg)とを同時に腹腔内投与すると、D-AP7のシグナルは単独投与の時とほぼ同様に投与5分後の測定で検出されたが、シグナルの強度は単独投与時に比し、極めて大きく、投与60-70分後まで観測された。そのさい、ATP及びCrPのシグナルの著明な減弱、Piのシグナルの著明な増強が認められた（図2）。なお、本実験の経過において、けいれん発作は認められなかった。

［考察］

サーフェイスコイルを使用して、生体の特定臓器あるいは限定部位について ^{1}H,^{13}C,^{23}Na,^{31}Pなどの核種のNMRスペクトルを観測する方法が開発され、脳については、ラット脳のATP(α-,β-,γ-P),CrP,Pi及びsugar-Pの測定が可能となり、脳のリン酸代謝やエネルギー代謝の研究に応用されるようになった(1,2,4,7)。α-アミノカルボン酸のω-リン酸誘導体

であるD-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid(D-AP5)やD-AP7はin vivo及び in vitroでNMDAレセプターの強力かつ選択的なアンタゴニストであることが知られている(3,5,6)。我々は、まずD-AP7をマウスに腹腔内注入し、それが血行を介して脳へ移行する状態を検討するため、SMR法により D-AP7-^{31}P-NMRシグナルの観察をおこなった。一般に^{31}P-NMRは、^{1}H-NMRに比し感度が低く、動物に^{31}Pを含む薬物を投与しても、かなり大量でないとNMR測定は、不可能とされていたが、D-AP7は脳内にそれと対応するレセプター（NMDAレセプター）が存在するためか抗けいれん実験に使用する程度の量(60-120mg/kg)を投与すると、投与後1時間にわたってD-AP7-^{31}P-NMRシグナルを観察することができた。従ってNMDAレセプターの無侵襲測定など、けいれん発現機構に関係した多くの研究に今後応用が可能と考えられる。次に、D-AP7 とNMDAとを同時に投与した実験において、当初はNMDAはレセプター部位でD-AP7と競合するため D-AP7-^{32}P-NMDAシグナルが減少することが予想されたけれども、実験の結果は、逆にシグナルが増強していた。現在、NMDAそれ自体の脳内動態を調べる手段はないので、NMDAレセプター部位でのNMDAとD-AP7との直接的な相互関係を論ずることはできないが、D-AP7は従来考えられているようにNMDAレセプターでアンタゴニストとして競合するばかりでなく、他にNMDAとは競合しないD-AP7結合部位が存在するのかもしれない。そしてその第二の結合部位は抑制性であり興奮性レセプターであるNMDAレセプターが過剰に刺激された場合、それに対応して賦活化され、そのレセプターへの結合が増強されるのかもしれない。この問題に関しては、今後さらに詳細な検討を行いたい。

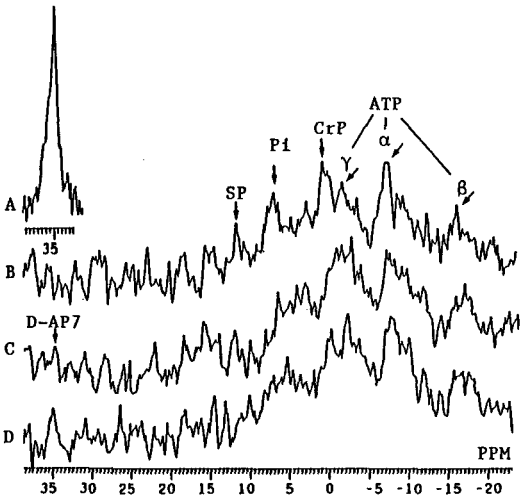


Fig 1. ^{31}P NMR spectra of a mouse brain injected i.p. with D-AP7 (90mg/kg). A) D-AP7 standard (1.7mg/1.7ml H_2O, scans 60), B) control:before D-AP7 injection, C) 20min after D-AP7 injection, D) 60min after D-AP7 injection. ATP (α,β,γ):α,β, and γ-phosphate of ATP, CrP:creatine phosphate, Pi:inorganic phosphate, SP:sugar phosphate.

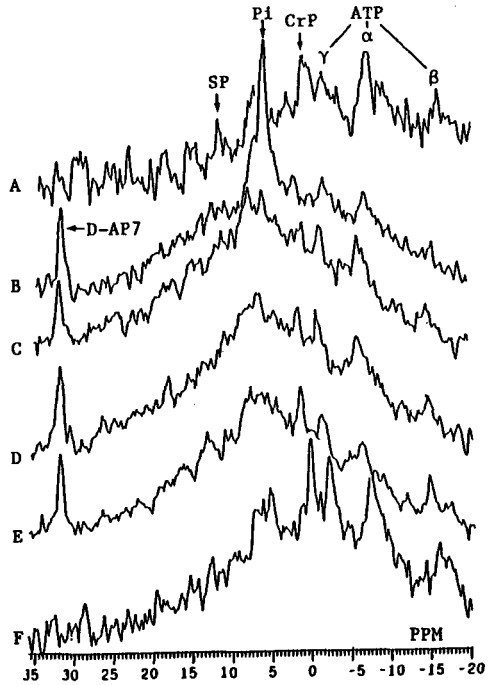


Fig 2. ^{31}P NMR spectra of a mouse brain injected with D-AP7 (90mg/kg) and NMDA (200mg/kg) simultaneously. A) control: before injection, B) 5min, C) 20min, D) 40min, E) 60min, and F) 70min after injection.

[文献]

1,Ackerman,J.J.H.et.al.(1980) Nature, 283,167-170

2,Chance,B.et.al. (1978) Proc.Nath.Acad.Sci.USA,4925-4929

3,Fagg,G.E.et.al.(1982) J.Neurosci, 2,958-965

4,Grove,T.H.et.al.(1980) Proc.Nath.Acad.Sci.USA,77,299-302

5,Olverman,H.J.,Jones,A.W. and Watkins,J.C. (1984) Nature, 307,460-462

6,Watkins,J.C. (1984) Trends Pharmacol.Sci. 5,373-376

7,Yasuda,T. (1983) JEOL news 19A(1),2-8

91 in vivo ^{31}P MRSによる脳内グルコース取り込みと酸化的リン酸化について

○古賀けい子、三浦巖
（大塚製薬・徳島研）

〔要約〕

2-deoxy-glucose(DG)投与後のラット脳内に蓄積される2-deoxy-glucose-6-phosphate(DG6P)を in vivo ^{31}P MRSを用いて観測し、グルコース取り込み速度を求めた。脳代謝を亢進する系（ビククリンによりてんかんを起こさせた系）、比較的影響を与えない系（笑気により無痛化した系）、抑制する系（ペントバルビタール麻酔下）に対して、本方法より得られた値は、これらの系に対してすでに報告されている値と比べて妥当なものであった。従って、本方法はグルコース取り込み速度を求める新しい方法となり得る。

さらに、DG投与前の ^{31}P NMRスペクトルから得られる無機リン酸とクレアチンリン酸の比(Pi/PCr)は、グルコース取り込み速度とよい相関を示した。本方法を用いることにより、同一動物におけるグルコース取り込み速度と酸化的リン酸化レベルとを同時に測定でき、ここで観測した系においては、それらがよい相関を持つことが示された。

Key word: in vivo ^{31}P MRS, glucose uptake, 2-deoxy-glucose, oxidative phosphorylation

〔はじめに〕

近年、in vivo ^{31}P MRS が、脳代謝の研究に広く応用されつつあり、脳の様々な状態における高エネルギーリン酸化合物の動きや細胞内pHに関する知見が蓄積されている。ところで、Sokoloffら(6)は、DGを用いて脳内グルコース取り込み速度を求める方法を確立した。この方法は、Autoradiographyや Positron Emission Tomographyとして広く用いられている。ここでは、in vivo ^{31}P MRSを用いてDG6Pの信号を経時的に観測することによりグルコース取り込み速度を求める試みを報告する。

〔実験〕

実験には ラット WKY、オス（12-20週令）を用いた。大腿動静脈にカテーテルを挿入し、静脈より薬物投与を、動脈より血圧モニターと血液ガス測定用の採血を行なった。気管切開し、笑気－酸素混合ガス（酸素濃度 30%）にて人工呼吸した。ペントバルビタール麻酔の場合は、笑気の代わりに窒素を用いた。ビククリン投与実験の場合は必要に応じて酸素濃度を上げた例もある。

^{31}P NMRスペクトルは、Phospho Energetics社製、BEM140/200を用いて、80.6 MHzにて、1.2cm サーフェスコイルを用いて得た。パルス幅は23μS, 繰り返し時間は2Sであった。筋肉からの信号の寄与を除くため、頭皮と側頭筋とを切除した。ペントバルビタール麻酔以外の場合は、ツボクラリンにて不動化した。行なった実験系を表１に示す。DGの用量は、0.5g/kgである。

TABLE 1

SYSTEM	COMMENTS
B(a), BICUCULLINE(a)	DG, 2.5MIN., THEN BICUCULLINE(1.2MG/KG)
B(b), BICUCULLINE(b)	BICUCULLINE(1.2MG/KG), 15MIN., THEN DG
N , NITROUS OXIDE	
P , PENTOBARBITAL	PENTOBARBITAL(55MG/KG),I.P.,～1.5HOUR, THEN DG

〔結果〕

図１は、ビククリンを投与した系（投与後0-5および10-15分）、笑気により無痛化した系、ペント

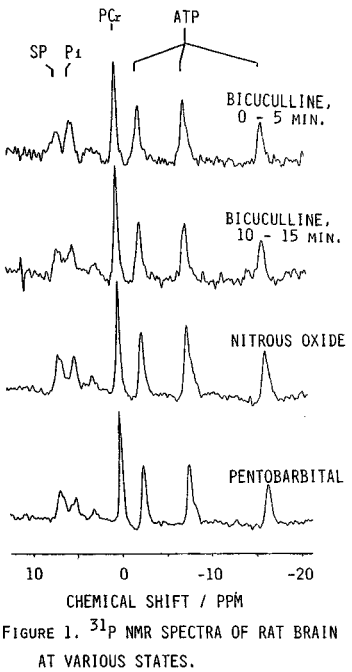


FIGURE 1. ^{31}P NMR SPECTRA OF RAT BRAIN AT VARIOUS STATES.

バルビタール麻酔した系におけるラット脳の^{31}P NMRスペクトルを示す。 Pi/PCrが異なっていることが認められる。その面積強度比はそれぞれ、0.66±0.04, 0.51±0.06, 0.45±0.02, 0.32±0.03であった。

図２に、DG投与後の^{31}P NMRスペクトルの時間変化の例を示す(系B(b))。DG6Pの信号(7.15ppm , 図中の矢印）が現われ、時間とともにその強度が増加した。DG投与後のDG6P強度の増加の程度は系に依存した。図３に、４種の系におけるDG6P信号の時間変化を示す（時刻0における7.15ppmの強度を0とした）。初期勾配、定常値、定常値に達するまでの時間のいずれも4種の系において異なってっていた。ここでは、DG6P強度の時間変化の初期勾配をグルコース取り込み速度の指標とした。得られた初期勾配は、系Nの値を１とすると系B(a), B(b), Pに対してそれぞれ 4、2.5、0.4 であった。

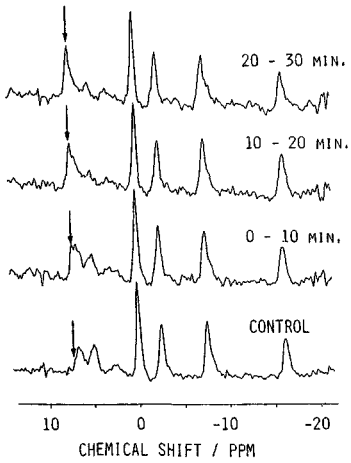


FIGURE 2. TIME DEPENDENCE OF ^{31}P NMR SPECTRA AFTER DG ADMINISTRATION TO SYSTEM B(b).

Pi/PCrと、DG6P強度の時間変化の初期勾配との関係を図４に示す。ここで、系B(b)に対応するPi/PCr値は、ビククリン投与後10-15分の値で代用した。

DGの用量が大きいことの影響を検討するため、DGの用量を変えた実験(0.25 g/kg, 0.5g/kg, 1g/kg)を系Nに対して行なったところ、用量を変化させても定常値に達するまでの時間はほぼ一定であり、かつ、初期勾配は 0.5g/kgまでは用量にほぼ比例して増加した。従って、DG用量0.5g/kgを用いた場合は、グルコース取り込み速度を充分に反映していると考えられる。

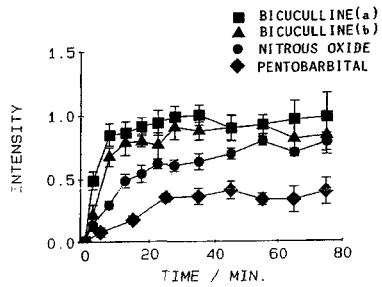


FIGURE 3. TIME DEPENDENCE OF DG6P INTENSITY.

［考察］

本実験より得られたグルコース取り込み速度は、報告されている結果(1,3,5)と比べて、妥当な値である。従って、本方法はグルコース取り込み速度を求める新しい方法となり得る。

ビククリンによるPi/PCrの増加は報告されている(4)が、笑気による無痛化系とペントバルビタール麻酔系とのPi/PCr値の差は、初めて見い出された。

酸素と基質の供給が充分行なわれておりATP量が不変な場合には、Pi/PCrから酸化的リン酸化の活性レベルを知る事ができる(2)。図４で示されたように、DG6P強度の初期勾配とPi/PCrとがよい相関を示したことは、ここで観測した系においてはグルコース取り込み速度と酸化的リン酸化レベルとの間によい相関が保たれていることを示している。

本方法は、同一動物において脳代謝上重要な２つの情報、すなわち、グルコース取り込み速度と高エネルギーリン酸化合物の動きと同時に測定でき、有用な測定手段となり得る。

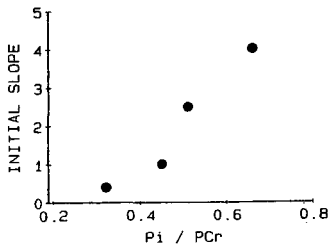


FIGURE 4. INITIAL SLOPE OF DG6P vs. Pi/PCr.

［文献］

(1) Borgstroem, L., Chapman, A.G. and Siesjoe, B.K. (1976) J.Neurochem., 27, 971-973.
(2) Chance, B., et al., (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82, 8384-8388.
(3) Crosby, G., Crane, A.M. and Sokoloff, L. (1984) Anesthesiology, 61, 434-438.
(4) Prichard, J.W., et al., (1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80, 2748-2751.
(5) Sakabe, T., Tsutsui, T., Maekawa, T., Ishikawa, T. and Takeshita, H. (1985) Anesthesiology, 63, 262-266.
(6) Sokoloff, L., et al., (1977), J.Neurochem., 28, 897-916.

92 ラット脳微小循環自動調節における prostaglandin脳室内投与による影響

小野信文，大塚正征，神谷大雄 （福岡大・薬・薬理）

〔要約〕
脳微小循環調節におけるprostaglandin(PG)の作用を解明するため電解式水素クリアランス法によりラット視床下部腹内側核(VMH)の微小循環量(CBF)を測定し，神経性因子の関与について検討を行った。VMH CBFは，$PGF_{2\alpha}$ならびにD_2(50nmol)の脳室内投与(icv)により減少し，PGE_2ならびにI_2では増加した。全身血圧は，$PGF_{2\alpha}$，E_2ならびにD_2のicvにより上昇し，PGI_2では下降を示した。これらの作用はVMH破壊により消失した。VMH CBFはphenylephrineの静脈内持続注入によって全身血圧レベルを変化させた時，全身血圧60-160mmHgではほぼ一定に保たれるが，160mmHg以上では著明に増加し，その自動調節の破壊が認められ，また脳血管抵抗についても類似の自動調節が認められた。$PGF_{2\alpha}$(50nmol,icv)は全身血圧60-160mmHgにおける微小循環自動調節にはほとんど影響しなかったが，160ならびに180mmHgの血圧レベルにおける自動調節能の崩壊を抑制し，この抑制作用は用量作用関係を示した。このPGの自動調節崩壊の抑制は両側上頸部交感神経節(SCG)の切除によって有意に減弱した。以上の結果より，$PGF_{2\alpha}$はVMHの微小循環調節の上限を上昇させ，この作用は一部上頸部交感神経節を介する可能性が考えられる。

PGは中枢神経系にも局在し，神経活動や機能変化に深く関与し，生理的な役割を持つ可能性が考えられている。一方，脳循環に関しては，近年，脳血管を支配する神経の局在が明かとなり，神経因子の関与が示唆されている。従って，PGが脳循環においてもその機能調節に関与すると推察されるが，PGの研究の多くは摘出血管，脳軟膜血管周囲への微量注入などによるものが多く，脳深部の神経核レベルでのCBFにおける研究は少ない。また，脳はCBFを一定に保つ自動調節能を有し，この機能に関し神経性調節の関与が考えられている。そこで，CBF調節におけるPGの作用を明らかにする目的で脳深部CBF測定用電極を自作し，電解式水素クリアランス法により検討した。

［実験方法］

実験には体重350-400gのラットを使用し，urethane(1.0 g/kg,ip)により麻酔し，icv用ガイドカニューレを右側脳室に，CBF測定用単極電極をVMHに挿入し，さらに，皿型銀・塩化銀不関電極を背部皮下に装着した。VMHのCBFは電解式水素クリアランス法にて測定し，同時に血圧は左大腿動脈より，心拍数はその脈波よりポリグラフにて測定した。血液中炭酸ガス，酸素ガス分圧ならびにpHは自動pH/血液ガス分析装置にて，ヘマトクリットならびにヘモグロビンは自動血球計数装置にて測定した。脳微小循環自動調節の実験では，上記条件の他，gallamine(20mg/kg,iv)により筋弛緩状態とし，人工呼吸下にて行った。CBF自動調節はphenylephrineの静脈内持続投与にて人為的に血圧を上昇させ検討した。

［結果］

1)$PGF_{2\alpha}$ならびにD_2(50nmol,icv)は血圧上昇，心拍数増加ならびにVMH CBF減少を，$PGF_{2\alpha}$は血圧上昇，心拍数増加ならびにCBF増加，PGI_2は血圧下降，心拍数増加ならびにCBF増加を示した。2)$PGF_{2\alpha}$(50nmol,icv)はCBFを持続的に減少し，PGE_2は持続的に増加した。3)$PGF_{2\alpha}$(50nmol,iv)は一過性の軽度血圧上昇，心拍数増加を示したが，VMH CBFに有意な変化はみられなかった。4)上記PGのicvはいずれも血液中炭酸ガス，

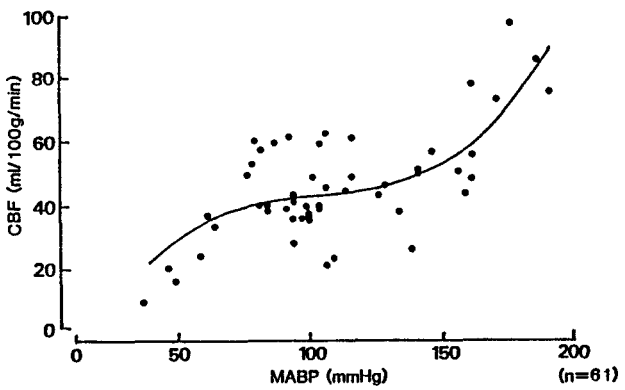


図1．VMHにおける脳微小循環自動調節
縦軸；脳微小循環量，横軸；平均血圧，n；例数，図中実線は脳微小循環量と血圧の関係を非線形最小二乗法で求めた．

酸素ガス分圧，pH，ヘマクリットならびにヘモグロビン値に影響を及ぼさなかった。5)CBFは約60-150mmHgにおいて一定に保たれており自動調節能が認められ，150mmHg以上ではその崩壊が認められた(図 1)。6)$PGF_{2\alpha}$(50nmol，icv)は140，160ならびに180mmHgのいずれの血圧レベルにおいても自動調節能の崩壊を抑制し，この作用は用量依存的であった(図 2)。7)上記作用に対し両側SCGを切除すると，160ならびに180mmHgにおいて自動調節崩壊の抑制作用は減弱した(図 3)。

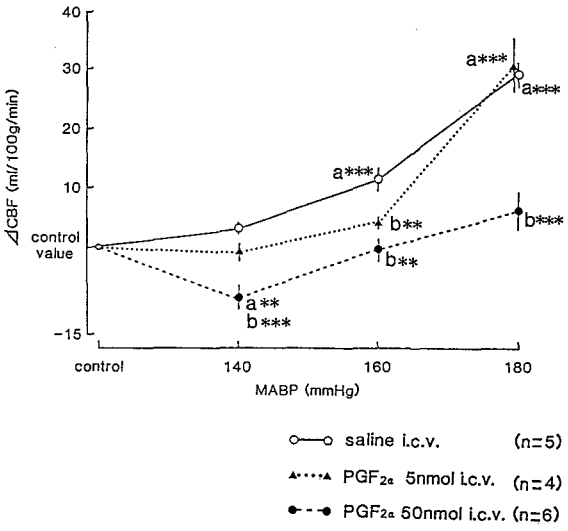


図２．VMH微小循環自動調節に及ぼす$PGF_{2\alpha}$ icvの用量作用関係
縦軸；脳微小循環の変化量，横軸；平均血圧

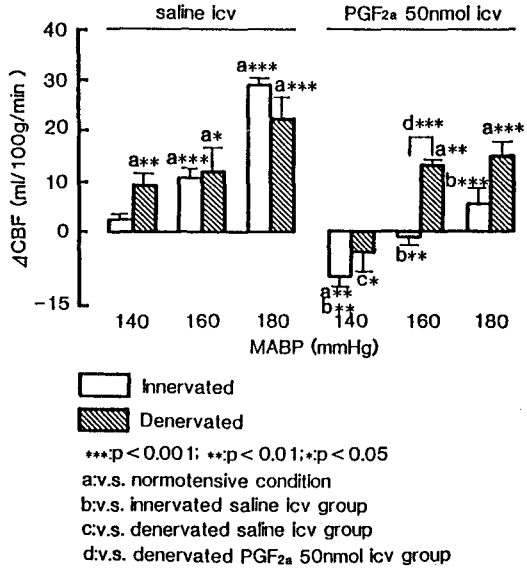


図３．VMH微小循環自動調節に対する$PGF_{2\alpha}$ icvの作用に及ぼす両側上頸部交感神経節切除の影響
縦軸；脳微小循環の変化量，横軸；平均血圧

［考察］

$PGF_{2\alpha}$icvの血圧上昇，拍数増加ならびにVMH CBF減少作用は，静脈内投与によっては認められないので，PGが脳室から全身循環に移行したものではなく，中枢神経を介した作用によると考えられる(1)。この$PGF_{2\alpha}$のicvによる昇圧ならびに心拍数増加作用は血中noradrenaline量の増加が認められ(2)，またβ遮断薬で抑制される(3)ことから脊髄を介した交感神経興奮の結果と考えられる。一方，本研究において$PGF_{2\alpha}$はVMH CBFに対し，減少を示した。これは一部VMHの血管に対する直接作用による可能性も考えられる。しかしVMH CBF増加を示すPGE_2も同様に，昇圧および心拍数増加を示すので，PGF2αの作用は他の機構が考えられる。

本研究から明らかなように，VMH CBFは60-160mmHgで自動調節が認められるが，それ以上では急激に増加し，その崩壊が起こる。$PGF_{2\alpha}$icvはこの崩壊を抑制し，自動調節の上限を高め保持作用を示した。さらにこの$PGF_{2\alpha}$icvによる自動調節保持作用は両側SCG切断によって減弱するので，SCGを介したnoradrenaline性神経の関与が考えられる。自動調節におけるSCGの関与はSadoshimaらも類似の報告をしている(4)。一方，VMH血管を支配するnoradrenaline性神経はSCGの外に青斑核由来の支配(5)も考えられ，さらにSCGからはセロトニン性神経支配も存在する(6)ことなどから，これらの関与について今後さらに検討を要する。

［文献］

1) Ono, N. et al. (1979) Japan. J. Pharmacol. 29, 175p.
2) Feurstein, G. et al. (1982) Brain Res. 231, 335-342.
3) Ono, N. and Furukawa, T. (1983) Pharmacology 27, 23-28.
4) Shadoshima, S. et al. (1986) stroke 17, 981-984.
5) Swanson, L. W. et al. (1977) Brain Res. 136, 166-173.
6) Eles, M. S. (1986) in "Neural Regulation of Brain Circulation", ed. by Christer and Janerik, Elserior. pp 219-234, Amsterdam.

93 局所脳虚血ラットに対するGM$_1$-Gangliosideの効果

—脳皮質および線条体のmonoamineとその代謝産物への影響—

古賀照邦*, 小島秀樹, 山田茂人, 西 彰五郎, 稲永和豊,
庄司紘史*, 加地正郎*, G.Jonsson**, G.Toffano***
久留米大, 脳研, 第一内科*, Karolinska Ins.(Sweden)**, Fidia Res.Lab.(Italy)***

〔要約〕

GM$_1$-monosialoganglioside (以下GM$_1$) は中枢神経細胞膜成分の一種である。GM$_1$の脳虚血後の脳損傷に対する治療効果を明らかにする目的でラット局所脳虚血モデルを用いて大脳皮質および線条体のmonoamineとその代謝産物を指標としてGM$_1$の作用について検討した。SD系雄性ラットの左中大脳動脈閉塞手術を行い、GM$_1$30mg/kgを手術前3日間連日1回ずつ腹腔内投与しさらに中大脳動脈閉塞30分後、3時間後、6時間後、24時間後、48時間後に投与し脳浮腫の最大となる72時間後に断頭した。大脳を摘出した後、虚血側および非虚血側の大脳皮質と線条体のmonoamine(5-HT, DA)とその代謝産物(5-HIAA, DOPAC)の含有量を測定しそれらの非虚血側に対する虚血側の変化率を用いて検討した。皮質では5-HT,また線条体では5-HT, DA, DOPACがGM$_1$投与群の方が対照群に比べ有意に増加していた。

〈緒言〉

最近、GM$_1$を脳虚血性病変の新しい治療薬として開発応用しようとの試みがあり、GM$_1$の抗浮腫効果[1]、局所脳血流および糖代謝改善効果[2]、さらに脳卒中患者に対する治療効果[3]などが注目されつつある。我々も局所脳虚血ラットを用いてGM$_1$の抗浮腫効果、および脳内monoamineの変化を報告したが[4]、今回さらに大脳皮質および線条体のmonoamineとその代謝産物への影響を検討した。

＜実験方法＞

1) 中大脳動脈 (MCA) 閉塞モデルの手術法

雄性Sprague-Dawley種ラット (250～300g) を用いて 2%ハロセン吸入麻酔下にて手術用顕微鏡下に田村らの方法[5]に準じて左 MCA を電気凝固後切断し局所脳虚血モデルを作成した。

2) GM$_1$の投与方法

牛脳から抽出されたGM$_1$ (Fidia,Italy; 30mg/kg) を腹腔内に MCA 閉塞手術前3日間連日1回ずつ投与し、さらにMCA閉塞30分後、3時間後、6時間後、24時間後、48時間後に投与した。対照群として同様に生理食塩水を投与した。

3) 生化学的分析法

MCA閉塞72時間後に断頭し、摘出した脳を上部は松果体、底部は視交叉の5mm 尾側で吻側部、尾側部に2分割した後に、それぞれ左右に分け、吻側の皮質と線条体を取り出した。Yokooらの方法[6]に準じてECDつきHPLCを用いて各検体の DA ,DOPAC ,5-HT ,5-HIAA の含有量(湿重量にて補正)を測定し、ラットの成長度による個体差、開頭手術、手術後の栄養状態などの実験条件や手技上のartifactを取り除くために、非虚血側の値を対照とし、虚血側の値をこれで割った比率(%)を用いて検討した。統計処理にはWilcoxon testを用いた。

＜結果＞

手術後死亡例はなく、著しい体重変化や明らかな異常行動はみられなかった。各 monoamine含量は皮質の非虚血側で 5-HT: 250.0± 7.47ng/g, DA: 157.14±14.67ng/g, 虚血側で 5-HT: 132.68±5.63ng/g, DA: 53.85±11.84ng/g,また、線条体の非虚血側で 5-HT: 222.71±2.45ng/g, DA: 5130.5±337.9ng/g, 虚血側で 5-HT: 86.06±34.56ng/g, DA: 824.66±309.56ng/g であり、 虚血側の monoamineおよびその代謝産物の変化は皮質5-HT, DA が減少し5-HIAAが増加していた。線条体では5-HT, DA, DOPAC が減少し、5-HIAA が増加していたが、GM_1投与群では対照群に比べて皮質では 5-HT が有意に高値を示し、線条体では5-HT, DA, DOPAC が有意に増加していた。(Fig. 1)。 また、尾側の 5-HT, 5-HIAA, DA, DOPACの変化は少なくGM_1投与群と非投与群との間には有意な差はみられなかった。

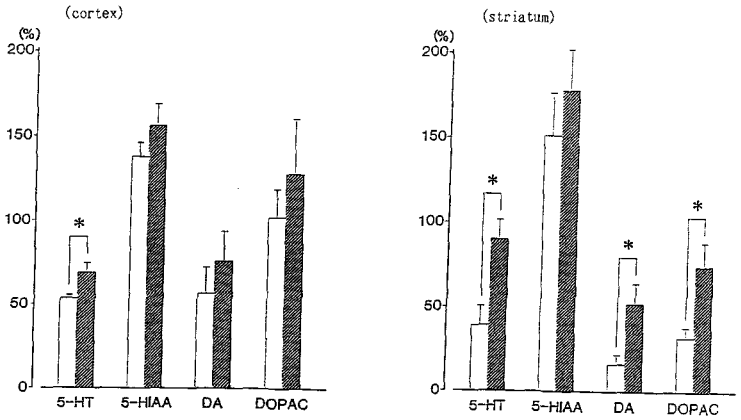


Fig 1. Difference in % change of Ischemic Side compared to Intact (contralateral) Side between GM1 Group and Controls for monoamine and metabolites.
□ Saline group (n=7) ▨ GM1 group (n=6) * P<0.05

〈考察〉

GM_1は Sialic acid を含む糖脂質の類で、脳、特に灰白質に多く存在している。Karpiak[7] らはGM_1は脳虚血障害時に細胞機能を保護することにより、細胞の減少、線維の変性、細胞膜の不全などの中枢神経局所の損傷を減じるのであろうと仮定している。また、GM_1は72時間後での含水量の増加を抑える効果を我々は認めており、今回、MCA閉塞72時間後での検討で皮質で5-HT, 線条体でDA, DOPAC,および5-HTが減少したが、GM_1投与によりその減少を有意に回復した。この事実は外因性GM_1が以上の理由などからDA, 5-HT神経終末を含む脳組織の損傷の拡大を軽減するのであろうと考えられる。

〈文献〉

1. Karpiak,S.E.,et al. (1987) Soc.Neurosci., 13,1501.
2. Tanaka,K.,et al. (1986) Stroke, 6,1170-1178.
3. Bassi, S.,et al. (1984) Neurosci.Res., 12,493-498.
4. Koga,T.,et al. (1988) C.I.N.P.Congress Munich.
5. 田村 勲ら、(1986) 脳神経, 38,747-751.
6. Yokoo,H.,et al. (1985) Kurume Med.J.,32,75-80.
7. Karpiak,S.E.,et al. (1987) Stroke,1,184-187.

94 慢性脳血流低下動物モデルに於ける脳蛋白質・行動の変化

工藤 喬、 多田國利、 山下 正、 新川久義、 門田永治*、 服部英幸*、 武田雅俊
播口之朗、 西村 健 (大阪大・医・精神医学、 近畿大・医・第二病理*)

〔要約〕
慢性的な脳血流低下状態に於ける脳機能の変化を調べる目的で、砂ネズミ (Mongolian gerbil)の総頸動脈を狭窄し、行動の変化および脳蛋白質の変化を検討し、以下の知見を得た。 (1)狭窄8週後の大脳皮質血流量は対照群の73～76%と低下していた。 (2)自動動物観察装置 OUCEM-86 (Osaka University Computerized Electronic Maze) による行動観察の結果、総運動量は狭窄群、対照群間に差異を認めなかったが、非ショック領域滞在時間の延長が、狭窄群において対照群に対し遅れる傾向を示した。この傾向は第1日に著明であったが、狭窄群と対照群の差は試行を重ねていくと縮小し、第12日にはほぼなくなった。 (3)狭窄8週後、大脳皮質、線条体、海馬の各組織の蛋白質についてSDS-polyacrylamide gel電気泳動(SDS-PAGE)を行なったところ、水溶性分画中のMAP2(Microtuble associated protein 2)が狭窄群の大脳皮質、線条体で有意に減少していた(大脳皮質：対照群の84%, 線条体：対照群の81.6%)。以上のことから、今回実験的に作成した慢性脳血流低下動物モデルにおいて、学習、記憶の障害が生じ、その発現にMAP2の減少が関与している可能性が示唆された。

［方 法］
砂ネズミ(60～80g)の両側総頸動脈をpentobarbital麻酔 (50mg/kg, i.p.)下に露出し、コイル状にしたステンレススチール線 (ϕ=0.1mm) を装着した(コイルの内径=0.2～0.3mm)。ステンレス線を装着後、ドップラー法を用いて総頸動脈の血流速を心臓側で計測し、狭窄を確認した。行動の検討には、我々の研究室で開発した自動動物観察装置OUCEM－86を用いた[1]。装置内中央に発泡スチロール製の板を置いて非ショック領域とし、その他の領域には0.5mAの電流を流してショック領域とした。総頸動脈狭窄6週後を試行第1日とし、以後第2日、第5日、第12日に、砂ネズミを非ショック領域に置いてから5分間の行動を観察した。総頸動脈狭窄8週後に、水素クリアランス法を用いて大脳皮質の血流量を測定した。脳血流量を測定後、断頭し脳を摘出した。摘出脳は4°C下に前頭葉皮質、線条体、海馬に分離し、湿重量を測定した後、4倍容の0.01M phosphate buffer(pH 7.2)でhomogenizeし、100,000g,30分間遠沈して、その上清の水溶性分画と沈査の不溶性分画とに分離し、それぞれをSDS-PAGEで分析した。また一部の摘出脳は、HE染色で脳組織の変化を検討した。それぞれの検討には、sham operationを施したものを対照として用いた。

［結 果］
＜血流ドップラー法による狭窄の確認＞ 両側総頸動脈狭窄直後、両側総頸動脈の血流速を測定したところ、狭窄前に比べて約30%の低下がみられた。

＜水素クリアランス法による脳血流量の測定＞ 両側総頸動脈狭窄8週後、狭窄群の大脳皮質血流量は対照群の73～76%に有意に低下していた(Fig. 1)。

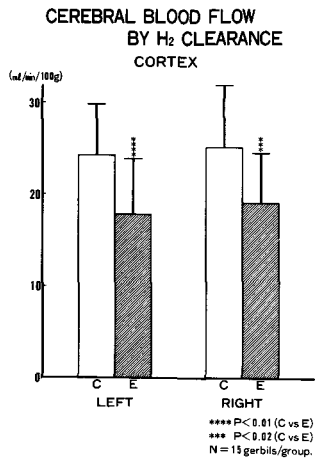
＜行動の検討＞ 両側総頸動脈狭窄6週後より、OUCEM－86を用いて総運動量(TIO)、非ショック領域滞在時間(NST)について検討した。各試行（第1、2、5、12日）の5分間 TIOを検討したところ、狭窄群と対照群との間には有意な差を認めなかった。また各試行の運動量を1分間隔で検討したが、狭窄群・対照群共に経時的に運動量が減衰していき、両者間に有意な差を認めなかった。各試行の5分間全体のNSTを検討したところ、第1日では、狭窄群は対照群に対してNSTが有意に短いことが確認された。その後の試行では、狭窄群と対照群との間に、有意な差は認められなかった(Fig.2棒グラフ)。各試行のNSTの時間的推移を1分間隔で検討したところ、第1日では、対照群のNSTは経時的に延長し、速やかに100%に近づくのに対し、狭窄群の NSTの延長が有意に遅れることが確認された。しかし、試行を重ねていくと、狭窄群と対象群とのNSTの差は縮小傾向を示し、第12日にはほぼなくなった(Fig.2折れ線グラフ)。

＜脳蛋白質の検討＞ 両側総頸動脈狭窄8週後、電気泳動により分離した脳蛋白質をデンシトメーターで測定し、水溶性蛋白質総量に対する割合を算出した結果、脳水溶性分画中のMAP2、calspectin、clathrinが各々、対照群に比べて、脳各部位で減少傾向を示し、特にMAP2は大脳皮質、線条体で有意に減少していることが確認された(Table 1)(大脳皮質：84%、線条体：81.6% $p<0.05$)。

＜脳組織の検討＞ HE染色で検討した結果、神経細胞脱落、gliosisなどの変化はいずれの部位でも認められなかった。

［考　察］

今回我々は総頸動脈を実験的に狭窄することにより慢性脳血流低下動物モデルを作成した。このモデルの行動を検討すると、運動量に変化を認めないにもかかわらず、非ショック領域に滞在する時間に、差異を認めた。この差異は試行第1日では有意であり、試行を重ねていくと減少していく傾向を示した。これらより、慢性的な脳血流低下動物モデルでは学習および記憶の機能に何等かの障害が生じていることが推測された。脳蛋白質の検討では、以前我々が報告した[3]急性虚血実験で変化のあったMAP2, calspectin, clathrinがこのモデルにおいても減少する傾向を示し、特にMAP2は大脳皮質、線条体で有意に減少することが示された。MAP2は急性虚血で最も変化の著しい蛋白質であり、慢性脳血流低下状態においても他の蛋白質に先行して変化する傾向は興味ある所見と考えられる。MAP2は神経細胞内蛋白質として機能的に重要な蛋白質であり、微小管とactin, あるいは微小管とneurofilamentの相互作用に何等かの役割を担う架橋蛋白質のひとつと考えられており[2]、このモデルの示した学習、記憶の障害にMAP2の変化が関与している可能性も考えられる。以上のことから今回作製した動物モデルは慢性的脳血流低下状態に於ける脳機能変化の機序解明に、価値あるものと考えられる。



↑Fig. 1 狭窄8週後脳血流量

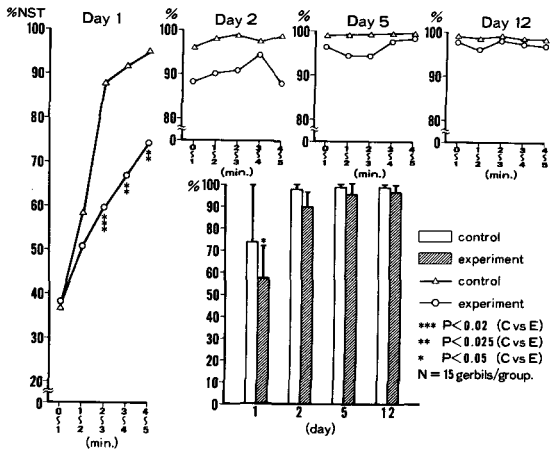


Fig. 2 非ショック領域滞在時間
棒グラフ：5分間総滞在時間
折れ線グラフ：各5分間の時間的推移

			% OF SOLUBLE PROTEIN
MAP2	Cx.	C	0.82 ± 0.15
		E	0.69 ± 0.16*
	St.	C	0.46 ± 0.12
		E	0.38 ± 0.079*
	Hp.	C	0.77 ± 0.18
		E	0.73 ± 0.18
CALSPECTIN	Cx.	C	0.91 ± 0.21
		E	0.80 ± 0.065
	St.	C	0.66 ± 0.20
		E	0.55 ± 0.15
	Hp.	C	0.85 ± 0.14
		E	0.78 ± 0.12
CLATHRIN	Cx.	C	0.89 ± 0.19
		E	0.82 ± 0.19
	St.	C	0.82 ± 0.32
		E	0.77 ± 0.12
	Hp.	C	0.81 ± 0.23
		E	0.74 ± 0.14

Cx. : CORTEX, St. : STRIATUM, Hp. : HIPPOCAMPUS
C : control, E : experiment
*p<0.05 (C vs E)

←Table 1　脳水溶性蛋白質の変化(N=13gerbils/group)

［文　献］

1) Ramon Cacabelos et al. Hormone Res. 29, 129-132 (1988)
2) Sobue K. et al. Biochem. Biophysi. Acta. 845, 366-372 (1985)
3) 山下　正ら　神経化学 24, 31-33 (1985)

95 脳虚血後の海馬におけるProtein kinase C

小野寺宏，荒木努，小暮久也
（東北大学神経内科）

〔要約〕

Protein kinase C(PKC) は中枢神経系での神経伝達機構に重要な役割を演じており，海馬での密度が大であるが，海馬CA1錐体細胞は脳虚血後一定時間後に死滅するという特異な挙動を示す（遅延性神経死）．今回，ラットに２０分間の一過性前脳虚血を負荷し，血流再開後のPKC分布を〔^{3}H〕phorbor 12,13-dibutyrate(PDBu)によるin vitro オートラジオグラフィにより経時的に観察した．血流再開後，CA1のdendritic fieldsでは〔^{3}H〕PDBu結合は増加し虚血後６－１２時間後に最大となった後，徐々に減少し１週間後には約半数の〔^{3}H〕PDBu結合部位が失われた．一方，CA3のstratum radiatumは有意の変化を示さなかった．CA3のstratum oriensにて虚血後３から２４時間まで一過性の〔^{3}H〕PDBu結合の減少を認めた．歯状回のstratum moleculareでは，虚血後の時間経過と共に，徐々に〔^{3}H〕PDBu結合は増加したが，特にsupragranular layerで著明であった．この事から，CA1では錐体細胞上にPDBu結合部位が多く存在する事，一過性の〔^{3}H〕PDBu結合増加が選択的神経細胞死をきたすCA1に限局して認められる為虚血侵襲後の神経細胞障害にPKC活性化が関与している可能性が示唆された．

［目的］

海馬ではProtein kinase Cが脳内で最も密に分布しており，海馬においてPKCが主要な情報伝達機構を担っていると推測される．tumor promotorであるphorbor ester結合の分布はPKCのそれを反映する．脳虚血等のenergy crisisに対して，海馬CA1領域の錐体細胞は極めて脆弱だがGABA作動性の介在神経には殆ど異常が認められない．この遅延性CA1錐体細胞死には興奮性入力の関与が推定され，我々はCA1錐体細胞への興奮性線維の主力であるSchaffer collateralsの遮断によりCA1錐体細胞の選択性細胞死を予防し得る事を示した(2)．今回，虚血後の海馬に於ける細胞内伝達機構の解析を目的として，in vitro 〔^{3}H〕PDBu オートラジオグラフィを施行した．

［方法］

（１） 虚血モデルの作成　既報の方法でWistar系雄性ラット（220-280グラム）に２０分間の前脳虚血を負荷した(2)．即ち，Pulsinelli とBrierleyの方法に従い(5)，前日に両側椎骨動脈血流を電気凝固にて遮断しておいた動物の総頸動脈を２０分間クリップ後血流再開し，再灌流１時間後より７日後まで経時的に観察した．

（２） (3H)PDBuオートラジオグラフィ　〔^{3}H〕PDBuオートラジオグラフィはWorleyらの方法を改変して施行した(6)．脳切片を２５℃で６０分インキュベートした（50 mM TrisHCl(pH 7.7), 100 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 2.5 nM〔^{3}H〕PDBu）．非特異的結合は１μMの非放射性PDBuを加えることにより算出した．反応後４℃で２分間２回洗浄後蒸留水でリンス，冷風流にて急速に乾燥させ，トリチウムスタンダード線源と共にフィルムにコンタクトした．フィルム上の銀粒子密度をコンピュータ画像解析装置にて測定，非線形最小二乗法を用いて放射活性を計算した．トリチウムによるオートラジオグラフィでは組織密度の違いのためquenching levelの差を生ずるが，虚血群と対照群の間で非特異的結合に差が認められない事と，また既報に示した理由より虚血後のquenching level補正は行なわなかった(3)．統計学的処理はStudent's t-testによった．

［結果及び考察］

脳虚血後CA1錐体細胞は虚血負荷２日後に選択的神経細胞死に陥るが，同部位のGABA作動性介在神経，CA3錐体細胞及び歯状回顆粒細胞には形態学的異常を認めなかった．Table 1に定量的〔^{3}H〕PDBuオートラジオグラフィの結果を示した．CA1のstr. oriens,radiatumが最も〔^{3}H〕PDBu

結合部位に富むが，CA3,歯状回str.moleculareでも比較的(³H)PDBu結合部位が多い．虚血後，CA1のdendritic fields(str.oriens,radiatum,lacunosum-molecualre)で(³H)PDBu結合が徐々に増加し６－１２時間後にピークに達したが，その後減少に転じCA1錐体細胞が壊死に陥る２日後に対照群とほぼ等しくなり，１週間後には約半数の(³H)PDBu結合部位が失われた．しかしこの時期でもCA1のstr.pyramidaleは他のstr.よりも高い銀粒子密度を有し，GABA作動性神経上のPKCを反映すると考えられる．CA3のstr.oriensでは虚血後一過性に(³H)PDBu結合部位が減少したが，str.radiatumでは経過中変化は認められなかった．歯状回str.moleculareでは，血流再開後結合が漸増し１週間後では３０％の増加を示したが，outer layerよりもinner layer (supragranular layer)での(³H)PDBu結合増加がより著明であった．

この様に，組織学的変化が認められない超急性期からCA1におけるsignal transductionが著明に変化している事が推測される．血流再開数時間後から，CA1でのepileptic discharge,糖取込パターンの変化が認められるが(4)，(³H)PDBu結合はそれらが出現する以前に増加する点が興味深い．in vitroオートラジオグラフィでの(³H)PDBu結合の増加はPKCの膜画分への結合の増加とも解釈可能である．long term potentiation後,PKCの膜へのtranslocationが報告されているが(1)，虚血後には細胞内Ca^{2+}レベルの増加，glutamateの放出，phospholipase Cの活性化など，PKCの活性化とtranslocationを促進する条件は十分揃っている．CA1錐体細胞に於けるPKC活性化が遅延性CA1錐体細胞死の直接の引金となるか否かについては今後の検討が必要である．

Table (³H)PDBu binding fmol/cm² from 6 to 8 animals, mean±SEM

	CA1			CA3		dentate gyrus
stratum	oriens	radiatum	lacunosum-moleculare	oriens	radiatum	moleculare
control	384±22	407±22	192±11	385±14	286±19	303±16
ischemia						
1 hr	465±20*	444±20	208±15	319±33	318±27	319±18
3 hr	537±14**	459±15	234±14**	302±23**	296±20	314±18
6 hr	503±38*	490±37	236±28	311±26*	296±25	316±21
12 hr	527±19**	479±19*	215±12	277±28**	293±22	326±15
1 day	453±39	457±22	211±17	311±18**	326±23	317±21
2 day	387±23	399±33	195±27	370±20	317±32	372±21*
7 day	200±31**	248±21**	71±11**	378±16	282±11	399±19**

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

［文献］

(1) Akers R.F., Lovinger D.M., Colley P.A., Linden D.J., and Routtenberg A. (1987) Science 231,587-589.
(2) Onodera H., Sato G., and Kogure K. (1986) Neurosci.Lett. 68,169-174.
(3) Onodera H., Sato G., and Kogure K. (1987) Brain Res. 415,309-322.
(4) Onodera H., Tobita M., and Kogure K. (1988) Neurosci.Lett. 89,90-96.
(5) Pulsinelli W.A., and Brierley J.B. (1979) Stroke 10,267-272.
(6) Worley P.F., Baraban J.M., and Snyder S.H. (1986) J.Neurosci. 8,199-207.

96 扁桃核キンドリングラットの扁桃核・海馬における[³H]3-(2-Carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid ([³H]CPP) 特異的結合

秋山一文、山田了士、西川浩、曽良一郎*、大月三郎
岡山大・医・神経精神、*国立療養所山陽荘病院

〔要約〕
私どもは昨年の本学会で、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が扁桃核キンドリングラットの扁桃核で長期持続性に亢進していることを報告した。興奮性アミノ酸受容体subtypeのなかで、seizure triggering mechanism に最も重要な役割を担っているのはN-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体である。NMDA受容体を直接、結合実験を用いて、キンドリング動物脳で検討した報告は未だない。そこで今回は、NMDA受容体を標識する[³H]3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid ([³H]CPP)を用い、最終電気刺激から4週間後の時点で、扁桃核キンドリングが完成したラットの扁桃核、及び海馬の膜標品を作成し、結合実験を行った。Scatchard解析より、いずれの脳部位でも Bmax, K_D値ともに、対照群とキンドリング群との間に有意な差は認められなかった。この結果より、キンドリング刺激により、長期持続性の痙攣準備状態が獲得されるようになっても、NMDA受容体の数は変化しないことが示唆された。

昨年の本学会で、私ども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が扁桃核キンドリングラットの扁桃核で長期持続性に亢進していることを報告した(1)。興奮性アミノ酸受容体subtypeのなかで、N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体は慢性てんかん源性の獲得に最も重要な役割を演じているといわれる。NMDA受容体の性状を結合実験によって直接的に検討することは、従来、適当なリガンドがないために困難であったが、最近、選択的なNMDA受容体の拮抗薬である3-(2-Carboxypiparazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (CPP)の[³H]標識物が開発された(3)。結合実験を用いて、NMDA受容体をキンドリング動物脳で検討した報告は未だないので、今回は、[³H]CPPの結合実験を扁桃核キンドリングの扁桃核・海馬で検討した。

（対象と方法）

１）キンドリングラットの作成：７週齢のSD系雄性ラットの左側扁桃核に慢性深部電極を植え込み、200μA, 60 Hzの正弦波で１秒間１日１回刺激した。stage 5痙攣が７回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、扁桃核、海馬を切り出した。

２）[³H]CPP結合実験：Murphyらの方法(3)に準じて行った。切り出した脳組織は直ちに50倍容量の50 mM Tris-acetate buffer (pH 7.6 at 25° C)中でポリトロンを用いてホモゲナイズして、30000 g ,15分間で遠沈し、その沈渣を-70° Cで凍結した。1週間以内にそれを解凍し、50倍容量の同上bufferにsuspendし、さらにTriton X-100を0.1%となるように加え、25° Cで15分間プレインキュベイトした。この後、30000 g ,15分間で遠沈し、さらにTriton X-100を含まない同上bufferで膜標品を４回繰り返し遠沈して洗浄した。結合実験は上記膜標品（扁桃核で0.05-0.06 mg protein、海馬で0.13-0.15 mg protein）と[³H]CPPとを0.5 mlの容量で反応させることによって行った。非特異的結合は1 mMのL-glutamate存在下での結合とした。25° C, 30分間の反応の後、遠沈法によりB/F分離を行った。２群間の有意差検定には、Student's t test を用いた。

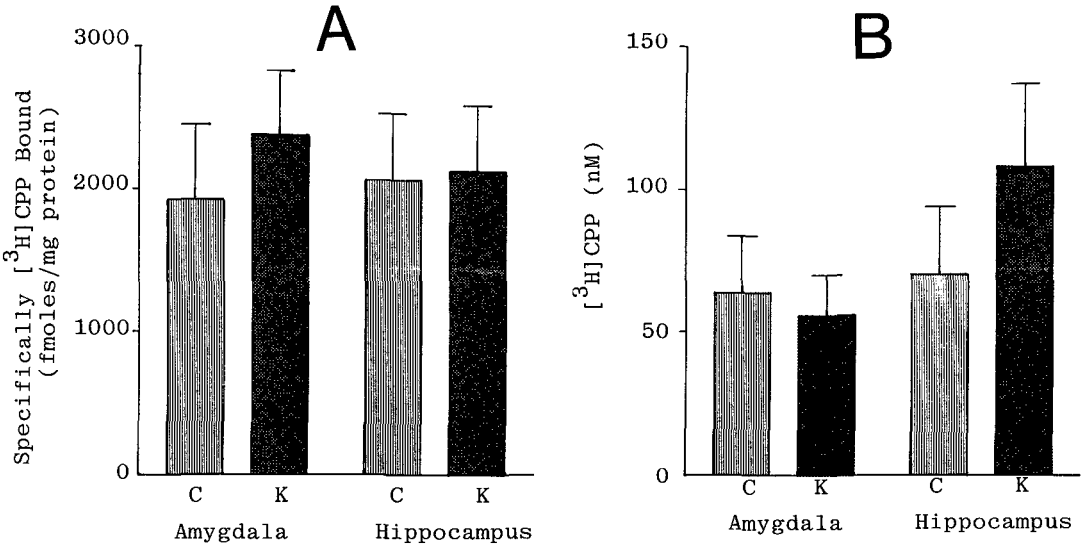
（結果）

特異的[³H]CPP結合は15-30分間で平衡に達した。海馬の組織量0.07-0.28 mg proteinまでは、特異的結合はほぼ直線的に増加した。Scatchard解析より得られた Bmax, K_Dは扁桃核、海馬のいずれの部位でも、対照群とキンドリング群との間で有意差は認められなかった（Figure)。

（考察）

最近、電気生理学的に、キンドリングの seizure triggering mechanism にNMDA 受容体の働きが必須である

ことが判明している。実際、キンドリングに対する NMDA 受容体拮抗薬の効果も検討されており、いったん完成したキンドリング痙攣への抑制効果は弱いものの、キンドリングの発展過程を有意に抑制することが示されている(2,4)。キンドリング完成動物脳における興奮性アミノ酸受容体を結合実験で検討した報告は数少ない。Savageらは、キスカル酸感受性のL-[^{3}H]glutamate結合が angular bundle キンドリングラットの海馬に於て、最終刺激から１日後で有意に増加していたが、２８日後では不変であったと報告している(5)。Slevinらは、entorhinal cortex刺激によるキンドリングを受けたラットの海馬で最終刺激から３日の時点で、Na依存性 L-[^{3}H]glutamate high affinity uptakeとNa非依存性L-[^{3}H]glutamate bindingを検討し、いずれも両群間で有意差はなかったと報告している(6)。NMDA受容体を選択的に標識するといわれる[^{3}H]CPP結合実験は、キンドリング動物脳では未だ報告がない。今回の成績で、最終電気刺激から４週間の時点では扁桃核、海馬のいずれの部位でも、その結合部位の最大結合数(Bmax)も親和性(K_D)とも両群間で有意差はなかった。以上より、最終電気刺激から断頭までの日数を変えて検討する余地は残されているものの、キンドリングに於ける長期持続性の痙攣準備状態には NMDA受容体の数の変化は関与していないことが示唆された。



Figure。The maximal number of binding sites (Bmax)(A) and the dissociation constant (K_D)(B) obtained from the saturation isotherms of specific [^{3}H]CPP binding to the membranes of amygdala and hippocampus。 The amygdala kindled rats (K) and control rats (C) were decapitated 28 days after the last kindled seizure。 The data represent the mean ± S.E.M。 of 5 determinations。 Neither Bmax nor K_D was significantly different between the two groups (Student's t test)。

（文献）(1)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,26:175-177. (2)Cain, D.P., Desborough, K.A. & McKitrick, D.J.(1988)Exp. Neurol. 100:179-187. (3)Murphy, D.E,. Schneider, J., Boehm, C., Lehmann, J. & Williams, M.(1987) J. Pharmacol. Exp. Ther. 240:778-784. (4)Peterson, D.W., Collins, J.F. & Bradford, H.F.(1983) Brain Res. 275:169-172. (5)Savage, D.D., Werling, L.L., Nadler, J.V. & McNamara, J.O.(1984)Brain Res.307:332-335. (6)Slevin, J.T. & Ferrada, L.P. (1985) Exp. Neurol. 89:49-58.

97 Elマウス脳のPoly(A)mRNAのcomplexity －cDNAによる分析－

撫井弘二、山上 栄、平山栄一、古塚大介、
大西 博、川北幸男
（大阪市大・医・神経精神）

〔要約〕
発作感受性のElマウスにおける全脳のPoly(A^+)-mRNAより逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、cDNA-RNA hybridization法を行い、発作非感受性のddYマウスと比較した。El(+)のcDNA-RNA hybridizationでは、Rot 1×10^4において75.1％の飽和に達し、少なくとも３つのcomplexityの異なったclassを持つ曲線が得られた。同様な曲線は痙攣履歴のないEl(o)やddYでも認められ、それらの飽和hybrid値は、80.4と67.4％であった。El(+)のcDNAとEl(o)またはddYのmRNAとの交叉hybridizationでの飽和hybrid値は、50.0と70.8％であった。El(o)のcDNAとEl(+)またはddYとの飽和hybrid値は、79.5と79.7％であった。ddYのcDNAとEl(+)またはEl(o)との飽和hybrid値は、50.5と56.2％であった。この結果はElとddYとでは、脳の遺伝子の活性化領域で大差があることを示唆している。またEl(+)はEl(o)よりmRNAのsequence complexityが高く、これは発作によって惹起された可能性が推測される。

我々は、発作感受性のEl(+)マウスでは、Polysomal poly(A^+)-mRNAのsequence complexityがddYマウスに比べて有意に低いことをsingle-copy DNAとのhybridizationにより明らかにした[5]。今回は逆転写酵素を用いてマウス脳のPolysomal poly(A^+)-mRNAに相補的なcDNAを合成し、cDNA-mRNA hybridization法でこの相関に検討を加えた。

［方法］ １）生後25日より週一回の放り上げ刺激を加え、痙攣を誘発させたEl(+)マウスと痙攣履歴のないEl(o)マウスとに分け、加えて非痙攣性のddYマウスをも用いた。２）Polysomeは前報[11]に従って調製した。Poly-(A^+)-mRNAはOligo(dT)カラムを用いて[1]、分離した。３）Poly(A^+)-mRNAよりKacianら[6]の方法に従い[^{3}H]cDNAを合成した。その比放射能は3.86×10^7 dpm/μg cDNAであった。４）mRNAはThomasら[10]に従い、１％ Agaroseにformaldehydeを加え、電気泳動を行った。cDNAの電気泳動はMcDonellら[8]に従いAlkaline agarose gelを用いた。５）Grouseら[3]の方法に従い、5μl glass capillary tube内でcDNA-RNA hybridizationを行った。サンプルを100℃、５分間熱変性させた後、63℃でincubateした。種々なRotで反応を停止し、cDNA-RNA hybrid量をS_1 nuclease-DEAE cellulose filter法[7]を用いて測定した。

［結果］ ファージ$\phi\times174$ DNAをHaeⅢで消化し、DNA断片をマーカーとして、El(+)マウスのcDNAの大きさをFig. 1に示した。その大きさは約603－1078 nucleotide lengthであった。同様なpatternはEl(o)、ddYマウスのcDNAでも得られた。Fig. 2にddY、El(+)、El(o)マウスのcDNA-RNA hybridization curveを示した。3種の異なったsequence complexityを持つclassのcurveが得られた。その内 abundant classは16.1％、intermediate classが38.2％、rare classが47.4％であった。いずれの反応もRot 1.0×10^4で飽和に達した。Table 1にはEl(+)およびEl(o)とddYマウスのそれぞれのcDNAとmRNAの hybridizationにおける飽和hybrid値を示し、El(+)マウスのmRNAからのcDNAとEl(o) またはddYマウスとのmRNAのcross hybridizationでの飽和hybrid値とを比較した。またddYマウスのcDNAとEl(+)あるいはEl(o)マウスのmRNAの間で得られた結果と、El(o)マウスのcDNAとEl(+)あるいはddYマウスのmRNAの間で得られた結果も加えた。El(+) cDNAとEl(o) mRNAとの飽和hybrid値は、El(+)やddYの

mRNAとの場合に比べて有意な低値を示した。 El(o) cDNAと３群のmRNAとのhybridizationでは、３群の間に有意差を見出し得なかった。 ddYのcDNAとEl(+)またはEl(o)マウスのmRNAとのhybridizatinでは、ddY mRNAとの場合に比べて有意に低値であった。

［考察］ 今回得られたElマウスの飽和hybrid値は他の研究者[2,9]の結果と同程度であったが、Hahnら[4]の結果より低値であった。 Table 1の結果より、１) El(o)マウスのmRNAのnucleotide sequenceはEl(+)やddYと部分的に重複している。２) El(+)マウスにはEl(o)に存在しないmRNAが存在する。３) Elマウスのsequence complexityはddYマウスより低いと考えられる。従って、Elマウスの脳の遺伝子の活性化領域ではddYマウスとかなり差があることが示唆される。痙攣感受性を獲得したElマウスでは痙攣履歴のないElマウスには存在しないsequence complexityを持つmRNAがある可能性が考えられる。

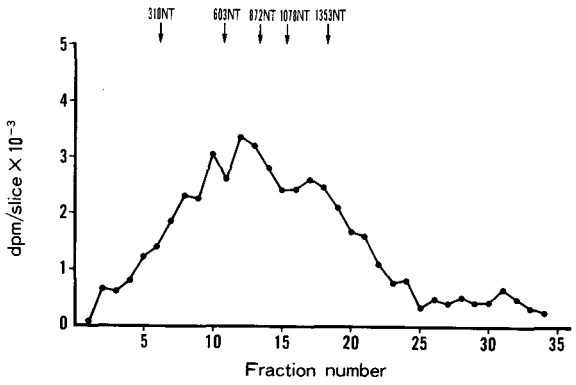


Fig. 1 Electrophoresis in alkaline agarose gels of cDNA transcribed from poly(A)⁺ mRNA of El mouse brain. Arrows indicate position of DNA segments as a marker.

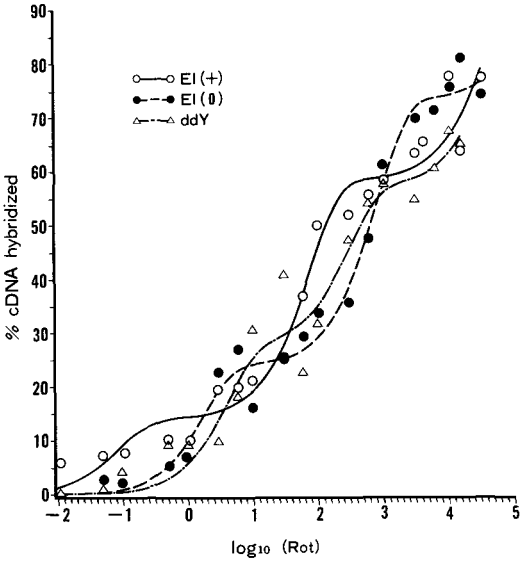


Fig.2 The cDNA-RNA hybridization curve.

Table 1 Saturated value of cDNA-mRNA hybridization

cDNA	mRNA El(+)	mRNA El(0)	mRNA ddY
El(+)	75.1 ± 3.1 (8)	50.0 ± 1.7 (7)	70.8 ± 2.9 (6)
El(0)	79.5 ± 2.3 (9)	80.4 ± 2.9 (6)	79.7 ± 3.2 (6)
ddY	50.5 ± 3.4 (6)	56.2 ± 3.6 (6)	67.4 ± 2.3 (7)

The value is mean ± SE% and number of experiments is indicated in parenthesis.

a): $p<0.01$, compared to value of El(+)cDNA-El(+)mRNA.
b): $p<0.01$, compared to value of El(+)cDNA-ddY mRNA.
c): $p<0.01$, compared to value of ddY cDNA-ddY mRNA.
d): $p<0.05$, compared to value of ddY cDNA-El(+)mRNA.
e): $p<0.01$, compared to value of ddY cDNA-ddY mRNA.

［文献］ 1) Aviv, J. et al. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412. 2) de la Bastie, D. et al. (1987) Eur. J. Clin. Inves. 110, 194-201. 3) Grouse, L. D. et al. (1980) J. Biol. Chem. 255, 3871-3877. 4) Hahn, W. E. et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5544-5547. 5) Hirayama, E. et al. (1986) Jpn. J. Psych. Neurol. 40, 361-365. 6) Kacian, D. L. et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2191-2195. 7) Maxwell, I. H. (1978) Nucleic Acids Res. 7, 2033-2038. 8) McDonell, M. W. et al. (1977) J. Mol. Biol. 110, 119-146. 9) Milcarek, C. (1979) Eur. J. Biochem. 102, 467-476. 10) Thomas, P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-52 . 11) Yamagami, S. et al. (1970) J. Neurochem. 17, 721-731.

98 E1マウス脳におけるオピオイドδレセプターの変化

相馬俊子、大西 博、小出誠司、山上 栄、
川北幸男

（大阪市大・医・神経精神）

〔要約〕

E1マウスにおける痙攣と脳内オピオイド系の関係を明らかにするために、E1とその母系である ddYマウス脳からP_2 Fractionを調製し、オピオイドδレセプターのアゴニストである [^{3}H]-D-Ala^2-D-Leu^5 enkephalin ([^{3}H]-DADLE) をリガンドとして結合実験を行い、最大結合数 (Bmax) と解離定数 (Kd) を求めた。 E1の発作発現前の生後14日、25日と不全発作発現期の50日の大脳においては、Bmax、Kdともに E1とddYの間に差はなかったが、痙攣発作発現後の150日の大脳において、E1のBmaxが有意に増加した。脳の部位別では、一般にE1のBmaxはddYより高値を示し、生後25日のE1の海馬と中隔野のBmaxがddYに比べて有意に増加し、150日のE1の海馬、中隔野と大脳皮質のBmaxも有意に増加した。Kdは両群で差がなかった。以上の結果から、E1の痙攣発作の病因に海馬、中隔野、大脳皮質のオピオイドδレセプターが密接に関係していることが示唆される。

morphineやオピオイドペプチドを脳室内[4]や脳の局所[2]に投与した場合に脳波上や行動上に変化がみられるという報告があり、オピオイド系が痙攣に関与することが推測されている。さらに、キンドリング[9]や電撃痙攣[5]後の脳内オピオイドペプチド含量の変化が報告されている。一方、遺伝性てんかんモデルを用いた研究[1,3,8]は少ないが、オピオイドレセプター-の性状については、発作感受性をもつスナネズミの脳をautoradiographyで調べた報告があり[6,7]、痙攣素因に脳内オピオイド系が重要な役割を果たすことが示唆されている。今回我々は、遺伝的に痙攣素因を有するE1マウスの各発育時期と脳の部位別についてオピオイドδレセプターの解析を行った。

[方法]　実験動物：E1および、その母系であるddYマウスを用いた。 E1には生後28日目から、週1回の割合で、40回の放り上げ刺激を行った。50日前後で刺激時に不全発作を生じ、75日前後で完全な痙攣発作を示した。結合実験：放り上げ刺激の影響が及ばないと考えられる、刺激後3日目の発作間歇期に断頭し、脳を摘出した。全脳から嗅脳、橋-延髄、小脳を除いたものを大脳として用い、脳を部位別に分ける場合には Sidmanのアトラスに従い、8部位に切り出した。Whittackerらの方法によりマウス脳から調製した P_2 Fractionに、0.2～10 nMの種々の濃度の[^{3}H]DADLEを加えて24℃で30分間incubateした。全結合量と、20 μM DADLE存在下の非特異結合量の差を特異結合量とし、得られたSaturation curveをSimplex法で解析し、Hill係数とBmax、Kdを算出した。

[結果]　E1、ddYともにいずれの発育時期、脳部位においても、10 nMの [^{3}H]DADLEで飽和され、Hill係数は0.8～1.2の間の値を示し、1 siteモデルによく適合した。各発育時期の、大脳のBmaxとKdを比較すると、生後14日、25日、50日におい

Table I. Bmax (fmol/mg protein) and Kd (nM) values in cerebrum of 14, 25, 50 and 150-day-old mice of E1 and ddY strains.

	Strain	14 days	25 days	50 days	150 days
Bmax	E1	148.8 ± 1.6	156.0 ± 2.2	160.6 ± 4.7	190.3 ± 12.9] *
(fmol/mg protein)	ddY	154.8 ± 5.0	141.4 ± 16.1	158.8 ± 9.0	147.9 ± 16.4]
Kd	E1	1.51 ± 0.11	1.74 ± 0.62	1.40 ± 0.26	1.35 ± 0.15
(nM)	ddY	1.72 ± 0.26	1.44 ± 0.13	1.22 ± 0.39	1.24 ± 0.23

* $p<0.05$, compared to ddY

て 両群にBmaxの差はなかったが、150日のEl のBmaxが有意に増加した（Table Ⅰ）。Kdはいずれの時期においても差がなかった。生後25日と150日の脳を部位別に比較すると、Elにおいて25日の海馬と中隔野の、150日の海馬、中隔野と大脳皮質のBmaxが有意に増加した（Table Ⅱ）。Kdは両群に差がなかった。150日のElの大脳のBmaxの増加は、量的に大脳の約40％をしめる大脳皮質のBmaxの増加を反映していると考えられる。なお、小脳は特異結合量が極めて低く、レセプター解析ができなかった。

Table Ⅱ. Bmax (fmol/mg protein) values in different brain regions at 25-day-old and 150-day-old mice of El and ddY strains.

Region	Strain	25 days	150 days
Cerebral cortex	El	119.3 ± 10.6	156.0 ± 6.4]*
	ddY	106.6 ± 8.9	103.1 ± 30.3]
Hippocampus	El	142.6 ± 14.5]*	123.0 ± 15.8]*
	ddY	102.6 ± 12.2]	92.5 ± 6.1]
Septal area	El	132.9 ± 18.3]*	163.7 ± 10.3]*
	ddY	92.7 ± 15.5]	126.2 ± 13.1]
Striatum	El	172.8 ± 6.4	201.6 ± 32.8
	ddY	163.0 ± 9.3	192.8 ± 17.9
Amygdala	El	160.0 ± 30.2	171.1 ± 32.6
	ddY	143.6 ± 21.6	156.4 ± 38.0
Thalamus plus Hypothalamus	El	126.0 ± 13.9	118.3 ± 4.6
	ddY	104.4 ± 10.5	114.6 ± 2.9
Pons-medulla	El	111.0 ± 20.8	67.2 ± 15.0
	ddY	84.4 ± 2.5	60.9 ± 8.6
Cerebellum	El	n.a.	n.a.
	ddY	n.a.	n.a.

* $P<0.05$, compared to ddY
n.a., not applicable

［考察］ 今回我々が［^{3}H］DADLEを用いて行った結合実験では、Elのオピオイドδレセプター密度がddYに比べて増加した。放り上げ刺激を受ける前で、痙攣を誘発していない生後25日のElの、海馬と中隔野のδレセプター密度がすでに増加しており、痙攣発現後の150日でも増加しているのは、これらの部位のδレセプターが、Elの痙攣素因に密接に関係していることを示唆している。150日のElの大脳皮質のδレセプター密度の増加は、痙攣のtriggerと関係するのかもしれないが、これについては、他の発育時期の脳の部位別の解析や、生後一度も痙攣を誘発させていないEl(o)との比較が必要であろう。一般にNeurotransmitterの放出減少は、それの作用部位であるレセプターのup-regulationを生ずるとされており、Elのδレセプター密度の増加から、δレセプターに選択性の強い内因性のMet-enkephalin、Leu-enkephalinなどの放出減少か合成阻害が推測される。オピオイドペプチドは、痙攣に対し、促進的または抑制的であるという、相反する報告がみられるが、Elの脳ではδオピオイド系が、各発育時期、脳部位別に、痙攣に抑制的に作用するのではないかと考えられる。

［文献］ 1）Bajorek, J. G. et al. (1982) Peptides 3, 83-86 2）Cain, D. P. et al. (1985) Brain Res. 338, 327-336 3）Chen, C. S. et al. (1976) Br. J. Pharmac. 58, 517-520 4）Henriksen, S. J. et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5221-5225 5）Hong, J. S. et al. (1979) Brain Res. 177, 273-278 6）Lee, R. J. et al. (1984) Neuropeptides 5, 105-108 7）Lee, R. J. et al. (1986) Brain Res. 380, 76-82 8）Meldrum, B. S. et al. (1979) Brain Res. 170, 333-348 9）Vindrola, O. et al. (1981) Neurosci. Letters 26, 125-130.

99 ビタミンB6拮抗剤投与によるマウス脳内 c-fos mRNA 発現について

水野 有武、 溝渕 宗秀、 石橋 由朗、 松田 誠
慈恵医大 医化学

〔要約〕 Vitamin B_6 拮抗剤を投与したとき痙攣が誘発されるが、このとき癌遺伝子の一つである c-fos の mRNA の発現をマウス脳で検索した。 Vitamin B_6 拮抗剤として penicillamine, hydrazine, thiosemicarbazide および dooxypyridoxineを用いた。 マウス脳内には基底レベルの c-fos mRNA の発現が弱いけれども認められる。 痙攣時、penicillamine や hydrazine, thiosemicarbazide では c-fos の発現は基底レベルかそれ以下であった。 しかし deoxypyridoxine 投与後 60 分で c-fos 発現は著明に増加した。 この発現の増加は投与後 10 分で認められ、60 分で著明となり 120 分では基底レベルに戻った。 c-fos mRNA の発現をマーカーとしてみる場合 Vitamin B_6 拮抗剤の中枢神経に対する作用機序は、その拮抗剤の種類により大きな差があることを示している。

「目的」 Vitamin B_6 拮抗剤は中枢神経性の痙攣を引き起こす。 Vitamin B_6 拮抗剤には数多くのものが知られている。 また、痙攣の起こりかたや発現時間も拮抗剤によりいろいろである。 1987 年 Morgan らは Vitamin B_6 拮抗剤でない痙攣剤 metrazol を用いて中枢神経で c-fos mRNA の発現増加を報告している(1)。 さらに、Dragunow らは電気的 kindling 刺激で歯状回の神経細胞に c-fos-like protein の増加を認めている(2)。 このことは痙攣時、過剰の刺激が特定の神経細胞に働き c-fos gene を発現させるのではないかと考えられる。 そこで、今回われわれは種々の Vitamin B_6 拮抗剤を用いて、中枢神経性の痙攣時の c-fos mRNA 発現を検討した。

「方法」 雄性の ICR 系マウス 5 週齢に 4 種類の Vitamin B_6 拮抗剤を腹腔内に注射した。 すなわち、thiosemicarbazide (Tsc, 15 mg/kg of body weight) それに L-penicillamine (Pcm, 250 mg/kg), hydrazine HCl (350 mg/kg), 4-deoxypyridoxine HCl (Dop, 200 mg/kg) である。 痙攣発作時に頸椎脱臼させてからすみやかに全脳を取り出し RNA の分離抽出に用いた。 平均して Tsc では 52 分後、Pcm では 134 分後、Hydrazine では 30 分後、そして Dop では 59 分後であった。 Dop に関しては時間経過を 10, 20, 40, 60 そして 120 分と追った。

RNA の抽出はマウス脳から Guanidinium/Cesium chloride 法に従い行った。

Northern blot analysis は抽出した total RNA を 1% formaldehyde agarose gel 電気泳動した後、nitrocellulose 膜にトランスファーし、v-fos cDNA を (α-^{32}P) dCTP でラベルして得られたプローブを用いて hybridization を行なった。 v-fos cDNA は宝酒造より購入した。 一部の実験では dot blot 法を用いた。

「結果および考按」 各 Vitamin B_6 拮抗剤による痙攣時の脳内 c-fos mRNA 発現を northern blot 法でみた結果を Fig. 1 に示す。 Line 1 はコントロールのマウスで基底レベルの mRNA の発現を示している。 Line 5 は Dop で処理したマウス脳で c-fos mRNA 発現が有意に増加している。 それに比べ Line 2-4 の hydrazine や Pcm , Tsc 投与マウス脳では基底レベルかそれ以下の発現をしめした。 このことは c-fos mRNA の発現が Dop のときと違い増加しないか、むしろ減少していることを示している。 Fig. 2 は Dop 投与群の c-fos mRNA 発現の時間経過である。 c-fos 発現の増加は 10, 20,40 分と著明でないが発現増加がみられた。 痙攣発作を起こす 60 分ではその発現は最大となる。 そして 120 分後では元の基底レベルに戻る。 この傾向は Morgan らの報告した

metrazol による痙攣時の c-fos 発現増加と同じであった。 Dop による c-fos mRNA 発現増加の脳内の局在は今回調べていないが、 metrazol とおなじく海馬である可能性がある。 Dop は脳内で pyridoxine から pyridoxal phosphte への経路を阻害すると考えられ、一方今回 c-fos 発現を増加しなかった hydrazine や Tsc, Pcmはそれぞれ pyridoxal phosphate に結合して hydrazone, carbazone 体や thiazolidine 誘導体をつくり pyridoxal phosphate の作用を阻害すると考えられている。 この作用の違いから今回の c-fos mRNA 発現の違いが生じたと考えられる。 Vitamin B_6 拮抗剤の作用機序の解明に一つの手がかりとなるとともに、c-fos gene とその生成蛋白の神経細胞での役割の解明にも役に立つものと考えられる。

1) J. J. Morgan et al. Sccience 237, 192-197 (1987)

2) M. Dragunow & H. A. Robertson. Nature 329, 441-442 (1987)

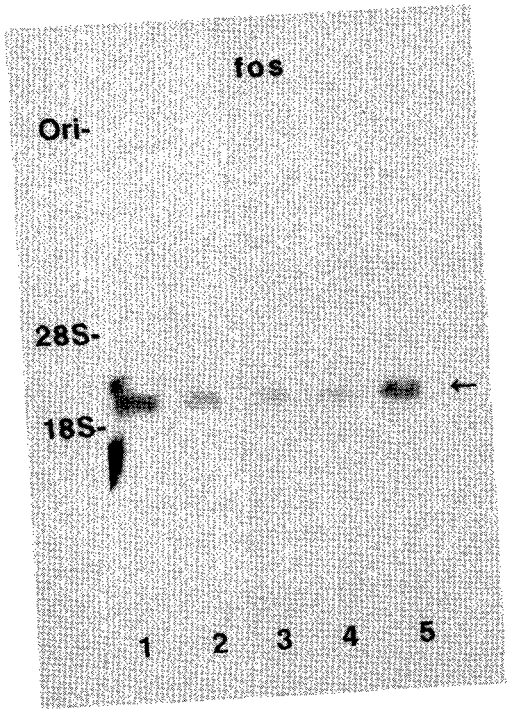


Fig. 1 Northern blot analysis of c-fos mRNA from mouse brain treated with vitamin B6 antagonists. 1. untreated control 2. hydrazine 3. penicillamine 4. thiosemicarbazide 5. deoxypyridoxine

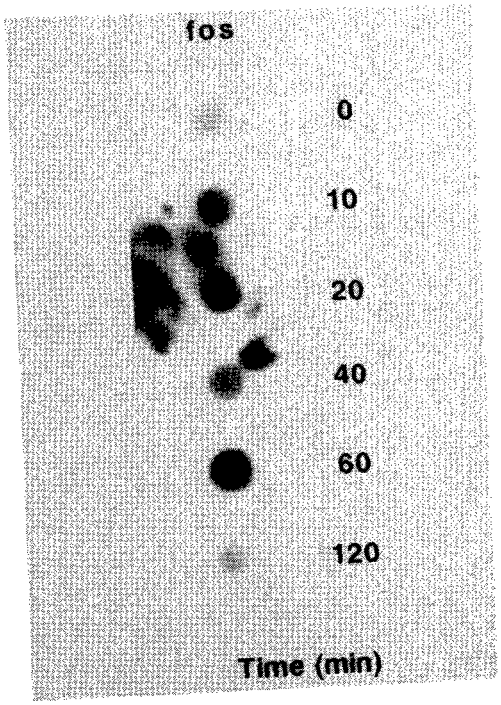


Fig. 2 Dot blot analysis of c-fos mRNA from mouse brain treated with deoxypyridoxine: as a function of time

100 脳ライソゾームに対するアルミニウムの作用

中村 祐，武田雅俊，鈴木英夫，森田 仁，多田國利，播口之朗，西村 健

（大阪大・医・精神医学）

〔要約〕

aluminium (Al)を脳内に注入した実験的神経原線維変化作製家兎脳（以下ENFC脳）において細胞分画を行ない、lysosome matrix enzymeであるカテプシンD（以下CD）、β -glucuronidase（以下b-G)の活性の分布を対照群と比較したところ、cytosol 分画に移行する割合の増加を認め、実験群においてlysosomeの安定性の低下が示唆された。また、粗lysosome分画にAlを作用させると、50μM 付近でlysosomeの安定性の低下が見られ、その作用は浸透圧の低下により大きくなり、$ZnCl_2$ により阻害された。

我々は、これまでにAlzheimer 病脳およびENFC脳においてCDの組織蛋白当たりの活性の上昇を報告した[1,2]。今回は、Alのlysosomeの安定性に対する影響をCD,b-Gを指標として調べたので報告する。

［材料と方法］

1：家兎（2.5 Kg）をpentobarbital 麻酔下で 0.25 mlのHolt's adjuvant(1.4% $AlCl_3$）を大脳実質内に注入しAl脳内注入家兎を作製し、処理10日後にエーテル麻酔下で氷冷0.25M sucrose にて灌流、断頭し、大脳皮質、海馬を取り出した。3 vol の0.25M sucrose /0.2M KCl（以下 Sol.A）を加えてteflon glass homogenizerにて1000回転,3回上下という緩徐な条件にてhomogenateを作り、650 g,10分遠沈し上清をとり、沈査をN 分画（核、破砕されていない細胞などを含む）とした。更に10000 g 、20分遠沈し、上清をcytosol 分画，沈査をLM分画（lysosomal -mithochondrial 分画）とし、Sol.A にて再懸濁し、 LM 懸濁液とした[3]。 homogenate 、LM分画の活性は、homogenate、LM懸濁液に 4 volの0.125% Triton X-100 /Sol.Aを加えそのCD,b-Gの活性を、cytosol 分画はそのままの活性を測定し、各々のhomogenate活性に対する割合を求めた。尚、N 分画に含まれる活性は、homogenate活性からcytosol 分画、LM分画を差し引いて求めた。尚、0.25mlのsalineを脳内注入したものを対照とした。 2：Alのlysosomeに対する影響を調べた。対照脳から得られたLM懸濁液を、0 -400μM $AlCl_3$,0.25M sucrose を含むbuffer B（ 0.2M KCl / 0.1M Acetate buffer/pH 5.0）中、37℃にて，80分間incubateし,12000 g,20 分遠沈し、上清のCD, b-Gの活性及び蛋白量を測定し、 0μM における値に対する割合として求めた。 3：lysosome安定性に影響する浸透圧とAlの相互作用について検討した。 0μM-50μM AlClと0.05-0.25M sucroseを含むbuffer B中、80分間incubateし同様に、上清に移行するCD,b-Gの活性の 0μM $AlCl_3$,0.25M sucrose における値に対する割合を求めた。 4：50μM $AlCl_3$,0.25M sucrose の系にて、hydrocortisone, phenobarbital, $ZnCl_2$ の影響を調べた。尚、CDの活性の測定は山本らの方法により、b-G の活性の測定はFishman らの方法により行ない、各検定には、Student's t-testをもちいた。

［結果］

1：細胞分画法によって得られた各分画に含まれるCD、b-G の総活性をhomogenateを100%ととして求めた（Fig.1A,B）。CD, b-G ともcytosol 分画(S) へ移行するCD、b-G の割合が、対照群に比して有意に増加し、CDは大脳皮質では25% 、海馬では50% の増加を示し、b-G は皮質では170%、海馬では100%の増加を示した。また、LM分画として得られるCD、b-G の割合が対照群に比して減少する傾向にあり、海馬においてCD、b-G とも有意の減少が見られた。また、N 分画に含まれるCD、b-G の割合には有意な変化はみられなかった。 2：[Alのlysosome安定性に対する影響] CD、b-G の両方の系においてAlの濃度 0μM から50μM の間では、濃度依存性に増加し、50μM 以上の濃度では濃度依存性に減少し、その傾向はCDの方が顕著であった。また、上清に移行する蛋白量は、濃度依存性に減少した（Fig.2)。中性pH領域ではAlの溶解度が極めて低く適当でなく、ｐH 5.0において実験を行なった。 3：[lysosome安定性に影響する浸透圧とAlの相互作用] CDの系において２．でみられた傾向は、浸透圧の低下と共に増強し、b-G の系でも同様の傾向が見られたが、その傾向はCDの系の方が顕著であった(Fig.3)。 4：Alの作用に対して、hydrocortisone, phenobarbital は無効であり、 $ZnCl_2$ はCD、b-G の上清への移行を阻害し、1mM でCDの系で30.8% , b-G の系で13.7% , 10mMでCDの系で55.8% , b-G の系で54.2% の阻害が見られた。

［考察］

今回我々は、ENFC脳において細胞分画を行ない、lysosome matrix enzymeであるCD、b-G の分布を調べたところ、対照群に比してcytosol 分画へ移行する割合の増加を認め、実験群では、lysosomeが壊れやすい傾向がみられた。また、対照群より得られたLM分画にpH 5.0でAlを作用させると、50μM 付近で上清へ移行するCD,b-Gの割合に増加がみられ、Alにより lysosomeのrapture が促進され、Znにより阻害されることが示唆された。pH 5.0においてAlが膜の流動性を低下させるという報告[4] やlysosomeにAlが蓄積するという報告[5] もあり、ENFC脳においてAlによってlysosomeの安定性に低下を来している可能性が示唆された。neurofilament [6] やMAPs[7] が中性pH領域においてCDにより分解されるという報告やCDの内因性のinhibitor が報告されていないことなどから、ENFC脳においてcytosol にCDがleakし、そのCDよってneurofilament やmicrotuble系蛋白が分解され、細胞骨格の異常に関与している可能性が考えられる。脳内Alの増加が報告されている透析脳症やAlの関与が示唆されているAlzheimer 病の病態にlysosome系の関与する可能性が示唆された。

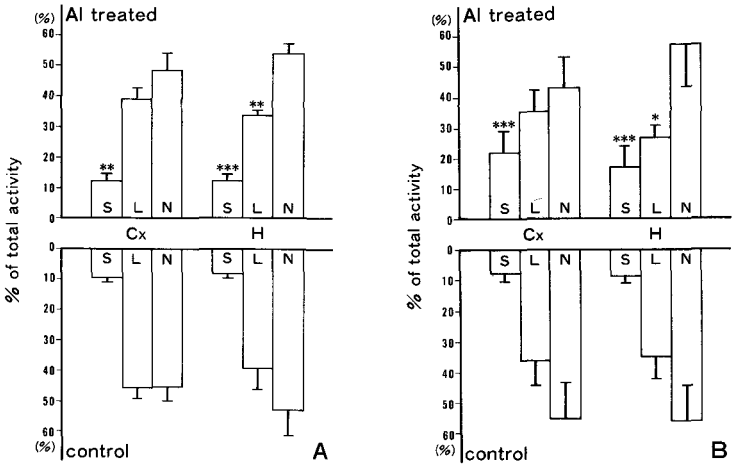


Fig. 1
Subcellular distribution of cathepsin D (A), β-glucuronidase (B), in Al-treated (N = 6) and control brains(N = 9).
***: p<0.005,
**: p<0.02,
*: P<0.05 vs control.

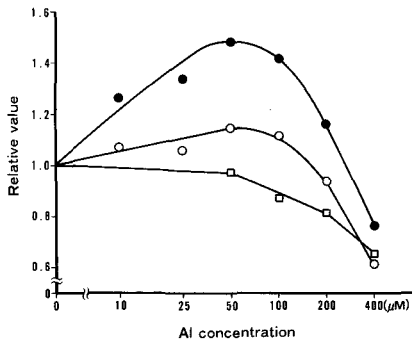


Fig. 2 Effect of Aluminium on release of cathepsin D(-●-), β-glucuronidase (-○-), and the amount of protein (-□-) to the 10000 g supernatant.

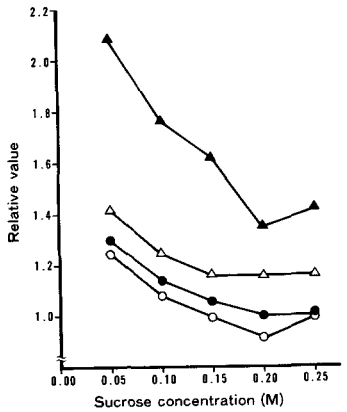


Fig. 3
Effect of osmorality on release of cathepsin D (-●-:0 μM, -▲-:50 μM Al), and β-glucuronidase (-○-:0 μM, -△-:50 μM Al).

［文献］ 1)鈴木ら, 神経化学, 25, 172, 1986. 2)Suzuki H et al, Neurosci. Lett. 89, 234, 1988. 3)Ignaro L, Biochem. Pharm. 20, 2847, 1971. 4)Viestra R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 84, 138, 1978. 5) De Boni U. et al., Acta Neuropath. (Berl.) 35, 285, 1976. 6) Suzuki H. et al., Neurosci. Lett., 89, 240. 1988. 7) Matus A. et al., Biochem., 26, 8083, 1987.

101 アルツハイマー病脳中におけるアミロイド前駆体タンパク各部(subsequence)の老人斑内局在

亀谷 富由樹[1]、羽賀 誠一[2]、田中 喜久子[1]、佐藤 麿人[1]、石井 毅[2]
(東京都精神医学総合研究所、[1]分子生物、[2]超微形態)

[要約]
アルツハイマー病(AD)脳中に沈着するアミロイド物質の主要成分はβタンパクであることが知られている。このタンパクのN末端部(β1-24)と前駆体タンパクの3カ所(R35;274-286, R36;527-540, R37;681-695)のペプチドを合成し、それらに対する抗体を作成した。これらの抗体を用いて、AD脳4例、正常脳2例について免疫組織化学分析を行った。AD脳において抗R35抗体は反応せず、抗R36抗体は抗β1-24抗体と同様に老人斑アミロイドを認識し、さらに抗R37抗体は老人斑中の変性神経突起様構造物を認識した。正常脳ではいずれの抗体も反応しなかった。これらのことからAD脳ではβタンパクおよびR36を含む断片が老人斑中にアミロイドとして沈着し、またR37を含むC末端部が変性神経突起部に存在することが示唆された。

[目的]
アルツハイマー病脳中には老人斑が特徴的にみられ、アミロイド物質が主要構成成分として沈着している。このメカニズムを解析することは、ADの病因の解明において非常に重要であると思われる。このアミロイド物質は分子量4.2Kdで、βタンパク(2)またはA4タンパク(4)として知られる線維性のタンパク質を主な成分としている。Kangらは(3)このタンパク質前駆体のcDNAの全一次構造を解析し、βタンパク質が、695残基のアミノ酸を持つ糖タンパク(amyloid precursor protein, APP)の一部であることを報告した。APPをコードするmRNAは神経系をふくむ各種組織に存在することが報告され(1)、一部組織においてはAPPの存在もイムノブロット法を用いて確認されている(5)。しかし脳内におけるAPPについては、アミロイドとして沈着するβタンパク以外の部分については不明のままである。本研究ではこのAPPの4カ所のペプチドを合成し、それらに対する抗体を作成し、AD脳についてAPP各部の老人斑内局在を免疫化学的に検索した。

[方法]
1)抗体の作成： Kangらの発表したAPPの一次構造をもとに、R35(274-286), R36(527-540), R37(681-695)を、そしてβタンパクのN末端部のβ1-24(597-620)の4つペプチドを合成した。これらのペプチドのC末端にシステインを結合させm-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide esterを用いてkeyhole limpet hemocyanin(KLH)と結合させた。このKLH複合体を兎に注射し抗体を作成した。これらの抗体の特異性はELIZA等で測定した。
2)免疫組織化学分析： これらの作成した抗体をもちいて、AD脳4例、正常脳2例についてavidin-bition法およびFITC標識法を用いて免疫組織化学分析をおこなった。
3)AD脳および正常脳内のAPPおよびその関連タンパクの分析： AD脳、正常脳を10mM Tris/1mM EDTA/1mM PMSF, pH7.6の緩衝液でホモゲナイズし、その遠心上清画分をトリス上清画分とし、沈査はSDSで可容化し、その遠心上清画分をSDS画分とした。さらにその沈査はconc HCOOHで処理した(HCOOH画分)。これらの画分について電気泳動し、その後イムノブロットを行い、APPおよびその関連成分の検索をおこなった。

[結果]

1)免疫組織化学分析

AD脳において、抗R35抗体に反応する構造物は見いだされなかったが、抗R36抗体は抗β1-24抗体と同様に、老人斑内のアミロイド及び血管壁アミロイドを認識した。抗R37抗体は老人斑内の変性神経突起様構造物と反応し、抗β1-24抗体と抗R37抗体を用いて二重染色を行うと、これらの変性神経突起様構造物は初期老人斑内に存在していた(図1)。さらにこの抗体はAD脳および正常脳内の神経細胞をひじょうに弱く認識したが、この反応が特異的か非特異的であるのかは現時点では定めることができなかった。正常脳については抗R35抗体、抗R36抗体とも反応しなかった。

2) AD脳および正常脳内におけるAPPおよびその関連タンパク

AD脳および正常脳のTris上清画分では、図2に示したようにAD脳、正常脳いずれにも共通して抗R37抗体と反応するAPPそのものと考えられる約85Kdのバンドが見られた。抗R35抗体、抗R36抗体とも同様の結果が得られ、上清画分についてはAD脳、正常脳で差は見られなかった。不溶性画分については現在検索中である。

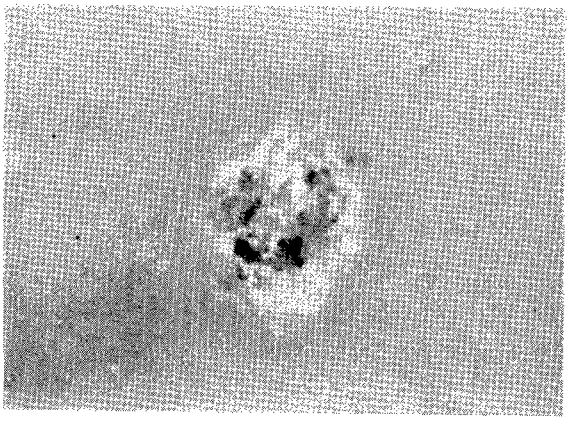


図1　老人斑の抗R37抗体(ABC法)と抗β1-24抗体(FITC標識)による二重染色

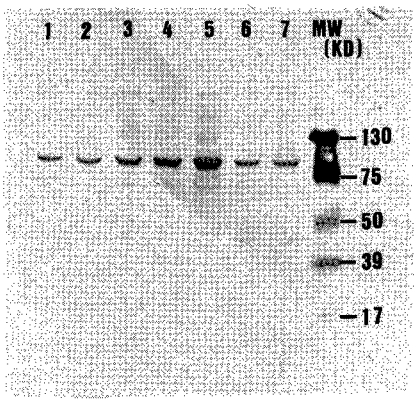


図2　抗R37抗体によるImmunoblot
1-3; AD, 4; DS, 5-7; Normal brain

[考察]

AD脳内で、抗R36抗体が老人斑を認識したということは、βタンパク以外にR36を含む断片がアミロイドとして沈着している可能性を示唆している。さらに興味あることは、抗R37抗体が老人斑内の変性神経突起様構造物を認識したということである。この構造物は抗ニューロフィラメント抗体と反応し、抗GFAP抗体等とは反応せず、またこの構造物はリポスチン粒子とも異なることからこの構造物は変性神経突起であり、R37を含む断片がその中に存在することを示唆している。これまでのところこれらの断片の同定ができてはいないが、AD脳内ではAPPの異常代謝が起こり、R36を含む断片およびβタンパク部分がアミロイドとして老人斑内に沈着し、R37を含むC末端部が神経突起内に局在することが推定された。

[文献]

1. Bahmanyer, S., et al. (1987) Science 237, 77-80.
2. Glenner, G.G. and Wong, C.W. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 885-890.
3. Kang, J., et al. (1987) Nature 325, 733-736.
4. Masters, C.L., et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4245-4249.
5. Zimmermann, K., et al. (1988) ENBO J. 7, 367-372.

102 リポゾーム封入による抗てんかん薬の持続的抑制効果発現と毒性軽減

森 則夫、太田 聖一、黒河内 彰、熊代 永
福島県立医科大学神経精神科

〔要約〕
ラットを用い、バルプロ酸(VPA)、フェニトイン(PHT)、aminooxyacetic acid(AOAA)をリポゾーム(LIPO)に封入した時のAMキンドリングけいれんやAM originのてんかん重積状態に対する効果を検討して次の結果を得た。(1) VPAのLIPO封入によりAMキンドリングけいれんの全身けいれん誘発閾値に対する持続的抑制効果が得られた。(2) VPAのLIPO封入によりてんかん重積状態(AM origin)のAM焦点は選択的に抑制され、抗てんかん作用はPHTより強力となった。(3) AOAAのLIPO封入によりAOAAの毒性（てんかん発作の誘発、死亡）が軽減され、AMキンドリングけいれんは著明に抑制された。以上のことから、抗てんかん薬のLIPO封入は、その作用を増強し毒性を軽減する有用な手段であることが示唆される。

（はじめに）
リポゾーム(LIPO)はリン脂質を素材とするマイクロカプセルで、その中に種々の薬物を封入することができる。理論的には、LIPOに封入された抗てんかん薬はLIPOにより保護され徐々に放出されるので、持続性の効果を発揮することが期待される。また、毒性をもつ抗てんかん薬ではその毒性の軽減が期待される。本研究の実験1では、バルプロ酸(VPA)またはフェニトイン(PHT)をLIPOに封入(VPA-LまたはPHT-L)した時に、ラットの扁桃核(AM)キンドリングけいれんまたはAM originのてんかん重積状態に対する長期の抑制効果が得られるか否かを検討した(実験1-(1)及び(2))。そして、実験2では、抗てんかん作用とてんかん発作誘発作用が近接しているaminooxyacetic acid(AOAA)の用量をLIPOに封入(AOAA-L)した時に、てんかん発作を誘発せずに抗てんかん作用が発揮されるか否かをラットのAMキンドリングけいれんを用いて検討した。

（方法と結果）
実験1-(1):VPA-LのAMキンドリングけいれんに対する効果
Wistar系雄ラットの左側AMにあらかじめ留置しておいた双極電極を通じ、電気刺激を加えてAMキンドリングを作成した。そして、全身けいれんを誘発する最小刺激強度を全身けいれん誘発閾値(GST, generalized seizure triggering threshold)とした。
VPAは脱イオン水に22.5 mg/mlの濃度で溶解した。LIPOおよびVPA-Lは次のようにして作成した。まず、L-α-phosphatydylcholine 40 μM、cholesterol 11.2 μM、stearylamine 5.7 μMをモル比7:2:1の割合でクロロホルムに溶解した。クロロホルムを除去した後、脱イオン水またはVPA溶液4 mlを加えて約50℃で撹拌し、LIPOまたはVPA-Lを作成した。
動物はVPA(N=8)、VPA-L(N=10)、LIPO(N=6)の3群に分けた。VPA群にはVPA 300 mg/kg、VPA-L群にはVPA-L 300 mg/kg、LIPO群にはLIPOのみを腹腔内に投与し、1時間後にGST刺激を加えた。以後、全身けいれんが3回連続して出現するまで24時間毎にGST刺激を加えた。
結果をFig. 1に要約した。LIPO群では抑制効果は全く認められなかった。VPA群では、1時間後のGST刺激で2/8例でafterdischarge(AD)の出現が完全に抑えられ、残り6/8例でもADは出現したが、明らかな発作症状を伴わなかった。しかし、24時間後には抑制効果は完全に消失した。VPA-L群では、1時間後、5/10例でADが完全に抑制され、5/10例ではADは出現したが明らかな発作症状は認められなかった。しかも、ADが完全に抑制された5/10例では、刺激強度をあげると全身けいれんが誘発されたが、GST刺激を加えた時の抑制効果は24時間以後も持続し、うち2例でこの効果は20日以上に及んだ。
実験1-(2):PHT-Lのてんかん重積状態(AM origin)に対する効果
Wistar系雄ラットの左側AMにあらかじめ留置しておいたguide cannulaを通じ、dibutyryl cAMP(db-cAMP) 200

μg/EDTA 67.2 ngを注入してんかん重積状態を誘発した。脳波は左側AMと両側感覚運動領皮質(Cx)から導出した。db-cAMP/EDTA注入後30分と60分に、あらかじめ頚静脈に留置しておいたカテーテルを通じ、PHT(N=5)またはPHT-L(N=6)を投与した。1回の投与量はPHT、PHT-Lのいずれでも40 mg/kg(1.5 ml/kg)とした。PHTの対照にはそのvehicle(N=5)を、PHT-Lの対照にはLIPO(N=5)を同様の方法で投与した。

vehicle及びLIPOには抑制効果は全く認められなかった。PHTとPHT-Lは1回目及び2回目のいずれの投与でも、その直後から約10分間、AMとCxの発作波、それに伴う発作症状を著明に抑制した。PHT-Lは2回目の投与後約1-2時間にかけて、Cxには殆ど影響を与えずにAMの発作波のみを著明に抑制した。しかも、PHT投与例ではdb-cAMP/EDTA注入後6時間を経過してもAMとCxに発作波が認められたのに対し、PHT-Lはdb-cAMP/EDTA注入6時間後にはAMとCxの発作波をほぼ完全に抑制した。

実験2:AOAA-LのAMキンドリングけいれんに対する効果

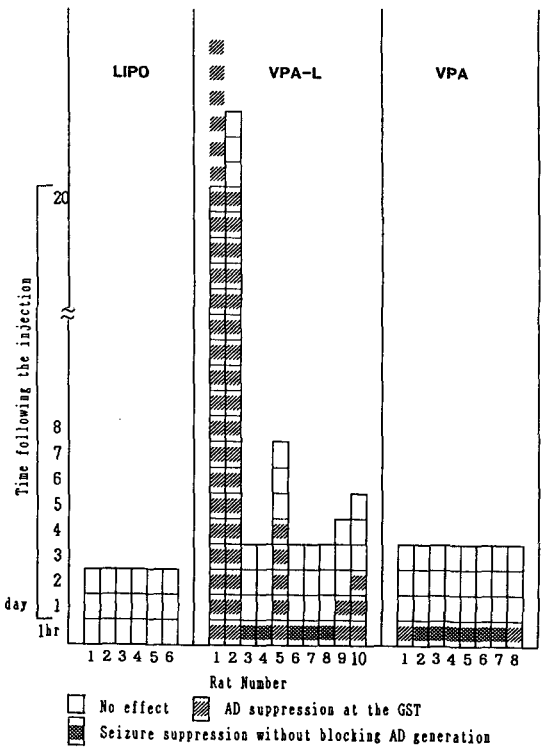
まず、AOAA 10(N=4)、20(N=3)、30(N=7)、40(N=5)mg/kgをAMキンドリングが完成したラットの腹腔内に投与し、その3時間後にGST刺激を加えた。その結果、10 mg/kgでは抑制効果は認められなかったが、20 mg/kgの1/3例、30 mg/kgの5/7例では発作症状が抑制された。しかし、30 mg/kgの1/7例では、AOAA投与約20分後からてんかん発作が出現し約1時間後に死亡した。40 mg/kgを投与すると、3/5例がてんかん発作を示し、約1時間後に全例が死亡した。

これに対し、AOAA-Lでは40 mg/kgを用いても、てんかん発作誘発例や死亡例は認められず、GST刺激による発作症状を著明に抑制した。

(考察)

実験1で、VPAやPHTをLIPOに封入するとAM発作の焦点に対する選択的、かつ持続的な抑制効果が認められることが示された。この結果は、先に当教室の深津(1)が、AMキンドリングけいれんを用いて検討したDN-1417(TRH誘導体)の抑制様式と同様のものである。従って、LIPOに封入した抗てんかん薬のAM発作の焦点に対する選択的持続的抑制効果は抗てんかん薬の種類によらないLIPO本来の特性に基ずくものであることが示唆される。また、実験2では、LIPO封入によりAOAA本来の抗てんかん作用は損なわれずに、その毒性が軽減されることが示された。以上のことから、抗てんかん薬のLIPO封入は、その作用を増強し毒性を軽減する有用な手段であることが示唆される。

Fig. 1 Lasting antiepileptic effect of VPA-L



(文献)

1. 深津敏彦:Liposomeに封入したTRH誘導体のkindlingけいれんに対する抑制効果。福島医誌、37:121-131, 1988.

103 高血圧短期運動療法モデルの検討II：中枢及び末梢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
（藤田学園保健衛生大学・医・生理，
新潟薬科大学・薬剤*）

［要約］高血圧短期運動療法モデル実験系（回転カゴを用いたSHRの夜間連続フリーランニング）を用いて，運動による中枢性および末梢性モノアミン含量の変動が，運動期間中の血圧変動といかに関係しているかについて検討した．前回の報告と同様，血圧は3日間および6日間runningでは有意に低下したが，9日間runningでは，軽度の低下傾向を認めた．また，心拍数は3日間および6日間runningで有意の減少をみたが，9日間runningでは軽度の減少傾向を示した．有意に降圧効果の得られた6日間runningの中枢モノアミン含量は，橋・延髄及び間脳ともにNE, DA及びDOPACの増加傾向，5HT及び5HIAAの減少傾向を認めた．また，橋・延髄および間脳内5HIAA量と血圧との間にそれぞれ有意の正相関を認めた．血漿中DA量は血圧との間に高い負の相関を認めた．以上より夜間のみの短期連続フリーランニングが高血圧運動療法モデルとなり得る事を立証した．また，本研究における血圧調節機序に中枢性には5HTが，末梢性にはDAがそれぞれ重要な役割を果していることが示唆された．

近年，高血圧の運動療法が注目されてきているが，その有効性及び降圧機序については，未だ不明な点が多い．これは実験動物を用いた運動療法モデル実験系が確立しておらず，療法期間中の生化学的および生理学的な情報の欠落によると考えられる．そこで我々は，運動療法による降圧機序解明の手掛りを得ることを目的とし，運動療法モデル実験系を構築すべく検討を進めてきており，昨年の本学会において，SHR(Spontaneously Hypertensive Rat)にwheel runningを用いた夜間連続フリーランニング負荷を与えることにより，動物の血圧が，運動開始後4～5日目において確実に低下することを見いだし，この方法が高血圧運動療法モデル実験系になりうる可能性のあることを明きらかにした[2]．また10日間の運動終了4日後のSHR脳内モノアミンに変動を認めることを報告した．そこで，今回，運動による中枢性及び末梢性モノアミンの変動が，運動期間中に認められる血圧の変動といかに関係しているかについて検討した．運動期間は前回報告の10日間連続夜間運動群において最も血圧の低下した4～5日目の前後2日間，すなわち3日間および6日間と，血圧が有意の上昇を示した9日間とした．

［実験方法］実験動物には12-14週齢の雄性SHR（日本Charles River社）を用い，実験期間を通して既報に従って飼育した[2]．総数26匹のSHRの血圧及び心拍数を測定した後，コントロール群（running wheelに入れずに通常飼育を行う群）10匹，3日間連続夜間運動群（3日間running）5匹，6日間連続夜間運動群（6日間running）6匹，9日間連続夜間運動群（9日間running）5匹に分けて実験を行った．血圧（間接法による尾動脈圧）及び心拍数は運動開始直前，運動期間終了後12時間後の2回測定した．また，3群のうち最も大きく血圧が低下した6日間runningよりコントロール3匹，運動群4匹を，血圧および心拍数の最終測定の後12時間後に断頭し，血液採取及び既報の方法[3]に従って橋・延髄及び間脳を摘出した．各組織及び血漿モノアミン含量（NE;Norepinephrine, EPI;Epinephrine, DOPAC;3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, DA;Dopamine, 5HT;Serotonine, 5HIAA;5-Hydroxyindole acetic acid）はHPLC-ECD法[3]により測定した．

表 フリーランニングによる血圧と心拍数の変動

Parameters	Preexercise	Postexercise (Control)	(Ex. for 3days)	(Ex. for 6days)	(Ex. for 9days)
Blood Pressure(mm Hg)	198±15 (n=26)	202±14 (n=10)	168±21* (n=5)	160±10* (n=6)	191±24 (n=5)
Heart Rate(beats/min)	397±50 (n=26)	389±44 (n=10)	316±42* (n=5)	326±18* (n=6)	360±36 (n=5)

Values are mean±SD. *$p<0.01$, compared with corresponding initial value.

［結果および考察］

(1)血圧および心拍数の変動：表に示す如く，血圧は3日間と6日間runningでは有意に低下したが，9日間runningでは血圧の上昇，下降あるいは不変の動物が混在しており，全体として軽度の低下傾向を認めた．また，心拍数は3日間および6日間running で有意の減少をみたが，9日間runningでは軽度の減少傾向を示した．3日間および6日間runningともに，有意の心拍数減少を伴った降圧が得られたことは，SHRでは夜間のみの短期連続フリーランニングが高血圧運動療法モデルとなりうることを立証したと考えられる．

(2)中枢モノアミン含量（橋・延髄および間脳内モノアミン含量）の変動：6日間runningの脳内モノアミン含量は，橋・延髄および間脳ともにNE, DAおよびDOPACの増加傾向, 5HTおよび5HIAAの減少傾向を認めた（図）．近年，5HTによる中枢性血圧調節に果たす役割が注目されている．しかし，5HT作動性神経が降圧的に働くか，もしくは昇圧的に働くかは充分解明されていない．無麻酔のラットにおいて脳室内に5HTを投与すると中枢性および末梢交感神経緊張を伴う昇圧を来す[1]という報告は，5HT作動性神経が昇圧的に働く可能性を示唆する．しかし，ハロセン麻酔下でラットの延髄内に存在するnucleus tractus solitarii (NTS)に両側性に5HTを微量注入すると一過性に血圧は低下する[4]という報告は，5HT作動性神経が降圧的に働く可能性を示唆する．本研究においては，6日間runningにより橋・延髄および間脳内5HIAA量と血圧との間に有意の正相関を認めた(橋・延髄：n=7, r=0.854, p<0.05, 間脳：n=7, r=0.839, p<0.05)．このことはランニングによって, 5HTおよびその代謝物である5HIAAが減少し, 降圧的に働いたと考えられる．従って，6日間runningの中枢性降圧機序には，脳幹部ニューロンのシナプス伝達に際して，5HTが神経伝達物質として関与している可能性が示唆された．

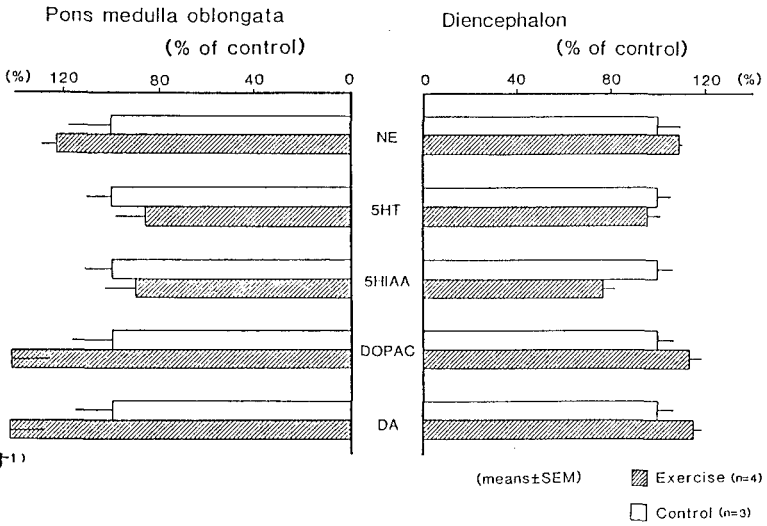


図　6日間ランニングによる脳内モノアミン含量の変動

(3)末梢モノアミン（血漿モノアミン）の変動：6日間runningの血漿中のNEおよびEPIは運動群とコントロール群との間に大きな変動がみられなかったが，DA量は，増加する傾向が認められた．また，これらの動物群の血漿中のDA量は血圧との間に高い負の相関が認められた(n=7, r=-0.963, p<0.01)．血漿DAは交感神経末端のDA$_1$受容体を介して末梢血管を拡張させ，その結果降圧的に働くことが知られている[6]．また，血漿DAは主として交感神経末端から放出されたもので，副腎髄質や腎由来のDAは少ない[5]と報告されている．これらの報告などから夜間のみのフリーランニングにおける血漿DA量の増加は交感神経末端からのDAの放出量が増加して降圧的に働いたものと推定される．以上より本研究におけるSHRの血圧変動の調節機序には中枢においては5HTが，末梢においてはDAが重要な役割を果していることが示唆された．

［文献］

(1)車谷　仁ほか(1985)日内分泌会誌 61, 775-783.

(2)松井　啓ほか(1987)神経化学, 26, 562-564.

(3)岡村　邦博ほか(1986)神経化学 25, 286-288.

(4)Shvaloff A. and Laguzzi R. (1986)Europoan J. Pharmacol. 283-288.

(5)Yoneda S. et. al. (1986)Jpn. Circ. J. 49. 1028-1034.

(6)吉村　学，高橋　伯夫(1987)循環器科　22. 440-447.

104 Parkinson 病惹起物質 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine及び 1-methyl-4- phenylpyridinium ion のマウス体温に及ぼす影響

佐藤 信範・只野 武・木皿 憲佐・＊荒井 裕一朗・＊杵鞭 宏育

（東北薬科大・薬理、＊昭和大・医・第二薬理）

〔要約〕
黒質-線条体dopamine(DA)神経毒である1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)と1-methyl-4-phenylpyridinium ion(MPP+)のマウス体温に及ぼす影響と視床下部モノアミン代謝につき検討を行った。両化合物は腹腔内投与(i.p.)投与初期に体温上昇作用を引き起こすが、この作用はtolazoline(TZL)前処理では抑制されず、atropine methylbromide (ATMB)、scopolamine methylbromide(SCMB)等の末梢性抗コリン薬前処理により抑制された。また、MPTPは投与後期に体温下降作用を示し、これはnomifensine(NF)、fluoxetine(FXT)、clomipramine(CLP)前処理により抑制された。しかし、desmethylimipramine(DMI)前処理では抑制されなかった。両化合物の体温下降時の視床下部モノアミン代謝について検討を加えた結果、両化合物はいずれも5-HT濃度の著明な増加と5-HIAA濃度の減少を示した。以上の結果から両化合物による体温上昇作用は末梢でのコリナージック神経機能亢進によって引き起こされ、体温下降作用は視床下部に於ける5-HT神経にMPP+が取り込まれた後、MAO阻害作用あるいは5-HT遊離阻害作用を示した結果発現する可能性が示唆された。

MPTPは脳内でMAO-Bにより代謝されMPP+に変換後、黒質－線条体DA神経に取り込まれ、この神経を破壊しParkinson病類似症状を引き起こす。したがってMPTPはParkinson病動物モデル発症薬としての有用性が示唆されている(1)。しかし、これら神経毒性作用の多くはMPTPを連続的に処理した報告が主であり他の作用についてはあまり検討されていない。すでに我々は両化合物の急性効果として自発運動量の低下とその際の線条体DA代謝変化について報告した(2)。また、前報(3)では他の急性効果として体温変化についても報告しMPTP i.p. 投与により体温上昇作用とそれに続く体温下降作用の二相性の作用を、またMPP+ i.p. 投与では体温上昇作用のみ、両化合物の脳室内投与(i.c.v.)では体温下降作用のみ見られることを報告した。このMPTPによる体温上昇作用は末梢でのコリナージク機能に影響する可能性を、一方、体温下降作用は機序不明の中枢作用により発現し、上述のDA神経毒性作用とは異なりMPTP がMPP+へと変換する必要性のないことを示唆した。今回は、MPP+の体温上昇作用機序につき検討すると共にMPTPによる体温下降作用の機序を視床下部モノアミン代謝の面から検討した。

実験材料及び方法

実験には全て体重25-30gのddY 系雄性マウスを使用し、マウス直腸温の変化は直腸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体温が37.0-38.0℃のマウスを選びあらかじめ室温23.0+1℃の実験室に1時間放置後、実験に使用した。

脳内モノアミンの分離は、MPTP i.p. 投与では240分後、i.c.v. 投与では60分後に、またMPP+ i.c.v. 投与では30分後にマウスを断頭し、Glowinski & Iversenの方法(4)に準じ視床下部を摘出した。続いてMuraiらの方法(5)に従い、HPLC-ECD法により視床下部中のモノアミンとその代謝産物を測定した。得られた結果は、Dunnett testにより有意差を算出した。

結果及び考察

1. MPP+ i.p. 投与時の体温上昇作用に対する検討

前報で報告したごとく、MPTP(24 mg/kg,i.p.)投与により投与初期の体温上昇作用(60分：約+1.5℃)と投与後期の体温下降作用(240分： 約-1.2℃)が、またMPP+(6 mg/kg,i.p.)投与では体温上昇作用(30分： 約+2.0 ℃)のみが観察された。このMPP+による体温上昇作用はTable 1に示すようにMPTPの体温上昇作用の場合と同様に末梢性の抗コリン薬ATMB及びSCMB前処理により抑制され、α受容体遮断薬のTZL前処理では抑制されなかった。従って、MPP+による体温上昇作用もMPTPの場合と同様に末梢でのコリナージック機能亢進に基づく可能性が示唆される。

2. MPTP i.p. 及び MPP+ i.c.v. 投与による体温下降作用に対するアミン取り込み阻害薬の影響及び視床下部モノアミン代謝に及ぼす影響

MPTP(24 mg/kg,i.p.)及びMPP+(10 μg/mouse,i.c.v.)投与による体温下降作用に対するカテコールアミンや5-HTの取り込み阻害薬の影響について検討を加えた。その結果、Table 2に示したようにMPTPの体温下降作用はDAの取り込み阻害作用の強いNF、5-HTの取り込み阻害作用の強いFXT、CLPによって抑制され、その効力は5-HT uptake blocker＞DA uptake blockerの順であった。しかしNEの取り込み阻害薬のDMI前処理ではこの体温下降作用には何らの影響も与えなかった。一方、MPP+の体温下降作用は5-HTの取り込み阻害作用の強いFXT及びCLPによってのみ抑制され、NF及びDMI前処理では何らの影響も受けなかった。

MPTP i.p.及びi.c.v.で見られた体温下降時の視床下部モノアミン代謝について検討した。その結果、いずれの投与経路でも共に著明な5-HT濃度の上昇(control群:708.2±25.3ng/g,i.p.群:1067.8±84.8ng/g ; control群:683.1±44.9ng/g,i.c.v.群:1155.8±43.3ng/g)と5-HIAA濃度の低下(control群:998.2±53.2ng/g,i.p.群:611.1±59.5ng/g;control群:1244.2±58.8ng/g,i.c.v.群:607.8±29.6ng/g)が見られた、しかしDA、NE及びそれら代謝物では変化はみられなかった。　一方、MPP+(20μg/mouse,i.c.v.)投与で見られた体温下降作用でもMPTP投与と同様に著明な5-HT濃度の上昇(control群:1206.3±86.6ng/g,MPP+群:2042.0±185.3ng/g)と5-HIAA濃度の低下(control群:2403.4±151.8ng/g,MPP+群:1348.5±142.3ng/g)が観察された。以上の結果より両化合物による体温下降作用はいずれも視床下部5-HT神経にMPP+が取り込まれた後、MAO阻害作用あるいは5-HT遊離阻害作用を引き起こした結果発現する可能性が示唆される。

Table 1 Effects of some agents on changes in mouse hyperthermia caused by MPP+.

Drug	Dose (mg/kg,i.p.)	Rectal temperature (℃) 60 min	90 min
Saline	——	37.4 ± 0.12	37.5 ± 0.16
MPP+	6	39.4 ± 0.27[a)]	39.2 ± 0.29[a)]
Atoropine (ATMB) methylbromide	20	37.8 ± 0.31[c)]	37.9 ± 0.26[b)]
Scopolamine (SCMB) methylbromide	20	38.2 ± 0.25[b)]	37.6 ± 0.32[c)]
Tolazoline (TZL) hydrochloride	20	38.8 ± 0.23	38.6 ± 0.19

Either of the pretreated drugs was administered 15 min prior to injection of MPP+. Results are expressed as the mean±S.E.M. for 10 animals in each group. a); significant differences from saline ($p<0.01$), b,c); from MPP+ treated group (b:$p<0.01$, c:$p<0.05$).

Table 2 Effects of catecholamine uptake inhibitor on changes in mouse hypothermia caused by MPTP and MPP+

Drug	Dose	Rectal temperature (℃) 180 min	240 min
Saline	———	37.0 ± 0.09	37.2 ± 0.08
MPTP	24 mg/kg i.p.	36.2 ± 0.09[a)]	36.3 ± 0.13[a)]
Nomifensine (NF)	2.5 mg/kg i.p.	36.6 ± 0.10[b)]	36.8 ± 0.13
Fluoxetine (FXT)	10 mg/kg i.p.	36.8 ± 0.07[b)]	36.9 ± 0.09[c)]
Clomipramine (CLP)	10 mg/kg i.p.	36.6 ± 0.13[b)]	36.8 ± 0.02[c)]
Desmethyl (DMI) imipramine	25 mg/kg i.p.	36.1 ± 0.04	36.1 ± 0.04

Drug	Dose	Rectal temperature (℃) 30 min	60 min
Ringer	———	37.0 ± 0.13	36.9 ± 0.14
MPP+	10 μg/mouse i.c.v.	34.6 ± 0.26[a)]	34.7 ± 0.27[a)]
Nomifensine (NF)	2.5 mg/kg i.p.	35.1 ± 0.25	35.3 ± 0.16
Fluoxetine (FXT)	10 mg/kg i.p.	35.8 ± 0.15[b)]	36.0 ± 0.19[b)]
Clomipramine (CLP)	10 mg/kg i.p.	35.9 ± 0.11[b)]	35.9 ± 0.12[b)]
Desmethyl (DMI) imipramine	25 mg/kg i.p.	34.7 ± 0.22	35.2 ± 0.20

Either of the pretreated drugs was administered 30 min prior to injection of MPTP and MPP+. Results are expressed as the mean±S.E.M. for 10 animals in each group. a); significant differences from saline ($p<0.01$), b,c); from MPTP or MPP+ treated group (b:$p<0.01$, c:$p<0.05$).

文献

1) Kinemuchi, H. et.al. (1987) Neurochem. Int. 11, 359-373
2) Tadano, T. et.al. (1987) Life Sci. 40, 1309-1318
3) Satoh, N. et.al. (1987) Life Sci. 41, 1415-1424
4) Glowinski, J. and Iversen L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669
5) Murai, S. et.al. (1988) J. Neurochem. 50, 473-479

105 マイネルト基底核破壊の受動的回避行動およびストレス反応ペプチドに及ぼす影響

新川久義, Ramon Cacabelos, 播口之朗, 西村 健
(大阪大・医・精神医学)

〔要約〕

ラットのマイネルト基底核破壊が, 小動物の行動観察装置であるOUCEM-86で作成したステップダウン式の受動的回避反応課題に及ぼす影響を調べると共に, 基底核破壊がストレス刺激後の脳内バソプレッシン(VP)および血中ACTH反応に及ぼす影響を調べ, 行動学的パラメーターと内分泌学的パラメーターとの関連を検討した. マイネルト基底核の破壊は使用したイボテン酸の用量増加に伴い獲得試験中の総運動量を減少し, 保持試験時の平均潜時を著明に短縮した. また, マイネルト基底核破壊は, イボテン酸の用量増加に伴い, 高張食塩水の腹腔内投与によるストレス刺激に対する視床下部のVP反応および血中ACTH反応を抑制した. 以上の結果は, コリン作動性ニューロンの障害により生じる記憶・学習障害にVPとACTHの変化が何等かの機構で関わっている可能性を示唆するものである.

[目的] 近年, 加齢およびアルツハイマー型痴呆患者の記憶および学習障害とコリン作動性ニューロン脱落との関連が注目されている(3,8,9). また, 記憶・学習と関わる神経ペプチドとして, ストレスで増加することが知られるバソプレッシン(VP)およびACTHがあり, これらのペプチドは, コリン作動性の支配を受けていることが知られている(5). そこで今回, 我々は, ラットの基底核を両側性にイボテン酸で破壊した後, 自室で開発した小動物の行動観察装置であるOUCEM-86^{TM} (Osaka University Computerized Electronic Maze) (2) でステップダウン式の受動的回避反応課題を作成し, コリン作動性障害の行動に及ぼす影響を調べ, さらに, ストレス刺激後の脳内VPおよび血中ACTH反応に及ぼす影響を調べることによって, 行動学的パラメーターと内分泌学的パラメーターとの関連を検討した.

[方法] 1群 7～8 匹の雄ウィスターラット (日本動物, 180～200g) を用いた. ラットはネンブタール麻酔後, 2μgの生理食塩水で溶解した 1μg, 2μg のイボテン酸を, ステレオ下に両側のマイネルト基底核に注入し, 2週間の回復期間後, 行動観察を開始した. 観察装置の内部面積は 2304cm^2 (48×48cm) であり, その中央に発砲スチロール性24×24×2 cmのステップを置き, その周囲の床面に1mA の電流を流した. 観察時間は 1試行 5分で, 第 1日, 第 2日, 第 5日に獲得試験を行い第 8日には電流を切って保持試験とした. この装置により, ステップ中央に置いたラットがショック領域にはいるまでの潜時およびステップ上またはショック領域上の運動量および滞在時間を自動的に記録した. 行動観察終了3 日後, ストレス刺激として10%の高張食塩水 5mlを腹腔内投与し, 5分後に断頭を行って脳および血液標本を得た. 採血は軀幹より行い, 脳を視床下部前部, 後部, 正中隆起および神経性下垂体に分けた. VPの測定はde Wied らの教室より得た抗体を用いた RIAにより行い, ACTHの測定は緑十字社製 RIA kitを用いた. 統計学的解析は ANOVAの student tを用いた.

[結果] マイネルト基底核の破壊は使用したイボテン酸の用量増加に伴い獲得試験中の総運動量, ステップ

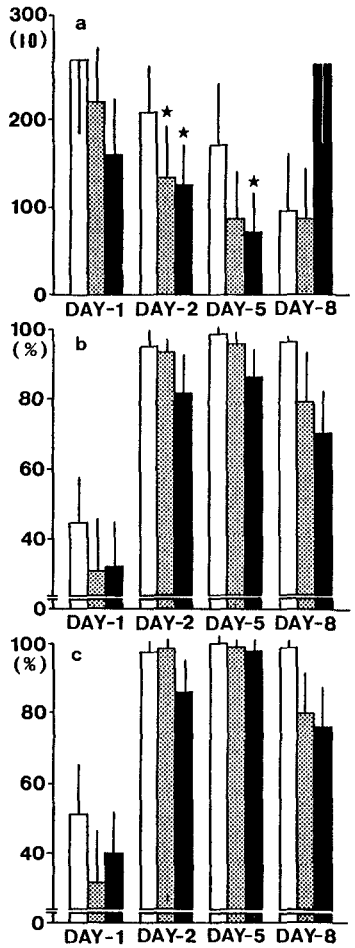


Fig.1 マイネルト基底核破壊の受動的回避行動に及ぼす影響. (a)総運動量, (b)全領域内運動量に対するステップ領域内運動量, (c)全領域内滞在時間に対するステップ領域内滞在時間, □:対照群, ▨:イボテン酸1μgによる破壊群, ■:イボテン酸2μgによる破壊群,
★:p < 0.01 vs CONTROL, N = 7～8 rats/group

における運動量比を減少し，ステップ上における滞在時間を短縮する傾向にあった（FIG.1）．また，イボテン酸によるマイネルト基底核の破壊は，保持試験時の平均潜時を著明に短縮した（対照群：252.8±90.1sec，1μg群：194.9±121.4sec，2μg群：189.6±11.7sec）．マイネルト基底核破壊は，イボテン酸の用量増加に伴って，10%食塩水 5ml腹腔内投与5分後にみられる，視床下部前部および後部のVPレベルおよび血中ACTHレベルの上昇反応を抑制した（FIG.2）．正中隆起および神経性下垂体には有意な変化は認められなかった．

［考案］既に，外因性のVP投与は能動的ならびに受動的回避反応の双方の消去を遅らせ(1,4)，さらに抗VP血清投与が受動的回避反応の保持を低下することが知られている(6,7)．また，下垂体摘出後のACTH補充療法は，障害された回避学習を正常レベルに回復させることが報告されている(10)．今回の結果はマイネルト基底核破壊，即ちコリン作動性ニューロンの障害が，ラットの運動量を減少し，受動的回避反応の獲得と保持を障害すると同時に，高張食塩水の腹腔内投与によるストレス刺激に対する視床下部のVPとACTHの反応を障害することを示している．コリン作動性ニューロンの障害により生じる記憶・学習障害に対して，VPとACTHがどの様に関わっているのか明らかではないが，その障害発現にVPとACTHが直接影響を及ぼしていると考えるよりは，VPとACTHの変化が基礎ホルモン状態を二時的に変化させることによって，次の刺激に対する行動反応に影響を及ぼしていると考えた方が自然であるかも知れない．即ち，刺激でVP，ACTHが増大することが，次の刺激に対する準備状態を整えるように，基礎ホルモン状態に働いてコリン作動系の記憶・学習獲得機能を助けていると考えられる．この仮説を証明するために，さらに研究が必要である．

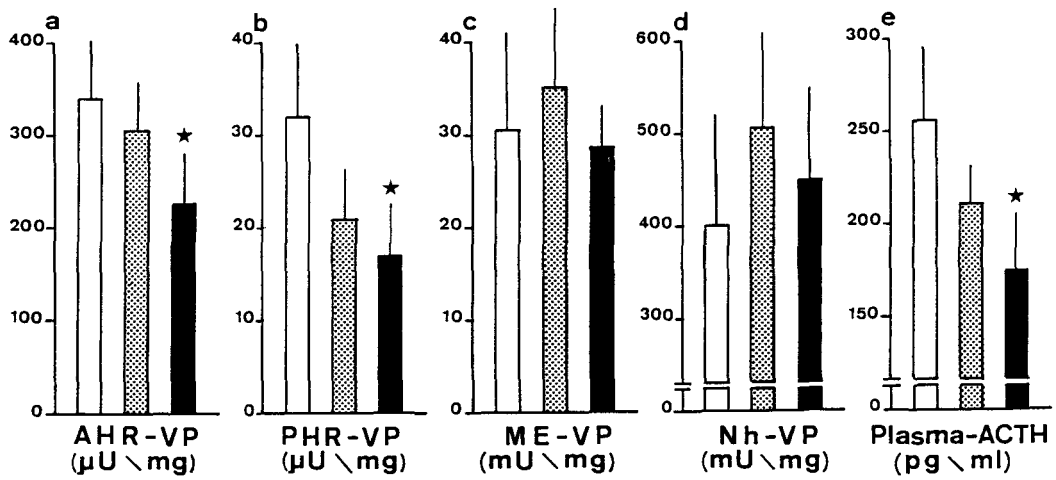


Fig.2 マイネルト基底核破壊のストレス反応ペプチドに及ぼす影響．(a)視床下部前部VP反応，(b)視床下部後部VP反応，(c)正中隆起VP反応，(d)神経性下垂体VP反応，(e)血中ACTH反応．□：対照群，▨：イボテン酸1μgによる破壊群，■：イボテン酸2μgによる破壊群，★：$p < 0.01$ vs CONTROL，N = 7～8 rats/group

［文献］

(1) Ader, R. and De Wied, D. (1972) Psychonomic Sci. 29:46-48
(2) Cacabelos, R., Niigawa, H. et al. (1988) Hormone Res. 29:129-132
(3) Davies, P. and Maloney, A.J.F. (1976) Lancet, ii:1403
(4) De Wied, D., Bohus, B. et al. (1974) Prog. Brain Res. 41:417-428
(5) Gregg, C.M. (1985) Neuroendoclinology. 40:423-429
(6) Kovacs, G.L., Buijs, R.M. et al. (1981) Physiol.Behav. 28:45-48
(7) Kovacs, G.L., Veldhuis, H.D. et al. (1986) Brain Res. 371:17-24
(8) Perry, E.K., Perry R.H. et al. Lancet, i:189
(9) Smis, N.R., Bowen, D.M. et al. (1983) J.Neurochem. 40:503-509
(10) Weiss, J.M., McEwen, B.S. et al. (1970) Amer.J.Physiol. 218:864-868

106 イボテン酸によるNucleas Basalis of Magnocellularis破壊による学習記憶障害モデル動物作成の試み

山崎りつ，岡田理之，田口浩資郎，高橋美枝，山下元司，池田久男
高知医大，神経精神科

〔要約〕ラットで，Acetylcholine性神経の起始核の１つであるNucleus basalis of Magnocellularis(NBM)をiboten酸を用いて破壊し,(1)Oltonらの８方向放射状迷路学習課題によって，新しい学習形式に対する影響，及び一旦獲得された学習に対する影響を検討するとともに(2)choline性神経支配をうけている脳部位であるfrontal cortexとhippocampusでCholineacelyltransferase(CAT)活性と，dopamine(DA),Noradrenaline(NA)含量を測定した。結果は(1)学習の形成に破壊の影響は認めず，一度達成基準に達した学習成績にも，変化はなかった。Strategy patternは対照群において経時的に変化し，一定のパターンを採るようになったが，破壊群にはパターン形成の傾向はなかった。一度形成されたパターンは,NBM破壊によっても，変化がなかった。(2)CAT活性は，破壊部より投射をうけているfrontal cortexでのみ有意に低下し，hippocampusでは変化がなかった。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，本動物ではcortexのコリン系の選択的機能低下は認めたものの，従来の評価尺度に反映されている学習能力低下は認められなかった。Strategy Pa-tternの迷路学習における評価は，今後検討の必要があるが，NBM-cortex系の機能はこのパターン形成と関連があると思われた。

［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，なかでも大脳皮質に線維を送っているとされるNBMをIbo-ten酸注入により破壊し，その効果を行動学的，生化学的に評価することとした。特に，行動学的には記憶の獲得と維持各々の過程に及ぼすNBM破壊の影響について検討を試みた。

［実験方法］

対象：Wistar系雄ラット，手術時，A群10週令，B群15週令

破壊方法：麻酔下で，脳定位固定下にマイクロシリンジを挿入し，両側NBMにIboten酸溶液（60nmol/μl,phosphate,buffered saline)を各々0.5μl,5分間で注入した。逆流防止のため５分静置後抜去した。対照群には，同量の溶媒のみを注入した。実験終了後，脳の固定標本を検討した。

行動実験：Oltonらの高架式８方向放射状迷路学習課題を用いた。A,B,2groupに分け，A groupは術後試行を開始した。B groupは予め試行を行い学習達成基準に達した個体のみを手術に供し，術後再度試行を行なった。装置は光量，温度などを一定にした静かな専用の部屋に装置した。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。給餌制限を行ない，実験期間中は体重を標準体重の70～80%に維持した。実験は，夜間の同じ時間帯に，各個体１日１試行を行なった。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とるようにさせ，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ト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° Cで15min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，75mg/ml Na［B(C6H5)4］/3-heptanone溶液750μlを加えて10秒かくはんした後3000rpm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1nM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 co-lum(ODS) 4.6×150mm,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，餌が取れなかった場合を誤選択とした。評価尺度として，①正選択数，学習達成基準，②Initial Correct Respo-nse,③Strategy Patternを用いた。今回Strategy Patternの分析にあたって，移動形式を，ラットがアームから次のアームに移動する2つのアーム間の角度を用いて表現した。①最初の８選択中の正選択数を経時的に比較すると，A groupにおいて，NBM破壊群は若干の学習達成の時期

Fig.1

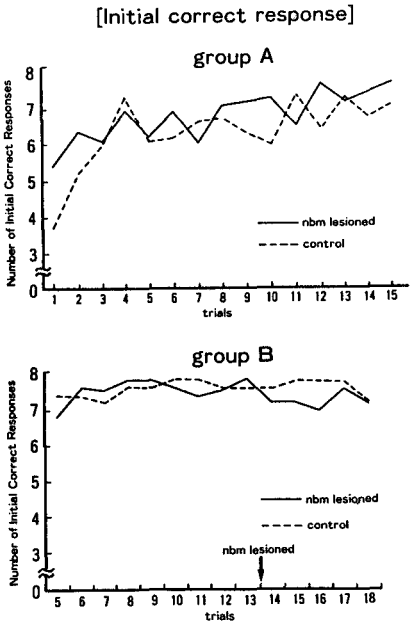
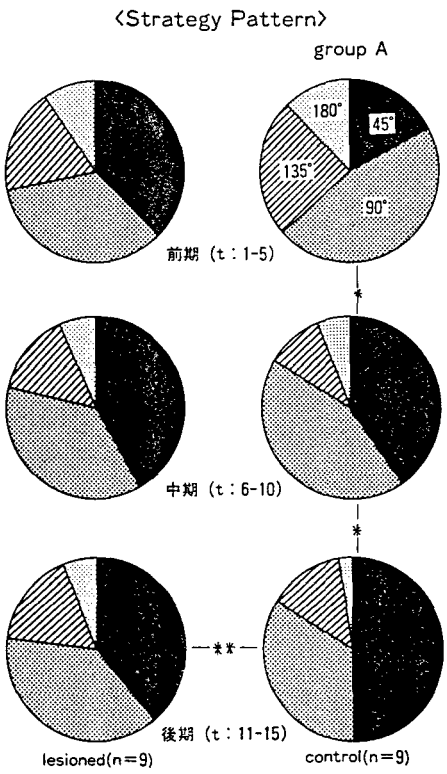


Fig.4



が遅れたものの，正選択数平均では有意な差は認められなかった。ICRにも図１に示すとう差は認められなかった。図4に示すように，対照群には，試行が進むにつれて45°の移動，つまり隣のアームへと順次手際よく移動を行なうものが増加するのに対し，破壊群にはその傾向がみられず，試行後期においては２群間にパターンの差が認められた。B群において,即ち，一旦迷路学習の達成基準に達した動物のNBMを破壊した場合，正選択数,ICRとも対照群との間に差は認められなかった。形成されていたStrategy patternにも変化は認められなかった。

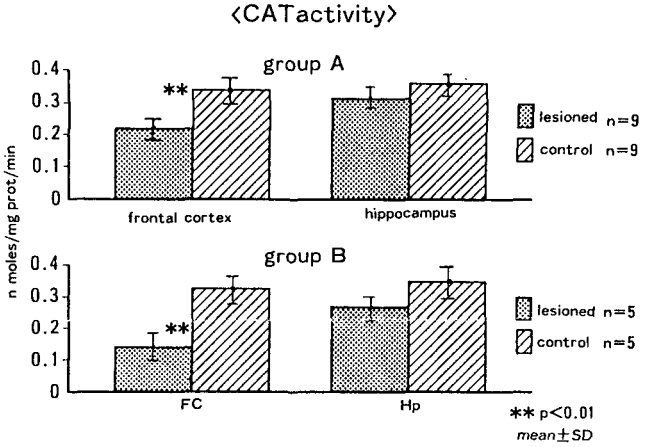
＜実験２＞

脳組織標本にて，iboten酸注入部位での神経細胞の脱落を認めた。

＜実験３　CAT活性測定＞

両群とも，行動実験終了後，A群術後９週目，B群術後7週目にCAT活性を測定した。結果は図2の通りで，両群ともFrontal Cortexにて,CAT活性の有意な低値を認め，Hippocampusには変化を認めなかった。

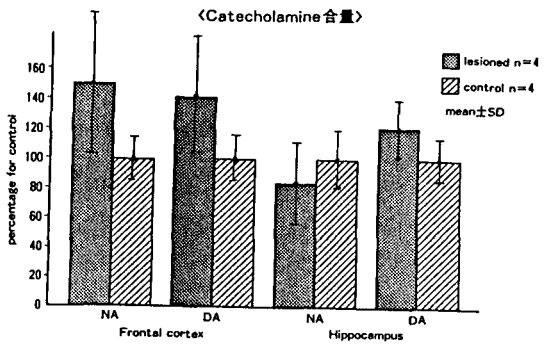
Fig.2



＜実験４　Catecholamine含量測定＞

Fig.3

frontal cortexとhippocampusで，dopamine, noradrenaline含量を測定した結果は図3のとうりで，破壊群と対照群との間に差は認めなかった。



［考察］

NBMの破壊により，生化学的には，Cortex ch--oline系の選択的機能低下を引き起こし得た。しかし，従来の迷路学習評価尺度においては，学習記憶の獲得,維持双方とも能力低下は認められなかった。Strategy Patternは，迷路学習上，いかなる学習能力，記憶と関連するか，今後の詳細な検討が必要であろうが，その形成の過程において，NBM-cortex系の関連が示唆された。

［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
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

107 S-Adenosyl-L-methionine (SAMe)の海馬神経細胞壊死抑制効果

佐藤博実、森口幸栄
(富士化学工業㈱、研究部)

〔要約〕
ラットに10分間の前脳虚血を負荷し、海馬CA1領域に生じる遅発性神経細胞壊死に及ぼすS-adenosyl-L-methionine (SAMe)およびその関連化合物の効果を検討した。その結果、SAMeは用量依存的に神経細胞壊死を抑制した。しかし、SAMeの前駆体であるL-methionineや代謝物であるS-adenosyl-L-homocysteine (SAH), 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA)およびadenineにはその作用は認められなかった。従って、神経細胞壊死抑制効果は前駆体や代謝物ではなくSAMeによる作用であることが確認された。また、SAMeとtransmethylationの阻害物質であるSAHを同時投与するとSAMeによる改善効果が抑制されたことより、SAMeの神経細胞壊死抑制効果にはtransmethylationの関与が示唆された。一方、SAMeはリン脂質phosphatidylcholine (PC)の生合成に関与しているが、SAMeとは別の経路でPC生合成に関与するCDP-cholineおよびPCの効果を検討した結果、これらは神経細胞壊死を抑制しなかった。このことより、神経細胞壊死の抑制が細胞膜の修復による作用であると仮定すると、SAMe経路で合成されるPCの重要性が示唆される。

【目的】

SAMeは生体内でATPとL-methionineより生合成され、主として、生体内アミン類、リン脂質、核酸、蛋白質など生体内物質のtransmethylationにおいてメチル基供与体として関与している。近年、SAMeの脳虚血モデルに対する延命効果(1)や抗脳浮腫効果(2)が報告され、脳血管障害に対する有効性が示唆されている。そこで今回我々は、一過性の脳虚血を負荷したラットの海馬CA1領域に生じ、しかも薬物の投与により治療可能である「遅発性神経細胞壊死」(3)の現象に注目し、この実験系を利用してSAMeの効果を検討した。またSAMeの代謝関連化合物の効果もあわせて検討して、神経細胞壊死に及ぼすSAMeの作用機序を推測した。

【方法】

前脳虚血モデルはPulsinelliらの方法(4)により作成した。pentobarbital麻酔下に、雄性Wistarラット(230-270g)の両側椎骨動脈を電気凝固し、その24時間後に両側総頸動脈のクリッピングにより10分間の脳虚血を負荷した。薬物投与(ivまたはip)は、虚血終了後血流再開と同時に行なった。虚血負荷7日後に脳を灌流固定し、背側海馬を含む厚さ5μmの前額断組織切片を作成した。組織切片の染色はcresyl violetで行なった。海馬CA1領域の錐体細胞層における生存神経細胞数の計測はKirinoらの方法(3)に従って行ない、長さ1mmあたりの神経細胞数を算出した。統計学的解析はMann-WhitneyのU-testにより行なった。

【結果と考察】

Table 1に結果を示す。ラットに10分間の前脳虚血が負荷され、有効な薬物が投与されなければ、ほとんどのCA1領域の神経細胞は変性脱落し、神経細胞密度はSaline群およびVehicle群に示されるように減少した。しかし、SAMeを投与した場合、CA1細胞の壊死は用量依存的に抑制された。特に、

SAMe 60および120 mg/kgでは有意な改善効果が認められた。一方、SAMeの前駆体であるL-methionineおよび代謝物であるSAH, MTA, adenineはいずれも効果を示さないか、示しても軽微であった。このことよりSAMeの神経細胞壊死抑制効果は、投与されたSAMeによる作用であることが確かめられた。

次にSAMeの作用機序を推測するために、まずSAMeとtransmethylationの強力な阻害物質であるSAHの同時投与を行なったところ、SAMeの効果は著しく抑制された。従って、SAMeの神経細胞壊死抑制効果にはtransmethylationが深くかかわっている可能性が示唆された。SAMeの関与するtransmethylationの代表的なものにPCの生合成反応があり、これが虚血により障害を受けた膜の修復という意味でSAMeの作用機序の一つの候補と考えられる。そこで、神経細胞壊死抑制におけるPC生合成の重要性を評価するために、SAMeとは別の経路でPC生合成に関与するCDP-cholineおよびPCそのものの神経細胞壊死に及ぼす影響を検討した。その結果、CDP-cholineもPCも神経細胞壊死の抑制に効果を示さなかった。以上の結果より、SAMeの神経細胞壊死抑制効果の作用機序には次の２つの可能性が推測される。第１はSAMeの作用がPC生合成に依存する可能性である。この場合、SAMeとCDP-cholineで結果が異なっているのは、それぞれの経路で合成されるPCの分子種、特にエステル結合している脂肪酸の種類の違いに起因しているのかもしれない。すなわち、SAMe経路で合成されるPCはCDP-choline経路のものよりも生理作用により影響を与える多価不飽和脂肪酸の含有率が高いことが報告されており(5)、このことがSAMeの効果に関与しているのかもしれない。第２はSAMeの作用がPC生合成以外のものによる可能性である。この場合は、脳内アミン類、核酸、蛋白質等のtransmetylationの関与が考えられるが、作用機序の解明には今後さらに検討が必要である。

Table 1 Effect of drugs on survival of hippocampal CA1 neurons in rats subjected to forebrain ischemia for 10 min.

Drug	Dose (mg/kg)	N	Cell density
Sham operated		10	276± 6**
Saline		10	48±12
Vehicle		10	50±14
SAMe	15	11	48± 7
	30	10	78±16
	60	12	104±15*
	120	10	223±20**
L-Methionine	22.4	11	58±14
	44.8	10	46±10
SAMe + SAH	60 + 57.7	10	74±12
	120 + 115	10	75±10
CDP-choline	76.1	10	58±11
	152	11	33± 7
PC	250 (ip)	11	42±12
SAMe	100	8	219±10**
SAH	96.1	10	53±18
MTA	74.3(ip)	10	63±13
Adenine	33.8	8	81± 9*

Values are expressed as mean ±SE in number of neurons per mm of linear length of CA1 sector.
*p<0.05; **p<0.01 vs Saline by Mann-Whitney's U-test.

【文献】

(1)森口幸栄ら (1988) 脳神経、40, 351-356. (2) Iwata, N. et al. (1984) Jpn. J. Pharmacol. 36 (Suppl.), 331. (3) Kirino, T. et al. (1986) Stroke 17, 455-459. (4) Pulsinelli, W.A. & Brierley, J.B. (1979) Stroke 10, 267-272. (5) Arvidson, G.A.E. (1968) Eur. J. Biochem. 5, 415-421.

108 実験的脳虚血における脳内アセチルコリン(ACh)レベルおよびモノアミン代謝の変化に及ぼす各種薬剤の効果

羽場久美子、小川紀雄、森　昭胤
(岡山大、医、脳代謝研、機能生化)

〔要約〕
砂ネズミ(Mongolian gerbil)の両側総頸動脈結紮による脳虚血モデルを用い、虚血による脳内acetylcholine(ACh)レベル、およびモノアミン代謝の変化を調べた。さらにbifemelane hydrochloride(bifemelane)、idebenone、indeloxazine hydrochloride(indeloxazine)を虚血30分前に15mg/kgもしくは30mg/kg腹腔内投与、また小柴胡湯合桂枝加芍薬湯(TJ-960)を1ヶ月間連続経口投与(700mg/kg/day、3.5g/kg/day)し、これら薬剤の効果を検討した。その結果、薬剤、脳部位により効果に差があるものの虚血によるAChレベルの減少を防げることが明らかになったのは、特にbifemelane、TJ-960で、これらは虚血による大脳皮質、海馬のモノアミン神経伝達物質の合成、代謝回転の低下をも阻止できることが認められた。

〔はじめに〕
脳の虚血により各種神経伝達物質に多くの変化が認められ、それが脳梗塞に伴う脳の機能障害に大きく関わっているとされてきた。今回我々は砂ネズミ(Mongolian gerbil)を用いて脳虚血モデルを作製し、脳虚血による脳内アセチルコリン(ACh)レベルおよびモノアミン神経伝達物質の変化について検討を加えた。さらに脳血管障害の治療に応用されているbifemelane hydrochloride (bifemelane)、idebenone、indeloxazine hydrochloride (indeloxazine)および小柴胡湯合桂枝加芍薬湯(TJ-960)のこれら変化に及ぼす効果を調べた。

〔方法〕
成熟砂ネズミ(70-90g)を用い、エーテル麻酔下両側総頸動脈を露出し覚醒後二重結紮した(3)。30分後マイクロウェーブで屠殺、脳を摘出し、大脳皮質、海馬、線条体、間脳＋中脳に分けた。bifemelane, indeloxazineは生理的食塩水に溶解、idebenoneは5%アラビアゴム液に懸濁し、15mg/kgもしくは30mg/kgを結紮30分前に腹腔内投与した。また、TJ-960はそれぞれ5%、または1%含む飼料を1カ月間自由に摂食させた(TJ-960の平均の摂取量はそれぞれ3.5g/kg/day, 700mg/kg/dayであった)。脳内AChレベル、モノアミン神経伝達物質およびその代謝産物の定量はHPLC法で、有意差検定はone-way ANOVAにより行った。

〔結果と考察〕
全ての脳部位で脳虚血時のAChレベルは定常状態に比べ著明に減少していた。bifemelaneが虚血による大脳皮質、海馬内のAChレベルの低下を防ぐことは既に報告されている(5)が、今回bifemelane,TJ-960前投与で、全ての脳部位におけるAChレベル低下は防止さ

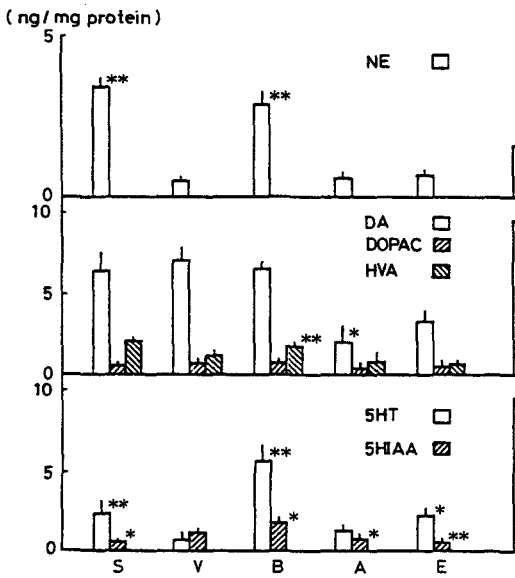


Figure 1 Cortex

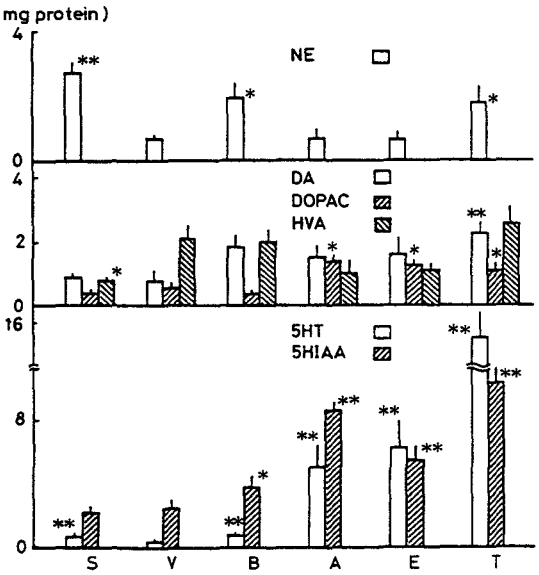


Figure 2 Hippocampus

Effects of each drug on monoamine metabolism in ischemic gerbils.
S: sham operated V: vehicle B: bifemelane (30mg/kg)
A: idebenone (30mg/kg) E: indeloxazine (30mg/kg)
T: TJ-960 (3.5g/kg/day)
Mean+SEM *:$p < 0.05$, **:$p < 0.01$ vs. V

れた。 一方、idebenoneが虚血によるラット前脳部のAChレベルの低下を防ぐという報告がある(4)ものの、今回の我々の成績では、間脳＋中脳に対するidebenone の効果以外は、idebenone, indeloxazineによる顕著な効果は見られなかった。

また以前に報告された結果(2)と同様、脳の各部位でNEが減少し、DAについては線条体で見かけ上の合成の低下、代謝亢進、中脳＋間脳で合成、代謝の亢進が見られた。また、虚血の高度な大脳皮質、海馬で5HTが減少、その代謝産物である5HIAAが蓄積していた。

次に虚血により大きく変化を受けた大脳皮質、海馬への各薬剤の効果をFig.1、 2に示した。bifemelaneは既に報告された通り(1)、両部位内のNE、5HTの虚血による減少を防いだ。この傾向はTJ-960でも見られ、これら両薬剤には大脳皮質、海馬におけるモノアミン神経伝達物質の合成、代謝回転の促進という類似した作用機序があるといえる。また図示していないが、idebenoneは特に間脳＋中脳でモノアミン神経伝達物質の合成、代謝を亢進し、更にAChレベル低下の抑制もこの部位で顕著であることから、本薬剤の作用点は間脳＋中脳にあると推定される。indeloxazineに関しては、AChレベルよりもむしろ海馬のモノアミン神経伝達物質を変動させることから、他剤と異なる作用機序、作用点を有するものと思われる。以上のように、各治療剤によって作用部位や作用機序のプロファイルに差異が見られた。尚、薬剤の単独投与が定常状態に及ぼす影響については、現在検討中である。

(1)Egawa, M. et al (1984) Japan. J. Pharmacol. 34, 363-365
(2)Gaudet, R. et al (1978) J. Neurochem. 30, 751
(3)Kahn, K. (1972) Neurology 22, 510-515
(4)Kakihana, M. et al (1984) Japan. J. Pharmacol. 36, 357-363
(5)Saito, K. et al (1985) Japan. J. Pharmacol. 38, 375-380

109 HPLC-ECDを用いたモノアミン同時定量法の検討:多要因実験とシュミレーションによる最適化

中川照丈、久保里子、増田千春、鵜飼清治
(科研製薬・中研・薬理)

〔要約〕
HPLC-ECDを用いて、17個のモノアミン神経伝達物質、前駆体および代謝物の同時定量法を検討した。その移動相のcitrate bufferのpH、methanol濃度、カラム温度および流速を要因として、各物質について、retention timeの分割型多要因実験を実施し、回帰分析を行なった。求めた17個の重回帰式から、4要因をパラメーターとして拘束条件付シンプレックス法でコンピューター・シュミレーションを行ない、短時間で17物質を同時定量するために4パラメーターの最適条件を求めた。この最適条件下で確認実験を行なったところ、シュミレーション予想値とほぼ一致した結果が得られた。われわれの最適化法は時間的、経済的および実験的簡素化が行なわれており、短時間で客観的に多数の物質を同時定量可能かどうか判定するとき、また、その条件を算出しようとするときに有用な方法であると考える。さらに、他の物質のHPLC同時定量化問題への適用も示唆する。

逆相高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器(HPLC-ECD)によるモノアミン神経伝達物質、前駆体および代謝物の同時定量法に関する報告は多数報告されているが、統計学的方法をもちいたシステマティックなアプローチによる最適化の報告は少ない。Westerらは要因実験を実施し、コンピューター探索により、17個のモノアミン神経伝達物質、前駆体および代謝物の同時定量が可能であることを示した(4)。われわれはこの方法の時間的、経済的および実験的簡素化を試みた。

材料および方法

分離定量に用いたモノアミン神経伝達物質、前駆体および代謝物は3,4-dihydroxyphenylalanine(LDOPA), dopamine(DA), dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC), 3-methoxytyramine(3MT), homovanillic acid(HVA), norepinephrine(NE), normetanephrine(NMET), 3,4-dihydroxyphenylglycol(DHPG), 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol(MHPG), epinephrine(EPI),5-hydroxytryptophan(5HTP),serotonin(5HT),5-hydroxytryptophol(5HTOL),5-hydroxyindole-3-acetic acid(5HIAA)である。さらに、統計解析およびシュミレーションには内部標準物質としてisoproterenol(ISOP),3,4-dihydroxybenzylamine hydrobromide(DHBA), N-methyl-serotonin(NM5HT)を加えて17物質とした。確認実験のクロマトグラムにはvanillylmandelic acid(VMA)およびDL-metanephrine(MET)を新たに加えた。各物質は200ng/mlになるように、pH3のcitrate bufferに溶解した。液体クロマトグラフィーシステムは、HPLCポンプ655A-11(日立)、サンプル20μl自動注入のためのオートサンプラーKSST-1201(協和精密)、カラム温度コントロールのカラムヒータTHERMO CONTROLLER(協和精密)、分析逆相カラム5μ-C18 CHEMCOSO RB 4.6×250mm(ケムコ)および電気化学検出器LC4B(BAS)-CB 100(エイコム)よりなる。分析記録をインテグレータCHROMATO PAC C-R3A(島津)上に描記し、同時にRS232Cでパーソナルコンピューター PC-9801(日本電気)にon lineでつなぎ、フロッピィーディスクに保存して、以後の統計解析に使用した。実験計画はイオンペアー剤として0.3mMのsodium 1-octanesulfonate(SOS)を添加した0.05M citrate bufferを一定として、pH(2.5と3.5:x_1)とmethanol濃度(10%と15%:x_2)を1次単位要因、カラム温度(40℃と50℃:x_3)とHPLCポンプ流速(0.8, 1.0, 1.2ml/min:x_4)を二次単位要因とする分割型多要因実験を行なった。解析は17物質各々のretention timeを対数変換後、分割型多要因分散分析および回帰分析を実施して、17個の重回帰式

Table 1 Split-plot design: Calculated Coefficients (βvalues) on the retention times of the 17 substances.

Substances.	m	Coefficient βai	βbi	βci	βdi	βei	βgi	Prediction	Experiment
DHPG	1.318	0.000	−0.016	0.000	−0.884	0.000	0.000	3.84	3.91
LDOPA	1.689	−0.680	−0.037	−0.013	−0.901	0.021	0.000	3.85	4.00
NE	1.704	−0.283	−0.028	−0.006	−0.915	0.000	0.000	4.83	4.73
EPI	1.833	−0.284	−0.039	−0.006	−0.904	0.000	0.002	5.54	5.36
MHPG	1.699	0.000	−0.034	0.000	−0.884	0.000	0.000	5.59	5.83
5HTP	2.284	−0.923	−0.071	−0.019	−0.915	0.032	0.000	6.23	6.59
DHBA	1.979	−0.273	−0.044	−0.010	−0.892	0.016	0.004	6.43	6.19
NMET	2.127	−0.296	−0.052	−0.008	−0.926	0.014	0.003	7.39	7.03
DA	2.250	−0.277	−0.060	−0.011	−0.921	0.019	0.004	8.49	8.04
DOPAC	2.166	0.000	−0.042	−0.009	−0.031	0.016	0.004	8.93	9.40
5HTOL	2.383	0.000	−0.059	−0.010	−0.870	0.000	0.004	11.35	11.75
5HIAA	2.487	0.000	−0.062	−0.012	−0.864	0.022	0.005	12.50	12.42
ISOP	2.629	−0.253	−0.084	−0.012	−0.901	0.019	0.005	12.72	13.78
5HT	2.883	−0.280	−0.089	−0.017	−0.909	0.029	0.007	16.22	15.68
3MT	2.979	−0.280	−0.090	−0.014	−0.918	0.025	−0.005	17.75	16.83
NM5HT	2.993	−0.272	−0.097	−0.017	−0.909	0.030	0.007	18.26	17.80
HVA	3.009	0.000	−0.064	−0.011	−0.887	0.020	0.005	21.08	22.73

$Ri = m+\beta ai(x_1-\bar{x}_1)+\beta bi(x_2-\bar{x}_2)+error_1+\beta ci(x_3-\bar{x}_3)+\beta di(x_4-\bar{x}_4)+\beta ei(x_1-\bar{x}_1)(x_3-\bar{x}_3)+\beta fi(x_1-\bar{x}_1)(x_4-\bar{x}_4)+\beta gi(x_2-\bar{x}_2)(x_3-\bar{x}_3)+\beta hi(x_2-\bar{x}_2)(x_4-\bar{x}_4)+error_2$ $i=_{1,2,3,\cdots,17}$

のパラメーター$\beta ai, \beta bi, \beta ci, \beta di, \beta ei, \beta fi, \beta gi, \beta hi$ の有意性を検定し、直交係数表により、各βの値を求めた (1,2)。次いで、x_1,x_2,x_3,x_4 を逆にパラメーターとして、任意のx_1,x_2,x_3,x_4 での Ri を retention time の 早い順にソート仕直し、$\Sigma(R_{i+1}-R_i-\Delta)^2$ {Δ：任意の時間の対数} を最小にするx_1,x_2,x_3,x_4 を拘束条件付シンプレックス法で求めた (1,3)。このシュミレーションによる17物質同時定量のための予想最適条件値x_1,x_2,x_3,x_4 で、retention time 予想値の確認実験を行なった。

結果および考察

要因選択においては要因の水準変更が容易で効果の大きな要因を選ぶことが重要である。Wester らは移動相の要因として、カラム温度, diethylamine, SOS, pH, acetonitrile および Na_2EDTA を取り上げ、L8 直交係数表を用いて、6 要因の主効果のみを求める最初の実験を行なった (4)。次いで、移動相の要因として、SOS, pH, acetonitrile を取り上げ、3 要因の交互作用も含めた多要因実験を行ない、17物質の重回帰式を算出した。しかしながら、移動相の変更にともなうカラムの洗浄および安定化には24時間以上の時間を必要とする。このことは移動相の内容に関する要因数が多くなればなる程、その多要因実験には多大な時間がかかることを示している。われわれは今回、移動相の内容に関しては要因効果の大きな pH および methanol をとりあげた。それ以外の要因で retention time に影響をおよぼし、水準変更が容易でカラムの安定に時間のかからないカラム温度、HPLC 流速をとりあげた。17個の分散分析を実施したが、主効果 $\beta ai, \beta bi, \beta ci, \beta di$ および交互作用 $\beta ei, \beta gi$ 以外の 2 次交互作用や 3 次交互作用および 1 次誤差には統計的に有意な差が認められなかった。従って、17個の重回帰式は $Ri = m+\beta ai(x_1-\bar{x}_1)+\beta bi(x_2-\bar{x}_2)+\beta ci(x_3-\bar{x}_3)+\beta di(x_4-\bar{x}_4)+\beta ei(x_1-\bar{x}_1)(x_3-\bar{x}_3)+\beta gi(x_2-\bar{x}_2)(x_3-\bar{x}_3)+error$ $i=_{1,2,3,\cdots,17}$ で表されることになる。但し、その寄与率が1.5%以下のパラメーターは 0 とした(表1)。Wester らはカラム温度25℃、流量 1.2ml/min で 0.293mM の SOS および 6.3% acetonitrile を含む pH2.35 の 0.1M citrate buffer に最適条件があるとしているが、彼等も指摘しているように pH が下がると検出感度が低下し、カラムの劣化を早める (4)。多数の物質の同時定量をルーチンワークで行なう場合には検出感度および経済性も考慮されねばならない。同様に、高濃度の methanol および高流量もカラム圧を上げる原因となりカラム劣化を早める。カラム温度は低温領域では外気温のカラムへの影響が高温領域ではカラムの劣化が問題になってくる。このような理由により各要因の変数に拘束条件を設けた。そこで、pH $2.5<x_1<3.5$, methanol(%) $10<x_2<15$, カラム温度℃ $40<x_3<50$, HPLC ポンプ流速 ml/min $0.8<x_4<1.2$ の範囲で $\Sigma(R_{i+1}-R_i-\Delta)^2$ を最小にする x_1,x_2,x_3,x_4 をシンプレックス法により求めると、その最適値は x_1=pH 3.4、x_2=methanol 12%、x_3=カラム温度 44℃、x_4=流量1ml/min で、その17個の retention time 予想値は 表 1 の prediction であった。この条件下で、実際に、19物質(2物質追加)を高速液体クロマトグラフィーにかけた結果が図1および 表 1 の experiment である。

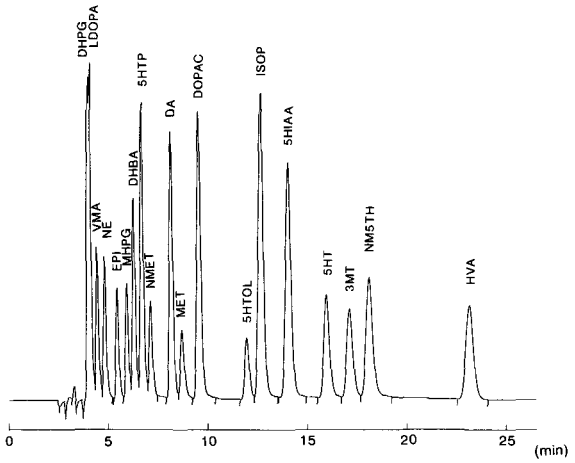


Fig.1 Chromatogram of 4ng/20μl of standards; The mobile phase consisted of a 0.05M citrate buffer containing 0.1mM Na_2EDTA, 0.3mM sodium 1-octanesulfonate and 12% methanol at a pH of 3.4. The detector cell was set at+0.7 V. The flow rate was 1.0ml/min and the temperature was kept at 44℃.

以上の結果、われわれの最適化法は時間的、経済的および実験的簡素化が行なわれており、短時間で客観的に多数の物質を同時定量可能かどうか判定するとき、また、その条件を算出しようとするときに有用な方法であると考える。さらに、他の物質の HPLC 同時定量化問題への適用も示唆する。

文 献

1) 中川照丈, 鵜飼清治, 久保里子, 増田千春 (1988) メディカル—マイコン—レポート 8,30-44
2) 田口玄一 (1976) 第3版実験計画法、22-29、丸善. 東京
3) 山岡清 (1986) メディカル—マイコン—レポート 7,21-31
4) Wester P., Gottfries J., Johansson K., Klinteback F. and Winblad B.(1987) J.Chromatogr. 415,261-274

110 メタンフェタミン投与による中枢モノアミン及び代謝産物の変化：神経終末及び細胞体における影響の相違

楯林 義寛・平野 誠・松本 孝・黒木 俊秀・堤 哲之・西山 浩二・大星 博明・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・生物*、九州大・理・化学**、大牟田労災病院***）

〔要約〕
少用量（2mg/kg）又は比較的高用量(15mg/kg)のメタンフェタミン(MAP)を用いて、ラットに急性単回及び7日間反復投与し、投与1日後の定常状態に於けるドーパミン（DA）及びセロトニン（5-HT）神経の変化を脳内部位別に検討した。その結果、比較的高用量投与では、神経終末領域のほとんどの部位で5-HT及び5-HIAAが有意に減少しており、DA神経系よりも5-HT神経系の機能低下が広範に生じること、即ち5-HT系へのより強いneurotoxicな影響が示唆された。一方、神経細胞体領域では、高用量反復投与群で背側縫線核の5-HT低下がみられた他、A9及び青斑核のDOPACがMAP用量及び投与回数に依存的に増加しており、DA神経細胞体部の機能亢進が示唆された。以上のように両神経系へのMAPの影響が神経終末と細胞体で異なっていたことは極めて興味深い所見として注目された。

〈緒言〉 実験動物への覚醒剤投与は、精神病の病態モデルとして広く用いられており、とくに慢性投与により生じるsensitizationに注目した薬理化学的な研究が数多くなされている(7)。しかしながら近年、アンフェタミンやメタンフェタミン(MAP)の大量あるいは持続投与により中枢のモノアミン神経に変性（neurotoxicity)が生じるとの報告も増えつつあり(1,5,6）、投与量や投与方法による中枢神経系に対する影響の相違も指摘されている。また従来の研究では線条体をはじめとする中枢DA神経系の神経終末領域における生化学的な変化をみたものがほとんどであり、起始細胞体領域を含む脳内の諸部位における変化を詳細に検討した研究は少ない。そこで今回の実験では、低用量(2mg/kg,i.p.)と比較的高用量(15mg/kg,i.p.)のMAPの単回及び反復投与によるモノアミン神経系の定常状態における変化を起始細胞体領域を含む広範な脳内各部位別に検討した。

〈実験方法〉 成熟Wistar系雄性ラット(310-360g)を用いて、MAP2mg/kg及び15mg/kgを各々7日間、毎日1回腹腔内に注射した。急性単回投与群として生食水を同様に6日間投与し、最終7日目のみ各用量のMAPを投与した。各ラットは最終注射後24時間で断頭し、脳を摘出し、-80℃で凍結後、クリオスタット(-20℃)内で300μmの連続切片を作製した。各切片より-20℃のプレート上でアトラス(3)に従って各部位をマイクロナイフで切り出した。DA、5-HT及び各代謝産物は、既法(4)に準じたHPLC-ECD法により一斉に測定した。切り出した各組織に400μM $NaHSO_3$、50μMアスコルビン酸を含む0.1M ギ酸を加えてホモジナイズ後、遠心(15000rpm,10分,5℃)し、その上澄を更に孔径0.45μmのフィルターにて濾過したものをHPLC-ECDに注入した。測定感度は10pg/injection以下であった。各モノアミンはホモジナイズ溶液中では室温下でも安定している事を確認した。

＜結果及び考察＞ Table 1.にMAP高用量(15mg/kg)投与群の中枢DA系各神経終末領域におけるDA、5-HT及び各代謝産物の変化を示す。DA系は側坐核後部のDAが単回投与群で軽度(-10%)減少した他は、黒質ー線条体系、中脳ー辺縁系及び中脳ー皮質系DA神経終末のいずれの部位においても急性及び反復投与群ともDAとその代謝産物に有意の変化はなかった。一方、5-HT系は反復投与群でほぼ全ての神経終末領域で5-HT及び5-HIAAの有意の減少(-15%～-37%)がみられた。単回投与群でも5-HTが尾状核ー被殻、側坐核、嗅結節及び前部帯状回皮質で、5-HIAAが側坐核、嗅結節及び前部帯状回皮質で各々低下(-20%～-34%)していた。MAP低用量(2mg/kg)投与群では反復投与群の嗅結節と前部帯状回皮質で5-HT及び5-HIAAの減少(-18%～-25%)が見られた以外は、DA系、5-HT系ともほとんどの部位で変化はなかった。以上の所見は、比較的高用量のMAP15mg/kg反復投与により、神経終末領域でDA神経系には変化がなく、むしろ5-HT神経系の機能低下が広範囲にわたっていることを示している。これまでモノアミン含量の他、トリプトファン水酸化酵素活性や5-HT取り込み部位の変化を生化学的指標として用いた研究などからMAPのneurotoxicな作用はDA系よりも5-HT系に感受性が強いことが示唆されている(2,5,6,8)。

従って、今回の実験結果から、比較的高用量(15mg/kg)MAPの間歇投与による神経終末領域でのneurotoxicな影響に対してDA系よりも5-HT系の感受性が強いことが示唆され、その影響も広範な部位に及んでいることが明らかとなった。5-HT系の低下には、単回と反復投与とで差のみられぬ部位もあり、MAPの投与用量の問題のみならず、各部位による感受性の相違も関与している可能性が考えられる。今回の研究は投与1日後の定常状態の変化を検討したものなので、今後は更に長いtime-courseでの検討や、取り込み部位など、他の生化学的指標を用いた研究及び組織形態学的検索がMAPのneurotoxicityを明らかにするために必要であろう。

次に細胞体領域では、神経終末領域とは異なる変化が見られ、注目された(Table 2.)。5-HT系は、高用量投与群で5-HT細胞体部B7領域を含む背側縫線核の5-HTの有意な減少(-21%)が認められ、上述したMAPの5-HT系に対するneurotoxicity(5-HT合成酵素の阻害作用)を反映していると考えられる。一方、DA系はA9領域(黒質緻密質)とA6領域を含む青斑核でMAP用量及び投与回数に依存的にDOPACが増加(+15%～+55%)しており、終末部位とは異なる変化があった。A10(腹側被蓋野)でも同様の傾向が認められた。背側縫線核のDAが反復投与群で増加(+20%～+37%)した以外には、DA、HVAの変化はなかった。A9のDOPAC増加について線条体の神経終末からのDA放出亢進の結果、long-loop feedbackによりsomatodendritic DA放出が増加している可能性、あるいは自己受容体の機能変化を経て細胞内DA代謝が亢進している可能性が考えられる。従来、A9、A10などのDA神経細胞体部は、MAPのneurotoxicityを受けにくいとされ、MAPのDA放出促進作用も神経終末に比べると乏しいと報告されている(9)。しかしながら今回の実験で、DA神経終末にはほとんど変化が認められないにもかかわらず、投与後1日を経てなお細胞体部ではなんらかの機能亢進を示唆する所見が見られたことはMAPの影響が神経系全体に持続的に及んでいることを示唆しており極めて興味深い。今後はMAPの神経系に対する影響を検討する上で、神経終末の変化のみならず、細胞体部を含めた神経系全体の機能連関の変化により注目する必要があると思われる。

Table 1. Effect of higher dose (15 mg/kg, i.p.) of methamphetamine on DA, 5-HT and their metabolite levels in discrete dopaminergic terminal areas of rat brain.

areas	treatment	DA	DOPAC	5-HT	5-HIAA
1. The nigro-striatal dopaminergic terminals					
caudatus putamen ant.	acute	135.45±7.48	12.93±0.43	3.60±0.19*	2.84±0.17
	chronic	129.49±4.16	14.73±0.80	3.44±0.20*	2.51±0.15*
	control	144.44±4.01	14.71±1.19	4.24±0.15	3.35±0.26
caudatus putamen post.	acute	110.97±4.22	10.75±0.30	4.99±0.30*	3.48±0.13
	chronic	108.06±4.28	12.69±0.80	4.66±0.28*	3.12±0.17*
	control	112.94±5.26	11.05±0.69	6.21±0.48	4.00±0.35
2. The meso-limbic dopaminergic terminals					
nucleus accumbens ant.	acute	83.38±3.01	12.27±0.29	4.98±0.24**	3.14±0.12*
	chronic	83.23±3.00	15.07±1.07	4.90±0.32**	3.07±0.10*
	control	85.45±3.58	12.88±0.74	6.74±0.32	3.87±0.20
nucleus accumbens post.	acute	113.16±4.50*	20.31±0.48	5.87±0.33*	3.66±0.17*
	chronic	115.59±3.73	23.40±1.40	5.85±0.40*	3.66±0.20*
	control	126.33±2.99	21.60±1.35	8.17±0.74	4.57±0.29
tuberculum olfactorium	acute	46.78±2.86	19.94±2.27	10.06±0.95*	3.80±0.41*
	chronic	46.15±3.97	25.30±1.98	9.41±0.51**	3.66±0.16*
	control	51.08±5.88	26.78±2.67	13.65±0.93	5.80±0.32
amygdala	acute	8.53±0.76	0.84±0.12	13.21±0.82	5.57±0.23
	chronic	7.03±0.75	0.84±0.10	11.14±0.68*	5.11±0.23*
	control	7.39±0.66	0.73±0.08	14.68±0.72	6.17±0.31
3. The meso-cortical dopaminergic terminals					
prefrontal cortex medial field	acute	0.98±0.07	0.34±0.02	6.92±0.47	3.11±0.29
	chronic	1.00±0.10	0.44±0.03	6.15±0.41	2.91±0.23*
	control	0.90±0.04	0.37±0.03	7.73±0.55	4.09±0.39
anterior cingulate cortex	acute	0.89±0.09	——	3.53±0.15*	2.15±0.11*
	chronic	0.86±0.07	——	3.06±0.21**	1.91±0.16**
	control	0.80±0.13	——	4.40±0.32	2.73±0.19

Values are mean±S.E.M. (ng/mg protein). The number of determinations were 4-7 rats. *p<0.05 with respect to controls (Student's t test), *p<0.05, **p<0.01 with respect to controls (Scheffe test).

Table 2. Effect of methamphetamine (2 mg/kg or 15 mg/kg, i.p.) on DA, 5-HT and their metabolite levels in discrete cell body areas of rat brain.

area	treatment	DA	DOPAC	5-HT	5-HIAA
A9 (Substantia nigra pars compacta)	acute 2(7)	13.53±0.92	2.22±0.17	24.28±0.60	8.69±0.37
	chronic 2(7)	15.37±0.67	2.58±0.07**	23.83±1.21	8.61±0.33
	acute 15(7)	13.62±0.60	2.43±0.07*	23.07±1.11	8.62±0.38
	chronic15(7)	14.72±1.00	3.07±0.11**	22.24±0.77	7.90±0.12
	control (5)	14.00±0.38	2.12±0.11	22.33±1.19	8.00±0.41
A10 (Ventral tegmental area)	acute 2(7)	39.84±1.53	6.65±0.33	21.41±0.53	12.13±0.47
	chronic 2(7)	39.89±1.13	7.45±0.36	20.63±0.61	13.28±0.78
	acute 15(7)	41.18±1.78	7.88±0.36	19.36±0.73	13.34±0.69
	chronic15(7)	40.39±1.45	8.23±0.35	18.80±0.65	12.06±0.36
	control (5)	37.88±1.42	6.71±0.39	21.23±1.17	12.18±0.77
A6 (Locus coeruleus)	acute 2(7)	3.53±0.35	4.49±0.50	15.54±1.00	7.97±0.33
	chronic 2(7)	4.73±0.24	5.50±0.66	14.66±0.45	8.34±0.63
	acute 15(7)	4.42±0.14	7.04±0.39**	15.03±0.79	7.57±0.35
	chronic15(7)	5.41±0.40	6.67±0.55*	12.63±1.24	6.75±0.27
	control (4)	4.10±0.50	4.55±0.50	13.45±0.93	7.21±0.46
Nucleus raphe dorsalis	acute 2(6)	3.55±0.17	——	59.37±3.92	26.96±1.57
	chronic 2(7)	4.31±0.19**	——	62.41±1.27	28.26±1.29
	acute 15(7)	3.72±0.20	——	50.64±3.43	29.25±0.95
	chronic15(7)	3.80±0.15*	——	47.22±2.08**	26.00±0.56
	control (5)	3.15±0.27	——	59.59±3.10	27.27±1.03
Nucleus raphe medialis	acute 2(6)	——	——	14.56±0.93	17.59±0.88
	chronic 2(7)	——	——	15.43±0.63	17.76±1.10
	acute 15(7)	——	——	12.72±0.80	18.09±1.33
	chronic15(7)	——	——	12.92±1.01	15.78±0.79
	control (5)	——	——	15.13±1.01	16.67±0.83

Values are mean±S.E.M. (ng/mg protein). The number of determinations are filled in the parentheses. *p<0.05, **p<0.01 with respect to controls (Student's t test), **p<0.01 with respect to controls (Scheffe test).

References 1)Ellison G. et al. (1978) Science 201, 276-278. 2)Hotchikiss A.J. et al. (1979) Life Sci. 25, 1373-1378. 3)König J.F.R. and Klippel R.A. (1963) The rat brain. Williams & Wilkins, Baltimore, Md. 4)Kuroki T. et al. (1987) Neuropeptides 9, 169-176. 5)Morgan M.E. and Gibb J.W. (1980) Neuropharmacol. 19, 989-995. 6)Ricaurte G.A. et al. (1980) Brain Res. 193, 153-163. 7)Robinson T.E. and Becker J.B. (1986) Brain Res. Rev. 11, 157-198. 8)Trulson M.E. and Jacob B.L. (1980) Life Sci. 26, 329-335. 9)Zetterström T. et al. (1986) Eur. J. Pharmacol. 132, 1-9.

111 N−Methylisoquinolinium ion のドーパミンニューロンにおよぼす影響

平田洋子、南正康、直井信*、永津俊治*
（日本医大・衛生、名大・医・生化一*）

〔要約〕
N-Methylisoquinolinium ion (NMIQ$^+$)のドーパミンニューロンへの作用を調べる目的で、HPLC-蛍光法を用い、NMIQ$^+$の高感度な定量法を確立し、ラット線条体スライスへの取り込みを検討した。NMIQ$^+$はラット線条体スライスにincubationの時間と温度に依存して取り込まれた。取り込みは、ノミフェンシンで一部阻害され、ドーパミン取り込み機構の関与が示唆された。また、NMIQ$^+$はラット線条体スライスにおいて、MPP$^+$と同様にin situ チロシン水酸化酵素活性の阻害と乳酸産生の増加を引き起こした。以上の結果より、NMIQ$^+$はドーパミン取り込み機構によって線条体のドーパミンニューロンに取り込まれ、ドーパミンの生合成とミトコンドリアの呼吸を阻害することが示唆された。すなわちNMIQ$^+$はMPP$^+$様のドーパミン神経毒となり得ると考えられる。

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)はヒト、サル、マウスなどでパーキンソン病様の症状を起こす黒質線条体系ドーパミンニューロンの神経毒である(1)。MPTPはB型モノアミン酸化酵素により1-methyl-4-phenylpyridinium ion(MPP$^+$)に代謝され(2)、MPP$^+$はドーパミン取り込み機構によってドーパミンニューロンに取り込まれて蓄積し(3)、ドーパミンの減少とニューロンの変性を起こす。神経毒性の発現機構は、明らかではないが、MPP$^+$がミトコンドリア呼吸を抑制することが重要な因子であると考えられている(4)。我々は、MPTP,MPP$^+$および種々の誘導体が線条体スライスのチロシン水酸化酵素系を阻害することを報告した(5,6)。この中で、N-methylisoquinolinium ion (NMIQ$^+$) は線条体スライスのin situチロシン水酸化酵素活性を阻害するほか、A型 およびB型モノアミン酸化酵素を阻害する(7)などドーパミン神経毒MPP$^+$と類似した性質を示す。さらに、NMIQ$^+$の脱メチル還元体であるテトラヒドロイソキノリンがラットおよびヒトの脳に存在することが報告されている(8,9)。本研究では、NMIQ$^+$の高感度な定量法を確立し、ラット線条体スライスへの取り込みを検討した。また、in situチロシン水酸化酵素活性の阻害との関係および乳酸産生へおよぼす影響を調べた。

＜実験方法＞

NMIQ$^+$の測定：NMIQ$^+$はHPLCにより分離し、225nmの励起光による375nmの蛍光強度を測定した。カラムは、ゲル濾過クロマトグラフィモードと、逆相クロマトグラフィモードのマルチモードで分離分析できるAsahipak GS-320H(7.6x250mm)を用い、0.1Mリン酸緩衝液(pH 2.6),1 ml/minで溶出した。

線条体スライスへのNMIQ$^+$の取り込み：Wistar雄性ラット(200-300g)を断頭後、ただちに線条体をMcIlwain tissue chopperにて厚さ約0.2mmのスライスを作製し 1mlのKrebs-Ringer液中でincubationした。反応終了後スライスをKrebs-Ringer液で洗浄し、過塩素酸で除蛋白し、その上清をHPLCに注入した。

線条体スライス中のチロシン水酸化酵素活性および乳酸量の測定：スライスをNSD-1055(脱炭酸酵素阻害剤)を含むKrebs-Ringer液中で1時間incubationした後、超音波破砕によりホモジナイズし、除蛋白後、内在性チロシンから生成したDOPAをHPLC-ECDにより測定した(10)。同一試料について乳酸量をLDHを用いて定量した。蛋白定量はBradfordの方法によった(11)。

＜結果と考察＞

NMIQ$^+$の自然蛍光は、励起波長225nm、蛍光波長375nmで極大波長を示した。NMIQ$^+$の感度限界は50 fmolで、標準曲線は10pmolまで直線性を示した。NMIQ$^+$を含むKrebs-Ringer液中で線条体スライスをincubationし、組織内のNMIQ$^+$を測定するとNMIQ$^+$は20分までmedium中のNMIQ$^+$濃度に比例して取り込まれた。Fig.1に示したのは本法を用いて測定したNMIQ$^+$のクロマトグラムで、5μM NMIQ$^+$を含むKrebs-Ringer液 1mlと線条体スライスを (I)は0℃、(II)は37℃で1時間incubationした際の、(III)は5.3 pmolNMIQ$^+$の標準液のパターンである。また、この時NMIQ$^+$の線条体スライスへの取り込みは等量(5μM)のノミフェンシン(ドーパミン取り込み阻害剤)で約50%に抑制された。これらの結果は、NMIQ$^+$が

incubationの時間と温度に依存して、ドーパミン取り込み機構を介して線条体スライスに取り込まれることを示している。

Table 1 にNMIQ⁺の線条体スライスチロシン水酸化酵素活性におよぼす影響と組織内に取り込まれたNMIQ⁺の濃度を示した。線条体スライスを10^{-6}M-10^{-3}MのNMIQ⁺存在下で1時間incubationすると NMIQ⁺はmediumの濃度に対して約3-19倍組織に濃縮された。ただしこの濃度は線条体組織を均一と仮定して計算したのでドーパミンニューロン内の濃度は実際にはもっと高いと考えられる。NMIQ⁺(5μM)による線条体スライスチロシン水酸化酵素活性の阻害はノミフェンシン(5μM)で完全に回復し、この時の組織内NMIQ⁺濃度はそれぞれ57μM、27μMであった。Table 1の結果と考え合わせるとチロシン水酸化酵素活性の阻害は、NMIQ⁺の組織内濃度が数10μM位から起こると推定できる。

Fig.2にMPP⁺ とNMIQ⁺の線条体スライス乳酸産生におよぼす影響を示した。MPP⁺とNMIQ⁺による乳酸の顕著な増加は、NMIQ⁺がMPP⁺と同様に呼吸阻害を起こし解糖系が活性化された結果と考えられる。

以上の結果よりNMIQ⁺は、MPP⁺様のドーパミン神経毒として作用し、もしこのような物質が脳に蓄積すればパーキンソン病を起こす可能性が考えられる。

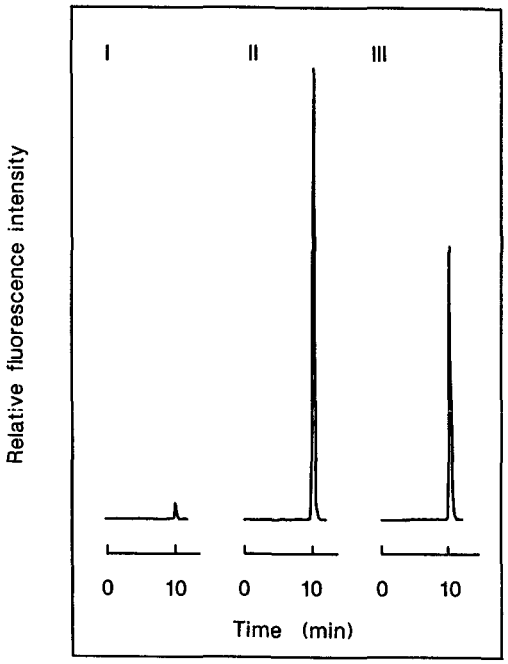


Fig.1 High-performance liquid chromatograms of NMIQ⁺. NMIQ⁺ (5 nmol) was incubated with rat striatal slices (ca. 1 mg protein) at 0°C (I) or 37°C (II) for 1 hr, then the amounts of NMIQ⁺ taken up was measured as described under Method. (III);standard NMIQ⁺ (5.3 pmol)

Table 1 Effect of NMIQ⁺ on DOPA formation in rat striatal slices and caliculated concentrations of NMIQ⁺ uptaken

NMIQ⁺ (M)	DOPA formation (% of control)	NMIQ⁺ uptaken (μM)
0	100 ± 2	0
10^{-6}	99 ± 7	19
10^{-5}	62 ± 3	140
10^{-4}	24 ± 1	573
10^{-3}	21 ± 5	3272

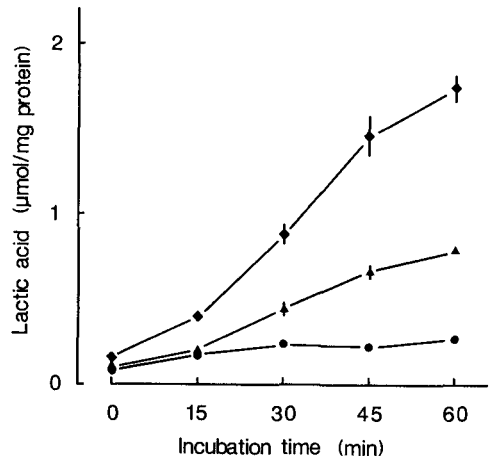


Fig.2 Effect of MPP⁺ or NMIQ⁺ on the content of lactic acid in rat striatal slices. ●;control, ◆;0.1 mM MPP⁺ ▲;0.1 mM NMIQ⁺

＜文献＞

1.Langston,J.W. et al.; Science 219,979-980 (1983)
2.Chiba,K. et al.; Biochem.Biophys.Res.Commun.120,574-578 (1984)
3.Chiba,K. et al.; Biochem.Biophys.Res.Commun.128,1228-1232(1985)
4.Ramsay,R.R. et al.; Life Science 39,581-588 (1986)
5.Hirata,Y. and Nagatsu,T.; Brain Res.337,193-196 (1985)
6.Hirata,Y. et al.; Brain Res.397,341-344 (1986)
7.Naoi,M. et al.; J.Neurochem.48,709-712 (1987)
8.Kohno,M. et al.; Biochem.Biophys.Res.Commun.140,448-454 (1986)
9.Niwa,T. et al.; Biochem.Biophys.Res.Commun.144,1084-1089 (1987)
10.Hirata,Y. et al.; J.Neurochem.40,1585-1589 (1983)
11.Bradford,M.M.; Anal.Biochem.72,248-254 (1976)

112 ラット脳セロトニン1A受容体－G蛋白共役系に対する可逆的SH基修飾試薬の効果

北村佳久，今井伸一，野村靖幸
（北大・薬・薬効）

〔要約〕
脳セロトニン$_{1A}$（5-HT$_{1A}$）受容体と百日咳毒素（IAP）感受性G蛋白との共役機構を明らかにするため、可逆的SH基修飾試薬、3-nitro-2-pyridinesulfenyl(Npys)誘導体、すなわち Npys-cysteine (Npys(Cys))、および Npys-butoxycarbonylcysteine (Npys(Boc-Cys)) を用いて検討した。Npys-(Cys) 処置は、IAP および N-ethylmaleimide (NEM) と同様に[^{3}H]8-OH-DPAT のラット脳膜画分への結合を抑制した。しかし Npys(Cys) の結合抑制効果は、Dithiothreitol(DTT) 処置によって消失した。Npys(Boc-Cys) は、Npys(Cys) とは異なり [^{3}H]8-OH-DPAT 結合を抑制しなかったが、結合に対するGTPγS 効果を消失させた。IAP による精製ラット脳G蛋白（Go）の ADP-リボシル化を、Npys(Cys) は、NEM と同様、抑制した。一方、Go への [^{35}S]GTPγS 結合に対して Npys(Boc-Cys) は NEM と同様何ら影響しなかったが、Npys(Cys) は抑制した。以上のことから、脳 5-HT$_{1A}$ 受容体は、IAP 感受性G蛋白と共役すること、Npys(Cys) は NEM と同様おそらくG蛋白の受容体との結合ドメインのSH基を修飾して脱共役させることの他に、GTP 結合ドメインのSH基も修飾すること、一方 Npys(Boc-Cys) は 受容体-G蛋白共役系に影響すること、おそらく両者の疎水結合 および/または コンホメーション変化を導き共役状態を安定化し GTP 効果を消失させることが推定された。

《緒言》

脳セロトニン受容体は、リガンド親和性の差から 1A, 1B, 1C, 1D, 2, 3 に細分類されている[1]。最近、このうち 5-HT$_{1A}$ 受容体は、IAP 感受性G蛋白を介しアデニル酸シクラーゼ活性を抑制することが報告されている[2]。今回、脳 5-HT$_{1A}$ 受容体と IAP 感受性G蛋白の共役機構を明らかにする目的で、可逆的SH基修飾試薬である 3-nitro-2-pyridinesulfenyl (Npys) 誘導体[3]（図1）、すなわち Npys-cysteine (Npys(Cys)) および Npys-butoxycarbonyl cysteine (Npys(Boc-Cys))の、ラット脳膜画分への[^{3}H]8-OH-DPAT (5-HT$_{1A}$ 受容体アゴニスト）結合に対する効果を検討した。

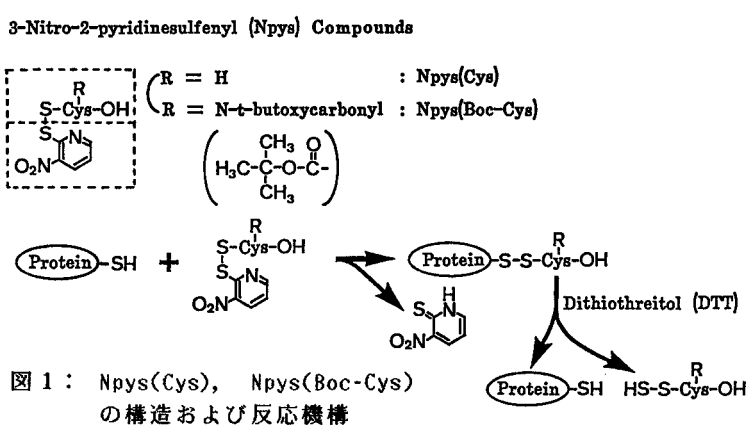


図1： Npys(Cys), Npys(Boc-Cys) の構造および反応機構

《実験方法》

Donryu 系雄性ラット全脳（小脳を除く）膜画分に Npys(Cys), Npys(Boc-Cys) を加え、4 ℃, 30 分間インキュベートし、洗浄後、DTT 存在下、非存在下で 4 ℃, 10 分間再度インキュベートし、調製した。処置膜（約 100μg 蛋白質量）に、[^{3}H]8-OH-DPAT (0.2～0.5 nM) を加え 10μM GTPγS 存在下、非存在下で 30 ℃, 40 分間インキュベートすることにより結合実験を行なった。IAP 感受性G蛋白は、Katadaらの方法[4] で精製した。

《実験結果》

Npys(Cys) は、IAP, NEM と同様に [^{3}H]8-OH-DPAT 結合を濃度依存的に抑制した。また、10μM GTPγS 存在下では このアゴニスト結合は抑制されたが、1 ～ 100μM Npys(Cys) 処置では、この GTPγS 効果が若干阻害された（図 2-A）。一方、Npys(Cys) 処置後 DTT 処置した膜では、GTPγS 存在下、非存在下にかかわらず[^{3}H]8-OH-DPAT 結合にほとんど影響は認められなかった（図 2-B）。Npys(Boc-Cys) は、Npys(Cys) とは異なり、0.1 mM でも[^{3}H]8-OH-DPAT 結合に何ら影響しなかった。

しかし、GTPγS によるアゴニスト結合抑制を濃度依存的に阻害した（図 3-A）。また DTT 処置では、この GTPγS 効果に対する Npys(Boc-Cys) の阻害効果は 完全には抑制することはできなかった（図 3-B）。さらに Npys(Boc-Cys) によって GTPγS 効果を消失した条件下で NEM, Npys(Cys) を作用させると、[^{3}H]8-OH-DPAT 結合は対照群での GTPγS 存在下での結合レベルまで濃度依存的に減少した（結果省略）。

精製ラット脳 IAP 感受性G蛋白（Go）への[^{35}S]GTPγS 結合は、Npys(Cys) で著しく阻害されたが、DTT 処置によってNpys-(Cys)の抑制効果は消失した（結果省略）。一方、精製Go の IAP による ADP-リボシル化は Npys-(Cys), NEM で著しく阻害され、Npys(Boc-Cys)では 50 % 程度しか阻害されなかった（結果省略）。DTT 処置によって Npys(Cys), Npys(Boc-Cys) の ADP-リボシル化抑制効果は消失した。

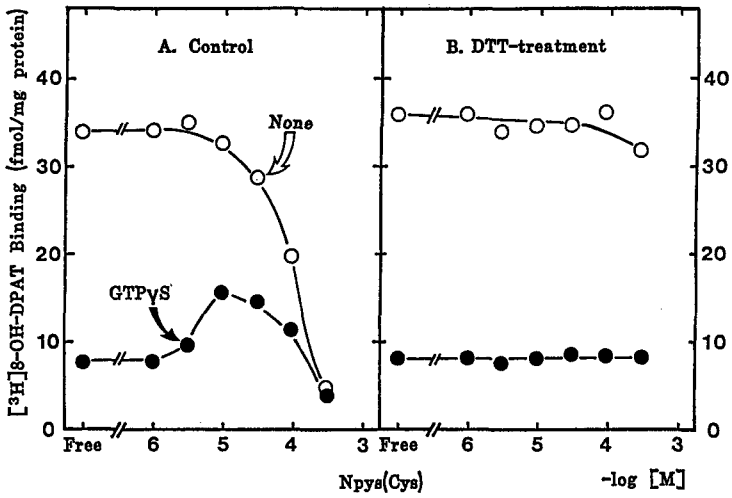


図２： [3H]8-OH-DPAT 結合に対する Npys(Cys) の効果

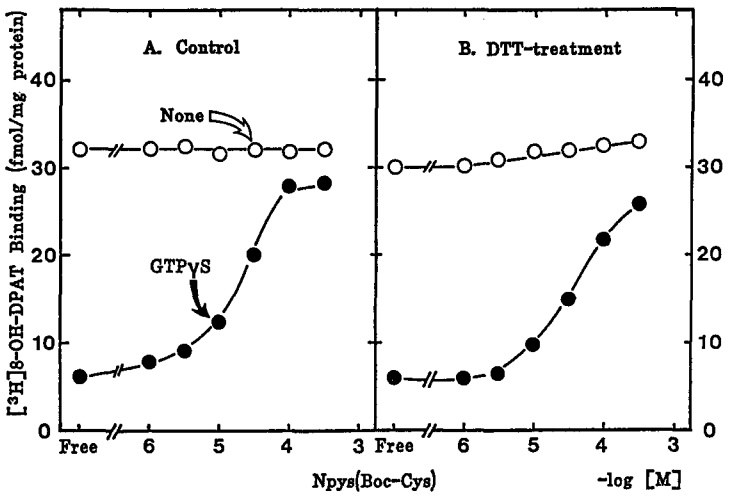


図３： [3H]8-OH-DPAT 結合に対する Npys(Boc-Cys) の効果

《考察》

脳 5-HT$_{1A}$ 受容体は IAP 感受性G蛋白と共役し、アゴニスト結合を調節すること、Npys(Cys) は、NEM と同様に IAP 感受性G蛋白の受容体との結合ドメインを修飾することによって 5-HT$_{1A}$ 受容体とG蛋白を脱共役させると考えられる。さらに、Go への GTPγS 結合も阻害したことからG蛋白の GTP 結合ドメインも修飾するものと推定される。また、これらの修飾は可逆的であることも示唆された。一方、Npys(Boc-Cys) は、Npys(Cys) とは異なり G蛋白の GTPγS 結合を阻害することもなく、GTPγS による受容体・G蛋白の脱共役を阻害した。このことから、Npys(Boc-Cys) は、G蛋白の GTP 結合ドメインには影響をあたえず、おそらく疎水結合、あるいはコンホメーション変化を導くことにより受容体・G蛋白の共役を安定に維持する状態をひき起こし、GTPγS効果を消失させると推定される。さらに、Npys 誘導体は、NEM[5] と同様 受容体-G蛋白共役機構の研究に有用なツールであることがわかった。

《謝辞》

Npys(Cys)およびNpys(Boc-Cys)をご提供下さった松枝礼博士(三共・活性物質研)に感謝致します。

《参考文献》

(1) Fozard, J.R. (1987) TIPS 8, 501-506.
(2) Dumuis, A., Sebben, M. and Bockaert, J. (1988) Mol. Pharmacol. 33, 178-186.
(3) Matsueda, R., Kimura, T., Kaiser, E.T. and Matsueda G.R. (1981) Chem. Lett. 737-740.
(4) Katada, T., Oinuma, M. and Ui, M. (1986) J. Biol. Chem. 261, 8182-8191.
(5) Kitamira, Y. and Nomura, Y. (1987) J. Neurochem. 49, 1894-1901.

113 ヒト死後脳phencyclidine結合部位に対するL-グルタミン酸、グリシンおよびMg^{2+}の影響

白川　治、中井　隆、北村　登、橋本健志、西野直樹、三田達雄

(神戸大学医学部精神神経科学教室)

〔要約〕

ヒト死後脳において、^{3}H-TCPで標識されるphencyclidine（PCP）の結合部位とN-methyl-D-aspartate (NMDA)感受性L-グルタミン酸受容体との関係を検討した。その結果、1）ヒト脳前頭前野には、高親和性、飽和性の^{3}H-TCP結合部位が存在し、PCP および NMDA感受性 L-グルタミン酸受容体の非競合型拮抗薬であるMK-801は、nMオーダーの強い阻害能を示した。２）膜をTriton X-100 で前処置することにより、L-グルタミン酸は濃度依存的に^{3}H-TCP結合を増加させた。この効果は、10μMグリシンにより著しく増強した。３）L-グルタミン酸存在下、非存在下にかかわらず、Mg2+ により軽度の結合量の増加をみたが、1 mM 以上のMg2+ によって逆に明らかな結合量の減少をみた。以上から、ヒト死後脳における^{3}H-TCP で標識されるPCP 結合部位は、L-グルタミン酸、グリシンおよびMg2+ により調節され、すでに報告されたラットにおけるNMDA感受性 L-グルタミン酸受容体と同様の特性を示した。

Phencyclidine (PCP)はその乱用により精神分裂病様の精神障害をきたすことが知られている。ラット等齧歯類の中枢神経系における最近の研究から、興奮性アミノ酸受容体、なかでもN-methyl-D-aspartate (NMDA)感受性 L-グルタミン酸受容体を介するPCPの作用が注目されている（1）。一方、NMDA感受性L-グルタミン酸受容体の活性はグリシンおよびMg2+ によって調節されていることが主として生理学的研究により明らかにされている（2、3）。今回我々は、^{3}H-1-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine (^{3}H-TCP) を用いて、L-グルタミン酸、グリシンおよびMg2+ の^{3}H-TCP結合への影響を検討することにより、ヒト死後脳におけるPCP結合部位とL-グルタミン酸受容体との関連について解析した。

［実験方法］

ヒト死後脳前頭前野を 5m M Tris/HCl 緩衝液、pH 7.4 で 38,000 g, 15分間遠心、再浮遊を 繰り返してえられた膜標品を用いた。^{3}H-TCP結合実験は、5 mM Tris/HCl 緩衝液中で、30℃、60分間インキュベーション後、ポリエチレニミン前処置ガラス繊維沪紙を用いる減圧下沪過法によった。

［結果･考察］

1. ヒト死後脳における^{3}H-TCP結合の薬理学的特性

ヒト死後脳前頭前野には、高親和性、飽和性の^{3}H-TCP 結合部位が存在し、Scatchard 解析により、Kdは 6.4 ± 1.0 n M、Bmax は 179 ± 15 fmol/mg protein (n = 3) であった。次に、^{3}H-TCP 結合に対する各種薬物の阻害能 (IC_{50}) を比較した。PCPおよび NMDA 感受性 L-グルタミン酸受容体の非競合型拮抗薬である MK-801 は 、n M オーダーのほぼ等しい親和性を示し、pentazocine および ketamine は μM オーダーの親和性を示した。一方、オピエートσ受容体、ムスカリニック受容体、ドーパミン取り込み部位にそれぞれ n M オーダーの親和性をもつ haloperidol、atropine、GBR-12909 の IC_{50} は10μM以上で、^{3}H-TCP 結合にはほとんど親和性を示さなかった。

2. ^{3}H-TCP 結合に対するL-グルタミン酸、グリシンおよび Mg2+ の影響 (Figure1, 2)

L-グルタミン酸による^{3}H-TCP結合量に対する増強効果は、3回遠心、再浮遊を繰りかえしてえられた通常の膜ではほとんどみられず、膜をTriton X-100で前処置することにより明らかになった。以下の実験では Triton X-100 で前処置した膜を用いた。L-グルタミン酸は濃度依存的に^{3}H-TCP結合を増加させ、

Figure 1. Effect of Glutamate and Glycine on Specific Binding of 3H-TCP

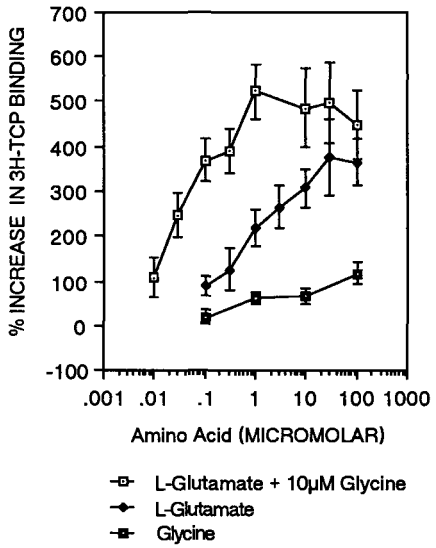
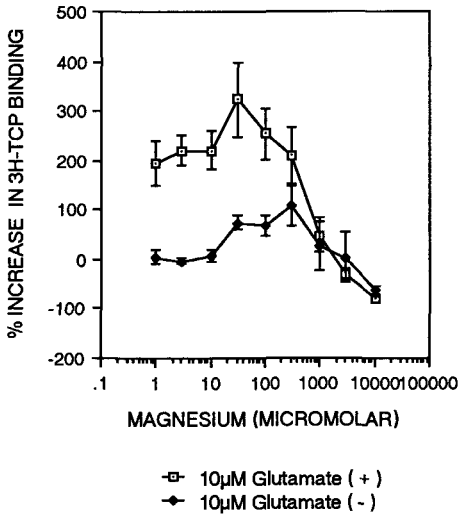


Figure 2. Effect of Mg2+ on Specific Binding of 3H-TCP In the absence and presence of Glutamate



30μMで約350%の最大増強効果を示した。この効果は10μMグリシンの存在により著しく増強し、最大で約500%の結合量の増加を示した。グリシン単独ではたかだか100%の増加しか示さなかった。Mg2+は、L-グルタミン酸存在下、非存在下にかかわらず、100μM前後で軽度の増強効果を示したが、1mM以上では明らかな結合量の減少をみた。10μM L-グルタミン酸存在下では、Mg2+ が100μM 以上では濃度依存的に結合量は減少した。

以上の結果から、ヒト脳には PCP および MK-801 に高い親和性を示す^{3}H-TCP結合部位が存在し、この結合は、L-グルタミン酸、グリシンおよび Mg2+の存在により影響を受けることが明らかになった。これらヒト脳における^{3}H-TCPの結合特性は、ラットにおける結合特性（4, 5, 6）とよく一致していたが、Bmax がラット大脳皮質におけるBmax (~1 pmol/mg protein) に比べて小さかった。この原因として、膜分画調製法の違い、ヒト脳における死後変化（死後凍結時間、凍結保存期間）の影響等が考えられるが、NMDA 感受性 L-グルタミン酸結合を指標した報告からもヒト脳ではラット脳に比べて小さい値が得られている（7, 8）。現在、^{3}H-TCPで標識されるヒト脳のPCP結合部位とNMDA 感受性 L-グルタミン酸受容体との関係をさらに明らかにするために、各種興奮性アミノ酸およびその関連化合物の^{3}H-TCP 結合への影響を検討中である。

［文献］

1. Kemp,J.A., Foster,A.C. and Wong, H.F. (1987) Trends Neurosci. 10, 294-302.
2. Nowak,L., Bregestovski,P. Ascher,P. Herbert,A .and Prochiantz,A. (1984) Nature (London) 307, 462-465.
3. Johnson,J.W. and Ascher,P. (1987) Nature (London) 325, 529-533.
4. Fagg,G.E. (1987) Neurosci.Lett. 76, 221-227.
5. Bonhaus,D.W., Burge,B.C. and McNamara,J.O. (1987) Eur. J. Pharmacol. 142, 489-490.
6. Loo,P.S., Braunwalder,A.F., Lehmann,J.,Williams,M. and Sills,M.A. (1987) Mol. Pharmacol. 32, 820-830.
7. Geddes,J.W., Chang-Chui,H., Cooper,S.M., Lott,I.T. and Cotman, C.W. (1986) Brain Res. 399, 156-161.
8. Monaghan, D.T. and Cotman, C.W. (1985) J. Neurosci. 5, 2909-2919.

114 ラット脳神経伝達物質に対するdantroleneの作用

竹内潤一，木内祐二*，小林利雄，清水浩光，
小片　寛，融　道男
（信州大学医学部精神医学教室，昭和大学
医学部第二薬理学教室*）

〔要約〕

抗精神病薬による悪性症候群（NMS）の治療に使われるdantrolene sodiumは、従来骨格筋弛緩剤と考えられていたが、中枢に由来する病変と思われるNMSに効く理由について疑問がもたれていた。そこでdantroleneをラットに与え、脳内神経伝達物質の変動を調べた。脳内4部位でGABAとグルタミン酸は変化なかった。norepinephrineは視床下部で減少した。高温下で実験すると脳内4部位のホモバニリン酸はすべて増加し、2部位で5-hydroxyindolacetic acidも増加した。このほかのモノアミン、代謝物にもかなりの変動があり、dantroleneは中枢のドーパミンを中心としたモノアミン系神経伝達物質に影響するものと思われる。

抗精神病薬による悪性症候群（neuroleptic malignant syndrome, NMS）にdantrolene sodium（Dt）が有効であることが臨床的に知られている[7]。Dtは悪性高熱の特効薬であり、その作用は骨格筋の筋小胞体からのカルシウムイオンの放出を抑えることと考えられている。しかし、NMSは発熱とともに錐体外路症状、意識障害などの中枢症状があり、Dt以外には中枢性のdopamine（DA）アゴニストが有効であることが知られている。従って、Dtが中枢性に働き神経伝達物質に影響を与えているのではないかと考え、ラットにDtを投与し、脳内4部位における神経伝達物質の変化について検索した。

［方法］Wistar系雄性成熟ラットを用いて、propylene glycolに溶かしたDt 25mg／kgを腹腔内に注射し、対照にはvehicleを注射した。室温および、人工気象室を用いた高温下で、30分、60分、120分後に断頭し、冷凍箱内で脳を前頭前野（PF）、視床下部前部（a-H）、同後部（p-H）、線条体（St）の4部位に分割した。各試料に130μlの0.5NHCl（1mM EDTAを含む）を加え、ソニファイアーで10秒間ホモジナイズ後、50μlのクロロホルムを加え、8,800gで15分間、4℃にて遠沈した後、上清を電気化学検出器付高速液体クロマトグラフ（島津LC－3A，VMD－101A）に注入し、norepinephrine（NE）、DA、3,4-dihydroxyphenylacetic acid（DOPAC）、homovanillic acid（HVA）、5-hydroxytryptamine（5HT）、5-hydroxyindolacetic acid（5HIAA）を分離測定した。カラムはEicompak MA－ODSを使用し、クエン酸バッファー（pH3.9）を用いた。同じ上清を用い、グルタミン酸、GABAを蛍光測定法により測定した[3,5]。

［結果］1．室温における実験：1)グルタミン酸およびGABA量は、どの部位でも有意な変化は得られなかった（Table 1）。2)脳内アミンのうち、NEは対照群に比べ、p-Hの120分後でDt投与群が80.8%（±5.4%）と有意に減少し（Student's t-test, $p<0.05$）、またStで60分後に141.3%（±11.0）と増加がみられた（$p<0.05$）。DAはPFで30分後，60分後にそれぞれ143.8%（±12.5）、131.9%（±7.0）と増加がみられ（$p<0.05$）、a-Hで30分後に153.0%（±14.9）と増加がみられた（$p<0.05$）。DOPACはa-Hで30分後に147.4%（±18.7）に増加した（$p<0.05$）。HVAはStで30分後に89.8%（±2.8）に減少した（$p<0.05$）。5HTは、PFで30分後、120分後にそれぞれ134.4%（±7.7）、118.7%（±4.6）に増加し（$p<0.05$）、p-Hで30分後に152.6%（±6.4）に増加した（$p<0.01$）。5HIAAもStで120分後に116.6%（±6.4）と増加がみられた（$p<0.05$）。

Table 1. Changes in GABA and Glutamic Acid Concentrations of Rat Brain Areas after Administration of Dantrolene Sodium (25mg/kg, IP)

		GABA			Glutamic Acid		
Brain areas		30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
prefront. cortex	C	37.4±3.6(6)	42.9±2.8(6)	33.4±1.8(7)	58.1±3.4(7)	60.9±1.3(6)	57.4±2.9(7)
	Dt	37.3±2.8(7)	37.5±2.4(6)	38.8±4.8(7)	53.7±3.4(7)	56.9±2.2(7)	56.5±4.4(7)
ant. hypoth.	C	134.3±3.9(6)	139.4±6.1(6)	141.4±6.8(7)	41.6±2.3(7)	37.6±3.0(6)	37.1±2.8(7)
	Dt	132.7±1.5(6)	135.0±3.4(6)	135.8±2.3(7)	40.2±2.4(7)	38.4±2.3(7)	35.8±1.8(7)
post. hypoth.	C	75.1±9.0(6)	77.6±3.5(6)	70.5±6.0(7)	34.0±2.1(7)	31.7±1.3(6)	32.7±1.1(7)
	Dt	73.1±3.6(6)	65.6±6.0(6)	68.1±3.9(7)	32.3±1.7(7)	33.4±1.8(7)	31.0±1.1(7)
striatum	C	55.8±4.2(7)	68.0±2.7(6)	61.0±2.3(7)	45.7±2.9(7)	51.9±2.7(6)	44.9±1.3(7)
	Dt	58.0±1.8(7)	60.5±2.9(6)	63.5±1.8(6)	45.7±1.4(7)	48.1±2.7(7)	47.0±1.9(6)

(n moles/mg protein, mean ± S.E.)

2．高温下における実験：ラットを30分間37～38℃に慣らした後、環境温を40～40.5℃に上昇させ、体温が40℃前後になった時点でDtあるいはvehicleを注射した。注射後30分～120分までの間、ラットの体温は39～40.5℃であった。Dt投与群で体温の下降はみられなかった。1)室温に放置した無処置の対照群と、体温を上昇させてvehicleを注射した高温対照群との比較では、高温群でPFのDA、HVAに有意な増加、a-Hの5HTに有意な増加、p-HのDOPACに有意な減少、StのHVAに有意な増加が認められた。2)Dt投与群とvehicle投与群の比較では、Dt群のNEがa-H、p-Hで最も著明に減少し、HVAは全ての部位で有意に増加した。5HIAAも、PF、Stの2部位で有意に増加した。測定したアミンの変化のうち2部位（a-H，p-H）について Table 2 にまとめた。

［考察］Dtを臨床で使用すると、不眠、頭痛、抑うつ、てんかん発作、精神錯乱、神経過敏などの副作用がを生ずることから、中枢性の神経伝達物質系に作用していることが推定される。Pattiら[6]はDtが、ラットの線条体、黒質などのglutamic acid decarboxylase活性を上昇させ、大脳皮質のGABAを増加させる（Dt 25mg／kg投与）と報告しているが、今回の実験では、どの部位でもGABAの有意な変化を認めることができなかった。昨年岡田ら[4]が20mg／kgのDtをラット腹腔内に投与し、小脳を除いた全脳のトリプトファン水酸化酵素活性が増加していることを報告し、Dtのセロトニンニューロン系への影響を示唆しているが、今回の実験では、室温でPFおよびp-Hの5HTとStの5HIAAが、また高温下ではPF、Stの5HIAAが増加していることが認められた。Dtの作用として、室温および高温下で一貫して変化をみせているのは、NEのp-Hでの減少、および5HIAAのStでの増加である。更にNEは、高温下でa-Hにおいて著明な減少を示し、HVAは、高温下でPF、a-H、p-Hにおいて顕著に増加した。同様に5HIAAもPFにおいて増加がみられた。

DAや5HTは、体温降下作用に関係していると考えられているが[1),2)]、以上の結果はDtにより室温でPF、a-HのDAおよびPF、p-H等の5HTが増加し、高温下では全部位のHVAとp-H、Stの5HIAAが増加したことを示している。すなわちDtは脳内各部位のDAおよび5HTの合成を高める作用をもち、これがNMSに対するDtの作用を一部説明すると解することができよう。NE減少については、代謝物の測定がなされていないので意味づけは困難であるが、Dtが脳内モノアミンにかなりの変化を及ぼすことはこの実験から明らかである。NMSにおける高熱には、抗精神病薬による黒質線条体系のDAの遮断が関係していると推定されるので、今回の実験のような環境温による高熱とは異なった発熱機序を考えねばならぬが、このような条件下でもDtが脳内モノアミンを変動させたことはNMSに対するDtの作用を考える上で重要であろう。

Table 2.
Changes in Amines and Metabolites Concentrations of Anterior Hypothalamus (A) and Posterior Hypothalamus (B) of Rats after Administration of Dantrolene Sodium (25mg/kg,IP) under a High Ambient Temperature

[A]		30 min	60 min	120 min	Room Temper.
NE	C	16.1±0.6(6)	17.6±0.7(6)	20.8±0.9(7)	21.1±1.7(6)
	Dt	16.5±1.2(6)	17.1±1.0(7)	14.2±0.9(7)***	
DA	C	5.4±0.5(6)	4.6±0.6(7)	4.7±0.7(7)	2.9±0.4(6)
	Dt	5.5±0.7(6)	5.2±0.7(7)	5.4±0.5(7)	
DOPAC	C	7.8±0.3(6)	4.7±0.7(6)	4.4±0.6(7)	4.7±0.5(6)
	Dt	7.4±0.9(6)	5.4±0.7(7)	5.5±0.6(7)	
HVA	C	2.0±0.1(6)	1.4±0.2(6)	1.0±0.1(7)	1.1±0.1(6)
	Dt	2.1±0.2(6)	1.7±0.2(7)	1.5±0.1(7)**	
5HT	C	3.5±0.3(6)	4.2±0.4(6)	5.1±0.6(7)	3.4±0.3(6)°
	Dt	3.1±0.2(6)	4.7±0.5(7)	5.4±0.5(7)	
5HIAA	C	10.9±0.3(6)	10.2±0.8(6)	10.6±0.9(7)	12.0±0.9(6)
	Dt	11.0±0.8(6)	10.6±1.2(7)	13.0±0.7(7)	

[B]		30 min	60 min	120 min	Room Temper.
NE	C	10.9±0.5(7)	11.6±0.7(7)	13.4±0.6(7)	14.5±1.3(5)
	Dt	8.9±0.7(6)*	11.3±0.6(7)	9.7±0.7(7)**	
DA	C	4.6±0.4(7)	4.6±0.3(7)	4.8±0.3(7)	4.3±0.6(5)
	Dt	4.1±0.3(6)	5.6±0.3(7)	5.8±0.4(7)	
DOPAC	C	3.1±0.1(7)	2.9±0.4(7)	2.4±0.4(7)	4.1±0.4(5)°
	Dt	3.2±0.4(6)	2.8±0.3(7)	2.9±0.5(7)	
HVA	C	0.7±0.03(7)	0.6±0.1(7)	0.4±0.03(7)	0.4±0.1(5)
	Dt	0.8±0.1(6)	0.9±0.2(7)	0.8±0.1(7)*	
5HT	C	3.3±0.2(7)	4.6±0.7(7)	5.4±0.7(7)	3.5±0.5(5)
	Dt	3.0±0.1(6)	5.5±0.7(7)	5.8±0.7(7)	
5HIAA	C	7.8±0.2(7)	7.9±0.7(7)	7.6±0.8(7)	9.3±0.8(5)
	Dt	8.4±0.5(6)	7.2±0.6(7)	9.4±0.9(7)	

(ng/mg protein, mean ± S.E.)
t-test: compared with control, * p<0.05, ** p<0.01 ,*** p<0.001
with control 120 min, ° p<0.05

実験に協力頂いた本学環境生理学教室、上田五雨教授および教室の先生方、当教室の勝山淳子さん小林京子さんに感謝する。なおダントリウムは、山之内製薬の提供を受けた。

文献

1. Clark WG (1979) Neurosci Biobeh Rev 3, 514-518.
2. Lee TF et al (1985) Neurosci Biobeh Rev 9, 589-598.
3. Nitsch C et al (1979) Neurosci Lett 11, 295-299.
4. 岡田尚志郎ほか (1987) 神経化学 26, 457-459.
5. Okada Y et al (1971) Exp Brain Res 13, 514-518.
6. Patti F et al (1981) Acta Neurol (Napoli) 36: 384-388.
7. Shalev A et al(1986) Acta psychiatr scand 73: 337-347.

115　ウシ脳組織から分離したモノアミン生合成活性化タンパク質（14-3-3）の不均一性

市村　徹*，礒辺　俊明，奥山　典生
（都立大・理・化学）

〔要約〕

モノアミン生合成活性化タンパク質（14-3-3タンパク質）を逆相HPLCを用いて７種類のポリペプチド（α～η鎖）に分離した。水系緩衝液中での再構成実験の後，各鎖はいずれもホモダイマーを形成し，すべてがトリプトファン水酸化酵素を約２倍活性化した。SDS存在下での電気泳動で測定した分子量はα，β，γ，δ，ζ，η鎖が27 kDa，ε鎖は30 kDaであった。モノクローナル抗体を用いた免疫化学的分析とアミノ酸配列分析からα～η鎖は類似の然し独立した構造をもつポリペプチドである事が示唆された。以上の結果より14-3-3タンパク質中に含まれる７種類のポリペプチド鎖は，モノアミン生合成活性化因子として１つのタンパク質ファミリィーを形成しており，脳のモノアミン生合成はこれら７種類の分子によって調節されていると考えられた。

14-3-3タンパク質（以下14-3-3）は脳神経系における可溶性タンパク質の約 1% を占める酸性タンパク質である[1]。我々はこの14-3-3がカテコールアミンやセロトニン生合成の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をCa　，カルモデュリン／キナーゼIIに依存して活性化する因子である事を見い出した[2]。またこの14-3-3標品から上記活性化能をもつ１種のポリペプチド鎖（η鎖）を分離，全アミノ酸配列を決定してその水酸化酵素活性化機構を提唱した[3]。一方で我々は SDS存在下の電気泳動とイオン交換クロマトグラフィーの結果から，14-3-3が複数の分子種を含む不均一なタンパク質である事を示唆した[3,4]。本研究では14-3-3標品中に含まれるη鎖以外の６種類のポリペプチド鎖（α～ζ鎖）を単離し，それらの水酸化酵素活性化能を調査した。また各鎖の構造を免疫化学的，タンパク質化学的手法を用いて分析した。

（実験方法）14-3-3の調製：　14-3-3標品はウシ脳（20 kg）の可溶性画分から硫安分画（30%; pH 7.1 - 85%; pH4.7），DEAE-Sephadex A-50 と Sephadex G75 カラムを用いた既報[2,3]の方法で分離した。
α～η鎖の分離と活性化能の測定：　α～η鎖は Senshu pak VP304-5061カラム(20 I.D.X 60 mm)を用い，0.1% TFA中の ｱｾﾄﾆﾄﾘﾙ濃度を48～55% まで直線的に上昇させる方法で分離した（流速 5.5ml/ min）。水酸化酵素に対する活性化能は山内らの方法[5]に従って測定した。
モノクローナル抗体の調製：　５週齢の Balb/c マウス５匹をウシ脳14-3-3標品で免疫し，血中抗体価の上昇を確認した後，常法によりヒ細胞とマウス骨髄腫細胞(P3U1)との細胞融合を行った。HAT選択倍地で増殖した1200個の雑種細胞クローン中14-3-3に対して抗体産生能を示した14個を限界希釈法でクローニングした。その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。

（結果と考察）14-3-3標品に含まれるポリペプチドの分離：
14-3-3は異なったサブユニット組成をもつ２種類のタンパク質の混合物である事が報告されている[6]。我々の14-3-3標品も SDS存在下の電気泳動において量比の異なる（存在比 9:1，CBB 染色から定量）２本のバンド（27 kDaと 30 kDa)を示し，またこれらはいずれも抗14-3-3血清と反応した[3]。然しながら，逆相 HPLC を用いた検討から14-3-3には少なくとも７種類のポリペプチド（α～η鎖）が存在していると考えられた（Fig.1a）。本クロマトグラフィー下，７種類のα～η鎖はいずれもアセトニトリル濃度50～55% 間に溶離した。またピーク面積から計算した各鎖の含量は，α(3%)，β(12%)，γ(19%)，δ(10%)，ε(18%)，ζ(28%)，η(10%) であった。
次に各α～η鎖分画を再度，逆相カラムに添加，HPLCを行った(Fig.1b)。各分画のポリペプチド鎖は上記溶離位置(Fig.1a)にいずれも単一ピークとして溶離した(Fig.1b)。

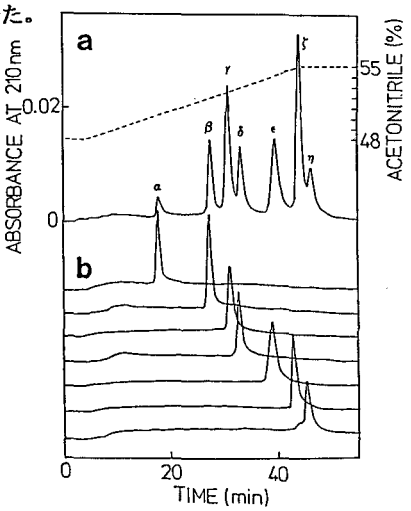


Fig.1 逆相HPLCによるα～η鎖の分離

各々は SDS存在下，非存在下の電気泳動で単一バンドを示した。SDS存在下の電気泳動で測定した５種の（α，β，γ，δ，ζ）鎖の分子量はη鎖と同じ27 kDaであった。一方，ε鎖は30 kDaの分子量を示した。27kD鎖と30 kd鎖の含量比(82%:18%) は上記電気泳動での定量値(9:1) とよく一致した。

α～η鎖の再構成と水酸化酵素活性化能：　α～η鎖を分離した逆相HPLCの条件すなわち0.1% TFAの酸性，高濃度のアセトニトリル存在下ではタンパク質の高次構造は破壊され生理活性を持たないことが一般的である。そこで逆相HPLCから溶離したα～η鎖は直ちに５倍容の50mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.5) を加えて中和し希釈した後，TSK-gel DEAE-5PW (7.5I.D.X75 mm)カラムに添加し，同緩衝液で洗浄して，アセトニトリルを除去した。吸着したタンパク質は0.4M NaCl を含む同緩衝液で溶離した。この操作によって得られたα～η鎖は，いずれも２量体分子 (Mr=55kDa) を形成し，またイオン交換HPLCで天然の14-3-3と同じ位置 (NaCl濃度　0.19M)に単一ピークとして溶離した。

この様に再構成したホモダイマー型のα～η鎖標品を用いてトリプトファン水酸化酵素に対する活性化能を測定した (Fig.2)。この条件下，η_2 鎖がトリプトファン水酸化酵素を約２倍活性化する事は以前報告した[3]。再構成したα～ζ鎖もη鎖と同様に酵素を約２倍活性化した。その活性化能の程度は各鎖を混合しても増加しなかった。従って，14-3-3標品中に含まれるη鎖以外の６種類のポリペプチド鎖もまたη鎖と同様の分子機構によってトリプトファン水酸化酵素のN末端調節ドメインに結合し，酵素を活性化すると推察した。

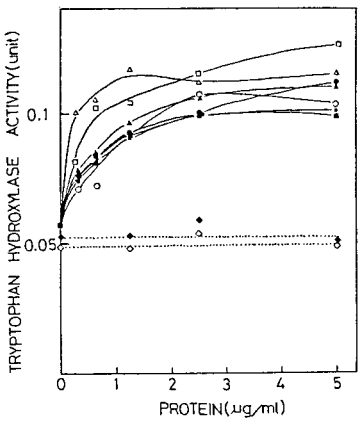


Fig. 2 α～η鎖のトリプトファン水酸化酵素活性化能

α～η鎖の構造比較：　細胞融合法で得た14種類のモノクローナル抗体とα～η鎖との反応性を ELISA法で検定した (Fig.3)。過半数の10種の抗体はα～η鎖のいずれとも反応した (Fig.3a)。一方，残りの抗体の中にはすべての27 kDa鎖(Fig.3b)，ε鎖(Fig.3c)，γ，δ鎖(Fig.3d)を特異的に検出するものがあった。

各鎖のアミノ酸組成値はいずれも非常に似かよっていた (相関係数 0.96 以上)，またアミノ酸配列分析を行った範囲ではα～ζ鎖はいずれもη鎖[3]と76% 以上の構造類似性を示した。以上の結果から14-3-3中に存在する７つのポリペプチド鎖は類似のしかし独立した遺伝子からの転写産物であり，脳のモノアミン生合成はこれら７種類の活性化分子によって調節される可能性があると結論した。

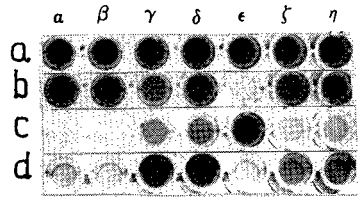


Fig. 3 モノクロナール抗体の反応性

キナーゼIIを提供してくだっさた東京都神経科学研究所の，山内　卓　博士に感謝致します。

（文献）

1. Boston,P., Jackson ,P. and Thompson,R.J. (1982) J. Neurochem. 38, 1475-1482
2. Ichimura,T., Isobe,T., Okuyama,T., Yamauchi,T. and Fijisawa,H.,(1987) FEBS Lett. 219, 79-82
3. Ichimura,T., Isobe,T., Okuyama,T., Takahashi,N., Araki,K., Kuwano,R. and Takahashi,Y (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press
4. Kadoya,T., Tamura,A., Ichimura,T., Manabe,T., Isobe,T., Okuyama,T. and Nakajima,T (1985) Bull. Jap. Neurochem. Soc. 24, 37-39
5. Yamauchi,T., Nakata,H. and Fujisawa,H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 5404-5409

116 シナプトソーム膜タンパク質の分離分析

石岡 憲昭、名竹 洋子、栗岡 晋
（慈恵医大・医科研生化学）

〔要約〕

シナプトソーム膜タンパク質を 8M尿素を含む CHAPSで可溶化し、2次元電気泳動法（2D法）により分析した。シナプトソーム膜タンパク質は、クマシー染色で pI 3.5−10、M.W. 10K−200 Kの領域に すくなくとも250個のスポットとして検出された。ミエリン 及びミトコンドリア膜タンパク質との比較から、シナプトソーム膜タンパク質は、 pI 4.0−7.5、M.W. 20K−130 K の領域に多く見られ、少なくとも 30 個のタンパク質スポットが シナプトソーム膜特異的と考えられた。2次元電気泳動の結果を基に、膜タンパク質の分離を逆相系HPLCにより検討し、pI 4.6、M.W. 56 K のシナプトソーム膜に特徴的なタンパク質を分離することが出来た。このタンパク質はラット脳及びウシ脳シナプトソーム膜に存在していた。また、Con A あるいは Protein Aに対して親和性を有することから、免疫グロブリン系に関連するタンパク質である可能性が示唆された。

<はじめに> 中枢神経系の膜タンパク質は、膜酵素、神経伝達の受容体、シナプス形成因子など、重要な役割を果たしているが、その統括的な分析及びタンパク質化学的研究がこれまで多くはなされていない。おそらく、抽出時の可溶化条件や、分離分析の際の可溶化剤の影響などの問題が伴うためと考えられる。シナプトソーム画分の膜タンパク質を2D法により統括的分析を行い、タンパク質マップを作成した。このマップを基にシナプス膜タンパク質の分離をHPLC法で検討したので報告する。

<実験方法> （1）膜タンパク質の調製：ラット脳及びウシ脳から調製した、ミエリン、シナプトソーム、ミトコンドリア分画画分を凍結融解及び低張処理後、遠心洗浄を数回繰り返して、膜画分を調製した。次に膜画分をクロロホルム：メタノール（1:2、v/v）で脱脂質後、1% CHAPS−8M尿素−10mM Tris-HCl（pH 7.5）により膜タンパク質の可溶化、抽出を行った。（2）2D法によるタンパク質マップの作成：2D法は、既報の方法(2)(3)を基に膜タンパク質に適した条件を検討し、マップを作成した。（3）HPLC による分離分析：逆相系カラム（Develosil, 300 ODS-7, 4.6 I.D x 250 mm）を用い、0.1%TFAーアセトニトリル系で溶出した。

<結果> （1）シナプトソーム膜タンパク質マップ：図1にシナプトソーム膜画分より可溶化、抽出した膜タンパク質のマップを示した。pI 3.5−10、M. W. 10K−200 Kの範囲に少なくとも 258個のシナプトソーム膜タンパク質スポットが見いだされた。 ミエリン、ミトコンドリア膜タンパク質マップとの比較から、シナプトソーム膜に 特徴的なタンパク質はpI 4.0−7.5、M.W. 20K−130 Kに多くみられた。特に、シナプトソーム膜特異的と思われる少なくとも 30個のタンパク質スポットを同定することができた。マップ上には、アクチン(1)(4)、チュブリン(4)(5)、カルモジュリン (5)、GFA(5)、PSD52K(1)、ニューロフィラメント(5)の位置を示した。（2）逆相系 HPLC によるシナプトソーム膜タンパク質分離：シナプトソーム膜タンパク質を逆相系カラムを用いた HPLC により分離することを試みた。図2に示したように、溶出パターンは、膜タンパク質が複雑に溶出されていることを示しており、 12 の分画画分を得た（図中1〜12）。各画分を凍結乾燥後、2D法によりそれぞれ分析した（図3I、III、V及びVII）。分画1、2、及び 3には、タンパク質が含まれていなかった。 分画4のピークは、シナプトソーム膜に特異的と思われるタンパク質の一つ（図1、10）がほぼ単一に分離された。分画5と6には主として塩基性及び低分子性タンパク質が溶出され、特に、分画6には特異的タンパク質（12、13、23：図3III矢印）が溶出されていた。分画7、8、9は広範囲なpI、M.W.の領域に、多くのタンパク質が溶出され、分画8には主にカルモジュリン、特異的タンパク質 19、27、28 及び 29（図3V矢印）が溶出された。分画10には、チューブリンが溶出された（図3VII）。

<考察> 2D法によるシナプトソーム膜タンパク質分析から258個のタンパク質が検出され、少なくとも30個の特異的と思われるタンパク質を同定することができた。更に銀染色、糖染色法等の併用により、より詳細な分析が可能である。また逆相系HPLCの結果、二次元マップにより分析された大部分のタンパク質及び特異的と思われるタンパク質が順次溶出された。このことは溶出条件の検討やイオン交換、ゲル沪過等のカラムの選択及び組合せにより、更に詳細な分離分析が可能であることを示している。今回、ほぼ単一な状態で得られたタンパク質は（図1、10及び図3I矢印）マップ上 pI4.6、 M.W. 56Kであったが 分子量に比して逆相系 HPLC で相対的に早く溶出され、また、クマシー染色の度合が 弱いなどの特徴に加え Con A、Protein A との親和性を示したことから免疫グロブリン系に関連するタンパク質である可能性が示唆された。

1) Kelly, P.T., and Cotman, C.W. (1978) J. Cell. Biol. 79, 173-183. 2) Manabe, T., Hayama, E., and Okuyama, T. 1982) Clin. Chem. 28, 824-827. 3) O'Farrell, P.H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007-4021. 4) Strocchi, P., Brown, B.A., Young, J.D., Bonventre, J.A., and Gilbert, J.M. (1981) J. Neurochem. 37, 1295-1307. 5) Takahashi, Y., Manabe, T., Kadoya, T., Ishioka, N., Isobe, T., and Okuyama, T. (1984) Electrophoresis '83 (Hirai, H. ed.) pp 263-269.

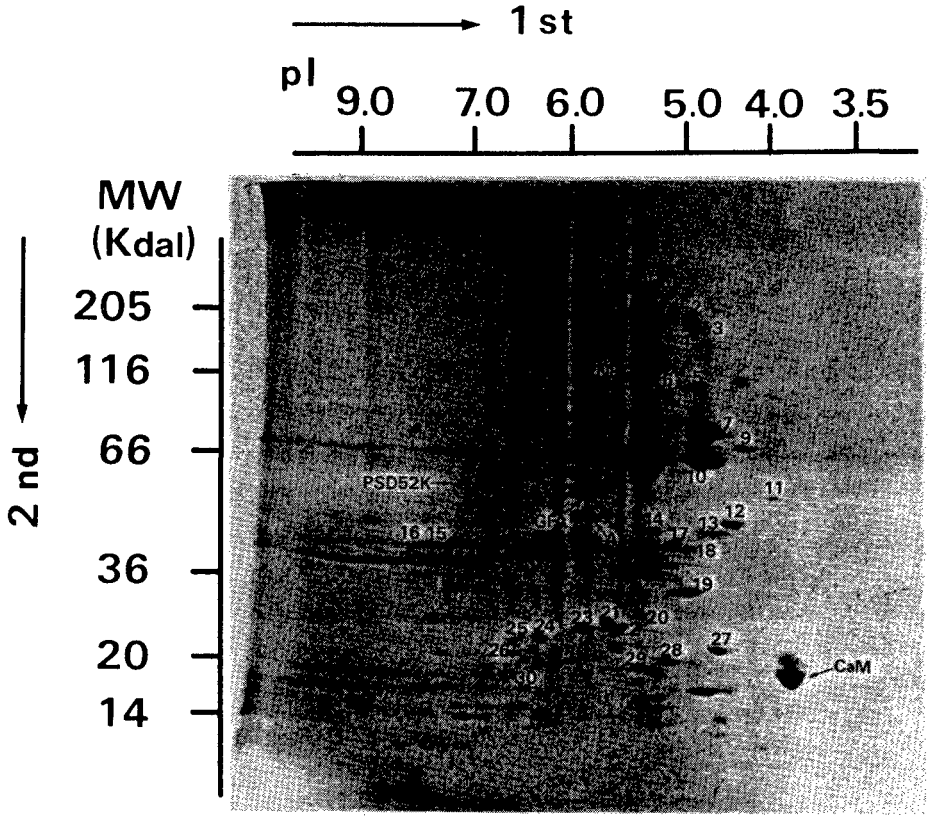


図1、シナプトソーム膜タンパク質の2次元マップ

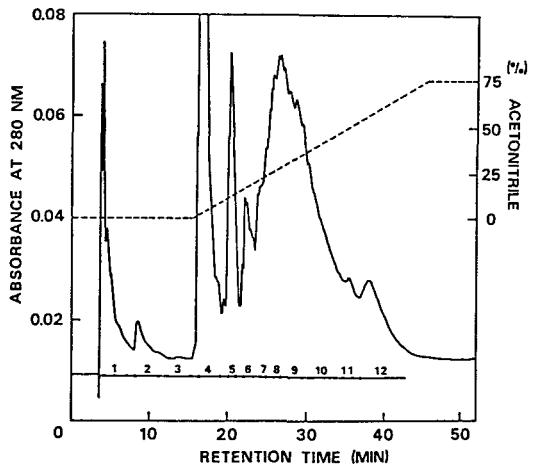


図2、シナプトソーム膜タンパク質の逆相HPLC

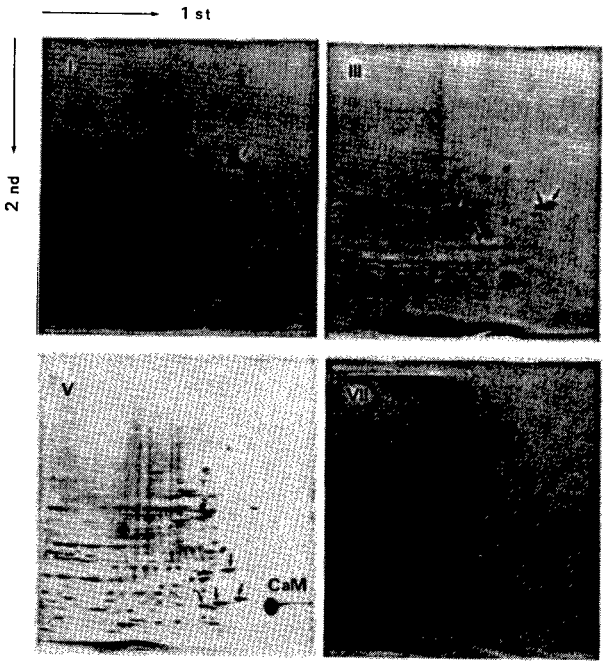


図3、HPLC溶出画分の2次元電気泳動分析

117　ラット小脳の成熟にともなうタンパク質変動の二次元ＨＰＬＣによる解析

田岡　万悟，礒辺　俊明，真鍋　敬，奥山　典生，山国　徹*
（都立大・理・化，三菱化成生命研*）

〔要約　小脳の分化の過程での細胞の生化学的マーカーや分化のシグナルとなるタンパク質の検索を目的として、まず、小脳の成熟の過程での可溶性タンパク質変動を解析した。

1）出生から成熟に至るラット小脳可溶性タンパク質を二次元HPLCで系統的に分離しタンパク質地図を作成した。この地図上には160-180 種のポリペプチドが存在した。

2）成熟ラット小脳のタンパク質地図上に存在するほとんどのポリペプチドは出生直後にすでに存在していた。

3）1）で作成した６枚のタンパク質地図をもとにして地図上に存在する150 種のポリペプチドの加齢にともなう変動を定量的に追跡した。

4）最も一般的な変動様式を示すポリペプチドは出生直後にすでに存在し小脳の成熟にともなって増加する傾向が認められた。一方、出生直後あるいは発育初期にはほとんど検出されず、成熟にともなって出現し、その量が変動するポリペプチドが数種類検出された。

＜はじめに＞

ラット小脳は出生後に分化、成熟することが知られている。本研究では小脳の分化の過程での細胞の生化学的マーカーや分化のシグナルとなるタンパク質の検索を目的として、まず、ラット小脳の発育過程における可溶性タンパク質組成の変動を２次元HPLC(2D-HPLC) により解析した。

＜材料と方法＞

出生直後および出生後3,7,12,21 および180 日の成熟ラットの小脳をそれぞれ湿重量100mg に対して500 μl の25mM Tris-HCl(pH7.5)緩衝液を加えて磨砕した後、15000xg で60分間遠心した。上清として得られた小脳可溶性タンパク質画分を直接DEAE-5PW(7.8I.D.x75mm)とPhenyl-5PWRPカラム(4.6I.D.x75mm)を直列に連結した2D-HPLシステムに導入し、既報の方法[2] で分離した。

＜結果と考察＞

ラット小脳の可溶性タンパク質の2D-HPLC マッピング：生後180 日の成熟ラット小脳の可溶性タンパク質を直接2D-HPLシステムで分離して得た「タンパク質地図」を図１に示した。この地図上には、約170 種類のポリペプチドピークが検出された。同様の方法で作成したウシ小脳の可溶性タンパク質地図[2] と比較すると、ウシ小脳で検出、同定されたポリペプチドピークの大部分は、ラット小脳でも地図上のほぼ対応する位置に検出された。必要な場合には、タンパク質地図作成のための2D-HPLC の過程で分取したピークについてアミノ酸組成分析や配列分析、SDS 存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動や特異抗体を用いた免疫化学的検出法などをおこなってウシ脳タンパク質との対応を確認した。図１には小脳の可溶性タンパク質地図の指標となる典型的７種類のタンパク質の位置を示した。

タンパク質地図の比較と変動の解析：出生直後、および出生後3,7,12,21 日のラット小脳から可溶性タンパク質を抽出し、前と同様の方法で2D-HPLC によるタンパク質地図を作成した。それぞれの地図には160-180 種類のポリペプチドピークが検出されたが、そのほとんどは、対応するピークが成熟ラットにも存在していた。すなわち、成熟ラット小脳に存在するタンパク質の大部分は出生直後にすでに存在していた。出生直後から成熟に至る小脳タンパク質の変動を示す例としてアルブミンが溶離する第５番目および脳型クレアチンキナーゼ（ＣＫ）が溶離する第９番目のタンパク質地図を重ねてそれぞれ図２と図３に示した。

このような比較をもとにしてタンパク質地図上でのピーク高さを測定することにより小脳の成熟にともなう個々のタンパク質の変動を定量化したのが図４である。実際には約150 種類のポリペチドピークについて変動曲線を得ることができたが図４には結果の一部のみを示してある。一方、出生から成熟に至るラット小脳のＣＫ量の変動を抽出液中での酵素活性の測定によって追跡した結果[1] が図４に示してある。タンパク質マップ法と酵素活性測定法で定量したＣＫの変動曲線はよく対応しており、2D-HPLC 法が成熟過程でのタンパク質変動を系統的、網羅的に追跡する目的に使用し得る方法であることを示唆している。

タンパク質地図上に検出されたタンパク質は多様な変動様式を示したが、最も典型的にはＣＫの場合のように出生直後にすでに存在し小脳の成熟にともなって増加する傾向が認められた。あるいはアルブミンの場合のように発育とは無関係にほぼ一定のレベルで検出されるタンパク質も存在していた。一方、例えば図２に示したタンパク質V-12のように出生直

後あるいは発育の初期にはほとんど検出されず、小脳の分化、成熟にともなってその量が変動するタンパク質も認められた。

図１．ラット小脳の可溶性タンパク質地図

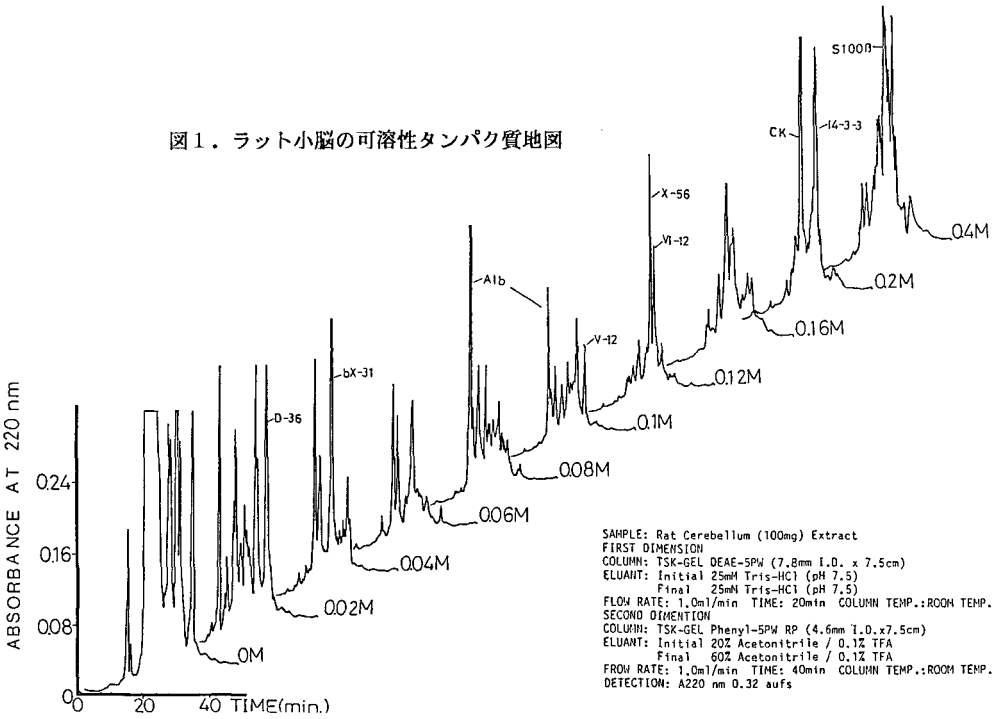


図４．ラット小脳可溶性タンパク質の加齢にともなう変動

図３．タンパク質地図の比較

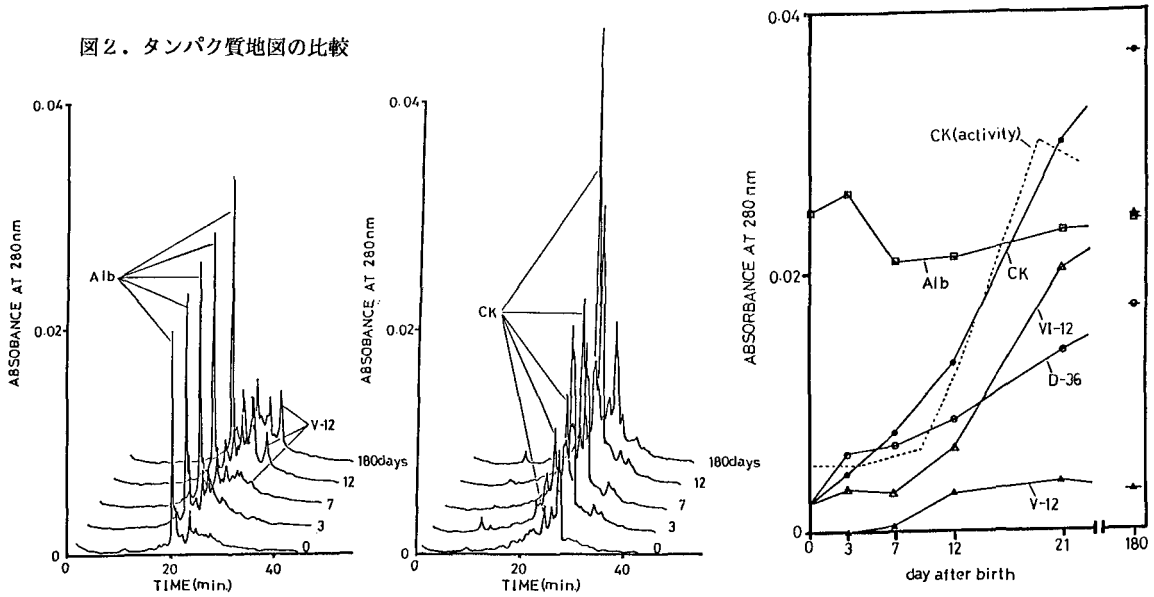


図２．タンパク質地図の比較

文献

(1) Evelyn P. Lapin, H. S. Maker and G. M. Lehrer (1974) J. Neurochem. 23, 465-469.

(2) 内田　和久ら (1987) 神経化学 26, 157-159.

118 ヒト脳型グリコーゲンホスホリラーゼ：脳からの精製、特異抗体の作成、ＥＩＡ法の確立、組織分布

加藤兼房、清水温子、黒部直美
（愛知県コロニー・研・生化）

〔要約〕

1) グリコーゲンホスホリラーゼ（以下Phos）をヒト脳および骨格筋より精製し。SDS-PAGEで単一バンドを示す標品を得た。精製した脳型酵素(B-Phos)をウサギで免疫し抗血清を得た。抗血清のIgG画分をB-Phosを結合させたセファロースカラムにかけ、抗体を吸着、溶出させて精製した。しかし、得られた抗体はB-Phosのみならず、筋型酵素(M-Phos)とも反応したので、M-Phos-セファロースカラムを通して吸収してB-Phos特異抗体を得ることが出来た。

2) B-Phos特異抗体IgGを用いて、抗体を結合させたポリスチレン球とβ-ガラクトシダーゼ標識抗体より成るサンドイッチＥＩＡ系を作成した。測定系はB-Phosに特異的で、M-Phosとの交叉は１％以下であった。最少測定限度は B-Phos 0.1 ng／試験管であった。

3) この測定系を使って、ヒト組織中のB-Phos免疫活性を定量した。B-Phosは心臓にも脳と同程度の高濃度で存在することが分かった。消化管、膀胱、大動脈など平滑筋組織に比較的多く分布し、その他、こう丸や肝臓などでも検出された。

4) ヒト脳における局在を、ホルマリン固定のパラフィン切片を用いて免疫染色して調べた限りでは、B-Phosはアストログリア細胞の大部分と老人斑におもに存在し、神経細胞は、大脳皮質のニューロンの一部と小脳ゴルジ細胞が弱陽性を示したが小脳プルキンエ細胞や顆粒細胞など大部分は染色されなかった。

Phosには少なくとも筋型、肝型、脳型の三種類のアイソザイムがあり、それぞれが蛋白質化学的、機能的、免疫学的に異なることが知られている。最近三種類のヒトPhosのｃＤＮＡがクローニングされ[1,2]、その塩基配列ならびにアミノ酸配列が明らかにされた。B-Phosのアミノ配列はM-Phosのそれと83%、L-phosとは80%の相同性があることが明らかにされている[2]。一方、B-Phosは胎児型のPhosとも云われ、未分化の筋や肝、さらに腫瘍組織などで発現している[3]。しかし、脳からB-Phosが精製された報告はなく、B-Phosの特異抗体やそれを用いた免疫測定法の報告もない。今回我々は、ヒト脳からB-Phosを精製し、これを免疫原にして、抗B-Phos特異抗体を得、ヒトB-Phosの高感度ＥＩＡ系を作成することができた。また、測定系を用いてヒト各組織中のB-Phos免疫活性を測定し、脳における免疫組織化学的局在を調べたので、それらの結果を報告する。

［方法と結果］

ヒトPhosの精製：剖検時に得て、-80℃で保存した脳の粗抽出液にウサギ肝グリコーゲンを加え（最終濃度0.5％）、Phosをグリコーゲン複合体として沈澱回収し、これを順次、ブチルセファロース、ＡＭＰ-セファロース、MonoQカラムにかけて精製した（表１）。M-phosもヒト胸筋より同様の方法で精製した。最終標品は7.5%SDS-PAGEで、94kDaの位置に単一バンドを示した。Phos活性はGilboeらの方法[4]で測定した。精製酵素の比活性は、B-Phos、M-Phosとも約70units/mgであった。

TABLE 1. Purification of phosphorylase b from human brain

Fractions	Total protein (mg)	Phosphorylase activity (total units)	(units/mg protein)	Yield (%)
Crude extract*	6740	2620	0.389	100
80% $(NH_4)_2SO_4$	5680	2040	0.358	78
Glycogen pellet	271	1550	5.70	59
Butyl-Sepharose	42.0	794	18.9	30
Sephadex G-150	32.4	777	24.0	30
AMP-Sepharose	7.63	497	65.1	19
Mono Q	5.81	411	70.7	16

*About 800 g of brains were used.

抗体の作製：精製したB-Phosをウサギに４週間間隔で注射(0.3 mg/rabbit)し、３回目の免疫後から採血した。抗血清のIgG画分をB-Phosーセファロースカラムにかけ、抗体を吸着、溶出して精製した。精製抗体はB-Phosのみならずm-Phosとも反応したので、M-Phos-セファロースカラムを通して、M-Phosとも交叉反応する抗体を分離した。このようにして得られた抗体は、B-Phosと特異的に反応することをイムノブロット法にて確かめた。

ＥＩＡ系の作製：上記の特異抗体IgGをペプシンで処理して$F(ab')_2$フラグメントとし、これをポリスチレン球（直径3mm）に

Fig. 1.

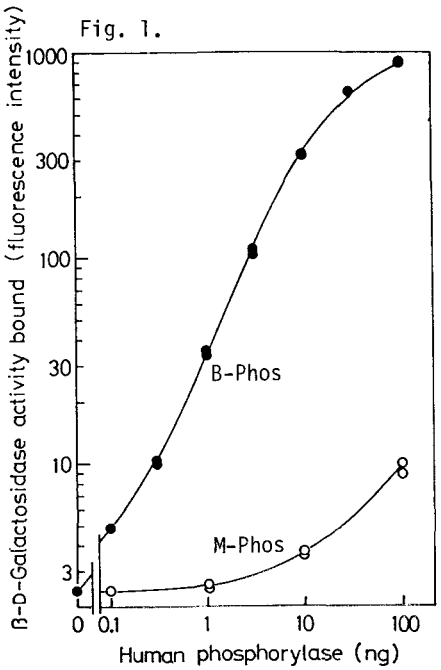


TABLE 2. Concentrations of brain type phosphorylase in various human tissues

Tissues	No. of samples	Phosphorylase (ng*/mg soluble protein) mean ± SD	ranges
Cerebral cortex	3	6250 ± 290	5950 - 6520
Cardiac muscle	3	4180 ± 1220	2860 - 5260
Skeletal muscle	4	52 ± 30	24 - 88
Aorta	3	502 ± 362	86 - 745
Esophagus	6	1470 ± 630	845 - 2540
Stomach	4	167 ± 141	68 - 375
Small intestine	9	240 ± 102	109 - 391
Large intestine	5	432 ± 453	117 - 1200
Liver	4	404 ± 26	379 - 439
Spleen	4	200 ± 63	126 - 280
Kidney	3	216 ± 74	147 - 294
Urinary bladder	5	824 ± 425	414 - 1390
Testis	3	658 ± 464	265 - 1170
Pancreas	3	166 ± 151	67 - 340
Adrenal	4	339 ± 52	292 - 397
Thyroid	4	106 ± 30	73 - 143
Adipose tissue	3	40 ± 6	33 - 44
Lymphnode	3	120 ± 97	45 - 230
Lung	1	202	
Trachea	1	168	

* human brain phosphorylase b equivalents

結合させた固相と、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼで標識した抗体Fab'より成るサンドイッチ型測定系[5,6]を作った。測定系は0.1 ng/試験管の微量のB-Phosが検出できた。また、M-phosはほとんど交叉反応しなかった（図１）。

ヒト組織におけるB-Phosの分布：ＥＩＡ法を用いてヒト各組織の可溶性画分中のB-Phos免疫活性を測定した結果を表２に示した。B-Phosは脳に高濃度で存在したが、末梢組織でもかなりの濃度で広く分布し、とくに心臓には脳に匹敵する程存在した。消化管、膀胱、大動脈など平滑筋組織に比較的多く分布した。こう丸にもかなりのB-Phos免疫活性が測定された。

脳における免疫組織化学的局在：脳のホルマリン固定、パラフィン切片を用いて、酵素抗体間接法にて免疫染色を行った。B-Phosはおもにアストログリアに局在し、老人斑も陽性染色された。ニューロンでは、プルキンエ細胞や顆粒細胞などほとんどが染色されなかった。大脳皮質の神経細胞の一部と小脳のゴルジ細胞が弱陽性を示すにとどまり、従来組織化学染色で報告[7]されている結果と異なった。B-PhosとM-Phosの共通抗体を用いた染色でも同様の結果が得られた。

［考察］

脳型Phosは胎児型Phosともいわれ、Novikoff肝癌より精製[8]されているが、脳、少なくともヒト脳から精製したのは本報告が最初である。ヒトB-Phosを免疫して得られた抗血清は、M-Phosとも交叉反応する抗体を含み、B-PhosとM-Phosに共通のエピトープが存在することが示唆された。今回、我々が得た抗体は、少なくとも二重免疫拡散法では肝抽出液との間に沈降線を作らなかったが、精製L-Phosで交叉性を調べていないので、測定系がL-Phosとも交叉反応しないとは断言できない。しかし、B-Phosが末梢組織では心臓、消化管やこう丸などに広く分布することは、すでに電気泳動的分析で予想されていた[9]。我々の結果はこれらの報告と矛盾しない傾向を示している。脳切片の免疫染色の結果が、すでに報告されている組織化学的酵素活性染色の結果[7]と異なるのは、おそらくPhos分子の抗原活性が不安定で、ホルマリン固定やパラフィン包埋時に失活するためと想像される。他の、より穏和な固定法で切片を調製し、検討する必要がある。

［文献］

(1) Newgard CB, Nakao K, Hwang PK, Fletterick RJ Proc Natl Acad Sci USA 83, 8132-8136, 1986 **(2)** Newgard CB, Littman DR, Genderen C, Smith M J Biol Chem 263, 3850-3857, 1988 **(3)** Sato K, Satoh K, Sato T, Imai F, Morris HP Cancer Res 36, 487-495, 1976 **(4)** Gilboe DP, Larson KL, Nuttall FQ Anal Biochem 47, 20-27 **(5)** Kato K Methods in Enzymology 92, 345-359, 1983 **(6)** Kato K Methods of Enzymatic Analysis 9, 451-462, 1986 **(7)** Ibrahim MZM, Pascoe E, Necco Khayat MY J Neurol Sci 18, 117-131, 1973 **(8)** Sato K, Weinhouse S Arch Biochem Biophys 159, 151-159, 1973 **(9)** Yonezawa S, Hori SH J Histochem Cytochem 23, 745-751, 1975

119 脳プロテインホスファターゼ２Ａに対する抗体の性質とラット脳における免疫組織化学的検索

斎藤義樹、山本秀幸＊、生塩之敬、宮本英七＊
（熊本大・医・脳外科、第一薬理＊）

〔要約〕

牛脳より精製したプロテインホスファターゼ２Ａ（PrP-2A）の触媒サブユニットに対するポリクローン抗体を作製し、アフィニティカラムで精製した。精製抗体はラット脳ホモジネートのうち単一の蛋白質とのみ交叉反応した。反応蛋白質は SDS-PAGE の易動度から PrP-2A と考えられた。抗体はカルシニューリン、プロテインホスファターゼ１とは交叉反応しなかった。抗体は PrP-2A を免疫沈降させるだけでなく、酵素活性を阻害した。ラット脳の細胞分画を行ない、イムノブロット法で検索すると、細胞上清画分およびシナプトソーム可溶性画分が強い免疫反応性を示した。ラット脳内分布を調べると線条体に強い免疫反応性を確認した。免疫組織化学的検索では免疫反応性は、脳の広い範囲の部位に認められ、特に神経細胞に検出された。神経細胞は、小脳核で強く、扁桃核、視床、大脳皮質、海馬、線条体で中等度に染色された。蛋白質燐酸化反応は種々の細胞機能の制御に関与する調節機構であり、プロテインホスファターゼ（PrP）はプロテインキナーゼによって触媒された燐酸化反応を“スイッチオフ”するものである。哺乳動物の組織中には少なくとも PrP-1、2A、2B、2C が存在し、種々の蛋白質を脱燐酸化していることが示されている（1）。PrP-2A に関しては既に、脳、心筋、肝臓、骨格筋などの種々の組織中に広く分布していることが報告されている。cAMP 依存性プロテインキナーゼ、プロテインキナーゼC、カルシウム／カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡ（CaM キナーゼⅡ）の広い臓器分布から、その基質の脱燐酸化反応に関与することは十分に推測される。ここでは、精製した PrP-2A に対する抗体の性質を検討し、さらに、イムノブロット法および免疫組織化学的手法を用いてラット脳内における PrP-2A の分布を検索する。

【実験方法】

抗 PrP-2A 抗体の作製：牛脳より精製した PrP-2A を家兎に免疫してポリクローナル抗 PrP-2A 抗体を作製した。これをアフィニティカラムを用いて精製した。

イムノブロット法：各サンプルは、SDS-PAGE の後、ニトロセルロース膜に移し、上記の抗体と４℃で一晩、インキュベートした。二次抗体はペルオキシダーゼ抗家兎 IgG を用い、4-クロロ-1-ナフトールで発色させた。

免疫組織化学的検索：ホルマリン固定パラフィン包埋したラット脳を使用し、酵素抗体法には ABC（avidin-biotin peroxidase complex）法を用いた。抗体は上記で精製したものを使用した。

【結果および考察】

精製した抗体を用い、イムノブロット法を行なうと PrP-2A およびラット脳ホモジネートで同様の部位に反応バンドを認めた（Fig. 1）。

ここで部分精製した抗体の IgG 画分および精製した PrP-2A の触媒サブユニットを用いて免疫沈降実験および酵素活性に対する効果を調べた。抗体と酵素の比が、約 140 対 1 のモル比で、酵素は免疫沈降された（Fig. 2）。また、抗体と酵素とのモル比が、約 1,000 対 1 で酵素活性を阻害した（Fig. 3）。

ラット脳における PrP-2A の細胞内分布を調べるために、イムノブロット法を用いて検索すると、免疫反応性は、ミエリン分画以外のいずれの細胞画分でも検出された。イムノブロットで検出されたバンドを調べ、蛋白質量当たりの相対的酵素量を概算すると、核、粗ミトコンドリア、シナプス小胞の画分で少なく、細胞上清画分およびシナプトソーム可溶性画分で高い値を示した。

ラット脳内の各部位における PrP-2A の量を同様の方法で調べると、線条体で高い値を示した。

免疫組織化学的手法（ABC 法）を用いて、ラット脳内の各部位における PrP-2A の分布を調べた。概して、白質に少なく、灰白質で強い免疫反応性が認められた。線条体、大脳皮質、小脳皮質で顕著であった。免疫染色はグリア細胞よりも神経細胞により著明で、細胞体および神経突起が染色された。脳梁や内包などの神経路（白質）は、ほとんど染色されなかった。大脳皮質においては、第Ⅲ層および第Ⅴ層の神経細胞が比較的よく染色された。線条体の神経細胞は、比較的高い免疫染色性を示し、海馬は中等度に染色された。海馬の歯状回顆粒細胞において、細胞膜直下の細胞質部分が強く染色された。扁桃体はかなり強い免疫染色性を示したが、その神経細胞は核周囲よりも神経突起がより強く染色された。また小脳においてはプルキンエ細胞および顆粒細胞層は中等度に染色されたが、小脳核では神経細胞の細胞質が非常に強く染色された。このように免疫組織化学的に示された PrP-2A の脳内分布は、一般的にイムノブロット法による結果と相関した。

自己燐酸化された CaM キナーゼⅡの活性調節に PrP-2A による脱燐酸化反応の関与が示唆されている。CaM キナーゼⅡのラット脳内分布 (2) と比較すると、PrP-2A は CaM キナーゼⅡよりも、広範囲に、散在性に存在している。しかし、線条体や大脳皮質は他部位に比べてより高い局在性を示した。特に小脳核の神経細胞では強い免疫染色が認められた。PrP-2A は $2A_0$、$2A_1$、$2A_2$ などのサブタイプの存在が知られている (3)。脳のサブタイプについては未だ研究されていない。本研究では PrP-2A の触媒サブユニットに対する抗体を用いているので、いずれのサブタイプも認識していよう。少なくともラット脳における PrP-2A グループ全体の分布を示しているものと考えられる。PrP-2A が MAP2 やタウ因子 (4) および CaM キナーゼⅡ (5) などの重要な機能蛋白質を基質とすることから考えると PrP-2A は、蛋白質燐酸化－脱燐酸化を介して種々の神経機能の調節に重要な役割を果たしていることが示唆される。

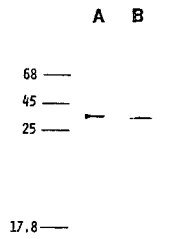


Fig. 1. Immunoblot analysis of rat forebrain homogenate using antibodies prepared against PrP-2A.
0.2μg of purified PrP-2A (lane A) and 150μg of rat forebrain homogenate (lane B) were subjected to electrophoresis on a 13.5% SDS-PAGE polyacrylamide gel. The gel was transblotted to nitrocellulose membrane and subjected to immunoblotting using purified anti-PrP-2A antibodies.

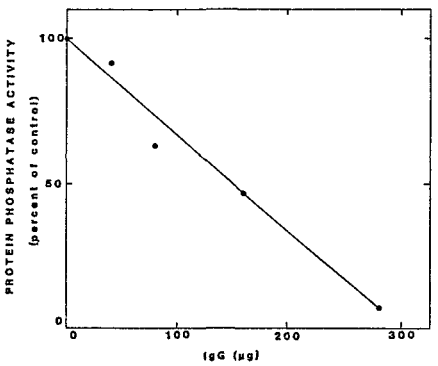


Fig. 2. Immunoprecipitation of protein phosphatase 2A
Purified protein phosphatase 2A (0.5μg) was mixed with indicated amount of antibodies to protein phosphatase 2A.

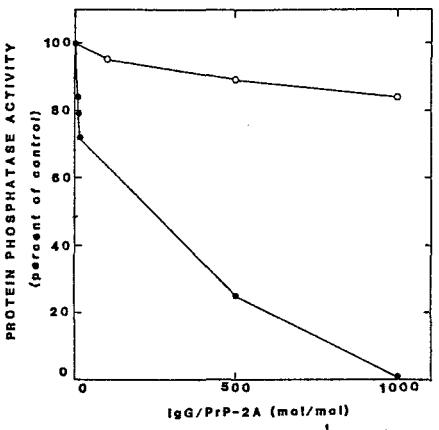


Fig. 3. Inhibition of purified protein phosphatase 2A activity by protein phosphatase 2A antibody
A standard amount of purified protein phosphatase 2A (0.011 nmol) was incubated with various amounts of anti-PrP-2A antibodies (closed circle) or pre-immune IgG (open circle).

【文　献】

1. Ingebritsen, T.S., and Cohen, P. (1985) Science 221, 331－338
2. Fukunaga, K., Goto, S., and Miyamoto, E. (1988) J. Neurochem. in press
3. Tung, H.Y.L., Alemany, S., and Cohen, P. (1985) Eur. J. Biochem. 148, 253－263
4. Yamamoto, H., Saitoh, Y., Fukunaga, K., Nishimura, H., and Miyamoto, E. (1988) J. Neurochem. 50, 1614－1623
5. Saitoh, Y., Yamamoto, H., Fukunaga, K., Matsukado, Y., and Miyamoto, E. (1987) J. Neurochem. 49, 1286－1292

120 ラット小脳におけるビリルビン結合タンパク

青野幸子、仙波禮治、佐藤浩、柏俣重夫

(愛知県コロニー・研究所・周生期)

〔要約〕

ラット小脳におけるビリルビン (BR) 結合タンパクの有無を検討するために、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびブロッティング法を用い、ブロット上で タンパク結合性 ^{14}C-BR を検出する方法を考案した。この方法を用いて、ラット小脳、大脳、および肝臓における BR 結合タンパクを検出したところ、小脳には少なくとも 6 つの結合タンパクが見いだされた。分子量はそれぞれ 15k (a) 、17k (b) 、18k (c) 、30k (d) 、31k (e) 、240k (f) であったが、タンパク f 以外はすべて核画分のみにみられた。大脳には d、e を除く BR 結合タンパクが存在し、肝臓では a、f のほかにグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) のサブユニット 1 (Ya) 、2 (Yc) に BR 結合活性が認められた。

遺伝的に高 BR 血症を示す Gunn ラット (1) ホモ接合体 (j/j) 小脳では、新生仔期に侵入した BR によって高度な発育障害 (小脳低形成) の生ずることが知られている (2) 。低形成小脳ではプルキンエ細胞および内顆粒細胞の障害が著しい (3) が、この BR 性脳障害の成立機構は未だ十分には解明されていない。今回、成立機構解明への最初の試みとして、BR の標的部位を明らかにするためにラット小脳における BR 結合タンパクを検索し、小脳に特徴的と思われる BR 結合タンパクを見いだしたので報告する。

[材料と方法] **動物**: BR 結合タンパクの検索には 8 および 30 日齢の Gunn ラットヘテロ接合体 (j/+) の小脳と大脳を、成獣 j/j ラットにおいては肝臓を用いた。**^{14}C-BR 溶液の調製**: ^{14}C-BR (1-8-^{14}C) をクロロホルムに溶かしたのち、1% 酢酸を含むクロロホルムにて TLC を行い、^{14}C-BR 相当部分をクロロホルムで抽出した。実験には比活性600cpm/nmol の ^{14}C-BR 溶液を用いた。**BR結合タンパクの検索**: 断頭採取した小脳および大脳を 9 倍量の 50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジェナイズ (氷冷下) した。そのホモジェネートを最終濃度として 3% SDS、10% グリセロール、1% メルカプトエタノール含有 0.0625M トリス-塩酸緩衝液 (タンパク可溶化用緩衝液; pH 6.8) 中で 100℃、3 分間処理し、電気泳動用試料とした (100μg/40μl) 。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli (4) の方法に準じて行い (5) 、ポリアクリルアミドの濃度は 5-15% とした。SDS-電気泳動後、Towbin ら (6) の方法に従いタンパクをニトロセルロース膜上にブロットした。ニトロセルロース膜を 85μM 牛血清アルブミン/170μM ^{14}C-BR を含む緩衝液中で 1時間インキュベート (室温) した。緩衝液で水洗後、乾燥させて X-Omat™ AR X 線フィルム (Kodak) を用いてオートラジオグラフィーを行った (-80℃、4-5 日) 。この方法が BR 結合タンパクを検索するために適当であるかどうか確かめるために、上述の方法で調製した j/jラット肝臓ホモジェネート (100μg/40μl) 、および市販のラット肝GST (Sigma; 100μg/40μl) を同時に泳動し BR 結合性を調べた。分子量のマーカーとしては低分子量、高分子量測定キット (Pharmacia) を用い、タンパク定量は Lowry ら (7) の方法に従った。**BR 結合タンパクの細胞下分布**: 8 日齢 j/+ ラットより採取した小脳を9倍量の0.32M しょ糖/50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジェナイズ (氷冷下) し、そのホモジェネートを 1000 x g、10 分間遠心した沈澱を核画分、その上清を 12,000 x g、20 分間遠心した沈澱をミトコンドリア画分、その上清を 105,000 x g、60 分間遠心した沈澱をミクロゾーム画分、その上清を可溶性画分とした。各画分をタンパク可溶化用緩衝液で処理、電気泳動用試料とした (100μg/40μl) 。

[結果] ラット肝 GST は SDS-電気泳動上 3 つの異なったサブユニット 1 (Ya; 25k) 、3 (Yb; 26.5k) 、2 (Yc; 28k) に分離し、^{14}C-BR はすべてに結合したが、特に サブユニット 1 と 3 に対して親和性が強かった。成獣 j/j ラットの肝臓ホモジェネートには少なくとも 4 つの ^{14}C-BR 結合タンパクが検出された。そのうち 2 つはおのおの GST サブユニット1 および 2 と同じ移動度を示した。他 2 つの分子量はそれぞれ 15k と 240k であった。8、30 日齢ラット小脳ホモジ

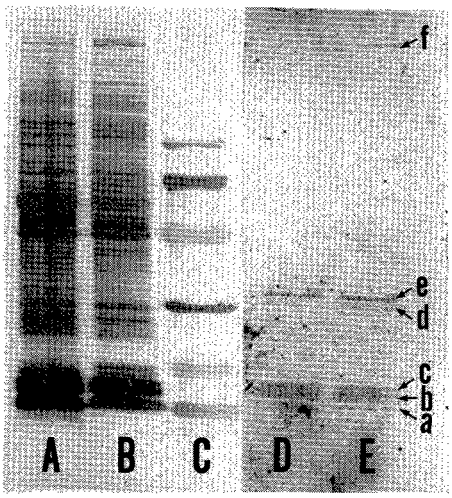


Fig. 1 ^{14}C-Bilirubin binding proteins in the nuclear fraction from heterozygous (j/+) Gunn rat cerebella. A-C, 0.1 % amido black staining; D and E, autoradiogram. A and D, day 8; B and E, day 30; C, standard proteins (from bottom, 14.4, 20.1, 30, 43, 67 and 94 kDa). ^{14}C-Bilirubin binding proteins are indicated as a-f in D and E.

ェネートおよび核画分 (Fig. 1) には少なくとも 6 つの ^{14}C-BR 結合タンパクが見いだされた。分子量はそれぞれ 15k (a) 、17k (b) 、18k (c) 、30k (d) 、31k (e) 、240k (f) であった。この方法では、肝臓の GST と同じ移動度を示す BR 結合タンパクは検出されなかった。分子量 15k タンパク a は肝臓における BR 結合タンパクの 1 つと同じ移動度を示した。大脳ホモジェネートでも分子量 15k、17k、18k の位置に BR 結合タンパクを検出することができたが、その量は非常にすくなかった。さらに大脳には肝臓、小脳におけると同様、分子量 240k を示す BR 結合タンパクが存在することがわかった。タンパク f を除く小脳 BR 結合タンパクはすべて核画分に存在し、他の画分には認められなかった。

[考察] j/j ラット小脳では、プルキンエ細胞および内顆粒細胞等の神経細胞に著しい障害がみられ (3) 、一方、アストロサイトの障害は比較的少ないことが明らかとなっている (8) 。このことより、神経細胞とアストロサイトでは明らかな BR 感受性の違いがあることが示唆される。肝臓には BR に結合してその毒性を抑制するタンパク (1-1 型 GST;リガンディン) が存在する (9) が、最近、脳においても GST の存在が報告された (10) 。脳には GST サブユニット 1 (Ya) はないとされている (11) が、見いだされた GST はアストロサイトおよび上衣細胞に存在すると報告されている (12) ので、この GST タンパクが BR 結合活性をもち、BR からアストロサイトを防御している可能性がある。小脳には 少なくとも 6 つの BR 結合タンパクの存在することが明らかになったが、分子量でみるかぎり、24-28k の GST サブユニット (13) に相当するタンパクは検出されなかった。これは、肝臓に比べて脳では GST の濃度が低いためであると思われる。プルキンエ細胞をはじめとする神経細胞にはこのような BR 結合タンパクがないか、あるいは BR が結合することによってその機能が阻害されるタンパクが存在するのか二つの可能性が考えられる。タンパク d、e は大脳、肝臓ではほとんど検出できなかったことを考えると、この 2 つのタンパクは小脳に特徴的なタンパクであって、小脳低形成成立機構に密接な関連性を持った BR 標的タンパクである可能性も考えられる。またタンパク b、cは小脳、大脳には存在したが、肝臓ではほとんど検出されなかったので、この 2 つのタンパクは脳に特徴的にみられるタンパクである可能性も示唆される。タンパク a、f は 3 つの臓器に共通してみられるタンパクであるが、f についてはその電気泳動パターンおよび分子量よりスペクトリンであることが示唆された。小脳 BR 結合タンパクの性質については現時点では未知な部分が多いが、それらの性格付けは BR による小脳低形成 (小脳発育障害) 成立機構を解明するうえに今後の重要な課題となると考えられる。

(1) Gunn, C. K. (1938) J. Hered. **29** 137-139. (2) Kashiwamata, S., Katoh-Semba, R., and Sato, H. (1984) Protein Nucl. Acid Enz. **29** 1679-1694. (3) Schutta, H. S. and Johnson, L. (1967) J. Neuropath. Exp. Neurol. **26** 377-396. (4) Laemmli, U. K. (1970) Nature **227** 680-685. (5) Kashiwamata, S., Aono, S., and Semba, R. K. (1980) Experientia **36** 1143-1144. (6) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76** 4350-4354. (7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. **193** 265-275. (8) Aono, S., Sato, H., Semba, R., Kashiwamata, S., Kato, K., and Eng, L. F. (1988) J. Neurochem., **50** 717-721. (9) Litwack, G., Ketterer, B., and Arias, I. M. (1971) Nature **234** 466-467. (10) Das, M., Dixit, R., Seth, P. K., and Mukhtar, H. (1981) J. Neurochem. **36**, 1439-1442. (11) Senjo, M. and Ishibashi, T. (1986) Biomed. Res. **7** 19-26. (12) Senjo, M. and Ishibashi, T. (1985) Biomed. Res. **6** 433-436. (13) Tsuchida, S. and Sato, K. (1988) Protein Nucl. Acid Enz. **33** 1564-1573.

121 キョートルフィンによるシナプス膜からのカルシウム動員とIP3産生を介する作用機序

— GTP結合タンパクの関与 —

田村滋規、 植田弘師、 佐藤公道 (京都大・薬・薬理)

〔要約〕

ラット全脳より調製したシナプス膜に予め$^{45}Ca^{2+}$を取り込ませた後、IP3を作用させると$^{45}Ca^{2+}$遊離が見られた。このIP3の作用は、1)飽和性を示し、2)細胞下分画した膜のうちシナプス膜で最も顕著であり、3)ATP非依存性であった。これらよりシナプス膜には、小胞体とは異なるIP3感受性カルシウムストアーが存在することが示唆された。一方、GTPアナログ、GppNHpによりGタンパクを活性化することによっても同様の$^{45}Ca^{2+}$遊離が見られ、神経ペプチド、キョートルフィンを加えると$^{45}Ca^{2+}$遊離はさらに増大した。GppNHp存在下でのキョートルフィンによる$^{45}Ca^{2+}$遊離は、ホスホリパーゼCの阻害剤であるネオマイシンの添加あるいは、百日咳毒素(IAP)を前処置することにより抑制された。これらの結果及び、すでに報告しているようにキョートルフィンがGiタンパクを介してホスホリパーゼCを活性化することを考えると、GppNHp存在下でのキョートルフィンによる$^{45}Ca^{2+}$遊離は、キョートルフィンレセプター刺激後に産生されるIP3を介したものと推察される。こうしてシナプス膜に存在するIP3感受性カルシウムストアーが、レセプター →Gタンパク →ホスホリパーゼCという情報伝達系と機能的に連関することが明らかとなった。

ホルモンや神経伝達物質がホスホリパーゼCを活性化してIP3を産生し、細胞内カルシウムストアーからカルシウムを動員することが多くの細胞標本において示されてきたが、神経終末部でのカルシウム動員機構についてはほとんど明らかにされていない。すでに我々は、キョートルフィンがシナプス膜結合性カルシウムストアーからカルシウムを遊離させることを示してきた(1)。またキョートルフィンはGiタンパクを介してホスホリパーゼCを活性化する(2)。そこで今回は、キョートルフィンによるシナプス膜からのカルシウム遊離作用にIP3が関与する可能性について検討を行った。

〔実験方法〕

標本にはシナプス膜画分として、ラット全脳より常法に従って調製したシナプトゾーム画分を、低張メディウム(50mM Tris・HCl, 1mM $MgCl_2$, 100nM $CaCl_2$ (pH 7.5))で処理したものを用いた。シナプス膜画分に$^{45}Ca^{2+}$ (0.5μCi)を37℃で30分間取り込ませ、洗浄後再び低張メディウムに懸濁し(5~6mg/ml)、うち150μlをGF/Cグラスフィルターを敷いたチェンバー内に加え、37℃で低張メディウムによる灌流を行った。1分間隔で灌流液を分取し(1ml/min)、放射活性を測定して遊離$^{45}Ca^{2+}$量を求めた。灌流終了後、フィルター上に残存する$^{45}Ca^{2+}$量から求めた各測定時での組織中の$^{45}Ca^{2+}$全量に対する遊離$^{45}Ca^{2+}$量の比をfractional releaseとして表現した。

〔実験結果〕

IP3によるシナプス膜からのカルシウム遊離作用

1)シナプス膜標本において、灌流流液中にIP3 (5μM)を添加すると$^{45}Ca^{2+}$遊離はただちに増大した。一方、シナプトゾームを低張処理せず等張メディウムで灌流を行った場合ではIP3の作用は見られなかった(Fig.1)。

2)IP3による$^{45}Ca^{2+}$遊離作用は飽和性を示し(Km=3.1μM)、最大反応はfractional releaseで5.2%であった。

3)細胞下分画した膜のうちIP3による$^{45}Ca^{2+}$遊離作用はシナプス膜で最大であった。

4)シナプス膜でのIP3による$^{45}Ca^{2+}$遊離作用はATP非依存性であり、小胞体を多く含むマイクロゾームにおけるIP3感受性カルシウムストアーではATP依存性であった。

キョートルフィンによるシナプス膜からのカルシウム遊離作用

1)灌流液中にGppNHp (0.1~ 10μM)単独を添加するとIP3と同様な$^{45}Ca^{2+}$遊離の増大が見られた(1.3~2.8%, evoked $^{45}Ca^{2+}$ release)。一方、キョートルフィン (0.1~ 100μM)単独を加えることによっても$^{45}Ca^{2+}$遊離の増大が見られ(1.0~ 2.8%)、キョートルフィン(10μM)の作用はキョートルフィンレセプターアンタゴニスト Leu-Arg (1μM)により拮抗された。さらにキョートルフィン(100μM)をGppNHp (0.1~10μM)と同時に添加することによりGppNHpの効果は相乗的に増大した(2.8~ 8.9%) (Fig.2)。

2)ネオマイシン（30～ 300μM）を灌流液中に添加すると、GppNHp（10μM）存在下でのキョートルフィン（100μM）誘発性$^{45}Ca^{2+}$遊離作用が濃度依存的に抑制された（Fig.3A）。

3)シナプス膜をＩＡＰ（5～ 50μg/ml）で前処置すると、GppNHp（10μM）存在下でのキョートルフィン（100μM）誘発性$^{45}Ca^{2+}$遊離作用は濃度依存的に抑制された（Fig.3B）。

〔考察〕

シナプス膜には、IP_3感受性カルシウムストアーとして従来より知られている小胞体とは異なる性質を持ったカルシウムストアーが存在し、IP_3は細胞の内側からそのストアーに作用するこが示唆された。また、GppNHp存在下でのキョートルフィンによる$^{45}Ca^{2+}$遊離作用は、ネオマイシンの添加あるいは、ＩＡＰの前処置で消失したことから、キョートルフィンレセプター →Gタンパク →ホスホリパーゼC という経路を介して産生されるIP_3によるものと考えられる。 なお GppNHp 無添加の状態においてもキョートルフィンの作用が見られたが、これはすでに組織由来のＧＴＰがわずかに存在していることによると思われる。

以上の結果より、キョートルフィンレセプターはシナプス膜に存在する新規のIP_3感受性カルシウムストアーと機能的に連関することが明かとなった。そしてキョートルフィンによる神経終末からのメチオニンエンケファリン遊離作用は、このようなメカニズムを介しているものと考えられる（Fig.4）。

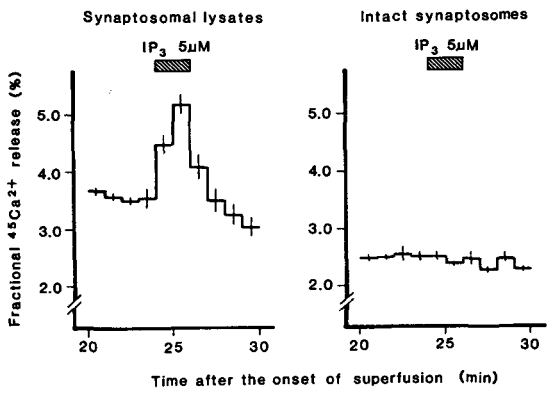


Fig.1 IP_3-evoked $^{45}Ca^{2+}$ release from synaptosomal lysates of the rat brain

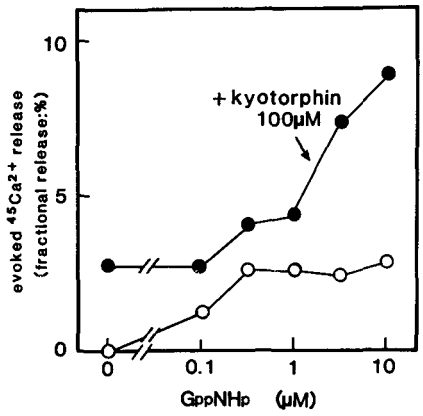


Fig.2 GppNHp-dependent kyotorphin-evoked $^{45}Ca^{2+}$ release from synaptosomal lysates

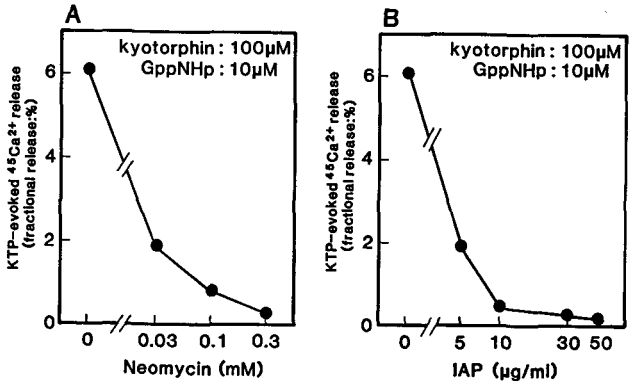


Fig.3 Blockade of kyotorphin-evoked $^{45}Ca^{2+}$ release by neomycin or IAP

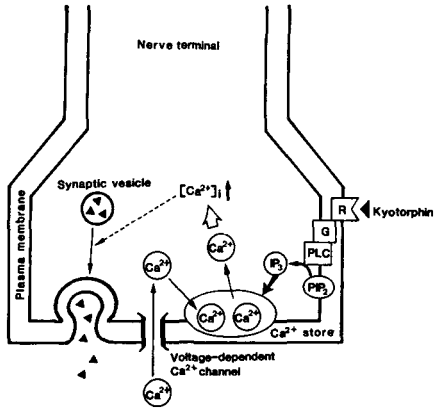


Fig.4 A possible role of IP_3 in the Ca^{2+} mobilization in nerve terminals

〔文献〕

(1) Ueda,H., Fukushima,N., Yoshihara,Y., Takagi,H. (1987) Brain Res. 419, 197-200

(2) Ueda,H., Yoshihara,Y., Misawa,H., Fukushima,N., Katada,T., Ui,M., Takagi,H., Satoh,M. (1988) Jpn. J. Pharmacol. 46 (suppl.), 200

122　脳由来δ-オピオイドレセプターとGTP-結合蛋白のシグナル伝達を伴わない連関様式について

－再構成実験による考察－

植田弘師、三澤日出巳、原田淳、佐藤公道　(京都大・薬・薬理)

〔要約〕

モルモット線条体シナプス膜において選択的なδ-オピオイドアゴニストである[^{3}H]-[D-Pen^{2,5}]-enkephalin (DPDPE)の特異的結合はグアニンヌクレオチドの添加により阻害されることからδ-レセプターはGTP-結合蛋白 (G-蛋白) と連関することが示唆されたが、DPDPE自身シナプス膜結合性のG-蛋白活性、すなわち高親和性GTPase活性やGDP-GTP交換反応に無影響であった。しかし、同膜標品においてμ-オピオイドアゴニスト,[D-Ala^2,MePhe^4,Glyol^5]-enkephalin (DAGO)は濃度依存的にこれらのG-蛋白活性を増強した。一方、NG108-15細胞において、DPDPEは高親和性GTPase活性を濃度依存的に増強した。これらの知見より、δ-レセプターには少なくとも２種類のサブタイプが存在し、脳由来δ-レセプターはシグナル伝達を伴わない様式でG-蛋白と連関していることが明らかになった。

オピオイドレセプターは主にμ、δ、κの３種のサブタイプに分類されることが多いが、各サブタイプのレセプター刺激にもとずく薬理作用の分子機構については十分に研究されていない。多くのオピオイド作用が百日咳毒素の前処理により遮断されること、及び特定の細胞においてオピオイドがアデニレートシクラーゼを抑制することなどから、オピオイドレセプターとGTP-結合蛋白 (G-蛋白) との機能的連関が示唆されてきた。この観点から、我々は各サブタイプのオピオイドレセプターアゴニストによるG-蛋白活性に及ぼす影響を精製あるいは膜結合性のオピオイドレセプターと精製G-蛋白との再構成実験を用いて検討してきた。その結果、μ-レセプターはGiとGoとに連関し(1)、そのアゴニスト刺激はG-蛋白活性を増強させること、またκ-レセプターはGiのみと連関し(2)、そのアゴニスト刺激は逆にG-蛋白活性を抑制させることを明らかにしてきた。しかしながら、我々は選択的なδ-アゴニストが脳膜標品においてG-蛋白活性のひとつである高親和性GTPase活性になんら影響を及ぼさないという予備知見を得ており、δ-レセプターのG-蛋白との連関について疑問を抱くに至った。本研究においては、このδ-レセプターのG-蛋白との再構成実験を通じ、本レセプターの脳における生理学的意義について考察する。

〔実験方法〕

膜標品の作成とN-ethylmaleimide (NEM) 処理　シナプス膜はモルモット線条体の粗ミトコンドリア膜を用い、NEM処理においては、膜標品を5μMのNEMとともに4℃、15分間インキュベートし、20mM Tris-HCl(pH7.5)で3回洗浄した。

NEM処理膜と精製G-蛋白との再構成　精製した(＞95%)GiあるいはGoをNEM処理した20μg蛋白／アッセイのシナプス膜と0.1%CHAPS存在下で4℃、60分間インキュベートして再構成を行った。

高親和性GTPase活性の測定および再構成膜からのGppNHpとの交換にもとづく[^{3}H]GDP遊離活性の測定

GTPase活性はUeda et al.(3)の方法によった。[^{3}H]GDP遊離実験(2)においては、あらかじめ精製したG-蛋白を[^{3}H]GTPと30℃、20分間インキュベートし、GDP結合型のG-蛋白にしたものを再構成させ、メジウム中に10μMのGppNHpを加え、[^{3}H]GDP遊離の時間経過に対するオピオイドアゴニストの効果を検討した。

〔実験成績〕

1　モルモット線条体シナプス膜における[^{3}H]DAGOおよび[^{3}H]DPDPEの特異的結合はGTPγSの添加により阻害されそのIC50はともに10μMであった。
2　モルモット線条体シナプス膜における高親和性GTPase活性に対しμ-アゴニストは濃度依存的に増強を示したが、δ-選択的アゴニストでは無影響であった（表１）。
3　Gi あるいは Go と再構成した線条体膜において100nM DAGOは有意に[^{3}H]GDP遊離活性を促進させたが、10μM DPDPEは無影響であった（図１）。
4　NG-108-15 細胞においてDPDPEは高親和性 GTPase 活性を濃度依存的に増強させ、10μMでは50%の増強が観察された。

〔考察〕

本研究に用いたモルモット線条体はμ-およびδ-オピオイドレセプターが共存している適切な標品であるが、そのいずれのレセプターアゴニスト結合ともMgCl$_2$存在下のGTPγS添加により阻害された。この効果は、いわゆる「ＧＴＰ効果」と呼ばれるもので、そのレセプターとG-蛋白とがなんらかの連関をしていることを示唆するものである。

しかしながら、DPDPEをはじめとする多くの選択的なδ-アゴニストはG-蛋白活性のひとつである高親和性GTPase活性になんらの影響も示さなかった。レセプターとG-蛋白との情報伝達機構において、アゴニスト刺激につづいておこる最初のG-蛋白上におこる変化は、GDP-GTPの交換反応の促進（あるいは抑制）であるが、このGTPase活性は、この交換さ

表1　各種オピオイドアゴニストの高親和性GTPase活性に及ぼす作用

agonists	subtypes	conc.	% of control low Km GTPase activity	paired t-test v.s. control
Control			100	
DAGO	(μ-agonist)	1 μM	129.7 ± 5.7	p<0.05
FK-33824	(μ-agonist)	1 μM	107.4 ± 1.9	p<0.05
Morphine	(μ-agonist)	10 μM	117.3 ± 1.9	p<0.05
DPDPE	(δ-agonist)	100 nM	98.8 ± 0.2	
		1 μM	100.9 ± 0.8	
DPLPE	(δ-agonist)	1 μM	98.6 ± 2.2	
		10 μM	96.2 ± 4.4	
DTLET	(δ-agonist)	10 μM	95.9 ± 2.7	
U-50,488H	(κ-agonist)	10 nM	92.0 ± 4.1	p<0.05
		100 nM	92.9 ± 3.3	p<0.05

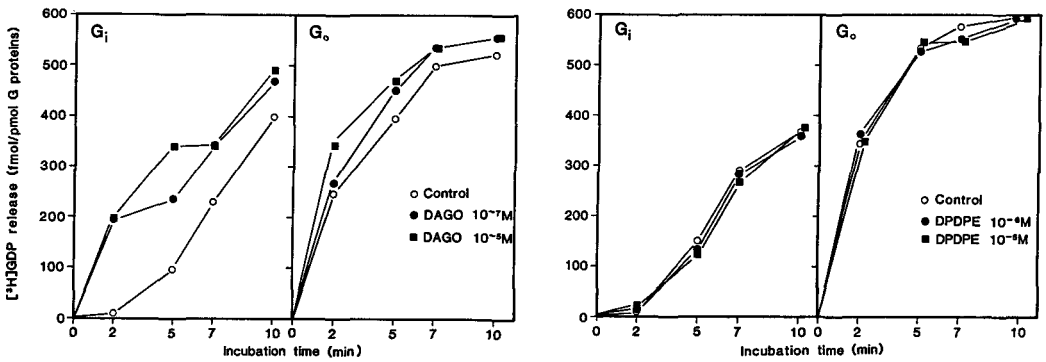


図1　μ-及びδ-アゴニストの[³H]GDP遊離に及ぼす作用

れたGTP結合量に依存するとされている。本研究においては、この点をさらに明らかにする目的でアゴニスト刺激にもとずくGDP-GTP交換反応の変化を調べた。シナプス膜そのものへの[³H]GppNHp結合によりこの活性を調べることも検討したが、バックグラウンドへの結合が大きいため、μ-アゴニストによる変化でさえとらえることができなかった。そこで、あらかじめG-蛋白を[³H]GDPで標識しておきNEM処理したシナプス膜に再構成した標品における効果を調べたところ、μ-アゴニストは、Gi、Goともに、[³H]GDP遊離を促進した。しかしながら、δ-アゴニストは、両者ともなんら効果を示さなかった。

ここで用いたδ-アゴニストは、NG108-15細胞膜の高親和性GTPase活性を濃度依存的に増強した。NG108-15細胞には、δ-レセプターが主に存在し、またアゴニスト刺激でアデニレートシクラーゼ活性が抑制されるという報告を考慮すると、この細胞では、δ-レセプターはGiと「機能的」に連関していることが明らかである。

従って、δ-レセプターにはさらなるサブタイプが存在する可能性があると思われる。もし、脳に存在するδ-レセプターが生理学的に意義あるものなら、このレセプターは、G-蛋白と連関せずその他の機能蛋白、たとえば直接イオンチャンネルに連関するなどが考えられる。しかし、鎮痛効果や脳細胞の電気生理学的研究において、選択的なδ-アゴニストは、μ-アゴニストなどと比較し数百倍以上も作用が弱いこと、一方、モルモット回腸収縮抑制や腸粘膜下神経節の電気生理学的変化においては、δ-アゴニストは低濃度で有効であるということを考え合わせると、やはり脳におけるδ-レセプターはあまり重要な役割を果たしていない様に推測される。

以上のように、すくなくとも2種以上のδ-レセプターが存在することは、ほぼ確からしいが、これらが遺伝子レベルで異なるのか、あるいは alternative splicing によるものか、さらには post-translational processing によるものなのかは今後の課題であろう。

〔文献〕

(1) H. Ueda, H. Harada, M. Nozaki, T. Katada, M. Ui, M. Satoh and H. Takagi (1988) PNAS in press.
(2) H. Ueda, H. Misawa, T. Katada, M. Ui, M. Satoh and H. Takagi (1988) JBC in press.
(3) H. Ueda, H. Misawa, N. Fukushima and H. Takagi (1987) Eur. J. Pharmacol. 138, 129-132.

123 クモ毒NSTX-3アナログ[^{35}S](NSTX-3)-Met の合成とラット脳組織における特異的結合

稲生英俊・新延道夫・豊島正*・芝哲夫*・川合述史**・御子柴克彦
（阪大・蛋白研、阪大・理学部*、都立神経研**）

〔要約〕

クモ毒NSTXは甲殻類神経筋シナプスにおけるEPSPおよびグルタミン酸作働性神経伝達を特異的に阻害することが報告され[1]、その構造決定[2]および化学合成[3]も既に行われている。今回、我々はNSTX-3 (2,4-Dihydroxyphenylacetyl-L-Asparaginyl-(L-Arginyl-Cadaverno-β-Alanyl)-Cadaverine)のアナログである(NSTX-3)-Met (2,4-Dihydroxyphenylacetyl-L-Asparaginyl-(L-Methionyl-L-Arginyl-Cadaverno-β-Alanyl)-Cadaverine)を合成し、NSTX-3同様にイセエビ歩脚の伸張筋シナプスのEPSPを不可逆的に遮断する作用のあることを認めた。さらに、放射活性をもつ[^{35}S](NSTX-3)-Metを合成し、ラット脳組織膜標品を用いて結合実験を行った。その結果、[^{35}S](NSTX-3)-Metの特異的結合が観察され、この特異的結合はNSTX-3および各種NSTX-3アナログによって阻害された。阻害活性の強さは(NSTX-3)-Met＞NSTX-3＞[Arg→Lys]NSTX-3＞Des-Arg-NSTX-3,[Arg→Ala]NSTX-3,[Arg→Asp]NSTX-3の順となった。しかし、L-グルタミン酸による阻害は見出されなかった。また、L-[^{3}H]グルタミン酸のラット脳組織膜標品に対する結合は NSTX-3によって顕著な阻害を受けなかった。

グルタミン酸レセプターが脳神経系において重要な役割を果していることについては多くの指摘がなされているが、レセプター自身の性質、構造、機能については、未知の点が多い。最近、ある種のクモ毒から、グルタミン酸レセプターの作用を特異的に遮断する物質がいくつか発見された。そのうち、我々はニューギニア産オオジョロウグモの毒腺より単離されたNSTX-3に着目し、アナログ体(NSTX-3)-MetがNSTX-3同様の生理活性をもつことを確認した後、放射活性をもつ[^{35}S](NSTX-3)-Metを合成し、それを用いてラット脳組織膜標品に対する結合活性を調べたので報告する。

（材料及び方法）

[(NSTX-3)-Met及び[^{35}S](NSTX-3)-Metの合成]

NSTX-3合成の中間体(1)とBoc-Met-OSuをカップリングさせた後、トリフルオロメタンスルホン酸/トリフルオロ酢酸系によって脱保護して(NSTX-3)-Metを得た（図２）。(NSTX-3)-Metは逆相系Cosmosile 5C$_{18}$カラムによって精製した。[^{35}S](NSTX-3)-Metの合成も同様に行った。ただし[^{35}S]Boc-Met-OSu(^{35}SLR;～1000Ci/mmole、アマーシャム社)を用いた。精製後の[^{35}S](NSTX-3)-Metは10mM DTTを含む溶液中-20℃で保存した。

(NSTX-3)-Metの生理活性測定は既に報告した方法によった。[1]

[ラット脳組織膜標品の調製]

ウィスター系雄ラット全脳を0.32Mショ糖,0.2mM HEPES-Na,1mMロイペプチン,0.1mM PMSF, 0.1mMペプスタチン(pH7.4)中でホモゲナイズし、1000g ５分間遠心した上清に同量の水を加え、105,000g １時間遠心分離した。得られた沈渣を1mM Tris-Acetate(pH8.0)中で１時間放置した後、105,000g 30分間遠心分離した。さらに沈渣を1mM Tris-Acetate(pH7.4)で２回洗浄した後、50mM Tris-Acetate(pH7.4)に懸濁して膜標品としてそのまま結合実験に用いた。

[結合実験]

0.2～0.5nM [^{35}S](NSTX-3)-Metまたは30nM L-[^{3}H]グルタミン酸を含む、ラット脳組織膜標品(30～100μg),50mM Tris-Acetate(pH7.4)、全容量200μlの溶液を４℃または30℃で30分間インキュベートした。インキュベート後のサンプルは10,000g５分間遠心分離し、沈渣を50mM Tris-Acetate(pH7.4)で３回洗浄した後、液体シンチレーションカウンターで測定した。

（結果）

i)合成(NSTX-3)-Metは逆相系カラムを用いたHPLCにおいて、NSTX-3よりも遅れた位置に溶出された。このものは、NMRおよび質量分析によって同定した。[^{35}S](NSTX-3)-Metは同一の系のHPLCにおいて、非放射性(NSTX-3)-Metの溶出位置と完全に一致した。[^{35}S](NSTX-3)-MetはHPLCによって未反応のNSTX-3と完全に分離しており、その比活性は約1000Ci/mmoleである。

ii)ラット脳組織膜標品に対して[^{35}S](NSTX-3)-Metの特異的結合が認められた。図３Ａは[^{35}S](NSTX-3)Metの膜標品への結合に対するNSTX-3およびNSTX-3アナログの阻害効果を表している。NSTX-3と(NSTX-3)-Metは同程度で最も強い阻害効果を示した。IC$_{50}$はNSTX-3 $1X10^{-7}$M、(NSTX-3)-Met $4X10^{-8}$Mであった。それに次いで[Arg→Lys]NSTX-3が強い阻害効果を示し、Des-Arg-NSTX-3、[Arg→Ala]NSTX-3、[Arg→Asp]NSTX-3はNSTX-3および(NSTX-3)-Metに比べて一桁低い阻害効果を示した。これらのNSTX-3アナログのうち、[Arg→Lys]NSTX-3、[Arg→Ala]NSTX-3およびDes-Arg-NSTX-3の三者はNSTX-3および(NSTX-3)-Met同様にイセエビ歩脚伸張筋シナプスのEPSPを非可逆的に遮断する生理活性をもつことがわかっている。それぞれの生理活性の強さは表１に示してある。また、 [Arg→Asp]NSTX-3には生理活性はない。一方、L-グルタミン酸には上記のNSTX-3アナログに類する阻害効果は見られなかった。

iii)図３Ｂはラット脳組織膜標品のL-[^{3}H]グルタミン酸の結合に対するL-グルタミン酸およびNSTX-3の阻害効果を表わしている。NSTX-3はL-[^{3}H]グルタミン酸の結合に対して顕著な阻害効果を示さなかった。

（考察）

クモ毒NSTXはJSTXと並んで甲殻類の神経筋シナプスに存在するキスカル酸感受性グルタミン酸レセプターの特異的アンタゴニストであると考えられている。

今回、合成したNSTX-3のラベル体はラット脳組織膜標品に対する特異的結合活性を有し、さらにそれがNSTX-3アナログによって濃度依存的に阻害されることを明きらかにした。しかし、NSTX-3や(NSTX-3)-MetのIC$_{50}$が約10^{-7}Mと電気生理学的に予想されるよりも結合が弱く、これが甲殻類筋組織と哺乳類脳組織の違いによることも考えられるので、さらに詳細な解析が今後必要である。

NSTX-3の各種アナログを用いた結合実験よりアナログのもつ生理活性と [^{35}S] (NSTX-3)-Met結合阻害活性との間の正相関が認められた。ただし、生理活性をもたない [Arg→Asp] NSTX-3もある程度の阻害活性を有してることから、単に結合力の強さが生理活性の強さを反映しているのではないことも示唆している。

最後に、膜標品に対するL-グルタミン酸の結合とNSTX-3および(NSTX-3)-Metの間にほとんど関連性が見出されなかったことから、NSTX-3または(NSTX-3)-Metはグルタミン酸レセプターに対する拮抗型アンタゴニストではなく、レセプターそれ自身あるいはレセプターと関連した何らかの分子種に結合する非拮抗型アンタゴニストであると考えられる。

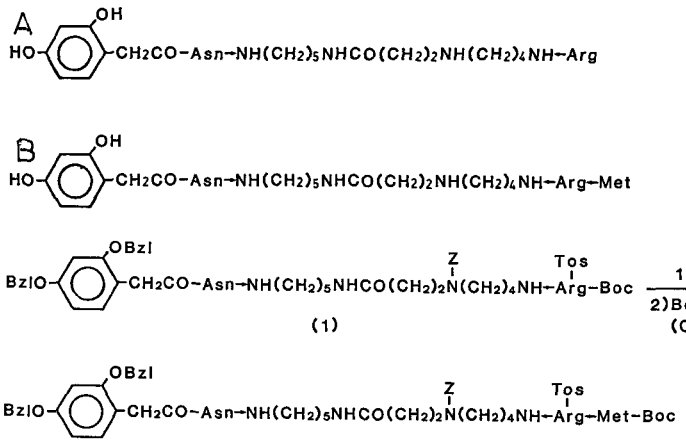


Fig.1. Structure of NSTX-3 and (NSTX-3)-Met.
A:NSTX-3. B:(NSTX-3)-Met.

Fig.2. Synthetic pathway of (NSTX-3)-Met.

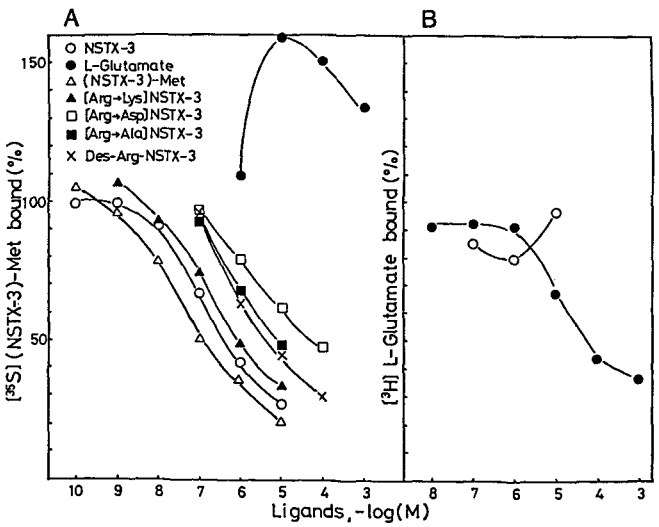


Fig.3. (A)Inhibition of [^{35}S] (NSTX-3)-Met binding to rat brain membrane by NSTX-3, its analogues and L-glutamate. The arginine residue of NSTX-3 was substituted by lysine; [Arg-Lys]NSTX-3, by alanine; [Arg-Ala]NSTX-3, by aspartate [Arg-Asp]NSTX-3 and deleted; Des-Arg-NSTX-3. (B)Inhibition of L-[^{3}H]glutamate binding to rat brain membrane by L-glutamate and NSTX-3.

Table 1. Physiological activity of NSTX-3 analogues

Analogue	Relative Activity(%)	Inhibition Mode
NSTX-3	100	I
(NSTX-3)-Met	40	I
[Arg→Lys]NSTX-3	20	I
[Arg→Ala]NSTX-3	5	I
[Arg→Asp]NSTX-3	<0.1	R
[Arg→Met]NSTX-3	8	I
Des-Arg-NSTX-3	10	I

I:Irreversible, R:Reversible

謝辞

本研究を遂行するに当り懇切なる御助言を頂きました東京大学中島暉躬教授に感謝致します。

References

1)A.Miwa et al. J.Neurophysiol., 58, 319-326(1987).
2)Y.Aramaki et al. Biomed.Res. 8, 241-245(1987).
3)T.Teshima et al. Tetrahedron Lett. 28,3509-3510(1987).

124 ハチ毒ＭＣＤペプチドの化学合成とその生理作用

近藤哲朗、相本三郎、北條裕信、伊藤憲一*、加藤宏司*、池中一裕、御子柴克彦

（ 阪大・蛋白研、*山形大・医・第二生理 ）

〔要約〕

ハチ毒MCDペプチド(Mast Cell Degranulating peptide)を、ABI社製ペプチド合成機を用いて合成した。得られた保護ペプチド樹脂をフッ化水素処理後、４個のCys残基を２個ずつ選択的に酸化し、逆相クロマトグラフィーにより精製した。合成標品の生理活性をguinea pig海馬スライスを用いて電気生理学的に検討したところ、MCDペプチドは1μMの濃度でLTP(Long-Term Potentiation)を誘発し、それが40分以上持続した。

天然のハチ毒から分離、精製されたMCDペプチドは、２個のジスルフィド結合を含む22個のアミノ酸からなる塩基性の天然生理活性ペプチドである(ref.3 図1)。その生理活性としては、mast cellからヒスタミンを放出させること、さらには中枢神経系にも作用して低濃度では覚醒、高濃度ではけいれんを誘発する(ref.1)ことが知られている。また最近ではラット海馬スライス切片を用いた実験で、0.5～2μMのMCDペプチドの投与によって、CA1領域のシナプス伝達の長期増強(LTP)が誘発される(ref.2)ことが報告されている。この作用に対するMCDペプチドの分子機構は不明であるが、脳組織膜分画において、MCDペプチドに高親和性を有する結合部位(Kd=150pM)が存在する(ref.5)ことが認められている。

このようにMCDペプチドを用いてそのレセプター分子の構造及びその情報伝達の機構を解明することは、記憶に関して重要な意味をもっていると考えられているLTPの機構解明に有用であると考えられる。そこで筆者らはMCDペプチドを化学合成し、海馬スライス標本を用いて電気生理学的にその生理活性を検討したところ、天然のMCDペプチドと同様なLTP誘発現象が確認されたので報告する。

[方法]

MCDペプチドの合成：

ABI社製ペプチド合成機を用いて合成した保護ペプチド樹脂(Cys3及びCys15側鎖はAcetoamidomethyl基、Cys5及びCys19側鎖は4-methylbenzyl基で保護)を約15%アニソール存在下、0℃,80分間、フッ化水素処理することにより、Acetoamidomenthyl基以外の保護基を除去したのち、10%酢酸によってペプチドを抽出した。これをpH8に調整し、室温で16時間空気酸化して、選択的にCys5とCys19のS-S結合を生成させた。次に酸性条件下でこれをヨード処理し、残りのCys3とCys15のS-S結合を生成させた後、YMC ODS-AMタイプ逆相カラムを用いたHPLC （5%-35%アセトニトリル(CH_3CN)、0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)）を行うことによってMCDペプチドを精製した。さらにこれをAsahipak逆相カラム（5%-35% CH_3CN, 10mM 酢酸アンモニウム(NH_4OAc)）を用いて塩交換した後、凍結乾燥を行って最終標品とした。また、精製標品の一部を4Nメタンスルホン酸で加水分解し、アミノ酸分析を行い、生成物の同定及び定量を行った。また質量分析（JMS-HX100）も行い生成物の同定を行った。

MCDペプチドの生理活性測定：

guinea pig海馬のスライス切片(500μm thick)を5%CO2+95%O2飽和灌流液(31℃～32℃)中で保存し、合成したMCDペプチド(1μM)を５分間添加した。test刺激としては、海馬のst. radiatum（放線層）にbipolar electrodeを刺入し、20sec毎に200μsec巾の単発刺激を与え、反応の記録は10-20MΩのglass-pipetteに灌流液を充填したものを、CA1領域の錐体細胞層に入れ、スライス表面から150～250μmの深さに固定して行った（図３）。

Reference
1. Bidard,J.N., et al. (in press) Brain res.
2. Cherubini,E., et al. (1987) Nature 328, 70-73
3. Gauldie,J., et al. (1978) Eur.J. Biochem. 83, 405-410
4. Hartter,P. (1980) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 361, 503-513
5. Taylor,J.W., et al. (1984) J.Biol.Chem. 259, 13957-13967

[結果及び考察]

MCDペプチドの構造は図１に示す通り、４個の Cys残基を含み、分子内で２個のS-S結合を形成している。しかし現在までこの構造は合成的に決定されていない。MCDペプチドの合成は 既に報告されているものの、S-S結合を選択的に形成させず、遊離の４固のSH基を 空気酸化させることにより合成し、ヒスタミン遊離作用をもってその生成を確認(ref.4)しているのみである。そこで、筆者らは、４個のCys側鎖に対して、２種類の保護基を導入し空気酸化及びヨード酸化の２段階の操作によってS-S結合を選択的に生成させた。生成物をYMC ODS-AM逆相カラムによるHPLCを行った結果を図２aに示す。37,46分のピークを分取後、Asahipak逆相カラムを用いて0.05%TFAから10mM酢酸アンモニウムと塩交換を行った結果が図２bである。２３分のピークを分取後、凍結乾燥して生理活性測定のための標品とした。

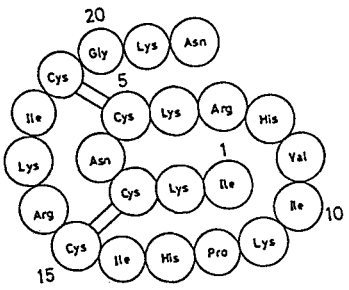


Fig.1
Structure of MCD peptide

海馬スライス切片に MCDペプチド(1μM)を投与（図４ーで示した）し、CA1 錐体細胞の集合電位振幅増加の継時変化を示したのが図４である。 MCDペプチドを５分間投与後、４分後にはresponseが漸増していき約15分で反応は plateau に達し、それが持続した。コントロールレベルに対して集合電位振は約180%（図４の B/A）まで増加し、４０分以上持続した。以上の結果から、化学合成した MCDペプチドは天然のハチ毒から精製したものと同様に LTP誘発活性を有することが明らかとなった。また、天然の MCDペプチドを用いて決定された構造の正しいことが合成的にも認められた。

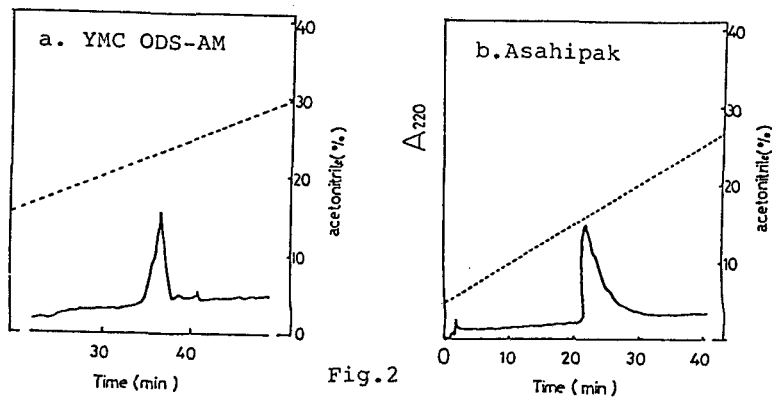


Fig.2
Elution profile of MCD peptide on reversed-phase HPLC

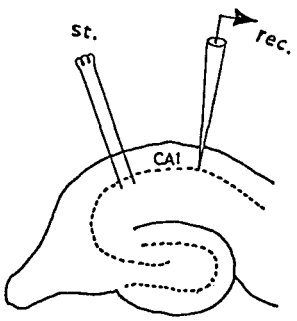


Fig.3 Experimental arrangement; extracellular recordings of the pyramidal cells of CA1. Bipolar stimulating electrodes were positioned in stratum radiatum.

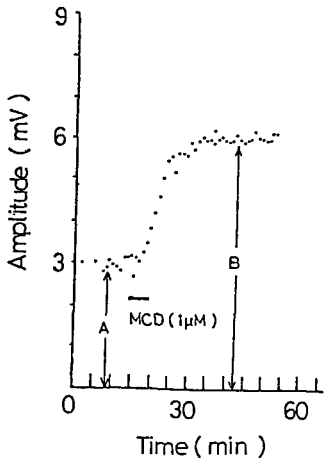


Fig.4 Time-course of the enhancement of the population spike amplitude produced by 1μM MCD (bar).

125 脳内微小透析法を用いたコレシストキニンの測定

滝田正寿、鶴田智也、大橋美浩、加藤武
（東京工大・生命化学）

〔要約〕 ラットの内側前頭葉皮質に、U字型微小透析チューブを麻酔下において植え込み二日後、無麻酔無拘束下で溶液を灌流した。灌流液は、30分毎に回収し免疫測定法を用いて計測した。回収された灌流液中のCholecystokinin octapeptide sulfate様免疫活性（CCK8S－LI）はK⁺刺激時に増加し、この増加はCa^{2+}依存性であった。その時、組織におけるCCK8S－LI量に関しても測定を行った。また、薬物による影響を観察した。

中枢のCCK性神経の活動について我々は研究してきた[1,2]。その神経活動が如何なる要因によって調節されているかを知るために、放出量を直接測定することが必要である。これまで我々は脳内微小透析法を用いてカテコールアミン、アセチルコリンの放出を測定している。今回は脳内微小透析法により無麻酔無拘束下ラットの内側前頭葉皮質内でコレシストキニンを経時的に測定する方法を確立したので報告する。

［方法］

実験には300－400 gのWistar系ラットを用いた。ネンブタール（50 mg／kg）麻酔下、脳定位固定装置を用いて内側前頭葉皮質（B：-3.0 mm, L：1.0 mm, V：3.0 mm）へU字型微小透析チューブを固定した。二日後、無麻酔無拘束下 0.3％BSAを含むリンゲル液（NaCl 147 mM, $CaCl_2$ 2.3 mM, KCl 4 mM）を7μl／minの流速で灌流した。

灌流開始1時間後、灌流液は氷浴中で冷却した試験管に30分毎に回収した。測定はCCK8Sのアミノ基末端認識抗体を用いた、酵素免疫測定法により行った（最小検出感度 2 pg, 交差反応性 CCK4：0.31％, CCK non sulfate：1.26％, Gastrin I：66％[3]）。

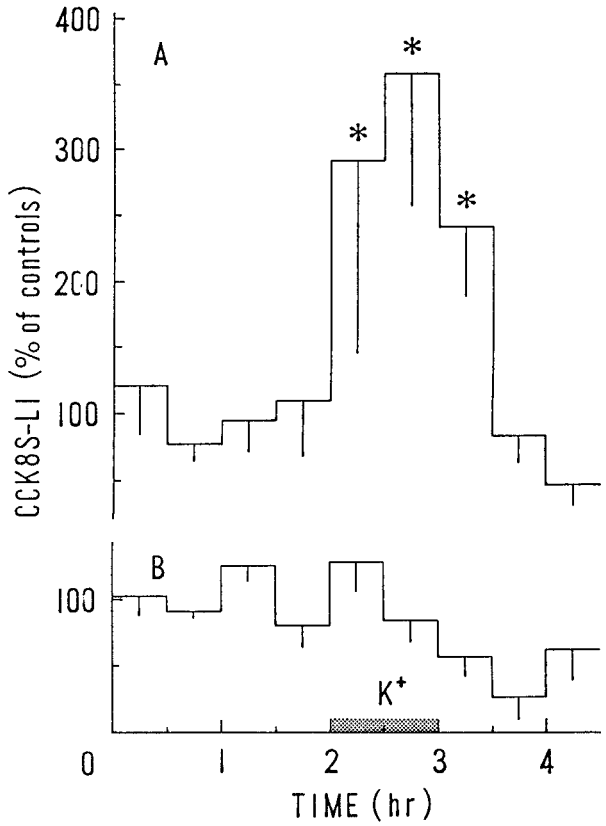


図 Ca^{2+}の存在下（A）と非存在下（B）におけるK⁺刺激によるCCK8S－LIの放出

実験では、灌流液を介したCa^{2+}の存在下と非存在下における50 mM K⁺刺激によるCCK8S－LIの放出について観察した。そのときの組織量についても灌流後速やかに断頭し、90％メタノール抽出法[1]を用いて測定した。また、Sulpirideを100 mg/kg腹腔内より投与した群と、生理食塩水をした群とを比較した。

［結果］

灌流液を回収し始めてからの4サンプルを対照値（8.8 ± 4.7 pg／30 min, n = 3－4）とした時、試料中のCCK8S－LIは、Ca^{2+}の存在下において50 mM K⁺刺激時に約300％まで増加した（＊：$p<0.001$）。この増加は50 mM K⁺刺激を行った1時間の間中持続し、50 mM K⁺刺激を中止した1時間後には対照値と差はなくなった（図 A）。同様にしてCa^{2+}の

刺激の影響を観察した、試料中のＣＣＫ８Ｓ－ＬＩは対照値（10.2± 3.1 pg / 30 min, n = 3 - 5 ）と比較して減少傾向があった（図　Ｂ ）。

表　ラットの内側前頭葉皮質における灌流液中と灌流部　位のＣＣＫ８Ｓ－ＬＩ量の比較

操　作	灌流液　（ pg ） 0 - 30 min	（30 - 60 min（操作）） （ 0 - 30 min ）	CCK8S-LI （ng ／ mg protein）	n
偽手術群	－	－	2.52 ± 0.14	4
対照群	13.02 ± 2.86	0.718 ± 0.138	3.09 ± 0.13＊	4
50 mM K^+	9.74	3.575	2.83	2
50 mM K^+ ／ - Ca^{2+}	9.50 ± 2.86	0.732 ± 0.411	3.00 ± 0.10＊	4

＊：$p<0.005$ vs 偽手術群

次に灌流液中と灌流部位におけるＣＣＫ８Ｓ－ＬＩ量の関係を調べた。その時灌流部位間において顕著な変化はなかった。しかし、偽手術群と対照群およびCa^{2+} の非存在下における 50 mM K^+刺激をした群の間には有意な増加があった（表）。

また、Sulpiride を 100 mg/kg 腹腔内より投与した群と、生理食塩水を投与した群における灌流液中と灌流部位のＣＣＫ８Ｓ－ＬＩ量を比較した結果、有意な変化はみられなっかたものの増加傾向が観察された。

［考察］

ＣＣＫ８Ｓの放出について in vitro または push-pull [4]を用いた報告はあるが、今回我々は脳内微小透析法（ brain dialysis ）を用いて、無麻酔無拘束下かつ蛋白分解阻害剤を使用せず測定を行った。この放出は、Ca^{2+}要求性であったことから我々の測定したＣＣＫ８Ｓ－ＬＩは神経細胞由来であると考えられる（図　Ａ、Ｂ）。

ＣＣＫ８Ｓ－ＬＩは、脳内分布が DOPAMINE （ＤＡ）と似ている、もしくは共存しているといわれており、内側前頭葉皮質において高濃度に存在することが報告されている[5]。この部位における灌流液中と灌流部位のＣＣＫ８Ｓ－ＬＩ量についての関係から、我々が測定している灌流液中のＣＣＫ８Ｓ－ＬＩは灌流部位の一部であろうと推察した。偽手術群と比較して、他の灌流群では組織中のＣＣＫ８Ｓ－ＬＩ量は増加していたが、その理由は明かではない。また、この部位における、ＣＣＫ性神経とＤＡ作動性神経の関係を調べるために、急性投与により顕著にＣＣＫ８Ｓ－ＬＩ量が減少すると報告されている sulupiride を用いて実験を行った[6]。このとき、有意ではなかったがＣＣＫ８Ｓ－ＬＩの放出量が増加する傾向があった。このことはＣＣＫ性神経の放出機構が、D_2受容体を介して抑制性に調節されていることを推察させた。更に例数を重ね検討を加えたい。

REFERENCES

1) T.KATO, Y.EMI, M.TAKITA AND Y.KUSHIMA. NEUROCHEM. INT. (1988) 12, No. 4, 493 - 497

2) 滝田、加藤 神経化学 (1987) 26, 625-627

3) K.TAKEDA, F.UCHIUMI, M.TAKITA and T.KATO. 投稿中

4) T.L.YAKSH, T.FURUI, I.S.KANAWATI and V.L.W.GO. BRAIN RES. (1987) 406, 207 - 214

5) J.M.STUDLER, H.SIMON, F.CESSELIN, J.C.LEGRAND, J.GLWINSKI AND J.P.TASSIN. NEUROPEPTIDES (1981) 2, 131 - 139

6) F.FUKAMAUCHI, T.YOSHIKAWA, S.KANENO, H.SHIBUYA and R.TAKAHASHI. NEUROPEPTIDES (1987) 10, 207-220

126 脳内微小透析法による蛋白質・ペプチドの解析

中村光夫*，板野俊文，山口文徳*，徳田雅明
松井秀樹，細川　清*，畠瀬　修
（香川医科大学・第一生理，精神神経*）

〔要約〕

分子量10万の蛋白質を80%通過させる血漿交換用の膜を用いてプローブを自製し，脳内微小透析を行なった。In vitroの実験でその回収率を測定したところ、分子量66Kdの牛血清アルブミンでは、45%（潅流速度、2μl／min ）と高い値を示した。しかし、回収率は必ずしも分子量と一致せず、一般に分子量10000 以下のポリペプチドでは回収率は悪く（10～20%）、サブスタンスP（分子量1348）等は全く通過しなかった。これはおそらく膜特性によるものと考えられた。線状体におけるIn vivo の透析の結果、主バンドとして分子量62Kd、他に副バンドとして14Kd, 28Kd, 52Kd（ダブレット）、70Kd 等を検出でき、蛋白質解析用プローブとしてある範囲内で有用であることが判明した。

〔目　的〕

無麻酔無拘束下での脳内物質の解析は、push-pull cannula を用いられて行なわれてきたが[1]、この方法は組織に与えるダメージが大であり、またpush-pull の条件設定が困難であった。この欠点を改良する目的で脳内微小透析法が開発された[2]。本法は、cannula の先端を透析膜で覆ったものであるが、これにより多くの欠点が改良された。市販のプローブでは腎人工透析用ファイバーが用いられており、ドーパミン（DA）とその代謝物[2]、及びGABA[3]やアセチルコリン等の低分子物質の解析には有効である。しかし、神経ペプチドや蛋白質の解析は困難であった。最近“古典的神経伝達物質”と“神経ペプチド”の共存が示唆され、タンパク、ペプチドの分析が注目されている[4),5)]。そこで、我々は脳内におけるポリペプチドや蛋白質の動的解析を目標とし血漿交換用の膜を用いてプローブを自製した。さらにIn vitroでの回収率を解析することで、透析膜の特性を明らかにする一方、in vivo に応用して、脳組織中の遊離蛋白質の同定を行なったので報告する。

〔材料及び方法〕

1）プローブの作成：22G スパイナル針を用いてプローブを自製した（Fig 1 右）。透析部を 2mmずつ削り、中央で折り曲げて外筒とした。透析膜は血漿交換用フォローファイバー（クラレ　エバフラックス４Ａ）を用いた。なお、透析チューブは外筒に入れやすくするためナイロンファイバーを通して折り曲がらないようにした。

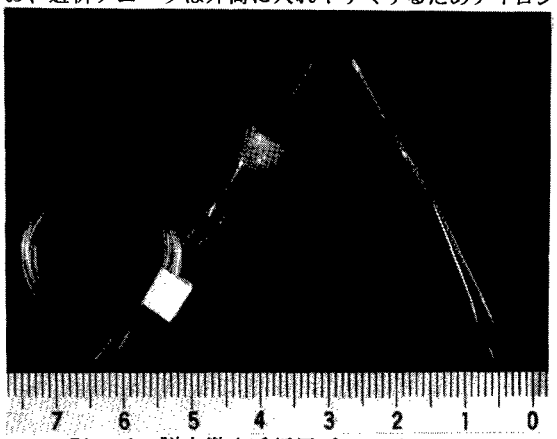


Fig. 1　脳内微小透析用プローブ

2）In vitroの回収率測定：各蛋白質ペプチドを生理食塩水中に1mg／ml になるように溶解した。プローブを挿入後通常2μl／min の流速で潅流を行なった。10分毎に透析液を回収し、蛋白質定量は色素結合法及びフルオレサミン法で行なった。外液と透析液の比より回収率を計算した。

3）In vivoの透析：Wistar系ラット(270-310g)を定位脳固定装置に固定後、頭皮を切開し、Bregmaより A1.0mm、L2.5mm［Paxinos & Watsonのatlasによる[6)]］にbarr hole を開け、硬膜より深さ5mmの位置にプローブを挿入し、2μ/minの流速で潅流し、回収した潅流液をSDS-電気泳動法により解析した。

〔結果及び考察〕

1）プローブの特性

Fig. 1 にプローブを示す。右は我々が自製したもので、左は市販されているものである。市販のものは分子量5000以下の物質を検出するのに適しているといわれているが、各社によって、回収率は異なり、またポリペプチドは全く通過しないものが多い。本実験に用いたエバフラックスは、血漿交換療法において、アルブミンなどの比較的低分子の物質のみを選択的に灌流するために開発された抗血栓性に優れた孔径300Åのエチレンビニールアルコール重合体である。

2）In vitroの回収率

cytochrome Cを用いて至適灌流速度の検討を行ない、2μl／minで以下の実験を行なった。Table. 1 に実験に用いたタンパク、ポリペプチドの分子量と回収率を示す。当初の予想に反し、回収率は必ずしも分子量に依存しない。一般に分子量5000以下のペプチドは10～25%の回収率で、アルブミンの45%に比較すればはるかに低いものであった。更に、サブスタンスPのようにある種のペプチドは全く通過しない。この原因の可能性としては、いくつかのものが考えられるが、エバフラックスはエチレン：ビニルアルコール共重合体であることより、その電荷はないので電気的相互作用は少ないと考えられる。疎水性基による吸着が最も可能性は強いが、それだけではうまく説明できない。現在他のファイバーを用いて解析中である。

3）In vivo における解析

ラット線状体にプローブを挿入し、4時間透析しサンプルを集め凍結乾燥後、15%SDS-電気泳動を行なった。図2に示すように62K に主バンド、更に副バンドとして14Kd、28Kd、52Kd(ダブレット)、70Kd等を検出した。これらの蛋白質が何であり、どのような生理的機能を有するかは現在解析中であるが、本プローブはIn vivo でも充分に機能することが判明した。

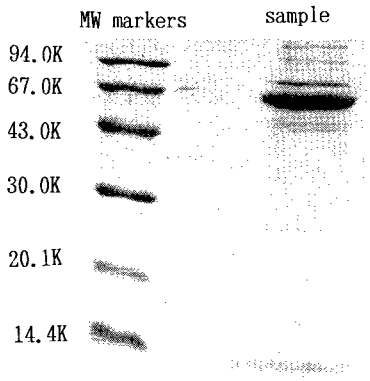


Fig. 2 ラット線状体透析液の電気泳動パターン

Table. 1 In vitro における各種蛋白質・ペプチドの透過率

	分子量	最大透過率(%)
bovine serum albumin	66000	45
cytochrome C	13000	25
ACTH	4500	8
somatostatin	1638	24
substance P	1348	0
ceruletide	1143	18
vasopressin	1084	34
dopamine	153	0

〔文　献〕

1) Drucker-Colin, R. Aguilar-Roblero, R. and Arankowsky-Sandoval, G. (1986) Annals of the New York Acad. of Sci., 473:449-460

2) Zetterström, T., Sharp, T., Marden, C.A. and Ungerstedt, U. (1983) J. Neurochem. 41(6):1769-1773

3) Tossman, U. and Ungerstedt, U. (1986) European J. Pharmacol. 123: 295-298

4) Brodin, E., Lindefors, N. and Ungerstedt, U. (1983) Acta Physiol Scand Suppl. 515:17-20

5) Kendrick, K.M., Keverne, E.B., Chapman, C. and Baldwin, B.A. (1988) Brain Res. 439:1-10

6) Paxinos, G. and Watson, C. (1982) in "The rat brain in stereotaxic coordinates" Academic Press

127 Ｎｅｕｒｏｐｅｐｔｉｄｅ Ｙ前駆体ｍＲＮＡ発現 —加令及び降圧剤（Ｒｅｓｅｒｐｉｎｅ）の影響

樋口宗史、岩佐厚*、吉田博、
（大阪大・医・第一薬理・*泌尿器）

〔要約〕加令および降圧剤（Reserpine)投与に伴なうNeuropeptide Y (NPY)とNPY 前駆体mRNA (NPYmRNA)の変動をラット副腎及び脳各部位において調べた。副腎では、NPY ペプチド（ NPY及びMet(o)-NPY）とNPYmRNA の両者が加令に伴ない著明に増加した。一方，脳内線条体、延髄においては NPYそのものの減少を引き起こしたがNPYmRNA は約２倍加令に伴ない増加した。大脳皮質、視床下部においては両者とも変動しなかった。５日間のReserpine 投与は副腎においてのみ選択的にNPY 量とNPY-mRNA量を２倍増加させたが中枢性には変化を与えなかった。以上、加令及び降圧剤によるNPY の調節は、中枢神経及び副腎の各部位で異なっている。副腎では両者の影響によりNPYmRNA の増加、つまりNPY 遺伝子発現の増加を引き起こすことでNPY 量が増加すると考えられる。一方、脳内線条体、延髄において、加令に伴ないNPYmRNA 量が軽度増加するにもかかわらず、逆にNPY 量の減少が起こるのは、翻訳効率の低下、あるいはペプチド遊離増加等による代謝回転の亢進等が生体内で生じているためと考えられる。

Key word; Prepro-neuropeptide YmRNA / Aging / Reserpine

（目的）Neuropeptide Y (NPY)は、Ｃ末端がアミド化された３６個のペプチドで、広く中枢及び末梢交感神経に分布し、降圧作用を含む種々の中枢神経作用や血管平滑筋収縮作用等を有している（1、2）。最近、cDNAあるいはgenomic cloning 及びsequencingによりヒト及びラットのNPY 前駆体構造が決定され（3-5)、ブタ(6) を含め系統的にその構造が強く保存されていることより、生体に基本的な生理作用を持つペプチド性神経伝達物質と考えられる。しかし、NPY の多彩な生理作用に比べ、遺伝子発現機構や前駆体のprocessing等、生合成代謝系に関する知見は少ない。私達はこれまでNPY 遺伝子発現とその調節因子を解析するためにNPY 遺伝子の組織特異的発現や、培養神経細胞を用いて遺伝子発現に対するホルモン、伝達物質、セカンドメッセンジャーの関与について研究してきた（2,3)。今回、in vivo においてもNPY 遺伝子発現及びＮＰＹ量が加令及び降圧剤（Reserpine ）投与により著明に変化することを見い出したので報告する。

（方法）１）NPY 免疫活性（NPY-I)定量；特異的NPY 抗体を用いRIA により測定した（7,8)。２）HPLC分析;NPY-Iを逆相高速液体クロマトBioSil ODS10で分離同定した（8)。３）Northern分析及びprepro-NPYmRNA(NPYmRNA) 定量；既報（4、5）に従い、精製pBL-NPY1 transcript をコントロールとし、rat brain NPYcDNA をプローベに測定した。４）Reserpine 投与；８週令雄性ラットに５日間0.5mg/kg 腹腔内投与を行なった。

（結果）１）副腎におけるNPY-I の加令による変化;6-69 週令の雄性ラットにおいてNPY-I は７±１から 1500 ± 580pmol /g tissue にまで約200 倍増加した（図１）。HPLC分析によりこの増加はNPY とMet 残基の酸化型 NPY(Met(o)-NPY)によるものであった。２）脳におけるNPY-I の加令による変化；副腎に反して、6-26週令雄性ラット脳においてNPY-I は線条体、海馬、延髄、脊髄において加令による減少を示した（表１）。特に血管運動中枢の存在する延髄において約 1/10 に減少した。HPLC分析では、脳内では加令に伴なうMet(O)-NPYの出現は認められず、NPY の単一のピークを示した。 ３）加令に伴なうNPYmRNA の変化; Northern blot 分析でラット脳、副腎には約800bp の成熟 NPYmRNAとその前駆体と思われる7.0kbp,3.3kbp のサイズのRNA が検出された（図２）。これら、NPYmRNA species は加令に伴ない、副腎で17倍の増加を、ラット脳内線条体、延髄では２倍の増加を示した。一方、大脳皮質、視床下部ではNPYmRNA 含量に有意の変化を示さなかった（図２、表２）。４）Reserpine 投与に伴なうNPY-I の変化; Reserpine 投与によりNPY-I は副腎では30% に低下の後、約250%に増加したが、脳内、大脳皮質、線条体、延髄においては有意の変化を示さなかった（図３）。 ５）Reserpine 投与に伴なうNPYmRNA の変化；Reserpine 投与５日目の副腎、線条体のNorthern blot 分析を示す（図４）。 副腎においてのみReserpine 処理によるNPYmRNA 含量の 1.5 ± 0.1から3.1 ± 0.3 pg/μg tcRNA への約２倍の増加が認められた。

（考察）加令及び降圧剤（Reserpine)投与に伴なうNPY ペプチドの変動とNPYmRNA の変動を報告した。NPY を中枢性に投与すると降圧作用、末梢性に投与すると強い昇圧作用を持つ。 加令とともに中枢部位（特に延髄）で量的減少が、逆に血中に

NPY を遊離する副腎組織 (8,9)において著明な増加が発現したことはこのペプチドの血圧調節機構を考える上で重要である。副腎においてNPY は主にクロマフィン細胞に存在する (10) 。加令に伴なうNPY-I の増大が同時にNPYmRNA 発現の増大を伴なうことより、何らかの要因でクロマフィン細胞内でのNPY 遺伝子転写活性の増大が推察される。この点に関して Splanchnic nerve の切断が加令によるNPY-I の増加を消失させること(7) 及び Splanchnic nerve の刺激によりNPYmRNA 量が増大する(11)という報告は副腎におけるtranssynaptic control が加令に伴なうNPY 遺伝子発現の変化に関与している事を示唆している。Reserpine 投与による副腎におけるNPYmRNA の増加も、Reserpine による Splanchnic nerve の活動の増加の報告(12)を考慮すると、同じ機構によるかもしれない。一方、脳内線条体、延髄における加令によるNPY 量の減少には、NPYmRNA の減少が伴なわず、ペプチド遊離増加等による代謝回転の亢進あるいは mRNA 翻訳効率の低下等の別の機構によりその減少がおこっている事を示している。

References

1)O'Donohue,T.L. et al.(1985) Peptides 6, 755-768. 2)Higuchi,H. et al.(1986) J.Pharmacol.Exp.Therapeut.244, 468-474. 3)Minth,C.D. et al.(1984) Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A.81,4577-4581. 4) 樋口京史,Sabol,S.L.(1987) 神経化学 26,58-60. 5)Higuchi,H. et al.(1988) J.Biol.Chem. 263, 6288-6295. 6)Tatemoto,K.(1982) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.79,5485-5489. 7)Higuchi,H.,Yang,H.-Y.T.(1986) J. Neurochem. 46, 1658-1660. 8)Higuchi,H. et al.(1988) J. Neurochem.50, 1879-1886. 9)Hexum,T.D. et al.(1988) J.Pharmacol.Exp.Therapeut. 243, 927-930. 10)De Quidt,Emson,P.C.(1986)Neurosci. 19, 1011-1022. 11)Fischer-Colbrie,R. et al.(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85,3240-3244. 12)Thoenen,H.et al.(1969) J.Pharmacol.Exp.Therapeut. 169, 249-254.

Fig.1 Age-related change of NPY immunoreactivity in rat adrenal glands

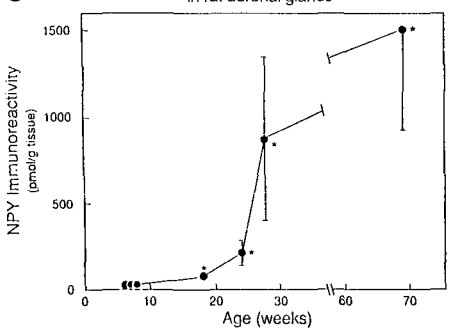


Table 1 AGE-RELATED DECREASE OF NEUROPEPTIDE Y IMMUNOREACTIVITY IN RAT BRAIN

Region	Age 6W	18W	26W
Cerebral cortex	52.2 ± 5.3 (10)	57.9 ± 5.3 (10)	48.4 ± 6.1 (10)
Striatum	51.0 ± 4.0 (17)	32.7 ± 3.6 (10)**	18.6 ± 1.5 (16)*
Hypothalamus	112 ± 10 (10)	118 ± 6.9 (10)	108 ± 12 (10)
Hippocampus	23.6 ± 1.4 (10)	19.7 ± 2.0 (10)	14.8 ± 1.3 (10)*
Mid brain	2.7 ± 0.90 (10)	3.2 ± 0.45 (10)	3.0 ± 0.87 (10)
Cerebellum	N.D.	N.D.	N.D.
Medulla oblongata	7.0 ± 0.59 (17)	0.92 ± 0.34 (10)*	0.66 ± 0.24 (16)*
Spinal cord	6.6 ± 0.39 (6)	---	1.7 ± 0.48 (6)*

Table 2 Age-related changes in NPYmRNA content.

Region	Age 7 W	33 W
Adrenal	1.1 + 0.3 (3)	17.4 + 2.0 (3)*
Cerebral cortex	4.4 + 0.3 (5)	6.2 + 1.2 (5)
Hypothalamus	1.8 + 0.5 (3)	2.0 + 0.2 (4)
Striatum	2.9 + 0.7 (4)	5.8 + 0.7 (4)*
Medulla oblongata	0.8 + 0.1 (5)	1.7 + 0.2 (5)*

(pg/μg tcRNA)

Fig.2

Age-related increase of NPYmRNA in rat adrenal

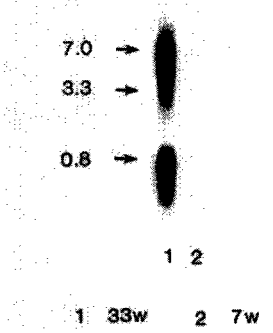


Fig.4

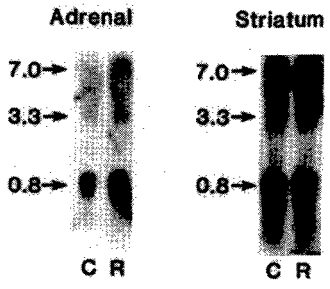
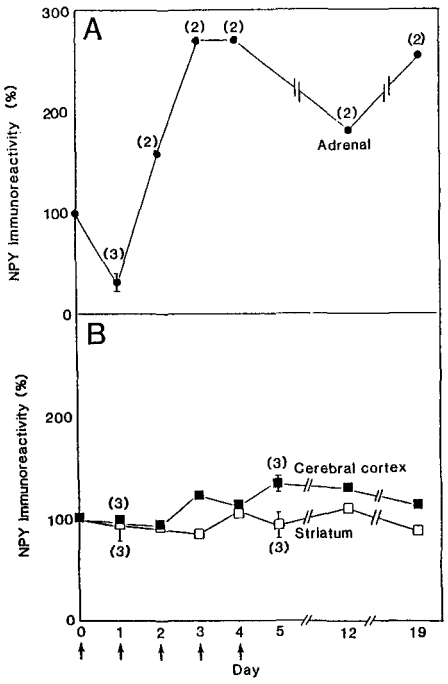


Fig.3 Time course of change in NPY-LI with reserpine



128　タキキニン・ペプチド二量体アナログの生理作用と受容体特異性

高野行夫[1]，樋口義信[1]，野中重幸[1]，本多健治[1]，斎藤　亮[1]，神谷大雄[1]，
下東康幸[2]，坂口和靖[2]，松本宏志[2]，児玉浩明[2]，脇　道典[2]，
（福岡大・薬・薬理[1]，　九州大・理・化学[2]）

〔要約〕

ペプチド性神経伝達物質・タキキニン類のうち，哺乳類にはsubstance P (SP)，neurokinin A (NKA)，neurokinin B (NKB)の３つが知られている。そしてこれらタキキニンと特異的に相互作用する受容体が存在し，いくつかのサブタイプに分類される。今回我々はこれらペプチドのC末端フラグメントをα-アミノ基でコハク酸により架橋した二量体アナログを合成し，その生理活性と^{125}I-BHSP結合への効果を検討した。その結果，SPフラグメントの二量体（D-SP$_{3-11}$）はモルモット回腸縦走筋や，SPに特異的なNK-1型受容体に富むラット唾液腺分泌に対して天然物SPよりはるかに強い生理活性を示した。これはこのアナログがNK-1型受容体サブタイプに比較的高い選択性を持ち，この受容体が二量体構造に適合した構造を持つ可能性を示した。

SPは11個のアミノ酸から成るペプチドで，痛みを伝える一次知覚神経の伝達物質であることが知られている。このSPに代表されるタキキニン・ペプチドは，Ｃ末端に-Phe-X-Gly-Leu-Met-NH$_2$ の共通のアミノ酸構造を持ち，類似の生理活性を発現する(1)。最近の研究から，哺乳動物にはSPの他に二種のタキキニン・ペプチド，NKAおよびNKBの存在が確認され，それぞれに特異的なタキキニン受容体のサブタイプ，NK-1，NK-2，NK-3の存在が提唱されている(2)。今回我々は，これらペプチドのＣ末端フラグメントのＮ末端α-アミノ残基をコハク酸により架橋した二量体アナログを合成し(Table 1)，その生理活性（モルモット回腸やラット輸精管平滑筋の収縮，およびラット唾液分泌促進や血圧下降）ならびに受容体結合実験を行い，タキキニン・ペプチド受容体サブタイプについて検討を試みた。

[実験方法]

実験はWistar系雄性ラットとHartley系雄性モルモットを使用した。

タキキニン・ペプチド二量体アナログの合成：　タキキニン・ペプチド短鎖二量体は単量体のＮ末端部をコハク酸で架橋した(Table 1)(3-5)。

平滑筋収縮：　モルモット回腸縦走筋標本とラット輸精管標本を作成後，Krebs液を入れたorgan bath中に懸垂して，各薬物による等張性収縮を記録した。その収縮反応は，モルモット回腸縦走筋では5×10^{-5}M carbacholで惹起される収縮を100％とし，ラット輸精管では1×10^{-5}M norepinephrineで惹起される収縮を100%としてそれぞれに対する百分率で表現した。

唾液分泌：　ラットを用い麻酔下で，Takano(6)らの方法により，唾液の分泌を測定した。同時に血圧および拍数に対する変化も測定した。

^{125}I-Bolton Hunter substance P (^{125}I-BHSP)による結合実験：　モルモット回腸縦走筋およびラット顎下腺組織から膜試料を作成した後，^{125}I-BHSPをリガンドに用い，常法に従って結合実験を行った。

Table 1.　Chemical Structures of Dimeric Tachykinin Peptides

D-SP$_{3-11}$	CH$_2$CO-Lys-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH$_2$ | CH$_2$CO-Lys-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH$_2$
D-NKA$_{3-10}$	CH$_2$CO-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH$_2$ | CH$_2$CO-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH$_2$
D-NKB$_{4-10}$	CH$_2$CO-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH$_2$ | CH$_2$CO-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH$_2$

[結果および考察]

モルモット回腸縦走筋におけるタキキニン・ペプチド二量体の生理活性を収縮反応の強さで比較した結果，SPフラグメントの二量体(D-SP_{3-11})が最も強く，その活性の強さは単量体(M-SP_{3-11})や天然物SPの約２－３倍であった(Table 2)。また二量体のNKA(D-NKA_{3-10})も単量体(M-NKA_{3-10})に比べて約２倍強い生理活性を示した。更に二量体ペプチドでは最大収縮反応発現後の栄養液交換によるwash-outが極めて困難であったことから，二量体ペプチドが受容体と相互に強く作用し，構造的に両者が適合していることが示唆された。しかし，^{125}I-BHSPをリガンドに用いた回腸縦走筋結合への各ペプチドの置換実験の成績から，SPのIC_{50}が0.2nMであるのに対し，D-SP_{3-11}は14.0nMと約70倍弱いことが明らかになった。一方，NKAに特異的なNK-2受容体に富むと考えられているラットの輸精管では二量体ペプチドの効果は弱く，特にD-SP_{3-11}はほとんど生理活性を示さなかった。

次に，SPに特異的なNK-1受容体に富むと考えられているラットの顎下腺を用いて二量体の効果を検討した。Table 2に示すように，D-SP_{3-11}の唾液分泌作用はSPに比べ約３倍強い生理活性を示した。しかし，D-SP_{3-11}は生理作用が強いにもかかわらず，^{125}I-BHSP(0.047nM)結合に対する置換実験の成績をIC_{50}値で比較すると，D-SP_{3-11}はSPに比べ約２倍弱いことがわかった。

以上の成績より，Ｃ末端フラグメントをコハク酸で架橋したD-SP_{3-11}は，内因性ペプチダーゼに対して安定であると考えられる。特にin vivoでの唾液の分泌や血圧下降に対する効果は著明であった。また例えば，D-SP_{3-11}の回腸縦走筋における生理活性と結合実験の効果の差(EC_{50}=0.63nM，IC_{50}=14.0nM)は“receptor efficacy”，あるいは“intrinsic activity”という言葉で説明できるかもしれない。この点に関しては今後さらに検討したい。

Table 2. Activity of Monomeric and Dimeric Takikinin Peptides.

	Guinea pig ileum				Rat vas deferens		Rat submaxillary gland			
	Contraction		Binding affinity		Contraction		Salivation		Binding affinity	
	EC_{50} (nM)	R.P.	IC_{50} (nM)	R.P.	EC_{50} (nM)	R.P.	ED_{50} (nmol/kg)	R.P.	IC_{50} (nM)	R.P.
SP	2.4	1.0	0.2	1.0	3160	1.0	1.0	1.0	0.5	1.0
M-SP_{3-11}	1.0	2.4	13.0	0.015	2820	1.12	25.0	0.04	10.9	0.046
D-SP_{3-11}	0.63	3.81	14.0	0.014	inactive	--	0.32	3.1	1.0	0.5
NKA	13.4	0.18	35.0	0.006	75.3	42.0	3.8	0.26	22.1	0.023
M-NKA_{3-10}	21.0	0.11	N.D.	--	N.D.	--	>31.0	<0.032	123.4	0.004
D-NKA_{3-10}	8.5	0.28	N.D.	--	304	10.4	>10.5	<0.095	N.D.	--
NKB	4.5	0.53	N.D.	--	1900	1.66	>>40.0	<<0.025	N.D.	--
M-NKB_{4-10}	6.6	0.36	N.D.	--	275	11.5	>>15.0	<<0.067	N.D.	--
D-NKB_{4-10}	11.7	0.21	N.D.	--	1350	2.34	N.D.	--	N.D.	--

R.P. = relative potency(SP=1) N.D. = not determined

[文献]

(1) Y.Takano et al., Brain Res., 334, 105 (1985).
(2) J.L.Henry et al., "Substance P and Neurokinins", Springer-Verlag (1987).
(3) Y.Kawasaki et al., Peptide Chemistry 1986, 217-222 (1987).
(4) H.Kodama et al., Peptid Chemistry 1987, Proc. of the Japan Symposium on Peptide Chemistry, 565-568 (1988).
(5) H.Kodama et al., Eur. J. Pharmacol., in press.
(6) Y.Takano et al., Eur. J. pharmacol., 111, 381-383 (1985).

129 Methamphetamine投与によるラット脳内SubstanceP受容体，TRH受容体の変化におよぼすD-1，D-2遮断薬の効果

尾上太一，氏家寛，中島誠，柏原健一，秋山一文，岡本基，大月三郎
小川紀雄*　（岡山大・医・神経精神，脳研・機能生化*）

〔要約〕
われわれは、Methamphetamine(MAP)による脳内SubstanceP(SP)系およびThyrotropin-releasing-hormone(TRH)系の変化を報告してきたが、今回はこの変化に対する選択的D-1およびD-2ドパミン遮断薬の影響をSCH 23390(以下SCH)，YM-09151-2（以下YM）を使用して調べた。MAP4mg／kg 急性投与では線条体SP含量は減少したが、この変化はYM前処理によって阻止されたがSCH前処理では不変であった。MAP14日間反復投与では特異的SP結合及びTRH結合は線条体においてMAP最終投与1時間後の時点では有意に減少していた、この変化は最終投与48時間後では消失した。特異的SP結合の減少はYM前処理で拮抗したがSCH前処理では不変であった。一方、特異的TRH結合はSCH，YMいずれの前処理でも拮抗された。これらの結果よりMAPによる線条体SP系の変化はD-2を、一方TRH系の変化はD-1，D-2両レセプターを介している事が推測された。

MAPを動物に慢性投与すると常同行動などへの過敏反応性（逆耐性現象）が形成される。この逆耐性現象は覚醒剤の長期乱用によって生じた覚醒剤精神病やその再燃しやすさ、さらには分裂病の慢性化機構の原因解明のための手段として取り上げられてきた。われわれはこれまでMAP慢性投与により生じる逆耐性現象に脳内SP系およびTRH系の機能変化が関与している可能性について報告してきた(1,2,5)。そこで今回MAPによるSP系，TRH系の変化はD-1，D-2いずれを介しているのかを選択的ドーパミン遮断薬を使ってしらべた。

〔対象と方法〕7週齢のSD系雄ラットを1週間のハンドリングの後に実験に供した。実験1：ラットに生食（生食群），MAP4mg/kg（MAP群），YM1mg/kgのみ（YM群），YM1mg/kg投与5分後にMAP4mg/kg（YM-MAP群），SCH0.5mg/kgのみ（SCH群），SCH投与5分後にMAP4mg/kg（SCH-MAP群）をそれぞれ腹腔内単回投与し30分後の時点における線条体と黒質のSP含量を既報（5）に従って測定した。実験2：ラットに実験1と同じ薬物をそれぞれ1日1回14日間腹腔内反復投与し、最終投与1時間後と48時間後の時点における線条体および黒質の特異的SP結合と線条体の特異的TRH結合を既報（4,5)に従って測定した。

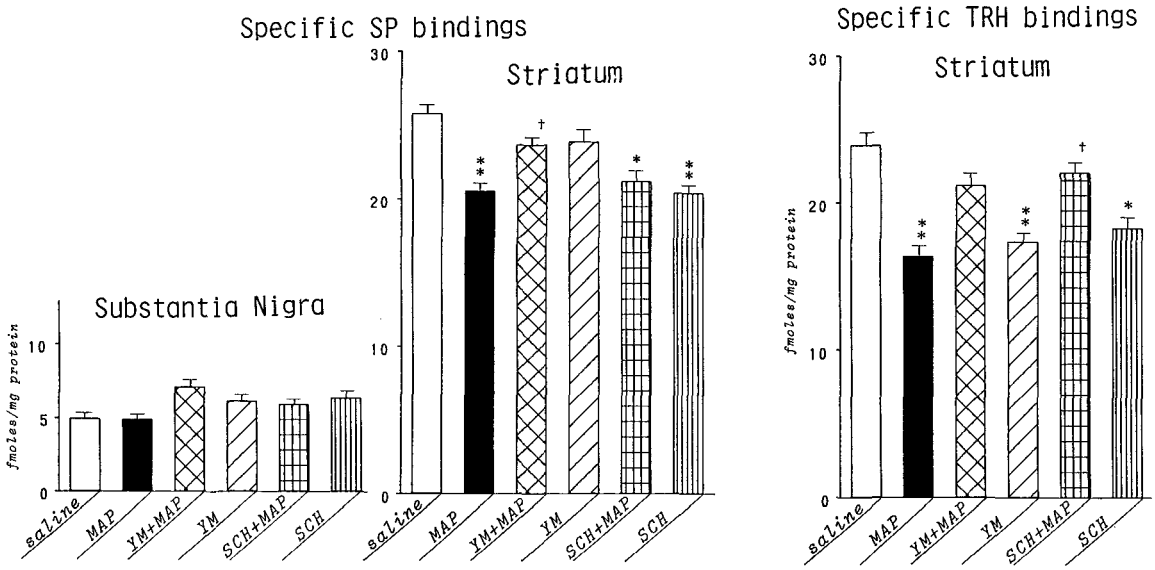
〔結果〕実験1：MAP4mg/kg投与30分後の線条体でSP含量が減少しており、この変化はYM前処理で拮抗されたがSCH前処理では不変であった。黒質のSP含量は各群間に有意差は認められなかった（表1）。実験2：特異的SP結合は最終投与1時間後の時点では線条体においてMAP群で生食群と比べて有意な減少がみられ、この減少はYM前処理で阻止されたがSCH前処理では変化なかった。なおSCHのみの慢性投与でも生食群と比べて有意に減少していた（図1）。黒質においては各群間に有意差は認められなかった（図1）。線条体における特異的TRH結合は最終投与1時間後の時点ではMAP群で生食群と比べて有意に減少し、この変化はSCH前処理群およびYM前処理群で阻止された。なおSCH単独群，YM単独群でも生食群と比べて有意な減少がみられた（図1）。最終投与より48時間後の時点では特異的SP結合，TRH結合はともに各群間に有意差は認められなかった。

Table 1. Substance P level after single administration of each drug.

	Control	MAP	YM+MAP	YM	SCH+MAP	SCH
Substantia	1773	1536	1756	1785	1622	1811
Nigra	±	±	±	±	±	±
	167	81	153	173	167	69
Striatum	491	375*	466	463	386*	451
	±	±	±	±	±	±
	40	32	15	45	24	41

Values are means ± S.E.M. (fmoles/mg protein)
*p<0.05 vs. control

Fig. 1. Specific substance P and TRH bindings after repeated administration of each drug.



Vertical bar indicates S.E.M. *p<0.05, **p<0.02 versus saline.
†p<0.05 versus MAP group.

〔考察〕われわれはＭＡＰによる逆耐性現象に脳内ＳＰ系及びＴＲＨ系の機能変化が関与している可能性について報告してきた（2,5）。本研究ではＭＡＰ急性投与での線条体ＳＰ含量の減少およびＭＡＰ慢性投与による線条体の特異的ＳＰ結合の減少が選択的Ｄ-２遮断薬によって阻止されるが選択的Ｄ-１遮断薬では阻止されないことをしめした。このことよりＭＡＰによるＳＰ系の変化はＤ-２レセプターを介しているものと推測される。Ｄ-１遮断薬単独の慢性投与で特異的ＳＰ結合が減少した。ＯｂｌｉｎらはSCH 23390慢性投与後に線条体ＳＰ含量の増加を見い出しており（3）、このことはＤ-１受容体遮断によりＳＰ系の機能亢進が起こると考えればわれわれの結果と合致する。線条体の特異的ＴＲＨ結合のＭＡＰ慢性投与による減少はＤ-１，Ｄ-２両遮断薬によってそれぞれ阻止された。このことはＭＡＰによるＴＲＨ系の変化はＤ-１，Ｄ-２両レセプターを介しているものと推測できる。また両遮断薬のみの慢性投与で特異的ＴＲＨ結合の減少がそれぞれみられた。これはドーパミン系とＴＲＨ系の相互作用を示唆するものと考えられる。ＭＡＰ慢性投与による特異的ＳＰおよびＴＲＨ結合の変化は最終投与１時間後の時点でみられたが４８時間後では回復していた。これらの時間経過から両ペプタイド系のＭＡＰ誘発性の変化はＭＡＰ逆耐性現象における易再燃準備状態形成に対応するというより、むしろＭＡＰ再投与による過大反応に関連するものと考えられた。

〔参考文献〕

（１）梶田三郎，藤原豊，佐藤光源，大月三郎，小川紀雄（１９８５）神経化学，２４，４５４－４５６（２）中島誠，梶田三郎，山下公三郎，氏家寛，他（１９８６）神経化学，，２５，４８１－４８３（３）Ｏｂｌｉｎ，Ａ．Ｚｉｖｋｏｖｉｃ，Ｂ ａｎｄ Ｂａｒｔｈｏｌｉｎｉ，Ｇ（１９８７）Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ，４２１，３８７－３９０（４）Ｏｇａｗａ，Ｎ．Ｈｉｒｏｓｅ，Ｙ．ａｎｄ Ｎｏｍｕｒａ，Ｙ．Ｎｅｕｒｏｔｒａｎｓｍｉｔｔｅｒｓ ｉｎ Ｄｉｓｅａｓｅ，Ｅｘｃｅｒｐｔａ Ｍｅｄｉｃａ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ（１９８５），５６－６８（５）Ｕｊｉｋｅ，Ｈ．Ｏｇａｗａ，Ｎ．Ｏｔｓｕｋｉ，Ｓ．（１９８８）Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ，４５３，１３６－１４２

130 Alzheimer型痴呆脳におけるAcetylcholinesteraseの異常

川嶋信吾、中野 智、辻 輝之、荒木 亘、中村重信
（京都大学・神経内科）

〔要約〕

Alzheimer型痴呆剖検脳におけるacetylcholinesterase(AChE)の細胞下分布は対照群と異なり老人斑分画に高い比活性が認められた。しかし、AChEはamyloid蛋白とは異なりcollagenaseやproteaseにより容易に可溶化されG4型に相当する10S isozymeが出現した。

Alzheimer型痴呆ではacetylcholine作動系の異常が認められている。acetylcholine分解酵素acetylcholinesterase（AChE）も診断や治療の面から検討されている。今回、Alzheimer型痴呆剖検脳におけるAChEを検索したので報告する。

「材料・方法」 collagenaseは新田ゼラチン社製collagenase-Nを、proteaseはToyobo製streptomyces alkaline proteaseを用いた。死後4時間以内に剖検した脳の半分を-80℃にて凍結し生化学的分析に使用し、他の半分を形態学的検索に用いた。臨床的、病理学的所見をもとにして対照群とAlzheimer型痴呆群に分類した。剖検脳前頭葉を融解後homogenizeして、細胞下分画を行った。ラット脳と同様にWittakerの方法(9)を用いた。老人斑分画はAlzheimer型痴呆脳前頭葉より、Candyらの方法(1)を改良して分離し、Congo redを添加し偏光顕微鏡下に観察した。AChE活性はNakanoらの方法(7)にて、5'-nucleotidase(5)、2'-nucleotidase(6)活性は既に報告した方法に従って測定した。acid phosphataseはNagataら[6]の方法により、succinic dehydrogenaseはSottocasaら(8)の方法により測定した。蛋白はLowryらの方法[8]により測定した。蔗糖密度勾配遠沈はNakanoらの方法(7)により行った。

「結果」 1）ラット大脳皮質におけるAChE活性の細胞下分布

新鮮なラット大脳皮質を細胞分画すると、AChE活性の約90%は可溶性分画以外の分画に認められた（Fig 1）。それらの分画のうちで、神経終末分画(B)に最も高い比活性が認められ、顆粒分画AChEはTritonにより容易に可溶化された。

2）ヒト剖検脳におけるAChE活性の細胞下分布

対照群患者剖検脳AChEも新鮮ラット脳に類似した細胞下分布を示し、可溶性分画のAChE活性は低値であった。一方、Alzheimer型痴呆患者剖検脳では比重の高い分画P1、C にAChE活性が高値であった(Fig. 2)。このP1、C分画にはCongo red陽性の構造物が認められた。

3）老人斑分画におけるAChE活性

-80℃で1ケ月凍結保存したAlzheimer型痴呆脳前頭葉皮質5gを材料とし、融解後25mlの0.1M燐酸カリウム緩衝液(pH7.0)中で、Polytronにより30秒間、十分にhomogenizeした。homogenateを20,000xg,15分間遠沈し、その上清をS1、沈渣をP1とした。P1は15mlの2% sodium dodecylsulfateに懸濁し、再びPolytronにより30秒間homogenizeした。 その懸濁液を28,000回転(35,000xg)45分間遠沈し、その上清をS2、沈渣をP2とした。P2を6mlの20%蔗糖(pH7.5)に懸濁し、homogenizeした。45%蔗糖、30%蔗糖の不連続密度勾配上にP2懸濁液を上層し、10,000回転(6,000xg)にて15分間遠沈した。遠沈後、20%と30%の境界（A分画）、30%と45%の境界（B分画）および管底の沈渣（C分画）に分離された。これらの分画に10mlの0.01M燐酸カリウム緩衝液(pH7.0)を加えて、17,000回転(30,000xg)にて15分間遠沈した。その沈渣を同じ緩衝液5mlに懸濁して、それぞれA,B,C分画とした。Congo redで染色すると、B分画が染色顆粒を最も多く含んでおり、次いでC分画に多かった。これらの分画にみられるAChE活性をFig. 3に示す。S1に比較的高い活性が得られたが、B分画に最も高い比活性が認められた。

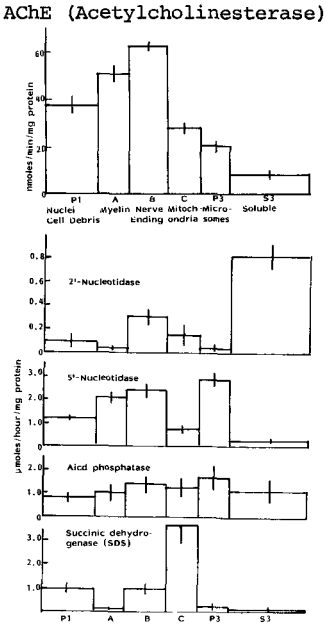
4）老人斑分画よりのAChEの可溶化

上記のB或はC分画にcollagenaseを0.2mg/ml加えて10分間37℃でincubateした。同様にalkaline proteaseを0.2mg/ml加えてincubateした。反応液を100,000xg,60分間遠沈し、上清(S4)と沈渣(P4)に分離した。collagenaseで処理したものは60%の活性が、proteaseで処理したものは70%が上清に回収された(Fig. 4)。しかし、Congo redで染色されるamyloid蛋白はproteaseやcollagenaseによって可溶化されなかった。可溶化されたAChEは蔗糖密度遠沈にてG4型isozymeに相当する位置（10S）に活性が認められた。

「考察」AChEは正常者とAlzheimer型痴呆患者で細胞下分布が異なることが明らかになった。組織化学的にAChE活性が老人斑に一致して認められることが報告されている(3)。細胞分画法によってもその事実が裏付けられた。さらにアミロイド蛋白とは異なり、collagenaseやproteaseにより容易に可溶化された。従って、collagen tailによりG4型AChEが老人斑に差し込まれている可能性が示唆された。正常者とAlzheimer痴呆患者のAChEの違いは診断・治療上、重要と思われる。

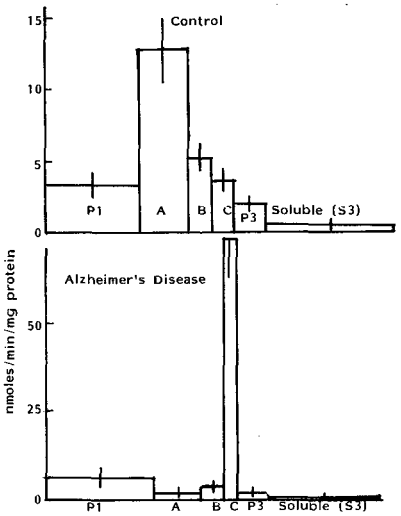
「文献」(1)Candy, J. M. et al. (1986)Lancet 1:354-357. (2)Lowry, O. H. et al. (1951)J. Biol. Chem. 193:265-275. (3)Mesulum, M. M. et al. (1987)Ann. Neurol. 22:683-691. (4)Nagata, H. et al. (1984)J. Neurochem. 42:1001-1007. (5) Nakamura, S. (1976)Biochim. Biophys. Acta 426:339-347. (6)Nakamura, S. et al. (1979)Biochim. Biophys. Acta 568:30-38. (7)Nakano, S. et al. (1986)J. Neurol. Sci. 75:213-223. (8)Sottocasa, H. et al. (1967)J. Cell Biol. 32:415-438. (9)Whittaker, V. P. (1959)Biochem. J. 72:694-706.

Fig. 1. Subcellular Distribution in Rat Cerebral Cortex



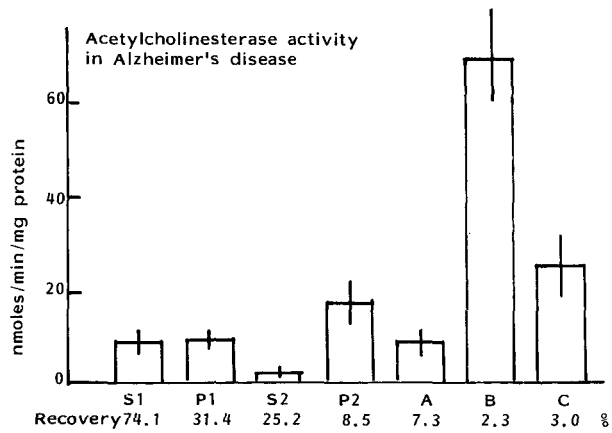
n=5. mean ± SD

Fig. 2. Subcellular Distribution of Acetylcholinesterase in Autopsied Brain



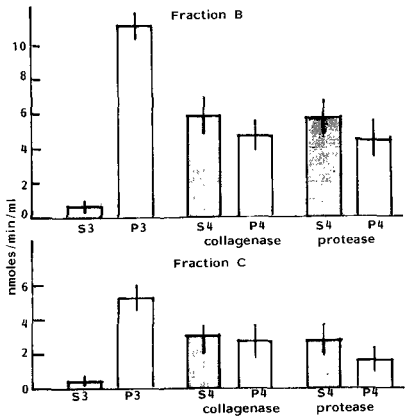
Control; n=6, Alzheimer's Disease; n=5. mean ± SD

Fig. 3. Acetylcholinesterase Activity in Senile Plaque Fraction (B)



n=6. mean ± SD

Fig. 4. Solubilization of Acetylcholinesterase from Fraction (B) and (C)



n=6. mean ± SD

131 ニューロンの生存や突起形成を抑制する因子 －アルツハイマー病との関連－

内田洋子、朝長正徳
（老人研・臨床病理、東大・脳研病理）

〔要約〕
新生ラット大脳皮質ニューロンを無血清培地下で培養し、アルツハイマー病(AD)の脳抽出液中に神経栄養因子が含まれるかどうかを調べた。AD脳抽出液では見かけ上、正常老人脳抽出液よりも栄養因子活性が高くなっていた。しかしこれは、AD脳にspecificな栄養因子が存在しているのではなく、正常脳では栄養因子とその阻害物質が共存しているのに対し、AD脳では栄養因子だけで阻害物質がないか、少ないためであった。この阻害物質は、分子量10K以上（限外ろ過）で、DEAE-Sephacelに吸着して0.05M NaClと0.2M NaClで溶出された。

アルツハイマー病(AD)では、大脳皮質や皮質下のニューロンに著しい変性・脱落が認められる。それとともに、アルツハイマー原線維や老人斑が蓄積し、多数の再生線維(somatodendritic sprouting)も出現している(2)。それゆえ、ニューロンの変性・脱落は神経栄養因子の欠損に起因するという仮説(1)は、AD脳で変性と再生の両方が起こっていることを説明できない。我々はこれまで、培養大脳皮質ニューロンの生存や突起形成を促進する作用がAD脳抽出液で強いことを明らかにした(3)。今回は、AD脳でみかけ上栄養因子活性が高いのは、AD脳にspecificな栄養因子が存在しているのではなく、正常老人脳に含まれる阻害物質がAD脳では欠落しているか、または、減少していることを報告する。

＜方法＞

対象：臨床的および神経病理学的にADと診断された６例（年齢６９±４才）と、臨床的に痴呆がなく神経病理学的にも目立った変化のない正常対照１３例（年齢７７±３才）を対象とした。凍結(-80℃)保存された剖検脳より前頭葉の灰白質を取り出し、４倍量の水でホモジナイズし、遠心上清(20,000 xg, 1hr)を脳抽出液として使用した。

ニューロンの培養：生後０日齢のラットより大脳皮質を取り出し、tripsin-DNase 1で処理して細胞を得た。Gelatin-polyornithine coatした6 mmのmicroplateに、1.75x10⁴個の細胞をまき、無血清培地に脳抽出液を加えて５日間培養した。培養後、４％パラホルムアルデヒドと９０％メタノール・５％酢酸で固定し、microtubule-associated protein 2(MAP2)抗体を用いたELISAでニューロンの数と突起形成を半定量し、神経栄養因子活性の指標とした。

＜結果＞

正常老人の脳抽出液を加えると、培養細胞中のMAP2レベルは脳抽出液を加えないときの２－３倍に増加した。AD脳抽出液を加えた場合には、MAP2レベルはさらに３－５倍増加した（図１）。この結果は、ニューロンの数を数えた場合(3)とほぼ同じであった。

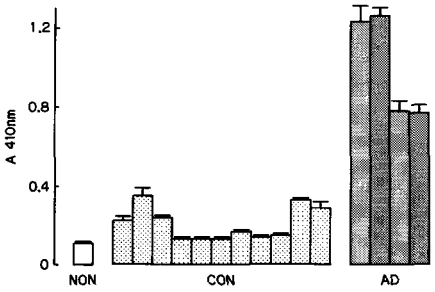


図１．正常老人１１例とＡＤ４例の脳抽出液中の神経栄養因子活性

脳抽出液を希釈して(31.5-250μg/ml)用量-反応曲線を書くと、AD脳では用量依存的に栄養因子活性が上がるのに対して、正常老人脳では用量依存的に活性が下がった（図２）。このことは、正常脳抽出液には栄養因子を阻害する物質が存在することを示唆したため、AD脳抽出液に正常脳抽出液を混ぜたところ、栄養因子活性は阻害され、阻害の程度は正常脳抽出液の濃度に依存した。

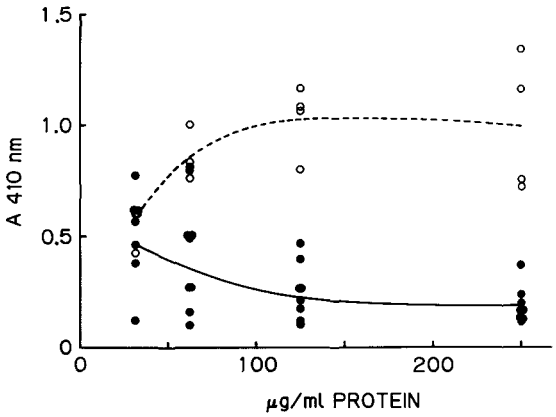


図２．正常脳抽出液７例（●）とＡＤ脳抽出液４例（○）の用量-反応曲線

正常脳抽出液をAmicon YM-10 membraneで限外ろ過すると、membrane上に残る分画には全例で阻害活性が認められ、阻害の程度は限外ろ過前の脳抽出液と同様に用量依存的であった。一部の例ではYM-10 membrane上とろ液の両方に阻害活性が認められた（図３）。YM-10 membrane上に残る分画をDEAE-Sephacelにのせ、10mM tris-HCl(pH 7.6)で洗った後、0.05M、0.2M、0.5M NaClで溶出し、どの分画に阻害活性があるかを調べた。阻害活性は未吸着分画や0.5M NaCl溶出分画にも認められたが、正常脳だけではなく、AD脳でも両分画に阻害活性が認められた。0.05M NaCl溶出分画と0.2M NaCl溶出分画には、正常脳にだけ阻害活性が認められた（図４）。

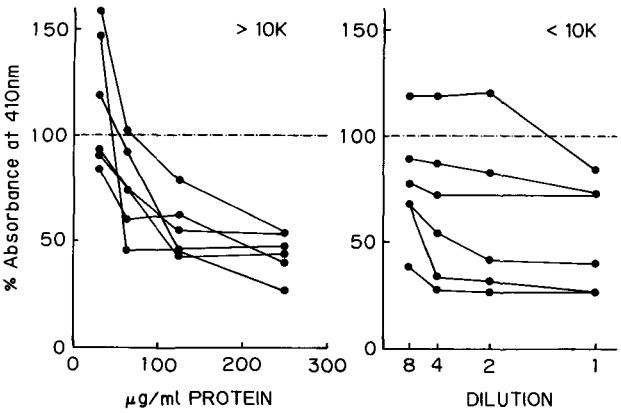


図３．正常脳抽出液（６例）の＞１０ＫＤａ分画（左）と＜１０ＫＤａ分画（右）に含まれる阻害活性、

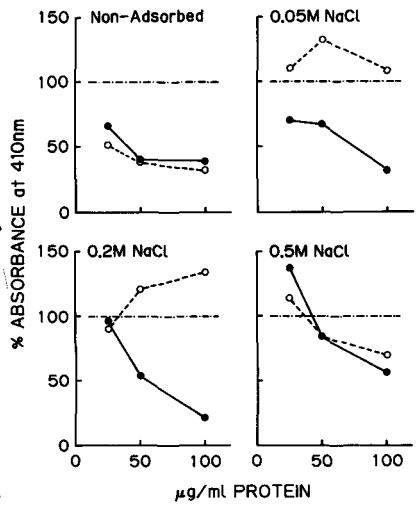


図４．
正常脳抽出液（●）とＡＤ脳抽出液（○）のDEAE-Sephacelクロマトグラフィ

＜考察＞

以上の結果から、AD脳抽出液で見かけ上、栄養因子活性が高くなっているのは、AD脳にspecificな栄養因子が存在しているのではないと思われる。むしろ、正常脳では栄養因子とその阻害物質が共存していて、ニューロンの代謝や可塑性を抑えているが、AD脳には栄養因子だけで、阻害物質がないか、少ないため、ニューロンの代謝や可塑性が亢進している可能性を示唆した。このことは、(1)の仮説を支持しない反面、AD脳で異常なsproutingが生じていること(2,4)とよく一致する。ADではニューロンの代謝や可塑性が亢進した結果、ニューロンはoverworkになったり、glutamateなどに傷つきやすくなったりして、その死を早めると考えた。

＜文献＞(1)Appel,S.H.(1981) Ann. Neurol.,10,499-505, (2)Ihara,Y.(1988) Brain Res., in press (3)Uchida,Y.et al.(1988)BBRC,150,1263-1267,(4)Probst,A.et al.(1983)Brain Res.,268,249-254

132　加齢に伴う神経組織特異蛋白質の脳での変動

鈴木富士子、森下理香、浅野富子、加藤兼房、佐藤秩子＊
（愛知県コロニー・研・生化、＊愛知医大・加齢研）

〔要約〕
加齢老化に伴う神経組織特異蛋白質の濃度変化を、生後８週齢から２５カ月齢にわたってラットの中枢神経組織を中心に調べた。測定した蛋白質は、S-100蛋白質（S-100ao、S-100aとS-100b）、エノラーゼ アイソザイム（ニューロン特異γ-エノラーゼとα-エノラーゼ）、ＧＴＰ結合蛋白質、GoとＧｉ2のαサブユニットおよびβサブユニットで、このうちS-100とα-エノラーゼはグリア細胞の細胞質に、γ-エノラーゼは神経細胞の細胞質に、Goαは神経細胞膜と神経網（neuropil）に、おもに局在する蛋白質である。加齢に伴って顕著な変化を示したのは、大脳皮質のS-100b（S-100β鎖）で、８週齢ラットの濃度（3.05 ± 0.32 μg/mg protein)にくらべ、１４カ月齢では、135% (4.11 ± 0.25 μg/mg)、２５カ月齢では、155% (4.73 ± 0.48 μg/mg）と増加していた(p<0.001)。大脳皮質のα-エノラーゼも115-118%と有意に(p<0.01)高い値を示した。しかし、小脳および脳幹では、加齢に伴う変化は全く無かった。γ-エノラーゼ、Goα、Ｇｉ2αおよびＧβの濃度は、大脳皮質、小脳および脳幹でそれぞれ一定した値を示し、有意な変化は認められなかった。一方、骨格筋や舌などの横紋筋組織のS-100α、および副腎のS-100αとS-100βも加齢に伴って増加した。しかし、脂肪組織や軟骨組織のS-100のレベルは変わらなかった。

老化に伴う脳の変化として神経細胞数の減少をともなう脳重量の減少が知られている。しかし、他の臓器にくらべ神経系の老化萎縮は微少である。また、アミロイド沈着を伴う老人斑の増加、PHF(paired helical filaments)やリポフスチンの神経細胞細胞質への沈着などの変化が問題になっている。一方、いわゆる神経組織特異蛋白質として列挙されている大部分の蛋白質は、神経系の発育、分化に伴って脳内での濃度が増加し、神経機能に密接に関与していることが示唆されている。しかし、神経系の老化に伴うこれらの蛋白質の挙動に関してはほとんど知られていない。今回、最近その遺伝子がヒトでは染色体２１ｑ２２の位置にあることがわかり、ダウン症やアルツハイマー病との関連性が話題[1]になっているS-100βを中心に、種々の神経組織特異蛋白質について、ラットの中枢神経系および一部の末梢組織での加齢による濃度変化を、今までに確立したエンザイムイムノアッセイ系を使って測定した。

［材料と方法］

組織および抽出液の調整：　生後８週齢-２５カ月齢の雄ドンリュウラットの各組織を摘出後直ちに-80℃で凍結保存した。中枢神経組織は、9 vol/wtの0.32M 庶糖を含む50 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)でホモジナイズし、100,000 x g, 1時間遠心上清をとり、S-100およびエノラーゼの測定に使った。遠心沈渣は既報[2]のように、1 M NaClと2%コール酸を含む緩衝液で処理し、再び超遠心し、上清を得てG蛋白質の測定に用いた。末梢組織は、5 mM硫酸マグネシウムを含む50 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)でホモジナイズし、20,000 x g, 20分間遠心上清を得て、S-100の測定に用いた。

イムノアッセイ法：　三種類のS-100蛋白質の分別測定は、既報[3,4]のようにヒトS-100α鎖とβ鎖に対する抗体よりなるEIA系で行い、それぞれヒトS-100ao、S-100aおよびS-100b等価で表した。ラットα-およびγ-エノラーゼも既報[5]のEIA系にて測定し、結果はααおよびγγエノラーゼ等価で表した。G蛋白質(Goα、Gi2αとGβ)も既に報告[2,6,7]したEIA系にて測定した。それぞれの測定は精製ウシ蛋白質をスタンダードとして用い、ウシGoα、Gi2α、およびGβ等価で表した。

［結果と考察］

中枢神経組織での各測定結果を表に示した。加齢に伴って顕著な変化を示したのは大脳皮質のS-100bで、mg proteinあたりの濃度は８週齢(3050 ± 320 ng)に対し１４カ月齢で１３５％(4110 ± 250 ng)、２５カ月齢で１５５％(4730 ±

480 ng)と有意(p<0.001)に増加していた。大脳皮質では他にもS-100aが８週齢(226 ± 27 ng/mg protein)とくらべて２５カ月齢で１６２％(367 ± 67 ng/mg protein)と有意(p<0.01)に高かった。同じくα-エノラーゼも８週齢(9.04 ± 0.35 ng/mg protein)に対し１４カ月齢１１８％(10.7 ± 0.7 ng/mg protein)、２５カ月齢１１５％(10.4 ± 0.8 ng/mg protein)と有意(p<0.01)に高い値を示した。また組織湿重量あたりの値で比較したところ上記のうちS-100bのみが加齢に伴い有意に増加していた{８週齢(73.2 ± 3.6 μg/g tissue)に対して１４カ月齢１１７％(85.5 ± 4.9 μg/g tissue)、２５カ月齢１３５％(98.7 ± 11.8 μg/g tissue)、p<0.01}。

一方、小脳及び脳幹では加齢に伴う変化はほとんど観察されなかった。僅かに、小脳ではS-100aが８週齢(372 ± 55 ng/mg protein)、１４カ月齢(564 ± 150 ng/mg protein)、２５カ月齢(550 ± 97 ng/mg protein)と加齢に伴い増加傾向がみられた。脳幹ではGi2αが多少増加する傾向を示した。

γ-エノラーゼ、Goα及びGβの濃度は、大脳、小脳及び脳幹で加齢に伴う有意な変化は認められなかった。

Concentrations of Nervous Tissue-Related Proteins in Rat CNS with Various Ages

Regions	Ages of rats 8-week (5)	14-month (5)	25-month (4)
	S-100b (ng/mg protein)		
Cerebral cortex	3050 ± 320	4110 ± 250**	4730 ± 480**
Cerebellum	5240 ± 530	6020 ± 1210	5930 ± 940
Brainstem	5690 ± 680	5460 ± 590	5790 ± 610
	S-100a (ng/mg protein)		
Cerebral cortex	226 ± 27	349 ± 126	367 ± 67*
Cerebellum	372 ± 55	564 ± 150	550 ± 97*
Brainstem	455 ± 68	633 ± 178	546 ± 118
	S-100a_0 (ng/mg protein)		
Cerebral cortex	12 ± 5	19 ± 15	19 ± 14
Cerebellum	12 ± 8	8 ± 11	9 ± 15
Brainstem	18 ± 13	15 ± 9	25 ± 23
	α-Enolase (μg/mg protein)		
Cerebral cortex	9.04 ± 0.35	10.7 ± 0.7*	10.4 ± 0.8*
Cerebellum	9.76 ± 0.91	12.0 ± 0.6	11.1 ± 1.0
Brainstem	10.9 ± 0.8	11.2 ± 1.2	10.6 ± 2.5
	γ-Enolase (μg/mg protein)		
Cerebral cortex	8.31 ± 0.57	8.67 ± 1.31	8.99 ± 1.59
Cerebellum	9.68 ± 0.87	8.87 ± 0.70	8.25 ± 1.82
Brainstem	9.45 ± 0.80	8.71 ± 1.76	9.53 ± 2.08
	Goα (pmol/mg protein)		
Cerebral cortex	90.4 ± 13.0	90.8 ± 21.6	96.3 ± 7.6
Cerebellum	47.1 ± 3.9	56.5 ± 8.5	50.6 ± 8.4
Brainstem	21.1 ± 3.9	25.0 ± 8.3	21.9 ± 3.7
	$Gi_2\alpha$ (pmol/mg protein)		
Cerebral cortex	10.1 ± 1.2	10.8 ± 0.7	11.4 ± 2.3
Cerebellum	6.9 ± 1.0	7.9 ± 0.8	7.2 ± 0.7
Brainstem	7.5 ± 1.1	10.9 ± 2.4	10.0 ± 1.4
	Gβ (pmol/mg protein)		
Cerebral cortex	234 ± 26	203 ± 39	213 ± 41
Cerebellum	100 ± 15	100 ± 15	93 ± 24
Brainstem	61 ± 4	57 ± 15	56 ± 16

Statistically significant (Student's t test) compared with the 8-week rats: *p<0.01, **p<0.001

末梢組織ではS-100α濃度の高い骨格筋、副腎及び舌でS-100ao濃度が加齢に伴い有意に増加していた。しかし、S-100β含量の多い脂肪組織、軟骨組織では加齢によるS-100の濃度変化はみられなかった。

神経細胞の細胞質に局在するγ-エノラーゼ、および神経細胞膜や神経網に多量分布するGoαのレベルは加齢に伴う変化はなく、グリア細胞質に分布するS-100及びα-エノラーゼが加齢とともに増加することが明らかになった。とくに大脳皮質のS-100bレベルの著しい増加は、単に加齢によるグリア細胞の比較的増加による変化だけとは考えにくく、加齢に関連したS-100の何らかの役割を示唆しているように思われる。

[文献]

(1) Allore R, O'Hanlon D, Price R, et al Science 239, 1311-1313, 1988
(2) Asano T, Semba R, Ogasawara N, Kato K J Neurochem 48, 1617-1623, 1987
(3) Kimura S, Kato K, Semba R, Isobe T Neurochem Int 6, 513-518, 1984
(4) Kato K, Haimoto H, Shimizu A, Tanaka J Biomed Res 8, 119-125, 1987
(5) Kato K, Suzuki F, Semba R J Neurochem 37, 998-1005, 1981
(6) Asano T, et al submitted for publication
(7) Asano T, Kamiya N, Morishita R, Kato K J Biochem 103, 950-953, 1988

133 Ｚｅｌｌｗｅｇｅｒ症候群のｐｅｒｏｘｉｓｏｍｅ異常について

相川純一郎*、成沢邦明**、多田啓也*
東北大学医学部小児科教室*、同病態代謝学講座**

〔要約〕
Zellweger症候群は新生児期より重篤な中枢神経症状を呈し、各種の生化学的異常を示す予後不良の疾患である。我々はそのprimary lesionを追及する過程で、ペルオキシゾームβ-酸化系酵素と膜蛋白に関して以下の知見を得た。

1. Zellweger症候群の大脳白質に於て、コレステロールエステル画分でvery long chain fatty acid（ＶＬＣＦＡ）がcontrolに比して著増していた。

2. ペルオキシゾームβ-酸化系酵素をWestern blotで調べた。肝と脳で3-ketoacyl CoA thiolaseは成熟酵素が存在せず、precursorが検出された。しかし肝と脳ではprecursorのsizeが違っていた。

3. 肝からm-RNAを抽出し、ウサギ網状赤血球溶血液を用いcell free translationを行なった。ペルオキシゾームβ-酸化系酵素は、Western blotで検出できないにも拘らず、cell free translationで合成された。

4. 線維芽細胞を^{35}S-メチオニンでラベルし、膜蛋白をフルオログラフィーで調べた。26 KDa，22 KDaの膜蛋白はcontrolと患者で同様に検出された。70 KDaの膜蛋白は患者で非常に薄いバンドを示し、controlには存在しない30 KDaのバンドを検出した。

Zellweger症候群は、著明な筋緊張低下、肝腫大等で発症する重篤な予後不良の遺伝性疾患である。1973年にGoldfisherら(1)により細胞内小器官であるperoxisome欠損が指摘され注目された。しかしprimary lesionは未だ不明で、細胞内小器官欠損という特異な位置付けにある。その中枢神経病変も、白質のミエリン低形成とneuronal heterotopiaという特異な像を呈する。大脳白質にＶＬＣＦＡが蓄積する事はすでに報告があるが、ペルオキシゾームβ-酸化系酵素の有無を調べ脳に於けるＶＬＣＦＡ蓄積との関係を検討し、さらに線維芽細胞に於けるペルオキシゾーム膜蛋白の生合成をも検討した。

【方　法】
大脳白質からクロロホルム／メタノール（2/1, V/V）で総脂質を抽出し、これをＴＬＣでわけてコレステロールエステルを単離した。次にBF_3で脂肪酸をメチル化し、liquid phaseキャピラリーカラムを用いたＧＬＣで分析を行なった。ラット肝から精製したペルオキシゾームβ-酸化系酵素（acyl-CoA oxidase, bifunctional protein, 3-ketoacyl-CoA thiolase），不飽和脂肪酸分解に関与するペルオキシゾーム2,4-dienoyl CoA reductaseの抗体を用いWestern blotを行なった。肝からm-RNAを抽出しウサギ網状赤血球溶血液を用いてcell free translationを行ない、ペルオキシゾーム酵素合成能をみた。線維芽細胞を^{35}S-メチオニンでラベルして、細胞を集め溶解し、抗体で沈降し、フルオログラフィーで調べた。

【結　果】
大脳白質のコレステロールエステル画分の脂肪酸分析をTable 1に示した。Zellweger症候群では明らかにＶＬＣＦＡが増加していた。次にFig. 1にペルオキシゾームβ-酸化系酵素の1つ3-ketoacyl CoA thiolaseのWestern blotを示す。脳に於てはZellweger症候群では成熟酵素は検出できないが、肝のprecursorよりも分子量が小さいprecursorが存在した。

Table 2に肝β-酸化系酵素のWestern blotとcell free translationの結果をまとめた。Zellweger症候群ではβ-酸化系酵素が検出できないが、m-RNAは存在する事がわかった(2)。またcell labellingでは26KDa、22 KDaの膜蛋白は存在するが70 KDaに異常がある事を見出し、更に新たに30 KDaの蛋白を確認した。

【考　察】
Zellweger症候群では肝と同様に脳のペルオキシゾームに異常がある事がわかった。患者肝に於て飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸分解に関与するペルオキシゾーム酵素は蛋白としては検出できなかった。さらにペルオキシゾームβ-酸化系

酵素のm-RNAが存在するので、合成された酵素がペルオキシゾームという入物が存在しないために局在できず、蛋白分解酵素で壊されると考えられた。ラベル実験からZellweger症候群のprimary lesionに関して2つの可能性が考えられた。1つは70 KDa膜蛋白の分解がproteaseで増強され低分子のバンドが出現する。もう1つは70 KDa膜蛋白の異常な低分子化でペルオキシゾーム膜が形成されないことである。

【文 献】

1. Goldfisher, S. et al. (1973) Science, 182:62
2. Aikawa, J., Ishizawa, S., Narisawa, K., Tada, K. et al. (1987) J. Inher. Dis., 10:211-213

Table 1. Fatty Acids Analysis of Cholesterol Ester Fraction in Brain

	Control (n = 5)	Zellweger syndrome
Brain		
% C24:0	0.1	2.7
% C25:0	n.d.	1.9
% C26:0	n.d.	2.6
% C27:0	n.d.	0.2

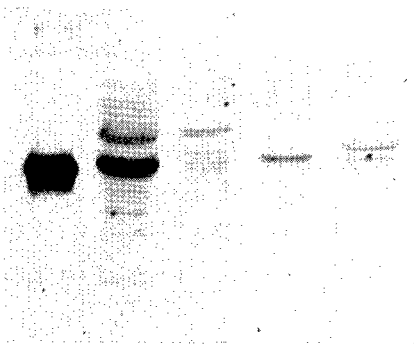
Expressed as % of total fatty acids
n.d.; not detectable

Table 2. Results of Immunoblotting (A) and Cell-free Translation (B)

	(A)		(B)	
	patient	control	patient	control
Peroxisomal β-oxidation enzymes				
acyl-CoA oxidase	-	+	+	+
bifunctional protein	-	+	+	+
3-oxoacyl-CoA thiolase	precursor	+	+	+
2,4-dienoyl CoA reductase	-	+	+	+
Peroxisomal membrane polypeptides				
70 K	-	+	ND	ND
26 K	-	+	ND	ND
22 K	-	+	ND	ND

ND, not done

Fig. 1 Immunoblotting of 3-ketoacyl CoA thiolase



1 2 3 4 5

1. rat purified enzyme
2. normal liver
3. patient liver
4. normal brain
5. patient brain

134 シアリドーシス「ＴＹＰＥ２」例の脳に蓄積したシアル酸化合物の検討

横田　司*　六川　千秋　　飯田　静夫

（東京医科歯科大学・分子医化学，神経内科*）

〔要約〕

生後８７日で死亡したシアリドーシスの１剖検例の脳を用い、ガングリオシド及び、シアロオリゴ糖の分析を行った。ガングリオシドでは、ＴＬＣ上、著変を認めなかった。シアロオリゴ糖では、対照例の同一蛋白量と比較して、ＴＬＣ上、より強いレゾルシノール陽性のｓｐｏｔを認め、また、同様の条件で行ったDEAE-Sepharoseの濃度勾配溶出カラムクロマトグラフィラフィーで、７６歳例には、見られなかったｔｒｉｓｉａｌｏ画分が出現し質、量共に、明らかな変化を示すものと考えられた。現在、それらの構造の解析中である。

Ｋｅｙ ｗｏｒｄ：Ｓｉａｌｉｄｏｓｉｓ：Ｓｉａｌｉｃ ａｃｉｄ：Ｓｉａｌｙｌ ｏｌｉｇｏｓａｃｃｈａｒｉｄｅ

〔はじめに〕

シアリドーシスは、リソゾーム中のシアリダーゼの先天的欠損によって生じる代謝異常症である。臨床像は、多彩であって２型に分類される。世界的にみても、その報告は少なく、特に、脳組織中の蓄積物についての生化学的検討のなされたものは極めて少ない。今回、我々は、病理組織学的にも、酵素学的にもシアリドーシスＴＹＰＥ２と考えられる１小児例の脳組織中シアル酸化合物の分析を行ったのでその結果を報告する。

〔材料と方法〕

妊娠２８週頃、超音波画像上胎児水腫と診断され、３６週、３６５０ｇで出生し生下時より、著明な全身浮腫と肝脾腫を認め、８７日で死亡した女児で、末梢血中白血球の酵素学的検索により診断されたシアリドーシス例（山口大学第１病理より）及び、対照として、神経疾患以外の原因により死亡し剖検に供せられた２歳、７６歳、の２例とＧａｕｃｈｅｒ病、Ｔａｙ-Ｓａｃｈｓ病、ダウン症候群、アルギノコハク酸尿症の４例の計７例の脳を用いた。脳の湿重量の１０倍容の０．５％オクタエチレン-ｎ-ドデシルエーテル（$C_{12}E_8$）でホモジナイズした。4℃、２０万×ｇ、６０分間遠心、上清をDEAE-Sepharoseカラムにかけ酸性画分を得た。そのセントリコン-Ｍ１０濾液画分を脱塩後、シアロオリゴ糖画分として分析に用いた。また、DEAE-Sepharoseの濃度勾配溶出（０～０．４Ｍ NH_4HCO_3）を行い、ｍｏｎｏ-、ｄｉ- 及びｔｒｉｓｉａｌｏ画分を得た。　クロロホルム-メタノール抽出後、DEAE-Sepharoseカラムにより、ガングリオシド画分を得た。蛋白質は、ミクロビュレット法、ガングリオシドのシアル酸は、レゾルシノール-塩酸法、及び、シアロオリゴ糖のシアル酸は、ＡｍｉｎｏｆｆのＴＢＡ法を用い定量した。

ＴＬＣ：シアロオリゴ糖は、ｎ-プロパノール：１４．８Ｎ NH_4OH：H_2O（６：１：３）の溶媒で、ガングリオシドは、クロロホルム：メタノール：H_2O（６０：３０：８）の溶媒で展開し、レゾルシノール-塩酸法で検出した。

酵素活性：凍結保存の脳を水でホモジナイズし６００×ｇ、１０分間遠心した上清を酵素源として、合成基質を用い、桜庭らの方法[5]に準じて測定した。

〔結果〕

遠心上清中の総シアル酸量は、同一蛋白量にて比較した場合シアリドーシスでは、対照の２～３倍であった。シアロオリゴ糖画分のＴＬＣの結果、シアリドーシス脳に於ては移動度が、遊離シアル酸に一致する成分とシアリルラクトースより移動度の低い４つの成分が検出され、本画分の総シアル酸量は、６．７μｇ／ｍｇproteinであった。その他の対照例では、シアル酸量は０．７μｇ／ｍｇprotin以下であった（Ｆｉｇ.１）。

シアリドーシス例のｍｏｎｏ-、ｄｉ-、ｔｒｉｓｉａｌｏオリゴ糖のＴＬＣでは、各画分に、それぞれ、７つ、７つ、２つの、レゾルシノール陽性のｓｐｏｔを認めた（Ｆｉｇ.２）。 ｔｒｉｓｉａｌｏ画分は、シアリドーシスにのみ認められた。 一方、酵素学的には、シアリダーゼの欠損が認められた。また、ガングリオシド画分では、総シアル酸量に、変化を認めず、ＴＬＣ上も、明かな変化は、見られなかった[4]。

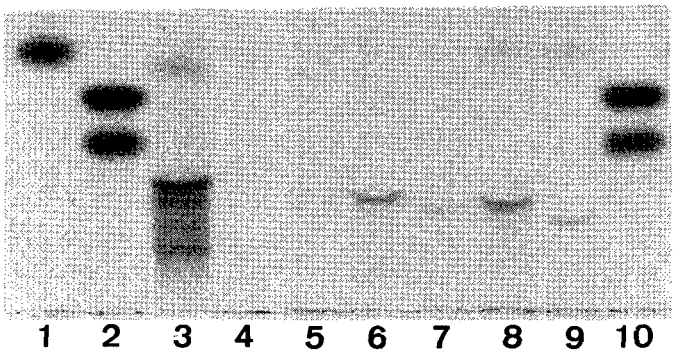


Fig.1 TLC of sialyloligosaccharide
lane 1; free sialic acid, lane 2,10; sialyl(2-3)lactose & sialyl(2-6)lactose, lane 3; sialidosis,
lane 4; 2 years old, lane 5; 76 years old,
lane 6; arginosuccinic aciduria, lane 7; Down syndrome,
lane 8; Gaucher disease, lane 9; Tay-Sachs disease

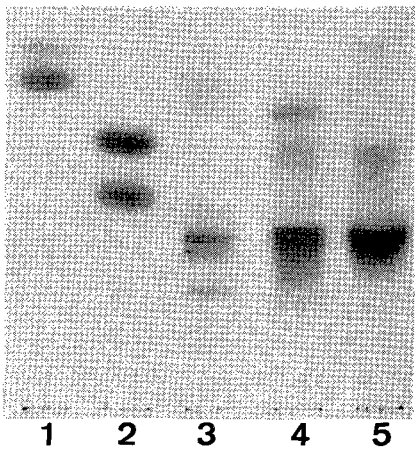


Fig.2 TLC of sialyloligosaccharide fraction. Oligosaccharides in the case of sialidosis were separated by DEAE-Sepharose colum chromatography. lane 1; free sialic acid, lane 2; sialyl(2-3)lactose & sialyl(2-6)-lactose, lane 3; monosiallo fraction, lane 4; disialo fraction, lane 5; trisialo fraction

〔考察〕

本例は、臨床、病理、並びに、生化学的所見より、Ｌｏｗｄｅｎ、Ｏ'Ｂｒｉｅｎら[2]の言うシアリドーシス ＴＹＰＥ ２ Ｉｎｆａｎｔｉｌｅ Ｆｏｒｍと考えられる。シアリドーシスの脳組織に於けるガングリオシドの変化を検討した文献は、少ないが、Ｂｅｒａｒｄ[1]、Ｐａｌｌｍａｎｎ[3]、Ｕｌｒｉｃｈ-Ｂｏｔｔら[6]は、各々、変化を認めないとしたり、若干の増加を認めるとしたり、あるいは、３～４倍の増加を認めるとしている。一方、シアロオリゴ糖は、我々と同様の方法を採って分析しているものがなく比較は困難だが、本症では、シアロオリゴ糖、シアロ糖蛋白が蓄積していると考えられ、組織、細胞、尿、更に、腹水中総シアル酸が増加していると言われている。本例でも、総シアル酸とシアロオリゴ糖は増加していた。が、セントリコンで限外濾過を受けなかった蛋白濃縮画分は、ＳＤＳ-ポリアクリルアミドゲル電気泳導上シアロ糖蛋白の増加は、認められなかった。本例では、シアロオリゴ糖の蓄積が示唆されるが、シアロ糖蛋白の蓄積は、否定的と考えられた。また、ガングリオシドにも変化を、認めなかった。

〔文献〕

(1)Berard,M.,et al.,(1968) Path.europ.3,172-183 (2)Lowden,J.A.,et al.,(1979) Am.J.Hum.Genet.31,1-18
(3)Pallmann,B.,et al.,(1980)In:Structure and Function of Gangliosides(Svennerholm,L.,et al.,eds.),Advances in Experimental Medicine and Biology,Vol.125,pp.401-414.New York-London:Plenum Press. (4)飯田 静夫, (1985) 文部省特定研究 先天代謝病の病因解析と治療に関する研究 73-75 (5)Sakuraba,.H.,et al.,(1983)Ann.Neurol.13, 497-503 (6)Ulrich-Bott,B.,et al.,(1987)Enzyme 38,262-266

135 Wriggle Mouse Sagamiに関する神経化学的検討

池田正行*，西川　徹，三国雅彦，高橋清久
（国立精神神経センター神経研究所
疾病研究第３部，現　旭中央病院神経内科*）

〔要約〕

5-HT 症候群に類似した異常運動を示すWriggle Mouse Sagami(ＷＭＳ)に関して神経化学的検討を行なった．その結果　①ritanserin（5-HT2拮抗薬）とprazosin（α1 adrenaline拮抗薬）が特異的に異常運動抑制効果を示した．②脳内各部位で5-HIAAの濃度が上昇し，③NSD 1015投与による5-HTPの蓄積も亢進していた．④小脳では5-HT，5HIAA，noradrenalineが増加し，高親和性[^{3}H]muscimol結合部位数が減少していた．⑤[^{3}H]5-HT，[^{3}H]ketanserin，[^{3}H]paroxetine，[^{3}H]prazosin結合の結合部位数並びに親和性は，一部線条体で軽度の変化があった他は，いずれも対照と比較して明らかな差はなかった．ＷＭＳでは5-HTの産生亢進に基づくシナプス前由来の5-HT系の機能亢進状態があり，noradrenaline系やGABA系の異常も存在する．ＷＭＳは，5-HTが錐体外路症状の発現に大きく関与していることを示す興味あるモデルと考え報告した．

［緒言］

ＷＭＳは常染色体性劣性遺伝により，生後12日ごろより，不随意運動，筋緊張の異常，失調などが混在した複雑な異常運動を示すマウスであるが1)2)，中枢神経系に明らかな病理学的変化が見出されないこともあり，その病因はいまだ全く不明である．我々はＷＭＳの異常運動が正常マウスに5-HTのagonistを投与したときの運動に類似している3)ことに着目し，5-HT系を中心とした行動薬理学並びに神経化学的検討を行なった．

［材料と方法］

14-16週齢の雄性ＷＭＳと，対照として同週齢の雄性Balb/cマウスを用いた．

１．はじめにＷＭＳにおいて如何なる神経伝達系に異常があるのかをスクリーニングする目的で行動薬理学的検討を行なった．すなわち下記の各種神経伝達物質拮抗薬を投与し，投与後の異常運動を観察，溶媒投与時と比較した．metergoline(5-HT1,2)．ritanserin(5-HT2)．prazosin（α1 adrenaline）．SCH 23390(dopamine１)．YM 09151-2(dopamine2)．　一方Balb/cの行動量抑制を指標として，各薬剤の非特異的あるいは鎮静作用の要素を除外した．

２．脳各部位の切出しはGlowinskiとIversenの方法に準じて行なった．マウスは断頭屠殺後直ちに氷上で大脳皮質，線条体，海馬，視床＋間脳，中脳，小脳，橋を切り出し-80℃で保存した．

３．脳内モノアミンならびにアミノ酸の測定：noradrenaline(NA)，dopamine(DA)，DOPAC HVA,5-HT,5-HIAAの定量及び5-HTの代謝回転を知る目的でアミノ酸脱炭酸酵素阻害剤であるNSD1015(100 mg/kg)を腹腔内投与したのちの脳内5-HTPの蓄積を定量した．測定はHPLC-ECDにより行なった．

４．脳内各種受容体結合能の測定：以下の各受容体につきin vitroでの結合実験を行なった．（）内は用いた^{3}H放射性リガンドを示す．5-HT1 (5-HT)，5-HT2 (ketanserin)，5-HT uptake site (paroxetine)，α1 adrenaline (prazosin)，$GABA_A$ (muscimol)．

［結果］

１．行動薬理学的検討：ritanserin(5-HT2拮抗薬）とprazosin(α1アドレナリン拮抗薬)のみが受容体遮断作用を介して特異的に効果を示した．dopamine系拮抗薬には特異的運動抑制効果はなかった．

２．5-HT系では5-HTそのものは小脳でのみ対照の２倍以上に上昇していた．5-HIAAは大脳皮質を除く全域で上昇していた(Fig.1)．5-HTPの蓄積は視床下部，正中縫線核，橋，小脳で有意に亢進していた(Fig.2)．カテコラミン系では NAが小脳でのみ対照の1.5倍に上昇していた．DA,DOPAC,HVAは濃度は不変であった．

３．アミノ酸：GABA濃度は線条体でのみ軽度上昇していた．グルタミン酸の濃度はいずれの部位でも対照と有意差はなかった．

４．受容体結合実験：[^{3}H]5-HT，[^{3}H]paroxetine結合はBmax,K_Dとも対照とＷＭＳの間に有意な差を認めなかった．[^{3}H]ketanserin結合は線条体で対照の120%と軽度増加していたがK_Dは不変であった．．[^{3}H]prazosin結合部位はやはり線条体で対照の85%に減少していた(Fig.3)．[^{3}H]muscimol結合部位はＷＭＳで単位蛋白あたり15%,小脳あたり対照の60%に減少していたがK_Dは不変であった(Fig.3)．

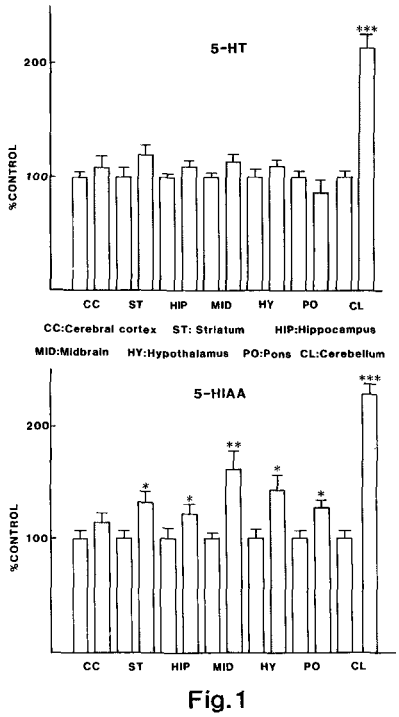


Fig.1

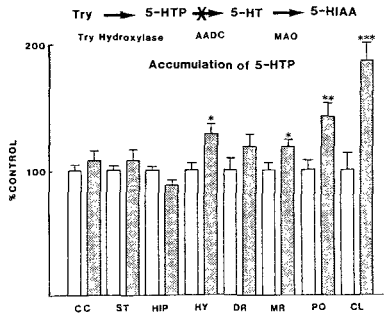


Fig.2

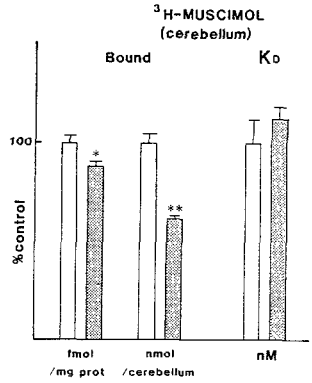


Fig.3

［考案］

以下の理由によりＷＭＳでは5-HTの産生亢進に基づくシナプス前由来の5TH系の機能亢進状態が存在すると考えられる．①ＷＭＳの異常運動はマウスに5-HT agonistを投与した際の症状に類似している．②行動薬理学的検討では選択的5-HT2拮抗薬であるritanserinが特異的に異常運動抑制効果を示した．③脳内各部位で5-HTの代謝産物である5-HIAAの濃度が上昇していた．④5-HTPの蓄積が亢進していた．⑤5-HT受容体結合実験では5-HT1，5-HT2受容体及び5-HT取込部位いずれも，対照と比較して明らかな変化はなかった．5-HT系以外ではnoradrenaline系とGABA系の異常も示唆された．

5-HT系と錐体外路症状に関しては，齧歯類では5-HTのagonistの投与によりミオクローヌス様不随意運動が生じることが知られている4)5)．ヒトではＷＭＳの場合とは逆に，5-HTの前駆体である5-HTPの投与により軽快するLance-Adams症候群が有名であるが，一方で抗鬱薬やMAO阻害剤といった5-HT系の機能亢進を引起こす薬剤でもミオクローヌス様不随意運動が生じることが知られている6)7)．ＷＭＳにおける5-HT系の機能亢進所見が一次的なものか二次的なものか，あるいはヒトの如何なる疾患に対応するのかなどについては今後の検討を要するが ＷＭＳは5-HT系機能亢進状態が錐体外路症状の発現に大きく関与していることを示す興味あるモデルと考えられる．

［文献］

1)中野健司ら(1986) 第33回日本実験動物学会総会講演要旨集，p109.
2)松井京子ら(1987)．実験動物，36：185-189.
3)鈴木二郎ら(1987) 第28回日本神経学会総会抄録集 ，p60.
4)Chadwick D, et al (1978) J.Neurol.Sci. 35:157-165.
5)Luscombe G. et al (1986) Adv Neurol 43:529-543.
6)Lippmann,S. et al (1977) Am.J. Psychiatry 134:90-91.
7)Cohen,R.M. et al (1980) Am.J.Psychiatry,137:105-106.

136 マウスMPTPパーキンソニスムにおけるストレスの影響
－各種薬剤による検討－

浦上克哉＊、正木直子、足立芳樹、
栗木悦子、西川清方、高橋和郎
（＊高尾病院神経内科，鳥取大学脳神経内科）

〔要約〕C57BL/J マウスに、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)を30mg/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週間後に各種薬剤を投与した後水浸拘束ストレスを加えた。薬剤は臨床上有効と考えられたImipramine(IMP)、代表的オピオイドであるMorphine(MOR),Naloxone(NAL) を用いた。IMP 10,20mg/kgとMOR 3,6mg/kg投与群では、自発運動量の低下、線条体DAの低下と線条体及び皮質DAの代謝回転の亢進を抑制した。IMP 5mg/kg、NAL 5mg/kg投与群では抑制されなかった。パーキンソン病のstress-induced akinesia に対して、IMP は用いて見るべき薬剤と考えられた。また、MOR が有効であったことより、外因性オピオイドによる治療の可能性も示唆された。

（目的）

昨年の本会で、パーキンソン病（パ病）患者のstress induced akinesia (SIA) の病態に、線条体のドーパミン(DA)の低下と線条体及び大脳皮質のDAの代謝回転の亢進が関与していることを報告した(1) 。パ病患者のSIA には有効な治療法がなく苦慮しているのが現状である。そこで、代表的オピオイドのMorphine(MOR),Naloxone(NAL) を用いオピオイド物質のパ病のストレス下におけるDA代謝に及ぼす影響を明らかにし、臨床上有効性が推測されるImipramine (IMP)のSIA 抑制効果(2) を実験的に確認することを目的とした。

（実験方法）

1)動物と薬剤投与　８週令のC57BL/J 雄マウス(20-30g)を実験に用いた。実験開始１週間前より、昼夜明暗サイクル(12時間) を逆転させた小屋にて飼育した。マウスに、MPTP塩酸塩(Aldrich社製)30mg/kg/ 日を連続３日間腹腔内投与してパ病モデルを作成した(1) 。対照群には等量の生食を腹腔内投与した。１週間後、MOR(3,6mg/kg),NAL(5mg/kg),IMP(5,10,20mg/kg)の前投与を行った後、Takagi et alの方法(3) に従い水浸拘束ストレスを水温25度で約15時間負荷した。

Group は、Table 1のごとく設定した。実験は１群５匹とし、自発運動量の測定には、３群(計15匹) を用い、脳内アミン定量には５群(25 匹，０，３，６，24時間，７日目) を用いた。

Table 1. Subjects

Group	アニメックス用 (匹)	脳内アミン測定用 (匹)
Saline	15	25
Saline+stress	15	25
MPTP	15	25
MPTP+stress	15	25
MPTP+stress+IMP 5mg/kg	15	25
MPTP+stress+IMP 10mg/kg	15	25
MPTP+stress+IMP 20mg/kg	15	25
MPTP+stress+Morphine 3mg/kg	15	25
MPTP+stress+Morphine 6mg/kg	15	25
MPTP+stress+Naloxone 5mg/kg	15	25

2)自発運動量測定　ストレス解除直後より、自発運動量測定装置を用いて、30分毎にカウント数を測定し約７時間観察した。各Group 共に３群として、カウント数は３回の平均値とした。

3)脳内アミンの定量　ストレス解除後の０，３，６，24時間，７日目と経時的にマウスを断頭屠殺し脳を取り、氷上にて速やかに線条体及び大脳皮質を分離した。これに0.1N過塩素酸を加えてホモジナイズし、15,000Xg ,20分間冷却遠心分離し、上清を測定まで-20 度で保存した。DAとその主要代謝産物であるHVA,DOPACを、HPLC-ECD法で測定した。測定結果は分散分析にて統計処理を行い、DA indexは(DOPAC＋HVA)/DA として計算した。

（結果）

(1) 自発運動量測定　MPTP＋ストレス群は著明な運動量低下を示し、約４時間で改善がみられた。IMP 投与群では、5mg/kg投与の際ストレス後の運動量低下が抑制されなかったが、10mg/kg,20mg/kg の投与で抑制された(Fig 1) 。MOR 投与群では、3mg/kg,6mg/kg 共に運動量の低下が抑制され、NAL 投与群では、抑制されなかった(Fig 2) 。

(2) 脳内アミンの定量　ストレス解除０時間目の変化ではMPTP＋ストレス群において、線条体のDAの有意な低下が見られた。IMP では、5mg/kg,10mg/kgでは線条体のDA低下が抑制されなかったが、20mg/kg では有意に抑制された(Table 2) 。MOR(3mg/kg,6mg/kg)投与群は線条体DAの低下を抑制し、NAL(5mg/kg) 投与群は低下を抑制しなかった。線条体のDA index は、MPTP＋ストレス群で有意に上昇していたが、IMP(10,20mg/kg),MOR(3,6mg/kg) 投与群では抑制され、IMP(5mg/kg)

は、MPTP＋ストレス群で有意に上昇していたが、IMP(10,20mg/kg),MOR(3,6mg/kg) 投与群では抑制され、IMP(5mg/kg)、NAL(5mg/kg) 投与群では抑制されなかった(Fig 4,5)。IMP(10mg/kg)投与群は、経時的にみると線条体DAの低下が3時間目よりの改善がみられた(Fig 3)。IMP(5mg/kg),NAL(5mg/kg) 投与群は、生食＋ストレス群と差異がなかった。皮質は、MPTP＋ストレス群においても、DA,HVA,DOPACすべて低下を認めなかった。DA index はMPTP＋ストレス群で有意に上昇していた。これがIMP(10,20mg/kg),MOR(3,6mg/kg) では抑制され、IMP(5mg/kg),NAL(5mg/kg) では抑制されなかった。

〔考察〕

IMP(10mg/kg)投与では、ストレス解除0時間の時点で一過性の線条体DA低下をきたした。しかし、DA indexは有意に上昇せず、また線条体DAの経時的変化でMPTP＋ストレス群に比較して早期改善を示した。皮質でもIMP(10,20mg/kg) 投与でDAの代謝回転の亢進を抑制した。このことより、IMP(10,20mg/kg) の投与量で有効と考えられた。作用機序としては、IMP のDA再取り込み抑制作用、抗コリン作用等の関与が推測される。MOR は3,6mg/kg共にストレスによる自発運動量低下線条体DAの低下と線条体及び大脳皮質のDAの代謝回転の亢進を抑制した。内因性オピオイドが、ストレス下で関与しストレスによるノルアドレナリンの代謝回転の上昇を抑制することが報告されている(4)。しかし、パ病モデルにおいてMORがストレス状況下のDA系に及ぼす影響は良く知られていない。文献的には、MOR 自体はDAの遊離を促進しDAを低下させるとしている(5)。しかし、今回の検討でMOR はDA系に影響し、ストレス下においてDA遊離に抑制的に作用することが示された。NAL はMOR の代表的拮抗薬であるが、パ病モデルのストレス下でDA遊離に抑制的に作用しないことが示された。

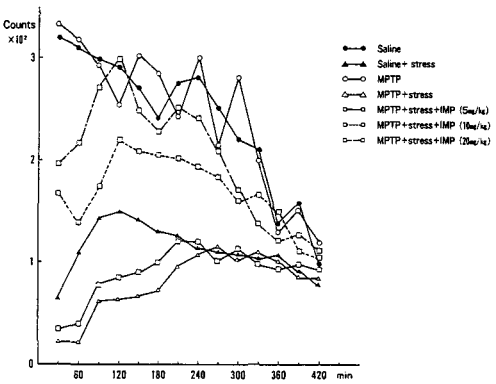


Fig. 1 Time course of locomotor activity

従来明らかでなかったパ病のSIA の治療としてIMP が有効であり、SIA の治療として用いるべきことが示唆された。また、内因性オピオイドについては、MOR がパ病のストレス下で線条体DAの低下と線条体、大脳皮質のDAの代謝回転の亢進を抑制することが分かった。このことより、SIA に対する外因性オピオイドによる治療の可能性が示唆された。

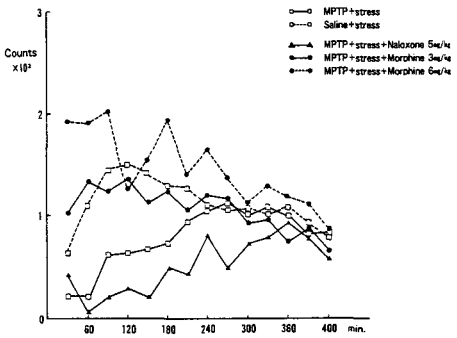


Fig 2. Time course of locomotor activity

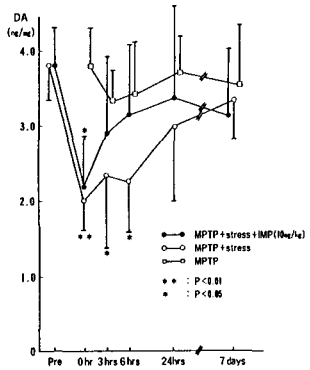


Fig 3. Time course of striatal DA levels

〔文献〕①浦上克哉、他 (1987) 神経化学26,199. ②西川清方、他 神経変性疾患調査研究班 1986 年度報告書, 198.③Takagi K,et al. (1964) Chem Pharm Bull 120,465. ④Tanaka M, et al. (1982) Life Sci 30,1663.⑤Arbilla S,et al. (1978) Nature 271,559.

Table 2. Striatal DA, DOPAC and HVA levels (ng/mg) in mice at 0 hour after stress.

	DA	DOPAC	HVA
Saline	9.886±3.287	0.736±0.263	0.874±0.253
Saline+Stress	8.852±0.422	0.753±0.109	1.150±0.186
MPTP	3.809±0.626	0.314±0.044	0.506±0.085
MPTP+Stress	2.018±0.387**	0.308±0.057	0.431±0.132
MPTP+Stress +IMP 5mg/kg	2.283±0.492**	0.311±0.069	0.453±0.124
MPTP+Stress +IMP 10mg/kg	2.405±0.643*	0.251±0.054	0.469±0.170
MPTP+Stress +IMP 20mg/kg	3.555±0.702	0.403±0.124	0.419±0.119
MPTP+Stress +Morphine 3mg/kg	3.360±0.844	0.215±0.086	0.515±0.085
MPTP+Stress +Morphine 6mg/kg	3.906±0.610	0.225±0.067	0.566±0.118
MPTP+Stress +Naloxone 5mg/kg	1.972±0.785**	0.252±0.086	0.698±0.242

N=5 * * : P<0.01, * : P<0.05 >vs MPTP group

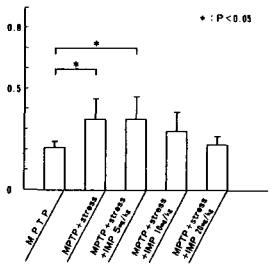


Fig 4. Striatal (DOPAC+HVA)/DA ratio at 0 hour after stress

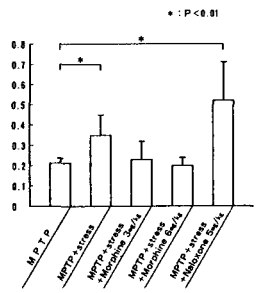


Fig 5. Striatal (DOPAC+HVA)/DA ratio at 0 hour after stress

137 パーキンソン病モデルイヌにおける日内リズム異常

日根野尚，溝渕睦彦，柿本泰男
平谷勝彦※
（愛媛大学医学部神経精神科，第一外科学※）

〔要約〕 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine（ＭＰＴＰ）投与により、パーキンソン病モデルイヌを作成した。このモデルイヌの尿量、尿中クレアチニン、血中バゾプレッシン、コーチゾール、ＡＣＴＨの日内リズムを４時間毎に、ＭＰＴＰ投与前後で比較した。

尿量は、投与前のイヌでは１７～２１時あるいは２１～１時に最高に達し、５～９時が最低である日内リズムを認めた。ＭＰＴＰ投与２週後、４週後ともにそのリズムは消失した。血中バゾプレッシンは、投与前は１３時を最高値とし５時を最低値とする日内リズムを示した。投与２週後では、ややリズムが乱れ、４週後では消失した。なお尿中クレアチニンは日内リズムを認めず、投与前後で変化しなかった。血中コーチゾール、ＡＣＴＨは、明確な日内リズムを示さなかったが、ＭＰＴＰ投与により、２週後、４週後ともに有意の増加を認めた。

精神神経疾患の一部には日内リズムの異常が知られている[1]が、パーキンソン病では報告がない。われわれはパーキンソン病患者において他疾患患者に比して夜間尿の多い事に気付き、この排尿リズムの異常の機序を研究した。

今回、ヒトやサルの脳内、特に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発現させるＭＰＴＰを用い、イヌのパーキンソン病モデルを作成し、カテーテルを挿入して、血液および尿を持続的に採取できるよう処置した。そこで、４時間毎に血中のバゾプレッシン、コーチゾール、ＡＣＴＨ、尿量およびクレアチニン等の日内リズムをＭＰＴＰ投与前後で比較し、パーキンソン病モデルイヌの日内リズムを詳細に検討した。

【方法】

雄イヌ６匹(8～10Kg)を用い、各部屋は９、２１時で明暗の調節をし、室温は２３～２５°Ｃ に保った。餌は、イヌ固形食を９～１７時まで充分量与え、水は２４時間自由飲水とした。採血、採尿のために静脈内留置カテーテルと膀胱瘻を造設し、チューブを金属の誘導管の中を通してケージの外へ誘導し、自由に採血、採尿ができるようにした。この手技によってイヌの活動は多少制限されるが、摂食、睡眠、排泄等の行動に影響はなかった。上記の処置による肉体的侵襲から十分回復したとおもわれる、処置後１４日目から実験を開始した。採血を３～４日にわたって４時間毎に行い、尿を５～６日にわたり４時間毎に採尿した。上記処置後、２０日後にＭＰＴＰ２．５mg/kg体重を静注した。投与２週後に、再び３～４日間の採血と５～６日間の採尿を行った。さらに投与４週後にも同様の採取を行った。血液は－８０°Ｃ、尿は－２０°Ｃで保存した。血漿バゾプレッシン（三菱油化Ｋ．Ｋ．のＡＶＰ－ＲＩＡＫＩＴ）、コーチゾール（第一ラジオアイソトープ社のＳＰＡＣコーチゾールＫＩＴⅡ）、ＡＣＴＨ（ＳＲＬ社のＡＣＴＨ－ＩＲＭＡＫＩＴ）はラジオイムノアッセイＫＩＴで測定した。クレアチニンはヤッフェ法で測定した。

【結果】

尿量の日内変化は図１、２に示した。図１は、典型的なイヌの例で、ＭＰＴＰ投与前と投与２週、４週後のそれぞれの時間帯量を連続的に示したものである。投与前には、９時から次第に増加、２１～１時に最高に達し、以後次第に減少する明確な日内リズムを認めた。投与２週、４週後では一定の排尿リズムは認めなかった。図２は、各イヌの１日平均尿量を１００とし、それぞれの時間帯量を％で示したものである。１３～１時に高値を示し、５～９時に最低量に達する日内リズムを認めた。いっぽう、投与２、４週後では、明確なリズムを認めなかった。尿中クレアチニンは、日内変動がほとんどなく、投与前後でも変化がなかった。血中バゾプレッシンは、投与前は、１３時を最高値とし、次第に低下して５時に最低値となる日内リズムを示した（図３）。投与２週後では、ややリズムが乱れ、４週後では消失し、しかも全体に投与前より高値を示した。イヌの血中コーチゾールは、日内リズムは認められないとされている[2]が、われわれの結果も同様で、明確な日内リズムを示さなかった。表１は、各時間帯の測定値を投与前後で比較したものであ

る。投与２週、４週後は、投与前に比して有意の増加を示した（Ｐ＜０．００１）。血中ＡＣＴＨも同様に、日内リズムを認めず、投与後に有意の増加を示した（Ｐ＜０．００１）。

【考察】

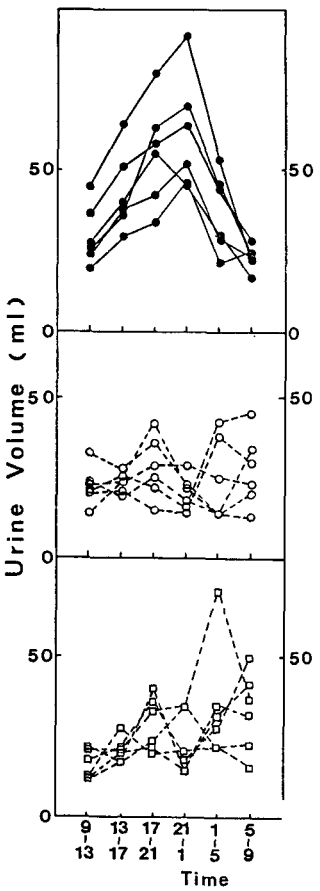
ＭＰＴＰは、黒質線条体やその他の部位のドーパミンニューロンを破壊し、パーキンソン病と酷似した症状を出現させる。パーキンソン病患者でも黒質線条体以外の部位も障害され振戦、寡動のほか多くの自律神経症状を示す。われわれの作成したモデルでは、視床下部のドーパミンニューロンの破壊により、ドーパミンの下垂体前葉ホルモンの分泌抑制機能が障害される可能性が考えられる。同様に、下垂体後葉からのバゾプレッシン分泌の調節も障害され、尿排泄パターンが変化すると考えられる。さらに、このモデル動物を用い、血中レニン、尿中電解質の日内リズム変化も検討中である。

【文献】

1)Wehr, A. and Goodwin, K. (1981) American Handbook of Psychiatry, Vol7 46-74

2)Kemppainen, R. and Sartin, J. (1984) J. Endocr. 103, 219-226

図１．　ＭＰＴＰ投与前後の連続４時間毎の尿量



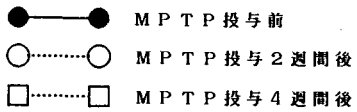


図２．　ＭＰＴＰ投与前後の尿量の日内変化（％）

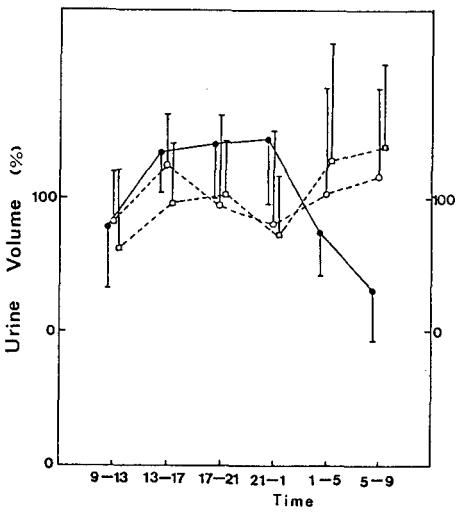


図３．　ＭＰＴＰ投与前後のバゾプレッシンの日内変化

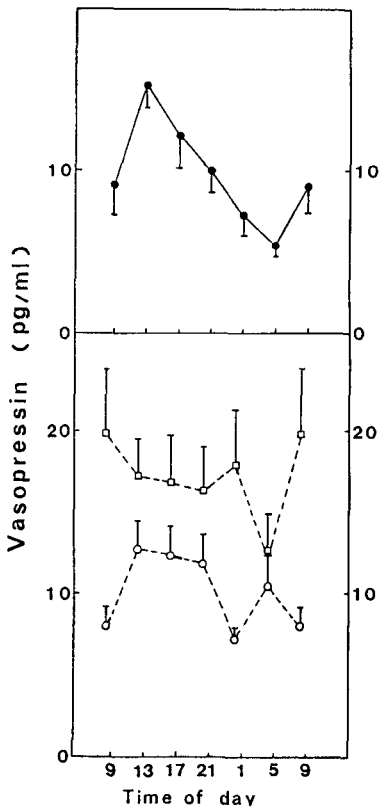


表１）ＭＰＴＰ投与前後の血中CortisolとＡＣＴＨ

	preＭＰＴＰ	post２Ｗ	post４Ｗ
Cortisol (μg/dl)	2.5± 0.9	3.9±1.7*	3.8± 2.1*
ＡＣＴＨ (pg/ml)	17.4±10.7	25.7±9.0*	28.0±13.8*

Mean±S.D.　N=54　*p<0.001

138 ラット脳内ノルアドレナリン代謝に及ぼす短時間拘束と持続拘束ストレスの影響の差

権藤雄二，津田　彰，井田能成，末吉圭子，
小口雅申，田中正敏　（久留米大・医・薬理）

〔要約〕

拘束ストレスによって生じるラット脳内noradrenaline(NA)代謝の変化に対して、ストレスを負荷した初期段階の影響が重要な意味をもつのかどうかについて、10分間の短時間拘束ストレス負荷後(ストレスより解放0、20、40、60分後)に起こる脳内NA代謝の経時的変化と70分間持続拘束ストレスによって生じる脳内NA代謝の変化とを、NAの主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO_4)含量を定量することによって検討した。70分間の持続ストレスにより、MHPG-SO_4含量は視床下部や扁桃核など検討した6部位で有意に増加した。一方10分間の短時間拘束ストレスの場合には、ストレス解放直後より20分後にかけて、70分間持続ストレス状況とほぼ同程度のMHPG-SO_4含量の増加が得られた。10分間の短時間でストレスから解放しても、70分間の持続ストレス状況と同程度の脳内NA代謝回転亢進が生じることより、ストレス初期の影響が生体の一連のストレス反応の発現を決定する上で重要な意味を持つと思われる。

【 目的 】

拘束や電撃などのストレスをラットに一定時間(30分から1時間以上)負荷すると、脳内の広範な部位でnoradrenaline(NA)代謝回転の亢進が生じることを既に報告した(2,5,8)。しかしながら、そのような脳内変化を引き起こす持続的ストレス状況であっても、ストレス開始直後の影響は生体に対して、その後のストレス反応の発現を決定する上でとくに重要な意味を持つと考えられる(7)。そこで今回、ストレス負荷初期の脳内NA代謝回転亢進に及ぼす影響の意味を明らかにするために、70分間の持続拘束ストレスと10分間の短時間ストレス負荷後に生じるラット脳内各部位のNA代謝の差異について検討した。

【 方法 】

Wistar系雄性ラット(210-240g)48匹を対象とし、1群8匹とした。ストレスとしては、金網による拘束を負荷した(6)。ラットを無作為に次のいずれかの条件に割り当てた：①無処置コントロール群；②70分間の持続拘束ストレス負荷後に断頭する群；③10分間の短時間拘束ストレス負荷後に断頭する群；④～⑥10分間の短時間拘束ストレス後ホームケージに戻し、ストレスより解放20分後、40分後および60分後に断頭する群である。各操作終了後、断頭時に採血するとともに、脳を摘出し、氷上にてGispenらの方法(1)に従って視床下部、扁桃核、視床、海馬、大脳皮質に、またReis & Rossの方法(1)により青斑核部に分割し、測定まで-85℃で保存した。これら脳部位について、NAのラット脳における主要代謝産物、3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO_4)含量をKohnoらの方法(3)によって、また血液は血漿に分離後、van der Vies変法(9)によってcorticosterone含量を蛍光法で測定した。

【 結果と考察 】

Fig.1に示すように、コントロール群と比較したとき、70分間の持続拘束ストレスは検討したすべての部位でMHPG-SO_4含量を有意に増加させた。また10分間の短時間拘束ストレスによっても、ストレスから解放後20分後には、70分間の持続拘束ストレスを負荷したときと同程度のMHPG-SO_4含量の上昇を認め

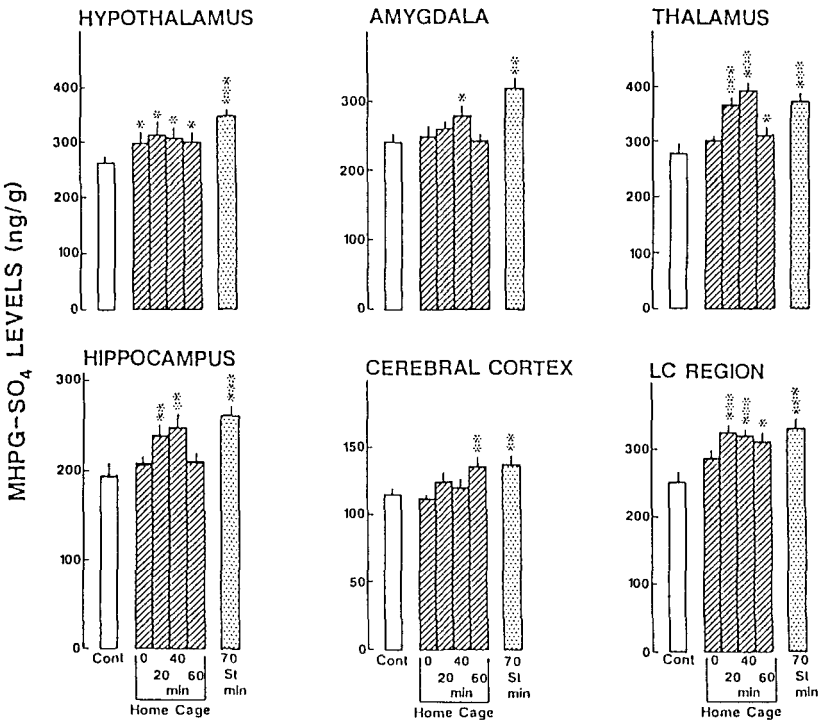


FIGURE 1. Levels of MHPG-SO4 in various brain regions of rats exposed to a 10-min restraint stress followed by either 0, 20, 40 or 60 min of post-stress delay, as well as a 70-min continuously stress. Each value indicates the mean (±S.E.M.) of 8 rats. (□), control; (▨), 10-min stress + home-cage; (▩), 70-min stress. Differs significantly from control group (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

た。すなわちMHPG-SO_4含量の有意な増加は、視床下部ではストレス解放直後より解放60分後まで(増加のピークは20分後)、青斑核部と視床ではストレス解放20～60分後まで、海馬ではストレス解放20分後から40分後まで、扁桃核ではストレス解放40分後にのみ、大脳皮質ではストレス解放60分後にのみ起こった。短時間の拘束ストレスより解放後のこのようなMHPG-SO_4含量の増加は、扁桃核と海馬では解放60分後にはコントロール群の値まで回復した。血漿コルチコステロン含量は70分間の持続拘束ストレスによって著明に増加したが(mean±SE＝119.2±9.7μg/dl)、10分間の短時間拘束ストレスによっても解放直後(51.7±5.5)より40分後(58.6±8.3)にかけて有意に増加し、60分後(15.3±4.8)には定常の水準に戻った。本実験の結果は、10分間の短時間拘束ストレス負荷によっても、70分間の持続的な拘束ストレスを負荷したときと同程度のNA代謝回転の亢進が脳内の多くの部位で生じること、またそのようなNA代謝の経時的変化には部位差があることなどを明らかにした。これらの知見は、naloxoneのNA放出亢進の増強作用が拘束ストレス負荷直前ないし5分前に投与したときに限ってのみ認められることより、ストレスによって惹起される脳内変化をトリガーする機構の存在を示唆したTanakaら(7)の最近の報告を追認するとともに、70分間の持続拘束ストレスによる脳内NA代謝回転の著明な亢進の発現に、ストレス開始時の初期10分間の影響が関与していることをさらに強調した。以上のことより、ストレス負荷の初期段階の影響が生体の一連のストレス反応を起こす上で重要な意味を持つものと思われる。

【 文献 】

(1) Gispen WH., et al. 1972 Neuroendocrinelogy, 9:285-296. (2) Ida Y, et al. 1985 Life Sci, 37:2491-2498. (3) Kohno Y, et al. 1979 Anal Biochem, 97:352-358. (4) Reis DJ & Ross RA 1973 Brain Res, 57:307-326. (5) Tanaka M, et al. 1982 Pharmacol Biochem Behav, 16:315-319. (6) Tanaka M, et al. 1983 Brain Res, 275:105-115. (7) Tanaka M, et al. 1988 Pharmacol Biochem Behav, 29:613-616. (8) Tsuda A & Tanaka M 1985 Behav Neurosci, 99:802-817. (9) Van der Vies J 1961 Endocrinology, 38:399-406.

139 恐怖条件づけによる脳内カテコールアミンニューロンの活動性亢進とdiazepamの抑制作用

井田能成、津田　彰、末吉圭子、権藤雄二、
田中正敏　（久留米大学・医・薬理）

〔要約〕
恐怖条件づけ(一度foot-shockストレスを受けた環境に24時間後に再び置く)により、ラットの視床下部、扁桃核、青斑核部のnoradrenalineの主要代謝産物3-methoxy-4-hydroxypenylglycol sulfate含量、前頭前皮質のdopamineの主要代謝産物3,4-dihydroxyphenylacetic acid含量および血漿コルチコステロン含量が増加した。それら含量の増加はbenzodiazepine(BZD)系抗不安薬diazepam(2 or 5 mg/kg)により抑制され、その抑制作用はBZD受容体拮抗薬Ro 15-1788(15 mg/kg)により拮抗された。以上の結果より、恐怖条件づけによる部位選択的な脳内catecholamineニューロンの活動性亢進は、脳内BZD受容体を介してdiazepamにより抑制されることから不快な情動変化(不安や恐怖)の発現に関係し、その活動性亢進を抑制することがBZD系薬物の抗不安作用発現の一つの神経機序である可能性が示唆された。

各種ストレス状況下における脳内catecholamine(CA)ニューロンの活動性亢進がbenzodiazepine(BZD)系抗不安薬により部位選択的に抑制されることは、脳内CAニューロンが不快な情動変化(不安や恐怖)の発現に関与するという仮説を支持している(2,6,7,8)。しかしながら、従来の報告では拘束ストレスやfoot-shockストレスなど身体的要因が関与するストレス法を用いており、抗不安作用以外の薬理作用がストレスの身体的要因に影響し、生体側の反応を変化させた可能性も否定できなかった。一方、恐怖条件づけ(一度foot-shockストレスを受けた環境に再び置く)は、心理的要因のみの関与により脳内で部位選択的なNAニューロン(視床下部、扁桃核、青斑核部のみ)およびDAニューロン(前頭前皮質内側部のみ)の活動性亢進を引き起こすことが報告されている(1,2,9)。そこで今回は、恐怖条件づけによる脳内CAニューロンの活動性亢進を、代表的BZD系抗不安薬であるdiazepamが抑制しうるかどうか、またdiazepamの作用がBZD受容体の拮抗薬であるRo 15-1788で拮抗されうるかどうかについて検討した。

【方法】
体重170-190gのWistar系雄性ラットを対象とした。diazepamおよびRo 15-1788は、vehicle(0.3% CMC)に懸濁して腹腔内に投与した。25の区画(18×19×53 cm)に仕切られ、床面がステンレス格子のboxをfoot-shockストレスを負荷する装置として使用した。実験1では、対照群と4つのshock群の計5群に分け、shock群のラットに1時間のfoot-shock(5.0 mA, 5-sec on, 30 sec-off)を加え、対照群はboxに1時間入れるのみでfoot-shockは加えなかった。24時間後、Ro 15-1788(15 mg/kg)もしくはvehicleをboxに入れる10分前に、diazepam(2 or 5 mg/kg)もしくはvehicleをboxに入れる直前に投与し、すべてのラットをboxに1時間入れた後に取り出し直ちに断頭した。断頭時に採血するとともに、脳を摘出し、視床下部、扁桃核、青斑核部に分割した。実験2では、ストレスによる前頭前皮質のDOPAC含量の増加は一過性であるため(4)、boxに入れる時間を40分にして実験1と同様の操作を行い、前頭前皮質(内側部)を摘出した。NAの主要代謝産物3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol sulfate(MHPG-SO_4)含量は蛍光法(5)で、DAの主要代謝産物3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)含量はHPLC-ECD(7)で、血液は血漿に分離後コ

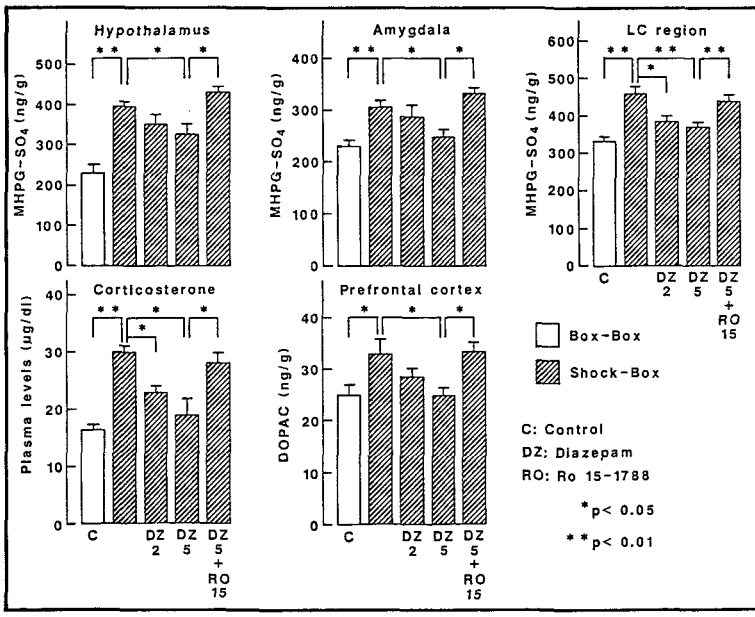


Fig. 1. Effect of diazepam and/or Ro 15-1788 on changes in MHPG-SO_4 and DOPAC levels in brain regions and in plasma corticosterone level of rats by conditioned fear. Each value indicates the mean ± S.E.M. of 6-8 rats. Ro 15-1788 (15 mg/kg) and diazepam (2 or 5 mg/kg) were i.p. treated 10 min and immediately before exposure to conditioned fear. The horizontal bar indicates the statistical significance between the two groups.

ルチコステロン含量を蛍光法(10)で定量した。統計的解析は、Student's t-test(two-tailed)を用いた。

【結果と考察】

実験1と2の結果をFig 1に示す。ラットを一度foot-shockストレスを受けた環境に再び置くことにより、実験1では視床下部、扁桃核、青斑核部のMHPG-SO_4含量および血漿コルチコステロン含量が、実験2では前頭前皮質のDOPAC含量の増加がみられた。これらの含量の増加はdiazepamの投与により、青斑核部のMHPG-SO_4含量と血漿コルチコステロン含量は2 mg/kgの用量から、視床下部と扁桃核のMHPG-SO_4含量および前頭前皮質のDOPAC含量は5 mg/kgの用量で有意に抑制された。diazepam(5 mg/kg)の抑制作用はRo 15-1788 (15 mg/kg)の併用投与により有意に拮抗された。

一度foot-shockストレスを受けた環境に戻すことにより視床下部，扁桃核、青斑核部のMHPG-SO_4含量、前頭前皮質のDOPAC含量、血漿コルチコステロン含量が増加したことは従来の報告(1,2,9)と一致する。このことから、身体的要因をほとんど含まず心理的的要因のみが関与するストレス状況である恐怖条件づけにより、視床下部、扁桃核、青斑核部のNAニューロンおよび前頭前皮質のDAニューロンの活動性が亢進すると考えられる。これらCAニューロンの活動性亢進はdiazepamで抑制され、その抑制作用はBZD受容体拮抗薬のRo 15-1788で拮抗されたことから、diazepamの作用は脳内BZD受容体を介したものであり、特に抗不安作用と関係する可能性が示唆された。以上の結果より、恐怖条件づけによりみられる部位選択的な脳内CAニューロンの活動性亢進が不快な情動変化(不安や恐怖)の発現に関係しており、その活動性亢進を抑制することがBZD系薬物の抗不安作用発現の一つの神経機序である可能性が示唆された。

【文献】

(1) Deutch. A.Y., et al.(1985) Pharmacol. Biochem. Behav. 24, 115. (2) Herman, J.P., et al. (1982) Life Sci. 30, 2207. (3) Ida, Y., et al. (1985) Life Sci.37, 2491. (4) 井田能成, 他 (1987) 神経化学, 30, 196. (5) Kohno, Y., et al. (1979) Anal. Biochem. 97: 352. (6) Lavielle, et al.(1978) Brain Res. 168, 585. (7) Reinhard, J.F., (1982) Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 318, 374. (8) 田中正敏, 他 (1985) 神経化学, 28, 121. (9) Tsuda, A., et al. (1986) Pharmacol. Biochem. Behav. 24, 115. (10) Van der Vies, (1961) Acta endocr. 38: 399.

140　抗うつ薬のラット大脳皮質プロテインキナーゼA およびプロテインキナーゼC活性

長田賢一　朝倉幹雄　塚本　徹　柴田牧子　今福　淳
窪田　博　西崎　純　佐藤厚子　中西純一　長谷川和夫
(聖マリアンナ医大・神経精神)

〔要約〕

三環系抗うつ薬および非定型抗うつ薬慢性投与後のラット大脳皮質膜標品(P_2)ならびに細胞質成分(S_2)のプロテインキナーゼA(PK-A)およびプロテインキナーゼC(PK-C)活性を測定した．Desipramine(DMI) 20 mg/kg 7日間皮下投与後P_2画分のPK-A活性は有意に減少したが，mianserin(MIA) 30 mg/kg 7日後は有意な変化を認めなかった．DMI，MIA 7日間処置のS_2画分でdioleinによる用量依存曲線は対照群と変化を認めない．一方，DMI 20 mg/kg，clomipramine(CMI) 20 mg/kgを14日間皮下投与したラット大脳皮質のS_2画分をDEAE-cellulose columnから0～0.4 M NaCl濃度勾配により溶出した各フラクションのPK-C活性は対照群と大きな変化は見られなかった．P_2画分に対する[^{3}H]phorbol 12,13-dibutyrate(PDBu)結合特性は DMIおよびCMI 14日間投与後のBmaxとKdには有意な変化を見なかった．

〔はじめに〕

抗うつ薬の作用機構はまだ解明されていない．近年は抗うつ薬慢性投与後の後シナプス受容体や情報伝達系の生化学的変化に焦点が当てられるようになった．三環系抗うつ薬慢性投与後のcAMP調節系（β受容体減少とアデニル酸シクラーゼ活性）の“down-regulation”や脱感作が知られ，また5-HT系では5-HT_2受容体減少や5-HTに対するイノシトールリン脂質代謝回転の低下などが知られている．一般に形質膜ではcAMP情報伝達系とイノシトールリン脂質代謝系の少なくとも２つの情報伝達系により調節されており，前者はcAMP依存性プロテインキナーゼ(PK-A)が活性化される．後者ではinositol triphosphate(IP_3)とdiacylglycerolがセカンドメッセンジャーとしてそれぞれ細胞内のCa^{2+}動員とCa^{2+}リン脂質依存性プロテインキナーゼ(PK-C)の活性化に働く．最終的な細胞応答はこれらのプロテインキナーゼによる特異的蛋白質のリン酸化反応によって制御されている．現在，抗うつ薬投与後の各種のプロテインキナーゼ活性についてはまだ多くの報告を見ない．本報告では三環系抗うつ薬および非定型抗うつ薬慢性投与後のラット大脳皮質膜標品(P_2)ならびに細胞質成分(S_2)のPK-AおよびPK-C活性を測定した．同時に[^{3}H]PDBu結合実験を行いPK-C活性と比較検討した．

〔方法〕

１．動物・薬物処置と膜標品の作製：Wistar系雄性ラット(180～250 g)を用いた．Desipramine(DMI)20 mg/kg/day，mianserin(MIA)30 mg/kg/day，clomipramine(CMI)20 mg/kg/dayをラット背部皮下に埋込んだ浸透圧ポンプ(2ML1)により持続投与し7～14日後に屠殺した．大脳皮質を分割し，20 mM Tris·HCl 0.32 M sucrose buffer pH 7.5(50 μM leupeptin，10 mM EGTA存在または非存在) 中でホモジナイズし1,000 g 10分間遠心分離しS_2とP_2画分を得た．

２．プロテインキナーゼ活性の測定：(a)プロテインキナーゼA活性はCorbinとReimannの方法(2)に準じた．HistoneⅡ-Aを基質として[γ-^{32}P]ATP，50 mM リン酸buffer(15 mM $MgCl_2$,100 mM NaF)にて30°C 10分間インキュベート後Whatman 3MM filterにｽﾎﾟｯﾄし洗浄乾燥後filterを測定した．1 mg/ml H-8存在と非存在との差を活性値とした．(b)プロテインキナーゼC活性は，Castagnaらの方法(1)により，histoneⅢ-Sを基質として[γ-^{32}P]ATP，20 mM Tris·HCl buffer(0.04 mM PMSF，0.5 mM Mg-acetate，0.1 mM $CaCl_2$，40 μg/ml Phosphatidylserine，8 μg/ml diolein)にて30°C 4分間インキュベートし，25 % trichloracetic acid(TCA)で反応停止後Toyo-Roshi membrane filter(pore size 0.45 μm)に吸引濾過しfilterを 5 % TCAで洗浄乾燥後測定した．

Fig.1.

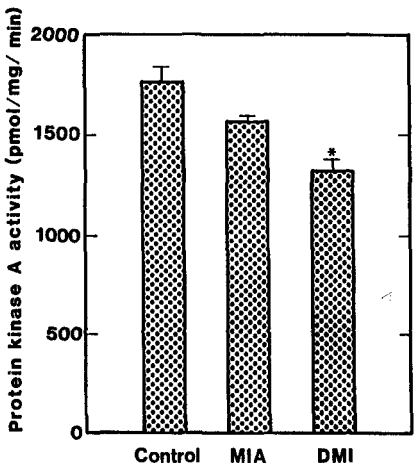


Fig.2.

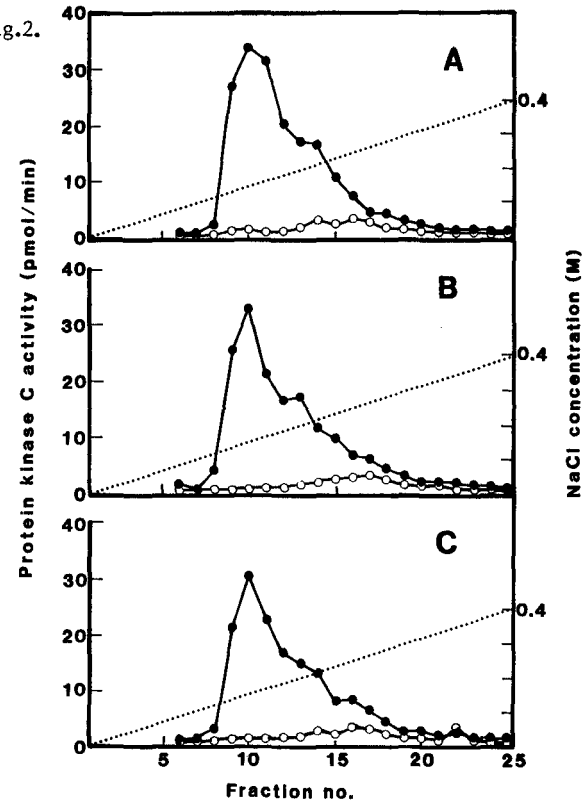


Fig.1. The PK-A activity of the particulate fraction of Control, MIA15mg/kg/day, DMI 10mg /kg/day for 7 days.
Fig.2. DEAEcolumn chromatography of cytosolic PK-C. Saline(A), DMI(B) or CMI(C) by osmotic pumps. PK-C activity with Ca^{2+}-phosphlipid and diolein(●), with EGTA(○). NaCl conc.(---).

3．[^{3}H]PDBu結合実験：1% Triton X-100で可溶化した膜標品(0.1～0.2mg protein)を1.0～32 nMの[^{3}H]PDBu(S.A.12.4Ci/mmol)を25mM Tris HCl·buffer pH 7.5 25°C中で，90分間インキュベート後，0.3% polyethyleneimineで1時間前処置したWhatman GF/B上に吸引濾過し反応を停止した．フィルター上のβ線はキシレンシンチレーター中で測定した．3 μM 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)存在下の結合を非特異的結合とし全結合との差を特異的結合とした．

〔結果と考察〕

DMI 20 mg/kg 7日間投与後 P_2画分のPK-A活性は有意に減少し，MIA 30 mg/kg 7日後では減少傾向を認めた(Fig. 1)．DMI,MIA 7日間投与後のS_2画分では，PK-C活性のdioleinによる用量依存曲線は対照群と変化を認めない．PK-A活性の低下の機序は現時点では明らかではないが，活性調節領域の変化等示唆され，cAMPの用量依存曲線等について検討している．一方，DMI 20 mg/kg，CMI 20 mg/kgを14日間皮下投与したS_2画分を，DEAE-cellulose columnを用い0-0.4 M NaCl濃度勾配をかけて溶出した各フラクションのPK-C活性は対照群と大きな変化は見られなかった(Fig. 2)．[^{3}H]PDBuの飽和結合実験より，DMI，CMI投与14日後の1% Triton X-100で可溶化したP_2画分に対する[^{3}H]PDBuの結合特性は対照群と有意な変化を認めなかった．本実験結果からDMI，CMI，MIA慢性投与後の大脳皮質S_2画分のPK-C活性は変化しない．しかし脳組織をホモジナイズする際のbuffer中のEGTA(またはCa^{2+})の濃度やprotease inhibitors，glycerolの効果を含めて検討を要する点も多いので現在検討中である．

本研究は昭和63年度文部省科学研究，昭和63年度厚生省神経精神疾患委託研究，昭和63年度私学学術研究助成金，昭和63年度持田記念研究助成金の援助を受けている

〔文献〕

(1) Castagna M. Takai.Y. Kaibuti.K. et al.1982,J.Biol.Chem., 257. 7847.

(2) Corbin J.D. and E.M. Reimann,1974, Assay of cyclic AMP dependent protein kinase, Meth.Enzymol.38.287.

141　脳 mRNA 移入卵母細胞のセロトニン電流応答に対する抗うつ薬とくにイミプラミンの抑制効果

東田道久、高須俊行、野村靖幸
（北大、薬、薬効）

〔要約〕

ラット脳 mRNA を移入したアフリカツメガエル卵母細胞に対しセロトニン（5-HT）は、内向き電流応答を引き起こした。本 5-HT 応答は 0.1μM mianserin（5-HT_{1c} 受容体拮抗薬）により完全に遮断された。imipramine, ならびに desipramine は、濃度依存的に 5-HT 電流応答を抑制した（IC_{50} は imipramine 56.2 nM, desipramine 14.1μM）。desiptiline, maprotiline, amoxapine も 各々 10μM において抑制した。1 mM アセチルコリンの灌流適用、50 pmol IP_3 または 50 pmol Ca^{2+} の細胞内注入により生ずる内向き電流応答に対し、imipramine は全く影響を及ぼさなかった。以上より、imipramine は、5-HT_{1c} 受容体に拮抗薬として作用し、5-HT 電流応答を抑制することが示唆された。

［緒言］

ラット脳 mRNA 移入によりアフリカツメガエル卵母細胞に発現するセロトニン(5-HT)受容体(1)を活性化すると、ポリフォスフォイノシチド(PI)代謝促進、イノシトール三リン酸(IP_3)産生、細胞内 Ca^{2+} 上昇、Cl^-チャネル開口を引き起こし、内向き電流を導く(2)。抗うつ薬である mianserin は、5-HT 電流応答を抑制するが、これは 5-HT_{1c} 受容体を遮断することによると示唆されている(3)。今回、この卵母細胞に発現する 5-HT 受容体サブタイプの同定と、抗うつ薬の5-HT 誘発電流に対する効果、ならびにその機序を明らかにする目的で以下の検討を行なった。

［実験方法］

mRNA の調製：ラット全脳から guanidium/hot phenol 法により total RNA を抽出、oligo dT cellulose カラムにより poly(A)$^+$ mRNA を精製した。卵母細胞の調製：卵母細胞をコラゲナーゼ処理、直径 1 mm 以上のものを使用した。mRNA の微量注入：先端開口直径 10～50μm のシリコン処理微小ガラス管により 50 ng 注入した。膜電流測定：23℃でmRNA 注入後 20～40 時間 incubate した細胞をチャンバーに入れ、膜電位を -60 mV に固定し、膜電流を測定した。セロトニン、アセチルコリンおよび抗うつ薬は灌流適用し、IP_3 および Ca^{2+} は、細胞内に注入した。

［結果と考察］

mRNA 注入卵母細胞は 1μM 5-HT により一過性の内向き電流と、それに続くゆらぎを共なった内向き電流応答を示した。5-HT 投与後 10 分間洗浄し、5-HT を再添加すると、1回目とほぼ同様の電流応答を示したが、ピーク電流は1回目のそれの 53.1±6.1 (n=12) %に低下した。種々の 5-HT 受容体作用薬を 5 分間処置し、5-HT 電流応答への影響を検討した。0.1μM mianserin（5-HT_{1c} お

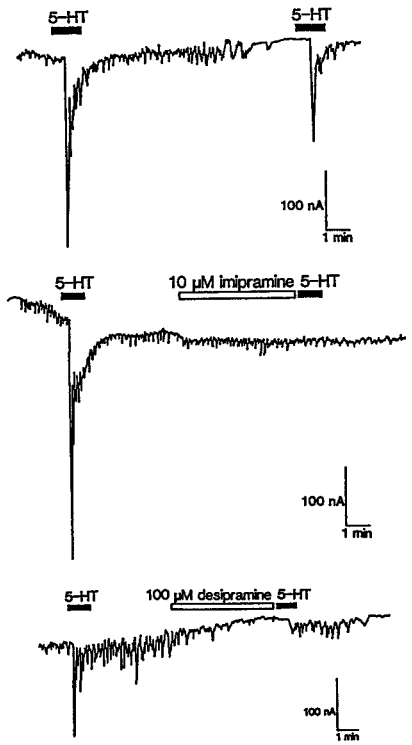


Fig. 1. Effects imipramine or desipramine on 5-HT-induced Cl^- current response.

および 5-HT_2 受容体拮抗薬）はほぼ完全に抑制したが、8OH-DPAT（5-HT_{1A}受容体拮抗薬）、buspirone（5-HT_{1A} 受容体作用薬）、spiperone（5-HT_{1A} および 5-HT_2 受容体拮抗薬）、TFMPP（5-HT_{1B} 受容体作用薬）、ICS 205-930（5-HT_3 受容体拮抗薬）はいずれも 10μM において、単独で、および 5-HT 誘発電流に何ら影響を及ぼさなかった。以上により、5-HT 電流応答は 5-HT_{1C} 受容体を介して生ずることが示唆された。同様の方法により、抗うつ薬、10μM imipramine, 100μM desipramine, 10μM desiptiline, 10μM maprotiline, 10μM amoxapine の効果を検討したところ、いずれも 5-HT 電流応答を抑制した(Fig.1)。imipramine と desipramine の 5-HT 電流に対する IC_{50} 値を濃度-抑制曲線（Fig.2）より算出したところ、imipramine (56.2 nM) の方が desipramine (14.1μM) より約300 倍効力が強いことが認められた。次に抗うつ薬の 5-HT 電流抑制作用機序を検討する目的で、imipramine の作用を検討した。まず 5-HT と同様の内向き電流応答を引き起こす 1 mM アセチルコリン(4)の作用に対し imipramine はまったく影響を及ぼさなかった（Fig.3)。また、5-HT 電流応答には IP_3 およびそれによって放出される細胞内遊離型 Ca^{2+} が関与していることが示されているので(2)、50 pmol IP_3 および 50 pmol Ca^{2+} の細胞内注入により生ずる内向き電流に及ぼす imipramine の効果を検討したが、何ら影響を及ぼさなかった（Fig.3)。したがって、imipramine は 5-HT_{1C} 受容体に作用して、電流応答を抑制することが示唆された。imipramine は神経終末部への 5-HT 取り込みを抑制することが広く知られている。今回、imipramine が5-HT_{1C} 受容体拮抗薬の性質を有する事が明らかとなった。このことが本薬物の 5-HT 取り込み抑制効果、さらに抗うつ効果とどの様に関連するかなどに興味がもたれる。

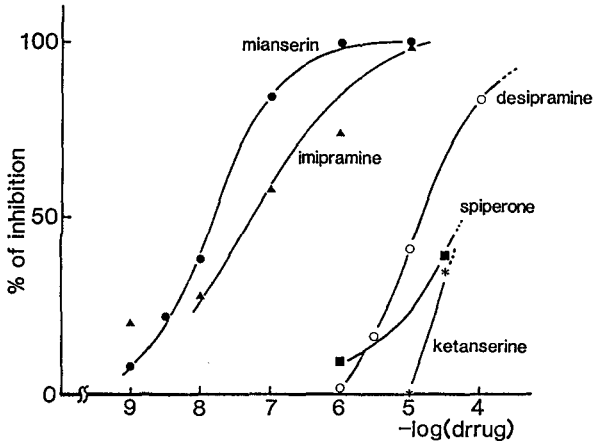


Fig. 2. Inhibitory effects of antidepressants on 5-HT-induced current response.

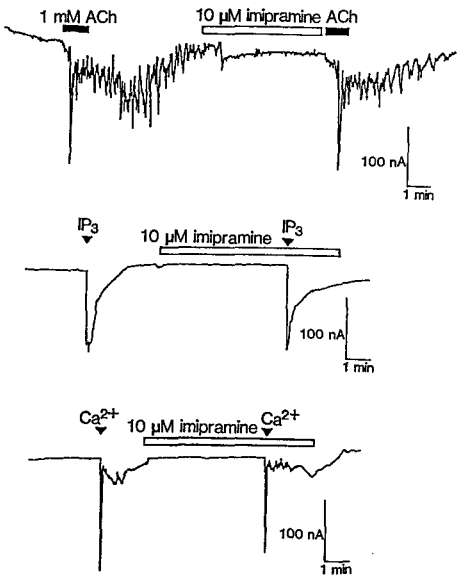


Fig. 3. Effects of imipramine on acetylcholine-, IP_3- or Ca^{2+}-induced current response.

［参考文献］

(1) Snutch, T.P. (1988) TINS 11, 250-255

(2) Nomura, Y., Kaneko, S., Kato, K., Yamagishi, S. and Sugiyama, H. (1987) Mol. Brain Res. 2, 113-123.

(3) Lubbert, H., Snutch, T.P., Dascal, N., Lester, H.A. and Davidson, N. (1987) J. Neurosci. 7, 1159-1165

(4) Hirono, C., Ito, I. and Sugiyama, H. (1987) J. Physiol. 382, 523-535.

142 海馬キンドリングにおけ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の変化ーその長期持続性の検討ー

山田了士、秋山一文、大源明宏、西川浩、氏家寛、森分隆、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〕

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長期持続性に亢進しており、さらに海馬キンドリングラットの最終刺激から２４時間後及び５日後において、海馬と扁桃核スライスで同様の変化が見いだされたことを報告した。今回の実験では、海馬キンドリング完成ラットでのイノシトールリン脂質代謝回転の変化が長期持続性であるか否かを検討した。海馬キンドリング完成ラットの最終刺激から１５日後では、海馬及び扁桃核スライスにおいてイボテン酸添加時の[^{3}H]*inositol*-1-phosphate ([^{3}H]IP$_1$) の蓄積が対照を有意に上回っていた。最終刺激から３０日後では、海馬スライスでは有意な変化がみられなかったが、扁桃核スライスでは [^{3}H]IP$_1$蓄積が有意に増加していた。

（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260-290g)を用いて、左側背側海馬に慢性深部電極を挿入した。キンドリング刺激条件は200-300μA, 60Hzの正弦波を１秒間、１日２回で行った。運動発作症状はRacine(9)の分類に従い、stage 4の全身痙攣に至った段階で刺激を１日１回とし、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。キンドリング完成ラットは最終刺激から１５日及び３０日後にそれぞれ断頭し、イノシトールリン脂質代謝回転の実験に供した。各々の群には対照群を設け、これには深部電極の挿入のみを行った。

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、速やかに氷上で切り出した海馬及び扁桃核を 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既報に準拠して、LiCl 存在下にイボテン酸またはbufferを添加し、[^{3}H]IP$_1$を溶出して放射活性を測定した。[^{3}H]IP$_1$蓄積値は fmoles/mg protein によって表示し、統計学的解析は one way ANOVA に従った。

（結果）

海馬キンドリング完成ラットにおけるイノシトールリン脂質代謝回転の結果を Fig. 1,2 に示す。海馬スライスでは、最終刺激から１５日後で、イボテン酸 10^{-4}M, 3×10^{-4}M, 10^{-3}M 各添加時の [^{3}H]IP$_1$ 蓄積値が有意に増加していた。３０日後では [^{3}H]IP$_1$ 蓄積値は増加している傾向が示唆されたが、統計学的な有意差は認められなかった。一方、扁桃核スライスでは、最終刺激から１５日後、３０日後の両時点で [^{3}H]IP$_1$ 蓄積値はそれぞれの対照を、86% ($p<0.05$), 90% ($p<0.05$) 有意に上回っていた。

（考察）

近年、N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体を含む興奮性アミノ酸 (EAA)受容体が、キンドリング現象をはじめとする慢性てんかん源性の獲得に強く関与している可能性が示唆されている。今回我々は、これまでの報告に続いて海馬キンドリング完成ラットでグルタミン酸の構造類似体であるイボテン酸によるイノシトールリン脂質代謝回転が長期持続性に亢進していることを示した。 その変化は扁桃核スライスにおいて、より長期持続性であり、３０日後まで続いた。海馬では有意な変化が認められたのは１５日後までであった。これは、扁桃核キンドリングに

おける成績(1、2、4)と傾向を同一にしており、一次刺激部位に拘わらず、扁桃核でイノシトールリン脂質代謝回転の亢進が長期持続性に存在することが示唆された。これまでの電気生理学的研究では、海馬キンドリングでは扁桃核に強い”転移現象”がおきること、扁桃核は発作伝播過程での重要なリレーポイントであること(6)、一次刺激部位に拘わらず扁桃核が最もてんかん源性刺激に敏感であること(5)、そして扁桃核において、長期持続的な細胞興奮性の亢進が見られること(7、8)が示されており、我々の成績はこうした知見の生化学的側面を示唆している可能性が考えられる。

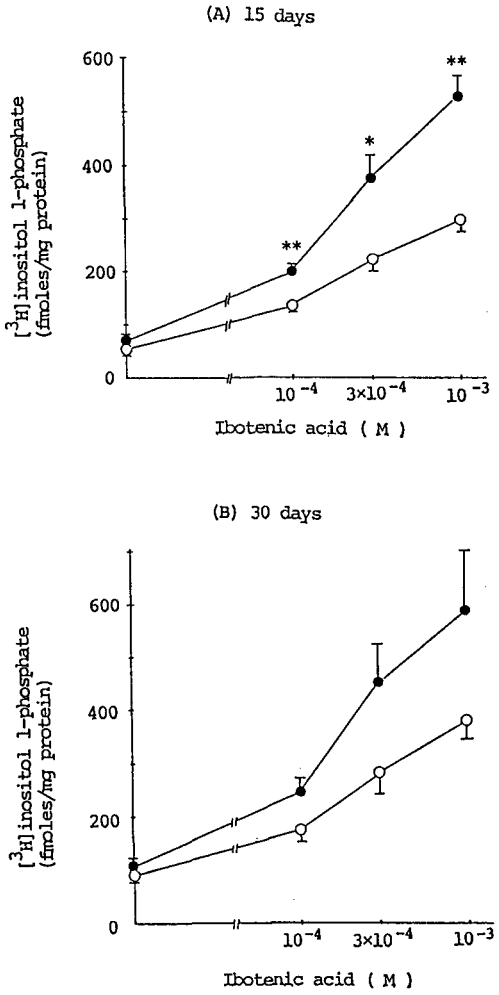


Fig. 1 Ibotenate-stimulated [^{3}H]IP$_1$ accumulation in the hippocampus.
* p<0.05, ** p<0.01 as compared to control.
○ : control, ● : kindled.

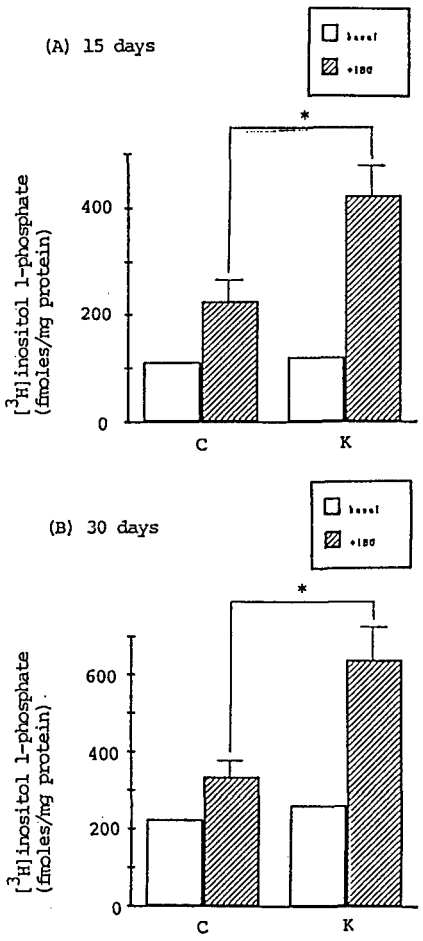


Fig. 2 Ibotenate-stimulated [^{3}H]IP$_1$ accumulation in the amygdala.
*p<0.05 as compared to control.
C : control, K : kindled.

（文献）
(1) Akiyama, K. et al. (1987) Exp. Neurol., 98, 499-508. (2) Akiyama, K. et al. Brain Res., submitted. (3) Berridge, M.J. et al. (1982) Biochem. J., 206, 587-595. (4) Iadalora, M.J. et al. (1986) Brain Res., 322, 101-110. (5) Kairiss, E.W. et al. (1984) Brain Res., 374, 174-178. (6) Lothman, E.W. et al. (1985) Brain Res. 360, 92-100. (7) McIntyre, D.C. et al. (1986) J. Nrurophysiol., 55, 1295-1307. (8) Morimoto, K. et al. (1987) Exp. Neurol., 97, 1-16. (9) Racine, R. (1972) Electroenceph. Clin. Neurophysiol., 32, 281-294. (10)山田了士 他 (1987) 神経化学 27、172-174.

143 悪性症候群の病態と治療に関する実験的研究（第２報）—病態モデル動物の作成—

小山　司、松原良次、井上　猛、中山　誠、
小田垣雄二、山下　格
（北海道大学医学部・精神医学教室）

〔要約〕

抗精神病薬投与中に出現する悪性症候群の病態モデルを作成する目的で、高体温、筋硬直、血清ＣＰＫ値などを指標とし、Sprague-Dawley、Wistar-King、Fawn-Hooded の各系ラットにおいて、tryptophanとpargyline併用によるセロトニン機能増強の影響を検討した。その結果、Fawn-Hooded ラットにおいて、症候学的、血液生化学的に、さらに治療薬であるdantroleneに対する反応においても、悪性症候群と極めて類似した事象を見出した。すなわちpargyline、50mg/kg投与後、tryptophan、100mg/kg以上投与により筋硬直と最高42℃にまで達する発熱反応を呈し、投与後12時間の経過でほぼ100%の致死率を認めた。その際、血清ＣＰＫ値は異常高値を示し、ＣＰＫアイソザイム分析結果から、その大部分が筋肉由来であることが確認された。またhaloperidol decanoate 前処置、すなわち持続的なD$_2$受容体遮断はこの高熱反応を増強したが、治療薬であるdantrolene 前処置は高体温を抑止するとともに血清ＣＰＫ値の異常上昇も抑制した。

【はじめに】

抗精神病薬治療中に出現する悪性症候群（ＮＭＳ）は、発熱、筋硬直、意識障害および多彩な自律神経症状を特徴とするが、その成因および病態はいまだ不明のままである。発症要因として、これまでに抗精神病薬による中枢ドパミン(DA)機能の急激な遮断が重視されてきたが、それのみでＮＭＳの臨床的事実の全てを説明することは困難である。我々はこれまでのＮＭＳの自験例の検討から、抗精神病薬のみならず、治療時の精神的あるいは身体的状態および素因などの個体側の要因にも着目し、ＮＭＳの発症を薬物・個体相互反応の病態として理解することが妥当と考えてきた。

一方、最近の薬理学的知見から、視床下部体温中枢においてDA系は体温下降に、セロトニン(5-HT)系は体温上昇に関与することが明らかとなり、両者のバランスに基づいて体温調節機構のひとつが成立すると考えられている。したがってＮＭＳの主症状である高体温の発症機序として、抗精神病薬のD$_2$受容体遮断作用による両モノアミン系のバランスの乱れの結果と推定することが可能である。

今回、我々は前述した観点に基づいて、ラットの異なる系において、tryptophanとpargyline 併用による5-HT機能増強の影響を検討した結果、Fawn-Hooded ラットにおいて、症候学的にも、血液生化学的にも悪性症候群と極めて類似した事象を見出したので報告する。

【実験方法】

Sprague-Dawley、Wistar-King、Fawn-Hoodedの３系のラットにpargyline、50mg/kgとtryptophan、50－200mg/kgを腹腔内投与した後、経時的に直腸温を測定した。直腸温の測定は温度計のプローブを肛門より６cmの深さまで挿入して行った。血清ＣＰＫ値およびアイソザイム分析のための血液試料は、pentobarbital 麻酔下において開腹して下大静脈より採血した。 haloperidol decanoate、100mg/kgおよびdantrolene、20mg/kg 前処置は、pargyline、tryptophan投与の各々１週間前、30分前に行った。

【結果と考察】

（１） pargyline、tryptophan併用投与による体温の変化 (Fig 1)

pargyline、tryptophan 腹腔内投与後30分で、Fawn-Hooded ラットの直腸温は低下傾向を示したが、その後、tryptophan用量依存的に急激に上昇した。tryptophan、100mg/kg以上の投与量では、投与後２時間で42℃前後の発熱反応を呈し、同時に死亡ラットが続出し、投与後12時間の経過でほぼ100%の死亡率を確認した。その際、著明な

筋硬直を認め、ＥＭＧで筋肉の発射放電の頻度と振幅の異常増加を確認した。Sprague-Dawley系およびWistar-King系では発熱反応は軽微であり致死的結果に至らなかった。

（２） pargyline、tryptophan併用投与による発熱反応に及ぼすhaloperidol前処置の影響（Fig 2）

１週間前に行ったhaloperidol decanoate、100mg/kg前処置は、Fawn-Hoodedラットのpargyline、tryptophan併用投与による発熱反応において、tryptophanの用量反応曲線を左方へ移動させた。すなわちhaloperidolによるD$_2$受容体遮断は、この発熱反応を増強させることが明らかとなった。

（３） pargyline、tryptophan併用投与による血清ＣＰＫ値の変動（Fig 3）

Fawn-Hoodedラットの血清ＣＰＫ値は、pargylineとtryptophan、100mg/kg腹腔内投与90分後、3845.0±317.4mU/ml (n=6)であり、生食投与群 196.0±22.4mU/ml(n=6)と比較して異常高値を示した。さらにＣＰＫアイソザイム分析の結果、ＭＭ型が約94%であり、異常高値を示したＣＰＫの大部分が筋肉由来であることが明らかとなった。

（４） pargyline、tryptophan併用投与による発熱反応に及ぼすdantrolene前処置の影響（Fig 4）

ＮＭＳの治療薬であるdantorolene、20mg/kg前処置は、Fawn-Hoodedラットにおける pargyline、tryptophan併用投与による発熱反応を著明に抑制した。さらに投与後12時間の観察でも死亡ラットは出現せず、dantroleneは致死的結果をも完全に抑制した。また、血清ＣＰＫ値の上昇は1500mU/ml前後にとどまり、dantrolene は血清ＣＰＫ値の上昇も抑制することが明らかとなった。

以上の結果から、Fawn-Hoodedラットにおけるpargylineとtryptophan併用による5-HT機能増強の影響は、症候学的にも、血液生化学的にも、さらに治療薬であるdantroleneに対する反応でも、ＮＭＳと極めて類似した事象であることを示唆している。さらにこの現象はhaloperidol前処置によるD$_2$受容体遮断によって増強化されることから、ＮＭＳの病態モデルとして今後の神経化学的研究に資するものと思われる。

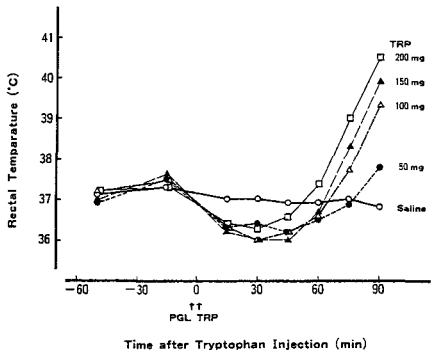


Fig.1. Effect of combined treatment of tryptophan(TRP) and pargyline(PGL) on rectal temparature in Fawn-Hooded rats

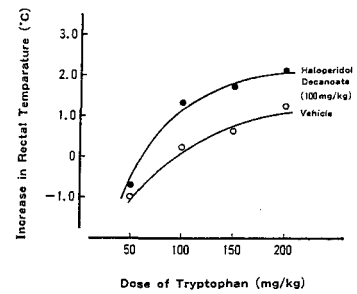


Fig.2. Effect of haloperidol pretreatment on hyperthermia by combined treatment of tryptophan and pargyline in Fawn-Hooded rats

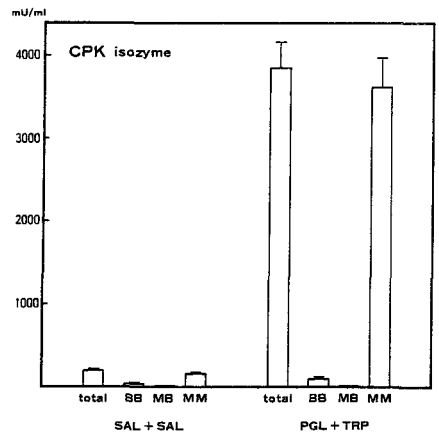


Fig.3. Effect of combined treatment of tryptophan(TRP) and pargyline(PGL) on serum CPK levels in Fawn-Hooded rats. Each bar represents mean±S.E.M.

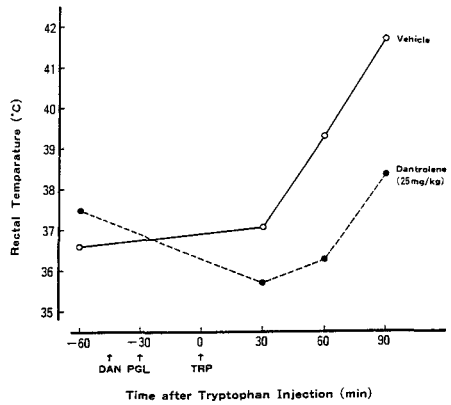


Fig.4. Effect of dantrolene(DAN) pretreatment on hyperthermia by combined treatment of tryptophan(TRP) and pargyline(PGL) in Fawn-Hooded rats

144 新生マウスに対する銅投与の効果

笠間　透、　田中　晴美

（国立精神神経センター・神経研究所　疾病研究第二部）

〔要約〕

新生雄マウスに対する銅投与が、組織内銅含有酵素活性、銅含量に及ぼす効果を検討した。対象組織は大脳、肝、腎とし、酵素はsuperoxide dismutase(SOD)とcytochrome oxidase(Cyto Oxi)を測定した。生後７、１０日に腹腔内投与を受けた生後１３日雄マウスでは、対照に比し、大脳、肝で両酵素活性が、大脳、肝、腎で銅含量が上昇した。妊娠後期（妊娠１３日より出産迄）及び授乳期（出産より産後１３日迄）の母体に対する経口銅投与では、新生仔の成長の障害、大脳、肝、腎でCyto Oxi活性の低下、銅含量の上昇がみられ、一方大脳のSOD活性は上昇した。妊娠後期のみの投与で、大脳では両酵素活性は低下したが銅含量は上昇し、肝は同じ傾向を示した。腎は大脳、肝と異なり、銅含量は上昇したが両酵素活性に著明な変化は認められなかった。妊娠後期母体経口銅投与と新生仔腹腔内銅投与の組合せは、新生仔の成長を障害することなく大脳での銅含有酵素活性と銅含量を上昇させることが示唆された。

Menkes' kinky hair病は銅代謝異常を原因とする伴性劣性遺伝性疾患で、銅の組織分布の異常、銅含有酵素活性の低下などが報告され、モデル動物としてマウスのmutantが存在する。いずれも大脳中銅含量、銅含有酵素活性は低下するが、ヒトでは有効な治療法はなく、マウスでは生後銅投与が有効とされる(1)。我々は母体を介した出生前治療の可能性に着目し、mutantと同系のC3H系正常マウスを用い、mutantに有効とされる新生仔腹腔内銅投与、並びに母体経口銅投与の新生仔に及ぼす効果を検討した。

【材料及び方法】

新生仔腹腔内投与は生後7、10日に銅として体重1gあたり5μgとなるように調整した酢酸銅の生理食塩水溶液50μlを腹腔内注射し(Cu群)、対照群には同量の生理食塩水を注射した(C群)。母体投与は、妊娠後期投与(妊娠13日より出産迄銅として6ppm）と授乳期投与（出産より生後13日迄5ppm）とし、硫酸銅溶液を飲料として与えた。Cu-Cu群(妊娠中及び授乳期)、Cu-TW群（妊娠中のみ）、TW-TW群（対照として水のみ）の三群とした。いずれも生後13日の新生仔雄を分析に供し、大脳、肝、腎の蛋白量、superoxide dismutase活性(SOD)(6)、cytochrome oxidase活性(Cyto Oxi)、銅、亜鉛含量を測定した(4)。母体に妊娠後期銅投与を行った生後24時間以内の新生仔の大脳、肝、腎の銅、亜鉛含量を測定した。

【結果】

新生仔腹腔内投与で、新生仔の発育に差はなく、13日の体重はCu群7.0±0.5(9) g（Mean±SD（匹数）、以下同じ)、C群7.0±0.8(10) gであった。Table.1に示したように、大脳、肝で両酵素活性と銅含量が、腎で蛋白量と銅含量がそれぞれ上昇し、組織による反応の違いが認められた。

Table.1: Effects of intraperitoneal copper injections on neonatal mice.

	Wet weight (mg)	Protein (mg/g wet wt.)	SOD (units/g wet wt.)	Cyto Oxi	Cu (μg/g wet wt.)	Zn
Cerebrum						
Cu	236.7±7.7(9)	121.5±2.5(8)	322.5±44.8(9)[a]	36.07±3.32(9)[a]	1.60±0.19(9)[a]	8.80±0.03(9)
C	236.5±10.7(10)	120.8±9.8(10)	243.2±54.3(10)	31.51±4.69(10)	1.27±0.12(10)	8.71±0.47(10)
Liver						
Cu	236.8±25.4(7)	216.7±18.2(7)	2645±370(7)[a]	171.3±26.4(7)[a]	93.08±2.75(6)[a]	34.54±3.75(7)[a]
C	243.7±51.5(10)	218.3±11.2(10)	1867±198(10)	130.8±25.9(10)	60.44±17.42(10)	23.70±2.94(10)
Kidney						
Cu	83.3±8.0(9)	159.4±6.5(9)[a]	642.7±58.9(9)	102.0±15.0(9)	2.75±0.27(9)[a]	15.89±1.04(9)
C	90.1±17.2(10)	147.4±8.7(10)	637.0±126.0(10)	90.69±11.05(10)	2.26±0.21(10)	16.92±1.99(10)

Values are Means±SD (numbers of neonatal mice).
a. significantly higher than C groups ($p<0.05$)

妊娠後期経口投与を受けた母体からの新生仔では、生後24時

間以内で体重（投与群:1.50±0.10(8)、対照群:1.52±0.05(6) g ）、組織湿重量ともに銅投与による差はなかった。一方、銅含量は大脳で上昇し（投与群:0.98±0.05(8)、対照群:0.81±0.07(6) μg/g組織湿重量）、肝は差がなく、腎は投与群の値がバラ付いたが上昇の傾向は認められた。

母体経口投与の結果はTable. 2に示した。Cu-Cu群の新生仔は他二群に比し体重（Cu-Cu:5.2±0,9(10)、Cu-TW:6.5±1.1(13)、TW-TW: 6.7±0.7(10) g）、肝、腎の組織湿重量が低く、授乳期投与が新生仔の成長を障害すると考えられた。SODは大脳でCu-Cu群がTW-TW群に比し上昇したが、Cu-TW群は低下し、Cu-Cu群の上昇は銅亜鉛含有SODの上昇によるものであった。肝ではCu-TW群、腎ではCu-Cu群が低かった。Cyto Oxiは大脳でCu-Cu群＜Cu-TW群＜TW-TW群の順に有意差がみられたが、肝、腎ではCu-Cu群のみが低値であった。銅含量は大脳、腎ではCu-Cu群とCu-TW群が、肝ではCu-Cu群のみが対照となるTW-TW群より高値を示した。

Table. 2: Effects of maternal copper administration on neonatal mice at 13-days of age.

	Wet weight	Protein	SOD			Cyto Oxi	Cu	Zn
			Total	Cu, Zn-	Mn-			
	(mg)	(mg/g wet wt.)	(units/gwet wt.)				(μg/g wet wt.)	
Cerebrum								
Cu-Cu	222.6±13.8[a,b] (10)	122.2±0.7 (6)	260.6±26.8[a,b] (6)	130.3±13.1[a,b] (6)	130.4±17.5[b] (6)	22.47±2.39[a,b] (6)	1.56±0.11[a] (6)	10.99±0.33 (6)
Cu-TW	237.0±5.1 (13)	122.7±2.5 (11)	175.1±16.6[a] (11)	88.1±12.5[a] (11)	87.0±8.9[a] (11)	41.08±6.15[a] (11)	1.54±0.05[a] (9)	11.36±0.54 (9)
TW-TW	233.1±5.5 (10)	121.7±4.3 (9)	230.2±13.3 (9)	109.4±12.0 (9)	120.8±5.6 (9)	60.49±6.84 (9)	1.31±0.11 (6)	11.59±1.44 (6)
Liver								
Cu-Cu	169.6±39.8[a,b] (10)	197.1±7.8[a,b] (6)	1816±163[a] (6)	1567±172[a] (6)	262.4±12.7[b] (6)	112.6±10.6[a,b] (6)	100.8±13.0[a,b] (6)	25.17±1.42 (6)
Cu-TW	228.7±58.5 (13)	218.0±5.1 (11)	1706±217[a] (11)	1522±173[a] (11)	184.0±72.2[a] (11)	156.2±29.3 (11)	74.15±8.98 (9)	25.16±1.84 (9)
TW-TW	236.4±35.2 (10)	218.4±3.0 (8)	2024± 85 (8)	1742± 82 (8)	283.1±20.8 (8)	176.7±29.9 (8)	75.96±8.80 (8)	25.42±1.76 (8)
Kidney								
Cu-Cu	68.9±16.1[a,b] (10)	131.8±5.0[a,b] (6)	502.4±44.5[a] (6)	366.5±33.3[a,b] (6)	135.9±17.3[b] (6)	66.39±7.06[a,b] (6)	2.50±0.17[a] (6)	19.65±1.44 (6)
Cu-TW	88.9±19.5 (13)	145.7±8.2 (11)	519.2±51.7[a] (11)	451.5±60.3 (11)	67.8±9.8[a] (11)	91.41±18.03 (11)	2.78±0.16[a] (9)	21.19±3.04 (9)
TW-TW	92.3±11.7 (10)	141.8±4.0 (8)	582.2±44.8 (8)	462.3±45.0 (8)	119.9± 5.7 (8)	108.4±15.2 (8)	1.90±0.30 (8)	19.84±3.51 (8)

Values are Means±SD (numbers of neonatal mice).
a. significantly different from TW-TW group ($p<0.05$)
b. significantly different from Cu-TW group ($p<0.05$)

【考察】

新生仔腹腔内銅投与は新生仔の成長を障害せず、大脳の銅含有酵素活性、銅含量を上昇させる。この大脳の反応は銅欠乏マウスに対する銅補充の結果と一致する(3)。

母体経口投与では、妊娠中銅投与は胎仔の発育を障害せず、少なくとも大脳銅含量を増加させるが、酵素活性の発達を障害する可能性が考えられる。授乳期銅投与によるSODの上昇は大脳では著明で、腎では見られず、肝では若干見られるが正常に達しない。このことは新生仔腹腔内銅投与に対する反応と一致する。Cyto Oxiは授乳期に銅を投与しなければ回復の傾向を示す。Cyto Oxiは生後8日から13日の間に急激に増加し(5)、SODも出生後上昇しその程度はCyto Oxiより早い(2)との報告があり、大脳の酵素活性の変化は成長障害は関連する可能性も考えられる。

妊娠母体経口銅投与は胎仔の発育を障害せず大脳銅含量を増加させ、新生仔腹腔内銅投与で大脳の両酵素活性上昇、銅含量増加が期待できる。今後モデルマウスにこの組合せを適用し出生前治療の可能性を検討する。

【文献】

1. Danks, D. M. (1983) in The metabolic basis of inherited disease, ed. by Stanbury, J. B. et al. pp1251
2. Mavelli, I. et al. (1982) Biochem. J., 204, 535
3. Phillips, M. et al. (1986) Biochem. J., 238, 177
4. Prohaska, J. R. and Wells, W. W. (1974) J. Neurochem., 23, 91
5. Rezek, D. L. and Moore, C. L. (1986) Exp. Neurol., 91, 640
6. Suzuki, H. et al. (1986) Brain Dev., 8, 17

145 脳シナプス膜標品への[^{3}H]MK-801結合

米田幸雄、荻田喜代一
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕

ラット脳シナプス膜標品をTriton X-100で前処理すると、[^{3}H](+)-5-methyl-10,11- dihydro-5H-dibenzo[a,d] cyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801) 結合活性は著明に減少した。非処理膜標品中には温度依存性の結合活性が検出されたが、Triton処理膜標品の場合は反応温度を上昇させても結合に著変は見出せなかった。しかしながら、L-グルタミン酸(Glu)の添加は、Triton処理膜標品中の[^{3}H]MK-801結合活性に対して、温度依存性、立体特異性および構造特異性の増強効果を誘発した。同様の増強効果が、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)やN-メチル-L-アスパラギン酸(NMLA)、あるいはキスカル酸(QA)の添加により観察されたが、DL-α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate(AMPA)やカイニン酸(KA),ウィラルジンの添加は結合に著変を与えなかった。また、L-Gluによる増強は、DL-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonate(CPP)、D-2-アミノ-5-ホスホノ吉草酸(AP5)およびD-2-アミノ-7-ホスホノヘプタン酸(AP7)のいずれによっても有意に拮抗された。したがって[^{3}H]MK-801結合は、NMDA受容体/カチオンチャンネル共役機構の解析に有用な手段の1つであると思われる。

脳内の興奮性アミノ酸受容体に NMDA、QA、および KAのそれぞれに感受性の高いサブタイプが存在するとの仮説が広く受け入れられている。中でも特にNMDA受容体に関しては、脳内の神経伝達機構における機能的役割、あるいは種々の神経精神疾患発症機構における病態生理学的意義などが、除々に解明されつつある現状である(8)。一方、抗けいれん薬として開発されたMK-801(1)は、筋弛緩作用以外にも抗不安作用や中枢性の交感神経興奮作用(2)を持つことが知られている。この化合物はさらに、NMDA受容体に対して非競合的アンタゴニストとしての効果(7)を有することが明らかとなり、近年特に注目を浴びている。したがって本研究では、[^{3}H]MK-801結合の性質について解析するとともに、NMDA受容体との相関関係についても検討を加えた。

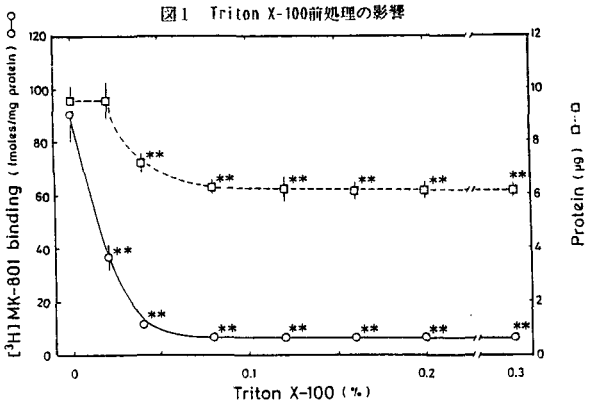
[実験方法]

粗シナプス膜標品をWistar系雄性ラット全脳より調製したのち、50mMトリス酢酸緩衝液(PH 7.4)を用いて、50,000g、30分間の遠心分離による洗浄操作を3回行った。沈渣は0.32Mショ糖水溶液に懸濁状態で-80℃にて凍結保存した。使用時には、凍結懸濁液を室温融解後、通常は 0.08% Triton X-100で2℃、10分間の前処理を行った。前処理ののち、上述の遠心分離洗浄操作を2回行った標品を結合実験に供した。結合実験は、膜標品を5nM [^{3}H]MK-801(NEN,29.4 Ci/mmol)と、2℃または30℃で30分間反応させて行った。反応はWhatman GF/B グラスフィルターを用いた吸引濾過法により停止した。フィルター上の放射活性は、液体シンチレーション法(測定効率 40-42%)により測定した。

[実験結果]

シナプス膜標品を種々の濃度のTriton X-100で前処理したのち、[^{3}H]MK-801結合活性を測定すると、Triton X-100の濃度上昇に伴い結合活性が低下することが判明した(図1)。非処理膜標品中の活性は、反応温度2℃の場合にも検出されたが、反応温度を30℃に上昇させると活性は著明に増加した。これに対して、Triton処理膜標品の場合は、反応温度にかかわらず極めて低い活性しか検出されなかった(表1)。しかしながら、L-Glu(10^{-5}M)を添加するとTriton処理膜標品中の活性は、反応温度30℃の場合にのみ極めて著明に増強された。L-Gluばかりでなく、L-アスパラギン酸(Asp)、D-Asp、L-ホモシステイン酸、L-システインスルフィン酸、L-システイン酸およびD-Gluなどにも同様の温度依存性結合増強作用が観察された(表2)。さらに、NMDAやNMLA、あるいはQAも結合増強作用を発揮したが、AMPA、KAおよびウィラルジンの添加は結合に著変を与えなかった(表2)。この10^{-5}M L-Glu添加による増強は、CPPおよびD-AP5によって濃度依存的に阻止された(表3)。さらに、D-AP7も弱い拮抗作用を示したが、L-AP5およびL-AP7はともにL-Gluによる結合増強に対して有意な変化を与えなかった。

図1　Triton X-100前処理の影響



** p<0.01, compared with each control value

表1　反応時間および反応温度の影響

Incubation time (min)	[3H]MK-801 binding (fmoles/mg protein) Untreated	Triton-treated
(2℃)		
2	33.6 ± 4.3	4.3 ± 2.0
5	50.7 ± 6.7	8.5 ± 1.8
10	55.0 ± 6.2	11.6 ± 2.2
20	76.4 ± 7.4	14.7 ± 2.4
30	96.5 ± 6.8	15.4 ± 2.9
40	111 ± 7	20.0 ± 4.3
60	130 ± 7	22.5 ± 4.2
90	143 ± 14	27.6 ± 2.5
(30℃)		
2	43.4 ± 5.6	7.3 ± 1.7
5	63.1 ± 7.2	11.5 ± 2.4
10	83.1 ± 7.3	12.7 ± 1.8
20	146 ± 9	20.7 ± 3.4
30	197 ± 18	23.2 ± 4.9
40	210 ± 13	28.7 ± 3.4
60	267 ± 11	34.9 ± 3.2
90	297 ± 9	39.1 ± 3.4

Each value represents the mean±S.E. obtained in four separate experiments.

表2　各種 Glu関連化合物およびアゴニストの効果

	ED 50 (μM)	Maximal value (% of control)
L-Glu	0.22 ± 0.05	731 ± 64
D-Glu	5.38 ± 0.92	619 ± 45
L-Asp	1.53 ± 0.24	675 ± 47
D-Asp	0.71 ± 0.16	581 ± 48
L-CSA	5.09 ± 0.83	649 ± 34
L-CA	19.2 ± 1.7	544 ± 36
L-HCA	1.57 ± 0.36	625 ± 59
NMDA	3.46 ± 0.48	520 ± 54
NMLA	16.0 ± 3.2	477 ± 29
QA	20.0 ± 0.6	508 ± 59
AMPA	No effect	116 ± 5
NTL	No effect	88 ± 8
KA	No effect	105 ± 6

Each value represents the mean±S.E. obtained in four separate experiments.

表3　Gluの増強効果に対するNMDAアンタゴニストの影響

Drug (M)	[3H]MK-801 binding (fmoles/mg protein)
None	14.6 ± 1.6
Glu(10^{-5})	106 ± 7
+L-AP5(10^{-6})	108 ± 5
(10^{-5})	105 ± 5
(10^{-4})	96.7 ± 6.2
+D-AP5(10^{-6})	103 ± 6
(10^{-5})	66.9 ± 5.2 **
(10^{-4})	21.6 ± 3.4 **
+L-AP7(10^{-6})	107 ± 5
(10^{-5})	111 ± 7
(10^{-4})	91.2 ± 8.5
+D-AP7(10^{-6})	101 ± 6
(10^{-5})	97.1 ± 7.5
(10^{-4})	59.5 ± 6.1 **
+CPP (10^{-5})	97.0 ± 4.4
(10^{-5})	70.4 ± 3.9 **
(10^{-4})	22.7 ± 2.3 **

Each value represents the mean±S.E. obtained in four separate experiments.

[考察]

Triton X-100前処理による結合低下は、内在性の結合増強物質(L-Glu、L-Asp等)の除去によるものと思われる。事実、同様のTriton X-100処理により、脳シナプス膜標品中のL-Glu、L-AspあるいはGABAなどが著明に減少することが知られている(3-5)。したがって、[3H]MK-801結合の正確な生化学的解析のためには、本研究の様にTriton処理膜標品を用いて、種々の外因性化合物存在下と非存在下について検索することが必要であろう。MK-801は電気生理学的にはNMDA反応を非競合的に遮断するが(7)、生化学的結合実験ではNMDA感受性[3H]Glu結合部位に対して親和力を持たない(6)。これらの事実は、本化合物がNMDA受容体によって活性化されるカチオンチャンネル(あるいはその近傍)に結合する可能性を示唆するものである。本研究結果は、この可能性を強く支持するものと言えよう。[3H]MK-801は活性化状態のNMDAチャンネルのみを標識し、静止状態のチャンネルには結合しないのかも知れない。NMDA感受性[3H]Glu結合、[3H]CPP結合、[3H]MK-801結合などの解析により、脳内の興奮性アミノ酸作動性シナプス伝達機構の一端が解明されることを期待したい。

[謝辞]

本研究の一部は文部省科学研究費(63571068)の援助のもとに行った。

[文献]

1. Clineschmidt, B.V.,Martin, G.E. and Bunting, P.R. (1982) Drug Dev. Res. 2, 123-134.
2. Clineschmidt, B.V.,Martin, G.E.,Bunting, P.R. and Papp, N.L. (1982) Drug Dev. Res. 2, 135-145.
3. Fischer, T.E.,Tucher, J.M. and Johnson, D.D. (1986) Neurochem. Res. 11, 1-8.
4. Kontro, P. and Oja, S.S. (1987) Int. J. Neurosci. 32, 881-889.
5. Murphy, D.E.,Schneider, J.,Boehm, C.,Lehmann, J. and Williams, M. (1987) J. Pharmacol. Exp. Ther. 240, 778-784.
6. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
7. Wong, E.H.K.,Kemp, J.A.,Priestley, T.,Knight, A.R.,Woodruff, G.N. and Iversen, L.L. (1986) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 83, 7104-7108.
8. 米田幸雄、荻田喜代一 (1988) 神経精神薬理 10, 139-157.

146 NMDA感受性[^{3}H] グルタミン酸結合

荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
脳シナプス膜標品を種々の濃度のTriton X-100で前処理した結果、N-メチル-D- アスパラギン酸(NMDA)感受性 [^{3}H] グルタミン酸(Glu) 結合は著明に増強された。このNMDA感受性結合は、反応温度 2℃の場合には反応開始後10分で平衡状態に達した。一方、反応温度30℃の場合には反応開始後 1分で最大結合に到達するが、この最大結合活性は反応温度 2 ℃の場合の約30% であった。反応温度 2℃条件下で平衡状態に達した時点に、非放射性のGlu あるいはNMDAを添加すると、結合は速やかに解離した。Scatchard 解析により、本結合は単一成分系であることが判明した(Kd値:24.4 nM、Bmax値:0.94 pmoles/mg protein)。本結合は、NMDA以外に DL-2-アミノ-5- ホスホノ吉草酸(DL-AP5)、 DL-2-アミノ-7-ホスホノヘプタン酸(DL-AP7)およびDL-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonate(CPP) などの競合的NMDAアンタゴニストで強く阻害されたが、カイニン酸(KA)や、キスカル酸(QA)受容体の特異的アゴニストである DL-α-amino-3- hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate(AMPA) では強い阻害作用は認められなかった。また、非競合的NMDAアンタゴニスト(D-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801)、phencyclidine (PCP))は本結合に対して著変を与えなかった。以上の結果から、本結合がNMDA受容体を反映する可能性が示唆される。

Glu のシナプス受容体には電気生理学的に三種類のサブタイプが存在することが示されている (3)。すなわち、NMDA、QA、およびKAのそれぞれに感受性を持つタイプである。最近、NMDA受容体に関しては、中枢神経系の可塑性形成過程のモデルである長期増強現象の発現機序に関連することや、てんかん、脳虚血、あるいはアルツハイマー病などの種々の神経精神疾患の発症機構に関与することなどから、その重要性が注目されている (4)。しかしながら、生化学的な結合実験によるNMDA受容体の検出は容易ではなく、その簡便な検出方法の確立は極めて重要である。したがって、本研究では[^{3}H]Glu結合実験条件の再検討により、NMDA感受性部位検出の可能性について追究した。

〔実験方法〕

脳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を調製したのち、50 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)に懸濁して、50,000xg、30分間遠心分離を行った。この洗浄操作を3 回繰り返したのち、標品を-80 ℃で凍結保存した (5)。使用時には凍結懸濁液を室温融解し、0.08% Triton X-100で 2℃、10分間の前処理を行った。処理後遠心分離による洗浄操作を2 回行った (6)。

[^{3}H]Glu結合実験：通常は膜標品 (約100 μg)を10 nM [^{3}H]Glu(ICN、30 Ci/mmol) と50 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)中で、 2℃、10分間反応させた (2)。反応停止はWhatman GF/Bグラスフィルターを用いた吸引沪過法により行った。NMDA感受性結合は 0.1 mM NMDAの存在下の結合(NMDA非感受性結合) を全結合から差引くことにより算出した。

〔結果〕

前処理に用いるTriton X-100の濃度が増加するのに伴いNMDA感受性結合は著明に増加し、その増強効果は0.08% Triton X-100で最大となり、活性は未処理の場合の結合の約10倍にも達した (図1)。膜標品中の総タンパク質量は Triton X- 100 処理により、最大約40% の減少が認められた。NMDA感受性結合は、反応温度 2℃の場合には反応開始後10分で平衡状態に到達し、その結合は少なくとも60分まで持続した。一方、反応温度30℃の場合には反応開始後 1分で最大結合を示したが、この最大結合活性は反応温度 2℃の場合の約30% であった。これに対して、NMDA非感受性結合には反応温度依存性が見られた (図2)。また、反応温度 2℃条件下で結合が平衡状態に達した時点に、非放射性の Glu (1 mM)あるいはNMDA(0.1 mM)を添加したところ、両者とも速やかに結合を解離させることが明らかとなった。

Scatchard 解析より、Triton処理膜および未処理膜標品中の[^{3}H]Glu結合部位はいずれも単一成分から構成されることが判明した。Triton処理膜におけるKd値およびBmax値は、未処理膜標品の場合と比べてそれぞれ約1/5 および約 2倍であった (図3)。Triton処理膜への[^{3}H]Glu結合は、種々の Glu関連化合物により阻害されるばかりでなく、NMDAや競合的NMDAアンタゴニストであるCPP 、DL-AP5、DL-AP7で強く阻害された。また、非競合的NMDAアンタゴニストである PCP およびMK-801は、本結合に対して有意な変化を与えなかった。QAは本結合をほぼ完全に阻害したが、KAおよびQA受容体

図1　Triton X-100前処理の影響

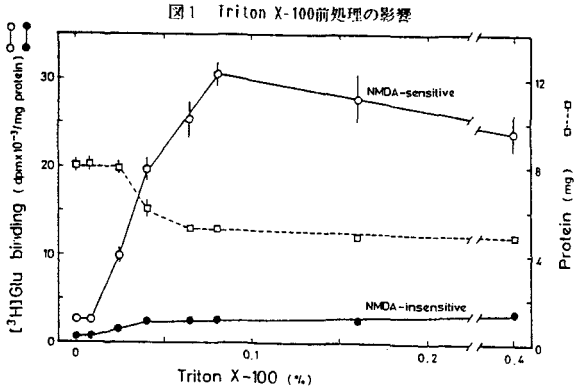


図2　反応時間および反応温度の影響

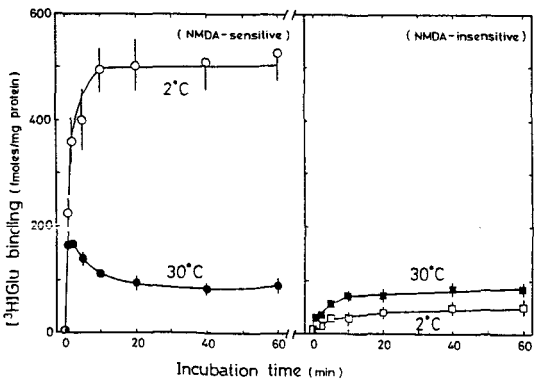


図3　Scatchard 解析

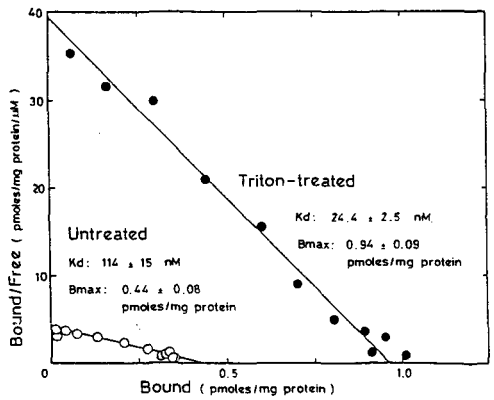


表1　各種化合物の影響

Compounds	IC_{50} Values (μM)	Compounds	IC_{50} Values (μM)
L-Glu	0.022 ± 0.002	QA	2.99 ± 0.22
L-HCA	0.30 ± 0.01	GDEE	11.4 ± 1.3
D-Asp	0.48 ± 0.07	AMPA	>100
L-Asp	0.70 ± 0.04	KA	>100
L-CSA	1.15 ± 0.24		
D-Glu	4.27 ± 0.72	DL-AP3	no inhibition
L-CA	6.39 ± 0.81	DL-AP4	>100
DL-HCySH	>100	DL-AP5	1.27 ± 0.31
L-CySH	no inhibition	DL-AP6	71.6 ± 5.0
		DL-AP7	4.19 ± 1.41
CPP	0.67 ± 0.21		
NMDA	4.24 ± 0.10	GSH	0.92 ± 0.08
o-AAA	5.67 ± 1.14	GSSG	1.57 ± 0.31
NMLA	10.9 ± 2.2	NAAG	>100
γ-DGG	48.5 ± 4.4	TRH	>100
PCP	no inhibition		
MK-801	no inhibition		

に特異性が高いAMPAは最大20-30%の阻害作用を示すに過ぎなかった（表1）。

〔考察〕

従来の[^{3}H]Glu結合実験では検出が容易ではなかったNMDA感受性部位が、シナプス膜標品をTriton X-100前処理、および反応温度の変更により、容易に検出できることが明らかとなった。本結合のKd値は従来の[^{3}H]Glu結合実験で求められたものに比べて極めて小さい値である（1）。これは、Triton X-100の前処理により内因性の結合阻害物質が除去されたことのみならず、NMDA受容体以外の[^{3}H]Glu結合部位である代謝酵素の除去、あるいは[^{3}H]Gluを取り込む小胞構造物の消失によるものと推察される。事実、未処理膜標品を用いると、反応を低温で行っても[^{3}H]Gluの酵素的分解は避けられないのに対して、Triton処理膜を用いると、低温条件下では[^{3}H]Gluの分解は認められない（6）。これらのことからも、本実験条件がGlu(NMDA)受容体の検出に最適であり、本受容体を介する神経情報伝達機構の解明に極めて有用であるものと思われる。

〔謝辞〕

本研究の一部は文部省科学研究費(63571068)の援助のもとに行った。

〔文献〕

1. Foster, A.C. and Fagg, G.E. (1984) Brain Res. Rev. 7, 103-164.
2. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
3. Watkins, J.C. and Evans, R.H.(1981) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21,165-204.
4. 米田幸雄、荻田喜代一 (1988) 神経精神薬理 10, 139-157.
5. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1987) Brain Res. 400, 70-79.
6. 米田幸雄、荻田喜代一、大垣孝雄 (1988) 神経精神薬理 10, 211-219.

147 高カリウム刺激によるラット脳シナプトゾーム内のCa 2+ 濃度上昇に対するN－methyl-D-aspartate antagonist の効果.

岡田三津子、美根和典＊、岩崎克典、藤原道弘
（福大・薬・応用薬理、＊九大・医・心療内科）

〔要約〕15mM K^+ 刺激によるラット脳シナプトゾーム内の Ca^{2+} 濃度（$[Ca^{2+}]i$）上昇に対する、N-methyl-D-aspartate antagonist、2-amino-5-phosphonovalerate (APV) の効果ならびにこれらの作用に及ぼす hypoxia の影響を検討した。normal 条件下で、APV 10μM を 3 分間前処置すると、high K^+ 刺激による $[Ca^{2+}]i$ の上昇は有意に増強したが、20 分間前処置では、増強効果は全くなかった。一方、hypoxia によって high K^+ 刺激による $[Ca^{2+}]i$ の上昇は約 50 % 抑制された。この抑制作用は、APV (1-100μM) を 3 分間前処置することによって認められなくなり、[Ca2+]i の上昇は 正常レベルに戻った。しかしながら、APV (1-100μM)を 20 分間前処置すると、逆に $[Ca^{2+}]i$の上昇は著明に抑制された。以上の結果、APV は一時的に、Ca^{2+} 流入を著しく増加させることがわかった。また、hypoxia による calcium overload を、APV がさらに促進することが示唆された。

hypoxia や ischemia によって、引き起こされる 脳障害の原因の１つとして、細胞内の calcium overload が挙げられる8)。これには、N-methyl-D-aspartate (NMDA) recptor が重要な役割を果たしており[2]、NMDA receptorの活性化によって、$[Ca^{2+}]i$ が上昇することはよく知られている[4)5)]。現在、NMDA receptor antagonist は、hypoxia や ischemia による細胞障害を保護するといわれてるが[3)6)]、逆に細胞障害を促進するという報告7)もあり、詳細未だ不明である。そこで我々は、high K^+ 刺激による $[Ca^{2+}]i$の上昇に対する、NMDA receptor antagonist の APV の効果について調べ、さらに、hypoxia の影響について検討した。

（方法および結果）Wistar 系雄性ラットの全脳シナプトゾームを調製し、Ashely ら1)の方法に従って、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 normal medium または hypoxic medium 中で 20 分間 preincubationした後、15mM K^+ で刺激し、脱分極 10および 180 秒後の$[Ca^{2+}]i$ の変化を測定した。hypoxic medium としては、純窒素で 3-5 時間脱酸素を行った HEPES medium を用いた。APV は、high K^+ 刺激の 3 または 20 分前に加えた。

Fig.1a に示す様に、normal 条件下で、1μM APV を 3 分前処置した場合、high K^+ 刺激による $[Ca^{2+}]i$ の上昇作用は、control (high K^+ 刺激単独)とほとんど変化がなかった。しかし、10μM APV では、$[Ca^{2+}]i$ の上昇作用は著し増加した。さらに、100μMまで増加させると、$[Ca^{2+}]i$ の上昇の程度は、むしろ低下した。一方、APV の 前処置時間を20 分に延長

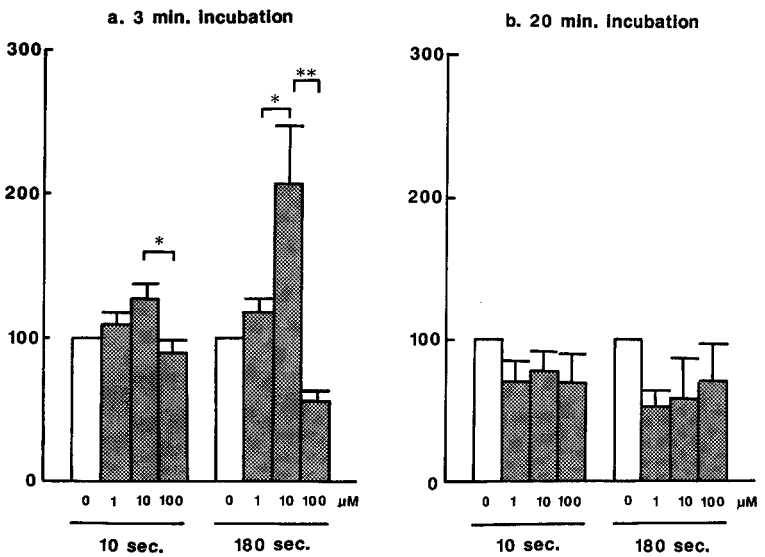


Fig.1 Effects of APV on the rise in $[Ca^{2+}]i$ following depolarization under the normal conditions.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

すると、$[Ca^{2+}]i$ の上昇はむしろ低下した(Fig. 1b)。次に、hypoxa について調べたところ、Fig. 2aに示す様に、APV (1-100μM)の 3 分間前処置群でhigh K^+ 刺激による$[Ca^{2+}]i$ の上昇が著明に増強され、その程度は Fig. 1a の normal 条件下による結果と同等であった。しかし、前処置時間を 20 分に延長すると、high K^+ 刺激による $[Ca^{2+}]i$の上昇は、control (hypoxia + high K^+ 刺激) よりむしろ低下した (Fig. 2b)。

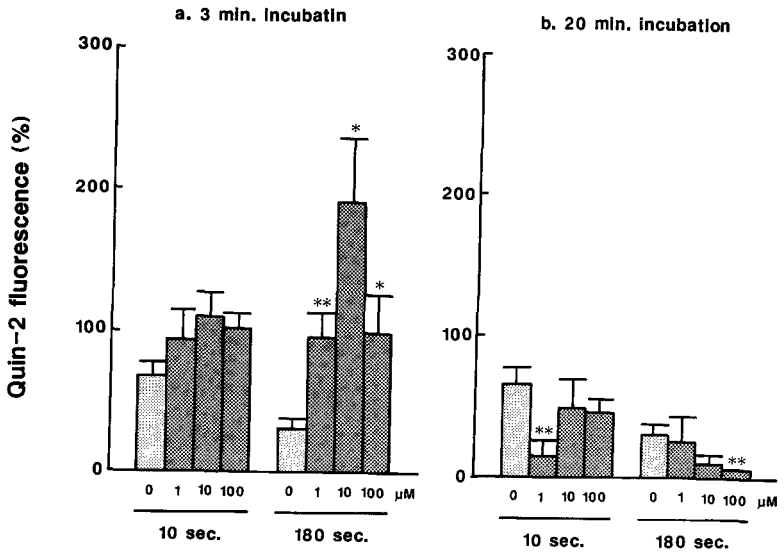


Fig. 2 Effects of APV on the rise in $[Ca^{2+}]i$ following depolarization under the hypoxic conditions.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. hypoxia only.

（考察）APV の 3 分間前処置によって、normal あるいは hypoxia のいずれの条件下においても、high K^+刺激による $[Ca^{2+}]i$ の上昇の増強作用が認められた。シナプトゾームを用いた実験系 では、NMDA receptor を活性化するほどの濃度の興奮性アミノ酸が遊離されているところから、APV の作用は receptor を介するものでなく細胞膜への直接作用ではないかと考えられた。また、normal あるいは hypoxia のいずれの条件下においても、APV を 3 分間前処置した群においては、high K^+ 刺激単独群と比べて、high K^+ 刺激による $[Ca^{2+}]i$ の上昇の増強作用が認められるのに、APV の前処置を 20 分に延長するとこの増強作用が認められなくなった。このことから、APV は細胞膜の脱分極を促進することによって一時的に high K^+ 刺激による反応性を増加させるが、作用時間が長くなると high K^+ 刺激にたいする膜の脱感作がおこるのではないかと推定された。このことは、normal 条件下で APV を 3 分間前処置すると 10μM では、high K^+ 刺激による $[Ca^{2+}]i$ の上昇の増強作用が認められるのに、100μM になるとこの増強作用が消失することからも示唆された。APV は、hypoxia によって生じた high K^+ 刺激による反応性の低下を一時的に回復させるが、最終的には hypoxia による細胞膜の脱分極を促進させ calcium overload を進行させるものと考えられた。

(references)

1. Ashley, R. H., Marchbanks, R. and Whitakker, V. P., Biochem. J., 219, 149-158 (1984).
2. Ashton, D., Reid, K., Willems R. and Wauquier, A., Brain Res., 385, 185-188 (1986).
3. Boast, C. A., Gerhardt, S. C., Pastor, G., Lehmann, J., Etienne, P. E. and Liebman, J. M., Brain Res., 442, 345-348 (1988).
4. Kudo, Y. and Ogura, M., Br. J. Pharmacol., 89, 191-198 (1986).
5. MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., and Baker, J. L., Nature, 321, 519-522 (1986).
6. Novelli, A, Reilly, J. A., Lysko, P. G. and Henneberry, R. C., Brain Res., 451, 205-212, (1988).
7 Schurr, A. Changaris, D. G., and Rigor, B. M. Brain Res. 412, 179-181 (1987).
8. Schurr, A. and Rigor, B. M., FEBS lett., 224, 4-8 (1987).

148 $GABA_B$受容体と細胞内情報伝達系の機能的共軛について

大森敬之，西川正雄，上羽毅，田口淳一，栗山欣弥
京都府立医大，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、アデニル酸シクラーゼおよびイノシトールリン脂質（PI）代謝回転との共軛機構について検討した。$GABA_B$受容体アゴニストであるGABA、(-)バクロフェンはウシ大脳皮質シナプス膜におけるbasal およびフォルスコリンによって上昇したアデニル酸シクラーゼ活性のいずれも抑制した。またこれら$GABA_B$ 受容体アゴニストは、ラット大脳皮質切片における各種イノシトールリン酸の生成をも抑制した。一方、これらの抑制効果は $GABA_B$受容体のアンタゴニストとされるファクロフェンで拮抗され、また、islet-activating protein (IAP) で前処置することによっても消失した。以上のことより、$GABA_B$受容体はアデニル酸シクラーゼのみならず、PI代謝回転とも抑制的に共軛しており、これらの共軛機構には、抑制性の GTP結合蛋白が関与している可能性が示唆される。

【目的】中枢神経系に存在するGABA受容体は、その薬理学的性質から $GABA_A$および $GABA_B$受容体の 2種類に分類され、$GABA_A$受容体はビククリンに感受性を示し、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に共軛していることが報告されている[5,7,8]。これに対して $GABA_B$受容体はビククリンには感受性を示さず、バクロフェンにより活性化され、Ca^{2+}チャンネルおよび抑制性 GTP結合蛋白のうちNiあるいはNoと機能的に共軛している可能性が示唆されているが[3,4]、その他の共軛機構に関しては不明な点が多い。従って本研究においては、$GABA_B$受容体と細胞内情報伝達系との共軛機構を明らかにするとともに、電気生理学的に $GABA_B$受容体のアンタゴニストであると考えられているファクロフェンの拮抗作用についても神経化学的に検討した。

【実験方法】シナプス膜分画の調製と結合実験:Zukinら[9]の方法に従って、ウシ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。[^{3}H](-)バクロフェンの特異的結合の測定は、シナプス膜を [^{3}H](-)バクロフェンと 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吸引ろ過法で行い、GABA(10^{-4}M)で置換された非特異的結合量を差し引くことにより求めた。アデニル酸シクラーゼ活性の測定：Okuda ら[6]の方法に従って、シナプス膜分画を [^{3}H]ATPと37℃で10分間インキュベートしたのち、加熱して反応を停止し、薄層クロマトグラフィーによって生成した [^{3}H]c-AMPを分離、回収することにより行った。PI代謝回転の測定:Brownら[1]の方法に従って、ラット大脳皮質切片を10mM LiCl 存在下で[^{3}H]myo-inositolと37℃で30分間インキュベートしたのち、クロロホルム：メタノール (1:2)を加えて反応を停止し、水で抽出した分画を Dowex 1×8(formate form) イオン交換カラムに吸着させ、各種[^{3}H]イノシトールリン酸を分離することにより行った。IAP によるシナプス膜および大脳皮質切片の処置：Bokochら[2]の方法に従って、シナプス膜分画および大脳皮質切片をIAP(250ng/ml) と30℃で60分間インキュベートすることにより行った。

【結果】[^{3}H](-)バクロフェン結合に対するファクロフェンの影響：GABA,(-)バクロフェンおよびファクロフェンによる[^{3}H](-) バクロフェン結合の阻害を GTPの存在下で検討した結果、GABA,(-)バクロフェンによる [^{3}H](-)バクロフェン結合の阻害曲線は GTPにより右へシフトするのに対して、ファクロフェンによる阻害曲線は GTPにより左へシフトすることが認められた(Fig.1)。アデニル酸シクラーゼ活性に対するGABAおよび (-)バクロフェンの影響 :ウシ大脳皮質シナプス膜のアデニル酸シクラーゼ活性に対するGABA,(-)バクロフェンの影響を検討した結果、basalおよびフォルスコリンで上昇

したアデニル酸シクラーゼ活性は、GABA,(-)バクロフェンによっていずれも用量依存的に抑制されることが観察された。これら $GABA_B$受容体アゴニストによる抑制効果はファクロフェンによって拮抗され(Fig.2)、またシナプス膜を IAP処置することによっても消失した。イノシトールリン酸の生成に対する(-) バクロフェンの影響：イノシトールリン酸（IP,IP_2および IP_3）の生成に対する (-)バクロフェンの影響を検討した結果、IPおよびIP_3 の生成は有意に抑制され、IP_2の生成にも抑制される傾向が認められた。またこれらの抑制効果はファクロフェンによって拮抗された (Fig.3)。このような (-)バクロフェンによるイノシトールリン酸の生成抑制は、GTP の添加によってさらに増強されたが、これらの(-) バクロフェンによる抑制効果はIAP 処置によって消失した。

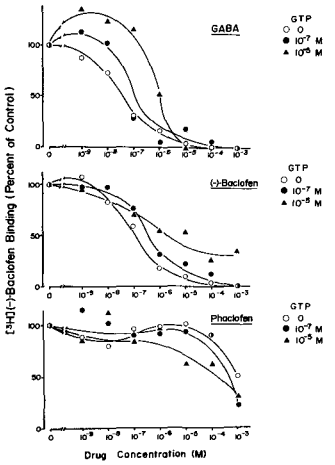


Fig.1 GABA,(-)-baclofen and phaclofen-induced inhibitions of [^{3}H](-)-baclofen binding to synaptic membrane from bovine cerebral cortex in the presence or absence of GTP.

【考察】GABA,(-)バクロフェンはbasal およびフォルスコリンによって上昇したアデニル酸シクラーゼ活性を抑制し、しかもこれらの効果がIAP 処置によって消失したことから、$GABA_B$ 受容体はGTP 結合蛋白のうちNiあるいはNoを介して、アデニル酸シクラーゼと抑制的に共軛している可能性が示唆された。一方、(-)バクロフェンはIP,IP_2および IP_3の生成をいずれも抑制したことから、$GABA_B$ 受容体はPI代謝回転とも抑制的に共軛している可能性が示唆され、さらに、(-)バクロフェンによるIP生成の抑制が GTPによって増強されたこと、また、各種イノシトールリン酸の生成における(-) バクロフェンの抑制効果は IAP処置によって消失したことから、$GABA_B$ 受容体とPI代謝回転の共軛にも抑制性のGTP 結合蛋白が関与している可能性が示唆された。更に、ファクロフェンはアデニル酸シクラーゼ活性およびイノシトールリン酸の生成におよぼす$GABA_B$ 受容体アゴニストの抑制効果に対して拮抗作用を示し、かつ、ファクロフェンによる[^{3}H](-) バクロフェン結合の阻害曲線が左へシフトしたことから、ファクロフェンは電気生理学的のみならず、薬理学的にも$GABA_B$ 受容体のアンタゴニストであることが示唆される。

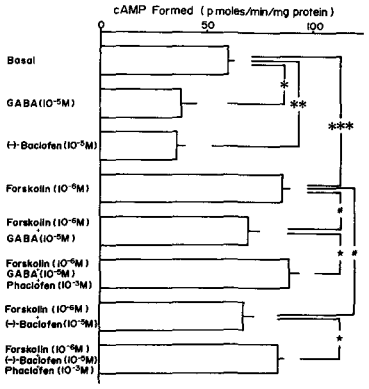


Fig.2 Effect of phaclofen on GABA and (-)-baclofen-induced suppressions of folskolin-stimulated adenylate cyclase activity in synaptic membrane of bovine cerebral cortex. *p<0.05,**p<0.01, ***p<0.001;significantly different from each basal value. #p<0.05;significantly different from addition of folskolin. ★p<0.05;significantly different from addition of folskolin in the presence of GABA or (-)-baclofen.

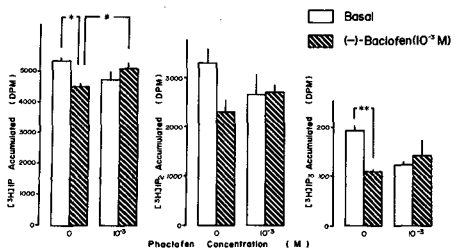


Fig.3 Effect of phaclofen on (-)-baclofen-induced suppression of turnover of phosphatidylinositides in rat cerebral cortical slices. *p<0.01,**p<0.001;significantly different from each basal value.

【文献】1)Brown,E.,Kendall,D.A.,and Nahorski,S.R.(1984) J. Neurochem.42,1379-1387.2)Bokoch,G.M.,Katada,T.,Northup,J.K.,Ui M.,and Gilman,A.G.(1984) J.Biol.Chem.259,3560-3567.3)Bowery,N. G.,Hill,D.R.,and Hudson,A.C.(1983) Br.J.Pharmacol.78,191-206. 4)Hill,D.R.,Bowery,N.G.,and Hudson,A.C.(1984) J.Neurochem.42, 652-657. 5)Kuriyama,K.,and Taguchi,J.-I.(1987) Neurochem.Int. 10,253-263.6)Okuda,C.,Miyazaki,M.,and Kuriyama,K(1984) Neurochem.Int.6,237-244.7)Taguchi,J.-I.,and Kuriyama,K.(1987) Neuropharmacology 26,1745-1750. 8)Taguchi,J.-I.,and Kuriyama,K.(1984) Brain Res.323,219-226.9)Zukin,S.R.,Young,A.B.,and Snyder,S.H.(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.71,4802-4807.

149 分化ヒト白血病（ＨＬ－６０）細胞膜のＰＩレスポンスに及ぼすｃＡＭＰ依存性プロテインキナーゼ活性化の影響

三崎尚之、渡辺康裕、今泉太郎、吉田博
（大阪大・医・第一薬理）

〔要約〕ヒト白血病（ＨＬ－６０）細胞膜からのinositol trisphosphate(IP_3)生成に及ぼすｃＡＭＰ依存性プロテインキナーゼ（PKA）活性化の影響について検討した。
１）0～$10^{-5.3}$Mのカルシウムで刺激した場合、PKAは何ら効果を及ぼさなかった。
２）10^{-7}Mカルシウム存在下で、10^{-7}～10^{-4}MのGTPγSで刺激した場合、PKAはIP_3の生成量を20～30%減弱させた。
３）^{32}P-ATPを用いたPKAによる細胞膜ホモジネートの燐酸化実験にて分子量40K付近に^{32}Pの取り込みがみられた。
以上の結果から、PKAはＨＬ－６０細胞膜のＰＩレスポンスに共役するＧ蛋白を燐酸化することにより、その機能を一部抑制すると推定された。また、アデニレートサイクラーゼ活性系とＧ蛋白を介した反応系での情報のcrosstalkの可能性が考えられた。

Key word cAMP-dependent protein kinase, GTP-binding protein, Phosphorylation, PI response, HL-60 cell

［緒言］ GTP結合蛋白（Ｇ蛋白）は、アデニレートサイクラーゼの活性化、抑制、ＰＩレスポンス等、種々の生体内反応に関係している。しかし、Ｇ蛋白自身の機能調節については、コレラ毒素、百日咳毒素によるADP-ribosylationといった非生理的なものが知られているのみである。我々は、抑制性Ｇ蛋白（Ｇｉ、41K）が、cAMP依存性プロテインキナーゼ（PKA）により燐酸化を受けることを報告したが(7)、これは、いくつかの受容体がそうであるように、Ｇ蛋白も燐酸化を受けることにより、その機能を調節されているという可能性を示唆するものである。そこで本研究では、Ｇ蛋白を介した反応系として、ヒト白血病（ＨＬ－６０）細胞膜でのＰＩレスポンスを用いて活性化PKAの及ぼす効果について検討した。また、γ-^{32}P-ATPを用いたautoradiographyにて燐酸化を受ける蛋白についても検討した。

［方法］ 試料調製：試料調製は、概ね高井らの方法に従った(3)。ＨＬ－６０細胞は、500μM dbcAMPを添加したHam's F-10にて48hr.(37℃,5% CO_2)培養し、分化させた。この際、3 μCi/ml の^{3}H-inositolにて同時に標識を行った。この細胞を、超音波にて破砕した後、Percollによる密度勾配法により、膜分画を調製した。
反応条件：^{3}H-inositolにより標識した細胞膜約100,000 cpmを0.5 mlの反応液（50 mM Hepes pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, 3 mM EGTA, 0.1 mM cAMP, 1 mM ATP)にサスペンドした。この溶液に0.1 mg/mlのPKA、またはvehicleを添加し、37℃、15分間プレインキュベートした後、各種濃度のカルシウム、またはGTPγSにて刺激し、その1分後に6%TCAにて反応を停止させた。15,000g、1分間遠沈後の上清から3回のエーテル洗浄によりTCAを除去した後、Dowex AG1-X8樹脂にて、IP_3分画を分離し(1)、そのradioactivityを測定した。
燐酸化：Ｇｉはラット脳より部分精製した(2)。細胞膜ホモジネートを 10 mM $MgCl_2$, 1mM γ-^{32}P ATP(10,000 cpm/μl) 存在下、PKA catalytic subunit(5-10 unit/100μl)にて37℃ 30分間反応させた後、20% TCAにて反応を停止させ、autoradiographyを行った(6,7)。

［結果］ カルシウム刺激によるIP_3生成に対するPKAの効果：図１に示すように、^{3}H-inositolにより標識した細胞膜を0～$10^{-5.3}$Mカルシウムにて刺激すると、カルシウム濃度依存性にIP_3が生成された。しかし、活性化PKAを前処置することにより、IP_3生成量は、前処置しなかった場合と比較し、なんら変化しなかった。

GTPγS刺激によるIP₃生成に対するPKAの効果：カルシウム0.1μM存在下で、各種濃度(0～10^{-4}M)のGTPγSで刺激すると、図2に示すように、GTPγS濃度依存性にIP₃が生成された。また、PKAにて前処置を行うと、このIP₃の生成は、最大20～30%の減少がみられた。

PKAによる膜ホモジネートの燐酸化：分子量40K付近に^{32}Pの取り込みのバンドが認められ、このバンドは、部分精製Giとほぼ一致した。即ち、分子量約40K付近の蛋白が活性化PKAにより燐酸化を受けたことが示唆された。

［考察］　HL－60細胞膜のPIレスポンスは、百日咳毒素感受性であり、カルシウム及び、GTP濃度に依存性である(4)。また、fMLPによりこのPIレスポンスが起きることから、この反応は、

fMLP受容体　→　百日咳毒素感受性G蛋白　→　ホスホリパーゼC

といった情報伝達経路が考えられる。

カルシウムによりホスホリパーゼCを刺激した場合には、MgATP存在下、PKA添加はなんらIP₃の生成量に変化を起こさなかった。次に、0.1μM カルシウム存在下にてGTPγSで刺激すると、PKA前処置により、IP₃生成量は非処置群に比較し、最大20～30%減少した。カルシウム刺激ホスホリパーゼC活性はPKA添加により影響を受けないのであるから、この結果から、PKAはG蛋白を燐酸化し、その機能を一部抑制したと考えられた。即ち、PKAの燐酸化によるG蛋白の機能調節の可能性が考えられた。次に、G蛋白がPKAにより、実際に燐酸化を受けるかどうかを検討した結果、膜ホモジネートにおいて分子量約40Kに^{32}Pの取り込みのバンドが認められた。HL－60細胞のPIレスポンスに共役するG蛋白は分子量40KのG蛋白と考えられているため(4,5)、先の40Kにおける^{32}Pの取り込みは、PIレスポンスに関係するG蛋白が燐酸化を受けた事を示唆する。この結果は、前述した、PKAによるG蛋白の機能調節の可能性を支持する。また、この結果から、アデニレートサイクラーゼ系とG蛋白を介した反応系との情報のcrosstalkの可能性が考えられた。即ち、例えばGsを介した系などにより、アデニレートサイクラーゼが活性化され、細胞内cAMPが増加し、これによりPKAが活性化され、G蛋白を燐酸化することで、その機能を抑制するという可能性が考えられた。

References
1. Berridge, M.J., Downes, P.C. and Hanley, M.R. (1982) Biochem. J. 206, 587-595
2. Katada, T., Oinuma, M. and Ui, M. (1986) J. Biol. Chem. 261, 8182-8191
3. Kikuchi, A., Kozawa, O., Kaibuchi, K., Katada, T., Ui, M. and Takai, Y. (1986) J. Biol. Chem. 261, 11558-11562
4. Oinuma, M., Katada, T. and Ui, M. (1987) J. Biol. Chem. 262, 8347-8353
5. Uhing, R.J., Polakis, P.G. and Snyderman, R. (1987) J. Biol. Chem. 262, 15575-15579
6. Watanabe, Y., Iwakura, K., Imaizumi, T. and Yoshida, H. (1987) 神経化学 26, 28-30
7. Watanabe, Y., Imaizumi, T., Misaki, N., Iwakura, K. and Yoshida, H. FEBS Lett. in press

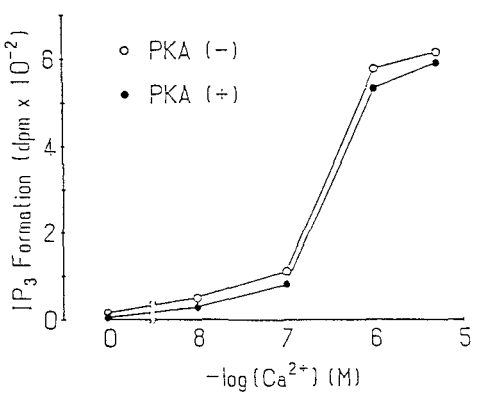


図1　カルシウム刺激PIレスポンスに対するPKAの効果
^{3}H-inositolで標識した分化HL－60細胞膜約100,000 cpmにPKA (0.1 mg/ml) を添加 (●)、添加せず (○) に、15分間インキュベートした後、各濃度のカルシウムにて1分間刺激した際のIP₃の生成量を示す。

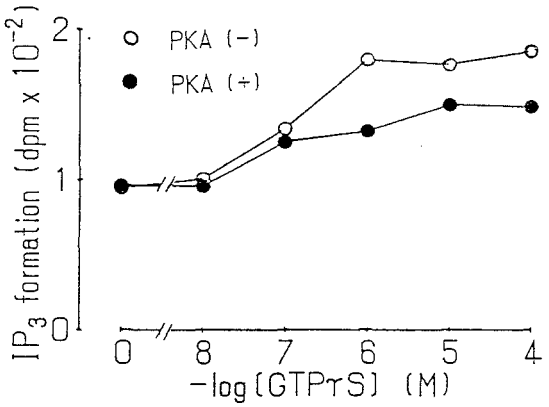


図2　GTPγS刺激PIレスポンスに対するPKAの効果
^{3}H-inositolで標識した分化HL－60細胞膜約100,000 cpmにPKA (0.1 mg/ml) を添加 (●)、添加せず (○) に、15分間インキュベートした後、0.1μM カルシウム存在下で、各濃度のGTPγSにて1分間刺激した際のIP₃の生成量を示す。

150 ヒト血小板α-2アドレナリン性受容体を介したイノシトールリン脂質代謝 －Bt2 cAMPおよび8Br cGMPの効果－

森 秀樹，三国雅彦*，小山 司**，山下 格**，
（小樽第２病院 精神神経，*国立精神神経センター
**北大 医 精神）

〔要約〕
ヒト血小板において、エピネフリン刺激によって生じるイノシトールリン脂質（ＰＩ）代謝について検討した。Ca^{2+} free HEPES buffer に浮遊させた [^{3}H]myo-inositol でプレラベルした血小板において、エピネフリンは 10 mMリチウム存在下で濃度依存性に [^{3}H]inositol-1-phosphate の蓄積を増加させた。エピネフリンのＥＣ50値は、5 μM であった。このエピネフリンによる反応に及ぼす各種モノアミン受容体阻害剤の効果を検討したところ、α-2アドレナリン性（α-2）受容体を介してＰＩ代謝回転の亢進が起ることが明らかとなった。さらに、このエピネフリンによるＰＩ反応は、血小板活性化の強力な阻害剤として知られる dibutyryl cAMP および 8-bromo-cGMP により濃度依存性に抑制されることから、ヒト血小板細胞膜に存在するα-2受容体を介する血小板の活性化を示し、α-2受容体の機能を反映する有用な生化学的指標であることが示唆される。

ヒト血小板がエピネフリンにより刺激されたとき、凝集反応が生じることはよく知られていて、この反応はα-2アドレナリン性（α-2）受容体を介することが示されている (1)。またこれまでに血小板において立証されているα-2受容体を介して生じる唯一の生化学反応は、アデニレートシクラーゼ（ＡＣ）活性の抑制であるが、この変化が血小板凝集惹起の原因とすることには、疑問がもたれている (2,3)。そこでα-2受容体は、ヒト血小板において、ＡＣ活性の抑制よりもより直接的に関係した二次情報伝達機構と連関している可能性がある。一方、血小板がトロンビンやＡＤＰやＰＡＦによって刺激されると、細胞膜中のホスホリパーゼＣが活性化されてホスファチジルイノシトール4,5 二リン酸を特異的に分解し、イノシトールリン脂質（ＰＩ）代謝を亢進することが報告され、血小板の活性化と連関していると考えられている (4)。近年、inositol 1-phosphate(IP-1)から inositol への代謝を阻害するリチウムを用いることによりＰＩ代謝におけるわずかな変化を測定することが可能になった (5)。そこでこの方法によりヒト血小板におけるＰＩ代謝に及ぼすエピネフリンの影響について検討した。

［方法］
研究主旨について同意を得た健康成人から採血後すみやかに血小板濃厚血漿を作製し、1500xg 10分間の遠心により得た血小板ペレットを用いた。この血小板ペレットを 10 mM EDTA と 0.5% bovine serum albumin(BSA)を含む pH 7.4 に調節した Ca^{2+}-free HEPES buffer に浮遊させて、[^{3}H]-myo-inositol を加え 37 ℃ 2時間のインキュベーションによりプレラベルした。この[^{3}H]-myo-inositol でラベルされた血小板を洗滌後、EDTAを含まない Ca -free HEPES buffer に浮遊させ、10 mM リチウム存在下でエピネフリンおよび各種アンタゴニストを添加し 37 ℃でインキュベーションした。冷却したクロロホルムとメタノールの混液を加えて反応を止め、抽出した [^{3}H]inositol phosphatesを Dowex 1x8イオン交換樹脂に吸着させた。Berridgeの方法に従って [^{3}H]IP-1 は 0.1 Mギ酸と 0.2 Mギ酸アンモニウム溶液で溶出し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

［結果および考察］
ヒト血小板において、10μM のエピネフリンの添加により、IP-1の蓄積は増加した。[^{3}H]IP-1の有意な増加は、3 分のインキュベーションでみられ 30 分間増加は続いた。またエピネフリン非存在下での basal levelも、このインキュベーション時間で同時に増加を続けたため、以後の実験は basal levelに対して十分なエピネフリンの反応が観察できる 15 分間のインキュベーションで検討した。Fig.1 に示すように、エピネフリンの刺激による [^{3}H]IP-1 の増加は 1-100μM の範囲で濃度依存性であった。最大増加は basal levelに対して 147%を示し、エピネフリンの EC50 値は 5μM であった。10μM エピネフリン刺激によって生じる [^{3}H]IP-1 蓄積率増加に対する各種モノアミン受容体阻害剤の効果を Fig.2 に示した。選択的α-2アドレナリン性（α-2）受容体阻害剤であるヨヒンビン(1μM)は、エピネフリンによる反応の 88 %を抑制した。またα-2受容体に強力な阻害能をもつミアンセリン(1μM)は、エピネフリンによる反応の 70 %を抑制した。これらのα-2受容体阻害剤に対して、選択的α-1アドレナリン性受容体阻害剤であるプラゾシンおよびβアドレナリン性受容体阻害剤であるプロプラノロールは、ともに 1μM でこのエピネフリンの反応を抑制しなかった。さらに、選択的ドーパミンD-2 受容体阻害剤である (-)スルピライドや選択的 5HT-2受容体阻害剤であるケタンセリンも 1μM で抑制効果を示さなかった。以上のことからエピネフリンがヒト血小板に存在するα-2受容体を介して[^{3}H]IP-1の蓄積率を増加させることが明らかとなった。 ヨヒンビンは 10 μM エピネフリンによる反応を濃度依存性に抑制した。3 μM ヨヒン

ビン存在下でエピネフリン(10 μM)の反応は完全に抑制された。Fig.3 は 10 μM エピネフリン刺激によって生じる[^{3}H]IP-1 蓄積率増加に対するヨヒンビンの抑制をヒルプロット解析したものである。ヨヒンビンのIC50値は 181 nM で、Ki値を求めると60.3 nM となった。 10μM エピネフリン刺激によって生じる[^{3}H]IP-1蓄積率増加に対するdibutyryl cAMP (Bt2 cAMP)および 8-bromo-cGMP(8-Br-cGMP)の効果を Table 1 に示した。血小板の活性化を強力に阻害することが知られているこれらの cyclic nucleotide (6) は、エピネフリン(10 μM)による反応を濃度依存性に抑制した。 また Bt2 cAMPおよび 8-Br-cGMPは Table 1に示した濃度では、エピネフリン非存在下の[^{3}H]IP-1 basal levelに有意には影響を与えなかった。以上のことからヒト血小板細胞膜に存在する α-2受容体を介して生じるＰＩ代謝回転の亢進は、エピネフリン刺激による血小板の活性化および凝集反応に直接的に連関していると考えられる。さらにα-2受容体を介するＡＣ活性の抑制が血小板の凝集反応惹起を十分に説明しない (2,3)ことから、我われの示した所見は、ヒト血小板には、ＡＣ抑制系とＰＩ系の二つの情報伝達機構とそれぞれ独立して連関する区別される二種類のα-2受容体が存在することを示唆している。また近年ヒト中枢神経シナプスにおけるα-2受容体の調節不全が、感情障害の病態モデルの一つとして提唱され、この仮説は血小板α-2受容体に対して、選択的放射性リガンドを用いた結合実験により調べられてきた (7)。血小板α-2受容体数の増加がα-2受容体の agonist bindingによって、うつ病患者で報告されている (8)。したがって感情障害を対象とした臨床研究において、α-2受容体の機能を反映するエピネフリン刺激によるヒト血小板におけるＰＩ反応は、有用な生化学的指標となることが示唆される。

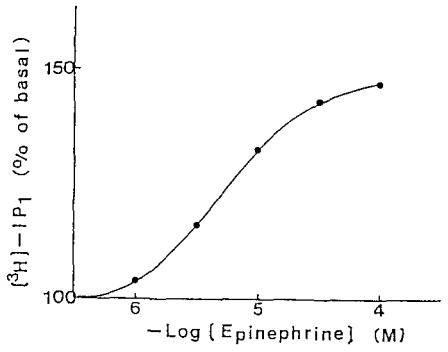


FIG. 1

Effects of epinephrine concentration on the accumulation of [^{3}H]IP-1 in human platelets. Samples were incubated with epinephrine for 15 min. Each point is the mean of duplicates in 4-6 separate experiments (SEM was less than 3 % of the mean) The basal value was 365 ± 61 DPM.

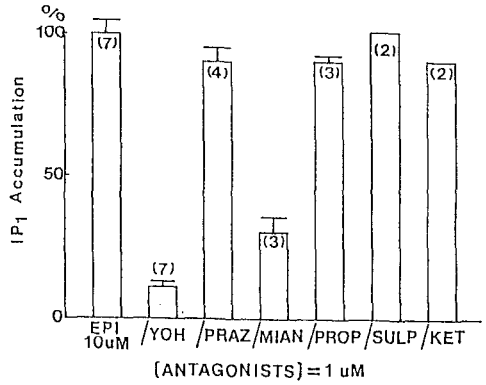


FIG. 2

Effects of various antagonists on the accumulation of [^{3}H]IP-1 stimulated by 10 uM epinephrine during 15 min incubation. Values are means ± SEM for the indicated number of experiments, performed in duplicate. YOH, yohimbine, PRAZ, prazosin; MIAN, mianserin; PROP, (-)propranolol; SULP, sulpiride; KET, ketanserin

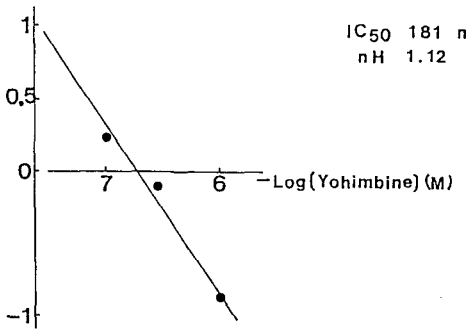


FIG. 3

Hill plot analysis of yohimbine inhibition on the accumulation of [^{3}H]IP-1 stimulated by 10 uM epinephrine during 15 min incubation. Each point is the mean of dupulicates in 4-7 separate experiments.

TABLE I

Effects of Bt2 cAMP and 8Br cGMP on Epinephrine (10 uM)-stimulated IP-1 Accumulation in Human Platelets

	% of EPI(10 uM) stimulated PI turnover
EPI(10 uM)	100
/Bt2 cAMP(10 uM)	23.7 ± 6.1
/Bt2 cAMP(100 uM)	0
/8Br cGMP(10 uM)	46.2 ± 6.8
/8Br cGMP(100 uM)	23.5 ± 2.8
/8Br cGMP(1 mM)	0

Results are means ± SEM for 3 separate experiments, performed in duplicate, and are expressed as percentage of the [^{3}H]IP-1 accumulation stimulated by 10 uM epinephrine.

[文献] (1)Grant J.A.(1979)Nature 277 659-661 (2)Clare K.A.(1984)Br.J.Pharmacol. 82 467-476 (3)Swart S.S.(1985)Eur.J.Pharmacol. 116 113-119 (4)Nishizuka Y.(1984)Nature 308 693-698 (5)Berridge M.J.(1983)Biochem.J. 221 473-482 (6)Sano K.(1983)J.Biol.Chem. 258 2010-2013 (7)Piletz J.E.(1986)Life Sci. 39 1589-1616 (8)Garcia-Sevilla J.A.(1986)Arch.Gen.Psychiat. 43 51-57

151 培養上頸交感神経節細胞にみられる3種のイオンチャンネル

飯島敏夫、関口達彦*、松本元
（電総研アナログ情報、*三洋筑波研）

〔要約〕

初代培養したウサギ上頸交感神経節細胞のムスカリニックリスポンスでは少なくとも3種の化学修飾型イオンチャンネルが現れる。ツボクラリン存在下で投与した10～100μMアセチルコリンは -60mVに電位固定した神経細胞膜にはコンダクタンス上昇を伴うゆっくりした内向き電流を生じさせ、-20mVでは外向電流（M電流）を抑制、0mVではコンダクタンス上昇を伴い、不活性化の速い外向き電流を生じさせた。これら3種のイオンチャンネルの性格を細胞内カルシウムイオン、セカンドメッセンジャーの動態とあわせ考察した。

〔目的〕

上頸交感神経節細胞では多様なムスカリン様アセチルコリン応答が観察される（1）。この応答の多様性は化学修飾型イオンチャンネルの活動による。本研究の目的はそれらイオンチャンネル活性変化を制御因子である細胞内カルシウムイオンおよび他のセカンドメッセンジャーの変動に注目し、解析する事である。

〔方法〕

成熟ウサギより摘出した上頸交感神経節をコラーゲナーゼ処理し、細胞を分散させ、初代培養した。培養後2日～6日の細胞を材料とした。ムスカリン様アセチルコリン応答時のイオンチャンネル活性変化と細胞内カルシウム濃度変化を同時測定した。膜電位（電流）はパッチクランプ法により、細胞内カルシウム濃度変化はFura-2を用いた光学測定法によった（2）。ムスカリニックリスポンスのみ抽出する為、実験液には常にTubocurarine(30μM)を含ませた。アセチルコリン等の薬物は連続的に行った外部灌流液に適時、混入させ投与した。

〔結果〕

観察された3種のイオンチャンネルの出現の典型的なパターンを図1～3に示す。図1は-60mVにVoltage clampされた膜に100μMアセチルコリンによって引き起こされた内向き電流である。膜電位は基本的に-60mVに固定し、そこにパルス的に100msec durationの-60→-63mV clamp commandを重畳させた。マクロスコピック電流上に見られる針状の電流が3mV分のclamp電流に相当し、それから膜コンダクタンス変化を知ることができる。この場合、膜コンダクタンスは1.6倍に増加している。この電流の reversal potential は+25mVである。細胞内カルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)は静止時95nMであったのがアセチルコリン投与により270nMに上昇し、その変化は膜電流変化に明かに先行している。

図2は図1と同一細胞から得られた記録で、膜電位だけ+20mVに変化させてある。コンダクタンス上昇を伴う大きな外向き電流が一過性に出現している。図1での内向き流はアセチルコリン投与終了後に電流のピークをむかえる、ゆっくりした経過のものであるが、この外向き流は立ち上がりも鋭く、アセチルコリン投与中に不活性化してしまう足の速い電流である。この電流はおよそ0mV（固定電位）から見え始め膜電位レベルの上昇に伴って大きくなった。ピークからの概算でそのreversal potentialは約-5mVであった。$[Ca^{2+}]_i$変化はこの外向き電流にも先行し、変化分は固定電位-60mV時とほぼ同様で180nMであった。

図3は図1、2とは別の細胞から得られた記録である。膜電位は-20mV。明かな膜コンダクタンスの減少を伴った電流変化が見える。この細胞膜は膜電位-40mVでは膜コンダクタンス1.3×10^{-8}Sで-20mVでは1.9×10^{-8}Sに上昇する。アセチルコリン投与による電流変化のピーク時では膜コンダクタンスが-40mVの膜コンダクタンスと同レベルに低下してい

た。従ってVh-40mV→-20mVの変化で活性化されたイオンチャンネルがアセチルコリンにより不活性化されたと考えられ、このイオンチャンネルはMチャンネルである。$[Ca^{2+}]_i$は静止時30nMであったがアセチルコリン投与で75nMに上昇した。この場合$[Ca^{2+}]_i$上昇はMチャンネル不活性化の始まりとほぼ同期して起こっている。

〔考察〕

上頸交感神経節細胞のムスカリニックリスポンスでは上記のイオンチャンネルに加えてCa^{2+}依存性K^+チャンネル活性が明らかに現れる。これらイオンチャンネルの活性変化と細胞内カルシウムイオンの関係を考えるとき細胞外からのCa^{2+}流入の他、細胞内Ca^{2+}ストア（小胞体）からのIP_3系によるCa^{2+}動員が重要な要素となっている証拠がある。細胞外液にCa^{2+}が含まれなくてもアセチルコリンは①～③のどのイオンチャンネルも動員させることができた。ところが、いずれの場合も$[Ca^{2+}]_i$は小胞体からのCa^{2+}流出で上昇する。又、IP_3あるいはCa^{2+}の細胞内注入だけでは①～③いずれのイオンチャンネルも動員できなかったし（K^+_{Ca}のみ活性化）、OAG（合成ジアシルグリセロール）投与によっても再現できなかった。現在、細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}流出を抑制した時のアセチルコリン応答を調査中である。

〔参考文献〕

1)Mochida,S. and Kobayashi,H. (1986) Brain Research 383, 299-304

2)kudo,Y.,Ogura,A. and Iijima,T.(1988) Neurosci. Lett. 85, 345-350

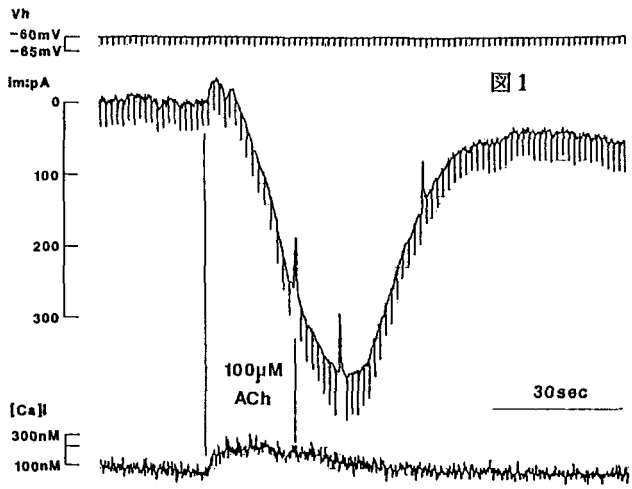


図1

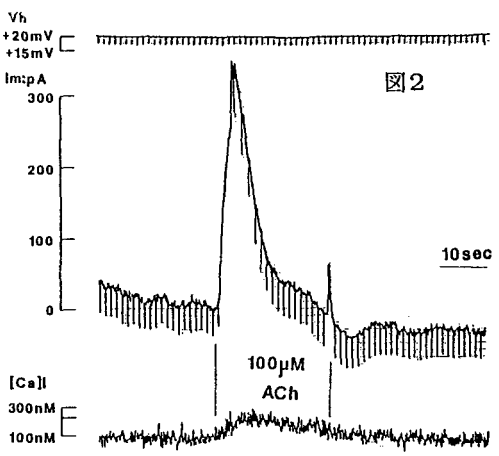


図2

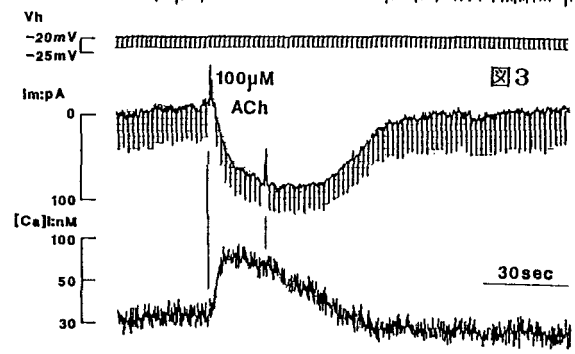


図3

152 Ca^{2+}/カルモデュリン依存性キナーゼⅡの細胞内自己リン酸化反応の解析

太田安隆、大場　隆、福永浩司、宮本英七
(熊本大・医・第一薬理)

〔要約〕

1) 精製したラット脳Ca^{2+}/カルモデュリン (CaM) 依存性キナーゼⅡ (CaMキナーゼⅡ) を家兎に免疫し、抗体を得た。2) アフィニティー精製したCaMキナーゼⅡの抗体は、3Y1細胞中で50-kDa蛋白質のみを認識した。50-kDa蛋白質は、Ca^{2+}/CaMに依存して、in vitroで自己リン酸化反応を起こした。3) 静止期3Y1細胞に血清を添加すると、50-kDa蛋白質のリン酸化が増強した。4) in vitroリン酸化50-kDa蛋白質と血清添加に基づくin vivoリン酸化50-kDa蛋白質のリン酸化ペプチドマップは、極めて類似していた。血清添加により細胞内でCaMキナーゼⅡの自己リン酸化反応が惹起されることが示唆された。5) 血清の他、A23187、EGF、PDGFが自己リン酸化を誘導した。CaMキナーゼⅡの細胞内自己リン酸化反応は、細胞内Ca^{2+}動員系の活性化によるものと考えられた。以上の結果は、CaMキナーゼⅡが細胞内で自己リン酸化反応を起こすことを示し、Ca^{2+}/CaMを介する細胞内情報伝達に関与していることを示唆している (1)。

CaMキナーゼⅡは、脳に高濃度に存在し、広い基質特異性を示して、神経機能に重要な役割を担っていると考えられている。本酵素はCa^{2+}/CaMに依存して自己リン酸化反応を起こし、酵素活性調節が行なわれている (2−4)。今回我々は、ラット脳より精製したCaMキナーゼⅡに対する抗体を用い、免疫沈降法により、生細胞 (ラット線維芽3Y1細胞) 中でCaMキナーゼⅡがin vitroと同様な自己リン酸化反応を起こすこと、および細胞内自己リン酸化反応の細胞外刺激について検討した。

【実験方法】

ラット脳のCaMキナーゼⅡは既報 (4) に基づき精製した。精製CaMキナーゼⅡを家兎に免疫し、ポリクローン抗体を作製した。得られた抗体はアフィニティー精製した。ラット線維芽3Y1細胞は、5％ CO_2、37℃で10％のウシ胎児血清存在下で培養した。イムノブロットは、SDS-PAGE (5) 後、デュラポア膜に転写 (6) し、ペルオキシダーゼ法により行なった。3Y1細胞中のCaMキナーゼⅡのin vitroでのリン酸化は、可溶性画分を抗体で免疫沈降させ、[γ ^{32}P-ATP]存在下で30℃で行ない、SDS-PAGE後、オートラジオグラフィーを行ない解析した。CaMキナーゼⅡのin vivoでのリン酸化反応は、静止期3Y1細胞を[^{32}P]正リン酸で18時間ラベルした後、10％血清やその他の刺激因子を添加した。反応後、0.5％ Triton X-100、0.1％ SDSを含む溶液で細胞を可溶化し、抗体で免疫沈降させ、SDS-PAGE後、オートラジオグラフィーで解析した。

【実験結果・考察】

1) CaMキナーゼⅡに対する抗体の特異性

アフィニティー精製した抗体は、ラット脳CaMキナーゼⅡの49kDa、60kDaの両サブユニットを認識し、ラット脳全蛋白質中で両サブユニットのみを認識した。この抗体は、3Y1細胞全蛋白質の中で50-kDa蛋白質を認識した。

2) 3Y1細胞のCaMキナーゼⅡのin vitroでのリン酸化反応

静止期3Y1細胞の可溶性画分を免疫沈降させ、[γ-^{32}P]ATP存在下でリン酸化反応を行なうと、50-kDa蛋白質が、Ca^{2+}/CaMに依存してリン酸化された。このリン酸化の初速度は、免疫沈降された酵素量に依存しないことから50-kDa蛋白質の自己リン酸化反応であることが示唆された。

3) 3Y1細胞の CaMキナーゼⅡの in vivo でのリン酸化反応

静止期3Y1細胞を [^{32}P]正リン酸で 18時間ラベルした後、10%血清を添加すると、CaMキナーゼⅡのリン酸化が著明に増大し、血清添加後2分で最大になりその後減少し、60分以内で定常状態に達した (Fig. 1)。この間で酵素量は一定であるので、リン酸化の減少は脱リン酸化反応であると考えられる。CaMキナーゼⅡの細胞内でのリン酸化の増大は血清の他、A23187 や EGF、PDGF でもみられることから、細胞内 Ca^{2+}動員系の活性化によるものと考えられる (Fig. 2)。

4) in vitro と in vivo での CaMキナーゼⅡのリン酸化の比較

細胞内でリン酸化した CaMキナーゼⅡは、刺激した因子によらず同一のリン酸化ペプチドマップを示した。このペプチドマップは、in vitro で自己リン酸化させた CaMキナーゼⅡのリン酸化ペプチドマップと極めて類似していることから、in vivo での CaMキナーゼⅡのリン酸化は自己リン酸化反応であることが強く示唆された。

脳から精製された CaMキナーゼⅡは、in vitro で Ca^{2+}/CaM に依存して自己リン酸化反応を起こし、その結果 Ca^{2+}/CaM 非依存性の酵素活性を示すことが知られている。今回我々は、生細胞 (3Y1細胞) 中でも in vitro と同様な自己リン酸化反応を起こすことを明らかにした。また in vivo での CaMキナーゼⅡの自己リン酸化は Ca^{2+}動員系を活性化する特定の細胞外因子の刺激に基づくものであることが示唆され、細胞内では自己リン酸化反応と同時に脱リン酸化反応も進行することがわかった。現在、in vivo での自己リン酸化による酵素活性の調節機構を検討中である。

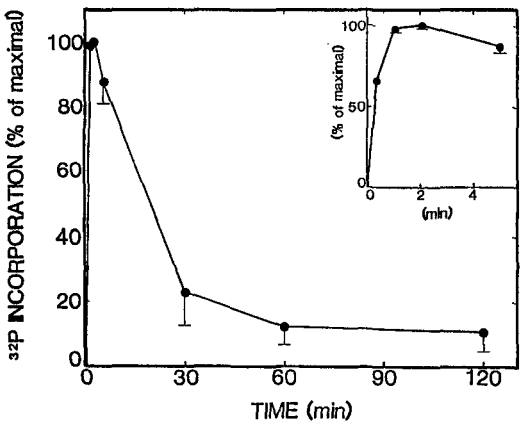


Fig. 1. Time course of phosphorylation of CaM kinase II elicited by addition of 10% (v/v) serum to quiescent 3Y1 cells.

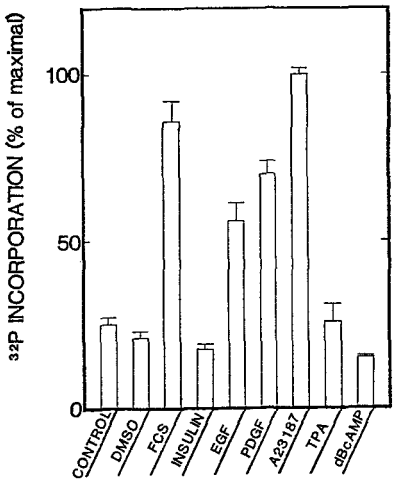


Fig. 2. Effect of various agents on phosphorylation of CaM kinase II in quiescent 3Y1 cells.

【文　献】

1. Ohta, Y., Ohba, T., Fukunaga, K., and Miyamoto, E. (1988) J. Biol. Chem. in press
2. Nairn, A.C., Hemmings, H.C., and Greengard, P. (1985) Annu. Rev. Biochem. 54, 931−976
3. Miyamoto, E. (1986) Neuromethods 5, 519−550
4. Fukunaga, K., Yamamoto, H., Matsui, K., Higashi, K., and Miyamoto, E. (1982) J. Neurochem. 39, 1607−1617
5. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680−685
6. Towbin, H., Staenelin, T., and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350−4354

153　ラット脳Ca^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡの自己燐酸化によって誘起されたCa^{2+}/CaM非依存活性と分子内生成物阻害

加藤　剛志、　藤澤　仁
（旭川医大、　第一生化）

〔要約〕

ラット脳Ca^{2+}/カルモデュリン(CaM)依存性プロテインキナーゼⅡ(ＫⅡ)の自己燐酸化反応は、初期の速い相とその後の遅い相より成り、取り込まれた燐酸は、前者でサブユニット1モル当り約1モル、後者で約2モル、合計約3モルであった。　前者にほぼ平行してCa^{2+}/CaM非依存の活性が現れた。　その時のＫⅡの速度論的性質は、Ca^{2+}存在下では未処理のそれと同じであった。　Ca^{2+}非存下では、VmはCa^{2+}存在下のそれと同じであったが、ATP及びMAP2に対するKmは各々約1.5倍及び2倍大きいという結果を得た。　これは、見かけのCa^{2+}/CaM非依存性の程度が基質濃度に依存して変化することを意味する。　第2相でＫⅡの活性低下が起こった。　その時、MAP2に対しては負の協同性を伴う競争阻害、ATPに対しては非競争阻害が起こっていた。　自己燐酸化によって起こる著しい活性の低下は分子内生成物阻害によることが示唆された。　一方、Ca^{2+}/CaM非依存の活性を誘起した燐酸化アミノ酸としてほぼ同量のThrとSerが検出された。　したがって、ＫⅡのサブユニット当り3箇所の近接した自己燐酸化部位があり、その内1つの燐酸化によってCa^{2+}/CaM非依存の活性が生じ、2つめ以降の燐酸化によって阻害が起こるものと考えられる。

脳のＫⅡは、2乃至3種のサブユニットから成る10量体で、種々の酵素や蛋白質を燐酸化することによって、神経伝達物質の合成や分泌などの神経機能の調節に重要な役割を果していると考えられている(1)。　また、自己燐酸化により、Ca^{2+}/CaMに依存しない活性の出現、及び活性の低下を起こして、自ら活性の調節を行う(2,3)。　しかし、誘起されたCa^{2+}/CaM非依存性の程度、活性低下との相互の関連、取り込まれた燐酸との定量的関係及び両者の起こる仕組みなど、不明な点が多い。それらを解明するために、ＫⅡの自己燐酸化反応、及び自己燐酸化されたＫⅡの速度論的性質を調べた。

《 実験方法 》

ＫⅡはラット大脳皮質より山内と藤澤の方法(4)で、CaMはラット精巣より矢沢の方法(5)で、MAP2はブタ脳よりKimらの方法(6)で調製した。　ＫⅡの活性は、0.2-0.3nMのＫⅡを用いて、2mM DTT、5mM Mg^{2+}、40mM HEPES (pH8.0)、0.1mMEGTA、30° Cで、CaM存在下、±Ca^{2+}で、[γ-^{32}P]ATPとMAP2を基質として、MAP2への^{32}Pの取り込みの経時変化を測定し、その直線部分から算出した。　^{32}Pの取り込みは、濾紙法で行った(7)。　自己燐酸化反応は、6-20nMのＫⅡを用いて、50μM ATP存在下、MAP2を加えずに、5 あるいは30° Cで行った。　燐酸化アミノ残基の同定は、酸加水分解後、HunterとSeftonの方法(8)で行った。　ＫⅡ及びMAP2の分子量は、それぞれ540､000及び270､000を用いた。

《 結果と考察 》

Ca^{2+}/CaM存在下、5° Cで、ＫⅡと[γ-^{32}P]ATPを反応させ、ＫⅡへの^{32}Pの取り込みを調べた(Fig1.)。　燐酸の取り込みは、初期の速い相とそれに続く定常状態様の遅い相から成る２相性を示した。　前者でＫⅡのサブユニット1モル当り約1モル、後者で約2モルの燐酸が取り込まれた。　自己燐酸化反応に伴うＫⅡの活性の変化をMAP2を基質として調べた。　Ca^{2+}存在下では、Fig.1に示した範囲で、未処理のＫⅡとほぼ同じ活性を維持した。　Ca^{2+}非存下での活性は、ＫⅡへの燐酸の取り込みにほぼ平行して増加し、用いた条件下では、未処理、+Ca^{2+}での活性の約50%程度のところでプラトーに達した。　その時点のＫⅡについて活性の基質濃度依存性を調べた。　Ca^{2+}存在下では、MAP2に対するKmと、Vmに、自己燐酸化による影響はみられなかった。　Ca^{2+}非存下では、Vmは同じだったが、Kmは約2倍であった(Fig.2)。ATPについても、Ca^{2+}存在下では未処理のＫⅡと区別できなかったが、Ca^{2+}非存下では､Kmは約1.5

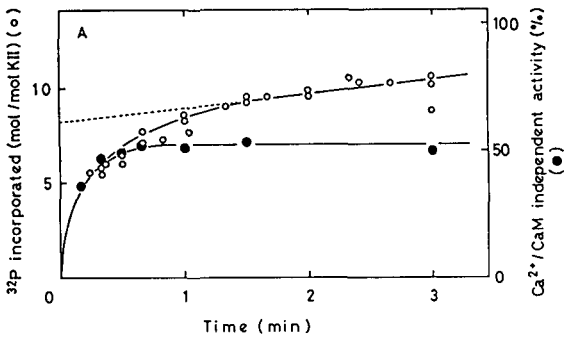


Fig.1 Assay condition; 50μM ATP, 0.58μM MAP2

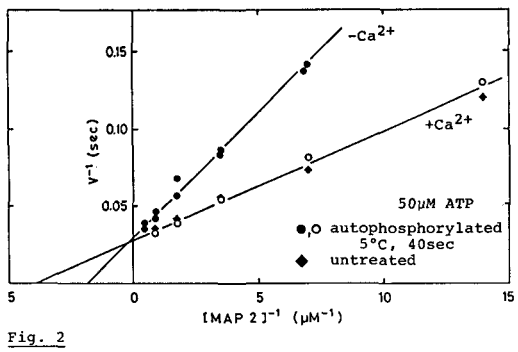


Fig. 2

倍であった(Fig.2)。 これらの結果は、活性の見かけのCa^{2+}/CaM非依存性の程度が基質濃度に依存して変化することを意味する。

第2相の遅い燐酸化の影響を調べるために、30° Cで自己燐酸化を行ったところ、著しい活性の低下がみられた。低下した活性の基質濃度依存性を調べたところ、活性とMAP2濃度の両逆数プロットは直線とはならず、強い負の協同性を示した。 しかし、Vmは変化していないと仮定し、Hillの式で回帰して得られた理論曲線は、 Fig.3に示したように、測定値と良く一致した。 ATPについては、両逆数プロットは直線となり、単純な非競争阻害を示した。これは、第2相での自己燐酸化が、 MAP2に対する競争阻害を誘き起こしたことを意味し、自己燐酸化された部位による分子内生成物阻害が示唆された。

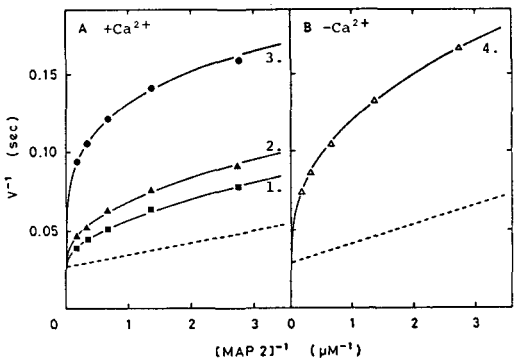


Fig. 3

■ 1.9 mol P incorporated / mol subunit
▲,△ 2.5 "
● 3.1 "

Solid lines are theoletical ones with following parameters.

1. H=0.56, K_m=0.93μM 2. H=0.46, K_m=2.0μM
3. H=0.26, K_m=126μM 4. H=0.41, K_m=17μM

Broken lines are from Fig.2.

Assay condition; 50μM ATP

一方、 第1相でCa^{2+}/CaM非依存の活性が最大値に達したKII二ついて、燐酸化されたアミノ酸残基を調べたところ、ThrとSerが約4：3の比で検出された。 これは、Ca^{2+}/CaMに依存しない活性の発現が1つの特定のアミノ酸残基の燐酸化には対応しないことを示唆する。 従って、KIIにはサブユニット当り3箇所の近接した自己燐酸化部位があり、そのどれか一つが燐酸化されるとCa^{2+}/CaM非依存の活性が現れ、2つめ以降の燐酸化によって阻害が誘き起こされるものと考えられる。

《 文献 》

1. Fujisawa, H., Yamauchi, T., Okuno, S., & Nakata, H. (1984) in CALCIUM REGULATION IN BIOLOGICAL SYSTEMS (Ebashi, T. et al., eds.) pp.129-140, Academic Press
2. Lai, Y., Nairn, A.C., Gorelick,F., & Greengard, P. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5710-5714
3. Yamauchi, T. & Fujisawa, H. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 213-219
4. Yamauchi, T. & Fujisawa, H. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 15-21
5. Yazawa, M. (1983) Seikagaku 55, 370-382
6. Kim, H., Binder, L.I., & Rosenbaum, J.L. (1979) J. Cell. Biol. 80, 266-276
7. Corbin, J.D. & Reimann, E.M. (1974) in Methods in Enzymology 38, pp287-299
8. Hunter, T. & Sefton, B.M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1311-1315

154 L型Caチャンネルに対するモノクローナル抗体

高橋正身
（三菱化成生命研・脳神経化学）

〔要約〕

精製したニワトリシナプス膜で繰り返し免疫したマウスから得た脾臓細胞とミエローマ細胞（NS1）とを細胞融合させハイブリドーマを作成し神経細胞のCaチャンネルに対するモノクローナル抗体の作成を試みた．得られた抗体（MAC－BL1）は可溶化したニワトリのL型Caチャンネルを容量依存的に免疫沈降させた．さらにニワトリ心筋及び骨格筋のL型Caチャンネルをも免疫沈降させたがこれらの場合には脳の場合の約6倍量の抗体が必要であった．これに対してラット脳のL型CaチャンネルはMAC－BL1によってはまったく免疫沈降が起きなかった．次にωコノトキシン結合部位の性質を調べるためニワトリシナプス膜からωコノトキシン結合部位を可溶化しMAC－BL1と作用させるとその一部は免疫沈降した．この結果はニワトリシナプス膜上のωコノトキシン結合部位の少なくとも一部はその構造中にL型Caチャンネルときわめてよく似た構造を持っている事を示している．

【目的】

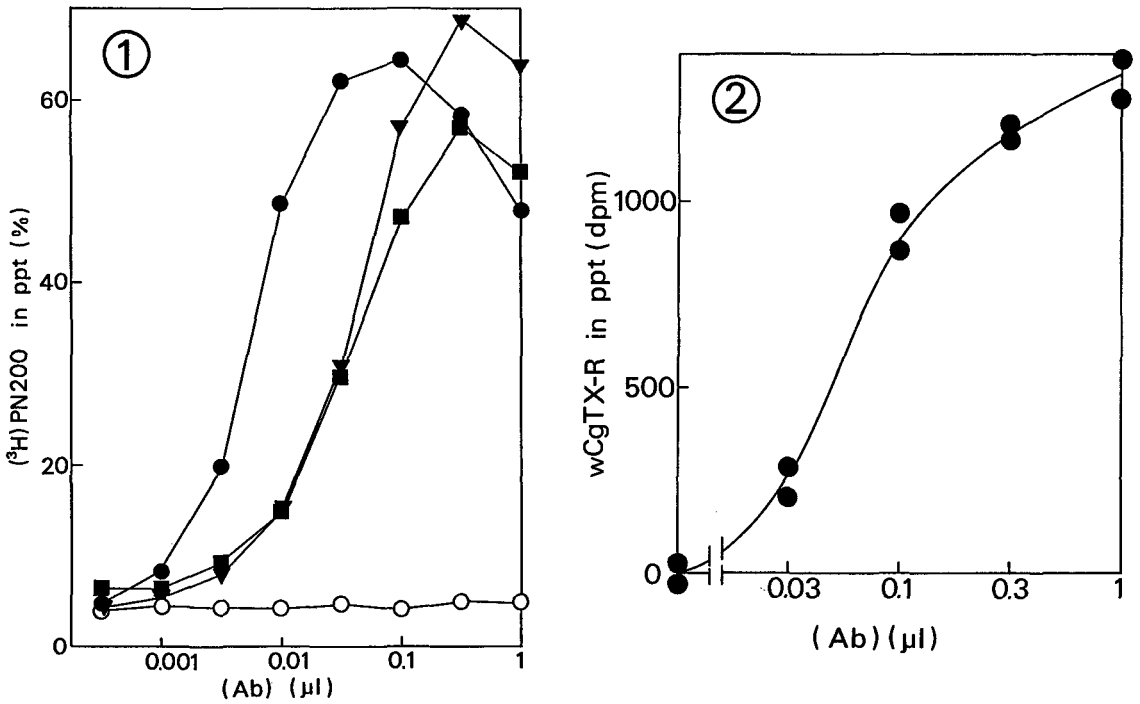
神経細胞にはT型，N型及びL型と呼ばれる少なくとも3種類の異なった性質を示すCaチャンネルが存在している事が示されているが，それらの化学構造に関してはまだ殆ど明らかにされていない．我々は昨年，マウスでつくった骨格筋L型Caチャンネルに対するポリクローナル抗体（PAC－1）の交差性を利用し，中枢神経組織のL型Caチャンネルにも骨格筋Caチャンネルのα_2と相同のサブユニットが存在することを明らかにした．しかしながら得られた抗体量がわずかであったためそれ以上の解析を進めることが出来なかった（5）．今回我々はこの問題点を克服すべく神経のL型Caチャンネルに対するモノクローナル抗体の作成を試みた．

【方法】

庶糖密度勾配法で精製したニワトリシナプス膜をアジュバンドと共に繰り返し腹腔内投与しBalb／cマウスを免疫した．抗体価の測定は^{3}H－PN200で標識し，部分精製したニワトリ脳のL型Caチャンネルを用いたラジオイミュノアッセイ法（5，6）で行った．血清中の抗体価が上昇したマウスから調製した脾臓細胞とミエローマ細胞（NS1）とからハイブリドーマを作った．抗体産製細胞を希釈法によってクローニングした後大量に培養し培養液より抗体を調製した．精製はプロティンAセファロースカラムを用いて行った．イミュノグロブリンのタイプはザイメット社製のタイピングキットを用いて決定した．

【結果及び考察】

得られたモノクローナル抗体（MAC－BL1）のタイプはH鎖がIgG2a，L鎖はκであった．図1に示すようにMAC－BL1は可溶化し，部分精製したニワトリ脳のL型Caチャンネルを容量依存的に免疫沈降させた．しかしながらMAC－BL1はラットのチャンネルは認識せず抗体量を最も多くした場合にも有意な沈降はまったく認められなかった．一方ニワトリ心筋膜及び骨格筋ミクロゾームから可溶化，部分精製したL型Caチャンネルは図1に合わせて示すようにMAC－BL1によって免疫沈降した．％で示した最大沈降量はどちらの場合も脳の場合とほぼ同じであったが最大値を得るためには脳の場合の約6倍量の抗体が必要であった．これらの結果はMAC－BL1の認識部位はL型Caチャンネルの構造中，動物種差による違いが著しいが異なる組織間での差異は余り大きくない部分であることを強く示している．MAC－BL1の認識部位と種々のCaチャンネル標識リガンドの結合部位との関連を調べるためニワトリシナプス膜への^{3}H－PN200－110，^{3}H－D888，^{3}Hージルチアゼン及び^{125}Iーωコノトキシンの結合に対するMAC－BL1の影響を調べたところいずれのリガンドの結合にもまったく影響を及ぼさなかった．した



（図1） MAC－BL1と種々の材料のL型Caチャンネルとの交叉性．^{3}H－PN200－110で標識して部分精製したニワトリ脳（●），心筋（▼），骨格筋（■）およびラット脳（○）のL型Caチャンネルと様々な量のMAC－BL1を反応させ，形成した抗原抗体複合体の放射活性を加えた総放射活性に対する%表示で示したもの．

（図2） MAC－BL1とωコノトキシン結合部位との交叉性．^{125}I－ωコノトキシンで標識したニワトリシナプス膜を可溶化し様々な量のMAC－BL1と反応させ抗体と結合した放射活性を示してある．

がってMAC－BL1の認識部位はこれらのリガンドの結合部位とは異なる部位であろうと結論された．

南方産の有毒イモ貝の毒腺から得られるペプチド毒であるωコノトキシンはニワトリ8日胚の感覚神経細胞を用いた研究ではN型及びL型Caチャンネルに不可逆的に作用するすることが明らかにされている（4）．またωコノトキシンで標識される成分として分子量34，000～310，000の成分が同定されているがそれらとN型，L型Caチャンネルとの関係はまだ明らかになっていない（1－4）．この問題を解く第一歩としてニワトリシナプス膜からωコノトキシン結合部位をCHAPS及びTriton－X100を含む注出液で可溶化しMAC－BL1と反応させると図2に示すように容量依存的に免疫沈降した．この結果はニワトリシナプス膜上のωコノトキシン結合部位の少なくとも一部はその構造中にL型Caチャンネルときわめてよく似た構造を持っている事を示している．今後MAC－BL1は神経のみならず様々な細胞のCaチャンネルを研究する上で非常に有力な道具になると考えられる．

【文献】

(1) Abe T. & Saisu H.(1987) J.Biol.Chem.,**262**,9877-9882

(2) Barhanin,J.,Schmid,A., & Lazdunski,M.(1988) Biochem.Biophys.Res.Commun.,**150**,1051-1062

(3) Cruz,L.J.,Johnson,D.S., & Olivera,M.(1987) Biochemistry,**26**,820-824

(4) Fox,A.P.,Nowycky,M.C., & Tsien,R.W.(1987) J.Physiol.,**394**,149-172

(5) Takahashi,M. & Catterall,W.A.(1987) Science,**236**,88-91

(6) Takahashi,M. & Catterall,W.A.(1987) Biochemistry,**26**,5518-5526

155　ラット脳膜分画における非ラベル 1,4-ジヒドロピリジン系Ｃａ拮抗薬の結合動態の解析

伊原正樹，倉田立子，鈴木国夫，矢野光夫

（萬有製薬（株）中央研、生化学）

〔要約〕

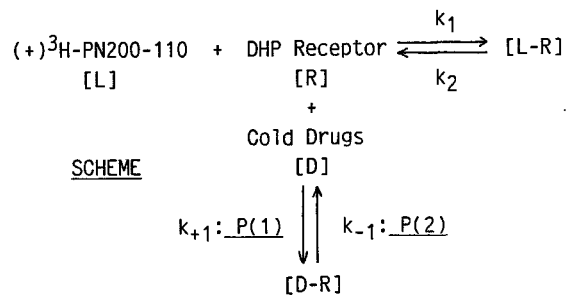
ラット脳膜分画を用いて、1,4-ジヒドロピリジン(DHP)系Ca拮抗薬(+)^{3}H-PN200-110(PN)の特異的結合動態におよぼす非ラベル体の影響より、非ラベル体の結合解離速度定数(k_{+1}, k_{-1})を求める方法について検討した。予め、非ラベル体にて前処理することにより受容体の一部を非ラベル体で占有した膜分画への^{3}H-PNの結合は、同時に添加されたものに比べ特異的結合の遅れが生じた。同時添加の場合と非ラベル薬剤にて前処理した場合について、各々の^{3}H-PN結合のtime-courseを測定し、これら2種のtime-courseが最もよくone-receptor two-ligand model(Scheme)にあうように非ラベル薬剤の受容体へのk_{+1}, k_{-1}をRunge-Kutta-Gill法により求めた。この解析法にて得られた非ラベル体のk_{+1}, k_{-1}は、(+)-^{3}H-PN200-110自身のk_{+1}, k_{-1}として実測されたものと同等であり、またこれらの定数は使用した非ラベル体の濃度に依存しなかった。以上より、この解析方法により信頼性のある非ラベル体のk_{+1}, k_{-1}が求められることがわかった。さらに、この方法を用いて数種のDHP系Ca拮抗薬のk_{+1}, k_{-1}を解析した。NB-818に比べ、Nicardipine, Nimodipine, Nitrendipineのk_{+1}は、各々 1.4, 2.0, 2.0倍、またk_{-1}は 1.2, 4.8, 5.4倍であり、NB-818がこれら3種の薬剤に比べ、受容体への結合解離がともに遅いことが示された。

［緒言］

薬物の受容体への結合解離動態は、その親和性とともに薬物の受容体への作用を調べるうえで重要である。近年、緩徐な作用および持続性を目指して多くのDrug Designが進められているが、これらの作用は、薬剤の受容体との遅い結合および解離に依存するものが多い。薬物の受容体への作用を調べるためには、ほとんどの受容体は、リガンドにたいして低nM範囲の平衡解離定数(K_D)を持っているので、それぞれの薬剤の高比活性ラベル体が必要であり、このような高比活性ラベル体の合成は、多くの場合容易ではない。従来から、親和性については、特異的に結合する高比活性ラベル体の入手可能な場合、そのラベル体の結合に対する非ラベル薬剤の阻害より求められてきた[2]。しかし、現在までに受容体との非ラベル体の結合動態の遅さについて報告されたものはあるが[3),4)]、結合解離速度定数を求めたものは高比活性ラベル体についてだけであり、非ラベル体の受容体について求めたものはない。今回我々は、DHP系Ca拮抗薬について、非ラベル薬剤の受容体への結合解離速度定数を求める方法を開発したので報告する。

［実験方法］

１）<u>膜分画の調製</u>：SD系雄性ラット(8-10週令)を断頭処分し大脳半球を摘出した。10倍量0.32M Sucroseでホモジナイズした後、遠心分離(48000g, 20min)し、得られた沈澱を50mM Tris-HCl, 10uM $CaCl_2$, 10uM $MgCl_2$(pH 7.4) buffer(A buffer)で洗浄して脳膜分画とした[4)]。



２）<u>結合動態の測定および解析</u>： 非ラベルCa拮抗薬を脳膜分画と A buffer中、25℃にて 90min, preincubationした後、^{3}H-PN(final: 0.03nM)を加えさらにincubationした。6時間にわたり一定時間ごとに一定量を採取し、冷 A bufferを加え直ちにWhatman GF/C filterで 吸引ろ過し、さらに冷 A bufferで3回洗浄した後、filter上の放射活性を測定し、結合量の推移を調べた。特異的結合は、1uM (±)PNを添加し

て測定した非特異的結合量を全結合量から差し引いて求めた。また、非ラベルCa拮抗薬と^{3}H-PNを脳膜分画に同時に加えた場合についても同様に特異的結合量の推移を求めた。以上の実験により求められた2種の結合量変化曲線が、one-receptor two-ligand model(Scheme)より導かれる連立微分方程式に同時にあてはまるようにパラメータである非ラベル体の結合解離定数P(1), P(2)をRunge-Kutta-Gill法[5]により求めた。

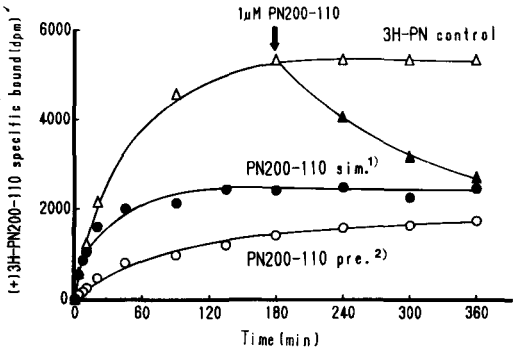


Fig.1 Effects of PN200-110 on the time course of (+)^{3}H-PN200-110 binding in rat brain membranes. The experiments were performed at 25°C with 0.03nM (+)^{3}H-PN200-110.

1) PN200-110(0.1nM) was simultaneously added with membranes and (+)^{3}H-PN200-110.
2) PN200-110(0.1nM) was preincubated with membranes for 90 minutes, and then (+)^{3}H-PN200-110 were added.

［結果および考察］

1）非ラベルPN200-110結合解離速度定数の解析（測定系の確認）

非ラベルPNをあらかじめ受容体とpreincubationすることにより、同時添加した場合に比べ^{3}H-PN結合の遅れが生じた(Fig.1)。これらのtime-courseを上記のように解析する事によりPNのk_{+1}, k_{-1}を求めた(Table 1)。これらの速度定数は、ラベル体(+)^{3}H-PNの速度定数(K_{+1} : 0.71±0.03nM^{-1}·min^{-1}, k_{-1}:0.0042±0.0002min^{-1})およびそれらの文献値[1]に比べ、k_{-1}はほぼ同じであり、またk_{+1}は、約50%であった。これは、使用した非ラベルPNがラセミ体であり(-)PNには全く活性がないため活性体である(+)PNの濃度が50%となり、濃度に依存したパラメーターであるk_{+1}だけを約50%にしたものである。また、非ラベル体の濃度を0.025から0.2nM まで変化させても k_{+1}は 0.29±0.03nM^{-1}·min^{-1}、k_{-1}は 0.0035±0.0002min^{-1} と一定であり、非ラベル体の濃度はこの範囲ではほとんどk_{+1}, k_{-1}に影響しなかった。以上より、非ラベル体速度定数がラベル体速度定数と同様に信頼性高く求まることが確認された。

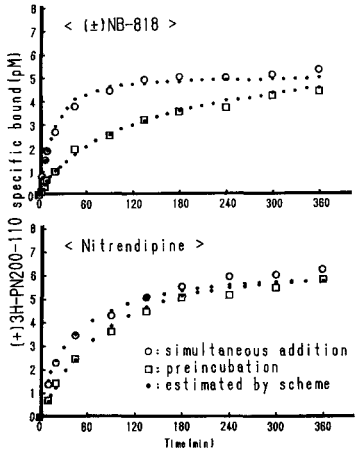


Fig.2 Comparison of the delay to equilibrium of (+)^{3}H-PN200-110 binding by preincubation of (±)NB-818 and Nitrendipine. Each drug concentration was 0.1nM.

2）非ラベルDHP系Ca拮抗薬の結合解離速度定数の解析

Fig.2に示すように、非ラベル体前処理によるラベル体結合の遅れは非ラベル薬剤の性質により異なる。NB-818および代表的なDHP系Ca拮抗薬について求めたk_{+1}, k_{-1}をTable 1 に示す。NB-818のk_{+1}, k_{-1}は、Nicardipine, Nimodipine, Nitrendipineに比べ小さく、受容体への結合解離がともにこれらの薬剤に比べ遅いことが示された。さらに、NB-818の活性isomer(-)NB-818については、ラセミ体であるNB-818に比べ、k_{+1}は理論値である200%より若干低いものの、k_{-1}はほぼ等しく、ラセミ体中の非活性isomer(+)NB-818が(-)NB-818の結合動態にほとんど影響しないことが示された。

Table.1 Rate constants of dihydropyridines binding in rat brain membranes at 25°C

Drug	Rate Constants		Kd
	Association(k+1) (nM^{-1}min^{-1})	Dissociation(k-1) (min^{-1}x10^{-3})	(pM)
NB-818	0.28 ± 0.02 (100)	7.3 ± 0.6 (100)	27 ± 2.7 (100)
(-)NB-818	0.46 ± 0.04*(164)	7.2 ± 0.5 (99)	16 ± 0.8* (59)
Nicardipine	0.38 ± 0.06 (136)	9.0 ± 0.1 (123)	24 ± 2.7 (89)
Nimodipine	0.56 ± 0.08*(200)	34.7 ±13.0*(475)	61 ±17.0*(226)
Nitrendipine	0.55 ± 0.10*(196)	39.7 ±0.01*(544)	71 ± 8.1*(263)
PN200-110	0.31 ± 0.03 (111)	3.5 ± 0.2* (48)	12 ± 1.2* (44)

* $p < 0.05$ (Mean ± SE)

［参考文献］

1)Gregory,A.W.,and Robert,E.O.(1985)J.Biol.Chem.**260**,8456-8464
2)Howard,R.L.,William,R.R.,and Henry,I.Y.(1984)Life Sci. **35**,721-732
3)Josee,E.L.,and Walter,G.(1986) Drug Dev.Res. **8**,119-131
4)Miura,A.,Ukai,Y.,and Enomoto,H.,et al.(1986)Arzheim.-Forsch./Drug Res. **36**,1323-1328
5)Yamaoka,K.,et al.(1983) J.Pharm.Dyn. **6**,596

156 ω-conotoxin 受容体（Caチャンネル成分）の可溶化

山口　徹，西須英雄，三井宏美*，阿部輝雄
（新潟大・脳研・神経化学，理学部・生物*）

〔要約〕
牛脳において ω-conotoxin GVIA（GVIA）結合部位について検討した。[^{3}H]Pr-GVIA は、P_2膜分画において、飽和性に高・低両親和性をもって結合し、そのみかけのKd値は3 pMと3.5 nMであり、Bmax値は0.38および2.91 pmol/mg proteinであった。Caアンタゴニストの中で diltiazemは高親和性結合を立体特異的に阻害した。また、[^{125}I]で標識したGVIAのアジドニトロベンゾイル誘導体（ANB-^{125}I-GVIA)を用いた光親和標識により、分子量約310 kDa 、230 kDa および 37kDaの三成分が特異的に標識された。一方、P_2膜分画の digitonin処理によって得られた可溶化分画には、Kd値 0.46 nMの単一の結合部位が存在し、ショ糖密度勾配遠心法により約20 Sの沈降係数をもつことが明らかになった。なお、この結合が diltiazemによって立体特異的に阻害されることから、P_2膜分画の高親和性結合部位に相当すると考えられる。可溶化分画においても分子量約310 kDa 、230 kDa の成分が特異的に光標識された。

従来、Caチャンネル分子の研究は、主として dihydropyridine系薬剤を用いて行なわれて来たが、神経系には、dihydropyridine 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型の存在が知られている（5)。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型および神経系のL型を阻害することが知られている。今回、このGVIAをプローブとして牛脳のGVIA受容体（おそらくCaチャンネル成分）の可溶化を試みた。

［実験方法］

標識リガンドとしてはGVIAを20 mM ホウ酸緩衝液(pH 8.5)中で、N-succinimidyl[2,3-^{3}H]propionateと反応させ、CM-Sephadex C-25によって mono[^{3}H]propyl GVIA ([^{3}H]Pr-GVIA)を分離し、以下の実験に用いた。P_2膜分画（粗ミトコンドリア分画）は、牛の大脳皮質から遠心法にて調整し、-80°C で凍結保存した。可溶化は各種界面活性剤で、4°C で30分間撹伴する事により行ない、10^5 xgで60分間遠心して得られた上清を可溶化分画とした。リガンド結合実験は、[^{3}H]Pr-GVIA と 4°Cで90分間インキュベートした後、P_2膜分画の場合はGF/C、可溶化分画では 0.6% ポリエチレンイミン処理したGF/Fガラスフィルターを用いて吸引ろ過法で行なった。沈降係数は、可溶化分画を 33 mlの 5-20%ショ糖溶液上に重層し10^5 xgで13時間遠心後、遠沈管の底から分取することによって求めた。ANB-^{125}I-GVIA を用いた光親和標識は、既報（2)の方法によって行なった。

［結果と考察］

[^{3}H]Pr-GVIA 結合の Scatchard解析の結果、P_2膜分画には、高親和性(Kd=3.0 ± 0.8 pM, Bmax=0.38 ± 0.03 pmol/mg protein) および低親和性(Kd=3.5 ± 1.0 nM, Bmax=2.91 ± 0.59 pmol/mg protein) 結合が認められた。この結合は、ラットシナプス膜分画への ^{125}I-GVIAの結合と同様に種々の金属イオンによって阻害された（1)。また、1 μM GVIA 存在下の解離実験より、解離反応は部分的でほぼ不可逆な性質をもつ事が明らかになった。この結果は、電気生理学的実験から得られたGVIAの性質をよく反映していると考えられる（4)。次に、各種薬物の [^{3}H]Pr-GVIA結合に対する影響を検討した結果、dihydropyridine や verapamilは 40 μMでもほとんど影響しないのに対して、diltiazem は高親和性結合を、

立体特異的に阻害した。d-cis-diltiazem のIC_{50}値は、約13 μMであった。ANB-^{125}I-GVIA を用いた光親和標識によって分子量約310 kDa, 230 kDa および 37 kDa の三成分が光標識された。これらの成分は、1 μMのGVIA存在下では全く観察されないので、特異的な成分を反映していると考えられる。P_2膜分画を、各種界面活性剤（Triton X-100, CHAPS, octyl-glucoside, コール酸ナトリウムなど）で処理したところ、20% グリセリン存在下で 2-3% の digitoninで処理した場合に最も高いGVIA結合活性（全活性の約5%）が可溶化分画に検出された。可溶化した [^{3}H]Pr-GVIA結合活性の安定性は温度依存性であり、20°Cでは数時間で半分になる。よって以下の実験は全て 4°Cで行なった。Scatchard 解析の結果、可溶化分画中の [^{3}H]Pr-GVIA結合部位は、単一成分から構成され、そのkd値は0.46 ± 0.04 nM、Bmax値は0.32 ± 0.02 pmol/mg protein である事が明らかになった（図 1）。可溶化分画における金属イオンによる[^{3}H]Pr-GVIA 結合阻害は、P_2膜分画のそれとよく一致した。なお、この結合が diltiazemによって立体特異的に阻害される事から、膜上の高親和性結合部位に相当すると考えられる。可溶化分画においても、ANB-^{125}I-GVIAによって、分子量約 310 kDa、230 kDa の成分が光標識され、1 μM GVIA や 100 μM d-cis-diltiazem によって阻害される事は、結合実験の結果とよく一致する。可溶化した digitonin-GVIA 受容体複合体の沈降係数をショ糖密度勾配遠心法にて求めたところ、ラット脳の dihydropyridine 受容体と同様（3）、約20 S の単一ピークを示した（図 2）。この結果から、脳のGVIA受容体は、dihydropyridine受容体とある程度相同性を持つ可能性が示唆される。今後、GVIA受容体の諸性質についてさらに検討するとともに、単離・精製を進める予定である。

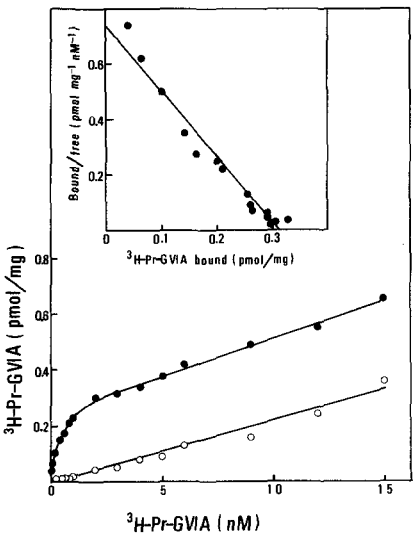


図 1. [^{3}H]Pr-GVIA の可溶化分画への結合。
全結合（●）と非特異的結合（○）との差より計算された特異的結合は、Scatchard プロットとして示されている。

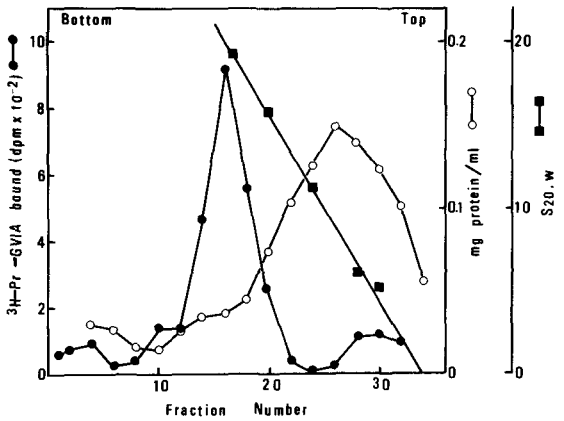


図 2. 可溶化分画のショ糖密度勾配遠心法による分画

[文献]

1. Abe, T. et al. (1986) Neurosci. Lett. 71, 203-208
2. Abe, T. et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 9877-9882
3. Benson, M.C. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258, 7280-7283
4. Koyano, K. et al. (1987) Eur. J. Pharmacol. 135, 337-344
5. Nowycky, M.C. et al. (1985) Nature 316, 440-443

157 ヤリイカ巨大軸索膜裏打ち構造とＮａチャンネルゲーティング

松本　元*、市川道教*、新井孝夫**、月田承一郎***
（*電子技術総合研究所、**筑波大基礎医学系、
***東京都臨床医学総合研究所）

〔要約〕

ヤリイカ巨大軸索の膜裏打ち構造・細胞骨格は特異に分化している。膜近傍の細胞骨格はアクチンフィラメントと微小管から成り、ともに膜と系状の蛋白質構造体を介して結合する。この事は膜機能が細胞内から調節・制御をうけるとすると、アクチンフィラメントが膜に付着する膜領域と微小管が膜に付着する膜領域で機能分化していることを示唆する。

一方、カルモジュリン阻害剤をヤリイカ巨大軸索内に灌流すると、Ｎａチャンネルのゲート機能をほぼ完全に抑制することを見いだした。この作用は細胞内から起こり、Ｎａチャンネルに特異的で且つほぼ可逆である。

膜裏打ち構造の特異的分化、特にアクチンフィラメントがフォードリンを介して膜に付着していると思われることとＮａチャンネルのゲート機構の関連につき研究を進めている。

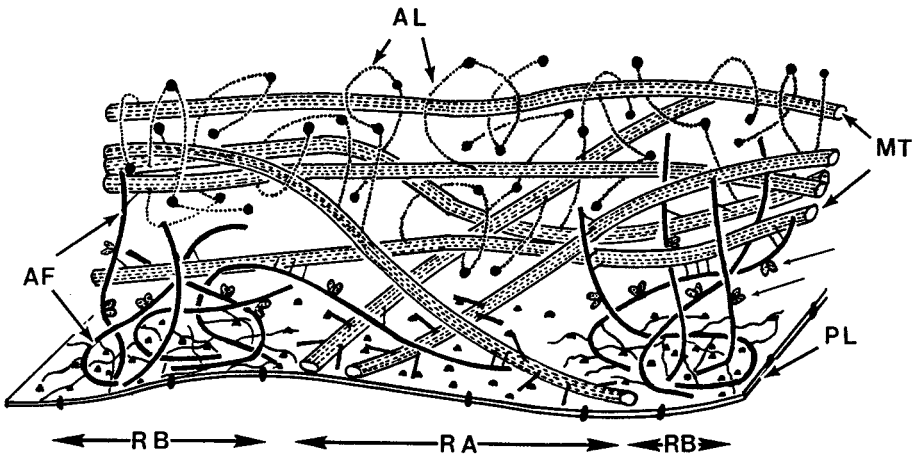


図１：ヤリイカ巨大軸索膜裏打ち構造・細胞骨格のモデル[1)]
RA：微小管付着の膜領域、RB：アクチンフィラメント付着の膜領域、MT：微小管、
AF:アクチンフィラメント、PL：軸索膜、AL:アクソリン

ヤリイカ巨大軸索の膜裏打ち構造・細胞骨格について、その構造およびそれを構成する蛋白質と蛋白質の性質を研究している。その結果、次の様なことが明かになった[1,2)]（図１）：（１）細胞骨格は主としてアクチンフィラメントと微小管から成る。（２）アクチンフィラメントは軸索膜と特異的に発達した二次元の網み目構造を介して結びついている。網み目はフォードリンとアクチンから成っていると思われる。この様なアクチンフィラメント付着領域がスポット状に２－４μm間隔で局在する。（３）微小管は、主としてアクソリニンからなる網み目構造の中を軸索膜と平行に束となって走る。微小管の中に、膜に付着するものもある。膜と微小管とが付着する領域を微小管付着の膜領域と呼ぶ。微小管付着膜領域はアクチンフィラメント付着膜領域の間に存在し、微小管と膜とはひも状の蛋白質構造体で結びついている。（４）従って膜は細胞内から微小管とアクチンの付着領域で異なって機能分化している、と考えられる。

軸索の二大機能は情報伝達と物質輸送である。後者のいわゆる軸索機能は軸索中心部の微小管が主として担っている。図1の軸索周辺部の微小管と軸索輸送の微小管は構造的にも[1]生化学的性質も[3]まったく異なる。軸索膜の主機能は電気的興奮能である。そこで興奮能と軸索膜近傍の特異的に分化した細胞骨格構造との関連を探る為に、アクチンフィラメントと膜蛋白にフォードリンが介在しているらしいことを根拠に、カルモジュリン阻害剤の興奮能への効果をみた。その結果、次のことが明かになった[4,5]：（1）カルモジュリン阻害剤はPDEの活性阻害を起こすと同程度の薬量で、細胞内からほぼ可逆的にＮａ電流を特異的に、Ｎａ電流を特異的に（Ｋ電流に余り影響せず）抑制する[4]。（2）Ｎａ電流の阻害はＮａゲートの抑制を介して起こる。[5]

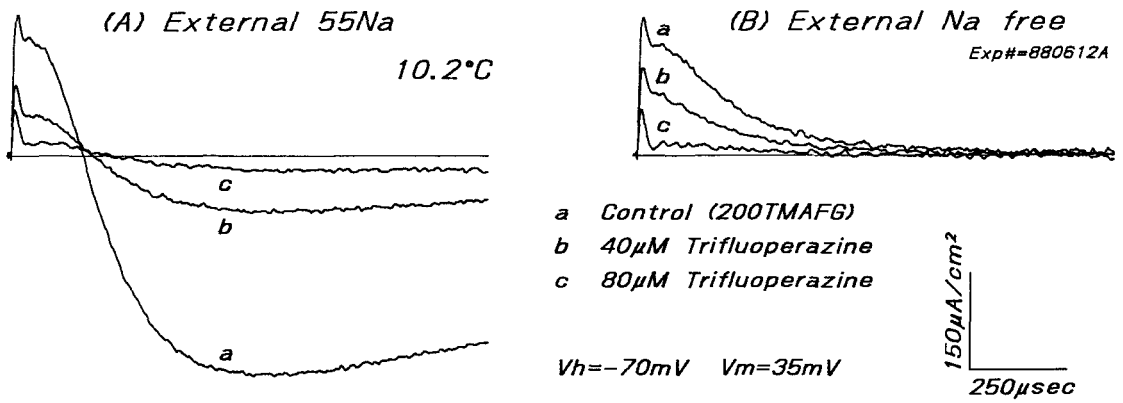


図２：カルモジュリン阻害剤トリフルオペラジンのＮａゲート電流に及ぼす効果[5]

これらの生理実験結果が上記の特異的に分化した膜裏打ち構造と直接関連するかどうかを調べる為、Ｎａチャンネルがアクチンフィラメント付着の膜領域に局在するかどうか、フォードリンのモノクローン抗体に果してカルモジュリン阻害剤と似た効果を引き起こすものがあるかどうかなどによってさらに実験的検証を進めている。

文献

(1)Tsukita,S. Tsukita,S. Kobayashi,T. and Matsumoto,G. (1986) J.Cell Biol. 102:196.

(2)Matsumoto,G. Tsukita,S. and Arai,T. (1988) Organization of the Axonal Cytoskeleton (Alan Liss Pub,NY)

(3)Arai,T. and Matsumoto,G. (1988) J.Neurochem.(in Press).

(4)Urayma,M. and Matsumoto,G. (to be submitted to J.Neuroscience)

(5)Ichikawa, M. and Matsumoto,G. (to be submitted to J.Neuroscience)

158 ラット脳ＮａＫ－ＡＴＰａｓｅ α－３サブユニットｃＤＮＡの３Ｔ３細胞への導入とＮａポンプ活性の発現

原　諭吉、二家本　晃、小島利之、松本暁子
中尾　真　（東京医歯大　医生化）

〔要約〕

ラット脳 Na^+K^+-ATPase α-3 サブユニットをコードするcDNAとSV40プロモーターを持つプラスミドをneomycin 耐性遺伝子と共にリン酸－カルシウム法で、BALB/c 3T3細胞に導入した。得られた安定な形質転換細胞クローン T3-3-3 を用いて、 Na^+K-ATPase活性およびNaポンプ活性のウワバイン感受性を測定した。α-3は、ウワバイン高親和性触媒サブユニットであることが見出された。また、ウワバイン感受性は、αサブユニットの性質によって決定される事が示唆された。

目的

ラット脳 Na^+K^+-ATPase は、αサブユニットが異なる二種のアイソザイムが存在する事が知られていた。近年cDNA クローニングに依り第三のαサブユニットと思われる配列が見出され (2,5)、α-3と名付けられた。α-3 mRNAは、ラット脳、脊髄、胎児ラット心臓に見いだされ、従来知られていたα＋に較べ、より神経組織に特異的に発現している。しかし、α-3タンパクも酵素活性もいまだに検出されていない。このα-3が Na^+K^+-ATPase の触媒サブユニットである事およびその酵素学的性質を知るには、α-3 cDNA からポンプ活性のあるタンパクの発現が欠かせない。われわれは、α-3 cDNA を培養真核細胞に導入し、α-3を発現する安定な形質転換細胞の作製に成功した。このクローンのウワバイン感受性について報告する。

方法

SV40プロモーターとラット脳 Na^+K^+-ATPase α-3サブユニットをコードするcDNAを含む Okayama-Burg ベクター組換え体 pNAK131 のクローニングは前報による (2)。 10 μg pNAK131 と 1 μg neomycin耐性遺伝子 pCDNeo を、0.125 M $CaCl_2$ と混合し、$2x10^5/27cm^2$ のBALB/c 3T3 細胞に加えた。35℃, 5% CO_2で20時間培養後 Dalbeccoの培地に置き換え、更に二日間37℃ 4% CO_2 で培養した。これを $1x10^5/75\ cm^2$になるように撒き、300 μg/ml G-418を加え 6 週間培養を行なった (1)。

RNA ブロットハイブリダイゼイション； トータルRNA は、GTC/CsTFA 法に依った (4)。RNA をglyoxal で変性後、１％寒天ゲルで泳動した。ハイブリダイゼイションのプローブには、pNAK131 から切り出した、3'- 非翻訳領域 DdeI(3044)/ApaI(3349)断片を用いた。

Na^+K-ATPase の活性測定；細胞ホモジネートを中尾らの方法 (3)によりNaI 処理し、140 mM NaCl,14 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$,3 mM ATP, 0.5 mM EDTA, 10-20 μｇホモジネートと種々の濃度のウワバインを加え37℃で行なった。

Naポンプ活性の測定； $1x10^5$ の細胞を生理的食塩水に浮べ、5 mM $^{86}RbCl$ と種々の濃度のウワバインを加え全量を0.1 mlとした。37℃,10 分反応後、細胞内の放射活性を測定した。

結果

$2x10^5$ の細胞あたり、48個のネオマイシン耐性クローンが得られ、ノーザンブロット解析から17クローンに、α-3 mRNA の存在が確認された。このうちで、mRNA量の多いクローンT3-3-3 を以下の実験に用いた。T3-3-3, 3T3 およびラット脳のRNA のノーザンブロットの結果を図１に示す。T3-3-3とラット脳 RNAに陽性バンドが見ら

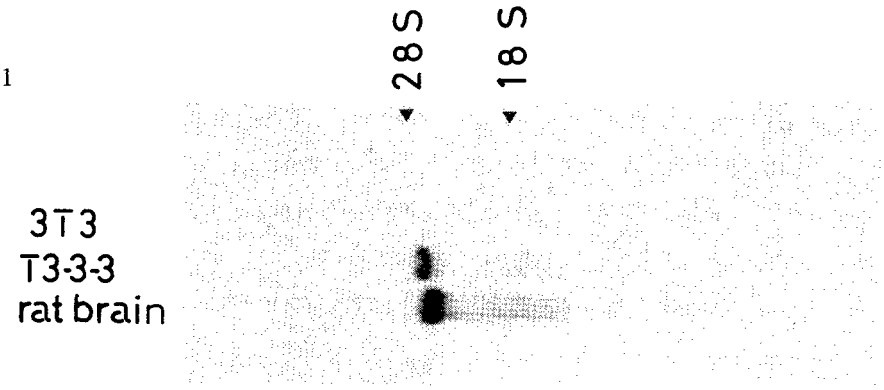
れた。

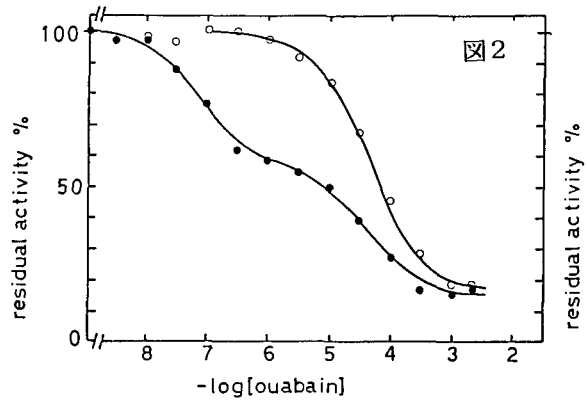
Na^+K^+-ATPase 活性NaI 処理ホモジネートの Na^+K-ATPase活性は、3T3 細胞で2.3, T3-3-3で4.1 μmoles Pi/mg/h であった。これらの活性のウワバイン感受性を図２に示す。3T3 ではウワバインに対し一相性の阻害曲線（○）が得られ、そのKiは、$4.5x10^{-5}$M であった。一方T3-3-3（●）では二相性を示し、$4.5x10^{-5}$ M と $8x10^{-8}$ Mの二個のKiが得られた。これらの結果から新たに発現した活性はウワバイン高感受性である事が強く示唆された。これらの細胞のRb^+ 取り込み速度のウワバイン感受性を図３に示す。計算されたKiは、3T3 細胞（○）で$4x10^{-5}$M T3-3-3（●）で$4x10^{-5}$, $8x10^{-8}$M であった。

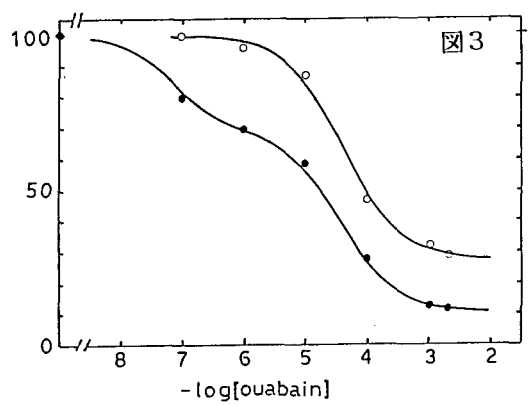
考察

ラット脳 Na^+K^+-ATPase α-3は、ウワバイン高感受性触媒サブユニットである。従来脳型 Na^+K-ATPaseとして調べられて来た性質は、α＋とα３の混ざったものを観察していた思われる。われわれは、ラット脳 Na^+K-ATPase α＋を発現する細胞クローンも得ており、これらを用いおのの性質を調べる事が必要であろう。

図1







1) Chen, C and Okayama, H (1987) Mol. Cel. Biol. 7, 2745-2752

2) 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

3) Nakao, T., Nakao, M., Mizuno, N., Komatsu, Y. and Fujita, M. (1973) J. Biochem. 73, 609-619

4) Okayama, H., Kawaichi, M., Brownstein, M., Lee, F., Yokota, T. and Arai, K. (1987) in Methods in Enzymology (Wu, R, and Grossman, L. eds) pp 3-28, Academic Press, London

5) Shull, G.E., Greeb, J. and Lingrel, J.B. (1986) Biochemistry 25, 8125-8132

159 グルタミン酸によるニューロンのＮａポンプ活性の上昇

井上順雄，松井英男
（杏林大・医・生化学）

〔要約〕

ラット胚大脳からニューロンを分離，初代培養し，細胞内へのK^+の流入を測定しＮａポンプ活性を求めた．ニューロンの示すＮａポンプ活性は，細胞をグルタミン酸で処理すると上昇した．このグルタミン酸によるＮａポンプ活性の上昇は，３０μM付近のグルタミン酸濃度で最大となり，この時の活性上昇はグルタミン酸無処理の細胞の約２倍であった．一方，ＮａポンプによらないK^+の流入活性は全く上昇しなかった．ニューロンのＮａポンプは，ジギタリス高感受性型Ｎａポンプとジギタリス低感受性型Ｎａポンプに区別され，グルタミン酸刺激で活性が上昇するのは，高感受性型Ｎａポンプのみであり（最大２．６倍），低感受性型Ｎａポンプは上昇しなかった．

Ｎａポンプ（Na,K-ATPase）は，ニューロンの機能維持にとって重要な機能を果たしている．これまで我々は，神経系培養細胞を用いた研究から培養大脳ニューロンにアイソザイムが存在することを明らかにした（１－４）．すなわち，大脳ニューロンには，他の細胞にも普遍的に存在するαⅠ型酵素（または，α型酵素；αⅠ鎖（α鎖）とβ鎖から構成されるジギタリス低感受性型酵素）の他にαⅡ型酵素（または，α(+)型酵素；αⅡ鎖（α(+)鎖）とβ鎖から構成されるジギタリス高感受性型酵素）が存在する（１，４）．さらに，ｍＲＮＡの解析から，ニューロンにαⅠ鎖ｍＲＮＡ，αⅡ鎖ｍＲＮＡの他にαⅢ鎖ｍＲＮＡが存在することも明らかにした（２）．しかし，ニューロンに存在するこれらのアイソザイムに局在，機能上の相違が有るのか全く不明である．

今回，我々は，アイソザイムに機能上の相違が存在するかどうか解明する糸口として，ラット胚大脳から得た初代培養ニューロンをグルタミン酸で処理し，そのＮａポンプ活性への影響をみた．その際に，Ｎａポンプ活性をジギタリス高感受性型と低感受性型に分け，それぞれへの影響を検討した．

［実験方法］

ニューロンは，Wistar系ラットの１７日胚大脳から得た．細胞は24穴マルチウェル上に5×10^5 cells/cm^{2}の濃度でまき，５％準胎児牛血清及び５％熱非働化馬血清を含む培地で培養した(１，４)．細胞へのK^+の流入を測定するには,細胞を130mM NaCl, 0.5mM KCl, 0.8mM $MgCl_2$, 1.8mM $CaCl_2$, 5mM glucose, 5mM Hepes-Imidazole緩衝液(pH7.3)中で，37℃で30分間preincubationした後，^{42}ＫＣｌを添加し，37℃で１２分間に細胞内に取り込まれた^{42}Kを測り求めた．Ｎａポンプ活性は，３ｍＭウアバイン添加によって特異的に阻害されるK^+の流入活性として求めた．さらに，アイソザイムの区別のために，Ｎａポンプ活性を１μMウアバインによって阻害されるか否かによって，ジギタリス高感受性型活性，低感受性型活性に分別し

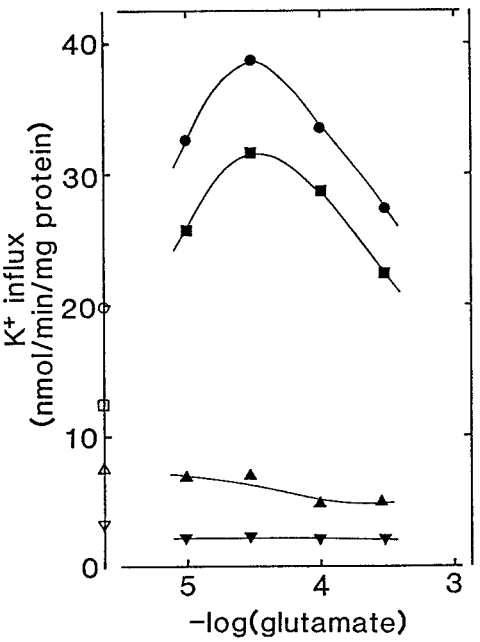


図１．ラットの培養ニューロン（７日間）のK^+の流入活性に対するグルタミン酸刺激の影響．
○,● Ｎａポンプ活性　（□,■ ジギタリス高感受性型，△,▲ ジギタリス低感受性型）
▽,▼ Ｎａポンプ以外の活性
（白印はグルタミン酸無処理ニューロン，黒印はグルタミン酸処理ニューロン）

た．グルタミン酸の効果をみるためには，preincubationの時に$^{42}K^+$を添加する直前の１０分間，反応液を１００μMグルタミン酸を含むものに変え，細胞を処理した．

［実験結果と考察］

図１に示すように，ニューロンをグルタミン酸で刺激すると，Ｎａポンプ活性が上昇した．一方，ＮａポンプによらないK⁺流入活性は上昇しなかった．このグルタミン酸によるＮａポンプの活性化のためには，５分間のグルタミン酸処理で十分であった（図２）．また，グルタミン酸の効果は３０μM付近のグルタミン酸濃度で最大であり，この時のＮａポンプ活性は，グルタミン酸無処理の細胞の約２倍であった（図１）．図３に見られるように，培養によって分化したニューロンのＮａポンプ活性のウアバイン阻害曲線は２相性を示し，Ｎａポンプのアイソザイムを区別できる（１，４）．そこで，グルタミン酸無処理の細胞と，グルタミン酸処理した細胞の阻害曲線を比較することにより，グルタミン酸の刺激によって，ジギタリス高感受性型Ｎａポンプ活性は上昇するが，ジギタリス低感受性型Ｎａポンプ活性は上昇しないことが明らかになった．図１もグルタミン酸によって，ジギタリス高感受性型Ｎａポンプの活性が特異的に上昇することを示している．そして，ジギタリス高感受性型Ｎａポンプ活性は，最大２．６倍にも活性化された．グルタミン酸刺激によるＮａポンプ活性の上昇の原因としては，グルタミン酸レセプターを介する，あるいはグルタミン酸の取り込みに伴う，細胞内外のイオン濃度差の減少などが考えられるが，現在検討中である．一方，両Ｎａポンプ活性のグルタミン酸刺激に対する反応性の相違の理由も今後の問題であるが，我々は両Ｎａポンプ活性の細胞外液のK⁺濃度に対する依存性が異なることも見いだしている（生化学会発表予定）．これらのニューロンにおけるＮａポンプアイソザイムの性質の相違は，両者に何らかの機能上の相違があることを示唆しているものと思われ興味深い．

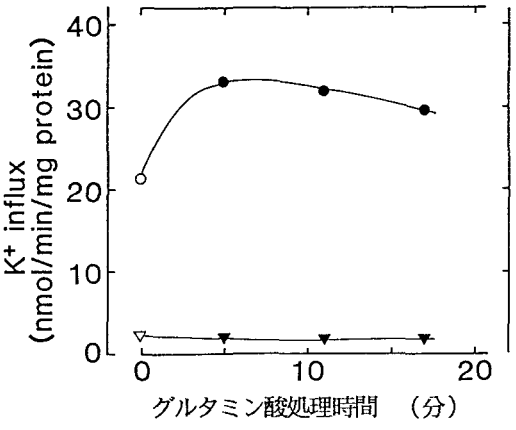


図2．ラットの培養ニューロン（８日間）のK⁺の流入活性に対するグルタミン酸刺激の時間経過．
○,● Ｎａポンプ活性，　▽,▼ Ｎａポンプ以外の活性
（白印はグルタミン酸無処理ニューロン，
黒印はグルタミン酸処理ニューロン）

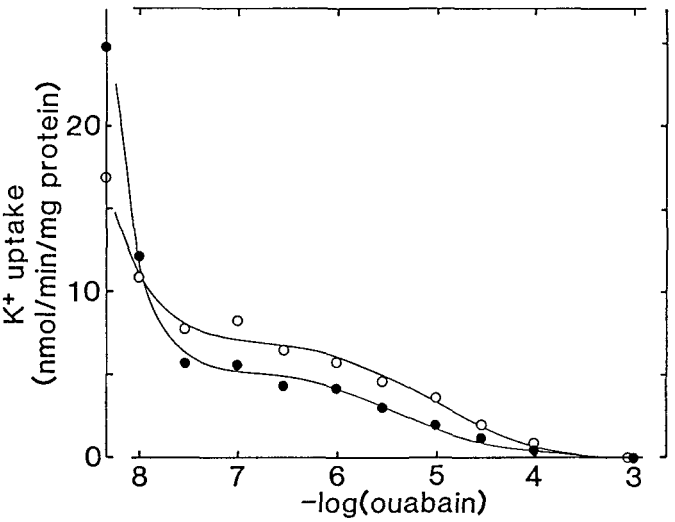


図3．ラットの培養ニューロン（６日間）のＮａポンプ活性のウアバイン感受性．
○ グルタミン酸無処理ニューロン，● グルタミン酸処理ニューロン

この研究に用いた^{42}Kは，森永晴彦博士（西ドイツ，ミュンヘン工科大学）が開発した$^{42}Ar-^{42}K$ジェネレーターによって作った．森永博士とジェネレーターを貸与して下さった日本アイソトープ協会に深く感謝いたします．

［文献］

1．井上順雄，松井英男，津久井弘子，畠中寛（1986）神経化学，25，376-378．

2．井上順雄，原諭吉，中尾真，津久井弘子，畠中寛，松井英男（1987）神経化学，26，229-231．

3．Inoue, N., Matsui, H., and Hatanaka, H.(1988) J. Neurochem. 50, 230-236.

4．Inoue, N., Matsui, H., Tsukui, H., and Hatanaka, H.(1988) J. Biochem. 104, (in press).

160 In vivoにおけるラット線条体からのacetylcholineの放出に及ぼすceruleinの影響

下山政憲＊，鬼頭昭三
（広島大医学部・第三内科）

〔要約〕
ラット線条体からのacetylcholine(ACH)の放出に及ぼすceruleinの影響をintracerebral dialysis を用いて検討した。灌流液中のAChはelectrochemical detectorを組み合わしたHPLC system で測定した。cholecystokinin octapeptide(CCK-8)のanalogであるceruleinを20-200 ug/kg腹腔内投与すると、線条体からのspontaneousなAChの放出は用量依存的に増加した。cerulein(100 ug/kg)の腹腔内投与はhigh potassium(30 mM)で誘発されるAChの放出を増強した。 ceruleinのACh の放出に及ぼす作用は、両側のvagotomyで消失した。今回の結果から、末梢投与されたceruleinはラット線条体 のcholinergic systemに対し促進的に作用することが考えられた。またこの作用はvagal affarentの刺激を介したものであることが示唆された。

［目的］
ventral tegmental area の一部のneuronでdopamine(DA)とCCK-immunoreactivity(IR)の共存が確認されて以来(2)、CCKとDAとの脳内における相互関連が行動薬理学、電気生理学及び生化学的研究から明確にされている 。脳内の CCK pathwayは広汎に分布しており、その中には必ずしもdopaminergic systemと関連しないものも存在する。従ってCCKとDA以外の他のneurotransmitterとの脳内に於ける関連についても検討されつつある。近年、CCK-8とceruleinがラット大脳皮質からのAChの放出を調節するという報告がなされた(3)。今日まで、脳内に於けるCCKとAChとの相互関連についての検討は少なく、CCK, AChおよび DAの三者が豊富に存在する線条体における検討もほとんど存在しない。
本研究で、私共は末梢投与したceruleinの、線条体からのAChの放出に及ぼす影響をfree moving ratを用いて in vivoのlevelで検索した。さらにceruleinの作用に及ぼすvagotomyの影響についても検討した。

［方法］
雄性ラットをpentobarbital麻酔下でstereotaxic aparatusに固定し、両側線条体を貫通する位置に、水平に半透膜tube(Vita fiber3X50, Amicon, ID=0.34mm, molecular weight cut-off 50,000)を挿入した。tubeが線条体以外を通過する部分は半透膜機能を除くため、あらかじめepoxyで被覆した。灌流実験は手術24時間後に行い、実験中ラットはfree movingの状態に保った。ラットの一部は、灌流実験の8日前に横隔膜下で両側の迷走神経切断術を行なった。100 uMのphysostigmineを含むRinger液を2.5 ul/minのspeedで灌流し、20 minごとに灌流液を採取した。K^+誘発実験では灌流液中に30 mMの K^+をくわえた。灌流開始後、120分(S1)および180分(S2)の2回にそれぞれ20分間high potassium mediumを加えた。cerulein(100 ug/kg, i.p.)はS2の30分前に投与した AChの測定はFujimoriの報告に従いHPLCを用いておこなった(1)。即ち分離columnで灌流液中のcholineとACHを分離したのち、choline oxidase及び acetylcholinesteraseをふくむ columnに applyして、ここで生ずる過酸化水素をelectrochemical detectorで測定した。

［結果］
灌流開始後、1時間でAChの放出は平衡に達した。それ故、灌流開始1時間目にceruleinを投与した。線条体からのAChの基礎放出量は0.44±0.05 p mol/minであった。この値とvagotomized ratの基礎放出量(0.42±0.02 p mol/min)との間で差はなかった。cerulein(20-200 ug/kg)を腹腔内投与すると、線条体からのspontaneousなAChの放出は投与40分後に急速

に増加した(60-150%)。一方、vagotomyを施行したラットでは、このcerulein の効果は消失した(Fig. 1)。次に灌流液中に30 mMのpotassiumを加えると添加前に比してAChの放出は5倍に増加した。high potassiumで誘発される線条体からのAChの放出に対し、cerulein(100 ug/kg, i.p.)は促進的に作用した。ceruleinのこの作用は vagotomyで同様に消失した(Fig. 2)。

[考察]

脳内に於けるCCKとDAの共存が報告されて以来、両者の相互関連が注目されている。この点に関して多方面から検討されているが、CCKがDA機能にたいし抑制的に作用するという報告、促進的に作用するという報告、変化を与えないという報告など多様であり、一定した結果は得られていない。CCKと他のneurotransmitterとの関係も検索されているが、CCKとAChとの脳内における相互作用の検索はすくない。線条体でcholinergic systemはinterneuronとして存在し、黒質からの dopaminergic pathwayの影響を受けている。加えて、この部位はCCK-8とそのreceptorが豊富に存在する(5)。それ故、線条体でCCKとAChとは密接な関連が存在することが想像される。私共の結果では、末梢投与したceruleinは線条体からのspontaneous及びdeporalizingな刺激で誘発されたAChの放出を共に促進した。またこのceruleinの作用はvagotomyにより消失した。従って、末梢投与されたceruleinはまずvagusのCCK receptorに結合し,そのbinding siteはaxonal flowにより孤束核に輸送されたものと考えられる(4)。しかしながら、孤束核に達したceruleinの情報がさらにどの様な経路とtransmitterを介して線条体まで伝達され、そこからのAChの放出を調節しているかについては不明である。結論として、CCk-peptidesは脳内の多様なneurotransmitterの放出に影響を与えている事が示唆された。

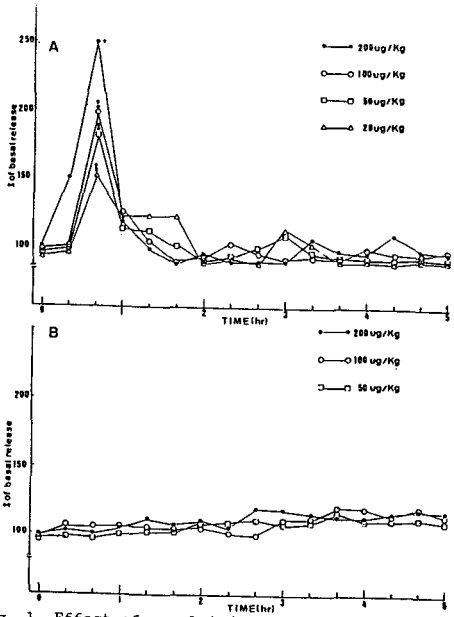


Fig. 1. Effect of cerulein(20-200 ug/kg,i.p.) on the release of ACh from the striata of control(A) and vagotomized rats(B).*p 0.01, **p 0.05 with respect to basal values.

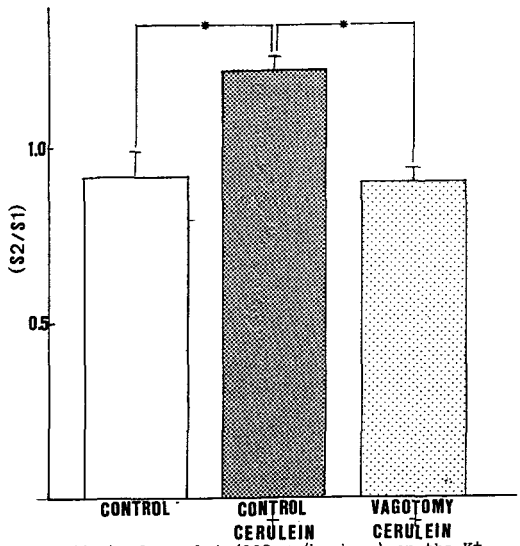


Fig. 2. Effect of cerulein(100 ug/kg,i.p.) on the K^+-evoked ACh release from the striata of control and vagotomized rats. ACh release was stimulated twice by perfusing with K^+(30 mM) for 20 min(S1,S2). Values are the ratios of the K^+-evoked ACh release evoked by S2 and S1 S2/S1). Significant differences for controls. *P 0.05.

1. Fujimori, K(1987)J.Chromatgr.414. 167.

2. Hokfelt, T.,Rehfeld, J.F.,Skirboll,L.R.,Ivemark, B.,Goldstein, M.and Markey, K(1980)Nature.285.476

3. Maganini,M., Florian, A., Casamenti, F. and Pepeu, G(1987)Neuropharmacology. 26. 1207.

4. Moran, T.H., Smith, G.P., Hostetler, A.M. and McHugh, P.R.(1987) Brain Res. 415. 149

5. Saito, A., Sankaran, H., Goldfine, I.D.and Williams, J.A.(1980) Science. 208. 1155.

161 ラット線条体Cyclic-AMP及びMonoamine metabolitesに及ぼすCaerulein の影響

森田勇二，小長谷正明，小長谷陽子
高柳哲也
（奈良医大・神経内科）

〔要約〕
Caerulein(CCK)は一部の不随意運動に対して有効であると報告され、錐体外路系機能をModulationすると考えられる。我々はﾗｯﾄ線条体c-AMP及びMonoamine metabolitesに及ぼすCCKの影響更にL-DOPA負荷に対する影響も検討した。
CCKのみの投与ではc-AMP levelに変化がみられなかったが、L-DOPA負荷によるc-AMP含量増加がCCK前処置で抑制され、adenylate-cyclaseと共役しているD1 receptorに対し抑制的にmodulationしていると考えられた。
CCK投与後2時間まではDOPAC,HVA共に低下傾向をみた。24時間でDOPACは基準値に戻ったが、HVAは72時間後で有意に低下した。5-HTは2時間後より増加傾向がみられたが、5-HIAAは2時間で有意に増加した。L-DOPA負荷により約2倍に増加したDA metabolitesはCCK前処置により、処置後24時間迄は抑制傾向にあった。ﾗｯﾄ線条体のDA turnoverに対してCCKは抑制的に作用し、インドールアミンにも影響を与えると考えられた。

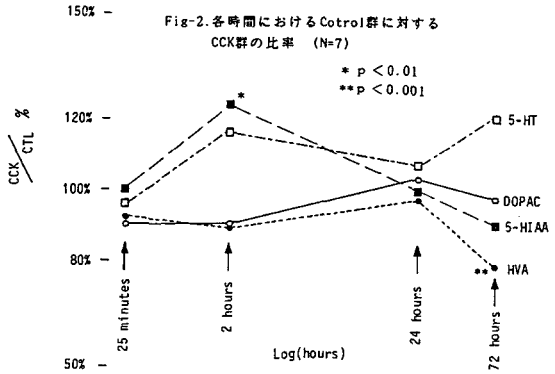
＜目的＞
コレシストキニン（CCK）は消化管のみでなく中枢神経系にも分布し、neurotransmitterまたはneuromodulatorとして作動している事が明らかになり、数々の神経作用が報告されている。8個のアミノ酸で構成されているCCK8は摂食・行動などの精神活動に影響を与え、最近では不随意運動にも抑制的に作用する事が言われている(5)。そこで、我々は錐体外路系へのCCK8の影響を観察する目的で、CCK8の類似物質であるCaerulein をラットに投与し、線条体への影響を検討した。特に今回はDopamine(DA)のD1 recepterに共役するadenylate-cyclase活性の指標となるcyclic-AMP及びモノアミン代謝産物の含量を測定した。CCKの作用持続時間が長く(4)、作用発現まで潜時があるとも言われているので、C-aerulein投与後25分,120分,24時間,72時間で検討した。更にL-DOPA負荷による変動に対するCCKの影響も検討した。
＜方法＞
SD雄ラット(150~170g)を用い(一群6~7尾)、CaerulainとL-DOPAの投与を行い線条体でのc-AMPとDOPAC,HVA,5-HT,5-HIAAなどの主としてモノアミン代謝産物の測定を行った。（ラットの屠殺は午後5~7時の間に行った。）
［c-AMP測定］
1)対照群：生食液腹腔内投与25分後に屠殺。2)L-DOPA群：L-DOPA 50mg/kgを腹腔内投与し、その15分後に屠殺。
3)CCK群：Caerulein 250μg/kgを腹腔内投与し、その25分後に屠殺。 4)CCK+L-DOPA群：Caerulein 250μg/kgを腹腔内投与10分後に、L-DOPA 50mg/kgを負荷．その15分後に屠殺。5KWのMicrowaveを1秒間照射して屠殺後の線条体c-AMPをYAMASA c-AMPｷｯﾄにてRIAをして測定した。
［モノアミン代謝産物測定］
1)対照群：生食液腹腔内投与後に屠殺。2)L-DOPA群：L-DOPA 50mg/kgを腹腔内投与し、その30分後に屠殺。
3)CCK群：Caerulein 250μg/kgを腹腔内投与し、その25分,120分後,24時間後 72時間後 に屠殺。 4)CCK+L-DOPA群：Caerulein 250μg/kgを腹腔内投与後10分,90分,24時間,72時間に、L-DOPA 50mg/kgを負荷、その30分後に屠殺。
モノアミンは断頭にて屠殺後、低温下で速やかに線条体を摘出し直ちに0.1N PCAにて処理した。測定は電気検出器付き高速液体クロマトグラフィーで行った。
＜結果＞
（1）c-AMPの結果はFig-1に示す。c-AMPではL-DOPA投与群は対照群に比し著明な増加を示し、またL-DOPA群に比べCCK+L-DOPA群は有意に低下していた。即ちCCKをあらかじめ投与しておくとL-DOPA負荷によるc-AMPの増加が抑制された。

（2）CCK投与によりDOPACは25分,120分後で軽度の低下傾向がみられた。HVAも低下傾向を示し、72時間後では有意な低下を認めた。5-HTは120分後以後の増加傾向をみたが、5-HIAAは120分後で有意に増加した。（Fig-2）

（3）L-DOPA負荷により線条体でのHVA,DOPACはそれぞれ2.49倍，2.04倍に有意に増加した。CCKによるDA代謝物への影響はCCK前処置90分後での負荷でとくにHVAは約80%に有意な減少をみたが、処置24時間後では基準値に戻り、DOPACのみ減少がみられたが推計学的には有意ではなかった。（Fig-3）

＜考察＞

Caeruleinは視床症候群，及び赤核近傍の障害による不随意運動に対して有効であるとされており、錐体外路系の機能をmodulationしていると考えられている。Studlerは、Nucleus AccumbensでのD1 receptorに対して、DAとCCKのinnervating fiberが混在する後部ではCCK8は賦活する様に作用し、混在しない前部では抑制する様に作用すること、更にCCK8のみではこの作用はみられないことを報告し、D1 receptorに対しCCK8は間接的にmodulationしていると推定した。そのmodulationはDA fiberとCCK fiberの存在様式によっては正反対に働くとしている(8)。今回の線条体での検討ではCaeruleinのみの投与ではc-AMP levelに変化がなかったが、L-DOPA投与によるc-AMP増加が、Caeruleinの前処置により有意に抑制された。この事はadenylate-cyclaseと共役しているD1 receptorの機能に対しCCK8は抑制的にmodulateしていると推察される。DAの代謝物については、CCK投与により低下し、DA代謝回転を低下させていると推察された。これはHVAでは72時間後でもみられた。L-DOPA負荷に対するCCKの影響は120分迄は明らかにみられ、24時間後にもHVAの低下傾向が認められた。ラットの脳室内へのCCK8投与後にL-DOPAを負荷すると、L-DOPA単独負荷したラットに比べ外部刺激に対する反応性や行動反応が抑制されるという報告がある(1)。またCCK8のDA代謝回転に与える影響は、抑制的に作用するという報告と、逆に促進的に作用するという報告もある(2,3,6,7)。我々の検討では、線条体でのDA代謝回転にはCaeruleinが比較的短時間ではあるが、抑制的に作用する事が示唆された。Caeruleinの不随意運動に対する臨床効果はこの作用による可能性が推察される。インドールアミン系については、Caerulein投与120分後で5-HIAAの有意な増加と5-HTの増加傾向が認められ、5-HTは72時間後迄増加傾向にあった。Caeruleinはインドールアミンに対しても影響を及ぼすと推察される。



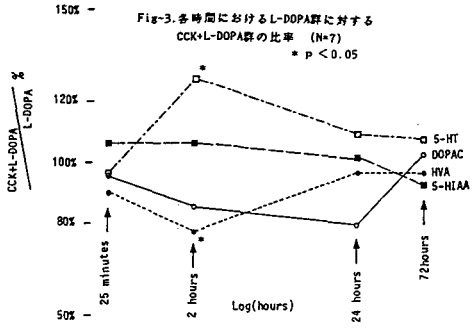
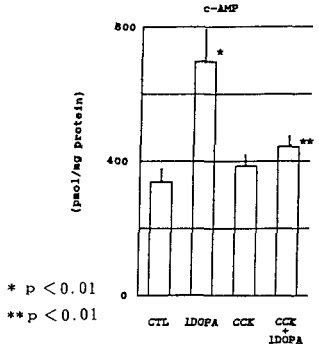


Fig-1

STRIATAL C-AMP CHANGE AFTER CAERULEIN(25 min)
AND L-DOPA(15 min) ADMINISTRATION (n=6)



* ; significantly increased compared with CTL
**; significantly decreased compared with L-DOPA

［文献］

1) Itoh,S., Katsuura,G.et al.(1981) European J.Pharmacology 75,313-316
2) Fekete,M., Kadar,T. et al.(1981) J.Neural Transmission 50,81-88
3) Fuxe,K., Andersson,K. et al.(1980) European J.Pharmacology 67,329-331
4) Kuroki,T., Matsumoto,T. et al.(1987) Neuropeptide 9,169-176
5) Nakamuro,T., Mano,Y. et al.(1988) Neurological Therapeutics in press
6) Matsumoto.T., Nakahara.T. et al.(1984) Brain Research 324,195-199
7) Robert D.Mashal, Frank Owen. et al.(1983) Brain Research 277,375-376
8) Studler,J.M., Reibaud,M. et al.(1986) European J.Pharma. 126,125-128

162 海馬培養神経細胞における somatostatin の細胞内カルシウム濃度上昇作用について

三好理絵, 鬼頭昭三, 山下さゆり
(広島大・医・第三内科)

〔要約〕

ラット海馬培養神経細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]i$) に対する somatostatin の作用を fura-2 を用いて測定した。 somatostatin は dose-dependent に $[Ca^{2+}]i$ を上昇させた。 somatostatin に反応する細胞は全細胞数の約 26% であったが、 10 ng/ml IAP を 24 時間作用させると 17% に減少した。 somatostatin による $[Ca^{2+}]i$ 上昇の Ca^{2+} 供給源を調べるため、細胞外液を Ca^{2+} free にした状態、外液に 30 μM La^{3+} を加えた状態での somatostatin の反応を測定した。 その結果、このような条件下では somatostatin の作用は完全に抑えられることがわかった。 以上の結果より、ラット海馬培養神経細胞において somatostatin は興奮性に働くこと、Ca^{2+} は channel を通して細胞外液から流入してくること、この反応に IAP の基質となる GTP 結合蛋白が関与していることがわかった。

〔目的〕

somatostatin は内分泌・神経系で抑制性の神経ペプチドとして知られている。somatostatin は生理学的に膜電位を過分極させ、内分泌学的にはホルモン分泌を抑制する。 これらの作用を引き起こす細胞内反応として、アデニル酸シクラーゼ活性の抑制、$[Ca^{2+}]i$ の減少があり、そこには Gi 蛋白が介在しているであろうと示唆されている (3)。 一方、中枢神経系の特定の部位 (海馬・大脳皮質) で somatostatin の興奮方向への作用が見い出されている (2)。 これは、ほとんど生理学的立場からの報告であり、膜の脱分極としてとらえられている。 興味あることに、同じラット海馬の CA1 領域の錐体細胞を用いても研究者により、過分極と脱分極の反対の効果が見られている。 今回、我々はラット海馬培養神経細胞において somatostatin が $[Ca^{2+}]i$ を上昇させることを見い出したので報告する。

〔方法〕

胎生 18 日齢のラット胎児から海馬皮質を取り出し、トリプシン処理し dissociated cell culture を行なった。 細胞は、5 % 牛胎児血清、5 % 馬血清含有 DMEM 培地を用いて 10 % CO_2 中 37℃ で約 10 日間培養した。 $[Ca^{2+}]i$ は fura-2、 倒立蛍光顕微鏡、ビデオカメラ装置を用いて、工藤らの方法 (4) により測定した。 poly-L-lysine を coating したカバーグラス上の細胞に、 somatostatin のより安定なアナログとして $[D\text{-}trp^8]$ somatostatin、SMS201-995 を 30 秒灌流投与し、その際の $[Ca^{2+}]i$ の変化を測定した。 測光中は細胞の自発活動を抑えるため、1 μM tetrodotoxin を細胞に灌流投与した。

〔成績〕

Fig.1 に 10^{-5} M $[D\text{-}trp^8]$ somatostatin を加えたときの $[Ca^{2+}]i$ の反応を示す。 somatostatin に反応する細胞は全神経細胞の約 25 % であった。 反応はいずれも monophasic であったが、持続時間には若干の 違いが認められた。 somatostatin の強力なアナログである SMS201-995 は $[D\text{-}trp^8]$ somatostatin に比べ $[Ca^{2+}]i$ に対する効果が約 2 倍であった。 sister culture を行い、 10 ng/ml 百日咳毒素 (IAP) で 24 時間処理した細胞と対照の細胞で SMS201-995 に反応する細胞の割合を比較した。 対照細胞では 26.5 % であるのに対し、IAP 処理細胞では 17.0 % と有意の減少を示した。 同じ現象が $[D\text{-}trp^8]$ somatostatin の場合にも見られた。 次に、この $[Ca^{2+}]i$ 上昇の Ca^{2+} 供給源を調べるために、外液の Ca^{2+} を free にした状態 (灌流液から $CaCl_2$ をのぞき 0.1 mM EGTA を加えた) 及び normal 灌流液に 30 μM $LaCl_3$ を加えた状態での $[D\text{-}trp^8]$ somatostatin の反応を調べた。 その結果、細胞外液の Ca^{2+} がない、あるいは細胞内への流入が抑えられた条件下では、 somatostatin の反応は完全に抑制された (Fig.2)。

〔考察〕

種々の細胞で somatostatin が $[Ca^{2+}]i$ を減少させることが認められているが、上昇作用についての報告は本報が最初である。 中枢神経系において somatostatin がアデニル酸シクラーゼを抑制することが知られているが、我々の実験でも somatostatin は Ca^{2+}/calmodulin あるいは forskolin で刺激された本酵素活性を抑えた。この事実や生理学実験についての報告を考え合わせると somatostatin は海馬において興奮性と抑制性の両方の作用を有していると考えられる。脳において somatostatin 受容体には2つの異なる subtype が存在することが示唆されている(5)。 Tran らは SMS201-995 に高親和性を示す受容体を SS_A タイプ、低親和性のものを SS_B タイプと名づけ、下垂体や膵臓の somatostatin 受容体はすべて SS_A タイプであることを見い出した(6)。 更に、脳では両方のタイプを有し、特に海馬では SS_B タイプが 70 % を占めることを報告した。 Chneiweiss らは SS_A タイプがアデニル酸シクラーゼ活性抑制に共役する受容体であると述べている(1)。 したがって、脳において SS_B タイプが興奮性の作用を持ち、それは特にこのタイプの多い海馬で明らかに観察されるものと考えられる。 Ca^{2+} free の条件下での実験から somatostatin による $[Ca^{2+}]i$ 上昇の Ca^{2+} は channel を通して細胞外液から流入してくることがわかった。 どのようなメカニズムでこのような現象がおこるのかを解明することが今後の課題である。

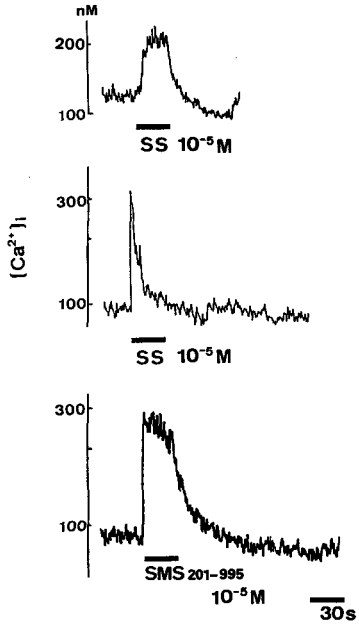


Fig.1 Effect of 10^{-5} M somatostatin on $[Ca^{2+}]i$ in cultured rat hippocampal neurons. The upper and middle traces show responses to $[D\text{-}trp^8]$ somatostatin (SS) in a *different cell. Heterogeneity in the responsiveness* was observed. The lower figure shows the effect of SMS201-995 in the same neurons as the upper one. SMS201-995 had an more potent activity than $[D\text{-}trp^8]$ somatostatin.

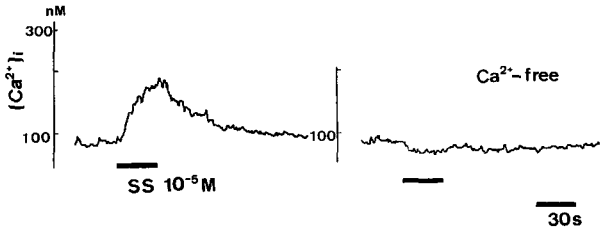


Fig.2 Determination of the source of Ca^{2+} for somatostatin (SS)-induced elevation of $[Ca^{2+}]i$ in cultured rat hippocampal neurons. A left figure shows a result of experiment perfusing normal buffer and a right Ca^{2+}-depleted medium. SS's effect was completely abolished in Ca^{2+}-depleted medium.

〔文献〕

1. Chneiweiss, H., Bertrand, Ph., Epelbaum, J., Kordon, C., Glowinski, J., Premont, J. and Enjalbert, A. (1987) Eur. J. Pharmacol. 138, 249.
2. Dodd, J. and Kelly, J. S. (1978) Nature 273, 674.
3. Koch, B. D., Dorflinger, L. J. and Schonbrunn, A. (1985) J. Biol. Chem. 260, 13138.
4. Kudo, Y., Ozaki, K., Miyakawa, A., Amano, T. and Ogura, A. (1986) Japan. J. Pharmacol. 41, 345.
5. Reubi, J. C. and Maurer, R. (1986) Regulatory Peptides 14, 301.
6. Tran, V. T., Beal, M. F. and Martin, J. B. (1985) Science 228, 492.

163 上頸部交感神経節内心房性Na利尿ペプチドの存在様式と節前および節後神経切断による変動

戎 弘志，小出 直，田丸 政男*，藤田 公和*，永田 豊*
（福友会医学研究所，藤田学園保健衛生大・医・生理学*）

〔要約〕 心房から血中に分泌されて、腎尿細管に作用して、Na^+排出と利尿をひきおこす因子として知られる、心房性ナトリウム利尿ペプチド(atrial natriuretic peptide, ANP)は、radioimmunoassay(RIA)や immunohistochemistry により中枢神経系内にも存在が証明されている。前回我々は、α-ANPのRIAを用いて、ラットの上頸部交感神経節(superior cervical sympathetic ganglion, SCG)内のANPのimmunoreactivityを調べたところ、SCG内にもかなりの量が認められ、節前あるいは節後神経切断手術後に急速に減少することを報告した[4]。今回、逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)を用いて、SCG内のANPを分離・分析して、その分子レベルでの存在様式を調べた。intact SCG内では低分子型のα-ANPが主要成分を占めていたが、一部高分子型のγ-ANPも含まれていた。これは脳組織抽出物のRP-HPLC像と同じで、心臓抽出物の像とは明かに異なっていた。節前神経切断によってコリン作動性神経末端の変性がおこり、アセチルコリン合成酵素の低下がおこるが、SCG内ANP量も著明に減少することが、RP-HPLC像からも確かめられた。又、節後神経切断によっておこるSCG内ANP含量の低下は、RP-HPLC像でも認められた。実験成績から、SCG内ANPは主としてα-ANPで、コリン作動性神経伝達機能と密接に関連して働いている可能性が示唆された。

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血中に分泌される体液性因子で、利尿による血圧低下作用や平滑筋弛緩作用などを示すことが知られている[3]。ANPはラット体内では心房筋や血漿中のみならず、脳の水分調節中枢の局在する視床下部内にもかなり多量に含まれており[10]、神経機能との密接な関連が強く示唆されている。前回我々は、ラット上頸部交感神経節（superior cervical sympathetic ganglion, SCG)組織内にもANPと免疫反応性を示す因子が相当量見出されること、そして節前及び節後神経切断後に、SCG内ANPに対する免疫反応性が急激に減少することを報告した[4]。動物組織内のANP分子の存在様式については、ラット心筋抽出液中の主要成分が大部分大分子型のγ-ANPであるのに対して、中枢神経抽出液に含まれる成分は逆に小分子型のα-ANPであるとされている[6][7]。そこで今回我々は、SCG内に含まれるANP免疫反応性因子の存在様式を逆相クロマトグラフィー法で分析して調べ、さらに前回おこなった節前及び節後神経切断術のSCG内ANP含量の減少が、α型あるいはγ型ANPの存在様式にどのような変動を与えるかを検討した。

［実験材料と方法］

実験動物は主として、Wistar系雄性成熟ラット（体重200ｇ前後）を使用した。ウレタン麻酔（1.5g/kg体重）下にラット両側頸部よりSCGを摘出し、その周囲の結合織を注意深く除去した。節前神経切断(denervation)及び節後神経切断(axotomy)手術は、ペントバルビタール麻酔(40mg/kg体重)下に行った[2]。摘出したSCG(15-30個)は、組織重量を電子天秤で測定後、約10倍量の0.1M酢酸中で磨細後、100℃・５分間加熱処理をしてから冷却遠沈(15,000rpm, 15分間)し、その上清をさらにミリポアーフィルター(孔径0.22μm)に通過させて、逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)の試料とした。RP-HPLCは、TSK-GEL ODS 120T カラム(4.6 X 70mm, Toyo Soda製)を用い、1.0ml/min.の流量で、最初の45分間0.08% trifluoro acetic acid (TFA：終末濃度)を含む20% acetonitrile(CH_3CN) bufferを流した。引き続いて、同じ濃度のTFAを含むbufferのCH_3CN濃度を20%から60%までlinearに上昇させるgradientでさらに45分間溶出を行ない[8]、1.0mlずつ分画を集めた。各溶出液に含まれるANP量は、rat α-ANP用測定kit（Amersham International製）による放射免疫測定法(RIA)を用いてα-ANP-like immunoreactivityを測定し、図表を作製した後プロットした。標準物質としては合成rat α-ANP（ペプチド研）を用い、同様の操作でRP-HPLCを用いて分画し、ANP免疫反応性を測定した後プロットして、SCG抽出物の場合と比較検討した。

［実験結果と考察］

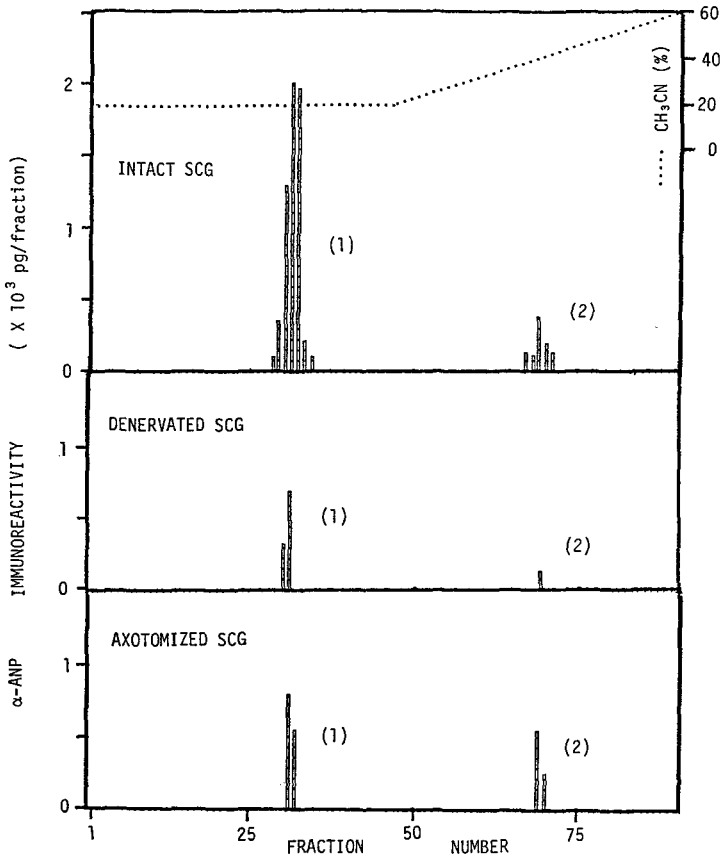
1) SCG内ANPの存在様式

Intact SCGの0.1N酢酸抽出液をRP-HPLCにかけて分離した後、各分画のα-ANPに対する免疫反応性をプロットしたのが、図（上）である。すなわち、28から34分後に標準のα-ANPと一致する大きなピークが認められたほか、68-72分後の CH_3CN 40% bufferで流出される第2のピークが認められた。これは、Kangawa & Matsuo[6]が人心房抽出物のRP-HPLC系で得たα-ANPと一致していた。つまり、SCG内に含まれるANPの80%以上は脳と同様小分子型(分子量3,000 dalton)のα-ANPであるが、心房筋内に存在している大分子型(分子量13,000 dalton)のγ-ANPが、わずかながらSCG内に含まれていることが明らかになった。これらの我々の実験結果は、塩野ら[9]による脳の抽出物のRP-HPLC分析系の結果とほぼ一致しているのが認められたことから、SCGなどの末梢神経節組織中にも脳と同じα-ANPが主成分として含まれており、神経の興奮伝達機能と密接に関連しうる可能性が強く示唆された。

2) 節前及び節後神経切断によるSCG内ANP含量の変動とその存在様式

成熟ラットの節前神経を切断手術(denervation)をおこなった後では、SCG内ANP濃度は時間経過と共に急激に減少を続け3時間後には非手術SCG内ANP値の1/2に、24時間後には1/10にまで低下した。節前神経切断後のSCG抽出物をRP-HPLCを通して分析した像は図（中）に示す如く、α-ANPのみならずγ-ANPもやはり1/10に低下して認められた。コリン作動性シナプス伝達系の第2次メッセンジャー系として働いているcyclic GMPは、SCG標本で興奮伝達に伴って著明に増大することが認められており[1]　又、ANPは培養PC12-pheochromocytomaで、cyclic GMPの生成を増大させることが報告されている[5]。したがって、SCG内ではANPがコリン作動性神経伝達と極めて密接に関連して変動している可能性が強く示唆された。節後神経軸索切断手術(axotomy)後24時間で摘出したSCGからの抽出物のRP-HPLC像は図1（下）の如くで、α-ANP及びγ-ANP共に減少が認められたが、前者の減少度の方が著明であった。つまり、交感性支配臓器で生合成されるANPは心房筋の場合とは異なり、SCGでは脳神経組織の場合と同様α-ANPが主要成分であったが、一部γ-ANPも含まれており、それぞれのANPは異なった神経機能と関連して働く可能性が考えられる。

図. ラットSCG内ANPのRP-HPLCによる分析像



［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) De Bold, A. J. (1982) Science, 230:767-770
4) 戎　弘志　ほか(1987) 神経化学, 26:631-633
5) Fiscus, R. R. et al. (1987) J. Neurochem., 48:522-528
6) Kangawa, K. & Matsuo, H. (1984) Biochem. Biophys. Res. Comm., 118:131-139
7) Morii, N. et al. (1985) Biochem. Biophys. Res. Comm., 127:413-419
8) Morii, N. et al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Comm., 145:196-203
9) 塩野　尚三　ほか(1986) 神経化学, 25:193-195
10) Tanaka, I. et al. (1984) Biochem. Biophys. Res. Comm., 124:663-668

164 卵胞刺激ホルモン(FSH)による培養セルトリ細胞内エンケファリン前駆体遺伝子発現の調節

相沢貴子・山本明広・野沢明美・吉川和明
（東京都精神医学総合研究所・分子生物学研究室）

〔要約〕 卵胞刺激ホルモン(FSH)は生後20日のラットから単離した培養セルトリ細胞中のエンケファリン前駆体(pEnk)-mRNA濃度を一過性に増加させた。pEnk-mRNAは約1.5kbの長さで、FSH処理後12時間で最大(約30分子/細胞)に増加し、その後減少した。細胞内サイクリックAMP（cAMP）系を活性化するフォルスコリン、8-Br-cAMP、ノルアドレナリンなども同様に、pEnk-mRNA濃度を上昇させた。また、FSHはセルトリ細胞内Enkペプチド量も増加させた。 このことから、FSHはcAMP系を介してセルトリ細胞内のpEnk遺伝子発現を調節していることが示唆される。

エンケファリン（Enk）性神経細胞は脳内に広く分布し、種々の神経活動を調節しているものと推定される。pEnk遺伝子は神経系のみならず精巣の生殖細胞や体細胞[3,7,8]においても発現しているが、これらの細胞系は初代培養が可能であり、均一の細胞が多量に得られるなど、pEnk遺伝子発現の研究に適している。また腫瘍性培養細胞[5,6]と異なり、遺伝子量や発現様式が生理的状態を反映することも特長の一つである。そこで今回はセルトリ細胞機能の生理的調節因子であるFSHによるpEnk遺伝子発現の調節について検討した。

【実験方法】ラットFSHおよび黄体刺激ホルモン（LH）はNIHより供与を受けた。セルトリ細胞は生後20日のWistar系ラットの精巣からTungらの方法[2]によって分離した。培養は10 cm培養皿を用いてDMEM中33℃で4-5日間95%空気/5%CO_2条件下で培養した。ホルモン類は培養液中に添加し、一定時間の後細胞を集めた。最終細胞密度は1-2 x 10^7細胞/培養皿であった。RNAの精製はChirgwinらの方法[1]を微量化した方法[9]で行なった。全細胞RNA（5 μg）中のpEnk-mRNAおよびβアクチンmRNA量は6%ホルムアルデヒド／1.2%アガロースゲルで泳動後ノーザン法によって、^{32}Pで標識したラットのpEnk-cDNA[4]またはβアクチン遺伝子DNA（NCI/NIH・Dr. B.Patersonから供与）をプローブとして分析した。

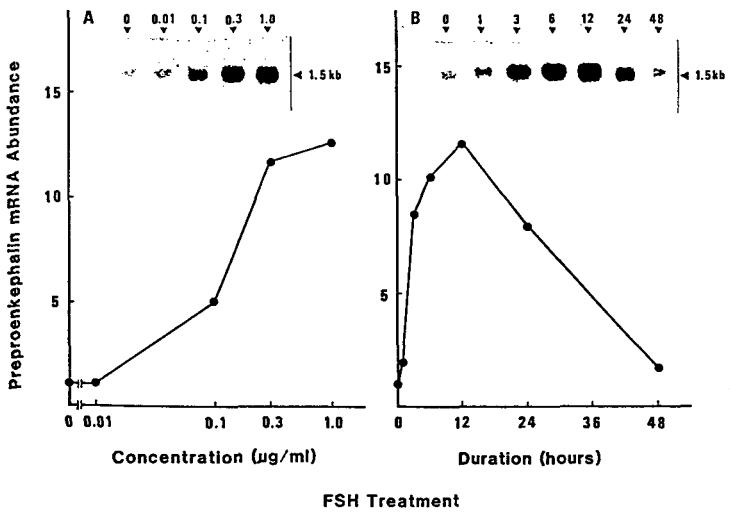


Fig. 1. Effect of FSH on pEnk mRNA abundance in cultured Sertoli cells.
A: Dose-response curve. Cultured Sertoli cells were incubated with various concentrations of FSH for 6 hr. B: Time course. Sertoli cells were treated with FSH (0.5 μg/ml) for various durations prior to harvest. Abundances of pEnk mRNA are given in arbitrary units.

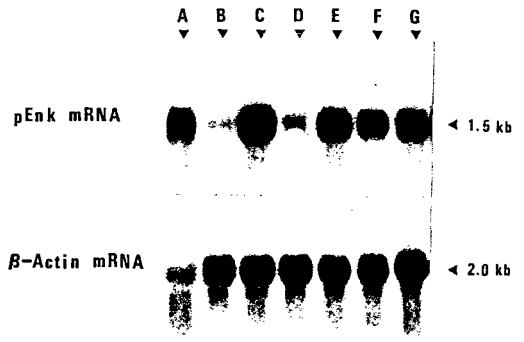


Fig.2. Effects of various compounds that activate cyclic AMP system on pEnk mRNA abundance in cultured Sertoli cells. Sertoli cells were treated with various compounds for 7 hr (B-G). Lanes: A, rat frontal cortex; B, untreated control; C, FSH (0.5 μg/ml); D, luteinizing hormone (0.5 μg/ml); E. forskolin (10 μM); F, 8-bromo-cyclic AMP(0.5 mM); G, noradrenalin (10 μM). Autoradiograms ofpEnk mRNA and β-actin mRNA are of 16 and 1 hr exposure, respectively. Numbers at right are the sizes of hybridized signals.

【成績】培養セルトリ細胞は1.5 kbの長さの単一pEnk-mRNAを発現していた。このpEnk-mRNAはFSH(1.0 μg/ml)で6時間処理をした場合、約13倍に増加した（Fig.1A）。この増加は一過性のもので、FSH処置後12時間で最大となり、その後減少した（Fig.1B)。pEnk-mRNAの濃度は標準RNAを用いてドットブロットで定量[5]したところ、セルトリ細胞１個あたり非刺激時約2分子、FSHの最大刺激時約30分子であった。FSHは受容体-cAMP系を介してpEnk遺伝子の発現を調節する可能性があるため、次にセルトリ細胞のcAMP系を活性化する物質の影響を検討した（Fig.2）。フォルスコリン、8-Br-cAMP、ノルアドレナリンなどはFSHと同程度にpEnk-mRNAレベルを上昇させた。一方、LHではpEnk-mRNAの顕著な増加は認められなかった。また、対照として用いたβアクチンmRNAは上記の物質によって影響を受けなかった。次に、FSHによって上昇したpEnk-mRNAがEnkペプチドに翻訳されているか否かをラジオイムノアッセイ[5]によって検討した。セルトリ細胞中の免疫反応性Met-enkは非刺激時では検出限界以下であったが、FSH刺激時（0.5μg/ml,24時間）には50±7 fmol/mg蛋白に上昇した。

【考察】ラット精巣では生殖細胞以外にも、今回の精細管内の支持細胞であるセルトリ細胞や精細管周囲細胞(発表予定)などの体細胞においてpEnk遺伝子が発現していることは、pEnk遺伝子の組織特異性発現を考える上で興味深い。セルトリ細胞はオピオイド受容体をもつため、自ら分泌するEnkによって自己分泌(autocrine)調節を行なっている可能性がある。また、セルトリ細胞はFSHやオピオイドペプチド以外にもβ-アドレナリン性アゴニスト、ムスカリン型アセチルコリン性アゴニスト、α-色素細胞刺激ホルモンなどによって機能調節を受けていることが知られているため、神経系におけるpEnk遺伝子発現の多因子性調節の研究に適したモデル系になるものと考えられる。

【文献】

[1] Chirgwin,J.M., Przbyla,A.E., Macnald,R.J.,and Rutter,W.J.(1979) Biochemisry 18,5294-5299.
[2] Tung,P.S., Dorrington,J.H., and Fritz,I.B. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72, 1838-1842.
[3] Kilpatrick,D.L., and Millette,C.F. (1986) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83, 5015-5018.
[4] Yoshikawa,K., Williams,C., and Sabol,S.L. (1984) J.Biol.Chem. 259, 14301-14308.
[5] Yoshikawa,K. and Sabol,S.L. (1986) Mol.Brain Res. 1, 75-83.
[6] Yoshikawa,K. and Sabol,S.L. (1986) Biochem.Biophys.Res.Commun. 139, 1-10.
[7] 吉川・相沢(1987)神経化学 26, 76-78.
[8] Yoshikawa,K. and Aizawa,T. (1988) Biochem.Biophys.Res.Commun. 151, 664-671.
[9] Yoshikawa,K. and Aizawa,T. (1988) Mol.Brain Res. (in press)

165 視床下部視索上核におけるδ－オピオイドペプチドの作用

津島宏美，森真由美，松田友宏
（名古屋市立大・医・薬理）

〔要約〕
バゾプレッシンニューロン細胞体が局在する視床下部視索上核(SON)におけるオピオイド受容機構を検討するため、D-アラニン²-D-ロイシン⁵-エンケファリン(DADL；δ-アゴニスト)とダイノルフィン(1-13)(DYN；κ-アゴニスト)をSONに微量注入し尿流出量への影響を測定し、その作用をモルヒネ(MOR；μ-アゴニスト)の作用と比較した。DADLとDYNはともに抗利尿作用を発現した(DADL>DYN≧MOR)。DADLの抗利尿作用はナロキソン(NAL)の前処置で抑制されたが、MORの場合より高用量のNALを必要とした。フェノキシベンザミン(PHE)、チモロール(TIM)、アトロピン(ATR)前処置では抑制されなかった。DYNの抗利尿作用はNAL前処置で抑制されず、PHE、TIM、ATRの前処置によって部分的に抑制された。以上の結果より、SONにおいて、DADLはMORやDYNと異なる機能をもつオピオイドレセプターに作用し、このレセプターはアドレナリンおよびコリン作動性神経終末に存在しないことが示唆された。

近年、免疫組織化学的に、バゾプレッシンニューロン細胞体が局在する視床下部視索上核(SON)にオピオイド作動性神経終末が存在すること、DYNがバゾプレッシンと共存していることが明らかにされ、SONでのオピオイドレセプターの役割が注目されている。我々は、この神経核のオピオイド受容機構を明らかにするため各種オピオイドアゴニストをSONに微量注入し生理機能への影響を検討してきた。その結果、MORはオピオイドレセプターを介してアセチルコリン遊離を促進し抗利尿作用を発現していること[1]、DYNの抗利尿作用時にはバゾプレッシンの遊離促進が認められること[2]を報告してきた。今回、δ-アゴニストであるDADLとκ-アゴニストであるDYNをSONに微量注入し、尿流出量への作用、さらにNAL、PHE、TIM、ATRの前処置による影響を検討した。

〔実験方法〕
既に報告した通り[1-3]、約18時間絶食したWistar系雄性ラットを用いた。水(5 ml/100g体重)負荷し、45分後同量の12%エタノールを経口投与した。SONの位置はKönigらのアトラスにより定め、微量注入用のカニューレを挿入した。薬物(1 μl)はすべてこのカニューレより微量注入した。実験中は、頸静脈カニューレより3%エタノールロック液を持続注入(0.1 ml/min)した。膀胱カニューレからの尿流出量は10分毎に測定し、その変化は薬物投与前10分間の尿流出量に対する百分率であらわした。

〔実験結果〕
DADL微量注入による作用：DADLのSONへの微量注入は著明な抗利尿作用を発現し、その時間経過は約30分で最も強く、90分で対照の約80%に回復した。DYNの作用のそれとよく似ていた(Fig.1 b and c)。ED50値は約1nmolであった。4 nmolDADLの抗利尿作用はNAL(600 nmol)前処置によって抑制された(Fig.1 b)。しかし、PHE(80 mmol)、TIM(100nmol)、ATR(300nmol)の前処置によっては抑制されなかった。用量反応曲線をFig.2に示した。DYN微量注入による作用：DYNのSONへの微量注入による抗利尿作用については報告した[2]。今回は、オピオイドレセプターの介在を検討するため高用量のNALを前処置したが、DYN(10 nmol)の抗利尿作用への有意な影響は認められなかった(Fig.1 c)。PHE(80mmol)、TIM(100nmol)、ATR(300 nmol)を前処置した

ところ、いずれもDYNの作用を部分的に抑制した。

［考察］

DADL、DYN、MORのSONへの微量注入はいずれも用量依存性の抗利尿作用を発現し、作用強度はDADL＞DYN≧MORの順であった。μ-アゴニストのMOR(10 nmol)はNAL(300 nmol)によって完全に抑制された[1]が、δ-アゴニストのDADL(4 nmol)の作用の抑制には600 nmolのNALを要し、κ-アゴニストのDYN(10 nmol)の作用は600 nmolのNALでも抑制されなかった。DADLは、MORよりNALに対して低感受性のオピオイドレセプターに作用していることが示唆された。δ-サブタイプかどうかを明らかにするには更に検討を要する。DYNについてはオピオイドレセプターの関与は明らかでなかった。

DADLの抗利尿作用はPHE、TIMやATRの前処置で影響を受けなかったので、アドレナリンおよびコリン作動性神経終末上にDADLが作用するオピオイドレセプターが存在しないことが示唆された。これに対してMORの作用はATRで完全に抑制される[1]のでMORはコリン作動性神経終末に作用しているものと思われる。DYNの作用はPHE、TIM、ATRによって部分的に抑制されたことから、DYNはアドレナリン、コリン両神経終末に作用していると考えられる。

以上より、視床下部視索上核において、DADL、DYN、MORはそれぞれ薬理学的性質の異なるレセプターに作用し、抗利尿作用を発現していることが明らかとなった。今後、これらのレセプターのさらに詳しい薬理学的性質等について検討する予定である。

［文献］

1) Tsushima,H.,Mori,M. and Matsuda,T.(1987) Japan.J.Pharmacol.,45, 449-457.

2) 津島宏美，森真由美，松田友宏 (1986) 神経化学，25, 535-537.

3) Tsushima,H.,Mori,M. and Matsuda,T.(1986) Japan.J.Pharmacol.,42, 507-515.

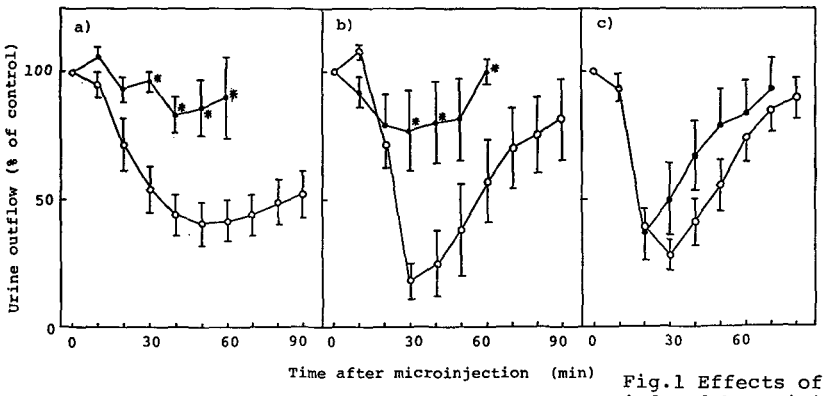


Fig.1 Effects of naloxone on antidiureses induced by opioids microinjected into the SON.

a) ○:MOR, 8.6 nmol (n=13)
●:NAL, 300 nmol + MOR (n=5)

b) ○:DADL, 4 nmol (n=4)
●:NAL, 600 nmol + DADL (n=4)

c) ○:DYN, 10 nmol (n=9)
●:NAL, 600 nmol + DADL (n=9)

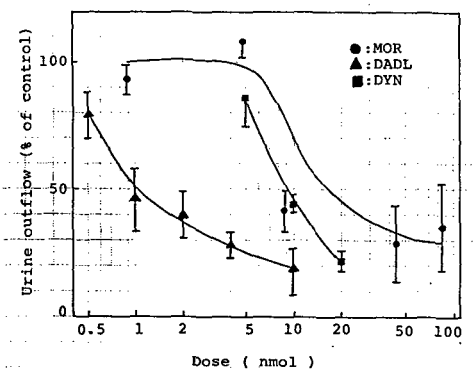


Fig.2 Dose-effect curves for antidiureses induced by opioids microinjected into the SON.

166 ウシ下垂体後葉分泌顆粒の Enkephalin について

竹田二美代、竹田稔、島田明範、倉岡幸令、紺野邦夫、塩田清二*、中井康光*
（昭和大・医、生化学、解剖1*）

〔要約〕
Enkephalin(ENk)とVasopressin(VP)やOxytocin(OT)は中枢神経系に広く分布していることが知られている。最近の免疫組織化学的手法により、これらのペプタイド類が、下垂体後葉にかなり高濃度含有されていることが明らかにされた。下垂体後葉は神経分泌細胞軸索終末の集合体で、多数の軸索終末と後葉細胞からなり、軸索終末には大、小の分泌顆粒が存在する。ENkは脳のsynaptosomeに存在するのでneurotransmitterあるいはneuromodulatorとして作用していると考えられる。ところが下垂体後葉に存在するENkの生理作用は未だ不明である。我々は、下垂体後葉分泌顆粒をpercollで遠心分離してENkと、VP又はOTの共存の様子と、顆粒内ENkの動態について研究を行った。免疫組織化学により検討した結果、Leu-ENkはVPと共存する。Met-ENkは一部はOTと共存するが大部分は別個に存在する。Met-ENk-Arg^{6}Phe^{7}はOTと共存することが明かとなった。この顆粒内のENkの取り込みと放出を［^{3}H］Met-ENkで検討したところCa^{++}とATPの存在下で取り込みが促進された。又、この［^{3}H］Met-ENkの放出はCa^{++}濃度に依存した結果が得られた。

下垂体後葉神経分泌軸索終末には直径150～300nmの分泌顆粒を含むものと、直径約100nmの分泌顆粒の２種類が存在する。大型の分泌顆粒にはVPとOTが含有されている。一方、ENkはどのサイズの顆粒に存在するのか、或はENk固有の顆粒が存在するのか、もしENkがOTやVPと同一顆粒内に共存している場合その生理的役割について興味を持った。我々は先の本学会において、ウシ下垂体後葉分泌顆粒にはLeu-ENkとVPの共存は不明であると報告した（6）。ラット下垂体後葉では、大型の神経分泌顆粒にはENkとVP又はOTが共存し（3）、小型の顆粒にはENkのみが含有される（4）と報告されている。最近Gaymann とMartinらは、ラット下垂体後葉のMet-ENkは、常にOTと共存する。又、ほとんどのLeu-ENkはOT終末にあり、大型のVPを含む顆粒にはLeu-ENkは共存しない（1）。そしてこれらのペプタイドは神経終末からco-releaseされると報告している。これらの報告を踏まえ、今回はMet-ENk類の超微局在と、ENkの放出の機構について検討した。

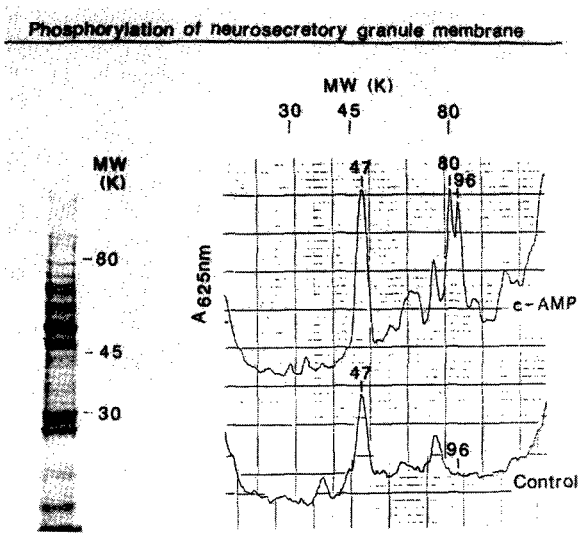
〔方法〕

ウシ下垂体後葉分泌顆粒はPercollの連続密度勾配遠心により分離した。即ち屠殺後、１時間以内に牛脳より下垂体後葉部分を切り出し、10倍量のＨＳＥ液(10mM Hepes pH=7.0、190mM Sucrose、25mM EGTA) にてhomogenizeし、Ｐ２画分を得る。Ｐ２画分をＨＳＥ液に懸濁後、percoll 0～50%の連続密度勾配遠心で60、000×g、30分の遠心を行う。遠心後、フラクションに分け、percollの密度及びタンパク量、marker enzyme活性、電顕による観察を行った。電顕はグルタールアルデヒド固定、オスミウム酸固定を引き続き行い、脱水、包埋を経て、超薄切片を作製し酢酸ウラン、クエン酸鉛による染色後、観察した。分泌顆粒へのEnkの取り込みと放出機構は［^{3}H］Met-Enk活性の測定で行った（5）。即ち、顆粒タンパク100μgを140mMKCl,5mMNaCl,2mMMgCl_2,10mMHepes,0.5mMPMSF pH=7.4,5.5×10^{-8}M (2.5μCi)［^{3}H］Met-ENkで25℃、10分の反応の後、Millipore HAWPでろ過後、フィルター上のＲＩカウントで［^{3}H］Met-ENkの取り込み活性を測定した。又、放出活性は、同じ反応液で25℃、30分間の反応後、40、000×g、60分の遠心の沈澱をCa^{++}freeのBufferに懸濁した顆粒画分を用いて、種々の条件で、取り込みと同じ反応液で25℃10分間の反応を行った。分泌顆粒膜タンパク質のリン酸化は、顆粒を1mMHEPES、1mMEDTA pH=7.4で１時間低張処理後、105、000×g、90分の遠心で顆粒膜を調整して、^{32}P-ATPと反応を行った。引き続きSDS-PAGEをLaemmliの系で行い（2）、Autoradiogramのパターンを測定した。

〔結果と考察〕

percoll密度勾配遠心法による分泌顆粒の分離は、遠心後、遠心管の上部から6～8本のフラクションに分け、percol marker beadesで夫々の密度を測定した。d=1.128の部分に直径100～300nmの分泌顆粒が最も多く認められた。この部分の純度は核、ミトコンドリア、ライソゾーマル酵素、膜のmarker enzymeで活性を測定すると共に、電顕で観察した結果僅かにミトコンドリアの混入が認められた他は、ほとんど100%インタクトな分泌顆粒が得られた。夫々のフラクションのMet-ENkとLeu-ENk,OTの含量はＲＩＡまたはＨＰＬＣにて測定した。この結果、分泌顆粒分画に最も多くのMet-ENk、Leu-ENk、OTが含まれることが分かった。この結果は二重免疫染色による電顕の観察でも明らかになった。即ち、Met-ENk,Leu-ENk,Met-ENk-Arg^{6}Phe^{7}の抗体で包埋前PAP法による免疫染色を行いEpon-Aralditeに包埋した。その後、超薄切片作製後にOTとVP(AVP)の抗体で包埋後金コロイド法により免疫染色を行い同一超薄切片を電顕で観察した。この結果同一神経分泌顆粒内にLeu-ENKはVPと共存するがOTとは共存しないことが分かった。一方Met-ENKはOTと共存するがVPとは共存しないことが分かった。またMet-ENk-Arg^{6}Phe^{7}は一部OTと共存することが明らかになった。我々は牛脳synaptic vesicleのENkの取り込みがATPやCa^{++}の２価の陽イオンによりactivateされることを報告（7）してきたがこの下垂体後葉分泌顆粒の［^{3}H］Met-ENkの取り込みについても検討した。その結果、percoll遠心後の各フラクション共、2mMCa^{++}単独、あるいはCa^{++}と2mMATPの存在下で［^{3}H］Met-ENkの取り込みが促進された。尚分泌顆粒分画以外のフラクションでの［^{3}H］Met-ENkのとりこみは、主にsynaptic vesicleへの再取り込みと考える。neurotransmitterの合成や放出にタンパク質のリン酸化が関与しているという考え方が提唱されてきているが、このリン酸化を受けるとタンパク質分子は形態変化を起こし、そのタンパク質が持っている生理機能の活性化を生じる。そこで分泌顆粒のENkの放出と、リン酸化の関係を検討した。顆粒の膜を調整し、この膜のリン酸化は、5μMc-AMPの存在下で分子量47KDa,80KDa,96KDaのタンパク質が最も強くリン酸化された（Fig 1）。分泌顆粒内に取り込ませた［^{3}H］Met-ENkの放出の機構を検討した。予め、［^{3}H］Met-ENkを顆粒内に取り込ませた後、種々の条件で放出を観察した。放出は25℃、10分間の反応を行い、HAWPでろ過後，filterはPBSで洗い、filter上にtrapされたRIのカウントを測定した。controlはCa^{++}freeの条件で行った。その結果Ca^{++}濃度に依存した放出と、Ca^{++}とc-AMPを加えた場合による相加作用がみられた。又、下垂体後葉のcytosol分画を反応液に加えると、controlに比べ、53.7%の放出が起こり、cytosolにはreleaseを促進するfactorが存在することを示唆している。最近このfactorは熱安定性であることが判明した。現在このcytosol中に含まれているfactorを同定中である。

(Fig-1)



References

(1)Gaymann,W.and Martin,R.(1987)Neuroscience.20,1069-1080 (2)Laemmli,U.K.(1970)Nature.227,680-685 (3)Martin,R.,Geis,R.,Holl,R.,Schafer,M.and Voigt,K.H.(1983)Neuroscience.8,212-241 (4)Shioda,S.,Nakai,Y.,Ochiai,H.,Nakada,H.and Sano,Y.(1984)J.Electron Microsc.33,72-75 (5)Takeda,F.,Tadeda,M.,Shimada,A.and Konno,K.(1985)Brain Res.344,220-226 (6)Takeda,F.,Tadeda,M.,Shimada,A.,Kuraoka,Y.,Shioda,S.and Nakai,Y.(1986)神経化学.25,316-318 (7)Takeda,M.,Takeda,F.,Matsumoto,F.,Tanaka,R.and Konno,K.(1982)Brain Res.234,319-326

167 細胞内シグナル変換系の相互作用によるエンケファリン前駆体遺伝子発現の調節：アルツハイマー病アミロイド蛋白遺伝子との比較

吉川和明・相沢貴子・山本明広・野沢明美
（東京都精神医学総合研究所・分子生物学研究室）

〔要約〕ラット精巣から分離培養した精細管周囲(PT)細胞はエンケファリン前駆体（pEnk）mRNAおよび２種の長さのアルツハイマー病アミロイド蛋白(AAP)mRNAを発現していた。pEnk-mRNAはフォルスコリン(FK)、フォルボルエステル(TPA)、およびデキサメサゾン(DEX)によって誘導を受け、２種の活性化物質を同時に添加した場合には協同作用(synergism)が見られた。一方、AAP-mRNAはこれらの物質によって影響を受けなかった。これに対して、上記の活性化因子にpEnk-、AAP-mRNA両者とも全く反応しない脳室腫瘍由来の細胞も見出された。したがって、pEnk遺伝子発現はプロテインキナーゼA,C系およびグルココルチコイドの細胞内因子を介する相互作用によって調節されている可能性があるが、AAP遺伝子ではこれらのシグナル変換系の影響は受けないものと推定される。

私達は培養細胞系を用いてpEnk遺伝子発現の調節機構を研究し、NG108-15細胞やC6細胞ではサイクリックAMP（cAMP）系とDEXが協同的にpEnk-mRNAを誘導することを見出した[5,6]。一方、Combら[2]はpEnk遺伝子の5'側上流にcAMPのresponsive element があることを見出し、同じ領域にプロテインキナーゼCの活性化物質であるTPAが作用することを報告している。今回私達はラットPT細胞を用いてpEnkやAAP遺伝子の発現におけるcAMP、TPA、DEXの３者による調節作用を検討した。

【実験方法】　PT細胞はSkinnerらの方法[3]によって生後20日のWistar系ラットの精巣から調製した。BKウイルスでin vivo条件で形質転換したマウス脳室腫瘍細胞(Vn1916)は当研究所・内田清二郎博士から供与を受けた。PT細胞は10cm培養皿、95%空気/5%CO_2、33℃、DMEM+10%ウシ胎児血清の培養液で1回の継代を含んで8日間培養し、無血清培養液に交換した後に各活性化物質を添加した。培養細胞中のpEnk-およびAAP-mRNAの分析は、ノーザンブロット後、ラットの脳cDNAライブラリーからクローン化したpEnk-cDNA[4]とAAP-cDNA(発表予定)を^{32}Pで標識し、ハイブリダイゼイションを行なった。

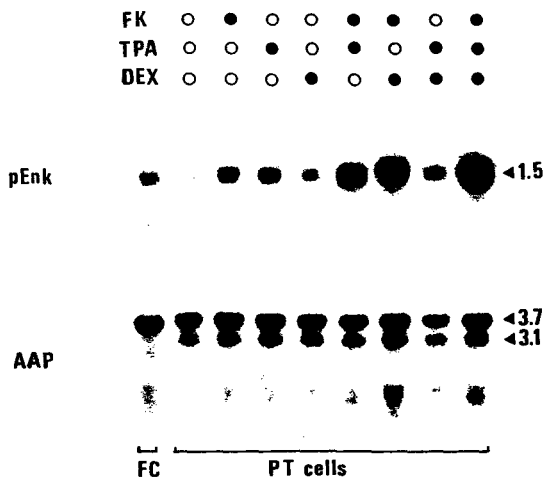


Fig. 1: Effects of forskolin, phorbol ester, and glucocorticoid on abundances of pEnk mRNA (pEnk) and AAP mRNA (AAP) in testicular peritubular (PT) cells. Cultured PT cells were treated without (○) or with (●) forskolin (FK, 10 μg/ml), phorbol ester (TPA, 0.1 μM), and dexamethasone (DEX, 1 μM) for 16 hr prior to harvest. FC; frontal cortex (control). Numbers at right are the sizes of hybridized signals in kilobases.

TABLE I

Relative abundances of pEnk mRNA and AAP mRNA in cultured PT cells treated with forskolin, phorbol ester, and dexamethasone

FK	TPA	DEX	RNA yielded (μg/dish)	pEnk mRNA	AAP mRNA
−	−	−	48	1.0	1.0
+	−	−	59	5.0	0.8
−	+	−	61	3.8	0.8
−	−	+	54	2.0	0.7
+	+	−	81	14.4	0.6
+	−	+	54	22.6	0.9
−	+	+	70	6.0	0.8
+	+	+	63	38.2	1.0

The autoradiograms shown in Fig.1 were quantified by scanning densitometry. Each value was normalized with that of β-actin mRNA in the corresponding RNA preparation. The AAP mRNA abundance is of the two mRNA species in combination. Abundances relative to those of the untreated controls are presented.

【成績】 PT細胞は非刺激時においても微量の1.5 kbのpENK-mRNAと、 2種の長さ(3.4および2.8kb) のAAP-mRNAを含んでいた(Fig.1)。FK,TPA,DEXのPT細胞内pEnk-mRNA濃度に及ぼす効果を検討したところ、それぞれ単独では2～5倍、2物質同時添加では6～22.6倍、3物質同時添加では38.2倍に上昇させた(Fig. 1とTable I)。TPA+FKでは協同的に作用したが、TP+DEXではTK+DEXに比較して殆ど協同作用は認められなかった。一方、AAP-mRNAはこれらの物質によって増加せず、やや減少傾向を示した。

Vn1916細胞は多量のpEnk-mRNA(1.5kb)とMet-Enkを含んでいたが、FK,TPA,DEXには全く感受性を示さなかった。このことは、これらの物質によるpEnk遺伝子の活性化には共通の細胞内因子(受容機構)が関与していることを示唆する。また、Vn1916細胞は一種類(3.4kb)のAAP-mRNAを発現していたが、上記3物質の影響は受けなかった。

【考察】 Combらの成績[1]からpENK遺伝子もTPA感受性があることが予想されてきたが、私達が現在まで検討したところでは、pEnk-mRNAレベルはcAMPによって増加を示しても、TPAに明確な反応性を示す細胞系を見出すことは出来なかった(未発表)。したがって、PT細胞はTPAによるpEnk遺伝子発現の調節機構を研究する上で適した細胞系と考えられる。pEnk遺伝子発現活性化過程に関与する細胞内因子(蛋白)についてはまだ不明であるが、TPAはプロテインキナーゼC活性化を介して、cAMP系に対して影響を与えることが知られており[2]、TPAの効果はcAMP系を活性化することによる二次的効果である可能性がある。しかし、TPAとFKは協同的であること、DEXの増強効果はTPAとFKに対して異なること、などから、両者は相互作用はあるものの別個の機構でpEnk遺伝子を活性化することも考えられる。 PT細胞では2種の、Vn1916細胞では1種のAAP-mRNAを発現しているが、両者ともTPAとFKに対しては全く反応を示さなかった。このことはAAP遺伝子はpEnk遺伝子と異なり、他の細胞からの情報因子によって影響されないconstitutionalな発現をしていることを示唆する。PT細胞での2種のmRNA種はヒトAAP-mRNAと同様にalternative RNA splicingによって生じる可能性があり、今後検討を要する点である。

【文献】

[1] Comb,M., Birnberg,N.C., Seasholtz,A., Herbert,E., and Goodman,H.M.(1986) Nature, 323, 353-356.
[2] Nishizuka,Y.(1986) Science 233, 305-312.
[3] Skinner,M.K. and Fritz,I.B. (1985) J.Biol.Chem. 260, 11874-11883.
[4] Yoshikawa,K., Williams,C., and Sabol,S.L.(1984) J.Biol.Chem. 259, 14301-14308.
[5] Yoshikawa,K.and Sabol,S.L.(1986) Mol.Brain.Res. 1, 75-83.
[6] Yoshikawa,K. and Sabol,S.L.(1986) Biochem.Biophys.Res.Commun.139, 1-10.
[7] Yoshikawa,K. and Aizawa,T.(1988) Biochem.Biophys.Res.Commun. 151, 664-671.

168 アルツハイマー病アミロイド蛋白メッセンジャーRNAのラット中枢神経系内分布：ソマトスタチンおよびコレシストキニン前駆体メッセンジャーRNAとの比較

山本明広・相沢貴子・野沢明美・吉川和明
（東京都精神医学総合研究所・分子生物学研究室）

〔要約〕　ラット大脳皮質のcDNAライブラリーからクローン化したアルツハイマー病アミロイド蛋白（AAP）cDNAを用いて、成熟ラットの臓器および脳内でのAAP-mRNA分布をノーザンブロットによって検討した。各臓器および脳ではAAP-mRNAは3.3 kbの単一バンドを示した。腎臓および脳には高濃度のAAP-mRNAが認められたが、それ以外の臓器では低値であった。一方、AAPは脳内の各部位では、ほぼ均一に分布していたが、新皮質には高く、嗅球、梨状皮質、内嗅皮質などでは低い傾向が認められた。これに対してソマトソタチン前駆体(pSOM)mRNAやコレシストキニン前駆体(pCCK)mRNAの場合は高濃度を含む新皮質、扁桃体などに比べて著しく低濃度の部位があり、AAP-mRNAと比較すると部位差が大きかった。これらの結果からAAPは中枢神経系の細胞に共通かつ必須の機能を持つものと考えられる。

アルツハイマー病では大脳皮質領域の血管や実質にアミロイドが大量に沈着することが知られている。最近、このアミロイドの構成成分である蛋白(AAP)のcDNAがクローン化され、ヒトではmRNAに多様性があること、さらにmRNAは脳のみならず非神経組織にも分布すること　などが報告されている（総説[7]参照）。このAAPの遺伝子発現や沈着機構を研究するためには実験動物系が有用と考えられるため、私達はラットの脳からAAP-cDNAをクローン化し、これを用いてラットの脳内各部位でのAAP-mRNAレベルをノーザンブロットによって分析した。また、アルツハイマー病では大脳皮質のソマトスタチンニューロンが変性することが知られている。また、コレシストキンニューロンは大脳皮質に高濃度に分布している。そこでpSOM-およびpCCK-mRNAの分布を対照として用い、比較検討した。

【実験方法】Wistar系雄ラット(生後90日)の各脳部位はMarleyらの方法[2]に基づいて分離し、全細胞RNAを抽出[8]後、一定量のRNA(2.5 μg)を6%ホルムアルデヒド/1.2%アガロースゲルで電気泳動し、ノーザンブロットを行なった。ハイブリダイゼイションは各cDNAをマルチプライム法で^{32}Pでラベルしたものをプローブとして用いた。ラットAAP-cDNAはラット大脳皮質のλgt11系で作成したcDNAライブラリーからヒトAAP-cDNA[3]をプローブとしてクローン化したものを用いた(発表予定)。　また、pSOM-cDNAはTufts大学・Dr.H.Goodmanから、pCCK-cDNAはPurdue大学・Dr.J.Dixonから供与を受けた。オートラジオグラムはデンシトメーターで定量し、前頭皮質を1とした相対量で表示した。

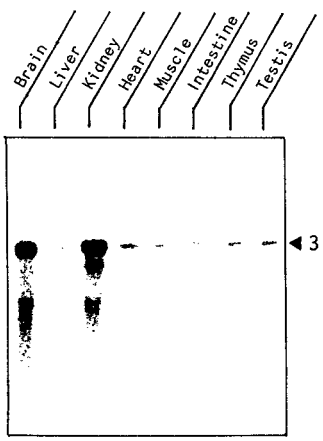


Fig.1 (left)
Northern blot analysis of AAP-mRNA in various organs of rat.

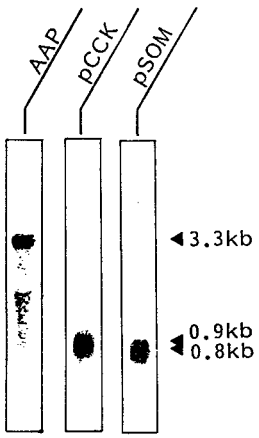


Fig.2 (right)
Northern blot analyses of AAP-, pCCK-, and pSOM-mRNA in the frontal cortex. Numbers at right are the sizes in kilobases (kb) of hybridized signals.

TABLE I
Regional distribution of mRNAs encoding AAP, pSOM, and pCCK in of rat brain

	AAP	pSOM	pCCK
Frontal cortex	1.00 (1.00)	1.00 (1.00)	1.00 (1.00)
Cingulate cortex	1.18 (1.09)	0.89 (0.82)	0.73 (0.67)
Parietal cortex	1.05 (1.03)	0.79 (0.77)	0.49 (0.48)
Occipital cortex	1.34 (1.19)	1.01 (0.90)	0.49 (0.44)
Temporal cortex	1.02 (0.84)	0.65 (0.53)	0.42 (0.34)
Olfactory bulb	0.38 (0.44)	0.07 (0.08)	0.06 (0.07)
Piriform cortex	0.42 (0.37)	0.60 (0.52)	0.33 (0.29)
Entorhinal cortex	0.49 (0.42)	0.49 (0.42)	0.38 (0.32)
Amygdala	0.79 (0.63)	0.90 (0.72)	1.20 (0.96)
Hippocampus	1.22 (1.18)	0.23 (0.22)	0.23 (0.22)
Septum	0.81 (0.60)	0.39 (0.28)	0.27 (0.20)
Striatum	1.12 (0.75)	0.55 (0.37)	ND
Hypothalamus	0.64 (0.54)	1.04 (0.87)	0.66 (0.55)
Thalamus	0.34 (0.23)	0.17 (0.12)	ND
Mesencephalon	1.45 (0.75)	0.35 (0.18)	0.06 (0.03)
Cerebellum	0.69 (0.45)	0.15 (0.10)	ND
Pons + Medulla	0.66 (0.25)	0.49 (0.19)	ND

The autoradiograms of hybridized signals were quantified by scanning densitometry. Abundances (units/μg RNA) relative to those of frontal cortex are shown. ( ): Relative abundances in units/mg wet weight.

【成績】AAP-mRNAの臓器分布を検討したところ、腎臓と脳では他の部位と比較して著しく高濃度に存在した。しかし、検討した全ての臓器で低濃度ではあるがAAP-mRNAは検出された(Fig.1)。これは既報のマウスでの成績[6]と一致する。つぎに、脳内の各部位別のAAP-,pSOM-,pCCK-mRNAの分布を調べた。各部位ではFig.2で示した前頭皮質の例のように主バンドはAAP-mRNA 3.3 kb, pSOM-mRNA 0.8 kb, pCCK-mRNA 0.9 kbの長さを示した。Table Iで示したように、各脳部位でのAAP-mRNAの分布は一般的に新皮質、海馬、線条体などで高値であったが、同じ大脳皮質領域の中でも嗅球、梨状皮質、内嗅皮質などでは低値であった。pSOM-mRNAはAAP-mRNAと同様に脳のほぼ全域に分布していたが、新皮質、扁桃体、視床下部で高く、嗅球、視床、小脳などでは低値であった。一方、pCCK-mRNAは大脳皮質で高く、線条体、視床、小脳、橋+延髄などでは定量限界以下であった。

【考察】 AAP-mRNAのラットやマウスの脳内分布に関しては既にin situ hybidization を用いた知見が報告されている[1,5]。一般にAAP-mRNAは脳各領域にほぼ均一に分布するが、ニューロンに多く、グリアには余り分布しないものと考えられている。今回のノーザンブロットを用いた結果でも脳部位間の差はpSOM-RNAやpCCK-mRNAほど顕著ではなく、特異なニューロンがAAP遺伝子を発現している可能性は少ない。これらの結果から、AAPはニューロンにとって必須の機能を持つためconstitutionalな発現をしていることが示唆される。また最近、AAPはヘパラン硫酸プロテオグリカンのコア蛋白であることが報告[4]されており、AAPはシナプス形成や細胞接着などの神経細胞膜機能に必須な機能をもつ可能性が出てきた。したがって、AAP-mRNAは神経細胞の密度を忠実に反映する可能性があり、老化などの神経細胞の変性を起こすような条件や神経系の分化に伴う細胞種の変化に伴って変動することも考えられる。

【文献】 [1] Bendotti,C., Forloni,G., Morgan,R., O'Hara,B., Oster-Granite,M., Reeves,R., Gearhart,J. and Coyle,J. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85, 3628-3632. [2] Marley,P., Rehfeld, J. and Emson,P. (1984) J.Neurochem. 42, 1523-1535. [3] Robakis,N., Ramakrishna,N., Wolfe,G. and Wisniewski,H. (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 4190-4194. [4] Schubert,D., Schroeder,R., LaCorbiere,M., Saitoh,T. and Cole,G. (1988) Science 241, 223-226. [5] Shivers,B., Hilbich,C., Multhaup,G., Salbaum,M., Beyreuther,K. and Seeburg,P. (1988) EMBO J. 7, 1365-1370. [6] Yamada,T., Sasaki,H., Furuya,H., Miyata,T., Goto,I. and Sakaki,Y.(1987) Biochem.Biophys.Res. Commun. 149, 665-671.[7] 吉川・亀谷 (1988) 日本臨床 46, 66-71. [8] Yoshikawa,K. and Aizawa, T (1988) Mol.Brain Res. (in press)

169 出血性ショック時における脳内神経ペプチドの変化

小野 剛、小川紀雄、羽場久美子、森 昭胤
（岡山大・医・脳代謝・機能生化）

［要約］

ラットを用い、無麻酔下における出血性ショックモデルを作成し、出血性ショック時の神経ペプチドの変化を脳部位別に調べた。

Thyrotropin releasing hormone (TRH) は、frontal cortex,septum,hippocampus,hindbrain の4部位にて有意の減少がみられたが、残りのstriatum, hypothalamus, midbrainの 3部位には有意の変化がなかった。Cholecystokinin-octapeptide (CCK-8) については、striatumでのみに有意に減少したが、他の部位には変化を認めなかった。Substance P およびsomatostatinは、調べた 7部位のいずれにも有意の変化がなかった。神経ペプチド含量の変化の最も大きかったTRH についてreceptor binding assay を行なったところ、septumおよびhindbrain にのみ特異的結合能の有意の減少が見られた。 TRH 含量の変化と特異的結合能の変化を併せて考えると、TRH は出血性ショック時に急激にseptumおよびhindbrain から放出され、TRH の持つ抗ショック作用の少なくとも一部を演じている可能性が示唆される。

［はじめに］

Thyrotropin releasing hormone (TRH) は、出血性ショック時に平均動脈圧を上昇させ（ 3 ）、 あるいはショック状態から生体を回復させるという報告（ 8,9 ）があり、ショック治療におけるTRH の有用性が示唆されている。一方、出血性ショックの実験の多くは麻酔下で行なわれており（ 8,9 ）、この場合、生体の代償機能が抑制されている状態なので真の病態生理を解明していくことは困難であると思われる。今回、我々はラットを用い、出血性ショックモデルを作成し、脳内のTRH 神経機構を部位別にradioimmunoassay (RIA)とreceptor binding assay (RRA) とにより検討したので報告する。 また、心血管系の調節および体内の恒常性の維持に関与していると思われる他の神経ペプチドのsubstance P（ SP ）（ 2,4 ）、somatostatin（ SOM ）（ 10 ）、さらに cholecystokinin-octapeptide (CCK-8) についても脳部位別の濃度変化についてあわせて報告する。

［方法］

SD雄ラット（体重 280-350g)を用いた。Ketamine (100mg/kg, i.m.) にて麻酔後、左大腿動静脈を出血させないように気をつけながら結合織より剝離する。大腿動静脈にそれぞれカニューレを挿入し、皮下を通して背部に出し、間に三方活栓を結合し、その三方活栓を背部に固定した。これらの操作により動静脈シャントを作成する。麻酔より覚醒後、ラットはケージ（一辺が約30cmの立方体）の中を自由に動き回れるようにしておいた。シャントが閉塞しないよう実験に供するまでヘパリン （ ヘパリン 1mlに生理的食塩水を加えて24mlに調製したもの ） を 2ml/kg/hr でシャントより持続注入した。 1日後、 2ml/kg のヘパリンをさらに静注した。 5分後に0.5ml の動脈血を採取し、ヘモグロビン濃度を測定し術中および術後の出血がないことを確認した。脱血は動脈側より行ない、脱血量は体重の3.5%とした。30分間で上記の量を一定のスピードで脱血できるように脱血速度を決定した。血圧は脱血直前および脱血開始後90分後まで 5分ごとに測定した。脱血開始後30分より60分間は平均動脈圧が40mmHgになるように血圧を適宜調節した。脱血開始後90分後にラットを断頭屠殺し、脳をすみやかに取り出し、 Glowinski and Iversen の方法（ 1 ）で 7部位に分けた。対照群として前記の手術操作を行ない、1日後にヘパリンを投与したのち90分後に断頭したラットの脳を用いた。神経ペプチドは各脳部位より酸エタノールにより抽出し、RIA により測定した（ 7 ）。 TRH の特異的結合能の変化は、RRA（ 6 ）により測定した。その他の神経ペプチドのRIA は TRHのRIA に準じた。各測定値は、one-way ANOVA により検定し、5%以下を有意の差とした。

[結果]

TRH に関しては、frontal cortex, septum, hippocampus, hindbrain の 4部位に有意の減少がみられたが、残りの striatum, hypothalamus, midbrainの 3部位には有意の変化がなかった（図-1，上段）。 CCK-8 については、striatumの部位のみに有意の減少がみられたが、その他の 6部位には変化を認めなかった。 SPおよびSOM においては、調べた 7部位のいずれの部位にも有意の変化を認めえなかった。 神経ペプチド含量の変化が最も大きかった TRH について RRA を行なったところ、TRH 含量の減少がみられた 4部位のうち、septumおよびhindbrain の 2部位では特異的結合能の有意の減少がみられたが、 frontal cortexおよびhippocampus の 2部位では変化がなかった。（ 図-1，下段）。TRH 含量の変化がなかった残りの 3部位には特異的結合能の変化もなかった。なお、TRH 特異的結合の減少が親和性の変化であるのか、あるいは、結合数の変化に由来するかについて、現在さらに検討している。

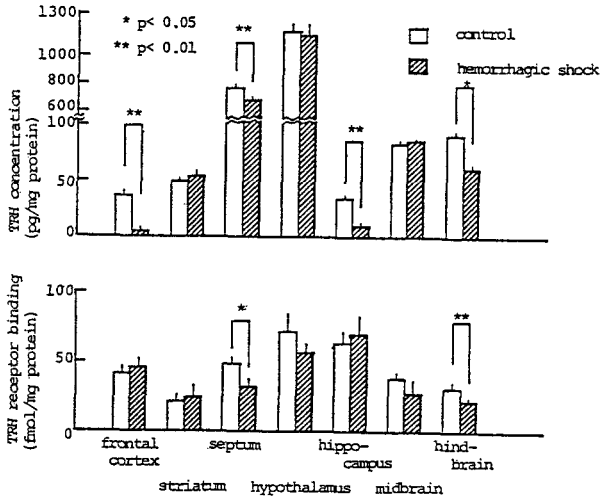


図-1 出血性ショック後の脳内部位別TRH 濃度および特異的結合量

[考察]

出血性ショック時、大脳皮質におけるTRH が増加するという学会報告（ 5 ）もあるが、我々の実験では調べた 7部位でTRH 含量が増加する部位は全くなく、 4部位で逆に減少した。この相違は実験条件の違いによるものかもしれない。また、血圧の調節に何らかの関係があるとされているSPおよびSOM は、出血性ショック後にも脳内では全く変化がなかった。

これらのことから、我々が今回の実験で検討した 4種類の神経ペプチドの中では、TRH が最も強く出血性ショックの病態に関与しているのかもしれない。TRH のレセプター結合能の変化は、hindbrain およびseptumで有意の減少を認めたが、TRH 含量も減少したことをあわせて考慮すると、出血性ショックが起こったためにこれらの 2部位より急激なTRH の放出が起こったものと推定しうる。さらに、外因性にTRH を投与すると血圧が上昇する（3,8,9）という現象もみられることから、出血性ショック時には内因性TRH の放出が血圧の低下を代償しようとして脳、特に生命維持の中枢であるhindbrain より起こったものと考えることができるかもしれない。このようにTRH は出血性ショックの病態生理に深く関与している可能性が示唆される。

[文献]

1. Glowinski, J. and Iversen, L. L. (1966) J. Neurochem., 13, 665-669.
2. Hancock, J. C. and Hoover, D. B. (1985) J. Auton. Pharmac., 5, 25-30.
3. Holaday, J. W. and D'Amato, R. J. (1981) Science, 213, 216-218.
4. Kubo, T. and Kihara, M. (1987) Brain Res., 413, 379-383.
5. 溝部俊樹、奥田千恵子、坂田由美 他、(1986) 麻酔、35（号外），S 208.
6. Ogawa, N., Mizuno, S., Nukina, I., et. al. (1983) Brain Res., 263, 348-350.
7. Ogawa, N., Kabuto, H., Hirose, Y., et. al. (1985) Regul. Peptides, 10, 85-90.
8. Sugiura, A., Smith, R. A. and Shateney, C. H. (1986) J. Surg. Res., 40, 63-68.
9. Teba, L., Zakaria, M., Dedhia, H. V., et. al. (1987) Circ. Shock, 21, 51-57.
10. Wang, X., Tresham, J. J., Congiu, M., et. al. (1987) Brain Res., 436, 199-203.

170　ヒト血小板トロンビン刺激によるイノシトールリン脂質代謝回転に及ぼすChlorpromazineの作用

若田部博文、塚原敏正、石郷岡　純、大貫裕子[1)]、永田悦子[2)]、笠原友幸、大谷義夫、三浦貞則
北里大学医学部精神科、北里大学医学部生物化学系[1)]、北里大学医学部東病院研究系[2)]

〔要約〕

ヒト血小板をトロンビン刺激すると、イノシトールリン脂質代謝回転亢進（PI response)と protein kinase C (C-kinase)の活性化がおこることが知られている。今回われわれは、この反応に及ぼすchlorpromazine(CPZ) の作用について検討した。 CPZはC-kinase活性化による40,000-dalton protein のリン酸化を抑制した。一方、 CPZは PI responseにより生じる 1,2-diacylglycerol(1,2-DAG)の一過性産生は抑制しないが phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate の初期の分解につづく再合成を抑制し、さらにphosphatidic acid の産生を抑制した。このように CPZは C-kinase 活性化を抑制するが、この作用は1,2-DAG 産生の抑制によるものではないと思われる。しかし、CPZ はPI response への抑制作用も有していると考えられた。

向精神薬である Chlorpromazine (CPZ) はprotein kinase C(C-kinase)活性を抑制するとされており、この抑制作用はphosphatidylserine(PS)により回復することから、 CPZの作用はPSとC kinaseとの相互作用の抑制と考えられている[3)5)]。そこで今回われわれは、ヒト血小板をトロンビン刺激して40,000-dalton protein(40K-da protein) のリン酸化を調べることによりprotein kinase C (C-kinase) の活性化を観察し、さらに1,2-diacylglycerol(1,2-DAG), phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP_2) , phosphatidylinositol 4-monophosphate(PIP) , phosphatidyl-inositol(PI), phosphatidic acid(PA) の経時的変化をとらえ PI responseを観察して CPZのこれらの反応への影響について検討した。

［方法］　健康成人男性の血液を試料とし、採血後すみやかに1/10量の 3.8%sodium citrateと混合し、２回の遠心操作（130 ×g, 100×g,15min,24℃）により platelet-rich plasma(PRP)を調整した。

(1)［蛋白リン酸化測定］ PRPから３回の遠心操作(200×g,15min,24℃) で得られたwashed platelets suspension (3×10^9platelets/ml)と[^{32}P]Pi をincubate(1mCi/2mlsuspension,37℃,60min) した後洗浄し、[^{32}P] ラベルされたsuspensionを作製した。suspensionを37℃の条件下でトロンビン刺激(0.3U/ml) した後、100 ℃ SDS-stop solutionにより経時的(0,10,30,60,300sec) に反応を止め、 SDS電気泳動にて展開し、オートラジオグラフィーにて放射活性部位を確認し40K-da proteinを切りだし、放射活性を測定した。

(2)[PI代謝回転測定] 10%BSAに溶解(25μCi/ml)した[^{3}H]アラキドン酸とPRP(2mM EGTA添加) をincubate(1μCi/mlPRP, 37℃, 60min)し、Ca^{++}free HEPES bufferで３回の遠心操作(200×g,15min,24℃) によりwashed platelets suspension (3×10^8platelets/250μl) を作製した。suspensionを37℃の条件下でトロンビン刺激(0.3U/ml) した後、経時的(0, 10,15,30,60,300sec) に反応を止め(chloroform:methanol:1NHCl/6:12:1)、Bligh-Dyer法により脂質の抽出を行った。各抽出液を薄層クロマトグラフィーで展開し 1,2-DAGの分離(chloroform:methanol:acetic acid/98:2:1)とPIP_2,PIP, PI,PA の分離(chloroform:acetone:methanol:acetic acid:d.w./80:30:26:24:16) 後、各画分の放射活性を測定した。

(3) [CPZ の影響] 以上の２つの操作の際、CPZ(100μM)で前処置(1min)を行った試料についても同様の操作を行い、

PI代謝回転と C-kinase 活性化に対する CPZの影響を調べた。

［結果］各Fig.は各画分の時間経過における放射活性をトロンビン刺激前を controlとした値に対するpercentage表示である（n=3)。C-kinase 活性化による40K-da proteinのリン酸化は刺激後早期に始まり 60secで最大になったが、CPZ はこの反応をほぼ完全に抑制した(Fig.1)。一方、PI代謝回転であるが、1,2-DAG(Fig.2-a)はトロンビン刺激後 15secでpeakに達する一過性の増加を示し、引きつづき300secまで徐々に減少した。CPZ はこの1,2-DAG の増加に対し抑制作用は示さなかった。しかし、この1,2-DAG から主に産生されてくるとされるPA(Fig.2-b) の増加はCPZ により有意に抑制された。また、PIP_2(Fig.2-c) は刺激後10sec で一過性に減少し15sec から徐々に増加してくるが、CPZ はこのPIP_2の再合成を抑制し、その効果は 60secまで認められた。PIPは刺激後軽度の増加傾向を示し、PIは減少してくるが、CPZ はこの変化にはほとんど影響を与えなかった。

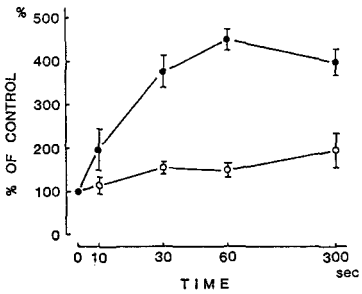


Fig.1. 40K-da protein phosphorylation following treatment of thrombin (0.3U/ml) in presence of 100μM CPZ (○−○) or without CPZ (●−●).

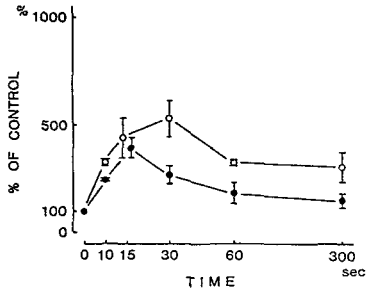


Fig.2-a. 1,2-DAG formation following treatment of thrombin (0.3U/ml) in presence of CPZ(○−○) or without CPZ (●−●).

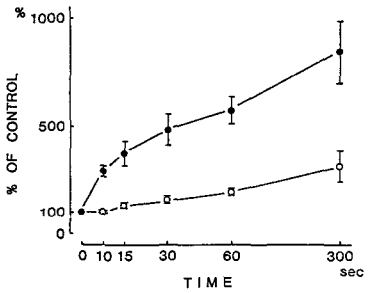


Fig.2-b. PA formation following treatment of thrombin (0.3U/ml) in presence of CPZ (○−○) or without CPZ(●−●).

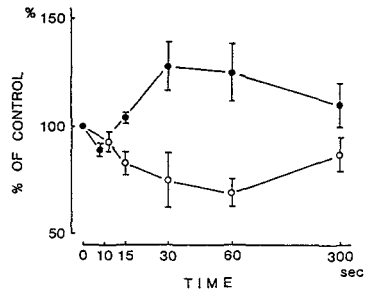


Fig.2-c. Radioactivity in PIP_2 following treatment of thrombin (0.3U/ml) in presence of CPZ (○−○) or without CPZ(●−●).

［考察］トロンビン刺激された血小板において PI responseの初期反応であるPIP_2の分解による1,2-DAG と細胞内Ca^{++}の動員が C-kinase を活性化し40K-da proteinをリン酸化するとされている[4]。今回のわれわれの結果ではトロンビン刺激されたヒト血小板の C-kinase 活性化が 100μMの濃度のCPZ により抑制されたが、この作用は 1,2-DAGの産生を抑制することにより生じるものではなかった。血小板をトロンビン刺激すると 10sec後までにPIP_2が分解され、これに引きつづいて再合成される[1)2)]とされており、われわれの結果においても同様の変化が認められた。しかし CPZ はこの変化に対して抑制を示したことから PI responseに対する抑制作用はあると考えられ、さらにPA産生の抑制もこの作用を支持すると考えられる。

［文献］

1) Agranoff,B.W.,Murthy,P.& Seguin,E.B.(1983) J.Biol.Chem.,**258**,2076-2078.

2) Billah,M.M. & Lapetina,E.G. (1982) J.Biol.Chem.,**257**,12705-12708.

3) Mori,T.,Takai,Y.,Minakuchi,R.,Yu,B.& Nishizuka,Y.(1980) J.Biol.Chem.,**255**,8378-8380.

4) Nishizuka,Y.(1984) Nature,**308**,693-698.

5) Schatzman,R.C.,Wise,B.C.&Kuo,J.F.(1981) Biochem.Biophys.Res.Commun.,**98**,669-676.

171　M電流のないニューロブラストーマ細胞ではブラジキニン刺激はイノシトール三リン酸依存性過分極を生じる

東田陽博、星　直人、横山　茂、岡野幸雄*、野澤義則*
（金沢大・医・神経情報研・神経物性、*岐阜大・医・生化）

〔要約〕

ニューロブラストーマとファイブロブラスト雑種ＮＬ３０８細胞へのブラジキニン投与は、ホスホイノシトール１、４、５三リン酸（ＩｎｓＰ$_3$）生成を約５倍高め、細胞内のCa^{2+}濃度を上昇させた。ブラジキニンは膜過分極を生じたが、M電流抑制により生じるイオン透過減少を伴う脱分極は生じなかった。過分極はCa^{2+}依存性K^+電流の活性化により生じ、それは、細胞内へのＩｎｓＰ$_3$注入によりミミック出来た事から、ＩｎｓＰ$_3$／Ca^{2+}により情報が伝えられる事がわかった。一方、Ｃ－キナーゼ活性は正常であった。しかし、Mカリウム電流は、この細胞には存在しなかった。従って、ジアシルグリセロール／Ｃ－キナーゼ系による信号伝達が、Mチャンネルには伝わらず、その結果脱分極が生じないと推論された。

ブラジキニン受容体からの信号は、リン脂質（ＰＩ）代謝を介して行われる（１）。今回、その経路で最終信号受容を行うイオンチャンネルのうち、M電流を欠くが、その他の信号伝達機構は備えている細胞を発見したので報告する。

［方法］

ＮＬ３０８細胞は Dr. Nirenberg より入手し、既報どうり培養した（２）。Ｉｎｓ（１、４、５）Ｐ$_3$はアマーシャムのラジオイムノアッセーキットにより測定した。膜電位膜電流はアクソクランプ２を用いて測定した（３）。

［結果と考察］

１０μMのブラジキニンをＮＬ３０８細胞外から与えて一過性の過分極がみられた（図・１）。脱分極も生じたがそれらは皆イオン透過性が増大しており、ＮＧ１０８－１５細胞で観察されたそれ（４）とは異なっていた。そこで、その理由を調査した。ＮＬ３０８細胞のブラジキニン受容体を刺激するとＩｎｓＰ$_3$の顕著な増大が見られた（図・２）。このことからＮＬ３０８はＩｎｓＰ$_3$とＤＧをセカンドメッセンジャーとする事がわかった。

ＩｎｓＰ$_3$細胞内注入により過分極反応が再現でき、ブラジキニンが、－９０ｍＶ前後で反転する外むき電流を生じることから（図・３）過分極はＩｎｓＰ$_3$／Ca^{2+}信号伝達経路をへて生じる事。一方、Ｃ－キナーゼ活性化によるタンパク質リン酸化反応は得られたのでＤＧ／Ｃ－キナーゼ通路も正常に作動している事がわかった。しかし、ＮＬ３０８細胞にはM電流は存在しなかった（図・４）。従って、ＤＧ／Ｃ－キナーゼ活性の結果生じるM電流の抑制が生じず、ＤＧ依存性の脱分極が生じないと考えられた。

以上、ＰＩ代謝産物によるイオンチャンネル制御機構をM電流を欠くミュータント細胞で解析した（図・５）。今後、ＮＬ３０８細胞はMチャンネルそれ自身や、それを調節する生化学的機構解明に有用な細胞となるであろう。

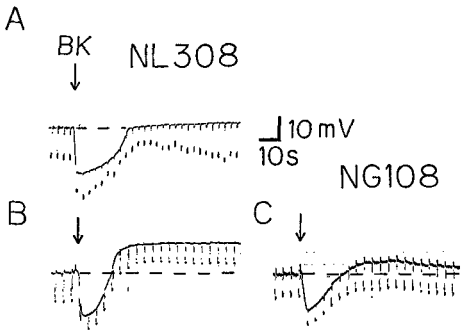


Fig. 1. Effects of bradykinin (BK) on the membrane potential of NL308 (A and B) and NG108-15 (C) cells. Pen recording traces showing the time course of typical hyperpolarizing (A) and biphasic (B and C) responses to 3 ul of 10 uM BK.

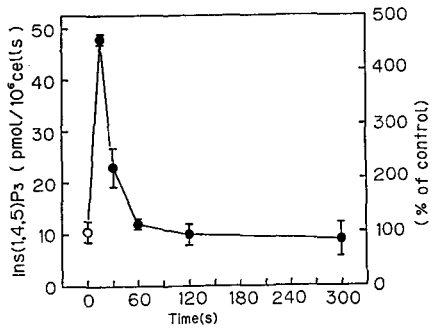


Fig. 2. Time course of BK-induced accumulation of $InsP_3$ in NL308 cells. The cells were incubated with (•) or without (o) 10 uM BK.

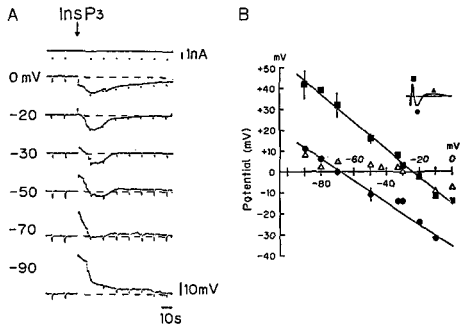


Fig. 3. Effects of changing initial membrane potential on tridirectional potential evoked by a single injection of $InsP_3$ (-30 nA , 0.2 s). Intracellular injections of $InsP_3$ elicited depolarization followed by transient hyperpolarization and subsequent depolarization at resting membrane potentials (=-50 mV).

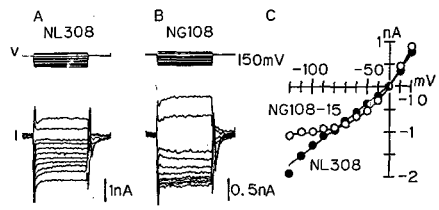


Fig. 4. Current transients (I, lower records) evoked by a series of 500 ms voltage steps (V, upper records) from +20 to -120 mV in NL308 (A) and NG108-15 (B) cells. Holding potential, -30 mV. C, plots of current level attained at the end of each 0.5s voltage step.

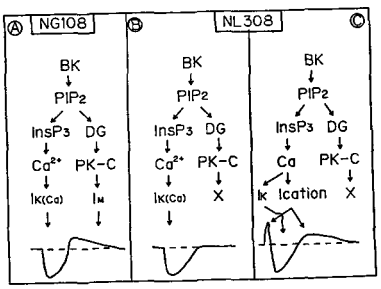


Fig. 5. Proposal sequence of response to BK in NG108-15 (A) and NL308 (B and C) cells. The prototype of BK-induced depolarizations in NG108-15 cells were associated with a decreased conductance (A), though initial and second depolarizations seen in NL308 cells (C) were accompanied by an increased conductance.

[文献]

1. Yano, K., Higashida, H., Inoue, R. & Nozawa, Y. (1984) J. Biol. Chem. 259, 10201-10207.

2. Chalazonitis, A, Minna, J. D. & Nirenberg, M. (1977) Exp. Cell Res. 105, 269-280.

3. Brown, D. A. & Higashida, H. (1988) J. Physiol. 397, 149-165.

4. Higashida, H. & Brown, D. A. (1986) Nature, 323, 333-335.

172 リチウムの細胞内情報伝達系に対する作用発現調節におけるナトリウムチャンネルの関与

神庭 重信[1]、八木 剛平[1]、
加藤 隆一[2]、Elliott Richelson[3]
[1]慶応大・医・精神神経、[2]同・薬理、[3]メイヨ・クリニック、薬理

〔要約〕
リチウムイオン（Li^+）のトランスメンブレンコントロールに及ぼす作用の代表的なものとして、イノシトール－1－リン酸化酵素の阻害[1]、アデニレートシクラーゼの阻害[2]、グアニレートシクラーゼの阻害[3]などがある。我々はマウス神経芽細胞腫を用いて、ナトリウムチャンネル（Naチャンネル）をベラトリジンで活性化すると、細胞が静止状態にある時に比べて、Li^+の細胞内作用が100%以上増強し、しかもこの増強作用がテトロドトキシン（TTX）で完全に阻害されることを見いだした。すなわち、Li^+の細胞内効果は、活動が盛んな神経細胞でより強く現われることを示唆する。そう病およびうつ病では、それぞれモノアミン神経系あるいはAch神経系の絶対的あるいは相対的な過剰活動が推定されている。Li^+はこれら過剰に興奮している神経においてより強い作用を発揮し、神経ネットワークのバランスの失調を修正し、そううつ病に効果を示すのかも知れない。

Li^+が臨床で使用され出してからおよそ30年がたとうとしている。現在では、そう病およびうつ病の急性期治療効果および再発予防効果をもつことが確立している。Li^+は他の抗精神病薬と異なり、鎮静作用をもって興奮を押え込むのではなく、そううつ病の基本障害である情動の変化に特異的に作用する。したがって、Li^+の薬理作用の解明は、そううつ病の発症のメカニズムを理解する助けとなることが予想される。現在まで、Li^+の作用機序研究はおもにシナプス部位での作用に焦点が当てられてきた。数種の酵素、イオンチャンネル・ポンプ、受容体そしてセカンドメッセンジャーに対する作用が調べられ、数多くの知見が集積されてきた。しかしながら、どの作用をとっても、それだけでLi^+の持つそう・うつに対する両極性の薬理作用機序を説明できるものはなかった。一つの可能性として、病相につれてLi^+の分布にシフトが起こり、作用の質や程度が変わることが考えられる。今回我々はこの仮説を支持する結果を得たのでここに発表する。

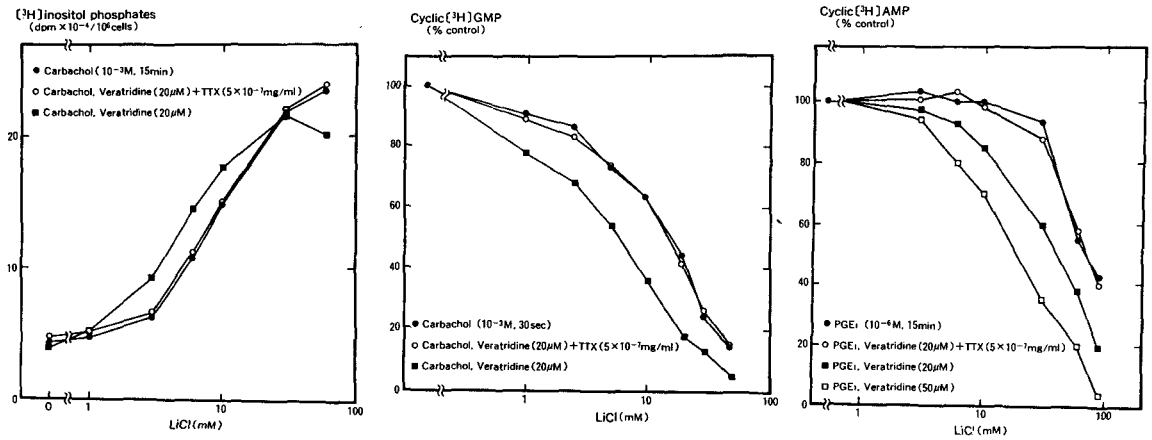
［方法］ マウス神経芽細胞腫N1E－115を用い、以下の実験を行なった。Prelabeling法を用いて、各受容体刺激で起こるcAMP、cGMP生成，およびイノシトールリン酸（IP）の放出を測定した[3,4]。アゴニストの濃度、反応時間はFig1に明記してある。この実験系にあらかじめ45分間Li^+をインキュベートし、Li^+の作用を調べたが、この際、ベラトリジン存在下（10分間）でNaチャンネルを活性化して、あるいはTTX（10分間）で抑制して、Li^+の作用がどう変化するかを調べた。

［結果］ N1E－115クローンでは、PGE_1受容体刺激によってcAMPの生成促進が起こり、ムスカリン受容体刺激によってcGMP生成およびIP放出が促進される。これらの反応系に、あらかじめLi^+をインキュベートしておくといずれの系においても、容量－、時間－依存性に抑制が見られる（Fig1、2参照、ただしここでは個々の作用機序の詳細については触れない）。ところが、ベラトリジンを作用させ、Naチャンネルを活性化させるとLi^+の持つこれらのセカンドメッセンジャー系に対する作用効力がいずれも100%近く高まることが明かになった。また、これらのベラトリジンによる増強作用はTTXによって完全に抑制された（Fig1）。

［考察］Ｌｉ⁺のセカンドメッセンジャー系に対する作用はベラトリジンによって増強されることを発見した。このベラトリジンの作用はＴＴＸによって阻害される。ＮａチャンネルがNa^+とLi^+を区別せず、Ｎａチャンネルが活性化されるとNa^+にまざってLi^+が細胞内により多く流入することが著者の一人によってすでに報告されている[5]。以上のことを考え合わせると、ベラトリジンによるLi^+の細胞内作用の増強は、Ｎａチャンネルを通って流入するLi^+によって細胞内Li^+濃度が増加したためであると考えられる（Ｆｉｇ２）。

もし仮に、このｉｎ　ｖｉｔｒｏのデータからｉｎ　ｖｉｖｏでのLi^+の作用機序を推定するならば、次のようなことが可能性として挙げられる。そううつ病の原因に関して広く受け入れられている最近の精神生物学的仮説では、そう病は、モノアミン神経系（ＮＡ、ＤＡ、５－ＨＴなど）のＡｃｈ神経系に対する、絶対的あるいは相対的過剰によって生み出され、うつ病はその逆の状態であると考えられている。現在、特定の神経系の過剰興奮を支持する決定的な証拠は見つかっていないが、そう病あるいはうつ病で、ある特定の神経系の絶対的あるいは相対的過活動が起こっていることは想像に難くない。Li^+はこれらの神経系により多く取り込まれるだろう。そしてその神経系に選択的により強い効果を発揮し、バランスの崩れを修正するのではないだろうか。やがて病気が治まるにつれ、Li^+の分布も均等に戻り、Li^+はその効果を失っていくのかもしれない。実際、Li^+は正常人あるいはそううつ病の寛解期にははっきりした作用を持たない。さらに、そう期ではLi^+が体内により蓄積し（ｐｏｓｉｔｉｖｅ　ｂａｌａｎｃｅ）、回復時に排泄が増加する（ｎｅｇａｔｉｖｅ　ｂａｌａｎｃｅ）という臨床報告も[6]、精神運動興奮が著明なそう期には、Ｎａチャンネルを通ってより多くのLi^+が神経あるいは筋肉へ流入し、蓄積されることで一部説明できるかもしれない。

Fig.1 Effects of Li^+ on receptor-mediated synthesis of second messengers in the presence and absence of veratridine.



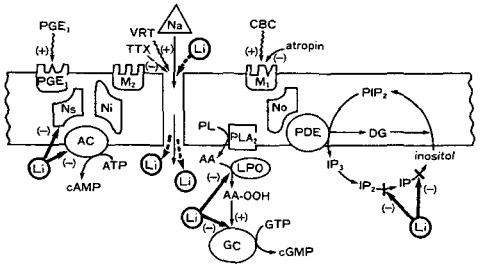


Fig.2 Hypothetical scheme of the molecular mechanism of Li^+effects on the second messenger systems.

Muscarinic M_1-and M_2-receptor($M_1$and M_2), prostaglandine E_1 receptor(PGE_1), phospholipid(PL), arachidonic acid(AA), hydroperoxy AA(AA-OH), carbamylcholine(CBC), veratridine(VRT), tetrodotoxine(TTX).

[References] 1)Allison, JH et al., Nature,233;267,1971. 2)Geisler, A et al., in Drug Receptors and Dynamic Process in Cells. ed. by JS Schou, Munksgaad, pp.302, 1986. 3)Kanba, S et al., Eur. J. Pharmacol.,126;111,1986. 4)kanba KS et al., J. Neurochem.,50;131,1988. 5)Richelson E, Science,196;1001,1977.

173 リチウムとカルバマゼピンのラット脳内ＧＡＢＡ受容体に与える影響

本橋伸高　假屋哲彦
山梨医大　精神神経科

〔要約〕
感情障害の治療予防薬であるリチウムとカルバマゼピンのラット脳内 GABA 受容体に与える影響を検討した。$GABA_A$受容体および $GABA_B$受容体の結合実験には^{3}H-muscimol と ^{3}H-(-)baclofen をそれぞれ用いた。大脳皮質膜標品を用いた in vitro の結合実験では、どちらの薬物も ^{3}H-muscimol結合および ^{3}H-(-)baclofen 結合をほとんど阻害しなかった。塩化リチウム(1.5 mEq/kg)、カルバマゼピン(50 mg/kg)1 回投与 24 時間後の前頭葉皮質および海馬の両結合部位に変化はなかった。同量の薬物を1 日1 回 14 日間投与し、最終投与 24 時間後に断頭したラット前頭葉皮質の両結合部位は変化を示さなかったが、海馬では ^{3}H-(-)baclofen 結合がリチウム、カルバマゼピンのどちらの群でも増加していた。この増加は主として総結合数の変化を反映すると考えられた。以上の結果より、リチウムとカルバマゼピンの共通の作用機序として、GABA受容体、特に $GABA_B$受容体を介するものがあることが示唆され、あわせて感情障害に GABA が関与している可能性が示された。

感情障害患者の血漿や脳脊髄液中の GABA 濃度が異常を示すとの報告や、バルプロ酸などの GABA 作動薬が感情障害の治療や予防に有効であるとの報告などから、感情障害の GABA 仮説が提唱されている。感情障害の治療や予防に広く用いられているリチウムやカルバマゼピンが GABA 作動系に影響を与えることは示されているものの(1,2,4,7,8)、GABA 受容体に対する作用についてはほとんど調べられていない。そこで、今回リチウムやカルバマゼピンをラットに投与したさいの $GABA_A$ および $GABA_B$受容体の変化を、それぞれの受容体の選択的作動薬である^{3}H-muscimol および ^{3}H-(-)baclofenを用いた結合実験法により検討したので報告する。

＜方法＞

実験動物はウィスター系雄性ラット(200-300g)を用いた。塩化リチウム(1.5 mEq/kg)は生理的食塩水に溶き、カルバマゼピン(50 mg/kg)は 0.1% tween80 を含む生理的食塩水に懸濁し、それぞれ腹腔内に投与した。対照群には生理的食塩水を投与した。1 回投与では 24 時間後に断頭し、取り出した脳を氷上で各部位に分割し、-80℃ で保存した。慢性投与では、各薬物を1 日1 回 14 日間投与し最終投与 24 時間後に断頭した。

膜標品の作成は Herschel と Baldssarini(3) にならった。^{3}H-(-)baclofenを用いた $GABA_B$受容体結合実験法は既報(9) によった。^{3}H-muscimol を用いた $GABA_A$受容体の結合実験法は Herschel と Baldssarini(3) に準じた。Triton X-100 の処置はしなかった。非特異的結合は 100μM isoguvacine 存在下のものとし、インキュベートの条件は 20℃、60分間とした。一点測定でのリガンドの濃度は、^{3}H-muscimol は4 nM、^{3}H-(-)baclofen は 10 nMとした。Scatchard 解析には10-80nM の^{3}H-(-)baclofenを用いた。蛋白量は Lowryら(6)により測定した。統計処理は ANOVAに引き続き Duncun の方法によった。

＜結果＞

ラット大脳皮質膜標品を用いてのH-muscimolの結合阻害能(IC_{50})は、muscimolが18.4 nM、isoguvacine が94 nMであった。(-)baclofen はほとんど作用しなかった。リチウム、カルバマゼピン共に 100μM でも結合を阻害しなかった。

リチウム、カルバマゼピン1 回投与 24 時間後の^{3}H-muscimol結合と^{3}H-(-)baclofen 結合は、前頭葉皮質と海馬で変化がなかった（^{3}H-muscimol結合、前頭葉、対照[SA]群 472±24fmol/mg protein リチウム[LI]群 449±26 カルバマゼピン[CA]群 442±14、海馬、SA群 220±11 LI群 196±8 CA群 208±10; ^{3}H-(-)baclofen結合、前頭葉、SA群 234±

21 LI群 233±20 CA群235±11、 海馬、SA群 31±2 LI群 29±1 CA群 29±2; Mean±SEM; n=7)。

14 日間の慢性投与後のラットの体重は各群間で差がなかった。^{3}H-muscimol 結合は前頭葉皮質でも海馬でも変化を示さなかったが、^{3}H-(-)baclofen結合は海馬でのみLI群とCA群の両方で増加していた (Fig.1)。プールした海馬の膜標品を用いて結合飽和実験をおこない、結果をScatchard 解析すると、この増加は最大結合数(Bmax)の変化を反映していると考えられた (Fig.2)。

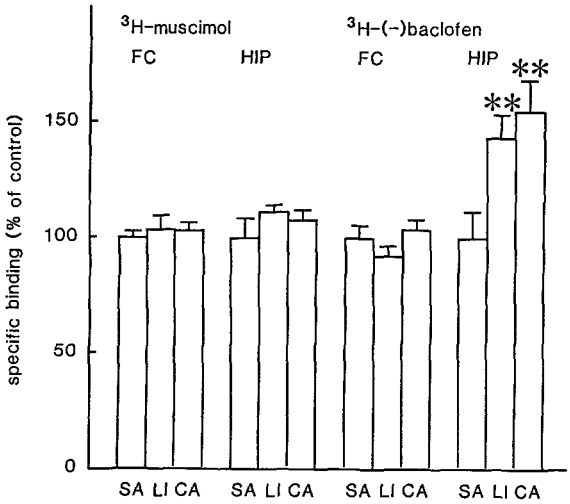


Fig.1 Changes in GABA receptors following chronic treatment with lithium and carbamazepine. **: p<0.01

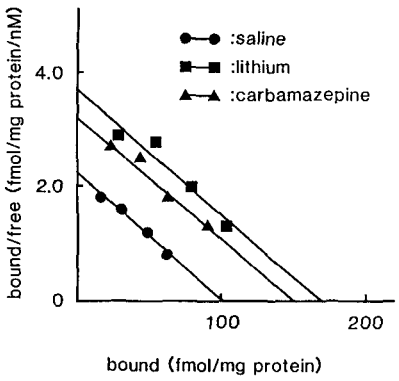


Fig.2 Scatchard plot of ^{3}H-(-)baclofen binding.

＜考察＞

リチウムとカルバマゼピンは感情障害の治療および予防に広く用いられているが、作用機序については不明な点が多い。カルバマゼピンが抗けいれん剤であることから、 GABA 系に影響を与えることが予想されるものの、検討はほとんどなされていない。本研究は、リチウムとカルバマゼピンの慢性投与によりラット海馬の結合が増加することを示している。同じ投与量、投与期間で 72 時間後に断頭したラットでも同様の変化が認められた (9)。したがって、断薬にともなう代償的変化とは考えにくい。Lloyd らは、三環系や非三環系の抗うつ剤のみならずバルプロ酸の慢性投与によってもラット前頭葉の$GABA_B$受容体数が増加することを示している(5)。今回の結果とは部位の違いはあるものの、感情障害治療薬の作用機序を考える上で興味深い。 ^{3}H-(-)baclofen 結合増加の機構についてはよくわからないが、リチウムとカルバマゼピンの慢性投与によりラット脳内の GABA 濃度が増加するとの報告(1,2,4,8) があり、そのことに対応した変化かもしれない。本実験では ^{3}H-muscimol結合に変化がなかった。リチウム慢性投与で、ラット大脳皮質と海馬の GABA($GABA_A$)受容体に変化がみられないとの研究(7) と結果は一致している。この研究では線条体と視床下部の GABA 受容体数は減少しており、今後他の脳部位についても検討の余地を残している。 GABA 分解酵素の阻害剤の慢性投与により $GABA_A$と $GABA_B$の両方の受容体が増加するとの報告(10)があるので、今回の結果を GABA 濃度だけで説明することは困難かも知れない。 $GABA_A$及び $GABA_B$受容体の調節機構についてはさらに研究が必要である。

＜文献＞

1) Ahluwalia,P. et al.(1981) Prog.Neuro.-Psychopharmacol. 5:527-530. 2) Gottesfeld,Z. et al.(1971) Nature 234:124-125. 3) Herschel,M. and Baldessarini,R.J.(1979) Life Sci. 24:1849-1854. 4) Higuchi,T. et al.(1986) Eur.J.Pharmacol. 125:169-175. 5) Lloyd,K.G. et al.(1985) J.Pharmacol.Exp.Ther. 235:191-199.6) Lowry,O.H. et al.(1951) J.Biol.Chem. 193:265-275. 7) Maggi,A. and Enna,S.J.(1980) J.Neurochem. 34:888-892. 8) Marcus,S.R. et al.(1986) Biochem.Pharmacol. 35:365-369. 9) 本橋伸高ら, 神経化学 26:490-492. 10) Sykes,C. et al.(1984) Biochem.Pharmacol. 33:387-393.

174 脳ミクロソーム極長鎖脂肪酸伸長反応酵素系の特徴

斉藤寿仁、吉田敏*、竹下正純

（大分医大・生化学、*実験センター）

〔要約〕

ブタ脳ミクロソームでの、C20 acyl-CoA 鎖長伸長反応の特徴を検討した。通常の条件下で、活性は C24 fatty acid 生成までは顕著であり、C26 fatty acid 合成は微弱であるが、N-ethylmaleimide (NEM)、p-chloromercuriphenyl sulfonic acid (PCMPS) によって C26 fatty acid 合成活性は増強する。これら SH 基阻害剤によって活性が増強される C26 fatty acid 合成を包括した、C20 acyl-CoA から C26 fatty acid への反応系の酵素学的特徴解明のため、ミクロソーム膜に存在する複合酵素系に対し、熱による酵素不活化、界面活性剤による変化、基質濃度依存性を調べた。反応生成物（C22、C24、C26 fatty acid）の鎖長の違い、飽和、一不飽和系での違いにより、反応の特徴に差異がみられるか否かを検討し種々の結果を得た。これらの結果とこれまでの知見とから、C20 acyl-CoA から C26 fatty acid 合成への極長鎖脂肪酸伸長酵素反応系モデルを提示した。

［目的］

ミエリン形成あるいは脱髄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、前々回、前回の本学会で我々は一不飽和系（C20:1-CoA→C26:1）について、NEM、PCMPS による C26:1 合成の活性化機構、反応系の特徴を報告した。今回は、飽和系と一不飽和系の極長鎖脂肪酸伸長系の C20→C26 までの反応の特徴を論じ、これまでの研究によって得られた知見を加味して、当酵素反応系のモデルを示す。ALD をはじめ極長鎖伸長反応系の変化が報告されている脱髄性疾患の機序解明、治療の試みとして行われている一不飽和長鎖脂肪酸の有効性、などに新たな示唆を与えると思われる。

［方法］

（1）生後５ないし６ヶ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（５）。

（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（6）。

（3）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（7、8）。

（4）C26 fatty acid 合成活性は反応液に 0.6 mM NEM を添加することで測定した（2）。

［成績と考察］

20:0-CoA および 20:1-CoA を外部基質とし、0.6 mM NEM 存在下での 20:0-CoA および 20:1-CoA elongation の基質濃度依存性の各々の結果を図１に示した。飽和系 22:0、24:0 への伸長は ほぼ同様の濃度依存性を示し、一方、一不飽和系では 24:1、26:1 への伸長が類似していた。飽和、一不飽和、共に C26 fatty acid への伸長は比較的少量の基質濃度で活性は一定となった。飽和系での伸長活性に対する熱処理の影響、界面活性剤（cholate）による活性低下について結果を図２に示した。C26:0 合成は、22:0 や 24:0 の合成とは異なった様相を呈し、45°C 加熱時間による活性の低下についてみると、26:0合成活性は急速に低下し、22:0、24:0 合成活性はやや長く保持された。cholate の作用は 22:0 合成活性を 0.2 % で微増させ、24:0 合成活性はやや減少させ、

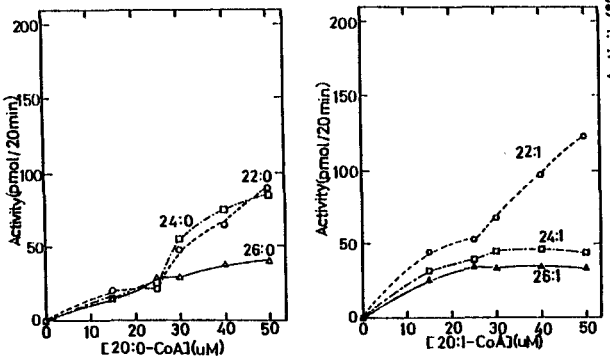


Fig. 1. Effect of substrate concentration on the elongation activity of 20:0-CoA to 26:0 (left) and 20:1-CoA to 26:1 (right) by swine cerebral microsomes. The elongation reaction was carried out with 2.0 mg of microsomal protein at 37°C for 20 min in the presence of 0.6 mM NEM.

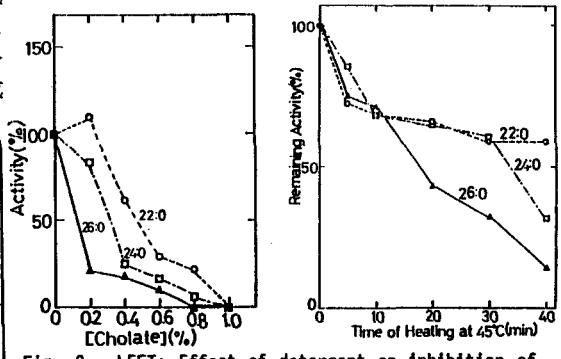
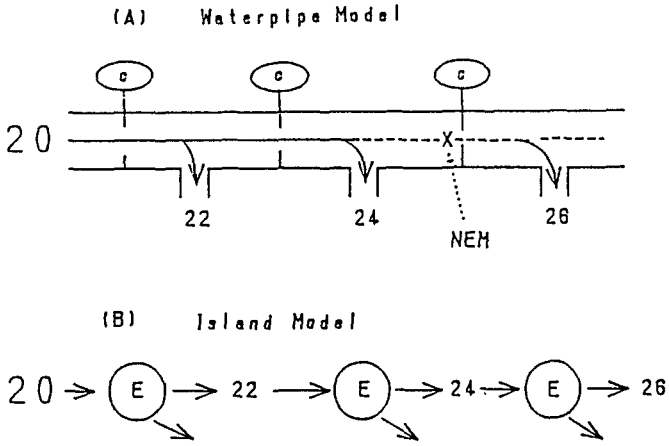


Fig. 2. LEFT; Effect of detergent on inhibition of the elongation activity of 20:0-CoA to 26:0 by swine cerebral microsomes. The elongation reaction was carried out with 2.0 mg of microsomal protein and various amount of cholate at 37°C for 20 min in the presence of 0.6 mM NEM. Results were expressed as the percentage of the reaction activity without the cholate.
RIGHT; Heat in activation of 22:0, 24:0 and 26:0 synthesis from 20:0-CoA. Microsomes were heated at 45°C for various interval and assayed under standard reaction condition. Results were expressed at the percentage of unheated microsomal activity.

26:0 合成活性は著しく低下させた。図2での傾向は、20:1-CoA を外基質とする一不飽和反応系でも一致した。これら図1、2で示した基質濃度依存性および酵素変性実験の結果と time course、dilution experiment の結果(4)、NEM を CoASH、glutathione (GSH) で逆滴定して得た結果などから次のことが考えられる。

(1) SH 基阻害剤による C26 fatty acid 合成活性増強は、ミクロソームのタンパク質への作用ではなく、脂肪酸伸長反応の過程で生じ、C26 fatty acid 合成を抑制する SH 基を含む物質への作用である可能性が強い。

(2) C20 acyl-CoA から C26 fatty acid までの脳ミクロソーム極長鎖脂肪酸伸長系は scheme 1 (B) のような liner に逐次に鎖長伸長がおこる反応系ではなく、(A) のごとくに拡散が起らず、連続的に C26 まで鎖長伸長されるものと思われる。



scheme 1. Hypothetic models of the elongation system of C20 acyl-CoA to C26 fatty acid.
x:SH-containing substance which produce from the elongation reaction regulates the activity of synthesis of C26 fatty acid.

さらに、極長鎖脂肪酸伸長反応系で飽和と一不飽和系との相異を検討するため、伸長反応の律速段階の一つである縮合活性(7、8)で kinetic なアプローチを行い、Lineweaver-Burk プロットをとると、飽和系は Michaelis-Menten タイプの反応を示すのに対し、一不飽和系では異なっていた(3)。40 μM 20:1-CoA 存在下で 20:0-CoA 濃度依存性を GC-MS を用い測定し Lineweaver-Burk プロットをとると(図3)、20:0-CoA 縮合活性の 20:1-CoA による阻害は非拮抗阻害の様相を示し、飽和、一不飽和反応の酵素あるいは活性中心は異なっている事を示唆した(3)。

近来、adrenoleukodystrophy (ALD) 治療に oleate (18:1) や Triolein を用い、患者での 26:0 蓄積が低下し、症状が改善した例が報告された(1)。この治療法の 18:1 作用機序にここで扱った飽和、一不飽和反応系の相互作用が関与する可能性がある。ALD など、脱髄性疾患の病態解明、治療法の開発などにミクロソームでの極長鎖脂肪酸伸長酵素の調節様式の研究が重要である。

[文献]

(1) Moser, A. B., Borel, J., Odone, A., Naidu, S., Cornblath, D., Sanders, D. and Moser, H. W. (1987) Ann Neurol, 21, 240-249.
(2) Saitoh, T., Yoshida, S. and Takeshita, M. (1988) Biochemistry International, 16, 671-678.
(3) Saitoh, T., Yoshida, S. and Takeshita, M. (1988) Biochem. Biophys. Acta, 960, 410-416.
(4) 斉藤寿仁、吉田 敏、竹下正純, (1987) 神経化学, 26, 637-639.
(5) 吉田 敏、竹下正純, (1984) 神経化学, 23, 192-194.
(6) Yoshida, S. and Takeshita, M. (1984) Biochem. Biophys. Acta, 795, 137-146.
(7) Yoshida, S. and Takeshita, M. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 254, 170-179.
(8) Yoshida, S. and Takeshita, M. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 254, 180-187.

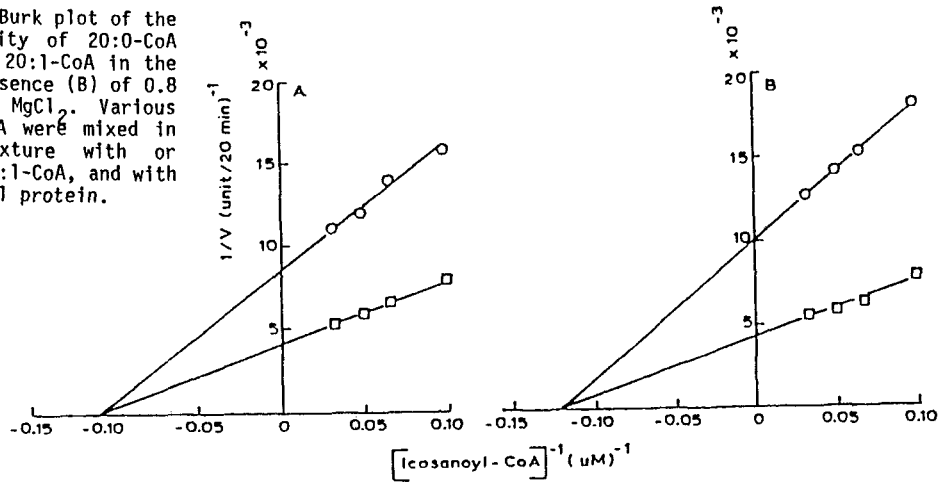


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of the condensation activity of 20:0-CoA and the effect of 20:1-CoA in the presence (A) and absence (B) of 0.8 mM ATP and 1 mM $MgCl_2$. Various amounts of 20:0-CoA were mixed in the reaction mixxture with or without 40 μM of 20:1-CoA, and with 0.6 mg of microsomal protein.

175 脳ミクロソームの長鎖脂肪酸伸長活性と膜の微細構造に及ぼすCa^{2+}の影響

吉田 敏、斎藤寿仁*、竹下正純*
（大分医大・実験センター、 *生化学）

〔要約〕

豚脳ミクロソームの長鎖及び極長鎖脂肪酸伸長活性の律速段階である、縮合酵素活性の膜脂質による調節機構を明らかにする目的で、Ca^{2+}の効果を検討した。1 mM 程度のCa^{2+}で、内在性の16:0-CoAと20:4-CoAの縮合活性は2-3 倍に活性化されたが、外在性20:0- CoA の縮合活性は、内在性基質の生成条件下では、約50% 阻害された。しかし、acyl-CoA合成のない条件下では、外在性基質の縮合活性は、1 mM Ca^{2+} では、影響を受けなかった。内在性基質の縮合活性が増大したのは、1 mM Ca^{2+} で、基質であるacyl-CoAの量が増大したためであることが、直接acyl-CoA含量を測定することにより示された。また、Ca^{2+}は、縮合活性のArrhenius plotにも大きく影響し、特に16:0-CoA縮合活性のArrhenius plotでは16℃付近の折れ曲がりが消失したが、一方、20:0-CoA縮合活性のplotへの影響は小さかった。これは、Ca^{2+}がミクロソーム膜の相に影響を与えたことによると考えられるが、このことを確認するために、フーリエ変換赤外分光法（FT-IR)により観測した。FT-IR で、Ca^{2+}がミクロソーム膜のphosphatidylserine(PS)と結合することが直接示され、また、メチレン基の伸縮振動による2849-2855cm^{-1} 付近の吸収に分解能を上げたときに見出された4つの成分のうち、2854cm^{-1}付近のより柔らかい成分がCa^{2+}により低波数側にシフトし、より固い状態になったことが見出された。これらは、脳ミクロソームには異なるいくつかのドメインが存在することを強く示唆している。以上より、Ca^{2+}は、脳ミクロソーム膜のPSと結合し膜の相状態を変えることにより、acyl-CoA合成反応が進み、内在性acyl-CoAの伸長活性のみかけの増大をもたらしたと考えられたが、ミエリン形成に重要な反応である20:0-CoA伸長活性は、内在性acyl-CoAの増大により逆に阻害されたものと思われる。

昨年と一昨年の本大会において、豚脳ミクロソーム（Ms）の長鎖及び極長鎖脂肪酸伸長活性がphospholipase A_2により阻害され、また遊離脂肪酸によっても阻害を受けることを示し、内在性16:0-CoA縮合酵素と、20:0-CoA縮合酵素は、Arrhenius plotが大きく異なることから、違う脂質環境にあることを予想した。また、膜脂質相の変化による長鎖脂肪酸伸長活性の調節は、オリゴデンドログリア細胞の糖脂質合成調節と関連する可能性を示唆した。

今回は、Ca^{2+}の伸長活性に対する影響を詳細に調べ、また、膜にドメイン構造が存在し、Ca^{2+}で変化を受けることを示す直接的証拠がFT-IR により得られたので報告する。

〈方法〉

豚脳ミクロソームの精製、acyl-CoAとmalonyl-CoA との縮合酵素活性のGC-MS 法による測定は、既報により行なった。(4,5) 内在性基質からのacyl-CoAの合成は、Prasadらの方法 (3)を改善して測定した。内在性acyl-CoAの含量を分子種とともに測定する方法は、先ずミクロソーム膜を一定反応時間後酸で反応を止め、内部標準としてC19:0-CoA を加える。次に、クロロホルム／メタノールで脂質成分を分離し、水相及び界面にある変性タンパク質部分を共に集め、クロロホルムで洗う。活性アルミナにCoA エステルを吸着させた後、再びクロロホルムで洗う。次に、KOH-methanolでケン化をおこない、遊離脂肪酸とし、TMTFTH法で(2) 、ガスクロにて同定、定量を行なう。ATP-Mg存在下で行なわれたacyl-CoA合成で生成した量は、コントロールとしてATP-Mgのない状態での脂肪酸エステルの量を差し引いて求める。（Table 1)

FT-IR によるミクロソーム膜脂質の測定。 膜試料（1 mg microsomal protein)は、±1 mM $CaCl_2$で50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4),0.2 M NaCl (TBS) 溶液に薄めたあと超遠心にて膜沈殿を得て、それを20-30 μl TBS にsuspend して、CaF_2セルにのせる。15μm のteflon spacer を置き、他のCaF_2 window ではさんで、FT-IR(JEOL,JIR-100) のビームコンデンサーにのせ測定する。この系では、実質的に測定されている膜試料は10μg protein 程度である。脂肪酸のメチレン基（CH_2, ν_s ）に由来する2852cm^{-1}付近の赤外吸収について、1 cm^{-1}の分解能で測定したあとコンピューターによって解像度を上昇させた。このとき"Subtraction of a super-smooth spectrum" （差スムージング法と略す）の方法が有効であった。(1)

〈結果と考察〉

前回報告したように、20:0-CoAを40μM加えて、ATP-Mg存在下、脳ミクロソームの縮合反応を行なわせ測定すると、3-keto 22:0-CoA のケン化物21:0-2-oneと、内在性基質の縮合反応由来の17:0-2-oneと21:0-2-oneが検出される。1 mM Ca^{2+} 存在下では、内在性基質からの活性は、2-3 倍に活性化されるが、外在性20:0-CoAの縮合活性は半分に阻害された。ところが、ATP-Mg の無い状態で、外在性の16:0-CoAや20:0-CoAの縮合活性は、1 mM Ca^{2+} ではほとんど影響を受けなかった。またATP-Mgがあっても、外在性20:4-CoAを40μM加えている条件下では、1 mM Ca^{2+} で20:4-CoA縮合活性の増大は見られなかった。遊離脂肪酸量は、1 mM Ca^{2+}ではほとんど変化しなかった。これらのことより、1 mM Ca^{2+} で内在性基質からの縮合活性が大きく活性化したのは、基質量が増えたことを示しているが、つぎに直接acyl-CoAの量を測定した。Table 1 にあるように、1 mM Ca^{2+} 添加で、16:0-CoAと20:4-CoAがそ

れぞれ 7 nmol/mg protein, 3 nmol/mg protein 増大したことを示している。これらの事実より1 mM Ca^{2+} によりATP-MgとCoA 存在下、acyl-CoA合成が促進され、その結果として内在性基質の縮合活性が増大したことが示された。

また1 mM Ca^{2+} は、図1にあるように、縮合活性のArrhenius plotを変化させた。特に、内在性16:0-CoA縮合活性の持つ16℃付近のArrhenius break が、1 mM Ca^{2+}で消失した。20:4-CoA縮合活性のArrhenius plotは上方へ移行し活性化エネルギーも増大した。外在性20:0-CoA縮合活性については下方に移行したが、活性化エネルギーはほとんど変化していない。1mM Ca^{2+}によるこれらArrhenius plotの変化は、膜脂質の相変化を反映している可能性があり、FT-IR によりメチレン基の赤外吸収を詳細に調べ膜の微細構造の変化を測定した。

Table 1. Effect of Ca^{2+}-treatment on the endogenous synthesis of fatty acyl-CoAs in brain microsomes.

	ATP-Mg[a]	CoA[b]	Ca^{2+}(1mM)	Fatty Acid Esters[c] (nmol/mg protein) 16:0-	18:0-	20:4-
(1)	-	+	-	12.9 ± 1.3[d]	20.4 ± 0.9	16.3 ± 0.1
(2)	+	+	-	19.4 ± 0.9	21.7 ± 1.2	16.3 ± 0.4
(3)	+	+	+	26.5 ± 2.2	22.5 ± 1.0	19.3 ± 1.7
△((3)-(2))[e]				7.0	0.7	3.0
△((2)-(1))				6.5	1.3	(<0.3)

[a] ATP, 0.8 mM; $MgCl_2$, 1 mM. [b] 100 μM CoA. [c] The fatty acid esters were detected after saponification of chloroform/methanol-washed protein fraction precipitated in the interface between aqueous phase and chloroform phase. Nonadecanoyl-CoA(19:0-CoA) was used as an internal standard. [d] Each value (±S.D.) was the average of three to four experiments. [e] Net increase of acyl-CoAs induced by Ca^{2+}.

〈方法〉で述べたようにMs膜のFT-IR 測定は、ビームコンデンサーを用い、微量の膜試料で行なうことができた。図2の(a) と(a')に未処理Ms膜のメチレン基の赤外吸収スペクトルを示す。(a')のように解像度を上昇させると2854, 2852, 2850.5, 2849cm^{-1}に肩が見出された。このなかで、特に1 mM Ca^{2+} によって2854 cm^{-1} の肩が小さくなり、2853 cm^{-1} にシフトした。(図2(b')) この伸縮振動の波数は、固い膜脂質ほど低波数側に出るので、以上の事実はMs膜のなかにheterogeneity があり、そのなかのより柔らかいドメインがCa^{2+}によって少し固い状態になったことを示している。また、Ca^{2+}はMs膜のphosphatidylserine(PS)のカルボキシル基 ($C\text{-}O^-$) の吸収 (1350 cm^{-1})を変えたので、膜の相は、先ずPSが作用をうけることによって、ある柔らかいドメインが固い状態になったと考えられる。Ca^{2+}による縮合活性の変化、特に16:0-CoAに対するArrhenius plotのbreak の消失と高温部の活性化エネルギーの増大は、上記の脂質相の変化によると考えられる。

このFT IR は、少量の神経系の細胞や膜標品の生理生化学的な変化と、脂質構造の変化とのつながりを研究するうえで有用な手法と思われる。

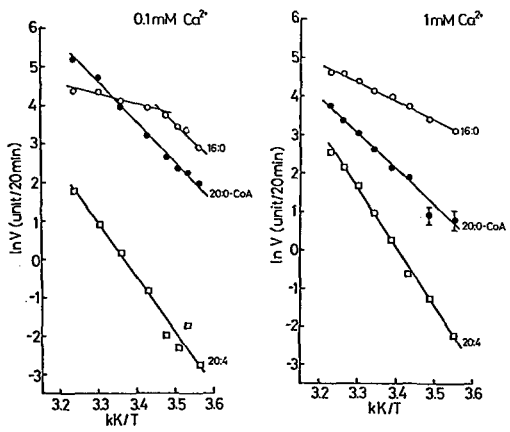


図1 Effect of calcium ion on the Arrhenius plots for the condensation activities for endogenous 16:0-CoA, 20:4-CoA, and exogenous 20:0-CoA.

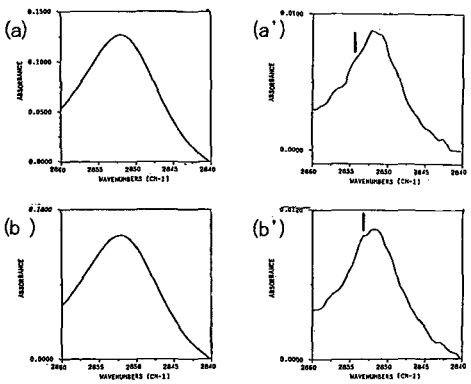


図2 FT-IR spectra of methylene stretching in brain microsomal lipids . (LEFT) Native spectra; (RIGHT) " 差スムージング" spectra. (TOP) Control Ms; (BOTTOM) +1 mM Ca^{2+}. Resolution, 1cm^{-1}. On smoothing, 21 point.

[文献]

(1) Chapdos, C., Beliveau, J., Trudel, M. and Levesque, C. (1986) Appl. Spectrosc., 40, 773-781.

(2) MacGee, J. and Allen, K. G. (1974) J. Chromatogr., 100, 35-42.

(3) Prasad, M. R., Sauter, J., and Lands, W. E. M. (1987) Anal. Biochem., 162, 202-212.

(4) Yoshida, S. and Takeshita, M. (1986) J. Neurochem., 46, 1353-1358.

(5) Yoshida, S. and Takeshita, M. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 254, 170-179.

176 ヒト脳総脂質の脂肪酸・脂肪アルデヒド・コレステロールのGC及びGC-MS分析による脳組織の病態解析

武富 保、 原 厚
（信大・医・心脈管研・脂質生化）

〔要約〕脳の脂質異常が中枢神経系のミエリンの脱落によるか、形成不全によるかは、必らずしも容易に鑑別できないが、脳総脂質の脂肪酸組成のうち、cerebroside やsulfatide に特有な長鎖脂肪酸の直鎖酸及びα－オキシ酸の占める割合を知ることによつてある程度可能であることが示唆された。 ミエリン形成不全脳では長鎖脂肪酸の占める割合はごく僅かで、またその純化したcerebroside やsulfatide の脂肪酸組成自体極めて異常であることが判つた。
他方、脱髄脳では長鎖脂肪酸の占める割合は減少したが、その純化したcerebroside やsulfatide の脂肪酸は長鎖脂肪酸が比較的よく保たれていた。 従つて、ミエリン形成不全脳ではミエリン脂質の合成自体が異常であること、他方、脱髄脳ではcerebroside やsulfatide などミエリン脂質の減少によるものであることが明らかになつた。

従来、演者らは神経疾患で脱髄病変のみられる脳、例えば、Metachromatic leukodystrophy (MLD)(1981), 楓糖尿病(1983), Sanfilippo syndrome(1984),Menkes'Steely- Hair 病(1986),GM1-gangliosidosis(1986), Adrenoleukodystrophy(ALD)(1987) などについて詳細な脂質分析結果を報告して来ている。 これらは、いずれも貴重な疾患脳だけに脂質分析に時間と手間をかけなければならなかつたことは言うまでもないが、一方では、病理組織検査に役立てるためにも多くの冷凍保存脳やホルマリン固定脳材料ついて、簡便で的確な分析法を検討することも必要である。 とくにGC及びGC－MS分析の性能が上がり、かつ簡便化されてきたので以前には躊躇した方法も敢えて試みられるようになつて来た。 ここでは、このような種々の疾患脳の総脂質のGC及びGC－MS分析を行つたのでそれらの結果を報告することにしたい。

（方法）

上記の脳材料を用いて、それらの白質部（湿重量、約100mg 以下）よりchloroform-methanol(2:1)で総脂質を抽出し、その抽出液を水洗後、脂質（1-2mg)を常法によりmethanolysisした。 そのhexane抽出液をGC及びGC－MS分析に用いた。 GCの未知ピークについてはGC－MS（EI，CI）によつて同定された。 他方、総脂質をVance & Sweeley 法によつてsimple lipids,glycolipids とphospholipids 分画に分け、更にglycolipids 分画は珪酸カラムクロマトグラフィーによつてcerebroside,sulfatide などを単離した。 sphingomyelin は phospholipids 分画をアルカリ処理後、preparative TLCによつて純化した。 これらについても同様にmethanolysisして脂肪酸などを分析した。

（結果）

脳総脂質の脂肪酸・脂肪アルデヒド・コレステロールをGCにより同時分析した(Fig.1) 。 特に、ミエリン脂質の一つであるethanolamine plasmalogenに由来するA1,A2,A3のピークはFig.2 のmass spectrum(CI) によつて、C16,C18:1,C18-aldehydes 由来のalkenyl monomethyl ethers であることが同定された。 この機序については既に演者らによつて報告された（1）。 直鎖酸及びα－オキシ酸についても、GC－MS(EI) で直鎖酸にはMcLafferty転位によるM/Z 74の他、M/Z 83,87 などのピークが認められたが、他方、α－オキシ酸にはM/Z 71,83 などが認められた。 CIによつては直鎖酸及びα－オキシ酸のmolecular ion が認められ、α－オキシ酸ではM-59のピークも見られた。 コレステロールのmethanolysisによる副産物もGC－MSによつて同定された。
各種脳の分析結果はTable 1 とTable 2 にまとめられた。 冷凍保存正常脳ではかなりよい一致を見た。 脱髄の見られなかつたcase 2(Vogt-Spielmeyer) とcase 2(Schizophrenia) では正常脳と比較的一致したが、脱髄の見られたcase 1(Sanfilippo syndrome Type B)とcase 4(Homozygous familial hypercholesterolemia)では長鎖脂肪酸の減少が見られた。 しかしながら、case 1とcase 4の総脂質より純化したcerebroside とsulfatide の長鎖脂肪酸はよく保存されていたので(Fig.3) 、総脂質の長鎖脂肪酸の減少はそれらミエリン脂質の減少を意味した。 ホルマリン固定正常脳では脂肪アルデヒドが著減したが、長鎖脂肪酸はよく保存されていた。 脱髄の見られなかつたcase 8(Kufs) を除いて、case 5(MLD),case 6(SLD),case 7(ALD) では長鎖脂肪酸の減少が明白であつた。 特に、case 9(Pelizaeus-Merzbacher)では脂肪酸組成の異常が著しかつた。 本症はミエリン形成不全でproteolipid protein の欠損が指摘されているが（2）、これと並行してcerebroside,sulfatide の生成も極めて異常であることが判つた(Fig.3) 。

（考察）

ヒト脳組織の病態解析で脂質異常を知るためにTLCやカラムクロマトグラフィー分析によつてミエリン脂質の減少やcholesterol ester の増量などを確かめることはすでに行われて来たところであるが、今回、総脂質を直接methanolysisして、簡便なGC及びGC－MS分析を行うことによつても興味ある知見を得ることが判つた。

（文献）

（1）原厚，武富保，脂質生化学研究 30:291-294(1988)

(2) Koeppen A.H., Ronca N.A., Greenfield & Hans M.B., Ann Neurol 21:159-170(1987)

(謝辞)

本研究にあたつて、case 9の脳試料は鳥取大・医・脳研中村晴臣教授により、また、その他試料は多くの方々によつて供与されたもので心より感謝したい。 また、本実験を手伝つてくれた当研究部門の沓掛ゆき江さんにも感謝したい。

Fig.1. GC of fatty acid methyl esters, alkenyl methyl ethers and cholesterol and its by-products.

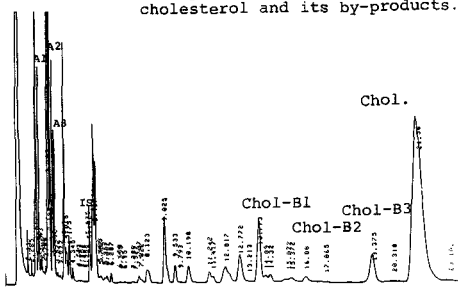


Fig.2. Mass spectra of alkenyl methyl ethers in Fig.1.

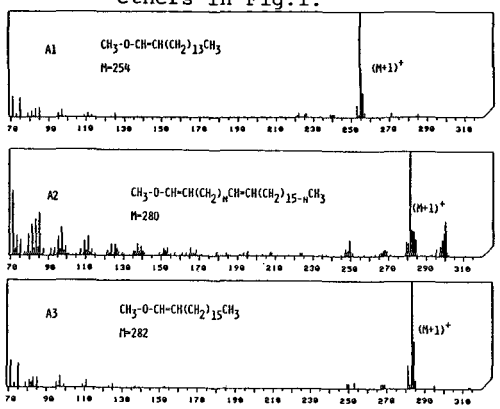


Table 2. Fatty Acid Composition of Total Lipids Obtained from Formalin-fixed Brains

	Normals mean±SD (n=6)	Case 5 (37y)	Case 6 (38y)	Case 7 (45y)	Case 8 (21y)	Case 9 (12y)
C14	0.33±0.06	0.38	0.69	0.45	0.42	0.06
C16	12.90±2.65	20.45	21.56	21.63	18.11	32.76
C18:1,2	24.77±2.67	27.85	29.10	24.73	25.72	20.06
C18	18.09±2.94	22.86	17.20	24.81	21.93	36.17
C20:4	2.07±0.70	1.00	3.37	0.42	0.44	0.65
C20:1,2,3	2.13±0.83	0.67	4.56	2.36	3.31	1.51
C20	1.44±1.33	2.07	0.70	0.64	0.15	0.81
C22:x	3.80±0.66	1.54	6.08	1.05	1.18	2.37
C22	0.54±0.10	0.38	0.67	0.51	0.63	0.76
C23	0.61±0.22	0.50	0.64	0.50	0.66	0.26
C22h	1.50±0.57	0.88	0.73	0.80	1.02	0.17
C24:1	9.19±0.47	5.93	5.33	4.86	7.56	1.60
C24	2.47±0.52	1.43	1.54	1.29	1.81	0.58
C23h	2.63±0.19	1.93	0.91	1.94	2.63	0.13
C25:1	2.16±0.43	1.69	0.78	1.46	2.09	0.18
C25	0.51±0.43	0.64	0.38	0.55	0.63	-
C24:1h	3.96±0.60	2.87	1.12	3.32	3.59	0.18
C24h	5.33±0.50	3.43	2.05	3.75	5.83	0.41
C26:1	1.34±0.46	0.92	0.14	0.95	0.86	-
C26	0.91±0.42	0.56	0.36	0.94	0.25	-
C25:1h	0.95±0.45	0.78	0.26	0.49	-	-
C25h	1.11±0.70	-	0.45	1.28	1.15	-
Cholest	37.98±2.47	38.30	30.80	37.90	39.50	33.53

Fig.3. GC of fatty acid methyl esters of cerebroside and sulfatide.

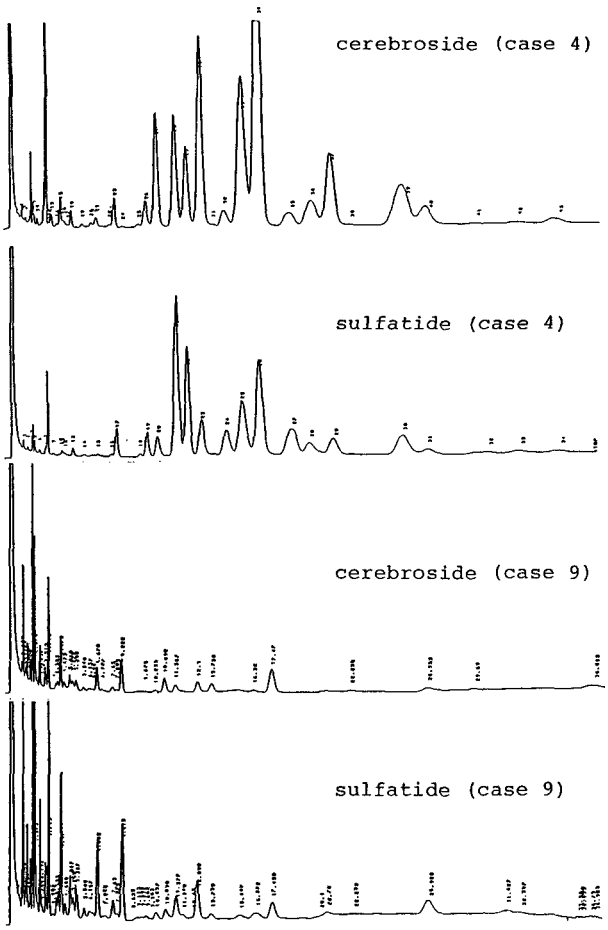


Table 1. Fatty Acid Composition of Total Lipids Obtained from Preserved Brains in Frozen.

	Normals mean±SD (n=6)	Case 1 (18y)	Case 2 (19y)	Case 3 (53y)	Case 4 (4y)
C14	0.24±0.03	0.47	0.34	0.22	0.37
C16	9.82±1.62	17.07	10.56	8.46	17.25
C18:1,2	21.80±0.84	21.13	22.97	20.48	18.58
C18	14.71±1.04	16.71	14.58	14.74	21.52
C20:4	3.17±0.60	4.86	2.28	2.74	5.32
C20:1,2,3	3.81±0.56	2.61	4.06	4.13	3.14
C20	0.36±0.06	0.36	0.37	0.33	0.28
C22:x	7.10±0.45	9.67	5.38	7.10	11.54
C22	0.48±0.06	0.35	0.66	0.42	0.27
C23	0.74±0.09	0.36	0.75	0.77	0.38
C22:1h	0.72±0.35	0.20	0.82	0.78	-
C22h	1.00±0.20	1.17	0.90	1.17	0.43
C24:1	7.41±1.55	3.92	6.24	8.26	3.23
C24	1.97±0.40	1.00	1.97	2.15	1.23
C23h	2.04±0.26	1.27	1.70	2.11	0.80
C25:1	1.82±0.34	0.77	1.80	1.89	0.62
C25	0.43±0.31	0.38	1.02	-	0.39
C24:1h	3.08±0.73	2.28	2.28	3.94	1.11
C24h	4.76±0.51	2.79	4.32	4.90	2.46
C26:1	0.73±0.31	0.54	1.05	0.90	0.16
C26	0.48±0.23	0.67	0.40	0.62	0.16
C25:1h	0.86±0.11	0.51	0.75	0.92	0.38
C25h	0.94±0.07	0.62	1.04	0.88	0.30
C16ald	3.13±0.34	3.04	2.66	3.58	3.33
C18:1als	5.72±1.08	4.40	5.32	5.50	2.71
C18ald	2.36±0.31	2.40	2.16	2.26	3.83
Cholest	33.46±0.95	30.70	29.20	32.00	29.30

177 Adrenoleukodystrophyにおける極長鎖脂肪酸代謝異常及びオレイン酸添加による治療効果の検討

小池亮子、辻　省次、大野　司、宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科）

〔要約〕

Adrenoleukodystrophy(ALD)における極長鎖脂肪酸増加のメカニズムを明らかにする目的で、培養皮膚線維芽細胞における極長鎖脂肪酸代謝を調べ、Zellweger症候群(ZWS)との相違を検討した。controlでは^{14}C-C18:0からの^{14}C-C26:0の生成は全く検出されないが、ALD,ZWSでは共にC26:0の生成が認められた。^{14}C-C24:0の生成はcontrol,ZWSと比較し、ALDで亢進していた。次に培養液にC:18:1（オレイン酸）を添加してC18:0からの極長鎖脂肪酸(VLCFA)生成に及ぼす影響を調べた。C18:1添加によりVLCFAの生成はALD,control共に無添加時の50%以下に抑制された。一方C18:1はC18:0の細胞内への取り込み及びVLCFA分解系には影響を与えなかった。以上よりALDにおけるVLCFAの蓄積には分解系の低下のみならず合成系の亢進も関与していることが示唆されさらにC18:1の添加はC18:0からのVLCFAへの伸長活性を選択的に抑制することが考えられ、ALDにおける治療の有用性を裏づける結果と考えられた。

ALDでは極長鎖飽和脂肪酸(VLCFA)が異常蓄積し脱髄を来すが、本症の代謝異常の本態はペルオキシゾームでのvery long chain fatty acyl-CoA synthetaseの異常と考えられている[1)2)]がその詳細なメカニズムについては未だ明らかでない。また我々はALDのfibroblastでミクロゾームの脂肪酸鎖長伸長活性の亢進を報告している。[3)]一方ZWSではペルオキシゾームのβ酸化系酵素が完全に欠損しているためにVLCFA蓄積を来す。ALDのVLCFA代謝を知る上で両者の差異を明らかにすることは重要と思われ、我々は^{14}C-C18:0を用いてfibroblast培養系のVLCFA代謝を調べた。

一方Rizzoら[4)]によりC18:1の添加がfibroblastのVLCFAを減少させることが報告され、ALDの治療にC18:1を用いた食餌療法が有用と考えられている[5)6)]が、その作用メカニズムは不明である。この点を明らかにするためにC18:1添加のVLCFA代謝に及ぼす影響を合成系、分解系の両者より検討した。

〈方法〉

1)controlおよびALD各２例、ZWS１例のfibroblastにアルブミン結合［18-^{14}C］ステアリン酸(C18:0)を加えた培地にて培養し[7)]、１，２，４日後に細胞を集め総脂質を抽出しメチル化後、総脂質中の放射活性を持った脂肪酸組成をラジオガスクロマトグラフィー（カラム１％ＯＶ１）にて分析した。

2)C18:1のVLCFA代謝に及ぼす影響を調べるため、ALD,control各４例のfibroblastをそれぞれ50μMC18:1を添加した培地(+)および無添加の培地(-)に1)と同様に［18-^{14}C］C18:0を加え48時間培養後の総脂質中のVLCFAの生成を比較検討した。一方18:1添加のVLCFA分解に対する影響は［1-^{14}C］C24:0のacid soluble productsへの分解を測定し検討した。

〈結果〉

1)fibroblastにおける［18-^{14}C］C18:0の細胞内への取り込みにはALD,ZWS,control間で差はみられなかった。培養４日目までの全放射活性をもった脂肪酸中のVLCFAの組成の経時的変化を見ると、C24:0の生成はcontrol,ZWS間で差はみられなかったがALDの２例では培養２日目よりC24:0の生成が両者に比べて高値となった(Fig.1)C26:0はcontrolでは４日目までの培養にて全く検出されていないが、ALD,ZWS共に２日目より検出された。^{14}C-C26:0はALDで全放射活性の0.6%,0.7%,ZWSで0.4%と微量ではあるが、ALDでより高値であった。C18:0からのC16:0の生成はALD,controlでは４日目で10%程度認められたがZWSでは0.3%と著しく低下していた。

2)C18:1添加による［18-^{14}C］C18:0の細胞内への取り込みには有意の変化はみられなかった。^{14}C-C18:0からのVLCFA生成では、^{14}C-C24:0はcontrolでC18:1(-)で、全放射活性の2.43±0.48%であったが、(+)で1.08±0.78%と低下した($P<0.01$)ALDでは(-)では4.43±0.73%であったのに対して(+)で2.02±0.48%と低下した($p<0.01$)C26:0はALDでは(-)で0.66±0.26%であったのが(+)で0.29±0.05%と低下した($p<0.05$)(Fig 2)［1-^{14}C］C24:0からの

acid soluble productへの分解活性はALDではcontrolの約30%で、C18:1添加にても両者の活性には影響がみられなかった。

〈考察〉

ALDにおいてC18:0からのC24:0,C26:0の生成が増加していたが、分解系の完全欠損しているZWSよりも高値を示したことはALDのVLCFA蓄積には分解系の部分低下のみならずVLCFA合成系の亢進の関与も重要と考えられた。一方C18:1の添加によりVLCFAの生成は、ALD control共にほぼ同程度に抑制された。一方C18:1の添加はVLCFA分解系に影響を与えなかったことよりC18:0からの伸長活性を選択的に抑制することが明らかとなった。これはC18:1のALDにおける治療効果と対応する結果と考えられた。

一方C18:0からのC16:0の生成がZellwegerで著しく低下していたことはfibroblast培養系においても長鎖脂肪酸の部分分解がペルオキシゾームで起きることを反映しているが、ALDではその障害はみられず、ALDでの代謝異常はVLCFAに限られていた。

〈謝辞〉

Zellweger症候群のfibroblastを御供与下さった、岐阜大学小児科鈴木康之先生に深謝申しあげます。

〈文献〉

①Singh I, Moser AE, Goldfisher S, Moser HW (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81,4203-4207

②Hashmi M, Stasnley W, and Singh I (1984) FEBS Letters 196,247-250

③Tsuji S, Ohno T, Miyatake T, Suzuki A, Yamakawa T (1984) J Biochem 96,1241-1247

④Rizzo WB, Watkins PA, Phillips MW, Granin D, Campbell B and Avigan J (1986) Neurology 36,357-361

⑤Rizzo WB, Phillips MW, Dammann AL, Leshner RT, Jennings SS, Avigan J and Proud VK (1987) Ann Neurol 21,232-239

⑥Moser AE, Borel J, Odone A, Naids S, Cornblath D, Sanders DB and Moser HW (1987) Ann Neurol 21,240-249

⑦Tsuji S, Sano T, Ariga T, Miyatake T (1981) J Biochem 90,1233-1236

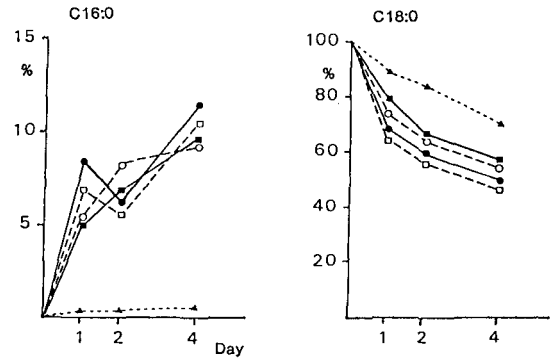
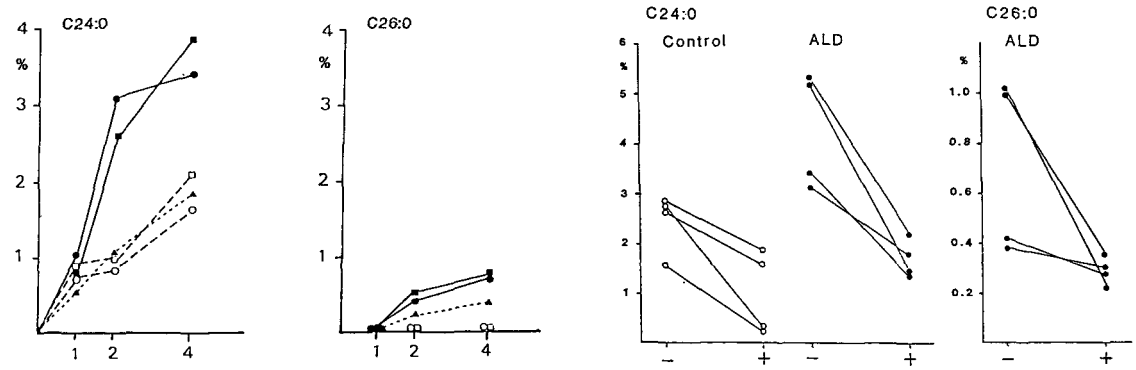


Figure 1 Time course of radioactive fatty acid compositions in control(○-○,□-□), ALD(●-●,■-■) and Zellweger(▲-▲) fibroblasts. Values in the ordinate are expressed as composition(%) of each radioactive fatty acids.

Figure 2 Synthesis of radioactive VLCFA compositions in total lipids with 50μM C18:1(+) or without C18:1(-).



178　ヒト運動神経、感覚神経のガングリオシドのセラミド分子種及びその局在

小川希代子、藤原祐子、山川淳子、舟本規明、菅又久美子、阿部敏明、＊長嶋和郎
（帝京大学医学部小児科、＊北大医学部病理）

〔要約〕
末梢神経系のなかで、感覚神経と運動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長鎖塩基の分子種の違いを明らかにした。感覚神経由来のガングリオシドは炭素数18の長鎖塩基が主成分であるのに対して、運動神経由来のガングリオシドは炭素数18及び20の長鎖塩基を多く含んでいた。これまでの両神経ガングリオシドの脂肪酸についての分析結果と合せて、末梢神経線維ガングリオシドのセラミド部分の分子種は各々の突起由来細胞の性質を反映していることが推察されたので、各神経からmyelin,axon分画を調整しそのガングリオシド組成を検討した。分析の結果、ヒト末梢神経の myelin分画にはLM1等,axon分画にはGT1a,GD1b,GD1a等が多く存在していた。以上の結果より、ヒト末梢神経線維ガングリオシドに見られたセラミド分子種の特徴はそれぞれのaxonの性質を部分的に反映している事が示唆された。

末梢神経系のうち、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な明らかな差異が存在する。筆者らはこれらの点より感覚神経及び運動神経を特徴ずける物質レベルでの違いを想定しその検索を行ってきた。昨年度の本大会において、両神経の間でGD1aガングリオシド等の脂肪酸組成が異なり、感覚神経では長鎖脂肪酸、運動神経では短鎖脂肪酸が多く含まれている事を示した(1)。今回は、セラミドの他方の構成成分である長鎖塩基について両神経の比較を行いその違いを明らかにした。又、myelin由来と考えられているLM1ガングリオシドの脂肪酸組成については両神経で差が見られなかった為、今回各ガングリオシドの局在を調べる目的でmyelin,axon分画を調整しその脂質分析を行なった。

［方法］

1．材料　ヒト末梢神経は神経疾患以外の剖検例より馬尾神経を前根（運動神経）、後根（感覚神経）に分離して分析に供した。脊髄神経節は、前根を慎重に取除いて分析に用いた。

2．ガングリオシドの精製、分析　脂質の抽出は既報(2)に従い、DEAE-Sephadex(A-25)カラムの濃度勾配溶出(0.02M-0.2M CH_3COONH_4)によりモノシアロ、ジシアロ、トリシアロ分画を得た。各分画よりIatrobeadsカラムによりガングリオシドを単離した。精製ガングリオシドの長鎖塩基組成はHPLCを用いてKadowakiらの方法(3)、およびGaver&Sweeley法(4)に従い分析した。脂肪酸組成はGCにより、CapillaryPEG20Mカラム及びOV101カラムを用いて分析した。

3．Axon,myelin画分の調整　末梢神経線維からのaxon,myelin画分はMickoらの方法(4)に従い調整した。各画分はSDS-PAGEにより構成蛋白質の分析を行なった。

［結果］

1．各ガングリオシドの長鎖塩基組成　運動神経、感覚神経より精製したGM1,GD1a,GD1bの長鎖塩基組成を図1に示した。感覚神経のガングリオシドはd18:1,d18:0が主成分で、炭素数20の長鎖塩基は微量であった。これに対し運動神経の各ガングリオシドは炭素数18に加えて20の長鎖塩基を非常に多く含んでいた。図2に示したように、各ガングリオシドのC20長鎖塩基のC18長鎖塩基に対する比 {d20:1 + d20:0 / d18:1 + d18:0} は、両神経の違いをよく示し、又、感覚神経は脊髄神経節にちかい組成であった。

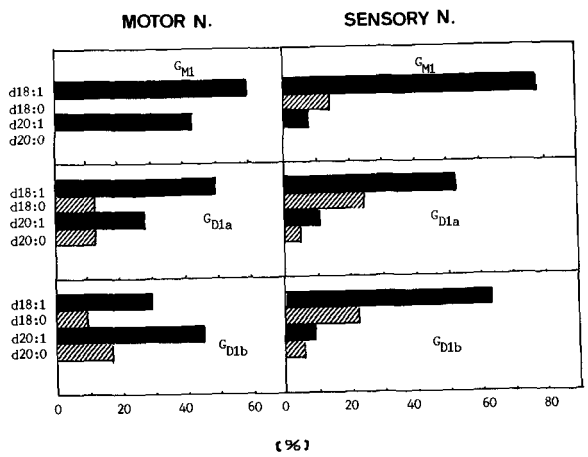


Figure 1. Long-chain base compositions of gangliosides from human sensory and motor nerves.

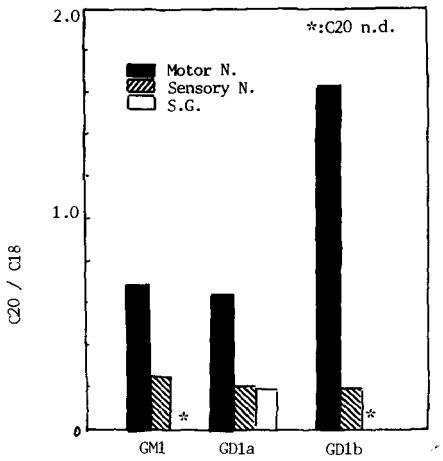


Figure 2. Ratios of C20 long-chain bases (d20:1 + d20:0 / d18:1 + d18:0) of PNS gangliosides.

2. Axon及びmyelin画分の蛋白質、ガングリオシド　感覚神経、運動神経より得たmyelin画分のSDS-PAGEでは、PAS染色陽性、27kのP0蛋白質と考えられるバンドが主成分であった。Axon画分ではP0蛋白質は微量となり分子量のより大きい蛋白質(ニューロフィラメント蛋白質等を含む)が主成分であり、これらより両画分をそれぞれ myelin-rich fraction、axon-rich fractionとした。

ガングリオシドのTLC分析を行なうと、感覚神経、運動神経共にmyelin画分ではLM1ガングリオシドが主成分であり、他にGD3と等しいRf値をもつバンド(未同定)が検出された。GD1a,GD1bは少量検出されたにすぎなかった。Axon画分は、GT1b,GD1b,GD1aが主要ガングリオシドであり、LM1は微量のみ検出された。以上の結果より、ヒト末梢神経のガングリオシドの局在として、LM1はmyelin, GT1b,GD1b,GD1aはaxonに多く存在する事が示唆された。

[考察]

本研究で示した運動神経のガングリオシドの長鎖塩基組成は、大脳由来のガングリオシドのそれと近い組成を示し、感覚神経の場合は脊髄神経節に近かった。これは、両神経ガングリオシドの脂肪酸組成と全く同様の傾向であった(1)。これらのガングリオシドのセラミド部分の分子種の違いは、それぞれの突起由来細胞の性質の違いを反映していると思われる。この事は、両末梢神経線維より得たaxonのガングリオシド分析からも確かめられた。

末梢myelinのガングリオシドとしては、Rat等でLM1が既に報告されている(6)。本研究で示したヒト末梢myelinの主要ガングリオシドのうち、GD3と等しいRf値を持つバンドについては今後詳細な検討が必要と思われる。

[References]

(1)小川希代子他、(1987)神経化学, 26, 415-417

(2)Ogawa,K. et al. (1986) B.B.A., 878, 292-295

(3)Kadowaki,H. et al (1983)J.Lipid Res., 24, 1389-1397

(4)Gaver,RC. et al (1965)J.Ame.Oil Chem.Soc., 42, 294-298

(5)Micko,S. et al (1978)J.Neurochem., 30,1041-1049

(6)Chou,K.H. et al (1985) J.Neurochem., 44,1398-1912

179 胎生期高Phe血症ラット脳組織の各部位におけるガングリオシド

小木曽学，原田寧，大田昌子，平野修助
（東邦大・医・第二生理）

〔要約〕

胎生期高フェニルアラニン血症（HyPhe）ラットでは脳の発育不良により脳湿重量の低下およびガングリオシド含量の低下をもたらす。そこで対照群、PKU 群の脳各部位に存在するガングリオシドの量的、質的な差異について再検討を行なった。PKU 群では大脳皮質、海馬、視床下部でガングリオシド含量は対照群と比較して低値を示したが、蛋白質量あたりに換算した結果では多くの部位で高値を示した。また、すべての部位にアルカリ感受性ガングリオシドの存在が認められ、大脳皮質、線条体などにおいては PKU 群ではそれらのガングリオシドの一部に差異が見られた。

胎生期高 Phe 血症ラットでは生後の発育段階において脳湿重量、ガングリオシド含量の低下、ミエリンの低形成が生じることが既に示唆されている（２）。そこで大脳皮質におけるガングリオシドの量的、質的な差異について重点的に研究を進めてきたが、未だこの差異を十分に明かにするには至っていない。そこで脳各部位での差異に関して再検討を加え、解明への手掛りを得ようと一連の実験を試みた。

実験方法

材料：妊娠 SD 系ラットに妊娠 10 日から 14 日までの間 2g/kg- 体重の L-Phe を 1 日 3 回経口投与し、出生した雄ラット（49 日齢）より脳を摘出し、Glowinski & Iversen の方法（１）に従って各部位に分別した。

ガングリオシドの抽出と定量：各部位よりクロロホルムーメタノール（CM)(2:1) と (1:2) により総脂質画分を抽出し、一部をチオバルビツール酸（TBA）法（６）によりシアル酸を定量した。総脂質画分は、Ledeen らの方法（３）に従って DEAE- セファデックスカラムにより中性画分を除去した後、蒸留水に対して透析を行ない、粗ガングリオシド画分を得た。

ガングリオシドの解析：主としてアルカリ感受性ガングリオシドを検索するため、以下に示す 2 種類の展開溶媒系を用いた 2 次元 TLC により解析を行なった。用いた溶媒系は 1) 1 次元目；クロロホルムーメタノールー0.25% $CaCl_2$(CMW)(55:45:10,V/V)，アンモニア処理後 2 次元目；同じ CMW、2) 1 次元目；クロロホルムーメタノールー0.02% $CaCl_2$(CMW)(60:35:8,V/V),2 回展開、2 次元目；1-プロパノールー28% NH_4OH－DW(PAmW)(75:5:25,V/V)。

結果

対照群、PKU 群の各部位におけるシアル酸含量を総脂質画分より直接 TBA 法により定量した結果を Table に示す。従来の報告通り（２）、Lowry 法による可溶性蛋白質量は各部位において PKU 群では減少が認められた。しかし、酸加水分解後の遊離シアル酸として表したガングリオシド量では従来の結果とは一部異なる興味ある結果が得られた。すなわち、相対的にガングリオシド含量は PKU 群では低値を示す傾向があるが、逆に蛋白質量あたりに換算した場合対照群より高値を示す部位が認められた。

次に各部位におけるガングリオシドの質的な差異を検索する目的で 2 次元 TLC を行なった。今回は特にアルカリ感受性成分について比較検討を行なうため、CMW-アンモニア処理-CMW 系（５）と CMW-PAmW 系（４）を展開溶媒として用いた。前者の系では GD_{1a}、GD_{1b}、GT_{1b}、GQ_{1b} を親ガングリオシドとするアルカリ感受性成分が各部位で多数認められ、大脳皮質では特に矢印で示す 2 個の成分が顕著に分離された (Fig.1)。後者の系では多くのスポットが分離され、皮質では矢印の位置に差異が見られた (Fig.2)。さらにこれらのうちの多くがアルカリ処理により消失したことからアルカリ感受性成分と推定された。

考察

今回ラット脳の各部位の総脂質画分をシアル酸に特異性が高い TBA 法によりガングリオシドの定量を行なった。しかし、 TBA はシアル酸だけでなく他の物質 (例えば 2- デオキシリボース等)とも反応することからも、若干の補正が必要と思われる。Table に示した値はガングリオシド画分の酸加水分解前の TBA 法による値を補正したものであるが、この値についても PKU 群と対照群との間に差が見られその原因について現在検討中である。

PKU 群におけるガングリオシドの質的な差異については従来より大脳皮質を中心に進めてきており、その差異を同定するため精製を行なっているが未だ結論には達していない。一方、アルカリ感受性という視点から再度考察を加えた結果、PKU 群では何らかの変化がアルカリ感受性成分に生じている可能性が示唆され、従来の 2 次元 TLC の知見とも一致する。しかし、現段階ではこれら微量成分の定量は行なっておらず、またその機能的意義についても今後の課題と考える。

文献

(1)Glowinski,J.& Iversen,L.L.(1968) J. Neurochem. 13, 655. (2)原田寧 (1987) 東邦医会誌 34, 16. (3)Ledeen, R.W.,Haley,J.E.& Skrivanek,J.A.(1980) Analyt. Biochem. 112,135. (4)Ohashi,M.(1979) Lipids 14, 52.(5)Sonnino,S., Ghidoni,R., Chigorno,V., Masserini,M.& Tettamanti,G.(1983) Analyt. Biochem. 128, 104. (6)Warren,L.(1959) J. biol. Chem. 234, 1971.

Table Summary of ganglioside contents in brain.

	Cortex	Hippocampus	Striatum	Brain Stem	Thalamus	Hypothalamus	
Control							
Sialic acid (nmoles)	2078.7 (162.4)	218.2 (11.2)	433.4 (77.4)	497.6 (129.3)	278.8 (82.0)	175.8 (46.7)	Mean (SD)
Protein (mg)	71.3 (12.8)	8.26 (0.48)	7.95 (0.94)	47.3 (2.60)	5.29 (0.52)	3.58 (0.55)	
SA/Pro. (nmoles/mg)	30.4 (8.50)	26.5 (2.26)	46.8 (12.0)	8.44 (4.28)	47.9 (16.5)	46.8 (18.5)	
HyPhe							
Sialic acid (nmoles)	1879.0 (263.8)	186.7 (12.37)	429.8 (142.7)	500.2 (112.8)	269.6 (45.34)	124.9 (53.22)	
Protein (mg)	54.4 (6.89)	7.43 (0.62)	6.65 (2.00)	47.6 (1.02)	4.72 (0.88)	3.68 (0.58)	
SA/Pro. (nmoles/mg)	33.7 (6.64)	25.3 (2.75)	63.7 (21.8)	9.04 (4.24)	57.9 (8.38)	30.4 (12.3)	

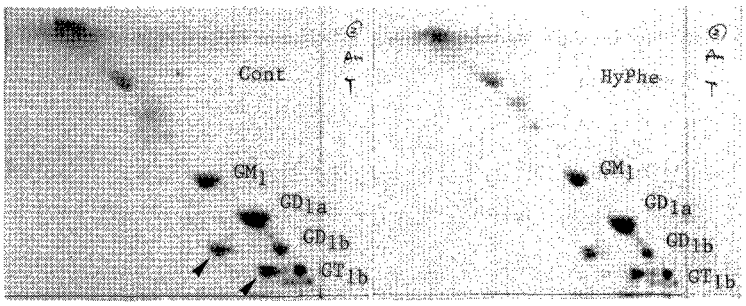


Fig.1 Two-dimensional TLC profiles of gangliosides from cerebral cortex. Solvent; CMW-Ammonia-CMW

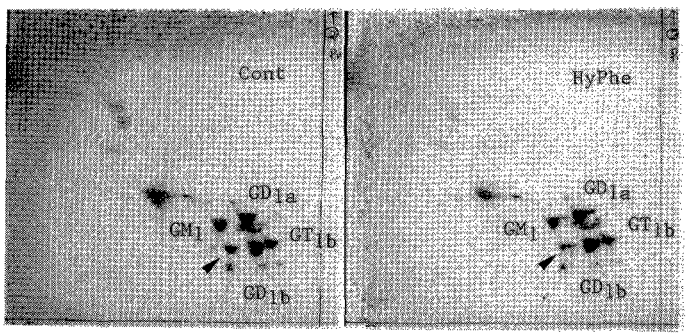


Fig.2 Two-dimensional TLC profiles of gangliosides from cerebral cortex. Solvent; CMW-PAmW

180　ヒト脳における免疫染色を用いたasialo GM_1 の検索

岩本典彦・羽賀千恵・牧野裕*・小阪憲司
（東京都精神医学総合研究所・神経病理，*東京都立松沢病院）

〔要約〕

asialo GM_1 は細胞膜を構成するグリコスフィンゴリピッドの一つであり，マウスの脳組織ではミエリンに存在することが確認されている．しかしヒトにおいては幼児期の脳で微量検出されたという報告があるだけで詳細な分布はまったく不明である．今回われわれは市販の抗asialo GM_1 抗血清を用い，正常ヒト剖検脳においてasialo GM_1 の免疫染色を行いその分布について考察した．抗asialo GM_1 抗血清を用いた染色ではヒト脳において，とくに皮質直下の白質部分（U-fiber部分）が帯状に強く染まり，また白質全体が弱い染色性を示した．マウスではこのような白質部の染色分布の相違は見られないことから，ヒトでは同じ白質内でもasialo GM_1 の分布に差があることが示唆された．またヒト皮質においても抗asialo GM_1 抗体に強く染まる構造物が確認されたが，マウス皮質では同様の構造物は認めなかった．

asialo GM_1 は細胞膜の表面に存在しているグリコスフィンゴリピッドの一つであり，脳組織ではマウスのミエリンに存在することが確認されている(5)他は，ヒトにおいては幼児期の脳で生化学的方法を用いて微量検出されたという報告(6)があるに過ぎない．しかしこのasialo GM_1 に対する自己抗体は神経疾患ではしばしば検出され，神経症状を伴うsystemic lupus erhythematosus(SLE)(1,2)や multiple sclerosis(MS)(1)，またBehçet病(3)やAlzheimer病(4)などで報告されている．この抗体の出現については，正常成人ヒト脳においても本来asialo GM_1 が存在するのか，それとも疾患のために細胞膜を構成する糖脂質に変化をきたすためなのか，いまだ不明な点が多い．これまで行われてきた生化学的検索方法ではどうしてもサンプル採取部位が狭い範囲に限定されるため，広い範囲を十分に検索することが出来なかったこともその原因の一つとしてあげられると思える．そこで今回われわれは市販の抗asialo GM_1 抗体を用い，免疫染色を正常ヒト剖検脳において行いasialo GM_1 の分布について考察したのでここに報告する．

［対象と方法］

今回の発表で使用した抗asialo GM_1 抗血清は生化学工業（東京）から入手した．吸収試験で使用したasialo GM_1 ならびにGM_1 はSigma(USA) とダイアヤトロン（東京）から購入した．PAP法における第２抗体，第３抗体はDakopatts（Denmark）社製を，ABC法においてはVector（USA）のものをそれぞれ使用した．

対象は，＃１．69才男性（精神神経科的には著変なし）前頭葉，死後2時間40分にて剖検，その後直ちに-80℃ deep freezerにて凍結保存のもの，＃２．65才女性（Schizophrenia）前頭葉，剖検直後に液体窒素にて凍結したものである．さらに今回は死後変化の確認のためとヒト脳との対照のため，＃３．マウス脳（35Wと37W）を①kill直後に液体窒素にて凍結したもの，②kill後 4℃にて24hr保存，その後-80℃ deep freezerにて凍結したもの，をcontrol sampleとして使用した．

方法：凍結脳をクライオスタットにて10μm～20μm に薄切し，ポリリジン塗布のスライドグラスに貼布して乾燥．アセトンにて5分間固定し乾燥させた後，PBSにて10分間3回洗浄し，免疫染色をおこなった．抗asialo GM_1 抗血清を

10%ヤギ血清と0.1%TritonX-100を加えたPBS にて1000倍希釈した第1抗体を滴下し4℃にてovernightした．以降はPAP法においては，第2抗体，第3抗体とも1% ヤギ血清を含むPBSにて100倍希釈したものを使用．洗浄はすべて1% ヤギ血清を含む0.1%PBSにて10分間3回とした．発色はDABを使用し5分間反応させた．またABC法を用いての染色もほぼ同様の手順にて行った．

「結果と考察」

抗asialo GM_1抗血清による染色結果の一部を図に示す．マウス脳における死後変化の検索ではkill直後のサンプルとkill後24hr保存したものの間に染色性の違いは認められなかった．ヒト脳においても剖検直後に凍結したものと凍結保存してある脳との間に染色性の違いは認められず，凍結までの時間や凍結方法による染色への影響はあまりないものと考えられる．また抗asialo GM_1 血清の吸収試験ではasialo GM_1での吸収で染色は抑制されたが，ガングリオシドGM_1を用いた吸収試験では染色性に変化は現れなかった．正常ヒト脳における染色では，とくに皮質直下の白質部分（U-fiber部分）が帯状に強く染まり，またその他の白質全体が弱い染色性を示した．皮質直下は神経線維が比較的密に集まっている場所ではあるが，マウスではこのような分布の極端な相違は見られないことから，ヒトでは同じ白質でもasialo GM_1の分布に質的な差があるのではないかと思われる．またヒト皮質においても抗asialo GM_1 血清に強く染まる構造物が確認され，マウス皮質ではまったく認めないところからこれもヒトに特有なものである可能性もあると思える．これについては今後サンプルの連続切片を一般染色して，対応する構造物を検索して行く予定である．以上，ヒト脳においてはasialo GM_1 はマウスとは若干異なった分布を示し，とくに同じ白質内でもasialo GM1の分布に差があることが示唆された．これがagingなどによる膜糖脂質構成の変化によるものなのか，元来こういう分布をとるのか，今後さらに年齢別の検索やもっと大きな切片での検索，電子顕微鏡を用いての検索で明らかにして行きたい．

図1．kill直後マウス大脳例（PAP法，×50）

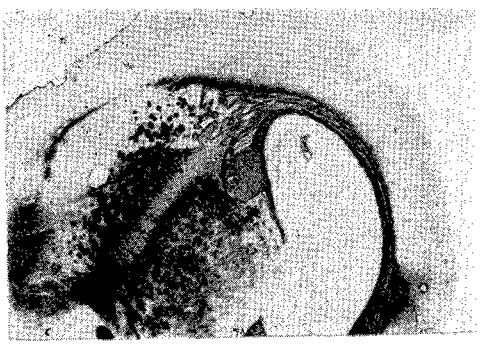


図2．ヒト剖検脳例

（PAP法，×100，G：皮質，W：白質）

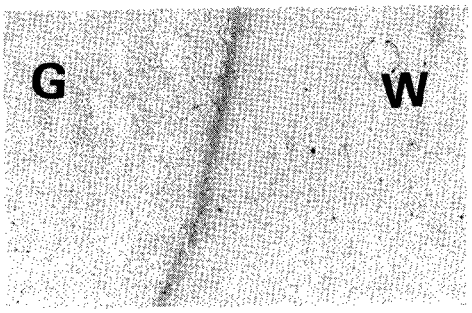
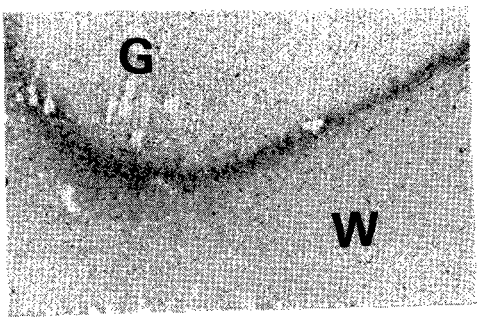


図3．ヒト凍結保存脳例（条件は図2と同じ）



「文献」

(1) Endo T. et al. (1984) J. Immunol. 132:1793-1797

(2) Hirano T. et al. (1980) J. Clin. Invest. 66:1437-1440

(3) Inaba G. and Aoyama J. Behçet disiease(ed. Inaba G), University of Tokyo press, Tokyo, 1981, pp145-152

(4) 岩本典彦ら. (1987) Dementia 1:143-148

(5) Kusunoki S. et al. (1985) Brain Res. 334:117-124

(6) Vanier M.T. et al. (1973) J. Neurochem. 21:1375-1384

181 ＰＣ１２ｈ細胞に蓄積するＧａｌα１→３残基を有する中性糖脂質

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〕 PC12h 細胞をラット皮下に移植後、腫瘍組織から PC12h 細胞由来の５種の Galα1→3 残基含有中性糖脂質（G1-G5）を液滴向流（DCC），Iatrobeads column および薄層クロマトグラフィー（TLC）により、それぞれ単離した。高分解能質量分析（FAB-MS），高分解能核磁気共鳴（NMR），完全メチル化分析等により、これら糖脂質の構造解析をした。

G1: Galα1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
G2: Fucα1-2Galα1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
G3: GalNAcβ1-3Galα1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
G4: Galα1-3Galα1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
G5: Galα1-3Galα1-3Galα1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer

PC12h 細胞およびその移植腫瘍組織でこれら中性糖脂質が蓄積されていた。

PC12 細胞（pheochromocytoma cells）はラット副腎由来のクローム親和性細胞のクローン細胞である。神経成長因子（NFG）により、形態学的に変化し、神経細胞のモデルとして知られている。我々は NGF 処理により、PC 12 細胞の ganglioside が２倍に増加すること、主要４種の ganglioside は Fuc-GM1, Fuc-GD1b およびこれら core 構造に Galα1-3 残基を有するＢ型決定基を有する ganglioside であることを報告した（1-3）。PC12 細胞の中性糖脂質については、我々は globoside（Gb4）が主成分であることを報告した（3）。畠中らによりsub-clone された PC12h 細胞では original の細胞に比べ Gb4 が減少し、相対的に globotriaosyl ceramide（Gb3）および糖鎖の長い複合中性糖脂質の増加することを報告した（4）。今回、我々は PC12h 細胞をラット皮下に移植し、得られた腫瘍組織から PC12h 細胞由来の中性複合糖脂質 G1～G5 を精製し、それらの構造解析をしたので報告する。

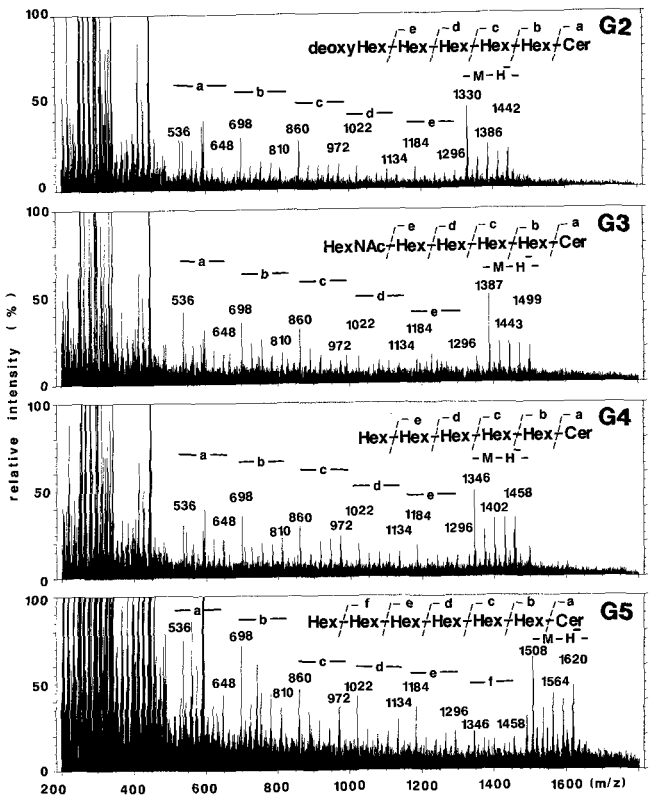
〔方法〕 PC12h 細胞約 1×10^7 cells を NEDH 系ラット（200-300 g）の皮下に注入した。約２ヶ月後、腫瘍組織を摘出した。腫瘍組織約 100 g から１０倍量のクロロホルム・メタノール（C:M; 2:1, 1:1, 1:2）で総脂質を抽出した。溶媒を留去後、残渣を C:M:水（30:60:4.5）にとかし、DEAE-Sephadex A-25 カラムにかけ、素通りされる中性糖脂質画分を集めた。大塚らの方法（5）に従い、DCC により、過剰のリン脂質、低級糖脂質等を除去後、イアトロビーズおよび TLC によるかき取りにより５種の糖脂質（G1～G5）を単離した。

〔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 FAB-MS(日本電子 HX100 型）で測定した。アノマー分析、構成糖の組成は NMR（日本電子または Brucker 社 500 MHz）で測定した。

〔exoglycosidase による消化〕 exoglycosidase としては Sigma 社 α-galactosidase, β-hexosaminidase（いずれもコーヒ豆）および生化学工業のα-fucosidase（サザエ）を用いた。精製糖脂質約 50μgをNa-tauro-cholate 入り、citrate buffer（pH 5.0）100μl にとかし、酵素を加え 37℃で反応した。５倍量の C:M（2:1）を加え、反応停止後、クロロホルム層を窒素ガスで蒸発乾固後、分解産物を TLC で調べた。

〔結果および考察〕 PC12 細胞の主要中性糖脂質は Gb4 で総中性糖脂質画分の約 75% を占める。Gb3 は約 5% であった（3）。畠中らにより subclone された PC12h 細胞では Gb4 は総中性糖脂質の約 35% に減少した。一

方 Gb3 は約3倍に増加し、塩基性溶媒系で TLC 上 Gb4 のすぐ下に Gb4 とほぼ同量の G1 が新たに検出された。G1 より糖鎖の長い糖脂質（G2～G5）が検出され、これらは総中性糖脂質の約 9% を占めた。PC12h 細胞およびその移植腫瘍組織で中性糖脂質の TLC パターンは大きな差はみられなかった。腫瘍組織 100 g から PC12h 細胞由来の糖脂質 G1～G5 はそれぞれ11 mg, 1 mg, 0.7 mg, 0.5 mg および 0.9 mg 精製された。FAB-MS では分子イオンは $[M-H]^-$ 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。G1はCeramide tetrasaccharide（Cer-Hex-Hex-Hex-Hex）と推定された。G2, G3 および G4 は G1(e) にそれぞれ deoxy Hex, HexNAc および Hex が1分子ついた Ceramide pentasaccharide と推定された。G5 は G1(e) に2分子の Hex がついた Ceramide hexasaccharide と推定された（図）。NMR による化学シフトおよび結合定数の結果、G1 からは1モルのβ-Glc およびβ-Gal と2モルのα-Galが検出された。G2, G3 および G4 からはこれらのシグナルに加え、それぞれ1モルのα-Fuc, β-GalNAc およびα-Gal が検出された。G5 には G1 のシグナルに加え、さらに2モルのα-Gal が検出された。G1 はα-galactosidase 消化により Gb3 および Lac-Cerになった。G2 および G3 はα-fucosidase およびβ-hexosaminidase により共に G1 になった。G4 および G5 はα-galactosidase で消化され、G1, Gb3 および Lac-Cer になった。完全メチル化分析により、G1, G4 および G5 からは OGal1-, -3Gal1-, -4Gal1- および-4Glc1- が同定された。G2 からは OGal1- のかわりに OFuc1- と -2Gal1- が検出された。G3 からは OGal1- のかわりに OGalNAc1- が同定された。以上の結果、G1～G5 の構造は要約に示す様な構造と推定された。なお Breimer らはラット小腸にこれら特異糖脂質が微量存在することを報告している。彼らはこれら糖脂質を単離していないが、我々の結果と異なり hydroxy fatty acid および phytosphingosine を含むことを報告した（6）。Schwarting らは ^{3}H-fucoseおよび ^{3}H-galactose の PC12 細胞への取り込み実験で、構造未知の中性複合糖脂質に取り込まれること、またこの取り込みは NGF により増大することを報告し、これら複合糖脂質と neurite outgrowth の関係を示唆している（7）。PC12h 細胞およびその腫瘍組織に蓄積されるこれら特異糖脂質は特異糖転移酵素の活性化により発現し、恐らく細胞の分化あるいは neurite outgrowth に関与しているものと推定される。



[文献] (1) 有賀敏夫, その他 (1987) 神経化学 26, 409-411 (2) Ariga, T. et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 14146-14153 (3) Ariga, T. et al. (1988) Biochemistry 27, 52-58 (4) Ariga, T. et al. (1988) ibid in press (5) Otsuka, H. et al. (1983) J. Biochem. 94, 2035-2041 (6) Breimer, M.E. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257, 557-568 (7) Schwarting, et al. (1986) Neurosci. 19, 647-656

182　無麻酔無拘束ラット線条体におけるドーパミン放出と代謝に対するM1、M2ムスカリン受容体の調節作用

徐曼、溝部文夫、山本敏文、加藤武
（東工大・生命化学、雪印乳業）

〔要約〕

脳透析法により M_1 と M_2 ムスカリン性受容体のアゴニストとアンタゴニストを透析膜を介してラット線条体に投与し、線条体のDAの分泌とその代謝物 DOPAC の変化に対する作用を研究した。M_1 選択的アゴニストの AF102B と M_1/M_2 性アゴニストのオキソトレモリン (OXO) は濃度依存的に DA の分泌を促進した。M_1選択的アンタゴニストのピレンゼピン (PZ) は 10^{-7}M で DA の分泌を有意に抑制した。PZ を10^{-5}M 投与したとき、DA の分泌を有意に抑制しなかったが、AF102B の分泌促進作用を完全に抑制し、OXO の作用を部分的に抑制した。M_2 選択的アンタゴニスト AF-DX116 を10^{-5}M 投与したとき、DA の分泌は増加し、AF102B の DA 分泌促進作用に対し、相加的であった。しかし、OXO の作用には影響しなかった。これらの結果から、ラットの線条体の in vivo DA 分泌に対して、ムスカリン性受容体は調節作用を演じ、M_1 性受容体は DA の分泌を促進し、M_2 性受容体は DA の分泌を抑制的に作用することを示唆した。また、これらの各種薬物による DA の分泌に対する変化は、TTX の灌流により消失したことから、これらの薬物による DA の分泌の変化は活動電位に依存した神経活動であることを示した。

目的：　ムスカリン性アセチルコリン受容体はピレンゼピン (PZ) により高親和性の M_1型と低親和性の M_2 型に分類される(1,2)。近年、M_2受容体に対し高親和性、M_1受容体に低親和性を持っている M_2 型アンタゴニスト AF-DX116 (3) と M_1 に選択的アゴニスト AF102B (4) が開発された。最近、M_1、M_2ムスカリン性薬物は海馬、皮質で異なった作用を演じることが報告された(5)。しかし、線条体の DA 分泌に対する M_1、M_2 のアゴニストとアンタゴニストの作用は不明な点が多い。本研究では、自由に運動している動物の脳内 DA 分泌が測定できる、脳透析法を用いて M_1、M_2 ムスカリン性薬物を投与し、線条体内の M_1、M_2 受容体の生理的意義について検討した。

方法：　Wistar 雄性ラットを用い、麻酔下で透析用ループ式カニューレを線条体に植え込んだ。カニューレは直径 250 μm、長さ 6 mm の透析膜 1 本と、直径0.45mm、長さ 1 cm のステンレスパイプ 2 本から成っている。手術による影響を除くために、手術してから 3 日間動物を休ませた。ラットは幅 15 cm、長さ25 cm、高さ 25 cm の透明な箱で自由に運動している状態で灌流を行った。透析用カニューラは Ringer 液 (147mM Na^+, 2.3mM Ca^{++}, 4mM K^+, 155.6mM Cl^-) で連続的に灌流した。灌流速度は5μl/min で、15 分ずつ集めた灌流液を 1 fraction として、HPLC-ECDで分析した。溶出液は 0.1 mM EDTA, 8% アセトニトリルと 0.12mM SOS を含む 0.1M クエン酸ナトリウム

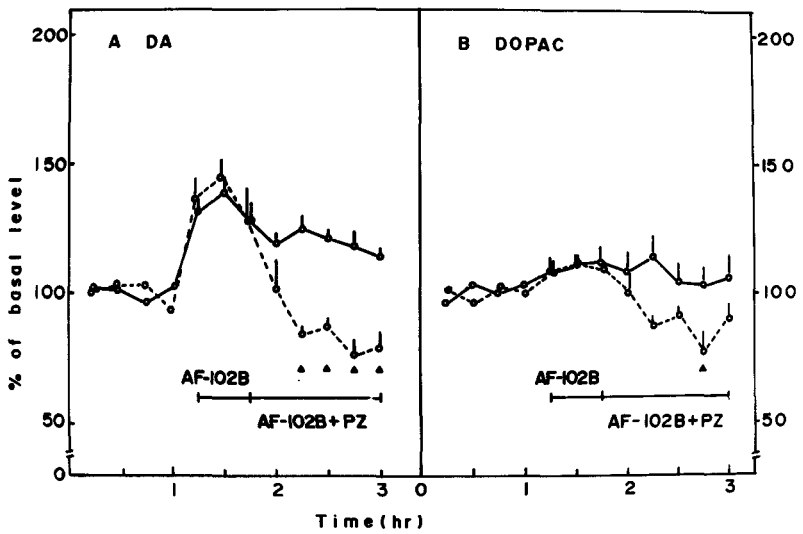


図1．AF102B の前処理による DA 分泌に対する PZ の抑制作用
○ — ○:10^{-5}M AF-102B; ○ --- ○:10^{-5}M AF-102B+10^{-5}M PZ;▲:P<0.05.

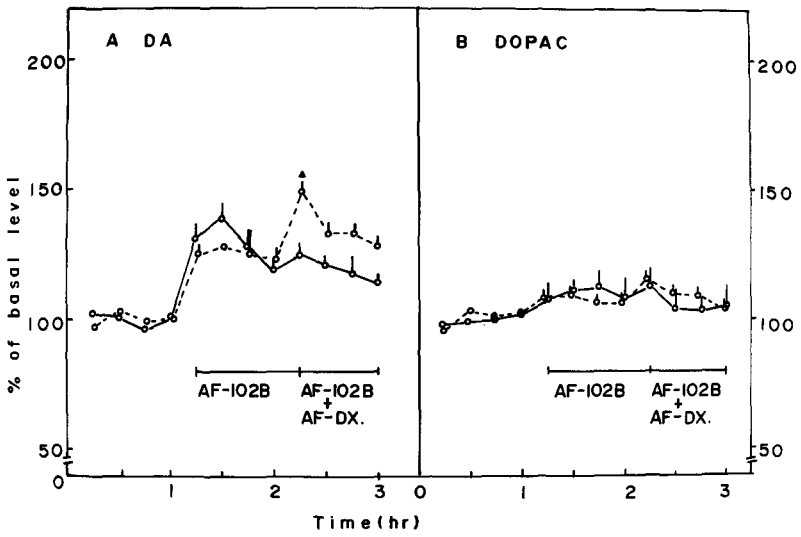


図 2. AF102Bの前処理によるDA分泌に対するAF-DX116 の作用
○ — ○:10^{-5}M AF-102B; ○ --- ○:10^{-5}M AF-102B + 10^{-5}M AF-DX116
▲:P<0.05.

緩衝液で測定した。薬物は全部 Ringer 液に溶かし、透析膜を介して投与した。

結果: M_1選択的アゴニスト AF102B と M_1/M_2 アゴニストのオキソトレモリン(OXO)は濃度依存的に線条体の DA 分泌を促進した。M_1選択的アンタゴニストの PZ は 10^{-7}M で DAの分泌を basal level の 70% まで抑制した。10^{-5}M PZ を投与したとき、DA の分泌を有意に抑制しなかったが、M_1 選択的アゴニスト AF102B (10^{-5}M) の DA 分泌に対する増加作用を完全に抑制した(図 1)。10^{-4}M OXO の DA の分泌に対する増加作用も 10^{-5}M PZ が部分的に抑制した。M_2 選択的アンタゴニストの AF-DX116 は 10^{-5}M で投与したとき、DA の分泌は増加した。また、10^{-5}M AF102B の DA 分泌促進作用に対して相加的であった(図2)が、OXO の作用に対しては影響しなかった。

10^{-4}M TTX を透析膜を介して 15 分間投与したところ、DA の分泌は basal level の 10% まで減少した。10^{-5}M AF102B、10^{-4}M OXO、10^{-5}M AF-DX116 の DA の分泌促進作用は TTX の前投与により、全部消失した。DOPAC の濃度は AF102B により変化しなかったが、OXOにより増加した。

考察: ラット線条体 DA の分泌は M_1 選択的アゴニスト AF102B および M_1、M_2 アゴニストの OXO により濃度依存的に促進した。また、この促進はM_1選択的アンタゴニストの PZ により完全にあるいは部分的に抑制された。これらの結果から、線条体 DA の分泌に対し、M_1ムスカリン性受容体は促進的に制御していることを示している。M_2 選択的アンタゴニストの AF-DX116 は DA の分泌を促進し、また、M_1 選択的アゴニスト AF102B の DA 分泌促進作用に相加的であることから、M_2ムスカリン性受容体は線条体の DA の分泌を抑制的に制御していることを示唆している。OXO の薬理作用は複雑であり、binding assay の実験から、OXO は M_2 アンタゴニスト様の性質があるとの報告もある(6)。従って、OXO の DA の分泌に対する増加が PZ によって完全に抑制されなかったことから、OXO が一部 M_2 アンタゴニストとして作用したためとも考えられる。OXO は DOPAC の濃度を増加させたが、この作用は TTX の存在下でも完全に消失できなかったことから、OXO は活動電位に非依存的な DA の turn over を促進する作用があると推測される。

文献:

1)Hammer R. and Giachetti A. (1982), Life Sci. 31, 2991-2998.
2)Watson M., Roeske W.R. and Yamamura H.I. (1982), Life Sci. 31, 2019-2023.
3)Hammer R., Berrie C.P., Birdsall N.J.M., Burgen A.S.V. and Hulme E.C. (1986), Life Sci. 38, 1653-1662.
4)小野、岩本、川西、溝部 (1987), 神経化学, 26, 139-141.
5)Rascol O. and Lamour Y. (1988), Brain Res. 446, 303-313.
6)Hagan J.J., Tonnaer J.A.D.M., Rijk H., Broekkamp C.L.E. and van Delft A.M.L. (1987), Brain Res. 410, 69-73.

183 EFFECT OF LIPID ENVIRONMENT ON THE AFFINITIES OF CEREBRAL AND ATRIAL PURIFIED MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS FOR PIRENZEPINE

Gabriel Berstein, Tatsuya Haga*, and Arata Ichiyama

Department of Biochemistry, Hamamatsu University School of Medicine (*Present address: Biochemistry Department, Institute of Brain Research, Tokyo University Faculty of Medicine)

〔要約〕

Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) of porcine cerebral membrane (predominantly M1 subtype) and those of porcine atrial membrane (M2 subtype) showed the same affinity for muscarinic antagonist quinuclidinylbenzylate ([^{3}H]QNB). In contrast, affinity for pirenzepine (PZ, another muscarinic antagonist) of 80% of binding sites in cerebral membrane was 30 times higher than that of atrial membrane. After purification of the mAChRs by affinity chromatography, this difference was reduced to less than 3 times. Insertion of purified mAChRs in either cerebral or atrial membrane fully reversed this phenomenon. When purified mAChRs were inserted in lipid mixtures consisting of egg phosphatidylcholine (PC)/soybean phosphatidylinositol (PI)/ cholesterol (CHO), affinities of inserted receptors for PZ varied depending on lipid to lipid ratio. At a PC/PI/CHO ratio of 48:48:4 (w/w), 73% of cerebral receptors presented 60 times higher affinity for PZ than atrial receptors. These results suggest that composition of lipid environment is relevant to the differential affinity of mAChRs subtypes for PZ.

Introduction. Pirenzepine (PZ) is a muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) antagonist that discriminates between cerebral (high affinity) and atrial (low affinity) mAChRs (8). Molecular cloning and expression of porcine cerebral (predominantly M1 subtype) and atrial (M2 subtype) mAChRs has indicated a good correlation between subtypes defined on the basis of structural heterogeneity and on the basis of differential affinity for PZ (4,9,10). However, after solubilization and purification of mAChRs, the affinities for PZ of cerebral and atrial mAChRs become similar to each other(1,2,5,12). The purpose of the present study is to examine the reversibility of this phenomenon upon insertion of purified mAChRs in either membrane preparations or lipid mixtures.

Experimental Procedures. Cerebral and atrial membranes were prepared as described in (6) and (11), respectively. Membranes were incubated in the presence of 150 nM propylbenzylyl choline mustard (PrBCM) for 15 min at 30°C in order to alkylate more than 95% of mAChRs binding sites, before insertion of purified mAChRs. Solubilization and purification of mAChRs from porcine cerebrum and atrium was carried out as described previously (6). Procedure for insertion of purified mAChRs either in alkylated membranes or in lipid mixtures was essentially as described in (3,7).

Results and Discussion. Affinity for PZ of 80% of mAChRs in cerebral membrane was 23 nM, whereas in atrial membrane it was 653 nM, the Kd for [^{3}H]QNB being 44 pM and 43 pM for cerebral and atrial membranes, respectively (Table I). After solubilization and purification, Kd for PZ of mAChRs from cerebrum and atrium were found to be 300 nM and 690 nM, respectively, the Kd for [^{3}H]QNB being 330 pM and 380 pM for cerebral and atrial mAChRs, respectively (5). Upon insertion in either cerebral or atrial membrane, where native mAChRs binding sites had been alkylated with PrBCM, the original membrane affinities were recovered (Figs. 1 and 2 and Table I). In addition, when purified mAChRs were inserted in a mixture of PC/PI/CHO, 73% of cerebral receptors showed 60 times higher affinity for PZ than atrial receptors (Fig. 3 and Table I). In this case, the affinities for both antagonists were 4 to 5 times lower than in membrane. These findings indicate that the loss in differential affinity for PZ after purification is reversible and that a lipid mixture is sufficient to reverse it. Typical recoveries of binding sites after insertion were 65% and 25% for cerebral receptors and 75% and 23% for atrial receptors inserted in membrane and lipid mixture, respectively. Table II shows the affinity for PZ of cerebral and atrial mAChRs inserted in lipid mixtures of different CHO/PC ratios. At CHO/PC ratios of 100:0, 80:20 and 50:50, IC_{50} of inserted cerebral mAChRs was 3 times higher than that of inserted atrial mAChRs, whereas at

Table I
Affinities for [^{3}H]QNB and pirenzepine of mAChRs in intact membrane and mAChRs inserted in either membrane or lipid vesicles

	[^{3}H]QNB	Pirenzepine			
		H-sites		L-sites	
	Kd (pM)	Prop. (%)	Kd (nM)	Prop. (%)	Kd (nM)
Cerebral Membrane					
native mAChRs	44	86	23	14	653
inserted mAChRs purified from cerebrum	44	79	26	21	729
inserted mAChRs purified from atrium	59			100	979
Atrial Membrane					
native mAChRs	43			100	787
inserted mAChRs purified from atrium	72			100	1275
inserted mAChRs purified from cerebrum	78	81	30	19	1182
PC/PI/CHO (48:48:4) (w/w)					
inserted mAChRs purified from cerebrum	168	73	85	27	4300
inserted mAChRs purified from atrium	235			100	5200

Table II
Displacement by pirenzepine of [^{3}H]QNB binding of mAChRs inserted in cholesterol/phosphatidylcholine vesicles

CHO : PC (w/w)	mAChRs purified from cerebrum				mAChRs purified from atrium
	H-sites		L-sites		
	prop. (%)	IC_{50} (μM)	prop. (%)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)
100 : 0	100	0.62			2.1
80 : 20	100	1.4			4.2
50 : 50	100	2.8			8.0
20 : 80	75	0.63	25	13.7	11.5
0 : 100	72	6.2	28	56.2	29.5

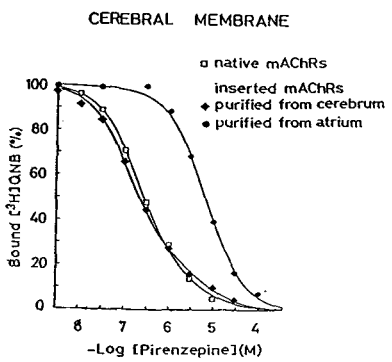


Figure 1

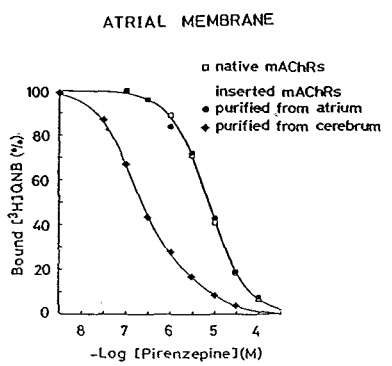


Figure 2

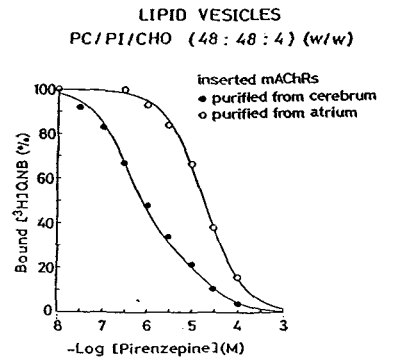


Figure 3

CHO/PC ratios of 20:80 and 0:100, IC_{50}s of 75% of inserted cerebral mAChRs were 18 and 5 times higher than those of atrial mAChRs, respectively. These results suggest the possibility that lipid environment is relevant to the mAChR subtype specific affinity for PZ in situ.

References. (1)Baumgold J. et al.(1987)Mol.BrainRes.**2**,7-14 (2)Birdsall N.J.M. et al.(1986)Br.J.Pharmac.**87**,307-316 (3)Florio V.A. & Sternweis P.C.(1985) J.Biol.Chem.**260**,3477-3488 (4)Fukuda K. et al.(1987)Nature**327**,623-625 (5)Haga T. et al.(1988)TIPS(suppl.),12-18 (6)Haga K. & Haga T.(1985)J.Biol.Chem. **260**,7927-7935 (7)Haga K. et al.(1986)J.Biol.Chem.**261**,10133-10140 (8) Hammer R. et al.(1980)Nature**283**,90-92 (9)Kubo T. et al(1986)Nature**323**, 411-416 (10)Peralta E.G. et al.(1987)Science**236**,600-605 (11)Peterson G.L. & Schimerlik M.I.(1984)Prep.Biochem.**14**,33-74 (12)Wang J. et al.(1987)J. Pharmacol.Exp.Ther.**242**,981-990.

184 ブタ心房ムスカリン受容体とG蛋白質の相互作用

芳賀和子　芳賀達也
（浜松医大生化学、現東京大医学部脳研生化学）

〔要約〕

［１］心房膜標品中のムスカリン性アセチルコリン受容体とＧ蛋白質の相互作用を調べる簡便な実験系を開発した。ブタ心房膜標品を熱処理（60°C 30分）後ブタ大脳より精製したＧ蛋白質標品とコール酸存在下で混ぜ、0℃で60分放置する。塩溶液で稀釈後[^{3}H]QNB結合活性のアゴニストによる阻害を±ＧＴＰで測定する。
［２］Ｇ蛋白質との再構成によりアゴニストに対する親和性が増大した。この高親和性はＧＴＰ添加で低親和性に変った。ＧＴＰ感受性高親和性アゴニスト結合は、膜標品とＧ蛋白質を混ぜるときのコール酸濃度に依存し、Ｇ蛋白質（Ｇｏ）の濃度の増加と共に増加する。。
［３］Ｎエチルマレイミド（ＮＥＭ）はＧ蛋白質の受容体との反応性を失わせると同時に、ムスカリン受容体に作用してアゴニストに対する親和性を増大させる(9)。後者の作用はＧ蛋白質との相互作用による親和性の増大と相加的に起こり、ＮＥＭ処理後Ｇ蛋白質と再構成するとカルバミルコリンに対する親和性は無処理の場合に比べ、約４桁増大した。
［４］この系で心房ムスカリン受容体は３種のＧ蛋白質（Ｇｉ，Ｇｏ，Ｇｎ）と相互作用してＧＴＰ依存性高親和性アゴニスト結合を示すようになる。ただし、[^{3}H]Oxo（[^{3}H]オキソトレモリンーＭ、アゴニスト）との結合量は、Ｇｏを用いた時最も高くＧｎを用いた時最も低かった。ＳＨ（super high affinity）部位の生成は、Ｇ蛋白質の種類による可能性が考えられる。

ムスカリン受容体には少なくとも４種類のサブタイプがあり、ブタ大脳のムスカリン受容体は主成分がｍ１で、他にｍ２、ｍ３、ｍ４が混在し、心房のムスカリン受容体はｍ２サブタイプと考えられる(1,7,8)。大脳から精製した受容体は、３種のＧ蛋白質（Ｇｉ，Ｇｏ，Ｇｎ）いずれと再構成したときもＧ蛋白質濃度依存性にＧＴＰ感受性高親和性アゴニスト結合を示すようになった(3,4)。同様な結果が心房から精製したムスカリン受容体の再構成系でも見られた(6)。この結果は、ムスカリン受容体がサブタイプの種類によらず３種のＧ蛋白質と相互作用し得る事、更には３種のＧ蛋白質を活性化し得る事を示唆する。一方、ｍ１あるいはｍ２サブタイプに対応するｍＲＮＡをアフリカツメガエルの卵に注入すると、ｍ１とｍ２で異なる反応が誘起された(2,7)。この結果は、in vivo ではｍ１サブタイプとｍ２サブタイプが異なるＧ蛋白質を活性化する事を示唆する。１種類のサブタイプは複数のＧ蛋白質と相互作用し得るが、in vivo では特定のＧ蛋白質との相互作用だけを許すなんらかの機構が存在する可能性が考えられる。受容体とＧ蛋白質の相互作用を制御する成分が存在する可能性を考えて、精製受容体の代りに膜標品を用いてＧ蛋白質との再構成を検討した。

図１　再構成するＧｏ濃度の効果

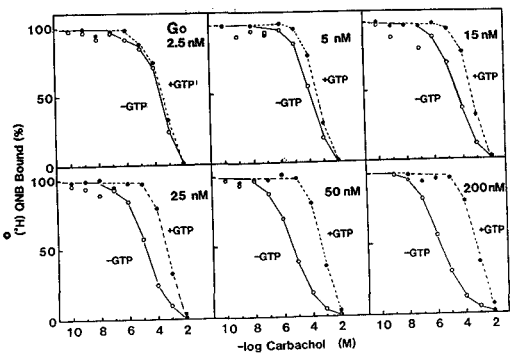
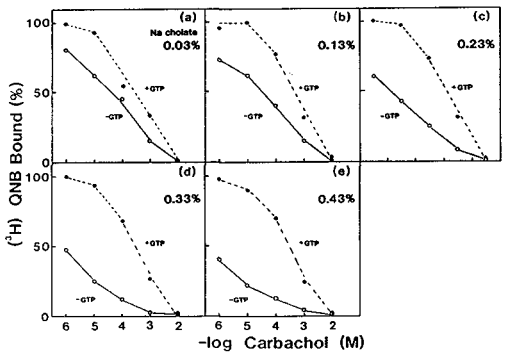


図２　再構成時のコール酸濃度の効果



［実験方法］Peterson & Schimerlik(7)の方法で調製したブタ心房膜標品（3 pmol mACh-R/ml, 25 mM imidazole buffer (pH 7.5)/1 mM EDTA/ca 1 M sucrose, 500μl)を60°Cで30分処理後、ブタ大脳より精製したＧ蛋白質（3 nmol/ml, HEN (20 mM Hepes (pH 8), 1 mM EDTA, 0.16 M NaCl), 0-40μl）と一定濃度のコール酸（0.4%）と $MgCl_2$存在下に4°C で60分放置した（全量、600μl）。HEN 1.9 mlでゆっくり稀釈したのち[^{3}H]QNBとの結合実験に使用した（稀釈した溶液 50μl／試験官(1 ml)

[³H]QNB 0.3 nM（または,[³H]Oxo 3 nM), ±0.1 mM GTP、30°C 60分、ガラス繊維ろ紙 Whatman GFB)。[³H]Oxo結合実験は0.03 3% のポリチレンイミン液に約２時間浸したガラス繊維を使用した。ＮＥＭ(1 mM)処理は30°Cで30分行なった。新しいＧ蛋白質Ｇｎは、Ｇ蛋白質精製の最終段階であるDEAEトヨパールカラムでＧｏの後に溶出され、同じカラムの再クロマトグラフィーで精製された。Ｇｎ-αの分子量はＧｉ-αとＧｏ-αの中間で、γサブユニットもＧｉ及びＧｏのそれとは異なると思われる（Ｇｎ-γはCキナーゼでリン酸化されないがＧｉとＧｏのγはリン酸化される）。

［実験結果］図１に、異なる濃度のＧｏと再構成させた時のカルバミルコリンによる[³H]QNB結合の阻害曲線を示す。Ｇｏ濃度増加と共にＧＴＰ依存性高親和性結合の増大が見られる（再構成時のコール酸濃度 0.43%）。図２は再構成時のコール酸濃度を変えた時の結果を示す。十分量のＧｏ（再構成時 200 nM）存在下でも、再構成時にコール酸がないと受容体とＧ蛋白質の相互作用が十分起こらない事を示している。図３に熱処理とＮＥＭの効果を示す。心房の膜標品をＮＥＭで処理するとアゴニスト結合の親和性が増加し、ＧＴＰ感受性が消失する(9)。ＮＥＭ処理後Ｇ蛋白質と再構成すると、アゴニストによる阻害曲線は単独処理の場合より更に左方に移動した。図４にＧｉ，Ｇｎと再構成した結果を示す。Ｇｏを用いた場合と同様、いずれの場合もＧＴＰ依存性高親和性アゴニスト結合が観察された。図５は予備的なものであるが[³H]Oxo との結合のScatchard 解析の結果を示す。結合量が３種のＧ蛋白質間で異なりＧｏ、Ｇｉ、Ｇｎの順であった。

［考察］膜標品を用いた場合も精製受容体を用いた時と同様、ムスカリン受容体（ｍ２サブタイプ）が３種のＧ蛋白質と相互作用した。ｍ２サブタイプは in vivo では１種のＧ蛋白質としか相互作用しないとすれば、そのような特異的相互作用だけを許す機構は膜標品の調製およびそのコール酸処理を含む今回の様な実験条件では失活する種類のものであることが推測される。一方、ＧＴＰ感受性高親和性アゴニスト結合が受容体によるＧ蛋白質の活性化に対応しないという可能性が有り得る（ただし(5)のモデルとは両立しない）。ＧＴＰ感受性結合の存在は受容体とＧ蛋白質の相互作用を意味するので、受容体とＧ蛋白質との相互作用の仕方が１種類だけではない可能性も考えられる。今回の実験ではＮＥＭ処理の結果はムスカリン受容体がアゴニストへの親和性の異なる３つの状態を取り得ることを示した。[³H]Oxo 結合実験および[³H]QNB結合阻害実験の結果も３種の状態を示唆する。さらに、最も親和性の高い[³H]Oxo結合部位の生成はＧ蛋白質の種類により異なるように思われる。その意味が興味ある課題として残されている。

図３　ＮＥＭ処理と熱処理の効果

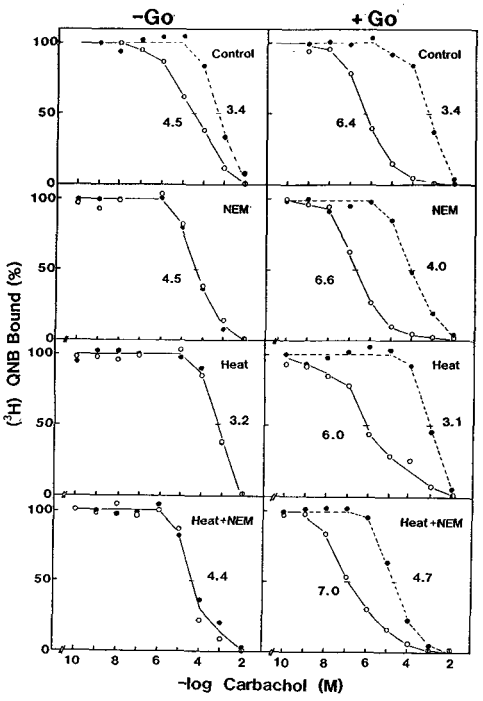


図４　Ｇｉ、Ｇｎとの再構成

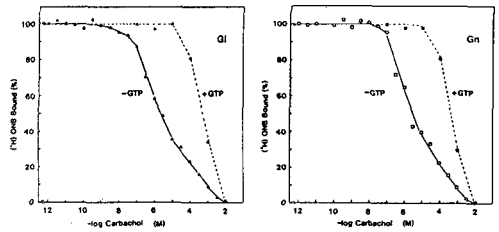
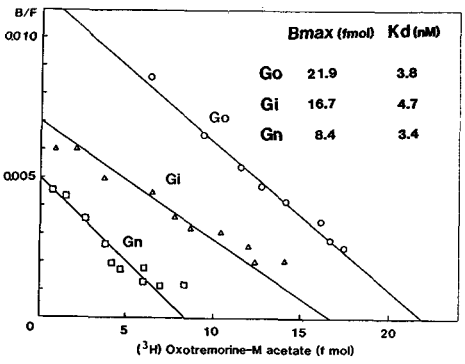


図５　[³H]Oxo結合 Scatchard 解析



[文献] (1)Bonner et al. Science 237, 527 (1987). (2) Fukuda et. al. Nature 327, 623 (1987). (3) Haga et al. J.Biol.Chem. 261, 10133 (1986). (4) Haga et al. TIPS Supplment III, 12 (1988). (5) Haga & Haga Biomed. Res. Supplement 8,149 (1987). (6)池ヶ谷貴愛他 生化学会 (1988). (7) Kubo et. al. Nature 323,411(1986) (8) Kubo et al. FEBS Lett. 209,367. (9) Nukada et al. Mol. Pharm.24.366(1983). (10) Pertersen $ Schimerlik Prep. Biochem. 14, 33 (1984).

185 ＣＣＫ伝達機構に対するシナプス前ＤＡ受容体機能について

深間内文彦、 吉川武男、 渋谷治男、 高橋 良
（東京医歯大・医・神経精神）

〔要約〕
コレシストキニン（ＣＣＫ）に対するドーパミン（ＤＡ）神経細胞のシナプス前部受容体を介した制御機構を検討するために 3-(3-hydroxyphenyl)-N-n-propylpiperidine （３－ＰＰＰ）のR（＋）体とＳ（－）体をそれぞれ用量をかえてラットに投与し前頭皮質と線条体のＣＣＫ－８免疫活性（ＣＣＫ－８ＩＲ）を測定した。別に、神経細胞毒として N-methyl-D-aspartic acid （ＮＭＤＡ）を用いて内側前頭皮質の内在性ニューロンを破壊したのち apomorphine （ＡＰＯ） を腹腔内に投与し、シナプス前ＤＡ受容体を介したＣＣＫ－８に及ぼす影響について検討した。これらの実験より内側前頭皮質においてはシナプス前ＤＡ受容体の刺激によりＣＣＫ－８ＩＲが増加することが明らかとなり、シナプス前ＤＡ受容体を介してもＣＣＫの放出が制御されていることが示唆された。

ＣＣＫとＤＡの相互作用に関しては数多くの報告があるが、今回、我々はＤＡ神経のシナプス前部受容体を介したＤＡのＣＣＫに対する制御機構について報告する。

〔方法〕

（１）3-(3-hydroxyphenyl)-N-n-propylpiperidine （３－ＰＰＰ）の投与実験

実験動物は、すべてWistar系雄性ラット（断頭時体重２５０－３００ｇ）を使用した。R(+)-３－ＰＰＰ（１０μmol/kg および １００μmol/kg), S(−)-３－ＰＰＰ（１０μmol/kg および１００μmol/kg)をそれぞれ皮下注射し６０分後に断頭した。断頭後すみやかに全脳を摘出し内側前頭皮質と線条体を取り出し試料とした。試料の抽出方法およびＣＣＫ－８のラジオイムノアッセイ法については既報のとおりである。[1)]

（２）内側前頭皮質への N-methyl-D-aspartic acid（ＮＭＤＡ）の微量注入実験

ラットを麻酔下、脳定位装置に固定し、溶解したＮＭＤＡ 20μgを内側前頭皮質へ注入した。注入後８日目に apomorphine（ＡＰＯ）１mg/kgを腹腔内に投与し３０分後に断頭し内側前頭皮質をパンチアウトし試料とし、ＣＣＫ－８免疫活性（ＣＣＫ－８ＩＲ）を測定した。（１）（２）共に蛋白量は Lowryらの方法に準じて測定し、統計学的解析には一元分散分析(ANOVA)を用いた。

〔結果〕

（１）R(+)-３－ＰＰＰおよび S(−)-３－ＰＰＰによるラットの行動変化

R(+)-３－ＰＰＰの高用量(100μmol/kg)では sniffing や rearing 等の常同行動が出現した。S(−)-３－ＰＰＰについては低用量、高用量共にラットは強い鎮静化を示した。

（２）ＣＣＫ－８ＩＲに及ぼす３－ＰＰＰの効果

R(+)-３－ＰＰＰあるいは S(−)-３－ＰＰＰを投与したラットについてその内側前頭皮質と線条体におけるＣＣＫ－８ＩＲを測定したところ線条体ではどの群においても対照群と有意差がみられなかったのに対して、内側前頭皮質では、Fig.1および Fig. 2 のような結果を得た。

（３）内側前頭皮質へのＮＭＤＡの微量注入実験

対照群に比べNMDA注入群では内側前頭皮質のCCK－８IRは低下傾向を示したが有意差はみられなかった。NMDAの注入処置後８日目にAPO 1㎎/kgを投与した群では内側前頭皮質でCCK－８IRが有意に増加した（Fig.3）。

〔考察〕

３－PPPには（＋）と（－）の光学異性体が存在するが R(+)-３－PPPの低用量はシナプス前DA受容体に対して agonistとして作用し、高用量はシナプス後DA受容体に対しても agonistとして作用する。一方、S(−)-３－PPPの低用量は、シナプス前DA受容体に対しては agonistとして作用するが、その高用量はシナプス後DA受容体に対しては antagonistとして作用する。[2] CCK－８IRの変化をみると R(+)-３－PPPの投与では用量依存的にCCK－８IRが増加しており S(−)-３－PPPの低用量の投与でもCCK－８IRが増加することから、内側前頭皮質のDA神経細胞においては、そのシナプス前あるいは後DA受容体への agonistic な刺激は共にCCK－８IRを増加させるといえる。

NMDAはカイニン酸と同様に神経毒として作用し、神経細胞の細胞体と樹状突起には、はなはだしい変性を生じるが軸索には影響を与えない。このNMDAの特性から考えて内側前頭皮質へのNMDAの微量注入により内在性CCKニューロンが破壊され、この部位のCCK－８IRは減少傾向を示すがNMDA注入後にAPOを腹腔内投与したラットではCCK－８IRが増加することから、NMDAによって変性した内在性以外のCCKニューロン、すなわち求心性ニューロンのシナプス前部においてもDA受容体を介してAPOに反応する機構が存在することが示唆された。

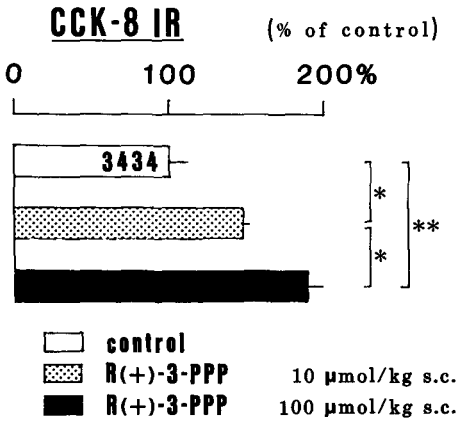


Fig.1 Effects of R(+)-3-PPP on CCK-8 IR in the medial frontal cortex of the rat brain 60 mins after subcutaneous administration. Each bar denotes mean per cent value as saline-treated group and the S.E.M. The number in the open column shows CCK-8 IR (fmol/mg protein) of saline-treated rats.
* p<0.05 ** p<0.01

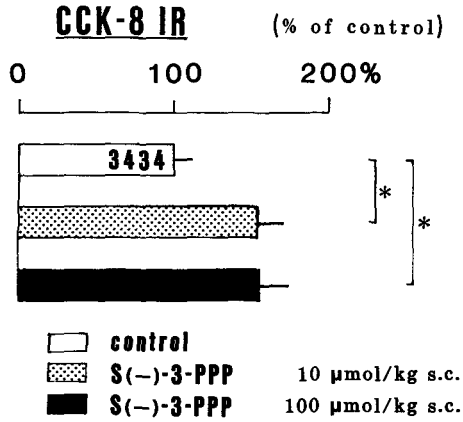


Fig.2 Effects of S(-)-3-PPP on CCK-8 IR in the medial frontal cortex of the rat brain 60 mins after subcutaneous administration.

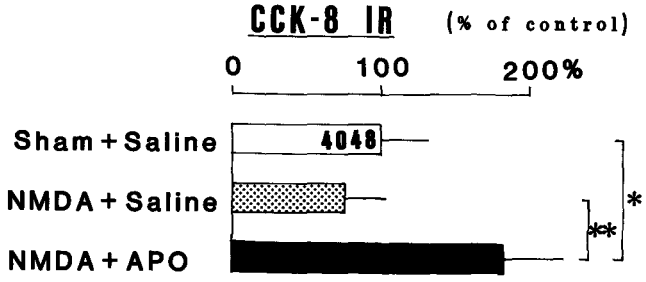


Fig.3 CCK-8 IR in the medial frontal cortex following NMDA microinjection or subsequent APO (1 mg/kg) administration.

〔文献〕 1) Fukamauchi,F.,Yoshikawa,T. et al.(1987) Neuropeptides 10, 207-220.

2) Hjorth,S.,Carlsson,A. et al.(1983) Psychopharmacol. 81, 89-99.

186 受容体固相化法による中枢セロトニン受容体の検索

高見正雄，今井千佳，水田正，瀬川富朗*
（明治乳業ヘルスサイエンス研究所・生化，
広島大・医・薬効解析*）

〔要約〕
直径 6.2mm のポリエチレン・ビーズの表面に化学的に活性なエポキシド基を有する担体を用いて、トランスフェリン（Tf）受容体を固相化し Tf の結合実験を行ったところ、良好の成績を得ることができたので、この方法を用いてウシ大脳皮質よりセロトニン（5-HT）受容体の検索を試みた。ウシ大脳皮質シナプトゾーム膜画分の 1% Triton X-100 可溶化液を用いて、[^{3}H] 5-HT の結合実験を行ったところ、特異的結合が得られた。一方、シナプトゾーム膜画分の可溶化液を Sephacryl S-200 のカラムでゲルロ過後、各フラクションの [^{3}H] 5-HT の結合活性を調べると、分子量約40kのところに、結合活性が観察された。

（目的）

細胞膜表面に存在する受容体は、細胞の機能に関与する重要な膜蛋白質である。その受容体の精製、単離は受容体機能の分子論的研究をする上で、必要不可欠な仕事の一つとなっている。可溶化した状態でのリガンドと受容体との結合実験はポリエチレン沈澱法やリポゾーム再構成法で行っているが、両方法とも多数の検体を検索することは、実験が煩雑になりやすい欠点があった。そこで受容体を、結合活性を保持したままで担体に固相化できれば、結合実験は非常に簡単で多数の検体を検索することが可能になると考えられ、受容体の固相化法を検討した。

（実験方法）

Ⅰ）材料　固相化する Tf 受容体を含む膜画分は、ヒト胎盤微絨毛膜を用い、その調整法は Takamiらの方法(1)で行った。ウシ大脳皮質の 5-HT 受容体を含む膜画分は、Segawaらの方法(2)により調製し、これらの膜画分を実験に供した。固相化の担体は、Eupergit CB-6200（Röhn Phärma社，径 6.2mm）を使用した。

Ⅱ）Tf の結合実験　ヒト胎盤微絨毛膜を 1% Triton X-100 を含む PBS（phosphate buffered saline）溶液で可溶化し、その溶液 400μl をビーズ１個が入った試験管に入れ、4℃ 一晩インキュベートし、膜蛋白質をビーズに固相化した。次に膜蛋白質溶液を捨て、未反応のエポキシド基をブロックするために 1% bovine serum albumin（BSA）を含む PBS 溶液 400μl をビーズに加え、一晩インキュベートした。その後 BSA 溶液を捨て、[^{125}I] - Tf 溶液を加え、37℃ 1時間インキュベートした。次に [^{125}I] - Tf 溶液を捨て、ビーズを 0.1% Tween-20 を含む PBS 溶液 1ml で２回洗浄し、ビーズに結合している放射活性を測定した。

Ⅲ）5-HT の結合実験　ウシ大脳皮質シナプトゾーム膜画分を 1% Triton X-100 と 0.5M NaCl を含む PBS で可溶化し、その 400μl をビーズ１個と共に 4℃ 一晩インキュベートし、膜蛋白質をビーズに固相化した。次に膜蛋白質溶液を捨て、0.1% Tween-20 を含む PBS 溶液 1ml で洗浄し、[^{3}H] 5-HT 溶液を加えて 37℃ 30分間インキュベートした。その後 [^{3}H] 5-HT 溶液を捨て、ビーズを 0.1% Tween-20 を含む PBS 溶液 1ml で２回洗浄し、ビーズに結合している放射活性を測定した。

（結果および考察）

固相化した膜蛋白質への [^{125}I] - Tf の結合は、ヒト血清アルブミンや卵白アルブミンでは阻害を受けず Tf のみで阻害を受けることから、特異的結合であると思われる（Fig. 1）。また [^{125}I] - Tf と受容体との結合の親和定数および最大結合値はそれぞれ、Kd=1.8x10^{-9} M，0.6ng/μg of solubilized protein を示した（Fig. 2）。この値はポリエチレン沈澱法で得られた値(3)とほぼ同値であった。ビーズの蛋白質結合能力は、1% Triton X-100 溶液中では、可溶性蛋白質（BSA）よりも膜蛋白質の方が ５～１０倍高く（data not shown）、このことは膜蛋白質のビーズへの結合は、大部分疎水性部分を介してビーズに結合しているのではないかと考えられる。また Tf 受容体を固

相化して得られた親和定数および最大結合値がポリエチレン沈澱法とほぼ同値を示していることからビーズに固相化された Tf 受容体は、大部分が Tf への結合活性を保持していると思われる。以上のことから、Tf受容体を固相化しても結合実験を行えることが分ったので、次に 5-HT受容体の結合実験を行った。

種々の濃度の可溶化したウシ大脳皮質シナプトゾーム膜画分をビーズに固相化すると、蛋白濃度にほぼ比例して [^{3}H] 5-HT結合活性を示した（Fig. 3）。次に、可溶化標品を用いて、本結合に対する 5-HT 構造関連物質、5-HT 受容体の各サブタイプのアゴニスト、アンタゴニストおよびモノアミン類の阻害実験を行った（Fig. 4）。最も強い阻害活性を示したのは 5-HT、5-メトキシトリプタミン（5-MeOT）、5-メトキシ-N,N-ジメチルトリプタミン（5-MeODMT）であり、次いで、5-HT$_{1A}$受容体のアゴニストである 8-ハイドロオキシ-2-（ジ-n-プロピルアミノ）テトラリン（8-OH-DPAT）および 5-HT$_2$受容体アンタゴニストであるミアンセリンであった。一方モノアミン類のうちドーパミン（DA）、ヒスタミン（His）はほとんど阻害活性を示さなかったが、ノルエピネフリン（NE）は若干の阻害活性を示した。そこで、可溶化した膜蛋白質を Sephacryl S-200 でゲルロ過し、各フラクション の [^{3}H] 5-HT の結合活性を調べると、分子量約40k画分に結合活性を有するピークが検出された（Fig. 5）。

以上の結果より、5-HT 受容体をビーズに固相化しても、結合実験を行うことが可能であると思われる。さらにリガンドと受容体との結合のカイネティクスについて検討中である。

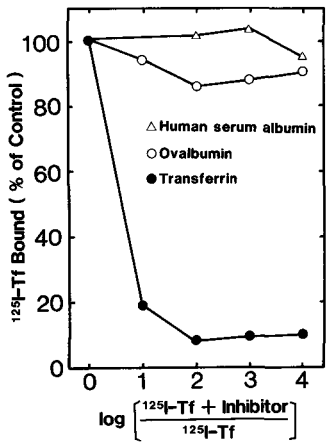


Fig.1. Specificity of ^{125}I-transferrin binding to immobilized membrane proteins on the beads.

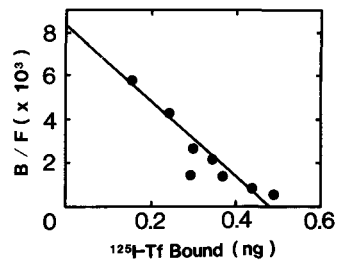


Fig.2. Scatchard plots of ^{125}I-transferrin binding.

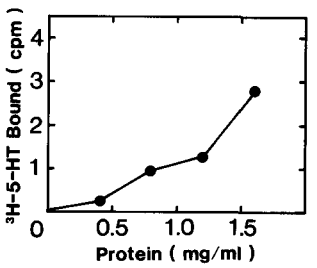


Fig.3. ^{3}H-5-HT binding as a function of amount of cerebral cortex membrane proteins immobilized on the beads.

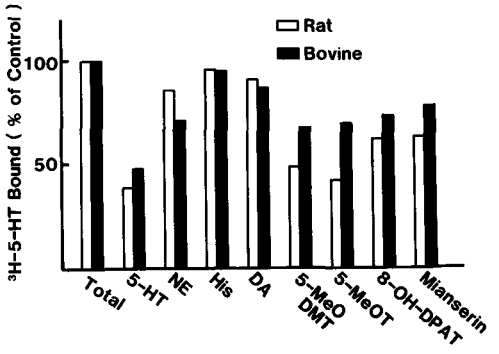


Fig.4. Inhibition of various compounds (1 x 10^{-5}M) on ^{3}H-5-HT binding in cerebral cortex membrane immobilized on the beads.

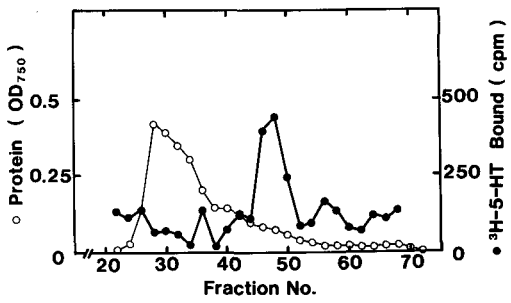


Fig.5. ^{3}H-5-HT binding assay of the eluates of solubilized membrane proteins from Sephacryl S-200 column.

（文献）

1）Takami, M., Kasuya, I. and Tsunoo, H. (1988) Anal. Biochem. 170, 238.

2）Segawa, T. and Kuruma, I. (1968) J. Pharm. Pharmacol. 20, 320.

3）Tsunoo, H. and Sussman, H.H. (1983) J. Biol. Chem. 258, 4118.

187　N-エチルマレイミドによるα_1-アドレナリン受容体-ホスホリパーゼC系の修飾

宮本　篤，　木村永一，　大鹿英世
（札幌医大　・　薬理）

〔要約〕

ラット耳下腺細胞のα_1-アドレナリン受容体活性調節機構に及ぼす、SH基アルキル化剤 N-ethylmaleimide（NEM）の作用について検討した。細胞膜への低濃度NEM（10μM)の処置（0 ℃, 30 min)は、10～100 μM norepinephrine (NE)によるphosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phospholipase C (PtdIns-P_2 PLase C)の活性化を減弱させるとともに、[^{3}H]prazosinの結合親和性を低下させた。また、細胞へのNEM（10μM)の処置（25 ℃,10 min)は、10～100μM NE刺激による K^+ 放出反応も減弱させた。一方、細胞膜への高濃度NEM(1mM)の処置（0 ℃, 30 min)は、1～100μM NEによるPtdIns-P_2 PLase Cの活性化の減弱とともに、[3H]prazosinの結合数及び結合親和性を低下させた。以上の成績より、NEM による受容体－PLase C系の脱共役は、α_1-アドレナリン受容体結合性（[^{3}H]prazosin結合部位）及びα_1-アドレナリン受容体機能（K^+放出反応）の低下を起こすことが示唆された。

〔目　的〕

我々は、ラット耳下腺細胞α_1-アドレナリン受容体へのアゴニスト結合調節に、細胞膜リン脂質及び膜流動性が関与すること（5）、この受容体刺激に pertussis toxin(PT)-sensitive G protein － PLase C 系及び PT-insensitive G protein － PLase A_2 系が共役していること（7）を報告してきた。一方、SH基アルキル化剤 NEM は受容体へのアゴニスト結合を抑制したり（1，8，9）、受容体とG proteinとの脱共役を起こすこと（3）が報告されている。今回、耳下腺α_1-アドレナリン受容体の活性調節機構を更に追求するため、NEM処置の効果について検討した。

〔方　法〕

実験には、Wistar系雄性ラット(250 - 300g)の耳下腺細胞を使用した。

（I）耳下腺細胞の調整：耳下腺切片は前報に従い（7）、collagenase(4 mg/ml)とbovine testicular hyaluronidase(2 mg/ml)を含むHanks' balanced salts solution II (HBSS II, Ca^{2+} and Mg^{2+} omitted, pH7.4)中で37 ℃, 1 hr incubate後、細胞を分取しHanks' solution I (HBSS I, pH7.4)中に再浮遊した。

（II）[^{3}H]Prazosin結合：細胞をprotease inhibitorsを含む50 mM Tris(pH7.4)でhomogenateし、超遠心分離後、沈渣を膜標品とした。最終濃度10μM, 1mM NEMを膜標品と 0℃, 30 min incubateし最終濃度 1mM dithiothreitolを加え反応を停止後、超遠心分離で沈渣を3回洗浄し結合実験に用いた。[^{3}H]-prazosin特異的結合は、10μM phentolamine 存在下で算出した（6）。

（III）PtdIns-P_2 PLase C assay： Jackowskiら（2）の方法に従い、上述のNEM処置膜標品及び NE をコール酸 Na中の[^{3}H]PtdIns-P_2と37℃, 10min incubateした。氷中で急冷することにより反応を停止し、 反応液は二重層を用いて抽出し水層中の生成した[^{3}H]IP_3の放射活性を測定した。

（IV）K^+ 放出：最終濃度10μM, 1mM NEMを細胞と25℃,10 min incubate後、HBSS I中で37 ℃, 10 min NE とincubateし刺激による細胞からのK^+ 放出をflame photometerで測定した（4）。

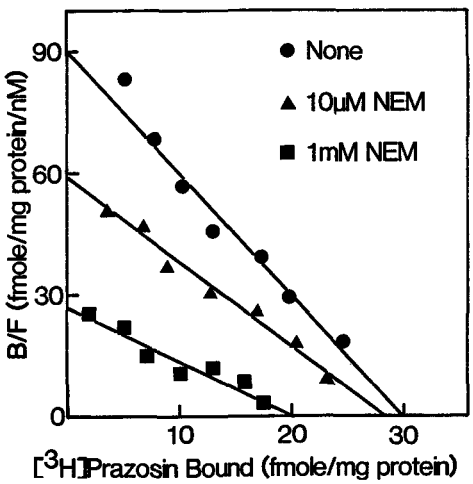


Fig. 1 Effect of N-ethylmaleimide (NEM) pre-treatment on the specific binding of [^{3}H]-prazosin to parotid cell membranes.

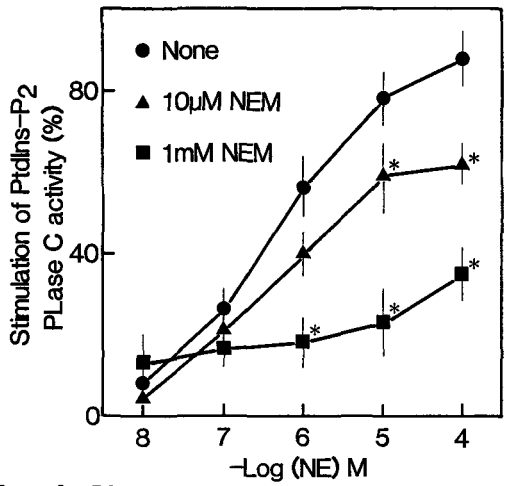


Fig. 2 Effect of N-ethylmaleimide (NEM) pretreatment on norepinephrine (NE)-stimulated parotid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns-P_2) phospholipase (PLase) C activity.

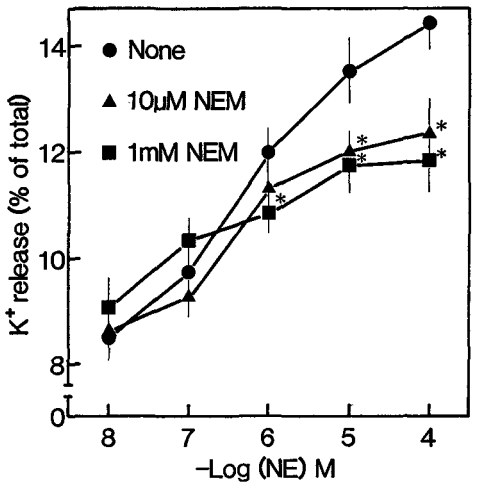


Fig. 3 Effect of N-ethylmaleimide (NEM) pretreatment on norepinephrine (NE)-stimulated K^+ release from parotid cells.

〔結　果〕

耳下腺細胞膜画分への[^{3}H]prazosin特異的結合：10 μM の低濃度のＮＥＭ処置膜では、無処置膜に比べ結合親和性の低下のみを示したが、1mM の高濃度のＮＥＭ処置膜においては親和性の低下とともに約３０％の結合量の減少をも示した(Fig. 1)。耳下腺細胞膜画分でのNE刺激によるPtdIns-P_2 PLase C活性：10 μM ＮＥＭ処置により、10 - 100 μM NE刺激によるPtdIns-P_2 PLase C活性は有意に抑制された。しかし、10nM - 1 μM NE刺激のPtdIns-P_2 PLase C活性に変化はなかった。1 mM ＮＥＭ処置は、1 - 100 μM NE刺激によるPtdIns-P_2 PLase C 活性を更に抑制した(Fig. 2)。耳下腺細胞からのNE刺激による K^+ 放出： 10 μM ＮＥＭ処置細胞では、10 - 100 μM NE刺激による K^+ 放出反応を有意に抑制した。また1 mM ＮＥＭ処置細胞では、1 - 100 μM NE刺激による K^+ 放出反応を更に抑制した(Fig. 3)。

〔考　察〕

低濃度(1 - 50 μM)のＮＥＭは、PT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、受容体とG protein との脱共役を生ずることが報告されている（３）。今回、耳下腺細胞の[^{3}H]prazosin結合親和性が低濃度のＮＥＭ(10 μM)で低下したこと、及びNE刺激によるPtdIns-P_2 PLase C活性をＮＥＭが抑制したことは、耳下腺α_1-アドレナリン受容体がPT基質となるG proteinと共役している可能性が考えられた。一方、高濃度の ＮＥＭが、[^{3}H]prazosin結合数及び結合親和性を低下させると共にNE刺激によるPtdIns-P_2 PLase C活性を抑制した。高濃度ＮＥＭは、この受容体のＳＨ基を直接アルキル化し受容体とNEとの結合を阻害すると思われ、一部のα_1-アドレナリン受容体結合部位でのＳＨ基の関与が示唆された。しかし、1mM ＮＥＭは、中枢α_2-アドレナリン受容体結合をほぼ消失させる（３）のに比べ、中枢α_1-アドレナリン受容体結合数は約１０％しか低下させないこと（８，９）、そして耳下腺細胞の[^{3}H]prazosin結合数が約３０％の低下に過ぎない事は、ＳＨ基の関与しない結合部位の存在も同時に示唆している。以上の成績より、ＮＥＭ による受容体－PLase C系の脱共役は、α_1-アドレナリン受容体結合性（[^{3}H]prazosin 結合部位）及びα_1-アドレナリン受容体機能（K^+ 放出反応）の低下を惹起することが示唆された。

〔文　献〕

1. Goodhardt, M., Ferry, N., Aggerbeck, M., and Hanoune, J. (1984) *Biochem. Pharmacol.* **33**, 863-868
2. Jackowski, S., Rettenmier, C. W., Sherr, C. J., and Rock, C. O. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 4978-4985
3. Kitamura, Y., and Nomura, Y. (1987) *J. Neurochem.* **49**, 1894-1901
4. Miyamoto, A., and Ohshika, H. (1985) *Japan. J. Pharmacol.* **38**, 305-311
5. 宮本　篤，大鹿英世 (1986) 神経化学 **25**, 265-267
6. Miyamoto, A., Akino, T., and Ohshika, H. (1986) *Japan. J. Pharmacol.* **42**, 63-70
7. 宮本　篤，大鹿英世 (1987) 神経化学 **26**, 337-339
8. Reader, T. A., and Briere, R. (1985) *Neurochem. Res.* **10**, 107-122
9. Reader, T. A., Briere, R., and Grondin, L. (1986) *Neurochem. Res.* **11**, 9-27

188 牛脳ゴルジ体画分に見られるα2アドレナリン受容体

宇佐美美穂子、 *門田朋子、 門田健

(東京都精神研・神経化学、*千葉大・医・解剖)

〔要約〕

牛大脳皮質より分離したゴルジ体画分中には、α_2 アドレナリン性受容体の選択的リガンドである^{3}H－クロニジンおよび^{3}H－ラウオルシンと結合する活性が存在している。^{3}H－クロニジン結合のスキャッチャード分析は、双曲線となり、高親和性、低親和性の二種類の結合サイトの存在を示した。また、この結合は非放射性クロニジンの添加により減少し、その50%阻害濃度は500ｎＭであった。一方、^{3}H－ラウオルシンの結合のスキャッチャード分析は直線を示し、そのＫｄは2.5ｎＭ、Ｂｍａｘは189 fmol/mg proteinであった。^{3}H－ラウオルシンの結合は非放射性ヨヒンビンにより阻害され、その50%阻害濃度は1μＭであった。またこの結合はエピネフリン、ノルエピネフリン、クロニジン等のαアゴニストで濃度依存性に阻害されるが、イソプレテレノール、ドパミン等では影響を受けなかった。

多くの神経伝達物質受容体は糖蛋白質であり、その生合成や細胞内輸送の過程で、ゴルジ体において糖鎖が付加されることが予想される。ここではα_2－アドレナリン性受容体をとりあげ、ゴルジ体画分中の存在の有無及びその性質をリガンド結合活性を測定することによって調べることを試みた。

【方法】

ゴルジ体の分離：牛大脳皮質より分離した (1) 。

リガンド結合の測定： ^{3}H－クロニジンについては50mMトリス塩酸 (pH7.4) 、1mM EDTA, 80-100μｇ蛋白、1－33nM ^{3}H－クロニジンを含む反応液 (0.25ml) を30° C, 30分間、^{3}H－ラウオルシンについては50mMトリス塩酸 (pH7.0) 、80-100μｇ蛋白、0.15-8nM ^{3}H－ラウオルシンを含む反応液 (0.25ml) を30° C, 20分間、それぞれ反応させた後、ガラスフィルター上で濾過洗浄を行い、液体シンチレーションカウンターにて測定した。非特異的結合は反応液にそれぞれ非放射性の10μＭクロニジン、50μＭヨヒンビンを加えて測定した。

【結果】

図１ａと２ａはそれぞれ、^{3}Ｈ－クロニジン及び^{3}Ｈ－ラウオルシン結合の飽和実験の結果を示している。図１ａをスキャッチャード分析すると双曲線を示し（図１ｂ）、ゴルジ体画分の^{3}Ｈ－クロニジン結合性には高親和性（Kd=1.56, Bmax=28.7）、低親和性（Kd=16.7, Bmax=166.7）の二つのサイトが存在することを示してい

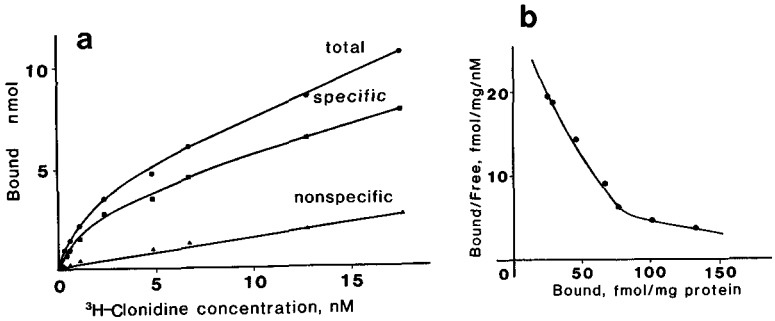


図１． ^{3}Ｈ－クロニジンの結合
ａ，飽和曲線　　ｂ，スキャッチャード分析

る。^{3}H－ラウオルシン結合のスキャッチャード分析（図２ｂ）は直線を示し、そのＫｄは約2.5ｎＭ，Ｂｍａｘは189 fmol/mg proteinと計算された。図３は^{3}Ｈ－クロニジン結合、図４は^{3}Ｈ－ラウオルシン結合に対する種々の薬物の阻害作用を見たものである。^{3}Ｈ－クロニジンの結合に対してはクロニジン、ヨヒンビンが阻害を示したがエピネフリン、ノルエピネフリン等はほとんど阻害しなかった。^{3}Ｈ－ラウオルシン結合はエピネフリン、ノルエピネフリン、クロニジン、ヨヒンビン等のα－アゴニストにより阻害された。

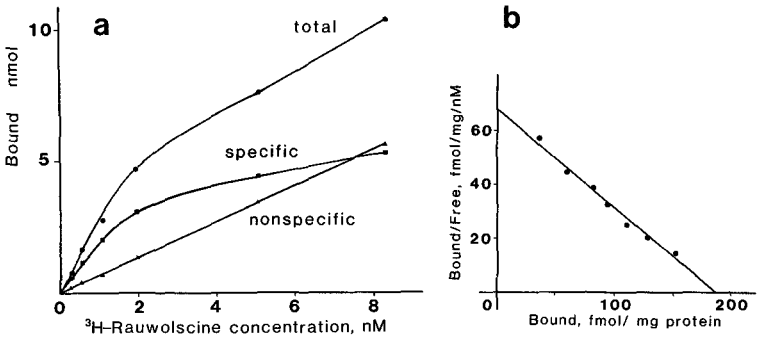


図３．　^{3}Ｈ－ラウオルシンの結合
ａ，飽和曲線　　ｂ，スキャッチャード分析

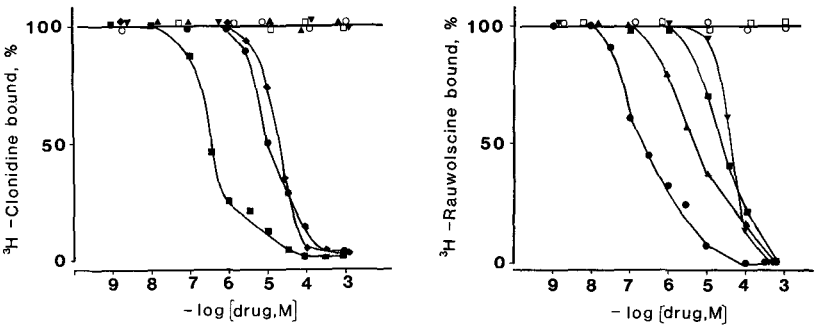


図３．　種々の薬物による^{3}Ｈ－クロニジン結合の阻害作用
■，クロニジン；　●，ヨヒンビン；　▲，エピネフリン；　▼，ノルエピネフリン；
◆，フェニレフリン；　□，イソプレテレノール；　○，ドパミン

図４．　種々の薬物による^{3}Ｈ－ラウオルシン結合の阻害作用

【考察】

牛脳ゴルジ体画分中には、^{3}Ｈ－クロニジン、^{3}Ｈ－ラウオルシン等のα$_2$アドレナリン性受容体のリガンドを特異的に結合する活性が存在していることが明らかになった。アゴニストである^{3}Ｈ－クロニジンに対しては高親和性、低親和性の二つの結合サイトが、またアンタゴニストである^{3}Ｈ－ラウオルシンに対しては１つの結合サイトが存在していることは、粗膜標本のα$_2$アドレナリン性受容体の性質と類似している（2,3,4）。しかし、ゴルジ体画分では非放射性リガンドによる結合阻害には一般に高い濃度が必要とされること、またエピネフリン、ノルエピネフリンなどによって^{3}Ｈ－クロニジンの結合が阻害されないことなど、相違も見られたことより、細胞膜のものとはそのあり方が異なる可能性も大きい。

α$_2$アドレナリン性受容体は、細胞膜上では、抑制性ＧＴＰ結合タンパク質（ＮｉまたはＧｉ）とリンクして存在していると考えられている。ゴルジ体に於けるＧタンパク質との関係についても検討する。

【引用文献】

1.宇佐美美穂子，門田朋子，門田健，神経化学，(1986) 25,226-228.

2. Byland,D.B.,Rudeen,P.K., Petterborg,L.J. and Ray-Prenger,C., (1988) 51, 81-86.

3. Glossman,H. and Hornung,R.,Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., (1980) 314, 101-109.

4. Perry,B.D. and U'Prichard,D.C. (1981) 76, 416-464.

189 ウシ脳コート小胞で見られるα_2アドレナリン受容体

諸井佳代子、門田健*、久我哲郎

(千葉大学医・高次研・高次神経、*東京都精神研・神経化学)

〔要約〕

(1)ウシ大脳皮質より分離したコート小胞画分はα_2アドレナリン受容体の選択的リガンドである^{3}H-Rauwolscine（ＲＡＷ）及び^{3}H-Clonidine（ＣＬＮ）と特異的に結合した。(2)この結合は飽和性であり可逆的であった。(3)^{3}H-ＲＡＷをリガンドとした場合、見かけ上のＫd値は１２nM、Ｂmax値は６８fmol/mg蛋白であった。(4)この結合は１－１００μM濃度のyohimbine、clonidine、phenoxybenzamine、noradrenalineによって置換された。これらの結果は、コート小胞にはα_2アドレナリン受容体が存在することを示している。

コート小胞は細胞内小器官の一つであり形質膜からのendocytosisやゴルジ体膜からの芽出によって形成される。その機能として、分泌蛋白や酵素等の運搬や、形質膜表面上の受容体に結合した血清中の巨大分子ートランスフェリンやインスリン、神経成長因子、などを細胞内にとりこむことが報告されている(1)。それ以外に神経伝達物質の受容体の形質膜への運搬や、形質膜からの取り込みに関与しているであろうことが示唆されている。例えばβアドレナリン受容体やムスカリニックアセチルコリン受容体またはオピオイド受容体の存在がコート小胞に示されている(2,3,4)。これらの事を考慮にいれて、今回我々はコート小胞におけるα_2アドレナリン受容体の存否、およびその性質について検討を加えた。

(実験方法)

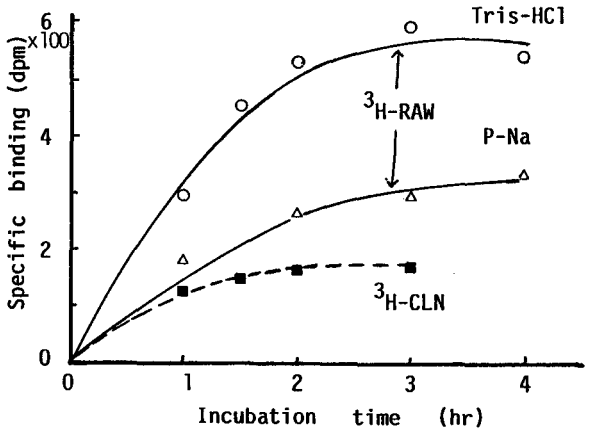
（コート小胞の分離）ウシ大脳皮質から、Pearseら(4)の方法を改変して、30%-50%の連続庶糖密度勾配遠心にてコート小胞を精製した。より均一な小胞が必要な場合は再度5-30%の連続庶糖密度勾配遠心を行った。コート小胞の純度は電子顕微鏡にてしらべ、蛋白量はLowry法にて測定した。

（受容体結合実験）α_2アドレナリン受容体のリガンドとして^{3}H-ＲＡＷおよび^{3}H-ＣＬＮを用いた。約200-300μg蛋白量のコート小胞標品を２nMＲＡＷまたは4nMＣＬＮと30°Ｃ、３時間、または１．５時間インキュベートし、反応液をWhatmann G/F濾紙にて吸引濾過することで反応を停止した。非特異的結合は100μMのYohimbineまたは非標識のclonidine存在下の結合とした。置換実験では薬物は緩衝液に溶解しコート小胞と１０分間プレインキュベイションを行った。Ｋｄ値およびＢmax値は飽和実験のデータより計算した。

(実験結果)

コート小胞は^{3}H-ＲＡＷおよび^{3}H-ＣＬＮと特異的に結合した。この結合が飽和に達する時間は^{3}H-ＲＡＷをリガンドとした場合3-4時間で、^{3}H-ＣＬＮをリガンドとした場合1.5-2時間であった。^{3}H-ＣＬＮ結合は用いた緩衝液で差はなく、またpH7.0-8.0で変化はなかった。これに対し^{3}H-ＲＡＷ結合

Fig.1. Time course of ^{3}H-ligand binding to the coated vesicles



の飽和時間は緩衝液により差がみられた（図１）。図２に^{3}H-ＲＡＷをリガンドとした場合の飽和実験の結果とScatchard analysisを示した。見かけ上のＫｄ値とＢmax値はそれぞれ１２nM、６８fmole／mg蛋白と計算された。図３に置換実験の結果を示した。^{3}H-ＲＡＷ結合をYohimbine、clonidine、phenoxybenzamine、noradrenalineなどが1-100μMの濃度範囲で置換した。^{3}H-ＣＬＮ結合にたいしてはclonidineが最も強い置換作用を持ち１μMで約50%を置換した。

Fig.2. Saturation curve and Scatchard analysis of ^{3}H-RAW binding to the coated vesicles

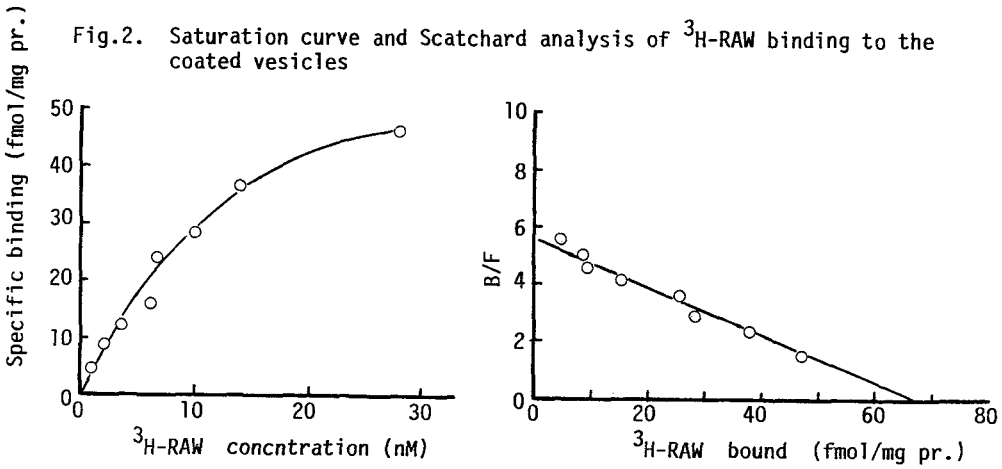
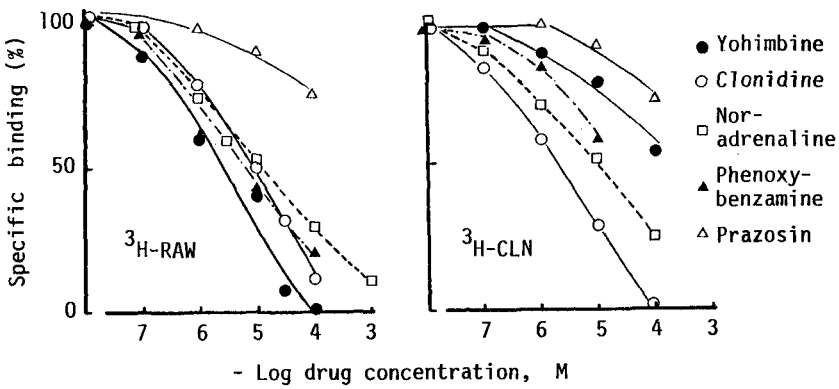


Fig. 3. Displacement of ^{3}H-ligand binding to the coated vesicles by several agonists and antagonists



（考察）

今回の結果はウシ脳大脳皮質より得られたコート小胞にα_2アドレナリン受容体が存在することを示した。しかしながら、コート小胞へのリガンドの結合が粗膜標品への結合(6)にくらべて親和性が低く、またリガンド結合を置換するために高濃度のアゴニストやアンタゴニストを要した。このことはコート小胞中のα_2受容体が形質膜中のそれとは違った状態で存在していることを示唆するものであろう。

（文献）

(4)Bennett et al. (1985) J.Neuroscience 5, 3010-3015

(6)Bylund D.B. et al. (1988) J.Neurochem. 51, 81-86

(2)Chuang D-M et al. (1986) J.Neuroscience 6, 2578-2584

(1)Goldstein J.L. et al. (1979) Nature 279, 679-685

(5)Pearse B.M.S. & Bretscher M.S. (1981) Ann.Rev.Biochem. 50. 85-101

(3)Silva W.I. et al. (1986) J.Biol.Chem. 261, 14788-14796

190 ＮＭＤＡ感受性［^{3}Ｈ］グルタミン酸結合に対するＧＴＰの阻害作用

大垣孝雄*、荻田喜代一、米田幸雄
（*錦秀会臨検学院、摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
ラット脳シナプス膜標品をTriton X-100で前処理すると、N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）に感受性を持つ[^{3}H]グルタミン酸(Glu)結合部位が出現した。非前処理膜標品への[^{3}H]Glu結合は、Na^+イオンの添加により著明に増強されたが、Triton処理膜標品ではNa^+イオンは[^{3}H]Glu結合を有意に阻害した。NMDA型受容体のアゴニストおよびアンタゴニストはいずれも本結合を濃度依存的に阻害したが、これらの阻害能はNa^+イオンの存在下でも影響されなかった。一方、種々のヌクレオチドの中でGTPとGDPはともに本結合を有意に阻害したが、GMP、cGMP、ATP、ADP、AMP、ITP、UTP、CTPなどは結合に著変を与えなかった。NMDAの結合阻害強度は、GTPの共存により有意に低下した。以上の結果より、NMDA受容体とGTP結合蛋白質の間に連関機構が存在する可能性が示唆される。

興奮性アミノ酸受容体のサブタイプの一つであるNMDA受容体は、その活性化に伴いカチオンチャンネルを開放して、Na^+イオンとCa^{2+}イオンの細胞内流入を惹起するものと理解されている(9)。この様なイオンチャンネルに対する直接的な活性化以外に、NMDA受容体によるイノシトール燐酸生成調節機構の存在が近年報告されている(1,5)。一方、[^{3}H]Glu結合(8)や[^{3}H]DL-2-アミノ-4-ホスホノ酪酸(AP4)結合(2)は、ともにグアニンヌクレオチドの添加により有意に抑制されるが、これらの実験条件下で標識される結合部位はNMDAに対する感受性を持たない(10)。したがって本研究では、NMDA受容体とGTP結合蛋白の連関機構存在の可能性を追求する目的で、NMDA感受性[^{3}H]Glu結合(6)に対する種々のヌクレオチドやNa^+イオンの効果(3)について検討した。

［実験方法］
50mMトリス酢酸緩衝液(pH7.4)を用いて、50,000g、30分間の遠心分離による洗浄操作を3回行ったラット脳粗シナプス膜標品を、0.32Mショ糖水溶液に懸濁状態で凍結保存(-80°C)した。使用時には室温融解後、通常は0.08% Triton X-100で懸濁液を2°C、10分間前処理した。前処理後、上述の洗浄操作を2回行った標品を結合実験に供した(6)。結合実験は10 nM [^{3}H]Glu (ICN、30 Ci/mmol)と膜標品を2°C、10分間、同緩衝液中で反応させて行った。反応は Whatman GF/B グラスフィルターを用いた吸引濾過法により停止した。

［実験結果］
シナプス膜標品を各濃度(0.01-0.4%)のTriton X-100で前処理すると、[^{3}H]Glu結合活性は著明に増加した(図1)。非前処理膜標品への結合は、100 mM酢酸ナトリウム添加により有意に増強されたが、Triton前処理膜標品では逆に、Na^+イオン添加により結合は阻害された。このNa^+イオンの阻害作用は、反応温度、あるいは反応時間にかかわらず観察された(図2)。Triton前処理膜標品への[^{3}H]Glu結合は、NMDAアゴニストのL-Glu、NMDAおよびN-メチル-L-アスパラギン酸(NMLA)ばかりでなく、NMDAアンタゴニストの3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid(CPP)、DL-2-アミノ-5-ホスホノ吉草酸(AP5)、DL-2-アミノ-7-ホスホノヘプタン酸(AP7)、α－アミノアジピン酸およびγ-D-グルタミルグリシンによっても濃度依存的(10^{-8}-10^{-4}M)に阻害された。さらに、キスカル酸も本結合を阻害したが、これらいずれの化合物の結合阻害能(IC_{50}値)も、100 mM酢酸ナトリウムの共存による変化を受けなかった。次いで、グアニンヌクレオチドの効果について検索を進めたところ、GTPがNMLAと同等度の阻害作用を発揮することが判明した(表1)。さらに、GDPにも結合阻害作用が見出されたが、GMPは結合に著変を与えなかった。非水解性GTPアナログであるGTPγSやGpp(NH)pも結合を有意に阻害したが、ATP、ADP、AMP、アデノシン、グアノシン、cGMP、ITP、UTPおよびCTPには有意な結合阻害作用は認められなかった。NMDAは濃度依存的に本結合を阻害したが、この阻害曲線はGTP(10^{-5}および10^{-4}M)の共存下に右側へ移行した(図3)。

［考察］
本研究において、NMDA感受性[^{3}H]Glu結合がGTPによる選択的阻害を受けることが明らかとなった。他のヌクレ

図1 Triton X-100前処理の影響

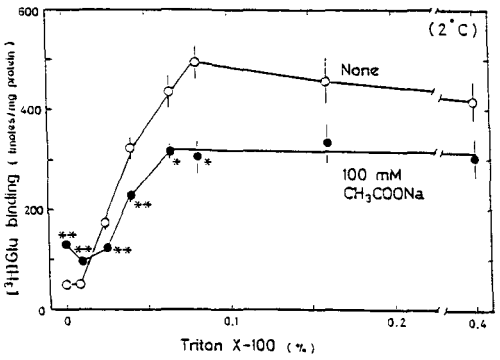


図2 Na^+ イオンの影響

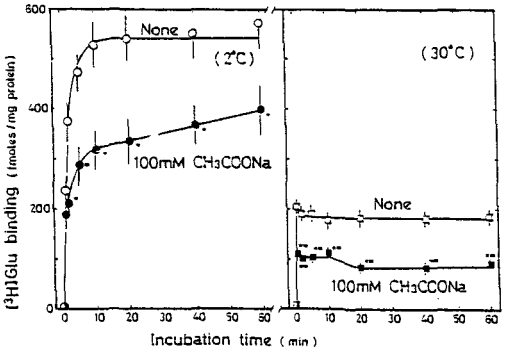
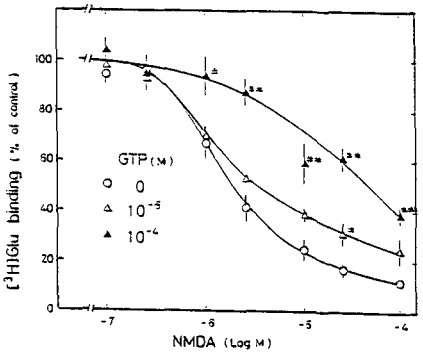


表1 グアニンヌクレオチドの影響

Compounds	IC_{50} values (μM)
GTP	8.81 ± 0.54
GDP	23.8 ± 2.9
GMP	>100

Each value represents the mean±S.E. obtained in four separate experiments.

図3 NMDA阻害曲線に対する GTPの影響



オチドの効果や非水解性GTPアナログの作用、さらにはアゴニスト(NMDA)の親和力低下などを考え合わせると、本研究結果はNMDA受容体とGTP結合蛋白質との間の連関機構存在の可能性を示唆するものと思われる。Na^+イオンによる結合阻害現象も、この可能性を支持するものである。事実、$GABA_B$受容体に関しては、本研究の場合と同様の研究結果(4)を契機として、GTP結合蛋白質/アデニル酸シクラーゼ系との連関機構が解明されている。しかしながら、このNMDA受容体/GTP結合蛋白質の連関機構が、いずれの細胞内情報伝達系と機能的連絡を持つのかは現時点では不明である。また、イオンチャンネルとの間に直接的な共役機構をもつNMDA受容体が、酵素的な細胞内物質代謝変化を誘発するのかどうかも明らかではない。その意味でも、NMDA受容体にさらにサブタイプが存在するという報告(7)は興味深い。前述のイノシトール燐酸生成調節機構におけるNMDA受容体の機能的役割の解析が、今後の検討課題として重要であろう。

［謝辞］

本研究の一部は文部省科学研究費(63571068)の援助のもとに行った。

［文献］

1.Baudry, M., Evans, J. and Lynch, G. (1986) Nature 319, 329-331.
2.Butcher, S.P., Roberts, P. J. (1981) Biochem. Pharmacol. 30, 3019-3022.
3.Ehlert, F.J., Roeske, W.R. and Yamamura, H.I. (1981) Fed. Proc. 40, 153-159.
4.Hill, D.R., Bowery, N.G. and Hudson, A.L. (1984) J. Neurochem. 42, 652-657.
5.Nicoletti, F., Meek, J.L., Iadarola, M.J., Chuang, D.M., Roth, B.L. and Costa, E. (1986) J. Neurochem. 46, 40-46.
6.Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
7.Perkins, M.N. and Stone, T.W. (1983) Brain Res. 259, 172-176.
8.Sharif, N.A. and Roberts, P.J. (1981) Biochem. Pharmacol. 35, 991-994.
9.米田幸雄、荻田喜代一 (1988) 神経精神薬理 10、139-157.
10.米田幸雄、荻田喜代一、大垣孝雄 (1988) 神経精神薬理 10、211-219.

191 温度依存性および非依存性 [^{3}H]グルタチオン結合活性

荻田喜代一、鈴木竹雄、米田幸雄
(摂南大・薬・薬理)

〔要約〕
脳シナプス膜標品中の [^{3}H]グルタチオン(GSH) 結合活性の性質について、反応温度 2℃の場合と30℃の場合を比較検討した。両反応温度でScatchard 解析を行った結果、反応温度 2℃条件下では単一成分系 (Kd値：0.77μM 、Bmax値：5.6 pmoles/mg protein)であるのに対して、反応温度30℃条件下では見かけ上二成分系 (Kd値：0.56および 12.6 μM 、Bmax値：2.5 および28.5 pmoles/mg protein)であった。Triton X-100による膜標品の前処理は、両反応温度における結合活性には著変を与えなかった。GSH の構成アミノ酸のうち、L-システイン(CySH)は反応温度に関係なく本結合活性を増強した。この増強効果はいずれの反応温度の場合も、不可逆的な低親和性部位の増加に起因することが判明した。中枢神経系において本結合活性は広く不均一に分布し、中でも網膜、視床下部、および線条体における温度感受性が顕著であった。以上の結果より、脳シナプス膜標品中には温度非依存性の高親和性 GSH結合部位と温度依存性の低親和性 GSH結合部位が存在する可能性が示唆される。

GSH は生体内に広く分布し、種々の重要な生理的役割を演じていることが判明している。しかしながら、中枢神経系における GSHの特異的役割については、ほとんど解析されていないのが現状である。筆者らは、 GSHおよび酸化型グルタチオン(GSSG)がシナプス膜における[^{3}H] グルタミン酸 (Glu)結合を強く阻害することを見出し、これらのペプチドが脳内の Glu作動性シナプス伝達機構に関与する可能性を報告した (2)。事実、脳シナプス膜標品中には高親和性、温度感受性、飽和性、構造選択性および立体特異性を持つ [^{3}H]GSH 結合活性が認められる (3)。また、この結合活性はCySHで増強されることから、CySHが [^{3}H]GSH 結合活性を調節する可能性が示唆されている (4,5)。本研究では温度感受性に注目して、温度依存性および非依存性結合活性の性質を比較検討するとともに、CySHの増強効果についてもさらに検討を加えた。

〔実験方法〕
脳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 (8)を調製したのち、50倍量の50 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)に懸濁して、50,000g 、30分間遠心分離した。この洗浄操作を3 回繰返したのち、沈渣を0.32 Mショ糖溶液に懸濁して-80 ℃で凍結保存した (7)。使用時には凍結懸濁液を室温融解し、上記洗浄操作をさらに 2回行った。

[^{3}H]GSH結合実験：通常はシナプス膜標品(約400 μg)を100 nM [^{3}H]GSH(NEN 、1 Ci/mmol)と50 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)中、 2℃あるいは30℃で60分間反応させた。反応停止はWhatman GF/Bグラスフィルターを用いた吸引沪過法により行い、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 (6)。

〔結果〕
脳シナプス膜標品への [^{3}H]GSH 結合活性は反応温度 2℃の場合よりも30℃の場合の方が高く、温度感受性が認められた(2℃：337 ± 26 fmoles/mg protein, 30℃：888 ± 104 fmoles/mg protein) 。Scatchard 解析により、反応温度 2℃条件下では結合は単一成分系であり、そのKd値およびBmax値はそれぞれ 0.77 ± 0.19 μM および 5.60 ± 1.90 pmoles/mg proteinであった。これに対して、反応温度30℃条件下では見かけ上高親和性部位と低親和性部位の2 成分から構成され、それらのKd値はそれぞれ 0.56 ± 0.11 および 12.6 ± 3.7 μM 、Bmax値はそれぞれ 2.50 ± 0.50および 28.5 ± 2.8 pmoles/mg protein であった。シナプス膜標品をTriton X-100(0.01-0.2%) で前処理したのち本結合活性を測定したが、いずれの結合活性にも有意な変化は認められなかった (図1)。GSH の構成アミノ酸である Glu、グリシン(Gly) 、およびCySHの添加効果を両反応条件で検討したところ、Glu およびGly はともに反応温度30℃条件下の結合活性を高濃度で阻害したが、 2℃条件下の結合活性には著変を与えなかった。一方、CySHはいずれの結合活性に対しても増強作用を発揮した (図2)。しかし、他のSH基含有化合物であるジチオスレイトール(DTT) およびジチオエリスリトール(DTE) は結合増強作用を示さなかった。Scatchard 解析により、反応温度 2℃の場合にはCySH(1 mM)の添加はKd値およびBmax値の両者の増加を惹起することが判明した。また、反応温度30℃の場合にはCySH(1 mM)の添加により結合は見かけ上単一成分系となり、低親和性部位の最大数が著しく増加することが明らかとなった。CySH(1 mM)

図1 Triton X-100前処理の影響

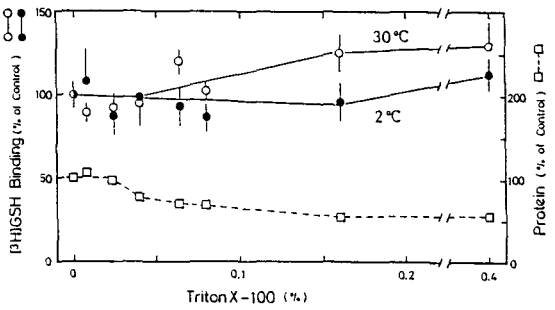


図2 GSH 構成アミノ酸の影響

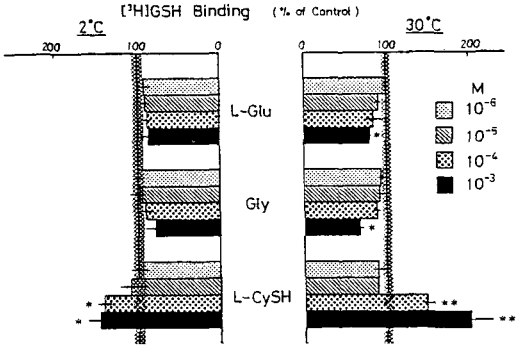


図3 CySH前処理の影響

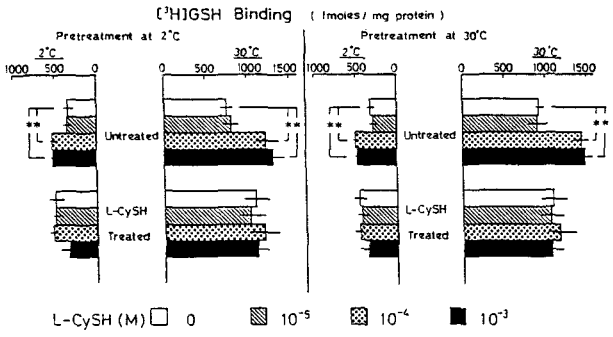
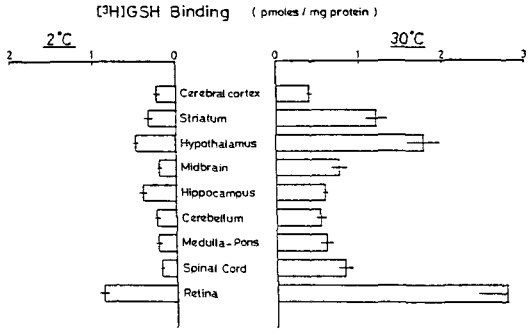


図4 中枢神経系内分布



によりシナプス膜標品を 2℃あるいは30℃で前処理したのち、CySH非存在下および存在下(10^{-5}-10^{-3} M)で [^{3}H]GSH 結合活性を測定すると、CySHによる前処理は処理温度に関係なくCySH添加による本結合活性の増強を消失させた (図3)。このようにCySHの結合増強作用は不可逆的であることが明らかとなった。本結合活性は中枢神経系に不均一に分布していたが、最も高い結合が見られたのは網膜であり、次いで視床下部、線条体の順であった。また、本結合活性の温度感受性は中枢神経系全体に認められ、中でも網膜、視床下部、および線条体の温度感受性が顕著であった (図4)。

〔考察〕

脳シナプス膜標品への [^{3}H]GSH 結合活性の機能的意義については現在のところ不明であるが、その可能性の 1つとして GSHの輸送系あるいは膜標品中の小胞構造物への取り込み系の関与などがあげられる。しかしながら、膜標品をTriton X-100で前処理した場合でも温度非依存性および依存性結合活性は減少しないことから、本結合活性が小胞構造物への取り込みを反映するとは考え難い。また、 GSHの輸送系の存在が明確である腎臓や小腸粘膜 (1)には本結合活性がほとんど認められないことから、既知の GSH輸送系を想定することも妥当ではないと思われる。CySHの結合増強作用がそのSH基に起因しないことは、 DTTや DTEが増強作用を持たないことからも明白であり、この増強効果はCySHの分子構造に特異的な現象であると思われる。このようなCySHによる特異的調節を受ける温度非依存性および依存性 [^{3}H]-GSH 結合部位を介して、脳内GSH が未知の特殊な機能的役割を演じているのかもしれない。

〔謝辞〕

本研究の一部は文部省科学研究費(63772026)の援助のもとに行った。

〔文献〕

1. Inoue, M. and Morino, Y. (1985) J. Biol. Chem. 240, 326-331.
2. Ogita, K., Kitago, T., Nakamuta, H., Fukuda, Y., Koida, M., Ogawa, Y. and Yoneda, Y. (1986) Life Sci. 39, 2411-2418.
3. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1987) Neurosci. Res. 4, 486-496.
4. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Brain Res. in press.
5. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Pharmacol. in press.
6. Ogita, K., Ogawa, Y. and Yoneda, Y. (1988) Neurochem. Int. in press.
7. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1987) Brain Res. 400, 70-79.
8. Zukin, S.R., Young, A.B. and Snyder, S.H. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4802-4807.

192 ストリキニーネ非感受性[^{3}H]グリシン結合

米田 幸雄、荻田 喜代一、鈴木 竹雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕

ラット脳シナプス膜標品中に[^{3}H]グリシン(Gly)結合活性が検出されたが、本活性はシナプス膜標品のTriton X-100 処理、あるいは反応温度の如何にかかわらず、ストリキニーネ、ピククリンおよびピクロトキシンの添加(10^{-6}-10^{-4}M)によって影響されなかった。Triton X-100 処理シナプス膜標品への結合活性は、蛋白依存性、反応時間依存性、反応温度逆依存性、可逆性、構造特異性、高親和性、および飽和性を示した。その結合部位はKd値 202 nM、B_{max}値 1.74 pmoles/mg proteinの単一成分から構成されることが判明した。以上の結果より、ラット脳内にはストリキニーネ非感受性[^{3}H]Gly結合部位が存在する可能性が示唆される。

哺乳動物中枢神経系の中でも特に脊髄において、Glyは抑制性神経情報伝達物質としての機能を持つものと解釈されている(1,2)。脊髄におけるシナプス後抑制の殆んどがストリキニーネによって遮断されること、あるいはGlyの脊髄における抑制作用がストリキニーネによって拮抗されること、などからストリキニーネはGlyのアンタゴニストであると考えられている。しかしながら、[^{3}H]ストリキニーネによって標識される脊髄内部位は、Gly受容体とは異なる可能性も示唆されている(3,10)。一方、最近の電気生理学的研究(4)によれば、大脳皮質培養細胞では興奮性アミノ酸受容体のサブタイプの一つであるN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体に対して、Glyがストリキニーネ非感受性の増強作用を発揮すると言う。このことは、哺乳動物中枢神経系において、Glyが二つの異なった機能的役割を演じる可能性を示唆するものである。したがって本研究では、脳内の[^{3}H]Gly結合部位の性質について検討を加えた。

［実験方法］

脳シナプス膜標品の調製：ラット全脳から粗シナプス膜標品(7)を調製後、本標品を50 mMトリス酢酸緩衝液(pH7.4)を用いて、50,000g、30分間の遠心分離による洗浄操作を3回行った(6)。沈渣は0.32 Mショ糖水溶液に懸濁状態で-80°Cにて凍結保存した(8)。使用時には室温融解後、標品を0.08% Triton X-100で2°C、10分間の前処理を行った。前処理後、前述の洗浄操作を2回行った標品を実験に供した。

[^{3}H]Gly結合実験：通常はシナプス膜標品(150-200μg蛋白)を10 nM [^{3}H]Gly (ARC, 40 Ci/mmol)と2°C、10分間同緩衝液中で反応させた。反応はWhatman GF/Bグラスフィルターを用いた吸引濾過法(9)で停止した。

［実験結果］

Triton X-100で前処理をしない脳シナプス膜標品中にも、[^{3}H]Gly結合活性が検出されたが、本活性は反応温度に感受性を示さず、またストリキニーネ、ピクロトキシン、あるいはピククリンの添加(10^{-6}-10^{-4}M)によっても全く影響されなかった。脳シナプス膜標品をTriton X-100で前処理すると、[^{3}H]Gly結合活性は著明に増強された。本結合活性は反応温度に逆依存し、反応温度を2°Cから30°Cに上昇させると活性は1/2以下にまで低下した(表1)。このTriton X-100処理膜への[^{3}H]Gly結合は、約300μgまでは用いた蛋白質量に比例して直線的に増加した(図1)。反応温度2°Cの場合は、反応開始後約10分で結合は平衡状態に到達し、この時点で非放射性1 mM Glyを添加すると、結合は急速に解離して10分以内に完全に消失した。一方、反応温度30°Cの場合は、結合は反応開始後1分以内に最大となり以後ゆっくりと減少した。この時点に非放射性Gly(1 mM)を添加すると、添加後30秒以内に結合は非特異的結合レベルまで低下した(図2)。種々の構造類似体の中で、D-セリンおよびD-アラニンは強い結合阻害能を発揮したが、L-セリン、L-アラニンあるいはβ-アラニンの阻害作用は比較的軽微であった(図3)。Scatchard解析の結果、本結合部位は単一成分から構成されることが判明し、その解離定数(Kd)は、202±53 nM、最大結合部位数(B_{max})は1.74±0.16 pmoles/mg protein であった。また、他のアミノ酸や化合物についても検索を進めたが、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-プロリン、タウリン、GABA、NMDA、カイニン酸、アドレナリン、ノルアドレナリン、アセチルコリン、セロトニンおよびヒスタミンのいずれも、本結合に対して著変を

表1　各種アンタゴニストの影響

Drug (M)	[^{3}H]Gly binding (fmoles/mg protein)			
	Untreated		Triton-treated	
	2 ℃	30℃	2 ℃	30℃
None	26.6 ± 4.2	22.6 ± 1.3	131 ± 11	54.9 ± 5.8
Strychnine				
(10^{-6})	26.0 ± 2.9	27.3 ± 4.6	136 ± 10	63.1 ± 8.6
(10^{-5})	25.5 ± 5.2	26.0 ± 4.6	130 ± 8	58.0 ± 11.5
(10^{-4})	26.8 ± 4.2	21.2 ± 3.7	128 ± 6	54.9 ± 5.7
Picrotoxin				
(10^{-6})	28.8 ± 4.4	24.1 ± 2.9	139 ± 15	54.4 ± 12.1
(10^{-5})	29.1 ± 5.5	20.5 ± 5.2	139 ± 10	58.0 ± 11.7
(10^{-4})	28.4 ± 4.7	20.6 ± 3.1	132 ± 12	55.8 ± 6.8
Bicuculline				
(10^{-6})	31.3 ± 3.9	24.5 ± 2.5	136 ± 11	60.3 ± 7.5
(10^{-5})	34.6 ± 5.0	24.2 ± 2.5	136 ± 12	63.6 ± 11.1
(10^{-4})	34.2 ± 3.3	27.1 ± 3.5	139 ± 7	63.9 ± 2.5

Each value represents the mean±S.E. obtained in four separate experiments.

図1　蛋白質依存性

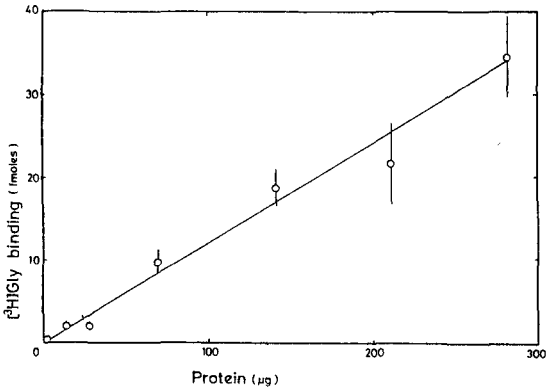


図2　反応時間および反応温度の影響

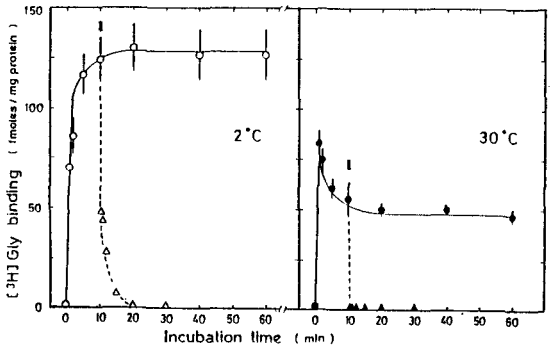
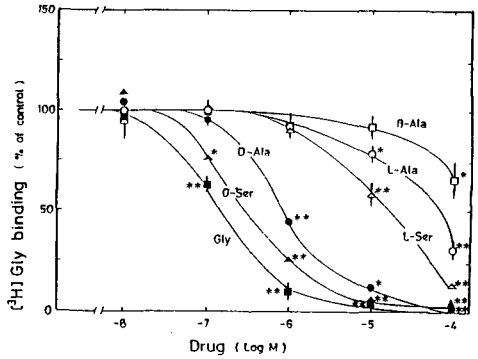


図3　構造類似アミノ酸の影響



与えなかった。

［考察］

本研究により、ラット脳シナプス膜には蛋白依存性、反応時間依存性、反応温度逆依存性、可逆性、構造特異性、高親和性および飽和性を示す[^{3}H]Gly結合部位が存在することが明らかとなった。本結合部位は、ストリキニーネに対する感受性を持たないことから、既報のストリキニーネ非感受性[^{3}H]Gly結合部位(5)と同一の部位と思われる。しかしながら、この[^{3}H]Gly結合がTriton X-100前処理によって著明に増強されること、あるいは反応温度に逆依存性を示すことなどは特に興味深い。NMDA受容体に対するGlyの増強作用が、ストリキニーネ非感受性であることを考慮すると、本結合部位がNMDA受容体との間に何らかの相互作用をもつ可能性は充分に考えられるものである。今後、これらの両結合部位を含めたNMDA/Gly/カチオンチャンネル受容体複合体の連関機構の解明やその生理的意義の解析は、早急に解決されるべき検討課題であろう。

［文献］

1.Aprison, M.H. and Nadi, N.S. (1978) Amino Acids as Chemical Transmitters (Fonnum, F., ed.), pp. 531-570. Plenum Press, New York.

2.Daly, E.C. and Aprison, M.H. (1974) J. Neurochem. 22, 887-885.

3.DeFeudis, F.V., Orensanz Munoz, L.M. and Fando, J.L. (1978) Gen. Pharmacol. 9, 171-176.

4.Johnson, J.W. and Ascher, .P. (1987) Nature 325, 529-531.

5.Kishimoto, H., Simon, J.R. and Aprison, M.H. (1981) J. Neurochem. 37, 1015-1024.

6.Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.

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.Young, A.B. and Snyder, S.H. (1974) Mol. Pharmacol. 10, 790-809.

193 [^{3}H]CPPによるNMDA受容体の標識

米田幸雄、荻田喜代一、香田知子
(摂南大・薬・薬理)

〔要約〕

Triton X-100で前処理したラット脳シナプス膜標品への[^{3}H]3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (CPP)結合は、反応温度に逆依存性を示し、反応温度30℃では極めて低い活性しか検出されなかった。これに対して反応温度2℃の場合は、蛋白量依存性、反応時間依存性および可逆性の[^{3}H]CPP結合が観察された。本結合はCPPばかりでなく、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)やL-グルタミン酸(Glu)の添加によっても急速に解離した。L-Gluやその構造類似体のL-アスパラギン酸(Asp)、L-システインスルフィン酸(CSA)あるいはL-ホモシステイン酸(HCA)なども、本結合を著明に阻害した。さらに、選択的 NMDAアンタゴニストである、DL-2-アミノ-5-ホスホノ吉草酸(AP5)やDL-2-アミノ-7-ホスホノヘプタン酸(AP7)も、強い結合阻害作用を発揮した。したがって[^{3}H]CPPは、NMDA受容体を標識するリガンドとして有用である可能性が示唆される。

脳内の興奮性アミノ酸受容体のサブタイプの1つであるNMDA受容体は、その機能的役割や病態生理学的意義が徐々に解明されつつあるのに対して(8)、生化学的な受容体結合実験で標識することは比較的困難なことがよく知られている。例えば、[^{3}H]NMDAや[^{3}H]DL-AP5、[^{3}H]DL-AP7などは、NMDA受容体を標識するリガンドとしては不適当である(4)。[^{3}H]Gluをリガンドとして用いると、特有のシナプス膜標品中にNMDA受容体が検出されるが(2,3,5)、これらの検出法は繁雑な標品分離操作を必要とするばかりでなく、受容体以外の膜蛋白に対する[^{3}H]Gluの結合も無視することが出来ない。一方、最近開発されたCPPは、AP5やAP7に比べてNMDAアンタゴニストとしては強力で、かつ特異性の高い化合物である(1)。したがって本研究では、この[^{3}H]CPP結合の性質について検討を加えた。

[実験方法]

ラット全脳から調製した粗シナプス膜標品を、50mMトリス酢酸緩衝液(pH 7.4)を用いて、50,000g、30分間の遠心分離操作により3回洗浄した。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(7)。使用時には本懸濁液を室温融解後、0.08% Triton X-100で2℃、10分間前処理した。前処理標品は、上述の洗浄操作を2回行ったのち実験に供した(5)。結合実験はこの懸濁液を同緩衝液中で、10nM [^{3}H]CPP(NEN,30.7 Ci/mmol)と2℃、10分間反応させて行った。反応は Whatman GF/B グラスフィルターを用いた吸引濾過法(6)で停止した。非特異的結合は1mM Glu 存在下の放射活性より算出した。

[実験結果]

反応温度30℃の場合は、Triton処理シナプス膜標品への[^{3}H]CPP結合活性は極めて低く、全結合量の80%前後が非特異的結合であった。これに対して、反応温度を2℃に下げると非特異的結合には著変はなく、全結合量のみが著明に増加して、結局全結合の70%が1mM Gluで置換された(図1)。この特異的結合は反応時間に比例して増加し、反応開始後約5分で結合は平衡状態に到達した。この平衡状態が得られた時点(10分)に、非放射性CPP(10^{-4}M)を添加すると結合は急速に解離し、添加後10分以内に結合は完全に消失した。リガンドである[^{3}H]CPPの濃度上昇に伴い結合は増加し、約400 nMで結合は飽和状態に到達した(図2)。この結果をScatchard plotで解析したところ、結合は解離定数(Kd) 123±17 nM、最大結合部位数(Bmax) 1.763±0.124 pmoles/mg proteinの単一成分から構成されることが判明した。

L-GluはD-Glu に比べてはるかに強く結合を阻害したが、D-AspはL-Aspと同程度の阻害能を示した。L-CSA、L-HCAおよびL-システイン酸にも結合阻害作用が見出された。NMDA自身もCPPよりは弱い結合阻害作用を発揮したが、選択的NMDAアンタゴニストのDL-AP5やDL-AP7も強く結合を阻害した(図3)。これら両化合物はともに、そのD体の方がL体よりも阻害作用が強力であった。一方、DL-2-アミノ-3-ホスホノプロピオン酸やDL-2-アミノ-4-ホスホノ酪酸は結合を阻害しなかったが、DL-2-アミノ-6-ホスホノヘキサン酸(AP6)は、D-Gluと同等度の弱い阻害能を示した。さらに、NMDAアンタゴニストとしての作用を持つ、α-アミノアジピン酸やγ-D-グルタミルグリシンなども本結合を阻害した。しかし

図1　蛋白質依存性

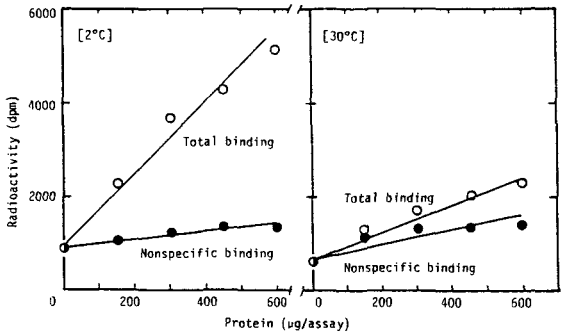


図2　リガンド濃度の影響

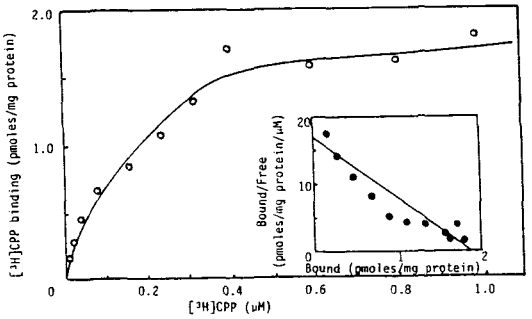


図3　NMDAアゴニストおよびアンタゴニストの影響

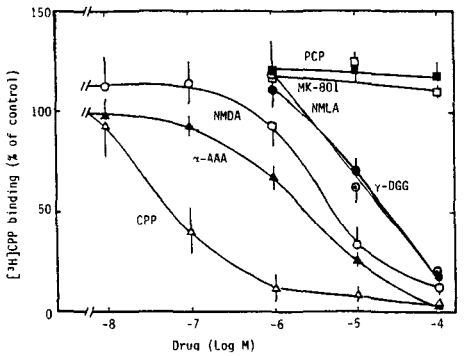


表1　各種トリプトファン代謝物、アミノ酸および神経伝達物質の影響

Compounds (10^{-4}M)	[^{3}H]CPP binding (% of control)	Compounds (10^{-4}M)	[^{3}H]CPP binding (% of control)
KYNN	93.5 ± 3.9	L-CySH	87.9 ± 4.9
KYNA	41.0 ± 5.7 **	L-CyssyC	51.4 ± 5.6 **
XTA	89.4 ± 5.7	L-Gln	11.1 ± 1.4 **
ATA	23.7 ± 6.8 **	L-Trp	81.2 ± 4.0
QNA	62.7 ± 7.3 *	ACh	86.4 ± 6.5
GABA	95.3 ± 4.3	5-HT	85.7 ± 5.9
Gly	94.7 ± 11.0	HA	64.0 ± 5.5 *
β-Ala	101 ± 5	NA	85.5 ± 6.2
Tau	91.9 ± 1.9	Ad	81.7 ± 5.6
L-Ser	76.4 ± 2.4	DA	89.1 ± 7.4
L-Pro	96.1 ± 22.5		

Each value represents the mean±S.E. obtained in four separate experiments.

ながら、非競合的NMDAアンタゴニストであるフェンシクリジンや(+)-5-methyl-10,11,-dihydro-5H-dibenzo[a,d]-cyclohepten-5,10-imine maleate(MK-801)は、結合に著変を与えなかった。キスカル酸(QA)にもD-Gluと同等度の結合阻害作用が観察されたが、QA受容体に対する特異性の高いDL-α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA)は結合に対して全く影響を与えなかった。また、カイニン酸は著明な作用を示さなかったが、L-グルタミン酸ジエチルエステルは弱い阻害作用を発揮した。 数多くの他のアミノ酸や化合物の中で、L-グルタミンが比較的強力に結合を阻害したが、キヌレン酸やキノリン酸による阻害は軽度であった(表1)。

[考察]

最近の研究報告(4)によれば、[^{3}H]CPP結合は反応停止を遠心法で行った場合にのみ観察され、吸引濾過法では特異的結合が検出されないと言う。しかしながら、本研究結果でも明らかな様に、吸引濾過法を用いても[^{3}H]CPP特異的結合の解析が可能であった。この原因はおそらくは、反応温度をはじめとする実験条件の相違によるものと思われる。NMDA受容体の正確な生化学的分析のためには、NMDA感受性[^{3}H]Glu結合(5)とともに、本研究で見られた様な[^{3}H]CPP結合についても、充分な検索を進めることが必要であろう。これらアゴニスト結合とアンタゴニスト結合の両面からの解析により、NMDA受容体の生化学的・薬理学的諸性質が解明されるものと思われる。

[文献]

1. Childs, A.M.,Evans, R.H. and Watkins, J.C. (1988) Eur. J. Pharmacol. 145, 81-86.
2. Fagg, G.E. and Matus, A. (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6876-6880.
3. Monahan, J.B. and Michel, J. (1987) J. Neurochem. 48, 1699-1708.
4. Murphy, D.E.,Schneider, J.,Boehm, C.,Lehmann, J. and Williams, M. (1987) J. Pharmacol. Exp. Ther. 240, 778-784.
5. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
6. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1987) Biochem. Biophys. Res. Comm. 142, 609-616.
7 Yoneda, Y. and Ogita, K. (1987) Brain Res. 400, 70-79.
8. 米田幸雄、荻田喜代一(1988)神経精神薬理10, 139-157.

194 2－deoxyglucose（DG）と2－Deoxyglucose－6－P（DG6P）の超微量測定法

赤林　朗，加藤　尚彦
（東大・医・脳研）

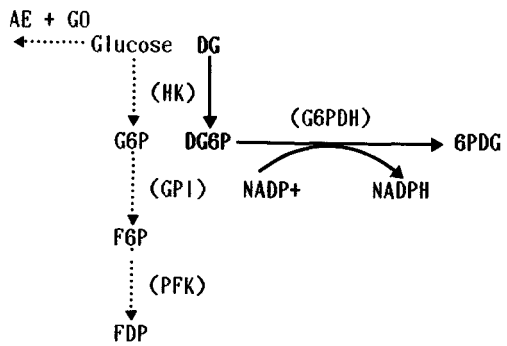
〔要約〕
Glucose-6-P dehydrogenase（G6PDH）が DG6P を glucose-6-P(G6P）の千分の一の速度で酸化することを利用して，0.1pmol 以下の DG と DG6P を測定できる超微量測定法を開発した．試料中の glucose と G6P を解糖系の酵素反応を用いて，fructose-1,6-diphosphate にして除去する．この反応で DG は DG6P となる．次にこの DG6P と試料中の DG6P を，過剰量の $NADP^+$ の存在下で G6PDH により NADPH に転換し，この NADPH を NADPサイクリング（酵素反応を利用する増幅反応）を用いて 10,000 倍以上に増幅して蛍光測定した．ラットの尾静脈に 0.5mmol/kgの DGを注入すると，4分後の脳脊髄微小領野中の DG 濃度は，小脳分子層＞脊髄前角≧小脳顆粒層＞網膜の順に高かった．DG6P 濃度は，ニューロンの細胞体が密集する 網膜＞小脳顆粒層＞脊髄前角の順に高かった．

Glucose の analog である DG は，glucose と同様にニューロンに取り込まれて代謝されるが，生成された DG6P は殆ど代謝されず細胞内に長く留まる（図参照．図中にこれから述べる酵素と代謝物の略号を示す）．Sokoloffらはこの性質を利用し，^{14}C-DG を用いて 脳領野に蓄積された DG6Pをオートラジオグラフにより半定量的に測定して，各領野のグルコース利用速度を推定する方法を考案した(1)．最近　Chiらにより，G6PDH は DG6P を G6P の約千分の一の速度で酸化することが示され，G6PDH を用いて DG と DG6P の酵素的測定法が工夫された(2)．そこで我々は，DG6P と同時に G6PDH により酸化され，高いブランクを与える glucose と G6P を酵素反応により効率よく除去する方法を工夫し，中枢神経系の微小領野や単一ニューロン内の DG とDG6P を定量できる超微量測定法を開発した．

実験方法

［測定試料］1）脳抽出液　マウス（ C57BL，オス，6週齢，16-18g，2匹 ）に DG 1.0 mmol/kg を腹腔内に注入し，液体窒素に投入して凍結した大脳の凍結粉末を調製して，0.1 M HCl-メタノールで抽出した(3)．2）凍結乾燥切片　ラット（ Sprague-Dawley，オス,6週齢，190-200g，2匹 ）に，DG 0.5 mmol/kg を尾静脈より注入し，4分後に液体窒素中に投入して瞬間凍結した．神経組織の厚さ15-25μm の凍結乾燥切片より，表に示した試料を切り出した（0.7-2.3 μg 乾燥重量，ref.3）．

［DG + DG6P 測定法］　まず 480nl の 0.1M HCl に直接秤量した試料を加え 90℃ 30 分 加熱して試料内の種々の酵素を変性させた後，480nl の 0.1M NaOH を加え中和した．続いて 480nl の反応液（300mM Tris-HCl,pH 8.1; 0.06% ウシ血清アルブミン(BSA);3mM $MgCl_2$; 150mM KCl; 1.5mM phosphoenolpyruvate;0.9mM ATP; 15μg/ml pyruvate kinase; 45 μg/ml HK; 30μg/ml GPI; 5μg/ml PFK)を加え，38℃で30分反応させてglucoseとG6PをFDPに転換して除去する（図参照．glucoseとG6P の除去反応）．この時 DG は HK により DG6P に転換され，試料内の DG6P に加わるが，DG6Pは



図．点線は除去反応を，実線は測定反応を示す．

Substrates
G6P, glucose-6-P
F6P, fructose-6-P
FDP, fructose-1,6-di-P

Analogs for assay
DG, 2-deoxyglucose
DG6P, 2-deoxyglucose-6-P
6PDG, 6-P-deoxygluconate

(Enzymes)
AE, aldose epimerase
GO, glucose oxidase
HK, hexokinase
G6PDH, G6P dehydrogenase
PGI, glucose-P isomerase
PFK, phosphofructokinase

GPI の基質とはならない。続いて 480nl の G6PDH 反応液（100 mM Tris-HCl,pH 8.1; 0.02 % BSA; 400 μM $NADP^+$, 200 μg/ml G6PDH）を加え 38℃ 30分 反応させた後，480nl の 0.7M NaOH を加え反応を止めた．70℃ 30分 加熱し，生成された NADPH を保存したまま過剰の $NADP^+$ を破壊した後，反応液全量を 50 μl の NADP サイクリング反応液に加えて，生成された NADPH を 3,000～12,000 倍に増幅して蛍光測定した(3,4)．

［DG6P 測定法］ 前述のように HCl と NaOH で処理した試料に，480 nl の除去反応液（前述の組成中 HK を除き，1.5 μg/ml AE と 180 μg/ml GO を添加 ）を加えて 38℃で 30 分反応させた．この時 glucose は AE と GO により取り除かれ(2)，また DG は HK がないので DG6P に転換されない（図参照）．次の DG6P 測定反応時 glucose はG6PDH により $NADP^+$ と反応し NADPH を生成し，高いブランクを与えるので，前もって除去せねばならない．続いて［DG + DG6P 測定反応］と同様に処理して，DG6P を NADPH に転換し蛍光測定する(3)．

DG は［DG + DG6P 測定値］より［DG6P 測定値］を差し引いて求めた（表参照）．

［脳抽出液の測定（通常の測定法）］ 抽出液試料 2 μl を 50 μl の除去反応液（DG + DG6P と DG6P 測定によって前述の様に組成を変える）に加え 38℃ 30分 反応させた後，50 μl の G6PDH 反応液を加えさらに38℃30分反応する．0.7M NaOH を50 μl 加えて 70℃ 30分 加熱後，1.0 mlの 6M NaOH 溶液（10mM Imidazol と3mM H_2O_2 を含む）を加え，強アルカリ下で 60℃ 20分 加熱して NADPH の蛍光の約 10 倍強い蛍光物質を生成して測定した(3)．

［測定法の特徴］ 通常の抽出液測定では 0.1 - 2 nmol，乾燥試料の増幅測定法では，10,000 倍の増幅により 0.1- 2 pmol の測定が可能であった（結果は表参照）．反応液量を 10 nl にし，1,000,000 倍の増幅を行えば，単一ニューロンの測定も可能である．Chiらの測定法では，glucose と G6P を G6PDH を用いて NADPH へ転換し，酸を加えて NADPH を破壊してglucose と G6Pを除去し，NaOHを加えて中和した後に，残存するDG6P を再び G6PDH で NADPH へ転換し測定するというように，複雑な操作をせねばならない．従って微量測定には不向きである．本法では DG の代謝的特性を利用し,効率よく glucose と G6P を除く反応系を工夫した．

結果及び考察

［マウス脳抽出液中の DG6P 及び DG 濃度の時間経過］ 腹腔内に DG を投与した時，脳内濃度は以下のとおりである。 DG: 1.20 mmol/kg 乾燥重量 (5分，DG 投与後凍結までの時間．以下同じ)，1.80 (10分)，1.32 (20分)；DG6P: 0.20 (5分)，0.90 (10分)，1.26 (20分)［各 2 匹のマウスの平均］．静脈内投与では，脳組織内の DG 濃度レベルは１分以内にプラトーに達し，５分迄はそのレベルを維持するのに比べ，腹腔内投与では 10 分後になだらかなピークを示す．DG6P 濃度は腹腔内投与後 20 分まで徐々に増加した．中枢神経系の各微小領野内の一定レベルの DG 濃度と ，そのときの DG6P レベルを求めるため，以下では静脈内投与を行った．

［ラット神経系組織内の DG6P 及び DG 濃度］ DG 静脈内投与後のDG 濃度は，小脳では 分子層＞顆粒層＞白質，脊髄では 前角＞白質の順に高かった。 DG6P 濃度は，小脳では 顆粒層＞分子層＞白質，脊髄では 前角＞白質 の順に高く，網膜が最高濃度を示した（表）．ニューロンの細胞体が高密度に集合する小脳顆粒層や網膜でDG6Pの濃度が高く，活発なエネルギー代謝が進行していることを示している．また樹状突起やシナプス（小脳分子層に多く含まれる）の DG 濃度は高く，glucoseを活発に取り込むが，細胞体（顆粒層に多い）よりエネルギー代謝速度は低いと考えられる．

表． ラット神経組織中の DG 及び DG6P 濃度

	DG+DG6P (A)	DG6P (B)	DG (A - B)
	mmol/kg 乾燥重量 ± SEM		
小脳			
分子層	3.88 ± 0.09	1.58 ± 0.06	2.30
顆粒層	3.92 ± 0.11	2.05 ± 0.09	1.87
白質	1.22 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.83
脊髄			
前角	3.09 ± 0.06	1.21 ± 0.03	1.88
白質	0.99 ± 0.03	0.24 ± 0.01	0.75
神経網膜	4.10 ± 0.18	2.56 ± 0.05	1.54

測定試料数，10; ２匹のラットから各 5 試料

［ 文献 ］1) Sokoloff,L. et al.(1977) J.Neurochem. 28,897-916. 2) Chi,M.M.-Y et al.(1987) Anal. Biochem. 161, 508-513. 3) Lowry,O.H. and Passonneau,J.V. (1972) in "A Flexible System of Enzymatic Analysis", pp. 8-14, pp. 124-125, pp. 236-260, Academic Press, New York. 4) Chi,M.M.-Y et al.(1978) Anal.Biochem. 89,119-129.

195 脳微小血管培養細胞の炭水化物代謝に及ぼす神経伝達物質の影響

山本秀子、M.Spatz*、 N.Merkel*、J.Bembry*、B.Wroblewska*、三国雅彦、高橋清久
（国立精神神経センター・疾病３部、ＮＩＨ，ＮＩＮＣＤＳ*）

〔要約〕ラット脳微小血管構成成分である内皮細胞と平滑筋細胞を経代培養して神経伝達物質に対する細胞内エネルギー代謝に及ぼす影響を比較した。セロトニン(5-HT)はどの細胞のグリコーゲン(GLN) 含量も増加させたがそれはとくに内皮細胞系に顕著にみられた。一方、ノルエピネフリン(NE)は GLN分解を促進した。シクロオキシゲナーゼ阻害剤インドメタシンは5-HTまたはNEの GLN含量に対する作用を各々の細胞系で異なる修飾を示したことから、平滑筋培養細胞系でのエネルギー代謝はプロスタグランディン系が関与することを示唆した。また内皮細胞ではβ2-受容体を介することを見いだした。脳微小血管についてコレシストキニンオクタペプタイドサルフェイト(CCK8)受容体は報告されていないが、これらの培養細胞の代謝がCCK8により変化し、培養筋細胞で収縮が見られたことから脳微小血管に受容体が存在する可能性を示した。

脳血管上またはその近傍にNE、5-HT、ドーパミン、アセチルコリン、ペプチド系神経終末が観察され、脳血流(CBF)、血液脳関門透過性(BBB) 及び血圧(BP)への複雑な神経支配についての形態学的証拠が蓄積されている。しかし、毛細血管、小動脈等を構成する各々の細胞がCBF、BBB、BPの制御にかかわる機構を検討する事は困難であった。最近 Spatzらは脳毛細血管、脳毛細血管と小動脈から内皮細胞と平滑筋細胞を分離して培養し、その性質と受容体についての知見を得ている(1-3)。一般にモノアミンは血管収縮または弛緩させるときにグリコーゲン分解を伴うことが知られているが、神経伝達物質の脳微小血管の炭水化物代謝への影響についての報告は乏しい。そこでこれらの培養細胞がモノアミンおよびCCK8によってどのような炭水化物代謝の変動を受けるかを検討した。

［実験方法］

Spatzらの方法(1,2) によりラット２日令脳からメッシュ分離にて毛細血管、小動脈を調製し、酵素処理後、内皮細胞と平滑筋細胞を各々経代培養し、３－７代目を実験に用いた。GLN,グルコース(Glu),酪酸、ATP、P-クレアチンの測定はLowryらの方法によった(4)。 5-HT、NEは５uM、シクロオキシゲナーゼ阻害剤インドメタシンまたはイブプロフェンは10uM、ブトキサミン、プラゾシンは10uMを単独または組合わせて1-20%牛胎児血清を含む培養液に 24-72時間さらした培養細胞に添加した。またCCK8(0.2-5.0uM) はバシトラシン(30uM)存在下、牛胎児血清非存在下で培養細胞に添加した。PGI_2の安定な代謝物である 6-KetoPGF$_{1\alpha}$は培養細胞培養液を [^{125}I] 6-KetoPGF$_{1\alpha}$アッセイキットにより測定した。

［結果］

培養細胞は培養液の牛胎児血清濃度に関りなく高濃度のGLN と低濃度のATP,P-クレアチン量を示した。対照群の平滑筋細胞のGlu、GLN、酪酸、ATP、P-クレアチン濃度は 11.81±1.2, 203.3±11.0,10.58±0.41, 1.96±0.05, 1.32±0.05 nmol/mg protein (n=40)。内皮細胞では23.8±1.36,309±32.6, 10.7±0.67, 2.04±0.10, 1.81±9nmol/mg protein (n=8)であった。両方の細胞系で5-HT添加によりGLN 含量は増加し、NE添加によりGLN 含量は減少した。インドメタシンは平滑筋細胞のATP、酪酸量に影響することなく、GLN 含量を増加した。5-HTは相乗効果は示さず若干減少させた。一方内皮細胞ではインドメタシンまたはイブプロフェンで変化はなかったが、インドメタシンと5-HTはGLN 含量を極めて増加させ、酪酸量を減少させた。対照群の培養液に含まれる 6-KetoPGF$_{1\alpha}$量は平滑筋細胞では 990±91pg/mg protein (n=6),内皮細胞では1734.9±352pg/mg protein (n=6)であった。インドメタシン、イブプロフェンは 85-92%のPGI_2合成を阻害した。5-HT、NE添加は様々な程度のPGI_2放出を引き起こし、それはアラキドン酸の量に依存すると考えられた。またにCCK8添加はPGI_2合成には影響しなかった。表1,2 に示したようにβ2-アンタゴニスト、ブトキサミンは内皮細胞でPGI_2合成に関らずにNEによる GLN分解を抑制したが、平滑筋細胞ではシクロオキシゲナーゼ阻害剤の前処置とブトキサミンまたはブトキサミンとα1-アンタゴニスト、プラゾシン添加によりNEによる GLN分解を抑制した。CCK8添加は表3,4 に示したように内皮細胞で GLN含量の増加が認められ、平滑筋細胞ではATP,P-クレアチン量が極めて増加し、培養細胞の収縮が観察された。

[考察]

本実験は未だ知られていなかった脳微小血管構成細胞のアミン、ペプチド刺激によるエネルギー代謝を測定し、それが神経伝達物質に反応することを明らかにした。5-HTによるGLN 含量増加に対するシクロオキシゲナーゼ阻害剤の作用が内皮細胞と平滑筋細胞とで異なったことから細胞内GLN 調節がこれらの細胞で異なることを示唆した。平滑筋細胞での5-HTによるGLN 含量増加は細胞中また培養液中の Glu量に変化がみられないことから、GLN 合成酵素活性化というよりは5-HTとPGI_2の相互作用によりGLN 分解が阻害されたのではないかと考えられる。そしてNEによる GLN分解が平滑筋細胞でシクロオキシゲナーゼ阻害剤β2-またはα1-アンタゴニストとの組合わせにより抑制されたことはPGI_2がGLN 代謝に関与することを強く示唆した。一方、内皮細胞では GLN分解は明らかにβ2-受容体を介しているが明らかになった。これまでに脳血管に対するCCK8受容体の報告はないが、Hendryら(5) はCCK8神経終末の血管近傍への存在を報告している。今回CCK8が培養細胞のエネルギー代謝に影響を及ぼしたことはこのペプチドがBBB, CBF等に関与する可能性を示唆するもので興味深いことである。

[文献]

(1)Spatz,M., Bembry,J., Dodson,R.F., Hervonen,H. and Murray,M.(1980) Brain Res., 191, 577-582.

(2)Spatz,M., Dodson,R.F., and Bembry,J.(1983) Brain Res., 280, 387-391.

(3)Spatz,M. (1986) In: Mechanisms of Secondary Brain Damage, edited by A.Baethmann, K.G.Go, and A.Unterberg, pp.283-294.

(4)Lowry,O.H., and Passoneau,J.V. (1972) A Flexible System of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York.

(5)Hendry,S.H.C., Jones,E.G., and Beinfeld,M.C. (1983) Proc.Natl.Acad.USA, 80, 2400-2404.

Table 1 Norepinephrine induced glycogenolysis without stimulation of 6-keto PGF1α production.

	Endothelium	Smooth muscle
	(% of Controls)	
NE	41.3 ± 3.0 (20)	37.9 ± 3.5 (15)
B + NE	66.2 ± 3.4 (8)***	30.7 ± 2.6 (12)
I + B + NE	33.5 ± 15 (4)	87.7 ± 4.3 (4)***
I + NE	34.5 ± 2.0 (4)	37.2 ± 2.7 (4)

NE=norepinephrine; B=Butoxamine; I=Indomethacin. PGI_2 release in the medium of cells exposed to NE [5 μM(1 hr)] was not significantly different from that found prior to NE addition or in the medium of control cultures. ***, p<0.001.

Table 2 Norepinephrine induced glycogenolysis associated with 6-keto PGF1α production.

	Endothelium	Smooth Muscle
	(% of Controls)	
NE	44.6 ± 2.6 (16)	42.2 ± 1.6 (15)
I + NE	32.4 ± 2.0 (4)	37.2 ± 2.7 (4)
B + NE	67.5 ± 1.2 (4)***	35.6 ± 6.0 (4)
I + B + NE	38.3 ± 2.2 (3)	43.7 ± 1.8 (4)
I + B + P + NE	—	69.3 ± 2.5 (4)***

NE=Norepinephrine, I=Ibuprofen, B=Butoxamine, P=Prazosin. Each cell type exposed to NE [5 μM(1 hr)] stimulated PGI_2 release (50%) above that found in the medium prior to NE addition or in the medium of control of cultures. ***, p<0.001.

Table 3 Response of carbohydrate and energy metabolites to CCK-8S in cultured endothelial cellular elements.

Substance	B.(30μM)	B.+CCK-8S(0.5μM)	B.+CCK-8S(1μM)
Glucose	100 ± 3.1 (9)	102.7 ± 4.9 (9)	102.9 ± 3.9 (9)
Glycogen	100 ± 6.3 (9)	141.4 ± 4.8 (9)***	127.5 ± 4.4 (9)**
ATP	100 ± 4.5 (9)	123.1 ± 4.7 (9)**	113.6 ± 4.1 (9)*
P-creatine	100 ± 6.2 (9)	111.0 ± 4.3 (9)	103.8 ± 2.7 (9)
Lactate	100 ± 7.8 (9)	118.7 ± 8.3 (9)	103.6 ± 7.4 (9)

B.=Bacitracin, CCK-8S=Cholecystokinin-8-sulfate. Values shown are percent of control(B.treated group) as the means ± SEM of nine representative cultures assayed in duplicate. *, p<0.05. **, p<0.01. ***, p<0.001.

Table 4 Response of carbohydrate and energy metabolites to *CCK-8S in cultured smooth muscle* cellular elements.

Substance	B.(30μM)	B.+CCK-8S(0.5μM)	B.+CCK-8S(1μM)
Glucose	100 ± 5.6 (8)	100.5 ± 7.1 (7)	104.2 ± 11.4 (8)
Glycogen	100 ± 5.4 (8)	105.8 ± 7.9 (8)	124.3 ± 10.2 (8)
ATP	100 ± 10.5(8)	170.3 ± 16.1(8)**	162.6 ± 22.0 (8)*
P-creatine	100 ± 8.8 (8)	168.3 ± 11.7(8)***	187.8 ± 13.9 (8)***
Lactate	100 ± 9.5 (8)	88.8 ± 14.3(8)	94.6 ± 16.7 (8)

B.=Bacitracin, CCK-8S;Cholecystokinin-8-sulfate. Values shown are percent of control(B.treated group) as the means ± SEM of several representative cultures assayed in duplicate. *, p<0.05. **, p<0.01. ***, p<0.001.

196 シナプトゾーム内GABAのコンパートメントについて

朝倉　正、　松田　誠
（慈恵医大、医化学）

〔要約〕

シナプトゾーム(Syn)内の伝達物質γ-アミノ酪酸(GABA)代謝のコンパートメントについて調べた。

①Synに^{3}H-GABAを添加すると速やかに取り込まれ、時間と共に分解されるが、GABAの分解阻害剤であるgabaculine(GC)を添加しておくとこの分解は完全に阻害され、^{3}H-GABAは蓄積した。一方、Synに^{14}C-グルタミン酸(^{14}C-Glu)を添加すると、この^{14}C-Gluからの^{14}C-GABAの合成は盛んに行われるが、生成^{14}C-GABAに対するGCの添加効果は 全く認められなかった。　②①でSyn内に存在する^{3}H-GABAおよび^{14}C-GABAはGABAや2,4-ジアミノ酪酸(DABA)の添加によって有意に交換されるが、β-アラニンの添加によってはほとんど交換されなかった。　③脱分極刺激によるGABA放出をCa^{2+}依存性・非依存性について調べると、^{3}H-GABAの放出はCa^{2+}依存性・非依存性共に認められるが、GC阻害によって増量するのはCa^{2+}非依存性の放出のみであり、Ca^{2+}依存性の放出には変化がなかった。^{14}C-GABAの放出もやはりCa^{2+}依存性・非依存性共に認められたが、GC阻害による変化は全く認められなかった。

以上のことから、Syn内にはGABAに対して分解のためのpoolと放出のためのpoolとが存在し、Gluから合成されたGABAは分解されることなく放出のために貯蔵され、取り込まれたGABAのみが分解されるのではないかと考えられた。また、放出のためのpoolにおいてもCa^{2+}依存性と非依存性に違いがあるように思われた。

神経終末において抑制性伝達物質γ-アミノ酪酸(GABA)は、「グルタミン酸(Glu)からの合成→刺激による放出→取り込み→分解」という一連の過程により伝達の制御が行われているが、Gluから合成されたGABA(合成GABA)と 放出された後取り込まれたGABA(取込GABA)とでは、そのコンパートメントにおいて違いがあることが Abeら(1)やWoodら(7)の in vivoの実験によって示された。すなわち、取込GABAの方が合成GABAよりもより分解されやすく、また合成GABAの方が刺激によって放出されやすかった。そこで、本実験ではシナプトゾーム(Syn)を用いて^{14}C-Gluを添加後Syn内で合成された^{14}C-GABAと ^{3}H-GABAを添加後Syn内に取り込まれた^{3}H-GABAとの分解の違いについて,GABA分解酵素(GABA transaminase)の阻害剤gabaculine(GC)に対する態度、GABAおよび GABA analogueによる交換能、さらに、脱分極刺激による放出量の面から検討した。

＜方法＞

Synの調製：マウス(DD系、雄、5週齢)脳よりGrayら(3)の方法に準じて粗ミトコンドリア分画を得、さらにSellströmら(6)の方法に準じFicoll-sucroseの密度勾配遠心法によりSynを調製し,Krebs Ringer bicarbonate(KRB,pH7.4)に懸濁した。

取込GABAおよび合成GABA：Syn(0.1g brain)に^{3}H-GABA(1.0μM)または^{14}C-Glu(1.0μM)を添加し,37℃で反応した後 Syn内の^{3}H-GABAまたは^{14}C-GABAをDowex 50(H^{+})あるいはDowex 1(CH_3COO^{-})カラムでそれぞれ分画し測定した。GC(1.0μM)は ^{3}H-GABAおよび^{14}C-Glu添加前に加え 37℃、5分間反応した。

GABA,GABA analogueによる取込GABAおよび合成GABAの交換：^{3}H-GABAまたは^{14}C-Gluを添加後、37℃でそれぞれ10分、30分間反応し、遠心後沈澱をKRBで懸濁し、GABA、2,4-ジアミノ酪酸(DABA)、β-アラニン(β-Ala)を各1mM添加し37℃、10分間での外液中の^{3}H-GABA、^{14}C-GABAをそれぞれ測定した。

取込GABAおよび合成GABAの放出：上記の方法で^{3}H-GABA、^{14}C-Gluを取り込ませたSynを灌流法(2,4,5)により、Ca^{2+}共存下・非共存下における高K^{+}(56mM)の脱分極刺激を行い、放出された^{3}H-GABAおよび^{14}C-GABAを測定した。

＜結果および考察＞

取込GABAの分解ならびに合成GABAの分解に対するGCの阻害効果

取込GABAは急速に増加(2分)した後、時間と共にゆっくりと分解され 減少し60分後に最大取り込み量の約40%になった。しかし、GC(1.0μM)の添加ではこのGABAの減少は完全に阻害された。これとは反対に、合成GABAの方は時間と共に増加するが、GCの添加には全く影響しなかった(図1)。このことは、取込GABAは GABA transaminaseによって分解されやすく、反対に合成GABAは分解されにくいという 少なくとも2つのプールが存在することを示している。GABA transaminaseの非特異的阻害剤であるアミノオキシ酢酸は、GABA合成酵素(Glutamic acid decarboxylase)をも阻害するため、このような両コンパートメントの存在を示すことはできなかった。

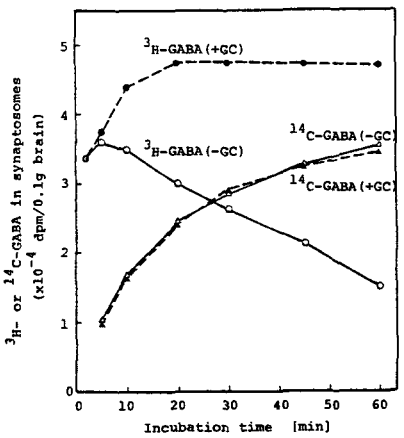


図1．Syn内の取込GABA(^{3}H-GABA)および合成GABA(^{14}C-GABA)量におけるGCの効果

取込GABA、合成GABAの添加GABA、GABA analogueによる交換

GABAおよびDABAの添加による取込GABA、合成GABAの交換は共に30-55%(GABA),20-35%(DABA)であったのに対し、β-Alaの添加による交換は取込・合成GABA共に2-5%と非常に少なかった(表1)。GABAおよびDABAは神経組織のGABAの交換を行うのに対し、β-Alaはグリアの GABAを交換するするといわれているので、β-Alaの効果がないということは取込GABAと合成GABAの違いはグリアの混在による現象ではなく Syn内での現象を表していると思われる。取込GABAプールの性質はGABAを取り込み 分解する点でグリア細胞の性質によく似ている。従って、このプールにグリア細胞が混在していないことを証明しなければならない。上の実験は、取込GABAプールはグリア細胞とは違うということを示したものできわめて重要である。

表1．GABAおよびGABA analogueによる取込GABAおよび合成GABAの交換

	Taken up GABA		Synthesized GABA	
	-GC	+GC	-GC	+GC
GABA	53.93	39.82	34.37	31.21
DABA	34.66	27.42	20.81	21.21
β-Ala	5.48	5.53	2.05	2.86

(% of exchange)

脱分極刺激による放出

取込GABAおよび合成GABAの脱分極刺激によるCa^{2+}依存性、非依存性放出の相違を調べた(図2)。まず、取込GABAはCa^{2+}依存性・非依存性共に認められるが、GCの添加で増量した取込GABAはCa^{2+}依存性の放出にはほとんど関与せず、もっぱらCa^{2+}非依存性放出にのみ関与した。一方、合成GABAにもCa^{2+}依存性・非依存性放出が共に認められるが、GCの影響は全く認められなかった。

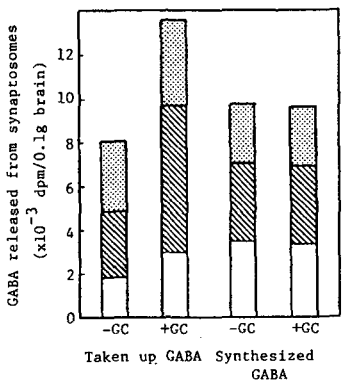


図2．取込GABA、合成GABAのCa^{2+}依存性(▨)・非依存性(▩)放出におけるGCの効果 □：自然放出

以上のことは、GABAはSyn内ではいくつかのプールに分かれて存在し、各プールの間にはいろいろな複雑な移行があることを示している。GCにより取込GABAプールが肥大し、Ca^{2+}非依存性GABAの放出も増大するなどは、取込GABAプールとCa^{2+}非依存性GABAプールの流通が密であることを示す例である。

＜文献＞

1)Abe,M. & Matsuda,M.(1983) Neurochem.Res.,8:563-573. 2)Asakura,T. et al.(1982) J.Biochem.,92:1919-1923. 3)Gray,E.G. & Whittaker,V.P.(1962) J.Anal.,96:79-88. 4)Hoshino,M. et al.(1979) J.Nutr.Sci.Vitaminol.,25:367-374. 5)Raiteri,M. et al.(1974) Eur.J.Pharmacol.,25:411-414. 6)Sellström,Å. et al.(1975) J.Neurochem.,25:393-398. 7)Wood,J.D. et al.(1988) J.Neurochem.,50:1839-1843.

197 牛脳内遊離アミノ酸分画からの５種のメチルアミノ酸とβ－アラニルハイプシンの単離精製及び同定

胡谷和彦　柿本泰男
（愛媛大学医学部精神科）

〔要約〕 牛脳３個分、約１kg相当を出発材料として、ＴＣＡを用いて除蛋白を行ない、さらに２段階のクロマトグラフィーによって塩基性脂肪族アミノ酸分画を得た。この分画を陽イオン交換樹脂上でアンモニアの段階的濃度勾配によって展開し、各分画を高圧濾紙電気泳動によって分析した。その結果から従来未知と思われる化合物をＡ～Ｆと命名した。これらの化合物をさらに陽イオン交換樹脂を用いるクロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィーによって精製した。

各化合物をペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーによって合成品と比較して同定した。すなわち化合物Ａ、Ｂ、Ｄ、Ｅ、Ｆはそれぞれ蛋白中に存在の知られている[2]ジメチルリジン、トリメチルリジン、N^G,N^Gジメチルアルギニン、N^G,N'^Gジメチルアルギニン、N^Gモノメチルアルギニンと同定した。未知の化合物Ｃについてはダンシル化を行い、Ｎ末端がβ－アラニン、Ｃ末端がハイプシンのジペプチドと同定した。

著者の研究グループでは以前から哺乳動物の脳の遊離アミノ酸、低分子量のペプチドの分離同定を行い、酸性ペプチドとしては、８種類のγ－グルタミルペプチドを見いだした。また塩基性アミノ酸としては、ハイプシン[4]、プトレアニン、塩基性ペプチドとしては、γ－アミノブチリルハイプシン[3]、ホモカルノシン、ホモアンセリン、γ－アミノブチリルリジン、β－アラニルリジン、を見いだした。

またヒト尿中アミノ酸から塩基性アミノ酸のメチル体の発見[1]に続いて、その起源が蛋白中のアミノ酸の修飾による事を見いだし、蛋白のメチル化の研究を行って来た。その後、化合物の精製法やＨＰＬＣを始めとする微量定量や検出が可能となった事により、ふたたび脳の遊離のアミノ酸、ペプチドの分離同定を試みた。

その結果二群の化合物が新たに分離された。すなわち一つの群はメチルアミノ酸で、ジ及びトリメチルリジン、N^Gモノメチルアルギニン、N^G,N'^Gジメチルアルギニン 、N^G,N^Gジメチルアルギニンであった。もう一つの群はハイプシンを含む小ペプチドで、β－アラニルハイプシンであった。

【方法及び結果】

牛脳３個分、1,090ｇを出発材料とした。牛脳は屠殺場より新鮮なものを得、氷冷化で軟膜血管を取り除き、表面を0.9％食塩水５ℓで洗浄し付着した血液をできるだけ除いた。これを10％ＴＣＡでホモジナイズし、それに5％ＴＣＡ2ℓを加え3,000回転、20分間遠心して上清を集めた。さらにその沈渣に5％ＴＣＡ4ℓを加えて遠心し再び上清を集めた。２回分の上清を集めて濾過した後、Amberlite CG－120（H^+FORM、100-200Mesh、4.5X15cm）に通し、水1ℓで洗浄した後、1M ピリジン1ℓで洗い、4Mアンモニア1.5ℓで溶出した。

この分画をロータリーエバポレーターで減圧乾固してアンモニアを除去した後、水約100ｍｌ中に溶解して、Amberlite CG-50（NH_4^+FORM、100-200Mesh、4.5X9cm）に通し、水1ℓで洗浄した後、2Mアンモニア1ℓで溶出して、これを減圧乾固し、塩基性脂肪族アミノ酸分画を得た。

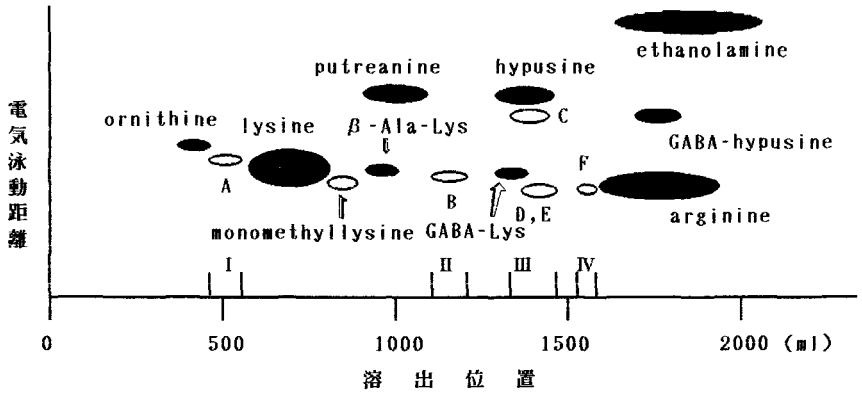
この分画をロータリーエバポレーターで減圧乾固してアンモニアを除去した後、水に溶解してAmberlite CG-120（NH_4^+FORM、200-400Mesh、3X43cm）カラム上で、アンモニア濃度を段階的に上げてクロマトグラフィーを行った。最初、水200mℓで洗浄しこれを捨て、その後0.3Mアンモニア400ml、0.45Mアンモニア400ml、0.5Mアンモニア650ml、１Mアンモニア550ml、1.5Mアンモニア500mlで段階的に溶出し、１フラクション10mlずつ集めてうち5μlを高圧濾紙電気泳動で分離後ニンヒドリン反応で分析した。

【化合物の精製】

上に述べた塩基性脂肪族アミノ酸分画の展開の結果を高圧濾紙電気泳動で分析したものを図１に示す。その中で既知

の化合物を除いて未知と思われる物質をA～Fと命名し、これらの化合物を含むフラクションをフラクションⅠ～Ⅳとした。

図 1



化合物A：フラクションⅠをAmberlite CG-50 (NH_4^+FORM、200-400Mesh、1.2X30cm）に通し、0.1Mアンモニアで溶出、26～30mlの分画を集めた。高速液体クロマトグラフィー上でピークは単一となった。

化合物B：フラクションⅡをDowex50WX8 (NH_4^+FORM、200-400Mesh、1.2X30cm)に通し、0.5Mアンモニアで溶出し、60～72mlの分画を集めた。高速液体クロマトグラフィー上でピークは単一となった。

化合物ＣＤＥ：フラクションⅢをDowex50WX8 (NH_4^+FORM、200-400Mesh、1.2X30cm)に通し、0.8Mアンモニアで溶出し、58～76mlの分画と38～54mlの分画とを集めた。58～76mlの分画は高圧濾紙電気泳動上で一つの濃いスポットと少しずれる薄いスポットを含んでおり、両者をさらに高速液体クロマトグラフィーを用いて分離した。それぞれ薄層クロマトグラフィー上単一のスポットとなったので化合物Ｄ、Ｅとした。

38～54ｍｌの分画は高圧濾紙電気泳動上、２つのスポットを示した。この分画をロータリーエバポレーターで減圧乾固しさらに0.4Mアンモニアで平衡化したAmberlite CG-50(NH_4^+FORM、200-400Mesh、1X27cm)に通し、0.4Mアンモニアで溶出し、24～30mlの分画と32～48mlの分画を集めた。どちらの分画も高速液体クロマトグラフィー上、単一のピークを示した。あとのほうの分画はハイプシンと一致し、前の方の分画は未知の化合物Ｃとした。

化合物Ｆ：フラクションⅣをDowex50WX8 (NH_4^+FORM、200-400Mesh、1.2X30cm)に通し、1Mアンモニアで溶出し、60～80mlの分画を集めた。高速液体クロマトグラフィー上でピークは単一となった。

【化合物の同定】

化合物Ａ～Ｆまでについてそれぞれに、高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、高圧濾紙電気泳動を行い、既知の化合物と比較することによって同定を行った。化合物Ａ、Ｂ、Ｄ、Ｅ、Ｆは、それぞれ既知のジメチルリジン、トリメチルリジン、N^G,N^Gジメチルアルギニン、N^G,N'^Gジメチルアルギニン、N^Gモノメチルアルギニンと一致した。化合物Ｃについてはハイプシンとβーアラニンのペプチドと考えられたのでダンシル化を行い、Ｎ末端をβーアラニン、Ｃ末端をハイプシンと決定した。このときほぼ等量の２種類のダンシル化合物のみが検出され他の化合物は検出されなかった。また化合物Ｃを加水分解すると等モルのβーアラニンとハイプシンを生じた。この結果より化合物ＣはＮ末端がβーアラニン、Ｃ末端がハイプシンのジペプチドと同定された。

【文献】

1) Kakimoto, Y., and Akazawa, S. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5751-5758

2) Nakajima, T., Matsuoka, Y., and Kakimoto, Y. (1971) Biochim. Biophs. Acta243, 31-37

3) Sano, A., Kotani, K., and Kakimoto, Y. (1986) J. Neurochem. 46, 1046-1049

4) Shiba, T., Mizote, H., Kaneko, Nakajima, T., Kakimoto, Y., and Sano, I. (1971) Biocchim. Biophys. Acta244, 523-531

198 ラット延髄グルタミン酸神経の伝達物質合成における *aspartate aminotransferase* の関与

木原　実、久保　孝夫、三須　良実
（横浜市立大学・医・薬理）

〔要約〕
ラット脳スライスの電気刺激による内在性グルタミン酸遊離を指標として、延髄グルタミン酸神経の伝達物質合成における aspartate aminotransferase (AAT)、 ornithine aminotransferase (OAT) の役割を検討した。延髄、小脳において、両トランスアミナーゼを阻害する aminooxyacetic acid (AOAA) はグルタミン酸遊離を抑制し、AAT により直接グルタミン酸へ代謝される 2-oxoglutarate は同遊離を増大した。しかし、OAT を阻害するが AAT を阻害しない L-canaline、 γ-acetylenic GABA、gabaculine は同遊離に影響を与えなかった。一方、大脳皮質、海馬において、AOAA、2-oxoglutarate はともにグルタミン酸遊離に影響を与えなかった。 AOAA 処置は全スライス AAT 活性をほぼ完全に抑制した。以上の結果は、AAT は延髄における伝達物質グルタミン酸の合成に関与しているが OAT の関与はごく小さいこと、AAT の同合成への関与に部位特異性が存在することを示唆する。

グルタミン酸は中枢神経系の主要な興奮性伝達物質であると考えられている。グルタミン酸の伝達物質プールの生合成経路としては、glutamine から glutaminase を介して合成される経路がよく知られているが、その他にも 2-oxoglutarate、 ornithine からそれぞれ aspartate aminotransferase (AAT)、ornithine aminotransferase (OAT) によりアミノ基転移されてグルタミン酸となる経路の関与も考えられている (1,2,6)。我々は、ラット延髄スライスの表面潅流－電場刺激実験から、延髄にもグルタミン酸神経が密に存在することを明らかにしてきた (3,4)。本部位におけるグルタミン酸神経の伝達物質合成経路における AAT および OAT の関与の有無を明らかにすることを目的として、まず、非特異的トランスアミナーゼ阻害剤である aminooxyacetic acid (AOAA)、特異的 OAT 阻害剤の L-canaline、グルタミン酸前駆物質の 2-oxoglutarate 等が電気刺激によるグルタミン酸遊離に及ぼす影響を延髄、小脳、大脳皮質、海馬スライスにおいて比較検討した。

（方法）雄性 Wistar ラットの脳スライス (0.3 mm) を作成、krebs 液にて 30 分 preincubation の後、表面潅流し、4 分ごとに潅流液を採取した。潅流開始後 30 分目 (S1) と 90 分目 (S2) に 1 分間の双極性電場刺激 (50 V, 100 Hz, 2 msec, 500 train every 15 sec) を加えた (3)。誘発性グルタミン酸遊離量 (S1 および S2 遊離) は刺激時の全遊離量から刺激直前の遊離量を差し引いた値とした。薬物は S2 前 50 分より潅流液中に適用し、その効果は S2/S1 遊離量比から評価した。潅流液中のグルタミン酸は HPLC と蛍光分光光度計にて定量した。潅流後、スライス中の cytosolic AAT 活性を Karmen 法にて測定した。

（結果と考察） 電場刺激は延髄、小脳、大脳皮質、海馬スライスから、Ca 依存性にグルタミン酸を遊離した (Table 1,2)。AAT および OAT を阻害する AOAA は延髄、小脳スライスからの誘発性グルタミン酸遊離を有意に抑制した (Fig. 1)。しかし、AOAA の作用がもっとも顕著に認められた延髄において、OAT を阻害するが AAT を阻害しない L-canaline、 γ-acetylenic GABA、 gabaculine はグルタミン酸遊離に影響を及ぼさなかった (Table 3)。さらに、 AAT によりグルタミン酸へ直接代謝される 2-oxoglutarate は、延髄、小脳からのグルタミン酸遊離を増大した (Fig. 1)。一方、大脳皮質、海馬において、AOAA、2-oxoglutarate はともにグルタミン酸遊離にほとんど影響を与えなかった (Fig. 1)。AOAA (10^{-4} M) 処置は全スライスの AAT 活性を強く抑制した (Fig. 2)。

以上の結果は、延髄、小脳においては、伝達物質グルタミン酸の合成に AAT が関与しているというこれまでの知見に一致した。一方、 大脳皮質、海馬においては AAT が同合成に関与するとしてもその

役割は小さいことが示唆された。本知見は、グルタミン酸作動性である小脳の顆粒細胞は AAT 免疫活性陽性、同じくグルタミン酸作動性であると考えられている大脳皮質の錐体細胞はほとんどが AAT 陰性、海馬はまったく AAT 陰性であるとの免疫組織学的知見とよく一致する (5)。また、延髄においてはグルタミン酸の神経伝達物質プール合成への OAT の関与は少ないと考えられる。

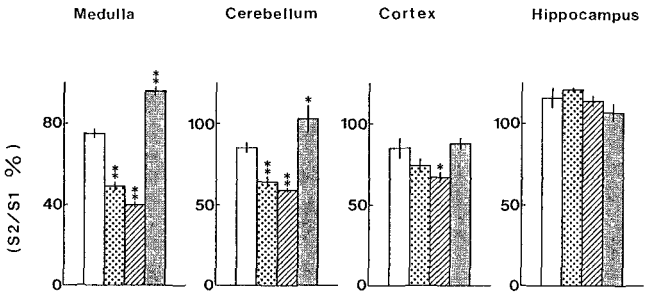


Fig. 1 Effect of aminooxyacetic acid (AOAA) and 2-oxoglutarate on the evoked release of glutamate. Electrical stimulations were applied twice (S1 and S2) at an interval of 60 min. Test compounds were added to the medium 50 min before the S2 stimulation and the effects were evaluated by the ratios of S2/S1. Values are mean± SEM. * P<0.05; ** P<0.01, compared with respective non-treated control. □, non-treated control. ▨, AOAA (10^{-4} M). ▨, AOAA (10^{-3} M). ▩, 2-oxoglutarate (10^{-3} M).

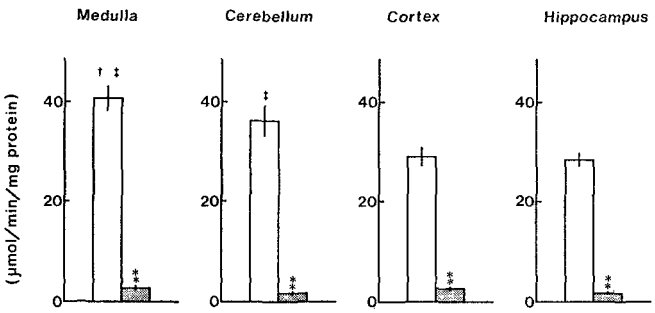


Fig. 2 Effect of aminooxyacetic acid (AOAA) on the activity of cytosolic aspartate aminotransferase in slices. The enzyme activity is expressed as μ mol of NADH oxidized at 25 ℃ per min per mg protein. Values are mean ± SEM from 6 experiments. ** P<0.01, compared with respective non-treated control. † P<0.01, compared with the cortex. ‡ P<0.01, compared with the hippocampus. □, non-treated control. ▩, AOAA (10^{-4} M)

Table 1 Electrical stimulation-evoked release of endogenous glutamate

Region	(A)	(B)	(B−A)
Medulla	128.5 ± 8.3	538.6 ± 35.6**	410.2 ± 31.1
Cerebellum	116.4 ± 14.0	1945.5 ± 93.1**	1829.1 ± 89.0
ortex	25.8 ± 1.9	79.2 ± 4.6**	53.4 ± 4.3
Hippocampus	25.1 ± 1.5	69.2 ± 2.0**	44.1 ± 2.3

Values are the mean± SEM (pmol/mg protein) from 8-10 experiments.(A), spontaneous efflux. (B), total amount of glutamate release during the stimulation. (B-A), stimulus-evoked release. ** P<0.01, compared with A.

Table 2 Ca^{2+}-dependency of the evoked release of glutamate

Region	Medium	n	(S2/S1x100)
Medulla	None	14	74.7 ± 2.2
	Ca^{2+}-deprived	4	4.8 ± 1.5**
Cerebellum	None	8	85.1 ± 2.7
	Ca^{2+}-deprived	4	1.7 ± 0.3**
Cortex	None	7	84.8 ± 5.8
	Ca^{2+}-deprived	4	1.1 ± 0.4**
Hippocampus	None	7	115.9 ± 5.9
	Ca^{2+}-deprived	4	5.5 ± 0.3**

Values (S2/S1x100) are mean± SEM. ** P<0.01, compared with respective non-treated control. Other details are as in Fig. 1.

Table 3 Effect of OAT inhibitors on the evoked release of glutamate

Treatment		n	(S2/S1x100)
None		14	74.7 ± 2.2
L-Canaline	(5×10^{-5} M)	5	69.8 ± 3.2
γ-Acetylenic GABA	(10^{-4} M)	5	73.4 ± 2.4
γ-Acetylenic GABA	(10^{-3} M)	7	80.9 ± 3.5
Gabaculine	(10^{-5} M)	6	79.7 ± 4.3

Values are mean± SEM. Other details are as in Fig. 1.

(1) Fonnum F. (1984) J. Neurochem. 42: 1
(2) Hamberger A., Chiang G.H., Nylen E.S. et al. (1979) Brain Res. 168: 513
(3) Kihara M., Misu Y. and Kubo T. (1988) Life Sci. 42: 1817
(4) Kihara M., Misu Y. and Kubo T. J. Neurochem. (in press)
(5) Wenthold R.J. and Altshculer R.A. (1983) Neurology and Neurobiology, vol. 7: 33
(6) Yoneda Y., Roberts E. and Dietz Jr. G.W. (1982) J. Neurochem. 68: 1686

199 新生児期 glutamate の明暗弁別学習に及ぼす影響

小平 隆太郎・九穂 泰三・松本 明・芝軒 信次・小暮 美樹・石川 紘一
(日本大学医学部薬理学教室)

〔要約〕

ラット新生児期にmonosodium glutamate (MSG)を大量に投与すると，生後10週齢の時点で海馬 CA_1領域を中心として錐体細胞の変性が認められた。この変性は，グルタミン酸受容体の拮抗薬とされているglutamate diethyl ester (GDEE)を前投与しておくと予防することができた。MSG を単独投与された動物に明暗弁別学習を行わせたところ，獲得試行および保持テストともに正解率の上昇は抑制された。これに対してGDEEを併用投与した動物においては，保持テスト時に特に顕著であったが，正解率の回復が認められた。一方新生児期のMSG 投与は，脳内伝達物質の濃度には有意の変化を及ぼさなかった。このような結果は，海馬のグルタミン酸作働神経系が，動物の学習・記憶に対して重要な働きを持っており，その作用がグルタミン酸受容体を介して発現する可能性を示唆している。

緒　言

グルタミン酸は哺乳動物中枢神経系の伝達物質であり，電気生理学的な記憶のモデルである海馬長期増強現象と密接な関係を持っていると報告されている (1)。新生児期に大量のグルタミン酸を動物に投与すると，網膜に異常の発生することは古くより知られている (4)。このことは，脳組織にも何等かの組織学的な変化が発生する可能性を示唆している。そこで今回の実験においては，出生直後よりmonosodium glutamate (MSG)を投与した動物について成熟後組織学的・生化学的検索を行い，同時に明暗弁別学習を行わせてMSD の影響について検討した。

実験方法

(1) 実験動物および薬物投与：生後12週齢のWistar系ラットを交配させ，恒温・恒湿に維持された室内で飼育し，出産させた。この間妊娠ラットには何等処置を行わず，可能な限り安静に保った。このラットより出生した新生児に 1，2 または 4 mg/g/日のMSG を，生後 1，3，5，7 および9 日目に皮下投与した。また別の新生児には，MSG を投与する15分前に1.6 mg/gのglutamate diethyl ester (GDEE)を皮下に投与した。なお薬物の投与は，生理食塩液に溶解し，滅菌後マイクロシリンジを用いて行った。

(2) 明暗弁別学習：新生児期に薬物の投与を受けた動物について，生後10週齢において明暗弁別学習を行わせた。学習はコンピューターと接続し，常時行動を監視できるシャットル・ボックスを用いて行われた (3)。この装置は20 X 25 X 20cmのコンパートメントをU字型のゲートで接続したもので，床は電撃ショック (2 mA) を加えるため，gridで出来ていた。一方のコンパートメントを15 Vの電球で照明し，明室とした。学習は，まず動物のいない方のコンパートメントを明室とし，点灯後10秒以内に明室に移動しなかった場合，gridを介して電撃が加えられた。移動が完了すると消灯し，60秒後に再び一方の電球が点灯した。電撃を受けずに移動した場合正解とし，この訓練 (獲得試行) を連続して90回行わせた。その後ホームケージに戻しで１週間飼育後保持テストを行い，学習効果が維持されていたが否かを検討した。

(3) 組織学的検索：Pentobarbital (25 mg/kg i.p.) 麻酔下に灌流固定を行い，脳を摘出し，脱水・包埋後5 μm の切片を作成した。その後Hematoxyline-Eosin染色を行い，脳内の組織学的所見について検討を行った。

(4) 脳内伝達物質の定量：Glowinski and Iversen の方法に準じて分画脳を採取した。この試料について，脳内モノアミン伝達物質と考えられているnoradrenaline (NA)，dopamine (DA)，5-hydroxytryptamine (5-HT) およびそれらの代謝産物は既に発表されている電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーを用いる方法 (2)で，またアミノ酸伝達物質については，アミノ酸自動分析機 (日立 835型) を用いて測定した。

実験結果および考察

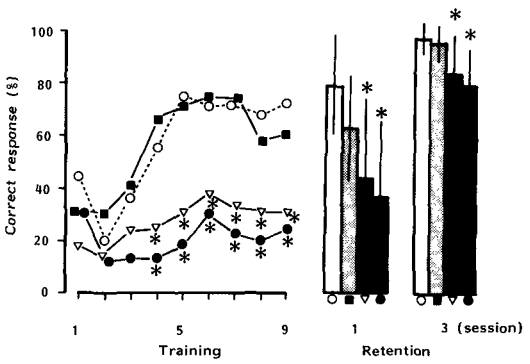
1 mg/g以上のMSG を新生児期に投与されたラットの海馬錐体細胞は組織学的に変性を起こし，この変性は用量依存的に強く認められた。またこの際，網膜にはすでに発表されているもの (4)と同様の変性が認められ，特に内顆粒層や内網状層において強かった。今回の学習実験は明暗弁別学習であったので，MSG を投与された動物の視覚が正常であったか否かが重要であるが，網膜誘発電位を測定した結果によれば，ラットの視覚機能は維持されていたものと結論でき

た。これに対してグルタミン酸受容体の拮抗剤の１つであるGDEEを前処置しておくと，MSG によって引き起こされる組織学的変化は，海馬においてもまた網膜においても改善された。

獲得試行を10試行ずつの９セッションに分画して比較を行った。最初の第３セッションまでは無処置の対照動物をも含めて各群とも正解率の上昇は認められなかった。第４セッション以降になると，対照群の正解率は上昇し，第５セッションで第１セッションと比較して有意に高い値となった（図－１）。0.1 mg/gのMSG を投与された動物では，各セッションとも対照群と比較して有意の変化は認められなかったが，１および２ mg/g の薬物を投与した群においては正解率の上昇が抑制され，対照群と比較して有意に低い値であった。１週間後に保持テストを行ったところ，１および2 mg/gのMSG を投与された動物では，正常対照動物と比較して正解率は有意に低く，明暗弁別学習にもとずく情報が保持されていなかったことを示していた（図－１）。予め0.5 mg/gのGDEEを投与しておくと，MSG 1 mg/gの投与によって引き起こされる明暗弁別学習正解率の抑制は改善された（図－２）。このように，組織学的な所見と学習実験の結果とが一致しており，海馬が学習の習得・保持に重要な関係を持っていると考えることが出来る。なお保持テストの結果は，動物の記憶に依存しているとされているので (3),今回のMSGの作用は，動物の記憶形成を抑制したものといえる。

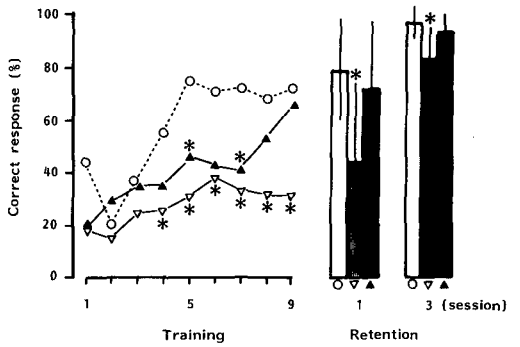
既にラット明暗弁別学習において，海馬セロトニン作働神経系が関係していると報告されているが (5),MSG 投与による異常ラットにおいては，5-HTやその代謝産物に対照動物と比較して何等有意の差は認められなかった。またNAやDAといったカテコールアミンおよびそれらの代謝産物にも有意の差はなく，さらに海馬内のglutamate ばかりでなく，aspartate，glycine，GABA などのアミノ酸伝達物質にもMSG は影響を与えなかった。

今回の実験では，学習や組織学的所見の異常と一致するような生化学的変化は認められなかった。しかし興奮性アミノ酸はシナップス後部を破壊することが知られており，新生児期に大量のMSG を投与するとグルタミン酸作働神経系の異常，特にシナップス後部の不可逆的な変化が引き起こされ，成熟後に行った学習に障害が認められたものと結論することが出来る。予めGDEEを投与しておくと，glutamate の受容体への結合が遮断されてシナップス後部の変化は予防され，このことが学習正解率の上昇として認められたものと考えられる。



図－１　ラット明暗弁別学習に及ぼすMSGの作用

新生児期に 0.1 （■），1 （▽），または2 mg/kg （●）のMSG を投与し，生後10週目にシャットル・ボックスを用いて学習を行わせた。（○）は生理食塩液を投与された対照群の結果を示している。それぞれのカラムとバーは平均値と標準偏差を表し，　は対照群と比較して有意の差（P<0.05）のあることを示している。



図－２　MSG の弁別学習にに及ぼす作用に対するGDEEの予防効果

新生児期に1 mg/kg のMSG を単独（▽）または0.5 mg/kg のGDEEと併用（▲）投与し，10週目に学習を行わせた。（○）は対照群を表している。

文　献

(1) Baudry, M. and Lynch, G. (1987) Psychopharmacology: The Third Generation of Progress. pp. 449-462, Raven Press, New York.
(2) Ishikawa, K and Shibanoki, S. (1985) Anal. Biochem. 147, 441-450.
(3) Kubo, T. et al. (1988) Behav. Brain Res. in press.
(4) Olney, J.W. (1969) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 28, 455-474.
(5) Shibanoki, S. et al. (1982) Neurosciences 8, 333-337.

200 ラット脳における[³H]8-OH-DPAT結合部位の多様性

横田則夫、山脇成人*、早川浩**、吉田玲夫、更井啓介
（広島大学・精神、国立呉病院・臨床研究部*、早川病院**）

〔要約〕
ラット脳における[³H]8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin([³H]8-OH-DPAT)の結合特性を検討し、複数の結合部位が存在することを確かめた。5-HTアゴニスト、アンタゴニストによる結合阻害曲線は、前頭皮質、海馬、線条体のいずれの部位でも２相性となり、結合飽和実験からは２つの結合部位が認められた。高親和性結合部位は海馬に多く、5-HTアゴニストとアンタゴニストに対して高い親和性を示した。低親和性結合部位は、線条体における[³H]8-OH-DPAT結合の大部分を占め、5-HT取り込み阻害薬のclomipramineに高い親和性を示した。高親和性結合部位はguanosine triphosphate(GTP)とNa^+により減少し、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}により増加した。一方、低親和性結合部位はカチオンの添加によって減少し、特に１価カチオンとCa^{2+}の効果が大きかった。以上のことから、[³H]8-OH-DPATの高親和性結合部位は5-HT_{1A}受容体の高親和性状態であり、GTP結合蛋白質と共役することが示された。一方、低親和性結合部位は5-HT_{1A}受容体の低親和性状態の他に、clomipramineに高親和性を有し、１価カチオンやCa^{2+}によって結合が阻害される部位を含んでいることが明らかになった。

[³H]8-OH-DPATは、海馬において5-HT_{1A}受容体を特異的にラベルするアゴニストリガンドと考えられているが(1)、線条体や血小板における結合特性は海馬とは異なることが示されている(2,4)。また[³H]8-OH-DPAT結合部位に高親和性結合状態と低親和性結合状態があることが示唆されている(3)。今回、[³H]8-OH-DPAT結合が5-HT_{1A}受容体に選択的と言えるか否か検討をおこなった。

［方法］
(1)膜標品の作成：Wistar系雄性ラットを断頭し、氷冷下に前頭皮質、海馬、線条体を切り出した。脳組織を氷冷した50倍量の 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.4,37℃)中でホモジナイズし、50,000gで10分間遠沈した。得られた沈渣を同bufferに懸濁して、37℃で10分間プレインキュベートした後同様に遠沈し、沈渣を同bufferに再懸濁したものを粗膜画分として実験に用いた。(2)結合実験：[³H]8-OH-DPAT、粗膜画分(約0.4mg protein)を、1mlのTris-HCl buffer(10μM pargyline、0.1%アスコルビン酸を含む)中で37℃、10分間インキュベートした。インキュベーションの後、cell harvester(Brandel社) で Whatman GF/Bフィルター上に吸引濾過し、Tris-HCl bufferで２回洗浄した後、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。非特異的結合は10^{-4}Mの5-HT存在下に求めた。結合飽和実験では0.1～15nM、結合阻害実験では約1nMの[³H]8-OH-DPATを用いた。結合阻害曲線および結合飽和曲線は、非線型最小二乗法を用いたコンピュータープログラムにより解析した。

［結果］
[³H]8-OH-DPAT結合の5-HTによる阻害曲線は、前頭皮質、海馬、線条体のいずれの部位でも２相性となり、5-HTに対して親和性の異なる２つの結合部位(KH=5.7nM,KL=1.6μM)を想定した場合に最も適合性が良かった(Fig.1)。３脳部位において高親和性および低親和性結合部位に対する5-HTの親和性はほぼ同一であったが、特異的結合のうちで5-HTに対して高親和性を有する部位の占める割合は、前頭皮質64.9%、海馬86.0%、線条体16.9%と異なっていた。

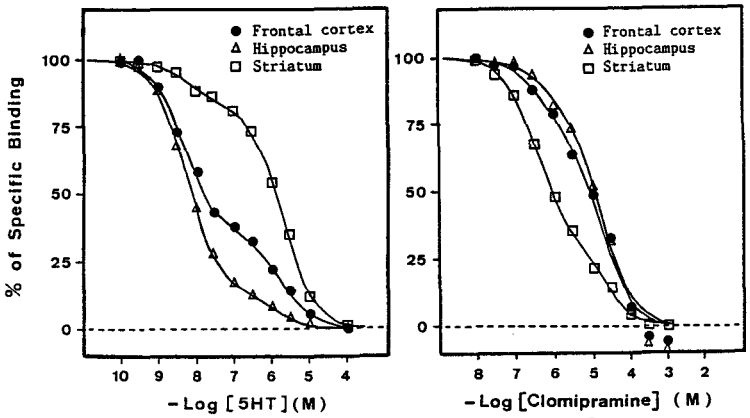


Fig.1 Competition by 5-HT and clomipramine for [³H]8-OH-DPAT binding

さらに他の5-HTアゴニストやアンタゴニストによる結合阻害曲線も5-HTの場合と同様に２相性であった。一方、5-HT取り込み阻害薬のclomipramineによる結合阻害曲線も２相性となったが、高親和性結合部位と低親和性結合部位の占める割合はアゴニストやアンタゴニストで見られたものと正反対であり、clomipramineに高親和性を有する部位は線条体に多く海馬に少なかった(Fig.1)。

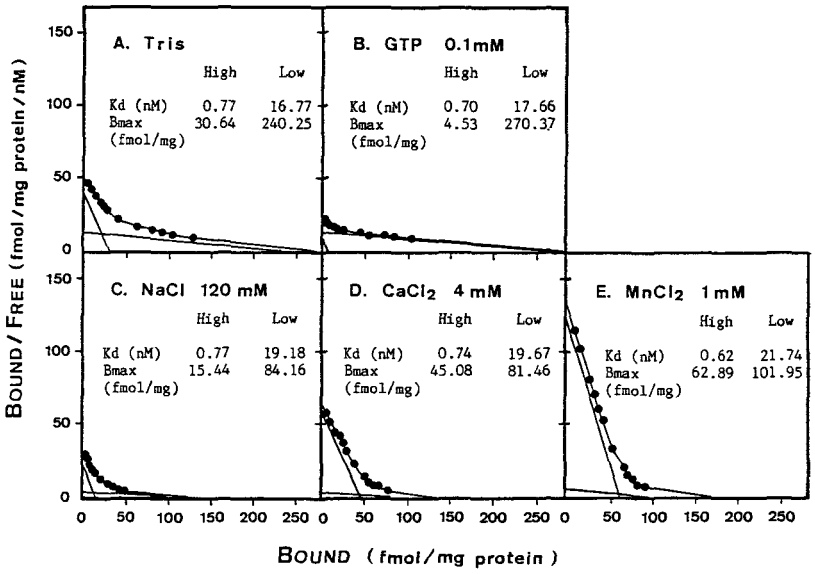


Fig.2 Scatchard plots of [^{3}H]8-OH-DPAT binding to fronto-cortical membrane in the absense or presense of GTP and cations.

カチオンおよびGTPを添加すると[^{3}H]8-OH-DPATの特異的結合量は変化し、その変化は部位により異なっていた。前頭皮質における[^{3}H]8-OH-DPAT結合飽和曲線に対するGTPやカチオンの影響をFig.2に示した。GTP(0.1mM)の添加により高親和性結合部位数は減少したが、総結合数には変化がみられなかった。Na^+(120mM)存在下では高親和性結合部位数、低親和性結合部位数とも減少した。一方、Ca^{2+}(4mM)、Mn^{2+}(1mM)の添加により高親和性結合部位数は増加したが、低親和性結合部位数と総結合数は減少した。高親和性結合部位数の増加率はMn^{2+}添加時に大きかったが、低親和性結合部位の減少率はCa^{2+}添加時に大きかった。また高親和性および低親和性結合部位に対する[^{3}H]8-OH-DPATの親和性はいずれの場合にも変化がなかった。

以上の結果、GTPの添加により高親和性結合部位は低親和性結合部位に移行することが示された。しかし、カチオンの存在下では高親和性結合部位と低親和性結合部位の移行がおこるばかりでなく、低親和性結合部位が減少することがわかった。そして低親和性結合部位には、特に１価カチオンやCa^{2+}により結合が阻害される部位が含まれていることが示された。

[考察]

今回の実験から、[^{3}H]8-OH-DPAT結合部位は、海馬、前頭皮質、線条体のいずれの部位でも単一ではなく、高親和性結合部位と低親和性結合部位が存在することが示された。高親和性結合部位はGTP結合蛋白質に共役する$5\text{-}HT_{1A}$受容体の高親和性状態であり海馬に高濃度に存在し線条体には少なかった。また低親和性結合部位は$5\text{-}HT_{1A}$受容体の低親和性状態とは別の部位を含んでいることがわかった。5-HT関連物質のうちで8-OH-DPAT自身を除くと、5-HT取り込み阻害薬であるclomipramineがこの低親和性結合部位に対して高い親和性を示したことから、低親和性結合部位の一部は5-HT再取り込み部位である可能性が考えられた。

[文献]

(1)Gozlan,H., et al. (1983) Nature 305, 140-142
(2)Hall,M.D., et al. (1986) Neurochem. Res. 11, 891-912
(3)西崎　純、佐藤厚子　他 (1987) 神経化学 26, 112-114
(4)Schoemaker H. and Langer S.Z.(1986) Eur.J.Pharmacol. 124, 371-373

201　視床下部スライスからのヒスタミン及びカテコラミン放出に対するカルシウム拮抗薬の抑制効果

竹村基彦，岸野淳二，望月貴年，大和谷厚，和田博
（阪大・医・第二薬理）

〔要約〕

ラット脳視床下部切片をin vitroで灌流し，遊離されるヒスタミン，ノルアドレナリン，及び，ドーパミンを高速液体クロマトグラフィーにより定量した。高カリウム（40 mM）刺激による，ヒスタミン，ノルアドレナリン，ドーパミンの遊離は1 μM ω-Conotoxin GVIA の前処置により有意に抑制されたのに対し，1 μMニルバジピン（ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬）の前処置では抑制傾向は見られたものの有意ではなかった。ヒスタミン，ノルアドレナリン，ドーパミンの高カリウム刺激による放出に対するω-Conotoxin GVIAの抑制は 1.0 nM から 1.0 μM の間で用量依存的であったが、ニルバジピンは1 μMまでは有意の抑制は見られなかった。以上より，内在性のノルアドレナリン，ドーパミンの放出はジヒドロピリジン非感受性－ω-Conotoxin GVIA感受性のカルシウム・チャンネルを経由するカルシウム・イオンにより引き起こされること，視床下部のヒスタミン遊離も，このチャンネルによりコントロールされていることが明らかになった。

神経終末の興奮は電位依存性カルシウム・チャンネル(VSCC)を開き，流入したカルシウム・イオンは伝達物質放出を引き起す。近年，VSCCにはジヒドロピリジン感受性とω－コノトキシン GVIA (ω-CgTX)感受性の二種のサブタイプが存在すると言われており (4)，ω-CgTX感受性VSCCはシナプス終末に局在し (5)，人工的に取り込ませた伝達物質の放出に関与している(1) のに対して，ジヒドロピリジン感受性VSCCは細胞表面に広がって分布していることがわかっている。我々は，in vitroでラット視床下部切片を灌流し遊離する内在性のヒスタミン，ノルアドレナリン，ドーパミンを測定することにより、内在性のこれらの物質の高カリウム濃度(40 mM) 刺激による遊離に対するジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬ニルバジピンとω-CgTXの抑制効果を比較検討した。

〔実験方法〕

体重100gの雄性ウィスター系ラットにペントバルビタール麻酔下に冷Krebs-Henseleit 液(95%O_2,5%CO_2飽和) 50 ml を上行大動脈から灌流後，脳を取り出し，視床下部をブロックで切り出し，カミソリでスライスを作製し，200 μlのチャンバーに入れ，37℃の同バッファーを 50 μl/ 分で灌流した。チャンバーも37℃で保温した。刺激は40 mM KClを等張NaClと置換した高K^+液により行なった。1時間通常のバッファーで灌流したあと，引き続き20分間の放出を観察してから，高K^+で刺激し，40分間隔で高カリウム刺激を反復した。薬剤は1回目の刺激の終了後から前処置を開始し，2回目の刺激時にも共存させた。灌流液中のノルアドレナリン，ドーパミンはジフェニルエチレンジアミン法を用いた HPLC-蛍光分析器（東ソーHLC 8030）で，ヒスタミンは HPLC-蛍光分析法 (7)により測定した。カテコールアミン代謝物は一部のサンプルについてHPLC-ECD (2)で測定した。実験データは各々の切片について通常バッファー灌流時の基礎放出量の平均値で正規化し，同じ薬剤について観察したデータを加算平均した。薬剤の影響は無添加の場合の2回目の放出量と比較することによって行ない，Student's t-testにより検定した。

〔結果と考察〕

ヒスタミン，ノルアドレナリン，ドーパミンは基礎放出量，それぞれ，0.48±0.070，0.10±0.022，0.045±0.010 pmol/min/hypothalamus から，10分間の高K^+刺激により，それぞれ，1.6，11，6.8倍に増大し，40分間隔で繰り返して刺激すると，それに応じて放出量の増大が起こったが，増加高は1回目の刺激に比べて漸減した。ヒスタミンはラット脳内で神経細胞以外に肥満細胞にも含まれているが，この細胞は電位依存性カルシウム・チャンネルを欠如しており，高K^+刺激により放出されてくるヒスタミンは神経性のものと考えられる (3)。1 μM ω-CgTX を40分間前処置すると，それぞれ，54.2，47.5，47.5% 有意に抑制された。1 μMニルバジピンの前処置ではそれぞれ，22.5，21.6，7.5%の抑制傾向が見られたものの有意ではなかった［図1］。これにより，ヒスタミン，ノルアドレナリン，ドーパミンの放出に対する抑制作用はω-CgTXがニルバジピンよりも強いことが示唆されたので，この二者の抑制効果の用量依存関係を観察した。ヒスタミン，ノルアドレナリン，ドーパミン放出はω-CgTXにより1 nMから1 μMの間で用量依存的に抑制された。これに対して，ニルバジピンは同じ範囲で有為な抑制効果を持たなかった。以上より，[^{3}H]標識した伝達物質をpreload したスライス，シナプトソームからの放出実験により報告されているように(1) 内在性の伝達物質であるノルアドレナリン，ドーパミンの放出に連関するVSCCはω-CgTX感受性，ジヒドロピリジン非感受性であることと，中枢神経細胞に存在し (6)，神経伝達物質あるいは神経調節物質としての機能が推測されているヒスタミンの遊離もこれらと同様にω-CgTX感受性VSCCによりコントロールされていることが明らかになった。

次に，ジヒドロピリジン・カルシウム・アゴニストであるBay K8644 1 μMを15分間前処置すると，ノルアドレナリン，ドーパミン，ヒスタミンの高K^+ 刺激による放出は，コントロールの，それぞれ 9.0，5.8，6.1 %増加した。Bay K8644 処置開始の15分前から1 μMニルバジピンを30分間処置した場合にはこれら三種のアミンの放出は，いずれも，ニルバジピン単独処置と同程度であった。即ち，ニルバジピンは膜の脱分極によるアミン放出に対しては抑制効果を持たない用量でBay K8644 によるカルシウム・チャンネルの強制開口によるアミン放出を抑制した。このBay K8644 の遊離，及び，それに対するニルバジピンの抑制作用もノルアドレナリン，ドーパミン，ヒスタミンの間で同様であった。

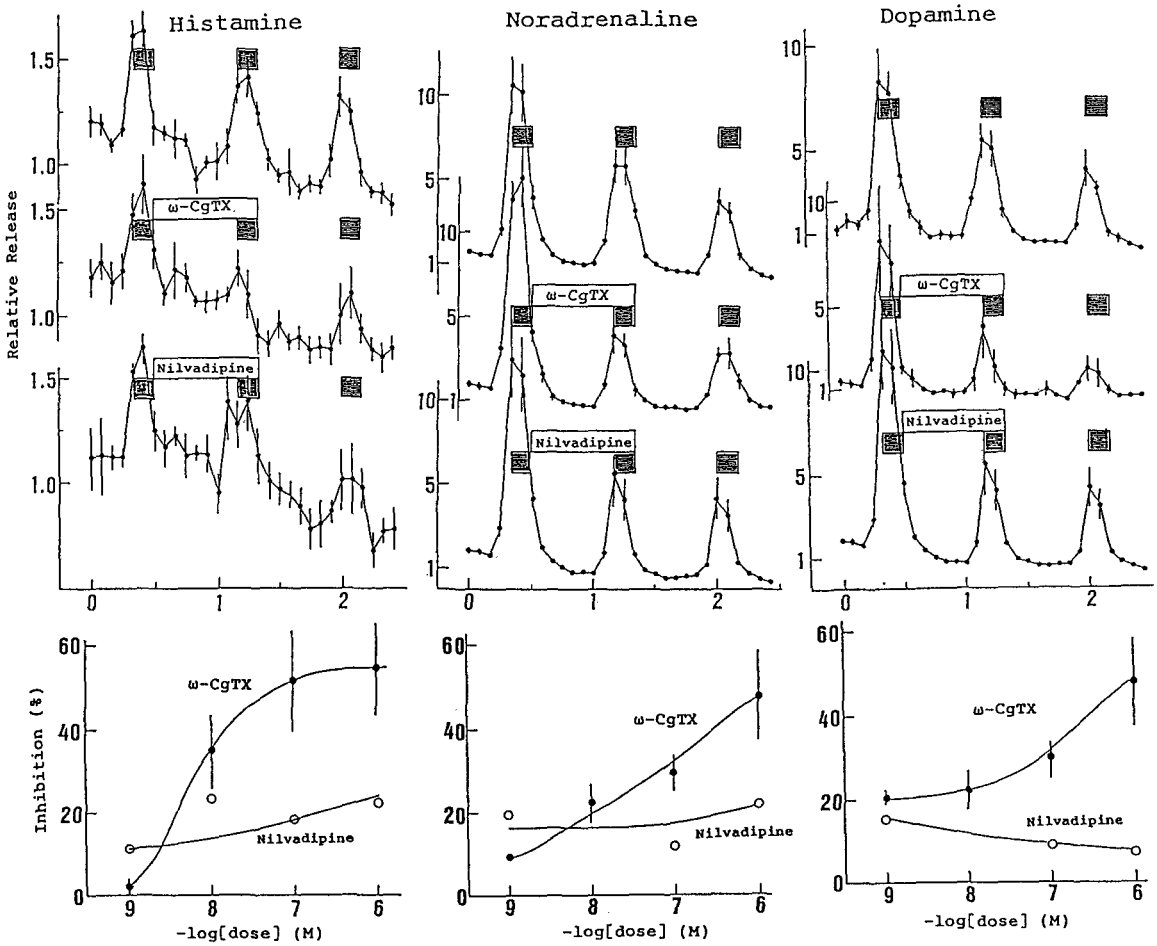


Figure 1. Comparison of inhibitory effect of ω-conotoxin GVIA and nilvadipine on high K^+-stimulation evoked release of histamine, noradrenaline and dopamine. High K^+-stimulation was applied as indicated by hatched bars. 1 μM ω-CgTX or nilvadipine was perfused as indicated. Lowermost columns indicate dose/inhibition relationship.

References

1. Dooley,D.J., Lupp,A., and Hertting,G. (1987) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 336, 467-470.
2. Furukawa,K., Kurosawa,T., and Kadokawa,T. (1986) Jpn. J. Pharmacol. (abstr) 40, 149P.
3. Kanner,B.I. and Metzger,H. (1984) J. Biol. Chem. 259, 10188-10193.
4. Nowycky,M.C., Fox,A.P., and Tsien,R.W. (1985) Nature 316, 440-443.
5. Takemura, M., Fukui, H., and Wada,H. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 149, 982-988.
6. Watanabe,T., Taguchi,Y., Schiosaka,S., Tanaka,J., Kubota,H., Terano,Y., Tohyama,M., and Wada,H. (1984) Brain Res. 295, 13-25.
7. Yamatodani,A., Fukuda,H., Wada,H., Iwaeda,T., and Watanabe,T. (1985) J. Chromatogr. 344, 115-123.

202 ラット脳シナプトソーム内Ca^{2+}濃度上昇に対するCa^{2+}拮抗薬とdantroleneの効果

加藤 匡宏　山脇 成人　松林 弘明

国立呉病院臨床研究部精神神経科学研究室

〔要約〕抗精神病薬の副作用である悪性症候群の治療薬としてdantroleneの有効性が報告されているが、その作用機序にはまだ不明な点が多い。われわれは、その病態に5HT神経終末内でのCa^{2+}異常動態が関与する可能性を示唆し、神経終末内でのCa^{2+}異常動態を抑制するというdantroleneの中枢作用を推定している。そこで、dantroleneの中枢作用と悪性症候群の治療薬としてCa^{2+}拮抗薬の有効性を検討する目的で、神経終末のモデルとしてシナプトソームを作成し、Ca^{2+}蛍光指示薬であるfura-2を使用してCa^{2+}動態を測定し、高K^+刺激およびveratrine刺激によるシナプトソーム内Ca^{2+}濃度($[Ca^{2+}]_i$)上昇に対するCa^{2+}拮抗薬とdantroleneの効果を検討した。(1)高K^+刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇は10μM nicardipine, 10μM verapamil, 10μM dantroleneにより有意に抑制されたが、100μM diltiazemでは抑制されなかった。(2)Veratrine刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇は10μM verapamil,10μM dantrolene,100μM diltiazemにより有意に抑制されたが、10μM nicardipineでは抑制されなかった。以上の結果より、nicardipineは高K^+刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇のみを抑制し、diltiazemはveratrine刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇のみを抑制した。さらにverapamilとdantroleneは高K^+刺激およびveratrine刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇をともに抑制することが示された。

キーワード：Ca^{2+} antagonist, Dantrolene, fura-2, Synaptosomes, Neuroleptic malignant syndrome

はじめに

悪性症候群は、著明な体温上昇をきたして意識障害や自律神経症状および錐体外路症状など多彩な症状を呈する致死的疾患である。この悪性症候群の治療にdantroleneが有効であることが報告されている。われわれは、dantroleneが有効であった悪性症候群の症例から悪性症候群の発熱機序に関するDA-5HT不均衡仮説を提唱し、さらにdantroleneが神経終末内のCa^{2+}動態に作用して神経伝達物質遊離の抑制するという中枢作用を推定している。神経終末からの神経伝達物質遊離は神経終末内の遊離Ca^{2+}濃度の上昇が必要とされている。Ca^{2+}拮抗薬は膜電位依存性Ca^{2+} channel(VDC)に作用して細胞外からのCa^{2+}流入を阻害することによって神経伝達物質の遊離を抑制する作用が明らかとなってきた。また、Ca^{2+}拮抗薬はVDCのみならず細胞内のCa^{2+}動態にも薬理作用をもつことが示唆されている。さらに、最近では、Ca^{2+}拮抗薬が悪性症候群に対して有効であったという症例が報告されている。そこで本研究では、Ca^{2+}蛍光指示薬であるfura-2を使用して神経終末のモデルであるシナプトソーム内のCa^{2+}動態を測定し、高K^+刺激およびveratrine刺激によるCa^{2+}濃度上昇に対するCa^{2+}拮抗薬とdantroleneの効果について考察した。

方法

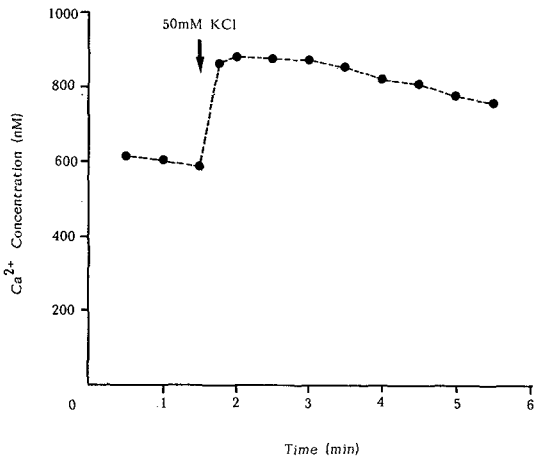
(1)シナプトソーム分画の作成：シナプトソーム分画の作成はGray and Whittakerらの方法(1962)に準じて行った。体重280-320gのWistar系雄性ラットを断頭致死させた後、全脳を摘出し小脳,橋,延髄を除去した。これよりP_2分画を作成し、さらにsucroseによる密度勾配遠心分離を行ってシナプトソーム分画を採取した。

(2)シナプトソーム内の遊離Ca^{2+}濃度の測定：シナプトソーム内の遊離Ca^{2+}濃度の測定は、Bondyらの方法(1987)[1]を一部改変して行った。シナプトソーム懸濁液1mlに遮光下で5μM fura-2/AMを負荷し37°C45分間インキュベーションを行った。その懸濁液を遠心分離して沈渣をHepes buffer A(NaCl 125mM, KCl 5mM, NaH_2PO_4 1.2mM, $MgCl_2$ 1.2mM, $NaHCO_3$ 5mM, glucose 6mM, $CaCl_2$ 1mM, HEPES 25mM pH 7.4)で再懸濁させた。その懸濁液から1.5ml標本を採り遠心分離し、沈渣をHepes buffer B(Hepes buffer AからNaH_2PO_4と$NaHCO_3$を除去した緩衝液 37°C)に再懸濁させて蛍光光度計RF-540（島津製作所）を用いてシナプトソーム内の遊離Ca^{2+}濃度の測定を行った。このシナプトソーム懸濁液中の蛋白含量は250-340μg/mlであった。シナプトソーム外のfura-2による蛍光は40μM $MnCl_2$を加えて除去した。刺激は高K^+刺激(50mM KCl)およびveratrine刺激(67μg/ml 約100μM)を行い、Ca^{2+}拮抗薬とdantroleneはあらかじめHepes buffer Bに溶解して使用した。測定波長は、励起波長340nmおよび380nmと蛍光波長510nmを用いた。われわれの使用した蛍光光度計では励起波長340nmと380nmによる二波長同時測定ができないので、まず励起波長340nmでの蛍光測定を行って蛍光強度(F340)を求め、すみやかに、励起波長を380nmに切り替えて蛍光強度(F380)を求める方法で刺激直前と刺激直後の蛍光強度をそれぞれ測定した。一方fura-2を負荷していない同標本を用いて自発蛍光を測定し、これを得られた蛍光強度より差し引いて、その蛍光強度の比からGrynkiewiczらの計算式(1985)[2]を用いて$[Ca^{2+}]_i$を計算した。

結果

(1)高K⁺刺激による[Ca^{2+}]$_i$上昇の経時的変化(Fig.1)
得られた蛍光強度の変化から高K⁺刺激による[Ca^{2+}]$_i$上昇の経時的変化を求めた。
(2)高K⁺刺激による[Ca^{2+}]$_i$上昇に対するCa^{2+}拮抗薬とdantroleneの効果(Table.1)
Nicardipine,verapamil,dantroleneは10μMの濃度で高K刺激による[Ca^{2+}]$_i$上昇を有意に抑制したが、diltiazemは100μMの濃度においても抑制できなかった。
(3)Veratrine刺激による[Ca^{2+}]$_i$上昇に対するCa^{2+}拮抗薬とdantroleneの効果(Table.1)
Verapamilとdantroleneは10μMの濃度で、またDiltiazemは100μMの濃度でveratrine刺激による[Ca^{2+}]$_i$上昇を有意に抑制したが、nicardipineは10μMの濃度では抑制できなかった。

High K^+-induced Ca^{2+} Concentration Changes in Synaptosomes



Effect of Ca^{2+} Antagonists and Dantrolene on Free Intrasynaptosomal Ca^{2+} Increase

	High K^+-induced	Veratrine-induced
Nicardipine	↓↓ (10uM)	→ (10uM)
Diltiazem	→ (100uM)	↓ (100uM)
Verapamil	↓↓ (10uM)	↓↓ (10uM)
Dantrolene	↓↓ (10uM)	↓↓ (10uM)

考察

高K⁺刺激による[Ca^{2+}]$_i$上昇は脱分極によってVDCを通じて細胞外Ca^{2+}が流入したことによると考えられる。VDCは電気生理学的解析からL型,T型,N型の三種類に分類されている。また、神経終末においてL型とN型channelが共存しており、終末内遊離Ca^{2+}濃度上昇はその両方のchannelを介して生ずるが、神経伝達物質遊離には主に神経終末接合部に存在するN型channelが重要な役割を演じているというモデルが提唱されている[3)]。今回の実験結果から、nicardipine,verapamil,dantroleneは5HT神経終末に存在するL型とN型channelを阻害することによって終末内遊離Ca^{2+}濃度上昇を妨げた可能性が示唆された。一方、veratrineは、Na^+ channelに作用して終末内Ca^{2+}貯蔵部位からのCa^{2+}放出を促進し神経伝達物質遊離を引き起こすと考えられている。今回の実験結果から、verapamil,diltiazem,dantroleneは神経終末内Ca^{2+}貯蔵部位からのCa^{2+}放出抑制作用を持つ可能性が示唆された。われわれは、悪性症候群の発熱機序には視床下部に投射される神経終末内のCa^{2+}異常動態が原因となって神経伝達物質が過剰に遊離された病前状態が存在しており、抗精神病薬の投与がひきがねとなってモノアミンによる体温調節作用の均衡がくずれて高熱が発現するものと推定している。これらのことから、dantroleneが神経終末内のCa^{2+}濃度上昇を抑制するという中枢作用が確認されたとともに神経終末内でのCa^{2+}濃度上昇を阻害する作用が、悪性症候群の治療に関連している可能性が示唆された。VerapamilなどのCa²⁺拮抗薬は悪性症候群の原因と推定している神経終末内のCa^{2+}異常動態を抑制することによって悪性症候群に対して治療効果を持つ可能性が考えられる。しかしながら、悪性症候群の病態がまだ不明であり細胞内情報伝達系におけるCa^{2+}の役割が複雑であることから、Ca^{2+}拮抗薬の悪性症候群に対する治療効果を説明するためには詳細な研究が必要と思われる。

参考文献

1)Komulainen,H.and Bondy,S.C.(1985) J.Pharmacol.Exp.Ther. 241,575-581
2)Grynkiewicz,G., Poenie,M. and Tsien,R.Y.(1985) J.Biol.Chem. 260(6),3440-3450
3)Miller,R.J.(1987) Science 235,46-52

203 シナプスでの内因性コリン産生とアセチルコリン合成

田中康一*、安藤　進、E. Yavin#
（東京都老人総合研究所・生化学、#Weizmann Institute of Science・Neurology、Israel）

〔要約〕
シナプスでのアセチルコリン（ACh）代謝を知るために、マウス脳シナプトゾームを用いてACh合成とコリン産生について検討した。生成物の定量には高速液体クロマトグラフィーを用いた。その結果、①シナプトゾームは反応液にコリンを添加しなくてもAChを合成することが出来、かつAChの10倍量の遊離コリンが産生される。逆に高濃度(100 μM)のコリン添加はACh合成を阻害した。②水溶性コリン中間体であるグリセロホスホリルコリン（GPCh）とホスホリルコリン（PCh）のプールサイズは、各々、12nmoles、7 nmoles/mg タンパク質であり、これは遊離コリンのプールより2～3倍大きい。③hemicholinium-3で高親和性コリン取込みを阻害するとAch合成は阻害された。④グルコース欠乏、および低酸素状態でACh合成は抑制されたがコリン産生は影響を受けなかった。　以上の結果から、シナプトゾームは、静止期においては、ACh合成に必要なコリンを内因性の水溶性コリン中間体から十分量供給出来ること、内因的に産生された遊離コリンもコリン取込み機構を介してACh合成に利用されること、さらに、コリン産生はエネルギー非依存的であるが、ACh合成はエネルギー依存的であることが示唆された。

高齢者でみられる知的能力の低下は、主としてコリン作動性ニューロンの障害によるとの仮説（cholinergic hypothesis)が唱えられている。加齢によるコリン作動性ニューロン活動低下の原因として、ニューロン数の減少による神経回路網の損失といった変性性変化と、ニューロトランスミッターの合成・分解・放出の退行変化といった代謝的変化の二つの側面が考えられる。我々は、加齢に伴う中枢神経機能の低下の原因を代謝的側面から明らかにすることを目的とし研究を続けている。今回、マウスシナプトゾームを用いてシナプスでのACh代謝について基礎的検討を加えたので報告する。

【実験方法】

シナプトゾームの調製：C57BL/6マウスを断頭後、その大脳皮質よりBooth and ClarkのFicoll密度勾配遠心法[2]にてシナプトゾームを調製した。

ACh合成量とコリン産生量の定量：シナプトゾーム標品（0.2 mg　タンパク質）をKrebs-Ringer液に懸濁し、50 μMのeserine共存下、37°Cでインキュベートした。反応を 1N 過塩素酸で停止し、既知量のethylhomocholineを内部標準物質として加えた。反応液を遠心後、その上清を、HPLCの試料とした。AChとコリンは固定化酵素カラムを用いる電気化学検出器（BAS社製）付HPLC（HPLC-ECD）で定量した。

GPChとPChの定量：シナプトゾーム標品に水／エタノール(1:2)混液を加えて超音波で破砕後、-20°Cで一昼夜水溶性物質を抽出した。抽出液からチッ素気流下エタノールを除去し、残渣を25 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)に再び溶解した。これにl unitのalkaline phosphataseあるいは、0.5 unitのglycerophosphorylcholine phosphodiesteraseを加えて37°C、30分間インキュベートした。この反応で生じたコリンをHPLC－ECDシステムで定量した。

【結果と考察】

図1にシナプトゾームでのACh合成に対するコリン添加の効果を示した。反応液にコリンが存在しなくてもACh合成がみられる。また、100 μMの高濃度コリンの添加はACh合成を抑制した。コリン無添加の条件下で、ACh合成とコリン産生の時間変化をみると、共に直線的に増加し、しかもAChの10倍量のコリンが常に産生されていた。これ

らは、シナプトゾームでは、少なくとも静止期においては、ＡＣｈ合成に必要なコリンを自ら供給出来ることを示すものと考えられる。この遊離コリンの由来として水溶性コリン中間体であるＧＰＣｈとＰＣｈが考えられる。そこで、この二つの中間体のシナプトゾームにおけるプールサイズを測定した。図２に示すように、調製直後のシナプトゾームには、7 nmoles/mg タンパクのＧＰＣｈ、3nmoles/mgタンパクのＰＣｈを含有する。60分間のインキュベーションのうち初めの10分間は両者とも直線的に増加するが、その後はＧＰＣｈが13nmoles、ＰＣｈが7nmoles/mg タンパクの一定レベルに達した。この両中間体のプールサイズは、インキュベーション期間中に産生されるコリン量より十分に大きい。ＧＰＣｈもＰＣｈもホスファチジルコリン（ＰＣ）の分解によって生ずると考えられることから、ＡＣｈ合成へのコリン供給源としてのＰＣの重要性が確認された[1]。図３はhemicholinium-3（ＨＣ－３）で高親和性コリン取込みを阻害した場合のＡＣｈ合成をみたものである。この実験いおいても反応液にコリンは添加していない。10^{-6}MのＨＣ－３でＡＣｈ合成はほぼ完全に抑制された。この結果は、シナプトゾーム内で産生されたコリンも、コリン取込み機構を介してＡＣｈ合成に利用されることを示すものと考えられる。

グルコース欠乏および、低酸素状態でのＡＣｈ合成とコリン産生速度を表１に示した。ＡＣｈ合成速度はグルコース欠乏、低酸素によって著しく低下するが、コリン産生はほとんど影響を受けない。また、シナプトゾームの構造を低張処理で破壊するとＡＣｈ合成能は消失するが、コリン産生はみられる。このことから、コリン産生はエネルギー非依存的であるが、ＡＣｈ合成はエネルギー依存的であると考えられる。

表１ **Effect of in vitro hypoxia and hypoglycemia on the rates of ACh and Ch synthesis**

	Acetylcholine (pmoles/mg protein/min)	Choline (pmoles/mg protein/min)
Complete	10.2 ± 1.1	96.9 ± 14.4
$-O_2$	6.6 ± 2.4	96.2 ± 9.2
-Glc	7.8 ± 0.5	114.0 ± 20.0
$-O_2$-Glc	4.6 ± 1.9	109.5 ± 16.6

【文献】

1) Blusztajn, J.K. et al. (1985) in: Cellular and Molecular Basis of Cholinergic Function (M.J. Dowdall & J.N. Howthorone eds) pp341-346, VCH, W.G.

2) Booth, R.F.G. and Clark, J.B. (1978) Bioch. J. 176, 365-370

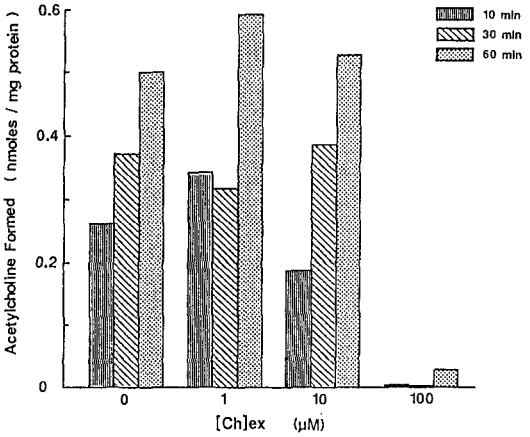


図１ Effect of exogenous choline on ACh synthesis in synaptosomes

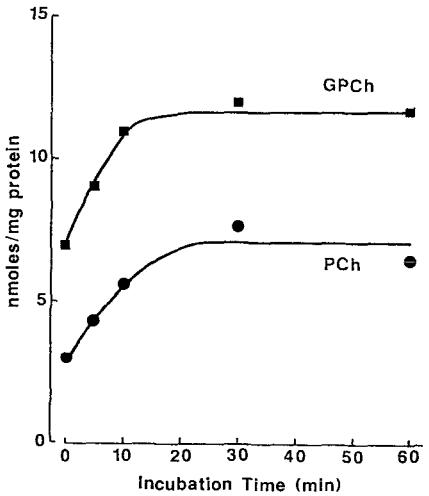


図２ Pool sizes of GPCh and PCh in synaptosomes

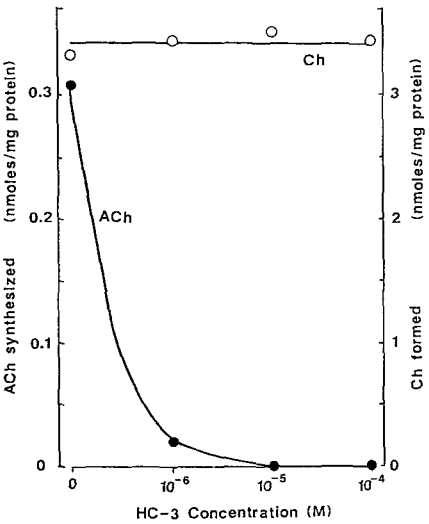


図３ Effect of HC-3 on ACh synthesis

204 摘出上頸部交感神経節のコリン取込みおよび代謝系

岩田 光良・田丸 政男・中島 雄三・永田 豊

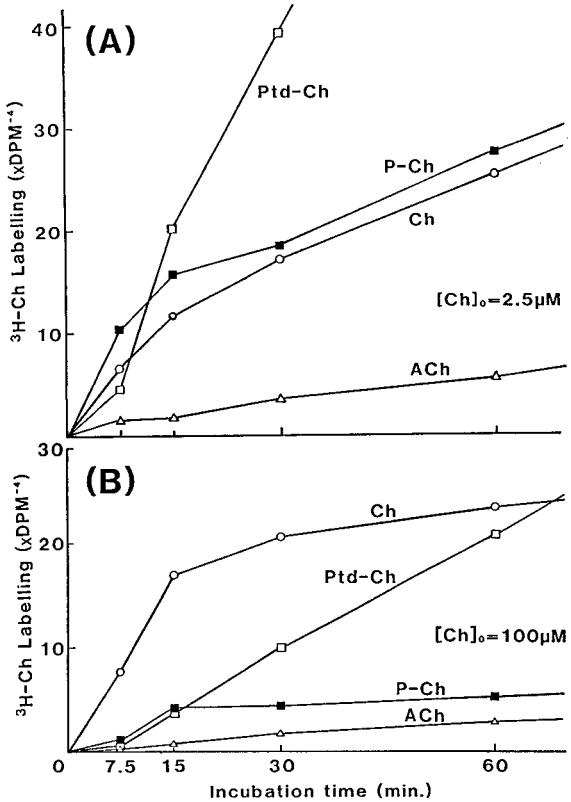
（藤田学園保衛大・医・生理）

〔要約〕 摘出白鼠上頸部交感神経節(superior cervical ganglia, SCG)のコリンの取込み(choline uptake: ChU)及び代謝について，Hemicholinium-3(HC-3) 感受性，Na^+-依存性，K^+-感受性 および，節前神経切断 (denervation)，節後神経切断(axotomy)の影響を検討した。 1),外液コリン濃度が低い条件（高親和性コリン取り込み系:HAChU）で摘出SCGを好気的にincubateすると，組織中に能動的に取り込まれた^{3}H-Chは，AChのみならずもっと多量かつ速やかにphosphocholine(P-Ch)およびphosphatidylcholine(Ptd-Ch)分画に取り込まれた。この傾向は，外液コリン濃度が高い低親和性コリン取り込み系(LAChU)よりもHAChUで著明に認められた。 2),HAChU系では HC-3の添加により，SCGへのChU並びにACh合成は著明に抑制されたが，Ptd-Chへのincorporationには変化がなかった。Na^+-freeの溶液中でincubateすると，SCGへのCh取り込み，ACh合成ならびにPtd-Ch分画へのincorporationは明らかに抑制された。またK^+-rich脱分極条件下でSCGをincubateすると，SCGへのChUの低下とACh合成が著明に抑制されたが，Ptd-Chへのincorporationもまた低下傾向が示された。 3),節前繊維切断手術後一週間のSCGではコリン作動性神経末端の変性がおこるが，HAChU，ACh生成ならびにPtd-Chへのincorporationは著明に低下した。しかし，節後繊維切断手術をおこなって，神経節細胞が変性し周辺グリアが増殖したSCGでは，ChUとACh生成の抑制はわずかであったが，Ptd-Chへの^{3}H-Ch incorporationは著明に抑制された。 以上の結果から，SCGへのHAChU系で取り込まれた^{3}H-Chは，特にコリン作動性神経末端において，ACh生成のみならず，Ptd-Ch系にも活発に取り込まれて，細胞膜内に蓄積される可能性が強く示唆された。

神経組織ではコリンを合成出来ないので，コリン作動性ニューロンでは， Chは周囲の溶液中より能動的に取り込まれる必要がある[5]。そして,高親和性コリン取り込み（high affinity choline uptake: HAChU）系は， 外液のCh濃度が低い時（$[Ch]_o$=2.5μM）にコリン作動性ニューロンで伝達物質のACh生合成と結び付いて働いており[4]，外液Ch濃度が高い場合（$[Ch]_o$=100μM）のChUは，低親和性過程（Low affinity choline uptake: LAChU）で，広く神経系に分布しているといわれる[4)8)]。ラットSCGは，コリン作動性シナプスを豊富に含む代表的なコリン作動性神経組織として知られている。 我々はラット摘出SCGを用いてHAChUを調べたところ，ラットSCGではHAChUが一部しか認められないことを見出し，昨年の本学会で報告した[5]。本研究では，ラット摘出SCG組織内にChが取り込まれた後，ACh，P-ChおよびPtd-Chに生合成される過程を，^{3}H-choline(^{3}H-Ch)を用いてその放射ラベルの分布を調べ，HAChUとLAChUとの場合を比較し,また節前あるいは節後神経切断術後のSCGのChUとその代謝について検討した。

〔実験材料及び方法〕 SCGのdenervationおよびaxotomy手術は，Wistar系成熟白鼠を用いて既報[1]に従って実施した。SCG標本の摘出も やはり既報[1]の如く行い，組織周囲の結合織を除去した後実験に供した。preincubation 30分後に^{3}H-Chおよびcarrierの2.5μM-choline(HAChU)あるいは 100μM-choline(LAChU)を含む生理的溶液(standard bathing solusion: SBS)

図1：摘出SCG内Ch化合物への^{3}H-Ch取り込みとincorporationの時間経過（A：HAChU，B：LAChU）



中で37℃, 30分間好気的にインキュベーションした。その後SCGを"cold"SBS中で洗浄して, 組織周囲のRI汚染を除去した後に, ホモゲナイズし, Hagaらの方法[4]でAChとChを, Burtらの方法[3]でP-Chを, Larrabeeらの方法[6]でPtd-Chを抽出し, 各々の分画に含まれる放射能を測定した。SCGの蛋白量は, Lowryらの方法[7]で定量した。

〔実験結果及び考察〕 1）SCG内へのCh取り込みと代謝の経時的変化： SCG内^{3}H-Ch化合物の経時的変化を調べたところ, HAChUでは, ^{3}H-ChUとAChおよびP-Chへの^{3}H-Ch incorporationは, 15分から30分まで急速に立ち上がり, その後３時間まで緩やかな上昇がみられるという二相性の経過であった。これに対してPtd-Chへの^{3}H-Ch incorporationは, 1時間以上にわたって極めて急激な上昇がみられるという一相性の経過を示した（図1－A）。また, LAChUにより取り込まれたChはSCG内に蓄積されて, 30分以内のincubationではACh, P-ChおよびPtd-Chへのincorporationは僅かであった（図1－B）。しかし, 3時間のincubation後には, Ptd-Chへのlabellingが著明に増大した（Data未掲載）。従って, HAChUの条件下でSCGに取り込まれたChは, ACh生合成よりはむしろPtd-Chへの活発な代謝回転にむかうことが確認された。 2）HC-3添加, Na^+-free及びK^+-rich条件下でのChUとincorporation： HC-3は, HAChUを特異的に抑制する事がよく知られている[4]。HC-3(100μM)の添加でSCGのACh合成は明らかに抑制されたが, Ptd-Chへのincorporationには変化がなかった。HAChUはまたNa^+依存性の特徴を持っているので, Na^+-freeの溶液中では前駆物質のChUが低下したため, ACh合成及びPtd-Chへの Ch-incorporationもまた著明に抑制された。K^+-rich条件下では細胞膜の脱分極が生じる為, Chの遊離がおこり, 神経末端で合成されたAChも遊離されて低下し, Ptd-Chへのincorporationもまた弱い低下傾向が見られた（図2）。一方, LAChU系では, HC-3によるChUやACh合成の抑制はわずかであったが, Ptd-Chへのincorporationはかなり抑制された。Na^+-freeおよびK^+-rich条件では, LAChUによるSCG内のCh含有化合物への^{3}H-Ch incorporationの抑制は, HAChU系のものと類似していた（Data未掲載）。

3）denervation及びaxotomy手術後のSCGにおける^{3}H-ChU及びincorporation： cholinergic nerve terminalの変性が生じているdenervated SCGでは, intact SCG標本と比べて, ^{3}H-ChのChUならびにAChおよびPtd-Chへのincorporationが著明に抑制された。neuronの脱落とgliaの増生ををを引き起こす axotomized SCGでは, ^{3}H-ChUおよびACh生成の低下は 比較的少ないにもかかわらず, Ptd-Chへのincorporationは denervated SCGの場合と同様に強く抑制された。すなわち, denervation手術によってSCGのACh並びにPtd-Ch生成系には, 著明な抑制傾向が示されたが, axotomy手術によるACh生成系の抑制は僅かで, Ptd-Chへのincorporationが強く抑制された(図3)。

以上の実験成績から, これまで主にACh合成系のみが注目されてきたコリン作動性ニューロンにおけるHAChUによるCh代謝系は, SCGではPtd-Ch生成系の著明な促進をも引き起こし, 細胞膜構成脂質の合成やChの貯蔵にも, 深く関与している可能性が, 強く示唆された。

図2：SCG内Ch化合物への^{3}H-Ch取り込みとincorporation
(HAChU, 30分間incubation)

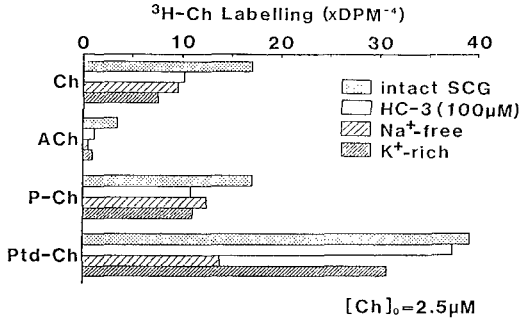
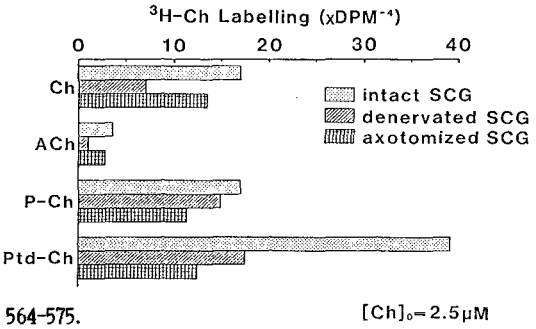


図3：SCG内Ch化合物への^{3}H-Ch取り込みとincorporation
(HAChU, 30分間incubation)



〔参考文献〕

1) Ando, M. et. al. (1984) J. Neurochem. 42: 94-100.
2) Ansell, G. B. et. al. (1971) Biochem. J. 122: 741-750.
3) Burt, A. M. et. al. (1975) Anal. Biochem. 65: 215-224.
4) Haga, T. & Noda, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta. 291: 564-575.
5) 岩田 光良, 田丸 政男, 永田 豊 (1987) 神経化学 26: 433-435.
6) Larrabee, M. G. et. al. (1963) J. Neurochem. 42: 94-100.
7) Lowry, O. H. et. al. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275.
8) Yamamura, H. I. & Snyder, S. H. (1973) J. Neurochem. 21: 1355-1374.

205 カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡのｃＤＮＡの発現と性質

山内卓＊　大迫俊二

（東京都神経科学総合研究所・神経生化学）

〔要約〕

カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡ（キナーゼⅡ）はα、βの２種のサブユニットから構成されているが両サブユニットの構成比は不明で、酵素活性の発現と調節に対する各サブユニットの役割は明らかでない。この点を明らかにする目的で本酵素のｃＤＮＡをクローニングし発現ベクターに結合し培養細胞に導入することにより酵素活性の発現を調べた。すなわち、α、β両サブユニットのｃＤＮＡを同時にＣＨＯ細胞に導入し安定なクローンを得た。その細胞抽出液を用いて Ca^{2+}、カルモデュリン存在下にＭＡＰ２およびミオシン軽鎖のリン酸化を調べると、高いキナーゼⅡ活性の発現が認められた。細胞内での両サブユニットのｍＲＮＡの生成はそれぞれに特異的なプローブを用いて Northern blotting により確認し、また両サブユニット蛋白質の生成は特異的抗体による Immunoblotting で確認した。また、αあるいはβサブユニットのｃＤＮＡをそれぞれ単独にＣＨＯ細胞あるいはＣＯＳ細胞に導入することにより、αとβサブユニット単独でも酵素活性を持つことが明らかとなった。

神経細胞の情報伝達は神経終末から放出される伝達物質が標的細胞の受容体に作用することによって行なわれる。この情報変換の過程に蛋白質リン酸化反応が介在することが次第に明らかになってきた。神経組織では蛋白質リン酸化活性が他の組織に比べて非常に高いことも神経伝達における蛋白質リン酸化反応の重要性を示唆するものといえる。一方、キナーゼⅡは脳神経系に高い活性を有し、脳の多くの蛋白質のリン酸化を触媒する事が明らかにされ例えばモノアミン合成の調節、神経伝達物質の分泌の調節あるいは、細胞骨格蛋白質の機能調節等神経機能の調節に重要な役割を担っているものと考えられている。我々は本酵素の神経組織での役割を明らかにするための最初の段階として本酵素のｃＤＮＡを調製し培養細胞での酵素活性の発現を調べた。本研究の一部は第６１回日本生化学会に於て発表の予定である。

［実験方法］

ラット大脳から poly(A)$^+$RNA を調製し、λgt10 を用いｃＤＮＡライブラリーを作成し、すでに報告されたキナーゼⅡのα、βサブユニットの構造 (1,4) を参考にしてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとしてｃＤＮＡのクローニングを行なった.得られたｃＤＮＡを Okayama-Berg 発現ベクター pcDL1 の EcoRI site に挿入しリン酸カルシウム法(3)によりＣＨＯ細胞へ導入し、また DEAE デキストラン法(2)によりＣＯＳ細胞に導入した。キナーゼⅡの活性は［γ-^{32}P］ATP を用いて Ca^{2+}、カルモデュリン存在下に MAP2 とミオシン軽鎖のリン酸化により測定した。精製したキナーゼⅡをマウスに免疫してその腹水からキナーゼⅡの特異抗体を得た(6)。Northern blotting に使用するαとβサブユニットに特異的なプローブはそれぞれαｃＤＮＡの AccⅢと PvuⅡの間のｃＤＮＡとβｃＤＮＡの SacⅡと BamHIの間のｃＤＮＡを用いた。

［実験結果・考察］

ラット大脳からｃＤＮＡライブラリーを作成し合成オリゴヌクレオチドを用いキナーゼⅡのクローニングを行ないαとβサブユニットのｃＤＮＡを得た。αｃＤＮＡは 1.7kbp で、βｃＤＮＡは 1.8kbp であったが、これらｃＤＮＡの両端について塩基配列を決定したところいずれのｃＤＮＡも全翻訳領域を含んでいることが判った。制限酵素地図は図１のようであり、Lin 達 (4) や Bennett 達(1) によって報告された構造とよく一致している。このｃＤＮＡを SV-40 のプロモーターをもつ pcDL1 に挿入し発現ベクターを調製し、培養細胞に導入し酵素活性が発現するかどうか調べた。すなわちαｃＤＮＡ、βｃＤＮＡを単独または両者同時にＣＨＯ細胞に導入し、それぞ

れ3種のクローンについて酵素活性とmRNAの生成、酵素蛋白質の生成を調べた。その結果、αとβcDNAの両者を同時に導入した細胞ではキナーゼIIの高い活性が認められた（表1）。とくにα-1クローンでは大脳抽出液の約2倍の比活性を示すことからキナーゼIIのcDNAがCHO細胞において活性をもった状態で発現することが明らかとなった。また、αサブユニット単独でも比較的高い活性が見出され、β単独でも有意に高い活性が見出された（表1）。αとβサブユニットは単独でも活性があることはcDNAをCOS細胞に導入すると一過性に活性が発現することからも確認することができた。次にcDNA導入によるmRNAの生成はα、βそれぞれに特異的なプローブを用いた Northern blotting により確認された。酵素蛋白質の生成は特異抗体を用いた Immunoblotting により確認された（図2）。またαとβcDNAを同時に導入した細胞では単一細胞からクローン化した場合にも両サブユニットの蛋白質が生成していることから一つの細胞で両サブユニットの蛋白質が発現していることが確認された。

以上のようにラット大脳のキナーゼIIのcDNAがCHO細胞やCOS細胞で発現されることが明らかとなった。酵素はαあるいはβサブユニット単独でも活性を持つことから両サブユニットの構成比と酵素活性の発現や調節がどのような関係にあるか興味深い。大脳ではαサブユニットがβに比べて多く、小脳ではその逆の結果が報告されており(5)今後さらに酵素の性質を解析し、脳神経系におけるキナーゼIIの生理的役割を明らかにしていきたい。

［文献］

1. Bennett, M. K. and Kennedy, M. B. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1794
2. Cullen, B. R. (1987) Methods Enzymol. 152, 684
3. Gorman, C. (1985) in DNA Cloning; A Practical Approach (Glover, D. M. ed.) vol 2, pp. 143
4. Lin, C. R., Kapiloff, M. S., Durgerian, S., Takemoto, K., Russo, A. F., Hanson, P., Schulman, H., and Rosenfeld, M. G. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5962
5. McGuinness, T. L., Lai. Y., and Greengard, P. (1985) J. Biol. Chem. 260, 1696
6. Tung, A. S., Ju, S. -T., Sato, S. and Nisonoff, A. (1976) J. Immunol. 116, 676

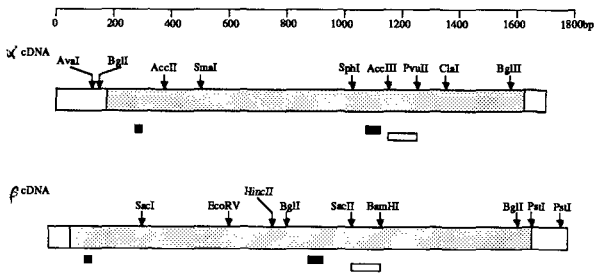


Fig. 1. Restriction Maps of the cDNAs Encording α-and β-subunits of KinaseII from Rat Brain

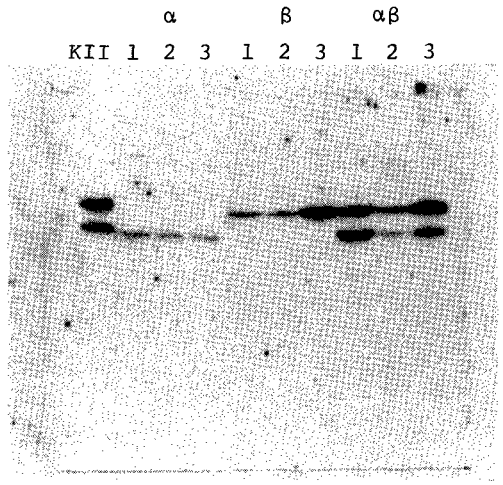


Fig. 2. Immunoblot analysis

TableI. Activity of kinaseII in transfected CHO cells

cell	Transfected cDNA	KinaseII Activity MAP2	MLC
		nmol/min/mg protein	
Neo	neo	0.31	0.79
α1	α	0.93	2.20
α2	α	0.90	1.87
α3	α	0.73	1.45
β1	β	0.53	0.93
β2	β	0.61	1.14
β3	β	0.71	1.82
αβ1	α＋β	3.78	6.86
αβ2	α＋β	1.10	1.86
αβ3	α＋β	2.23	4.38

人名索引（ABC順）

〔数字は掲載ページを示す〕

（A）

阿部輝雄……334
阿部敏明……378
阿部俊夫……190
足立芳樹……294
相川純一郎……288
相本三郎……270
相沢貴子……350•356•358
赤林朗……410
赤川公朗……196
秋山一文……214•280•306
秋山万里子……72
天野武彦……94•158
安藤進……428
青野幸子……262
荒井裕一朗……230
新井孝夫……336
荒木一明……82
荒木努……212
荒木亘……282
有賀敏夫……384
有松靖温……162
朝倉幹雄……302
朝倉正……190•414
浅野富子……26•286
阿相皓晃……96
栗木悦子……294

（B）

B. Wroblewska……412

（C）

Campagnoni A.T.……40
Campagnoni C.……40
C.E. Henderson……150

（D）

大源明宏……306
出口武夫……86

（E）

E. Yavin……428
戎弘志……348
枝松礼……140
Elliott Richelson……366
衛藤義勝……108

（F）

藤田信也……36•38
藤田忍……66
深間内文彦……392
舟本規明……378
古市貞一……46
古田知久……198•200
古塚大介……216
藤木嘉明……138

（G）

G. Jonsson……208
G. Toffano……208
Gabriel Berstein……388
George A. Bray……56
権藤雄二……298•300
後藤幾生……64
後藤香糸子……188
後藤正義……100

（H）

羽場久美子……140•238•360
羽賀誠一……224
芳賀和子……390
芳賀達也……388•390
萩野顕彦……160
濱登希子……156
濱田一……140
飯田静夫……290
原厚……374
原靖……98
原諭吉……338
原田淳……266
原田寧……380
播口之朗……78•192•210•222•232
長谷川和夫……302
橋本誠一……160
橋本健志……248
畠中寛……110•156•162•168
畠瀬修……274
畑澤順……136
八田慎一……186
服部英幸……210
早川浩……422
早川徹……178•180
林英之……202
林謙一郎……112
林基治……66
林昌亮……100
樋口宗史……276
樋口義信……278
日根野尚……296
平松緑……140•202
平野誠……242
平野修助……380
平田洋子……244
平谷勝彦……296
平山栄一……216
久永欣哉……110•168
本多健治……278
星直人……364
細川清……274
北條裕信……270
藤澤仁……328
藤田公和……348
藤原道弘……316

藤原祐子……378
福永浩司……326
(I)
井端由起郎……96
市川道教……336
市村徹……252
一瀬宏……52
Ichiyama Arata……388
井田能成……298•300
池田久男……234
井戸達雄……136
五十嵐道弘……116
伊原正樹……332
飯島敏夫……324
池田正行……292
池田淑夫……138
池中一裕……42•270
今福淳……302
今井伸一……132•246
今井千佳……394
今泉美佳……54
今泉太郎……28•320
今村幸治……82
今澤正興……104
稲永和豊……208
稲生英俊……268
井上順雄……340
井上猛……130•308
石橋由朗……220
石田外樹……30
石郷岡純……362
石井加代子……86
石井毅……224
石川博……108
石川紘一……48•420
石岡憲照……254
石渡喜一……136
礒辺俊明……252•256
板野俊文……274
伊藤憲一……270
伊藤正敏……136
伊藤哲一彦……138
伊藤仁一……102
岩本典彦……382
岩佐厚……276
岩崎克典……316
岩崎忠昭……28
岩田光良……430
(J)
J. Bembry……412
J.N. Kanfer……194
J.P. Changeux……150
徐曼……386
(K)
加太英明……124•202
門田永治……210
門田健……398•400
門田朋子……398
加地正郎……208
垣花満……166
柿本泰男……296•416
郭哲輝……72
亀谷富由樹……224
神谷大雄……206•278
神庭重信……366
神田啓子……118
金行孝雄……122
神野哲夫……146
假屋哲彦……368
笠原友幸……362
笠間透……310
柏俣重夫……92•262
柏原健一……280
片岡和夫……178•180
片山禎夫……144
加藤宏司……270
加藤兼房……26•258•286
加藤隆一……366
加藤聖……30
加藤匡宏……426
加藤泰治……102
加藤尚彦……410
加藤武……272•386
加藤剛志……328
加藤兼房……90
川端昌弘……120
川合述史……268
川北幸男……216•218
川本日出雄……28
川島誠一……172
川嶋信吾……282
木原実……418
Kikkawa Ushio……32
菊池章……24
木村永一……396
木村宏……98
杵鞭宏育……230
木下章……178•180
木皿憲佐……230
岸野淳三……424
岸正孝……142
北本年弘……74
北村邦男……40
北村登……248
北村佳久……132•246
鬼頭昭三……144•342•346
木内祐二……250
小林功……56
小林和夫……114•384
小林清史……120
小林睦博……194
小林節雄……56
小林卓郎……64
小林利雄……250
児玉浩明……278
古賀けい子……204
古賀照邦……208
小暮久也……212
小暮美樹……420
小平隆太郎……420

小出誠司……218
小出直……348
小池亮子……376
小池達郎……164
小島秀樹……208
小島利之……338
小宮義璋……182•184
小長谷正明……344
小長谷陽子……344
近藤哲朗……270
紺野邦夫……354
小阪憲司……382
胡谷和彦……416
香田知子……408
甲村英二……178
高坂新一……96
小山司……130•308•322
久保里子……240
久保孝史……418
九穂泰三……420
窪田博……302
工藤喬……210
工藤佳久……114
久我哲郎……400
熊谷博道……74
熊倉鴻之助……54
熊代永……226
国塩勝三……198•200
倉岡幸令……354
倉田のり……80
倉田立子……332
栗原正紀……176
栗原正……36•38
栗岡晋……254
栗山欣弥……142•318
黒部直美……258
黒田洋一郎……114•384
黒木俊秀……242
黒河内彰……226
桑野良三……82

(M)

M. Spatz……412
馬福海……142
前田信明……46•60•62
前川昌平……70
牧野裕……382
真鍋敬……256
Mark S. Shearman……32
丸野内棣……80
正木直子……294
増田千春……240
松原良次……130•308
松林弘明……426
松田誠……152•190•220•414
松田友宏……352
松久卓……198•200
松井秀樹……274
松井英男……340
松井啓……228
松井和隆……108
松井泰……24
松海信彦……198•200
松本暁子……338
松本明……420
松本元……324•336
松本宏志……278
松本健五……198•200
松本勝美……178•180
松本孝……242
松本智明……100
松村道一……66
松尾圭一……176
松下和弘……202
松澤大樹……136
三木直正……72
御子柴克彦……42•44•46•60•62•268•270
三国雅彦……292•322•412

南正康……244
美根和典……316
峯田寿裕……34
三崎尚之……28•320
三澤日出巳……266
三島宣哉……198•200
三須良実……418
三田達雄……248
三井宏美……82•334
三浦巌……204
三浦貞則……362
宮原正……108
三宅正治……170
宮本亜紀……100
宮本篤……396
宮本英七……62•260•326
宮本侃治……104
宮本真美……156•162
宮武正……36•38•376•384
宮脇敦史……60
三好理絵……144•346
溝部文夫……386
溝渕睦彦……296
溝渕宗秀……152•220
水野有武……152•220
水野智……228
水田正……394
望月貴年……424
最上平太郎……178•180
桃井真里子……88
桃井隆……74
桃崎宣明……34
森昭胤……124•140•202•238•360
森秀樹……322
森和夫……176
森真由美……352
森則夫……226
森口幸栄……236

盛政忠臣……122
森本清……306
森下理香……26•286
森田仁……222
森田勇二……344
森分隆……306
諸井佳代子……400
本橋伸高……368
撫井弘二……216
村上哲英……148
村木彰……130
村越和子……76•78
村本和世……114
莚井武……178•180

(N)

N. Merkel……412
羽賀千恵……382
永井克孝……174
長嶋和郎……378
永田悦子……362
永田豊……348•430
長瀧重信……176
永津俊治……52•244
中川照丈……240
中原辰雄……242
中井隆……248
中井康光……84•354
中島誠……280
中嶋一行……104
中三川晃利……88
中村薫……242
中村光夫……274
中村重信……282
中村泰治……84
中村祐……192•222
中西純一……302
中野智……282
中尾真……338
中島雄三……430
中谷一泰……84
中山誠……130•308
中条茂男……84
野村正彦……146
直井信……52•244
成沢邦明……288
名竹洋子……254
根木哲郎……148
根岸晃六……30
Newman S.……40
新川久義……210•232
新美達司……112
新延道夫……46•60•62•268
二家本晃……338
西彰五郎……208
西川浩……214•306
西川正雄……318
西川清方……294
西川徹……126•292
西本詮……198•200
西村健……76•78•192•210•222•232
西野直樹……248
西尾チカ……156•168
西山浩二……242
西崎純……302
Nishizuka Yasutomi……32
丹羽正美……176
野口鉄也……154
野倉一也……112
野村正彦……228
野村総一郎……58
野村靖幸……132•246•304
野中重幸……278
野沢明美……350•356•358
野沢義則……364

(O)

大場隆……326
大星博明……242
落合英彦……84
Oda Tomiichiro……32
小田恵夫……86
小田垣雄二……130•308
大垣孝雄……402
小片寛……250
小川希代子……378
小川紀雄……238•280•360
小木曾学……380
荻田喜代一……312•314•402•404•406•408
小口雅申……298
小倉明彦……114
大橋美浩……272
大平敦彦……92
岡部紀子……94
岡田英俊……122
岡田理之……234
岡田三津子……316
岡田尚志郎……50
岡本基……280
岡村邦博……228
岡野栄之……42
岡野幸雄……364
大川清……190
岡崎宏司……178•180
大熊誠太郎……142
奥山真司……138
奥山典生……252•256
小俣久美子……84
大森哲郎……130
大森敬之……318
大西博……216•218
小野信文……206
小野剛……360
大野司……376
小野寺宏……212
尾上太一……280
大貫裕子……362
長田賢一……302
大迫俊二……432

大鹿英世……186•396
大島健一……100
大城公恵……138
太田聖一……226
太田安隆……326
大田昌子……380
大谷義夫……362
大塚正征……206
大月三郎……214•280•306
大柳光正……28
尾崎正若……176
小澤健太郎……68
小澤光一郎……134
小鹿幸生……112

(R)

Ramon Cacabelos……232
六川千秋……290

(S)

西須英雄……334
斎藤亮……278
斎藤寿仁……370•372
斎藤義樹……260
斎藤祐見子……172
斉藤利和……186
坂口和靖……278
桜井真夫……100
佐野公彦……24
佐野護……90
更井啓介……422
佐藤厚子……302
佐藤博美……236
佐藤浩……262
佐藤光源……306
佐藤麿人……224
佐藤公道……264•266
佐藤信範……230
佐藤修三……36•38
佐藤透……198•200
佐藤秩子……286
澤温……58
澤田誠……80
瀬川富朗……134•394
関口達彦……324
仙波禮治……26•262
仙波りつ子……90•92
芝哲夫……268
芝軒信次……420
柴田牧子……302
渋谷治男……392
重松和人……176
島田明範……354
嶋津孝……128
清水浩光……250
清水弘行……56
下東康幸……278
下泉秀夫……88
下村洋之助……56
下山政憲……342
下条貞友……108
塩田清二……354
塩田千代……44
白石照雄……242
白石哲也……34
白川治……248
庄盛敏廉……120
清水温子……258
祖父江憲治……68•118
曽根一郎……214
相馬俊子……218
末吉圭子……298•300
菅又久美子……378
杉崎哲朗……154
杉田倫太郎……58
寿野正広……166
鈴木英夫……192•222
鈴木富士子……286
鈴木国夫……332
鈴木竹雄……404•406
錫村明生……80
庄田基……146
庄司紘史……208
庄盛敏廉……50•122

(T)

田淵和雄……34
多田啓也……288
多田幸司……48
多田國利……76•78•192•210•222
只野武……230
田口淳一……318
田口浩資郎……234
田口隆久……150
高田耕司……190
高木勝至……34
高橋啓……48
高橋清久……126•292•412
高橋正身……330
高橋美枝……234
高橋良……392
高橋勤……52
高橋康夫……36•38•82
高橋和郎……294
高畑直彦……186
高井義美……24
高見正雄……394
高野行夫……278
高須俊行……304
高柳哲也……344
竹田晃……128
竹田二美代……354
竹田稔……354
武田京子……54
武田雅俊……76•78•192•210•222
武井延之……110•156
竹村基彦……424
竹下正純……370•372
武富保……194•374
竹内潤一……250
滝田正寿……272

田丸政男……348•430
田村滋規……264
田中晴美……310
田中潤也……76•78
田中喜久子……224
田中雅邦……122
田中正敏……298•300
田中亮……102
田中秀逸……164
田中康一……428
田岡万悟……256
田代朋子……182•184
楯林義寛……242
戸田洋子……124
東田陽博……364
徳田雅明……274
友田桂子……138
朝長正徳……284
融道男……250
東田道久……304
戸谷重雄……96
遠山育夫……98
豊島正……268
津田彰……298•300
辻崇一……174
辻省次……376
辻輝之……282
塚田裕三……96
塚原敏正……362
塚本徹……302
月田承一郎……336
津久井弘子……110•156•162•168
津野和幸……198•200
鶴田智也……272
津島宏美……352
筒井公子……50
堤哲之……242
都築紀宏……188

(U)

内田洋子……284
内村英幸……242
上羽毅……318
植田弘師……264•266
植村慶一……196
氏家寛……280•306
鵜飼清治……240
浦上克哉……294
宇佐美美穂子……398
生塩之敬……260

(W)

和田博……424
和田健太郎……46
若田部博文……362
脇道典……278
渡辺康裕……28•320
渡邉建彦……136

(Y)

八木剛平……366
八木康之……152
山田和雄……178•180
山田了士……214•306
山田茂人……208
山上栄……216•218
山口文徳……274
山口仁……106
山口知子……106
山口徹……334
山川淳子……378
山国徹……82•94•158•256
山本明宏……358
山本明広……350•356
山本秀子……412
山本秀幸……62•260
山本正彦……112
山本敏文……94•158•386
山村初雄……96
山下格……130•308•322
山下元司……234
山下さゆり……346
山下俊一……176
山下正……210
山下達朗……174
大和谷厚……424
山内惟光……58•138
山内卓……432
山脇成人……422•426
山崎りつ……234
谷内一彦……136
矢野光夫……332
安原治……98
横井功……124•202
横田則夫……422
横田司……290
横山茂……364
米田幸雄……312•314•402•404•406•408
吉田博……28•276•320
吉田光昭……80
吉田玲夫……422
吉田敏……370•372
吉田幸宏……126
吉川和明……350•356•358
吉川真悟……46
吉川武男……392
吉村和法……196
由村健夫……64

神経化学　第27巻　第1号

昭和63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　笹氣出版印刷株式会社