ISSN:0037-3796

# 神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第32回　日本神経化学会大会論文集

Vol. 28 (No.1), 1989

日本神経化学会

# 神経化学

第32回日本神経化学会大会論文集

PROCEEDINGS OF THE 32th ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於 札 幌

9月27日(水), 9月28日(木), 9月29日(金)

Vol. 28 (No. 1), 1989

日 本 神 経 化 学 会

**編集委員**（ABC順）

阿部　弘　（北大・医・脳外科）
藤沢　仁　（旭川医大・生化）
小山　司　（北大・医・精神）
栗原堅三　（北大・薬・薬剤）
野村靖幸（代表）　（北大・薬・薬効）
大鹿英世　（札医大・薬理）
斎藤秀哉　（北大・医・薬理）
徳光幸子　（北大・薬・薬効）
山下　格（代表）　（北大・医・精神）

# 目　　次

1. 精神分裂病者の，治療前，治療後の脳糖代謝，脳血流量，脳酸素消費量 ……28
藤田　春洋，高津　修，岸本　英爾，石川　尚志，松下　正明，
飯尾　正明*　（横浜市大・医・精神医学，国立療養所・中野病院*）

2. 2-deoxyglucose（DG）と2-deoxyglucose-6-P（DG6P）の酵素的定量法を用いる，ラット微小中枢神経領野のグルコース利用率測定法 ……30
赤林　朗，加藤　尚彦　（東大・医・脳研生化）

3. 末梢組織の糖利用に及ぼす視床下部の調節作用 ……32
首藤　誠，高橋　章，箕越　靖彦，嶋津　孝　（愛媛大・医・生化第一）

4. E1マウスのけいれん発作に対する食餌中亜鉛量の影響 ……34
深堀　元文，伊藤　正敏，竹下　英康，川嵜　弘詔，橋本　喜次郎，
黒木　俊秀　（九大・医・神経精神）

5. 培養アストロサイト及び$C_6$グリオーマ細胞におけるアラキドン酸代謝 ……36
石崎　泰樹，森田　育男，室田　誠逸　（東京医歯大・歯・顎研機能）

6. 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代謝に及ぼす影響 ……38
松井　和隆*，衛藤　義勝*，白澤　信行**，石川　博**，下條　貞友***
（慈恵医大・小児科*，解剖**，第二内科***）

7. L-スレオならびにエリスローDOPS投与後の脳内モノアミンおよびその代謝産物の含量の変化について ……40
原田　博之，辻　元宏，多賀　千明，能登　直，中嶋　照夫
（京都府医大・精神医学）

8. Vasoactive Intestinal Polypeptide（VIP）およびHelodermin（HDM）の分解酵素に関する研究 ……42
蜂須　貢，平沼　豊一，谷　寿恵，加藤　由美子，飯塚　多美恵
（MDリサーチ㈱）

9. 高$K^+$ mediumによる脳切片内glutamine synthetase活性上昇の因子について ……44
金松　知幸，平野　修助　（東邦大・医・第二生理）

10. アストロサイトにおけるGM-CSFの産生 ……46
大野　和茂，澤田　誠，錫村　明生*，丸野内　棣
（藤田学園保健衛生大・総合医科研・応用細胞，医・神経内科*）

11. Astrocyte由来interleukin 3（IL-3）はmicroglia cellにMHC class II（Ia）antigenを誘導する ……48
今村　一博，錫村　明生*，大野　和茂**，丸野内　棣**，高橋　昭
（名大・医・神経内科，藤田学園保健衛生大・医・神経内科*，総合医科研・応用細胞**）

12. アルツハイマー病末梢リンパ球の抗グリア線維酸性タンパク質抗体産生能の検討 ……50
中村　和子，武田　雅俊，多田　國利，播口　之朗，西村　健
（阪大・医・精神神経）

13. Colony Stimulating Factorによる培養ミクログリアの機能および増殖の調節 ……52
錫村　明生，澤田　誠*，大野　和茂*，丸野内　棣*，山本　纐子
（藤田学園保健衛生大・医・神経内科，応用細胞*）

14. 塩基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 ……54
遠山　育夫，原　靖*，半田　譲二*，安原　治**，秋口　一郎**，
木村　宏　（滋賀医大・分子神経研，脳外科*，京大・医・神経内科**）

15. N-(1-〔2-thienyl〕cyclohexyl)〔$^{3}$H〕piperidine結合部位のラット脳における発達 ……56
篠原　一之，西川　徹，石井　澄和*，高橋　清久
（国立精神神経センター・神経研，武蔵病院*）

16. 抗うつ薬慢性投与後のラット大脳皮質$\beta$受容体数の変化：浸透圧ポンプ投与と皮下投与の差異 ……58
窪田　博，朝倉　幹雄，塚本　徹，今福　淳，小川　百合子，
長谷川　和夫　（聖マリアンナ医大・神経精神）

17. Immobilization stressによる脳内adenylate cyclase活性の変化 ……60
高嶋　修太郎，後藤　文男，石原　直毅*，田中　耕太郎**，五味　愼太郎，
美原　盤（慶大・医・神経内科，美原記念病院内科*，水戸日赤病院内科**）

18. PC 12細胞におけるNGFおよびグルタミン酸受容体応答とc-fos誘導 ……62

黒住　公一，村山　俊彦，野村　靖幸　　（北大・薬・薬効）

19. ヒスタミン$H_2$受容体を介する情報伝達系におけるリン脂質N-メチル化反応の関与—脳と心房の相同性について— ……64
小澤　光一郎，瀬川　富朗　　（広島大・医・薬効解析）

20. $D_1$，$D_2$ドーパミンレセプターを介したラット脳線条体内アセチルコリン放出量の調節 ……66
安島　綾子，加藤　武*，山口　時男**
（東工大・生命化・細胞生理，横浜市大・分子認識*，山之内㈱・中研**）

21. $P_{400}$／イノシトール1，4，5-三リン酸受容体の精製と性質 ……68
前田　信明，新延　道夫，御子柴　克彦　（阪大・蛋白研・機能制御）

22. 神経終末形質膜に存在する$IP_3$感受性カルシウムチャンネルについて ……70
植田　弘師，田村　滋規，佐藤　公道　　（京大・薬・薬理）

23. $IP_3$給合能を持つ$P_{400}$蛋白質の機能と存在様式 ……72
宮脇　敦史**，古市　貞一*，吉川　真悟**，御子柴　克彦**
（基生研・行動制御*，阪大・蛋白研・機能制御**）

24. ラット大脳皮質におけるGTP結合タンパク質GoとGi$_2$の細胞内分布 ……74
浅野　富子，加藤　兼房　　（愛知コロニー研・生化）

25. 精神分裂病死後脳のGTP結合蛋白質（Gi，Go） ……76
岡田　文彦，徳光　幸子*，T. J. Crow**，G. W. Roberts**
（北大・保管センター，薬・薬効*，Psychiatry，Clin. Res. Centre，UK**）

26. 炭酸リチウム投与そう鬱病患者の血小板における百日咳毒素による阻害性GTP結合蛋白のADP-ribosylationの変化について ……78
森田　仁*，渡辺　康裕，今泉　太郎，武田　雅俊*，播口　之朗*，
西村　健*，吉田　博　　（阪大・医・第一薬理，精神神経*）

27. ラット海馬膜標品における5-HT受容体を介するadenylate cyclase活性の抑制に関する検討 ……80
小田垣　雄二，小山　司，松原　繁広，大森　哲郎，中山　誠，松原　良次，
井上　猛，久住　一郎，村木　彰，山下　格　　（北大・医・精神医学）

28. ras p 21 類似 GTP 結合蛋白質 smg p 25 A の新しい調節蛋白質の精製と性状 ……82
荒木　伸，菊地　章，佐々木　卓也，畑　裕，磯村　光男，勝二　郁夫，黒田　真也，高井　義美　（神戸大・医・第一生化）

29. アストロサイトの産生するニューロン突起伸展因子について ……84
森　俊夫，飯島　昇，北畠　克顕，高坂　新一*
（アサヒビール・中央研，国立精神神経センター・神経研*）

30. コリン作動性神経分化に関与する細胞内因子 ……86
水野　憲一，栗原　堅三　（北大・薬・薬剤）

31. 安定型アスコルビン酸（L-アスコルビン酸-2-リン酸エステルナトリウム塩）の初代培養神経細胞に対する作用 ……88
榊原　真人，河瀬　恵信，高坂　新一*
（昭和電工・生化研，国立精神神経センター・神経研*）

32. ラット中枢ニューロンの高酸素気相下における培養 ……90
畠中　寛，津久井　弘子，西尾　チカ　（阪大・蛋白研・蛋白生合成）

33. 生後ラット脳幹カテコールアミンニューロンの初代培養と IL-6 によるその生存維持作用 ……92
濱　登希子，宮本　真美，武井　延之*，野口　かおり，九島　洋一**，畠中　寛**
（三菱化成生命研・脳神経，国立精神神経センター*，阪大・蛋白研**）

34. ラット胎児脳シナプトソーム画分の 50 K タンパク ……94
竹田　稔，碓井　由美子，門福　強樹，菅谷　慶三，藤森　基次，門　蒂声，中村　泰治*，佐藤　永雄
（昭和大・医・第二生化，薬・生物化学*）

35. 甲状腺ホルモンによる幼生オタマジャクシ知覚神経節内タンパク代謝の調節とストレスタンパクの誘導 ……96
安藤　正人，S. Maines*，R. Hammerschlag*
（藤田学園保健衛生大・医・生理，City of Hope・Beckman 研・神経科学*）

36. 分化成熟にともなうラット小脳タンパク質の変動解析と同定 ……98
田岡　万悟，礒辺　俊明，奥山　典生，山国　徹*

（都立大・理・化学，三菱化成生命研*）

37. ニューロン生存抑制因子の部分精製 ……100
内田　洋子，朝長　正徳　（都老人研・臨床病理，東大・脳研・病理）

38. Krabbe病の脱髄の病因に関する研究：マウスKrabbe病（twitcher）の培養オリゴデンドロサイト及びシュワン細胞を用いた検討 ……102
井田　博幸，衛藤　義勝　（慈恵医大・小児科）

39. Myelin deficient（mld）変異におけるMBP遺伝子再構成機構の解析 ……104
岡野　栄之，有賀　純，中川　敏幸，御子柴　克彦
（阪大・蛋白研・機能制御）

40. Myelin-associated glycoprotein（MAG）mRNAの脱髄および再生モデルにおける発現 ……106
藤田　信也，佐藤　修三，栗原　正*，石黒　英明，桑野　良三*，
崎村　建司*，高橋　康夫*，宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科，神経薬理*）

41. 妊娠ラットのアルコール摂取が仔ラット脳に及ぼす影響—その生化学的研究（II）
2′，3′-環状ヌクレオチド-3′-フォスフォジエステラーゼのmRNAについて ……108
小嶋　久子，北島　理恵，栗原　正*，中村　和生，高橋　康夫*，
玉井　洋一　（北里大・医・生化，新潟大・脳研・神経薬理*）

42. マウス2′，3′-環状ヌクレオチド3′-フォスフォジエステラーゼのcDNA及び遺伝子クローニング ……110
栗原　正，桃生　勝己*，高橋　康夫
（新潟大・脳研・神経薬理，秋田大・医・耳鼻咽喉*）

43. GH欠損と甲状腺ホルモン欠損のミエリン低形成発現機序の相違 ……112
野口　鉄也，森沢　啓一郎*，杉崎　哲朗，金松　知幸，青木　継稔*
（東邦大・医・第二生理，第二小児科*）

44. 脳におけるInsulin-like Growth Factor Iの解析 ……114
山口　文徳*，板野　俊文，中村　光夫*，溝淵　雅之**，松井　秀樹，
徳田　雅明，江藤　誠司，大本　堯史**，細川　清*，畠瀬　修
（香川医大・第一生理，精神神経*，脳外科**）

45. マウス脳GPDH活性に及ぼすホルモンの効果 ……116
杉崎　哲朗，野口　鉄也　（東邦大・医・第二生理）

46. Preprotachykinin B遺伝子由来のペプチド：neurokinin Bの局在と中枢性昇圧作用 ……118
高野　行夫，永島　亮，萩尾　哲也，立石　カヨ子*，松岡　雄治*，浜岡　利之**，神谷　大雄
（福岡大・薬・薬理，医・生化学*，阪大・医・バイオメディカルセンター**）

47. 視床下部のNPYと膵内分泌調節ならびにその異常との関連性 ……120
阿部　充志，斉藤　昌之*，嶋津　孝
（愛媛大・医・生化第一，現北大・獣医・生化*）

48. 精神分裂病死後脳前頭前野のオピオイド受容体について ……122
渋谷　治男，森　博史，高橋　良，融　道男*，西川　徹**
（東京医歯大・医・神経精神，信州大・医・精神*，国立精神神経センター**）

49. 脳に特異的に存在する超らせんDNA結合タンパク質 ……124
筒井　公子，岡田　尚志郎，筒井　研*，庄盛　敏廉，関　周司*
（岡山大・医・脳研病態生化，癌研生化*）

50. PC 12 h-AG 8細胞を用いた68 kDニューロフィラメント遺伝子の発現調節機構の解析 ……126
中平　健祐，高山　千利，和田　健太郎，池中　一裕，津久井　弘子*，畠中　寛*，御子柴　克彦　（阪大・蛋白研・機能制御，生合成*）

51. Neuron Specific Enolase遺伝子の転写制御領域の検討 ……128
崎村　建司，櫛谷　悦子，小倉　明彦*，工藤　佳久*，高橋　康夫
（新潟大・脳研・神経薬理，三菱化成生命研*）

52. 網膜錐体細胞に特異的に発現しているカルシウム結合蛋白質Visininのcloning とその光による誘導 ……130
山形　要人，後藤　薫*，郭　哲輝，近藤　尚武*，三木　直正
（金沢大・がん研・薬理，医・第一解剖*）

53. ヒトS 100蛋白βサブユニットのcDNAクローニング ……132
森井　研*，桑野　良三，高橋　康夫
（新潟大・脳研・神経薬理，脳外科*）

54. NMDAレセプター複合体の可溶化 ……134
荻田　喜代一，鈴木　竹雄，米田　幸雄　（摂南大・薬・薬理）

55. NMDA レセプター複合体におけるポリアミンの役割 ……136
米田　幸雄，荻田　喜代一　（摂南大・薬・薬理）

56. ニューロンのグルタミン酸刺激によって引き起こされるジギタリス高感受性型 Na ポンプ活性の上昇 ……138
井上　順雄，松井　英男　（杏林大・医・生化）

57. Methamphetamine，Phencyclidine 慢性投与後のラット脳内神経伝達物質の変化 ……140
小林　利雄，清水　浩光*，小片　寛，融　道男，鍋島　俊隆**，古川　宏***
（信州大・医・精神医学，北信総合病院*，名城大・薬・薬品作用**，薬化学***）

58. 神経回路形成の分子機構：培養大脳皮質ニューロン間シナプス形成による in vitro 神経回路網形成とプロテイン・キナーゼ・インヒビター（K 252 b）による阻害 ……142
黒田　洋一郎，村本　和世，小林　和夫，中西　哲*，松田　譲*
（都神経研・神経生化，協和発酵・東京研*）

59. 脳虚血時スナネズミ海馬領域の細胞外グルタミン酸濃度の解析―脳内微小透析法及び酵素的サイクリング法を用いた微量定量 ……144
伊賀　耕三*，三谷　章，井門　等**，久保　博彦***，片岡　喜由
（愛媛大・医・第一生理，整形外科*，麻酔科**，第一外科***）

60. 線条体背側部の $D_1$ receptor 刺激によるラットの apomorphine 誘発顎運動の促進 ……146
越川　憲明，小林　雅文，J. D. Stephenson*
（日大・歯・薬理，ロンドン大・精神研・薬理*）

61. ピリドキサールリン酸と $GABA_A$ 受容体 ……148
栗岡　晋，石岡　憲昭，宇田川　慶子，松田　誠*
（慈恵医大・医科研・生化学，医化学*）

62. 5-HT 刺激によるウサギ血小板内 $Ca^{2+}$ 濃度上昇の測定法 ……150
杉原　順二，山脇　成人*，加藤　匡宏*，更井　啓介
（広島大・医・神経精神，国立呉病院・臨床研*）

63. 5-$HT_2$受容体を介したヒト血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇の検討（躁うつ病患者群と正常群との比較）……152
山脇　成人，杉原　順二*，加藤　匡宏，清水　雅美，慈幸　由起
（国立呉病院・臨床研，広島大・医・神経精神*）

64. ラット海馬におけるセロトニン１ｃ受容体の薬理生化学的検討 ……154
黒田　安計，三国　雅彦，久住　一郎*，山本　秀子，加賀谷　有行，
高橋　清久　（国立精神神経センター・神経研，北大・医・精神医学*）

65. 神経突起伸展因子（NOF）と結合するニワトリ胚網膜の膜蛋白質（82 kDa 蛋白質）について ……156
谷浦　秀夫，林　要喜知，三木　直正　（金沢大・がん研・薬理）

66. 神経成長因子によるＡキナーゼおよびＣキナーゼ非依存性リボソーム S6 タンパク質リン酸化増加作用 ……158
橋本　誠一，萩野　顕彦*　（奥羽大・歯・生化，生物*）

67. PC12D 細胞の神経突起伸張と$MAP_s$燐酸化酵素 ……160
北島　哲子，佐野　護　（愛知コロニー研・形態）

68. 脳可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカンによる PC 12 D 細胞の神経様突起形成抑制 ……162
大平　敦彦，松井　ふみ子，仙波　りつ子*
（愛知コロニー研・発生，周生期*）

69. ラット神経細胞における突起形成とガングリオシドとの関連 ……164
小木曽　学，大田　昌子，原田　寧，平野　修助
（東邦大・医・第二生理）

70. 細胞接着因子$L_1$のモノクローナル抗体による機能解析 ……166
阿相　皓晃，Schachner*，M，植村　慶一
（慶大・医・生理，ハイデルベルグ大・神経生物*）

71. ラットグリア芽細胞アデニル酸シクラーゼに対する$\alpha$-シアロシルコレステロールの抑制作用 ……168
伊藤　仁一，野路　久仁子，堂前　純子，加藤　泰治*，田中　亮
（名市大・医・第一生化，分子医・生体制御*）

72. Niemann-Pich 病マウスモデルにおけるコレステロールエステル化の障害 ……170
所　敏治，山本　敏晴，宮脇　茂樹*，衛藤　義勝
（慈恵医大・小児科，日本新薬㈱・山科植物研*）

73. 細胞内遊離スフィンゴシンの代謝 ……172
小林　卓郎，後藤　幾生　（九大・医・脳研・神経内科）

74. スフィンゴ脂質活性化蛋白質及びその前駆体蛋白質のラット脳における存在 ……174
佐野　輝，日根野　尚，近藤　啓次，水野　龍男，上野　修一，
柿本　泰男　（愛媛大・医・神経精神）

75. 異染性白質変性症の lysosulfatide の蓄積 ……176
戸田　健一，小林　卓郎，後藤　幾生　（九大・医・脳研・神経内科）

76. 光存在下，錫プロトポルフィリンによる生体障害と脳の膜分画における過酸化脂質形成 ……178
慶野　宏臣，三村　俊二*，長江　秀利**，柏俣　重夫
（愛知コロニー研・周生期，名大・医・小児科*，トヨタ記念病院**）

77. ドーパミン系伝達路におけるカルモジュリンの関与——脳シナプス膜と CaM との相互作用の検討—— ……180
夏苅　直己，花井　洋行*，藤田　道也**
（浜松医大・精神，生理研・能動輸送*，浜松医大・第二生化**）

78. sodium valproate と baclofen の GABA およびベンゾジアゼピン受容体に与える影響 ……182
本橋　伸高，塩江　邦彦，假屋　哲彦　（山梨医大・精神神経）

79. ラット脳セロトニン受容体サブタイプの分類 ……184
今井　伸一，北村　佳久，野村　靖幸　（北大・薬・薬効）

80. ラット大脳皮質における〔$^3$H〕prazosin で標識される $\alpha_1$ アドレナリン受容体サブタイプ：G タンパクを介する結合調節および光親和性標識による同定 ……186
足立　淳，松井　宏晃，西崎　純，佐藤　厚子，中西　純一，
伊野　美幸，小川　百合子，長谷川　和夫
（聖マリアンナ医大・神経精神）

81. ムスカリン受容体のアゴニスト依存性リン酸化 ……188
芳賀　和子，芳賀　達也　（東大・医・脳研・生化）

82. マイクロダイアリシス法によるラット大脳皮質における細胞外アセチルコリンの定量—コリンエステラーゼ阻害剤非存在下における検討—……190
小笹　貴史，山西　嘉晴，小倉　博雄，山津　清實
（エーザイ㈱・筑波研）

83. 後根切断および後脊髄動脈枝焼灼手術後の脊髄内神経伝達候補物質含量の変動 ……192
藤田　公和，戎　弘志*，小出　直*，永田　豊
（藤田学園保健衛生大・医・生理，福友会医学研*）

84. コリン作動性神経節のコリン取り込み及び代謝系に及ぼす神経切断手術の影響 ……194
中島　雄三，岩田　光良，田丸　政男，永田　豊
（藤田学園保健衛生大・医・生理）

85. NMDA レセプター複合体の神経化学的性質 ……196
米田　幸雄，荻田　喜代一，鈴木　竹雄，香田　知子
（摂南大・薬・薬理）

86. NMDA レセプター複合体に対するグアニンヌクレオチドの影響 ……198
荻田　喜代一，米田　幸雄　（摂南大・薬・薬理）

87. Triton X-100 処理シナプス膜標品の〔$^3$H〕TCP 結合活性 ……200
荻田　喜代一，鈴木　竹雄，香田　知子，米田　幸雄
（摂南大・薬・薬理）

88. 〔$^3$H〕グルタミン酸結合実験上の方法論的問題点 ……202
大垣　孝雄，荻田　喜代一*，米田　幸雄*
（中央臨床研，摂南大・薬・薬理*）

89. キスカル酸感受性〔$^3$H〕グルタミン酸結合活性の可溶化 ……204
米田　幸雄，荻田　喜代一，大垣　孝雄*
（摂南大・薬・薬理，中央臨床研*）

90. Xenopus 卵母細胞に発現した各種興奮性アミノ酸受容体に対する DIDS の選択的抑制効果 ……206

吉井　清哲，高杉　あおい，栗原　堅三　（北大・薬・薬剤）

91. ラット胃運動調節における5-$HT_3$受容体の関与 ……208
木村　永一，宮本　篤，大鹿　英世　（札幌医大・薬理）

92. アセチルコリンエステラーゼのトリプシン様プロテアーゼ活性に関する研究 ……210
荒木　亘，中村　重信，上田　國寛*，北口　暢哉*，高橋　保之**，
伊東　平隆**（京大・医・神経内科，臨床検査*，旭化成・生科学研**）

93. アデニル酸シクラーゼ活性の変化に伴う，GTP-結合蛋白質（Gi，Gs）間でのグアニンヌクレオチドの転移 ……212
八田　愼一，Mark M. Rasenick*，大鹿　英世
（札幌医大・薬理，イリノイ大・生理*）

94. Phospholipase Cを活性化するペプチドホルモン及びムスカリン受容体のinositol phosphate並びに$Ca^{2+}$動員の調節 ……214
竹村　晴夫，大鹿　英世，Menniti，F. S.*，Putney，J. W.，Jr.*
（札幌医大・薬理，NIEHS・NIH*）

95. In vivoにおけるラット線条体からのdopamineおよびacetylcholineの放出に及ぼすneurotensinの影響 ……216
下山　政憲，鬼頭　昭三　（広島大・医・第三内科）

96. 抗うつ剤のGTP結合蛋白質—アデニル酸シクラーゼ共役機構に対する影響 ……218
小澤　寛樹，斉藤　利和，Mark　M. Rasenick*，高畑　直彦
（札幌医大・神経精神，イリノイ大・生理*）

97. 百日咳毒素感受性GTP結合蛋白の質的変動 ……220
今泉　太郎，渡辺　康裕，川本　日出男，三崎　尚之，岩倉　克臣，
阪越　信雄，吉田　博　（阪大・医・第一薬理）

98. NG 108—15細胞のセロトニン受容体応答：グアニル酸シクラーゼの活性化 ……222
東田　道久，野村　靖幸　（北大・薬・薬効）

99. ラット脳からのヒスタミン$H_2$受容体の可溶化とその性質について ……224
温田　隆，小澤　光一郎，瀬川　富朗　（広島大・医・薬効解析）

100. 疼痛制御機構における脳内生理活性アミンの役割について ……226
武田　弘志**，小口　勝司*
（昭和大・医・第一薬理*，東京医大・薬理**）

101. 培養脳腫瘍細胞におけるプロテインキナーゼCアイソザイムの発現に関する免疫組織化学的研究 ……228
中村　博彦，設楽　信行，藤堂　具紀，高倉　公朋
（東大・医・脳外科）

102. 培養クロマフィン細胞のカテコールアミン放出反応に対するヒスタミンの促進作用について ……230
郷　保正，黒沢　淳　（塩野義製薬㈱・研究所）

103. 抗うつ薬のラット脳内GTP結合部位に及ぼす影響 ……232
山本　秀子，加賀谷　有行，黒田　安計，三国　雅彦，高橋　清久
（国立精神神経センター・神経研）

104. ヒト血小板におけるセロトニン$_2$受容体機能—セロトニンによる脱感作の機序と関連して— ……234
加賀谷　有行，三国　雅彦，久住　一郎*，山本　秀子，黒田　安計，
高橋　清久　（国立精神神経センター・神経研，北大・医・精神*）

105. 前頭葉皮質切片から遊離される内在性 Dopamine および Norepinephrine —自己受容体による調節— ……236
大森　哲郎，小山　司，松原　繁広，小田垣　雄二，松原　良次，
中山　誠，井上　猛，久住　一郎，村木　彰，山下　格
（北大・医・精神）

106. 下オリーブ核変性の小脳アミノ酸伝達物質に対する効果 ……238
石丸　浩平，倉橋　幸造，松永　宗雄*，富山　誠彦，菱田　良平
（弘前大・医・第三内科，脳研臨床神経*）

107. ラットグリア芽細胞及びC 6細胞の elongation factor-2様タンパク質のリン酸化に対する各種タンパク質リン酸化酵素阻害剤の影響 ……240
野路　久仁子，伊藤　仁一，加藤　泰治*，田中　亮
（名市大・医・生化I，分子研・生体制御*）

108. 軟体動物アフリカマイマイ（Achatina fulica F.）より得られたD型アミノ酸を含む新しい神経興奮性ペプチド achatin-I ……242

釜谷　好美，南方　宏之，竹内　宏*，野本　享資
（サントリー・生有研，岐阜大・医・第一生理*）

109. Prostaglandin $F_2\alpha$，vasopressin ならびに galanin のラット脳室内投与による血圧上昇作用における $\beta$ 受容体サブタイプの関与について ……244
小野　信文，神谷　大雄　（福岡大・薬・薬理）

110. El マウスの発育に伴うメチオニンエンケファリン様免疫活性の変化 ……246
小出　誠司，大西　博，相馬　俊子，山上　栄，川北　幸男
（大阪市大・医・神経精神）

111. 抵抗血管におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）含有血管拡張神経とその神経伝達における neuropeptide Y の役割 ……248
貫　周子，川崎　博己，高崎　浩一朗　（宮崎医大・薬理）

112. モルヒネとナロキソンの拮抗作用について一薬力学的拮抗と薬物動態学的拮抗の共存一 ……250
今村　与志子，九穂　泰三，小暮　美樹，松本　明，芝軒　信次，
石川　紘一　（日大・医・薬理）

113. 血中コルチコステロンよりみた抗うつ薬慢性投与の 5 HT-1 A レセプターへの効果 ……252
穐吉　條太郎，土山　幸之助，小野　妙子，山内　千代，大庭　明子，
岡田　久美子，児島　克博，佐々木　一郎，中村　誠，溝部　裕子，
永山　治男　（大分医大・精神神経）

114. 神経活動・脱分極刺激にともなう Neuropeptide Y 遺伝子発現の変化 ……254
樋口　宗史，岩佐　厚*，吉田　博　（阪大・医・第一薬理，泌尿器*）

115. 膜不透過型阻害剤（K-252 b）を用いた膜局在型タンパクリン酸化機構の解析 ……256
辻　崇一，山下　達朗，山本　英樹，松田　譲*，永井　克孝
（東大・医・第二生化，協和醗酵㈱・東京研*）

116. CaM キナーゼIIの自己燐酸化反応：基質との相互作用 ……258
安川　節子，福永　浩司*，山本　秀幸*，宮川　太平，宮本　英七*
（熊本大・医・神経精神，第一薬理*）

117. Na チャネルリン酸化部位指向性抗体の作成と性質 ……260

中山　仁，鹿野　博義，吉井　清哲*，金岡　祐一
（北大・薬・薬品合成，薬剤*）

118. 鉄誘導てんかん焦点形成に伴うラット線条体モノアミン代謝産物の変動及び(−)epigallocatechin の影響 ……262
加太　英明，横井　功，藤山　修，森　昭胤
（岡山大・医・脳研・機能生化）

119. Con A 結合性ウシ脳シナプトソーム膜糖タンパク質 ……264
石岡　憲昭，名竹　洋子，黒須　泰行*，栗岡　晋
（慈恵医大・医科研・生化，日本分光*）

120. 視床下部バゾプレッシンニューロン神経核（視索上核）におけるサブスタンスPとそのアナログの作用 ……266
森　眞由美，津島　宏美，松田　友宏　（名市大・医・薬理）

121. NG 108-15 細胞によるシナプス形成：イノシトールリン酸依存性 $Ca^{2+}$ によるアセチールコリンの遊離促進 ……268
明星　康裕，東田　陽博，小倉　明彦*
（金沢大・医・神経情報研・神経物性，三菱生命研*）

122. 脳腫瘍における末梢性 Benzodiazepine 受容体の発現様式 ……270
池崎　清信，田渕　和雄，K. L. Black*，D. P. Becker*
（佐賀医大・脳外科，UCLA・脳外科*）

123. マウス脳 HGPRT の免疫組織学による局在性の検討 ……272
池田　和正，飯田　利博*，飯田　達能**，高橋　秀夫**，中川　滋木**
（日大・農獣医・応用生科，医・皮膚*，医・生化**）

124. 脳の Submicrosomal Membrane における脂質の動態 ……274
竹下　正純，吉田　敏*　（大分医大・生化，実験センター*）

125. アラキドン酸による脳ミトコンドリア呼吸活性の阻害 ……276
竹内　裕子，森井　博史，渡辺　恭良，早石　修
（大阪バイオサイエンス研・神経科学）

126. 4-methylcatechol による末梢神経系 NGF の合成誘導 ……278
替地　恭介*，池上　亮介*，古川　美子**，林　恭三**，古川　昭栄*
（国立精神神経センター・神経研*，岐阜薬大・薬剤**）

127. シナプトゾーム内GABAのコンパートメントについて—特に4-アミノブチルアルデヒドから合成されたGABAとの比較— ……280
朝倉　正，松田　誠　（慈恵医大・医化学）

128. 大脳皮質NMDA受容体刺激時の細胞内カルシウムイオン，エネルギー代謝，脳波の変化とMK-801の拮抗作用 ……282
植松　大輔，J. H. Greenberg*，M. Reivich*
（慶大・医・神経内科，ペンシルバニア大・医・脳血管研*）

129. 交感神経節細胞におけるビオプテリンのターンオーバー ……284
長谷川　宏幸　（Sinai Hospital of Detroit，現 浜松医大・生化第一）

130. $GD_{1a}$ガングリオシドに対する単クローン性抗体 ……286
岩田　大二，佐藤　若生，蔵本　悦郎，島田　静雄
（三井製薬㈱・生物科学研）

131. 細胞内レチノイン酸結合タンパク及び核内受容体のラット脳内での局在 ……288
内海　裕美，相川　久志，西川　徹，埜中　征哉，福山　幸夫*，
桃井　真里子**，桃井　隆
（国立精神神経センター・神経研，東京女子医大・小児*，自治医大・小児**）

132. ヒト脳脊髄液，血漿，尿中のアセチルコリン及びコリンの測定について ……290
藤木　嘉明，池田　淑夫，奥山　真司*，友田　桂子，大城　公恵*，
伊藤　哲一彦，山内　惟光（藤田学園保健衛生大・精神，桶狭間病院*）

133. 神経系の筋酵素活性制御の検討—グルタミン合成酵素とグルコース6燐酸脱水素酵素について— ……292
小長谷　正明，小長谷　陽子，高柳　哲也　（奈良医大・神経内科）

134. カエル下垂体分泌顆粒の迅速分離法とペプチドの共存性 ……294
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・第一生化，第一解剖*）

135. 神経損傷後の軸策内輸送変化と細胞骨格の変化 ……296
田代　朋子，関本　澄人，小宮　義璋*
（東大・医・脳研・生化，群馬大・医・分子病態*）

136. ニューロフィラメント蛋白質のリン酸化と脊髄神経節における軸索内輸送 ……298
豊島　至，小宮　義璋*
（秋田大・医・第一内科，群馬大・医・分子病態*）

137. ラット脳ライソゾームの安定性に対するATPの関与 ……300
中村　祐，武田　雅俊，多田　國利，森田　仁，播口　之朗，西村　健
（阪大・医・精神）

138. 蛍光共鳴重合度測定法によるグリア線維酸性蛋白の動態の検討 ……302
中村　祐，武田　雅俊，Angelides K. J. *，多田　國利，田中　稔久，
播口　之朗，西村　健　（阪大・医・精神，ベイラー医大・生理*）

139. 抗ω-コノトキシンレセプター抗体の作製 ……304
高橋　正身，藤本　禎子　（三菱化成生命研・脳神経化学）

140. ω-コノトキシンレセプターの組織化学的分布 ……306
藤田　忍，藤本　禎子，高橋　正身　（三菱化成生命研・脳神経化学）

141. ω-コノトキシンレセプターの細胞内局在 ……308
有松　靖温，近藤　俊三，宮本　真美，藤本　禎子，高橋　正身
（三菱化成生命研・脳神経化学）

142. ウシ脳ω-conotoxin受容体とdihydropyridine受容体 ……310
早川　直彦，森田　貴雄，山口　徹，三井　宏美*，西須　英雄，
阿部　輝雄　（新潟大・脳研，理・生物*）

143. 神経ペプチドのFMRF amide受容体とcoupleしたK$^+$-channelの開閉に関与する細胞内機構 ……312
高橋　純子，佐々木　和彦，松本　光比古　（岩手医大・第一生理）

144. 脱分極による培養神経細胞死の阻止：神経成長因子依存性と細胞内$Ca^{2+}$濃度との関係 ……314
小池　達郎，田中　秀逸，E. M. Johnson, Jr. *
（佐賀医大・一般教育・化学，ワシントン大・医・薬理*）

145. 高血圧自然発症ラットの脳虚血によるモノアミン変動の加齢による修飾 ……316
八尾　博史，長尾　哲彦*，大星　博明，松本　孝，平野　誠，

中原　辰雄**，堤　哲夫，黒木　俊秀，楯林　義寛，西山　浩二，
内村　英幸，佐渡島　省三*，藤島　正敏*
（国立肥前療養所，九大・医・第二内科*，理・化学**）

146. ラット脳における β-phenylethylamine 含量の発達に伴う変化について ……318
多賀　千明，辻　元宏，橋本　泰道，中嶋　照夫
（京都府医大・神経精神）

147. ラット線条体スライスからのドーパミン遊離に対するハロペリドール
慢性投与の影響 ……320
山田　茂人，横尾　秀康*，西　彰五郎（久留米大・医・脳研，薬理*）

148. 脳内透析灌流法による視床下部ノルアドレナリンの経時的測定―拘束
ストレスによる影響― ……322
横尾　秀康，田中　隆彦，津田　彰，田中　正敏
（久留米大・医・薬理）

149. 3種類のモノアミン生合成活性化因子の構造と組織分布 ……324
市村　徹，礒辺　俊明，奥山　典生，荒木　一明*，桑野　良三*，
高橋　康夫*　（都立大・理・化学，新潟大・脳研・神経薬理*）

150. マイクロダイアリシス法による脳内神経性ヒスタミン動態の検討 ……326
望月　貴年，大和谷　厚，岸野　淳二，竹村　基彦，稲垣　直之，
和田　博　（阪大・医・第二薬理）

151. 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞の開口放出に及ぼす百日咳毒素（IAP）
の作用 ……328
今泉　美佳，河江　信幸，武田　京子，熊倉　鴻之助
（上智大・生命研）

152. 副腎クロマフィン細胞内遊離 Ca 濃度の動揺 ……330
反町　勝　（鹿児島大・医・第一生理）

153. マストパラン刺激時に見られるラット脳神経終末からの $Ca^{2+}$ 放出に
ついて ……332
都築　紀宏　（名市大・医・生化）

154. マストパランによる伝達物質放出は $Ca^{2+}$ に依存しない ……334
熊倉　鴻之助，武井　延之*，今泉　美佳，笠井　久隆**

（上智大•生命研，国立精神神経センター•神経研*，都立大•理•化学**）

155. 副腎髄質由来のアクチン調節 74 kDa 蛋白質の活性制御 ……336
前川　昌平　（東大・理・生化）

156. 成長円錐における $Ca^{2+}$感受性及び $Ca^{2+}$非感受性 $\alpha$-actinin の同定とその局在 ……338
神田　啓子，池田　和隆，祖父江　憲治　（阪大・医・神経生化）

157. Inhibition of protein kinase C subspecies from rat brain by non-steroidal anti-oestrogens ……340
E. Bignon, K. Ogita, U. Kikkawa, J. Gilbert*, J. Abecassis*, J-F. Miquel* &Y. Nishizuka
（神戸大・医・第二生化，CNRS-CERCOA・France*）

158. 培養神経膠芽腫細胞に於けるプロテインキナーゼCアイソザイム ……342
下澤　定志，蜂矢　隆久，萩原　正敏，臼田　信光**，渋谷　正人*，杉田　虔一郎*，日高　弘義
（名大・医・薬理，脳外科*，信州大・医・解剖1**）

159. ラット脳シナプス膜に対する $Ca^{2+}$キレータ抵抗性［$^3$H］PDBu 結合特性 ……344
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）

160. カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの構造と機能：欠失および部位特異的変異法による解析 ……346
大迫　俊二，関原　俊一，山内　卓　（都神経研・神経生化）

161. ラット脳カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII $\delta$ ポリペプチド cDNA の単離と構造決定 ……348
飛松　孝正，藤澤　仁　（旭川医大・生化第一）

162. Hypoxia 条件下におけるラット脳シナプトゾーム内カルシウム動態とこれに及ぼす cyclic AMP の影響 ……350
岡田　三津子*，浦江　明憲*，岩崎　克典，藤原　道弘
（福岡大・薬・応用薬理，九州臨床薬理研*）

163. パーキンソン病モデルイヌにおける日内リズム異常—L-DOPAによるリズム回復— ……352
日根野　尚，溝渕　睦彦，柿本　泰男，平谷　勝彦*
（愛媛大・医・神経精神，第一外科*）

164. レボドパおよびドパミンによる鉄依存性培養神経細胞障害—パーキンソン病との関連について— ……354
田中　真，外松　明美，金井　裕子，平井　俊策，中野　稔*
（群馬大・医・神経内科，医療短大*）

165. 老齢及び若年ラットの脳内コリン作動性神経伝達機構マーカーに対する脳機能改善薬塩酸 Bifemelane の影響 ……356
江頭　亨，油布　文枝，金馬　義平　（大分医大・薬理）

166. Endothelin／hypoglycemia 誘発性脳障害—線条体切片からの dopamine 遊離の real-time monitoring 法を用いて— ……358
片岡　泰文，小泉　修一*，熊倉　鴻之助**，栗原　正紀***，
丹羽　正美，植木　昭和*
（長崎大・医・薬理2，脳外科***，上智大・生命研**，九州大・薬・薬理*）

167. MPTP 投与に伴うマウス線条体内コリン作働性及び線条体-黒質系 GABA 作働性神経の機能的変化について ……360
田口　淳一，栗山　卓弥，栗山　欣弥　（京都府医大・薬理）

168. 3価鉄-ドーパ複合体による生体膜リン脂質過酸化反応 ……362
外松　明美，田中　真，平井　俊策，中野　稔*
（群馬大・医・神経内科，医療短大*）

169. Alzheimer 病脳における $^{3}$H-TCP 結合能の変化 ……364
下浜　俊，二宮　治明，亀山　正邦*
（京大・医・神経内科，住友病院*）

170. 家族性アルツハイマー病患者皮膚からの培養線維芽細胞に見られる細胞骨格蛋白の異常について ……366
武田　雅俊，工藤　喬，中村　祐，田中　雅子，多田　國利，
田辺　敬貴，播口　之朗，西村　健　（阪大・医・精神）

171. ダウン症，老化およびアルツハイマー病における S-100β 蛋白質と SOD ……368
加藤　兼房，鈴木　富士子，黒部　直美，森下　理香，浅野　富子，
稲垣　俊明*，佐藤　秩子**
（愛知コロニー研・生化，名古屋市厚生院・内科*，愛知医大・加齢研**）

172. ヒト脳における 1，2，3，4-Tetrahydroisoquinoline より N-Methyl-isoquinolinium ion の生合成 ……370
直井　信，松浦　貞郎*，高橋　勤**，永津　俊治
（名大・医・第一生化，教養・化学*，江南女短大**）

173. アミノ酸のモノアミン代謝と学習行動に及ぼす影響 ……372
野村　正彦，横越　英彦　（藤田学園保健衛生大・医・生理）

174. Hippocampal cholinergic neurotrophic peptide の精製とアミノ酸組成 ……374
小鹿　幸生，小島　深一**，山本　正彦，田中　亮*
（名市大・医・第二内科，第一生化*，住友製薬㈱・研究所**）

175. 培養細胞系におけるアルツハイマー病アミロイド蛋白前駆体遺伝子発現：神経系細胞の分化との関連 ……376
吉川　和明，相沢　貴子，丸山　敬　（都精神研・分子生物）

176. Embryonal Carcinoma 細胞の神経系分化に伴う神経ペプチド前駆体遺伝子発現の変化 ……378
吉川　和明，相沢　貴子，丸山　敬，野沢　明美
（都精神研・分子生物）

177. ラット初代培養ニューロン上での EGF receptor の発現とその機能 ……380
木下　章，山田　和雄，早川　徹，甲村　英二，最上　平太郎
（阪大・医・脳外科）

178. グリア細胞層上でのラット胎仔脊髄後根神経節ニューロンの培養
—神経突起伸長因子の検討— ……382
甲村　英二，山田　和雄，早川　徹，木下　章，最上　平太郎
（阪大・医・脳外科）

179. ストレスから解放後のラット脳内ノルアドレナリン放出亢進の部位差
—短時間拘束による検討— ……384
権藤　雄二，津田　彰，末吉　圭子，松口　直成，溝口　克弘，

田中　正敏　（久留米大・医・薬理）

180. 葛藤状態の導入（罰効果）によって生じたラット脳内ノルアドレナリン代謝の変化 ……386
津田　彰，権藤　雄二，末吉　圭子，松口　直成，溝口　克弘，
田中　正敏　（久留米大・医・薬理）

181. 松果体インドール化合物の日内変動に対する明期光強度の影響 ……388
東　均，八木　昭彦，西村　健，大和谷　厚*，和田　博*
（阪大・医・精神，第二薬理*）

182. 乳頭体部および前脳基底部破壊ラットの行動内分泌学的検討 ……390
新川　久義，R. Cacabelos*，播口　之朗，西村　健
（阪大・医・精神，サンチヤゴ大*）

183. 組換え型ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（rhbFGF）のラット脳アストログリア細胞における神経成長因子（NGF）誘導作用 ……392
福元　宏明，垣花　満，寿野　正広　（武田薬品・生物研）

184. 組換え型ヒト塩基性線維芽細胞成長因子の初代培養中隔野および海馬神経細胞に対する神経栄養効果について：マウス神経成長因子との比較 ……394
垣花　満，寿野　正広　（武田薬品・生物研）

185. グリア細胞の増殖と分化に及ぼすフォルスコリンの効果 ……396
山口　知子，R. Gérard*，M. Paul*
（東京女子医大・生化，CNRS・神経化学センター・フランス*）

186. カルシウム拮抗剤の血液脳関門透過の加齢変化 ……398
脇　初枝，近　一夫，田中　康一，安藤　進
（都老人研・臨床第2生化）

187. プロテアーゼ阻害剤による PC 12 細胞の突起形成―標的分子の探索― ……400
斎藤　祐見子，川島　誠一，津吹　聡*，伊藤　尚*
（都老人研・生化，青山学院大・理工*）

188. アミロイド小体へのケイ酸の蓄積 ……402
徳武　哲，山本　明広　（都精神研・分子生物）

189. 単離成長円錐画分における内因性リン酸化の検討：チロシン残基リン酸化の可能性 ……404
五十嵐　道弘**，小宮　義璋**
（自治医大・第二生化*，群馬大・医・分子病態**）

190. 初代培養神経細胞に対するホルボールエステルの作用 ……406
伊藤　康一，阿相　皓晃*，五十嵐　康，E. L. Way，丸山　悠司
（群馬大・医・神経精神薬理（ツムラ），慶大・医・生理*）

191. PC 12 細胞の抗ユビキチン抗体認識蛋白質に対する神経成長因子の影響 ……408
高田　耕司，阿部　俊夫，大川　清，松田　誠　（慈恵医大・医化学）

192. 高感度微量酵素免疫測定法によるラット脳内 NGF 分布 ……410
西尾　健資**，秋口　一郎**，古川　昭栄*
（国立精神神経センター*，京大・医・神経内科**）

193. 脳内エンケファリン濃度のサーカディアンリズム―モノアミン，ACh，GABA との比較― ……412
盛政　忠臣，金行　孝雄，岡田　英俊，庄盛　敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化）

194. 神経芽腫細胞の増殖，形態に及ぼすリゾスフィンゴ脂質の影響 ……414
杉山　英子，原　厚，武富　保（信州大・医・心脈管研・脂質生化）

195. プロテインキナーゼ C サブタイプの中枢神経系生後発達における変化 ……416
平田　みどり，斎藤　尚亮，細田　弘吉，古瀬　明子，伊藤　あつ子，
辻野　健，吉原　千佳，田中　千賀子　（神戸大・医・薬理）

196. ラット中隔―海馬系損傷による空間記憶障害に対するコリン作働薬の効果 ……418
松岡　信也，前田　典昭，大久保　佳孝，山口　勇
（藤沢薬品㈱・筑波研）

197. ラット water maze 学習に及ぼす AF 64 A の影響 ……420
石井　豊，石川　紘一*
（日研化学㈱・大宮研・第一薬理，日大・医・薬理*）

198. ウシガエルの視神経再生機構について ……422
溝渕　宗秀，八木　康之，水野　有武，松田　誠　（慈恵医大・医化学）

199. コリン作働性神経系の行動科学に及ぼす影響 ……424
野村　正彦，岡村　邦博　（藤田学園保健衛生大・医・生理）

200. HOE 427 の海馬長期増強に対する作用 ……426
田中　祥貴，桜井　真夫，林　昌亮
（ヘキストジャパン医薬総合研・薬理）

201. 老化促進マウス（SAM）脳切片からのノルアドレナリン放出へのグルタミン酸受容体の関与と加齢変化 ……428
趙　学慧，北村　佳久，野村　靖幸　（北大・薬・薬効）

202. 神経線維腫が産生する神経発育因子 ……430
堀田　妙子，加藤　泰治*，浅井　清文*，田中　亮，大塚　隆信**，
松井　宣夫**
（名市大・医・生化Ⅰ，分子研・生体制御*，医・整形外科**）

203. 細胞性癌遺伝子 c-fos mRNA 発現のアデノシン受容体による調節 ……432
中島　孝，Daval, J. L.*, Morgan, P. F.*, Post, R. M.*, Marangos, P. J.*　（新潟大・脳研・神経内科，NIMH*）

204. ヒトの Myelin-Associated Glycoprotein（MAG）の塩基配列 ……434
佐藤　修三，藤田　信也，栗原　正*，桑野　良三*，崎村　健司*，高橋康夫*，宮武　正　（新潟大・脳研・神経内科，神経薬理*）

205. ヒト tyrosine hydroxylase（TH）cDNA 導入線維芽細胞における L-DOPA 合成能について ……436
内田　耕一***，石井　晃****，金田　典雄****，戸谷　重雄**，
塚田　裕三***，永津　俊治****，高坂　新一*
（国立精神神経センター・神経研*，慶大・医・脳外**，生理***，名大・医・生化第一****）

206. 神経特異タンパク質 drebrin A の遺伝子構造とその発現 ……438
児島　伸彦，白尾　智明，寺田　庄一，小幡　邦彦
（生理研・神経化学）

207. 脳特異的 13.5 K タンパク質の cDNA クローニング ……440
田中　篤孝，中谷　一泰，戸部　敬*，富田　基郎*，落合　英彦**，中井　康光**，中村　泰治（昭和大・薬・生物化，生理化*，医・解剖**）

208. 核酸の脳内分布—超微量核酸の電気化学検出— ……442
中原　辰雄，平野　誠*，松本　孝*，黒木　俊秀*，堤　哲之*，
楯林　義寛*，西山　浩二*，大星　博明*，八尾　博史*，内村　英幸*，
白石　昭雄**，中村　薫***
（九大・理・化学，国立肥前療養所*，九大・理・生物**，大牟田労災病院***）

209. システインプロテアーゼ阻害剤による Heat Shock Protein の誘導 ……444
池内　聡，中村　紀夫，小林　秀*，森　啓**，井原　康夫**
（慈恵医大・脳外科，都老人医療センター・脳外科*，都老人研・臨床第二生理**）

210. 髄鞘発育不全ウサギ脳のカルシウム依存性中性プロテアーゼ（CANP） ……446
川島　誠一，猪股　光司，Teresa Zalewska　（都老人研・生化）

211. 感染後脳炎および神経炎と髄鞘蛋白 ……448
栗原　一浩，細川　武，根岸　輝彦，富岳　亮，濱口　勝彦
（埼玉医大・神経内科）

212. ペンチレンテトラゾール処理培養神経細胞の酸性蛋白質について：パラサイモシンの同定 ……450
北村　邦男，田中　早苗，坂本　安，植村　慶一*，津田　整**，
保田　和美**，菅谷　愛子**，菅谷　英一***
（埼玉医大•第一生理，慶大•医•生理*，城西大•薬•生薬材料**，神奈川歯大•生理***）

213. 精神分裂病者の脳糖代謝，脳血流量，脳酸素消費量 ……452
高津　修，藤田　春洋，岸本　英爾，石川　尚志，松下　正明，
飯尾　正明*　（横浜市大・医・精神，国立療養所中野病院*）

214. ポジトロン CT による躁うつ病者の脳代謝の研究（第2報） ……454
東海林　正，岸本　英爾，高津　修，藤田　春洋，石川　尚志，
松下　正明，飯尾　正明*
（横浜市大・医・精神，国立療養所中野病院*）

215. 一過性脳虚血後の海馬におけるムスカリン性アセチルコリンレセプターの超遅発性変化 ……456
羽場　久美子，小川　紀雄，森　昭胤（岡山大・医・脳研・機能生化）

216. キンドリングラットの中脳辺縁領域におけるドーパミン $D_1$／$D_2$受容体の変化 ……458
秋山　一文，大源　明宏，尾上　太一，伊藤　高，大月　三郎
（岡山大・医・神経精神）

217. 視床下部ノルアドレナリン放出に対するセルレチドの効果 ……460
浜村　貴史，奥村　一哉*，秋元　潔**，柏原　健一*，佐藤　光源***，
大月　三郎*
（香川県立中央病院・神経内科，岡山大・医・神経精神*，岡山県立病院**，
東北大・医・精神***）

218. 成人型（type 3）GM 1 ガングリオシドーシス患者尿中オリゴ糖の構造解析 ……462
辻　省次，有賀　敏夫*，安藤　進**，近　一夫**，矢作　友保***，
太田　恵子***，宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科，都臨床研・代謝*，都老人研・生化**，自治医大・
神経内科***）

219. 中大脳動脈閉塞ラットにおける脳蛋白質の経時的変化 ……416
犬塚　貴，田村　晃*，佐藤　修三，桐野　高明*，柳澤　勝彦，豊島　至**，
宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科，帝京大・脳外科*，秋田大・医・第一内科**）

220. 電子スピン共鳴によるフリーラジカルの分布描画 ……466
石田　信一，横山　秀克，松本　清治，森　則夫，熊代　永，
土橋　宣昭*　（福島医大・精神，RI 研*）

221. うつ病者の血小板 $\alpha_2$アドレナリン受容体の結合能とそれに及ぼす抗うつ薬の効果 ……468
菅野　智行，金子　元久，増子　博文，本田　教一，柳沼　正俊，
大須賀　伸佳，渡辺　厚，柳内　務，熊代　永，沼田　吉彦*
（福島医大・神経精神，福島赤十字病院・精神神経*）

222. Tryptamine 誘導体のセロトニン神経に対する行動薬理学的および生化学的評価 ……470
只野　武，小山　勝幸，佐藤　信範，木皿　憲佐，荒井　裕一朗*，杵鞭
宏育*　（東北薬大・薬理，昭和大・医・第二薬理*）

223. 脳虚血における細胞外カリウムイオン濃度および興奮性アミノ酸濃度の変化—脳マイクロダイアリシスによる検索— ……472
田村　亨，片山　容一，川又　達朗，坪川　孝志
（日大・医・脳外科）

224. 脈絡叢の Endothelin 受容体—実験水頭症に伴う変動— ……474
川口　務，栗原　正紀，丹羽　正美*，森　和夫
（長崎大・医・脳外科，第二薬理*）

225. ラット脳およびヒト死後脳における σ 受容体 ……476
森　博史，渋谷　治男，高橋　良　（東京医歯大・精神）

226. 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：経時的変化に関する検討 ……478
楯林　義寛，平野　誠，黒木　俊秀，松本　孝，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***
（国立肥前診療所，九大・理・生物*，化学**，大牟田労災病院***）

227. 脳虚血による微小管蛋白の変化について ……480
工藤　喬，多田　國利，武田　雅俊，山下　正，播口　之朗，西村　健
（阪大・医・精神）

228. ロイペプチン投与ラット老化モデル脳における中間径フィラメントおよびアルツハイマー病アミロイド蛋白前駆体メッセンジャーRNA の変化 ……482
野沢　明美，相沢　貴子，吉川　和明　（都精神研・分子生物）

229. Methamphetamine 投与によるラット線条体 Dopamine 放出について：In vivo microdialysis による検討 ……484
小山　司，中山　誠，松原　良次，井上　猛，小田垣　雄二，
大森　哲郎，市川　淳二，山下　格　（北大・医・精神）

230. 神経型日本人 Gaucher 病の遺伝子解析 ……486
川目　裕，衛藤　義勝　（慈恵医大・小児）

231. Twitcher マウスにおけるミエリン塩基性蛋白の posttranslation modification ……488
由村　健夫，小林　卓郎，後藤　幾生　（九大・医・脳研・神経内科）

232. 感情調整作用を持つ薬物の慢性投与後のラット脳内サブスタンスP含量に及ぼす影響 ……490
三ツ汐 洋，高嶋 瑞夫，高橋 清久
（国立精神神経センター・神経研）

233. 背髄小脳変性症剖検脳の小脳におけるセカンドメッセンジャー系の変化 ……492
小牟禮 修**，北村 登*，橋本 健志*，西野 直樹*，久野 貞子**，
田中 千賀子* （神戸大・医・薬理*，国立療養所・宇多野病院**）

234. Zotepineの神経薬理学的研究—ヒト死後脳$D_2$および5-$HT_2$受容体に対する高親和性— ……494
神庭 重信，八木 剛平，中木 敏夫*，鈴木 恵子，小口 江美子，
加藤 隆一* （慶大・医・精神神経，薬理*）

235. 脳内微小血管アセチルコリンエステラーゼのアルツハイマー病における変化 ……496
辻 輝之，中野 智，三森 康世，中村 重信 （京大・医・神経内科）

236. 精神分裂病における$^3$H-8 OH-DPAT結合部位の変化 ……498
北村 登，梶本 康雄*，白井 豊*，酒井 規雄，橋本 健志，中井 隆*，
西野 直樹*，三田 達雄*，田中 千賀子
（神戸大・医・薬理，精神神経*）

237. 脳内微小透析法を用いた急性拘束ストレスマウスの海馬におけるGABA-serotonin系の検討 ……500
福西 勇夫，村上 哲英*，根木 哲郎*，細川 清
（香川医大・精神神経，生物*）

1

# 精神分裂病者の、治療前、治療後の脳糖代謝、脳血流量、脳酸素消費量

藤田春洋、高津　修、岸本英爾、石川尚志、松下正明、飯尾正明＊
（横浜市立大学医学部精神医学教室、国立療養所中野病院＊）

〔要約〕
未治療精神分裂病者の薬物未投与時、寛解時の脳糖代謝、脳血流量、脳酸素消費量を、ポジトロンＣＴを用いて計測した。トレーサーとして、１１Ｃグルコース、Ｃ１５Ｏ２、１５Ｏ２を使用した。１１Ｃグルコースによる脳糖代謝は、前頭葉、頭頂葉、側頭葉、後頭葉で、正常者と比較して、薬物未投与の精神分裂病者では、低下の傾向が見られ、寛解者では、正常者の値に近付く傾向が見られた、これに対して、Ｃ１５Ｏ２、１５Ｏ２による、脳血流量、脳酸素消費量では、前頭葉、頭頂葉、側頭葉、後頭葉で、正常者と比較して、薬物未投与の精神分裂病者では、同様に低下の傾向が見られたが、寛解者では有意な増加が見られた。未治療の精神分裂病者では、脳糖代謝、脳血流量、脳酸素消費量において、正常者と比較して、全て低下の傾向が見られ、一方寛解者では、脳血流量、脳酸素消費量の増加が見られたことは、精神分裂病の治療、病因との関連で、新しい意味を持つものと考えられた。

Ⅰ．はじめに

１９８２年、ＮＩＨのＢｕｃｈｓｂａｕｍらが、精神分裂病患者のポジトロンＣＴ所見を発表して以来、様々なトレーサーを用いて、脳糖代謝、脳血流量、脳酸素消費量等が測定され、精神分裂病の症状との、関連が議論されてきたが、いまだ、寛解者のポジトロンＣＴ所見に関する報告はない。

今回、我々は、本人及び家族の同意の得られた、精神分裂病者寛解時のポジトロンＣＴの計測を行い、興味ある結果が得られたので、ここに報告する。

Ⅱ．対象と方法

横浜市立大学医学部病院神経科に初診し、ＤＳＭ－Ⅲにより、精神分裂病と診断された７名（男性６名、女性１名）と、正常対照者７名（男性６名、女性１名）について、国立療養所中野病院にて、ポジトロンＣＴ検査を行った。患者は、全員抗精神病薬を服用中であり、右手ききで、頭部Ｘ線ＣＴは、正常範囲で、脳波上も発作波等は、認めていない。患者の年齢、性別、経過年数等を表１に示す。

ポジトロンＣＴ検査では、トレーサーとして、１１Ｃグルコース、Ｃ１５Ｏ２、１５Ｏ２を用い、脳糖代謝、脳血流量（ＣＢＦ）、脳酸素消費量（ＣＭＲＯ２）を計測し、正常対照者７名と比較した（表１）。

Ⅲ．結果

１１Ｃグルコースによる、脳糖代謝の測定では、前頭葉、頭頂葉、側頭葉、後頭葉で、正常者と比較して、薬物未投与の精神分裂病者では、低下の傾向が見られ、特に、前頭葉、頭頂葉では、有意差があった。これに対し、抗精神病薬服用中の精神分裂病寛解者では、正常者の値に近付く傾向が見られた（表２）。

次に、Ｃ１５Ｏ２、１５Ｏ２による、脳血流量、脳酸素消費量の測定では、前頭葉、頭頂葉、側頭葉、後頭葉で、正常者と比較して、薬物未投与の精神分裂病者では、同様に低下の傾向が見られたが、抗精神病薬服用中の精神分裂病寛解者では、逆に有意な増加が見られた（表３）。

Ⅳ．考察

未治療の精神分裂病者では、脳代謝、脳血流量、脳酸素消費量が、脳の前頭葉、頭頂葉、側頭葉、後頭葉等全ての脳部位において、正常者と比較して、全て低下の傾向が見られたことは、我々その他の研究者の、ほぼ一致した結果であり、これが、精神分裂病の感情鈍麻や幻聴・妄想等の症状と、密接な関連があると私共は考えている。

表1　対象精神分裂病者

| 氏名 | 年齢 | 性 | 発病年齢 | 経過年数 | 服用薬（1日量） |
|---|---|---|---|---|---|
| A | 22 | 男 | 21 | 1 | Fluphnazine 4mg<br>Sulpiride 1200mg |
| B | 23 | 女 | 18 | 5 | Perphnazine 12mg |
| C | 34 | 男 | 31 | 3 | Haloperidol 5mg |
| D | 35 | 男 | 23 | 12 | Chlorpromazine 100mg |
| E | 44 | 男 | 38 | 6 | Haloperidol 6mg<br>Chlorpromazine 100mg |
| F | 24 | 男 | 21 | 3 | Zotepine 150mg |
| G | 35 | 男 | 34 | 1 | Haloperidol 2mg |
| 正常対照者（N=7） | 45±4才 | | | | |

表2.　$^{11}$C-glucose による脳各部位カウント数(counts/$\mu$Ci)

| 脳部位 | 正常者 | 精神分裂病者 未治療精神分裂病者 | 寛解者 |
|---|---|---|---|
| 前頭葉 | 4580±560 | 4050±370 * | 4220±270 |
| 頭頂葉 | 4390±380 | 3920±320 * | 4260±290 |
| 側頭葉 | 4490±490 | 4110±340 | 4330±310 |
| 後頭葉 | 4320±390 | 4210±280 | 4290±260 |

前頭葉はBrodmann 10 領域，頭頂葉はBrodmann 40 領域，側頭葉はBrodmann 38 領域，後頭葉はBrodmann 18 領域を計測した．それぞれの値は両側25ピクセルの平均値±S.D.
* P <0.05　(正常対照者との差)

表3．正常者，未治療精神分裂病者，寛解者の脳各部位脳血流量(CBF)，脳酸素消費量 ($CMRO_2$)

| 脳部位 | 正常者 | | 精神分裂病者 未治療精神分裂病者 | | 寛解者 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | CBF (ml/100g/min) | $CMRO_2$ (ml/100g/min) | CBF | $CMRO_2$ | CBF | $CMRO_2$ |
| 前頭葉 | 59±10 | 4.1±0.8 | 45± 8 | 3.2±0.5 | 83±20* | 6.2 ±0.9 * |
| 頭頂葉 | 63± 9 | 3.7±0.7 | 42±10 | 3.0±0.6 | 99±22* | 6.9 ±1.2 * |
| 側頭葉 | 67±10 | 4.3±0.8 | 48± 9 | 3.4±0.5 | 91±27* | 6.4 ±1.1 * |
| 後頭葉 | 53±10 | 3.4±0.8 | 44±10 | 3.1±0.7 | 90±18* | 6.3 ±0.8 * |

前頭葉はBrodmann 10 領域，頭頂葉はBrodmann 40 領域，側頭葉はBrodmann 38 領域，後頭葉はBrodmann 18 領域を計測した．それぞれの値は両側25ピクセルの平均値±S.D.
* P <0.05 (正常対照者との差)

今回、抗精神病薬服用中の寛解者で、脳血流量、脳酸素消費量が、正常対照者と比較して、有意に増加していたことは、どのように解釈すべきであろうか。

Ｎｉｌｓｓｏｎ（１）、Ｇｕｒ（２）らによると、１３３Ｘｅを用いた抗精神病薬服用中の精神分裂病者の脳血流量の測定では、正常者と比較して、差がないか、むしろ減少傾向にあるという報告がなされている。この、私共の成績との差は、それぞれの報告が、どの様な下位群（ｓｕｂｔｙｐｅ）の精神分裂病者の成績なのか、薬物を服用中でも寛解に至っているのか、まだ寛解に至たらない病期なのか、使用している薬剤の種類やその量、トレーサーとして使用している核種の差による生体の取り込み等の機構の差などによるものではないかと考えられる。

いずれにせよ、精神分裂病寛解者で、脳血流量、脳酸素消費量の増加が見られたことは、精神分裂病の病態が、脳血流量、脳酸素消費量に反映する面（未投薬時の減少）と反映しない面（寛解時での増加）を示しており、精神分裂病の治療、その病因との関連で、新しい意味を持つものと考えられる。

今後は、症例を積み重ねて、更に詳細な検討を加えたい。

〔文献〕

(1) Nilsson A. et al. (1977) Acta Neurol Scand 64：478－479.

(2) Gur RE. et al. (1985) Arch Gen Psychiatry 42：329－334.

## 2　2-deoxyglucose（DG）と2-deoxyglucose-6-P（DG6P）の酵素的定量法を用いる，ラット微小中枢神経領野のグルコース利用率測定法

赤林　朗，加藤　尚彦
（東大・医・脳研）

〔要約〕
DG と DG6P の酵素的微量測定法を用い，超微小中枢神経領野で解析可能な高感度の，定量的グルコース利用率(Glucose Utilization Rate;GUR)測定法を開発した．ラットに既知量の DG を静注し，2 分及び4 分後に液体窒素中で瞬間凍結し，脊髄及び小脳皮質各層の凍結乾燥切片を調製し，試料中の DG, DG6P, Glucose 及び Glucose-6-phosphate(G6P) 濃度を定量した．DG 静注後2 分より4 分の間に，DG 及び Glucose 代謝の定常状態のあることを確認したうえで，競合阻害物質存在下での Michaelis-Menten 速度関係式を用い，ラット in vivo におけるGURを算出した．アイソトープを用いる既報の系の測定値とほぼ一致し，また 5 分以内の短時間の実験系であるので，単一刺激による影響の解析も可能である．

Sokoloffら(1)の開発した $^{14}$C-DG 法は，45分という長い実験時間，この間の定常状態の仮説，オートラジオグラムによるための半定量性，不十分な感度等に対し，様々な批判がなされてきた．そこで我々は，新たに考案した DG と DG6P の酵素的微量測定法(2)を用い，中枢神経系微小領野や単一ニューロンのGURを測定するための理論と，短時間で行える定量的な高感度実験系を開発した．

**実験方法**　［測定試料］1）血漿（動脈血）；ラット（ Sprague-Dawley, オス，6 週齢，190-200g ）の大腿動静脈にカテーテルを留置後，DG を静注し，所定の時間後に動脈血を採取し，血漿を分離した．　2）凍結乾燥切片；ラットの尾静脈より DG を注入し，所定の時間後に液体窒素中に投入して瞬間凍結した．モデル部位として腰部脊髄及び小脳皮質の厚さ15-25$\mu$m の凍結乾燥切片（0.7-2.3 $\mu$g 乾燥重量）を調製した(3)．［測定方法］上記試料中の DG, DG6P, Glucose 及び G6P 濃度を，既報の酵素的測定法(2)を用い超微量測定を行った．

**結果及び考察**　1）DG 静注後の血漿中濃度（図1）：DG 濃度は静注後，速やかにほぼ一定レベルに達し，5 分以後次第に減少した．Glucose 濃度は不変であった．

2）DG 静注後の脊髄前角における濃度の時間経過（図2）：DG 濃度は静注後 1 分に一定レベルに達し，5 分以後次第に減少した．このことは，図1の血漿中の DG の動態とともに考えると，DG 静注後速やかに組織と血液間で DG 代謝が平衡状態に達し，約 5 分間持続することを示している．DG6P 濃度は 0 分より 5 分までほぼ直線的に増加した．　3）DG 静注後 4 分の脊髄前角の濃度変化（図3）：組織中の DG 及び DG6P 濃度は，0.5 mmol/kg 体重以下の DG 静注では DG 用量に比例して増加した．Glucose 濃度は 0.5 mmol/kg 体重以下の DG 静注で不変であった．　4）ラット脳ホモジェネートを酵素試料とした HK の Glucose 及び DG に対する Km 値は各々，28.6 $\mu$M, 125 $\mu$Mで，Vmax 値は，両者ともに 25.0 $\mu$moles/g wet wt./min であった．　5）GUR 及び Distribution volume（DV）の算出：競合阻害物質（DG）の存在下での Michaelis-Menten の速度関係式を用い，

$$\frac{v}{v^*} = \frac{\dfrac{[G]\,Vm}{Km\,(1+[DG]/Km^*)+[G]}}{\dfrac{[DG]\,Vm^*}{Km^*(1+[G]/Km)+[DG]}} = \frac{[G]}{[DG]}\cdot\frac{Vm\ Km^*}{Vm^*\ Km} \quad (1) \qquad v = v^*\cdot\frac{[G]}{[DG]}\cdot\frac{Vm\ Km^*}{Vm^*\ Km} \quad (2)$$

と表すことが出来る(1,4)．（v, v*は，Glucose 及び DG のHK による phosphorylation rate, Km, Km*, Vm, Vm*, は Glucose 及び DG の Michaelis 定数，Vmax 値を，［G］，［DG］は，上記の平衡状態での基質濃度，即ちここでは組織中 Glucose 及び DG 濃度を示す．）　0.5 mmol/kg 体重以下の用量の DG 静注時では，組織中の Glucose と G6P 濃度が不変であることから，DG は Glucose 代謝には影響せず，v も不変と考えられる（図3）．また，DG 静注後 1-5 分の間に組織内で平衡状態が

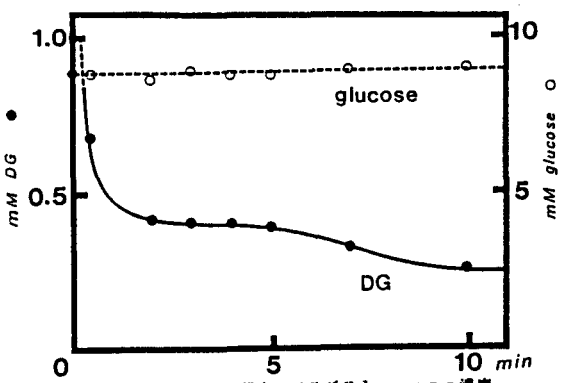



図1　DG静注後の血漿中DG及びGlucose濃度
DG（0.25 mmol/kg 体重）静注．2匹のラットの平均を示す．
DG6P及びG6P濃度は測定感度以下であった．

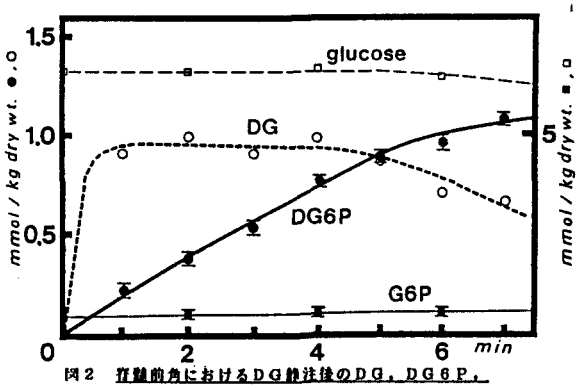



図2　脊髄前角におけるDG静注後のDG，DG6P，
Glucose及びG6P濃度の時間経過
DG（0.25 mmol/kg 体重）静注．測定試料数15，
3匹のラットより各5試料の平均を示す．TはSEMを表す．
Glucose及びG6P濃度は不変であった．

想定され，0分より DG6P 濃度が直線的に増加していることより，v' （単位時間あたりの DG6P 生成量）はこの間一定である（図1，2）．神経組織内の G6P 濃度は Glucose の 10分の 1 以下で，Glucose -6-phosphatase 活性も非常に低く，v の逆反応が無視できるのでGURを v で表すことができる．従って前ページの4）と(2)式より，

$$GUR(\mu moles/g\ wet\ wt./min) \cong [生成DG6P/min] \cdot \frac{[G]}{[DG]} \cdot \frac{25.0\times 125}{25.0\times 28.6}$$

として求めることができる．
（但し，VmKm'／Vm'Km = 25.0×125 / 25.0×28.6 = 4.37 ）今回は，DG(0.25 mmol/kg 体重）静注後，2分と 4 分に処理した試料において，DG, Glucose 及び G6P 濃度に各々統計的な差が認められない（平衡状態の存在）ことを確認した上で，v' = [DG6P(4min)] − [DG6P(2min)]／2min として算出した．DVは，平衡状態時の血中と組織中濃度比である．従って DV = [組織内濃度](4min)／[血液内濃度](4min) として算出した（表1）．得られたGURは既報値とほぼ一致した(1)．DVは，全測定域で Glucose より DG のほうが高く，それらの比：λ = DV(DG)／DV(Glucose) は，1.73-3.67 であった．本法の利点は以下の4点である．1）従来の半定量のオートラジオグラムに比べ，酵素的測定法を用いているため定量性において優れている．2）超微小領野や単一ニューロンでのGUR測定が可能である．3）DG と DG6P を分離定量できるため，直接 v' が測定できる．4）数分以内の実験であるため，単一刺激の影響の解析も可能である．　なお，現在単一ニューロンにおけるGURを測定中である．

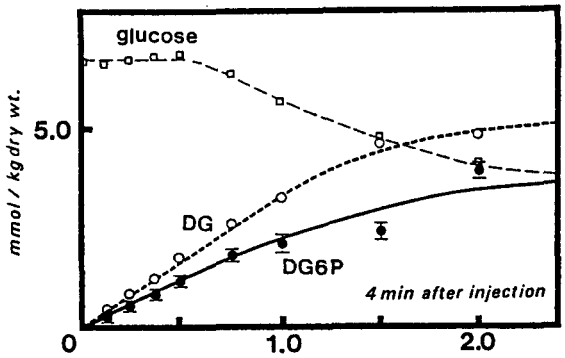



図3　脊髄前角におけるDG，DG6P及びGlucose濃度の，
静注DG用量依存性曲線　DG（0.125 − 2.0 mmol/kg 体重）
静注後4分に処理した際の値．測定試料数10，2匹のラットより
各5試料の平均を示す．TはSEMを示す．G6P濃度はどのDG用量
でも不変であった(0.47-0.55 mmol/kg dry wt.)．

表1　グルコース利用率(GUR)　及び　Distribution Volume(DV)

| | 腰部脊髄 前角 | 腰部脊髄 白質 | 小脳皮質 分子層 | 小脳皮質 顆粒層 | 小脳皮質 白質 |
|---|---|---|---|---|---|
| GUR | | | | | |
| (μ moles/g.dry wt./min) | 5.67 | 2.11 | 6.52 | 7.58 | 1.75 |
| [μ moles/g.wet wt./min] | [1.13] | [0.421] | [1.30] | [1.52] | [0.350] |
| DV(ml/g) | | | | | |
| 0.2[G]/plasma G (A) | 0.147 | 0.100 | 0.193 | 0.168 | 0.085 |
| 0.2[DG]/plasma DG (B) | 0.492 | 0.173 | 0.670 | 0.586 | 0.312 |
| ratio of DV [λ = (B)/(A)] | 3.35 | 1.73 | 3.47 | 3.49 | 3.67 |

DG（0.25 mmol/kg 体重）静注後2分及び4分に処理した試料による計算値．血漿グルコース濃度(plasma G)= 9.02，血漿DG濃度(plasma DG) = 0.406 (mmol/L)とした（図1参）．[G],[DG]は平衡状態時の濃度を代表するものとして、静注後4分の各組織中の濃度を用いた．湿重量濃度／乾燥重量濃度 = 0.2 として補正した．

[文献] 1) Sokoloff ,L. et al.(1977) J.Neurochem. 28,897-916 2) Akabayashi, A. et al. (1989) Biomed.Res. 10,173-177 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) Dixon, M. and Webb, E.C. (1964) in "Enzymes", 2nd Ed.,pp. 84-87, Academic Press, New York.

# 3 末梢組織の糖利用に及ぼす視床下部の調節作用

首藤 誠、高橋 章、箕越 靖彦、嶋津 孝
（愛媛大・医・生化学第一）

〔要約〕

ラット視床下部腹内側核(V M H)を電気的に刺激し、各末梢組織でのglucose利用の変化を、２－deoxy-glucose法によって調べた。V M Hを電気的に刺激すると、glucoseの取り込みは、骨格筋で約1.5倍、心筋と褐色脂肪組織(BAT)で、それぞれ３倍と５倍に増加したが、脳、横隔膜、白色脂肪組織では変化しなかった。また、左右の肩甲間褐色脂肪組織のうち、一側に分布する交感神経を外科的に切除しておくとV M Hの刺激効果は著しく抑制された。一方、心筋から sarcolemmal membrane を調製し、cytochalasin B との結合実験によって、glucose輸送体の変化を調べたところ、V M Hの刺激は glucose 輸送体の量($R_O$)及び Kd (dissociation constant)値になんら影響を及ぼさなかった。これらの結果から、glucoseの取り込みに及ぼす V M Hの促進作用には交感神経系が重要な役割を果たしており、しかもインスリンの作用とは異なった作用機構が介在していることが示唆された。

寒冷曝露や、運動負荷などのような交感神経系緊張状態では、膵からのインスリン分泌は抑えられているにもかかわらず、ＢＡＴや骨格筋などある種の末梢組織において、glucoseの利用が亢進することが知られている。今回我々は、交感神経系の中枢と見なされているV M Hが末梢組織におけるglucoseの利用にどのような影響を及ぼしているかを明らかにする目的で、ラットのV M Hを直接電気的に刺激し、末梢組織におけるglucose取り込みの変化並びに細胞膜における glucose 輸送体の変化を追究した。

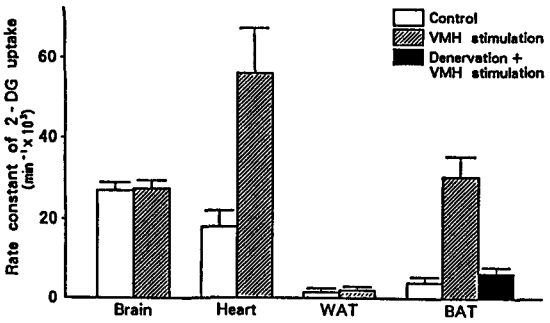
(方法)

成熟雌 SDラットを用い、片側の V M H に予め刺激電極を挿入しておき、体重回復後ペントバルビタール麻酔下に、電気刺激を加えた。電気刺激は、6V、50Hz、持続時間0.1～0.3msec の矩形波パルスを、1分毎に30秒間ずつの割合で与えた。刺激開始3分後に、$^{3}$H標識 2－deoxyglucose (2-$^{3}$H-DG,50μCi／rat) 並びに、$^{14}$C－sucrose (5μCi／rat)を頸静脈から投与し、経時的に採血するとともに、15分後に断頭屠殺して、組織を採取した。採取する組織は、脳、心筋、横隔膜、傍子宮白色脂肪組織 (WAT)、肩甲間褐色脂肪組織(BAT)、および骨格筋としては、大腿四頭筋、ヒラメ筋、長指伸筋(EDL)を選んだ。各組織のglucose利用速度は、組織中に取り込まれた $^{3}$H及び$^{14}$Cの放射活性を測定し、Sokoloffの方法を用いて Ki (rate constant for net tissue uptake)値を求めることにより算定した[3]。また一部の実験では、交感神経の関与を明確にするため、BAT については、左右のうち、右側の組織に分布する交感神経を外科的に切除した。さらに、心筋については sarcolemmal membrane を調製して[2]、cytochalasin Bの結合量及び、親和性[1]についても解析した。

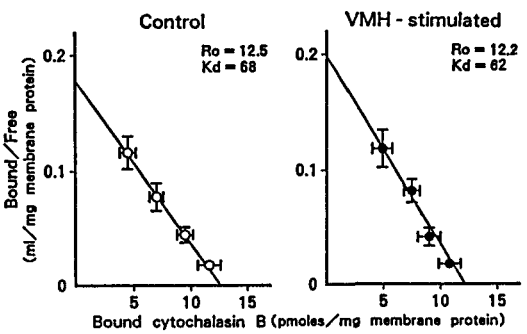
(結果並びに考察)

V M H を電気的に刺激すると、血糖値は刺激前値130mg/dlから200mg/dlにまで上昇した。この時、各組織における glucose の取り込み速度を上記の方法で調べると、非刺激対照群と比較して、BATで5倍、心筋で3倍、骨格筋で約1.5倍に増加した(図1,2)。しかし、脳、白色脂肪組織、横隔膜、では、glucose の取り込みは変化せず、V M H刺激の効果は、BAT、心筋、並びに骨格筋に対してのみ特異的であった。また、BATに対するV M Hの刺激効果は、局所の交感神経切除 によって著しく抑制されることが判明した。

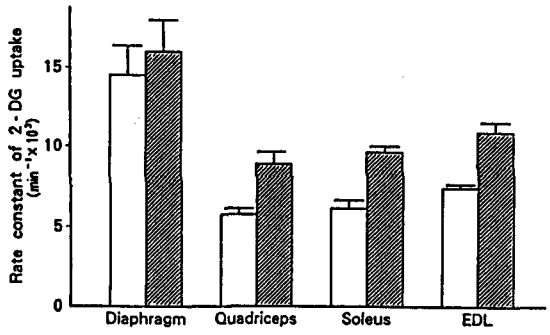
インスリンを心筋や白色脂肪細胞に作用させると、細胞質内プールからの移動によって細胞膜における glucose 輸送体量が増加し、そことによって組織での glucose 利用が促進することが知られている[1)(4)]。そこで、VMH の刺激効果も同様な作用機構に依存しているかを調べるために、心筋細胞膜における glucose輸送体の変化を解析した。その結果、VMHの 刺激によっては glucose 輸送体の数($R_O$)は変化せず、また cytochalasin B に対する親和性(Kd)も変らないことが明らかとなった(図 3)。これらの実験結果から、BAT、心筋、骨格筋などの末梢組織における glucose 利用に及ぼす VMH の促進作用には、インスリンとは異なる別の作用機構が関与しており、しかもその作用には交感神経系が重要な役割を果している可能性が高い。VMH を刺激すると、血中インスリンレベルが低下する事実も、この可能性を支持している。




(図１) VMH 刺激が、脳、心筋、白色脂肪組織(ＷＡＴ)、褐色脂肪組織(ＢＡＴ)における、糖利用に及ぼす影響。




(図３) 心筋の sarcolemmal membrane における cytochalasin-B binding site の数及び親和性に及ぼすVMH 刺激の効果
(scatchard plot による解析)。




(図２) VMH 刺激が、骨格筋及び横隔膜における糖利用に及ぼす影響。
骨格筋は、slow-twitch fiber を多く含むヒラメ筋, fast-twitch fiberを多く含む長指伸筋(ＥＤＬ)、並びに混合筋としての大腿四頭筋について調べた。

[参考文献]

1.Cushman,S.W.et al.(1980)
J. Biol. Chem. 255, 4758-4762
2.Philipson,K.D.et al.(1980)
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 1159-1173
3.Sokoloff,L.et al.(1977)
J. Neurochem. 28, 897-916
4.Suzuki,K.et al.(1980)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77, 2542-2545

# 4　Ｅｌマウスのけいれん発作に対する食餌中亜鉛量の影響

深堀元文，伊藤正敏，竹下英康，川嵜弘詔，橋本喜次郎，黒木俊秀

九州大・医・神経精神科

〔要約〕

脳内海馬の亜鉛が、Ｅｌマウスのけいれん素因に何らかの関与をしている可能性が論じられており、また近年亜鉛には、けいれん発作の形成過程において、それを保護防止する効果があることが報告されている。

そこで今回我々はＥｌマウスのけいれん形成過程における亜鉛の保護効果を調べる目的で、Ｅｌマウスを亜鉛欠乏食餌群・亜鉛負荷食餌群・亜鉛正常食餌群の３群に分けて、その発作感度の差異を経過観察した。さらにそれら３群の脳内海馬の微小部位における亜鉛量を測定し、比較検討を加えた。

その結果、亜鉛欠乏食餌群は他の２群に比べ有意に発作が起こりやすく、亜鉛負荷食餌群は他の２群に比べ有意に発作が起こりにくくなることが判明した。また亜鉛負荷食餌群の脳内亜鉛量は、尾側海馬のＣＡ3領域を除いて他の２群に比べ有意に高値を示したが、亜鉛欠乏食餌群の脳内亜鉛量は、亜鉛正常食餌群よりいずれもの領域でも有意ではないが低値を示した。以上より、亜鉛は、Ｅｌマウスのけいれん発作に対してけいれん抑止的に作用する効果を有しており、脳内海馬における亜鉛量とけいれんとが密接な関連がある可能性が示唆された。

Key word: Zinc, Hippocampus, Dentate gyrus, Epilepsy, El mouse
Zinc deficiency, Zinc sufficiency

〔緒言〕

Ｅｌマウスは、遺伝的にけいれん素因を有しており、放り上げ刺激により複雑部分発作の二次性全般化と考えられる強直間代けいれんが誘発される。またＥｌマウスでグルコース代謝を調べた研究によると、海馬の歯状野にけいれん発作の焦点があると推定されている[2]。

一方脳内亜鉛は、海馬の歯状野に高濃度で存在し、ＧＡＢＡ系を介してけいれん発作に関与する可能性が示唆されている[3]。従って脳内海馬特に歯状野の亜鉛が、Ｅｌマウスのけいれん素因に何らかの関与をしている可能性がある。我々は海馬の歯状野および尾側海馬のＣＡ1領域において、Ｅｌマウスは他のコントロールマウス（ｄｄＹ系・ＣＢＡ系）に比べ、有意に低い亜鉛量を示すことを報告し、海馬歯状野の亜鉛量とＥｌマウスのけいれん素因との関連性を示唆した。[1]

また近年亜鉛には、けいれん発作の形成過程において、それを保護防止する効果がある可能性が示されてきている。Howellらは、亜鉛を前処置として皮下注射すると audiogenic mouse の seizure activity が減少することを示し[4]、またSterman らは、猫の Kindling 形成過程におけるKindling rate を亜鉛負荷は延長させ、亜鉛欠乏は短縮することを報告している[5]。

そこで今回我々はＥｌマウスのけいれん形成過程における亜鉛の保護効果を調べる目的で、Ｅｌマウスを亜鉛欠乏食餌群・亜鉛負荷食餌群・亜鉛正常食餌群の３群に分けて、その発作感度の差異を経過観察した。さらにそれら３群に関して歯状野を中心とした脳内海馬の微小部位における亜鉛量を測定し、比較検討を加えた。

〔実験材料と方法〕

実験には、雄性Ｅｌマウス（４週齢）１８０頭を用いた。まず６０頭づつ任意に３群にそれらを分け、亜鉛欠乏食餌群・亜鉛負荷食餌群・亜鉛正常食餌群とした。各々の群は５頭づつ１２の cage 内で飼育し、蒸留水が与えられた。飼育は、specific pathogen-free 施設内で行い、cage や飲水口等全ての周辺環境には亜鉛の汚染を防ぐための最大限の留意をはらった。最初の１週間は３群とも亜鉛正常食餌を与えた。次の週から亜鉛欠乏食餌（1.1mg Zn/Kg）、亜鉛負荷食餌（248mg Zn/Kg）、亜鉛正常食餌（38.9mg Zn/Kg）をそれぞれの群に与え、８週間（５週齢～１３週齢）経過観察した。放り上げ刺激は、生後４週から週１回の割合で毎週行い、約 20cm の高さで 30～40 回垂直に真上に放り上げた。個々のマウスのけいれん誘発に対する感受性の強さを量的表示するために、発作の表現型を完全な強直間代けいれんを起こしたもの（＋＋）・不完全なもの（＋）・単に muscular twitchings や wild running fits のみを起こしたもの（±）の３群に分け、週齢ごとに点数を定めた（表１）。個々のマウスのけいれん誘発に対する感受性の強さは、その点数の合計点で表され、各３群間の比較を、

Wilcoxon 順位和検定を用いて行った。

さらに脳内海馬の微小部位における亜鉛量を測定するために、１３週齢において、各３群から１０頭づつ選び出した。断頭後、取り出した脳を液体窒素で凍結したのち、クリオスタットにて前額断切片を作り、真空吸引後、凍結乾燥した脳の連続切片を作成し、脳内微小部位を実体顕微鏡下で切り出した。切りだした部位は、吻側および尾側海馬の歯状野・ＣＡ1・ＣＡ3であり、超微量電気天秤にて重量を測定した（20-70μg）。全ての実験器具は、１０％の硝酸で洗浄し脱イオン蒸留水で５回以上すすいだのち用いた。試料に 10μlの濃硝酸を熱しながら加え消化したのち、190μlのリン酸アンモニウムで希釈後、無炎原子吸光光度計（日立180-70型ゼーマン原子吸光光度計）で吸光度を測定した。測定条件は、波長 213.8nm, Lamp current 10mA, Slit 1.3nm とし、すべてのサンプルにつき３回の測定を行った。その際亜鉛の定量的測定法として、標準添加法を用いた。統計学的解析には、Wilcoxon 順位和検定を用いた。

［結果と考察］

亜鉛欠乏食餌群においては、亜鉛欠乏による体重減少、脱毛、行動量の減少などの臨床症状が認められたが、亜鉛負荷食餌群には外観上の変化は認められなかった。個々のマウスのけいれん誘発に対する感受性の強さの３群間の比較は、図１に示したように亜鉛欠乏食餌群は、他の２群に比べ有意に（ $p<0.01$ ）感受性が強く、亜鉛負荷食餌群は、他の２群に比べ有意に（亜鉛欠乏食餌群： $p<0.01$ 、亜鉛正常食餌群： $p<0.05$ ）感受性が低かった。これらのことから亜鉛欠乏食餌群は他の２群に比べ有意に発作が起こりやすく、亜鉛負荷食餌群は他の２群に比べ有意に発作が起こりにくくなることが判明した。

また海馬微小部位における亜鉛含量の比較を図２に示した。同一食餌系の脳内亜鉛含量を部位別にみると、いづれの系においても海馬の歯状野は、他の部位に比べ約二倍近い高値を示し、この結果は、これまでに他の測定方法で報告されたものとよく一致していた。亜鉛負荷食餌群の脳内亜鉛量は、尾側海馬のＣＡ3領域を除いて他の２群に比べ有意に高値を示した。従来の亜鉛欠乏実験では、海馬の亜鉛量は減少しないという報告が多いが[6]、亜鉛欠乏食餌群の脳内亜鉛量は、亜鉛正常食餌群よりいずれの領域でも有意ではないが（$p<0.1$）低値を示した。

今回の実験結果は、近年報告されている亜鉛のけいれんに対する抑止効果を裏付けるものであり、さらに亜鉛量の違いが発作誘発に影響を及ぼすことから脳内海馬の亜鉛が、ＥＩマウスのけいれん素因に何らかの関与をしている可能性を示唆することにもなると考えられる。

［文献］ 1)Fukahori, M. et al. (1988) Brain Res., 455:381-384
2)Suzuki, J. et al (1983) Brain Res., 266:359-363
3)Itoh, M. et al (1982) Neurochem. Res., 7:1287-1298
4)Howell, G.A. et al (1986) Soc. Neurosci. Abstr., 12:890
5)Sterman, M.B. et al (1986) Brain Res., 383:382-386
6)Ebadi, M. et al (1985) Biol. Trace Element Res., 7:129

| seizure form | weeks of age | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| (+) | 30 | 29 | 28 | 27 | 26 | 25 | 24 | 23 | 22 | 21 |
| (+) | 20 | 19 | 18 | 17 | 16 | 15 | 14 | 13 | 12 | 11 |
| (±) | 10 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |

Table 1. Definite scores in order to express seizure susceptibility of EI mouse. (+): complete tonic clonic convulsion. (+): abortive form (catatonic posture). (±): simple muscular twitchings and running fits only.

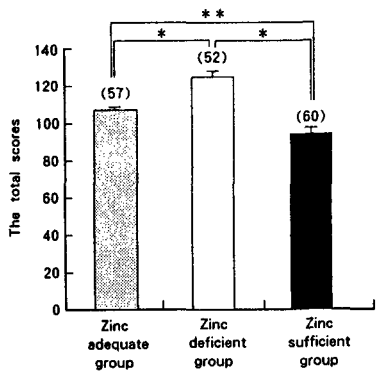



Fig. 1. Seizure susceptibility of the three dietary groups is expressed in total scores ±S.E.M. (* P < 0.01, ** P < 0.05 : the two tailed Wilcoxon $t$ − test). The numbers of animals are given above each column.

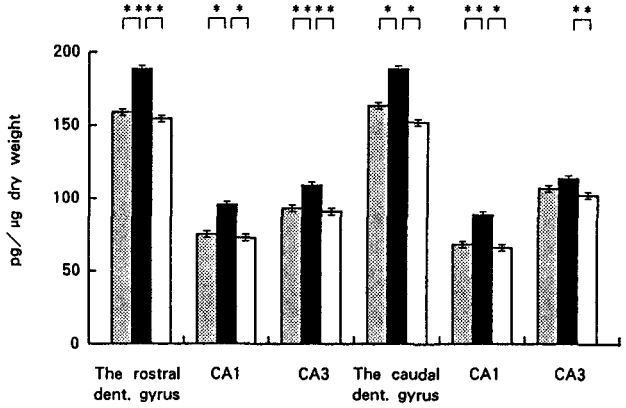



Fig. 2 The zinc contents in discrete hippocampal regions of three dietary groups of mice (control (dotted), zinc sufficient group (black), zinc deficient group (white column)). The zinc contents are expressed in pg/μg dry weight ±S.E.M. (* P < 0.01, ** P < 0.05 : the two tailed Wilcoxon $t$ − test). The numbers of animals are 10 respectively.

# 5　培養アストロサイト及び$C_6$グリオーマ細胞におけるアラキドン酸代謝

石崎泰樹、森田育男、室田誠逸
（東京医歯大・歯・顎研機能）

〔要約〕

ラット胎児脳よりアストロサイトを分離・培養し、そのホモジェネートを用いて、アラキドン酸代謝を調べた。アラキドン酸は主としてリポキシゲナーゼ系によって代謝され、主な代謝産物は、12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸（12-HETE）、11-HETE、15-HETEであった。ラット中枢神経組織にリポキシゲナーゼ活性が存在することが報告されているが、我々の結果からその少なくとも一部はアストロサイトに由来することが明かになった。　一方、ラット・アストロサイト由来と考えられている$C_6$グリオーマ細胞のホモジェネート系においては、アラキドン酸は主としてシクロオキシゲナーゼによって代謝され、主な代謝産物は、プロスタグランジン$E_2$（$PGE_2$）、トロンボキサン$B_2$（$TXB_2$）、$PGF_2\alpha$であった。

種々の細胞・組織において、アラキドン酸代謝活性が存在し、その代謝産物が生理的あるいは病態生理的に重要な役割を果たしていることが示唆されている。中枢神経組織に於いても以前よりアラキドン酸代謝活性が存在することが報告されており、シクロオキシゲナーゼ代謝産物が神経機能発現に重要な役割を果たしてる可能性が挙げられている(3)。近年、中枢神経組織にリポキシゲナーゼ活性が存在することが明らかにされ、5-HETE、9-HETE、11-HETE、12HETE、15-HETE 及びロイコトリエン$C_4$（$LTC_4$）、$LTD_4$、$LTE_4$ がラット大脳より単離されている(2)。さらに最近Aplysiaの神経系において12-リポキシゲナーゼ代謝産物が神経伝達物質のセカンド・メッセンジャーとして機能している可能性が示唆され大きな注目を集めている(4)。しかしながら中枢神経組織に存在するアラキドン酸代謝活性がどの細胞種に由来するものであるかは未だ明かではない。そこで我々はラット胎児脳より神経膠細胞の一種であるアストロサイトを分離・培養し、そのアラキドン酸代謝活性を調べた。またラット・グリオーマ由来で、グリア線維酸性蛋白（GFAP）陽性であることから、しばしばアストロサイトの代わりとして用いられる$C_6$グリオーマ細胞におけるアラキドン酸代謝も調べた(1)。

［実験方法］

Sprague-Dawleyラット18日胚の大脳より、アストロサイトを分離・培養し、単層培養系が得られた時点で（培養開始から7-10日後）、細胞をラバーポリスマンで剝離後、超音波破砕し、$^{14}$C-アラキドン酸と37°C 30分間インキュベートした。反応生成物を酢酸エチルで抽出後、薄層クロマトグラフィー（TLC）により展開し自動TLCリニア・アナライザーを用いて分析した。展開溶媒としては、C solvent（酢酸エチル：2,2,4-トリメチルペンタン：酢酸：水＝11:5:2:10、v/v の有機相）もしくは　D solvent（ジエチルエーテル：石油エーテル：酢酸＝50:50:1,v/v）を用いた。　高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析には、Shim-pak CLC-ODS, 0.5 x 15 cm を用い（移動相　アセトニトリル：メタノール：水：酢酸＝45:15:35:0.01）、15-HETE、11-HETE、12-HETEの標品が溶出されてくる分画をそれぞれ採取し、各分画中の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

［結果］

培養アストロサイトのホモジェネートにより、アラキドン酸はカルシウム非存在下（1 mM　EDTA）、主としてTLC上12-HETEと同じ移動度をもつ物質に代謝された（図１Ａ）。カルシウム添加（1 mM）によりこの代謝産物の

生成は顕著に増大した（図１Ｂ）。　この代謝産物の生成はインドメタシン（20 μM）によっては全く阻害されなかったが（図１Ｃ）、BW-755C（100 μM）により完全に阻害された（図１Ｄ）。このことからこの物質はアラキドン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物であることが強く示唆されたが、TLCでは15-HETE、11-HETE、12-HETEを分離することができない。　そこでTLC上12-HETEと同じ移動度を持つ部分をプレートからかきとり、クロロフォルム／メタノールで抽出後、逆相系HPLC にて分析したところ、代謝産物は12-HETE(56.2%)，11-HETE(37.9%)，15-HETE(5.9%)に分離した。　以上より培養アストロサイトのホモジェネート系においてはアラキドン酸は主としてリポキシゲナーゼによって代謝され、主な代謝産物は12-HETE、11-HETE及び15-HETEであることが明らかになった。次に$C_6$グリオーマ細胞におけるアラキドン酸代謝を同様の手法を用いて検討した。　図２Ａに示すように$C_6$グリオーマ細胞のホモジェネートによるアラキドン酸代謝産物は、TLC上$PGE_2$、$TXB_2$及び$PGF_2\alpha$と同一の移動度を持ち　（図２Ａ、１ mM EDTA存在下）、その生成はカルシウムの影響を受けず（図２Ｂ、１ mM　カルシウム存在下）、インドメタシン（20 μM）、BW-755C（100 μM）のいずれによっても、完全にその生成を阻害された（図２Ｃ、Ｄ）。このことから$C_6$グリオーマ細胞においては、アラキドン酸は主としてシクロオキシゲナーゼによって代謝され、主な代謝産物は$PGE_2$、$TXB_2$ 及び$PGF_2\alpha$であることが明らかになった。

［考察］

中枢神経組織に存在するアラキドン酸代謝活性がいかなる細胞種に由来するものであるかは、今まで明かではなかったが、我々の結果より、リポキシゲナーゼ活性の少なくとも一部はアストロサイトに存在することが明かになった。アストロサイトの産生するリポキシゲナーゼ代謝産物が神経系においていかなる機能を担っているかは未だ明かではないが、それを解明するための第一歩として我々は現在 intact の細胞系を用いて、リポキシゲナーゼ代謝動態を検討している。また$C_6$グリオーマ細胞はしばしばアストロサイトのモデルとして用いられているが我々の結果より$C_6$グリオーマ細胞を用いた実験の解釈には注意を要することが示唆された。

図１

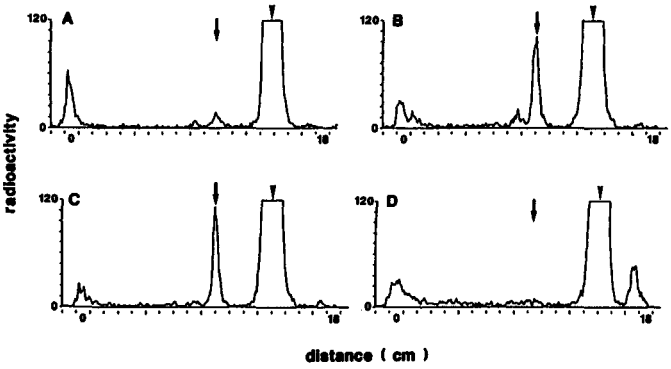
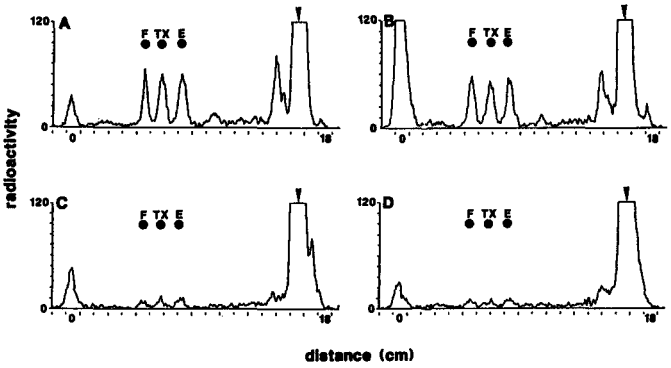



図２




［文献］

1. Ishizaki,Y., Morita,I. and Murota,S. (1989) Brain Res. (in press)
2. Miyamoto,T., Lindgren,J.A. and Samuelsson,B. (1987) Biochem. Biophys. Acta, 922, 372-378
3. Murphy,S. and Pearce,B. (1988) Prostagandins Leukot. Essenti. Fatty Acids, 31, 165-170
4. Piomelli,D., Volterra,A., Dale,N., Siegelbaum,S.A., Kandel,E.R., Schwartz,J.H. and Belardetti, F. (1987) Nature (Lond.) 328, 38-43

# 6　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代謝に及ぼす影響

松井和隆，衛藤義勝，白澤信行＊，石川博＊
下條貞友＊＊
慈恵医大・小児科，解剖＊，第二内科＊＊

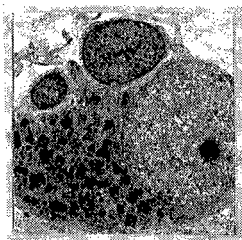
〔要約〕
チオールプロテアーゼ阻害剤であるE-64は細胞内の蛋白質分解を抑制し、代謝変化を引き起こす。第３０回、３１回の本学会において我々は、ラット脳初代培養細胞に１μｇ／ｍｌ以上の濃度のE-64を投与すると細胞内に蓄積物質が出現し、ライソゾーム酵素活性が増加する傾向があることを示した。また細胞内acid phosphatase活性を示す顆粒の増加を認め、蛋白代謝が変動することを報告した。今回我々は、E-64投与により蓄積物質の出現する細胞種の同定のためacid phosphatase活性染色とneurofilaments(NF)、glial fibrillary acidic protein (GFAP)、galactocerebroside(GC)の二重染色を行い、蓄積物質がneurone、oligodendrocyte、astrocyte のいずれにも出現するが、その出現の仕方は一様でなく細胞ごとに異なることを認めた。ライソゾーム酵素であるcathepsin B に対する抗体染色ではacid phosphatase活性染色と同様のパターンを示した。また、培養液中のE-64を除去することにより細胞内の蓄積物質は消失し、一連の変化は可逆的と思われた。これらの結果より、脳細胞に対するE-64の作用の多様性と臨床応用の可能性が示唆された。

ＭＬＤ（Metachromatic leucodystrophy）、ＭＳＤ（Multiple sulfatase deficiency）においてはアリルサルファターゼＡ又はセレブロシドサルファターゼの酵素活性が低下しており神経系組織等に於てサルファタイドが蓄積する。さらに患者の培養線維芽細胞にチオールプロテアーゼ阻害剤（Leupeptin）を添加すると代謝改善がみられたと報告されている（１、６）。本剤の脳障害治療への臨床応用の可能性を検討する上で脳細胞へのチオールプロテアーゼ阻害剤の作用に関する解明は重要と思われ、昨年に引続きラット胎児脳初代培養細胞を用いE-64の添加による形態学的、生化学的効果を検討した。

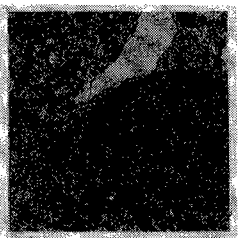
〔実験方法〕
胎生１５日令のWistar-Imamichi ラットより大脳半球を採取し、細切後、２１０μｍ、１４０μｍ、２５μｍのナイロンメッシュを通し細胞を単離した。実験に使用したシャーレ、培養用プレートは、Poly-DL-ornithineでコーティングして用いた。
①３５㎜シャーレに５×$10^5$ ／ｍｌの濃度の細胞を播き、Eagle's Minimum Essential Medium（以下EMEM）で５日間培養後、E-64を３～５０μｇ／mlの濃度で５日間添加した細胞と、その後E-64を除去しさらに５日間EMEM内で培養した細胞の電子顕微鏡による観察を行なった。
②直径１４ｍｍのカバーガラスの入った２４穴の細胞培養用プレートに細胞を播き、EMEM内で５日間培養後３～３０μｇ／ｍｌの濃度のE-64を５日間添加した。カバーガラスを取り出しacid phosphatase、cathepsin B（３）、NF（４）、GFAP、GC（５）の染色を施行した。
③１００㎜シャーレに細胞を播きEMEM内で５日間培養、methionine free medium内で１時間インキュベート後、methionine free mediumに$^{35}$S-methionineを５０μCi 添加し、２、４、６、８、２４時間培養した。各々の培養液を採取し、$(NH_4)_2SO_4$ で蛋白を沈澱させた後、透析を施行した。各々の細胞はtrypsinizationにて採取し、sonication、Triton X-100 添加、protamine sulfate添加、遠心を行い、培養液抽出液、細胞抽出液を得た。各抽出液の SDS-PAGE、autoradiographyを施行した（２）。

〔結果〕
写真１はE-64を１０μｇ／ｍｌ５日間添加した細胞の電顕写真である。コントロールと比較し、異常な蓄積物を持つ細胞の増加がみられた。写真２はE-64を１０μｇ／ｍｌ５日間添加した後E-64を除去し、さらに５日間EMEM内で培養した細胞の電顕写真である。多くの細胞で異常な蓄積物は消失し正常の細胞に近い構造となった。E-64添加による一連の変化は可逆的であると思われた。写真３、４はライソゾーム内のチオールプロテアーゼであるcathepsin B を染色した写真である。コントロール（写真３）と比較し、E-64を１０μｇ／ｍｌ添加した細胞（写真４）では染色性の増加がみられ、電顕写真で示したような細胞質内に蓄積物を持つ形に染色されてくる細胞も多数見られるようになった。ライソゾーム酵素であるacid phosphataseを染色すると、カテプシンＢと同様にE-64を添加した細胞では活性亢進がみられたが、全ての細胞で一様に活性亢進がみられるわけではなかった。ＮＦ、ＧＦＡＰとＧＣ染色をした後で acid phosphatase の検出をしたところ、各々の染色された細胞で　acid

phosphatase の活性が亢進している細胞がみられ、Neurone、Astrocyte、Oligodendrocyte の各細胞に対しE-64の影響が及ぶものと思われた。写真５、６は$^{35}$S-methionineを取り込ませた細胞とその培養液抽出物のSDS-PAGE後にautoradiography を施行したものである。時間毎に追ったものであるが、細胞内での蛋白合成が進み、培養液中への合成蛋白分泌が起こっているものと考えられる。



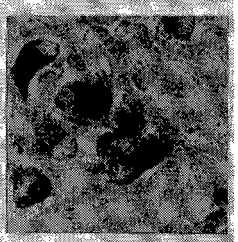
［写真１］
E-64 10μg/ml
添加細胞



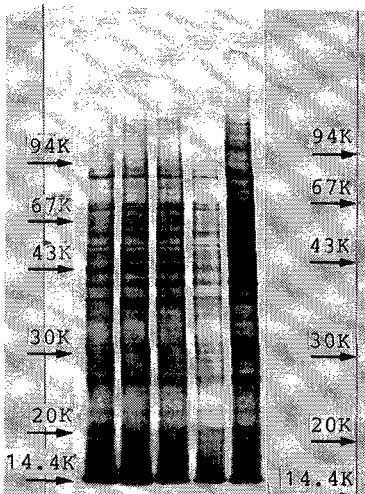
［写真２］
E-64 10μg/ml
５日間添加後、除去



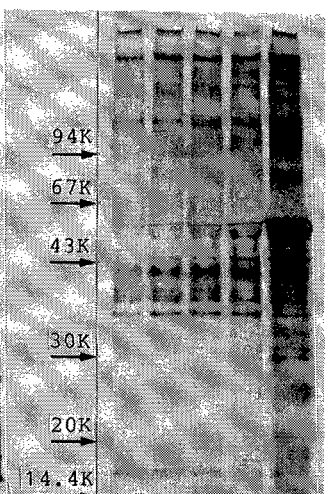
［写真３］
Cathepsin B 染色
コントロール細胞



［写真４］
Cathepsin B 染色
E-64 10μg/ml




［写真５］
$^{35}$S-methionine添加した
細胞の蛋白電気泳動




［写真６］
培養液中の蛋白質の
電気泳動

## 〔考察〕

チオールプロテアーゼ阻害剤投与によりチオールプロテアーゼによる分解をうける酵素が蓄積し、ライソゾーム内のさまざまな酵素の活性が上昇することが知られている。ライソゾーム内の酵素の活性低下が原因と考えられる疾患にはＭＬＤ、ＭＳＤ、Gaucher disease などがあるが、酵素活性低下による蓄積物質（例えばＭＬＤにおけるサルファチド）に対し、チオールプロテアーゼ阻害剤投与により酵素活性を高め蓄積物質の分解を促す治療法が期待される。一方、進行性筋ジストロフィー症では筋蛋白分解においてチオールプロテアーゼの関与が考えられ、チオールプロテアーゼ阻害剤投与によりその活性を抑え症状の進行を抑えようとの考えがある。今回の研究で、E-64はNeurone、Astrocyte、Oligodendrocyte に影響を及ぼしていることが判明した。その影響は各細胞ごとに異なり、一連の変化は可逆的であった。可逆性を示したことで、E-64を遺伝性脳変性疾患の治療に用いることの可能性が出てきたと考えられる。ヒトの治療に実際に用いる前に、E-64の脳細胞に及ぼす作用を解明することが必要である。目的とする効果が得られ、かつ副作用の出現しない濃度を求め、その濃度での作用時間の決定などE-64を治療に用いるにはより詳細な検討が必要と思われる。

写真５、６で示したように、細胞内蛋白合成が進むと同時に細胞外蛋白分泌が起こっていることがこの実験系で捉えられた。E-64がこの過程に及ぼす影響について、現在検討中である。

謝辞　本研究に使用した抗体を提供してくださった、徳島大学医学部酵素化学部　勝沼信彦教授、順天堂大学医学部　木南英紀教授、Canada　British Columbia大学　Ｋｉｍ教授に深謝いたします。

## 〔文献〕

（１）Eto,Y., et al. (1987) Enzyme 38, 273-279
（２）Hasilik,A., et al. (1980) J.Biol.Chem. 255, 4937-4945
（３）Ii,K., et al. (1985) J.Histochem.Cytochem. 33, 1173-1175
（４）Osborn,M., et al. (1983) Lab.Invest. 48, 372-394
（５）Sobue,G., et al. (1984) Science 224, 72-74
（６）von Figura,K., et al. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 80, 6066-6070

# 7　Ｌ－スレオならびにエリスロ－ＤＯＰＳ投与後の脳内モノアミンおよびその代謝産物の含量の変化について

原田　博之，辻　元宏，多賀　千明
能登　直，中嶋　照夫

（京都府医大．精神）

〔要約〕

Ｌ－スレオ－ＤＯＰＳならびにＬ－エリスロ－ＤＯＰＳをラット側脳室に投与し，脳内ノルアドレナリン（ＮＡ），ドーパミン（ＤＡ），セロトニン（５ＨＴ）ならびにそれらの代謝産物の濃度の経時的変化を高速液体クロマトグラフィーを用いた同時測定法にて測定した．Ｌ－スレオ－ＤＯＰＳの投与により脳内ＮＡ活性の亢進がおこるが，同時にＤＡ活性の低下と５ＨＴ活性の上昇がみられた．一方Ｌ－エリスロ－ＤＯＰＳの投与により脳内ＮＡ（ｄ－ＮＡ）の代謝回転の亢進（結果として脳内ＮＡ活性の低下）がおこるが，ＤＡ活性の低下と５ＨＴ活性の上昇もおこることを証明した．

＜緒言＞

ＤＯＰＳは非天然の中性アミノ酸で４つの異性体があり，Ｌ型のみがＬ－芳香族アミノ酸脱炭酸の基質となるのでＬ－スレオ型からｌ－ノルアドレナリン（ＮＡ）が，Ｌ－エリスロ－ＤＯＰＳ型からはｄ－ＮＡができる．Ｌ－スレオ－ＤＯＰＳはパーキンソンニスムの”すくみ現象”の治療や家族性アミロイドーシスおよびＳｈｙ－Ｄｒａｇｅｒ症候群の場合にみられる起立性低血圧の治療に用いられている．さらに最近では痴呆や精神分裂病の陰性症状の治療に対する有効性が検討されつつある．一方，Ｌ－エリスロ－ＤＯＰＳの投与により脳内ｌ－ＮＡ活性が低下することが明らかにされているが，臨床応用は現在のところなされていない．今回，われわれはＬ－スレオならびにエリスロ－ＤＯＰＳをラットの脳室内に投与し，脳内モノアミンおよびその代謝産物を経時的に測定し，若干の知見を得たので報告する．

＜実験方法と材料＞

実験には１２時間の明暗サイクル，恒温恒湿で飼育した２５０－３００ｇのウィスター系雄性ラットを用いた．動物の右側脳室に脳室内投与用ガイドカニューレを挿入し固定した．術後１週間を経過した動物を実験に用いた．人工髄液１μｌに溶かした５μｇのＬ－スレオ－ＤＯＰＳあるいはＬ－エリスロ－ＤＯＰＳをポリエチレンチューブを用いて静水圧にて脳室内に注入した．投与後３０，６０，１２０および１８０分後に動物を断頭致死せしめ，速やかに脳を取り出し，ＮＡ，ドーパミン（ＤＡ）ならびにセロトニン（５ＨＴ）およびそれらの代謝産物を高速液体クロマトグラフィーを用いた同時定量法（１）にて測定した．検出には電気検出器を用いた．抱合体の量を知るためにＳｕｌｆａｔａｓｅ ｔｙｐｅ Ｈ－５（Ｓｉｇｍａ）を用いて水解し合わせて測定した．

＜結果＞

図１に今回用いた高速液体クロマトグラフィーによるモノアミンおよびその代謝産物の溶出パターンとラットの脳サンプルの溶出パターンを示した．リテンション時間３０分以内にＮＡ，ＤＡ，５ＨＴおよびその代謝産物が分離溶出された．表１および２にＬ－スレオ－ＤＯＰＳを脳室内投与した時の脳内ＮＡ，ＤＡ，５ＨＴおよびそれらの代謝産物の濃度の変化を示した．ＮＡは３０分で増加し，１２０分まで続いた．またその代謝産物である３－メトオキシ，４－ヒドロキシフェニールグリコール（ＭＯＰＥＧ）とノルメタネフリン（ＮＭ）も増加傾向にあった．ＤＡは３０分で減少し，１８０分でもなお減少していた．またその代謝産物であるジヒドロキフェニール酢酸（ＤＯＰＡＣ）と３－メトオキシチラミン（３ＭＴ）も減少傾向がみられた．５ＨＴは増加傾向がみられ，その代謝産物である５－ヒドロキシインドール酢酸（５ＨＩＡＡ）は明らかに増加していた．表３および４にＬ－エリスロ－ＤＯＰＳを脳室内に投与した時の脳内ＮＡ，ＤＡ，５ＨＴおよびそれらの代謝産物の濃度の変化を示した．ＮＡは３０～１２０分の間で増加しており，その代謝産物も増加していた．ＤＡは３０分後で減少し，１８０分でも低下したままであった．また，その代謝産物も減少傾向にあった．５ＨＴは増加傾向がみられ，その代謝産物である５ＨＩＡＡは明らかに増加していた．

＜考察＞

アミンの前駆アミノ酸の投与は目的とするアミン活性を上げるのみでなく，他のアミン活性も変化させることが知られている．今回ＤＯＰＳについて検討した結果Ｌ－スレオ－ＤＯＰＳではＮＡ活性の上昇，ＤＡ活性の低下および　５ＨＴ活性の上昇がおこっていることが明らかになり，Ｌ－エリスロ－ＤＯＰＳではＮＡ（ｄ－型）の代謝回転の亢進（結果として脳内ＮＡ活性の低下），ＤＡ活性の低下および５ＨＴ活性の亢進がおこっていることが証明された．

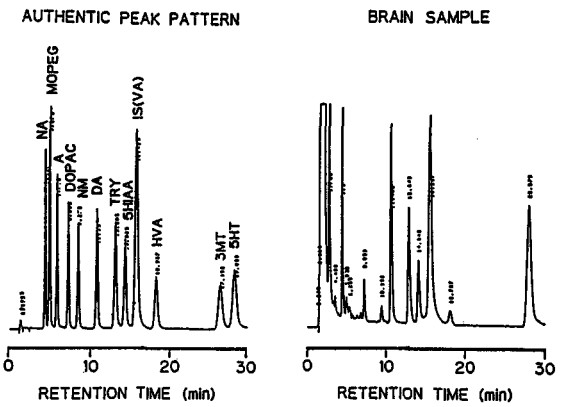



Fig 1)Chromatogram of 1ng-15ng/10ul of standard:
The mobile phase consisted of a 0.05M citrate buffer containing 0.04mM $Na_2$ EDTA, 0.018% sodium 1-octanesulfonate and 7.5% acetonitrile at a pH 4.3. The detector cell was set at +0.8V. The flow rate was 1.1ml/min and temperature was kept at 31°C.

TABLE1)
Chages in the concentrations of monoamines and their metabolites of rat brains after an intraventricular injection of L-threo-DOPS

| Time after Injection(min) | 0 | 30 | 60 | 120 | 180 |
|---|---|---|---|---|---|
| DA | 910.8±46.5 | 633.7±96.2** | 634.5±31.0** | 674.6±89.6** | 661.5±167.9** |
| DOPAC | 84.6±10.6 | 87.6±11.0 | 87.5±10.5 | 98.9±10.5* | 80.5±15.2 |
| 3MT | 27.4±7.7 | 24.7±4.1 | 23.3±6.25 | 25.1±21.3 | 15.4±3.3* |
| HVA | 58.1±6.2 | 74.7±8.4** | 92.0±26.0* | 88.3±2.6** | 72.5±10.9* |
| NA | 324.1±22.8 | 386.8±50.0* | 344.8±24.6 | 392.8±31.0** | 381.9±60.5 |
| MOPEG | 31.0±8.0 | 60.1±13.7 | 52.9±9.4** | 33.0±5.0 | 39.5±12.9 |
| NM | 15.8±4.1 | 13.8±2.8 | 14.6±3.4 | 14.6±1.5 | 9.4±1.3 |
| 5HT | 502.4±129.3 | 637.9±72.9 | 562.0±45.1 | 693.1±91.6* | 688.4±53.4* |
| 5HIAA | 358.3±15.4 | 637.9±72.9** | 335.4±30.5 | 401.5±14.5** | 349.1±30.3 |

Each value represents the mean ± S.D.(ng/g wet weigt) of 4 - 6 samples.
Statistically significant differences between values for L-threo-DOPS treated and control animals were evaluated by the Student't-test. *,p<0.05;**,p<0.01.

TABLE2)
Changes in the concentrations of sulfatase-hydrolysated monoamines and their metabolites of rat brains after the intraventricular injection of L-threo-DOPS

| Time after Treatment(min) | 0 | 30 | 60 | 120 | 180 |
|---|---|---|---|---|---|
| DA | 920.0±157.7 | 694.1±50.5* | 732.3±33.1* | 665.5±89.5* | 659.6±24.2* |
| DOPAC | 120.2±14.3 | 123.1±10.4 | 134.3±24.4* | 116.9±12.9 | 109.6±13.1 |
| 3MT | 25.4±7.5 | 22.4±4.5 | 16.5±5.1* | 19.9±7.1 | 14.0±3.4* |
| HVA | 98.8±16.9 | 107.8±10.3 | 122.0±27.6 | 101.0±15.1 | 100.7±12.1 |
| NA | 320.6±47.6 | 379.6±44.2* | 353.7±32.9 | 380.2±41.8* | 375.9±68.4 |
| MOPEG | 48.5±4.7 | 62.4±13.3** | 51.2±6.3 | 40.8±4.1* | 47.2±14.7 |
| NM | 13.9±2.2 | 17.6±4.5 | 18.3±2.2* | 16.3±3.5 | 13.1±1.7 |
| 5HT | 595.7±78.3 | 609.1±64.7 | 622.0±90.9 | 730.3±127.4 | 684.3±43.6* |
| 5HIAA | 338.3±41.9 | 475.0±36.0* | 416.1±78.0 | 383.6±38.9 | 352.6±19.7 |

Each value represents the mean ± S.D.(ng/g wet weigt) of 4 to 6 samples.
Statistically significant differeces between values for L-Threo-DOPS treated and control animals were evaluated by the Student't-test.*,p<0.05;**,p<0.01.

TABLE3)
Changes in the concentrations of monoamines and their metabolites of rat brains after an intraventricular injection of L-erythro-DOPS

| Time after Injection(min) | 0 | 30 | 60 | 120 | 180 |
|---|---|---|---|---|---|
| DA | 910.8±46.5 | 602.3±41.6** | 702.7±76.7** | 549.9±81.2** | 616±175.1* |
| DOPAC | 84.6±1.6 | 90.2±7.5 | 90.2±9.5 | 80.7±7.7 | 82.8±5.0 |
| 3MT | 27.4±7.7 | 38.1±11.7 | 29.3±4.0 | 24.7±2.2 | 20.1±5.8 |
| HVA | 58.1±6.2 | 94.2±11.0** | 64±5.3 | 60.0±5.0 | 56.2±6.0 |
| NA | 324.1±22.8 | 439.8±46.8** | 398.9±60.2* | 381.2±57.1 | 324.4±20.7 |
| MOPEG | 31±8.0 | 41.1±6.3 | 37.7±14.2 | 38.5±14.3 | 28.4±6.5 |
| NM | 15.8±4.1 | 36.0±5.1** | 20.7±5.4 | 22.4±3.3* | 11.5±1.4 |
| 5HT | 502.4±129.3 | 673.0±53.3* | 659.1±23.5 | 636.8±84.9 | 649.0±129.8 |
| 5HIAA | 350.2±20.5 | 471.9±57.6** | 417.7±49.8* | 334.4±27.8 | 340.9±22.8 |

Each value represents the mean ± S.D.(ng/g wet weight) of 4 - 6 samples.
Statistically significant differences between values for L-erythro-DOPS treated and control animals were evaluated by the Student't-test. *,p<0.05;**,p<0.01.

TABLE4)
Changes in the concentrations of sulfatase-hydrolysated monoamines and their metabolites of rat brains after an intraventricular injection of L-erythro-DOPS

| Time after Injection(min) | 0 | 30 | 60 | 120 | 180 |
|---|---|---|---|---|---|
| DA | 920.0±157.7 | 636.1±59.8** | 654.5±46.2** | 668.3±69.1** | 658.8±39.7* |
| DOPAC | 120.2±14.3 | 143.2±16.8* | 122.5±10.4 | 115.5±21.1 | 101.6±14.6* |
| 3MT | 25.4±7.5 | 46.9±8.1** | 30.3±12.5 | 19.4±4.7 | 20.3±8.0 |
| HVA | 98.8±16.9 | 138.6±19.4** | 107.9±15.5 | 91.4±6.1 | 76.9±11.8* |
| NA | 320.7±27.6 | 447.2±51.9** | 370.6±49.4* | 380.7±50.5* | 335.3±48.2 |
| MOPEG | 48.4±5.5 | 84.5±4.9** | 73.8±18.1* | 76.9±6.1** | 53.4±6.6 |
| NM | 13.9±2.2 | 38.6±5.8** | 22.2±8.7 | 17.9±3.6* | 13.4±3.4 |
| 5HT | 595.7±78.7 | 658.5±90.7 | 666.4±93.0* | 614.4±70.0 | 643.4±20.5 |
| 5HIAA | 338.3±41.9 | 472.8±54.9** | 474.1±62.4** | 329.8±22.8 | 348.8±40.0 |

Each values represents the mean ± S.D.(ng/g wet weight) of 4 - 6 samples.
Statistically significant differences between values for L-erythro-DOPS treated and control aminals are evaluated by the Student't-test. *,p<0.05;**,p<0.01.


## <文献>

1)Furukawa, K.,Karasawa, T, et al.:Jap. J. Pharm. 40, 149, 1986

# 8 Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) および Helodermin (HDM) の分解酵素に関する研究

蜂須 貢、平沼豊一、谷 寿恵、加藤由美子、飯塚多美恵
(MDリサーチ株式会社)

〔要約〕 Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) と Helodermine (HDM) の組織中での分解についてモルモット摘出気管筋標本を用いて検討した。エンケファリナーゼ阻害剤チオルファンおよびフォスフォラミドンは VIP の用量反応曲線を低濃度側にシフトし活性を増強したが、HDM に対しては影響しなかった。アミノペプチダーゼ阻害剤であるベスタチンやアンジオテンシン変換酵素阻害剤であるカプトプリルは VIP および HDM ともに影響しなかった。ラット線条体および肺より部分的に精製したエンケファリナーゼを用いて VIP および HDM の分解について検討したところ、肺エンケファリナーゼによっては VIP は分解されるが HDM は分解されなかった。また、線条体エンケファリナーゼでは VIP は肺の場合と同様に分解され、HDM は VIP に比較しゆっくりではあるが分解された。このエンケファリナーゼによる VIP の分解はチオルファンにより阻害された。

〔緒言〕 Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) は Said と Mutt (1) によりブタ十二指腸から発見された 28 アミノ酸残基よりなるポリペプチドであり、末梢および中枢神経系に広く分布している(2,3)。一方、Helodermine (HDM) はトカゲ(Heloderma suspectum)の毒から精製された 35アミノ酸残基からなるポリペプチドでその薬理作用は secretin /VIP ファミリーに属す (4,5)。 また HDM はトカゲばかりでなく哺乳動物にも存在することが免疫組織学的に示され 、種々の作用が報告されている。今回、我々はこれらペプチドの生体内での不活性化について研究を行い、興味ある知見を得たので報告する。

〔方法〕 モルモット摘出気管鎖標本を用いたペプチドの活性は以下のように検討した。即ち、400-800 g のモルモット(SLC)から気管を摘出し気管鎖標本を作製し、タイロード氏液を満たしたマグヌス管中に懸垂した。張力はアイソトーニックトランスジューサーを介してポリグラフ (日本電気三栄) 上に記録した。ペプチドによる気管筋弛緩作用は 30 μM ヒスタミンであらかじめ収縮させ、ペプチドを低濃度より累積的に投与した。

ラット (SLC) の肺又は線条体のエンケファリナーゼ (EC 3.4.24.11) の部分的な精製は Rush と Hersh (6) の方法に準じて行った。即ち、組織をホモジナズ後遠心により膜画分を集め、1 % トリトン X-100 を加え可容化し、超遠心後上清を DEAE-セルロースカラムにかけて NaCl グラジエントにより分離した。各フラクションの酵素活性の測定は基質としてメチオニンエンケファリンを用い、Tyr-Gly-Gly のトリペプチドを遊離させるものをエンケファリナーゼとし、限界濾過システムにより濃縮し用いた。

エンケファリナーゼにペプチドを加え 37° Cでインキュベーションし、反応終了後これを UV 検出器 (214 nm) 付高速液体クロマトグラフィーにかけペプチドを分離定量した。溶離液は 50 mM リン酸緩衝液(pH 3.0) + 40% アセトニトリルを用い、2 ml/min の割合で溶出した。実験に使用したエンケファリナーゼはいずれも メチオニンエンケファリンを約 1 nmole/mg/min の速度で分解する活性に調整し用いた。

〔結果〕 各種酵素阻害剤による VIP および HDM の増強作用

VIP および HDM は摘出気管筋に対してそれぞれ 1 nM - 300 nM, 10 nM - 300 nM の範囲で弛緩作用を示し、これにエンケファリナーゼ阻害剤チオルファン 0.1 μM を加えると、VIP 用量反応曲線を低濃度側にシフトするが HDM の容量反応曲線には影響しなかった (図1)。同様に種々ペプチダーゼ阻害剤の影響を検討した結果を表1に示した。数値は VIP 又は HDM の $ED_{50}$ 値を用量反応曲線より求めたものであり、各種ペプチダーゼ阻害剤が存在するときと存在しない (コントロール) ときの値を同一標本において比較した。アクチノニン (7) は 3 μM で VIP の $ED_{50}$ 値を約 1/2 に減少させ活性を増強した($p < 0.05$)。エンケファリナーゼ阻害剤のチオルファンは 0.1 μM および 1μM の適用で VIP の $ED_{50}$ 値を約 1/2 に減少させた。同様にフォスフォラミドン 1 μM は VIP の $ED_{50}$ 値を約 1/2 に減少 ($p < 0.05$) させた。アミノペプチダーゼ阻害剤ベスタチンおよびアンジオテンシン変換酵素阻害剤カプトプリルは 10 μM 用いても VIP の $ED_{50}$ 値に影響しなかった。一方、HDM に対しては VIP の活性を増強したアクチノニン、チオルファンおよびフォスフォラミドンは全く影響せず、更にベスタチンおよびカプトプリルも影響しなかった。

エンケファリナーゼによる VIP および HDM の分解

VIP 10 μM はラット肺エンケファリナーゼにより 37° C 約 2 時間のインキュベーションでほぼ 100 % 分解されたが、HDM 10 μM は同じ酵素を用いても 3 時間の間殆ど分解されなかった。 ラット線条体エンケファリナーゼでは同量の VIP は 2 時間で 100 % 分解され、同量の HDM も 3 - 4 時間で 50 % 以上分解された（図2）。ラット肺エンケファリナーゼによる VIP の分解はチオルファン $10^{-6}$ M で阻害され VIP の減少が遅延した。

〔考察〕 Liu ら (8)は VIP の気管筋弛緩作用がフォスフォラミドンにより増強されることより VIP の気管筋中での分解についてエンケファリナーゼが役割を演じていることを示唆した。 我々はエンケファリナーゼの特異的阻害剤であるフォスフォラミドンおよびチオルファンを用い同様の結果を得た。一方、HDM は Secretin/VIP ファミリー に属すペプチドであるが気管筋中では VIPとは異なりエンケファリナーゼ阻害剤により影響されないことを示した。更に、VIP,HDM とも気管筋中ではアミノペプチダーゼやアンジオテンシン変換酵素により影響されないことが示唆された。以上の事実から、線条体および肺からエンケファリナーゼを部分的に精製し、これを用い VIP と HDM の分解について検討した。VIP はラット肺および線条体の両エンケファリナーゼにより同様に分解された。しかし HDM の場合はラット肺エンケファリナーゼによっては殆ど分解されず、線条体エンケファリナーゼによって 3 - 4 時間で約 50 % 分解された。また、ラット肺エンケファリナーゼによる VIP の分解はチオルファンによって阻害された。今後、VIP と HDM のエンケファリナーゼによる分解の差について詳細に検討したい。

〔文献〕1. Said S.I. and Mutt V.(1970) Science, 169, 1217.
2. Larsson L.I. et al.(1976) Pro. N.A.S., 73, 3197.
3. Loren I. et al.(1979) Neuroscience, 4, 1953.
4. Vandermeers A. et al.(1984) FEBS Lett., 166, 273.
5. Robberecht P. et al.(1984) FEBS Lett., 166, 277.
6. Rush R.S. and Hersh L.B.(1982) Life Sci., 31, 445.
7. Hachisu M. et al.(1987) Life Sci., 41, 235.
8. Liu L-W. et al.(1987) Suppl. Meet. of VIP at NY.

表1. ＶＩＰのモルモット気管筋弛緩作用に対する酵素阻害剤の影響

| 阻害剤 | 用量(μM) | VIP EDso ± SE | | p | n |
|---|---|---|---|---|---|
| Actinonin | 0 (control) | 27.0 | 4.3 | | |
| | 0.3 | 26.5 | 5.1 | - | 6 |
| Actinonin | 0 | 23.1 | 2.8 | | |
| | 3.0 | 15.2 | 1.8 | 0.05 | 7 |
| Thiorphan | 0 | 20.4 | 3.1 | | |
| | 0.1 | 9.3 | 2.2 | 0.05 | 5 |
| Thiorphan | 0 | 26.1 | 5.0 | | |
| | 1.0 | 14.1 | 2.7 | 0.1 | 5 |
| Phosphoramidon | 0 | 36.8 | 5.0 | | |
| | 0.1 | 25.6 | 3.5 | 0.1 | 6 |
| Phosphoramidon | 0 | 30.4 | 3.7 | | |
| | 1.0 | 16.8 | 3.5 | 0.05 | 5 |
| Bestatin | 0 | 27.1 | 4.3 | | |
| | 10 | 33.6 | 5.8 | - | 5 |
| Captopril | 0 | 35.6 | 5.9 | | |
| | 10 | 35.8 | 6.2 | - | 5 |

p：危険率, n：例数

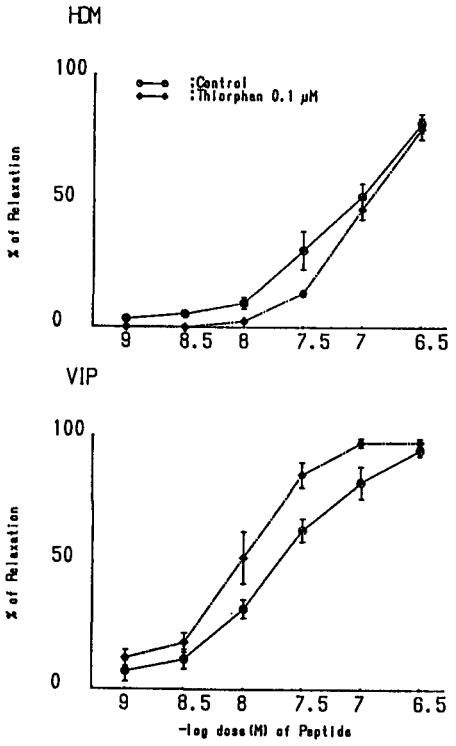



図1. ＶＩＰ と HDM の用量反応曲線に対するチオルファンの影響

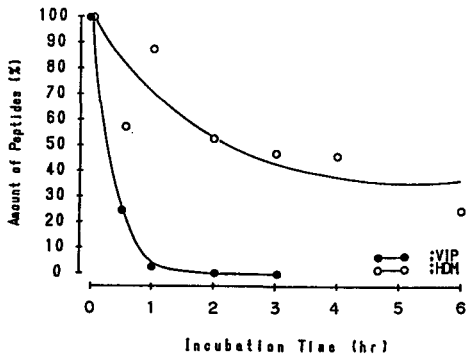



図2. 線条体エンケファリナーゼによる ＶＩＰ と HDM の分解

9

# 高 $K^+$ medium による脳切片内 glutamine synthetase 活性上昇の因子について

金松知幸・平野修助
（東邦大学・医学部・第二生理）

[要約]
高 $K^+$ medium による、ラット脳切片内 glutamine 代謝の変化について検討を行った。脳切片を高 $K^+$ 処理することにより切片内 glutamine synthetase (GS) 活性は増加を示し、glutaminase (PAG) 活性は低下を示した。この高 $K^+$ による GS 活性の上昇は Ca/calmodulin 依存性 protein kinase (PKI) の阻害剤である N-6-aminohexyl-5-chloro-1-naphtalenesulfonamide (W7) および protein kinase C (PKC) の阻害剤である polymxin B (PMB) で抑制されず、PKC 促進剤である 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を normal medium 中へ加えても GS 活性の上昇は認められなかった。$Na^+$-$K^+$ ATPase の阻害剤である ouabain, strophanthidin, gitoxin を normal medium 中に加えると、いずれも切片内 GS 活性を上昇させ、高 $K^+$ 効果と同様の結果を示した。また、高 $K^+$ medium 中へそれらの試薬を加えても高 $K^+$ による GS 活性上昇に対し、影響を与えなかった。これらのことから、高 $K^+$ による切片内 GS 活性上昇は、高 $K^+$ によるneuron の活動変化に伴う現象ではなく、glia 細胞が高 $K^+$ 環境下に置かれることにより生じるものと考えられる。

[目的] ラット脳切片を高 $K^+$ medium 中で incubate することによって、脳切片内 Glu 濃度が減少し(1)、Gln 濃度が上昇すること(2)、また、脳切片内グルタミン合成酵素 (GS) の活性が上昇することなどが報告されている(2)。 今回、我々は Gln 濃度上昇の機序を調べるために高 $K^+$ medium 処理後の脳切片内 GS 活性及び glutaminase (PAG) 活性を測定するとともに, GS 活性上昇の背景についても protein kinase 系の関与、$Na^+$-$K^+$ ATPase 阻害剤の影響などの面から詳しく検討を行った。

[実験方法] 1) 実験材料 : 雄の Wistar 系ラット、体重 200~250g を用いた。 2) 脳切片の作製法及び実験法 :ラットを断頭瀉血後、すばやく脳を取り出し氷冷された Krebs-Ringer, Phosphate buffer (pH 7.4) 中に入れ、その後、大脳皮質部のみを両刃カミソリの刃を用いて、フリーハンドで切片にした。切片の incu-bation は、湿重量 70~90mgの組織を 4mℓ の normal 及び 50mM-$K^+$ を含むmedium 中で、酸素気中、37℃で行った。Medium中に strophanthidin, gitoxin, N-6-aminohexyl-5-chloro-1-naphtalene-sulfonamide (W7), 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA), polymyxin B を加える場合は dimethyl sulfoxide (DMSO) で各々の試薬を溶解した。3) GS 活性の測定法 : 既に報告した方法に従った(2)。即ち、切片をincubation 後すばやく medium より取り出し、氷冷下で 10mM imidazole-HCl, 0.5mM EDTA, 5mM 2-mer-captoethanol (pH 7.2) 溶液で homogenate し、その 30μℓ (タンパク量、200μg相当) を enzyme sourceとして、70μℓ の assay medium へ加えた。基質としては assay tube 当たり、L-[1-$^{14}$C]-glutamic acid(50~60mCi/mmol, Amersham社製) を 0.05μCi 含む、400nmoles の glutamic acid を用いた。 4) Glut-aminase (PAG) 活性の測定 : Yudkoff et al. の方法(3)を変更して行った。即ち、4.8mM Gln($^{14}$C-U-Gln >250mCi/mmol, Amersham 社製, 0.05μCi を含む)、5mM $MgCl_2$、30mM KCl, 20mM HEPES, 5mM または 100mM $NaH_2PO_4$, 0.3mg/ℓ antimycin, 0.2mg/ℓ rotenone の溶液 70μℓ に、10μℓ の whole homogenate を加え、37℃ で 10 分間 incubate した後、氷冷された 20mM imidazole、30mM Glu、30mM Gln 溶液 (pH 7.2) を 1mℓ 加え反応を停止した。この全溶液を Dowex 1X4 $Cl^-$ form 200~400 mesh に通し、7mℓ の 10mM imidazole、30mM Gln 溶液 (pH7.2) でカラムを洗った後、6mℓ の 2N 酢酸で合成された Glu を溶出した。溶出液の 2mℓ を用い、 液体シンチレーションカウンターで測定した。

[結果と考察]
1) 高 $K^+$ medium 中での incubation 時間に伴う切片内 GS 活性の変化 : 脳切片を 50mM $K^+$ medium 中で incubate すると、incubation 開始後 3 分ですでに GS 活性の上昇が認められ始め (Fig.1)、10 分後で、normal のほぼ 1.5 倍の値を示した。この活性上昇は 60 分後まで認められた。 2) 高 $K^+$ medium 中での incubation 時間に伴う切片内 PAG 活性の変化 : 脳切片を 50mM $K^+$ medium 中で incubate すると、PAG活性は (Fig.2) incubation 開始後 30 分で、normal に比べ低値を示し始めた。この傾向は、60 分後まで認められた。 高 $K^+$ medium 中で脳切片を incubate すると切片内 Gln 濃度が上昇することを、すでに報告しているが(2)、Fig.1 および Fig.2 の結果より、この Gln 濃度上昇は、GS 活性が上昇

する一方、PAG 活性が低下するために生じるものと思われる。 3) Medium 中の W7 および TPA の切片内 GS 活性への効果 : Ca/calmodulin dependent protein kinase (PKⅡ) の阻害剤である W7 および Ca/phospholipid dependent protein kinase (PKC) を高 $K^+$ medium 中に添加したが、GS 活性に対する高 $K^+$ 効果はまったく抑制されなかった(Table 1)。

また、PKC を促進する TPA を normal medium 中に加えたが、切片内 GS 活性の上昇はまったく認められなかった。dBtcAMP が切片内 GS 活性に対しまたく効果を示さないことは既に報告しているが[2]、今回の結果と考えあわせると、高 $K^+$ medium により認められる GS 活性上昇は PKA, PKC および PKⅡ などによる GS 酵素の活性化に伴うものでないように思われる。 4) 切片内 GS 活性への medium 中の ouabain、gitoxin、strophanthidin の影響 : Normal および高 $K^+$ medium 中に、10μM の ouabain、strophanthidin および 100μM の gitoxin をそれぞれ加えると (Table 2)、いずれの試薬も normal medium 中で切片内 GS 活性を、ほぼ高 $K^+$ 効果と同様の値まで上昇させた。また、高 $K^+$ medium 中では、これらの試薬はともに GS に対する 高 $K^+$ 効果に対し影響を与えなかった。以上のように、$Na^+$-$K^+$ ATPase の阻害剤が切片内 GS 活性に対し高 $K^+$ 効果と同様の効果を示すことや、高 $K^+$ によって上昇する GS 活性に対し影響を与えないこと、また、すでに報告しているように $Ca^{2+}$ free medium でも高 $K^+$ 効果が認められること[2]、および高 $K^+$ 効果は protein kinase 系を介している可能性が少ないことなどから、GS 活性に対する高 $K^+$ 効果は neuron の興奮に伴う現象ではなく、glia 細胞が高 $K^+$ 環境下に置かれることによって生じるものと思われる。

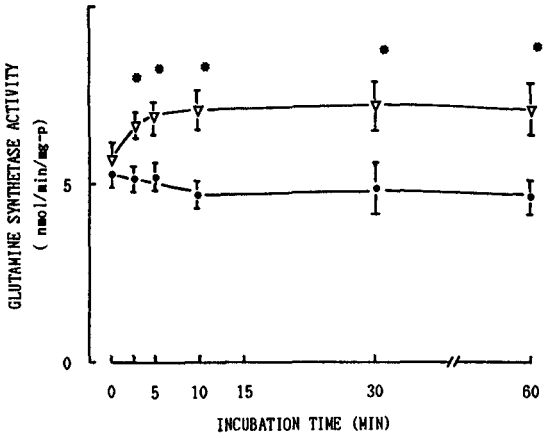



Fig.1 Effect of incubation time on glutamine synthetase activity in rat brain cortex slices. Rat brain cortex slices were incubated for various times in medium containing 5.6mM $K^+$( ● ) or 50mM $K^+$( ▽ ). Each point is the mean ± SD of three to six experiments. ‡P<0.01 ; compared with normal(5.6mM $K^+$) medium.

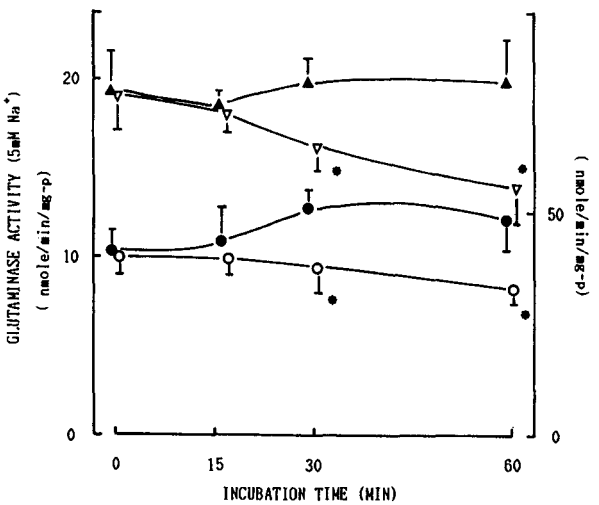



Fig.2 Effect of incubation time on glutaminase activity in rat brain cortex slices. Rat brain cortex slices were incubated for various times in medium containing 5.6mM $K^+$( ●, ▼ ) or 50mM $K^+$( ○, ▽ ). Enzyme activities were mesured with 5mM $Na^+$( ●, ○ ) and with 100mM $Na^+$ ( ▼, ▽ ). Each point is the mean ± SD of three experiments. ‡P<0.01 ; compared with normal(5.6mM $K^+$) medium.

Table 1

Effect of W7 and PMB on the increase of glutamine synthetase activity by 50mM $K^+$

| | nmol/min/mg-p | % change |
|---|---|---|
| Normal | 5.06 ± 0.34 | |
| 50mM $K^+$ | 7.44 ± 0.52[a] | 47 |
| 50mM $K^+$ + W7($10^{-5}$M) | 7.25 ± 0.65[a] | 43 |
| 50mM $K^+$ + PMB($10^{-5}$M) | 7.37 ± 0.72[a] | 45 |

Each value is the mean ± SD of four experiments.
[a]P < 0.01 ; compared with normal medium.

Table 2

Effect of TPA, ouabain, strophanthidin and gitoxin on the glutamine synthetase activity of rat brain slices

| | nmol/min/mg-p | % change |
|---|---|---|
| Normal | 4.89 ± 0.28 | |
| + TPA($10^{-5}$M) | 4.97 ± 0.35 | |
| + ouabain($10^{-5}$M) | 7.02 ± 0.42[a] | 44 |
| + strophanthidin($10^{-5}$M) | 7.52 ± 0.51[a] | 54 |
| + gitoxin($10^{-4}$M) | 6.72 ± 0.32[a] | 37 |
| 50mM $K^+$ | 7.32 ± 0.48[a] | 50 |
| + ouabain($10^{-5}$M) | 7.15 ± 0.52[a] | 46 |
| + strophanthidin($10^{-5}$M) | 7.22 ± 0.45[a] | 48 |
| + gitoxin($10^{-4}$M) | 6.60 ± 0.49[a] | 35 |

Each value is the mean ± SD of four experiments.
[a]P < 0.01 ; compared with normal medium.

[文献] (1) Hamberger, A., Chiang, G., Nylen, E., Scheff, S.W. and Cotman, C. (1978) Brain Res. 143, 549-555. (2) 金松知幸、中歩師恵、平野修助、中井健而 (1980) 神経化学 19、230-233 (3) Yudkoff, M., Nissim, I. and Pleasure, D. (1988) J. Neurochem. 51, 843-850

# 10 アストロサイトにおけるGM－CSFの産生

大野和茂、澤田誠、鍋村明生°、丸野内　棣
（藤田学園保健衛生大学・応用細胞、神経内科°）

アストロサイトにおけるIL-3様活性物質の産生を確認し、その因子を同定する目的で、精製アストロサイトを、TPA、LPSで刺激し、その培養上清中の IL-3様活性を、IL-3、GM-CSF 依存性の細胞IC-2により測定し、特異性を抗IL-3抗体、抗GM-CSF抗体を用い調べた。TPA、LPS刺激ともに24時間でIL-3様活性が認められた。この作用は、プロテインキナーゼCの阻害剤であるスタウロスポリン、H-7により阻害された。 この活性はまた、抗IL-3抗体ではほとんど阻害されず、抗GM-CSF抗体により阻害された。これらの結果より、アストロサイトはTPA、LPS刺激でIL-3様活性物質を産生し、これは主にGM-CSFであることが示された。

〔目的〕

脳内における免疫を担う細胞としてグリア細胞が最近注目されつつある。これらの細胞は病態においてIa陽性となり T細胞に抗原提示したり、そしてまた末梢の免疫系で働いている各種サイトカインを産生することが報告されている。今回我々はアストロサイトがIL-3様物質を産生しミクログリアの増殖を促進するとの報告(1)に注目し、アストロサイトによる IL-3様物質の産生、そして同定を検討したので報告する。

〔方法〕

1)精製アストロサイトの作製　C3H新生マウスより全脳を取り出し氷冷したMEM培地中で髄膜を除去した後、ナイロンメッシュにより細胞をほぐし10%血清、0.5μg/mlインシュリン、0.2%ブドウ糖を含むMEM培地に懸濁しF75フラスコ中で培養した。 2日後に基質に接着しない細胞を培地ごと除去し、この後3日毎に培地交換を繰り返し 14日間培養を行った。これによりシート状に広がったアストロサイト層の上に広汎に不整形の細胞（ミクログリア）が出現するので、この細胞を150rpmの円振とうで2時間振とうして分離した。さらにアストロサイトの精製のために trypsin、DNase Iによりフラスコから細胞をはがし細菌用ペトリディシュにまきこみ30分間で接着しない細胞を回収し培養した。この操作を2～3回繰り返した後、この細胞をGFAPで染色し 95%以上陽性であることを確認した後以下の実験に使用した。

2)IL-3様活性の測定　精製アストロサイトを24well plateに $1x10^5$/wellでまきこみplateに接着させた後、TPA、LPS各々を各wellに加えた。24、48、72時間後その培養上清を回収しIL-3様活性の測定用サンプルとした。活性の測定はIL-3、GM-CSF依存性の細胞IC-2(2)による bioassayにて行った。IC-2をPBSにて3回洗い96well plateに $1x10^4$/wellでまき、そこに各々サンプルを加え48時間培養の後、MTTassay(3)により細胞数を測定した。活性がIL-3であるか GM-CSFであるかは、サンプルに抗IL-3モノクローナル抗体、抗GM-CSF血清を加え確かめた。

〔結果〕

アストロサイト培養上清中の IL-3様活性は、無刺激では検出されず、TPA 0.01μg/ml 24時間でピークになり48時間ではその約 2/3程度に72時間で約1/2程度にまでおちた。LPS 10μg/ml 24時間で活性が上がり48時間、72時間でもその活性は保たれていた。TPA、LPS両刺激ともプロテインキナーゼCの阻害剤であるH-7、スタウロスポリンにより各々100μM、50μMの濃度で阻害された。特異抗体による阻害実験では、IL-3様活性は、抗IL-3モノクローナル抗体ではほとんど阻害できなかったが、抗GM-CSF血清により 90%以上阻害された。両抗体を同時に加えた場合、抗GM-CSF血清単独の時と同程度の阻害がみられた。(Fig.1,Fig.2)

〔考察〕

Freiらにより アストロサイトの培養上清が in vitroでミクログリアの増殖を促進し、これにIL-3が関与している可能性が報告(1)されているが、本学会別報（鍋村ら）(4)のごとく、ミクログリアの増殖を促進するのはGM-CSFであり、IL-3はこの活性をもたない。今回の我々の成績よりアストロサイトがGM-CSFを産生することが示された。アストロサイトは種々の液性因子を産生し、ニューロンや他のグリア細胞の増殖、活性化を調節しているが、GM-CSFもそれらの細胞の増殖を調節する重要な因子と考えられる。

〔文献〕

(1)Frei,K.,et al.(1986) J.Immunol. 137:3521
(2)Koyasu,S.,et al.(1985) J.Immunol. 134:3130
(3)Mosmann,T.(1983)J.Immunol.Methods 65:55
(4)鍋村　明生,et al.(1989)神経化学 28:in press

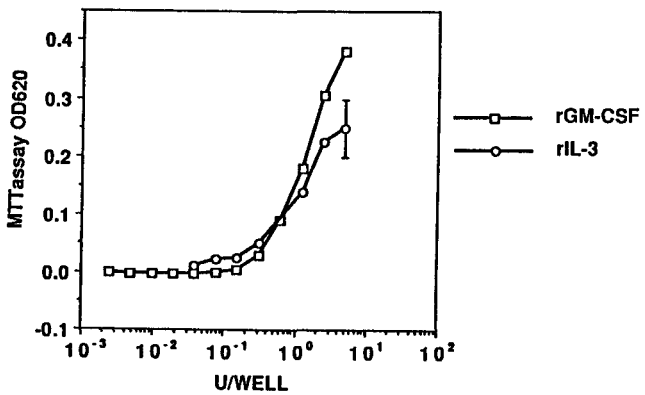



Fig.1 IL-3 and GM-CSF assay standerd curve

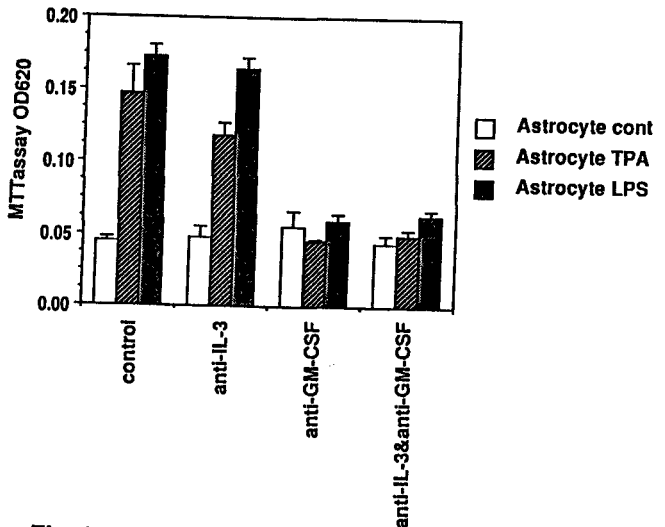



Fig. 2 IL-3 like factor assay of AstSup

# 11 Astrocyte由来interleukin 3 (IL-3)は microglia cellに MHC class Ⅱ (Ia) antigen を誘導する

今村一博[1]、錫村明生[2]、大野和茂[3]、丸野内棣[3]、高橋昭[1]
1)名古屋大学医学部神経内科
2)藤田学園保健衛生大学医学部神経内科
3)　同　総医研応用細胞

〔要約〕
最近、Alzheimer病、Parkinson病などの変性疾患において、変性神経細胞周辺に増殖する、HLA-DR陽性のmicroglia が報告された。我々は、このようなmicrogliaの出現に astrocyte 由来のIL-3が重要な役割を果たしていると考え、in vitro において,IL-3のmicrogliaのMHCclass II(Ia) 誘導について、flowcytometryをもちいて検討した。その結果、IL-3にはIFNγに匹敵する程のmicroglia のIa誘導作用をもつことが明らかとなった。さらに、LPS刺激下で培養したastrocyte 上清で刺激した場合でも同様にmicroglia にIaが誘導され、これはanti IL-3 antibody で特異的にblock された。このことから、astrocyte 由来のIL-3 がmicroglia の増殖とIa 誘導をregulate している可能性が示唆された。以上のことは、中枢神経系の病態を考える上で極めて重要なことと考える。
Key words:microglia, astrocyte, interleukin 3(IL-3),MHC class II(Ia)

〔緒言〕
McGeerら[4][5]は、Alzheimer病、Parkinson 病などの変性疾患において、変性神経細胞周辺にHLA-DR陽性のreactive microglia が出現していることを示した。一方、顔面神経切断後に顔面神経核周辺にmicroglia の増殖が認められ、これらの細胞もMHC class Ⅱ (Ia)抗原陽性となる。[3][6] ここにはreactive astrocyte の出現も認められ、Ia陽性のmicrogliaの増殖にastrocyteの関与が強く示唆される。Freiら[1]は、astrocyte 由来のIL-3 がmicroglia 及びperitoneal macrophage を増殖させると報告しており、reactive microglia の出現と関わっている可能性が考えられる。今回我々は、astrocyte由来のIL-3 のmicrogliaの MHC class Ⅱ (Ia) 抗原誘導能について、flowcytometryをもちいて検討したので報告する。

〔実験方法〕
C3H/Hemouse(Charles River Japan,Inc)新生仔脳から既報[7]のごとくmicroglia,astrocyteを分離した。分離したmicroglia cellを8X10$^5$ cells/2ml mediumずつP4 culture dishにまいた。各々のdishは、mouse rIFNγ (50u/ml),mouse rIL-3 (50u/ml),mouse rGM-CSF (50u/ml),LPS (10μg/ml),LPS刺激astrocyte培養上清(Ast/LPS)(50%),Ast/LPS(50%)+rat anti mouse IL-3 antibody (DNAX Inst. Dr.Schreursより供与) 及びastrocyte 培養上清(Ast)(50%) で48時間刺激した。刺激後、各々のdishをmedium で2回洗浄し、付着細胞を集め、非動化10% normal goat serum と氷上で30分間反応させた。その後、anti I-A$^K$ antibody (1:500 Meiji Tokyo) と氷上で1時間反応させた。Negative control としては、anti I-A$^D$ antibody (1:500 Meiji Tokyo)をもちいた。冷PBSで2回洗浄後に、FITC－goat(Fab')$_2$ anti mouse(IgG+IgM)antibody(1:50 Cappel)と氷上で30分間反応させ、PBSで洗浄後、EPICS V をもちいてflowcytometryで解析した。

〔結果〕
Flowcytometry の結果は、Fig.1 に示す。すなわち、無刺激及びLPS(10μg/ml)刺激では、microglia にIa は誘導されなかった。mouse rIFNγ (50u/ml)刺激では、microglia にIa が誘導された。Colony stimulating factors (CSFs)の刺激では、LCM (crude M-CSF)(10%),mouse rGM-CSF (50u/ml)刺激では、microgliaに Ia は誘導されなかったが、mouse rIL-3 (50u/ml)刺激でmicrogliaに強くIa が誘導された。このIL-3 のIa 誘導作用は、rat anti mouse IL-3 antibody (10μl/ml)で完全にblockされた。さらに、astrocyte 培養上清(Ast)(50%) で刺激しても

microglia にIa は誘導されなかったが、LPS刺激 astrocyte培養上清(Ast/LPS)(50%)ではIa 誘導作用が認められ、rat anti mouse IL-3 antibody (10μl/ml)で完全にblock された。

〔考察〕

Suzumuraら[7]が既に$^{51}$Cr relase assay をもちいて報告しているごとく、無刺激のmicrogliaにはIa 抗原の表出は認められないが、IFNγ 刺激でIa抗原が誘導されることがflowcytometry をもちいて証明された。さらに、CSFs の刺激では、crude M-CSF(LCM,10%),rGM-CSF(50u/ml)ではIa抗原の誘導は認められないが、IL-3(50u/ml)刺激で明らかなIa 誘導が認められた。このIL-3のIa誘導は antiIL-3 antibody (10μl/ml)で特異的にblockされた。

Freiら[1]は、astrocyteをLPS刺激すると、IL-3 like factor を産生し、microgliaを増殖させると報告している。今回我々の検討でも、astrocyte を LPS(10μg/ml)で48時間刺激した培養上清でmicrogliaにIa が誘導され、anti IL-3 antibody (10μl/ml)で特異的にblock された。このことは、すくなくともLPS刺激astrocyte 培養上清にはIL-3が含まれていると考えられる。なお、LPS刺激ではmicroglia にIa は誘導されなかった。以上のことから、変性神経細胞周辺にみられる、増殖能をもち、MHC class II (Ia) 陽性となるmicroglia の出現には、astrocyte から産生されるIL-3が関与している可能性が示唆される。最近、IL-3 に神経突起形成作用があることが報告されており、神経変性に伴い、activate されたastrocyte がIL-3 産生を介してneuronと microgliaの両者を調節していることは中枢神経系における病態を考える上で極めて重要なことと考える。IL-3またはastrocyte からのcytokines によるMHC class II(Ia)の誘導は従来報告されておらず、現在 mRNAの検出も含め詳細な機序を検討である。

〔文献〕

1)Frei,K.,Bodmer,S.,Schwerdel,C.,and Fontana,A.(1986) J.Immunol. 11,3521-3527
2)Giulian,D.,and Ingeman,E.(1988) J.Neurosci. 8,4707-4717
3)Kreutzberg,G.W.,and Barron,D. (1978) J.Neurocytol. 7,601-612
4)McGeer,P.L.,Itagaki,S.,Tago,H.,and McGeer,E.G.(1987) Neurosci. Lett. 79,195-200
5)McGeer,P.L.,Itagaki,S.,and McGeer,E.G.(1988) Acta Neuropathol. 76,550-557
6)Streit,W.J.,Graeber,M.B.,and Kreutzberg,G.W.(1989) J.Neuroimmunol. 21,117-123
7)Suzumura,A.,Mezitis,S.G.E.,Gonatas,N.K.,and Silberberg,D.H.(1987) J.Neuroimmunol. 15,263-278

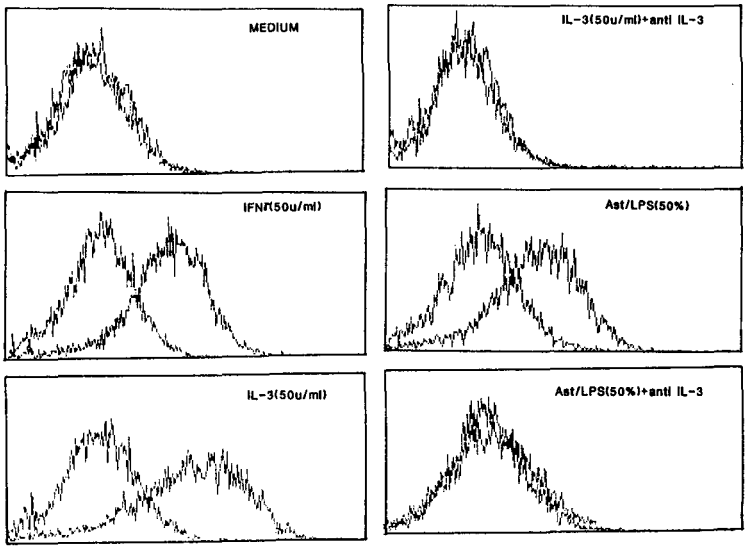



Fig.1 FACS analysis

FACS analysis did not show Ia antigen expression on unstimulated microglia cells. Microglia cells were induced Ia antigen by IFNγ and IL-3. Ia antigen induction by IL-3 was selectively blocked by anti IL-3 antibody.

Furthermore, astrocytes cultuer supernatant stimulated by LPS induced Ia antigen on microglia cellsand also blocked by anti IL-3 antibody. Unstimulated astrocytes cultuer supernatant did not induce Ia antigenon microglia cells.

# 12 アルツハイマー病末梢リンパ球の抗グリア線維酸性タンパク質抗体産生能の検討

中村和子、武田雅俊、多田國利、播口之朗、西村 健
（大阪大・医・精神神経科）

〔要約〕
我々は、アルツハイマー病患者血清中には、アストログリア細胞中の中間径フィラメントであるグリア線維酸性タンパク質(glial fibrillary acidic protein;GFAP)に対する自己抗体の上昇が認められることを報告した(1)が、今回、in vitroで抗体産生能を誘導する系を用い、抗GFAP抗体価上昇の病態生理学的な検討を行なった。まず、培養リンパ球上清中の抗GFAP抗体を検出するためのELISAを確立し、pokeweed mitogen(PWM)による刺激あるいはEB virusでtransformした患者末梢リンパ球の培養上清中に産出された抗体をこのELISAにより定量した。これによってて次の3点が明らかとなった。1)アルツハイマー病では抗GFAP産生クローンがControlに比べて増えている。2)アルツハイマー病リンパ球では抗GFAP抗体も抗ニューロフィラメント(NF)200K抗体両者とも産生能が上昇している。3)両蛋白を認識するB cellクローンがしばしば異なる。今回の結果から、アルツハイマー病においてはB cell系のIg産生能に誘導刺激により高まりやすく、これが血中抗体価の上昇と関連があるという可能性が示唆された。

我々は、ヒト血清中に抗グリア線維酸性蛋白(GFAP)抗体が存在しており、アルツハイマー病患者においてはこの自己抗体価が正常人と比較して有意に上昇していることを報告した。アルツハイマー病患者リンパ球をEB virusでtransformさせることにより、神経原線維変化(NFT)(2)やGFAP(3)と反応する抗体が産生することが示されており、また、正常人リンパ球もEB virus transformationによりNFTに対する抗体が産出されることが報告されている(4)。今回我々はアルツハイマー病患者血清中に見られる抗GFAP抗体価の上昇の病態生理学的意義を解明する目的で、pokeweed mitogen(PWM)及びEB virusによりヒト末梢リンパ球の抗体産生能を誘導することによりアルツハイマー患者において抗GFAP抗体及び抗ニューロフィラメントサブユニット蛋白(NF200K)抗体産生能に差異があるかどうかを検討した。

＜材料と方法＞

1) GFAPとNF200Kの精製； 牛脊髄からaxonal floatation 法によりCrude Neuro- filament分画を抽出し、これよりDE-52カラムクロマトグラフィーで精製した。

2) リンパ球の単離；肘静脈より採取したヘパリン加末梢血に等量のRPMI-1640(GIBCO)を加えて希釈しFicoll-Paque(Pharmacia)上に重層後、1500rpm，30分遠心して，リンパ球層を単離し、リンパ球を採取した。採取したリンパ球はRPMI-1640で3回洗浄した。尚、採血に際しては 、あらかじめ患者あるいは家族に検査目的及び内容を説明して同意を得た。

3) Blastogenic Responses to Mitogens; 20% fetal calf serum(FCS,GIBCO)を含む培養液RPMI-1640培地(加penicillin G 100U/ml,streptomycin 100mcg/ml, amphotericin B 0.25mcg/ml)中で所定の数に調整したリンパ球に対してpokeweed mitogen(PWM,10μg/ml,Biosys s.a.)を，各wellに20μlずつ加え5%$CO_2$37℃で7日間培養した。

4) Transformation by EB virus; ヒトリンパ球のcell pelletにB95-8細胞の培養上清を450nmのミリポアフィルターで濾過したものを約3ml加え、さらにCyclosporin A(Sandoz)(2μg/ml)を加えて37℃、3時間incubateした後、上記の培養液にて細胞数2.5x$10^5$/wellに調整してマイクロプレートにinoculateし、5%$CO_2$37℃で培養した。培地は3日毎に、細胞を残して培養液のみ半量交換した。

5) Avidin-Biotin法による抗GFAP抗体及び抗NF200K抗体のELISAの確立；マイクロプレートの各wellにGFAP又はNF200K 0.01mg/mlを100μlずつ添加して固相化抗原とし、4℃で 12 時間静置し、1%skim milk-Tris緩衝生理食塩水-0.05%Tween20(TBS-T)で3回洗浄した。1%skim milk-TBSで30分間 blocking後、polyclonal anti-GFAP(Biomeda)又はmonoclonal anti-NF200K(Amersham)の希釈系列を作り、それぞれ35μl入れて37℃で1時間反応させた。同様に洗浄しながらbiotinylated anti-rabbit IgG(Vector)又はbiotinylated anti-mouse IgG(Vector)を加えて37℃で30分間、続いてhorseradish peroxydase-Avidin D(Vector)を加え同じく37℃で30分間incubateした後、orthophenylenediamineを発色基質として492nmで吸光度(optical density;OD)を測定した。以上の方法でELISAの標準曲線を描き、抗体価の定量が可能であることを確認した後、第2反応に用いる抗体をbiotinylated anti-humanIgG(Vector)に変えてヒトリンパ球培養上清中の抗体価を測定した。

＜結果と考察＞

我々はまず、Avidin-Biotin法によるELISAでヒトリンパ球が産生する免疫グロブリンの量が測定できるかを検討するために上記の方法に従って標準曲線を作成した。Fig.1に示すように抗GFAP抗体、抗NF200K抗体両者ともその標準曲線はsigmoid curveを示し本ELISA系の特異性と定量性が確認された。次に、抗GFAP抗体を分泌しているBリンパ球のクローンのサイズを患者群と

Control群で比較するために、pokeweed mitogen(PWM)を用いてT cell依存性のBリンパ球の抗体産生刺激を行なった。その結果,患者群ではControl群に比べて1wellあたりのまき込み細胞数が少なくても抗GFAP抗体価が高いということが明らかとなり、これによりアルツハイマー病では抗GFAP抗体産生クローンがControlに比べて増えていることが示唆された(Fig.2)。次に、アルツハイマー患者リンパ球の抗GFAP抗体の産生能を調べるためにEB virus transformationによる実験を行なった。Fig.3はEB virus接種後、経過を追って OD値の変化を調べたものであるが、transformantが確立されると考えられる14日目でOD値が高くなっていた。同じマイクロプレート上でのnegative controlの平均+3SDに、Fig.1 の標準曲線の直線勾配上でdilutionがx4違う個所のODの差を足したもの一以上のODを示すwellを便宜的に陽性と定め、Fig.4にEB virusでtransformして14日目の培養上清のELISAにおける陽性率を示した。抗GFAP抗体価の対照として、抗NF200K抗体価も測定し、同様の方法で陽性限界を定め、その陽性率も記載した。患者群ではControl群に比べて抗GFAP抗体、抗NF200K抗体両者とも有意な上昇を示していた。この結果は、先に報告したアルツハイマー病患者血清中での抗GFAP抗体価の上昇が抗GFAP抗体産生クローンの増加によることを示している。中間径線維蛋白には共通の抗原決定基が存在することも知られているが(5)、今回の実験結果からは抗中間径線維蛋白抗体を産生するB cellクローンがGFAPとNF200Kとで異なる場合があることが見い出された。従って、アルツハイマー病患者で血清中に認められる高い抗GFAP自己抗体価はGFAP特異的であることが強く示唆される。今回得られた結果は、アルツハイマー病においては、B cell系のIg産生能が、誘導刺激により高まりやすいことを示すものであり、アルツハイマー病における免疫系の研究が重要であることを示すものであろう。

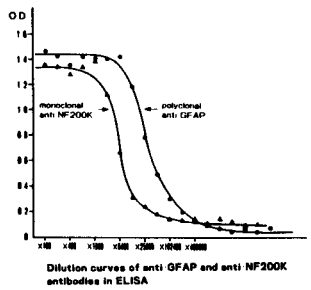



Fig.1.抗GFAP抗体、抗NF200K抗体の標準曲線

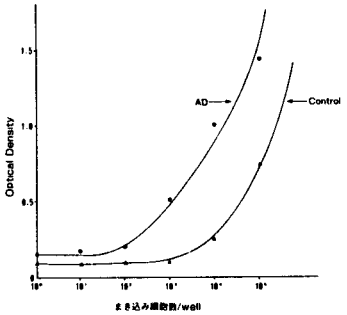



Fig.2.pokeweed mitogen刺激後アルツハイマー病(AD)とcontrolのまき込み細胞数/wellを変化させたときのODの推移

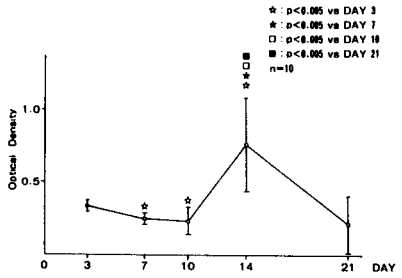



Fig.3.EB virus接種後のアルツハイマー病リンパ球の培養上清におけるODの変化

| | GFAP | Nf(200k) |
|---|---|---|
| Alz 1 | 100% (14/14) | 100% (14/14) |
| Alz 2 | 100% (14/14) | 100% (14/14) |
| Alz 3 | 81.8% (9/11) | 36.4% (4/11) |
| Control(n=4) | 48.4±29.1% | 35.4±22.5% |

Fig.4. アルツハイマー病(Alz)及びcontrolのリンパ球培養上清における抗GFAP抗体と抗NF200K抗体の陽性率の比較

＜謝辞＞
本実験に際しまして、B95-8細胞を提供して頂きました大阪大学細胞工学センター　内田教授に深く感謝いたします。

＜文献＞

1.Tanaka J.et al,1988 Biomed Res 9;209-216
2.Gaskin F.et al,1987 J.Exp.Med.165;245-250
3.Simpson J.et al,1986 J.Neuroimmunol.13;1-8
4.Kingsley B.S.et al,1988 J.Neuroimmunol.19;89-99
5.Pruss R.M.et.al,1981 Cell 27;419-428

# 13 Colony Stimulating Factorによる培養ミクログリアの機能および増殖の調節

錫村明生，澤田　誠*，大野和茂*，
丸野内　棣*，山本纁子
藤田学園保健衛生大・神経内科，応用細胞*

〔要約〕
単球・マクロファージ系細胞の分化を調節するColony Stimulating Factor(CSF)のミクログリアへの効果を検討した。M-CSFはミクログリアの増殖および活性化に、GM-CSFは増殖に、IL-3は survivalのみの働いた。これは、ミクログリアが比較的分化・成熟した単球系細胞の特性を持つことを示しており、ミクログリアの単球起源説を支持している。アストロサイトはGM-CSF、IL-3を産生するが、アストロサイト培養上清はGM-CSFともIL-3とも異なる効果を持ち、ミクログリアをramifiedに変化させたが、増殖に対しては無効であった。このことは、アストロサイトが他のサイトカインを出す可能性や、種々のCSFが競合的に働く可能性を示唆している。

ミクログリアは中枢神経系を構成するグリア細胞の一つであるが、細胞の起源および機能については不明な点が多い。周産期に脳内へ移行した単球・マクロファージ系の細胞をミクログリアの起源とする説が一般的であるが、これに対する反論もみられる。我々はミクログリアの本態にアプローチするために正常マウス脳よりミクログリアを単離・培養する方法を開発し(1)、この細胞が培養下で、形態学的及び 機能的に極めて単球・マクロファージ系の細胞に近似することを報告してきた (1, 2, 3,) 。また、γーインターフェロンによる class II MHC (Ia)抗原の誘導の成績より、ミクログリアが中枢神経内における免疫応答に重要な役割を果す可能性を示した(1, 2)。In vivoでは Ia陽性のミクログリアは免疫性神経疾患のみならず、アルツハイマーをはじめとする変性疾患や、実験的ワーラー変性の際にも出現することが知られており、神経変性またはグリオージスの病態とも関連していると考えられている。しかしながら、ミクログリアの活性化、増殖の機序は全く解明されていない。

今回、種々のサイトカイン、とくに単球系細胞の分化・増殖を調節しているcolony stimulating factor(CSF)のミクログリアの増殖および活性化への効果を検討した。また別報（大野ら）のごとく、アストロサイトが CSFを産生することが判明したので、その効果も検討した。

［方法］

既報(1)のごとく、新生仔マウス (C3H) より全脳を取り出し、氷冷したハンクス液中で、顕微鏡下で髄膜を剝離した後、ナイロンメッシュ (320μm) で細胞をほぐし、10%FCS、5μg/mlインスリン、0.2%ブドウ糖を含むMEM培地に懸濁し、75cm² フラスコ (Falcon) 中で培養した。2日後に培地を交換し、以後2回／週の割で培地交換を行った。培養14日目に、フラスコを orbital shakerにて2時間、37℃で振盪し、遊離細胞のうち接着細胞のみを集めて、ミクログリアとして用いた。

この分離ミクログリアを1)無刺激、2)IL-3 (recombinant, 0.5－50U/ml) 、3) GM-CSF (recombinant, 0.5－50U/ml) 、4) L929培養上清 (crude M－CSF, 1－25%) 5)LPS刺激アストロサイト上清 (Ast－Sup, 0.1－25%) とともに3日ないし7日間培養し、これら培養細胞の ①形態学的変化、②増殖能 (細胞数、MTT－assay, $^3$H－thymidine uptake) 、③酵素活性 (酸フォスファターゼ) 、④スーパーオキサイドアニオン ($O_2^-$) 産生、を検討した。

［結果］

①形態学的変化：いずれのサイトカインもミクログリアのsurvivalを延長させた。IL-3は形態変化を引きおこさないが、GM-CSFは細胞体全体を延長させ、M-CSFはさらに糸状に延長させた。Ast-Supはミクログリアに複数の突起を形成させ、ramified microgliaに変化させた（図1）。

②増殖能：IL-3、GM-CSF、M-CSF、Ast-Supで刺激した群では無刺激のものに比して細胞数は多かったが$^{3}$H-thymidine uptakeを増加させたのはGM-CSFとM-CSFのみであった。

③酸フォスファターゼ活性：M-CSF はミクログリアの酸フォスファターゼ産生を増強させたが、他はいずれも無効であった。

④$O_2^-$産生：M-CSF以外はいずれも$O_2^-$産生能を増強させなかった。

［考察］

今回の成績のまとめを表1に示す。単球・マクロファージ系細胞を調節するCSFがM-CSF＞GM-CSF＞IL-3の順にミクログリアの増殖・活性化に効果をもち、ミクログリアの単球起源説をさらに支持するとともに、ミクログリアが単球系の細胞のうち、かなり分化・成熟した細胞の特性をもつことを示している。Ast-Supは GM-CSF、IL-3を含むにもかかわらず、ミクログリアの活性化に対しては、いずれのCSFとも異なる態度を示し、ミクログリアの増殖活性は持たなかった。これはAst-Sup中の他の因子の共存、または、複数のCSFが競合的に働く可能性を示唆している。

［文献］

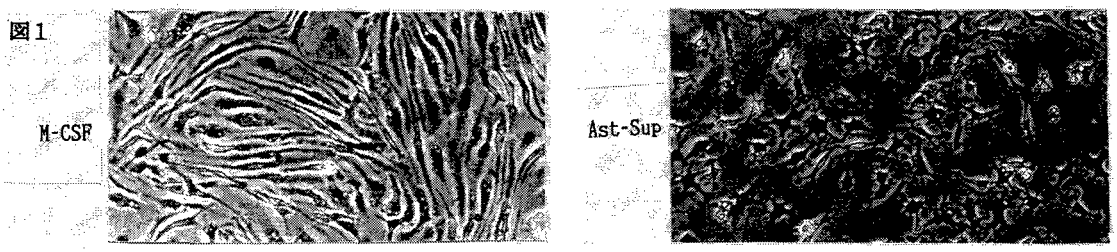

1. Suzumura, A. et al., MHC antigen expression on bulk isolated macrophage-microglia from newborn mouse brain : induction of Ia antigen expression by γ-interferon. J. Neuroimmunol. 15 (1987) 263-268.
2. 鍋村明生、マウス神経膠細胞の培養とその応用研究－培養神経膠細胞のMHC抗原について。組織培養研究 6 (1988) 35-42.
3. Sawada, M. et al, Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. Brain Res. in press.


表1

| | survival* | $^{3}$H-thymidine uptake | morphological changes | enzymatic activation |
|---|---|---|---|---|
| IL-3 | + | - | - | - |
| GM-CSF | + | + | + | - |
| M-CSF | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Ast-Sup | ++ | - | ++ | - |

- : no activity, +～+++ : moderate to strong activity
* survived viable cells at 7 days after isolation as determined by MTT assay.

図1



# 14　塩基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

遠山育夫，原靖＊，半田譲二＊，安原治＊＊，秋口一郎＊＊，木村宏
（滋賀医大・分子神経生物学研究ｾﾝﾀｰ、脳外科＊、京大・医・神内＊＊）

〔要約〕塩基性線維芽細胞成長因子（ｂＦＧＦ）をウシ脳５０頭分より抽出・精製した。得られたペプチドの性質を等電点およびＳＤＳ電気泳動法で確認したところ、塩基性の等電点を有する分子量１７Ｋのペプチドであることから、ｂＦＧＦであると考えられた。これを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下垂体におけるｂＦＧＦ様免疫活性物質の局在について検索した。その結果、点状または線維状の構造および一部の細胞体にｂＦＧＦ様免疫活性物質が観察された。線維状の構造は前葉、中葉および後葉いづれにも存在したが、とくに後葉に密で前葉では疎であった。いっぽう細胞体は後葉のみに分布し、前葉の内分泌細胞には認められなかった。

## 〔緒言〕

塩基性線維芽細胞成長因子（ｂＦＧＦ）は神経細胞の生命維持や保護作用を有し（１）、とりわけ下垂体に豊富に存在することが知られている（２）。しかしながら、その形態学的な証明はなされていない。そこで本研究ではウシ脳より抽出・精製したｂＦＧＦを用いて抗体を作製し、免疫組織化学的にラット下垂体におけるｂＦＧＦ様免疫活性物質の局在について検索した。

## 〔方法〕

ｂＦＧＦの抗体作製：　５０頭分のウシ脳を用いた。Bohlenらの方法（３）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、2.6 mg のペプチドを精製した。このペプチドを電気泳動法で検討したところ、塩基性の等電点をもつ分子量１７ＫのペプチドであることからｂＦＧＦと考えられた（Fig. 1）。このペプチド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（４）で検定した。すなわち，ニトロセルロース膜に2.7 pmoles から 0.1 pmoles のｂＦＧＦまたは acidic 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，ｂＦＧＦ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。

ｂＦＧＦ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。下垂体を摘出後、パラホルムアルデヒドとピクリン酸の混液に２日間浸漬し、後固定を行った。その後15%庶糖液で数回洗浄した後、３７℃の10%ゼラチン水溶液中に２４時間浸漬した。これを４℃にて冷却し、ゼラチン包埋標本を作製した。これをクリオスタットで２０μｍの連続切片とし、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ｂＦＧＦ抗体を５千倍希釈でスポットテストに用いた場合 0.3 pmoles のｂＦＧＦが十分な感度で検出されたが、acidic ＦＧＦとは 2.7 pmoles の高濃度を用いても反応しなかった（Fig. 2）。したがって、この抗体の acidic ＦＧＦとの交叉率は10%以下と考えられた。

ラット下垂体における免疫組織化学では、点状あるいは線維状の構造と一部の細胞体にｂＦＧＦ様免疫活性が認められた（Fig. 3 A and B）。陽性線維（Fig. 3A)は前葉、中葉および後葉の三葉ともに認められたが、その密度は部位により異なり、後葉に密な、前葉で疎な分布傾向がみられた。これに対して陽性の細胞体(Fig. 3B)は後葉にのみ観察された。いっぽう前葉の内分泌細胞には陽性反応は全く観察されなかった（Fig. 3A)。

## 〔考察〕

今回作製したｂＦＧＦ抗体は特異性および力価が高く、免疫組織化学法に応用しても十分な

染色結果を得ることができた。生化学的な研究によればｂＦＧＦは生体内に広く存在し、とりわけ下垂体に豊富に存在するとされる（２）。しかしながら、これまでその形態学的証拠は得られていなかった。本研究により、はじめて下垂体内のｂＦＧＦの局在を明らかにすることができた。陽性染色反応は後葉の細胞体のほか、下垂体の全ての領域においておそらく神経終末に分布するものと考えられた。従って点状の構造はバリコシティと思われるが、その真偽の判定には免疫電顕による検索が必要である。これら線維状構造は後葉に最も密で、前葉では疎であった。一方、前葉および中葉の内分泌細胞は染まらなかった。これらの結果よりラット下垂体内のｂＦＧＦは腺性下垂体に比し、神経性下垂体優位に分布していることが明かとなった。

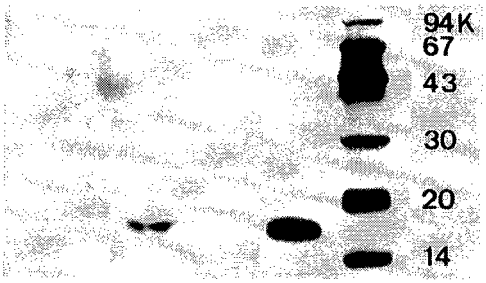



Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrohoresis of basic FGF (left) and acidic FGF (right)

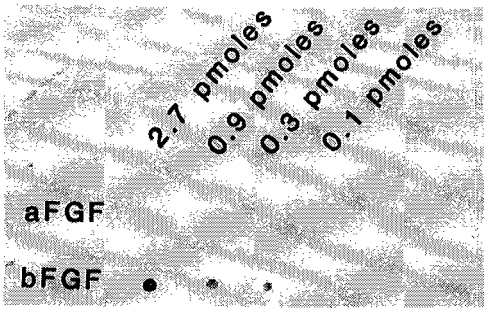



Fig. 2 Immuno-spot test of antiserum against acidic (upper) and basic (lower) fibroblast growth factors.

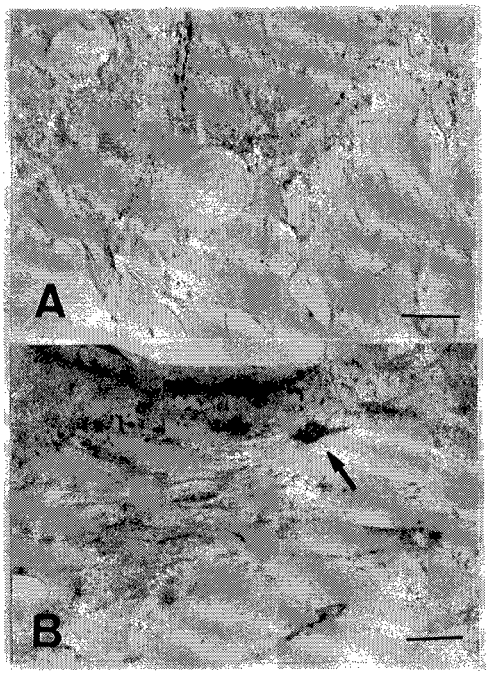



Fig. 3 Basic fibroblast growth factor like immunoreactivities in the rat pituitary gland. A; anterior lobe B: posterior lobe. Arrow indicates bFGF like immunoreactive cell. Bar = 20 μm

［文献］

1) Anderson K.J., Dam D., Lee S. and Cotman C.W. (1988) Nature, 332, 360-361
2) Gospodarowicz D. (1987) Methods Enzymology, 147, 106-119
3) Bohlen P, Esch F, Baird A and Gospodarowicz (1985) EMBO J., 4, 1951-1956
4) Tomida Y, Kimura H (1987) Acta Histochem. Cytochem., 20, 31-40

# 15 N-(1-[2-thienyl]cyclohexyl)[$^3$H]piperidine 結合部位のラット脳における発達

篠原　一之．西川　徹．石井　澄和*
高橋　清久　（国立精神・神経センター．神経研究所第三部．武蔵病院*）

〔要約〕

ラット前脳部においてphencyclidine(PCP)受容体に対する特異的N-(1-[2-thienyl]cyclohexyl)[$^3$H]piperidine([$^3$H]-TCP)結合の発達を調べた。前脳ホモジネートにおいて、[$^3$H]TCP結合は胎生18日に既に存在するが、生後３日までは成熟期の約20%であった。その後急速な増加を示し、生後14日にはほぼ成熟期のレベルに達することが解った。出生後の発達段階を通して、[$^3$H]TCP結合の Bmax値が増加したが、Kd値は変化しなかった。また、TCP，PCP および (-)-2-amino-5-phosphonovalerate((-)APV))の[$^3$H]TCP結合阻害能には生後7日と50日で差異がなかった。以上のことから、1) PCP受容体数は生後の発達にともなって増加するがその親和性は変化しないこと、2)PCP受容体とN-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体の間の機能的連関は変化しないことが示唆された。出生後にみられる[$^3$H]TCP結合の増加は、オートラジオグラフィー法によっても確認された。

NMDA型興奮性アミノ酸受容体は、受容体ーイオンチャンネルコンプレックスを形成し、アゴニスト結合部位以外にグリシン結合部位やPCP結合部位を有する。本受容体はさまざまな神経の可塑性や損傷に関与しているが、これらの現象の一部は幼若期に増強して起こることが知られている。この年齢に伴うNMDA受容体機能の相違は、NMDA受容体コンプレックス内のいずれかの結合部位の発達上の変化によっておこる可能性が考えられる。今回我々は、PCP 受容体への[$^3$H]TCP結合の発達を脳のホモジネートにおける結合実験とオートラジオグラフィ法を用いて検討した。また、[$^3$H]TCP結合はグルタミン酸 やグリシンによって増強されるため、同時にこれらアミノ酸濃度の発達に伴う変化を調べた。

<材料及び方法>

胎生(ED)18日より生後(PN)50日までのウイスター系雄性ラットをもちいた。

シナプス膜標品による結合実験を行うため、前脳（下垂体漏斗より前方）を5mMトリス塩酸緩衝液中でポリトロンによるホモジナイズをした。ホモジネイトの一部は、アミノ酸の測定に用いた。結合実験は、膜標品を 5nM[$^3$H]TCP(NEN，60 Ci/mmol）と、25°Cで90分間反応させて行い、非特異結合は100uMPCPの存在下で測定した。反応はWhatman GF/Cグラスフイルターを用いた吸引濾過法で停止した。

オートラジオグラフィによる実験を行うため、ラット脳の前額断切片（10uM）をクライオトームを用いて作成した。脳切片を上記緩衝液中で２時間プレインキュベーションした後、10nM[$^3$H]TCPと45分間反応させた。その後、緩衝液中で１分間洗浄する操作を3回繰り返し、蒸留水でリンスしたのち冷風にて乾燥させた。さらに、この脳切片を28日間トリチウムフィルムに暴露した。

グルタミン酸およびグリシンは自動アミノ酸分析器（Biotronik，Model LC 5000）を用い、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィによって測定した。統計解析には、Cochran-Coxのt-testまたはは Kruskal-Wallis testを用いた。

<結果>

特異的 [$^3$H] TCP結合は胎生18日にすでに存在し、成熟ラットの19%を示した。その後出生までは、発達曲線の変化は見られないが、出生後、Ｓ字状曲線を描きながら増加して、生後14日に成熟ラットのレベルに達した(図１)。[$^3$H]-TCP結合の性質は、生後7日と50日で調べた。飽和実験の Scatchard 解析から結合定数を求めると、生後7日では kd=14.5nM，Bmax=183fmol/prot、生後50日ではkd=13.6nM，Bmax=556fmol/protであった。このことから発達期間中、PCP受容体の親和性は変化せず最大結合数が増加することが解った。競合実験からは、PCP受容体アゴニスト(PCP,TCP)及びNMDA受容体アンタゴニスト((-)APV)の [$^3$H] TCP結合に対する親和性は幼若期(PN7)と成熟期(PN50)の間で差がないことが解った(表１)。

脳のスライスにおける［$^3$H］TCP結合をオートラジオグラフィーによって解析すると、①成熟期(PN50)における脳内分布は従来の報告に一致すること、②ホモジネートで得られた結果と同様に、脳内のいずれの部位でも、幼若期(PN7)における結合は成熟期(PN50)に比して低いこと、③視床や海馬では、PCP受容体結合の分布が幼若期においてはびまん性の傾向があり、成熟期(PN50)のように明確な組織内の分布密度の差が認められないことなどが解った。

グルタミン酸の濃度は胎生18日から出生時にかけて減少し、その後は徐々に増加した。グリシンの濃度は胎生18日から出生までは変化しないが、その後年齢とともに減少した(図１)。

＜考察＞

以上の結果から、PCP受容体はすでに胎生期から存在するが、成熟期に比べて著しく低いレベルであり、生後２週間に急速に増加して成熟期のレベルに達することが解った。この間、[$^3$H]TCP結合のBmaxが増加するのに対してKdは変化しないこと、TCPやPCPの[$^3$H]TCP結合阻害能も不変であることなどより、PCP受容体結合能の増大は受容体数の増加によると考えられた。生後にPCP受容体の増加が生ずることは、最近の[$^3$H]TCP(2)や[$^3$H]MK801をリガンドに用いた研究結果とも一致する。グルタミン酸とグリシンは[$^3$H]TCP結合を増強することから、[$^3$H]TCP結合の発達はこれらアミノ酸濃度の発達上の変化による可能性も考えられるが、その可能性は次のことから否定された。すなわち、1)[$^3$H]TCP結合とグルタミン酸濃度は共に生後増加するが、発達曲線は互いに異なる、2)グリシンの濃度は生後減少する、3)NMDA受容体を阻害することによって[$^3$H]TCP結合を減少させるAPVの[$^3$H]TCP結合に対する$IC_{50}$は，成熟期と幼若期の間で変化がないなどが観察された。

また、幼若期と成熟期におけるNMDAアンタゴニストの[$^3$H]-TCP結合阻害能には差異がなかったことから、発達段階において、NMDA受容体とPCP受容体の機能的連関はほとんど変化しないと考えられる。この結果と、NMDA受容体およびPCP受容体が同じ受容体－イオンチャンネルコンプレックス中に存在することを考え合わせると、双方の受容体の発達曲線は相似することが予想される。しかし、NMDA受容体への[$^3$H]-グルタミン酸結合は成熟期よりも幼若期の方が高値であり、幼若期には一過性に上昇するという報告(4)がある。PCP受容体はイオンチャンネル内にあると考えられていることから、この発達曲線の相異は、発達段階の一時期においてイオンチャンネルと共役しないNMDA受容体が存在する可能性を示唆している。この可能性は、幼若期にはNMDA受容体の刺激によって生ずる膜電流が、成熟期でみられるような電位依存性を示さないという所見(1)からも支持されると考えられる。

＜文献＞

(1) Ben-Ari, Y. et al.: Neurosci. Lett., 94(1988)88-92, (2) Dorota, M. et al.: Dev. Brain Res., 47(1989)13-18, (3) Morin, A.M. et al.: Brain Res., 487(1989)376-379, (4) Trendy, E. et al.: Brain Res., 461(1988)393-396

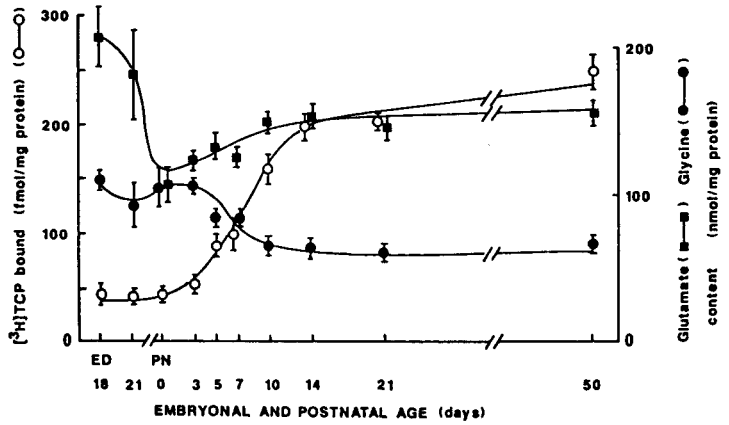



図１．ラット前脳部における[3H]TCP 結合、グルタミン酸濃度およびグリシン濃度の発達による変化
結果は、平均値±標準誤差で示す(n=3) 。

| Drug | $IC_{50}$ PN 7 | PN50 |
|---|---|---|
| TCP | 7.79±0.07nM | 7.94±0.03nM |
| PCP | 7.24±0.18nM | 7.64±0.15nM |
| APV | 372 ±56 uM | 441 ±11 uM |

表１．７日齢および50日齢ラットの前脳部における[3H]TCP 結合の阻害実験
PCP 、TCP あるいはAPV は、$10^{-9}$～$10^{-3}$M の濃度で展開した。結果は、平均値±標準誤差で示す(n=3) 。

# 16　抗うつ薬慢性投与後のラット大脳皮質β受容体数の変化：浸透圧ポンプ投与と皮下投与の差異

窪田　博，朝倉幹雄，塚本　徹，今福　淳，小川百合子，長谷川和夫

（聖マリアンナ医科大学神経精神科学教室）

## 〔要約〕

抗うつ薬50mg/kg/日1日1回7日間の皮下最終投与6時間(6h)後の変化として，desipramine(DMI)，imipramineは約40%のβ受容体の減少を示したが，mianserin(MIA)は有意なβ受容体の減少を示さなかった．浸透圧ポンプによるDMI5~50mg/kg/日7日間投与後のβ受容体はDMIの投与量にかかわらず40%減少した．MIAは10mg/kg/日7日間ではβ受容体は有意な減少を示さず，20mg/kgあるいは30mg/kg/日7日間の投与で約25%，40mg/kgあるいは50mg/kg/日の投与では，約40%の濃度依存的な減少を示した．しかし，fluoxetine，trazodoneの20mg/kg/日7日間，14日間の浸透圧ポンプによる持続投与ではβ受容体の減少は起こらなかった．したがって，抗うつ薬持続投与後のβ受容体はシナプス間隙のノルエピネフリンの持続的増加により減少すると考えられる．しかし，DMIは5mg/kg/日7日間の持続投与で40%のβ受容体の減少を起こすが，MIAは40mg/kg/日以上の投与量が必要であり，β受容体の減少機構にはノルエピネフリン系以外の因子の関与が考えられる．

［緒言］

ラット脳β受容体の減少は，三環系抗うつ薬desipramine(DMI)やモノアミン酸化酵素阻害薬の慢性投与そして電気痙攣療法反復処置後に認められることが報告されており，また，ラット脳スライスではnorepinephrine(NE)やイソプロテレノールに対するadenylate cyclase(AC)活性が低下することが知られている．四環系抗うつ薬 mianserin(MIA)や maprotiline(MPR) は NE-AC 活性の低下は起こすがβ受容体の減少を起こさないことが報告され，Mishraらは NE-AC 活性の低下が抗うつ薬の作用機序に関連すると考えた．われわれは，MIAやMPRは1日1回30mg/kg の皮下投与ではラット脳β受容体数は減少を示さないが，15mg/kg1日2回4日間最終投与6時間(h)後では約25%減少し，この減少は24時間以内に回復することを報告した(1,2)．MIAやMPRがβ受容体の減少を起こすことからわれわれは，β受容体の減少が抗うつ薬に共通な生化学的指標にならないかと考えた．しかし，臨床において抗うつ薬作用を持つとされる新しい世代の抗うつ薬trazodoneやfluoxetine(FLX)は，β受容体の減少を起こすという報告もあるが一定の見解がなく，われわれの研究では1日2回の腹腔および皮下慢性等投与でもβ受容体の減少は認めない．ラットでは1日1~2回の抗うつ薬皮下あるいは腹腔内注射で起こらない変化が，経静脈的持続投与や浸透圧ポンプによる持続投与で見られるという報告があ(3,6)．そこで今回著者はtrazodone，FLXを含む定型，非定型抗うつ薬について浸透圧ポンプによる持続投与と皮下投与による慢性投与後のラット脳大脳皮質β受容体数の変化について比較し，β受容体の減少が抗うつ薬に共通な生化学的指標になる可能性を検討した．

［方法］

1)動物，薬物処置

体重200g~300gのWistar 系雄性ラットをsodium pentobarbitalで麻酔後，抗うつ薬の投与量が5~50mg/kg/日となるようにセットした浸透圧ポンプ(Model2ML1，AlzetCorp,USA)を，背部の皮下に埋め込み，imipramine(IMI)，DMI，MIA，FLX，trazodoneを，持続的に4日~14日間投与した．

ラットは各実験により薬物投与中または，浸透圧ポンプ取り出し後6h，24h，48h，5日目および7日目に断頭した．これらの薬物は50mg/kg/日1日1回7日間の皮下注射 (S.C.) も行ない薬物最終投与6h後に断頭した．各対照には同様の処置を行い vehicleを投与した．

2)受容体膜標品の調整

大脳皮質摘出後，氷冷 50mM Tris･HCl buffer 中でBrinkmann Porytron PT-10(dial set No.5，30sec)でホモジナイズし，50，000g 10分間2回遠心分離洗浄し，沈渣を同bufferに懸濁したものを受容体膜標品とした．

3)[$^3$H]CGP-12177によるβ受容体結合実験

膜標品(0.2~0.5 mg protein)を，0.05~0.8nMの[$^3$H]CGP-12177 ([$^3$H]CGP:S.A.31Ci/mmol)と50mM tris･HCl buffer (pH 8.0，30℃)中で40分間インキュベート後，Whatman GF/Bフィルター上に吸引濾過した．フィルターは15ml bufferで洗浄し，シンチレーター中でシンチレーションカウンターによりβ線を測定した．非特異的結合は10μM alprenolol 存在下で同様に行ない，全結合と非特異的結合の差を特異的結合とした．Scatchard解析によりβ受容体数(Bmax)と解離定数(KD)を求めた．平均値の差の検定にはStudent-Tテストを用いた．

［結果］

1) 浸透圧ポンプによる抗うつ薬20mg/kg/日7日間持続投与後のβ受容体数(Bmax)の変化は，IMI，DMIは対照と比較

し40％の有意なBmaxの減少を示したが,MIAは21％の減少にとどまった.trazodone,FLXは,有意なBmaxの変化は認めなかった.投与量の変化として,DMIは5mg･10mg/kg/日7日間の持続投与でもBmaxは約40％の減少を示したが,DMI 30,40,50mg/kg/日の投与でもBmaxの減少は40%と一定であり最大の減少を示した.MIA 10mg/kg/日7日間の持続投与では有意なBmaxの減少は認めなかったが,20mg/kg/日で21%,30mg/kg/日で25%の減少を示し,MIA 40mgおよび50mg/kg/日の投与ではBmaxは40％まで減少した. IMI,DMI,MIA持続投与後減少したβ受容体の回復過程については,MIA 20mg/kg7日間投与では浸透圧ポンプ抜去後24hでは有意なBmaxの減少を認めず,遅くとも48h 後には完全に回復していた.一方,浸透圧ポンプ抜去後 IMIは5日目では24%,DMIは26%の減少を認め ,7日目では有意な減少は認めなかった.

2)皮下注射による抗うつ薬50mg/kg/日 1日1回7日間投与6h後のBmaxの変化では,対照と比較してIMIは40%,DMIは42%のBmaxの減少を示したが,MIA,FLX,trazodoneは有意なBmaxの減少は示さなかった.

以上すべての実験においてKDの変化は認めなかった.

[考察]

Clements-JeweryはCF HBラットにおいてtrazodone10mg 25日間投与 24時間後に著明なβ受容体の減少を起こしたと報告しているが(5),本研究においては大量の皮下慢性投与でもβ受容体の減少を認めなかった.Trazodoneのラットでの血中半減期は2時間と非常に短いため,今回浸透圧ポンプによる持続投与の結果に期待したが,有意なβ受容体の減少は認めなかった.FLXについて,ByerleyらはFLX投与後,ラット前頭皮質第4層において有意なβ受容体の減少を認めたと報告しているが(4),今回の皮下大量投与あるいは浸透圧ポンプによる慢性投与でもβ受容体の減少は認めなかった.Trazodoneはserotonin (5-HT) 取り込み阻害作用を持つがNE取り込み阻害作用はないとされている.5-HT取り込み阻害薬であるFLXもNE取り込み阻害作用は持つが弱いとされている.本研究では観察できなかった変化が,動物種の違いや脳の解剖学上の局在的変化を検討することにより観察できるのかも知れないが,5-HTの取り込み阻害作用だけではβ受容体の減少は起こらない可能性も考えられた.

近年,抗うつ薬投与後のβ受容体の減少についてNE-5-HTリンク仮説が提唱されており,JanowskyやSulserらは,DMI投与後のβ受容体の減少に5-HTが必要であると報告している.従来,MIAはα2受容体を阻害しシナプス間隙内のNEは増加するが,5-HT取り込み阻害作用は持たずβ受容体の減少は起こさないとされていた.しかし,本研究において,浸透圧ポンプによるMIA 20mg/kg/日以上の慢性投与では有意なβ受容体の減少を起こし,大量投与ではDMI同様最大40%の減少を示した.以上の結果から,シナプス間隙の5-HTの存在だけではβ受容体の減少は起こらず,β受容体は5-HTの存在がなくてもNEの持続的刺激により最大の減少を起こすと考えられる.一般にβ受容体が減少するためには受容体が過剰なアゴニストに長期間暴露される必要がある.MIAがβ受容体の減少を起こさないと報告されていたのは,MIAは半減期が2hと短く1日1回の注射では長期間アゴニストに暴露されるという条件を満たさなかったためかも知れない.

次に,浸透圧ポンプによる持続投与により,DMIが5mg/kg/日7日間でβ受容体の最大減少に達するにもかかわらず,MIAは持続投与しても8倍以上の投与量を必要とする.この理由として,一つには,MIAはDMIに比べシナプス間隙のNEが十分増加していない可能性がある.しかし,Racagniらは,DMI 10,20,50mg 1回腹腔内投与1h後の急性期のラット大脳皮質のnormetanephrine濃度の増加率は,MIAをそれぞれ同量投与した方が高いと報告している(6).また倉田らは浸透圧ポンプによるclomipramine, amitriptylineとMIA慢性投与後のラット脳内薬物濃度分布は差がないと報告しており,本研究において,浸透圧ポンプによるMIAの持続投与は血中濃度と比較しMIAの脳内濃度が十分高いことが予測され,MIAはシナプス間隙において十分なNEの増加を起こしていると考えらる.したがって,上記の疑問はNEだけでは説明できない.第二の理由として,DMIはNEと5-HT両方の取り込み阻害作用を持つが,MIAは5-HTの取り込み阻害作用を持たない.したがって,DMIの持つ5-HT取り込み阻害によるシナプス間隙内の5-HTの増加が,NEの作用により減少したβ受容体の減少率を促進あるいは回復率を抑制していると考えらる.すでにp-chlorophenylalanine前処置により,DMIの7日を要するβ受容体の回復が48 h 以内に起こることを報告したが(1,2),本研究の結果はこの報告を支持するものである.現時点では,ラット大脳皮質においてβ受容体の減少がすべての抗うつ薬に共通な減少であるとは結論できなかったが, 以上の結果をまとめると

1）抗うつ薬慢性持続投与後のβ受容体は,シナプス間隙内の5-HTの増加がなくても十分なNEの刺激により減少する.

2）5-HTはNEによるβ受容体の減少率を促進あるいは回復率を抑制している可能性がある.

[引用文献]

1) 朝倉　幹雄,塚本　徹,窪田　博他 (1987) 神経精神薬理,9:331-341.

2) Asakura, M., Tsukamoto, T.and Kubota, H. et al. (1987) European J.Pharmacol.,141:95-100.

3) Bradford,L.D.,Tulp,M.Th.M.and Schipper,J.(1987) :Arch.int.Pharmacodyn.,287:188-202.

4) Byerley,W.F.,McConnell,E.J.,McCabe,R.T. et al.(1987) :Psychopharmacology,94:141-143.

5)Clements-Jewery.S.(1978) :Neuropharmacology, 17:779-781.

6) Racagni,G.,Mocchetti,I.,Calderini,G.et al.(1983) Neuropharmacology,22:415-424.

# 17 Immobilization stressによる脳内adenylate cyclase活性の変化

高嶋修太郎，後藤文男，石原直毅*，田中耕太郎**，五味愼太郎，美原 盤
（慶應義塾大・神内，美原記念・内*，水戸日赤・内** ）

〔要約〕

砂ねずみにimmobilization stress（覚醒状態で仰臥位に四肢を6時間固定）を加えた際の脳内adenylate cyclase活性の変化をforskolin（FK）をリガンドとしたレセプター・オートラジオグラフ法により，コントロールと比較検討した。FKの特異的結合量は，immobilization stressによりcaudate-putamenで44.4%（$p<0.01$），accumbens nucleusで43.9%（$p<0.05$），globus pallidusで48.6%（$p<0.05$）とそれぞれ有意な増加を示した。また，olfactory tubercleで32.6%，hippocampus CA3で16.7%と増加傾向を認めた。一方，cerebral cortex，thalamus，hippocampus CA1，cerebellumでは有意な変化を認めなかった。以上より，immobilization stressによりGs-protein を介する脳内adenylate cyclase活性は線条体および大脳辺縁系で増加するが大脳皮質では明らかな変化はなく，ストレスに対する脳内adenylate cyclase活性の変化に脳局所特異性が認められた。

【目的】様々なストレスが，ドパミン・ノルエピネフリン・セロトニンなどの脳内神経伝達物質の放出や代謝に影響を及ぼすことが知られている。しかし，その機序および各局所における反応の相違に関しては未だ明らかではない。そこで，セカンドメッセンジャー系の一つであるadenylate cyclaseに注目し，immobilization stressを加えた際の酵素活性の変化をオートラジオグラフ法を用いて検討した。

【方法】体重60-80gの砂ねずみ13匹を用いた。7匹（ストレス群）は覚醒状態で絆創膏にて四肢を平板上に固定し，仰臥位とした。6時間後断頭し脳を取り出し，Freon 22（旭ガラス）により直ちに凍結した。6匹（コントロール群）は飼育箱より取り出し，直ちに断頭凍結した。両群の凍結脳は，-20℃のクリオスタット（AO Scientific Instruments）内にて脳の各レベル（frontal cortex，caudate-putamen，globus pallidus，thalamus，substantia nigra，cerebellum）において20μmの厚さの連続脳切片を作製し，ゼラチンスライドに固定した。作製した脳切片標本を用い，22℃のbuffer（50mM Tris-HCl（pH 7.7），100mM NaCl，5mM $MgCl_2$，10mM NaF）100ml中で5分間インキュベートした。次に，上記bufferに5nMの[$^3$H] forskolin（specific activity=40.0Ci/mmol，New England Nuclear）を加えた組成の溶液100ml中において，22℃で10分間インキュベートした。また，非特異的結合量の測定のため，上記のbufferにさらに5μMのforskolin（Sigma Chemiacl Co.）を加えた溶液中で同様にインキュベートした。その後，4℃のbuffer中で2分間の洗浄を2回繰り返し，最後に0℃の精製水で洗浄し，直ちに冷風にて乾燥した。これらの標本は，[$^3$H]標準線源とともにUltrofilmに4週間感光し，オートラジオグラムを作製した。尚，キャリブレーションに用いた[$^3$H]標準線源は[$^3$H] l-leucine（New England Nuclear）とgerbil脳のホモジネートを用いて，予め脳組織等価性を検定した。作製したオートラジオグラムは，CCDカメラ（TI-25A，NEC）により，512×512 pixels，256階調のデジタルイメージとしてパーソナルコンピュータ（PC/AT，IBM）の画像メモリー（PC vision，Imaging Technology）に取り込み，標準線源のoptical densityから得られた較正曲線により，[$^3$H]の脳組織中の濃度を求めた。また，FKの特異的結合量は，それぞれ総結合量より非特異的結合量を差し引いて求め画像表示した。

【成績】両群の各局所におけるFKの特異的結合量の平均値および標準偏差を図1に示した。コントロール群とストレス群のFKの特異的結合量（fmol/mg）は，caudate-putamenで175.8±38.8と253.8±36.2，accumbens nucleusで165.2±51.9と237.7±37.0，globus pallidusで132.5±27.5と196.8±41.0であり，immobilization stressによりcaudate-putamenで44.4%（$p<0.01$），accumbens nucleusで43.9%（$p<0.05$），globus pallidusで48.6%（$p<0.05$）とそれぞ

れ有意な増加を示した。また，olfactory tubercleでは32.6％，hippocampus CA3では16.7％の増加傾向を認めた。一方，cerebral cortex，thalamus，hippocampus CA1，cerebellumでは有意な変化を認めなかった。

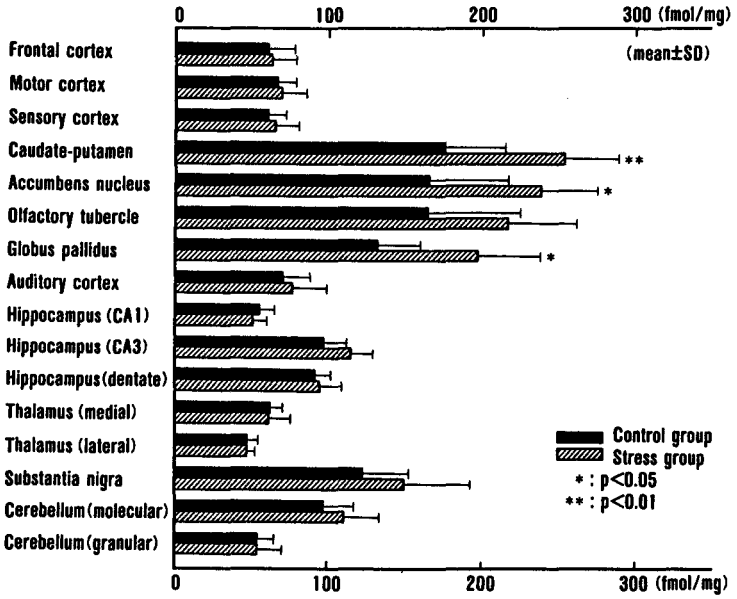



図１：コントロール群およびストレス群の各局所におけるFK特異的結合量

【考察】 Forskolinをリガンドとしたレセプター・オートラジオグラフ法(6，7)は，本実験のような低濃度，すなわち5nM，10分間のインキュベーションでは，FKの高親和性結合部位を示す(5)。この分布が$G_s$-proteinの分布と一致していることより，FKの高親和性結合の特異的結合量は$G_s$-proteinで活性化された脳内adenylate cyclase活性と相関すると考えられている(4)。また，ドパミン($D_1$ receptor)やβ-adrenergic receptor agonistが，$G_s$-proteinを介してadenylate cyclaseを活性化する(2)。今回，砂ねずみにimmobilization stressを加える事により，FKの特異的結合量は，caudate-putamen，accumbens nucleus，globus pallidusで有意な増加を示し，olfactory tubercle，hippocampus CA3では増加傾向を認めた。一方，cerebral cortex，thalamus，hippocampus CA1，cerebellumでは有意な変化を認めなかった。以上より，immobilization stressにより$G_s$-proteinを介する脳内adenylate cyclase活性は線条体および大脳辺縁系で増加するが大脳皮質では明らかな変化はなく，ストレスに対する脳内adenylate cyclase活性の変化に脳局所特異性があると言える。Abercrombieら(1)は，ストレスによりnoradrenergic neuronは大脳で一様な代謝亢進を示し，dopaminergic neuronは大脳皮質，大脳辺縁系では代謝が亢進するが，線条体では変化が少ないとしている。一方，Dunn(3)は，dopaminergic neuronのストレスに対する反応はnoradrenergic neuronと同様に一様な代謝亢進を示すとしている。これらの報告はホモジネートやmicrodialysisを用いて局所の神経伝達物質やその代謝物を定量し解析している。今回のオートラジオグラフ法による検討はregionalityに関する解析により適した方法であり，しかも，ストレスに対してセカンドメッセンジャー系の一つであるadenylate cyclaseの反応が大脳局所で様々であることは興味深い知見である。

【文献】(1) Abercrombie, E. D., Keefe, K. A., DiFrischia, D. S. and Zigmond, M. J. (1989) J. Neurochem. 52, 1655-1658. (2) Daly, J.W. (1984) Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res. 17, 81-89. (3) Dunn, A. J. (1988) Ann. NY Acad. Sci. 537, 188-205. (4) Gehlert, D. R. (1986) J. Pharmacol. Exp. Ther. 239, 952-958. (5) Seamon, K. B., Vaillancourt, R., Edwards, M. and Daly, J. W. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81, 5081-5085. (6) Tanaka, K., Gotoh, F., Ishihara, N., Gomi, S., Takashima, S. and Mihara, B. (1988) Brain Res. Bull. 21, 693-700. (7) 高嶋修太郎，後藤文男，石原直毅，田中耕太郎，五味愼太郎，美原 盤(1989) 自律神経 投稿中.

# 18 ＰＣ１２細胞におけるＮＧＦおよびグルタミン酸受容体応答とc-fos誘導

黒住公一、村山俊彦、野村靖幸
（北大・薬・薬効）

〔要約〕

ＰＣ１２細胞においてグルタミン酸受容体応答と、Ｃキナーゼ活性化、c-fos誘導との関連性を解明するために神経化学的検討を行なった。その結果、１）ＮＧＦはホスファチジルイノシトール（ＰＩ）の代謝回転を促進した、２）ＮＧＦおよびホルボールエステル（ＰＭＡ）刺激はprotooncogene c-fos mＲＮＡレベルを増加した、３）ＮＧＦによるc-fos mＲＮＡの誘導はＨ－７（プロテインキナーゼＣ阻害薬）により阻害された、４）グルタミン酸もＰＩの代謝回転を促進した、５）グルタミン酸受容体アゴニストであるＮＭＤＡ（Ｎ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸）刺激によっても濃度依存的にＩＰ、$IP_2$、$IP_3$の生成が促進された。これらの結果よりＰＣ１２細胞においてＮＧＦのc-fos誘導効果はＣキナーゼ活性化を介して行なわれること、またＮＭＤＡ刺激によりc-fosの誘導が起こる可能性が示唆される。

〔緒言〕

副腎髄質褐色細胞腫よりクローン化されたＰＣ１２細胞は、副腎髄質クロム親和性細胞および交感神経細胞類似の性質を有しており、神経分化のモデル系として用いられている。すなわちＰＣ１２細胞にＮＧＦやＰＭＡを添加すると増殖が停止し球状細胞から神経突起を持つ交感神経様細胞へと分化する。このとき刺激後１０～３０分という短時間にc-fos遺伝子の誘導が起こることが観察され、c-fos遺伝子産物が遺伝子の転写を制御することから、c-fos遺伝子は分化などのシグナル伝達系に重要な役割を果たすと考えられている。

一方、グルタミン酸は中枢神経系において神経伝達物質として作用することが知られている。また中枢神経系以外では神経性下垂体、副腎髄質、松果体などにグルタミン酸の特異的結合活性が検出されているが、これらの組織でグルタミン酸が神経伝達物質として機能しているか否か、さらにこの結合部位が受容体としての機能を有するかどうかに関し詳細な検討がされていない。今回、ＰＣ１２細胞において、グルタミン酸はＰＩレスポンスを引き起こすことを見いだした。これよりＰＣ１２細胞にはグルタミン酸受容体が存在し、この受容体刺激によるＰＩレスポンスとそれに続くＣキナーゼの活性化およびc-fos誘導の系が存在することが予想される。

〔方法〕

ＰＣ１２細胞の培養

実験にはＰＣ１２Ｇ細胞を用いた。培養は１０％馬血清、５％牛胎仔血清を含むダルベッコ改変培地を用い、コラーゲンコートしたφ１００㎜ディシュにおいて３７℃、１０％$CO_2$の条件で行なった。confluentになったＰＣ１２細胞をさらに血清を含まない培地中で２４時間培養し実験に用いた。

ノーザンブロット分析

ＮＧＦなどの刺激物質を加え３７℃で１０分または３０分間インキュベーションした。またＨ－７による阻害実験は、各種濃度のＨ－７存在下で１０分間プレインキュベーションを行なった後同様にしてＮＧＦを加え、３７℃で３０分間インキュベーションした後ＲＮＡ抽出を行なった。ＲＮＡ抽出はグアニジウム／セシウムクロライド法[1]に従い、これより調製したtotalＲＮＡをホルムアルデヒドを含む１％アガロースゲルで電気泳動した。ニトロセルロース膜にトランスファー後、$^{32}P$でラベルした

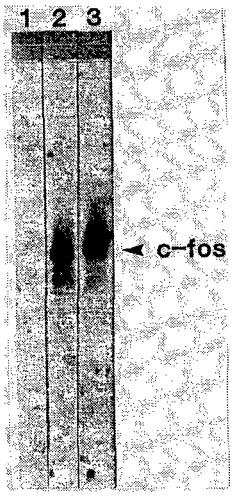



図１．ＮＧＦによるc-fos誘導（ノーザンブロット分析）
レーン１　コントロール
レーン２　100 ng/ml NGF刺激１０分後
レーン３　100 ng/ml NGF刺激３０分後

v-fos PstI-SacI断片（５６５ bp）をプローブとしハイブリダイゼーションを行なった。

イノシトールリン脂質代謝回転の測定

［$^3$H］myo inositol でラベルしたＰＣ１２細胞を０.１％ＢＳＡと１０ｍＭ ＬｉＣｌを含んだ反応液（１３７ｍＭ ＮａＣｌ，５ｍＭ ＫＣｌ，５.６ｍＭ ｇｌｕｃｏｓｅ，１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ，１ｍＭ $MgCl_2$，１ｍＭ $CaCl_2$（ｐＨ７.４））に浮遊させた。各種濃度のＮＭＤＡを含んだ同じ反応液にこの細胞浮遊液を加え３７℃で１分間インキュベーションした。最終濃度１Ｎの塩酸を加え反応を止め、２０００×ｇ、５分間遠沈後の上清をDowexAG1-X8樹脂にてＩＰ、$IP_2$、$IP_3$分画に分離し[2]、その放射活性を測定した。

［結果と考察］

１００ｎｇ／ｍｌ ＮＧＦ刺激したＰＣ１２細胞においてc-fos誘導のtime-courseを見たところ刺激後３０分で最大となった（図１）。また０.１μＭ ＰＭＡは刺激後３０分でc-fosの誘導が最大となった（データ省略）。さらに各濃度のＨ－７存在下で１００ｎｇ／ｍｌＮＧＦ刺激３０分後のc-fos誘導を見たところＨ－７の濃度に依存してc-fos誘導が抑制された（図２）。またＮＧＦ刺激によりＰＩレスポンスが起こることが既に報告されているが[3]、３７℃で１分間ＮＧＦとインキュベーションした後の$IP_2$、$IP_3$生成量はＮＧＦの濃度に依存して増加した（データ省略）。以上の結果はＰＣ１２細胞においてＰＩレスポンスにひき続いて生ずるＣキナーゼの活性化がc-fosの誘導をひきおこすという経路が存在することを示唆する。

一方今回新たにグルタミン酸刺激により$IP_3$生成が濃度依存的に増加することを見いだした（データ省略）。グルタミン酸受容体のサブタイプの一つであるＮＭＤＡ受容体刺激（３７℃、１分間インキュベーション）もまた濃度依存的にＩＰ、$IP_2$、$IP_3$生成を増加させた（図３）。これよりＰＣ１２細胞にはグルタミン酸受容体（少なくともＮＭＤＡサブタイプ）が存在し、この受容体刺激によりＰＩレスポンスが起こりこれによりc-fosの誘導が起こる可能性が示唆される。

現在このグルタミン酸受容体の各サブタイプ刺激によるＰＩレスポンスおよびc-fosの誘導を検討中である。

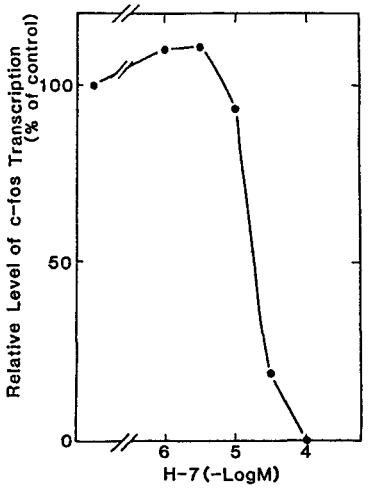



図２．ＮＧＦのc-fos誘導効果に対するＨ－７の影響

図１と同様にしてノーザンブロット分析を行いデンシトメーターでシグナル強度を測定した。コントロールを１００として表した。

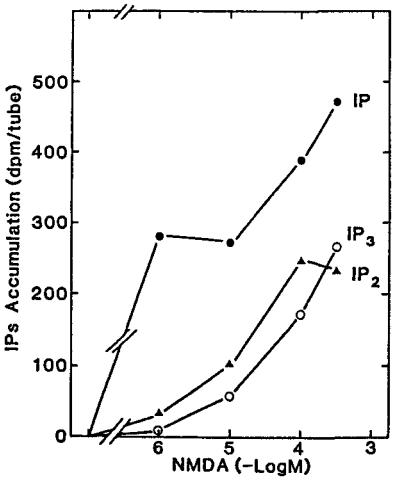



図３．ＮＭＤＡ刺激による ＩＰ，$IP_2$，$IP_3$ 生成の濃度反応曲線

［謝辞］

c-fos のプローブ作製法とノーザンブロット分析法についてご教示頂いた小森雅之助手、鎌滝哲也教授（北大・薬・分析）に感謝いたします。

［文献］

1) Raymond, V. and Shore, G. C. (1979) J. Biol. Chem. 254, 9335-9338
2) Berridge, M. J.,Downes, P. C. and Hanley, M. R. (1982) Biochem. J. 206, 587-595
3) Margarita, L. C. and Gordon, G. (1987) J. Neurochem. 48, 1466-1472

# 19 ヒスタミン$H_2$受容体を介する情報伝達系におけるリン脂質N－メチル化反応の関与－脳と心房の相同性について－

小澤光一郎、瀬川富朗
（広島大・医・薬効解析）

〔要約〕

モルモット右心房における、ヒスタミン$H_2$受容体を介するアデニル酸シクラーゼ（AC)活性化および陽性変時作用の情報伝達機構の検討を行い、脳における情報伝達系との相同性について考察した。ヒスタミンは、モルモット右心房スライスにおいて、$H_2$ 受容体を介してホスファチジルエタノールアミン・メチルトランスフェラーゼ（PMTase）を活性化させ、リン脂質N－メチル化反応を急速に促進させた。一方、ヒスタミンはモルモット右心房において、$H_2$受容体を介して細胞内 cyclic AMP濃度の上昇、ならびに陽性の変時作用を引き起こした。ヒスタミンによる AC 活性化ならびに陽性変時作用は、PMTaseの阻害剤である homocysteine により、用量依存的に抑制された。以上の結果より、モルモット右心房において、ヒスタミンが$H_2$受容体を介して膜リン脂質のN-メチル化反応を促進させ、このN－メチル化反応が$H_2$ 受容体刺激による AC 活性化ならびに陽性変時作用において、重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、この右心房における情報伝達機構に、脳における機構との相同性が認められた。

われわれはラット脳シナプス膜を用いた解析の結果、膜リン脂質のN－メチル化反応が$H_2$ 受容体刺激によるAC活性化に関与していることを明らかにし(1, 2)、本学会で発表した。今回、モルモット右心房$H_2$ 受容体においても、ラット脳と同様の情報伝達機構が存在するか否かを明らかにするため、 $H_2$ 受容体刺激によるリン脂質N－メチル化反応、 AC 活性化、ならびに陽性変時作用の比較検討を行い、さらに脳における情報伝達系との相同性について考察を加えた。

【実験方法】

<u>リン脂質N－メチル化反応の測定</u>　リン脂質N－メチル化反応の測定は、雄性 Hartley系モルモット右心房スライス、あるいは雄性 Wistar 系ラット大脳皮質シナプス膜を用い、S-adenosyl-[methyl-$^3$H]-methionineをメチル基供与体として、Ozawa ら (1, 2) の方法に従い行った。

<u>AC 活性の測定</u>　モルモット右心房スライスにおける AC 活性の測定は、 cyclic AMP assay system (Amersharm International plc.)を用い行い、ラット脳シナプス膜における測定は、OzawaとSegawa(2)の方法に従い行った。

【結果】

ヒスタミンおよび$H_2$－アゴニストである impromidineと dimaprit は、モルモット右心房においてPMTaseを活性化させ、リン脂質N－メチル化反応を用量依存的に促進させたが、$H_1$-アゴニストである2-pyridylethylamineは促進させなかった(Fig. 1A)。ヒスタミンおよび$H_2$-アゴニストは、モルモット右

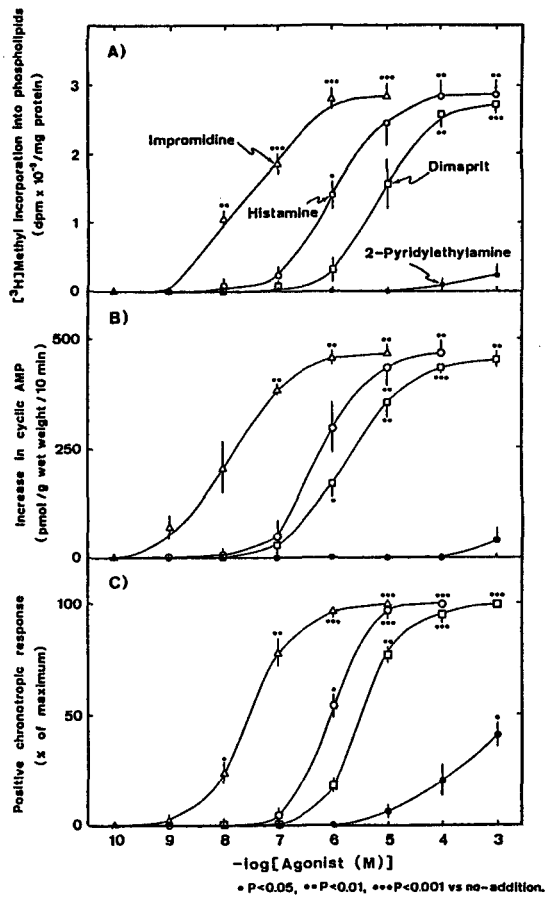



Fig. 1 Effect of histamine and histaminergic agonists on phospholipid methylation (A), cyclic AMP accumulation (B), and positive chronotropic response (C) in guinea-pig atrium.

心房において、用量依存的に AC を活性化させ細胞内 cyclic AMP 濃度の上昇 (Fig. 1B)、ならびに陽性変時作用 (Fig. 1C)を引き起こしたが、$H_1$-アゴニストは引き起こさなかった (Fig. 1B, 1C)。一方、ヒスタミンによるこれらの作用は、いずれも $H_2$-アンタゴニストにより用量依存的に抑制されたが、 $H_1$ーアンタゴニストによっては抑制されなかった (図省略)。モルモット右心房スライスを PMTaseの阻害剤であるhomocysteineで前処置した結果、ヒスタミンによるリン脂質N－メチル化反応 (Fig. 2A)、ならびに AC 活性化作用 (Fig. 2B)は、用量依存的に抑制された。同様に、ラット脳シナプス膜においても、ヒスタミンによるリン脂質N-メチル化反応(Fig. 2C)、ならびに AC 活性化作用 (Fig. 2D)は、PMTase阻害剤であるS-adenosylhomocysteineの共存により抑制された。一方、摘出モルモット右心房をhomocysteineで前処置した結果、ヒスタミンおよび impromidineによる陽性変時作用は著しく抑制された (Fig. 3)。

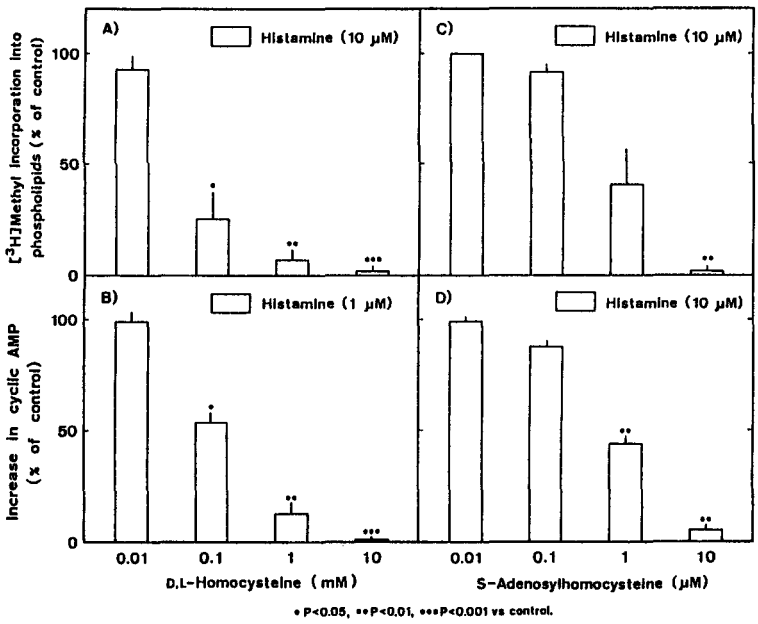



Fig. 2 Effect of homocysteine on histamine-induced phospholipid methylation (A) and cyclic cAMP accumulation (B) in slices of guinea-pig atrium (A, B) and rat brain (C, D).

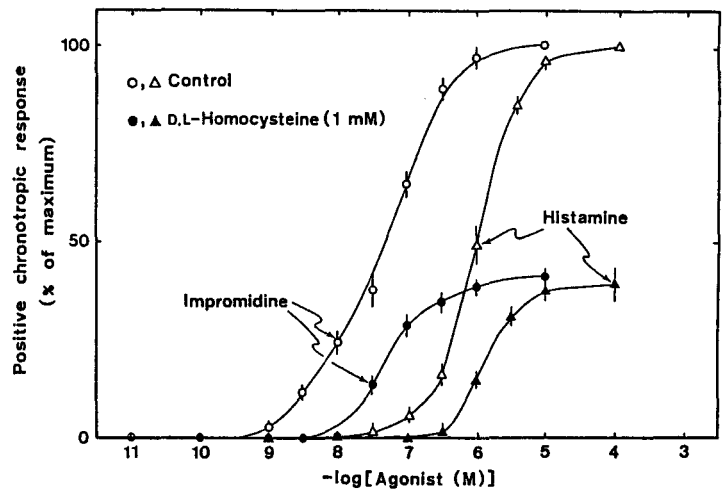



Fig. 3 Effect of homocysteine on histamine- and impromidine-induced positive chronotropic response in isolated guinea-pig atrium.

【考察】

モルモット右心房における、リン脂質N－メチル化反応、AC 活性化、および陽性変時作用に対するアゴニストおよびアンタゴニストの作用の検討の結果、これら３者の反応はすべて$H_2$ 受容体を介することが示唆された。 さらに、Fig. 1 に示すように、これら反応に対するヒスタミンおよび $H_2$ーアゴニストの用量－反応曲線が、すべて平行関係にあったことから、これら３者の間における相互関係が推定された。また、PMTase阻害剤により、リン脂質N－メチル化反応、AC活性化作用、および陽性変時作用のすべてが抑制されたことは、リン脂質N－メチル化反応が、$H_2$受容体刺激による AC活性化と陽性変時作用の一連の反応において、重要な役割を果していることを示唆している。これらの結果は、われわれがすでに脳において明らかにしているシナプス膜での結果 (1, 2)とよく一致しており、ラット脳とモルモット右心房において$H_2$受容体を介する情報伝達に相同性が認められ、リン脂質N－メチル化反応が、$H_2$ 受容体を介した情報伝達系において、普遍的な役割を果たしている可能性が推定された。

【参考文献】

(1) Ozawa K., Nomura Y., Segawa T. (1987) J. Neurochem. 48, 1392-1398.

(2) Ozawa K. and Segawa T. (1988) J. Neurochem. 50, 1551-1558.

# 20 D1, D2 ドーパミンレセプターを介したラット脳線条体内アセチルコリン放出量の調節

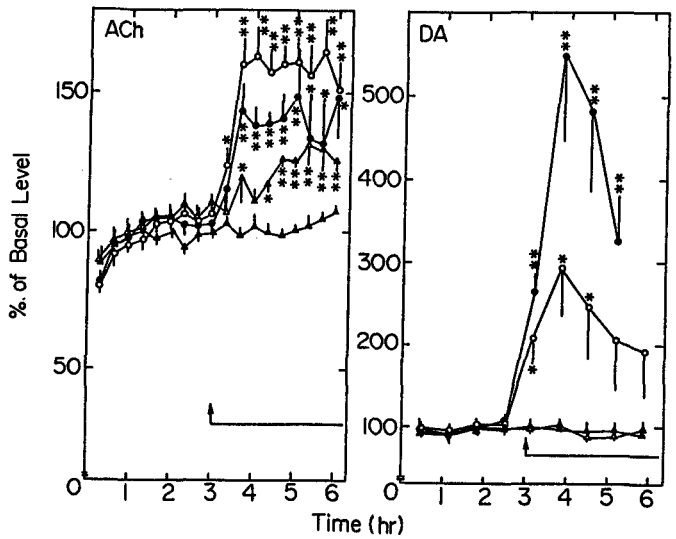
安島 綾子, 加藤 武*, 山口 時男**
(東工大・生命化学, *横浜市大・分子認識, **山之内・中研)

〔要約〕
ドーパミン性神経のアセチルコリン放出に及ぼす作用を解明する目的で、Brain Dialysis 法により、D1、D2ドーパミン性リガンドを透析膜を介して投与し、ラット脳線条体内アセチルコリン放出量を測定した。D1アゴニストと低濃度のアンタゴニスト投与によってアセチルコリン放出は増加し、両者を同時に投与すると増加が抑制された。一方D2アゴニストとアンタゴニストをそれぞれ投与してもアセチルコリンの放出は余り変化しなかった。更に、D1アゴニストによるアセチルコリン放出の増加はD2アゴニストによって抑制された。以上の結果からラット脳線条体内コリン作動性神経はD1レセプターによって直接的に、また、D2レセプターによって間接的に調節されていることを示唆している。また、それらを裏付けるべくドーパミン放出についても同時に測定した。

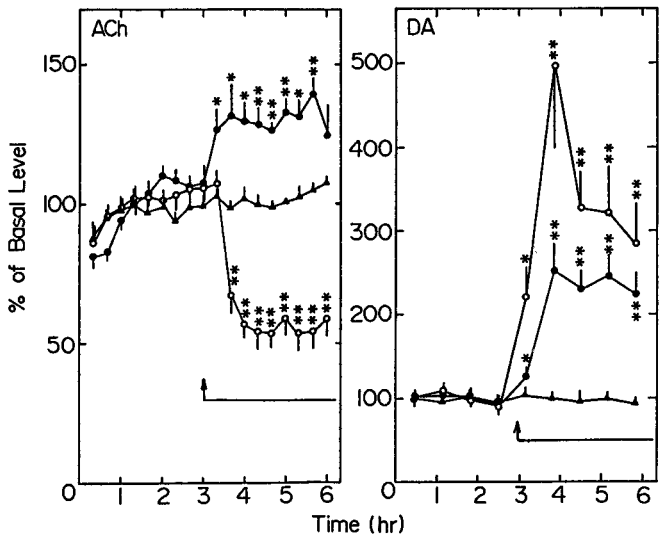
Kebabian らは線条体内にD1、D2ドーパミンレセプターが存在することを明らかにしている[1]。また黒質－線条体路のドーパミン性神経の終末がコリン作動性神経に投射していると考えられている[2]。ところが、アセチルコリン放出に及ぼすD1、D2 ドーパミンレセプターの寄与は異なった実験系における様々なデータがあり一義的には決まっていない[3-5]。この点を明らかにする目的で、今回神経回路網を切断する事なく、かつ局部にリガンドを投与することで他の部位からの投射の影響を最小限に抑えられる Brain Dialysis 法を用いて本実験を行った。

(方法)

ウィスター系雄性ラット(250-300g)を用い、ネンブタール麻酔下で透析膜を有するU字型カニューレを脳線条体に埋め込み、術後1日目にリンゲル液の灌流を開始した。アセチルコリン測定のために灌流させるリンゲル液に分解酵素の阻害剤であるエゼリンを $10^{-5}$ M 程度溶解させた。灌流速度は、2.6 ul/min で 20 min 毎に1 fraction とし、アセチルコリン測定用とした。また、残ったサンプルを2本ずつまとめてドーパミンとドーパミン代謝物測定に用いた。アセチルコリン、ドーパミンはそれぞれ 1 mM Ethylenediamine tetraacetate (EDTA)、0.6 mM Tetramethylammonium chloride、0.6 mM Decanesulfonate を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.5)、0.1 mM EDTA、8 % アセトニトリル、0.12 mM Octanesulfonate を含む 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.




(図1)
D1アゴニスト (SKF38393) のアセチルコリン、ドーパミン放出に及ぼす効果
各点は 5-8 匹のラットの平均と SEM で示してある。矢印と横棒で投薬の時間を示している。投薬は、SKF38393 を灌流液に溶解して行った。投薬前のサンプルを平均して 100 % とした。SKF38393 投与群は、(－●－) $10^{-4}$ M, (－○－) 3 x $10^{-5}$ M (－△－) $10^{-6}$ M で, 対象群は (－▲－) で示した。
* ; $p < 0.05$,
** ; $p < 0.005$




(図2)
D1 アンタゴニスト(SCH23390)のアセチルコリン、ドーパミン放出に及ぼす効果
図1と同様に 5-8 匹のラットを用いて行った。 SCH23390 も灌流液に溶解して投薬を行った。
SCH23390 投薬群は(—○—) $10^{-3}$ M, (—●—) $10^{-4}$ M で、対象群は (—▲—) で示した。
* ; $p < 0.05$,
** ; $p < 0.005$

25) を用いて、HPLC-ECD で分析した[6-8]。薬物の投与はすべて灌流液に溶解し、透析膜を介して直接線条体に投与した。

(結果)

D1アゴニスト(SKF38393)を $10^{-6}$ M - $10^{-4}$ M 加えたところ、アセチルコリン放出は濃度依存的に増加した(図1)。D1アンタゴニスト(SCH23390)を $10^{-6}$ M - $10^{-4}$ M 加えるとやはりアセチルコリン放出は濃度依存的に増加したが、$10^{-3}$ M の SCH23390 では、アセチルコリン放出は有意に減少した(図2)。D1アゴニストとD1アンタゴニストを同時に投与するとD1アゴニストによるアセチルコリンの増加がみられなかったことから、D1アンタゴニストがD1アゴニストの効果を抑制できたことが解る。一方D2アゴニスト(LY171555)とD2アンタゴニスト(sulpiride)をそれぞれ $10^{-4}$ M 加えたところD2アンタゴニストでアセチルコリン放出はほとんど変化しなかった。同時に測定したドーパミンのデータからD1アゴニスト、アンタゴニストではともに飛躍的な増加を示し(図1,2)、D2アンタゴニストでは少しの増加を見たが、D2アゴニストでほぼ半分にまで減少した。またD1アゴニストで増加したアセチルコリン放出はD2アゴニストで抑制され、ドーパミン放出は促進された。

(考察)

今回の実験より、コリン作動性神経がドーパミン性神経により調節を受けていることが解り、主にD1レセプターを介して作用が伝わっている事が示唆された。またD1アゴニストの作用がD2アゴニストで抑制されたことから、D1とD2レセプターは相互に影響を及ぼし合っている可能性がある。更にD1アゴニストとアンタゴニストで同様の効果がでたことはD1レセプターがアセチルコリン細胞体上だけでなく、コリン作動性神経に促進(抑制)的に入力している他の神経のシナプス前膜側にも存在しドーパミンによって抑制(促進)を受けている可能性が考えられる。以上より線条体においてコリン作動性神経は、黒質－線条体路のドーパミン作動性神経のみならず他の様々な部位からの入力を統合、制御している可能性があり、今後更に詳細な検討が必要であると考えられる。

(参考文献)

1 Kebabian J. W. and Calne D. B., (1979) Nature, 227, 93-96
2 Hattori T., et al., (1986) Brain Res., 102, 164-173
3 Fage D. and Scatton B., (1986) Eur. J. Pharmacol., 129, 359-362
4 Gorell J. M. et al., (1986) Life Sci., 38, 2247-2254
5 Gorell J. M. and Czarnecki B., (1986) Life Sci., 38, 2239-2246
6 Ajima A. and Kato T., (1987) Neurosci. Lett., 81, 129-132
7 Ajima A. and Kato T., (1988) Biogenic Amines, 5, 461-464
8 Ajima A. and Kato T., J. Chromatogr., in press

# 21 P400／イノシトール1、4、5ー三リン酸受容体の精製と性質

前田信明、新延道夫、御子柴克彦 （大阪大・蛋白研）

〔要約〕
P400蛋白質は小脳プルキンエ細胞に豊富に存在する糖蛋白質である。マウス小脳よりイノシトール1,4,5-三リン酸（IP3）受容体を精製し、これがP400蛋白質と同一である可能性を検討すると共に、その性質について解析した。IP3受容体はマウス小脳ミクロソーム画分のTriton X-100抽出液を、DE52、heparin-agarose、Lentil Lectin Sepharose、hydroxyapatiteの各クロマトグラフィーで分画することにより、単一にまで精製した。精製蛋白質は、分子量25万で、IP3に対するKd及びBmaxは それぞれ、83nM、2.1pmol/ug proteinであった。クロマトグラフィーの各画分を抗P400モノクローン抗体を用いたimmunoblot法で分析したところ、P400蛋白質の溶出位置とIP3結合活性のそれとは完全に一致することが明かとなった。また、精製IP3受容体は3種類の抗P400モノクローン抗体と反応した。このことは、両者が同一の蛋白質であることを示している。精製IP3受容体をBS3で架橋することによって、nativeな受容体は、分子量約120万の四量体として存在することが明かとなった。

P400蛋白質は、小脳プルキンエ細胞に豊富に存在する分子量25万の糖蛋白質である(1)。我々は、当蛋白質が（1）プルキンエ細胞に例外的に多量に発現しているが、他の組織にも少量ながら存在するかなり普遍的な成分であること。（2）プルキンエ細胞の小胞体、細胞膜、シナプス後肥厚部に局在性を示すこと。（3）プルキンエ細胞の樹状突起及びシナプス形成期に一致して当蛋白質の発現は増大するが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当蛋白質の発現増大が見られないこと。（4）P400蛋白質は、Aキナーゼの良い基質となり、培養プルキンエ細胞においても当蛋白質のリン酸化が観察されること等を明かにしてきた(2-4)。一方、Supattaponeら(5)は、IP3受容体が小脳に多量に存在し、その分子量は26万であると報告している。今回、我々はマウス小脳よりIP3受容体を精製し、P400蛋白質との同一性及びその性質について検討したので報告する。

〔方法〕 抗P400モノクローン抗体（4C11,18A10,10A6）は、既報の方法によって作製した。IP3受容体は、マウス小脳ミクロソーム画分を1%Triton X-100 で可溶化し、これをDE52、heparin-agarose、Lentil Lectin Sepharose、hydroxyapatite の各クロマトグラフィーで分画することにより精製した。BS3による架橋及びagarose PAGEは、それぞれ Staros(6),及びKiehm(7)の方法によりおこなった。IP3の結合assayは、PEG沈澱法によって行った。

〔結果〕 図1は、マウス小脳 Triton X-100抽出物のクロマトグラフィーの結果を示す。Lentil Lectin Sepharose においてはIP3結合活性は非吸着画分にも溶出されているが、これは糖鎖のheterogeneityの結果であると考えられる。その他のクロマトグラフィでは、IP3結合活性は、単一ピークとして回収された。IP3受容体は最終的に分子量25万の単一蛋白質として精製された（図2、B）。精製IP3受容体をScatchard解析した結果、Kd及びBmaxは、それぞれ83nM、2.1pmol/ug proteinであった（図2、A）。クロマトグラフィーの各画分を抗P400モノクローン抗体、4C11でimmunoblot解析したところ、P400蛋白質とIP3結合活性の溶出位置は完全に一致した（図1）。さらに、精製IP3受容体はその他の二種類の抗P400モノクローン抗体とも反応した。このことは、P400蛋白質がIP3受容体であることを示している。次に精製IP3受容体をbis(sulfosuccinimidyl)suberate（BS3）で架橋し、agarose PAGE で解析したところ、二、三、四量体の産生が認められた（図3）。架橋剤濃度を上げても五量体以上の産生は認められない。このことはnativeな受容体は四量体として存在することを示している。 〔考察〕 IP3が細胞内貯蔵部位（小胞体）からCaイオンを放出させることは多くの細胞で確認されている。またTリンパ球においてはIP3が細胞外からのCaイオン流入にも関与している

ことが示唆されている。P400/ＩP3受容体はプルキンエ細胞の小胞体及び細胞膜に局在しておりプルキンエ細胞におけるＣａイオンの移動に直接、関与していることが考えられる。現在、我々は精製P400/ＩP3受容体を脂質平面膜に組み込むことによって、イオンチャネル活性を測定しているところである。また、最近、プルキンエ細胞におけるnon-NMDA型のグルタミン酸受容体がイノシトールリン脂質代謝を上昇させることにより作用する可能性が示唆されており(8)、P400/ＩP3受容体とプルキンエ細胞の機能との関連に興味が持たれる。

〔文献〕

(1) Mikoshiba et al.(1979) Dev.Neurosci.2,254.
(2) Maeda et al.(1988) J.Neurochem.51,1724.
(3) Maeda et al.(1989) Dev.Biol.133,67.
(4) Yamamoto et al.(1989) J.Neurochem.,in press.
(5) Supattapone et al.(1988) J.Biol.Chem.263,1530.
(6) Staros et al.(1982) Biochemistry 21,3950.
(7) Kiehm et al.(1977) J.Biol.Chem.252,8524.
(8) Joels et al.(1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,3404.

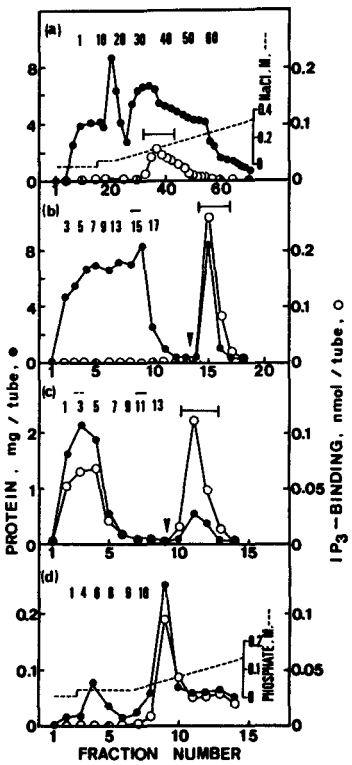



図１．ＩP3受容体の精製
(a)DE52,(b)heparin agarose,(c)Lentil Lectin Sepharose, hydroxyapatite. 挿入写真は各画分のimmunoblot 解析の結果を示す。

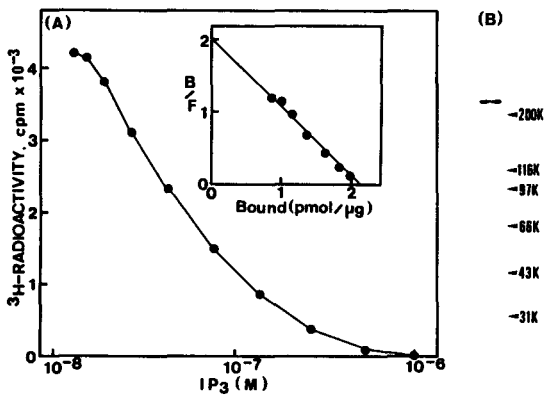



図２．（A）精製ＩP3受容体のScatchard解析
（B）精製ＩP3受容体のSDS-PAGE

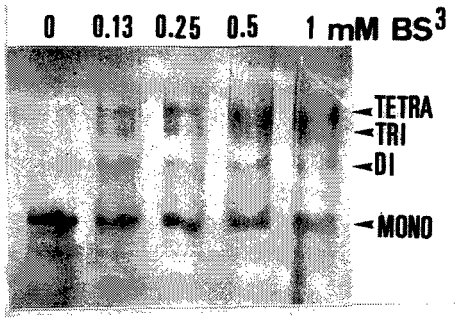



図３．ＩP3受容体の架橋実験
精製ＩP3受容体をＢＳ3によって架橋し、agarose-PAGEによって解析した。

# 22 神経終末形質膜に存在するIP3感受性カルシウムチャンネルについて

植田弘師、田村滋規、佐藤公道
（京都大・薬・薬理）

〔要約〕
神経終末のシナプス形質膜をreseal したinside out小胞において、IP3はKm値1.5μMで$^{45}Ca^{2+}$の遊離を誘発した。この作用はヘパリンで著明に拮抗されたことや、イノシトールおよび他のイノシトールリン酸はいずれも弱い作用しか示さなかった。また、各細胞下分画のうち、シナプス形成膜におけるIP3誘発の$^{45}Ca^{2+}$遊離作用はマイクロゾーム由来の膜などより著明であった。以上の結果より、神経終末形質膜にはIP3に感受性のレセプターおよびそれと連関するカルシウムチャンネルが存在することが示唆された。

我々は、ニューロペプチド、キョートルフィンのレセプター以後の分子機構の研究においてキョートルフィンレセプターがGTP結合蛋白質(Gi)を介し、ホスホリパーゼCを活性化することを明らかにしてきた(1)。一方、$^{45}Ca^{2+}$を負荷したシナプス膜標品の灌流実験において、キョートルフィンはCa動員作用を示し(2)、このメカニズムにおいても上述の情報伝達機構が関与していることを再構成実験により明らかにしてきた(3)。本研究においては、このシナプス膜灌流実験において、キョートルフィン刺激により産生されると推定されるIP3のそれ自身のCa動員機構を詳細に検討し、その結果、神経終末形質膜に新たにIP3感受性のカルシウムチャンネルが存在する可能性があることを見いだした。

## 実験方法

### シナプス膜および各細胞下分画よりの膜標品の調製

雄性Sprague-Dawley系ラット(200-250g)より、全脳を摘出し、0.32M蔗糖により、ホモジナイズし、Whittakerら(4)の方法にもとずき、細胞下分画を行い、それぞれを0.1μM CaCl2と1mM MgCl2を含む5mMのTris-HCl buffer, pH7.5 (TMC buffer)中でホモジナイズすることにより"lyzed" 膜標品を作製した。

### 膜標品における$^{45}Ca^{2+}$取り込みと灌流における$^{45}Ca^{2+}$遊離実験

$^{45}Ca^{2+}$の取り込みは各膜標品を0.5μCi (0.1μM)の$^{45}Ca^{2+}$を含むTMC buffer中で37℃、0-30分間インキュベートすることにより行った。一部の実験においては，この後、ガラス繊維ろ紙(whatman GF/C)によりろ過し、取り込み量の放射活性を測定した。灌流実験においては、30分間$^{45}Ca^{2+}$とインキュベートした標品GF/Cを敷いたチャンバーに入れ、TMC bufferにて1ml/minの流速で灌流した。ろ液は1分間ごと分画し放射活性を測定した。30分間の灌流終了後、ろ紙上の放射活性をも測定し、残存量(Rr)とした。IP3などの薬物は灌流開始後の25-27分の間に適用した。$^{45}Ca^{2+}$遊離量は、以下の式にしたがって、fractional release として表した。Fractional release (%)＝100 x Rx／Rt ここで、Rxは灌流後x分での分画の放射活性、Rtはx分以後30分までの活性とRrとを加算したものを示す。この処理により、各標品あるいは実験間の基礎遊離量の偏差は少なくなった。薬物誘発性の$^{45}Ca^{2+}$遊離量はR25-27 - 1/2(R22-24 + R28-30)で表した。

## 実験成績

### Inside outおよび outside outのシナプス膜小胞の作製

Lyzedシナプトゾーム（300μg 蛋白）を$^{45}Ca^{2+}$と37℃でインキュベートしたとき、図1（●）に示したように、初期の一分以内の急速な$^{45}Ca^{2+}$の取り込みが見られ、その後ゆっくりと20分までほぼ直線的に取り込みの増加が認められた。10分間インキュベートした後、5μMのA-23187を加えると（○）、50%程度の取り込みの減少が認められた。この減少、すなわちA-23187による$^{45}Ca^{2+}$の遊離作用はその濃度を20μMに増加させても変化が認められなかった。また、形質膜に局在する、コレステロールからミセルを形成し膜を透過性にすることで知られる、サポニンをこのlyzedシナプトゾームに作用させておいた時、A-23187感受性の$^{45}Ca^{2+}$遊離は消失した。一方、lyzedシナプトゾームを$^{45}Ca^{2+}$非存在下でインキュベート(37℃、30分)した後、改めて$^{45}Ca^{2+}$とインキュベートした時、その最大取り込み量は前述のA-23187存在下での値にとどまった（▲）。しかも、この標品で A-23187を加えても、殆ど変化は認められなかった（△）。一方、この標品を1 mM ATP 存在下でインキュベートした時、有意な$^{45}Ca^{2+}$取り込み増加が認められたが、intactのシナプトゾームでの同様の実験では、ATPによる取り込み増加は認められなかった。これらの知見は、lyzeした膜標品を$^{45}Ca^{2+}$とインキュベートする際、小胞が形成され、それに伴って$^{45}Ca^{2+}$が取り込まれることを示唆している。さらに、一旦小胞が形成された後、$^{45}Ca^{2+}$とインキュベートしても、もはや小胞内への取り込みは認められず、ここで得られたみかけの$^{45}Ca^{2+}$取り込み量は、むしろ小胞表面への結合であると考えられる。ATPによる新たな$^{45}Ca^{2+}$取り込みは形質膜の内側に存在するCa-ATPaseによるものであることを考慮すると、本実験で得られたresealed小胞はinside outおよびoutside out の両方を含んでいることが明らかである。インキュベート後のresealed小胞の電子顕微鏡写真（ネガティブ染色）からこの標品はunilamelarな小胞であることが明らかとなっている（図2）。

### IP3によるシナプス膜resealed小胞からの$^{45}Ca^{2+}$遊離

灌流液にIP3（イノシトール-1,4,5-P3）を加えた時、速やかな$^{45}Ca^{2+}$の遊離が引き起こされ、IP3を除いた時、同様に速やかに消失した（図3）。Kineticsをとった時、Km値は1.5μM、Vmaxは4.16%であった。このVmax値は、昨年度報告したGppNHp存在下でのキョートルフィンによる最大値(9%)に比べ明らかに小さな値であった。しかし、イノシトール、イ

ノシトール-4-P、イノシトール-1,4-P2は有意な$^{45}Ca^{2+}$遊離は示さなかった。それに対し、イノシトール-1,3,4,5-P4は最大値でIP3の50%程度の遊離作用を示した。IP3の効果はIP3拮抗薬として知られるヘパリンによって拮抗され、そのIC50は3μg/mlであった。また、5μM A-23187を2分間灌流液に添加した時、顕著な$^{45}Ca^{2+}$遊離が観察されたが、その後11分に添加したIP3の作用は認められなかった。一方、あらかじめ形成されたresealed小胞を$^{45}Ca^{2+}$とインキュベートした標品を灌流した時、IP3による$^{45}Ca^{2+}$遊離は認められなかった。従って、自然拡散により取り込まれ（表面へ結合された）た標品では、IP3は無効であることが明らかになった。さらに、サポニン処理した標品に$^{45}Ca^{2+}$を取り込ませた標品においても、IP3は無効であった。

**各細胞下画分由来のresealed小胞からの$^{45}Ca^{2+}$遊離**

各細胞下画分由来のresealed小胞での5μM IP3 誘発性の$^{45}Ca^{2+}$遊離(fractional release)は、小胞体(ER)を含むマイクロゾーム膜(1.94 ± 0.11%)；蔗糖密度勾配遠心法により得られるミエリン膜(1.19 ± 0.15%)、シナプトゾーム膜（3.62 ± 0.30%)およびミトコンドリア膜（1.49 ± 0.26%)；シナプトゾームをlysisし、さらに再度蔗糖密度勾配遠心して得られるシナプス小胞膜（1.79 ± 0.37%)、精製されたシナプス膜（4.48 ± 0.41%)およびシナプトゾーム内に含まれていたミトコンドリアの膜（1.34 ± 0.30%)においてそれぞれ観察された。

図1

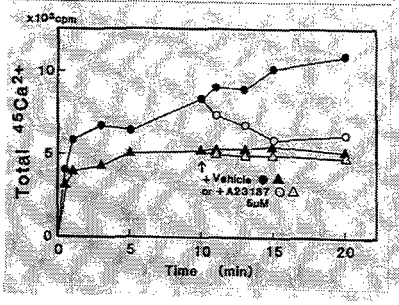



図2

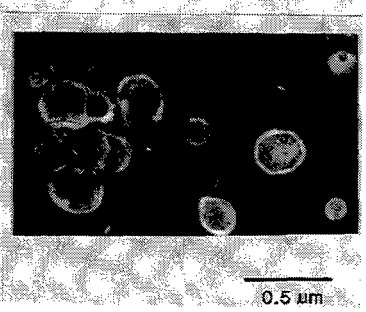
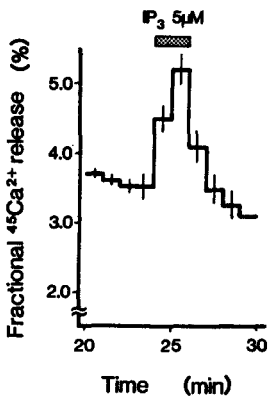



図3




## 考察

本実験で用いたシナプス膜のresealed小胞標品は、inside out およびoutside outの配向性をともに有していることが明らかになった。$^{45}Ca^{2+}$は小胞に包み込まれるような形で取り込まれる為、その過程にCa-ATPaseの様なCa-ポンプ機構を必要としない。このような標品では、inside out 小胞におけるIP3の作用と、outside out小胞におけるレセプターアゴニストの作用が同時に観察できるという、利点がある。この両機構による$^{45}Ca^{2+}$遊離作用の最大値を比較すると、IP3によるものは4.16%であったのに対し、キョートルフィンでは、9%であった。キョートルフィンによる$^{45}Ca^{2+}$遊離はIP3産生を介していること(3)を考慮に入れると、この事実はinside out小胞のpopulationは outside out小胞のそれの50%以下であったことを示唆している。 筋小胞体や小胞体などのカルシウムストアーにおいて、IP3は特異的なレセプターに結合し、特定のチャンネルを開口させると現在では考えられている。本研究では、シナプス形質膜のresealed小胞において、IP3による$^{45}Ca^{2+}$遊離はそのレセプター拮抗薬と考えられているヘパリンにより著明に遮断された。問題となるのは、シナプス膜に結合している小胞体様のIP3感受性のストアーの関与である。 しかし、この可能性は否定されると思われる。なぜなら、細胞下分画の結果、シナプトゾームから精製されたシナプス膜において、マイクロゾーム膜よりIP3ははるかに強力な作用を示したことやサポニンが著明にこの作用を遮断したことなどから、IP3の作用点は形質膜に存在すると考えられるからである。さらには、「ストアー」がlysisに抵抗してintactで存在しており、自然拡散により$^{45}Ca^{2+}$が取り込まれたとしても、上述のように、こうした標品ではIP3は無効であったという結果を得ていることなどから、むしろこの「ストアー」という概念は成立しないように思われる。このような理由からシナプス膜、特に神経終末の形質膜に特異的なIP3レセプターおよびそれと連関したチャンネルが存在することが示唆される。キョートルフィンはシナプトゾーム標品において、$^{45}Ca^{2+}$の取り込みを促進したという知見(5)などもあることから、シナプス前膜に存在するキョートルフィンレセプターはＧｉ-ホスホリパーゼＣ-IP3-IP3感受性カルシウムチャンネルと形質膜上で、一連のシグナル伝達を行うものと考えられる。


**文献** (1) H. Ueda, Y. Yoshihara, H. Misawa, N. Fukushima, T. Katada, M. Ui, H. Takagi and M. Satoh, J. Biol. Chem., 264, 3732-3741 (1989)

(2) H. Ueda, N. Fukushima, Y. Yoshihara and H. Takagi, Brain Res., 419, 197-200 (1987)

(3) 田村滋規、植田弘師、佐藤公道 (1988) 神経化学 27, 264-265

(4) V.P. Whittaker, I.A. Michaelson and R.J.A. Kirkland, Biochem. J., 90, 293-303 (1964)

(5) H. Ueda, Y. Yoshihara and H. Takagi, Biochem. Biophys. Res. Commun., 137, 897-902 (1986)

# 23 ＩＰ3結合能を持つＰ400蛋白質の機能と存在様式

宮脇敦史*,**、古市貞一*、吉川真悟*,**　御子柴克彦*,**

（基生研　行動制御*、阪大蛋白研　機能制御**）

## 〔要約〕

小脳プルキンエ細胞に豊富に存在する蛋白質Ｐ400 の機能と存在様式を追究すべく、我々は既に得ているＰ400 cDNAをNG108-15 cell lineへ導入し、β-actin promoterの下に発現させる系を確立した。発現実験の結果、Ｐ400 cDNAのコードする蛋白質は膜画分に回収され、IP3結合能を有することが明らかとなった。更に、これまでの実験データと併せて、Ｐ400 蛋白質の膜における存在様式に関して一考を加えた。

【緒言】

最近、我々の研究室にて、以下に述べる事実を明らかにした。

・Ｐ400 蛋白質は小脳プルキンエ細胞のみならず、他の細胞、組織にも微量ではあるが存在すること。

・Ｐ400 蛋白質は小胞体膜に多量に存在すること。

・マウス小脳から精製したIP3結合蛋白質が、Ｐ400 蛋白質と同一であること。（１）。

多くの細胞で、IP3はアゴニストの刺激に応じて細胞内にカルシウムを動員するセカンドメッセンジャーであると考えられている。最近、Snyderらは、ラット小脳より“IP3 receptor binding protein”を精製しており、この蛋白質と我々のＰ400 蛋白質との同一性を指摘している（２）。IP3の細胞膜からの遊離、これに引き続いて起こる細胞内貯蔵部位からのカルシウム放出、このふたつの事象間に橋を渡す分子の一つとして、Ｐ400 をとらえてみた。

我々は、これまでにマウスＰ400cDNAを得、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列の解析を行い、昨年の本学会で報告した（３）。今回、Ｐ400の全長cDNA及び改変cDNAに由来する蛋白質を用いて解析したところ、興味ある結果が得られたので報告する。

【実験方法】

１）expression vectorとcDNA　pβact-CAT9（４）のCATgeneを除去後、Sall siteを導入し、ここにSall linkerをつけた全長cDNAおよび3'deleted cDNAを挿入した。3'deleted cDNAは、5'末端より内部のEcoRI部位までの、およそ7kbp長の断片である（図１-ａ）。cDNAを含まないvectorのみをcontrol plasmidとした。

２）transfection　plasmid DNAの導入は、$CaPO_4$沈澱法に従った（５）。

３）細胞の分画　transfection２日後に細胞を回収し、0.25M sucrose in bufferA（10mM Tris ClpH8.0, 0.1mM EDTA, 1mM PMSF, 0.01mM pepstatine A, 0.2u/ml aprotinin）中でホモジナイズした。ホモジネートを3,300xg、３分間遠心したのち、上清を320,000xg、５分間遠心し、沈澱を膜画分、上清を可溶性画分とした。マウスの小脳microsome画分調製は前田らの方法（６）に従った。

４）Western Blotting　Ｐ400モノクローナル抗体4C11、10A6、18A10を用いた。

５）$^3$H-IP3 binding assay　rapid centrifugation method（７）を採用した。non-specific bindingは、1μM cold IP3の存在下で測定した。total bindingからnon-specific bindingを差し引いて、specific bindingとした。

【結果と考察】

Western blot解析により、NG108-15 cellが既に３種のＰ400モノクローナル抗体に反応する蛋白質（内因性Ｐ400）を有していることがわかった（図２-ａ lane 2～4）。NG108-15 cellは神経細胞の多くの性質を備える、neuroblastomaとgliomaとのhybrid cell lineで、この細胞に於いてもIP3が細胞内セカンドメッセンジャーとして働くことは証明され

ており、内因性$P_{400}$は$IP_3$に関与した機能を持つと考えられる。　NG108-15内因性$P_{400}$はマウス小脳$P_{400}$よりも、SDS PAGE上、分子量が小さく観察される（図2-a）。　一方、全長$P_{400}$cDNAをNG108-15 cellで発現させると、小脳$P_{400}$と同じ位置に、3種のモノクローナル抗体陽性の濃いbandが出現する（図2-a　lane1）。　こうして、cDNA由来$P_{400}$と内因性$P_{400}$とを分子量の差で区別できる系が得られた。

全長cDNAを発現させた細胞の膜画分を使って、$^3H$-$IP_3$ binding assayをおこなったところ、controlと比べて$IP_3$結合能の顕著な増加がみられた（図3）。　我々は、$P_{400}$cDNAは$IP_3$結合能を持つ蛋白をコードしていると結論し、その結合様式を小脳$P_{400}$のそれ（1）と比較検討しつつある。

ところで我々は、アミノ酸配列より、$P_{400}$cDNAのC末端近くに連続して存在する7つの膜貫通領域を予測している（図1-b）。　今回の3'deleted cDNAはN末端よりこの領域手前までのおよそ250kDaのペプチドをコードする。　このC末端欠失$P_{400}$蛋白質は主に可溶性画分に回収され（図2-b　lane3）、先述の領域の膜anchoring作用を裏付ける一つのデータが得られた。　膜画分にも微量の250kDaペプチドが回収されたが、これは調製時に混入したものと考えられる。現在、膜貫通領域を中心にして、それよりN末端領域、C末端領域がどのように配向しているかを、$P_{400}$蛋白質のリン酸化（8）、糖付加（9）などの現象と絡めて検討中である。

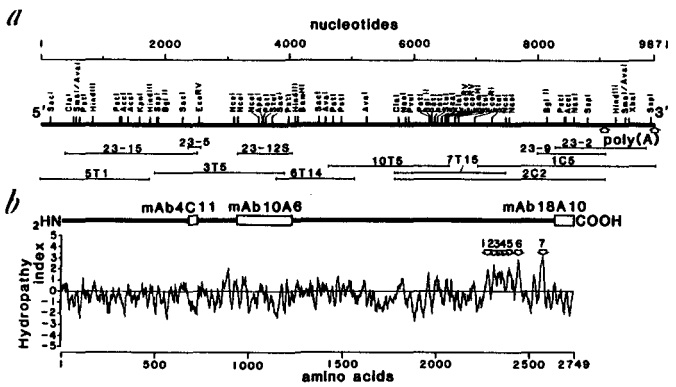



図1　$P_{400}$の構造　a, $P_{400}$cDNA制限酵素切断地図
b, $P_{400}$アミノ酸配列解析：Hydropathy Plot

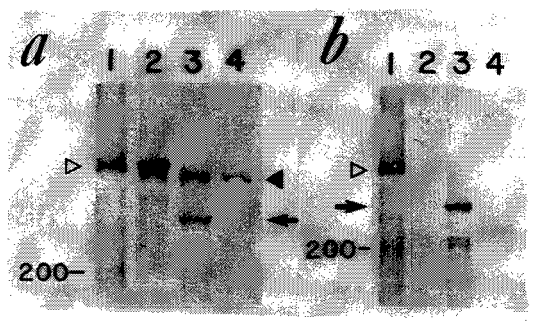



図2 Western blot解析　lane1:マウス小脳microsome 5ug lane2, 3, 4:各々 cDNA, 3'deletedcDNA, vectorを発現させた場合
（a:膜蛋白50ug/lane,　b:可溶性蛋白15ug/lane）

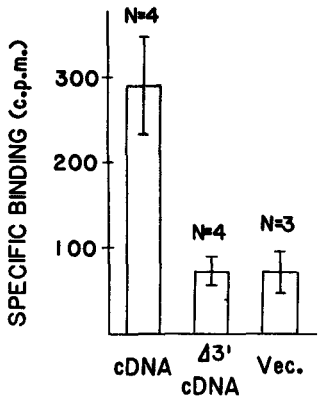



図3　$IP_3$ binding assay

【文献】

1）Maeda, N. et al. EMBO J. (submitted)
2）Supattapone, S. et al. J. Biol. Chem. 263, 1530-1534 (1988)
3）Furuichi, T. et al. 神経化学　27, 46-47 (1988)
4）Fregien, N. et al. Gene 48, 1-11 (1986)
5）Miura, M. et al. Gene 75, 31-38 (1989)
6）Maeda, N. et al. Dev. Biol. 133, 67-76 (1989)
7）Wilcocks, A.L. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 146, 1071-1078 (1987)
8）Yamamoto, H. et al. J. Neurochem. (in press)
9）Maeda, N. et al. J. Neurochem. 51, 1724-1730 (1988)

# 24　ラット大脳皮質におけるＧＴＰ結合タンパク質ＧｏとＧｉ2の細胞内分布

浅野富子、加藤兼房（愛知県コロニー・研・生化）

〔要約〕

ＧＴＰ結合蛋白質GoとGi2のαサブユニットおよびβサブユニットに対するイムノアッセイ法を用いてラット大脳皮質におけるこれらのサブユニットの細胞内分布を検討した。

(1) Goα、Gi2α、βサブユニットとも粗ミトコンドリア分画（P2）とミクロソーム分画（P3）に高濃度存在した。

(2) P2分画を低張処理したのちショ糖密度勾配遠心すると３種類のサブユニットはシナプス膜分画で高い濃度を示し、ミエリン分画、ミトコンドリア分画では低かった。

(3) ミクロソーム分画をショ糖密度勾配遠心で細分画するとＧＴＰ結合蛋白質のサブユニットは主に滑面小胞体の分画に見られた。この分画は高いNa+、K+-ATPase活性を示すので、原形質膜が多く混入しているものと考えられる。

(4) ムスカリン性アセチルコリン受容体を[3H]quinuclidinyl benzylate結合活性を用いて同じ分画で測定すると、常にＧＴＰ結合蛋白質の高い分画で高い結合を示した。

細胞膜受容体と共役するＧＴＰ結合蛋白質（Ｇ蛋白質）にはGs、Gi、Go、トランスデューシンが知られているが、脳内のＧ蛋白質としてはこれまでにGs、Gi1、Gi2、Goの存在が示されている。我々はGoおよびGi2のαサブユニット（Goα、Gi2α）に対する抗体およびこれらを用いたイムノアッセイ法によりGoα、Gi2αの生体分布を明らかにしてきた［1,2］。そこで今回はこれらのαサブユニットの脳における細胞内分布を調べ、受容体の分布と比較検討した。

［実験方法］

Wistar系ラットの大脳皮質を９倍量の0.32 M ショ糖でホモジナイズし、1000 x g, 10分間遠心し、沈渣（P1）を得た。上清を10,000 x g, 20分間遠心した沈渣をP2とし、さらにその上清を105,000 x g、60分間遠心し、沈渣（P3）と上清(10,5000 x g supernatant)を分離した。P2分画はJone and Matus［3］の方法に従って低張処理したのちショ糖密度勾配遠心し、Fraction 1（ミエリン分画）、２(シナプス膜分画)、３(ミトコンドリア分画)を得た。また大脳皮質を4倍量の0.88 M ショ糖でホモジナイズし、25,000 x g、20分間遠心した上清（ミクロソーム分画）をTamai［4］らの方法でlight滑面小胞体、heavy滑面小胞体および粗面小胞体の各分画に分けた。各分画の純度の検定は電子顕微鏡による方法と、膜マーカーの分布を測定する方法で行った。各分画は20 mM Tris-HCl(pH 8)/1 mM EDTAで1回洗ったのち同溶液の懸濁液とし、これを用いて蛋白質、ムスカリン受容体、各マーカーの定量を行った。またこの懸濁液に1% コール酸ナトリウムを加えて可溶化したものをＧ蛋白質の定量に用いた。Goα、Gi2α、βの各サブユニットの定量は既報のエンザイムイムノアッセイ法［2,5,6］で行った。ムスカリン受容体は[3H]quinuclidinyl benzylate(QNB)を用いてYamamura and Snyder［7］の方法で測定した。マーカーはそれぞれ既報の方法［3,4,8］に従って測定した。

［結果］

ラット大脳皮質をP1(核)、P2(粗ミトコンドリア)、P3(ミクロソーム)および105,000 x g 上清に分画すると、Ｇ蛋白質の各サブユニットおよびムスカリン受容体はP2とP3分画に高濃度存在していた(Table 1)。そこでP2およびP3分画をさらにショ糖密度勾配遠心で細分画してＧ蛋白質の局在を調べた。細分画した各分画のマーカー量はTable 2,3 に示したが、電顕像も合わせて純度は原報にほぼ近いと考えられる。 まずP2分画をミエリン、シナプス膜、ミトコンドリアに分画したものではＧ蛋白質の3種類のサブユニットおよびムスカリン受容体はシナプス膜の分画に高濃度局在し、他の分画では非常に低い濃度を示した(Table 2)。一方、P3分画をlightおよびheavy滑面小胞体と粗面小胞体の3フラクションに分画するとＧ蛋白質、ムスカリン受容体ともheavy滑面小胞体の分画に最も高濃度局在し、粗面小胞体の分画で最も低かった(Table 3)。原形質膜のマーカーであるNa+、K+-ATPase活性も滑面小胞体の分画で高かった。

［考察］

今回の結果から$G_o$と$G_{i2}$は主に原形質膜上に存在すると考えられる。すでに報告したこれらの蛋白質の免疫組織化学的染色結果、すなわちneuropilが強く染色され、細胞体が細胞膜を除いてほとんど陰性であったという結果［2,5］とよく一致する。またこれらのG蛋白質の局在はムスカリン受容体の局在と一致していた。105,000 x g 上清分画には$\beta$サブユニットも含めてG蛋白質がほとんど存在しなかったことは、少なくとも$\beta\gamma$と結合したG蛋白質はsolubleな形ではほとんど存在していないことを示している。最近イヌの膵臓の粗面小胞体に百日咳毒素の基質になるG蛋白質が存在するという報告［9］がなされたが、ラット脳の粗面小胞体の分画では$G_o\alpha$、$G_{i2}\alpha$、$\beta$サブユニットいずれの濃度も低かった。なお、本研究は形態学部の長浜真人博士と共同で行われた。

Table 1. Concentrations of G-protein subunits and muscarinic receptors in subcellular fractions of rat cerebral cortex

| Fraction | $G_o\alpha$ | $G_{i2}\alpha$ | $\beta$ | [$^3$H]QNB binding |
|---|---|---|---|---|
| | (pmol/mg protein) | | | |
| $P_1$ | 35 ± 9 | 2.8 ± 0.1 | 45 ± 16 | 1.0 ± 0.4 |
| $P_2$ | 64 ± 9 | 4.1 ± 0.2 | 91 ± 31 | 1.8 ± 0.6 |
| $P_3$ | 105 ± 32 | 5.7 ± 0.7 | 149 ± 82 | 3.7 ± 0.7 |
| 105,000 x g Supernatant | 2 ± 1 | 0.1 ± 0.0 | 3 ± 0 | - |

Table 2. Concentrations of G-protein subunits, muscarinic receptors and markers in subfractions of crude mitochondrial fraction ($P_2$)

| Fraction | $G_o\alpha$ | $G_{i2}\alpha$ | $\beta$ | [$^3$H]QNB binding | Na$^+$,K$^+$-ATPase | CNP* | Cyt c** oxidase |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (pmol/mg protein) | | | | (μmol/h/mg protein) | | |
| 1 (myelin) | 16 ± 1 | 0.9 ± 0.2 | 22 ± 9 | 0.3 ± 0.1 | 12 | 113 | <1 |
| 2 (synaptic membrane) | 116 ± 18 | 5.2 ± 1.2 | 168 ± 47 | 3.5 ± 0.5 | 38 | 32 | 5 |
| 3 (mitochondria) | 13 ± 2 | 1.3 ± 0.1 | 19 ± 2 | 0.6 ± 0.1 | 7 | 6 | 49 |

*2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase, **Cytochrome c oxidase

Table 3. Concentrations of G-protein subunits, muscarinic receptors and various markers in rat submicrosomal membrane fractions

| Submicrosomal membranes | $G_o\alpha$ | $G_{i2}\alpha$ | $\beta$ | [$^3$H]QNB binding | Na$^+$,K$^+$-ATPase | NADPH-Cyt c* reductase | RNA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (pmol/mg protein) | | | | (μmol/h/mg protein) | | (μg/mg protein) |
| Light smooth-surfaced | 43 ± 11 | 2.4 ± 0.5 | 77 ± 25 | 1.7 ± 0.5 | 20 | 1.4 | 15 |
| Heavy smooth-surfaced | 102 ± 16 | 5.1 ± 1.5 | 189 ± 50 | 5.4 ± 0.9 | 32 | 0.8 | 16 |
| Rough-surfaced | 14 ± 6 | 1.6 ± 0.4 | 32 ± 13 | 0.4 ± 0.2 | 6 | 0.6 | 353 |

*NADPH-cytochrome c reductase

［文献］


[1] Asano, T., Semba, R., Kamiya, N., Ogasawara, N. and Kato, K. (1988) J. Neurochem., 50, 1164-1169
[2] Asano, T., Morishita, R., Semba, R., Itoh, H., Kaziro, Y. and Kato, K. (1989) Biochemistry, in press
[3] Jones, D.H. and Matus, A.I (1974) Biochim. Biophys. Acta, 356, 276-287
[4] Tamai, Y. Araki, S.M., Katsuta, K. and Satake, M. (1974) J. Cell Biol., 63, 749-758
[5] Asano, T., Semba, R., Ogasawara, N. and Kato, K. (1987) J. Neurochem., 48, 1617-1623
[6] Asano, T., Kamiya, N., Morishita, R, and Kato, K. (1988) J. Biochem., 103, 950-953
[7] Yamamura, H.I. and Snyder, S.H. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 1725-1729
[8] Lu, A.Y.H., Junk, K.W. and Coon, M.J. (1969) J. Biol. Chem., 244, 3714-3721
[9] Audigier, Y., Nigam, S.K. and Blobel, G. (1988) J. Biol. Chem., 263, 16352-16357

# 25 精神分裂病死後脳のGTP結合蛋白質（Gi, Go）

岡田文彦[※]，徳光幸子[※※]，T. J. Crow[※※※]，G. W. Roberts[※※※]

北海道大学保健管理センター[※]，薬学部薬効学[※※]，Division of Psychiatry, Clinical Research Centre[※※※]，U. K.

〔要約〕

百日咳毒素によるADPリボシル化反応を用いて，精神分裂病死後脳のGTP結合蛋白質（Gi/Go）の量的変化を検討した。対照群と比較して，精神分裂病群の左側の被殻と海馬でGi/Go量がそれぞれ，42%，32%減少していた。他の脳部位では有意な変化を認めなかった。これらの結果から，精神分裂病脳の左被殻ではドーパミン神経機能が亢進している可能性があり，左海馬ではGABA神経系障害などが存在すると推測される。

精神分裂病のドーパミン仮説ではドーパミン神経伝達の亢進を予測している[1]。しかし，この仮説を直接支持する所見に乏しかった。ドーパミンの含有量の多い脳部位では$D_2$受容体が増加（$D_1$受容体は不変）しているとの報告[2]があるが，分裂病の病的過程によるのか，長期間の向精神薬療法による結果なのか，不明のままである。線状体にはドーパミン受容体とアデニレートシクラーゼとの間に介在する促進性（Gs）及び抑制性（Gi）のGTP結合蛋白質の存在が知られており，膜を介する情報伝達系に重要な役割をになっていると考えられる[3]。また，海馬では$5HT_{1A}$やGABA$_B$受容体と共役する百日咳毒素感受性のGTP結合蛋白質の存在が報告されている[4]。

我々は精神分裂病死後脳の線状体や海馬などの抑制性GTP結合蛋白質（Gi/Go）を百日咳毒素によるADPリボシル化反応を用いて測定し，精神分裂病における情報伝達機構の異常の存在について検討を加えた。

方法：精神分裂病と診断（Wing[5]らのnuclear syndrome, Feighner[6]らのdefinite or probable schizophrenia）された患者の死後脳は英国の二つの精神病院で集められた。対照群は英国の一般病院より集められたが，年令，性，死後時間などを一致させたものを用いた。脳の切除は一定の方式で行われ，各脳部位別に－80℃に保存された。検討した脳部位は尾状核，被殻，淡蒼球，扁桃核，海馬，海馬旁回，側頭皮質，島，前頭皮質である。

膜標品は50mM トリス，0.5mM EDTA，pH7.5緩衝液でホモジナイズし，1万g16分間遠心分離し得られた沈渣を同緩衝液で1回洗浄し，－80℃に保存した。膜標品を25$\mu$g/ml IAP，2$\mu$M[$^{32}$P]NAD存在下ADP－リボシル化し，Laemmliの方法[7]に準じてSDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ないゲルを乾燥後，X線フイルムと1～4日間曝露することによりオートラジオグラフィーを行なった。

結果：分裂病及び対照群の脳膜標本で$^{32}$PはIAPによるADPリボシル化の結果，分子量39000－41000の蛋白バンドに検出された。このバンドは分子量41000のGiと39000のGoを含むと思われるが，我々の方法では，この両者を分離できなかった。図1に示すように，左側の被殻では対照群と比較してGi/Go量は42%減少していた。同様の有意の変化は尾状核，淡蒼球及び右被殻では認められなかった。また，図2に示すように，左側の海馬では対照群と比較してGi/Go量が32%減少していた。扁桃核と右海馬では同様の変化を認めなかった。

考察と結論

線状体では$D_1$－GsとD$_2$－Giの二重支配によりアデニレートシクラーゼが調節されていることが証明されている[8]。D$_2$－Gi系の機能低下が$D_1$－Gs系の亢進[9]をもたらし，Giの機能低下がD$_2$受容体数の増加[2]をもたらすと推定することも可能である。海馬ではGi/Goに共役した$5HT_{1A}$受容体がアデニレートシクラーゼを抑制し[10]，5HTとGABA$_B$受容体によるKチャンネル開閉にこのG蛋白質系が関与することが知られている[4]。われわれの研究ではどのG蛋白（Gi，Go，その他のG）が被殻や海馬の変化に関連しているか決定することが出来なかった。今後はG蛋白の生化学的及び遺伝学的研究の進展が精神分裂病の病的過程の究明に寄与するものと思われる。

文献

1. Crow, T. J. (1987) Brit. J. Psychiat. 151, 460 465
2. Cross, A. J., Crow, T. J. and Owen, F. (1981) Psychopharmacology 74, 122-124
3. Memo, M., Lovenberg, W. and Hanbauer, I. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4456-4460
4. Andrade, R., Malenka, R. C. and Nicoll, R. A. (1986) Science 234, 1261-1265
5. Wing, J. K., Cooper, J. E. and Sartorius, N. (1974) Measurement and Classification of Psychiatric Symptoms. London
6. Feighner, J. P., Robins, E., Guze, S. B., Woodruff, R. A., Winokur, G. and Munoz, R. (1972) Arch. Gen. Psychiat. 26, 57-63
7. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685
8. Olianas, M. C. and Onali, P. (1987) J. Neurochem. 48, 1443-1447
9. Memo, M., Kleinman, J. E. and Hanbauer, I. (1983) Science 221, 1304-1307
10. Okada, F., Tokumitsu, Y. and Nomura, Y. (1989) J. Neurochem. 52, 1566-1569

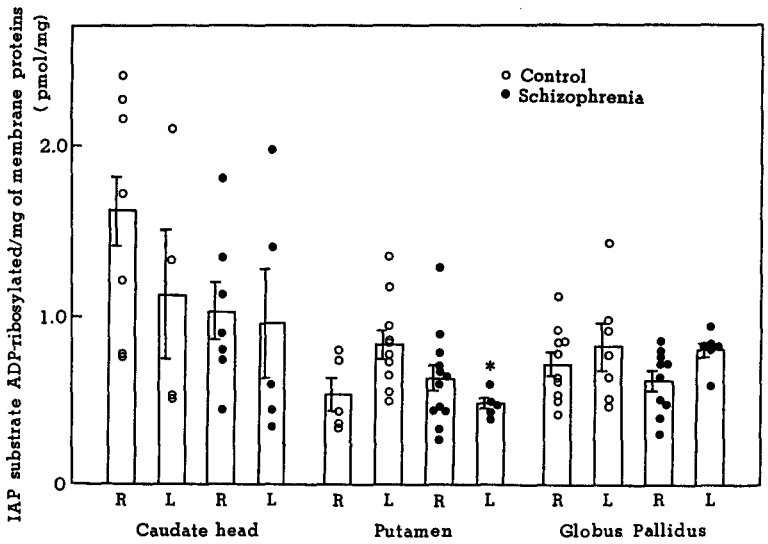



図1　尾状核，被殻，淡蒼球のGi/Go R：右，L：左

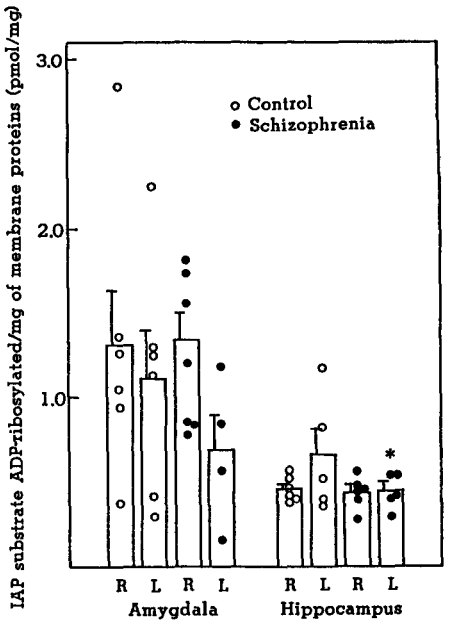



図2　扁桃核，海馬のGi/Go

## 26 炭酸リチウム投与そう鬱病患者の血小板における百日咳毒素による阻害性ＧＴＰ結合蛋白のＡＤＰ－ＲＩＢＯＳＹＬＡＴＩＯＮの変化について

森田仁[2]、渡辺康裕[1]、今泉太郎[1]、武田雅俊[2]、播口之朗[2]、西村健[2]、吉田博[1]
（大阪大学医学部・第一薬理[1]、精神神経科[2]）

〔要約〕
そう鬱病患者の血小板を用いて、40-41k蛋白(阻害性GTP結合蛋白-Gi)の百日咳毒素(IAP)によるADP-ribosylation量と病態との関係を検討した。 40-41k蛋白におけるADP-ribosylationは、GTPγS(1～100μM)存在下で減弱し、G蛋白におけるものであると考えられた。 炭酸リチウム投与にて、精神症状が改善し、投与中止可能となった4症例について、各々、投与中の血液と、中止後、一定の期間を置いた血液を採取した。 上記の各症例 2 検体について、血小板のG蛋白のIAPによるADP-ribosylation量を比較すると、リチウム投与中の血液に減少が観られた。 以上より、そう鬱病治療薬としてのリチウムの作用点の1つとして、神経伝達物質受容体と共役するIAP感受性G蛋白（特にGi）の関与の可能性が考えられる。

〔目的〕
リチウムは、そう鬱病の治療薬として広く臨床で使用されているが、作用機序は未だ不明である。これまでに、リチウムは、phosphatidyl inositol turnoverを抑制する(1)、forskolin刺激時のadenylate cyclase活性を抑制する(2)、ラット大脳皮質膜で、アドレナリン、アセチル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(3)、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量を減少させる(4)、等の知見がある。
今回、我々は、リチウム治療の対象となった、そう鬱病患者血液より血小板を分離し、IAP感受性Gi蛋白のIAPによるADP-ribosylationに対するリチウム連用時の影響について検討した。
〔方法〕
（血液の採取）
そう鬱病患者においてリチウム投与中の血液①と、中止後、一定期間を置いた血液②を採取した。
採血にあたっては、患者並びに家族に研究内容を説明し、その同意を文書にて確認した。
（試料調製）
患者Heparin加血液を遠沈(200 g、15分)し、得られた上清(platelet rich plasma)をさらに遠沈(700 g、20分)し、血小板分画を得た。 その血小板分画を低張処理後、遠沈(10000 g、2分)洗浄[10 mM、pH 7.4、triethanolamine-HCl (TEA) buffer、5 mM EDTA]を2回繰り返し膜分画を得て-80℃で保存した。
（IAPによるADP-ribosylationの観察）
ヒト血小板細胞膜分画(5μg/100μl)を、1 mM ATP、10 mM thymidine、1 mM EDTA、2 mM $MgCl_2$を含むTEA buffer(50 mM pH 7.4)中で、1μM $^{32}$P-NAD、IAP(2μg/100μl)と25℃で反応させ、Laemmli(5)のsample bufferに懸濁後、SDS-PAGE後、autoradiographyを行った。40-41K 蛋白のbandを、Densitometer(島津2波長chromatoscanner、CS-930)を用いて、吸光度(area of band、densitometric unit)を測定し、IAPによるADP-ribosylation量を観察した(6-8)。
〔結果及び考察〕
ヒト血小板細胞膜分画40-41k蛋白におけるADP-ribosylationは、GTPγS(1～100μM)存在下減弱し、Gi蛋白であると考えられた。
Fig.1に示す様に、IAPによるヒト血小板膜分画40-41K蛋白のADP-ribosylation反応は、約90分にてほぼ飽和に達しており、血小板膜分画におけるADP-ribosylation量の測定の反応時間を90分とした。

また、ADP-ribosylation量は、30分、60分、90分、120分の各反応時間において、リチウム投与中の検体と、リチウム投与中止後、一定の期間を置いて採取した検体と比較すると、リチウム投与中止後の検体にて、増加が観られた。 Table.1において、各症例のADP-ribosylation量の（Lithium投与中/Lithium中止後）比を観ると0.61-0.75の範囲で0.68±0.072(Mean±SD、n=4)となった。この様に、今回、検討した症例においては、そう鬱病治療薬として連用投与されたリチウムが、血小板IAP感受性Gi蛋白に作用し、IAPによるADP-ribosylation反応を変化させたと考えられる。 以上より、リチウム連用により、ヒト血小板IAP感受性Gi蛋白（40-41 K）の量的質的変動が生じたと考えられた。 これらのGi蛋白の変動は、IAP感受性G蛋白を介する神経伝達物質受容体と共役反応との間のsignal transductionの変化を引き起こす可能性が考えられ、そう鬱病治療薬として連用投与されたリチウムの作用点の一つがIAP感受性Gi蛋白である事を示唆する。 同様の変化が脳内においても生じているか、否かは、今後の課題である。

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. Kawamoto, H. Watanabe, Y. Imaizumi, T. and Yoshida, H. (1988) 神経化学 27, 28-29.
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
7. Watanabe, Y. Imaizumi, T. Misaki, N. Iwakura, K. Sakagoshi, N. Matsumori, Y. and Yoshida, H. 'Mechanism of Transmembrane Signalling' in press.
8. Watanabe, Y. Imaizumi, T. Misaki, N. Iwakura, K. and Yoshida, H. (1988) FEBS Lett. 236(2), 372-375.

| | Sex | Age | 血中 Li 濃度 (mEq/l) | $Li_2CO_3$ 投与量 (mg/day) | Li 服薬中止後の期間 (day) | ADP-ribosylation量比 (Li投与中/Li中止後) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Exp. 1 | F | 28 | 0.4 | 600 | 28 | 0.63 |
| Exp. 2 | F | 41 | 0.6 | 800 | 16 | 0.75 |
| Exp. 3 | M | 42 | 0.5 | 600 | 21 | 0.61 |
| Exp. 4 | F | 67 | 0.5 | 600 | 30 | 0.74 |
| mean ± S.D. | | | | | | 0.68 ± 0.072 |

Table 1 症例とG蛋白の ADP-ribosylation 量比

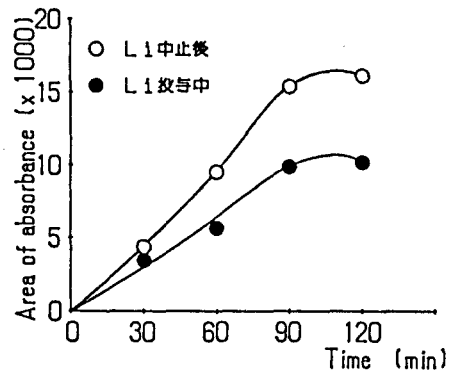



Fig.1 血小板膜ホモジネート40－41K蛋白のIAPによるADP-ribosylation に対する Li の影響

| | Area of band of 40-41K prot. (densitometric unit) | | |
|---|---|---|---|
| | ① Li 投与中 | ② Li 中止後 | ①／② |
| Exp. 1 | 10,226 | 16,185 | 0.63 |
| Exp. 2 | 243 | 321 | 0.75 |
| Exp. 3 | 2,360 | 3,819 | 0.61 |
| Exp. 4 | 2,628 | 3,508 | 0.74 |

Table 2 血小板における Li 慢性投与の影響

# 27 ラット海馬膜標品における5-HT受容体を介するadenylate cyclase活性の抑制に関する検討

小田垣雄二，小山 司，松原繁広，大森哲郎，中山 誠，松原良次，井上 猛，
久住一郎，村木 彰，山下 格
（北海道大学医学部・精神医学教室）

〔要約〕

ラットの海馬膜標品を用い，forskolin により刺激されたadenylate cyclase (AC)活性の5-HTによる抑制を検討した。5-HTによるAC活性の抑制はGTP 依存性であり，また，forskolin 以外のNaF，$Mn^{2+}$ およびGpp(NH)pによる刺激に対しては認められなかった。AC活性の抑制をみるのに最適な条件を設定した上で，5-HT，8-OH-DPAT およびbuspirone による抑制を検討すると，$EC_{50}$はそれぞれ約50，30および300nM，最大抑制率はそれぞれ約17，13および9%であった。5-HTによる濃度反応曲線は$5\text{-}HT_{1A}$受容体に対する比較的高力価のantagonistであるspiperone およびmethiothepinにより濃度依存的に右方に偏位した。三環系抗うつ薬desipramine やMAO 阻害剤tranylcypromine の長期投与は5-HTによるAC活性の抑制に影響を与えなかった。炭酸リチウムの長期投与によってもこの抑制に変化は認められなかった。

〔はじめに〕

近年，セロトニン(5-hydroxytryptamine，5-HT) 受容体の細分類が進むに従い，各受容体亜型とそれに対応する細胞内情報伝達系との関連が次第に明らかにされ，精神科治療薬の効果発現機序との関係にも言及されるようになってきた。$5\text{-}HT_{1A}$受容体については，モルモットおよびラット海馬でadenylate cyclase (AC)にpositiveに(7)，かつnegativeに(1) 共役していることが指摘されている。われわれもモルモット海馬膜標品における5-HTによるAC活性の刺激については昨年報告した(4) 。今回は，forskolin で刺激したAC活性に対する5-HTによる抑制について検討したのでその結果を報告する。さらに，この5-HTによるACの抑制を，desipramine(3)やmonoamine oxidase (MAO) 阻害剤(8) の長期投与が減少させるという報告がなされているので，この点についても検討を加えた。

〔対象と方法〕

200-300gのSprague-Dawley系雄ラットを用いた。De Vivo とMaayani の方法(1) を一部改変し，〔$\alpha^{32}$P〕ATP より生成された〔$^{32}$P〕cAMPをDowex AG-X4(200-400 mesh) とneutral alumina の二重カラムで分離し，〔$^{3}$H〕cAMPの回収率による補正を行ってAC活性を求めた(6) 。Desipramine，tranylcypromineはそれぞれ10mg/kg，5mg/kg を1日1回，3週間腹腔内投与した。リチウム (Li) は，0.2%の炭酸Li含有飼料として4週間経口的に投与した。

〔結果および考察〕

Forskolin(10$\mu$M)刺激によるAC活性は，20分，90$\mu$g/assay まで，incubation time および蛋白量に比例していた。以後の実験においてはincubation time として5分間，蛋白量として50-70 $\mu$g/assay を用いた。AC活性は添加したforskolin の濃度依存性に上昇し，1mMのforskolin 刺激でforskolin 非存在下での値の5-7 倍に達した。5-HTによる抑制はforskolin の濃度によらず認められ，高濃度のforskolin によっても拮抗されなかった。以後の実験においては，forskolin の溶媒として用いたdimethylsulfoxide (DMSO)の濃度も考慮して，10$\mu$M のforskolon (DMSO 1%) による刺激を選択した。5-HTによるACの抑制はforskolin 以外の刺激(NaF，$Mn^{2+}$およびGpp(NH)p) に対しては認められなかった。5-HTによるforskolin 刺激性ACの抑制はGTP 依存性で(Fig.1)，GTPに代えてGpp(NH)pを用いた場合には認められなかった。5-HTによるACの抑制にpertussis toxin 感受性のG蛋白，おそらくはGiが介在していることはすでに報告されている(2) 。Fig.1 の結果から，5-HTによる抑制率が最大となるGTP 10$\mu$M，Mg acetate 1.5mM の条件下で，5-HTと$5\text{-}HT_{1A}$

受容体agonist (8-OH-DPAT, buspirone)を濃度展開すると，各agonist は濃度依存的にACを抑制した(Fig.2) 。5-HT,8-OH-DPATおよびbuspirone の$EC_{50}$はそれぞれ約 50, 30および300nM, 最大抑制率はそれぞれ約 17, 13および9%であった。5-HTによる濃度反応曲線は5-$HT_{1A}$受容体に比較的親和性の高いantagonistであるspiperone および methiothepinにより右方に偏位し，5-$HT_{1A}$受容体を介する反応であることが示唆された。この5-HTによるACの抑制に対し，desipramine, tranylcypromine およびLiの長期投与は影響を与えなかった(Table I) 。Desipramine およびtranylcypromine投与の結果は従来の報告(3,8) と相反するが，その理由は明らかでない。また，われわれはLiの長期投与が海馬の5-$HT_{1A}$受容体のdown-regulation を引き起こすことを報告してきたが(5),今回の結果はこれとも一致しない。5-$HT_{1A}$受容体および5-$HT_{1A}$受容体を介するACの抑制が精神科治療薬の作用機序や精神疾患の成因とどのような関連性を有するかについてはさらに検討が必要と思われる。

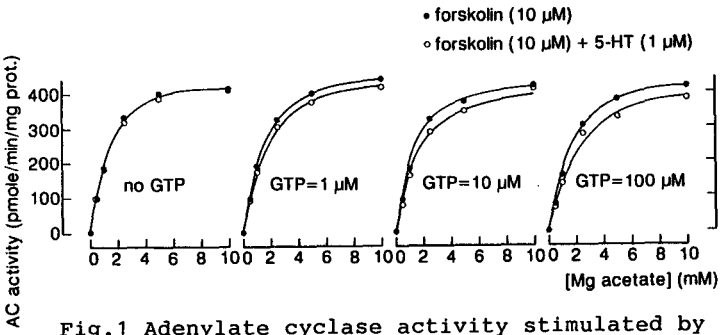



Fig.1 Adenylate cyclase activity stimulated by 10 uM forskolin in the absence and presence of 1 uM 5-HT at various concentrations of GPT and Mg acetate.

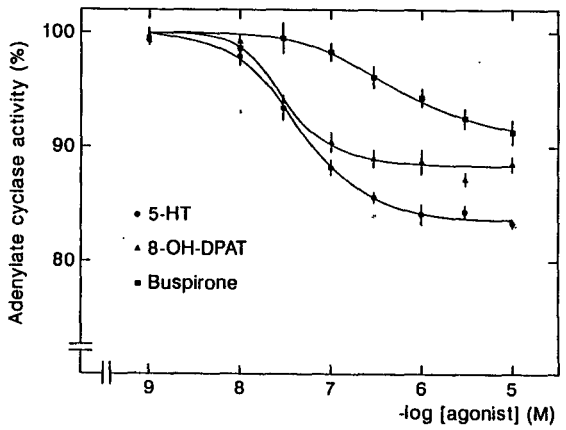



Fig.2 Inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity by 5-HT agonists. Forskolin-stimulated activity was normalized to 100 for each experiment. Results are means ± SEM of three independent experiments.

Table I Effect of long-term treatment of desipramine, tranylcypromine and lithium on the inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity by 5-HT in rat hippocampal membranes

| Treatment | n | Percent inhibition of forskolin-stimulated AC log [5-HT] (M) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | -8 | -7 | -6 | -5 |
| Experiment I | | | | | |
| Control | 4 | 2.1±1.2 | 12.5±0.4 | 18.2±0.8 | 17.8±0.4 |
| Desipramine | 4 | 3.8±0.8 | 12.9±1.1 | 17.9±1.1 | 19.8±0.9 |
| Tranylcypromine | 4 | 3.2±0.6 | 13.4±1.0 | 19.9±1.7 | 18.9±0.6 |
| Experiment II | | | | | |
| Control | 6 | 2.7±1.4 | 12.4±0.9 | 17.5±0.7 | 17.9±0.8 |
| Lithium | 6 | 2.4±0.6 | 11.8±0.7 | 18.9±0.4 | 17.6±0.4 |

Values are means ± SEM

〔文献〕


1. De Vivo, M., and Maayani, S. (1986) *J. Pharmacol. Exp. Ther., 238,* 248-253
2. Harrington, M. A., Oksenberg, D., and Peroutka, S. J. (1988) *Eur. J. Pharmacol., 154,* 95-98
3. Newman, M. E. and Lerer, B. (1988) *Eur. J. Pharmacol., 148,* 257-260
4. 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 (1988) 神経化学，*27*，130-131
5. 小田垣雄二，松原繁広，小山司，松原良次，山下格 (1988) 薬物・精神・行動，*8*，49-50
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
8. Sleight, A. J., Marsden, C. A., Palfreyman, M. G., Mir, A. K., and Lovenberg, W. (1988) *Eur. J. Pharmacol., 154,* 255-261

## 28 ras p21 類似ＧＴＰ結合蛋白質smg p25Aの新しい調節蛋白質の精製と性状

荒木　伸、菊池　章、佐々木卓也、畑　裕、磯村光男、勝二郁夫、黒田真也、
高井義美　（神戸大・医・第一生化）

〔要約〕
ras p21 類似ＧＴＰ結合蛋白質smg p25Aの活性制御機構を明らかにするために、smg p25Aへのグアニンヌクレオチドの交換反応の解析を行ったところ、smg p25AからのＧＤＰの解離がsmg p25AへのＧＴＰの結合の律速段階であることが明らかとなった。また、ウシ大脳可溶性画分にsmg p25AからＧＤＰの解離を促進する蛋白質（smg p25A調節蛋白質）が存在することが判明したので、本調節蛋白質を部分精製してその性状を検討した。この調節蛋白質はsmg p25AからＧＴＰの解離を促進せず、ＧＤＰの解離を促進し、ＧＴＰやＧＤＰのsmg p25Aへの結合を共に阻害した。smg p25A調節蛋白質はsmg p25AのＧＴＰase 活性を促進せず、それ自体ＧＴＰ結合活性およびＧＴＰase 活性を示さなかった。このsmg p25A調節蛋白質にはc-Ha-ras p21、rhoB p20 およびsmg p21 に対するＧＤＰの解離促進、ＧＴＰase 活性促進、ＧＴＰの結合阻害の活性はいずれも認められなかった。smg p25A調節蛋白質の分子量はゲルろ過法で8.2 万、ショ糖密度勾配遠心法で6.5 万と推定された。以上の結果から、ウシ大脳可溶性画分には、smg p25AからＧＤＰの解離を促進するsmg p25Aに特異的な調節蛋白質が存在することが明らかとなった。

〔緒言〕
smg p25Aは220 個のアミノ酸からなる分子量24,954の低分子量Ｇ蛋白質の１つである(6,7)。smg p25Aは神経組織に大量に存在し、また、本Ｇ蛋白質は大脳の中ではシナプスに高濃度に存在し(8,10)、神経機能、特にシナプス機能の制御に関与していると考えられる。しかし、本Ｇ蛋白質の活性制御機構と作用機構は不明である。ras p21 とのアナロジーにおいて、smg p25AにもＧＤＰ結合型の不活性型とＧＴＰ結合型の活性型が存在すると考えられ、不活性型を活性型に変換したり、活性型を不活性型に変換する調節蛋白質、および活性型smg p25Aの標的蛋白質が存在すると考えられる。事実、最近になりras p21 、rho p20 、smg p21 においては、それぞれのＧＴＰase 活性を促進する蛋白質が精製されている(1,2,5,11)。また、蛋白質合成に関与している真核細胞のペプチド鎖合成開始因子や原核細胞のペプチド鎖伸長因子にはＧＤＰを解離させてＧＴＰを結合させる特異的な調節蛋白質が存在することが報告されている(4,9)。しかし、smg p25Aに直接に作用する蛋白質は未だ同定されていない。今回、私共はsmg p25AからのＧＤＰの解離がsmg p25AへのＧＴＰの結合の律速段階であることをまず明らかにし、さらに、smg p25AからＧＤＰの解離を促進する蛋白質をウシ大脳から部分精製してその性状を検討した。

〔実験方法〕
smg p25AとＧＤＰ非結合型smg p25Aは既報の方法(3,6) に従い精製した。smg p25Aからの［$^{3}$Ｈ］ＧＤＰ解離促進活性は［$^{3}$Ｈ］ＧＤＰ－smg p25A二量体にサンプルを添加して一定時間インキュベートし、反応終了後、ニトロセルロースフィルターでろ過してフィルター上に残存する放射活性を測定して検出した。
smg p25AへのＧＴＰ結合活性の測定は［$^{35}$Ｓ］ＧＴＰγＳを用いて既報の方法(6) に従い測定した。

〔結果と考察〕
１．smg p25Aへのグアニンヌクレオチド交換反応の解析
smg p25AへのＧＴＰγＳ結合およびsmg p25AからのＧＤＰ解離の初速度はＭｇ$^{2+}$の濃度を下げると増大した。ＧＤＰ非結合型smg p25AへのＧＴＰγＳ結合の初速度はＭｇ$^{2+}$の濃度変化により影響を受けず、ＧＤＰ

非結合型smg p25AへのＧＴＰγＳ結合速度はＧＤＰ結合型smg p25Aへのそれと比べて著しく促進していた。したがって、smg p25AからのＧＤＰの解離がsmg p25AへのＧＴＰ結合の律速段階であること、さらに、smg p25AからＧＤＰの解離を促進して、ＧＴＰの結合を促進する蛋白質が生体内に存在する可能性が示唆された。事実、smg p25AからＧＤＰの解離を促進する活性がウシ大脳可溶性画分に検出された。

２．smg p25A調節蛋白質の精製

ウシ大脳可溶性画分は既報の方法(5) で調整した。ウシ大脳可溶性画分をDEAE-Sephacel にてカラムクロマトグラフィーを行ったところ、0.3 Ｍ　ＮａＣｌで溶出される画分にsmg p25A調節蛋白質の活性がすべて検出された。この画分を硫安塩析し、透析後、このサンプルをMono Qでカラムクロマトグラフィーを行ったところ、大小２つの活性ピークを検出した。この２つのピークの関係は現段階では不明である。１つ目の大きなピークをAmicon PM-10フィルターにより濃縮し、Sepharose CL-6B でカラムクロマトグラフィーを行い単一の活性ピークを得た。これをsmg p25A調節蛋白質の部分精製標品とし、その性状を検討した。

３．smg p25A調節蛋白質の性状

smg p25A調節蛋白質はsmg p25AからのＧＤＰの解離を用量依存的に促進したが、smg p25AからのＧＴＰγＳの解離を促進せず、逆にsmg p25AへのＧＴＰγＳの結合を阻害した。この原因は不明であるがＧＴＰのsmg p25Aへの結合を促進するには、この蛋白質が何らかの修飾を受けるかあるいは他の因子を必要とする可能性が考えられる。ＧＤＰ解離促進の活性とＧＴＰγＳ結合阻害の活性はともにトリプシン処理あるいは60℃における熱処理により消失した。smg p25A調節蛋白質はsmg p25AのＧＴＰase 活性の促進はなく、それ自体ＧＴＰγＳ結合活性およびＧＴＰase 活性を示さなかった。このsmg p25A調節蛋白質にはc-Ha-ras p21 、rhoB p20およびsmg p21 に対するＧＤＰの解離促進、ＧＴＰase 活性促進、ＧＴＰの結合阻害の活性はいずれも認められなかった。smg p25A調節蛋白質の分子量はゲルろ過法とショ糖密度勾配遠心法から、それぞれ8.2 万と6.5 万と推定された。

[文献]


1) Garrett, M.D., Self, A.J., Oers, C.V., and Hall, A. (1988) J. Biol. Chem. 246, 10-13
2) Gibbs, J.B., Schaber, M.D., Allard, W.J., Sigal, I.S., and Scolnick, E.M. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 5026-5030
3) Hoshino, M., Clanton, D.J., Shih, T.Y., Kawakita, M., and Hattori, S. (1987) J. Biochem. 102, 503-511
4) Kaziro, Y. (1978) Biochim. Biophys. Acta. 505, 95-127
5) Kikuchi, A., Sasaki, T., Araki, S., Hata, Y., and Takai, Y. (1989) 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) Matsui, Y., Kikuchi, A., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y., and Takai, Y. (1988) J. Biol. Chem. 263, 11070-11074
8) Mizoguchi, A., Kim, S., Ueda, T., Kikuchi, A., Hirokawa, N., and Takai, Y. manuscript in preparation
9) Pain, V.M. (1986) Biochem. J. 235, 625-637
10) Sano, K., Kikuchi, A., Matsui, Y., Teranishi, Y., and Takai, Y. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 158, 377-385
11) Trahey, M., and McCormick, F. (1987) Science 238, 542-545

# 29 アストロサイトの産生するニューロン突起伸展因子について

森俊夫，○飯島昇，北畠克頭，高坂新一*

（アサヒビール中央研究所，国立精神・神経センター　神経研*）

〔要約〕

ラット胎児大脳半球ニューロンの突起を伸展する，ラットアストロサイト（As）由来の液性因子について検討した．この因子は，レクチン（WGA，$RCA_{120}$）と結合し，溶出画分に活性が回収されたことから，糖タンパク様の因子と考えられた．レクチン-アガロースより回収した活性画分は，加熱，プロテアーゼ処理にかなり安定であった．また，その活性は，抗ラミニン（LN）抗体で阻害されず，western blottingを行ってもLNは検出されなかったことから，因子はLNとは異なることが判明した．Asのconditioned mediumを80%硫安沈澱後，WGA-アガロース，FPLCによるゲル濾過を行ったところ，突起伸展活性は主として2つのピークに分画された．ほぼvoid volumeに溶出される最初の活性ピーク（peak Ⅰ）は現時点では未同定であるが，第2の活性ピーク（peak Ⅱ）にはwestern blotting等の結果から，$\alpha_2$-マクログロブリン（$\alpha_2M$）の存在が確認された．さらに市販$\alpha_2M$も突起伸展活性を示したことから突起伸展に対する$\alpha_2M$の関与が示唆された．

〔緒言〕

アストロサイトconditioned medium（AsCM）中には，ニューロンの突起伸展を促進する因子が存在することが知られている[1,2]．しかしながら，その液性因子の同定は必ずしも明らかにされていない．今回我々は，ラット胎仔大脳半球ニューロン突起伸展因子を明らかにするため，因子をレクチンアフィニティークロマトグラフィー，ゲル濾過により部分精製を行い，その同定を試みた．併せて，突起伸展活性が報告されている既知物質についても比較検討した．

〔方法〕

Asの分離・培養とCMの調製：Asは，新生1-3日令のSDラット大脳半球より調製し，McCarthy & de Vellisの方法[3]に従って精製した．培養は，10%FCSを含むダルベッコ改変イーグル培地（DME：0.1μg/ml ストレプトマイシン，10万単位ペニシリンを含む）で行った．Asがconfluentになったら，無血清培地（5μg/ml インシュリン，1μg/ml トランスフェリン，20nM ハイドロコルチゾン，0.3nM 3,3',5-トリヨード-サイロニンを含むDME，以下CDM）[2]で充分洗浄した後，無血清培地（20ml/75$cm^2$ flask）で24時間conditionし，AsCMとした．AsCMは硫安沈澱を行って使用した．

ニューロンの調製と突起伸展活性の測定：胎生17日令SDラット大脳半球より調製したニューロンを予めポリ-L-リジンコートした6穴カルチャーディッシュに$3x10^4$ cells/$cm^2$ で播種し，試料検体を含むCDMで培養した（37℃，5%$CO_2$）．2日後ニューロンを2% グルタルアルデヒドで固定し，その突起伸展活性を測定した．

突起伸展活性=｛（1$mm^2$ に存在する1細胞長以上の突起を有する細胞数）/（1$mm^2$に存在する細胞数）｝x100（%）

因子の精製：80%硫安沈澱により濃縮したAsCMをVolmanらの方法[4]に準じてレクチン-アガロースで分画した．WGA-アガロースに硫安濃縮液をアプライし，0.1M N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）で溶出されてくる活性画分をFPLC（Superose 6）で分画した．

〔結果及び考察〕

AsCMのニューロン突起伸展効果：胎生17日令SDラット大脳半球より調製したニューロンに，AsCMを25%（v/v）添加したCDMで培養した場合，無添加に較べて，ニューロンの突起伸展を著しく促進することが認められた（図1）．

レクチンによる分画：AsCM硫安濃縮液をWGA-，$RCA_{120}$-アガロースにアプライし，各々洗浄後，0.1M GlcNAc，0.1M ガラクトースで，溶出される画分に突起伸展活性が認められた（図2）．突起伸展活性ピークも280nmのピークと一致し

た．活性がレクチンとの結合性を有することから，この因子は糖タンパク様の因子であることが示唆された．

レクチンより溶出された画分の性質：WGA，$RCA_{120}$より溶出された活性画分は100℃，10分の加熱処理でも活性は80%以上保持され，トリプシン，プロナーゼ処理でも顕著に活性が低下しなかったことから，非タンパク性の活性部位を有すると推定された．一方，突起伸展活性の知られているLN[5,6]は，プロナーゼ処理で活性のほとんどが失われた．抗LN抗体を用いた阻害実験でも，レクチンより溶出された画分は，活性阻害を受けず，western blottingを行っても，各画分中にLNはほとんど検出できなかったことから，この因子はLNとは異なる因子であることが判明した．

突起伸展因子の精製：AsCMの80%硫安沈澱を，10mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）に透析後，同緩衝液で平衡化したWGA-アガロース（1x6cm）にアプライし，洗浄後，0.1M GlcNAcを含む同緩衝液で溶出した．活性画分を0.4M NaClを含む0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）に透析し，FPLC-Superose 6カラム（1x30cm）でゲル濾過を行ったところ，突起伸展活性は主として２つのピークに分れた（図３）．カラムのほぼvoid volumeに溶出されるピーク（peak Ⅰ）はaggregateの可能性もあるが，現時点では未同定である．一方，western blottingおよびstandardとのFPLC上でのretention timeの一致により少なくとも第２のピーク（peak Ⅱ）には$\alpha_2$-マクログロブリン（$\alpha_2$M）が存在することが明らかになった．さらに市販の$\alpha_2$Mも突起伸展活性を示したが，$\alpha_2$MはAsも産生するとされるほか[7]，ＩＬ－６，ＮＧＦ，ｂＦＧＦなど種々のタンパクと結合することが知られているため，peak Ⅱの突起伸展作用が$\alpha_2$Mの直接的作用によるのか間接的な作用によるのか，ニューロンの突起伸展に対する$\alpha_2$Mの関与が注目される．

## [文献]

1) Banker,G.A. (1980) Science 209,809 2) Müller,H.W.,Seifert,W. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81,1248 3) McCarthy,K.D. and de Vellis,J. (1980) J.Cell Biol. 85,890 4) Valman,G.N.,Narasimhan,S. and Leterte,M (1987) Molec.Immun. 24,871 5) Davis,G.E.,Klier,F.G.,Engvall,E.,Cornbrooks,C.,Varon,S. and Manthorpe,M. (1987) Neurochem.Res. 12,909 6) Lander,A.D.,Fujii,D.K. and Reichart,L.F. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82,2183 7) Gebicke-Haerter, P.J., Bauer,J., Brenner, A.and Gerok, W.(1987) J.Neurochem. 49 1139

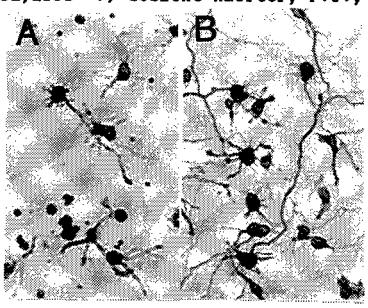



図１　突起伸展に対するAsCMの効果
Ａ：コントロール、Ｂ：AsCM

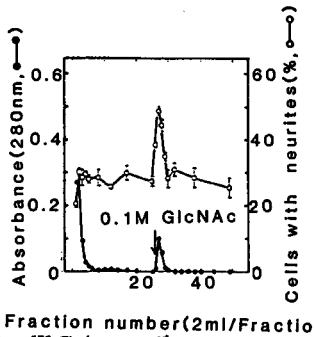



図２　ＷＧＡ－アガロースによる活性の溶出パターン

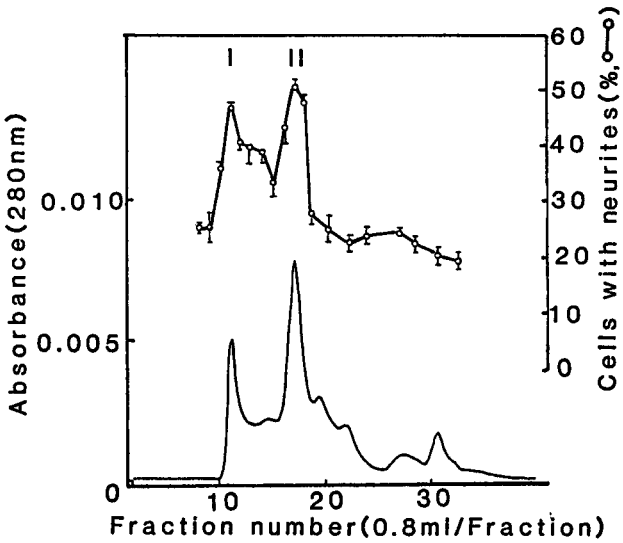



図３　FPLC(Superose6)による活性の溶出パターン

# 30　コリン作動性神経分化に関与する細胞内因子

水野意一、栗原堅三
〈北海道大・薬・薬剤〉

〔要約〕

神経芽細胞腫とグリア細胞腫のハイブリッド細胞ＮＧ１０８－１５にＣ６グリア細胞腫の培養液（ＧＣＭ）やレチノイン酸（ＲＡ）のような外因性分化誘導因子を作用させコリン作動性神経分化を誘導すると、細胞内にコリン作動性神経分化を担う高分子量の因子が発現することが示唆された。

我々は、副腎髄質由来の株化細胞ＰＣ１２に対してＣ６グリア細胞腫の培養液（ＧＣＭ）やレチノイン酸（ＲＡ）を作用させると、カテコールアミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素（ＴＨ）活性を増加させアドレナリン作動性神経分化を誘導する神経成長因子（ＮＧＦ）とは異なり、コリン作動性神経分化の指標となるアセチルコリンの合成酵素コリンアセチルトランスフェラーゼ（ＣｈＡＴ）活性が増加しコリン作動性神経分化を誘導することを報告した（１、２、３、４）。ＧＣＭやＲＡが誘導するコリン作動性神経分化は、コリン作動性の神経芽細胞腫とグリア細胞腫のハイブリッド細胞ＮＧ１０８－１５でもみられた。このようにＧＣＭやＲＡは、コリン作動性神経分化の機構を調べる上で有用である。またＧＣＭやＲＡのそれぞれの因子が同様なコリン作動性神経分化を誘導することは、細胞外からの異なる神経分化因子に対して細胞内にコリン作動性神経分化を誘導するための共通するシグナルをもつことを示唆する。そこで共通する経路を探索する目的で、本研究では異なる神経分化因子で刺激した細胞の細胞質画分を細胞内に導入することにより、ＣｈＡＴ活性に対する影響を調べ、コリン作動性神経分化に関与する因子について検討した。

実験方法

ＮＧ１０８－１５細胞は、３７ ℃、１０ ％$CO_2$存在下で５％牛胎児血清、１００ μＭ ヒポキサンチン、１６ μＭ チミジン、０.８ μＭ アミノプテリンを含むＤＭＥＭ中で培養した。細胞質画分は、ＲＡやＧＣＭを加えて２日間培養したＮＧ１０８－１５細胞あるいは刺激していない細胞のホモジネートを100,000 ｇで１時間遠心した上清を用いた。巨大分子の導入は、Nomuraらの方法（５）を改良し、単層培養下で行なった。直径３５ ㎜のディッシュでＮＧ１０８－１５細胞を培養後ＰＢＳ(-)で洗い、室温でL-α-リゾフォスファチジルコリン（リゾレシチン）とポリエチレングリコールを含む高張溶液中に浸漬させた。ＦＩＴＣ－デキストランあるいは細胞質画分などの巨大分子を含むＰＢＳ(-)に置き換えることにより細胞内に導入し、さらに培養液と交換した。コリン作動性分化因子の探索をするために、導入後２～４日間培養した細胞のＣｈＡＴ活性

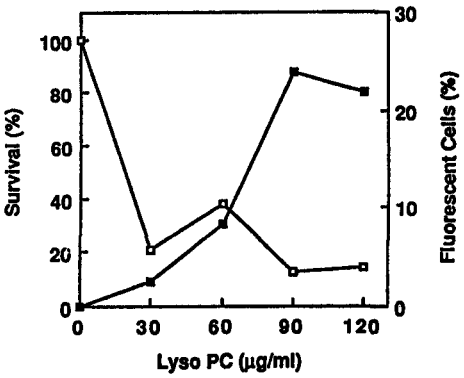



図１．L-α-リゾフォスファチジルコリンによるＦＩＴＣ－デキストラン導入に対するＮＧ１０８－１５細胞の生存率（□）と導入率（▦）
導入率は生存した細胞の中で蛍光を含む細胞の割合を示した。

を測定した。ＣｈＡＴ活性は、Fonnum法を改良した方法を用いた。

結果および考察

細胞内に蛋白質のような巨大分子を導入するために、細胞膜に対する透過性を増加させるL-α-リゾフォスファチジルコリンと浸透圧差を利用した方法（Osmotic Lysis）を用いた。ＦＩＴＣ－デキストラン（分子量約１万）により蛍光顕微鏡下で細胞内への導入率を調べたところ、ＮＧ１０８－１５細胞では生存率１０～２０％中の約２０～３０％の割合で細胞内に導入することが確認された（図１）。この方法を用いてＧＣＭ、ＲＡにより刺激したＮＧ１０８－１５細胞の細胞質画分と、刺激していない細胞の細胞質画分を、それぞれ刺激をしていないＮＧ１０８－１５細胞に導入して、ＣｈＡＴ活性に対する影響を調べた（図２）。培養液中にＲＡを加えて２日間培養したＮＧ１０８－１５細胞の細胞質画分を、５００μｇ／ｍｌの濃度で上記の方法により導入すると、刺激していない細胞の細胞質画分を導入した場合に比べて、導入後４日目でＣｈＡＴ活性は約２倍に増加した（図２－上）。また同様に２日間ＧＣＭで刺激した細胞の細胞質画分でも、ＣｈＡＴ活性は約２倍に増加し、その濃度依存性はＲＡで刺激した細胞の細胞質画分の場合とほぼ同程度であった（図２－下）。これらのことから、細胞外からの分化因子により細胞質に発現する内因性の因子が存在することが示唆された。これらの細胞質画分の導入によるＣｈＡＴ活性の増加は、導入後２日目にはみられ、以後この効果は持続した。導入後２日以内ではＣｈＡＴ活性の増加が顕著にみられなかったことから、ＣｈＡＴ活性の増加はＣｈＡＴ自身の導入によるものではないと考えられる。またこれらの細胞質画分を細胞外から作用させても、ＣｈＡＴ活性に変化が認められなかった。このことから、この因子は細胞質に残存するＧＣＭやＲＡあるいはオートクリンとして働く因子ではなく、細胞内で発現し、細胞内で分化を誘導する因子であることが示唆された。またゲル濾過による細胞質画分の分離から、分子量約６０Ｋと２０Ｋの２つの画分にＣｈＡＴ活性を増加させる因子が含まれることが判明した。現在この因子の精製を進めている。

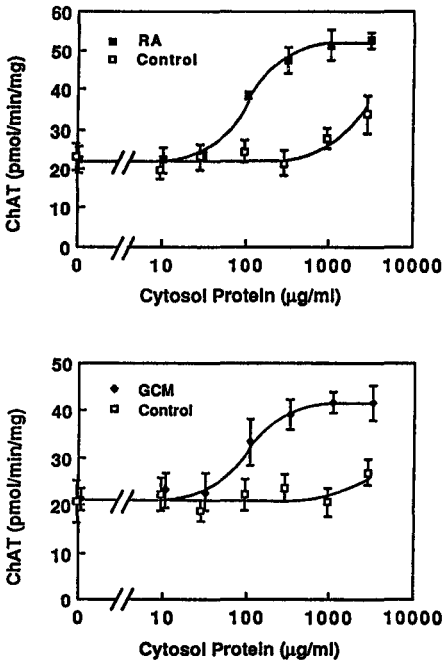



図２．ＲＡ、ＧＣＭで刺激した細胞の細胞質画分導入によるＮＧ１０８－１５細胞のＣｈＡＴ活性変化
ＣｈＡＴ活性は細胞質画分導入後４日目に測定した。

参考文献

1) Matuoka, I., Satake, R., and Kurihara, K. (1986) Dev. Brain Res. 24, 133-143
2) Matuoka, I., Satake, R., and Kurihara, K. (1986) Dev. Brain Res. 24, 145-152
3) Matuoka, I., Mizuno, N., and Kurihara, K. (1989) Dev. Brain Res. in press.
4) Mizuno, N., Matuoka, I., and Kurihara, K. (1989) Dev. Brain Res. in press.
5) Nomura, S., Kamiya, T., and Oishi, M., (1986) Exp. Cell Res. 163, 434-444

## 31　安定型アスコルビン酸（L－アスコルビン酸－2－リン酸エステルナトリウム塩）の初代培養神経細胞に対する作用

榊原　真人[1]、河瀬　恵信[1]、高坂　新一[2]
[1]昭和電工，生化研、[2]国立精神・神経センター神経研

〔要約〕

Ｌ－アスコルビン酸（以下ＡｓＡと略す）は、生体内において種々の生理作用、すなわち、コラーゲン合成、薬物代謝酵素活性、カテコラミン合成あるいはラジカルスカベンジャー等に関与していることが知られている。しかし、中枢神経系におけるアスコルビン酸の生理作用に関していまだ不明な点が多い。

ＡｓＡは中性溶液においてきわめて不安定であり、培養細胞においてＡｓＡの作用を検討することには種々の問題があった。そこで我々は、ＡｓＡの安定型として既に報告されているＬ－アスコルビン酸-2-リン酸エステルナトリウム塩（以下ＡＰＳと略す）を用いて、ラット胎仔大脳皮質の初代培養神経細胞におけるＡｓＡの作用を検索した。また、ＡＰＳの培養神経細胞における代謝動態も併せて検討した。その結果は以下の通りであった。(1) ＡＰＳ添加群では培養神経細胞の神経線維の収束が著明に亢進された。(2) ＡＰＳ添加群では培養神経細胞の生存率の増加が認められた。(3) 培養神経細胞中のＡｓＡ量の減少はＡＰＳ添加により抑制された。(4) $^{14}$Ｃ標識ＡＰＳを用いた実験から、培養神経細胞中ではＡＰＳの型でなくＡｓＡとして存在していることが示された。

以上のことから、ＡＰＳは培養神経細胞に対して線維の収束および生存率増加作用を有することおよびその効果は細胞中のＡｓＡ量の維持を介していることが示唆された。

ＡｓＡは生体内において重要な作用[1,2,3,4]を有する。しかし、ＡｓＡの作用を培養神経細胞で検討する上で問題となるのが、ＡｓＡは中性溶液においてきわめて不安定であることである。そこでＡＰＳを用いて培養神経細胞に対する作用を検討した。さらに、その作用機序を検索する一環として、添加したＡＰＳの培養神経細胞中の代謝動態を$^{14}$Ｃで標識したＡＰＳを用いて検討したので併せて報告する。

【方法】　ラット胎生１６日目の胎仔大脳皮質神経細胞の初代培養は既報の方法[6]により行った。ただし、牛胎仔血清（以下ＦＣＳと略す）濃度は１％とした。

１、培養神経細胞の形態におよぼす影響

神経細胞は培養用プレート(12well)を用いpoly-L-lysine でコートしたカバースリップ上に $2\times10^5$ 個／well蒔き、ＡＰＳを20～100 μＭ添加し４日間培養を行った。神経細胞の形態的観察は位相差顕微鏡および免疫蛍光染色により行った。免疫蛍光染色は、tubulin 抗体を用いＦＩＴＣ標識を行った。

２、培養神経細胞の生存率に対する作用

細胞数は培養用プレート(12well)に $1.5\times10^5$ 個／wellとし４日間の培養を行った。ＡＰＳ添加は10～2000μＭとし、ＡｓＡの 1～50μＭ添加との比較検討を行った。生存細胞数の計数は培養神経細胞を培養用プレートよりトリプシンを用いて回収し、 0.2％のトリパンブルーで染色した後、生細胞のみを血球計算盤で測定した。

３、培養神経細胞中のＡｓＡ量の経時的変化およびＡＰＳ添加の影響

細胞数は培養用プレート（6well)に $1.1\times10^7$ 個／wellとし、培養開始後０、２、４、２４、４８および９６時間目に培養神経細胞を回収し、細胞中のＡｓＡ量を分析定量した。また、ＡＰＳを 200μＭ添加群についても同様にＡＰＳあるいはＡｓＡ量の分析定量を行った。

培養神経細胞中におけるＡｓＡ量の分析定量は、ＨＰＬＣを用いたH.Nomuraら[7]の方法を改良して行った。分析の条件は、カラム Shodex Ionpak KC-811 、溶離液 0.5%$HClO_4$、流速 0.5ml/minおよび測定波長 239nmで行った。分析の前処理は、培養神経細胞をスクレーパーにより回収し、その後遠沈し、その細胞に 200μl の蒸留水を加えソニケーターで処理し、細胞を破壊粉砕した。その一部で蛋白定量を行い、残りを0.27M$HClO_4$ により除蛋白し0.22μm フィルターで濾過し、ＨＰＬＣ用試料とした。

４、培養神経細胞における$^{14}$Ｃ標識ＡＰＳの代謝動態

specific activity を151.2 μCi／mmolとした$^{14}$Ｃ標識ＡＰＳを、培養開始４日目の神経細胞に1μCi／ml mediumとなるように添加した。なお、 1μCi/ml は6.6mM と高濃度となるので曝露時間は１５分とした。また、培養条件は前項と同様とした。細胞中のＡＰＳあるいはＡｓＡの分析定量および放射活性はＨＰＬＣ－ラジオアナライザーにより放射活性ピ

ークの同定あるいは、液体シンチレーションカウンター（ＬＳＣ）により総放射活性を測定した。なお、$^{14}$Ｃ標識ＡＰＳは$^{14}$Ｃ標識ＡｓＡ(Ascorbic asid,L-[1-$^{14}$C]:NEN) を既報の方法[7]により合成した。

【結果】　形態変化：ＡＰＳを培養神経細胞に20μＭ添加し、神経細胞の凝集部を位相差顕微鏡で観察したものをFig.１-bに示した。ＡＰＳ20μＭ添加は対照（Fig.１-a）と比較して、神経細胞の凝集部から出ている神経線維において明かな収束亢進像が認められた。さらに、tubulin 蛍光染色を行った観察では、ＡＰＳ 100μＭの添加において突起のtubulin の染色性が増強されていた（Fig.２）。

生存率：ＡＰＳの培養神経細胞に対する生存率増加作用は、ＡＰＳ20～ 100μＭの添加において用量依存的に神経細胞の生存率を増加させ、 100～ 500μＭの添加においてその作用はプラトーとなった。しかし、1000μＭ以上の添加においては、その生存率の増加作用は減弱した。それに対して、ＡｓＡ添加群では 5μＭ以上の濃度で生存率が著しく低下し、50μＭに至ると生存細胞はほとんど認められなくなった。

細胞中ＡｓＡ量：培養神経細胞中におけるＡｓＡ量の経時的変化（Fig.３）は、培養開始後経時的に減少し４８時間後には 7.6%が残存するのみであった。それに対して、ＡＰＳ 200μＭの添加群では培養４８時間後においても開始時の59.2%のＡｓＡが残存していた。

$^{14}$Ｃ標識ＡＰＳの代謝動態：$^{14}$Ｃ標識ＡＰＳの添加において、細胞中のＡＰＳは検出限界以下であり、また、ラジオアナライザーによる測定においても、同様にＡＰＳのretention time（ＲＴ）に対応する位置に放射活性は全く認められなかった。一方、ＡｓＡのＲＴに対応する位置には吸光度のピークおよび放射活性が検出された。

【考察】　安定型ＡｓＡとしてＬ－アスコルビン酸－２－リン酸エステル類[5]（以下ＡＰと略す）があり、そのＡＰは安定性ＡｓＡとして線維芽細胞に添加しコラーゲン合成および分裂増殖について既に検討されている[8]。今回我々は、ＡＰのナトリウム塩であるＡＰＳを用いて中枢神経細胞におけるＡｓＡの作用をラット胎仔大脳皮質の初代神経細胞で検討した。その結果、ＡＰＳは培養神経細胞において神経線維の収束亢進作用および生存率の増加作用が認められた。これらの効果は前述の結果より、ＡＰＳの薬理作用ではなく細胞中ＡｓＡ量の維持を介して発現しているものと考えられる。上記２つの効果に対する作用機序は現在のところ全く不明であるが、収束亢進については細胞接着因子あるいは細胞骨格タンパクなどの合成あるいは化学的修飾を調節している可能性も考えられる。また、これらの効果がＡｓＡのラジカルスカベンジャーの作用にのみに基づいているとは考えにくく、神経細胞におけるＡｓＡの生理作用をさらに追求することは今後重要な課題と考えられる。

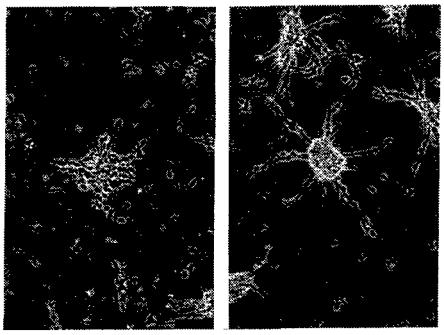



Fig.１　ＡＰＳの神経線維に対する作用
ａ：対照　ｂ：ＡＰＳ20μＭ添加

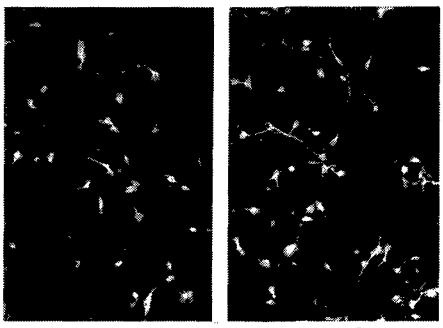



Fig.２　神経細胞のtubulin 抗体による蛍光(FITC)染色
ａ：対照　ｂ：ＡＰＳ 100μＭ添加

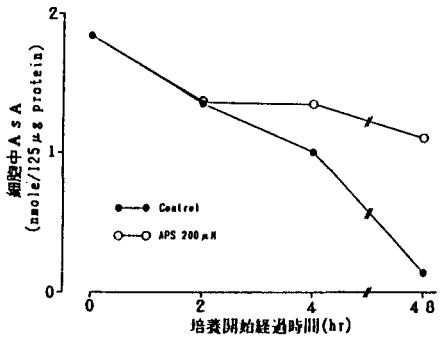



Fig.３　培養神経細胞中のＡｓＡ濃度

【参考文献】1)B.S.Gould,J.Biol.Chem. 232,637-649,1958. 2)V.G.Zannoni,et al.,Fed.Proc.,35,2464-2469,1976. 3)Y.Nakashima,et al.,Arch.Biochem.Biophys. 152,515-520,1972. 4)M.Scarpa,et al.,Biochim.Biophys.Acta 801, 215-219,1984. 5)美間博之、他、ビタミン 41,381-398,1970. 6)吉田一成、他、神経化学 26,211-213,1987. 7)H.Nomura,et al.,Chem.Pharm.Bull. 17,387-393,1969. 8)R.Hata,et al.,J.Cell.Physiol. 138,8-16,1989.

# 32 ラット中枢ニューロンの高酸素気相下における培養

畠中 寛、津久井弘子、西尾チカ
(大阪大学蛋白質研究所・蛋白質生合成部門)

〔要約〕 生後ラット(P11～13)脳から中隔野(Sep)とブローカ対角帯核垂直部(vDB)を含む領域のコリナージックニューロンを、神経成長因子(NGF)存在および非存在下に、インキュベーター内気相の酸素濃度を変えて培養した。培養下のコリナージックニューロンの生存維持はアセチルコリン合成酵素(ChAT)活性を指標として評価した。その結果、50%酸素気相下の培養では、NGFの存在非存在にかかわらず20%酸素(空気)気相の場合より顕著にChAT活性が高かった。一方、10%酸素気相では、きわめて低い値となった。以上の異なる気相酸素濃度によるニューロンの生存維持の違いは、NGFなどの神経栄養因子による生存維持作用とは異なる現象であると考えられる。50%酸素気相下での培養を出生前と後のラット(E18とP3)のSep+vDBで行い比較した。P3では、50%酸素気相下の方が20%の場合にくらべ、ChAT活性として高い値となり、E18では逆に低いChAT活性値を与えた。いずれの場合にも、NGFによる著明なChAT活性誘導は観察された。

脳は酸素消費量の極めて高いエネルギー多消費臓器としてよく知られている。またニューロンは血流で運ばれる酸素の一過性の低下に対して極めて脆弱であり、それによって不可逆的なダメージを受けることもよく知られている。これらのことはニューロンにおける酸素利用の特殊な仕組みの存在を予想させるものである。ここではニューロンを培養下におき、インキュベーター内気相を高酸素にすることにより、培地への溶存酸素量を増大させニューロンに対する酸素の影響を調べた結果を報告する。

【実験方法】

胚および生後ラット脳からSep+vDBを含む領域のコリナージックニューロンを既報(1)(2)(3)に従って培養した。用いたラットは、Wistar系 ST (♂、♀) であり、胚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。細断した組織をパパイン消化の後、表1では得られた生細胞を1ウェルに0.5ラット分として48-well plate(培養面積1cm²、polyethyleneimine-コート済)に、図2では横軸に示した濃度で、まいた。培地は、1μMのcytosine arabinosideを含み、NGF(100ng/ml)存在非存在下で7日間培養した。$CO_2$ incubatorはタバイ $N_2$-$O_2$-$CO_2$型(BNP-110M)を用いた。ChAT活性の測定は、前報(3)どおり簡易法を用いた。

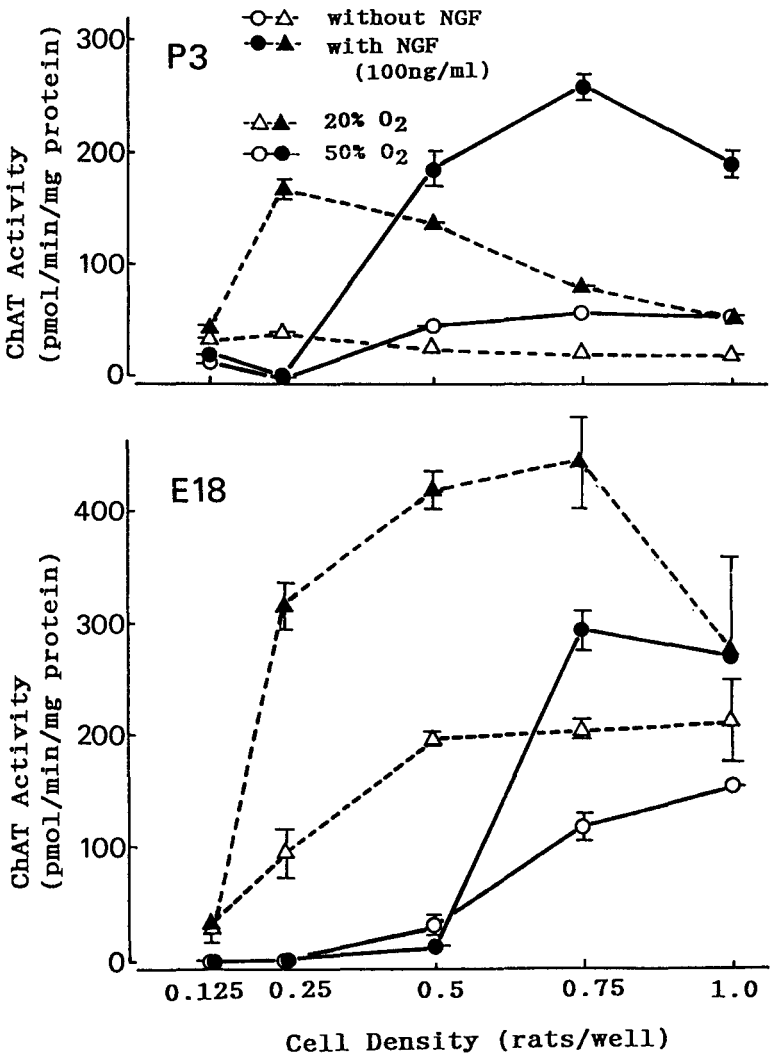
【結果と考察】

表1は、生後ラット(P11～13)脳のSep+vDBを含む領域からコリナージックニューロンを培養し、NGF存在および非存在下で、インキュベーター内気相の酸素濃度を10%、20%(空気)、50%と変えて培養し、7日後、ChAT活性を測定し、

表1．10%、20%(空気)、50%酸素気相下での生後ラット(P11～13)脳Sep+vDBコリナージックニューロンの培養

| Culture condition | Culture with NGF | ChAT Activitiy after 7-days Culture: total ChAT (pmol/min/well) | specific ChAT (pmol/min/mg protein) |
|---|---|---|---|
| **P13** | | | |
| 10% $O_2$ atmosphere | - | 0.87 ± 0.15 | 22.2 ± 4.4 |
| | + | 2.49 ± 0.69 | 63.9 ± 18.1 |
| 20% $O_2$ atomosphere | - | 1.56 ± 0.20 | 28.0 ± 2.1 |
| | + | 8.14 ± 1.64 | 153 ± 37 |
| **P11** | | | |
| 20% $O_2$ atmosphere | - | 1.02 ± 0.19 | 6.68 ± 1.06 |
| | + | 6.70 ± 0.46 | 44.2 ± 3.6 |
| 50% $O_2$ atomosphere | - | 2.33 ± 0.21 | 12.4 ± 1.3 |
| | + | 20.3 ± 2.1 | 110 ± 9 |

図1．50%と20%(空気)気相下での培養における出生前と後のラット(E18とP3)のSep+vDBコリナージックニューロンのNGFによるChAT活性誘導




これをコリナージックニューロンの生存数の指標とした(2)。その結果、50%酸素気相下の培養では、20%の場合よりNGF存在下およびNGF非存在下共に、顕著にChAT活性が高かった。一方、10%酸素気相の場合では、それぞれきわめて低い値に留まった。この培養系には切り出した脳組織からグリア系細胞も一部混じってくるが、それらは50%酸素気相下では、20%の場合とくらべ生育が困難であるように見えた。この結果は、生後ラット中枢ニューロンが、高い酸素濃度でも十分な生育が可能であり、むしろエネルギー代謝の高いニューロンでは、培養下でも高い酸素濃度に気相を保った方がよいことを意味している。また、このような異なる気相酸素濃度によるニューロンの生存維持の違いは、NGFによる生存維持作用とは独立した現象であると思われた。

図1に、発生段階の異なるラットよりSep+vDBコリナージックニューロンを培養し、高酸素要求性がどの段階で生じるかを調べた。出生前と後のラット(E18とP3)のSep+vDBを用いて50%酸素気相下での培養を行った。幼若な時期でのこれらニューロンはNGFによって強く分化が促進され、ChAT活性の誘導が生じる(3)。培養時の細胞密度を変えて調べてみると、P3では50%酸素気相下の方が20%の場合にくらべ、高いChAT活性を観察した。一方、E18では逆に50%では低いChAT活性しか得られなかった。いずれの場合にも、NGFによる著明なChAT活性誘導が観察されている。E18およびP3共に、薄い細胞密度での培養では50%酸素気相では細胞のほとんどが死滅し、酸素毒性の高いことを示している。

この研究で用いた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)。既に我々は、これらのニューロンの生存維持に必要なトロフィック因子として、NGFおよびIL-6の役割を明らかにしてきた(2)(5)。本報告は、これらトロフィック因子の作用に加えて、生後の成熟ニューロンにおける高い酸素消費、エネルギー代謝もまた、重要な問題点としてニューロンの生存維持に関わっていることを示唆するものである。ここで用いた生後中枢ニューロンの培養系はこれらの問題点解決を図れるすぐれた系の一つであろう。

【文献】 (1)畠中寛、津久井弘子、実験医学、6 (1988) 1211-1217.
(2)H.Hatanaka, H.Tsukui, I.Nihonmatsu, Dev. Brain Res., 39 (1988) 85-95.
(3)H.Hatanaka, H.Tsukui, Dev. Brain Res., 30 (1986) 47-56.
(4)畠中寛、池上司郎、有松靖温「脳の老化、ニューロンの生と死を考える」共立出版(1988)
(5)T.Hama, M.Miyamoto, H.Tsukui, C.Nishio, H.Hatanaka, Neurosci.Lett., in press.

# 33 生後ラット脳幹カテコールアミンニューロンの初代培養とＩＬ－６によるその生存維持作用

濱　登希子、宮本　真美、武井　延之＊、野口　かおり、九島　洋一＊＊、畠中　寛＊＊
（三菱化成生命研、脳神経科学、＊国立精神神経センター、＊＊大阪大学蛋白研）

〔要約〕

成熟ニューロンへ作用する神経栄養因子の探索を行う目的で、生後ラット脳幹の黒質部位を中心とした領域を用いた初代培養を行った。培養下にカテコールアミン（ＣＡ）ニューロンを抗チロシン水酸化酵素（ＴＨ）抗体を用いて同定した。また、この系での、インターロイキン６（ＩＬ－６）の効果について調べたところ、中隔野アセチルコリン（ＡＣｈ）ニューロンで見られたと同様に、ＣＡニューロンにおいても生存維持作用がみられた。

成熟ニューロンは、種々の神経栄養因子によりその生存維持が図られ、また損傷や変性に対しても、ある程度の修復が行われていると考えられている（1）。私達は、生後ラット中隔野ＡＣｈニューロンの初代培養系を用いて、その生存や、修復に関わる因子の探索を行い、ＩＬ－６にその作用があることを明らかにした（2）。さらにこの因子のニューロン特異性等を調べる為に、生後ラット脳幹からＣＡニューロンの初代培養を行い、抗チロシン水酸化酵素抗体で同定することにより、ＣＡニューロンへの作用を見る系を確立した。その結果ＣＡニューロンに対してもＩＬ－６の生存維持効果を見ることができたので報告する。

［実験方法］

生後ラット中枢ニューロンの培養は既に報告した方法に従って行った（3,4）。すなわち、生後９～１５日齢のラット脳幹から黒質を中心とする領域をクリーンベンチ内での実体顕微鏡下で取り出し、$O_2$ 通気Ｌ１５培地中に集めた。パパインで分散した細胞を４８マルチウエルプレート上にあらかじめまいておいたアストログリア細胞上に、$1 \times 10^5$ cells/well の濃度でまいた。用いた培地は、５％単胎児牛血清／５％馬血清／１％ラット血清／８９％ＤＦ（ＤＭＥ：Ｆ１２＝１：１）培地である。ＴＨ陽性細胞の検出は抗ＴＨモノクローナル抗体（5）を用い、パーオキシダーゼ・ジアミノベンチジンにより発色させることで行う。カテコールアミン含有量は、細胞を０．１Ｍ　ＰＣＡで破壊し、除蛋白後その上清をＨＰＬＣ－ＥＣＤ法により測定した。

ヒト・リコンビナント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提供していただいたものを用いた（6,7）。

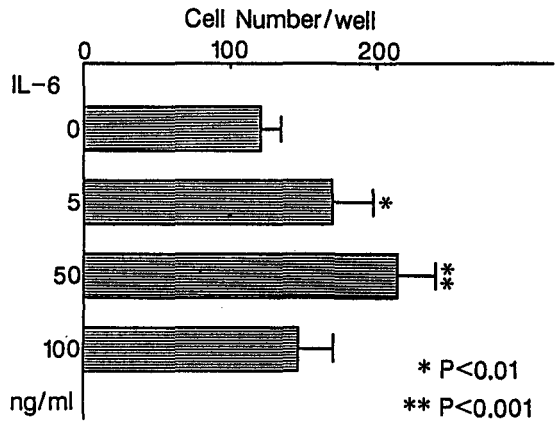



図１　培養脳幹ＣＡニューロンの生存に対するＩＬ－６の効果
生後１５日齢ラット中脳を用いてＩＬ－６の存在下、非存在下で６日間培養後、抗ＴＨ抗体によりニューロンを標識しカウントした。値は　ｍｅａｎ±Ｓ．Ｄ．　ｎ＝４。

［結果と考察］

生後１５日齢ラット脳幹部位を用い、種々の濃度のＩＬ－６存在下、非存在下で６日間培養し、抗ＴＨ抗体によりＣＡニューロンを同定し、その数をカウントした。図１に示すように、ＩＬ－６は濃

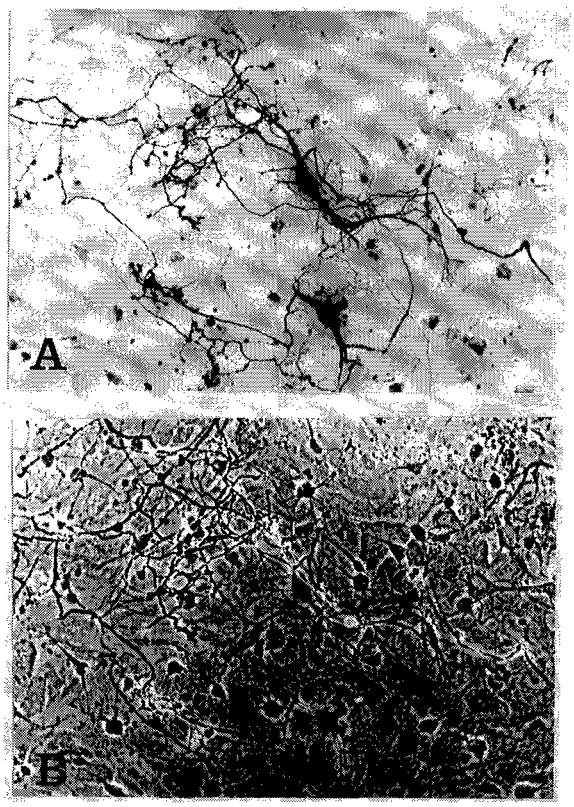



図2　　培養下の脳幹ＣＡニューロン
ＩＬ－６　５０ng/ml 存在下で４日間培養後の抗ＴＨ抗体によるＣＡニューロンの写真（Ａ）とその位相差写真（Ｂ）。

度依存的にＣＡニューロンの生存維持作用を持ち、その最大効果量は５０ng/ml であった。既に報告したＡＣｈニューロンと同様に、高濃度（１００ｎｇ／ｍｌ）のＩＬ－６はむしろ効果を落とした。この理由は不明である。ＩＬ－６存在下で培養したＣＡニューロンは十分によく突起を伸長し、成熟したＣＡニューロンの形態を保持していた（図２）。また同様に、その培養ニューロンのカテコールアミン（ＣＡ）含有量を測定したところ、ＣＡニューロンの数と相関して、ＩＬ－６の濃度依存的に増加していた。

以上のことから、ＩＬ－６は生後ラット中隔野ＡＣｈニューロンだけでなく、脳幹ＣＡニューロンにも生存維持作用があることが認められた。既に報告した中隔野ＡＣｈニューロンの場合（2）、アストログリア細胞上に培養したとき、ＩＬ－６の効果はあまり大きくなく、アストログリア細胞が少ない条件で強い効果がみられた。今回の報告では脳幹ＣＡニューロンは、アストログリア細胞の存在下でも、ＩＬ－６は強い効果を示すことが明かとなった。今後ＩＬ－６の中枢作用をさらに数々のニューロン系調べることによりその本質を明らかにしてゆきい。

［文献］
1) 武井延之、畠中寛、代謝, 24, 989-996 (1987)
2) Hama, T., et al., Neurosci. Lett., (in press)
3) 畠中寛、津久井弘子、実験医学, 6, 1211-1217 (1988)
4) Hatanaka, H., et al., Dev. Brain. Res., 39, 85-95 (1988)
5) Hatanaka, H., Arimatsu, Y., Neurosci. Res., 1, 253-263 (1984)
6) Hirano, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 5490-5494 (1985)
7) Hirano, t., et al., Nature, 324, 73-76 (1986)

［謝辞］
この研究を行うにあたり、御討論頂いた有松靖温先生（三菱化成生命科学研究所）に深く感謝致します。また、ＩＬ－６を快く御提供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。

# 34 ラット胎児脳シナプトソーム画分の５０Ｋタンパク

竹田　稔、碓井由美子、門福強樹、菅谷慶三、
藤森基次、門　蒂声、中村泰治(1)、佐藤永雄
（昭和大・医・第二生化、(1)薬・生物化学）

〔要約〕
加令に伴う中枢神経の様々な機能変化を解明する目的で我々は、加令によるシナプトソーム画分のタンパク質の質的変化に着目し、解析を試みた。SDS-PAGEによって各週令のラット脳シナプトソームに含まれるタンパクを分析すると、いくつかの移動度の異なったタンパクが存在する事が確かめられる。今回は胎児に特異的に存在する分子量50,000のタンパクについて部分精製を試み、その性質について若干の検討を行った。電気泳動法、ゲル濾過の組み合わせによりこのタンパクはSDS-PAGE上でsingle band にまで精製された。本タンパクはPAS 染色では染まらず糖鎖は含まないと考えられる。アミノ酸組成を調べると、極性度は43.1%で、tubulin,actin,Tau タンパク，NGF,EGF,FGF,等との類似性は認められない。このfetal 50K タンパクをTPCK-trypsin消化を行ない、HPLCにてペプチドフラグメントに分離後、partial aminoacid sequenceを調べてみると、hydrophobic なアミノ酸の連続した部分を持つ事が判明した。
コンピューターによるタンパクの一次構造の検索を行なうと、partial sequence と homology を示すタンパクは今のところ報告されていない。このタンパクを Neurolastoma の培養系に加えると、５ngでcellの増殖を約４倍に促進した

従来、加令に伴う脳の機能変化は神経伝達物質(1)、それらの合成・代謝酵素、アミロイド等(2)の沈着物質等の面から研究されてきた。我々は、各Age に特異的に出現するタンパクを同定し、中枢神経の老化に伴う様々な障害との関連性について解明する事を目的として研究を進めている。今回ラット胎児脳に特異的に存在し、老齢ラットでは認められない分子量５万のタンパクに着目しその部分精製を試みた。

＜実験方法＞

妊娠19～20日のラットより充分脱血後速やかに胎児を取り出し、脳を摘出する。0.5mM PMSF, 0.1mM FUT を含む0.32M sucrose 液にてホモジナイズ後、1,000g× 10 分の遠心上清を更に15,000 g× 20 分の遠心にてP₂画分を得る。この画分を低張液中にてホモジナイズ、超音波処理後105,000 g ×90分の上清を凍結乾燥したものをシナプトソーム可溶性画分として用いた。分析用電気泳動法は、0.1 %SDS を含む10%アクリルアミドゲルを用い、Laemmli の方法で行なった。分離用電気泳動は同様の方法で２×6.5 cmのゲル管を用いて行ない、目的とするタンパクを0.1 %SDS 溶液中に抽出した。アミノ酸組成は精製標品を６N HClを用い110 ℃ 20 時間の加水分解後Hitachi 835 アミノ酸分析計で行なった。ペプチドマップは ODS 120T カラムを用い、0.1 %TFA を含む５～70%の$CH_3CN$ のlinear gradient により行なった。アミノ酸配列は Applied Bio. 470-A Sequencer を用いて行なった。培養細胞に対する効果については Mouse neuroblastoma cell line(Neuro 2A) を用いて、10%FCS を含むDulbecco MEM中で行なった。

＜結果と考察＞

胎児および２年半生存のラット脳より調整したP₂画分低調処理上清画分のタンパクをLaemmli の方法に従ってSDS-PAGEにて分析すると、胎児では80K,50K,40K,34K 及び32K のタンパクが特徴的であるのに対し、老齢では78K,55K,38K,33K のタンパクが胎児では認められないタンパクであった。(Fig 1) これらのタンパクの中でfetal 50K タンパクが量的に多い事に着目して、このタンパクの精製を試みた。分離用電気泳動により凍結乾燥標品を分離後、50K に相当する部分のゲルを切り出し、0.1 %SDS 溶液中に溶出した。

この画分を0.1 %SDS を含む20mM Imidazole-HCl pH7.0にて平衡化したSephadex G-75 にてゲル濾過を行ない、Void volume直後のピークを回収すると、SDS-PAGEにてSingle Band として認められる。(Fig. 2) この画分から、Pre-packed detergent removing gel column(Pierce)を用いてSDS を除去した後にアミノ酸分析を行なった。分子量の近似な脳関連タンパクのアミノ酸組成と比較するとfetal 50K と α、βtubulin, β－actin, Tau protein 等とのホモロジーは認められない。この fetal 50K のTPCK-trypsin消化後のHPLC上での peptide mapは Fig. 3に示すようなパターンを示す。この中で量的に多いPeak Aについてアミノ配列を決定するとFig. 4に示すようなHydrophobic なアミノ酸の連続配列を示す部分を持つ事が明らかとなった。このような疎水性のアミノ酸の連続配列部分はアセチルコリンレセプター等[3] の膜結合性レセプターあるいは膜成分タンパクのAnchor部分を形成するために有効であると考えられるが fetal 50K タンパクがsynaptic membrane, synaptic vesicleあるいは可溶性画分に由来するか否かは確定しておらず、また全アミノ酸配列の決定していないため、局在性と機能についてはこれからの課題となる。このタンパク質の機能については全く不明であるが、培養細胞系を用いた実験では Neuroblastoma( Neuro 2A )の増殖に対して$10^{-8}$Mの濃度でコントロールに比して約４倍の増殖促進活性を示した。この活性が本タンパク質の本来の生理機能であるか否かは不明であるが、従来から報告されている NGF, FGF, EGF 等のGrowth factor とは異なったものであると考えられる。

(1) Mc Geer, E.G. (1978), Alzheimer's Disease (eds. Katzman R. et. al) Raven, N. Y.

(2) Glenner, G.G., (1984) Biochem. Biophy. Res. Commun. 120, 885～892

(3) Noda M., et. al. (1983) Nature, 302, 528～532

Fig.1

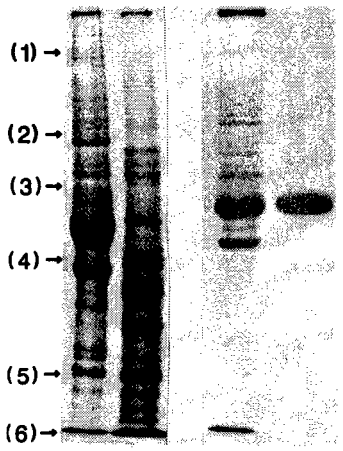


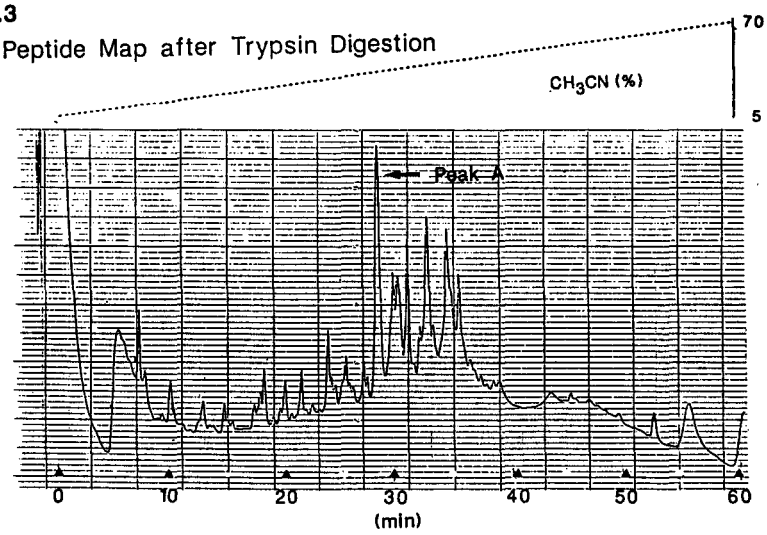

Fig.1,2 SDS-PAGE
(A),(C):Fetal Extract
(B):Old Extract
(D):Purified Fetal 50K

(1):220K Muscle Myosin
(2):94K Phosphorylase a
(3):68K BSA
(4):45K Ovalbumin
(5):30K Carbonic Anhydrase
(6):BPB

Fig.2

Fig.3

Peptide Map after Trypsin Digestion




TPCK-trypsin digestion : 3 hr
Column : ODS 120T
Elution : 5-70% $CH_3CN$ linear gradient in 0.1 %TFA
Flow : 1.0ml/min

Fig.4

Partial Amino Acid Sequence of Peak A

N-Phe-Ile-Val-Val-Ile-Leu-X-Pro-Phe-C

# 35 甲状腺ホルモンによる幼生オタマジャクシ知覚神経節内タンパク代謝の調節とストレスタンパクの誘導

安藤正人, Silvina Maines[1], Richard Hammerschlag[1]
(藤田学園保健衛生大・医・生理, [1]City of Hope, Beckman研・神経科学)

〔要約〕(1) オタマジャクシ (Tp) の変態climax期に示される後肢の伸長と劇的な尾の消失は血中甲状腺ホルモンの変動により調節されている. この時, Tp に注射した$^{3}$H-leucineは後肢知覚支配の後根神経節 (LG) 細胞内へ活発に取り込まれた. そこで, 外因性の$T_3$(0.3nmol/g-b.w.ip)でTp を刺激すると幼生期 (stage V-VI) Tpの未成熟なLG節細胞の分化・発達が加速されてタンパク合成の活性化 (4倍) と既に胎生期に成熟した神経細胞を含む尾知覚神経節 (TG) 内への抑制的な取り込みが特異的に示された. このように, 外因性の $T_3$で幼生Tpを刺激することによりclimax期Tp内の自発的な神経系の発達と退化の機能的な物質変動を実験的に誘発し得ることが明かとなり, Tp が神経発達研究の有用な材料の一つと考えられる. (2) 幼生Tpから摘出したLG 標本を$^{35}$S-methionineと伴にインキュベート (1時間) し, 更に二次元電気泳動法で分離したタンパクのフルオログラムからストレスタンパク (heat shock-like protein, HSLP)のスポットが25と68 kD (pI 6.5-7.0) に見いだされ, 何れのHSLPも外因性の$T_3$刺激には依存しなかった. LG内25 kD HSLPは更に1時間のプレインキュベーションで9倍に増大し, この時予め投与した $T_3$の反応性に対応して見られるin vitroの$^{3}$H-leucineの著明な取り込み効果 (8倍) は完全に消失した. 即ち, ストレスタンパクの誘導は神経組織の分化・発達過程でも普遍的に認められ, 併せて生理的な細胞応答を調節する可能性が強く示唆される.

〔序〕オタマジャクシ (tadpole, Tp) の変態 climax 期に示される特徴的な形態変化は後肢の伸長と尾の劇的な退化・消失が同時に進行し, この過程は血中甲状腺ホルモン (TH) レベルによって調節されている[5]. また, 幼生期 (~stage XI) のTpには後肢知覚支配の未成熟(immature)な第8-9後根神経節 (LG)と既に胎生期に成熟(mature)した神経細胞を含む第11-18後根神経節(TG)が共存している[2]. 従って, Tp内でプログラム化されたTHレベルの変動によって, あるいは外因生のtriiodothyronine ($T_3$)で誘発される後肢と尾の機能変化を指標にそれらを支える後根神経節内タンパク代謝の変動をin vivo及びin vitroの条件で$^{3}$H-leucineの取り込みによって比較検討した. また, 摘出したLG標本を$^{35}$S-methionine と伴にインキュベートした後, 電気泳動的に分離したタンパクのフルオログラムから新たにストレスタンパク(heat shock-like protein, HSLP) の誘導が見られたので神経組織の生理的なタンパク代謝との関連性を併せて考察した.

〔実験材料及び方法〕オタマジャクシ(R. catesbeiana)の変態過程は既報[4]に準じて区分した. 予め$T_3$(0.3nmol/g-b.w.,ip)投与して2日間経過した幼生から climaxに至る異なる発達段階の, あるいは未処置のTpに対し $^{3}$H-leucine (74KBq/g-b.w.,ip)を注射して90分の後, 摘出したLGとTG内へ取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した[1]. また, $T_3$刺激したTpから摘出した標本をin vitroの条件下で$^{3}$H-leucineあるいは $^{35}$S-methionine (9.25MBq/ml)と伴にインキュベート (60分, 22° C) しin vivoでの取り込みと比較した. $^{35}$Sでラベルされた LG標本はさらに二次元電気泳動法でタンパクを分離し, そのフルオログラムから新たに誘導されたタンパクを検索した[2].

〔実験結果及び考察〕(1) 幼生Tpの後根神経節内タンパク代謝に及ぼす$T_3$の合目的効果：幼生から climax期の自発的な変態過程のTpでLG内への$^{3}$H-leucine 取り込みの放射活性を比較すると図1下段に示すようにstage XIX-XXで著明な上昇ピークが見られた. このようにclimax期の血中TH変動に対応した後肢の機能的形態変化[5]に一致してLG内のタンパク合成も亢進したことから, LG神経細胞の発達の調節に TH が積極的に関与していることが考えられる. そこで, 外因性の$T_3$ で刺激したTpで同様な取り込みを比較するとstage V-VIの幼生期に一過性の増大効果 (4倍) が見られ (図1上段) しかもこの時, 尾支配の TG内へのアミノ酸取り込みは逆に抑制された (未掲載). つまり, 外因性の$T_3$刺激で幼生期に示される後根神経節のタンパク代謝の調節は, 自発的な変態 climax期に現されるそれを実験的に反映し, 対応した組織の機能的形態変化を支配するうえで極めて合目的な結果と言えよう. さらに TG と LGの相反した$T_3$に対する反応性がそれぞれ成熟あるいは未成熟な神経細胞の発達過程に起因する変動であることからも, Tpの変態過程の利用は神経発達研究の有用なモデル系の一つと考えられる. (2) In vitro インキュベーションによるLG内ストレスタンパクの誘導と$T_3$反応性：$T_3$刺激した幼生Tpから摘出した神経節標本を$^{3}$H-leucine と伴にインキュベートしたところ図2Aに示すようにLG内へは8倍に達する著明な取り込みの増大効果が, TGのそれは抑制傾向が見られた. このように, in vivo で示す$T_3$の反応性はin vitroの条件下で機能的に保たれていた. 次に, 両実験条件下に$^{35}$S-methionine

で各々ラベルしたLG標本タンパクを二次元電気泳動法で分離し，そのフルオログラムから$T_3$の効果を分子レベルで検討した．$T_3$ で誘導される特異的なスポットは検出されなかったが，何れのスポットも感光度の増強が見られた．つまり，$T_3$ がLG内の全タンパクの代謝系を亢進しアミノ酸基質の促進的な取り込みを伴って変態の加速が見られたものと解される．しかし，LG をin vitroでインキュベートすると$T_3$刺激には依存せず，見かけの分子量が 25と 68 kDで共に弱酸性(pI 6.5-7.0)のストレスタンパク(heat shock-like protein, HSLP)が新たに出現した（図3B,表1）．一方，既に成熟した節細胞を含むTGでは何れのHSLPも認められなかった[2]．ストレスタンパクの主な誘因が環境温度の上昇や金属イオン，ウイルスなどの刺激であるのに対して，今回認めた HSLPと同様に組織の損傷で誘導されるストレスタンパクが新鮮生体標本や細胞培養系で報告されている[3]．しかも，これらタンパクの誘導に伴って機能的な物質代謝が抑制されることが知られている[6]．そこで，プレインキュベーションを更に1時間行うと25 kD HSLPの誘導は9倍に増大し（図3C,表1）この時，図2Bで示すように未成熟な LG節細胞内への促進的な$^3$H-leucine の取り込み効果は完全に消失した．現在，in vitro の実験系を用いて幼若組織への種々のホルモンや分化促進因子の利用が盛んに行われているが，今回の結果はこうした条件下に附随して誘導されるストレスタンパクが神経組織の分化・発達過程でも普遍的に認められ，併せて生理的な細胞応答を調節している可能性を強く示唆したものと思われる．

〔謝辞〕このような機会を与えて頂いた藤田学園保健衛生大・医学部 永田 豊教授に感謝致します（NIH grant NS-18858の援助に依った）．

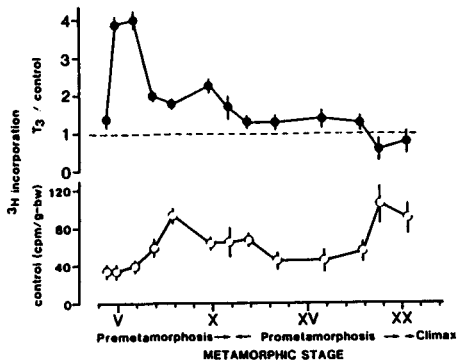



図1．Tpの発達過程（変態）に見られるLG内への$^3$H-leucine取り込みの変動

表1．ストレスタンパク誘導に及ぼすプレインキュベーションの影響
68 kD はpIの異なる(A-F)ファミリーとして出現した(CPM±S.E.)

| Gel spot (s) | I No preincubation | II Preincubation 1h, 22℃ | II/I |
|---|---|---|---|
| | Pulse-labeling: 1h, 22℃ | | |
| 25 kD | 34±4 | 310±65 | 9.1 |
| 68 kD | | | |
| A | 48±9 | 26±7 | 0.6 |
| B | 131±21 | 110±10 | 0.8 |
| C | 37±12 | 71±14 | 1.9 |
| D | 60±14 | 94±13 | 1.6 |
| E | not present | not determined | - |
| F | not present | not determined | - |

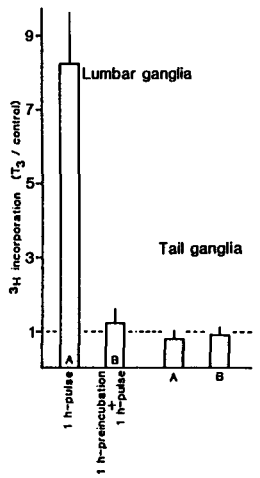



図2．LGとTG内への$^3$H-leucine取り込みに及ぼすプレインキュベーションの影響

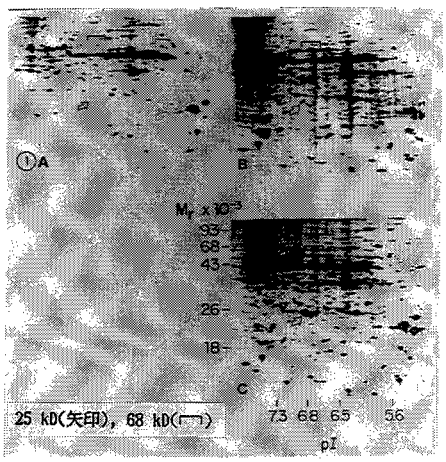



図3．In vivo(A)，in vitro(B)及びプレインキュベーション(C)で出現するLG内ストレスタンパク

〔文献〕(1)Ando, M. and Hammerschlag, R.(1989)Int. J. Dev. Neuroscience(in press) (2)Hammerschlag, R. et al.(1989)J. Neurosci. Res.(in press) (3)Schlesinger, M. J. et al.(1982)Heat Shock:From Bacteria to Man, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N. Y. (4)Taylor, A. C. and Kollros, J. J.(1946)Anat. Rec. 94:7-23 (5)White, B. A. and Nicoll, C. S.(1981) In Metamorphosis, pp363-396 Plenum Press, New York (6)Wolffe, A. P. et al.(1984)Exp. Cell Res. 154:581-590

# 36 分化成熟にともなうラット小脳タンパク質の変動解析と同定

田岡 万悟, 礒辺 俊明, 奥山 典生, 山国 徹＊
（都立大・三菱化成生命研＊）

〔要約〕
ラット小脳に存在するタンパク質の出生から成熟に至るまでの加齢にともなう変動を二次元ＨＰＬＣで解析し、また、その一部を分離同定した。1）68種類のタンパク質は出生時に既に存在し、以後、徐々に増加して成熟レベルに達した。これらのタンパク質にはクレアチンキナーゼ、乳酸脱水素酵素、ホスホグリセロムターゼなど、脳のエネルギー代謝に関わる一連の酵素群が含まれていた。2）グリコーゲンホスホリラーゼを含む12種類のタンパク質は出生時には検出されず、生後3-7 日で出現して増加し生後12日でほぼ成熟レベルに達した。3）25種類のタンパク質は生後3-12日で小脳内含有量が最大となり以後の発育にともなって減少した。生後３日および、７日に最大となり小脳の分化との関連が注目されたV-1 とV-2 タンパク質はいずれも低分子量の酸性タンパク質であり、既知のどのタンパク質とも異なる独特の一次構造を持っていた。

＜はじめに＞我々は小脳の分化成熟の過程での細胞の生化学的マーカーの検索、あるいは、分化に直接関連するタンパク質の同定を目的として、ラットの発育に伴う小脳のタンパク質組成の変動を二次元ＨＰＬＣシステムで系統的に追跡している。本報告では、小脳に存在する121 種類のタンパク質の変動を４つの様式に分類し、それぞれの型に属する典型的なタンパク質を同定した。また、上記の目的との関連で特に興味のもたれた２種類のタンパク質を分離精製し、その生化学的な性質を検討した。

＜材料と方法＞出生から生後180 日に至るラット小脳（湿重量100mg)を500 μl の25mMTris-HCl(pH7.5) 緩衝液中で磨砕した後、15000xg で60分間遠心分離し、得た小脳抽出液を直接2D-HPLC システム[4] に導入して各発育段階でのタンパク質をマッピングした。また、分取したタンパク質に対して生化学的な解析を行った。

＜結果と考察＞出生直後から生後180 日に至る一連のラット小脳から調製した粗抽出液を直接2D-HPLC システムで分離して作成したタンパク質マップには約170 種類のタンパク質が同定、検出された[1]。それぞれのタンパク質量は 0.1 -10 μg で、これらが抽出液中の全可溶性タンパク質にしめる含量は0.01-1 %であった。以上のタンパク質のうち、ピークの分離が不完全なものを除く121 種類のタンパク質について、発育にともなう量的な変動を追跡した。それぞれのタンパク質は、多様な変動様式を示したが、その様式は類型的には大きく４つの型（Ⅰ－Ⅳ型）に分類できた。すなわち、Ⅰ）出生時から存在し発育にともなって徐々に増加して成熟レベルに到達するタンパク質68種類、Ⅱ）出生時には存在せず、生後3-7 日で出現し生後12日までに成熟レベルに到達するタンパク質12種類、Ⅲ）出生時に既に存在し、生後3-12日で最大となり以後徐々に減少するタンパク質25種類、Ⅳ）発育に無関係に一定のレベルで存在するタンパク質16種類であった。それらの変動様式の典型的な例を図１に示した。Ⅰ－Ⅲ型タンパク質について2D-HPLC システムで分離して生化学的な解析を行った。Ⅳ型タンパク質はアルブミンを含み、末梢血由来のタンパク質であることが予想されたのでそれ以上の同定を行わなかった。

Ⅰ型タンパク質：68種類のⅠ型タンパク質のうち脳内含有量の多い(1%) 3種類のタンパク質について部分一次構造決定などを行い同定した。これらはそれぞれクレアチンキナーゼ (CK) 乳酸脱水素酵素(LDH) 、ホスホグリセロムターゼ(PGM) の脳型イソ酵素であり、いずれも脳のエネルギー代謝に関わるタンパク質であった。

Ⅱ型タンパク質：Ⅱ型タンパク質に属するV-12タンパク質は部分一次構造の解析からグリコーゲンホスホリラーゼ(GP)であると同定した[2] （図２）。GPは昨年度、加藤ら[3] により主としてアストログリアに存在することが報告されており、アストログリアの分化増殖との関連が注目される。

Ⅲ型タンパク質：25種類のタンパク質のうち１種類(V-1タンパク質) は生後３日で最大、１種類(V-2タンパク質) は生後７日で最大、残りの23種類は生後12日に最大となるものであり、これらのうちプルキンエ細胞の突起伸展、登上繊維とのシナプスの形成[1] など分化成熟との関連で特に注目されるV-1 とV-2 について解析を行った。V-1 とV-2 はGPが存在する第５番目のタンパク質マップ（図３）上に検出され、いずれも脳内含有量の低い（全可溶性タンパク質の0.01%）低分子量（分子量約12000)の酸性タンパク質（等電点約5.0)であった。アミノ酸組成を表１に示した。V-1 とV-2 はど

ちらもブロックされたN末端をもっていた。限定分解によって得たフラグメントの解析からV-1 タンパク質ではほぼ全長に匹敵する約100 残基、V-2 タンパク質では約90残基の一次構造を決定した。この一次構造から、NRBFデータベースで検索を行ったところ、有為な相同性を示すタンパク質は存在しなかった。すなわち、構造や、機能が未知の新タンパク質であると推定された。小脳神経系の分化成熟との関連とともに、特異抗体による組織分布の詳細な解析が今後の研究課題である。

図1

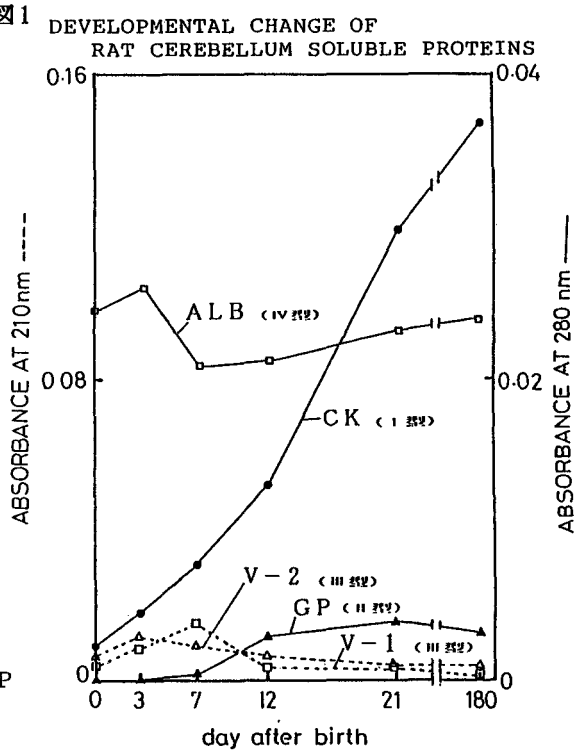



図2 V-12タンパク質の部分一次構造

```
V-12PROTEIN(M)ATLGLAAYGXGIRYEFGIFNQKIV
              : :::::::::: ::::::::::::::
Glycogen      M ATLGLAAYGYGIRYEFGIFNQKIV
Phosphorylase
```

図3

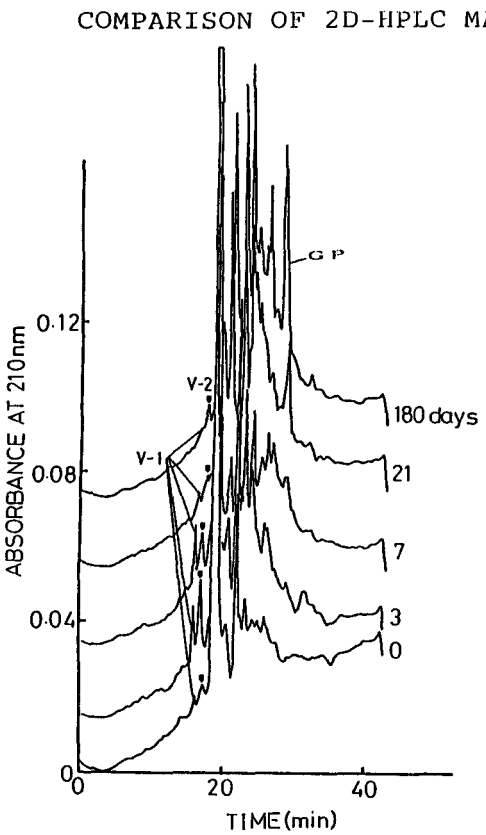



表1

| | V-1 PROTEIN | V-2 PROTEIN |
|---|---|---|
| AMINO ACID COMPOSITION | | |
| ASP | 17.21(17) | 10.3(10) |
| THR | 4.63(5) | 6.5(7) |
| SER | 3.64(4) | 9.4(10) |
| GLU | 11.63(12) | 6.2(6) |
| PRO | 3.48(3) | 4.7(5) |
| GLY | 9.96(10) | 9.9(10) |
| ALA | 11.21(11) | 12.7(13) |
| VAL | 5.37(5) | 6.5(7) |
| MET | 0.99(1) | 1.6(2) |
| ILE | 3.00(3) | 2.1(2) |
| LEU | 13.30(13) | 10.0(10) |
| TYR | 2.77(3) | 2.5(3) |
| PHE | 2.06(2) | 4.7(5) |
| LYS | 10.04(10) | 8.6(9) |
| HIS | 3.31(3) | 7.0(7) |
| ARG | 2.35(2) | 2.5(3) |
| TRP,CYS not determined | | |
| total | (104) | (109) |
| M.W. | 11K | M.W. 12K |

(1) Altman J.(1972)J.Comp.Neurol.145,399-464 (2) Christopher B.Newgard et al.(1988)263,3850-3857 (3) 加藤 兼房ら(1988)神経化学27,258-259 (4) 田岡 万悟ら(1988)神経化学27,256-257

# 37　ニューロン生存抑制因子の部分精製

内田洋子、朝長正徳
（都老人研臨床病理、東大脳研病理）

〔要約〕

新生ラット大脳皮質ニューロンの培養系を用い、AD脳では欠損しているニューロン生存抑制因子を正常老人脳より部分精製した。生存抑制因子の一つは、DEAE-Sephacelに吸着され200mM NaClで溶出される、分子量約20kDa（ゲルろ過による）の熱に安定な蛋白であった。

アルツハイマー病(AD)の脳ではニューロンが変性脱落する一方、老人斑やneurofibrillary tangle(NFT)、tau陽性curly fiberが多数出現する。そして、老人斑内の変性突起やtau陽性curly fiberは樹状突起からの異常なsproutingであるという仮説が出されている(1,2)。この研究の目的は、どのような機構でAD脳では異常なsproutingがおきるかを調べることであり、我々はこれまで、培養系を使って、AD脳ではニューロン生存抑制因子が欠損するため、見かけ上の栄養因子活性が高くなっていることを明らかにした(3,4)。今回は、このニューロン生存抑制因子を部分精製し、その性質を調べたので報告する。

＜方法＞

ニューロン生存抑制活性の測定：新生ラットより大脳皮質を取り出し、trypsin-DNaselでdissosiateして細胞を得た。Gelatin-polyornithine coatした6mmの micro plateに、1.75x10$^4$個の細胞をまき、無血清培地に抑制因子分画とAD脳抽出液(125 μg/ml）を加えて5日間培養した。培養後、パラホルムアルデヒドと90%メタノール・5%酢酸で固定し、ELISAでmicrotubule-associated protein 2(MAP2)レベルを定量した。生存抑制活性は、AD脳抽出液中の栄養因子活性の阻害の程度（％）で示した。

精製方法：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老人脳の灰白質を水でhomogenizeし（25％homogenate)、その遠心上清(20,000xg, 1hr)を限外ろ過後、DEAE-Sephacel、TSKG2000SWなどのカラムクロマトグラフィーで抑制活性を分離した。

＜結果＞

脳抽出液をAmicon YM-10 membraneで限外ろ過し、分子量10kDa以上の分画をDEAE-Sephacelにのせた。20mM tris HCl(pH 7.6)で洗った後、50-300mM NaClの直線勾配をかけると（図１）、正常老人脳では200mM NaClで溶出される分画に強い抑制活性が認められた。それに対して、AD脳の200mM NaCl溶出分画には抑制活性がほとんど認められなかった。200mM NaCl溶出分画をTSK G2000 SWでゲルろ過したところ（図２）、正常老人脳では、約20kDAの蛋白ピークに強い抑制活性が認められた。AD脳では約20kDaの蛋白ピークは小さく、抑制活性も極めて弱かった。正常老人脳から分離した抑

制因子(20kDa)の熱や酵素に対する感受性を調べたところ、抑制活性は100℃、5分間の熱処理に安定で、DNaseやRNaseでも失活しなかった。trypsin処理でも失活しなかったが、trypsin処理した抑制因子をもう一度ゲルろ過すると、13－18kDaと1kDa、さらに低分子の部分の3ヶ所に抑制活性が認められた（図3下）。このことから、20kDaの抑制因子は蛋白であろうと考えた。

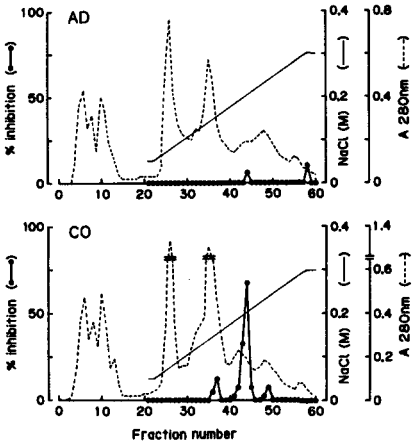



図1．抑制因子のDEAE-Sephacelクロマトグラフィー

<考察>

以上のことから、正常脳に存在するニューロン生存抑制因子の一つは、分子量約20kDaの熱に安定な酸性蛋白と思われる。正常脳では神経栄養因子と抑制因子が共存していて、異常なsproutingを抑えているのに対し、AD脳では抑制因子がなくなるため、ニューロンの代謝が亢進し、異常なsproutingをひきおこしている。その結果、NFTやtau陽性curly fiberが作られ、ニューロンはoverworkになり疲弊して死に至ると考えた。最近、dopamine(5)やacetyl-choline(6) CNS myelin(7)や砂嚢(8)由来の膜蛋白に突起伸展阻害作用があることが明らかにされた。しかし、これらはいずれもニューロンの生存は抑制しないことや、dopamineやacetylcholineは低分子であり、CNS myelinや砂嚢由来の膜蛋白は水に不溶であることから、我々の抑制因子とは異なると考えられる。

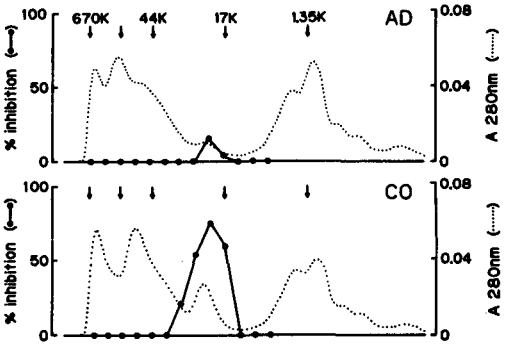



図2．TSKG 2000 SWカラムによるゲルろ過

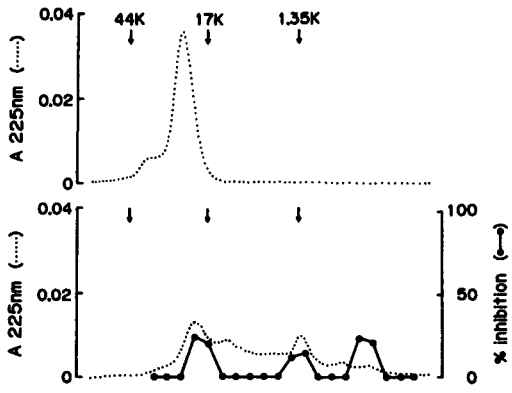



図3．trypsin処理した抑制因子のゲルろ過

<文献>

(1)Nukina,N. & Ihara,Y.: Proc.Jap.Acad., 58(b):284-292 (1983)
(2)Ihara,Y.: Brain Res.,459:138-144 (1988)
(3)Uchida,Y. et al.: Biochem.Biophys.Res. Commun.,150:1263-1267 (1988)
(4)Uchida,Y. & Tomonaga,M.: Brain Res.,481 :190-193 (1989)
(5)Lankford,K. et al.: Neurosci.,Lett.,75:169-174 (1987) (6)Lipton,S.A., et al.:Science,239:1293-1296 (1988) (7)Caroni,P.& Schwab,M.E.:J.Cell Biol., 106:1281-1288 (1988) (8)Taniuchi,H. et al.:J.Neurochem. 50:1572-1578 (1988)

# 38 Krabbe病の脱髄の病因に関する研究：マウスKrabbe病（twitcher）の培養オリゴデンドロサイト及びシュワン細胞を用いた検討

井田博幸，衛藤義勝
東京慈恵会医科大学小児科

〔要約〕

ヒトKrabbe病(GLD)の動物モデルであるtwitcherマウスからオリゴデンドロサイト及びシュワン細胞を分離培養しその in vitroの変化を経時的に検討した。培養オリゴデンドロサイトを抗ガラクトセレブロシド抗体で免疫染色したところ，コントロールマウスにおいては，オリゴデンドロサイトは突起延長，ミエリン膜の発育など，分化，成熟の所見が認められるのに対し，twitcherマウスにおいては分化，成熟は認められずむしろ退行変性した。培養シュワン細胞においては，コントロールマウスではその突起長は経時的に伸長するのに対し，twitcherマウスにおいては突起の伸びは停止していた。また，サイコシンの含量をミエリン及び坐骨神経で測定したところ，twitcher マウスではそれぞれ，約50倍，約80倍に増加した。以上の結果から，GLDにおける脱髄はミエリンを形成する膜及び突起から始まり，これら形態的変化には，サイコシンが重要な役割を果たしていると考えられた。

〔目的〕

GLD(Globoid cell leukodystrophy)は著明な脱髄を生化学的，病理学的特徴とする小児脳変性疾患の1である。その脱髄の成因として本症で欠損しているβ－ガラクトシダーゼの基質であるサイコシン(galactosylsphingosine)が蓄積するためと報告されているが，その詳細については明らかではない。今回我々は本症における脱髄の成因及び過程を明確にする目的で，ヒトGLDの動物モデルであるtwitcherマウスからオリゴデンドロサイト及びシュワン細胞を分離，培養し，その変化について検討した。

〔対象及び方法〕

臨床症状及びβ－ガラクトシダーゼの欠損により診断した日令30のtwitcherマウス及びコントロールマウスからオリゴデンドロサイトとシュワン細胞を分離した。オリゴデンドロサイトの分離はパコール濃度勾配法を用い[1]，またシュワン細胞は坐骨神経をトリプシン，コラゲナーゼ処理をして得た[2]。そしてそれぞれ，10％FCSを含むMEM培地にて培養した。

オリゴデンドロサイトについては，抗ガラクトセレブロシド抗体で染色して，その形態的変化を検討した。定量的にその変化を検討するため，その染色パターンにより突起をほとんど有さないtype 1，突起は存在するが膜様物をもたないtype 2，膜様物が存在するtype 3に分類し[3]，それぞれの分布を数量化した。シュワン細胞については，Process Index ($= \frac{\text{突起長}}{\text{細胞体長径}}$)を経時的に測定した。サイコシンの定量は，0－フタルアルデヒドで螢光化したサイコシンを高速液体クロマトグラフィーを用いて行なった[4]。

〔成績〕

培養オリゴデンドロサイトは，培養6日後より突起を伸ばしはじめたが，type 1がコントロール，twitcher マウスともに50％前後を占め，その分布に差異は認められなかった。しかしながら，培養14日目になると，コントロールマウスにおいては突起はよく伸び網状構造を示し膜様物を有するtype 3が約50％出現するのに対し，twitcher マウスでは，type 3は10％と少なくtype 2が50％を占めていた。しかもこれらtype 2の細胞突起は細く針金状で網状構造の形成は不良であった。培養22日目になると，コントロールマウスではtype 3が80％とそのほとんどを占めるのに対し，twitcher マウスではtype 1が50％，type 3は10％にすぎなかった。又一部では細胞体自体の染色性も不良であった。

シュワン細胞のProcess Indexについては，培養8日目では，コントロールマウス2.0，twitcherマウス1.6とほぼ

同様であった。しかしコントロールマウスでは培養13日目で3.2，20日目で6.4，28日目で9.2と増加するのに対し，twitcherマウスでは培養13日目で1.7，20日目で3.6，28日目で3.1と変化が認められなかった。

分離したミエリン及び坐骨神経の糖脂質，リン脂質，サイコシン濃度を測定したところ，糖脂質，リン脂質では，コントロールマウスとtwitcherマウスの間に明らかな差異は認められなかった。しかしながら，サイコシンはtwitcherマウスのミエリン及び坐骨神経では，コントロールマウスのそれぞれ約50倍，約80倍の増加が認められた。（ミエリン：コントロールマウス2.7 ng／mg protein，twitcherマウス130 ng／mg protein．坐骨神経：コントロールマウス6.7 ng／mg protein，twitcherマウス420 ng／mg protein）。

〔考察〕

従来，twitcherマウスの培養神経細胞については細胞の変性，数の減少が報告されてきたが，その詳細については明らかではなかった。今回の我々の検討によりtwitcherマウスの培養オリゴデンドロサイトはミエリンを形成する膜様部，ついで突起より変性が始まり，ついには細胞体が変性することが明らかとなった。培養シュワン細胞についても突起伸長不良が明らかとなり，サイコシンの著明な蓄積が認められた。

以上の結果からミエリンを形成する細胞膜の変性，消失がGLDの脱髄の第一段階と考えられ，これら変化は細胞毒性を有するサイコシンの蓄積により惹起されることが推察された。

(REFERENCES)

1.Hirayama,M.,Silberberg,D.H.,Lisak,R.P., and Pleasure,D.(1983) J.Neuropath.Exp. Neurol. 42,16-28

2.White,F.V.,Ceccarini,C.,Georgieff,I.,Mathieu,J.M., and Costantinu,C. (1983) Exp.Cell Res. 148,183-194

3.Kuhlmann-Krieg,S.,Sommer,I., and Schacherner,M. (1988) Dev.Brain Res.39,269-280

4.Shinoda,H.,Kobayashi,T.,Katayama,M.,Goto,I., and Nagara,H. (1987) J.Neurochem. 49,92-99

# 39 myelin deficient (mld) 変異におけるMBP遺伝子再構成機構の解析

岡野栄之、有賀純、中川敏幸、御子柴克彦
(阪大・蛋白研・機能制御)

〔要約〕
myelin deficient (mld)は、常染色体性劣性の遺伝様式を取る変異であり、ミエリン塩基性蛋白質(Myelin Basic Protein; MBP)遺伝子内に再構成を伴い、shiverer 変異と同座性を示す。コスミドライブラリーによる正常及びmldのMBP遺伝子座全領域の遺伝子歩行及び組換え部位の構造解析をおこなった。mld遺伝子座は、重複、逆位、未知のスペーサー配列の挿入を伴い、複数のrecombinationの産物であると考えられた。このうち、exon3から7までを含む領域の逆位は、同様の領域の欠失を伴うshiverer変異の形成機構(Z型DNAを介したhomologous recombination)とは異なり、DNA topoisomersaeII.あるいはスイッチrecombinase 様の酵素活性による非相同組換えによるものと考えられた。

myelin deficient (mld) ミュータントマウスは、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP) 遺伝子の発現障害に伴う中枢神経系のミエリン形成不全を特徴とし、MBP遺伝子の欠失変異であるshiverer (shi)変異と同座性を示す(6)。mld 遺伝子座においては、MBP遺伝子は直列の重複変異を示し、intactな遺伝子(gene-2)が下流に、再構成を伴うもの(gene-1)が上流に存在する。上流の遺伝子内では、exon3からexon7までを含む領域が逆転していることが知られている(7,8)。本研究では、mld遺伝子座におけるMBP遺伝子の再構成機構およびmld脳内で観察されるMBPのモザイク発現のメカニズムを明かにする第一歩として、コスミドによる正常およびmldのMBP遺伝子全領域にわたる遺伝子歩行を行い、詳細な制限酵素地図作製と塩基配列決定により、組換えを起こしている部位(recombination point)周辺の構造解析を行った。

[実験方法]
1.正常マウス (C57/BL)およびmldマウス肝臓DNAからのコスミドライブラリーの作製は、lorist Bをベクターとして、Littleらの方法(2)に従って行った。
2.塩基配列の決定は、Sangerらの dideoxy法(9)に従って行った。

[実験結果]
遺伝子歩行; 約110kbにわたるmld遺伝子座のほぼ全領域は、部分的にoverlapする領域を有する4つのコスミドクローンおよび3つのファージクローンに分断されてクローニングされた (図-1)。野生型正常MBP遺伝子の構造遺伝子約32Kb, 5'側 約30kb, 3'側 約30kbを含む約9.0kbの領域が、部分的にoverlapする5つのコスミドに分断されてクローニングされた。
逆転部分の3'側境界領域; 下流遺伝子(gene-2)と上流遺伝子 (gene-1)の5'側の制限酵素地図を詳細に検討した結果、recombination point は、PvuII-BglII断片内に存在すると考えられた (図-2a)。この領域の塩基配列を決定することにより、recombination pointは、PvuIIより169bp 上流に位置すると結論された。このrecombination point (point-Aとする) の上流約5kbにはgene-1由来の逆転したexon-3が存在するものの、第2イントロンの配列は直接にはpoint-Aとは接続せず、約1.6kb のスペーサー配列 (X領域とする) が存在していた。このX領域の由来は、正常MBP遺伝子座以外の未知の配列であった。
逆転部分の5'側境界領域; mldのgene-1と正常MBP遺伝子の第2イントロンの制限酵素地図の比較及び塩基配列の決定により、逆転部分の5'側境界領域は、正常MBP遺伝子のexon-3の上流約1.3kbに相当する部位であると結論された。従って、第2イントロンの約2.6kbの配列は、逆転部分の5'側と3'側においてinverted repeatを、gene-1とgene-2の第2イントロン間でdirect repeat を形成していることが明かとなった (図-1内の矢印)。

[考察]
shiverer遺伝子座に於ける遺伝子再構成は、Z型DNAを介した相同組換えによる1回のrecombinationによると考えられている(4)。一方、mld座の形成は、重複、逆位、X領域の挿入を伴い、複数回のrecombinationの産物であり、recombination pointの両側には、特に相同性がないため、非相同組換えの一型であると考えられた。非相同組換えの考えうる機構として、1. DNA topoisomeraseIIを介した多重組換え、 2.特殊なrecombinaseによるものが考えられた。point-A周辺の塩基配列を、Gen Bankを用いてhomology searchをおこなったところ、後者の考え方を支持する結果を得た。即ち、免疫グロブリン重鎖遺伝子のスイッチ領域と相同な配列が、point-A周辺に散在していた (図-3a)。ま

た、point-Aのすぐ５’側には、TCCTGG A(T/G)Aという配列が存在していた（図-3b)。この配列は、生殖細胞型免疫グロブリン重鎖$C_\mu$遺伝子とCγ2b遺伝子のrecombination pointのすぐ５’側にも存在することが、Tonegawa(10)らにより報告されており、スイッチrecombinaseの認識部位の重要なcandidateと考えられている。mld座にこのような配列が認められたことは、スイッチrecombinaseの組織及び塩基配列特異性を考える上で重要であると考えられた。免疫グロブリン重鎖のスイッチrecombinationには、欠失型と逆位型が知られており(1)、このような酵素活性が、mld座の形成のうちで、逆位に関与している可能性が考えられた。mld座の形成のうちで、重複の機構に関しては、さらに正常MBP遺伝子を含む、遺伝子の５’側と３’側の相同な領域の検索等の解析がさらに必要であると考えられた。

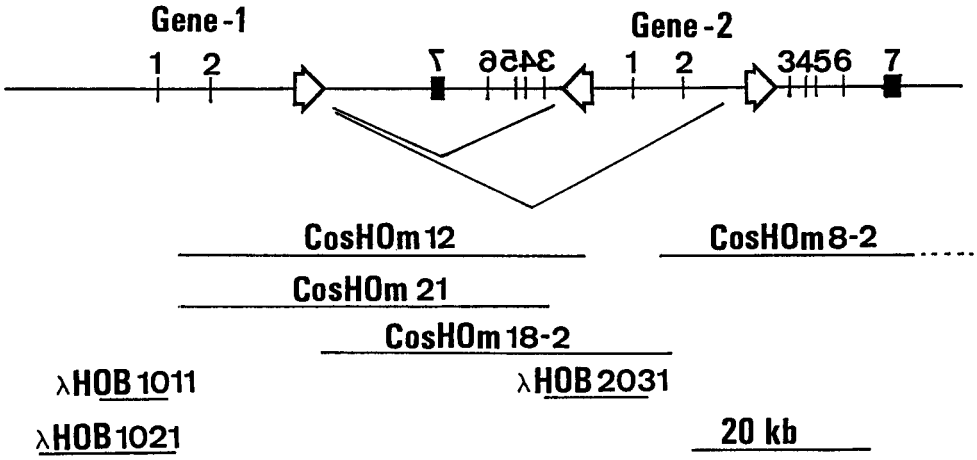



図-1 コスミドとファージによるmld遺伝子座全領域の遺伝子歩行

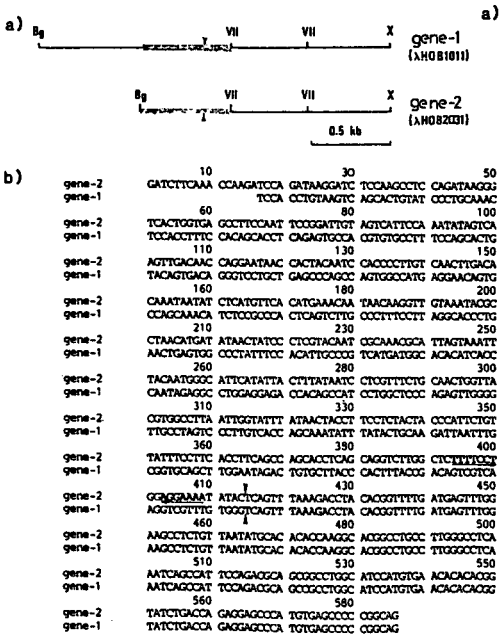



図-2 逆転領域３’側 point-A 周辺の制限酵素地図 a）と塩基配列 b）

a)

mld MBP (gene-1,2) Switch region of Ig Heavy Chain $C_{\gamma 1}$ 509 ATTCCAGACgCAGCgGCCT GGCA 531 / 3 ATTCCAGACcCAGCaGCCTaGGCA 26

mld MBP (gene-2) intron of Ig Heavy Chain $C_{\gamma 2b}$ 356 CCTTCacCTTCAGCCAgcACCTC 378 / 1350 CCTTCcaCTTCAGCCAtgACCTC 1372

mld MBP (gene-1,2) Switch region of Ig Heavy Chain $C_{\gamma 3}$ 501 AATCAGCCAttCCAGACgCAG 521 / 5512 AATCAGCCAagCCAGACcCAG 5532

mld MBP (gene-2) Switch region of Ig Heavy Chain $C_{\gamma 3}$ 356 CCTTCacCTTCAGCCAgcACCTC 378 / 3996 CCTTCtgCTTCAGCCAcgACCTC 4018

b)

mld MBP (gene-2) TTTTCCTGGAGGAAAATATACTCAGTTTAAA

Ig $C_\mu$ (Embryonic) TACTTCCTGGTTGTTAAAGAATGGTATCAAA

Ig $C_{\gamma 2b}$ (Embryonic) GAGTCCTGGGGGCCAGGAGAGTTGTCCGATT

Ig $C_{\gamma 2b}$ (MOPC141) TACTTCCTGGTTGTTAAAGAATTGTCCGATT

図-3 point-A 周辺における免疫グロブリン重鎖遺伝子スイッチ領域と相同な配列。mld MBP gene の塩基の番号は 図-2bに対応する。

【文献】

1. Jack,H.J. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1581-1585
2. Little,P.F. (1987) DNA cloning III (IRL press) pp.19-42
3. Mikoshiba,K. et al. (1987) Dev. Brain Res. 35, 111-121
4. Molineaux,S.M. et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7542-7546
5. Naito,A. Naito,S. and Ikeda,H. (1984) Mol. Gen. Genet. 193, 238-243
6. Okano,H. et al. (1987) J. Neurochem. 48, 470-476
7. Okano,H. et al. (1988) EMBO J. 7, 77-83
8. Popko,B. et al. (1988) Neuron 1, 221-225
9. Sanger,F. et al. (1980) J. Mol. Biol. 143, 161-178
10. Tonegawa,S. et al. (1981) Cold Spring Harbor Symp. Quat. Biol. 45, 839-858

## 40 Myelin-associated glycoprotein (MAG) mRNA の脱髄および再生モデルにおける発現

藤田信也、佐藤修三、栗原 正*、石黒英明、桑野良三*、崎村建司*、高橋康夫*、宮武 正
（新潟大・脳研・神経内科、*神経薬理）

〔要約〕

マウス myelin-associated glycoprotein (MAG) mRNAの発現を cuprizone による実験的脱髄および再生モデル脳で検討した。脱髄期において、MAG 及び 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) mRNA の発現は一様に抑制されていた。神経細胞のマーカーである neuronspecific enolase (NSE) 及びアストロサイトのマーカーである S-100β mRNA の発現は不変であり cuprizone による脱髄が oligodendrocyte の障害に基づくことが分子レベルで証明された。再生期において２種類の MAG mRNA の発現を検討した結果、45base の exon 12 が splice out した幼若型の MAG mRNA が再生初期に発現され、脱髄後の再生においても幼若型の MAG が何らかの役割を果たしていることが示唆された。

Myelin-associated glycoprotein (MAG) は分子量約10万の糖蛋白で、含有量はミエリン蛋白の１%程度であるが、神経軸索周辺に集積しており、軸索とミエリン両者の接着に重要な役割を果していると考えられている。ラットの MAG の遺伝子は、13個の exon を含む約16kbのもので、ひとつの遺伝子から終止コドンを含む 45base の exon12 の alternative splicing により２種類の mRNA が生じることが知られている。そして、この２種類の mRNA から２種類のポリペプタイドが生じると考えられている。我々は、マウスについて MAG の cDNA クローニングをおこない、得られた cDNA と２種類のmRNA に特異的に反応する合成プローブを使って正常及びquaking マウスの発育に伴う発現を検討してきた[1)2)3)]。その結果、幼若期に発現する exon12 を含まない mRNA から作られる大きな分子量の MAG がミエリンの形成に重要ではないかと考えるに至った。今回は、実験的脱髄及び再生モデル動物を cuprizone によって作成し、脱髄と再生における MAG mRNA の alternative splicing による発現を検討した。

（方法）

Blakemore[4)]の方法に従い、生後３週令のオスの ddY マウスに 0.7% の cuprizone を７週間投与し脱髄期とした。その後普通エサにもどして再生期とした。各週に３匹ずつの全脳からそれぞれ total RNA を調製し、10μg を slot blotting した。マウス MAG cDNA のほかに、マウス CNP、ラット NSE、ラット S-100β の cDNA のフラグメントを神経組織の各細胞のマーカーとして用いた。 MAG の２種類の mRNA に特異的なプローブとして 45 base の exon12 と相補配列の合成プローブ (P45) 及び exon 12 の外側の両方を合わせた 25base の相補配列の合成プローブ (P25) を使用した。

（結果）

Cuprizone 投与群は、非投与群に比べ 30-50% の体重減少を認めた。電顕的に、脱髄４週において上小脳脚部に著明な脱髄を認め、再生２週においてミエリンの再生を確認した。脱髄期において control に比し MAG 及び CNP mRNA の発現は著しく抑制された。一方、NSE 及び S100β mRNA の発現は不変であった（図.a）。再生１週より MAG mRNA の著明な発現増加を認めた。Exon 12 を含む成熟型の MAG mRNA (P45) の発現も増加したが、幼若型の MAG mRNA (P25) により強い増加を認め、再生４週ではその発現は減少していた(図.b)。

（考案）

既に我々は、マウスの MAG mRNA の発現を正常及びミエリン形成不全マウスである quaking マウスについて検討してきた[1)3)]。その結果、２種類の MAG mRNA のうち exon 12 を含まない mRNA がミエリン形成の最も盛んな

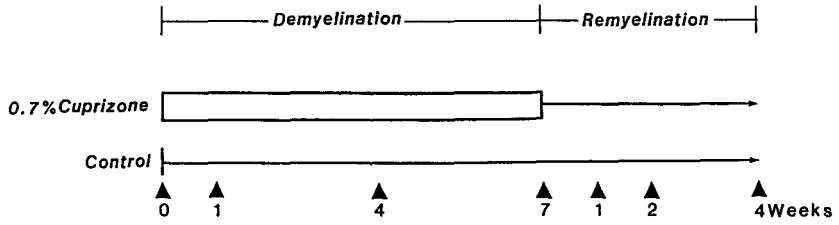
時期に多く発現し、exon 12 を含む mRNA はそれより遅れて発現することが分かった。 Quakingマウスでは幼若型の mRNA は発現しておらず、成熟型の mRNA のみが過剰に発現されており、MAG の alternative splicing の機構が損なわれている可能性が示唆された。これらのことより、exon 12 が幼若期に splice out される機構がミエリンの形成に重要な役割を果していると考えられた。Cuprizone は、従来から oligodendrocyte を直接障害し脱髄を引き起こし、更に投与中止によりミエリンの再生をおこすことが知られている。脱髄期においてoligodendrocyte に特異的な MAG と CNP mRNA の発現のみが減少していたことは、この事を分子レベルで証明できたと思われる。ミエリンを直接障害するモデルでも、このような細胞のマーカーを用いて脱髄の病態を分子レベルで検討していきたい。

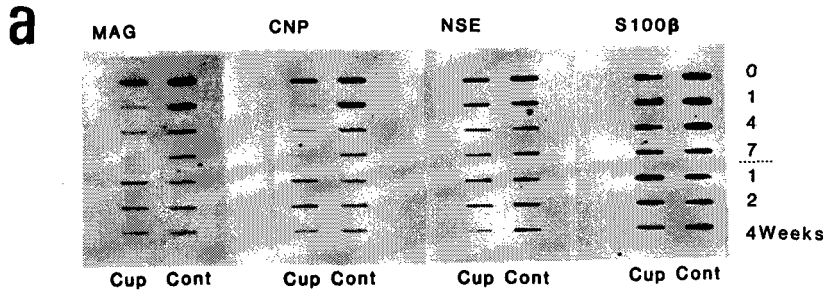
一方再生期においては、正常では発現をほとんど認めない週令において幼若型の MAG mRNA の発現を認めた。このことは、脱髄後の再生の初期においても exon 12 が splice outされる調節機構が存在し、2種類の MAG ポリペプタイドの内大きな分子量のポリペプタイドがミエリンの再生の初期に何らかの役割を果たしていると考えられる。

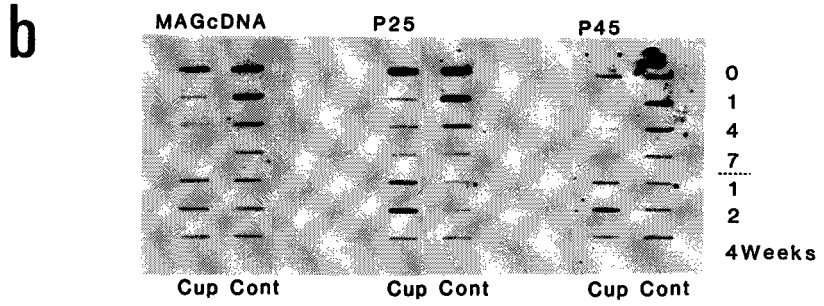
1)Fujita,N., Sato,S., Kurihara,T., Inuzuka,T.,Takahashi,Y. and Miyatake,T.(1988) FEBS Lett. 232:323-327

2)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

3)藤田信也、佐藤修三、栗原正、高橋康夫、宮武正 (1988) 神経化学、27:38-39




(図) Cuprizone による脱髄期及び再生期における、a: MAG,CNP,NSE,S100β mRNA b: 幼若型(P25), 成熟型(P45) MAG mRNA の発現

41　妊娠ラットのアルコール摂取が仔ラット脳に及ぼす影響 — その生化学的研究（II）

## 2',3'－環状ヌクレオチド－3'フォスフォジエステラーゼのｍＲＮＡについて

小嶋久子[1]、北島理恵[1]、栗原　正[2]、中村和生[1]、高橋康夫[2]、玉井洋一[1]

（[1]北里大・医・生化学、[2] 新潟大・脳研・神経薬理）

〔要約〕

妊娠ラットにエタノールを投与すると、出生後の仔ラット脳ミエリンの2',3'-環状ヌクレオチド-3'-フォスフォジエステラーゼ（ＣＮＰ）の活性がエタノール投与時期や投与量によって対照群の60-80% に低下する。今回我々はその胎児期に母体を通してアルコールに被爆したラットの成熟後の脳のＣＮＰｍＲＮＡの発現を検討した。

1)妊娠ラットにエタノールを連日腹腔内投与した。投与開始は妊娠１週目と２週目の二つに分けた。７週目に採脳し、直ちに凍結保存した。　2)マウスＣＮＰのｃＤＮＡ断片 437bp をプローブに用いて正常およびエタノール被爆ラット脳のノーザンブロット分析およびドットブロット分析を行った。　3)胎児期にエタノール被爆をしても、成熟期脳のＣＮＰｍＲＮＡの発現は正常と変わらなかった。酵素活性の低下は成長期のＣＮＰ合成量低下によるものであると推定された。

〔はじめに〕

以前に、我々は胎児性アルコール症候群に関する神経化学的情報を得ることを目的として、妊娠ラットにエタノールを投与し、出産後、仔ラット脳の細胞分画を行って、各画分の膜標識酵素活性などを調べた結果、脳機能を担う基本的な酵素活性に異常が起こることを明らかにした[2)]。特に胎児期のエタノール被爆により、ミエリンの2',3'-環状ヌクレオチド3'-フォスフォジエステラーゼ（ＣＮＰ）活性が顕著に低下した。その低下度はエタノール投与時期や投与量によって異なるが対照群の60-80%であった。また電気泳動上Wolfgram protein 量が減少し、ＣＮＰ活性の低下は酵素蛋白量の減少によることが示唆された。

そこで、既にクローニングされているマウスＣＮＰのｃＤＮＡ[3)]をプローブとして、胎児期エタノール被爆ラットおよび正常ラット脳のノーザンブロット分析とドットブロット分析を行い、ＣＮＰｍＲＮＡの発現について検索した。

〔実験方法〕

1)妊娠ラット（Wistar系）に体重当りの量を正確に定めて（2g/kg体重・日）、エタノールを腹腔内投与した。投与開始は妊娠7日目（Ａ群）と14日目（Ｂ群）の二つに分けた。出生後42日目にエーテル麻酔下に心臓より生食灌流後、断頭して脳を採取し、直ちに凍結した。エタノールを投与しなかったコントロール（Ｃ群）についても同様の処置を行った。

2)脳よりグアニジンチオシアネート／熱フェノール法により total RNA を抽出した。２個体の大脳をあわせて１回の抽出に使用し、同一群について３回の抽出実験をした。

3)マウスＣＮＰのｃＤＮＡ断片 437bp[3)] をプローブに用いてホルムアルデヒド法でノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。

4)ノーザンブロット分析の結果、このＣＮＰプローブはＣＮＰｍＲＮＡとのみ反応して、他のバンドは検出されなかったので、Scleicher & Schuell社のQuick-Blot Kitを使ってドットブロットハイブリダイゼーションを行い、コントロール群とエタノール群のｍＲＮＡ濃度を比較した。

〔結果と考察〕

図１はノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果である。コントロールとエタノール被爆群に差はなく、両群で2400～2800ntのバンドが検出され、BernierらのラットｃＮＰ遺伝子に関する報告とよく一致している[1)]。

次に、ドットブロット分析でこの3群のCNPmRNA量を比較したのが図2である。図からも明らかなように、この3群のCNPmRNA量に違いは認められなかった。

しかし、コントロールとエタノール被爆群とのmRNAの発現には差がないが、以前に報告したように、胎児期にエタノール被爆したラットの生後7週令の脳におけるCNP活性は妊娠早期からのエタノール投与群（A）でコントロールの60%、後期からの群（B）でコントロールの約80%と[2]明らかな酵素活性低下が認められた。栗原らはマウスで発育に伴うCNPmRNAの発現の変化を検討し、mRNAの発現はミエリン形成期にピークに達し、その後次第に少なくなっていくと報告している[3]。そこで、本実験のエタノール被爆群のCNP酵素活性低下の原因として次の可能性が考えられる。すなわち、ミエリン形成期のエタノール被爆群ではCNPmRNAの発現がコントロールに比して低かったが、成熟とともにコントロールの発現が減少し、7週令ではエタノール群との差がなくなった。ところがCNP蛋白の蓄積に差があるため、ミエリン蛋白当りの酵素活性はエタノール群で低くなったのではないだろうか。現在、胎児期にエタノール被爆したラットの発育に伴うCNPmRNAの変化に関する実験を検討中である。

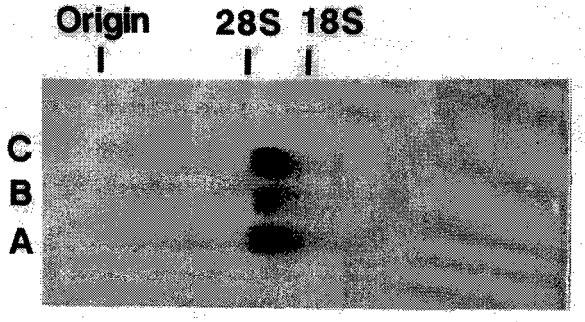



図1．　ノーザンブロット分析
C：コントロール、　AとB：胎児期にエタノール被爆したラット
（A・母体エタノール摂取妊娠7日目、B・妊娠14日目）

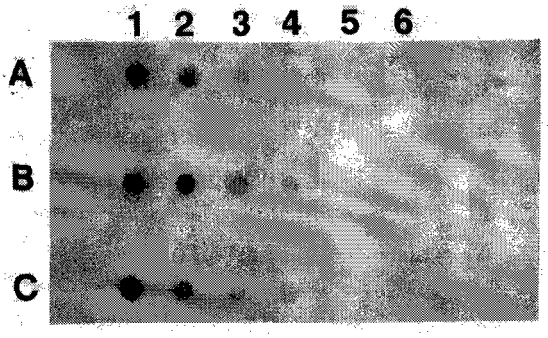



図2．　ドットブロット分析
C：コントロール、　AとB：胎児期にエタノール被爆したラット
1:24μgRNA　2:12μg　3:6μg　4:3μg　5:1.5μg　6:0.75μg

〔文献〕


[1] 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

[2] 小嶋久子、原田菜穂子、玉井洋一(1987)　神経化学　26, 493-495

[3] Kurihara, T., Takahashi, Y., Fujita, N., Sato, S., and Miyatake, T.(1989) Mol. Brain Res. 5, 247-250

## 42　マウス2',3'-環状ヌクレオチド3'-フォスフォジエステラーゼのｃＤＮＡ及び遺伝子クローニング

栗原　正，桃生勝己＊，高橋康夫
（新潟大　脳研　神経薬理，＊秋田大　医　耳鼻咽喉科）

〔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）（ＥＣ3.1.4.37）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，更にマウスＣＮＰの遺伝子のクローニングを行なったのでここに報告する．

１）　マウスＣＮＰのｃＤＮＡ 2374bp を得た．ｃＤＮＡは翻訳領域 1200bp 全部を含んでいて，マウスＣＮＰタンパクの全一次構造が推定された．

２）　マウス遺伝子ライブラリーから制限酵素地図が一部異なる２種類の遺伝子ＤＮＡを分離した．現在これらの遺伝子ＤＮＡを解析中で，ＣＮＰ遺伝子のエクソンーイントロン構成が明らかになりつつある．

2',3'-環状ヌクレオチド3'-フォスフォジエステラーゼ（ＣＮＰ）（ＥＣ3.1.4.37)は中枢神経系ではオリゴデンドログリアとミエリン，末梢神経系ではシュワン細胞のマーカーとして知られている．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)．脳におけるＣＮＰｍＲＮＡの発現はミエリン形成期にピークに達しその後次第に減少していく（Kurihara et al.,1989)．また in situ hybridization でＣＮＰｍＲＮＡはオリゴデンドログリアの核周辺領域に局在していることが明らかになった（Trapp et al.,1988; 後藤ら,1989)．脳の発育過程におけるＣＮＰｍＲＮＡの変動は，マウスＣＮＰのｃＤＮＡ断片 437bp をプローブに用いて調べた（Kurihara et al.,1989)．今回我々は，マウスＣＮＰｍＲＮＡの全長に近い 2374bp のｃＤＮＡを得ることができた．そこでこれをプローブに用い，マウスＣＮＰ遺伝子のクローニングを行なった．

＜実験方法＞

マウス脳ｃＤＮＡライブラリー（λgt11）は J.Sikela, W.E.Hahn 両博士から送られたものを用いた．マウス遺伝子ライブラリーは Clontech Laboratories のを使用した．スクリーニングに用いたプローブはランダムプライマー法で標識した．ヌクレオチド配列は Maxam-Gilbert 法で決定した．

＜実験結果及び考察＞

マウスＣＮＰのｃＤＮＡ断片 437bp(Kurihara et al.,1989) をプローブに用いて，約 2400bp のｃＤＮＡを得た．ヌクレオチド配列を決定したところ，ｃＤＮＡは翻訳開始点ＡＴＧのＡを＋１として -242 から +2154 にわたっていた（５' 非翻訳領域はマイナス番号で示す）．ｃＤＮＡから推定されるＣＮＰタンパクのアミノ酸残基数はイニシエーターのメチオニンを含めて 400 であった．アミノ酸配列はすでに報告されたウシ（Kurihara et al.,1987; Vogel and Thompson,1987)及びヒト（Kurihara et al.,1988)のアミノ酸配列と相同で，ウシとは 82.5%，ヒトとは 84.8% のホモロジーを示した（ウシとヒトでは 90.3%)．報告されたラットＣＮＰのアミノ酸配列（Bernier et al.,1987)にはヌクレオチド配列に誤りが多くて比較できなかった．

次にここで得たｃＤＮＡ 2374bp を HindIII で３つに切断し，マウスＣＮＰ遺伝子をスクリーニングするためのプローブとした．マウス遺伝子ライブラリーから１０種類の独立したクローンが得られたが，このうち７種類が同一の遺伝子由来と考えられ，クローン０７１で代表させた（図１）．また残り３種類がやはり同一の遺伝子由来と考えられ，クローン０３１で代表させた（図１）．ヌクレオチド配列を一部決定したところ，両クローンから全く同じ配列のエクソン部分が明らかになった（ -242 から -51 まで）．クローン０３１の +753 の

次にはイントロンが挿入されていた．両クローンを比較すると，翻訳領域の３’端付近から上流が全く同一の配列に見える．サザンハイブリッド形成でマウス核ＤＮＡの HindIII 断片をｃＤＮＡの下流プローブと反応させると，０７１型で予想される 5kb と０３１型で予想される 3kb の両方のバンドが検出された．

今回得られた０７１型ＤＮＡと０３１型ＤＮＡが２つの異なったＣＮＰ遺伝子に相当するのか，あるいは同一の遺伝子の多型に由来するのかは今のところ不明である．

＜文献＞


Bernier,L. et al. (1987) J.Neurosci. 7, 2703-2710

後藤　薫，栗原　正，高橋康夫，近藤尚武 (1989) 日本解剖学会総会にて発表

Kurihara,T. et al. (1987) J.Biol.Chem. 262, 3256-3261

Kurihara,T. et al. (1988) Biochem.Biophys.Res.Commun. 152, 837-842

Kurihara,T. et al. (1989) Mol.Brain Res. 5, 247-250

Trapp,B.D. et al. (1988) J.Neurochem. 51, 859-868

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

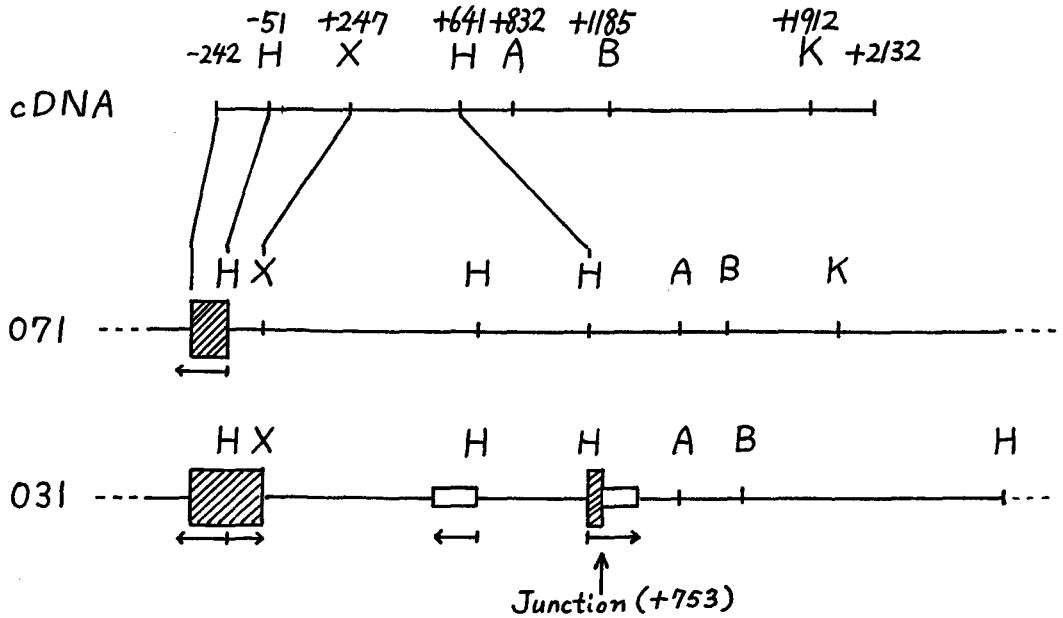




図１　遺伝子ＤＮＡ２クローン（０７１及び０３１）の制限酵素地図及び一部明らかになったエクソン－イントロン構成（ ，エクソン部分； ，イントロン部分）

配列決定をした部分は横矢印で示した．ｃＤＮＡのヌクレオチド番号は翻訳開始点ＡＴＧのＡを＋１とした．翻訳領域は +1200 までである．翻訳開始点より上流はマイナス符号をつけて示した．A,ApaI;B,BglII;H,HindIII;K,KpnI;X,XbaI

# 43 GH欠損と甲状腺ホルモン欠損のミエリン低形成発現機序の相違

野口鉄也、森沢啓一郎※、杉崎哲朗、
金松知幸、青木継稔※
（東邦大・医・第二生理・第二小児※）

〔要約〕
先天性成長ホルモン(GH)単独欠損症Littleマウス(lit)と先天性甲状腺機能低下症マウス(hyt)を用いて、発育期の脳各部位湿重量及びミエリンに局在する2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase(CNPase)活性の変動、さらに7日齢大脳DNAへのチミジンの取り込みの変化を測定し、これらミエリン形成に及ぼすGHと甲状腺ホルモンの作用機序の相違を明らかにした。即ち、litマウスでは発育期を通じて小頭症が認められたが、hytマウスでは認められなかった。グリア細胞の増殖が大脳で最も盛んな7日齢で大脳DNAへのチミジンの取り込みはlitマウスで正常の50%に低下していたが、hytマウスではこの変化が認められなかった。しかし、大脳のCNPase活性はいずれのマウスでも発育期を通じて活性上昇の遅滞がみられ、ミエリン低形成のあることが示された。今回の実験から、GH欠損ではグリア細胞の分裂が低下し、その結果ミエリン低形成が惹起されること、甲状腺ホルモン欠損ではグリア細胞の分裂増殖は正常に行われ、その後のミエリン形成に不全のあることが示唆された。

目的：
先天性甲状腺機能低下症は身体的発育遅滞に加えて重篤な精神発達障害を伴う。一方、成長ホルモン単独欠損症でも身体的発育不全に加えて精神発達遅滞を伴うことが知られている(2)。Noguchiら(3,6)は先天性甲状腺機能低下症マウス(hyt)と、先天性成長ホルモン(GH)単独欠損症Littleマウス(lit)の両者の大脳にのみミエリン低形成のあることを報告した。今回は、これら両マウスを用いて、GH欠損、あるいは甲状腺ホルモン欠損に伴う大脳ミエリン低形成の発症機序の相違につき検討を加えた。
方法：
試薬：[Methyl-$^{3}$H]チミジン(16mCi/mmol)はRadiochemical Centre, U.K.より購入した。動物：litマウス、hytマウスはジャクソン研究所より購入し、既報の方法(3.6)に従って自家繁殖し、実験に供した。チミジンのDNAへの取り込み実験：既報の方法(5)に従って行った。CNPase活性の測定：Kurihara and Tsukadaの方法(1)で反応を行い、2'-AMPは高速液体クロマトグラフィー法(7)により測定した。
結果：
発育期脳湿重量変化の比較：litマウス大脳湿重量増加は正常群に比較して遅く、かつ20日齢からその増加は停止した。40日齢では正常群の81.6%にとどまった。litマウス小脳湿重量も20日齢から増加は停止し、40日齢で正常群の82.7%にとどまった。しかし、脳幹湿重量はlitマウスと正常群との間に差は見られなかった。一方、hytマウスでは、発育期を通じて、脳のどの部位、湿重量も正常群と差はなかった。発育期脳CNPase活性の比較：ミエリン形成に伴う脳各部位での活性増加の様子を比較した。litマウス大脳（図1A)では正常群との差が16日齢より明らかとなり、20日齢から40日齢にかけて正常群の約75%にとどまった。脳幹（図1B)、小脳（図1C)では正常群との間に有意な差はなかった。hytマウス大脳（図2A)でも正常群との差が16日齢より明らかとなり、20日齢から40日齢にかけて正常群の約60%にとどまった。また、脳幹（図2B)、小脳（図2C)では正常群との間に有意な差はなかった。7日齢litマウスとhytマウスの脳各部位及び肝のDNAへのチミジンの取り込み：litマウスではDNAへのチミジンの取り込みは大脳で正常群の55%、脳幹では60%、小脳と肝で45%にとどまった。しかし、hytマウスではこの抑制は認められなかった(表1)。
考察：
GH及び甲状腺ホルモンの脳発育に対する効果、とくにミエリン形成について検討を加えた。GH欠損マウスでは小頭症がみられ、チミジンの脳DNAへの取り込みの低下及び大脳のCNPase活性の低下が認められた。一方、甲状腺ホルモン欠損マウスでは、小頭症、DNA合成の低下は全くみられず、大脳のCNPase活性の低下のみ認められた。このことはGH欠損では大脳でグリア細胞の分裂増殖が停止あるいは抑制をうけ、オリゴデンドログリアの細胞数の不足により、それにひきつづいて起こるミエリン形成が進行し得なくなり、一方、甲状腺ホルモン欠損ではオリゴデンドログリアの分裂増殖は順調に進行するが、その後に起こる細胞の成熟とミエリン形成が不全になると考えられた。われわれは(4)GHと甲状腺ホルモンを共に欠損する

先天性Snell下垂体性小人症マウス(dw)の大脳でのガングリオシドの含量変動を検索し、GHは神経細胞の成熟に関与するガングリオシド種の回復に、サイロキシンの併用投与はオリゴデンドログリアの成熟とミエリン形成に関与するガングリオシド種の回復に効果のあることが示され、今回の実験結果を支持するものであった。

文献:

(1)Kurihara,T.&Tsukada,Y.(1967)J.Neurochem.14,1167-1174.(2)Laron,Z.&Galatzer,A.(1980)in Horm. and Brain(DeWied,D.&VanKeep,P.A.,eds.)pp.293-302,MTP Press,Lancaster.(3)Noguchi,T.&Sugisaki,T.(1984)J.Neurochem.42,891-893.(4)Noguchi,T.&Sugisaki,T.(1986)47,1785-1792.(5)Noguchi,T.,Sugisaki,T.,Takamatsu,K.&Tsukada,Y.(1982)J.Neurochem.39,1693-1699.(6)Noguchi,T.,Sugisaki,T.&Tsukada,Y.(1985)Neurochem.Res.10,1097-1106.(7)Tsukada,Y.,Nagai,K.&Suda,M.(1980)J.Neurochem.34,1019-1022.

表1

| Tissue | Specific activity lit/lit(a) | lit/+(b) | (a)/(b)(%) | P |
|---|---|---|---|---|
| Cerebrum | 6.13±0.41(5) | 11.0±2.2 (7) | 55.7 | <0.001 |
| Brain stem | 6.54±0.46(5) | 10.6±2.0 (7) | 61.7 | <0.001 |
| Cerebellum | 52.5±2.9 (5) | 114 ± 29 (7) | 46.1 | <0.001 |
| Liver | 8.29±0.58(5) | 18.8±8.8 (7) | 44.1 | <0.001 |

| Tissue | Specific activity hyt/hyt(a) | hyt/+(b) | (a)/(b)(%) | P |
|---|---|---|---|---|
| Cerebrum | 9.24±1.76(5) | 10.7±2.2 (7) | 86.1 | n.s. |
| Brain stem | 8.26±2.07(5) | 9.16±2.03(7) | 90.2 | n.s. |
| Cerebellum | 84.3±24.6(5) | 109 ± 43 (7) | 77.4 | n.s. |
| Liver | 16.0±6.0 (5) | 22.7±7.1 (7) | 70.3 | n.s. |

[$^3$H]Thymidine incorporation into the DNA fraction of different parts of the brain and liver of 7-day-old mice.

Values (dpm in DNA fraction/dpm in acid-soluble fraction) are expressed as mean ± SEM, with the number of animals shown in parentheses. Statistical significance was determined by Student's t test.

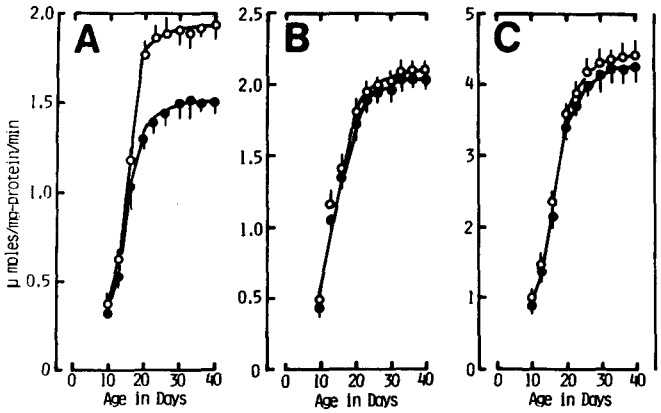



図1

Ontogenetic changes in CNPase activity of the lit brain.

Each point represents the mean activity of six animals. Vertical lines represent 1 S.D. (A) Cerebrum; (B) cerebellum; (C) brain stem. o, Normal mice (lit/+); ●, little mice (lit/lit).

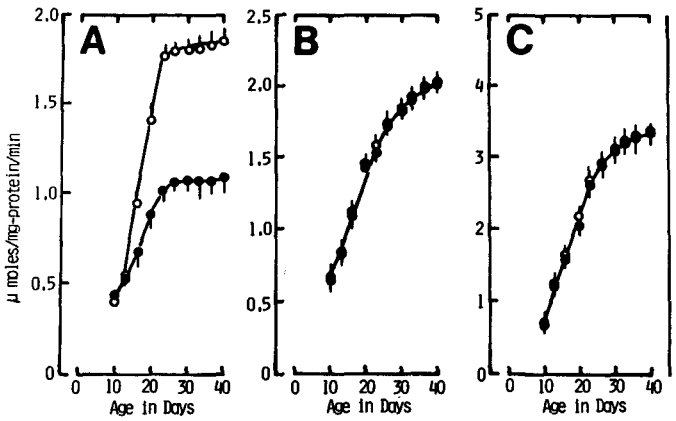



図2

Ontogenetic changes in CNPase activity of the hyt brain.

Each point represents the mean activity of six animals. Vertical lines represent 1 S.D. (A) Cerebrum; (B) cerebellum; (C) brain stem. o, Normal mice (hyt/+); ●, hyt mice (hyt/hyt).

# 44 脳におけるInsulin-like Growth Factor Iの解析

山口文徳*、板野俊文、中村光夫*、溝淵雅之**、
松井秀樹、徳田雅明、江藤誠司、大本堯史**、細川　清*、
畠瀬　修（香川医大・第一生理、精神神経*、脳外**）

〔要約〕

ラット脳各部位における細胞内と細胞外（組織間）のInsulin-like Growth Factor I (IGF-I)の測定、解析を行なった。脳各部位の組織から細胞内のIGF-IをAcetic acidを用いて抽出し、ラジオイムノアッセイにて定量したところ、下垂体、小脳、海馬、嗅脳、皮質等に大量に存在することがわかった。　次にU字型プローブを自製し脳内微小透析法にて脳各部位の透析を行ない灌流液中の IGF-Iを測定したところ、海馬、小脳、嗅脳、皮質等に比較的大量に存在し、細胞内分布と同様の傾向を示した。さらに片側の海馬を電気凝固法にて部分破壊し、破壊側の海馬にて、神経の再生過程でのIGF-I量の変化を測定・検討している。

〔目　的〕

神経組織の成長・分化・再生にはさまざまな物質が関与している。Insulin-like Growth Factor I (IGF-I)は、Insulinと類似したアミノ酸構造をもつペプチドであり、脳内に存在していることが知られている。IGF-Iのレセプターの分布については多くの報告があるが[1)2)3)]、IGF-I自身の濃度を直接測定した報告は少ない。また、In Vitroの系でIGF-Iは神経細胞やグリア細胞の栄養因子としてはたらき、またNeuromoduratorとして皮質や海馬スライスからのアセチルコリンの放出を修飾することが知られている[1)4)]。これらには細胞外のIGF-Iが重要な役割をはたしていると考えられる。そこで我々は、脳各部位の細胞内のIGF-Iを抽出・測定し、また脳内微小透析法を用いて細胞外のIGF-Iを測定・比較した。さらに神経成長・栄養因子としての役割を調べるため、片側海馬を破壊し神経の再生過程でのIGF-I量の変化を検討したので報告する。

〔方　法〕

１）Acetic acidによる細胞内 IGF-Iの抽出：S-D系ラット（270-320g）を断頭後、すばやく脳を取り出し各部位（嗅脳、下垂体、皮質、線条体、海馬、小脳、脳幹上部・下部）に分けた。それぞれの組織 200mgにたいして、0.32M Sucrose,50mM Tris-HCl,2mM EDTA溶液を２ｍｌ加えホモジェネートし、さらに２ｍｌの２M　Acetic acidを加え、２時間放置・抽出し１８,０００ｇ、１０分で遠沈した。上清を取り、さらに沈澱に２ｍｌの１M　Acetic acidを加え３０分間再抽出した後、同様に遠沈し上清を取り、再回収分とともに凍結乾燥した。最後に１ｍｌの50 mM Tris-Hcl溶液 (pH 7.6)を加えラジオイムノアッセイまで凍結保存した。またそれぞれの蛋白量をBIORAD法にて定量した。

２）脳各部位の微小透析：ラットをエーテル麻酔下にて定位脳固定装置に固定後、頭皮を切開し、barr holeを開け 脳各部位（Paxinos & Watsonのatlas[5)]を参照して、嗅脳、皮質、線条体、海馬、視床下部、小脳の透析位置を決定した）にプローブを挿入しRinger 液にて２μｌ／ｍｉｎの流速で約１０時間灌流した。回収した灌流液中のIGF-Iをアマシャム社製ＲＩＡキットを用い、ラジオイムノアッセイにて定量した。

３）片側海馬の部分破壊と脳内微小透析：ラットをエーテル麻酔下にて定位脳固定装置に固定後、頭皮を切開し、BregmaよりA;-4.3mm, L;3.0mmの位置にbarr holeを開け、硬膜より深さ2.5mmにRFG-4A Lesion generatorの電極を挿入し７５℃、１分で電気凝固破壊した。破壊後、頭皮を縫合し飼育ケージに戻した。一定の回復期間をおき、破壊側海馬をエーテル麻酔下に微小透析し、灌流液を回収、IGF-Iを定量した。破壊は実験後組織学的に確認した。

〔結果及び考察〕

1）脳各部位の細胞内IGF-Iの解析：

Table 1 に脳各部位での細胞内 IGF-I の量とレセプターの存在部位を示す 。 既知の濃度のIGF-Iを用いて In Vitroで本方法の回収率を測定したところ約２７％であった。脳各部位では下垂体に最も大量に存在した。嗅脳、海馬、小脳、皮質等にも比較的多量に存在し、線条体にはあまり存在しないことが判明した。またこれらの結果は今までに報告されているIGF-I レセプターの存在部位とよい相関を示した。

Table 1, IGF-I Contents and Specific Binding In Rat Brain

| REGION | IGF-I CONTENTS (pg/mg protein) | SPECIFIC BINDING* |
|---|---|---|
| BRAIN STEM (LOWER) | 1618 | ++ |
| BRAIN STEM (UPPER) | 2811 | +++ |
| PITUITARY GLAND | 8400 | ++++ |
| STRIATUM | 1070 | ++ |
| HIPPOCAMPUS | 1876 | +++ |
| CEREBELLUM | 2007 | +++ |
| CORTEX | 1520 | +++ |
| OLFACTORY BULB | 1515 | +++ |

* According to Bohannon et al and Goodyer et al.

2）脳各部位における細胞外IGF-Iの解析：

Table 2 に脳各部位での脳内微小透析による細胞外のIGF-I量を示す。In Vitro の実験結果から脳内微小透析法によるIGF-Iの回収率は約２．３％であった。脳各部位では、嗅脳、海馬、小脳、皮質等に比較的多量に存在することが判明し、線条体には少なく、細胞内の IGF-I の局在と同様の傾向を示した。海馬や皮質において細胞外にIGF-Iが大量に存在することは、これらの部位でIGF-Iが Neuromodulatorとしてはたらくために必要な条件であると考えられる。

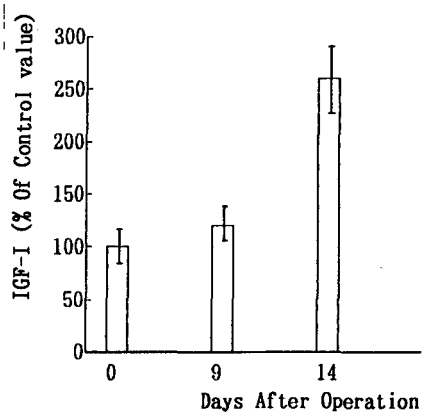
Table 2, IGF-I Contents In Dialysate

| REGION | IGF-I (pg/100μl Dialysate) |
|---|---|
| HYPOTHALAMUS | 100 |
| STRIATUM | 105 |
| HIPPOCAMPUS | 195 |
| CEREBELLUM | 195 |
| CORTEX | 170 |
| OLFACTORY BULB | 173 |

3）片側海馬破壊のIGF-Iへの影響：

Figure 1 に海馬破壊後のIGF-I量の変化を示す。Controlに比べ、破壊後２週間前後で破壊部位でのIGF-I量の増加が認められた。神経の再生過程でIGF-Iが重要な役割を担っていることが示唆される。

Figure 1 EFFECT OF HIPPOCAMPAL LESION ON IGF-I




IGF-Iは脳において多くの生理学的機能を有すると考えらているが、具体的な働きについてはその報告をみない。本報告は、レセプターと細胞内外の局在がよい一致を示すことから、従来の仮説を前進させたこと、また、具体的に神経系の成長・栄養因子として働く可能性があることを示した。さらに現在どの神経系において成長・栄養因子として働いているかを検討している。

〔文　献〕

1) D. M. Araujo, P. A. Lapchak, B. Collier, J. -G. Chabot, and R. Quirion(1989) Brain Res. 484:130-138
2) Nancy J. Bohannon, Eric S. Corp, Barbara J. Wilcox, Dianne P. Figlewicz, Daniel M. Dorsa and Denis G. Baskin (1988) Brain Res. 444: 205-213
3) Cynthia G. Goodyer, Lucie de Stephano, Wei Hsien Lai, Harvey J. Guyda, and Barry I. Posner (1984) Endocrinology Vol.114, No.4:1187-1195
4) L. Nilsson, V. R. Sara and A. Nordberg (1988) Neurosci. Lett.,88: 221-226
5) Paxinos,G. and Watson, C. (1982) in "The rat brain in stereotaxic coordinates" Academic Press

# 45 マウス脳GPDH活性に及ぼすホルモンの効果

杉崎哲朗、野口鉄也
（東邦大・医・第二生理）

〔要約〕
三種の先天性内分泌異常ミュータントマウス－－先天性甲状腺機能低下症マウス(hyt)、先天性Snell下垂体性小人症マウス(dw)，先天性成長ホルモン単独欠損症マウス(lit)－－を用いて、Bergmann細胞とオリゴデンドロサイトに高濃度に存在するsn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)の活性を測定するとともに抗GPDH抗体を用いて免疫組織学的に検索した。GPDH活性は甲状腺ホルモンを欠損するhyt，dw両マウスの小脳と脳幹で著しく減少していたが、その他の部位では変化がなかった。他方、litマウスでは脳各部位で正常群と比較してGPDH活性に差は認められなかった。抗GPDH抗体を用いた免疫組織学的検索では、dwマウス小脳Bergmann細胞は細胞体、線維の両者に酵素の発現がみられず、hytマウス小脳ではBergmann細胞の細胞質にのみ発現がみられ、線維にはなかった。　一方、litマウスBergmann細胞は細胞質も線維も良く染め出されていた。以上のことから、Bergmann細胞の成熟に甲状腺ホルモンが強く関与していることが示唆された。

目的:
脳発育に及ぼす甲状腺ホルモンの効果の研究は主として神経細胞に限られ、グリア細胞の成熟分化に関する報告は少ない[1 10 11]。　そこで、われわれは三種の内分泌異常ミュータントマウス--先天性Snell下垂体性小人症マウス（dw）（成長ホルモン，甲状腺刺激ホルモン，プロラクチンを欠損する），先天性成長ホルモン単独欠損症Littleマウス(lit)，先天性甲状腺機能低下症マウス(hyt)－－を用い、小脳Bergmann細胞とオリゴデンドロサイトに高濃度に存在する[3]sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC1.1.1.8) (GPDH)の活性を脳各部位で測定し、さらに抗GPDH抗体を用いて小脳を免疫組織学的に検索し、甲状腺ホルモンと成長ホルモンのグリア細胞の成熟分化に及ぼす効果を比較した。

方法:
動物: dw，lit，hyt 各マウスはジャクソン研究所より購入し、既報の方法[5 6 8]に従って自家繁殖し、40日齢で実験に供した。　GPDH活性の測定: Kozakの方法[4]に従った。　免疫組織学的検索:　抗ウシS-100蛋白抗体は自家製のものを[7]、抗GPDH抗体はDr.Kozakより恵与されたものを用いた。免疫組織学的方法は既報の方法[9]に従った。

結果:
GPDH活性の変化:　40日齢の各種ミュータントマウスの脳各部位（大脳、脳幹、小脳、嗅球）のGPDH活性を測定した（表１）。脳各部位の湿重量当たりの酵素活性を見ると、hytマウスでは脳幹、小脳で、それぞれ正常群の値の68.1%，67.4%に減少していた。しかし、大脳、嗅球では有意な差はみられなかった。dwマウスではhytマウスと同様に脳幹、小脳でそれぞれ64.5%，39.9%に減少し、他の部位では有意な差は見られなかった。litマウスでは脳のどの部位でも正常群と全く差はなかった。

免疫組織学的処見:　40日齢小脳皮質を抗Ｓ-100抗体、及び抗GPDH抗体で免疫組織学的に染めてみた。抗S-100抗体で染めると、どの種のミュータントマウスでもBergmann細胞の細胞体と線維が強く染め出され、正常群と全く差は認められなかった。他方、抗GPDH抗体では、どの正常群でもBergmann細胞の細胞体と線維が染め出されたにもかかわらず（図１A,C,E)，dwマウスでは細胞体も線維も染め出されず（図１D)，hytマウスでは細胞体のみが染め出され、線維は全く染め出されなかった（図１Ｂ）。また、litマウスでは正常群と全く差はみられなかった（図１Ｆ）。

考察:
de Vellisら[2]は、ラットを用い、コ-チゾルが大脳皮質及び脳幹のGPDH活性を調節していることを示したが、同時に甲状腺ホルモンはこの活性に全く影響がないことを報告している。しかし、Schwarkら[11]は甲状腺ホルモンが発育期での大脳皮質及び小脳のGPDHの活性上昇に有効であることを示している。また、Fisherら[3]は抗GPDH抗体を用いてマウス小脳を免疫組織学的に検索し、GPDHがBergmann細胞とオリゴデンドロサイトに高濃度に存在することを明らかにしている。しかし、Pesetsky[10]はラットにプロピルチ

オウラシル投与して甲状腺摘除を行い、小脳を形態学的に観察し、生育後アストロサイトは未熟のまま残存するが、Bergmann細胞には異常を認めないと報告している。この様に脳発育期におけるグリア細胞の成熟分化とGPDH活性の変動については一致した結論が出ていない。そこで、われわれは上記の三種の先天性内分泌異常ミュータントマウスを用い、脳各部位でのGPDH活性の測定とBergmann細胞の免疫組織学的検索を行った。その結果、甲状腺ホルモンを欠損するhytマウスとdwマウスの小脳でGPDHの活性がそれぞれの正常の67.4%, 39.3%に低下し、また、免疫組織学的には抗S-100抗体で両マウスのBergmann細胞が正常に染め出されたにもかかわらず、dwマウスでは細胞と線維で、hytマウスでは線維のみにGPDHの発現が欠損していることが示され、litマウスではこれらに異常がなく、生化学的処見と組織学的処見がよく一致した。このことはBergmann細胞内のGPDHの発現に甲状腺ホルモンが強く関与していることが示唆される。また、脳幹でのhyt、dw両マウスのGPDH活性低下はこの部位でオリゴデンドロサイトの成熟が遅滞していると考えられるが、組織学的に有意な処見は得られなかった。以上のことから、少なくとも、小脳Bergmann細胞の成熟分化に甲状腺ホルモンが必須であることが明らかとなり、現在、発育段階でのGPDHの活性変動を検討中である。

文献:

(1)Clos,J. Rebiere,A &Legrand,J.(1973)Brain Res.63,445-449.(2)de Vellis,J.& Inglish,D.(1968) J.Neurochem.15,1061-1070.(3)Fisher,M.,Gapp,D.A.&Kozak,L.P.(1981)Dev.Brain Res.1,341-354. (4)Kozak,L.P.(1972)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69,3170-3174.(5)Noguchi,T.,&Sugisaki,T.(1984)J.Neuroc hem.42,891-893.(6)Noguchi,T.,Sugisaki,T.&Tsukada,Y.(1982)J.Neurochem.38,257-263.(7)Noguchi,T., Sugisaki,T.,Takamatsu,K.&Tsukada,Y.(1982)in Genetic Approaches to Developmental Neurobiology ( Tsukada,Y.,ed.)pp.153-170, U.Tokyo Press,Tokyo.(8)Noguchi,T.,Sugisaki,T.&Tsukada,Y.(1985)Neuro chem.Res.10,1097-1106.(9)Noguchi,T.,Sugisaki,T.,Kanamatsu,T.,Satoh,I.&Nishikawa,N.(1988)J.Endo cr.118,179-185.(10)Pesetsky,I.(1973)Brain Res.63,456-460.(11)Schwark,W.S.,Singhal,R.L.&Ling,G. M.(1971)Can.J.Physiol.Pharmacol.49,598-607.

| | Cerebrum | Brain stem | Cerebellum | Olfactory bulb |
|---|---|---|---|---|
| hyt/+ | 2.46±0.36(12) | 3.01±0.53(12) | 11.53±2.77(12) | 1.70±0.25(6) |
| hyt/hyt | 2.15±0.28(12)* | 2.05±0.33(12)** | 7.77±1.30(12)** | 1.45±0.18(6) |
| +/? | 2.07±0.41(12) | 2.28±0.28(11) | 6.54±1.03(12) | 1.57±0.33(6) |
| dw/dw | 1.82±0.20(12) | 1.47±0.06(11)** | 2.57±0.74(12)** | 1.61±0.13(6) |
| lit/+ | 2.37±0.23(12) | 3.06±0.54(13) | 8.84±1.10(12) | 1.67±0.25(6) |
| lit/lit | 2.47±0.31(12) | 3.05±0.32(12) | 8.06±1.75(12) | 1.70±0.22(6) |

表 1

GPDH activities in different parts of the CNS of 40 day-old hyt, dw and lit mice. Values (μmoles/min/g wet wt.) are expressed as mean±SD, with the number of animals in parentheses. All differences from the respective controls, hyt/+, +/? or lit/+, were significantly by Student's t-test. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$.

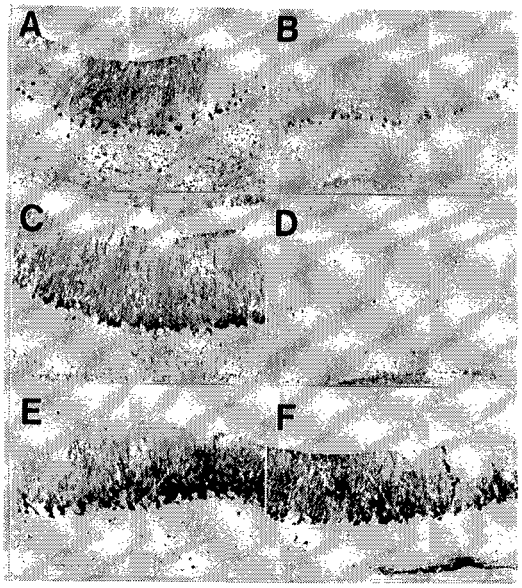



図 1

Comparison of the cerebellar cortices of the control and mutant mice; the sections were stained for GPDH. A: hyt/+. B: hyt/hyt. C: +/? D: dw/dw. E: lit/+. F: lit/lit. X 60.

# 46 Preprotachykinin B遺伝子由来のペプチド：neurokinin Bの局在と中枢性昇圧作用

高野行夫[1]，永島　亮[1]，荻尾哲也[1]，立石カヨ子[2]，松岡雄治[2]，浜岡利之[3]，神谷大雄[1]
（福岡大・薬・薬理[1]，医・生化学[2]，大阪大・医・バイオメディカルセンター[3]）

〔要約〕

最近の研究から，哺乳動物で5種のタキキニン・ペプチド，substance P (SP)，neurokinin A (NKA)，neurokinin B(NKB)，neuropeptide K，およびneuropeptide γ (NPγ)がすでに同定されている．これらのうち，SP，NKA，neuropeptide K，NPγはpreprotachykinin A gene由来であり，一方NKBはpreprotachykinin B gene由来である．今回，我々はNKBの生理的意義を調べる目的で，NKBに対する特異的抗体を使用し，高血圧自然発症ラット(SHR)の中枢神経系でのNKB含量の微細分布を調べた．さらに脳室内にNKBのアナログを投与し，中枢性昇圧作用機序について検討した．その結果，SHRにおけるNKB含量は視床下部の視索上核や延髄の孤束核で対照の正常ラット(WKY)に比べ有意に高く，SPとは異なる分布傾向を示した．またNKBによる中枢性昇圧作用はvasopressin受容体拮抗薬の末梢投与により抑制されたことから，SPの場合と異なり，その作用の一部は視床下部からのvasopressinの遊離によるものと考えられる．

substance P(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として知られている。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 neurokinin A (NKA)，neurokinin B(NKB)，neuropeptide K，およびneuropeptide γ(NPγ)の4種タキキニン・ペプチドが確認されている(2)．このうち，NKBを除く他のタキキニン・ペプチドはpreprotachykinin A (PPT-A) geneから産生されるのに対して，NKBはpreprotachykinin B (PPT-B) gene より導かれる（図1）．しかしながら，このPPT-B gene由来のタキキニン・ペプチドであるNKBの中枢での役割に関する報告はきわめて少ない．そこで今回，我々はNKBの生理的意義を調べる目的で，高血圧自然発症ラット(SHR)の中枢神経系におけるNKBの微細分布と中枢性血圧調節機構を調べ，他のタキキニン・ペプチドと比較検討した．

[実験方法]

動物は12週齢のSHRと対照のWKYおよびWistar系雄性ラット(250-300g)を使用した。

ラジオイムノアッセイ(RIA)法：SHRおよびWKYの血圧および拍数を非観血的に予め測定し，断頭後，脊髄および脳各部位をマイクロパンクチャー法にて採取した．SPおよびNKB含量はすでに報告した抗血清を用いてRIA法で測定した(3,4,5)．特に，今回使用したNKB抗血清(R707)はTateishiらによって開発された免疫法で作られ，NKBに非常に特異性が高く，他のタキキニン・ペプチドとは殆ど交差しない免疫特性を有している(5)，

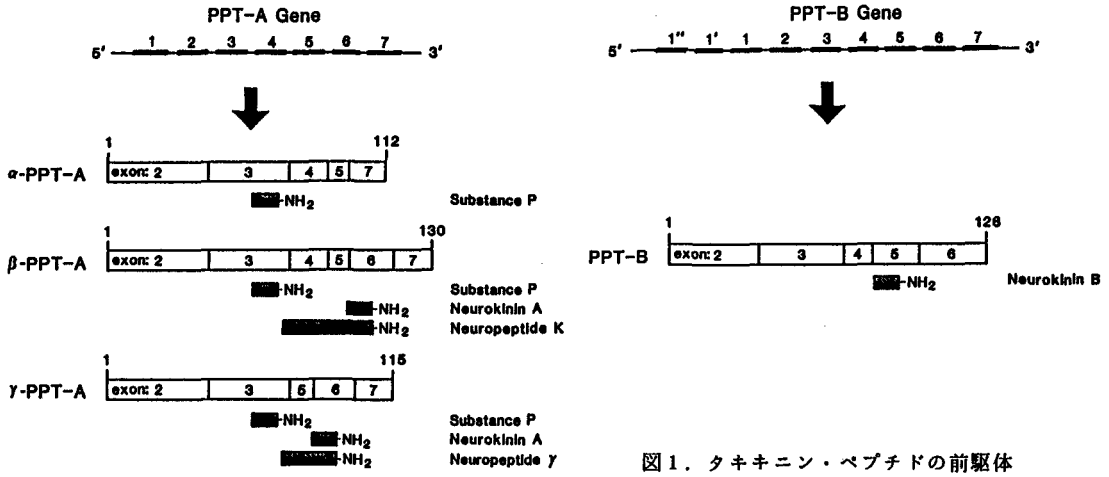



図1．タキキニン・ペプチドの前駆体

血圧・心拍数の測定：既報の方法に従い(3,6)，Wistar系雄性ラットをウレタンで麻酔し(0.9g/kg，i.p.)，大腿動脈より圧トランスジューサーを介して，血圧および心拍数を測定した．

[結果および考察]

中枢神経系でのNKBの局在：NKBの中枢神経系での生理的意義を明らかにする目的で，まずNKB含量を測定した．正常ラットのNKB含量は視床下部，孤束核，扁桃核および脊髄などで高い値を示した．一方，SP含量は黒質，孤束核，疑核，視床下部および脊髄で高く，両者の分布傾向は一致しなかった．SPと同じPPT-A geneより導かれるNKAの脳内分布がほぼSPの分布と一致していることから(3)，この結果は，NKBの遺伝子とSPおよびNKAの遺伝子との違いから生じてきた可能性が考えられる．SHRのNKB含量は対照のWKYに比べ，視床下部の視索上核や延髄の孤束核などで有意に高い値を示した．視索上核や孤束核は中枢性血圧調節に重要な部位であり，この部位でSHRのNKB含量が高い値を示したことは非常に興味深い．

NKBによる中枢性血圧調節：NKBは難溶性のため，最近NKBの受容体（NK-3型受容体サブタイプ）の選択的アゴニストとして開発されたsenktideや[Pro$^7$]-NKBを用いて(7,8)，中枢性血圧調節について検討した．図2Aに示すように，NKBアナログの脳室内投与により，持続性の血圧上昇，心拍数増加作用を示した．このNKBアナログによる血圧上昇はvasopressin受容体拮抗薬（d(CH$_2$)$_5$OMe (Tyr)-AVP）静脈内前処置で抑制された．一方，SPやNKAを側脳室内に投与すると，血圧や心拍数は上昇するが，この反応はvasopressin拮抗薬で抑制されなかった（図2B）．脳内NKB分布の結果などから，NKBによる昇圧作用は視床下部の視索上核のNK-3型受容体サブタイプを介してvasopressinの遊離を引き起こし，血圧を上昇させると考えられる．一方，SPやNKAによる昇圧作用は節遮断薬によって抑制されることから，主に交感神経系を介しているものと考えられる．また孤束核内へSPやNKBを微量投与して起きる圧反射に関しても，SPとNKBとの間の作用機序に違いがあることをすでに我々は報告している(4)．現在NPγについても検討を試みている．

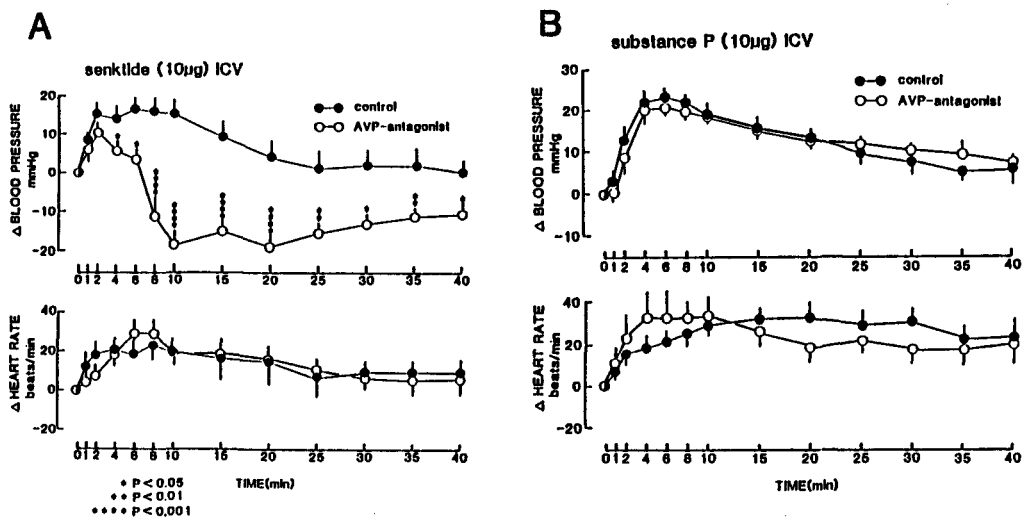



図2．タキキニン・ペプチド脳室内投与による血圧・心拍数の変化に対するvasopressin拮抗薬の効果

[文献]

(1) J.E.Maggio, Ann. Rev. Neurosci., 11, 13 (1988)
(2) J.E.Krause et.al., BioEssays, 10, 62 (1989)
(3) Y.Takano et.al., Brain Research, 369, 400 (1986)
(4) A.Nagashima et.al., Brain Research, 487, 392 (1989)
(5) K.Tateishi et.al., Regulatory Peptide, 24, 245 (1989)
(6) Y.Takano et.al., Brain Research, 445, 188 (1988)
(7) S.Lavielle et.al., Biochem. Pharmacol., 37, 41 (1988)
(8) U.Wormser et.al., EMBO J., 5, 2605 (1986)

# 47 視床下部のＮＰＹと膵内分泌調節ならびにその異常との関連性

阿部充志、斉藤昌之*、嶋津　孝
（愛媛大・医・生化一、*現・北海道大・獣医・生化）

〔要約〕

ニューロペプチド Ｙ（ＮＰＹ）は、中枢神経特に視床下部において摂食行動誘発作用を持っており、この作用は室傍核（ＰＶＮ）に投与した時に最も強く発現する。無麻酔、無拘束下のラットのＰＶＮにＮＰＹを微量注入し、血糖、膵ホルモンの動態を検討したところ、血糖、インスリン及びグルカゴン濃度の上昇を認めた。他方、同じく摂食誘発作用を持つノルエピネフリン投与時には、インスリンの分泌亢進は認められないので、ＰＶＮにおけるＮＰＹはインスリン分泌の調節因子の一つと考えられる。そこで、低インスリン糖尿症ラットを用いて、視床下部諸核のＮＰＹ含量を微量測定した。ストレプトゾトシンによる糖尿症ラットでは、ＰＶＮ及び腹内側核（ＶＭＨ）のＮＰＹ含量が有意に増加し、自然発症糖尿症ラット（ＢＢラット）では、ＰＶＮ及び弓状核（ＡＲＨ）のＮＰＹ含量の著増を認めた。これらの実験結果はＡＲＨ－ＰＶＮ系のＮＰＹ作動性ニューロンが生理的ならびに病理的に膵内分泌の調節に関与していることを示唆している。

［目的］

ＮＰＹは、36ケのアミノ酸残基よりなるペプチドで、哺乳類の中枢神経系及び末梢神経系に広く分布し、種々の生理活性を持つことが知られている。その中でも中枢投与時の摂食行動誘発作用は、ノルエピネフリン（ＮＥ）など他の因子に比べ強力であり、視床下部、特にＰＶＮに投与する時、最も有効であると報告されている(4)。また、ＮＰＹの脳室内投与によって、ラット及びニワトリで摂食開始と共にインスリン分泌が亢進するという知見が最近報告された(2,3)。そこで我々は、無麻酔・無拘束ラットを用いて、ＰＶＮへのＮＰＹの微量注入が膵内分泌にどのような影響を与えるかを検討した。さらに、膵内分泌の異常状態として糖尿症ラットを選び、低インスリン状態が持続した場合に、ＰＶＮその他の視床下部諸核における内在性ＮＰＹの変動を追究した。

［方法］

［実験１］体重 250-270g の ＳＤ系雄性ラットを使用し、麻酔下に脳定位固定装置を用いてステンレス製の微小カニューレを片側のＰＶＮに挿入固定した。さらに、採血用の心臓カテーテルを右頸静脈より挿入し留置した。１週間後に、無麻酔・無拘束下でＰＶＮにＮＰＹ及びＮＥを微量注入（0.5μl）し、ＮＰＹ及びＮＥの摂食行動誘発作用を確かめた。摂食行動の誘発を認めた動物に対して、今度はエサを与えない条件下でＮＰＹ及びＮＥをＰＶＮ内に微量注入し、注入10分前、３分前、10分後、20分後、30分後に心臓カテーテルより採血し血漿中のグルコース、インスリン、グルカゴン濃度を測定した。

［実験２］体重 320-330gのＳＤ系雄性ラットに、ストレプトゾトシン(STZ, 55mg/kg) を右頸静脈より注入し低インスリン糖尿症ラットを作成し、対照群には同量の生食水を注入した。ＳＴＺ投与後10日目に屠殺、脳を摘出し、ドライアイス上にて凍結した。脳の凍結切片を作成した後、視床下部のＰＶＮ、ＶＭＨ、ＡＲＨ、視交叉上核（ＳＣＮ）、外側核（ＬＨ）を punch out した。各試料は 0.1N酢酸中にてホモゲナイズ後、3,000g 15分間冷却遠沈して得られる上清を凍結乾燥し、試料中のＮＰＹ含量をＲＩＡ法にて測定した。Ｉ型糖尿病（ＩＤＤＭ）の自然発症モデルであるＢＢラットについても、上と同様の方法で視床下部諸核を分離し、ＮＰＹ含量を測定した。

［結果と考察］

ＰＶＮへＮＰＹを微量注入すると、摂食行動が誘発されるが、実際にはエサを与えないにもかかわらず、血糖値、血

中インスリン値の上昇が認められた (Fig.1)。また、同部位へのＮＥの注入でも血糖値及びグルカゴン値の上昇は認められたが、血中インスリン値の変動は認められなかった。血糖値の上昇は、膵グルカゴン分泌の増加によると考えられるが、グルカゴン分泌の亢進は、おそらくＰＶＮ－交感神経系の活性化によって引き起こされたものと思われる。また、ＮＰＹ投与時にのみ見られたインスリン分泌の亢進は、メチルアトロピンの前投与によって抑制されるので、ＰＶＮより膵ラ氏島への迷走神経を介する副交感神経系の活性化によると考えられる。以上の結果から、ＰＶＮへのＮＰＹ投与により、膵インスリンの分泌が特異的に亢進することが明らかになり、ＰＶＮにおけるＮＰＹが膵内分泌の神経性調節に関与していることが示唆される。

ＰＶＮにおけるＮＰＹ作動機構が生理的な場で発現しているか否かを知るため、末梢のインスリン欠乏モデル動物について、視床下部諸核のＮＰＹ含量の微量測定を試みた。ＳＴＺ－糖尿症ラットでは、ＰＶＮ、ＶＭＨのＮＰＹ含量に有意な増加がみられた (Fig.2)。また、自然発症糖尿症ラットであるＢＢラットでは、ＰＶＮ、ＡＲＨにおいてＮＰＹ含量の著しい増加がみられた (Fig.3)。ＰＶＮは視床下部の諸核の中でもＮＰＹ作動性神経線維が密に分布し、摂食行動や他の自律神経機能、例えば胃酸分泌に関与していることが報告されているが、この神経線維の多くはＡＲＨのＮＰＹ含有細胞由来と考えられている(1)。今回の我々の実験結果でも、ＳＴＺ、ＢＢラット共にＰＶＮでのＮＰＹ含量の増加が認められ、インスリンの低値が持続すると、その求心系路は不明であるが視床下部に情報が入力され、特にＡＲＨ－ＰＶＮ系において内在性のＮＰＹが変動することが判明した。このことは、上述のＮＰＹ作動ニューロン系が生理的ならびに病理的な条件下においても膵内分泌の調節機構として作動していることを示唆するものである。

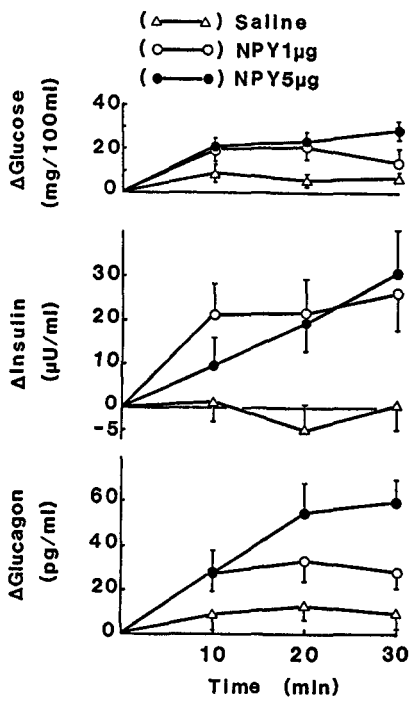



Fig.1 Effects of microinjection of NPY into the PVN on plasma glucose, insulin and glucagon levels.

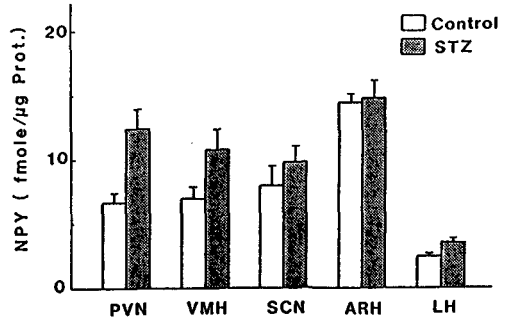



Fig.2 NPY content in specific regions of the hypothalamus in the streptozotocin-induced diabetic rats.

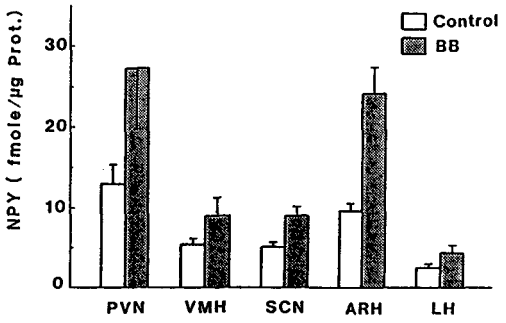



Fig.3 NPY content in specific regions of the hypothalamus in the BB rats.

(References)
1.Bai,F.L., Yamamoto,M., Shiotani,Y., Emson,P.C., Smith,A.D., Powell,J.F., Tohyama,M., (1985) Brain Res.331, 172-175
2.Kuenzel,W.J., McMurtry,J. (1988) Physiol.& Behavior 44, 669-678
3.Moltz,J.H., McDonald,J.K. (1985) Peptide 6, 1155-1159
4.Stanley,B.G., Leibowitz,S.F. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82,3940-3943

# 48　精神分裂病死後脳前頭前野のオピオイド受容体について

渋谷治男[1]、森博史[1]、高橋良[1]、融道男[2]、西川徹[3]
（東京医科歯科大学　医　神経精神科[1]、信州大学 医 精神科[2]、国立精神神経センター[3]）

〔要約〕　精神分裂病１２例および対照１０例の前頭前野皮質のオピオイド受容体について検索した。μ－受容体は$^3$H-DAGOを、δ－受容体は$^3$H-DADLEを用いて測定した。分裂病群において$^3$H-DAGO結合は内側前頭皮質および眼球運動領野で有意に増加していた。$^3$H-DADLE結合も内側前頭皮質、眼窩前頭皮質で有意な増加を認めた。特に内側前頭皮質および眼窩前頭皮質の$^3$H-DADLE結合量は抗分裂病薬を長期間服用しなかった群でも有意に増加しており、疾患に関連する変化であると考えた。同じ試料でメチオニンエンケファリン免疫活性も増加していたことから、分裂病においては前頭前野皮質のエンケファリン作動系の機能が亢進しているものと推察され、これが皮質下のドーパミンニューロンの活動に関与している可能性がある。

前頭前野は認知、情動、思考、意欲等の精神機能に係わる脳部位であり、精神分裂病は前頭前野の機能異常によるという考えがある。われわれは以前ドーパミン（DA）と深くかかわるエンケファリンを検索して、分裂病死後脳の前頭葉の一部でメチオニンエンケファリン免疫活性（MEI）の亢進を認めた。今回、同部位のμ－オピオイド受容体およびδ－オピオイド受容体を測定し検討を加えた。

［対象と方法］

分裂病脳は１２例で男７例、女５例。死亡時平均年齢は60.4才。DSM-IIIによる病型分類は解体型６、緊張型１、妄想型１、分類不能型４。死亡直前４０日以上にわたり抗分裂病薬を服用していない症例を非服薬群とした。対照群は男７、女３の計１０例で死亡時平均年齢は６６．７才。　前頭前野皮質は視床背内側核からの神経線維連絡を考慮して内側前頭皮質（Brodmann の領野９、１０、４６）、眼球運動領野（領野８）、眼窩前頭皮質（領野４５、４７）、眼窩皮質（領野１１、１２）に分けた。粗膜分画を作成しμ－ 受容体の測定には$^3$H-Enkephalin-(D-Ala-MePhe-Glyol)（$^3$H-DAGO）をリガンドとして用い、δ－受容体の測定には$^3$H-Enkephalin(2-D-Ala-5-D-Leu)($^3$H-DADLE)をリガンドとして$10^{-7}$MのDAGO存在下でおこなった。２５℃，１５０分間のインキュベーションの後減圧吸引濾過した。なを$10^{-6}$Mのlevallorphan存在下での結合量を非特異的結合とした。蛋白定量はウシγ－グロブリンを標準液としてBio-Rad法で行った。統計処理はMann-WhitenyのU検定（両側）を行いp<0.05以下を有意な差とした。

［結果］

ヒト前頭葉皮質の$^3$H-DAGO結合はScatchard解析によってKd:0.413nM、 Bmax：35.0fmol/mgprot、$^3$H-DADLE結合はKd:1.373nM、Bmax:39.7fmol/mgprotの値を得た。そこで0.78nM $^3$H-DAGO あるいは0.96nM $^3$H-DADLEの一点濃度を用いて前頭前野皮質のμ－受容体およびδ－受容体への結合量を求めた。 表に示したように$^3$H-DAGO結合量は分裂病群で全般的に高い傾向を示した。特に内側前頭皮質では対照群の156%、眼球運動領野では199%と有意な増加を認めた。$^3$H-DADLE結合についても内側前頭皮質および眼窩前頭皮質でそれぞれ187%、163%と対照群に比べ有意な増加をみた。これらの部位では分裂病非服薬群においても有意に増加していた。

［考察］

μ－受容体は分裂病の内側前頭皮質と眼球運動領野で、δ－受容体は内側前頭皮質と眼窩前頭皮質で有意に増

加していた。　非服薬分裂病群でも脳各部位でいずれも対照群に比較して高い傾向を示したこと、さらに内側前頭皮質、眼窩前頭皮質のδ一受容体は非服薬群でも有意に増加していたことから、分裂病におけるこれらのオピオイド受容体の増加が抗分裂病薬服用の結果ではなく、疾患そのものに関連する所見であることを示唆している。

われわれは以前に同じ試料のＭＥＩを測定して、分裂病群で高い傾向を認めた[1]。特に内側前頭皮質、眼球運動領野、眼窩前頭皮質では有意に増加していた。今回のオピオイド受容体についての所見と合わせ考えると、分裂病前頭前野皮質のオピオイド作動系は機能亢進状態にあると推察される。しかし、個々の症例について調べると、オピオイド受容体結合量とＭＥＩとの間に有意な正の相関関係を検出するまでには至らなかった。

すでに同じ脳資料で分裂病群の被殻、黒質、赤核、視床下核でチロジン水酸化酵素活性が高いことが報告されている[2]。内側前頭皮質、眼窩前頭皮質、眼球運動領野の$^3$H-DAGO結合量が尾状核や側坐核のチロジン水酸化酵素と高い正の相関を示した。内側前頭皮質の$^3$H-DADLE結合は尾状核、被殻、黒質のチロジン水酸化酵素活性と、眼窩前頭皮質の$^3$H-DADLE結合は側坐核のチロジン水酸化酵素活性と高い正の相関を示した。このように前頭前野のオピオイド受容体の増加が黒質·線条体ＤＡ系の神経終末部位あるいは中脳·辺縁系ＤＡ神経終末部位のチロジン水酸化酵素活性と相関することは興味ぶかい所見であり、この酵素活性の増加に前頭前野のオピオイド作動系の機能亢進が関与していることを示唆している。

脳試料の作成にご協力くださった国立精神神経センター疾病研究第三部の諸先生方ならびに実験に協力していただいた橋本千津子さん、林菜海子さんに感謝いたします。

表：精神分裂病死後脳前頭前野皮質の$^3$H-DAGOおよび$^3$H-DADLE結合量

| | $^3$H-DAGO結合 | | $^3$H-DADLE結合 | |
|---|---|---|---|---|
| | 対照群 | 精神分裂病群 | 対照群 | 精神分裂病群 |
| 内側前頭皮質 | 6.08 ± 1.00 (9) | 9.51 ± 1.11 (12)*<br>非服薬群 8.48 ± 1.44 (6)<br>服薬群 10.54 ± 1.70 (6)* | 4.21 ± 0.60 (9) | 7.89 ± 0.82 (12)***<br>非服薬群 7.13 ± 1.36 (6)*<br>服薬群 8.65 ± 0.95 (6)** |
| 眼窩前頭皮質 | 7.68 ± 1.27 (8) | 10.60 ± 0.62 (12)<br>非服薬群 9.68 ± 0.69 (6)<br>服薬群 11.51 ± 0.95 (6) | 3.71 ± 0.60 (8) | 6.05 ± 0.80 (12)*<br>非服薬群 6.46 ± 1.25 (6)*<br>服薬群 5.63 ± 1.11 (6) |
| 眼球運動領野 | 10.38 ± 3.06 (6) | 20.67 ± 2.78 (12)*<br>非服薬群 18.45 ± 1.75 (6)<br>服薬群 23.33 ± 5.88 (5) | 6.12 ± 1.70 (6) | 7.61 ± 0.55 (11)<br>非服薬群 6.90 ± 0.69 (6)<br>服薬群 8.45 ± 0.78 (5) |
| 眼窩皮質 | 21.33 ± 5.08 (8) | 26.04 ± 2.99 (11)<br>非服薬群 25.74 ± 6.14 (5)<br>服薬群 26.29 ± 2.75 (6) | 5.94 ± 1.35 (8) | 7.84 ± 0.64 (11)<br>非服薬群 8.29 ± 1.10 (5)<br>服薬群 7.47 ± 0.80 (6) |

平均値±標準誤差（症例数）　　＊：p<0.05, ＊＊：p<0.01, ＊＊＊：p<0.002 (Mann-Whiteny U-test)
(fmol/mgprotein)

［文献］

1　渋谷治男：エンドルフィンと精神分裂病、臨床精神医学、12:713-724、1983

2　融道男、渋谷治男、野田恭平、三ツ汐洋、高嶋瑞夫、俣賀宣子、渡部修三、西川徹、市川広伸：精神分裂病死後脳黒質、赤核、視床下核および視床の神経伝達物質の生化学的分析、精神経誌、85:527-541、1983

# 49 脳に特異的に存在する超らせんＤＮＡ結合タンパク質

筒井公子、岡田尚志郎、筒井研＊、庄盛敏廉、関周司＊
（岡山大、医、脳研病態生化、癌研生化＊）

〔要約〕

ラットの脳、肝、腎、脾より細胞核を精製し、それぞれの核の塩可溶性画分に含まれる超らせんＤＮＡ結合タンパク質を調べたところ、脳に特異的に存在する分子量１６５Ｋ Ｄａのタンパク質が見いだされた。このタンパク質は核骨格には存在しない。１６５Ｋタンパク質は線状ＤＮＡも超らせんＤＮＡも結合するが、両者が共存する場合には超らせんＤＮＡを選択的に結合した。超らせんＤＮＡに対する特異性はネオクプロインにより消失した。

ＤＮＡの超らせん構造は、複製、転写、組み換え、修復の過程に深く関わっていることが示唆されている。この超らせんＤＮＡを特異的に認識して結合するタンパク質は上記の過程において重要な役割を果たしていると思われる。我々は細胞核の核骨格に超らせんＤＮＡ結合タンパク質を見いだし解析をすすめているが（４）、核内には他にＨＭＧタンパク質、Ｚ－ＤＮＡ結合タンパク質など超らせんＤＮＡを認識するタンパク質が存在することが判明している（１，２）。今回、脳の細胞核に特異的に存在する超らせんＤＮＡ結合タンパク質を確認したので報告する。

［実験方法］細胞核の精製　２週齢のＳＤラットの脳、肝、腎、脾をそれぞれ2.2M sucrose/5mM $MgCl_2$/5mM 2-mercaptoethanol中でホモジナイズし、70000 x g, 1時間遠心して核を得た（４）。

核抽出液と核骨格の調製　精製核を0.5M NaCl/140mM 2-mercaptoethanolで処理し可溶化されるタンパク質を遠心上清として得た（３）。核骨格の調製は筒井らの変法によった（４）。

タンパク質ブロッティングとＤＮＡ結合反応　タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、ＰＶＤＦ膜(Millipore)に電気泳動的にトランスファーしたのち、膜上でビオチンラベルの超らせん型pBR322ＤＮＡ（Ｉ型）と反応させた。ＤＮＡを結合したタンパク質のバンドはストレプトアビジンーアルカリホスファターゼ複合体を用いた呈色反応により検出した。

［結果］４種類の細胞核（脳、肝、腎、 脾）より得た核抽出液のタンパク質の泳動パターンを図１（Ａ）に示す。分子量７万以下のタンパク質には共通して存在するものが多いが、核の種類により特徴的な像を呈する。ＰＡＧＥで分離したタンパク質をＰＶＤＦ膜にブロットし、ビオチンラベルのＩ型ＤＮＡ（超らせんＤＮＡ）の結合をみた（図１、Ｂ）。７５ＫのＤＮＡ結合タンパク質は脳、肝、腎ともに見いだされる。このタンパク質は核骨格の構成成分でもある（図３）。肝、腎に共通する超らせんＤＮＡ結合タンパク質は存在するが（分子量約１３０Ｋ）、脳には脳特異的な超らせんＤＮＡ結合タンパク質がみられる（１６５Ｋ）。この１６５ＫタンパクへのＤＮＡの結合を詳しく調べると（図２）、線状ＤＮＡ（Ⅲ型）も超らせんＤＮＡ（Ｉ型）も共にこのタンパク質に結合するが（図２、レーン１と４）、Ｉ型と過剰のⅢ型ＤＮＡが共存する場合にはＩ型ＤＮＡに特異性を示す（図２、レーン６）ことがわかった。結合しているのがＩ型ＤＮＡであることは、ラベルしていないＩ型ＤＮＡの添加により結合が競合されることにより証明された（図２、レーン７）。Ｉ型ＤＮＡの結合は、過剰のⅢ型ＤＮＡの存在下でのみ、銅のキレーターであるネオクプロインにより阻害された（図２、レーン２、５と８）。核骨格タンパク質について同様の反応を行うと、Ｉ型ＤＮＡ結合タンパク質として１２０Ｋと７５Ｋタンパク質が検出されるのみで（図３、レーン６）、１６５Ｋタンパク質はＩ型、Ⅲ型いずれのＤＮＡを基質にしても検出されなかった（図３）。図３に示されている分子量約１５０Ｋのタンパク質はＤＮＡの結合に関しては再現性がない。

［考察］ラット脳細胞核より調製した核骨格のＤＮＡ結合特性をしらべ、核骨格に超らせんＤＮＡが特異的に結合する部位の存在することは既に報告した（４）。さらに結合に関与していると思われるタンパク質を同定し、ネオクプロインがこのタンパク質の超らせんＤＮＡに対する特異性を消失させることを示した（５）。図２に示す結果は、塩可溶性の１６５Ｋタンパク質に対しても、ネオクプロインがその超らせんＤＮＡに対する特異性を失わせることを示しており興味深い。超らせんＤＮＡを特異的に認識するタンパク質がＤＮＡの転写、修復などの過程で果たす役割はまだ解明されてはいないが、核骨格に存在する１２０Ｋ，７５Ｋタンパク質のように、各種臓器に共通するものは何らかの基本的な過程に関わっている可能性が考えられる。それに対し、１６５Ｋタンパク質のように脳に特異的に存在するものは、その組織における特異的なＤＮＡの転写、修復、組み換えに関わっていることが想像される。

REFERENCES: 1) Nordheim, A., Tesser, P., Azorin, F., Kwon, Y. H., Moller, A., and Rich, A. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79, 7729-7733. 2) Schröter, H., Maier, G., Ponsting, H., and Nordheim, A. (1985) EMBO J. 4, 3867-3872. 3) Tsutsui, K., Tsutsui, K., Sakurai, H., Shohmori, T., and Oda, T. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 1116-1122. 4) Tsutsui, K., Tsutsui, K., and Muller, T. (1988) J. Biol. Chem. 263, 7235-7241. 5) 筒井公子、庄盛敏廉、筒井研 (1988) 生化学 60, 711.

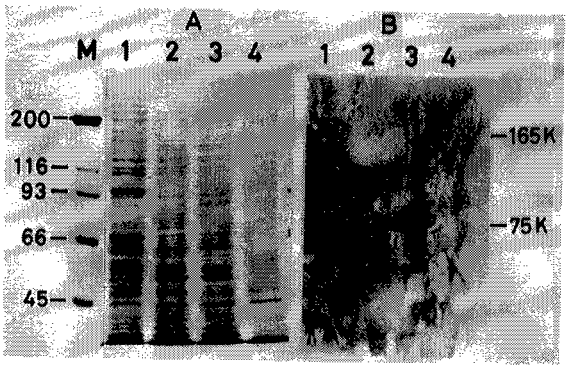



Fig.1 Detection of supercoiled-DNA-binding proteins in nuclear extracts. A) Nuclear proteins were seperated by 7.5% SDS-PAGE and stained with CBB. B) Proteins were blotted on a PVDF membrane and incubated with biotinylated pBR322 DNA (form I) in the presence of excess calf thymus DNA. Brain(1), liver(2), kidney(3), spleen(4). Migration of molecular weight marker is shown on the leftmost side.

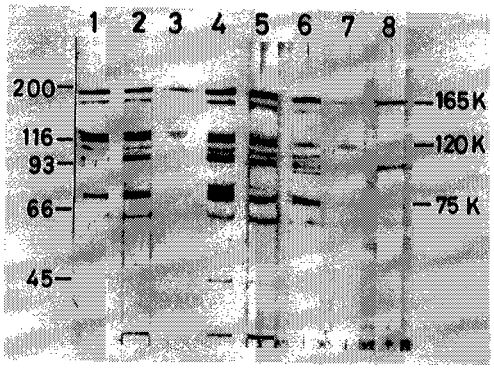



Fig.2 DNA-binding proteins in rat brain nuclear extract. DNA-binding assay was performed on the protein-blotted PVDF membrane using biotinylated pBR322 DNA (form III) (lanes 1-3) or biotinylated pBR322 DNA (form I) (lanes 4-8) as substrates either in the presence of neocuproine (lanes 2,5 and 8), calf thymus DNA (form III) in excess (lanes 3,6-8), or unlabeled pBR322 DNA (form I) in excess (lane 7).

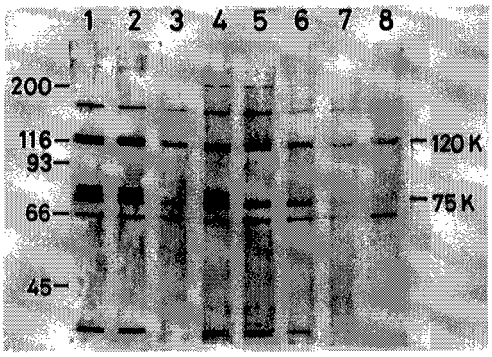



Fig.3 DNA-binding proteins in rat brain nuclear scaffold. The conditions for the DNA-binding were the same as shown in the legend to the Fig.2.

# 50 ＰＣ１２ｈ－ＡＧ８細胞を用いた６８ｋＤニューロフィラメント遺伝子の発現調節機構の解析

中平健祐、高山千利、和田健太郎、池中一裕、津久井弘子*、畠中寛*、御子柴克彦
（大阪大・蛋白研　機能制御、*生合成）

〔要約〕
ラット褐色細胞腫PC12hの亜株PC12h-AG8は、神経成長因子(NGF)に対しPC12hより敏速に応答し、約１日で半数の細胞が、そして約３日でほぼすべての細胞が突起を形成する。このPC12h-AG8におけるG8kDニューロフィラメント(NF)のmRNAの発現をノーザンブロット法で解析したところ、突起伸展と同様に、きわめて敏速にNGFに対して応答した。さらに、その応答のパターンは2.5kbと4kbの２種のNF-mRNAで異なっており、2.5kb mRNA は3hrで一過性の増加を示し、その後減少したが、4kb mRNAは、6hr後に増加し、24hr後にも変わらなかった。この 68kD NF-mRNA の増加が転写量の増加によるものかどうかを調べるために Nuclear run off assay を行ったところ、有為な変化はみられなかった。アクチノマイシンＤ を用いて、mRNAの安定性を調べたところ、NGF存在下にmRNAの安定化が観察された。したがって、PC12h-AG8において、68kD NF-mRNA の発現は、post transcriptional に制御されていると考えられた。

〔はじめに〕
ニューロフィラメント(NF)蛋白質は神経細胞のみに特異的に発現する中間径線維蛋白質である。68kD NFの遺伝子は４つのエクソンからなり、第４エクソンのpoly(A) siteのalternate useにより2.5kb、4kbの２種のmRNAが産生される(5)。68kD NFの発現調節機構の解析には、神経成長因子(NGF)に応答して神経突起を形成するラット褐色細胞腫のPC12細胞は格好の系である。PC12において68kD NF-mRNAはNGFに応答して増加するが、これは主として転写の増加によるものと考えられmRNAの安定性は関与していないとされている(4)。しかしながら、2.5kb mRNAと4kb mRNAが同調して増加しないこと(1)から、post transcriptionalな調節機構の存在する可能性もある。我々は、従来PC12hを用いてNFの発現調節機構を解析してきたが、PC12においてNGF誘導後NF-mRNAの増加が観察されるまで数日要するためプロモーター活性をtransient assayで測定するのが困難であった。そこで今回、PC12hより、NGFに対して早く応答する亜株PC12h-AG8を用い、この細胞を用いて68kD NFの発現を解析したところ、post transcriptionalに制御を受けていることを示す結果を得たので報告する。

〔材料と方法〕
培養：PC12h-AG8は　10%牛胎児血清、5%馬血清を含むDulbecco変法Eagle最小培地にて培養した。NGFは、50ng/mlを培養液に加え、コラーゲン処理した培養皿にて培養した。アクチノマイシンＤは10μg/mlの濃度で用いた。 PC12h-AG8からのcytoplasmic RNA及び、細胞核の調製はGreenbergらの方法(2)に従った。
Northern blot解析：cytoplasmic RNAは、１レーンあたり20μgを用いた。プローブには マウス 68kD NF cDNA (NF 68 (3); Cowan 博士より恵与)のBglII - EcoRI 断片をランダムプライマー法にて標識して用いた。
Nuclear run off assay：Greenbergらの方法(2)に従った。テンプレートＤＮＡにはNorthern blot解析に用いたものと同じcDNAクローンをEcoRIで切断して用いた。

〔結果と考察〕
PC12h-AG8は、親株のPC12hと形態的に少し異なり、NGF非存在下においても、よくコラーゲンに接着し、偏平で、すこし大型の細胞である。NGF存在下に培養すると、PC12h同様、長い突起を伸ばし交感神経細胞様に分化する。このとき、Tyrosine hydroxylase活性も増大する。NGFに対する応答の速度は、PC12hに比較して非常に早く、PC12hにおいては50%の細胞が突起を伸展するのに約６．６日（血清存在下）要するのに対し、PC12h-AG8は、１日しか要しない（図１）。また、PC12h-AG8ではNGF投与後ただちに突起が伸長し始めるので、神経細胞への分化がより進んだ段階にある可能性が考えられる。

PC12h-AG8における68kD NF-mRNAのNGFによる誘導をNorthern blot法により解析した（図２Ａ）。68kD NF-mRNA量には約3hr後から変化がみられ、PC12における場合と異なり素早い応答を示した。また、同一のpromoterより転写さ

れた後poly(A) siteのalternate useにより生じる2.5kbと4kbの２種のmRNAは、互いにまったく異なる応答を示した。すなわち、2.5kb mRNAは、NGF添加後3hrというきわめて早い時点で3.2倍に増加し、その後減少したのに対し、4kb mRNAは、6hr以後、約1.7倍に増加した。２種のmRNAが別々の制御を受けていることは、PC12h-AG8においては転写のinitiationよりもpost transcriptionalなRNAのprocessingが重要な役割を果たしている可能性を示唆している。これについて検討するために、アクチノマイシンＤを用いた転写阻害実験をおこなった。（図２Ｂ）NGFを添加して2hr後からアクチノマイシンＤを加えた場合、NGF非存在下に加えた場合と比較して、有意にmRNAの安定化がみられ、その傾向は、2.5kb mRNAにおいてより顕著であった。また、NGF添加による転写量の変化をNuclear run off assay によって調べたところ、変化はみられなかった。したがって、PC12h-AG8 のNGFに対する素早い応答において、68 kD NF-mRNA量の変化は、i)転写量の増大によるものではなく、ii)post transcriptionalな制御によるものであり、しかも、iii)２種のmRNAは、それぞれ独立に制御を受けていることが明らかとなった。

68kD NFの発現調節には、従来考えられていた転写活性によるもの以外に、post transcriptionalな調節機構が存在することがあきらかとなったが、この調節機構がNGFによる誘導以外の場合にも働くのか、特にin vivoでどのように働いているのかは不明であり今後検討を要する。しかし、素早い応答性から考えると、神経突起の再生のような早い突起伸展の際に、重要な役割を果たしている可能性が考えられ興味深い。

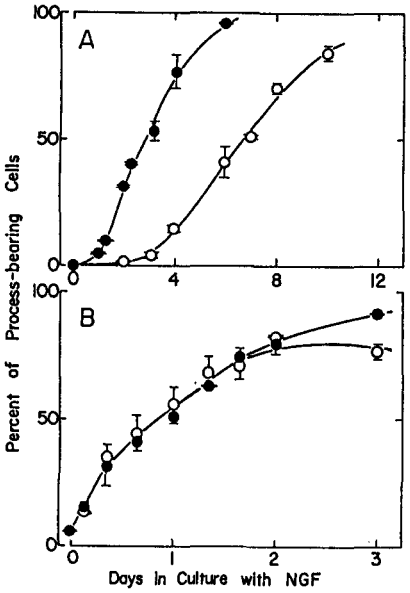



図１．　NGFによる神経突起の誘導
A）ＰＣ１２ｈ
B）ＰＣ１２ｈ－ＡＧ８
○：血清存在下に培養
●：無血清培地で培養
２０μｍ以上の突起を持つ細胞数を数えた。

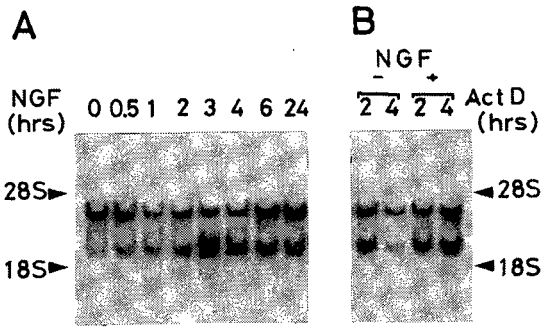



図２．　68kD NF-mRNA の Northern blot 解析
A）NGFによる 68kD NF-mRNAの誘導
NGFを添加後 0, 0.5, 1, 2, 3, 6, 24hr後に cytoplasmic RNAを回収し、Northern blot解析した。
B）アクチノマイシンＤ処理に対するNGFの効果
NGF存在、非存在下に2hr培養し、アクチノマイシンＤを加え 2, 4hr後にcytoplasmic RNAを回収、Northern blot解析した。

［文献］
(1) Dickson, G. et al.(1986) EMBO J. 5, 3449-3453
(2) Greenberg, M.E. et al.(1984) Nature 311, 433-438
(3) Lewis, S.A. et al.(1985) J.Cell Biol. 100, 843-850
(4) Lindenbaum, M.H. et al.(1988) J.Biol.Chem. 263, 5662-5667
(5) 和田健太郎ら　第６２回日本生化学会要旨

# 51 Neuron Specific Enolase遺伝子の転写制御領域の検討

嶋村建司　柳谷悦子　小倉明彦*　工藤佳久*　高橋康夫
（新潟大学　脳研究所　神経薬理、*三菱化成生命研究所　脳神経薬理）

〔要約〕 Neuron specific enolase (NSE) 遺伝子の神経細胞特異的な発現機構を検討するために、NSE 遺伝子プロモーター領域及び隣接する領域をレポーター遺伝子である CAT 及び lacZ とつないだキメラ遺伝子を作製し、NSE を発現している細胞として、Neuronの primary culture, PC12, NSEを発現していない細胞として、C6, glia primary culture 等の細胞に導入し transient assay をおこなった。各種の欠失を導入する遺伝子に加え検討した結果、 NSE の細胞特異的発現には NSE 遺伝子の 1st intron の 1st exon 側半分の約 500b が必須であった。転写開始点より上流は -190b まであれば特異的な発現はおこるが、さらに上流 -2.7 kb まであると転写活性は増加した。しかしこの 5'側上流の転写促進活性は NSE を発現していない細胞においても認められる特異性のないものであった。一方 ID sequence は NSE 遺伝子の転写調節に影響をあたえなかった。

NSE は解糖系の酵素エノラーゼのアイソザイムであり、神経細胞のマーカー蛋白として知られている。我々は神経系における遺伝子発現機構解析のモデルのひとつとしてこの遺伝子に注目しその構造等の検討をおこなってきた[1,2]。今回は NSE 遺伝子が神経細胞で特異的に発現するのに必要な領域 (cis-acting element) を培養細胞を用いた transient expression assay により検討を加えた。そのために内在的に NSE を発現している培養細胞の検討をおこない PC12では NSE と NNE がほぼ半分ずつ発現していること、さらに neuron primary culture では培養一週間で生後30日の脳の NSE mRNA と同等なレベルの発現がおこることを見出した。これらの培養細胞に NSE 遺伝子とレポーター遺伝子とのキメラ遺伝子を導入し、NSE を発現していない細胞 C6, glia primary culture 等と比較し、その特異的な発現に関与する領域の検討をおこなった。更に脳における転写調節に関わるのではないかとされていた ID sequenceが NSE 遺伝子の転写に与える影響についても検討を加えたので合せて報告する。

【実験方法】

NSE 遺伝子の最上流の転写開始点を +1 としたとき -4.5kb 上流より 1st exon 及び1st intron を含む領域にレポーター遺伝子である CAT 或いは lacZ をつないだものを基本にし、それより様々な欠失体を作製した。neuron primary culture はラット１６日胚の neocortex よりおこなった。培養４日目に DNA をリン酸カルシウム法により導入し 48-72 時間後に細胞を集め CAT 或いは lacZ の活性を測定した。PC12 は 5% 馬血清、10% FCS を含む D-MEM で培養し DNA の添加 4 時間前に β-NGF を 20ng/mlになるようにくわえた。トランスフェクションの効率は、internal control としてモロニーウイルスのプロモーターに lacZ を結合した遺伝子を普通 1/10 量 co-transfection して補正した。

【結果及び考察】

HeLa cell lysate をもちいた cell free 転写系での検討により、NSE遺伝子は、1st exon とその転写開始点5'側上流-190b まであれば、正しい位置より転写がおこることをS1 nuclease mapping等で明らかにしている[2]。この領域にレポーター遺伝子 CAT をつなぎ、各種の培養細胞に導入するといずれの細胞においても弱い発現が認められた。更に-190 b より転写開始点にむかい欠失を加えていくと、どの細胞においても程度の差は存在するが、転写量の増減が同じパターンでおこることから、この領域は細胞特異性のない基本的なプロモーター領域と考えた。

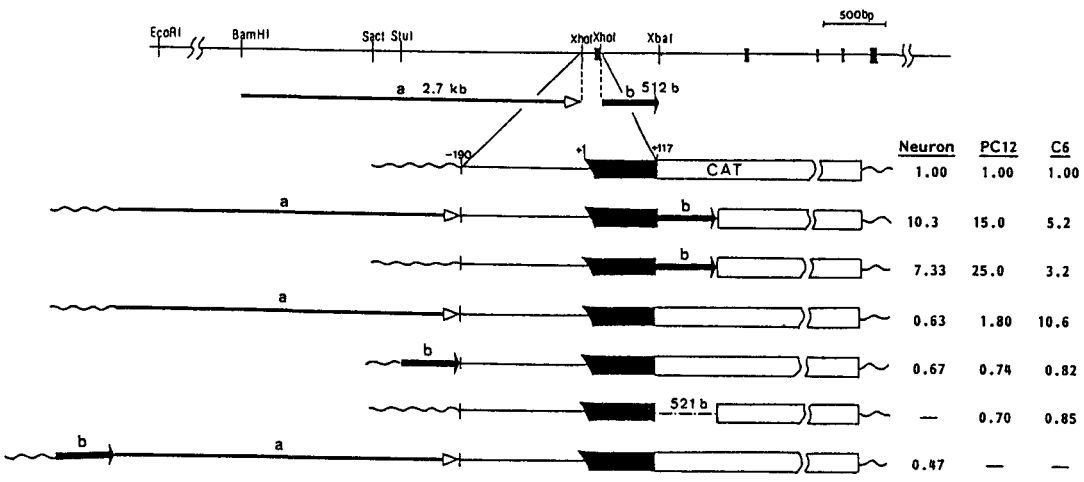
neuron primary culture に導入したキメラ遺伝子のうち最大の転写活性を示したものは、上流 -4.5kbと 1st exonをはさみ、1st intronの 5'側半分約 500b を含むものであった。上流側は -2.7kbまで欠失しても転写活性の低下は認められなかったが、1st intron前半分の 500b を欠失すると転写活性はほとんどなくなった。逆に5'

側上流を-190まで欠失しても、1st intron前半分 500b が存在すれば、活性は最大活性の 70%までしか低下しなかった。他の intronの領域をこの 500b のかわりに結合してもこの転写促進活性は認められなかった。この傾向は PC12でも同様で、-190bより 1st intron 500bまでを含むものは非常に高い転写活性を示すが、1st intron 500b を欠失すると 5'側上流の有無に関わらずその転写活性はほぼなくなる。一方、NSEの転写がほとんどおこなわれていない C6、glia primary culture 等の細胞では 5'側上流の領域は転写を増進させるが、1st intron 500b が存在するとその増進を抑制する傾向がみられた。また、-190から1st intron 500b のみでは、C6 では基本プロモーターの数倍の活性をしめすが、そのほかの細胞では基本プロモーターと同じレベルのごく弱い活性しか示さなかった。このことから、NSE 遺伝子の発現は 1st intron前半分の約 500b の中に存在する cis-acting elementにより特異性を規定され 5'側上流の転写促進活性領域と協調し制御されていると考えられる。ただ、この領域に存在する神経細胞に特異的な転写促進活性は、位置を変えると消失することから、位置特異性があるものと考えられる。更に、NSE を発現している細胞にはこの領域に作用する NSE 遺伝子に特異的な因子の存在が予想できる。 ID sequenceは、NSE遺伝子の3'側下流2.5kbに存在しているが、この ID sequenceが、NSE の転写に関与するか否かを検討した。NSE と CAT のキメラ遺伝子の NSE 遺伝子上流領側と CAT 遺伝子下流にID sequenceをつなぎ、各種の培養細胞に導入した結果、NSE の転写の有無に関わらずID sequenceをつないだものとの転写量の変化は認められなかった。更に、PC12 、neuron primary cultureではほとんど転写されないpSV2CATのプロモーターの上流、下流にもID sequenceをつないでみたが、その転写活性には影響を与えなかった。これらの実験からは、神経系においての転写に関与するのではないかという考えは否定される。

【文献】

1) Sakimura,k.et al., Proc.Nalt.Acad.Sci.USA (1985) 82, 7453-7457

2) Sakimura,k.et al., Gene (1987) 60, 103-113




(図) 各種の欠失や変異を加えた NSE 遺伝子と CAT 遺伝子のキメラ遺伝子を neuron primary culture ,PC12 ,C6 に導入したときの CAT の活性をしめす。各々の細胞において -190 より 1st exon までの NSE 遺伝子領域と CAT 遺伝子をつないだときの活性を 1.00 としたときの相対活性をしめす。

# 52 網膜錐体細胞に特異的に発現しているカルシウム結合蛋白質ｖｉｓｉｎｉｎのｃＤＮＡクローニングとその光による誘導

山形要人、後藤薫＊、郭哲輝、近藤尚武＊、三木直正
（金沢大・がん研・薬理、　医・第一解剖＊）

「要約」
Visininはニワトリ網膜錐体細胞に特異的な24kDaの蛋白質である。その錐体細胞での機能を探るために、visinin cDNAのクローニングを行った。ニワトリ網膜λgt11ライブラリーを抗visinin血清でスクリーニングし、一種類の陽性クローンを得た。このクローンが、網膜錐体細胞の24kDaの蛋白質、すなわち、visininをコードしていることが、Northern blot, in situハイブリダイゼーション、エピトープ選択法などによって確かめられた。このcDNAをプローブにして、extension libraryをスクリーニングし、960b.p.のほぼ完全長のcDNAを得た。このcDNAの塩基配列より、visininが3個のE-Fハンド構造をもち、$Ca^{++}$を結合すると考えられた。さらに、松果体を培養し、光を4日間照射し続けると暗所で培養した場合に比べて、明らかにvisinin陽性細胞が増加していた。これらの結果より、visininが、錐体細胞に特異的な$Ca^{++}$結合蛋白質で、光により誘導されることから、錐体細胞の光変換に関与している可能性が示唆された。

Visininは、ニワトリ網膜錐体細胞に特異的に局在する、分子量約24,000、pI約5の可溶性蛋白質である(2,3)。現在のところ、桿体細胞については、phototransductionのメカニズムが明らかになりつつあるが、錐体細胞については、色覚物質以外は、生化学的情報がなく、visininの機能を知ることが、そのメカニズムを探る一つの手がかりになると考えられる。そこで我々は、visinin cDNAのクローニングを行い、その解析を行った(8)。

「材料および方法」
1) ニワトリ胚(19日目)網膜poly(A)$^+$RNAより、Gubler-Hoffmanの方法(1)に従ってcDNAを合成し、Huynh(4)の方法に従ってλgt11 libraryを作製した。また、visinin cDNAに相補的なプライマー(22mer)を合成し、それを用いて、extension libraryを作製した。
2) λgt11 libraryのスクリーニングは、抗visinin血清（ウサギ）を用い、Huynhら(4)の方法に従った。また、extension libraryのスクリーニングは、visinin cDNAをプローブにして、常法通り行った(5)。
3) エピトープ選択法は、Weinbergerらの方法(7)に従った。

「結果および考察」
抗visinin血清を用いて、ニワトリ網膜λgt11 libraryをスクリーニングし、一種類の陽性クローンを得た。このファージをY1089に溶原化し、β-galactosidaseとの融合蛋白質を作らせ、スクリーニングに用いた抗体と反応させると、IPTGで誘導される融合蛋白質のみが反応した。また、抗visinin血清中に、少量の抗calbindin抗体がふくまれている(6)のでニトロセルロース膜上の融合蛋白質とこの抗体を反応させ、特異的に吸着している抗体だけを酸性溶液で溶出した。この抗体を用いて、Westernブロッティングを行うと、網膜の24kDa蛋白質とのみ反応し、他の組織の蛋白質とは反応しなかった（図１）。また、同じ抗体を用いて、免疫組織化学を行ったところ、網膜の視細胞内節から外顆粒層にかけて染色が認められた。また、松果体にもvisinin陽性細胞がみられた。

そこで、そのcDNAをプローブにして、Northernハイブリダイゼーションを行うと、網膜の約12S(～1,000塩基)のmRNAのみと反応した（図２）。同じプローブでin situハイブリダイゼーションを行うと、やはり視細胞内節から外顆粒層にかけて多数のグレインが認められた（図３）。このcDNAは、完全長に足りない(620b.p.)ので、visinin cDNAに相補的なプライマーを用いてextension libraryを作製し、ほぼ完全長(960b.p.)のクローンを得た。その塩基配列を、シークエンサーを用いて決定したところ、visininがcalmodulinやtroponin Cと相同性のあるE-Fハンド構造を3個持ち、$Ca^{++}$を結合することが予想された。このうち、一番N末側のCa結合ドメイン（I）は、そのCa結合ループ中にCysを1個多く含み、実際は$Ca^{++}$が結合しない可能性がある。

また、光による影響をみるために、培養松果体を、一方は4,000ルクスの白色蛍光灯下、もう一方は完全に遮光して培養し、4日後に、visinin発現量を免疫組織化学的に調べると、明らかに、明所で培養した方が、visinin陽性細胞数が増加し

ていた。これらの結果よりvisininが、錐体細胞特異的なCa$^{++}$結合蛋白質でphototransductionに関与している可能性があると考えられる。近年、視細胞のG-cyclaseが、ある種のCa$^{++}$結合蛋白質によって調節されているという報告があり、visininの作用を考える上で興味深い。また、Ca$^{++}$結合蛋白質として、分子進化の上でも、さらに、錐体細胞特異的遺伝子発現のメカニズムのモデルとしても興味が持たれるが、現在cosmidライブラリーより、visinin遺伝子を単離し、その解析を進めている。

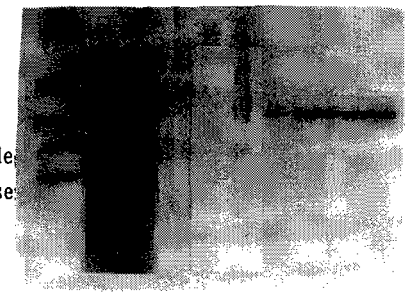


Fig. 1 Induction of the $\beta$-galactosidase-visinin fusion protein by IPTG.

Lysogens of $\lambda$vis4 were induced with (+) or without (-) isopropyl-thiogalactoside (IPTG). After induction, cells were collected and dissolved. The cell lysates were analyzed on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel(left). The separated proteins were transferred to a nitrocellulose paper and reacted with anti-visinin serum. A single protein band was detected by anti-visinin serum(right).



Fig 2 Northern analyses by using visinin cDNA as a probe.

Total RNAs extracted from retina (lane 1), brain (lane 2), liver (lane 3), heart (lane 4), intestine (lane 5) and kidney (lane 6) from 19-day-old chick embryos isolated by the guanidine method were resolved on a 1% agarose gel (60 ug RNA/lane), and transferred to a nylon filter. The filter was hybridized with nick-translated EcoRI fragment (365bp), washed at high stringency, and exposed to a X-ray film. Positions of 28S and 18S ribosomal RNA are shown.

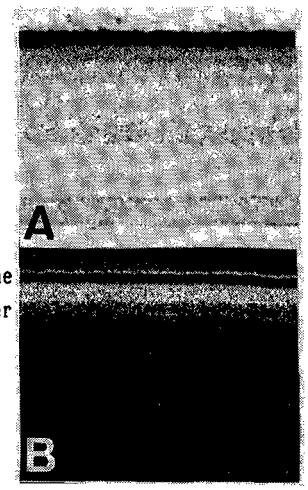



Fig 3 In situ hybridization by using visinin cDNA probe.

Frozen section of 3-day-old chick retina was hybridized to $^{35}$S labeled visinin cDNA. After hybridization and washing, the section was dipped in NTB 2 emulsion and exposed for 2 weeks at 4℃ before development (A). Gimsa stain, bright field illumination. (B) Dark field illumination of the same section. The radioactivity is concentrated in the outer nuclear layer and inner segment.

文献

1) Gubler, U. and Hoffman, B.J. (1983) Gene, 25, 263-269
2) Hatakenaka, S., Kuo, C-H., and Miki, N. (1983) Dev. Brain Res., 10, 155-163
3) Hatakenaka, S., Kiyama, H., Tohyama, M., and Miki, N. (1985) Brain Res., 331, 209-215
4) Huynh, T.V., Young, R.A., and Davis, R.W. (1985) in DNA Cloning Techniques: A Pradical Approach (Glover, D., ed.) pp49-78, IRL Press, Oxford
5) Kuo, C-H., Yamagata, K., Moyzis, R.K., Bitensky, M. W., and Miki, N. (1986) Mol. Brain Res., 1, 251-260
6) Pasteels, B., Miki, N., Hatakenaka, S., and Pochet, P. (1987) Brain Res., 412, 107-113
7) Weinberger, C., Hollenberg, S.M., Ong. E.S., Harmon, J. M., Bower, S.T ., Cidolowski, J., Thomson, E.B., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M.(1985)Science, 228, 747-742
8) 山形要人(1989) 金沢大学十全医学誌、印刷中

## 53　ヒトＳ１００蛋白βサブユニットのｃＤＮＡクローニング

森井 研＊　　桑野 良三　　高橋 康夫
（新潟大・脳研・＊脳外科，神経薬理）

〔要約〕

ヒト剖検脳よりＲＮＡを調製し、Gubler and Hoffman 法により合成したｃＤＮＡをλgt10 に挿入し、ｃＤＮＡライブラリーを作成した。ラットＳ１００βcDNAをプローブとしてスクリーニングし、ヒトＳ１００βcＤＮＡをクローニングした。得られたヒトＳ１００βｃＤＮＡは全長で787bpあり、276bpの翻訳領域，57bpの5'非翻訳領域，poly Aを43bp含む454bpの3'非翻訳領域から成っていた。northern blot 解析から、マウス、ラット、ウシのＳ１００βｍＲＮＡは1500～1600bであるのに対して、ヒトでは800～850bの大きさであり、得られたヒトＳ１００βｃＤＮＡは全長を含むと考えられた。翻訳領域は、ラットと塩基配列で85%のホモロジーを示し、アミノ酸配列では、92個のアミノ酸中、2個のアミノ酸が異なるのみであった。一方、3'非翻訳領域はラットの約半分の長さで、そのうち翻訳領域の近傍は比較的類似していたが、その下流ではホモロジーが低く、ヒトＳ１００βｍＲＮＡとのみハイブリダイズした。３'非翻訳領域はヒトＳ１００βサブユニットに特異的なプローブとして有用と考えられる。

神経組織において細胞特異的な遺伝子の発現調節機構を解明する目的で、我々はＳ１００蛋白に着目して研究を行なってきた。Ｓ１００蛋白はα，βサブユニットの異なる組合せのダイマーとして存在するが、βサブユニットは中枢神経系ではアストロサイトに特異的に発現している。我々はすでにラットＳ１００βｃＤＮＡクローニング、遺伝子クローニング、ウシＳ１００αｃＤＮＡクローニングを行ない発表した[1)2)3)]。ヒトＳ１００β遺伝子については、Alloreら により染色体上の局在が述べられているが[4)]、ヒトＳ１００βｃＤＮＡについては全長にわたる報告はみられない。今回、ヒトＳ１００βｃＤＮＡをクローニングし、塩基配列の決定とnorthern blot 解析を行なったので報告する。

（方法）

ヒト剖検脳の前頭葉からpoly(A)$^+$ ＲＮＡ を調製し、Gubler and Hoffman 法により合成したｃＤＮＡ をλgt10のEcoRIサイトに挿入し、ｃＤＮＡライブラリー を作成した。ラットＳ１００βｃＤＮＡの翻訳領域を含む531bpをプローブとし(図1)、プラークハイブリダイゼーションを行ない、陽性プラークを得た。ファージクローンより抽出したＤＮＡをプラスミドベクター PUC118にサブクローニングし、dideoxy 法で塩基配列を決定した。さらに、ラット，マウス，ウシ，ヒトの脳から抽出した poly(A)$^+$ ＲＮＡを電気泳動し、ニトロセルロース膜にブロットした。そして翻訳領域をふくむラットＳ１００βｃＤＮＡ 300bp(P1)，3'非翻訳領域 387bp(P2)，及び、今回得られたヒトＳ１００βｃＤＮＡ3'非翻訳領域 292bp(P3)，ウシＳ１００αｃＤＮＡ532bp(P4)をそれぞれプローブとし、ハイブリダイズさせた(図2)。

（結果，考察）

ヒト脳λgt10ｃＤＮＡライブラリー約30万個のプラークから４種類のクローンが得られた（図1)。最長のｃＤＮＡクローンは、全長で787bpあり、276bpの翻訳領域，57bpの5'非翻訳領域，poly (A)を43bp含む454bpの3'非翻訳領域から成っていた。翻訳領域は、塩基配列がラットとは39箇所異なっており、85%のホモロジーであった。塩基配列から推定されるアミノ酸配列は報告と一致し[5)]、ラットのアミノ酸配列とは、Glu→ Asn，Ser→

Ala の２残基、ウシとは、Val→ Met, Ser→ Asn, Ile→ Valの３残基異なるのみであった。非翻訳領域は、ラットｃＤＮＡの5'側 120bp, 3'側 1092bpにくらべていずれも短く、3'側の非翻訳領域には、ラットで見られた翻訳領域寄りの18個のAの連続はなかった。しかし、HindIIIをはさむ24bpは、ラットの塩基配列と全く一致しており、3'非翻訳領域の翻訳領域近傍は、その下流にくらべてみると、ヒトとラットの間で類似性が認められた。一方、5'非翻訳領域では、ホモロジーは低かった。

northern blot 解析では(図2)、ラットＳ１００βｃＤＮＡ翻訳領域(P1)をプローブとすると、ラット,マウス,ウシでは、1500～1600bに単一のバンドがあり、これは先に報告したラットのＳ１００βmRNAと同じ大きさであった[1)]。ところがヒトでは、1500～1600bに相当するバンドは認められず、これらよりサイズの小さい単一のバンドであった。ラットＳ１００βｃＤＮＡ非翻訳領域(P2)をプローブとすると、ラットとマウスでのみ、P1の場合とサイズの一致したバンドが認められ、ウシ、ヒトとは反応しなかった。今回得られたヒトＳ１００βｃＤＮＡ3'非翻訳領域(P3)をプローブとすると、ヒトでのみ特異的にハイブリダイズし、P1の場合とサイズの一致したバンドが見られた。対照においたウシＳ１００αｃＤＮＡ(P4)では、ウシ,ヒトでP1,P3の場合よりもサイズの小さなバンドが見られた。ウシのＳ１００αmＲＮＡの長さは700～800bであり[3)]、P1,P3とハイブリダイズするヒトのＳ１００βmＲＮＡはこれよりやや長く、800～850bくらいであった。今回得られたヒトＳ１００βｃＤＮＡは、poly (A) 43bpを含めて787bであり、ヒトＳ１００βmＲＮＡの全長を含むと考えられた。

ヒトＳ１００βｃＤＮＡの3'非翻訳領域下流部分は、ラット,マウス,ウシのＳ１００βmRNA及び、Ｓ１００αmＲＮＡとハイブリダイズしなかった。このことは、この3'非翻訳領域はヒトのＳ１００βサブユニットに特異的であり、グリオーム等の脳腫瘍の病態を調べる上で、ヒトＧＦＡＰｃＤＮＡ等とあわせ[6)]、in situ hybridization等の有用なプローブになり得ると思われる。

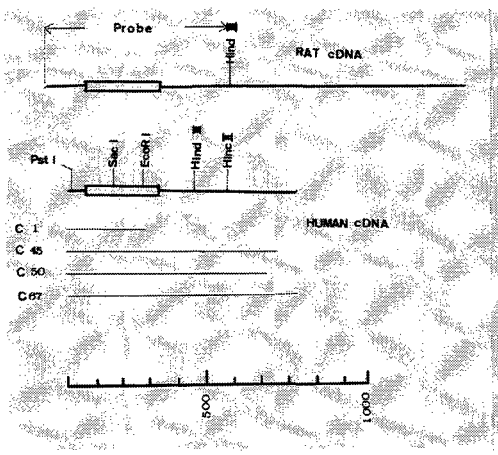



図１　Ｓ１００βｃＤＮＡの構造

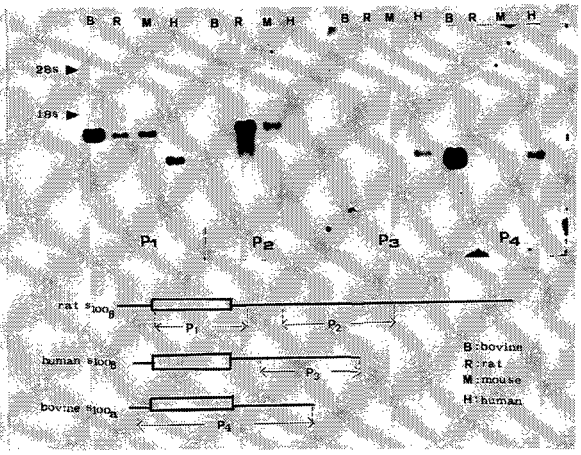



図２　northern blotting

（文献）

1, Kuwano,R. et al.(1984) Nucleic Acids Res,12,7455－7464.
2, Takahashi,Y. et al.(1986)Role of RNA and DNA in Brain Function, pp. 308－311,Martinus Nijhoff Publ,Comp,Boston,1986.
3, Kuwano,R. et al.(1986) FEBS Lett, 202, 97－101.
4, Allore,R. et al.(1988) Science, 239,1311－1313.
5, Isobe,T. et al.(1982) Protide of the Biological Fluids,30, 21－24 .
6, Nishiyama,A. et al.(1989) Acta Neuropath, in press.

# 54 NMDAレセプター複合体の可溶化

荻田喜代一、鈴木竹雄、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
ラット脳の膜標品から[ $^{3}$H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801) 結合活性を指標に、N-メチル-D- アスパラギン酸(NMDA)レセプター複合体の可溶化を試みた。可溶化剤としてデオキシコール酸(DOC) 、Triton X-100、コール酸、CHAPS 、ジギトニン、n-オクチルグルコシド、およびn-オクチルチオグルコシドを用いたところ、[ $^{3}$H]MK-801 結合活性は DOCで最も効率的に可溶化された。可溶化に用いるDOC の濃度を検討した結果、0.4%で処理した可溶化上清中に最も高い結合活性が検出された。可溶化標品中の結合活性は反応時間および反応温度に依存し、室温で反応させた場合は24時間以内に平衡状態に到達した。本結合活性はグルタミン酸(Glu) やグリシン(Gly) を添加しても著明な変化を示さなかった。しかしながら、 (±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonate(CPP)、D-アミノ-5- ホスホノ吉草酸(D-AP5) 、および7-クロロキヌレン酸(7-ClKYNA)は、本結合活性を有意に阻害した。以上の結果より、[ $^{3}$H]MK-801 結合活性の可溶化にDOC が比較的有効であり、本可溶化標品中にNMDAレセプター複合体が存在する可能性が示唆される。

興奮性アミノ酸レセプターのサブタイプの一つであるNMDAレセプターは、その機能的役割や病態生理学的意義が明らかにされるにつれて近年大いに注目されている。NMDAレセプター複合体は、アゴニスト認識部位、Gly による調節部位(GlyB 部位)(4)、およびイオンチャンネル(NMDA チャンネル) 部位から構成されると理解されている(9,11)。アゴニスト認識部位およびGlyB調節部位の生化学的な標識には、それぞれ[ $^{3}$H]Glu(1,5) や[ $^{3}$H]CPP(3,6) 、および[ $^{3}$H]Gly(4) が用いられる。また、非競合的アンタゴニストであるMK-801は活性化状態のNMDAチャンネルを反映することが示されている(7,8,10)。本研究では、NMDAレセプター複合体の本体を追究する目的で、[ $^{3}$H]MK-801 結合活性を指標としてNMDAレセプター複合体の可溶化を試み、その性質について検討した。

〔実験方法〕
ラット全脳を 1 mM EDTA、0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、および0.01% bacitracinを含む50 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)でホモジナイズした後、50,000 g、30分間遠心分離して膜標品を得た。得られた膜標品は同緩衝液に懸濁状態で凍結保存(-80℃) した。室温融解した膜標品は、0.4% DOCおよび 20%グリセリンを含む同緩衝液中で 2℃、30分間反応後、100,000 g 、60分間の遠心分離を行った。得られた上清は可溶化標品として結合実験に供した。[ $^{3}$H]MK-801 結合活性の測定は、可溶化標品と 5 nM [ $^{3}$H]MK-801 (NEN、15 Ci/mmol) を室温または 4℃で24時間反応させて行い、反応停止は予め0.3%ポリエチレンイミンで処理したWhatman GF/Bグラスフィルターを用いた吸引沪過法(10)により行った。

〔実験結果〕
膜標品を各種界面活性化剤で処理したのち、上清と沈渣について結合活性を測定した結果、上清に最も高い活性が検出されたのは DOCを用いた場合であった。その可溶化標品中の全結合活性は、可溶化前の膜標品における活性の5-10% であった。一方、Triton X-100、コール酸、CHAPS 、ジギトニン、n-オクチルグルコシド、およびn-オクチルチオグルコシドを用いた場合、いずれの可溶化上清中にも極めて弱い活性しか検出されなかった。沈渣にはいずれの界面活性化剤を用いた場合も結合活性が検出され、特にコール酸、CHAPS 、およびn-オクチルグルコシドの場合に高い活性が認められた (表1)。可溶化に用いるDOC の濃度の影響を検討したところ、蛋白質は 0.4%DOCで約70% 可溶化され、DOC 濃度の上昇に伴い可溶化蛋白質量は除々に増加した。これに対して結合活性は0.4%で最大となり、以後DOC 濃度が増加するとともに著明な活性の減少が見られた (図1)。可溶化標品中の結合活性は、いずれの反応温度においても反応時間に依存して増加した。室温反応の場合は24時間以内に最大結合活性が得られ、以後除々に結合活性の減少が見られた。それに対して、反応温度 4℃の場合は活性が平衡に達するのに約 4日間を要した (図2)。本結合活性はGlu ($10^{-5}$ M)やGly ($10^{-5}$ M)の添加でも著明な影響を受けなかった。これに対して、NMDAレセプターの競合的アンタゴニストのCPP やD-AP5 を添加すると、本結合活性は有意に阻害された。さらに、[ $^{3}$H]Gly結合部位に選択的拮抗作用を持つ7-ClKYNAも本結合活性を阻害した (図3)。

表1　各種界面活性化剤による[$^3$H]MK-801 結合活性の可溶化

| Detergents (0.5%) | Supernatants | | | Pellets | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Activity (fmol/mg protein) | (fmol) | Protein (%) | Activity (fmol/mg protein) | (fmol) |
| DOC | 30.1±2.7 | 163±15 | 78±6 | 220±23 | 550± 69 |
| Triton X-100 | 2.2±0.4 | 9± 1 | 55±9 | 230±39 | 802±125 |
| Cholate | 14.5±5.8 | 25±13 | 25±3 | 679±87 | 3015±456 |
| CHAPS | Not detectable | | 46±4 | 694±47 | 2570±189 |
| Digitonin | 0.8±0.5 | 1± 1 | 25±4 | 41±25 | 145± 24 |
| n-Octylglucoside | 16.3±4.3 | 40±10 | 35±8 | 621±14 | 2481±168 |
| n-Octylthioglucoside | 7.4±1.7 | 25± 6 | 48±7 | 457±67 | 1577± 35 |

図1．DOC濃度の影響

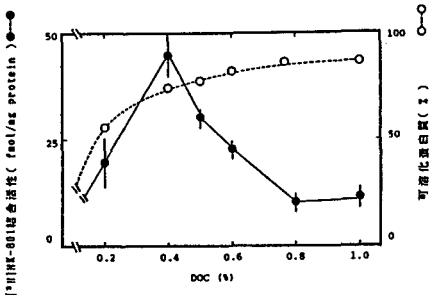



図2．反応温度および反応時間の影響

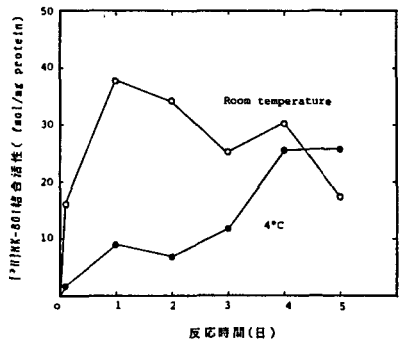
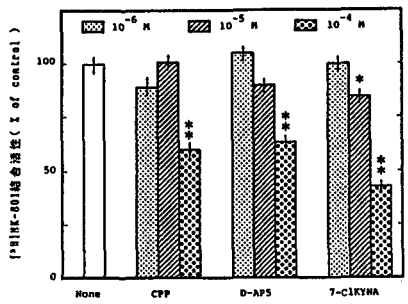



図3．各種アンタゴニストの影響




〔考察〕

本研究でDOC による可溶化標品中には、反応温度依存性、反応時間依存性、およびNMDAアンタゴニスト感受性の[$^3$H]MK-801 結合活性が存在することが明らかとなった。用いたDOC の濃度が0.5%以上になると、可溶化蛋白質量には著しい変化は認められないが 結合活性が著明に減少する。このことは本結合活性が過剰な界面活性化剤により阻害されるか、あるいは失活することを示唆するものである。結合活性の収率が低いことも界面活性化剤による阻害の可能性を支持する。しかしながら、沈渣に比較的高い活性が検出されることから、さらに有効な可溶化条件を検討する必要があると思われる。本結合活性が反応温度に依存性を示すのは膜標品の場合と同様であるが、結合活性が平衡に到達するのに要する時間は膜標品に比べて極めて長い。可溶化標品中にGlu やGly などの内在性アミノ酸が大量に存在することが、本結合活性がGlu やGly の添加で変化を受けない理由であろう。しかしながら、競合的NMDAアンタゴニストやGlyBアンタゴニストの7-ClKYNA(2) が本結合活性を阻害することから、本結合活性がNMDAレセプター複合体を反映する可能性が示唆される。

〔謝辞〕

本研究の一部は文部省科学研究費(01772048)の援助のもとに行った。

〔文献〕

1. Tagg, G.E. and Matus A. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6876-6880.
2. Kemp, J.A., Foster, A.C., Leeson, P.D., Priestley, T., Tridgett, R., Iversen, L.L. and Woodruff, G.N. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 6547-6550.
3. Murphy, D.E., Schneider, J., Bohem, C., Lehmann, J. and Williams, M. (1987) J. Pharmacol. Exp. Ther. 240, 778-784.
4. Ogita, K. Suzuki, T. and Yoneda, Y. (1989) Neuropharmacol. in press.
5. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
6. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1989) Brain Res. in press.
7. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1989) Brain Res. in press.
8. Reynolds, I.J., Murphy, S.N. and Miller, R.J. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7744-7748.
9. Robinson, M.B. and Coyle J.T. (1987) FASEB J. 1, 446-455.
10. Wong, E.H.F., Knight, A.R. and Woodruff, G.N. (1988) J. Neurochem. 50, 274-281.
11. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T. (1988) Neurotransmitter: Focus on Excitatory Amino Acids (Kanazawa, I. ed.), pp. 47-65, Excepta Medica Tokyo.

# 55 NMDAレセプター複合体における ポリアミンの役割

米田幸雄、荻田喜代一
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕

N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)感受性レセプターと連関するイオンチャンネルの指標である、[$^3$H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801)結合活性に対して、ポリアミンの一つであるスペルミジン(SPD)は濃度依存的($10^{-5}$ M 以上)な増強作用を発揮した。SPD単独では著明な増強作用は持たなかったが、L-グルタミン酸(Glu)存在下にみられる活性の増加に対してSPDは強い増強効果を示した。グリシン(Gly)はL-Gluの活性増強作用をさらに増強するが、この両アミノ酸共存下の活性はSPD添加に伴い著しく増加した。しかしながら、Glyのみが存在するときの活性に対しては、SPDは著変を与えなかった。SPD以外のポリアミンでは、spermineとbis-(3-aminopropyl)amineに同様の増強作用が見られたが、putrescine, cadaverine, 1,6-diaminohexane, 1,7-diaminoheptane, 1,8-diaminooctane および putreanine には有意な増強効果は見いだせなかった。SPDの増強作用は、競合的NMDAアンタゴニストである(±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (CPP)の添加により完全に阻止された。さらに、脳シナプス膜標品中には、有意な[$^3$H]SPD結合活性が検出された。したがって、NMDAレセプター複合体上には第四番目の部位としてSPD結合部位が存在する可能性が示唆される。

興奮性アミノ酸レセプターのサブタイプの一つであるNMDA感受性レセプターは、ストリキニーネ非感受性Gly結合部位との間にレセプター複合体を形成することが示唆されている(11,13)。この複合体上には、1) [$^3$H]Glu(2,8)や[$^3$H]CPP(6,7)で標識されるNMDA認識部位、2) [$^3$H]MK-801(3,12)や[$^3$H]TCP(5,1)で標識されるイオンチャンネル部位、および 3) [$^3$H]Gly(4,9)で標識されるGly結合部位が存在する。最近、ポリアミンの一つであるSPDが[$^3$H]MK-801結合活性の増強作用を持つことが報告(10)されたので、本研究ではこのSPDの作用について詳細な解析を行った。

[実験方法]

ラット全脳より粗シナプス膜標品を調製したのち、50,000 g, 30分間の遠心分離操作による洗浄操作、-80℃における凍結保存および室温融解を行った。融解標品は0.08% Triton X-100 と2℃で10分間前処理した。前処理ののち2回の遠心分離操作により洗浄したシナプス膜を実験に用いた。本膜標品は5 nM [$^3$H]MK-801 (NEN, 15Ci/mmol)と2℃または30℃で30分間反応させた。反応はWhatman GF/Bグラスフィルターを用いた吸引濾過法により停止した。また、[$^3$H]SPD結合実験は10 nM [$^3$H]SPD (NEN, 30 Ci/mmol)と2℃で各時間反応させて行った。

[実験結果]

反応温度2℃の場合は、10 μM Gluの添加により[$^3$H]MK-801結合活性は約2倍に増加したが、この時にSPDをさらに添加すると活性は有意に増加した(表1)。10 μM Glyの添加もGluと同様に活性を増加させたが、このGlyの増強作用はSPDによる影響を受けなかった。GluとGlyの共存は相加的増強効果を発揮したが、SPDは両アミノ酸共存下の活性をさらに増加させた。一方、反応温度30℃ではGluは単独で活性を約10倍増加させたが、この時にSPDを添加すると活性はさらに2倍以上増加した。これに対して、Glyは約2倍の増強作用を示したが、このGlyの増強作用はSPD によって影響されなかった。しかしながら、両アミノ酸存在下の活性に対してSPDは強い増強作用を発揮した。この両アミノ酸存在下の活性に対する他のポリアミンの影響を検討したところ、spermine と bis-(3-aminopropyl)amineはSPDと同様の増強作用を誘発したが、putrescine, cadaverine, 1,6-diaminohexane, 1,7-diaminoheptane, 1,8-diaminooctaneおよびputreanineには著明な増強作用は観察されなかった(図1)。Glu およびGlu/Gly存在下の活性に対するSPDの増強作用は濃度依存的に出現し、その作用は$10^{-3}$ M付近で最大となった(図2)。このSPDの増強作用に対して、NMDAレセプターの競合的アンタゴニストであるCPPは有意な拮抗作用を示し、

表1. [³H]MK-801結合活性に対するSPDの作用

| SPD (log M) | [³H]MK-801結合活性 (fmol/mg protein) None | Glu | Gly | Glu/Gly |
|---|---|---|---|---|
| 2℃ | | | | |
| (-6) | 14.2±2.4 | 20.5±2.4 | 24.1±2.1 | 45.6±2.2 |
| (-5) | 13.5±0.8 | 23.6±2.2 | 28.4±4.8 | 48.1±4.7 |
| (-4) | 16.9±3.2 | 52.1±6.5 | 29.4±1.8 | 73.2±5.1 |
| 30℃ | | | | |
| (-6) | 12.5±0.9 | 91.4±7.8 | 26.8±3.1 | 185.8± 3.3 |
| (-5) | 9.2±2.6 | 61.5±6.1 | 26.4±6.9 | 183.2± 7.8 |
| (-4) | 14.8±2.9 | 240.3±7.2 | 33.2±2.1 | 340.3±13.2 |

図1. 各種ポリアミンの影響

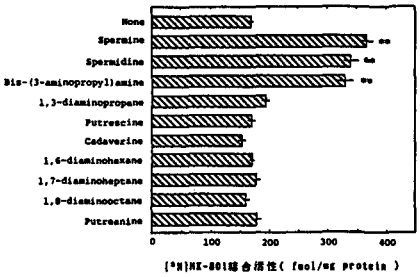



図2. SPDの増強作用に対するCPPの影響

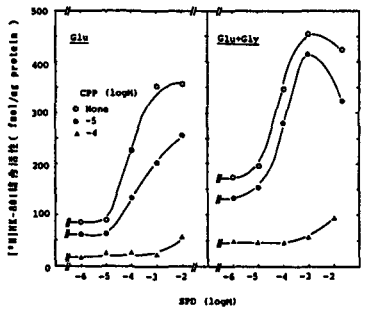
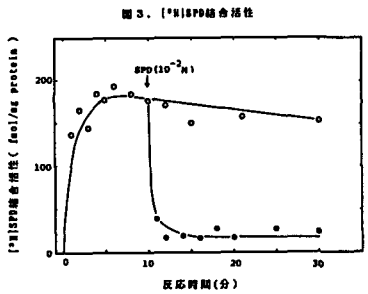



図3. [³H]SPD結合活性




$10^{-4}$ M CPPはSPDの増強作用をほぼ完全に阻止した。次いで、[³H]SPD結合部位の有無について検索を進めたところ、Triton X-100で前処理した脳シナプス膜中に[³H]SPD結合活性が検出された(図3)。この結合活性は2℃では反応開始後5分以内に平衡状態に到達し、この平衡状態は約30分後まで持続した。定常状態時に非放射性の高濃度SPD (10 mM)を添加すると、活性は速やかに減少し添加後1分以内に消失した。

[考察]

本研究結果は、SPDの増強作用がNMDAレセプター複合体上のNMDA認識部位を介した現象であることを支持するものである。しかしながら、その作用出現に比較的高濃度のSPDを必要とすることは、作用部位が細胞外ではなく細胞内に存在する可能性を示唆するのかも知れない。その意味でも、[³H]SPD結合活性が真のSPD結合部位の存在を反映するかどうかは早急に解決されなければならない課題である。

[謝辞]

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(01571229)の援助のもとに行った。

[文献]

1. Fagg, G.E. (1987) Neurosci. Lett. 76, 221-227.
2. Fagg, G.E. and Matus, A. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6876-6880.
3. Foster, A.C. and Wong, E.H.F. (1987) Br. J. Pharmacol. 91, 403-409.
4. Kishimoto, H., Simon, J.R. and Aprison, M.H. (1981) J. Neurochem. 37, 1015-1024.
5. Loo, P., Braunwalder, A., Lehmann, J. and Williams, M. (1986) Eur. J. Pharmacol. 123, 467-468.
6. Murphy, D.E., Schneider, J., Boehm, C., Lehmann, J. and Williams, M. (1987) J. Pharmacol. Exp. Ther. 240, 778-784.
7. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1989) Brain Res. in press.
8. Ogita, k. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
9. Ogita, K., Suzuki, T. and Yoneda, Y. (1989) Neuropharmacol. in press.
10. Ransom, R.W. and Stec, N.L. (1988) J. Neurochem. 51, 830-836.
11. Robinson, M.B. and Coyle, J.T. (1987) FASEB J. 1, 446-455.
12. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Brain Res. in press.
13. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T. (1988) Neurotransmitters: Focus on Excitatory Amino Acis (Kanazawa, I., ed.), pp.47-65, Excerpta Medica, Tokyo.

# 56 ニューロンのグルタミン酸刺激によって引き起こされるジギタリス高感受性型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〕
ラット大脳の初代培養ニューロンをグルタミン酸で刺激すると，Ｎａポンプの活性（＝細胞へのK⁺の取り込み活性）が１．８倍に増加した．この時，ニューロンに存在するＮａポンプアイソフォームのうち，ジギタリス高感受性型（＝ニューロン型）Ｎａポンプの活性だけが３．５倍に上昇した．他のグルタミン酸アゴニストも同様にＮａポンプ活性を上昇させ，その効果はアンタゴニストによって抑えられた．また，グルタミン酸が効果を示すためには，細胞外液にＮａ⁺が必要であり，ベラトリジンもグルタミン酸と同様な効果を示した．一方，Ｎａポンプ活性の増加に先立ち，グルタミン酸刺激で細胞内へのＮａ⁺の流入と細胞外へのK⁺の流出が見られ，その用量依存性はＮａポンプに対するのと同様であった．以上から，グルタミン酸がレセプターに結合することにより，Ｎａ⁺が細胞内へ流入し，それに対応して，ジギタリス高感受性型Ｎａポンプ活性の選択的な上昇が起こると考えられた．

Ｎａポンプ（Na,K-ATPase）が維持する細胞内外のＮａ⁺とK⁺の濃度勾配は，ニューロンの機能維持にとって重要である．これまで我々は，ラット大脳の初代培養ニューロンを用いた研究によって，ニューロンにＮａポンプアイソフォームが存在することを明らかにした（１－３）．すなわち，ニューロンには，他の細胞にも普遍的に存在するジギタリス低感受性型Ｎａポンプ（αⅠ型または，α型ポンプ）の他に，ニューロンに特異的に存在するジギタリス高感受性型Ｎａポンプ（αⅡ型または，α(+)型ポンプとαⅢ型ポンプ）が存在する（１－３）．そして，ニューロンをグルタミン酸で処理すると，ジギタリス高感受性型Ｎａポンプの活性が上昇することによって，全体のＮａポンプ活性が上昇することを見いだした（４）．そこで今回，我々は，ニューロンのグルタミン酸刺激から，どの様な過程を経てジギタリス高感受性型Ｎａポンプの活性が上昇するか検討した．

［実験方法］

ニューロンは，Wistar系ラットの１７日胚大脳から分離し，24穴マルチウェル上に培養した(１－４)．ニューロンのＮａポンプ活性測定の条件は，既報（２－４）をわずかに変えた．即ち，細胞を反応液［130mM NaCl, 2mM KCl, 0.8mM $MgCl_2$, 1.8mM $CaCl_2$, 5mM glucose, 25mM Hepes-Imidazole緩衝液(pH7.3)］中で，37℃で２０分間preincubationした後，グルタミン酸などの添加物を含む反応液に変え，更に１２分間preincubationする．その後，添加物を含まない反応液に戻し，すぐに$^{42}$ＫＣｌを添加し，37℃で１２分間に細胞内に流入する$^{42}$Kを測った．Ｎａポンプ活性は，K⁺の流入活性のうち２ｍＭウアバイン添加によって特異的に阻害される活性である．さらに，Ｎａポンプの活性を，３μＭ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と低感受性型のアイソフォームの活性に分別した．

［実験結果と考察］

表１に示すように，本研究の実験条件下（細胞外液が2 mM KCl）においても，既報（４）（細胞外液が0.5 mM KCl）と同様に，グルタミン酸刺激によって全体のＮａポンプ活性が増加（１．８倍）した．これは，ジギタリス高感受性型のＮａポンプの活性が選択

| 実験条件 | 全活性 | ジギタリス高感受性型活性 | ジギタリス低感受性型活性 |
|---|---|---|---|
| | (K⁺取り込み活性：nmol/min/mg protein) | | |
| 無刺激 | 30.8 ± 1.1 | 11.4 ± 0.4 | 19.4 ± 0.8 |
| グルタミン酸刺激 | 54.2 ± 1.6* | 39.3 ± 1.6* | 14.9 ± 0.7* |
| グルタミン酸刺激／無刺激 (%) | 178 ± 7 | 348 ± 17 | 77.2 ± 2.2 |

表１．培養ニューロン（10-16日間）のＮａポンプ活性に対するグルタミン酸(0.1mM)刺激の影響．平均値±SEM (n=14)，*p<0.001.

的に上昇（３．５倍）したためであり，ジギタリス低感受性型のＮａポンプ活性は逆に低下（０．８倍）した．図１に示す様に，これらのグルタミン酸の効果は用量依存的であり０．１ｍＭで最大となる．一方，Ｎａポンプ活性の増加に先立ち，グルタミン酸刺激時に細胞内へのＮａ⁺の流入量と細胞外へのＫ⁺の流出量の増加が見られた．そして，その用量依存性（図２）は，Ｎａポンプ活性の用量依存性（図１）と同様であった．結果はここに示さないが，グルタミン酸以外に，アスパラギン酸，カイニン酸，キスカル酸，N-メチル-D-アスパラギン酸の，グルタミン酸アゴニストによっても，Ｎａポンプアイソフォームの活性の変化が見られた．そして，その効果は，アンタゴニストによって完全にあるいは部分的に抑えられた．一方，グルタミン酸の効果は，細胞内へのグルタミン酸の取り込みを抑えるジヒドロカイニン酸を添加しても，細胞外液の$CaCl_2$を除いても，変わらなかった．しかし，表２に示すように，外液のナトリウムをコリンに替えるとグルタミン酸による効果は全く失われた．また，Ｎａチャンネルを開くベラトリジンもグルタミン酸と同様にジギタリス高感受性型Ｎａポンプの活性を高めた（表２）．以上の結果から，グルタミン酸でニューロンを刺激すると，グルタミン酸がレセプターに結合して，レセプター連動陽イオンチャンネルが開き，細胞内へのＮａ⁺の流入と細胞外へのＫ⁺の流出が起き，細胞内外のイオン濃度勾配が減少する．そして，イオン（特にＮａ⁺）濃度勾配の減少に対応して，ジギタリス高感受性型（ニューロン型）Ｎａポンプが選択的に活性化することが明らかになった．すなわち，ニューロンの興奮後のイオン環境の維持に，ジギタリス高感受性型Ｎａポンプが重要な役割を果たしていると推定された．

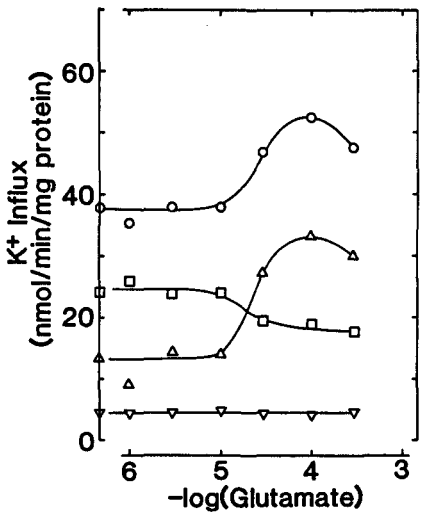



図１．グルタミン酸による培養ニューロン刺激後のK⁺の流入活性の変化：グルタミン酸濃度の影響．
○，全Ｎａポンプ活性；
△，ジギタリス高感受性型Ｎａポンプ活性；
□，ジギタリス低感受性型Ｎａポンプ活性；
▽，Ｎａポンプ以外の活性．

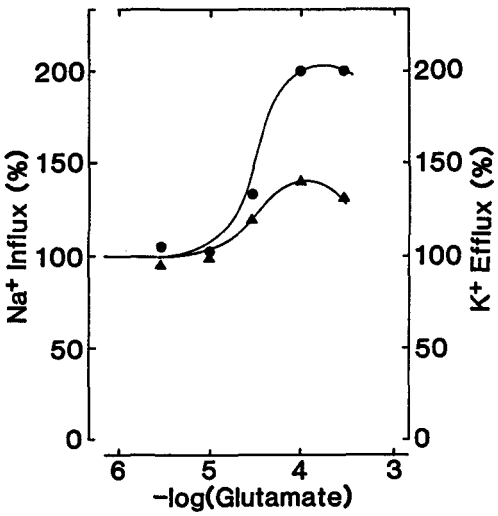



図２．グルタミン酸による培養ニューロン刺激時のＮａ⁺の流入，K⁺の流出の増加：グルタミン酸濃度の影響．
●，Ｎａ⁺流入；
▲，K⁺流出．

| 実験条件 | 全活性 | ジギタリス高感受性型活性 | ジギタリス低感受性型活性 |
|---|---|---|---|
| | (nmol/min/mg protein) | | |
| A | | | |
| <標準条件> | | | |
| 無刺激 | 25.6 | 9.9 | 15.7 |
| グルタミン酸刺激 | 45.6 | 31.0 | 14.6 |
| <0 mM NaCl, 130 mM 塩化コリン> | | | |
| 無刺激 | 10.5 | 6.4 | 4.1 |
| グルタミン酸刺激 | 9.3 | 6.0 | 3.3 |
| B | | | |
| 無刺激 | 37.1 | 14.6 | 22.5 |
| ベラトリジン刺激 | 65.9 | 58.5 | 7.4 |

表２．種々の刺激条件における培養ニューロンのＮａポンプ活性．（グルタミン酸，0.1 mM；ベラトリジン，3 μM）

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，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．

2．Inoue, N., Matsui, H., Tsukui, H., and Hatanaka, H.(1988) J. Biochem. 104, 349-354.

3．Inoue, N., Matsui, H., Tsukui, H., and Hatanaka, H.(1988) Prog. Clin. Biol. Res. 268B, 91-96.

4．井上順雄，松井英男（1988）神経化学，27，340-341．

# 57 Methamphetamine, Phencyclidine慢性投与後のラット脳内神経伝達物質の変化

小林利雄[1]，清水浩光[2]，小片　寛[1]，融　道男[1]，
鍋島俊隆[3]，古川　宏[4]
（信州大学医学部精神医学教室[1]，北信総合病院[2]，
名城大学薬学部薬品作用学教室[3]，薬化学教室[4]）

〔要約〕 methamphetamineまたはphencyclidineを40日間ラットに飼料中に混ぜて与え、断薬後に脳内の神経伝達物質および受容体を測定した。両薬物投与群の前頭前野において$^{3}$H-カイニン酸特異結合が増加し線条体においては、phencyclidine投与群でグルタミン酸の減少がみられた。この結果は、慢性分裂病脳において以前見出した変化と同じ傾向を示していた。

慢性分裂病死後脳の生化学的検索において、内側前頭皮質をはじめ大脳皮質における($^{3}$H)-kainic acid(KA)結合の増加が見出された。また脳のいくつかの部位のグルタミン酸値がこれと逆相関したことから、慢性分裂病脳にはグルタミン酸ニューロンの低活性を推測した(6)。今回、我々は、この所見が動物の分裂病モデルから得られるか否かを検討してみた。すなわち、ラットに精神病症状惹起物質である methamphetamine(M)あるいは phencyclidine(P)を40日間慢性投与し、断薬後に表れている脳内物質の変化を研究した。

［方法］Wistar系雄性ラット30匹を３群に分け、それぞれをC群、M群（粉末飼料１kgあたり111mgを含む)，P群(同222mg)とし、40日間飼育後、薬物を含まぬ飼料に戻し、４日目に断頭した。脳は、0°C以下に保った冷凍箱内で取り出し、前頭前野（吻側端よりBregma2.7mm(5)までで嗅裂より腹側および小鉗子を除いた部分）および線条体に分け、−80°Cに保存した。($^{3}$H)-Kainic acid(KA)結合は、LondonとCoyleの方法(1)を改変して行なった(2)。膜標品は蒸留水を用いて２回遠沈した後、50mM Tris-クエン酸バッファー(pH 7.1)を用いて再度遠沈し、これを超音波破砕したものを用いて、この0.6ml(0.5mg蛋白／アッセイ)と0.3ml(final 15nM)($^{3}$H)-KA,それに特異結合を求めるため0.3ml L-グルタミン酸(final 1mM)を、2°Cで60分間インキュベートした後、フィルターで吸引濾過、バッファー15mlで洗浄し、液体シンチレーターに入れてカウントした。グルタミン酸、GABAは蛍光測定法により(3)(4)、norepinephrine(NE),dopamine(DA),3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC),homovanillic acid(HVA),5-hydroxyindoleacetic acid(5HIAA)は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)、カラムはEicompak MA-ODS、クエン酸バッファーを用いて測定した。

［結果］M群、P群のラットの平均薬物摂取量は、それぞれ 8.15mg/kg/day,19.17mg/kg/dayであった。

１．前頭前野における変化

($^{3}$H)-KA結合；M群、P群で,C群に比し、有意な増加がみられた(Fig.1)。

２．線条体における変化

(1)グルタミン酸；P群で有意な低下がみられた(Fig.2)。

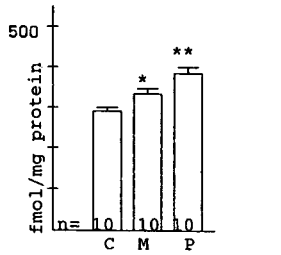
(2)GABA、モノアミンには特に変化はみられなかった(Table 1)。

３．相関；線条体グルタミン酸と前頭前野の($^{3}$H)-KA結合の相関を調べると相関係数 $r=-0.51, p<0.01 (n=27)$で有意な負の相関を示した(Fig.3)。

［考察］我々は14例の慢性分裂病脳の生化学的測定により内側前頭皮質、眼球運動領野、感覚領野、上頭頂小葉、角回などにおいて分裂病群の値に有意な高値を見出した(2)(6)。分裂病脳内のグルタミン酸値には変化は認められなかったが、前頭葉の値と相関をとるとかなりの脳部位の値が有意な負の相関を示すことから、慢性分裂病の脳内にはdopamineの過剰活動以外にも、グルタミン酸ニューロンの異常（多分低活性）があるものと推測した。慢性分裂病には、

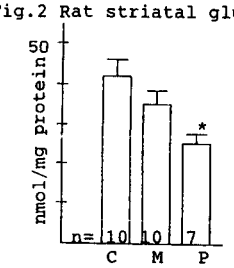
現在の抗精神病薬は無効であるので、このような脳の所見を手がかりとして治療法を開発していくのが急務と思われる。今回の実験で特にPを慢性投与した群で前頭前野のカイニン酸特異結合の増加がみられ、線条体のグルタミン酸値がこれと有意の負の相関を示したことは、慢性分裂病脳の変化と同じ傾向と判断される。Mによる変化も、程度はやや軽いが同傾向のものがあった。脳のdopamineの過剰活動が持続すると、グルタミン酸のニューロンの活動が低下してくると考えると、慢性分裂病は、急性期のdopamine過活動の結果生じてきたものと推定することができる。Pの変化の方が大きいことは、serotoninなど他のニューロンへの影響が慢性状態を導くのに役割を演じているのかもしれない。このような動物を用いて、グルタミン酸ニューロンの変化を防止する方法を検索することが重要であると思われる。

Fig.1 $^{3}$H-KA binding at Rat Prefrontal Cortex




Ryan's method, * p<0.05
**p<0.001

Fig.2 Rat striatal glutamate




* p<0.05

Fig.3 Correlation between rat striatal glutamate and frontal $^{3}$H-KA binding

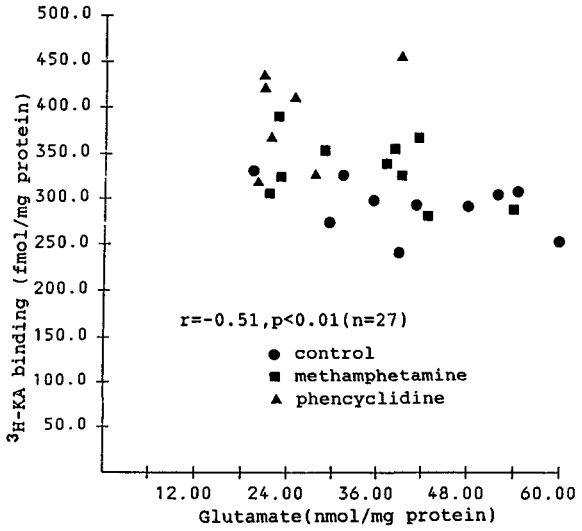



Table 1.Neurotransmitters & their metabolites in rat striatum

| | C | M | P | |
|---|---|---|---|---|
| NE | 50.9±3.9(6) | 72.2±10.2(8) | 60.2±5.0(7) | (ng) |
| DA | 200.0±43.5(7) | 127.7±22.3(9) | 142.4±31.6(10) | |
| DOPAC | 186.3±16.7(8) | 153.5±17.4(10) | 198.4±14.6(10) | |
| HVA | 30.2±3.8(9) | 30.8±3.5(10) | 29.9±4.5(10) | |
| 5HIAA | 19.2±3.7(9) | 13.1±1.7(9) | 16.6±3.2(10) | |
| GABA | 32.1±2.5(10) | 33.9±2.1(10) | 34.4±2.7(10) | (nmol) |

(/mg protein,mean±S.E.)

実験に協力して頂いた当教室の横山文枝さんに感謝する。

文献

1. London ED & Coyle JT (1979) Molec Pharmacol 15, 492-505.

2. Nishikawa T et al (1983) Neurosci Lett 40, 245-250.

3. Nitsch C et al (1979) Neurosci Lett 11, 295-299.

4. Okada Y et al (1971) Exp Brain Res 13, 514-518.

5. Paxinos G & Watson C (1986) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates(second edition),Academic Press.

6. Toru M et al (1988) Acta Psychiatr Scand 78, 121-137.

# 58 神経回路形成の分子機構：培養大脳皮質ニューロン間シナプス形成によるin vitro神経回路網形成とプロテイン・キナーゼ・インヒビター（K252b）による阻害

黒田 洋一郎、村本 和世、小林 和夫、 ＊中西 哲、＊松田 譲
東京都神経科学総合研究所・神経生化学、＊協和発酵東京研究所

〔要約〕

ラット（胎令18日）脳から大脳皮質をとり出し、細胞を酵素処理で単離、培養した。fura-2を利用した細胞内$Ca^{2+}$濃度多点観察システムでニューロン内の$Ca^{2+}$濃度をモニターしたところ、5～7日後から多数のニューロンに、同期した$Ca^{2+}$濃度の変動が観察された。テトロドトキシンやグルタミン酸受容体アンタゴニスト（APV）によって、これらの変動は阻害されたので、海馬ニューロンで報告されたものと同じく、グルタミン酸を興奮性伝達物質とするシナプス形成が行われ、その神経回路網全体が自発発火ニューロンによって同期発火していることが示唆された。この培養ニューロン間シナプス形成系に、培養開始時からプロテイン・キナーゼ・インヒビターの一種であるK-252bを継続的に添加したところ、$Ca^{2+}$変動は濃度依存的に抑制された。K-252bは細胞膜を透過しないことが知られているので、これらの結果は、細胞外に活性をもつ蛋白質リン酸化酵素(ecto-protein kinase)によるシナプス膜蛋白のリン酸化が大脳皮質ニューロン間シナプス形成又は維持に必須である可能性を示唆している。

記憶など脳の高次機能は大脳皮質連合野を中心とする脳内の神経回路網によって営まれている。最近、演者はヒト成熟脳でもシナプス結合のdynamic な変化が起こり、回路外シナプスの選択的除去と回路内シナプスのsprouting によるシナプス結合数の増加がヒト長期記憶のメカニズムであるとする"tracing circuit" モデルを提唱した[1]。 従って、シナプス形成・保持の分子機構の解明は発生段階における神経回路網形成のみならず、記憶などepigeneticな脳の可塑性の研究としても重要であると考えられる。しかしながら、培養中枢ニューロン内のシナプス形成そのものを定量的に観察する実験法がpractical にはなかったために、この分野の研究は突起の形成、接着・進展など部分的な研究に限られていた。工藤らはfura-2 を用いた細胞内$Ca^{2+}$ の多点観察系を開発し[2]、この方法により、小倉らは多数の培養海馬ニューロン間で機能シナプス形成が起こっていることを明らかにした[3]。前回の本学会では細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体のいくつかがこのシナプス形成を阻害することを報告したが[8]，今回は記憶の座と考えられる大脳皮質由来の培養ニューロン間でもin vitroの機能シナプスが形成されうること、このシナプス形成がある種のプロテイン・キナーゼ・インヒビターで阻害されることを報告する。

［実験方法］

ラット大脳皮質ニューロンの培養は既報のように[11]、Banker & Cowan法[4]を少しかえて行った。18日令のラット胎児脳から大脳皮質をとり出し、パパイン消化しflexipermを用いて培養した。fura-2のロードと蛍光ビデオ装置による細胞内$Ca^{2+}$濃度の観察も既に報告された方法[3] を用いた。プロテイン・キナーゼ・インヒビター K-252b は、Nocadiopsis sp. K-290の培養液中から精製し[5]、少量のDMSOに溶解し、希釈したものを用いた。

［実験結果と考察］

培養大脳皮質ニューロン間のシナプス活動；図１に培養大脳皮質ニューロン内の$Ca^{2+}$濃度の変化を培養日数を追って示した。培養３日後、いくつかのニューロンが不規則な細胞内$Ca^{2+}$濃度の変化を示し、５日後には細胞内$Ca^{2+}$濃度の変化は大きくなり、かつ同期を始めた。７日後には、細胞内$Ca^{2+}$濃度のoscillation頻度は高くなり、培養中のほとんどのニューロンが同期した細胞内 $Ca^{2+}$濃度の変化を示すようになった。細胞内$Ca^{2+}$濃度のoscillation の頻度はさらに培養日数を追うにしたがい次第増加し、培養３週間後にはいくつかのpeakが一緒になりplateau-likeな波形を示した。テトロドトキシンやグルタミン酸受容体アンタゴニスト（APV）を添加するとこの細胞内$Ca^{2+}$濃度の変動は可逆的に阻害されるので、既に培養海馬ニューロンで報告されているように[3]、培養大脳皮質ニューロン間でもグルタミン酸を興奮性伝達物質とするシナプス形成が行われている事が示唆された。培養海馬では、外液の$Ca^{2+}$濃度を下げることでも細胞内$Ca^{2+}$濃度の変動は止まったが、それでもまだ小数のニューロンはspike-likeな細胞内$Ca^{2+}$濃度の変動を示し、しかもそれらは互いに同期しておらず独立した周期を示した。これらのニューロンは自発発火しているペースメーカーニューロンであることが示唆された。培養内のペースメーカーの自発性の興奮は機能的なシナプスにより他のニューロンに伝

達され、そのために神経回路網内のほとんどのニューロンが同期した興奮を示すと思われる。

プロテイン・キナーゼ・インヒビターの添加；培養開始からプロテイン・キナーゼ・インヒビター、K-252b、200nMを培養液に継続投与すると、６日後細胞内$Ca^{2+}$濃度の変動はほとんど見られなくなる（図２Ｃ）。無添加のControl Cultureでは細胞内$Ca^{2+}$濃度の同期した変動は高頻度に観察された（図２Ａ）。この頻度はK-252bを50nM投与した場合には低下した（図２Ｂ）。K-252b 200nMで処理した場合でも少数のニューロンは同期はしていないがspike-likeな細胞内$Ca^{2+}$濃度の変動を示したので、K-252bはペースメーカーニューロンの自発的な興奮活動は阻害しないと思われる。このことはK-252bは培養大脳皮質ニューロン間のシナプス形成を阻害している事を強く示唆する。また、K-252bは精製酵素を用いたアッセイ系ではプロテイン・キナーゼ活性を阻害するが($IC_{50}$=38nM)[5]、生細胞にはなんの影響も及ぼさない。この原因として、K-252bは細胞膜を透過しないというデータが示されている。これらのことはK-252bの作用する部位が細胞膜の外表面に存在していることを意味している。神経細胞膜には膜の外表に基質結合部位があり、N-CAMの様な細胞接着タンパク質をリン酸化するecto-protein kinaseが存在している事が報告されている[6]。プロテイン・キナーゼ・インヒビター、K-252bのターゲットはこのecto-protein kinaseである可能性が高い。ecto-protein kinaseに関しては、最近ガングリオシドによって調節される別のタイプのものが発見されている[7]。これらの酵素の基質は細胞外に放出されるＡＴＰであるが、高濃度のＡＴＰがシナプス小胞中に含まれ、刺激により前シナプス終末からエクソサイトーシスで放出されることは既に報告されている[9],[10]。ecto-protein kinaseがシナプス形成で果たす分子メカニズムとしては、最もよく使われる高頻度刺激のシナプス入力ではその伝達の際に一緒に放出されるＡＴＰのシナプス間隙における濃度が高くなり、これを基質としたリン酸化によってそのシナプスが選択的に安定化されることが考えられる。"tracing circuit" モデルによれば比較的長期間持続できるシナプスの形態的な可塑性は長期記憶の成立において重要な過程と考えられる[1]。

［文献］
1) Kuroda,Y.(1989) Neurochem.Intern.14:309. 2) Kudo,Y.and Ogura,A.(1986)Brit.J.Pharmacol. 89:191. 3) Ogura,A.et.al.(1987)Neurosci.Let.78:69. 4) Banker,G.A.and Cowan,W.M.(1977)Brain Res.126:397. 5) Nakanishi,S.et al.(1986)J.Antibio.39:1066. 6) Ehrlich,Y.et.al.(1986)Nature 320:67. 7) Tsuji,S.et.al.(1988)J.Biochem.104:498. 8) 黒田洋一郎 他(1988)神経化学 20:114. 9) Kuroda,Y.and McIlwain.H(1974)J.Neurochem.22:691.10) White,T.D.(1978)J.Neurochem.30:329. 11) Muramoto,K.et al.(1988)Proc.Japan Acad. Ser.B 64:319.

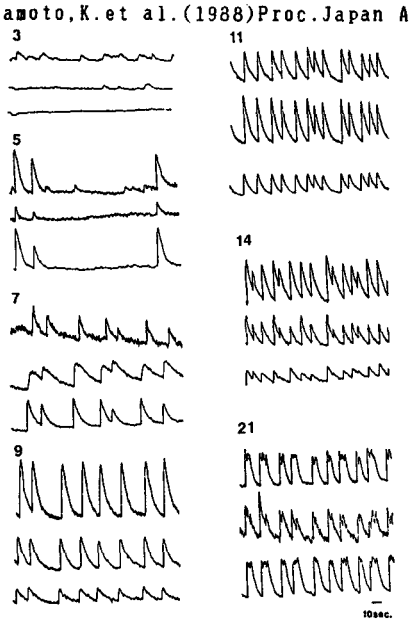



図１．ラット大脳皮質培養ニューロンでのシナプス活動の発生と維持。シナプス活動に対応する蛍光強度(340nm) の変動 が$Ca^{2+}$濃度蛍光ビデオ・モニター装置を用い培養のいくつかのステージで任意に選んだ３つのニューロンについて記録されている。数字は培養開始後の日数を示す。

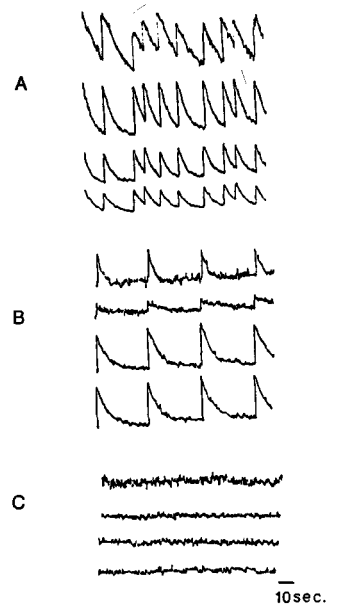



図２．ラット大脳皮質培養ニューロンのシナプス活動に及ぼすプロテイン・キナーゼ・インヒビター、K-252bの効果。蛍光強度の変化(340nm) は培養６日目の一組のシスター・カルチャーで記録された。A：コントロール（無投与）、B：K-252b 50nM、C：K-252b 200nM、が全培養期間継続的に投与されている。

## 59　脳虚血時スナネズミ海馬領域の細胞外グルタミン酸濃度の解析 －脳内微小透析法及び酵素的サイクリング法を用いた微量定量

伊賀耕三[1]，三谷章　，井門等[2]，久保博彦[3]，片岡喜由

（愛媛大学医学部　第一生理　，整形外科[1]，麻酔科[2]，第一外科[3]）

〔要約〕

麻酔下のスナネズミ海馬領域へ微小透析プローブを刺入し、２時間後に総頸動脈に懸けておいた絹糸におもりを懸垂させることで５分間の前脳虚血を負荷した。灌流液には生理食塩水を用い、２μl／minで灌流させ、回収は虚血前10分より開始し、虚血後30分まで90秒毎に行った。回収した灌流液は酵素的サイクリング法を用いて3000倍以上に増幅させてグルタミン酸の定量を行った。細胞外グルタミン酸濃度は虚血前に比較し、虚血負荷直後(90秒以内)から虚血中に有意な上昇を示し、ピーク時には約３倍のレベルまで上昇した。血流再開後は速やかに下降し、３分後には虚血前のレベルまで戻り、それ以降は有意な上昇を認めなかった。従って、グルタミン酸は遅発性神経細胞壊死において、ごく初期の段階で一つの引金としての役割をしていると思われる。

神経興奮性アミノ酸のexcitotoxic hypothesisが提唱され、脳虚血後の遅発性神経細胞壊死に興奮性アミノ酸が大きな役割を果たしていると言われている。我々は後交通動脈が未熟で総頸動脈を遮断することだけで容易に前脳虚血を作りうるスナネズミを用いて、細胞外グルタミン酸濃度の解析を行った。現在までの報告では[1)2)]５～１０分毎の解析しか見られず短い時間単位のグルタミン酸の変動、特に虚血負荷直後及び虚血中の変動が未解決のままであった。今回90秒毎の解析を可能にする方法を開発し、短い時間単位の経過を明らかにすることができたので、若干の文献的考察を加えて報告する。

（実験方法）12～14週のスナネズミを用い、$O_2$70%　$N_2O$30%　halothane　1.5%の麻酔下に総頸動脈にループ状に絹糸を懸けた後、海馬領域に脳内微小透析プローブ（エイコム製BDP-I-4-01）を刺入し、２時間後に絹糸におもりを懸けることで脳虚血を負荷した。灌流液は生理食塩水を用いて２μl／minの速度で灌流させ、回収は酵素的サイクリング法の第一次反応液（60μl）中に90秒間（灌流液３μl）回収し、直ちに－80℃で冷凍させ保存した。回収した灌流液中にはグルタミン酸が１pM程度しか含まれていないため酵素的サイクリング法[3)4)]を用いて測定を行った。（当教室においては3000倍以上の増幅率を確保しており今回の測定においても充分信頼できる結果が得られた。）脳虚血負荷後４～７日後に脳組織切片を作製し（図１）、組織学的に海馬ＣＡ１領域で神経細胞壊死が確認できた動物につき、グルタミン酸濃度の経時的解析を行った。

（結果及び考察）神経細胞壊死が確認された４例につき検討した。（図２）細胞外グルタミン酸濃度は虚血前に比較すると虚血負荷直後（90秒以内）に約２.５倍の有意の上昇を示し、虚血中はピーク時には３.２倍に上昇した。そして血流再開後すぐに低下傾向を示し、再開後３分にて虚血前のレベルまで戻った。それ以降、虚血後３０分まで有意な上昇は認められなかった。今回使用した脳内微小透析用プローブはin vitroにおいて１０～１５%の回収率が得られ、これを元に単純計算をすると虚血前の細胞外グルタミン酸濃度は２０μM前後で、虚血中のピーク時で７０μM前後となる。今までの報告では、培養神経細胞に於てグルタミン酸が神経毒性を発揮し、急性の神経細胞壊死を惹起する濃度は100μMであり[5)6)]、５０μMでも約３０%に見られるといわれている[6)]。今回の結果は、この神経細胞壊死を起こす境界域の濃度に当たり、またこの脳虚血モデルでは急性ではなく遅発性の神経細胞壊死を起こすものであることより、グルタミン酸が急性毒性を示す境界域の濃度に短時間曝されることがこの特異な遅発性神経細胞壊死の引金になるものと思われた。

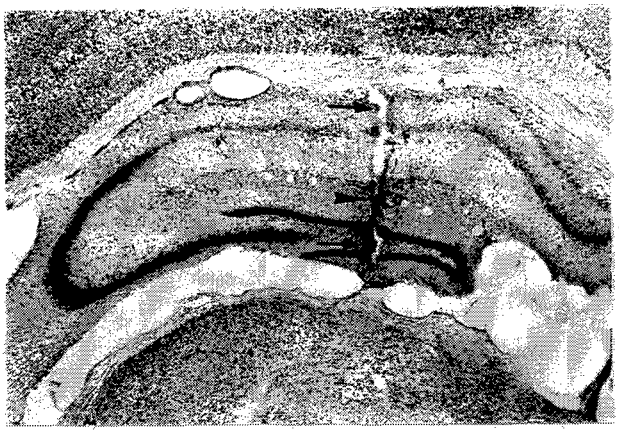


図１　スナネズミ海馬組織像
（ニッスル染色）

→：微小透析プローブ透析膜全長
►：海馬ＣＡ１領域と歯状回の境界

海馬ＣＡ１領域に遅発性神経細胞
壊死が認められる。（虚血後４日）

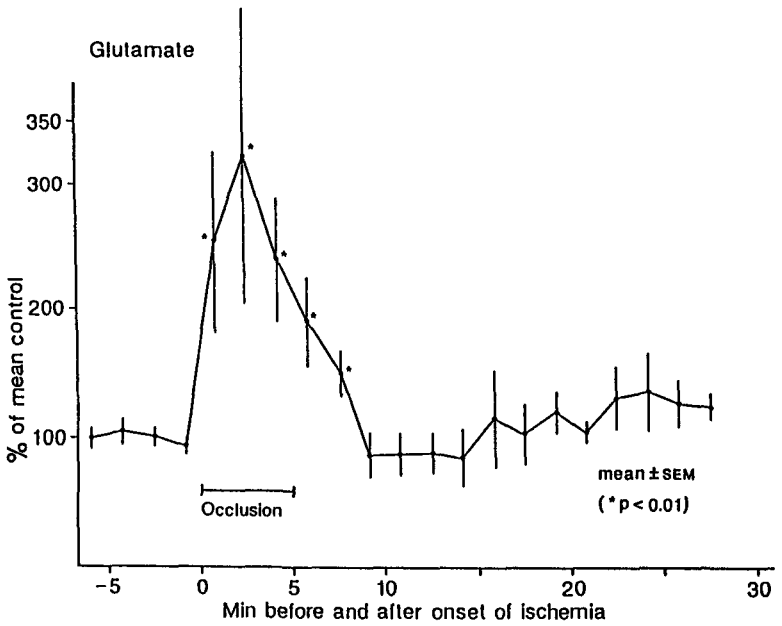



図２　細胞外グルタミン酸濃度の経時的変動

（文献）

1)Benveniste H.,Drejer J.,Schousboe A,.and Diemer N.H. (1984) J.Neurochem. 43:1369-1374
2)Globus M.Y.-T.,Busto R.,Dietrich W.D.,Martinez E.,Valdes I.,and Ginsberg M.D. (1988) J.Neurochem. 51:1455-1464
3)Kato T., Berjer S.J.,and Lowry O.H. (1973) Anal. Biochem. 35:86-97
4)Nitch C.,and Okada Y. (1979) J. Neurosci. Res. 4:161-167
5)Steven Rothman (1987) J.Neurosci. 4:1884-1891
6)Choi D.W.,Maulucci-Gedde M.,and Kriegstein A.R. (1987) J.Neurosci. 7:357-368

# 60 線条体背側部のD1 receptor刺激によるラットのapomorphine誘発顎運動の促進

越川意明，小林雅文，J.D. Stephenson*
（日本大・歯・薬理，ロンドン大精神研・薬理*）

〔要約〕
線条体背側部へD2 antagonistを注入した場合に認められるapomorphine（APO）誘発顎運動の促進効果について検討を行った。線条体背側部へ YM-09151-2（YM: 0.2, 0.5μg）を注入すると APO 0.2 mg/kg i.v. によって誘発される顎運動は促進され，その促進は SCH23390（SCH：1μg）を併用することによって拮抗された。線条体背側部へcis-(z)-flupentixol（Flu：1μg）を注入した場合にもAPO誘発顎運動は促進され，その促進はSCHの併用により拮抗された。YM注入によって線条体背側部のDOPACおよび HVA量は増加し，SCHを同時注入することによってその増加はさらに亢進された。Flu注入の場合にも同様の傾向が認められた。線条体背側部へ D1 agonist（SKF38393 5μg，SKF75670 10μg）を注入した場合には APO誘発顎運動が促進されたが，D2 agonist（quinpirole 10μg）の注入では促進が認められなかった。以上の結果より，線条体背側部へD2 antagonistを注入した場合のAPO誘発顎運動の促進効果は背側部において惹き起こされた dopamine系の機能亢進がD1受容体を介して発現したものである可能性が示唆された。

［目的］APOによって誘発されるstereotypicな顎運動は線条体腹側部にSCHおよび sulpiride（Sul）を注入することによって抑制されるが，背側部への注入ではSulを注入した場合のみにAPO誘発顎運動の促進が認められる（3）。この促進はSCHをSulと併用することにより拮抗される（3）のでその発現機構に背側部におけるD1 receptorの関与が推察される。今回は背側部へSulを注入した場合のAPO誘発顎運動を促進する効果が，他のD2 receptor阻害作用をもつ薬物においても共通して認められるか否かを検討するため，D2 の選択的 antagonistであるYMとD1，D2 の両方の antagonistとされるFluを用いそれらの作用について比較検討した。また Sulの線条体背側部への注入は同部位へSCHを注入した場合と比べてDOPACやHVA量を増加させる（2，3）ため，背側部におけるdopamine系の機能亢進がD1 receptor を介して発現し，促進作用を示した可能性も考えられる。そこでこの点を検討するため，D1とD2 receptorの選択的なagonistをそれぞれ線条体背側部に注入した場合の APO誘発顎運動に及ぼす効果についても実験を行った。

［方法］S-D系雄性ラット（250～320 g）をketamine 10 mg/kg i.p.および halothane（0.5～4 %）で麻酔し，観察期間中動物の動きを頭部顔面領域に制限するため脊髄をC1 で切断し，人工呼吸下で実験を行った。頭部は頭蓋骨表面にビスおよび歯科用即時重合レジンで維持を求め，下顎骨先端部に固定した発光ダイオードとそれから発せられる近赤外線を感知するポジションセンサーの位置的関係を一定にするため，脳定位固定装置に固定した。薬物注入は Paxinos & Watson（4）のatlasに従って（ant.: 9.0, lat.: 3.5, vert.: 6.0）両側の線条体背側部へ植え込んだガイドカニューレより行った。注入液量は1側当り0.5μlとし，30秒間かけて注入した。またAPO 0.2 mg/kg投与は頸静脈に挿入したカテーテルより行った。下顎の開閉運動はその矢状面上の垂直的変位を導出し，その数を60分にわたって数えた。カニューレの先端部位は実験終了後組織学的に確認した。線条体内DA，DOPAC，HVA量の測定は線条体背側部へ各種dopamine receptor antagonistを注入し，60分後にマイクロウェーブ照射（5kW 1.5s）して線条体背側部を切り出した後，HPLC-ECDを用いて行った。

［結果および考察］Fig. 1Aに示すとおり，D2 の選択的antagonistであるYMを線条体背側部へ注入すると，APO誘発顎運動の促進が認められ，その促進はSCHを同時に注入することによって拮抗された。これはすでに報告したSulの場合（3）と同様の結果であった。そこでD1，D2 両方のantagonistとされているFluを用いて同様の実験を行ったところYMの場合と同様に線条体背側部への注入によってAPO誘発顎運動は促進され，その促進はSCHを併用することによって拮抗された（Fig. 1B）。Iorioら（1）およびWaddingtonら（6）によればFluはD1よりもD2 に対して5～12倍程度高い親和性を示すとされているので，Fluによる促進はそのD1 receptor に対する作用が不十分であったためYMと同様の結果を示したとも考えられる。また SCHのD1 阻害作用は比較的早期にその作用が消失することが知られ

ているので（3），SCHの注入を YMおよび Fluの注入50分後に行い，SCH の効果がより確実な時点でAPO誘発顎運動に対する効果を検討した。その結果同時投与の場合と同様の拮抗作用が認められた（Fig. 1 A, B）。Salamaら（5）はhaloperidol投与による線条体 DOPAC, HVA 量の増加が SCH を併用することによって抑制されることを報告し，pre-synaptic $D_2$ receptor阻害による dopamine 機能亢進の調節に $D_1$ receptor が関与することを示唆している。そこでYMやFluとSCHを同時に投与したときのSCHによる拮抗作用は，SCHをYMおよびFlu注入の 50分後に投与した場合と異なり，線条体背側部においてYMおよびFluによるdopamine代謝亢進を抑制したために惹き起こされた可能性も考えられる。この点を検討したところ，Fig. 2 に示すとおり，YMによる dopamine 代謝の亢進はSCHの同時注入によりさらに高められ，Fluの場合にも同様の傾向が認められた。このことは顎運動における拮抗は少なくとも併用したSCHが代謝亢進を抑制したためではないことを示している。線条体背側部における dopamine機能の亢進が $D_1$ receptorを介して発現したと仮定すれば線条体背側部に $D_1$ の選択的agonist を注入することによってAPO誘発顎運動が促進されるはずである。そこで $D_1$, $D_2$それぞれのagonistを線条体背側部へ注入し，その直後に投与したAPOによって誘発される顎運動を測定したところ，SKF38393, SKF75670 では促進が認められたが，quinpiroleではそれが認められず（Fig. 1C），線条体背側部 $D_1$受容体の刺激によってAPO誘発顎運動が促進されることが確認された。


| 文献 |

1）Iorio L.C., et al.(1986) Adv. Exp. Med. Biol., 204, 1-14. 2）Koshikawa N., et al. (1987) Eur. J. Pharmacol. 133, 119-125. 3）Koshikawa N., et al. (1989) Eur. J. Pharmacol. 163, 227-236. 4）Paxinos G. and Watson C.(1986) in "The rat brain in stereotaxic coordinates" Academic Press. 5）Salama A.I. and Sailer C.F. (1986) Adv. Exp. Med. Biol. 204, 137-150. 6）Waddington J. L., et al.(1986) Adv. Exp. Med. Biol. 204, 125-136.


Fig. 1

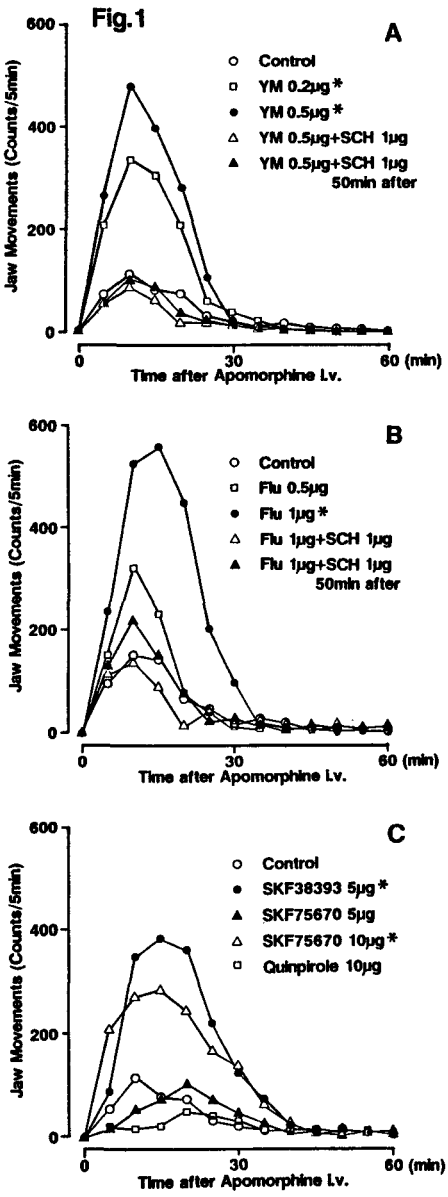
Effects of bilateral injections into the dorsal striatum of DA receptor agonists and antagonists on apomorphine-induced jaw movements.

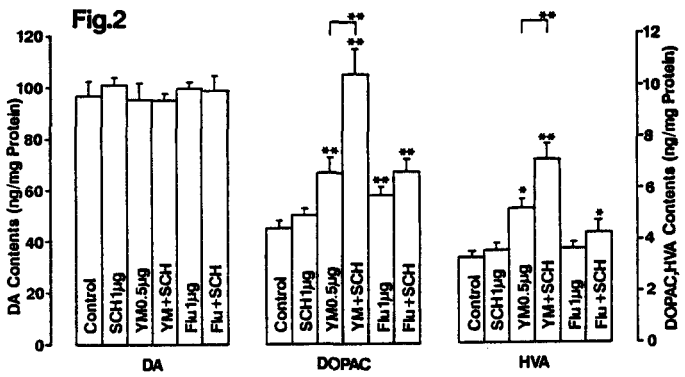
※ P < 0.01 (ANOVA, n=6)

Fig. 2

DA metabolism in the dorsal striatum 60 min after injection of DA receptor antagonists into the dorsal striatum.

(mean ± S.E.M., ※ P < 0.05, ※※ P < 0.01 Student t-test, n=10～16)



# 61 ピリドキサールリン酸とGABA$_A$受容体

栗岡　晋、石岡　憲昭、宇田川慶子、＊松田　誠
（慈恵医大・医科研生化学、＊医化学）

〔要約〕可溶化したGABA$_A$受容体への［$^3$H］GABA、［$^3$H］フルニトラゼパン（FNZ）の特異的結合は、PLP もしくは固定化PLP（PLPゲル）によって阻害された。$IC_{50}$ は 1 mMであった。可溶化GABA$_A$受容体はPLPゲルによって吸着され、12 mMPLPによって溶出されるPLP結合性タンパク質に含まれていることを確認した。さらにイオン交換クロマト等で部分精製した標品を［$^3$H］FNZ で光標識後、SDS-PAGE で分析した結果、標識された［$^3$H］は GABA$_A$受容体タンパク質の サブユニット（$\alpha$、$\beta$）の分子量に相当する位置に見いだされた。PLPのGABA$_A$受容体上の結合部位について考察した。

《目的》脳組織においてピリドキサールリン酸（PLP）は 各種の神経伝達物質アミンを産生する脱炭酸酵素の補酵素として重要である。 PLPの生化学機能を阻害する作用を持つセミカルバジド、チオセミカルバジド、ヒドラジド等の 抗$B_6$剤をマウス、ラット等の脳室内あるいは腹腔内投与すると神経終末における PLP含量が減少し、疾走発作を伴う間代性、強直性痙攣をひきおこすことが知られている。この時 PLPと平行して神経終末におけるγアミノ酪酸（GABA）量及び終末からの放出量の減少が観察されることから、後シナプスのGABAによる抑制性神経伝達機能の低下が、痙攣を引き起こすと考えられている（1）。 一方、同じような痙攣が、大量のPLPを脳室内投与あるいは幼若動物に腹腔内投与した時に見られることが報告されている（2）。このような大量のPLP投与による痙攣の発現機序が、先に述べた神経終末GABA放出量減少に至る連鎖的機序にもとずくとは考えにくい。むしろGABA$_A$受容体タンパク質のPLPによる修飾によってもたらされる抑制性神経伝達機能の阻害が可能性として考えられる。

この可能性を検討するため、可溶化したGABA$_A$受容体活性が PLPによって阻害されることを踏まえ、PLPをリガンドとしたアフィニティゲルによって得られるPLP結合性タンパク質画分にGABA$_A$受容体タンパク質が存在することを明らかにすると共に、シナプス膜をPLPでアフィニティラベルして得られる PLPタンパク質の分離分析を試みた。

《方法》<u>シナプス膜の可溶化</u>：ウシ脳 $P_2$ を50 mM リン酸カリウム緩衝液中で凍結融解後、遠心洗浄を 5回繰り返して得た膜画分を 1.5 %ルブロール PXで可溶化した。<u>GABA$_A$受容体活性</u>：［$^3$H］GABA、［$^3$H］FNZの特異的結合の測定によった。<u>PLP固定化ゲル</u>：田村、高橋の方法（3）で Fig.1に示したPLP固定化ゲルを作成した。<u>光標識</u>：Siegel等の方法（4）でシナプス膜、PLP結合性タンパク質画分を［$^3$H］FNZで光標識した。 <u>PLP標識</u>：シナプス膜を 10 mM PLPでアフィニティ標識後、［$^3$H］$NaBH_4$で固定化、標識した。さらに、GABA, ムスシモール存在下で同様の標識を試みた。 <u>SDS-PAGE / 二次元電気泳動（2DE）</u>：既報の方法（5）によった。

《結果》可溶化したGABA$_A$受容体への［$^3$H］GABA、［$^3$H］FNZの特異的結合量を阻害するPLPの $IC_{50}$は共に1 mMであり、また100 % 阻害するに要するPLP濃度にも差は無かった。作成したPLPゲル中の PLP濃度は 15mM に相当しこの濃度は［$^3$H］GABA、［$^3$H］FNZの特異的結合量を100 % 阻害するに要する PLP濃度にほぼ等しい。可溶化したGABA$_A$受容体の［$^3$H］GABA及び［$^3$H］FNZ特異的結合活性は、PLPゲルで処理することによって、最高 76 % が吸着によって失われた。 PLPゲルから12 mMPLPによって溶出されるPLP結合性タンパク質画分中にGABA$_A$受容体タンパク質（分子量：24 Kdalton）が含まれていることがSephasose 6Bによるゲル沪過法により確かめられた（Fig.2）。PLP結合性タンパク質画分を吸着、イオン交換クロマトグラフ法で部分精製した標品を［$^3$H］FNZで光標識後、SDS-PAGE で分析した結果、標識された［$^3$H］は GABA$_A$受容体タンパク質のサブユニット（$\alpha$、$\beta$）の分子量に相当する位置に見いだされた（Fig.4）。 さらに、この標品について2DEによるポリペプチドマップを作成したがGABA$_A$受容体タンパク質のサブユニット（$\alpha$、$\beta$）を明確に同定することは困難であった(Fig.3)。シナプス膜をPLPで標識後、［$^3$H］$NaBH_4$で固定化したものについてサブユニットの同定を試みている。

《考察》可溶化したGABA$_A$受容体活性が、遊離の10 mM PLPによって阻害され、また同程度の濃度を持つ固定化 PLPゲルに効率よく吸着される事実は、GABA$_A$受容体タンパク質が、PLPと結合し、この結合がリガンドの受容体結合を阻害することを示している。 Barnard 等（6）は、GABA$_A$受容体モデルとして、サブユニット（$\alpha$、$\beta$）がシナプス後膜を貫通し、シナプス間隙側のチャンネル開口部はプラスに荷電していて$Cl^-$の誘引に機能する構造を提示している。$Cl^-$（アニオン）チャンネルとしてのGABA$_A$受容体と機能上の類似性を持つものとして 赤血球膜貫通性の Band 3タンパク質が知られている。この Band 3 タンパク質は、$HCO_3^-$ ／ $Cl^-$交換反応に機能するアニオンチャンネル を構成しているが、10 mMPLP によって特異的に修飾されるとその機能が阻害される（7）。これは、チャンネル開口部周辺のリジン残基が、PLPのアルデヒドとシッフ塩基を形成すると共にアルギニン残基とPLPのリン酸基とが静電気結合するためである。Band 3 タンパク質の場合と同じように、GABA$_A$受容体機能の阻害が $Cl^-$チャンネル開口部周辺にPLPが結合することにもとずくならば、両方のアニオンチャンネルが、PLPに対して類似の反応性持つことになり興味深い。

《文献》（1）松田 誠（1983）ビタミン 57, 1-15.（2）Yamashita, J.（1973）ビタミン 47, 167-172.（3）Tamura, Z. and Takahashi, S.（1970）"Method in Enzymology" Vol. 18A, p471.（4）Siegel, E. et al.（1983）J. Biol. Chem. 258, 6965-6971.（5）Manabe, T. et al.（1982）Clin. Chem. 28, 824-827.（6）Barnard, E. A. et al.（1987）TINS. 10, 502-509.（7）Nanri, H. et al.（1983）J. Biol. Chem. 258, 5985-5989.

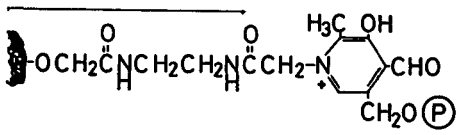



Fig.1 PLP-gel

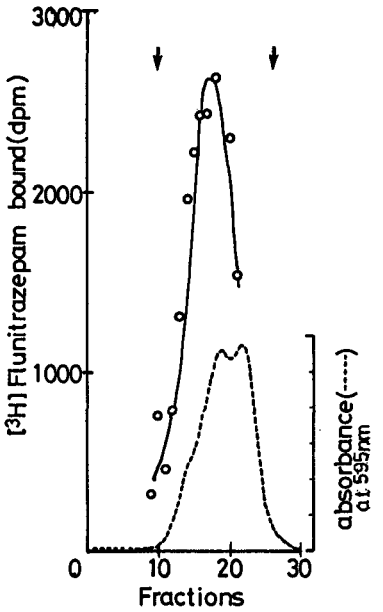



Fig.2
Sepharose 6B gel filtration of
PLP binding protein fraction

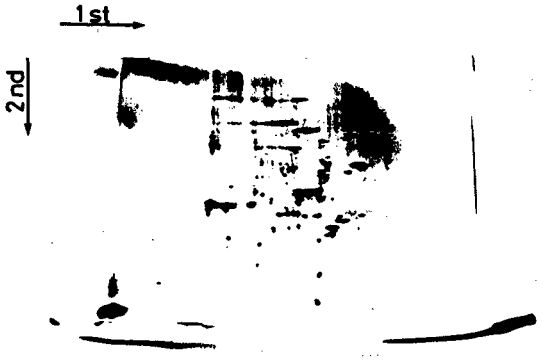



Fig.3 2D gel electrophoresis of
PLP binding protein fraction

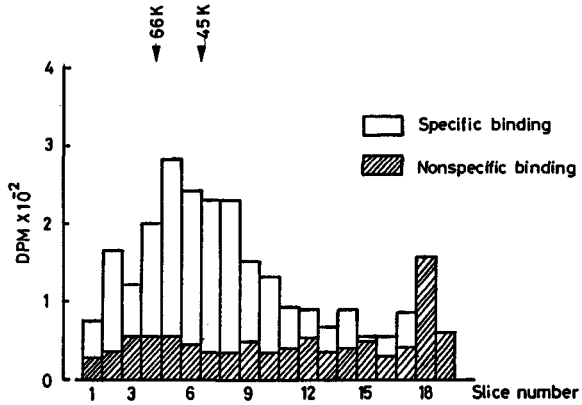



Fig.4 Photoaffinity labeling and
SDS-PAGE of PLP binding protein
fraction

# 62 5－HT刺激によるウサギ血小板内Ca2+濃度上昇の測定法

杉原順二[1)]、山脇成人[2)]、加藤匡宏[2)]、更井啓介[1)]
[1)]広島大学医学部神経精神医学教室
[2)]国立呉病院臨床研究部精神神経科学研究室

〔要約〕 セロトニン(5-HT)刺激によるウサギ血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇は血小板濃厚浮遊液(PRP)にfura-2/AMを負荷するといった従来の方法では測定できなかったが、PRPをさらに遠心し0.5mM EGTAを含むHepes緩衝液に分散させたのちfura-2/AMを負荷することにより測定可能となった。さらに、ウサギ血小板はヒト血小板に比べて細胞外の$Ca^{2+}$濃度に影響を受けやすく、緩衝液中の0.5mM EGTAによって血小板内の$Ca^{2+}$が失われるため測定時には漏出した$Ca^{2+}$を補う必要がある。また、10μM 5-HT刺激による血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇はritanserin(1 nM)によって抑制されたが、Li(10 mM)では抑制されなかった。

【はじめに】

5-HTは、脳において情動行動に関係する神経伝達物質として働くことが知られており、その受容体機能と躁うつ病などの感情疾患との関連性が注目されている。最近の受容体研究の進歩によって、5-HT受容体にはいくつかのsubtypeが存在することが示され、その情報伝達機構や生理機能なども明らかにされているその中で$5\text{-}HT_2$受容体はイノシトール燐脂質(PI)-$Ca^{2+}$系に共役し、細胞内$Ca^{2+}$濃度上昇を引き起こすことが知られている。血小板は5-HT取り込み機構や遊離機構を有し、さらに$5\text{-}HT_2$受容体も存在することから中枢の5-HT作動性神経のモデルとしての可能性が示唆されている。ヒトでは血小板と中枢の$5\text{-}HT_2$受容体機能の関係を明らかにすることは困難であるが、ウサギでは同一個体における両者の比較検討が可能であるという利点がある。また、ウサギ血小板は5-HT機構が発達しているため、多くの研究が報告されているが、$5\text{-}HT_2$受容体を介する血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇反応に関する研究はまだ報告されていない。本研究ではウサギ血小板における細胞内$Ca^{2+}$動態について検討し、その測定法の確立を試みたので報告する。

【方法】

採血はウサギ後耳介静脈より行い、ACD液1容と静脈血9容を混合した。この血液を150g 20分間遠心し、血小板濃厚浮遊液(PRP)を得た。このPRPを350g 15分間遠心し、0.5mM EGTAを含むHepes緩衝液に分散させたのち、3μM fura-2/AMを37℃で15分間負荷した。さらに350g 15分間遠心し$10^8$個/mlの濃度となるように0.5mM EGTAを含むHepes緩衝液に分散させて血小板浮遊液を作成した。血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇の測定はPletschterらの方法[1)]を一部改変して行った。

【結果】

(1)ウサギ血小板にfura-2を取り込ませるためには、PRPをさらに遠心し0.5 mM EGTAを含むHepes緩衝液に分散させたのちfura-2/AMを負荷しなければならない。
(2)血小板内$Ca^{2+}$濃度は5-HT刺激を行う直前に、1.5 mMの$Ca^{2+}$を加えて約1分間インキュベーションすることによって上昇した(Fig. 1a,1b)。
(3)血小板内$Ca^{2+}$濃度は1.5 mMの$Ca^{2+}$でインキュベーションをおこなった後 5mM EGTAを加えて細胞外の$Ca^{2+}$を除去した条件下で5-HT刺激をおこなった場合でも上昇した(Fig. 1c)。
(4)5-HT刺激による血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇は用量依存性が認められた(Fig. 2)。
(5)10μM 5-HT刺激による血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇はritanserin(1 nM)によって抑制された(Fig. 3)。
(6)10μM 5-HT刺激による血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇はLi(1,10 mM)により影響されなかった。

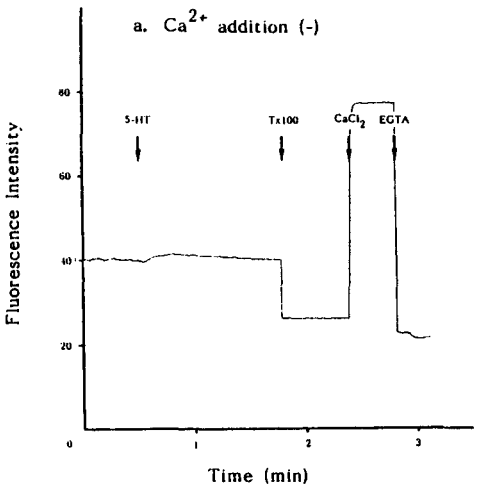
【考察】

fura-2を用いて血小板内$Ca^{2+}$濃度の測定を行うためには、血小板膜破壊後、過量の$Ca^{2+}$とfura-2との蛍光値(Fmax)および$Ca^{2+}$を除去した状態でのfura-2のみの蛍光値(Fmin)を求めることが必要である。血小板濃厚浮遊液(PRP)にfura-2/AMを負荷する方法では、5-HT刺激を介する$Ca^{2+}$濃度上昇および血小板膜破壊後に認められるFmaxが計測されなかった。ところが、PRPをさらに遠心し0.5mM EGTAを含むHepes緩衝液に分散させたのちfura-2/AMを負荷する方法により測定可能となった。この理由として、ウサギにおいては血清中に存在するエステラーゼ活性がヒトに比べて高いために、PRP中にfura-2/AMを負荷するとそのアセトメチル基が分解されfura-2が血小板に取り込まれなかった可能性が推定される。また、血小板内$Ca^{2+}$濃度は5-HT刺激直前に1.5 mMの$Ca^{2+}$を加え約1分間インキュベーションを行う条件下で上昇した。さらに1.5 mMの$Ca^{2+}$でインキュベーションをおこなった後、5 mM EGTAを加えて細胞外の$Ca^{2+}$を除去して5-HT刺激をおこ

なった場合でも$Ca^{2+}$濃度は上昇している。このことから、ウサギ血小板は、緩衝液中のEGTAによって細胞外$Ca^{2+}$が除去されると血小板内から$Ca^{2+}$が漏出しやすいことが推定される。従って測定に際しては失われた$Ca^{2+}$を補う必要がある。また、10μM 5-HT刺激による血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇はritanserin(1 nM)によって抑制されたことから、5-$HT_2$受容体を介した反応であることが示されている。PI代謝回転を阻害するとされるLi(1,10 mM)の刺激直前の添加はこの$Ca^{2+}$濃度上昇に影響しなかった。これはLiが細胞内にまだ十分に取り込まれていないためと考えられるので、さらに検討が必要である。

【参考文献】

1)Affolter, H., Erne, P., Burgisser. E. and Pletscher, A. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol 1984 325 :337-342



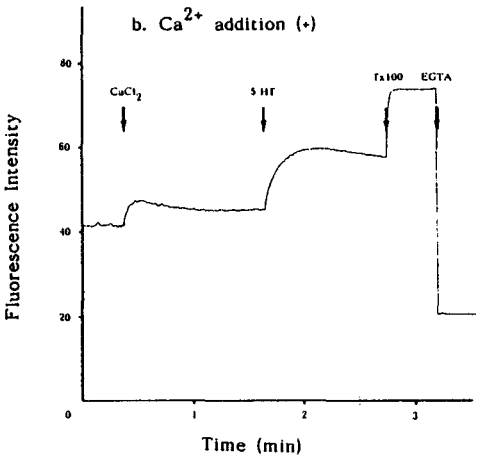




Fig. 2 Effect of 5-HT on the concentration of $[Ca^{2+}]i$ in rabbit platelets

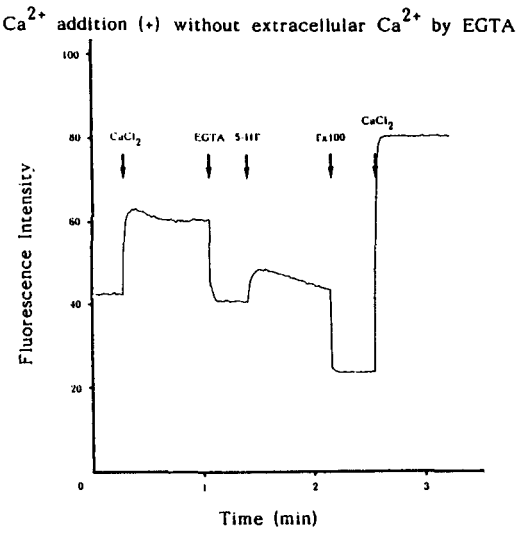



Fig. 1 Effects of extracellular $Ca^{2+}$ on 5-HT(10μM)-induced $[Ca^{2+}]i$ change in rabbit platelets

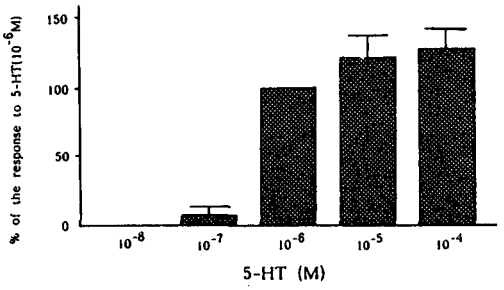
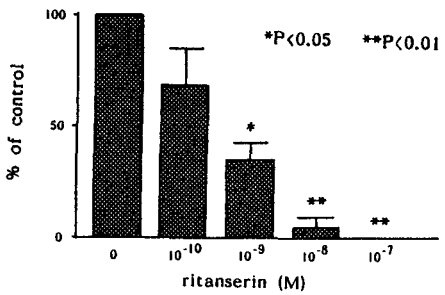



Fig. 3 Effect of ritanserin on the increase in $[Ca^{2+}]i$ by 5-HT in rabbit platelets



# 63 5－ＨＴ2受容体を介したヒト血小板内Ｃａ2＋濃度上昇の検討（躁うつ病患者群と正常群との比較）

山脇成人[1)]、杉原順二[2)]、加藤匡宏[1)]、清水雅美[1)]、慈幸由起[1)]
[1)]国立呉病院臨床研究部精神神経科学研究室
[2)]広島大学医学部神経精神医学教室

〔要約〕ヒト血小板におけるセロトニン(5-HT)刺激による$Ca^{2+}$濃度上昇反応について検討を行った。10μM 5-HT刺激による$Ca^{2+}$濃度上昇は約72 nMであり、この$Ca^{2+}$濃度上昇はritanserinにより用量依存性に抑制されたことから、この反応は5-$HT_2$受容体を介していると考えられる。躁うつ病群の血小板では5-HTによる$Ca^{2+}$濃度上昇は正常群に比較して有意な増加が認められた。この結果は躁うつ病の5-$HT_2$受容体感受性亢進仮説を支持するものであり、5-HTによる$Ca^{2+}$濃度上昇反応は躁うつ病の生物学的指標として有用である可能性が示唆された。

【はじめに】

抗うつ薬の慢性投与によって中枢5-$HT_2$受容体の減少が引き起こされることから、躁うつ病の病因として中枢5-$HT_2$受容体の感受性亢進仮説が提唱されている。一方、血小板にも5-$HT_2$受容体が存在することが知られており、5-HT刺激に反応して一連の凝集反応が引き起こされる。この反応は5-$HT_2$受容体-PI系を介する血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇がひきがねとなる。われわれは5-$HT_2$受容体を介する血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇が中枢における5-HT作動性神経系の情報伝達のモデルとして有用であると考えている。本研究ではヒト血小板の5-HTによる$Ca^{2+}$濃度上昇に関して基礎検討を行い、躁うつ病および精神分裂病患者の血小板における反応性を正常人と比較した。さらに、ヒト血小板内$Ca^{2+}$動態の画像解析についても検討した。

【方法】

採血は上腕内側皮静脈より行い、ACD液1容と静脈血9容を混合し10mlとした。この血液を700g 5分間遠心し血小板濃厚浮遊液(PRP)を得た。このPRPに5 μM fura-2/AMを37°Cで15分間負荷した。負荷後350g 15分間遠心し、クエン酸緩衝液(pH 6.2)に分散させた後、350g 15分間遠心し$10^8$個/mlの濃度となるようにHepes緩衝液(pH 7.4)に分散させて血小板浮遊液を作成した。血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇の測定はPletschterらの方法[1)]を一部改変して行った。一方、血小板内$Ca^{2+}$動態の画像解析を行うためfura-2を負荷したPRPは遠心後、0.5mM EGTAを含むHepes緩衝液に分散し、poly-l-lysineをcoatingしたカバーグラス上に固定し、蛍光顕微鏡からの画像をARGUS100を用いて解析した。尚、この研究に際して健常人および患者には研究目的について説明し承諾を得た。

【結果】

(1)正常ヒト血小板内$Ca^{2+}$濃度は刺激前は約140 nMであった。5-HT刺激による細胞内$Ca^{2+}$濃度上昇は5-HT濃度が10μMでは約72 nMであり、30μMのとき最大反応を示した(Fig. 1)。
(2)Ritanserinは1 nM以上の濃度で10μM 5-HT刺激による$Ca^{2+}$濃度上昇を有意に抑制した(Fig. 2)。
(3)Liは1, 3, 10 mMの濃度でPRPに60分間負荷したが有意な変化は認められなかった(Fig. 3)。
(4)10μM 5-HT刺激による血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇は未服薬の躁うつ病群において有意に増加していたが、服薬中の躁うつ病群では正常群との間に位置していた。また、未治療の精神分裂病群では正常群と同程度であった(Fig. 4)。

【考察】

10μM5-HT刺激によるヒト血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇はritanserin(1 nM)によって抑制されたことから、5-$HT_2$受容体を介した反応であると考えられる。一方、PI代謝回転を阻害するLiは10 mMの負荷においても5-HTによる$Ca^{2+}$濃度上昇を抑制しなかった。また、この$Ca^{2+}$濃度上昇は躁うつ病群において有意な増加が認められたが、精神分裂病群では正常群と同程度であった。躁うつ病群の反応性の増加は血小板の5-$HT_2$受容体数の増加あるいは親和性の亢進の可能性が推定される。服薬中の躁うつ病群の反応性は未服薬の躁うつ病群に比べて減少傾向が認められ、薬物治療による精神状態の改善と関連しているのかも知れない。近年、躁うつ病治療薬が5-HT受容体のみならず受容体を介した細胞内情報伝達系まで作用する可能性が示唆されているが、患者脳を用いて受容体情報伝達系を調べることは困難であり動物実験の結果から類推するしかない。しかし、血小板は容易にヒトから採取することができ、さらに5-$HT_2$受容体を持つことからその受容体を介した細胞内伝達系について患者対象研究が可能である。本研究の結果は、躁うつ病の中枢5-$HT_2$受容

体感受性亢進仮説を末梢のレベルで支持するものであり、5-$HT_2$受容体を介する血小板内$Ca^{2+}$濃度上昇がその生物学的指標として有用である可能性が示唆された。

参考文献

1)Affolter, H., Erne, P., Burgisser, E. and Pletscher, A. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1984 325 :337-342

Fig. 1
Effect of 5-HT on the concentration of [Ca]i in human platelets

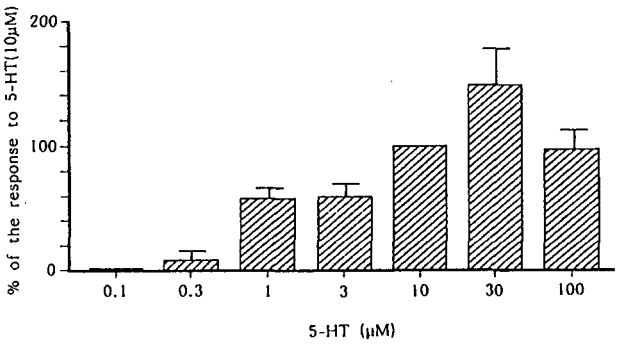
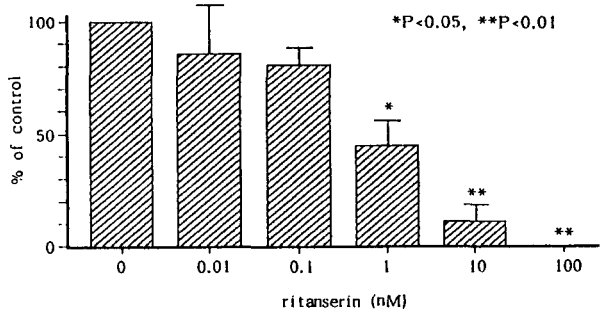



Fig. 2
Effect of ritanserin on the increase in [Ca]i by 5-HT in human platelets



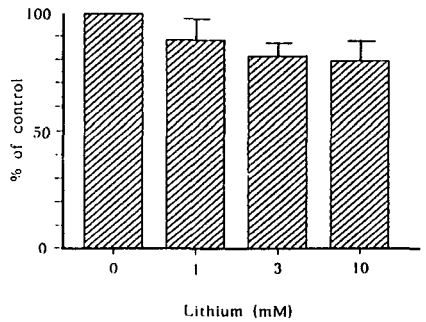




Fig. 3 Effect of intracellular Li on the increase in [Ca]i by 5-HT in platelets

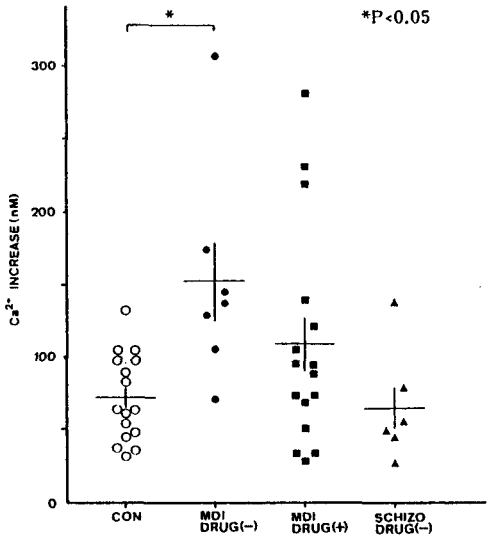



Fig. 4 The increase in [Ca]i by 5-HT in platelets of psychiatric patients

# 64 ラット海馬におけるセロトニン1c受容体の薬理生化学的検討

黒田安計　三国雅彦　久住一郎*　山本秀子　加賀谷有行　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　*北海道大学医学部精神医学教室）

〔要約〕
ラット海馬における［$N^6$-methyl-$^3$H］メスレルジンの結合特性並びにセロトニン受容体を介するイノシトールリン脂質代謝について検討した。
1；ラット海馬膜標本を用いた［$^3$H］メスレルジンによる受容体結合実験では5HTによる結合阻害曲線は二相性を示し、低濃度の5HTで阻害される部位と比較的高濃度の5HTで阻害される部位の2つの結合部位の存在が示唆された。5HTアンタゴニストであるスピペロンによる結合阻害実験では［$^3$H］メスレルジン結合に対するスピペロンの阻害曲線は2相性を示した。一方(+)ミアンセリンによる結合阻害実験においては［$^3$H］メスレルジン結合に対する(+)ミアンセリンの阻害曲線は1相性を示した。
2；ラット海馬切片における5HT刺激性イノシトール1リン酸蓄積に対する受容体アンタゴニストによる抑制は、リタンセリン、(+)ミアンセリンは著明な抑制率を示すものの、ケタンセリンやスピペロンではわずかな抑制率しか示さなかった。mCPP(m-chlorphenylpiperazine)は10$\mu$Mでイノシトール1リン酸蓄積増加の傾向を示し100$\mu$Mで有意な増加となるが、5HT(10$\mu$M)と同時に刺激するとイノシトール1リン酸蓄積が5HT単独に比し有意に抑制された。
以上の結果は従来脈絡叢に局在すると考えられていた5HT1C 受容体の海馬における存在を示唆するものと思われる。

5HT受容体は従来よりその薬理学的特徴からいくつかのsublypeに分類されているが、そのうち Pazos A.ら(1984)[1]によって提示された5HT1c 受容体は［$^3$H］5HTや［$^3$H］メスレルジンで標識され脈絡叢に高濃度に存在することが知られており、5HT2 受容体とともに細胞内二次情報伝達系としてホスフォリパーゼCを介したイノシトールリン脂質代謝と共役していることが明らかにされている。しかし、分子生物学的手法を用いた最近の研究[2][3]によって5HT1c 受容体のmRNAは脈絡叢に限らず広く脳内に分布している事が確かめられ、脳内の5HT1C受容体の存在と機能の解明が待たれている。今回われわれは情動に関係が深いとされる海馬における5HT1c 受容体について、［$^3$H］メスレルジン結合に及ぼす5HT，5HTアンタゴニストによる結合阻害実験並びに海馬切片における5HT刺激性イノシトール1リン酸蓄積に対する各種薬物の影響を指標として検討を加えた。

［方法］
1；［$^3$H］メスレルジン結合実験　Sprague-Dawley系雄性ラットを断頭し氷冷下に海馬を採取し実験当日まで-80℃で保存した。EDTA加50mM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 500g 5分間の遠心を行いその上清について 49000g 10分間の遠心を2回繰り返した後、50mM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 49000g 10分間の遠心を行った。最終沈渣を同緩衝液に再懸濁したものを膜標品として用いた。［$^3$H］メスレルジン(2nM)と各種 displacer を含む50mMトリス塩酸緩衝液に膜標品を加え、37℃で30分間反応させた後 WhatmannGF/Bフィルター上に吸引濾過し、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。

2；イノシトール1リン酸($IP_1$)蓄積に及ぼす5HTアゴニスト、アンタゴニストの影響
Sprague-Dawley系雄性ラット海馬切片(0.3×0.3×1mm)をHYスライサーにより作製し、95%$O_2$、5%$CO_2$混合ガスで飽和したKrebs炭酸緩衝液とともに1時間インキュベーションし、この間3回遠心操作を繰り返しながら洗浄した。［$^3$H］イノシトール(30$\mu$Ci)をこの緩衝液に添加し、37℃で1時間インキュベーションして海馬のイノシトールリン脂質を標識し、10mM LiCl存在下で$IP_1$ホスファターゼ活性を阻害して海馬切片標本を作製した。5HT，5HTアゴニストを加えて45分間インキュベーションし、阻害実験では5HT刺激の10分前に各種アンタゴニストを添加した。インキュベーション終了後メタノールクロロホルム混液を加えて反応を停止させ［$^3$H］PI加水分解により生成される［$^3$H］$IP_1$をイオン交換樹脂カラムで分離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。

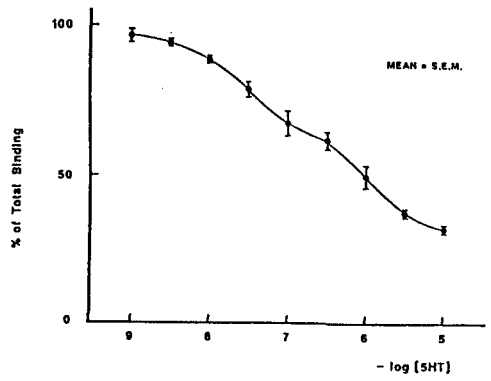
［結果］
ラット海馬膜標本における［$^3$H］メスレルジン結合に対する5HTの阻害曲線は2相性を示し、コンピュータプログラムを用いた解析では5HTに対する親和性の異なった2つの結合部位(IC50=24nM,IC50=1200nM)を想定した場合に最も適合性の良いものとなった($P<0.01$)。5HTアンタゴニストによる結合阻害実験では5HT2 受容体に対して比較的親和性が高く、5HT1C 受容体に対して親和性の低いとされるスピペロン[4]においては［$^3$H］メスレルジン結合に対するスピペロンの阻害曲線は2相性を示し親和性の異なる2つの結合部位(IC50=11nM, IC50=2890nM)を想定した場合に最も適合性の良いものとなった($P<0.01$)。一方5HT2 受容体並びに5HT1C 受容体に対してともに親和性の高いとされるミアンセリンのうち、より阻害能の大きい(+)ミアンセリン[5]による結合阻害実験では［$^3$H］メスレルジン結合に対する(+)ミアンセリンの阻害曲線は1相性を示した(IC50=49nM)。

ラット海馬切片における10μM５ＨＴ刺激性$IP_1$蓄積に対する１μMの各種受容体アンタゴニストの抑制ではリタンセリン、メテルゴリン、(+)ミアンセリンは著明な抑制率を示すものの、ケタンセリンでは有意ではあるがわずかな抑制率しか示さず、スピペロンは有意な抑制を示さなかった。一方５ＨＴ2 受容体に対してはアンタゴニストとして作用し５ＨＴ1C 受容体に対してはアゴニストとして作用すると報告されているｍＣＰＰ[6]では10μＭで$IP_1$蓄積増加の傾向を示し100μＭでは有意な増加となるが、５ＨＴ（10μＭ）と同時に刺激すると$IP_1$蓄積が同濃度の５ＨＴ単独に比して有意に抑制された。

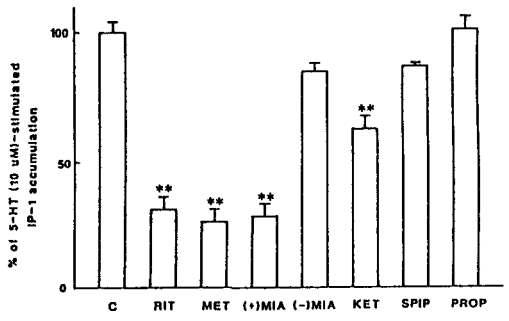
［考察］

今回の実験結果からラット海馬において［$^3$Ｈ］メスレルジンで標識される５ＨＴ結合部位には５ＨＴに対する親和性の異なる２つの部位が存在することが示され、これは脈絡叢での［$^3$Ｈ］メスレルジン結合に対する５ＨＴのIC50[1]、大脳皮質での［$^3$Ｈ］ケタンセリン結合に対する５ＨＴのIC50[7]にそれぞれ対応しているものであった。各種５ＨＴ受容体アンタゴニストによる結合阻害実験や５ＨＴ刺激性イノシトール１リン酸蓄積反応の抑制実験においても、５ＨＴ2 並びに５ＨＴ1C 受容体に対する親和性の差異によって２つの異なった結合阻害ないしは抑制様式が観察された。またｍＣＰＰを用いたイノシトール１リン酸蓄積反応では、海馬における５ＨＴ2 ならびに５ＨＴ1C 受容体の両者の受容体機能を反映していると考えられる結果を得た。これらの結果は今まで明確ではなかった海馬におけるセロトニン1C 受容体の存在とその機能を薬理生化学的に示すものであるといえる。

［文献］
(1)Pazos A., et al. (1984) Eur.J.Pharmacol. 106, 539-546.
(2)Julius D., et al. (1988) Science 241, 558-564.
(3)Hoffman B., et al. (1988) FEBS Lett. 247, 453-462.
(4)Hoyer D. (1988) TiPS 9, 89-94.
(5)Helmeste D. M. (1986) Life Sci. 39, 223-227.
(6)Conn P. J. (1987) J. Pharmacol. Exp. Ther. 242, 552-557
(7)Leysen J. E. (1982) Mol. Pharmacol. 21, 301-314.

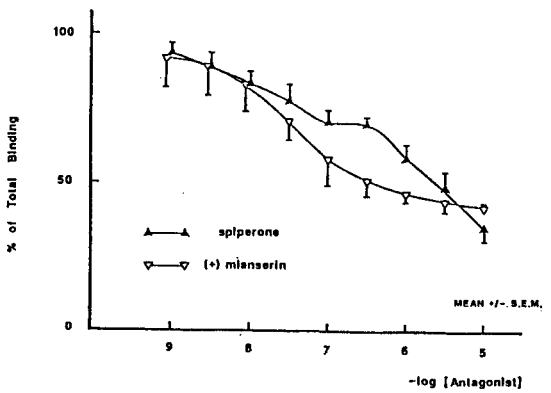



A competition curve of 5HT for [3H]mesulergine binding to rat hippocampus.

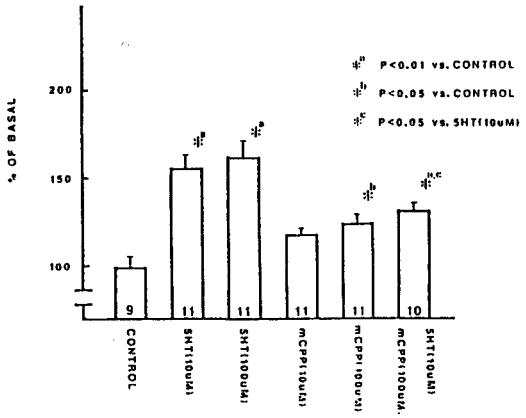



** p < 0.01

Inhibition of 5HT-Stimulated IP-1 Accumulation in Rat Hippocampus by Various Monoamin Receptor Antagonists




Competition curves of antagonists for [3H]mesulergine binding to rat hippocampus




PI Hydrolysis in Rat Hippocampal Slices

# 65 神経突起伸展因子（ＮＯＦ）と結合するニワトリ胚網膜の膜蛋白質（８２ｋＤａ蛋白質）について

谷浦秀夫、林要喜知、三木直正
（金沢大、がん研、薬理部）

〔要約〕

ニワトリ砂嚢平滑筋を用いて、神経突起伸展因子(NOF)に結合し、かつNOFの突起伸展活性を阻害する82kDa膜蛋白質を同定した。82kDa膜蛋白質は、NOFに反応して突起を伸展するニワトリ胚網膜にも存在した。ニワトリ胚網膜膜分画をさらにTriton X-114 を用いて相分離(phase separation)をおこなうと、Triton X-114相に82kDa蛋白質が主なNOF結合蛋白質として含まれていた。胚齢に伴うNOFに対する網膜の突起伸展の反応性の変化と、網膜膜分画に含まれるNOFに対する阻害活性及びNOFとの結合活性の変化を比較した。最も突起伸展の反応性の高い8日目胚では、NOFに対する阻害及びNOF結合活性とも強かった。その後、突起伸展の反応性は急激に減少し、これとほぼ平行してNOFに対する阻害活性及び結合活性は減少して行った。従って、82kDa蛋白質はNOFの突起伸展ドメインに結合する受容体と考えられた。また、網膜の胚齢と共に、NOFに対する突起伸展能が減少する原因の一つとして、加齢に伴う82kDa蛋白質（NOF受容体）の減少が示唆された。

神経突起伸展因子(NOF)は、培養末梢神経細胞に対し著明な突起伸展を誘導する700kDaの糖蛋白質である。分子サイズ、作用様式などからラミニンファミリーに属すると考えられる。ラミニンでは、インテグリンを含めていくつかのラミニン結合（膜）蛋白質が報告されている。しかし、突起伸展の誘導を介在する受容体はいまだ不明である。神経突起伸展誘導のメカニズムを探る目的でNOF受容体を検索した。NOF受容体蛋白質として、NOFと特異的に結合する蛋白質を同定すると共に、受容体活性として、この蛋白質がNOFと結合することにより、NOFの突起伸展活性を阻害する能力を調べた。

「方法」

①NOFの精製は既報(1)によった。

②リガンドブロット：膜蛋白質をSDS-PAGE後、ニトロセルロース膜に転写し、37℃、2時間NOFとインキュベートした。その後、通常のイムノブロット法にてNOF結合蛋白質を同定した。

③阻害アッセイ：NOFを塗布したマルチウエルに可溶化膜蛋白質を加え37℃ 、12時間インキュベートした。その後蒸留水、PBS(-)にて洗浄後、8-9日目胚毛様体神経節ニューロンを培養し5時間後に突起伸展率を測定し、受容体活性とした。

④ニワトリ砂嚢平滑筋よりの82kDaの粗精製：ニワトリ砂嚢平滑筋をPBS(-)にてホモゲナイズ後、遠心し、沈澱をさらに10mM Tris-acetate(8.0)で洗浄し、その沈澱を0.5% Nonidet P-40で可溶化した。その上清をアセトン粉末し、PBS(-)で洗浄し可溶性蛋白質を除去して、沈澱を再度0.5% NP-40にて可溶化した。

⑤ニワトリ胚網膜膜分画の調整：ニワトリ胚網膜を0.32Mショ糖液でホモゲナイズし、1000g、10分遠心した上清を18000g、30分遠心した。この沈澱を$P_2$とし、0.5% NP-40にて可溶化し、さらにTriton X-114 による相分離を行った(2)。

「結果」

粗ニワトリ砂嚢平滑筋のNP-40可溶化分画には、NOFの突起伸展活性を阻害する物質が含まれており、その阻害活性はトリプシン処理、熱処理にて消失した。NP-40可溶化分画を用いてNOFリガンドブロットをおこなうと、82kの位置に主要なNOF結合蛋白質が検出された。この82kDa蛋白質をSDSゲルから切り出し、NOF活性を阻害するかどうかを調べたところ、NOF活性を強く阻害した。同様な性質の膜蛋白質が神経系に存在するかどうか検索したところ、ニワトリ胚網膜に強い阻害活性が存在した。網膜を砂嚢平滑筋と同様の処理法にて膜分画を調整したところ、7-8日目胚網膜に強い阻害活性が存在した。また、リガンドブロットを行うと、いくつかのNOF結合バンドと共に,82kDaバンドも検出された。この82kDa蛋白質が,網膜で確かに膜蛋白質であるかどうかを遠心分離による分画法にて調べた。$P_2$分画に強い阻害活性が存在しており、可溶性分画には全く活性がなかった。この$P_2$分画をさらにTriton X-114 相分離をおこない、Triton X-114相と水相に分けると、Triton X-114相に強い阻害活性が存在した。また、この相を用いてリガンドブロットをおこなうと、82kDa蛋白質が主なNOF結合蛋白質であった（図１）。網膜の粗標品でみられた他のNOF結合蛋白質は、大部分水相の方に移行していた。したがって、82kDa蛋白質は内在性膜蛋白質と考えられた。NOFによるニワトリ胚網膜からの突起伸展は、厳密に胚齢に依存して

いることはすでに報告している(3)。すなわち、7-9日目胚で最大の突起伸展反応性を示し、その後は急速にその反応性が低下する。上記Triton X-114 相を用いて胚齢に伴うNOF活性の阻害及びNOF結合活性の変化を突起伸展反応と比較した。突起伸展反応の高い8日目胚網膜に、最も強いNOF活性の阻害能と、NOF結合活性が認められ、その後、胚齢の進行と共に徐々に低下していく傾向が認められた（図２）。

「考察」

ニワトリ砂嚢平滑筋で同定したNOF結合膜蛋白質は、そのアッセイ系からだけでは、NOFの阻害物質か、あるいはNOF受容体かは判断できない。しかし、今回の網膜における実験から、82kDa蛋白質の結合能が高い時期に、突起伸展反応が強いこと、突起伸展能のなくなった時には、82kDa蛋白質の結合能が減少することより判断して、82kDa蛋白質はNOF受容体であると考えられた。また、網膜の胚齢に伴い突起伸展能が消失する原因の一つとして、NOF受容体の減少、あるいはNOF受容体活性の低下が示唆された。

「文献」

1. Hayashi,Y. and Miki,N.(1985) J. Biol. Chem. 260, 14269-14278.
2. Bordier,C.(1981) J. Biol. Chem. 256, 1604-1607.
3. Kato,S., Negishi,K., Hayashi,Y. and Miki,N.(1983) J. Neurochem. 40, 929-938.

図１、 Triton X-114 相分離したニワトリ胚網膜（10日目胚）膜分画でのリガンドブロット
D: Triton X-114 相 (detergent phase)
A: 水相 (aqueous phase)
矢印は、82kDa 蛋白質を示す。

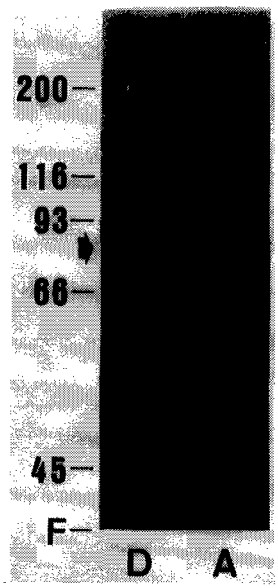
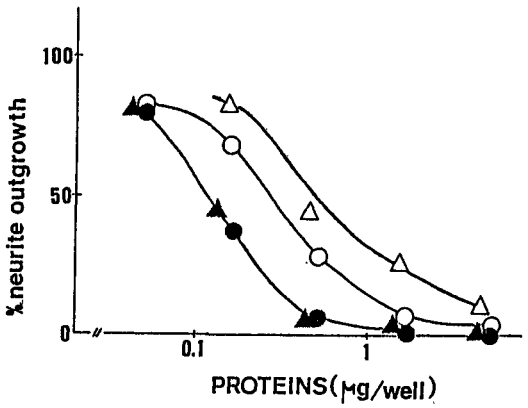



図２、各胚ニワトリ胚網膜膜分画（Triton X-114 相）を用いた突起伸展活性（NOF活性）の容量依存性阻害
● 8日目胚、 ▲ 11日目胚
○ 14日目胚、 △ 18日目胚



# 66 神経成長因子によるAキナーゼおよびCキナーゼ非依存性リボソームS6タンパク質リン酸化増加作用

橋本誠一・萩野顕彦*
（奥羽大学・歯・生化，生物*）

〔要約〕

PC12h細胞に神経成長因子（NGF）を作用させるとリボソームS6タンパクのリン酸化の一過性の増加が認められた。dBcAMPやホルボールエステルであるTPAを作用させても同様にS6タンパクのリン酸化が一過性に増加したが、その作用はNGFが最も強く、TPAによるリン酸化の増加は微弱であった。また、dBcAMPとTPAを同時に作用させるとNGFと同程度のリン酸化の増加が見られた。一方、dBcAMPおよびTPAで3日間処理した細胞は、未処理の細胞よりも僅かに高いS6タンパクのリン酸化レベルを示すが、さらにdBcAMPおよびTPAを作用させてもS6タンパクのリン酸化の増加は起こらなかった。しかし、NGFには応答して未処理の細胞の場合におけるのと同程度のS6タンパクのリン酸化の増加が見られた。従って、NGFによるS6タンパクのリン酸化の増加のメカニズムにAキナーゼやCキナーゼの関与はほとんど無いものと思われる。

私達は、PC12h細胞に神経成長因子（NGF）を作用させるとチロシン水酸化酵素および0.2％Triton X-100不溶性の35,000Dタンパクのリン酸化が増加すること、また、このNGFの作用はwheat germ agglutinin（5）やタンパク質リン酸化酵素阻害剤であるK-252a（3）およびstaurosporine（4）で細胞を予め処理することによって完全に阻害されることを報告した。ところで、分子量35,000タンパクのリン酸化の増加は、dBcAMPによっても惹起されるが、このdBcAMPの作用を阻害するにはNGFの作用を阻害するのに要するよりも高濃度のK-252aやstaurosporineを必要とすることから、これらタンパク質リン酸化酵素阻害剤によるNGFの作用の阻害は、cAMP依存性タンパク質リン酸化酵素（Aキナーゼ）を阻害することによるものとは思われない。この分子量35,000タンパクはリボソームS6タンパクであった。一方、NGFによるS6タンパクのリン酸化の増加のメカニズムに、AキナーゼあるいはCキナーゼが関与するという報告がある（1，2，6）。そこで、NGFによる分子量35,000タンパクのリン酸化の増加にAキナーゼあるいはCキナーゼが関与するか否か検討した。

〔実験方法〕PC12h細胞の培養、細胞レベルでのタンパク質リン酸化、SDS-PAGE、およびオートラジオグラフの作製は、既に報告した方法（3）に従って行った。

〔結果〕PC12h細胞にNGF（50 n*g*/*ml*）を作用させると、S6タンパクへの$^{32}P$の取り込み増加が見られる。この増加は作用15分後で既に明らかであり1時間後で最大となった後、徐々に減少し24時間後までに未処理の細胞のS6タンパクのリン酸化レベルと同じレベルにもどる〔Fig.1〕。このようなS6タンパクのリン酸化の一過性の増加は、細胞にdBcAMP（1mM）やTPA（500 n*g*/*ml*）を作用させても認められるが、dBcAMPおよびTPAによる増加は、作用48時間後においても僅かながら残存していた（data not shown）。また、これらの刺激に対して見られるリン酸化の増加作用はNGFで最も強く、次いでdBcAMPで強くTPAでは僅かな増加しかみられなかった。しかしながら、細胞にdBcAMPとTPAを同時に作用させるとNGFの場合と同程度のリン酸化の増加が見られた（Fig.2A and Fig.3）。

PC12h細胞をdBcAMP（0.3mM）およびTPA（500 n*g*/*ml*）で3日間処理したときのS6タンパクのリン酸化レベルは、未処理の細胞のそれよりも僅かに高いレベルを示した。この前処理した細胞にさらにdBcAMP（1mM；final 1.3mM）、TPA（500 n*g*/*ml*；final 1*μg*/*ml*）あるいはdBcAMPとTPAをともに作用させてもS6タンパクのリン酸化の増加は惹起されなかった（Fig.2B and Fig.3）。ところが、NGFに対しては未処理の細胞において見られたのと同程度のS6タンパクのリン酸化の増加が見られた（Fig.2 and Fig.3）。このようにdBcAMPおよびTPAの前処理によって細胞が再刺激に応答しない状態でもNGFに対する応答性にはほとんど影響がみられなかった。従ってNGFによるS6タンパクのリン酸化の増加のメカニズムにAキナーゼおよびCキナーゼはほとんど関与しないものと思われる。

〔考察〕Halegoua and Patrickは、PC12細胞に神経成長因子を作用させるとチロシン水酸化酵素やリボソームS6タンパク等いくつかの特異的なタンパク質のリン酸化が増加することを、またコレラトキシンやdBcAMPで細胞内cAMP濃度を上昇させてもNGFと同じタンパク質リン酸化の変動を惹起することを示し、NGFの作用はAキナーゼの活性化を介して発現されると結論した（2）。その後、Matsuda and Guroffは、NGFによってNGF感受

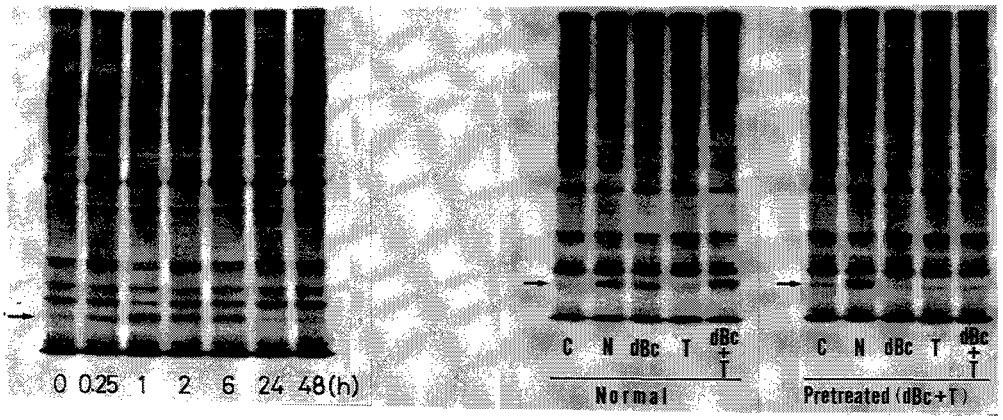



Figure 1. Time course of the effect of NGF on the phosphorylation of ribosomal protein S6 in intact-cell phosphorylation system

PC12h cells were labeled with $^{32}$P-orthophosphoric acid in DME supplemented with 7% FBS and 7% horse serum for the last 120 min of the culture period. 0.2% Triton X-100 detergent-insoluble fractions from the cells treated with NGF (50 ng/ml) for various time periods as indicated in the autoradiogram were subjected to SDS-PAGE (10%). The arrow indicates the position of ribosomal protein S6.

Figure 2. Effect of pretreatment of PC12h cells with dBcAMP plus TPA on the subsequent stimulation with NGF, dBcAMP, TPA, or dBcAMP plus TPA of S6 protein phosphorylation in intact-cell phosphorylation system

PC12h cells were pretreated or not with dBcAMP (0.3 mM) plus TPA (500 ng/ml) for 3 days. The cells were labeled with $^{32}$P-orthophosphoric acid (100 μCi/ml) for 120 min and stimulated with NGF (50 ng/ml), dBcAMP (1 mM), TPA (500 ng/ml), or dBcAMP (1 mM) plus TPA (500 ng/ml) for the last 60 min of the labeling period. A and B are autoradiograms from SDS-PAGE (10%) of 0.2% Triton X-100 detergent-insoluble fractions from respective normal PC12h cells and PC12h cells pretreated with dBcAMP plus TPA for 3 days. The arrow indicates the position of ribosomal S6 protein.

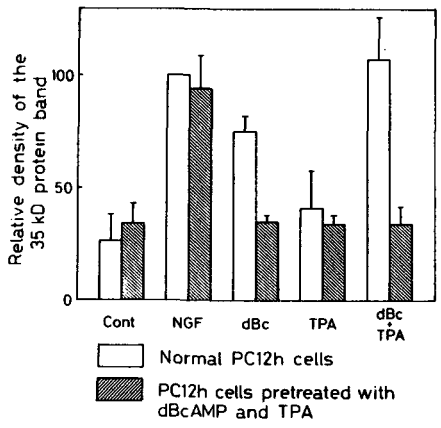



Figure 3. Selective inhibition by pretreatment of PC12h cells with dBcAMP plus TPA of the action of dBcAMP, TPA, and dBcAMP plus TPA, but not of the action of NGF on S6 protein phosphorylation. Relative densities of ribosomal S6 protein bands were measured by densitometry of autoradiograms, and were expressed as a percentage of the values from NGF-treated cells taken as 100%. The values represent averages ± SD of 4 determinations.

性S6キナーゼが一過性に活性化されることを、またこのS6キナーゼの活性化は、この酵素がAキナーゼによりリン酸化されることによって惹起されることを示唆した(6)。一方、Blenis and Eriksonは、NGFによるS6キナーゼの活性化には、少なくとも二つのコンポーネントが関与し、そのうちの一つにCキナーゼが含まれるとした(1)。しかしながら、今回の私達の研究によりNGFによるS6タンパクのリン酸化の増加作用にAキナーゼおよびCキナーゼは関与しないことが明らかとなった。

〔文献〕

1. Blenis,J., and Erikson,R.L. (1986) EMBO J. 5, 3441-3447
2. Halegoua,S., and Patrick,J. (1980) Cell 22, 571-581
3. Hashimoto,S. (1988) J.Cell Biol. 107, 1531-1539
4. Hashimoto,S. and Hagino,A. (1989) J.Neurochem. in press
5. Hashimoto,S., Ikeno,T., and Kuzuya,H. (1985) J.Neurochem. 45, 906-912
6. Matsuda,Y. and Guroff,G. (1987) J.Biol.Chem. 262, 2832-2844

# 67 PC12D細胞の神経突起伸張とMAPs燐酸化酵素

北島 哲子、佐野 護
（愛知県コロニー研、形態）

〔要約〕

PC12D細胞は、NGFだけでなくcAMPにも反応し素早く神経突起を伸張する。NGF又はcAMPと数分処理した細胞抽出液に精製した微小管蛋白を加え、in vitroで燐酸化を調べると、MAP2を燐酸化する活性が著しく上昇している。 cAMPで上昇する活性は,40 kdで A－キナーゼと見られ、NGFで活性化される酵素は50Kdで、その活性化には、約５分を要した。後者をNGF-依存性MAPsキナーゼと名付けた。 PC12Dを基に、NGF或いは cAMPの一方にのみ反応して突起が誘導される新たなミュータント細胞を採取し、MAPs燐酸化活性のcAMP,NGFに対する反応性を調べると、突起誘導能と一致した反応の低下が認められた。またNGFによる突起誘導を特異的に阻害するキナーゼ阻害剤 K-252aを細胞に処理すると、NGF依存性MAPsキナーゼの活性化を特異的に阻害した。 以上よりMAPsキナーゼ活性の上昇と神経突起の誘導との間に密接な相関が在ることが推察される。 酵素活性の安定性に対し、フォスファターゼ阻害剤の効果が認められた事は、NGFによるNGF依存性MAPsキナーゼの活性化が、別のキナーゼによる燐酸化によって惹起される可能性が示唆された。

通常のPC12細胞はNGF処理後５日程度で神経突起の伸張が観察される。これは、微小管蛋白などの合成に必要な時間である事が示唆されている。しかし神経突起の誘導そのものは新たな蛋白合成を必要としないことが、NGFで前処理したPC12細胞で示されている[1]。我々の樹立したPC12D細胞は NGFのみでなく、cAMP処理によっても、10数時間で長い突起の伸張が見られる[2]。この反応は燐酸化などによる既存の材料の再構成である可能性が推察される。そこで牛脳より精製した微小管蛋白を基質として、in vitroで、細胞抽出液中のキナーゼ活性を調べ、MAP2を燐酸化する活性がcAMPやNGF処理によって顕著に増加する事を認めた。その酵素活性と神経突起の伸張との関連性について検討した。

［方法］細胞抽出液 培養PC12D細胞をHEPES-Hank's 中で、37度、数分NGF又 は dbcAMP処理し、集めた細胞をHarvest buffer [50 mM HEPES buffer(pH 7,4),2 mM EGTA, 2 mM DTT, 0.2 mM $Na_3VO_4$, 20 mMβ-glycerophosphate, protease inhibitors]で、超音波処理後、12,000xg,1分の上清を-80度で保存した。
キナーゼアッセイ 細胞抽出液(20μg),熱処理微小管蛋白,10 mM $Mg^{2+}$,[$^{32}$P]ATP(100μM,1-4μCi)を75ulとし、30度、２分間反応を行い、SDS電気泳動後、オートラオ及び蛋白バンド(MAP2)の液シン測定を行なった。
変異細胞の採取 N-メチルニロソグアニヂン(16ug/ml)で20h処理後、生存した細胞をNGF又はdbcAMPで１週間培養、突起の無い細胞は剝がれ易いので分離し、再びNGF,dbcAMPを加え、２週間培養、突起の無いコロニーを採取し、それぞれ培養、NGF,dbcAMPによる突起誘導の片方のみ低下したクローンを分離した。

［結果、考察］ PC12D細胞をNGF,dbcAMP処理し、抽出液のMAP2燐酸化活性を調べると、dbcAMPでは１分後、NGFでは５分後顕著な活性の増加が認められた（図１）。 同時投与すると、相加的増加が見られた。 抽出

液をゲル濾過すると、cAMP依存性の活性は40 kdで、A-キナーゼと推定され、NGF依存性活性は50 kdで、別の酵素の存在が示された（図２）。後者は、ヒストン、カゼインを基質とせず、$Mn^{2+}$では活性が無く、$Ca^{2+}$を要求しない。既知のキナーゼとは異なることから、NGF-dependent MAPs kinaseと名付けることにした。

図１、MAP2を基質とする燐酸化活性の上昇の時間経過。PC12D細胞をNGF(○),dbcAMP(△),NGF+dbcAMP(□)を加え、HEPES-Hank's中で、インキュベートし時間をおって、細胞抽出液を採取し、MAP2を基質とする キナーゼ活性を調べた。

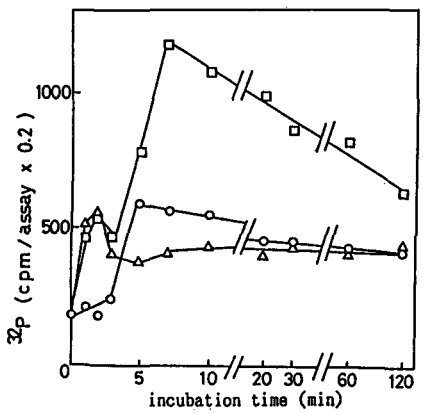
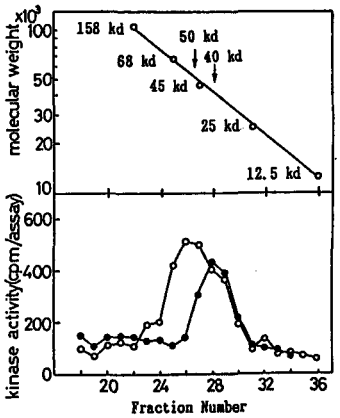



図２、MAP2を基質とする燐酸化活性のゲル濾過。NGF(○), dbcAMP(●)処理された細胞抽出液の超遠心上清(0.25 mg 蛋白)をUltrogel AcA 44カラム(0.7 x 50 cm)で分画し、MAP2を燐酸化する活性(30 μl/assay)を測定した。




NGF或いは、dbcAMPの片方にだけ反応して突起の出る変異細胞をそれぞれ得た。 これらの細胞は,NGFまたはdbcAMPによるMAP2を燐酸化する活性の増加の内、片方が突起形成能と一致して低下していることが示された（省略）。 キナーゼ阻害剤 K-252aを、PC12D細胞に処理すると、dbcAMPによる突起に影響無く、NGFによる突起伸張を特異的に阻害した。 この時、MAP2を燐酸化する活性が上昇しているか調べた結果、A-キナーゼは上昇しているのに対して、NGF依存性MAPsキナーゼの活性化は阻害されていた。これらの観察結果は、MAP2を燐酸化するキナーゼ活性の上昇が、神経突起の伸張に深く関わる可能性を示している。 ところで、K-252aは in vitroでは、活性化されたこれら２種のキナーゼを同程度阻害した。 何故、細胞に処理した時には、NGF依存性の活性上昇を特異的に阻害するのか疑問に思われる。① K-252a は疎水性の薬物であり、簡単に細胞内へ通過して、可溶性の酵素を阻害するとは考え難い。 ② NGFによるPC12細胞の活性化にも、EGFの場合の様に、チロシンキナーゼの介在が示唆されている [3]。③ NGF依存性MAPsキナーゼの活性化にも数分の lag がある。 などの理由を総合し、K-252aは膜に存在するキナーゼを阻害する、NGF依存性MAPsキナーゼは、この膜結合性キナーゼによる燐酸化により活性化されるとの仮説を設定した。この可能性を検討する意味から、NGF依存性MAPsキナーゼをフォスファターゼ阻害剤である β-glycerophosphate の在る、無しで、インキュベートした結果、β-glycerophosphateがなければ顕著に失活する事が観察され,上記の仮説の妥当性が示された。

[文献] (1) Greene et al., Devlop.Biol. 1982, 91,305. (2) Katoh-Semba et al., J. Neurosci. Res. 1987,17, 36. (3) Maher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1988, 85, 6788.

# 68 脳可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカンによるＰＣ１２Ｄ細胞の神経様突起形成抑制

大平敦彦，松井ふみ子，仙波りつ子*

（愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・発生学，*周生期学）

〔要約〕

ラット脳可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)を、 PC12D細胞の培養液に添加し、神経分化に対するCSPGs の効果を調べた。 PC12D細胞は、 NGFに感応し、神経様突起を伸展するが、 CSPGsは、この突起形成を濃度依存性に阻害した（完全阻害に必要な濃度は、 50 nmolウロン酸/ml)。脳の CSPGsには、コアタンパクの構造が異なる４種類以上の分子種が存在するが、低分子の CSPGsのほうが阻害活性が強い傾向を示した。ラット軟骨より精製したCSPGは、100 nmol/ml の濃度で添加しても、全く阻害効果は認められなかった。また、タンパクに結合していないコンドロイチン硫酸は、250 nmol/ml の濃度でも阻害しなかった。一方、脳の CSPGsのコアタンパク部分を添加したところ、完全な CSPGsに近い阻害効果が認められた。以上の結果より、脳の CSPGsのコアタンパク部分に、 NGFによって誘発される PC12D細胞の神経分化を抑制する作用があることが明らかとなった。

プロテオグリカンとは、硫酸化グリコサミノグリカンを多糖側鎖として結合しているタンパクの総称である。近年、神経組織に存在するプロテオグリカンの研究は著しく進展し、神経系の発生・分化・老化に重要な役割をはたしていることが明らかになりつつある（文献１の総説参照）。私達は、幼若ラットの脳には、リン酸緩衝塩溶液(PBS) で効率良く可溶化される、少なくとも、４種類の CSPGsが存在することを示した (2)。今回、脳可溶性 CSPGsの機能を調べる目的で、PC12細胞の培養液に添加し、 NGFにより誘発されるPC12細胞の神経様突起伸展に対する効果を調べた。

［実験方法］

CSPGsは、生後10日のラット脳を、タンパク分解酵素阻害剤を含む PBSにより可溶化し、イオン交換クロマトグラフィー，ゲルろ過，超遠心分離により精製した (2)。このCSPG標品は、分子量250K,220K,150K, および130Kのコアタンパクを持つ、すくなくとも４種類の CSPGsを含む。私達は、これらのすべての混合物 (Mixture)、250Kのコアタンパクを持つCSPG (CSPG-250と呼ぶ) のみを含む画分、および、CSPG-250とCSPG-220を全く含まない低分子CSPG混合物 (Low-mix)を調製し、添加実験に使用した。

予備実験において、通常のPC12細胞と、PC12細胞よりやや分化の進んでいる細胞株と考えられる PC12D細胞(3) を用いたが、 CSPGsの突起形成に対する効果は、全く同じであったので、本実験には、 PC12D細胞を使用した。 PC12D細胞の培養には、5%牛胎仔血清， 2 mM グルタミン，1 μg/mlインシュリン，100 U/mlペニシリンを含むダルベッコ変法培地(GIBCO No. 430-2100)を用いた。ポリリジンで処理した96穴培養皿に、各穴あたり、4.0 X $10^3$ 個の細胞を含む100 μl の培養液を注入した。24時間培養した後、7S-NGFと種々の濃度(0～100 nmolウロン酸/ml)の CSPGsを含む培養液に変え、さらに48時間培養した。培養終了後、細胞を2%グルタルアルデヒド-PBS溶液にて固定し、位相差顕微鏡下で神経様突起（細胞体の直径の２倍以上の長さの突起）を有する細胞の割合を測定した。

［結果と考察］

本培養条件下では、 CSPGsが存在しない場合には、 PC12D細胞の60～70% が NGFに感応して培養48時間以内に神経様突起を伸展した（図1a）。しかし、 NGF共存下で CSPGsの濃度を上昇させていくと、どのCSPG標品の場合も、神経様突起を有する細胞の割合が減少することがわかった。神経様突起を有する細胞の割合を半分に減らすのに必要な CSPGsの濃度は、CSPG-250では約 13 nmolウロン酸/ml，Mixtureと Low-mixでは約 5 nmol/mlであった（図２）。いずれの標品の場合も、50 nmol/mlの濃度になると、細胞は丸形となり、神経様突起伸展は完全に阻害された（図1b，Mixture の例）。 PC12D細

胞は、通常のPC12細胞に比べて偏平な形態をしている(3)が、CSPGs を添加すると、 NGF非存在下でも、丸い形に変わった。また、 PC12D細胞は、フォルスコリンのような細胞内cAMP濃度を上昇させる試薬にも感応し、神経様突起を伸展する (3)が、どのCSPG標品も、 NGFの場合と同程度の濃度で、このcAMP依存性の突起形成をも抑制した。

脳の CSPGsは、コンドロイチン4-硫酸単位を主体とする多糖側鎖を持つ (2)。上述の突起形成抑制能が、、多糖側鎖部分とコアタンパク部分のどちらに存在するのかを調べるために、まず、コンドロイチン4-硫酸を培養液に添加してみた。図1cにみられるように、250 nmolウロン酸/ml の濃度にしても、突起形成抑制効果は、全く認められなかった。次に、CSPGs をコンドロイチン硫酸分解酵素-ABCで処理し、コアタンパク部分を調製し、培養液に添加してみた。予想どおり、コアタンパクは、 PC12D細胞の神経様突起伸展を阻害した（図1d, Mixture の例）が、その阻害能は、完全なプロテオグリカン分子よりわずかに低い傾向を示した。

ラットの軟骨の主成分であるCSPG（PG-Hと呼ぶ）も、コンドロイチン4-硫酸を主な多糖側鎖として結合している (4)が、コアタンパクの構造は、脳の CSPGsと異なる。新生仔ラットの骨端軟骨から精製したPG-Hを、 100 nmol/mlの濃度でPC12D 細胞の培養液に添加しても、突起形成に対する抑制はみられなかった（図2）。

神経系のプロテオグリカンの役割として、細胞の接着や移動を調節していることを示唆する結果が報告されている (1)が、私達の結果から、プロテオグリカンには神経分化の制御という機能もあることが分かった。

［文献］


1． 大平敦彦：神経精神薬理，11(8):印刷中，1989.

2． Oohira, A. et al.: J. Biol. Chem., 263:10240-10246, 1988.

3． Katoh-Semba, R. et al.: J. Neurosci. Res., 17: 36-44, 1987.

4． Oohira, A. et al.: J. Biol. Chem., 255:1346-1350, 1980.

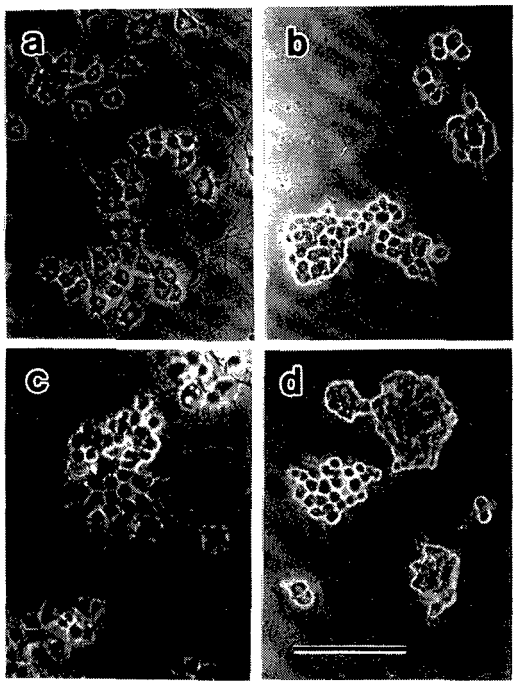




図１． PC12D細胞の突起形成に対する CSPGsの効果。 (a) 対照。 NGF存在下48時間培養。(b) Mixture （50 nmol ウロン酸／ml）。(c) コンドロイチン4-硫酸（250 nmol／ml）。(d) Mixture から調製したコアタンパク（ウロン酸濃度50 nmol/ml相当量）。——, 100 μm.

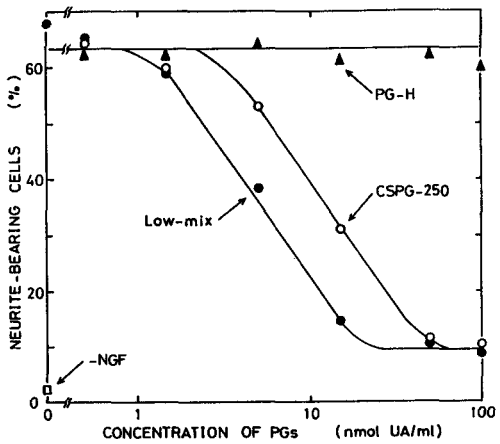



図２． NGFにより誘発される PC12D細胞の突起形成と CSPGsの添加濃度との関係。

# 69 ラット神経細胞における突起形成とガングリオシドとの関連

小木曽学，大田昌子，原田寧，平野修助
（東邦大・医・第二生理）

〔要約〕

ラット胎仔の大脳皮質細胞の初代培養での神経突起とその細胞膜に存在する糖脂質との関連について検討した。細胞骨格毒であるコルヒチンを添加することにより突起形成を阻害した場合に、糖脂質、特にガングリオシドの量的、質的な差異は認められなかった。この結果は培養初期には、突起形成による細胞膜表面積の増大とガングリオシドの合成とが直接に関連していないことを示唆する。また、突起形成は細胞濃度により形態的に変化を示すが、その場合においてもガングリオシドの差異は見られなかった。

神経細胞の神経突起およびシナプスの形成は分化過程初期における重要な事象であり、神経細胞の細胞膜に豊富に存在するガングリオシドが何らかの役割を果たしている（1）。ガングリオシドは細胞応答、認識、および相互作用に重要な機能を持つことが種々の細胞、組織において報告されており、脳組織ではシナプス膜、細胞膜に局在している（6）。我々は、シナプス形成以前に起こる突起形成および神経細胞間の相互作用にガングリオシドがどのような役割を持つかを明らかにするため、初代培養系を用いて培養初期におけるガングリオシドの変動について検討を試みた。

実験方法

神経細胞の初代培養：胎生 17 日目のラット胎仔の大脳半球を取り出し、メッシュにより神経細胞を解離した。得られた細胞は polylysine でコートしたプラスチックシャーレに播種し、 3% 牛胎仔血清を含む BME および無血清培地を用いて培養を行なった。コルヒチン（$10^{-7}$~$10^{-8}$M）を培養開始時および８時間後に培地に加え、２４時間後に細胞を集め分析を行なった。

ガングリオシドの抽出、定量、解析：培養細胞は PBS で洗浄後、クロロホルム／メタノール（2:1 と1:2）により総脂質を抽出し、 Ledeen らの方法（2）に従って DEAE-Sephadex カラムにより酸性と中性脂質画分に分画した。得られた酸性画分に対してチオバルビツール酸法（5）によるシアル酸の定量と HP-TLC によるガングリオシド分子種の解析を行なった。

結果および考察

ラットの胎生期神経細胞の培養系では、グリア細胞の増殖が短期間（２４時間）の培養ではほとんど観察されず、Fig. 1 に示す様にグリア細胞に多く存在するGM3 はほとんど検出されない。この様な神経細胞に富む条件下では、ガングリオシド含量は培養の経過とともに緩やかな上昇を２４時間後までに示すが、その分子種パターンにはほとんど変化が見られない（3）。また、成長円錐は突起の先端部に観察されるが円錐におけるガングリオシド分子種の違いおよび局在については検討を行なっていない。

$10^{-7}$M のコルヒチンを培養開始と同時に培地へ添加すると突起の形成阻害が引き起こされ、 neuroblastoma における形成阻害（4）と同様にチューブリンの重合阻害によるものと考えられる。対照およびコルヒチン添加群からの２４時間培養後のガングリオシド含量を Table に示すが、それぞれ総含量および蛋白質量当りに換算した値について有意な差異は見られなかった。また、DNA 含量も両群でほぼ同じレベルであることより細胞の増殖もほとんど起こっていないことが示唆された。 HP-TLC によるガングリオシドの分布パターンにおいても有意な差はなく、ジ、トリシアロガングリオシドから主に構成されていた（Fig. 1）。無血清培地を用いた実験でも同様の結果を得た。また、培養８時間後にはすでに細胞体の 1-2 倍の突起を形成しているが、コルヒチンの添加によりその突起は消失する。しかし、２４時間後までにガングリオシド含量は対照群レベルまで増加し、その組成も同様であった（Table, Fig. 1）。

これらの知見より、細胞の分化に伴う初期の形態変化に関係なくガングリオシドの合成、発現が進むことが示唆された。

次に高濃度で播種された細胞は短時間では多くのクラスターを形成する。そこで上述の細胞濃度 (5-6 x $10^5$ cells /$cm^2$) の 2, 1/2,1/4 倍にした場合の細胞間相互作用とガングリオシドの関連について検討した。しかし、 Fig. 2 に示す様にガングリオシド組成には大きな変化は見られなかった。

Yavin & Yavin (7) はガングリオシドの質的、量的変化がラットの胎生期の脳での in vivo と培養系での変遷がよく一致することを報告し、この時期ではシナプス形成ではなく突起形成と神経細胞間での相互作用によるものとした。しかし、我々が細胞骨格毒により初期の突起形成を培養系で抑えた結果、ガングリオシドに変化は見られなかったことから、何らかの他の要因が神経細胞のガングリオシド合成、発現を制御している可能性が示唆された。

文献

(1)Dreyfus,H., Louis,J.C. Harth,S. & Mandel,P.(1980) Neuroscience 5, 1647. (2)Ledeen,R.W., Haley,J.E. & Skrivanek,J.A.(1980) Analyt. Biochem. 112,135. (3)小木曽学、大田昌子、平野修助、野口鉄也 (1987) 神経化学、26, 406. (4)Seeds,N.W., Gilman,A.G., Amano,T. & Nirenberg,M.W. (1970) Pro.N.A.S. 66, 160. (5)Warren,L. (1959) J. Biol. Chem. 234, 1971. (6)Wiegandt,H. (1967) J.Neurochem. 14,671. (7)Yavin,Z. & Yavin,E. (1979) Dev. Neurosci. 2, 25.

Table Summary of gangliosides from colchicine-treated cells. The neuronal cells were cultured in the presence of 3% calf serum.

| | Ganglioside(nmoles) | Protein(mg) | Gang./Pro.(nmoles/mg) |
|---|---|---|---|
| Exp.1 | | | |
| control | 9.96 | 2.30 | 4.33 |
| $10^{-8}$M colchicine | 10.28 | 2.50 | 4.11 |
| $10^{-7}$M colchicine | 9.56 | 1.70 | 5.63 |
| control(8hr) | 8.22 | 2.40 | 3.43 |
| $10^{-7}$M colchicine(8-24hr) | 9.13 | 2.00 | 4.56 |
| Exp.2 | | | |
| control | 9.15 | 1.80 | 5.08 |
| $10^{-8}$M colchicine | 5.24 | 1.70 | 3.08 |
| $10^{-7}$M colchicine | 7.20 | 2.10 | 3.43 |
| control(8hr) | 5.52 | 1.65 | 3.35 |
| $10^{-7}$M colchicine(8-24hr) | 7.25 | 1.75 | 4.14 |

Fig.1

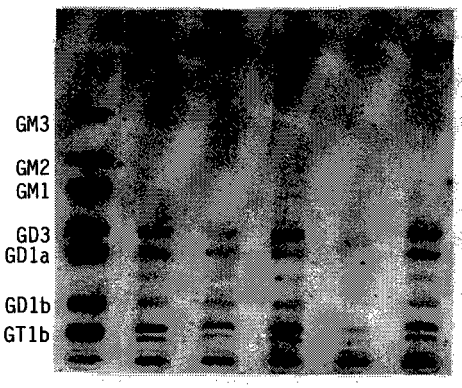



Fig.2

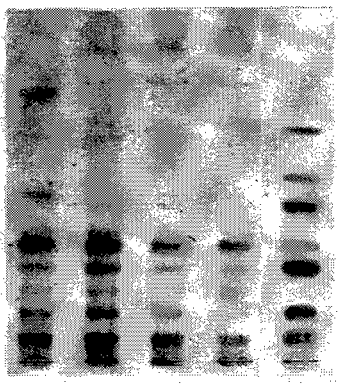



Fig.1 Effect of colchicine on ganglioside patterns in cultured neurons. TLC was performed in a solvent system of C/M/0.25% $CaCl_2$ (55:45:10,V/V).
Fig.2 Effect of cell density on ganglioside patterns.

# 70 細胞接着因子$L_1$のモノクローナル抗体による機能解析

阿相 皓晃、Schachner, M.*、植村 慶一
（慶応大・医・生理、 ハイデルベルグ大学・神経生物*）

〔要約〕

$L_1$分子の生物活性をモノクローナル抗体を用いた方法で検討した。$L_1$分子の糖鎖部位を認識するエピトープを持ったモノクローン抗体は神経細胞の接着とそれに伴う神経突起形成に大きな影響を及ぼすだけでなく、神経成長円錐の発達を阻害した。また、このモノクローン抗体は、成長円錐の糸状足部位に染色性が強く、$L_1$分子の糖鎖部位は細胞の突起形成や認識に関与しているものと考えられた。

［はじめに］

神経回路形成には細胞間の接着や認識に関与する分子が重要な役割を果たしていると考えられる。ニューロンの生長円錐や膜に存在し、ニューロン間の接着や認識に関与している細胞接着因子$L_1$は、最初マウス小脳からモノクローナル抗体を用いたアフィニティーカラムで単離精製された分子量200KDの糖蛋白で(1)、遺伝子解析によって免疫グロブリンスパーファミリーに属しフイブロネクチンと共通の配列をその中に含んでいる分子である(2)。$L_1$分子の機能についてこれまでにさまざまな生物活性が示されているが(3,4)、まだ解明されていない点も多い。神経細胞結合分子とその認識現象の相関や機能をさぐる上でモノクローナル抗体による研究が有用であることから、今回我々は$L_1$分子のさまざまなドメインを認識するモノクローナル抗体を作製し、$L_1$分子の機能について検討した。

［方法］

$L_1$のモノクローナル抗体は既報の方法(1)により作製し培養上清および腹水から硫安分画で精製したものをさらにImmuno Pure (G) IgG,Fab,purification kit (PIERCE社) を用いてIgG,Fab分画のものを使用した。$L_1$分子の酵素的手法による糖鎖の切出しには、β－ガラクトシダーゼ、β－N－アセチルヘキソサミニダーゼ、エンド－β－N－アセチルグルコサミニダーゼD，α－フコシダーゼ、α－マンノシダーゼ、グリコペプチダーゼFの各種の酵素を用いた。SDS-PAGE とWestern Blot による分析はこれまでの方法に従った(5)。$L_1$分子の機能アッセイには ①成長円錐の形態的変化を調べるために神経細胞のサンドイッチカルチャーを行った。 ②神経突起の伸長を測定するためにaggregation cell cultureからmicroexplant cultureの方法を導入して調べた。 ③抗体添加による神経細胞のaggregation testはこれまでの方法に従った(6)。

［結果］

これまでに得られた$L_1$のモノクローナル抗体はIgGでサブクラスはG2aであった。モノクローナル抗体の$L_1$分子に対する認識エピトープを調べるために、まずSDS-PAGEからWestern Blotを行った(図-1)。$L_1$分子をGlycohydrolase（例えば図-1ではGlycopeptidase Fを使用）で糖鎖を切断しておいてモノクローナル抗体(mAb555, mAb559,mAb601)で分析してみると、559、555、601いづれの場合も酵素処理した$L_1$には反応しないことがわかりこれらの抗体は$L_1$分子の糖鎖部位を認識していることを示唆した。そのうちのモノクローナル抗体(mAb 601)はβ－N－アセチルヘキソサミニダーゼ、エンド－β－グルコサミニダーゼD処理したものには反応しなくなることからオリゴ糖鎖部分のコア構造を持っている部位を認識している可能性が強く示唆された。

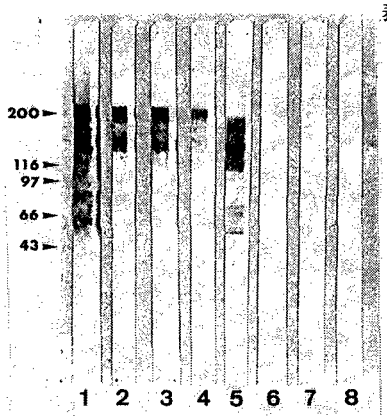
これらの糖鎖を認識部位としているモノクローナル抗体を、培養系に添加したときに神経成長円錐の発達を著しく抑制した（表-2）。抗N-CAM抗体を添加してその効果をみてもL$_1$の場合のような顕著な変化は認められなかった。さらにこのことを詳しく調べるために一度神経細胞のaggregation cultureを行い、これをexplant culture系に再培養するというculture系で糖鎖を認識しているこれらのモノクローナル抗体を添加すると神経細胞の突起伸長は著しく抑制された（図-2）。また神経細胞のaggregation testに対するL$_1$モノクローナル抗体の阻害効果を調べた結果をまとめたのが表-1であるが、必ずしも神経突起伸長阻害効果や、生長円錐の発達阻止に影響を及ぼす抗体が強いaggregation阻害を起こすとはかぎらなかった。

［考察］

L$_1$分子の糖鎖部位を認識ドメインにもつモノクロナル抗体は突起伸長や神経の成長円錐の発達に大きな影響を与えることでそれらの物質が神経細胞の認識や回路形成に直接かかわっていることが示唆された。今後糖鎖構造と生物活性の関係を追及する予定である。

［文献］

(1)Rathjen,F.G.& Schachner,M.(1984) EMBO.J. 3:1-10 (2) Moos,M.et.al, (1988) Nature 334: 701-703 (3)Schachner,M.et al.(1985) The cell contact(Edelman,GM.&Thiery,J.P.(ed) pp257-276 (4)阿相皓晃他 (1989) 実験医学 7(8):37-42 (5)Faissner,A.et al.(1984)EMBO,J. 3:733-737 (6)Thor,G. et. al. (1987) EMBO,J. 6:2581-2586




図－１：L$_1$のWestern blot(SDS-PAGEは4~20%gelを使用)
L$_1$分子をglycopeptidaseで処理前(1,2,3,4),処理後(5,6,7,8)
1,5はポリクローナル抗体、2,6はmAb555、3,7はmAb559,4,8はmAb601

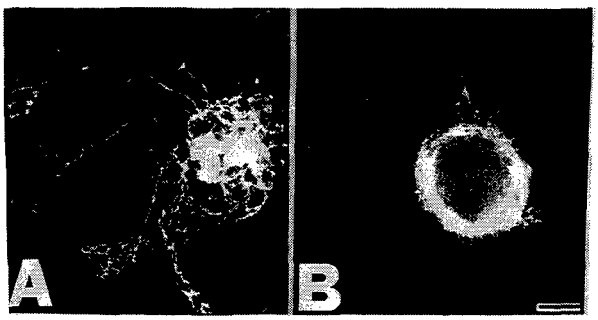
表－２：モノクローナルL$_1$抗体による神経成長円錐の形態変化
A：正常な成長円錐、B：異常な成長円錐、C：成長円錐の吸収型

| Antibodies / Type of GrowthCones | Control | monoL$_1$ (Mab601) | polyNCAM |
|---|---|---|---|
| A) lamellopodia with associated filopodia (%) | >90 | <5 | >85 |
| overall width(μm) | 8.3±2.2 | 3.4±1.8 | 8.4±2.1 |
| overall length(μm) | 21.4±3.7 | 7.2±2.1 | 19.7±4.5 |
| B) lamellopodia with associated club shaped (%) | <5 | >90 | <10 |
| overall width(μm) | 4.8±1.6 | 1.9±0.7 | 3.9±1.3 |
| overall length(μm) | 6.3±1.8 | 3.9±1.2 | 4.5±2.4 |
| C) looping neurites with blunt ended (%) | ND | >75 | ND |

表－１：モノクローナル抗体による細胞凝集阻害効果

| Monoclonal antibodies | % Inhibition of aggregation |
|---|---|
| L1 ( 324 ) | 8.9 ± 4.6 |
| L1 ( 555 ) | 19.5 ± 4.7 |
| L1 ( 557 ) | 22.1 ± 4.5 |
| L1 ( 559 ) | 12.7 ± 2.7 |
| L1 ( 600 ) | 55.6 ± 3.0 |
| L1 ( 601 ) | 39.7 ± 4.5 |
| MAG ( 513 ) | 5.5 ± 12.0 |
| L2 ( 412 ) | -3.1 ± 2.5 |
| NCAM ( H28 ) | 14.2 ± 8.9 |
| None immune-rat serum | 0 ± 0.6 |
| None | 0 ± 0.4 |

図－２：神経突起伸長に及ぼすモノクローナルL$_1$抗体
A：Control, B：実験群、倍率：×100



71 ラットグリア芽細胞アデニル酸シクラーゼに対するα-シアロシルコレステロールの抑制作用

伊藤仁一、野路久仁子、堂前純子、加藤泰治*、田中亮
（名市大・医・生化Ⅰ、分子医研・生体制御*）

〔要約〕

α-シアロシルコレステロール(α-SC)は濃度依存的にラットグリア芽細胞内cAMP含量を減少させた。1μMα-isoproterenolにより１７倍に上昇したグリア芽細胞内 cAMP含量は、1μM の propranololや timolol により完全に抑制されたが、1μM α-SCにより何ら影響を受けなかった。また α-isoproterenol(1μM)により誘導されたグリア芽細胞の形態変化を propranolol(1μM)や timolol(1μM)は抑制したが、α-SC(1μM)は抑制しなかった。これらの事実から、α-SC はα-isoproterenol のβ-レセプターへの結合を阻害しないことが示唆された。α-SCはコレラ毒素や forskolin によって促進されたグリア芽細胞の cAMP 産生を濃度依存的に抑制し、さらに GTPγS や forskolin によって促進された細胞膜のアデニル酸シクラーゼ活性を強く阻害した。しかしながら、細胞膜G-タンパク質の GTP結合能やGTPase 活性に対しては抑制作用を示さなかった。これらの結果から、α-SC はβ-レセプターやG-タンパク質ではなく、アデニル酸シクラーゼに直接作用してグリア芽細胞の cAMP 産生を抑制すると考えられる。また、10μM epinephrine によって 3.5 倍上昇したグリオーマＣ６細胞の 50 kDa タンパク質のリン酸化はα-SC により完全に抑制された。これらの事実から、α-SCは、βアゴニストによるグリア芽細胞内 cAMP の上昇を抑制することにより、A-kinase 活性をも抑制するものと考えられる。

我々は細胞膜脂質成分のモデルとして種々のコレステロール誘導体を用い、その生物活性、細胞膜への結合能などと構造との関係を調べてきた。合成シアロシルコレステロール（α,β-SC）は 15μM 以上の濃度で、濃度依存的にラットグリア芽細胞のＤＮＡ合成や細胞増殖を抑制する。また、グリア芽細胞のストレスファイバーの消失など細胞骨格の構造を変化させ形態変化を誘導する。グリア芽細胞による SC の取り込みはβ-SC に比べα-SC のほうが約２倍高く、その生物活性もα-SCの方が強い(1,2)。しかし、SCはアルブミンなど血漿タンパク質に結合することにより細胞による取り込みが抑制されると同時に、細胞膜に結合した SC の遊離が促進される(3)。その結果、SCの生物作用は血清やアルブミンにより著しく抑制される。また、SCはグリア芽細胞膜に作用し、細胞内 cAMP 含量を減少させることが認められた。そこで、今回はα-SC によるグリア芽細胞の cAMP 産生に対する抑制作用について検討したので報告する。

［実験方法］

1．ラットグリア芽細胞の培養：髄膜を除去した在胎１７日目のラット胎児大脳を0.1%トリプシンで処理した後、20%FCS含有F-10培地にて一次培養した。１週間後0.1%トリプシンにて細胞を採取し、10%NBS含有F-10培地にて１週間二次培養し実験に供した。

2．アデニル酸シクラーゼの測定：グリア芽細胞膜を 0.1mM IBMX 存在下で 1% Lubrol にて可溶化し、これにDTT(1 mM),$MgCl_2$(10 mM),K-ATP(0.3 mM)および各種濃度のα-SC を加えて、30° C で 30分incubateした。cAMPの定量には cAMP 定量キット（ヤマサ）を用いた。

3．グリア芽細胞の GTP 結合能と GTPase 活性の測定：グリア芽細胞膜に反応液（1mM GTP, [γ-$^{32}$P]GTP(1mCi/ml), 10mM adenosine 5'-[β, γ-imido]-triphosphateおよび各種濃度のα-SC)

を加え、0°C、10分あるいは30分間incubate した。反応後、これに活性炭を加え、遠心上清をカウントした。また、細胞膜に同様の反応液を加え、37°C、20分間 incubate し、ニトロセルロース膜にて濾過し、洗浄後フィルターをカウントした。

4．グリオーマC6細胞のリン酸化：C6細胞を epinephrine(10μM)およびα-SC(30μM)存在下あるいは非存在下で37°C、2時間 incubate し、超音波処理したC6細胞を[γ-$^{32}$P]ATP で25°C、10分間リン酸化した。

[結果および考察]

ラットグリア芽細胞を propranolol, timolol あるいはα-SC（それぞれ 1 μM）存在下、非存在下において 1 μM α-isoproterenolで2時間刺激した。α-isoproterenol 刺激により細胞内 cAMP レベルは17倍上昇し、グリア芽細胞の形態はアストロサイト様に分化誘導された。1 μM のpropranolol や timolol はこれらの細胞内反応を完全に抑制したが、1 μMα-SC はなんら影響を与えなかった（図1）。これらの事実からα-SC はβ-レセプターを介したアデニル酸シクラーゼの活性化を抑制するが、β-レセプターには直接作用しないことが示唆された。グリア芽細胞膜をGTPγS(1 μM)あるいは forskolin(1, 10 μM)と30°C、30分間反応させた後 cAMP を測定した。GTPγS, forskolin はともに細胞膜アデニル酸シクラーゼを強く促進したが、α-SC は濃度依存的にこれを抑制した（図2）。このことから、α-SC は forskolin による直接的およびG-タンパク質を介した間接的なアデニル酸シクラーゼの活性化をともに抑制することが示唆された。 グリア芽細胞のG-タンパク質に対するα-SC の作用を検討するために、グリア芽細胞膜G-タンパク質のGTP 結合能および GTPase 活性に対するα-SC の阻害作用を調べた。図3に示したように、α-SC は細胞膜の GTP 結合能および GTPase 活性に対して抑制作用を示さなかった。これらの事実から、α-SC はグリア芽細胞G-タンパク質には作用せず、アデニル酸シクラーゼに直接作用して細胞内cAMP レベルを低下させることが示唆された。また、epinephrine 刺激によって促進される50 kDa タンパク質のリン酸化が,α-SC によるcAMPレベルの低下とともに抑制された。

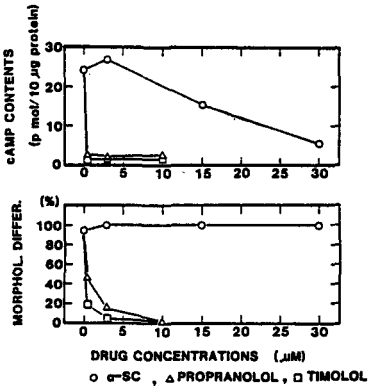



図1．α-isoproterenol で刺激されたグリア芽細胞の cAMP 産生と形態変化に対するα-SC の効果

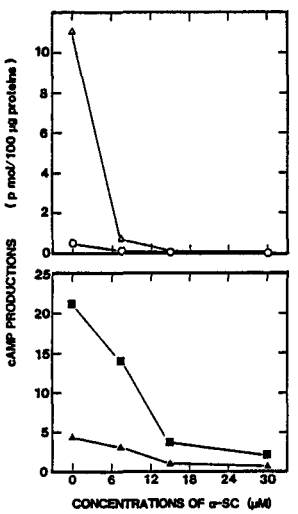



図2．グリア芽細胞膜アデニル酸シクラーゼに対するα-SC の効果

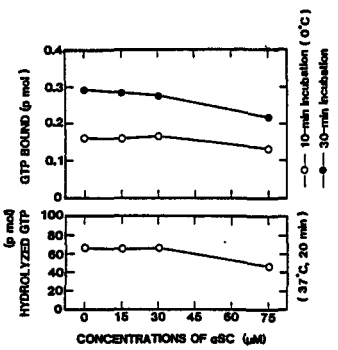



図3．グリア芽細胞膜の GTP 結合能と GTPase 活性に対するα-SC の効果

（文献）

(1). T. Kato, J. Ito, R. Tanaka, et al.: Brain Res.438,277-285,1988

(2). J. Ito, T. Kato, K. Okumura-Noji, et al.: Brain Res.481,335-343,1989

(3). 伊藤仁一、加藤泰治、阿部純子、田中亮：神経化学、26,292-294,1987

72. Niemann-Pick 病マウスモデルにおけるコレステロールエステル化の障害

所 敏治、 山本 敏晴、 宮脇茂樹*、 衛藤 義勝
（東京慈恵会医科大学・小児科，日本新薬山科植物研究所*）

〔要約〕

C57 BL/Ks J 系 spm/spm マウスは、 Niemann-Pick病（ＮＰＤ）動物モデルとして1982年崎山、北川らにより紹介された。本症の病因に関し崎山らはsphingomyelinase（ＳＭase）のアイソザイムの異常を報告しているが、依然不明な点が多い。今回我々は、ＮＰＤマウスモデルのコレステロール代謝を形態学的及び生化学的に検討し、コレステロールのエステル化障害を見い出したので報告する。

［目的］
ＮＰＤは、現在５つのサブタイプに分類されている。Type Ａ 及びＢは、ライソゾーム酵素の一つである ＳＭaseの遺伝的欠損により、sphingomyelin（ＳＭ）が各臓器に蓄積する疾患である。ＮＰＤ Type Ｃは、ＳＭが蓄積しているにもかかわらず、 ＳＭase 活性は正常であり、病因は不明であった。 しかしながらPenchev 3 により、コレステロールのエステル化障害がＮＰＤ Type Ｃ に見い出された(1)ことよりＮＰＤ Type Ｃ におけるコレステロール代謝障害がその病因論と関連づけ、にわかに注目されるようになった。
C57 BL/Ks J系 spm/spm マウスにおいても、ＳＭ が諸臓器に蓄積するが、ＳＭase 活性の著明な低下が認められず、そのコレステロール代謝に大変興味がもたれる。そこで我々は、ＮＰＤマウスモデルのコレステロールのエステル化を含めた、細胞内コレステロールホメオスターシスを検討することにより、本症の病因を解明したい。

［方法］
Ⅰ） フィリピン染色による組織化学分析； マウス皮膚線維芽細胞を lipoprotein deficient serum （ＬＰＤＳ）含有ＲＰＭＩ培養液で、４日間培養後、20％ウシ血清含有ＲＰＭＩで１日間培養し、0.1M sucrose含有10％phosphate buffer formarinにて固定。フィリピン染色液（2.5mg filipin /ml of Dimetyl formanide）にて 30分間固定後、ＵＶmicroscope 下にて観察。

Ⅱ） 遠赤外線分析； マウス肝組織を凍結乾燥後、ＫＢｒ と混合し FT/IR-7000（日本分光工業㈱）を用い、拡散反射測定法にて遠赤外線吸光分析を行った。

Ⅲ） 外因性コレステロールエステル化の検討； マウス皮膚線維芽細胞を、５日間ＬＰＤＳ培養液にて培養後、$^{3}$H-oleic acid（5μCi/dish）及びコレステロール（50μg/ml）を培養液中に負荷し、炭酸ガスインキュベーター内で37°Cにて培養。3，6，24時間後、細胞を収穫し Folch抽出後、下層をＴＬＣにて展開し、コレステロールエステル分画をシンチレーションカウンターにてカウントした。

［結果］

ＮＰＤ マウス肝組織の遠赤外線分析で、コレステロールのピークを認め、（Figure１）ガスクロマトグラフィー分析でも、正常コントロールの１０倍前後のコレステロールの蓄積を認めた。さらにフィリピンを用いた組織化学分析で、細胞内コレステロール蓄積部位がライソゾームに一致することを、光顕及び電顕所見より確認した。（Figure２）またこれらのコレステロールのライソゾーム内蓄積は、$^{3}$H-oleic acid のコレステロールエステルへの取り込み実験より、外来性コレステロールのエステル化障害によることが示唆された。（Figure３）

［考察］

C57 BL/Ks 系 spm/spm マウスはヒトＮＰＤ のモデルマウスとして興味が持たれ、その詳細な病態代謝・病因は依然不明である。組織内ＳＭ、コレステロールなどの中性脂質、の蓄積に関し、北川らは ＳＭaseのアイソザイムの異常がその一次的病因と報告している。[2]しかしながら蓄積されたコレステロールは ＳＭase の活性及びＳＭの代謝にも影響を与える為、さらに十分な検討が必要である。我々は、フィリピン染色にてライソゾーム内に、著名にコレステロールが蓄積しているのを示し、さらに $^{3}$H-oleic acid を用いたコレステロールエステル化の分析にて、そのエステル化が本症にて強く抑制されていることをＭＰＤモデルマウスにて見いだした。このことは、本症においても、ヒトＮＰＣと同様、コレステロールのエステル化を含めたコレステロール代謝異常が、本症病因と深く関与していることを示唆しており、今後細胞内のコレステロールホメオスタシスの詳細な検討が必要であると思われた。

［文献］

１．Peter G. Pentchev, Maralla C. Comby, Roscoe O. Brady. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82 (1985) 8247-8251.

２．M. Tsuda, M. Owada and T. Kitagawa. J. Inher. Metab. Dis. 8 (1985) 147-148.

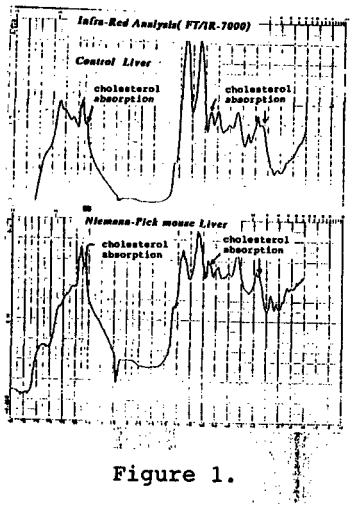
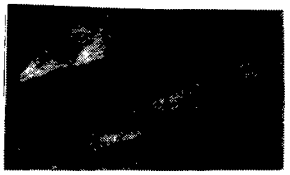



Figure 1.

FLUORESCENCE MICROSCOPIC OBSERVATION OF FIBROBLAST CELLS.

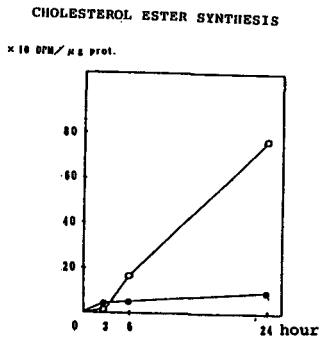


Normal mouse



NPD mouse

Figure 2.




FLUORESCENCE MICROSCOPIC OBSERVATION OF FIBROBLASTIC CELLS

Figure 3.

# 73 組織内遊離スフィンゴシンの代謝

小林卓郎，　後藤幾生
九州大学医学部脳研神経内科

〔要約〕 正常組織内に存在する遊離スフィンゴシンの代謝をマウス肝、脳及びヒト線維芽細胞を用いて検討を行った。マウス肝の細胞分画ではスフィンゴシンは膜分画に存在した。セラミドよりスフィンゴシンへの分解が遺伝的に欠損しているFarber 病の線維芽細胞でのスフィンゴシン濃度は正常のそれとほぼ同様であった。スフィンゴシンの合成阻害剤である L-cycloserine を培養液中に混入すると細胞内のスフィンゴシンは濃度依存性に低下していった。これらの事実より組織内遊離スフィンゴシンはスフィンゴ脂質よりの分解産物ではなく新たに合成されたと考えられる。次に、脳幹・脊髄より調整したミクロゾームを acyl CoA や UDP-glycoside と反応させるとミクロゾーム内のスフィンゴシンは減少し、その減少と等モルのセラミドやサイコシンが産生された。セラミドの合成はサイコシンのそれよりはるかに迅速であり、肝ではサイコシンの合成は見られなかった。以上の結果より組織内遊離スフィンゴシンの代謝は主にサイコシン合成ではなく、セラミドの合成であると考えられた。

スフィンゴシンはアミノ基を２位、水酸基を１、３位に持つ長鎖塩基で、スフィンゴ脂質の基本的構造物である。一般に組織内では遊離の形で存在しないと考えられてきた。最近我々はマウス組織内に微量の遊離スフィンゴシンが存在することを見いだした（１）。その後の検索で殆ど全ての組織に遊離スフィンゴシンが存在することが判明したが、それがスフィンゴ脂質よりの分解産物かスフィンゴ脂質合成経路にあるのか不明である。また、遊離スフィンゴシンの代謝も不明である。我々はマウス肝、脳及びヒト線維芽細胞を用いて組織内遊離スフィンゴシンの由来及びその代謝を検討したので報告する。

「方法」

すべてのマウスは C57/BL 系を用いた。細胞分画は肝を Percoll にて分画し、細胞内小器官のマーカー酵素を測定した（２）。遊離スフィンゴシン及びサイコシン（グルコシル及びガラクトシル）はＯ－フタルアルデヒドにて蛍光を付け、ＨＰＬＣで測定した（１、３）。前者は逆相カラム、後者は順相カラムを用いたが、感度は数 pmol まで検出可能であった。ミクロゾームは脳では 0.32M、肝では 0.25M sucrose にてホモジェネートし、14000 x g 上層、100000 x g pellet を用いた。ミクロゾーム内遊離スフィンゴシンよりセラミドの合成の検出はミクロゾーム（約 1 mg 蛋白）を 25 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM DTT 存在下で [$^{14}$C] palmitoyl CoA と反応させて行なった。。クロロホルムーメタノール（２：１）で反応を停止の後、Folch 分画下層を薄相クロマトグラフィーにスポットし、クロロホルムー酢酸（９：１）で展開の後オートラジオグラフィーを行った。セラミド分画内の放射活性はＴＬＣをはぎ取り、液体シンチレーションカウンターにて測定した。サイコシンの合成は脳幹・脊髄より調整したミクロゾームと 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM DTT, 5 mM $MgCl_2$ 存在下で UDP-galactose または UDP-glucose を反応させ、ＨＰＬＣにて検出した。

「結果及び考察」

マウス肝の細胞分画では、多くの遊離スフィンゴシンは膜分画に存在し、リソゾーム分画にも少量存在した（図１）。細胞質分画にも微量ながら見られた。酸性セラミダーゼの遺伝的欠損症である Farber 病の線維芽細胞内遊離スフィンゴシン濃度は正常細胞のそれとほぼ同様であった。スフィンゴシン合成の阻害剤である L-cycloserine を 0-6.5 mM 培養液に混じ細胞内遊離スフィンゴシンを測定すると、L-cycloserine の濃度に比例してスフィンゴシン濃度は減少した。以上の結果より組織内あるいは細胞内の遊離スフィンゴシンの多くはスフィンゴ脂質よりの分解産物ではなく新しく合成されたものと考えられる。

次に組織内遊離スフィンゴシンの代謝を検討するため palmitoyl CoA とマウス脳幹・脊髄あるいは肝より調整したミ

クロゾームを反応させると、外部よりスフィンゴシンを加えても加えなくてもセラミドの合成が見られた（図2）。この反応はミクロゾームを 100 ℃ 3分間加熱させると外部よりスフィンゴシンを加えないとセラミドは合成されなかった。これらの結果より内在性のスフィンゴシンと palmitoyl CoA によるセラミドの合成は酵素反応によると考えられた。palmitoyl CoA の量を 1-80 μM に変化させると合成されたセラミドも増加するが 30 μM 以上になるともはや増加しなかった（図3）。この時ミクロゾーム内の遊離スフィンゴシン濃度は低下し、ミクロゾーム内遊離スフィンゴシンと合成されたセラミドの合計は反応前のミクロゾーム内遊離スフィンゴシン濃度と一致した。セラミド合成の反応は oleoyl CoA を用いても見られた。これらの結果よりセラミドの合成は試験管内でスフィンゴシンが新しく合成されたのではなく、ミクロゾーム内の遊離スフィンゴシンがセラミドの合成に利用されたと考えられる。セラミド合成の反応は約5分以内に完成し、肝でも同様の反応が見られた。一方、サイコシンの合成は 5 mM という高濃度の UDP-glycoside が必要で反応速度は完成まで数時間を要した。この反応は脳幹・脊髄よりのミクロゾームにのみ見られ、肝では見られなかった。この臓器間の差は glycosyltransferase 活性の差によると考えられる（4）。以上の結果より組織内の遊離スフィンゴシンの代謝は glycosylation（サイコシン合成）より acylation（セラミドの合成）が主であると考えられる。

「文献」


1) Kobayashi,T., Mitsuo,K. and Goto,I.(1988)Eur.J.Biochem.172,747-752.

2) Kobayashi,T., Shinnoh,N., Goto,I., Kuroiwa,Y., Okawauchi,M, Sugihara,G and Tanaka,M.(1985) Biochim. Biophys.Acta 835,456-464.

3) Shinoda,H., Kobayashi,T, Katayama,M., Goto,I. and Nagara,H.(1987) J.Neurochem.49,92-99.

4) Mitsuo,K., Kobayashi,T., Shinnoh,N. and Goto,I.(1989) Neurochem.Res. in press.

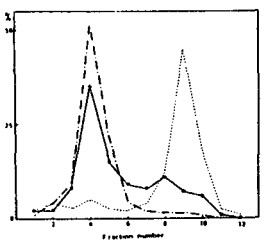



図1。マウス肝細胞分画と遊離スフィンゴシン局在

●—● Free sphingosine

—·— Galactosyltransferase

····· N-β-acetylglucosaminidase

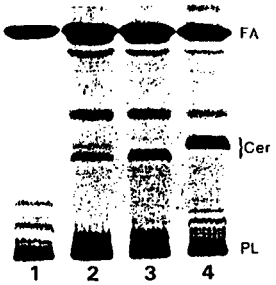



図2。脳幹・脊髄ミクロゾームのセラミド合成

1, heated microsomes; 2-4, microsomes stored on ice; 3, with exogenous sphingenine (18:1) 4, with exogenous sphinganine (18:0)

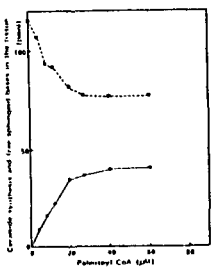


図3。脳幹・脊髄ミクロゾームでのセラミド合成と遊離スフィンゴシンの変化

●—● synthesized ceramide

●···● free sphingosine

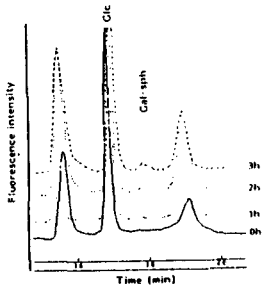



図4。脳幹・脊髄ミクロゾームのサイコシン合成

Glc-sph, glucosylsphingosine (internal standard); Gal-sph, synthesized galactosylsphingosine

# 74　スフィンゴ脂質活性化蛋白質及びその前駆体蛋白質のラット脳における存在

佐野 輝，日根野 尚，近藤啓次，水野龍男，上野修一，柿本泰男
（愛媛大学医学部神経精神医学教室）

〔要約〕
ウシ脾臓からスフィンゴ脂質活性化蛋白質-2 (SAP-2) を精製単離し、これを抗原としてモノスペシフィックな抗体を作成した。この抗体を用いたイムノブロット法で SAP-2 及びその前駆体蛋白質の存在をラット脳で確認した。ラット脳での細胞内局在を検討した結果、成熟型 SAP-2 はミエリン分画に、前駆体蛋白質はミトコンドリア分画に豊富に存在することが明らかとなった。これら蛋白質の脳の成長における変化をラットを用いて検索した。前駆体型は生后１０日目頃より徐々に増加した。量比としても成年ラットでは前駆体型がより濃く検出された。抗ヒト SAP-1 抗体を用いた場合にも全く同様の結果が観察された。

【はじめに】　糖脂質は細胞周期、増殖、分化、癌化に伴い劇的に変化することが知られている。この糖脂質の代謝にかかわる種々の水解酵素の活性制御には活性化蛋白質が関与していることが知られている。この活性化蛋白質の一種であるグルコセレブロシダーゼ活性化蛋白質 (SAP-2) は著者等が世界に先駆けて単離しそのアミノ酸配列を決定した酸性小糖蛋白質であり[1),2)]最近この蛋白質の前駆体蛋白質の存在が核酸レベルから報告されている[3),4)]。この前駆体は、SAP-1（スルファターゼ活性化蛋白質）、SAP-2を始め４種の活性化蛋白質をドメインとして持つ高分子蛋白質で、睾丸のセルトリ細胞から精細管に分泌される硫酸化糖蛋白質と同一蛋白質とも考えられ[5)]注目されている。すなわち、この糖蛋白質は精子形成の分化過程に働きかけるものとして重要視されており、分泌された細胞外腔から細胞膜表面の再修飾の制御機能を担っていることが想定されている。

【方法】　ウシ脾臓は屠殺場より新鮮な状態のものを入手し、使用まで -80℃ で保存した。SAP-2 の精製は、既報の方法に基づき[2)]熱処理、硫安塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル沪過の後、逆相 HPLC で行なった（レクチンカラムクロマトグラフィーは省略）。精製した SAP-2 はアミノ酸配列分析上も均一であった[6)]。このウシ SAP-2 を免疫原として家兎に抗血清を作成させた。この抗血清から IgG 分画を精製した後、ウシ SAP-2 アフィニティーカラムでモノスペシフィックにして使用した。モノスペシフィック抗ヒト SAP-1 抗体は、大阪大学医学部小児科・乾幸治博士より供与されたもの[7)]を使用した。イムノブロット法は、PVDF 膜にトランスファーした後、上記の一次抗体およびペルオキシダーゼラベルの抗ウサギ IgG 抗体を用いて行なった。ラット脳の細胞内分画は Gray and Whittaker の方法[8)]に従った。酸性フォスファターゼの活性は既報の方法[9)]で行なった。

【結果と考察】　ウシ脾臓から精製した SAP-2 はアミノ酸配列分析上均一であり、そのアミノ酸配列は報告されている他種のものと相同性が高いものであった[6)]。また他種の SAP-2 同様電気泳動上は複数のバンドを示し、糖鎖による微小不均一性を持つものと考えられた。これを抗原としたモノスペシフィックな抗体を作成し、イムノブロット法を確立した。SAP-2 及びその前駆体蛋白質の存在を各組織で検討した結果、これら蛋白質は調べられた全組織に分布していることが明らかとなり、その成熟度の度合いは組織によってかなり異なっていた。他の組織に比し、脳では前駆体型が多量に存在していた。ラット脳での細胞内局在を検討した結果、成熟型 SAP-2 はミエリン分画に、前駆体蛋白質はミトコンドリア分画に豊富に存在することが明らかとなった（Fig. 1）。また前駆体型に関しては可溶性分画にも検出されており細胞外腔に分泌されている可能性も考えられる。これら蛋白質の脳の成長における変化をラットを用いて検索した。前駆体型は生后１０日目頃より徐々に増加した。量比としては、成年ラットで前駆体型がより濃く検出された（Fig. 2）。ラット脳の成長において、生后１０日目頃からの時期はシナプス形成や髄鞘化の時期にあたり、神経組織の形態・機能の分化の時期と言われる。ちょうどこの時期に一致して前駆体型が増加する現象は、精巣における硫酸化糖蛋白質の様に分化誘導の可能性も考えられ非常に興味深い。

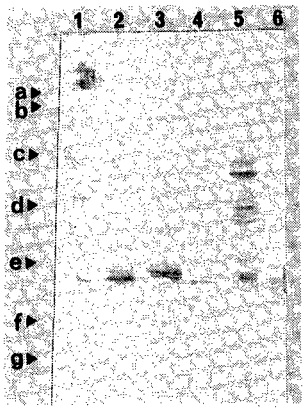



**Figure 1. Subcellular Distribution of SAP-2 and Its Precursor Forms.** Each 50 μg protein of subcellular fractions were applied to SDS-PAGE (15% gel), then immunoblotted as described in the text. Lane 1, cytosol; 2, microsome; 3, myelin; 4, synaptosome; 5, mitochondria; 6, nuclei.The arrow heads on the left side are positions of molecular weight standards. These include a, phosphorylase b (94K), b, BSA (67K), c, OVA (43K), d, carbonic anhydrase (30K), e, trypsin inhibitor (20K), f, lactalbumin (14K), and g, aprotinin (6.5K).

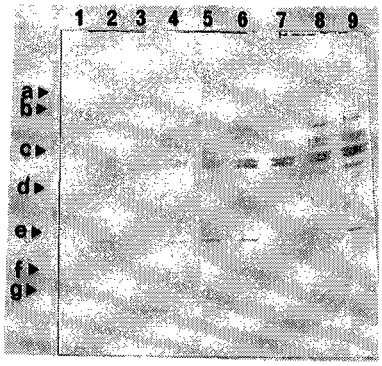



**Figure 2. Developmental Changes of SAP-2 and Its Precursor Forms in Rat Brain.** Rat brains were homogenized in 10 mM Na-phosphate (pH 7.0) and centrifuged at 10,000 g for 10 min. Each 15 μg protein of the resultant supernatant was used for SDS-PAGE (15% gel). Immunoblotting was performed as described in the text. Lane 1, control (purified bovine SAP-2); 2, 0 day; 3, 5 day; 4, 10 day; 5, 15 day; 6, 20 day; 7, 25 day; 8, 30 day; 50 day. Molecular weight standards are labeled as in Fig. 1.

**【参考文献】**

1) Sano A., Radin N. S., Johnson L. L., and Tarr G. E. (1988) J. Biol. Chem. **263**, 19597-19601

2) Sano A. and Radin N. S. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. **154**, 1197-1203

3) O'Brien J. S. , Kretz K. A., Dewji N., Wenger D. A., Esch F., and Fluharty A. L. (1988) Science **241**, 1098-1101

4) Nakano T., Sandhoff K., Stumper J., Christomanou H., and Suzuki K. (1989) J. Biochem *(Tokyo)* **105**, 152-154

5) Collard M. W., Sylvester, S. R., Tsuruta J. K., and Griswold M. D. (1988) Biochemistry **27**, 4557-4564

6) Sano A. et al. unpublished work

7) Inui K. and Wenger D. A. (1984) Arch. Biochem. Biophys. **233**, 556-564

8) Gray E. G. and Whittaker V. P. (1962) J. Anat. **96**, 79-88

9) Sano A. and Radin N. S. (1988) Biochem. J. **254**, 297-300

75

# 異染性白質変性症のLYSOSULFATIDEの蓄積

戸田健一，　小林卓郎，　後藤幾生

九州大学医学部脳研神経内科

〔要約〕

近年幾つかのsphingolipidosisでlyso型のsphingolipidの蓄積が報告されている。今回異染性白質変性症（metachromatic leukodystrophy,MLD)においてlysosulfatideの蓄積について検討した。MLD２例、対照３例の剖検組織（脳、肝、腎）から総脂質を抽出し0.1N-KOHでケン化後C18 Sep-pakカラムにかけメタノール／水(8:2)でlysosulfatideを溶出した。sphingosineを内部標準としてo-phthalaldehydeで蛍光標識しHPLCで定量した。MLD例では対照に比べ明らかにlysosulfatideの蓄積増加が認められた。その蓄積分布はsomatic organに比べ神経系、特に脳白質に高く、Krabbe病におけるpsychosineの蓄積と同様にlysosulfatideの蓄積がMLDの脱髄の要因となっている可能性が考えられた。

［目的］MLDはlysosome水解酵素のarylsulfataseAが遺伝的に欠損し、神経系ではミエリン形成細胞にsulfatideが蓄積し脱髄がおこると考えられている。しかし、sulfatideは正常ミエリンの重要な構成成分であり、またいく例かのMLDでは、sulfatideの蓄積と脱髄所見が必ずしも一致しないこともあり、MLDの脱髄機序に関しては、未だ不明である。Krabbe病では、cerebrosideのlyso型であるpsychosineが蓄積し脱髄が引き起こされることが明らかとなっており、MLDにおいても同様にlysosulfatideの蓄積が脱髄の要因となっている可能性があり、MLD剖検組織におけるlysosulfatideの蓄積について検討した。

［方法］対象はMLD２例(late-infantile form, juvenile form)、対照３例。各剖検組織をクロロホルム／メタノール(2:1)でhomogenizeし、総脂質を抽出した。この時、一部を取りLowry法で蛋白質量を測定した。抽出した総脂質を、0.1N-KOH/メタノールで２時間ケン化後、C-18 Sep-pakカラムにかけメタノール／水(8:2)でlysosulfatideを溶出した。内部標準としてsphingosineを加えo-phthalaldehydeで蛍光標識し、逆相HPLCでlysosulfatideの定量をおこなった。この実験系では、lysosulfatideの回収率は94%と良好で、HPLCによるlysosulfatideの定量は、10pmolまで測定可能であった。　更に、この系により、MLD脳白質より溶出したsampleを加水分解と胎盤より精製したarylsulfatase Aでincubationした後、o-phtalaldehydeで標識し、逆相ＨＰＬＣで定量をおこなった。また、MLD及び対照脳白質より溶出したsampleを順相HPLCにかけ、lysosulfatide分画を取り出した後、薄層クロマトグラフィーにapplyし、ニンヒドリンにて呈色反応をおこなった。

［結果］１．Standard lysosphingolipidsのHPLCによる分離は良好であった。（Fig.1A）　２．対照例に比べMLD脳白質では、明かにlysosulfatideのpeakが認められた。（Fig.2）　３．MLD脳白質から溶出したlysosulfatide分画を加水分解すると、psychosine,sphingenine,sphinganine,ができていることが確かめられた。(Fig.1B)　４．図には示さなかったが、同分画をarylsulfataseAとincubateすると、psychosineができていることがHPLCで確かめられた。５．薄層クロマトグラフィーでも、対照例と比べMLD脳白質では、lysosulfatideの蓄積が認められた。６.（Table1)にMLD及び対照例各組織の単位蛋白質量当たりのlysosulfatideの量を示した。MLD例では、脳白質、脊髄、末梢神経、に多く脳灰白質、腎臓、肝臓、は少量であった。対照例では、脳灰白質、腎臓、肝臓、には蓄積はなく、脳白質は少量であった。

［考察］最近幾つかのsphingolipidosisでlyso型のsphingolipidの蓄積が報告されている。Krabbe病でのpsychosine(1)、Gaucher病でのglucosylsphingosine(2)、GM2gangliosidosisでのlyso-GM2(3)で、今回MLDでlysosulfatideの蓄

積を報告した。GM2gangliosidosisとGaucher病では、lysoshingolipid の蓄積と病因との関係は明らかにされていないが、Krabbe病では、psychosineの蓄積が、中枢及び末梢神経の脱髄を引き起こしていることが明かとなっている(1, 4)。MLDでのlysosulfatideの蓄積分布は、Krabbeb病と同様に、somatic organに比べ神経系に多く、神経系では、灰白質に比べ白質に多量の蓄積が認められた。また、psychosineの細胞毒性と同様に、lysosulfatideがprotein kinase C活性を抑制することが報告されている(5)。これらのことからKrabbe病と同様に、MLDにおいlysosulfatideの蓄積が、脱髄の要因となっている可能性が考えられた。

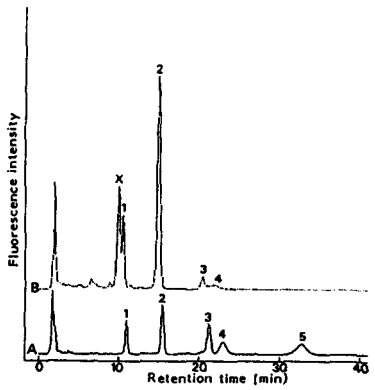



Fig. 1. HPLC chromatograms of the compounds derivatized with o-phthalaldehyde. A, Standard lysosphingolipids. 1, galactosylsphingenine; 2, sphingenine; 3, sphinganine; 4, sulfogalactosylsphingenine; 5, sulfogalactosylsphinganine. B, Hydrolysate of the lysosulfatide-containing fraction from MLD white matter. Galactosylsphingenine, sphingenine, sphinganine and sulfogalactosylsphingenine are seen. X, unidentified.

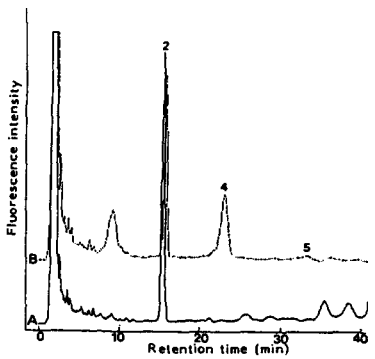



Fig. 2. HPLC chromatograms. A, Cerebral white matter from control subject. B, Cerebral white matter from MLD patient. 2, sphingenine (333 pmol, internal standard).

Table 1.
LYSOSULFATIDE CONCENTRATION

| Tissues | MLD | | Control(n=3) |
|---|---|---|---|
| | Late-infantile | Juvenile | |
| Brain white matter | 618 | 400 | trace |
| gray matter | 23 | 16 | 0 |
| Spinal cord | 405 | - | - |
| Sciatic nerve | 116 | - | - |
| Kidney | 21 | 11 | 0 |
| Liver | 3 | - | 0 |

(pmol/mg protein)

[文献]
1. Kobayashi, T., Goto, I., Yamanaka, T., Suzuki, Y., Nakano, T. and Suzuki, K. (1988) Ann. Neurol. 24, 517-522.
2. Nilsson, O., and Svennerholm, L. (1982) J. Neurochem. 39, 709-718.
3. Rosengren, B., Mansson, J.-E., and Svennerholm, L. (1987) J. Neurochem. 49, 834-840.
4. Shinoda, H., Kobayashi, T., Katayama, M., Goto, I., and Nagara, H. (1987) J. Neurochem. 49, 92-99.
5. Hannun, Y. A., and Bell, R. M. (1987) Science 235, 670-673.

# 76 光存在下、錫プロトポルフィリンによる生体障害と脳の膜分画における過酸化脂質形成

慶野宏臣[1]、三村俊二[2]、長江秀利[3]、柏俣重夫[1]

([1]愛知県コロニー・発達障害研・周生、[2]名大・医・小児、[3]トヨタ記念病院・小児)

〔要約〕錫プロトポルフィリンを皮下投与されたラットは光照射されると突発的で激しい行動を引き起こし、脳障害の様相を示した。In vitro実験においては、光の存在によってSnPPは脳の膜脂質の過酸化を起こすことが示された。

Key work: tin-protoporphyrin, porphyrin, photoirradiation, malonaldehyde

錫プロトポルフィリン（SnPP）はビリルビン合成を効果的に阻害し[1,2]、高ビリルビン血症Gunnラットの小脳低形成を幾分防止した[5]。しかし、SnPP投与されたラットに光照射すると強い神経症状を示して、高率にラットが死亡した[4]。本研究では光存在下においてSnPPが引き起こす生体障害機構を検討した。

**材料と方法**　生後6から8日のSprague-Dawley系ラットを使用した。光照射は極大波長460nmである青白色蛍光管（FL20BW）または極大波長525nmである緑色蛍光管（FL20SG）を利用した。光は総量6から200 kerg/secの範囲を用いた。ラットが5分の間に突如激しい行動をする回数を運動の指標とした。脳障害の遅発効果については、生後6日のラットに20μmol/kg体重のSnPPを投与した後、4時間および24時間後に68 kerg/secの青白色光を3時間づつ照射し、生後20日に外形観察、組織観察を行った。脳の膜分画は10 mM燐酸緩衝液（pH 7.4、10° C）中にてSnPPおよび光と反応させ、過酸化脂質形成量はTBA法で測定したmalonaldehyde量で示した。

**結果**　SnPP投与されたラットは光照射されると直ちに突発的な行動（SFM）を示すようになる。SFM頻度は光照射後急速に増加し、20分で最高値を示した後低下した（図1）。SFM頻度は投与するSnPP量に比例したが、ラットの示す運動パターンなどはSnPP量のいかんにかかわらず同じであった。SnPPを投与した後薄暗くした室内に置いたラットはSFMを示さず、体重1g当り生理食塩水を1μl投与した後光照射したラットでは極くまれにSFMを示した。20および5μmol/kgのSnPPを投与され200 kerg/secの光照射を受けたラットは2時間内に総て死亡した。生後6日にSnPP投与と光照射を受け、生後20日まで生存したラットの（生存率50%、n=18）皮膚は痂皮で被われ、尾の屈曲、角膜の白濁、行動の異常が見られた。小脳湿重量は169.2 ± 13.8 mg と対照群に比べ有意に低かった。小脳虫部を組織観察すると、外顆粒層が対照に比べて厚いなど発達遅延のあることが示された。また、内顆粒細胞が各所で脱落し、小型の核を持った細胞に置き変わっていた（図2）。脳の膜分画を暗黒下25° Cに置くと時間と共に過酸化脂質形成を示すMDA値が急速に上昇するが、10° Cではほとんど上昇しないので、以下の実験はすべ

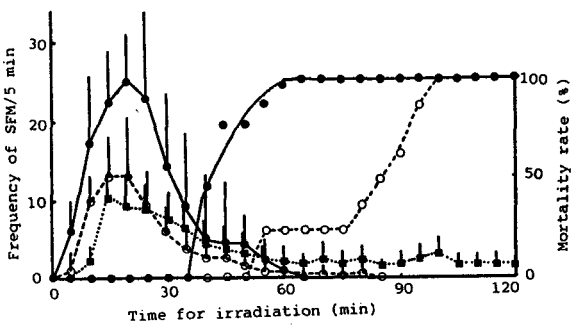



FIG 1 Effects of tin-protoporphyrin plus photoirradiation on the behavior and mortality rate of neonatal rats. ● 20μmol SnPP/kg b.w., ○ 5μmol SnPP/kg b.w. ■ 2.5μmol SnPP/kg b.w. symbols with bar (SD) indicate the frequency of the sudden, furious movements (SFM). Closed and open circles without bar denote the mortality rates of rats injected with 20 and 5 μmol SnPP/kg b.w., respectively.

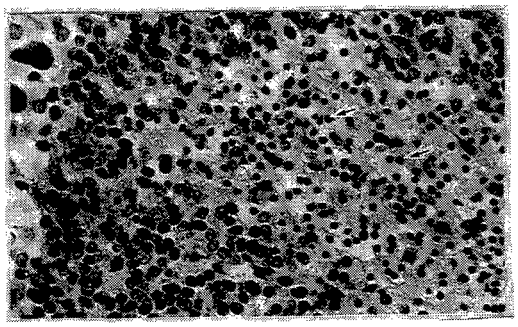


Fig 2 Cerebellar lesion of a young rat treated with SnPP plus photoirradiation at postnatal day 6. In some areas granule cells are lost and replaced by small cells (arrow)

て10° Cで行った。0から20μMのSnPPを加えて膜分画を60分間反応させても暗黒下であればMDA値の上昇は認められなかった。60kerg/secの光照射するとSnPP量に比例してMDA値が上昇し、両逆数プロットによって（図３）最大反応量の1/2を与えるSnPP濃度は6.3μMであることが示された。2価および4価の無機錫（$SnCl_2$、$SnCl_4$）はMDA値を上昇させなかった。金属を持たないprotoporphyrinは光の存在によりMDA値を上昇させたがSnPPに比較して効果は弱く、最大反応量の1/2を与える濃度は15μMであった。光量を5から25kerg/secまで変化させて反応させ、20もしくは50μMのSnPP存在下で出現するMDA値の変化をみた（図４）。MDA値は光エネルギー量に比例してほぼ直線的に増加した。緑色光においても光エネルギー量に比例してMDA値は上昇したが、同一エネルギー量で比較すると緑色光は青白色光の1/2の値であった。

考察　SnPPは強力なヘムオキシゲナーゼ活性阻害剤であって血中ビリルビンを効果的に減少させ[1,2]ヒト新生児黄疸の予防的処置の可能性が示されている[3]。しかし、一方副作用の存在がGunnラットを使った実験から示唆されている[4-6]。SnPP投与と光照射を同時に行うとラットは突然急激な動きを起こし、その発現頻度は投

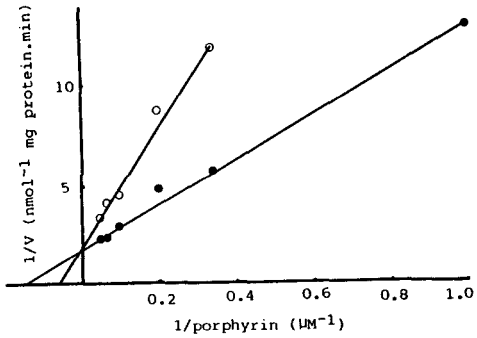



Fig. 3. Double reciplocal plots of the malonaldehyde formation in the rat brain versus SnPP (●) and protoporphyrin (○).

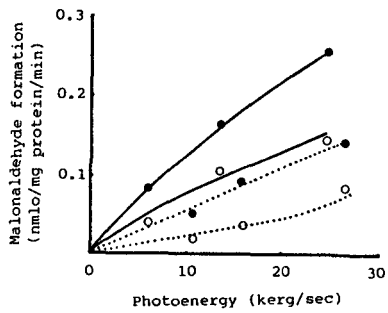



Fig. 4. Effect of photo-energy on the malonaldehyde formation in the brain of rats irradiated with blue-white (—) or green (·····) light in the presence of SnPP (●, 50μM; ○, 20μM).

与するSnPP量に比例して増加した（図１）。光照射15分から25分までのSFM頻度の逆数を縦軸に、SnPP濃度の逆数を横軸にしてプロットすると最大反応の1/2を与えるSnPP濃度は5μMであることが示された。この値はin vitroで脳の膜分画を使ってMDA合成を見た場合の最大反応量の1/2を起こすSnPP濃度6.3 μMにほぼ一致し、血球を使った場合の1.3μM[4]とはやや異なった値となった。また、同時処理後生後20日まで生育させたラットの小脳に異常が認められたことからも、SnPP投与され光照射を受けたラットでは脳が障害されていると考えられた。SnPPは光エネルギーを吸収して励起状態となることが知られている[5]。本実験においても、脳の膜分画において、SnPP量、光エネルギー量、そして波長依存的に過酸化脂質形成が進んでいることが示された。protoporphyrinも脳膜分画のMDA値を上昇させたがその効果は低く（図３）、Co-mesoporphyrin や hemeは肝臓膜分画でMDA値を上昇させない（長江他89年度新生児学会発表）。これらの薬物をラット皮下に投与し光照射するとin vitroでのMDA値上昇効果に一致した致死効果を現した[4]。In vitroでMDA値をやや上昇させるprotoporphyrinはSFMを起こさせるもののSnPPに比べて効果は低かった。これらの事から、SnPPは光の存在によって生体内においても励起状態となり酸素フリーラジカル反応を進め、直接または間接的に脳を障害し、異常行動を起こしたり発達障害を起こすと考えられた。

1) Drummond & Kappas (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6466-6470. 2) Drummond & Kappas (1982) Science 217, 1250-1252. 3) Kappas et al. (1988) Pediatrics 81, 485-497. 4) Keino et al. Europ. J. Pediatr. (in press). 5) Land et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 5249-5253. 6)Nagae et al. (1988) Pediatr. Res. 24, 209-212.

# 77 ドーパミン系伝達路におけるカルモジュリンの関与
## ――――脳シナプス膜とＣａＭとの相互作用の検討

夏苅直已、花井洋行*、藤田道也**
浜松医大・精神、第二生化**、岡崎生理研・能動 輸送*

〔要約〕

EGTAで洗浄したラット脳シナプス膜とカルモジュリン(CaM) との相互作用を検討した。$^{3}$ H-CaM と膜との結合実験を行い、親和性の異なる二つの結合部位と二相性のCa濃度依存性を見いだした。$^{125}$ I-CaM の gel overlayから CaM結合部位は235/240、135、58、49、32 kDa他で、脳部位と種差で heterogeneityを示した。可溶化した膜から CaM affinity columnで数種の CaM結合蛋白質を得た。膜結合性CaM を Western blot 法で評価すると、3 μg/mg protein以下で、全CaM 量のほぼ1/4 に相当した。このシナプス膜には、CaM 依存性 adenylate cyclase活性、phosphodiesterase(PDE)活性、リン酸化／脱リン酸化活性が存在した。CaM 依存性AC活性のCa濃度依存性は pCa 6.2(pH 7.5)で最大を示し、CaMとdopamineを同時に加えると、それぞれの活性を単純和した場合より有意な増加を認めた。forskolin と CaMにも同様のsynergistic な作用があった。膜結合性 PDEもCa感受性を示したが、外因性 CaMの効果をほとんど認めなかった。

神経シナプス膜を介した一連の情報伝達経路において、CaMとその作用部位の生理的意義が次第に明らかになりつつある。信号増幅系である adenylate cyclase(AC)、CaM kinase II、信号消去系の PDE、calcineurin などの CaMの標的の他に G蛋白質への直接作用、細胞骨格系への作用も考慮されねばならない。我々は、EGTAで洗浄した脳シナプス膜がこれらの機能を intact に保った系であることを示し、次いで、CaM と膜との相互作用のひとつとして dopamine (DA)系の AC 活性を検討した。DAを介するAC活性には CaMの関与があること、さらに、DAとCaM による作用は相乗的であることをAC活性のCa感受性から明らかにした。膜の PDE活性についても検討を加えた。

〔方法〕

ラット脳シナプス膜（大脳、線条体、小脳）は、EGTAで二回洗浄し低張 shockを加えて調製した(6)。 最終標品を sol A(60mM Tris-HCl,pH 7.5, 5.0mM $MgSO_4$ ,0.5mM DTT),50μg/ml PMSF に懸濁した。ブタ大脳から精製した CaMをacetyl化し$^{3}$ H-CaM を調製、filtration法(10)により膜との結合実験を行った。$^{125}$ I-CaM で gel overlay(2) を行いCaM 結合部位を同定した。ラット大脳シナプス膜を detergent (0.5% CHAPS,MEGA-8 etc)と 4℃、1h incubate 後、27,000×g で遠心した上清をCaM affinity column に乗せ、 EGTA で溶出して CaM結合蛋白質を得た。DNFB化した CaMをウサギに免疫して CaM抗体を得(11)、nitrocellulose 膜上でシナプス膜の Western blot を行なった。既知濃度のCaM も同時にblotし、HRP染色後に試料中の CaM量をlaser densitometerで半定量的に評価した。シナプス膜の Na/K ATPase活性をsol A(ただしimidazole-HCl),140mM NaCl,14mM KCl,3mM ATP,0.5mM EDTA の条件で測定した。AC活性はsol A,1.0mMATP(1μCi $\alpha^{32}$P-ATP/50μl/assay),2.0mM cAMP, 2.0mM theophyline, 20mM creatine phosphate, 25 μg creatine phosphokinaseの条件で測定(5) した。basal AC活性、10μM GTP 刺激、20μM DA刺激( 10μM GTP 存在下)、0.5 μgCaM刺激、20μM DA+0.5μgCaM( GTP 存在下 )刺激それぞれでAC活性の Ca 濃度依存性を測定した。$Ca^{2+}$濃度はEGTA/Ca buffer系(9) で調節した。20μM forskolin(FK)、20 μM FK+0.5μg CaM についても pCa 6.2での活性を求めた。 PDE活性は sol A、40μM $^{3}$ H-cAMP(0.5μCi/500μl/assay)の条件で測定した(3)。 5μg CaM の有無で、PDE活性の pCa依存性を調べた。シナプス膜のリン酸化は、sol A,0.5mM ATP(1.0 Ci $\gamma^{32}$P-ATP/mmol), 0.2mg/mlBSA, pCa 6.2, 0.09μg CaM、assay volume 100μl で行い、Caの有無による効果を調べた。

〔結果と考察〕

EGTAで洗浄したラット大脳シナプス膜の特性を表1に示した。この膜はNa/K ATPase 活性を持つ plasma membraneで電顕観察でも均一な膜断片であった。AC活性も DA、GTP 感受性があった。 PDE活性も膜に存在したが、CaM 依存性の成分は少ない。リン酸化の基質のうち42、51、60 kDaは、CaM 依存性リン酸化／脱リン酸化を受けた。膜結合性の内因性 CaMを Western blot で評価すると 3μg/mg protein以下で、homogenate CaM のほぼ1/4 に相当した。この膜はレセプター機構を保持し、二つの信号増幅系と消去系を持つ内因性 CaMの少ない膜で、情報伝達系での膜とCaM の相互作用を調べる上にふさわしいモデル系であると考えられた。

表1．シナプス膜の特性

| 活性 | | 測定値(sample) | |
|---|---|---|---|
| Na/K ATPase [1] | | 6.48 ±0.61(9) | |
| adenylate cyclase [2] | | | |
| ① | basal | 75.6±13.3(9) | |
| ②③④ | GTP-stimulated | 31.1±22.4(6) | |
| ② | DA- | 50.4±19.0(9) | |
| ③④ | CaM- | 83.0±18.0(9) | |
| ⑤ | (DA+CaM)- | 171.2±28.6(9) | * |
| | ③+④ | 133.4±37.0(9) | |
| ⑥ | (DA+forskolin)- | 417.9±58.4(4) | |
| ⑦ | (DA+FK+CaM)- | 826.6±95.5(4) | ** |
| | ④+⑥ | 560.9±76.4 | |
| | ⑤+⑥ | 589.1±87.0 | |
| phosphodiesterase [3] | | | |
| | +CaM | 10.9±0.3 (3) | |
| | -CaM | 9.9±0.3 (3) | |
| phosphorylation [4] | | | |
| 51 kDa(1min) | $+Ca^{2+}$ | 27.4 | |
| | $-Ca^{2+}$ | 15.4 | |

Unit [1] μmoles Pi/hr/mg protein ,pH 7.5
[2] pmoles cAMPformed/min/mg protein
[3] pmoles cAMPdegraded/min/mg protein
[4] fmolesPincorporated/μg protein
* p=0.05,** p=0.02 sognificant

膜と CaMとの結合実験から、pCa 6.2 で、高親和性部位 $K_d$ =1.8×10$^{-8}$M, $B_{max}$ = 26 pmol/mg protein、低親和性部位 $K_d$ =6.4×10$^{-8}$M, $B_{max}$ =35 pmol/mg protein の値を得た。pCa 4 では高親和性部位で $B_{max}$ =128 pmol/mg proteinまで増加した。結合のpCa 変化も二相性を示した。gel overlay から同定した結合部位は235/240、135、58、49、32 kDaが主で、他にいくつかの成分を認めた（図1）.32、49、58 kDa は種差及び脳部位で差があった.49、58 kDa はCaM kinase IIと思われ、自己リン酸化により高分子量側(51、60 kDa)に移動した可能性がある。135、58 kDaは、CaM affinity column後の overlay からCaM 結合蛋白質であることを確認した。

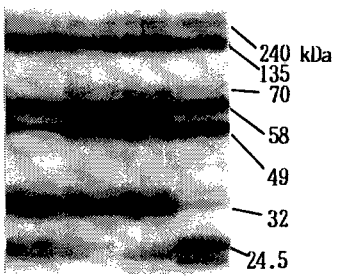



図1 $^{125}$I-CaM overlay
ラット小脳(a)；線条体(b)；大脳(c)；ブタ大脳(d)10%ゲル

上記の特性を有する膜でACと CaMとの相互作用を検討した。ACと PDE活性のCa濃度依存性を示した（図2）.GTP刺激は基礎活性をほぼ一様に上昇させ、DA刺激はこの活性をさらに高めた。 CaM刺激はpCa 6.2 で最大活性を示し高濃度Caは活性を抑制した。CaM とDA同時刺激では、pCa 6.2、5.7 でそれぞれの単独刺激時の和より活性は有意に増加していた。DAと CaMの相乗効果は、forskolin と CaMとのsynergistic な作用（表1）に似ている。FKはACへの直接の結合部位の他、ACとcouplingした状態の G蛋白質に高親和性に結合する(7) という。CaM と G蛋白質βγ成分との作用も報告(4) されており、CaMとDAとのsynergism では、ACと CaMとの直接結合(8) 以外の作用点を想定すべきである.CaMとDAとの相乗効果はHarrisonらの見解(1) とも合致する.PDE活性もCa感受性を示したが、外因性に加えた CaMの効果をほとんど認めなかった。Ca感受性部位がどこかは不明だが膜結合性 CaM自体の可能性もある。

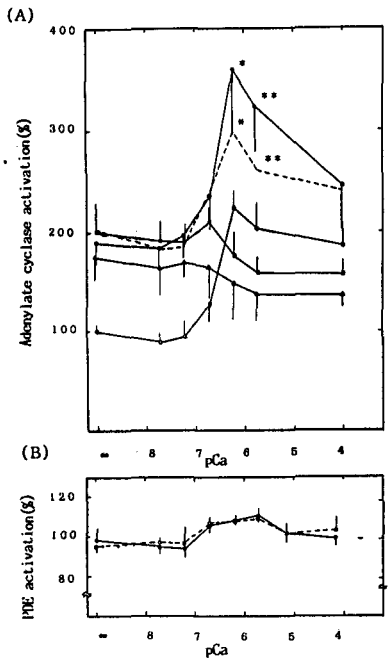



図2 アデニル酸シクラーゼ活性（A）とフォスフォジエステラーゼ活性（B）のCa濃度依存性
（A）GTP 刺激（△）；DA刺激（□）；CaM 刺激（○）DA+CaM刺激（●）；DA刺激とCaM 刺激の和（－－）基礎活性を100 %として補正。 *p=0.05,**p=0.02 有意
（B）+CaM（●）；-CaM（○）

〔文献〕
1) Harrison,J.K.et al.(1988) J.Neurochem.51,345-352
2) Hertzberg,E.L.et al.(1987) Methods Enzymol.139,445-454
3) Hidaka,H.and Endo,T.(1981) Calmodulin,Kodansha,Tokyo,p37
4) Katada,T.et al.(1987) J.Biol.Chem.262,11897-11900
5) Liang,C.T.and Sacktor,B.(1977) Biochim.Biophys.Acta.466,474-487
6) Malnoe,A.et al.(1982) Biochim.Biophys.Acta.714,84-92
7) Malnoe,A.and Cox,J.A.(1985) J.Neurochem.45,1163-1171
8) Minocherhomjee,A.M.et al.(1987) Biochem.26,4444-4448
9) Fabiato,A.and Fabiato,F.(1979) J.Physiol.(Parris) 25,463-505
10)Sobue,K.et al.(1982) J.Biochem.91,1313-1320
11)Wallace,R.W.and Cheung,W.Y.(1979) J.Biol.Chem.254,6564-6571

# 78 sodium valproate と baclofen の GABA およびベンゾジアゼピン受容体に与える影響

本橋伸高、塩江邦彦、假屋哲彦
山梨医大、精神神経科

〔要約〕

GABA作動薬である sodium valproateと baclofenの GABA およびベンゾジアゼピン受容体に与える影響を検討した。$GABA_A$、$GABA_B$、ベンゾジアゼピン受容体の結合実験には[$^3$H]muscimol、[$^3$H](-)baclofen、[$^3$H]flunitrazepamをそれぞれ用いた。sodium valproate (150 mg/kg)とbaclofen (10 mg/kg)の単回投与により、ラット前頭葉と海馬の$GABA_A$および$GABA_B$ 受容体に変化はなかった。両薬物の慢性投与後の前頭葉と海馬の$GABA_A$ 受容体は対照群と差を認めなかった。sodium valproate 投与後の$GABA_B$受容体は海馬で増加しており、前頭葉でも増加傾向を示した。$GABA_B$受容体はbaclofen 投与群では変化を示さなかった。さらに、大脳皮質のベンゾジアゼピン受容体はどちらの薬物の投与によっても変わらず、前頭葉と海馬のGABA濃度にも変化がなかった。以上の結果より、GABA作動薬の影響は$GABA_A$受容体と$GABA_B$受容体とでは異なること、sodium valproateの作用機序の一つとして$GABA_B$ 受容体を介するものが考えられることが示された。

γーアミノ酪酸(GABA)は、ほ乳類の中枢神経系で最も重要な抑制性神経伝達物質の一つである。近年、GABA受容体にbicucullineで拮抗される$GABA_A$と拮抗されない$GABA_B$ の二つのサブタイプのあることがあることが明らかになり(7) 、前者は弱い刺激による速いIPSPに、後者は強い刺激による遅いIPSPに、それぞれ対応すると考えられている(3) 。しかし、GABA受容体の調節機構については不明な点が多い。そこで、GABA濃度を増加させる作用のあるsodium valproate (5)と、$GABA_B$ 受容体の選択的作動薬であるbaclofen(7)のラット脳内$GABA_A$、$GABA_B$およびベンゾジアゼピン受容体に与える影響を検討した。

＜方法＞

実験動物はウィスター系雄性ラット(200-250 g)を用いた。sodium valproateは鐘紡、baclofenは第一製薬、clonazepamは日本ロシュの供与をそれぞれ受けた。[$^3$H]muscimol(20 Ci/mmol, NEN)、[$^3$H](-)baclofen(39.8 Ci/mmol, NEN)、[$^3$H]flunitrazepam (81.2 Ci/mmol, Amersham)を使用した。

Sodium valproate(150 mg/kg)とbaclofen(10 mg/kg) は生理食塩水に溶解し、ラット腹腔内に1日1回14日間投与し、最終投与24時間後に断頭した。単回投与実験でも薬物投与24時間後に断頭した。対照群には生理食塩水を投与した。断頭後取り出した脳は氷上で各部位に分割し－80℃で保存した。膜標品の作成はHerschelとBaldessarini(6) に従った。$GABA_A$および$GABA_B$受容体の結合実験法はHerschelとBaldessarini(6)、Motohashiら(11)に従い、[$^3$H]muscimol (最終濃度 4 nM)と[$^3$H](-)baclofen (10 nM)をそれぞれ用いた。ベンゾジアゼピン受容体結合実験は Korobathと Sperkの方法(8)により、0.1-4 nM の[$^3$H]flunitrazepamを用いた飽和実験の結果をScatchrad解析し、最大結合数(Bmax)と解離定数(Kd)を求めた。非特異的結合は 1 μM clonazepam により定めた。脳内GABA濃度の測定はBernasconiらの方法(2)を参考にradioreceptor assay でおこない、2 nMの[$^3$H]muscimolに対する阻害能で値を計算した。いずれの結合実験においても、反応液をGF/Bフィルター上に吸引濾過し、フィルター上の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

蛋白定量にはLowry らの方法(10)を用いた。統計には、一元配置分散分析とDuncanの多重比較検定を使用した。

＜結果＞

ラット大脳皮質膜標品を用いて結合阻害実験を行ったところ、sodium valproateは 1 mMにおいても、$GABA_A$、$GABA_B$およびベンゾジアゼピン受容体に作用しなかった。また、(-)baclofenは100 μMでも$GABA_A$およびベンゾジアゼピン受容体にほとんど作用しなかった。

sodium valproateとbaclofenの単回投与後の前頭葉と海馬の$GABA_A$、$GABA_B$両受容体には対照群との間に差を認めなかった(データ省略)。Table 1 に示すようにsodium valproate慢性投与後の前頭葉と海馬の $GABA_A$受容体に有意な変化は

なかった。$GABA_B$受容体は前頭葉で増加傾向を示し(+20%)、海馬では有意に増加していた(+35%)。これに対し、baclofen慢性投与群の前頭葉と海馬の$GABA_A$および$GABA_B$受容体は対照群と差がなかった。両薬物投与後の大脳皮質のベンゾジアゼピン受容体には有意な変化がなく (Table 2)、さらには、前頭葉と海馬のGABA濃度は対照群との間に差を認めなかった (Table 1)。

Table 1. Effects of chronic treatment with sodium valproate or baclofen on GABA receptors (fmol/mg protein) and GABA levels (nmol/mg protein). N=8.

| | $GABA_A$ | $GABA_B$ | GABA |
|---|---|---|---|
| Frontal cortex | | | |
| Saline | 490 ± 19 | 232 ± 11 | 14.5 ± 0.42 |
| Valproate | 558 ± 31 | 277 ± 19 | 13.6 ± 0.23 |
| Baclofen | 499 ± 22 | 249 ± 10 | 14.0 ± 0.32 |
| Hippocampus | | | |
| Saline | 256 ± 9 | 27 ± 2 | 21.8 ± 0.59 |
| Valproate | 282 ± 17 | 37 ± 3* | 22.1 ± 0.45 |
| Baclofen | 246 ± 22 | 27 ± 3 | 23.7 ± 0.54 |

* $p < 0.05$ as compared to saline-treated group.

Table 2. Effects of chronic treatment with sodium valproate or baclofen on benzodiazepine receptors in the cerebral cortex. Mean ± SE. N=4.

| | Bmax (fmol/mg protein) | Kd (nM) |
|---|---|---|
| Saline | 490 ± 75 | 2.54 ± 0.34 |
| Valproate | 444 ± 53 | 2.42 ± 0.20 |
| Baclofen | 440 ± 55 | 2.39 ± 0.29 |

＜考察＞

GABA作動薬であるsodium valproateとbaclofenのラット脳内GABAおよびベンゾジアゼピン受容体に与える影響を検討した。sodium valproateは$GABA_A$、$GABA_B$、ベンゾジアゼピンのいずれの受容体にも直接作用を示さなかった。しかし、慢性投与により海馬の $GABA_B$受容体を有意に増加させた。sodium valproateは躁病の治療や躁うつ病の予防に有効とされており(4)、同様の作用を有するlithiumやcarbamazepineでも海馬の$GABA_B$受容体が増加する(11)ことから、これらの薬物の共通の作用機序としてこの変化を考えることは可能かもしれない。実際、これら三つの薬物の慢性投与によりマウス海馬や線条体のGABA代謝回転が低下することが報告されており(1) 、本実験結果との関連で興味深い。今回の結果では、前頭葉の$GABA_B$ 受容体は約20%の増加傾向を示した。これは、sodium valproate を18日間投与後ラット前頭葉の$GABA_B$受容体が20%増加したとの報告(9)とほぼ一致している。$GABA_A$受容体は前頭葉でも海馬でも変化がなかったが、この結果はSlevinとFerrara(12)の結果と同様である。$GABA_A$受容体と密接な関係があるベンゾジアゼピン受容体も大脳皮質では変化を示さなかった。baclofen慢性投与は、前頭葉と海馬の$GABA_A$および$GABA_B$受容体に影響を与えなかった。本研究と同量のbaclofen投与によりマウス大脳皮質の$GABA_B$ 受容体が減少したとの報告(13)があるが、結果の不一致は実験動物の種差や用いたリガンドの差によるかもしれない。大脳皮質のベンゾジアゼピン受容体に変化のなかったことは、$GABA_A$ 受容体の結果と一致している。

GABA受容体数がGABA濃度によって調節されるとの研究(15)があるため、両薬物投与後のGABA濃度を測定したが、前頭葉でも海馬でも対照群と差を認めなかった。sodium valproate 慢性投与後ラット脳内 GABA濃度が増加するとの報告(12)はあるが、これは最終投与2時間後の結果であり、24時間後には変化がなくなると考えることも可能であろう。いずれにせよ、$GABA_B$受容体の変化をGABA濃度だけで説明することは難しいと思われる。sodium valproate のシナプス後部への直接作用(5)といったものを考える必要があろう。

＜文献＞

(1)Bernasconi,R.(1982) in Basic mechanisms in the action of lithium. Eds. H.M.Emrich, J.B.Aidenhoff and H.D.Lux, pp.183-192. Excerpta Medica, Amstedam-Oxford-Princeton. (2)Bernasconi,R. et al.(1980) J Neurochem 34,614-618. (3)Dutar,P. and Nicoll,R.A.(1988) Nature 332,156-158. (4)Emrich,H.M. et al.(1980) Arch Psychiat Nervenkr 229,1-16. (5)Gram,L. and Bentsen,K.D.(1985) Acta Neurol Scand 72,129-139. (6)Herschel, M. and Baldessarini,R.J.(1979) Life Sci 24,1849-1854. (7)Hill,D.R. and Bowery,N.G.(1981) Nature 290,149-152. (8)Korobath,M. and Sperk,G.(1979) Proc Natl Acad Sci USA 76,1004-1006. (9)Lloyd, K.G., Thuret,F. and Pilc,A.(1985) J Pharmacol Exp Ther 235,191-199. (10)Lowry,O.H. et al.(1951) J biol Chem 193,265-275. (11) Motohashi,N., Ikawa,K. and Kariya,T.(1989) Eur J Pharmacol, in press. (12)Patsalos,P.N. and Lascelles,P. T.(1981) J Neurochem 36,688-695. (13)Slevin,J.T. and Ferrara,L.P.(1985) Neurology 35,728-731. (14)Suzdak, P.D. and Gianutsos,G.(1986) Eur J Pharmacol 131,129-133. (15)Sykes, C., Prestwich,S. and Horton,R.(1984) Biochem Pharmacol 33,387-393.

# 79 ラット脳セロトニン受容体サブタイプの分類

今井伸一、北村佳久、野村靖幸
（北大・薬・薬効）

〔要約〕

ラット脳セロトニン（5-HT）受容体サブタイプの相関性、さらに 5-$HT_{1C}$受容体と GTP 結合蛋白質（G蛋白）の共役およびその性質を、ラット脳膜画分への 5-$HT_{1A}$、5-$HT_{1B}$、5-$HT_{1C}$、5-$HT_2$受容体サブタイプの選択的リガンド結合実験により検討した。受容体サブタイプへのリガンド結合に対する各種 5-HT 受容体作用薬の 50% 結合抑制濃度（$IC_{50}$）より各サブタイプ間の相関性を検討したところ、5-$HT_{1A}$と 5-$HT_{1D}$、5-$HT_{1B}$と 5-$HT_{1D}$、5-$HT_{1A}$と 5-$HT_{1B}$、5-$HT_{1A}$と 5-$HT_2$、5-$HT_{1C}$と 5-$HT_2$の各受容体サブタイプ間に相関性が認められた。また、[$^3$H]メスレルギン（5-$HT_{1C}$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 の高親和性結合部位数が減少する（GTPγS 効果）ことがわかった。N-エチルマレイミド（NEM）処置膜においては、高親和性結合部位数が増加し、かつ、GTPγS 効果も認められた。以上および前報の結果（今井ら（1988）神経化学 27, 132-133）より、5-$HT_{1C}$受容体はG蛋白と共役しており、また 5-HT 受容体サブタイプは 5-$HT_{1A}$、5-$HT_{1B}$、5-$HT_{1D}$受容体が1つのスーパーファミリーに、5-$HT_{1C}$および 5-$HT_2$受容体がもう1つのスーパーファミリーに分類できることが示唆された。

〈緒言〉

脳 5-HT 受容体は現在 5-$HT_{1A}$、5-$HT_{1B}$、5-$HT_{1C}$、5-$HT_{1D}$、5-$HT_2$、5-$HT_3$の6種に分類されており、各受容体サブタイプの機能的役割として 5-$HT_{1A}$、5-$HT_{1B}$、5-$HT_{1D}$はアデニル酸シクラーゼの抑制、5-$HT_{1C}$および 5-$HT_2$はホスホリパーゼCの活性化を導くことが報告されている(4)。われわれは、第31回日本神経化学会において、1) 5-$HT_{1A}$受容体は百日咳毒素（IAP）感受性G蛋白おそらく$G_{i1}$と共役し、IAP や NEM により脱共役すること、2) 5-$HT_{1B}$受容体もG蛋白と共役しているが、その共役は IAP や NEM に対して低感受性であること、3) 5-$HT_2$受容体もG蛋白と共役しているが、NEM の作用は 5-$HT_{1A}$受容体・G蛋白共役系とは逆に、5-$HT_2$では低親和性結合部位を高親和性結合部位へとシフトさせることを報告した(5)。今回、5-$HT_{1C}$受容体の新しい結合実験方法を確立し、5-$HT_{1C}$受容体のG蛋白との共役およびその性質、さらに 5-HT 受容体サブタイプの分類について検討した。

〈実験方法〉

Donryu 系雄性ラットの全脳（小脳を除く）ホモジネートより膜画分を調製し受容体標本とした。NEM処置は、NEM（最終濃度：0.1 mM）を受容体標本と4 ℃、30 分間インキュベートし、3回洗浄することにより行なった。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 10 μM 5-HT 存在下での結合）、5-$HT_{1B}$受容体については 30 μM イソプロテレノール存在下、0.1 nM [$^{125}$I]ヨードシアノピンドロール（非特異的結合は 10 μM 5-HT 存在下での結合）、5-$HT_{1C}$受容体については 0.1 μM スピペロン存在下、1 nM [$^3$H]メスレルギン（非特異的結合は 10 μM ミアンセリン存在下での結合）、5-$HT_2$受容体については 1 nM [$^3$H]ケタンセリン（非特異的結合は 10 μM メチセルジド存在下での結合）と 30 ℃、40 分間インキュベートし結合実験を行なった。得られた置換曲線から、コンピューター解析により高、低両親和性結合部位の $IC_{50}$値および構成比（%）を算出した。

〈結果〉

[$^3$H]メスレルギンは 5-$HT_{1C}$および 5-$HT_2$受容体に結合することから、両受容体で著しく親和性の異なるスピペロン（5-$HT_{1C}$受容体に対する $IC_{50}$: 20,000 nM、5-$HT_2$受容体に対する $IC_{50}$: 17 nM）で5-$HT_2$受容体をブロックし、[$^3$H]メスレルギンが 5-$HT_{1C}$受容体のみに結合する実験条件を検討した。0.1 μM スピペロン存在下で、[$^3$H]メスレルギン結合に対する各種 5-HT 受容体作用薬の $IC_{50}$値とブタ脈絡叢の 5-$HT_{1C}$受容体に対する $pK_D$値(3)の間に有意な相関性（$r=0.918$, $p<0.001$）が認められたことから、この条件下で [$^3$H]メスレルギンが 5-$HT_{1C}$受容体に結合していることが示唆された。他のサブタイプ（5-$HT_{1A}$、5-$HT_{1B}$、5-$HT_{1C}$）でも同様にそれぞれの特異的リガンド結合に対する各種5-HT 受容体作用薬の $IC_{50}$値を求め、各サブタイプ間の相関性を検討したところ表1の結果を得た（なお 5-$HT_{1D}$受容体に対する $K_i$値は文献値(2)を用いた）。この結果より、5-$HT_{1A}$と 5-$HT_{1D}$、5-$HT_{1B}$と

5-$HT_{1D}$、5-$HT_{1A}$と 5-$HT_{1B}$、5-$HT_{1C}$と 5-$HT_2$の各受容体サブタイプ間に正の相関性が認められた。また、5-$HT_{1A}$と 5-$HT_2$受容体間に負の相関性が認められた。[$^3$H]メスレルギン結合に対する 5-HT の置換曲線は 20 μM GTPγSの添加により右にシフトした（図1A）。置換曲線を２相性解析すると高親和性結合部位数が減少することがわかった（表２）。0.1 mM NEM 処置膜においては 5-HT の置換曲線が左にシフトした（図１）。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部位数が有意に増加していた（表２）。このNEM 処置膜においても GTPγS効果が認められた（図1B、表２）。

表 1 5-HT 受容体サブタイプ間の相関係数

| | 5-$HT_{1B}$ | 5-$HT_{1D}$ | 5-$HT_{1A}$ | 5-$HT_2$ | 5-$HT_{1C}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 5-$HT_{1B}$ | — | | | | |
| 5-$HT_{1D}$ | 0.970** | — | | | |
| 5-$HT_{1A}$ | 0.860 | 0.906* | — | | |
| 5-$HT_2$ | -0.159 | -0.519 | -0.691* | — | |
| 5-$HT_{1C}$ | 0.160 | -0.108 | -0.386 | 0.857** | — |

* p<0.05, ** p<0.01 ： 相関性の有意性

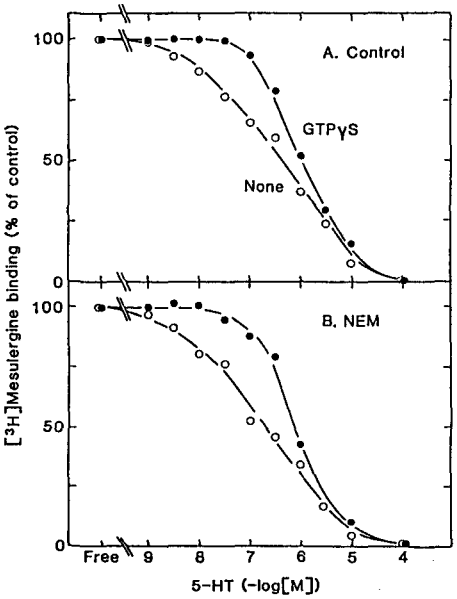



図 1 NEM 処置膜における [$^3$H]メスレルギン結合に対する 5-HT の置換曲線

表 2 NEM 処置膜における 5-HT の [$^3$H]メスレルギン結合抑制効果の各パラメーター

| Treatment Addition | (n) | $IC_{50}$(nM) | nH | $R_H$ (nM) | $R_H$ (%) | $R_L$ (nM) | $R_L$ (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | | | | | | | |
| None | (4) | 294±35 | 0.56±0.08** | 22.3±14.1 | 37.8±4.1 | 1,883±623 | 62.2±4.1 |
| 20 μM GTPγS | (4) | 1,564±204*** | 0.93±0.04** | — | 0 | 1,564±204 | 100 |
| 0.1 mM NEM | | | | | | | |
| None | (4) | 223±56 | 0.45±0.03 | 22.5±1.0 | 58.2±5.5* | 6,174±1,703 | 41.8±5.5* |
| 20 μM GTPγS | (3) | 755±230+,a | 0.92±0.12*,aa | — | 0 | 755±230 | 100 |

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 ： Control None に対する有意差
+ p<0.05 ： Control 20 μM GTPγS に対する有意差
a p<0.05, aa p<0.01 ： 0.1 mM NEM None に対する有意差

〈考察〉

昨年の第31回日本神経化学会において、われわれは 5-$HT_{1A}$、5-$HT_{1B}$、5-$HT_2$受容体がそれぞれG蛋白と共役していることを報告したが(5)、今回 5-$HT_{1C}$受容体に対する結合実験方法を検討、確立し、5-$HT_{1C}$受容体もG蛋白と共役していることを示唆した。さらに 5-$HT_{1C}$受容体はそれと高い相関性を示す 5-$HT_2$受容体同様、NEM によって低親和性結合部位が高親和性結合部位へシフトすることが認められた（なお、5-$HT_{1A}$、5-$HT_{1B}$受容体では NEM は高親和性結合部位を低親和性結合部位させる(5)）。各受容体サブタイプ間の相関性、各受容体サブタイプの機能的役割、今回および前回の報告(5)における NEM の作用より、5-HT 受容体サブタイプは 5-$HT_{1A}$、5-$HT_{1B}$、5-$HT_{1D}$受容体が１つのスーパーファミリーに、5-$HT_{1C}$および5-$HT_2$受容体がもう１つのスーパーファミリーに分類できることが示唆された。さらに、最近報告された 5-$HT_{1A}$、5-$HT_{1C}$、5-$HT_2$受容体の一次構造(1)においても、5-$HT_{1C}$受容体は 5-$HT_{1A}$受容体よりも 5-$HT_2$受容体と相同性が高いことから、5-$HT_{1C}$受容体は 5-$HT_1$受容体ファミリーの一員というよりも 5-$HT_2$受容体のサブタイプと考えられる。

〈参考文献〉

(1) Hartig P.R. (1989) Trends Pharmacol. Sci. 10, 64-69.
(2) Heuring R.E., and Peroutka S.J. (1987) J. Neurosci. 7, 894-903.
(3) Hoyer D., Engel G., and Kalkman H.O. (1985) Eur. J. Pharmacol. 118, 13-23.
(4) Peroutka S.J. (1988) Trends Neurosci. 11, 496-500.
(5) 今井伸一、北村佳久、野村靖幸 (1988) 神経化学 27, 132-133.

## 80　ラット大脳皮質における[3H]prazosinで標識される α1アドレナリン受容体サブタイプ: Gタンパクを介する結合調節および光親和性標識による同定

○足立　淳　松井宏晃　西崎　純　佐藤厚子　中西純一
伊野美幸　小川百合子　長谷川和夫
聖マリアンナ医科大学神経精神科学教室

〔要約〕 α1受容体は、WB4101やphentolamine(PHE)に高親和性のα1-A受容体および低親和性成分のα1-B受容体に細分される。[3H]prazosin(PRA)を用い、30nM PHE存在下にα1-Bを、chlorethylclonidine(CEC)前処置によりα1-Aを選択的に標識する条件下で、ラット大脳皮質の結合特性を調べた。α1-A受容体への[3H]PRA結合はepinephrineにより阻害されたが、その程度は1価金属およびGpp(NH)pにより著しく減少し、2価金属では増加した。α1-B受容体においては、Gpp(NH)pにより軽度減少した。　さらに、[125I]azido prazosinを用い光親和性標識を行うと、SDS-PAGSにて80Kおよび55Kの特異的に標識されるタンパク質が検出され、前者の生化学的特性はα1-Bに相当し、後者のそれはα1-Aに一致した。これらの結果より、α1-Aおよびα1-B受容体はGタンパクを介し結合調節を受ける構造を異にするタンパク質であることが示唆された。

＜緒言＞

最近、抗うつ薬のα1受容体阻害作用と、うつ効果との関連が注目されている。ラット大脳皮質で抗うつ薬投与後や電気ショック処置後、[3H]prazosin(PRA)で標識されるα1受容体数の増加やα1受容体のアゴニストに対する親和性の増加が報告されている(2)。さらに、α1受容体は、薬理学的な性質を異にする少なくとも二種類のサブタイプα1-Aおよびα1-B受容体に細分化されることが報告され、α1-B受容体は、百日咳毒素感受性および非感受性Gタンパクを介し、phospholipase Cの活性化とそれに続くPI代謝回転の亢進を起こし、生じたIP3等およびジアセルグリセロールはそれぞれCa++動員およびCキナーゼの活性化を引き起こすことがよく知られている。一方、α1-Aは未同定のGタンパクを介しジヒドロピリジン感受性Caチャンネルの活性化を引き起こし、細胞内へのCa++流入増大を生じさせることが報告された。すなわち、α1-Aおよびα1-B受容体は異なる情報伝達経路を介して、細胞質内遊離Ca++濃度を高めることが想定されているが、いまだ不明な点が多く、各サブタイプの性質を明らかにしてゆくことは非常に重要な課題となっている(3)。

今回我々は、Minnemanらの方法に準じ、ラット大脳皮質をα1-Aおよびα1-B受容体の[3H]PRA結合特性を調べ、さらに[125I]azido prazosinを用いた光親和性標識を行い、サブタイプの特性をSDS-PAGEにより解析した。

＜方法＞

（1）受容体膜標品: 調製には10μg/ml Leupeptin, 10μg/ml trypsin inhibitor, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 0.1mM PMSFを含む20mM Tris-HCl buffer pH 7.4(buffer A)を用い、Wistar系雄性ラット大脳皮質より、粗シナプトゾーム膜標品を作成した。

（2）chlorethylclonidine(CEC)処置: Minnemanらの方法に準じ、膜標品をタンパク分解酵素阻害剤を含む10mM HEPES bufferに懸濁し、10μMのCECで処置した。

（3）[3H]PRA結合実験: 既報の方法(4)に準じ反応液は総量500μlとし受容体標品(300μg protein)を1mM EDTAを含む50mM Tris-HCl buffer pH 7.4中終濃度0.5nM [3H]PRAおよび種々の薬物を混和し、25°C 30分間インキュベーション後、Whatman GF/Bフィルター（0.3%ポリエチレンイミン前処置）上に吸引濾過し、反応を停止した。phentolamine(PHE) 10μM存在下での結合を非特異的結合として全結合より差し引き、特異的結合を求めた。結合実験の結果はAsakuraらの方法(1)によりコンピューター解析した。

（4）光親和性標識: 膜標品(600-800μg protein)を5ml buffer A中で0.1nM[125I] azido prazosinおよび種々の薬物と混和、25°C 60分間暗条件下でインキュベーションした。遠心により反応を停止させ、0.5% BSA 6mlを含むbuffer Aで2回洗浄遠心を繰り返し、最終的に得られた沈渣を1mM DTT 6mlを含むbuffer Aに懸濁し254nmのUVランプにて1.5分間紫外線を照射した。遠心後沈渣を150μlのSDS-PAGE sample bufferに溶解しうち60-80μlを10% SDS-polyacrylamide gelにて電気泳動した。

＜結果と考察＞

1．ラット大脳皮質α1-Aおよびα1-B受容体: α1受容体特異的アンタゴニスト、[3H]PRAの結合は飽和性、可逆性であり直線のscatchard plotが得られBmax=266 fmol/mg protein, Kd=0.97 nMと算出された。[3H]PRA結合を、prazosinは一相性に阻害したがPHEおよびWB4101はそれぞれ高親和性成分(Ki=3.2nM)低親和性成分(Ki=95nM)の二相性に阻害した。Minnemanらは[3H]PRAにて標識されるα1受容体について、PHEやWB4101に高親和性の成分をα1-A、低親和性の成分をα1-Bと分類している。

そこで、α1-Bを特異的かつ非可逆的に不活化するCECにて前処置した膜を用い同様の実

験をしたところ、PHEおよびWB4101はいずれも一相性に[3H]PRA結合を阻害し、Ki=4.4nMは先に求めた高親和性成分のKi値にほぼ一致した。

さらに、[3H]PRA結合実験をPHEが高親和性成分をmaskするかどうかを確かめるために、30nM PHE存在下で行うとPHEおよびWB4101の[3H]PRA結合阻害曲線は一相性となり、Ki=59 nMは先に求めた低親和性成分のKi値にほぼ一致した。以上の結果は、30nMPHE存在下およびCEC処置後は[3H]PRAがそれぞれα1-B、α1-A受容体に特異的に結合することを示している。

2．ＧＴＰ結合調節タンパクを介する、α1-Aおよびα1-B受容体の結合調節機構：１価陽イオン、２価陽イオンさらに各種ヌクレオチド単独では、[3H]PRAのα1-Aおよびα1-B受容体への結合に、影響を与えなかった。α1アゴニストepinephrine(EPI)は、[3H]PRAのα1-B受容体への結合を濃度依存性、二相性に阻害した。その程度は１価および２価陽イオンでは影響を受けなかったが、GTP、Gpp(NH)p存在下でやや減弱した。さらに、Mg++存在下では１価金属やGTP、Gpp(NH)pは濃度依存性にEPIの阻害能を減弱させた。一方、α1-A受容体への[3H]PRA結合もEPIにより濃度依存性、二相性に阻害されたが、この阻害能は１価陽イオンやGTP、Gpp(NH)p存在下で著明に減弱し、２価陽イオン存在下では著明に増大した。Mg++、Gpp(NH)p存在下では、EPIによる[3H]PRA結合阻害曲線は著明に右方移動し一相性となった。

以上の結果は、α1-Aおよびα1-B受容体がいずれもGタンパクを介する結合調節を受けることを示している。

3．光親和性標識におけるα1-Aおよびα1-B受容体の同定：α1-Aおよびα1-B受容体の生化学的な性質を明らかにするため[125I]azido prazosin を用い光親和性標識を試み、SDS-PAGEを行った。その結果、分子量80Kおよび55Kのタンパクが標識され、分子量80Kの標識タンパクは従来報告されたデータよりα1-B受容体に相当するものと考えられた。

興味あることに、PHE(0.5nM-100nM)存在下に光親和性標識を行うと、分子量55Kのタンパクの PHEに対する感受性は、分子量80Kのタンパクよりも高いことが判明した。さらに、CEC処置後、分子量55Kのタンパクは無処置と比べて同様に標識されるが、分子量80Kのタンパクの標識は著しく減弱することがわかった。α1-B受容体の一次構造はすでにcDNAクローニングの結果より明かとされているが、α1-A受容体の一次構造はいまだ明かにされていない。しかし以上の結果より、α1-Aおよびα1-B受容体は異なる一次構造を有するタンパク質であり、その分子量がおおよそ55Kならびに80Kであることを示している。

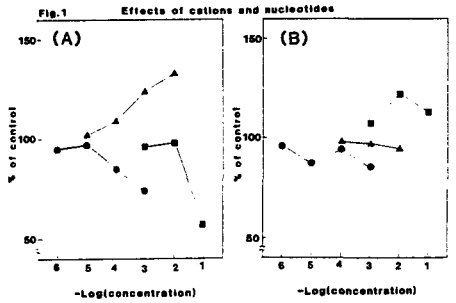



Fig.1
Effects of cations and guanine nucleotie on the epinephrine-induced inhibition of [3H]prazosin binding to α1-A(A) and α1-B (B) receptors.Under the standerd cations, epinephrine(3μM) inhibited the specific [3H]prazosin binding by 60%, which was definded as 100% of the control inhibition. The epinephrine-induced inhibition was measured in the presence of NaCl(■), MgCl2(▲) or guanidyl imidodiphosphate (Gpp(NH)p)(●). Data are expressed as % of the control inhibition.

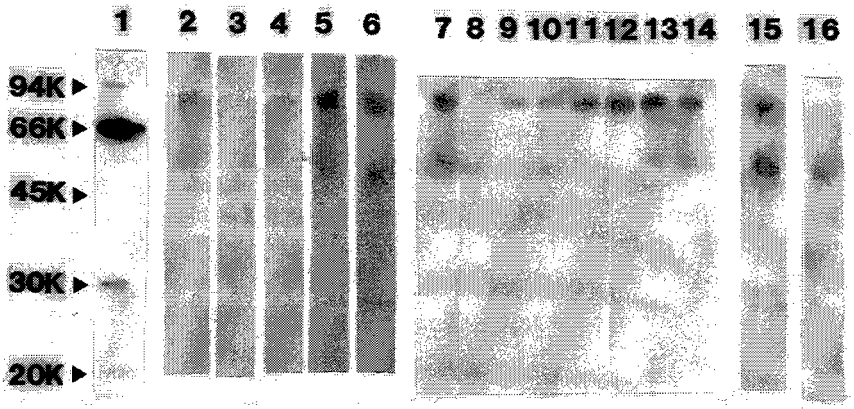



Fig. 2
Photoaffinity labelling of rat brain $\alpha_1$A and $\alpha_1$B receptors. [125I]Azidoprazosin analogue(0.1 nM) was used for this study. Lane 1: radioiodinated standards,2:control,3: prazosin(10 nM),4: phentolamine(10 nM),5: yohimbine(10 nM),6: alprenolol(10 nM),7: control,8:prazosin(100 nM),9-14:phentolamine; 9:(100 nM),10:(50 nM), 11:(10 nM),12:(5 nM),13: (1 nM),14(0.5 nM),15: control,16:10 μM chloroethylclonidine pretreatment.

(1) Asakura.M.,Tsukamoto.T.,Imafuku.J.,Matsui.H.,Ino.M.,and Hasegawa.K.(1984)Eur.J.Phamacol. 106,141-147.(2)Lipinski,J.F.Jr.,Cohen,B.M.,Zubenko,G.S.,and Waternaux,C.M.(1987)Life sci.40, 1947-1963(3)Minneman,K.P.,Han,C. and Abel,P.(1988)Mol.Phamacol.33:509-514(4)Minneman,K.P. (1988)Phamacol.Reviews 40,87-119(5)Cotecchia,S.,Schwinn,D.A.,Rendall,R.R.,Lefkowitz,J.R., caron,M.G.,and Kobilka.K(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.85,7159-7163

# 81 ムスカリン受容体のアゴニスト依存性リン酸化

芳賀和子　芳賀達也
（東京大学医学部脳研生化学）

〔要約〕
ムスカリン受容体をアゴニスト依存的にリン酸化する酵素をブタ大脳抽出液から部分的に精製した。大脳と心房どちらから精製したムスカリン受容体もカルバミルコリン存在時にのみリン酸化された。1 mM カルバミルコリンの効果は10μMアトロピンで完全に抑制された。Caイオンは活性に必要なくむしろ抑制的に働き、cAMPおよびcGMPは活性に影響しなかった。0.15 M NaClあるいはKClで活性が抑制された。この酵素はβアドレナリン受容体キナーゼと同一か、あるいは非常によくにた酵素と考えられる。

受容体刺激により引き起こされる反応は、一般にアゴニストの継続的存在により低下する。この現象は脱感受性と呼ばれ、その受容体に特異的なもの（Homologous Desensitization）と、他の受容体を介する反応も低下する場合（Heterologous Desensitization）とがある。Homologous Desensitizationは受容体自身の変化によって生じ、Heterologous Desensitizationは受容体以後の成分の変化によって生ずると考えられる。Homologous Desensitizationの分子的機作として、アゴニストが結合した受容体のリン酸化が想定されている。ロドプシンは光があたるとロドプシンキナーゼでリン酸化され、リン酸化されたロドプシンはG蛋白質（トランスジューシン）との相互作用がアレスチンという蛋白質によって阻害されるようになる(5)。βアドレナリン受容体もβアドレナリン受容体キナーゼによってアゴニスト依存的にリン酸化されると報告されている(1)。

我々はこれまで種々のキナーゼによるムスカリン受容体のリン酸化を検討してきた(3)。大脳から精製したムスカリン受容体（m1サブタイプ が主）は蛋白質キナーゼCでリン酸化される。心房の受容体（m2サブタイプ ）は蛋白質キナーゼCではリン酸化されず、cAMP依存性キナーゼによってリン酸化される。カルモジュリンキナーゼによるリン酸化はいずれの受容体でもほとんど検出されなかった。これらのリン酸化はいずれも、アゴニストの有無によって影響されなかった。一方Kwatraらは心筋ムスカリン受容体のアゴニスト依存性リン酸化の存在を報告している。しかし、関与するキナーゼは同定されていない(4)。今回我々は、アゴニスト依存性にムスカリン受容体をリン酸化する酵素の分離・同定を試みた。

［実験方法］

[1]リン酸化条件：キナーゼ画分を2μM ATPと30°Cで30分反応させた後、リン脂質に組込んだムスカリン受容体(1-2 pmol) と[$^{32}$P]ATP($10^6$cpm/tube)を加えて30°Cで0-60分反応させた。反応液の組成は、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)/2 mM EDTA/5 mM $MgCl_2$で、反応液量は0.3 mlである。カルバミルコリンは通常1mM、cAMP及びcGMPは加えた時は0.1 mM、NaClあるいはKClを加えた時は最終的に0.15 Mとした。反応終了後2 mlの緩衝液（20 mM Hepes-KOH (pH 8)/1 mM EDTA/0.16 M NaCl）を加えて50,000 rpmで30分遠心した。沈殿をSDS溶液にとかしてSDS電気泳動にかけ、オートラジオグラフィー後受容体画分を切出してカウントした。ムスカリン受容体はブタ大脳あるいは心房より精製し、既報にしたがって脂質に組込ませた(2,6)。

[2]受容体キナーゼの部分精製：βアドレナリン受容体キナーゼの精製(1)に準じて行なった。ブタ大脳200 gに1 lの緩衝液（20 mM Tris-HCl (pH 7.5)/5 mM EDTA/5 mM EGTA/1 mM PMSF/200μg/ml benzamidine/10μg/ml pepstatin）を加え、Waring BlendorとHiscotronで撹拌し、30,000 rpm 20分の遠心で上清を得た。上清を硫安分画（0-30%）後、Ultrogel AcA34 (1.2 l)にかけた。ムスカリン受容体をリン酸化する活性がある部分を集め、連結した2本のカラム（DEAE-Sephacel(10 ml)とCM-Toyopearl(8 ml)）にかけた。CM-Toyopearlを0から0.12 MのNaCl gradient(40ml-40 ml)で溶出した。約80 mM NaCl 部分にアゴニスト依存性にムスカリン受容体をリン酸化する活性が認められ、今回の実験に使用した。DEAE-Sephacelから溶出された画分にもムスカリン受容体のリン酸化活性が認められたが、アゴニスト依存性は見られなかった。両カラムに結合せず素通りした画分には、ムスカリン受容体リン酸化活性は見られなかった。

［結果と考察］

大脳から精製した受容体も心房から精製した受容体もカルバミルコリン存在下にリン酸化された（図1）。カルバミルコリンがない時にはほとんどリン酸化は観察されず、0.1-1 mMのカルバミルコリン存在下に最大のリン

酸化が見られ、10 mMでは僅かに阻害が見られた。1 mMカルバミルコリン存在下のリン酸化は、10μMアトロピンで完全に抑えられた。

心房のムスカリン受容体はm2サブタイプ のみからなると考えられる。一方、大脳から精製したムスカリン受容体はm1サブタイプが主成分と考えられるが、他のサブタイプ が混在している可能性がある。受容体あたりのリン酸化される程度は両者でほとんど変らなかったので、m1、m2両サブタイプ ともリン酸化されるものと推測される。心房から精製したムスカリン受容体は大脳から精製した受容体に比べ、SDS電気泳動での見かけの分子量が少し大きい。リン酸化されるバンドも蛋白質染色で見た時と同様、心房の受容体の方が少し大きかった（図１）。この結果も先の推測を支持する。しかしサブタイプ特異性の最終的決定は、それぞれのサブタイプ を発現させて調べることによってなされるはずである。

この標品でのリン酸化は、ムスカリン受容体を加えなければ見られず、cAMPやcGMPで影響されなかった（図２）。リン酸化反応はEGTAとEDTAで$Ca^{2+}$を除去する条件で行なっており、フリーの$Ca^{2+}$濃度を0.5 mMにすると反応はむしろ抑制された。これらの結果は、このリン酸化反応がＡキナーゼ、Ｇキナーゼ、Ｃキナーゼ、カルモジュリンキナーゼによるものではないことを示唆する。また、ＡキナーゼとＣキナーゼはこの標品から分離されていると考えられる。

この標品はβアドレナリン受容体キナーゼと基本的に同じ精製方法で得られたので、βアドレナリン受容体キナーゼそのもである可能性が考えられる。0.15 M NaCl及びKClでリン酸化が阻害されるという結果はβアドレナリン受容体キナーゼとの類似性を示す。しかし活性の溶出位置及び活性のイオン濃度依存性について、今回の結果とβアドレナリン受容体キナーゼについて文献で報告されている結果との間には完全な一致は見られず、両者の間に量的な差があった。この差が、酵素材料の差（ブタとウシ）基質の差（ムスカリン受容体とβアドレナリン受容体）あるいは微妙な実験条件の差によるのか、あるいは異なる酵素であるためなのかは、今回の実験では決められなかった。この酵素がβアドレナリン受容体キナーゼそのもではないとしても、それによく似た同じファミリーの酵素であると考えられる。

図 1

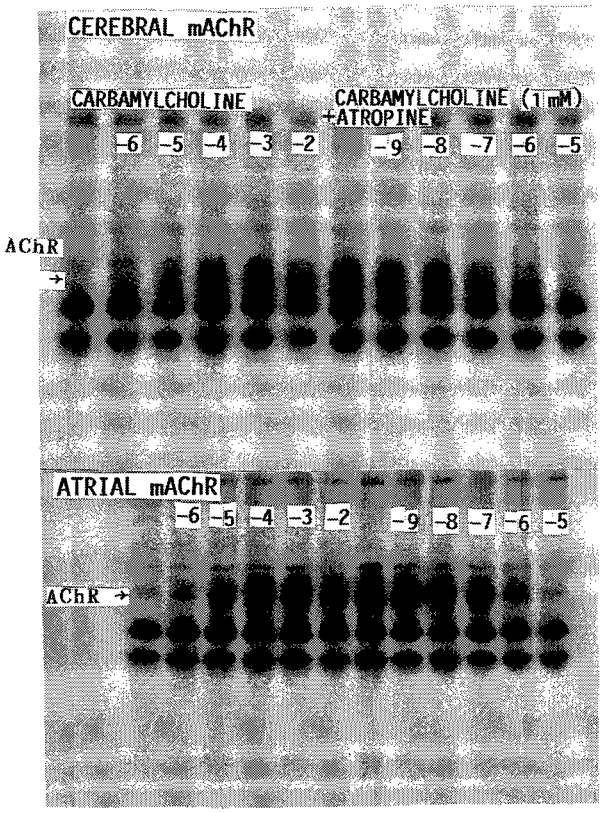
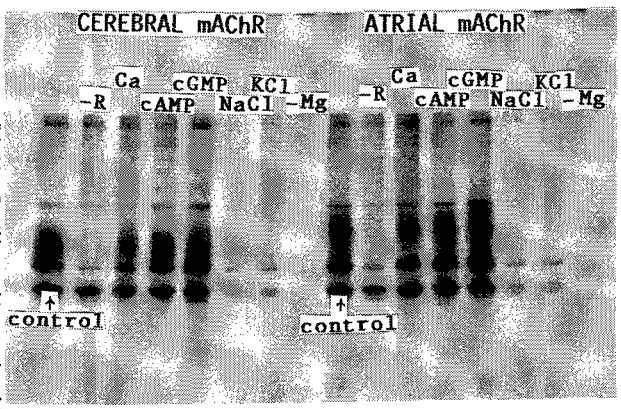



図 2




［文献］

(1) Benovic, J.L. et al., J. Biol. Chem., 262, 9026-9032 (1987).
(2) Haga, K. et al., Mol. Pharmac., 35,286-294 (1989).
(3) Haga, T. et al., TIPS,.Supplement III, 12-18 (1988).
(4) Kwatra, M.M. et al., J. Biol. Chem., 262, 16314-16321 (1987).
(5) Kuhn, H., et al., FEBS Lett., 176, 473-478 (1986).
(6) Nishiyama, T., et al., Biomed. Res., in press (1989).

# 82 マイクロダイアリシス法によるラット大脳皮質における細胞外アセチルコリンの定量 —— コリンエステラーゼ阻害剤非存在下における検討

小笹貴史、山西嘉晴、小倉博雄、山津清實
（エーザイ・筑波研）

〔要約〕

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による高感度アセチルコリン（ACh）測定法を用い、コリンエステラーゼ阻害剤（ChEI）非存在下でマイクロダイアリシス法によるラット大脳皮質の細胞外 ACh の測定を試みた。

1） ACh の検出限界は 0.2 pmol/injection であった。

2） ラット大脳皮質灌流液中の basal ACh 量は 0.49 ± 0.08 pmol であった。100mM の高 KCl-Krebs 溶液で灌流すると ACh 量は約 6 倍に増加し、再び normal KCl-Krebs 溶液に戻すと直ちに basal level まで回復した。また、tetrodotoxin（TTX）1.0 μM の処置により basal ACh は速やかに測定限界以下に減少した。

3） 本法を用いて、新規 ChEI 1-benzyl-4-[( 5,6-dimethoxy-1-indanon )-2-yl )]-methylpiperidine hydrochloride（E2020）および既存のChEI tetrahydroaminoacridine（THA）を腹腔内投与した際の効果について検討したところ、E2020 および THA はいずれも用量依存的に ACh 量を増加させた。

以上の結果より、本法はラット大脳皮質のコリン作動性神経の神経化学的解析に有用な方法であることが示唆された。

Key words： microdialysis, ACh, cerebral cortex, E2020, THA.

〔序論〕

従来、マイクロダイアリシス法による脳内 ACh の定量には、ACh 測定法の感度の限界から灌流液中に ChEI を加えることが必要であるとされてきた。しかし灌流液中の ChEI が ACh 遊離機構になんらかの影響を与える可能性は十分に考えられることであり、ChEI 非存在下での測定が望まれる[1]。特に、ChEI の in vivo での作用を正しく評価するためには、灌流液中に ChEI を加えずに測定することが不可欠であろう。

大脳皮質のコリン作動性神経は海馬のそれとともに学習、記憶に重要な役割を演じている神経であり、大脳皮質の細胞外 ACh 量を測定することはきわめて意義深いことであると思われる。しかし、マイクロダイアリシス法を用いてラット大脳皮質内 ACh を ChEI 非存在下で定量した報告は我々の知る限りまだない。

今回、我々は高感度 ACh 測定法を用い、ChEI 非存在下でラット大脳皮質の ACh の測定を試み、ACh 遊離に関する基礎的検討、並びに２種類の ChEI、E2020[4),5)] および THA を腹腔内投与した際の細胞外 ACh 増加作用について検討を行なった。

〔実験方法〕

Wistar系雄性ラット(180-380g)を使用した。ラットを pentobarbital 麻酔し、Maysinger らの方法[2)]に準拠して透析プローブ（U字型 3.0 mm、EICOM BDP-U-23-03）を Bregma より A 2.0, L 2.0 mmの位置に、垂直より40° の角度で、プローブの先端より 3.5 mm の深さまで挿入した(Fig.1)。手術後 1-2 日後に灌流実験を行なった。Krebs-Henseleit buffer を2 μl/min で灌流し 20 分毎に回収した。透析液 35 μl に内部標準（IS）isopropylhomocholine（IPHC）5 pmolを加え、直ちに HPLC に注入した。HPLC条件は著者らの既報[6)]に準じたが、さらに測定感度の向上を図るためにエアーダンパー（EICOM PL-100）およびsignal cleaner（SCI SC70）を使用した。なお、本透析プローブにおける ACh の回収率は、$1x10^{-6}$ M の ACh 溶液中室温下で検討したところ 16.1 ± 0.49 %（n=3）であった。

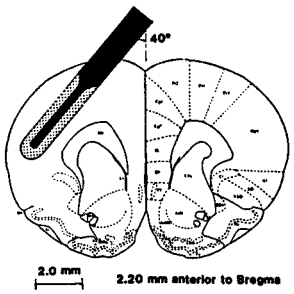



Fig. 1 Schematic illustration of the location of microdialysis probe. The schematic drawing of the brain section was taken from atlas of Paxinos and Watson[3)].

〔結果および考察〕

Authentic ACh の測定

IS 2pmol に対し、種々のACh 量 (0.2-2.0 pmol) の ACh / IS peak hight 比は直線性を示した(Fig.2)。検出感度は 0.2 pmol/injection であり、灌流液中の ACh の定量は可能であった。Fig.3 に standard溶液およびラット大脳皮質灌流液中の ACh のクロマトグラムを示した。

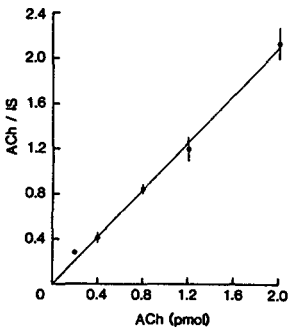



Fig. 2 Standard curve for ACh. Ordinate represents the peak height ratio of ACh to internal standard (IPHC 2 pmol). n=4.

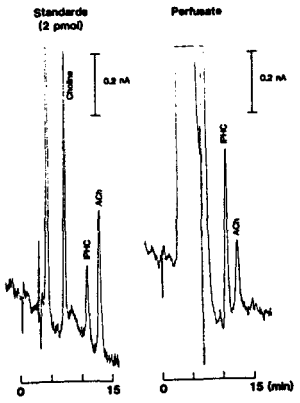



Fig. 3 Typical chromatograms of standards and microdialysis perfusate. Microdialysis perfusate contained 5 pmol of IPHC as an internal standard.

内在性 ACh 遊離の検討

ラット大脳皮質灌流液中の basal ACh 量は 0.49 ± 0.08 pmol(n=3)であった。100 mM の高 KCl-Krebs溶液で灌流すると ACh 量は basal levelの 5.8 倍まで増加した。灌流液を再び正常の KCl濃度 (4.7 mM)に戻すと ACh量は速やかに正常値にまで回復した。また、TTX 1.0 μM の処置により basal ACh は速やかに測定限界以下に減少した。以上の結果より、本実験で測定した ACh は神経終末から遊離されたものであることが示唆された。

ChEI 投与時の細胞外 ACh の変化

本法を用いて、構造を異にする２つの ChEI E2020 および THA を腹腔内投与した際の効果を検討した。E2020 1.0 mg/kg では投与直後より 80 分後まで最大 40 % の ACh 量の増加を示した。高用量の 3.0 mg/kg では最大 140 % ACh量が増加し、この効果は 180 分以上持続した。一方、THA は 3.0 mg/kg では最大 102 % のACh 量の増加を示したが、その作用は速やかに消失した。10.0 mg/kgでは投与直後から 180 分以上にわたり最大134 % の ACh量 の増加が認められた。これらの結果は、以前我々が報告した[4]ラット大脳皮質 ACh 含量の変化とよく一致する。

以上の結果より、本法は、ラット大脳皮質における ACh遊離機序の解析や薬物の作用などの検討に有用な方法であると考えられる。

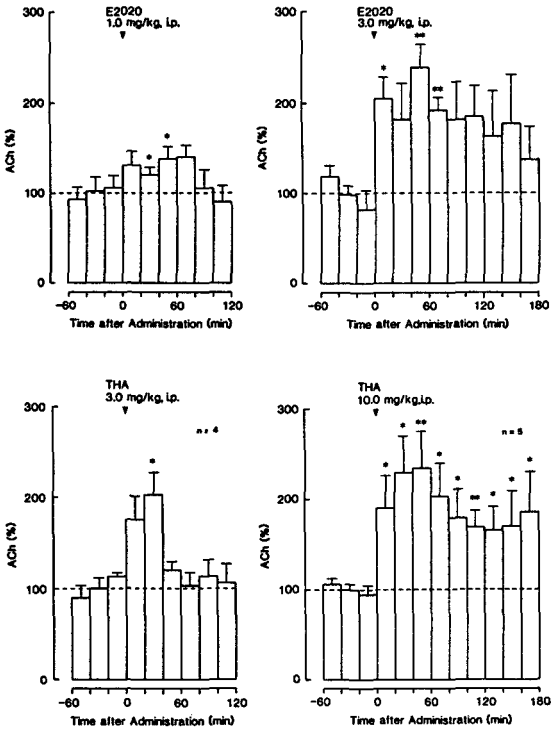



Fig. 4 Effects of E2020 and THA on the extracellular ACh level in the cerebral cortex of rats. Basal levels (pmol) in the drug-treated groups were as follows : E2020(1.0 mg/kg), 0.66±0.14; E2020(3.0 mg/kg), 0.36±0.03; THA(3.0 mg/kg), 0.67±0.17; THA(10.0 mg/kg), 0.67±0.14. *, ** : p < 0.05, 0.01 vs basal levels by paired t-test. n=4-5.

〔参考文献〕

1) G. Damsma et al. (1988) Life Sci.,43,1161-1168 2) D. Maysinger et al. (1988) Brain Res.,461,355-360. 3) G. Paxinos and C. Watson, The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edn., Academic Press, Sydney, 1986 4) Y. Yamanishi et al. (1988)Soc. Neurosci. Abstr.,27.20. 5) H. Ogura et al. (1988) Soc. Neurosci. Abstr., 27.21. 6) 山西嘉晴ら(1986) 神経化学,250-252

# 83 後根切断および後脊髄動脈枝焼灼手術後の脊髄内神経伝達候補物質含量の変動

藤田　公和・*戎　弘志・*小出　直・永田　豊
（藤田学園保衛大・医・生理，*福友会医学研究所）

〔要約〕脊髄の第一次知覚神経軸索および脊髄背側部に存在する介在ニューロンの伝達物質を明らかにしようと企図して，ラットの脊髄後根の片側切断および後脊髄動脈の片側分枝の焼灼手術を行って一週間後に，脊髄背側組織中に含まれる神経伝達物質候補含量を非手術対照部と比較した．すなわち，第８頸髄から第２胸髄（$C_8$～$T_2$）部の脊髄神経後根の切断手術後，および片側脊髄動脈分枝の焼灼，閉塞手術後７日目にラットを断頭して脊髄を摘出した．そして，摘出脊髄組織内に含まれるアセチルコリン合成および分解酵素活性，神経伝達物質候補の遊離アミノ酸含量および心房性利尿ペプチド（ANP）を測定した。片側の後根神経切断手術を行い，一週間後に摘出した脊髄背側で，手術側のChAT活性が非手術側脊髄に比べて有意に低下したが，ANP含量は逆に増加した．また、切断手術後に背側脊髄内の遊離アミノ酸含量は有意な変動を示さなかった．したがって，脊髄神経の第一次知覚神経の伝達物質として，アミノ酸が関与している可能性は極めて少ないと考えられた．一方、後脊髄動脈の片側分枝の血管焼灼手術により，手術側の背側脊髄組織の変性を引き起こさせたとき，当慨部のAsp,Glu,およびGABA含量は有意に減少した．したがって，脊髄背側部に存在する介在ニューロンのシナプス伝達に，これらのアミノ酸が神経伝達物質として利用されていることが示唆された．

末梢の感覚を脊髄へ伝える一次知覚神経が利用している伝達物質のうち，痛覚の伝達に関与する神経伝達物質は，substance P であることがほぼ確立している．しかし，その他の感覚の伝達に関与していると推定される脊髄内の神経伝達物質については，まだほとんど解明されていない現状である．また，一次知覚神経からの信号入力やその制御に関与していると考えられる脊髄背側の介在ニューロンが利用している伝達物質もほとんど確定されていない[1]．そこで本研究では一側の脊髄後根神経切断手術を行うことによって一次知覚神経の変性を引き起こしたり，あるいは片側の後脊髄動脈枝を焼灼，閉塞させてその栄養支配領域の脊髄背側部組織を変性させて、介在ニューロンの脱落を引き起こさせた。そして一定期間経過した後摘出した脊髄組織内に含まれるACh合成（ChAT）および分解酵素（AChE）活性や脊髄内遊離アミノ酸含量などを測定し一次知覚神経と脊髄背側の局在する介在ニューロンの伝達物質を明らかにしようと企図した。

〔実験材料および方法〕　本実験には体重230～270gのウイスター系成熟ラット（雌）を用いた．ペントバルビタールで麻酔した後、後根切断は右側の$C_8$～$T_2$部位の神経束を，脊髄に入る直前部で切断した．また，別の個体で同部位の脊髄後部を露出して，表面を走行する後脊髄動脈の右背側部に分布する小枝のみ尖端の細い電気メスを用いて焼灼，閉塞した．これら２種類の手術後７日目に，ラットにウレタン麻酔した後断頭し，脊椎骨を開いて脊髄を摘出した．取り出した脊髄は第８頸髄（$C_8$）から第２胸髄（$T_2$）部分（長さ約１cm位）を切り出して凍結させた．生化学的分析には脊髄を左右の腹背側の４部位に分割した組織を使用した．ChAT活性の測定はRossierらの方法[2]を、AChE活性はEllmanらの方法[3]に従い，定量した．脊髄組織中の遊離アミノ酸の測定は70％エチルアルコールで除蛋白した抽出液を，アミノ酸自動分析機（日立835型）を用いて分離定量した。脊髄組織内のANP量の測定は，組織重量を電子天秤で計量した後，１０倍量の0.1M酢酸中で磨細し，100℃，５分間熱処理をしてから遠沈（15,000rpm/15分）して得られた上清に含まれるペプチドをrat ANP用RIA kit（アマシャムジャパン）で測定した．

〔結果および考察〕１）脊髄後根切断による脊髄内神経伝達候補物質の変動：鼠の右後根を脊髄に入る直前で切断した後，一週間経過したあとで断頭した。そして摘出した当該脊髄組織を左，右の腹，背側

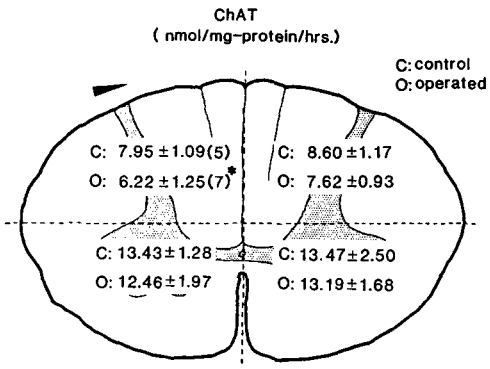



図１．右側の後根切断手術後７日目の脊髄内ChAT活性値

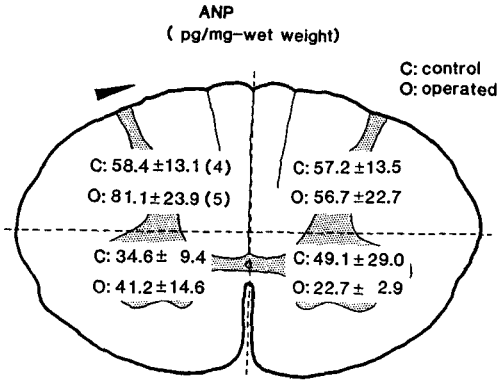



図２．後根切断手術７日後のANP含量

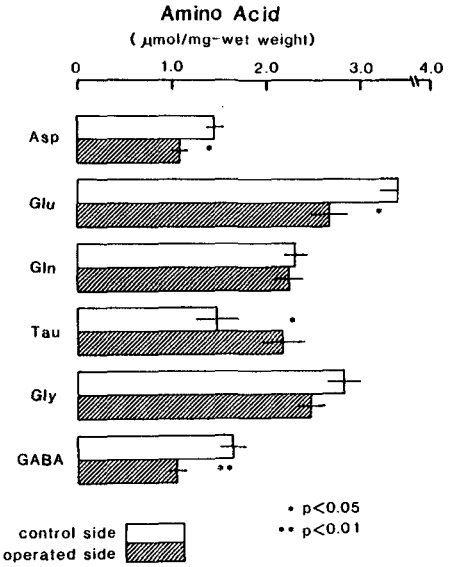



図３．後脊髄動脈枝の焼灼手術後７日目の脊髄内遊離アミノ酸含量

に４分割しその標本に含まれるChATおよびAChE活性を測定した．手術側の１／４部脊髄組織に含まれるChAT活性は，同部位のコントロール脊髄組織内の値と比較して有意に（P<0.05）低下した．また，同部位のANP含量は増加する傾向が見られたが，その生理的な意味については現在のところ不明である．しかし，他の３部位ではsham-ope.の組織と比較して有意な変動が見られなかった．一方、AChE活性は手術後一週間で非手術対照側の背側脊髄以外の他の３部位すなわち，手術側の腹および背側部ならびに非手術側の腹側部で，有意な低下が認められた。脊髄内に含まれる遊離アミノ酸含量の変動は．手術後脊髄腹側および背側で，手術側と対照側との間に，アミノ酸含量にはほとんど差異が見られなかった．ただ，タウリン量のみは背部脊髄組織の手術側内で，対照側部分よりも増加する傾向が見られた．このことから、アミノ酸が一次知覚神経の伝達物質として利用されている可能性は極めて少ないことが示唆された。　２）後脊髄動脈枝の焼灼・閉塞後の脊髄内神経伝達候補物質含量の変動：　手術後の脊髄内遊離アミノ酸含量の変動について、脊髄背側部では手術側脊髄の Asp,Glu および GABA含有量は，対照側脊髄部分と比べて有意（p<0.05）な減少を示したが，逆にtaurine量には有意（p<0.01）な増加が見られた．一方、脊髄内のChATおよびAChE活性には手術後有意な変動は観察されなかった。したがって脊髄背側に局在する介在ニューロンではAsp,GluおよびGABAが伝達物質として機能している可能性が推察された。これは、Miyataら[5]Barberら[6]の報告と同様の結果である。一方、Tauは脳内で抑制性の神経伝達物質の一つと考えられているが，今回の実験から少なくとも脊髄内では他のアミノ酸伝達物質とは異なった生理作用機序を持つことが示唆された．

〔文献〕 1)金沢一郎、須藤伝悦 (1982) 神研進歩. 26. 623-636. 2)Rossier,J.et al(1973)FEBS Lett.32.231-234. 3)Ellman,G.L.et al(1961)Biochem.Pharmacol.7.88-95. 4)Potashner,S.J.and Dymczyk,K.(1986)J.Neurochem.44.1511-1519. 5)Miyata,Y.and Otsuka,M.(1975)J.Neurochem.25.239-244. 6)Barber,R.P.et al(1978)Brain Res.141.35-55.

# 84 コリン作動性神経節のコリン取り込み及び代謝系に及ぼす神経切断手術の影響

中島雄三，岩田光良，田丸政男，永田豊
（藤田学園保衛大・医・生理）

〔要約〕コリン(Ch)作動性神経末端を多量に含む上頸部交感神経節(Superior Cervical Ganglion,SCG)を白鼠頸部より摘出して、そのコリン取り込み(Choline up take,ChU)とAChおよび膜脂質(Phosphatidyl Choline,Ptd-Ch)への代謝的生成系について測定した。(1)節前線維切断(Denervated)SCG（術後1週間）ではコリン作動性神経末端の変性が生じており，特に$^{3}$H-ChからAChへの生合成がほぼ完全に抑制された。またこの神経節の高親和性ChUおよびPtd-Ch分画への$^{3}$H-Chのincorporationは，intact SCG の場合と比較してかなり抑制されたが，intact SCGとその代謝パターンは類似していた。(2)節後神経切断(axotomized)SCGでは，交感性節後ニューロン細胞体の逆行性変性と反応性グリアの増殖がみられたが，この標本のACh合成はわずかに抑制された。しかし，この神経節のPtd-Chへのincorporation は，intact SCG 標本の場合と比較してかなり著明に抑制された。これらの実験成績から，高親和性ChU系とACh生成系は特異的にコリン作動性神経末端部に局在していることが確かめられた。また，SCG組織内に取り込まれたChは節前神経末端部よりも節後神経細胞膜成分に取り込まれて，Chの貯蔵系として機能している可能性が考えられた。

高親和性コリン取り込み(High affinity choline uptake; HAChU)系は，コリン作動性ニューロンに特異的で，外液のCh濃度が低い時（$[Ch]_o$=2.5$\mu$M）に伝達物質のACh生合成と共役して作動していると主張されている[4]。一方，外液Ch濃度が高い場合($[Ch]_o$=100$\mu$M)のChUは，主に低親和性ChU(low affinity choline uptake, LAChU)系で，細胞膜脂質の生成系に関与しており，広く神経系に分布しているといわれる[4]。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である。我々はラット摘出SCGのコリン取り込み及び代謝系を測定したところ，ラットSCGのHAChUがACh合成系のみならず膜脂質のPtd-Ch生成系の著明な促進をも引き起こす事を見出し，昨年の本学会で報告した[5]。本研究では，denervationあるいはaxotomy手術を行い，一週間後に節前神経末端あるいは節後神経細胞の変性を生じさせたSCGを用いて，SCG内に取り込まれたChがACh及びPtd-Chへ代謝される過程を調べ，HAChUとLAChUとの場合を比較して，コリン作動性ニューロンにおけるCh代謝系の局在について検討した。

〔実験材料及び方法〕SCGのdenervation及びaxotomy手術は，Wistar系成熟白鼠を用い既報[1]に従って実施した。SCG標本の摘出もやはり既報の如く行い，組織周囲の結合織を除去したSCG本体を実験に供した。30分間preincubation 後に$^{3}$H-Ch及びcarrierの2.5$\mu$M-Ch(HAChU系)あるいは100$\mu$M-Ch(LAChU系)を含む生理的溶液(SBS)中で，これらSCGを37°C，30分間好気的にインキュベーションした。その後溶液から取り出し"cold" SBS中で洗浄して組織周囲のRI 汚染を除去した後にSCGを微小ホモゲナイザーで磨細し，Hagaらの方法[4]でAChとChを，Burtらの方法[3]でphosphocholine(P-Ch)を，Larrabeeらの方法[6]でPtd-Chをそれぞれ分離抽出し，各々の分画に含まれる$^{3}$H-Chを測定して，取り込まれたChの量を算出した。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〕<u>節前神経切断手術の影響：</u> Denervation手術後1週間経過したSCGでは，節前コリン作動性神経末梢部は完全に変性して脱落消失していたが，節後交感性ニューロン細胞体はそのまま変性せずに保たれていることが組織学的に示されている。この標本ではACh合成酵素(choline acetyltransferase,ChAT)活性もまたほぼ完全に消失していた。このSCGを$^{3}$H-Chを含むSBS中で好気的にインキュベートすると，HAChU($[Ch]_o$=2.5$\mu$M)系によってSCG内に取り込まれ蓄積された$^{3}$H-Chの量は，intact SCGの場合と比較してやや減少して認められた。しかし，このSCGによるACh分画へのincorporationは，ほぼ完全に近く抑制された状態であった。このことはCh基質からAChが生合成される部位は，コリン作動性神経末端に局在するChATによって特徴的におこなわれるという従来の主張が確かめられたことになる。しかし，ChからPth-Chへのincorporationはintact SCGの場合よりはやや減少したが，P-Chへのincorporationはほとんど変化しなかった。一方，LAChU($[Ch]_o$=100$\mu$M)で取り込まれたChは，Chのままdenervated SCG内に大部分蓄積されていた。また，P-Chへのincorporationはほとんど変わらなかったが，Pth-Chへのincorporationは明らかに減少した。また，AChの生合成も非常に低下していたが，HAChU系で取り込まれた場合よりも少しは認められた。したがって，denervated SCG内にLAChUで取り込まれたChからはわずかながらACh合成も行われるが，それはコリン作動性神経末端以外でおこなわれている可能性がある。また，Ptd-Chへのincorporationは一部神経末端膜でおこっていることが推察される。

<u>節後神経切断手術の影響：</u> Axotomy手術後1週間のSCGでは，交感性ニューロン細胞体の逆行性変性と反応性の非ニューロン細胞(グリア)の著明な増殖がおこることが報告されている。この標本では，HAChUでもLAChUでも生合成系は比

較的保たれているのが認められた(図1)。しかし，SCGではintact SCGに比べてPtd-Ch分画への$^{3}$H-Chのincorporationが，HAChU系よりもLAChU系で著明に減少しているのが認められた(図2)。このことからSCG内に取り込まれたChはリン酸化されたのちPtd-Chにincorporateされたのちかなりの部分のニューロン細胞膜の構成成分として沈着している可能性が示唆された。

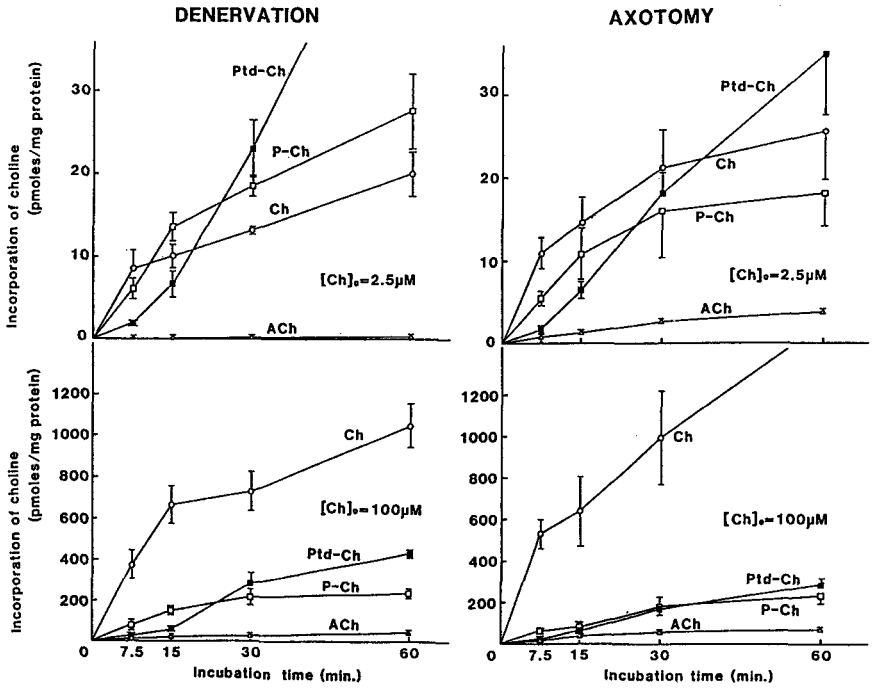



図1
摘出SCG内コリン代謝物質内へのコリン取り込みとincorporationの経時的変化

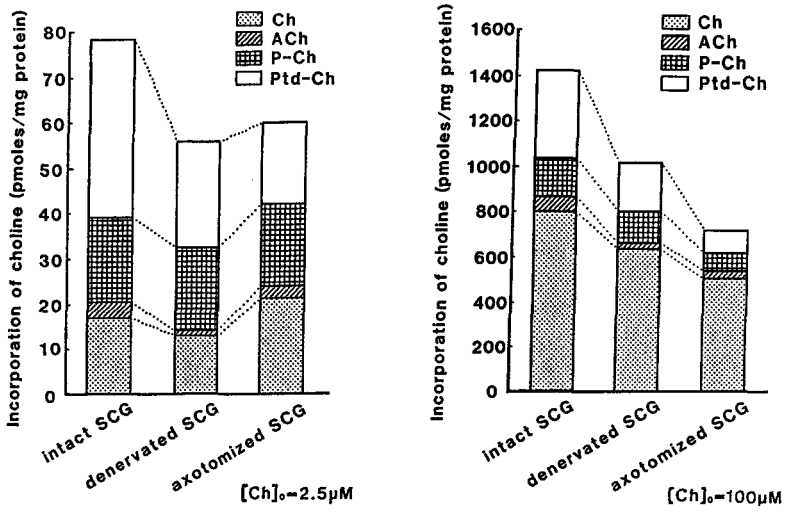



図2
摘出SCG内コリン代謝物質へのコリン分布に及ぼすdenervation及びaxotomy手術の影響

[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) Burt,A.M. et.al (1975) Anal. Biochem. 65:215-224. 4) Haga,T. & Noda,H. (1973 ) Biochem. Biophys. Acta. 291:564-575. 5) 岩田 光良 他 (1987) 神経化学 27:430-431. 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) Nagata,y. & Tsukada,Y. (1968) Expl. Brain Res. 5: 202-209.

# 85 ＮＭＤＡレセプター複合体の神経化学的性質

米田幸雄、荻田喜代一、鈴木竹雄、香山知子

（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕

N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)感受性レセプターと連関するイオンチャンネルの指標である、[$^3$H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801)の結合活性は、脳シナプス膜標品のTriton X-100前処理により著しく低下した。L-グルタミン酸(Glu)の添加によりこの活性低下は一部回復したが、グリシン(Gly)をさらに添加すると活性はTriton X-100処理をしない膜標品レベルにまで回復した。前処理をしない膜標品においても、GluおよびGlu/Glyは活性増強を誘発したが、その増強作用は結合速度の上昇に起因するものであり、定常状態レベルは両アミノ酸により影響されなかった。一方、Triton X-100 処理膜では結合速度と定常状態レベルが共に、GluおよびGlu/Glyの添加により増強された。また、非処理膜標品を各種のSH基修飾剤で前処理すると、Glu依存性活性は有意に阻害されたが、Gly依存性活性には著しい変化は見いだせなかった。さらに、SH基修飾剤処理は[$^3$H](±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (CPP)結合を有意に低下させたが、[$^3$H]Glu結合および[$^3$H]Gly結合には影響を与えなかった。したがって、[$^3$H]MK-801結合活性に対するGluおよびGlyの増強作用は、いずれも結合速度の上昇に起因するものと推察される。

筋弛緩作用を持つMK-801は、興奮性アミノ酸レセプターのサブタイプの一つであるNMDA感受性レセプターに対する非競合的アンタゴニストとしての作用を持つばかりでなく(6)、その結合活性は同レセプターと連関するイオンチャンネルの活性化状態を反映することが示唆されている(7,4)。同サブタイプはさらに、ストリキニーネ非感受性Gly結合部位($Gly_S$)(1)との間にレセプターチャンネル複合体を形成し、この複合体が脳内での興奮性シナプス伝達に重要な役割を演じるものと推察される(5,8)。したがって本研究では、本レセプター複合体の生理的意義追求の目的で、[$^3$H]MK-801結合活性の生化学的諸性質について検討を加えた。

[実験方法]

ラット全脳より調製したシナプス膜標品を、洗浄・凍結・融解・洗浄ののち、必要に応じて0.08% Triton X-100による前処理を行った。また、SH基修飾剤による前処理はTriton X-100非処理膜標品を用いて、30℃で30分間行った。[$^3$H]MK-801結合活性(9)および[$^3$H]Glu結合(2)、[$^3$H]CPP結合(3)、[$^3$H]Gly結合(1)の測定は、それぞれ既報の方法に準じて行った。

[実験結果]

シナプス膜標品のTriton X-100処理により[$^3$H]MK-801結合活性は著明に低下したが、この低下はGlu (10 μM)およびGly (10 μM)の添加により完全に回復した(図1)。しかしながら、Gly単独の添加は活性に対して著明な影響を及ぼさなかった。Triton X-100非処理膜標品では、アミノ酸非添加時は反応開始後90分の時点でも活性は定常状態に到達しなかったが、Glu添加時には約60分で活性は定常状態に到達した。さらにGlyを添加すると結合速度が著しく増加し、反応開始後約20分で活性は平衡状態になった(図1)。一方、Triton X-100処理膜標品では結合速度が非常に遅く、いずれの条件下でも活性の定常状態は観察されなかった。但し、Glu/Gly添加時は反応開始後90分の時点では非処理膜標品との間に有意な変化は認められなかった。この90分の時点で見かけ上のScatchard解析を行うと、いずれの条件下でも単一成分系の直線が得られた(図2)。アミノ酸非添加時(Kd = 88.0±9.4 nM, Bmax = 0.56±0.06 pmol/mg protein)の活性に対して、Gluは親和力と最大結合部位数の両者を共に増加させたが(Kd = 18.9±1.9 nM, 0.85±0.07 pmol/mg protein)、Glu/Glyの添加は結合部位数のみを増加させ親和力には有意な変化を与えなかった(Kd = 16.2±2.9 nM, Bmax = 1.14±0.10 pmol/mg protein)。次いで、本レセプター複合体における遊離SH基の意義を追求する目的で、Triton X-100非処理膜標品を用いて各種SH基修飾剤の影響について検索を進めた。GluおよびGly共存下の[$^3$H]MK-801結合活性について、両アミノ酸の効果が最も顕著にみられ

図１．反応温度の影響

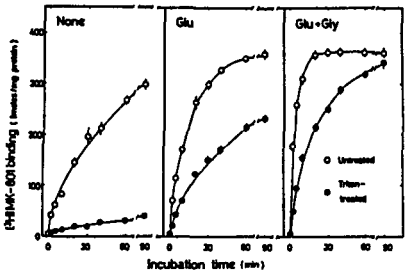



図２．Scatchard解析

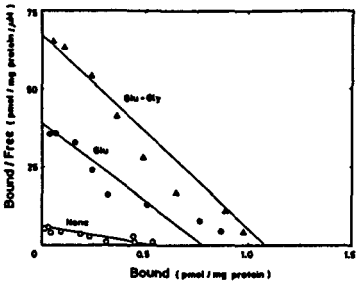



図３．各種SH基修飾剤の影響

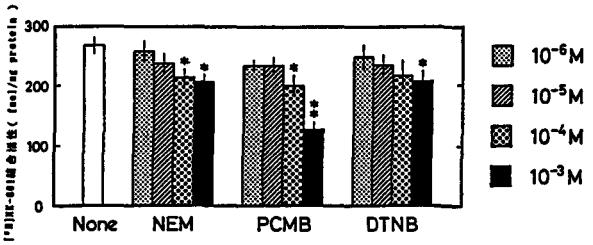



表１．各種SH基修飾剤の影響

| ( log M ) | [³H]Glu結合 | [³H]CPP結合 ( % of control ) | [³H]Gly結合 |
|---|---|---|---|
| Control | 100.0± 14.3 | 100.0± 16.( | 100.0± 10.0 |
| NEM | | | |
| (-5) | 102.4± 10.8 | 86.8± 10.2 | 90.9± 5.4 |
| (-4) | 97.7± 6.5 | 62.8± 0.8 | 97.5± 10.0 |
| (-3) | 104.9± 11.7 | 52.0± 4.0* | 98.4± 3.8 |
| PCMB | | | |
| (-5) | 102.7± 5.2 | 90.2± 3.3 | 98.0± 3.9 |
| (-4) | 93.5± 7.8 | 75.7± 2.7 | 93.7± 7.0 |
| (-3) | 75.5± 8.0 | 29.4± 6.5** | 86.9± 1.4 |
| DTNB | | | |
| (-5) | 109.0± 4.9 | 87.9± 5.3 | 89.6± 4.3 |
| (-4) | 109.0± 6.0 | 58.7± 2.1* | 88.4± 7.9 |
| (-3) | 108.6± 4.4 | 52.7± 5.1* | 84.0± 1.4 |

た反応開始後10分の時点で検討したところ、いずれの薬物も活性を有意に阻害することが明かとなった(図3)。[³H]CPP結合に対してこれらの薬物は同様に有意な阻害作用を示したが、[³H]Glu結合および[³H]Gly結合は共にSH基修飾薬による有意な影響を受けなかった(表1)。

[考察]

本研究により、GluやGlyによる[³H]MK-801結合活性の増強は、結合速度の上昇に起因するものであり、定常状態レベルは両アミノ酸によっても影響されないことが判明した。この事実は、これらのアミノ酸が本イオンチャンネルの開放速度を促進することを意味するのかも知れない。また、SH基修飾剤の影響が異なって出現したことは、[³H]Glu結合部位と[³H]CPP部位との間の相違を示唆するものである。今後両結合部位の性質についてさらに詳細な解析が必要であろう。

[謝辞]

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(01571229)の援助のもとに行った。

[文献]

1. Ogita, K., Suzuki, T. and Yoneda, Y. (1989) Neuropharmacol. in press.
2. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
3. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1989) Brain Res. in press.
4. Reynolds, I.J., Murphy, S.N. and Miller, R.J.(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7744-7748.
5. Robinson, M.B. and Coyle, J.T. (1987) FASEB J. 1, 446-455.
6. Wong, E.H.F., Kemp, J.A., Priestley, T., Knight, A.R., Woodruff, G.N. and Iversen, L.L. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 7104-7108.
7. Wong, E.H.F., Knight, A.R. and Woodruff, G.N.(1988) J. Neurochem. 50, 274-281.
8. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T. (1988) Neurotransmitters: Focus on Excitatory Amino Acids (Kanazawa, I., ed.), pp.47-65, Excerpta Medica, Tokyo.
9. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Brain Res. in press.

# 86 NMDAレセプター複合体に対するグアニンヌクレオチドの影響

荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
Triton X-100処理したラット脳シナプス膜標品への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、ストリキニーネ非感受性 [$^3$H]グリシン(Gly) 結合、および[$^3$H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合活性におけるGlu とGly の増強作用に対する種々のグアニンヌクレオチドの影響を検討した。[$^3$H]Glu結合はGDP 、GTP 、 GTPγS 、およびGppNHpにより強く阻害されたが、GMP の結合阻害作用は弱かった。Scatchard 解析より、GTP の結合阻害作用は親和力の低下に起因することが判明した。一方、[$^3$H]MK-801 結合活性に対するGlu の増強作用は、GDP 、GTP 、 GTPγS 、およびGppNHpの添加により抑制された。これに対して、グアノシン、GMP 、cGMP、アデノシン、ATP 、ADP 、あるいは、AMP などはGlu の活性増強作用に対して著変を与えなかった。また、[$^3$H]MK-801 結合活性のGly による活性増強に対して、GTP は著明な変化を与えないことが明らかとなった。さらに、GTP は[$^3$H]Gly結合に対しても有意な阻害作用を示さなかった。以上の結果より、NMDAレセプター機構にGTP 結合蛋白質が関与する可能性が示唆される。

興奮性アミノ酸レセプターのサブタイプの一つであるNMDAレセプターの活性化は、直接的にカチオンチャンネル(NMDA チャンネル) を開放して、$Na^+$イオンと$Ca^{2+}$ イオンの流入を惹起するが(2) 、そのNMDAチャンネルの開放はGly により増強されることが示されている(1) 。また、抗けいれん作用を持つMK-801の結合活性はNMDAアゴニストで増強され、さらにGlu 共存下でGly による活性の増強が観察される(5) 。このような事実はNMDAレセプターがアゴニスト認識部位、Gly による調節部位(GlyB 部位) 、およびカチオンチャンネルによる複合体を形成していることを示唆するものである(8,9) 。

一方、NMDA感受性[$^3$H]Glu結合は$Na^+$ イオンにより阻害されるとともに、GTP によっても強く抑制されることから、NMDAレセプターとGTP 結合蛋白質との間の連関機構が推察される(3,4) 。したがって、本研究ではNMDAレセプター機構におけるGTP 結合蛋白質の関与の可能性を追究する目的で、NMDA感受性[$^3$H]Glu結合、[$^3$H]Gly結合、および[$^3$H]MK-801 結合活性に対する種々のグアニンヌクレオチドの影響を検討した。

〔実験方法〕
Wistar系雄性ラット(200-250 g) の全脳から調製した粗シナプス膜標品を、50 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)を用いて 3回洗浄した。最終標品は0.32 Mショ糖水溶液に懸濁して-80 ℃で凍結保存した。使用時には懸濁液を室温融解した後に、0.08% Triton X-100で 2℃、10分間の処理を行った。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。[$^3$H]Glu(6) および[$^3$H]Gly結合実験(7) は、それぞれ10 nM [$^3$H]Glu(ARC、60 Ci/mmol) および10 nM [$^3$H]Gly(ARC、40 Ci/mmol) と膜標品を上記緩衝液中で 2℃、10分間反応させて行った。また、[$^3$H]MK-801 結合活性の測定は、5 nM [$^3$H]MK-801(NEN、15 Ci/mmol) と膜標品を、30℃、30分間反応させて行った。反応停止はいずれの結合実験の場合も、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。

〔実験結果〕
NMDA感受性[$^3$H]Glu結合はGTP およびGDP の添加により有意に阻害され、そのIC$_{50}$ 値はそれぞれ8.81および23.8μM であった (図1)。また、非水解性GTP アナログである GTPγS やGppNHpも結合を阻害した。それに対してGMP の結合阻害作用は極めて弱く、またグアノシン、cGMP、アデノシン、AMP 、ADP 、ATP 、CTP 、ITP 、およびUTP は結合に対して有意な変化を与えなかった。[$^3$H]Glu結合のKd値およびBmax値は、それぞれ22.4±0.3 nMおよび1.9±0.1 pmol/mg protein であった。GTP($10^{-5}$ M) を添加した場合、そのKd値は61.3±1.5 nMに増大するのに対して、Bmax値は 2.1±0.1 と有意な変化は認められなかった。Triton X-100前処理膜標品への[$^3$H]MK-801 結合活性は極めて弱いが、Glu をはじめとするNMDAアゴニストを添加すると活性は著明に増強された。このGlu による増強能(EC$_{50}$値) はGTP ($10^{-6}$ -$10^{-4}$ M) により著明に減弱された (図2 、表1 ) 。このような抑制作用はGDP 、 GTPγS 、およびGppNHpにも顕著に認められたが、GMP や他の上記ヌクレオシドおよびヌクレオチドには抑制作用はほとんど観察されなかった。また、[$^3$H]MK-801 結合活性は Glu共存下でGly により著明に増強されるが、このGly の増強能に

図1．グアニンヌクレオチドの影響

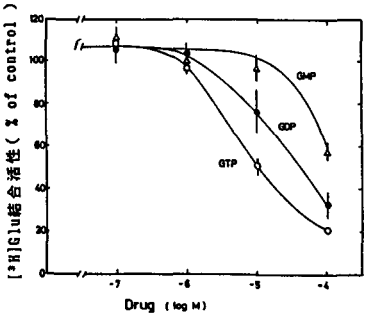



図2．Gluの増強作用に対するGTPの影響

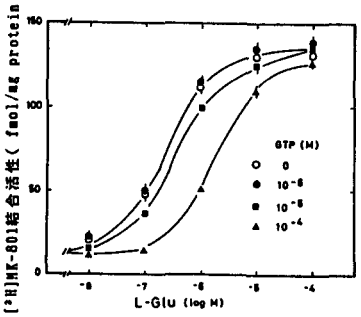



図3．Glyの増強作用に対するGTPの影響

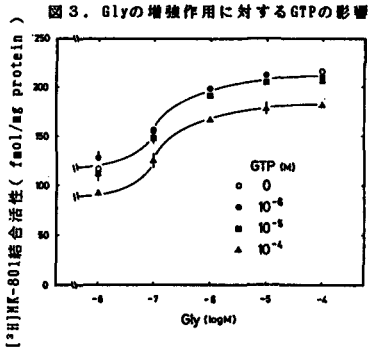



表1．[³H]MK-801 結合活性におけるGlu およびGly の増強作用に対するGTP の影響

| GTP (log M) | $EC_{50}$ (μM) | | Hill coefficient | |
|---|---|---|---|---|
| | Glu | Gly | Glu | Gly |
| None | 0.26±0.04 | 0.13±0.01 | 1.12±0.16 | 0.88±0.17 |
| -6 | 0.36±0.03 | 0.13±0.02 | 0.95±0.09 | 1.08±0.18 |
| -5 | 0.46±0.06* | 0.12±0.02 | 1.00±0.13 | 1.02±0.19 |
| -4 | 3.45±0.89** | 0.12±0.01 | 1.08±0.12 | 0.99±0.23 |

対してGTP は全く変化を与えなかった( 図3 、表1)。さらに、[³H]Gly結合に対するグアニンヌクレオチドの影響を検討した結果、GTP 、GDP 、およびGMP のいずれを添加($10^{-4}$ M)しても結合は全く変化を示さなかった。

〔考察〕

NMDAレセプター複合体にはアゴニスト認識部位、調節部位、およびカチオンチャンネルがあり、それぞれ[³H]Glu、[³H]Gly、および[³H]MK-801 で標識することができる。本研究におけるGTP 、GDP 、あるいは非水解性GTP アナログの選択的阻害作用から判断して、 GTPアナログはNMDAレセプター複合体上の調節部位には影響を与えず、アゴニスト結合の親和力を低下させることにより、NMDAチャンネルの活性化を抑制することが推察される。このことはNMDAレセプター機構に GTP結合蛋白質が関与する可能性を示唆するものである。しかしながら、NMDAレセプターのようなイオンチャンネルと直結した細胞内情報伝達系に GTP結合蛋白質が関与するという例は極めて少ない。したがって、最終的な結論を導くためには電気生理学的解析を含めた今後の詳細な研究が必要であろう。

〔謝辞〕

本研究の一部は文部省科学研究費(01772048)の援助のもとに行った。

〔文献〕

1. Johnson, J.W. and Ascher, P. (1987) Nature 325, 529-531.
2. MacDermott, A.B. and Dale, N. (1987) Trend Neurosci. 10, 280-283.
3. Monahan, J.B., Hood, W.F., Michel, J. and Compton, R.P. (1988) J. Pharmacol. Exp. Ther. 34, 111-116.
4. 大垣孝雄、荻田喜代一、米田幸雄 (1988) 神経化学 27, 402-403.
5. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1989) Brain Res. in press.
6. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
7. Ogita, K. Suzuki, T. and Yoneda, Y. (1989) Neuropharmacol. in press.
8. Robinson, M.B. and Coyle J.T. (1987) FASEB J. 1, 446-455.
9. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T.(1988) Neurotransmitter: Focus on Excitatory Amino Acids (Kanazawa, I. ed.), pp. 47-65, Excepta Medica, Tokyo.

# 87 Triton X－100処理シナプス膜標品の [$^3$H]TCP結合活性

荻田喜代一、鈴木竹雄、香田知子、米田幸雄
（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中の[$^3$H]N-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine(TCP)結合活性は若干の温度依存性を示したが、この温度依存性成分はDL-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid(CPP)、あるいはDL-2-アミノ-5-ホスホノ吉草酸(AP5)の添加により完全に消失した。反応温度2°Cの場合は、L-グルタミン酸(Glu)は結合に著変を与えなかったが、反応温度30°Cの場合はL-Gluは濃度依存性($10^{-8}$-$10^{-4}$M)の増強作用を発揮した。この時グリシン(Gly)が共存すると、L-Gluの増強作用はさらに増強された。L-アスパラギン酸(ASP)、D-ASP、D-Glu、L-ホモシステイン酸(HCA)、L-システインスルフィン酸(CSA)、およびL-システイン酸(CA)にも結合増強作用が観察された。さらに、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)、N-メチル-L-アスパラギン酸(NMLA)、あるいはキスカル酸(QA)も有意に結合を増強したが、DL-α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA)やカイニン酸(KA)にはこの様な作用は見い出せなかった。L-GluおよびGlyによる増強はいずれも、CPPや DL-AP5によって拮抗されたが、ストリキニーネは両アミノ酸の増強作用に対して著明な作用を発揮しなかった。以上の結果より、Triton X-100処理シナプス膜標品は、活性化状態のNMDAチャンネルの標識に有用であることが明かとなった。

解離性麻酔薬の一つであるフェンシクリジン(PCP)は、オピエートσ受容体のアゴニストとしての作用を持つことが知られている(7)。しかしながら、脳内のPCP結合部位は、σ受容体アゴニストであるN-アリル-ノルメタゾシン(SKF10,047)やシクラゾシンの結合部位とは、その薬理学的性質が異なると言う(5)。これらの事実は、PCPがσ受容体以外に独自の結合部位を有する可能性を示唆するものである。一方、興奮性アミノ酸受容体のサブタイプの一つである、NMDA受容体活性化に伴う電気生理学的反応が、PCPにより非競合的に遮断される(1,3)ことから、PCP結合部位とNMDA受容体との間の相関関係が注目されている現状である。したがって本研究では、PCP結合部位に対して親和性および特異性の高い[$^3$H]TCPをリガンドとして用いて、両結合部位の相互作用について解析した。

［実験方法］

50,000g、30分間の遠心分離操作を3回繰り返して洗浄したラット全脳粗シナプス膜標品を、0.32Mショ糖水溶液に懸濁状態で-80°Cにて凍結保存した。使用時には、本凍結懸濁液を室温で融解したのち、0.08% Triton X-100で2°C、10分間前処理した。上述の遠心分離洗浄操作を2回行ったのち、最終的に得られた沈渣は、50mMトリス酢酸緩衝液(pH7.4)に懸濁した。懸濁液は同緩衝液中で、5 nM [$^3$H]TCP (NEN, 60 Ci/mmol)と2°Cまたは30°Cで10分間反応させた。反応は0.1%ポリエチレンイミン処理をしたWhatman GF/B グラスフィルターによる吸引濾過法(9)で停止した。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］

反応温度を2°Cから30°Cに上昇させると結合活性は約2倍に増加したが、この温度依存性成分はNMDAアンタゴニストのCPP、あるいはDL-AP5の添加($10^{-8}$-$10^{-4}$M)により濃度依存的に阻害された。反応温度2°Cの場合は、L-Gluを添加しても活性に著変は見出せなかったが、反応温度30°Cの場合はL-Glu添加により活性は濃度依存的に増強された（図１）。この時に$10^{-5}$M Glyを添加すると、L-Gluの増強作用がさらに亢進された。L-Glu以外の化合物についても検索を進めたところ、L-Asp、D-Asp、L-HCA、L-CAおよびD-Gluの順に活性増強作用が観察された。さらに、NMDA、NMLA、QAも同様の増強効果を示したが、AMPAおよびKAは結合に著変を与えなかった（図2）。CPPやDL-AP5は濃度依存的に、L-GluおよびGlyの増強作用を阻止したが、Glyアンタゴニストとして知られるストリキニーネは、Glyの作用に対して拮抗作用を発揮しなかった（図3）。NMDA感受性[$^3$H]Glu結合(8)に対する各種化合物の阻害強

図1 Glu およびGly の影響

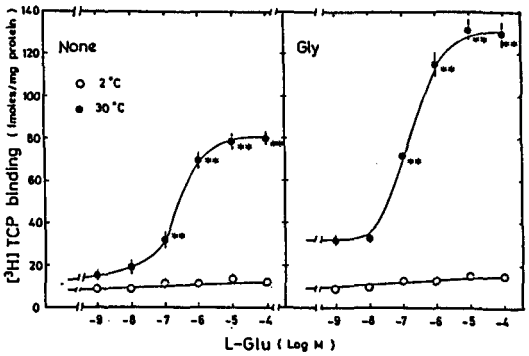



図2 Glu アゴニストの影響

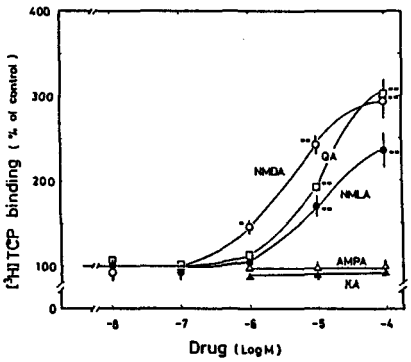



図3 各種アンタゴニストの影響

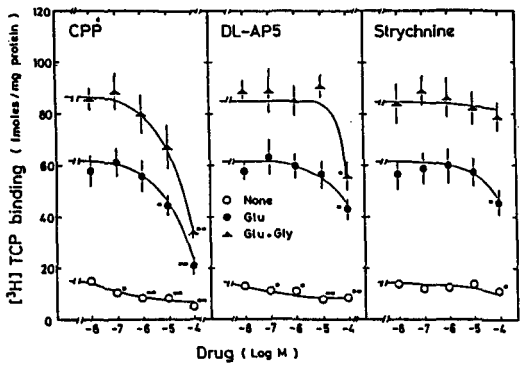
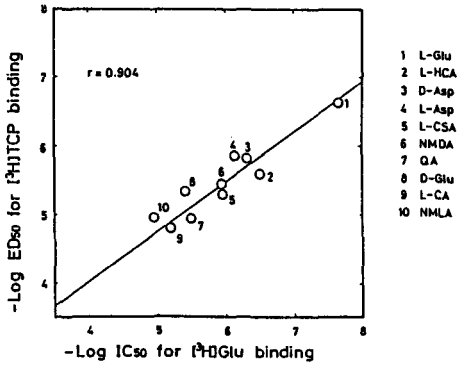



図4 NMDA受容体との相関関係




度と、[³H]TCP結合活性に対する増強強度の相関関係を分析したところ、両者の間には高い相関性があることが判明した（図4）。

［考察］

CPPやDL-AP5の効果から判断して、Triton処理膜標品中の温度依存性成分は、内在性のL-GluやL-Aspなどの結合活性増強物質に起因するものと思われる。QA受容体に特異性の高いアゴニストであるAMPAが活性に著変を与えない事実は、QAの非特異的作用による活性増強を示唆するものである。したがって本研究結果は、[³H]TCPが活性化状態のNMDAチャンネルを標識するとの仮説(2,6)を支持すると考えられる。また、Glyの活性増強作用が、NMDA反応に対するGlyの選択的増強作用(4)と同様に、ストリキニーネ非感受性であることを考え合わせると、NMDAチャンネルとストリキニーネ非感受性Gly結合部位の連関機構存在の可能性が示唆される。[³H]TCPにより標識されるPCP結合部位は、オピエートσ受容体よりはむしろ、NMDAチャンネルに極めて近い場所に存在すると考えるのが妥当であろう。これら各種の受容体結合実験が、脳内のNMDA受容体を介する神経情報伝達機構の解明に貢献することを期待したい。

［文献］

1. Anis, N.A., Berry, S.C., Burton, N.R. and Lodge, D. (1983) Br. J. Pharmacol. 79, 565-575.
2. Fagg, G.E. (1987) Neurosci. Lett. 76, 221-227.
3. Harrison, N.L. and Simmonds, M.A. (1985) Br. J. Pharmacol. 84, 381-391.
4. Johnson, J.W. and Ascher, P. (1987) Nature 325, 529-531.
5. Largent, B.L., Gundlach, A.L. and Snyder, S.H. (1986) J. Pharmacol. Exp. Ther. 79, 565-575.
6. Loo, P., Braunwalder, A., Lehmann, J. and Williams, M. (1986) Eur. J. Pharmacol. 123, 467-468.
7. Mendelsohn, L.G., Kalra, V., Johnson, B.G. and Kerchner, G.A. (1985) J. Pharmacol. Exp. Ther. 23, 597-602.
8. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
9. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1987) Biochem. Biophys. Res. Comm. 142, 609-616.

# 88 [$^3$H]グルタミン酸結合実験上の方法論的問題点

大垣孝雄＊、荻田　喜代一、米田　幸雄
（摂南大・薬・薬理、＊中央臨床研）

〔要約〕

[$^3$H]グルタミン酸(Glu)受容体結合実験の実験条件を再検討した。精製した[$^3$H]Gluを50 mMトリス酢酸緩衝液(pH7.4)中で反応させたのち、Whatman GF/B グラスフイルターによる吸引濾過法により反応を停止した。その結果、脳シナプス膜標品非添加条件下にもかかわらず、反応温度依存性、立体特異性、構造選択性、非可逆性、高親和性および飽和性を示す、見かけ上の特異的結合が検出された。脳内Glu受容体のアゴニストやアンタゴニストの中で、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)および(±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonate (CPP)以外の殆んど全ての化合物は、脳シナプス膜標品非存在下の本結合を阻害した。除菌フィルター(孔径、0.45μm)で濾過した緩衝液を用いると、この吸着反応は完全に消失した。以上の結果より、[$^3$H]Glu受容体結合実験は、緩衝液中に発生する微生物の蛋白分子によって大きく影響されることが明らかとなった。

哺乳動物脳内の神経情報伝達物質であるGluのシナプス受容体には、少なくとも三種類のサブタイプが存在することが提唱されている(1,3)。これらは、NMDA、キスカル酸およびカイニン酸などの外因性化合物に感受性の高い受容体として分類される。しかしながら、電気生理学的な研究では比較的統一的な結果が得られるのに対して、生化学的な受容体結合実験成績には数多くの矛盾点が見受けられる。例えば、NMDA受容体は通常の結合実験条件では検出できない場合が多い(5)。したがって本研究では、Glu受容体結合実験に繁用される実験条件の再点検を行った。

［実験方法］

[$^3$H]Gluの精製：市販の[$^3$H]Glu標品を、陽イオン交換樹脂（Dowex 50W×8, 200-400 mesh）を充填したカラム（5×50mm）に適用した。15 mlの水で溶出した後、0.5N HClで溶出される分画のうち、8 mlから14 mlの分画を集めて凍結乾燥した。乾燥後、残渣を0.01N HClに溶解して実験に用いた(4)。

結合実験：脳シナプス膜標品非存在下で、精製[$^3$H]Glu(10 nM)を50 mMトリス酢酸緩衝液(pH7.4)中で2°C、または30°Cで反応させた。反応停止は、Whatman GF/B グラスフィルターを用いた吸引濾過法(6)により行った。緩衝液としては、2°Cで1-2週間保存した500 mMトリス酢酸緩衝液(pH7.4)を、用時脱塩除菌蒸留水で希釈したものを用いた。

［実験結果］

脳シナプス膜標品非存在下で、精製[$^3$H]Gluを30°C、60分間、緩衝液中で反応させると、グラスフィルター上に極めて高い放射活性が検出された。反応を1 mM非放射性Glu共存下で行うと、この放射活性は著明に減少した。しかしながら、非放射性1 mM Gluで予め処理しておいたグラスフィルター上で反応を停止させた場合でも、同様に極めて高い放射活性が検出された。反応を2°Cで行うと放射活性の吸着は見いだせなかったが、反応温度30°Cの場合は反応開始後1分でも放射活性の吸着が認められた(図1)。この吸着量は反応時間と共に増加し、約40分で平衡状態となった。この平衡状態の時点(60分)で、高濃度の非放射性Gluを添加しても、吸着放射活性の急速な減少は起こらなかった(図1)。[$^3$H]Glu濃度の上昇に比例して吸着量も増加したが、200 nM以上では吸着は飽和性を示した(図2)。この結果をScatchard plotで解析すると、吸着は見かけ上のKd値、73±20 nMの単一成分から構成されることが判明した。吸着反応はL-Gluばかりでなく、L-アスパラギン酸、L-システインスルフィン酸、およびL-システイン酸の共存により著明に阻害されたが、これらの化合物のD体はL体に比べて阻害作用が弱かった。脳内Glu受容体のアゴニストやアンタゴニストとして分類される化合物の中で、NMDAとCPPを除く殆んどすべての化合物が本吸着反応に対する阻害能を持つことが判明した(表1)。反応に用いる緩衝液を使用直前に煮沸(100°C、30分)するか、あるいは除菌フィルター(孔径0.45μm)で濾過すると、吸着反応は完全に消失した(図3)。

［考察］

本研究により脳シナプス膜標品非存在下にもかかわらず、見かけ上の受容体結合が検出されることが明らかと

図1　反応温度の影響

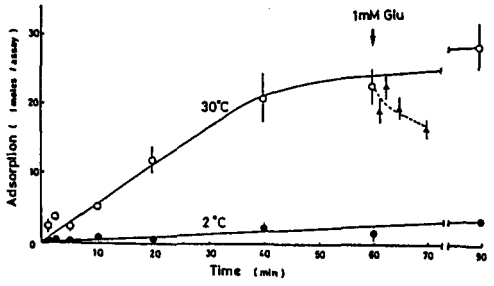



図2　リガンド濃度の影響

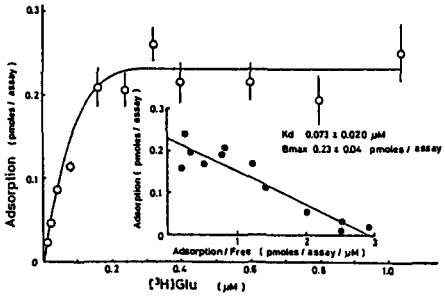
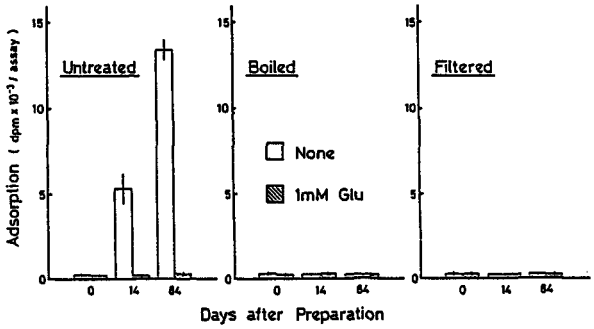



表1　各種化合物の影響

| Addition ($10^{-4}$ M) | Adsorption (% of control) | Addition ($10^{-4}$ M) | Adsorption (% of control) |
|---|---|---|---|
| None | 100 ± 5.6 | | |
| L-Glu | 0 | L-CySH | 78.5 ± 3.2 ** |
| D-Glu | 18.7 ± 4.9 ** | DL-HCySH | 44.9 ±12.7 ** |
| L-Asp | 0.4 ± 0.2 ** | L-HCA | 19.6 ± 7.6 ** |
| D-Asp | 47.0 ± 4.7 ** | L-Met | 40.3 ± 6.2 ** |
| L-CSA | 9.2 ± 2.1 ** | TAU | 62.1 ±10.3 ** |
| L-CA | 5.7 ± 0.6 ** | HTAU | 149.6 ±37.9 |
| | | CIN | 38.7 ± 2.6 ** |
| QA | 5.4 ± 1.5 ** | GSH | 9.2 ± 0.7 ** |
| AMPA | 58.4 ± 1.3 ** | | |
| NMDA | 96.3 ± 9.2 | GTP | 117.3 ± 7.4 |
| CPP | 100.5 ± 5.2 | | |
| KYNA | 95.0 ±15.1 | NBS | 5.8 ± 1.5 ** |
| α-AAA | 73.2 ±12.3 ** | NEM | 39.1 ±14.2 ** |
| MK-801 | 92.1 ±10.6 | DTNB | 144.2 ±25.2 |
| PCP | 53.2 ± 4.6 ** | PCMB | 54.6 ± 0.2 ** |
| KA | 72.2 ± 5.8 ** | DTT | 103.6 ±13.8 |
| GDEE | 32.1 ±10.1 ** | | |
| | | $NH_4Cl$ | 123.0 ±14.2 |
| DL-AP3 | 66.6 ± 4.1 ** | $Ca(CH_3COO)_2$ | 125.0 ±19.4 |
| DL-AP4 | 28.2 ± 5.8 ** | $CaCl_2$ | 114.3 ±17.3 |
| DL-AP5 | 34.9 ± 4.7 ** | $CH_3COONa$ | 84.5 ±22.5 |
| DL-AP6 | 24.5 ± 5.4 ** | | |
| DL-AP7 | 39.2 ± 5.9 ** | | |

図3　滅菌処理の影響




なった。本吸着物質はグラスフィルターやニトロセルロース膜に対しては強い吸着能を示すが、ポリプロピレン、あるいはポリエチレン製の遠心管には全く吸着しない。したがって、[³H]Glu受容体結合実験の反応停止法として遠心法を採用すると、本研究で観察されたような微生物由来の蛋白分子の関与には気付かないことになる。このことが、Glu受容体結合実験における数多くの矛盾点発生の要因の一つであることは、疑う余地がないように思われる(7)。事実、著者らは修正実験条件下では従来の報告に比べてはるかに高親和性(Kd=22.4±2.5 nM)で、かつNMDA感受性の高い[³H]Glu結合部位が検出されることを見いだしている(2)。脳内Glu受容体のアゴニストやアンタゴニストに分類される数多くの化合物が、この微生物由来蛋白分子に対して親和力を持つことが判明したので、Glu受容体関連物質の薬理学的特異性の再点検が早急に行われる必要があると思われる。

［謝辞］

本研究の一部は学校法人大阪工大摂南大学中央研究所一般助成金(89-603)の援助のもとに行った。

［文献］

1.Foster, A.C. and Fagg, G.E. (1981) 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, 164-204.

4.Yoneda,Y., Roberts, E. and Dietz, G.W. (1982) J. Neurochem. 38, 1686-1694.

5.Yoneda, Y., Ogita, K., Nakamuta, H., Koida, M., Ohgaki, T. and Meguri, H. (1986) Neurochem. Int. 9, 521-531.

6.Yoneda, Y. and Ogita, K. (1987) Brain Res. 400, 70-79.

7.Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Anal. Biochem. 177, 250-255.

# 89 キスカル酸感受性［$^3$H］グルタミン酸結合活性の可溶化

米田幸雄、荻田喜代一、大垣孝雄＊
（摂南大・薬・薬理、＊中央臨床研）

〔要約〕
ラット網膜、下垂体および副腎の膜標品を1% Nonidet P-40で処理した上清中には、透析前は[$^3$H]グルタミン酸(Glu)結合活性は見いだせなかったが、透析後の上清中には高い[$^3$H]Glu結合活性が検出された。本活性はいずれも、蛋白依存性、反応時間依存性、温度感受性、立体特異性、構造特異性、可逆性、飽和性および高親和性を示した。Gluレセプターサブタイプの三つのアゴニストの中で、キスカル酸(QA)は結合活性を強く阻害したが、他のアゴニストであるN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)やカイニン酸(KA)は活性に著変を与えなかった。しかしながら、QA感受性サブタイプに対する特異性の高いアゴニストのDL-α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionic acid (AMPA)は、QAとは異なり本結合活性に対する阻害作用を発揮しなかった。さらに、結合反応終了後の反応液を陽イオン交換クロマトグラフィー法で分析すると、[$^3$H]Glu以外に水で溶出される分画に高い放射活性が観察された。したがって、これらのQA感受性[$^3$H]Glu結合活性の少なくとも一部は、Glu代謝能をもつ膜結合型酵素の基質認識部位への結合を反映するものと思われる。

興奮性アミノ酸レセプターの生化学的指標としては、脳シナプス膜標品への[$^3$H]Glu結合が繁用されるが、本結合活性が単にレセプター部位への結合を反映するばかりでなく、再封入された小胞様構造におけるアミノ酸輸送系や、あるいは膜結合型酵素の基質認識部位への結合などを意味する可能性も無視することはできない。事実、塩素イオンにより著明に増強される脳シナプス膜への[$^3$H]Glu結合活性は、シナプスレセプターの活性よりはむしろ酸性アミノ酸の交換輸送活性と極めてよく一致することが知られている(1,3)。さらに、界面活性化剤で処理しない脳シナプス膜標品を用いた[$^3$H]Gluレセプターアッセイでは、反応中に極めて大量の放射性代謝産物の生成が認められる(2)。したがって本研究では、[$^3$H]Glu結合活性を有する神経組織として、網膜(4,5)、下垂体(6,7)および副腎(8,9)を取り上げ、その[$^3$H]Glu結合活性の可溶化に着手した。

[実験方法]
各神経組織より調製した膜標品を十分に洗浄後、2℃、60分間1% Nonidet P-40と反応させた。反応を100,000 g、60分間の遠心分離により停止したのち、0.2% Triton X-100, 0.1 mM PMSF, 0.02% bacitracin および0.1 mM EGTA を含有する 50 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)中で14時間透析した。この透析操作を三回繰り返したのち、可溶化標品を10 nM [$^3$H]Glu と2℃または30℃で60分間反応させた。反応は予め0.3%ポリエチレンイミンで処理した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(10)。また、50,000 g 、30分間の遠心分離により反応停止を行った上清を、Dowex 50W x 8 (200-400メッシュ) 樹脂を充填(5 x 20 mm)したプラスチックカラムに適用した。カラムは最初脱イオン蒸留水で溶出し、次いで0.5 M HClで溶出した。0.5 mlの各分画についてその放射活性を測定した(5)。

[実験結果]
各可溶化標品中の[$^3$H]Glu結合活性はいずれも反応温度感受性を示し、反応温度を2℃から30℃に上昇させると活性は約10倍増加した(図1)。反応温度30℃の場合は活性は反応時間と共に増加し、反応開始後60分までに定常状態に到達した。この時に非放射性高濃度Gluを添加すると活性は速やかに減少し、添加後20分以内に非特異的結合レベルにまで低下した。リガンド濃度の上昇に伴い活性は増加し、600 nM以上では飽和性を示した。これらのデータをScatchard解析すると、いずれの神経組織においても結合部位は単一成分より構成されることが判明した(表1)。L-GluやL-アスパラギン酸(L-Asp)は、それぞれのD異性体よりもはるかに強い濃度依存的結合阻害作用を発揮した。Gluレセプターアゴニストの中で、QAは濃度依存的に結合活性を阻害したが、QA感受性レセプターに対する特異性の高いAMPAは活性に影響を与えなかった。一方、他のアゴニストであるNMDAやKAは活性に対して著変

表1 結合定数

| | Kd (μM) | Bmax (pmol/mg protein) |
|---|---|---|
| 網膜 | 0.25 ± 0.03 | 57.4 ± 7.9 |
| 下垂体 | 0.34 ± 0.07 | 53.6 ± 9.6 |
| 副腎 | 0.15 ± 0.03 | 35.9 ± 7.6 |

図1．反応時間の影響

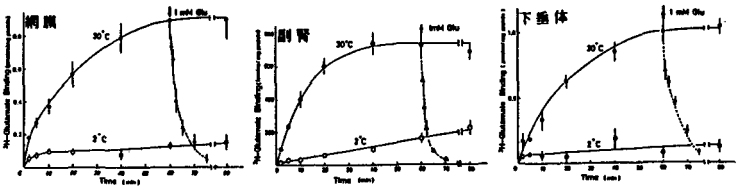
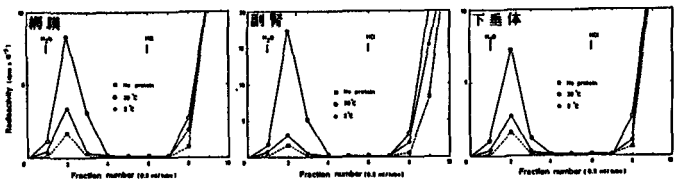



表2 各種アゴニストおよびアンタゴニストの作用

| | [3H]Glu結合活性(% of control) 網膜 | 下垂体 | 副腎 |
|---|---|---|---|
| control | 100.0 ± 8.5 | 100.0 ±12.7 | 100.0 ±10.3 |
| QA(Sigma) | 33.7 ± 9.7 | 33.1 ± 1.2 | 8.1 ± 8.5 |
| QA(CRB) | 35.4 ± 1.1 | 25.1 ± 7.2 | 34.2 ± 4.6 |
| AMPA | 109.8 ±11.5 | 96.6 ±12.8 | 93.7 ± 5.6 |
| NIL | 107.4 ± 5.3 | 81.2 ± 3.6 | 98.8 ± 5.1 |
| CPP | 100.7 ± 8.7 | 92.8 ±17.8 | 98.1 ± 2.9 |
| α-AAA | 94.6 ± 8.6 | 105.0 ± 7.8 | 100.6 ± 7.8 |
| γ-DGG | 106.8 ± 8.6 | 94.8 ± 2.8 | 93.4 ± 3.5 |
| PCP | 104.9 ± 8.7 | 90.8 ±12.1 | 96.5 ± 1.7 |
| MK-801 | 114.6 ± 8.1 | 102.3 ± 5.9 | 107.8 ± 3.6 |

図2．放射性代謝産物の生成




を与えなかった。また、NMDAレセプターの競合的アンタゴニストのCPPやα-AAA,γ-DGG、あるいは非競合的アンタゴニストであるPCPやMK-801なども有意な作用を示さなかった(表2)。これら三つの神経組織の可溶化標品を用いた反応液を陽イオン交換クロマトグラフィー法により分析すると、いずれの組織の場合でも[$^3$H]Glu以外に水で溶出される分画に高い放射活性が検出された(図2)。

[考察]

界面活性化剤により可溶化されたことは、本研究で測定された[$^3$H]Glu結合活性がGlu輸送系に由来するものではないことを支持するものである。しかしながら、その薬理学的特性や放射性代謝産物の生成等を考慮すると、本結合活性はGluシナプスレセプターよりはむしろGlu代謝能をもつ膜結合型酵素の基質認識部位への結合を意味すると考える方が妥当であろう。したがって、内在性リガンドを用いたレセプターアッセイの結果の解釈には、十分な留意が必要だと思われる。

[謝辞]

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(01571229)の援助のもとに行った。

[文献]

1. Kessler, M., Baudry, M. and Lynch, G. (1987) Neurosci. Lett. 81, 221-226.
2. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
3. Pin, J.-P., Bockaert, J. and Recansens, M. (1984) FEBS Lett. 175, 31-36.
4. Yoneda, Y., Ogita, K., Nakamuta, H., Fukuda, Y., Koida, M. and Ogawa, Y. (1987) Biochem. Pharmacol. 36, 772-774.
5. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) J. Neurochem. 52, 1501-1507.
6. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1986) Neurosci. Res. 3, 430-435.
7. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Neuropharmacol. in press.
8. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1986) Brain Res. 383, 387-391.
9. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1987) Brain Res. 406, 24-31.
10. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1987) Biochem. Biophys. Res. Comm. 142, 609-616.

# 90 Xenopus卵母細胞に発現した各種興奮性アミノ酸受容体に対するDIDSの選択的抑制効果

吉井清哲、高杉あおい、栗原堅三
（北海道大学、薬学部）

〔要約〕

ラット脳mRNAを注入することによりXenopusの卵母細胞に発現した興奮性アミノ酸受容体に対する4,4-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid(DIDS)の効果を電位固定下で調べた。1)卵母細胞は、興奮性アミノ酸受容体のionotropicなサブタイプ3種（カイニン酸受容体、キスカル酸受容体、NMDA受容体）とmetabotropicキスカル酸受容体を発現した。2)この卵母細胞を1 μM DIDSで10分間処理することによって、カイニン酸受容体の応答は不可逆的に抑制されたが、キスカル酸受容体、NMDA受容体の応答には影響を与えなかった。3)DIDSは、metabotropicキスカル酸受容体(mQR)に対しても不可逆的な抑制効果を示したが、1 μMではその程度は小さく、明瞭に抑制するためには10 μMを必要とした。これまでカイニン酸受容体をキスカル酸受容体と区別して抑制する物質の報告はなく、DIDSが初めての例である。またDIDSは、mQRに対して初めて発見された阻害剤である。

ionotropicな興奮性アミノ酸受容体は、アゴニストを基準としてＮＭＤＡ型、キスカル酸型、カイニン酸型の三種に分類されている。これらのうちNMDA受容体については、各種のアンタゴニストが開発されておりよく研究されている。また、キスカル酸受容体は、クモ毒によって不可逆的に抑制されることが発見された[1]。しかし、カイニン酸受容体を選択的に抑制する物質については、少なくとも演者らの知る限りでは、報告されていない。

ラット脳より抽出したmRNAを注入されたXenopus卵母細胞は、上述の3種の興奮性アミノ酸受容体のサブタイプを生産し、脳ではその存在が知られていなかったmQRも生産する[4]。我々は、この卵母細胞の翻訳系を用いてDIDSの各種受容体に対する効果を電位固定下で調べた。

〔方法〕

mRNAは、グアニジン／Cs法で10日齢ラットの全脳より抽出した[3]。卵母細胞は、コラゲナーゼ処理によって ロ胞層を除き、mRNA注入後3日間20 ℃で培養し、電位固定下で発現した各種受容体の応答を測定した[5]。実験には、以下の組成の生理的塩類溶液(96 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.3 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES (pH 7.4))を用い、NMDAを除く各種薬物はこの溶液に溶かして与えた。NMDAに関する実験は、Mgを含まない上記の溶液を用いて行った。

〔結果および考察〕

1．各種ionotropic受容体に対するDIDSの効果

図1は、3種の受容体の応答パターンを示している。100 μMのカイニン酸、NMDA、および(RS)-α-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionic acid (AMPA,キスカル酸受容体のアゴニスト)は、いずれも刺激直後になめらかに増加する内向き電流を発生する（図1上段）。図では上向きを負とし、スケールはカイニン酸、NMDAに対して100 nA、AMPAに対して10 nAを示している。この卵母細胞を1 μM DIDSで10分間処理した後、DIDSを洗い流してから各種アゴニストで刺激するとカイニン酸に対する応答のみが選択的に抑制された（図1下段）。抑制された応答は、30分間の洗浄後も回復しなかった。DIDSの抑制効果は、処理時間と濃度に依存して増大した。

DIDSは、赤血球等においてはClイオンの輸送を阻害する[2]。カイニン酸によって生じるイオン電流の逆転電位は、

0 mV 付近にあり、Cl濃度を変えても変化しなかったことから、この電流に対するClイオンの寄与は無視できることがわかった。したがってDIDSによる抑制効果は、チャネルブロッカーとしての作用では説明できない。DIDSにはアミノ基修飾作用があるので、不可逆的抑制効果は、カイニン酸受容体蛋白質のアミノ基に対する修飾作用に由来するものと思われる。

2．DIDSのmetabotropicキスカル酸受容体(mQR)に対する抑制効果

mQRの応答は、図2 Aに示したように、1)長い潜時を持つ、2)電流が振動するという点ですでに述べたionotropic受容体の応答と異なっている。DIDSはこのmQRの応答も不可逆的に抑制したが、カイニン酸受容体に対する場合より強い条件（10 μM DIDS 10分間処理）を必要とした（図2 B）。高濃度のキスカル酸(100 μM)は、ionotropicキスカル酸受容体も刺激するが（図2 C）、DIDSはこれを抑制しなかった（図2 D）。このことは,AMPAを用いて得た結果とよく一致している。

mQRは、G蛋白質／$IP_3$を介して細胞内Caを上昇させることによって、卵母細胞では Cl イオンの透過性を上昇させる[4]。DIDSは赤血球等ではClイオンの輸送を阻害することから、DIDSは卵母細胞でもClチャネルを阻害することによってmQRの応答を抑制していることが考えられた。しかし、この可能性は以下のことから否定された。1)卵母細胞に発現したムスカリン性アセチルコリン受容体やセロトニン受容体もmQR同様にG蛋白質/$IP_3$/Caを介してClチャネルとカップルしているが、DIDS のこれら受容体に対する抑制効果は可逆的なものであった。2)DIDSで処理した卵母細胞にCaイオンを注入するとCl電流が生じた。したがってmQRに対するDIDSの作用も、受容体蛋白質のアミノ基に対する修飾作用によるものと思われる。

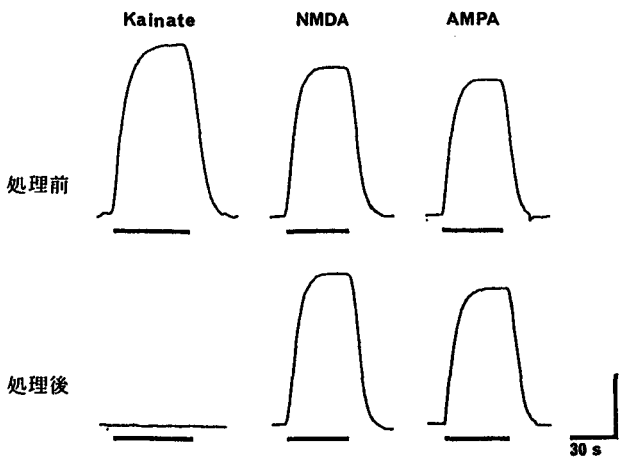



図1．各種興奮性アミノ酸受容体に対するDIDSの効果
静止電位(-50 mV)に電位固定。

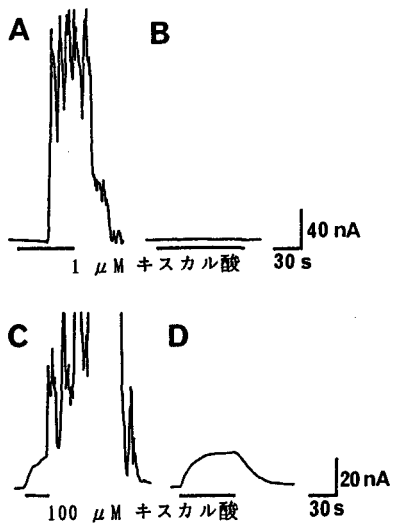



図2．metabotropic キスカル酸受容体に対するDIDSの抑制効果
静止電位(-48 mV)に電位固定、

〔文献〕

1. Abe, T., Kawai, N. and Miwa, A., (1983) J. Physiol., Lond., 339, 243-252

2. Cabnatchik, Z.I., Knauf, P.A., and Rothstein, A. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 515, 239-302

3. Davis, L.G., Dibner, M.D., and Battey, J.F. (1986) in "Method in Molecular Biology" Elsevier, New York

4. Sugiyama, H., Ito, I., and Hirono, C. (1987) Nature, 325, 531-533

5. Yoshii, K. and Kurihara, K. (1989) Synapse 3, 234-238

91

# ラット胃運動調節における5-HT$_3$受容体の関与

木村永一，　宮本　篤，　大鹿英世
〈札幌医大　・　薬理〉

〔要約〕

ラット胃運動調節における5-HT$_3$受容体の関与を検討した。摘出ラット胃動脈内へのSN-307(5-HT$_3$受容体遮断薬）の投与は、胃内圧および自動運動に二相性の変化を示した。すなわちSN-307は、$5x10^{-11}$molesで胃内圧を上昇させ自動運動を促進した。しかし、$5x10^{-9}$moles より高濃度になるに従い、胃自動運動は明らかに抑制され胃内圧を低下させた。5-HT($1.02x10^{-9}$moles)の胃動脈内投与は、胃内圧を一過性に上昇させた。SN-307は、$10^{-9}$M(槽内添加)以上で5-HTによる内圧上昇反応を著しく抑制した。[$^3$H]Cholineをpreloadした胃底部条片からのspontaneousな[$^3$H]effluxを、hemicholinium-3存在下で観察した。SN-307の累積的superfuseは、$10^{-9}$Mにより[$^3$H]effluxを明らかに増加させた。しかし、この増加は$10^{-7}$Mより消失した。以上の成績より、SN-307は胃壁内コリン作動性神経に局在する5-HT$_3$受容体に作用することにより、ACh遊離および胃運動を調節するものと示唆された。

〔目　的〕

胃運動は、中枢性及び末梢性の神経性調節に加えて内因性活性物質による体液性調節を受けている。消化管は元来5-HT含量の多い組織として知られており、5-HTの消化管運動への関与は、直接平滑筋を収縮させる(1)ほか、choline作動性ニューロンよりのACh放出を増加させる(2)ことにより、運動の促進をもたらすと考えられている。近年5-HT受容体は、種々の5-HT受容体に特異的に結合する薬物が合成されたことにより、現在5-HT$_{1A,1B,1C,1D}$, 5-HT$_2$および5-HT$_3$のサブタイプに分類されている(3)。SN-307 (英国名GR38032F)は、強力かつ選択性の高い競合的5-HT$_3$受容体遮断薬であり、迷走神経や上頸神経節標本で、 5-HTで引き起こされる脱分極作用に拮抗すること(4)、5-HTや2-methyl-5-HT (5-HT$_3$ agonist)によるモルモット回腸縦走筋の収縮を抑え、ラット胃排出能を促進させること(5)などが知られている。本研究は、ラット胃運動の調節機構における5-HT$_3$受容体の役割を検討した。

〔方　法〕

実験には、Wistar系雄性ラット(280 - 340g)の摘出胃を使用した。

（Ⅰ）摘出胃内圧測定：ラットを麻酔後、食道の一部と十二指腸を含め胃を摘出した。胃標本は、Van Nueten and Janssen(6)の方法に準じて作製した。すなわち胃内をTyrode液で洗浄後、十二指腸より内圧測定用カニューレを挿入し幽門部に装着した。次に10mlのTyrode液で胃内を満たして食道を結紮し、胃標本をマグヌス槽内（70 ml Tyrode液，37℃）に懸垂した。胃内に一定圧（3cm $H_2O$）をかけ、トランスデューサー（日本光電，TNF）を介し胃内圧の変化を記録した。薬物は、左胃動脈内およびマグヌス槽内に10分間隔で投与した。

（Ⅱ）摘出胃筋条片からの[$^3$H]ACh放出の測定：粘膜を除去した胃底部条片を、Tyrode液中の[$^3$H]choline(3.2 $\mu$Ci/ml)と37℃，1 hr incubateした。15min間fresh Tyrode液で洗浄後、条片を装置に固定し、hemicholinium-3(10 $\mu$M)を含むTyrode液(37℃)を1ml/minのflow rateでsuperfuseした。このsuperfusateを1 min毎に採取し、その放射活性を測定した(7)。薬物は、hemicholinium-3(10 $\mu$M)を含むTyrode液に溶解し、累積的に作用させた。

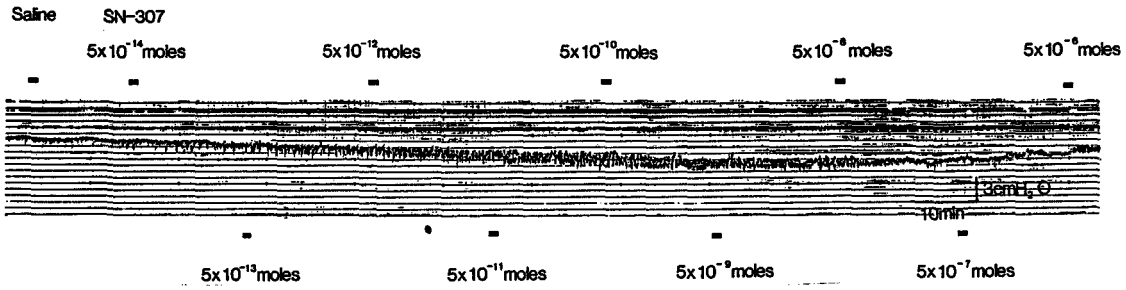



Fig. 1　Effects of intra-arterial SN-307 (50$\mu$l) on spontaneous contractile activity of the isolated rat stomach.

Table 1
Effects of various agents on 5-HT ($1.02\times10^{-8}$ moles, i.a.)-induced contractions in the isolated rat stomach.

| Drugs (in bath) | Maximum response ($cmH_2O$) |
|---|---|
| Control | 2.97 ± 0.18 |
| Hexamethonium ($2.5\times10^{-4}$g/ml) | 2.70 |
| Tetrodotoxin ($10^{-7}$g/ml) | 3.00 |
| Atropine ($10^{-7}$M) | 1.60 |
| SN-307 ($5\times10^{-7}$M) | 2.87 ± 0.85 |
| SN-307 ($1\times10^{-6}$M) | 1.37 ± 0.22* |
| SN-307 ($5\times10^{-6}$M) | 1.38 ± 0.33* |

*p<0.01, as compared to control.

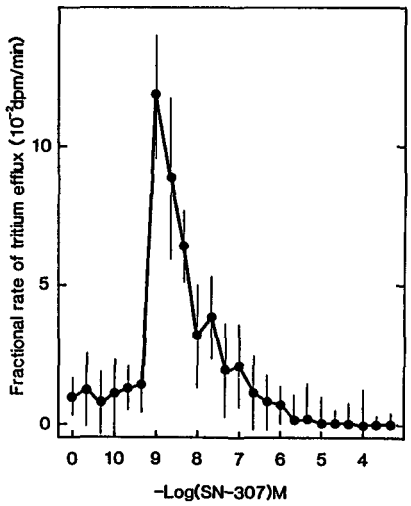



Fig. 2 Effects of SN-307 on spontaneous tritium outflow from rat stomach fundic strips preloaded with [$^3$H]choline.

〔結　果〕

自動運動および胃内圧変化の比較的一定した標本を用いて、SN-307 の作用を検討した。濃度の異なる SN-307（$5\times10^{-14}$～$5\times10^{-8}$moles）の溶液を胃動脈内に投与した際、胃内圧および自動運動に二相性の変化が認められた。すなわちSN-307は、$5\times10^{-13}$molesより胃内圧の僅かな上昇と自動運動を促進させ、$5\times10^{-11}$molesで明らかに胃内圧の上昇と自動運動を促進させた。しかし、$5\times10^{-8}$molesでは胃自動運動は明らかに抑制され、の際胃内圧の低下が認められた(Fig. 1)。一方5-HTの胃動脈内投与は、$1.02\times10^{-8}$molesで一過性の収縮に伴う胃内圧上昇を引き起こした。この作用は、hexamathonium ($2.5\times10^{-4}$g/ml)やtetrodotoxin($10^{-7}$g/ml)の槽内添加により影響を受けなかったが、atropine($10^{-7}$M)により僅かに抑制された。SN-307は$10^{-6}$M（槽内添加）より5-HTによる内圧上昇反応を著しく抑制した(Table 1)。[$^3$H]Cholineを取り込ませた胃底部条片からのspontaneous[$^3$H]effluxを、hemicholinium-3存在下で検討した。SN-307の累積的superfuseは、$10^{-6}$Mで最大の[$^3$H]effluxを引き起こした。しかし、このspontaneous[$^3$H]effluxの増加は、$10^{-7}$Mより抑制された(Fig. 2)。

〔考　察〕

摘出ラット胃に対して5-HT$_3$受容体遮断薬のSN-307は、濃度により内圧上昇に伴う自動運動の促進と内圧低下に伴う自動運動を抑制したことからSN-307の作用点は胃壁に内在すると推測された。SN-307の用量による胃内容排出能の促進と抑制は、生体位ラット(5)においても認められている。5-HTによる胃の一過性の内圧上昇は、SN-307で抑制された。これらの結果から、ラット胃に5-HT$_3$受容体が存在し、胃運動の調節に関与する可能性が考えられた。SN-307の胃運動に対する作用は、コリン作動性神経からのACh遊離を調節する可能性が考えられるが、その直接証明はされていない。我々は5-HT$_3$受容体がコリン作動性神経に局在すると考え、粘膜を除去した胃底部条片を用いてACh遊離に対するSN-307の作用を調べた。SN-307は、低濃度($10^{-6}$M)で[$^3$H]cholineをpreloadした条片より[$^3$H]AChと考えられる[$^3$H]effluxを増加させ、高濃度(＞$10^{-7}$M)で[$^3$H]effluxは不変であった。また、胃筋条片への電気刺激による収縮および[$^3$H]effluxは、SN-307の低濃度により増強され、高濃度で抑制されることを認めている（投稿中）。以上の成績よりSN-307は、胃壁内コリン作動性神経に局在する5-HT$_3$受容体に作用してACh遊離を調節するものと考えられた。

〔文　献〕

1. Engel, G., Hoyer, D., Kalkman, H. and Wick, M. B. (1985) *Br. J. Pharmacol.* 84, 106P
2. Richardson, B. P., Engel, G., Donatsch, P. and Stadler, P. A. (1985) *Nature* 316, 126-131
3. Brian, P. R. and Engel, G. (1988) *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 424-428
4. Butler, A., Hill, J. M., Ireland, S. J., Jordan, C. C. and Tyers, M. B. (1988) *Br. J. Pharmacol.* 94, 397-412
5. 木村永一，宮本　篤，八田慎一，大鹿英世 (1989) *札幌医誌*　(印刷中)
6. Van Neuten, J. M. and Jassen, P. A. J. (1980) *Gastrointestinal Motility* (Raven Press) 225-231
7. Kusunoki. M., Taniyama. K. and Tanaka, C. (1985) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234, 713-719

# 92 アセチルコリンエステラーゼのトリプシン様プロテアーゼ活性に関する研究

荒木　亘、中村重信、上田國寛*、北口暢哉*、高橋保之*、伊東平隆*
（京都大学神経内科、同臨床検査医学*、旭化成工業生科学研究所*）

〔要約〕
電気ウナギ アセチルコリンエステラーゼ acetylcholinesterase (AChE) をエドロホニウムセファローズカラムにて精製し、そのトリプシン様プロテアーゼ活性およびプロテアーゼインヒビターによる影響を検討した。[$^{14}$C] メチル化カゼインを基質とする方法で、プロテアーゼ活性はカラム通過分画に高かったが、精製 AChE 分画にもわずかに認められた。精製 AChE 標品の AChE 活性は N-α-p-tosyl-L-lysine-chloromethylketone (TLCK)、(p-amidinophenyl) methanesulfonyl fluoride (p-APMSF)、N-tosyl-L-phenylalanine-chloromethylketone (TPCK) によって阻害されたが、leupeptin、soybean trypsin inhibitor、beef pancreas trypsin inhibitor、$\alpha_1$-antichymotrypsin、APPI-72 (βアミロイド蛋白前駆体のプロテアーゼインヒビター部分) による阻害はみられなかった。

AChE はアセチルコリンを分解するエステラーゼ活性以外に神経ペプチドなどを分解するトリプシン様プロテアーゼ活性を持つという報告がある (1)。我々は AChE がエステラーゼ活性以外にプロテアーゼ活性を持つかどうか、またエステラーゼ活性とプロテアーゼインヒビター (特にトリプシン、キモトリプシンインヒビター) の間に関連性があるかどうかという問題について検討した。

【方法】

1) 電気ウナギ AChE の精製　アフィニティゲルの作製：エポキシ活性化セファローズ 6B (Pharmacia) と 塩化エドロホニウム edrophonium chloride (EdCl) 溶液を50℃で反応させた後、洗浄して使用した。アフィニティクロマトグラフィー：市販電気ウナギ AChE (Sigma) 2300単位をカラム (1.5×15cm) に添加し、50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (NaPB) pH8.0、0.5M NaCl-50mM NaPB にて洗浄後、12mM EdCl 溶液にて溶出を行った。溶出液を P-30 (Bio-Rad) 中で遠沈して EdCl を除去した。

2) AChE 活性の測定　Ellmanら (2) の方法によりヨウ化アセチルチオコリンを基質とし、チオコリンの生成速度を、412nm、25℃にて測定した。また、インヒビターの実験では [$^{14}$C] アセチルコリンを基質とし、生じた [$^{14}$C] 酢酸を液体シンチレーション法により測定する Johnson (3) らの方法も用いた。

3) プロテアーゼ活性の測定　[$^{14}$C] メチル化カゼインを基質とし、37℃、2時間インキュベートした。この反応液に、BSA (2mg/ml) -TCA (10%) 溶液を添加し、遠沈後、上清の放射能を液体シンチレーション法で測定した。

4) AChE 活性に対するプロテアーゼインヒビターの影響　TLCK、p-APMSF、TPCK、leupeptin、soybean trypsin inhibitor、beef pancreas trypsin inhibitor、$\alpha_1$-antichymotrypsin、あるいは APPI-72 の各インヒビターが反応液中に存在する条件下で AChE 活性を測定した。APPI-72 はβアミロイド蛋白前駆体のプロテアーゼインヒビター部分の cDNA を用いて、トランスフェクション法により作製した72個のアミノ酸からなるポリペプチドである (4)。

【結果】

1) 各フラクションの AChE 活性、プロテアーゼ活性の測定結果を Fig.1 に示した。AChE 活性は EdCl 溶出分画に認められ、回収率は45%であった。一方、プロテアーゼ活性は、通過分画に非常に高かったが、AChE 分画にもわずかに認められた (矢印)。各分画の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を Fig.2 に示す。AChE 分画では 70K と50K の位置にバンドが認められ、高純度に精製されていた。

2) 精製 AChE 標品の AChE 活性に対する各種プロテアーゼインヒビターの影響を Table に示した。AChE 活性は TLCK により最も強く阻害され、TPCK、p-APMSF によっても阻害がみられた。その他のインヒビターによる阻害は認められなかった。

【考察】

市販電気ウナギ AChE の精製において、カラム通過分画に見出されたプロテアーゼ活性は、電気泳動の結果からも、AChE と関係のないプロテアーゼによるものと思われる。一方、精製 AChE 分画にわずかに認められた活性は、そのピークと AChE 活性のピークがほぼ一致することより、AChE に付随するプロテアーゼ活性である可能性が大きい。事実、

AChE 分画のプロテアーゼが通過分画のものと性質が異なることが、各種インヒビターによる実験で示唆された。また、精製AChE 活性は一部の低分子量プロテアーゼインヒビターに影響されたが、プロテアーゼ活性は AChE のインヒビターである EdCl によって阻害されなかった。この結果より、AChE のエステラーゼとプロテアーゼの活性中心が異なる可能性が示唆された。

【文献】

1) Chubb, I.W. et al. (1983) Neuroscience 10:1369-1377 2) Ellman, G.L. et al. (1960) Biochem. Pharmacol. 7 : 88-95 3) Johnson, C.D. and Russel, R.L. (1975) Anal. Biochem. 64:229-238 4) Kitaguchi, N. et al. (1988) Nature 331:530-532

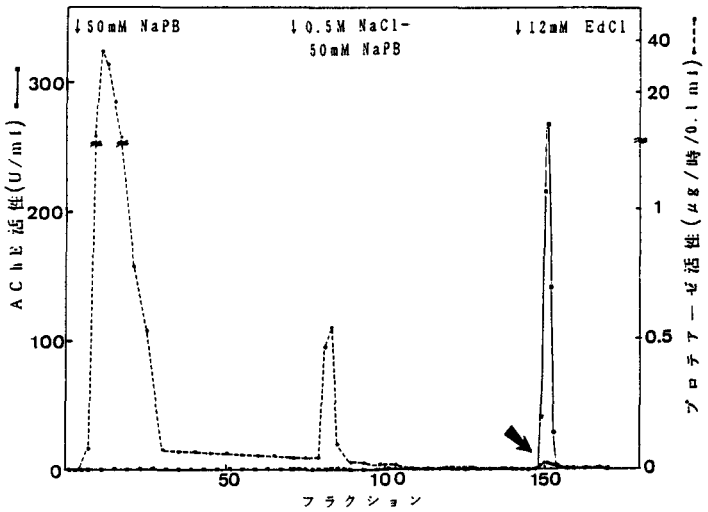
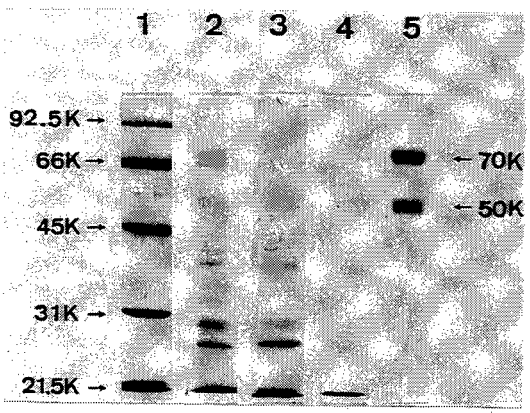



Fig. 1 電気ウナギ AChE の精製




1 : 分子量マーカー
2 : 精製前
3 : 通過分画
4 : NaCl溶出分画
5 : EdCl溶出分画

Fig. 2 電気ウナギ AChE の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

| インヒビター | IC50 (μM) | 阻害率(%) 0.1 mM | 1 mM |
|---|---|---|---|
| TLCK | 280*<br>125 | 25*<br>36 | 85*<br>93 |
| p-APMSF | 540 | 14 | 73 |
| Leupeptin | | — | 0* |
| STI | | — | 0* |
| BPTI | | — | 0* |
| $\alpha_1$-ACT | | — | 0* |
| TPCK | 300 | 30 | — |
| APPI-72 | | 0# | — |

STI: soybean trypsin inhibitor
BPTI: beef pancreas trypsin inhibitor
$\alpha_1$-ACT: $\alpha_1$-antichymotrypsin
* Ellman 法による # 5μM

Table. AChE 活性に対するプロテアーゼインヒビターの影響

## 93 アデニル酸シクラーゼ活性の変化に伴う、ＧＴＰ－結合蛋白質（Ｇｉ、Ｇｓ）間でのグアニンヌクレオチドの転移

八田愼一、Mark. M. Rasenick*、 大鹿英世

（札幌医科大学・薬理、* University of Illinois・Physiology and Biophysics）

〔要約〕 非加水分解性 GTP類似体によって、大脳皮質シナプス膜アデニル酸シクラーゼ(AC)活性が持続的に抑制される現象が知られている。この抑制が解除される際のGsとGiとの相互作用について、非加水分解性Photoaffinity GTP類似体の$P^3$-(4-azido-anilido)-$P^1$-5' GTP (AAGTP)を用いて検討した。 AAGTPを作用させることで生じたAC活性の持続的抑制は、シナプス膜にGppNHpを作用させることによって抑制状態から解除される。AC活性の抑制状態で主としてGiに結合していた $^{32}$P-AAGTPは、活性の抑制→活性化の変化に伴って、Giでの結合減少とGsでの結合増加がみられ、グアニンヌクレオチド(GN)のGiからGsへの転移が観察された。GppNHpの代わりに$^3$H-AAGTPを用いて同様の実験を行うと、$^{32}$P-AAGTP 結合はGppNHpの場合と同じくGiからGsへ転移し、一方、$^3$H-AAGTPの結合はGiでは殆ど増加せず、Gsでの結合増加が認められた。これらの結果から、GiからGsへの AAGTPの転移は、GNに対するGsの結合親和性での増加が生じ、その結果生じるGi、GsのGN結合親和性の相対的変化によるものであることが示唆された。

【目的】 大脳皮質シナプス膜に非加水分解性 GTP類似体を一定の条件下で作用させた際、アデニル酸シクラーゼ(AC)の活性が持続的に抑制される、すなわち細胞膜を洗浄して GTP類似体を除去しても抑制が継続する現象が知られている(7)。 先に我々は、非加水分解性Photoaffinity GTP 類似体の$P^3$-(4-azido-anilido)-$P^1$-5' GTP (AAGTP)を用いて、大脳皮質シナプス膜ACの持続的抑制が解除される際のGsとGiとの相互作用について検討し、ACの状態が抑制から促進へ切り替えられると共に、結合しているグアニンヌクレオチド(GN)がGiからGsへ転移されることを示した(3)。 このGNの転移現象は、これまでのところ、神経系組織でのみ観察されることから、神経系AC活性の調節に Gi-Gs間での何らかの相互作用が関与していることが示唆される。今回、我々はこの Gi-Gs間のGNの転移の機序についてさらに検討を加えた。

【方法】 実験には雄性 Sprague-Dawley 系ラットを用い、大脳皮質シナプス膜の調製、および $^{32}$P-AAGTPによる大脳皮質シナプス膜のPhotoaffinity Labelingは先に報告した方法によって行った(3)。一部の実験では $^3$H-AAGTPを用い、GN結合の変化について検討した。これらの実験手順についてはFig. 1に示した。 $^{32}$P-AAGTP、$^3$H-AAGTP はPfeuffer の方法(4) に従って作成した。AC活性は $^{32}$P-ATPを基質として用い、Salomon の方法(6)に従って測定した。

【結果と考察】 ラット大脳皮質シナプス膜にAAGTP ($1.2 \times 10^{-4}$ M)を作用させ (23℃、3 分間)[Incubation-1]、ACを持続的に抑制した後、膜を溶媒で洗浄し、それに続いてこの膜に GppHNp($10^{-9}$～$10^{-4}$ M) を作用させる (23℃、10分間) [Incubation-2]と、AAGTP によって生じた持続的な抑制は解除された(Fig. 2; Lower)。 同様の実験を $^{32}$P-AAGTPを用いて行うと、ACが持続的に抑制される条件下では、Gi/oに $^{32}$P-AAGTPの主要な結合がみられた。GppNHpによってAC活性の持続的抑制が解除されるのにつれて、$^{32}$P-AAGTP の放射活性はGi/oで徐々に減少し、Gsでの増加が観察され、(Fig. 2; Upper)、 これらの結果は先に報告したものと一致していた。GNのGi/oからGsへの転移の機序に関して、[Incubation-2]で添加しているGppNHpと $^{32}$P-AAGTPとがGi/oのGN結合部位で競合し、その結果として転移が生じている可能性が考えられる。しかしながら、GNとはその結合部位で競合しないと考えられる NaFを、[Incubation-2]で用いてもAAGTP の転移がGppNHpでの場合と同様に生じる(3) ことから、転移はGi上でのGN間の単純な競合の結果によるものではないと推測される。この点について、[Incubation-2]でGppNHpの代わりに$^3$H-AAGTPを用いて、さらに検討を加えた。[Incubation-1]で作用させた $^{32}$P-AAGTPの結合は、$10^{-8}$～$10^{-5}$ Mの$^3$H-AAGTPによって、GppNHpでの場合と同様に、$^3$H-AAGTPの濃度の上昇に伴ってGiで減少し、Gsで増加した(Fig. 3)。このとき、$^3$H-AAGTP自

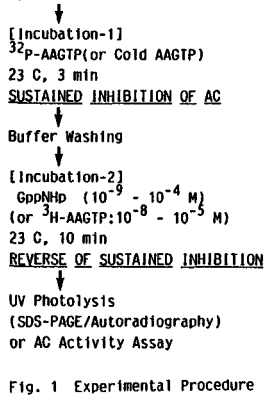



Fig. 1 Experimental Procedure

体の結合はGiでは殆ど増加せず、一方、$^{3}$H-AAGTPの濃度増加に伴って、Gsでの結合の増加が認められた(Fig.4)。また、Gordon and Rasenick(2)は、AAGTPのGs、Giに対する結合親和性の変化について検討し、ACが活性化される条件下で、Giの AAGTPに対する結合親和性の変化は殆ど認められないが、一方、Gsの結合親和性は有意に上昇することを報告している。すなわち、GNのGiからGsへの転移は、GNに対するGiとGsの結合親和性の相対的変化の結果生じていることが示唆される。GNの転移が生じる際、GNに対するGsの親和性が上昇する機序については、現時点では不明である。GppNHpのGsへの結合によって、GsのGNに対する親和性が上昇する可能性が考えられる。しかしながら、G 蛋白質（αサブユニット）上のGN結合部位は一つであると考えられていること、さらにGsでの AAGTP結合のHill係数がほぼ 1である(2) ことから、Gs自体の変化によって、GNに対するGsの親和性が上昇する可能性は少ない。他の機序としては、他の種類の GTP結合蛋白質にGppNHpが結合し、このものによってGsの結合親和性の調節が行われている可能性が考えられる。このような可能性を支持して、Tubulin とGiとの相互作用を介するAC活性の調節機構が示唆されている(5)。

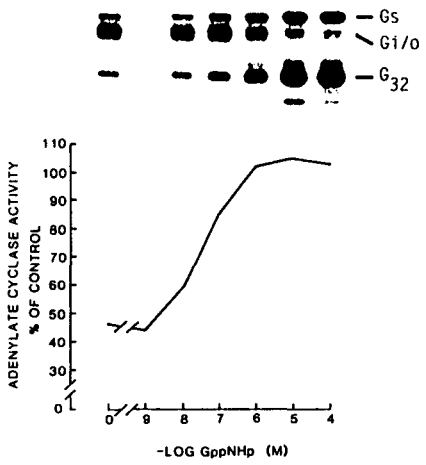



Fig. 2 Correlation of guanine nucleotide transfer from Gi/o to Gs with the GppNHp-induced override of adenylate cyclase inhibition. (Upper) SDS/PAGE analysis of AAGTP-labeled synaptic membranes. (Lower) Adenylate cyclase activity of synaptic membranes incubated with AAGTP.

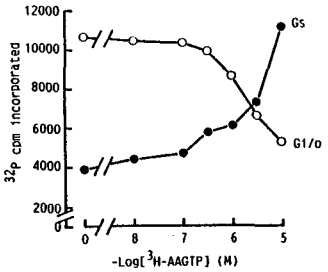



Fig. 3 $^{32}$P-AAGTP binding to Gi/o and Gs in synaptic membranes.

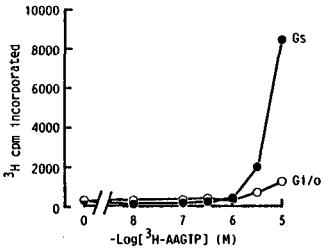



Fig. 4 $^{3}$H-AAGTP binding to Gi/o and Gs in synaptic membranes.

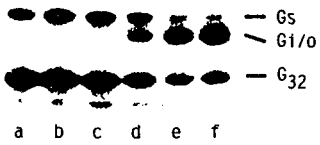



Fig. 5 Effects of [$Mg^{2+}$] on $^{32}$P-AAGTP binding. Lanes a, 0 mM $MgCl_2$; b, 0.1; c, 0.25; d, 0.5; e, 1.0; f, 1.25.

次に、$^{32}$P-AAGTP のG 蛋白質への結合に影響する要因の一つとして、Mgイオンの効果について検討した。[Incubation-2]で 1 mM EDTAと、0 mMから1.25 mM の$MgCl_2$ の存在下でシナプス膜をインキュベートした結果、0 から 0.25 mM の$MgCl_2$ 濃度では、$^{32}$P-AAGTP の主要な結合はGsで観られた。一方、$MgCl_2$ 濃度が0.25から1.0 mMでGi/oへの結合が生じ、1.25 mM 以上では $^{32}$P-AAGTPの主たる結合部位はGi/oであった(Fig. 5)。このように、 AAGTPのGi/oへの結合にはMgイオンを必要とするが、Gsへの結合ではMgイオンに対する要求性は低い( <0.5 mM；Free $Mg^{2+}$ 濃度でsubmicromolar レベル)。しかしながら、今回の結果は、Brandt and Ross(1)の精製Gs蛋白質を用いた再構成系の実験結果とは一致せず、この違いはGs蛋白質のMgに対する要求性が、再構成系と膜標品を用いた実験系の場合で異なっていることによるものかもしれない。あるいはまた、本実験で観察されたMgイオンの効果は、他の膜成分蛋白質を介して発現していることも考えられる。このように今回の結果から、神経系AC活性の調節には G蛋白質以外の膜蛋白質（他の種類の GTP結合蛋白質も含めて）が関与している可能性も推測され、今後さらに詳細な検討が必要と思われる。

【文献】 (1)Brandt, D.R. and Ross, E.M.(1986) J. Biol. Chem. 261, 1656-1664 (2)Gordon, J.H. and Rasenick, M.M.(1988) FEBS Lett. 235, 201-206 (3)Hatta, S., Marcus, M.M., and Rasenick, M.M.(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 5439-5443 (4)Pfeuffer, T.(1977) J. Biol. Chem. 252, 7224-7234 (5)Rasenick, M.M. and Wang, N.(1988) J. Neurochem. 51, 300-311 (6)Salomon, Y.(1979) Adv. Cyclic Nucelotide Res. 10, 35-55 (7)Yamamoto, T. and Shimizu, H.(1983) J. Neurochem. 40, 629-636

# 94 Phospholipase Cを活性化するペプチドホルモン及びムスカリン受容体のinositol phosphate並びに$Ca^{2+}$動員の調節

竹村晴夫、大鹿英世、F.S. Menniti*、J.W. Putney, Jr.*
(札幌医大・薬理、*NIEHS/NIH)

〔要約〕
ラット膵臓癌AR4-2J細胞において、phospholipaseCを活性化するペプチド並びにムスカリン受容体のinositol 1,4,5-trisphosphate ($IP_3$)及び細胞内$Ca^{2+}$ ($[Ca^{2+}]_i$)に対する作用を検討した。サブスタンスP(SP)による$IP_3$の増加は一過性であった。一方、bombesin (BBS)及びcholecystokinin (CCK)による$IP_3$の上昇はSPによるものより程度が強く、ピーク後減少したが、増加したレベルを維持した。Methacholine (MCh)は$IP_3$を徐々に上昇させた後、緩やかに減少させた。これらBBS,CCK,MChの$IP_3$に対する効果は、同薬物の$[Ca^{2+}]_i$のsustained levelを生じる効果と一致したが、SPによる$[Ca^{2+}]_i$の上昇は一過性であった。SP及びMChは$IP_3$並びに$[Ca^{2+}]_i$両者に対して同種脱感作を示したが、MChによる脱感作を発現するに要する時間はSPによるものより長かった。これらの結果から、phospholipase C活性を調節する機構の異なる受容体が同じ細胞に存在することが示唆される。

〔目　的〕
ラット膵臓癌AR4-2J細胞にはムスカリン受容体及び３種類のペプチド受容体が存在し、各々phospholipase Cを活性化し細胞の情報伝達を調節しているが（３、６）、その調節機構やさらに情報伝達で重要な役割を担っているinositol phosphate生成や$Ca^{2+}$動員の調節ついては不明な点が多い。我々はSP,BBS,CCKそしてMChに対する$IP_3$及び$[Ca^{2+}]_i$の反応を測定することにより、同細胞でのphospholipase Cの活性化の調節を検討した。

〔方　法〕
10% DFBSを含むDMEMで３日間培養されたラット膵臓癌AR4-2J細胞を実験に用いた。
（Ⅰ）$IP_3$の定量： 前報に従い（２）、[$^3$H]inositol (10 $\mu$Ci/ml)を三日間負荷したAR4-2J細胞をfresh DMEMで洗浄し、各薬物で刺激した後、ice-cold 7.5% TCAで反応を止めた。TCA抽出物中の$IP_3$をHPLCにより検出した。
（Ⅱ）$[Ca^{2+}]_i$の測定： DMEMを含む150 mmの培養皿中のAR4-2J細胞に4 $\mu$M fura-2/AMを加え、室温中で5% $CO_2$ - 95% $O_2$を通気しながら45分間負荷した。DMEM除去後、5 mM EDTAを含むバックス液を加えて細胞を培養皿より剥離した。さらに、細胞をKrebs-Ringer solution (120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 20 mM HEPES, 11.1 mM glucose, 0.2% BSA; pH 7.4)で洗浄した後、同溶液にてポリスチレンセル中に再浮遊させ、蛍光を測定した。$[Ca^{2+}]_i$はGrynkiewicz ら（１）の励起光の比(340 nm/380 nm)による方法により求めた。

〔結　果〕
図１に４種類のアゴニストによる$IP_3$生成のパターンを示した。1 $\mu$M SPにより上昇した$IP_3$はピーク後、2分以内に薬物を加える前のレベルに減少した。200 nM BBS又は1 $\mu$M CCKにより、$IP_3$レベルはほぼ同程度のピーク(SPによるピークの約6.5倍）に達した後減少したが、なお高い値を維持した。これに反し、100 $\mu$M MChにより IP3は徐々に上昇し、約90秒のピーク後、緩やかに減退し、30分以内に静止レベルに戻った。図２に示されるように、1 mM $Ca^{2+}$を含む溶液中において、BBS, CCK及びMChにより上昇した$[Ca^{2+}]_i$はピーク後減少したがなお静止レベルより高い値を維持した。これに対し、SPは一過性に$[Ca^{2+}]_i$を増加させた。しかし、外液$Ca^{2+}$を除去した条件下で、４種類のアゴニストによる$[Ca^{2+}]_i$増加のピークは、著明に減少したばかりかsustained levelも消失した。このことは、これらアゴニストが細胞内貯蔵部位から$Ca^{2+}$を遊離するばかりでなく細胞外からも$Ca^{2+}$を動員することを示している。SP刺激後$IP_3$レベルが非刺激レベルに回復してから、SPを再添加しても$IP_3$の上昇は認められなかったが、BBSによる再刺激は$IP_3$を再び増加させた。これに対応して、SP刺激後SPを再添加しても$[Ca^{2+}]_i$は増加しなかったが、BBSによる再刺激は$[Ca^{2+}]_i$を正常に上昇させた。この結果はSPが$IP_3$生成に対して同種脱感作を生じ、細胞内貯蔵部位に$Ca^{2+}$が再充填されることを意味している。BBS刺激10分後にCCKで再刺激すると$IP_3$はCCK単独によるレベルに増加したが、$[Ca^{2+}]_i$は全く変化しなかった。このことは持続した$IP_3$の増加が細胞内

貯蔵部位の$Ca^{2+}$を枯渇することを示している。他方、AR4-2J細胞を MCh前処置45分後、MChを再添加してもIP$_3$並びに$[Ca^{2+}]_i$レベルは変化しなかったが、BBS再刺激はIP$_3$並びに$[Ca^{2+}]_i$両レベルを上昇させた。

〔考　察〕

ラット膵臓癌AR4-2J細胞には少なくとも以下の３種類のphospholipase Ｃ活性化パターンがあることが示唆される。 1)急速な同種脱感作を発現するもので、SP受容体の刺激により引き起こされる。 2)同種脱感作を発現するのに要する時間が長いもので、ムスカリン受容体刺激により生じる。 3)受容体刺激が続く間phospholipaseＣ活性化が持続するものであり、BBS及びCCKにより引き起こされる。1)の効果は同じ外分泌腺であるラット耳下線細胞でも認められている（４、５）が、AR4-2J細胞では、これら多種類のphospholipase Ｃ活性化により情報伝達が調節されていると考えられる。

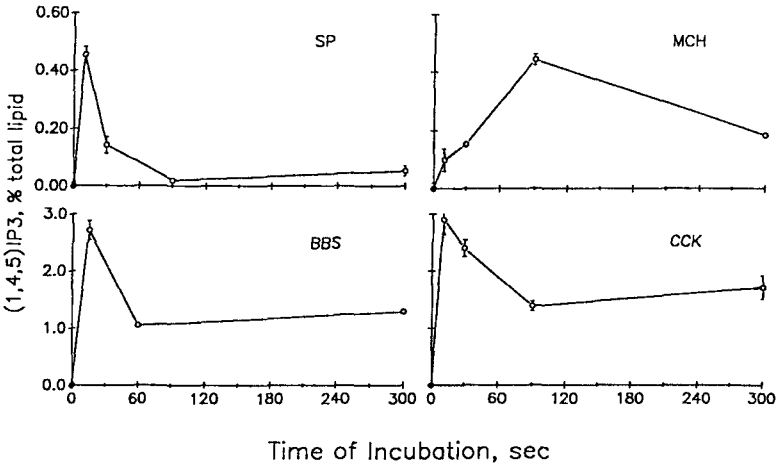



図１　ペプチド及びムスカリンアゴニストによるIP$_3$生成の変化

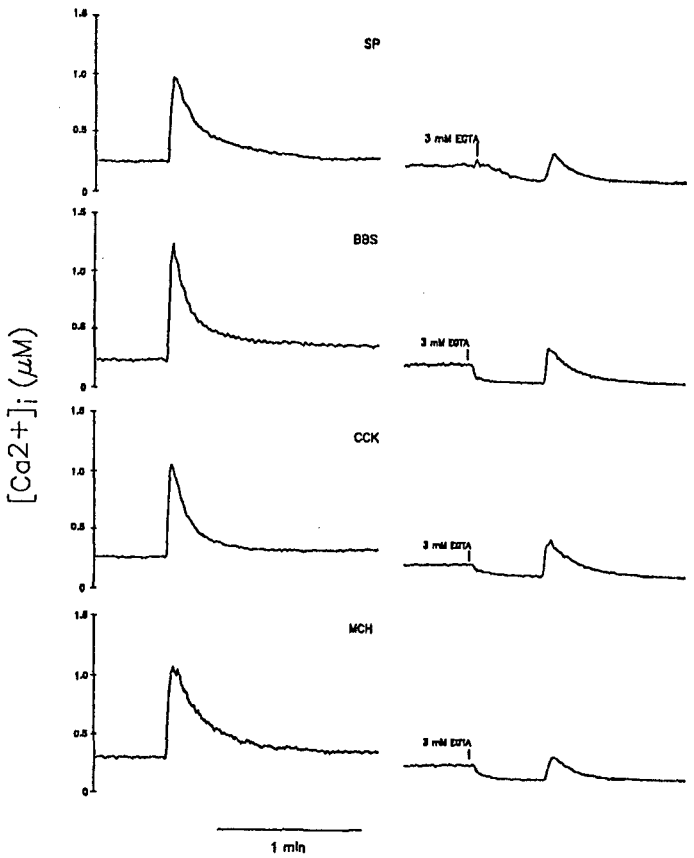



図２　外液$Ca^{2+}$存在及び非存在（3 mM EGTAを添加）下でのペプチド及びムスカリンアゴニストによる$[Ca^{2+}]_i$の変化

〔文　献〕

(1).Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1986) *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450 (2).Horstman, D.A., Takemura, H. and Putney, J.W.,Jr.(1988) *J. Biol. Chem.* 263, 15297-15303 (3).Menniti, F.S., Takemura, H. and Putney, J.W., Jr. (1989) *Biol. Cell. Transducing Signals '89* (Ed. by Vanderhoek, J. Y.) Abs. 104 (4).Sugiya, H., Tennes, K.A. and Putney, J.W.,Jr. (1987) *Biochem. J.* 244, 647-653 (5). Sugiya, H., Obie, J.F. and Putney, J.W.,Jr. (1988) *Biochem. J.* 253, 459-466 (6). Takemura, H., Menniti, F.S. and Putney, J.W.,Jr. (1989) *Biol. Cell. Transducing Signals '89* (Ed. by Vanderhoek, J.Y.) Abs.181

# 95 In vivoにおけるラット線条体からのdopamineおよびacetylcholineの放出に及ぼすneurotensin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dopamine(DA)およびacetylcholine(ACh)の放出に及ぼすneurotensin(NT)の影響をintracerebral dialysis を用いて検討した。灌流液中のDAとその代謝産物及びAChはelectrochemical detectorを組み合わせたHPLC system で測定した。NTを$10^{-4}$-$10^{-6}$ M線条体内に投与すると、そこからのDAの放出は著明に増加し、この増加は用量依存的であった。DAの代謝物であるdihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)およびhomovanillic acid(HVA)の放出もNTの線条体内投与に伴って増加した。NT(25-200 ug/kg)の腹腔内投与では、投与100分後に一過性の、線条体からのDAの放出が増加したが、DAの代謝物の放出には影響はみられなかった。 NT($10^{-4}$-$10^{-6}$M)の線条体内投与では、高濃度($10^{-4}$ M)でAChの放出は軽度に促進したが、NT(25-100 ug/kg)の腹腔内投与ではAChの放出に変化は見られなかった。

NT含有神経細胞は、哺乳類の黒質及びventral tegmental areaに存在し、その分布様式は、DA ニューロンの分布様式ときわめて類似している(7)。加えて、NT-binding siteは黒質ー線条体系および中脳ー辺縁系DAニューロンとその神経終末に豊富に存在する(8)。それ故、脳内において、NTとDAとの間には密接な機能的相互関連が存在する事が考えられる。一方、NTと他の神経伝達物質との間の相互関連についても、近年、検討が加えられつつあるが、AChとの関連についての報告は少ない。そこで、著者らは、ラット線条体に於けるNTとDAあるいはAChとの相互関連について、free moving ratを用いて、intracerebral dialysisから検討したので報告する。

［方法］
雄性ラットをchloral hydrate麻酔下で定位固定装置に固定し、ラット脳地図に従ってdialysis probe(Carnegie Medicine, 長さ3 mm, molecular weight cut-off 20,000)を一側線条体内に挿入した。probe挿入24時間後に、灌流液を2 ul/分の速度で持続的にprobe内に注入し、20分ごとに採取した。DA放出実験では、灌流液はRinger液を用い、ACh放出実験では、10 u M physostigmineを含むRinger液を用いた。灌流実験中、ラットは無麻酔下で、free movingの状態に保った。灌流液中のDA, DOPAC, HVAおよびAChは、HPLCにelectrochemical detectorを組み合わせて測定した(6)。NTは腹腔内あるいは probeを介して線条体内に投与した。

［結果］
($^3$H)-3,11-tyrosyl-NTを用いて、in vitroにおける、NTの相対的回収率を確認した。$10^{-4}$から$10^{-6}$ Mの濃度におけるNTの回収率は、2 ul/分の灌流速度で約5 %前後であった。灌流開始後、1時間でDA、その代謝物及びAChの放出量はいずれも平衡に達した。この状態での灌流液中のDA, DOPAC, HVAおよびAChの放出量、即ちbasal releaseはそれぞれ0.012±0.002, 1.21±0.3, 0.61±0.08, 0.51±0.05であった(n=8)。NTを灌流液中に$10^{-4}$から$10^{-6}$ M加えて、140分間線条体内に局所投与すると、DAの放出は添加直後から用量依存的に増加した。DAの放出増加は、NTの添加中止により、速やかにbasal levelに回復した(Fig. 1)。DOPACおよびHVAの放出も、NT添加により増加したが、DOPACの放出増加の方が、HVAのそれより著明であった。NT(25-100 ug/kg)を腹腔内投与すると、投与100分後に一過性に線条体からのDAの放出が促進したが、DOPACおよびHVAの放出量には変化はなかった。NTを$10^{-4}$から$10^{-6}$ M 線条体内に投与すると、高濃度($10^{-4}$ M)で軽度(30 %)のAChの放出増加が認められたが、$10^{-5}$, $10^{-6}$ Mの濃度では、放出に影響は見られなかった(Fig.2)。NTの腹腔内投与は、

線条体からのAChの放出に影響を及ぼさなかった。

［考察］

今回の研究から、線条体内に投与したNTは、用量依存的に線条体からのDAとその代謝物の放出を、in vivoのlevelで促進した事が明らかとなった。この結果は、従来の線条体sliceを用いた実験結果とほぼ一致した(1)。本研究における、NTの、黒質ー線条体系 DA systemにおけるDA放出促進作用の機序については、次のような事が考えられる。 第一に、NT receptorを介したDA放出の調節機構の関与である。線条体内に存在するNT receptorの約3割は、DA nerve terminal上に局在している(3)。 NTはこのNT receptor receptorに作用し、活性化されたreceptorが DA nerve terminalからのDAの放出を促進した事が考えられた。第二は、NTが線条体のDA receptorに作用して、DAの放出に影響を与えた可能性である。Nemeroffらは、NTが線条体の($^3$H)spiperone binding等に影響を及ぼさない所から、DA receptorに対する作用については、否定的見解を示している(4)。しかし、NTがDA D2-agonist binding siteに影響を及ぼすという報告もあり、NTがDA receptorを介して作用する可能性は否定しきれない(2)。電気生理学的あるいは行動薬理学的研究から、脳内に投与したNTは、DA receptor antagonistであるneurolepticsと類似した作用をはたす事が知られている。従って、NTを［内因性］のneurolepticsとみなす仮説が存在する(4)。線条体では、活性化されたDA D2-receptorは、線条体からのDAおよびAChの放出を調節している(5)。今回の研究で、線条体内に投与したNTは、ここからのDAの放出と共に、ACHの放出をも促進した。NTの線条体cholinergic systemに対する促進的作用は、NTがneuroleptcsと類似した作用をDA D2-receptorにおよぼし、AChの放出を刺激した可能性が示唆された。最後に、NTを腹腔内投与すると、一過性ではあるが、線条体からのDAの放出は促進した。末梢投与したneuropeptideが脳ー血流関門を通過するか否かは、現在までの所、確立した見解は存在しない。それ故、末梢投与したNTの作用機序については、今後さらに検討する必要がある。

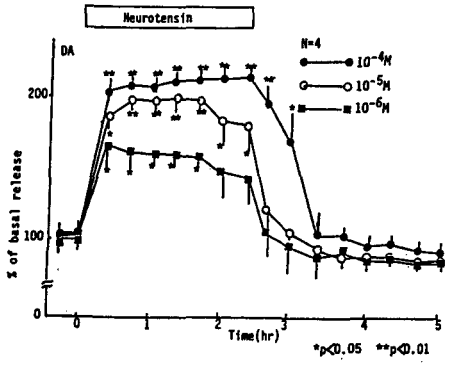



Fig. 1. The effect of local perfusion with different concentrations of NT on levels of DA in striatal perfusates.

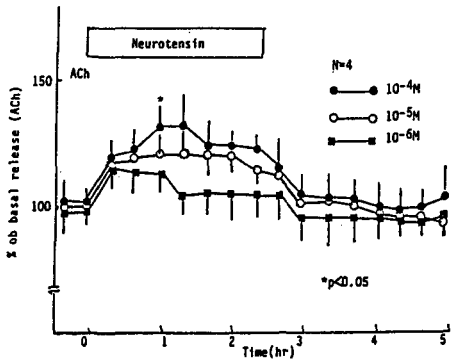



Fig. 2. The effect of local perfusion with different concentrations of NT on levels of ACh in striatal perfusates.

［文献］

1)DeQuidt, J.T. and Emson, P.C. (1983)Brain Res., 274. 376-390.

2)Euler, G.V. and Fuxe, K. (1987) Acta Physiol Scand. 131, 625-626

3)Goedert, G., Pittaway, K. and Emson, P.C. (1984) Brain Res., 299, 164-168.

4)Nemeroff, C.B., Luttinger, D., Hernandez, D.E., Mailman, R.B., Mason, G.A., Davis, D., Widerlov, E., Frye, G.D., Kilts, C.A., Beaumont, K. and Breese, G.R. (1983) J. Pharmacol. Exp. Ther. 225, 337-346.

5)Sethy, V.H. (1979)Europ. J. Pharmacol. 60, 397-398.

6)下山政憲、鬼頭昭三(1989)医学のあゆみ., 148, 205-206.

7) Uhl, G.R., Kuhar, M.J and Snyder, S.H. (1976) Life Sci., 19, 1827-1832.

8) Uhl, G.R. and Snyder, S.H. (1977) Europ. J. Pharmcol., 41. 89-91.

# 96 抗うつ剤のＧＴＰ結合蛋白質－アデニル酸シクラーゼ共役機構に対する影響

小澤寛樹１、斉藤利和１、Mark.M.Rasenick２、高畑直彦１
１札幌医科大学・神経精神医学講座　2 Department of physiology and Biopysics ,University of Illinois College of Medicine

［要約］三環系抗うつ剤（Desipramine, Amitriptyline),非定型抗うつ剤(Iprindole)をラットに急性(1日)、慢性(連続21日)腹腔内投与し、大脳膜標本を用いてGTP結合蛋白質－アデニル酸シクラーゼ系に対する影響を検索した。
抗うつ剤慢性投与群においてのみ、Gpp(NH)p（10nM -100uM),NaF(20mM),Forskolin(100uM)刺激によるアデニル酸シクラーゼ(AC)活性が対照群に比して上昇を示した。Gpp(NH)pによるAC活性の最大抑制率は急性,慢性各群で有意な差が観察されなかった。Gpp(NH)pによるAC活性の変化から求めたGpp(NH)pに対するＥＣ５０ＩＣ５０には各群に変化は認められなかった。非水解性、光親和型ＧＴＰ誘導体である［３２Ｐ］P3(4-azidoanilido)-P1-5'-GTP(AAGTP)を用いたポリアクリドアミド電気泳動法(PAGE)よりGs、Gi／ｏその他のGTP結合蛋白質に対するAAGTPのKd, Total Bindingは各群で有意な差は認められなかった。さらに、Gi／ｏからへのグアニンヌクレオチド(AAGTP)の転移は抗うつ剤慢性投与群において促進していた。これらの結果から抗うつ剤慢性投与によりとアデニル酸シクラーゼ触媒部位(C)との連関が増強し、またGi／ｏとの相互関係にも影響を与えることが示唆された。

［序説、目的］慢性抗うつ剤あるいは慢性電気けいれんショックによりラット大脳膜標本においてGppNH, NaF, Forskolin刺激AC活性の増強が報告されており、GTP結合蛋白質への影響が示唆されている(1, 2, 3)。しかしながら、ＡＣ活性を調節するGs, Giまた最近その解明が進んでいるGoや比較的低分子量のGTP結合蛋白質(32KDa, 29KDa)と言った個々のGTP結合蛋白質の機能への影響、量的変化、GTP誘導体に対する親和性の変化と言った詳細な点については、明らかにされていない。今回、我々はこれらの問題について検討した。

［方法］Sprauge-Dawly系雄性ラット(150-200g)にDesipramine, Amitriptyline, Iprindole(各々10mg/Kg)または同量の生理食塩水を１日１回単回及び連続２１回腹腔内に投与しそれぞれ急性、慢性投与群とした。最終投与２４時間後に断頭し、Rasenick(4)らの方法により大脳皮質膜標本を作成した。AC活性は［３２Ｐ］-ATPを基質として用い、生成された［３２Ｐ］-cAMPをSalomon(5)らの方法に従って分離し測定した。
［３２Ｐ］-AAGTPはPfeuffer(6)らの方法により作成した。

［結果］我々はMgイオン、Caイオンの濃度、温度といったAC活性のAssay条件を変えることにより、選択的にGs, Giの機能を反映したGTP誘導体刺激によるAC活性の変化を観察した。すなわち5mM M gCl2、1mM EGTA, 30 C, 10min（促進性条件）では促進的に、1mM MgCl2、EGTA非存在下、23 C, 10min（抑制性条件）では抑制的にGpp(NH)pによりAC活性が変化する(Fig1A, B)。促進性条件下では、慢性投与群(Amitriptyline, Iprindole)において、Gpp(NH)p刺激AC活性の増強が観られた(Fig1A). 抑制性条件下では慢性投与群で基礎AC活性の上昇が認められた(Fig1B)。Fig1の結果より求めたVmaxは,慢性投与群(Amitriptyline, Iprindole)において有意に上昇していた、Gpp(NH)p に対するEC 50, IC 50また最大抑制率は各群で差が認められなかった。　　NaF、Forskolin刺激AC活性も慢性投与群でのみ増強していた。Hatta(7)らは、［３２Ｐ］-AAGTPを用いてPAGE上で分子量52, 42, 40, 32KDaの蛋白質にAAGTPが結合し、それぞれＧｓＨ（High Molecular Weight Gs）、Gs、Gi／ｏ（GiとGoとの混合体）、G32であることを同定し(Fig2)、さらにGi／ｏからへAAGTPが転移することを示した。この転移現象を各群で比較すると、Gi／ｏからへ［３２Ｐ］－AAGTPの転移とそれに伴うAC活性の抑制解除が慢性投与群で促進していることが認められた(Fig3A,B,C)。また、Gordon(8)らの方法によりこれらのGTP結合蛋白質に対する［３２Ｐ］-AAGTPの結合Isothermから Scatchard解析し各GTP結合蛋白質について［３２Ｐ］－AAGTPのKd、Total Bindingを慢性投与群で比較すると、各群で差は認められなかった。

［考察］慢性抗うつ剤投与による促進性条件下でのGpp(NH)p刺激またNaF, Forskolin刺激のAC活性の増強はGpp(NH)pに対するEC 50, IC 50, AC活性の最大抑制率に変化が観られなかったこと,各GTP結合蛋白質に対する［３２Ｐ］－AAGTPのKd、Total Bindingに変化がなかったことより、Giの機能、GTP誘導体のGi／ｏ, Gsへの親和性、GTP結合蛋白質量を変えることなしに,主にGsとCとのcouplingを増強することにより発現すると考えられる。同時に、慢性抗うつ剤投与群でグアニンヌクレオタイドのGi／ｏからＧｓへの転移が促進していたことより，GsとGi／ｏとの相互作用にも影響を与えることが示唆される。今回の我々の結果と過去の抗うつ剤に関する研究を考え合わせると慢性抗うつ剤投与によるシナプス後膜における Beta-Adrenergic Receptorの減少(Down-Regulation)により Beta-Adrenergic ReceptorのGsに対する拘束の緩和がおこりGsとC、Gi／ｏとの共役機構に変化を起こしたと考えられる。

[文献] (1)Menkes, D.B., Rasenick.M.,Wheeler,M.A.,Bitensky,M.W.(1983)Science.129,65-67 (2)Adersen,P.H., Klysner,R.Geisler,A.(1984)Neuropharmacol.23,445-447 (3)Newman,M.E.,Solomon,H. Lerer,B.(1986)J.Neurochem. 46,1667-1669(4)Rasenick.M.M.,SteinP.J.,BitenskyM.W.(1981)Nature294,560-562(5)Salomon. Y(1979)Adv.Cyclic Nucleotide Res.10,35-54.(6)Pfeuffer T.(1977)J.Biol.Chem.252,7224-7234(7)Hatta S.,Marcus,M.M.,Rasenick,M.M. (1986)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83,5439-5443(8)Gordon,J.H.,Rasenick,M.M.(1988)FEBS Lett.235,201-206

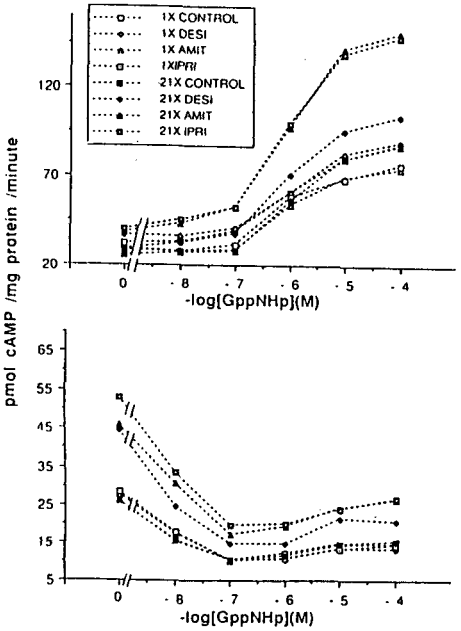



Figure 1A : Effect of antidepressant treatment on the activation of adenylate cyclase by GppNHp

Figure 1B : Effect of antidepressant treatment on the inhibition of adenylate cyclase by GppNHp

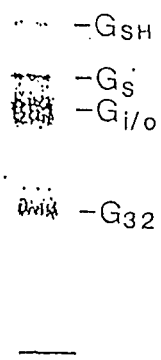
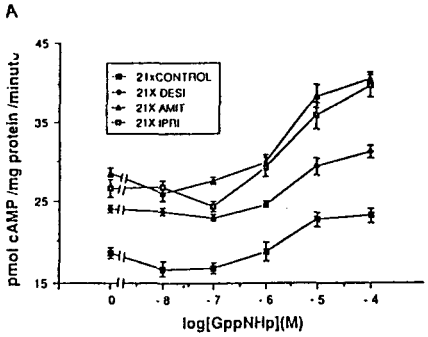
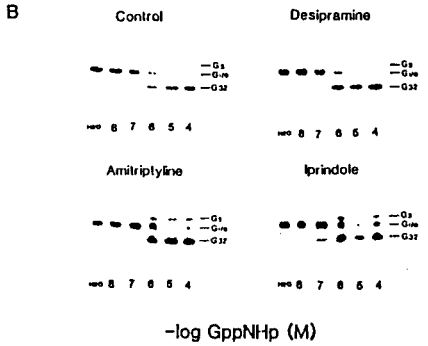



Figure 2 AAGTP labelled synaptic membrane proteins. Synaptic membranes were incubated with $1.2 \times 10^{-5}$ M [$^{32}$P] AAGTP .After washing,resuspension ,UV irradiation and SDS-PAGE were carried out .Radioautography shows incorporation of [$^{32}$P] AAGTP into 4 major bands.Exposure of membrane to $10^{-3}$ M AAGTP (or GppNHp or GTP S) and washing prior to incubation of membrane with [$^{32}$P] AAGTP blocked incorporation of that compound, the difference of blocking effect on various GTP analogs as described in ref (7),(8) .ADP-ribosylation and western blots with antibodies supplied by S.Mumby and A.Gilman indicated that 52KDa is $G_{SH}$,42KDa is Gs and 40KDa is Gi/o.$G_{32}$ refers to a 32KDa AAGTP binding protein which appears particularly abundant in rat protein ,however,its function is unknown.



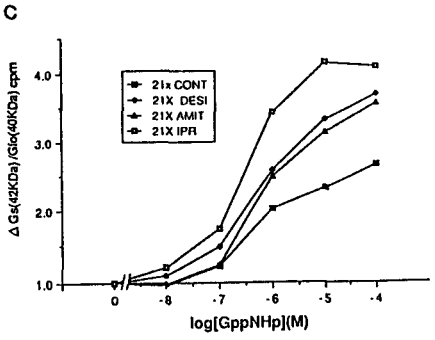




Figure 3A : Effect of antidepressant treatment "disinhibition" of adenylate cyclase by GppNHp after preincubation with AAGTP

Figure 3B : NaDodSO4 / PAGE analysis of [$^{32}$P] AAGTP labelled cerebral cortex membrane : Effect of antidepressant treatment on nucleotide transfer.

Figure 3C : Quantization of nucleotide transfer Radiolabelled bands of the dried gels (from 3B) were excised and counted in a Beckman LS 5800 scintilation spectophotometer .Ratio of the $^{32}$P cpm incorporated by Gs(42KDa) : Gi/o(40KDa) are plotted in Figure 3C using data from 3-4 separate experiments ,SEM are less than 5 % ( acute data which resemble control,are not shown)

# 97 百日咳毒素感受性ＧＴＰ結合蛋白の質的変動

今泉太郎、渡辺康裕、川本日出雄、三崎尚之、岩倉克臣、阪越信雄、吉田博
（大阪大学医学部・第一薬理）

〔要約〕

百日咳毒素（IAP）感受性GTP結合（G）蛋白（40-41 K）は、cyclic AMP依存性protein kinase（PKA）によるリン酸化を受ける事により、並びに、lithium 添加（in vitro）により、そのG蛋白のIAPによるADP-ribosylation量は減弱するが、この時のG蛋白のsubunit間の解離状態、受容体刺激high affinity GTPase活性、並びに、IAP感受性G蛋白（特にGi）を介する他の共役反応（adenylate cyclase阻害）の変化を検討した。PKAによるリン酸化の条件下で、MgGTPrSによるGiのα、β、γ-subunitの三量体の解離は阻害され、α2-受容体刺激によるhigh affinity GTPase活性上昇抑制、並びに、basal 活性の上昇が観られた。この様に、PKAによるリン酸化を受ける事により、Giでは、そのsubunitの解離抑制を伴う機能変化が生じると考えられた。一方、Lithium添加では、α2-受容体刺激によるadenylate cyclase活性阻害の減弱が観られたが、Giのα、β、γ-subunitの三量体の解離状態の著明な変化、high affinity GTPase活性の変化は観られなかった。この様に、Gi蛋白の質的変動には、そのsubunitの解離の変化を伴う場合と伴わない場合が考えられた。

**目的**

百日咳毒素（IAP）感受性GTP結合（G）蛋白（40-41 K）は、cyclic AMP依存性 protein kinase（PKA）によるリン酸化を受ける事（１、２）により、並びに、lithium 添加（in vitro）（３）により、そのG蛋白のIAPによるADP-ribosylation量は減弱し、PKAによるリン酸化を受ける事により、ある種のG蛋白（Gi2）を介する共役反応（differentiated HL-60細胞に於けるguanine nucleotide 刺激によるphospholipase C活性）も阻害される事（２、４）を既に報告した。この時のIAP感受性G蛋白のsubunit間の解離状態、受容体刺激high affinity GTPase活性、並びに、IAP感受性G蛋白（特にGi）を介する他の共役反応（adenylate cyclase阻害）の変化を検討した。

**方法**

**試料調製**

Giは、宇井、堅田らの方法（５）にて、部分精製した。分離したヒト血小板の膜分画をtriethanolamine-HCL buffer（10 mM, pH 7.4）にて調製した。

**Giの解離**

Birnbaumerらの方法（６）に従い、部分精製Giを、PKA処理（MgATP存在下）、又は、LiCl存在下、37℃ 30min、incubate後、分子量マーカーを加えて、ショ糖密度勾配（5-20%）上に静置した後、100000 g, 90 min, 室温（15℃）にて超遠心した。Giのsubunitを解離させる場合は、ショ糖密度勾配上に静置時に、MgCl2 50 mM、GTPrS 500 μMを添加した。遠沈後各fractionを分取し、EDTA にて、Mg2+をchelating後、各分画を、1 mM ATP, 10 mM thymidine, 1mM EDTAを含むtriehanolamine（TEA）-HCl buffer （50 mM, pH 7.4）中で、1 μM 32P-NAD, IAP（2 μg/100μl）と、25℃ 90minで反応させ、Laemmmliのsample bufferに懸濁後、SDS-pageを行い、autoradiographyにて得た、40-41 Kのbandの吸光度をdensitometer（島津２波長chromatoscanner, CS-930）にて判定し、IAPによるADP-ribosylation量を測定し、Giのsubunitsの解離状態を観察した（１）。

**high affinity GTPase活性の測定**

Cassel and Selinger（７）の方法に従い、ヒト血小板膜をγ32P-GTP 0.5 μM, ATP 1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM, MgCl2 2 mM TEA-buffer 50 mM （pH 7.4）の反応液にて、25 ℃ 3-10 min incubateした後、charcoalを加えて反応を止めた。

**adenylate cyclase の測定**

ヒト血小板膜をγ32P-ATP 100 μM、GTP 1 μM、 EGTA 0.1 mM、 DTT 1 mM、 MgCl2 2 mM、isobuthylmethyl-xanthine 1 mM、CPNa2 0.164 mg/100 μl、CK 0.04 mg/100 μl、TEA-buffer 50 mM （pH 7.4）の反応液にて、25 ℃ 10 min、反応させた（８）。

**結果**

１）Gi蛋白のsubunit間の解離状態に対する影響

部分精製Gi（41K）をMgCl2、ATPの存在下PKA処置した後、ショ糖密度勾配法にて、GiのsubunitのMgCl2(5 mM) GTPrS(100 μM)による解離に対する影響を観た所、図１に示すように、抑制が観られた。一方、Lithium添加は、Giのsubunitの解離に影響を持たなかった（図2）。

２）受容体刺激GTPase活性

ヒト血小板膜分画を用いて、adrenaline（Ad）10 μM刺激によるhigh affinity GTPase活性の増加に対するPKA処置、Lithium 添加の影響を観た。図3に、示すように、反応液にPKAを添加すると、basal activityを増加させたが、Ad刺激は、減弱した。一方、Lithium添加は、その活性に著明な影響を与えなかった。

３）Giを介するadenylate cyclase阻害

ヒト血小板膜分画を用いて、adrenaline （Ad）10 μM刺激によるadenylate cyclase（forskolin刺激）活性阻害に対するPKA添加、Lithium 添加の影響を観た。図4に示すように、反応液にLithium 添加すると、forskolin

(Fors. 10 μM) 刺激活性は著明に変化しなかったが、Fors. (10 μM) 刺激に対するAdによる阻害は抑制された。一方、MgATP存在下、PKA添加により、Fors.刺激活性、並びに、Adによる阻害、GTP (0.1-30 μM) 刺激による活性は、著明な影響を受けなかった。

**考察**

PKAによるリン酸化の条件下で、MgGTPrSによるGiのα、β、γ-subunitの三量体からの解離、並びに、α2-受容体刺激によるhigh affinity GTPase活性上昇抑制、並びに、basal 活性の上昇が観られた。この様に、PKAによるリン酸化を受ける事により、Giでは、そのsubunitの解離抑制を伴う機能変化が生じると考えられた。Gi2を介する共役反応 (differentiated HL-60細胞に於けるguanine nucleotide 刺激によるphospholipase C活性) が阻害される事を既に報告した (2、4) が、上述の様に、ヒト血小板膜分画を用いたAd刺激によるadenylate cyclase活性阻害に対しては、PKA処置は著明な影響をもたらさなかった。この差異は、関与するGi蛋白のsubtypeの相違、連関する共役反応の相違によると考えられる。一方、Lithium添加では、α2-受容体刺激によるadenylate cyclase活性阻害の減弱が、観られたが、Giのα、β、γ-subunitの三量体の解離状態の著明な変化、high affinity GTPase活性の変化は観られなかった。この様に、Gi蛋白の質的変動には、そのsubunitの解離の変化を伴う場合と伴わない場合が考えられた。


文献

(1) Y.Watanabe, T.Imaizumi, N.Misaki, K.Iwakuras and H.Yoshida. FEBS Letters 236, 372-375, 1988.

(2) Y.Watanabe, T.Imaizumi, N.Misaki, K.Iwakura, N.Sakagoshi, Y.Matumori and H.Yoshida. Mechanism of Transmembrane Signalling. Elservier Sciences Publishers In presas.

(3) H.Kawamato, Y.Watanabe, T.Imaizumi, N.Misaki, M.Ooyanagi, T.Iwasaki and H.Yoshida. Bulletin of the Japanese Neurochemical Society 27, 28-29, 1988.

(4) N.Misaki, Y.Watanabe, T.Imaizumi and H.Yoshida. Bulletin of the Japanese Neurochemical Society 27, 320-321, 1988.

(5) T.Katada, M.Oinuma and M.Ui. J.Biol.Chem. 261, 8182-8191, 1986.

(6) J.Codina, O.Hildebrandt, L.Birnbaumer. J.Biol.Chem. 259, 11408-11419, 1984.

(7) D.Cassel and Z.Selinger. Biochim. Biophys. Acta 452, 538-551, 1976.

(8) T.Watanabe and K.H.Jakobs. Molecular Pharmacology 29, 258-263. 1986.

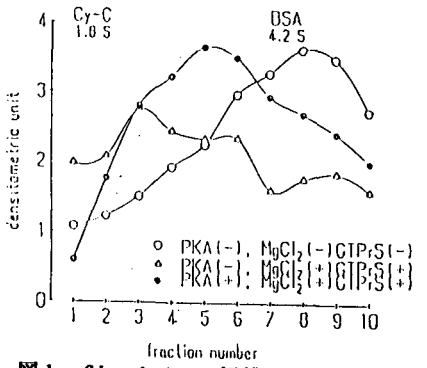




**図1 Gi subuitsの解離 (PKAの効果)**

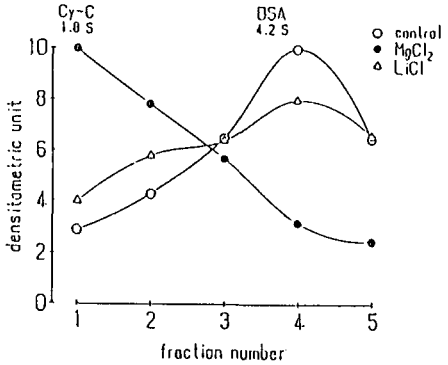



**図2 Gi subuitsの解離 (リチウムの効果)**

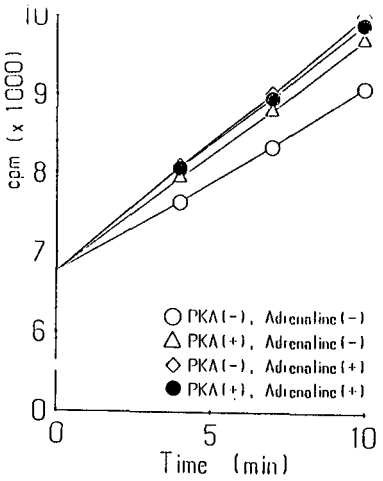



**図3 ヒト血小板high affinity GTPase 活性に対するPKAの影響**(one representative result of three experiments).

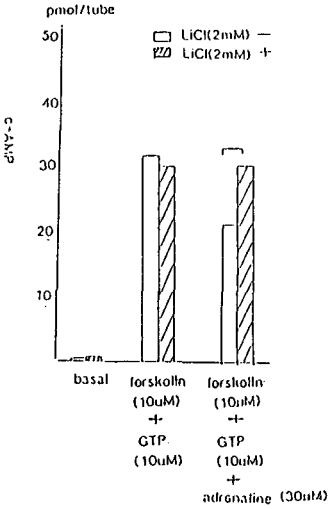



**図4 ヒト血小板adenylate cyclase活性に対するリチウムの影響**(one representative result of three experiments).

# 98 NG108-15 細胞のセロトニン受容体応答：グアニル酸シクラーゼの活性化

東田道久、野村靖幸
（北大、薬、薬効）

〔要約〕NG108-15 細胞におけるセロトニン（5-HT）受容体サブタイプ応答機構の解明を目的として、cAMP、cGMP 生成および、イノシトールリン酸産生への 5-HT の影響を検討した。5-HT は cAMP 生成の促進、抑制作用ならびに、イノシトールリン酸生成作用を有しなかったが、cGMP 含量を濃度依存的に上昇させた（$EC_{50}$:10 μM)。cGMP 量の上昇は $Ca^{2+}$ によっても引き起こされたが、5-HT による上昇に対して $Ca^{2+}$ の増減は影響しなかった。各種 5-HT 受容体サブタイプ（5-$HT_{1A}$, 5$HT_{1B}$, 5-$HT_{1C}$, 5-$HT_{1D}$, 5-$HT_2$, 5-$HT_3$）の アンタゴニスト 11 種の効果を検討したところ、そのいずれもがこの作用を抑制しなかった。以上の結果より、5-HT は既知の受容体以外の情報伝達系を介し、グアニル酸シクラーゼを活性化していることが推定された。また、NG108-15 細胞には、アデニル酸シクラーゼおよびフォスフォリパーゼCと連関する 5-$HT_{1A}$、5-$HT_{1C}$、ならびに 5-$HT_2$ 受容体は存在しないことも示唆された。

【緒言】

セロトニン（5-HT）受容体サブタイプの情報伝達機構として現在、5-$HT_{1A}$ がアデニル酸シクラーゼの抑制、5-$HT_{1C}$、5-$TH_2$ がポリフォスフォイノシチド（PI）代謝の促進に、5-$HT_3$ がイオンチャネルと共役している事を示唆する知見が得られている（1)。ニューロンのモデルとして多用されている培養 NG108-15 細胞は、5-HT により脱分極を引き起こすことが示唆されているものの、その受容体サブタイプと細胞内情報伝達機構は不明である（2)。また、結合実験から 5-$HT_3$ 受容体の存在が示されているもののその機能は不明である（3)。今回、この NG108-15 細胞の 5-HT受容体サブタイプと細胞情報伝達機構について検討を行った。

【実験方法】

細胞培養：NG108-15 細胞は polyornithine コーティングをほどこした 35 mm dish 上で、5 % 牛胎児血清（FCS）含有 DMEM-HAT 培地で培養し confluent になったものを用いた。cAMP、cGMP の定量：35 mm dish 上の培地を除き、新たに HEPES buffered saline（HBS）900 μl と アンタゴニストまたは vehicle 50 μl を添加し、37 ℃ で 5 分間インキュベートした後に、50 μl の 5-HT を添加し、37 ℃ で 10 分間反応させた。反応停止は 1 N HCl 100 μl 添加により行い、ラジオイムノアッセイキット（ヤマサ）により上清中の cAMP および cGMP を定量した。イノシトールリン酸の定量：35 mm dish 上の培地を除き、新たに inositol を除去した 2 % FCS 含有 DMEM 培地と [$^3$H] inositol 2 μCi/dish を添加し、17 時間培養した。反応は [$^3$H] inositol 含有培地を除き、洗滌後、HBS 900 μl と 5-HT100 μlを加え 37 ℃ で 1 分間インキュベートすることにより行った。その後、20 % トリクロロ酢酸（TCA）1 ml を添加して反応を停止、水飽和エーテルで TCA を除去した後、イオン交換樹脂（AG 1X8 ギ酸型、200-400 mesh）により各イノシトールリン酸を分離した。

【結果】

5-HT は NG108-15 細胞の cGMP 含量を濃度依存的に上昇させた（Fig.1)。cAMP 含量にはほとんど影響せず（Fig. 1)、また forskolin によって引き起こされた cAMP 含量の上昇に対しても影響しなかった。さらに、イノシトールリン酸の生成増大も引き起こさなかった(Table 1)。5-HT の cGMP 含量上昇効果の受容体サブタイプの同定を目的として各種 5-HT アンタゴニスト 前処置の影響を検討した。30 μM 5-HT によって引き起こされる cGMP 含量上昇に対して、

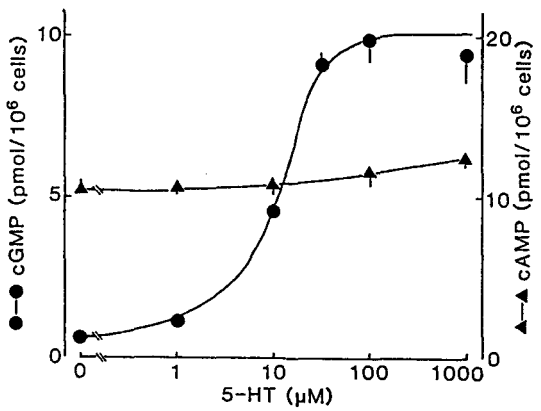



Fig. 1. Effects of 5-HT on cGMP and cAMP contents in NG108-15 cells

Table 1. Effects of 5-HT on inositol phosphates formation in NG108-15 cells

| | [$^3$H] $IP_n$ content (dpm/$10^6$ cells) | | |
|---|---|---|---|
| | $IP_1$ | $IP_2$ | $IP_3$ |
| 0 | 4029 ± 155 | 553 ± 42 | 172 ± 41 |
| 1 | 3578 ± 217 | 635 ± 24 | 177 ± 19 |
| 10 | 3763 ± 117 | 584 ± 80 | 182 ± 40 |
| 100 | 3178 ± 61 | 537 ± 55 | 188 ± 20 |
| 1000 | 2985 ± 139 | 622 ± 28 | 175 ± 22 |

Table 2. Effects of 5-HT antagonists on 30 μM 5-HT-induced elevation of cGMP content in NG108-15 cells

| | cGMP content (% of 30 μM 5-HT) | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | methysergide | pindolol | propranolol | mianserin | spiperone | ketanserin | ICS 205-930 | cocain | MDL 72,222 | imipramine |
| 0.01 μM | 98 ± 3.6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 0.1 | 116 ±12.5 | 114 ± 15.7 | — | 113 ± 4.8 | 99 ± 4.6 | — | 93 ± 2.8 | 100 ± 6.3 | 112 ±29.7 | — |
| 1.0 | 89 ± 4.3 | 104 ± 6.6 | — | 149 ±18.5 | 84 ±13.6 | — | 91 ± 6.2 | 113 ±10.2 | 104 ± 7.1 | — |
| 10 | 95 ± 9.8 | 125 ± 10.1 | — | 179 ± 0.0 | 83 ± 8.8 | — | 97 ± 7.1 | 107 ± 3.0 | 98 ± 5.7 | — |
| 100 | — | 132 ± 10.4 | 144 ± 7.7 | 142 ± 3.2 | 98 ± 9.7 | 91 ± 5.9 | 92 ± 3.3 | 102 ±14.0 | — | 153 ± 10.9 |

以下の 5-HT 受容体アンタゴニストすなわち、methysergide (5-$HT_1$)、spiperone (5-$HT_{1A}$, 5-$HT_2$)、yohimbine (5-$HT_{1D}$)、ketanserin (5-$HT_2$)、ICS 205-930 (5-$HT_3$)、cocaine (5-$HT_3$)、MDL 72,222 (5-$HT_3$) は全く影響しなかった。pindolol (5-$HT_{1B}$)、propranolol (5-$HT_{1B}$)、mianserin (5-$HT_{1C}$, 5-$HT_2$)、imipramine (5-$HT_{1C}$ (4,5), uptakeinhibitor) は逆に 5-HT の効果を増強させた (Table 2)。外液 $Ca^{2+}$ を除去し EGTA と TMB-8を添加 (細胞内遊離 $Ca^{2+}$ を減少)すると、cGMP 含量は減少した。一方、50 mM KCl と 10 μM BAY k 8644 の添加 (細胞遊離内$Ca^{2+}$ 増加) は、cGMP 含量を約 3 倍に増大させた。上記の条件下で 5-HT の効果を検討したところ、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度とは無関係な、対照群とほぼ同様のcGMP 含量の上昇が認められた(Fig. 2)。なお、1 μM tetrodotoxin (TTX) は無効であった。

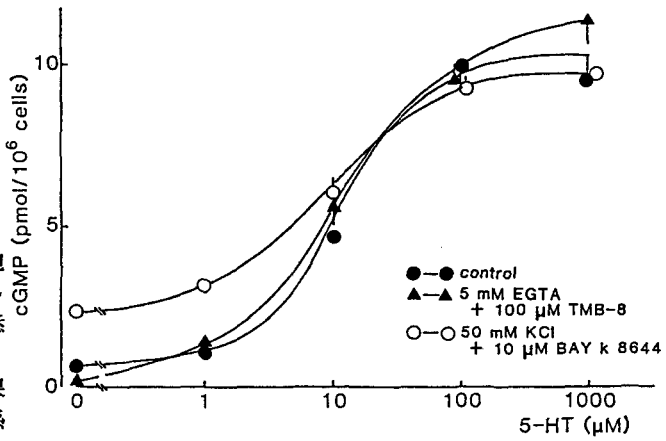



Fig. 2. Effects of 5-HT on cGMP contents under $Ca^{2+}$-rich or $Ca^{2+}$-free conditions in NG108-15 cells

【考察】

NG108-15 細胞は 5-HT を含有すること (6) より、本細胞において何らかの機能を有することが推定されるが不明瞭な点が多い。今回我々は、細胞情報伝達機構の面から NG108-15 細胞における 5-HT の機能についての検討を行った。5-HT は cAMP 生成の促進、抑制、PI 代謝の促進を引き起こさなかった。この事は、NG108-15 細胞膜にアデニル酸シクラーゼおよびフォスフォリパーゼCと共役した形での 5-$HT_{1A}$, 5-$HT_{1C}$, 5-$HT_2$ 受容体は存在しないことを示唆する。5-HT は本細胞の cGMP の上昇を引き起こすことが新たに見いだされた。その $EC_{50}$ 値は約 10 μM で、5-$HT_2$ サブタイプ様の 5-HT 親和性を有することが示唆されたが、5-$HT_2$ アンタゴニスト の spiperone、ketanserin は影響しなかった。その他の 5-HT 受容体 アンタゴニスト も全て 5-HT の cGMP 上昇作用を抑制しなかった。また、細胞を熱処理、および 0.1 N HCl 処理により死滅させた後に 5-HT を作用させると cGMP 上昇は認められなかった。以上の結果より、5-HT は未知の 5-HT 受容体サブタイプに作用し、cGMP の上昇を引き起こすと推定された。NG108-15 細胞内の cGMP 含量は $Ca^{2+}$ の除去により減少し、$Ca^{2+}$ 増加状態にすると逆に cGMP 含量が増加した。この事より本細胞のグアニル酸シクラーゼ (GC)は $Ca^{2+}$ により活性化されることが示唆された。しかし、5-HT に対する反応性は$Ca^{2+}$ により影響を受けなかった。TTX が無効であったことより $Na^+$ チャネルも関与しないと考えられる。GC には可溶性と膜結合性との 2 種類が存在することが示されているが (7)、本細胞が 5-HT により PI 代謝を生じないことも考え合わせると、この cGMP 上昇は膜結合性 GC 活性化により生じているものと考えられるが、詳細な機構については現在検討中である。

【参考文献】


1) Harting, P.R. (1989) TIPS 10, 64.
2) Christian, C.N., Nelson, P.G., Bullock, P., Mullinax, D. and Nirenberg, M. (1978) Brain Res. 147, 261.
3) Hoyer, D. and Neijt, H.C. (1987) Eur. J. Pharmacol. 143, 291.
4) Tohda, M., Takasu, T. and Nomura, Y. (1989) Eur. J. Pharmacol. in press.
5) 東田道久、高須俊行、野村靖幸 (1988) 神経化学 27, 304.
6) Suzuki, O., Hattori, H., Sawada, M., Nagatu, T., Miki, N. and Higashida, H. (1983) Neurochem. Int. 5, 599.
7) 三木直正 (1986) 代謝 23, 277.

# 99　ラット脳からのヒスタミンH２受容体の可溶化とその性質について

温田　隆、小澤　光一郎、瀬川　富朗
（広島大・医・薬効解析）

〔要約〕

ラット脳からのヒスタミン$H_2$受容体の可溶化とその性質について検討した。ラット脳$H_2$受容体は両イオン性の可溶化剤であるＣＨＡＰＳ (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) ,６ mM により有効に可溶化された。可溶化$H_2$受容体は膜に結合した$H_2$受容体の薬理学的性質を保持していた。また、可溶化$H_2$受容体への［$^3$Ｈ］ヒスタミン結合のScatchard 解析の結果、Ｋｄ値 3.2 nM と 32.1 nM の２つの異なる親和性を有する結合部位の存在が明らかになった。これらのＫｄ値は膜に結合した$H_2$受容体で得られるものとほぼ同じ値であった。さらに、可溶化$H_2$受容体への［$^3$Ｈ］ヒスタミン結合の速度論的パラメーターは膜に結合した$H_2$受容体のものと近似していた。そして、可溶化$H_2$受容体への［$^3$Ｈ］ヒスタミン結合はＧＴＰとＧＴＰγＳにより濃度依存的に抑制され、$MgCl_2$により増加し、ＮａＣｌにより減少した。以上の結果より、ラット脳ヒスタミン$H_2$受容体がＣＨＡＰＳによりＧ蛋白質に共役した形で、膜に結合した$H_2$受容体の性質を保持したまま可溶化されることが示唆された。

ヒスタミン受容体には、$H_1$，$H_2$，$H_3$の３つのサブタイプが示唆されており (6)、数多くの研究が行われている。われわれは、$H_2$受容体の結合調節機構について研究を行ってきており、第３０回・第３１回本学会において、［$^3$Ｈ］ヒスタミンが低濃度のメピラミン（$H_1$アンタゴニスト）存在下で$H_2$受容体に選択的に結合し、その結合がＧ蛋白質により調節されていることを報告した (4,5) 。一方、受容体の性質を明らかにする上で、受容体蛋白質を単離・精製することは有効であり、その第一段階として可溶化は必要な過程である。そこで今回、ラット脳からの$H_2$受容体の可溶化を試み、その性質について検討を行った。

［方法］

Wistar系雄性ラット大脳皮質より得られた$P_2$画分を 10 mM $MgCl_2$ を含む 50 mM Tris-$H_2SO_4$ buffer (pH 7.48) に懸濁させ、37℃で30分間インキュベートし内因性ヒスタミンの除去を行い、遠心と懸濁を繰り返すことにより充分に洗浄したものを膜画分とした。この膜画分を可溶化剤を含む 100 mM Tris-$H_2SO_4$ buffer (pH 7.48)に懸濁させ、氷中１時間放置し、100,000 ×ｇで１時間遠心を行い、得られた上清を可溶化膜画分とした。［$^3$Ｈ］ヒスタミン結合実験は、上記方法によって得られた膜画分あるいは可溶化膜画分を 40 nM のメピラミンを含む 100 mM Tris-$H_2SO_4$ buffer(pH7.48)に懸濁させ、［$^3$Ｈ］ヒスタミン及び各種薬物を加え、30℃で45分間インキュベートすることによって行った。その後、Bruns らの方法 (1)に従い0.3 %ポリエチレンイミンで前処理したＧＦ／Ｂフィルターを用い吸引沪過法によりＢＦ分離を行った。特異的結合量は 100μM 非放射性ヒスタミンで置換される量とした。

［結果］

ラット脳からの［$^3$Ｈ］ヒスタミン結合部位（$H_2$受容体）の可溶化における各種可溶化剤の効力を検討した結果、可溶化される蛋白量はいずれの可溶化剤においても、約40～60%認められたが、［$^3$Ｈ］ヒスタミン結合活性はＣＨＡＰＳ（６ mM ）においてのみ16%と有効に可溶化された(Fig.1) 。可溶化$H_2$受容体への［$^3$Ｈ］ヒスタミン結合は$H_2$アゴニスト・アンタゴニストにより低濃度で阻害されるが、$H_1$アゴニスト・アンタゴニストでは高濃度でしか阻害されなかった。その結果より得られる$IC_{50}$値は膜に結合した$H_2$受容体のものと近似していた(Table.1) 。可溶化$H_2$受容体への［$^3$Ｈ］ヒスタミン結合のScatchard 解析の結果、膜に結合した$H_2$受容体と

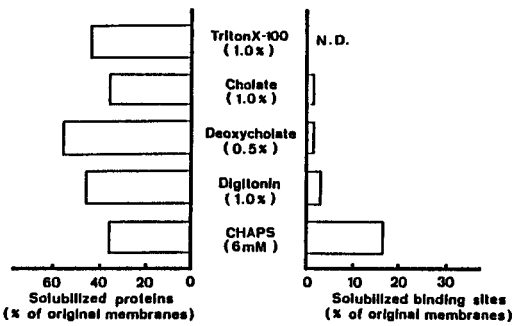



Fig.1 Solubilization of membrane proteins and [$^3$H] histamine binding sites by various detergents.

ほぼ同じ平衡解離定数Ｋｄ値（3.2 nM ,32.1 nM ）が得られた。また、速度論的解析の結果、結合速度定数（$k_1$ ),解離速度定数（$k_{-1}$ ）は膜に結合した$H_2$ 受容体のものと近似していた。つぎに可溶化$H_2$ 受容体への［$^3$ Ｈ］ヒスタミン結合に対するヌクレオチドの影響を検討したところ、ＧＴＰとＧＴＰγＳは濃度依存的に抑制し、ＡＴＰは影響しなかった(Fig.2) 。更に、可溶化$H_2$ 受容体への［$^3$ Ｈ］ヒスタミン結合を$MgCl_2$ は増加させ、ＮａＣｌは減少させた。

［考察］

今回の実験結果より、ラット脳より［$^3$ Ｈ］ヒスタミン結合部位がＣＨＡＰＳ（６mM）により可溶化されることが示唆された。そして、その可溶化画分への［$^3$ Ｈ］ヒスタミン結合が$H_2$ アゴニスト・アンタゴニストにより低濃度で阻害されたことより、その結合が$H_2$ 受容体へのものであることを強く示唆するものであり、$H_2$ 受容体が可溶化されたことが推定される。また、この可溶化$H_2$ 受容体への［$^3$ Ｈ］ヒスタミン結合の Scatchard解析・速度論的解析より得られた各種パラメーターの値が膜に結合した$H_2$ 受容体へのものと近似していたことより、膜に結合した$H_2$ 受容体の性質を保持したまま可溶化されたことが示唆される。また、グアニンヌクレオチド，$MgCl_2$ ，ＮａＣｌの効果も認められることから、G蛋白質との共役機構も保持しているものと推定される。このように、G蛋白質との共役機構を保持したまま可溶化されたものとして$\alpha_2$ 受容体 (3) ,$D_2$ 受容体 (2) などが報告されている。一方、ＣＨＡＰＳによる可溶化は多くの受容体で行われており、今回の可溶化画分中には数多くの受容体が含まれている可能性があり、今後、ゲルろ過・アフィニティーカラムクロマトグラフィー・電気泳動法などを使うことにより精製へ向けて実験を行っていく予定である。

| | −log［IC50(M)］ | |
|---|---|---|
| | Solubilized | Membrane−bound |
| Histamine | 7.97 ± 0.03 | 8.19 ± 0.03 |
| Impromidine | 7.34 ± 0.10 | 7.34 ± 0.16 |
| Dimaprit | 5.79 ± 0.25 | 5.84 ± 0.05 |
| Famotidine | 6.99 ± 0.46 | 7.18 ± 0.70 |
| Cimetidine | 6.06 ± 0.12 | 6.00 ± 0.06 |
| Metiamide | 5.71 ± 0.38 | 5.94 ± 0.60 |
| 2−PEA | 4.60 ± 0.04 | 4.65 ± 0.46 |
| Diphenhydramine | 3.81 ± 0.02 | 3.42 ± 0.11 |

Table.1 Inhibition of [$^3$H] histamine binding to solubilized and membrane−bound $H_2$−receptors by histaminergic agonists and antagonists.

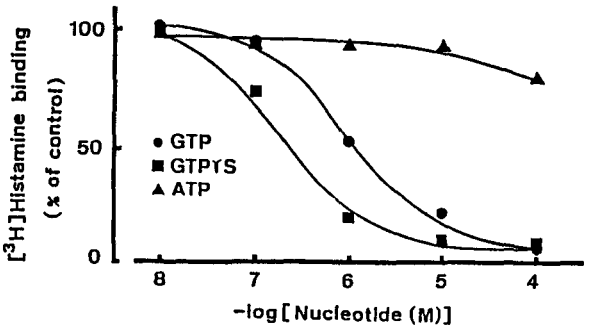



Fig.2 Effect of GTP , GTPγS and ATP on [$^3$H] histamine binding to solubilized $H_2$−receptors.

最後に本実験にご協力いただいた、藤島　祐子　嬢に深く感謝する。

［文献］

(1) Bruns R.F.,Lawson-Wendling K.,and Pugsley T.A. (1983) Anal.Biochem.132, 74-81.
(2) Kuno T.,Saijoh K.,and Tanaka C. (1983) J.Neurochem.41, 841-847.
(3) Matsui H.,Asakura M.,Tsukamoto T.,Imafuku J.,Ino M.,Saitoh N.,Miyamura S.,and Hasegawa K. (1985) J.Neurochem.44, 1625-1632.
(4) 小澤光一郎, 瀬川富朗 (1987) 神経化学 26, 475-477.
(5) 小澤光一郎, 瀬川富朗 (1988) 神経化学 27,134-135.
(6) Schwartz J.C.,Arrang J.M.,Garbarg M.,and Korner M. (1986) J.exp.Biol.124, 203-224.

# 100 疼痛制御機構における脳内生理活性アミンの役割について

武田弘志1，2），小口勝司1）
1）（昭和大学医学部第一薬理学教室）
2）（東京医科大学薬理学教室）

〔要約〕
脳に於ける疼痛制御機構追求の一環として、熱〔Thermal nociception(TN)〕あるいは圧侵害刺激〔Mechanical nociception(MN)〕誘発疼痛を有するラット脳内ドーパミン、セロトニンおよびノルアドレナリン作動性神経系の動態、並びにこの動態に及ぼす electric acupuncture(EA) の影響をクーロメトリーHPLCを用いて神経化学的に検討した。TN(55℃) あるいは MN(75～85g) は、視床下部、中脳および延髄内 DA, DOPAC 含量を有意に増加させた。また、中脳および延髄に於ける HVA 含量も、TN あるいは MN により有意に増加したが、視床下部では、TN でのみ認められ、MN では 3-MT 含量の増加が認められた。下垂体に於いて、MN 後 DA, 3-MT 含量の増加が生じた。EA 処置により、上記した視床下部、中脳および下垂体での DA とその代謝物含量の増加は著明に抑制された。TN 後に、視床下部、中脳および延髄内 5-HT, 5-HIAA 含量が有意に増加し、また、MN では、視床下部での NE 含量増加、中脳および延髄での MHPG 含量増加が認められた。TN あるいは MN が誘発する 5-HT, NE およびこれら代謝物含量の増加は、EA 処置により何ら影響を受けなかった。以上の所見から、ラット脳内には、異種侵害刺激を認識する機構が存在することが示唆された。また、TN あるいは MN が誘発する疼痛の発現には、脳内ドーパミン作動性神経系が関与することが示唆された。

〔目的〕
侵害刺激により誘発される疼痛に対する脊髄レベルでの制御機構については、詳細な報告がみられる[4]。しかし、脳内での制御機構及び異種侵害刺激の認識機構の存在についての報告は少ない。本研究では、TN あるいは MN が誘発する疼痛時の脳内ドーパミン、セロトニンおよびノルアドレナリン作動性神経系の動態、並びにこれら神経の動態に及ぼす EA の影響を神経化学的に検討し、脳内疼痛制御機構に於けるこれら神経系の役割、さらには異種侵害刺激に対する認識機構の存在について考察を加えた。

〔実験方法〕
1）侵害刺激による疼痛誘発
実験には、体重 250-280g の SD 系雄性ラットを用いた。疼痛は、ラット尾部に TN(55℃) あるいは MN(75-85g) を、10 分間隔で、それぞれ 50 分、40 分間行うことにより誘発させた。また、TN あるいは MN 時の疼痛発現の判定には、それぞれ Tail Flick Latency 法[1]、Randall-Seritto 法[2]を尾部に応用した方法を用いて行った。侵害刺激誘発疼痛を有するラットの脳は、以後の神経化学的検討に用いた。
2）EA 処置
実験には、体重 260-300g の SD 系雄性ラットを用いた。EA は左右のヒト足三里穴相当部位にステンレス（40mm 20′号）鍼を刺入し、1Hz の通電を 40 あるいは 50 分間施すことによった。通電開始後、10 分間隔で、疼痛の誘発に TN を用いた場合は、Tail Flick Latency 法[1]を、また、MN の場合は、Randall-Seritto 法[2]を尾部に応用した方法を用い鎮痛効果を測定し、効果が最大に達した時点で、ラットの脳を摘出し、実験1）と同様、以後の神経化学的検討に用いた。
3）脳内 catecholamine(CA), indoleamine(IA) およびその関連代謝物含量の測定
上記した実験1）、2）から得た脳は、中脳、視床下部、延髄および下垂体に分割し、組織サンプルとした。各部位組織は、液体窒素内で凍結した後、0.1mM $HClO_4$, 0.1M EDTA, 1N $NaHSO_3$ および内部標準物質（deoxyepinephrine, 5-hydroxy-Nω-methyltryptamine）を含む混合液内でホモジネートした。その後、遠心分離（20,000 x g）を行い、上清液 10μl をクーロメトリーHPLCシステム[3,5,6]に直接注入し、CA〔norepinephrine(NE), epinephrine(E), dopamine(DA)〕, IA〔5-hydroxytryptamine(5-HT)〕およびその関連代謝物〔4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol (MHPG), 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid(DOPAC), homovanillic acid(HVA), 3-methoxytramine(3-MT), 5-hydroxyindole-3-acetic acid(5-HIAA)〕量を測定した。

〔実験結果〕

1）TN あるいは MN 誘発疼痛時の脳内生理活性アミン動態

視床下部内 CA,IA およびその関連代謝物動態に及ぼす侵害刺激の影響を Fig.1 に示した。MN あるいは TN により、視床下部内 DAおよび DOPAC 含量の有意な増加が認められた。また、HVA および3-MT 含量には特徴的変動が生じ、TN では HVA 含量、MN では 3-MT 含量が著明に増加することが観察された、さらにMN による NE 含量の有意な増加と 5-HT含量の減少、TN による 5-HTおよび 5-HIAA 含量の有意な増加が認められた。中脳に於て、MN あるいはTN によるDA,DOPAC, HVA および 3-MT含量の有意な増加が認められた。また、TN は 5-HT, および5-HIAA 含量の増加を誘発しさらに、MN は MHPG 含量の有意な増加を生じさせた。延髄に於て、MN あるいは TN により DA, DOPAC および HVA 含量が、いずれも有意に増加した。また、TN による 5-HT, および 5-HIAA 含量の有意な増加と MN による有意な MHPG 含量の増加が生じた。MN により下垂体内 DA および 3-MT 含量の著明な増加が認められたが、TN では、特記すべき変動は生じなかった。

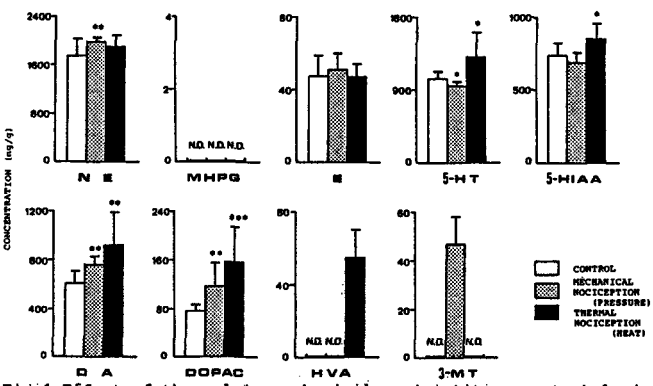



Fig.1 Effect of thermal or mechanical nociception on catecholamines, indoleamines and related metabolites contents in hypothalamus of rat brain. N.D.: Not detectable Each column represents the mean ± S.D. of 8-10 animals. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$

2）TN あるいは MN 誘発疼痛時の脳内生理活性アミン動態に及ぼす EA の影響

EA 処置により、視床下部に於て MN あるいは TN が誘発する DA および DOPAC 含量の増加が著明に抑制された。さらに、TN による HVA 含量増加、MN による 3-MT 含量増加のいずれも抑制された。一方、EA 処置は、MN での NE 含量増加、さらには TN による 5-HT および 5-HIAA 含量増加に対しては何ら影響を示さなかった。 MN あるいは TN が誘発する中脳内 DA および DOPAC 含量の増加は、EA 処置により有意に抑制された。さらに、TN による HVA および 3-MT 含量増加も EA 処置により、同様に抑制された。また EA 処置は、 TN が誘発する 5-HT および 5-HIAA 含量増加ならびに MN による MHPG 含量増加に対して影響を示さなかった。延髄に於て、MN あるいは TN により誘発される DA,DOPAC および HVA 含量増加、TN による 5-HT および 5-HIAA 含量増加、また MN による MHPG 含量増加のいずれも EA 処置により何ら影響を受けなかった。下垂体に於いて、MN が誘発する DA および 3-MT 含量の増加が EA 処置により有意に抑制された。

〔考察〕

本研究で得た所見から、TN 誘発疼痛時には、脳内ドーパミンおよびセロトニン作動性神経系が、また、MN 誘発疼痛に於いては、ドーパミンおよびノルアドレナリン作動性神経系の活性亢進が明かとなった。このことから、ラット脳内には、異種侵害刺激を認識する機構が存在することが示唆された。さらに、EA 処置により、脳内ドーパミン作動性神経系の活性亢進のみが抑制されることから TN あるいは MN が誘発する疼痛の発現過程に於いて脳内ドーパミン作動性神経系が重要な役割を演じることが示唆された。

〔文献〕

1) D'Amour,F.E. et.al.(1941) J. Pharmacol. Exp.Ther., 72, 74P
2) Ottoson,D (1983) Physiology of the Nervous System. Macmillan Press 485P
3) Randall,L.O. et.al.(1957) Arch. int. Pharmacodyn., 111, 409P
4) Sugiyama,H. et.al.(1988) Japan. J. Pharmacol. 252P
5) 武田弘志ほか(1987) 第８回液体クロマトグラフィー討論会講演要旨集 139-140.
6) Takeda,H. et.al.(1989) Japan. J. Pharmacol. 274P.

# 101 培養脳腫瘍細胞におけるプロテインキナーゼCアイソザイムの発現に関する免疫組織化学的研究

中村博彦，設楽信行，藤堂具紀，高倉公朋
東京大学脳神経外科

〔要約〕

C6ラット及びU251ヒトグリオーマ細胞，グリオブラストーマ由来培養細胞3種，髄膜腫由来培養細胞3種の計8種の脳腫瘍培養細胞についてプロテインキナーゼCアイソザイムを免疫組織化学的検索により同定した。いずれの細胞もTypeⅠ，TypeⅡはコントロールと同程度に全く染色されず，TypeⅢのみ細胞質が著明に染色された。C6，U251について染色性を検討すると，対数増殖期には全ての細胞が一様に染色されるが，定常期に達すると一部の細胞のみ染色されるようになり，また無血清により48時間でCキナーゼの染色性が消失し血清を再び加えることにより6時間以内に染色性が回復した。以上の結果より代表的な脳腫瘍培養細胞はいずれもCキナーゼのTypeⅢのみ存在し，またCキナーゼ蛋白の発現は増殖サイクルや血清中に含まれる種々の成長因子によりコントロールを受けていることが証明された。

〔目的〕

プロテインキナーゼC（以下Cキナーゼと略す。）は細胞の刺激応答に共役した細胞膜のリン脂質代謝回転にともなって産生されるジアシルグリセオールや発癌プロモーターとして知られるホルボールエステルによって活性化され，細胞の分裂増殖の制御や癌化に大きく関与していると考えられている。[3] 1985年以来，Cキナーゼの機能解明のための有力な手段としてポリクローナル抗体が使用されてきたが，Cキナーゼは蛋白生化学的に3種類のアイソザイムに分離されるために最近になって各アイソザイムを特異的に認識するモノクローナル抗体が開発された[1]。Cキナーゼアイソザイムは組織間や細胞間で分布に差が認められ，正常脳についても特異的なCキナーゼアイソザイムの免疫組織学的分布が明らかにされつつある[1,4]。代表的な悪性脳腫瘍であるグリオーマ細胞については，Cキナーゼが細胞増殖や機能の発現に重要な役割を担っていることを我々は既に報告しているが[2]，アイソザイムの発現様式や細胞内分布にについては未だ明らかにされていない。我々は培養脳腫瘍細胞における免疫組織学的なCキナーゼアイソザイムの局在と，細胞の増殖サイクルや血清によるCキナーゼの影響を調べることを目的として本研究を施行した。

〔材料及び方法〕

ラットC6グリオーマ細胞，ヒトグリオーマ株U251細胞，グリオブラストーマ由来培養細胞（3種，継代3－5代），髄膜腫由来培養細胞（3種，継代4－5代）の計8種の細胞をRab-Tek tissue culture chamber/slides (4 chambers) で10% FCSを含むMEM培地にて5%$CO_2$，37℃で培養し，70%冷アルコールにて30分間固定し風乾後医学生物学研究所（MBL）製Cキナーゼアイソザイム染色テストを用いてPAP法にて染色した。C6，U251細胞については対数増殖期，定常期についてそれぞれ染色した。また血清のCキナーゼに与える影響について調べるために，対数増殖期に無血清のMEM培地に培養液を交換し48時間後に再び血清を含むMEMに交換して染色性の変化を調べた。

〔結果〕

全ての8種の培養脳腫瘍細胞はいずれもTypeⅢのみに強陽性所見を示し，TypeⅠ，Ⅱはコントロールと同程度に全く染色されなかった。染色部位の細胞内分布としては8種の細胞ともほとんど全ての細胞の細胞質が均一に染色され一部の細胞は核も陽性であった。C6，U251細胞について増殖サイクルとの関連性を調べてみると，対数増殖期には全ての細胞が陽性であったが定常期に達した細胞では染色性に細胞間でばらつきが存在し染色されない細胞も存在した。また対数増殖期に無血清のMEMに交換すると48時間後にはCキナーゼは認められなくなり，10%血清を含むMEMに再び交換すると6時間以内に染色性が回復した。

〔考察〕

本研究で8種の培養脳腫瘍細胞に対する免疫組織化学的解析の結果，すべての細胞ともCキナーゼアイソザイムTypeⅢの

み検出された。グリオブラストーマ（神経膠芽腫）はグリア（神経膠細胞）より発生する悪性脳腫瘍を代表する腫瘍であり，髄膜腫はクモ膜絨毛または髄膜より発生する良性脳腫瘍を代表する腫瘍である。実際に手術により患者から採取された腫瘍組織もTypeⅢが優位であることから[5]，脳腫瘍のCキナーゼはTypeⅢであると言える。Cキナーゼは現在ではcDNAクローンの解析により少なくとも7つの分子種（$\alpha$，$\beta_1$，$\beta_2$，$\gamma$，$\delta$，$\epsilon$，$\zeta$）が存在し，各分子種に対する特異的抗体を用いた検索の結果，TypeⅠ（$\gamma$），Ⅱ（$\beta_1$，$\beta_2$），Ⅲ（$\alpha$）については特有の分布を示すことが明らかになっている。[1,4] TypeⅠは中枢神経系のニューロンのみに存在しており小脳Purkinje細胞層や大脳皮質に，TypeⅡは小脳皮質分子層や顆粒層，黒質，橋核に，TypeⅢはほとんど全ての臓器に存在するが脳内では主にグリア細胞に認められ，我々の結果は腫瘍の発生母地を考えれば当然の結果であり培養細胞では特異性がとりわけ顕著になっている。

Cキナーゼの主要な機能として細胞増殖や癌化に重要な役割を果たしていることは既に知られているが[3]，C6とU251細胞という確立されたラット及びヒトのグリオーマ細胞を本研究に使用することにより，Cキナーゼ自体も増殖サイクルによって細胞自身によりその発現が調節され対数増殖期に比較して定常期になるとCキナーゼの量が減少し，また血清に含まれる種々の成長因子は単にCキナーゼを刺激して増殖のシグナルを核に伝達するだけではなくCキナーゼ自体の産生を促進する作用を有していることが本研究より明らかになった。グリオーマ細胞におけるCキナーゼの機能を考える上でCキナーゼ発現の調節機構を研究することは非常に重要であり，本研究で使用したCキナーゼアイソザイムに対するモノクローナル抗体はこれらの研究にきわめて有用であろうと考えられる。

## 〔文献〕


1) Hidaka H.:Cell type-specific expression of protein kinase C isozymes in the rabbit cerebellum. J. Biol. Chem. 263：4523-4526, 1988

2) Nakamura H. et al, : Phorbor esters stimulate DNA synthesis and cell proliferation in cultured glioma cells. The seventh international conference on brain tumor research and therapy (Moto-Hakone), 1987

3) Nisizuka Y. : Studies and perspectives of protein kinase C. Science 233：305-312, 1986

4) Nisizuka Y. : The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. Nature 334：661-665, 1988

5) Todo T. et al. : Immunohistochemical studies on the expression of protein kinase C isozymes in brain tumors. The second meeting of the society for the brain and immunology (Tokyo), 1989

# 102 培養クロマフィン細胞のカテコールアミン放出反応に対するヒスタミンの促進作用について

郷 保正*、 黒沢 淳
（塩野義製薬株式会社 研究所）

〔要約〕
ヒスタミン(His) はウシ副腎髄質培養クロマフィン細胞からのカテコールアミン(CA)放出反応を促進した。 HisによるCA放出反応は刺激濃度によって 2相に分離された。このうち高濃度 Hisによって生ずる刺激直後の一過性の放出は非特異的反応であると思われたが、持続的な放出は $H_1$ 受容体を介した His特異的な反応であった。この持続的放出反応は絶対的に細胞外$Ca^{2+}$を要求したが、開口放出に必須とされる$Ca^{2+}$の流入は膜電位依存性$Ca^{2+}$チャンネルを介したものは一部であった。 Hisはまた細胞内$Ca^{2+}$貯蔵部位からの$Ca^{2+}$放出を促進し、同時にprotein kinase C (PKC)活性の膜画分への移動（即ちPKC 活性化）を促進した。 こうした条件を$Ca^{2+}$-ionophoreとPKC 活性化剤を併用して再現すると、 Hisによる反応と同じ性質を有するCA放出反応が得られた。以上の結果は HisによるCA放出反応は細胞内$Ca^{2+}$の上昇とPKC 活性化に由来するものであることを示唆し、これらの細胞内反応が膜電位依存性$Ca^{2+}$チャンネル以外のゆっくりした$Ca^{2+}$流入系を活性化する可能性を示す。

ヒスタミン(His) は中枢及び末梢神経系で神経伝達物質として機能しているが、副腎でも存在することが示されている。近年、ウシ副腎髄質培養クロマフィン細胞においても Hisがカテコールアミン(CA)放出を促進することが報告されている。しかし、この HisによるCA放出機構については未だ殆ど明らかにされていない。そこで HisによるCA放出機構を明らかにすることを目的として本研究を行った。

［実験方法］
クロマフィン細胞は、Kilpatrickら[1]の方法によりウシ副腎髄質より単離し、24穴プレートで培養した。細胞は培養4-6 日の間に assayに用いた。各wellより培養液を除き、37℃でLocke's 液と置換しCA assayを行った。CAは HPLC-ECD により定量した。細胞内free- $Ca^{2+}$濃度の測定はFura 2を取り込ませた懸濁細胞を用いて Grynkiewiczら[2]に従って行った。Protein kinase C (PKC)活性の測定は12穴プレートで培養した細胞を用いてTerBush ら[3]に従って行った。

［実験結果及び考察］
1) His刺激によるPKC 活性と細胞内$Ca^{2+}$濃度の変化
His $10^{-5}$M で刺激すると細胞内可溶性画分のPKC 活性の膜画分への移動が認められた。この移動幅は2 分間刺激時で全活性の約10% に相当した。ちなみにPhorbol myristate acetate (PMA) $10^{-6}$M で10分間刺激すると約40% のPKC 活性の膜画分への移動が認められた。このPKC 活性の膜画分への移動は細胞のPKC の活性化を意味するとされている[3]。
His $10^{-5}$M で刺激すると細胞内$Ca^{2+}$濃度 ( $[Ca^{2+}]i$) が上昇した。この時細胞外$Ca^{2+}$濃度を0 mMにしても $[Ca^{2+}]i$の上昇が認められ、その上昇幅は細胞外$Ca^{2+}$存在下のそれの約 60%に相当した。これはニコチン( Nic)による上昇が細胞外$Ca^{2+}$に絶対的に依存するのとは大きく異なる。これらのことは His刺激時には燐脂質代謝が亢進し、その時生成されるInositol phosphates により細胞内$Ca^{2+}$貯蔵部位から$Ca^{2+}$が放出されたことを示唆し、 Nicの場合、受容体に付随したイオンチャンネルを介した$Na^+$の上昇が膜電位依存性$Ca^{2+}$チャンネルを活性化し細胞内$Ca^{2+}$を上昇させると考えられているのとは明らかに異なる。
2) His刺激によるCA放出反応の一般的性質
細胞を$10^{-5}$M の His或いは Nicで20分間刺激すると細胞全含有CA量のそれぞれおよそ 6% , 12% の放出が認められた。Nic $10^{-5}$M で刺激した時、CA放出は 5分以内に終了し、その後は全く放出促進は認められなかった。しかし、His $10^{-5}$M によるCA放出は持続的であり、少なくとも30分間ほぼ同じ速度で放出が持続した。 また、Nic によるCA放出は典型的な一種の受容体を介すると思われる用量依存性の反応曲線を描くのに対し、 HisによるCA放出は$10^{-7}$から$10^{-3}$M までほぼ直線的に増大した。低濃度（≦$10^{-5}$M ）の HisによるCA放出はincubation時間の増加に伴ってほぼ直線的に増加したが、高濃度の Hisでは刺激後約 5分の間に一過性のCA放出（初期放出）が生じ、その後持続的な放出（持続放出）が生じた。初期放出反応はHis $10^{-5}$M では極めて僅かであるが$10^{-3}$M まで刺激濃度の上昇に伴い増加した。一方、持続放

出は$10^{-7}$M で明らかであり$10^{-5}$M でプラトーに達した。これらのことは HisによるCA放出反応は初期放出、持続放出の2種の系が関与しており、これにより上述した HisによるCA放出が広い用量範囲にわたって直線性を保つことが説明される。

3) His刺激による初期放出反応

Hisによる初期放出反応は細胞外液$Ca^{2+}$に非依存性であった。また細胞内$Ca^{2+}$貯蔵部位よりの$Ca^{2+}$放出による細胞内$Ca^{2+}$濃度の上昇のみからは高濃度の HisによるCA初期放出反応は説明されない。なぜなら His刺激は細胞内の$Ca^{2+}$貯蔵部位よりの$Ca^{2+}$放出を促進したが、この促進作用は$10^{-7}-10^{-5}$M の範囲でのみ用量に依存して上昇し、$10^{-5}$M 以上$10^{-3}$M まででは変化は認められなかったからである。さらに初期放出反応は His受容体拮抗剤存在下でも認められた事から高濃度のHis による非特異的放出反応と考えられた。

4) His刺激による持続放出反応の性質

持続放出の機構を調べるため、$10^{-5}$MHisによるCA放出について以下の検討をした。 HisによるCA放出は $H_1$ 拮抗剤によって完全に抑制されたが、 $H_2$ の拮抗剤では抑制されなかった。またHis による $[Ca^{2+}]i$の上昇も $H_1$ 受容体拮抗剤により完全に抑制された。CA放出反応は Nicの場合と同じく細胞外液$Ca^{2+}$を絶対的に要求し、非存在下では全く認められなかった。膜電位依存性$Ca^{2+}$チャンネルの阻害剤である Nifedipine (Nif) を作用させると、 Nic によるCA放出は$10^{-7}-10^{-5}$M の Nifで約 80%程度の抑制を受けたが、 HisによるCA放出は$10^{-5}$M Nif で約 40%程度抑制されるにすぎず、また別種の $Ca^{2+}$チャンネルの阻害剤であるω-conotoxinでも殆ど影響を受けなかった。 同様に Nic刺激時による $[Ca^{2+}]i$ の上昇は Nifにより大幅な抑制を受けたが、 His刺激時にはわずかな抑制が認められたにすぎなかった。更に、 Nic或いは His刺激をhigh $K^+$ 存在下で行うと、 Nicにより引き起こされるCA放出量はhigh $K^+$の濃度に依存して減少したが、 HisによるCA放出量は 35mM $K^+$まで殆ど影響を受けなかった。以上の結果は、 HisによるCA放出は絶対的に外液$Ca^{2+}$を要求するが、 Nicとは異なり膜電位依存性$Ca^{2+}$チャンネルを介するものはほんの一部であり、大部分はこのチャンネルを介さないで$Ca^{2+}$流入が生じ、CAが放出されていることを示唆する。放出反応が極めてゆっくりした持続的なものであることから、この場合の$Ca^{2+}$流入はチャンネルではなくゆっくりした$Ca^{2+}$の流入を引き起こす$Ca^{2+}$輸送系が関与していることが考えられる。

5)PKC 活性化剤と$Ca^{2+}$-ionophoreの作用

His刺激が $[Ca^{2+}]i$の上昇とPKC 活性化を引き起こしたことから、こうした状況を$Ca^{2+}$-ionophore(A-23187 $10^{-5}$M , 及びIonomycine $10^{-6}$M)とPKC 活性化剤 (PMA $10^{-6}$M 及び1-oleoyl 2-acetylglycerol $10^{-4}$M)を用いて再現した。$Ca^{2+}$-ionophore単独では $[Ca^{2+}]i$の大幅な上昇が認められたが、殆どCA放出は認められなかった。一方、PKC 活性化剤単独では、 $[Ca^{2+}]i$の上昇はまったく認められなかったが、ゆっくりした持続的なCA放出が認められた。これらを併用すると$Ca^{2+}$の上昇には殆ど変化を認めなかったが、相乗的にCAの放出量は増加した。このCA放出はゆっくりした持続的な反応であり、PKC 活性化剤の用量に依存し、PMA の$EC_{50}$は$10^{-8}$M 程度であった。またこの反応は細胞外液の$Ca^{2+}$を絶対的に要求したが、Nif によっては殆ど抑制されなかった。これらの性質は Hisによって引き起こされる放出反応と極めて良く似ており、His によって引き起こされるCAの放出がPKC の活性化と細胞内$Ca^{2+}$の上昇、両者に由来していることを示唆する。

［結論］

ヒスタミンによるカテコールアミンの放出反応は、一部高濃度での非特異的放出が認められるものの、主としてヒスタミン $H_1$ 受容体を介したゆっくりしたかつ持続的な反応である。この際には$Ca^{2+}$チャンネルを介さないゆっくりした$Ca^{2+}$流入が起こっているものと考えられるが、この$Ca^{2+}$流入系の活性化は $H_1$ 受容体を介して生じた細胞内$Ca^{2+}$の上昇とProtein kinase Cの活性化に由来するものと思われる。

［参考文献］

1) Kilpatrick, D.L., ledbetter, F.H., Carson, K.A., Kirshner, A.G., Slepetis, R., and Kirshner, N. (1980) J.Neurochem. 35, 679-692

2) Grynkiewicz, G. Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985) J.Biol. Chem. 260,3440-3450

3) TerBush, D.R., Bitter, M.A., and Holz, R.W. (1988) J.Biol. Chem. 263,18873-18879

# 103 抗うつ薬のラット脳内ＧＴＰ結合部位に及ぼす影響

山本秀子、加賀谷有行、黒田安計、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３部）

〔要約〕
各種向精神薬のラット脳粗膜分画内ＧＴＰ結合部位並びに高親和性ＧＴＰase 活性に及ぼす影響について検討した。抗うつ薬は三環系及び非定型抗うつ薬共に[$^3$H]ＧＴＰに対する親和性を低下させ、最大結合数を増加させた。しかし、その他の抗精神病薬、抗アレルギー薬及びＭＡＯ阻害薬等は有意な変化を示さなかった。抗うつ薬のＧＴＰ結合部位に対する効果は用量依存性があり、コレラ毒素また百日咳毒素によるADP-リボシル化で弱められた。さらに、抗うつ薬は高親和性ＧＴＰase 活性を用量依存的に阻害し、ADP-リボシル化はその阻害を部分的に回復した。以上の結果より、抗うつ薬がG蛋白質にIN VITROで直接作用する可能性が示唆された。

【はじめに】
中枢神経系において三環系抗うつ薬はノルエピネフリン、セロトニンの取り込み阻害を惹起することが作用機序と関わるとされていた。しかし、イミプラミン等はアミン取り込みを速やかに阻害するのに対し、治療における抗うつ薬の作用発現は１－２週間の遅延があり、非定型抗うつ薬であるイプリンドール、ミアンセリンは取り込み阻害能を有しない。近年三環系抗うつの長期投与はcyclic AMP系の$\beta$受容体 Down regulationや脱感作を惹起すること、またセロトニンニューロンでは$S_2$ 受容体減少やイノシトールリン脂質代謝回転の低下などが知られ、受容体以降の情報伝達系にたいする作用が注目されている。そこで抗うつ薬がIN VITROで細胞内G蛋白質に作用する可能性について [$^3$H] GTP 結合実験と高親和性GTPase活性を測定することにより検討した。

【材料と方法】
SD 系雄ラット大脳皮質を氷冷 5mM Tris/5mM EDTAでホモジナイズし、48,000 gで10分間遠心後、沈さを３回洗浄して2mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 (1mM EGTA)に懸濁し、膜標品とした。

ADP-リボシル化は20mM DTTで前処理したコレラ毒素 (50$\mu$g/ml) または百日咳毒素 (25$\mu$g/ml) により行なった。膜標品を各々の毒素と 25mM Tris-HCl buffer (10mM NAD, 1mM ATP, 1mM EGTA,100$\mu$M GTP, 2mM DTT, 5mM $MgCl_2$, 10mM Thymidine, 20mM Creatine phosphate, 40$\mu$g/ml Creatine phosphokinase, pH 7.4)中、30℃、15分間反応後、遠心により分離し、 GTP結合実験またはGTPase活性測定に使用した。

薬物処理は各薬物 300$\mu$M を処理または未処理膜標品と37℃、10分間インキュベートした。

抗うつ薬存在下でラット大脳皮質粗膜画分に対する [$^3$H] GTP 結合実験を Avissar[1]等の方法を修飾して行なった。0.025-0.45$\mu$M [$^3$H] GTP を膜標品50$\mu$g(25mM Tris-HCl buffer, 0.1mM $Mg^{++}$, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0.4mM ATP) と25℃ 10分間インキュベートした後、セルハーベスターで分離し、シンチレーションカウンターで測定した。

高親和性GTPase活性はCassel[2]等の方法により測定した。膜標品10$\mu$g を125nM GTP ( 100,000dpm/tube[$\gamma$-$^{32}$P] GTP, 0.5mM App(NH)p, 0.1mM ATP, 3.0mM Creatine phosphate, 75U/ml Creatine phosphokinase, 0.1mM EGTA, 1mM DTT, 0.5 mM $MgCl_2$) と30℃、 8分間インキュベートし、活性炭処理後遊離した [$^{32}$P]リン酸を測定した。

【結果】
[$^3$H] GTP 結合を Scatchard解析すると 1 site 型、Bmax 25 pmol/mg protein, Kd 値は 139nMであった。図1(A)に示したように抗うつ薬は GTP結合部位の親和性を低下させ、結合数を増加させた。百日咳毒素処理 (B)及びコレラ毒素処理 (C) は抗うつ薬による GTP結合部位の親和性または結合数の変化を抑制した。次に様々な薬物(300$\mu$M)によるIN VITROの GTP結合部位に及ぼす影響について表1 に示した。定型及び非定型抗うつ薬は GTP結合部位のKd値、Bmax値を有意に増加させたが、Monoamine oxydase inhibitor,抗精神病薬、抗不安薬は影響しなかった。このとき、高親和性GTPase活性に及ぼす影響について検討したところ、抗うつ薬により用量依存的に阻害されたが、この阻害は百日咳毒素またはコレラ毒素処理により部分的に回復された (表2)。

【考察】

抗うつ薬存在下で [$^3$H] GTP 結合に対する影響がADP-リボシル化で修飾されたことは、抗うつ薬がG蛋白質の機能に作用している結果を反映していると考えられる。In vitroにおいて抗うつ薬が高親和性GTPase活性を阻害したことは、G蛋白質のturn off機構を遅らせることにより活性化されたG蛋白質αサブユニットを増加させている可能性を示している。このこととIN VITROにおいて抗うつ薬存在下で [$^3$H] GTP 結合が低親和性、高結合状態に移行したことより、次の可能性が示唆された。抗うつ薬によりG蛋白質のαサブユニットが活性化されたことによりβγサブユニットからαサブユニットが遊離し、GTP 結合部位の親和性を低下させたと考えられた。

抗うつ作用を有する薬剤がG蛋白質を低親和性、高結合状態に移行させたことはうつ病におけるG蛋白質の関与を示唆し、作用機構の解明に新たな方向を加えるものである。

【文献】


1) Avissar,S.,Schreiber,G.,Danon,A.,Belmaker,R.H. Nature, 331, 440-442(1988).

2) Cassel,D., Sellinger,Z., Biochim. Biophys. Acta 452, 538-551(1976).

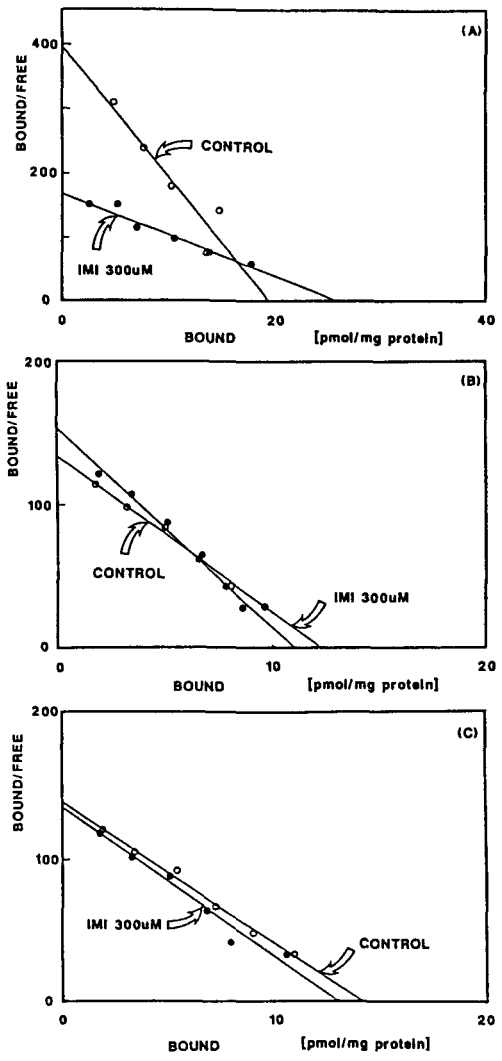




図1.ラット大脳皮質膜の[$^3$H] GTP結合のScatchard plot に及ぼす 300μM イミプラミンの影響 (A) 無処理 (B) 百日咳毒素処理膜 (C) コレラ毒素処理膜。

○, CONTROL. ●, 300μM イミプラミン.

表1. Effects of Psychotropic Agents on the Kd and Bmax of [$^3$H] GTP Binding in Vitro

| | Kd | B max |
|---|---|---|
| | % of Control | |
| Desipramine | 183.7 ± 16.6 (5)** | 171.5 ± 13.1 (5)** |
| Imipramine | 172.1 ± 9.1 (5)** | 158.5 ± 16.4 (5)* |
| Clomipramine | 242.4 ± 25.6 (6)*** | 206.0 ± 10.5 (6)*** |
| Iprindole | 174.1 ± 10.8 (6) ** | 168.6 ± 12.5 (6)** |
| Amitriptyline | 168.9 ± 10.9 (4)** | 154.5 ± 12.2 (4)* |
| Pargyline | 102.9 ± 3.1 (4) | 96.9 ± 1.0 (4) |
| Yohimbine | 87.5 ± 5.1 (3) | 95.0 ± 6.6 (3) |
| Phencyclidine | 100.7 ± 2.4 (3) | 96.5 ± 3.1 (3) |
| Chlorpheniramine | 88.6 ± 3.4 (4) | 94.7 ± 3.2 (4) |
| Clorgyline | 124.6 ± 4.9 (3) | 121.6 ± 13.4 (3) |
| Deprenyl | 93.7 ± 9.6 (3) | 95.0 ± 6.7 (3) |
| Metoclopramide | 100.0 ± 6.6 (3) | 97.9 ± 1.2 (3) |
| Sulpiride | 104.7 ± 8.0 (5) | 90.5 ± 2.8 (5) |
| Chlorpromazine | 94.3 ± 7.1 (4) | 121.7 ± 16.3 (4) |
| Haloperidol | 81.4 ± 2.9 (3) | 103.5 ± 4.2 (3) |

表2. Effect of antidepressants on GTPase activity

| | (uM) | None | P-toxin | C-toxin |
|---|---|---|---|---|
| Desipramine | 10 | 96.9 | - | - |
| | 30 | 93.6 | 99.8 | - |
| | 100 | 85.2 | 100.8 | 113.7 |
| | 300 | 51.0 | 84.1 | 83.0 |
| Imipramine | 10 | 96.7 | - | - |
| | 30 | 91.9 | 111.7 | - |
| | 100 | 89.0 | 110.5 | 109.2 |
| | 300 | 46.7 | 78.7 | 72.0 |
| Clomipramine | 10 | 90.4 | - | - |
| | 30 | 92.2 | 109.4 | - |
| | 100 | 67.5 | 75.3 | 71.4 |
| | 300 | 22.1 | 43.5 | 43.3 |
| Iprindole | 10 | 101.4 | - | - |
| | 30 | 100.6 | 134.9 | - |
| | 100 | 89.7 | 129.1 | 124.5 |
| | 300 | 48.8 | 79.3 | 72.7 |
| Arachidonic acid | 30 | 101.0 | 86.3 | - |
| | 100 | 63.5 | 72.6 | - |
| | 300 | 22.8 | - | - |

% of Control

# 104 ヒト血小板におけるセロトニン2受容体機能

## ——セロトニンによる脱感作の機序と関連して——

加賀谷有行*、三国雅彦*、久住一郎**、山本秀子*、黒田安計*、高橋清久*
(*国立精神神経センター疾病研究第3部、**北海道大学医学部精神医学教室)

〔要約〕
ヒト血小板におけるセロトニン(5-HT)受容体を介する2次情報伝達系について調べた。5-HTは血小板の細胞内遊離カルシウム濃度($[Ca^{++}]_i$)を5-HTの濃度依存性に116nM増加させ、$EC_{50}$は200nMであった。5-$HT_2$阻害剤であるケタンセリンは10uM 5-HT刺激性 $[Ca^{++}]_i$増加を濃度依存性に阻害し、$IC_{50}$は2nMであった。次にprotein kinase C(PKC)と5-HT受容体との関連を調べた。PKC activator である mezerein, PMAは5-HT刺激性inositol monophosphate($IP_1$)蓄積、$[Ca^{++}]_i$増加を阻害した。一方、PKC inhibitorである H-7は、 PKC activatorによる阻害を抑制した。さらに、5-HT刺激性 $[Ca^{++}]_i$増加のplateau phaseにketanserinを添加すると plateauは消失したが、5-HTを添加すると$[Ca^{++}]_i$は変化しなかった。また、H-7は5-HT刺激性 $[Ca^{++}]_i$増加の plateau phaseを上昇させた。以上の結果から5-HT刺激性 $[Ca^{++}]_i$増加は5-$HT_2$受容体を介すること、PKCの feedback機構を介してこの受容体が脱感作される可能性が示唆された。

脳内5-HT受容体には 5-$HT_1$、5-$HT_2$、5-$HT_3$ types が同定されており、5-$HT_1$ 受容体は 5-$HT_{1A}$、5-$HT_{1B}$、5-$HT_{1C}$、5-$HT_{1D}$ subtypes(Peroutka,1986)[1]に細分類されている。さらに近年,5-$HT_{1A}$,5-$HT_{1B}$,5-$HT_{1D}$はadenylate cyclaseとnegativeに関連していること、5-$HT_{1C}$、5-$HT_2$はphosphoinositide(PI)代謝回転に関連していることが明らかになっている。このように脳内5-HT受容体はその多様性が指摘されているがより単純な系である血小板にも5-$HT_2$受容体が存在する。この末梢性受容体の機能を薬理生化学的に検討することにより、脳内5-$HT_2$受容体機能を解明する手がかりが得られると期待される。 ヒト血小板では5-$HT_2$受容体刺激により$[Ca^{++}]_i$上昇が見られるという報告(Affolter et al.,1984)[2]があるが、5-$HT_2$受容体機能の詳細についてはまだ不明な部分が多い。そこで、今回我々はヒト血小板で5-HT刺激性$IP_1$蓄積と$[Ca^{++}]_i$増加を測定し、5-$HT_2$受容体機能を明らかにし、さらにPKCの関与について検討したので報告する。

【方法】

(1)健康成人より採血し、500g,5分間の遠心により調整した血小板浮遊血漿に3uM fura-2/AMを添加して37℃ 15分間incubation後、1000g,10分間遠心して血小板沈渣を得た。これをHepes bufferに浮遊させ、日立F-2000を用いてGrynkiewiczら[3]の方法に準じて励起波長340nmと380nm、蛍光波長510nmで$Ca^{++}$-fura-2の蛍光強度を測定し、その比から$Ca^{++}$濃度を求めた。Ketanserin,mezerein等の薬物は5-HT刺激の3分前に加えられた。

(2) 血小板沈渣を10mM EDTA,0.5% bovine serum albuminを含む$Ca^{++}$-free Hepes bufferに浮遊させて[$^3$H]-myo-inositolを加え、37℃ 2時間 prelabelした。この血小板を洗浄後、$Ca^{++}$-free Hepes bufferに浮遊させ,10mM $Li^+$存在下で5-HTおよび各種ligandsを添加して37℃,15分間 incubateした。これに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、Berridgeの方法[4]にしたがって[$^3$H]$IP_1$を溶出し放射活性を測定した。

【結果】

(1)10uM 5-HT刺激により$[Ca^{++}]_i$は直ちに増加し始め、刺激後15秒でpeakに達し、その増加は116±21nMであった。その後$[Ca^{++}]_i$は静止時濃度より約50nM高濃度のplateau phaseを数分間持続した(fig.1-a)。 Fig.2に示すように5-HTは濃度依存性に$[Ca^{++}]_i$を増加させ、最大反応は10uMで得られ、$EC_{50}$値は200nMであった。Fig.3にketanserinの阻害曲線を示す。Ketanserinはその濃度に依存して10uM 5-HT刺激性$[Ca^{++}]_i$上昇を阻害し、その$IC_{50}$値は 2nMであった。1uM ketanserin前処置により10uM 5-HTの作用は完全に阻害された(fig.1-b)。また、10uM 5-HT刺激性$[Ca^{++}]_i$ 上昇後のplateau phaseに10uM 5-HTをさらに処置すると $[Ca^{++}]_i$は上昇しなかった(fig.1-c)が、10uM ketanserinを処置するとplateau phaseは消失し、$[Ca^{++}]_i$は静止時濃度に低下した(fig.1-d)。

(2)PKC活性剤であるmezerein,PMAは、その濃度依存性に5-HT刺激性$IP_1$蓄積を阻害した。5-HT刺激性$[Ca^{++}]_i$上昇も同様にmezereinにより阻害された(data not shown)。5-HT刺激性$IP_1$蓄積に対するPKCの影響をfig.4に示す。 PKC inhibitorであるH-7は5-HT刺激性$IP_1$蓄積を変化させなかったが、mezerein,PMAによる5-HT刺激性$IP_1$蓄積の阻害を部分的に抑制した。Fig.5は5-HT刺激性$[Ca^{++}]_i$増加に対するPKCの効果を示したものである。Fig.4と同様に H-7は5-HT刺激性$[Ca^{++}]_i$上昇のpeak値を変化させなかったが、mezereinによる5-HT刺激性$[Ca^{++}]_i$動員阻害を抑制した。

(3)H-7前処置により5-HT刺激性$[Ca^{++}]_i$増加のplateau phaseは上昇した(fig.1-e,f)。Table1に刺激1分後における$[Ca^{++}]_i$上昇のpeak値に対する割合を示す。300uM H-7前処置により、5-HT刺激性$[Ca^{++}]_i$増加の plateau phaseは37±2.1%から49±1.7%へ有意に上昇した。

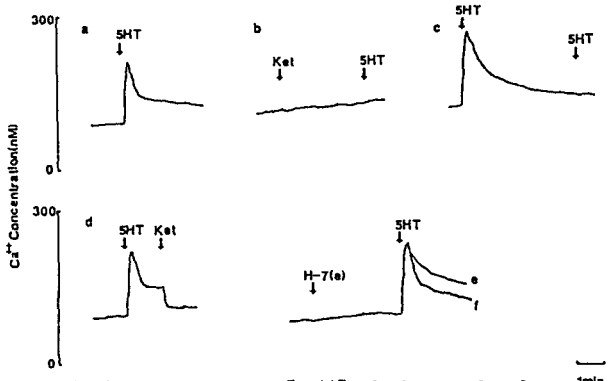



Fig.1 Time course of $[Ca^{++}]_i$ in human platelets

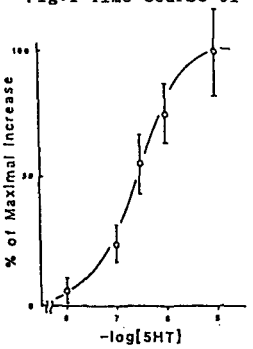



Fig.2 Effect of 5-HT on $[Ca^{++}]_i$ in human platelets(n=5)
Maximal increase was 116±21nM at the concentration of 10uM 5-HT.

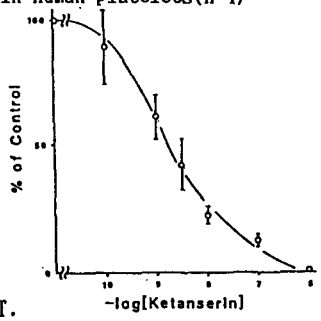



Fig.3 Inhibition by ketanserin of 10uM 5-HT-induced $[Ca^{++}]_i$ increase in human platelets(n=4)

| | Peak Height(nM) | Plateau(% of Peak) |
|---|---|---|
| Control | 127±14 | 37±2.1 |
| 0.1mM H-7 | 126±15 | 42±2.3 |
| 0.3mM H-7 | 135±19 | 49±1.7 * |

*<0.01 vs Control

Table 1 Effect of H-7 on $[Ca^{++}]_i$ plateau phase induced by 10uM 5-HT(n=4)

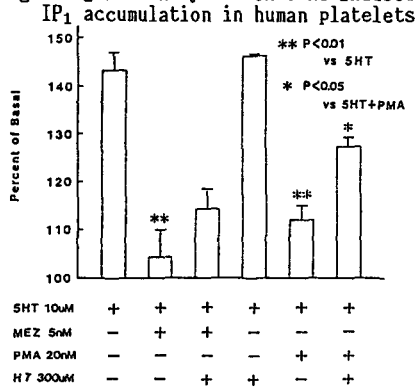



Fig.4 Regulation by PKC on 5-HT-induced $IP_1$ accumulation in human platelets

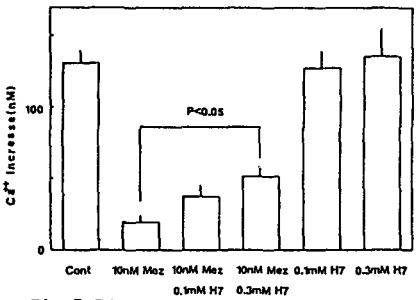



Fig.5 Effect of PKC on 5-HT-stimulated $[Ca^{++}]_i$ increase in human platelets in human platelets(n≧3)
Control shows $[Ca^{++}]_i$ increase at the concentration of 10uM 5-HT.

【考察】

本実験により、ヒト血小板では5-HTが$[Ca^{++}]_i$を動員することが確認された。この5-HT刺激性 $[Ca^{++}]_i$ 増加はketanserinにより阻害されることから 5-$HT_2$ 受容体を介していることも明らかになった。そして、ketanserinがplateau phaseを阻害したことからplateau phaseの$[Ca^{++}]_i$上昇にも5-$HT_2$受容体が関与していることが明らかになった。また、PKC activatorであるmezerein、PMAが5-HT刺激性$IP_1$蓄積、$[Ca^{++}]_i$ 増加を阻害し、一方、PKC inhibitorであるH-7がPKC activatorによる阻害を抑制したことから、PKCがPI代謝回転に対して抑制的に調節していることが明らかになった。PI代謝回転のもう一方の産生物であるdiacylglycerol(DG)はPKCを活性化することが知られており(Nishizuka,1984)[5]、二度目の5-HT刺激で$[Ca^{++}]_i$が動員されなかったのは最初の5-HT刺激により産生されたDG によって5-$HT_2$ 受容体が脱感作されたためと考えられる。さらに、H-7が 5-HT刺激性 $[Ca^{++}]_i$動員のplateau phaseを上昇させた成績と考えあわせると,5-HT刺激によってphospholipase C が活性化されPI代謝回転が亢進して$[Ca^{++}]_i$を動員するが、一方ではDGによるPKCの活性化も進み、それによる脱感作のために $[Ca^{++}]_i$濃度がpeakからplateauへと減少する機構の存在する可能性が示唆された。

【文献】

1) Peroutka,S.J.(1986) J.Neurochem.47,529-540
2) Affolter,H. et al.(1984) Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.325,337-342
3) Grynkiewicz,G. et al.(1985) J.Biol.Chem.260,3440-3450
4) Berridge,M.,J.(1983) Biochem.J.221,473-482 5) Nishizuka,Y.(1984) Nature 308,693-698

# 105 前頭葉皮質切片から遊離される内在性 Dopamine および Norepinephrine - 自己受容体による調節 -

大森哲郎、小山　司、松原繁広、小田垣雄二、松原良次、
中山　誠、井上　猛、久住一郎、村木　彰、　山下　格
（北海道大学医学部　精神医学教室）

〔要約〕

内側前頭葉皮質のスライスを、in vitro で灌流し、遊離される内在性の Dopamine(DA) および Norepinephrine(NE)を、高速液体クロマトグラフィによって同時に定量した。高$K^+$刺激は、$K^+$濃度依存性に、DAおよびNEを遊離させ、この遊離は$Ca^{++}$依存性であった。DA agonist(Apomorphine)は、DAの遊離を用量依存性に抑制し、$D_2$ antagonist(Sulpiride)は遊離を増強した。$\alpha_2$ agonist(Clonidine)は、NEの遊離を用量依存性に抑制し、$\alpha_2$ antagonist(Idazoxan)は、遊離を増強した。この方法は、従来の人工的に取り込ませた伝達物質の遊離をみる方法に比べ、より生理的な条件で前頭葉皮質におけるDAとNEの放出過程を同時に検討できるという利点がある。今回の検討では、これまでその有無について論議のあった前頭葉皮質の放出制御DA自己受容体の存在が示唆された。

〔緒言〕

従来、DAの放出過程の研究には、放射性同位元素で標識したDAをあらかじめ取り込ませておく方法が用いられることが多かった。しかし、この方法には、取り込まれたDAが生理的なDAと同じ動態をしめすかという問題があることに加え(1)、これを前頭葉に適用する場合には、標識DAが高密度に分布するNE神経終末にも取り込まれてしまうという選択性の問題も生じる(2)。今回、我々は、内側前頭葉皮質のスライスを、in vitro で灌流し、遊離される内在性のDAおよびNEを、高速液体クロマトグラフィによって定量する方法を確立し、自己受容体を介した放出過程の調節について検討した。

〔方法〕

雄性 Wister-King ラットを断頭後、速やかに脳を取り出し、brain cutting block を用いて、厚さ1.5mmの frontal cortexの冠状面を、後面が KönigとKlippelの図譜のおよそ10,000um に相当するように切り出す。これをtissue chopper で 450um厚にスライスし、forceps minor の内側部分を取り出して実験に供した。内容積約 60ul の chamber に、約10片のスライスを封入し、95% $O_2$、5% $CO_2$ の混合ガスで飽和した Krebs Bicarbonate 液を、0.4mL/min の流速で、37°C の恒温漕中において灌流した。灌流液の採取は、灌流開始後約60分から8分または10分間隔で行い、放出刺激は、KCl を等モルの NaCl と置換した高$K^+$液により3分間（8分または10分間の分画中の始め3分）行った。薬物の自己受容体に対する効果を検討する実験では、22.5mM の高$K^+$液を用いて、１回目の刺激を灌流開始70分後（S1）、２回目を100分後（S2）に行った。薬物は、１回目の刺激の後に灌流液中に加えた。灌流液中のDAとNEは、アルミナ抽出後 HPLC-ECD(エイコム)にて測定した。測定の検出限界は、5pg 程度だった。薬物の影響は、無添加の場合と添加の場合の放出量の比（S1/S2）を指標とし、t-test により検定した。

〔結果〕

図１および図２に、$K^+$の濃度を増加させて、経時的に４回刺激した場合の、１分画（８分）中のDAとNEの遊離量を示した。非刺激時のDAおよびNEの遊離量は、測定の検出限界以下であった。刺激時には$K^+$の濃度に依存した遊離が観察された。この反応は、$Ca^{++}$非存在下では、著しく減弱した。予備的な検討により、30mM以上の高濃度の$K^+$刺激では、薬物の自己受容体に対する効果は認められないことが判明したので、以下の実験では22.5mMの$K^+$を用いた。また、いずれの薬物を加えた場合も、非刺激時のDAおよびNEの遊離量は測定の検出限界以下だった。図３に、各薬物のDA遊離に対する影響を示した。Apomorphine 1uM および 10uM 存在下では、S2/S1(mean ± SE)は、それぞれ 0.46 ± 0.05,　0.60 ± 0.03 であり、

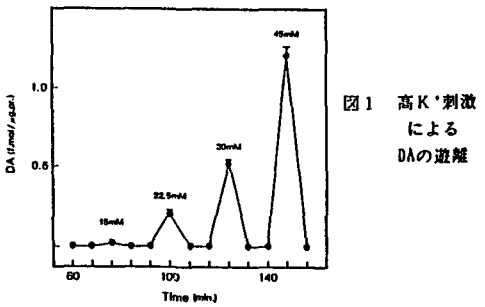



図1　高K⁺刺激によるDAの遊離

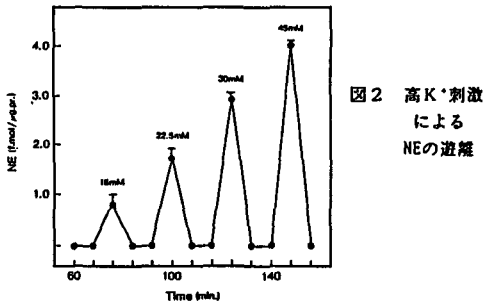



図2　高K⁺刺激によるNEの遊離

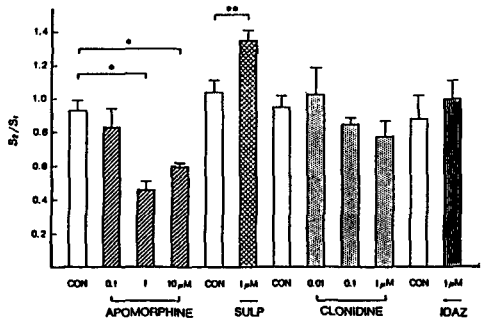



図3　DAの遊離に及ぼす Apomorphine、(-)-sulpiride、Clonidine および Idazoxan の影響　(N=4~6　* P<0.01, ** P<0.02)

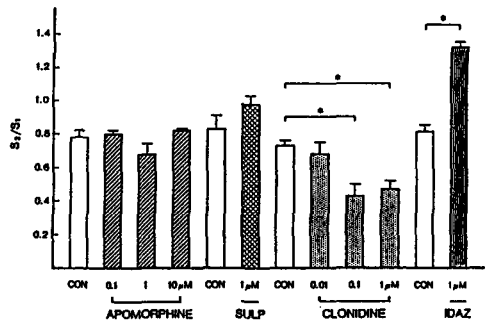



図4　NEの遊離に及ぼす Apomorphine、(-)-sulpiride、Clonidine および Idazoxan の影響　(N=4~6　* P<0.01)

Controlの 0.93 ± 0.06 に比べ、有意に(P<0.01)減少していた。(-)-Sulpirideでは、S2/S1 は1.35 ± 0.06であり、controlの 1.04 ± 0.07 に対し、有意に(P<0.02)増加していた。Clonidine と Idazoxan は DA の遊離に影響を与えなかった。図4に、各薬物の NE の遊離に対する影響を示した。Clonidine 0.1uM および1uM 存在下では、S2/S1 はそれぞれ 0.43 ± 0.07, 0.47 ± 0.05 であり、control の 0.73 ± 0,03 に比べ、有意に (P<0.01) 減少していた。Idazoxan では、1.32 ± 0.03 であり、control の 0.81 ± 0.04 に比べ、有意に(P<0.01) 増加していた。Apomorphine と (-)-Sulpiride は NE の遊離に影響を与えなかった。

[考察]

前頭葉皮質に投射する中脳皮質路神経終末は、中脳辺縁系路や黒質線条体路と異なり、DAの合成を制御する自己受容体を欠くと言われてきた(3)。ところが、最近になって、前頭葉皮質脳切片からのDAの遊離を、DA agonistが抑制し、$D_2$ antagonistが増強するという所見から、DAの放出を制御する自己受容体は、前頭葉皮質にも存在することが示唆された(2,4)。しかし、これらの研究では、あらかじめ取り込ませた標識DAの遊離をみており、標識DAがNE神経終末に取り込まれるのを抑えるため高濃度のDesipramineを処置している。このため、必ずしも生理的なDAの動態を反映していない可能性がある。我々の確立した方法は、従来の方法に比べ、より生理的な条件下で前頭葉皮質における内在性DAの放出を検討することができる。今回の検討でも、DA agonist はDAの遊離を抑制し、$D_2$ antagonistは増強するという結果が得られ、DAの放出を制御する自己受容体の存在が示唆された。この方法は、内在性NEの遊離も同時に測定可能であり、前頭葉皮質における両カテコールアミンの放出過程の研究に有用と思われる。

[文献]

1)Herdon,H.et al.(1985)Brain Research,348, 309-320　2)Plantje,J.F.et al.(1985)Eur.J.Pharmacol.,114,401-402
3)Roth,R.H.,(1984)Ann.N.Y.Acad.Sci.,430,27-53　4)Talmaciu,R.K.et al.(1986)J.Neurochem.,47,865-870

106

# 下オリーブ核変性の小脳アミノ酸伝達物質に対する効果

石丸浩平，倉橋幸造，松永宗雄＊，
富山誠彦，菱田良平
（弘前大・医・第三内科，脳研臨床神経＊）

〔要約〕 下オリーブ核を3-acetylpyridine(3-AP)にて化学的に破壊したラットを用い、小脳での神経伝達性アミノ酸の変動を調べた。結合実験では小脳 ($^3$H)GABA Na依存性特異的結合が対照群と比較し27%の減少を示した($p<0.001$)。高速液体クロマト法で検討した遊離アミノ酸濃度はTau、Asp及びGluが有意の減少を示し、Gly及びGABAは不変であった。小脳glutamic acid decarboxylase(GAD)活性は変化しなかった。cAMPでの研究によると、下オリーブ核変性はプルキンエGABAニューロンの活動性を亢進させることが示唆されている。本実験では、このような小脳GABA活動性の変化は、GABAのNa依存性特異的結合の減少、即ち、GABA再取込み系抑制の機転を介する可能性を示した。また、登上線維系の欠落に伴う小脳Asp又はTau減少は、下オリーブ核－小脳路の、ないしは星状細胞とプルキンエ間線維連絡の生化学的変化を示すものと考えた。

［目的］

3-acetylpyridine(3-AP)は下オリーブ核を選択的に破壊する[1]。この時、病理学的には下オリーブ核からの線維が終止する小脳プルキンエ細胞の樹状突起部では、著明な spine(棘)の増加が認められる[2]。これは下オリーブ核変性に伴い、小脳プルキンエ細胞の機能が修飾を受けることを示唆している。そこで本実験では下オリーブ核の化学的破壊に伴う小脳アミノ酸作動神経伝達系の動態を検討した。

［実験方法］

Wister系雄ラット(体重120～160g)は3-AP投与群と対照群に分けた。3-AP群では75mg/kgを腹腔内投与した。動物は投与10日後にマイクロウエーブ法(5kW 1sec、実験B)あるいは断頭法（実験A、C）で屠殺し、小脳を剔出した。組織は実験まで－70℃に保存した。蛋白定量はLowrey法（実験A）あるいは色素結合法(Bio-Rad Protein Assey、実験B、C）で行なった。

実験A．アミノ酸伝達物質の特異的結合

調整したP２分画[3]を用い、結合実験はpH 7.4 Tris-HCl反応系で、120mM NaClの存在下あるいは非存在下に行った。リガンドには($^3$H)GABA(32.8 Ci/mmol)、($^3$H)グルタミン酸(25.0 Ci/mmol)、($^3$H)アスパラギン酸(13.8 Ci/mmol)(New England Nuclear社)を用いた。インキュベーションはNa依存性($^3$H)GABAでは４℃で、その他は20℃で30分行い、吸引濾過にて回収した標品を液体シンチレーションで測定した(triplicate)。2mMの非標識リガンド存在下での結合を差引いた結合分を、特異的結合とした。

実験B．遊離アミノ酸濃度

小脳は10容量125mM Na-phosphate buffer (pH 6.4)でホモジネート、1%ピクリン酸１mlを加え、10000G 15min 4℃の遠沈を行った。この上清をDowex 2x8 ($Cl^-$ form)に通し、抽出液は凍結乾燥した。高速液体クロマトでの測定ではN-leucineを内部標準とした。移動相にはリチウム緩衝液LiA、LiB、LiC (Beckman) を用い、切換え時間は各々26分、24分、60分とした。分析用カラムはMCI Gel CK 10S (ガスクロ工業)を使用。流速0.4 ml/min、カラム温度55℃とし、検出はニンヒドリン570 nmの吸光度によった。

実験C．Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) 活性

小脳は10容量の125mM pH 6.4 Na-phosphate buffer (pH 6.4)でホモジネート、1500 rpm 5min 4℃で遠沈した上清400μlを粗酵素液とした。反応は0.75mM pyridoxysal phosphateの存在下、6mMグルタミン酸添加にて開始、37℃ 60分インキュベート後、1%ピクリン酸で停止した。反応生成物GABAを実験Bと同様の高速液体クロマトで分析した。実験毎に反応０分のblancを立てた。

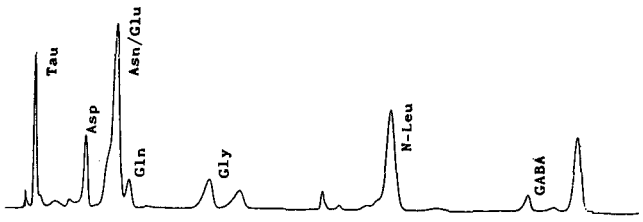
実験結果の解析はStudentのt-検定で行なった。

［結果］

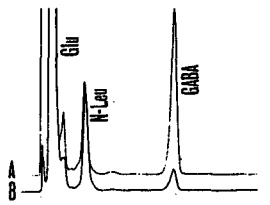
Ⅰ．3-AP投与の小脳ではGABAのNa依存性特異的結合が27%の減少を示した(Table 1、$p<0.001$)。Asp及びGluのNa依存性及びNa非依存性結合、GABAのNa非依存性結合は有意な変動を認めなかった。

Ⅱ．遊離アミノ酸分析ではTau、Asp、Gln、Gly、GABAは完全に分離できた。Asn/Glu分離は不完全であり(Fig 1-a)、Fig 2のGlu濃度はAsn/Gluを意味する。3-AP投与によって、小脳Tau、Asp、Gluはそれぞれ39%、71%、24%と有意に減少していた。Gln、Gly、GABAは変化しなかった。

Ⅲ．GAD活性では3-AP投与によって有意な変化は認めなかった（Fig 1-b、Table 2）。




a: Amino Acid in Cerebellum




b: GABA for GAD Activity
A:60 min incubation
B: 0 min (blanc)

Fig 1. Representative Chromatographs

[考察]

本実験では、下オリーブ核の化学的破壊によって、小脳GABA作動系ではNa依存性の特異的結合、即ちGABA再取込みが減少することを示した(Table 1)。他方、GABA合成酵素GAD活性、GABAの受容体に対する結合、あるいは遊離GABA濃度の何れも変化を受けなかった(Table 1, Table 2 & Fig 2)。下オリーブ核変性にともなう小脳GABA代謝に関しては、従来cGMPでの研究があり、小脳プルキンエ細胞GABA活動性の昂進が示唆されてきた[4]。GABA再取込みの減少が見られた今回の実験結果はcGMPを指標とした従来の研究成果と一致するのみならず、下オリーブ核からの入力遮断が小脳系へ及ぼす効果としてGABA再取込み機構が重要な役割を果している可能性を示している。

従来、3APによる下オリーブ核破壊での小脳アミノ酸の変動に関しては報告間に不一致が見られる。Nadiら[5]によると、小脳GABA、Asp濃度の減少が、Reaら[6]の報告では、Asp、Tauの減少が見られ、他方、Perryら[7]の実験では、GABA、Aspは変化せず、Tauは減少、Serine、Glnが増加した。今回の検討では、小脳Tau、Asp、Gluの減少が見られた。結果の不一致は屠殺法、組織の調整あるいは測定系感度等の違いによると考えられる。何れにせよ、小脳Asp濃度の減少は3報告(本研究を含む)で一致し、同様に、小脳Tau減少もまた3報告中2(本実験も含む)で認めている。

登上線維系の消失による小脳Aspの減少は登上線維系伝達物質がAspである可能性を示唆する。Wiklundら[8]によると、ラット小脳に注入した D-($^3$H) Aspは登上線維を逆行性に標識する。また3AP投与ラット小脳ではAsp放出が減少している。これらの成績は登上線維系Asp作動説を支持する。さて、登上線維がAsp作動系であるとすれば、下オリーブ核破壊に伴う同線維の消失は、denervation supersensitibityによりAsp受容体結合を増やすことが予測される。今回の実験では、($^3$H) Asp受容体に対する特異的結合は変化を示さなかった(Table 1)。しかし、この結果は他のリガンドも含んだ kinetic analysisによって検証する必要があろう。

下オリーブ核変性に伴う小脳Tauの減少効果も注目される。Tauは小脳系では星状細胞の伝達物質である可能性が高い。小脳入力系の脱落に連動したTauの変化は、星状細胞によるプルキンエ細胞の活動性調節機構によるものかもしれない。

Table 1. Effect of 3-AP on The Specific Binding of Amino Acids.
(pmole / mg of protein)

| | | Sodium-independent | Sodium-dependent |
|---|---|---|---|
| Asp | 3AP(+) | 0.40 + 0.05 (5) | 0.43 + 0.09 (5) |
| | (-) | 0.34 + 0.05 (5) | 0.45 + 0.04 (5) |
| Glu | 3AP(+) | 0.19 + 0.03 (5) | 0.12 + 0.03 (4) |
| | (-) | 0.17 + 0.03 (5) | 0.11 + 0.02 (5) |
| GABA | 3AP(+) | 0.48 + 0.07 (5) | 0.32 + 0.01 (5)* |
| | (-) | 0.47 + 0.06 (5) | 0.44 + 0.03 (5) |

Expressed as mean + SE (number of animals)
*p >0.001

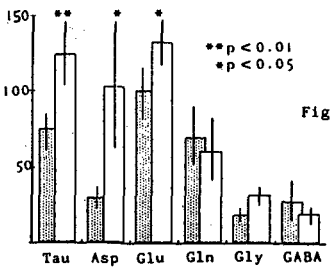



Fig 2. Amino Acids in Cerebellum.
(nmole / mg of protein)

3-AP (+): shaded bar (n=6)
control : white bar (n=6)

Expressed as mean + SE.

Table 2. Effect of 3-AP on GAD Activity.
(nmole / mg of protein / min)

| | |
|---|---|
| 3-AP injected | 1.57 + 0.18 (7) |
| control | 1.48 + 0.12 (7) |

Expressed as mean + SE (number of animals)

## References


Desclin, J.C. and Escubi, J. (1974) **Brain Res. 77**, 349-364.

Mao, C.C., Guidotti, A. et al. (1975) **Brain Res. 90**, 335-339.

Nadi, N.S., Kanter, D. et al. (1977) **J. Neurochem. 28**, 661-662.

Perry, T.L., MacLean, J. et al. (1976) **Brain Res. 109**, 632-635.

Rea, M.A., McBride, W.J. et al. (1980) **J. Neurochem. 34**, 1106-1108.

Sotelo, C., Hillman, D.E. et al. (1975) **Brain Res. 98**, 574-581.

Wiklund, L., Toggenberger, G. et al. (1982) **Science 216**, 78-80.

Zukin, S.R., Young, A.N. et al. (1974) **Proc. Nat. Acad. Sci. 71**, 4802-7.

# 107 ラットグリア芽細胞及びC6細胞のelongation factor-2様タンパク質のリン酸化に対する各種タンパク質リン酸化酵素阻害剤の影響

野路久仁子、伊藤仁一、加藤泰治*、田中亮

（名市大・医・生化学第一，分子研・生体制御*）

〔要約〕
培養グリア芽細胞（GB）及びC6細胞の$Ca^{2+}$/calmodulin依存性タンパク質リン酸化の主な基質の一つであるMr100kタンパク質は、抗elongation factor-2(EF-2)抗血清で沈澱した。精製EF-2と共に二次元電気泳動を行うと、分子量は全く同じになった。pIはリン酸化100kタンパク質が7.3付近、精製EF-2が7.5付近で、この差は結合したリン酸基の違いによるもので、これら一群の100kタンパク質は、少くともEF-2に極めて類似のものと思われた。cytosolの100kタンパク質内在性リン酸化は、K252a，K252b，KT5822，KT5823，KT5720のリン酸化酵素阻害剤の直接添加により阻害されなかったが、GB，PC12，PC12DをK252a，K252b，KT5822の存在下で培養（24h）後リン酸化すると一部阻害された。他の基質（GB C6の50kタンパク質やPC12，PC12Dの53k，60kタンパク質）のリン酸化は低濃度阻害剤のcytosolへの直接添加で強く阻害された。100kタンパク質のリン酸化が阻害剤により直接作用を受けず、intactな細胞構築を必要とする事は特徴的であった。

〔緒言〕
培養グリア芽細胞をグリア細胞成長因子（GMF）で刺激すると、S期途中から、$Ca^{2+}$/calmodulin依存性タンパク質リン酸化、特に100kタンパク質(100kpr)の活性が上昇した[1]。Mr100kタンパク質リン酸化活性はPC12，neuroblastoma，gliomaに強く、細胞増殖を阻害する薬剤の存在下で細胞を培養すると抑制されることから、細胞増殖と何らかの関係があると思われる。A.C.Nairnらの一連の報告によると、mitogen刺激でリン酸化活性が上昇するhuman fibroblastのMr100kタンパク質の実体はEF-2であった[2]。そこでグリア芽細胞の100kprについて、EF-2との相同性を免疫交叉反応と二次元電気泳動により調べた。さらにタンパク質リン酸化酵素の阻害剤であるK252a[3]，K252bなどの影響を、グリア芽細胞とPC12及び仙波らにより樹立されたPC12D[4]を用いて調べた。

〔方法〕
二次培養ラットグリア芽細胞の培地を2%NBS含有F-10に交換し、GMFを加え24h培養した。K252aなどの阻害剤（Dr.Y.Matsudaより供与された）はGMFと同時に添加した。C6（ラットアストロサイトーマ）とPC12，PC12Dは5%NBSまたはFCSを含む培地に交換し、阻害剤存在下で24h培養した。細胞を集め、HEPES，DTT，$MgCl_2$，PMSF，pH7.4のhomogenateとし、$10^5$ g,60分遠心した。homogenateまたはcytosolを用いて、58$\mu$M free $Ca^{2+}$存在下で5-50$\mu$M［$\gamma$-$^{32}$P］ATP(2.5 $\mu$Ci/100$\mu$l)を加えて25°，1分間のリン酸化反応を行った。リン酸化タンパク質の免疫沈澱実験にはウサギ抗EF-2抗血清を用いた。リン酸化後のcytosolと精製EF-2の混合物を二次元電気泳動した。乾燥ゲルのautoradiogramからリン酸化度をdensitometerによって測定した。

〔結果〕
GBまたはC6のcytosol中のリン酸化100kprは抗EF-2抗血清によって沈澱した（図1）。これはEF-2のタンパク染色の位置に一致した。normal IgGでは$^{32}$Pラベルは沈澱中にみられなかった。リン酸化100prは有色マーカーによりpI7.3付近に泳動され、リン酸化されていない精製EF-2はpI7.5付近に泳動された（図2）。pIは文献値（6.8）[5]よりやや高めであった。GBをK252aの存在下で培養した細胞後homogenateでは100kprリン酸化が29-75%阻害された（図3）が、リン酸化反応時にhomogenateやcytosolに添加した場合は阻害効果がなかった（1uMまで）。PC12の100kprについても同様で、0.5$\mu$M K252a，C-kinaseに親和性に高いK252b、G-kinaseやMLCKに親和性の高いKT5822の細胞前処理では抑制されたが、cytosolへの添加では逆に増加した（図4）。一方、GB，C6のMr50k、PC12のMr53k、C6，PC12のMr85kタンパク質の$Ca^{2+}$リン酸化は、両実験方法で強く阻害された（0.05-0.15 $\mu$M）。G-kinaseやA-kinaseにのみ親和性の高いKT5823，KT5720はどの実験方法でもこれらのリン酸化を阻害しなかった（0.5$\mu$M）。NGFで増加するPC12DのMr60kタンパク質リン酸化は0.2$\mu$M K252a，K252bで強く阻害された。以上のように100kprリン酸化は、intact細胞における関接的阻害しか受けないという特徴があった。GBの細胞増殖を抑制する合成$\alpha$-sialosyl cholesterolでGBを処理すると、100kprリン酸化が強く阻害されるが、PC12の100kprに対しては全く阻害作用がなかった。

〔考察〕
グリア芽細胞やC6の$Ca^{2+}$依存性にリン酸化されるMr100kprは、免疫交叉反応や二次元電気泳動から

EF-2である事が示唆された。Nairnらは、すい臓から精製した$Ca^{2+}$/CaM-kinaseの基質Mr100kタンパク質をEF-2と同定した[6]。このCaM-kinase基質は広く組織や培養細胞に分布し、従来から知られているPC12のNsp100もこのMr100kタンパク質と同じであった[7]。

GB, PC12, PC12Dの100kprのリン酸化は、タンパク質リン酸化酵素の強い阻害剤であるK252aの細胞前処理によって阻害されるだけでなく、細胞膜を通らないとされているK252bによってもK252aと同程度に阻害された。細胞表面の酵素活性の変化が細胞内の変化を引き起こすという考え方が提示されているが、今回のように100kprのリン酸化がリン酸化反応時に阻害剤を添加した場合はどの阻害剤にも抵抗を示したので、上記のような調節機構を明らかにする事はできなかった。この理由はわからないが100kprリン酸化はATPに対する親和性が顕著に高かった。また一般にEF-2 kinaseはEF-2に特異的であるとされている。


[文献]

1. 野路久仁子ら(1987), 神経化学 26, 301-303. 2. H.C.Palfrey et al.(1987), J.biol.Chem. 262, 9785-9792. 3. H.Kase et al.(1987), Biochem.Biophys.Res.Commun. 142, 436-440. 4. R.Katoh-Semba et al.(1987), J.Neurosci.Res. 17, 36-44. 5. A.C.Nairn et al.(1985), Proc Natl.Acad.Sci. 82, 7939-7943. 6. A.C.Nairn and H.C.Palfrey (1987), J.biol.Chem. 262, 17299-17303. 7. A.C.Nairn et al. (1987), J.biol.Chem. 262, 14265-14272.

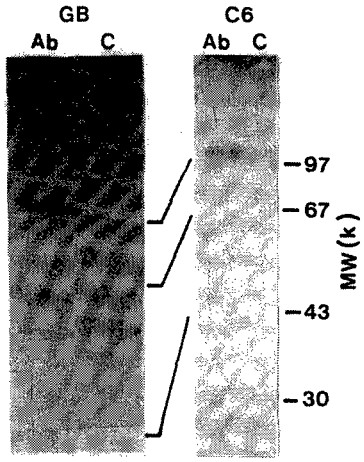




図1. GBまたはC6 cytosolのリン酸化100kprのImmunoprecipitation. Ab, 抗EF-2抗血清; C, normal IgG.

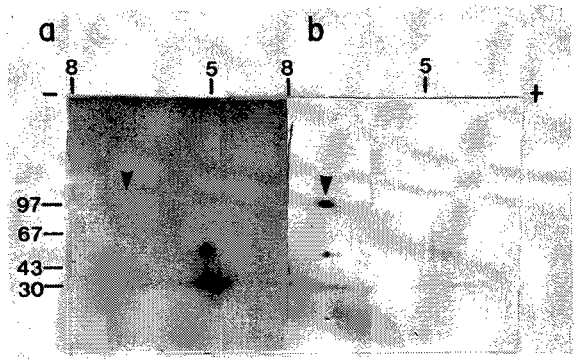



図2.リン酸化C6 cytosolとEF-2の二次元電気泳動 a, autoradiograph; b, EF-2のみの銀染色.

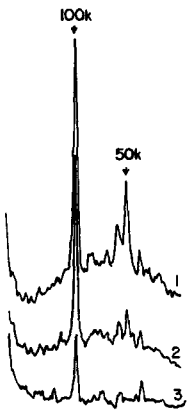



図3. GBのタンパク質リン酸化に対するK252aによる細胞前処理の影響. 1,control; 2,0.05uM K252a; 3,0.2uMK252a.

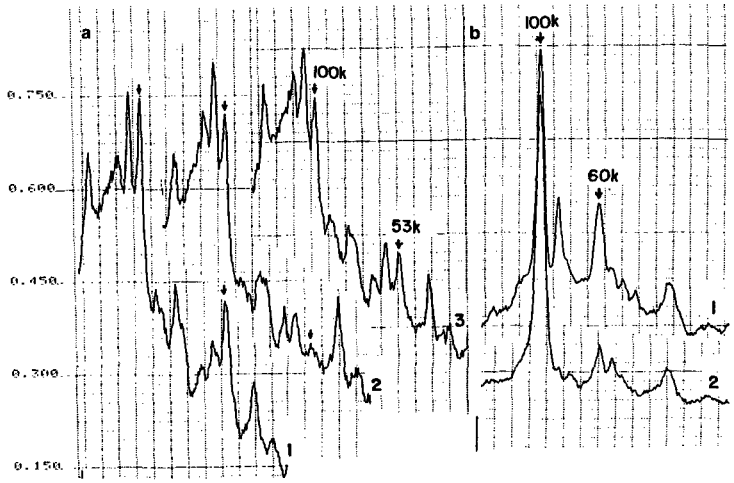



図4. PC12のタンパク質リン酸化に対するK252aとK252bによる細胞前処理の影響 (a)とPC12 cytosolに対するK252aの影響(b). 1,control; 2,0.5uM K252a; 3, 0.5uM K252b.

## 108 軟体動物アフリカマイマイ（Achatina fulica F.）より得られたD型アミノ酸を含む新しい神経興奮性ペプチド achatin-I

釜谷好美、南方宏之、竹内 宏*、野本享資
（財、サントリー生有研、*岐阜大・医・第一生理）

〔要約〕
アフリカマイマイ（Achatina fulica Férussac）の食道下神経節および脳神経節から、内在性の神経興奮性テトラペプチドを単離した。Achatin-I と名付けた本ペプチドの構造は、Gly-D-Phe-Ala-Asp である。Achatin-I は、アフリカマイマイの巨大神経細胞ＰＯＮ(periodically ocillating neuron) に対して $Na^+$ 依存性の inward current を引き起こした。そこで、achatin-I の全ての立体異性体を合成しＰＯＮに対する作用を検討した。８個の立体異性体の中で、achatin-Iのみが、顕著な興奮作用を示し($ED_{50}$=2.29x10$^{-6}$M)、他には、Gly-D-Phe-D-Ala-Asp が、achatin-I の 1/1000 以下の活性を示した。このようにＰＯＮに対する作用は、極めて立体特異的であった。また、本抽出物中には同じアミノ酸配列を持ちＬ型アミノ酸だけから成る Gly-Phe-Ala-Asp が存在し、本物質は、ＰＯＮに対して 3x10$^{-4}$M で活性を示さなかった。

現在までに、FMRFamide(1)、small cardioactive peptides(2)、egg-laying hormones(3)、 mytilus inhibitory peptides(4) などの神経活性ペプチドが高等な無脊椎動物から単離されているが、これらはすべて、Ｌ型アミノ酸より構成されている。例外として、South American frog の皮膚の抽出物より dermorphin と[Hyp$^6$]-dermorphin(5,6)が、Ｄ型アミノ酸を含み、神経に対して活性を示すと報告されている。しかし、神経節から単離された内在性のペプチドでＤ型アミノ酸を含む神経活性ペプチドは、我々の知る限りでは報告されていない。我々は、アフリカマイマイの食道下神経節および脳神経節から、同種動物の巨大神経細胞ＰＯＮに対して強い興奮作用を示し、Ｄ型アミノ酸を含む新奇テトラペプチドを単離・構造決定したので、報告する。

［実験方法］

精製：アフリカマイマイ 30,724 頭の食道下神経節および脳神経節を 80%冷エタノール中で磨砕後、同溶媒で抽出した。上清を減圧乾固した後、蒸留水に溶解し、酢酸エチルで脱脂した。水層を凍結乾燥し、この乾燥品を図１に示すような各種クロマトグラフィーによって分画し、各段階で生物検定を行い、活性物質を得た。

生物検定：アフリカマイマイの食道下神経節の結合組織を 0.67%のトリプシン処理後除去し、ＰＯＮを含む神経クラスターを神経節より単離した。これを容積 0.2ml の実験槽に固定しペプチドを生理溶液に溶解後、bath 法で，ＰＯＮに作用させた。

［結果および考察］

活性画分はゲル濾過のＨＰＬＣ上で 15.0分から 17.5分に溶出し(図2A)、これを同じ系で再分画したところ、二つのピークが得られ、それぞれの成分を、achatin-I、achatin-II と名付けた(図2B)。Achatin-I は、次の逆相ＨＰＬＣ上で 11.2分に単一ピークとして溶出され(図2C)、収量は、アフリカマイマイ 30,724頭より約 50$\mu$gであった。また、achatin-II は、8.2分に単一ピークとして溶出され(図2D)、収量は約 17$\mu$gであった。Achatin-I および achatin-II の塩酸加水分解後のアミノ酸分析値は、それぞれ Gly:Phe:Ala:Asp = 1.2:1.0:0.9:0.9(achatin-I)、1.1:1.2:0.8:0.9(achatin-II)であった。また、気相式シークエンサーを用い、achatin-I および achatin-II のアミノ酸配列が共に、Ｎ末端から３番目のアミノ酸残基まで、Gly-Phe-Ala- と確定した。さらに、liquid SIMS の測定により、共に $(M+H)^+$ M/Z 409、$(M+Na)^+$ M/Z 431となり分子量を408と決定した。従って両者のアミノ酸配列は、Gly-Phe-Ala-Asp であると推定された。固相法で合成した Gly-Phe-Ala-Asp 1 は、ゲル濾過と逆相のＨＰＬＣ上、achatin-II の挙動と全く一致した。さらに、achatin-I、achatin-II および合成品1の$^1$H-NMR を測定すると achatin-II と1のスペクトルが完全に一致し、achatin-II の構造を Gly-Phe-Ala-Asp と決定した。一方、achatin-I と1の $^1$H-NMR における化学シフトの値を比較検討すると、achatin-I は1の Phe と Ala 残基に関する立体異性体であることが推定された。そこで、Gly-Phe-Ala-Asp という配列を持った８個の立体異性体を全て合成し、生物検定と機器分析を行った。その結果、Gly-D-Phe-Ala-Asp のみが、ＰＯＮに対して天然物と同じ顕著な興奮作用を示し、また、$^1$H-NMR、CD、HPLC の分析結果も、achatin-I と完全に一致した。Bath 法による achatin-I のＰＯＮに対する $ED_{50}$ は、2.29x10$^{-6}$M (95% confidence limits 1.67-3.14x10$^{-6}$M)であり、Gly-D-Phe-D-Ala-Asp の活性は、achatin-I の1/1000以下であった(図3)。他の立体異性体は、全て 3x10$^{-4}$M で活性を示さず、活性発現に対する立体特異性が極めて強いことが示された。また、生理溶液中 あるいは 生理溶液から $Ca^{2+}$ を除去し $Mg^{2+}$を３倍の濃度にした溶液中で、achatin-I をＰＯＮに対して -50mV の voltage clamp 下で局所投与すると long lasting

inward current が観察された(図3挿入図)。このことから achatin-I はPONに、シナプスを介さず直接作用していると考えられた。さらに、achatin-I は、電圧依存性の inward current を引き起こす(図4A)。また、生理溶液を環流によって $Na^+$ の濃度が1/10 である溶液に換えると、achatin-I の作用は殆ど消失し、$Na^+$ 依存性であることが示された(図4B)。

アフリカマイマイの他の神経細胞に対する achatin-I の作用について検討したところ、TAN(tonically autoactive neuron)、d-RCDN(dorsal right cerebral distinct neuron)に対しても興奮作用を引き起こした。アフリカマイマイの中枢神経系において、PON、TAN、TAN-2、TAN-3、d-RCDN、d-LCDN および VG-1が心臓を調節する7個の神経として確認されており、PONはそれらの中で最も強い作用を有する心臓の興奮性神経細胞である(7)。従って、PON、TAN、d-RCDNに興奮性作用を引き起こす achatin-I は、アフリカマイマイの心臓の調節において非常に重要な役割を果たしていると推定される。注目すべき点として、同じアミノ酸配列で、L型のアミノ酸だけを含む achatin-II(Gly-Phe-Ala-Asp) が同じ抽出物中に存在する。本物質はPONに対して全く活性を示さないが、生合成と不活性化機構を考慮すると、achatin-I の前駆体あるいは代謝物である可能性があり、興味深い。

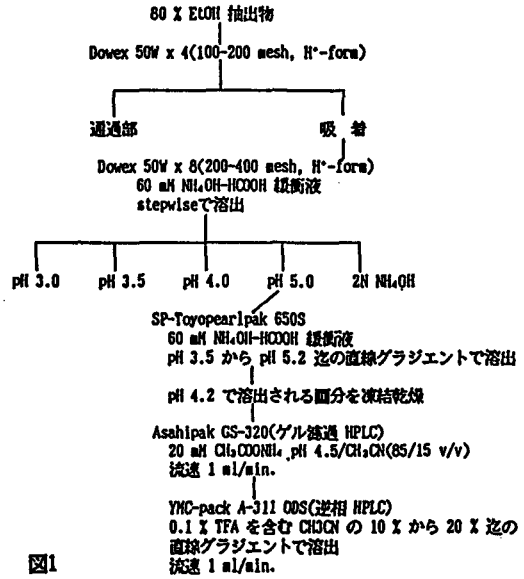



図1

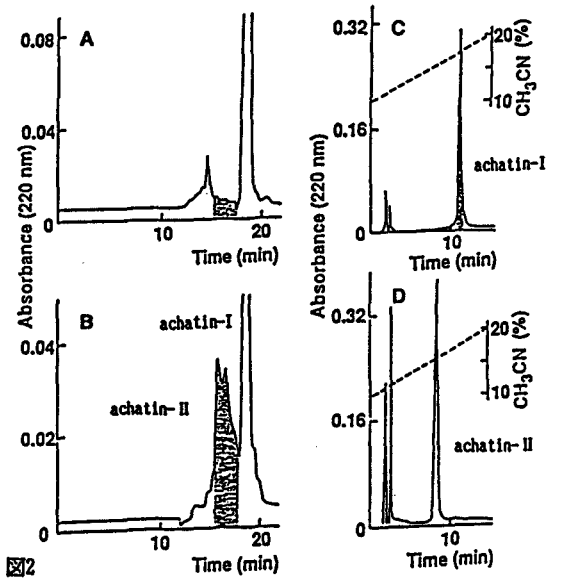



図2

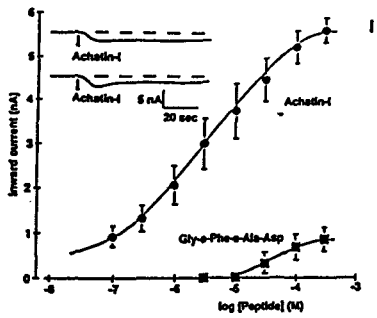



図3 Dose-response relations for achatin-I and Gly-D-Phe-D-Ala-Asp. Inset, effect of achatin-I at $10^{-3}$ M applied locally to PON by a pressure pulse. *Upper trace*, Physiological state. *Lower trace*, $Ca^{2+}$ free and $Mg^{2+}$ rich state.

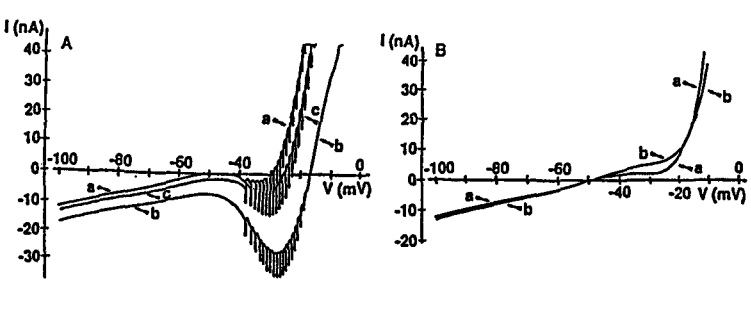



図4 Voltage-dependent inward current induced by achatin-I at $10^{-5}$ M (bath application) and its $Na^+$ dependency. A: a, physiological state; b, achatin-I application; c, after washing out. B: a, 0.1 x [$Na^+$] ($Na^+$ replaced by $Tris^+$) state; b, achatin-I in 0.1 x [$Na^+$]. In A and B, the current-voltage curves, which were obtained from the same individual neuron, were measured by superimposing a depolarizing ramp voltage (a slope of 100 mV/100 sec) on holding voltage of -100 mV.


*References*

1) Price, D. A. et al.(1977) *Science* 197, 670-671
2) Lloyd, P. E.(1986) *Trends Neurosci.* 9, 428-432
3) Heller, E. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2328-2332
4) Hirata, T. et al. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 1376-1382
5) Montecucchi, P. C. et al. (1981) *Int. J. Peptide Protein Res.* 17, 275-283
6) Montecucchi, P. C. et al. (1981) *Int. J. Peptide Protein Res.* 17, 316-321
7) Furukawa, Y. et al. (1987) *J. Exp. Biol.* 129, 279-293

# 109 Prostaglandin $F_{2\alpha}$, vasopressinならびにgalaninのラット脳室内投与による血圧上昇作用における$\beta$受容体サブタイプの関与について

小野信文，神谷大雄　（福岡大・薬・薬理）

〔要約〕

prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PG $F_{2\alpha}$), vasopressinならびにgalaninの中枢性血圧調節機構における$\beta$受容体の関与についてラット脳室内投与による血圧変化を測定し，検討した。PG $F_{2\alpha}$ (1～50 nmol), vasopressin (5～10 nmol)ならびにgalanin (5～50 nmol)は用量に依存した血圧上昇を示した。PG $F_{2\alpha}$ (10 nmol)の血圧上昇作用はpropranolol，ならびに$\beta_2$選択的遮断薬ICI 118,551の脳室内前投与によって用量依存的に抑制されるが，$\beta_1$選択的metoprololでは影響されなかった。vasopressinの血圧上昇作用はpropranololならびにICI 118,551によって増強されたが，metoprololでは影響されなかった。galaninの血圧上昇はpropranololならびにmetoprololのいずれによっても抑制された。以上の結果より，PG $F_{2\alpha}$, vasopressinならびにgalaninはそれぞれ$\beta$受容体サブタイプを介する異なった機構によって昇圧作用を起こすと考えられる。

PG $F_{2\alpha}$は中枢神経系にも存在し，種々の生体機能調節に関与することが知られている。PG $F_{2\alpha}$の血圧の中枢性調節については，脳室内投与によって，血圧上昇，心拍数増加を起こし[2]，この作用は視床下部を起因とする末梢交感神経の興奮によることが知られている[1]。中枢神経におけるこの作用発現機構については，$\alpha$遮断薬，抗ヒスタミン薬ならびに抗ムスカリン薬などでは影響されないが，$\beta$遮断薬によって抑制され，aminophyllineによって増強されることなどから，$\beta$受容体を介する機構が考えられている[3]．しかし$\beta$受容体のサブタイプの関与についてはまだ報告をみない。一方，近年vasopressinやgalaninなどの神経ペプチドも血圧の中枢性調節に与ることが示唆されているが，その機構も明らかでない。したがって，これらの中枢性血圧調節に関し，$\beta$受容体ならびにそのサブタイプの関与について比較検討した。

〔実験方法〕 実験には体重350～400 gのWistar雄性ラットを使用し，urethane (1.0 g/kg, ip)により麻酔し，脳室内(icv)投与用ガイドカニューレを右側脳室に挿入した。血圧は左大腿動脈より，心拍数は脈波よりポリグラフにて記録測定した。薬物投与は上記icvガイドカニューレを通してのicv投与(10 μl; 1分間)の他，股静脈よりiv投与も行なった。各種$\beta$遮断薬のicv前投与による実験では，そのicv後15～30分に一定に安定した血圧のもとで行なわれた。

〔結果〕 【1】PG $F_{2\alpha}$, 1, 10ならびに50 nmol, galanin, 5～50 nmol icvにより用量依存的持続性血圧上昇，心拍数増加を示した。vasopressin, 5, 10 nmol icvにより用量依存的血圧上昇を示すが，心拍数は軽度の減少が認められた（図1）。【2】PG $F_{2\alpha}$ icvの作用はpropranololllならびにICI 118,551によって用量依存的に抑制されたがmetoprololやatenololでは全く影響されなかった（図2）。【3】vasopressin (5, 10 nmol, icv)最大血圧上昇反応はpropranololならびにICI 118,551, 1 μmol icv前投与によって増強したが，metoprolol 1 μmolでは影響されなかった（図3）。【4】vasopressin (0.5 nmol/kg) ivによる血圧上昇作用はICI 118,551 1 μmol icv投与30分後（図4）ならびにpropranolol 0.2 mg/kg iv後では影響されなかった。【5】galanin (10 nmol, icv)の最大血圧上昇反応は，propranololならびにmetoprolol(1 μmol icv)のいずれによっても抑制された。

〔考察〕 PG $F_{2\alpha}$脳室内投与による血圧上昇作用は，非選択的$\beta$遮断薬のpropranololならびに$\beta_2$選択的遮断薬のICI 118,551によって抑制されるが，$\beta_1$選択的遮断薬のmetoprololによっては影響されないので，$\beta_2$受容体を介する可能性が考えられる。一方，vasopressinによる血圧上昇作用は，PG $F_{2\alpha}$と同様にmetoprololでは影響されないが，propranololやICI 118,551によって増強が認められ，PG $F_{2\alpha}$とは相対するパターンを示した。本実験から明らかなように，末梢投与したvasopressinは，icvしたICI 118,551ならびに末梢投与したpropranololによって全く影響されないので，vasopressin icvの$\beta_2$遮断薬による増強作用は中枢に起因するものと考えられる。従って，PG $F_{2\alpha}$にみられる様な$\beta_2$を介した昇圧機構とvasopressinにみられる様な降圧機

構の存在が示唆されるが，その脳内経路や部位についてはさらに検討を要する。

PG $F_{2\alpha}$の中枢性昇圧について，この作用部位については視床下部腹内側核，外側核ならびに後部視床下部が関与している。FeursteinらはPG $F_{2\alpha}$の昇圧時血中norepinephrineの増加が節遮断薬によって抑制されることから末梢交感神経を介する可能性を報告している[1]。さらに血中norepinephrineと同様に血中vasopressinの増加も認め，これは節遮断薬では抑制されないことから，下垂体から遊離された内因性vasopressinの末梢作用の可能性を示唆している。したがって，本実験における$\beta_2$遮断薬によるPG $F_{2\alpha}$の抑制に内因性vasopressin遊離機構が一部働くならば，その遊離機構に$\beta_2$受容体の関与が考えられる。

galaninの昇圧作用は，$\beta_1$ならびに$\beta_2$によって抑制されたので，非選択的$\beta$受容体を介する昇圧系の存在が推察される。

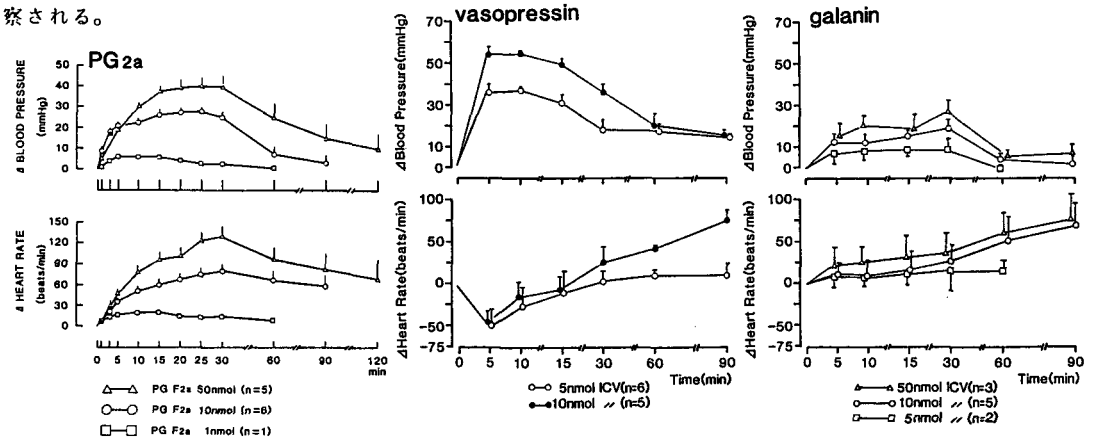



図1．PG $F_{2\alpha}$，vasopressine ならびに galanin 脳室内投与による血圧，心拍数変化

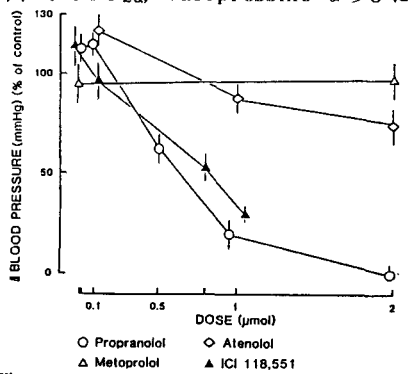



図2．PG $F_{2\alpha}$ 10nmol のラット脳室内投与による血圧上昇作用に及ぼす各種$\beta$遮断薬脳室内前投与の影響における用量作用.

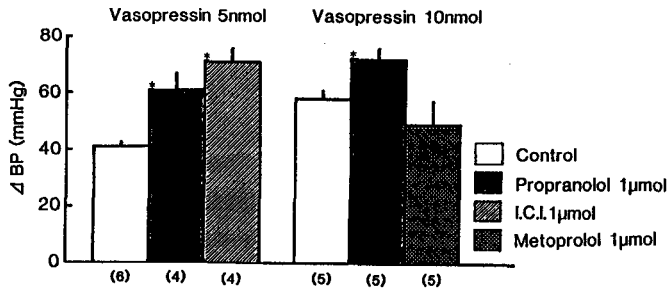



図3．vasopressinのラット脳室内投与による血圧上昇作用に及ぼす各種$\beta$遮断薬脳室内前投与の影響.

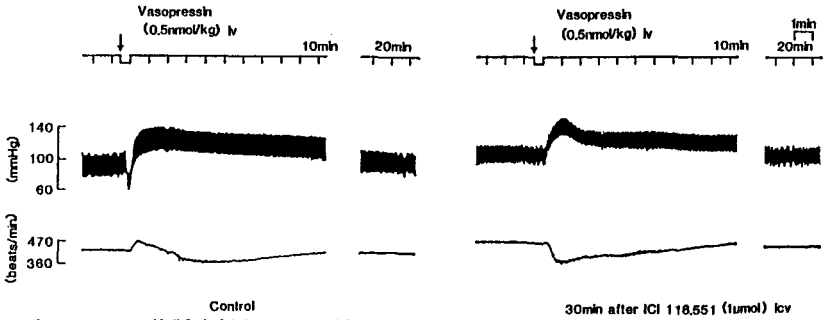



図4．vasopressinのラット静脈内投与による循環器作用に及ぼすICI 118,551脳室内前投与の影響.
BP；Blood Pressure, HR；Heart Rate

[文献] 1) Feurstein, G. et al. (1982) Brain Res. 231, 335-342. 2) Ono, N. et al. (1979) Japan J. Pharmacol. 29, 175P. 3) Ono, N. et al. (1986) in 'Brain and Blood Pressure Control', ed. Nakamura, K., Elsevier Sci., Amsterdam.

# 110 El マウスの発育に伴うメチオニンエンケファリン様免疫活性の変化

小出誠司，大西　博，相馬俊子，山上　栄，川北幸男

（大阪市大・医・神経精神）

〔要約〕

遺伝てんかんモデルであるElマウスの痙攣と脳内オピオイド系との関係を明らかにするために、Elとその母系であるddYマウス脳のメチオニンエンケファリン様免疫活性（ME-LI）を、radioimmunoassay（RIA）で測定した。放り上げ刺激前の25日ですでに、ElのME-LIが、ddYに比べて海馬で有意に減少した。不全発作発現期の50日では、放り上げ刺激を受けたEl(+) 及び刺激を受けていないEl(o)マウスのME-LIが、海馬と中隔野で有意に低下した。強直間代発作発現以後の150日では、El(+)及びEl(o)のME-LIが、大脳皮質と中隔野と線条体で有意に減少した。Elマウス脳のME-LIの低下は、昨年報告したElのオピオイドδレセプターのup-regulationと対応しており、enkephalinergic neuronの機能低下が、Elマウスの痙攣素因や痙攣発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

オピオイドペプチドは、多彩な生理作用[1]を有するが、痙攣に対しては、促進的或いは抑制的であるという相反する報告が見られる[2]。前回我々は、Elマウスのオピオイドδレセプター解析を行い、ddYマウスに比べてup-regulateすることを報告した。今回は、δレセプターに結合する内因性メチオニンエンケファリンを、各発育時期と脳の部位別で、RIAを用いて測定した。

〔方法〕　Elマウスには生後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。生後50日頃より不全発作を示し、75日以降で完全な痙攣発作を示した。Elマウスは、放り上げ刺激の履歴の有無でEl(+)とEl(o)に分けた。El(+)、El(o)、ddYマウスは、それぞれ生後25日、50日、150日で断頭した。El(+)マウスについては、放り上げ刺激後３日目の発作間歇期に断頭した。Sidmanのアトラスに従い脳を８部位に切り出し、1 M 酢酸中で90℃、15分間加熱し、氷冷後ホモジナイズして遠心した。上清の一部を凍結乾燥した後、assay bufferに溶解し、Amersham社から購入した[$^{125}$I]MEと抗血清を加え４℃、24時間インキュベートした。デキストラン炭末法により上清を分離し、γ-counterでradioactivityを測定した。蛋白定量は、Lowry法[4]に従った。

〔結果〕　各発育時期で、ddYとElマウス脳のME-LIは、線条体と中隔野で最も高値を示し、扁桃核と視床＋視床下部の２－３倍、大脳皮質と海馬の10倍量を示した。ElのME-LIは、ddYに比べて低値を示した。生後25日では、海馬でElのME-LIが、ddYに比べて有意に低下した（TABLE 1）。生後50日では、海馬と中隔野でEl(o)とEl(+)マウスのME-LIが、ddYに比べて有意に減少した（TABLE 2）。生後150日では、大脳皮質と中隔野と線条体において、El(o)とEl(+)のME-LIが、ddYに比べて有意に低下した（TABLE 3）。

〔考察〕　Elマウス脳におけるME-LIの低下は、我々の報告したElのオピオイドδレセプターのup-regulation[5]と、良く対応している。放り上げ刺激前の25日のEl及び、不全発作発現期の50日のEl(o)とEl(+)のME-LIが、海馬ですでに減少していることは、海馬の内因性MEが、Elの痙攣素因に密接に関係していることを示唆する。El(o)とEl(+)のME-LIに差がみられなかったことから、Elマウス脳のME-LIの減少は、痙攣の結果によるものでは

ないと考えられる。 Elマウスの発作感受性は、放り上げ刺激の履歴に加え成長に伴って増加し、El(o)マウスも、発育に伴って痙攣閾値が低下する[6]。これらのことから、我々はレセプターのup-regulationと対応している150日のEl(o)とEl(+)の大脳皮質におけるME量の低下が、痙攣発現の病因に関与すると考える。レセプターの結合実験の結果[5]と対応しない 25日の中隔野及び150日の海馬と線条体については、抗血清が活性ペプチドのME以外にも前駆体や代謝物や他の神経ペプチドなどと cross-reactする可能性が否定できず、今後 HPLC/RIA法[3]を用いて検討するつもりである。これまでの成績から、enkephalinergic neuronの機能低下が、Elマウスの痙攣素因や痙攣発現に重要な役割を果たし、Elマウスでは脳内オピオイド系が、痙攣に対して抑制的に作用すると考えられる。

[文献] 1) Akil, H. et al. (1984) Ann. Rev. Neurosci. 7, 223-255 2) Frenk, H. et al. (1983) Brain Res. Rev. 6, 197-210 3) Hong, J.-S. et al. (1983) Methods in ENZYMOLOGY, 547-564 4) Lowry, O. H. et al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275 5) Onishi, H. et al. (1989) Neurochem. Res. 14, 31-35 6) Suzuki, J. et al. (1982) Exp. Neurol. 75, 440-452

TABLE 1. ME-LI (pmol/mg protein) in various brain regions of 25-day-old ddY and El strain mice

| Region | Strain | |
|---|---|---|
| | ddY | El |
| Cerebrum | 3.2±0.62 | 2.8±0.44 |
| Cerebral cortex | 1.5±0.47 | 0.86±0.22 |
| Hippocampus | 1.4±0.16 | 0.76±0.16[a] |
| Septal area | 9.6±1.6 | 8.2±1.9 |
| Striatum | 14.7±1.9 | 12.7±3.0 |
| Amygdala | 4.6±0.84 | 3.6±1.2 |
| Thalamus plus Hypothalamus | 4.8±1.6 | 4.8±1.3 |
| Pons-medulla | 4.4±0.68 | 4.7±1.2 |
| Cerebellum | 2.1±0.32 | 1.8±0.39 |

TABLE 2. 50-day-old ddY, El(o) and El(+) strain mice

| Region | Strain | | |
|---|---|---|---|
| | ddY | El(o) | El(+) |
| Cerebrum | 3.7±0.05 | 3.2±0.80 | 2.6±0.35 |
| Cerebral cortex | 1.4±0.19 | 0.64±0.17 | 0.80±0.11 |
| Hippocampus | 1.4±0.02 | 0.86±0.09[b] | 0.92±0.01[a] |
| Septal area | 22.3±2.2 | 11.7±1.6[b] | 11.6±0.62[b] |
| Striatum | 19.9±2.5 | 16.7±1.6 | 11.7±0.32 |
| Amygdala | 6.8±1.2 | 5.4±0.22 | 5.8±0.51 |
| Thalamus plus Hypothalamus | 7.1±0.67 | 5.7±1.1 | 5.6±0.67 |
| Pons-medulla | 4.1±0.66 | 4.4±0.28 | 3.7±0.66 |
| Cerebellum | 3.3±0.11 | 2.3±0.68 | 2.5±1.04 |

TABLE 3. 150-day-old ddY, El(o) and El(+) strain mice

| Region | Strain | | |
|---|---|---|---|
| | ddY | El(o) | El(+) |
| Cerebrum | 3.0±0.35 | 2.1±0.47[a] | 1.7±0.28[b] |
| Cerebral cortex | 1.9±0.31 | 0.60±0.17[b] | 0.97±0.19[b] |
| Hippocampus | 1.1±0.12 | 1.3±0.32 | 1.1±0.12 |
| Septal area | 16.9±2.5 | 8.9±0.73[a] | 10.2±1.7[b] |
| Striatum | 18.7±2.1 | 9.6±0.56[b] | 10.2±1.2[b] |
| Amygdala | 4.4±0.65 | 4.2±0.03 | 4.8±0.68 |
| Thalamus plus Hypothalamus | 6.5±1.3 | 4.4±0.14 | 5.6±0.59 |
| Pons-medulla | 4.9±1.1 | 3.4±0.89 | 4.6±0.49 |
| Cerebellum | 1.0±0.15 | 1.2±0.26 | 1.1±0.15 |

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$; compared with ddY mice.

# 111 抵抗血管におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)含有血管拡張神経とその神経伝達における neuropeptide Yの役割

黄周子、川崎博己、高崎浩一朗
(宮崎医科大学薬理学教室)

〔要約〕免疫組織化学的な検索によって、ラット腸間膜動脈にはneuropeptide Y(NPY)-like immuno-reactive(NPY-LI)およびCGRP-LI含有神経が密に分布していた。ラットの腸間膜動脈灌流標本を用いた実験で、guanethidine存在下、methoxamineで一定の血管緊張を保った標本の血管周囲神経を電気刺激すると、刺激頻度依存的な灌流圧の減少、すなわち血管拡張反応が生じた。この反応は血管収縮反応を起こさない濃度(5x10$^{-9}$M、10$^{-8}$M、5x10$^{-8}$M)のneuropeptide Y(NPY)が灌流液中に存在するとNPYの濃度依存的に、有意に抑制された。このとき、外因性のacetylcholineまたはCGRPによる血管拡張反応は影響されなかった。以上の結果からNPYはCGRP含有神経に作用して、CGRPの遊離を抑制的に調節していると考えられる。

【目的】我々はすでに、ラットの腸間膜動脈抵抗血管には、CGRPを伝達物質とするnonadrenergic、noncholinergic(NANC)の血管拡張性神経、すなわちCGRP含有神経が存在することを証明し、血管収縮性神経の交感神経とともに血管の緊張度を調節している可能性を示唆している[1]。血管に分布する交感神経内には伝達物質のnorepinephrine(NE)と共存するpeptide、NPYが知られており、交感神経伝達機構に関与していると考えられている[2]。我々はすでにNEがCGRP含有神経による血管拡張反応を抑制的に調節していることを報告しており[3]、交感神経の刺激によりNEと同時に遊離されるNPYもCGRP含有神経伝達機構に関与している可能性がある。今回我々は、CGRP含有神経伝達機構におよぼすNPYの役割について検討した。

【方法】体重350g前後のWister系雄性ラットから摘出した腸間膜動脈灌流標本をKawasakiの法[4]に従って作製した。標本をperistaltic pump(SJ-1215,ATTO)を用いて、Krebs-Ringer bicarbonate solusion(Krebs液)を5ml/minの定流量で灌流し、また0.5ml/minの流量で表面灌流した。灌流圧の変化を圧transducerで測定した。灌流圧が安定した後、5$\mu$M guanethidine(交感神経遮断薬)および7$\mu$M methoxamine($\alpha_1$-アドレナリン受容体作動薬)を含むKrebs液(MG-Krebs液)を灌流して血管を収縮させ、灌流圧を一定レベルまで上昇させた。灌流圧が一定した後、腸間膜動脈周囲神経を電気刺激(PNS;1～8Hz,60V,30秒間)した。NPY 5x10$^{-9}$M、10$^{-8}$M、5x10$^{-8}$Mの各濃度を含むMG-Krebs液を灌流し、PNSによる灌流圧の変化を調べた。また、acetylcholine(ACh; 1 nmol)およびCGRP(0.01,0.1 nmol), substance P(SP;10 nmol)、neurokinin A(NKA; 10 nmol)、neurokinin B(NKB; 10 nmol)などのneuropeptideをinfusion pump(Model 975, Havard)を用いて100$\mu$l(10sec)の容量で灌流液中に直接注入した。腸間膜動脈の NPY-LIおよびCGRP-LI含有神経は免疫組織化学的に検討した[5]。各実験終了時、100 $\mu$Mのpapaverineを灌流して最大弛緩を求め、これを100%として弛緩率を算出した。

【結果と考察】免疫組織化学的な検索からラット腸間膜動脈には、CGRP-LI神経(Fig 1A)とNPY-LI神経(Fig 1B)が密に分布することが観察された。動脈標本を500 nM capsaicin(peptidergic toxin)で処置するとCGRP-LI神経の免疫蛍光は減少したが、NPY-LI神経には変化はみられなかった。一方、動脈を6-hydroxydopamine(6-OHDA)(adrenergic toxin)で処置するとNPY-LI神経の免疫蛍光は消失したが、CGRP-LI神経には変化がみられなかった。この結果からNPY-LI神経は血管交感神経に含有されており、CGRP-LI神経とは異なることを示している。
ラットの腸間膜動脈抵抗血管床の灌流標本において、guanethidine存在下に交感神経反応を抑制し、methoxamineで血管収縮させた後、経壁電気刺激を行うと、刺激頻度依存的な血管拡張反応が現れた。この反応は持続性であり、神経毒のtetrodotoxinおよびcapsaicin処置で消失したが、6-OHDA処置では変化を受けなかった。外因性にSP、NKAおよびNKBを注入しても血管拡張反応は殆どみられなかったが、CGRPの注入では、PNSによって生じる血管拡張反応と類似した血管拡張反応が観察された。従って、この拡張反応は神経性であり、CGRP含有神経から遊離されたCGRPが、血管平滑筋を弛緩することによって発現したものである。
神経性血管拡張反応は、NPYの濃度に依存して抑制され、10$^{-9}$M、5x10$^{-9}$Mの濃度では低頻度刺激による血管拡張反応は殆ど消失した(Fig 2)。この時、AChまたはCGRP注入による血管拡張反応は、NPYの存在下でも殆ど影響されなかった。このことは、NPYが内皮依存性弛緩物質を介するAChの血管拡張反応およびCGRPの拡張作用には影響を及ぼさないことを示している(Fig 3)。一方、NPYはNEのα-アドレナリン受容体興奮による血管収縮反応を増強することが知られている。しかし、本実験ではmethoxamineに

よる昇圧作用(灌流圧の上昇)はNPYが存在してもcontrolと差が認められなかった。従って、NPY存在下ではmethoxamineの血管収縮反応が強くなった為に神経性血管拡張反応が抑制されたとは考えられない。おそらく、NPYによる神経性血管拡張反応の抑制は、CGRP含有神経からの伝達物質CGRPの遊離抑制によるものであると考えられる。

これらの結果から血管収縮性神経の交感神経は、NEとNPYを遊離することによってCGRP含有神経による血管拡張反応を抑制的に制御していると考えられる。腸間膜動脈抵抗血管における緊張度の維持調節は、これらの神経の相互作用によって行われていると思われる。

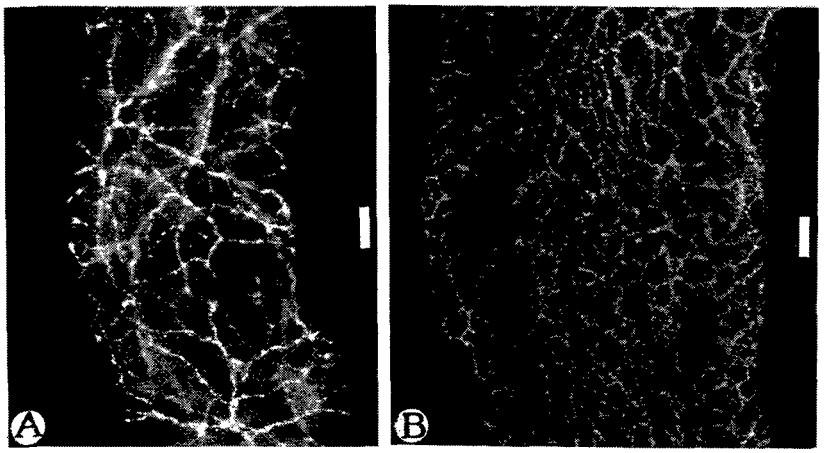



**Fig. 1**
CGRP-like(A) and NPY-like(B) immunoreactive fibres in the mesenteric artery of rats. Marker bars=50μm

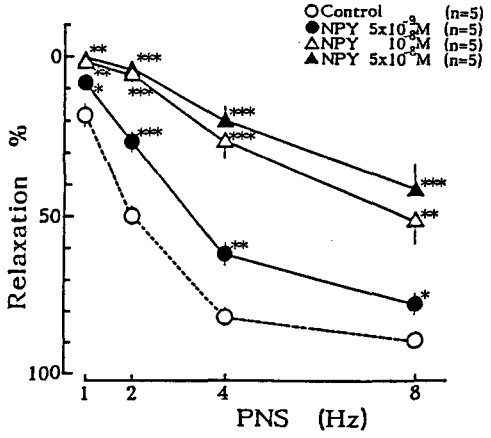



**Fig. 2**
Effect of neuropeptide Y(NPY) on the vasodilator response induced by perivascular nerve stimulation (PNS) in the perfused mesenteric vascular bed of rats. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compaired with control

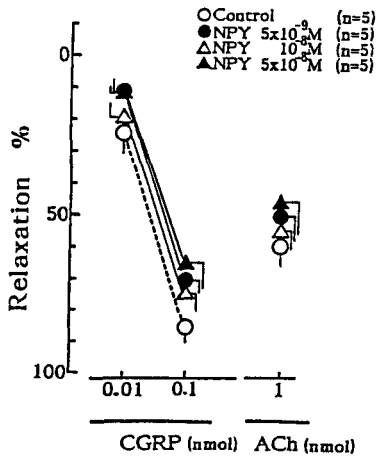



**Fig. 3**
Effect of NPY on the vasodilator response induced by bolus infusion CGRP and ACh

【文献】1)Kawasaki,H.et al.(1988)Nature. 335,164-167.
2)Lundberg,J.M.et al.(1982)Acta Physiol.Scand. 116,477-480.
3)Kawasaki,H.,Nuki,C.&Takasaki,K.(1989)Japan.J.Pharmacol.49(Suppl),200p.
4)Kawasaki,H.&Takasaki,K.(1984)J.Pharmacol.Exp.Ther.229,816-822
5)Saito,A.&Goto,K.(1986)J.Pharmacobio-Dyn.9,613-619

# 112 モルヒネとナロキソンの拮抗作用について

## —薬力学的拮抗と薬物動態学的拮抗の共存

今村 与志子, 九穂 泰三, 小暮 美樹, 松本 明, 芝軒 信次, 石川 紘一
(日本大・医・薬理)

〔要約〕
モルヒネの脳内濃度は，拮抗薬であるナロキソンを併用することによって，有意に低下した。この作用はモルヒネの平滑筋収縮作用が関係しており，胆管への排泄速度に依存し，薬物動態学的な拮抗作用と考えられる。この結果は，モルヒネとナロキソンの拮抗関係が，これまで言われていたように，単純に受容体を介した薬力学的な競合拮抗だけではないことを示している。そこでモルヒネの脳内濃度と，この薬物によって引き起こされるモノアミン伝達物質の代謝変動とを，in vivo 実験系で濃度ー作用曲線を求めて比較したところ，脳内のドパミン作働神経系は多くの部位で，ナロキソンを識別する受容体を介した作用として発現し，ノルアドレナリン作働神経系についてみると大脳皮質前部および視床下部のみがこの受容体を介して作用を発現した。しかし，セロトニン作働神経系では，脳内のすべての部位でナロキソンを識別する受容体を介したモノアミン代謝に対する作用は引き起こされなかった。

〔緒　言〕
薬物の作用は，作用点における薬物濃度と時間に依存して変化する。しかし，従来行われていた in vivo実験においては，作用点での濃度は不明であり，一般には投与用量の関数として薬物の作用を表してきた。この方法だと，薬物動態学的な要因によって作用が修飾され，正確な作用の比較が出来ない場合も起りうる。このような欠点を除くために，我々はフェノチアジン誘導体を用いた実験で，脳内の薬物濃度とその薬物によって引き起こされるモノアミン伝達物質代謝の変動との相関を，直接的に測定する方法を開発し，有用な方法であることを報告した (1,4)。モルヒネは生化学的な作用として，脳内モノアミン伝達物質代謝に影響することがよく知られている。この薬物は，電気化学検出器を装着した高速液体クロマトグラフィーを用いて，モノアミン伝達物質と同時に定量できることが明らかにされている (3)。そこで上述の方法 (1,4)をモルヒネに適用した。この際，モルヒネの拮抗剤であるナロキソンの影響についても検討した。

〔実験方法〕
(1) 実験動物：体重約250 g のWistar系雄性ラットを使用した。動物は購入後，実験に供するまで恒温，恒湿，人工照明下の飼育室で最低１週間飼育後，処置を行った。

(2) 薬物の投与および脳試料の作成：モルヒネは0.01～10 mg/kgの範囲の用量になるよう生理食塩液に溶解して，尾静脈より投与した。一部の動物にはナロキソン1 mg/kg を同時に投与した。薬物の投与１時間後にマイクロウエーヴ (5 KW, 1.2 sec)を照射して屠殺し，Glowinski and Iversen の方法に準じて脳を９部位に分画し，定量を行うまで-80℃の超低温槽に保存した。なお血液も採取し，血清を分離後保存した。

(3) モルヒネおよびモノアミン関連物質の定量：電気化学検出器を装着した高速液体クロマトグラフィーを用いて，既に報告した方法 (2,3)に準じて行った。保存されていた脳組織に内部標準物質を含んだ塩酸を加えてホモジネートを作成し，遠心後上清の一部をノルアドレナリンの代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol (MOPEG)の定量に用いた。残りのホモジネートに食塩，EDTAおよびブタノールを加え，60分振盪後遠心し，ブタノール層に塩酸を加え，再度振盪後塩酸層をモルヒネおよびノルアドレナリン (NA)，ドパミン (DA)，セロトニン (5-HT) の定量用試料とした。残ったブタノール層にトリス塩酸緩衝液を加え，撹拌・遠心後緩衝液層を酸性代謝産物 (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC; homovanillic acid, HVA; 5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA) の定量試料とした。

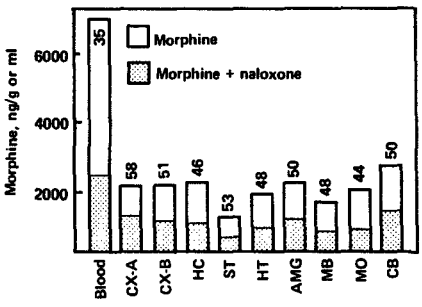



図１　血中および脳内モルヒネ濃度に及ぼすナロキソンの影響
数値は単独投与時に対する百分率

［実験結果および考察］

10 mg/kgのモルヒネを投与し，血液中の生物学的半減期（排泄相）を計算すると，75 ± 13分であった。拮抗薬であるナロキソンを同時に投与した場合，モルヒネの半減期は55 ± 5 分と有意に短縮された。このことは，モルヒネが胆管収縮作用をもち，この径路を経由して排泄されるのを抑制していたところ，ナロキソンによって収縮作用が拮抗され，排泄が促進された結果と解釈することができる。このことは，ナロキソン処置を行うと，bromsulphalein排泄速度が有意に速くなることからも推測できる。この結果，モルヒネ投与１時間後に血中または脳内の薬物濃度を測定すると，ナロキソンを併用すると単独投与の場合と比較して約1/2 と，有意に低くなっていた（図１）。したがって，ナロキソンのモルヒネに対する拮抗作用の一部には，薬物動態学的な要素も含まれていることになる。線条体におけるモルヒネ濃度とDOPAC やHVA の濃度について，direct correlation analysisを行うと，有意の一次相関関係が認められた（図２）。この結果は in vitro 実験における濃度－作用曲線に相当するもので，既に発表したように（1,4），薬物のモノアミン代謝に及ぼす作用を，簡単に比較検討することができる。ナロキソンを併用した場合，この濃度－作用曲線は右方に移動し，両薬物の間に競合拮抗関係のあることが示された。このこと自体は既に多くの研究結果が明らかにしている。同様の解析をMOPEG および5-HIAAについても行った。前者の場合，モルヒネ単独投与時に有意の一次相関関係が認められず，また後者の場合，単独投与時には相関関係が認められたが，ナロキソンを併用しても，DA代謝産物においてみられたような，右方への移動は認められなかった。このことは，線条体で起こったモノアミン代謝の変化のうち，ドパミン作働神経系に対するものはナロキソンを識別する受容体（μ）を介したものであり，ノルアドレナリン作働神経系やセロトニン作働神経系に対する作用は，それ以外の作用機構を介したものであろうと推測することができる。

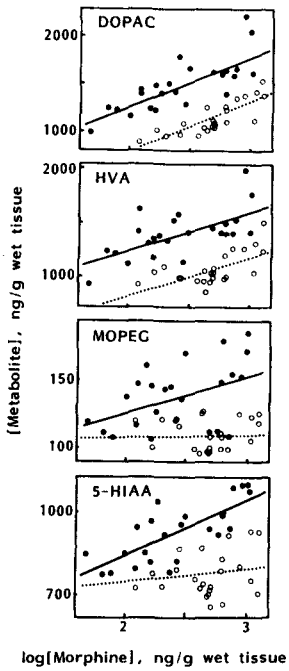



図２　線条体におけるモルヒネとモノアミン代謝産物濃度の相関関係

モルヒネを単独（●）またはナロキソンと併用投与（○）し，１時間後に屠殺して，同一試料中の濃度をHPLC-ECDを用いて測定した。

線条体以外の脳内部位についても同様の解析を行った（表１）。ここで"Significant" とは，①モルヒネ単独投与時，ナロキソン併用時ともモルヒネおよびモノアミン代謝産物濃度の間に，有意の一次相関関係が認められたこと，②２つの回帰直線の勾配に有意の差が認められなかたこと，③２つの回帰直線のＹ切片に有意の差が認められたこと，の３つのクライテリアを満足するものとした。その結果によれば，ドパミン作働神経系には脳内の多くの部位（海馬，橋－延髄，小脳を除く）でナロキソンを識別する受容体を介した作用が認められ，ノルアドレナリン作働神経系については大脳皮質前部と視床下部において，同様の作用が発現した。しかし，セロトニン作働神経系については脳内のどの部位においても，このような作用は認められなかった。

表１　Direct correlation analysisのまとめ

| Region | Noradrenergic | Dopaminergic | Serotonergic |
|---|---|---|---|
| Anterior cortex | Significant | Significant | N.S. |
| Posterior cortex | N.S. | Significant | N.S. |
| Amygdala | N.S. | Significant | N.S. |
| Hippocampus | N.S. | N.S. | N.S. |
| Hypothalamus | Significant | Significant | N.S. |
| Striatum | N.S. | Significant | N.S. |
| Midbrain | N.S. | Significant | N.S. |
| Pons-medulla | N.S. | N.S. | N.S. |
| Cerebellum | N.S. | N.S. | N.S. |

"Significant"判定基準については本文を参照

以上今回の結果は，モルヒネとナロキソンの間に，従来言われていた薬力学的な競合拮抗ばかりでなく，薬物動態学的な拮抗関係も存在し，両薬物の影響を検討するのに，単純なモノアミン代謝産物の測定だけでは不十分なことを示しており，この点を補うため脳内薬物とモノアミン関連物質を同時に定量する方法が有効であることを示している。

［文　献］

(1) Gotoh, Y., Shibanoki, S. and Ishikawa, K. (1986) Jan. J. Pharmacol. 40, 231-237.
(2) Ishikawa, K., Martinez, Jr., J.L. and McGaugh, J.L. (1982) J. Chromatogr. 231, 255-264.
(3) Ishikawa, K. and Shibanoki, S. (1985) Anal. Biochem. 147,441-450.
(4) Shibanoki, S., Kubo, T. and Ishikawa, K. (1987) J. Pharmacol. Exp. Ther. 240, 959-965.

# 113 血中コルチコステロンよりみた抗うつ薬慢性投与の5HT-1Aレセプターへの効果

稲吉條太郎*，土山幸之助，小野妙子，山内千代，大庭明子，岡田久美子，
児島克博，佐々木一郎，中村　誠，溝部裕子，永山治男.
（大分医科大学・精神神経）

〔要約〕
抗うつ薬 mianserin 2mg/kg, mianserin 10mg/kg, desipramine 5mg/kg, doxepine 5mg/kgをラットに3週間腹腔内投与し，さらに最終投与18時間後に5HT-1Aレセプターのアゴニストである8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) 0.5mg/kgを腹腔内投与し，その30分後に断頭し血中コルチコステロンを測定した。mianserin 10mg/kg, desipramine 5mg/kg, doxepine 5mg/kg投与群は血中コルチコステロンの有意な増加を示し，その程度はsaline+8-OH-DPAT群より有意に大であった。以上から抗うつ薬の慢性投与が5HT-1Aレセプターの過感受性状態を惹起することが示唆された。

〔目的〕
われわれは従来「うつ病の少なくともいくつかの亜型は，シナプスのセロトニン系の伝達過剰に基づいており，各種の抗うつ薬は，これをポストセロトニンレセプターでブロックする事により，その抗うつ効果を示す」という仮説を呈示してきた。また，最近抗うつ薬mianserin 2mg/kg, desipramine 5mg/kg, doxepine 5mg/kg, amitriptyline 5mg/kg, trazodone 10mg/kg の慢性投与が5HT-1Aレセプターの高親和性部位の$B_{max}$を有意に増加させることを報告した。本研究は5HT-1Aレセプターの変化を5HT-1Aレセプターアゴニストである8-OH-DPATによる血中コルチコステロンの反応を通してこの現象を機能面からとらえようとするものである。

〔方法〕
18:00から6:00の12時間を明期とする明暗条件下で3週間以上飼育した350-400gのWistar系成熟雄性ラットを用いた。3週間にわたってmianserin 2mg/kg, mianserin 10mg/kg, desipramine 5mg/kg, doxepine 5mg/kgを腹腔内投与した。対照群にはsalineを投与した。最終投与18時間後に8-OH-DPAT 0.5mg/kgを腹腔内投与し，30分後に断頭し駆幹血を採取した。血中コルチコステロンはradioimmunoassayにより測定した。

〔結果〕
1. saline, mianserin 10mg/kg, desipramine 5mg/kg, doxepine 5mg/kgの慢性投与後に8-OH-DPATを投与した群では，コントロール群（saline投与群）に比べて血中コルチコステロンは有意に高値を示した。しかし，mianserin 2mg/kg群は有意な増加は見られなかった。
2. mianserin 10mg/kg, desipramine 5mg/kg, doxepine 5mg/kg の慢性投与群では，8-OH-DPAT投与後の血中コルチコステロンはコントロール（saline+8-OH-DPAT)に比べ有意に高値を示した。しかし，mianserin 2mg/kg群は有意な増加は見られなかった。

〔考察〕
mianserin 10mg/kg, desipramine 5mg/kg, doxepine 5mg/kg の慢性投与は，8-OH-DPATによる血中コルチコステロン増加作用を有意に増強させた。8-OH-DPATは血中ACTHを増加させるが，この増加は5HT-2,5HT-3,ドーパミン，αアドレナジックやβアドレナジック・レセプター・アンタゴニストによって影響を受けないことより，5HT-1Aレセプターを介しているものと考えられている。また，5HT合成阻害薬であるparachlorophenylalanine (PCPA)は，8-OH-DPATによるACTHの増加に影響を及ぼさないことより，ACTH分泌に関する5HT-1Aレセプターは，ポストレセプターに存在するとされている。このことより8-OH-DPATによるcorticosterone増加作用に関与する5HT-1Aレセプターもポストレセプターに存在すると思われる。以前，我々は抗うつ薬mianserin 2mg/kg, desipramine 5mg/kg, doxepine 5mg/kg, amitriptyline 5mg/kg, trazodone 10mg/kg の慢性投与がラット大脳皮質5HT-1Aレセプターの高親和性部位の$B_{max}$を有意に増加させるこ

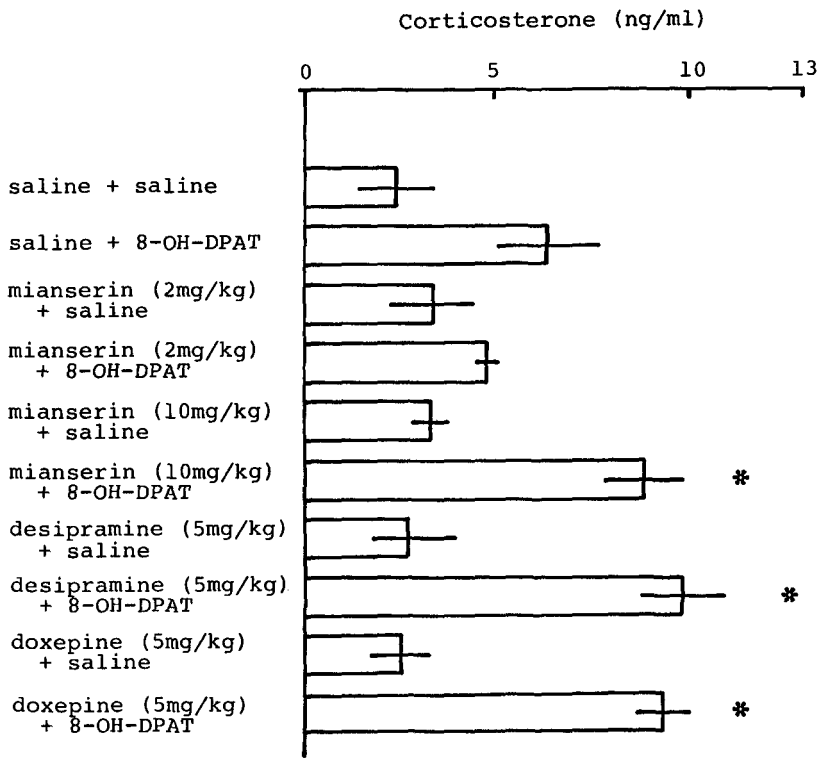



Fig. 1

Effect of various antidepressants on 8-OH-DPAT (0.5mg/kg) stimulated corticosterone.

* $p < 0.01$; as compared with (saline + 8-OH-DPAT)

とを報告した。また，8-OH-DPATは5HT-1Aレセプターを介して濃度依存的にコルチコステロンを増加させることも報告されている。これらの事実を合わせ考えると，本報告で得られた結果は，抗うつ薬慢性投与によりポストレセプターに存在する5HT-1Aレセプターに過感受性が生じたため8-OH-DPATによるcorticosterone増加作用が増強されたものと考えられる。

［文献］

1. 穐吉條太郎，永山治男，土山幸之助　他，(1988) そううつ病の発生機序に関する生物学的研究，昭和62年度研究成果報告書，101-106.
2. Akiyoshi, J., Kuranaga, H., Tsuchiyama, K., et. al. ($1989_a$) Pharmacol. Biochem. Behav. in press
3. Akiyoshi, H., Tsuchiyama, K., Mizobe, Y., et. al. ($1989_b$) Pharmacol. Biochem. Behav. in press
4. Nagayama, H., Akiyoshi, J., Tobo, M. (1986) Pharmacol. Biochem. Behav. 25, 805-811.
5. Koenig, J. I., Gudelsky, G. A., Meltzer, H. Y. European J. Pharmacol. 137, 1-8.

# 114 神経活動・脱分極刺激にともなう Neuropeptide Y遺伝子発現の変化

樋口 宗史、岩佐 厚*、吉田 博
（大阪大、医、第一薬理、*泌尿器科）

〔要約〕神経活動及び神経細胞膜の脱分極刺激が神経特異的遺伝子である Neuropeptide Y(NPY)遺伝子の発現にどう影響を与えるかについて in vivo 及び in vivo の系を用いて調べた。 In vitro においてラット副腎支配内臓神経を除神経し、副腎クロマフィン細胞の NPY mRNA 発現量の変化を調べると、除神経副腎のNPY mRNA 量は１２ 日後においても対照群の 99% と変化を認めなかった。 一方、降圧剤 reserpine (0.5 mg/kg) 5日間投与は副腎においてβ-actin mRNA量を変化させることなく、NPY mRNA 量を約４倍増加させた。 この reserpine による副腎 NPY mRNA 及び前駆体 RNA の増加は、除神経によりその増加が対照群の 39% にまで抑制された。 このことは副腎クロマフィン細胞の NPY 遺伝子発現が内臓神経活動時に、transsynaptic に活性化を受けることを示していた。 神経細胞膜の脱分極刺激が NPY 遺伝子発現に影響を与えるかを NG108-15 細胞で調べた。 50mM $K^+$ 刺激、20μM veratridine 刺激は時間依存性に NPYmRNA 量を 266% にまで増加させた。 veratridine の効果は $10^{-6}$ M TTX で完全に抑制された。 80mM $K^+$ 30分間刺激により、３時間後に NPY mRNA は対照群の 30% の増加を示し、６時間後でも 13% の増加が認められた。 以上のように神経活動及び細胞膜脱分極シグナルは、NPY 遺伝子発現を正に調節することが示された。

[目的] ペプチド性神経伝達物質である Neuropeptide Y (NPY) は血圧調節、摂食行動を含む多くの神経機能に関与している。 私達は NPY 遺伝子の発現調節や生合成代謝系を解析するために、培養細胞を用いて NPY 遺伝子発現調節にはホルモン、伝達物質、セカンドメッセンジャーが関与している事 (1,2)、交感神経への分化に伴い NPY 遺伝子発現が増大する事 (3)、また、生体内においても中枢及び末梢神経系の NPY 遺伝子発現が加令及び降圧剤投与で著しく変動する事 (4,5) 等を報告してきた。 今回、この神経特異的遺伝子である NPY 遺伝子の発現が、神経活動及び神経細胞膜の脱分極シグナルでどのように調節されているかについて in vivo 及び培養細胞を用いて検討した。

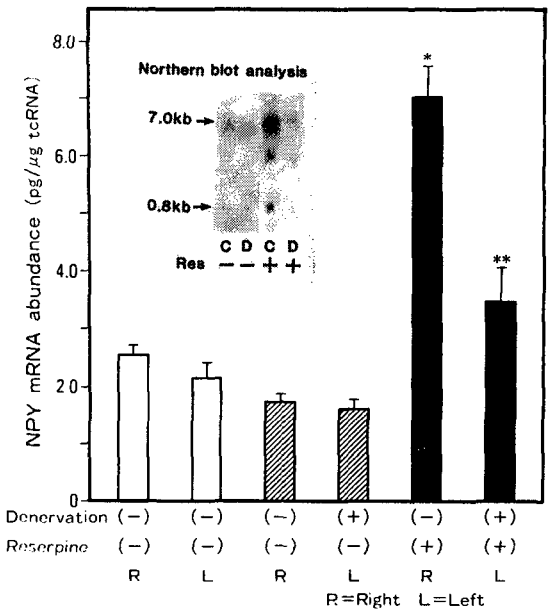
[実験方法] （１）除神経及び薬物投与　７週令雄性ラットの左側副腎支配内臓神経を切断した。 薬物投与群では術後１週間目から reserpine ５日間投与 (0.5mg/kg, i.p.) を行った。（２）細胞培養　PC12 細胞に reserpine 処理を、NG108-15 細胞に高カリウムあるいは veratridine 処理を行った。（３）Northern 分析及び NPY mRNA ・β-actin mRNA 定量　全細胞 RNA を抽出後、既報 (2,4) に従い rat NPY cDNA をプローベとして、精製 pBL-NPY transcript をコントロールに、NPY mRNA を定量した。 β-actin mRNA は、Dr.B.Paterson から供与された rat β-actin cDNA をプローベに定量した (6)。

[結果] （１）ラット副腎支配内臓神経の切断は、それ単独では除神経側副腎クロマフィン細胞の NPY mRNA 量に影響を与えなかった（図１）。 （２）Reserpine 投与により副腎 NPY mRNA は β-actin mRNA 量の変化を伴わず約４倍に増加した。 内臓神経除神経はこの NPY mRNA 及び前駆体 RNA の増加を 39% にまで有意に抑制した（図１）。 （３）rat pheochromocytoma PC12 細胞を直接 reserpine (2.4μg/ml) 処理すると NPY mRNA 量は逆にコントロールの 35% に減少した。 （４）NPY mRNA を高濃度 (11.4pg/μg tcRNA)発現する NG108-15 細胞を 50mM $K^+$ あるいは 20μM veratridine で刺激すると時間依存性に NPY mRNA 量は 266% にまで増加した。 veratridine の効果は $10^{-6}$ M TTX で完全に抑制された（図２、３）。 （５）80mM $K^+$ ,30分間の一過性刺激により、NG108-15 細胞の NPY mRNA 量は ３時間後に 30% の、６時間に 13% の時間オーダーでの増加を示し、その後、回復が認められた。 （６）80mM $K^+$ ,３０分間刺激による NPY mRNA の増加には、NPY 遺伝子発現を変化させる 1 μM dexamethasone, 10 μM forskolin は影響を与えなかった。 以上のように、神経活動及び細胞膜脱分極シグナルは神経特異的遺伝子である NPY 遺伝子の発現を正に調節する事が示された。

[考察] NPY mRNA が副腎において insulin 投与、reserpine 投与でその量が増加する事が最近報告された(4,7,8)。 クロマフィン細胞内において神経情報伝達に関与する tyrosine hydroxylase (TH) 遺伝子、proenkephalin A (ENK) 遺伝子の発現が内臓神経を介する神経活動の影響を受けることから考え、transsynaptic な機構が推察された。 私達の今回の実験は、NPY 遺伝子の発現が強く内臓神経の活動や細胞膜の脱分極を介して増強を受けることを直接的に示していた。 このことは、一般的に、ENK 遺伝子発現が支配内臓神経活動や脱分極で抑制を受ける事 (9,10) と対照的である。 つまり、支配神経活動や脱分極はこの二つの神経ペプチド遺伝子発現にた

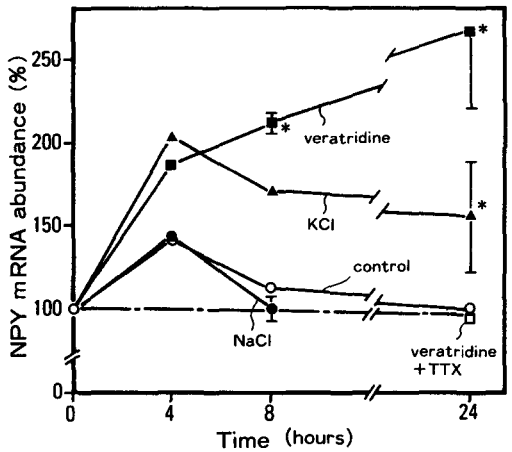
いして逆の方向に調節していた。さらに、NPY 遺伝子発現は除神経単独では影響を受けない事より、正常の生理的状態では支配神経活動は NPY 遺伝子発現に強い作用を持っていない事を示唆していた。一方、TH 遺伝子発現は支配神経活動により NPY 遺伝子とよく似た調節を受けている(11,12)。何故、単一の脱分極刺激でこれらの遺伝子が異なる調節を受けるのかその機作の詳細は不明であり興味深い。膜脱分極刺激後の NPY 遺伝子発現の増加（多分転写活性の増加）に到る過程を調べる目的で、NPY 遺伝子発現に影響を与えることが知られている(2,4) dexamethasone, forskoline の存在下の脱分極刺激の効果を調べた。しかし、脱分極の効果はこれらの因子で影響を受けないことから、glucocorticoids や cAMP が脱分極刺激のメディエイターである可能性は低い。

**Fig.1 Effect of Splanchnic nerve transection on NPY mRNA expression in rat adrenal**



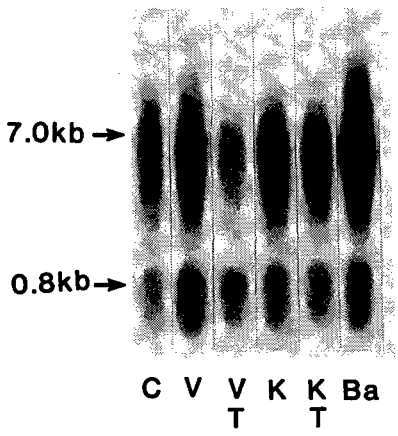

the splanchnic fibers leading from the main trunk to the left adrenal were transected.

**Fig.2 Effect of depolarization on NPY mRNA abundance in NG108-15 cells**




NG108-15 cells were treated with 20 μM veratridine, 50 mM KCl, 50 mM NaCl and 1 μM tetrodotoxin.

**Fig.3 Northern blot analysis of NPY mRNA on depolarization**




NG108-15 cells were treated with 20 μM veratridine, 50 mM KCl, 1 μM tetrodotoxin and 1 mM $BaCl_2$ for 24h.

[文献]


1. 樋口宗史、Sabol, S.L. (1987) 神経化学 26, 58-56.
2. Higuchi, H. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 6288-6295.
3. Higuchi, H. Sabol, S.L. (1988) Japan. J. Pharmacol. 46 (suppl.) 99p.
4. 樋口宗史、岩佐 厚、吉田 博 (1988) 神経化学 27, 276-277.
5. Higuchi, H. et al. (1988) J. Neurochem. 50, 1879-1886.
6. Levi, A. et al (1985) Science 229, 393-395.
7. Fischer-Colbrie, R. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 3240-3244.
8. Schalling, M. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 8306-8310.
9. Kilpatrick, D.L. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7221-7223.
10. LaGamma, E.F. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 8252-8255.
11. Thoenen, H. et al. (1969) J. Pharmacol, Exp. Therapeut. 169, 249-254.
12. Biguet, N.F. et al. (1986) EMBO J. 5, 287-291.

# 115 膜不透過型阻害剤(K-252b)を用いた膜局在型タンパクリン酸化機構の解析

辻　崇一、山下達朗、山本英樹、松田　譲＊、永井克孝
(東大・医・第二生化、協和醗酵(株)東京研＊)

[要約]

神経系の細胞間の情報伝達に何等かの役割を担っていると考えられる膜局在型のタンパクリン酸化酵素系ならびにガングリオシドによるその調節機能を解析してきた。最近、タンパクリン酸化酵素の阻害剤の中で、膜を透過出来ないK-252bを用いて、神経芽腫癌細胞、褐色細胞腫細胞、神経膠細胞腫細胞ならびに神経膠星状細胞における膜局在型のタンパクリン酸化機構を再検討した。その結果、若干の知見を得たのでここに報告する。

1)細胞にintactな状態で外からATPを加えてリン酸化されるタンパク質群の中で、K-252bで阻害される群があった。従って、いわゆるecto-型のリン酸化酵素が存在すると考えられる。2)ecto-型の活性は神経系細胞の方がグリア系細胞よりも高かった。また、SDS-PAGEで見る限り、神経系細胞の方が基質の種類も多かった。3)外因性ガングリオシドGQ1bにより活性化されるecto-型のタンパクリン酸化酵素系を持つのは、GOTO細胞のみで、この細胞は他の細胞と異なって内因性GQ1bを持っていなかった。

これらの結果から、ecto-型の活性は神経系の何等かの機能と係わっていることが考えられる。

[目的]

最近、細胞膜とくに細胞表層局在型(ecto-型)のタンパクリン酸化酵素系が神経系の情報伝達に何等かの役割を持っているものと考えられ注目を集めている。また、昨年、ヒト由来神経芽腫癌細胞GOTOのecto-型の酵素活性の一部がガングリオシドGQ1bにより特異的に活性化されることを我々は明らかにした[1]。この現象を分子レベルで明らかにする事は、ガングリオシドの神経系における機能を考える上でも重要であると考えられる。そこで、(i)我々の観察した酵素活性が本当にecto-型と考えて良いものなのか、(ii)神経細胞やグリア細胞に普遍的に存在するものなのか否か、さらに(iii)GQ1bによる調節機構が他の細胞にも見られるのか否かを明らかにする事を本年度の目的とした。

[実験方法]

酵素活性測定法は図1に、用いた細胞は表に示した。

図1．活性測定法

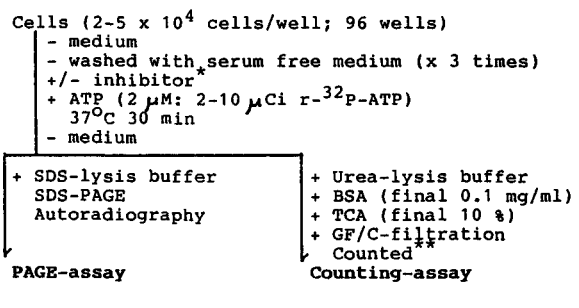



表　用いた株細胞

| | | |
|---|---|---|
| **Neuroblastoma** | | |
| GOTO[2] | human | cholinergic clone |
| Neuro2a | mouse | - |
| N1E-115 | mouse | adrenergic clone |
| NS-20Y | mouse | cholinergic clone |
| **Pheochromocytoma** | | |
| PC-12 | rat | |
| PC-12h[3] | rat | |
| **Astroglioma** | | |
| C-6 | rat | |
| GA-1 | rat | |
| **Peripheral glioma like schwannoma** | | |
| 354-A | rat | |
| **Astrocyte** | | |
| RCR-1[4] | rat | |
| RCR-1GP[4] | rat | |

[結果]

A．ecto-型タンパクリン酸化酵素系は本当に存在するのか？　以下の実験事実から、ecto-型タンパクリン酸化酵素系は存在すると考えられる。

1)K-252b存在下、図１の方法でタンパクリン酸化酵素活性を測定すると、明らかにそのリン酸化が阻害される一群のタンパク質が存在する。この阻害剤は、膜を通過しないので、少なくともこの一群のタンパク質のリン酸化はecto-型のものであると考えられる。

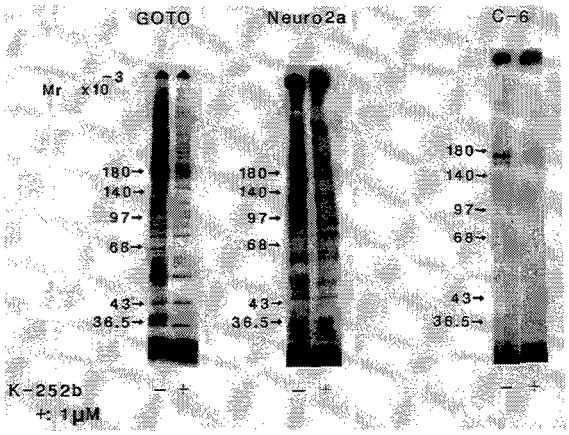



図２．ecto-型タンパクリン酸化の比較（代表例）

2)$^{32}$P-ATPのかわりに無機リン($^{32}$P)を用いた場合、細胞内のリン酸化が観察できるが、この時のリン酸化タンパク群を、$^{32}$P-ATPを用いた場合と比較して見ると、かなりの相違が見られる。

3)図１の方法で得られるリン酸化タンパク質はトリプシン処理に極めて感受性である。細胞に影響を与えるはるか以前にこれらのリン酸化部位が取除かれる。

B．各細胞におけるecto-型タンパクリン酸化酵素系の比較。

1)神経細胞系を用いた場合、GOTO細胞の場合と良く似た結果が得られた。グリア細胞系を用いた場合は、グリア細胞間でお互に良く似ていたが、神経細胞系の結果とは大きく異なっていた(図２)。

2)神経細胞系の方がグリア細胞系よりも活性は高く、基質となるタンパク質の種類も多かった。

C．ガングリオシドGQ1bによる活性化は普遍的に見られる現象なのか？

1)各細胞の培養液に外からGQ1bを加え、ecto-型タンパクリン酸化酵素の活性をGQ1bを加えなかったものと比較すると、GOTO細胞以外は有意な活性化あるいは阻害が見られなかった。

2)GQ1bに特異的なモノクローナル抗体4F10を用いて、内因性ガングリオシド中のGQ1b量を測定して見ると、GOTO細胞は有意な量のGQ1bを持ってはいなかった。測定限界から評価すると、仮に存在するとしても、それは細胞当り $10^4$ 分子以下しかないと考えられる。この事実は、GQ1bの有無が、細胞の外因性GQ1bに対する応答能と深い関係にあることを示唆している。

[考察]

ecto-型タンパクリン酸化酵素活性が神経細胞系の方がグリア細胞系よりも活性が強く、基質分子も多い。さらに、神経研の黒田博士らのK-252bはシナプス形成を阻害するという事実[5]を考え合わせると、この酵素活性は可塑性等を含めた神経機能と何等かの関連があるものと考えられる。

[謝辞]

本研究を遂行するに当り、これらの細胞株を分けて下さった名古屋市立大学の加藤泰治教授、神経研の黒田洋一郎博士、組織培養記念研の高岡聰子博士に感謝します。

[文献]

1) Tsuji,S., et al., J. Biochem. (1988) 104 498-503

2) Sekiguchi,M., et al., Japan J. Exp. Med. (1979) 49 67-83

3) Hatanaka,H. (1981) Brain Res. 222 225-233

4) Jou,T-C., et al., (1983) Formosan Med. Assoc. 82 1115-1125

5) Muramoto,K., et al., (1988) Proc. Japan Acad., 64 ser.B 319-322

# 116 ＣａＭキナーゼⅡの自己燐酸化反応：基質との相互作用

安川節子、 福永浩司*、山本秀幸*、宮川太平、 宮本英七*
(熊大・医・神経精神、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)依存性プロテインキナーゼⅡ(CaMキナーゼⅡ)を用い、0℃にて自己燐酸化反応を行なった。最大 6.6 mole/moleの燐酸が取り込まれた。2)自己燐酸化反応後、酵素活性を各種の基質を用いて、30℃、1分間、$Ca^{2+}$/CaM存在下、非存在下にて測定した。ミエリン塩基性蛋白質、カルシニューリンを基質に用いると、$Ca^{2+}$/CaM依存性の全活性が上昇し、10分間の自己燐酸化反応により数倍から数十倍に達した。ミオシン軽鎖などの他の基質を用いた場合は、この活性の上昇は観察されなかった。いずれの基質を用いた場合でも、$Ca^{2+}$/CaM非依存性活性は生じた。3)高濃度のCaMは、上記の上昇を阻害した。以上の結果は、CaMキナーゼⅡが自己燐酸化によって活性化されることを示唆している。用いる基質に選択性のあることから、自己燐酸化反応は酵素の基質に対する親和性を変化させることを示している。

CaMキナーゼⅡは、脳に最も高濃度存在し、広い基質特異性を示し、$Ca^{2+}$を介する神経機能に深く関与していると考えられている。CaMキナーゼⅡは、$Ca^{2+}$/CaM依存性に自己燐酸化反応をおこし (1)、酵素活性に影響を及ぼすと考えられ、検索が続けられている。これまでの研究結果では、自己燐酸化反応は、酵素の$Ca^{2+}$/CaM非依存性活性を上昇させ、細胞内に一過性に上昇する$Ca^{2+}$効果を延長させる役割を持つと考えられている。本研究では、CaMキナーゼⅡが自己燐酸化反応をおこすと、用いる基質によっては酵素が活性化されることを見出したので報告する (5)。

【実験方法】

CaMキナーゼⅡ (1)、ミエリン塩基性蛋白質 (3)、カルシニューリン (2)は、それぞれ既報に基づき大脳から精製した。酵素の熱不安定性を考慮して、自己燐酸化反応は、0℃にて行なった。CaMキナーゼⅡは、0℃、0～30分間、0.1mM $Ca^{2+}$、0.3$\mu$M CaM、10mM $Mg^{2+}$、0.1mM DTT、25mM Tris-HCl(pH 7.5)、20$\mu$M 非放射性 ATP 存在下、自己燐酸化反応を行なった。つぎに、自己燐酸化された酵素を、基質、[$\gamma$-$^{32}$P]ATPを含む溶液に加え、$Ca^{2+}$/CaM 存在下または EGTA 存在下、30℃、1分間、基質の燐酸化反応を行なった。最終濃度は、0.1mM $Ca^{2+}$+0.3$\mu$M CaM($Ca^{2+}$/CaM)または 2mM EGTA +0.05mM $Ca^{2+}$+0.15$\mu$M CaM(EGTA)、10mM $Mg^{2+}$、0.1mM DTT、25mM Tris-HCl(pH 7.5)、30$\mu$M ATPであった。反応を、LaemmliのSDS solution で停止し、続いて、SDS-PAGEを行なった。対応する基質のバンドをゲルから切り出し、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、酵素活性を求めた。

【結果と考察】

1) CaMキナーゼⅡの自己燐酸化反応

自己燐酸化反応時に、[$\gamma$-$^{32}$P]ATP を用い、$\alpha$サブユニットと$\beta$サブユニットに取り込まれた燐酸を測定した。反応は 30分で平衡に達し、$\alpha$サブユニットには 0.3 mole/mole、$\beta$サブユニットには 1.3 mole/mole の燐酸が取り込まれた。CaMキナーゼⅡは$\alpha_3\beta_3$で構成されていると考えると、ホロ酵素には総計 6.6 mole/mole の燐酸が取り込まれた。

2) 自己燐酸化反応の酵素活性に対する効果

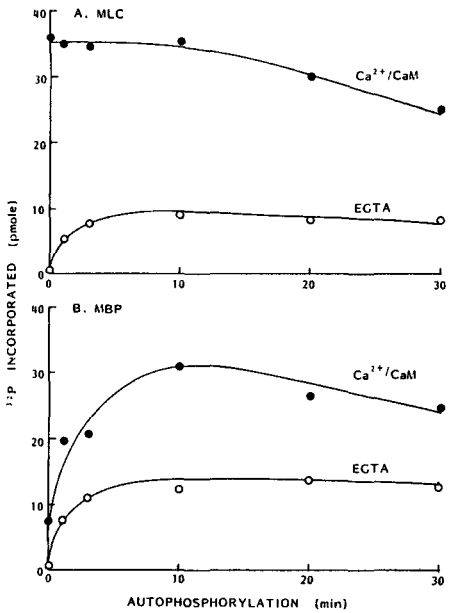
自己燐酸化酵素に対する対照として、ATPを加えずに同様の操作を行なった酵素活性を測定し、比較検討した。非自己燐酸化酵素は以下の実験で認められたような自己燐酸化酵素の活性変動を示さなかった。図1では自己燐酸化反応の酵素活性に対する効果の経時的変化を示している。$Ca^{2+}$/CaM依存性の全活性は、基質にミオシン軽鎖 (図1A) とミエリン塩基性蛋白質 (図1B) を用いた場合で自己燐酸化反応により違いが見られた。ミオシン軽鎖を用いた場合、酵素活性は自己燐酸化反応の時間的経過の中で不変或いは減少した。それに対して、基質にミエリン塩基性蛋白質を用いた場合、

10分間の自己燐酸化反応により、全活性が、約 4倍に増加した。カルシニューリンを基質として用いると、ミエリン塩基性蛋白質と同様に自己燐酸化反応により全活性が増加した（表1）。この場合、自己燐酸化酵素は、カルシニューリンのサブユニットAのみを燐酸化した。非自己燐酸化酵素ではカルシニューリンはほとんど燐酸化されなかった。これらの活性化は、ミオシン軽鎖、MAP2、タウ蛋白質を基質に用いた場合には認めなかった。いずれの基質を用いた場合でも、$Ca^{2+}$/CaM非依存性の活性は、自己燐酸化反応により上昇した。酵素の活性化は、10分で平衡に達したが、酵素の自己燐酸化反応は、最大時の70%に過ぎなかった。活性化に必要な燐酸化部位は限定されていると思われる。

3) 活性化に対するCaM濃度の影響

ミエリン塩基性蛋白質、カルシニューリンが、CaM結合蛋白質であるため、基質の燐酸化に必要なCaMが不足している可能性を考え、飽和濃度の10倍のCaM濃度（3.0$\mu$M）で活性を求めた。基質にはミエリン塩基性蛋白質、ミオシン軽鎖、カルシニューリンを用いた。非自己燐酸化酵素活性は、CaM濃度を上げることにより上昇したが、自己燐酸化酵素活性の上昇は逆に阻害された（表1）。このことは、自己燐酸化酵素のミエリン塩基性蛋白質、カルシニューリンによる活性化が、少なくともCaM濃度の低下によって起こっているものではないことを示している。

以上の結果は、CaMキナーゼⅡが自己燐酸化反応によって基質特異性を変え、活性化されることを示唆している。一過性の$Ca^{2+}$上昇により、細胞系において、in vivoに自己燐酸化反応を起こすことが報告された（4）。CaMキナーゼⅡは、酵素の活性化状態下に於いて、それ自身の自己燐酸化反応を通じて新たな基質を燐酸化し、その機能を発揮していると考えらる。以上の結果は、細胞内での本酵素の動態を示し、生理的意義を示すものと考えられる。酵素の活性化を認める基質に共通する性質は今のところ不明である。今後、他の基質の検索を含め活性化機構の解析が必要と思われる。




（図1）自己燐酸化反応の酵素活性に対する効果の時間的経過-----横軸は自己燐酸化反応時間。酵素活性を求めるに用いた基質は、A. ミオシン軽鎖（MLC）、B. ミエリン塩基性蛋白質（MBP）

（表1）活性化に対するCaM濃度の影響---------0分自己燐酸化酵素（非自己燐酸化酵素）と10分自己燐酸化酵素の活性をCaM濃度を変えて比較

| Substrate | CaM ($\mu$M) | Autophosphorylation (min) | |
|---|---|---|---|
| | | 0 | 10 |
| | | pmol | |
| MLC | EGTA | 0.9 | 8.3 |
| | 0.3 | 35.3 | 21.9 |
| | 3.0 | 50.5 | 41.3 |
| MBP | EGTA | 1.6 | 30.9 |
| | 0.3 | 24.6 | 85.6 |
| | 3.0 | 55.4 | 61.7 |
| Calcineurin | EGTA | 0.8 | 3.1 |
| | 0.3 | 3.4 | 32.6 |
| | 3.0 | 9.1 | 13.4 |

【文献】

(1) Fukunaga,K., Yamamoto,H., Matsui, K., Higashi, K., and Miyamoto, E. (1982) J. Neurochem. 39, 1607-1617 (2) Goto,S., Yamamoto,H., Fukunaga,K., Iwasa,T., Matsukado,Y.,and Miyamoto,E. (1985) J.Neurochem. 45, 276-283 (3) Miyamoto,E., Fukunaga,K., Matsui,K., and Iwasa,Y. (1981) J. Neurochem. 37, 1324-1330 (4) Ohta,Y., Ohba,T., Fukunaga,K., and Miyamoto,E. (1988) J. Biol. Chem. 263, 11540-11547 (5) Yasugawa, S., Fukunaga,K., Yamamoto,H., Miyakawa,T., and Miyamoto,E. (1988) Biomedical Res. 9, 497-502

# 117 Naチャネルリン酸化部位指向性抗体の作成と性質

中山　仁，鹿野博義，吉井清哲*，金岡祐一
（北大・薬・薬品合成，薬剤*）

〔要約〕

ラット脳Naチャネルのプロテインキナーゼ A（Aキナーゼ）によるリン酸化とチャネル機能制御との関連を解析していく道具として、このリン酸化部位に指向性をもつ抗体を作成した。それには一次構造から推定されるリン酸化部位のアミノ酸配列をもつ4種のペプチドを合成し、ハプテン抗原として用いた。そのうち一つの抗体がNaチャネルとも免疫反応することが、免疫沈降反応、ELISA法、ウエスタンブロット法で確認された。その免疫反応性はアミノ酸配列に特異的であることがいくつかの合成ペプチドによる競合阻害実験から示された。またこの抗体の添加によって、Aキナーゼによる無細胞系でのNaチャネルのリン酸化も抑制された。

［目的・方法］

生体情報伝達系のうちイオンチャネル系もまた、プロテインキナーゼによるリン酸化によってその機能が制御されている例がいくつか知られてきている。NaチャネルがAキナーゼでリン酸化されるとNa⁺インフラックス能が低下することは、ラット脳から精製したチャネル標品を用いた生化学的実験で示されたが（1）、生きた細胞や組織を使って電気生理学的に解析する必要がある。とくに、脳型や筋肉型のNaチャネルの一次構造が相次いで明らかにされ、そのトランスメンブレン トポロジーのモデルもいくつか提唱されている現在、その検証の意味からも、分子レベルでのより詳しい解析が必要である。われわれは、ラット脳Naチャネル一次構造（2）の中からAキナーゼでリン酸化されると推定されている部位を含むアミノ酸配列を選び、これらに対応する抗ペプチド抗体を作成して上記課題にアプローチした。

［成績］

図1は合成した4種のペプチドのシークエンスで、モデルからは膜の内側（細胞質側）に存在すると考えられている。これらをチログロブリンまたはウシ血清アルブミンに結合してウサギに免疫した。得られた抗体はいずれも元のペプチドとは強く反応したが、ペプチドIIに対する抗体だけがラット脳のNaチャネルとも反応した。予想どうり、電気ウナギの

Peptide I : $^{544}$CS RLTYEKRFSS$^{555}$P

Peptide II : $^{561}$CS IRGSLFSPRRNS$^{575}$RA

Peptide III : $^{681}$CI RKRRSSS$^{689}$Y

Peptide IV : $^{602}$CE DNDSRRDSLFVPH$^{616}$R

図1 リン酸化可能な部位として、ラットNaチャネルの一次構造から選んだシークエンスに対応する合成ペプチド

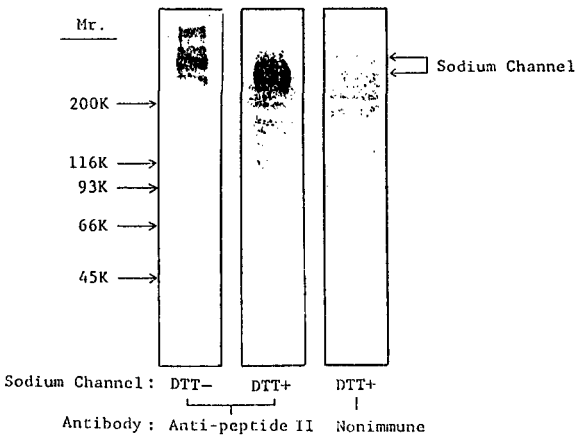



図2 抗ペプチドII抗体によるウエスタンブロット

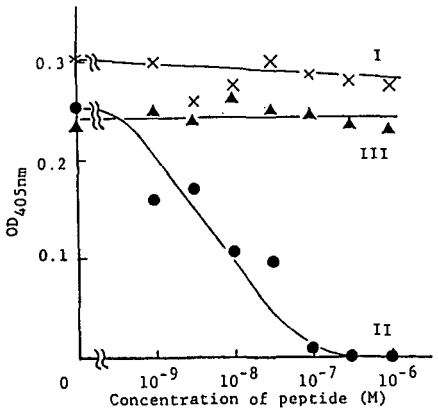



図3 抗ペプチドII抗体とNaチャネルとの複合体形成に及ぼす合成ペプチドの阻害効果

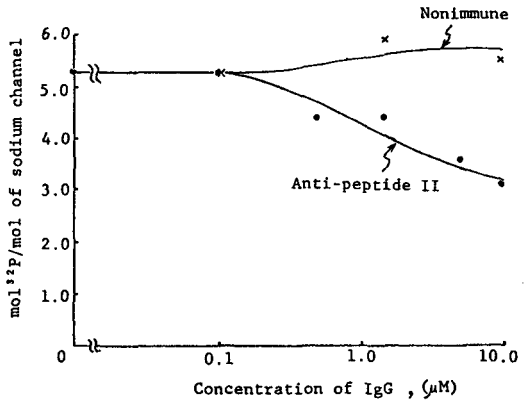



図4 AキナーゼによるNaチャネルリン酸化の抗ペプチド抗体による抑制

チャネルとは免疫反応しなかった。ウエスタンブロット法でも　２６０ｋＤａのαサブユニットと反応していることが図２からわかる。

抗体とＮａチャネルの複合体形成に及ぼすそれぞれの合成ペプチド（１ｎＭ　～１μＭ）の阻害能をＥＬＩＳＡ法で調べた。　その結果、ペプチドIIのみが０．１μＭでほぼ完全な阻害効果を示したことから（図３）、この抗体のＮａチャネル認識部位（エピトープ）が、抗原として用いたペプチドのアミノ酸配列中にあることが確かめられた。　抗体のこのような部位特異的結合によって、チャネルタンパクのリン酸化が抑えられるか否かを調べた。ラット脳から可溶化、部分精製したＮａチャネルを、［$^{32}$Ｐ］ＡＴＰとＡキナーゼ触媒サブユニットでリン酸化する際に抗体を共存させて、その効果をＳＤＳ-ＰＡＧＥ後のオートラジオグラフィーで調べた。その結果、１０μＭの抗体で１．５～２個のリン酸化阻害が認められた。

［考察］

一次構造から推定された、リン酸化部位を含む合成ペプチドに対して産生させた抗体の中には、元のチャネル分子のリン酸化部位を識別し、かつそのリン酸化を抑えるものが確かに存在した。これを用いた電気生理手法による詳しい解析が必要で、現在実験を進めている。このような抗ペプチド抗体の作成と利用による機能の解析は他のイオンチャネルにも適用できるものである。

［文献］

(1) Costa, M. R. C. and Catterall, W. A. (1984) J. Biol. Chem., 259, 12735-12744.

(2) Noda, M., Ikeda, T., Kayano, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Kurasaki, M., Takahashi, H., and Numa, S. (1986) Nature, 320, 188-192.

# 118 鉄誘導てんかん焦点形成に伴うラット線条体モノアミン代謝産物の変動及び(-)epigallocatechinの影響

加太英明、横井功、藤山修、森　昭胤
(岡大・脳研・機能生化)

〔要約〕
脳内透析法を用いて、鉄イオン大脳皮質内投与によるてんかん焦点形成に伴うラット線条体における dopamine (DA)及び serotonin (5-HT) 代謝産物の変動及びそれらの変動に対する茶葉タンニン (-)epigallocatechin (EGC) 静脈内投与による影響を調べた。$FeCl_3$ 500nmol 投与では、対照群と比べ80分以後よりDOPAC量の、160分以後よりHVA量の有意な上昇がみられた。しかし5-HIAA量には有意な変化はみられなかった。EGC 50mg/kg 投与では、DOPAC, HVA, 5-HIAA 共に有意な変化はみられなかった。$FeCl_3$ 投与直後EGCを投与したところ、DOPACの変動は $FeCl_3$ 単独で投与したときと比べ小さくなり、HVAの変動は完全に抑制された。しかし 5-HIAA は、120分以後より有意に上昇した。
以上の結果より、鉄誘導てんかん焦点形成に伴い、DA系が変化すること、EGCを投与すると鉄イオンによるDA系の変動を抑制するが、その抑制には5-HT系が関与している可能性のあることが示唆された。

頭部外傷、脳内血腫、あるいは出血性及び脳虚血性脳梗塞時などに際し、脳組織内において赤血球が崩壊するが、その際溶血に伴う鉄イオンの遊離、放出がてんかん焦点形成に関与することが、知られてきた。

茶葉が含むタンニンの1つであるEGC(3)は、活性酸素の消去作用を持つ(5)。大脳皮質に鉄イオンを投与すると、鉄は活性酸素を発生させこの活性酸素が神経細胞膜に働いて、てんかん焦点を形成すると考えられている(6)。我々は先に脳波において、鉄イオンにより誘発されるspikeが、鉄投与直後にEGCを投与することにより抑制されること(7)、またEGCには catechol-O-methyltransferase (COMT) 活性の阻害作用があることを報告している(4)。そこで今回は、鉄イオン及びEGC投与に伴う線条体におけるDOPAC,HVA,5-HIAAの経時的変化を、脳内透析法を用いて測定したので報告する。

[方法]

Sprague-Dawley rat (♂,250-350g) 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、自作した透析プローブ(4)を線条体に挿入し、生理食塩水で灌流(3μl/min)した。Samplingは20分ごとにおこない、透析開始2時間後に $FeCl_3$溶液(100mM) を bregma より右方1mm、後方1mmの大脳皮質感覚運動野 (2) に 5μl注入した。$FeCl_3$+EGC群では、鉄注入直後に EGC (50mg/kg)を 1mlの生理食塩水に溶解し、femoral vein から (0.2ml/min)注入した。 DOPAC,HVA,5-HIAAの測定は、HPLC-ECDを用いて行い薬物投与直前のものを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:鉄投与群では、投与120分後から140分後及び160分後から220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。EGC投与群には、対照群との間に有意な変化はみられなかった。鉄+EGC投与群では投与80分後より120分後及び160分後より180分後までのサンプルで有意に増加していた(Fig1-A)。

HVA:鉄投与群では、投与160分以後のサンプルにおいて有意に増加していたが、EGC,及び鉄+EGC投与群は対照群との間に有意な変化はみられなかった(Fig1-B)。

5-HIAA:鉄及びEGC投与群には、対照群との間に有意な変化は観察されなかったが、鉄+EGC投与群は、投与120分以後のサンプルにおいて有意な上昇がみられた(Fig1-C)。

[考察]

鉄イオン投与30-60分後よりラット脳波には、投与側よりspikeが出現しはじめ、1-1.5時間後より大脳皮質両側から

ictal seizure pattern が5-10分間隔で繰り返し出現し、鉄投与直後に50mg/kgのEGCを投与するとspike活動は誘発されない。今回アミン代謝産物を測定した結果 DOPAC,HVAは、主に鉄投与160分以後に上昇がみられた。これは ictal seizure pattern が出現しはじめてかなりたった後であり、脳波異常形成と、DA代謝産物の変化との間には、関係は認められなかった。しかし鉄誘導てんかん焦点には、DA系の神経異常が伴うことが示唆される。

EGCにはCOMT活性阻害作用があることを我々は見いだしているが、今回EGCのみを投与してもDOPAC,HVA,5-HIAAに変化はみられなかった。これは脳内にEGCがCOMT活性阻害作用を示すほどの濃度にまで達しなかったためと思われる。鉄投与直後にEGCを投与すると、DOPAC,HVAの上昇が抑制される。また5-HIAAの上昇が120分以後に現れる。これは、5-HT系がDA系に対して抑制的に働いていることを示しているのかもしれない。

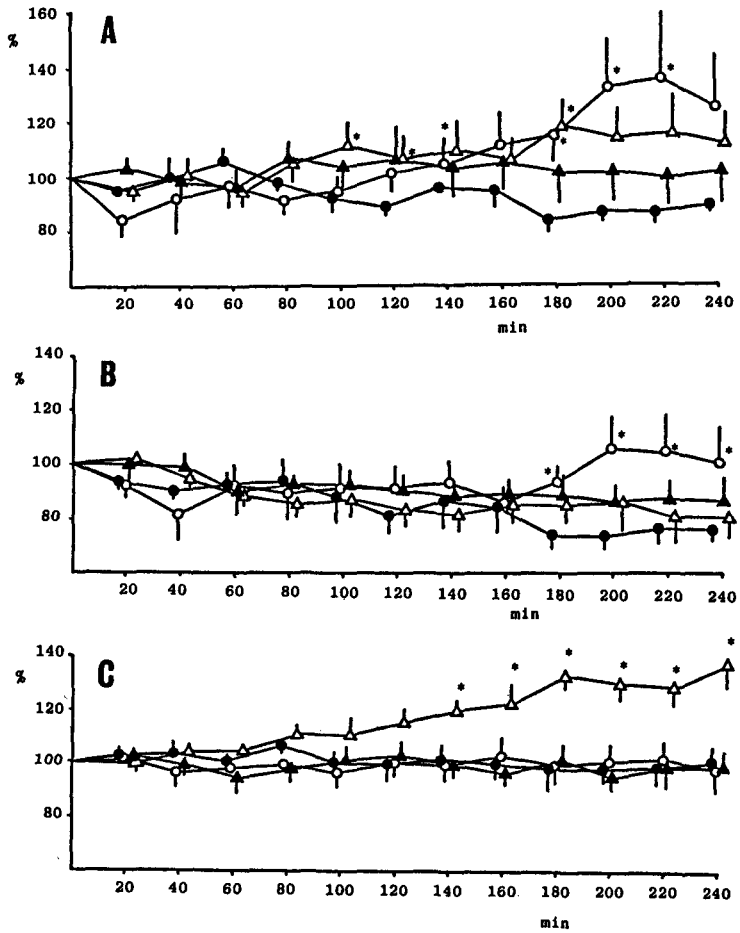



Fig 1 The time-dependent changes (mean±SEM) in the levels of DOPAC (A), HVA (B), and 5-HIAA (C) after administration of $FeCl_3$ (500nmol:into cortex) and EGC (50mg/kg:iv). Data are expressed as percent changes from the value of the sample just prior to the treatment. ● :control, O :$FeCl_3$, ▲ :EGC, △ :$FeCl_3$+EGC. n=6
*:$p<0.05$,compared with control by U-test.


[参考文献]

1) Akiyama,K. et al. (in press) Neurosciences.

2) Hall,R.D. and Lindholm,E.P. (1974) Brain Res. 66, 23-38.

3) Nonaka,G. et al. (1983) Chem Pharm Bull. 31, 3906-3914.

4) Sandberg,M. and Lindstroms. (1983) J.Neurosci Method 9, 65-74.

5) Uchida,S. et al. (1987) Med Sci Res. 15, 831-832.

6) Willmore,L.J. et al. (1983) Brain Res. 227, 393-396.

7) Yokoi,I. et al. (in press) The Japanese Journal of Psychiatry and Neurology.

# 119 Con A 結合性ウシ脳シナプトソーム膜糖タンパク質

石岡 憲昭、名竹 洋子、黒須 泰行*、栗岡 晋
（慈恵医大・医科研生化学、日本分光*）

〔要約〕
ウシ脳シナプトソーム膜に存在する糖タンパク質をコンカナバリンA（Con A）に対する結合性を指標に分離分析した。Con Aをリガンドにしたアフィニティクロマトグラフィによって得られたCon A結合性シナプトソーム膜糖タンパク質は、二次元電気泳動（2DE）分析及びそのCon A染色の結果から、等電点（pI）8.0−4.5、分子量（MW）120K−10Kの領域に少なくとも30個のタンパク質群として検出された。その結果、クマシー染色や銀染色では検出されにくいがシナプトソーム膜に比較的多く特徴的に存在し、Con Aに対して特に強い結合性を示す低分子量（13K）タンパク質の存在が明かになった。アフィニティクロマトグラフィ後、イオン交換及びゲルクロマトグラフィの2ステップでこの糖タンパク質（GP13と命名）を精製することができた。GP13のアミノ酸分析の結果はThy−1[1]などの糖タンパク質とは異なっていた。

《はじめに》 中枢神経系膜タンパク質、特にシナプス膜タンパク質は、神経回路網の形成とその機能発現に重要な役割を果たしている。しかしながら神経伝達物質受容体関連タンパク質を除いて、分離分析及び機能についての解析がこれまで多くはなされていない。そこでシナプス膜タンパク質を統括的に分析し、タンパク質化学的研究を行うためにその分離精製を検討してきた[2]。最近、細胞間粘着物質N−CAM[3]、N−CAMと構造的に類似性を持つミエリン膜糖タンパク質MAG[4]などの膜糖タンパク質が、脳中に見いだされていることから、シナプトソーム膜画分に存在する糖タンパク質をCon Aに対する結合性を指標に分析を行ったところ、ウシ脳シナプトソーム膜に特徴的な糖タンパク質を分離精製することができたので報告する。

《実験方法》1）シナプトソーム膜タンパク質の抽出：既報の方法[2)5)]に従い、ウシ脳から分画したシナプトソーム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、膜画分を得た。膜タンパク質は、膜画分を脱脂質後、1%CHAPS−8M尿素を含む10mM Tris−HCl（pH7.5）で可溶化し抽出した。2）Con A結合性膜糖タンパク質の調製：アフィゲル10にCon Aを結合させたアフィニティゲルに可溶化膜タンパク質を作用させ、α−メチル−D−マンノシドにより溶離された画分をCon A結合性膜タンパク質標品とした。3）2DE法による分析：2DE法は、既報[2)5)]の方法に従い、染色は、クマシー法とCon A法[6]を併用した。4）GP13の分離精製：Con A結合性膜タンパク質標品をイオン交換カラム（Qセファロース）に添加後、NaCl濃度を直線的に上昇させる方法で溶離した。GP13画分のゲルクロマトグラフィはセファデックスG75で行った。

《結果》（1）Con A結合性膜タンパク質群の分離分析：図1に膜タンパク質画分のアフィニティクロマトグラム（a）および得られたCon A結合性糖タンパク質標品（図1a↓）の2DE分析の結果（b）を示した。pI8.0−4.5、MW120K−10Kの領域に少なくとも30個のCon A結合性タンパク質群を同定した（図1b）。Con Aに対して親和性を示し、シナプトソーム膜に比較的多い特徴的なタンパク質を図中▼で示した。特に強い結合性を示したGP13はpI6.0−5.5、MW13Kの位置に同定した。（2）GP13の分離精製：図2にCon A結合性タンパク質標品のQセファロースクロマトグラムを示した。溶離液をSDS電気泳動及びそのCon A染色により検討した結果、GP13はNaCl濃度0.08−0.18Mの範囲に溶離された（図2斜線）。GP13画分は、濃縮後、セファデックスG75カラムに添加しゲルクロマトグラフィを行った。図3に示したようにGP13はほぼ単一のピークとして分離溶出され（図3斜線↓）、SDS電気泳動のクマシー染色及びCon A染色は単一バンドを与えた（図4a、b）。

《考察》Con Aゲルを素通りした画分には、Con A染色によって検出されるスポットがないことから可溶化シナプトソーム膜タンパク質中に存在するほとんどのCon A結合性糖タンパク質を得ることができた。これらのタンパク質の2DE法による分析においては、クマシー染色及びCon A染色を併用することで、より効果的な解析を行うことができた。精製GP13はSDS電気泳動でMW13Kの単一タンパク質バンドとして検出されたが、2DE分析ではpI6.0−5.5の間に二つのスポットとして検出された。このことはシアル酸などによる糖鎖の不均一性あるいは二つの異なる種類の存在が考えられた。またGP13様タンパク質が脳可溶性画分にも存在することから膜結合型、非結合型が存在するものと思われる。さらにラット脳シナプトソーム膜では検出されないことからウシ脳に特徴的なタンパク質である可能性が示唆された。

1) Williams, A.F., & Gagnon, J. (1982) Science, 216, 696-703. 2) 石岡憲昭、名竹洋子、栗岡 晋 (1988) 神経化学, 27, 254-255. 3) Hemperly, J.J., Murphy, B.A., Edelman, A.M., & Cunningham, B.A. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 3037-3041. 4) Salzer, J.L., Holmes, W.P., & Colman, D.R. (1987) J. Cell Biol. 104, 957-965. 5) Natake, Y., Udagawa, K., Ishioka, N., & Kurioka, S. (1988) Jikeikai Medical J. 35, 297-303. 6) Shimizu, S., Ito, M., & Dean, J. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 109(2), 449-454.

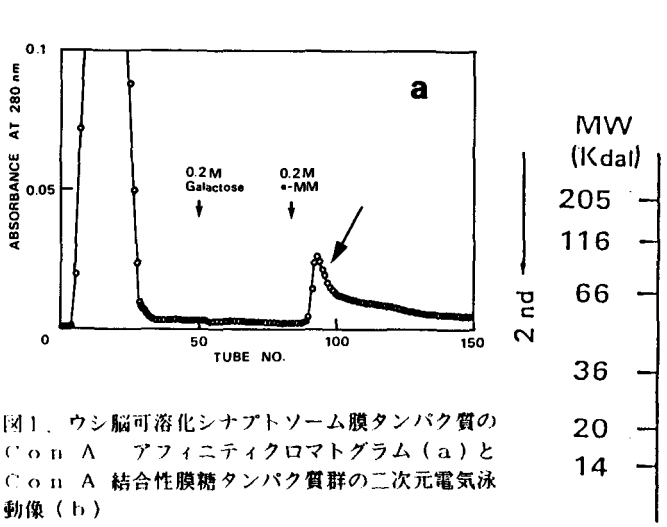



図1、ウシ脳可溶化シナプトソーム膜タンパク質のConA アフィニティクロマトグラム（a）とConA 結合性膜糖タンパク質群の二次元電気泳動像（b）

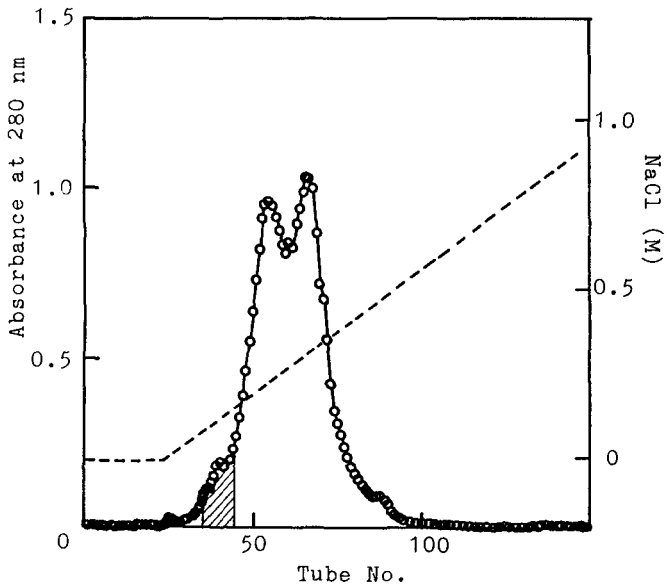



図2、ConA 結合性膜タンパク質のQセファロースカラムイオン交換クロマトグラフィ

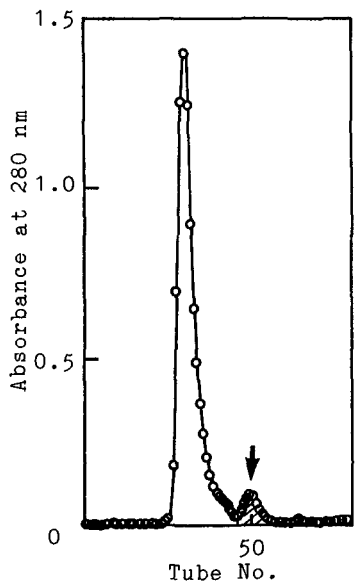



図3、GP13画分のセファデックスG75カラムゲルクロマトグラフィ

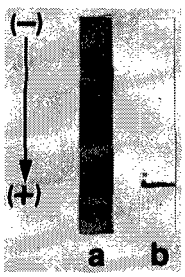



図4、精製GP13の12.5%ゲルSDS電気泳動
（a）クマシー染色
（b）ニトロセルロース膜に転写後ConA 染色

# 120　視床下部バゾプレッシンニューロン神経核（視索上核）におけるサブスタンスPとそのアナログの作用

森眞由美，　津島宏美，　松田友宏
（名古屋市立大・医・薬理）

〔要約〕

視床下部バゾプレッシンニューロン神経核（視索上核、SON）におけるサブスタンスP（SP）のin vivoでの生理機能を明らかにする目的で、神経核へ直接SPとSPアナログを微量注入し、尿流出量の変化を検討した。SPおよびSPアナログ：［D－Pro$^2$，D－Trp$^{7,9}$］SPをSONに微量注入すると、いずれの場合も著明な尿流出量の減少が用量依存的にひきおこされ、ED50はそれぞれ　約0．4，0．85nmolであった。これらの作用の時間経過は注入後20～30分で最大となり、概ね60～70分で回復した。両者の作用はバゾプレッシン（VP）－$V_1$ $V_2$ アンタゴニストの前処置（静注）によりほぼ完全に遮断された。ムスカリン様アンタゴニストのSONへの微量注入による前処置では、上記SPアナログの作用は抑制されたが、SPの作用は影響を受けなかった。以上の結果より、SONにおいてSPならびにSPアナログは比較的感受性の高い作用部位を介してVPニューロンを刺激し、VPの遊離促進によって抗利尿作用をひきおこすこと、および上記SPアナログにはアセチルコリン遊離作用もあることが示唆された。

視床下部視索上核（SON）に局在するニューロン細胞体には　サブスタンスP（SP）およびそのレセプターが存在することが免疫組織化学およびオートラジオグラフィーにより報告されている[2,6]。したがってSPが神経伝達物質あるいは神経調節物質として、バゾプレッシン（VP）の遊離調節に関与していることが示唆されている。我々はすでに上記神経核に直接種々の神経伝達物質候補を微量注入することにより、コリン（ムスカリン様）－、アドレナリン（α，β）－、およびオピオイド－作動性のVP遊離調節があることを明らかにしてきた[3-5]。今回はSPとそのアナログをSONへ微量注入して尿流出量への効果と、VP（$V_1$ $V_2$）アンタゴニストの前処置（静注）による影響を検討した。これら神経核のコリン作動性調節との関係についてはムスカリン様アンタゴニスト、アトロピンを前処置してその効果を調べた。

［実験方法］

尿流出量の測定：ウイスター雄ラット（300－350g）を用い、5ml／100g　b．w．の水を経口負荷し、45分後に同量の12％エタノールを経口投与して麻酔させた。尿流出量は注入後10分間ごとの滴数を注入前10分間の滴数に対する％として表した。実験中、外けい静脈カニューレから3％エタノール含有ロック液を持続注入した（0．1ml／min）。薬物の投与法：（1）SONへの微量注入，ラットを脳固定装置にセットし、Königらのアトラスに従ってSONに挿入したカニューレ（外径200μm）を介して行った。薬物は生理食塩水に溶解し、1μlを3分間で注入した。SONへの挿入の確認は前報[3-5]のとおりとした。（2）VPアンタゴニスト，d（$CH_2$）$_5$－D－Tyr（Et）VAVPの前処置：外けい静脈カニューレからVPアンタゴニスト50μg／kg（約0．2ml）を3分間で静注し、40分後にSPおよびSPアナログをSONに微量注入した。統計処理方法はStudent's　t－testによった。＊：P＜0．05.

［実験結果］

SPおよびSPアナログの微量注入による尿流出量への作用：SP（0．1～5nmol）をSONに微量注入した時、用量依存的な尿流出量の減少がひきおこされた。SP注入後20分目の用量反応曲線をFig．1に

にポした。ED50は0．4（0．13－1．2；95%信頼限界）nmolであった。この作用は注入後20－30分で最大となり、60－70分で回復した（Fig．3a；○）。SPアナログ、［D－Pro²，D－Trp⁷,⁹］SPをSONに微量注入した時もSPとほぼ同じ時間経過で尿流出量が減少し（Fig．3b；○）、ED50は 0．85（0．45－1．6）nmolであった。VPアンタゴニスト前処置の影響：VP（$V_1$ $V_2$）アンタゴニストd（$CH_2$）$_5$－D－Tyr（Et）VAVP，50μg／kgを静注し、40分後にSPおよびSPアナログ1nmolを微量注入した時、これらの抗利尿作用はほぼ完全に遮断された（Fig．2）。アトロピン前処置の影響：アトロピン，300nmolをSONに微量注入して前処置した時、SP，1nmolの作用は影響されなかったが、SPアナログ、［D－Pro²，D－Trp⁷,⁹］SP，1nmolの作用は強く抑制された（Fig．3a，b）。

［考察］

以上の結果、SP微量注入による尿流出量減少作用はコリン－、アドレナリン－、オピオイドーアゴニストの作用の時間経過とほぼ同様であるが、ED50値は比較的小さく、SPに対する感受性はかなり高いものと思われる。上記SPアナログは末梢ではSPアンタゴニストとして作用することがしられているが、SONでは青斑核[1]と同様にアゴニスト様作用を示した。この作用はアトロピンで抑制されることから主としてアセチルコリンの遊離を介していることが示唆された。SPとSPアナログによる抗利尿作用は腎臓VP（$V_2$）受容体の遮断により完全に消失することからVPの遊離によるものと考えられる。

［文献］1）Cheeseman,H.J.,Pinnock,R.D. and Henderson,G.(1983)Eur.J.Pharmacol.,94,93-99. 2）Ljungdahl,A.,Hökfelt,T. and Nilsson,G.(1978)Neurosci.,3,861-944. 3）Mori,M.,Tsushima,H. and Matsuda,T.(1984)Japan.J.Pharmacol.,35,27-36. 4）Tsushima,H.,Mori,M. and Matsuda,T.(1985)Japan.J.Pharmacol. 39, 365-374. 5）津島宏美，森島由美，松田友宏（1988）神経化学27,352-353. 6）Wolf,S.S.,Moody,T.W.,Quirion,R. and O'Donohue,T.L.(1985)Brain Res.,332,299-307.

Fig. 1. Dose-effect curves for antidiuresis induced by SP and SP analog microinjected into the SON.

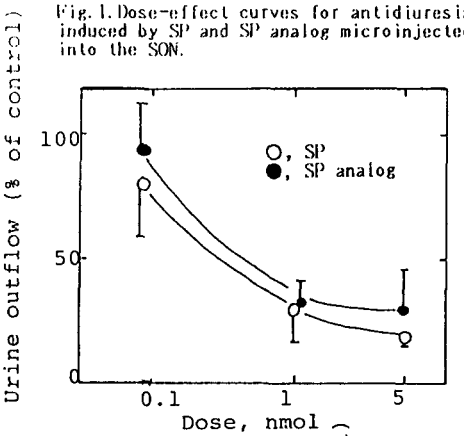



Fig. 2. Effect of pretreatment with VP antagonist on antidiuresis by SP (1 nmol).

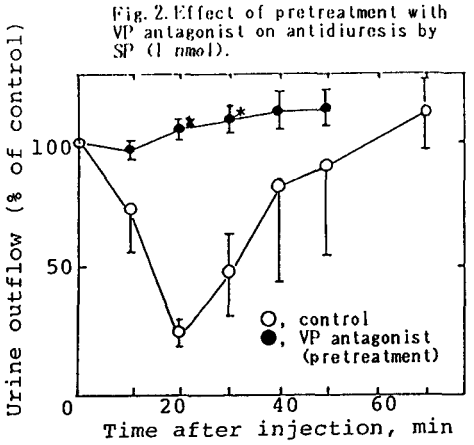
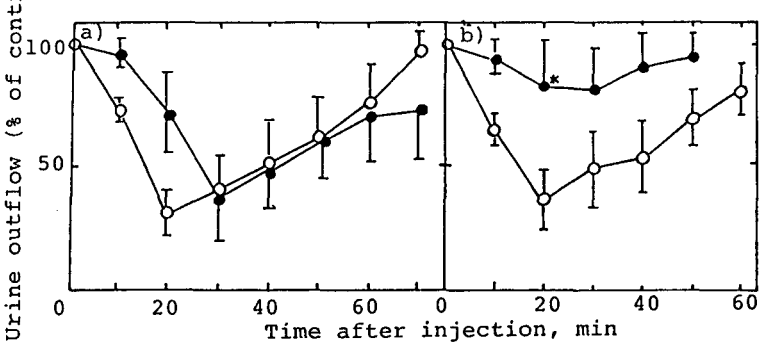



Fig. 3. Effects of atropine on antidiureses induced by SP and SP analog microinjected into the SON.
a) SP, 1 nmol (n=7)
b) SP analog, 1 nmol (n=8)
○, control ;
●, atropine, 300 nmol (Pretreatment)



121　NG108−15細胞によるシナプス形成：イノシトールリン酸依存性$Ca^{2+}$によるアセチールコリンの遊離促進

〔著者〕明星康裕、東田陽博、小倉明彦*
〔所属〕（金沢大・医・神経情報研・神経物性、三菱生命研*）

〔要約〕

ブラジキニン（BK）により促進されるアセチールコリンの遊離のメカニズムを、マウスニューロブラストーマXラットグリオーマ雑種NG108−15細胞で調べた。BKは、NG108−15細胞の膜過分極中にアセチールコリン（ACh）を遊離し、シナプス反応（MEPPs）を生じた。しかし、$Ba^{2+}$を細胞外に添加し、過分極を抑制した後でもBKによるMEPPs発生がみられた。さらに、イノシトール三リン酸（$InsP_3$）を細胞内に注入すると膜過分極を生じ、その期間中、MEPPsの頻度が増加した。しかし、$InsP_3$注入後、NG108−15細胞に特徴的な過分極が生じなくてもMEPPsが生じたことから、アセチールコリンの遊離が膜電位には依存しない事を確認した。そこで、Fura−2により、細胞内$Ca^{2+}$濃度を測定したところ、BKや$InsP_3$注入により、$Ca^{2+}$濃度は上昇し、膜過分極も記録できた。以上の結果は、NG108−15細胞からのアセチールコリンの遊離が細胞内の$Ca^{2+}$濃度上昇に起因している事を強く示唆している。

BK投与は、NG108−15細胞に一過性の過分極（Ca依存性K電流）とそれに続く脱分極（M電流抑制）を生じる（1）。同時にAChの遊離を増加させ、筋線維のMEPPsの頻度を増加させる（2）。BKが$InsP_3$生成を高めることから（3）、今回、$InsP_3$による細胞内の$Ca^{2+}$濃度の上昇とAChの遊離の間に因果関係があるか否かを調査した。

［方法］

マウス新生児（生後3日目まで）の後肢より分離した横紋筋細胞を培養した。筋線維の形成後、$Bt_2cAMP$にて分化させたNG108−15細胞を重層培養した。ガラス微小電極にてNG108−15および筋細胞内電位を導出した。AChの遊離は、自発性終板電位（MEPPs）を指標にした。Fura−2による蛍光測定にて、細胞内$Ca^{2+}$濃度を前述の如く測定した（4）。

［結果と考察］

細胞外液に4mMの$Ba^{2+}$を添加し、シナプス反応を記録したところ、NG108−15細胞の膜電位には過分極が見られないにもかかわらず、AChの遊離が観察された（図1）。又、$InsP_3$の細胞内注入によって生じたAch遊離はNG108−15細胞が過分極中に発生したが、膜電位が変化しない時や脱分極中にも見られた（図2）。以上の事は、BKや$InsP_3$による膜電位変化がACh遊離促進のドライブホースにはなっていないかと考えられる。Fura−2を取り込ませたNG108−15細胞にBKを与えたところ、蛍光量に変化が生じ、細胞内の$Ca^{2+}$濃度が上昇する事を確認した。この上昇は細胞全体に均一に生じた。一方$InsP_3$細胞内注入の場合、$Ca^{2+}$上昇は注入部位から発生した。誘発した活動電位は細胞の表層部に$Ca^{2+}$の上昇を生じた。細胞外の$Ca^{2+}$を除いたり、$Mn^{2+}$を細胞外に加えた場合でも、$Ca^{2+}$の上昇やACh遊離が観察された事から、$InsP_3$依存性の$Ca^{2+}$によ

る遊離に使われるCa$^{2+}$は細胞内のものである事が推察された。又、イノシトールリン脂質代謝（PI）回転をともなわない事が知られているこの細胞のアドレナリン性受容体やオピエト受容体の刺激ではAChの遊離促進は生じなかった。

以上の結果は、BKによるACh遊離促進がPI代謝回転、ことにInsP$_3$ 依存性のCa$^{2+}$の上昇により発生すると考えられた。

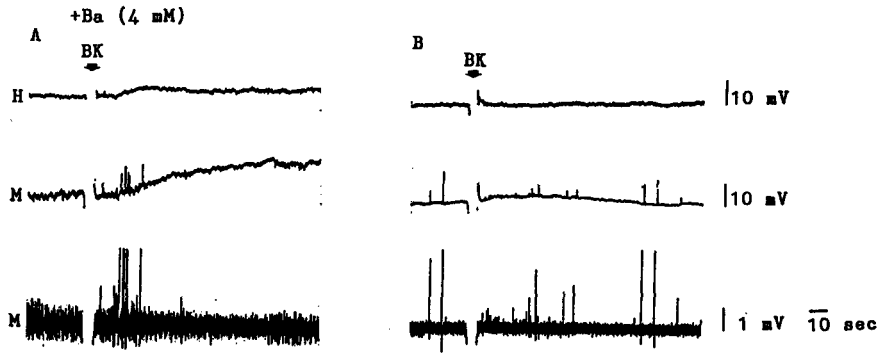



図1　細胞外Ba$^{2+}$の存在下のBKによるシナプス反応NG108－15と、筋線維から同時に膜電位記録を行い、灌流液中に4mMのBa$^{2+}$を加えた。BK（10μM×3μl）投与により誘発されるべきNG108－15の Hyperpolarization は抑制された。 Depolarizatioin のみが生じた場合（A）と、それも抑制された場合（B）を示す。両方ともBKによりMEPPsの頻度上昇が誘発された。

H：NG108－15細胞からの記録。M：筋線維からの記録で、中段はDC記録。下段はAC記録。

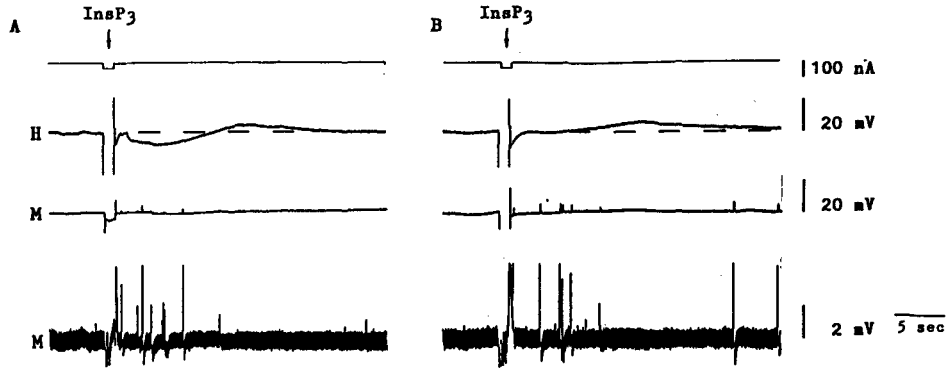



図2　InsP$_3$ 細胞内注入により誘発されるNG108－15細胞の膜電位応答とACh遊離。InsP$_3$ の細胞内注入（－30nA×1秒）は、Hybrid に対し、2通りの膜電位反応を生じた。（A） Hyperpolarization とそれに続く Depolarization。（B） Hyperpolarization は起こらず、Depolarization のみ。いずれの場合も、注入後の5～10秒間にMEPPsの発生をみた。この場合、非特異的カチオンチャネルの活性化によって生じる Depolarization 中は、MEPPsは増加しなかった。

［文献］

1．Brown, D. A. & Higashida, H. (1988) J. Physiol. 397, 149-165.

2．Higashida, H. (1986) J. Physiol. 397, 209-222.

3．Yano, K., Higashida, H., Hattori, H., & Nozawa, Y. (1985) FEBS Letters 181, 403-406.

4．Ogura, A., Miyamoto, M. & Kudo, Y. (1988) Exp. Brain Res. 73, 447-458.

# 122 脳腫瘍における末梢性 Benzodiazepine 受容体の発現様式

池崎清信，田渕和雄，Keith L. Black*，Donald P. Becker*
（佐賀医大脳神経外科，UCLA 脳神経外科 *）

〔要約〕

ラット脳腫瘍モデル及びヒト脳腫瘍手術標本を用いて末梢性benzodiazepine受容体の発現様式、組織学的悪性度との関連性、三次元mapping画像と組織学的腫瘍局在との相同性などにつき、in vitro 及び in vivo オートラジオグラフィーとデジタル画像解析にて検討した。In vitro Scatchard分析ではC6，RG-2 glioma及びWalker256転移性腫瘍すべてにおいて、$^{3}$H-PK11195（末梢性benzodiazepine）の特異的結合部位は組織学的な腫瘍細胞存在部位と一致したが、脳室系の上衣細胞、脈絡叢、松果体を除く正常脳組織及び壊死組織に対しては殆ど認められなかった。$^{3}$H-PK11195の受容体への親和性（Kd値）には有意の差は認められなかったが（約2nM）、最大結合数（Bmax）は正常脳皮質に比べC6とRG-2 gliomaでは15-20倍、LKとHK Walker256転移性腫瘍では11-15倍に著しく増加しているのが確認された。ヒトグリオーマにおいてはその悪性度に比例してより多くの特異的結合が認められた。In vivo では混合性benzodiazepineが腫瘍と周辺の解剖学的位置関係を示すのに優れているのに対し、腫瘍／正常脳皮質結合比あるいは三次元画像構成による組織像との比較より、末梢性benzodiazepineは腫瘍の検出及び描出性に優れていた。脳腫瘍の新しい生物学的特異性の解析及びPETを応用した画像解析の可能性が示唆された。

Benzodiazepine受容体は、神経細胞のGABA受容体と密接に関連して神経抑制的に働く（中枢性受容体）。一方、中枢神経系以外にもbenzodiazepineに対する受容体が存在することが指摘されており末梢性受容体と呼ばれているが、その生物学的役割は未だ明らかにされていない。最近、培養系グリオーマ細胞にも末梢性受容体の存在が示唆されている。そこで、我々は、ラット脳腫瘍モデル及びヒト脳腫瘍手術標本を用いて末梢性benzodiazepine受容体の発現様式、組織学的悪性度との関連性などにつきオートラジオグラフィーとデジタル画像解析装置にて検討した。さらに末梢性benzodiazepine受容体を利用したpositron emission tomography（PET）による脳腫瘍の新しい生物学的画像解析の可能性を検討するため、三次元画像にて組織学的腫瘍局在と受容体の存在部位との相同性を比較した。

〔実験方法〕麻酔下、Wistar雌ラット（100-150g）の左大脳半球にC6，RG-2ラットグリオーマ細胞を定位脳手術的に移植した。Walker256腫瘍（転移性モデル）は、脳と同時に腹部皮下にも移植した。（in vitro実験）1-2週間後、摘出脳凍結切片を末梢性リガンドである$^{3}$H-PK11195（0.25-10nM）を含む50mM Tris-HCl（pH7.4）緩衝液中で10μM PK11195存在あるいは非存在下にScatchard分析をおこなった。ヒト脳腫瘍凍結切片は病理組織診断後5nM $^{3}$H-PK11195±10mM PK11195で反応させた。グリオーマの組織学的悪性度はGrade ⅠとⅡをLow gradeとしそれ以上をHigh gradeとした。ヒト正常脳標本はintractable seizureに対する側頭葉切除術に際して入手し病理学的異常のないことを確認した。（in vivo実験）1-2週間後、血圧、動脈血ガス、ヘマトクリット、体温モニター下に、$^{3}$H-flunitrazepam（250μCi/rat）±clonazepam（5mg/kg）あるいは$^{3}$H-PK11195（125mCi/rat）を経静脈的に投与し、結合の時間経過をオートラジオグラフィーにて検討した。オートラジオグラムの生物学的データ解析はデジタル画像解析装置を用いて行った。その後、同一切片をHematoxylin-EosinあるいはThionin染色し腫瘍

の局在と放射活性の存在部位とを比較した。さらにデジタル画像解析装置にてthionin染色切片の組織学的三次元画像を作成し、オートラジオグラムより得られた生物学的三次元画像との比較を試みた。

〔結果〕ラット及びヒト脳腫瘍系いずれにも末梢性benzodiazepine受容体の発現が認められ$^{3}$H-PK11195の高密度の結合と組織学的腫瘍細胞の存在部位とが一致した。脈絡叢、脳室上衣細胞、松果体には中等度の結合が認められたが他の正常脳及び組織壊死部への結合は僅かであった。リガンドの親和性（Kd）は、正常脳とC6, RG-2, LK, HKW256腫瘍では有意の差は認められなかった。（正常vs腫瘍＝2.04±0.49vs2.09±0.74, 1.80±0.14vs2.29±0.30, 2.41±1.23vs2.17±0.23, 1.91±0.68vs1.27±0.27 nM,n＝3）最大結合数（Bmax）はC6（1027.3±78.7 fmol/mg tissue）, RG-2（1089.3±232.2）, LK（942.2±183.7）, HKW256（564.5±41.7）腫瘍においては正常脳に比し約20-11倍増加していた。W256腫瘍の頭蓋外での発育は受容体の性質に影響を与えなかった。（LK,HK ; mean Kd=2.24, 1.64nM, Bmax=845.7, 564.5 fmol/mg）ヒトグリオーマにおいてはその悪性度に比例しより多くの結合部位が認められ（low vs high grade=267.3 vs 451.3 fmol/mg, $p<0.005$）、腫瘍浸潤部（219.8±31.9, n=3）は正常脳（78.6±16.1, n=4）に比べ有意に高い結合部位を示した（$p<0.0005$）。混合性benzodiazepine（$^{3}$H-flunitrazepamと$^{3}$H-diazepam）の腫瘍／正常脳皮質結合比は、投与後明かなピークは示さず、5-60分間1.5-2.7に留まったが、中枢性受容体への結合から腫瘍の解剖学的局在が同定できた。しかし腫瘍と周辺脳の充分なコントラストが得られず、腫瘍輪郭決定のための域値設定が困難であり、オートラジオグラムによる三次元画像は量的に低下していた。Clonazepamにより中枢性benzodiazepine受容体への結合を阻害すると腫瘍／正常脳比は約4倍に上昇した。またPK11195（5mg/kg）の前投与にて腫瘍への結合は完全に阻害された。末梢性benzodiazepine（PK11195）は特異的に腫瘍に結合し（約5.7倍）三次元画像での組織像と細部にわたって合致し、より正確な腫瘍の同定に適していた。

〔考察〕現在使用されている脳腫瘍の画像診断には2つの問題点がある。第一はCT scanやMRIなどに代表されるように脳腫瘍細胞自体を特異的に描出できないことであり、第二点は腫瘍特異抗体など腫瘍細胞に特異的に結合する物質が脳血管関門を自由に通過できないことである。従って、脳血管関門を自由に通過することができ、かつ脳腫瘍細胞に特異的に結合する物質による、脳腫瘍の新しい生化学的画像解析の検討が必要である。末梢性benzodiazepineを用いることにより脳腫瘍細胞における特異的受容体の発現様式を検討した結果、腫瘍では正常脳皮質に比べて最大結合数の著しい増加が認められ、in vivoでも最大5.6倍のコントラストが得られた。混合性benzodiazepineは神経抑制的薬理作用を示すが、腫瘍の解剖学的位置関係や隣接組織における生化学的変化の検索には有用と思われた。また三次元画像再構成による神経解剖学的データと生化学的データの相同性より脳腫瘍における末梢性benzodiazepine受容体mapping画像の有用性が示唆された。PETによる脳腫瘍の新しい生化学的解析への応用が期待される。

References

1. Ikezaki, K, et al.: Imaging of brain tumors using peripheral benzodiazepine receptor ligands. J. Neurosurg. 71, 1989(in press)
2. Ikezaki, K, et al.: Specific high-affinity binding of peripheral benzodiazepine receptor ligands to brain tumors in rat and man. Cancer, 1989(in press)

# 123　マウス脳ＨＧＰＲＴの免疫組織学による局在性の検討

池田和正、飯田利博*、飯田達能**、高橋秀夫**、中川滋木**
（日大・農獣医・応用生科、日大・医・皮膚科*、日大・医・生化学**）

〔要約〕

マウス脳内のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴ）の局在を免疫組織染色により検討した。ＧＭＰ－Sepharose のアフィニティーカラムを用いた迅速精製法により電気泳動的に単一にまで精製されたＨＧＰＲＴを抗原として用い、家兎によりポリクローナル抗体を調製した。この抗体を用いてマウス脳の免疫組織染色を行なった。ＨＧＰＲＴは海馬と大脳皮質の一部の神経軸索に局在することが示され、本酵素が軸索内の蛋白合成かあるいはＡＴＰ合成に関与することが示唆された。

〔目的〕

遺伝的にＨＧＰＲＴが完全欠損している Lesch-Nyhan 症候群では自咬症、舞踏症等の特有な精神症状を有することが知られている（３）が、ＨＧＰＲＴとそれらの精神症状の関連性については全く示されていない。また、本酵素は脳内に多く含まれており、脳からの精製が多く試みられている（１）（４，５，６）にもかかわらず、その脳内での生理的役割はほとんど明らかにされていない。今回我々はマウス脳よりＨＧＰＲＴを精製、その抗体を調製し、免疫組織染色によりマウス脳内の本酵素の局在について検討し、その生理機能について考察を加えた。

〔方法〕

１．ＨＧＰＲＴの精製：約２０ｇのマウス脳をホモジナイズ後、遠心分離により可溶性分画を得、７０℃２時間の熱処理を行なう。変性蛋白を除去後、既報（１）に準じてＧＭＰ－Sepharose のアフィニティーカラムを用いて精製を行なった。ＳＤＳ－ＰＡＧＥは Laemmli の方法（２）で行なった。

２．抗体の調製：家兎で調製され、二重拡散法により確認されたポリクローナル抗体は、プロテインＡ－Sepharose カラムによりＩｇＧ分画として以下の実験に用いた。

３．組織染色：免疫組織化学は Peroxidase-Antiperoxidase （ＰＡＰ）法により行なった。染色は 3-amino 9-ethylcarbazole で行なった。

〔結果と考察〕

１．Ｆｉｇ．１にＧＭＰ－Sepharose のアフィニティーカラムの溶出パターンを示した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥの蛋白パターンよりＨＧＰＲＴはほぼ単一に精製されたことが確認された（Ｆｉｇ．２Ａ）。サブユニットの分子量は２５kDa であり、他起源のものとほぼ同じ値を示した。調製された抗血清は二重拡散法により沈降線を認め、またＨＧＰＲＴの酵素活性を阻害した。イムノブロッティング法により抗体の特異性を検討したところ抗体は、ホモジネート、熱処理後のいずれの粗酵素ともＨＧＰＲＴと思われる２５kDa の蛋白と特異的に反応した（Ｆｉｇ．２Ｂ）。

２．マウス脳の免疫組織染色の結果をＦｉｇ．３に示す。脳内に存在する赤血球が特異的に強く染

色され、本酵素が赤血球中に多く含まれることからＨＧＰＲＴに特異的な染色であることを更に確認した。　脳組織ではＨＧＰＲＴは大脳皮質の一部及び海馬の神経軸索に強く染色され、中脳被蓋が弱く染色された。　軸索での特異的な染色は本酵素が軸索内で蛋白質の生合成に必要なヌクレオチドの供給、あるいはＡＴＰの供給に関与している可能性を示唆した。

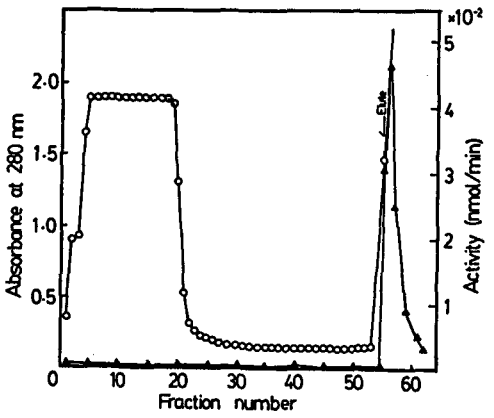



Fig. 1. GMP-Sepharose affinity chromatography. ○—○, Absorbance at 280 nm; ▲—▲, emzyme activity. The enzyme activity was eluted with the washing buffer containing 1 mM GMP.

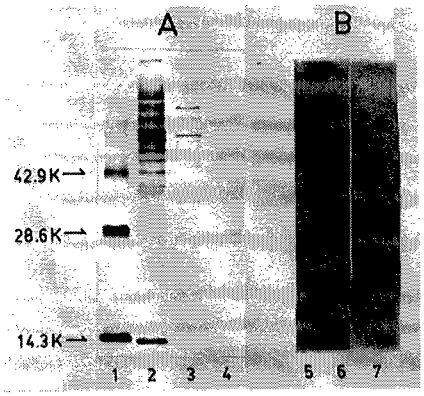



Fig.2 SDS-PAGE analysis of mouse brain HGPRT
A: Silver stained gel
Lane 1: Molecular weight standard
Lane 2: Initial homogenate
Lane 3: Heat treatment
Lane 4: Purified mouse brain HGPRT
B: Immunoblotting
Lane 5: Initial homogenate
Lane 6: Heat treatment
Lane 7: Purified mouse brain HGPRT

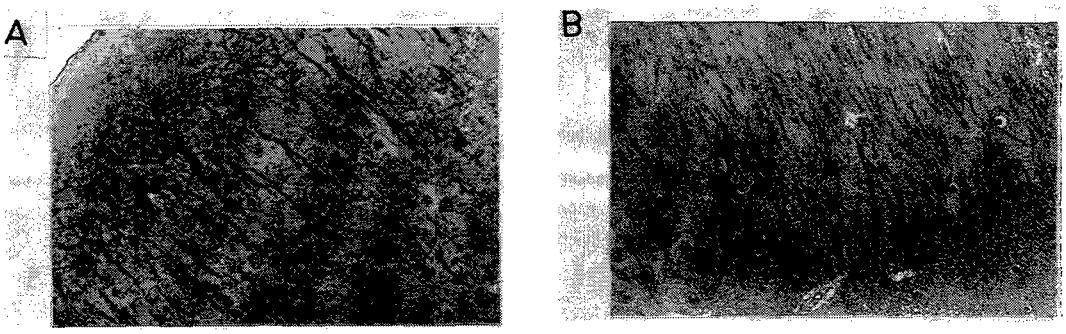



Fig. 3. Immunocytochemical demonstration of HGPRT in mouse brain. 5 μm sections of mouse brain were stained by PAP method.
A: Cerebral cortex. (x 200) B: Hippocampus (x 200).

[参考文献]

(1) Ikeda, K., Suzuki, H. & Nakagawa, S. (1986) Int. J. Biol. 18, 575-581

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

(3) Lesch, M. & Nyhan, W. L. (1964) Am. J. Med. 36, 561-570

(4) Olsen, A. S. & Milman, G. (1974) J. biol. Chem. 249, 4030-4037

(5) Paulus, V. A. et al. (1980) J. biol. Chem. 255, 2377-2382

(6) 丹野修，池田和正，鈴木晴男，中川滋木 (1984) 神経化学，23，448-450

# 124 脳のSubmicrosomal Membraneにおける脂質の動態

竹下正純、吉田　敏*
（大分医大・生化学、実験センター*）

〔要約〕
マウス、ミエリン形成不全マウス(jimpy) およびラットの脳から、 submicrosomal membrane: light-smooth surfaced (LSM), heavy-smooth surfaced (HSM)およびrough-surfaced (RM) microsome を調製し、ミエリン形成に関係する脂質の生成と分布について検討した。 LSM は２っのバンドLSM-1 およびLSM-2 に分かれた。 このうちLSM-1 のバンドは、jimpy マウスで消失しており、 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNPase) 活性はLSM-1 に高く、 jimpy で低下していた。 また極長鎖飽和、モノ不飽和脂肪酸は他分画に比しLSM-1 で高値を示した。 これらのことは LSM-1 にミエリンの存在を示す。 脂肪酸縮合反応に熱安定性の活性化因子の関与を考えさせる結果を得た。 セレブロシドは LSM-1 に高く、nonhydroxy型と hydroxy型がほぼ同じ値を示したが、他の分画では nonhydroxy 型が高い値を示した。

われわれは中枢神経系におけるミエリン形成に関連して、脂肪酸鎖長伸長(3) からセレブロシドの合成、転移の細胞内機構を明らかにするために解析を進めているが、今回は Tamai らの方法(2) に従い、マウス、ミエリン形成不全マウス(jimpy) あるいはラットの脳の submicrosomal membrane を調製し、脂肪酸およびセレブロシドの分布を検討した。

[ 方法 ] Submicrosomal membraneはTamai ら(2) に準じ、マウスまたはラット脳ホモジネートの 25,000 g 上清 (1.32 M sucrose)の上に1.23 M, 0.15 M sucroseを重ね、105,000 g 10時間遠心して調製した（各フラクション名は、Table 1 参照）。 標識酵素はそれぞれTable 1 の文献に従ってアッセイした。 脂肪酸は、Folchiの方法で抽出した脂質を5%塩酸メタノールでメタノリシスを行い、Chemical bonded キャピラリーカラム (25 m x 0.25 mm ID), FFAP bonded liquid phase, 160-210℃, 1 ℃/min昇温で行った。 脂肪酸縮合反応は K-phosphate (pH 7.4) 0.1 M, palmitoyl-CoA 40 μM, [2-$^{14}$C]malonyl-CoA 50 μM (50 nCi)に脳の各フラクションを加えて、全量 0.2 ml とし37℃、10 min incubation したのち、鹸化、抽出(3) を行い、2-heptadecanone の放射活性を液体シンチレーションで測定した。

セレブロシドはNonakaとKishimoto(1)の方法に準じ、ベンゾイル化後、TSK gel Silica 150 (4.6 mm ID x 25 cm)カラムによるHPLCで定量を行った。

[ 結果および考察 ] Tamai ら(2) は、0.15 Mと 1.23 M sucrose 界面を中心とする層をlight-smooth surfaced microsomes(LSM)と呼んでいるが、この層は二液の界面を境に明らかな２っのバンド（上からLSM-1, LSM-2) を示した。 しかもjimpy マウスでLSM-1 のバンドは肉眼的にはほとんど消失していた。このことはLSM-1 がミエリンを含むことを意味する。また、このことは標識酵素 CNPase がLSM-1 に多く、jimpy でそれが低下していることからも言える(Table 1)。LSM-2, HSM, RM（名称はTable 1 註参照）各分画で脂肪酸組成に実質上の差は認めら

Table 1　Marker Enzyme Activities in Submicrosomal Fractions

| Marker enzymes / Sub-microsomal fraction* | NADPH-Cyt.c reductase[1] (nmol/min /mg prot.) | Thiamine pyrophosphatase[2] (unit/mg prot.) | 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase[3] (μmol/h/mg prot.) | |
|---|---|---|---|---|
| | Normal | Normal | Normal | Jimpy |
| LSM-1 | 7.11±1.68** | 2.45±0.63** | 29.5±6.5** | 9.8 |
| LSM-2 | 8.56±1.48 | 2.23±0.93 | 3.1±0.7 | 1.8 |
| HSM | 5.68±1.20 | 1.50±0.63 | 2.7±0.6 | 1.7 |
| RM | 3.55±0.50 | 0.23±0.12 | 0.7±0.1 | 0.5 |

*LSM: light-smooth surfaced microsomes (F1)
HSM: heavy-smooth surfaced microsomes (F2)
RM : rough-surfaced microsomes (F3)
**Mean±SD of 3 to 7 determinations

1) F. Possmayer et al., J. Neurochem. 32:889 (1979)
2) L. Seijo et al., Biochim. Biophys. Acta 211:595 (1970)
3) S. Weissbarth et al., J. Neurochem. 35:503 (1980)

れないが、LSM-1 については 20:0, 20:1, 22:0, 22:1 および 24:0 の比率が他分画に比し明らかに高値を示した（データー省略）。 このことはミエリンに特徴的な極長鎖脂肪酸がLSM-1 に多いことを示す。 更に LSM-1 で正常／jimpy の脂肪酸比が極長鎖飽和、モノ不飽和脂肪酸で、他分画に比し高い値を示した (Table 2)。 また、極長鎖飽和、モノ不飽和脂肪酸の正常／jimpy 比が、HSM および RM で0.5 前後に低下していることについても考察を加える。

Submicrosomeに分けた分画で、脂肪酸伸長系の律速をなす縮合反応は、低酵素量のとき直線性から外れて低い活性を示した(Fig. 1)。 これにboiled microsomeを加えることにより、活性上昇を認めた(Fig. 2)。 すなわち本反応にmicrosome 中の何らかの因子が関係している可能性が考えられる。

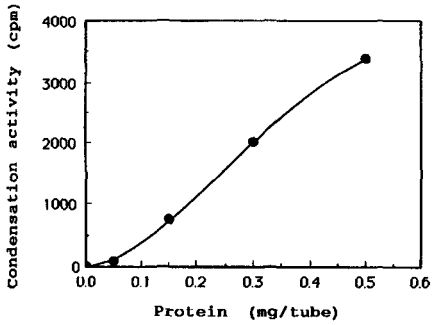



Fig. 1 Effect of protein concentration on palmitoyl-CoA condensation. Assay conditions are as described in the text except that *various amounts of LSM-1 were added.*

各分画におけるセレブロシドの測定で、マウス、ラット共に、LSM-1 セレブロシド値が高く、nonhydroxy と hydroxycerebroside がほぼ等量あるいは hydroxy 型がやや多かったが、他の分画では cerebroside値は低いながらも、nonhydroxyが hydroxy型より高く、HSM RMでより差が大になった(Table 3) 。これらの結果はセレブロシドの細胞内転移との関係で興味がある。

Table 2 Normal to Jimpy Ratio of Fatty Acids in Submicrosomal Fractions
(22 day normal and jimpy mice)

| | Ratio: normal/jimpy | | | |
|---|---|---|---|---|
| | LSM-1 | LSM-2 | HSM | RM |
| 14:0 | 0.42 | 0.49 | 1.03 | 0.83 |
| 16:0 | 0.71 | 0.88 | 0.88 | 0.77 |
| 16:1 (n-7) | 0.96 | 0.76 | 0.58 | 1.25 |
| 18:0 | 0.72 | 0.88 | 1.01 | 1.13 |
| 18:1 (n-9) | 1.12 | 0.99 | 1.10 | 2.03 |
| 18:2 (n-6) | 0.95 | 0.91 | 0.97 | 1.87 |
| 20:0 | 1.85 | 1.35 | 0.62 | 0.43 |
| 20:1 (n-9) | 1.60 | 1.13 | 1.19 | *2.94 |
| 20:3 (n-6) | 1.32 | 1.35 | 0.80 | 0.73 |
| 20:4 (n-6) | 0.70 | 0.79 | 1.13 | 1.58 |
| 22:0 | 2.55 | 1.50 | 0.48 | 1.76 |
| 22:1 (n-9) | 2.42 | 1.92 | *1.60 | 0.61 |
| 22:4 (n-6) | 0.80 | 0.80 | 1.12 | 1.82 |
| 22:5 (n-3) | 0.78 | 0.68 | 1.00 | 0.61 |
| 24:0 | 3.70 | 3.27 | 0.59 | 0.49 |
| 24:1 (n-9) | - | - | *0.44 | - |
| 22:6 (n-3) | 0.82 | 0.83 | 1.31 | 1.45 |

*Contents are small: less than 0.1% in jimpy.

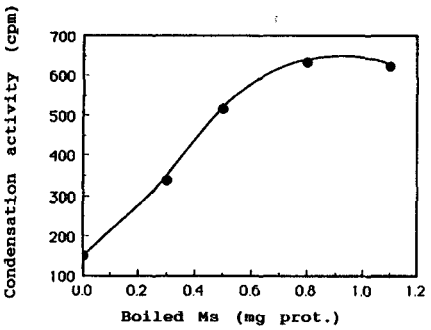



Fig 2. Effect of boiled microsomes on palmitoyl-CoA condensation. Rat brain LSM-2 (0.15 mg protein) was used for assay. Boiled microsomes (Ms) was prepared by heating at 100°C for 20 *min of rat brain microsomes obtained by the* previous method 3).

Table 3 Nonhydroxy- and Hydroxycerebroside in Brain Submicrosomal Fractions

| Submicrosomal fraction / Cerebroside | LSM-1 | LSM-2 | HMS | RM |
|---|---|---|---|---|
| | (mg cerebroside/mg protein)* | | | |
| | Mouse brain (22 days after birth) | | | |
| Nonhydroxy | 135.9±21.2 | 12.8±4.6 | 11.6±6.1 | 13.6±5.9 |
| Hydroxy | 140.6± 9.7 | 9.7±0.6 | 1.6±0.8 | 1.8±1.4 |
| | Rat brain (20 days after birth) | | | |
| Nonhydroxy | 65.8± 8.5 | 16.7±4.4 | 5.6±2.8 | 9.9±1.6 |
| Hydroxy | 66.1± 3.9 | 8.1±0.9 | 0.9±0.2 | 1.9±0.2 |

*Mean ± SD of 4 to 6 determinations

[ 文献 ]

(1) Nonaka, G, and Kishimoto, Y. (1979) Biochim. Biophys. Acta 572, 423-431

(2) Tamai, Y. et al. (1974) J. Cell Biol. 63, 749-758

(3) Yoshida, S., and Takeshita, M. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 254, 180-187

# 125 アラキドン酸による脳ミトコンドリア呼吸活性の阻害

竹内裕子*，森井博史*，渡辺恭良*，早石修
（大阪バイオサイエンス研究所，神経科学*）

〔要約〕

ラット脳より調製したミトコンドリア呼吸活性に対するアラキドン酸及びその代謝物の影響を調べた。アラキドン酸がミトコンドリアの脱共役を起こすばかりでなく高濃度になるとチトクロームｃ酸化酵素も阻害することを見いだした。一方プロスタグランジン等のアラキドン酸の代謝物はミトコンドリア呼吸にはほとんど影響を与えなかった。虚血時に脳で顕著に増加するアラキドン酸は脳細胞内で直接ミトコンドリアに作用し呼吸を阻害するがその作用機構は単一ではないことが示唆された。

〔はじめに〕

脳虚血時に細胞膜から脂肪酸が遊離することは知られているが、特に遊離アラキドン酸濃度は生理的状態の５０倍にも増加し、アラキドン酸代謝物も数１０倍近く増えることが報告されている（1,3）。一方、脳は非常に虚血に弱い臓器であり、虚血時にはミトコンドリアの呼吸活性が減少することが知られている。虚血時に増加するアラキドン酸が呼吸に及ぼす影響については未だに未知の部分が多い。最近Hillered & Chan（4）によってアラキドン酸による呼吸阻害が報告された。しかしこの阻害がアラキドン酸自身によるものなのかアラキドン酸の代謝物であり脳内での種々の生理活性が明らかにされつつあるプロスタグランジン類やロイコトリエン類、HPETE類によるものなのか明かではない。今回我々はラット脳より調製したミトコンドリアを用いてアラキドン酸及びその代謝物が呼吸活性に与える影響を検討したので報告する。

〔材料と方法〕

ラット脳からのミトコンドリアの調製はClark & Nicklasの方法（2）に従って行った。ただしより活性の高いミトコンドリアを得るためにFicoll処理は省略した。またアラキドン酸や他の脂肪酸の影響を正しく得るために調製液にBSAは加えなかった。呼吸活性はクラーク型の酸素電極を用い1.6mg mitochondrial protein/mlを含む600μl測定液中の溶存酸素の測定により求めた。各チトクロームの酸化還元状態は二波長分光光度計を用いて測定した。チトクロームｃ酸化酵素活性はferrocytochrome c の酸化を分光学的に測定した（6）。

〔結果〕

ラット脳より調製したミトコンドリアの呼吸調節能（ADPによって増加する酸素消費の比率であり以下RCRと略す）はコントロールでは、3.2±0.1（BSAを加えて調製すると4.2±0.1）であった。図１のようにアラキドン酸によりRCRは顕著に減少した。（$IC_{50}$=10μM）。このときstate4（基質によって維持されている呼吸）がアラキドン酸によって上昇する（$IC_{50}$=10μM）ことはアラキドン酸の脱共役効果を示している。しかし、cyclooxygenase系の代謝物である$PGE_2$，$PGD_2$，$PGF_2\alpha$，TXB2や、lipoxygenase系代謝物である5-HPETE，12-HPETE，$LTB_4$，$LTD_4$を1μM-10μM与えてもRCR、state4共に変わらなかった。一方、アラキドン酸の濃度が40μM以上になると、state4の阻害が見られるようになりアラキドン酸が直接電子伝達系に作用している可能性が考えられた。電子伝達系への作用をより明らかに示したのが図２である。Dinitrophenol（DNP）によって電子伝達系がATP合成と脱共役して動いている状態（DNP state）はアラキドン酸の濃度に依存して減少した。

次に電子伝達系のどの過程にアラキドン酸が作用するのかを検討した。ADP添加後呼吸の進行と共に還元化されるチトクローム類に対してアラキドン酸が特異的に働くかどうかを２波長分光光度計を用いて調べたところ、チトクロームa,b,c共に還元化が阻害されており、特別に阻害を受けやすい過程は見られなかった。そこで電子伝達系の最終過程であるチトクロームｃ酸化酵素活性を測定したところ有意に阻害が見られた。

他の脂肪酸の効果も検討した結果、飽和脂肪酸であるミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸ではRCRの減少、state4の増加がみられたが、炭素数10以下20以上の飽和脂肪酸では効果がなかった。炭素数20の不飽和脂肪酸では、Ｃ20：1からＣ20：5までアラキドン酸と同様の呼吸阻害が見られた。

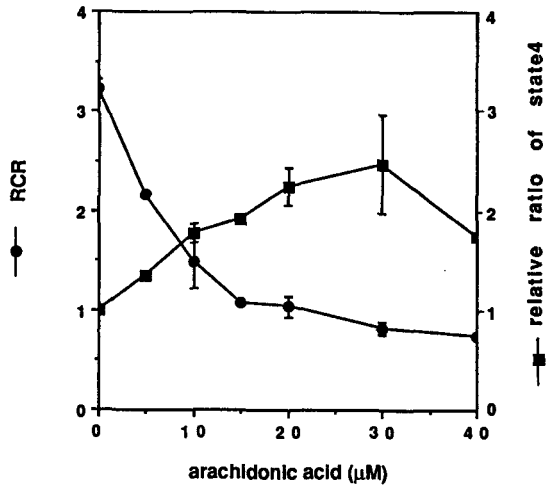



Fig.1

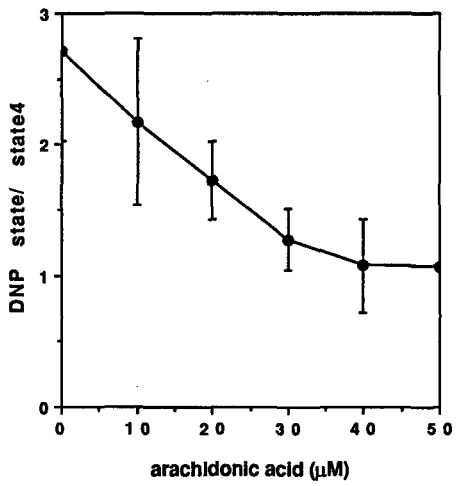



Fig.2

[考察]

虚血時には遊離アラキドン酸は0.4-0.6μmol/g brain tissue homogenate (i.e. 400-600μM) にまで上昇すると考えられている (5)。結果より、アラキドン酸は虚血時に細胞内で増加が予測される濃度で十分に作用していることがわかった。約10μMでは脱共役の効果が大きく、酸素消費は進むがATP合成は抑えられている。一方、アラキドン酸が約40μM以上になるとチトクロームｃ酸化酵素への阻害効果が大きくなり酸素消費も減少する。このようにアラキドン酸の作用機構は単一ではなく虚血時の細胞内で重要な役割を成していると考えられる。アラキドン酸が他の電子伝達系の酵素を阻害する可能性、また阻害機構についても現在研究を続けている。

[文献]

1 Bazan, N.G. (1970) Biochim. Biophys. Acta 218, 1-10

2 Clark, J.B., and Nicklas, W.J. (1970) J. Biol. Chem. 245, 4724-4731

3 Gaudet, R.J., and Levine, L. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 86, 893-901

4 Hillered, L., and Chan, P.H. (1988) J. Neurosci. Res. 19, 94-100

5 Ikeda, M., Yoshida, S., Busto, R., Santiso, M., and Ginberg, MD. (1986) J. Neurochem. 47, 123-132

6 Wharton, D.C., and Tzagoloff, A. (1967) Methods in Enzymology 10, 245-250

# 126 4-methylcatecholによる末梢神経系ＮＧＦの合成誘導

替地恭介[1]、池上亮介[1]、古川美子[1,2]、林恭三[2]、古川昭栄[1]（国立精神神経センター神経研究所[1]、岐阜薬大・薬剤[2]）

〔要約〕4-methylcatechol はin vitro で強い神経成長因子（ＮＧＦ）合成促進活性を示す化合物の一つである。今回、生体内ＮＧＦ合成に及ぼすその効果を検討した。4-methylcatecholを腹腔内に投与（５回／３日間）すると、顎下腺、心臓、坐骨神経内ＮＧＦ含量は最大で対照の３－４倍に上昇した。次に、腹腔内に一回投与した後ＮＧＦ量の経時変化を調べた。ＮＧＦレベルの上昇は一過性であり、上昇はまず末梢組織の心臓、顎下腺で認められ、次に神経軸索の通っている坐骨神経、神経細胞体のある上頸交感神経節と脊髄後根神経節で認められた。すなわち4-methylcatecholの腹腔内投与により、１）末梢交感神経支配組織中のＮＧＦレベルが上昇する、２）合成誘導されたＮＧＦは生理的に合成されたＮＧＦと同様に、軸索内を逆行性に神経細胞体へと輸送される、ことが明らかとなった。

末梢神経系での神経成長因子（ＮＧＦ）の生理的機能はほぼ明確になっているといえる。ＮＧＦは交感神経支配組織で合成・分泌され、神経末端で受容体を介して取り込まれた後軸索内を逆行性に神経細胞体へと輸送される。その過程で神経特異的酵素や蛋白合成の調節を行い、神経分化を促したり、神経機能を維持すると考えられている(6)。末梢組織でのＮＧＦ合成レベルは組織への交感神経支配密度と正の相関をする(5)ことが知られており、神経側からのなんらかのＮＧＦ合成調節機構があるものと考えられる。著者らはすでにカテコールアミン、その前駆体や代謝物を含むカテコール化合物が培養下で線維芽細胞やアストログリア細胞のＮＧＦ合成を促進すること、この作用の発現にはカテコール環構造が必要であることを明らかにしている(2-4)。この事実は末梢交感神経支配組織におけるＮＧＦ合成が神経末端から遊離されるノルエピネフリン、及びその代謝化合物によって調節されていることを示唆する。そこでその可能性を追求するため、in vitroでＮＧＦ合成促進活性を持つ化合物が生体内でもＮＧＦ合成を促進するかどうかを検討した。

【方法】Wistar Rat（7週齢、雄、体重200-250g）を用いた。in vitro で強いＮＧＦ合成促進活性を持ちアドレナリン作用がなく生体毒性が低い4-methylcatecholをPBSに溶解し用いた。対照は同容量の PBSを用いた。
（実験１）種々の濃度の4-methylcatecholを１日２回、２日間腹腔内に投与し３日目に５回目投与４時間後にラットをchloroformにて屠殺、顎下腺、心臓、坐骨神経を採取し、各組織のＮＧＦ含量を測定した。（実験２）実験１で、投与量2μg/匹の群に最も強いＮＧＦ合成誘導効果が認められたので、2μgの 4-methylcatecholを腹腔内に一回投与後、経時的にラットを屠殺、顎下腺、心臓、坐骨神経、上頸交感神経節（SCG）、脊髄後根神経節（DRG）を採取し、各組織内ＮＧＦ含量を測定した。なお坐骨神経は分枝の少ない部分 2 cm を採取し、これをさらに15個に細断し測定に供した。
組織は 2-5 % (W/V)にて、2 % gelatin、ウシ血清アルブミン、1M NaCl、0.02 % $NaN_3$、1 mM $MgCl_2$、 80 TIU/l aprotinin を含む 0.1M Tris-HCl buffer, pH 7.6 でホモジナイズ、10,0000 x g 遠心し、上清中のＮＧＦをenzyme immunoassay法にて測定した(1)。測定感度は約１pg/ml、組織からのＮＧＦの回収率は 90% 以上であった。
【結果】（実験１） 4-methylcatecholを５回腹腔内投与した場合、一匹あたりの投与量が顎下腺では 2 μg、心臓で 0.5-2 μg、坐骨神経では 0.5-100μgのとき、対照に比べ有意にＮＧＦ量の増加が認められた。いずれの組織も投与量が 2μg／匹のときＮＧＦ量の増加は最大となり、心臓、顎下腺、坐骨神経内ＮＧＦ含量はそれぞれ対照の 2.4倍、3.5倍、5.2倍であった。ラットの体重は対照との間に差を認めなかった。
（実験２）2μg の 4-methylcatecholをラット腹腔内投与後、各組織でのＮＧＦ含量を経時的に追跡した。心臓、顎下腺では投与後16時間に一過性にＮＧＦ量の上昇（対照の2-3倍）が観察されたがその4-16時間後に正常値に復した（図１）。坐骨神経のＮＧＦ含量は投与後8時間より各セグメントで一様に上昇し始め、12時間では対照のほぼ2.5倍に達した。16時間には再び対照値に戻ったが、20時間では坐骨神経末梢側セグメント(No.9-12)でＮＧＦ量が増加しその4時間後の24時間にはその位置が中枢側セグメント(No.3-6)に移動した（図２）。DRG、SCGのＮＧＦレベルの増加はそれぞれ投与後40時間、32時間に観察された（図３）。これらの大きな変化のほかに心臓、顎下腺、DRG、SCGにおいて投与後4-8時間に弱いＮＧＦ量の増加が認められた。

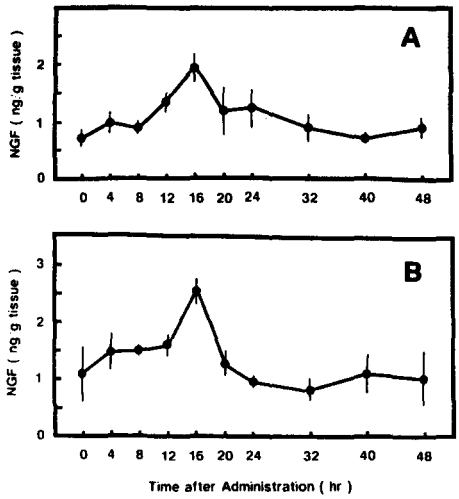



図１　4-methylcatechol投与後のラット末梢交感神経支配組織内ＮＧＦ量の経時変化
Ａ：心臓、Ｂ：顎下腺、値は平均±ＳＥ（ｎ＝４）を示す。

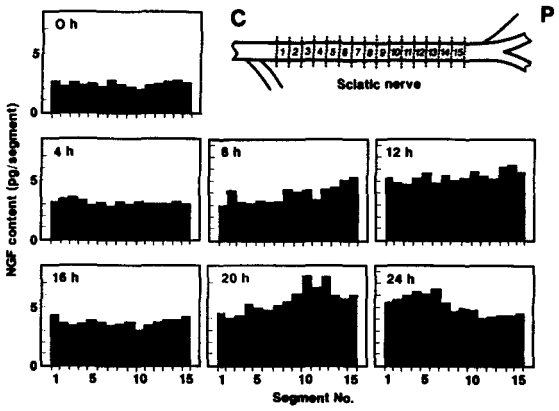



図２　同投与後のラット坐骨神経内ＮＧＦ量の経時的変化
右上図は坐骨神経セグメントの位置を示す。
Ｐ：末梢側、Ｃ：中枢側。値は平均値で示した（ｎ＝８）。

【考察】　4-methylcatecholの腹腔内投与は末梢交感組織中のＮＧＦレベルを著明に増加させた。線維芽細胞やアストログリア細胞を4-methylcatechol存在下で培養すると細胞内ＮＧＦ mRNAの増加が認められる(4)ことからこの場合もmRNAの増加に基づくＮＧＦ合成そのものの促進の結果と考えられる。現在mRNAレベルの変動を検討中である。経時的追跡実験の結果は、ＮＧＦがまず末梢交感神経支配組織で合成誘導され、そのＮＧＦは軸索内を逆行性に輸送され細胞体に到達することを示している。これは生理的に合成されるＮＧＦと同じ輸送経路であり、合成誘導されたＮＧＦも神経細胞に対し生理的ＮＧＦと同様の生物活性を発現するものと考えられた。一方、調べたすべての組織で投与後 4-8時間にわずかなＮＧＦ量の増加がみられたが投与から増加までの時間が短いことから血管壁構成細胞のＮＧＦ合成が誘導された結果と考えている。以上の結果と考察にもとづき次の結論が導き出された。

１）末梢神経系におけるＮＧＦ合成はカテコール化合物により調節されている可能性がある。２）薬物の投与により人為的に生体内ＮＧＦ量を高めることができる。

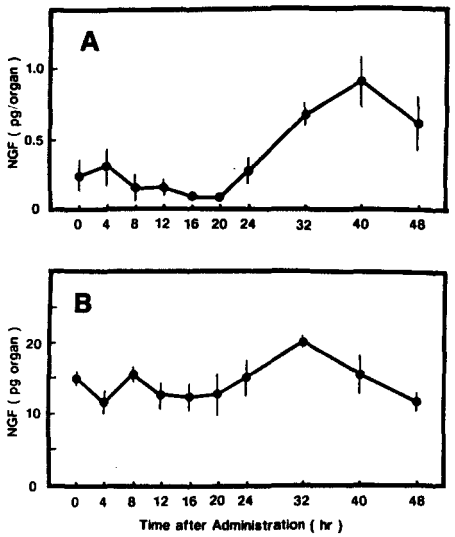



図３　同投与後のＤＲＧ（Ａ），ＳＣＧ（Ｂ）内ＮＧＦ量の経時的変化
値は平均±ＳＥを示す（ｎ＝８）。

【引用文献】

1) Furukawa,S.,Kamo,I.,Akazawa,S.,Furukawa,Y.,Satoyoshi,E.,Itoh,K.,Hayashi,K.(1983) J.Neurochem.,40,734
2) Furukawa,Y.,Furukawa,S.,Satoyoshi,E.,Hayashi,K.(1986) J.Biol.Chem.,261,6039
3) Furukawa,S.,Furukawa,Y.,Satoyoshi,E.,Hayashi,K.(1986) Biochem.Biophys.Res.Commun.147,1048
4) Furukawa,Y.,Tomioka,N.,Sato,W.,Satoyoshi,E.,Hayashi,K.,Furukawa,S.(1989) FEBS Lett.247,463
5) Shelton,D.L.,Reichardt,L.F.,(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,81,7951
6) Thoenen,H.,Bandtlow,C.,Heumann,R.,(1987) Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.,109,145

# 127 シナプトゾーム内GABAのコンパートメントについて
## ── 特に4-アミノブチルアルデヒドから合成されたGABAとの比較 ──

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)の機能的に異なったpoolの存在を検討するために、4-アミノブチルアルデヒド(ABAL)から合成されたGABAと、外から取り込まれたGABAやグルタミン酸からシナプトゾーム内で合成されたGABAとの代謝・放出における違いについて調べた。①ABALからGABAを合成する酵素はSyn内の細胞質に局在した。②あらかじめSynをGABA分解酵素(GABA-T)の阻害剤gabaculine(GC)で処理しておくと、ABALからのGABAの合成速度は約1.5倍に上昇した。③ABAL由来のGABAの脱分極刺激による放出は完全に$Ca^{2+}$非依存的であった。④外から取り込まれたGABAの分解はGC処理によって完全に阻害された。またこのGABAの刺激による放出も$Ca^{2+}$非依存的であった。⑤グルタミン酸から合成されたGABAはGCによって増加することは全くなく、刺激による放出は$Ca^{2+}$依存的、非依存的両者ともに認められた。これらの事実から、ABALから合成されたGABAは外から取り込まれたGABAと同じpool(細胞質)に入り、また同じようにGABA-Tによって分解され、刺激によって $Ca^{2+}$非依存的に放出されるのではないかと思われる。

神経終末内において抑制性伝達物質γ-アミノ酪酸(GABA)にはいくつかの機能的に異なったpoolの存在することが報告されている(1,12)。すなわち、グルタミン酸(Glu)より合成されたGABAは分解されにくく、脱分極刺激により$Ca^{2+}$依存的に放出され、また外から取り込まれたGABAは活発に分解され、刺激による放出は$Ca^{2+}$非依存的である。我々もシナプトゾーム(Syn)を用いてこれらの違いを明かにしてきている(3)。一方、我々は4-アミノブチルアルデヒド(ABAL)にGABAのpro-drugとしての可能性のあることをすでに報告してきている(4)。そこで、Syn内でABALから合成されたGABAの分解および刺激による放出を調べ、取り込まれたGABAやGluから合成されたGABAとの比較から、GABAのpoolの機能的な違いについて検討した。

＜方法＞

Synの調製：マウス(DD系、雄、5週齢)脳よりGrayら(5)の方法に準じて粗ミトコンドリア分画を得、さらにSellstromら(8)の方法に準じFicoll-sucroseの密度勾配遠心法により調製し、Krebs Ringer bicarbonate(KRB, pH7.4)に懸濁して用いた。

ABALの調製：$^{14}$C-ABALはAsakuraらの方法(2)に準じて$^{14}$C-putrescineより合成した。Cold ABALはABAL diethylacetalより合成し、Dowex 50($H^+$)カラムで精製した(2)。

ABALからGABAを合成する酵素活性の測定：Asakuraらの方法(4)に準じて$^{14}$C-ABALからの$^{14}$C-GABAの生成量より求めた。

ABALから合成されたGABAの測定：Syn(0.1g brain)に$^{14}$C-ABAL(10$\mu$M)を添加し、37℃で反応した後Syn内の$^{14}$C-GABAをDowex 50($Na^+$)カラムで分離測定した(2)。gabaculine(GC, 1.0$\mu$M)は$^{14}$C-ABAL添加前に加え、37℃、5分間反応した。

取り込まれた$^{3}$H-GABAおよび$^{14}$C-Gluから合成された$^{14}$C-GABAの測定：Syn(0.1g brain)に$^{3}$H-GABA(1.0$\mu$M)、または$^{14}$C-Glu(1.0$\mu$M)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(1.0$\mu$M) は $^{3}$H-GABAおよび$^{14}$C-Glu添加前に加え 37℃、5分間反応した。

ABALからのGABA、取込$^{3}$H-GABAおよび$^{14}$C-Gluからの合成$^{14}$C-GABAの放出：上記の方法でのそれぞれのGABAを含むSynを灌流法(6,7)により、$Ca^{2+}$共存下・非共存下での高$K^+$(56mM)脱分極刺激により放出されたそれぞれのGABAを測定した。

＜結果および考察＞

ABALからGABAを合成する酵素の局在

ABALをGABAに合成する酵素はTagoら(11)により可溶性分画に多いことは知られているが、表1に示すようにSyn分画にも活性が高くさらに細分画して調べると、この酵素はSyn内では主に細胞質分画に局在していた。従って、Syn内に取り込まれたABALは細胞質でGABAに変換されるものと思われる。

### $^{14}$C-ABALからの$^{14}$C-GABA合成およびGCの効果

Synに$^{14}$C-ABALを添加すると、図1Aに示すように時間と共に$^{14}$C-GABAが合成され、その速度は1.45nmol/h/0.1g brainであった。SynをGCで処理しておくと、その合成速度は2.15nmol/h/0.1g brainと1.5倍に上昇した。つまりABALから合成されたGABAはGABA-Tに接触するpoolに存在した。GABA-TはSyn内ミトコンドリアに局在するので、このpoolはミトコンドリアとこれを取り囲む細胞質部分に相当するものと推察される。

表1．ABALからGABAを合成する酵素(ABAL-DH)活性の細胞内分布

| | ABAL-DH specific activity (nmol/min/g brain) | (nmol/min/mg protein) |
|---|---|---|
| Homogenate | 33.2±3.3 | 0.254±0.0090 |
| P1 | 6.6±2.2 | 0.162±0.025 |
| S2 | 11.7±0.9 | 0.245±0.029 |
| P2 | 6.2±0.8 | 0.170±0.019 |
| Mye. frac. | 0.3±0.2 | 0.096±0.043 |
| Mit. frac. | 1.9±0.3 | 0.256±0.035 |
| Syn. frac. | 6.4±0.3 | 0.234±0.024 |
| Syn. cytosol | 3.9±0.2 | 1.214±0.208 |
| Syn. vesicle | n. d. | n. d. |
| Syn. mit. | 0.8±0.1 | 0.225±0.033 |

### 取込$^{3}$H-GABAおよび$^{14}$C-Gluからの合成GABAに対するGCの効果

Synに$^{3}$H-GABAを添加すると急速に取り込まれ、時間と共に分解されていくが、Synをあらかじめ GC(1.0μM)で処理しておくとこの分解は完全に阻害された（図1B）。この$^{3}$H-GABAの取り込み並びに分解はSyn分画への細胞体ミトコンドリア分画の混在とも考えられるが、ミトコンドリアにはSynでみられる様な急速でしかも多量の取り込みは認められないので、やはりこの効果はSyn内に取り込まれた$^{3}$H-GABAがSyn内ミトコンドリアで分解されていったものと思われる。一方、Synに$^{14}$C-Gluを添加すると$^{14}$C-GABAの合成がみられるが、この合成はGC処理によって全く影響を受けなかった。このことは、取込$^{3}$H-GABAはABALからのGABAと同様GABA-Tによって分解されやすいpoolに存在するのに対して、$^{14}$C-Gluから合成された$^{14}$C-GABAの方はpoolはこれらと明らかに異なり、GABA-Tによって分解されにくい状態のpool（例えばシナプス小胞？）に存在しているものと考えられる。

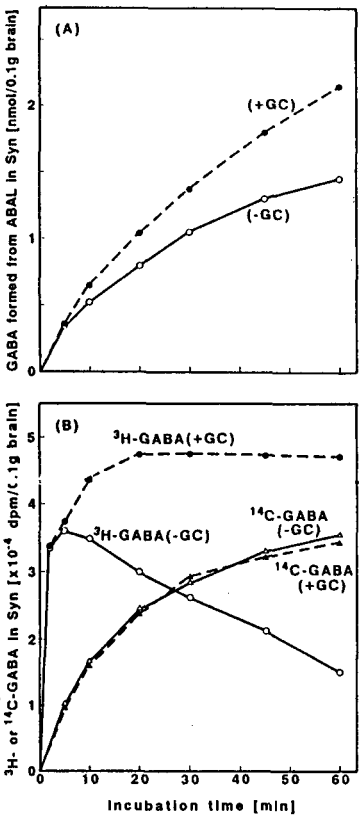



図1．Syn内での$^{14}$C-ABALから合成された$^{14}$C-GABA(A)、外から取り込まれた$^{3}$H-GABA(B;○,●)、および$^{14}$C-Gluから合成された$^{14}$C-GABA(B;△,▲)におけるGCの効果
←—— :cont、– – – :+GC

### 脱分極刺激による放出

$^{14}$C-ABALからの$^{14}$C-GABA、取込$^{3}$H-GABAおよび$^{14}$C-Gluからの合成$^{14}$C-GABAの脱分極刺激による放出を$Ca^{2+}$依存性、非依存性について調べた(図2)。$^{14}$C-ABALからの$^{14}$C-GABAは$Ca^{2+}$非依存性の放出のみが認められ、またGCにより増加した分についても$Ca^{2+}$非依存性のみであった。一方、取込$^{3}$H-GABAは$Ca^{2+}$依存性・非依存性共に認められたが、GCにより増量した$^{3}$H-GABAについてだけみると$Ca^{2+}$非依存性のみであった。これに反して、$^{14}$C-Gluから合成された$^{14}$C-GABAはGCには無関係に$Ca^{2+}$依存性・非依存性の放出が共に認められた。これらのことから、細胞質に存在するGABAは主に$Ca^{2+}$非依存的に放出され、$Ca^{2+}$依存性の放出は$^{14}$C-Gluから合成された$^{14}$C-GABAのように分解から保護されたpoolからの放出と考えられる。この$^{14}$C-GABAには$Ca^{2+}$非依存性の放出も認められるが、これはこのpoolから細胞質poolへのleakのためと思われる。事実、Szerbら(9,10)は放出において、$Ca^{2+}$依存的な小さなサイズのコンパートメントと$Ca^{2+}$非依存的な大きなサイズのコンパートメントの存在を推察している。

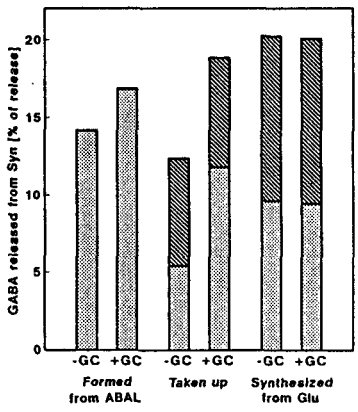



図2．$^{14}$C-ABALから合成された$^{14}$C-GABA、取り込まれた$^{3}$H-GABA、および$^{14}$C-Gluから合成された$^{14}$C-GABAのSynからの放出
▨：$Ca^{2+}$依存性、
▩：$Ca^{2+}$非依存性


＜文献＞

1) Abe, M. & Matsuda, M. (1983) Neurochem. Res., 8:563-573.
2) Asakura, T. et al. (1988) Jikeikai Med. J., 35:23-31.
3) Asakura, T. & Matsuda, M. (1988) 神経化学, 27:414-415.
4) Asakura, T. et al. (1989) J. Neurochem., 52:448-452.
5) Gray, E. G. & Whittaker, V. P. (1962) J. Anal., 96:79-88.
6) Hoshino, M. et al. (1979) J. Nutr. Sci. Vitaminol., 25: 367-374.
7) Raiteri, M. et al. (1974) Eur. J. Pharmacol., 25:411-414.
8) Sellstrom, A. et al. (1975) J. Neurochem. 25:393-398.
9) Szerb, J. C. (1979) J. Neurochem., 32:1565-1573.
10) Szerb, J. C. et al. (1981) J. Neurochem., 37:1186-1192.
11) Tago, K. et al. (1982) J. Neurochem., 39:803-809.
12) Wood, J. D. et al. (1988) J. Neurochem., 50:1839-1843.

# 128 大脳皮質NMDA受容体刺激時の細胞内カルシウムイオン、エネルギー代謝、脳波の変化とMK-801の拮抗作用

植松大輔*, J. H. Greenberg**, M. Reivich**

慶應義塾大学医学部神経内科*

ペンシルバニア大学医学部脳血管研究所**

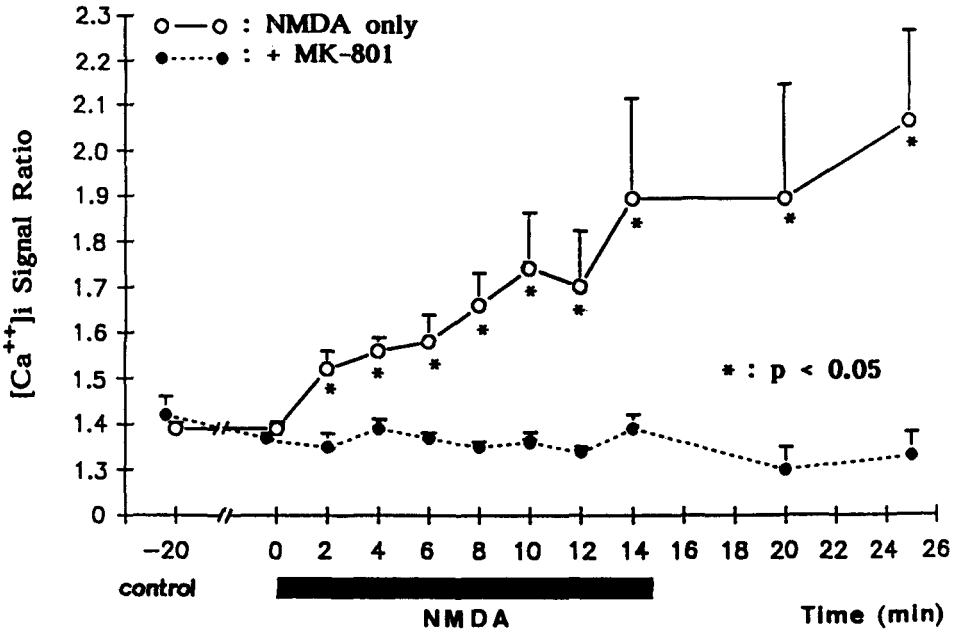
〔要約〕

大脳皮質NMDA受容体の過剰な活性化時の細胞内$Ca^{++}$，エネルギー代謝そして脳波の変化をin vivoで猫の皮質から同時に記録し，またNMDA受容体拮抗薬であるMK-801の効果を検討した．蛍光性$Ca^{++}$指示薬であるindo-1を脳皮質細胞内に取り込ませ，340 nmの紫外線を照射しindo-1-$Ca^{++}$蛍光の変化（400 & 506 nm）とNADH蛍光の変化（464 nm）を同時に測定し脳波も同部位より記録した．100 μM のNMDAを脳表より潅流すると脳波の急激な平低化とそれに続く鋭波や棘波の出現，細胞内$Ca^{++}$の有意な上昇，NAD/NADH redox stateの二相性変化（初期酸化と後期還元）を認めた．これらの変化はMK-801 2 mg/kgを20分前に静注することにより完全に抑制された．本研究ではNMDA受容体過剰刺激状態における現象をin vivoで明らかにすると同時にMK-801の神経細胞保護作用の機序を証明した．

近年，興奮性神経伝達物質である glutamate の受容体のsubtypeの一つであるN-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体の過剰な活性化とそれに伴う$Ca^{++}$の細胞内への流入が脳虚血やてんかん重積発作後の神経細胞障害に重要な役割を演じると考えられている(1)．これに対し非競合性NMDA受容体拮抗薬である MK-801(2) の保護作用が注目されている(1)．MK-801 は NMDA受容体作動性イオンチャンネルに働き $Ca^{++}$ の流入を抑制すると考えられている．本研究ではNMDA受容体の過剰な活性化状態において猫大脳皮質細胞内 $Ca^{++}$，NAD/NADH redox state および脳波の経時的変化を in vivo で同時に測定するとともに，MK-801 の拮抗作用を検討した．

方法：成猫13匹をhalothane吸入により麻酔し調節呼吸とした．側頭蓋に頭窓を作成し脳軟膜面を露出した．蛍光性$Ca^{++}$指示薬であるindo-1は膜透過型のindo-1-AMを7 μM含む人工髄液を約2時間脳表より潅流することにより皮質細胞内に取り込ませた．光学系を用い340 nmの紫外光を約2 mm径の脳表より間歇的に照射しindo-1-$Ca^{++}$ 蛍光(400 & 506 nm)，NADH蛍光(464 nm)そして反射光(340 nm)を適当なbarrier filterを装着した4つの光電管を用いて測定した．反射光とNADH蛍光の変化を補正後，400/506 nm の比（$Ca^{++}$蛍光比）をとり細胞内$Ca^{++}$の変化の指標とした(3)．脳波は頭窓に装着した電極より測定した．NMDA群(n = 7)では100 μMのNMDAを含む人工髄液を15分間,約 1 ml/分の速度で脳表に潅流しその後人工髄液にて15分間洗浄した．MK-801 群(n = 6) では20分前に MK-801 2 mg/kg を静注し，その後同様にNMDAを注入した．

結果：NMDA 群ではNMDA 注入直後より脳波は著明に平低化し2分後の振幅は前値の23 ± 2 %($p < 0.05$) となった，その後 3例では規則性（18 ～ 22 Hz）の鋭波，棘波が出現した．




$Ca^{++}$蛍光比は上図に示すように NMDA 注入後持続的に有意に増加した（平常時： 1.39 ± 0.01, NMDA 投与15分後：1.87 ± 0.24, $p < 0.05$）. NAD/NADH redox state は二相性の変化を示した即ちNMDA 注入後 2分間酸化を呈しその後徐々に還元された. MK-801 前投与群ではNMDAをその後同様に注入しても細胞内$Ca^{++}$, NAD/NAD redox state, そして脳波に変化はみられずこれらの変化はすべて完全に抑制された.

考察： 本方法で測定した蛍光は約500 $\mu$m までの深さの大脳皮質より由来する(3). NMDA受容体は海馬CA1領域と皮質表層の錐体細胞に多く分布する(4). 本研究で皮質のNMDA受容体を過剰に刺激すると細胞内$Ca^{++}$の有意な上昇, NAD/NADH redox stateの二相性の変化, および脳波の急激な平低化とそれに続く規則性の鋭波や棘波を認めた. 脳波の急激な平低化はNMDA投与による脱分極のためと考えられる. 細胞内$Ca^{++}$の上昇は2つのルートから生じ得る, 即ちNMDA受容体作動性イオンチャンネルおよび神経細胞の脱分極のため膜電位依存性$Ca^{++}$チャンネルからの$Ca^{++}$の細胞内への流入が考えられた. NAD/NADH redox state の初期の酸化は神経の興奮に伴うミトコンドリアにおける酸化的燐酸化の亢進のためと考えられその後の還元は多量の$Ca^{++}$流入によるエネルギー代謝障害の可能性が考えられた(5). MK-801は細胞内$Ca^{++}$の上昇を完全にブロックするだけでなくNMDAによる脳波の平低化, NAD/NADH redox state の酸化も抑制した.
本研究はNMDA受容体過剰刺激状態の細胞内$Ca^{++}$, エネルギー代謝および脳波への影響をin vivoで明らかにしただけでなく, MK-801 の実験的虚血時の保護作用の発現機序を証明するものである.

文献： (1)Siesjo,B.K.,and Bengtsson,F. (1989) J.Cereb.Blood Flow Metab. 9,127-140
(2)Clineschmidt,B.V.,Martin,G.E.,and Bunting,P.R. (1982) Drug Dev.Res. 2,123-134
(3)Uematsu,D.,Greenberg,J.H.,Reivich,M.,and Karp,A. (1988) Ann.Neurol. 24,420-428
(4)Cotman,C.W.,Monaghan,D.T.,Ottersen,O.P,and Storm-Mathisen,J. (1987) TINS 10,273-280
(5)Moreno-Sanchez,R. (1985) J Biol.Chem. 260,4028-4034

# 129 交感神経節細胞におけるビオプテリンのターンオーバー

長谷川宏幸*
Center for Cell Biology, Sinai Hospital of Detroit [現] 浜松医大・生化学第一

〔要約〕
代表的な交感神経細胞である上頸神経節の初代培養を用いてモノアミン生合成に必須なテトラヒドロビオプテリン(BH4)のターンオーバーを検討した．上頸神経節は生後２日未満のラット新生児より摘出し分散したのち，核酸類似体(cytosine-arabinoside, Ara-C) および 7S-NGF 存在下に単層培養した．ＧＴＰ－シクロヒドラーゼに対するインヒビターである 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine (DAHP)を与えたとき，ＢＨ４は 2.5 時間の半減時間で減少した．この減少速度は細胞内濃度に比例した．これは細胞内にＢＨ４を保持する機構が特に存在しないことを示唆した．一方，長時間ＤＡＨＰ投与によって，通常の１０％以下にまで低下したＢＨ４濃度はＤＡＨＰ除去後，速い速度で（約3時間で通常濃度の半分の濃度を）回復した．このことから，神経細胞内のＢＨ４はカテコールアミンのそれより速い回転の動的平衡状態にあるといえる．

テトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）を必須補酵素とするチロシン水酸化酵素およびトリプトファン水酸化酵素がそれぞれのカテコールアミンおよびインドールアミンの生合成の律速段階となっている．この補酵素は生合成経路のＧＴＰシクロヒドラーゼを律速酵素とし，この活性が，カテコールアミンおよびインドールアミン生合成を制御している可能性がある．しかし，その代謝動態についてはほとんどわかっていない．本研究ではこの視点から末梢神経系のモデルとして上頸神経節の単層培養系（ＳＣＧ）を用いてＢＨ４のターンオーバーを検討した．ＳＣＧはほぼ純粋な神経細胞群を培養系内に保持できることから，特異な素材である．

【材料，方法】
上頸神経節細胞の培養：生後２日以内のラットより上頸神経節を摘出し，コラゲナーゼ，トリプシンなどの混合液によって部分消化し，さらにパスツールピペットによって分散させ，Ａｒａ－Ｃおよび７Ｓ－ＮＧＦを添加した培養液（１）にて維持した．細胞収量は神経節あたり約１２万個程度であった．ＢＨ４の定量：培養プレート上の細胞をＰＢＳで洗浄した後，内部標準を含む液による酸性化（塩酸，0.1N），およびヨードによる酸化処理をしたのち，直接ＨＰＬＣ－ＦＤで定量した．一部のサンプルについてはアルカリ条件下で酸化処理し，細胞内ビオプテリンの９８％以上がテトラヒドロ型であることを確かめた．ＨＰＬＣ－ＦＤの検出感度から，９６穴（ウェル）培養プレートの１ウェルの細胞（約４万個）で定量が可能であった．
【実験結果】
１）細胞の成長およびＢＨ４量：細胞はこの培養系では一切細胞分裂せず，細胞体と神経繊維の量的増大のみが認められる．分裂能をもった細胞はＡｒａ－Ｃによって死滅し，約一週間後には見かけ状，純粋な神経細胞系を得る．この培養系の維持には７Ｓ－ＮＧＦが必須である．２週間目の培養について抗ＴＨ抗体を用いて細胞の染色を行なったところ，認められるすべての細胞が陽性であった．５日目の培養系は 200 pg/well のＢＨ４をもち４週目では 700 pg/well であった．この間，ウエルあたりのＢＨ４量は時間に対して直線的に増大した．
２）セピアプテリン投与によるＢＨ４の増加：ＳＣＧ細胞内ＢＨ４濃度を人為的に上昇させることを試みた．ＢＨ４の生合成における直接の前駆体は還元型セピアプテリン(6-(1'hydroxy-2'-oxo)propyl-tetrahydropterin)と考えられている．しかし，ジヒドロ体であるセピアプテリンは生理的な条件で生成することはないとされている．それにもかかわらず，ＳＣＧ細胞の培養液にセピアプテリンを与えたところ，きわめて効率良くＢＨ４に転換された．セピアプテリンからセピアプテリン還元酵素により生成したジヒドロビオプテリンは（ジヒドロ葉酸還元酵素により）すみやかにＢＨ４へ転換されたと推定される．また，培養液中のセピアプテリンを除くと細胞内のＢＨ４は速やかに減少し，数時間でほぼもとのレベルにもどった．すなわち，細

胞にはＢＨ４を効率良く保持する機構のないことが示唆された．

3) 2,4-Diamino-4-hydroxypyrimidine （ＤＡＨＰ）の効果：ＤＡＨＰはＧＴＰからのＢＨ４生合成の律速酵素，GTP-cyclohydrolase を阻害するとされ（２），これの投与によるＢＨ４枯渇が報告されている（３など）．当培養系にＤＡＨＰを与えると濃度依存的にＢＨ４が減少した．本実験で採用した 10 mM ＤＡＨＰは最大効果を与え，しかもその存在下で少なくとも４日間はＳＣＧ細胞に形態的な異常を認めなかった．図１に示すごとく，ＤＡＨＰ添加後ＳＣＧ細胞はＢＨ４を急速にを消失した．ＢＨ４の減少は典型的な１次反応であり，半減時間は約２時間半であった．つまり，消失速度は細胞内濃度に比例した．ＢＨ４の異化過程は知られていない．したがって観察されたＢＨ４の消失は細胞外への非特異的な漏洩であろうと推定された．

４）ＢＨ４消失後のＢＨ４回復：ＤＡＨＰ存在下で培養されたＳＣＧ細胞をＤＡＨＰを含まない培養液に戻すと，ただちにＢＨ４量の回復を開始した．図２に示すように，ＤＡＨＰ処理(15 hr)後，通常培養液に戻された細胞は約３時間で非ＤＡＨＰ処理群のＢＨ４量の半値まで回復した．消失速度が細胞内濃度に比例することから，実際の生合成速度は見かけの増加速度を上回ると推定される．

**Fig. 1 Depletion of BH4 by DAHP.**

**Cells were feed with 10 mM DAHP and the culture was terminated after indicated times (lower line). Control incubations were fed with ordinary medium (upper line).**

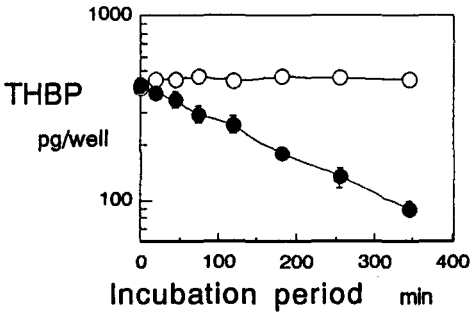
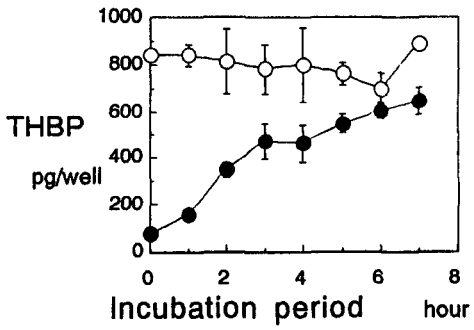



**Fig. 2 Recovery of Biopterin after DAHP**

**Cultures were fed on the 27th day of dissociation with and without (for control) 10 mM DAHP in the culture medium. On the next day, the culture was rinced once with the culture medium and kept in the absence of DAHP for indicated period of time.Upperline, control; lowerline, experimental.**




【考察】

モノアミン生合成を制限しているＢＨ４のレベルはきわめて早いターンオーバーのうえに成り立つ動的平衡である．モノアミン生合成は一般に律速酵素である水酸化酵素活性の変動によって調節されると考えられており，水酸化酵素の活性調節については酵素の転写レベルでの酵素分子生合成の調節およびタンパク質の修飾による活性調節が報告されている．一方，補酵素であるＢＨ４は必ずしも過剰には存在しないことが知られていたが，その動態については今日までほとんどわかっていなかった．本実験の結果はＢＨ４の代謝が予想以上に速いことを示している．また，このように補酵素が早い速度で細胞外へ漏洩し，常に生合成によって補充されるという，ターンオーバーの様式は特異である．ＢＨ４の生合成の調節，特にその律速酵素であるＧＴＰ－シクロヒドラーゼの調節機構の解明が必要である．

*本実験はSinai Hospital of Detroit, Center for Biology において，G.Kapatos, K. Hirayama, および V. Kemski らの協力をえた．

【文献】

1. Kessler, J. K. (1985) Neuroscience, 15. 827-839
2. Pabst, W. and Rembold, H. (1966) H-S Zeit fur Physiol. Chemie, 344. 107-114
3. Cotton, R. G. H. (1986) in "Chemistry and Biology of Pteridines 1986" pp. 231-234 (Walter de Gruyter)

# 130 ＧＤ１ａガングリオシドに対する単クローン性抗体

岩田大二、佐藤若生、蔵本悦郎、島田静雄
（三井製薬・生物科学研）

〔要約〕

ＧＤ１ａはＧＭ１と並んで高等動物の脳・神経系における主要なガングリオシドである。近年、ガングリオシドを始めとする糖脂質の研究には、それらを特異的に認識する抗体、特に、単クローン性抗体を用いることが、不可欠となりつつある。今回、我々は、ＧＤ１ａガングリオシドに対する単クローン性抗体の取得を試みた。箱守らの方法に従い、酸処理したサルモネラ菌に吸着させたＧＤ１ａをマウスに免疫し、脾細胞を、ＮＳ－１ミエローマと融合し、クローニングを行った結果、２クローンのハイブリドーマを確立した。それらの産生する抗体の特異性を、類縁糖脂質を用いてＥＬＩＳＡとＴＬＣ免疫染色で検討したところ、得られた２つのｍＡｂともＧＤ１ａとのみ反応し、それらははいずれもＧＤ１ａに特異的であることが示された。得られた単クローン性抗体を用いて、ＧＤ１ａの酵素免疫測定系の確立を検討した。その結果、３－９０ｎｇ／ｍｌの範囲でのＧＤ１ａ濃度測定が可能となった。また、脳組織の免疫組織化学的検討も一部行った。

［緒言］

ガングリオシドを始めとする糖脂質は、細胞膜の単なる構築物質ということではなく、細胞の種々の生理機能あるいは分化等の調節機構において、重要な役割を担っていることが近年明らかにされてきた。それらの研究には、高い特異性を有する抗体、特に単クローン性抗体（ｍＡｂ）の使用が必須となってる。糖脂質のｍＡｂ作製に関しては、多数の報告がある。しかしながら、糖脂質の中には、マウスあるいはラットの組織に多量に存在し、それらの動物に対しては免疫原性が低いため、ｍＡｂの得られていないものがある。ＧＭ１とならんで高等動物の脳・神経組織の主要なガングリオシドであるＧＤ１ａもその一つである。我々はこれまでに、アシアロＧＭ１（ＧＡ１）(2)およびＧＭ１(1)のそれぞれに対するｍＡｂを得ているが、今回はＧＤ１ａに対するｍＡｂの取得を試みた。その結果得られた抗体の特異性および応用性について検討を行った。

［実験方法］

①糖脂質：ウシ脳由来ＣＭＨ、ＣＤＨ、ＧＡ２、ＧＡ１、ＧＭ３、ＧＭ２、ＧＭ１、ＧＤ１ａ、ＧＤ１ｂ、ＧＴ１ｂ、ＧＱ１ｂおよび、ヒト赤血球由来ＣＴＨ、globoside、ｎＬｃ４(paragloboside)を用いた。 ②ｍＡｂの取得：箱守らの方法(3)に準じて、酸処理したサルモネラ菌にＧＤ１ａを固定して、ＢＡＬＢ／ｃマウスに頻回免疫した。enzyme-linked immunosorbent assay（ＥＬＩＳＡ）で血中に抗体価の上昇を認めた個体の脾細胞を、ポリエチレングリコールの存在下でＮＳ－１ミエローマと融合後、細胞上清のＧＤ１ａに対するＥＬＩＳＡ抗体価を指標として、クローニングを行った。③ｍＡｂ：樹立された単クローン性ハイブリドーマの培養上清あるいは、そのハイブリドーマをヌードマウスに移植し、得られた腹水をｍＡｂとして用いた。④ＥＬＩＳＡ：糖脂質を固定した96穴プレートの各ウエルに検体を反応させ、さらに、パーオキシダーゼ標識抗マウスIg抗体を反応させた。ＡＢＴＳを基質として発色を行わせ、414 nmにおける吸光度を測定した。⑤ＴＬＣ免疫染色：糖脂質をシリカゲルの薄層上で展開させた後、抗ＧＤ１ａ ｍＡｂを反応させた。続いて、パーオキシダーゼ標識抗マウスIg抗体を反応させ、クロロナフトールを基質として発色を行った。⑥ＧＤ１ａ濃度の酵素免疫測定：標準検体を96穴プレート中でｍＡｂを固定したポリスチレンビーズと反応させた。続いて、ビーズをビオチン化ｍＡｂと反応させ、さらにパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加えた。ビーズに基質であるＡＢＴＳ溶液を加え発色をおこなわせ、414 nmにおける吸光度を測定した。コレステロールとレシチン（重量比１：２）から成るリポソームにＧＤ１ａを包埋させたものを、標準検体として用いた。⑦マウスの脳の凍結切片をアセトン固定後、ｍＡｂ、ビオチン化抗マウスＩｇＭ、パーオキシダーゼ標識アビジン、さらに基質であるＡＥＣで逐次処理し、組織の発色を観察した。

［結果および考察］

細胞融合の後、クローニングを行った結果、２クローンのハイブリドーマを確立した。それらの産生するｍＡｂはともにＩｇＭであった。また、それらはＥＬＩＳＡおよびＴＬＣ免疫染色のいずれの系においても、

ＧＤ１ａとのみ反応し、得られたｍＡｂはともにＧＤ１ａに特異的なものであることが判明した（Ｆｉｇ．１およびＦｉｇ．２参照。２つのｍＡｂの反応性には本質的な差異は認められなかったので、Ｆｉｇ．には、いずれかのｍＡｂの代表的な反応パターンを示す）。

Ｆｉｇ．３に示されているように、リポソーム包埋ＧＤ１ａを標準検体とすると、ＧＤ１ａの濃度が３－９０ｎｇ／ｍｌの範囲における標準曲線が得られた。ＧＤ１ａは脳・神経系においては比較的多量に存在するガングリオシドである。そこで、今回確立した測定系は、血液あるいは脳脊髄液中のＧＤ１ａを定量することにより、脳・神経系の器質的な異常や傷害を診断する一助と成る可能性を有しているものと考えられる。

また、写真では示さないが、今回得られたｍＡｂを用いてマウスの脳の免疫組織化学的検討を行ったところ、小脳のプルキニエ細胞が特に強く染まるという結果が得られた。ｍＡｂをＧＤ１ａで予め吸収しておくと、その染色は見られなくなることから、プルキニエ細胞の染色は非特異的なものではないと判断される。その他の免疫組織化学的検討は、現在進行中である。

［文献］

(1)Iwata,D., Sato,W., Kuramoto,E. and Shimada,S.(1988) Neurochem. Res. 13, 1093.

(2)Shimada,S. and Iwata,D.(1987) Microbiol. Immunol. 31, 923-933.

(3)Young,W.W,Jr., MacDonald,E.M.S., Nowinski,R.C. and Hakomori,S.(1979) J. Exp. Med. 150, 1008-1019

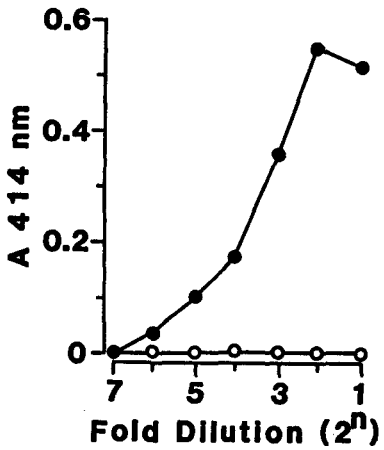



Fig. 1 Specificity by ELISA
(● GD1a, ○ other 13 glycolipids)

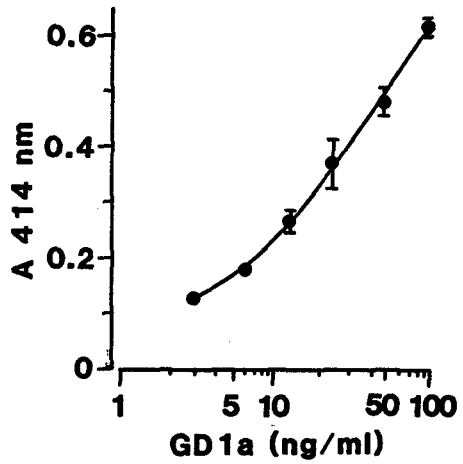



Fig. 3 Standard Curve for Immunoassay of GD1a Concentration

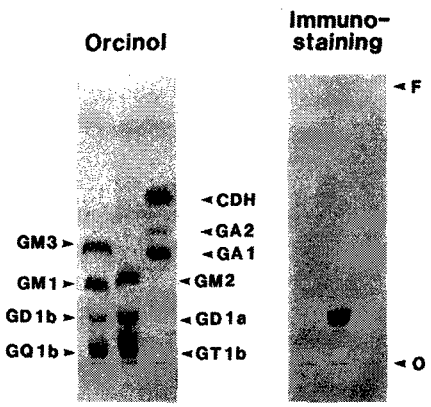



Fig. 2 Specificity by TLC Immunostaining

## 131 細胞内レチノイン酸結合タンパク及び核内受容体のラット脳内での局在

内海裕美[1,2]、相川久志[1]、西川徹[3]、埜中征哉[1]、福山幸夫[2]、桃井真里子[3]、桃井隆[5]
国立精神・神経センター 微細構造研究部[1]、疾病研究第３部[3]、疾病研究第５部[5]、
東京女子医大小児科[2]、自治医科大学小児科[4]

〔要約〕
我々はレチノイン酸の細胞内情報伝達に関与するCRABP（細胞内レチノイン酸結合タンパク）及びRAR（核内レチノイン酸受容体）の合成ペプチドに対する抗体を作成し、ラット脳内におけるCRABP及びRARの発現と局在について検討した。CRABPは海馬等の神経細胞の細胞質に弱陽性を示し、また線条体に散在する少数の有棘神経細胞が強陽性であった。一方、RARは海馬等の神経細胞と小脳プルキンエ細胞の核が陽性であった。レチノイン酸の情報伝達に関与するこれらの二つのタンパクの脳神経細胞における局在は、レチノイン酸が神経細胞においてなんらかの生理活性を荷っていることを示唆するものである。

【目的】
ビタミンＡの誘導体であるレチノイン酸は培養系では神経芽細胞などの分化誘導を促進することが知られており（１）、その作用機序はCRABPがレチノイン酸を核へと運搬し、RARと結合したレチノイン酸はN-myc等の遺伝子発現を調節すると考えられている（２－４）。一方、レチノイン酸の生体内での生理作用は不明であったが、近年モルフォジェンとして発生初期の肢芽形成に深く関与していることが明らかとなった（５－６）。我々はCRABPが肢芽のみならず発生初期の中枢神経系に特異的に発現することを明らかにしてきた（７、８）。昨年の本大会でブタ脳中にはレチノイン酸に特異的に結合する二種類のタンパク（RARとCRABP）の存在を報告した。本研究では神経系におけるレチノイン酸の生理的意義を明らかにするために、CRABP及びRARの抗体を用いてラット脳内におけるこれらレチノイン酸の情報伝達に関与する二つのタンパクの局在について検討した。

【方法】
(1)抗CRABP抗体及び抗RAR合成ペプチド抗体の作製
ブタ脳よりCRABPを精製し、ウサギに免疫し、抗CRABP抗体を作製した。同抗体はブタ睾丸CRABPと反応したが、ブタ肝CRBP（細胞内レチノール結合タンパク）及びウシ$P_2$タンパクと反応せず、CRABPに対する高い特異性を示した。またRARのDNA配列より予想されるアミノ酸配列をもとにペプチド（154番目-177番目）を合成し、ウサギに免疫し、抗RAR抗体を作成した。
(2)イムノブロット
Wistarラット（生後20日）の脳各部位を分離し、0.5M NaCl抽出液を15％と10％のSDS-PAGEを行った後、Towbinらの方法に従い（９）イムノブロットを行い、それぞれ抗CRABP抗体、及び抗RAR合成ペプチド抗体を用いて、CARBP、RARの発現量を検討した。
(3)組織染色
Wistarラット（生後20日）の脳を４％パラホルムアルデヒドを用いて還流固定し、パラフィン包埋した切片を用いて、抗CRABP抗体、抗RARペプチド抗体、及びコントロールとして免疫前血清をそれぞれ反応させ、ペルオキシダーゼ結合アビジン－ビオチンシステムにより、CRABP、RARの脳内局在を調べた。

【結果】
CRABPは海馬等の神経細胞の細胞質が弱陽性示したが（図１）、線条体に散在する少数の有棘神経細胞に強陽性が認められた。抗CRABP抗体を用いたイムノブロットによってこの結果は確認され、脳各部位に

は一様にCRABPは観察されたが、線条体では他の脳部位と比べ約５倍ほど多く発現していた（図２）。また、RAR合成ペプチドに対する抗体を用いたイムノブロットでは、RARは大脳よりむしろ小脳に多くの発現が観察された（図３）。RARは小脳では主にプルキンエ細胞が、大脳では海馬等の神経細胞の核が陽性であった。

【考察】

レチノイン酸の情報伝達に関与するCRABPとRARが生後20日のラット脳神経細胞の一部に存在していたことは、レチノイン酸は形態形成因子としてだけでなく、脳神経細胞の生理機能に直接関与している可能性が示唆された。また線条体に散在するCRABP強陽性細胞の同定は、脳レチノイン酸の生理的意義を解明する糸口を与えるものと思われる。

【文献】


1. Haussler, M., Sidell, N., Kelly, M., Donaldson, C., Altman, A. and Mangelsdorf, D. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5525-5529
2. Thiele, C., Reynolds, C. and Israel, M. (1985) Nature 313, 404-406
3. Takase, S., Ong, D.E. and Chytil, F. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 247, 328-334
4. Petkovich, M., Brand, N.J., Krust, A. and Chambon, P. (1987) Nature 330, 444-450
5. Tickle, C., Alberts, B.M., Wolpert, L. and Lee, J. (1982) Nature 296, 564-565
6. Thaller, C. and Eichele, G. (1987) Nature 327, 625-628
7. Momoi, T., Kitamoto, K., Sato-Kasuya, J., Senoo, H. and Momoi, M. (1989) Biomed. Res. 10, 43-48
8. Momoi, T., Hayasaka, N., Hanaoka, K. and Momoi, T. (1989) Proc. Japan Acad. 65, 9-12
9. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354

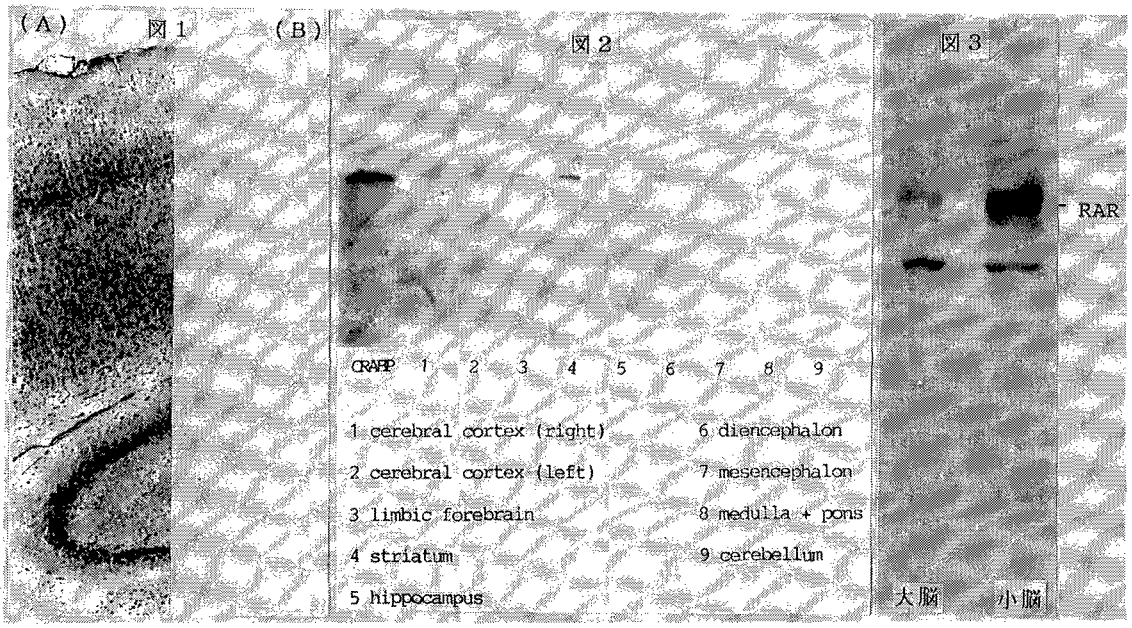




図１．ラット脳海馬領域におけるCRABP陽性細胞（Ａ）抗CRABP抗体、（Ｂ）免疫前血清

図２．抗CRABP抗体を用いたイムノブロット法による脳各部位でのCRABPの発現量の解析

図３．抗RAR合成ペプチド抗体を用いたイムノブロット法による大脳、小脳でのRARの発現量の解析

## 132　ヒト脳脊髄液、血漿、尿中のアセチルコリン及びコリンの測定について

藤木嘉明、池田　淑夫、奥山　真司*、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、桶狭間病院*）

〔要約〕
固定化酵素法を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）に抽出法としての液体陽イオン交換法を組み合わせることにより同一の測定システムで脳脊髄液（CSF）、血漿及び尿の三種の体液のアセチルコリン（ACh）及びコリン（Ch）濃度を初めて測定し得た。ここで用いた液体陽イオン交換法とHPLCとの組合せは、極めて低濃度で存在する体液中のAChの検索法として優れている。又、正常者において検索を行いCSF中のAChの濃度は加齢にともない減少しChの濃度は増加を認めるのに対し、血漿中のChの濃度は加齢にともない増加を認めたがAChの濃度は加齢にともなっての変化を認められなかった。

I　目的　アセチルコリン（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り、コリン（Ch）はその前駆体であり代謝産物である。その生体内における役割は主に中枢においては記憶機能、末梢においては自律神経系との関連が議論されている。しかし、従来の報告ではヒトの体液における両物質の変化をもとにその生体内における役割を推測するまでに至るものは数少ない。これは物質の不安定性に依るのではと思われるが、従来用いられてきた諸測定方法が簡便性などに欠けることも原因のひとつであろう。ヒトにおいて体液成分の分析は生体に侵襲が少ない神経化学的検索手段のひとつである。中枢、末梢の各々を反映する色々の体液を同一の簡便なシステムで測定可能となることは研究上有用なことと思われる。奥山らが報告した脳脊髄液（CSF）中の両物質濃度の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による測定方法（1）の抽出段階に改善を加えることにより血漿、尿における濃度の測定も可能とすることを試み、主に正常例を対象に定量を行った。

II　対象と方法　CSF、血漿、尿は研究の趣旨をよく説明し充分な同意を得た健常被験者より採取した。CSFは被験者30名より腰椎穿刺にて既報（1）に従い採取した。また血漿は健常被験者79名から午前11時に空腹状態で10分間の安静後、肘静脈より採血し得た。heparin 65 IU入りの真空採血管に$physostigmine(10^{-3})$を入れ5ml採血し速やかに混和後、遠心し得られた血漿に対し直ちに抽出操作を加えた（図1）。尿試料は健常被験者5名の随時尿を用いた。採尿後直ちに抽出操作を加えた（図2）。抽出操作は概要としては奥山らの方法（1）に従ったが、血漿及び尿に応用可能とするために途中段階においての遠心操作を大幅に増強した。使用した機器及びHPLC-ECDの測定条件は既報（2）に同じである。

III　結果　1．回収率および最低検出限界　ACh、Ch、EHCの標準物質およびヒトCSF、血漿、尿抽出物のクロマトグラムの一例を図3に示す。いずれも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。AChの最低検出濃度は、CSFで5 pmol/ml、血漿で25 pmol/mlであった。回収率は血漿でACh 65.0±4.4、Ch 64.1±4.0、EHC 69.0±2.5であった。

2．ヒトCSF中のACh濃度　正常者全30例のACh濃度の最低値～最高値は 4～199pmol/ mlであり、その平均値と標準偏誤差は63.9±48.4pmol/ml で加齢にともない減少を認めた。Ch濃度の最低値～最高値は0.35～6.41 nmol/ mlであり、その平均値と標準偏差は2.5±1.3nmol/ml で加齢にともない増加を認めた。

3．ヒト血漿中のACh、Ch濃度　正常者全79例のACh濃度の最低値～最高値は25.9～242.0pmol/ mlであり、その平均値と標準偏誤差は80.6±34.6pmol/ml であった。ACh濃度の年齢による変化を図4に示す。Ch濃度の最低値～最高値は11.2～43.6nmol/ mlであり、その平均値と標準偏誤差は19.5±5.8nmol/ml であった。ACh濃度の年齢による変化を図5に示す。

4．ヒト尿中のACh、Ch濃度　検討した５例すべてにおいて ACh、Chが検出された。

IV　考察　これまでに我々は、CSF中のAChおよびCh濃度の、HPLCによる測定法を確立し（1）、その加齢変化やパーキンソン病、てんかん患者における変化について報告してきた（2、3）。HPLCは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。今回は、今までに報告してきた方法に改善を加えることにより、脳脊髄液、血漿及び尿の３種の体液のAChおよびCh濃度が同一のシステムで定量可能となった。従来の報告において各種体液中のAChおよびCh濃度の測定は主に生物学的測定法、RIAおよびGC／MS法などの様々な方法でなされてきた。しかし３種の体液のAChおよびCh濃度が簡便な同一のシステムで測定されたことは報告されていない。一方、健常者を対象に行われた血漿における加齢変化（Ch濃度は加齢にともない増加、ACh濃度は加齢にともなって変化せず）は従来の報告（４）と一致した。これらの結果は今回更に症例を加えて検討したCSFにおける変化（ACh濃度は加齢にともない減少しCh濃度は増加）と異なる傾向を認めたことを併せ、AChおよびChの中枢および末梢における生理的役割を考える上で注目される。これら各体液の両物質の由来についてはまだ不確定な部分が多く、今後更に検討を要する。また血漿中のACh濃度は採血時の刺激によっても変動を認めるなど敏速な変化を示すことも明らかになっており、末梢血管系の神経調節機構としての役割が推察される。本法は従来の諸方法に較べほぼ同一のシステムで測定可能であり中枢および末梢神経系におけるAChおよびChの機能を研究する方法として有用と考えられる。

V 文献 1) Okuyama, S., Ikeda, Y., (1988) J. Chromatogr. 431, 389-394. 2) Okuyama, S., etal. (1988) 神経化学, 27, 138-139. 3) Okuyama, S., et al. (1988) 自律神経 (投稿中) 4) Clare, J., et al. (1984) J. American Geriat. Society

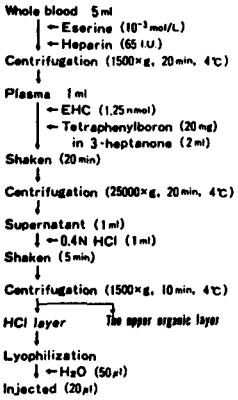



Fig 1. Extraction of ACh and Ch from plasma

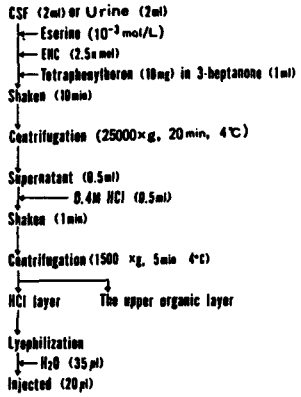



Fig 2. Extraction of ACh and Ch from CSF and urine

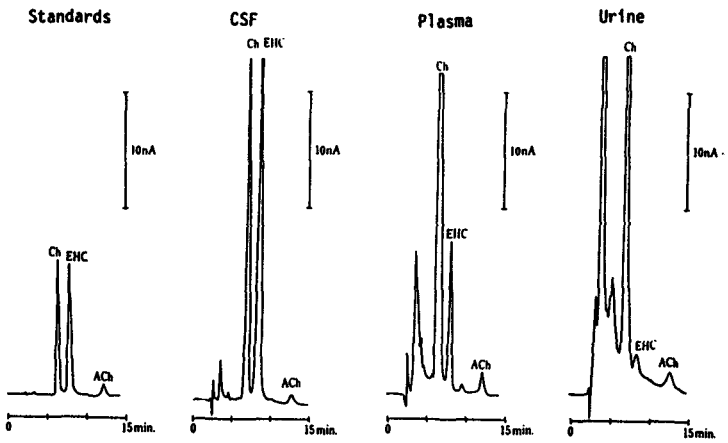



Fig 3. Chromatograms of STD (ACh:15.6, Ch and EHC:156pmol), CSF(EHC:2.5nmol), plasma(EHC:1.25nmol) and urine(EHC:2.5nmol).

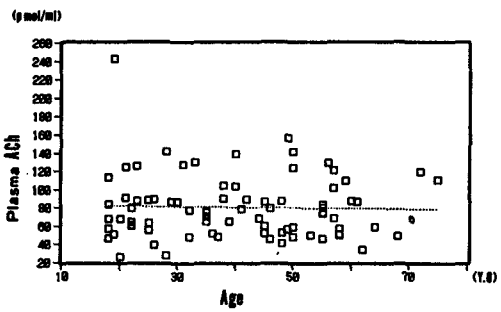



Fig 4. Concentrations of ACh in human plasma

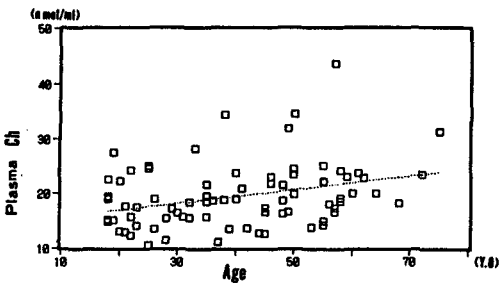



Fig 5. Concentrations of Ch in human plasma

# 133 神経系の筋酵素活性制御の検討

## グルタミン合成酵素とグルコース６燐酸脱水素酵素について

小長谷正明　小長谷陽子　高柳哲也

（奈良医大・神経内科）

〔要約〕

神経系の筋代謝への調節を検討する目的で、ラット座骨神経へ以下の処置を行い、筋のグルタミン合成酵素(GS)とグルコース６燐酸脱水素酵素(G6PD)を経時的に検討した。処置は機械的除神経、神経周膜下にテトロドトキシン(TTX) ボツリヌストキシンB(BTXB)、コルヒチン(Col) 、生食水を投与し、対照側と比較した。両酵素とも除神経で活性が増加した。ＧＳは２時間後にすでに対照側の２０４±２５．８％（M±SD）に増加し、１４４時間まで増加傾向がみられたが、Kmの変化はなかった。ＧＳ活性増加はBTXB,TTXとCol のすべてでみられ、アセチルコリン(Ach) が伝達する神経筋活動によって制御されているものと推定された。G6PDの活性増加はＧＳより遅く、程度も小さかった。BTXBとTTX 投与では有意の変化がなく、Col 投与で高値を示し、軸索流中の因子による制御が示唆された。

神経系は神経筋接合部を介して、筋の成育、代謝を調節しており、様々な筋の酵素活性に影響を与えている。その調節因子としてアセチルコリン(Ach) による神経筋伝達、non-quantum Ach 、軸索流による蛋白因子(myotrophic proteins) などが考えられている（４）。我々は筋グルタミン合成酵素(GS)が除神経により短期間に上昇することを明らかにしてきた（３）。この酵素は筋蛋白由来のアミノ酸よりグルタミンを生成して、筋よりのアミノ酸動員とカタボリズムに関与すると考えられる。今回はこの酵素活性制御がAch の神経筋伝達によるのか、軸索流によってもたらされる因子によるものかを検討する目的で、跳躍伝導を阻止するTTX 、神経終末よりのAch 放出を阻害するBTXB、軸索流を停止するCol を末梢神経に投与し、筋ＧＳ活性の変化を検討した。同時に軸索流でもたらされる因子の影響を受けるとされているG6PD[1]の活性も測定し、GSと比較検討した。

［方法］ 動物は６週齢雄ＳＤラット（体重180~220g）を用い、エーテル麻酔下に一側の座骨神経に以下のような処置を筋付着部から約1.5cm の部位に加えた。各測定群はそれぞれ５匹とした。薬剤は10%グルコース・生食水に溶かし、投与は神経周膜下に行った。

１）DEN 。２）BTXB 1μg。３）TTX　6μg 。４）Col　150nmol。５）生食水(Sal)1.5μl。

BTXBは24時間後に、他は処置後2,24,72,144 時間後に断頭し、足底筋のＧＳ，G6PDを測定し、処置側と無処置の対照側との酵素活性の比の変化を検討した。ＧＳ活性はSmith の方法（６）に、G6PD活性測定はGlock の方法（２）に従った。

［結果］ＧＳ活性は除神経２時間後に288.6±44.6nmol/h/muscle と対照側(140.8±26.3)の204±28.9% に増加し、144 時間後は508±80% と増加傾向にあった。DEN 48時間後のLineweaver-Burk の式による検討ではVmaxの増加のみで、Kmには変化がなかった（図１。DEN　1.48×10$^{-6}$　CTL 1.9×10$^{-6}$）。BTXB投与24時間後には169±22.7% とSal に比較して有意に増加していた(p<0.01)。TTX とCol では２時間後までは変化が無かったが、24時間後にはともに有意な増加が見られ、TTX では１４４時間後も対照側の406±91.5% と高値を維持していたが、Col では188±69.2% と比較的低値であった（図２）。Salでは有意な変化は見られなかった。G6PD活性の変化はCol 投与群で最も顕著であり、24時間後には対照側(119.4±34.3nmol/min/muscle) の343.8±85.9% に増加し，72時間後も高値であったが、144 時間後には147±15.5% に減少していた。DENは24時間後に142.6±27.8% ，144 時間後には180.8±37.9% とCol に比べて緩やかな増加を示していた（図３）。TTX では

ごく軽度の変化を見たのみであり、Sal では有意な増加は無かった。

［考察］以上の結果より、両酵素とも除神経で活性が増加し、神経系による制御が示唆された。

ＧＳ活性増加はBTXBによるAch 放出阻害、TTX による跳躍伝導障害、Col による軸索流停止のいずれでもみられた。軸索流停止によっても神経終末からのAch 放出がなくなることから、筋ＧＳ活性はAch によって調節され、non-quantum Ach 放出を抑制しないTTX（１）で活性増加をみたことや、非動化筋でも活性増加すること（３）から、神経筋活動によって調節されているものと推察される。GSが筋よりのアミノ酸動員に関与していることから、神経筋伝達遮断による活性上昇は神経原性筋萎縮の一因となっていると思われる。筋ＧＳ活性は、ステロイドミオパチーではGS-mRNA が増加し、酵素蛋白合成によって増加をきたすが（５）、除神経ではcyclohexamide の影響を受けないこと（３）から蛋白合成によらず、また、Kmに著変がないことから新たなisozyme の活性化によるものではない。筋細胞内での活性化機構については今後、さらに検討する予定である。

G6PDの活性増加はTTX では有意でなく、Col のみでみられ、軸索流中の因子がこの酵素活性を制御していることが示唆された。Col 投与が速やかに軸索流を停止させるのに対して、機械的除神経では筋側神経断端からの軸索流が除神経後も存続することから、後者での活性増加が遅く、かつ小さかったものと思われた。

本研究に協力戴いた郡山保子嬢に深謝する。

［文献］

1)Drachman DB, Stanley EF, Pestronk A, Griffin JW, Price DL (1982) J Neurosci 2,232-243

2)Glock GE, McLean P (1953) Biochem J 55,400-408

3)Konagay M, Konagaya Y, Max SR (1986) Abstr Society Neurosci 12,1107

4)Max SR, Markelonis GJ (1983)Neurochem Internatr 5,675-683.

5)Max SR, Thomas JW, Banner C, Vitkovic L, Konagaya M, Konagaya Y (1987) Endocrinol 120,1179-1183

6)Smith RJ, Larson S, Stred SE, Durschlag RP (1984) J Cell Physiol 120,197

図1

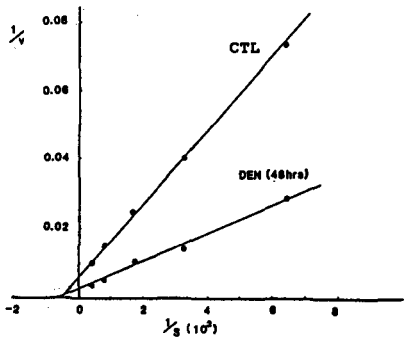



図2

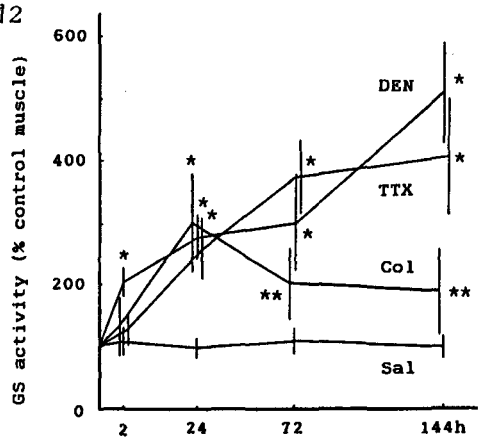



図3

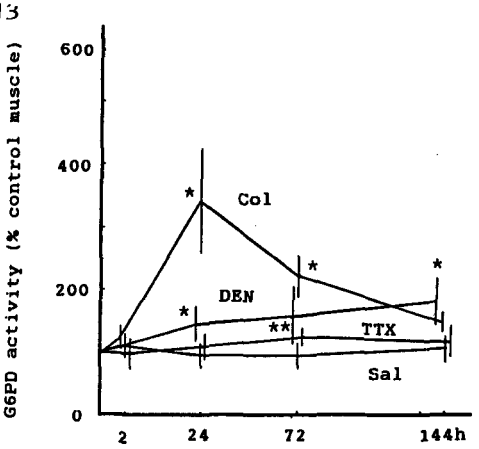



図1　ＧＳのLinewever-Burkの検討

図2　ＧＳ活性の経時的変化

M±SD　*:p<0.01, **:p<0.05 Sal との比較

図3　G6PD活性の経時的変化

# 134 カエル下垂体分泌顆粒の迅速分離法とペプチドの共存性

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〕

昨年の本学会において我々はウシ下垂体後葉より分離した分泌顆粒内には enkephalin(ENK)と oxytocin(OT) や vasopressin(VP) が存在し、直径100nm 以上の大型顆粒には Met-ENKとOTが共存することを確認し、このことが生化学的にどういう役割を演じているか報告した。今回は両生類の一種であるトノサマガエルの視床下部、下垂体を材料に分離用小型超遠心機を用いて少量かつ迅速に分泌顆粒の分離を試みた。その結果 percoll密度勾配遠心分離により大・小の分泌顆粒を分離し、直径約170nm の大型顆粒には、Met-ENK とmesotocin(MT) の共存を確認した。更にまたこの顆粒内のENK の動態について研究を行なった結果、この大型顆粒に含有されるMet-ENK は1.48ng/mg protein であった。またこの顆粒内への(3H) Met-ENKの取り込みはウシ下垂体後葉分泌顆粒の場合と同様に high $K^+$,$Mg^{++}$ 依存的であることが判明した。

下垂体後葉は神経分泌細胞軸索終末の集合体で、この終末には直径60-200nmの分泌顆粒を含む。カエルの軸索終末は顆粒の構造と大きさから３種類のタイプに分類することができる。即ち直径100-200nm の大型顆粒（Ａ）と、直径60-100nmの中間型顆粒（Ｂ）と、直径30-40nm の小型明小胞（Ｃ）である。塩田らは最近この平均直径約170nm の顆粒内にthyrotropin-releasing hormone(TRH)とmesotocin(MT) が共存すると報告している（２）。我々はpercoll により様々なサイズの分泌顆粒を分離した。ENK とMTやvasotocin(VT) の共存性、および分離分泌顆粒へのこれらのペプチドの取り込みについて検討した。

＜方法＞

トノサマガエル（15-25g）は断頭により屠殺後、下垂体、視床下部（30-35mg ）を取り出し20倍量の250mM Sucrose,10mM Hepes pH=7.4 にてhomogenizeし、 P2 画分を得る。このP2画分を70% percoll(Pharmacia Fine Chemicals Co.)の連続密度勾配により遠心分離を行なう。遠心は日立分離用小型超遠心機 CS120 型で、RP100AT4 ローターを使用し、50,000× g 20 分間の遠心を行なう。遠心後10-12 のフラクションに分け、分泌顆粒および細胞内成分の分離はRP100AT2 ローターで200,000 ×g 90分間の遠心後 percollの上層に集められた。 percollの密度の差によって集められた各フラクションは電顕により観察を行なうと共に、生化学的分析を行なった。電顕は２%グルタールアルデヒド固定に引き続き、オスミウム酸固定を行ない脱水、包埋を経て、超薄切片を作成し、酢酸ウラン、クエン酸鉛による染色後、観察した。また、各フラクションの percoll密度はmarker beadsを用いて測定した。分泌顆粒のタンパク量はTCA 処理後、Lowry 法で測定した（１）。分泌顆粒のMet-ENK の量はRIA 法により、 Met-ENK の取り込み機構は（3H)Met-ENKの測定で行なった（３）。

＜結果と考察＞

percoll密度勾配遠心により分離された分泌顆粒は marker beads (Pharmacia Fine Chemicals Co.)により各々の密度を測定した。その結果d(g/ml)=1.037 からd=1.138 の10のフラクションに分け、 d=1.138の部分に直径150-170nm の分泌顆粒が最も多く認められ、このフラクションを電顕で観察した結果インタクトな分泌顆粒が得られた（Fig. 1）。各々のフラクションのMet-ENK の含有量はRIA により測定した。この結果、大型の分泌顆粒分画に最も多くのMet-ENK が含有されていることが分かった。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 の抗体で包埋前PAP 法による免疫染色を行ない Epon-Aralditeに包埋した。その後、超薄切片作成後にMTと VT の抗体で包埋後金コロイド(IGS) 法に

より免疫染色を行ない同一超薄切片を電顕で観察した。この結果直径約170nm の分泌顆粒内にMet-ENK はMTと共存することが分かった(Fig 2) 。一方直径100nm のやや小さめの顆粒にはMet-ENK の存在は認められたがMTまたはVTの共存は認められなかった。以上のことよりカエル下垂体後葉神経分泌顆粒にはMet-ENK,TRH,MTのペプチドが２種類以上共存するものと、一つのペプチドしか含まないタイプのものがあると考えられる。各サイズの顆粒内へのMet-ENK の取込みについて検討した。その結果 Table 1に示すように２mM $MgCl_2$,150mM KCl, ５mM NaCl の存在下で100 μｇ各顆粒タンパクと5.5 $\times 10^{-8}$M (2.5μCi) の (3H)Met-ENKとの反応で最も密度の高い分画の顆粒に最大取り込み活性が認められた。

(1) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J. Bio. Chem. 193, 265

(2) Shioda, S., Nakai, Y., Iwai, C. and Sunayama, H. (1989) Neuroscience Letters 98, 25-28

(3) Takeda, F., Takeda, M., Shimada, A., Kuraoka, Y., Konno, K., Shioda, S. and Nakai, Y., (1988) 神経化学 27、354-355

Table 1

**[$^3$H]Met-ENK uptake on percoll fraction**

| fraction | density(g/ml) | f moles/mg protein/20min |
|---|---|---|
| 1 | 1.037 | 2.89 |
| 4 | 1.054 | 2.23 |
| 6 | 1.081 | 3.48 |
| 8 | 1.107 | 5.41 |
| 10 | 1.138 | 5.99 |



Fig 1 Percoll fraction of frog nerurohypophysis containing large granuler vesicle. (150-170nm diameter) Bar=1μm

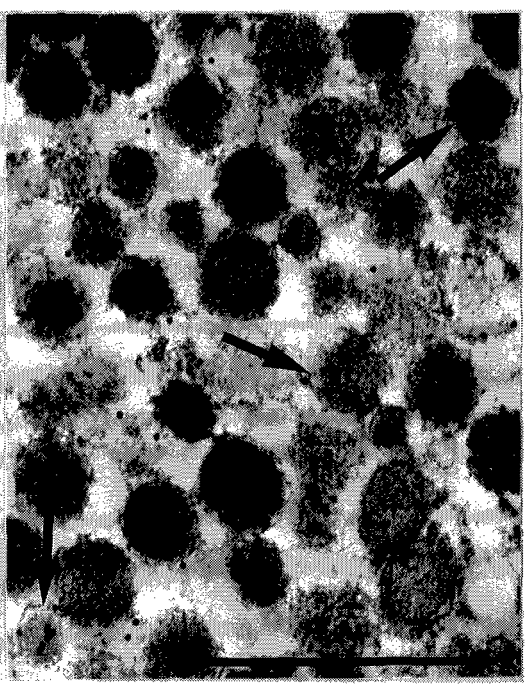


Fig 2 Double labeling pre-embedding PAP and post-embedding IGS immunocytochemistry Bar= 1 μm

# 135 神経損傷後の軸索内輸送変化と細胞骨格の変化

田代朋子・関本澄人・小宮義璋*
(東京大学医学部脳研究施設生化学、*群馬大学医学部分子病態)

〔要約〕

ラット坐骨神経に凍結損傷を加えた後、再生中の神経について、細胞骨格蛋白の輸送速度と溶解性を調べて、正常神経の場合と比較した。

1.損傷後、1-2 週の時点で、脊髄前角に L-[$^{35}$S]メチオニンを注入し、2 週間後に坐骨神経運動繊維内を移動中の標識細胞骨格蛋白を、低温下、1%Tritonに対する溶解性により、安定重合型とダイナミック型の二型に分別し、各々の速度分布を調べた。再生神経では、ダイナミック型の増加とこれを主体とする速度成分IIの加速が観察された。

2.放射標識 1週間後に損傷を加えた場合にも、ダイナミック型を主体とする速度成分IIの増加がみられた。細胞体で合成される細胞骨格蛋白の構成変化を反映する1.の変化に対して、2.の場合は既存の軸索細胞骨格の局所的再編成が可能であることを示しており、再生の初期過程に対応すると考えられる。

末梢神経では軸索損傷後、1-2 日の潜伏期間をおいて活発な再生が起こるが、その速度は細胞骨格蛋白の供給過程である遅い軸索内輸送に規定されている[4]。損傷部位で成長円錐が形成され細い軸索が伸長する初期過程は既存の細胞骨格の再編成によると考えられる。続いて、数週間にわたって細胞体におけるチューブリン、アクチンの合成量増加ニューロフィラメント(NF)蛋白の合成量低下が起こる[1,2,8]。このような過程を通じて軸索内輸送の変化と細胞骨格蛋白の変化の関連を追求することにより、輸送のメカニズムならびに細胞骨格調節機構の解明を試みた。軸索細胞骨格蛋白は、構造維持に重要な安定重合型と実際の輸送型と考えられるダイナミック型の二種の重合状態をとることが明らかになっている[5,7]。再生神経では、より速い速度で移動するダイナミック型が出現することにより、遅い輸送が加速される。

<方法> ラット(7週齢、雄)の脊髄前角$L_3$-$L_5$ に L-[$^{35}$S]メチオニン50μCi(0.2μl×2)を注入し、2週間後に坐骨神経を摘出して 6mmの連続切片にした。再生実験では、メチオニン注入の1-2 週間前あるいは1 週間後に、坐骨神経を大腿中央部で露出し、液体窒素で冷却した銅線を押し当て凍結損傷を加えた。チューブリンについては、各切片を凍結破砕後、1% Triton、50mM Tris(pH 7.5)、25mM KCl、1mM $MgCl_2$、5mM EGTA、5mMβ-メルカプトエタノール を含む抽出液でホモジェナイズし、0.25M 蔗糖に重層して67,000g、2時間遠心し、可溶性分画(S) と不溶性分画(P) に分別した。アクチンについては、凍結破砕切片を1%Tritonを含む$Ca^{2+}$緩衝液(20mM HEPES、pH 7.5、0.1M KCl、2mM $CaCl_2$、2mM $MgCl_2$、0.2mM ATP、0.2mM DTT、0.5mM ロイペプチン、0.25mM PMSF) でホモジェナイズし、100,000g、1時間遠心した。上清から DNase I-Sepharoseを用いたアフィニティ・クロマトグラフィーにより可溶性アクチンを得[3]、沈殿からEGTAにより、抽出分画(F)と沈殿(P) を得た。各分画中の標識蛋白を SDSゲル電気泳動分離した後、フルオログラフィーで検出すると共に、チューブリン、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> 軸索内輸送される細胞骨格蛋白には、図.1に示すように、低温下、1%Tritonに対する溶解性により、不溶性(P) の安定重合型と可溶性(S) のダイナミック型の二種の重合状態が区別される。正常神経では、遅い軸索内輸送は、安定重合型の大部分を含む最も遅い成分Ⅰ(1.5mm/ 日) とダイナミック型を主体とする成分II(3mm/ 日) の二つの速度成分から成る。坐骨神経運動繊維の系では、昨年本学会でも報告した通り[6,7]、時間経過とともに二成分への分離が観察されるが、本実験で用いた標識 2週間後

では、図.2にみられるように成分IIの分離が始まったばかりである。再生神経では、P分画、S分画ともに大幅な加速が観察されるが、内容的には、安定重合型の主ピークである成分Iの速度は変わらず、ダイナミック型が増加するとともに成分IIが加速していることが図.2および 3から明らかである。

軸索損傷の2-4 日後に細胞体では、NF蛋白の合成量低下およびチューブリン、アクチンの合成量増加が起こり、2 週間以上にわたって持続することが報告されている[1,2,8]。放射標識 1または 2週間前に損傷を加えた場合(-1w·2w または -2w·2w)の輸送変化は、このように合成される細胞骨格蛋白の構成が変化した結果と考えられる。一方、既に軸索内にある細胞骨格の変化を捉えるために、放射標識 1週間後に損傷を加えた場合 (+1w·2w)には、顕著な加速はみられないが、ダイナミック型を主体とする速度成分IIの増加が観察される。この結果は、軸索内で安定重合型→ダイナミック型の変換を伴う細胞骨格の再編成が起こることを示している。

再生時に加速される速度成分IIには、既知の細胞骨格蛋白以外に数種の蛋白が含まれる。これらの蛋白は、細胞骨格の調節あるいは輸送のメカニズムに直接関係すると考えられるので、その主要成分について細胞骨格との相互作用を中心に検索を進めている。

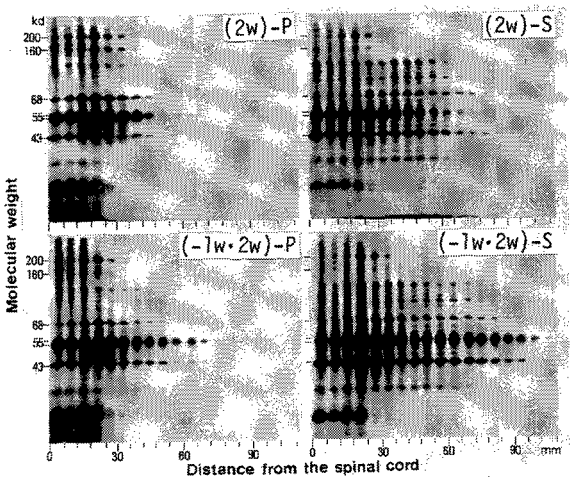



図.1 標識 2週間後の時点で正常(2w)、および標識 1週間前に凍結損傷を加えた再生神経(-1w·2w)内を輸送されている蛋白。
P：低温、Triton 不溶性分画。　S：可溶性分画。

＜文献＞ [1] Hoffman,P. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3472 [2] Hoffman,P. & Cleveland,D.W. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4530 [3] Hosoya,H. & Mabuchi,I. (1984) J.Cell Biol., 99, 994 [4]Komiya,Y. (1981) Exp. Neurol., 73, 824 [5]Komiya,Y. & Tashiro, T. (1988) Cell Motil. Cytoskel., 11, 151 [6]田代朋子、小宮義璋 (1988) 神経化学、27、182 [7] Tashiro, T. & Komiya, Y. (1989) J. Neurosci., 9, 760 [8] Tetzlaff, W. et al. (1988) J. Neurosci., 8, 3181

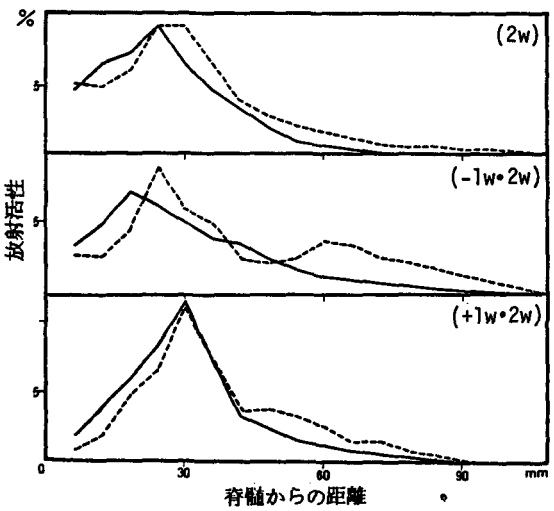



図.2 正常および再生神経における標識チューブリンの分布(標識 2週間後)。 (2w):正常。 (-1w·2w):標識 1週間前、(+1w·2w): 標識 1週間後の各時点で凍結損傷を加えた再生神経。 (———):低温、Triton 不溶性、(----):可溶性。

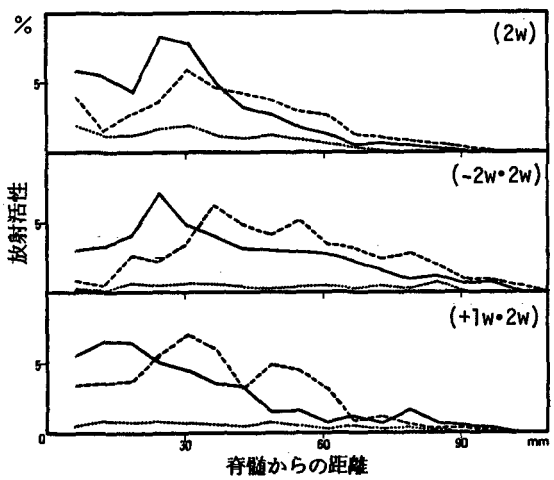



図.3 正常および再生神経における標識アクチンの分布。(2w):正常。 (-2w·2w):標識 2週間前、(+1w·2w): 標識 1週間後の各時点で損傷を加えた再生神経。 (----): 可溶性、(———):不溶性、(·····):EGTA抽出　分画中のアクチン。

# 136 ニューロフィラメント蛋白質のリン酸化と脊髄神経節における軸索内輸送

豊島　至*，小宮義璋**
（*秋田大学医学部第一内科，
**群馬大学医学部分子病態学）

〔要約〕

ラット脊髄神経節内に〔$^{32}$P〕リン酸を注入し，ニューロフィラメント蛋白質（ＮＦＰ）が神経細胞体から神経節内神経線維，末梢神経に移行する様態を検討した。

1.〔$^{32}$P〕リン酸は注入神経節内の細胞体，神経線維にとりこまれ，ＮＦＰのすべての成分が標識される。

2.ＮＦＰの高分子量成分（ＮＦＰ－Ｈ）の大部分は，神経節内神経線維の中で低リン酸成分から高リン酸成分に移行するが，一部は末梢神経に入ってからリン酸化が完成する。リン酸化は24時間で完了する。

3.神経細胞体から軸索への輸送は24時間でほぼ完了する。

4.末梢神経起始端にはＮＦＰ－Ｈの各成分のうち低リン酸成分が先に出現し，高リン酸成分より輸送速度がはやいことが示唆される。

ニューロフィラメント蛋白質は３成分からなり（ＮＦＰ－Ｈ，Ｍ，Ｌ），神経細胞体では無～低リン酸化で，軸索内で高リン酸化されることが知られている（1,4）。このリン酸化がどこでおこっているかについては研究者間で多少の見解の相違があるが，私達はすでに，細胞体でも一部は相当程度まで高リン酸化され，神経節内神経線維で進行し，heterogenousであることを報告した（7）。ＮＦＰのリン酸化が立体構造の変化をもたらすものと考えられているが（１），機能的意義は十分に理解されていない。軸索内輸送においては，Komiyaらが，〔$^{32}$P〕リン酸標識により〔$^{35}$S〕メチオニン標識よりも数倍速度のはやい成分を見出し，ＮＦＰの重合－脱重合変換による移動相形成モデルを提出している（2,3）。今回は，ＮＦＰの低リン酸成分と高リン酸成分の両者が観察可能な脊髄神経節とその近傍を用いて検討した。

〔材料と方法〕

７週齢雄ラットの第４，５腰髄の脊髄神経節に〔$^{32}$P〕－オルトリン酸を注入し，２・４・２４時間後にとり出し，OCT conpoundに埋め液体窒素で凍結した。25μm厚の凍結乾燥切片を作製し，神経細胞体が稠密に集まっている部分（以下“細胞体”），神経節内神経線維，末梢神経の起始端をそれぞれ15μgずつ切り出した。試料はO'Farrellの二次元電気泳動（5）を行ない，ニトロセルロース膜にブロットした。ラジオオートグラムを得たのちに，抗ＮＦＰ－Ｈモノクローナル抗体（３Ａ８）で免疫染色した。３Ａ８は，ＮＦＰ－Ｈの全成分に対し均等に反応する（７）。〔$^{35}$S〕メチオニンでも同様に標識した。

〔結果〕

〔$^{32}$P〕ラジオオートグラムでは，注入後２時間でラット脊髄神経節の“細胞体”と神経節内神経線維のＮＦＰの３成分のすべてが〔$^{32}$P〕をとりこんでいることが明かであった（図1a，b）。“細胞体”では二次元イムノブロット上でＳ字状をしたＮＦＰ－Ｈの低リン酸成分（図2a）にほぼ均等に標識が入り，神経節内神経線維にもこの成分が認められた。末梢神経起始端では標識がわずかであるが，イムノブロットでは明らかでないＮＦＰ－Ｈの低リン酸部分が明らかに見られた（図1c，2c）。

８時間後では，“細胞体”成分は同様であるが，神経節内神経線維ではＮＦＰ－Ｈの標識部分が高リン酸側に移動している（図1d，e）。末梢神経起始部では，２時間後で明らかでない高リン酸部分が強く標識されているが，イムノブロットで検出されない低リン酸成分が残存していた（図1f，2f）。

24時間後では“細胞体”の標識は３成分とも少なくなり，神経節内神経線維と末梢神経起始端では大部分が高リン酸成分となっているのが観察された（図1g,h,i）。

〔考察〕

“細胞体”での標識は24時間後で３成分とも不明瞭になったが，この間に神経細胞体から軸索へのＮＦＰの輸送は完了

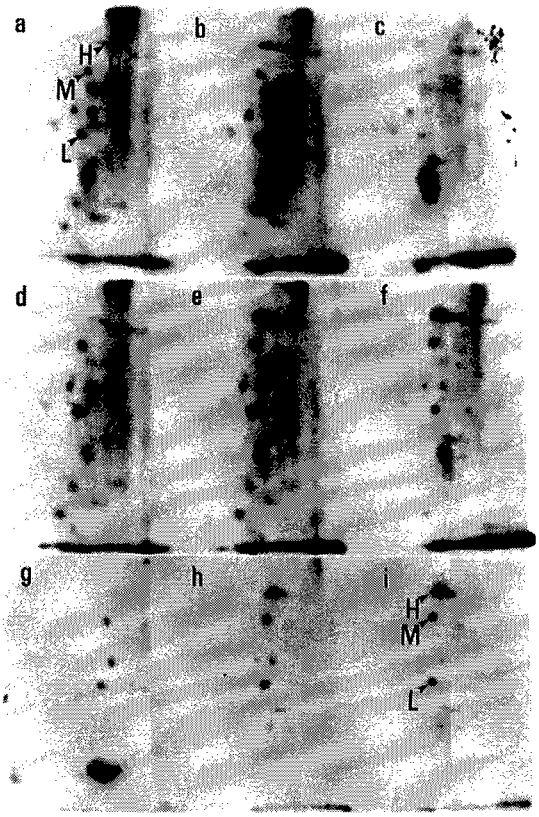



図1．〔$^{32}$P〕オートラジオグラム
二次元電気泳動後ニトロセルロースにブロット．
a-c:２時間後，d-f:８時間後，g-i:２４時間後．
a,d,g:”細胞体”，b,e,h:神経節内神経線維，
c,f,i:末梢神経起始端．２－Dの左側が酸性．

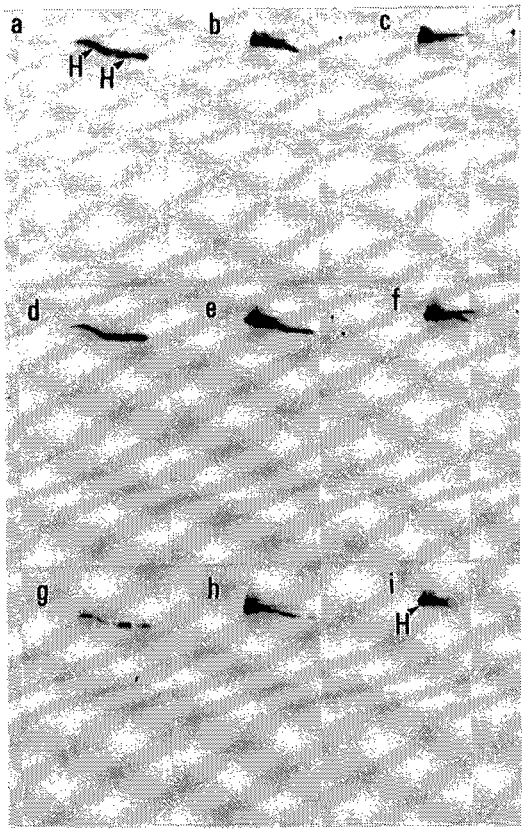



図2．抗ＮＦＰ抗体によるイムノブロット
a-c:２時間後，d-f:８時間後，g-i:２４時間後．
a,d,g:”細胞体”，b,e,h:神経節内神経線維，
c,f,i:末梢神経起始端

するものと考えられる。これは〔$^{35}$S〕メチオニン標識での結果よりも早いが，リン酸標識が，より短時間のラベルとして働くためと考えられる。神経節内神経線維では，ＮＦＰ－Ｈのイムノブロットがほぼ同一であるにもかかわらず，時間がたつにしたがい，高リン酸部分に標識があつまり，主にこの部分でＮＦＰ－Ｈのリン酸化が進行するものと思われる。同様のことが末梢神経起始端でも観察されるが，イムノブロットでみると，この部では，低リン酸成分は少なく，細胞体とそれに近接した部分で生じた低リン酸ＮＦＰ－Ｈの成分が，高リン酸成分に比しはやい速度で輸送されたことを示唆している。この点に関しては，今後，より詳細な検討が必要である。

〔文献〕

1.Carden MJ et al (1985) J Biol Chem 260, 9805-9817. 2.Komiya Y et al (1986) Biomedical Res 7, 345-348.
3.Komiya Y et al (1986) Biomedical Res 7, 359-363. 4.Oblinger MM (1987) J Neurosci 7, 2510-2521.
5.O'Farrell PH (1975) J Biol Chem 259, 4007-4021.
6.Sternberger LA and Sternberger NH (1983) Proc Natl Acad Sci USA 8, 6126-6130.
7.Toyoshima I et al (1988) Neurochem Res 13, 621-624.

# 137 ラット脳ライソゾームの安定性に対するＡＴＰの関与

中村　祐、武田　雅俊、多田　國利、森田　仁、
播口　之朗、西村　健
（大阪大医学部精神医学教室）

〔要約〕

ラット脳より部分的に精製したライソゾーム分画を用いてライソゾームの安定性に対するＡＴＰの作用を検討した。カテプシンＤなどのライソゾームマトリックス酵素を指標としてライソゾームの安定性を測定したところ、ＡＴＰの濃度依存性にライソゾーム酵素の漏出抑制が見られ、ＡＴＰが消費されてしまうとその効果が失われることが見られた。また、ＡＴＰを追加するとその漏出抑制効果の持続もみられ、ライソゾームの安定性はＡＴＰに大きく依存している可能性が示唆された。また、ＡＴＰのライソゾーム酵素漏出抑制作用作用は10mMのＥＤＴＡ、アルミニウムによりＡＴＰの分解を抑制すると阻害され、その作用にＡＴＰが分解されることが必要であることが示唆された。

我々はこれまでに老齢ラット脳において著しくライソゾームの安定性が低下していることを報告し[1]、またライソゾーム蛋白分解酵素であるカテプシンＤが神経細胞骨格であるニューロフィラメントを速やかに分解することを報告してきた[2]。また、虚血ラット脳においてもライソゾームの安定性の低下を示唆する報告もあり[3]、神経細胞の障害脱落にライソゾームの安定性の低下、ライソゾーム酵素の漏出が関与していることが考えられる。これらのことから、ライソゾームの安定性に寄与する可能性のある要素の一つとして、ＡＴＰの作用についてラット脳より部分精製したライソゾーム分画を用いて検討したので報告する。

［材料と方法］

1：粗ライソゾーム分画（以下ＬＭ分画）の調整：月齢２ヶ月のウイスターラットを無麻酔下で断頭、速やかに大脳組織（頭頂、側頭葉）を取り出す。３倍量（V/W）の0.25M sucrose/ 0.2M KCl/ 1mM EDTA溶液を加え、Teflon-glass homogenizerにて緩徐にホモジェナイズを行い、650g、10分間遠心し、更にその粗上清を10,000g、20分間遠心した沈査をＬＭ（lysosomal -mitochidrial）分画とした。ＬＭ分画は沈査を粗上清の1/5量の0.25M sucrose/ 0.2M KCl/ 20mM MOPS･KOH(pH 7.4)（以下buffer A）に懸濁したものを用いた[1]。

2：ライソゾームの安定性の測定：各条件にてincubationの後、12,000g、20分間遠心し、上清に含まれるカテプシンＤ、β-グルクロニダーゼの活性を0.1% Triton X-100にてincubationした場合を100%として表示し安定性の指標とした（% of Triton X-100 release）[1]。

3：ＡＴＰの安定性に対する作用：ＬＭ分画を1μg/ml oligomycin/ 1mM ouabain/ 10μg/ml leupeptin/ 0.5mM EGTA/ 2mM $MgCl_2$/ buffer Aにて、ＡＴＰ（0,1,4,8 mM）存在下で300分間incubationを行い、ライソゾームの安定性の経時推移を測定した[1,4]。また、ＡＴＰの消費をinorganic Pとして同時に測定した[5]。

［結果］

まず部分精製したＬＭ分画においてＡＴＰの作用を調べるために混入しているミトコンドリアの影響など実験条件について検討を加えた。5mM 2-deoxy glucose/ 1mM $NaN_3$をincubationのbufferに加えてもＡＴＰの有無に関わらず、ライソゾームの安定性、ＡＴＰの消費に影響は見られなかった。また、ミトコンドリアに含まれるmagnesium ATPase活性はＬＭ分画全体の約40%を占めるためにその活性を抑えるために1μg/ml oligomycinをincubation bufferに加えることとした。次に細胞質膜の混入に関しては、1mM ouabainにて阻害されるATPase活性が約10%あるために1mM ouabainをincubation bufferに加えた。oligomycin, ouabainともにライソゾームの安定性に対しては直接影響を与えないことを確認した。ライソゾーム、ミトコンドリア膜には相当量のCa-Mg ATPaseが存在するためにホモジェナイズを行う際にEDTAを加え，incubation bufferには0.5mM EGTAを加えた。また、ライソゾームに含まれるneutral protease群により測定する酵素の分解されるのを止めるために1μg/ml leupeptinを加え、これによって90分間で約10%の活性の喪失を阻止した。

以上の結果より、方法に示すincubation条件にてＬＭ分画に含まれるライソゾームに対するＡＴＰの作用の経時推移を調べた（図１）。100分まではＡＴＰの濃度依存性にカテプシンＤ、β-グルクロニダーゼの漏出の抑制が見られたが、100分以後では時間当りの漏出の程度に大きな違いはないように観察された。ＡＴＰ消費の経時推移をinorganic Pで測定したところ、100分までにほとんどのＡＴＰが消費されていることが観察された。次にＡＴＰを0分に4mM添加す

る場合と0分に2mM、100分に2mMと分割して添加する場合について検討した（図２）。200分で見ると分割添加した場合、明らかなカテプシンＤの漏出抑制がみられにも関わらず、ＡＴＰの消費量では差は見られなっかた。これらの結果よりライソゾームの安定性の維持にはＡＴＰが必要であるが、消費されてしまうとその作用は失われてしまうために安定性を保つためには一定量のＡＴＰが存在していることが必要であると考えられる。

次にＡＴＰの作用機序について方法３の実験条件にて検討した。ＡＴＰ存在下ではoligomycin, ouabainともＡＴＰによる安定化作用を阻害せず、また100μM quercetinもATPase活性を40%低下させるだけであった。ＡＴＰ添加による安定化作用は10mM EDTAをbufferに加えた場合失われ、またＡＴＰをモル比で１：１の塩化アルミニウムを反応させた後添加した場合も失われた。両方の場合ともＡＴＰの消費は殆ど見られず、ＡＴＰの作用はＡＴＰが分解されことが必要であり、ATPaseを介する作用である可能性が示唆された。

［考察］

今回、ラット脳より部分精製したライソゾーム分画にてＡＴＰの作用について検討した。先ず、ＡＴＰの添加実験によってライソゾームの安定性が大きくＡＴＰに依存しており、しかも消費されてしまうとその作用が失われてしまうために安定性を維持するためにはＡＴＰが存在している必要のあることが示唆された。ライソゾーム膜に存在するATPaseはMg-ATPaseとCa-Mg-ATPaseが大部分であるといわれており[4]、今回の実験系ではカルシウムを除いているため仮にATPase系が関与すると考えるとMg-ATPaseが関与する可能性が考えられる。実際、EDTA添加によりＡＴＰの作用が失われることからもその関与が示唆される。Mg-ATPaseはライソゾームのproton pumpであると報告されており内部の酸性化に働いていると考えられている[6]。酸性buffer（pH5.0付近）ではＡＴＰが存在しなくてもライソゾームは安定に保たれることからライソゾームの安定化にMg-ATPaseが関与している可能性があると考えられる。


［参考文献］

1]Nakamura Y, Takeda M, Suzuki H, et al.(1989) Neurosci.Lett.97:215-220

2]Suzuki H, Takeda M, Nakamura Y, et al.(1988) Neurosci.Lett.89:240-245

3]Nagarajan S, Deepa R, et al.(1988)Neurochem.Res. 13:193-201

4]Schneider DL.(1977) J.Membrane Biol. 34:247-261

5]Schneider DL.(1979) Biochim.Biophys.Res.Commun. 87:559-565

6]Ohkuma S, Poole B.(1978) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:3327-3331


図１：ＡＴＰ添加によるライソゾーム酵素漏出及びＡＴＰ消費の時間推移

（A：カテプシンD、B：β-グルクロニダーゼ、C：inorganic P）

－●－：０mM

－○－：１mM

－△－：４mM

－□－：８mM ＡＴＰ

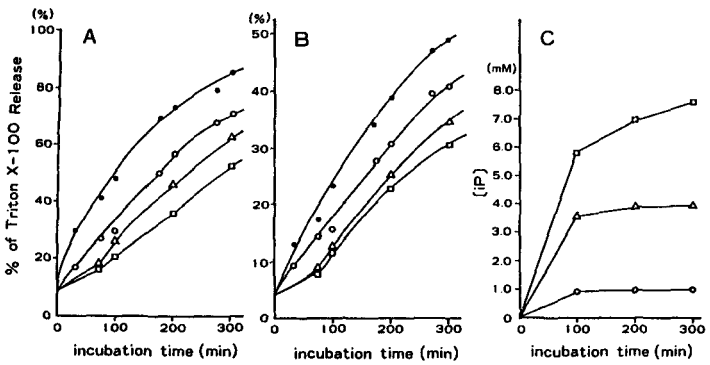


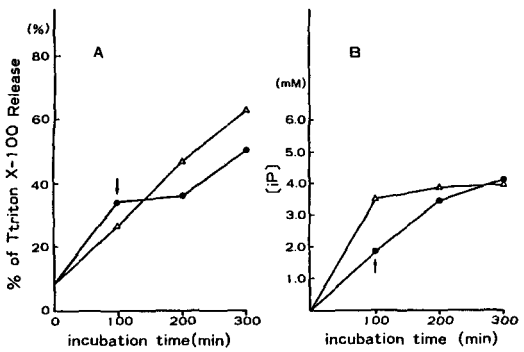

図２：ＡＴＰ分割添加によるカテプシンＤ及びＡＴＰ消費の時間推移

（A：カテプシンD、B：inorganic P）

－●－：２mM（0分）＋２mM（100分）ＡＴＰ

－△－：４mM（0分）ＡＴＰ

矢印：追加投与を示す。



# 138 蛍光共鳴重合度測定法による グリア線維酸性蛋白の動態の検討

中村 祐、武田 雅俊、Angelides K.J.*、多田 國利、
田中 稔久、播口 之朗、西村 健
（大阪大・医・精神、ベイラー医大・生理*）

〔要約〕
グリア線維酸性蛋白（以下ＧＦＡＰ）の動態をfluorescein-maleimideによりＧＦＡＰの持つ唯一のＣｙｓ残基を蛍光標識することにより検討した。標識ＧＦＡＰは、非標識ＧＦＡＰと比較して線維形態、重合状態について差異を認めなっかた。標識ＧＦＡＰを再構成し、非標識再構成ＧＦＡＰと混合することによりその蛍光quenchingの変化を測定し、その変化より再構成ＧＦＡＰにおいてサブユニットの交換が行われていることを示した。先に報告したニューロフィラメントと同じくＧＦＡＰもまた動的な平衡状態にあると考えれる。

中間径線維の機能、役割は、最近注目されている問題の一つである。中間径線維は、各々の細胞に特徴的な単位サブユニット蛋白から構成される径10nmの線維であるが、その動的状態についての解析は困難であった。我々は、これまでにニューロフィラメントをfluorescein-maleimideにより蛍光標識することにより動的状態について解析を試みてきた[1,2]。重合した状態の蛍光標識したニューロフィラメントサブユニット蛋白の蛍光強度を脱重合した基本サブユニットの蛍光強度と比較すると、self-quenchingのために著しく蛍光強度が低下しており、ニューロフィラメントサブユニットの重合の程度をfluoresceinのself-quenchingの程度により測定することが可能となった。この蛍光共鳴重合度測定法を用い、重合した状態の標識、非標識ニューロフィラメント蛋白を混合することにより、その蛍光強度の経時的な上昇からニューロフィラメント蛋白が重合-脱重合を繰り返している動的平衡状態にあることを示した。今回我々は、中間径線維の一つであるグリア線維性酸性蛋白（以下ＧＦＡＰ）もまたＣｙｓ残基を一つしか有しないのを利用し、ＳＨ基を修飾するfluorescein-maleimideによりＧＦＡＰを蛍光標識し、蛍光光学的にダイナミクスを検討したので報告する。

［方法］

１：蛍光標識したＧＦＡＰの精製：牛脊髄から徳武らの方法により精製した粗中間径線維分画を尿素で可溶化し、ＤＥ５２クロマトによりＧＦＡＰを精製した。尿素に溶解しているＧＦＡＰに10倍量の分子比となるようにdimethylsulfoxideに溶解したfluorescein-maleimideを加え、室温にて２時間反応させた。1mM DTTを加え反応を停止た後、Sephacryl S-200(φ1x30 cm)にて蛍光標識されたＧＦＡＰを精製した。

２：ＧＦＡＰ線維の再構成：尿素に溶解している精製ＧＦＡＰを４℃にて1mM EGTA/ 5mM Tris·HCl(pH7.5)に対して一晩透析を行い、1/4量の0.5M imidazole·HCl/ 5mM EGTA(pH7.1)を加え、30℃にて再構成した。再構成線維はuranyl acetateにてnegative染色、電顕にて観察し、10nm線維を形成していることを確認した。

３：蛍光エネルギー共鳴（fluorescein self-quenching）に基づいたサブユニット置換の測定：蛍光標識した再構成ＧＦＡＰと非標識再構成ＧＦＡＰを１：９の割合で混合し、30℃下で蛍光強度の変化を測定した。蛍光測定は、495nmの励起光にて520nmの蛍光強度をＦ３０００（日立）蛍光分光計にて測定した。また、蛍光強度の変化が平衡に達した後、1/10量の11%SDS溶液を加え蛍光強度を測定した。

［結果］

１：再構成ＧＦＡＰの形態：30℃ 1時間のインキュベーションにより図１に示すほぼ均一な径の10nm線維が電顕上、negative染色にて観察された。また、1%SDS存在下では線維形態は全くみられなかった。

２：蛍光標識したＧＦＡＰの性質：ＧＦＡＰ中の唯一つのＣｙｓ残基のＳＨ基を標識するためにmeleimide誘導体を用い、この標識反応はN-ethylmaleimideにて阻害された。蛍光標識はSDS-PAGE電気泳動にてＧＦＡＰに蛍光のあることを確認した。標識率は1%SDS存在下で蛍光強度から計算したところモル比では95%以上であった。標識した再構成ＧＦＡＰは電顕観察上、非標識ＧＦＡＰと形態上区別できなかった。更に、両者を12,000ｇ、20分間遠心しSDS-PAGE電気泳動にて上清、沈査を調べたが差異はなかった（図２）。また、 fluorescein-GFAPの最大吸光・最大蛍光波長は495nm/520nmであった。

３：サブユニットの交換：標識ＧＦＡＰを非標識ＧＦＡＰと混合した後の蛍光強度は、図３に

示すように直後より次第に増加し、fluoresceinのself-quenchingの解除が認められ、サブユニットの交換が行われていることが示唆された。尚、標識ＧＦＡＰを９倍量の再構成bufferと混合した場合は、蛍光強度の増加は見られなかった。また、標識ＧＦＡＰと非標識ＧＦＡＰを混合しても形態、遠心で見た場合の重合状態には変化が無かった。

［考察］

fluorescein-maleimideにてＳＨ基を修飾することはＧＦＡＰの線維形態、重合状態に影響を与えないと考えらる。この蛍光標識したＧＦＡＰを用いたin vitroのサブユニット交換実験の結果は、先にニューロフィラメントにおいて報告した結果と同様のものであると考えられ、ＧＦＡＰは重合条件において線維の形態をとりながらも動的な平衡状態にあると考えられる。ＧＦＡＰと分子量など性格の似ているvimentinやdesminなど他の中間径線維について、また種々の状態における中間径線維についても蛍光共鳴重合度測定法を用いてダイナミックスを検討することが可能であると考えられ、中間径線維の機能、役割を検討していく上で有用な方法であると考えられる。

［参考文献］

1]武田　雅俊、Angelides KJ、中村　祐、神経化学(1987)26,268-270

2]Angelides KJ, Smith KE, Takeda M, J.Cell Biol.(1989),108,1495-1506

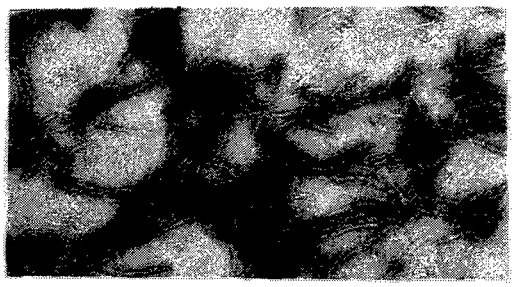


図１：再構成ＧＦＡＰのnegative染色像
（48,000倍、600μg/ml、pH7.1、30℃）

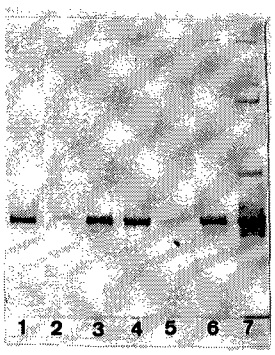



図２：SDS-PAGE（7.5%）電気泳動
lane 1:再構成非標識ＧＦＡＰ（2.4μg/lane）
2:1の12,000g上清
3:1の12,000g沈査
4:再構成標識ＧＦＡＰ（2.4μg/lane）
5:1の12,000g上清
6:1の12,000g沈査
7:粗中間径線維分画

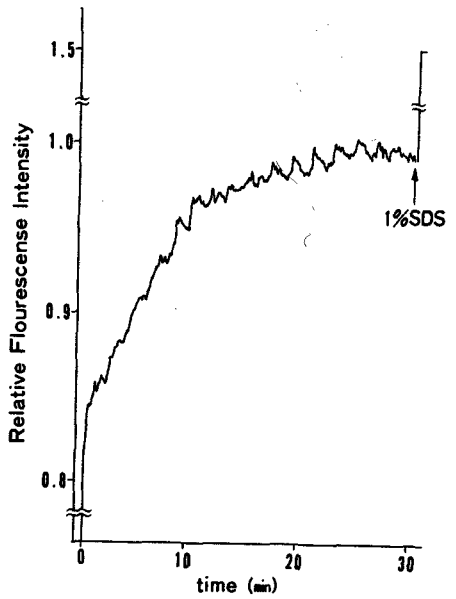



図３：標識、非標識再構成ＧＦＡＰの混合後の蛍光強度の変化
（Ex495nm、Em520nm、30℃）

# 139 抗ω－コノトキシンレセプター抗体の作製

高橋正身、藤本禎子
（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－Ｎ１）はニワトリ脳より可溶化したω－コノトキシンレセプターを容量依存的に免疫沈降させたがジヒドロピリジンレセプターはまったく免疫沈降しなかった。イムノブロット法によってＭＡＣ－Ｎ１の結合タンパク質を調べると分子量５８ｋＤａのバンドが強く染色され、この他に分子量１３５ｋＤａ及び４１ｋＤａのバンドが弱く染色された。これらの分子量の値は電気泳動を還元条件下で行っても変化しなかった。ＭＡＣ－Ｎ１はラット及びウサギに対しても交叉性を示しイムノブロットによって分子量５８ｋＤａの成分が同定された。

【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[1]，それらの分子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Ｌ型Ｃａチャンネルに対するモノクローナル抗体（ＭＡＣ－Ｌ１）を作成し、ニワトリの脳及び心筋のＬ型Ｃａチャンネルにも骨格筋Ｃａチャンネルの$\alpha_1$及び$\alpha_2$と相同のサブユニットが存在することを明らかにした[2]。今回我々はＮ型Ｃａチャンネルに対するモノクローナル抗体を得るため、Ｎ型チャンネルに作用するω－コノトキシンの結合活性を指標としてその作成を試みた。

【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トと共に繰り返し腹腔内投与しＳＪＬマウスを免疫した．抗体価の測定は［$^{125}$Ｉ］ω－コノトキシンで標識し、可溶化したニワトリ脳のω－コノトキシン受容体を用いたラジオイムノアッセイ法で行った。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。抗体産生細胞を限界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。イム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－Ｎ１）のタイプはＨ鎖が$G_{2a}$，Ｌ鎖はκであった。図１に示すようにＭＡＣ－Ｎ１は可溶化したニワトリ脳のω－コノトキシンレセプターを容量依存的に免疫沈降させたが、ジヒドロピリジンレセプターは認識せず用いた最多量の抗体濃度でも［$^{3}$Ｈ］ＰＮ２００－１１０で標識したレセプターの有意な沈降は認められなかった。

イムノブロット法によってヒヨコ脳シナプス膜標品中のＭＡＣ－Ｎ１結合タンパク質を同定すると図２Ａに示すように分子量５８ｋＤａのバンドが強く染色され、この他に分子量１３５ｋＤ及び４１ｋＤａのバンドが弱く染色された。Ｌ型Ｃａチャンネルの$\alpha_2$サブユニットの分子量は還元すると大きく減少するのに対し、これらのバンドの分子量は還元、非還元で差が認められなかった。ＭＡＣ－Ｎ１は哺乳動物に対しても交差反応性を示し図２Ｂに示すようにウサギ及びラットの脳で分子量５８ｋＤａのバンドに反応性が認められた。

光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた免疫組織化学的研究からＭＡＣ－Ｎ１で認識される部位は中枢神経系や末梢神経系の前シナプス部に局在している事が明らかにされている[3,4]。ＭＡＣ－Ｎ１は今後Ｎ型Ｃａチャンネルと

考えられているω－コノトキシンレセプターの分子構造の解明に役立つものと期待される。

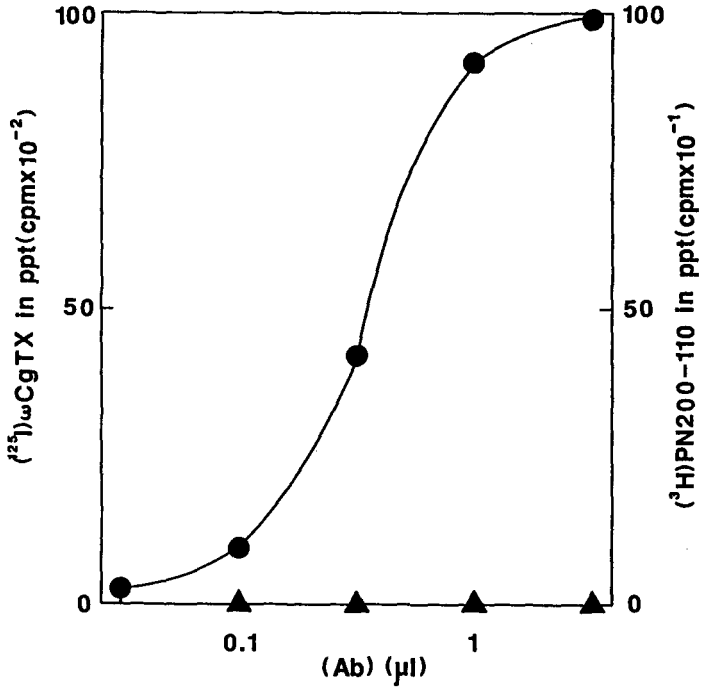



図１．　ＭＡＣ－Ｎ１とヒヨコ脳のωコノトキシン及びジヒドロピリジンレセプターとの交叉性。可溶化した［$^{125}$Ｉ］ω－コノトキシン（●）及び［$^{3}$Ｈ］ＰＮ２００－１１０（▲）レセプターを様々の量のＭＡＣ－Ｎ１と反応させ、形成した抗原抗体複合体をプロティンＡセファロースに吸着させ、沈澱する放射活性を計測した。

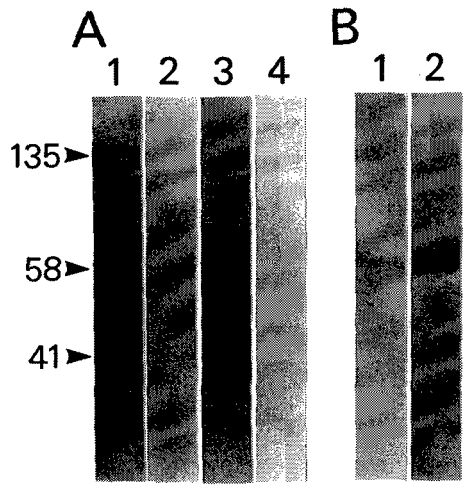



図２．　イムノブロット法によるＭＡＣ－Ｎ１結合ポリペプチドの同定。　Ａ；ヒヨコ脳シナプス膜タンパク質を非還元（１、２）及び還元条件下（３、４）でＳＤＳ電気泳動によって分離し、ニトロセルロース膜上に写し取った後，ＭＡＣ－Ｎ１（１、３）或は非免疫マウスから得たＩｇＧ（２、４）で免疫染色した。　Ｂ；ウサギ（１）またはラット（２）脳シナプス膜タンパク質を用いたイムノブロット。

【文献】

(1) Tsien,R.W.,Lipscombe,D.,Madison,D.V.,Bley,K.R. and Fox,A.P.(1988)TINS,11,431-438

(2)高橋正身(1988)神経化学、27、330-331

(3)有松靖温ら(1989)神経化学

(4)藤田　忍ら(1989)神経化学

# 140 ω－コノトキシン レセプターの組織化学的分布

藤田　忍、藤本禎子、高橋正身
（三菱化成生命研　脳神経化学）

〔要約〕
N型Caチャンネルの構成成分を特異的に認識していると考えられるモノクローナル抗体 MAC－N1を用い、蛍光抗体法によって ヒヨコ中枢神経系および末梢臓器を組織化学的に検索した。 中枢神経系組織において、顆粒状を呈する免疫活性はニューロピル領域と一致した分布を示した。 末梢においては、交感神経節が密な顆粒状に染色され、骨格筋終板が強く染まった。 血管と腸管の平滑筋では、バリコースな繊維が染色された。 したがって抗体MAC－N1はニューロンの神経伝達物質が放出される部位に局在する分子に結合すると考えられた。

電位依存性Caチャンネルには、電気生理学的にL，T，N型の三種があると考えられているが、N型Caチャンネルは神経細胞に存在して神経情報の伝達に関与しているとされている（1）。 高橋らにより得られた抗体 MAC－N1はω-コノトキシン結合サイトを特異的に免疫沈降させ、またイムノブロットにより分子量58KDaの主バンドが検出される（2）。 そこで この抗原分子の組織内分布を光学顕微鏡レベルで調べる必要が生じた。 今回は まずヒヨコの中枢神経系と末梢組織において検索を行った。

［方法］ 生後2日のヒヨコを4％パラホルムアルデヒドをふくむ 0.1M燐酸バッファーで灌流固定後、各組織をとり出し一晩同固定液で固定後 20％ショ糖／PBSに沈めた後、13μmの凍結切片として、間接蛍光抗体法によって MAC－N1の結合分布を顕微鏡下に調べた。 MAC－N1は培養上清より精製したものを 10μg／ml で用いた。 フルオレセインまたはローダミン標識抗マウスIgG（H＋L）（Cappel）は 50倍希釈でもちいた。 フルオレセイン標識αブンガロトキシン（Sigma）は 10μg／mlでもちいた。

［結果と考察］ 小脳においては、分子層と顆粒細胞層の小脳糸球が強く染色されたが、白質は陰性であった。 プルキンエ細胞は細胞体周囲に細顆粒状の反応が認められた（図1）。 網膜では内網状層と外網状層が強く染色された（図2）。 視蓋では、最外層の視神経繊維層と出力繊維層（SAC）の間の皮質ニューロピルが強く染色された。 脊髄では灰白質と、白質へ放射状に陥入するニューロンの突起と考えられる構造が陽性であった。 前角の大型ニューロンの細胞体内は染まらず、その周囲とニューロピル中に顆粒状の陽性構造が見られた（図3）。

脊髄神経節ではほとんど陽性構造がなく、ごく少数のニューロンの細胞質に弱い反応がみとめられたのみであったが、交感神経節は強く染色された。 骨格筋中では、終板部と少数のバリコースな繊維、および血管壁の繊維が陽性であったが、太い神経繊維の束は陰性であった。 腸管では、粘膜下神経叢と筋層間神経叢及び筋肉中を走行する神経繊維がバリコースに染色された。 肝臓では、血管壁の神経繊維のみが陽性であった。 皮膚では、表皮直下のバリコースな繊維と、立毛筋中の神経繊維が陽性であった。

マウス、ラット、ウサギ、ネコ、およびサルの中枢神経系においても、MAC－N1による強い染色がみられ、免疫活性の分布はシナプスの分布と対応した。

以上より MAC－N1陽性構造は、中枢神経系においてはシナプスの分布と一致し、末梢においては シナプス及び自律神経繊維等の終末部の分布と一致すると結論できる。この結果は有松らによる免疫電顕での観察と よく対応する（3）。このことは、本抗体の認識する分子がニューロンからの神経伝達物質の放出に関係した機能を持つことを示唆している。

［文献］1 Tsien, R. W., et al., Trends Neurosci. 11, 431-438 (1988). 2 高橋正身ら，本大会論文集. 3 有松靖温ら、本大会論文集.

図1　ヒヨコ小脳皮質断面におけるＭＡＣ－Ｎ１の免疫染色（Ａ）。Ｂはミエローマ上清によるネガティブコントロール。　ｍ：分子層、ｐ：プルキンエ細胞層、ｇ：顆粒細胞層、ｗ：白質。　矢状断。スケール＝100μｍ。

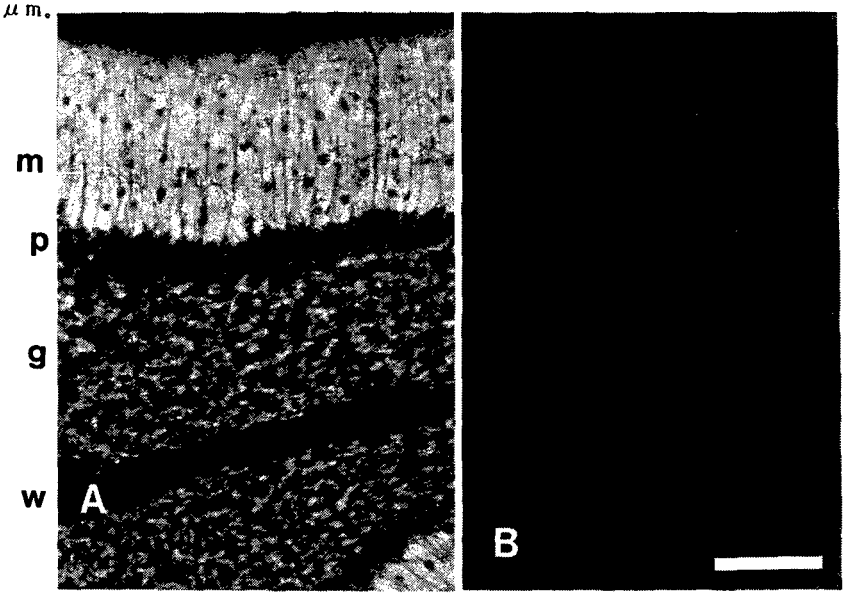



図2　ヒヨコ網膜におけるＭＡＣ－Ｎ１の免疫染色。　Ａは抗体８Ｃ５による核染色，Ｃはネガティブコントロール。　硝子体側下方。　ＩＰＬ：内網状層，ＯＰＬ：外網状層。　スケール＝100μｍ。

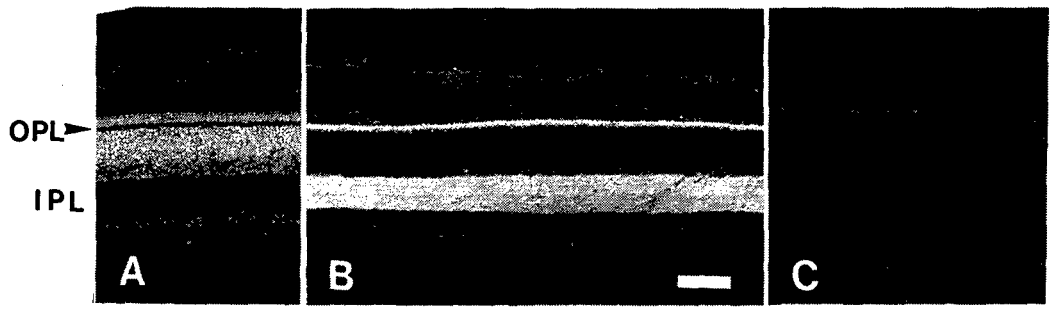
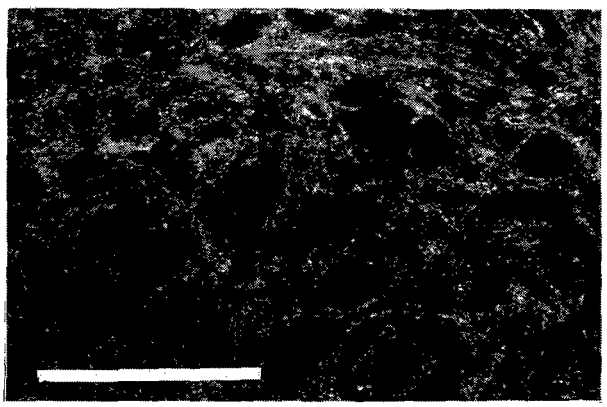



図3　ヒヨコ腰部脊髄前角におけるＭＡＣ－Ｎ１の免疫染色。　運動ニューロン細胞体内部が染色されない。　スケール＝100μｍ。



# 141 ω－コノトキシンレセプターの細胞内局在

有松靖温、近藤俊三、宮本真美、藤本禎子、
高橋正身
（三菱化成生命研）

〔要約〕
N型Caチャンネル本体もしくはそれと密接に関連している蛋白性の抗原に対するモノクローナル抗体MAC－N1を用い、その抗原部位の細胞内局在を、in vivo と in vitro で調べた。HRP標識プロテインAを用いた免疫電顕で検索すると、ラット小脳においては、MAC－N1免疫活性は、前シナプス側の細胞膜構造に斑状に存在した。後シナプス側の樹状突起や細胞体の細胞膜は陰性であった。培養ラット大脳皮質ニューロンのMAC－N1免疫蛍光を調べると、細胞突起に斑状に活性が認められた。また、成長円錐や、細胞核近傍の細胞質にも強い活性が認められた。これらの免疫蛍光は、MAC－N1抗体を生きた培養細胞に作用させたときには認められないので、MAC－N1によって認識されるエピトープは細胞膜の内側に存在すると考えられた。

われわれは、ω－コノトキシン（N型とL型Caチャンネルの拮抗薬）に結合する蛋白性の成分を特異的に免疫沈降させるが、ジヒドロピリジン（L型Caチャンネルの拮抗薬）の結合部位は沈降させないモノクローナル抗体MAC－N1を作製した（1）。ついで、MAC－N1抗原の神経組織内分布を検索した結果、シナプス密度の高い部域に多く存在することが判明した（2）。そこでこのMAC－N1免疫活性の細胞内局在をin vivo と in vitro で調べた。

【方法】

I）46日令ラットの小脳を2%グルタルアルデヒド、2%パラホルムアルデヒドを含む溶液で灌流固定した。さらに4%パラホルムアルデヒドで7時間浸漬固定後、25%ショ糖加PBSに沈め、液体窒素で凍結融解した。厚さ50μmのビブラトーム切片を1%水素化ホウ素ナトリウムで処理し、MAC－N1抗体（10μg／ml）を作用させた。結合した抗体にプロテインA結合HRPを作用させ、ジアミノベンチジンと過酸化水素で発色させた。1%オスミック酸で後固定した後、通常の方法で超薄切片を作製し、ウラニウム染色の後、透過型電子顕微鏡で観察した。

II）4日令ラットの大脳皮質を切り出して、パパインで神経細胞を分散し、予めプラスティック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播種した。1～11日間培養を続けた後、4%パラホルムアルデヒド、0．05%グルタルアルデヒド、0．2%ピクリン酸混液で固定し、間接蛍光抗体法でMAC－N1抗原の発現部位を検索した。用いたMAC－N1抗体およびローダミン標識抗マウスIgG（ヤギ）は5%正常ヤギ血清と0．1% Triton X-100 を含むPBSに溶解した。

【結果】

I）MAC－N1抗体は、ニワトリにおけると同様（2）、ラット小脳においても、分子層と顆粒細胞層のneuropilに強く反応した。電顕的免疫組織化学によって調べると、どちらの領域においても、前シナプス側の細胞膜構造に強い反応が認められた。分子層においては、平行線維の、前シナプス膜を含む軸索膜が染色され（図1A）、顆粒細胞層においては苔状線維終末の細胞膜（図1B）が強く染色された。細胞膜上の陽性反応はいずれも斑状を呈した。また、シナプス小胞や一部のミトコンドリア膜にも反応産物がみられた。一方、後シナプス側の構造には陽性反応は全く認められなかった。

II）培養した大脳皮質ニューロンの神経突起もMAC－N1抗体により斑状に染色された（図2A、B）。また、成長円錐や細胞体の核近傍も強く染色された。固定しTriton X-100で細胞膜の透過性を高めた標本では、上記のような所見が得られたが、生きた未固定標本に抗体を作用させた場合には、抗体に反応するニューロンは全く見いだされなかった（図2C、D）。いずれの場合も、アストログリア細胞には免疫活性は見いだされなかった。

【考察】

N型Caチャンネルは神経伝達物質の放出と密接に関係しており、シナプス部位での局在に大きな興味がもたれている。しかしながら、今日まで、フリーズフラクチャー法によって前シナプス膜に蛋白性の粒子が観察されている他は、その局在は明らかではない。われわれは、本研究により、N型Caチャンネル本体もしくはそれと密接な関係にあると考えられる蛋白性のMAC－N1抗原が、前シナプス膜を含む細胞膜に斑状に存在することを

明かにした。培養細胞においても、この抗原は神経突起に斑状に見いだされたが、この事実は、培養細胞表面のCaチャンネルが斑状に存在するという、パッチクランプ法を用いた実験の結果（3）を考え合わせると興味深い。また、このMAC－N1抗体は、培養細胞を固定し、Triton X-100で細胞膜の透過性を高めた時にのみ染色性を示したことは、この抗体によって認識されるエピトープが細胞膜の内側に存在していることを示唆している。

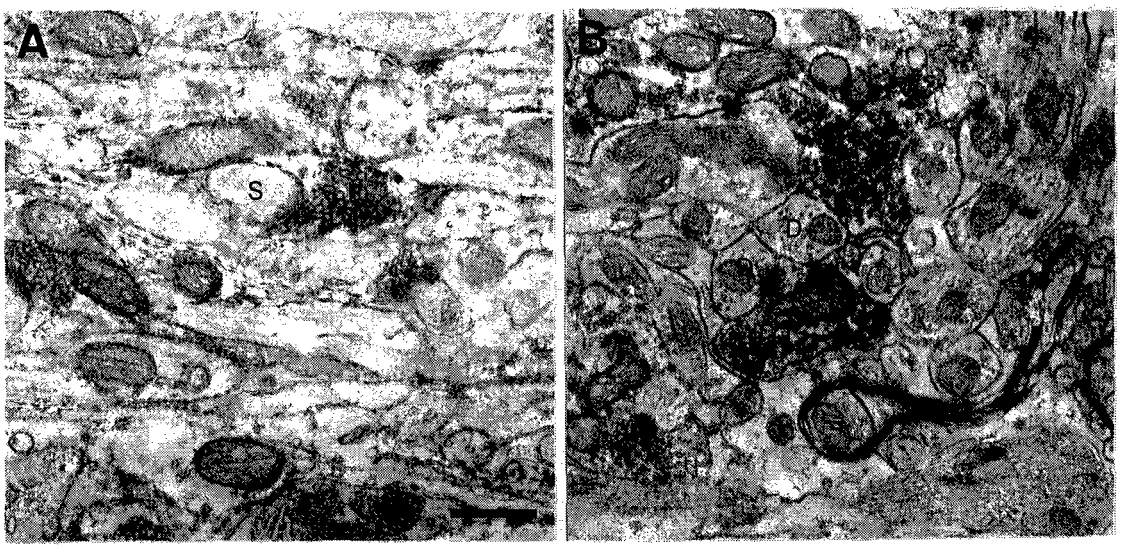



図1。ラット小脳におけるMAC－N1抗体の電顕的免疫組織化学。　A、分子層。平行線維（P）に免疫活性がみられる。樹状突起のスパイン（S）の細胞膜は陰性。　B、顆粒細胞層。苔状線維終末（T）の細胞膜に斑状の活性部位がみられる。樹状突起（D）の細胞膜は同じく陰性。スケール、500nm。

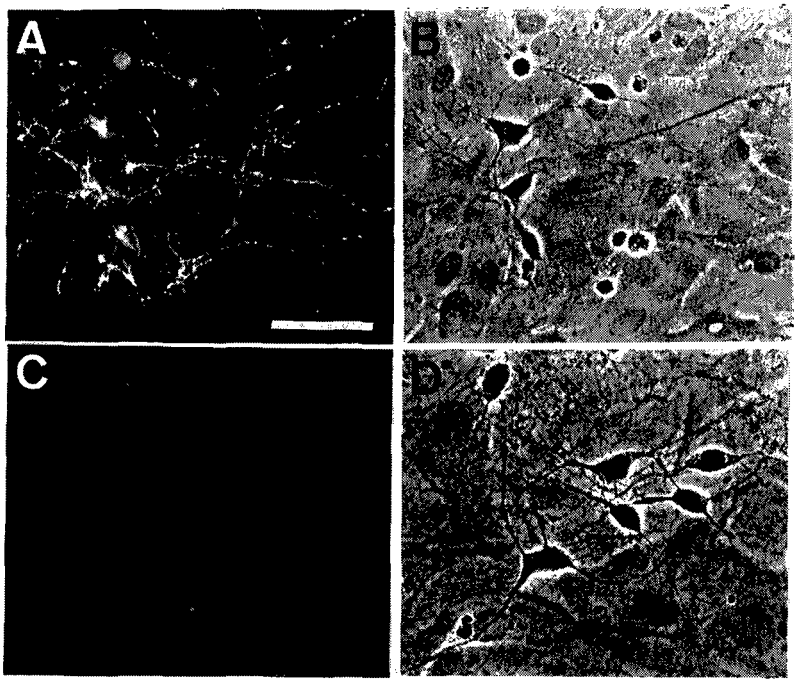



図2。培養ラット大脳皮質ニューロンのMAC－N1免疫蛍光。A、B、　アルデヒド固定し、Triton X-100 処理した後に、MAC－N1抗体を作用させた標本。　C、D、生きたままMAC－N1抗体を作用させた標本。A、C、ローダミン免疫蛍光。B、D、位相差像。培養3日目。スケール、50μm。

【文献】
1）高橋正身ら、神経化学　(1989)
2）藤田　忍ら、神経化学　(1989)
3）Tsien, W. E. et al., TINS, 11, 431-438 (1988)

# 142　ウシ脳ω-conotoxin受容体とdihydropyridine受容体

早川直彦、森田貴雄、山口　徹、三井宏美*
西須英雄、阿部輝雄（新潟大・脳研、*理学部・生物）

〔要約〕
ウサギ骨格筋より精製したdihydropyridine (DHP)感受性(L型)Caチャンネルでマウスを免疫し、単クローン抗体(MCC-1)を得た。この抗体は、ウサギ骨格筋ミクロソーム分画からジギトニンで抽出したDHP受容体のほとんどを沈降させた。ミクロソーム分画および精製DHP受容体のイミュノブロットでは、非還元条件下でM,約170000の成分と反応したが，還元条件下では反応しなかった。サブユニットに解離させた精製DHP受容体を用いた解析の結果から、この抗体は$\alpha_2$あるいはδサブユニットを認識するものと思われる。また、この抗体はウシ心筋および脳膜分画のジギトニン抽出物中の高親和性DHP結合活性の80%以上を沈降させた。しかし、同じ脳のジギトニン抽出物中のω-conotoxin結合活性は有意に沈降させなかった。心筋および脳膜分画のイミュノブロットでは、骨格筋と同様に非還元条件下でのみM, 約170000の成分が検出された。これらの結果は、ウシ脳の高親和性ω-conotoxin受容体の大部分がDHP受容体とは異なる分子であることを示す。

電位依存性Caチャンネルは興奮性細胞において重要な機能をはたしている。しかし、これまで単離されたCaチャンネルは骨格筋のDHP感受性(L型)チャンネル分子のみである。特に脳神経系には少なくともL,N,T の3型のCaチャンネルが存在することが知られているが(5)、それらの分子的差異は不明である。われわれはこれまで神経系のLおよびN型のCaチャンネルに特異的に作用すると考えられるω-conotoxin GVIA(以下GVIA)を用いて脳のCaチャンネルを追究してきた(1,2,6)。今回、ウサギ骨格筋から精製したL型Caチャンネルに対する単クローン抗体を用いて、脳Caチャンネルを解析した。その結果、ウシ脳においては、高親和性GVIA受容体の大部分がDHP受容体(L型 Caチャンネル)とは異なる分子であることを示す証拠が得られたので、報告する。

［実験方法］
[$^3$H]PN 200-110 で標識したウサギ骨格筋ミクロソーム分画をジギトニンで抽出し、WGA-Sepharose、DEAE-cellulose、WGA-Sepharoseの順でカラム・クロマトグラフィーをおこなってDHP感受性 Caチャンネルタンパク質を精製した。BALB/cマウスを精製Caチャンネル分子で免疫し、単クローン抗体を作製した。抗体のスクリーニングは、ジギトニンで可溶化した[$^3$H]PN 200-110標識DHP受容体(ウサギ骨格筋)を予めハイブリドーマ培養液とインキュベートした抗マウスIgG-Sepharoseで沈降させることにより行なった。ウシ心筋(ミクロソーム分画)および脳(低張処理$P_2$分画)のDHP受容体の免疫沈降も同様にして行なった。また、GVIA受容体の免疫沈降は、0.3 nM [$^3$H]propionylGVIA (6)で標識したウシ脳低張処理$P_2$分画をジギトニンで抽出したものを用いた。イミュノブロットでは、サンプルを還元条件(DTT存在下)あるいは非還元条件(NEM存在下)でSDS電気泳動をした後、nitrocellulose 上へブロットした。

［結果と考察］
精製Caチャンネルで免疫したマウスの脾臓細胞をミエローマ細胞と融合させ、得られたハイブリドーマ細胞の培養液を上記の方法でスクリーニングすることにより、DHP受容体を沈降させる単クローン抗体

(MCC-1)が確立された。この抗体はウサギ骨格筋のDHP受容体(L型Caチャンネル)を濃度依存的にほとんどすべて沈降させた(図 1)。イミュノブロットは、還元条件では反応せず、非還元条件では$M_r$約170000の成分が検出された(図 2, lane 1)。精製DHP受容体をTriton X-100で処理して、解離した$\alpha_1$と$\alpha_2$をlentil lectin-Sepharoseで分離(4)した後のイミュノブロットでは、lentil lectin 結合部分($\alpha_2\delta$)のみが反応した。したがって、MCC-1は$\alpha_2$あるいは$\delta$サブユニットを認識するものと思われる。この抗体はウシ心筋および脳膜分画の高親和性DHP結合活性の80%以上を沈降させた(図 1)。しかし、ウシ脳の高親和性GVIA受容体は有意に沈降させなかった (図 1)。またウサギ脳、ウシ心筋および脳のイミュノブロットでは、骨格筋の場合と同様に、還元条件では反応せず、非還元条件では$M_r$約170000の成分と反応した(図2, lane 2-4。ウシ脳の$M_r$約 70000, 75000の成分は$M_r$170000の成分の分解物と思われる)。これらの結果は、ウシ心筋および脳にも骨格筋のDHP感受性 Caチャンネル分子と類似の分子(おそらくL型Caチャンネル)が存在し 、MCC-1が骨格筋、心筋、脳の分子に共通の部位を認識することを示す。一方、この抗体はウシ脳のGVIA受容体は認識しない 。したがって、ウシ脳においては、GVIA受容体とDHP受容体は異なる分子であることがわかる。DHPは一般にL型Caチャンネルに特異的に、GVIAは神経系のL型および N型に作用すると考えられている(3)。ウシ脳のすべてのL型チャンネルがDHPを高親和性に結合するとすれば、高親和性GVIA受容体はN型のCaチャンネルを反映するものと考えられる。

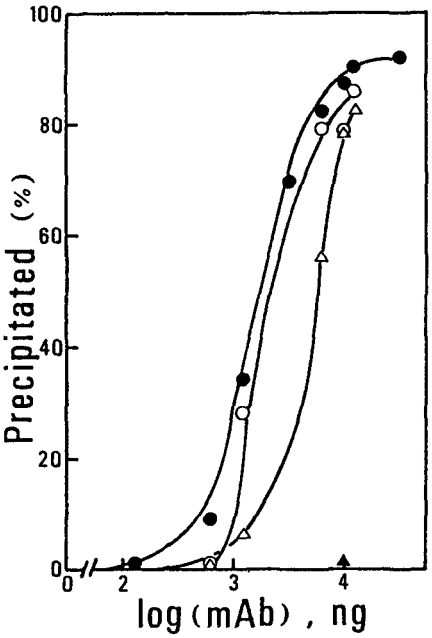



図 1 MCC-1によるDHP受容体およびGVIA受容体の免疫沈降
各分画のジギトニン抽出物中のDHPあるいはGVIAの全特異的結合に対する割合として表示。▲、ウシ脳$P_2$のGVIA受容体。他はすべてDHP受容体。△、ウシ脳$P_2$；○、ウシ心筋ミクロソーム；●、ウサギ骨格筋ミクロソーム

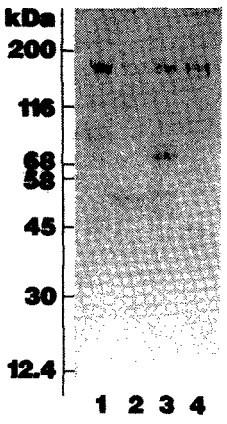



図 2. イミュノブロット
1, ウサギ骨格筋ミクロソーム；
2, ウサギ脳$P_2$；3, ウシ脳$P_2$；
4, ウシ心筋ミクロソーム。ウサギおよびウシ脳の$M_r$52000, 54000のバンドは非特異的染色。

[文献]

1. Abe, T. et al. (1986) Neurosci. Lett. 71, 203-208.
2. Abe, T. and Saisu, H. (1987) J. Biol. Chem. 262, 9877-9882.
3. McCleskey, E. W. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4327-4331.
4. Takahashi, M. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5478-5482.
5. Tsien, R. W. et al. (1988) Trend. Neurosci. 11, 431-438.
6. Yamaguchi, T. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 9491-9498.

# 143 神経ペプチドのFMRFamide受容体とcoupleしたK⁺-channelの開閉に関与する細胞内機構

高橋純子，佐々木和彦，松本光比古
岩手医大・医・第一生理

〔要約〕
膜電位固定下、Aplysia 神経節細胞に神経ペプタイドの Phe-Met-Arg-Phe-$NH_2$ (FMRFamide)を投与すると $K^+$ 透過性増大による外向き電流応答を示すことが多い。この応答は $Ca^{2+}$-activated $K^+$-channel を抑制する薬剤の投与で全く抑制されず、adenylate cyclase や A-kinase の抑制剤で影響を受けなかった。この細胞に GDPβS を投与すると FMRFamide 応答は抑制された。また、GTPγS を注入するとそれだけで静止膜の $K^+$ 透過性がゆっくりと不可逆的に増大し、そこに FMRFamide を投与すると、一過性の FMRFamide 応答の後も静止膜に FMRFamide による $K^+$ 透過性増大が不可逆的に残った。この細胞に GTP結合蛋白($G_i$ または $G_o$)と receptor 間の結合を外す作用がある PTX(pertussis toxin)を細胞内注入すると不可逆的に抑制された。この型の FMRFamide応答の発現では受容体の活性化に引き続いて PTX-sensitive な GTP結合蛋白の活性化が起こり、これが細胞内 $Ca^{2+}$ の増大や細胞内 cAMP の変化によらずに $K^+$-channel を開くことが示唆された。

FMRFamide は軟体動物の筋組織で発見されたが中枢神経系にも分布し、神経伝達物質またはホルモン様物質として働いている。また、ほ乳類を含む脊椎動物においても FMRFamide様物質に対する receptor が存在することが免疫組織化学的研究によって証明されつつある。この FMRFamideを Aplysia 神経細胞に投与すると、$K^+$透過性増大による過分極応答が得られることが多い。一般に receptor 刺激で $K^+$-channel が開く場合、ある種の細胞内 second messenger がその応答を mediate していることが最近示唆されている[2]。FMRFamide が receptor に結合し、過分極応答が現われる時にも、何らかの細胞内酵素反応が介在するか否か、研究した。

〔方法〕
Aplysia kurodai の腹部神経節を摘出し、灌流液に固定した。細胞を灌流液に露出させ、Aplysia kurodai の血液とイオン組成が似ている人工血液[3]（$Na^+$ 587, $K^+$ 12, $Cl^-$ 671, $Mg^{2+}$ 52 mM）で灌流した。pH は Tris と HClを用いて 7.4 に調整した。灌流液の流速は 5 ml に、液温は 20 ± 1 ℃ に常に保った。実体顕微鏡下に、1.8 M K-citrate をつめた二本のガラス微小電極を神経節内の細胞集団の中の一個の細胞に刺入した。一本の電極は膜電位変化を記録しもう一方は細胞膜を横切って電流を流した。定性的実験では FMRFamide で発生する膜電位変化を示標とし、定量的実験では、膜電位固定下、一定濃度の FMRFamide 灌流により引き起こされる電流応答の振幅を示標とした。FMRFamide, γ-amino butyric acid(GABA), tetraethylammonium(TEA), apamin は Aplysia の人工液液に溶かし、細胞の外側から投与した。PTX は 200 mM KCl, 10 mM dithiothreitol(DTT), 10 mM $NAD^+$, 10 mM ATP を含む溶液にとかし、細胞内に注入した。DTT は PTX の B-subunit からの A protomer の解離を促進し、活性化させるために使用した[1]。GDPβS と GTPγS, H-8, 3'-deoxyadenosine は蒸留水にとかし、細胞内に投与した。薬剤を細胞内投与するときは微小ガラスピペットに使用薬剤の溶液を満たし、細胞に刺入後、pressure pulse により細胞内に注入した。

〔結果と考察〕
FMRFamide 応答中に開く $K^+$-channel の種類を調べるため、$Ca^{2+}$をキレートする EGTA を細胞内に注入したが、応答に変化はなかった。また、$Ca^{2+}$-activated $K^+$-channel の blocker である apamin, TEA を投与したが殆ど抑制され

なかった。このことから FMRFamide 応答を起こす $K^+$-channel は $Ca^{2+}$ の細胞内流入によって開く $K^+$-channelではないことがわかった。PTX (pertussis toxin) はある種のG蛋白($G_i$ または $G_o$)を ADP- リボシル化して receptor との coupling を失わせることが知られている。この PTX を細胞内に注入したところ、FMRFamide 応答は徐々に小さくなり、30分後には control のおよそ 10 % 以下に抑えられた(Fig. 1)。PTX の抑制作用は6時間 wash out しても持続し、元に戻らなかった。G蛋白の GTP 結合部位に作用して GTP の結合を競合的に阻害する GDP analogue である GDPβS を細胞内注入すると、応答は注入直後から control の約 70 % に抑制された。また、GDPβS の結合部位と同じ部位に結合し、そのG蛋白を不可逆的に活性化する GTP analogue である GTPγS を細胞内投与すると膜の $K^+$ conductance 増大を伴う外向き電流が徐々に、かつ不可逆的に発生した。GTPγS 単独の静止膜に及ぼす効果の時間経過は極めてゆっくりしているが、細胞内 GTPγS の投与後に FMRFamide を繰り返し投与するとこの効果は著しく短縮された(Fig. 2)。このとき FMRFamide 応答の下降相が完全にもとの holding level まで戻らず、基線が上昇したままで留まった。このように FMRFamide 投与後に基線が上昇するのは GTPγS の静止膜に及ぼす上記不可逆的効果が receptor 刺激で促進されたためと考えられた。また、この後、繰り返し投与した FMRFamide応答の大きさも徐々に小さくなり、70 分後には完全に消失した。

以上の結果、この型の FMRFamide 応答は PTX に感受性を持つG蛋白($G_i$ または $G_o$)により媒介されていることが示唆された。また、この応答は $Ca^{2+}$-activated $K^+$-channel が開いて発生するのではないことが示された。なお、A-kinase の inhibitor(H-8) も、adenylate cyclase inhibitor(3'-deoxyadenosine)も FMRFamide 応答に著変を与えないので adenylate cyclase 系の直接的関与もないらしい。

本研究を進めるに当たり熱心なご討論ならびにご激励を頂いた佐藤誠教授に心より感謝いたします。また、本研究の一部は、文部省科学研究費補助金一般研究C (No. 01570074) 、内藤記念財団、圭陵会学術振興会 (No. 26)の研究助成を受けて行なわれた。

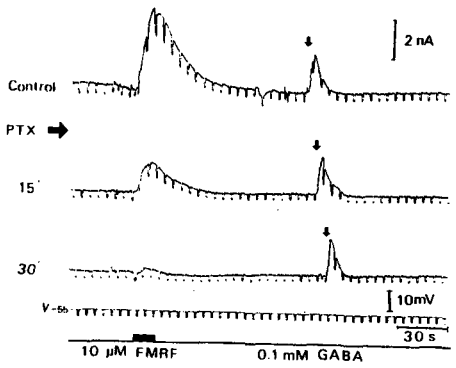



Fig. 1. Selective blocking effect of pertussis toxin on the FMRFamide-induced $K^+$-current response, and the lack of any effect on GABA-induced $Cl^-$-current responce. PTX injection is shown by an arrow.

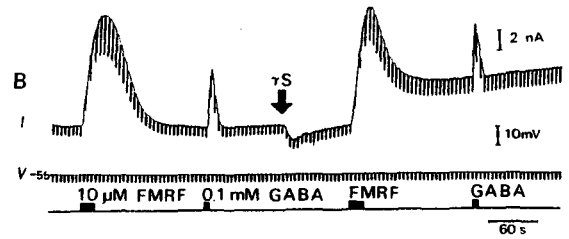



Fig. 2. Selective facilitatory effect of the receptor stimulation for FMRFamide on the GTPγS-induced slow $K^+$-current response. Intracellular injection (shown by arrow ) of GTPγS caused slowly and irreversibly developing $K^+$-current and generation of this current was facilitated by application of FMRFamide but not by GABA.

## [参考文献]

1. Katada, T., Tamura, M. & Ui, M. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 224, 290-298
2. Sasaki, K. & Sato, M. (1987) Nature 325, 259-262
3. Sato, M., Austin, G., Yai. H. & Maruhashi, J. (1968) J. Gen. Physiol. 51, 321-345

# 144 脱分極による培養神経細胞死の阻止: 神経成長因子依存性と細胞内$Ca^{2+}$濃度との関係

小池 達郎，田中 秀逸，E.M. Johnson, Jr
(ワシントン大・医・薬理, 佐賀医大・化学)

〔要約〕

交感神経節の生存はin vivoにおいてもin vitroにおいても神経成長因子(NGF)に依存する。即ちNGFを除くと細胞死が起こる。培養交感神経細胞を用いて、NGF除去後の細胞の生存に対する種々の脱分極剤の効果を調べた。高$K^+$培地は細胞死を防いだ。$K^+$の効果はdose-dependent($EC_{50}$=21mM)であり、外液の$Ca^{2+}$を除くとその効果は失われた。$Ca^{2+}$チャンネルアンタゴニストであるNimodipineやNifedipineは高$K^+$の効果を阻害し、$Ca^{2+}$チャンネルアゴニストである Bay K 8644や(+)-(S) 202 791は高$K^+$の効果を増強した。これらのことから高$K^+$の効果はL-タイプ$Ca^{2+}$チャンネルからの細胞外$Ca^{2+}$の流入によると結論された。他の脱分極剤コリン($EC_{50}$=1 mM)，カルバミルコリン($EC_{50}$=1 μM)も細胞死を阻止した。この効果は外液の$Ca^{2+}$に依存しなかったが、細胞内$Ca^{2+}$のキレーティングにより失われた。 これより細胞内storeからの$Ca^{2+}$releaseが、細胞死の阻止に関与していることも示唆された。 以上の結果をもとに交感神経節細胞のNGF依存性と細胞内$Ca^{2+}$との関係について仮設を提出した。

発生過程におこる神経細胞死は神経栄養因子の限定的供給による競合過程の結果である と考える根拠が蓄積されている。 特に最近種々の系においてこの細胞死が積極的な過程からなることが示唆され、そのカスケードの解明に大きな注目が集まっている。 交感神経節細胞の初代培養系はこの細胞死の研究において利点がある。ラットの上頸神経節から得られた神経細胞は生存のためにNGFを必要とする。培養液からNGFを除くと細胞は2～3日で死に cytoplasmic enzymeの放出が起こる[1]。このNGF除去による細胞死は、シクロヘキシミドやアクチノマイシンDを培地に加えることで防ぐことができる[1]。今回、NGF除去による細胞死を抑えるfactorとして脱分極剤が見出されたので、その機構について検討した[2]。

［実験方法］

<u>上頸神経節細胞の培養</u>： 妊娠21日目のラットからembryoをとり、上頸神経節を単離し、 コラーゲナーゼ処理後、コラーゲンコートした24 well plateにまいた(0.5神経節／well)。細胞は10%牛胎児血清、50 ng／ml NGFを含む培地で1週間培養後実験に用いた。non-neuronal cells はフルオロデオキシウリジンを培地に加えることにより除いた。

<u>細胞死のアッセイ法</u>：実験は培地中に1%のマウスNGFに対する抗体(guinea-pig)を加え、NGFを中和することにより開始した。 抗体添加後24時間では何の変化も見出せないが、36時間後には細胞が変性した。 48～60時間後細胞を顕微鏡観察した後、 培地中及び細胞内のアデニレートキナーゼ活性をそれぞれ測定した。このcytoplasmic enzyme は通常で3～6%培地中に放出されるが細胞死に伴って20～50%放出される。

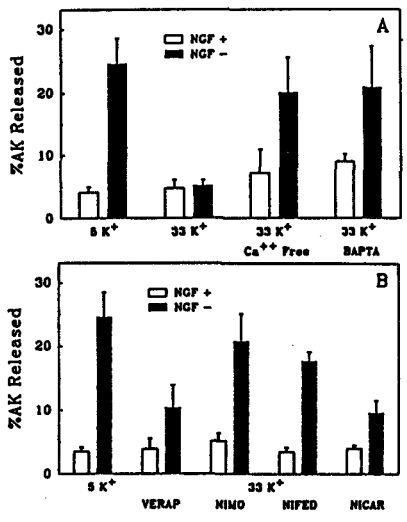



図1．高$K^+$による神経細胞死の阻止と脱分極剤の効果。横軸の数字は培地中の$K^+$濃度(mM)を示す。
BAPTA,BAPTA-AM; VERAP,Verapamil; NIMO,Nimodipine; NIFED,Nifedipine; NICAR,Nicardipine

［結果及び考察］

培養交感神経節細胞（７日）の培養液中からNGFを除去すると、２～３日後には細胞は死にアデニレートキナーゼ（ＡＫ）活性が培地中に放出された。 高$K^+$（33mM）培地は細胞死を防ぎ、ＡＫ活性はコントロール値とかわらなかった（図１Ａ）。その後 高$K^+$培地で３週間培養を続けても細胞は通常とかわらなかった。 この高$K^+$効果の機構を調べたところ、$K^+$の効果はdose-dependentでありEC50=21mMであった（図３Ａ —●— ）。細胞外液中の$Na^+$を$Li^+$に交換しても 高$K^+$効果は観察された（図２Ａ）。 Tetrodotoxin（２μM），Lidocaine（20mM）も高$K^+$効果を抑えなかった（図２Ｂ）。しかし外液の$Ca^{2+}$を除くか、又は細胞内$Ca^{2+}$のキレート剤（BAPTA-AM，20μM，２hr）で細胞を処理すると高$K^+$効果は失われた（図１Ａ）。 $Ca^{2+}$チャンネルアンタゴニストであるNimodipine（１μM），Nifedipine（５μM），Verapamil（５μM）等は高$K^+$効果を阻害した（図１Ｂ）。 一方$Ca^{2+}$チャンネルアゴニストである Bay K 8644（１μM）は、それ自身は効果がないが$K^+$効果を増強した。即ちdose-response curve をシフトさせ（図３Ａ ---o--- ）、$K^+$の効果はEC50=13mMになった。 同様に(+)-(S) 202 791（５μM）も$K^+$効果を増強した（図３Ｂ）。 これらの結果から、高$K^+$効果は主としてL-タイプ $Ca^{2+}$チャンネルを通しておこる細胞外液からの$Ca^{2+}$の流入によると結論された。 又、別の脱分極剤であるコリン（EC50=１mM）及び カルバミルコリン（EC50=１μM）もNGFの除去による細胞死を防いだが、これらの効果は高$K^+$効果と異なり、 外液の$Ca^{2+}$を除いても失われなかった。しかし細胞をBAPTA-AM で処理するとこれらの効果は失われた。この結果から細胞内$Ca^{2+}$ store からの$Ca^{2+}$の放出にこれらの効果は依存していると考えられた。 以上の結果をもとに交感神経節細胞のNGF依存性と細胞内$Ca^{2+}$との関係について、 "$Ca^{2+}$ set point hypothesis" を提出した。

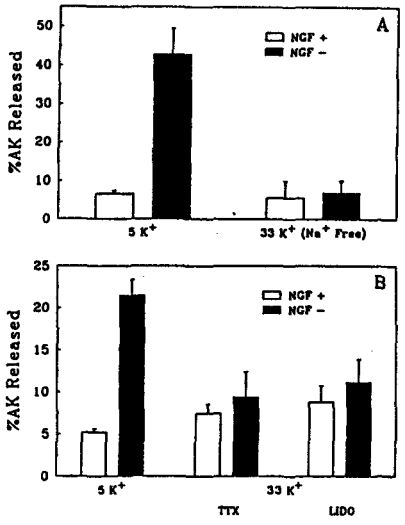



図２．高$K^+$による神経細胞死阻止の細胞外$Na^{2+}$非依存性（Ａ）と、TTX,LIDOの効果（Ｂ）。
横軸の数字は培地中の$K^+$濃度（mM）を示す。
TTX,Tetrodotoxin; LIDO,Lidocaine

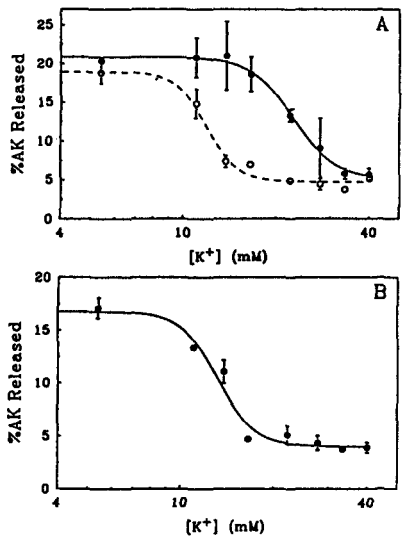



図３．高$K^+$による神経細胞死阻止の$K^+$への濃度依存性と$Ca^{2+}$チャンネルアゴニストの効果。
Ａ —●— は対照、Ａ ---o--- はBay K 8644を、
Ｂは(+)-(S) 202 791を培地に加えた。

［参考文献］

1. D. Martin et al., J. Cell Biol. 106, 829-844 (1988)
2. T. Koike et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) in press

## 145 高血圧自然発症ラットの脳虚血によるモノアミン変動の加齢による修飾

八尾博史、長尾哲彦*、大星博明、松本　孝、平野　誠、中原辰雄**、堤　哲之、黒木俊秀、楯林義寛、
西山浩二、内村英幸、佐渡島省三*、藤島正敏*
（国立肥前療養所、九州大・医・第二内科*、九州大・理・化学**）

〔要約〕　5-6カ月齢（成熟）と15-20カ月齢（老齢）の高血圧自然発症ラット（SHR）を用いて両側頸動脈結紮により脳虚血を作製し、20分虚血群および20分虚血後30分血行再開群とそれぞれの偽手術対照群で、モノアミン関連物質の組織含量の変動を脳内部位別に検討した。またBrain　dialysisにより線条体細胞外液中のdopamine (DA)とDOPACの経時的変化を測定した。脳虚血により老齢SHRでは線条体・側坐核・中隔野のDAとDOPACは成熟SHRに比し減少し、血行再開により同部のDOPACは増加する傾向を示した。脳虚血により細胞外液中DAは老齢SHRでは前値の80倍、成熟SHRでは20倍に増加した。DOPACは虚血中減少し血行再開後増加したが、老齢SHRでは血行再開40分以後も増加し続けるという成熟SHRとは異なるパターンをとった。以上よりSHRでは加齢により脳虚血時のDA代謝が修飾されることが示唆された。

＜緒言＞　高血圧発症後（5カ月齢以降）の高血圧自然発症ラット（SHR）では両側総頸動脈結紮（BCL）のみで両側大脳半球に広範な虚血を生じ脳虚血モデルとして確立されている［1］。脳虚血によるモノアミンの変動に関しては既に多くの報告があるが、加齢による影響を検討したものはない。そこで今回SHRの脳虚血モデルを用い、老齢SHRにおける一過性脳虚血時の脳内モノアミンの変動について検討した。

＜方法＞　5-6カ月齢（成熟）と15-20カ月齢（老齢）の雌SHRを用いた。(i)モノアミンの組織含量：脳虚血群はアモバルビタール麻酔下（100mg/kg,i.p.）に20分のBCLを行い、対照群には偽手術を行った。血行再開群は20分のBCL後30分血行再開させた。各ラットは断頭後速やかに脳を取り出し、-80℃で凍結後、クライオスタット（-12℃）内で300μmの連続切片を作製した。各切片よりPaxinosとWatsonのアトラスに従って実体顕微鏡下に脳の各部位をマイクロナイフで切り出した［2］。dopamine(DA)、3,4-dihydroxyphenylacetic　acid(DOPAC)、norepinephrine(NE)、serotonin(5-HT)、5-hydroxyindoleacetic　acid(5-HIAA)はHPLC-ECDにより定量し、蛋白量あたりのモノアミン含量を算出した。(ii)Brain　dialysis［3］：アモバルビタール麻酔下に股動脈にカニュレーションし血圧は連続的に、動脈血のガス分析は実験の各時期に行った。ラットを定位脳固定装置に固定しBregmaより前方0.5mm、側方2.5mm、脳表より4.5mm の位置（線条体）に透析用プローベ（BAS社製）と水素クリアランス法による脳血流測定用電極を留置した。Harvard　pumpでリンガー液を3.93μl/分で灌流し、10分毎に透析液を0.2Nの過塩素酸5μlをいれたチューブに回収し、全量をHPLC-ECDに注入してDAとDOPACの変化を虚血20分と血行再開60分まで測定した。

＜結果および考察＞　(i)モノアミンの組織含量：20分の脳虚血によりDAは成熟SHRの中隔野で偽手術群に比し53%増加し、DOPACと5-HIAAは老齢SHRの線条体でそれぞれ32%と19%減少した。老齢SHRでは虚血中のDAは線条体、側坐核、中隔野で成熟SHRに比し有意に低値であり、DOPACは線条体、側坐核で有意に低値、中隔野で低値の傾向を示した。NE、5-HT、5-HIAAの変化は一定の傾向を示さなかった（Fig.１）。成熟SHRと老齢SHRの虚血中の差は血行再開により消失したが、老齢SHRの線条体、側坐核、中隔野でDOPACが増加する傾向がみられた（Fig.２）。(ii)Brain　dialysis：平均血圧は成熟SHRで170±3mmHg（平均±SEM）老齢SHRで175±6と両群で差はなく、虚血

中および血行再開時にも有意差はなかった。脳血流は大脳皮質ではBCL前、BCL中は成熟SHRと老齢SHR間に差が無く、血行再開後60分には老齢SHRで成熟SHRに比し有意に減少した。線条体ではBCL後20分で成熟SHRの6.1±1.5 ml/100g/minに比し老齢SHRでは2.2±1.1とより減少する傾向を示した（Fig.３）。線条体細胞外でのDAはBCL20分で老齢SHRと成熟SHRでそれぞれ平均80倍および20倍まで増加し、血行再開により比較的速やかに前値のレベルへ戻った（Fig.４）。DOPACの変化は虚血により老齢SHRでより減少する傾向を示し、血行再開後は両群ともに増加したが、老齢SHRでは血行再開30分以降も増加を続けた（Fig.５）。比較的短時間の一過性脳虚血では、虚血中はDA、5-HT、NEは変化せず、血行再開により5-HTとNEは減少しDAは増加するという報告が多いが、必ずしも一致した成績は得られていない［4］。今回の結果からはSHRでは脳虚血によるDA代謝が加齢により修飾されるという結論が得られた。この変化には部位特異性があり、線条体を中心とする深部領域でみられ、皮質ではあきらかではなかった。SHRでは長期間高血圧が持続することにより脳血流自動調節の下限域が上方へ偏移し［5］わずかな灌流圧の低下によっても脳血流は減少しやすくなる。さらにBCL後でも脳血流の減少は老齢SHRで著明な傾向が線条体でみられた。SHRの加齢による脳虚血中のDA、DOPAC含量の差や細胞外DA増加の差はこのわずかな脳血流減少の差によるのかもしれないが、加齢自体による影響は否定できない。また老齢SHRにみられた虚血中の細胞外DA増加の差や血行再開によるDOPAC増加などが脳虚血の組織障害に関与するか否かについても今後検討を要する。

＜文献＞［1］Fujishima M et al., Stroke 6:62,1975. ［2］内村英幸ら，蛋白質核酸酵素26:1192,1981. ［3］Yao H et al., Experientia 44:506,1988. ［4］八尾博史ら，Ther Res 10:531,1989. ［5］Fujishima M et al., Gerontology 30:30,1984.

Fig. 1

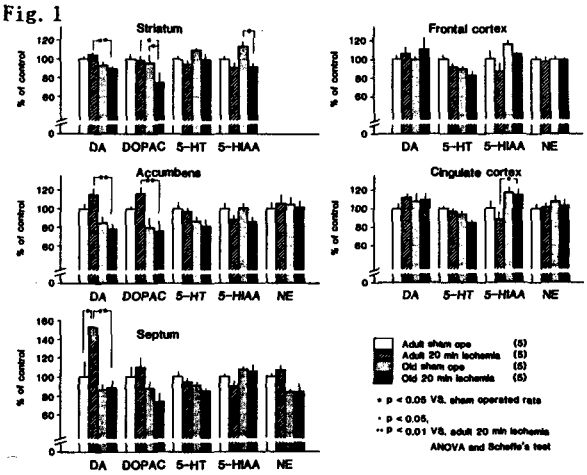



Fig. 2

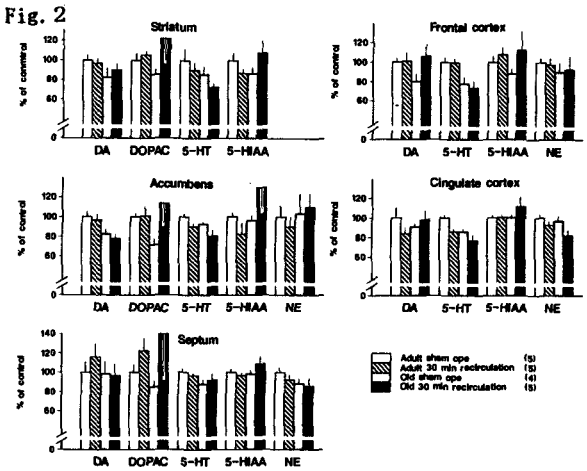



Fig. 3

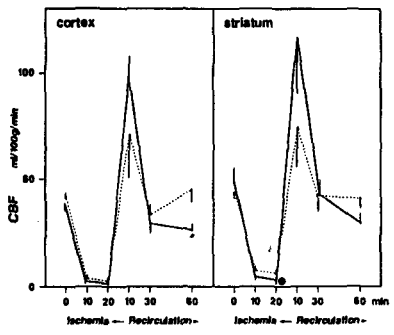



Fig. 4

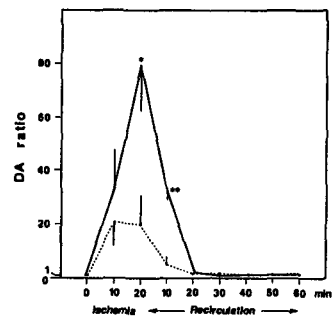
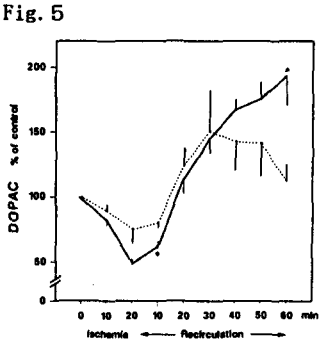



Fig. 5




●——● old SHR, ●----● adult SHR. ⊗＜0.1, *p<0.05, **p<0.01 vs. adult SHR

# 146 ラット脳におけるβ-phenylethylamine 含量の発達に伴う変化について

多賀千明、辻　元宏、橋本泰道、中嶋照夫
（京都府立医大・神経精神科）

〔要約〕

β-Phenylethylamine(PEA)の脳内での生理的役割を明らかにする目的で、ラット脳の胎生期より成熟期に至るまでのPEA濃度，及びその前駆物質であるphenylalanine(Phe)濃度、合成酵素のL-芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)活性を測定し、それらの関連を検索した。PEA濃度は、胎生13日に約 8ng/mg DNA を示した後減少したが、胎生17日には約 44ng/mg DNA と急激な増加を示した。その後再び減少し、出生時には約 2ng/mg DNAとなり、以後大きな変動は見られなかった。Phe濃度は胎生13日に約 9μg/mg DNA を示し発達に従い漸減傾向がみられた。またAADC活性は、胎生13日は低値であったが、17、19日には12～13 fmol/h/mg 蛋白 と急激に上昇した後減少し、出生時にはその３分の２となり以後変化は見られなかった。これらのことより胎生期脳内ＰＥＡ濃度上昇はAADC活性増加に基づくと推察された。

β-Phenylethylamine(PEA)はphenylalanine(Phe)の脱炭酸により生成される生理活性アミンで、成熟齧歯類におけるその脳内濃度は、１～５ng/g湿重量と少ないため、微量アミンの１つとされている。著者らは、マウス脳の発達段階において、PEAが胎生15日から出生２日の間に増加し、胎生19日には成熟マウス脳の25倍に達することを報告した（１）。またこれは、PEA合成経路であるPheを基質としたL-芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)の活性増加が関与すると推察した。今回はラット脳を用いPEA濃度、Phe濃度ならびに、AADC活性を測定し、それらの関連性を考察した。

＜方法＞①PEAおよびPheの定量－Wistar系ラットを用い、胎生期および出生後の全脳を取り出し、Tagaらの方法（２）により行なった。すなわち約７倍量の７％ＴＣＡにてホモジェネートとし、10000xg、20分遠沈後、上清に、内部標準（p-methoxyphenylethylamine,10ng）を加え、Dowex 50x8、200-400 mesh $H^+$型（0.8x2.0cm）に通し、６N塩酸３mlで洗浄後、６N塩酸+50％エタノール５mlにて溶出した。減圧乾固後、水１mlに溶解し、0.8 mlをAmberlite CG 50、100-200 mesh、$NH_4^+$型（0.8x2.0cm）に通し、５ml水にて洗浄した。この時、0.8ml流出液と５ml洗浄液を集めPhe分画とした。次に、カラムを0.1N $NH_4OH$５mlにて洗浄後、１N $NH_4OH$５mlにてPEAを溶出した(PEA分画)。Phe分画は、その一部をHPLC-FD(Ex380nm-Em480nm)に注入し、PEA分画は乾固後、移動相に溶解し一部をHPLC-FD(Ex340nm-Em380nm)に注入し測定した。移動相はPhe測定には、10%メタノールを含む0.05Mクエン酸緩衝液(pH4.3)、PEA測定には7%アセトニトリルを含む0.05Mクエン酸緩衝液(pH4.0)を用いた。反応相は 1g o-フタルアルデヒド、1.5mlメルカプトエタノールを1000ml、0.5M炭酸緩衝液(pH10.5)に溶解し用いた。回収率は、PEA78％,Phe87％であった。なおPEA定量法において、初めにDowex 50に通したauthentic PEA/IS比と回収されたPEA/IS比はr=0.998の相関を示した（２）。また、HPLCによるPEA定量法とGC-MSによるそれとの比較は既報（３、４）を参照されたい。　②AADC活性測定－ラット脳を５倍量の冷水にてホモジェナイズ後、10000xg、20分遠沈し、上清を酵素標品とした。酵素反応系は、0.03Mリン酸緩衝液(pH7.2)、$7x10^{-6}$Mピリドキサルリン酸、$10^{-4}$Mパージリン、酵素標品、0.0091nM 1μCi $^3$H-Phe(総量100μl)より成る。37℃、30分反応させ、1M トリクロロ酢酸20μlで停止させる。高圧ろ紙電気泳動(1200V、30分)後、ニンヒドリン発色させ、PEAおよびPheに相当する部分を切り出し、液体シンチレーションカウンターにて放射能を測定した。　③DNA定量－Kissaneらの方法（５）に基づき3,5-ジアミノ安息香酸を用いたけい光法により行なった。　④蛋白定量－Bio-Rad社のProtein Assayを用いた。

＜結果＞　脳内PEA濃度(図１)は、胎生17、19日に、44.4±21.8 ng/mg DNAと、胎生15日に比し23倍となった。その後急激に減少し、出生時は 1.95±0.21 ng/mg DNAとなり以後大きな変動はみられなかった。Phe濃度(図２)は胎生13日には 8.91±0.89 μg/mg DNAであったが徐々に減少し出生時は5.70±0.39 μg/mg DNAと約2/3になり以後大きな変化はみられなかった。次にPheを基質にしたAADC活性の変化(表１)は、胎生17、19日には13日の約4倍となるが出生時にはやや減少し、その後一定の値を示した。

＜考察＞　ラット脳内PEA含量の変化は、胎生17～19日において高値をとり、同時にAADC活性は上昇するがPhe濃度は増加しないことが明らかとなった。さらにこの時期においてはPEAの主たる代謝酵素であるMAO-B活性は低値であることが推測され(１)、PEA濃度増加はAADC活性上昇に基づくと考えられる。ラット胎生17～19日は、大脳皮質層構造の形成開始時期にあたるが、PEAはそのinitiatorとして働く可能性も考えられ、今後検討が必要であると思われる。

＜文献＞

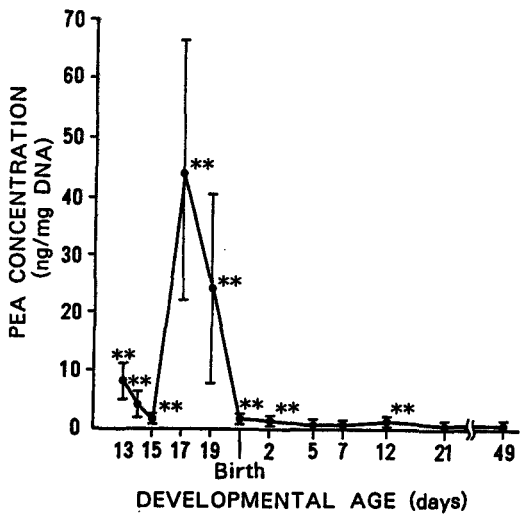
１）明神徹郎ら(1985)神経化学、24、85-87、２）Taga, C.,et al.(1989)Biomedical Chromatography, in press、３）辻元宏ら(1984)神経化学、23、57-59、４）Tsuji,M., et al.(1986)Anal.Biochem.,153,116-120、５）Kissane, J.M.,et al.(1958)J.Biol.Chem.,233, 184-188

表１　ＡＡＤＣ活性の発達に伴う変化

| | fmol/h/mg protein (mean±SD) |
|---|---|
| 胎生13日 | 3.07 ± 1.04** |
| 17日 | 13.41 ± 1.06** |
| 19日 | 12.32 ± 1.19** |
| 出生 1日 | 8.65 ± 0.64 |
| 11日 | 8.91 ± 0.95 |
| 19日 | 7.61 ± 0.77 |
| 49日 | 8.30 ± 1.53 |

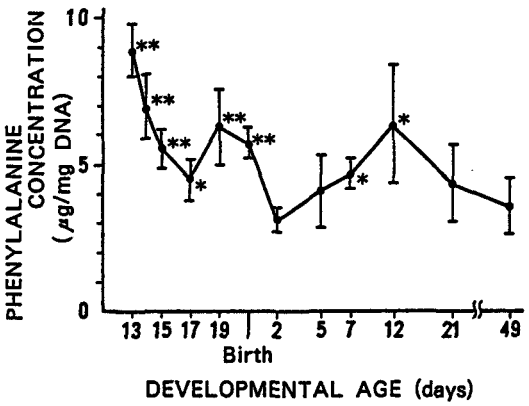
n=6, **p<0.01 when compared with the 49 day-old group(Student's t-test)

図１　ＰＥＡ濃度の発達に伴う変化




The results are expressed as mean values ± SD for groups of 6 animals. Asterisks indicate significantly different values from the day 49 old-group by Student's t test(**p<0.01).

図２　Ｐｈｅ濃度の発達に伴う変化




The results are expressed as mean values ± SD for groups of 6 animals. Asterisks indicate significantly different values from the day 49 old-group by Student's t test(*p<0.05, **p<0.01).

# 147 ラット線条体スライスからのドーパミン遊離に対するハロペリドール慢性投与の影響

山田茂人、横尾秀康＊、西彰五郎、
（久留米大学医学部脳研、同薬理＊）

〔要約〕

ﾗｯﾄ線条体からの電気刺激誘発DA遊離に対するhaloperidol(HPD)の影響を調べた。ﾗｯﾄ線条体ｽﾗｲｽをnomifensineを含むKrebs液で灌流した場合DAの基礎遊離量は118 pg/5min fractionであり、1HZ, 1 min, 2 msec duration, 5 mA の電気刺激により0.78 ng/5min fractionのDA遊離が認められた。電気刺激誘発DA遊離は$10^{-8}$MのHPDの存在下では増加傾向、$10^{-6}$MのHPDの存在下では有意な減少が観察された。1mg/kg/dayで21日間HPDを投与し24時間後に同様の実験を行った。HPD慢性投与群のDAの基礎遊離量及び電気刺激誘発DA遊離量は対照群の2/3に減少していた。更に$10^{-6}$MのHPDと共に灌流すると対照群で認められた電気刺激誘発DA遊離の減少はHPD慢性投与群では認められなかった。以上の結果はHPD慢性投与後にDA神経終末の低活動状態が起こり、同時にHPD灌流によるDA遊離抑制作用に耐性が生じることを示している。

haloperidol (HPD)は中枢dopamine(DA)受容体を遮断しその結果feed back機構を介してDA神経終末よりDA遊離の著明な増加を来す。このDA受容体遮断の力価が臨床用量と高い相関を示すことから抗精神病薬の薬理作用はDA受容体遮断作用と密接な関係があると考えられている。近年精神病患者の血漿中homovanillic acid (HVA)の時間的推移の観察からHPDの慢性投与後にHVAの低下傾向が認められ、この DA代謝回転の減少と精神症状の改善に高い相関が見いだされた。以上の報告からこれまで単に耐性の獲得と考えられていたHPD慢性投与後のDA代謝回転の低下について抗精神病作用としての観点からの見直しがなされている。すなわち、この変化はHPD慢性投与後のDA 自己受容体の過感受性によるものでこの作用が抗精神病薬の薬理作用であるという仮説である[2)]。そこでHPD慢性投与後のDA代謝回転の減少の機序を明らかにする目的で、HPDを慢性投与したﾗｯﾄの線条体ｽﾗｲｽからの内因性DA遊離の変化について自発遊離量、電気刺激誘発遊離およびHPD灌流時のそれぞれの反応性について検討した。

試料と方法

Wistar系雄性ﾗｯﾄに1mg/kg/dayのHPD(0.3% tartrateで溶解）を毎日一回21日間腹腔内投与した。最終投与24時間後に断頭し、脳を取り出しmicro-slicer(Dosaka EM Co.)で350μm x 4mm i.d.の線条体ｽﾗｲｽを作成した。このｽﾗｲｽを両端に電極を備えたﾃﾌﾛﾝ製のchamberに封入し37度ｃで酸素を飽和した Krebs液を1ml/minの速度で灌流し灌流液中のDA遊離の測定をおこなった。Krebs 液の組成は以前我々が報告したものに3μM のnomi-fensinを加えたものを用いた。灌流開始40分後に5分間のfractionを分取し基礎遊離量とした。続く5分間に5mA,1Hz,60sec, 2msec durationで電気刺激してS1 fractionと

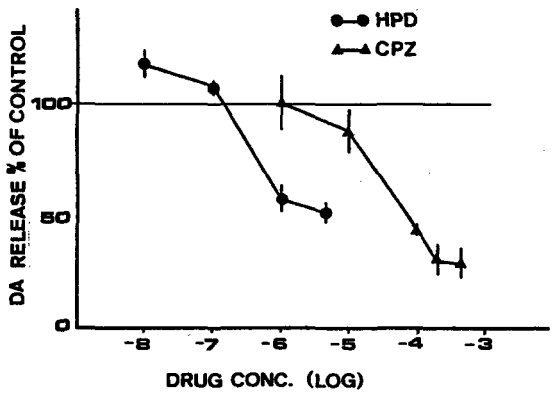



Fig.1

した。 その後40分間種々の濃度のHPDあるいはchlorpromazine(CPZ)を含むKrebs液を灌流し前回と同様に2つのfractionを採取し刺激したものをS2 fraction とした。分取したfractionには5ngのdihydroxybenzylamineを加えalumina吸着法によりDAの抽出を行い、HPLCで測定した。結果の表示にはfraction中のDA量をng/chamberあるいはS2/S1比を対照群と比較した。

結果

本実験系においてDAの基礎遊離量は118+11.7pg/fraction/5 minでありHPD慢性投与群では78.6±8.5pg/fraction/5 minと約35%の有意な減少が認められた。電気刺激により0.78 ± 0.15 ng/fraction/5 minのDAの遊離が認められた。このDA遊離はｶﾙｼｳﾑ依存性でありS2/S1 ratio は1.4±0.12であった。刺激誘発DA遊離にたいするHPDの影響を見るために$10^{-6}$-$10^{-8}$MのHPDをKrebs液に混ぜて灌流すると図1に示すように$10^{-8}$MではS2/S1 ratio は増加傾向を$10^{-6}$Mでは有意な減少が認められた。またCPZでは$10^{-4}$M以下で同様のDA遊離の低下が観察された。一方、HPD慢性投与群に於いては電気刺激誘発DA遊離量は対照群の40%の有意な低下が認められた。また$10^{-6}$MのHPDをKrebs液と共に灌流すると対照群で認められた電気刺激誘発DA遊離量の低下作用が消失した（Fig.2）。

考察

比較的高濃度のHPD灌流によるDA遊離低下作用については以前[3]Hﾗﾍﾞﾙのを用いた研究があるが[1,3]今回内因性DA遊離でもこの現象が観察された。この作用は大量のHPD急性投与で線条体DA代謝産物が減少するという報告を裏付けるものである[5]。近年HPD慢性投与後にDA神経終末のDA代謝回転が低下しており、この低下時期と臨床効果発現時期がほぼ一致することからこの作用が注目されている。今回の実験でHPD慢性投与により線条体ｽﾗｲｽからのDA基礎遊離量ばかりでなく電気刺激誘発DA遊離量も減少が認められたことはHPD慢性投与後にDA代謝産物が有意に低下する報告と矛盾しない[5]。更にこの変化がin vitroのｽﾗｲｽで見られたことはlong loop feedbackの関与がなくてもDA 遊離の低下が生じることを示しており、これはHPD慢性投与に依って生じたDA auto-receptor のsupersensitivityによるという従来の仮説を支持するものである。HPD慢性投与群の線条体ｽﾗｲｽにおける$10^{-6}$M HPD灌流時のDA遊離低下作用の消失の機序については今後さらに検討したい。

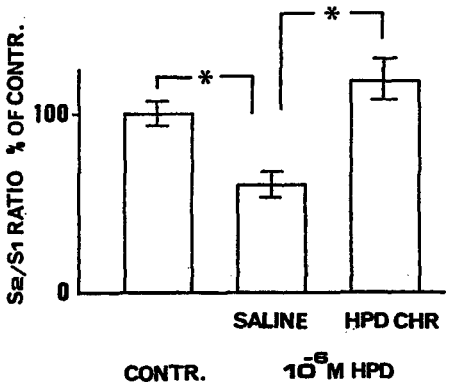



Fig.2 Saline 投与群で$10^{-6}$MのHPDの灌流によりDA遊離は40%減少する。一方HPD慢性投与群(HPD CHR)ではこの減少消失する。
(* P<0.01,n=12)

References: 1)Dismukes K. et al (1977) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.297,23-29, 2)Langer SZ and Lehmann (1988) In Catecholamines 1,Handb.Exp.Pharm.(Edts U.Trendelenburg and N.Weiger)pp419-507 3)Miller J.C. et al (1979) Biochem. Pharmacol. 28,691-692 4)Seeman P. and Lee T. (1975) Science, 188, 1217-1219 5) Wen-Ho Chang et al (1986) Biol.Psychiatr. 21, 374-381

# 148 脳内透析灌流法による視床下部ノルアドレナリンの経時的測定－拘束ストレスによる影響－

横尾秀康、田中隆彦、津田彰、田中正敏 (久留米大 医 薬理)

〔要約〕

視床下部を透析灌流することにより灌流液中のnoradrenaline( NA ) レベルの経時的な測定を行ない、拘束ストレス負荷によるこのNAレベルの変化について調べた。 前視床下部に透析チューブを植え込まれたラットは手術24時間後より灌流を開始し、1 時間の無拘束の状態で灌流液中に回収されたNAを20分毎に測定した。 さらに、拘束ストレス負荷を施し、20分後にこれを開放した。そして同様にこの間に得られた灌流液中のNAの測定をおこなったが、NAレベルは拘束直後よりその前値に比べ有意の増加を示し、拘束開放後もNAの高値は持続した。 NAは拘束開始より 2時間後に前値のレベルまで戻り、その後は一定の値が維持されていた。 以上の結果より、拘束ストレス時において視床下部 NA 神経の活動性の亢進が引き起こされており、ストレスにおける脳内 NA 神経系の関与が示唆された。

脳内透析灌流法を用いての研究は、これまで monoamineにおいては主に dopamine に関する報告が多く、noradrenaline( NA ) に関する報告は少ない、さらに、これらの研究の多くは薬物の影響に関するものが主であり、動物の行動や、外界から受けた刺激（ストレス暴露）に対して中枢がどのように反応するかといった面から、本法を用いての研究はほとんどなされていない。

演者らは、ストレス状況下での中枢 NA 代謝回転の変化を NA の主要代謝産物である MHPG-$SO_4$ を指標に研究を行ってきている。これまでの研究によってストレス状況下では NA 代謝回転は著しく高まり、この NA 代謝回転の亢進はストレス開放後もなお持続している。 また、この現象は広範な脳部位で観察される(4,5,6) 。 今回、我々は脳内透析灌流法を用いて視床下部 NA の経時的測定を行ない、拘束ストレス時においてこの NA がどのような変化を示すかを調べた。

（方法）

Wistar雄性ラット(250 - 300 g) を用い麻酔下でU字型の透析チューブを視床下部に植え込む手術を行った。 透析チューブは George Paxinos & Charles Watson(2)のラット脳アトラスに基づき、 前視床下部 ( Bregma より後 1.8、外側 0.8、脳硬膜表面より 9.0 mm ) へ挿入し固定した。 手術24時間後に灌流装置に接続し、動物を自由に動かしながらKrebs 液をを用い1.7 μl/min の流速で灌流を開始した。 灌流開始より 1時間後から 20 分毎に灌流液の採取を行なった。 はじめの 1時間の試料は視床下部からの NA の基礎遊離量の測定のために用いた。 その後、金網による20分間の拘束を施し、拘束開始から 3時間、前述のように灌流液を採取した。 試料は全量を電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーを用いて NA の測定を行った。 拘束による変化は、その前値を対照とし拘束後に得られた NA 値との間で比較検討した。 統計学的有意差は Student's t-test を用いて検定を行った。

（結果　と　考察）

視床下部の透析灌流で得られた試料の測定結果は図 1に示すように、この部位より遊離してくる NA の基礎遊離量は、5.47±0.37 pg/20 min ( n = 6 )であった。　Badoer らも同じ部位で NA の測定を行っており、彼らの報告と一致している。次に、20分間の拘束ストレスを行ったが拘束時に得られた灌流液中の NA 量は 11.47±1.85 pg/20 minと急激な増加を示し、これは基礎遊離量との間で有意な変化であった。　さらに、拘束開放後においては40分後まで NA の有意な増加が認められ、その後、減少が見られ 2時間後には基礎値に達し実験終了まで同様のレベルが持続した。

以上の結果より、拘束ストレスにより視床下部から NA 遊離の亢進がみられ、そして、この遊離の増加は拘束開放後においても認められ 1時間を経過した時点において減少しはじめ、 2時間以後は基礎遊離レベルとなる。　このことは、拘束ストレスを一定時間（30分から 1時間以上）負荷すると、脳内各部位で NA の代謝産物である MHPG-$SO_4$ の増加が認められ (4､5､6)、　また、短期拘束ストレス（10分間）によってその拘束開放60分後まで MHPG-$SO_4$ の増加が認められる(3) といった結果を支持するものである。

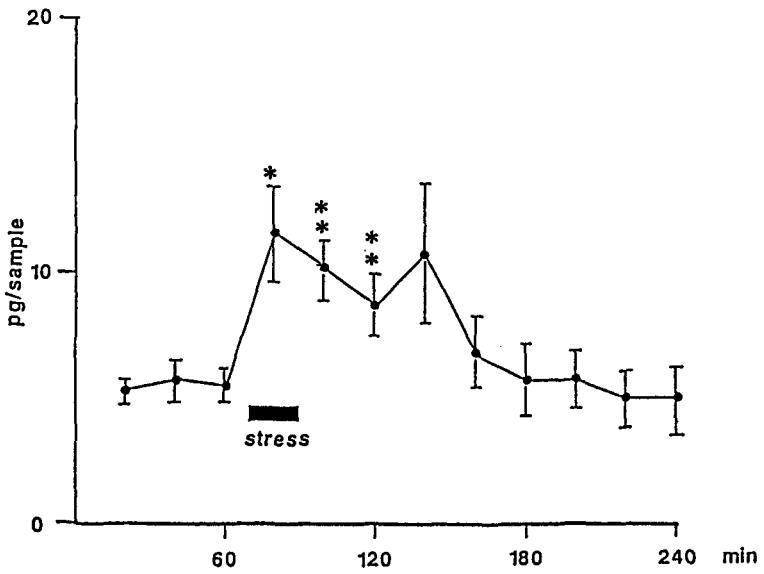



Fig.1. Effect of the immobilization stress on hypothalamic noradrenaline release in vivo. In fourth sample, the animal was exposed to the immobilization for 20 min. Each sample represents a 20 min collection period. The value indicates the mean ± S.E.M. of 5-6 rats. Statistically significant as compared to the basal values. * P < 0.05, **< 0.01

（文献）

(1) Badoer E.,et al.1989 Arch Pharmacol , 339:54-59. (2) Paxinos G. and Watoson C. 1982 The Rat Brain ,Academic Press. (3)権藤雄二ら 1988 神経化学 27:298-299. (4) Ida Y.,et al.1985 Life Sci. ,37:2491-2498. (5) Tanaka M.,et al.1982 Pharmacol Biochem Behav , 16:315-319 (6) Tsuda A. and Tanaka M., 1985 Behav Neurosci ,99:802-817.

# 149 3種類のモノアミン生合成活性化因子の構造と組織分布

市村 徹，礒辺 俊明，奥山 典生，荒木 一明*，桑野 良三*，高橋 康夫*
（都立大・理・化学，*新潟大・脳研・神経薬理）

〔要約〕

3種類のモノアミン生合成活性化因子（14-3-3タンパク質β，γ，η鎖）の構造と組織分布を解析した。β，γ，η鎖はいずれも独立した遺伝子からの産物であり、244(β)，245(γ)，246(η)個のアミノ酸より成る分子量27,818、27,976、28,221の糖を含まないポリペプチドであった。各配列は互いに似かよっており(75%，β/γ；75%，β/η；85%，γ/η)，また水酸化酵素活性化領域と推定した構造も共通に認められた。β，γ，η鎖mRNAは脳組織に高濃度（他臓器の10倍以上）に分布していた。しかしながらβ鎖mRNAは小腸、副腎、肝臓に、η鎖mRNAは骨格筋においてもそれぞれ検出された。この様な組織特異的発現はチロシン及びトリプトファン水酸化酵素(TH,TRH)活性を調節する制御機構の一つであると推定した。

神経伝達物質あるいはホルモンとして生体内で諸種の調節的な役割を担っているカテコールアミンやセロトニンは、その生合成系の律速段階酵素である TH，TRHの活性制御を通じてその生体内レベルが維持、制御されている。制御の機構としては誘導による酵素、補酵素（ﾃﾄﾗﾋﾄﾞﾛﾋﾟｵﾌﾟﾃﾘﾝ）量の調節や、生成モノアミンによるフィードバック調節など各種の様式が知られているが、中でも外的刺激に連動したcAMP或いは$Ca^{2+}$依存性のリン酸化反応は短期的、また長期的な酵素活性の制御機構として広く注目されている。我々は脳組織から分離した14-3-3タンパク質（以下14-3-3）が TH,TRHを$Ca^{2+}$，カルモデュリン/キナーゼIIによるリン酸化反応に依存し、活性化する因子である事を見出した[1]。また一方で14-3-3が7種類の分子種（α～η鎖）を含む不均一なタンパク質である事を示唆し、その一成分（η鎖）については全構造を決定した[2,3]。本研究では、14-3-3β，γ鎖の構造を決定しη鎖を含めた構造比較とそれらの組織分布を検討した。

＜実験方法＞ 14-3-3の調製：14-3-3標品はウシ脳(20Kg)の可溶性画分から硫安分画（30% pH7.1-85% pH4.7)，DEAE-Sephadex A-50，Sephadex G75カラムを用いた既報の方法[5]で分離した。
α～η鎖の分離：α～η鎖は Senshu Pak VP304-5061カラム(20 I.D.X 60mm)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）。
cDNAクローンの調製と塩基配列決定：cDNAライブラリーはウシ小脳poly(a)$^+$RNAより既報の方法[2]で構築した。このライブラリーをη鎖の部分アミノ酸配列から化学合成した17merのオリゴヌクレオチドプローブでスクリーニングし、6種の陽性クローンを分離した[2]。各クローンの配列は Maxam-Gilbertの方法[7]で決定した。
ノーザンブロット解析：ノーザンブロッティング及びハイブリッド形成はKuwano[6]に従った。プローブのDNA断片はランダムプライマー法で$^{32}$P標識した。

＜結果と考察＞14-3-3の不均一性：ウシ小脳cDNAライブラリー(3X10$^4$ｸﾛｰﾝ)を実験方法に記した手順でスクリーニングし、6種の陽性クローン(pAP-62,-115,-141,-142,-144,-149)を分離した。ヌクレオチド配列を決定したところ、この内の4種(pAP-62,-141,-142,-149)はη鎖mRNAに対応していた[2]。一方、pAP-115と-144はη鎖cDNAと類似の構造をもつ433bpと582bpのcDNA断片であり、η鎖cDNA[2]の190番目から634番目、217番目から798番目にそれぞれ対応していた。塩基配列は69%、79%がη鎖cDNAと同一であった。次に pAP-115,と-144の配列から予想されるポリペプチド成分の単離を試みた。逆相HPLCを用いた検討からウシ脳14-3-3標品には、η鎖以外に6種のポリペプチド（α～ζ鎖）が存在していると考えられた（図1a，文献 2,3）。単離したα～ζ鎖（図1b）はSDSゲル電気泳動でη鎖と類似の分子量(28kDa)を示し、またすべてがTRH活性化能を保持していた[3]。しかしながら、各ポリペプチドのアミノ酸配列には互いにまたη鎖とも異なる箇所が複数認められた。この配列分析からpAP-115と-144はβ及びγ鎖構造の一部をコードしている事が分かった。
β，γ，η鎖構造の比較：β，γ鎖の全構造は pAP-115と-144のヌクレオチド配列分析とウシ脳組織より分離したβ，γ鎖（図1b）の CNBr及びリシルエンドペプチダーゼ 消化物のアミノ酸配列分析により決定した。β，γ，η鎖は 244(β)，245(γ)，246(η)個のアミノ酸より成る分子量 27,818、27,976、28,221の糖を含まないポリペプチドであった。各配列は相互に 75%(β/γ)、75%(β/η)、85%(γ/η)の類似性を示した。またこの配列中には、以前推定した水酸化酵素活性化領域[2]や cAMP或いは$Ca^{2+}$依存性リン酸化配列も共通に認められた（図 2）。しかしながら、各配列に点在するアミノ酸変異（図 2）やpAP-115，-144，η鎖cDNAの塩基配列の相違より、β，γ，η鎖は独立した遺伝子からの翻訳産物であり alternative splicing等の機序により生じたものではないと考えられた。

β，γ，η鎖mRNAの分布：ウシ小脳poly(A)⁺RNAを用いたノーザンブロット分析から 3kb(β)，4.2kb(γ)，1.8kb(η)付近のmRNAを認めた（図3a）。これらと同一サイズのmRNAはヒトおよびマウス脳においても観察された（図3a）。この事は、14-3-3分子種がウシ以外の動物脳にも存在する事を示している。

β，γ，η鎖mRNAは脳組織に高濃度に分布していた（図3b；レーン1-3）。14-3-3は神経細胞に局在する事が免疫組織化学的に報告されている[4]。従って、これらのmRNAは神経細胞に由来するのものと考えられた。一方、β鎖mRNAは副腎、肝臓、小腸（図3b；レーン4,5,7）に、η鎖mRNAは骨格筋（図3b；レーン6）にも検出された。これと類似の組織特異的発現はキナーゼIIやTH分子でも報告されており、細胞内のモノアミンレベルを調節するための制御機構の一つであると推察した。

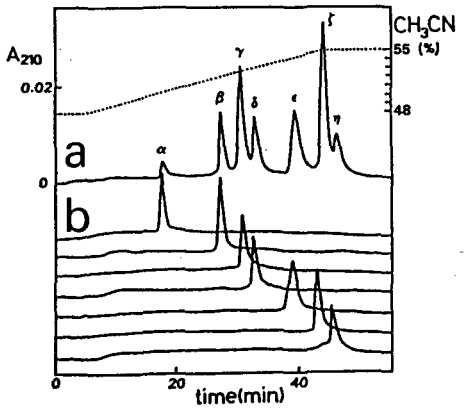



図1 逆相HPLCによるα～η鎖の分離

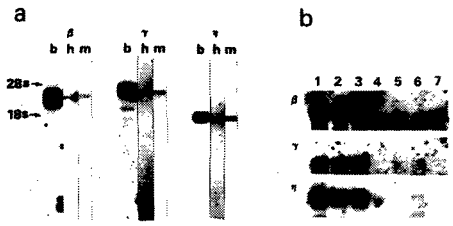



図3 ノーザンブロット解析
a）レーン：b，ウシ、h，ヒト、m，マウス
b）レーン：1，小脳、2，大脳、3，脳幹、4，副腎、5，肝臓、6，骨格筋、7，小腸

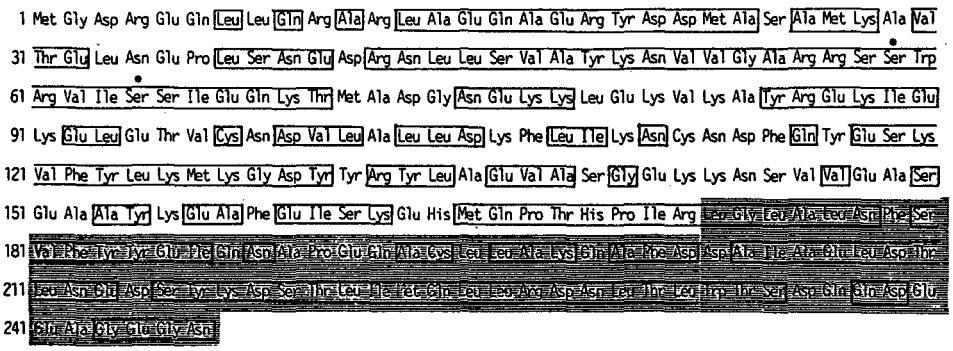



図2 アミノ酸配列の比較；η鎖構造において、β、γ、η鎖に共通のアミノ酸を枠で囲んだ。網線は水酸化酵素活性化領域[2]を、＊はcAMP或いは$Ca^{2+}$依存性リン酸化配列でのセリン残基を示した。

＜文献＞
1. Ichimura,T., Isobe,T., Okuyama,T., Yamauchi,T. & Fujisawa,H. (1987) FEBS Lett. 219, 79-82.
2. Ichimura,T., Isobe,T., Okuyama,T., Takahashi,N., Araki,K., Kuwano,R. & Takahashi,Y. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7084-7088.
3. 市村 徹，磯辺 俊明，奥山 典生 (1988) 神経化学 27, 252-253.
4. Isobe,T., Ichimura,T. & Okuyama,T. (1989) Arch. Histol. Cytol. 52, in press.
5. 門屋 利彦，田村 明敬，市村 徹，真鍋 敬，磯辺 俊明，奥山 典生，中島 孝 (1985) 神経化学,24,37-39.
6. Kuwano,R., Usui,H., Maeda,T., Fukui,T., Yamanari,N., Ohtsuka,E., Ikehara,M. & Takahashi,Y. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 7455-7464.
7. Maxam,A.M. & Gilbert,W. (1980) Methods Enzymol. 65,499-560.

# 150 マイクロダイアリシス法による脳内神経性ヒスタミン動態の検討

望月貴年, 大和谷 厚, 岸野淳二, 竹村基彦, 稲垣直之, 和田 博
（大阪大学・医学部・第二薬理）

〔要約〕

ラットの視床下部におけるヒスタミンの遊離を，マイクロダイアリシス法と高感度高速液体クロマトグラフィー法を用いて麻酔下で測定した．ヒスタミン神経の神経終末が密に存在する視床下部前部に透析プローブを刺入し，細胞体が局在する結節乳頭核を電気刺激すると，ヒスタミンの遊離が有意に増加した．また，高$K^+$液で灌流し神経終末を刺激しても同様の結果が得られた．しかし灌流液から$Ca^{2+}$を除去すると，電気刺激や高$K^+$刺激によるヒスタミン遊離の増加は認められなかった．このように，脱分極性刺激に応答して増加するヒスタミンの遊離は，神経伝達物質としてのヒスタミンの動態を示しているものと考えられる．

ヒスタミン神経系は視床下部後部の結節乳頭核を起始核とし，大脳皮質，視床下部をはじめとして脳内の広範な部位に線維を投射している[1]．そして，睡眠覚醒，神経内分泌，体温調節，摂食行動，血圧調節，平衡感覚などの制御にヒスタミン神経系が深く関与していると考えられるが[8]，その詳細な神経化学的機構については不明である．

われわれはすでに視床下部切片を in vitro で灌流し，ヒスタミンの遊離がω-コノトキシン感受性のカルシウムチャンネルに依存していること[5]，アスパラギン酸やグルタミン酸で遊離が増強し，ＧＡＢＡ，アデノシン，サブスタンスPで抑制されること[2]などを報告した．近年，透析膜を用いたin vivo マイクロダイアリシス法が，ドーパミンやアセチルコリンなどの神経伝達物質の脳内動態の測定に応用されている[6]．そこで本研究では，このマイクロダイアリシス法をラット視床下部からの神経性ヒスタミンの遊離の測定に応用し，より生理的な状態での脳内ヒスタミン動態を調べるための基礎的な条件について検討した．

## 実験方法

ＬＥ系雄性ラット(220-300g)をウレタン麻酔下(1.2g/kg, i.p.)に脳定位固定装置に固定し，透析プローブ(CMA/10, 2mm)をヒスタミン神経終末の密に存在する視床下部前部（AHy, bregmaより P 1.5, L 0.5, V 8.7-9.2mm)に，そして同側の結節乳頭核（TM, bregmaよりP 3.6-4.1, L 1.3, V 8.8-9.5mm）に細胞体電気刺激用の双極電極を刺入した．刺入後160分間は8μl/分の流速で人工脳脊髄液（$Na^+$140mM, $K^+$3mM, $Ca^{2+}$2.5mM, $Cl^-$144mM)を灌流し，その後，1μl/分の流速に落して20分毎のサンプリングを開始した．電気刺激は50Hz，パルス幅 0.1msec，100または200μAの矩形波で，また，高$K^+$刺激は100mMKClを液中の等張NaClと置換した灌流液を用い，通常の灌流液でのサンプルを1ないし2本採取した後，40分間隔でそれぞれ20分間行った．また，これらの刺激によるヒスタミン遊離の$Ca^{2+}$依存性は通常の灌流液での電気または高$K^+$刺激を2回行なった後，60分間$Ca^{2+}$を除去した上に4mMのEDTAを加えた灌流液で灌流したのち同じ刺激を2回行なうことにより検討した．

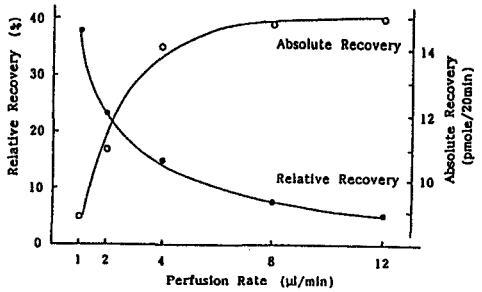
実験後，ラットの左心室より組織固定液を注入灌流し脳を摘出して前額切片を作成し，プローブと電極の先端位置を確認した．サンプル中のヒスタミンはHPLC-蛍光分析法により測定した[7]．短いカラム(SP2SW, 4×50mm, 東ソー)を用いることと発蛍光反応系の条件を改良することにより分析感度の飛躍的な向上に成功し，測定限界は0.01pmol/20μlであった．

## 結果と考察

ヒスタミンの透析効率を調べるために，まずin vitroで回収率を測定した．Fig.1は37℃で保温した1μMのヒスタミン溶液を2mmの透析プローブで灌流した結果を示した．実際の実験に用いた流速1μl/minでは平均37.7%の回収率であった．

Fig.2は100μA及び200μAの結節乳頭核(ヒスタミン神経系の細胞体が存在する)の電気刺激と視床下部前部のヒスタミン神経終末の高$K^+$刺激によるヒスタミンの遊離量の変化

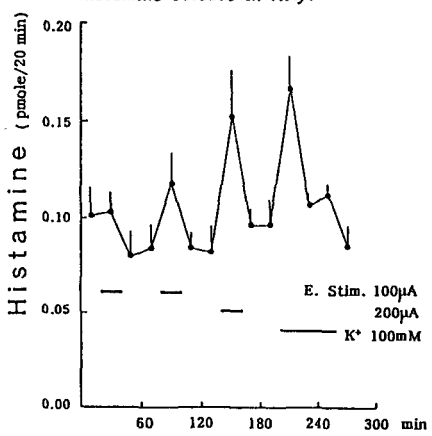
Fig. 1 Relationship between the perfusion rate and relative and absolute recoveries.



を示した．通常の灌流液では平均0.09±0.01pmole/20minの基礎遊離が100μA，200μAの電気刺激や高$K^+$刺激によってそれぞれ0.12±0.02，0.15±0.02，0.17±0.02pmole/20minに増加した．このヒスタミンの遊離増加は神経細胞体や神経終末の脱分極性刺激に応答していることから，電位依存性カルシウムチャンネルの欠如している肥満細胞[4]にプールされているヒスタミンによるものではないものと考えられる．

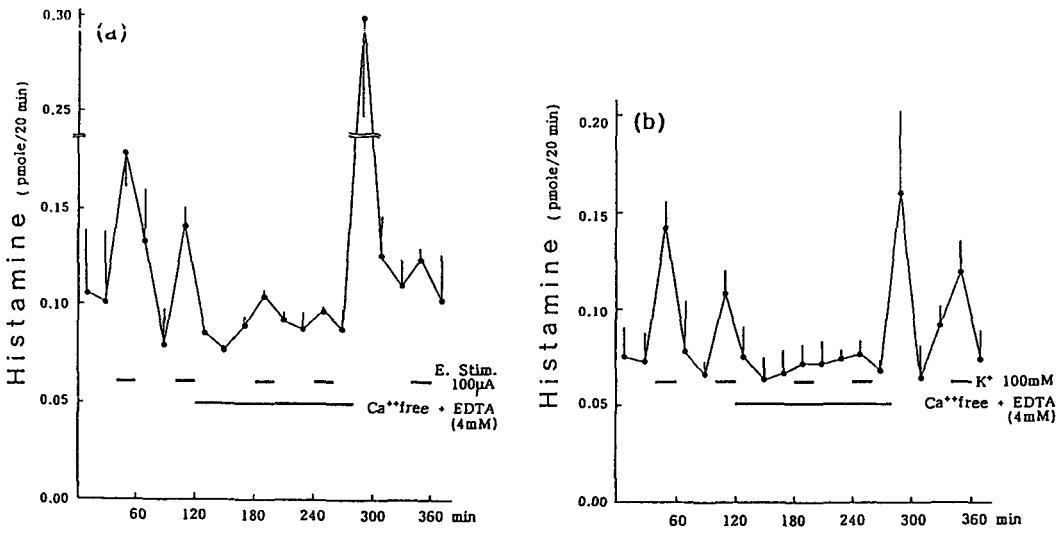
次に，結節乳頭核細胞体の電気刺激による神経終末部位でのヒスタミン遊離に及ぼす$Ca^{2+}$除去の影響を検討した（Fig. 3a）．通常の条件では基礎遊離（0.10±0.03pmole/20min）の約154%に電気刺激による遊離（0.16±0.01pmole/20min）が増加するが，灌流液から$Ca^{2+}$を除去すると刺激による有意な増加は認められなかった（0.10±0.00 pmole/20min）．同様に，神経終末部の高$K^+$刺激に対する$Ca^{2+}$除去の影響についてもFig. 3bに示すように，通常の条件での約175%の増加（基礎遊離量:0.07±0.02pmole/20min，高$K^+$刺激遊離量:0.13±0.01 pmole/20min）に対し，$Ca^{2+}$除去条件では遊離増加が完全に抑制された（0.07±0.01pmole/20min）．灌流液からの$Ca^{2+}$除去はヒスタミンの電気刺激および高$K^+$刺激による遊離を著明に減少させていることから，このような脱分極性刺激に応答するヒスタミン遊離量の増加は神経細胞由来のものであると考えられる．なお，$Ca^{2+}$除去条件から通常の灌流条件に戻した直後に 0.30±0.05（Fig. 3a），0.16±0.04pmole/20min（Fig. 3b）の大きなヒスタミン遊離が観察された．

Fig. 2 Effects of TM electrical stimulation and AHy high $K^+$ perfusion on histamine release in AHy.




以上のように，高感度高速液体クロマトグラフィー法と in vivo マイクロダイアリシスを組み合わせることにより，脳内の神経性ヒスタミンの動態を観察することができた．

Fig. 3 Effects of extracellular $Ca^{2+}$ on histamine release in AHy evoked by TM electrical stimulation (a) and AHy high $K^+$ perfusion (b).





1) Inagaki, N., Yamatodani, A., Ando-Yamamoto, M., Tohyama, M., Watanabe, T., and Wada, H. (1988) J. Comp. Neurol. 273, 283-300

2) Kishino, J., Takemura, M., Yamatodani, A., and Wada, H. (1989) Neurosci. Res., in press

3) Takemura, M., Kishino, J., Yamatodani, A., and Wada, H. (1989) Brain Res., in press

4) Penner, R., Matthews, G., and Neher, E. (1988) Nature 334, 499-504

5) Ungerstedt, U. (1984) in "Measurement of Neurotransmitter Release In Vivo" (C. A. Marsden ed.) pp81-105, John Wiley & Sons

6) 和田 博，大和谷 厚 (1987) in "続 脳の生体警告系 不安・不快・痛みの機構"（高木博司，大村 裕，伊藤正男 eds）pp43-62，東京大学出版会

7) Yamatodani, A., Fukuda, H., Wada, H., Iwaeda, T., and Watanabe, T. (1985) J. Chromatogr 344, 115-123

# 151 培養牛副腎髄質クロマフィン細胞の開口放出に及ぼす百日咳毒素（ＩＡＰ）の作用

今泉美佳，河江信幸，武田京子，熊倉鴻之助
（上智大学・生命研・神経化学）

〔要約〕
牛副腎髄質から調製した初代培養クロマフィン細胞を用いて、百日咳毒素（IAP)感受性ＧＴＰ結合蛋白質を特異的にＡＤＰ-リボシル化することが知られている IAPのカテコールアミン(CA)分泌に及ぼす作用を検討した。IAP によって細胞を前処理すると、アセチルコリン(ACh)刺激及び highK$^+$ 刺激による CA分泌は用量依存性に増大した。また、Histamine 刺激及び GABAによる CA分泌もIAPによって増大した。IAP 前処理した細胞において ACh による CA分泌の外液 $Ca^{2+}$濃度の影響を調べると、未処理細胞と同様、$Ca^{2+}$濃度依存性の飽和曲線が得られたが、maximal response は増大し、$Ca^{2+}$の half maximal concentration は大きく減少した。これらのことから、IAP 前処理によるCA分泌の増強は、エキソサイトーシスを引き起こすための $Ca^{2+}$のefficacyが高められた結果であると推察される。これらの結果により、$Ca^{2+}$が開口放出を引き起こす分子機構においてIAP感受性ＧＴＰ結合蛋白質が関与している可能性が示唆された。

近年、分泌細胞において、その分泌機構にＧＴＰ結合蛋白質の関与が示唆されてきているが不明な点が多い(1)。牛副腎髄質クロマフィン細胞には 39,40,41 KDa の３つの蛋白質がIAP によって特異的にＡＤＰ－リボシル化されることが報告されている(2)。一方、我々は最近 clonidine のCA分泌抑制作用が IAP 処理によって選択的に減弱することを報告しているが、その際、IAP 処理によって ACh刺激による CA分泌そのものが増大することをすでに見い出している(6)。そこで今回我々は、開口放出の分子機構への IAP感受性ＧＴＰ結合蛋白質の関与を明確にする目的で、IAPの CA分泌に及ぼす作用を検討した。

［実験方法］　クロマフィン細胞は牛副腎髄質から既報のように調製し、10 % 牛胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium 中で単層培養した(6)。実験には培養 4～10 日の細胞を用いた。また、各濃度の IAP（科研）を培養液中に加えて20 hr 培養した細胞を実験に用いた。CA分泌の測定には、培養細胞を Locke's 液で洗浄後、Locke's 液で 30℃、5 min間 preincubation した後、ACh、KCl、Histamine、GABA で各々 3 分間分泌刺激を行なった。Locke's液中に分泌されたCAと細胞含有 CA を 0.4 M 過塩素酸で抽出し、HPLC 法により CA 定量を行なった(4)。

［結果および考察］　IAPによって細胞を前処理すると、ACh刺激及び high K$^+$ 刺激による CA分泌は、図１のように増大した。クロマフィン細胞では Histamineにより $H_1$ 受容体を介した CA分泌が引き起こされることが知られている(5)。また、クロマフィン細胞には GABA 受容体が存在し、GABAは脱分極を引き起こすことによって CA分泌を引き起こすことを我々はすでに報告している(3)。図１に示したようにこれらの Histamine刺激および GABA刺激によるCA分泌もIAPによって同様に増大した。この IAPの分泌増強作用はIAPの処理用量に依存し、IAP 100 ng/mlで最大効果が得られた。

ACh刺激によるCA分泌の用量反応曲線に及ぼす IAPの作用を示したものが図２である。IAP前処理細胞は、見かけ上、Ｖmax を大きくしているが、AChの ＥＣ$_{50}$の値には影響を及ぼさなかった。

IAP前処理した細胞において AChによる CA分泌に及ぼす外液 $Ca^{2+}$ 濃度の影響を調べたものが図3である。未処理細胞と同様、$Ca^{2+}$ 濃度依存性の飽和曲線が得られた。しかしながら、未処理細胞に比べて maximal responseは増大し、$Ca^{2+}$の half maximal concentration は大きく減少した。最近の報告[7]によると、carbamylcholine- または high $K^+$-刺激による CA分泌は IAPによって増大するが、このとき $Ca^{2+}$ influx 量、及びInositol triphosphateの生成量は変わらないことが示されている。従って、今回の実験でIAP処理によってもたらされたCA分泌の増大は、$Ca^{2+}$流入以降のプロセスにおける$Ca^{2+}$のefficacyが高められた結果であると推察される。これらの結果により、$Ca^{2+}$が開口放出を引き起こす細胞内分子機構において IAP感受性ＧＴＰ結合蛋白質が関与している可能性が示唆された。

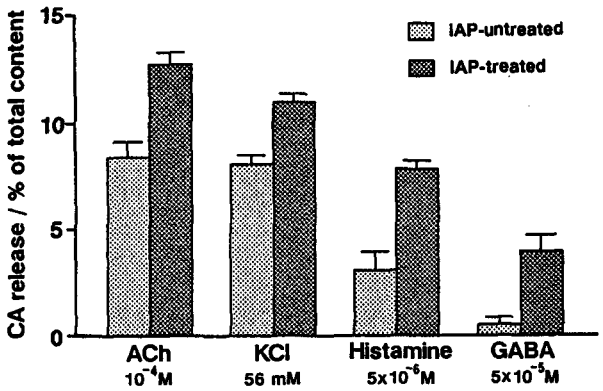



図1. ACh, high K+, Histamine及びGABA刺激によるCA分泌に及ぼすIAPの効果

各実験群はbasal CA releaseを差し引いた値を示している。
IAP: 100 ng/ml for 20h

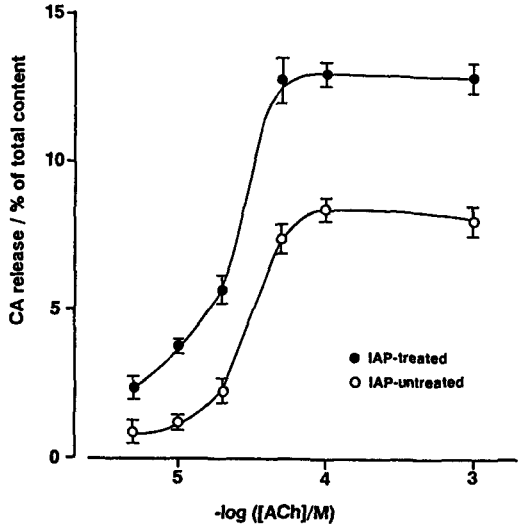



図2. ACh刺激によるCA分泌の用量反応曲線に及ぼすIAP(100 ng/ml for 20h)の影響

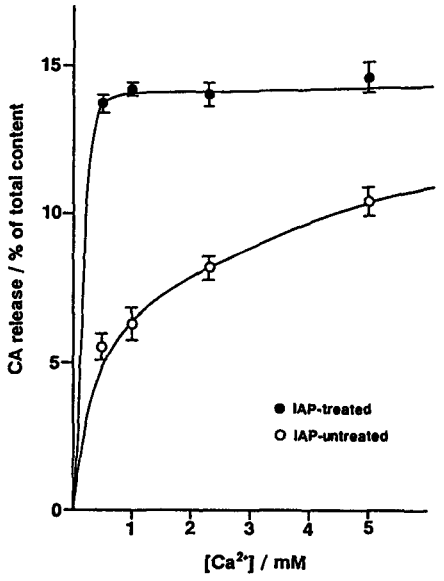



図3. ACh刺激によるCA分泌の[$Ca^{2+}$]依存性に及ぼすIAP(100 ng/ml for 20h)の影響

[文献]
1. Barrowman, M.M., Cockcroft, S., and Gomperts, B.D. (1986) Nature 319, 504-507
2. Bittner, M.A., Holtz, R.W. and Neubig, R.R. (1986) J. Biol. Chem. 261, 10182-10188
3. Kataoka, Y., Ohara-Imaizumi, M., Ueki, S., Kumakura, K. (1988) J. Neurochem. 50, 1765-1768
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. Ohara-Imaizumi, M., Miyakawa, Y., Kumakura, K. (1988) Neurosci. Lett. 93, 294-299
7. Sasakawa, N., Yamamoto, S., Nakaki, T. and Kato, R. (1988) Biochem. Pharmacol. 37, 2485-2487

# 152 副腎クロマフィン細胞内遊離Ca濃度の動揺

反町　勝

（鹿児島大・医・第一生理）

〔要約〕
牛副腎より、分離・培養したクロマフィン細胞に、Fura-2を負荷し、細胞内Caイオン濃度を顕微測光法で測定すると共に、カテコラミン（CA）放出、$^{45}$Ca流出速度を調べた。少数の細胞では、$Mn^{++}$により消失する、自発的な$[Ca]_{in}$の小さな動揺がみられたが、TTXでは減弱することはあっても存続した。$[Ca]_{in}$動揺を示さない細胞では、$K^+$チャネル阻害剤（テトラエチルアンモニウム、アパミン）、$Ca^{++}$チャネルアゴニスト(Bay-K-8644)、低濃度のニコチン様受容体アゴニスト、低濃度KClの添加により、しばしば誘発され、$[Ca]_{in}$変化の大きい場合にはCA放出、Ca流出の増加が伴ってみられた。誘発された$[Ca]_{in}$動揺は、$Ca^{++}$除去、$Mn^{++}$添加、D600添加により消滅し、$Na^+$除去、TTX添加により減弱した。従来の電気生理学的知見を考慮すると$[Ca]_{in}$動揺は、活動電位の発生頻度と密接に関連していることが示唆された。

〔目的〕　副腎クロマフィン細胞カテコラミン（CA）放出は、細胞内$Ca^{++}$濃度（$[Ca]_{in}$）の上昇がひきがねとなって生じることは、ACh、高KClによる分泌刺激時に$[Ca]_{in}$が上昇すること[1]、高圧放電やジギトニンによるpermeabilized cell における$Ca^{++}$添加によるCA放出[2]等の事実により証明されている。quin 2を用いた浮遊細胞系における$[Ca]_{in}$の測定は、すでにいくつかのLab，において行われている。この測定は細胞集団の平均の変化を示すが、個々の細胞における変化を反映しているとは限らない。そこで、我々は、個々のクロマフィン細胞$[Ca]_{in}$を、Fura-2[3]による顕微測光法を用いて検討した。

〔方法〕　浮遊クロマフィン細胞は、牛副腎より調整し、培養下に維持した[4]。①$[Ca]_{in}$測定－必要時に、0.125%トリプシン，0.2%EDTAを含む無$Ca^{++}$ saline で37℃,20分処理し、個々の細胞に分離した後、poly-L-lysine（10μg/ml）をコートしたカバーガラスに接着し、翌日以後用いた。1μM Fura-2/AM を、37℃,30分 負荷した細胞表面をたえず（0.5-1ml/分）潅流液で流し、340，380nmの2波長励起蛍光変化を日本分光CAM-200により測定した。②CAおよび$Ca^{++}$流出測定－$^{45}$Caを予めとりこませた浮遊細胞をswinnex Filter holder に装着したGF/C ろ紙上にトラップし、1ml/min の速度で潅流し、流出するCAと$^{45}$Caをそれぞれ蛍光法、液シン法で測定した[5]。

〔結果〕　潅流開始時、$[Ca]_{in}$上昇を示す細胞が時にみられたが、外液の$Ca^{++}$に依存しないことから、細胞への物理的刺激により細胞内結合$Ca^{++}$の遊離が生じるものと考えられた。この変化は、一回のみ生じ、以後、潅流液切り換え時にこの変化が生じることはなかった。

1．自発的$[Ca]_{in}$の変化。少数の細胞では、自発的に$[Ca]_{in}$が変化した。このピーク値は低く、規則性はみられず数分で消滅する例が多かった。10μM tetrodotoxin （TTX）の添加により、ほとんど変化のみられない場合と$[Ca]_{in}$のピーク値の低下がみられる場合があったが、消滅した例はなかった。他方2mM$Mn^{++}$の添加は全例でこの動揺を消失させた。（図1）

2．Bay-K-8644の影響。　小さな$[Ca]_{in}$動揺のみられる細胞へのK-8644（Caチャネルアゴニスト）の添加は、$[Ca]_{in}$のピーク値の上昇と頻度の増加をもたらす例が多くみられたが、時には、$[Ca]_{in}$動揺を示さない細胞に対し動揺を誘発する場合がみられた。TTXの添加は、ほとんど影響を与えなかったが、$Mn^{++}$の添加は、動揺を消失させるのみならず、2波長励起の蛍光強度を減弱させる例もみられ、$Mn^{++}$の細胞内への流入が示唆された。細胞集団を用いた分泌実験では、K-8644によるCA放出[45]，Ca流出速度の変化は、ほとんどみられなかった。

3．Tetraethylammonium （TEA）の影響。　Kチャネル阻害剤であるTEA(20mM)の添加は多くの細胞において著明な$[Ca]_{in}$の動揺を誘発した。この変化は、外液$Ca^{++}$除去、2mM$Mn^{++}$や、0.1mM D-600 （Caチャネル阻害剤）の添加により消失したが、TTXでは影響をうけない場合と減弱する場合がみられたが、消失する例はなかった。TEAは、濃度依存的にCA放出、$^{45}$Ca流出速度を増加させた。（表1）これらの増加は、2mM$Co^{++}$ により著明に、TTXにより部分的に抑制され、他方 K-8644の存在下では、著明に増強された。

4．Apamin の影響。　別のKチャネル阻害剤である Apamin（1μM）の添加は、ほとんどの細胞で$[Ca]_{in}$の変化を生じなかったが、少数の細胞では小さな動揺を誘発した。CA放出、$^{45}$Ca流出の増加は、全くみられなかった。

5．Acetylcholine（ACh），nicotine の影響。　比較的高濃度のACh，nicotine は、比較的長く続く著明な$[Ca]_{in}$上昇をひきおこすが、動揺はほとんどみられない。低濃度(1-2μM，ACh，1μM nicotine )では、$[Ca]_{in}$上昇にひきつづき動揺を誘発する例がみられた。この動揺は、Ca除去，Na除去，D-600添加により消失し、TTX添加により減弱した（図2）。

6．12.5mMKClの影響。　分泌刺激閾値濃度KClは、$[Ca]_{in}$の動揺をひきおこしたが、Na除去、TTXにより減弱した.(図3)。

〔考察〕　自発的$[Ca]_{in}$動揺のみられるクロマィン細胞は少数であったが、$K^+$チャネル阻害剤（TEA，Apamin），$Ca^{++}$チャネルアゴニスト(Bay-K-8644)、低濃度のニコチン様受容体アゴニスト（ACh，nicotine）、低濃度KClにより、多くの細胞において$[Ca]_{in}$動揺が誘発された。この動揺は、外液$Ca^{++}$に依存し、$Ca^{++}$チャ

ネル阻害剤で消滅することから、$Ca^{++}$チャネル活性化の動揺を反映するものと考えられた。しかし、この細胞に$Ca^{++}$-iuduced $Ca^{++}$ release の機構が存在すれば、$Ca^{++}$流入による$Ca^{++}$遊離機構の動揺により生じる可能性は除外できないであろう。膜電位依存性$Ca^{++}$チャネル活性化機構として、電気生理学的研究は、以下の可能性を挙げている。① 膜電位の動揺による$Na^{+}$チャネルの活性化が、自発的活動電位を発生する[6]。② ニコチン様受容体の活性化は、受容体チャネルを介した$Na^{+}$, $Ca^{++}$の流入をひきおこし、活動電位の発生頻度を増すと共に脱分極をひきおこす[7]。③ 軽度のＫＣｌ脱分極は、活動電位の発生頻度を増加させる[7]。④ ＴＥＡは、活動電位の再分極相を延長することにより、振巾を増す[8]。観察された［Ｃａ］$_{in}$動揺は、ＴＴＸにより部分的に減弱することから、Ｎａチャネルの活性化の関与が示唆されるが、他方ＴＴＸ抵抗性の［Ｃａ］$_{in}$変化は、$Ca^{++}$活動電位や、直接の脱分極による$Ca^{+}$チャネルの活性化により生じると考えられた。

図1．自発的［Ｃａ］$_{in}$の変化。

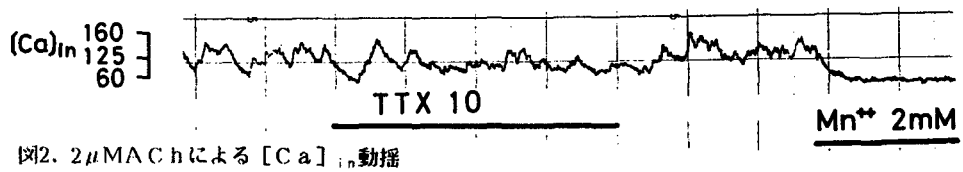



図2．2μＭＡＣｈによる［Ｃａ］$_{in}$動揺

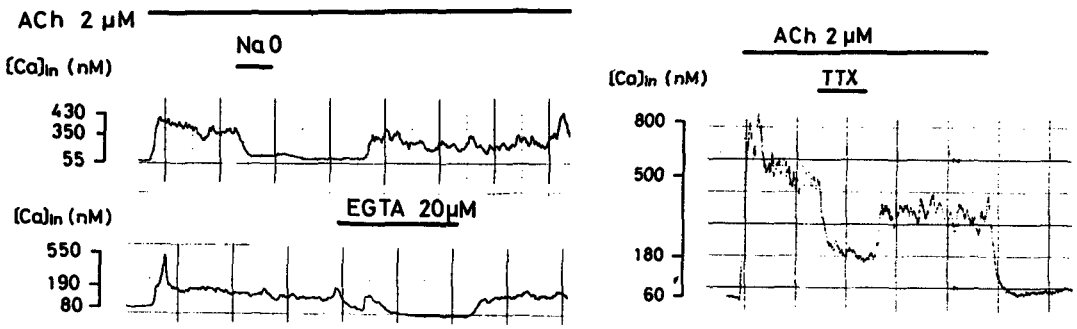



図3．ＫＣｌによる［Ｃａ］$_{in}$動揺

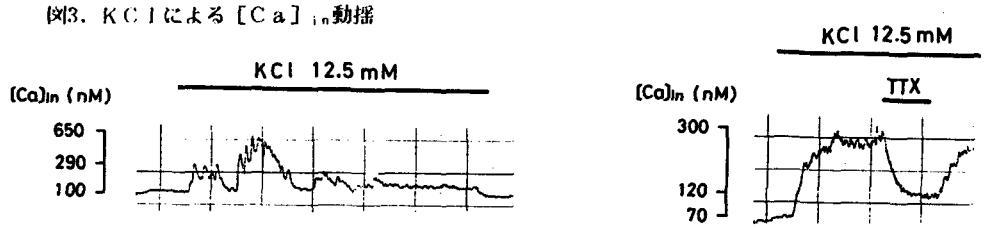



表１．ＴＥＡによるＣＡ放出、Ｃａ流出速度の増加と、これらに対する薬物の影響。

| 刺激 | ＣＡ放出（増加分,％／8分） | Ｃａ流出（増加分,％／8分） |
|---|---|---|
| 5mM | 0.06±0.02(4) | 0.29±0.11(4) |
| 5mM + K-8644(2μM) | 0.64±0.19(4) | 1.89±0.6 (4) |
| 10mM | 0.13±0.07(7) | 0.65±0.26(7) |
| 20mM TTX前 （対照） | 1.03±0.24(5) | 3.25±0.87(5) |
| 20mM TTX （10μM） | 0.44±0.13(5) | 1.47±0.36(5) |
| 20mM TTX後 （対照） | 0.57±0.20(5) | 1.68±0.45(5) |
| 20mM Co前 （対照） | 1.35±0.24(3) | 3.00±0.35(3) |
| 20mM $Co^{++}$ （2mM） | 0.26±0.04(3) | 0.60±0.11(3) |
| 20mM Co後 （対照） | 0.84±0.07(3) | 2.60±0.48(3) |

〔文献〕

(1) Knight, D.E. and Kesteven, N.T. (1983) Proc. R. Soc. Lond. B218 177-199.
(2) Baker, P.F. and Knight, D.E. (1978) Nature. 276 620-622.
(3) Grynkiewicz, G. et al (1985) J.Biol. chem. 260 3440-3450.
(4) Fenwick, E.M. et al (1978) J.Cell. Biol. 76 12-30.
(5) Nishimura, S. and Sorimachi, M. (1984) Jap. J. physiol. 34 731-745.
(6) Kidokoro, Y. et al (1982) J.Physiol. 324 203-220.
(7) Brandt, B.L. et al (1976) J. Physiol. 263 417-439.
(8) Nassar-Gentina et al (1988) Am. J. Physiol. 254 C675-C683.

## 153 マストパラン刺激時に見られるラット脳神経終末からの$Ca^{2+}$放出について。

都築紀宏 （名古屋市大・医・生化学）

〔要約〕

ラット脳神経終末をベラトリジン及びマストパランで刺激した際に見られるＡＴＰの放出並びに$Ca^{2+}$の挙動について調べた。(i) ＡＴＰの放出は$Ca^{2+}$添加を必要としなかったが、刺激時には終末内$Ca^{2+}$プールの動員に基づく終末内 free $Ca^{2+}$濃度の増大が見られた。(ii) マストパラン刺激時には終末外への$Ca^{2+}$放出が起こり、この結果は$^{45}Ca$負荷終末を用いた実験でも確認された。(iii) この$Ca^{2+}$放出は外液に加えた0.8mM $Ca^{2+}$、0.1μM テトロドトキシンの影響を受けなかった。(iv) これらの結果より刺激時に神経終末へ流入した$Ca^{2+}$は直ちに細胞外へ放出されている可能性が考えられる。(v) カテコラミン放出と$Ca^{2+}$のcoupling機序について１モデルを提示した。

［序］ 高濃度$K^+$刺激に依る神経終末からの伝達物質の放出が $Ca^{2+}$依存性であることは一般に認められているが、$Ca^{2+}$添加を必要としない放出も見られる。例えばアンフェタミンによるカテコラミンの放出、ベラトリジン、マストパランによるＡＴＰ（+カテコラミン）の放出などである。これらの場合終末内プールの$Ca^{2+}$が動員されると解釈されているが、では高$K^+$刺激による場合は何故動員されないかは明かではない。一昨年の本大会、昨年の生化学会では、ベラトリジン又はマストパラン刺激によるＡＴＰの放出は$Ca^{2+}$依存性が無いばかりか、ドーパミンの放出に対しても並行関係が見られないことを報告した(1,2)。今回の実験はマストパランでラット脳神経終末を刺激した際に、終末内 free $Ca^{2+}$濃度が増加するか否かを検討したものである。

［材料と方法］ 神経終末（シナプトソーム）：５週齢 Wistar rat（♂）脳より$P_2$分画を集め、パーコール密度勾配上で遠心分画した（10-12mg protein/ml of 45mM sodium phosphate-0.32M sucrose, pH 7.4)。 ＡＴＰの放出： 刺激時に終末から放出されるＡＴＰをルシフェリンールシフェラーゼ（ﾗﾎﾞｻｲｴﾝｽ社ATP-photometer)を用いて測定した。 終末内 free $Ca^{2+}$増加の測定： 神経終末とfura-2AMを室温で20分間反応（0.3mg fura-2AM/20mg protein）後、過剰fura-2AMを冷却遠心除去。刺激時の終末内 free $Ca^{2+}$増を蛍光測定した（exc. 335nm; emit. 495nm)。 終末からの$Ca^{2+}$放出： 水溶性（膜非透過）fura-2存在下で測定した（10nmol fura-2/2mg protein/ml)。 終末への$^{45}Ca$負荷と放出： 終末と$Ca^{2+}$（$^{45}Ca$少量含む）を室温にて20分間反応（100nmol $Ca^{2+}$/mg protein）後、free $Ca^{2+}$を冷却遠心除去（$Ca^{2+}$ uptake rate; 22%)。この終末（0.65mg prot)を室温にて5-10分間 1.0ml medium 中で放置後冷却遠心し、上清の$^{45}Ca$を液シン測定した。 マストパランは大阪箕面ベプチド研より、ベラトリジン、テトロドトキシンは Sigma Chem.より入手した。

［結果］ＡＴＰの放出： 図１にベラトリジン（35nmol/mg prot)及びマストパラン（10μg/mg prot)で神経終末を刺激した際のＡＴＰ放出過程を示す。前者によって放出されるＡＴＰ量は全含有量の2-3%であったが、後者の場合は20-25%に達した。これらのＡＴＰ放出は$Ca^{2+}$添加を必要とせず 0.1mM EDTA存在下でも見られた。また 0.1μM テトロドトキシンを加えても、その影響は認められなかった。終末内 free $Ca^{2+}$濃度の増加： 次にベラトリジンやマストパランで刺激した場合、神経終末内のfree $Ca^{2+}$濃度が増加するか否かを調べた。fura-2AMを負荷した神経終末を、$Ca^{2+}$を含まない反応液中でマストパラン刺激すると図２に示す様に蛍光の増加が見られた。この蛍光増加は1μM $Ca^{2+}$がfura-2と反応した際の増加分にほぼ相当した。しかしベラトリジンで終末を刺激しても殆ど蛍光増加は見られなかった。 神経終末からの$Ca^{2+}$の放出： 細胞膜非透過性fura-2存在下で

神経終末をマストパラン刺激するとfura-2の蛍光が増大することが観察され、その増大は 0.5-1.0μM $Ca^{2+}$に相当する量であった（図3）。テトロドトキシンの影響は見られなかった。ベラトリジンの添加では蛍光増大は殆ど認められず、同量のmedium添加は希釈に基づく蛍光の減少をもたらした。これらの結果は、神経終末をマストパランで刺激した場合、終末内カルシュウムプールの$Ca^{2+}$が mobilizeされ、それに続いて終末外へ放出されることを示唆している、と考えた。

<u>$Ca^{2+}$負荷した神経終末からの$Ca^{2+}$放出</u>： 上述の考えを定量的にもチェックする目的で、$Ca^{2+}$を負荷した終末をマストパランなどで刺激した際に$Ca^{2+}$放出が起こるか否かを調べた。表Iに示すようにマストパランで刺激すると59%の放出増大が起こり、ベラトリジン刺激の場合は8.0%増であった（自然放出: 全量の36%）。これら刺激に基づく$Ca^{2+}$放出はmedium中に0.8mM $Ca^{2+}$が存在する状態でも認められた。しかし50mM $K^+$刺激の場合放出促進は見られなかった。 mediumに1mM $Ca^{2+}$が存在すると交換反応の為か自然放出が(見かけ上)増す傾向があった。

［考察］<u>$Ca^{2+}$動員：</u> マストパランは蜂毒ペプチドで mast cellからセロトニンを放出するが、その作用機作は明かでない。今回マストパランには神経終末内プールの$Ca^{2+}$を動員する作用が示唆された。作用機序にG-蛋白の関与も考えられるが連想の域を出ない。$Na^+$チャンネル開口剤ベラトリジンによるＡＴＰ放出量はマストパランの1/10程度であったから、$Ca^{2+}$動員もそれに比例して低くなり、その為にベラトリジン刺激では$Ca^{2+}$動員が認められなかった可能性もある。

<u>$Ca^{2+}$の放出：</u> マストパラン刺激に伴って神経終末から$Ca^{2+}$の放出が見られ、これは$^{45}Ca$の負荷実験からも確認された。ベラトリジンの場合、fura-2では$Ca^{2+}$放出が検出されなかったが、$^{45}Ca$の放出実験ではその放出が確認出来た。マストパラン及びベラトリジンで放出される$Ca^{2+}$の（全量に対する）割合はＡＴＰ放出の場合とよく似ていて、各々２２%、４%前後であった。これらの結果は神経終末刺激時に流入した$Ca^{2+}$は直ちに細胞外へ放出されいる可能性を暗示している。

<u>意義：</u> 演者は以前、ドーパミンはラット脳神経終末では酸性蛋白と結合して存在し、$Ca^{2+}$の作用を受けてこの蛋白から遊離する可能性について報告した(3)。又、カテコラミンと$Ca^{2+}$は錯体を作り疎水性に成り易いことはよく知られているので、刺激時に流入した$Ca^{2+}$の役割はもしかしたらこの様な錯体形成-膜透過促進の方法で カテコラミンの放出と"coupling"しているのかも知れない。

［文献］ (1) 都築紀宏、神経化学 vol. 26, 601-603 (1987).
(2) 都築紀宏、後藤香糸子、生化学 vol. 60, 905 (1988).
(3) T. Tsudzuki, J. Biochem. 93, 599-606 (1983).

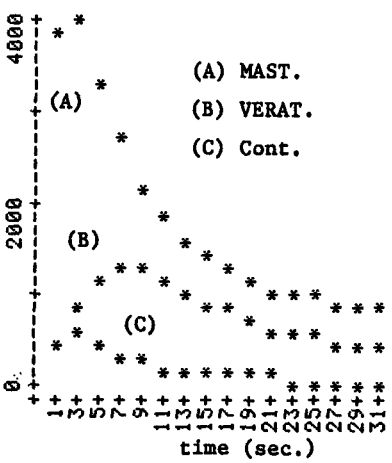



図1 神経終末からのＡＴＰ放出
(A)mastoparan(10μg/mg prot.); (B) veratridine(0.3μmol/mg); (C) none in 45mM $Na^+$-phosph. -0.32M sucr., pH 7.4. 縦軸、発光量（任意ｽｹｰﾙ）

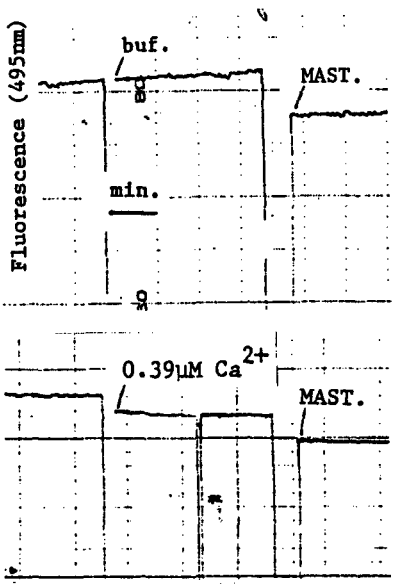



図2(上) マストパラン刺激による終末内$Ca^{2+}$の増加と、図3 同刺激時に起こる$Ca^{2+}$の放出。説明、本文参照。

表I 神経終末からの$^{45}Ca$の放出

| add. | cpm | nmol $Ca^{2+}$ | (%) |
|---|---|---|---|
| none | 11,055 | 7.9* | 100 |
| mast. | 18,331 | 12.7 | 159 |
| verat. | 12,003 | 9.7 | 108 |
| 50mM $K^+$ | 11,750 | 9.3 | 106 |
| 1 mM $Ca^{2+}$ | 15,620 | 11.0 | 140 |

*36 % of 22 nmol $C^{2+}$/mg prot.

# 154 マストパランによる伝達物質放出はCa$^{2+}$に依存しない

熊倉鴻之助[1]，武井延之[2]，今泉美佳[1]，笠井久隆[3]
（上智大学・生命研[1]，国立精神神経センター・代謝研究部[2]，
都立大・理・化学[3]）

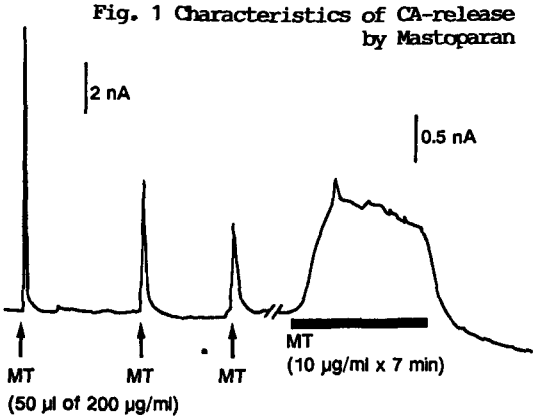
〔要約〕
培養副腎髄質クロマフィン細胞および培養中枢コリナージックニューロンを用いて、ハチ毒ペプチドであるマストパラン（MST）の伝達物質放出作用の解析を行なった。クロマフィン細胞からのMSTによるカテコールアミン（CA）放出は、パルス的投与によって一過性に引き起こされる一方、持続的投与中は放出が持続した。さらに、MSTのCA放出作用は全く外液 Ca$^{2+}$に依存せず、外液 Ca$^{2+}$はむしろ抑制的に作用した。MSTは培養中枢コリナージックニューロンに対してもアセチルコリン放出作用を示し、その作用はクロマフィン細胞の場合と同じく外液 Ca$^{2+}$の除去により著しく増大した。これらの結果から、MSTによる伝達物質放出の作用機序をさらに詳細に検討することは、伝達物質放出機構における Ca$^{2+}$の作用機序を解明していく上で興味深いと考えられた。

マストパラン（MST）はスズメバチ毒線に含まれるアミノ酸１４個からなるペプチドで、肥満細胞からの顆粒放出作用(4)、副腎髄質クロマフィン細胞からのCA放出作用(6)が知られている。またMSTには、ホスホリパーゼ$A_2$活性化作用(1)、ＧＴＰ－結合蛋白への結合活性(3)などが知られているが、MSTによるCA放出の作用機序は不明である。今回我々は、MSTによるCA放出の作用機序と伝達物質放出の細胞内機構との関連を明確にする目的で、培養牛副腎髄質クロマフィン細胞に対するMSTのCA放出作用の特性を解析した。さらに、培養中枢コリナージックニューロンからのアセチルコリン（ACh）放出に対するMSTの作用を検討した。

「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(5)のように調製し、実験には培養３－１０日の細胞を用いた。CA放出実験には Cell Bed Perfusion-ECD System を用いて、既報(5)に従ってReal-time Monitoringを行なった。培養中枢コリナージックニューロンは、胎生１７日ラット（Wistar)の脳から切り出した中隔野よりHatanakaら(2)の方法にしたがって調製し、ＮＧＦ存在下で１０日間培養した後に実験に用いた。培養ニューロンからのACh放出実験はTakeiらの既報(7)に従って行い、固定化酵素カラムを用いたHPLC-ECD法(7)によりACh定量を行なった。

「結果および考察」　図１は、MSTによるCA放出の動態を示す。135μＭ溶液　50μｌ（細胞への作用濃度は約27μＭ）をパルス的に投与すると一過性の鋭い放出応答が獲られた。繰り返し刺激を行なうと最初に脱感作が認められるが、その後安定した応答が得られた（Fig.１）。このようにして得られる応答の大きさは、MSTの濃度に依存した。一方、細胞のLysisは引き起こさないとされる濃度のMST 3μＭ，7μＭをそれぞれ持続的に投与すると、MST投与の間一定量の放出応答が持続し、MST除去と同時に放出は終了した。この前後では、AChによるCA放出は変化しなかった。持続的放出応答中の灌流液を分取してCA含量を測定すると、basal release 9.1ng/ml に対してMST刺激時は29.5ng/mlであった。MSTによるCA放出への Ca$^{2+}$の関与を調べるために、EGTA（0.2mM）を含む Ca$^{2+}$-free灌流液下でMSTをパルス的に投与すると、Ca$^{2+}$存在下のおよそ５倍に増大した放出応答が繰り返し得られた（Fig.2）。外液Ca$^{2+}$を除去した後にCaffeine 20mMで処理を行なっても増大したCA放出

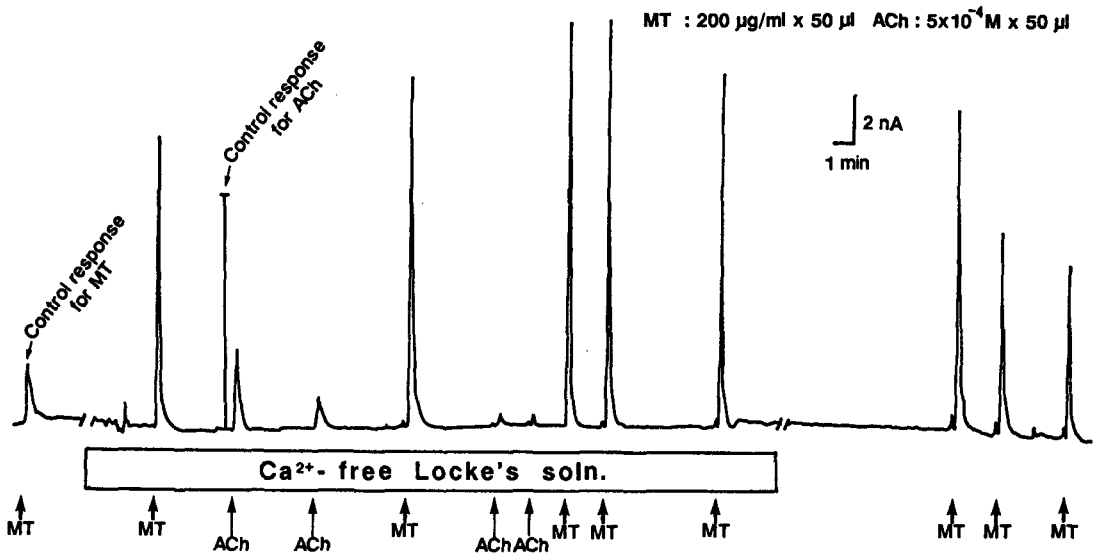
Fig. 1 Characteristics of CA-release by Mastoparan




応答は消失しなかった。また、digitonin処理によってpermeabilizationを行なった細胞に$Ca^{2+}$ 非存在下でMST 20μMを作用させると、$Ca^{2+}$添加による放出（9.6% of content）より有意に大きいCA放出(12.1% of content）が得られた。従ってクロマフィン細胞では、MSTは細胞外液または細胞内貯蔵部位のいずれからも$Ca^{2+}$を動員することなくCA放出を引き起こすことが明かである。

１７日胎生ラット中隔野由来の培養コリナージックニューロンでは、50mM KCl、3分間の刺激によりbasal releaseの420%のACh放出が引き起こされた。$Ca^{2+}$存在下では、20μM MSTによりbasal releaseの150%のACh放出が引き起こされ、この放出は $Ca^{2+}$除去によりbasal releaseの600%まで増強された。従って、MSTの$Ca^{2+}$非依存性の伝達物質放出作用はクロマフィン細胞に限らず神経細胞に対しても同様に認められる作用であり、同一の機序によるものと考えられ、この点は 神経分泌細胞の$Ca^{2+}$依存性伝達物質放出機構に於ける$Ca^{2+}$の作用機序を解明する上で非常に興味深い。MSTには溶血作用等のlytic activityも知られていることから、本実験で観察された伝達物質放出作用が細胞のlysisを伴うものか否かを含めて今後詳細な検討を行い、その作用機序を明らかにすることが重要と考えられる。

Fig. 2 CA-Releasing action of Mastoparan in the Absence of Extracellular $Ca^{2+}$




**REFERENCES:**
(1) Argiolas,A. & Pisano,J.J. (1983) J.Biol.Chem. 258,13697-13702. (2) Hatanaka,H., Tsukui, H. and Nihonmatsu,I. (1987) Neurosci. Lett. 79,85-90. (3) Higashijima,T., Uzu,S., Nakajima, T. and Ross,E.M. (1988) J.Biol.Chem. 263,6491-6494. (4) Hirai,Y., Yasuhara,T.,Yoshida,H., Nakajima,T., Fujino,M. and Kitada,C. (1979) Chem.Pharm.Bull. 27,1942-1944. (5) Kumakura,K., Ohara,M. and Sato,G.P. (1986) J.Neurochem. 46,1851-1858. (6) Kuroda,Y., Yoshioka,M., Kumakura,K., Kobayashi,K. and Nakajima,T. (1980) Proc.Jpn.Acad. Ser. B 56,660-664.
(7) Takei,N., Tsukui,H. and Hatanaka,H. (1988) J.Neurochem. 51,1118-1125.

## 155 副腎髄質由来のアクチン調節74 kDa蛋白質の活性制御

前川昌平（東大、理、生物化学）

副腎髄質中に存在する２種の異なったアクチン繊維切断蛋白質（gelsolinと74 kDa蛋白質）の比較を行った。両者は$Ca^{2+}$存在下でそのアクチン繊維切断活性並びにアクチン重合促進活性を示し、これらの活性がphosphatidylinositol 4,5-bisphosphate($PIP_2$)によってその活性が阻害される点でよく似ている。 しかしながら、両者のpeptide mapや抗体との反応性は明らかに異なっていた。 また74 kDa蛋白質の活性は、 $PIP_2$以外にもphosphatidylinositol(PI)や phosphatidylserine(PS)といったリン脂質によって阻害を受けることがわかった。この効果はTriton X-100の存在や phosphatidylcholine(PC)の添加によって減少すること、PI の由来によらないことなどより、phospholipid liposome に 74 kDa蛋白質が結合することによると考えられる。74 kDa蛋白質が$Ca^{2+}$依存的にPS liposomeに結合することは遠心法により確かめ得た。また heparin sulfate や polyglutamate は効果が無いこともわかった。

「目的」 細胞膜の形態や膜内蛋白質の分布は、その裏打ちである細胞骨格蛋白質によって制御されていると考えられている。従って伝達物質の開口放出の過程においても、裏打ち蛋白質のなんらかの関与が考えられる。実際、副腎髄質クロム親和細胞のカテコラミン放出に際して、アクチン繊維の脱重合やfodrin分布の変化等が報告されている（１、２）。

この細胞での分泌におけるアクチン繊維系の調節機構を知る目的で髄質中のアクチン結合蛋白質を検索したところ、gelsolin-actin 複合体並びに分子量 74 kDaの蛋白質が得られた。 この内 、74 kDa蛋白質のアクチン繊維切断機能について前回報告した（３）。今回、両者の差異をさらに明らかにするため、 gelsolinも同時に精製し同一条件下でその活性を比較することを試みた。

「方法」 74 kDa蛋白質は以前に報告した方法で精製した（３）。Gelsolinは、 DNase I column で得られた gelsolin-actin複合体を、 6 M 尿素存在下でDEAE-celluloseにかけ得られた画分をさらにゲル濾過することによって調製した。Villinはラット小腸よりMoosekerらの方法で精製した（４）。アクチンの重合変化は、Kouyama-Mihashiの方法（５）でpyrene-labelしたアクチンの蛍光変化を測定するか、 Ostwald粘度計で粘度の変化を測定することで追跡した。

「結果」 図１に示した様に、74 kDa 蛋白質、gelsolin 並びに villinのpeptide mapは明らかに異なっており、これらの蛋白質は互いに異なる蛋白質であることがわかる。Gelsolinと 74 kDa 蛋白質のアクチン切断活性に及ぼす$Ca^{2+}$効果を図２に示す。この様に両者は同じ$Ca^{2+}$レベルで働きうることがわかった。 次に重合促進に及ぼすリン脂質の効果を調べてみた（図３）。既に報告されている様にgelsolinは PC, phosphatidylethanolamine(PE) 或はphosphatidic acid(PA)によっては影響されないが、$PIP_2$はその活性を抑えることがわかる（A）。一方74 kDa蛋白質の場合には、$PIP_2$ のみならず、phosphatidylserine(PS), phosphatidylinositol(PI)もその活性を阻害することがわかった。これらリン脂質による阻害は 1) 濃度依存性がある、 2) ウシ肝由来のPIでもダイズ由来のPIでも同様に効果がある、3) PCや PEを加えることで阻害能が低下する、4) Triton X-100の添加によって阻害能が減少する、並びに、5) heparin やpoly-L-glutamate 等の

polyanionは効果が無いこと等より、 lipid vesicle 上の anion の配置が重要であると考えられる。PS liposomeと蛋白質を混合後、遠心してみると、74 kDa蛋白質は確かに$Ca^{2+}$存在下でPS liposome と結合するが、 gelsolin は結合しないことがわかった。

「考察」 Gelsolinが$Ca^{2+}$存在下にアクチン分子と結合し、 一度形成された gelsolin-actin(1:1) の複合体は EGTA 存在下でも安定であること、またこの複合体はアクチン繊維端をcapする効果はあるが、切断する効果の無いことは既に報告されている。74 kDa蛋白質はこれと異なり、アクチン分子と強固な結合体を作ることはない（３）。 一方、この蛋白質の活性が PS や PI で阻害されることは、$Ca^{2+}$の流入によって活性化されたこの蛋白質の一部は、膜系との結合によってその活性が制御されうる可能性をしめしている。PS や PI との結合部位が $PIP_2$のそれと同じであるのか否か、分子中のアクチン結合・切断部位とどの様な関係にあるのか等も興味深い問題である。

図１

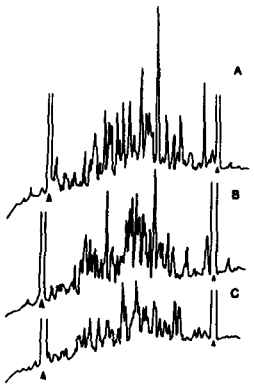



図２

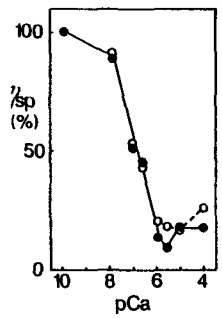



図３

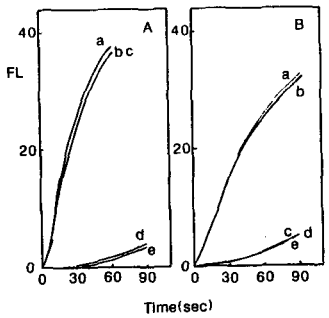



図１。 villin(A), gelsolin(B), 74 kDa protein(C)のα-chymotrypsin分解産物のreverse phase HPLC pattern

図２。Gelsolin(●), 74 kDa protein(○)によるアクチン繊維粘度変化の$Ca^{2+}$依存性。

図３。Gelsolin(A), 74 kDa protein(B)のアクチン重合促進活性に及ぼすリン脂質の効果。 a,-phospholipid. b,+PA,PC,PE. c,+PI. d,+$PIP_2$. e, -gelsolin(A) or 74 kDa protein(B).

「文献」

1. Cheek,T.R. and Burgoyne,R.D. (1987) J.Biol.Chem. 262 11663-11666
2. Perrin.D. and Aunis,D. (1985) Nature 315 589-592
3. Maekawa,S. et al. (1989) J.Biol.Chem. 264 7458-7465
4. Alicea,H.A. and Mooseker,M.S. (1988) Cell Motil. Cytoskel. 9 60-72
5. Kouyama,T. and Mihashi,K. (1981) Eur.J.Biochem. 114 33-38

# 156　成長円錐における$Ca^{2+}$感受性及び$Ca^{2+}$非感受性α－actininの同定とその局在

神田啓子、池田和隆、祖父江憲治、
（阪大・医・バイオ・神経生化）

［要約］成長円錐（growth cone）は細胞運動性の高い構造物で、神経突起伸展・その維持と神経回路網形成を決定する上で重要な役割を担っている。近年、このgrowth coneの運動性にミクロフィラメント（アクチン）の関与が重要視されている。われわれは前回アクチン結合蛋白質であるカルスベクチン、α－アクチニンがgrowth coneに存在し、カルスベクチンはgrowth coneの基質接着部位に、α－アクチニンはfilopodiaからgrowth cone基質接着部さらに神経突起遠位端に局在することを報告した。今回、このα－アクチニンにはアクチン結合性に関して$Ca^{2+}$感受性と非感受性の２種類があること、$Ca^{2+}$感受性α－アクチニンはアクチンフィラメントとともに$Ca^{2+}$によりその運動性が規定されるfilopodia に限局し、$Ca^{2+}$非感受性α－アクチニンは成長円錐基質接着部に局在することを見い出した。

神経回路網形成機序を分子レベルで解明することは神経科学の大きなテーマの一つである。神経突起の伸長端に相当するgrowth coneは細胞運動性の高い構造物で、神経突起伸長の維持・成長方向の認識をつかさどり神経結合を決定する上で重要な役割を担っている(3)。growth coneは体部と先端部のfilopodia及びlamellipodia に分けられる。filopodia は殊に運動の活発な部位である。近年、growth coneの運動性に細胞骨格、なかでもミクロフィラメントの関与が重要視されてきている(5,6)。しかし、これまでアクチンと相互作用をする蛋白質としてgrowth coneでの局在が明らかになったのはミオシンだけである(1,4)。われわれはgrowth coneにおけるカルスベクチン・アクチン・α－アクチニンの局在を明らかにし、昨年の本学会で報告した。今回、growth coneに局在するα－アクチニンには２種類（$Ca^{2+}$感受性・非感受性）があり、両者の局在が異なることとその機能について検討した。

［方法］NGF により分化させたPC12細胞を用いた。

①蛍光抗体法：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）抗体はアフィニティカラムで精製したもの、二次抗体はFITC標識抗体を用いた。アクチンの染色にはローダミン標識ファロイジンを用いた。EGTA又は$Ca^{2+}$を含む0.1%Triton緩衝液で室温、１分間処理した後、ホルマリン固定・染色を行った。

②細胞分画法：分化したPC12細胞を細胞体と成長円錐にとむ神経突起に分離する方法は既報(7) に従った。

③$Ca^{2+}$感受性及び非感受性α－アクチニンの抽出及びアクチン結合能の解析：細胞体と神経突起分画を各々0.1mM $CaCl_2$を含む0.1% Triton緩衝液で抽出した（抽出液Ⅰ）後、残渣を低イオン強度緩衝液で37℃、30分加温して抽出液Ⅱを得た。抽出液Ⅰ、Ⅱを各々F－アクチンと$10^{-8}$～$10^{-4}$M 濃度の$Ca^{2+}$条件下でインキュベートして遠心法を行った。サンプルはSDS-PAGE後、［$^{125}$I］ protein Aを用いたWestern blottingを行った。α－アクチニンはautoradiography を行った後、デンシトメーターで定量した。

［結果］今回われわれが用いたα－アクチニン抗体は$Ca^{2+}$感受性・非感受性α－アクチニンともに認識する。そこでgrowth coneにおけるα－アクチニンの性質を明らかにするため、$Ca^{2+}$存在・非存在下でTritonにより選択的抽出を行い、蛍光抗体法で両α－アクチニンの局在変化を検討した。アクチン・カルスベクチンは$Ca^{2+}$の有無に関わらずTriton処理により局在が変化しない。これに反して、filopodia に局在するα－アクチニンはμM以上の$Ca^{2+}$存在下で特異的に消失した。一方、growth cone体部に局在するα－アクチニンには変化が認められなかった（図１）。この結果より、$Ca^{2+}$感受性α－アクチニンはfilopodia に$Ca^{2+}$非感受性α－アクチニンは growth cone体部に局在する可能性が示唆された。次に、growth coneにおけるα－アクチニンの$Ca^{2+}$感受性について検討するため、分化させたPC12細胞を細胞体と神経突起に分画し、神経突起分画に選択的抽出法を行った。抽出液Ⅰには$Ca^{2+}$感受性α－アクチニンが抽出液Ⅱには$Ca^{2+}$非感受性α－アクチニンが抽出されたことが予想されるが、実際、両抽出液中のα－アクチニンのアクチン結合性を遠心法で調べると、抽出液Ⅰのα－アクチニンは$Ca^{2+}$非存在下（μM以下の濃度）でのみアクチンと結合し、μM以上の$Ca^{2+}$でアクチンとの結合性は阻害された。これに対し、抽出液Ⅱのα－アクチニンは$Ca^{2+}$の有無に関わらずアクチンと結合した（図２）。この結果はgrowth coneにおいて局在を異にする２種類のα－アクチニンが存在するという形態的観察を裏付けるものである。この選択的抽出法を用いて、NGF によって分化誘導されたPC12細胞で神経突起と細胞体における２種類のα－アクチニンの発現変化を検討すると、NGF 未処理の細胞では$Ca^{2+}$非感受性α－アクチニンがほとんどであるのに対し、NGF 処理の細胞では神経突起の伸長に伴って神経突起分画のα－アクチニンは増加する。そのうち$Ca^{2+}$感受性α－アクチニン量が非感受性α－アクチニン量の３倍以上を占める。一方、細胞体のα－アクチニンは２種類ともにわずかに増加が認められた。従って、２種類のα－アクチニンの増加は神経突起伸長に関連しており、$Ca^{2+}$感受性α－アクチニンはfilopodia に$Ca^{2+}$非感受性α－アクチニンはgrowth cone体部に集積すると考えられる。

［考察］growth cone運動性の物質的基盤としてアクチンの関与が示唆され、その機作としてアクチンの重合・脱重合、アクチン・ミオシン相互作用のモデルが提唱されている(5,6)。しかし、今のところ実験的根拠が乏しく

仮説の域を出ていない。growth cone運動性の細胞内メディエーターとしてまず$Ca^{2+}$が挙げられる。実際、活発なgrowth coneにおいては$Ca^{2+}$濃度が高いことが報告されている(2)。growth cone殊にfilopodia に局在するα－アクチニンに$Ca^{2+}$感受性があること、この$Ca^{2+}$感受性α－アクチニンが神経突起の伸長に伴って増加することから、growth coneの運動性にアクチンとともに$Ca^{2+}$感受性α－アクチニンが関与していることが示唆される。growth coneは基質接着性、細胞運動性という点からトランスフォームした細胞の基質との動的接着部に類似している。しかも両者ともにカルスベクチン、α－アクチニン、アクチン、src 蛋白質の集積が認められる(8,9)。従ってこれらの蛋白質の作用機作を解明することは、細胞接着、細胞運動のメカニズムを理解する上で重要なことと思われる。

[文献] 1) Bridgman, P. C. and Dailey, M. E. (1989) J. Cell Biol., 108, 95-109. 2) Cohan, C. S., Connor, J. A., and Kater, S. B. (1987) J. Neurosci., 7, 3588-3599. 3) Landis, S. C. (1983) Ann. Rev. Physiol. 45, 567-580. 4) Letourneau, P. C. (1981) Dev. Biol., 85, 113-122. 5) Mitchison, T. and Kirschner, M. (1988) Neuron, 1, 761-772. 6) Smith, S. J. (1988) Science, 242, 708-715. 7) Sobue, K. and Kanda, K.(1988) Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 1383-1389. 8) Sobue, K., Fujio, Y., and Kanda, K. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 482-486. 9) Sobue, K., Kanda, K., Miyamoto, I., Iida, K., Yahara, I., Hirai, R., and Hiragun, A. (1989) Exp. Cell Res., 181, 256-262.

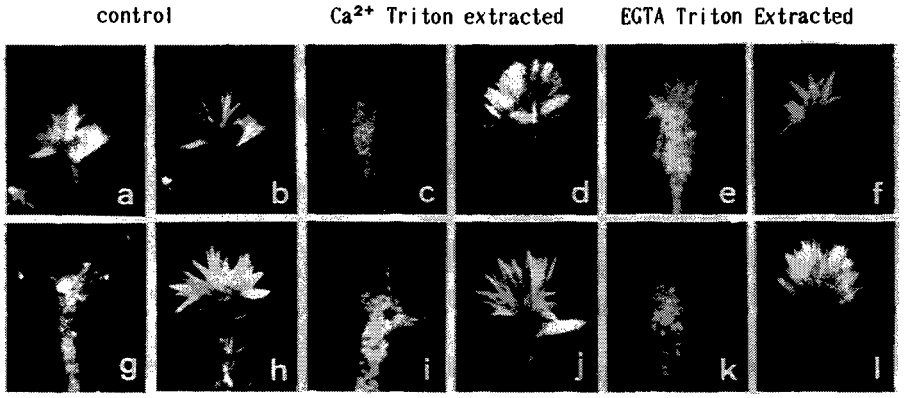



図1．growth coneにおけるカルスベクチン・α－アクチニン・アクチンのTriton処理による局在
α－actinin (a, c, e)及びカルスベクチン(g, i, k)とアクチン(b, d, f, h, j, l)の二重染色

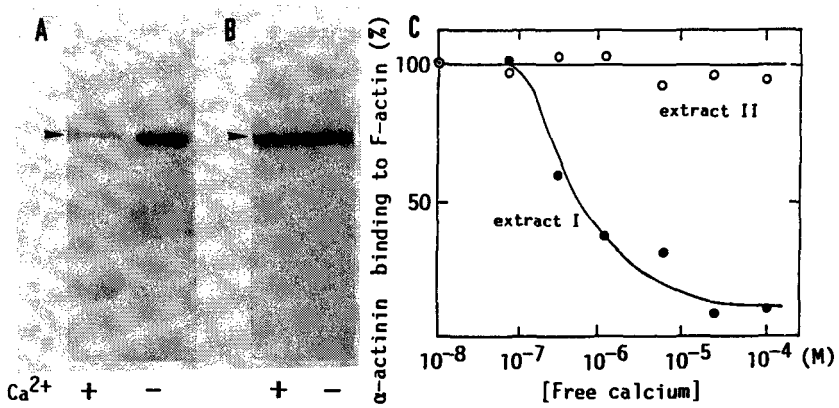



図2．growth coneにおける$Ca^{2+}$感受性及び非感受性α－アクチニンの同定
抽出液Ⅰ（A）、抽出液Ⅱ（B）についてF－アクチンと共沈するもののうちα－アクチニンをイムノブロットで同定した。（矢印）α－アクチニン

# 157 INHIBITION OF PROTEIN KINASE C SUBSPECIES FROM RAT BRAIN BY NON-STEROIDAL ANTI-OESTROGENS

Eric Bignon*, Kouji Ogita*, Ushio Kikkawa*, Jacques Gilbert#, Joséphine Abecassis#, Jean-François Miquel# and Yasutomi Nishizuka*. *Department of Biochemistry, Kobe University School of Medicine, Kobe 650, Japan. #CNRS-CERCOA, 94320 Thiais, France

**SUMMARY**

Protein kinase C (PKC) α-, β- and γ- subspecies activities were similarly inhibited at micromolar concentration by three triphenylacrylonitrile (TPE) anti-oestrogens. (E)-2-phenyl-3-[4-(2-diethylaminoethoxy)phenyl)]-3-(4-hydroxyphenyl) acrylonitrile (TPE 1) and 2-phenyl-3,3-bis-[4-(2-diethylamino-ethoxy)phenyl] acrylonitrile (TPE 2) were competitive inhibitors of phosphatidylserine (PS). Only the 2,3,3-tris-(4-hydroxyphenyl)acrylonitrile (TPE 3) a non competitive inhibitor of PS, inhibited the $Ca^{2+}$ and PS-independent phosphorylation of protamine sulfate by PKC subspecies. These results suggest that PKC α-, β- and γ- subspecies activities can be inhibited by these diethylaminoethoxy side chain substituted TPEs by a direct interaction with the regulatory domain of PKC or by interacting with phospholipids, whereas the trihydroxylated derivative (TPE 3) inhibited PKC activity by an interaction with the catalytic domain of the enzyme.

**INTRODUCTION**

It is generally accepted that the triphenylethylene anti-oestrogens exert their effects in estrogen target tissues and in the central nervous system (1) via the oestrogen receptor (ER). However some effect of these molecules can not be explain by their interaction with the ER, and others molecular targets of these molecules may be implied in their antitumoural action (2). Triphenylethylene tamoxifen inhibits the activity of partially purified protein kinase C (PKC) and the binding of phorbol esters (3), known to be potent tumour promoters and PKC activators (4). The correspondence of the antiproliferative effects of these TPEs to their effectiveness as inhibitors of PKC activity and of phorbol ester binding suggested that the mechanism of growth inhibition by TPE derivatives includes an interaction with PKC (5).

It is now clear that there is more than one species of PKC molecule, and several discrete subspecies have been defined (6). We studied here the effect on PKC I (γ), II (β) and III (α) subspecies activities of 3 TPE derivatives with typical structure: TPE 1 is substituted with a hydroxy and a diethylamino-ethoxy group, TPE 2 is disubstituted with a diethylaminoethoxy side chain and TPE 3 is trihydroxylated. These molecules exibit different oestrogenic/anti-oestrogenic and cytotoxic properties in the MCF-7 human breast cancer cell line (7,8) and we report here their differential inhibition on PKC activities.

**METHOD**

The preparation of triphenylacrylonitrile derivatives and their analytical characteristics have been described in previous papers (8, 9). Isomeric purity of TPEs was checked before use by HPLC analysis as previously described (8).

PKC was purified as described (10) from the rat brain soluble fraction by DE-52, threonine-Sepharose and TSK phenyl-5PW column chromatographies, and was separated into three types, type I, II and III, by chromatography on an hydroxy-apatite column connected to a Pharmacia FPLC system. PKC was assayed as described (10); the reaction mixture (0.125 ml) contained 20 mM Tris-HCl at pH 7.5, 10 μM [$\gamma^{32}$P]ATP (300-400 cpm/pmol), 5 mM magnesium acetate, 0.01 mM EGTA (from enzyme fraction), each type of PKC (approximately 0.05 μg), 400 μg/ml protamine sulfate or 200 μg/ml calf thymus HI histone, 0.1 mM $CaCl_2$ and various amounts of PS. Triphenylethylene derivatives or DMSO were added and mixed for 1.5 min with the reaction mixture (final DMSO concentration 5%). The incubation was carried out for 3 min at 30°C, and the reaction was terminated by the addition of trichloroacetic acid 25% (w/v). Acid precipitable material was collected on a nitrocellulose membrane and the radioactivity was quantified by liquid scintillation spectrophotometry.

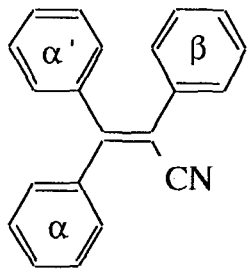
**RESULTS AND DISCUSSION**

In the presence of 2 μg/ml PS, PKC I, II and III subspecies activities were inhibited by anti-oestrogens in a concentration dependent manner (data not shown). The TPEs substituted with one (TPE 1) or two (TPE 2) diethylamino-ethoxy side chains inhibited PKC subspecies activities with IC50s~3 μM whereas trihydroxylated TPE 3 was 20 fold less active (table 1). When the phospho-lipid concentration was increased (figure 1), the inhibitory potency of TPE 1 and TPE 2 was completely blocked, whereas it was only partially blocked for trihydroxylated TPE 3. Double reciprocal plots indicated (data not shown) that TPE 1 and 2 were competitive inhibitors of PS, whereas TPE 3 was a non-

competitive inhibitor. The trihydroxylated TPE 3 inhibited the Ca2+ and phospholipid-independent phosphorylation of protamine sulfate by PKC subspecies (table 1) whereas the diethylaminoethoxy derivatives (TPEs 1 and 2) were inactive.

Thus like phenothiazines and tamoxifen derivatives (3, 5), TPEs 1 and 2 inhibited PKC by a direct interaction with the regulatory domain of PKC or by interacting with phospholipids, probably as a result of structural analogies based on the presence of a polyaromatic hydrophobic moiety and a charged dialkylamino side chain. This agreed with the non-competitive inhibition versus phospholipids of PKC activities by the trihydroxylated TPE 3 lacking the amino side chain. This trihydroxylated derivative probably inhibited PKC subspecies by a direct interaction of the compound with the active centre of the enzyme but not with the regulatory domain of the enzyme. Further studies are underway to investigate the mechanisms of inhibition of PKC subspecies by non-steroidal anti-oestrogens.

Table 1: Structure of triphenylacrylonitrile derivatives (TPE) and their IC50s (50% inhibitory concentration expressed in μM) on PKC I, II, III subspecies activities in the presence of 2 μg/ml phosphatidylserine (PS), and of protamine sulfate (Prot. sulf.). All substituents are in para position.
DEAE = $OCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$




| Substituents | | TPE 1 | TPE 2 | TPE 3 |
|---|---|---|---|---|
| | α | OH | DEAE | OH |
| | α' | DEAE | DEAE | OH |
| | β | — | — | OH |
| PKC | activator | $IC_{50}$(μM) | $IC_{50}$(μM) | $IC_{50}$(μM) |
| PKC I | PS | 8.0 | 4.6 | 63 |
| | Prot. sulf. | >>100 | >>100 | 44 |
| PKC II | PS | 3.0 | 3.0 | 69 |
| | Prot. sulf. | >>100 | >>100 | 38 |
| PKC III | PS | 3.0 | 2.7 | 70 |
| | Prot. sulf. | >>100 | >>100 | 63 |

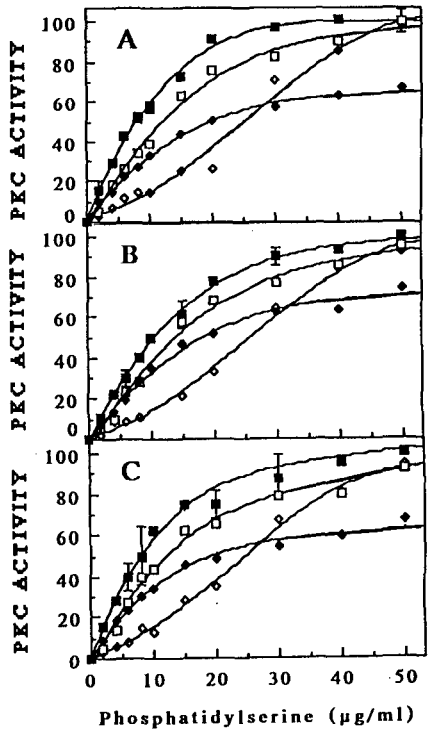



Figure 1: Inhibition of type I (A), II (B) and III (C) PKC subspecies activities (percent of control) by triphenylacrylonitrile derivatives [60 μM of TPE 1 (◇) and TPE 2 (□) 100 μM of TPE 3 (◆)] in the presence of increasing concentrations of phosphatidylserine. (■) control.


**REFERENCES**

1. Clark, C.R., Mc Losky, N.S. and Naftolin, F. (1982) J. Endocr. 93, 339-353.
2. Weiss, D.J., Gurpide, E. (1988) J. steroid Biochem. 31, 671-676.
3. O'Brian, C.A., Liskamp, R.M., Solomon, D.H., and Weinstein, I.B. (1985) Cancer Res. 45, 2462-2465.
4. Nishizuka, Y. (1986) Science 233, 253-392.
5. O'Brian, C.A., Liskamp, R.M., Solomon, D.H., and Weinstein, I.B. (1986) J.N.C.I. 76, 1243-1246.
6. Nishizuka, Y. (1988) Nature 334, 661-665.
7. Bignon, E., Pons, M., Gilbert, J. and Crastes de Paulet, A. (1988) J. steroid Biochem. 31, 877-886.
8. Bignon, E., Pons, M., Crastes de Paulet, A., Doré, J.-C., Gilbert, J., Abecassis, J., Miquel, J.-F., Ojasoo, T. and Raynaud, J.-P. J. Med. Chem. in press.
9. Pons, M., Michel, F., Crastes de Paulet, A., Gilbert, J., Miquel, J.-F., Precigoux, G., Hospital, M., Ojasoo, T. and Raynaud, J.-P., (1984) J. steroid Biochem. 20, 137-145.
10. Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ase, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1988) J. Biochem. 103, 759-765.

# 158 培養神経膠芽腫細胞に於けるプロテインキナーゼCアイソザイム

下澤定志、蜂矢隆久、萩原正敏、臼田信光*、渋谷正人**、杉田虔一郎**、日高弘義
（名大・医・薬理、脳外**、信州大・医・解剖1*）

〔要約〕
1984年我々はH-7がプロテインキナーゼCの阻害剤として有用であることを報告して以来(Biochemistry 1984)、プロテインキナーゼCの薬理学的研究はその第一歩を踏み出したと考えられている。同時に、イソキノリンの誘導体を用いてプロテインキナーゼCの精製法が確立され(J. B. C. 1985)、遺伝子学的解析(Nature 1987)や免疫学的解析(J. B.C. 1988)がプロテインキナーゼCについても詳しくなされるようになってきた。培養神経膠芽腫と神経芽腫に於けるプロテインキナーゼCアイソザイムについてモノクローナル抗体(MC-1a, -2a, -3a)を用いて調べた。イムノブロッティング法では、3種類の神経膠芽腫(A-172, SK-MG-1, SK-MG-4)は、type III プロテインキナーゼCを有し、神経芽腫(SK-N-MG)は、type II を有したが、髄膜腫ではどのアイソザイムも存在しなかった。イムノエンザイムアッセイでもイムノブロッティング法の結果と同様の結果を得た。蛍光抗体法を用いてA-172 細胞に於けるtype IIIプロテインキナーゼCの細胞内分布を検討したところ、細胞質が強く染まった。以上の結果より、中枢神経系の腫瘍によりプロテインキナーゼCのアイソザイムの発現が異なることが示唆された。

〔目的〕
プロテインキナーゼCには少なくとも3種類のアイソザイムが存在し、それらは組織及び細胞に特異的で、中枢神経系に豊富に存在することが報告されている(1, 2, 3, 4)。しかし、細胞単位に於けるアイソザイムについて充分調べられておらず、これを知ることがアイソザイムの機能、細胞の分布等を知る上で重要な情報を与えられることと思われる。今回我々は、脳を構成するグリアとニューロン由来の悪性腫瘍である神経膠芽腫と神経芽腫のアイソザイムについて調べた。

〔方法〕
モノクローナル抗体は日高等がすでに報告したものを用いた(1)。人間の神経膠芽腫(A-172, SK-MG-1, SK-MG-4)と神経芽腫(SK-N-MC)(5)を、10% FCSを含むDMEMで培養した。イムノブロッティングは、培養細胞をソニケート・超遠心(10,000 x g, 30 min)し、細胞質画分を得、SDS-PAGE施行後、ニトロセルロース膜へトランスブロッティングし、ABC キットで染色、4-chloro-1-naphtol により発色させた(6)。イムノエンザイム法は、プロテインキナーゼCのN末端に反応するモノクローナル抗体とC末端に反応するポリクローナル抗体を用いたサンドウィッチ法により定量した。モノクローナル抗体を固相化した後、細胞質分画とプロテインキナーゼCを含んだサンプルをインキュベートし、HRP とコンジュゲートさせたポリクローナル抗体を加え、O-phenylene-diamine の吸光度により定量した(7)。プロテインキナーゼC活性は、DEAEカラムにかけた後、NaClの濃度勾配により析出した分画における[$\gamma$ -$^{32}$P]ATP のヒストンIII-S への$^{32}$Pの結合により測定した。そして、$Ca^{2+}$、燐脂質の存在下・非存在下での差を測定した(4)。蛍光抗体法は、伊藤等の述べた方法を用いた(8)。

〔結果〕
イムノブロッティング法では、MC-2a はSK-N-MC に於ける80kDa 蛋白と反応し、MC-3a はA-172, SK-MG-1, SK-MG-4に於ける80kDa 蛋白と反応した。反応は特異的で、他の蛋白には反応しなかった。イムノエンザイム法による定量法では、SK-N-MC は389.5± 20.7 (ng/mg protein) のMC-2a に反応する蛋白を有し、A-172, SK-MG-1, SK-MG-4 はMC-3a に反応する蛋白を、それぞれ127.6± 14.4, 248.8± 38.5, 148.5± 35.8 (ng/mg protein) 有した。その他は測定下限以下であった。これら両者の結果はよく一致した。そこで、MC-2a 又はMC-3a に反応する蛋白がプロテインキナーゼCであることを確かめるために、A-172 細胞を大量培養し、DEAEカラムクロマトグラフィー後の活性を測定した結果、$Ca^{2+}$・燐脂質依存性のキナーゼC 活性を有することを確かめた。プロテインキナーゼC活性は、0.1-0.16 M NaCl 濃度で認められ、活性値は414 (P mol/min/mg protein)であった。続いて、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィーにかけたが、サンプル量の限界からか、明らかなピークを示さなかった。さらに、A-172 を間接蛍光抗体法によって染色したところ、MC-3a だけが細胞質に明らかな反応を示し、MC-1a, -2aはかすかに反応したにすぎなかった。MC-3a は核の周囲より細胞質によく反応した。

〔考察〕
今回、我々は3種類のモノクローナル抗体(MC-1a, -2a, -3a)(1)とポリクローナル抗体(7) を用いて、神経膠芽腫と神経芽腫のプロテインキナーゼCアイソザイムについて調べた。アイソザイムを調べるにあたり、細胞分画に於ける細胞質分画と核分画とでは同一のアイソザイムが存在するが、ホモゲナイズするときの$Ca^{2+}$濃度によってそれぞれの分画に於けるアイソザイムの分布が異なるため(9)、EGTAを含んだバッファーを用いてイムノブロット法による実験を行った。結果は神経膠芽腫はMC-3a に反応する蛋白を含み、神経芽腫はMC-2a に反応する蛋白を含んでいた。そしてその結果はイムノエンザイム法による定量法とよく一致する結果を得た。ここで、アイソザイムを調べるためにはハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィーでも可能であるが、実験結果よりサンプル量の限界からこの方法は適さないと思われた。
免疫組織法に関しては、Girard等が最初にポリクローナル抗体を作成し、ラットの脳に於けるプロテイン

キナーゼCの局在を示した(10)。Mochly-Rosen等は3種類のモノクローナル抗体を用いてラットの脳に於ける異なった染色形態を示した(3)。 Huang 等は、アイソザイム特異性の抗体を用いて、人間に於ける異なった組織のアイソザイムの存在を報告したが(11)、我々もアイソザイム特異性の抗体(MC-1a, -2a, -3a) を作成し、それらのアイソザイムの細胞特異性、分布を報告している(1, 8)。プロテインキナーゼC type I は、脳に特異的であり、プルキンエ細胞、海馬の錐体細胞、顆粒細胞に存在した。プロテインキナーゼC type IIは広く全身の組織に分布し、特にリンパ組織に多いが、脳に於いては分子層・顆粒層・錐体路にみられた。プロテインキナーゼC type III は、松果体・嗅球・小脳の希突起膠細胞に認められた(1, 12)。 しかし、細胞レベルでのアイソザイムの種類とその詳細な分布は充分に調べられていない。我々は、中枢神経系の腫瘍細胞について調べているが、その他に人間の培養上衣腫(KMS-11-104)(5) は、MC-3a に反応する蛋白を 161.3± 48.5 (ng/mg protein) 有していた。又、髄膜腫の組織細胞からは、3種類の抗体に反応する蛋白が認められなかった。これらの結果より、プロテインキナーゼCアイソザイムの同定は、そのアイソザイムの様々の作用を理解するのに役立つと共に、腫瘍に於いてそれがグリア細胞かニューロンか、又はメニンゲス由来かの診断に役立つと思われた。

[文献]


1. Hidaka, H., Tanaka, T., Onoda, K, Ohta, H., Watanabe, M., Itoh, Y., Tsurudome, M., Izutsu, K., and Yoshida, T. (1988) J. Biol. Chem. 263, 4523-4526
2. Wood, J. G., Girard, P. R., Mazzei, G. J. and Kuo, J. F. (1986) J. Neurosci. 6, 2571-2577
3. Mochly-Rosen, D., Basbaum, A. I. and Koshland, D. E., Jr. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 4660-4664
4. Hidaka, H., and Tanaka, K. (1987) Method. Enzymol. 139, 570-582
5. Wakabayashi, T., Yoshida, J., Seo, H., Kato, K., Murata, Y., Matsui, N., and Kageyama, N. (1988) J. Neurosurgery. 68, 449-455
6. Watanabe, M., Hagiwara, M., Onoda, K., and Hidaka, H. (1988) Bichem. Biophys. Res. Commun. 152, 642-648
7. Hagiwara, M., Hachiya, T., Watanabe, M., Usuda, N., Iida, F., Tamai, K., and Hidaka, H. (submitted)
8. Ito, T., Tanaka, T., Yoshida, T., Onoda, K., Ohta, H., Hagiwara, M., Itoh, Y., Ogura, M., Saito, H., and Hidaka, H. (1988) J. Cell Biol. 107, 929-937
9. Anderson, W. B., Estival, A., Tapiovaara, H., and Gopalakrishna R. (1985) Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. 19, 287-306
10. Girard, P. R., Mazzei, G. J., Wood, J. G., and Kuo, J. F. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3030-3034
11. Yoshida, Y., Huang, F. L., Nakabayashi, H., and Huang, K-P. (1988) J. Biol. Chem. 263, 9868-9873
12. Ase, T., Saito, N., Shearman, M. S., Kikkawa, U., Ono, Y., Igarashi, K., Tanaka, C., and Nishizuka, Y. (1988) J. Neurosci. 8(10), 3850-38


| | MC-1a | MC-2a | MC-3a |
|---|---|---|---|
| | ng/ mg protein | ng/ mg protein | ng/ mg protein |
| A-172 | N. D. | N. D. | 127.6 ± 14.4 |
| SK-MG-1 | N. D. | N. D. | 248.8 ± 38.5 |
| SK-MG-4 | N. D. | N. D. | 148.5 ± 35.8 |
| SK-N-MC | N. D. | 389.5 ± 20.7 | N. D. |

Data are expressed as the mean ± SD of 4 experiments.
N. D.; non detectable

# 159 ラット脳シナプス膜に対するCa²⁺キレータ抵抗性 [³H] PDBu結合特性

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〕
ラット大脳皮質と海馬の膜標品に対する[³H]phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu)の結合特性から，膜結合プロテインキナーゼC(PKC)に対するフォルボールエステルとCa²⁺の作用を考察した．膜の[³H]PDBu結合部位(Bmax)はEGTA (1～100 μM)による遠心洗浄によって最大 60%減少し，同時に上清の[³H]PDBu結合部位の増加を認めた．これは[³H]PDBu結合部位がCa²⁺によって膜に移行したことを示している．非標識PDBuによる前処置はEGTA存在下においても，膜の[³H]PDBu結合部位を濃度依存的に増加した．また非標識 PDBu あるいは高濃度の Ca²⁺(500 μM)による膜標品の前処置によって，1 mM EGTAによる遠心洗浄後の膜の[³H]PDBu結合部位は増加した．すなわち膜の[³H]PDBu結合とCa²⁺キレータ抵抗性[³H]PDBu結合の形成はフォルボールエステルとCa²⁺の両者によって促進された．このCa²⁺キレータ抵抗性PDBu結合部位と Bazziらが報告しているCa²⁺キレータ抵抗性 membrane-inserted PKCとの関連性を考察した．

〔はじめに〕
ジアシルグリセロールやCa²⁺によるPKCの活性化は一過性であるが，これらのsecond messenger消失後も活性が持続して細胞の長期応答を調節する場合がある．PKCは低濃度のCa²⁺存在下でジアシルグリセロールやフォルボールエステルにより膜に移行して活性化されるが，膜に対するPKCの結合様式がCa²⁺とフォルボールエステルでは異なるといわれている．Bazziらは膜に移行したPKCには 2つの型が存在することを報告している(1)．1つは Ca²⁺キレータ(EGTA)で膜から可逆的に解離する membrane-asssociated型 PKCと，もう1つはEGTAでは解離しない不可逆的な membrane-inserted型のPKCであるという．このmembrane-inserted PKCはCa²⁺非存在下でも活性を保ち，リン脂質やPDBuの影響を受けず，またCa²⁺非依存的にPDBuと結合する．このようなmembrane-inserted PKCは，高濃度のリン脂質，フォルボールエステル存在下，高濃度のCa²⁺などによって，形質膜と(または)PKCが何らかの構造変化を起こして形成される(2)．また membrane-inserted PKCは可溶化によって再度Ca²⁺やリン脂質依存性となり遊離型PKCと同じ特性を持つという．Membrane-inserted PKCの研究は精製したPKCとリン脂質膜を用いて行われているが，本報告ではラット脳の膜標品に対する[³H]PBDu結合部位に対するフォルボールエステルとCa²⁺の作用から膜結合PKCのとの関連を考察した．

〔方法〕
1．膜標品の作製：Wistarラットの大脳皮質および海馬をprotease inhibitors(leupeptin, trypsin inhibitor各200 μg/ml, 0.1 mM PMSF)を含む0.32M sucrose 50 mM Tris·HCl bufferr中でホモジナイズ後，1,000 xg 10分間遠心し得られた$S_1$を100,000 xg 1時間遠心分離し得られた沈渣をTris bufferで洗浄し膜標品を得た．実験により膜標品はEGTA $CaCl_2$あるいは非標識 PDBu存在下で30°C 20分間前処置し遠心洗浄後，50 μM Ca²⁺を含む同bufferに懸濁した．
2．[³H]PDBu結合実験は，膜標品(6～30 μg protein)と1～64 nM[³H]PDBuをprotease inhibitor, BSA 1mg/mlを含む 50 mM Tris·HCl bufferで25°Cまたは30°Cで30分間インキュベート後 Whatman GF/Bフィルター上に吸引濾過した．上清の[³H]PDBu結合は20～100 μg/ml phosphatidyl serineを含む Tris·bufferでインキュベート後 0.3% polyethylene-imine(PE) に1～2時間浸透したGF/Bフィルターに吸引濾過しフィルターのβ線を測定した．1 μM 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate(TPA)存在下の結合を非特異的結合として全結合との差を特異的結合とした．Scatchard解析によりBmaxとKdを求めた．

〔結果〕
[³H]PDBu飽和結合の最大結合数(Bmax)は膜標品調製の際のEGTA濃度 1～100 μMの範囲で著明に減少し，100 μM EGTAでは非存在下の40%に減少する．同時に上清の[³H]PDBu結合部位は増加した．Kd値には変化を見なかった．Ca²⁺存在下および1 mM EGTA存在下の[³H]PDBu特異的結合の時間経過を Fig.1に示す．Ca²⁺存在下の定常状態後に1 mM EGTAを添加した後の[³H]PDBu結合は，EGTA存在下の結合より高い．非標識PDBu(2, 32nM)はEGTA存在下においても濃度依存的に膜の[³H]PDBu結合部位を増加した(Fig.2)．さらに非標識PDBuによる膜の前処置は1mM EGTAによる遠心洗浄後の膜[³H]PDBu

Fig.1.

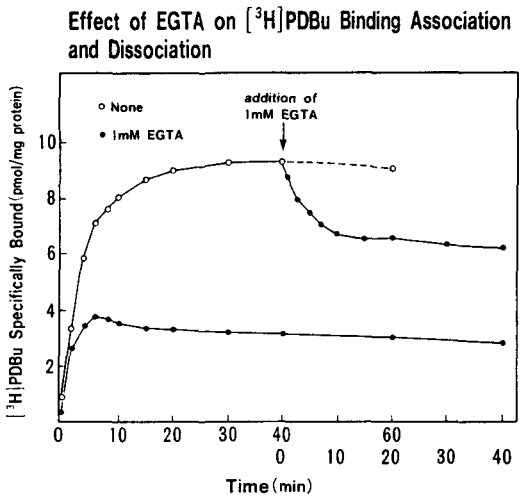



Fig.2.

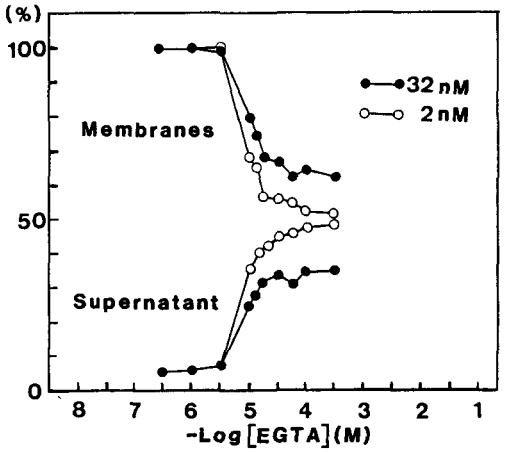



Fig.3.

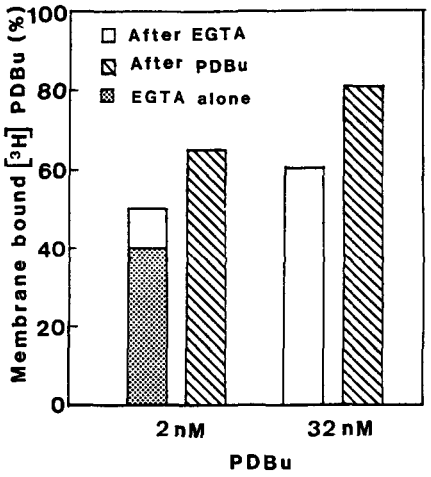



Fig.1. [$^3$H]PDBu binding association with or without $Ca^{2+}$. Membrane was incubated with $Ca^{2+}$ (○) and 1mM EGTA(●) was added. The lower indicates incubation with 1mM EGTA(●).

Fig.2. $Ca^{2+}$-chelator-resistant [$^3$H]PDBu binding sites in membranes. Membrane was incubated with PDBu (2 or 32 nM) after 1 mM EGTA or incubated with 1 mM EGTA after PDBu (2 or 32 nM), and washed by centrifugation.

Fig.3. [$^3$H]PDBu binding in membranes and supernatants after incubation with PDBu (2 or 32 nM) in the presence of increasing concentrations of EGTA.

結合部位を濃度依存的に増加した(Fig. 2)．また，500μM $Ca^{2+}$による膜の前処置も1mM EGTAによる遠心洗浄後の膜の$Ca^{2+}$キレータ抵抗性[$^3$H]PDBu結合部位を増加した．次に$Ca^{2+}$キレータ抵抗性[$^3$H]PDBu結合部位の減少が膜からの解離によることを確かめた．非標識PDBu存在下ではEGTAの濃度増加に伴って膜の[$^3$H]PDBu結合は減少し，上清の[$^3$H]PDBu結合は増加して鏡面的変化を示した(Fig. 3)．

[考察]

フォルボールエステル結合部位は必ずしもPKCとは限らず脂質膜との結合も報告されているが，PKCの制御ドメインの一部のC1領域にあると考えられている．本報告で[$^3$H]PDBu結合部位は$Ca^{2+}$非存在下でフォルボールエステル濃度依存的に膜に結合し，$Ca^{2+}$存在下でさらに促進された．またフォルボールエステルや高濃度$Ca^{2+}$による前処置によって$Ca^{2+}$キレータ抵抗性結合は増加した．この増加した$Ca^{2+}$キレータ抵抗性[$^3$H]PDBu結合部位の特性は，Bazziらが報告しているmembrane-inserted PKCの特性によく一致している．本結果のin vitroで増加した$Ca^{2+}$キレータ抵抗性[$^3$H]PDBu結合部位は膜-PKC複合体である可能性が示唆された．さらにこれらの処置による[$^3$H]PDBu結合部位の変化とPKC活性との関連について検討を加える．

[文献]

(1) Bazzi M.D. and Nelsestuen G.L., Biochemistry, 27:7589, 1988.

(2) Bazzi M.D. and Nelsestuen G.L., Biochemistry, 28:3577, 1989.

# 160 カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの構造と機能：欠失および部位特異的変異法による解析

大迫俊二*、関原俊一、山内卓
（東京都神経研・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）の構造と機能の関係を調べるために、欠失および部位特異的変異法を用い変異cDNAを作製し、培養細胞で発現させ、その性質を調べた。αおよびβサブユニットのC末端側の会合部位と考えられる部位を欠失させた変異酵素（αIIとβII）は、ともに$Ca^{2+}$、カルモデュリン依存性に酵素活性を示した。しかし、αIIはαサブユニットと異なりオリゴマーを形成することができずモノマーであった。またαおよびβサブユニットは自己リン酸化によって$Ca^{2+}$非依存性活性が生じるのに対し、αIIとβIIはほとんど自己リン酸化されず$Ca^{2+}$非依存性活性もほとんど発現しなかった。αサブユニットの 286 番目のThrをAlaにかえた変異酵素は、$Ca^{2+}$、カルモデュリン依存性に酵素活性を示したが、自己リン酸化による$Ca^{2+}$非依存性活性は発現しなかった。これらの結果により、自己リン酸化による$Ca^{2+}$非依存性活性の発現に 286 番目のThrとC末端側の構造が必須であることが明らかになった。

キナーゼIIは脳神経系に非常に高い活性を示し、伝達物質生合成酵素、細胞骨格蛋白質などの幅広い基質特異性を持つことから、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る。最近キナーゼIIのαおよびβサブユニットのcDNAクローニングがなされ、その一次構造が明らかにされた（1、2）。αとβサブユニットは互いに高いホモロジーを持ち、それぞれに触媒部位、カルモデュリン結合部位および自己リン酸化部位が存在すると考えられる。しかし、酵素蛋白質の構造と機能の関係については不明な点が多い。我々は、すでにキナーゼIIのαおよびβサブユニットのcDNAを培養細胞で発現させることによって酵素学的性質を明らかにしてきたので（3）、今回、αとβサブユニットcDNAに欠失および部位特異的変異法を用い、キナーゼIIの構造と機能の関係を調べた。

## 〔実験方法〕

欠失cDNA（αI、αIIとβI、βII）は図1に示した制限酵素で切断後、終止コドンと EcoRI site を含む合成オリゴヌクレオチドと結合し、発現ベクター pcDL1 の EcoRI site に挿入した。変異cDNAは合成オリゴヌクレオチドと site-directed mutagenesis kit (Boehringer) を用いて調製し、αサブユニットcDNA 283 番目のArgと 286 番目のThrを他のアミノ酸に置換したcDNAを発現ベクターへ組み込んだ。培養細胞での発現は既に報告した方法（3）に従って解析した。

## 〔実験結果・考察〕

キナーゼIIのサブユニットの構造と酵素活性の関係を調べるためにαおよびβcDNAから二種類の欠失cDNAを構築し（図1）CHO細胞に導入した。αIとβIcDNAは、キナーゼドメインのみを含み、αIIとβIIはキナーゼと調節ドメインの両ドメインを含む。βIIは、カルモデュリン結合部位のC末端側のβ特異的挿入領域を含む。αIもしくはβIcDNAを導入した細胞は、それぞれのmRNAを発現していることが Northern blot によって確認された。しかし蛋白質の生成と酵素活性の発現は検出できなかった。αIIもしくはβIIcDNAを導入した細胞には，蛋白質とmRNAの発現が Immunoblotting と Northern blotting によ

って確認された。蛋白質の分子量は４０（αII）と５１（βII）KDaでありcDNAから期待される値とよく一致した。αIIとβIIはともにCa$^{2+}$とカルモデュリンに依存性した活性を示し（表１）、カルモデュリンに対するKa値はαIIが８３nM、βIIが２５nMであり、αとβサブユニットの値とほぼ同様であった。シヨ糖密度勾配遠心法による解析から、αIIはαサブユニットと異なり、オリゴマーを形成できずモノマーであることが明らかになった（図２）.αおよびβサブユニットが、Ca$^{2+}$非依存性活性を発現するのに対し、αIIとβIIはほとんど自己リン酸化されず、またCa$^{2+}$非依存性活性も生じなかった（表１）。キナーゼIIの自己リン酸化によるCa$^{2+}$非依存性活性の発現には、αのThr-286 とβのThr-287 がリン酸化されることが重要であると考えられるので（４、５）、αサブユニットのThrをAlaに置換した変異酵素についてこの可能性を調べた。変異酵素（Thr-286 →Ala-286 ）はCa$^{2+}$、カルモデュリン依存性に酵素活性を示したが、自己リン酸化によるCa$^{2+}$非依存性は発現しなかった。

以上の結果は、自己リン酸化によるCa$^{2+}$非依存性活性の発現に 286 番目のThrとC末端側の構造が必須であることを示唆するものと思われる。今後、さらにキナーゼIIの調節機構における構造と機能の関係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. U.S.A. 84, 1794-1798.
2. Lin, C. R., et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 5962-5966.
3. 山内卓、大迫俊二 (1988) 神経化学 27, 432-433.
4. Schworer, C. M., et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 13486-13489.
5. Thiel, G., et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 6337-6341.


Fig. 1. Structure of open reading region of deleted cDNAs

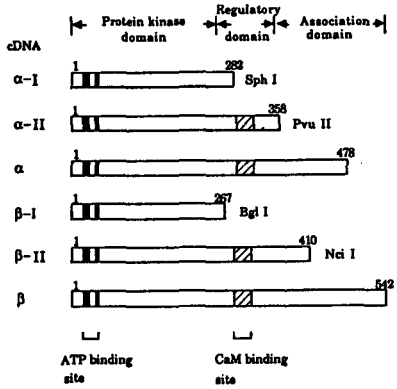



Fig. 2. Sucrose density gradient centrifugation of α and αII

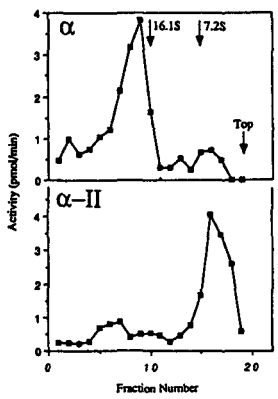



Table I. Reduced Ca$^{2+}$-independent activity of αII and βII under autophosphorylating conditions

| Clone | Autophosphorylating conditions | Phosphorylation of MAP 2 + Ca$^{2+}$ | - Ca$^{2+}$ |
|---|---|---|---|
| | | sp. act. (%) | sp. act. (%) |
| α | + Calmodulin | 51.8 (100) | 33.9 (65.4) |
| | - Calmodulin | 49.3 (95.2) | 0.80 ( 1.54) |
| α-II | + Calmodulin | 28.7 (100) | 5.12 (17.8) |
| | - Calmodulin | 22.5 (78.4) | 1.70 (5.94) |
| β | + Calmodulin | 24.2 (100) | 12.9 (53.3) |
| | - Calmodulin | 23.2 (95.7) | 0.81 (3.3) |
| β-II | + Calmodulin | 14.9 (100) | 4.22 (28.3) |
| | - Calmodulin | 12.6 (84.5) | 2.09 (14.0) |

# 161 ラット脳カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII δポリペプチドcDNAの単離と構造決定

飛松孝正、　藤澤仁
（　旭川医大・生化学第一　）

〔要約〕
第5番目のアイソフォームであるラット脳カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII(KII)のcDNAクローンを単離し、その塩基配列を決定した。そのcDNAの塩基配列は533アミノ酸からなる、分子量 60,080のポリペプチド（δと命名）をコードしていた。そのアミノ酸配列は α、β、β'、γポリペプチドのアミノ酸配列に対してそれぞれ86%、86%、86%、85%の相同性を示した。これらのアミノ酸配列の比較により、KIIはN領域（アミノ末端より約 300アミノ酸残基を含む領域）、C領域（カルボキシル末端の 150アミノ酸残基）およびその間に挟まれアミノ酸変化の多いD領域の3領域に分けられた。特に、触媒ドメインや調節ドメインを含むN領域で高い相同性が認められた。また、RNA blotting法により、δmRNAが大脳や脳幹と比べて、小脳に多く、α、β/β'、γmRNAと異なる組織分布をしていることが見いだされた。

ラット脳カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII(KII)は広い基質特異性を示し、脳に豊富に存在していることより、神経機能に重要な働きをしていると考えられている(1, 2)。精製された大脳のKIIは分子量54,000(α)や60,000(β)のサブユニットなどから構成されるオリゴマー酵素である (3)。このαとβの比率は大脳で約3：1であるのに対して、小脳では1：4と、臓器により異なっている(4, 5)。

一方、これまでに、ラット脳より調製したcDNAライブラリーからα(6)、β(7)、β'(8)、γ(9) ポリペプチドのcDNAが単離され、その一次構造が明らかにされている。これらのアミノ酸の一次構造やそれから予測される二次構造はお互いによく保存されているが、脳組織に於けるそれらの mRNA はそれぞれに特徴的に分布している (9)。今回、第5番目のアイソフォームのKIIcDNAを単離したので報告する。

《実験方法》

ラット大脳の Okayama-Berg cDNA ライブラリーは既報(9)のものを用いた。βサブユニットcDNAの一部分の塩基配列を有する 57merの合成オリゴヌクレオチドをプローブとし、クロスハイブリダイゼーションによりスクリーニングしてcDNAクローンを単離した。primer extensionによるcDNAライブラリーの作成やそのスクリーニング、cDNA の塩基配列の決定、RNA blotting は基本的に既報(9)と同様の方法で行った。

《結果と考察》

ラット大脳のcDNAライブラリーをβサブユニットのcDNAの塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングし、これまでに知られているα、β、γに加えて、それらと異なる塩基配列を持つcDNAを2個単離した。これらは全コーディング領域を含んでいなかったので primer extension によりcDNAライブラリーを作成して5'領域を含むクローンを単離し、全塩基配列を決定した。

翻訳の開始部位はα、β、γの塩基配列を参考にして決定した。その領域の塩基配列(GCCATGG)は Kozak のコンセンサスシークエンスに一致していた。533 番目のイソロイシンのコドンの後にストップコドンがあるので、このポリペプチド（δと命名)は 533アミノ酸からなり、その分子量は60,080であると計算された。

δとα、β/β'、γポリペプチドのアミノ酸配列を比較し、並べたものを図1に示した。その結果、KIIは一次構造上、2つの相同性の高い領域（N領域：図1のアミノ酸番号1から315まで、およびC領域：アミノ酸番号395から544まで）とそれらに挟まれたアミノ酸変化の多い領域(D領域：アミノ酸番号 316から 394まで)に分けることができる。N領域内には、アミノ酸番号21から26および43にATP結合部位に相当するアミノ酸配列(G-X-G-X-X-SとK)(10)、アミノ酸番号 297から 310にカルモデュリン結合部位に相当するアミノ酸配列(11)および自己活性の調節に関与していると考えられる2つの燐酸化部位（287 Thr と 315 Ser）が見いだされ、触媒ドメインと調節ドメインが存在していると考えられる。δポリペプチドはこれらの領域に加えてC末端に21アミノ酸残基を持っている。図1の並べ方でのそれぞれの領域での相同性を表1に示した。C領域の相同性が比較するペプチドの組合せにより75%から89%にばらつくのに対して、N領域の相同性はどの組合せに於いても90%前後の高い値を示した。これはN領域のアミノ酸配列が酵素機能に重要なためだと考えられる。一方、δとα、β/β'、γのタンパク質coding領域の塩基配列にはそれぞれ 76%、77%、75%の相同性が認められるが、共通のexonと考えられる塩基配列が存在しないので、これらのmRNAは異なる遺伝子産物であると考えられる。5'および3'-noncoding領域には相同性が全く認められなかった。

次に大脳、小脳、脳幹から単離した RNAをもちいて、RNA Blot解析を行なうと、それぞれの臓器で4.2-kbのバンドがδ

のプローブにより検出された。これら３つの臓器でのδmRNAの量は大脳、脳幹に比べて小脳に多かった。これはαmRNAが大脳に多く小脳にほとんどなく、βmRNAが３つの臓器にほぼ等量あり、γmRNAが大脳、脳幹に比べて小脳に少ない (9)ことと、顕著な違いを示していた。したがって、これら４種のＫⅡポリペプチドが脳内でそれぞれに特徴的な分布をしており、それぞれが異なる機能を果たしている可能性が考えられる。

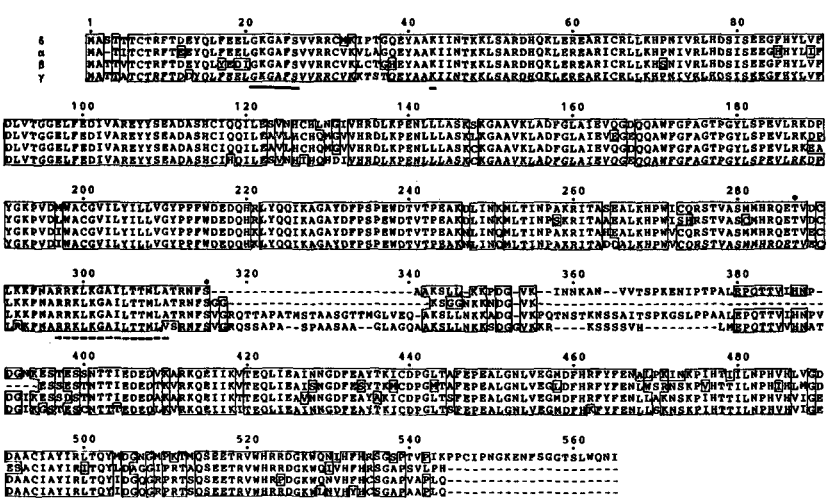


Fig. 1. Alignment of the deduced amino acid sequences of the α, β, γ, and δ polypeptides of CaM kinase-II. The putative ATP-binding site (amino acid residues 20-26 and Lys-43) is shown by the solid underline. The calmodulin-binding site is indicated by the broken underline. The possible phosphorylation sites are indicated with asterisks. β' polypeptide is identical to β except for the deletion of a segment with amino acid residues 380-394 in the aligned sequence.

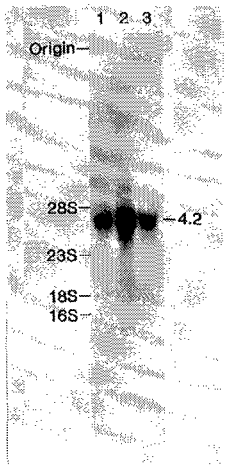



Fig. 2. RNA blot analysis of rat brain RNAs with a CaM-kinase II δ cDNA probe. Total RNAs (10 μg) from rat cerebrum (lane 1), cerebellum (lane 2), and brain stem (lane 3) were subjected to RNA blot analysis using a probe for δ. The size markers used were 28S and 18S rat rRNAs, and 23S and 16S E. coli rRNAs (indicated on the left). RNA sizes in kb are indicated on the right.

**Table 1. Amino acid sequence homology in the respective protein regions among five CaM-kinase II Isoforms** Position numbers refer to the numbers in the aligned sequences in Fig. 1.

| Region compared | Position number | Homology between | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | α/δ | β/δ | β'/δ | γ/δ | α/β | α/β' | α/γ | β/γ | β'/γ |
| | | % | | | | | | | | |
| N-region | 1-315 | 93 | 92 | 92 | 92 | 91 | 91 | 89 | 92 | 92 |
| D-region | 316-394 | 53 | 63 | 54 | 57 | 63 | 63 | 59 | 62 | 56 |
| C-region | 395-544 | 77 | 81 | 81 | 80 | 76 | 76 | 75 | 89 | 89 |
| Total | 1-565 | 86 | 86 | 86 | 85 | 85 | 85 | 84 | 88 | 87 |

《文献》


1. Yamauchi, T., and Fujisawa, H. (1980) FEBS Lett. 116, 141-144
2. Fujisawa, H., Yamauchi, T., Nakata, H., and Okuno, S. (1984) in Calcium and Cell Function (Cheung, W. Y., ed) Vol.5, pp.67-99, Academic, Orlando, FL
3. Yamauchi, T., and Fujisawa, H. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 15-21
4. McGuinness, T. L., Lai, Y., and Greengard, P. (1985) J. Biol. Chem. 260, 1696-1704
5. Miller, S. G., and Kennedy, M. B. (1985) J. Biol. Chem. 260, 9039-9046
6. Lin, C. R., Kapiloff, M. S., Durgerian, S., Tatemoto, K., Russo, A. F., Hanson, P., Schulman, H., and Rosenfeld, M. G. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5962-5966
7. Bennett, M. K., and Kennedy, M. B. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1794-1798
8. Bulleit, R. F., Bennett, M. K., M. K., Molfoy, S. S., Hurley, J. B., and Kennedy, M. B. (1988) Neuron 1, 63-72
9. Tobimatsu, T., Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1988) J. Biol. Chem. 263, 16082-16086
10. Kamps, M. P., Taylor, S. S., and Sefton, B. M. (1984) Nature (London) 310, 589-592
11. Payne, M. E., Fong, Y.-L., Ono, T., Colbran, R. J., Kemp, B. E., Soderling, T. R., and Means, A. R. (1988) J. Biol. Chem. 263, 7190-7195

# 162 hypoxia条件下におけるラット脳シナプトゾーム内カルシウム動態とこれに及ぼすcyclic AMPの影響

岡田三津子*、浦江明憲*、岩崎克典、藤原道弘
（福岡大・薬・応用薬理、*九州臨床薬理研究所）

〔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、hypoxiaの効果ならびに、hypoxiaの作用に及ぼす8-bromo cyclic AMPおよびyohimbineの影響を検討した。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hypoxiaの作用は8-bromo cyclic AMP(100、500 μM)を3分間前処置することによって濃度依存的抑制された。さらに、アデニレートサイクラーゼを活性化させるyohimbine(1、10μM) を3分間前処置しても、hypoxiaの効果は抑制された。これらの結果から、細胞内のcyclic AMP 濃度の上昇によって虚血による細胞障害が改善される可能性が示唆された。

cyclic AMP はhypoxiaやischemiaによる記憶障害を改善効果するという報告がある[1]。また、hypoxiaやischemia後の細胞障害には細胞内$Ca^{2+}$ 動態変化も関与していることが明かになってきている[2]。一方、種々の細胞においてセカンドメッセンジャーであるcyclic AMPと$Ca^{2+}$動態の間には密接な相互作用があることが知られている[3]。このことから、我々はラット脳シナプトゾームを用いてhigh $K^+$刺激によって起こる$[Ca^{2+}]i$の上昇がhypoxia条件下でどのような影響を受けるかを調べるとともにcyclic AMP の役割について8-bromo cyclic AMPおよびyohimbineを用いて検討した。

【方法および結果】high $K^+$ 刺激による$[Ca^{2+}]i$の変化は$Ca^{2+}$-indicator、Quin-2を用いて測定した[4]。すなわち、Wistar系雄性ラットの全脳シナプトゾームを調製し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pre-incubationした後、15mM $K^+$で刺激し、脱分極10、60および180秒後のQuin-2蛍光の増加を$[Ca^{2+}]i$の上昇として測定した。hypoxic medium としては純窒素でで3-5時間脱酸素を行ったHepes mediumを用いた。薬物はhigh $K^+$ 刺激3分または20分前に投与した。その結果、normoxia

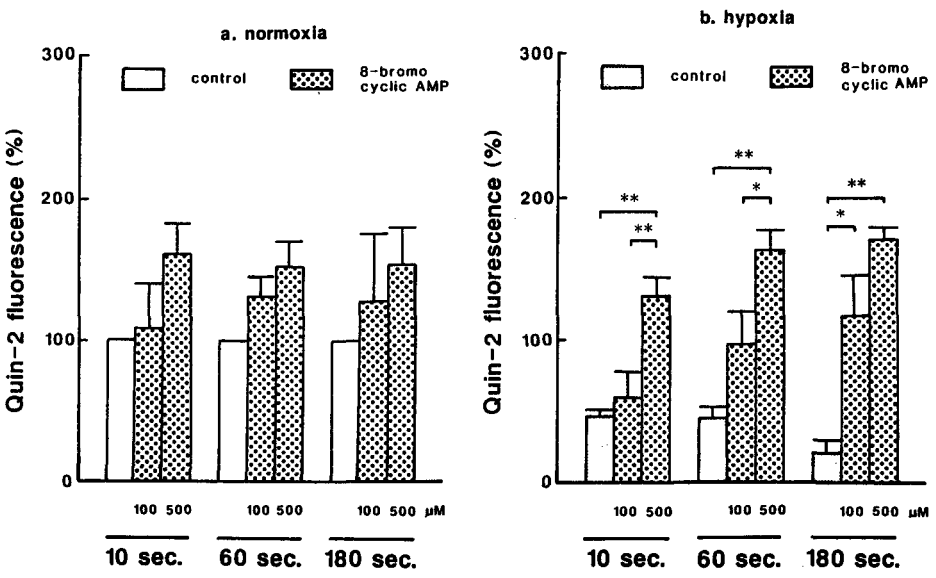



Fig. 1 Effects of 8-bromo cyclic AMP on the rise in $[Ca^{2+}]i$ following depolarization.
* $p<0.05$, ** $p<0.01$

条件下においてのhigh $K^+$刺激による$[Ca^{2+}]i$の上昇を8-bromo cyclic AMPは上昇させる傾向にあった(Fig.1a)。一方、hypoxia条件下では$K^+$刺激による$[Ca^{2+}]i$の上昇の程度は著明に抑制された。しかし、これは、8-bromo cyclic AMPを3分前処置することによって濃度依存的に正常時の上昇レベルまで回復した(Fig.1b)。また、アデニレートサイクラーゼを活性化する$\alpha_2$-antagonist、yohimbine(1, 10$\mu$M)を3分間前処置することによってhigh $K^+$刺激による$[Ca^{2+}]i$の上昇が著明に増強し、正常時のレベルまで回復した(Fig.2a)。しかし、前処置時間を20分間に延長すると、high $K^+$刺激による$[Ca^{2+}]i$の上昇はyohimbine 10$\mu$Mにおいてむしろ低下した(Fig.2b)。

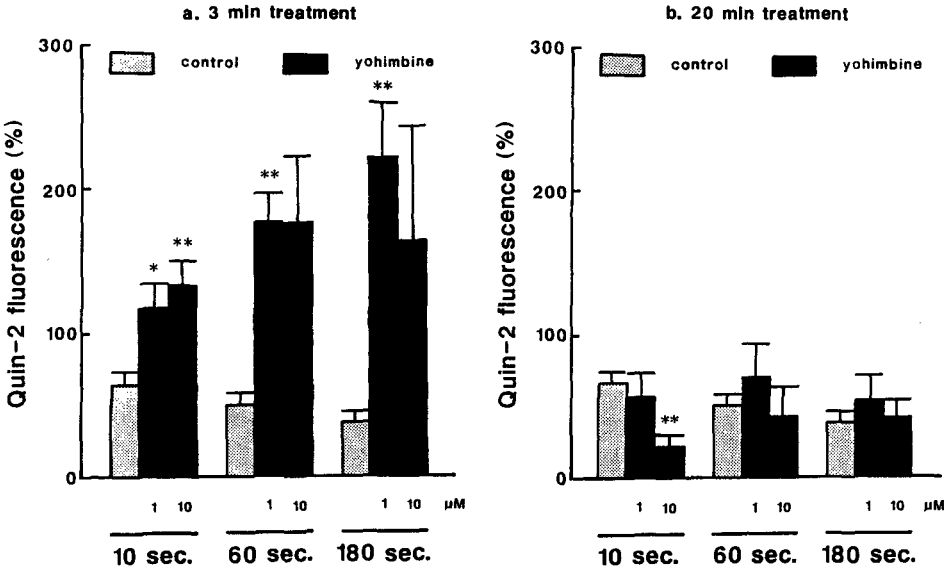



Fig.2 Effects of yohimbine on the rise in $[Ca^{2+}]i$ following depolarization under the hypoxic conditions.
* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. hypoxia only.

【考察】動物実験において、虚血による心疾患や記憶障害は、細胞内cyclic AMP濃度を上昇させる薬物によって改善されることが報告されている[1)5)]。本研究では、hypoxia条件下ではhigh $K^+$刺激による$[Ca^{2+}]i$上昇が抑制された。この抑制は、8-bromo cyclic AMPを3分間前処置することによって消失し、$Ca^{2+}$のhigh $K^+$刺激に対する反応性はnormoxia条件下におけるそれまで回復した。また、hypoxia条件下でyohimbineを3分間前処置しても同様な効果が認められた。これらの結果からhypoxia条件下でも細胞内cyclic AMP濃度が上昇するとhypoxiaによって生じた細胞の反応性の低下が改善される可能性が示された。一方、hypoxia条件下のyohimbineの前処置時間を20分に延長すると、むしろhigh $K^+$刺激による$[Ca^{2+}]i$の上昇はhigh $K^+$ 刺激単独と比べて低下する例がみられた。これは、yohimbineの長時間作用による受容体の脱感作かあるいは、hypoxia条件下における細胞障害の程度によってcyclic AMPの作用が全く異なっている為と考えられた。

【references】

1. Ando, S., Kametani, H., Osada, H., Iwamoto, M. and Kimura, N., Brain Res., 405, 371-374, (1987).
2. Siesjö, B.K., J. Cereb. Blood Flow Metab., 1, 155-185, (1981).
3. Rasmussen, H. and Barrett, P.W., Physiol., Rev., 64, 938-984 (1984).
4. Okada, M., Mine, K., Iwasaki, K. and Fujiwara, M., J. Neurochem., 52, 1837-1842 (1989).
5. Thandroynen, F.T., Mccarthy, J., Burton, K.P. and Opie, L.H., Cir. Res., 62, 306-314 (1988).

# 163　パーキンソン病モデルイヌにおける日内リズム異常－L-DOPAによるリズム回復－

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医学教室、＊第一外科学教室）

〔要約〕　我々は、昨年の本学会で、MPTP投与によりパーキンソン病モデルイヌを作成し、尿量、血中バゾプレシンの日内リズムをMPTP投与前後で比較し、以下の結果を報告した。

1）尿量は、投与前では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示した。MPTP投与後、そのリズムは消失した。

2）血中のバゾプレシンは、MPTP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が、投与２週間後では、ややリズムが乱れ４週後では消失した。

今回MPTP投与後L-DOPAを投与して上記のリズム異常に対する影響を調べた。その結果、尿量の日内リズム異常は回復した。また、L-DOPA投与によりバゾプレシンの分泌はMPTP投与前より高値を示したものの、日内リズムはほぼ回復した。

**【はじめに】**　我々は、パーキンソン病患者において、健康人や他疾患患者に比較して夜間尿が多いことに気付いた。昨年の本学会において、MPTPによるパーキンソン病モデルイヌにおける尿量ならびに、血中バゾプレシン、コルチゾール、ACTHなどの日内リズムについて報告した(1)。今回、MPTP投与後L-DOPAを投与し、尿量や血中バゾプレシンの日内リズム異常に対する回復効果を検討した。

**【方法】**

1）ヒトのデータについて

愛媛大学医学部精神神経科で治療を受けた６名のパーキンソン病患者と正常対照者６名について、９～２１時の昼間尿と２１～９時の夜間尿を４～５日間採尿した。

2）イヌのデータについて

雄イヌ１０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度に保った。餌は、イヌ固形食を９～１７時まで与え、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外科的に造設し、チューブを金属の誘導管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処置した。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、排泄など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思われる２週間後に、MPTP投与前のデータ（pre MPTP)として、採血を３～４日、採尿を５～６日間、４時間おきに１日６回行なった。採取終了後に、MPTP 2.5mg/kg体重を静脈注射した。MPTP投与後２週間後（Post 2W）にもMPTP投与前と同様の採血、採尿を行なった。また、MPTPを投与後、L-DOPAを経口投与し、尿量の日内リズムの回復を調べた。４匹のイヌを用いMPTP投与後１週目より、L-DOPAを１日６回、４時間毎に１日量として、4mg/kg体重を与え、投与２週間目をはさんで、３日間の採血と５日間の採尿を行なった。血液は、摂氏－８０度、尿は摂氏－２０度で保存した。血中バゾプレシンは、ラジオイムノアッセイキット（三菱油化K.K.のAVP-RIA KIT）で測定した。

**【結果】**　1）パーキンソン病患者ならびにパーキンソン病モデルイヌにおける尿量の日内リズム異常

表１は、パーキンソン病患者６名と、対照群として正常者６名で、９～２１時の昼間尿と、２１～９時の夜間尿を比較したものである。対照群では昼間尿が夜間尿に比べて多いのに対して、パーキンソン病患者群では逆に夜間尿が多くなっている。尚、脊髄小脳変性症２名、筋萎縮性側索硬化症１名では、健康人と同様であった。

図１は、パーキンソン病モデルイヌにおける尿量の日内リズムを示したもので、左のカラムがMPTP投与２週間後（Post 2W）、中央のカラムがMPTP投与前（Pre MPTP）、右のカラムが、MPTP投与後１週目からL-DOPAを経口投与した結果であり、L-DOPA投与の時期は、ちょうどPost 2Wの時期に一致する。L-DOPAを投与しない場合は、Post 2Wで示されるように尿量のリズムが

消失する．L-DOPAを投与することにより１日の総尿量が投与前の７０％に減少するものの、尿量のリズムは正常化した．

２）パーキンソン病モデルイヌにおける血中バゾプレシンの日内リズム異常

図２は、血中バゾプレシンの日内変化を示したものである．Pre MPTPでは、１３時を最高値とし、次第に減少して５時に最底値となる日内リズムを示し、Post 2Wではこのリズムが乱れて不明瞭となる．さて、MPTP投与後１週目からL-DOPAを投与した場合は、バゾプレシン量としては有意に高値を示すが、日内リズムは１７時を最高とするMPTP投与前のリズムに近いパターンを示した．

**【考察】**　バゾプレシンの分泌がカテコールアミンによって調節されていることはよく知られている．ラットではドーパミン(2-4)、ノルアドレナリン (2,3,5,6)、およびアドレナリン (3) がバゾプレシンの分泌を刺激することが生化学的、生理学的実験で示されている．逆に抑制的に作用しているとの報告もある．これらは実験条件や動物の種差によるものかも知れない (2)．今回の結果から、MPTPによるパーキンソン病モデルイヌにおける尿量のリズム異常にはバゾプレシンの分泌異常が深く関わっていると考えられる．そして、バゾプレシン分泌のリズム制御にはドーパミンニューロンが関与していることが明らかにされた．即ち、ドーパミンニューロンがMPTPによって障害を受けそのリズム制御が不能となり尿量の日内リズムが消失した．しかし、L-DOPA投与によりドーパミンニューロンの障害が改善し再びリズムが回復した．ドーパミンの関与の仕方については、バゾプレシン分泌細胞へのリズム中枢からの刺激伝達に対してドーパミンニューロンが促進的に働いていると推察できる．

**【参考文献】**

（１）日根野　尚　ら (1988) 神経化学 27, 296－297；（２）Bridges, T. E. et al. (1976) J. Physiol. (London) 260, 647-666；（３）Urano, A. et al. (1978) Exp. Neurol. 60, 140-150；（４）Moos, F. and Richard, P. (1982) Brain Res. 241, 249-260；（５）Bridges, T. E. et al. (1970) J. Endocrinol. 48, 265-276；（６）Willoughby, J. O. et al. (1987) Neuroendocrinol. 45, 219-226；（７）中井康光 (1989) 神経研究の進歩 33, 78－90.

**表１　*Urine Volume of Parkinsonian Patients and Controls during the Daytime and the Nighttime***

| | Number of Patients | Age | Urine Volume (ml) 9-21 h | 21-9 h |
|---|---|---|---|---|
| | | | ┌──**──┐ | |
| Parkinson Disease | 6 | 60±2 | 557 ± 40 (51) | 727 ± 30 (65) |
| Control | 6 | 57±3 | 830 ± 75 (19) | 623 ± 69 (18) |

Mean ± S.E.
( ) - *Number of Samples*
**；P < 0.01 (Student's t-test)

**図１　The Effect of L-DOPA on the Pattern of Urine Volume in MPTP-treated Dogs.**

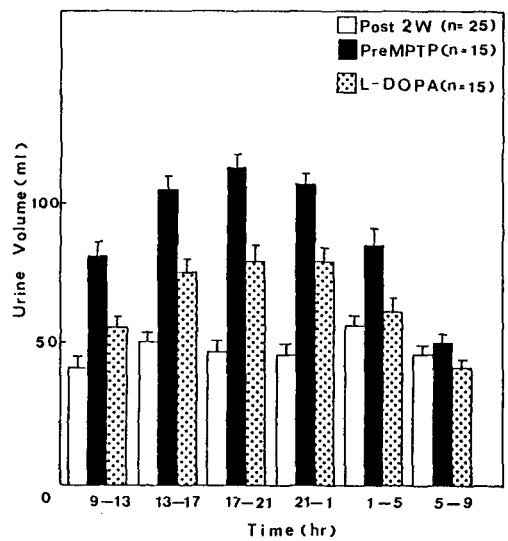
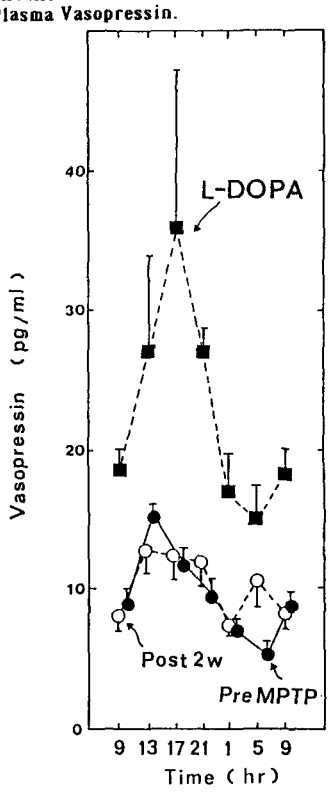



**図２　The Effect of L-DOPA on the Pattern of Plasma Vasopressin.**



# 164 レボドパおよびドパミンによる鉄依存性培養神経細胞障害 パーキンソン病との関連について

田中 真，外松明美，金井裕子，平井俊策，中野 稔*
（群馬大学神経内科，*群馬大学医療技術短大）

〔要約〕

抗ニューロフィラメント抗体を用いたＥＩＡによる神経細胞数の半定量法を新たに開発し，マウス脊髄後根神経節神経細胞を無血清培地下で培養し，レボドパおよびドパミンの神経細胞に及ぼす毒性を検討した．両物質は単独で添加すると顕著な残存神経細胞の減少をきたすが，強力な鉄のキレート剤である desferrioxamineを加えるとその減少は阻止されることから，両物質は培養系に混在する鉄存在下に細胞を障害することが明らかになった．Radical scavenger としてsuperoxide dismutaseとcatalaseを両物質と共に添加しても神経細胞数の減少は阻止できなかった．さらに新生ラット大脳皮質神経細胞の浮遊液を用いて両物質が鉄の存在下で脂質過酸化反応を惹起することを確認した．以上より両物質と培養系に混在する鉄とが活性酸素を介さずに神経細胞膜の脂質過酸化反応を惹起して細胞の脱落をきたすことが示唆された．これはパーキンソン病におけるドパミン作動性神経細胞の変性・脱落の機序として注目すべき事実であると思われる．

パーキンソン病はドパミン作動性神経細胞の変性・脱落を主体とする変性疾患であるため，ドパミンおよびその代謝関連物質と病因との関連が注目されてきた(1)．これらの物質は自身が free radicalとして作用したり，容易に活性酸素を生成することが示唆されるため，黒質神経細胞を障害する可能性が指摘されてきた．しかしこれらが一体どのように産生され，どのような機序で神経細胞が死に至るかについての実験的裏付けはなかった．一方，パーキンソン病患者の剖検脳の生化学的検討により，鉄(3)や脂質過酸化物(2)の含有量が正常脳に比して多いことが確認された．これらの報告を踏まえ，私たちは抗ニューロフィラメント抗体を用い神経細胞数を半定量するためのenzyme immunoassay (EIA)を新たに開発し，レボドパとドパミンの神経細胞に及ぼす毒性を培養系を用いて検討した．この過程で両物質の神経細胞障害に鉄の存在が重要であり，この系においては活性酸素の関与は少ないことを明らかにした．これはパーキンソン病における黒質神経細胞の変性・脱落の原因として注目する必要があると考えられるため若干の考察を加え報告する．

＜方法＞

1．脊髄後根神経節（ＤＲＧ）神経細胞の培養．既報(4)と同様の方法を用い，５週齢雄 BALB/cマウスからＤＲＧを摘出し，コラゲナーゼで１時間処理後，無血清培地中にＤＲＧ神経細胞浮遊液を作成した．以下の目的に応じた細胞密度に調整し，コラーゲン塗布した96-well microtiter plateを用いて４日間培養した．

2．ニューロフィラメント(NF)含量と神経細胞数の対応．種々の細胞密度の培養を終了後，以下の手順で酵素抗体間接法によるＥＩＡを施行した．第１抗体に抗NFウサギ血清，第２抗体にペロキシダーゼ標識抗ウサギIgG ヤギ IgG，呈色反応にABTS kitを用いた．個々のwellの残存神経細胞数を計測しO.D.値との対応をみた．

3．レボドパおよびドパミンと神経細胞の反応．培養開始24時間後，各wellから培地を除き，以下の試薬との反応を37℃，60分間行った．25 mM HEPES緩衝液に加えて，A: レボドパ 0.5 mM, B: A + superoxide dismutase(SOD) 2.5 U/ml + catalase 400 μg/ml, C: desferrioxamine 1 mM, D: A + C, E: 対照（生理的食塩水），を添加した．ドパミンとの反応は上記Aにおいてドパミン 1 mMと置換した．塗布されたコラーゲンの変性による神経細胞の脱落がないことを確認した（図２，３：pretreated well）．反応終了後培地に交換し，上述の培養を継続した後にＥＩＡを行った．

4．新生ラット大脳皮質神経細胞との反応．新生ラットから大脳皮質を摘出し，EDTA処理後trypsin-DNase で細胞を分散し，上述の反応 A～E，およびF: A + $Fe^{3+}$ADP complex 0.5 mM, G: F+Cの反応を行い，脂質過酸化物産生の指標としてmalondialdehyde(MDA)を定量した．

＜結果＞

1．神経細胞数とO.D.の対応（図１）．細胞数とO.D.はO.1%以下の危険率できわめて良好な相関を認めた．残存細胞数が400個 /15$mm^3$を越えると部分的に神経細胞体が密に集合した細胞群を形成し，個々の神経細胞数の計測が困難となったためこれ以上の残存細胞数における検討は行わなかった．しかし通常の細胞密度で培養を開始した場合，残存細胞

は図1に示した範囲内に含まれるため，抗NF抗体を用いたEIAによるO.D.の測定は培養終了時まで生存した神経細胞数の良好な指標となり，定量的価値があることが判明した．

2．レボドパとドパミンの培養神経細胞に及ぼす毒性の検討．レボドパ 0.5 mM の添加によってEIA によって得られたO.D.は著しく減少した（図2）．対照群に対するO.D.比でみると，レボドパを添加することによって0.58となり，これに SODとcatalaseを共存させても0.60であり顕著な変化はなかった．いずれの場合も P<0.001の危険率で有意な低下であった．レボドパに加えてdesferrioxamine を添加し鉄を反応系から除くと，レボドパの毒性は発現されず，有意なO.D.の低下はみられなかった．予めwellをレボドパと反応させた後にDRG 神経細胞の培養に用いても対照群との差異はみられなかった（図2：pretreated well）．ドパミンの場合も同様の傾向を認めた（図3）．

3．新生ラット大脳皮質神経細胞との反応．レボドパと$Fe^{3+}$ADP complexを加えた場合のみに9.63 nmol/mg proteinのMDAの産生がみられたが，desferrioxamine を加えたり各物質単独の反応では MDA は検出されなかった．

＜考察＞

今回の実験の意義は，1)レボドパとドパミンが神経細胞を破壊するが，その毒性発現に鉄の存在が必要であることを明確にし，2)両物質と鉄が惹起する細胞膜の脂質過酸化反応がそのメカニズムであることが示唆されたこと，3)両物質は生理的に脳内に存在し，中脳黒質では特に高濃度に存在することから，パーキンソン病における神経細胞変性・脱落の原因である可能性を提起したことにある．十分量の SODとCatalaseがこれを阻止できないことから細胞死のメカニズムに$O_2^-$や・OHの関与は少ないと考えられる．今回実験に用いた神経細胞はドパミン作動性でなく，レボドパやドパミンは外因性に加えたものであり，鉄は培養系に微量に混在するものを利用している．黒質は主にドパミン作動性神経細胞からなる上に，鉄を豊富に含むことから，今回の検討結果と同様の細胞障害が生じる可能性は高い．しかし生体内ではこれらの物質の毒性発現を抑える機構が存在するはずであり，一体何が反応の引金となるかを明らかにする必要があろう．

図1．神経細胞数とニューロフィラメント含量(O.D.)の相関

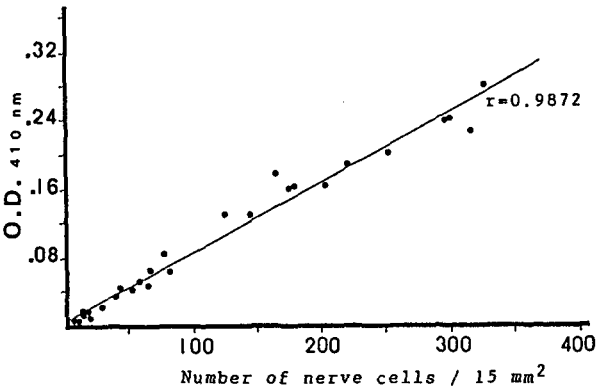



図2．レボドパ(Dopa)の鉄依存性細胞毒性

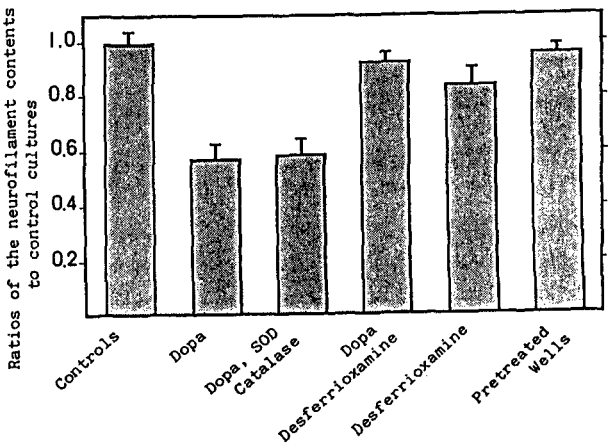
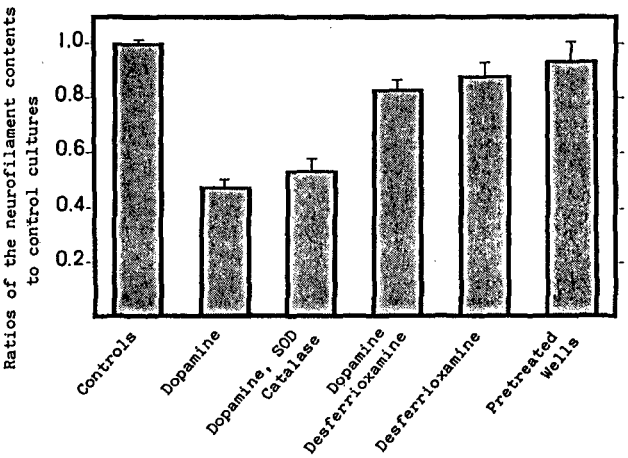



図3．ドパミンの鉄依存性細胞毒性




＜文献＞

(1)Barbeau, A. (1984) Can. J. Neurol. Sci. 11,24-28, (2) Dexter, D.T. et al.(1989) J. Neurochem. 52, 381-389, (3)Riederer, P. et al. (1989) J. Neurochem. 52, 515-520, (4)田中　真ら(1989) 日老医誌　印刷中

# 165 老齢及び若年ラットの脳内コリン作動性神経伝達機構マーカーに対する脳機能改善薬塩酸Bifemelaneの影響

江頭 亨、 油布 文枝、 金馬 義平 （大分医科大学、 薬理学教室）

〔要約〕老齢ラット（24ヶ月齢）及び若年ラット（24ヶ月齢）に塩酸Bifemelane(BF)を長期投与し、脳内コリン作動性神経系マーカーであるムスカリン受容体，choline acetyltransferase(CAT) 及びacetylcholinesterase(AChE) 活性に対する影響を比較検討した。老齢ラット脳のムスカリン受容体のBmax 値、CAT 及び AChE 活性は、若年ラット脳に比べて、有意に低下していた。 BF 投与若年ラットでは、ムスカリン受容体において Kd 及び Bmax 値の減少が認められたが、AChE 及び CAT 活性には何等変化は認められなかった。一方、BF 投与老齢ラットでは、ムスカリン受容体の Bmax 値には変化はなかったが、[$^3$H] -QNB に対する Kd 値は有意に減少した。また、CAT 活性は対照老齢ラットに比較して、有意に増加した。以上より、BF は、老齢ラット脳において低下した CAT 活性を増加させ、ムスカリン受容体の親和性を増加させてコリン作動性神経系を賦活させるものと思われる。

【目 的】

脳虚血やアノキシア後に持続する機能障害や記憶障害の原因として中枢の伝達機構の障害が考えられるが、塩酸 Bifemelane(BF) は、これら障害における norepinephrine の含量の低下や(2)、ACh 合成障害を有意に改善することが報告され(12)、BF のこれら病態の改善効果にあたり、BF が中枢のアドレナリン及びコリン作動性神経伝達機構をなんらかの形で単独か相互に賦活させているものと思われている(13)。しかし、動物実験における脳機能改善薬の評価は、予防実験や障害の急性期に対する効果によってなされる場合が多い。 今回、Bifemelane を老齢及び若年ラットに長期投与し、脳内コリン作動性神経への効果を、この神経系に関連する酵素活性及び受容体への影響から検討した。

【実験方法】

実験動物として、若年（2ヶ月齢）及び老齢（24ヶ月齢）のラット（Wistar，雄）を一群 5 匹とし、塩酸Bifemelane(BF) 10 mg/kg を経口的に一ヶ月間投与した。対照として生理的食塩水を同様に投与した。動物は外界からのストレスを避ける目的で、12 時間の明暗サイクル、恒温・恒湿の条件下で飼育した。最終投与から24 時間後にラットを断頭屠殺した。 小脳を除き、脳を Cortical Regions(CR) とSubcortical Structures(SS) の二部位に分けた。ムスカリン受容体結合の測定は、リガンドとして [$^3$H] -QNB(quinuclidinyl benzilate)，非特異的結合には、1 $\mu$M atropine を用い、Yamamura 等(14) の方法に準じて行った。 結合実験の試料として、脳 $P_2$ 分画を使用した。Choline acetyltransferase(CAT)活性、acetylcholinesterase(AChE)活性測定及び酵素試料の調製は、それぞれ、 Fonnum(5)及びEllman(3) の方法に準じた。

Table 1. Binding of $^3$H-QNB to muscarinic ACh receptors in the brain of control, BF-treated young and aged rats

| | | control | | BF-treated | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Kd | Bmax | Kd | Bmax |
| Young | CR | 0.123±0.081 | 1.82±0.07 | 0.058±0.006* | 0.559±0.025* |
| | SS | 0.116±0.026 | 0.96±0.17 | 0.094±0.025 | 0.561±0.058 |
| Aged | CR | 0.112±0.009 | 1.40±0.08 | 0.076±0.003# | 1.23±0.06 |
| | SS | 0.072±0.006 | 0.56±0.03 | 0.074±0.003 | 0.73±0.04 |

* $p<0.05$ vs young control, # $p<0.05$ vs aged control
Kd : nM, Bmax : pmol/mg protein

【結果・考察】

一般的に生理的老化に伴い、コリン作動性神経系の機能が低下する事が知られている。表 1,2 で見られる様に、若年ラットに比較して老齢ラットでは、ムス

カリン受容体の Bmax 値、CAT 及び AChE 活性は著明に低下していた。この傾向は CR 及び SS 両部位でも同様であった。若年及び老齢ラットに BF 10 mg/kgを一ヶ月間、経口的に投与したところ、若年ラットの場合、ムスカリン受容体においてBmax値及び [$^3$H] -QNB に対する Kd 値の減少が認められた。この事は、BFがコリン作動性神経を賦活した行動を示し、atropine の作用に拮抗する事等から(13)、BFはムスカリン受容体に対して部分的にアゴニスト作用を有するのかもしれない。そこで、この受容体の down regulationが起こったものと思われるが、BF投与により神経系が賦活するとの報告 (4,13)が多い事から、BF がムスカリン受容体に直接か又、シナプス膜への直接作用により Bmax の減少が起こったものとおもわれる。一方、老齢ラットに BF 10 mg/kg を一ヶ月間投与した場合、ムスカリン受容体の Bmax 値にはほとんど影響は見られなかったが、QNB 結合に対する親和性が CR の部位で有意に増加した。また、 BF の長期投与によって、若年ラット脳の CAT 及び AChE 活性には、ほとんど変化は認められなかったが、老齢ラット脳では SS の部位で著明な CAT 活性の増加が認められた(表 1)。さらに、BF はin vitro において 若年及び老齢ラット脳の CAT 及び AChE 活性にはほとんど影響を与えなかった。また、図 1 で見られる様に、BF 老齢ラット脳の CR 部位のムスカリン受容体に対する [$^3$H] -QNB の結合をかなり強く阻害し、その置換曲線より求めた BF の $IC_{50}$値はおよそ 5 μMであった。この $IC_{50}$ 値は、CR 及び SS 部位でも同様で、かつ老齢及び若年ラットを用いてもほとんど相違はなかった。この様に BF は若年ラット脳と老齢ラット脳では相違した作用を示し、特に、老齢ラット脳のムスカリン受容体および CAT に対して独特の作用を起こすものと思われる。 最近、老人性痴呆症において神経伝達物質の変化や、その合成・分解酵素及び受容体が変化するとの報告が多く (1,6,10,11)、これらに対応すべく種々の脳機能改善薬が開発されている(7-9)。 今回用いた BF の場合も、CR の部位でムスカリン受容体の親和性を増加させ、SS の部位で CAT 活性を増加させた事は、BF もまたアルツハイマー型痴呆や血管性痴呆を含む老人性痴呆の治療薬としての可能性を持つものと思われる。

Table 2. Effects of repeated administration of BF on CAT and AChE activity

| | | CAT activity | | AChE activity | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | control | BF-treated | control | BF-treated |
| Young | CR | 1.24±0.06 | 1.11±0.05 | 140.8±9.2 | 171.6±18.6 |
| | SS | 1.41±0.09 | 1.43±0.04 | 185.9±7.2 | 188.8±8.3 |
| Aged | CR | 1.09±0.09 | 1.41±0.1 | 92.2±1.8 | 86.2±6.6 |
| | SS | 0.92±0.09 | 2.32±0.3* | 122.5±5.3 | 134.9±7.7 |

* $p<0.05$ vs aged control, activity : nmol/min/mg protein

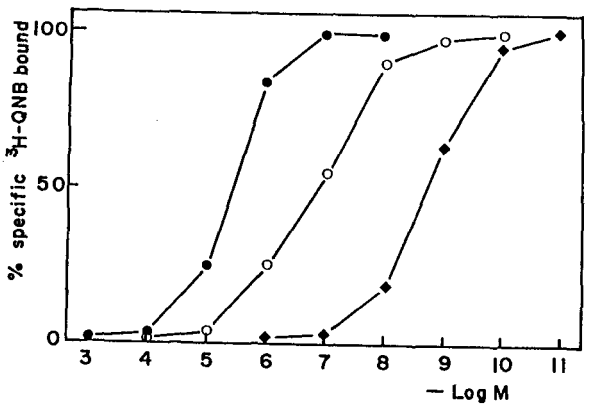



Fig. 1. Inhibition of specific $^3$H-QNB binding by BF, pirenzepine and atropine

Membrane preparations of CR of aged rats were incubated with 0.04 nM $^3$H-QNB and various concentration of BF (●——●), pirenzepine(○——○) and atropine(◆——◆) in 50 mM Tris-[illegible] buffer.

【参考文献】

(1) Araujo, D.M.(1988) J. Neurochem. 50, 1914-1923. (2) Egawa, M. et al.(1984) Japan. J. Pharmacol. 34, 363-365. (3) Ellman, G.L.(1961) Biochem. Pharmacol. 7, 88-95. (4) エーザイ (株) , 三菱化成工業 (株) 編 , (1982) E-0687 概説 (5) Fonnum, F.(1975) J. Neurochem. 24, 407-409. (6) Heake, H. and Lang, W.(1983) Brain Res. 267, 281-291. (7) Nakahiro, M. et al.(1989) Japan. J. Pharmacol. 49, 407-411. (8) Ogawa, N. et al.(1985) Japan. J. Pharmacol. 37, 45-50. (9) Ogawa, N. et al.(1987) Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 57, 149-160. (10) Perry, E.K. et al.(1977) J. Neurol. 34, 247-265. (11) Reisine, T.D. et al.(1978) Brain Res. 159, 477-481. (12) 島田真久 他(1985)脳神経 37, 1189-1194. (13) 戸部昭広 他(1985)日薬理誌 86, 51-60. (14) Yamamura, H.I. and Snyder, S.H.(1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1725-1729.

166 Endothelin/hypoglycemia 誘発性脳障害

－ 線条体切片からの dopamine 遊離の real-time monitoring 法を用いて －

片岡泰文、小泉修一*、熊倉鴻之助**、栗原正紀***、丹羽正美、植木昭和*

（長崎大・医・薬理２・脳外科***、上智大・生命研**、九州大・薬・薬理*）

〔要約〕

血管性脳障害発現における endothelin の役割を明らかにする目的で、線条体切片から遊離される dopamine を直接 monitoring する実験系を用いて実験を行った。d-glucose を除去した Ringer 溶液にて、20 分間灌流（hypoglycemia）しても、その後、通常の Ringer 溶液にて灌流すれば、切片の high $K^+$ 刺激応答に変化は認められなかった。この hypoglycemia 期間中に 5 分間隔で 2 回 endothelin $10^{-5}$ M （約 2.5 分間）で刺激すると、その後、通常の Ringer 溶液にて灌流しても high $K^+$ 刺激応答は著明に障害され、3 時間後でも回復は全く認められなかった。この endothelin/hypoglycemia 誘発性脳障害は、外液 $Ca^{2+}$ 除去、あるいは nifedipine $10^{-6}$M 存在下では発現しなかった。従って、endothelin はその特異的結合部位を介して、dihydropyridine 感受性の L 型電位依存性 $Ca^{2+}$ channel を賦活化し、細胞外 $Ca^{2+}$ の流入を促進することにより、hypoglycemic 脳障害を誘引するものと推測される。

Endothelin は、血管内皮細胞由来の強力な血管収縮物質であり、高血圧発症機序とも関連して注目を集めている(1)。Endothelin による血管収縮作用機序の 1 つとして、その特異的結合部位を介した voltage-sensitive $Ca^{2+}$ channel（VSCC）の活性化による細胞外 $Ca^{2+}$ の流入が指摘されている(2)。この VSCC は虚血性脳障害等を惹起する細胞内への多量の $Ca^{2+}$ 流入経路の 1 つでもある。実際、endothelin 結合部位は、虚血性脳障害の易損傷部位である海馬や線条体に比較的高濃度に分布している(3)。そこで、虚血性脳障害における endothelin の役割を明らかにする目的で、in vitro model 系(4)を用いて実験を行った。脳機能障害過程は、脳線条体切片からの dopamine 遊離を real-time monitoring することにより測定した。

〔実験方法〕

**Monitoring system：** 断頭後、ラット脳を摘出し、線条体を分画した後、厚さ 400$\mu$m の薄切片を作製した。これを 2 枚の filter 間に封入し、内容積 250$\mu$l の chamber にて保存し、Krebs Ringer 溶液（pH7.4; normal Ringer）で灌流した。灌流液は 37℃に維持し、95% $O_2$/5% $CO_2$ 混合ガスで bubbling し、流速は 1 ml/min とした。刺激は 500$\mu$l の loop injector を用いて、灌流液中へパルス的に注入した。このシステムを直接、電気化学検出器に連結した。電極に+450 mV の固定電位を印加し、脳切片から遊離される oxidizable substrate の電解電流を測定することにより、遊離動態を電流－時間曲線として記録した。

**Endothelin/hypoglycemia 誘発性脳障害：** 線条体切片を 60 分間灌流した後、50 mM KCl 溶液（high $K^+$）の 500$\mu$l 注入による刺激を 20 分毎に行った。3 回目の刺激直後から d-glucose を除去した Krebs Ringer 溶液（d-G free Ringer）で 20 分間灌流した。この hypoglycemia 期間中のみ流速は 100$\mu$l/min とし、5 分間隔で、2 回、500$\mu$l の endothelin を負荷した。その後、normal Ringer にて灌流し、線条体切片の high $K^+$ 刺激応答を 20 分毎に観察した。

〔実験結果および考察〕

線条体切片は、20 - 60 分間 d-G free Ringer で灌流しても、その後 normal Ringer に切り換えれば、その刺激応答には、hypoglycemia の影響はほとんど認められなかった（Fig.1)。20 分間の hypoglycemia 期間中、1 回だけ 500$\mu$l の endothelin $10^{-6}$ M あるいは $10^{-5}$ M で刺激しても、その後の high $K^+$ 刺激応答に変化はなかった。しかし、d-G free Ringer 灌流下（20 分間）にて、endothelin $10^{-5}$ M で 2 回刺激すると、その後 normal Ringer にて灌流しても、high $K^+$ 刺激応答は著明に減弱した（Fig.1,2)。この応答障害は 3 時間後でもなお回復することはなかった。Endothelin $10^{-6}$ M の 2 回刺激でも 40 分間の hypoglycemia 負荷であれば、上述と同様の応答障害が認められた。Normal Ringer 灌流中にて endothelin 刺激を施行しても、そ

の後の high $K^+$ 刺激応答に変化はなかった。従って、endothelin は hypoglycemic 脳障害を trigger するものと考えられる。d-G free Ringer より $Ca^{2+}$ を除去すると endothelin/hypoglycemia 誘発性脳障害は、認められなかった (Fig.1, 33.0±13.0 VS 100.1±10.2% of control, $p<0.01$)。この結果は、endothelin/hypoglycemia 誘発性脳障害は、endothelin 刺激による細胞外 $Ca^{2+}$ の流入により惹起されることを示唆するものである。ところで、endothelin の血管収縮作用には dihydropyridines (DHP) 感受性の L 型 VSCCが関与することが知られている (2)。Endothelin/hypoglycemia 誘発性脳障害も nifedipine $10^{-6}$ M 存在下では発現しなかった (Fig.2) が、verapamil や diltiazem では $10^{-5}$ M でもその障害を改善することはなかった。この結果より、脳障害の誘因となる endothelin により賦活化される VSCC は DHP 感受性 L 型 channel であることが推測される。以上、本実験結果は、endothelin が虚血性脳障害発現の一要因である可能性を提起するものとして興味深い。

〔文献〕


1. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. (1988) Nature 332, 411-415.
2. Hirata, Y., Yoshimi, H., Takata, S., Watanabe, T.X., Kumagai, S., Nakajima, K. and Sakakibara, S. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 154, 868-875.
3. Kumakura, K., Ohara, M. and Sato, G.P. (1986) J. Neurochem. 50, 1765-1768.
4. Koseki, C., Imai, M., Hirata, Y., Yanagisawa, M. and Masaki, T. (1989) Am. J. Physiol. 256, in press.

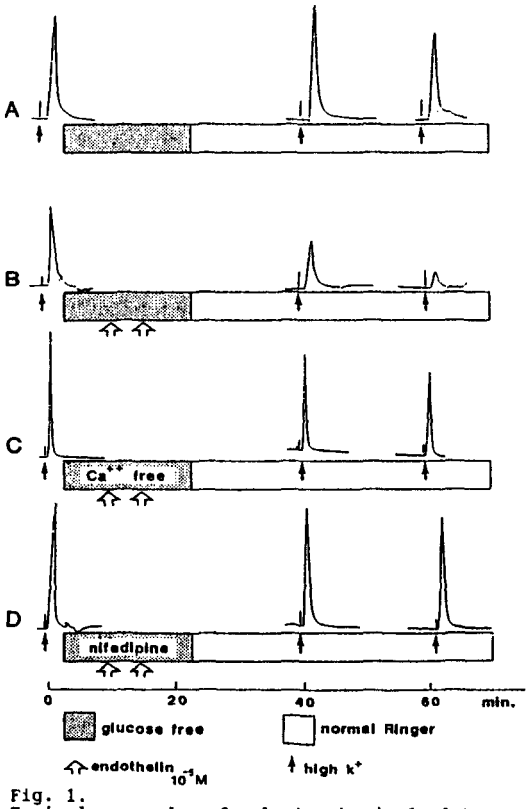




Fig. 1.
Typical records of electrochemical detector-monitored current-time curves illustrating endothelin-triggered hypoglycemic impairment of striatal responses to high $K^+$.

A: perfusion with d-G free Ringer for 20 min, B, C and D: stimulation with endothelin $10^{-5}$ M (2.5 min) twice at 5 min intervals during perfusion for 20 min with d-G free Ringer (B), d-G free/$Ca^{2+}$ free Ringer (C) and d-G free Ringer containing nifedipine $10^{-6}$ M (D).

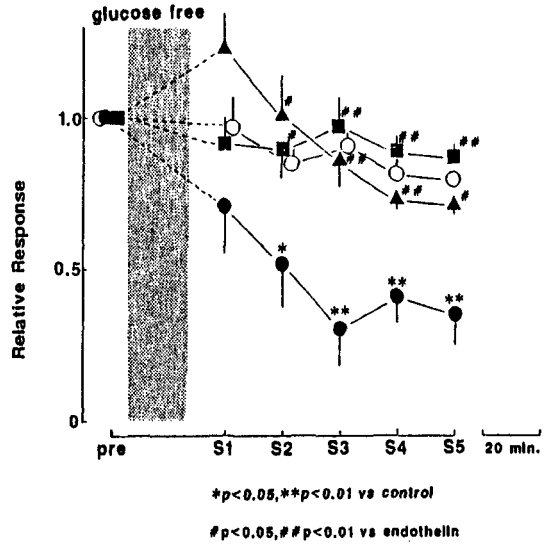



Fig. 2.
Time course of the impairment of striatal evoked response following stimulation with endothelin $10^{-5}$ M (2.5 min) twice under 20 min of hypoglycemia ( ● ) and effects of nifedipine $10^{-6}$ M ( ▲ ) and $10^{-5}$ M ( ■ ).

Tissues were perfused with d-G free Ringer for 20 min without endothelin stimulation in the control experiment ( ○ ). Nifedipine was given only during 20 min of hypoglycemia (glucose free). The relative response was expressed as a ratio of the peak current in the test stimulation-evoked response to that in the 3rd prestimulation-evoked response. Values represent the means ± S.E. of 4 - 12 experiments.

# 167 MPTP投与に伴うマウス線条体内コリン作働性及び線条体－黒質系GABA作働性神経の機能的変化について

田口淳一，栗山卓弥，栗山欣弥
京都府立医大・薬理

〔要約〕
1-メチル- 4-フェニル-1,2,3,6- テトラヒドロピリジン(MPTP)の腹腔内投与に伴うマウス線条体内コリン作働性及び中脳内γ－アミノ酪酸(GABA)作働性神経系の機能的変化について検討した。MPTP投与により，線条体においてドパミン(DA)含量の減少と $DA_2$受容体への［$^3$H］スピペロン（［$^3$H］SPI)結合の増加が観察された。一方，線条体内のコリン及びアセチルコリン(ACh) 含量並びにコリンアセチルトランスフェラーゼ(CAT) やACh エステラーゼ(ACh-E) 活性は変化を示さなかったが，ムスカリニック(mACh)受容体への［$^3$H］キヌクリジニルベンジレート（［$^3$H］QNB)結合の減少が観察された。また，中脳において，L-グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD) 及びGABAトランスアミナーゼ(GABA-T)活性は変化を示さなかったが，GABA含量の減少が観察されると共に，$GABA_A$ 受容体への［$^3$H］ムシモール（［$^3$H］MUS)結合の増加傾向及び$Cl^-$ チャンネルへの［$^3$H］t-ブチルビシクロオルトベンゾエート（［$^3$H］TBOB) 結合の増加が観察された。更に，GABA抗体及び$GABA_A$ 受容体複合体抗体を用いた免疫組織化学的検索を行うと，GABAの減少及び $GABA_A$受容体の増加が黒質で観察された。

【目的】MPTPは黒質－線条体系DA作働性神経の変性を招来することにより，ヒト及び動物でパーキンソン病様症状を誘発することが知られている(1,3,6) 。その作用機序としては，脳内においてモノアミンオキシダーゼB 型によりMPTPから生成されるMPP$^+$が，DA作働性神経終末や細胞体に取り込まれ，DA含量の低下をもたらすことが報告されている(2,4, 5,6)。一方，黒質－線条体系DA作働性神経は，線条体－黒質系GABA作働性神経による抑制性調節を受けると共に，線条体においてはコリン作働性神経に対して抑制性調節をもたらすことが知られている(7)。 従って本研究においては，MPTP投与によって誘発されるDA作働性神経の変性に伴う大脳基底核内コリン作働性神経及びGABA作働性神経の機能的変化について検討した。

【方法】実験動物及び薬物投与：dd系雄性マウス(20-30g)にMPTP(20-60mg/kg)を 5日間(1回/1日) 腹腔内投与後， 3日間休薬して実験に用いた。各種含量の測定：各種モノアミン，アミノ酸，及び AChの含量は，それぞれ電気化学的検出器，蛍光光度計及び酵素カラムー電気化学的検出器を装着したHPLCにより測定した。各種酵素活性の測定: GAD,GABA-T,CAT及びACh-E の各活性測定は，それぞれ［$^{14}$C ］L-グルタミン酸を用いた生成 $CO_2$のトラッピング法，生成されたNADHの蛍光測定法，［$^{14}$C］アセチルCoA を用いた放射性酵素活性測定法，DTNBを用いた吸光測定法により行った。膜分画の調製と受容体結合実験: 各分画脳を50mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.4) 中でポリトロンを用いてホモジナイズし，48,000xgで20分間遠心分離して得られた沈渣について同様の操作を繰り返し，以下の結合実験に用いた。受容体結合能の測定は，膜標品を［$^3$H］MUS(5nM)，［$^3$H］フルニトラゼパム(0,5nM)，［$^3$H］TBOB(2nM)，［$^3$H］SPI(0,5 nM) 及び［$^3$H］QNB(0,2nM)とインキュベートしたのち，GF/Bグラスフィルターを用いた吸引濾過法により行った。各種抗体を用いた免疫組織化学：GABA抗体及び$GABA_A$ 受容体複合体抗体を用いた免疫組織化学的検索は，パラホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド灌流固定脳の前額断切片( 厚さ20μm) を用いて，それぞれTakasuらの方法(9) 及びTaguchi らの方法(8) により行い，DAB反応部位を光学顕微鏡下で検索した。

【結果】DA作働性神経： MPTP(20～30mg/kg)投与により，線条体DA含量の有意な減少が認められると共に(Fig.1)，$DA_2$受容体への[$^3$H]SPI 結合の有意な増加が観察された(Table 1) 。コリン作働性神経：線条体におけるコリン及びACh 含量並びにCAT 及びACh-E 活性は，MPTP(50mg/kg) を投与しても有意な変化を来さなかったが，mAChr受容体への[$^3$H]QNB 結合は，30 mg/kg のMPTP投与により有意な減少を示した(Table 1)。 GABA作働性神経：MPTP(50mg/kg) 投与により，中脳内GABA含量には有意な減少が認められたが(Fig.1),線条体では有意な変化を認めなかった。GABA抗体を用いて免疫組織化学的検索を行ったところ，免疫陽性反応の減少が特に黒質で明らかであり(Fig.2),黒質内GABA含量も有意な減少を示した。また,GAD及びGABA-T活性について検討したところ，MPTP50mg/kg の投与を行っても線条体及び中脳で有意な変化を示さなかった。一方，

MPTPを 30mg/kg投与した場合，$GABA_A$ 受容体への[$^3$H]MUS 結合の増加傾向及び $Cl^-$チャンネルへの[$^3$H]TBOB結合の有意な増加が中脳で認められたが(Fig.1)， 線条体においてはこれらの変化が認められなかった。また，精製 $GABA_A$受容体複合体に対する抗体を用いて免疫組織化学的検索を行ったところ，免疫陽性反応の増加が黒質で観察された。

【考察】MPTP投与により，マウスは振戦などの異常行動を示すと共に，線条体内DA含量に有意な減少が認められたことから，本実験に用いたマウスにおいてもパーキンソン病様症状が誘発されていることが確認された。また，このDA含量の低下と共に，コリン作働性神経に存在する $DA_2$受容体に結合能の増加が観察されたことから，黒質－線条体系DA作働性神経の変性にともない$DA_2$ 受容体に過感作状態が招来されていることが示唆される。またMPTP投与マウスの線条体においては，コリン及び ACh含量のみならずCAT 及びACh-E 活性にも有意な変化が認められなかったが，GABA作働性ニューロン上に存在するmACh受容体の結合能が有意な減少を示した。これらの事実は，コリン作働性神経に何らかの機能亢進が生じ，mACh受容体に脱感作状態が招来されていることを示唆する。更にGABA作働性神経においては，MPTP投与により GAD及びGABA-T 活性に有意な変化は認められなかったものの，黒質においてGABA含量の有意な低下とDA作働性神経上に存在する$GABA_A$ 受容体／ベンゾジアゼピン受容体／$Cl^-$ チャンネル複合体機能の上昇が観察されたことから，線条体－黒質系GABA作働性神経の機能低下にともない$GABA_A$ 受容体複合体に過感作状態が誘発されているものと思われる。以上のことより，MPTP投与によって黒質－線条体系DA作働性神経の変性を招来した場合，線条体－黒質系GABA作働性神経にも機能的変化が誘発されるが，この変化には線条体内コリン作働性神経の何らかの機能変化が関与していることが示唆される。

【文献】1) Burns, R.S., Chiueh,C. C., Markey,S., Ebert, M. H.,Jacobowitz, D. and Kopin, I.J. (1983) Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A. 80, 4546-4550. 2) D'Amato, R.J., Lipman, Z. P. and Snyder,S.H. (1986) Science 231,987-989. 3)Heikkila,R. E., Hess,A. and Duvoisin, R.C. (1984) Science 224, 1451. 4) Heikkila, R.E.,Manzino,L.,Cabbat,F.S. and Duvoisin,R.C. (1984) Nature 311, 467-469. 5) Hirata, Y. and Nagatsu,T. (1985) Brain Res. 337, 193-196. 6) Langston,J.W., Ballard, P.,Tetrud,J.W. and Irwin,I. (1983) Science 219, 979-980. 7) McGeer, P. L. and McGeer, E.G. (1976) GABA in Nervous System Function ( ed. by Roberts,E., Chase,T.N. and Tower, D.B.) 487-495. 8) Taguchi,J., Kuriyama, T., Ohmori,Y. and Kuriyama, K.(1989) Brain Res. 483, 395-401 . 9) Takasu, N., Nakatani, T., Arikuni, T. and Kimura, H. (1987) J. Comp. Neurol. 263,42-53.

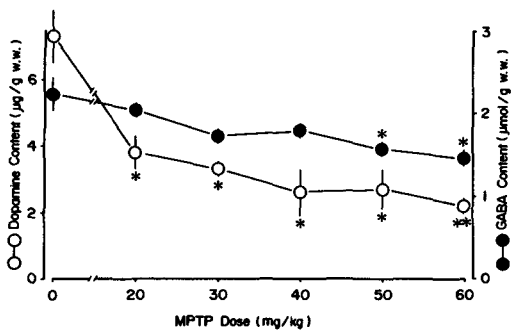



Fig. 1 Effect of MPTP administration on dopamine content in striatum and GABA content in midbrain of mouse. *P<0.05, **P<0.01 ; Significantly different from each control.

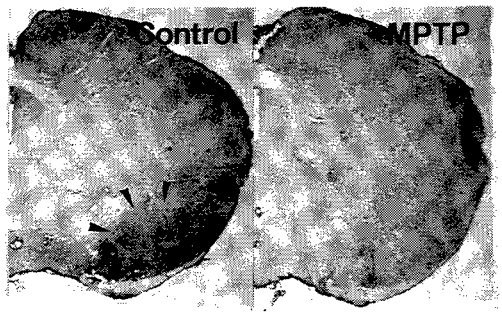



Fig. 2 Effect of MPTP administration on immunohistochemical staining using specific antibody against GABA.

Table 1 Effect of MPTP administration on bindings of various [$^3$H]ligands to particulate fraction of mouse brain

| | Striatum | | Midbrain | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | [$^3$H]Spiperone# ( 0.5nM ) | [$^3$H]QNB# ( 0.2nM ) | [$^3$H]Muscimol# ( 5.0nM ) | [$^3$H]Flunitrazepam# ( 0.5nM ) | [$^3$H]TBOB# ( 2.0nM ) |
| Control | 5.4 ± 0.44 | 98.6 ± 2.16 | 510 ± 24.6 | 118 ± 18.4 | 6.3 ± 3.60 |
| MPTP ( 30mg/kg ) | 8.5 ± 0.55* | 59.2 ± 10.18* | 549 ± 28.9 | 105 ± 17.2 | 24.8 ± 3.98* |

# ; fmol/mg protein
*P< 0.05 ; Significantly different from each control.

# 168　3価鉄－ドーパ複合体による生体膜リン脂質過酸価反応

外松明美*，田中　真*，平井俊策*，中野　稔**
（群馬大学医学部神経内科*，医療技術短期大学部**）

〔要約〕

Parkinson病の剖検脳において，Dexterらは，黒質にmalondialdehyde (MDA)の増加，および不飽和脂肪酸の減少が見られることを報告しており，またRiedererらは，同部位に，3価鉄が増加しており，これが lipid peroxidationに関与しているのではないかとのべている(1)(2)．われわれは3価鉄あるいは2価銅が L-3,5-dihydroxyphenyl alanine (l-dopa)と複合体をなし，これがラット肝ミクロゾームより抽出したリン脂質の脂質過酸化反応を惹起することを見いだした．この反応において，3価鉄濃度に比しl-dopa 濃度を増させると MDA成生量は減少し，l-dopaにはアスコルビン酸様の作用があるものと考えられた．MDA 生成量測定と同時にガスクロマトグラフによる脂肪酸分析を行い不飽和脂肪酸の減少を確認した．これらの反応を抑制し得たのは，検索した範囲では鉄の強力なキレート剤である desferrioxamine methansulfate とα-tocopherol のみであり，各種ラジカルスカベンジャーは無効であった．さらにl-dopa－金属複合体の吸収波長を観察し，上記過酸化反応の機序を考察した．

Parkinson病 (PD)原因としては，近年，外因性物質(MPTP等)の関与，遺伝子の異常等が論議されている．また，一方では，PD剖検脳で黒質のMDA増加や3価鉄増加がみられることから，黒質細胞脱落の原因としてフリーラジカルによる脂質過酸化反応の関与を推測するものもある(1)(2)．我々は，L-3,5-dihydroxyphenyl alanine (l-dopa)と3価鉄複合体が生体膜脂質の脂質過酸化反応を惹起することを見いだし，その反応機序を解明するため以下の検討を行った．

［方法］

生体膜モデルとして，Wistar 系雄ラット肝ミクロゾームより抽出したリン脂質を用いた(3)．脂質過酸化反応は，MDA測定法にてモニターし，脂肪酸分析にはガスクロマトグラフ (GC-4CM 島津)にSilar-9CPカラムを，吸光度測定には日立200-10 spectrometerを用いた．

反応系 A;リン脂質 (0.85μmole of lipid phosphorus/ml)，50 μM l-dopa，50 μM $Fe^{3+}$-835μM ADPおよび0.1M Tris-HCl buffer pH 7.4を用い，37 ℃にて，① MDA生成量の経時変化，② 反応時間30分間における MDA生成量に対する，l-dopaあるいは3価鉄濃度の影響，③ 反応時間30分間における MDA生成量，および脂肪酸組成の変化に対する下記の物質の影響，0.5 μM SOD; 40μM of catalase /ml;1.5mM desferroamine methansufate; 10 μM d-α-tocopherol; 0.5mM sodium azide; 20 mM sodium benzoade. ④ l-dopaを他のカテコールに置き換える，⑤ 3価鉄を他の金属に置き換える，（④，⑤は反応時間を30分間とする．）以上の検討を行った．次に上記緩衝液中にて0.1mM l-dopaおよび0.1mM $Fe^{3+}$-1.67 mM ADPによる複合体の吸収スペクトルを脱気下にて測定した．反応系は，総量3.0 mlとし室温において金属との差スペクトルを記録した．この反応系に1mM アスコルビン酸を添加し鉄を還元した時の複合体の吸収波長(625 nm)の変化を観察した．さらに37 ℃にてアラキドン酸ナトリウム塩(1.7μmol/ml)添加時の複合体の吸収波長の変化を観察した．

［結果および考察］

反応系Aにおける MDA生成量は，37℃，30分までは直線的に増加する．この時，3価鉄濃度を変化させると，3価鉄が

l-dopa (50μM)とほぼ同濃度に達するまではMDAは鉄濃度依存性に増加し，その後は一定となる．一方，3価鉄濃度を一定(50 μM)にした場合，l-dopa濃度が鉄濃度を越えるとMDA生成は抑制され，l-dopaにアスコルビン酸様作用があるのではないかと思われた．反応系 Aの30分間における脂肪酸組成の変化は，ガスクロマトグラフにより，不飽和脂肪酸の減少であることが確認された．この脂肪酸組成の変化を抑制し得たものは，d-α-tocopherolおよび desferrioxamineのみであり，SOD, catalase, sodium azideあるいはsodium benzoateは無効であった．同時に測定した MDA生成の抑制についても，同様の結果であった．このことからl-dopa−3価鉄による脂質過酸化反応には，$O_2^-$，$H_2O_2$，一重項酸素あるいは ·OHの関与はないものと考えられた．l-dopaを同濃度の他のカテコールに置き換えた場合，MDA 生成量はl-dopaに比し dopamineで35%, epinephrineで16%, norepinephrineで17%であった．また鉄を他の金属($Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$,$Al^{3+}$,$Mg^{2+}$,$Ca^{2+}$)に置き換えた場合，2価銅によってのみ有意なMDA生成がみられた．（3価鉄に比し約65%．）

このように生体膜リン脂質の脂質過酸化反応を惹起する，l-dopaおよび3価鉄は波長625nmに吸収を持つ複合体対であり，この625nmの吸収は，37℃ 下でアラキドン酸を添加し脂質過酸化反応を起こさせるか，あるいはアスコルビン酸にて鉄を還元すると減衰する．（図 l-A;l-dopa,$Fe^{3+}$-ADP,B;A + aracidonic acid,C;A + ascorbate ）

以上のことから，3価鉄（または2価銅）−dopa semiquinone radical 複合体(4)が生体膜の脂質過酸化反応を惹起していることは明かであり，生体内においてもl-dopaにとむ組織にて，この反応により細胞死が起こりうるものと考えられた．ただし，この反応には l-dopaと3価鉄の濃度比が重要であり，また，生体内にはラジカル捕捉剤としてのα-tocopherolや鉄イオンの遊離を抑制する機構もあり，今後はこれらをふまえたin vivoでの検討が必要と思われた．

[文献]

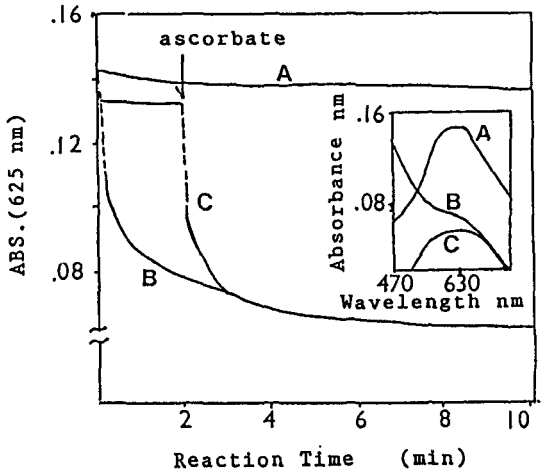
(1) Dexter, T.D., Carter, C.J.,Rausch,W.,Schmidt,B., and Reynolds, G.P. (1989) J.Neurochem. 52, 381-389

(2) Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W., Schmidt,B., and Reynolds, G.P. (1989) J.Neurochem. 52, 515-520

(3) Sugioka, K. and Nakano, M. (1982) Biochem. Biophys. Acta 713, 333-343

(4) Sealy, R.C., Flix, C.C. Hyde, J.S. and Swartz, H.M.(1980) in Free Radicals in Biology (Pryor, W.A., ed) Vol.IV, pp.227-234, Academic Press, New York

Fig.1



# 169　Alzheimer 病脳における $^{3}$H－TCP 結合能の変化

下浜　俊，二宮治明，亀山正邦*
（京大医・神経内科，住友病院*）

〔要約〕

10例の対照群と8例の Alzheimer 病群の剖検脳前頭葉を用いて $^{3}$H－N(1－〔2－thienyl〕cyclohexyl) 3, 4－piperidine($^{3}$H－TCP) 結合実験を行った。内因性物質の影響を最小限にするために十分に洗浄した膜標品を用いた。対照群に比べ，Alzheimer 病群では $^{3}$H－TCP 結合の最大結合量が有意に減少していた。親和性には変化は認められなかった。Triton X－100 処理膜標品でも結合数の減少が認められ，$^{3}$H－TCP 結合部位数と N－methyl－D-aspartate(NMDA) 感受性 $^{3}$H－glutamate 結合部位数の間には正の相関が認められた。Alzheimer 病脳で残存している $^{3}$H－TCP 結合部位は，NMDA，L－glutamate や glycine への反応性に関して対照脳との間に差は認められなかった。これらの結果より，Alzheimer 病脳での NMDA 受容体－イオンチャンネル複合体の主要な変化は，その数の減少であり，残存している受容体－イオンチャンネル複合体の機能は保たれていることが示唆された。

目　的

神経伝達物質受容体は神経間の情報伝達に重要な働きをしており，その受容体の解析は原因不明で治療法のない Alzheimer 病の病態生理，今後の治療を考える上で重要な問題である。グルタミン酸は哺乳類の中枢神経系の興奮性伝達物質であり，その受容体は大別するとキスカル酸受容体，カイニン酸受容体，NMDA 受容体の3種類のサブタイプに区別できる。特に NMDA 受容体は最近学習・記憶の生理的な基礎となる機構として，また数々の病的状態下での神経細胞死との関係で注目を集めている。TCP は，麻酔剤 phencyclidine（PCP）の類縁体であり，少くとも TCP の認識部位の一部は，NMDA 受容体に共役したイオンチャンネル内に存在するものと考えられている。ラット脳膜標品を用いた系で，glutamate および NMDA はその認識部位への親和性を上昇させることにより，$^{3}$H－TCP 結合数を増加させることが明らかとなり，また glycine にも陽性調節作用のあることが示されている。

オートラジオグラフィーによる検討より，Alzheimer 病死後脳大脳皮質で，キスカル酸感受性 $^{3}$H－glutamate 結合数の減少や海馬での NMDA 感受性 $^{3}$H－glutamate 結合数の減少が報告されているが，結合能に影響を与える glutamate や glycine の様な内因性物質に対する考慮がなされていない。

今回私たちは，Alzheimer 病脳での $^{3}$H－TCP 結合の生化学的薬理学的性質を明らかにするとともに，十分に洗浄した膜標品を用いて，内因性物質の結合実験に与える影響を排除した。さらに $^{3}$H－TCP 結合への NMDA 受容体アゴニストの影響および $^{3}$H－TCP 結合部位と NMDA－感受性 $^{3}$H－glutamate 結合部位との相関についても検討した。

対　象

対照群は10例（年齢70～86歳，男6例，女4例）で，すべて脳に肉眼的異常所見は認められなかった。Alzheimer 病群は8例（年齢73～91歳，男2例，女6例）で，臨床症状ならびに神経病理学的所見より本病と診断されている。年齢，死後剖検までの時間について，対照群との間に有意差は認められなかった。検索部位は前頭葉とした。

方　法

1）膜標品調整

組織を10倍量の0.32M sucrose 液で homogenize した後，1,000×g で10分間遠沈し，その上清を20,000×g で20分間遠沈し，その沈査を5mM Tris－HCl（pH 7.7）で resuspend した後ポリトロンで homogenize した。懸濁液を再び8,000×g で20分間遠心し，その上清と軟層を48,000×g で20分間遠心し，その沈査を5mM Tris－HCl で resuspend して膜標品とし，－20℃の冷凍庫で18時間以上保存した。

2）受容体結合実験

凍結膜標品を融解させた後48,000×g で20分間遠心し，その沈査を5mM Tris－HCl で resuspend した後，37℃で30分間 incubation した。incubation 後再び48,000×g で20分間遠心し，その沈査を5回 Tris－HCl で洗い膜標品として実験に用いた。$^{3}$H－TCP 結合実験は，膜標品を $^{3}$H－TCP(比活性60Ci／mmol)と共に100μM PCP存在下または非存在下に5mM Tris－HCl中で25℃，60分間 incubate することにより行った。終了後，氷冷5mM Tris－HCl により反応を停止し，0.1％ polyethyleneimine処理

の Whatmann GF／C glass fiber filter を用いて吸引濾過し，シンチレーターを加え，その放射活性を測定した。$^3$H－Glutamate 結合実験は，Triton X－100処理の膜標品を用いた。融解した膜標品に0.08% Triton X－100 を加え，37°C で30分間 incubate した後，懸濁液を同様に洗い，50mM Tris－acetate buffer に resuspend して最終的膜標品とした。$^3$H－glutamate 結合実験は，膜標品を20nM の $^3$H－glutamate（69.7Ci／m mol）と共に，100μM の NMDA 存在下または非存在下に50mM Tris－acetate butter 中で，2 °C，10分間 incubate することにより行った。

## 結　果

1）対照脳における $^3$H－TCP 結合

$^3$H－TCP の特異的結合は反応液中の $^3$H－TCP 濃度増加にしたがって飽和性を示した。飽和曲線の Scatchard 解析は直線上に示され $^3$H－TCP の結合部位は単一であった。膜標品の洗浄により特異的 $^3$H－TCP 結合の最大結合量には変化はないが，親和性の有意な低下が認められた。洗浄膜標品を用いると，$^3$H－TCP の特異的結合に対して，glutamate および glycine は，最大結合量に変化をもたらさなかったが，親和性を増加させた（Table 1）。

2）Alzheimer 病脳における特異的 $^3$H－TCP 結合

Alzheimer 病脳における特異的 $^3$H－TCP の親和性には変化が認められなかったが，最大結合量の有意な減少が認められた（Table 2）。Triton X－100 処理膜標品を用いると，NMDA 感受性 $^3$H－glutamate 結合部位数と $^3$H－TCP 結合部位数の間には正の相関が認められた。Alzheimer 病脳において NMDA 感受性 $^3$H－glutamate の結合数は有意に減少していた（Table 3）。次に，対照脳および Alzheimer 病脳の膜標品を用いて，$^3$H－TCP の特異的結合に対する L－glutamate，NMDA および glycine の影響を調べてみると，両群間で有意な差は認められなかった。

Table 1. Effects of glutamate and glycine on $^3$H－TCP binding parameters

| | Kd (nM) | Bmax (f mol／mg protein) |
|---|---|---|
| 1. None | 52± 4 | 409±10 |
| 2. glutamate (50μM) | 28± 3 | 420±20 |
| 3. glycine (20μM) | 45± 5 | 380±35 |
| 4. 2 + 3 | 17± 2 | 415±11 |

n = 3

Table 2. Decreased $^3$H－TCP binding in AD frontal cartex

| | Kd (nM) | Bmax (f mol／mg protein) |
|---|---|---|
| Control（n =10） | 42± 3 | 441±26 |
| A D （n = 8） | 41± 2 | 237±15* |

*p ＜0.01

Table 3. Decreased NMDA-sensitive $^3$H－glutamate binding in AD frontal cortex

| | $^3$H－glutamate bound (fmol／mg protein) |
|---|---|
| Control（n =10） | 120±15 |
| A D （n = 8） | 64± 8* |

*p ＜0.01

## 考　察

Alzheimer 病脳前頭葉で $^3$H－TCP 結合部位の減少が認められ，親和性に変化はなく最大結合量が有意に減少していた。$^3$H－TCP 結合部位と NMDA 感受性 $^3$H－glutamate 結合部位の間に正の相関が認められたことにより，Alzheimer 病脳での NMDA 受容体－イオンチャンネル複合体の主変化は，その数の減少であることが示唆された。

私たちは，これまでに Alzheimer 病におけるニコチン性およびムスカリン性アセチルコリン受容体，αおよびβアドレナリン受容体およびベンゾジアゼピン受容体の変動について報告してきたが（1, 2, 3, 4），Alzheimer 病脳前頭葉ではベンゾジアゼピン受容体の最大結合量の減少を認めたのみであった。Greenamyre らも，ムスカリン性アセチルコリン受容体には変化を認めず，ベンゾジアゼンおよび NMDA 感受性 $^3$H－glutamate 結合数の減少をオートグラフィーにより示している（5, 6）。これらの結果は，Alzheimer 病脳における NMDA 受容体－イオンチャンネル複合体の変化の特異性を強く示唆し，Alzheimer 病の病態生理への興奮性アミノ酸受容体の関与を示唆する所見である。痴呆を呈する Huntington 病の前頭葉では $^3$H－glutamate 複合数に変化は認められていない。今後痴呆をきたす他疾患での変動を検索することにより，NMDA 受容体－イオンチャンネル複合体の Alzheimer 病における疾患特異性が明らかにされると期待される。対照脳と Alzheimer 病脳間で，$^3$H－TCP 結合の親和性に変化がなく，NMDA，glutamate および glycine への反応性に差が認められなかったことより，Alzheimer 病脳で残存している NMDA 受容体－イオンチャンネル複合体の機能は保たれていると推測される。

## 文　献


1. Shimohama S., Taniguchi T., Fujiwara M. and Kameyama M. (1986) J Neurochem **46**, 288－293.
2. Shimohama S., Taniguchi T., Fujiwara M. and Kameyama M. (1986) J Neurochem **47**, 1294－1301.
3. Shimohama S., Taniguchi T., Fujiwara M. and Kameyama M. (1987) J Neurochem **48**, 1215－1221.
4. Shimohama S., Taniguchi T., Fujiwara M. and Kameyama M. (1988) Ann Neurol **23**, 404－406.
5. Greenamyre JT., Penny JB. and Young AB (1985) Science **227**, 1496－1499.
6. Greenamyre JT., Penny JB., D'Amato CJ. and Young AB (1987) J Neurochem **48**, 543－551.

# 170 家族性アルツハイマー病患者皮膚からの培養線維芽細胞に見られる細胞骨格蛋白の異常について

武田雅俊　工藤喬　中村祐　田中雅子　多田國利　田辺敬貴　播口之朗　西村健
大阪大学精神医学教室

［要約］
家族性アルツハイマー病患者の生検皮膚組織から継代培養した線維芽細胞の分裂能・形態・基質への接着性・細胞骨格蛋白線維の細胞内配列・細胞骨格蛋白の変化について検討した。アルツハイマー病線維芽細胞は正常ヒトおよびウサギ新生児から継代培養した線維芽細胞と比較して、その増殖期においては増殖速度・形態・細胞骨格線維の配列に差異を示さなかったが、細胞が死滅する過程においては特徴的な細胞骨格からなる残骸を呈していた。細胞骨格関連蛋白抗体を用いた細胞染色法による検討ではアルツハイマー病線維芽細胞はマイクロチュブル系・マイクロフィラメント系は正常な配列が保たれているにもかかわらず、中間径フィラメント系のビメンチン線維については特徴的な配列の乱れが観察された。またウェスタンブロット法ではフォドリン蛋白の変化が示され中間径線維の配列の乱れとの関連が示唆された。

アルツハイマー病脳における神経細胞の変性脱落に細胞骨格蛋白の変化が重要な役割を果たしていることが推察される(4)。特に中間径細胞骨格蛋白については、アルツハイマー病脳では神経細胞中ニューロフィラメント蛋白が過度にリン酸化されていること(2)、アルツハイマー神経原線維変化とニューロフィラメント蛋白との抗原性が一致すること（1）、アルミニウム注入により実験的神経原線維変化を生じたウサギ脳内ではニューロフィラメント線維が過度に増生集積していること(5)などが知られており、またグリア細胞中のグリア線維酸性蛋白に関してもアルツハイマー病患者血清中ではその抗体価が上昇していることが報告されている(3)。さらに本研究進行中に他のグループによりアルツハイマー患者からの培養線維芽細胞では基質に対する付着性が変化しており分泌されるアミロイドβ蛋白の量が低下していることが報告された(6)。今回我々は家族性アルツハイマー病患者から得られた培養線維芽細胞について細胞骨格関連蛋白の変化を検索し、ビメンチン線維の細胞内配列に特徴的な乱れが生じていることを見いだしたので報告したい。

［材料および方法］

1．<u>アルツハイマー病患者線維芽細胞の培養</u>　家系内に３例以上の初老期発症の痴呆があり臨床的に家族性アルツハイマー病と診断された患者の生検皮膚組織から線維芽細胞を継代培養しその10-15代を用いた。対照としてほぼ同年齢の健常人から採取し継代数を一致させたヒト線維芽細胞およびウサギ新生児からの線維芽細胞とを用いた。培地は10%牛胎児血清を含むグルコース添加Dulbecco's Modified Essential Medium(DMEM)を用い、3-4日ごとに培地交換し、5%ＣＯ2下37℃で培養した。なおアルツハイマー患者からの皮膚生検にあたっては患者およびその家族に研究の内容を十分に説明し文書にてその同意を確認した。

2．<u>使用抗体</u>　ビメンチン抗体はAmersham社製、アクチン、チュブリン抗体はTransformation Research社製、フォドリン、カルデスモン、Ｐ３６蛋白抗体は日本新薬社製のモノクロナル抗体を用い、第２抗体としてのFITC標識抗マウスIgGおよびIgM抗体はTago社製、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGおよび抗ウサギIgG抗体はKPL社製のものを使用した。

3．<u>培養細胞の蛍光抗体法</u>　30mmディッシュ中ポリリジンでコートしたカバーガラス上に培養した線維芽細胞を生理食塩水で洗浄後4%パラホルムアルデヒドにて固定し、第一抗体と１時間さらにFITC標識第二抗体と反応させた後、ニコン落射型蛍光顕微鏡で観察した。

4．<u>ウェスタンブロッティング</u>　ハーベストした細胞から細胞骨格蛋白を粗分画し7.5%ゲルにてSDS電気泳動後ニトロセルロース膜に移した蛋白バンドを第一抗体、つづいてペルオキシダーゼ標識第二抗体と反応させて発色させた。

［結果および考察］

<u>アルツハイマー線維芽細胞の性質</u>　アルツハイマー病の線維芽細胞は、その増殖期においては、増殖曲線・ダブリングタイムは正常細胞とほぼ同じであり、位相差顕微鏡下での形態観察でも正常細胞と比較して差異を認めなかった。しかしながら牛胎児血清とグルコースを添加しない培地で１０日以上培養を続けると、培地の劣化に従い細胞は死滅脱落して行くが、正常細胞は突起を丸め基質からはずれて浮遊してくるのに対して、アルツハイマー細胞は特徴的な細胞の骨格からなる残骸を呈していた（図１）。

<u>細胞骨格の蛍光抗体による観察</u>　牛胎児血清を含まない培地で培養したアルツハイマー病線維芽細胞および健常ヒト線維芽細胞をチュブリン抗体・アクチン抗体・ビメンチン抗体で免疫染色するとそれぞれの細胞骨格に対応する線維の配列が細かく観察される。抗チュブリン抗体で染めだしたマイクロチュブル系と抗アクチン抗体で染めだしたマイクロフィラメント系には変化を認めなかったが、ビメンチン線維の配列についてはアルツハイマー病線維芽細胞において特徴的な線維配列の乱れが観察された（図２）。このビメンチン配列の乱れは、細胞表面の基質との付着部位になんらかの不均一な性質が生じたためにビメンチン線維の局所的な集積が起こっているように思われ、細胞表面直下の細胞骨格関連蛋白の変化が推察された。しかしながら、他の細胞骨格関連蛋白抗体（フォドリン、Ｐ３６蛋白）を用いた蛍光抗体法ではアルツハイマー病線維芽細胞に特徴的な変化は検出できなかった。

細胞骨格関連蛋白のウェスタンブロット　蛍光抗体法で観察されたアルツハイマー病線維芽細胞のビメンチン線維の配列の異常を調べるために、ハーベストした線維芽細胞および細胞骨格粗分画中の蛋白について各種抗体を用いてウェスタンブロット法にて検討した。その結果、ビメンチン蛋白はアルツハイマー病線維芽細胞中には正常ヒト線維芽細胞と一致する分子量の蛋白がほぼ同量存在することが示された。しかしながら、検索した細胞骨格関連蛋白の中では抗フォドリン抗体を用いたウェスタンブロットでは著明な変化が認められ、アルツハイマー病線維芽細胞では正常ヒト線維芽細胞中のフォドリン蛋白とは異なる分子量の蛋白バンドが検出された（図３）。

今回報告した家族性アルツハイマー病患者の皮膚培養線維芽細胞に観察されたビメンチン配列の乱れとフォドリン蛋白の変化は、アルツハイマー病脳で認められる中間径細胞骨格蛋白の変化と並び重要なものと考えられ、さらにアミロイドβ蛋白が膜表面蛋白としての性質を有していることを考えると、本症の発症に細胞膜表面とそれに関連する細胞骨格蛋白の変化が大きな役割を果たしていることが推察される。また、皮膚生検で得られる線維芽細胞を用いたアルツハイマー病の生物学的確定診断の可能性が示唆されたことは臨床面での寄与も大きいと考えられる。

[文献] (1)MillerCC,BrionJP, CalvertR, Chin TK;EMBO J 5,269-276,1986(2)SternbergerNH,SternbergerLA, UlrichJ; Proc Natl Acad Sci USA 82,4274-4276,1985(3)TanakaJ, MurakoshiK, TakedaM; BiomedicalRes 9,209-216,1988(4)TakedaM,Tada K, NishimuraT; JANO 3,323-328,1989(5)武田雅俊,多田國利,播口之朗,西村健; 神経化学23,180-182,1984(6)UedaK,Cole G, Sundsmo M; Ann Neurol 25, 246-251,1989

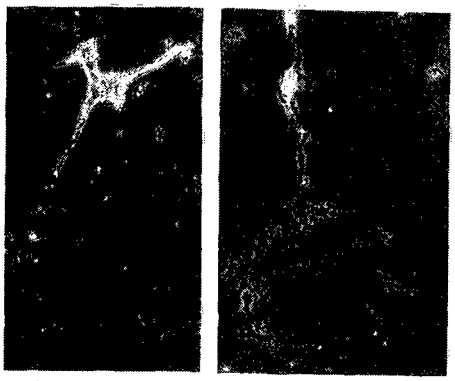


図１　死滅したアルツハイマー病細胞にみられる細胞骨格の残骸(x200位相差)。

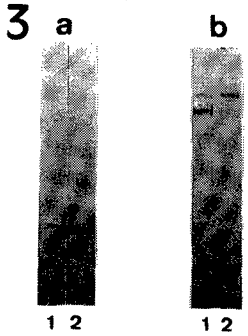



図３　ウェスタン法によるビメンチン(a)とフォドリン(b)の変化。1.正常ヒト細胞
2.アルツハイマー病細胞。アルツハイマー病細胞の抗フォドリン抗体で染色されるバンドは正常細胞と異なる。

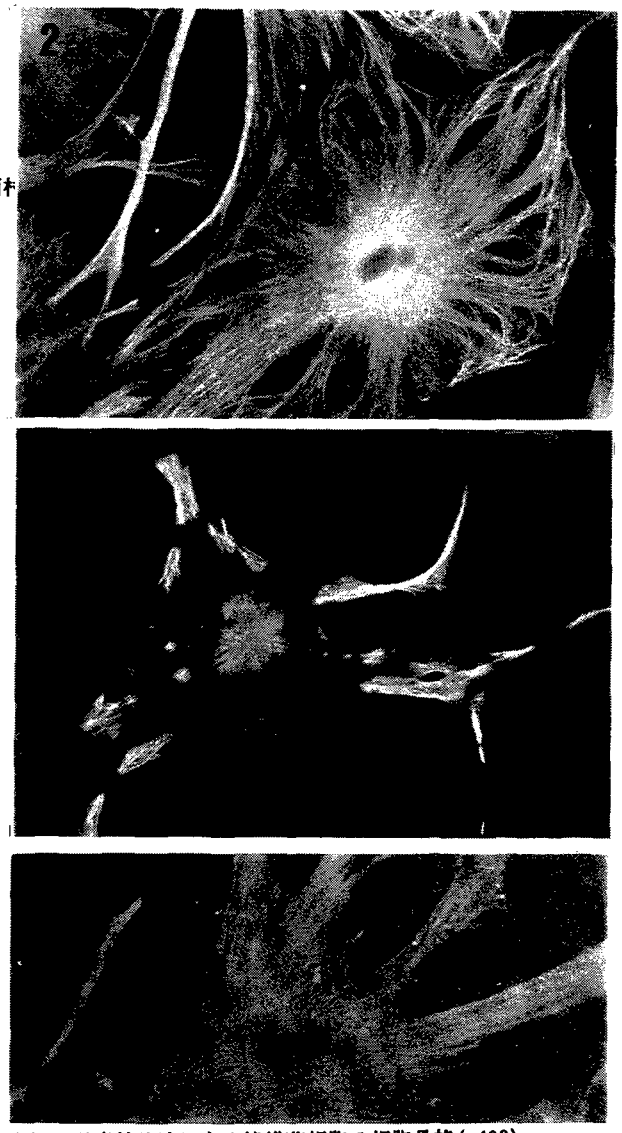



図２　蛍光抗体法による線維芽細胞の細胞骨格(x400)。
(a)正常ヒト細胞のビメンチン線維。(b)アルツハイマー病細胞のビメンチン線維。(c)アルツハイマー病のアクチン線維。アルツハイマー病細胞ではアクチン線維は正常であるが、ビメンチン線維に特徴的な乱れが認められる。

# 171　ダウン症、老化およびアルツハイマー病における S－１００β蛋白質とSOD

加藤兼房、鈴木富士子、黒部直美、森下理香、浅野富子、稲垣俊明*、佐藤秩子**
（愛知県コロニー・研・生化、*名古屋市厚生院・内科、**愛知医大・加齢研）

〔要約〕
1)その遺伝子が第21染色体長腕に存在するS-100β蛋白質と神経組織の老化との関連を明らかにするため、S-100β遺伝子のすぐ近くにその遺伝子が存在する Cu/Zn superoxide dismutase (SOD)のEIA系を新たに作製し、すでに作製した神経系関連蛋白質の測定系も用い、ダウン症(ＤＳ)患者血液、アルツハイマー病(ＡＤ)を含む剖検老人脳および、ラット脳中の濃度を測定解析した。
2)第21染色体のトリソミーが根本病因であり、早老傾向を示すＤＳ患者の血漿S-100βとSOD濃度は対照群に比べて有意に高く、また赤血球中のSODも約50%高い濃度が測定され、S-100β量の遺伝子量効果が推定された。
3)ラット脳におけるS-100βは大脳皮質で加齢に伴って増加したが、小脳、脳幹では一定の値であった。SODを含む他の神経系関連蛋白質（S-100α、α-enolase、γ-enolase、G-蛋白質 Go）濃度は大脳皮質でも一定の値を示し、増減する傾向は認められなかった。
4)ヒト血清中のS-100βおよびSODは加齢およびＡＤに伴う増加はなく、逆に血清SODは加齢とともに減少する傾向があった。
5)剖検の際に得られた大脳皮質検体の測定では、老化脳はS-100βが高い傾向を示したが、ＡＤ群と対照群の間には有意差は無かった。また、SODや他の神経系関連蛋白質の濃度にも差はなかった。

EF-hand型カルシウム結合蛋白質ファミリーの一員であるS-100蛋白質の神経機能に果たす役割はよく分かっていない。Alloreら[1]はS-100βの遺伝子がヒト第21染色体長腕(21q22)に存在することを明らかにし、これがＤＳ遺伝子の存在部位と一致することから、S-100βはＤＳ発症の原因蛋白質の一候補であり、少なくとも遺伝子量効果によるS-100βの過剰産生が、ＤＳにおける種々の神経症状と関連しているのではないかと述べている。一方、同じ染色体上でＤＳ遺伝子のすぐ近くに家族性ＡＤ遺伝子が位置している[2]。我々は、昨年加齢に伴ってラット大脳皮質のS-100βが増加することを報告した[3]。一方、ラット脳のSOD蛋白量が加齢によって増加することを示唆する報告がある[4]。これらの知見よりヒト脳の老化が第21染色体長腕に位置する遺伝子群の活性化と関連するのではないかと考え、今回はヒトおよびラットのSODのEIA系を確立し、ラット脳および、ＤＳならびにＡＤを含む高齢者の血液および脳組織のS-100βとSODを測定した結果を報告する。なお、ラットSOD遺伝子は、ヒトの第21染色体に相当する第16染色体に存在するが、ラットS-100β遺伝子の染色体マッピングはまだ成されていない。

［実験方法と材料］

ラット（ドンリュウ♂）はクリーンアイソレイター中で飼育した。脳組織の採取、保存、抽出液の調製法はすでに記した[3]。ＤＳ患者血液は、他の疾患を合併していない10才以上の患者の血液で、定期検診時に採血（ヘパリン）された一部を使用した。ＡＤおよび対照老人血清は、通常検査のための血清の一部を使用した。正常健常者血清は血液銀行より供与された。ヒト脳組織は剖検時の検体の一部で（死後平均14時間）、大脳皮質（灰白質）を測定に供した。ヘパリン血は血漿を遠心分離し、Ficoll-Paqueにて赤血球を分離した。血液検体および組織は-80℃で保存した。S-100蛋白質および enolase, G-蛋白質はEIA法にて測定した[3]。ヒトおよびラットのSODはそれぞれ、赤血球あるいは肝より精製したSODを免疫原として兎で抗血清を作製し、抗血清より特異抗体を精製、これを用いて上記の神経系関連蛋白質のEIAと類似のEIA系を作製した。測定感度は 3-10 pg SOD/tubeであった。

［結果］

ダウン症におけるS-100βとSOD:　図1に血漿中のS-100αとS-100βおよびSOD濃度を示した。ＤＳでは S-100β ($p<0.01$)および SOD ($p<0.05$)が高かった。S-100αは対照群と有意差はなかった。なお、赤血球中のSODはＤＳで平均50%高濃度であることを確認した。

加齢とヒト血清中のS-100蛋白質およびSOD濃度:　16才から64才の正常人血清(♂60、♀60)および施設療養加齢者血清(>40)のS-100β、S-100αおよびSOD濃度測定した。S-100βは 49.9 ± 23.1 pg/ml (n=161)であり、年齢による高低は認められなかった。一方, S-100αは 260 ± 191 pg/ml (n=161)で、S-100βよりも高く、また60才以上の高齢者で高くなる傾向を示した。SODは 31.8 ± 17.7 (n=164)で60才以上の高齢者で低下する傾向があった。これらの傾向はＡＤの有無とは無関係であった。

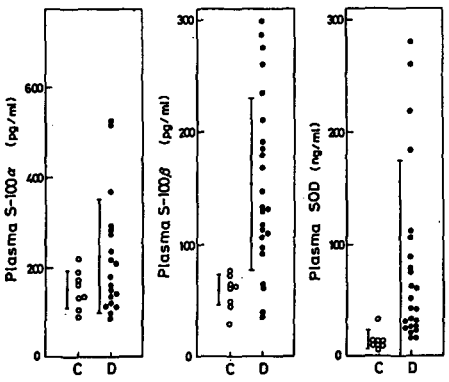
ラット脳のS-100蛋白質と加齢:　雄ラット２カ月齢から30カ月齢にわたって大脳皮質、小脳および脳幹のS-100α、S-100β、ニューロン特異γ-enolase、α-enolase、G-蛋白質 ($G_o\alpha$、$G_{i2}\alpha$、Gβ)およびSODを測定したところ。図2に示すように、S-100βが大脳皮質で加齢に伴って増加することが分かった。しかし、脳幹や小脳では一定の値を維持した。SODや他の神経系関連蛋白質の濃度は、何れの部位でも加齢によって変動することはなかった。

ヒト大脳皮質（若年者、老年者およびAD患者）でのS-100蛋白質、SOD、エノラーゼおよびG-蛋白質の濃度:

剖検時に得られた大脳皮質（灰白質）中の上記蛋白質濃度を測定した。表に示すように、老年者対照群とＡＤ群の間で大脳皮質前頭葉、側頭葉、頭頂葉、および後頭葉のそれぞれの部位で S-100β、S-100α、SOD、α-enolase、γ-enolase のレベルに違いはなかった。G-蛋白質濃度も対照群とＡＤ群間では、それぞれの部位で同じような値が得られた。しかし、例数は少ないが20才代の若年者の大脳皮質のS-100βレベルは、老年者と比べて低い傾向を示し、ラットで得られた傾向と一致するように思われた。

［考察］

第21染色体のトリソミーに起因するＤＳは、種々の神経症状と同時に早老傾向があり、その脳には老人斑やアルツハイマー原線維変化が往々観察される。S-100β蛋白質がその遺伝子量効果によりＤＳでは脳でも高い濃度で存在することが考えられる。一方、加齢に伴いラットS-100βが大脳皮質でのみ増加することを我々は見いだした[3]。また、SOD活性はglucosylationなどの酵素蛋白の修飾により不活化される[5]。ラット肝ホモジェネートのSOD比活性は加齢に伴って著しく低下するのに対し、脳では全く低下しない。しかし、抗体を用いた中和試験では、脳のSODの不活性型が加齢によって増加することが報告されている[4]。すなわち脳のSOD蛋白質量は加齢に伴い増えてくる不活性型の分だけ増加していることになる。これらのことから、ヒト神経系の加齢は第21染色体上のある部分の遺伝子群（S-100βおよびSOD遺伝子を含む）の活性化を伴うのではないかと考え、本研究を行った。しかし、予想に反し、SOD蛋白量は我々のEIA法で測った限りでは、加齢による増加はヒト、ラット双方の脳で認められなかった。老年者の大脳皮質におけるS-100βの増加は特異的で、他のグリアマーカー蛋白質の増量はないこと、ニューロンマーカーの減少もないことから神経細胞要素の減少とグリア細胞成分の増加という包括的な現象を反映しているとは思えない。なお、S-100βはＡＤ脳で特に高くなることはなかった。S-100βが神経系の加齢にどんな関わりあいを持つのかは不明である。




←図1

○：C，対照

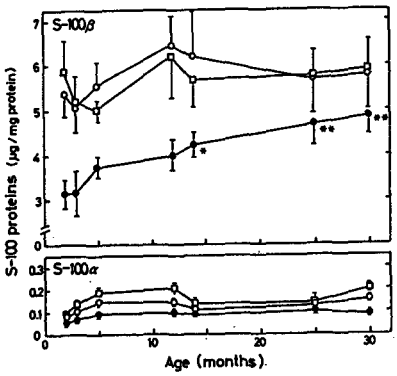
●：D，ダウン症

図2→

●：大脳皮質

○：小脳

□：脳幹




Concentrations of S-100 proteins, SOD and enolases in human cerebral cortex

| | No. of samples | Age (range) | S-100β | S-100α | SOD (μg/mg protein) | γ-enolase | α-enolase |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Frontal | | | | | | | |
| Control | 13 | 73-98 | 1.42 ± 0.31* | 0.594 ± 0.135 | 4.40 ± 0.74 | 12.8 ± 2.1 | 14.1 ± 4.9 |
| Alzheimer D. | 8 | 80-97 | 1.30 ± 0.08 | 0.522 ± 0.083 | 3.95 ± 0.57 | 12.1 ± 1.4 | 13.9 ± 3.6 |
| Temporal | | | | | | | |
| Control | 7 | 74-98 | 2.20 ± 0.75 | 0.535 ± 0.151 | 3.96 ± 0.75 | 10.1 ± 3.3 | 16.3 ± 2.6 |
| Alzheimer D. | 3 | 82-93 | 2.12 ± 1.06 | 0.628 ± 0.151 | 3.84 ± 1.30 | 8.4 ± 3.3 | 15.8 ± 5.8 |
| Parietal | | | | | | | |
| Control | 6 | 74-98 | 2.00 ± 0.79 | 0.438 ± 0.085 | 4.10 ± 0.61 | 11.7 ± 2.0 | 12.5 ± 3.0 |
| Alzheimer D. | 3 | 82-93 | 1.27 ± 0.16 | 0.535 ± 0.098 | 3.92 ± 0.94 | 11.6 ± 2.6 | 10.3 ± 0.2 |
| Occipital | | | | | | | |
| Control | 6 | 74-98 | 1.84 ± 0.64 | 0.530 ± 0.110 | 4.71 ± 0.80 | 13.1 ± 1.5 | 13.2 ± 2.8 |
| Alzheimer D. | 3 | 82-93 | 1.60 ± 0.08 | 0.597 ± 0.087 | 4.03 ± 0.72 | 11.1 ± 3.5 | 9.4 ± 3.2 |
| Cerebral cortex | | | | | | | |
| Young control | 1 | 25 | 0.993 | 0.425 | 3.76 | 10.9 | 8.30 |
| | 1 | 25 | 0.921 | 0.615 | 2.99 | 10.8 | 9.80 |
| | 1 | 43 | 1.45 | 0.586 | 5.31 | 16.8 | 14.9 |

*Mean ± SD

**REFERENCES** [1] Allore R, O'Hanlon D, Price R, Neilson K, Willard, H F, Cox D R, Marks A, Dunn R J (1988) Science 239, 1311-1313 [2] Peter H, et al (1987) Science 235, 885-890 [3] Suzuki F, Morishita R, Asano T, Kato K, Sato T (1988) Bull Jap Neurochem Soc 27, 286-287 [4] Reiss U, Gershon D (1976) Biochem Biophys Res Commun 73, 255-262 [5] Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N (1987) J Biol Chem 262, 16969-16972

# 172 ヒト脳における1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolineよりより N-Methylisoquinolinium ionの生合成

直井　信＊，松浦　貞郎＊＊，
高橋　勤＊＊＊，永津俊治＊
（＊名大・医・生化1，＊＊名大・教養・化学，＊＊＊江南女短大）

〔要約〕

ヒト脳内において存在が確認されている1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline (TIQ)からドーパミン系神経に毒性を有するN-Methylisoquinolinium ion (NMIQ$^+$)への生合成を検討した。TIQはヒト脳可溶化画分に存在するN-Methyltransferaseによりより N-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline(NMTIQ)となる。本酵素はS-Adenosyl-1-Methione(SAM)を必須としそのKm値は約7μM、TIQに対するKm値は21μMであった。NMTIQはミトコンドリアに存在するモノアミン酸化酵素により酸化されNMIQ$^+$が生成された。

〔目的〕

ドーパミン(DA)ニューロンを選択的に破壊しヒトにパーキンソン氏病様症状を発症させるN-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)の発見はヒト脳内で同様の神経毒性を有する物質の存在を示唆した。ヒト脳内において1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline(TIQ)が発見され[1]、サルへの長期投与でパーキンソン氏病様症状を発症させた[2]。しかし、TIQそのものは*in vitro*でDAの代謝系のMAOを阻害せず、毒性発症の分子レベルでの解明が求められてきた。一方、TIQの誘導体の一つであるN-Methyl-isoquinolinium ion(NMIQ$^+$)はその化学構造がMPTPの酸化生成物N-Methyl-4-phenyl-pyridinium ion(MPP$^+$)と類似することからDA代謝への影響が検討され、*in vivo*と*in vitro*でチロシン水酸化酵素(TH)[3,4]，モノアミン酸化酵素(MAO)[4,5]などを阻害することが明らかになった。我々は今回、ヒト脳内でのTIQからNMIQ$^+$への生合成を検討した。

〔方法〕

ヒト脳前頭葉皮質ホモジェネイトと可溶化画分をN-Methyltransferase(NMT)の、シナプトゾーム内のミトコンドリアをMAOの酵素標品とした。NMTによるTIQからのNMTIQの生成はHPLC-電気化学法[6]，MAOによるNMIQ$^+$の生成はHPLC-蛍光法[7]による定量で測定した。

〔結果と考察〕

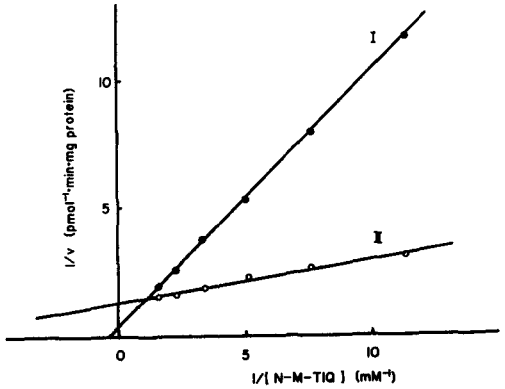
I: TIQよりNMTIQの生合成; ヒト脳ホモジェネイトとTIQを反応させ生成NMTIQを測定した。反応は酵素タンパク量に依存し37°Cに60分迄直線的であり、至適pHは8.25であった。また、S-Adenosyl-L-methionine(SAM)を必須とした。SAMならびにTIQに対するKm値，Vmax値をTable 1にまとめた。なお、本酵素の細

Table 1. Kinetic data on N-methyltransferase activity in human brain homogenate.

| | |
|---|---|
| In terms of SAM | |
| Km | 5.11 ± 1.69 (μM) |
| Vmax | 7.31 ± 0.21 (pmol/min/protein) |
| In terms of TIQ | |
| Km value | 20.9 ± 5.5 (μM) |
| Vmax value | 7.98 ± 1.21 (pmol/min/mg protein) |

The values are mean and SD of triplicate measurements of two separate experiments.

Fig.1




I : MAO-A
II : MAO-B

胞内存在は主に細胞質，可溶化画分であった。

II: NMTIQよりNMIQ⁺への酸化; NMTIQよりNMIQ⁺への生成をヒト皮質シナプトゾームミトコンドリアを用い検討した。NMIQ⁺の生成の至適pHは7.25であった。MAOのアミン基質であるKynuramineと競合的に阻害し、NMTIQの酸化がMAOによることを示した。A型，B型 MAO共にNMTIQを基質とした(Fig.1)。比活性は他のアミン基質と比べ、かなり低いものであった。

これらの結果は、食物その他に由来したTIQが脳内においてNMTによりN-Methyl化し、更にMAOにより酸化型になりうることを示している。TIQがin vivoにおいて、神経毒性を示しながらMAOの基質にならないことを併せると、このpathwayが神経毒性の発症に関与していると考えられる。

〔文献〕

1. Niwa,T., Takeda,N., Kaneda,N., Hashizume,Y. and Nagatsu,T.(1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 144,1084-1089.
2. Nagatsu,T. and Yoshida,M. (1988) Neurosci,Lett. 87,178-182.
3. Hirata,Y., Sugimura, H., Takai,H. and Nagatsu,T. (1986) Brain Res. 397, 341-344.
4. Naoi,M., Takahashi,T., Parvez,H., Kabeya,R., Taguchi,E., Yamaguchi, K., Hirata,Y., Minami,M., and Nagatsu,T. (1989) Neurochem. Int. in press.
5. Naoi,M., Hirata,Y. and Nagatsu,T. (1987) J.Neurochem. 48, 709-712.
6. Naoi,M., Matsuura,S., Takahashi,T. and Nagatsu,T. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. in press.
7. Naoi,M., Matsuura,S., Parvez.H., Takahashi,T., Hirata,Y., Minami,M. and Nagatsu,T. (1989) J.Neurochem. 52, 653-655.

# 173 アミノ酸のモノアミン代謝と学習行動に及ぼす影響

野村正彦，横越英彦
（藤田学園保健衛生大・医・生理学，
静岡県立大・食品栄養・栄養化学）

［要約］
餌に含まれる種々アミノ酸およびタンパク質が、神経伝達物質の基質として脳内に取込まれ、神経の種々の機能発現に関与している事はよく知られている。10％の低タンパク質餌群、およびこれにメチオニン（ＭＥＴ）とスレオニン（ＴＨＲ）を添加した餌（ＳＵＰ群）で飼育した２群のラットを作製した。そして、これらアミノ酸添加が脳内の神経伝達物質に及ぼす影響を調べた。低タンパク質餌群に比較して、ＳＵＰ群は、脳内トリプトファンおよびインドールアミン代謝系に著明な低値を示した。また、中枢機能のうち、特に高次神経機能の一つと考えられる弁別学習能力のへの影響を調べた。ＳＵＰ群がオペラント型明度弁別学習課題下で、学習能力は初期学習では差を認めなかったが、逆転学習では著明な改善を示した。これは脳内セロトニン低値によるセロトニン作働性神経系機能が関与している可能性が示唆された。

［目的］　脳内セロトニン作働性神経系は、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、低トリプトファン飼育ラットで認められた事からもその可能性が考えられる（２、３）。低タンパク質餌群、およびこれに MET と THR を添加した餌で飼育したＳＵＰ群ラットを作製した（７）。そして、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、低トリプトファンならびに低セロトニン含有量と、これらラットが示す弁別学習課題下での学習への影響を調べ、セロトニ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週齢の WISTAR ラットを２群に分けて、10％精製大豆タンパク質を主成分にする低タンパク質餌と、これに必要量の２倍である 0.747%の MET と 0.720%の THR を添加したＳＵＰ餌で飼育した（７、８）。脳内部位は Glowinskiらの方法（１）で大脳を６部位に分けて、それぞれの部位でアミノ酸およびモノアミン含有量の測定を行なった（５）。

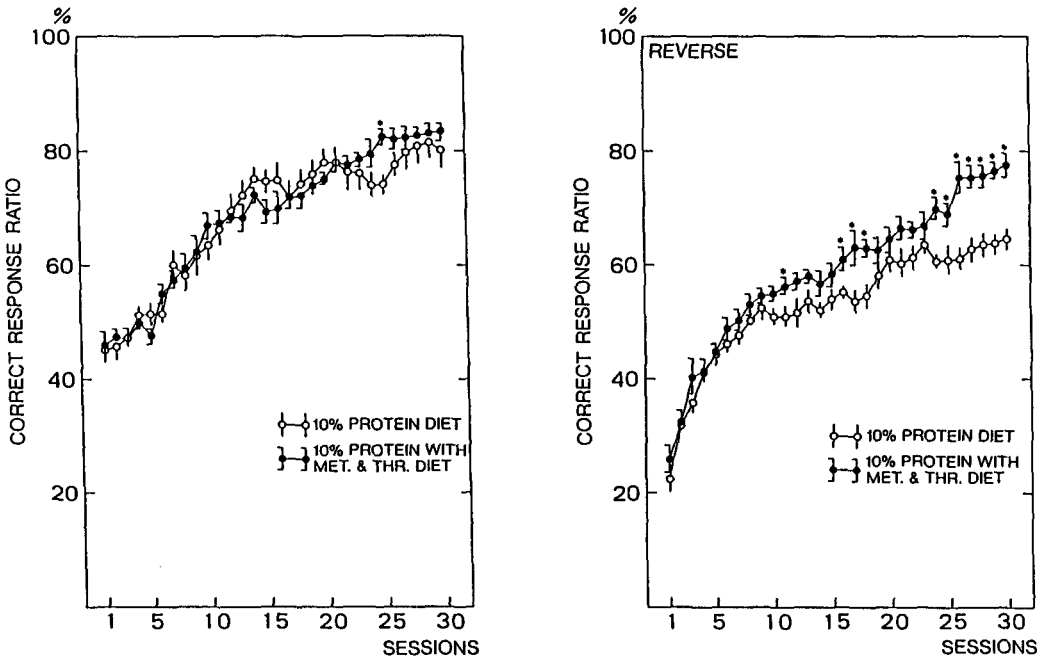
学習実験：以上の２群を１１週齢時に、飽食時体重の８５％まで餌を制限して、体重を調節維持した。そして、明度弁別学習課題下に学習能力を検索した（６）。明るい明度呈示時にラットがレバーを押せば餌が強化され（Ｒ＋）、暗い明度呈示時にレバーを押せしても餌が強化されない（Ｒ－）、Multiple VI 15 Seconds Extinction 課題で３０日間連続して行なった（３）。これを初期学習とした。ひき続いて、逆転学習として、明度呈示と餌の強化を逆転させた学習課題を、更に３０日間連続して行なった。

［成績］　（１）．学習成績　１．初期学習：　低タンパク質餌群は第１試行日にはＲ＋は６０回で、Ｒ－は７７回（１０匹平均）で、第１０試行日にはＲ＋は１８０回、Ｒ－は１１０回で、第２０試行日にはＲ＋は２１０回、Ｒ－は６０回で、第３０試行日にはＲ＋は２３７回、Ｒ－は５９回であった。従って、正反応率は図－１Ａのごとく、４５％から試行日数の進行に伴い、第１０試行日には６４％、第２０試行日には７８％および第３０試行日には８０％を示した。これに対して、ＳＵＰ餌群は第１試行日にはＲ＋は６０回、Ｒ－は７３回（１０匹平均）で、第１０試行日にはＲ＋は２０６回、Ｒ－は１０６回で、第２０試行日にはＲ＋は２１８回、Ｒ－は７８回で、第３０試行日にはＲ＋は２６３回、Ｒ－は５２回であった。従って、正反応率は４６％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７５％および第３０試行日には８４％を示した。

２．逆転学習：　低タンパク質餌群は初期学習同様に、Ｒ＋の増加はＳＵＰ餌群に比較して緩やかに上昇した。Ｒ－の減少はＳＵＰ餌群同様認めたが、学習過程後半には少なく、第３０試行日になお１５０回以上を認めた。これに対して、ＳＵＰ餌群はＲ＋の増加は著明であり、Ｒ－の減少も、学習過程後半に著明であった。従って、正反応率は図－１Ｂのごとく、全学習過程を通じてＳＵＰ餌群が高かった。

（２）．モノアミンミン含有量　１０日間２群の餌で飼育した、脳６部位のうち脳幹部の変化を図－２に示した。２群間の Norepinephrine、Epinephrine の変化は認められず、セロトニン、

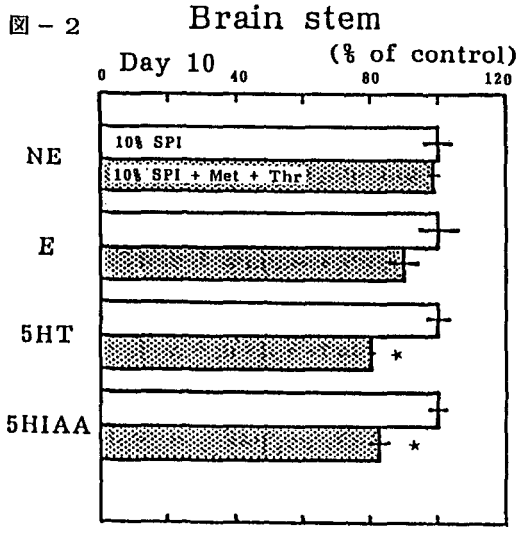
図－1




5 HIAA はＳＵＰ群で著明に低かった。また、海馬等の他の脳部位で、NE の低値を示したものもあり、カテコールアミン量にも変化を認めた。

［考察］　セロトニン作働性神経起始核である縫線核を含む脳幹部位、および他の脳６部位で、セロトニンのみならず、カテコールアミン含有量にも減少を認めた。このことは、添加した２つのアミノ酸が、アミン含有量低下を起こし、弁別学習課題という、高次神経活動時の学習過程に影響を及ぼした可能性が考えられる( 4、5 )。しかし、低トリプトファン餌による低セロトニンラットが、学習不全を示した( 2 )事から、学習能力は単にセロトニン量のみならず、カテコールアミン作働性神経系にも変化が認められた事から、他の種々作働性神経系列との相関性を検討しなければならない。また、以上の２種の必須アミノ酸添加による血中アミノ酸および脳内タンパク質組成の改善があった事を含め、さらに詳細な検討をする必要性のある事が示唆された( 5、8 )。

図－2




★ Significant differences ($p < 0.05$).

［文献］

1.Glowinski,L. & Iversen,L.C. (1966) J.Neurochem.13,655-669.
2.Nomura,M. (1981) Neurochem.Res. 6,115-116.
3.Nomura,M. (1984) Res.Commun.Psychol. Psychiat.Behav. 9,373-384.
4.Nomura,M. (1985) Jpn.J.Psychopharmac. 5,243-249.
5.Nomura,M. & Okamura,K. (1989) J. Neurochem. 52,933-937.
6.Tsukada,Y.,Nomura,M.,Nagai,K.,Kohsaka,S. Kawahata,H.,Ito,M. & Matsutani,T. (1977) Behavioral Neurochemistry pp.63-84. (spectrum Pub.)
7.Yokogoshi,H.,Iwata,T.,Ishida,K. & Yoshida,A. (1987) J.Nutr. 117,42-47.
8.Yokogoshi,H.,Iwata,T. & Ishida,K. (1988) Agric.Biol.Chem. 52,701-710.

# 174 Hippocampal cholinergic neurotrophic peptide の精製とアミノ酸組成

小鹿幸生*, 小島深一**, 山本正彦*, 田中亮***
* 名市大（医）第２内科, *** 同, 第１生化学
** 住友製薬（株）研究所

〔要約〕

胎令16日目ラット培養中隔核のAch産生を促進する、海馬組織内のmicromolecule因子を精製しアミノ酸組成を決定した。精製には10-12日令ラット316匹の海馬組織を用い、遠沈法、Ultrafiltration法、Bio-Gel P2 Column分画法、Sep-Pak C18 Cartridge 吸着法、ＨＰＬＣ法などを順次用いた。１回目のＨＰＬＣによる主活性分画の総活性量は、Sep-Pak C18 よりeluteされた総活性量の約半量であったことから、主活性分画以外にも類似した因子の存在が示唆された。今回はこの主活性分画を、ＨＰＬＣにて更に２回rechromatogramを実施して精製した。精製品の総 peplide 量は約４μgであった。また、約200pg/mlの濃度で培養組織のAch産生を対照に比し50%促進した。Pico-Tag 法およびChymotrypsin 断片化産物のCarboxypeptidase Y によるC末端アミノ酸分析法から、精製品のアミノ酸組成はAsx(1), Glx(1), Ser(1), Gly(1), Ala(3), Pro(1), Ile(1), Leu(1), Trp(1)であった。

〔緒言〕我々はneurogenesisに於ける標的組織の作用研究過程(1)で、中枢神経系に於ても中隔核培養組織のアセチルコリン(Ach)産生を促進する因子が、その標的組織である海馬内に存在することを報告した(2)(3)。また、この海馬組織内の中隔核 Ach 産生促進因子には数種類存在し(4)、可溶性のmicromolecule因子は各種の方法により部分精製が可能であることも報告してきた(5)(6)。今回このmicromolecule因子の一成分について精製とアミノ酸組成決定を試みたので報告する。

〔方法〕（Ａ)生物学的活性測定法は既報告(2)(3)に準ずるが、使用した中隔核組織は胎令16日目の exactry timed pregnant Wister rat(Charles River Japan)brainより摘出、培養液は micromoleculeの活性を検出する為に従来の海馬不溶性成分の代わりに、飽和量（1%)のＦＣＳを含むBottensteinの改変$N_2$medium(5)を用いた。また、活性測定までの時間短縮を目的に、活性成分を培養直後から培養系に添加し、３日目に培養液を交換、６日目に従来の方法(2)に従ってAchの産生能を測定した。更に、対照群と比較し、培養組織のAch産生量を50%促進する培養液１ml中の活性因子量を一生物学的単位(BU)とした。

（Ｂ)海馬 micromolecule の精製法は 以下の１～11のstepで実施した。

1, hippocumpus tissue from 10-12 day old 316 rats brain
2, homogenized and centrifuged at 100,000g for 90 min
3, Acidificd with acctic acid(final 1N)
4, Centrifuged at 100,000g for 120min,collect supernatant
5, Amicon YM 5 filtrate
6, Lyophilized and dissolved with 9ml 0.05N acetic acid
7, Bio-Gel P2 Columm fractionation
columm size φ1.6cm×84cm, elution with 0.05N acetic acid,elution speed 8cm/hr, pooled active fraction(between Vitamin $B_{12}$ and NADH)
8, Sep-Pak C18 Cartridge(loaded 2.5mg P2 samle/cartridge)
eluted with 60%MeCN containing 0.05N acetic acid
9, HPLC(1) Bio-Rad RP-304
Buffer A:0.1%TFA, Buffer B:95%MeCN with 0.1%TFA, elution speed 1ml/min, pooled active fraction(Fraction D MeCN 21%-26%)
10, HPLC(2) Tosoh TSK-120T(rechromato of Fraction D)
Buffer A:0.1%TFA, Buffer B:95%MeCN with 0.1%TFA, slow gradient, elution speed 1ml/min, pooled active fraction(Fraction G MeCN 32.5 35.5%)
11, HPLC(3) Tosoh TSK-120T(rechromato of Fraction G)
Buffer A:0.05%TFA, Buffer B:95%MeCN with 0.05%TFA, slow gradient,elution speed 1ml/min, pooled active single peak(Fraction F MeCN 28%-30%)

Peptide 量はAngiotensin IIを標準にfluorescamine法(7)を用いて測定した。

（Ｃ)アミノ酸組成の決定は、最終精製 sampleをフェノール含有沸点塩酸で、110 C、20時間、加水分解してPico-Tagアミノ酸分解システム(Waters社製)を用いて実施した。また、最終精製 sampleの一部にSigma 社製 Chymotrypsin 0.4μgを加え37 Cでincubation、6時間後に更にChymotrypsin 0.4μgを加え、37 Cで終夜 incubationした。このChymotrypsin断片化 sampleを精製 stap 11と同様に、ＴＳＫ-120T Columnを用いＨＰＬＣ法により分取した。凍結乾燥した分取 sampleに340μlの100mMピリジン酢酸緩衝液(pH5.5)を加え溶解し、110 pmol の

Carboxypeptidase Y(宝酒造)を加え、37 Cでincubationした。経時的に反応液を分取し、sample中のアミノ酸をＰＴＣアミノ酸に変換してPico-Tagアミノ酸分析システムを用い検討した。

〔結果および考察〕 Table(1)に各精製過程に於ける total peptide 量と活性量を示すが、生物学的活性量はBio-Gel P2 Column fractionation のstepまで漸次増加傾向を示した。これは、既報告(5)と同様、粗精製品の中に培養中隔核のAch産生を抑制する成分が含まれることを示すものと考えられた。また、Fig(1)にSep-pak C18 Cartridge elute sample のＨＰＬＣ Chromatogramを示すが、fraction Dに最も強い活性が認められた。この分画の総生物学的活性は1.9×10⁴であったが、この総活性量はSep-pak C18 elute の総活性の約半量であったことから、fraction D以外にも類似した作用を示す成分が存在することが示唆された。

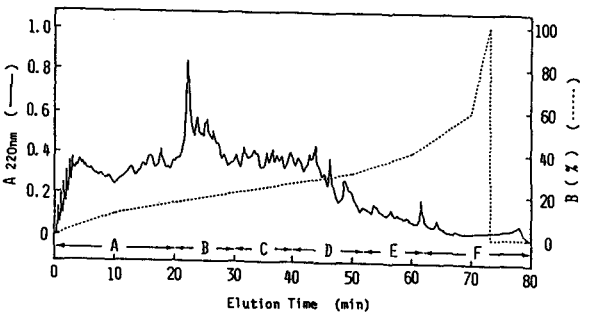
Fig(2)にstep 11 ＨＰＬＣ(3)のChromatogram を示す。active fraction Fはアミノ酸分析結果から約4μgであった。また、Concentration Curve (Fig(3)) から、一生物学的単位は総最終産物の５×10⁻⁵volumであったことから約200pgと考えられた。

step 11 ＨＰＬＣ(3)のactive fraction Fのpico-Tag 法によるアミノ酸組成比は、Leu を1.0とするとAsx 0.9 (1), Glx 1.3(1), Ser 1.4(1), Gly 1.3(1), Ala 2.5(3), Pro 1.0(1), Ile 0.9(1), Leu 1.0(1), 〔Trp 0.4〕であった。Trp分子の存在を明らかにする目的で、fraction F の一部をChymotrypsin による断片化を実施したところ、ＨＰＬＣ上二つの断片に分離することができた。各々をCarboxypeptidase Y により消化、消化産物のアミノ酸組成をPico-Tag法により検討した。一方の断片のC末端にTrpが認められたことから、海馬 micromoleculeには Trp 一分子が含まれているものと考えられた。

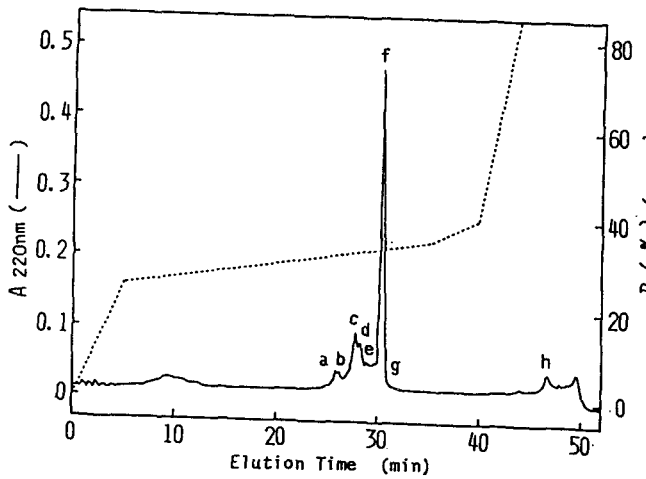
table(1) 精製過程の total peptide 量と活性量

| | Total amount | Total B.U. |
|---|---|---|
| acidified Supernatant | 224mg(110ml) | 1.7×10⁴(13.5μg/BU) |
| Amicon YM5 filtrate | 186mg | 2.1×10⁴(9.0μg/BU) |
| Bio-Gel P2 fraction | 35mg | 4.2×10⁴(0.83μg/BU) |
| Sep-Pak C18 elute | 6.8mg | 4.3×10⁴(0.16μg/BU) |
| HPLC(1) Fraction D | ND | 1.9×10⁴ (5.3×10⁻⁵Volum of total/BU) |
| HPLC(2) Fraction G | ND | 1.7×10⁴ (5.8×10⁻⁵Volum of total/BU) |
| HPLC(3) Fraction F | ND(≒4μg) | 2×10⁴ (5.0×10⁻⁵Volum of total/BU) |

ND:not determined




Fig(1) HPLC(1) chromatograph of Sep-Pak C18 Cartridge eluate.




Fig(2) HPLC(3) rechromatograph of fraction G.

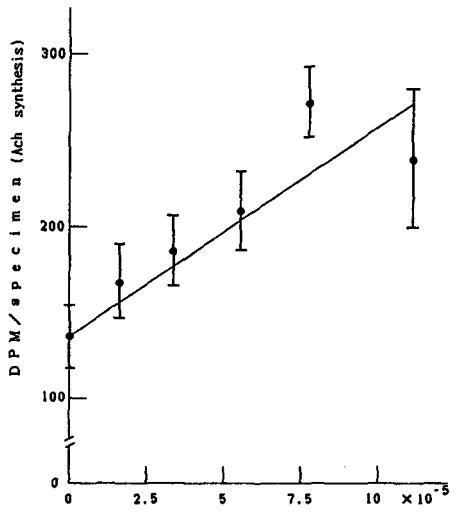



Fig (3) Dose effect of HPLC (3) fraction (f) on Ach synthesis


文献

(1)Ojika.K.et al, Banbury report 15,Cold Spring Harbor Laboratory,Cord Spring Harbor,pp285-292,1983
(2)Ojika.K.et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:2567-2571,1984 (3)小鹿幸生 他 神経化学、23：351-353, 1984 (4)小鹿幸生 他 神経化学、25(1)：412-414, 1986 (5)小鹿幸生 他 神経化学、24:493-495,1985
(6)小鹿幸生 薬物・精神・行動 7：447-451,1987 (7)Udenfriend.S. et al Science,178:871-872,1972

# 175 培養細胞系におけるアルツハイマー病アミロイド蛋白前駆体遺伝子発現：神経系細胞の分化との関連

吉川和明、相沢貴子、丸山敬
（東京都精神研・分子生物）

〔要約〕

アルツハイマー病アミロイド蛋白前駆体(APP)遺伝子の発現様式を検討するため、神経系腫瘍由来培養細胞内のAPP mRNAを測定した。分化度の低いラット胚細胞やマウスembryonal carcinoma (F9) 細胞ではAPP mRNAが検出されなかったが、medulloblastoma, neuroblastoma, glioma, pheochromocytoma, ventricular tumor由来の培養細胞全てにAPP mRNAが存在した。 神経系の細胞に高率に分化し得るembryonal carcinoma (P19) 細胞の場合、未分化の状態でもAPP mRNAは低濃度存在したが、細胞凝集とレチノイン酸によって神経方向に分化させた場合、APP mRNAは顕著に増加した。以上の結果から、神経系の細胞ではAPP mRNAはニューロンのみならず分化状態にある細胞全般に存在すること、また、神経系の初期発生過程では分化に伴って早期から発現している可能性が考えられる。

アルツハイマー型老年痴呆では脳内にアミロイドが蓄積することが特徴的である。最近、このアミロイドの主成分としてβ蛋白（β-protein）が見いだされ、その前駆体（amyloid protein precursor, APP）に関する分子生物学的研究が進展してきている。APP mRNAは脳組織では特にニューロンに多量に存在し、重要な神経機能に関与することが推定されるが、このAPPの生理機能や病態での蓄積機序については未だ不明の点が多い。一方、APP遺伝子がどのような細胞で発現し得るかは生理機能や病態を考える上で重要であろう。そこで今回は神経系腫瘍由来クローン化細胞を用いて、神経系細胞の分化とAPP遺伝子発現との関連を検討した。

【実験方法】 腫瘍由来培養細胞は三木（金沢大）、保井（都神経研）、内田（都精神研）、浜田（東大）の諸先生およびJCRB細胞バンクより供与を受けた。各細胞は既報 [9,10] にしたがって培養し、near-confluentの状態でharvestを行った。Embryonal carcinoma (P19) 細胞は細胞集合塊形成とレチノイン酸(0.5μM)によって分化させた [4]。既報[8-11]にしたがって各細胞から抽出したtotal RNAを6% formaldehyde/1.2% agarose gel で電気泳動後Northern法を行った。APP mRNAは$^{32}$Pでラベルしたラット APP cDNA [12] をプローブとして hybridization によって検出した。また、対照としてβ-actin, neurofilament-L (NF-L), glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNAを同時に分析した。

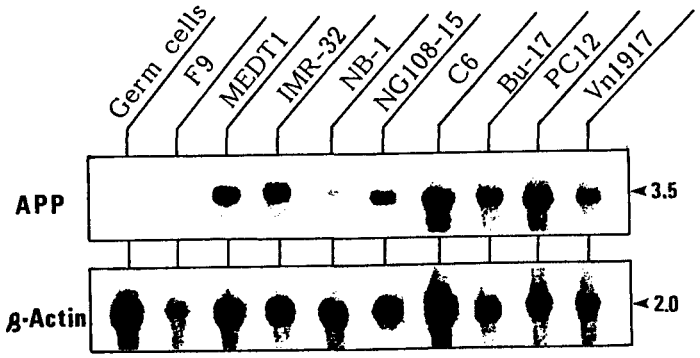



Fig.1 Northern blot analyses of APP mRNA and β-actin mRNA in various cell lines of tumor origin (2μg total RNA per lane)
Germ cells; rat mature spermatids, F9; mouse embryonal carcinoma
MEDT1; hamster medulloblastoma, IMR-32 and NB-1; human neuroblastomas
NG108-15; mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid, C6; rat glioma
Bu-17; human glioma, PC12; rat pheochromocytoma, Vn1917; mouse ventricular tumor.
Numbers at the right are the sizes of hybridized signals in kilobases.

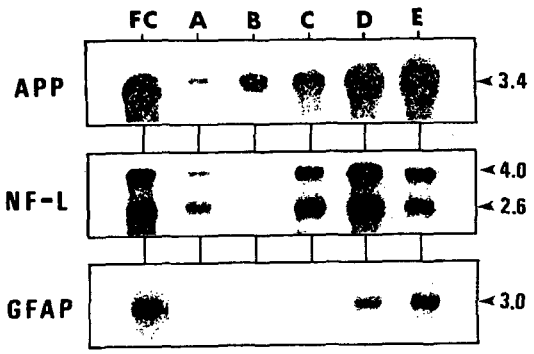



Fig.2 Northern blot analyses of mRNAs encoding APP, neurofilament-L (NF-L), and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in embryonal carcinoma P19 cells (2$\mu$g total RNA/lane).

FC; rat frontal cortex
A-E; P19 cells at different stages of neural differentiation
A; undifferentiated
B, C, D, and E; 0, 1, 3, and 6 days, respectively, after differentiation-stimulation.
Numbers at the right are the sizes of hybridized signals in kilobases.

【成績】APP mRNAは胚細胞やembryonal carcinoma F9細胞などの分化度の低い細胞では発現していなかったが、種々の神経系細胞の分化形質を示すmedulloblastoma (MEDT1)、neuroblastoma (IMR-32, NB-1)、neuroblastoma x glioma hybrid (NG108-15)、glioma (C6,Bu-17)、pheochromocytoma (PC12)、ventricular tumor (Vn1917)の各細胞では3.5 kb前後のバンドとして検出された (Fig.1)。同じヒトneuroblastomaでもIMR-32に比べNB-1細胞中のAPP mRNA濃度は極めて低かった。次にAPP遺伝子発現が神経系細胞の分化に伴って増加するか否かを検討するため、神経系の細胞に効率よく分化するembryonal carcinoma P19細胞を用いて、分化誘導によるAPP mRNAレベルの変化を調べた (Fig.2)。細胞集合とレチノイン酸によって分化誘導を行った場合、時間経過に伴って APP mRNA濃度の漸増が見られた。この増加はニューロンの指標であるNF-L mRNAの変化パターンとは一致せず、また、アストログリアの指標であるGFAP mRNAより早期から増加を示した。これらの結果、APP遺伝子の発現は神経系細胞の分化初期から発現していること、また、分化成長によって増加する可能性が考えられる。

【考察】in situ hybridization法によってAPP mRNAは脳内ではニューロンに多く含まれ、グリアには極めて少ないことが示されている [1]。今回の結果のようにAPP mRNAは非ニューロン系の腫瘍性培養細胞にも存在するため非ニューロン系細胞ではAPP遺伝子発現はin vivo条件下では抑制されているが、培養条件下では脱抑制状態になる可能性も考えられる。APP mRNAレベルは細胞内二次情報伝達系による制御は受けていない可能性がある [12]が、APP遺伝子発現の抑制や活性化の制御機構はアルツハイマー病の成因との関連からも興味深い。現在のところ3種のAPP mRNA (APP695、APP751、APP770) が存在することが報告 [2,3,5,7] されているが、この中でAPP695 mRNAはneuroblastoma (IMR-32、SY5Y) や pheochromocytoma(PC12)などのニューロンの形質を示す腫瘍性培養細胞に多く存在することが明かにされている [3,6]。したがって、今回の種々の培養細胞中で発現している APP mRNAの種類とその量比は神経系細胞の系譜を考える上で重要であり、今後の検討課題である。

【文献】

[1] Bahmanyar, S., et al. (1987) Science, 237, 77-80.
[2] Kitaguchi, N. et al. (1988) Nature, 331, 530-532.
[3] Ponte, P. et al.(1988) Nature, 331, 525-527.
[4] Rudnicki, M.A. and McBurney, M.W. (1987) In "Teratocarcinomas and embryonic stem cells" (ed. Robertson.E.J.) pp. 19-49, IRL Press.
[5] Tanzi, R.E. et al. (1988) Nature, 331, 528-530.
[6] Weidemann, A. et al.(1989) Cell 57, 115-126.
[7] Yamada, T. et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 158, 906-912.
[8] Yoshikawa, K. et al. (1984) J.Biol.Chem. 259, 14301-14308.
[9] Yoshikawa, K. and Sabol, S. L. (1986) Mol. Brain Res.1, 75-83.
[10] Yoshikawa, K. and Sabol, S.L. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 139, 1-10.
[11] Yoshikawa, K. and Aizawa, T. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 151, 664-671.
[12] Yoshikawa, K. et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. (in press)

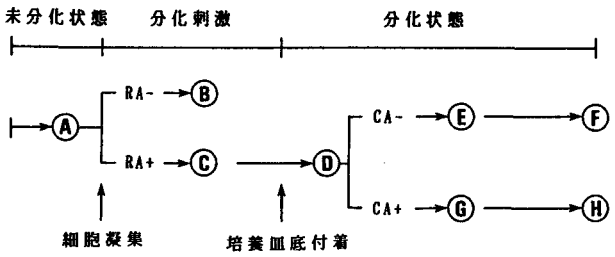
# 176 Embryonal Carcinoma細胞の神経系分化に伴う神経ペプチド前駆体遺伝子発現の変化

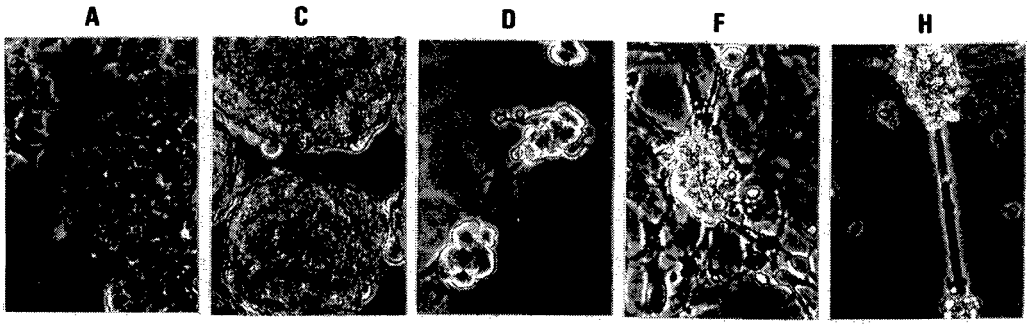
吉川和明、相沢貴子、丸山敬、野沢明美
（東京都精神研・分子生物）

〔要約〕マウス embryonal carcinoma (EC)細胞 P19を細胞凝集＋レチノイン酸で分化刺激し、細胞内の神経ペプチド前駆体 (preproenkephalin (A), pEnk; preprosomatostatin, pSOM; preprocholecystokinin, pCCK) mRNA および分化したニューロンとアストログリアのマーカーとして neurofimament-L (NF-L)と glial fibrillary acidic protein (GFAP)のmRNAを分析した。NF-L mRNAやpEnk mRNAは未分化（無刺激）状態でも存在しており、分化刺激時に一過性に減少したが、分化後は再び増加した。また、pCCK mRNAは未分化状態では検出できなかったが分化刺激時に発現し、再び減少した。GFAP mRNAは未分化細胞には存在しなかったが、分化後漸増した。分化が進んだニューロンを高密度に含む細胞集団にはpEnk mRNA、pCCK mRNA、pSOM mRNAが存在したが、特にpSOM mRNAは高濃度に含まれていた。これらの知見は神経系の初期発生と分化過程で神経ペプチド前駆体遺伝子発現に消長があることを示唆する。

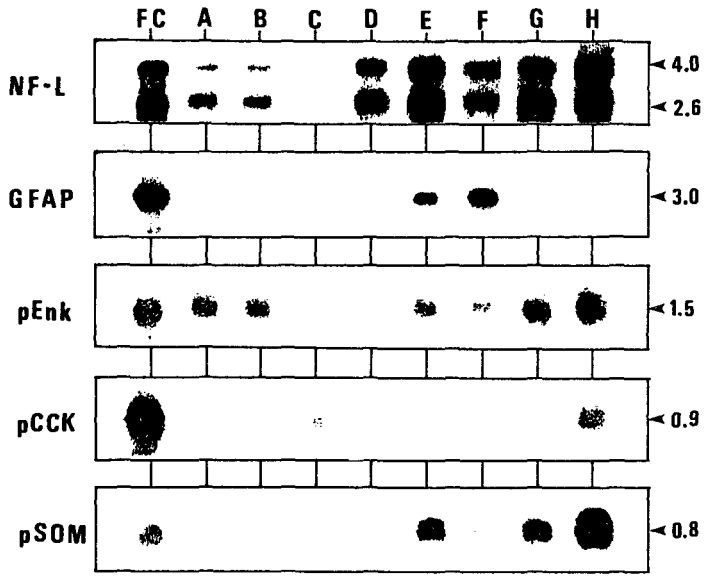
Embryonal carcinoma(EC)細胞は分化誘導刺激に反応して神経系細胞に分化し得るため、神経系細胞の初期発生過程を分子生物学的に研究する上で有用である［2］。エンケファリン前駆体(pEnk)遺伝子は胚細胞［1,6,9］、グリオーマ［5］、初期発生段階のアストログリア［3］において発現している。したがって、未分化細胞や神経系細胞の初期発生過程においても、pEnk遺伝子などの神経ペプチド前駆体遺伝子が発現している可能性が考えられる。そこで、今回はマウスのEC細胞を用いて神経方向に分化した細胞中の神経ペプチド前駆体遺伝子発現について検討した。

【実験方法】 EC細胞（P19）（University of Ottawa, Dr.McBurney、東大浜田博士より供与）は既報［2］に従って培養し、分化刺激を行った。EC細胞は未分化状態(A)で増殖させた後、細菌培養用シャーレに細胞を$10^5$/mlに浮遊状態で凝集させ、レチノイン酸(RA) 0.5$\mu$Mを添加(C)または非添加(B)の培養液で96時間培養することによって分化刺激を行った。その後、細胞をトリプシンで分散させて組織培養用シャーレに移し、24時間後(D)からcytocine arabinoside (CA) 5$\mu$g/ml を添加（G,H; E,Fは非添加）し、さらに2日間(E,G)と5日間(F,H)培養を続けた（下図参照）。NF-L、GFAP、pEnk、pSOM、pCCKのmRNAの分析は、既報［4-7］にしたがって、各段階の細胞から抽出したtotal RNAを6% formaldehyde/1.2% agarose gelで電気泳動後Northern法によって行った。




位相差顕微鏡写真




Northern blot analyses of mRNAs encoding NF-L, GFAP, pEnk, pCCK, and pSOM (2 μg/lane)

FC: rat frontal cortex
A: undifferentiated
B: cell aggregation (RA-)
C: cell aggregation (RA+)
D-H: cells committed to neural differentiation
D: 1 day
E: 3 days (CA-)
F: 6 days (CA-)
G: 3 days (CA+)
H: 6 days (CA+)

Numbers at the right are the sizes of hybridized signals in kilobases.

【成績】 未分化細胞(A)ではNF-L mRNAとpEnk mRNAが検出されたが、GFAP mRNA、pCCK mRNA、pSOM mRNAは検出されなかった。未分化細胞に存在するNF-L mRNAとpEnk mRNAは細胞凝集＋RAの分化刺激によって検出限界以下まで低下した(C)。細胞凝集のみ(B)ではこの減少がないため、これはRAの作用によるものと考えられる。 一方、pCCK mRNAは細胞凝集＋RAによって出現したが、細胞凝集のみでは出現しなかった。CAの非存在下ではNF-L mRNAは分化刺激後３日目に最大になり６日目には減少したが、GFAP mRNAは３日から６日にかけて漸増した（E,F）。この結果はニューロンは初期には多数存在するが数日で減少し、一方、アストログリアは前駆体細胞から徐々に成熟していくという知見［2］と一致する。これに対して、分裂細胞を除去する目的でCA処理をした場合、高密度のニューロン集団が得られた(H)。この処置によってNF-L mRNAは漸増したが、GFAP mRNAは検出されなかった(G, H)。高密度ニューロン集団(H)には、pEnk mRNA、pSOM mRNA、pCCK mRNAの３者共存在し、とくにpSOM mRNAが高濃度に含まれていた。したがって、EC細胞の分化したニューロン群には、神経ペプチド前駆体遺伝子発現に多様性が生じているものと推定される。

【考察】 pEnk遺伝子は精巣の胚細胞［1,6,9］や体細胞 ［8,10］ に発現しているが、胚細胞に由来するEC細胞（未分化状態）に存在することは、pEnk遺伝子発現の細胞（組織）特異性の点で興味深い。未分化状態でクローン化したEC細胞にもpEnk mRNAが存在するため、pEnk mRNAが未分化細胞集団中に混在する分化した細胞に含まれる可能性は少ない（発表予定）。半数体生殖細胞に存在するpEnk mRNAには体細胞成熟型pEnk mRNAではイントロンとして除去される配列が含まれる［9］が、未分化EC細胞に存在するpEnk mRNAはこの生殖細胞型ではない（発表予定）。このpEnk mRNA と共にNF-L mRNAは分化刺激で消失し、逆にpCCK mRNAが出現することは、RA刺激によってEC細胞内で著しい遺伝子発現の変動が起っていることを示唆する。このEC細胞で見られる現象はin vivoで見られる神経ペプチド前駆体遺伝子発現の変動［7］を反映している可能性がある。

【文献】

[1] Kilpatrick, D.L. and Millette, C.F. (1986) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83, 5015-5018.
[2] Rudnicki, M.A. and McBurney, M.W. (1987) In "Teratocarcinomas and embryonic stem cells" (ed. Robertson.E.J.) pp. 19-49, IRL Press, Oxford.
[3] Vilijn,M.-H., Vaysse, P.J.J., Zukin, R.S., and Kessler, J.A. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85, 6551-6555.
[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 Aizawa, T. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 151, 664-671.
[7] Yoshikawa, K. and Aizawa, T. (1988) Mol. Brain Res. 4, 87-96.
[8] Yoshikawa, K. and Aizawa, T. (1988) FEBS Lett. 237, 183-186.
[9] Yoshikawa, K. Maruyama, K., Aizawa, T., and Yamamoto, A. (1989) FEBS Lett. 246, 193-196.
[10] Yoshikawa, K., Aizawa, T., and Nozawa, A. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. (in press)

# 177 ラット初代培養ニューロン上でのEGF receptorの発現とその機能

木下 章, 山田和雄, 早川 徹, 甲村英二, 最上平太郎

(大阪大学医学部脳神経外科)

〔要約〕
前回，遺伝子組換え技術により合成されたヒトrecombinant EGF(rEGF)が低酸素負荷による培養ニューロン傷害の改善を中心として神経栄養効果を持つことを発表した[4]．今回はニューロン上でのレセプターの発現とその性質について検討すると共にrEGFの作用機作について考察した．その結果，EGF receptorは胎生第17日のラット初代培養ニューロン作成後3日目に約半数の細胞膜上に出現し，rEGFの投与に応じて高親和性レセプターの出現を認めた．このようなrEGFによる高親和性レセプターの誘導が前出の低酸素負荷による神経細胞傷害に影響すると考える．

【実験方法】

1．胎生第17日のラット大脳皮質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6ウェルプレート上に160 cells/$mm^2$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(Day 0とする)，同時にrEGFを100ng/ml，10ng/ml，1ng/mlの濃度で添加した．ついでDay 3に低酸素負荷を行った．負荷はプレートをanoxic chamber（真空デシケーターを利用）に入れ，圧を200mmHgまで真空ポンプを用いて減圧し95%$N_2$ 5%$CO_2$で再度内部を満たし，そしてこの操作を3回施行した後，4時間の低酸素状態を保つことにより行った（図1）．Day 5に細胞を固定し，位相差顕微鏡下に100$\mu$m以上の突起を持つ細胞を計数した．

2．Day 1, 2, 3に2%paraformaldehydeで細胞を固定した後，抗EGF受容体抗体（Ab-1, Oncor社）を用いて免疫染色を行った（Vectastain ABC-Elite kit）．

3．Day 5にmediumを10mM HEPES, 0.1% BSA含有MEM(pH7.6)と交換し，rEGFを最終濃度が$2x10^{-8}$M - $6x10^{-12}$Mまで8段階となるように投与し，さらに$^{125}$I-human EGF（IM-196, Amersham, > 900Ci/mmol）を4 x $10^{-11}$Mとなるように添加し，15° Cで6時間の結合実験を行った．ついで氷冷した$Mg^{2+}$,$Ca^{2+}$含有Dulbecco's PBS + 0.1%BSAを用いて洗浄操作を行い，最後に0.4N NaOH 1ml/wellと交換し細胞を可溶化した後にgamma counterでカウントした．

【結果及び考察】

1．培養ニューロンの生存曲線について（図2）
無負荷例においてはrEGFが10ng/mlの濃度で明らかなニューロンの生存延長を認めた。低酸素負荷例ではrEGF無添加の場合生存するニューロンの数は無負荷例の10分の1以下に低下したが，rEGFを添加することにより用量依存的に生存細胞数が増加し，rEGFの生存維持効果が示唆された．

2．EGF受容体の発現について
Day 1で約10%の細胞にEGF受容体の発現がみられ，Day 2でほぼ50%，Day 3でほぼ70%が染色された．EGF受容体はおもに細胞体に存在し，細胞体表面の一部に偏在していた（図3）．

3．EGF受容体の機能発現について
EGF受容体のreeceptor binding assayを行うことにより親和係数(Kd値)及び細胞一個当りのレセプター数を求めた（図4，表1）．その結果Day 0からrEGFを10ng/ml添加した群でEGF受容体の高親和性レセプターの出現が確認され，低親和性レセプターとの数の比は12:88でありKd値の比は52:1であった．一方，低親和性レセプターはEGF添加の有無にかかわらず存在した．

コリン作働性ニューロンの表面でのNGFレセプターの出現やその結合能についてはすでに報告されている[5][6]が，今回の実験結果から明らかになったように大脳皮質ニューロンにおけるEGFレセプターについてもNGFレセプターと似た結合様式を認めた．EGFレセプターには二種類の親和部位が存在し，EGFの共存により高親和性レセプターが誘導されることなどの機能分化についてニューロン以外の培養細胞ではすでに種々の報告がみられている[1][2][3]．すなわち，低親和性レセプター（dimer）はdown regulationに関与し，高親和性レセプター（monomer;EGFの存在によってconformational changeが誘導される）はsignal transmissionに関与していると考えられている．今回の報告はrecombinant typeのEGFにおいても同様な結果が得られ，rEGF(10ng/ml)の投与が高親和性レセプターの誘導をもたらした．また低酸素負荷を行ったニューロンにおいても同様な結合曲線を我々は得ている．このようなrEGFによる高親和性レセプターの誘導が前出の低酸素負荷による神経細胞傷害に影響すると考える．

【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. Basu M, et al., J Biol Chem 261, 12879-12882 (1986)
2. Biswas R, et al., Biochemistry 24, 3795-3802 (1985)
3. Gregoriou M and Rees AR, EMBO J 3, 929-937 (1984)
4. 莖井武, 他, 神経化学 27, 178-179 (1988)
5. Shooter EM, et al., Recent Prog Horm Res 37, 417-446 (1981)
6. Yankner BA and Shooter EM, Annu Rev Biochem 51, 845-868 (1982)

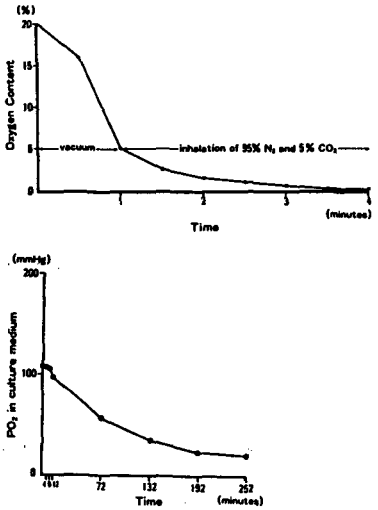



図1 anoxic chamber及び培養液中の酸素濃度
(上) 減圧操作及び95%$N_2$ 5%$CO_2$混合ガスの注入によりchamber内の酸素濃度はほぼ0となる.
(下) chamber内のガスを3回交換した時点での培養液中の酸素濃度は約100mmHgとなる. 4時間95%$N_2$ 5%$CO_2$混合ガス中に静置した時点での培養液中の酸素濃度は約20mmHgであった.

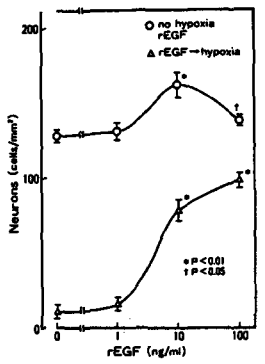



図2 rEGFによる神経細胞傷害改善効果
○印：無負荷群
△印：低酸素負荷群

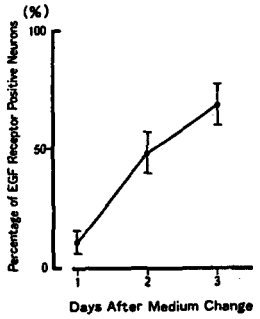
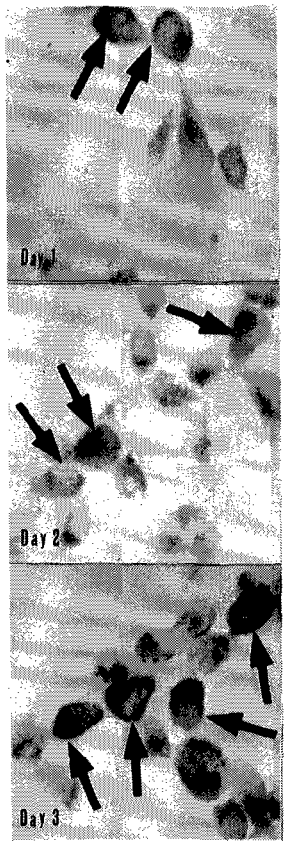
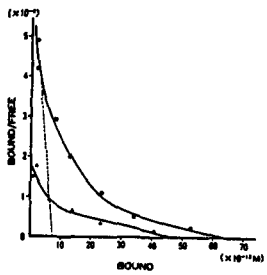



図3 EGF受容体の発現曲線及び免疫染色像




| | affinity | density (sites/cell) | Kd (M) |
|---|---|---|---|
| rEGF (10ng/ml) | high | $4.6\times10^4$ | $1.1\times10^{-10}$ |
| | low | $3.7\times10^5$ | $5.2\times10^{-9}$ |
| rEGF (−) | high | — | — |
| | low | $3.5\times10^5$ | $5.2\times10^{-9}$ |

図4, 表1 ヒトrEGFのScatchard解析
○印：ヒトrEGF 10ng/ml 投与群
△印：非投与群

# 178　グリア細胞層上でのラット胎仔脊髄後根神経節ニューロンの培養—神経突起伸長因子の検討—

甲村英二，山田　和雄，早川　徹，木下　章，最上　平太郎
（大阪大学医学部脳神経外科）

〔要約〕
幼若大脳アストロサイト上での脊髄後根神経節DRGニューロンの低密度培養系を用いて、神経突起伸長効果を検討した。アストロサイトはDRGニューロンに対し突起伸長効果を有しており、その効果はグリア細胞層を予め熱処理しても失われず細胞表面因子が主に関与していると考えられた。この実験系では、nerve growth factor (NGF)、basic fibroblast growth factor(bFGF)は神経突起伸長効果を有していた。グリアの熱処理実験によりNGFはDRGニューロンに対し直接に作用し、bFGFはグリア細胞層を介して間接的に作用していることが示された。抗NGF抗体を用いた実験によってグリア細胞がNGFを産生して突起伸長をもたらす可能性は否定的であることが示された。

中枢神経系と末梢神経系では神経再生機能に大きな相違が認められる。末梢神経グラフトの中枢神経への移植等の実験により、中枢と末梢での環境の相違、glial scarの形成等が中枢神経系での再生機能の欠如の一因とされている。他方培養系においてはグリア細胞の神経細胞に対する支持効果が認められている。[1),2),3)]大脳グリア細胞層上での末梢神経DRGニューロン培養系を用いてグリア細胞の神経突起伸展に対する影響及び栄養因子の効果を検討した。

【方法】　妊娠17日令のラット胎仔をMEM/10%FCS medium内に無菌的に取り出した。実体顕微鏡下に腰仙部 DRG を取り出し0.25%トリプシン溶液中で室温にて45分間処理した。先のmediumにて3回洗浄した後、無血清 medium (DMEM-F12-N1, 但しputrescineは除く) に交換しピペッティングをおこない単離細胞化した。これを単層グリア細胞層(同日令ラット胎仔大脳由来のグリア細胞を数回継代後作成、GMと略す)上に50cells/mm$^2$の低密度でseedingをおこなった。栄養因子(2.5S-NGF, bFGF)を添加し無血清培地にて37℃ 5%$CO_2$下で24時間培養した。別に60℃ 30分間加熱処理を行った単層グリア細胞層(HGM)上にもseedingを行いグリア細胞の生死によるDRGニューロンに対する成長効果の違いを比較検討した。

個々の神経細胞の突起長を各ウェル内で100倍視野にて最低10視野カウントし一つのデータとし，最低3ウェルの平均を求めた。統計学的処理はt-testを用いて行った。神経細胞、グリア細胞はそれぞれ抗200KDニューロフィラメントモノクローナル抗体、抗GFAPモノクローナル抗体(Lab-systems)を用いてABC法で染色し確認した。

GM上にDRGニューロンを無血清培地でseedingし栄養因子を添加した後に、抗βNGFモノクローナル抗体(Boehringer Mannheim Biochemica)を各種濃度で添加し24時間培養し、神経突起長を計測した。

【結果および考察】実験に用いたグリア細胞層はGFAP染色により80%以上に陽性を呈した。対照としてpoly-L-lysine coatingのみを行ったプレート上にDRGニューロンをseedingしたがニューロンの生着はきわめて不良でわずかにニューロン以外の細胞と集団を形成して生着するのみであった。NGF10ng/mlを添加しても神経突起長は61.5±4μmであった。他方、幼若グリア細胞層の上では良好なニューロンの生着を認めた。この培養系に液性栄養因子を添加したときの変化を検討した。Fig.1 は2.5S-NGF, bFGFの神経突起伸展に対する効果を示したものである。NGFは良く知られているようにcontrolの2倍にも及ぶ著明な突起伸長効果を示した。bFGFもcontrolに比しNGFには及ばないが有意の効果($p<0.01$)を示した。dose responseをみると、0.5ng/ml以上の濃度でbFGFは有意の突起伸長効果を示した。

グリア細胞の生死によってニューロンに対する効果が変化するかどうかを、熱処理グリア細胞層にseedingを行い比較した(Fig.1)。24時間後の神経突起長はグリア細胞層をあらかじめ熱処理しておいても有意の変化は認めなかった。bFGFの突起伸展に対する効果はグリア細胞層を予め熱処理することにより有意に減少した。他方NGFの効果発現はグリ

ア細胞の生死とは関係なかった。以上のことから幼若グリア細胞の突起伸長効果はグリア細胞の細胞表面の性質がおもに関与していると推測された。また、NGFがニューロンに直接作用するのに対し、bFGFの神経突起伸長効果はグリア細胞を介して発現されたものと考えられた。

これまで幼若アストロサイトの培養系におけるNGFの産生が報告されているが[4]、本実験系におけるグリア由来のNGFの関与の有無を抗βNGFモノクローナル抗体を用いて検討した(Fig.2)。抗NGF抗体の用量依存性に、NGF 10ng/ml添加群の神経突起伸長効果は抑制されたが、外因性のNGF10ng/mlの効果を有意に抑制し得る抗NGF抗体の量150ng/mlをもってしても、グリア細胞上での神経突起伸展及びbFGFの効果は抑制されなかった。

以上のように今回用いた培養系で，大脳幼若グリア細胞表面は中枢神経ニューロン[5]のみならず末梢神経であるDRGニューロンに対しても良好な性質を有していると考えられた。この系ではNGFはDRGニューロンに直接作用し、bFGFはグリア細胞を介して作用しているものと考えられ、幼若グリア細胞が産生するといわれるNGFの関与の可能性は否定的であった。現在グリア細胞の表面因子、FGFにより誘発される因子の同定を行っているが、グリア細胞のextracellular matrixが関与している知見を得ている。成熟中枢神経系での神経再生の欠如の一因としてastyroglial scarがあげられているが、胎仔由来の培養アストロサイトは、本実験系で示されたように神経突起伸展に対し良好な環境を提供していると考えられた。アストロサイトの成長に伴う機能分化に関しても、今後検討を加えていく必要があると思われる。

【文献】


1) Fallon, J.R. (1985) J.Cell Biol. 100, 198-207.

2) Noble, M., Fok-Seang, J., Cohen, J. (1984) J.Neurosci. 4, 1892-1903.

3) Pixley, S.K.R., Nieto-Sampedro, M., Cotman, C.W. (1987) J.Neurosci.Res. 18, 402-406.

4) Furukawa, Y., Furukawa, S., Satoyosi, E., Hayashi, K. (1986) J.Biol.Chem. 261, 6039-6047.

5) 井端由紀郎、他、(1987) 神経化学 26, 298-300.


Fig.1

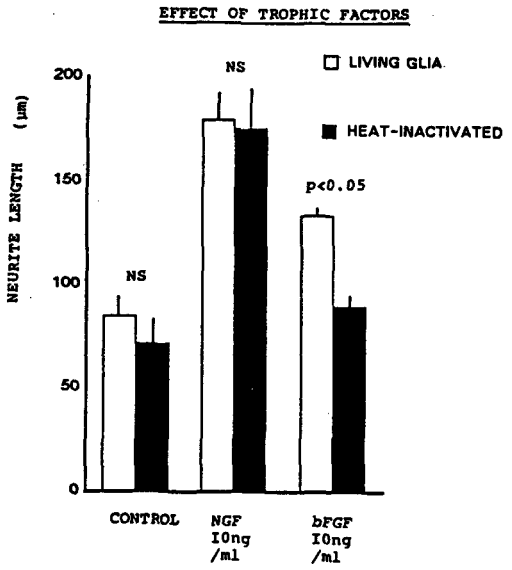
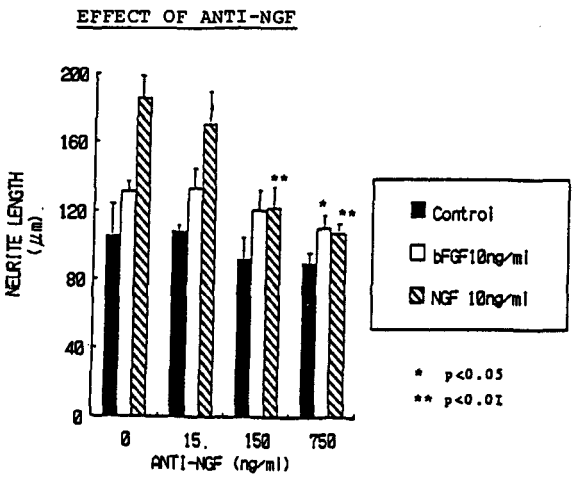



Fig. 2



# [179]ストレスから解放後のラット脳内ノルアドレナリン放出亢進の部位差-短時間拘束による検討-

権藤雄二、津田　彰、末吉圭子、松口直成、
溝口克弘、田中正敏　（久留米大・医・薬理）

〔要約〕

ストレスによる脳内noradrenaline(NA)系神経活動性亢進に及ぼすストレス開始時の影響を検討するために、1分間と5分間の短時間拘束ストレスを負荷した後のラット脳内NA放出の経時的変化について、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で検討した。金網による拘束を1分間負荷したとき、NA放出は視床下部や青斑核部、海馬、大脳皮質など検討したほとんどの部位で、ストレスから解放20分～40分後にかけて有意に増加した。1分間ストレスによってNA放出が亢進した脳部位と増加の程度は、45分間の持続拘束ストレスを負荷したときとほぼ同程度であった。これに対して、5分間の拘束ストレスによるNA放出亢進は視床下部と青斑核部でしか起こらず、反応性のパターンは25分間の持続ストレス状況で得られる変化と同一であった。これらの結果は、ストレスによる脳内NA放出亢進は短時間の拘束ストレスであっても、長時間の持続ストレスを負荷した場合と同程度となることを見出だした前研究を支持するとともに、同じ短時間のストレスであっても1分間と5分間の負荷ではその後の脳内NA放出の変化に大きな相違が生じてくることをさらに明らかにした。

【 目的 】

10分間の短時間拘束ストレス負荷によっても、70分間の持続的なストレスを負荷したときと同程度のnoraderenaline(NA)放出亢進が脳内の多くの部位で生じることを見出し、ストレス初期の影響がその後の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ことを示唆した(2)。そこで今回は、脳内NA系神経活動性亢進に及ぼすストレス初期段階の影響をさらに詳細に検討するために、ストレスを負荷する時間を前実験よりもさらに短縮させ、5分間あるいは1分間としたときのラット脳内NA放出の経時的変化(ストレスから解放0,20,40分後)について、NAの主要代謝産物である 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-$SO_4$)含量を指標にして検討した。

【 方法 】

Wistar系雄性ラット(210-230g)64匹を対象とし、1群8匹とした。ストレスとしては従来の金網による拘束を負荷した(5)。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; ②、③1分間ストレス負荷後ホームケージにに戻し、それぞれストレスから解放20分、40分後に断頭する群; ④5分間ストレス負荷直後に断頭する群; ⑤、⑥5分間ストレス負荷後ホームケージに戻し、それぞれストレスから解放20分、40分後に断頭する群; ⑦、⑧25分間、45分間持続ストレス負荷直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、海馬、大脳皮質に、またReis & Rossの方法(4)により青斑核部に分割した。これら脳部位のMHPG-$SO_4$含量についてはKohnoらの方法(3)によって、血液は血漿に分離後、van der Vies法(7)によってcorticosterone含量をともに蛍光法で測定した。

【 結果と考察 】

Fig.に示すように、コントロール群と比較したとき、1分間拘束ストレスはストレスから解放20～40分後にかけて、視床下部、青斑核部、海馬、大脳皮質など扁桃核を除くすべての部位のMHPG-$SO_4$含量を有意に増加させた。1分間ストレスによってMHPG-$SO_4$含量が増加した脳部位と増加の程度は、45分間の持続拘束ストレスを負荷したときに見られる変化に匹敵した。これに対して、5分間の拘束ストレスはストレス解放直後よりMHPG-$SO_4$含量を増加させたが、それらの変化は視床下部と青斑核部のみに限られていた。5分間拘束ストレスで得られたMHPG-$SO_4$含量の変化は25分間の持続ストレス状況で得られた結果とほぼ同程度であり、1分間拘束ストレスによる変化と比べて明らかに限局していた。血漿corticosterone含量の変化については、持続ストレス状況下で最も上昇したが、1分間および5分間の短時間ストレス負荷であっても、ストレスから解放後に有意な増加が続いた。1分間ストレスが広範な脳部位のNA放出を亢進させるのに、5分間ストレスでは視床下部と青斑核部にそれが限局される理由は、現時点では明らかではない。しかし、いずれにしても本実験の結果はストレスによる脳内NA放出亢進は短時間の拘束ストレスであっても、長時間の持続ストレスを負荷した場合と同程度となることを見出した前結果(2)と一致するものである。さらに同じ短時間のストレスであっても1分間と5分間の負荷では、その後の脳内NA放出の経時的変化に大きな相違が生じてくることを初めて明らかにするとともに、ストレス開始時の初期段階の影響が生体の一連のストレス反応を決定する上で重要な意味を持つことを(6)をさらに示唆するものと考えられる。

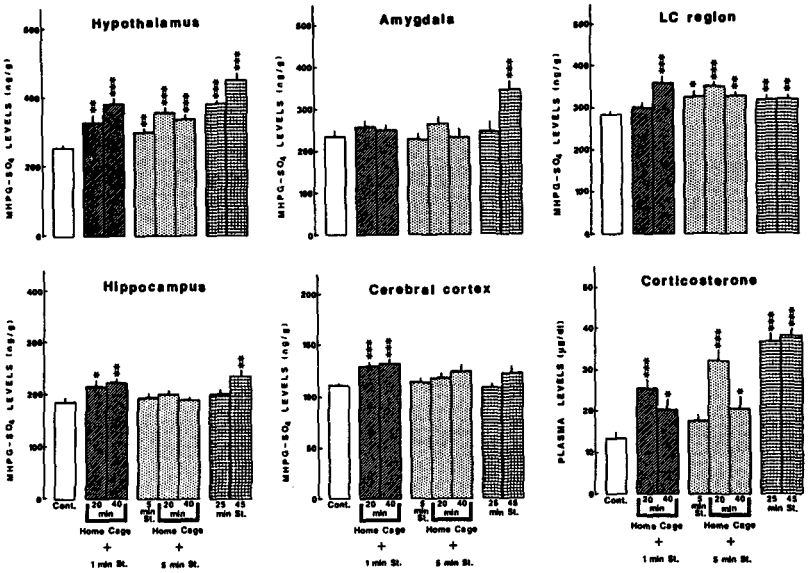



Fig. Mean(±SEM) levels of MHPG-$SO_4$ (ng/g) in various brain regions of control rats (□) and rats exposed to 1-min (■) or 5-min (▩) restraint stress followed by either 0, 20 or 40min of post-stress delay (home cage), as well as a 25-min and 45-min continuously stress (▤). Differs significantly from control group (*p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001).

【 文献 】

(1) Gispen WH., et al. 1972 Neuroendocrinology, 9:285-296. (2) 権藤雄二ら 1988 神経化学 27:298-299. (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. 1983 Brain Res, 275:105-115. (6) Tanaka M, et al. 1988 Pharmacol Biochem Behav, 29:613-616. (7) Van der Vies J 1961 Endocrinology, 38:399-406.

# [180] 葛藤状況の導入(罰効果)によって生じたラット脳内ノルアドレナリン代謝の変化

津田　彰，権藤雄二，末吉圭子，松口直成，
溝口克弘，田中正敏　（久留米大・医・薬理）

〔要約〕

電撃ストレッサーの停止をコントロールする対処反応を罰することで、葛藤状況を導入したときに見られるラット脳内noradrenaline(NA)代謝の変化について、NAの主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-$SO_4$)含量を指標にして調べた。電撃ストレスセッション(1日1回50分間、4日連続)の最終日に、電撃への対処反応が電撃によって罰せられたコントロール可能ラットのNA代謝回転は、そのような罰を受けなかったコントロール可能ラットと比べ、視床下部と青斑核部、海馬において有意に増加、扁桃核で増加傾向を示した。とくに視床下部と扁桃核のNA代謝回転の増加は、罰なし条件で認められた電撃へのコントロール可能性によるNA代謝回転亢進の減弱効果を消失させた。電撃に対してつねにコントロールが不可能であったラットのNA代謝回転は罰による影響を強く受けなかったことより(海馬を除く)、罰条件におけるコントロール可能ラットの視床下部や青斑核部、扁桃核などで見られたNA代謝回転の亢進は、これまで有効であった対処反応が罰せられたことによる葛藤(conflict)、あるいはコントロール可能性の喪失といった心理的要因と関係しているように思われる。

【 目的 】

たとえ物理的に等しい電撃ストレッサーを受けても、自分のコントロール(対処，coping)反応によって電撃の停止が可能であった場合、それが不可能であったときと比べて、ラット脳内noradrenaline(NA)代謝回転亢進の程度が僅かですむことから、電撃へのコントロール可能性の有無(controllability vs. helplessness)といった純心理学的現象が脳内NA代謝という神経化学的変化に反映されることを以前に報告した(5)。そこで今回、心理的ストレスと脳内NA代謝との関連性をさらに明らかにするために、電撃の停止をコントロールする対処反応を罰することで、葛藤状況を導入したときに見られるラット脳各部位のNA代謝の変化を検討した。

【 方法 】

Wistar系雄性ラット(200-240g)48匹を対象とした。実験装置は天井より電撃を停止するための棒が下がったオペラント箱、ショッカー(1秒間持続、1.5秒間隔、1mA強度)、実験制御器などであった。ラットを次の3群に分け、1日1回50分間のストレスセッションを4日間連続負荷したが、最終日には各群半数のラットを罰条件(コントロール可能ラットが電撃を停止するために、前日まで有効であった対処反応を行っても、電撃の停止はすぐには起こらず、5回の電撃パルスをさらに与えることで葛藤状況を導入)に割り当てた：①電撃なし群—装置に入れられるだけで、電撃を受けない—；②コントロール可能群—棒を引く対処反応によって尻尾にくわえられる電撃を停止したり、次に予定されている電撃を100秒間延期できる—；③コントロール不可能群—棒を引くことは可能であるが、その反応は電撃の停止には役立たず、電撃を受けるか受けないかは尻尾電極を直列に配線したコントロール可能ラットの反応いかんによる—。セッション終了後、摘出した脳をGispenらの方法(1)にしたがって視床下部、扁桃核、視床、海馬、大脳皮質に、またReis & Rossの方法(3)により青斑核部に分割した。これら脳部位について、NA

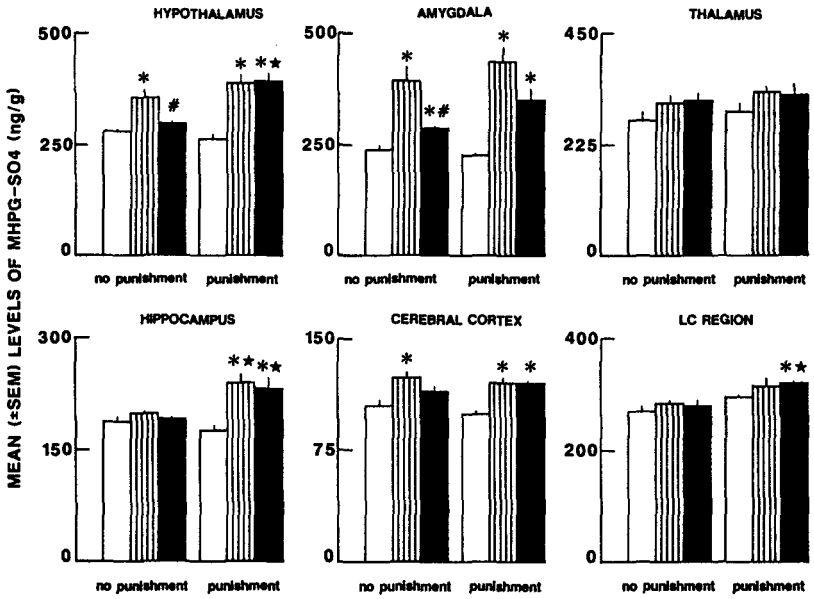



Figure: Mean (± sem) levels of MHPG-$SO_4$ (ng/g) in various brain regions for the non-shock (□), uncontrollable (▥) and controllable (■) groups in the no punishment and punishment conditions. Differs significantly from (*): respective the non-shock; (#): respective the uncontrollable; and (★): respective the no punishment condition.

の主要最終代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-$SO_4$)含量をKohnoらの方法(2)によって蛍光法で測定した。

【 結果と考察 】

ストレスセッションの進行とともに、コントロール可能群による対処学習が成立し、電撃を受ける回数は減少したが、テスト日に罰が導入された条件では、当該の電撃を停止するために罰電撃をさらに被らなければならないことで、被電撃量は増加し、コントロール可能群の対処反応も増加した。MHPG-$SO_4$含量の変化に関して(Figure参照)、罰なし条件のコントロール可能群は電撃なし群と比べて扁桃核においてのみ有意に増加したのに対して、コントロール不可能群では視床下部、扁桃核、大脳皮質で増加が認められ、しかも前者の2部位についてはコントロール可能群と比較したとき有意に高い値であった。一方罰条件では、電撃なし群と比べて、コントロール可能群のMHPG-$SO_4$含量は多くの部位で上昇したが、視床下部と扁桃核、青斑核部、海馬では、対応する罰なし条件のコントロール可能群と比べても著明な増加であり、コントロール不可能群とほとんど差がなくなった。コントロール不可能群では海馬を除いて、葛藤導入(罰効果)によるMHPG-$SO_4$含量の上昇を認めなかった。本実験の結果は、これまで電撃をコントロールする上で有効に機能していた対処反応が罰せられることにより、視床下部や扁桃核、青斑核部といった部位のNA代謝回転が特異的に亢進すること(コントロール可能群の場合)、しかし同じ罰電撃を経験しても罰が対処反応と関係しない場合にはこのような増加が起こらないこと(コントロール不可能群の場合)を示した。これらの知見は、葛藤という心理的ストレスによって視床下部や大脳辺縁系のNA代謝回転が亢進することを明らかにするとともに、不快な情動(不安、恐怖、怒りなど)の形成と発現にこれらの部位のNA系神経が関与していることを示唆するこれまでの報告(4,6,7)をさらに支持した。

【 文献 】

(1) Gispen WH, et al. 1972 Neuroendocrinol, 9:285. (2) Kohno Y, et al. 1979 Anal Biochem, 97:352. (3) Reis DJ & Ross RA 1973 Brain Res, 57:307. (4) Tanaka M, et al. 1983 Brain Res, 275:105. (5) Tsuda A & Tanaka M 1985 Behav Neurosci, 99:802. (6) Tsuda A, et al. 1986 Pharmacol Biochem Behav, 24:115. (7) Tsuda A, et al. 1988 Brain Res, 474:174.

# 181 松果体インドール化合物の日内変動に対する明期光強度の影響

東 均，八木 昭彦，西村 健，大和谷 厚*，和田 博*
（大阪大学医学部 精神医学，第二薬理*）

〔要約〕 ＨＰＬＣ蛍光法を用いて、NZB マウス及び Wistar ラットの松果体インドール化合物の日内変動と、これに対する明期光強度の影響を検討した。

8時～20時を明、20時～8時を暗とする明暗条件下で３週間飼育した NZB マウスを一定時間毎に断頭して、松果体を取り出し、インドール化合物を系統的に定量した。NZB マウス松果体では serotonin (5HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA), 5-hydroxytryptophol (5HTOL), N-acetylserotonin (NAc5HT) の４種類のインドール化合物が分別定量できたが、melatonin (MLT) はいずれの時刻にも検出されなかった。

明期に 2000 lx の高照度で飼育した NZB マウスでは、10 lx の低照度で飼育したものに比べて暗期の NAc5HT の上昇が約１時間遅れていた。Wistar ラットの MLT、NAc5HT にも明期の光強度によって同様の変化がみられ、明期の光強度が、松果体インドール化合物のリズムに影響を与えることが確認された。

【はじめに】 松果体は、生体のリズムの調節に重要な役割を果たしている。特に松果体の MLT は、その含量が著明な日内変動を示すことが知られており、光と MLT の関係について様々の研究が行なわれているが、従来の研究の多くは、明期の長さと MLT の変動との関係を検討したもの、あるいは、暗期に光刺激を行なった場合の MLT の変動について検討したものであり[5]、明期の光強度と暗期の MLT の変動との関係について検討したものはほとんどない。

ところで、近年、感情障害の一亜型として、冬季にうつ状態を呈する季節感情障害（ＳＡＤ）が注目されているが、ＳＡＤの治療法として、朝、あるいは夕方に、患者を強い光に曝露する光療法が提唱されている。そして、その作用機構として、強い光によって、患者の生体リズムになんらかの変化を起こしている可能性が想定されており、光療法を受けた患者では、うつ状態の改善にともなって、血中 MLT の上昇の位相が遅れるとの報告もみられる[3]が、これを裏づける基礎的研究は十分ではない。

我々は、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）蛍光法を用いて、ラット及び、MLT を欠損している NZB マウスの、松果体インドール化合物を、系統的に定量し、これに対する明期光強度の影響を検討した。

【対象と方法】 実験には、雄の NZB マウスおよび Wistar ラットを用いた。７週令の動物を購入し、8時～20時を明、20時～8時を暗とする明暗恒温条件下で３週間飼育した後、実験に供した。なお、この際、動物を、通常の照明強度（50～70 lx）で飼育した群（Ｎ群）以外に、明期の照明強度によって２群に分けた。高照度照明群（Ｂ群）では、40W 白色蛍光灯８本を装着した照明装置を用い、ケージ内の照度が約 2000 lx となるように調整した。低照度照明群（Ｄ群）は、ケージ内の照度が約 10 lx となるようにした。両群とも同一飼育室で飼育し、ケージ交換も同時に行なった。食物、水は自由に摂取させた。実験当日は、動物を一定時間毎に断頭致死せしめ、速やかに、氷上で、松果体を取り出し、測定まで -80℃で凍結保存した。なお、マウスの場合には、松果体を直上の頭骨とともに取り出した。暗期には写真用赤外線ランプのみの照明下で断頭した。

インドール化合物の定量には、ＨＰＬＣ蛍光法[1]を用いた。松果体に３％過塩素酸（0.1%アスコルビン酸含有）を、ラットでは100μl、マウスでは50μl加え、超音波破砕、遠沈後、その上清の一部をＨＰＬＣに注入した。ＨＰＬＣの固定相には逆相系充填剤、移動相には酢酸ナトリウム緩衝液とメタノールを混合した液を用い、メタノール濃度 10～50% で30分間の直線勾配溶出を行なった。カラムからの溶出液にオンラインでオルトフタルアルデヒド及び硫酸を加え、テフロンチューブ内で加熱後、生じる蛍光を蛍光計で検出した。実験１では、Ｎ群のマウスの松果体インドール化合物を２～４時間毎に24時間にわたって測定した。実験２では、Ｂ群及びＤ群のマウスの松果体インドール化合物を、22:00～10:00まで４時間毎に測定した。実験３では、Ｂ群及びＤ群のマウスの松果体インドール化合物を、2:00～5:00まで１時間毎に測定した。実験４では、Ｂ群及びＤ群のラットの松果体インドール化合物を、22:00～2:00まで、１～２時間毎に測定した。

【結果および考察】 ラット松果体では、5HT、5HIAA、5HTOL、NAc5HT、MLT の５種類のインドール化合物が分別定量された。NZB マウスでは、MLT は、明暗いずれの時刻にも検出されず、NZB マウスは、BALB/C や C57BL などのマウスと同様に MLT を欠いているものと考えられる。しかし、NAc5HT は存在しており、N-acetyltransferase (NAS) 活性は有していると考えられ、この点、NAS および hydroxyindole-O-metyltransferase (HIOMT) の両酵素とも欠損していると報告されている他のマウスとは異なっている[2]。

Fig.1 に、NZB マウス松果体のインドール化合物の日内変動を検討した実験１の結果を示した。5HT、5HIAA、5HTOL、NAc5HT のいずれにも日内変動が見られた。このうち、NAc5HT は、暗期開始６時間頃より上昇し始め、ピークに達した後、暗期終了直前には完全に低下するというパターンを示した。これは、シリアンハムスターの MLT の日内変動のパターン（Reiterのtype I[4]）と同様であった。一方、5HT、5HIAA、5HTOL は、いずれも、明期開始２時間後の午前10時にピークが見られた。

Tab.1 には、実験２の結果を示した。NAc5HT は、D群では、暗期開始６時間後の午前２時にすでに有意の上昇が見られるのに対して、B群では、上昇は見られず、明期の照明の強度が NAc5HT のリズムに影響を与えている可能性が考えられた。そこで、この点を更に検討するために、午前２時から午前５時の間の変動を、更に詳しく調べた（実験３）。Tab.2 に示すように、午前２時及び午前３時には、D群の NAc5HT 値は、B群より有意に高かったが、午前４時以後は、差は見られなかった。このことから、明期の強照度の照明が、暗期の NAc5HT の上昇を約１時間遅らせたものと考えられた。ところで、このような、明期の光強度の松果体インドール化合物への影響が、他の種の動物でも見られるかどうかを検討するため、Wistar系ラットを用いて同様の実験を行った。ラットは、暗期開始２～３時間目頃より MLT が上昇するパターン（ReiterのtypeII[4]）をもつため、暗期開始２～６時間後の松果体インドール化合物の変動を調べた（実験４、Tab.3）。D群では、22時ですでに MLT、NAc5HT が上昇を始め、23時には、ほぼ完全に上昇し終えるのに対して、B群では、23時でもほとんど上昇がみられず、23時の MLT、NAc5HT の値には、両群で著明な差がみられ、ラットにおいても明期の光強度が、松果体インドール化合物の日内変動に影響を与えることが確認された。最近、ヒトの季節感情障害に対する光療法が注目されているが、実験動物で明期の光強度が松果体のリズムに影響することが示されたことは、光療法の作用機構を考える上でも興味深く、今後、更に検討を加えたいと考えている。

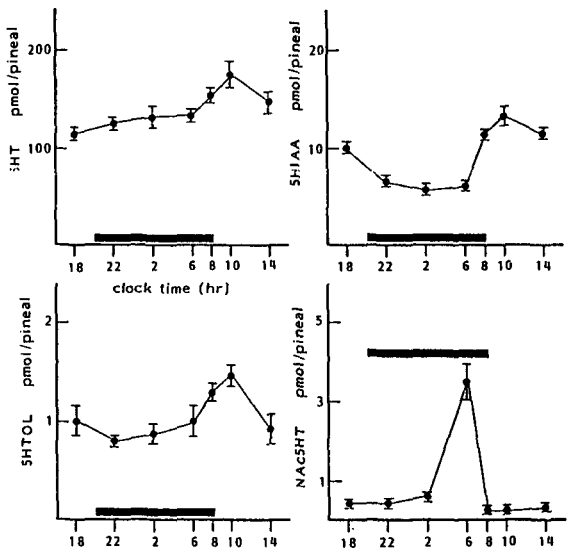



Fig.1 Diurnal variation of NZB mouse pineal indoles.
Values are the mean of four determinations ± SE.

| | 5HT | 5HIAA | 5HTOL | NAc5HT | |
|---|---|---|---|---|---|
| B22 | 102.3± 9.9 | 6.85±0.80 | 0.98±0.21 | 0.42±0.04 | |
| D22 | 125.6± 4.6 | 8.73±2.21 | 0.77±0.14 | 0.32±0.01 | |
| B2 | 100.9±10.2 | 7.08±0.46 | 0.83±0.17 | 0.28±0.02 | * |
| D2 | 132.3± 6.4 | 10.23±2.22 | 0.92±0.18 | 0.80±0.19 | * |
| B6 | 125.2± 4.9 | 7.03±0.44 | 0.75±0.13 | 2.74±0.70 | |
| D6 | 150.7± 7.0 | 10.43±0.74 | 0.94±0.08 | 2.44±0.45 | |
| B10 | 162.2± 5.7 | 12.30±1.04 | 1.27±0.30 | 0.18±0.02 | |
| D10 | 184.6±24.1 | 16.23±1.86 | 1.07±0.07 | 0.22±0.01 | |

mean±SE ( pmol/pineal )

Tab.1 Diurnal variation of NZB mouse pineal indoles
( 2:00 - 10:00 ) N=4 * p<0.05

| | 5HT | 5HIAA | 5HTOL | NAc5HT | |
|---|---|---|---|---|---|
| B2 | 103.9±9.9 | 6.07±0.63 | 0.91±0.16 | 0.69±0.10 | * |
| D2 | 118.1±3.6 | 7.23±1.65 | 1.19±0.45 | 1.02±0.04 | * |
| B3 | 115.0±6.8 | 5.08±0.37 | 0.91±0.26 | 0.90±0.08 | * |
| D3 | 122.3±5.2 | 6.35±0.55 | 0.73±0.07 | 1.57±0.18 | * |
| B4 | 128.1±10.8 | 5.58±0.48 | 0.58±0.06 | 2.85±0.05 | |
| D4 | 131.5±9.3 | 6.25±0.76 | 1.01±0.16 | 2.83±0.40 | |
| B5 | 116.4±3.0 | 7.68±0.51 | 1.39±0.17 | 2.81±0.35 | |
| D5 | 126.6±4.5 | 6.65±0.23 | 1.52±0.07 | 2.98±0.12 | |

mean±SE ( pmol/pineal )

Tab.2 Diurnal variation of NZB mouse pineal indoles
( 2:00 - 5:00 ) N=4 * p<0.05


1) 東 均、八木 昭彦、西村 健、大和谷 厚、和田 博 (1986) 神経化学, 26, 553-555

2) Ebihara,S., Marks,T., Hudson,D.J. and Menaker,M. (1985) Science, 231, 491-493

3) Lewy,A.J., Sack,R.L., Miller,L.S. and Hoban,T.M. (1987) Science, 235, 352-354

4) Reiter,R.J. (1983) in: The pineal and its endocrine role (Axelrod,J., Fraschini,F. and Velo,G.P. eds), pp. 227-241, Plenum

5) Reiter,R.J. (1985) Ann.N.Y.Acad.Sci., 453, 215-230


| | 5HT | 5HIAA | 5HTOL | NAc5HT | MLT | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B22 | 568.1±143.9 | 50.6±11.6 | 2.34±0.13 | 0.6± 0.1 | 1.0±0.2 | |
| D22 | 756.0±103.2 | 46.6± 5.0 | 2.43±0.41 | 32.3±25.2 | 3.2±1.2 | |
| B23 | 606.2± 17.9 | 31.5± 3.6 | 0.99±0.03 | ** 1.6± 0.9 | * 1.4±0.5 | ** |
| D23 | 570.3± 59.9 | 36.9± 8.0 | 1.58±0.04 | 42.3±16.3 | 11.8±2.6 | ** |
| B0 | 330.2± 75.7 | 26.1± 2.1 | 1.07±0.15 | 41.9± 4.1 | 11.6±0.7 | |
| D0 | 290.5± 83.1 | 30.4± 2.2 | 0.81±0.05 | 38.9± 7.8 | 10.9±2.2 | |
| B2 | 175.4± 37.3 | 22.5± 2.3 | 0.88±0.09 | 46.3± 2.6 | 11.7±1.8 | |
| D2 | 165.0± 31.5 | 22.4± 3.5 | 0.64±0.07 | 56.2± 9.5 | 14.0±2.8 | |

mean±SE ( pmol/pineal )

Tab.3 Diurnal variation of Wistar rat pineal indoles
( 22:00 - 2:00 ) N=3 ** p<0.01 * p<0.05

# 182 乳頭体部および前脳基底部破壊ラットの行動内分泌学的検討

新川久義，Ramon Cacabelos*，播口之朗，西村　健
（大阪大学・医・精神医学，Santiago Univ. Experimental Psychiatry Unit・Spain*）

〔要約〕
ヒスタミン(HA)作動系ニューロンの起始核が局在する乳頭体部およびコリン作動性ニューロンの起始核が局在する前脳基底部をイボテン酸により破壊し，ステップダウン式受動的回避反応を調べるとともに，脳内各部のcholine acetyltransfelase(CAT)活性およびHAにより神経修飾をうけると考えられるバゾプレッシン(VP)含量を測定し，比較検討した．その結果，乳頭体部の破壊は記憶の獲得障害を生じるが，反復学習により獲得した記憶の保持および想起を障害しなかった．前脳基底部破壊は記憶の獲得と保持あるいは想起の両方を障害した．また，乳頭体部破壊は脳内各部の CAT活性に影響を与えず，神経下垂体および正中隆起部のVP貯留と被殻・尾状核へのVP放出障害をもたらした．前脳基底部の破壊は脳内各部のVP含量に殆ど影響を及ぼさず．前頭葉皮質の CAT活性を低下させた．以上の結果は，HA作動系は視床下部・下垂体系の神経ペプチドや神経伝達物質を修飾することによって間接的に記憶の獲得に関わっているのに対し，コリン作動系は前頭葉皮質を通して直接的に記憶の獲得・保持あるいは想起に関わっている可能性を示唆するものである．

［目的］神経心理学的立場から記憶に関わる興味ある部位として乳頭体部，前脳基底部，前頭葉皮質，海馬等があるが，乳頭体部はまたHA作動系ニューロンの起始核の局在部位として注目を集めている．また，HAは記憶と関連が深いと考えられているVPを神経修飾することが報告されている (3)．前脳基底部はコリン作動性ニューロンの起始核の局在部位であり，そこから前頭葉皮質や海馬へも投射している．そこで今回我々は，イボテン酸により両側性に乳頭体部と前脳基底部をそれぞれ破壊したラットを作製し，自室で開発した小動物行動観察装置(OUCEM-86)(1) 上のステップダウン式受動的回避反応課題の成績と脳内各部のVP含量および CAT活性の測定結果とを比較検討し，それらの物質の記憶機能に関わる可能性を検討しようとした．
［方法］一群25～30匹の雄ウィスターラット（日本動物 180～200g）を用いた．ラットをネンブタール麻酔後，2μlの生理食塩水に溶解した2μgのイボテン酸を両側の乳頭体部および前脳基底部にステレオ下に注入し，一か月の回復期間後，オープンフィールド課題を実施し，対照群との間で運動量の差のないことを確認後，次の受動的回避反応を実施した．観察装置の内部面積は2304cm2(48x48cm)であり，その中央に24x24x2cm のステップを置いた．観察時間は１試行 5分で，第１日，第２日，第３日にステップ周囲の床面に 1mAの電流を流して獲得試験とし，第８日，第９日，第10日に電流を切って保持試験とした．尚，保持試験は第３日の獲得試験で95% 以上ステップ上に留まるラットに対して実施した．この装置により，ステップ中央においたラットがショック領域に入るまでの潜時および毎分ごとのステップ上の滞在時間を自動記録した．VPの測定はDe Wied の教室より得た抗体を用いたRIAにより測定し，CAT活性はFonnum(5)の方法に基ずいて14C-Acetyl CoAを用いて測定した．統計学的解析にはANOVAのStudent's t を用いた．
［結果］乳頭体部破壊は獲得試験時の滞在時間を短縮した．その傾向は特に第２日に有意であった．しかし，２回の獲得試行により，第３日で対照群との差は消失し，殆ど全時間ステップ上に留まった．保持試験においては対照群との間に差を認めなかった．前脳基底部破壊も獲得試験中のステップ上滞在時間を短縮したが，第３日で対照群との差は消失した．しかし，保持試験中滞在時間は対照に比べ有意に短縮していた (Fig.1)．乳頭体破壊によって脳内VP含量は正中隆起部および神経下垂体で上昇し，被殻・尾状核部で減少した (Table.1)．しかし，脳内各部のCAT 活性に何ら影響を及ぼさなかった．前脳基底部破壊は，脳内各部のVP含量に有意な変化を与えなかったが，前頭葉皮質のCAT活性を有意に減少した．海馬のCAT活性は対照との間で有意変化を認めなかった(Table.2)．
［考察］我々は乳頭体の破壊が視床下部，神経下垂体，前頭葉皮質，海馬等のHA含量を有意に低下し(6)，また，HAの合成酵素の非可逆的阻害剤であるα－フルオロメチルヒスチジン投与が副腎摘出によりもたらされるVPの下垂体から血中への放出を有意に抑制することを報告してきた(3)．また，この部分の障害は臨床上特徴的な記憶力障害を呈することが報告されている．HAの神経修飾を受けるVPは，De Wied ら (4)により記憶を助長する物質として研究されてきた．Shagal(7) は，VPの記憶に及ぼす影響は意識を改善することによる間接的作用である可能性を提唱している．今回の結果からも乳頭体破壊によってVPが影響を受ける部位は視床下部・下垂体系および被殻・尾状核に限局されていることからこの部の障害が意識障害による二次的効果である可能性が示唆される．前脳基底部のコリン作動性ニューロンは，前頭葉皮質にも海馬にも投射していることが知られている．アルツハイマー病ではこの部位に相当するマイネルト基

底核のコリン作動性ニューロンの脱落と皮質および海馬での著明なCAT 活性の減少がみられている．今回，この部の破壊は海馬のCAT 活性に影響せず，前頭葉皮質のCAT 活性を減少し，かつ，記憶の獲得・保持あるいは想起の障害を引き起こした．このことはコリン作動系の記憶に関わる部位として前頭葉皮質は重要な部位であり，乳頭体破壊による記憶障害とは内分泌学的結果からもその機構が異なるものと考えられる．

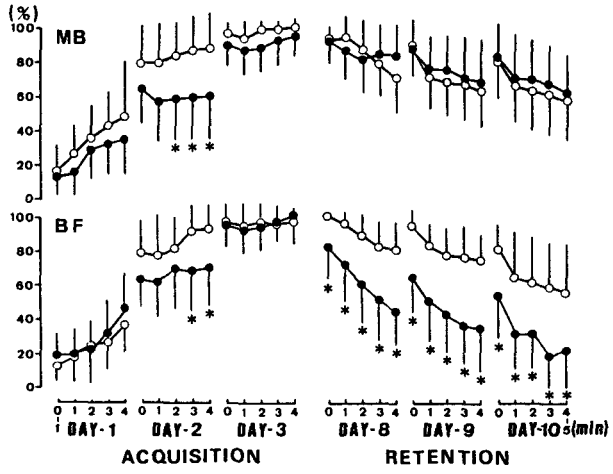



**Fig.1 Percentage stay time in step area on mammillary body and basal forebrain destruction.**
MB:Mammillary body destruction
BF:Basal forebrain destruction
● :destructed group
O :sham-operated group
＊:p<0.05 vs sham-operated rats
n=25-30 rats/group

**Table.1 The change of arginine vasopressin content on mammillary body and basal forebrain destruction.**

| | | Mammillary body | | Basal forebrain | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | experiment | control | experiment | control |
| Anterior hypothalmus | ($\times10^2$) | 2.57±0.39 | 2.72±0.39 | 2.48±0.59 | 3.20±0.62 |
| Median eminence | ($\times10^3$) | 4.11±2.09* | 2.48±0.76 | 2.65±0.95 | 2.66±0.81 |
| Adenohypophysis | ($\times10$) | 0.68±0.12 | 0.68±0.11 | 0.70±0.05 | 0.61±0.16 |
| Neurohypophysis | ($\times10^5$) | 1.20±0.35* | 0.75±0.37 | 0.69±0.26 | 0.78±0.20 |
| Frontal cortex | | 4.39±1.11 | 4.22±1.87 | 4.27±1.73 | 4.35±1.13 |
| Parietal cortex | | 2.01±0.79 | 2.19±0.38 | 2.23±1.12 | 2.30±0.56 |
| Temporal cortex | | 4.39±1.39 | 4.28±1.90 | 4.31±1.19 | 4.44±0.66 |
| Caudate-putamen | | 2.13±1.00* | 3.91±0.91 | 3.11±0.62 | 3.72±0.54 |
| Hippocampus | | 2.23±0.63 | 2.20±0.95 | 1.82±0.39 | 0.22±0.54 |

* :p<0.05 vs control, n=8 rats/group, Unit:μU/mg protein

**Table.2 The change of choline acetyltransferase activity on mammillary body and basal forebrain destruction.**

| | Mammillary body | | Basal forebrain | |
|---|---|---|---|---|
| | experiment | control | experiment | control |
| Frontal cortex | 390.4± 62.3 | 376.1± 61.8 | 303.1± 41.2** | 380.1± 41.3 |
| Parietal cortex | 343.5± 37.8 | 302.6± 48.2 | 298.7± 47.4 | 332.5± 48.1 |
| Temporal cortex | 481.3± 84.9 | 468.4±102.4 | 493.7± 92.0 | 462.4±114.2 |
| Caudate-putamen | 1016.6±204.4 | 888.0±203.7 | 953.5±109.0 | 1001.0±200.7 |
| Hippocampus | 376.9± 54.0 | 367.4± 40.8 | 364.2± 51.2 | 400.5± 46.0 |
| Thalamus | 481.6±102.7 | 447.2±100.1 | 485.7± 53.8 | 458.0±106.8 |

**:p<0.005 vs control, n=15 rats/group, Unit:pmol/mg tissue protein/min

(1)Cacabelos,R.,Niigawa,H. et al(1988)Hormone Res. 29:129-132
(2)Cacabelos,R.,Niigawa,H. et al(1988)Endocrinology. 122:1269-1275
(3)Cacabelos,R.,Yamatodani,A. et al(1987)Neuroendocrinology. 45:368-375
(4)De Wied,D. and Van Ree,J.M.(1982)Life Sci.31:709-719
(5)Fonnum,F. (1969)Biochem.J.115:465-472
(6)Niigawa,H.,Yamatodani,A. et al(1988)Brain Res. 459:183-186
(7)Shagal,A.(1984) Psychopharmacology. 83:215-228

183 組換え型ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（rhbFGF）のラット脳アストログリア細胞における神経成長因子(NGF)誘導作用

福元 宏明 、垣花 満 、寿野 正広
（武田薬品、生物研究所）

〔要約〕
ラット脳アストログリア細胞を用いて、ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（rhbFGF）の 神経成長因子(NGF)誘導作用について検討した。生後２日目のラット脳（海馬、及び 大脳皮質）より得たアストログリア細胞(90%以上)を血清存在下で培養し、rhbFGF添加後無血清培地で２４時間培養し、培地中に分泌されてくる NGF量を、酵素免疫測定法により測定した。 その結果、rhbFGF は、アストログリア細胞からの NGF の分泌を濃度依存的に誘導した。至適濃度は 3-10 ng/ml で、約２倍の分泌促進作用が認められた。経日変化を調べたところ、１日目に急速な NGF の誘導が認められた。次にアストログリア細胞の増殖と、 NGFの誘導との関係を調べる目的で、血清、及び 細胞密度の 影響について検討した。その結果、血清のない方が、また細胞密度の高いほど、NGF の誘導量は多かった。 以上の結果から、rhbFGF は、ラット脳アストログリア細胞において NGFの分泌を誘導する作用を有し、その作用発現には、アストログリア細胞が静止期にある必要があるものと推察される。

［緒言］ アストログリア細胞は、脳に多く存在し、その多岐にわたる作用から注目を集めているが、その機能の詳細は明らかではない。近年、アストログリア細胞は NGFをはじめとして多くの神経栄養因子を分泌し[1)2)]、神経細胞の生存・維持 に重要な役割を果していると考えられている。bFGF は、アストログリア細胞に作用し 増殖作用をもつことが知られている[3)]。今回、我々は ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(hbFGF)が、ラット脳アストログリア細胞に作用して NGF の分泌を誘導することを見出したのでその諸性質について報告する。

［方法］ アストログリア細胞の培養は、McCarthy と de Vellis の方法[4)]に準じて、ラット 脳の海馬 あるいは、大脳皮質より調製した。37℃、 5% $CO_2$下 10%FCS/DME/F12培地で 10日間培養の後あらかじめ ポリ-L-オルニチンでコートした 48 wellプレートに、(特に断わらない限り)$1\times10^5$ cells/cmになるようにまき、さらに3日間 2次培養をした。アストログリア細胞の同定は、GFAPに対するモノクローナル抗体 及び、Vectastin-ABC キット(Vector Lab. 社)を用いた免疫化学的染色法により行なった。 NGFの定量は、Korschingら[5)]及び Larkforsら[6)]の方法に準じた酵素免疫測定法を用いて行った。タンパクの定量は、Bradfordの方法[7)]に従って行なった。rhbFGFの NGF誘導作用を測定する場合には培養液を除去後 0.5% BSAを含むDME/F12培地 (無血清培地)にて、1回洗浄の後、同培地で溶解したrhbFGFを well あたり、500μl 添加した。経日変化を調べる実験以外は,24時間培養後に培養上清中のNGFを定量した。NGFの量は、単位タンパク質(mg)当たりで表現した。

［結果］ 使用した細胞がアストログリア細胞であるか否かを調べるために、アストログリア細胞の骨格タンパク質である GFAP をマーカーとして、免疫染色をおこなった。その結果、90% 以上の割合でアストログリア細胞が得られたことがわかった。ラット脳大脳皮質アストログリア細胞に rhbFGF(0.01-100 ng/ml)を添加し、 24時間培養した後 培養上清中に分泌してくる NGF量を測定したところ、rhbFGFの用量に依存して、NGF の分泌を促進した(Fig.1)。 Well 当たりのタンパク量は、ほとんど変動しなかった。分泌量が最大となる rhbFGFの濃度は、3-10 ng/mlであり、約 2倍の分泌促進が認められた。

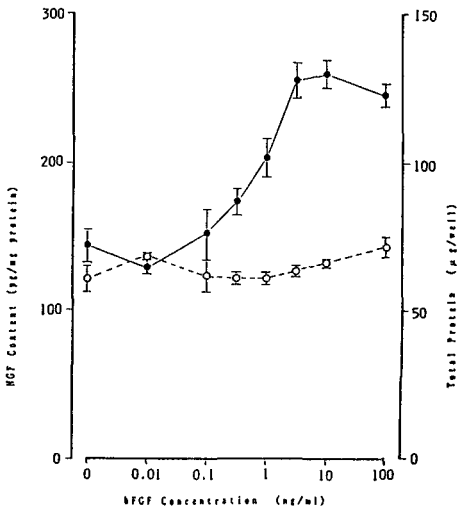



Fig.1 Induction of NGF in astrocytes from rat brain cortex by various concentration of rhbFGF.

Table 1 Effects of serum and cell density on the induction of NGF by rhbFGF

| serum | cell density (cells/cm²) | rhbFGF | NGF (pg/mg protein) | % of control |
|---|---|---|---|---|
| - | $1.0\times10^5$ | - | 167.0± 6.8 | 217±9 |
| | | + | 362.6±14.6 | |
| | $5.0\times10^4$ | - | 136.0±10.0 | 208±14 |
| | | + | 283.4±19.2 | |
| | $2.5\times10^4$ | - | 127.0± 7.4 | 151±18 |
| | | + | 193.0±22.2 | |
| + | $1.0\times10^5$ | - | 39.0± 3.2 | 189±7 |
| | | + | 73.6± 2.6 | |
| | $5.0\times10^4$ | - | 38.2± 3.6 | 138±6 |
| | | + | 53.4± 2.4 | |
| | $2.5\times10^4$ | - | 27.0± 2.6 | 93±5 |
| | | + | 25.2± 1.4 | |

さらに高濃度の100 ng/ml では、3-10 ng/ml の濃度に比べ若干分泌の低下が認められた。以上の結果は、海馬アストログリア細胞を用いた場合でもまったく同様であった。 次に rhbFGF(10 ng/ml)の作用の経日変化を調べた。血清の有無により作用の異なる可能性を考慮して、血清存在下、あるいは血清非存在下の2つの条件で調べた。その結果、無血清下 rhbFGF添加群では、1日目でcontrol群の約2倍の分泌をおこし、以後、その値を大きく越えることはなかった。 control群では、経日的に NGFの増加が認められた。血清存在下においても ほぼ同様の傾向を示した。次にアストログリア細胞の増殖状態と、NGFの分泌・誘導との関係を調べる目的で、血清と細胞密度の影響を調べた。すなわち、2次培養時に 種々の濃度の細胞をまき、培養 3日目に血清下あるいは無血清下で、rhbFGF(10 ng/ml)を 24時間処理した。その結果、細胞密度が高いほど また、無血清の方が、NGF の誘導量は多かった。また、分泌される NGF の絶対量は、無血清下の方が血清下の方よりも、3倍以上高かった。また細胞密度の高いものほどよく分泌された(Table 1)。

［考察］ アストログリア細胞に rhbFGF を添加すると、その用量に依存して NGF分泌が促進された。本条件下では細胞の増殖がほとんど認められないことから、NGF が rhbFGFにより誘導されたものと考えられる。bFGFは、グリア細胞に対する増殖因子であるが[3]、本条件下では、添加時間が短かったこと、細胞が、confluent な状態で接触疎外がかかり増殖しにくい条件であったことが、rhbFGFによる細胞の増殖の認められなかった原因であろうと思われる。 rhbFGF の至適濃度は、3-10 ng/ml(約200-600pM) であった。この濃度は、bFGF の低親和性受容体の解離定数に一致することから、rhbFGF の作用は、低親和性受容体を介した現象であることが示唆される。高濃度の rhbFGF を添加した場合、最高値よりも若干の NGFの誘導低下が認められたが、これは一種の down regulation がおこった可能性が考えられる。rhbFGF によるNGF の誘導が、アストログリア細胞の増殖状態とどのような関係があるかを明らかにする目的で、血清 及び 細胞密度の影響を調べた。その結果、無血清で、細胞密度の高い方が、より著明な NGF の誘導が認められた。この結果は、rhbFGF による NGF の誘導の為には、アストログリア細胞の増殖が抑制され 静止状態にある必要があることを示唆する。

［文献］ 1). Furukawa, S., Furukawa, Y., Satoyoshi, E., and Hayashi, K. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 136, 57-63
2). Westermann, R., Hardung, M., Meyer, D.K., Ehrhard, P., Otten, U., and Unsicker, K. (1988) J. Neurochem. 50, 1747-1758
3). Westermark, B., and Wasteson, A. (1975) Adv. Metab. Disord. 8, 85-100 4). McCarthy, K.D., and J. de Vellis. (1980) J. Cell Biol. 85, 890-902 5). Korsching, S., and Thoenen, H. (1987) Methods in Enzymology 147, 167-185
6). Lorkfors, L, and Ebendal, T. (1987) J. Immun. Meth. 97, 41-47 7). Bradford, M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254

184 組換え型ヒト塩基性線維芽細胞成長因子の初代培養中隔野および海馬神経細胞に対する神経栄養効果について：マウス神経成長因子との比較

垣花 満・寿野 正広

武田薬品・生物研究所

〔要約〕

ラット胎仔脳より採取した中隔野および海馬神経細胞を無血清完全合成培養液中で、低密度あるいは高密度で培養し、rhbFGFおよびNGF の神経栄養効果を比較した。低密度培養時、中隔野および海馬神経細胞は、seeding 後約１週間後までに死滅した。rhbFGFは、いずれの細胞に対しても生存延長作用を示し、そのED$_{50}$値は10-20 pg/ml であった。rhbFGFは、測定した 25-1600 pg/mlの濃度で24時間培養した海馬神経細胞からの neurite伸長を促進した。しかし、その用量依存性は明確ではなかった。中隔野神経細胞に対するneurite 伸長作用は海馬神経に対する作用より軽度であった。また、 rhbFGF 1 ng/ml 以上の濃度ではアストログリア細胞の増殖が認められた。NGF(100 ng/ml)は、生存延長作用あるいは neurite伸長作用を示さなかった。高密度培養時， rhbFGF は1 ng/mlの濃度で両神経細胞の ACh 量を増加させた。しかし、同時にタンパク量の増加も認められ、ACh 量の増加はアストログリア細胞の増加を介した二次的な作用によることが示唆された。NGF (100 ng/ml) は、タンパク量を増加させることなく中隔野神経細胞の ACh 量のみを増加させた。以上、中隔野および海馬神経細胞に対して、rhbFGFは神経栄養効果を示し、低密度培養時に両神経細胞の生存を延長し、また、細胞からの neurite伸長を促進した。一方、NGF は高密度培養時の中隔野 ACh 神経細胞の分化を促進した。

［目的］ 最近、上皮および中胚葉由来細胞の成長因子として良く知られている bFGF [3] が大脳皮質や海馬など多くの中枢神経細胞および末梢神経細胞に対して神経栄養効果を示すことが明らかとなってきた[7,8]。さらに、中隔野－海馬コリン系の連絡路であるfimbria-fornixを切断後、bFGFを脳室内に持続注入することにより、中隔野 ACh神経細胞の変性・脱落を抑制することが報告されている[1]。この作用はNGF において良く知られており[5]，bFGFが in vivo で NGF様作用を有することが示唆された。In vivo および in vitro の実験結果およびbFGFが脳内に存在することを考えると、bFGFは脳の発達および神経細胞の分化に重要な役割を担っていると思われる。bFGFとNGF の神経栄養効果を比較することは、これらNTF の神経系に対する生理作用を理解する上で重要であると考え本研究を行った。

［方法］ 中隔野は17日目の、海馬は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[4]。DME/F12/N2培養液[2] に浮遊させた中隔野あるいは海馬神経細胞を、生存延長作用と neurite 伸長作用の測定時には低密度(ca. 1.67x10$^4$ cells/cm$^2$ ) およびACh 量の測定時には高密度( ca. 1x10$^6$ cells/cm$^2$ ) の割合で各々、種々の処理を施した組織培養用培養皿（培養面積 9 cm$^2$ 、Falcon) および poly-L-ornithine (100$\mu$g/ml) 処理を施した 24-wellプレート (2 cm$^2$ , Falcon) と48-well プレート (1 cm$^2$ 、Costar) に seeding した。４時間培養後、0.1% ovalbumin/PBSに希釈した rhbFGF および NGFを添加した。経日的に 2.5% glutaraldehyde 溶液で固定した。1 培養皿当り12か所、1 か所 1.126 mm$^2$ 当りの生存細胞数を顕微鏡下に計測し、平均生存細胞数を求めた。この値を 800倍することから全生存細胞数を算出した。神経細胞からのneurite の長さを測定する時は、24時間後固定し、１枚の培養皿当り２部位、薬物１用量当り８部位を写真にとり、同時に撮影したミクロメーターを“物差し”として各細胞の一番長い neuriteの長さを計測した。ACh 量の測定には中隔野および前脳基底部神経細胞を合わせて用いた。４日間培養後、既報[5] に従いACh 量の測定を行った。

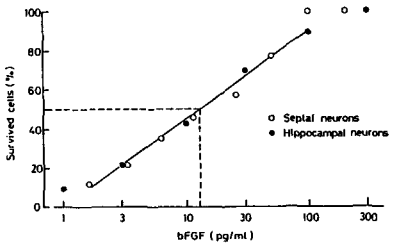
［結果および考察］ いずれの細胞も seeding後２－３日間は、細胞体は増大し、neurite は長く伸長した。しかし、この間も細胞数は徐々に減少した。その後、生存している細胞はさらに neuriteを伸長したものの、細胞数は低下し、seeding 約１週間後までに大部分の細胞は死滅した。中隔野神経細胞では、seeding 24時間後の細胞数は対照群、NGF(100 ng/ml)群および rhbFGF (100 pg/ml) 群の３群間で変わらなかった。その後、対照群および NGF群の細胞数が３日目および６日目と経日的に低下したのに対して、rhbFGF群では細胞数の低下が有意に抑制された。海馬神経細胞に対する NGFおよび rhbFGF(400 pg/ml)の作用は中隔野神経細胞に対する作用と同様であった。しかし、海馬神経

Abbreviations: ACh, acetylcholine; bFGF, basic fibroblast growth factor; CAT, choline acetyltransferase; NGF, nerve growth factor; NTF, neurotrophic factor; PBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; rhbFGF, recombinant human basic fibroblast growth factor

細胞の場合には、3日目においても対照群の生存率が高く、3群間で差は認められなかった。今回用いた 100あるいは 400 pg/mlの rhbFGF の添加ではグリア細胞や線維芽細胞の増殖は認められなかった。しかし、rhbFGFの濃度を1 ng/ml にまで増加させると、増殖している細胞の存在が認められた。rhbFGF 存在下に5日間培養した中隔野細胞をsubcultureし、血清存在下にさらに5日間培養した。GFAPに対するモノクローナール抗体を用いて免疫組織化学的に染色したところ大部分の細胞が陽性であり、rhbFGF存在下に増殖してくる細胞は主にアストログリア細胞であることがわかった。rhbFGFは用量依存的に両神経細胞の生存数を増加させ、$ED_{50}$値は 10-20 pg/mlであった（図－1）。培養皿表面を poly-L-ornithine, heparinおよび lamininで coatingした後，海馬細胞をseeding し rhbFGF(400 pg/ml)のneurite 伸長作用を測定した（図－2）。rhbFGFによりいずれにおいても長い neuriteを有する細胞の割合が増加した。中でも、poly-L-ornithine-coatingした培養皿を用いた時に、対照群とrhbFGF群間の差は最も顕著であった。この条件下に rhbFGF の neurite伸長作用の用量依存性を調べたところ、25-1600 pg/ml のいずれの用量でも、 50 μm 以上の長い neuriteを有する細胞の割合が増加した。しかし、その用量依存性は明確ではなかった。中隔野神経細胞からの neurite伸長作用は海馬神経細胞で観察された作用よりも軽度であった。NGF (100 ng/ml) は、neurite 伸長作用を示さなかった。NGF が無血清完全合成培養液中で初代培養した中隔野神経細胞の ACh量およびその合成酵素 CAT活性を経日的にまた用量依存的に増加させること、さらに、この時タンパク量には影響を与えないことをすでに報告した[5] 。今回まず、中隔野神経細胞の ACh量に対する rhbFGF の作用を検討した。rhbFGFは1 ng/mlにおいてのみ、タンパク量当りの ACh量を増加させた。この1 ng/mlを用いて NGF (100 ng/ml)の作用と比較したところ（表－1）、rhbFGFは中隔野および海馬神経細胞のいずれに対してもタンパク量の有意な増加および増加傾向と共に ACh 量を有意に増加させた。一方、NGF はタンパク量を変化させることなく、中隔野神経細胞の ACh量のみを増加させた。中隔野神経細胞のACh 量に対する作用は NGFの方が強かった。

無血清完全合成培養液中で低密度培養した中隔野および海馬神経細胞に対して、hbFGF は 400 pg/ml以下の濃度で神経栄養効果を示し，細胞の生存を延長し、neurite を伸長した。1 ng/ml 以上の濃度では、アストログリア細胞の増殖が認められた。高密度培養時の rhbFGF 1 ng/mlにおけるACh 量の増加はアストログリア細胞の増加を介した二次的な作用によるものと思われた。しかし、さらに高濃度の 10 および 100 ng/mlでは ACh量増加作用は認められないこと、また、rhbFGFの ACh細胞に対する直接作用の可能性も否定できないことから、今後グリア細胞の増殖を抑制した条件下で検討することが必要であろう。

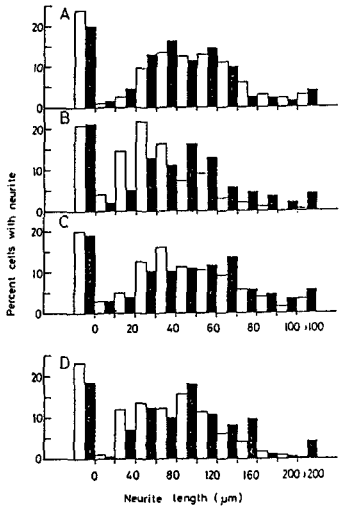
図－1
生存延長作用
（用量依存性）




表－1　ACh 量に対する作用

| | Protein | ACh content | |
|---|---|---|---|
| | μg/well | p mol/well | p mol/mg protein |
| Septal-basal forebrain neurons | | | |
| Control | 113.9±0.3 | 20.6±0.5 | 180.9±5.0 |
| rhbFGF 1.0 ng/ml | 121.3±1.7** | 24.8±0.3** | 204.3±2.4** |
| NGF 100 ng/ml | 112.3±0.2 | 28.8±0.4** | 256.8±4.1** |
| Hippocampal neurons | | | |
| Control | 210.0±4.0 | 1.60±0.07 | 7.64±0.31 |
| rhbFGF 1.0 ng/ml | 217.5±2.1 | 2.17±0.17** | 9.95±0.77* |
| NGF 100 ng/ml | 206.6±2.1 | 1.47±0.05 | 7.14±0.26 |

Mean±SEM, N=5-6




図－2　海馬神経細胞からの neurite伸長に対する rhbFGF の作用
A, non-coating; B, polyornithine; C, heparin; D, laminin
Control(□); rhbFGF(400 pg/ml,■)

［文献］ 1)Anderson, K.J. et al. Nature 334, 360-361 (1988) 2)Bottenstein, J.B. and Sato, G.H., Proc. Natl. Acad. Sci.USA 76, 514-517 (1979) 3) Gospodarowicz, D. et al., Endocrine Reviews 8, 95-114 (1987) 4) Hatanaka,H. and Tsukui, H., Develop. Brain Res. 30, 47-56 (1986) 5) Kakihana, M. and Suno, M. Bull. Jpn. Soc.Neurochem. 27, 166-167 (1988) 6) Hefti, F. J. Neurosci. 6, 2155- 2162 (1986) 7) Unsicker, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5459-5463 (1987) 8)Walicke,P.A. J. Neurosci. 8, 2618-2627 (1988)

# 185 グリア細胞の増殖と分化に及ぼすフォルスコリンの効果

山口知子、＊Gerard Rebel＊Paul Mandel
（東女医大・生化、＊Centre de Neuro-chimie,C.N.R.S.,Strasbourg,France）

〔要約〕
中枢神経細胞の初代培養におけるグリアの増殖を制御しかつ分化を促進する因子はニューロンの機能を支持する重要な鍵をにぎっている。細胞の核におけるpoly-ADP-リボシル化酵素は、細胞の成長や分化にかかわる遺伝子の発現を制御している。cAMPを特異的に賦活しかつ細胞増殖を抑制することが知られているフォルスコリンが培養グリア細胞の増殖と分化にどのような影響をおよぼすかについてラットとニワトリのグリアの初代培養で検討したところ、フォルスコリンはラットのグリア細胞のpoly-ADP-リボシル化酵素活性により促進効果が認められた。

ＮＡＤを基質とするタンパクのＡＤＰ－リボシル化が細胞膜、細胞質、ミトコンドリアおよび核でおこることが知られている。とくに核タンパクにおけるポリ－ＡＤＰ－リボシル化反応は細胞の増殖期よりはむしろ細胞の分化を調節していることが知られている[1]．グリアにおけるポリ－ＡＤＰ－リボシル化反応を細胞増殖を抑制することが知られているフォルスコリン[2]によって初代培養細胞の増殖期ならびにconfluent期にどのような効果を持つか、また種差による差異を検討した。

〔実験方法〕

グリア細胞培養法：新生ラットおよびニワトリの１４日令胚の全脳の細胞を無菌的に８２μｍのナイロンメッシュを通過させてバラシて８ｃｍ径の培養皿に細胞約１０$^{6}$ケ／ml,ＤＭＥＭ，10%ＣＦＳを加えて培養液を３日目ごとに交換した。ニワトリ胚のグリアは７－９日目を増殖期、１８－１９日目をconfluent期として、またラットのグリアは８－１０日目を増殖期、２１－２６日目をconfluent期として集め、フォルスコリンは１０$^{-6}$-１０$^{-4}$ Ｍの濃度で培養液に加えた。

ポリ－ＡＤＰ－リボシル化反応　：培養細胞を冷生理食塩水に懸濁し、軽い遠心で細胞を集め、再び生食水で洗って細胞を約2x１０$^{6}$ケ／ml,低張Berger緩衝液（0.01M,Tris-HCl,pH 7.8,1mM EDTA,4mM $MgCl_2$,30 mM 2-Mercaptoethanol）中で4°C，２０分処理する。軽い遠心で集めた細胞を等張Berger緩衝液に２．５x１０$^{7}$ケ／mlになるように懸濁し、４０μｌを反応液（0.1% Triton-X100,10 nmoles NAD {[$^{3}$H]-NAD(specific activity:　　uCi/mmol)},Berger 緩衝液）で全量１２５μｌとして２５°C，１０分インキュベートして２ｍｌの冷５％ＴＣＡ，２％ピロリン酸ナトリウで反応を停止し、１００μｌのＢＳＡ（100 mg/dl)を加えて、沈渣をWhatman GF/Cのろ紙上に捕集して洗い、乾燥してｼﾝﾁﾚｰｼｮﾝｶｳﾝﾀｰで計測した。

タンパクおよびＤＮＡの定量：タンパクはLowry法、ＤＮＡはBurton法で測定した。

〔実験結果〕

右の表に示されているように、ラットのグリア細胞のconfluent期におけるフォルスコリンの　効果は１０$^{-4}$Ｍで特に４日間培養すると、細胞死が著明となるが、２４時間における効果は、ＤＮＡおよびタンパク当たりのポリ－ＡＤＰ－リボシル化酵素の活性はdose-dependentに２－３倍賦活化されることが認められた。培養細胞の形態変化は培養開始３時間から２４時間ぐらいの間にフォルスコリン添加群で，いわゆる”reactive glia”の像が認められたが、ニワトリ胚のグリアの培養細胞ではこのような形態変化は認められず、フォルスコリンの添加による細胞死が著しく、ポリ－ＡＤＰ－リボシル化反応の活性化は認められなかった。

< Effect of Forskolin for 24hrs >

| Conc. of F.K | DNA content/dish: ug DNA/dish | Protein content/dish: mg Prot/dish |
|---|---|---|
| 0 | 22.5±5.7 | 1.04±0.22 |
| $10^{-6}$M | 19.2±3.5 | 0.70±0.06 |
| $10^{-5}$M | 18.1±2.7 | 0.50±0.04 |
| $10^{-4}$M | 20.3±0.3 | 0.61±0.07 |

| Conc. of F.K | Poly ADP ribosylation: n mole/mg DNA | n mole/mg Prot |
|---|---|---|
| 0 | 3.51±0.16 | 0.18±0.06 |
| $10^{-6}$M | 4.58±1.04 | 0.19±0.02 |
| $10^{-5}$M | 7.53±1.66 | 0.41±0.06 |
| $10^{-4}$M | 9.02±1.44 | 0.60±0.03 |

< Effect of Forskolin for 4 days >

| Conc. of F.K | DNA content/dish: ug DNA/dish | Protein content/dish: mg Prot/dish |
|---|---|---|
| 0 | 21.0±1.3 | 0.42±0.11 |
| $10^{-6}$M | 16.8±0.4 | 0.35±0.01 |
| $10^{-5}$M | 18.2±1.7 | 0.47±0.01 |
| $10^{-4}$M | 6.9±1.5 | 0.075±0.02 |

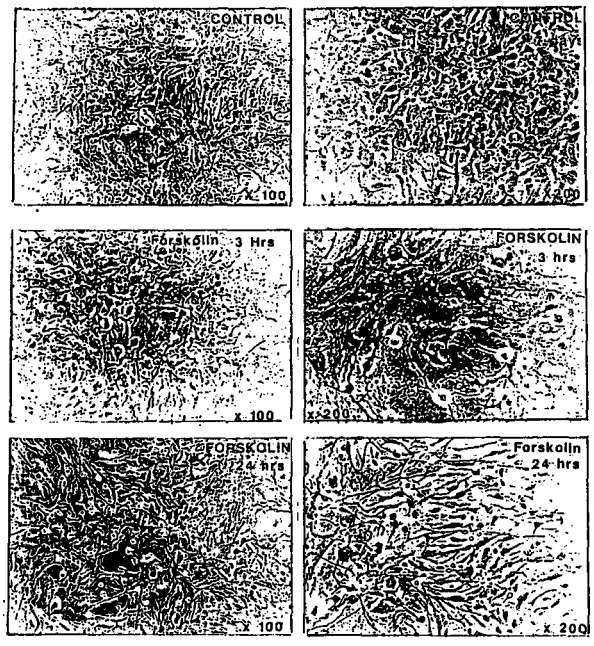
| Conc. of F.K | Poly ADP ribosylation: n mole/mg DNA | n mole/mg Prot |
|---|---|---|
| 0 | 5.16±0.15 | 0.27±0.08 |
| $10^{-6}$M | 3.67±0.09 | 0.18±0.03 |
| $10^{-5}$M | 3.23±0.73 | 0.12±0.02 |
| $10^{-4}$M | 6.90±1.57 | 0.64±0.19 |

〔考察〕

フォルスコリンはadenylate kinaseを賦活してcAMPを形成して細胞分裂を阻害し形態変化をある種の細胞にもたらせることがしられている。ラット脳におけるグリア細胞におけるＧＦＡＰの増加が報告されている(2)が、グリア細胞の分化の指標としてポリ－ＡＤＰ－リボシル化反応を種差で検討したところ、フォルスコリンの細胞分化に対する効果は哺乳類に特異的であることは興味あることと思われる。

EFFECT OF FORSKOLIN ON RAT GLIAL CELLS IN CULTURE

$10^{-4}$ M




〔文献〕

(1) Mandel P,Okazaki H and Niedergang C(1982) Progress in Nucl. Acid Res. and Mol. Biol. 27, 1-51.

(2) Kempski O,Wreblewska B and Spatz M (1987) Intl. J. Devel. Neurisci. 5,435-445.

# 186 カルシウム拮抗剤の血液脳関門透過の加齢変化

脇 初枝、近 一夫、田中康一、安藤 進
(東京都老人総合研究所生化学部)

〔要約〕
老若ラットにピペラジン系カルシウム拮抗剤を投与し、血液脳関門透過性に対する加齢の影響を調べた。若齢ラットでは、血中から微小血管内皮細胞、および内皮細胞から脳実質への２つの段階における薬剤の透過性には変化がなかった。ところが老齢ラットの場合、第１段階の取込み率は疎水性の大きいフルナリジンで相対的に高く、第２段階では逆に疎水性の小さいKB-2796 で高くなっていた。疎水性薬剤の血液脳関門透過性は加齢によって変化し、しかも毛細血管の内腔側と脳実質側とで異なる変化が認められた。

［はじめに］
血液脳関門の実質的な担い手は微小血管内皮細胞であるとされている。内皮細胞の加齢変化として、形態学的異常や、膜脂質組成、膜酵素活性、ホルモン感受性などの生化学的諸性質の変化が認められている(1)。親水性物質に対する血液脳関門透過性の変化も知られている。本研究では疎水性のピペラジン系カルシウム拮抗剤を用いて、血液脳関門透過性と脳実質への取込みに対する加齢の影響を調べた。カルシウム拮抗剤の脳への取込みの実体を明らかにすることは臨床上の意義もあると考えられる。

［実験方法］
３カ月齢と28カ月齢のラット（Fischer344，雌）にフルナリジン30mg/kg，KB-2796(鐘紡薬品研究所より恵与) 50 mg/kg を12時間間隔で３回経口投与した。初回投与から１，４，７，24，30時間後に採血を行った。最終投与から 6 時間後に脳を摘出した。脳の$P_2$画分の調製にはBooth & Clark の方法を用いた(2)。大脳$P_1$画分より超遠心法で得た微小血管を、0.25%コラゲナーゼ／ディスパーゼ処理した後、超遠心法で微小血管内皮細胞画分を得た。
カルシウム拮抗剤の定量は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で行った(5)。分析カラムはInertsil $C_8$，移動相にはアセトニトリル／20 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 5.5)(69:31)を用いた。カルシウム拮抗剤は210nm の波長で検出し、定量値はピークの高さを用いて計算した。

［結果と考察］
初回投与後のカルシウム拮抗剤の血中からの消失は、若齢、老齢ラットともにKB-2796 の方が速かった。最終投与後はフルナリジン、KB-2796 ともに血中への蓄積がみられ、特に老齢ラットでのKB-2796 の蓄積が顕著であった。Table 1 に最終投与から６時間後の血中および脳組織への薬剤の取込み量を示した。微小血管内皮細胞ではいずれの薬剤も老若間で取込みに有意の差はなかった。脳実質への取込みでは、フルナリジンでは老若間の差はなかったが、KB-2796 では大きな差が認められた。両薬剤の血中濃度は加齢により大きく差を生じているので、組織への取込み率をみるために血中、血管内皮、および脳$P_2$画分の濃度比を便宜的に採用した（Table ２）。血中から内皮細胞への取込み率はいずれの薬剤においても老齢ラットで減少しており、特にKB-2796 では21%にまで減少していた。一方、血管内皮から脳実質への透過性には加齢による変化がみられた。フルナリジンの場合には老若間で有意差はなかったが、KB-2796 では老齢ラットで２倍以上の増加が認められた。Table ２のA/B はフルナリジンとKB-2796 の取込み率の比であり、両薬剤の相対的膜透過性を示すものである。若齢ラットの場合、血中から血管内皮、血管内皮から脳実質のA/B は 1.2～1.3 と変わらない。ところが、老齢ラットでは第１段階の透過のA/B は 3.8とフルナリジンに高い選択性を示し、第２段階の場合は 0.5～0.6 でKB-2796 の方に高い選択性を示した。
薬剤の膜透過性の選択性における違いは薬剤の疎水性の差に由来するのではないかと考えられたので、疎水性の指標として分配係数（n-オクタノール／水）を測定した。フルナリジンは $7.4\times10^4$ 、KB-2796 は $3.2\times10^4$ であった。Oldendorf(4)、Cornfordら(3) は薬剤の疎水性と血液脳関門透過性との間には正の相関があると報告している。

Table 1. Flunarizine and KB-2796 levels in plasma, microvessel endothelial cells and brain tissue fractions of young and aged rats

| | Flunarizine | | KB-2796 | |
|---|---|---|---|---|
| | 3 Mo | 28 Mo | 3 Mo | 28 Mo |
| Plasma (ng/ml) | 713 ± 283 | 847 ± 249 | 226 ± 12 | 1047 ± 239 |
| Endothelial cell (ng/mg protein) | 24.7 ± 8.1 | 22.4 ± 9.5 | 7.1 ± 3.1 | 7.1 ± 0.5 |
| $P_2$ fraction (ng/mg protein) | | | | |
| Brain stem | 23.2 ± 11.9 | 23.4 ± 8.5 | 5.1 ± 1.5 | 15.2 ± 4.1 |
| Cerebrum | 19.7 ± 8.4 | 19.6 ± 6.7 | 4.1 ± 1.0 | 13.9 ± 3.9 |
| Cerebellum | 17.7 ± 7.0 | 18.0 ± 6.3 | 3.9 ± 0.6 | 10.7 ± 2.8 |

Table 2. Age-related changes in permeability of flunarizine and KB-2796 into microvessels and brain parenchyma

| Relative concentration | Flunarizine (A) | | KB-2796 (B) | | A / B | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 Mo | 28 Mo | 3 Mo | 28 Mo | 3 Mo | 28 Mo |
| Endothelial cell/ Plasma | 0.041 ± 0.026 | 0.027 ± 0.006 | 0.033 ± 0.019 | 0.007 ± 0.002 | 1.24 ± 0.44 | 3.83 ± 0.44 |
| $P_2$ fraction/ Endothelial cell | | | | | | |
| Brain stem | 1.04 ± 0.64 | 1.06 ± 0.07 | 0.85 ± 0.46 | 2.14 ± 0.70 | 1.22 ± 0.23 | 0.53 ± 0.14 |
| Cerebrum | 0.93 ± 0.66 | 0.89 ± 0.07 | 0.69 ± 0.37 | 1.96 ± 0.65 | 1.31 ± 0.32 | 0.49 ± 0.14 |
| Cerebellum | 0.81 ± 0.51 | 0.83 ± 0.14 | 0.64 ± 0.31 | 1.51 ± 0.52 | 1.22 ± 0.22 | 0.57 ± 0.11 |

これは若齢ラットではいずれの段階のA/B 値も疎水性の高いフルナリジンの透過に選択性が大きいことと一致している。老齢ラットの場合、血中から内皮細胞への透過の段階ではフルナリジンに対する選択性が大きく、内皮細胞から脳実質への段階では逆に疎水性の低いKB-2796 に対する選択性が高くなっている。血液脳関門の疎水性薬剤に対する透過性は加齢による影響を大きく受け、しかも毛細血管の内腔側と脳実質側とでは異なる加齢変化が認められた。今後内皮細胞の血管内腔側と反対側膜組成などの加齢変化が血液脳関門の変質との関連で検討される必要があろう。

[参考文献]


(1) 安藤 進、近 一夫、田中康一、岡部紘明、島田信子、木村成道、基礎老化研究, 10:137-138,1986.

(2) Booth,R.F.G. and Clark,J.B., Biochim.J., 176:365-370,1978.

(3) Cornford,E.M., Braun,L.D., Oldendorf,W.H. and Hill,M.A., Am.J.Physiol., 243:c161-c168,1982.

(4) Oldendorf,W.H., Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 147:813-816,1974.

(5) Waki,H. and Ando,S., J.Chromatogr.(in press)

# 187　プロテアーゼ阻害剤によるＰＣ１２細胞の突起形成－標的分子の探索

斎藤祐見子　川島誠一　津吹聡*　伊藤尚*
（都老人研・生化学部、*青山学院大・理工）

〔要約〕

昨年の日本神経化学会において我々は、NGF応答系のPC12細胞で、多くのプロテアーゼ阻害剤のうち、ロイペプチン類似体であるAc-Leu-Leu-Nle-al(ALLNal)のみが神経突起伸長を誘導することを見いだし、その分化はNGFによるものとは異なった経路、すなわち特異なプロテアーゼ－プロテアーゼ阻害物質系を経て起こる可能性を報告した。その後、PC12細胞の神経突起形成を指標にしてより感度の高いプロテアーゼ阻害剤を求めてALLNalの化学修飾を行った結果、ALLNalの約50分の1の濃度でALLNalによるものと同じ形態の神経突起伸長を誘導するプロテアーゼ阻害剤、Benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Leu-al(ZLLLal)を得た。そこで更にLeu-Leu-Leu-alをリガンドとしたアフィニティカラムを作製し、特異的に結合する分子をSDS-PAGEにより検索した結果、PC12細胞の培養上清ではなく細胞そのものにpH4で溶出する33Kタンパク質を検出した。この33Kタンパク質はアルデヒド基を持たずプロテアーゼ阻害活性を有しないLeu-Leu-Leuをリガンドとしたカラムには結合しない。これらの結果は33KタンパクがPC12細胞の神経突起伸長を直接調節している分子であることを示唆するものである。

（はじめに）

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ティベーター様のプロテアーゼとその阻害物質が関与していることがマウス由来の神経芽細胞腫や交感神経細胞で報告されている[1,2]。しかし調節能力を持っていると同定された分子はまだ非常に少なく、多くの未知のプロテアーゼ系が存在すると考えられている。

PC12細胞は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ことから神経細胞分化の良いモデル系とされている[3]。我々はこのPC12細胞にカルシウム依存性中性プロテアーゼ(CANP)の阻害剤であるロイペプチン類似体、Ac-Leu-Leu-Nle-al(ALLNal)を1-2μM程度加えると、単独でPC12細胞に作用してNGFによるものとは異なった神経突起を形成し、またアセチルコリンエステラーゼ活性も誘導することを既に見いだしている[4,5]。この誘導は他の強力なセリンプロテアーゼ阻害剤やCANPを阻害するチオールプロテアーゼ阻害剤では起こらない。またプロテアーゼ阻害活性に必要なアルデヒド基を還元するとこの効果は失われる。これらの事実からALLNalの効果は神経突起形成を調節する未知の特異なプロテアーゼを阻害することに起因すると考えられる。今回我々はその標的と見られる因子を特異性の高いプロテアーゼ阻害剤をリガンドとするアフィニティクロマトグラフィにより検出できたので報告する。

（方法）

PC12細胞の培養　PC12h細胞[6]は37°C,10%$CO_2$下で10%牛準胎児血清及び10%馬血清を含むDulbeccoの改変培地中で培養した。　突起形成の評価　対数増殖期後期にある細胞を無血清合成培地（N2）を用いてはがし、コラーゲンタイプ１をコートしたプレートにまき、各プロテアーゼ阻害剤を添加して培養した。2日後に固定・染色し、細胞体の径より長い突起を持つ細胞を突起形成細胞とした。　ゲルの作製　アフィゲル10とLeu-Leu-Leuをメタノール中で混合後、エタノールアミンで

ブロッキングする。洗浄後、塩酸を加えてpHを下げ、3位のleucineのセミカルバゾンをアルデヒド（セミカルバジド）に変換する。遊離するセミカルバジドの吸光度により、1mlのアフィゲル10には9.3μmolのLeu-Leu-Leu-alが結合していることが確認された。　アフィニティクロマトグラフィ　PC12h細胞を、1mM EDTA、1mM EGTA、ロイペプチン、ペプスタチンA、アプロチニン、PMSF、DFP、TLCKを含むリン酸緩衝液(0.1M,pH 7.3)中でホモジナイズし、Triton X-100を用いて常法によりcytosol分画とparticulate分画を調製し、リン酸緩衝液(0.1M,pH7.3),0.2M NaClに対し透析をした。それぞれの分画を上記のゲルを詰めたカラムにチャージし十分洗浄後、クエン酸緩衝液(0.1M,pH 4.0)を用いて結合したタンパク質を溶出し、SDS-PAGEを行った。培養上清は同様に透析しカラムにチャージし解析した。

（結果と考察）

1．アフィニティクロマトグラフィのためには特異性の高いリガンドが必要である。そこでPC12h細胞の神経突起形成を指標に、より感度の高いプロテアーゼ阻害剤を求めてALLNalの化学修飾を行った。まずALLNalのN末端アセチル基をベンジルオキシカルボニル(Z)基に置換したところアセチル誘導体の4分の1の濃度で突起伸長を引き起こした。次にロイペプチン(Ac-Leu-Leu-Arg-al)やAc-Leu-Leu-Met-alではPC12h細胞の突起形成は誘導できない[5]ことから、3位のアミノ酸残基の重要性は明らかなのでこのアミノ酸をさまざまに置換した。それがロイシンの場合に最も低い濃度(25-30nM)で神経突起を形成することが認められた。その神経突起は形態的（細胞体からでる突起と突起の長さ）にALLNalによるものと同じであった。

2．1の結果からLeu-Leu-Leu-alをリガンドとしてアフィニティクロマトグラフィを行ったところ、PC12h細胞のcytosol,particulate両分画にpH4で溶出する33Kタンパク質がSDS-PAGEにより検出できた。培養上清には特異的に吸着するタンパク質は見られなかった。C末端にアルデヒド基がなく、プロテアーゼ阻害活性を持たないLeu-Leu-LeuはPC12h細胞の突起形成もまた誘導しない。このLeu-Leu-Leuをリガンドとした場合には33Kタンパク質は結合しなかった。以上の結果から33KタンパクはPC12h細胞に存在する神経突起形成の調節に直接関わっていると予想される。33Kはまた生後1-2日のラット脳ホモジネートをLeu-Leu-Leu-alのアフィニティクロマトグラフィにかけた場合にも認められ、現在更に解析を進めている。

（参考文献）

(1)Pittman,R.N.and Patterson,P.H. J.Neurosci.,7:2664-2673,1988.
(2)Zurn,A,D.,et al. Dev.Neurosci.,10:17-24,1988.
(3)Guroff,G.,Cell Culture in the Neuroscience,Plenum.NY,1985,pp245-257.
(4)Saito,Y.and Kawasima,S.Neurosci Lett.,89:102-107,1988.
(5)斎藤、川島．神経化学、27:172-173,1988.
(6)Hatanaka,H. Brain Res.,222:225-233,1981.

# 188 アミロイド小体へのケイ酸の蓄積

徳武　哲、　山本明広
〈東京都精神研・分子生物〉

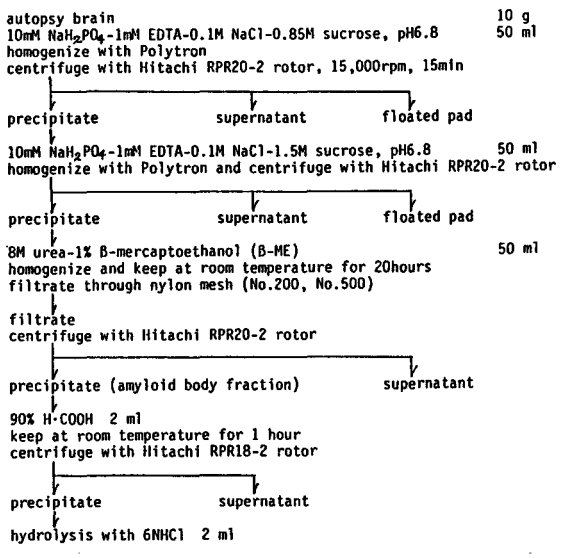
〔要約〕
アミロイド小体を多量に含んだ剖検脳よりアミロイド小体を濃縮した分画を得た。アミロイド小体は比重が大きいため、最終沈澱画分に含まれた。また、機械的にも極めて堅固でガラス様に見え、ケイ酸が蓄積している可能性が考えられたので、ケイ酸とアルミニウムの含量を測定した。その結果、濃縮画分の半分に近い量のケイ酸が含まれていることがわかった。アミロイド小体は、グリア細胞の変性に伴って生成すると考えられており、従って、精神神経疾患の症状と直接的関連性はあまり考えられていないが、脳の老化に伴い、神経細胞が変性する前に起こると思われるグリア細胞の変性原因を考える上で重要な結果ではないかと思われる。

アルツハイマー病をはじめとする老年痴呆症の剖検脳には、神経病理学的特徴として、老人斑(SP)や神経原繊維変化(NFT)等が見いだされている(3)。これらは、神経細胞の変性の結果できると考えられ、神経精神症状との関連性が認められている。しかし、老化に伴い、いきなり神経細胞の変性が起きるのではなく、その前にグリア細胞の変性が起きていると思われる。最近、我々は、グリア細胞の変性の結果できたと思われるアミロイド小体を多量に含んだ剖検脳より、アミロイド小体を精製することができ、その成分分析を試みたので、その結果について報告する。

【実験法】

1. アミロイド小体の精製と可溶化：　本実験に用いた剖検脳は、生前の臨床診断でPick病と診断されて55歳で死亡した女性の剖検脳を用いた(2)。剖検脳の半球は、生化学的分析のために -70 ℃で保存し、残りの半球はホルマリン固定後、神経病理学的診断に用いた。これには、多数のPick小体とともに、多量のアミロイド小体も見いだされたが、老人斑や神経原繊維変化はほとんど見いだされなかった。アミロイド小体の精製は、基本的には老人斑や神経原繊維変化の精製法と同様な方法を用いた(Fig. 1)(4)。アミロイド小体含有画分は、まず、90% ギ酸溶液で可溶性成分を抽出し、不溶性物質は、遠心分離後、6N 塩酸を用い、110 ℃で 24時間加水分解した。
2. ケイ酸およびアルミニウムの定量：　アルミニウムは試料溶液 1 mlに、1% 8-オキシキノリン-酢酸溶液 1 mlを加え、さらに 1N アンモニアで pH 5.0 に調整後、クロロホルム 3 mlで抽出、390nm で比色定量した。ケイ酸は試料溶液 1 mlに、1mM モリブデン酸アンモニウム溶液 2 mlを加え、さらに 10mM 塩化第一スズ溶液 0.1 ml、1M 酢酸ナトリウム(pH 5.0) 0.5 mlを加え、生成したモリブデンブルーを 740nm で比色定量した。
3. アミノ酸分析：　日立835 アミノ酸分析計により行なった。

Fig. 1.　Purification of Amyloid Body




【実験結果】

1. アミロイド小体の形態と性質：　Fig. 2 は剖検脳標本中のアミロイド小体である。Bodian法では Pick小体とともに濃い赤紫色に染色されるが、Pick小体は、

Table 1. $SiO_2$ and Al contents (μg from 10g of brain)

| | amyloid body fraction | | SP and NFT fraction | |
|---|---|---|---|---|
| | 90% H·COOH soluble | 6N HCl hydrolysed | 90% H·COOH soluble | 6N HCl hydrolysed |
| $SiO_2$ | 120 | 1,580 | 30 > | 30 > |
| Al | 8.6 | 28 | 17.2 | 26 |
| protein | 620 | 940 | 216 | 152 |
| total weight | | 4,000 | | 600 |

Table 2. Amino Acid Compositions (mol %)

| | amyloid body fraction 90% H·COOH | 6N HCl | β-protein precursor | lipofuscin |
|---|---|---|---|---|
| Asp | 7.9 | 5.9 | 10.8 | 8.2 |
| Thr | 5.1 | 2.8 | 6.5 | 4.1 |
| Ser | 7.3 | 4.8 | 4.3 | 6.4 |
| Glu | 11.8 | 10.1 | 17.0 | 7.8 |
| Pro | N.D | 5.6 | 4.5 | 2.7 |
| Gly | 17.7 | 34.0 | 4.5 | 12.5 |
| Ala | 8.9 | 10.4 | 8.2 | 6.3 |
| 1/2Cys | 0.8 | 0.9 | 1.7 | 16.3 |
| Val | 5.8 | 4.1 | 8.9 | 8.1 |
| Met | 2.0 | 1.6 | 3.0 | 1.5 |
| Ile | 4.3 | 2.6 | 3.3 | 4.3 |
| Leu | 8.5 | 4.8 | 7.5 | 7.7 |
| Tyr | 1.7 | 0.9 | 2.5 | 2.3 |
| Phe | 3.5 | 2.7 | 2.5 | 5.1 |
| Lys | 6.4 | 2.7 | 5.5 | 3.3 |
| His | 1.7 | 1.1 | 3.6 | 0.9 |
| Arg | 6.8 | 5.2 | 4.8 | 2.5 |
| Trp | | | 1.2 | |

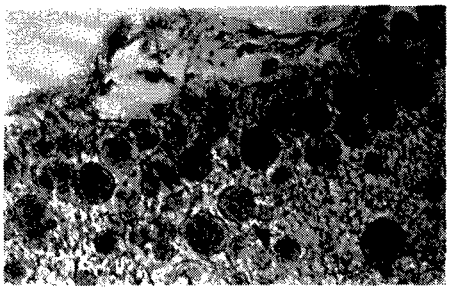


Fig. 2. Amyloid bodies in section of autopsy brain

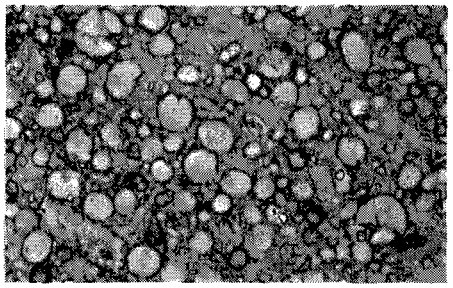


Fig. 3. Purified amyloid bodies

神経細胞中に見いだされるのに対し、アミロイド小体は毛細血管や脳の周辺部に見いだされた。形状は、5 μ前後の球状である。Fig. 3 はアミロイド小体濃縮画分を示す。夾雑混合物としては、結合組織断片やリポフスチン様物質が認められた。アミロイド小体は、最終沈澱画分に含まれており、大きな比重を持っているものと思われた。また、機械的にもきわめて安定で、包埋した樹脂からガラスナイフで切片を作製するのが困難なくらいであった。このことから、アミロイド小体には、ケイ酸が蓄積しているのではないかと思われた。

2. アミロイド小体の成分分析： Table 1 にはアミロイド小体濃縮画分中のケイ酸とアルミニウム含量を示した。比較のために、アルツハイマー病の剖検脳より調製した老人班と神経原繊維変化濃縮画分の値を示した。SP および NFT 画分中のケイ酸量は非常に少なかったが、アミロイド小体画分は、予想した通り高い値を示した。特に、6N 塩酸加水分解物中の値が高かった。アルミニウム含量はあまり大きな違いは見られなかったが、SP および NFT 画分中の値の方が高かった(1)。Table 2 には、アミロイド小体画分の ギ酸可溶性成分と 6N 塩酸加水分解物のアミノ酸組成を示した。ギ酸可溶性成分は、β-protein precursor の組成とは異なり、むしろ残っている核タンパク質に由来するものと思われた。6N 塩酸加水分解物の組成も、リポフスチンの組成と異なっており、混入した結合組織のコラーゲンに近いと思われた。

**【考察】**

本実験では、アミロイド小体画分に含まれるタンパク質成分の分析も試みたので、結合組織を分解するためのコラゲナーゼは用いなかった。従って、混入している結合組織の量比は定かではないが、本実験で得られた画分でも 50 % に近い量のケイ酸が含まれていたことは、驚くべきことである。このことから考えると、アミロイド小体は老化に伴い、脳血液関門の透過性が高まり、ケイ酸がグリア細胞に取り込まれ、それを分解排除できずにグリア細胞のリソゾームに蓄積して、ついにはガラス玉のようになったのではないかと想像される。本実験では、ギ酸可溶性成分のゲル電気泳動、およびホルマリン固定切片の抗体組織染色も行なったが、紙面の都合で省略した。

なお、本実験は、当研究所超微形態研究室、小柳新策研究員、泉山洋子、中村美奈子各氏との共同研究によった。

**【文献】**

(1)Candy, J.M., Oakley, A.E., Klimowski, J. et al., Lancet I, 354-356 (1986)
(2)小柳新策、田中政春、大森隆、松下正明、石井毅、神経研究の進歩 23, 441-451 (1979)
(3)Tanzi, R.E., St. George-Hyslop, P.H. and Gusella, J.F., TINS. 12, 152-158 (1989)
(4)徳武哲、日本老年医学会雑誌 25, 352-356 (1988)

# 189 単離成長円錐画分における内因性リン酸化の検討：チロシン残基リン酸化の可能性

五十嵐道弘[1),2)]、小宮義璋[2)]
（1）自治医大・生化学第二、
2）群馬大・医・分子病態学）

〔要約〕ラット胎生17日目の脳より単離した成長円錐画分を破砕して、内因性のリン酸化を検討した。チロシン残基のリン酸化に好適な条件下でリン酸化を行なわせると約 15 種の蛋白のリン酸化がオートラジオグラム上認められたが、主要なものは300 kD, 180 kD, 130 kD, 80 kD, 60 kD, 55 kD の 6種であった。さらにこれをアルカリ処理すると、80 kD, 300 kD のリン酸基は脱離したが、55 kD, 130 kD, 180 kDの三種はアルカリ加水分解に耐性であった。これらの蛋白のリン酸化はH-7, H-8, W-7のような蛋白キナーゼ阻害剤の影響をほとんど受けなかった。また 60 kD蛋白のリン酸化は界面活性剤の存在下に著しく増強された。以上の結果から、 55 kD, 130 kD, 180 kDのリン酸化にはこの部位に既知の蛋白キナーゼ以外の、内因性蛋白キナーゼの関与により、Tyr 残基のリン酸化を受ける可能性が示唆された。

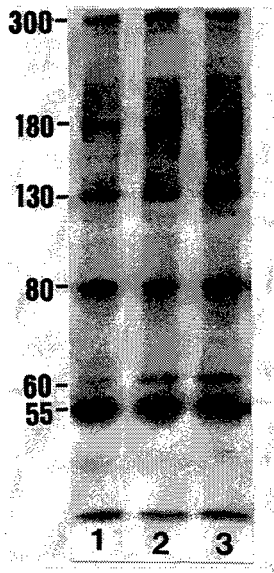
成長円錐は成長期の神経突起の先端に形成される特殊構造で、突起の成長と経路選択に重要な役割を果たすことが推定されている。成長円錐特有の機能を発現するためには、複雑な細胞内情報伝達が存在するはずだが、その生化学的な解明はほとんどなされていない。細胞分画法による成長円錐に富む画分（いわゆる「成長円錐画分」）の調製法 (1)は既に演者らにより再現性も示され (2)、成長円錐の機能の分子的基盤を研究する上で有力な手段となることが期待される。このような観点から、今回演者らは成長円錐画分に存在して内因性の蛋白リン酸化を受ける物質のうち、Tyr 残基がリン酸化を受ける可能性を持つ蛋白質を検索したので報告する。

（方法）① 成長円錐画分の調製：ラット胎生17日目の脳より、演者らによる Pfenninger法の変法(2)を用いて採取した。② 成長円錐画分における内因性の蛋白リン酸化：得られた成長円錐画分を 1 μM (p-amidinophenyl)-methanesulfonyl fluoride hydrochloride及び 30 μM leupeptin を含む、 6 mM Tris-HCl ( pH 8.1 ) で直ちにホモジェナイズし、Tyr 残基のリン酸化が検出されやすいと考えられる反応溶液 (A)に加えた。その組成は、20 mM HEPES ( pH 7.5 ), 10 mM $MnCl_2$, 10 μM $ZnCl_2$, 30 μM $NaVO_3$ (全容量は50 μl) である。(A)を30 ℃、1 分間プレインキュベートした後、0.5 μM [$\gamma$-$^{32}$P]ATP ( 22.2 GBq/mmol ) を加えて、15秒間反応させた。これに倍濃度の試料緩衝液 ( Laemmli ) 50 μl(3)を加えて反応を停止させ、SDS-PAGE（アクリルアミド濃度は10 %または 7.5 % ）に試料をかけ、さらにオートラジオグラムを作成してリン酸化された蛋白を分析した。③ 蛋白キナーゼ阻害剤及び界面活性剤の影響： 上記の反応溶液に(a) 20 μM H-7, (b) 5 μM H-8, (c) 100 μM W-7, (d) 0.1 % Nonidet P-40, (e) 0.1 % Triton X-100をそれぞれ加えて同様の条件で反応させ、オートラジオグラムを作成した。④ ゲルのアルカリ処理： 乾燥ゲルを1 M KOHに浸漬して55 ℃で 2 時間処理後、洗浄してゲルを元の大きさに戻し、再びオートラジオグラムを作成して処理前のものと比較した (4)。

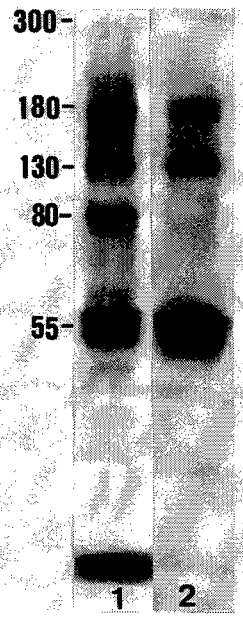
（結果）この系でのリン酸化を受ける蛋白はオートラジオグラム上、約 15 種程度が見いだされたが、主要なものは 300 kD, 180 kD, 130 kD, 80 kD, 60 kD, 55 kD の 6 種 であった（図1）。このうち、60 kD 蛋白は 0.1 % NP-40または 0.1 % TX-100 の存在下でリン酸化の程度が増強した（図1）。これらの蛋白がチロシン残基のリン酸化を受けている可能性を検討するために、アルカリ処理を行なったところ、300 kD, 80 kD はともにリン酸基が加水分解を受けたが、180 kD, 130 kD, 55 kD 蛋白のリン基は分解されなかった（図2、60 kD については検討中）。さらにこの系に H-7を加えると、80 kD, 300 kD はそのリン酸化が強く抑制されたが、180 kD, 130 kD, 55 kD では著変がなかった（図3）。

（考察）成長円錐には内因性の蛋白キナーゼとして、A-キナーゼ(5)、C-キナーゼ、$Ca^{2+}$/カルモデュリン- キナーゼ(6)、$pp60^{c-src}$ (7,8) が知られている。今回演者らは、Tyr 残基がリン酸化されうる成長円錐の蛋白を検索した。その結果、Tyr 残基のリン酸化が見出されやすい条件下で、180 kD, 130 kD, 55 kD の三種がアルカリ耐性であることがわかった。Ser 及びThr 結合性のリン酸基は、Tyr 結合性のものに比べて著しくアルカリ感受性であることが知られており、これら三種はSer, Thr残基でなく Tyr残基にリン酸が結合しているものと推定される。これらのリン酸化がA-キナーゼ、C-キナーゼ、$Ca^{2+}$/カルモデュリン- キナーゼ のそれぞれ阻害剤であるH-8, H-7, W-7 で阻害されないことからみても、Tyr 残基をリン酸化する未知のキナーゼが関与すると考えられる。 80 kD蛋白は pp 80 (9)と同一と考えられる外、55 kD は tubulin、60 kDは $pp60^{c-src}$の可能性もありうるが、推測の域を出ない。現在、上記の三種の蛋白が真に Tyr残基のリン酸化を受けていることを確定するとともに、これらの蛋白の性状もさらに詳しく検討する予定である。

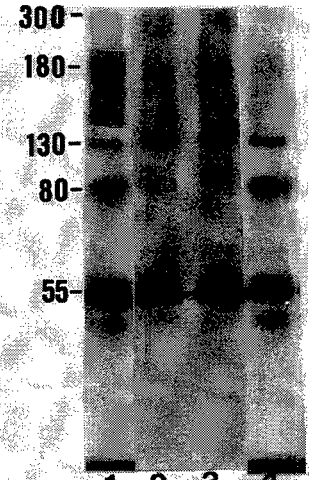
（文献）1) Pfenninger, K.H., Ellis, L., Johnson, M.P., Friedman, L.B., and Somlo, S. ( 1983 ) Cell **35**, 573-584 2) Igarashi, M., Waki, H., Hirota, M., Hirabayashi, Y., Obata, K., and Ando, S. ( 1989 ) Dev. Brain Res., in press 3) Laemmli, U.K. ( 1970 ) Nature **227**, 680-685 4) 碓井裕史、武田誠郎 ( 1986 ) 続生化学実験講座 **7**, pp. 423-433, 東京化学同人 5) Ellis, L., Katz, F., and Pfenninger, K.H. ( 1985 ) J. Neurosci. **5**, 1393-1401 6) Katz, F., Ellis, L., and Pfenninger, K.H. ( 1985 ) J. Neurosci. **5**, 1402-1411 7) Maness, P.F., Aubry, M., Shores, C.G., Frame, L., and Pfenninger, K.H. ( 1988 ) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 5001-5005 8) Sobue, K. and Kanda, K. ( 1988 ) Biochem. Biophys. Res. Commun. **157**, 1383-1389 9) Nelson, R.B., Linden, D.J., Hyman, C., Pfenninger, K.H., and Routtenberg, A. ( 1989 ) 381-389




（図１）成長円錐画分の内因性リン酸化 と界面活性剤
（ゲルは7.5 % T; 単位: kD ）
1: 反応溶液 (A);
2: (A)+ 0.1 % TX-100;
3: (A)+ 0.1 % NP-40




（図２）リン酸化蛋白のゲル上でのアルカリ加水分解
（ゲルは 10 % T; 単位: kD ）
1: アルカリ処理前；
2: アルカリ処理後




（図３）蛋白キナーゼ阻害剤の効果(ゲルは 10 % T ; 単位: kD )
1: 阻害剤(-); 2: H-7存在下;
3: W-7存在下; 4: H-8存在下

# 190 初代培養神経細胞に対するホルボールエステルの作用

伊藤康一，阿相皓晃*，五十嵐康，E.Leong Way，丸山悠司
（群馬大 医 神経精神薬理（ツムラ），*慶応大 医 生理）

〔要約〕

われわれは，神経系の分化とCキナーゼ(PKC) との関係を明らかにするため，まずPKC に直接作用するホルボールエステル(PMA) を使用し，マウス大脳皮質から得た細胞の発達段階におけるPMA の効果を検討した． PMA をこの培養系に長期添加し続けると，ニューロンは凝集し神経突起は束状になり，さらにN-CAM,L1の発現が認められた． アストロサイトは，PMA によりGFAP陽性細胞がほとんど認められなくなった． 特異的[ $^{3}$ H]PDBu結合は，培養日数とともに増加したがPMA 添加によりその増加が抑制された． 今回の実験から，神経系の発達さらには細胞間相互関係にPKC が何らかの役割をはたしていることが示唆された．

［はじめに］

PKC の神経系における機能を薬理学的方法によって検討するには，PKC に特異的阻害剤が必要であるが未だ得られていない．しかし，PKC に直接結合するPMA を培養細胞に直接長期添加することにより，PKC のdown-regulation が認められる多くの報告があるため，われわれは培養神経細胞にPMA を長期的に作用させ，その変化の程度を詳細に観察して神経系におけるPKC の役割を推定する一助とした．

［材料と方法］

胎齢15日目のマウス大脳皮質から得た単離細胞をポリリジンでコートした12および24ウエルのプレート上に1 $\times 10^{6}$ 個／mlの細胞数で接種し，同時にPMA を100ng/mlの濃度で添加し，20% 牛胎児血清を含むイーグルMEM で培養した． 形態変化は，位相差顕微鏡下で観察した． ニューロンとアストロサイトの同定は，抗ニューロフィラメントと抗GFAP抗体を，接着因子の検出には抗N-CAM,L1抗体をそれぞれ使用し，PAP 法により行った． [ $^{3}$ H]PDBu結合実験は，Jengらの方法(1) を一部変更して行った．

［結果と考察］

PMA 添加による形態変化は，光顕レベルでは培養１日ではほとんど変化は認められなかった． しかし，培養４日目にはニューロンの凝集と神経突起の束化が起き，培養１２日目でニューロンの細胞体凝集塊が太い神経束で結合した． 同時に，神経細胞体と神経束にN-CAM とL1が発現した（図１）． [ $^{3}$ H]PDBu結合は，対照群では培養日数に伴い増加した． しかし，PMA を添加し続けることに

よりPDBuの結合部位の増加は殆ど認められなかった（図２）．　これは，PMA レセプターのdown-regulationによってN-CAMおよびL1が発現したものと推定され，神経細胞の発育段階では細胞接着因子の発現にPKC がなんらかの影響を及ぼしていることが示唆された．　また，培養１２日目に抗GFAP抗体で染色するとPMA の添加で明らかにGFAP陽性グリア細胞の減少が確認された．　　以上の結果から，観察されたニューロンの形態変化はアストロサイトの分化がPMA の長期添加により影響を受け，ニューロンとアストロサイト，両者の相関性において生じた変化であることが明らかとなった．

［文献］　(1) A.Y.JENG,et al., Cancer Res., 45,5714-5721,1985

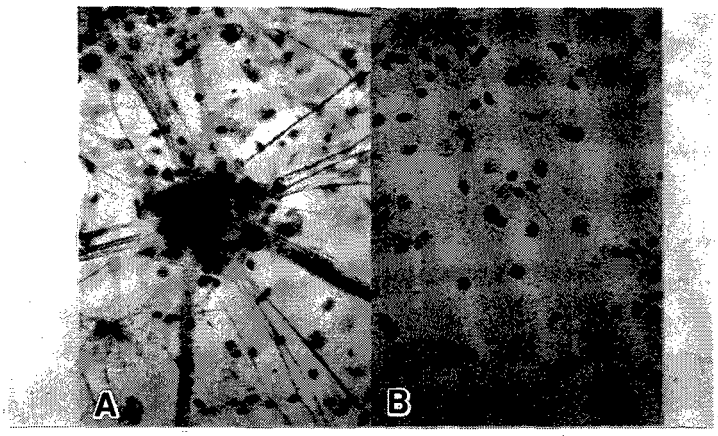



図１　PMA 存在下(A),非存在下(B) の培養12日目におけるL1のポリクロナール抗体による免疫染色(PAP法)

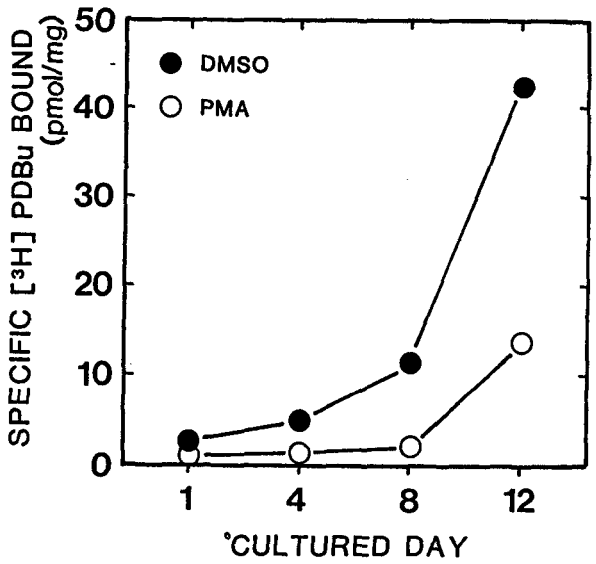



図２　PMA 存在下(○),非存在下(●) の培養1,4,8,12日目における特異的[ ³ H]PDBu結合の変化

# 191 ＰＣ１２細胞の抗ユビキチン抗体認識蛋白質に対する神経成長因子の影響

高田耕司、阿部俊夫、大川　清、松田　誠
（慈恵医大・医化学）

〔要約〕神経成長因子(NGF)によるPC12hの交感神経様の分化過程で、細胞内蛋白質の分解や機能の賦活化に係わるユビキチン系が何等かの役割を担っているかを検討する目的で、様々な培養条件下の同細胞の蛋白質を抗ユビキチン抗体を用いたSDSポリアクリルアミド電気泳動(SDS PAGE)-immunoblotで分析した。その結果、分子量54k,46k,23kに認められた抗体反応陽性バンドは、NGF(50ng/ml)の添加によってあまり影響を受けないとことがわかった。一方、分子量16kと約10kのバンドは、免疫前血清によっても多少染色される疑陽性バンドであるが、NGF添加後2～10日においてNGF未添加群よりも発色強度が低下する傾向を示した。16kと約10kのバンドに対するNGFの作用は、蛋白質リン酸化酵素阻害剤 staurosporineにより阻害された。また、NGFに似た分化誘導能を示すcAMPアナログでは、両バンドの減弱が認められなかった。この両バンドがユビキチン化蛋白質であるか否かはさらに検討が必要であるため、ユビキチン系の神経分化への関与の詳細は今後の課題である。

〔目的〕

ユビキチンは分子量8.6kのポリペプチドであり、細胞内の不要な蛋白質と結合することでATP依存性蛋白質分解酵素による分解を促す働きを担っている。また、まだ検証が十分でないがヒストン2A,2Bや膜受容体蛋白質に結合しその機能を調節する可能性も報告されている(1)。このようなことから、ユビキチン系が細胞の生存、成長、分化に重要な役割を果していると推察される。一方、NGFは、交感・知覚神経やPC12などの細胞の分化や生存に重要な役割を果しているが、その作用機序には不明な点が多い。本研究は、NGFによる神経分化に対するユビキチン系の関与を検討する目的で、様々な培養条件下のPC12hの蛋白質を抗ユビキチン抗体を用いたSDS PAGE-immunoblot法で分析した。

〔方法〕

細胞培養：PC12hの培養は、Inoueら(2)に従った。添加物として用いたNGFは、Mobeyら(3)の方法にもとづき調製した。

抗体の作成：抗ユビキチン抗体は、HaasとBright(4)の方法にほぼ準拠して、兎のγグロブリンと結合させたSDS未変性ユビキチン(Sigma)を抗原に用いて兎で作成し、この抗血清をユビキチンカラムでアフィニティ精製(4)した後、実験に供した。ユビキチン及びユビキチン化蛋白質に対する抗体の反応性は、兎網状赤血球の蛋白質を試料に用い確認した(5)。

SDS PAGE-immunoblot：細胞は培養皿上の細胞を2～3回PBSで洗った後、6M尿素を含むLaemmliの試料液(6)で抽出した。細胞分画実験(7)では分画後に同上の抽出液で試料を調製した。これらの細胞抽出液蛋白質は、ミニスラブゲルを用いたSDS-12.5%PAGEで泳動分離後(8)、セミドライ法(9)でイモビロンP膜(ミリポア)に転写した。膜上の抗原と結合した抗ユビキチン抗体は、ビオチン標識兎γグロブリン抗体とペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応後、アミノエチルカルバゾールを基質に用い発色検出した(10)。非特異的反応を確認するため用いた免疫前の兎の血清γグロブリンは、硫酸ナトリウム沈殿分画法(11)により調製した。

〔結果と考察〕

抗ユビキチン抗体は見掛け上PC12h細胞抽出物中の多くの蛋白質を認識するが、これらの中で抗体特異的と判断されるものは分子量54k,46k,23kに認められるバンドである(図1)。また、16kと約10kのバンドは、免疫前血清γグロブリンを用いた免疫染色でもわずかに発色したため抗体との反応は疑陽性とみなされる。アフィニティ精製抗体を用いたにもかかわらず非特異的なバンドが多く現れたのは、抗体特異的バンドの微弱な発色を増幅するため高感度な免疫染色を行ったことによる。非特異的結合のない条件で抗体認識バンドを分析するには、もっと高親和性の抗体を用いる必要があると思われる。なお、127kから71kにかけてのバンドは、一次抗体反応がなくても現れるため、ビオチンないしはストレプトアビジンに親和性のある蛋白質であると考えられる(図1)。

培養0日に8.2x10⁴個/mlの細胞で開始した実験の結果を図2に示す。対照群およびNGF(50ng/ml)添加群の間で、54k,46k,23kの抗体反応陽性バンドの発色強度に大きな違いは認められない。一方、16kと約10kの疑陽性バンドは、培養2日から対照群と比較してNGF添加群の方が薄くなる傾向を示した。培養2日目は神経突起の伸長の開始とほぼ一致している。培養4日以降の実験は、培養初日に4.2x10⁴個/mlないしは1.0x10⁴個/mlの細胞を用いて行った(図3)。NGF添加群に神経突起の著しい発達が観察された培養6,8,10

日いずれでも、16kと約10kのバンドの発色はNGF添加群の方が弱かったが、54k,46k,23kの抗体反応陽性バンドには顕著な差は見られなかった。培養初日に1.0x10⁴個/mlの細胞で開始して行った別の実験では、培養6,10日目において、NGF添加群にみられる16kと約10kのバンドの減弱が、8-(4-chlorophenylthio)cAMP(100μM)添加群では認められなかった(図4)。なお、この実験のcAMPアナログの添加で観察された神経突起は、NGF添加のものより太く短かかった。図4の実験と同一条件の別の実験では、staurosporine(10 nM)を加えると、NGF添加による16kと約10kのバンドの発色低下が抑制され、対照群と変わらなくなることが明らかになった(図省略)。また、細胞分画の結果から、16kバンド蛋白質は核分画に局在すると思われる(図5)。

以上の結果から、次のようなことが考えられる。まず、明らかにユビキチン化蛋白質と思われる54k,46k,23kの抗体反応陽性バンド蛋白質は、常に一定量存在することから細胞の生存に関与し、分化にはあまり関係のないものではないかと思われる。このなかで、23k蛋白質はユビキチン化ヒストン2Aである可能性が高い。一方、NGF、cAMPアナログおよび蛋白質リン酸化酵素阻害剤の作用から、16kと約10kのバンドは、NGFによる分化にともなって特異的に変動する細胞内蛋白質であると思われる。しかし、これらが抗ユビキチン抗体と特異的に結合しているか否かについては現時点では結論できない。神経分化に対するユビキチン系の関与については、引続き検討が必要である。

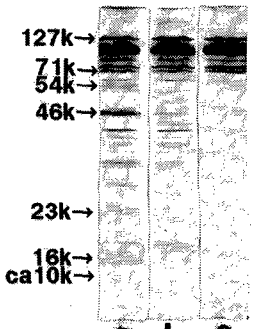



図1 試料:NGF未添加培養細胞(35μg蛋白質/lane)
a:一次反応に抗ユビキチン抗体(1.8μg蛋白質/ml)使用
b:一次反応に免疫前血清γグロブリン(3.7μg蛋白質/ml)使用
c:一次反応省略

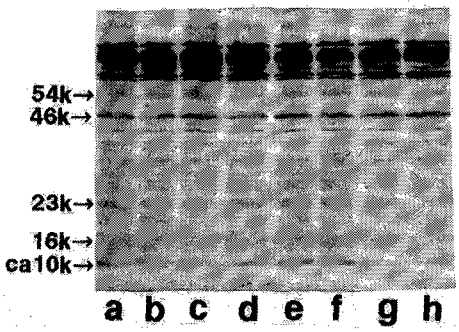



図2 試料量:35μg蛋白質/lane
a,b,c,d:対照群、e,f,g,h:NGF添加群
a,e:0.5日、 b,f:1日
c,g:2日、 d,h:3日

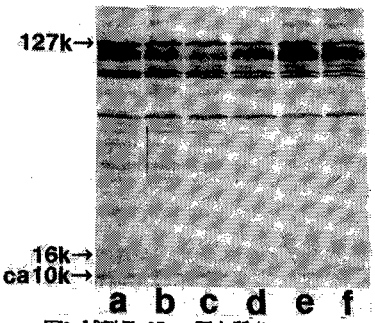



図3 試料量:35μg蛋白質/lane
a,b,c:対照群、d,e,f:NGF添加群
a,d:6日、 b,e:8日、 c,f:10日
(0日にa,dでは4.2x10⁴個/ml、他は1.0x10⁴個/mlの細胞をまきこんだ)

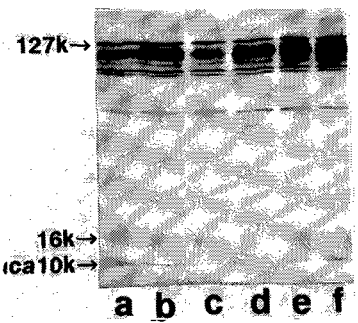



図4 試料量:35μg蛋白質/lane
a,b:対照群、c,d:NGF添加群
e,f:cAMPアナログ添加群
a,c,e:6日、 b,d,f:10日

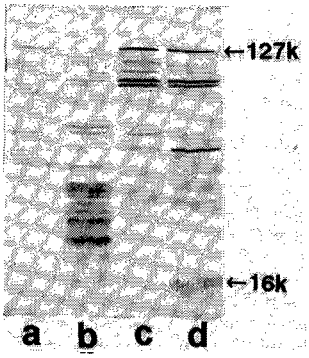



図5 試料:NGF添加培養(10日)細胞
(20μg蛋白質/lane)
a:可溶性画分、b:ミクロゾーム画分
c:ミトコンドリア画分、d:核画分

[謝辞]PC12hを提供して頂いた大阪大の島中寛先生ならびに抗体作成に御協力頂いた岡山大理学部の神田東作先生に感謝致します。

[文献]1. Hershko, A. (1988) J. Biol. Chem. 263, 15237-15240.
2. Inoue, N. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257, 9238-9241.
3. Mobey, W. C. et al. (1976) Biochemistry 15, 5543-5542.
4. Haas, A. L. et al. (1985) J. Biol. Chem. 260, 12464-12473.
5. Meyer, E. M. et al. (1986) J. Biol. Chem. 261, 14365-14368.
6. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685.
7. 花岡文雄(1988) in"組織培養の技術"日本組織培養学会編 67-70.
8. Lugtenberg, B. et al. (1975) FEBS Lett. 58, 254-258.
9. Kyhse-A., J. (1984) J. Biochem. Biophys. Methods 10, 203-209.
10. Brower, M. S. et al. (1985) Anal. Biochem. 147, 382-386.
11. Johnstone, A et al. (1982) in"Immunochemisty in practice"Blackwell Sci. Pub. 44-45.

# 192 高感度微量酵素免疫測定法によるラット脳内ＮＧＦ分布

西尾健資[1),2)]、秋口一郎[2)]、古川昭栄[1)]
（国立精神神経センター[1)]、京大・医・神内[2)]）

〔要約〕 神経成長因子（ＮＧＦ）の脳内レベルは極めて低く、その詳細な分布は不明であった。我々は、微小組織中のNGF を高感度で測定できる酵素免疫測定法を開発した。この方法により、以下の事実が明らかになった。
１）大脳皮質内のNGF 分布は一様でなく、部位により20倍もの相違がみられた。 ２）大脳皮質内では、頭頂葉後頭葉移行部で最も高値であり、帯状回、梨状葉皮質で高く、皮質側面で低い傾向を認めた。 ３）大脳皮質深層に比して浅層で高値であった。 ４）海馬皮質内では、ＣＡ１－２に比してＣＡ３－４および歯状回で高値であった。 ５）視床では前・内側核で相対的高値を認めた。 ６）扁桃核（なかでも底核）で高値を認めた。 ７）小脳・脳幹では、小脳核、前庭神経核、網様体で相対的高値を認めた。
以上より、視床前内側核群の神経細胞と小脳Purkinje細胞は、NGF 感受性神経の候補に挙げられる。

［緒言］ 中枢神経系において、神経成長因子（Nerve Growth Factor: NGF）は、前脳基底核の大細胞性コリン作動性神経細胞に対して、栄養因子として作用していることが知られている[1)]。しかし、NGF mRNAやNGF receptorは、この神経細胞とは関連がないと思われる領域でも見出されており[2)3)]、NGF はその他の神経細胞にも作用を及ぼしている可能性が考えられる。しかしながら、それを証明するための有力な根拠になるであろう詳細なNGF 分布については、全く不明である。さらに、その詳細な分布は、中枢神経系におけるNGF の生理的機能や、NGF 生合成調節機構の解明のためには必要不可欠な極めて重要な情報である。そこで我々は、微小組織切片中の極微量のNGF を高感度で測定できる酵素免疫測定法を開発し、Rat 脳内の詳細なNGF 分布について検討し、Rat 脳内NGF マップを作成した。

「実験材料と方法」 Wistar Rat（７週齢、雄、N = 3）脳を、-10 ℃凍結下に、ミクロトームで前方より0.9 mm厚の前額断切片を作成した。次に、この断面に垂直に、1.5 x1.5 mm²の碁盤状に切断し，最終的に 0.9 x1.5 x1.5 mm³の微小切片に分けた。微小切片中のNGF 含量測定は、基本的には文献[4)]の通りであるが、切片の微小化に伴うNGF 濃度の低下やNGF の抽出上の問題、さらに多検体処理の問題などに工夫開発を行なった。NGF の抽出は、従来のホモジェナイズ法に変え、凍結融解法で行なった。凍結融解の回数－抽出効率関係を検討したところ、３回目から抽出され始め、その後回数依存性に抽出効率が上昇し、６回目以後はプラトーに達し、ホモジェナイズ法と同様の抽出効率であった。(data not shown) 切片の微小化に伴うNGF 濃度の低下に対しては、検体量を10μｌまで減量した。

［結果］NGF 含量の測定結果をFig.1,2,3 に示す。大脳皮質では頭頂葉後頭葉移行部で最高であり、帯状回・後膨大皮質の正中部と梨状葉で高く、頭頂葉側面・側頭葉など皮質外側面では低値であった。前頭葉は中等度の値を認めた。中隔核、ブローカ対角帯は中等度の値を認めたが、マイネルト基底核は低値であった。線条体は低値であった。海馬は高値を認めたが、なかでもCA1-2 に比してCA3-4,歯状回でより高値を認めた。視床は全体に低値であったが、前核・内側核において相対的高値を認めた。扁桃核も高値を認めたが、なかでも底核でより高値であった。小脳・脳幹は全体に低値であったが、中脳中心灰白質、橋網様体、小脳核、前庭神経核などで相対的高値を認めた。より詳細な検討では、大脳皮質表層にNGF 含量が高い傾向と、左右差を認めた。（Fig.３）

［考案］今回の検索結果から脳内のNGF 分布は一様でなく、部位により20倍以上のNGF 含量の差があることが分かった。このことは、NGF が中枢神経内において、非特異的にではなく特異的に作用していることを伺わせるものである。また、これまで唯一証明されている中枢神経内のNGF 依存性神経細胞は、前脳基底核のコリン作動性神経であり、大脳皮質、海馬、嗅球からNGF を供給されるが、これら合成部位と輸送先である前脳基底核のNGF 含量を比較してみると合成部位で極めて高く、輸送先では半分以下である。この現象は末梢神経系に於ける関係とは全く逆であり、その解釈には慎重を要するが、中枢では神経終末でのNGF の取り込み効率が低い為、大過剰にNGF を合成する必要があるのかも知れない。或は、NGF が合成部位の神経細胞によって利用されているのかも知れない。さらに今回の検索で明かになったことは、視床前・内側核、扁桃核、小脳核、前庭神経核など、これまでNGF 含量が低いとされてきた部位でも、相対的高値を認めたことである。この事実より推測すると、帯状回や扁桃核に線維連絡を有する視床前内側核群の神経細胞と小脳核や前庭神経核に投射しているPurkinje細胞は、NGF 感受性神経の候補の一つに挙げられる。

Fig. 1

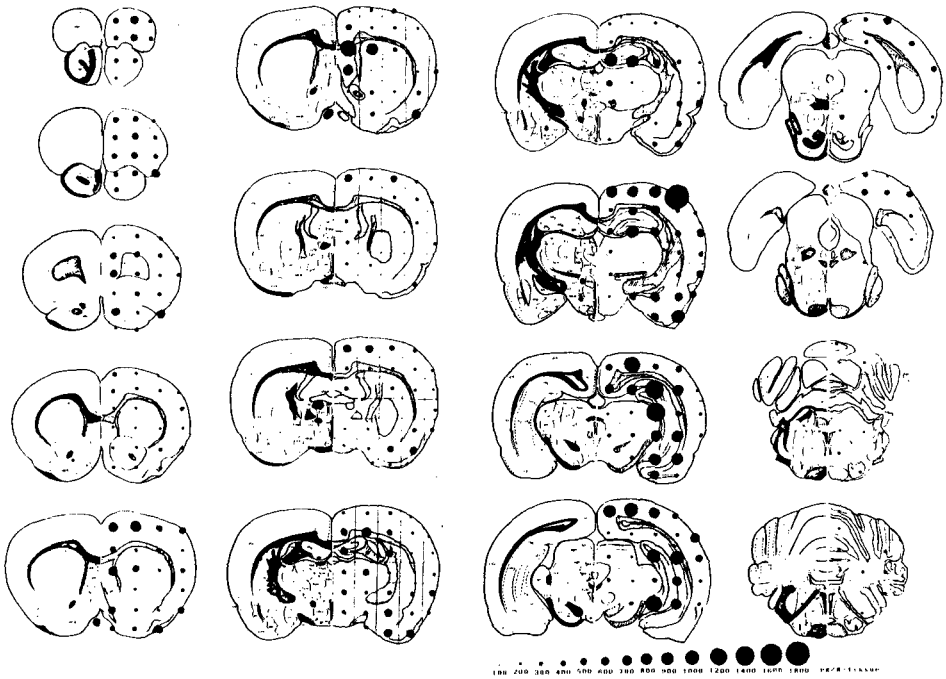


Fig. 2

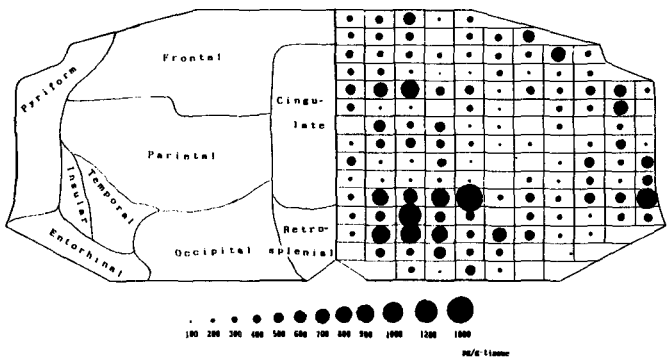



Fig. 3

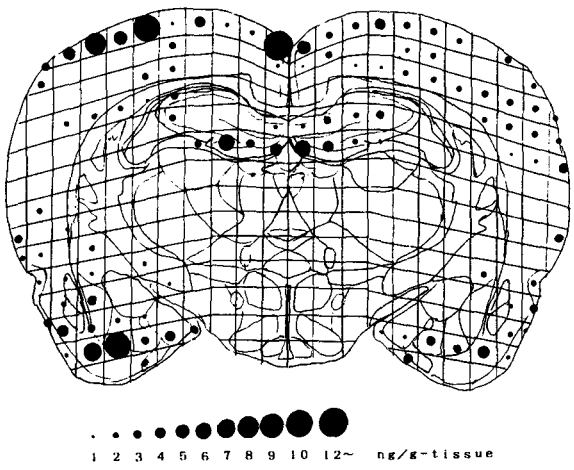



Fig.1 NGF distribution in rat brain determined from 1.5x1.5x0.9 mm³ pieces. NGF content in each piece is shown as solid circle, in proportion to its diameter. The piece without circle contains NGF under 100 pg / g-tissue.

Fig.2 NGF distribution in cerebral cortex, reconstructed in flat plain.

Fig.3 More detailed NGF map, determined from 0.9x0.7x0.7mm³ pieces. The piece without circle contains NGF under 1 ng/g-tissue.

[文献] 1) Korsching, S., Auburger, G. et al: EMBO J.,4:1389,1985.

2) Shelton,D.L. & Reichardt, L.F.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 2714, 1986.

3) Raivich,G. & Kreutzberg, G.W.: Neuroscience, 20: 23, 1987.

4) Furukawa,S, Kamo,I. et al; J. Neurochem.,40: 734, 1983.

# 193 脳内エンケファリン濃度のサーカデイアンリズム
## －モノアミン、ＡＣｈ、ＧＡＢＡとの比較－

盛政忠臣、金行孝雄、岡田英俊、庄盛敏廉
（岡山大、医、脳研、病態生化学）

〔要約〕

ラット（ＳＤ系、９週齢）脳内エンケファリン（Ｍｅｔ－Ｅｎｋ）濃度と、その他の伝達物質代謝の特徴を、サーカデイアンリズムに関して比較検討を行った。

線条体においては、エンケファリン（Ｍｅｔ－Ｅｎｋ）濃度は、暗期後半から明期前半にかけて高値を示し、ＤＡ代謝産物ＨＶＡ濃度は、明期中央に最小値を示し、各々特徴的なサーカデイアンリズムを示した。Ｍｅｔ－ＥｎｋのＤＡに対する抑制性支配を考えると、Ｍｅｔ－Ｅｎｋサーカデイアンリズムは、ＤＡに対して数時間先行していると考えることができる。さらに、このＭｅｔ－Ｅｎｋ濃度自体がＭｅｔ－Ｅｎｋ活動の指標と考えることができる。Ｃｈ濃度は明期中央に最大値を示し、ＨＶＡ濃度に対して逆転した位相を示していることから、ＤＡとＡＣｈの拮抗関係が、サーカデイアンリズムの上でも成立していることが示された。ＧＡＢＡ濃度は、２相性のサーカデイアンリズムを示したが、そのうち暗期後半から明期中央にかけての高値は、Ｍｅｔ－Ｅｎｋに一致するもので、両者の共存を反映した結果と考えられた。

視床下部領域においては、Ｍｅｔ－Ｅｎｋ濃度は明期前半に最低値を示した。ＨＶＡ濃度の最低値は明期中央に、Ｃｈ濃度の最低値は暗期中央に認められたが、それらの相互関係は明確でない。

〔緒言〕

脳機能を発現する基本構造は、［ニウロン］→［ニウロン］が構成する神経回路網であり、サーカデイアンリズムを形成する高次神経機能も、各々のニウロン活動のサーカデイアンリズムとして解析できるはずである。本研究においては、［Ｍｅｔ－Ｅｎｋ・ニウロン］を中心にして、それらのサーカデイアンリズムの相互関係について神経核レベルで検討を加えた。

〔実験方法〕

実験動物は、ＳＤ系雄性ラット（実験時９週齢）である。動物は、１２時間毎の明暗周期下、餌・水は自由に摂取できる恒常条件下で５週間飼育したものを用いた。２４時間内３時間毎の８時点において、マイクロウウェーブ処理した脳から、線条体（Ａ９支配領域）と視床下部領域を得た（３）。それぞれの脳標品から、Ｍｅｔ－Ｅｎｋ（ＲＩＡ）、モノアミンとＡＣｈ（ＨＰＬＣ）、ＧＡＢＡ（酵素 cycling）の全てを測定した（３，４，６）。統計学的な処理には、分散分析と ｔ-検定を用いた。

〔結果と考察〕

線条体においては、Ｍｅｔ－Ｅｎｋ濃度は、暗期後半から明期中央にかけて高値を示し、ＨＶＡ濃度からはＤＡニウロン活動が明期に抑制的である結果が得られた。ここでＭｅｔ－ＥｎｋがＤＡニウロンに対して抑制性である（２）ことを考えると、Ｍｅｔ－Ｅｎｋ濃度自体がＭｅｔ－Ｅｎｋ活動活動の指標であり、Ｍｅｔ－Ｅｎｋの変動はＤＡの変動に対して３時間以内先行していると解釈できる。ＨＶＡとＣｈの濃度は明期後半に各々最低値と最高値を示す位相の逆転した日内変動が示された。。これは、ＤＡとＡＣｈニウロンの拮抗関係がサーカデイアンリズムの上でも成立していることを示す結果である。Ｍｅｔ－ＥｎｋとＧＡＢＡは、ラット線条体においてはたがいに約１／２のニウロン群で共存している（１）。ＧＡＢＡ濃度の２相性変化の中、暗期後半から明期前半のピークがＭｅｔ－Ｅｎｋと一致しているのは、両者の共存を反映した結果であると示唆された。５－ＨＩＡＡとＣｈ濃度は、共に暗期の後半に増加する類似した日内変動が示された。線条体における５－ＨＴ終末は背

側縫線核からの投射であり、ＡＣｈによる節前支配を受けている（４）ことを含めて、両者の相互関係が示唆された。

視床下部領域においては、Ｍｅｔ－Ｅｎｋ濃度は明期前半が最小値をとる日内変動が示され、そのサーカデイアンリズムのパターンが一致していることから、ＧＡＢＡと共存している可能性が示唆された。Ｍｅｔ－ＥｎｋとＤＡ、ＤＡとＡＣｈの間には、線条体において示唆されたような相互関係は認められなかった。

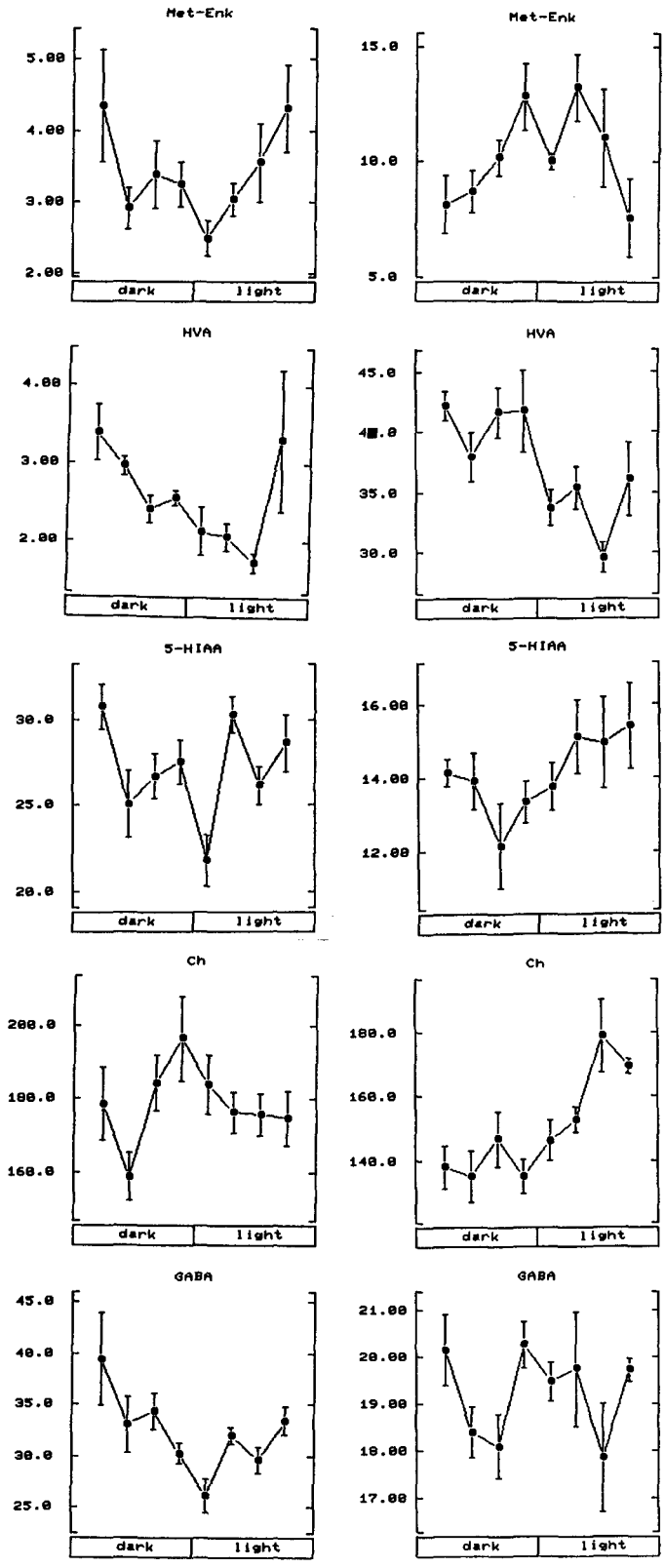



図１　線条体（右列）と視床下部領域（左列）における伝達物質と代謝産物濃度の日内変化。縦軸単位は、pmoles/mg protein, GABAのみnmoles/mg protein (mean±SEM).

[文献]

（１）Aronin,N. et al. (1984) Brain Res., 300; 376-380.

（２）Hong,J.S. et al. (1985) Federation Proc., 44: 2535-2539.

（３）盛政忠臣、他、(1985) 神経化学，24; 118-120.　（４）盛政忠臣、他、(1988) 神経化学，27; 122-123.

（５）Morimasa,T. et al. (1987) Physiology & Behavior, 39: 699-705.

（６）田中雅邦、他、(1987)神経化学，26; 445-447.

# 194 神経芽腫細胞の増殖、形態に及ぼすリゾスフィンゴ脂質の影響

杉山英子・原 厚・武富 保
(信州大・医・心脈管研・脂質生化)

〔要約〕
マウス神経芽細胞腫の細胞株NS-20Y (cholinergic)、Neuro2a(inactive)、NIE-115(adrenergic)にリゾスフィンゴ脂質を与え、増殖や形態に及ぼす影響を調べた。その結果、用いたリゾスフィンゴ脂質の種類によって細胞に対する作用性に明らかな差異があることが判った。リゾ糖脂質のサイコシン(Ps)、リゾスルファチド(lyso-CS)は比較的低濃度で細胞障害性を示したが、リゾリン脂質のスフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)とそのN-アセチル誘導体のN-アセチルスフィンゴシルホスホリルコリン(NAcSPC)は100~150μMという高濃度までは特に増殖・形態に対して障害を与えなかった。そしてSPCとNAcSPCのみが、いずれの細胞においても顕著に神経突起を伸展した。また、3種の細胞間にもリゾスフィンゴ脂質に対する感受性に違いが見られた。神経細胞の持つコリン作動性やアドレナリン作動性などの機能と関連している可能性があり興味深い。

リゾスフィンゴ脂質はスフィンゴ脂質の代謝過程における中間体と考えられるが、最近種々の組織や細胞において外来性のスフィンゴシンやリゾスフィンゴ脂質がPKCの活性を阻害するという知見が得られている[1]。PKC依存性の情報受容機構を調節する役割を果たしていると考えられているが、細胞における所在の有無やその機能発現のメカニズムなど不明な点も多い。本研究では、まず3種のリゾスフィンゴ脂質とN-アセチル誘導体1種を培養液中に添加して、増殖や形態に及ぼす影響を調べた。そして、リゾスフィンゴ脂質の種類による効果の違いと細胞の種類による違いを比較検討し、スフィンゴ脂質の機能を探る手掛かりを得ることを目的とした。

[材料と方法]

脂質：スフィンゴミエリン(SM)はヒツジ赤血球より、セレブロシド(CMH)はヒト脳より、スルファチド(CS)はブタ脊髄より単離したものを用いた。SPC,Ps,lyso-CSはそれぞれSM,CMH,CSより調製した。NAcSPCはSPCより合成した。

培養細胞及び培養条件：神経芽腫細胞 NS-20Y、Neuro2a、NIE-115 は、名市大医学部田中亮、加藤泰治両教授より分与され、10% のFCSを含むDMEM培地 (Flow.Lab.) を用いて37℃, 5%$CO_2$存在下で継代培養した。増殖に対する各種脂質の効果をみるために、$1\times10^4$cells/cm$^2$の密度で10%FCS含有DMEM 2ml、各脂質 0~150μM(終濃度)を加えて培養し、5~6日後に細胞数を算定した。

[結果と考察]

リゾスフィンゴ脂質の効果を調べるにあたり、コントロールとしてそれぞれの元の脂質であるSM、CMH、CSを添加したところSM,CMHにはいずれの細胞株に対しても増殖や形態への障害は見られなかった。しかしながら、CSは細胞の接着力を弱めた。元来接着力の弱いNS-20Y ではCS添加により、ウェルから脱落、浮遊してくる細胞が多く、剥離・採取した時点での細胞数はコントロールを下回った。CS 50μM添加ではコントロールの 76%、100μM添加では48%であった。CSの持つ硫酸基の影響かもしれない。

細胞に対するリゾスフィンゴ脂質の効果については、緩衝液中ではごく低濃度で細胞毒性を示すが、血清添加培地中では血清タンパク質によってその毒性が弱められることが知られている。本研究ではこの事実を踏まえた上で、より生体内に近い条件下でのリゾスフィンゴ脂質の機能を探るため、敢えて血清存在下で実験した。結果としてリゾ

スフィンゴ脂質の効果を認めるにはかなり高濃度の添加を必要とした。図1に示すようにリゾスフィンゴ脂質の種類及び細胞の機能の違いによって細胞の増殖に対するリゾスフィンゴ脂質の影響には差異が認められた。まずNS-20Yに対してはリゾ糖脂質(Ps,lyso-CS)は比較的低濃度で増殖を阻害し、細胞の泡沫化、肥大化、接着力を失っての脱落などの細胞障害性が観察された。一方、リゾリン脂質SPCとそのN-アセチル誘導体には、共にかなり高濃度まで増殖・形態への障害作用は 認められなかった。NS-20Yはコリン作動性であり、コリンを含むSPCとNAcSPCは他のリゾ脂質に比べて細胞に取り込まれやすく、アセチルコリンの合成に利用されているのかもしれない。Neuro2aに対しては増殖や形態に対する各種リゾスフィンゴ脂質の効果には類似性が見られ、Neuro2aは3種の細胞のうちでリゾスフィンゴ脂質に対する耐性が最も強かった。本細胞は他の細胞に比べて代謝系や合成系の酵素の働きがより活発であることが考えられる。 NIE-115 に対しては、lyso-CSのみが際立って強い細胞障害性を示した。他のリゾスフィンゴ脂質は高濃度では増殖・形態への障害性を示すものの、比較的低濃度では影響が小さかった。本細胞はアドレナリン作動性であるので、アミン合成能を有するが、強い酸性の硫酸基を持つ lyso-CSはその機能に影響を及ぼし強い細胞障害を誘発するのかもしれない。NAcSPCは厳密にはリゾスフィンゴ脂質ではないが、本研究で検討した限りにおいてSPCと同様に高濃度では細胞障害性を示した。やはり、SMのようにある長さの脂肪酸がスフィンゴシンのアミノ基に結合していることが重要であることがわかった。しかしながら、細胞の機能の違いにもかかわらず一様な挙動を示した点は、SPCはじめ他のリゾ脂質とは異なっていて興味深い。さらに興味深いことには、SPC,NAcSPCを添加した場合にのみ、血清添加培地中では100~150μMの濃度で3種の細胞に共通して神経突起の伸展が観察された(図2)。SPCはNS-20Yにおいて血清無添加の条件下[2]では1~10μMという低濃度で有効であった。最大有効濃度は2μM前後であった。 以上の事実から、外来性のリゾスフィンゴ脂質は濃度によっては一概に細胞に対して障害的に作用するとは言えないことがわかった。リゾスフィンゴ脂質の細胞の増殖や形態に対する影響は、リゾスフィンゴ脂質の性質と作用させる細胞の機能との密接な関連において、様々な現象を呈すると考えられる。

[文献]

1)Hannun,A,Y.,and Bell,M,R.(1989) Science 243,500-507

2)Tsuji,S.,Yamashita,T.,Tanaka,M.,and Nagai,Y.
(1988) J.Neurochem.50,414-423

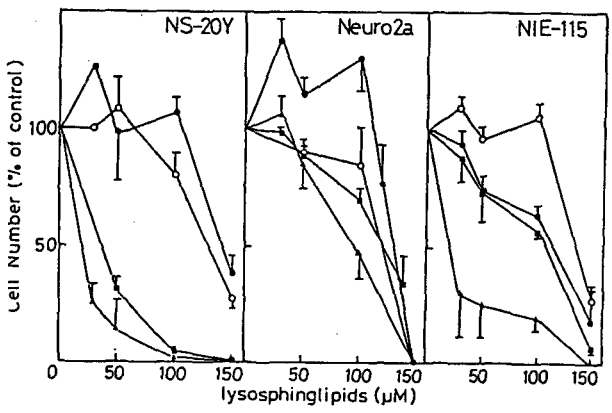



図1 神経芽腫細胞の増殖に及ぼす
リゾスフィンゴ脂質の影響
-●- SPC -○- NAcSPC
-■- PS -▲- lysoCS

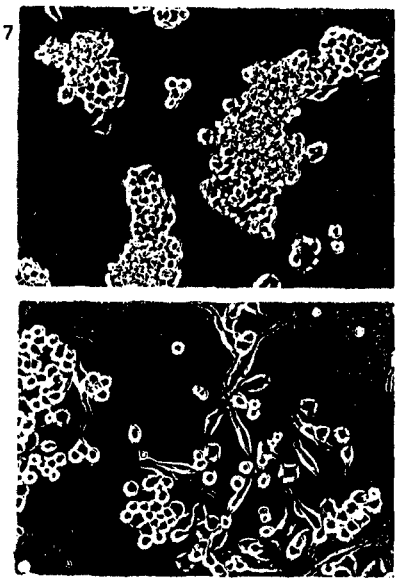


図2 NS-20Y に対するSPCの神経突起伸展効果
上: コントロール
下: 100μM 添加

# 195 プロテインキナーゼCサブタイプの中枢神経系生後発達における変化

平田みどり，斉藤尚亮，細田弘吉，古瀬明子，
伊藤あつ子，辻野　健，吉原千佳，田中千賀子
（神戸大・医・薬理）

〔要約〕

Protein kinase C（PKC）は中枢神経系では神経伝達のみならず、突起伸長などの神経の発生過程や可塑性にも関与していることが示唆されている。今回、遺伝子レベルから分類された4つの PKC サブタイプα、βⅠ、βⅡ、γの成長に伴う変化を、各々のサブタイプに対する特異的な抗体を用い、免疫組織化学的に検討した。α、βⅠ、βⅡ、γは何れも生下時より存在し、生後 2 週間徐々に増加し、14 日目にはほぼ plateau に達した。生下時においてはα、βⅡ、γは殆ど存在しないのに対して、βⅠは成熟ラットの約 50 %の量が存在した。また、免疫染色ではβⅡの免疫陽性反応は生下時には殆ど認められず、生後 2 週間に急増し、生後 28 日目に、ほぼ成熟ラットと同じパターンを示した。一方、βⅠ免疫陽性反応は、いくつかの部位においては、生後 1 週間以内に成熟ラットと同様に認められた。これらの結果から、PKC のサブタイプにより、神経発生過程における機能が異なることが示唆された。

＜緒言＞

PKC は外界刺激によるイノシトール燐脂質代謝の促進によって生成されるジアシルグリセロールによって活性化され、細胞内情報伝達のキーエンザイムとして働いている。PKC は種々の組織に広く分布しているが、特に、中枢神経系に大量に存在し、神経伝達機構に重要な役割を果していると考えられている。近年、PKC は蛋白質レベルでは Type Ⅰ、Ⅱ、Ⅲの3種類（1）、遺伝子レベルではα、βⅠ、βⅡ、γ、δ、ε、ζの少なくとも7種類（2）のサブタイプが存在することが報告されているが、各サブタイプの機能についてはまだ充分に研究されていない。今回我々は、中枢神経系において神経発生やシナプス形成に関与する PKC サブタイプを検討するために、各サブタイプに特異的な抗体を用いた免疫組織化学的手法により、ラット脳における各サブタイプの生後発達に伴う変化を観察した。

＜方法＞

1．抗体の作製

α、βⅠ、βⅡの各サブタイプに特異的なオリゴペプタイドを作製し、ウサギに免疫することにより、それぞれのサブタイプに対するポリクローナル抗体を得た。γについては、ラット大脳から生成した PKC をマウスに免疫してモノクローナル抗体を作製し、特に Type Ⅰ（γ）と強く反応する CK1-97 を用いた。

2．ウェスタンブロット

出生直後（P0）から生後 35 日目（P35）の各週齢の Wistar 系ラットの全脳を、氷冷下に 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 20 μg/ml leupeptin を含む、20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）中でホモジネートし、100,000 g、60 分間遠心した。上清を、7.5 % SDS-PAGE で電気泳動し、ニトロセルロースペーパーに転写した後、上記の抗体を用いて PAP 法で発色した。各抗体は予め FLISA 法においてほぼ同程度の抗体価を示す濃度を決定した。

3．免疫染色

各週齢のラットを 4 % paraformaldehyde, 0.5 % ～ 1 % gulutaraldehyde, 0.2 % picric acid を含む燐酸緩衝液で灌流固定し脳を摘出した。後固定後、30 % sucrose に浸漬し、10 ～ 20 μm のクリオスタット切片を作製した。切片は各サブタイプに対する抗体を第一抗体として PAP 法にて免疫染色した。

＜結果と考察＞

ウェスタンブロットの結果を図1に示す。4種類のサブタイプは、何れも生後発達に伴い漸増するパターンを示した。α、βⅡ、γは生下時にはごく僅かの免疫陽性反応しか認めず、生後 1 ～ 2 週間で徐々に増加し、14 日目でほぼ plateau に達するのに対し、βⅠは、成熟ラットの約 50 % の免疫活性を認め、徐々に増加し、やはり 14 日目にはほぼ plateau に達した。この結果は PKC の酵素活性の生後発達に伴う変化をサブタイプ別に検討した報告（3）とほぼ一致していた。ラット脳における生後のシナプス形成は、生後漸増し、 2 週間目に最も

著明になるという報告から、(4)、α、βII、γの PKC サブタイプがシナプス形成に関与している可能性が示唆された。また、更に詳細な解析が必要であるが、βIはα、βII、γに比べて中枢神経系の発生の早期から発現している可能性がある。

免疫染色画像解析像では、βIIの免疫陽性反応は生下時には殆ど認められず、生後 7 日目に caudate, cerebral cortex (cinglate cortex) に僅かに出現し、生後 14 日目以後急激に強くなって生後 28 日目にはほぼ成熟ラットと同じ分布パターンを示した。βIは brain stem, septal nucleus, globus pallidus などの部位において生後 1 週間ですでに比較的強い免疫反応を認めていた（図2）。

光顕像において、成熟ラット大脳ではβIIの免疫陽性反応は dot 状に認められるが (5)、生後 20 日目頃までこのパターンは認められず、cerebral cortex, hippocampus, caudate 等では、生後 2 週目には神経細胞の細胞膜にそった陽性反応が、細胞体と dendrite に著明に認められた。これらの結果はβIIが神経発生過程においてシナプス後部のシナプス形成に関与している可能性を示唆すると考えられる（図3）。βIとβIIは同一の遺伝子から alternative suplicing によって発現し (6)、蛋白レベルでは区別ができないが、これらの間に発現時期の違いがあるのは興味深いことである。

以上の結果より、ラット脳の PKC 各サブタイプにより神経発生過程における機能が異なることが示唆された。


＜文献＞

1. Huang et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 8535-8539. Kikkawa et al. (1987) FEBS Lett. 217, 227-231.
2. Nishizuka Y. (1988) Nature 334, 661-665.
3. Hashimoto et al. (1988) J. Neurosci. 8(5), 1678-1683.
4. Aghajanian et al. (1967) Brain Res. 6, 716-727.
5. Saito et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3409-3413.
6. Ono et al. (1987) Science 236, 116-1120.

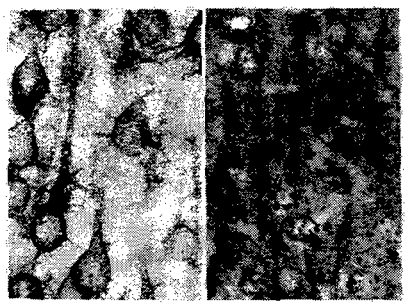




図3．βII-PKC 抗体による大脳皮質の免疫染色

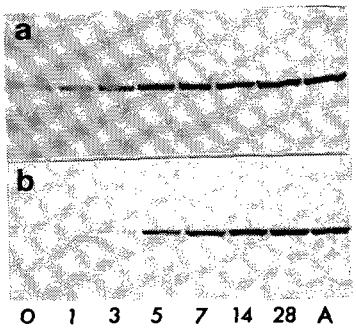



図1．ウェスタンブロット法による
βI(a)-, γ(b)-PKCの生後変化

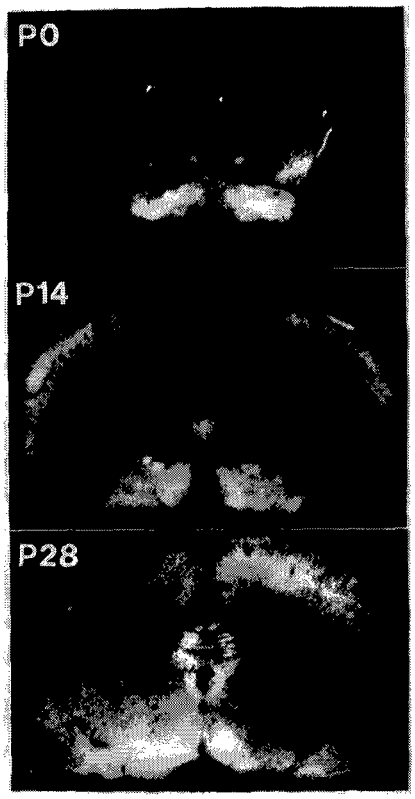



図2．βI-PKC 脳内分布の生後変化
Triangular septal nu. を含む断面

# 196 ラット中隔－海馬系損傷による空間記憶障害に対するコリン作働薬の効果

松岡信也，　前田典昭，　大久保佳孝，　山口勇
（　藤沢薬品工業株式会社・筑波研究所・Basic Research Group ）

〔要約〕
ラット中隔－海馬系に2種類の損傷すなわち中隔内側核損傷（MS lesion)と脳弓－海馬采切断(FF lesion）を与え，8方迷路での空間記憶に及ぼす影響を調べると共に，そこで認められる記憶障害に対するコリン作働薬の効果を検討した．MS lesion, FF lesion のいずれの中隔－海馬系損傷によっても著しい8方迷路での空間記憶障害が認められた．その障害は FF lesionでより顕著であった．両モデルでコリン作働薬のphysostigmine 及びpilocarpine の効果を検討したところ，physostigmine はMS lesion による記憶障害を有意に改善させたが，FF lesionモデルではなんら作用を示さなかった．一方，pilocarpine は両モデルにおいて有意な改善効果を示した．脳内ChAT(choline acetyltransferase) 活性測定によりMS lesion では海馬ChAT活性が約50% 低下していたが，FF lesionではshamの約5%とほとんどChAT活性は枯渇していることが明らかとなった．以上の結果よりphysostigmine とpilocarpine は異なるメカニズムを介して中隔－海馬系損傷による空間記憶障害を改善することが示唆された．

〔緒言〕
脳内コリン作働性神経の記憶・学習に果たす役割は古くから知られているが(1),なかでも海馬のコリン作働性神経の持つ空間記憶の保持における重要性が近年注目を集めている(2)．この海馬のコリン作働性神経は中隔内側核及びブローカの対角に細胞体を発し脳弓－海馬采を介して強い投射を受けている．一方Alzheimer 型老年痴呆で大脳皮質及び海馬のコリン作働性神経に病変が見られ，その程度が痴呆患者の空間認知能あるいは短期記憶の障害と相関のあること(3) からコリン作働薬による治療が広く試みられている(4)．そこで今回我々はラット中隔－海馬系に程度の異なる2種類の損傷を与え8方迷路での空間記憶に及ぼす影響を調べ，そこで見られる障害に対するコリン作働薬の効果を検討した．

〔実験方法〕
1)実験動物：Fisher系雄性ラット（開始時10週令）を用いた．実験期間中は体重を開始時の83% にコントロールした．
2)損傷手術：手術はすべてpentobarbital 麻酔下で行った．MS lesion はMS(AP0.8, L0, V7.0) へ高周波電流を1分間通電することによる熱凝固（約60℃）とした．Sham群では電極の刺入を施したが通電はしなかった．FF lesionはマイクロナイフを用いた両側性切断(AP-2.0, L-4 ～4, V5.0) とした．Sham群では中心静脈のみを切断した．
3) 8方迷路課題：3日間のハンドリングの後，Olton らの方法(5) に従って7日間1日1試行の訓練を与えた．訓練終了後中隔－海馬系損傷手術を与え1週間の回復期間の後，次の薬物テストに入った．空間記憶の指標としては正選択数，初期正選択数，正選択率，誤選択数の4つを測定した．
4)薬物テスト：Physostigmine, pilocarpine はいずれも生理食塩水に溶解させテスト試行15分前にi.p.投与した．薬物テストにおいてはすべての動物がすべての投与量を経験させるように，投与量の数だけテストを繰り返した．テストとテストの間には2日以上の休薬期間を与えた．
5)ChAT活性測定：各脳部位のChAT活性をFonnumらの方法(6) に従い測定した．

〔実験結果〕
1)ラット中隔－海馬系損傷の8方迷路課題に及ぼす影響
ラットに中隔－海馬系損傷手術を与えた後，1ケ月間8方迷路での行動を観察したところMS lesion，FF lesionのいずれのグループにおいても著明な空間記憶障害が認められ，1ヶ月間それは回復することがなかった(Fig.1)．空間記憶障害は正選択数，初期正選択数，正選択率の有意な低下及び誤選択数の有意な上昇として認められたが，その障害は FF lesion のグループでより顕著であった．
2)コリン作働薬の効果

それぞれの損傷による空間記憶障害に対するphysostigmine 及びpilocarpine 急性投与の効果を調べたところFig. 2 に示すような結果が得られた．すなわちphysostigmine の投与はMS lesion では改善効果を示し0.32 mg/kgでの作用は統計的に有意であった．しかし FF lesionモデルではいずれのパラメーターにおいても何ら改善効果は認められなかった．一方，pilocarpine はいずれのモデルでもbell-shapeの改善効果を示しMS lesion では0.32及び3.2 mg/kg，FF lesionにおいては0.1 mg/kg での作用が有意であった．

3)脳内ChAT活性に及ぼす影響

MS lesion，FF lesionを与えた1週間後に各脳部位のChAT活性を測定したところ，Table 1 に示すようにMS lesion では海馬ChAT活性がsham群の約50% に，FF lesionではsham群の約5%に低下していることが明らかとなった．いずれの lesion も前頭皮質，線条体のChAT活性にはほとんど影響を及ぼさなかった．

〔考察〕

中隔－海馬系損傷により8方迷路課題で著しい障害が認められたことから海馬のコリン作働性神経は空間記憶の維持に重要な役割を果していることが明らかとなったが，その障害が FF lesionでより顕著であったことから損傷の程度と記憶障害の間には相関のあることが示唆された．

さらにphysostigmine はMS lesion でのみ改善効果を示したが，pilocarpine は両モデルで有効であったことから，2薬剤は異なるメカニズムを介して中隔－海馬系損傷による空間記憶障害を改善することが示唆された．すなわち physostigmine のように間接的な作働薬は，残存する神経を賦活化させることにより損傷の程度に依存して作用を示し，pilocarpine のようなM1 agonistは損傷の程度に関係なく直接海馬を刺激して作用することが推察された．

〔文献〕

(1)Bartus, R. T. et al. (1982) Sience 217, 408. (2)Nilsson, O. G. et al. (1987) Exp. Brain Res. 67, 195. (3)Coyle, T. G et al. (1983) Science 219, 1184. (4)Mohs, R. C. et al. (1985) Am. J. Psychiat. 142, 28. (5)Olton, D. S. et al. (1978) Brain Res. 139, 295. (6)Fonnum, F. (1975) J. Neurochem. 24, 407.

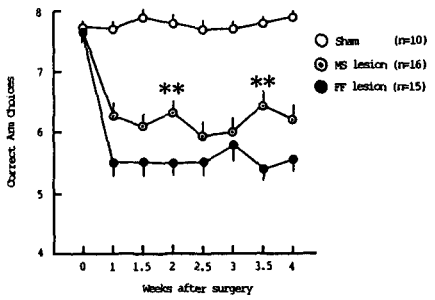



Fig.1. Mean correct arm choices in rats with MS and FF lesion in the radial maze task. Each points represent the means ± S.E.M.. * P<0.05, ** P<0.01, compared with the FF lesioned animals using Student's t-test.

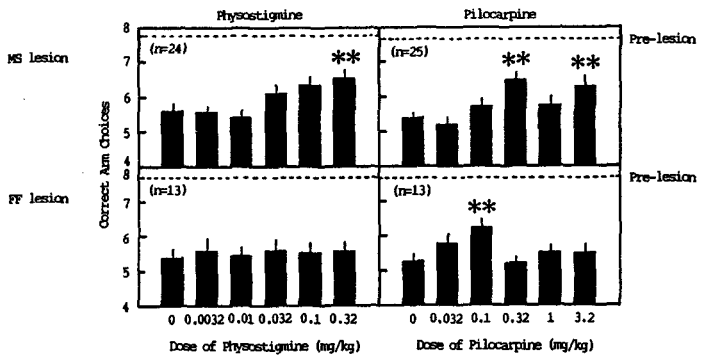



Fig.2. The effects of physostigmine and pilocarpine on the memory impairment induced by MS and FF lesion. The data are expressed as the means± S.E.M.. ** P<0.01, compared with saline-treated controls using ANOVA followed by Duncan's multiple comparison test.

Table 1. Regional ChAT activity after two kinds of septo-hippocampal deafferentations

| Regions | MS lesion (n=11) | FF lesion (n=15) |
|---|---|---|
| Hippocampus | 54.8 ± 4.6 *** | 6.2 ± 0.6 *** |
| Cortex anter. | 98.8 ± 2.3 | 98.5 ± 2.0 |
| Cortex postr. | 88.4 ± 2.1 *** | 66.0 ± 2.7 *** |
| Striatum | 105.0 ± 5.2 | 93.2 ± 1.8 ** |

Values are means± S.E.M. of per-cent of each sham animals. ** P<0.01, *** P<0.001 compared with the corresponding region of each sham animals using Student's t-test

# 197 ラットwater maze学習に及ぼすAF64Aの影響

石井 豊*, 石川 紘一**
(*日研化学・大宮研究所, **日本大・医・薬理)

〔要約〕

海馬にコリン作働性神経毒である ethylcholine mustard aziridinium ion (AF64A) を投与すると，コリンエステラーゼ (ChE)には影響しなかったが，投与した部位に限局したコリンアセチル転移酵素 (ChAT) の活性低下とACh 濃度の減少が引き起こされた。投与後１週間以内において自発運動量の増加が認められたが，10日目以降ではこの増加も回復した。そこで10日目または17日目にwater maze学習を行わせたところ，学習獲得の障害が認められた。以上の結果から，AF64A の微量・局所投与が，投与部位（今回の実験では海馬）に限局したコリン作働神経系の障害モデルを作るのに適した方法であり，この神経系の異常によって，water maze学習が障害されることが示された。

〔緒　言〕

古くは臨床的な所見から始まって，中枢神経系内のコリン作働神経系が動物の記憶形成に重要な働きをしていると考えられている (4)。実験的には ethylcholine mustard aziridinium ion (AF64A) が選択的神経毒として用いられ，この薬物によって中枢性コリン作働神経系を破壊した場合，明暗弁別学習 (1,7)や迷路学習の獲得 (2)が抑制されたと報告されている。動物を用いて学習・記憶を論じる場合，色々なタイプのパラダイムを用い，共通した効果が認められるか否かを検討しなければならない。迷路学習の中で，いわゆるwater mazeはspatial memoryまたはworking memoryの異常を検出するのに都合のよい方法とされている (5)。一方，記憶形成に関係している解剖学的な部位として，電気生理学的研究や生化学的研究から，海馬が注目されている。海馬へは，N. septi medialis や N. gyri diagonalis, pars dorsalisに起始核を持つコリン作働性ニューロンが線維を送り込んでいる。そこで，AF64A を海馬に投与し，コリン作働神経終末の破壊が，water maze学習に及ぼす作用を検討した。

〔実験方法〕

(1) 実験動物：体重約200 g のWistar系雄性ラットを使用した。動物は実験を行うまで，恒温 (23 ± 1℃)，恒湿 (55 ± 5%)，明期・暗期 (12時間交代) を人工的に調節した室内で飼育した。餌は通常の固形飼料 (日本クレアCE-2) を，また水は水道水を自由に摂取させた。

(2) AF64A の調製と投与法：AF64A はFisherらの方法 (3)に従い，前駆物質である acetyletylcholine mustard Cl (acetyl-AF64) より用時調製して実験に使用した。acetyl-AF64 23mgを4 mlの生理食塩水に溶解し，0.5 N NaOHを加え，pHを11.5～11.7に30分間維持し，次に0.2 N HCl を加え，pHを最終的7.3～7.4に調製した後，室温で１時間放置することによりAF64をaziridinium 環を有するAF64Aに変換した。ラットへの投与は，麻酔後脳定位固定装置に固定し，両側海馬 (A:+5.2mm, L:±3.3mm, V:-2.7mm)に30 Gの注射針をたて，この針を介してAF64A または生理食塩水 (対照群) を２分間で注入した。AF64A の投与量は0.5～20 nmolの範囲とした。

(3) Water maze学習：Morrisら(5) の方法に準じて行った。プールのサイズは直径1.8m，深さ0.45mであり，深さ0.3mまで水 (26±1℃)を張り，スキンミルクを加えた。プールの縁にはNorth, Sourth, West またはEastの４ポイントをとり，プールを４分画した。ラットが水より回避するためのプラットホーム (直径９cm) は分画中央の中心より45cmの位置に固定し，プラットホームの高さは水面下１cmに見えないようにした。water maze学習の獲得試行は最大遊泳時間を600秒とし，水面下に隠されたプラットホームに回避する潜時を測定した。試行が終了した後，ラットはプラットホームに30秒間放置した後ホームケージに戻した。試行は１日３試行連続４日間計12試行を行った。なお，ラットの入水は４ポイントよりランダムに行った。AF64A のwater maze学習への影響は注入後10および17日目より行った。また，AF64A による運動活性への作用はデジスキャンを用いて３日目より21日目まで測定した。

(4) 脳内伝達物質濃度および酵素活性の測定：AF64A を注入したラットは頭部にマイクロウェーブを照射して屠殺し，Glowinsky and Iversen の方法に従い海馬，線条体および大脳皮質前部に分画した後，ACh 濃度を電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) により測定した。また，AF64A 注入１週間後断頭により屠殺し，海馬におけるChAT活性およびChE 活性を HPLC-ECD を用いて測定した。

〔実験結果および考察〕

AF64A (5 nmol)を海馬実質内に投与したところ，投与後３日目より７日目にかけて自発運動活性の上昇が認められた。

このような変化は，今回用いたような学習パラダイム対して重大な影響を及ぼすので，water maze学習はこの時期を外して行った。AF64A (5 nmol)を投与すると，海馬ChAT活性の著しい低下が認められた（図1）。これに対してChE 活性には有意の変化は認められなかった。従来AF64A は，脳シナプトゾームへの高親和性コリン取込み機構を阻害することにより，ACh 濃度を減少させると考えられて来たが (3)，今回の結果では合成酵素に対する作用も認められた。この場合でも，酵素活性の変化は海馬においてのみ発現し，他の部位では認められなかった。一方，AF64A をO.5 nmolから20 nmol の範囲で海馬に投与したところ，海馬ACh 濃度は用量依存的に減少した。この変化は投与後21日目まで認められ，実際にwater maze学習の行われた時点で，海馬ACh 濃度の低下していたことが確認された（図2）。投与部位以外，例えば線条体，大脳皮質前部には，有意の変化は認められなかった。以上の結果より，AF64A を脳内局所に適用すれば，限局したコリン作働神経系の障害モデルを作ることが可能であることが確認された。

Water maze学習の獲得試行は，AF64A 注入後10または17日目より４日間行った（図3）。無処置群および偽手術群のラットにおいては，水面下に設置されたプラット・ホームに到達するまでの時間（潜時）が，試行回数とともに減少した。しかし，海馬にAF64A を投与され，ACh の減少していた動物においては潜時が減少せず，潜時を比較するとAF64A 投与群において有意に延長していた。この結果は，海馬のコリン作働神経系が不全状態になった場合，water maze学習が阻害されたことを示している。しかし，AF64A の投与量を減少した場合，学習阻害作用は認められなくなった。AF64A を投与した場合，弁別回避学習 (1,7)や放射状迷路学習 (2)の阻害されることは既に報告されているが，water maze学習においても同様な結果が得られたことになる。しかし，学習障害を起こすためには完全な海馬コリン作働神経系の破壊が必要であろうと考えられる。動物の学習・記憶を論じる場合，さまざまなパラダイムの結果を比較する必要があるが，AF64A を用いた海馬不全モデル動物の結果は，学習・記憶実験のモデルとして重要なものとなろう。

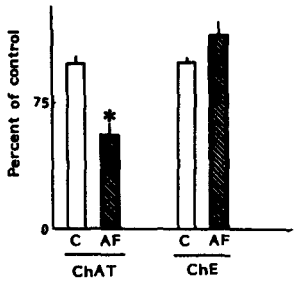



図1　ChATおよびChE 活性に及ぼすAF64Aの作用
*P < 0.01

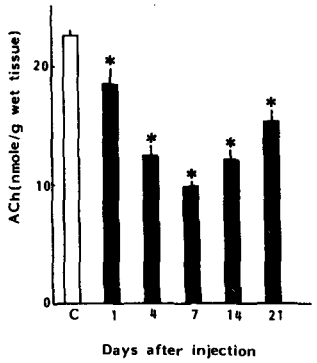



図2　海馬内AF64A 投与後の経時的ACh 濃度の変化
5 nmolのAF64A を投与後海馬内のACh 濃度をEPLC-ECDを用いて測定した。海馬以外の部位では有意の変化を認めなかった。
*P < 0.01

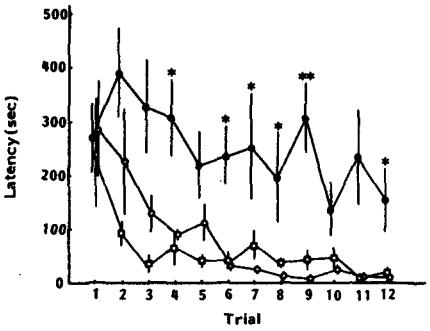



図3　Water maze学習に及ぼす海馬内AF64A 投与の影響
5 nmolのAF64A を投与後10日目より学習を行った。薬物投与群（●）においては反応潜時が有意に延長したが，無処置（□）や偽投与群（○）には変化を認めなかった。
*P < 0.05, **P < 0.01

［文　献］
(1) Bailey, E.L., Overstreet, D.H. and Crocker A.N. (1986) Behav. Neural Biol. 45, 263-274.
(2) Blaker, W.D. and Goodwin, S.D. (1987) Pharmcol. Biochem. Behav. 28, 157-163.
(3) Fisher, A., Mantione, C.R., Abraham, D.J. and Hanin, I. (1982) J. Pharmacol. Exp. Ther. 222, 140-145.
(4) Iversen, L.L. and Rossor, M.N. (1984) Neurobiology of Learning and Memory (Lynch, G. et al. Eds), Guilfor, 363-373.
(5) Morris, R. (1984) J. Neurosci. Meth. 11, 47-60.
(6) Shibanoki, S., Watabe, S., Ishikawa, K. and Saito, S. (1982) Neurosciences 8, 333-337.
(7) Walsh, T.J., Tilson, H.A., DeHaven, D.L., Mailman, R.B., Fisher, A. and Hanin, I. (1984) Brain Res. 321, 91-102.

# 198　ウシガエルの視神経再生機構について

溝渕　宗秀・八木　康之・水野　有武・松田　誠
（慈恵医大・医化学）

〔要約〕

昨年、一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、tubulin mRNAは、切断後 1，2時間目に一過性に増加し、これ以降は切断後 28日目まで再び徐々に増加することを報告した。また、actin mRNA は、切断して 24時間は著明な変化を認めなかった。今回は、それ以降の actin 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 7日目に強く増加することが分かった。これは、切断された軸索が伸長を開始する時期とほぼ一致している。また、切断された軸索の先端には成長円錐(growth cone)が存在し、この細胞骨格は、主に actin を含んだ microfilament から成ることが知られている。これらの事実は、 actin mRNA の増加が、 growth cone 形成に必要な actin を供給するために網膜神経節細胞で induce された結果である可能性を示唆している。

〔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、一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を遺伝子レベルで検討し、その結果を報告した。視神経を切断して1カ月間経時的に網膜 RNA を抽出し、α-tubulin を probe として northern blotを行ったところ、切断後 1，2 時間の時点で一過性に強く増加し(1)、さらに、これ以降は切断して 1カ月目まで再び徐々に増加した。 同様に、切断して 24 時間までの actin mRNAの発現量の変化について検討したところ、著明な変化を認めなかった。今回我々は、視神経切断後の網膜内 actin 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 2，4，6，7，9，10，14，28 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。

Northern blot 及び dot blot 法

Northern blot 法は、total RNA を変性後、agarose gel 電気泳動で分離し、nitrocellulose膜にトランスファーした。 さらに、加熱処理後、actin cDNA を［$\alpha^{-32}$P］dCTP でラベルして得られた probeを用い、hybridization を行った。dot blot 法も同様に total RNA を nitrocellulose 膜に添加した後、hybridizationを行った。さらに、autoradiographyの結果は、 Dual-wavelength flying-spot scanner（島津）で定量した。actin cDND は、筑波大学 新井先生より譲渡された。

〔結果及び考案〕

Fig. 1 は、昨年の日本神経化学会において報告した視神経切断後 2 日目から 28 日目までの α-tubulin mRNAの発現量の変化を northern blot により解析した結果である。α-tubulin mRNAは、28日目まで徐々に増加した。Fig. 2 に示すように、さらに、この結果を autoradiography をdensitometerで定量することにより確認した。 Fig. 3 は、視神経を切断して28日間の actin mRNA の発現量の変化を northern blotにより解析した結果である。 切断して約1週間目（lane 5，6）に強い発現が認められた。さらに、この actin mRNAレベルの定量的変化をみるために dot blot とそのdensitometric scanning を行った結果を Fig. 4 に示す。 これにより、切断後1週目に actin mRNA の強い発現が認められることが確認された。

発生途上の軸索や再生する軸索の先端には成長円錐(growth cone) が存在しており、これらを適切な目標に導いている(2)。また、この成長円錐の細胞骨格は、主に actin を含んだ microfilamentから成っていることが報告されている(3)。 一方、ウシガエルでは、視神経を切断してから軸索伸長が開始されるまでの期間は、4-10日とされており（4）、今回観察された actin mRNA の強い発現が認められた時期とほぼ一致している。これらの結果により、成長円錐形成のために必要な actinを供給するために actin mRNA が induce された可能性が示唆された。

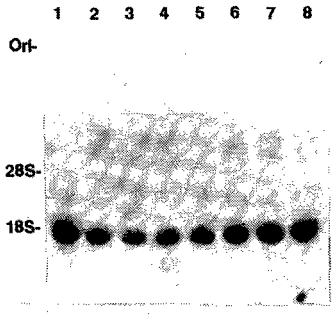



Fig. 1 Time-course of changes in tubulin mRNA levels determined by northern blot analysis. Total RNA extracted from rat brain (lane 1), control retinas (not transected, lane 2), and the retinas excised at 2 d (lane 3), 4 d (lane 4), 6 d (lane 5), 7 d (lane 6), 14 d (lane 7), and 28 d (lane 8) after transection by guanidinium/CsCl. Ten μg aliquots of total RNA were electrophoresed on a 1% formaldehyde-agarose gel, transferred to nitrocellulose membrane, and hybridized to the $^{32}$P-labeled α-tubulin cDNA as described in the Materials and Methods. The origin (Ori) and the positions of ribosomal 28S RNA and 18S RNA are indicated.

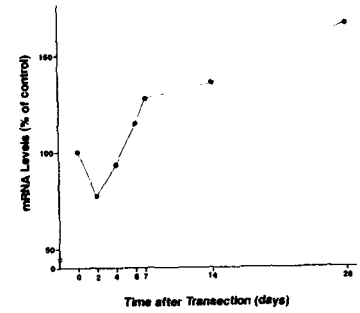



Fig. 2 Quantitative analysis of changes in tubulin mRNA levels during regeneration. Northern blot analysis in Fig. 1 was measured by densitometry. Experimental details were exactry as described in Fig. 1.

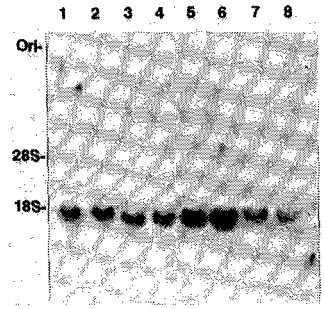



Fig. 3 Time-course of changes in actin mRNA levels in frog retinas during regeneration. Northern blot analysis of total RNA extracted from rat brain (lane 1), control retinas (not transected, lane 2), and the retinas excised at 2 d (lane 3), 4 d (lane 4), 6 d (lane 5), 7 d (lane 6), 14 d (lane 7), and 28 d (lane 8) after transection was carried out. Ten μg aliquots of total RNA were electrophoresed on a 1% formaldehyde-agarose gel, transferred to nitrocellulose membrane, and hybridized to the $^{32}$P-labeled actin cDNA as described in the Material and Methods. The origin (Ori) and the positions of ribosomal 28S RNA and 18S RNA are indicated.

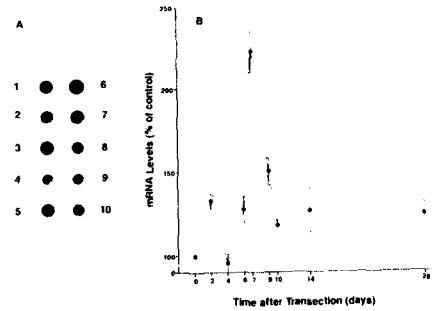



Fig. 4 Quantitative analysis of changes in actin mRNA determined by dot blot hybridization. A: total RNA was extracted from rat brain (dot 1), control retinas (not transected, dot 2), and the retinas excised at 2 d (dot 3), 4 d (dot 4), 6 d (dot 5), 7 d (dot 6), 9 d (dot 7), 10 d (dot 8), 14 d (dot 9), and 28 d (dot 10) after transection. Ten μg of total RNA was loaded into wells and vacuum filtered. Then baking, prehybridizaion, hybridization, washing, and autoradiography were performed by the same method as northern blot hybridization. The intensities of dot blot hybridization were measured by densitometry. B: Data are mean ± SE (bars) values from three experiments.

[文献]

1) Mizobuchi, T. et al. (1988) Neurosci. Lett. 86, 144-146.
2) Bray, D. (1982) Neurosci. Res. Prog. Bull. 20, 821-829.
3) Wessells, N. K. et al. (1971) Science 171, 135-143.
4) Maturana, H. R. (1958) J. Anat. 92, 21-27.

# 199　コリン作働性神経系の行動科学に及ぼす影響

野村正彦・岡村邦博
（藤田学園保健衛生大・医・生理）

［要約］　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、コリン作働性神経起始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。そして、この神経核を中心に破壊した後、継時的にどう変化するかを、２週、４週および８週間後から、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は、２週間後から学習を開始した群が最も著明で、次いで４週間後であり、８週間後からの成績は、３群間で最も良い事が分かった。しかし、学習不全の程度はアセチールコリン転換酵素（ ChAT ）値とは対応せず、特に破壊した部位、および大脳皮質での ChAT 活性は時間の経過と共に強くなった。これは、マイネルト核を破壊した後に、コリン作働性神経系の変化は広範な脳全体におよぶ変性と脱落を起こしたものと考えられた。そして、今回作製したコリン不全ラットは、脳の老化のみならず、アルツハイマー病を含む脳機能障害のモデル動物として、行動生理学ならびに行動薬理学的利用が可能である事が示唆された。

［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(10)。今回は、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を、実験的に作製するために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して作製した(6、8)。そして、これらの神経核破壊が、継時的にどの時期にどの程度の強度で、アセチールコリン作働性神経系に損傷を起こしたかを、アセチールコリン合成系を酵素レベルで測定するとともに、行動科学的に学習能力を指標にして、相関性を調べた。

［方法］

実験動物：　１０週齢の FISCHER 344 ラットの両側の脳実質内に、イボテン酸（10 mg/ml の濃度を 0.5ul）を infusion pump で注入して作製した。脳内注入部位は脳図布によりステレオタキシックに行なった（1、6)。

（１）．　学習実験：　対照群およびイボテン酸投与ラットを２週、４週および８週間後から、学習能力を検索した（4、5)。学習には、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検索した。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 Variable Interval 15 Seconds Extinction 課題で３０日間連続して行なった（4、9)。各群はそれぞれ１０匹平均で比較した。

（２）．　脳内アセチールコリン転換酵素の測定：　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。学習開始時期に一致させて、イボテン酸投与後、２週、４週および８週間後のラットを用いて測定した(7)。

［成績］

（１）．　学習成績

１）．２週群は第１試行日にはＲ＋は５７回、Ｒ－は６０回で、正反応率は４５％であった。そして第８試行日まで、Ｒ－がＲ＋より高く、この両反応数が有意差を示したのは第１０試行日であった。弁別学習成績の指標となる正反応率は試行日数の進行に伴い増加した（図－１）。しかし、４週群よりも、最後の４試行日以外は低かった。

２）．４週群は第１試行日にはＲ＋は７７回、Ｒ－は１００回で、正反応率は４４％であった。そして第６試行日まで、Ｒ－がＲ＋より高く、この両反応数が有意差を示したのは第９試行日であった。正反応率は試行日数の進行に伴い増加し、２週群よりおしなべて高かった。

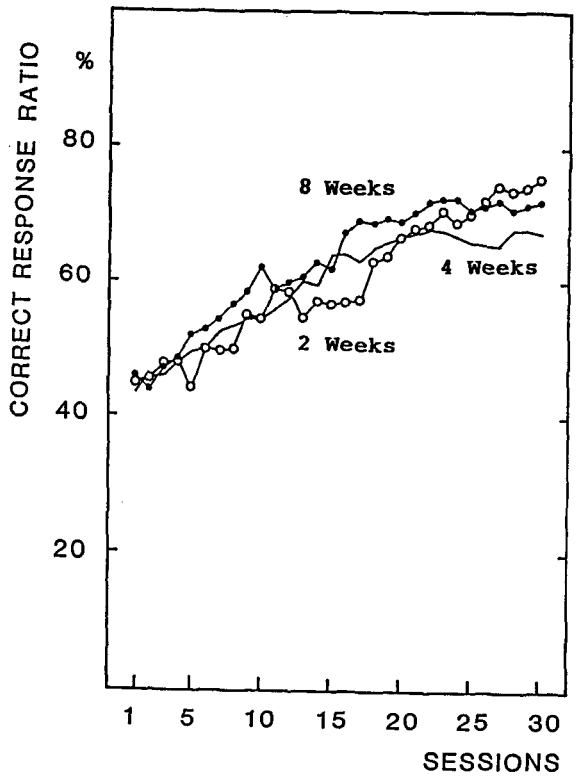
３）．８週群は第１試行日にはＲ＋は８３回、Ｒ－は９５回で、正反応率は４６％で、３群中最も高かった。そして第４試行日まで、Ｒ－がＲ＋より高く、この両反応数が有意差を示したのは第６試行日であった。正反応率は試行日数の進行に伴い増加し、その上昇傾向は最も高かった。
そして、３０日間の通算正反応率からも同様の結果をえた。
（２）．アセチールコリン転換酵素脳の６部位の酵素活性値の比較を、実験群３群間で比較した。これらの内、線条体と大脳皮質部位を図－２に示した。８週群は何れの部位でも最も低値を示した。

## ［考察］

イボテン酸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(6)。しかし、これらの学習成績と、破壊による障害の程度はアセチールコリン合成酵素である ChAT 活性値とは、必ずしも相関しなかった。神経毒であるイボテン酸による変性が、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、大脳全般に広がり、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(1、5、6)。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る事からも推察される (2)。以上の化学変化から、障害は常時持続進行しており、治療的考察を試みるには、より早い時期に開始する必要性がある事が示唆された。

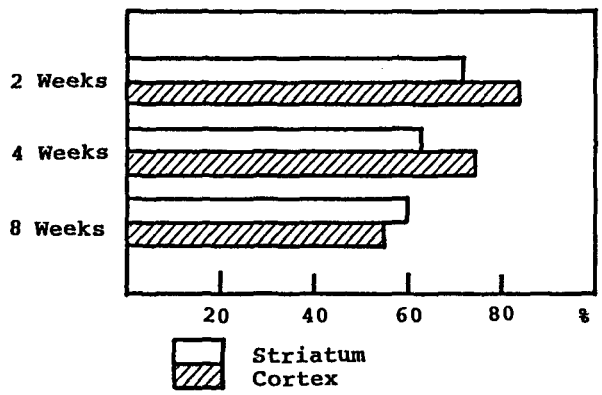
図－１

Correct response ratios in different 3 groups of ibotenic acid treatment




図－２

Percent decreases of CHAT activity in rat brain after ibotenic acid treatment




## ［文献］

1.Fibiger,H.C.(1982) Brain Res.Rev.4,327-388. 2.Fine,A.,Dunnell,S.B., Bjorklund, A. & Iversen,S.D.(1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA.82,5227-5230. 3.Glowinski,L. & Iversen,L.C.(1966) J.Neurochem.13,655-669. 4.Nomura,M.(1984) Res.Commun.Psychol. Psychiat.Behav.9,373-384. 5.Nomura,M.(1985) Jpn.J.Psychopharmac.5,243-249. 6. Nomura,M.,Shoda,M. & Kanno,T.(1988) Shinkeikagaku 27,146-147. 7.Rossier,K., Bauman,A. & Benda,P.(1973) Arch.Biochem.Biophys.32,231-234. 8.Schwarz,R., Hökfelt,T.,Fuxe,K.,Jonsson,G.,Goldstein,M. & Terenius,L.(1979) Exp.Brain Res.37, 199-216. 9.Tsukada,Y.,Nomura,M.,Nagai,K.,Kohsaka,S.,Kawahata,H.,Ito,M. & Matsutani,T.(1977) Behav.Neurochem. pp.63-84(spect. pub.). 10.Whitehouse,P.J., Price,D.L.,Struble,R.G.,Clark,A.W. & Delong,M.R.(1982) Science 215,1237-1239.

# 200 HOE 427の海馬長期増強に対する作用

田中祥貴、桜井真夫、林　昌亮、
（ヘキストジャパン医薬総合研究所、薬理）

［要約］

ACTH(4-9)アナログの一つであるHOE 427の海馬長期増強に対する作用を調べた。HOE 427（10 nM, 100 nM）を海馬切片標本に30分間潅流後、CA1野とCA3野の錐体細胞の集合電位を記録したがほとんど変化はなかった。しかし長期増強を誘発するためのテタヌス刺激を与えた後では、CA3野の長期増強をコントロールにくらべ有意に増大させた。一方 CA1野の長期増強にはほとんど作用がなかった。β受容体アンタゴニストのプロプラノロール（1 μM）とHOE 427を同時に潅流すると、HOE 427の長期増強に対する増大作用が阻害された。したがってHOE 427の長期増強に対する作用はβ受容体が関与していると考えられる。またノルエピネフリン（10 μM)による長期増強の増大に対し HOE 427 (10 nM)はほとんど作用を及ぼさなかった。従ってHOE 427はノルエピネフリンの放出を増大させることにより、長期増強に作用していると考えられる。

［目的］

HOE 427は海馬に特異的に取り込まれることが明らかにされており[3]、海馬ニューロンに対しなんらかの作用を及ぼしていることが予想される。海馬の興奮性シナプスに短時間の高頻度刺激を与えると、それ以後シナプス伝達が促進することが知られている[1]。この現象は長時間持続し、長期増強（Long-term potentiation, LTP）と呼ばれている。今回われわれはHOE 427のLTPへの作用を調べ、神経細胞に対する作用を検討した。

［方法］

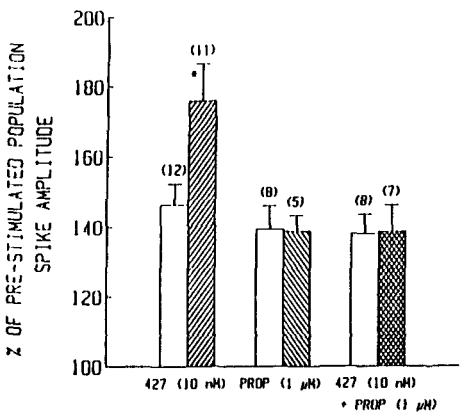
体重250-350 gのモルモットの脳より厚さ400 μmの海馬切片を作製した。海馬切片は混合ガスを通気した人工脳脊髄液（NaCl 124 mM, KCl 3.3 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM, $KH_2PO_4$ 1.25 mM, $MgSO_4$ 2 mM, $NaHCO_3$ 25.7 mM, Glucose 10 mM）の潅流液中に1-2時間以上放置した後、2 MのNaClを充填した2-5 MΩのガラス管電極を海馬CA1野あるいはCA3野の錐体細胞層に刺入し、細胞外集合電位を記録した。実験槽は人工脳脊髄液を2-2.5 ml/minで潅流し、温度は33 ℃に保った。 CA1野、CA3野の錐体細胞を刺激するために、先端以外は絶縁してある2本の直径200 μmのエナメル銀線をシェーファー側枝、あるいは苔状線維の部分に置いた。応答を記録するためのテスト刺激の周波数は0.2 Hzを用いた。刺激電圧はCA1野、CA3野でそれぞれ最大応答を引起こす電圧の40 %と80 %を用いた。LTPを誘発するためのテタヌス刺激は同電圧でCA1野、CA3野でそれぞれ50 Hz 2秒、20 Hz 5秒の刺激を行った。集合電位の大きさは応答の最小値とそれに続く最大値との差をとった。実験は集合電位の振幅が安定してから行った。(±)プロプラノロール（Aldrich), HOE 427 (Hoechst AG)、ノルエピネフリン（Sigma）は全て人工脳脊髄液に溶かし使用した。LTP形成の初期過程に対する薬物の作用を調べるため、薬物はテタヌス刺激直前まで30分間潅流し、テタヌス刺激直後に洗い流した。薬物潅流を受けた切片では潅流前、30分間潅流後のテタヌス刺激前、コントロールの切片では、テタヌス刺激前に記録を行い、それ以後は各切片ともに、テタヌス刺激直後から5分間ごと20分まで記録した。

［結果及び考察］

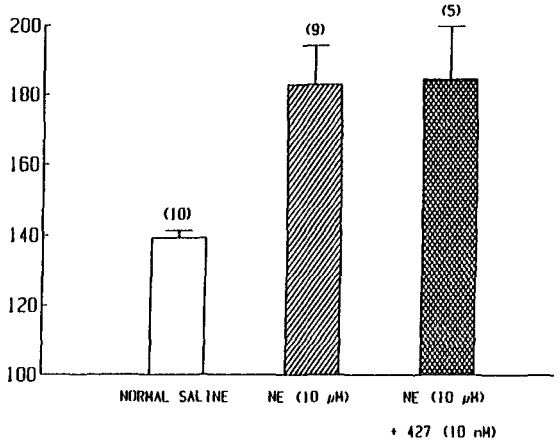
コントロールの切片では、テタヌス刺激後の集合電位の大きさはテタヌス刺激直後に一過性に増大したが、それ以後20分間は安定した応答の増大を示した。コントロール切片の20分後の集合電位（LTP）の大きさはテタヌス刺激前

の集合電位より約40 %増大した。HOE 427 (10 nM, 100 nM) の30分間灌流で、テタヌス刺激前のCA3野の集合電位にほとんど影響は見られなかった。しかしテタヌス刺激後の集合電位 (LTP) は5分後以降、20分後までコントロール切片にくらべ有意に増大した。CA1野の集合電位はHOE 427(100 nM) を30分間灌流後も変化しなかった。またHOE 427 (100 nM) はCA1野のLTPにも影響を及ぼさなかった。HOE 427のLTP増大作用がβ受容体を介しているのかどうかを調べるため、β受容体アンタゴニストであるプロプラノロールのLTPへの作用を調べた。プロプラノロール (1 μM) 単独ではテタヌス刺激前の30分灌流で集合電位にほとんど作用しなかった。またプロプラノロール (1 μM) はLTPにもほとんど影響を及ぼさなかった。しかしプロプラノロール(1 μM) とHOE 427 (10 nM) を同時に灌流すると、HOE 427 (10 nM) 単独適用で見られたLTPの増大が完全に阻害された (左図)。

ACTHは青斑核のノルアドレナリン作動性ニューロンを興奮させ[2]，またACTHは交感神経からのノルアドレナリンの放出を増大させる[4]。HOE427によるLTPの増大はβ受容体アンタゴニストのプロプラノロールで抑制されることから、おそらくHOE 427はβ受容体を介してLTPを増大させていると考えられる。HOE 427のLTPへの作用がノルエピネフリン放出の増大によるのか、あるいはβ受容体の活性化によるのかを調べるため、ノルエピネフリン (10 μM)によるLTPの増大にHOE 427が作用するかどうかを調べた。ノルエピネフリンは単独でテタヌス刺激まえ30分灌流で集合電位の振幅を有意に抑制したが、LTPを増大させた。一方HOE 427 (10 nM)とノルエピネフリン (10 μM)を同時に灌流しても、ノルエピネフリン単独のLTPへの作用と差はなかった (右図)。もしHOE 427がβ受容体を活性化させLTPを増大させるのなら、HOE 427とノルエピネフリンの同時灌流でさらにLTPが増大すると考えられる。したがってHOE 427はノルエピネフリンの放出を増大させることによりLTPに作用しているのであろう。しかし、我々の系では5-HTもLTPを増大させることが観察され、5-HTへのHOE 427の関与も考えなければならない。




HOE 427とプロプラノロール(PROP)単独及び同時適用によるLTPへの作用。




ノルエピネフリン(NE)単独のLTPへの作用、及びノルエピネフリンとHOE 427同時適用によるLTPへの作用。

[文献]

1. Bliss, T. V. P., and Lomo, T. (1973) J. Physiol. 232, 331-356

3. Olpe, H. R., Jones, R. S. G. (1982) Brain Res. 251, 177-179

4. Simura, T., Tabata, S., and Hayashi, S. (1988) Xenobio. Metabol. and Dispos. 3, 96-97

6. Szabo, B., Hedler, L., Schurr, C., and Starke, K. (1988) Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 338, 368-372

# 201 老化促進マウス（ＳＡＭ）脳切片からのノルアドレナリン放出へのグルタミン酸受容体の関与と加齢変化

趙　学慧、　北村佳久、　野村靖幸
（北大・薬・薬効）

〔要約〕

グルタミン酸受容体アゴニストＮ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸（ＮＭＤＡ）、キスカル酸（ＱＡ）およびカイニン酸（ＫＡ）は、マウス（ｄｄＹ系）脳切片より［$^{3}$Ｈ］ノルアドレナリン（ＮＡ）の放出を促進させた。ＮＭＤＡによる放出は競合的阻害剤のＡＰＶ、非競合的阻害剤フェンサイクリジン（ＰＣＰ）、ＭＫ－８０１および$Mg^{2+}$により抑制された。また、ＱＡによる放出は、ＧＤＥＥおよびクモ毒ＮＳＴＸにより抑制された。一方、マウス脳切片への［$^{3}$Ｈ］ＮＡの取り込みは、　ＮＭＤＡ、ＱＡ、ＫＡでは影響されなかったが、　ＰＣＰ、３－ＰＰＰにより抑制された。老化促進マウス（ＳＡＭ－Ｐ／８系）脳切片からの脱分極刺激、ＮＭＤＡによる［$^{3}$Ｈ］ＮＡの放出は加齢とともに有意に減少した。しかしながら、コントロールマウス（ＳＡＭ－Ｒ／１系）では加齢変化は認められなかった。以上のことから、ＮＭＤＡ、ＱＡ、ＫＡは脳切片からのＮＡ放出機構に関与していること、さらに、老化および学習、記憶障害モデル動物のＳＡＭ－Ｐ／８では脳切片からのＮＡ放出活性は加齢に伴い著しく低下することが示唆された。

【緒言】 グルタミン酸が神経伝達物質として、学習、記憶に関与し、また低酸素、虚血時の神経毒性に関与することが報告されている（１）。グルタミン酸受容体には、ＮＭＤＡ型、ＱＡ型ならびにＫＡ型の三種類のサブタイプが存在することが知られている（２）。老化促進マウス（ＳＡＭ－Ｐ／８系）は、そのコントロールマウス（ＳＡＭ－Ｒ／１系）との比較により、老化モデル（３）ならびに学習、記憶障害モデル（４）として有用であることが報告されている。今回我々は、グルタミン酸受容体のＮＡ放出機構への関与およびＳＡＭにおけるＮＡ放出機能の加齢変化を検討した。

【実験方法】 ５週齢のｄｄＹマウス（雄）の大脳皮質・海馬、１、３、６、９、１２月齢のＳＡＭ－Ｐ／８およびＳＡＭ－Ｒ／１（雄）の小脳を除いた全脳を用い、３００μｍの切片を作製した。脳切片を５０ mM KClを含んだ Krebs-Ringer buffer と３７℃下１０分間インキュベートし、内在性ＮＡを除いた。その後、20 nM［$^{3}$Ｈ］-ＮＡを前負荷し、灌流チャンバーに移し、３７℃中 Krebs-Ringer buffer で１ ml/min の流速で表面灌流した。グルタミン酸受容体アゴニストの場合は５分間、アンタゴニストと３０ mM KCl の場合は２０分間それぞれ灌流作用させ、放出される［$^{3}$Ｈ］ＮＡの放射活性を測定した。

【実験結果】 ＮＭＤＡ、ＱＡおよびＫＡはいずれも１０，１００μＭで脳切片からの［$^{3}$Ｈ］ＮＡ放出を濃度依存的に促進させた（図１）。１００μＭ ＮＭＤＡ誘発［$^{3}$Ｈ］ＮＡ放出は競合的阻害剤ＡＰＶ、非競合的阻害剤ＭＫ－８０１、ＰＣＰ、$Mg^{2+}$により濃度依存的に抑制され、ＱＡ誘発［$^{3}$Ｈ］ＮＡ放出はＧＤＥＥおよびクモ毒ＮＳＴＸによって抑制された。一方、［$^{3}$Ｈ］ＮＡの脳切片への取り込みは、ＮＭＤＡ、ＱＡ、ＫＡ（０.５ mM以下）では影響されなかったが、ＰＣＰ、３－ＰＰＰおよびＭＫ－８０１により濃度依存的に抑制された。

老化および学習、記憶障害モデルのＳＡＭ－Ｐ／８の脳切片において３０ mM KCl（図２）および１００μＭ ＮＭＤＡ（図３）誘発［$^{3}$Ｈ］ＮＡ放出は、加齢と共に減少し、６ヶ月齢ですでに１２ヶ月齢レベルまで低下し

ていた。また、[³H]NAの取り込みも加齢にともない低下した。

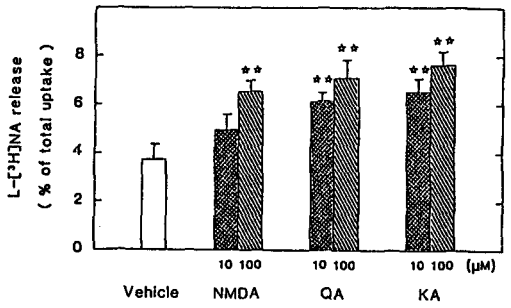



図1. [³H]NA放出に対するｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸受容体ｱｺﾞﾆｽﾄの作用

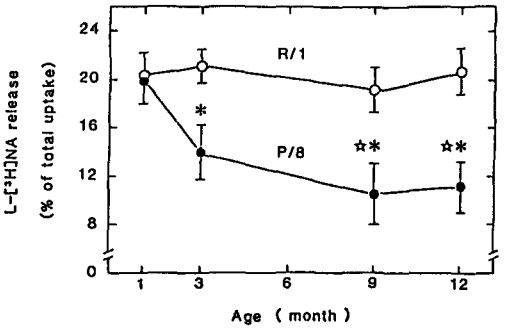



図2. SAM脳切片からの30mM KCl誘発[³H]NA放出の加齢変化

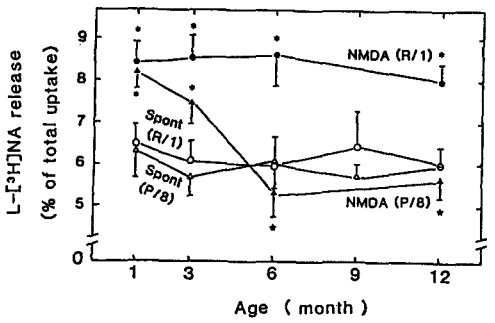



図3. SAM脳切片からのNMDA誘発[³H]NA放出の加齢変化

【考察】 中枢神経系において、ＮＡ放出は、神経終末のβ受容体・Ｇｓ系およびα₂受容体・Ｇｉ系によりcAMPを介して影響されるＡキナーゼ（５）、およびＰＩレスポンスによって影響されるＣキナーゼ（６）により調節を受けることが報告されている。今回、グルタミン酸受容体（細胞体および／または神経終末部）によってもＮＡ放出が調節されていることが示唆された。３－ＰＰＰは、ＮＭＤＡ誘発[³H]ＮＡ放出には影響を及ぼさなかったが、[³H]ＮＡ取り込みをＭＫ－８０１より強力に抑制したことから、σ受容体は、ＮＡ取り込み機構に関与していることが推定された。ＳＡＭ－Ｐ／８はＳＡＭ－Ｒ／１と比較し、生後８ヵ月以後著しい老化徴候および学習、記憶障害が認められるようになる（３、４）。ＳＡＭ－Ｒ／１では、脱分極刺激およびＮＭＤＡによるＮＡ放出は生後１２ヶ月までは変化しなかったが、ＳＡＭ－Ｐ／８では、生後６ヶ月以後著しいＮＡ放出の低下が認められたことから、ＳＡＭ－Ｐ／８でのＮＡ放出低下と老化促進および学習、記憶障害との関連性が示唆された。

【参考文献】


1. Novelli, A., Reilly, J. A., Lysko, P. G., and Henneberry, R.C.(1988) Brain Res. 451, 205-212
2. Foster, A. C., and Fagg, G.E. (1984) Brain Res. Rev. 7, 103-164
3. Takeda, T., Hosokawa, M., Takesita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M.,and Yamamuro, T. (1981) Mech. Aging Dev. 17, 183-194
4. Yagi, H., Katoh, S., Akiguchi, I., and Takeda, T. (1988) Brain Res. 474, 86-93
5. Qi, S.-B., Kitamura, Y., and Nomura, Y. (1988) Neurochem. Int. 12, 13-17
6. Nichols, R. A., Haycock, J. W., Wang, J. K. T., and Greengard, P. (1987) J. Neurochem. 48, 615-621

202

# 神経線維腫が産生する神経発育因子

堀田妙子、加藤泰治[1]、浅井清文[1]、田中　亮、大塚隆信[2]、松井宣夫[2]
（名古屋市立大学・医学部・生化Ⅰ・分子研生体制御[1]・整形外科[2]）

〔要約〕
Von Recklinghausen 氏病患者より得られた神経線維腫（neurofibroma）組織中に、ヒト神経芽腫細胞（GOTO、TGW 細胞）に対し強い DNA 合成を促進するペプチド性因子 neuronotrophic factor （NTF）と、グリア細胞の DNA 合成抑制作用を示すグリア増殖抑制因子 glial growth inhibitory factor（GGIF）が存在することを確認した。NTF は神経線維腫の粗抽出液より、熱（100℃、10分間）および酸（pH 2.3 ）処理後、ゲル濾過、陰イオン交換、逆相 HPLC により高度に精製された。 NTF は酸、熱安定性の分子量約 4,400 のペプチドで神経芽腫細胞に対し細胞増殖促進効果を示し、6.8 nM で DNA の合成を約４倍に増加する。また正常ラット大脳神経細胞の神経突起の伸長を促進する作用を有するが、ラット褐色細胞腫（pheochromocytoma）PC 12 細胞には無効であった。精製した NTF は、いままで知られている発育因子とは異なる生物学的および物理化学的性質を示した。

脳発育過程におけるニューロンの増殖や分化を制御する神経発育因子（neuronotrophic factor, NTF）が多数発見される[(1),(2)]なかで、我々はとくにグリアが産生する NTF に注目し、その物理化学的同定と同時に脳発育過程における生理的役割を研究している。[(3),(4),(5)] 今回は、シュワン細胞性のヒト神経線維腫が in vitro 系のニューロン性細胞（ヒト神経芽腫細胞、ラット皮質ニューロン）の増殖あるいは分化を促進する新しい NTF を産生していることを見いだしたので報告する。とくにこの NTF がグリア性細胞によって産生されることから、脳発育過程におけるニューロン・グリア相関を研究する上で、興味ある因子と考えられる。

［実験方法］

1、精製法

Von Recklinghausen 氏病患者より得られた神経線維腫の腫瘍塊を 20 mM トリス－塩酸緩衝液（pH 7.4）中でホモジネートした後、遠心分離（12,000rpm,1 時間）して不溶物を除去した。得られた上清を 100℃で10分間加熱し、さらに 0.1 M 塩酸で pH 2.3 とし超遠心で分離、上清を粗抽出液とした。次にゲル濾過カラム（Bio-gel P-10）を用いて、緩衝液 0.1 M 酢酸（pH 2.3）で分画した。それぞれの分画成分について生物活性を測定（後記の方法）した。活性のある画分を凍結乾燥後、逆相分取用カラム（LOP-ODS）に吸着させ、 A）0.1 % トリフルオロ 酢酸（TFA）から B）0.1 % TFA ／アセトニトリル へのリニアグラジエントをかけて流速 1 ml/min で溶出した。主たる活性画分は 5 % アセトニトリル分画に溶出した。得られた活性成分を陰イオン交換カラム mono Q に吸着させ、 A） 20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 9.0）から B）A 液 + 1.0 M 塩化ナトリウムへのリニアグラジエントをかけて流速 1 ml/min で溶出した。活性成分は塩化ナトリウム濃度が約 0.2 M のところに溶出した。活性含有画分をさらに逆相系 ODS カラムで分離精製した。溶出液は分取用 ODS と同じ溶出液を用いた。アセトニトリル濃度は 10 % まで50分のリニアグラジエントとした。活性画分はアセトニトリル約 5 %のところに鋭いピークとして溶出した（Fig. 1）。

2、生物活性測定

細胞はヒト神経芽腫細胞（GOTO, TGW）を用いた。24 ウェルプラスチックプレートに直径 14 mm のプラスチックシートを置き、 5 x $10^4$個／well の細胞をまき 37℃、7 時間静置し細胞を接着させた。各画分を加え［$^3$H］－チミジンを加え 37 ℃ 16 時間インキュベートした。プラスチックシートを取り出し水分を除去しシンチレーションカクテルに浸してトリチウムをカウントした。

3、分子量測定

HPLC のゲルろ過カラム（TSK 2000 SW 7.5 x 600 mm）で緩衝液は 50 mM トリス塩酸（pH 7.4 ）＋ 0.2 M NaClを用い流速は 0.8 ml /min で行った。

4、細胞培養法

ヒト神経芽腫細胞（GOTO,TGW）は、 10 % FCS 含有 Dulbecco's MEM で継代培養および二次培養した。ラット皮質ニューロンは、在胎 16 日目のラット脳より、ポリリジン被覆ペトリデイシュ上に初代培養した。

［結果および考察］

神経線維腫粗抽出液中には、ヒト神経芽腫細胞（GOTO, TGW）の増殖（DNA 合成、細胞数増加）を促進する NTF が存在する（ Fig. 2 ）と同時に、ラット腫瘍性グリア（C 6, 354 A）の増殖を抑制するグリア増殖抑制因子（glial growth inhibitory factor, GGIF）が存在することが判った。 NTFは、酸（ pH 2.3）、熱（ 100°C, 10 分）に安定な物質であった。粗抽出液から前述の方法でこの因子を高度に精製した。精製後の NTF は、6.8 nM で DNA の合成を約４倍に増加した。精製ＮＴＦについてアミノ酸分析（日立 L-8500 型）を行った結果、NTF は 30個のアミノ酸よりなるペプチドであった。ゲルろ過（TSK 2000 SW ）により算出される分子量は、4,400±500 で（Fig.3）ABS 気相プロテインシークエンサーを用いて分析したがアミノ末端は得られなかった。他の生理活性物質（IL-1, IL-2, IL-3, G-CSF, NGF, m-EGF, α-MSH, cr-FGF）についてヒト神経芽腫細胞（GOTO）の DNA 合成促進能を調べたが、いずれも活性は見られなかった。正常ラット大脳神経細胞の初代培養細胞を用いて、 NTF の神経突起伸長促進活性をコントロール群と比較したところ、強い突起伸長作用が認められた。

［参考文献］


(1) Darwin K.Berg (1984) Ann.Rev.Neurosci., 7, 149-170

(2) Hans Theonen (1985) Science, 229, 238-242

(3) Ito, J. et al.(1987) Neurochem.Interntl., 11, 331-337

(4) Kato, T. et al.(1982) Brain Res., 254, 596-601

(5) Sakazaki, Y. et al.(1983) Brain Res., 262,125-135

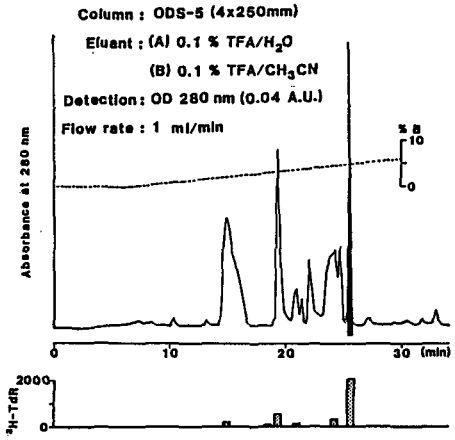




Fig. 1 HPLC(ODS-5)の溶出パターン

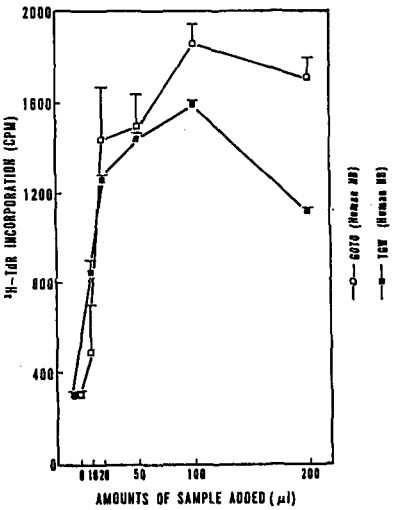



Fig. 2 NTF の DNA 合成促進能

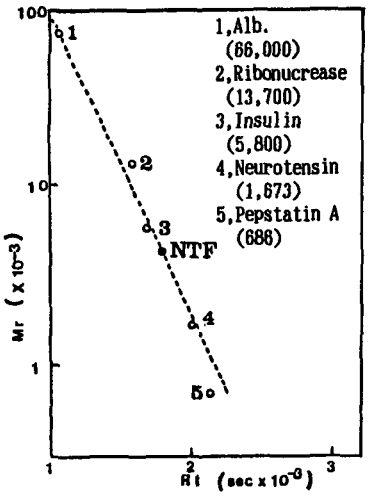



Fig. 3 分子量測定

# 203 細胞性癌遺伝子 c－f o s mRNA 発現のアデノシン受容体による調節

中島孝、Jean-Luc Daval＊, Philip F.Morgan＊,Robert M. Post＊, and Paul J. Marangos＊
（新潟大・脳研・神内、＊National Institute of Mental Health, U.S.A.）

〔要約〕

アデノシン受容体拮抗薬のカフェイン投与による細胞性癌遺伝子c-fos mRNA の発現をマウス脳において検討した。c-fos mRNA は用量依存性に発現し、その レベルはけいれん誘発量のカフェインで最大を示した。in situ ハイブリダイゼーション法では、そのc-fos mRNAの脳内分布は主に線条体と嗅結節に限局していた。このc-fos mRNA の分布は電撃けいれん[3]やペンチレンテトラゾール(PTZ)[1]等の他のけいれんモデルにおける分布と異なっていたが、アデノシン A2受容体の分布と同じであった。アデノシンA2受容体のアゴニストの作用をもつ5'- N- ethylcarboxamideadenosine (NECA) によりこの c-fos mRNA の発現は抑制されるが、A1受容体のアゴニストである N6-cyclohexyladenosine (CHA) では抑制できなかった。これらのことよりカフェインによる c-fos mRNA の発現はアデノシンA2受容体によって調節されていると考えられた。

アデノシンまたはその安定同族体はneuromodulatorとして神経活動や行動を変容する作用を持つ。カフェインの中枢神経刺激作用はアデノシン受容体の競合的拮抗作用と考えられている。細胞性癌遺伝子 c-fosは、転写制御因子として、細胞の分化、増殖の過程に関与している。神経系におけるc-fos mRNA の基礎発現値は非常に低値だが、各種の刺激により誘発することができる[1)2)3)]。また、各種培養細胞系において、Ca-influx, c-AMP, やphorborester 等による発現が報告されている。アデノシン受容体は細胞内 c-AMPレベルの調節や他の神経伝達物質の放出の調節を行っており、 c-fos mRNA の発現に関与していると考えられる。今回の報告では、c-fos mRNA の発現をカフェイン投与後に、ノーザンブロット法と in situ ハイブリダイゼーション法により検討した。

〔方法〕

カフェイン 17.8, 32, 56, 100, 178mg/kg および生食を腹腔内注射によりマウス(n=3) に投与した。投与１５分後に断頭し、全脳を素早く液体窒素にて凍結し、guanidium-cecium chloride 法によりtotal RNA を抽出した。マウス32P labelled c-fos DNA probe(ATCC41041,Hind III -- BamHI fragment) をつかいノーザンブロットハイブリダイゼーションをおこない、film に感光後デンシトメトリーにより、c-fos mRNA の相対的発現量を、測定した。 カフェイン56, 100, 178mg/kg,及び生食を腹腔内注射し(n=3)投与１５分後に全脳を取り出し-45℃ isopentane中にて凍結した。in situ ハイブリダイゼーションはcryostat により15$\mu$m の coronally section を作成し、Harper and Marselle の方法により35S labelled c-fos DNA probe （前述）を使い、80時間、Kodak O-mat film に感光した。CHA (1mg/kg,n=4),NECA (0.1mg/kg,n=4), carbamazepine (25mg/kg,n=4),Diazepam (10mg/kg,n=4), Ro15-1788 (10mg/kg,n=4), Ro5-4864 (10mg/kg,n=4)及び生食(n=8)を腹腔内投与後２０分後に生食またはカフェイン (100 mg/kg)を投与した。カフェイン投与３０分後に、断頭後、前述の方法でc-fos mRNA の相対的発現量を測定した。

〔結果〕

100mg/kg 以下のカフェイン投与ではmotor activity の亢進を認め178 mg/kg では全例に tonic-clonicの全身けいれんを認めた（死亡率 30 %）。c-fos mRNA はカフェイン投与により用量依存性に発現し、178 mg/kgのけいれん量では100 mg/kg の２倍のc-fos mRNA の発現量を示した(Fig.1)。 In situ ハイブリダイゼーションautoradiographyでは、untreated animalには有意なc-fos mRNA 発現は認められなかった。生食の腹腔内注

射により低レベルだが有意な c-fos mRNA が primary olfactory cortex, pyramidal cells of hippocampus, granule cells of the dentate gyrus, cortex に認められた。けいれん誘発量のカフェイン(178 mg/kg)投与後、c-fos mRNA はcaudate-putamenとolfactory tubercleに発現した (Fig 2A) 。けいれん域値以下のカフェイン(56、100mg/kg)投与によっても、同様の部位にdose-dependentな c-fos mRNA の発現を認めた (Fig 2B) 。腹腔内注射によるc-fos mRNA発現はdiazepamの前投与により抑制された (P<0.05) 。カフェイン(100mg/kg)によるc-fos mRNA の発現はbenzodiazepine誘導体、carbamazepine,アデノシンA1 agonistのCHAによっては抑制できなかっが、アデノシンA2 agonist の作用を持つNECAにより抑制可能であった (P<0.01) (Fig 3) 。

〔考案〕

カフェインによるc-fos mRNA 発現はアデノシンA2 agonist作用をもつNECAにより抑制され、またこの分布がアデノシンA2受容体と一致することから、カフェインによるc-fos mRNA の発現メカニズムは、アデノシンA2受容体を介していると考えられた。また、カフェインによる全身けいれんはPTZや電撃けいれんとc-fos mRNA 発現の分布上異なることが示された。

〔文献〕


1) Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., Curran, T. (1987) Science 237 192-196

2) Nakajima, T., Daval,J-L., Gleiter, C.H., Deckert, J., Post, R.M., and Marangos, P.J. (1989) Epi. Res. (in press)

3) Daval, J-L., Nakajima, T., Gleiter, C.H., Post, R.M. and Marangos, P.J. (1989) J.Neurochem. 52, 1954-1957

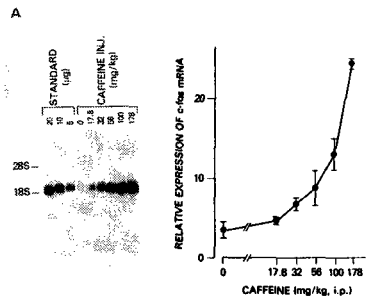




Fig 1. Dose response analysis of caffeine induced c-fos mRNA expression

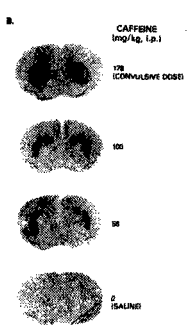



Fig 2B. In situ hybridization in candate putamen level

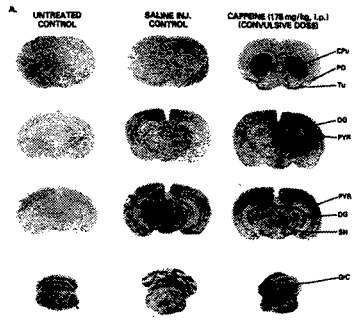



Fig 2A. In situ hybridization of caffeine induced c-fos mRNA expression

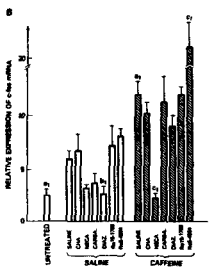



Fig 3. Pharmacological analysis of caffeine induced c-fos mRNA expression

# 204 ヒトの Myelin-Associated Glycoprotein (MAG) の塩基配列

佐藤修三*、藤田信也*、栗原 正**、桑野良三**、崎村建司**、高橋康夫**、宮武 正*
（新潟大脳研・神経内科*、神経薬理**）

〔要約〕 ヒトのmyelin-associated glycoprotein(MAG)の cDNA cloning を行い、全コード領域を含む陽性クローンを得た。既報のラットMAGの塩基配列と高い相同性があった。ラットでは3´末端に近い部分にexon12由来の45bが存在するか否かの2種類のmRNAが知られている。exon12が入っていない型は、ミエリン形成の初期に多く発現しており、ミエリン形成に重要と考えられているが、今回得たクローンはこのexon 12を含まないものであった。 5´末端近くのR-G-D（アルギニン-グリシン-アスパラギン酸）は、fibronectin receptor として細胞間認識に重要な構造と考えられているが、ヒトでもこの構造は保存されていた。これらの構造は、ヒトの各種の脱髄後のミエリン再生に重要な役割を担っていると考えられる。

Myelin-associated glycoprotein（MAG）は、軸索と接する部分のミエリンに多く存在すること、細胞間認識分子と考えられているneural cell adhesion molecule (N-CAM)とアミノ酸配列上の相同性があること[1,3]などより、細胞間認識分子としての役割が推測されている。また免疫グロブリンに類似したドメイン構造を有することより、免疫グロブリンスーパーファミリーの一員として注目されている。[2,3]

ラットMAGについては、cDNAクローニングによる全アミノ酸配列が報告されている。[1,2,3,]ラットでは、45bのexon12がsplice outされないと、その中に終止コドン（TGA）があるためにそこでコード領域が終ってしまい、短いペプチドが作られる、即ちalternative splicing で2種類のmRNAおよび蛋白が作られると考えられている。我々は既に、マウスMAGのcDNAクローニングに成功しており、マウスにもラットと同様の alternative splicing の機構が存在することを確認している。またexon12 の入っている型および入っていない型のmRNAを特異的に認識するプローブを用いて、発育による変化や、突然変異マウスによる発現について検討した。それによるとexon12由来の45bがないmRNA（幼若型）が、発育早期やミエリン再生期に発現しており、突然変異によりミエリン形成不全を示すquakingマウスでは、幼若期にもかかわらず、幼若型のmRNAが発現していないことが明かにされた。[4]これらのことはMAGの幼若型mRNAが、ミエリン形成に重要な役割を担っている可能性を示唆している。ヒトでの発育中のミエリン形成や、各種の脱髄にひきつづく再生などにおけるMAGの関与を明かにするために、ヒトのMAGのcDNAクローニングを行った。

【方法】 成人剖検脳よりPoly(A)⁺RNAを調整し、Gubler&Hoffmanの方法によりcDNAを得た後、λgt10をvectorとしてcDNAライブラリーを作製した。既にクローニングしたマウスのMAGのcDNA断片をプローブとして、plaque hybridizationにより、ヒト脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性クローンから λphage DNAを調整し、EcoRIによりインサートを取り出した後、プラスミドベクター（pUC118）にサブクローニングした。サブクローニングしたインサートDNAを、ExonucleaseIIIによりデリーションミュータントを作製した後、一本鎖DNAを調整して、dideoxy法にて塩基配列を決定した（図1）。またウシとマウスの脳よりpoly(A)⁺ RNAを調整し、northern blot法にてその大きさを比較した。

【結果】 得られた2個の陽性クローン(p8H4,p4H14)は全コード領域を含むものであった（図1）。その塩基配列は、既報のラットおよびマウスのものと極めて高い相同性があり塩基レベルでは約88.7%、アミノ酸レベルでは95.4%であった。成人脳から得たmRNAを用いて作製したcDNAライブラリーにもかかわらず、マウスやラットでは 幼若型に相当する配列を確認した。つまり、45bpのexon12が挿入されていない型が得られた（図3）。また細胞外に存在するアルギニン（R）-グリシン（G）-アスパラギン酸（D）という特異的なアミノ酸配列、つまりfibronectin receptorとして報告されている細胞間認識に重要な構造と考えられている部分は、9つの塩基のうち2つの置換があったにもかかわらず、アミノ酸は変化なくその構造が保たれていた。（図3） ラットでは細胞外に8つの糖鎖結合可能配列（Asn-X-Thr, Asn-X-Ser） があるが、ヒトでは9箇所存在していた。 細胞内の配列では、ラットと同様、蛋白分解を受け易い配列（Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Lys)は3カ所存在していた

（図4）。northern blotでは、ウシ　やマウスとほぼ同様の約2.5kbの一 本のバンドが得られた（図2）。

【考案】今回ヒトのMAGにて幼若型に相当するcDNAクローンを確認したことは、ヒトの各種の脱髄にひきつづいてのミエリン再生による組織修復に、幼若型mＲＮＡの発現が重要な過程となっている可能性があり、その発現調節機構の解明が、各種の脱髄性疾患の治療に有用であると思われる。

【文献】


1)Arquint M, Roder J, et al: Proc Natl Acad Sci USA 84:600-604,1987

2)Lai C, Brow M A, et al: Proc Natl Acad Sci USA 84:4337-4341,1987

3)Salzer JL, Holmes W P, et al:J Cell Biol 104:957-965,1987

4)Fujita N, Sato, et al: FEBS Letters 232:323-327,1988

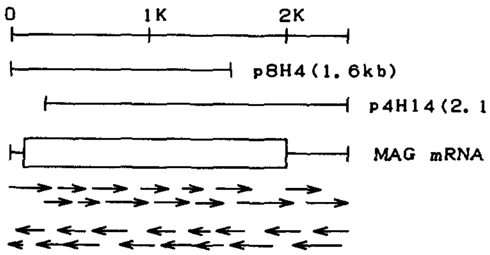




図１：得られた２個のクローン（p8H4,p4H14）と、デリーション ミュータントによる塩基配列決定法。

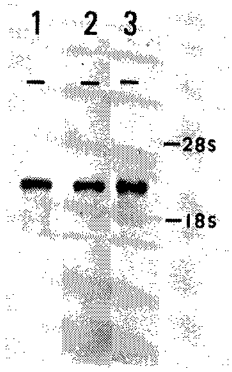
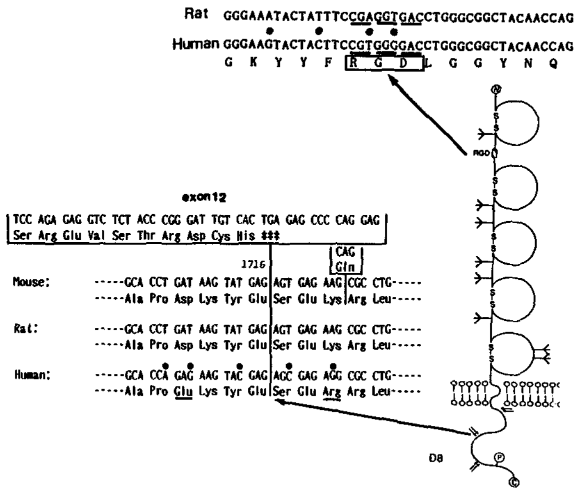



図２：Northern blot解析：１）マウス、２）ウシ、３）ヒト。プローブはマウスMAGのcDNA断片。



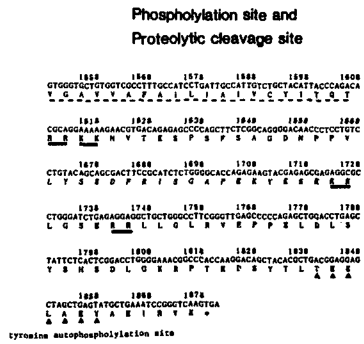




図３：ヒトMAGの分子構造：細胞外のfibronectin receptor構造（R-G-D）及びexon12の部位を示す。ヒトではexon12の入っていないクローンが得られた。●は塩基、－はアミノ酸のラットとの置換部位を示す。

図４：細胞内側のtyrosin autophosphorylation site （▲）と蛋白分解酵素作用部位（＿）を示す。…は膜貫通部分。

## 205　ヒトtyrosine hydroxylase (TH) cDNA導入線維芽細胞におけるL-DOPA合成能について

内田耕一[1,2]，石井　晃[4]，金田典雄[4]，戸谷重雄[2]，塚田裕三[3]，永津俊治[4]，高坂新一[1]
([1]国立精神・神経センター・神経研，[2]慶大・医・脳外，[3]慶大・医・生理，[4]名大・医・生化第一)

〔要約〕

我々は、脳内細胞移植によるParkinson病治療の基礎的研究を行う一環としてtyrosine hydroxylase (TH) cDNAをC6細胞に導入し、L-DOPA合成・分泌能を獲得させることに成功し報告してきた。今回はrat正常線維芽細胞(NRK-49F)にTH cDNAを導入し、L-DOPA合成・分泌能につき検索を加えた。ヒトtype 2 TH cDNAをpKCRH2に組み込み、pSV2 neoと共にCa-$PO_4$法によりcotransfectした。G418にてselection及びcloningを行い、得られたG418耐性cloneからTH抗体を用いた免疫染色とimmunoblottingによりTH発現cloneをscreeningした。TH発現NRK細胞(NRKneoTH2)は、in vitroのassay系では著明なTH活性を有したが実際にはL-DOPA合成能はなく、本細胞中にはL-DOPAは検出できなかった。しかし、THのcofactorであるtetrahydrobiopterin(THBP)を本細胞培地中に添加したところL-DOPA合成能を獲得し、細胞内に著明なL-DOPAの蓄積を認めたのみならずmedium中にも多量のL-DOPAが検出された。即ち、本細胞ではcofactorを補うことによってのみL-DOPA合成・分泌能を有することが明らかとなった。このことは、NRKneoTH2を脳内へ移植した場合、THBPの投与により脳内でのL-DOPA分泌量を調節出来る可能性を示唆している。

【はじめに】

近年、Parkinson病に対しcatecholamine産生細胞の脳内移植が有効とする動物実験や臨床例の報告が多くなされている(2)。しかし、その機能回復機序は現在なお不明であり、機能回復にdonorとhost間の神経回路網形成が必須か否か、また補充すべきdopamine量はどれくらいか等は明らかにされていない。こうした基礎的問題を解明するには、人為的にcatecholamine分泌量を調節し得る非神経細胞の移植が必須である。今回我々は、遺伝子操作によりcatecholamine分泌量を人為的に調節し得る可能性のある新しいdonor細胞を開発したので報告する。

【方法】

(1) TH発現NRK細胞の確立

既報の方法(5,6)により、rat正常線維芽細胞(NRK-49F)へtype 2 TH cDNA(1)を導入した。G418にてselection及びcloning後、TH抗体を用いた免疫染色及びimmunoblottingによりTH発現clone(NRKneoTH2)を得た。G418のselection及びcloning濃度は400μg/mlとした。

(2) 遺伝子導入培養細胞におけるTH活性、L-DOPA合成・分泌能の解析

$6\times10^5$の細胞をKrebs-Ringer solution 300μlにsuspendし、1mM (6R)-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterinを添加して37℃,60分間incubateした後、細胞内及びmedium中のL-DOPA濃度を測定した。TH活性は、Nagatsu(3),Oka(4)らの方法に準じHPLC-ECDにより、細胞内及びmedium中のL-DOPA濃度は同様にHPLC-ECDにより解析した。

【結果及び考察】

Fig.1はTH抗体を用いたG418耐性cloneの免疫蛍光染色である。NRKneoTH2においては全細胞TH陽性であり、本細胞においてTH分子が発現していることが示された。このことはFig.2に示したように、TH抗体を用いたimmunoblottingにおいても明らかである。NRKneoTH2においては60KDの位置にTH陽性バンドの出現がみられるが、TH遺伝子の導入されていない対照細胞(NRKneo)では陽性バンドは認められない。

次に、このNRKneoTH2細胞におけるTH活性、L-DOPA合成•分泌能につき検討を加えた。その結果をまとめたものがTable 1である。まず、本細胞のhomogenateを用いin vitroのcomplete assay系にてTH活性の測定を行った。Table 1に示した如く、in vitroのassay系においてはNRKneoTH2は高いTH活性を有していた。一方、本細胞内のL-DOPA量を測定してみると、Table 1の如く細胞内にはL-DOPAは検出されず、THが発現しているにもかかわらずL-DOPA合成能が欠損していることが明らかとなった。TH酵素活性は、THBP, $Ca^{2+}$, 各種protein kinases等により調節されていることが知られており、本細胞ではこれら調節因子のいずれかが欠損している可能性が考えられた。この可能性を確かめるためまずTHのcofactorであるTHBPを細胞培地中に添加し、L-DOPA合成能につき検討を加えた。その結果、THBPを添加した群においてのみ細胞内に多量のL-DOPAが蓄積されていることが明らかとなった。また、本実験系において培地中のL-DOPA量を測定したところ、同様に多量のL-DOPAを検出することができ、細胞内から培地中にL-DOPAが分泌されていることが明らかとなった。この結果は、今回我々が用いたNRK-49FではTHのcofactorであるTHBPの合成系が欠損していることを物語っている。以上のことから、NRKneoTH2はTHBPを外来性に補うことによってのみL-DOPA合成•分泌能を獲得することが示された。

Parkinson病における脳内細胞移植の有効性は、その作用機序の解明を含め依然として検討されねばならない問題が数多く残されている。これらの基礎的な検討を行う上で、L-DOPAの合成•分泌能を人為的に調節することが可能である遺伝子導入細胞を獲得することができたことは、今後の研究に多いに役立てることができるものと考えている。

Fig. 1
Immunocytochemical staining of NRKneo and NRKneoTH2.

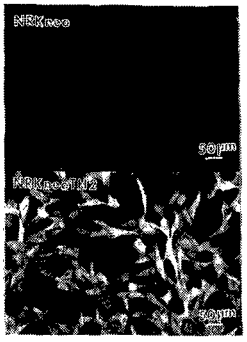



Fig. 2
Detection of TH molecules by immunoblotting.

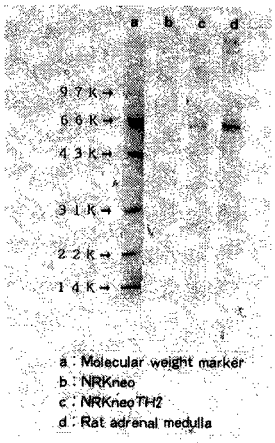



Table 1

**TH activity and L-DOPA formation in the genetically manipulated NRK.**

| | NRKneo | NRKneoTH 2 | |
|---|---|---|---|
| TH activity(pmole/㎎ prot./min)* | N.D. | 253.0±19.6 | |
| | | 6R-THBP(−) | 6R-THBP(+) |
| In the cell<br>L-DOPA accumulation(pmole/㎎ prot./min)** | N.D. | N.D. | 4.78 |
| In the medium<br>L-DOPA released(pmole/㎖/min)** | N.D. | N.D. | 8.93 |

*Each value represents Mean±S.E.M. of six individual experiments.
**Each value represents Mean of two individual experiments.

【文献】

(1) Kaneda, N., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 146, 971-975, 1987.
(2) Lewin, R., Science 237, 245-247, 1987.
(3) Nagatsu, T., et al., J. Chromatogr. 163, 247-252, 1979.
(4) Oka, K., et al., Biochem. Biophys. Acta. 706, 188-196, 1982.
(5) Uchida, K., et al., J. Neurochem., in press, 1989.
(6) Uchida, K., et al., Proc. Japan Acad., Ser. B 64, 290-293, 1988.

# 206 神経特異タンパク質 ｄｒｅｂｒｉｎ Ａ の遺伝子構造とその発現

児島伸彦、白尾智明、寺田庄一、小幡邦彦
（生理学研究所・神経化学）

〔要約〕
ニワトリ脳の発生段階に応じて特徴的な発現、消失パターンをもつ酸性タンパク質 drebrin は、2 種類の幼若型（E1 および E2）と 1 種類の成熟型（A）に分類される。我々は、既に幼若型 2 種の cDNA をクローニングすることによって、それらの構造上の違いを同定した。今回、成熟型に対応する cDNA をクローニングし、その塩基配列を決定して、幼若型 drebrin との違いを明らかにした。2 種の幼若型 drebrin cDNA の違いは、129 bp の挿入配列の有無であったが、成熟型の cDNA には、上記の挿入配列の直前に更に 138 bp の挿入があった。これらの cDNA をプローブとしたゲノム DNA のサザンブロット解析の結果から、これら 3 種の drebrin mRNA は、単一遺伝子からスプライス部位の選択の違いによって生ずることが示唆された。また、各 drebrin 分子の発現時期、発現部位が異なることから、スプライシングの違いを、発生時期、細胞種によって特異的に調節するメカニズムが存在すると考えられる。

神経系の発生過程においては、様々な遺伝子が時期的にも、部位的にも特異的に発現しており複雑で特異的な神経回路網が形成される。このような遺伝子の発現様式とそれらの遺伝子産物を同定することが、神経系の発生を理解するためには重要である。

ニワトリ脳の発生段階に応じて発現、消失するタンパク質 drebrin には、2 種類の幼若型（E1 および E2）と 1 種類の成熟型（A）があり、発生につれ神経細胞の分化度、成熟度が進むのと平行して、E1 から E2、A に変化する（2）。これらのタンパク質は相互に構造が非常に類似しているが、幼若型 2 種に関しては、各々に対応する cDNA をクローニングすることにより、E2 cDNA の塩基配列は E1 cDNA 中に 129 bp の配列（ins1 と命名）が挿入されていることが明らかになっている（1）。更に、ニワトリゲノム DNA のサザンブロット解析によって、それらが単一の遺伝子から生ずることが示唆された。

一方、発生の後期に出現し始める成熟型の drebrin A は E2 と同様に ins1 に対応するアミノ酸配列を持つが、SDS 電気泳動上、E2 よりも分子量が約 10 kDa 大きく、等電点もわずかに塩基性である。また、幼若型 drebrin が神経系以外でも存在し、発現細胞中では細胞質全体にわたって分布するのに対して、drebrin A の発現は神経系に限局しており、神経細胞内ではある種の樹状突起内に集中する（3）。このように、幼若型とは異なる発現様式をもち、細胞内分布も異なる drebrin A の構造を明らかにするために、ニワトリ脳の cDNA ライブラリーから drebrin A の cDNA クローンを取得して、その塩基配列を決定した。

【実験方法】

幼若型に比べ、drebrin A の発現量の多いふ化後 1 - 2 日目のヒヨコの大脳および視蓋より、ファージベクターλgt10 によって cDNA ライブラリーを作成し、スクリーニングを行った。

取得した cDNA クローンのうち、drebrin E2 の cDNA と制限酵素マップの異なるものを選別した。これを M13 ファージベクターにサブクローニングし、キロシークエンス法によって作成した欠失クローンについて、シークエナーゼあるいは Taq ポリメラーゼの系でシークエンス反応を行い、DNA シークエンサー（ABI モデル 370A）によって、電気泳動および解析を行った。

【結果および考察】

幼若型の drebrin cDNA クローンの得られた、10 日目のニワトリ胚 cDNA ライブラリーからはこれら 2 種と構造の異なる別のクローンは得られなかったので、drebrin A の発現量の多い時期のふ化後 1-2 日目のヒヨコ脳の cDNA ライブラリーを作成し、これから drebrin A のクローニングを試みた。E2 cDNA の挿入配列 ins1 は、drebrin A cDNA 中にも存在することが、この配列から想定されるペプチドに対する抗血清によるイムノブロット解析の結果予想された（1）ので、ins1 内の HinfI 断片（78 bp）の配列をプローブとして $1 \times 10^6$ 個のクローンをスクリーニングした結果、22 個の陽性クローンが得られた。これらの cDNA の制限酵素

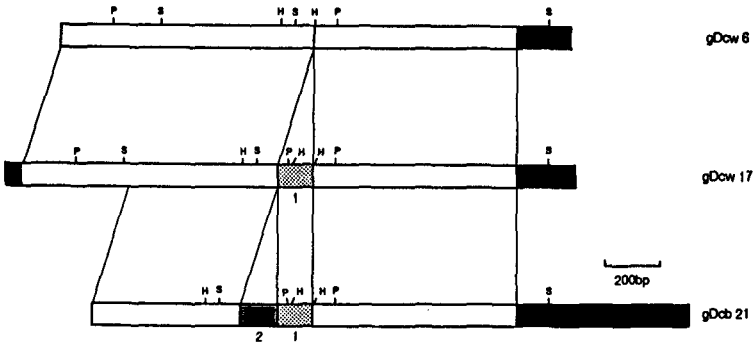



図 1 3 種の drebrin cDNA の構造
gDcw6, 17 および gDcb21 はそれぞれ drebrin E1, E2 および A をコードする。黒い部分が非翻訳領域。1 および 2 の領域はそれぞれ挿入配列 ins1 および ins2 を示す。H は HinfI、P は PstI 、S は SmaI の認識部位。

消化パターンが drebrin E2 cDNA のそれと異なるものが 3 個見つかった。この中でインサート DNA の最も長いクローン gDcb21 ( 2,058 bp ) の塩基配列を決定した。その結果、gDcb21 では ins1 の上流に、更に 138 bp の挿入配列 ( ins2 と命名) が存在することがわかった (図 1 )。その他の部位では drebrin E2 cDNA の塩基番号 458 番から 3' 端 2100 番まで両配列は完全に一致していた。更に gDcb21 は 3' 側に 416 bp 長くそこに 2 つのポリ A シグナル ( AATAAA ) を含んでいた。この cDNA が drebrin A をコードしていることを証明するには、ins2 から想定されるペプチドに対する抗体が、3 種の drebrin のうち、A にのみ反応するか否かを調べる必要があるが、このクローンが、 drebrin A の発現量の高い時期と部位のライブラリーから得られたものであること、またその cDNA が予想通り ins1 の配列をもち、ins2 以外の部分では、少なくとも E2 cDNA と重なる部分においては E2 の cDNA の配列と完全に一致していることから、残り 1 種の drebrin A に対応するものと考えて以下の考察を進める。

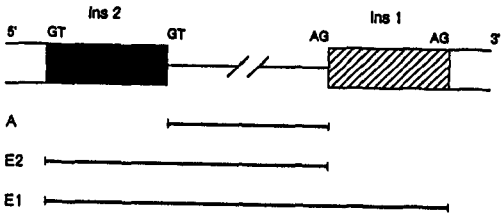



図 2 drebrin mRNA の挿入配列付近の遺伝子構造の予想図
スプライシングの GT-AG ルールに従って予想される drebrin 遺伝子のスプライス部位の選択パターン。それぞれの drebrin の mRNA が生じる際にはずれるイントロン部分を下線で示した。

今回得られたクローンは完全長のものではなかったので、それよりも 5' 側の配列は不明であるが、もし他の drebrin cDNA と同じ開始コドンから翻訳が始まり、ins2 までに別の挿入配列がないとすれば、drebrin A は 652 個のアミノ酸からなり、分子量は 71,532 Da と推定される。E2 の配列に ins2 ( 138 bp ) が挿入されることで 46 個のアミノ酸が加わるが、この挿入部位は読み取り枠とは一致していないので、ins1 のアミノ基末端側のグリシンがシステインに変化している。この 46 アミノ酸配列の特記すべき特徴は、プロリンが多いこと、またセリンの 8 個連続した配列が存在することである。想定される drebrin A のアミノ酸配列は幼若型と同様に親水性が高く膜貫通領域はないが、幼若型 drebrin が細胞内に均一に分布するのに比べ、A が樹状突起の膜近傍に集中するという免疫電顕による知見 ( 3 ) から、ins2 に対応する drebrin A に特異的なアミノ酸配列が樹状突起の膜あるいは他の膜結合タンパク質との相互作用に関連していることが予想される。

ゲノム DNA のサザンブロット解析の結果から drebrin A の mRNA も、2 種の幼若型 drebrin の mRNA と同一の遺伝子上にコードされていると考えられる。そのエクソンとイントロンの位置関係については、drebrin 遺伝子をゲノム DNA ライブラリーから単離して調べなければわからないが、ins2 の 5' 端には左側スプライス部位 ( donor ) のコンセンサス配列 GT が、ins1 の 3' 端には右側スプライス部位 ( acceptor ) のコンセンサス配列 AG があるので、挿入部位付近のスプライス部位の選択は、図 2 のように行われると推測される。このスプライス部位の選択が、発生時期、細胞種によって制御されるメカニズムは不明であるが、今後、これを明かにすることが、広く脳の発生過程に機能する遺伝子の発現制御機構を解明する手がかりになるものと考えている。

〔文献〕

1. Kojima, N., Kato, Y., Shirao, T. and Obata, K. (1988) Mol. Brain Res. 4 : 207-215.

2. Shirao, T. and Obata, K. (1985) J. Neurochem. 44 : 1210-1216.

3. Shirao, T., Inoue, H. K., Kano, Y. and Obata, K. (1987) Brain Res. 413 : 374-378.

## 207　脳特異的13.5Kタンパク質のｃＤＮＡクローニング

田中篤孝、中谷一泰、戸部　敬＊、
富田基郎＊、落合英彦＊＊、中井康光＊＊、中村泰治
（昭和大．薬．生物化，生理化＊，医．解剖＊＊）

〔要約〕
13.5Kタンパクは脳に特異的に存在する酸性タンパク質である。　我々はラット脳より単離した13.5Kタンパク質の部分アミノ酸配列をもとにして、２種類のオリゴヌクレオチドプローブを合成し、13.5Kタンパク質ｃＤＮＡのクローニングを行なった。　ラット脳より調整したpoly(A)+ＲＮＡより、pcD プラスミドをベクターとし岡山－Berg法で作製したｃＤＮＡライブラリーを用いた。　約６０万コロニーをスクリーニングし、１８個の陽性クローンを得た。　そのうちの一つは1.4 Ｋｂのｃ ＤＮＡを含んでおり、13.5Kタンパク質の全アミノ酸配列をコードするのに十分な長さのものであった。ｃＤＮＡの塩基配列より決定したアミノ酸配列にはＥＫＴＫＥＧＶの７個のアミノ酸よりなるモチーフが４箇所存在することが見いだされた。

［目的］
13.5Kタンパク質はグルタミン酸を多く含む pI 4.3 の脳（ヒト脳を含む）に特異的に存在するタンパク質である。このタンパク質の一次構造をタンパク化学的に、さらに組織分布を免疫学的に調べ前回報告した(1)。今回我々は一次構造の完全解析のために13.5Kタンパク質のｃＤＮＡをクローニングし、その塩基配列を決定し、13.5Kタンパク質の発現をｃＤＮＡをプローブとしてノーザンブロットにより調べたので報告する。

［実験材料と方法］
１）ラット脳ｃＤＮＡライブラリー：　ラット脳ｃＤＮＡライブラリーは、 pcDプラスミドをベクターとしラット大脳皮質 poly(A)+ ＲＮＡより作製したｃＤＮＡライブラリーを、東大医科研上代教授より分与していただき使用した。
２）オリゴヌクレオチドプローブの合成：　ラット脳13.5Kタンパク質のトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列を決定し、先に我々が決定したウシ脳の13.5Kタンパク質と一致する適当な配列を２箇所えらび、１７ｍｅｒのオリゴヌクレオチドプローブを作製した。
３）スクリーニングとクローニング：　６０万コロニーの一次スクリーニングは２種類のプローブを混合して行ない、２次スクリーニング以降は、２種類のプローブで別々にスクリーニングし、両方のプローブで陽性のものを最終クローンとした。
４）塩基配列決定法：　ｃＤＮＡ断片をM13ファージにサブクローニングし、サンガーのダイデオキシ法により決定した。

［結果および考察］
２種類のプローブに対して陽性のクローンは１８個得られた。　それぞれをミニプレップで挿入ＤＮＡのサイズを調べたところ、1.4 Ｋｂが最も長い挿入ｃＤＮＡであった。　図１に示したように、1.4 Ｋｂ ｃＤＮＡには Pst Iと Pvu II の制限酵素部位があり、これを利用して M13ファージにサブクローニングし、塩基配列を決定した。　13.5Kタンパク質はその分子量およびアミノ酸組成から約１１３残基のアミノ酸からなっていることが推定されるが、現在までに約７０％以上のアミノ酸配列が決定出来た。　また

決定したアミノ酸配列は、すでにプロテインシークエンサーにより決定したウシ脳の13.5Kタンパク質とほぼ完全に一致していた。 異なる種においてこのように高いホモロジーを有することは興味深い。また決定したアミノ酸配列中には、ＥＫＴＫＥＧＶの７個のアミノ酸よりなるモチーフが４箇所存在していた（図２）。 これはこのタンパク質の生理的機能を考える一つの指標になる可能性がある。 またこの部分の遺伝子の繰り返し増幅により進化した可能性も示唆しており、他に類似のモチーフを含んだファミリーの存在も考えられる。 図３に示したように免疫組織化学的に13.5Kタンパク質は小脳プルキンエ細胞にシナプス結合する神経終末や、大脳淡蒼球の神経細胞に存在が認められた。 今回得られたｃＤＮＡをプローブとしてノーザンブロットにより、我々はさらに各組織における発現と個体の発育過程における発現を調べている。 これにより13.5Kタンパク質の分布と性質がより正確に解明出来ると考える。また現在我々はｃＤＮＡの全塩基配列の決定を行なっている。

［文献］

(1) 中村泰治ら（１９８８）神経化学，２７，８４

［図の説明］

図１　13.5Kタンパク質ｃＤＮＡの制限酵素切断地図

図２　繰り返しアミノ酸配列のモチーフ

図３　小脳プルキンエ細胞（Ｐ）にシナプス様結合する免疫反応陽性の神経終末（矢印）

図１

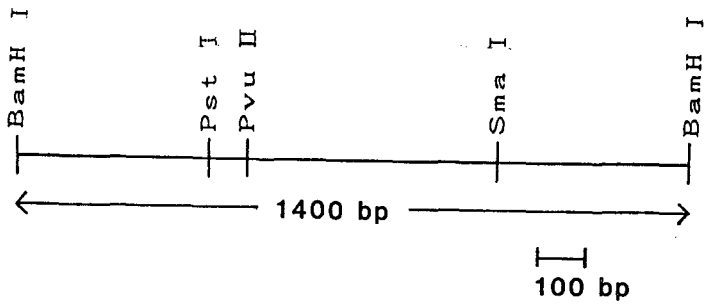



図２

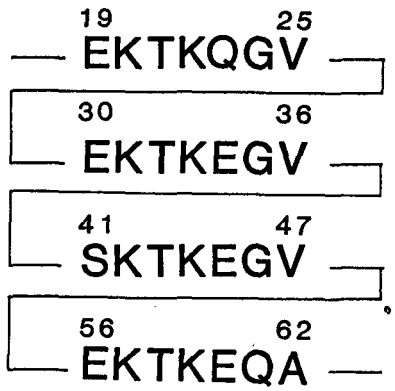
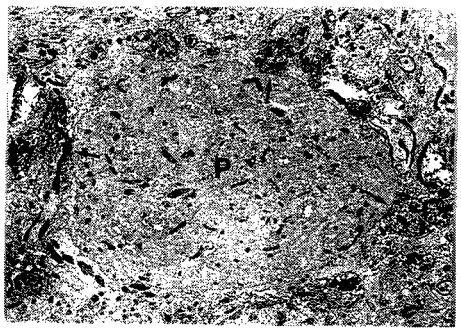



図３



# 208　核酸の脳内分布—超微量核酸の電気化学検出—

中原辰雄、平野誠*、松本孝*、黒木俊秀*、堤哲之*、楯林義寛*、西山浩二*、大星博明*、八尾博史*、内村英幸*、白石昭雄**、中村薫***

（九州大・理・化学、生物**、国立肥前療養所*、大牟田労災病院***）

〔要約〕

高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器（ＨＰＬＣ－ＥＣＤ）を用いた核酸の高感度分析法を開発し、ラット脳内の微小領域や神経核のＤＮＡおよびＲＮＡを定量した。この分析法の原理は、核酸の選択的加水分解によって遊離するグアニンをＨＰＬＣ－ＥＣＤで分析し、ＤＮＡおよびＲＮＡを定量するもので、測定感度は０.２ｎｇであった。脳内のＤＮＡ含量は、嗅結節、海馬、青斑核、視床下部で高く、とくに視床下部の正中隆起－弓状核は他部位の２倍ものＤＮＡを含有していた。また、前頭前野や尾状核－被殻ではＤＮＡの不均一な分布が認められた。視床下部諸核ではＲＮＡ含量も高くなるが、正中隆起－弓状核のＲＮＡ／ＤＮＡは低値であった。これらの結果は細胞死などの識別に有用であろう。

生体組織の核酸含量は、細胞密度や代謝機能などの生化学的指標である。核酸は，ジフェニルアミンによる呈色反応、エチジュウムブロマイドの蛍光増強、ジアミノ安息香酸－糖の蛍光などを分光学的方法で測定することによって定量されている。これらの方法は、特異性も高く、通常の組織量に対しては十分な測定感度をもつ。しかし、脳の微小領域や神経核などの微量な核酸分析には、従来の定量法に代わる新しい超高感度の定量法が必要である。そこで、われわれは核酸塩基の電子供与性に着目して（２）、電気化学検出法による核酸定量法を開発し（１）、核酸の脳内分布を測定した。

【方法】

Ｗｉｓｔａｒ系雄性ラット（３００－３５０ｇ）を用いた。脳を摘出し、クリオスタット（－２０°Ｃ）で３００μｍの連続切片を作製し、各切片よりマイクロナイフを用いて２０部位を切り出した。組織に２００－５００μｌの0.1Ｍ ギ酸を加えてホモジナイズした後、ホモジネート５０μｌに２０％ トリクロロ酢酸（ＴＣＡ）５０μｌを加え、遠心（１５０００ｒｐｍ、１５分、４°Ｃ）してＴＣＡ沈澱を得た。ＴＣＡ沈澱を１００μｌのエタノールで洗浄した後、０.０３Ｍ 塩酸（ＤＮＡ定量）あるいは3Ｍ 塩酸（ＤＮＡ＋ＲＮＡ定量）１０μｌを加えて５分間煮沸した。各試料を１００－４００μｌの移動相で希釈して、その２０μｌをＨＰＬＣ－ＥＣＤに注入した。ＤＮＡおよびＲＮＡは、それぞれ牛胸腺ＤＮＡおよび牛肝臓ＲＮＡを標準物質として定量した。ＨＰＬＣ－ＥＣＤ系には、ＨＰＬＣポンプＬＣ－６Ａ（島津）、$C_{18}$ 逆相カラムＭＡ－ＯＤＳ（エイコム）および電気化学検出器ＥＣＤ－１００（エイコム）を用い、移動相は０.１Ｍ りん酸緩衝液（ｐＨ ４）、１０ｍｇ／ｌ ＥＤＴＡ、２％ メタノール、流速は１ｍｌ／ｍｉｎ、ＥＣＤの電極電位は＋０.８５Ｖ ｖｓ．Ａｇ／ＡｇＣｌで測定した。

【結果と考察】

１．核酸塩基のＥＣＤ：グアニンはＥＣＤによって容易に検出され、半波電位は＋０.７８Ｖであった。アデニンはより高い電位でＥＣＤに応答し、チミンとシトシンは全く応答しなかった。グアノシンやデオキシグアノシンは＋０.９Ｖ以上で初めて酸化され、ＧＴＰとｄＧＴＰは反応しなかった。したがって、電極電位を＋０.８５Ｖに設定すると、グアニンのみが特異的に検出され、他の塩基、ヌクレオシドおよびヌクレオチドはグアニンの定量を妨害しない。

２．核酸の加水分解：グアニンのＥＣＤを核酸分析に応用するために、ヌクレオシド、ヌクレオチドおよび核酸からのグアニン遊離の条件を検討した。デオキシグアノシン、ｄＧＴＰおよびＤＮＡは低濃度の塩酸で定量的にグアニンを遊離し、グアノシン、ＧＴＰおよびＲＮＡの加水分解には、デオキシ化合物より１０００倍程高い濃度の塩酸が必要であった。このことから、ＤＮＡおよびＲＮＡのグアニンは、それぞれ０.０３Ｍおよび3Ｍ 塩酸で加水分解（９５°Ｃ、５分間）することによって区別され、核酸混合試料からＤＮＡあるいはＲＮＡのみを選択的に定量することができる。

3．DNAとRNAの定量：牛胸腺DNAおよびtRNAのECD応答は0.25－4ngの範囲で直線となり、測定感度（S／N＝3）は0.2ngであった。また、DNAあるいはRNAが共存していても、同様な検量線が得られた。このHPLC－ECD法の核酸検出感度は蛍光光度法や吸光光度法よりも100－1000倍程高く、数十個の細胞のDNAとRNAを定量することができる。この方法で測定したラット副腎のDNAおよびRNAは、3.8および5.5mg／g（湿重量）、ラット肝臓では、2.0および7.8mg／g（湿重量）であり、分光光度法の結果に一致する。

4．DNAとRNAの脳内分布：ラット脳内のDNAとRNA分布を表に示す。DNAは、脳全体に比較的均一に分布しているが、視床下部には他の領域に比べて高いDNA含量が認められた。とくに、正中隆起－弓状核（ME－ARC）は他の部位の2倍のDNAを含有し、DNA含量が脳内で最も高いとされている小脳や嗅球に匹敵する。他の領域では、嗅結節（OT）、海馬（HIP）、青斑核（LC）などが高いDNA含量を示した。前頭前野では、極野（FCP）は外側野（FCL）より有意に高いDNAを含有し、尾状核－被殻では、中部（CPM）が前部（CPA）より有意に高い値を示す。RNA含量は、視床下部で高く、尾状核－被殻の前部、内側縫線核（RM）、黒質（SN）、腹側被蓋野（VTA）で低い。RNA／DNAは皮質（FCM、FCL、ACC）で高く、正中隆起－弓状核で低い。一般にニューロンはグリヤ細胞より多量のRNAを含有するとされているので、正中隆起－弓状核は他の視床下部諸核に比べてグリヤ細胞の割合が多く、皮質では他の部位よりニューロンの割合が多いと考えられる。ただし、RNA量は細胞の大きさによっても異なるので、RNA／DNAの解釈については検討が必要である。DNAは細胞数の生化学的指標であり、HPLC－ECD法による超微量核酸分析は、個体発生や老化における細胞の増減、あるいは一過性虚血後にみられる遅発性細胞死などの識別にも有用となるであろう。

Regional distribution of DNA and RNA in rat brain

| Area or nucleus | Protein (μg/structure) | DNA (ng/ μg protein) | RNA (ng/μg protein) | RNA/DNA |
|---|---|---|---|---|
| FCP | 3364 ± 104 | 8.96 ± 0.68 | 21.4 ± 0.9 | 2.39 |
| FCM | 838 ± 27 | 7.83 ± 0.36 | 21.9 ± 0.6 | 2.80 |
| FCL | 1615 ± 45 | 6.94 ± 0.16 | 20.6 ± 0.6 | 2.96 |
| ACC | 314 ± 21 | 7.49 ± 0.33 | 21.9 ± 1.4 | 2.92 |
| AC | 440 ± 17 | 8.80 ± 0.60 | 18.4 ± 1.3 | 2.09 |
| OT | 322 ± 45 | 12.0 ± 0.7 | 22.8 ± 1.1 | 1.90 |
| SP | 489 ± 49 | 9.29 ± 0.55 | 23.7 ± 2.0 | 2.55 |
| CPA | 975 ± 36 | 6.67 ± 0.42 | 15.6 ± 0.9 | 2.33 |
| CPM | 1516 ± 74 | 8.04 ± 0.28 | 19.7 ± 0.5 | 2.46 |
| AMG | 706 ± 33 | 9.59 ± 0.34 | 24.6 ± 0.6 | 2.56 |
| HIP | 452 ± 66 | 10.1 ± 0.5 | 25.3 ± 0.9 | 2.50 |
| POM | 146 ± 9 | 11.0 ± 1.1 | 30.4 ± 1.4 | 2.76 |
| PE | 222 ± 13 | 13.9 ± 0.7 | 33.5 ± 3.1 | 2.41 |
| DM | 158 ± 20 | 10.2 ± 0.3 | 28.7 ± 2.9 | 2.82 |
| ME +ARC | 68.1 ± 7.3 | 19.9 ± 0.5 | 40.9 ± 3.71 | 1.93 |
| LC (A6) | 66.5 ± 4.1 | 11.2 ± 0.5 | 27.0 ± 2.4 | 2.41 |
| RD (B7) | 79.4 ± 4.5 | 8.78 ± 0.60 | 20.0 ± 0.8 | 2.28 |
| RM (B8) | 106 ± 8 | 9.01 ± 0.70 | 17.6 ± 2.6 | 1.96 |
| SN (A9) | 130 ± 13 | 8.44 ± 0.47 | 16.9 ± 0.9 | 2.01 |
| VTA(A10) | 88.0 ± 3.6 | 8.92 ± 0.62 | 17.8 ± 2.2 | 1.99 |

Results are expressed as mean ± S.E.M. of 5 animals.
FCP, FCM, FCL: prefrontal cortex polar, medial, lateral field; ACC: anterior cingulate cortex; AC: accumbens nucleus; OT: olfacory tubercle; SP: septum; CPA, CPM: caudate putamen, anterior, medial part; AMG: amygdala; HIP: hippocampus; POM: medial preoptic nucleus; PE: periventricular hypothalamic nucleus; DM: dorsomedial hypothalamic nucleus; ME+ARC: median eminence+arcuate nucleus; LC: locus coeruleus; RD, RM: dorsal, medial raphe nucleus; SN: substantia nigra; VTA: ventral tegmental area

【文献】1) Nakahara, T. et al. (1989) Anal. Biochem. (in press).

2) Pullman, B. and Pullman, A. (1963) Quantum Biochemistry, pp.215, Wiley, New York/London.

## 209 システインプロテアーゼ阻害剤による Heat Shock Protein の誘導

池内 聡、中村紀夫、小林 秀*、森 啓**、井原康夫**

東京慈恵会医科大学 脳外科、東京都老人医療センター 脳外科*
東京都老人総合研究所 臨床第二生理**

〔要約〕
培養グリオーマ細胞株U-87MGを用いてcysteine protease 阻害剤(leupeptin,E-64-d,calpeptin)による heat shock protein(HSP)の誘導について検討した。本細胞は加熱 (42℃,6時間) により、SDS-PAGE 上72,73 および90 kDのHSP を誘導した。上記阻害剤をそれぞれ20～ 200μg/mlの濃度で作用させると、calpeptinおよびE-64-dはそれぞれ 100μg/ml.6時間処理により HSPを誘導した。leupeptin は 200μg/ml,6時間処理でもHSP の合成を認めなかった。 HSP72に対するモノクローナル抗体による免疫染色を行ないHSP72 の局在を検討した。37℃では細胞質が弱く染色される細胞が一部に認められた。加熱およびcalpeptin,E-64-dの場合、3 ～6 時間処理ではほとんどの細胞の核・核小体が染色された。その後37℃または阻害剤を含まない培地に戻すと、細胞質特に核周囲の染色性が増加した。慢性実験として、上記阻害剤を 5または10μg/mlの濃度で増殖培地に添加して1 ～2 週間培養して同様に検討した。SDS-PAGE上蛋白合成に変化を認めたが、HSP の誘導は認めなかった。

アルツハイマー病に見られる神経原線維変化・老人斑や他の神経変性疾患における神経細胞内封入体が、ubiquitin に対する抗体で染色されることが報告されている (1,2)。ubiquitin が非リソゾーム系の ATP依存性蛋白分解機構に関与し、heat shock protein(HSP) の一つである(3) ことから、異常蛋白質の蓄積が細胞の防御反応として HSPを誘導する可能性が示唆される。またIvy らはcysteine protease 阻害剤であるleupeptin のラット脳室内持続投与により、神経細胞にリポフスチン様顆粒やneurofilament の蓄積、神経細胞の脱落が生ずることを報告し(4) 老化およびアルツハイマー病においてプロテアーゼ機能の低下が関与している可能性を示唆した。今回、プロテアーゼ阻害剤が HSPを誘導するかどうか、3 種類のcysteine protease 阻害剤を培養細胞に投与し免疫組織化学的、生化学的検討を行った。

〔方法〕
培養細胞としてヒトグリオーマ細胞株 U-87MG を用い、10%fetal bovine serum 添加 Eagle's minimum essential medium(EMEM)にて培養した。各実験にあたり約 5.0×10⁵/mlの細胞をplastic dishまたはtissue culture chamber slide にまき、対数増殖期の細胞を使用した。

加熱処理(heat shock)：あらかじめ加熱しておいた増殖培地に交換した後、42℃に設定した炭酸ガス培養器内で 1 ～ 12 時間加熱した。

プロテアーゼ阻害剤処理：cysteine protease 阻害剤としてleupeptin,E-64-dおよびcalpeptin を用いた。急性実験として、種々の濃度(20 ～ 100μg/ml) の阻害剤を含むserum-free EMEM で 1～24時間incubateした。慢性実験として、5 または10μg/mlの阻害剤を含む増殖培地で細胞を 1～2 週間培養した(3日毎に阻害剤を含む培地を交換し、1 週間目に継代を行った) 。

免疫組織化学的検討：加熱またはプロテアーゼ阻害剤処理を行った細胞を、4%パラホルムアルデヒド、5%酢酸・95% メタノールで固定し、一次抗体としてHeLa細胞のHSP72 に対するモノクローナル抗体:HSP72MAb(Amersham, 1:500)を用いて ABC法で染色した。

生化学的検討：今回使用したHSP72MAbの特性を検討するため、加熱処理(42 ℃,6時間) 後 methionine-free EMEMと交換して[$^{35}$S]methionine で1 時間ラベルした。細胞を採取しTris saline 緩衝液でhomogenize,20,000 ×g で遠心した(4℃,15 分間) 。その上清を本抗体を用いてimmunoprecipitation を行ない二次元電気泳動(O'Farrel)、fluorographyにて検討した。次に加熱またはプロテアーゼ阻害剤処理(100μg/ml,6時間) した細胞の 20,000×g 上清をSDS-PAGEで展開後、Western blotting 法にてHSP72 の合成を検討した。また蛋白合成の変化を検討するため細胞をSDS-PAGE sample bufferで直接溶解しSDS-PAGE,fluorography を行なった。

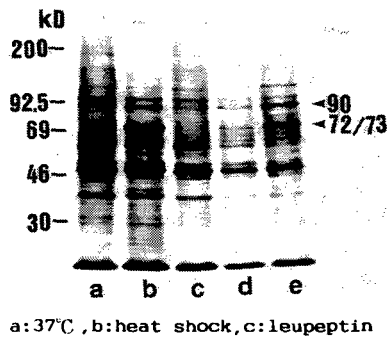
〔結果〕
HSP72MAbの特性：加熱処理によりU-87MG細胞は、SDS-PAGE上72,73 および90kDのHSP を誘導した。73および90kD蛋白は37℃でも存在するconstitutive HSPである。72kD蛋白はHeLa細胞では構成蛋白としては存在しないstress-inducible HSPであるが(4)、U-87MG の場合37℃でも少量合成されていた。immunoprecipitation の結果、HSP72 MAb はU-87MGにおいてもこの72kD蛋白のみを認識することが示された(Fig.1 A,C) 。

HSP72 の誘導：Western blotting法による検討では、calpeptin 処理の場合加熱処理と同様HSP72 の合成は著しく増加した。(Fig.1 B)

HSP72 の局在：U-87MGは37℃では細胞質が弱く染色される細胞が一部に認められた。加熱 (42℃,3時間) ,calpeptin(100μg/ml,3時間) および E-64-d (100μg/ml,6時間) 処理によりほとんどの細胞の核、核小体が染色された。その後37℃またはプロテアーゼ阻害剤を含まないEMEMに戻すと、核の染色性は減少し細胞質特に核の周囲が染色された(Fig.2) 。また処理時間を延長すると同様に細胞質の染色性が増加した。leupeptin 処理は特に変化を認めなかった。

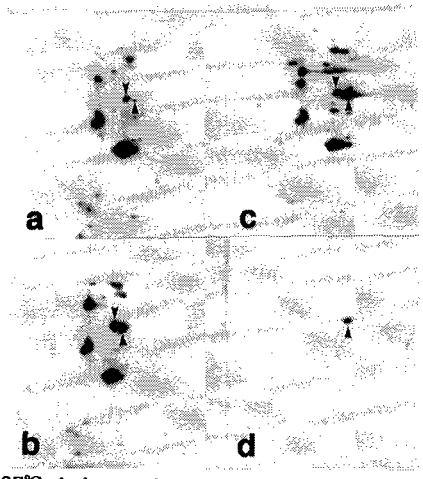
蛋白合成の変化：calpeptin およびE-64-dは 100μg/ml,6時間処理で加熱処理と同様に72,73 および90kD蛋白の合成が増加した。E-64-dはcalpeptin に比べ72kD蛋白の誘導は軽度であった。leupeptin は 200μg/ml,6時間処理でも蛋白合成に変化は認めなかった(Fig.1 A) 。慢性実験として低濃度 ( 5～10μg/ml) の阻害剤を 1～2 週間作用させSDS-PAGEを施行した。いずれの阻害剤処理も80kD蛋白の増加を認め蛋白合成に変化が見られたが、72 kD蛋白は誘導されなかった(Fig.3) 。

Fig.1 acute treatment (100 μg/ml,6hr)




a:37℃ ,b:heat shock,c:leupeptin
d:E-64-d,e:calpeptin

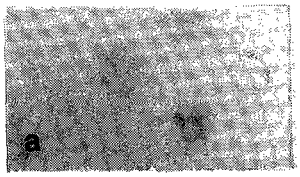
C)two-dimensional electrophoresis

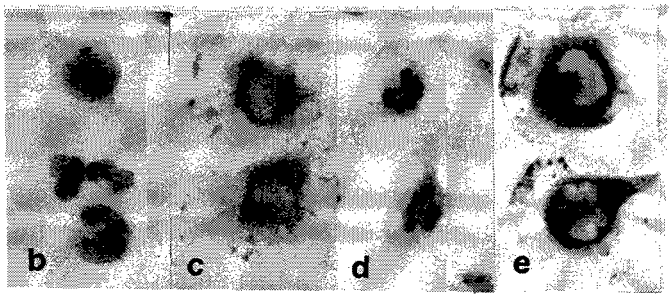


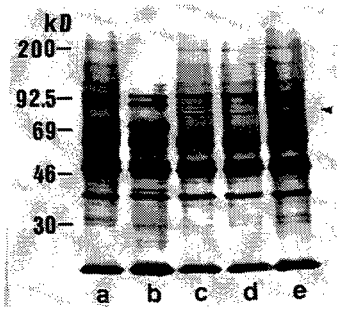

a:37℃ ,b:heat shock,c:calpeptin
d:immunoprecipitate ( ▲ 72kD ▼ 73kD )

Fig.3 chronic treatment (10μg/ml)
a:37℃ ,b:heat shock,c:leupeptin
d:E-64-d,e:calpeptin

Fig.2 immunocytochemistry
a:37℃ ,b:heat shock
c:recovery from heat shock
d:calpeptin
e:recovery from calpeptin




〔考察〕

HSP72 を中心にプロテアーゼ阻害剤によるHSP の誘導について検討した。calpeptin およびE-64-dはHSP を誘導しうることが示された。今回使用した阻害剤はいずれもcalcium activated neutral protease(CANP)を阻害するが、両者はleupeptin に比べCANPをより選択的に阻害し細胞膜の通過性がよいことが知られている(6,7) 。HSPsを誘導する機序としては蛋白分解機構の障害による異常蛋白質の蓄積が考えられるが、他のプロテアーゼを阻害する可能性もあり細胞内蛋白代謝にどのような影響を及ぼすかは本実験のみからでは言及しえない。Ivy(4)らのleupeptin による脳の老化モデルはアルツハイマー病の成因を考える上で興味深いが、今回の実験ではleupeptin はHSP の誘導を認めなかった。また慢性実験では、急性実験で観察された HSPの誘導が認められず、慢性に経過する神経変性疾患において防御反応としてHSP の誘導が起こりうるかどうかは今後の検討を要する。

〔謝辞〕

研究を行なうにあたりE-64-dを御供与頂いた花田和紀先生（大正製薬総合研究所）、calpeptin を御供与頂いた田中隆治先生（サントリー基礎研究所）に深く感謝致します。

〔文献〕

(1) H.Mori,J.Kondo and Y.Ihara (1987) Science,235,1641-1644 (2) J.M.Gallo and B.H.Anderton (1989) Nature,337,687-689 (3) U.Bond and M.J.Schlesinger (1985) Mol.Cell.Biol.5,949-956 (4) G.O.Ivy (1987) In:Neuroplasticity,Learning and Memory,Alan R.Liss,pp125-150 (5) W.J.Welch and J.P.Suhan (1986) J.Cell Biol.103,2035-2952 (6) T.Tsujinaka et al (1988) Bioch.Biophy.Res.Comm.153,1201-1208 (7) M.Tamai et al (1986) J.Pharmacobio-Dyn.9,672-677

# 210 髄鞘発育不全ウサギ脳のカルシウム依存性中性プロテアーゼ（ＣＡＮＰ）

川島誠一，猪股光司，Teresa Zalewska
（都老人研・生化学）

〔要約〕
神経変異種である麻痺性震えウサギ（ＰＴ）脳におけるミエリンタンパク質の異常分解の要因として、カルシウム依存性中性プロテアーゼ（ＣＡＮＰ）の関与を考えた。そこで、５週齢と３ケ月齢の正常およびＰＴウサギ脳から前ミエリン分画とミエリン分画を調製し、そこに存在するＣＡＮＰを調べた。ＣＡＮＰに対する抗体を用いたウェスタンブロットでは、いずれの分画にも２種類のＣＡＮＰ（μＣＡＮＰとｍＣＡＮＰ）が検出された。ＣＡＮＰ活性は５週齢のＰＴの前ミエリン分画で最高値を示した。総じてＣＡＮＰ活性は加齢と共に変化し、μＣＡＮＰは減少しｍＣＡＮＰは増加する。また、ＰＴ脳の分画では正常脳の分画よりＣＡＮＰ活性（比活性）は高く、特に前ミエリン分画でその差は著しい。組織重量当りのタンパク質量は５週齢ＰＴのミエリン分画に著しい減少が認められた。前ミエリン分画のタンパク質のＳＤＳ－電気泳動パターンはＰＴと正常とで異なり、ＰＴにおいてタンパク質分解が昂進していることがわかる。恐らくＣＡＮＰ活性の上昇がその原因で、ミエリンタンパク質の分解によりミエリン形成が異常となり麻痺をもたらすと考えられる。

〈序論〉
神経変異種である麻痺性震えウサギ（ＰＴ）脳ではミエリン量が25-30％に減少している。これがミエリン成分の合成能の低下によるものでないことは既に知られている。また、ＰＴのミエリンでは脂質に対してタンパク質が減少している。この原因としてミエリンタンパク質の異常分解が考えられる。ミエリンにはカルシウム依存性中性プロテアーゼ（ＣＡＮＰ）が結合し（1）、ある種の神経疾患ではＣＡＮＰ活性が増大してミエリンの分解が昂進しているとの報告（2）もある。そこで、ＰＴウサギ脳におけるミエリンタンパク質の減少とＣＡＮＰ活性の関係を明らかにするため、ＰＴウサギおよび正常ウサギの脳から前ミエリン分画およびミエリン分画を調製し、そこに存在するＣＡＮＰを調べた。

〈実験方法〉
ＰＴウサギの症状は加齢に従い改善されるため、実験には５週齢と３ケ月齢の２種類の実験動物を使用した。ミエリン分画はNortonとPoludoの方法（3）により、また前ミエリン（あるいはミエリン様）分画はBenjaminらの方法（4）により調製した。各分画をTriton X-100処理して可溶化し、得られた粗抽出液をDE-52カラムにより分離して各ＣＡＮＰを部分精製した（5）。ＣＡＮＰ活性は$^{14}$Ｃ－サクシニル化した子牛血清アルブミンを基質として測定した（5）。粗抽出液中のＣＡＮＰはＳＤＳ－電気泳動後抗ＣＡＮＰモノクロナル抗体（$1D_{10}A_7$）を用いたウェスタンブロットにより検出した（6）。

〈結果と考察〉
粗抽出液のイムノブロットにより、各分画には２種類のＣＡＮＰ（μＣＡＮＰとｍＣＡＮＰ）のいずれもが存在することがわかった。タンパク量当りのＣＡＮＰ量はすべての例で前ミエリン分画で高かった。これまで前ミエリン分画にＣＡＮＰが存在することは報告されていない。この分画に多量のＣＡＮＰが存在する事実は興味深いが、その生理機能は不明である。イムノブロットの結果を確認しさらに活性として定量化するため、各粗抽出液に含まれるμＣＡＮＰとｍＣＡＮＰを分離・精製してそれぞれの活性を測定した（表１）。ＣＡＮＰ活性は５週齢のＰＴ脳の前ミエリン分画で最も高かったが、各分画に含まれるＣＡＮＰ活性は加齢とともに変化した。特に、正常とＰＴのいずれの場合も加齢とともにμＣＡＮＰ活性は減少し、逆にｍＣＡＮＰ活性は増加した。湿組織重量当りのタンパク量はいずれの分画でもＰＴ脳において低かった（表２）。特に、５週齢ＰＴのミエリン分画タンパク質量は正常脳に比べ約１／４に減少していた。前ミエリン分画タンパク質量も約１／２に減少していた。しかしこれらの差は加齢とともに小さくなり、３ケ月齢ではミエリン分画で３０％の差となり前ミエリン分画での差はほとんどな

くなった。ＰＴおよび正常ウサギ脳からの前ミエリン・ミエリン各分画を構成するタンパク質の電気泳動像には明らかな差が認められた。ＰＴ脳の前ミエリンでは分子量約２０－３０ｋＤａのタンパク質の量が減少している。同じように、ミエリン分画でも２１ｋＤａの２本のバンド（恐らくミエリン塩基性タンパク質）がＰＴ脳では１本になっていた。これらの結果は、ＰＴではミエリンおよび前ミエリンのタンパク質の分解が昂進していることを示している。この分解を司るプロテアーゼとして、ＰＴ脳、特にその前ミエリン分画で著しく活性の上昇しているＣＡＮＰは有力な候補である。ＣＡＮＰによりミエリンタンパク質が分解されることによりミエリン鞘の形成・維持ができず、その結果麻痺性震えをもたらと考えられる。

表１．正常およびＰＴウサギ脳におけるＣＡＮＰ活性（ｍＵ／ｍｇタンパク質）

| Experimental group | Fraction | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Premyelin | | Myelin | |
| | μ | m | μ | m |
| 5-weeks | | | | |
| Control | 5.0 | 7.6 | 3.6 | 1.5 |
| PT | 15.0 | 18.0 | 3.9 | 1.7 |
| 3-months | | | | |
| Control | 2.4 | 10.8 | 1.4 | 7.5 |
| PT | 9.3 | 23.0 | 2.8 | 12.1 |

表２．正常およびＰＴウサギ脳におけるタンパク質含量分布（ｍｇタンパク質／ｇ湿重量）

| Experimental group | Fraction | |
|---|---|---|
| | Premyelin | Myelin |
| 5-weeks | | |
| Control | 8.90 | 10.20 |
| PT | 5.15 | 2.64 |
| 3-months | | |
| Control | 5.60 | 10.00 |
| PT | 5.38 | 6.40 |

〈文献〉


1. Banik,N.L., McAlhoney,W.W., and Hogan,E.L. (1985) *J. Neurochem.* 45, 581-588.
2. Sato,S., Quarles,R.H., Brady,R.O., and Taurtelotte,W.W. (1984) *Ann. Neurol.* 15, 264-267.
3. Norton,W.T., and Poduslo,S.E. (1973) *J. Neurochem.* 21, 749-757.
4. Benjamins, I.A., Miller,S.L., and Morell,P. (1976) *J. Neurochem.* 27, 565-570.
5. Kawashima,S., Hayashi,M., Saito,Y., Kasai,Y., and Imahori,K. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 965, 130-135.
6. Kasai,Y., Inomata,M., Hayashi,M., Imahori,K., and Kawashima,S. (1986) *J. Biochem.* 100, 183-190.

# 211　感染後脳炎および神経炎と髄鞘蛋白

栗原一浩　細川　武　根岸輝彦　富岳　亮　濱口勝彦
（埼玉医科大学・神経内科）

〔要約〕ウィルス感染後の神経症状の発現機序を検討する目的で、中枢および末梢神経症状出現後、抗ＥＢ抗体価上昇が確認された５症例、抗風疹抗体価上昇が確認された３症例について、抗ＭＢＰ抗体・抗Ｐ２抗体をＥＬＩＳＡ法で測定し、各種ウィルス抗体価上昇を認めない非炎症性疾患群および対照群と比較した。また、Immunoblot法で、各種ウィルス蛋白とＭＢＰ・Ｐ２蛋白の交叉抗原性を検討した。抗ＭＢＰおよびＰ２抗体は、抗ＥＢ抗体上昇群では、非炎症性疾患群および対照群より有意な上昇をみたが、抗風疹抗体上昇群では、有意差はみられなかった。また、各種ウィルス蛋白と抗ＭＢＰおよびＰ２抗体の反応は認めなかった。以上よりＥＢウィルス感染後の神経症状出現に抗ＭＢＰあるいはＰ２抗体が、何らかの形で関与する可能性もあり、今後更に蛋白のペプチドレベルでの検討が必要であると考えた。

ウィルス感染時の神経症状の発現機序に関しては、ウィルスが神経系内に侵入し、直接的に細胞破壊をきたすことや、ウィルスにより免疫学的異常が惹起され、神経系の脱髄がおこることが知られている。また、我々は既にギランバレー症候群において病初期より抗Ｐ２蛋白抗体が出現することを明らかにした（１）。今回我々は、ウィルス感染後の神経症状の発現機序を検討する目的で、中枢および末梢神経症状を呈した症例において、中枢神経髄鞘蛋白であるＭＢＰ、末梢神経髄鞘蛋白であるＰ２蛋白に対する抗体である抗ＭＢＰ抗体・抗Ｐ２抗体の上昇の有無、および各種ウィルス蛋白とＭＢＰ・Ｐ２蛋白の交叉抗原性を検討した。

【対象】中枢および末梢神経症状出現後、ウィルス抗体価の上昇が確認された、抗ＥＢ抗体価上昇例５例、抗風疹抗体価上昇例３例、いずれの抗ウィルス抗体価の上昇を認めない非炎症性神経疾患症例（以下ＮＩＮＤ）４例（抗Ｐ２抗体のみ３例）、対照７例（抗Ｐ２抗体のみ５例）を対象とした。

【方法】　１）ＭＢＰ・Ｐ２蛋白の調整：Ｐ２蛋白は、速やかに採取したウシ馬尾神経より、ＭＢＰは、ウシ脊髄よりミエリンを分画し、ミエリン分画より酸抽出しゲル濾過法により精製した。

２）ＥＬＩＳＡ法による抗ＭＢＰ抗体および抗Ｐ２抗体の測定：ａ)ＭＢＰを5ul/mlの濃度にＰＢＳで調製した後、microplateの各wellを coatingし、一次抗体として40倍に希釈した血清を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG血清を反応させた。その後、ＡＢＴＳにて発色させ、ムルチスキャンにて 414nmでの吸光度を測定した。ｂ）Ｐ２蛋白を10ul/mlの濃度にcoating bufferで調製した後、microplateの各wellをcoatingし、以下抗ＭＢＰ抗体の測定と同様な方法で行った。

３）ウィルス蛋白中のＭＢＰ・Ｐ２類似蛋白の検索：ａ）抗ＭＢＰ抗体・抗Ｐ２抗体の作製：ＭＢＰ・Ｐ２蛋白各々を、家兎に接種し、抗体を得た。ｂ）Immunoblot法による検討：12.5% SDS-PAGEを作製し、各種ウィルス抗原（ＥＢ・風疹等）を泳動後、ウェスタンブロット法によりニトロセルロース膜に転写した。次に転写された抗原蛋白は、一次抗体である５０倍希釈した抗ＭＢＰ抗体または抗Ｐ２抗体と反応させ、抗体の反応する部位を検討した。

【結果】１）ＥＬＩＳＡ法による抗ＭＢＰ抗体活性（図１）：抗ＥＢ抗体価上昇群ではＯＤは 0.391±0.075 (Mean±SD)、抗風疹抗体価上昇群では 0.270±0.045、ＮＩＮＤ群では 0.219±0.091、対照群では0.271±0.083であり、抗ＥＢ抗体価上昇群は、抗風疹抗体上昇群・非炎症性疾患群・対照群と比較して明らかな抗体上昇を認めた（いずれも$p<0.05$）。また、抗風疹抗体価上昇群は、ＮＩＮＤ群・対照群との間に有意差は認めなかった。

２）ＥＬＩＳＡ法による抗Ｐ２抗体活性（図２）：抗ＥＢ抗体価上昇群では 0.419±0.112、抗風疹抗体価上

昇群では 0.476±0.404、ＮＩＮＤ群では 0.156±0.030、対照群では0.279±0.093であり、抗ＥＢ抗体価上昇群は、ＮＩＮＤ群と比較して、有意の抗体上昇を認めた（p<0.01）。

３）ウィルス蛋白中のＭＢＰ・Ｐ２蛋白類似蛋白の検索：ａ）抗ＭＢＰ抗体が反応する部位（図３）：ＥＢ・風疹・HTLV-I・サイトメガロウィルス蛋白中には確認できなかった。ｂ）抗Ｐ２抗体が反応する部位（図４）：ＥＢ・風疹ウィルス蛋白中には確認できなかった。

【考察】今回の結果で、抗ＥＢ抗体価上昇群においては、ＮＩＮＤ群・対照群に比して抗ＭＢＰ抗体および抗Ｐ２抗体の上昇が認められたことは、神経症状の発現に抗ＭＢＰおよびＰ２蛋白抗体がの何らかの形で関与をしたか、または神経組織の破壊により二次的に上昇した可能性が示唆された。各ウィルス蛋白と抗ＭＢＰ抗体・抗Ｐ２抗体の反応が認められなっかたことからウィルス蛋白とＭＢＰ・Ｐ２蛋白との交叉抗原性による神経症状の発現は、今回の結果からは考え難いが、Jahnkeらが各ウィルス蛋白のアミノ酸配列とヒトＭＢＰおよびヒトＰ２蛋白のアミノ酸配列を比較し、ＥＢウィルスとＭＢＰとの間に２カ所、Ｐ２蛋白との間に３カ所の相同性を確認していることより、ウィルス蛋白の一部のアミノ酸配列を、ＥＢウィルス感染により免疫調節機構の異常を来した生体が認識し、自己免疫学的異常を誘発して神経系の障害を来し神経症状を呈する可能性も考えられ（２，３）、今後更に、ペプチドレベルでの検討が必要であると考えた。

【文献】（１）Negishi.T. et al.(1988) Ann. N.Y. Acad. Sci. 540. 376-377 ，（２）Jahnke. U. et al. (1985) Science 229. 282-284，（３）Neumann.B. et al.(1988) J.Neuroimmunol. 20. 169-170

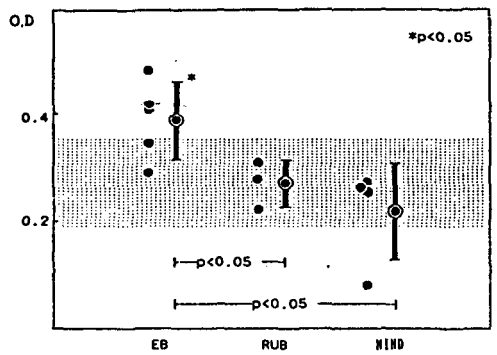



図１　各種ウィルス抗体価上昇群および非炎症性神経疾患群の抗ＭＢＰ抗体　（EB:ＥＢ抗体価上昇群，RUB:風疹抗体上昇群，NIND:非炎症性神経疾患群，ハーフトーン:対照群）

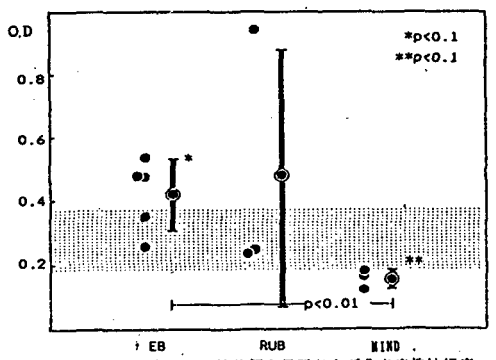



図２　各種ウィルス抗体価上昇群および非炎症性神経疾患群の抗Ｐ２蛋白抗体　（EB:ＥＢ抗体価上昇群，RUB:風疹抗体上昇群，NIND:非炎症性神経疾患群，ハーフトーン:対照群）

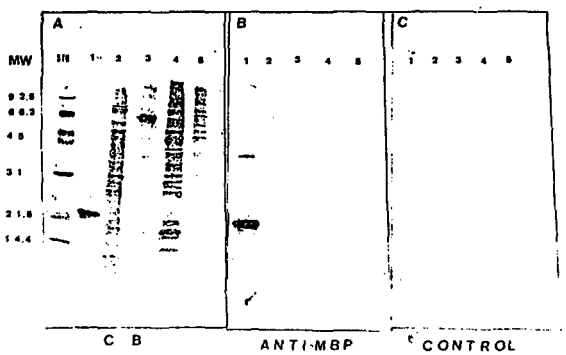



図３　各種ウィルス抗原に対するＭＢＰ抗体の反応
1. MBP, 2. HTLV-I, 3. 風疹 4. EB, 5.ｻｲﾄﾒｶﾞﾛ

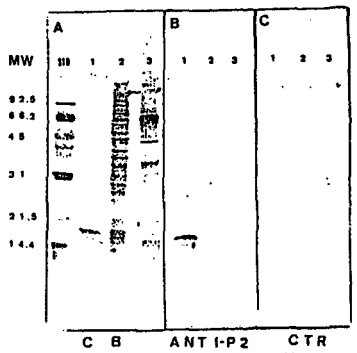



図４　各種ウィルス抗原に対するＰ２蛋白抗体の反応
1. P2, 2. EB, 3.風疹

# 212 ペンチレンテトラゾール処理培養神経細胞の酸性蛋白質について：パラサイモシンの同定

北村　邦男・田中早苗・坂本安・植村慶一[x]・津田整[xx]・保田和美[xx]・菅谷愛子[xx]・菅谷英一[xxx]
(埼玉医大・一生理、慶大・医・生理[x]、城西大・薬・生薬材料[xx]、神奈川歯大・生理[xxx])

〔要約〕ラット胎児の大脳皮質の初代培養神経細胞にペンチレンテトラゾール(PTZ)を添加すると、神経細胞の異常興奮をもたらし、burst 状の連続発射活動が認められる。このとき二次元電気泳動で分子量1～2万の酸性蛋白質領域に認められる３つの酸性蛋白質(P1,P2,P3)の内、P1 と P3 が有意な増加を示す。これらの蛋白質を単離するために PTZ 処理した培養神経細胞の抽出液を DEAE-Sephadex および ODS カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を行ない、P2 と P3 を精製した。両蛋白質をリジルエンドペプチダーゼで消化した後 ODS カラムで分画し、得られたペプチドのアミノ酸配列を決定したところ、P2 はカルモジュリンであることが判明した。一方、P3 より得たペプチドのアミノ酸配列はすべて、最近全一次構造が明らかとなったパラサイモシンの部分配列と一致していた。従って、PTZ 処理によって有意に増加する酸性蛋白質はパラサイモシンであることが判明し、同時に、神経細胞にもパラサイモシンが存在することが示された。パラサイモシンは免疫防御システムに対し抑制的に関与していると考えられているが、神経細胞にも存在するとの今回の結果は、パラサイモシンが細胞内において何等かの機能を営んでいる可能性を示唆している。

中枢興奮薬であるペンチレンテトラゾール(PTZ)は実験動物にてんかん類似の痙攣を惹起させることが知られており、菅谷らによって、培養神経細胞に PTZ を添加すると神経細胞の異常興奮をもたらし、burst 状の連続発射活動が認められることが指摘されている[1]。PTZ 処理による培養神経細胞の生化学的変化として、二次元電気泳動上の分子量1～2万の酸性蛋白質領域に存在する３つの蛋白質(P1, P2, P3;図1)のうち P1 と P3 の有意な増加を認めている(P2 の量は変化しない)[2]、そこで今回はこれらの蛋白質の精製を分析を試みた。

〔実験方法〕 Wistar 系ラットの妊娠 17 日目の胎仔の大脳皮質をステンレス100メッシュ処理、800 rpm 5 分遠心後、細胞を培養シャーレの中で $1x10^6$ 個/ml となるように調製し、1.5% $CO_2$下、37°C で培養した。培地には0.94% Eagle 7s MEM を用い、10%新生仔ウシ血清、0.0292% L-グルタミン、0.005% カナマイシン、0.5% ブドウ糖を加えた。培養 96 時間後、終濃度 25 mM になるように PTZ を加え 15 分処理した。リン酸緩衝液で 3 回洗浄した後細胞を集め、同緩衝液中でホモゲナイズし(800rpm 15回)、10,000 g 遠心上清を酸性蛋白質精製の出発材料とした。まず DEAE-Sephadex A25 カラム(1x45 cm; 0.05Mリン酸緩衝液, pH7.2)を用い、0.1, 0.2, 0.4, 1.0 M NaCl の段階的溶出により粗分画した。0.4M 溶出液を Sepahdex G15 にて脱塩後、Ultron ODS カラム(4.6x250mm)による高速液体クロマトグラフィーで分画した。精製蛋白はリジルエンドペプチダーゼにて 50mM トリス-塩酸, pH8.0 中で 37°C 4 時間消化し、再び ODS カラムで分画した。得られたペプチドは、気相シークエンサー(ABI)でアミノ酸配列を決定した。

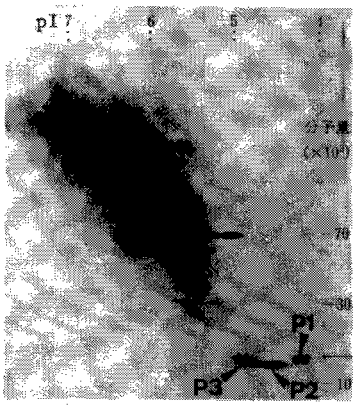


図1. 初代培養神経細胞の可溶性蛋白質のミクロ二次元電気泳動図

〔結果および考察〕 236 匹の胎仔の培養神経細胞よりの可溶性蛋白について DEAE Sephadex による分画をしたところ 0.4 M 溶出液中に P2 と P3 が存在することが二次元電気泳動上で確かめられた。この段階で P1 は纏まって溶出されなかったので回収することは出来なかった。0.4 M 画分を ODS カラムで分画したところ２つの主要なピークが得られ、他は蛋白は殆ど存在しなかった(図2)。二次元電気泳動上では 27 分のピークは P3 に、48 分のピークは P2 に一致しており、両者とも他の蛋白スポットは認められず純粋であった。それぞれの収量は P2 は 12 nmol, P3 は 5.8 nmol であった。両蛋白質の N 末端はブロックされていたので、まず P2 についてリジルエンドペプチダーゼで消化し、再び ODS カラムで分画し、良く分離した３つのピークのアミノ酸配列を調べた。その内の１つはN 末端がブロックされていたが、他の２つのアミノ酸配列はカルモジュリンの部分配列(22～30,78～94)に一致していた。従って、PTZ

処理によっても量的変化の無い P2 はカルモジュリンであると結論された。次に、P3のリジルエンドペプチダーゼ消化ペプチドの ODS HPLC を行ない 15 分画中９つの主要ピークを得た(図3)。ピーク 1には複数のペプチドが存在したが、他の８つのピークは単一で、ピーク 15 以外は全配列が決定された。これらの配列は、最近全一次構造が決定されたパラサイモシンα(ParaT)の構造[3]と完全に一致していた(表1)。ParaT は、胸腺のFraction V よりリンパ球の分化誘導作用をもつ因子の精製の際に得られた蛋白質であり、リンパ球の分化誘導作用をもつプロサイモシン(ProT)と構造上で似ているが、ProTの作用を抑制することが知られている免疫系に関与すると考えられている蛋白質である[4]。従って、神経細胞に存在することが判明した今回の結果は意外ではあったが、ParaT が免疫系以外の臓器にも広く存在し、胸腺よりもむしろ脳にその蛋白質やmRNAが多く存在するとの報告[5]もあるので、ParaT の本来の機能は全ての細胞がもつ共通の細胞内代謝に関与しているものと思われる。ProTについてではあるが、その cDNAにシグナル配列が存在しないことおよび遊離型ポリゾーム上にしかmRNAが存在しないことから分泌蛋白とは考えられず、本来の機能は細胞内であろうとしているおり、ProTおよびその分解ペプチドの免疫系における作用は "Xenobiotics"としての作用であろうとの指摘がなされている[6]。ParaT に関してもそのcDNAからシグナル配列は存在しないことが示されているので[7]ProTと同様の可能性が考えられる。今回、ラット培養神経細胞よりのParaTの精製されたこと、また昨年ウシ脳よりProTが精製されたことが報告されている[8]ことは、免疫系に関与すると考えられていたこれらの蛋白質が神経系で何等かの機能を営む可能性が高く、特に ParaT は PTZ処理によりその発現が促進されることから神経細胞の興奮性に係わる可能性が示唆される。Sugayaらは、PTZ処理による神経細胞の異常興奮の際、細胞内においてカルシウムが細胞膜の内側へ移行することを確かめている[9]。ParaT とカルシウム結合蛋白質との間に有意なホモロジーは見られなかったが、この極めて酸性な蛋白質のカルシウム移行との関連が注目される。

最後に、本研究を遂行するにあたり数々の助言を与えてくれた都立大の磯辺俊明先生に感謝致します。

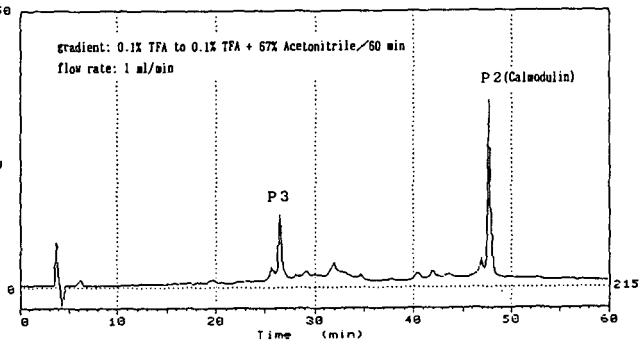



図2. Ultron-ODS HPLC による酸性蛋白質の分離パターン
蛋白試料は DEAE-Sephadex の 0.4M NaCl 溶出画分

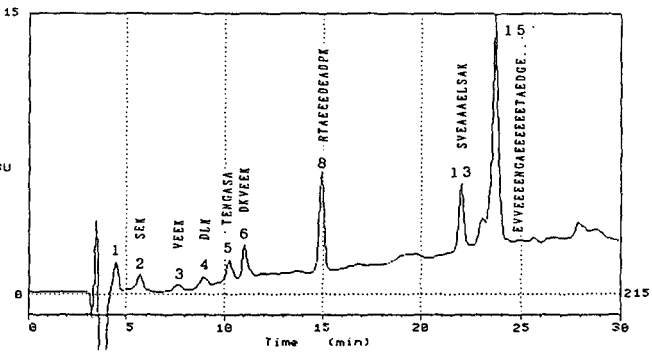



図3. Ultron-ODS HPLC による P3 由来のペプチドの分離パターン
試料は P3 を Lysylendopeptidase で消化したもの。

表1. パラサイモシンと P3 由来のペプチドのアミノ酸配列

```
    1   2   3
Ac-Ser-Glx-Lys-...
 ├─KC-ODS2─┤

    4                   10                              17   18   20
...-Ser-Val-Glu-Ala-Ala-Ala-Glu-Leu-Ser-Ala-Lys-Asp-Leu-Lys...[Glu-Lys-Lys]
 ├──────────────KC-ODS13──────────────┤ ├KC-ODS4┤

   21                                        30   31        34
...-Asp-Lys-Val-Glu-Glu-Lys-Ala-Gly-Arg-Lys-...[Glu-Arg-Lys-Lys]
 ├──────KC-ODS6──────┤ ├──KC-ODS1──┤
 ├KC1┤ ├──KC-ODS3 ──┤

   35                  40                                  50
...-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Glu-Glu-Asn-Gly-Ala-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Thr-
 ├──────────────────────KC-ODS15──────────────────────────────────────┤
   52                  59        60
-Ala-Glu-Asp-Gly-Glu-Asp-X[Asp]-Asp-...[Glu-Gly-Asp-Glu-Glu-Asp-Glu-Glu-
 ├──────────────────────KC-ODS15──────────────────────────────────────┤
   68        70                                  79
-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Asp-Glu-Gly-Pro-Val-Arg-Lys]
 ├──────────KC-ODS15──────────┤

   80                                  90        92   94
...-Arg-Thr-Ala-Glu-Glu-Glu-Asp-Glu-Ala-Asp-Pro-Lys-...[Arg-Gln-Lys]
 ├──────────KC-ODS8──────────┤

   95              100 101
...-Thr-Glu-Asn-Gly-Ala-Ser-AlaCOOH
 ├──────KC-ODS5──────┤
```

各配列の下に Lysylendopeptidase-C 消化物の ODS カラムより得られたペプチドのピーク番号を示した。[ ] 内は未決定部分であり、記載した配列番号は Panneerselvam,C.,et al.(1988)Biochem.Biophys.Res.Commun.,155,539-545 に報告された結果に基づく。

## [文献]


1)Sugaya,E. et al.(1989)Brain Res. in press
2)Uyemura,K. et al.(1988) in "Recent Advances in the Pharmacology of Kampo Medicines"(Hosoya,E. & Yamamura,Y. eds.),97-101, Excerpta Medica
3)Panneerselvam,C. et al.(1988)Biochem.Biophys.Res.Commun.,155,539-545
4)Haritos,A.A. et al.(1985)Anal.Biochem.,144,436-440
5)Clinton,M. et al.(1989)Arch.Biochem.Biophys.,269,256-263
6)Eschenfeldt,W.H. et al.(1989)J.Biol.Chem.,264,7546-7555
7)Clinton,M. et al.(1989)Biochem.Biophys.Res.Commun.,158,855-862
8)関寿明ら(1988)生化学,60,p.624
9)菅谷英一(1983)神経研究の進歩,27,533-544

213

# 精神分裂病者の脳糖代謝、脳血流量、脳酸素消費量

高津　修，藤田春洋，岸本英爾，石川尚志，松下正明，飯尾正明*

（横浜市立大学医学部精神医学教室，国立療養所中野病院*）

〔要約〕

未治療の精神分裂病者の脳糖代謝、脳血流量、脳酸素消費量をポジトロンCTで計測した。トレーサーは$^{11}$C-グルコース、$C^{15}O_2$、$^{15}O_2$を用いた。精神分裂病者は全例いずれかのトレーサーで異常を認め、前頭葉を中心に低下がみられる者、右頭頂葉を中心に低下がみられる者、左側頭葉を中心に低下がみられる者の３つのサブタイプに分類された。そのタイプ別に関心領域を設定し、脳糖代謝、脳血流量、脳酸素消費量を正常対照者と比較した。各タイプにおいてそれぞれ前頭葉、右頭頂葉、左側頭葉の活性が有意に低下していたが、皮質下では有意差を認めなかった。さらに水平断に加え矢状断、前額断の画像を構成することで個々の精神分裂病者で、異常部位の広がりを詳細に調べる事ができ、症状との対応についても検討した。

最近PET(positron emission tomography)を用いた精神分裂病の脳糖代謝、脳受容体の研究が次々と発表されている。しかしPETを用いて脳血流量、脳酸素消費量を測定した報告は一論文のみである。

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

Ⅰ対象と方法

横浜市立大学医学部病院神経科に初診した未治療患者で、精神分裂病と診断された13例(平均年齢36才)を対象とした。患者は全員右手ききで薬物未投与である。正常対照者は5名(平均年齢37才)であった。

PET計測法は、$C^{15}O_2$または$^{15}O_2$を経鼻的に吸入し、脳血流量(CBF)、脳酸素消費量($CMRO_2$)を測定した。一方$^{11}$C-グルコースは約20mCiを経口投与した。尚有意差検定はstudent t testによった。

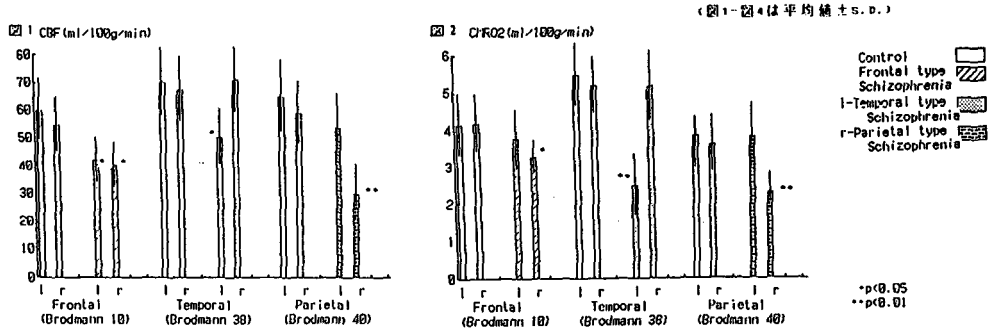
Ⅱ結果

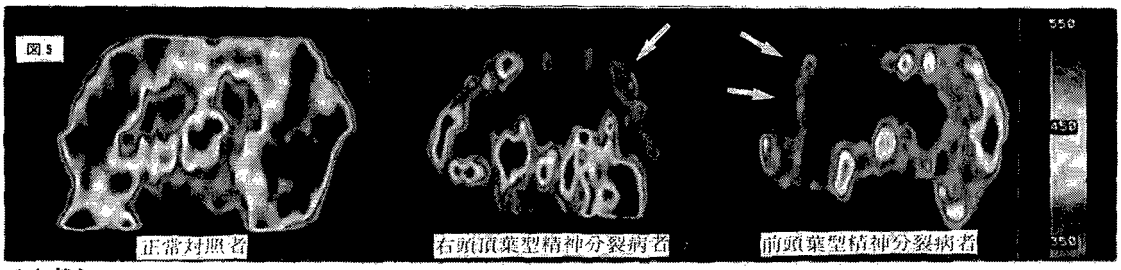
精神分裂病者のPETイメージは、前頭葉を中心に低下が見られるタイプ（前頭葉型，４名）と、右頭頂葉を中心に低下が見られるタイプ（右頭頂葉型，６名）と、左側頭葉を中心に低下が見られるタイプ（左側頭葉型，３名）に分類された。各型別に関心領域の脳糖代謝、脳血流量、脳酸素消費量を計測し、正常対照者と比較した。計測は前頭葉(Brodmann 10領域)、側頭葉(Brodmann 38領域)、頭頂葉(Brodmann 40領域)、後頭葉(Brodmann 18領域)、海馬、尾状核、被殻、視床を含めた各脳領域についておこなった。脳糖代謝、脳血流量は、正常対照者に比べ、精神分裂病前頭葉型では、両側前頭葉の低下、右頭頂葉型では右頭頂葉と右側頂葉の低下、左側頭葉型では左側頭葉と左頭頂葉の低下が有意に見られた（図１：図１には脳血流量が示してある。脳糖代謝では正常対照者に比べ、前頭葉型で前頭葉に約25%，右頭頂葉型で右頭頂葉に約20%の糖代謝の低下がみられた）。脳酸素消費量は、前頭葉型で右前頭葉、右頭頂葉型で右頭頂葉と右側頭葉、左側頭葉型で左側頭葉に有意な低下が見られた（図２）。海馬、尾状核、被殻、視床の各領域では脳血流量、脳酸素消費量は正常対照者との間に差を認めなかった（図３，４）。一部の精神分裂病

者について矢状断、前額断の画像を構成したが（図５：図５には矢状断のみ示してある）、被害関係妄想と頭頂葉障害、情意鈍麻、連合弛緩や自我障害と前頭葉障害との関連が示唆された。

III考察

精神分裂病者でBrodmann 10,38,40領域の脳糖代謝、脳血流量、脳酸素消費量の低下を見たことは、これらの領域が連合野と言われる脳領域で、その多くは人類で初めて出現してくる脳回であることから興味がもたれる。また症例によりさまざまではあるが、未治療の精神分裂病者で脳糖代謝、脳血流量、脳酸素消費量が減少している事が特徴である。最近のX線CTを用いた研究では、精神分裂病者の脳室の拡大は、例えば痴呆患者の様に年毎に拡大せず、十年近くの経過を見ても一定している（拡大しない）[1]とされており、今回の結果と合わせ考えると、シナプス、ニューロンのネットワークを含めた脳活動の機能的な面が精神分裂病では障害されているのかも知れない。そうした意味で、最近刑部ら[2]がSPECTを用いて、幻聴のある患者は左言語野が過活動になっていると報告している事は興味がもたれる。いずれにしても精神分裂病者では症例によって症状が異なる点があり、脳の障害部位、その障害の神経化学的性質との関連が今後重要な研究課題となって行くであろう。




〔文献〕

(1)Illowsky,B.P.(1988) J Neurology,Neurosurgery,and Psychiatry 51:209

(2)刑部 侃.(1988) 精神経誌 90:334

# 214 ポジトロンCTによる躁うつ病者の脳代謝の研究（第2報）

東海林 正，岸本英爾，髙津 修，藤田春洋，石川尚志，松下正明，飯尾正明*
（横浜市立大学医学部精神医学教室，国立療養所中野病院*）

〔要約〕
躁うつ病は代表的な内因性，機能性精神病の1つであり，近年の国際的研究はその原因解明に新しい展開をみせつつある．私共はポジトロンCTを用い，脳を画像化し，疾病を明瞭にして患者及び家族に，身体の病気との認識を与え，自殺の防止や早期治療に役立てている．今回横浜市立大学医学部病院精神神経科に入院，外来通院中のDSM－Ⅲにて診断されたうつ病者，躁病者，回復者及び正常対象者各々15例，3例，3例，7例に新しく生成された$^{11}$C－グルコース，C$^{15}O_2$,$^{15}O_2$を投与し，脳糖代謝，脳血流量，脳酸素消費量をポジトロンCTで計測したのでここに報告する．この結果，うつ病者では約30％の糖代謝の低下（P＜0.025）を躁病者では約25％の糖代謝の亢進（P＜0.05）を大脳皮質に認めた．一方，脳血流量，脳酸素消費量には正常対照者との間に差を認めなかった．これよりうつ病者では，大脳皮質体の糖代謝がほぼ均一に障害されていることが解かり，他の精神疾患に比し特徴的所見を示すことが解明された．この代謝障害はアミノ酸プールを含んだ部分の障害であることが示唆される．

（はじめに）

躁うつ病は感情病(affective disorder)とも呼ばれ，感情と欲動の障害を主徴とする原因が未だ解明しきれていない疾患で，精神分裂病と並んで，代表的な内因性，機能性精神病とされている．しかし，近年の知見の積み重ねは病態解明に新しい展開をみせつつある．我々は以前に「ポジトロンCTによる躁うつ病者の脳代謝の研究」と題して，$^{11}$C－グルコースを用い，大脳全体の糖代謝を画像化することで，うつ病者では約30％の糖代謝の低下（P＜0.025）を，躁病者では約25％の糖代謝の亢進（P＜0.05）を大脳皮質に認めたと本学会で発表した（第30回学会）．今回，先の結果に加えて，C$^{15}O_2$,$^{15}O_2$をトレーサーとして用い，うつ病者の脳各部位脳血流量（CBF），脳酸素消費量（CMR$O_2$），脳酸素摂取率（OER）を測定し，その新しい知見をもとに再び病態を考察したのでここに報告する．

（対象及び方法）

横浜市立大学医学部精神神経科に外来通院中で，DSM－Ⅲにより，躁及びうつ病と診断された患者21名，正常対照者7名を対象とした．患者の年齢，性，Hamilton score 等は表1に示した通りである．患者はいずれも身体的には健康でX線CT上脳萎縮はなく，脳波も正常である．正常対照者はいずれも心身ともに健康な者である．いずれも前回同様患者及びその家族に充分説明を行い同意書を得てポジトロンCTを実施している．

$^{11}$C－グルコースについては新しく生成したものを約20mCi を経口投与し，40分後よりPET計測した．またCBF，CMR$O_2$，OERについては，新しく合成C$^{15}O_2$,$^{15}O_2$を経鼻的に持続吸入させ$^{15}$Oによる血中のカウント値がプラトーに達した時より約7分間PET計測をした．

今回の計測も前回同様OMラインに平行な頭部横断面について行った．

（結果）

$^{11}$C－グルコースの脳皮質カウント数においては前回と同じように，うつ病者では，大脳皮質全体に約30％の低下（P＜0.025）を，躁病者では約25％の上昇（P＜0.05）がみられた（表2）．また脳血流量（CBF），脳酸素消費量（CMR$O_2$），脳酸素摂取率（OER）においてはいずれも，前頭葉，頭頂葉，側頭葉，後頭葉の各大脳皮質，及び海馬，尾状核，被殻，視床の各皮質下諸核の各皮質下諸核において正常対照者との間に差を認めなかった（表3）．

（考察）

今回我々は躁及びうつ病者の$^{11}$C－グルコース代謝，脳血流量，脳酸素消費量，脳酸素摂取率を計測した．$^{11}$C－グルコース代謝は脳内で次々にアミノ酸に変換され，ＰＥＴ画像の示す時間は糖源性アミノ酸プールにあると思われる（図１）．うつ病者では前回同様，大脳皮質全体の糖代謝がほぼ均一に障害され，躁病者では亢進していることが考えられ，これらは年齢・性に影響されないと考えられ，これらは年齢，性に影響されないと考えられた．

一方，新たにうつ病者において脳血流量，脳酸素消費量，脳酸素摂取率が正常という事がわかり，うつ病者では血流や内呼吸機能には異常がないことがわかった。即ち，糖代謝において糖をとりこんだり糖源性アミノ酸をつくりだしプールする機構の障害が示唆された．

（文献）


1）Gustafson,L,et al.(1981) Third World Congress of Biological Psychiatry, Stockholm.

2）Kishimoto,H et al.(1987) Psychiatry Research. 22,81.


表１．対象躁うつ病者一覧

| 氏名 No. | 年齢 | 性 | 診断 | 経過年数 | Hamilton score | Beck score |
|---|---|---|---|---|---|---|
| うつ病者 | | | | | | |
| 1* | 53 | 男 | UD | 4 | 24 | 32 |
| 2* | 52 | 男 | UD | 10 | 23 | 18 |
| 3* | 56 | 女 | UD | 3 | 23 | 14 |
| 4* | 42 | 男 | UD | 7 | 32 | 24 |
| 5* | 41 | 女 | UD | 6 | 21 | 17 |
| 6* | 56 | 男 | UD | 8 | 31 | 24 |
| 7* | 29 | 男 | UD | 5 | 34 | 28 |
| 8* | 47 | 男 | UD | 9 | 36 | 22 |
| 9* | 50 | 男 | UD | 28 | 32 | 36 |
| 10* + | 44 | 男 | UD | 1 | 25 | 24 |
| 11* + | 33 | 女 | UD | 3 | 28 | 29 |
| 12* + | 31 | 男 | UD | 1 | 27 | 26 |
| 13* + | 50 | 女 | UD | 1 | 32 | 30 |
| 14 + | 27 | 男 | UD | 1 | 34 | 31 |
| 15 + | 38 | 女 | UD | 1 | 28 | 25 |
| 躁病者 | | | | | | |
| 16* | 42 | 女 | BM | 8 | | |
| 17* | 43 | 男 | BM | 10 | | |
| 18* | 54 | 女 | BM | 34 | | |
| 回復者 | | | | | | |
| 19* | 57 | 男 | UD | 7 | 8 | 10 |
| 20* | 63 | 女 | UD | 14 | 7 | 11 |
| 21* | 43 | 女 | UD | 13 | 6 | 8 |
| 正常対照者 | | | | | | |
| 22* + | 42 | 男 | | | | |
| 23* + | 42 | 男 | | | | |
| 24* + | 46 | 男 | | | | |
| 25* + | 47 | 男 | | | | |
| 26* + | 56 | 男 | | | | |
| 27* + | 37 | 女 | | | | |
| 28* + | 45 | 女 | | | | |

UD;unipolar depressed　BM;bipolar manic
* ; $^{11}$C-glucose,　+; C$^{15}O_2$, $^{15}O_2$

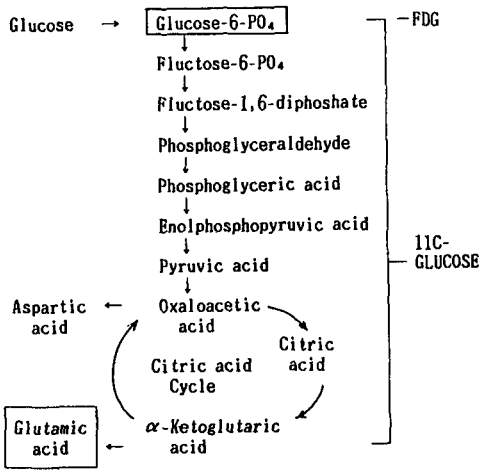



図 1．解糖代謝$^{18}$F-deoxyglucose(FDG) 法とは異なり，$^{11}$C-glucose 法は主に脳glutamic acid を標識する．

表 2．　$^{11}$C-glucose による脳各部位カウント数(counts/μCi)

| 脳部位 | 正常者 | うつ病者 | | 躁うつ病者 躁病者 | | 回復者 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 前頭葉 | 4580±560 | 3160±380 | ** | 5730±270 | * | 4560±450 |
| 頭頂葉 | 4390±380 | 3040±340 | ** | 5380±530 | * | 4320±410 |
| 側頭葉 | 4490±490 | 3090±430 | ** | 5620±640 | * | 4440±370 |
| 後頭葉 | 4320±390 | 2990±320 | ** | 5330±470 | * | 4240±330 |

前頭葉はBrodmann 10 領域，頭頂葉はBrodmann 40 領域，側頭葉はBrodmann 38 領域，後頭葉はBrodmann 18 領域を計測した．それぞれの値は両側25ピクセルの平均値±S.D.
** P<0.025　* P<0.5　(正常対照者との差，student t test)

表 3．正常者，うつ病者の脳各部位脳血流量(CBF)，脳酸素消費量 ($CMRO_2$)，脳酸素摂取率(OER)

| 脳部位 | 正常者 CBF (ml/100g/min) | 正常者 $CMRO_2$ (ml/100g/min) | 正常者 OER | うつ病者 CBF | うつ病者 $CMRO_2$ | うつ病者 OER |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 前頭葉 | 59±10 | 4.1±0.8 | 0.49±0.10 | 54±14 | 4.0±0.9 | 0.48 ±0.12 |
| 頭頂葉 | 63± 9 | 3.7±0.7 | 0.46±0.09 | 60±15 | 3.4±1.0 | 0.46 ±0.10 |
| 側頭葉 | 67±10 | 4.3±0.8 | 0.48±0.10 | 64±16 | 4.1±1.1 | 0.47 ±0.12 |
| 後頭葉 | 53±10 | 3.4±0.8 | 0.50±0.10 | 52±14 | 3.4±1.2 | 0.49 ±0.11 |
| 海　馬 | 42± 7 | 3.5±0.5 | 0.42±0.11 | 42±11 | 3.4±1.1 | 0.41 ±0.12 |
| 尾状核 | 43± 5 | 3.5±0.7 | 0.44±0.09 | 41±10 | 3.3±1.3 | 0.43 ±0.11 |
| 被　殻 | 40± 4 | 3.3±0.7 | 0.46±0.10 | 39±14 | 3.2±1.0 | 0.45 ±0.12 |
| 視　床 | 51± 9 | 3.5±0.7 | 0.47±0.08 | 50±13 | 3.3±1.2 | 0.46 ±0.13 |

前頭葉はBrodmann 10 領域，頭頂葉はBrodmann 40 領域，側頭葉はBrodmann 38 領域，後頭葉はBrodmann 18 領域を計測した．それぞれの値は両側25ピクセルの平均値±S.D.
P>0.05 (student t test)

# 215 一過性脳虚血後の海馬におけるムスカリン性アセチルコリンレセプターの超遅発性変化

羽場久美子，小川紀雄，森　昭胤
（岡大・医・脳研・機能生化）

〔要約〕

砂ネズミを用いて5分間の脳虚血後再開通し、海馬におけるアセチルコリン(ACh)レベル、ムスカリン性アセチルコリンレセプター(mACh-R)、および興奮性アミノ酸レセプターの１つであるN-methyl-D-aspartateレセプター(NMDA-R)の経時的変化を調べた。AChレベルは再開通7日後まで定常状態に比べ減少し、21日後には正常値に回復した。一方、mACh-R濃度は7日後から低下し21日後にはさらに減少、定常状態の約1/10になった。また、NMDA-R濃度は2日後では変化が見られなかったものの、21日後には有意に減少した。従来虚血による神経細胞壊死は遅くとも7日間で完成すると言われ、AChレベルの変化は時間的によく平行しているが、むしろmACh-RやNMDA-Rの変化はこれ以後みとめられ、脳虚血の後遺症として現れる様々な症候と深く関わっていると推察される。

[はじめに]

一過性脳虚血の後に多くの神経細胞が死滅し、これが脳虚血によってひきおこされる脳障害に関係しているが、1982年にKirinoら(3)が遅発性神経細胞壊死(delayed neuronal death)の現象を発表した。この現象は一過性脳虚血の後、血流、細胞エネルギー状態などいずれもが正常にもどった後に起こるとされ、海馬において特異的に、しかも極めて緩慢な病変として観察され(3)(7)、　古くから報告されているような脳虚血に対する海馬の選択的脆弱性が再確認された。遅発性神経細胞壊死は4日-1週間までには完成し、壊死に伴っておこる生化学的変化についての報告もこの期間に関するものが多い。

今回我々は、脳虚血による後遺症の背景を明らかにする目的で、これ以降の慢性期の神経細胞の生化学的変化を調べた。すなわち、アセチルコリン(ACh)レベル、ムスカリン性アセチルコリンレセプター(mACh-R)結合、興奮性アミノ酸レセプターの１つであるN-methyl-D-aspartateレセプター(NMDA-R)結合の脳虚血再開通後の急性期、慢性期における変化を検討した。

[方法]

雌雄両性の成熟砂ネズミ(体重60-80g)を用いた。ケタミン麻酔下(100mg/kg, i.p.)頸部正中切開にて両側総頸動脈を露出、絹糸をかけた。翌日、エーテル麻酔下再びこれを露出し、覚醒後動脈瘤クリップで閉塞した。5分後クリップを除去して再開通させた(ischemia群)。再開通後、1日、2日、3日、4日、7日、21日経た動物を屠殺、測定に供した。sham-operate 群は両側総頸動脈閉塞以外はischemia群と全て同じ条件下で実験を行った。AChレベルはマイクロウエーブ屠殺(4.8kw,1.1s)後、摘出した海馬について高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した(1)。 mACh-R結合の測定は、断頭屠殺後摘出した海馬について既に報告した方法(6)に従い、リガンドとしては[$^3$H]-QNB、非特異的結合には1$\mu$M-atoropineを用いた。NMDA-R結合の測定はMurphyらの方法(5)に準じ、リガンドとして[$^3$H]-CPP、非特異的結合には1mM-Gluを用いて行った。蛋白定量はBio-radのprotein assayキットを使用、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]

図１に示すように、一過性脳虚血により海馬AChレベルは比較的急性期(1-4日)にsham-operate群に比べ著明な減少が見られ、徐々に回復し21日後にはほぼ定常状態にもどった。一方、mACh-R結合についてScatchard解析を行った結果、いずれの時期においてもKd値には変化がなかったものの、Bmax値は7日後に低下し、21日後にはさらに著しく減少して定常状態の約1/10まで低下した(図２)。

同様にNMDA-Rについても慢性期において変化が観察された(図3)。すなわち、Kd値は2日後、21日後とも変化がなかったもののBmax値は21日後に定常状態に比べ有意に減少した。

[考察]

海馬の虚血に対する選択的脆弱性は古くから知られている(4)。Kirinoらにより遅発的神経細胞壊死の現象が報告され(3)、虚血性脳細胞壊死をもたらす機序が単に虚血によりひきおこされるATP産生の低下によるエネルギー欠乏によるものではないことが明らかになった。遅発的細胞壊死はむしろ血流、細胞のエネルギー状態、内部環境のいずれもが正常に回復した後見られ、海馬に特異的、しかも極めて緩慢に起こる。

今回我々は砂ネズミの海馬についてACh系神経機構を中心に神経細胞壊死に伴う生化学的変化を経時的に検討した。急性期においてAChレベルが減少するものの、以後回復するのはほぼ不可逆的に生じた遅発的細胞壊死とよく相関があるとはいえず、むしろ低酸素状態によるACh合成低下(2)の結果生じた現象であるといえよう。一方、mACh-R濃度が極めて緩慢に低下し続けたことは遅発的神経細胞壊死が顕微鏡的には完成した後、mACh-Rを含む神経細胞障害が超遅発的に起こったと考えられ、記憶と情動の中枢である海馬のACh神経系でこのような変化がみられたのは虚血後の脳機能障害に深く関わっているのではないかと推察される。

なお、NMDA-Rも虚血21日後で著しく減少しているので途中の経時変化については現在さらに検討中である。

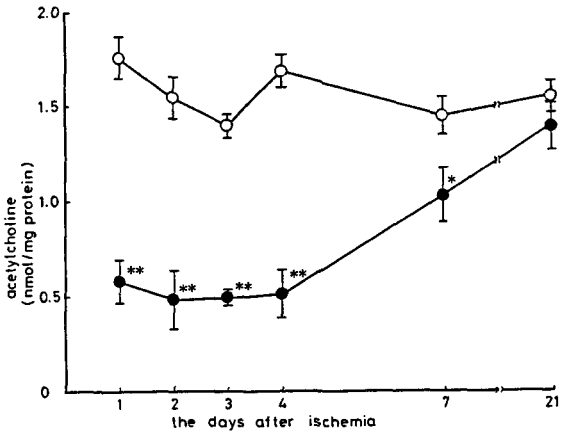



図1. AChレベルの経時的変化
○-○: sham-operate群, ●-●: ischemia群
Values are mean±SEM. (* p<0.05, ** p<0.01)

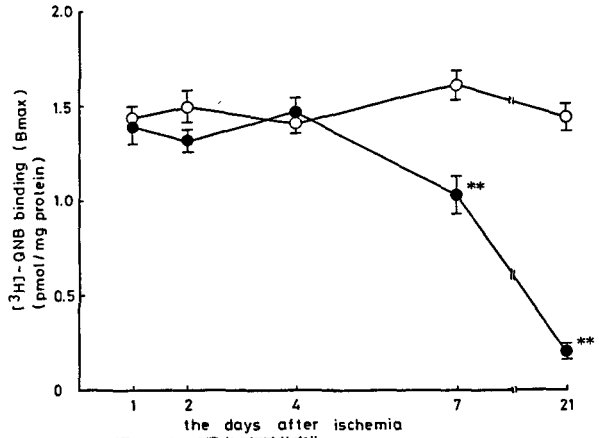



図2. mACh-R濃度の経時的変化
○-○: sham-operate群, ●-●: ischemia群
Values are mean±SEM. (** p<0.01)

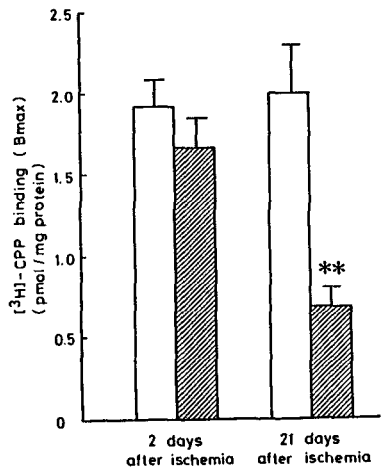



図3. 虚血, 再開通2日後, 21日後におけるNMDA-Rの変化
□: sham-operate群, ▨: ischemia群
Values are mean±SEM. (** p<0.01)

[文献]

(1)Fujimori, K. et al. (1987) J. Chromatography 414, 167-173.
(2)Kim, SV. (1975) Lab Invest. 33,658-669.
(3)Kirino, T. (1982) Brain Res. 239, 57-69.
(4)Ksiezak, H.J.(1981) J. Neurochem. 40,305-314.
(5)Murphy, D.E. et al.(1987) J. Pharmacol. Esp. Ther. 240, 778-784.
(6)Ogawa, N. et al.(1983) Brain Res. 263, 348-350.
(7)Pulsinelli W.A. et al. (1979) Stroke, 10,267-272.

## 216　キンドリングラットの中脳辺縁領域におけるドーパミンD1/D2受容体の変化

秋山一文、大源明宏、尾上太一、伊藤高、大月三郎
岡山大学医学部神経精神医学教室

〔要約〕

キンドリングラットの中脳辺縁領域（側坐核、嗅結節）でドーパミンD1/D2受容体をそれぞれ[$^3$H]SCH23390, [$^3$H]spiperoneの特異的結合を測定して検討した。扁桃核キンドリングの最終発作から24時間後で刺激（左）側及び反対（右）側の[$^3$H]spiperone結合のBmaxは対照値の約1.5倍まで有意に増加していた。海馬キンドリングの最終発作から24時間後で中脳辺縁領域を刺激（左）側と反対（右）側に分けて[$^3$H]SCH23390結合を検討したところ、Bmaxは刺激側で軽度ながら有意に減少したが、反対側では不変であった。また、両結合の$K_D$は両側とも対照群との間で有意差はなかった。これらのことより、キンドリング完成後には、刺激側の中脳辺縁領域のD1/D2受容体が逆の方向の変化をすることが示された。

キンドリングとは脳の一定部位に後発射を生じさせるような電気刺激を反復して加えると脳波上、行動上のてんかん様反応が進行性に増強し、やがては全身痙攣に至る現象をいい、いったん獲得された痙攣準備状態はほぼ永続性であることが特徴である。キンドリングではさまざまな神経化学的検討が加えられている[1]。カテコラミンについては、キンドリング形成初期段階においてノルアドレナリンの抑制効果が指摘され、皮質でのβアドレナリン受容体の減少、青斑核でのα2アドレナリン受容体の増加が報告されている。これに対し、ドーパミン(DA)の関与については、見解の相違があり、キンドリングラット脳でもDA含量は変化しないとする報告が殆どであった。しかし、最近、Csernanskiら[2,3]は扁桃核、海馬キンドリングで刺激側の側坐核でD2受容体が有意に増加していることを報告しており、DAもキンドリングになんらかの関与をしていることが示唆される。今回は，D2受容体と併せてキンドリングではまだ報告がみられないD1受容体を検討した。

[対象と方法]

1）キンドリングラットの作成：7週齢S.D.系雄性ラットを用いて、左側扁桃核、または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、100-200μA, 60Hzの正弦波を1秒間、1日1回で行った。各々の群の対照群には深部電極の挿入のみを行った。キンドリングが完成してから最終キンドリング痙攣の24時間後に断頭し、側坐核と嗅結節を含む中脳辺縁領域を刺激(左)側と反対(右)側に分けて切り出し、-70℃にて保存した。

2）[$^3$H]SCH23390、[$^3$H]spiperone結合実験：脳組織は50 mM Tris-HCl（120 mM Nacl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$を含む、pH 7.4 at 25℃）中でホモゲナイズし、40000 g, 15分間の遠沈を3回繰り返して、得られた膜標品を結合実験に用いた。[$^3$H]SCH23390結合の場合には、膜標品 (0.03-0.04 mg protein/assay tube)と[$^3$H] SCH23390 (86 - 3417 pM)とを1mlの容量で25℃、60分間反応させることによって行い、非特異的結合は20 μMのSCH23390の存在下での結合とした。[$^3$H]spiperone結合の場合には、膜標品（0.04 - 0.05 mg protein/ assay tube）と[$^3$H] spiperone (47 - 1094 pM)とを2mlの容量で25℃、80分間反応させることによって行い、非特異的結合は20 μMのl-sulprideの存在下での結合とした。B/F分離は0.1%のpolyethylenimineで処理したWhatman GF/B filterで反応液を吸引沪過することによって行った。Bmax, $K_D$の値はScatchard解析によって求め、蛋白量はLowry法によって測定した。2群間の有意差検定には、Student·s t testを用いた。

[結果]

1）[$^3$H]SCH23390結合：中脳辺縁領域を刺激側と反対側に分けて検討した海馬キンドリングの場合、Bmaxは刺激側で軽度ながら有意に減少したが、反対側では不変であった(Fig 1A)。$K_D$は両側とも変化はなかった(Fig. 1B)。

2）[$^3$H]spiperone結合：扁桃核キンドリングラットの中脳辺縁領域を刺激側及び反対側に分けて検討したところ Bmaxは両側ともそれぞれの対照値の約1.5倍まで有意に増加していた(Fig. 2)。$K_D$は両側とも不変であった。

[考察]

最近、Csernanskiら[2,3]は扁桃核キンドリングの最終発作から４日目で[³H]spiperoneで標識されたD₂受容体のBmaxが刺激側の側坐核で有意に増加していること、さらに海馬キンドリングでも２週間後に刺激側の側坐核で有意に増加していることを報告している。今回の中脳辺縁領域（側坐核と嗅結節とを含む）での[³H]spiperone結合の結果は彼らの成績とほぼ同程度の増加（約1.5倍）を確認し、さらに反対側でも有意な増加を認めた。従来、DAのキンドリングへの関与については見解の相違がある。DA受容体作動薬、同拮抗薬の処置により、キンドリングの発展がそれぞれ抑制、促進されるという薬物負荷実験上の成績[4]はあるものの、DA系に明瞭な神経化学的を認めたとする報告は殆どない。D2受容体の増加が何によってもたらされたものかは明かではないが、扁桃核、海馬からは側坐核への直接の投射路があり、シナプス前のDA機能の何らかの変化による可能性がある。ただし、この増加は最終キンドリング痙攣から４週間後には認められず（データは提示せず）、一過性の変化と考えられる。一方、D1受容体については今まで報告がなく、今回、中脳辺縁領域を左右に分けて、刺激側でBmaxの有意な減少を認めた。D1/D2受容体が逆の方向の変化を示す理由については明らかではない。最近、少なくとも黒質線条体DA系ではD1/D2受容体が複雑な相互作用をもっていることが知られている。しかし、中脳辺縁領域に於いては必ずしもこのことは明らかではなく、今後の検討に待たなければならない。

[文献]

1)秋山一文、佐藤光源. 蛋白核酸酵素、印刷中 2)Csernanski, J.G., Mellentin, J., Beauclair, L. and Lombrozo, L. (1988) Biol. Psychiatry 23:285-294. 3)Csernanski, J.G., Kerr, S., Pruthi, R. and Prosser, E.S. (1988) Brain Res. 449:357-360. 4)Sato, M., Tomoda, T., Hikasa, N. and Otsuki, S. (1987) Epilepsia 21:497-507.

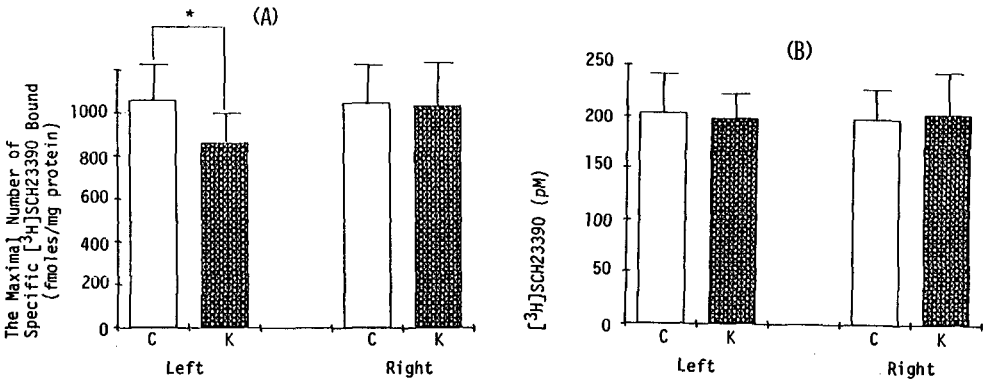



Fig. 1 The maximal number of binding sites (A) and the dissociation constant (B) obtained from the saturation isotherms of specific [³H]SCH23390 binding in the mesolimbic area. The hippocampal kindled (K) and control (C) rats were decapitated 24 hours after the last kindled seizure. The data represent the mean ± S.D. of 6 determinations. *: P<0.05 between the two groups (Student's t test).

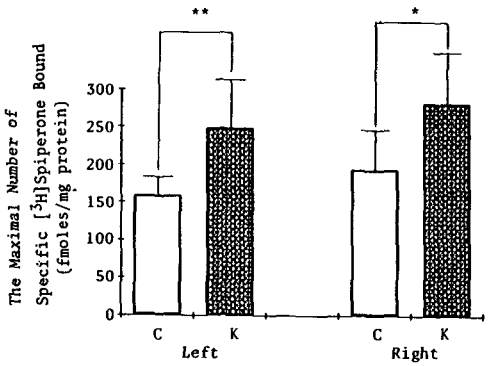



Fig. 2 The maximal number of binding sites obtained from the saturation isotherms of specific [³H] spiperone binding in the mesolimbic area. The amygdala kindled (K) and control (C) rats were decapitated 24 hours after the last kindled seizure. The data represent the mean ± S.D. of 6 determinations. *: P<0.03, **: P<0.01 between the two groups (Student's t test).

## 217　視床下部ノルアドレナリン放出に対するセルレチドの効果

浜村貴史*，奥村一哉，秋元　潔**，柏原健一，佐藤光源***，大月三郎
（岡山大・神経精神，香川県立中央病院・神経内科*，
岡山県立病院**，東北大・精神***）

〔要約〕

ceruletide（CLN）には、遅発性ジスキネジアを始めとする不随意運動に対する治療効果が知られている。遅発性ジスキネジアには、ドパミン（DA）のみならずノルアドレナリン（NA）の関与が知られている。今回我々は、CLNの脳内NA系に対する影響を　脳内透析法を用い、検討した。視床下部外側にプローベを植え込みRinger液を1μl/min.の速度で灌流し、30分間隔で回収し、HPLC-ECD法でNAを測定した。NAは、CLN末梢投与（400μg/kg i.p.）から30分後より有意に減少し、180分後でもその減少が持続していた。最大効果出現は、90-120分で　35％の減少を認めた。一方CLNの直接灌流（5X10$^{-6}$M）によりNA放出は増加傾向を示したが、有意差は認められなかった。従ってCLN末梢投与によるNAの減少は直接NA作動性神経細胞に作用したとは考え難い。これらの事からCLNの視床下部外側部におけるNA放出抑制作用は、中枢への直接作用ではなく　末梢を介した何らかの神経機序によることが示唆された。

CLNを用いた臨床研究が進むにつれ、CLNが不随意運動に対して有効な治療効果を持つことが明らかになってきた。CLNの有効な不随意運動はジスキネアと各種の振戦の二つである。遅発性ジスキネジア患者ではDAをNAに変換させるドパミンβ水酸化酵素が血中で有意に高値を示したと言う報告もある[1]。また振戦はβ遮断薬が有効であることからNA系の関与が想定されてきた。このため今回我々はCLNの脳内NA系に対する影響を検討するため脳内透析法を用い、NA含量の多いラット視床下部で検討を行った。

＜対照及び方法＞

対照には１２時間毎の明暗周期下に飼育したSD系雄性ラット（体重280-320g）を用いた。ラットをpentobarbital（50mg/kg i.p.）で麻酔しPellegrino&Cushmanのアトラス[4]に基づき、透析プローベを視床下部外側（AP:0 L:1.5mm D:9mm）に挿入固定した（fig.1）。

実験は手術18時間後より開始した。in vivo intracerebral dialysis法を用いてRinger液を1μl/minで透析プローベを灌流し、30分毎にサンプルチューブに回収した。

NAの測定は、HPLC-ECD法を用いて行なった。移動相として、5mg/L Na2EDTA、1250mg/L Na-octane sulfonate　及び20％（V/V）methanolを含むNa-dihydrogenphosphate buffer（pH4.3）を用いた。

実験１；CLN 400μg/kg腹腔内投与し3時間にわたりNA放出の変化を検討した（n=6）。

実験２；Ringer液にCLN 5×10$^{-6}$Mの濃度で溶解し視床下部外側野を直接灌流し、NA放出の変化を検討した（n=5）。

＜結果＞

実験１；CLN末梢投与によりNA放出は30分後より有意に減少し180分後も持続していた。最大効果は90-120分で認めた35％の減少であった（Fig.2）。

実験２；CLNの脳内直接灌流によりNA放出は増加傾向を示したが有意差は認められなかった（Fig.3）。

＜考察＞

CLN末梢投与により視床下部外側野のNA放出が減少し3時間後も持続していた。末梢投与されたCLNは速やかに血中から消失することが知られているので　この減少はCLNが直接NA作動性神経細胞やその終末に作用した結果とは考え難い。又灌流液中に溶解したCLNのうち少なくとも10％は細胞外液に漏出すると考えられることから[3]、$5\times10^{-6}$M程度のCLNが神経終末に達したと推定できる。この濃度はCLNが直接作用するには十分な濃度であるが、NA放出は有意な変化を示さなかった。以上よりCLNの視床下部外側野におけるNA放出抑制作用は、中枢への直接作用ではなく、末梢を介した何らかの神経機序によることが示唆された。

我々は既に末梢されたCLNが線条体でのDA放出を抑制すること　及びこの放出抑制効果が求心性迷走神経を介していることを明かとしている[2]。今回の研究からCLNが視床下部外側NA放出についても何らかの末梢機序を介して抑制効果を発現している可能性が示された。

＜文献＞

(1)Kaufmann,C.,Jeste,D.and Shelton,R.et al.,
(1986)Biol.Psychiatry,21,799-812.
(2)Hamamura,T.,Kazahaya,Y.and Otsuki,S.,
(1989)Brain Res.,483,78-83.
(3)中村光夫，板野俊文，畠瀬修ら，
(1988)神経化学，27,274-275.
(4)Pellegrino,L.,J.,Pellegrino,A.,S.
and Cushman,A.,J,(1979)Plenum Press

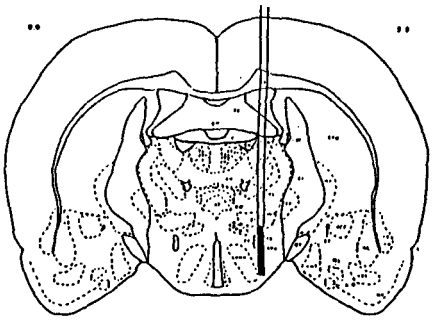


Fig 1　Scheme of dialysis probe located in rat hypothalamus

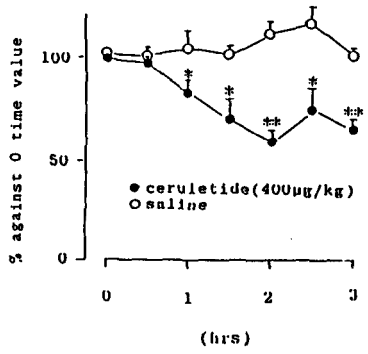



Fig 2　Effect of peripherally administered ceruletide on NA release in hypothalamus
＊p<0.05 ＊＊p<0.01

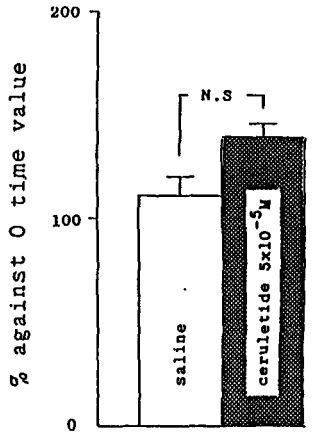



Fig 3　Effect of directly perfused ceruletide on NA release

## 218　成人型（type 3）GM1ガングリオシドーシス患者尿中オリゴ糖の構造解析

辻　省次[1]，有賀敏夫[2]，安藤　進[3]，近一夫[3]，矢作友保[4]，太田恵子[4]，宮武　正[1]
（1.新潟大学・脳研・神経内科，2.東京都臨床研・代謝，3.東京都老人研生化学，
4.自治医大神経内科）

〔要約〕

成人型(type 3)GM1ガングリオシドーシス患者尿中より，活性炭カラム，イオン交換カラム，Biogel P-4 カラムクロマトグラフィー，ペーパークロマトグラフィーなどにより２つの中性オリゴ糖を単離精製し，その構造を，糖組成分析，fast-atom-bombardment (FAB) mass spectrometry, direct inlet-chemical ionization mass spectrometry, メチル化分析，クロム酸酸化，プロトンNMRなどの方法により次のように決定した．

1.　Galβ1→4GlcNAcβ1→2Manα1→3
　　　　　　　　　　　　　　6Manβ1→4GlcNAc
　　Galβ1→4GlcNAcβ1→2Manα1↗

2.　Galβ1→3
　　Fucα1↗4GlcNAcβ1→3Galβ1→4
　　　　　　　　　　　　Fucα1↗3Glc

GM1ガングリオシドーシスの臨床型として，小児期に発症するtype 1 (infantile), type 2 (juvenile) の２つの臨床型はよく知られていたが，近年成人発症例で，ジストニア，パーキンソニズムなどを呈するtype 3 （成人型）GM1ガングリオシドーシスが見いだされてきているが，臨床型の違いが分子レベルでどのようなメカニズムによって生じるのかという点についての生化学的な解明は十分なされていないのが現状である．そこで，我々が経験した type 3 GM1 ガングリオシドーシス患者尿中に排泄される中性オリゴ糖を単離精製しその構造を解析しさらにtype 2 患者尿中の中性オリゴ糖と比較検討することにより，それぞれの臨床型における代謝異常の違いについての検討を試みた．

### 方法

<u>症例</u>：５１才男性で，血液型は，A型，分泌型，$Le^{(a+b-)}$,$M^+$,$N^+$,P2．軽度の痴呆，パーキンソニズム，構音障害を呈した．白血球および培養皮膚線維芽細胞のβ－ガラクトシダーゼ活性は，正常の５%に低下しており，培養皮膚線維芽細胞中のシアリダーゼ活性は正常範囲であった(5)．

<u>尿中中性オリゴ糖の精製</u>：活性炭カラム，Dowex 50X2，Dowex 1X2 のカラムクロマトグラフィー，Biogel P-4 カラムクロマトグラフィー，ペーパークロマトグラフィーなどにより中性オリゴ糖の単離精製を行った．

<u>オリゴ糖の構造解析</u>：ガスクロマトグラフィーによる組成分析，positive ion fast atom bombardment (FAB) mass spectometry による分子量の決定，direct inlet chemical ionization mass spectrometry による糖鎖の配列の解析，クロム酸酸化、プロトンNMRによるanomeric structure の解析などを行いオリゴ糖の構造を決定した．

## 結果

type 3 患者尿において，通常ではみられない異常なオリゴ糖のバンドがいくつか認められ，このうち２つのオリゴ糖について詳細な解析を行った．3.5 l のtype 3 患者尿から，5.3 mg のオリゴ糖２と，4.6 mg のオリゴ糖１を単離精製した．なお，比較のために，3.5 l のtype 2 患者尿から25.2 mgのオリゴ糖１単離した．

オリゴ糖２：糖組成の分析から，オリゴ糖２は，グルコース：ガラクトース：フコース：Ｎ－アセチルグルコサミンが1:2:2:1のモル比で存在することが示され，FAB-mass spectroscopyからm/z 1000が検出され，フコシダーゼ処理後のオリゴ糖２ではm/z 854が検出された．direct inlet chemical ionization mass spectroscopy による解析より，Hex-(Fuc)-HexNAc-(Fuc)-Hexの構造が示唆された．メチル化分析，クロム酸酸化，プロトンーNMRによる解析から，その構造は上記のようにlacto-N-difucohexaoseと決定された．

オリゴ糖１：同様の方法によりその構造は上記のように決定された．

さらに，薄層クロマトグラフィーによる解析では，type 3患者尿では，８糖であるオリゴ糖１よりも高分子の中性オリゴ糖の排泄は，type 2 患者尿に比べて著しく少ないことが示された．

## 考察

type 1 および type 2 GM1 ガングリオシドーシス患者尿にみられる詳細な中性オリゴ糖の解析がなされてきているが(4.6)，lacto-N-difucohexaose の尿中排泄は今までに報告がない．このlacto-N-difucohexaose は，ヒト乳汁中で初めて見いだされたものであり(3)，尿中への排泄は，妊娠中あるいは授乳中のＯ型非分泌型の女性で報告されているのみである(1)．興味あることに，最近type 1 GM1 ガングリオシドーシス患者剖検肝臓においてIIIα-fucosylneolactopentasylceramide の蓄積が報告されており(2)，これには，Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNacが存在することから，非還元末端にGalβ1→4(Fucα1→3)GlcNac や Galβ1→3(Fucα1→4)GlcNac の構造を持つ物質がGM1 ガングリオシドーシスにおい共通にみられる現象である可能性が示唆される．しかしながら，Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNac や Galβ1→3(Fucα1→4)GlcNac の構造は，一般にフコース残基による立体障害のためにβ-ガラクトシダーゼが作用しにくいと考えられており，lacto-N-difucohexaose の尿中排泄がβ-ガラクトシダーゼ欠損による直接の代謝障害によるものかどうか断定することは困難である．Hara and Taketomi が述べているように，GM1ガングリオシドーシスにおいて，ケラト硫酸様のglycosaminoglycanの蓄積により２次的にフコシダーゼ活性が阻害されることによる可能性も考えられる．

オリゴ糖１は，GM1 ガングリオシドーシスにおいて最も多く尿中に排泄される中性オリゴ糖である．今回調べたtype 3患者の尿中へのオリゴ糖１の排泄量は，type 2 患者のそれの 11 % であり，さらにこのオリゴ糖１よりもさらに高分子の中性オリゴ糖の尿中排泄量は，type 3 患者ではtype 2 患者に比較して著しく少なく，type 3 GM1 ガングリオシドーシスにおける変異β-ガラクトシダーゼの基質特異性がtype 2 の変異β-ガラクトシダーゼのそれと異なることを示している．

## 文献

1. Hallgren, P. and Lundblad, A. J. Biol. Chem. 252:1014-1022,1977

2. Hara, A. and Taketomi, T. J. Biochem. 96:1051-1059,1984

3. Kuhn, R. Bull. Soc. Chim. Biol. 40:297-314,1958

4. Ohkura, T., Yamashita, K. and Kobata, A. J. Biol. Chem. 256:8485-8490,1981

5. Ohta, K, Tsuji, S., Mizuno, Y., et al. Neurology 35:1490-1494,1985

6. Yamashita, K., Ohkura, T., Okada, S., et al. J. Biol. Chem. 256:4789-4798,1981

## 219　中大脳動脈閉塞ラットにおける脳蛋白質の経時的変化

犬塚　貴、　田村　晃＊、　佐藤　修三、　桐野　高明＊、　柳沢　勝彦、
豊島　至＊＊、宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科、＊帝京大・医・脳神経外科、＊＊秋田大・医・第一内科）

〔要約〕

脳梗塞のモデルとしてラットの左中大脳動脈(MCA)を閉塞し（田村のモデル）、閉塞半球と反対側半球の各構造蛋白の総蛋白量当りの変化を術後４時間から７日まで経時的に観察した。電気泳動した各半球の蛋白をニトロセルロース膜にブロットし各種抗体（MAP2:microtubule-associated protein 2、MAG:myelin-associated glycoprotein、200kd NF: Neurofilament、CNP:2',3'-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase、tubulin）を用いて免疫染色後デンシトメトリーを行なった。左半球では術後４時間、２４時間では殆ど変化なく、３日目には調べた全ての蛋白で有意な減少が認められた。特にMAP2の減少が顕著であった。MAP2、MAGの分解産物がブロット上に検出された。反対側半球でもMAP2、MAGの減少が３日目に認められた。虚血障害によるプロテアーゼの活性化が反対側半球でもおこっていると推定された。

＜目的＞局所的持続性脳虚血は、臨床的には脳梗塞でよくみられる病態であり、再発等により脳血管障害性痴呆に陥ることもある。ラットのMCA閉塞モデルを作製し[1]、局所的持続性脳虚血による組織障害で左右各半球においてどのような構造蛋白が変化するのか経時的に観察した。

＜方法＞Spraque-Dawley rat (male 340-440g)をハロセン麻酔下で側頭骨底部を穿孔し硬膜を切開して、左MCA本幹を電気凝固した後切断した。対照動物は側頭骨を穿孔し硬膜切開のみ行なった。術後４時間、１日、３日、７日の各時点毎に閉塞動物と対照動物を各々５匹ずつ断頭して左右各半球を摘出し計量後直ちに－７０℃に凍結した。蛋白分解酵素阻害剤を含むTris-bufferでホモジネートにして凍結乾燥した。SDSポリアクリルアミドゲル上を電気泳動した後、ニトロセルロース膜に電気的にブロットした。ゲルの一部は、蛋白染色した。泳動した総蛋白量は、各々の蛋白について適正な免疫染色が得られるように設定した。免疫染色のムラやブロット間の較差を少なくするために閉塞動物と対照動物の同一量の総蛋白を隣接レーンにペアとして泳動し、ABC法にて免疫染色後デンシトメトリーを行なった。各時点群で隣接レーンに泳動した５ペアの閉塞動物／対照動物の百分率を得て、各群間の有意差検定をWilcoxon-U testによって求めた。検索した蛋白は、MAP2、200kd NF、MAG、（以上はcalpainの基質）tubulin、CNPである。

＜結果＞１）半球重量は右側（非手術側）では各時点で対照動物との間に有意差はなかったが、左側（手術側）では術後１日目で対照動物に比して閉塞動物の方が有意に重く（U<0.05）、術後７日目では逆に軽かった。（U<0.05）　２）術後４時間では左、右半球での各蛋白の変化は、閉塞動物と対照動物との間で殆ど差はみられなかった。　３）左半球（手術側）では術後４時間と比較すると３日目で、いずれの蛋白でも単位総蛋白量当り、対照動物に比して閉塞動物で有意に減少した。（全てU<0.01）７日目でもCNPを除き有意に減少した。（MAP2、tubulin、200kd NFで U<0.01、MAGでU<0.05）　調べた蛋白のなかではMAP2の減少が著明であった（Fig 1）。ブロット上でMAP2とMAGの分解産物が検出された（Fig 2）。　４）左半球では術後３日目、７日目に蛋白染色ゲル上にアルブミンのバンドが検出されたが総蛋白の３％以下であった。　５）右半球（非手術側）では術後４時間と比較すると、３日目ではMAP2、MAGが対照動物に比して閉塞動物で有意に減少した（MAP2 U<0.01、MAG U<0.05）（Fig 3）。

＜考按＞これまで一過性脳虚血モデルでMAP2、tubulinなど神経細胞の構造蛋白の減少が生化学的、組織化学的に示されてきたが[2),3)]、我々の局所的持続性脳虚血モデルでも同様であり、とくにMAP2の変化は著明で虚血に対する感受性が高いと思われた。MAGやCNPなどの白質蛋白の有意な減少も観察され、白質の障害を反映したものと考えられた。３日、７日目におけるアルブミンの出現は、脳血液関門の障害を示唆しているが総蛋白の３％以下で

あり、一方プロット上にMAP2とMAGの分解産物が認められ、これらの減少が主に分解によるものであると考えられた。これらはcalpainのよい基質であり、虚血障害によるカルシウムイオンの流入が活性化をもたらした可能性がある[4]。またcalpain以外の蛋白の減少がみられることから、他のプロテアーゼの作用も考えられた。右半球（非手術側）はこれまで光顕上組織学的には異常は報告されていないが、MAP2とMAGが有意に減少しており機序は不明であるがcalpainの活性化がおこったものと思われる。７日目の変化が３日目と同程度又は軽度であるが、その理由の一つは障害組織が既に分解されて失われたためと思われる。また再生の可能性も否定できない。


1) Yamamoto M., Tamura A., Kirino T. et al. (1988) Brain Res. 452. 323-328.

2) Kuwaki T., Satoh H., Ono T. et al. (1989) Stroke. 20. 78-83.

3) Yamashita T., Tada K., Sobue K. et al (1986) Neurochem. Res. 11. 1728-1729

4) Siesjo Bo K. (1985) clin. toxicol. 23. 267-280.


FIG. 1

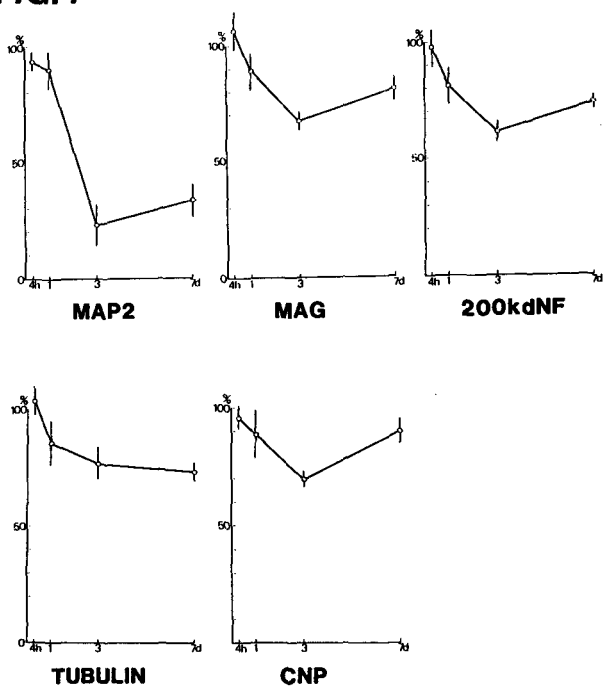



Fig 1. 左半球における各蛋白質の経時的変化
閉塞動物／対照動物×100（%）、±S.E.M.

Fig 2. 左半球のMAP2とMAGの各時点における
代表的免疫プロット
レーンO：閉塞動物、レーンS：対照動物

FIG.2

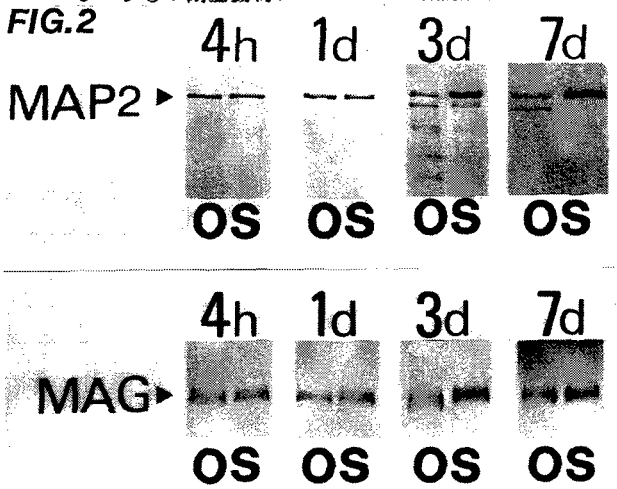
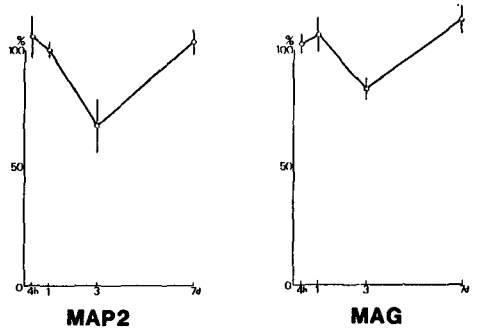



Fig 3. 右半球におけるMAP2とMAGの経時的変化
閉塞動物／対照動物×100（%）、±S.E.M.

FIG.3



# 220 電子スピン共鳴によるフリーラジカルの分布描画

石田信一，横山秀克，松本清治，森則夫，
熊代永，土橋宣昭＊
（福島医大・神精，ＲＩ研＊）

〔要約〕

Ｌ－バンド電子スピン共鳴（ＥＳＲ）によるイメージングシステムを開発し、ラットに投与されたニトロキシドラジカルの頭部における分布状態の画像化に成功した。本イメージングシステムはＬ－バンドＥＳＲスペクトロメータに３次元磁場勾配用コイルを装着し、データ収集およびデータ処理用のコンピュータを接続した。 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-yloxy(CPROXYL)の 0.2M溶液 5mℓをラット腹腔内に注入し、ラット頭部におけるこのフリーラジカルの分布状態の画像化を行った。 画像化にあたっては、Lauterbur の３次元ズーマトグラフィ法により、ラット頭部の冠状断および水平断のスライス像を得た。 その結果、ラットの脳の位置する領域では、CPROXYLのシグナル強度が小さく、脳の周囲の血管系、特に脳の底部でのシグナル強度が大であった。すなわち脳血管内でのCPROXYL濃度は、脳実質内に比べて、相対的に非常に高い状態にあり、このラジカルの分布状態がスライス画像として描出された。

＜緒言＞ さきに、筆者らは、Ｌ－バンド電子スピン共鳴（ＥＳＲ）スペクトロメータによって、ラットに投与されたニトロキシドラジカルの動態を観察し、報告した[1]。その後、この装置を基にＬ－バンドＥＳＲイメージングシステムを開発し、ラットに投与されたニトロキシドラジカルの分布状態を画像化する試みを行っている。

最近、フリーラジカルによる中枢神経障害が注目され、脳血管障害における血管れん縮の問題はもとより、パーキンソン病、アルツハイマー病、ダウン症、てんかん、さらには分裂病などにおけるフリーラジカル障害が、次々に報告されている。[2] 中枢神経系においては、その酸素消費量の多いことや、カテコールアミンなど酸化されやすい神経伝達物質の豊富さ、さらに、HO・生成を媒介する鉄イオンに富むことなどから、フリーラジカルによる障害を最も受けやすい器官のひとつといえる。ＥＳＲ法は、ラジカルを直接検出するための、最も有力な方法である。現時点でのＬ－バンドＥＳＲイメージングシステムは、生体内で発生したラジカルをそのまま検出、画像化するには、まだ感度が十分ではないが、生体内でのラジカル発生の状態や、分布、量、時間的変化などを直接観測できれば、種々の神経疾患の病態解明や新たな治療法の開発のため有力な手段となりうる。本研究はその基礎となるものである。

＜実験装置＞ 測定には、既報のＬ－バンドＥＳＲ装置を用いた[3]。共振器は、軸長10mm、共振周波数780MHzのループギャップ共振器を用いた。イメージング用として３次元磁場勾配用コイルを、電磁石のポールピース面に装着した。データ収集は、ミニコンピュタ（LSI-11）をシステムに接続して行った。データ処理には、日本データジェネラル MV 10000 SX コンピュータシステムを用いた。

＜試料＞ 実験動物は、Ｗｉｓｔａｒ系雄性ラット（体重120g）を用いた。投与するニトロキシドラジカルには、生体内半減期が長く、また生理食塩水に対する溶解度が大きい 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-yloxy(CPROXYL)を用い、その 0.2M溶液 5mℓを腹腔内に投与した。

＜画像化の方法＞　Lauterburのズーマトグラフィ法[4]を用いた。即ち、２次元イメージングを行い、さらに磁場勾配を３次元方向に展開することによって、スライス面の画像(ESR-CT像)を得た。本実験では、CPROXYL投与後、頭部におけるＥＳＲシグナル強度がほぼ一定値に達した時点で計測を開始した。磁場勾配は、1 mT/cmであり、その勾配磁場を 0° から 180° まで 20° きざみで系統的に変化させて計測した。

＜結果と考察＞　図１にラット頭蓋部の矢状断の模式図と頭部での冠状断、及び水平断のＣＴ像を示す。スライス厚は1.5mmである。脳自体からのシグナルは比較的弱く脳の部分は、シグナルレベルに対して設定されたスレッシュホルドでは、ほとんど描出されていない。これに対して、脳周囲の血管系が強く描出されている。高濃度のCPROXYLを投与しているために脳血管内でのCPROXYL濃度が脳実質内に比べて相対的に非常に高い状態にあること、更に水溶性であるCPROXYLは血液脳関門を通りにくい性質であることを示唆するものである。

ＥＳＲ画像法はまだ感度、分解能ともに十分ではないが、パルス法の導入や、新たなスピントラップ剤、スピンラベル剤の開発などによって、さらに高度な画像化を目指している。

本発表を承認された会員外共同研究者、山形大学工学部 尾形健明、小野光弘、北島龍雄助教授、及川和夫助手に謝意を表します。

＜文献＞　(1)　石田信一、他(1986)神経化学　25　214

(2)　Cadet J.L.　(1988)Intern.J.Neuroscience(1988) 40 13

(3)　Ishida S. et al,(1989)Phys.Med.Biol., in press.

(4)　Lauterbur　P.C. et al,(1980) IEEE　Trans.Nucl Scie.,NS-27 1227

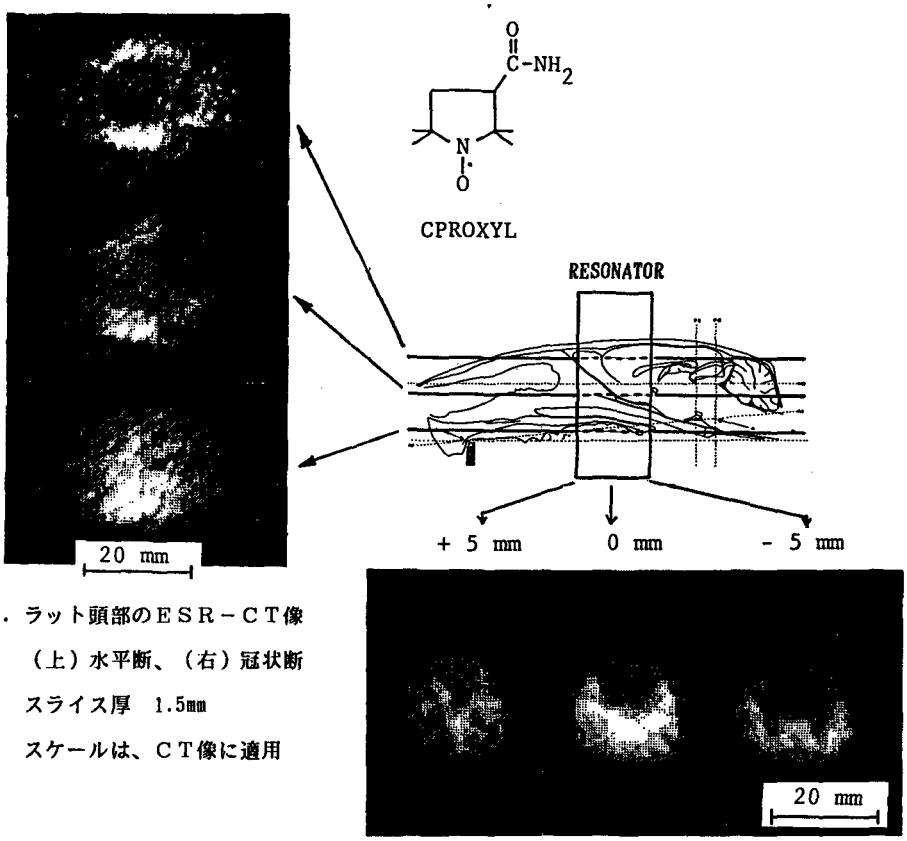



図１．ラット頭部のＥＳＲ－ＣＴ像
（上）水平断、（右）冠状断
スライス厚　1.5mm
スケールは、ＣＴ像に適用

# 221 うつ病者の血小板$\alpha_2$アドレナリン受容体の結合能とそれに及ぼす抗うつ薬の効果

菅野智行、金子元久、増子博文、本田教一、柳沼正俊、大須賀伸佳
渡辺 厚 、柳内 務 、熊代 永 、沼田吉彦＊
（福島医大・神経精神科、福島赤十字病院・精神神経科＊）

〔要約〕

うつ病患者の$\alpha_2$アドレナリン受容体($\alpha_2$受容体)の機能とそれに及ぼす抗うつ薬の効果を調べる目的で、うつ病患者の血小板$\alpha_2$受容体に対する$\alpha_2$アゴニストリガンド$^3$H-UK14304の結合能を測定した。その結果、未治療うつ病群(N=14)は正常対照群(N=12)に比べ、Bmax値が有意な高値を示した。これに対して、Kd値は両群との間に有意差はなかった。うつ病群において、Hamilton depression rating scaleの合計点とBmax値及びKd値の間に相関性は認められなかった。また、年齢との相関性もみられなかった。次に、抗うつ薬による治療後(N=9)には治療前に比べ、Bmax値及びKd値はともに有意に上昇していた。以上より、うつ病患者において$\alpha_2$受容体の機能異常の存在が示唆され、抗うつ薬は、$\alpha_2$受容体の親和性を低下させることによって、うつ病患者の$\alpha_2$受容体の機能を正常化することが示唆された。

血小板膜上の$\alpha_2$アドレナリン受容体($\alpha_2$受容体)は、中枢の$\alpha_2$受容体と薬理学的類似性が示唆されており(1)、うつ病の病態生理を解明する手段の一つとして、血小板$\alpha_2$受容体の結合能の測定が行なわれている。しかし、これまでのところ、その成績は一致していない(2,3)。このような成績の不一致については、測定に用いた放射性リガンドの違いも一因であると指摘されている。最近開発された$\alpha_2$アゴニストリガンドである$^3$H-UK14304は、これまで$\alpha_2$アゴニストリガンドとして用いられてきた$^3$H-Clonidineよりも$\alpha_2$受容体に対して特異的で選択性も高いことが報告されている(5)。そこで、我々は予備的研究として、同一者の血小板において、$\alpha_2$アンタゴニストリガンドである $^3$H-Yohimbineと $^3$H-UK14304の結合能を測定し、さらに、その結合能の成績とアドレナリン惹起性血小板凝集反応との相関性を検討した。その結果、$^3$H-UK14304の高親和性結合部位の数と$\alpha_2$受容体機能を反映する血小板凝集反応との間にのみ相関性が認められ、$\alpha_2$受容体の機能と関連した結合能の測定には、$^3$H-UK14304が有用であることを確認した(4)。そこで今回我々は、この$^3$H-UK14304をリガンドとして用いて、うつ病患者の治療前後における血小板$\alpha_2$受容体の結合能を測定し、正常対照群との比較ならびに抗うつ薬治療による影響について検討したので報告する。

[対象と方法]

対象は、DSM-Ⅲの”大うつ病エピソード(メランコリーを伴うもの)”の診断基準を満たすうつ病患者14名で、性別は男8名、女6名、年齢は17-77才まで、平均45.1才であった。これらのうち9名については、治療前ばかりでなく抗うつ薬による寛解時にも測定した。寛解時にはいずれも抗うつ薬を服用中であり、その内訳はMianserinが6例、 Amoxapine、Imipramine、Dosulepinがそれぞれ1例であった。抗うつ薬の投与期間は2~15週まで、平均7.4週であった。精神症状はHamilton depression rating scale(HDRS)を用いて評価した。なお、被検者には本研究について十分な説明をし、自由意志による同意を得てから本研究を行なった。また、正常対照群は、健康な本学男子学生と当教室の医師12名で、年齢は21~33才まで、平均27才であった。

血小板膜標本の作製は、午前9時から11時の間に採取した血液を、4℃、100Gで20分間遠沈し、PRP(platelet rich plasma)を得た。PRPを4℃、2,000Gで10分間遠沈し、血小板pelletを得て、これを-80℃で冷凍保存した。そのpelletを5mM Tris-HCl bufferで溶解し、glass homogenizerで破砕した後、4℃、30,000Gで10分間遠沈した。さらに、50mM Tris-HCl bufferで、2回遠沈、洗浄を繰り返し、沈渣を血小板膜標本として用いた。

binding assayは、Rommelspacherの方法(5)に準じて行い、buffer(50mM Tris-HCl、10mM $MgCl_2$、0.8mM Ascorbic acid、pH 7.5)に沈渣を再浮遊し、25℃、60分間incubationした後、Whatman GF/C filterで急速吸引濾過した。bufferで洗浄した後液シンにより放射活性を測定した。$^3$H-UK14304濃度については、予備実験からもとめたScatchard plotが、高親和性部位と低親和性部位の２つから成ることが確かめられており、今回の測定では、高親和性部位にあたるリガンド濃度0.5~3.0nMの5点を用いた。また、displacerとして10$\mu$Mのphentolamineを使用した。蛋白定量はLowry法で行い、Scatchard解析でBmax、Kd値を求めた。

[結果]

Table.1に示すように、未治療のうつ病群は正常対照群に比べ、Kd値は有意差が認められなかったが、 これに対して、

Bmax値は有意な高値(p<0.05)を示した。うつ病群において、全般重症度(HDRSの合計点)または症状別重症度(HDRSの関連のある複数の項目の合計点)とBmax値、Kd値の間に相関性は認められなかった。また、両群において、年齢との相関性もみられなかった。次に、Table.2、Fig.1に示すように、抗うつ薬の治療前後の測定値を比較したところ、治療後は治療前に比較して、Bmax値、Kd値はともに有意な上昇(P<0.01)を示した。また、このような変化は、とくにMianserinにおいて明らかであった。

Table.1 $^{3}$H-UK14304 binding to platelet membranes of untreated depressed patients and control subjects

| | Bmax (fmole/mg protein) | Kd (nM) |
|---|---|---|
| untreated depressed patients (N=14) | 69.0±22.0* | 1.44±0.74 |
| control subjects (N=12) | 49.7±17.7 | 1.39±0.42 |

mean±S.D. *: p<0.05

Table.2 $^{3}$H-UK14304 binding to platelet membranes of 9 depressed patients before and after treatment

| | Bmax (fmole/mg protein) | Kd (nM) |
|---|---|---|
| before treatment | 53.9±19.9 | 1.20±0.48 |
| after treatment | 87.1±32.6* | 2.42±1.13* |

mean±S.D.
*: p<0.01 compared to before treatment

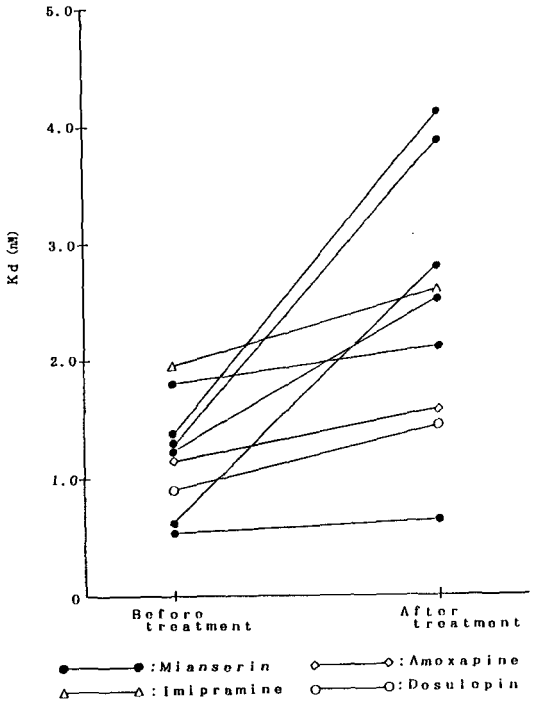



Fig.1 The changes of Kd for $^{3}$H-UK14304 binding to platelet membranes of 9 depressed patients before and after treatment.

[考察]

今回、未治療のうつ病群においてBmax値の高値を認め、血小板$^{3}$H-UK14304結合がうつ病の生物学的指標として有用であることが示唆された。この結合能の成績と$\alpha_2$受容体の機能との関連については、$^{3}$H-UK14304の結合能と血小板凝集反応との相関性をみた我々の予備的研究において、$^{3}$H-UK14304の高親和性結合部位の数の多いものほど機能が低下していた(4)。従って今回の、うつ病群における血小板$\alpha_2$受容体の高親和性部位の増加は、うつ病患者の脳において$\alpha_2$受容体の機能が低下していることを示唆するものと思われる。

抗うつ薬の慢性投与が血小板$\alpha_2$受容体に及ぼす影響について、これまで一致した見解は得られていない(2,3)。今回の結果は、治療後は治療前に比較してBmax値及びKd値はともに有意に上昇しており、とくにこのような影響は、$\alpha_2$受容体阻害作用を有する四環系抗うつ薬Mianserinにおいて明らかであった。このBmax値の上昇は、$^{3}$H-UK14304の高親和性部位の数が増加したのではなく、Kd値の上昇が、Scatchard解析上Bmax値の上昇に反映したものと考えられる。すなわち、抗うつ薬慢性投与は、血小板$\alpha_2$受容体に対して$^{3}$H-UK14304の高親和性部位の親和性を低下させ、低親和性部位への移行をもたらすことが推測された。以上より、抗うつ薬の抗うつ効果発現機序の一つとして、$\alpha_2$受容体の親和性の低下すなわち受容体やGTP結合蛋白質の構造変化を起こすことによって、うつ病患者の$\alpha_2$受容体機能の異常を改善することが考えられた。

(文献)

1)Byland,DB.et al (1983)Int Rev Neurobiol 24;343
2)Campbell IC.et al (1985)Psychiat Res 14;17
3)Garcia-Sevilla JA.et al (1986)Arch Gen Psychiatry 43;51
4)菅野智行ら(1989)薬物・精神・行動 9;61
5)Rommelspacher H.et al (1987)J Neural Transm 69;85

# 222 Tryptamine 誘導体のセロトニン神経に対する行動薬理学的および生化学的評価

只野 武，小山 勝幸，佐藤 信範，木皿 憲佐，荒井 裕一朗*，杵鞭 宏育*

（東北薬大・薬理，昭和大・医・第二薬理*）

〔要約〕 トリプタミンの誘導体で四種のフッ素化合物 5-fluorotryptamine (5-FT), 6-fluorotryptamine (6-FT), 5-fluoro-α-methyltryptamine (5-FMT) および 6-fluoro-α-methyltryptamine (6-FMT) の行動薬理学的評価，脳内セロトニン (5-HT) 代謝および脳内 MAO 阻害作用について検討した．四種の化合物は腹腔内投与 (i.p.) により Head-Twitch Response (HTR) を誘発させる．その出現頻度は構造上α-メチル基を有する 5-FMT および 6-FMT で高かった．これらの HTR は cyproheptadine や fluoxetine 前処理により抑制され，反対に，5,7-dihydroxytryptamine 前処理によって増強された．5-FMT および 6-FMT i.p. 投与 30 分後のマウス脳内 5-HT 量は視床下部，海馬，脳幹，線条体および皮質で上昇し，反対に5-HIAA 量は減少した．脳内 MAO 活性に対しては 5-FMT および 6-FMT が比較的選択的に MAO-A を阻害したが，5-FT および 6-FT による阻害はいずれも弱く，また非選択的であった．以上の結果を 5-HT 神経系の面から考察を加えた．

（緒言）先に我々は，amphetamine の代謝物 p-hydroxyamphetamine (p-OHA) をマウス脳室内に投与すると HTR が誘発され，その発現機序は脳内 5-HT 神経系の機能亢進に基づくことを明らかにした[1]．すなわち，p-OHA は 5-HT 神経内に reuptake 機構を介し取り込まれ，主に神経内 MAO-A を阻害し，5-HT レベルの上昇とそれに続く遊離が生じ，5-HT 受容体が興奮された結果，HTR を引き起こすことを指摘した[2]．さらに 5-HTP あるいは p-OHA 誘発 HTR は MAO-A 阻害薬により著明に増強されるので，HTR 発現に脳内 MAO-A 阻害作用は重要な要因であることが推察される．一方，MAO の基質のα-メチル化合物は主として MAO-A 阻害作用を有することが報告されている[3]．これらの結果から，本研究ではα-メチル基を有する二種と有しない二種，計四種のトリプタミン誘導体を用い，マウスに HTR が発現するか否か，また発現した場合にはその機序を脳内 MAO-A 活性，脳内 5-HT 代謝および各種 5-HT 作働薬併用などの面から検討した．

（実験材料および方法）実験には体重 23～25 g の ddY 系雄性マウスおよび体重約 200 g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用した．HTR の発生は四種の化合物 i.p. 投与 10 分後より 150 分後まで 10 分おきに 5 分ずつ測定した．MAO 活性は ラット forebrain の 10 % ホモジネートを用い，Radiometric assay 法で行い，マウス脳内 5-HT 代謝は HPLC-ECD 法により検討した．

（実験成績および考察）

① 四種トリプタミン誘導体による HTR 惹起作用

5-FMT および 6-FMT ではそれぞれ 45 mg/kg i.p. 投与 10～50 分後まで Head-Twitch (HT) 数は増加し，150 分後にはほぼ消失した．また，この 150 分間の累計 HT 数は 5-FMT で 51±3，6-FMT で 53±4 であった (Fig. 1)．これに対し，α-メチル基を欠く 5-FT および 6-FT 45 mg/kg i.p. の場合，HT 数はわずかに発現し，150 分間の累計 HT 数は 3.1±0.5 (5-FT) と 2.1±0.7 (6-FT) と低値を示した (Fig. 1)．

② HTR に及ぼす 5-HT 作働薬の影響

5-FMT 及び 6-FMT (各 45 mg/kg) 誘発 HTR は 5-$HT_2$ 受容体を比較的選択的に遮断する cyproheptadine (1 mg/kg i.p.) あるいは選択的 5-HT reuptake 阻害薬の fluoxetine (20 mg/kg i.p.) 前処理により有意に抑制された．しかし，5,7-dihydroxytryptamine (i.c.v.) 投与 5 日後では HTR は反対に増強された．また，6-FMT 誘発 HTR は 5-HT 生合成阻害薬 p-chlorophenylalanine (200 mg/kg i.p.) 前処理により抑制された．

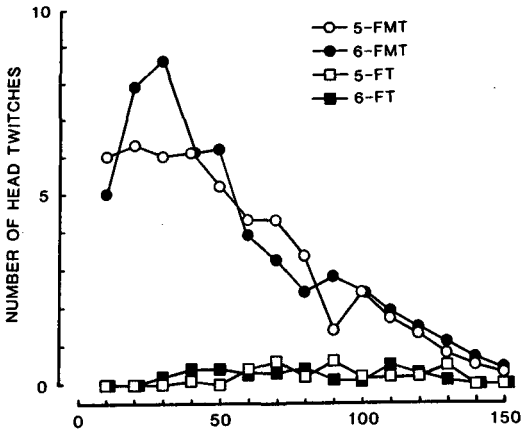



Fig. 1 Effect of i.p. injection of 5-FT, 6-FT, 5-FMT and 6-FMT on HTR. Each point represents the mean number of Head-Twitches. All of α-methylate analogues were injected in a dose of 45 mg/kg.

③ 5-FMT 及び 6-FMT 投与によるマウス脳内 5-HT 代謝に及ぼす影響

両化合物は検討した全ての部位（視床下部，海馬，脳幹，線条体，皮質）で 5-HT 量を増加させ，反対に代謝物 5-HIAA 量は減少あるいは減少傾向を示した．

④ ラット forebrain MAO 活性に及ぼす影響

[$^{14}$C]5-HT (0.1 mM) および [$^{14}$C]benzylamine (0.1 mM) を基質として，これら化合物のラット脳 MAO 活性に対する影響を $IC_{50}$，Ki 値より検討した結果，5-FMT と 6-FMT は MAO-A を選択的に強く阻害し，5-FT 及び 6-FT はほぼ非選択的に両タイプ MAO を阻害した．

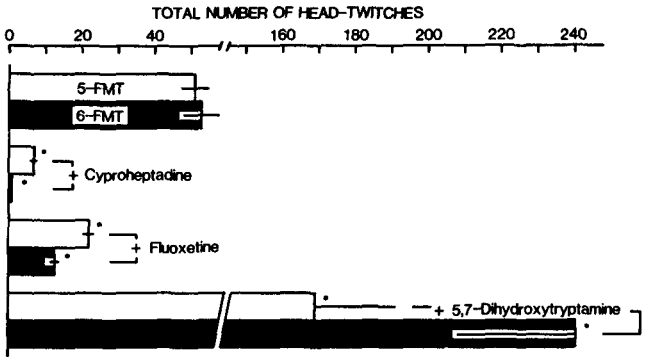



Fig. 2 Effect of pretreatment with cyproheptadine, fluoxetine or 5,7-dihydroxytryptamine on HTR induced by 5-FMT or 6-FMT. Cyproheptadine (1 mg/kg, i.p.) or fluoxetine (20 mg/kg, i.p.) was 30 min prior to 5-FMT or 6-FMT. 5,7-dihydroxytryptamine (100 μg/mouse, i.c.v.) was given 5 days prior to 5-FMT or 6-FMT (45 mg/kg). Each column shows the total number of head-twitches for 150 min. Vertical bars show the mean ± S.E.M. *p<0.01: significantly different from the 5-FMT- or 6-FMT-treated group.

④の成績はこれまで報告されているように，基質のα-メチル誘導体が MAO-A に対して選択的阻害作用を有する事実[3]と良く一致する．②の成績から，5-FMT 及び 6-FMT 誘発 HTR はこれらが 5-HT 神経に取り込まれ，そこの MAO-A を阻害し 5-HT のシナップスへの遊離が亢進し，主に $5\text{-HT}_2$ 受容体を介して発現する可能性が想定される．また，げっ歯類の脳内では，5-HT は主として MAO-A により代謝される[4]ので，③の成績は両化合物が脳各部位の MAO-A を阻害した結果 5-HT 量が増加し，逆に 5-HIAA 量が減少したと考えられる．また，6-FMT 誘発 HTR は p-chlorophenylalanine により 5-HT 生合成を減少させると抑制されることから，MAO-A 阻害により 5-HT 代謝が阻害され，増加した 5-HT の遊離も HTR 発現の一因と推定される．しかし，p-OHA と同様の 5-HT 遊離作用を有するか否かは不明である．

（文献）

1) Tadano, T., Satoh, S. and Kisara, K. (1986) Jap. J. Pharmacol. 41, 519-523
2) Tadano, T., Satoh, S., Satoh, N., Kisara, K., Arai, Y., Kim, S. K. and Kinemuchi, H. (1989) J. Pharmacol. Exp. Ther. in press.
3) C.J. Fowler. (1982) Drugs of future 7, 501-517
4) Oreland, L., Arai, Y. et al. (1983) MAO and its selective inhibitors, p.246-254

# 223 脳虚血における細胞外カリウムイオン濃度および興奮性アミノ酸濃度の変化
## — 脳マイクロダイアリシスによる検索 —

田村　亨，片山容一，川又達朗，坪川孝志
（日本大学医学部脳神経外科）

〔要約〕

脳虚血の発生後，細胞外カリウムイオン濃度は3相性に上昇し，phase 1からphase 2への移行は虚血開始からの時間に関係なく，細胞外カリウムイオン濃度が6－10mMになると生じることが証明されている(1,4)。しかしながら，phase 2への急峻な移行に関するメカニズムは現在までのところまだ明らかにはされていない。

今回の実験において，私どもはラットに実験的脳虚血を作成し，脳マイクロダイアリシスにより細胞外カリウムイオン濃度ならびに細胞外アミノ酸濃度の変化を検索した。細胞外カリウムイオン濃度の急峻な上昇に一致して細胞外興奮性アミノ酸濃度の上昇が生じることが証明された。この結果は，細胞外カリウムイオン濃度の上昇により神経細胞が脱分極し，神経終末から放出された興奮性アミノ酸がリガンド型イオンチャンネルを介する細胞内外の急激なイオン濃度変化をもたらしたためと考えられた。

〔目的〕

脳虚血において細胞外カリウムイオン濃度は3相性に上昇することが数々の報告により証明されている(1,4)。すなわち，最初は徐々に6－10mMまで上昇し(phase 1)，次いで急峻に40－50mMまで上昇し(phase 2)，最後には再び緩徐に約80mMまで上昇する(phase 3)。これまでの報告によると，phase 1からphase 2への移行は虚血開始からの時間に関係なく，細胞外カリウムイオン濃度が6－10mMになると生じる。しかしながら，phase 2への急峻な移行に関するメカニズムは現在までのところまだ明らかにはされていない。これまでに考えられているメカニズムとして，細胞外カリウムイオン濃度がこの一定のレベルに達すると脱分極が生じて，神経終末より非特異的な神経伝達物質の放出が起こり，その結果，リガンド型イオンチャンネルを介して細胞内から細胞外へカリウムイオンが多量に流出するという仮説が提唱されている(3,6,7,8)。私どもは，興奮性アミノ酸の拮抗剤をマイクロダイアリシスにより局所投与することで，この細胞外カリウムイオン濃度の上昇を抑制できることを報告した(5)。すなわち興奮性アミノ酸がphase 2の発生に重要な役割を果たしているものと考えられた。これまでの報告で，脳虚血の間に興奮性アミノ酸が上昇することが証明されている(2)。ところが，興奮性アミノ酸の上昇がphase 2に一致して生じるか否かは明らかにされていない。そこで，今回の実験で細胞外カリウムイオン濃度の変化と興奮性アミノ酸濃度変化の間に存在するメカニズムに関して検索を行なった。

〔方法〕

体重が180 gから250 gのSprague-Dawleyラットを使用した。ラットには笑気およびエンフルレンの吸入麻酔を施し，定位脳固定台に固定した。脳マイクロダイアリシスプローブをその先端部分が海馬のCA1からdentatearealに位置するように脳表から垂直に挿入した。微少注入ポンプに設置したシリンジにプローブを連結し，最初はリンゲル液(NaCl 148 mM, KCl 5 mM, $CaCl_2$ 2 mM, pH 7.4)を5.0 ul/minの注入速度で20分間灌流し状態が安定した後に，カリウムイオンを含まない等張液(NaCl 153 mM, $CaCl_2$ 2 mM, pH 7.4)で灌流し1分間隔で脳透析液をサンプリングした。透析液中のカリウムイオン濃度は，in vitroでカリウムイオン感受性電極で測定した。そして，カリウムイオン濃度測定後，同一のサンプルを使用して高速液体クロマトグラフィーでアミノ酸濃度を測定した。全脳虚血モデルは，断頭により作成した。

〔結果〕

脳虚血後，細胞外カリウムイオン濃度の上昇を反映して，透析液中のカリウムイオン濃度は徐々に上昇し(phase 1)，数分両後に急峻な上昇(phase 2)を示した。phase 2までの時間はラットの体重と逆相関していたが，これはラット脳の成熟度と関連しているものと考えられた。透析液中のカリウムイオン濃度が，虚血前の値の2倍以上に達した段階でphase 2に達したものとした。そして，透析液中のカリウムイオン濃度が最高値域に達したことの判定は，最高値の平均からその2ＳＤを引

いた値以上になったphase 2に達した後の最初の分画とした。

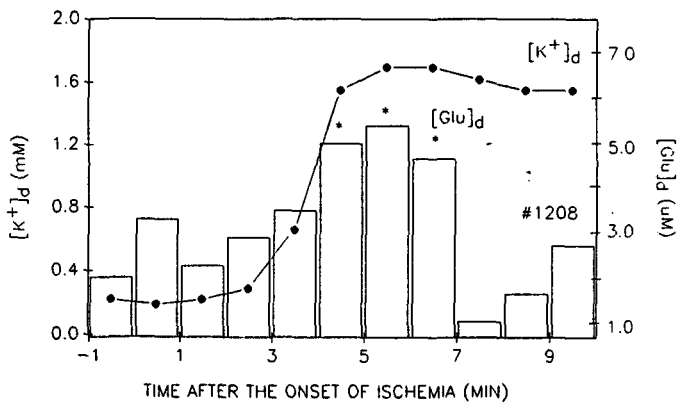
透析液中のカリウムイオン濃度が上昇しphase 2に達した分画で，興奮性アミノ酸，とくにグルタメートの上昇が証明された。これに対して，その他のアミノ酸，たとえばセリンは，明らかに上昇していなかった。すなわち，phase 2に一致して特異的に興奮性アミノ酸が上昇することが確認された。

## 〔考察〕

今回の実験で興奮性刺激伝達物質であるアミノ酸の細胞外での濃度が，phase 2に一致して上昇することが明らかとなった。phase 1からphase 2への移行に際して細胞外カリウムイオン濃度が上昇し，神経細胞が脱分極することで神経終末から神経伝達物質が放出されるのであろうと考えられてきた(3, 6, 7, 8)。脳虚血のphase 2の開始時にカリウムイオン依存性に興奮性アミノ酸が放出されるメカニズムの詳細はさらに検討する必要があるが，phase 2の時期と特異的な細胞外興奮性アミノ酸濃度の上昇が一致することから，細胞外カリウムイオン濃度上昇と興奮性刺激伝達物質であるアミノ酸の増加との因果関係が示唆される。そこで，非特異的な神経伝達物質の放出により，リガンド型イオンチャンネルを介するイオンの細胞外流出や細胞内流入が考えられる。

## 〔文献〕


1. Astrup, J., Rehncrona, S., Siesjo, B. K. (1980) Brain Res 199, 161-174
2. Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. and Diemer, N. H. (1984) J Neurochem 43, 1369-1374
3. Choi, D. W. (1987) J Neurosci 7, 369-379
4. Hansen, A. J. (1978) Acta Physiol Scand 102, 324-329
5. Katayama, Y., Becker, D. P., Tamura, T., Martin, A., Cheung, M. K. and Tsubokawa T. (1989) J Cereb Blood Flow Metab 9, S 57
6. Mayer, M. L., Westbrook, G. L. (1987) TINS 10, 59-61
7. Moghaddam, B., Schenk, J. O., Stewart, W. B. and Hansen, A. J. (1987) Can J Physiol Pharmacol 54, 1105-1110
8. Rothman, S. M., Olney, J. W. (1987) TINS 10, 299-302

# 224 脈絡叢のEndothelin受容体 ——実験水頭症に伴う変動——

川口 務[1]、栗原正紀[1]、丹羽正美[2]、森 和夫[1]
([1]長崎大・脳外、[2]第2薬理)

(要約) 定量的autoradiography法を用いてラット脈絡叢におけるエンドセリン (ET) 結合部位について解析し、さらにラット水頭症モデルを用いて、水頭症病態におけるET特異的結合の変化について検索した。ラット脈絡叢には、高親和性単一 ($Ka=2.6\times10^9/M$) のET特異結合が高濃度 (Bmax 36.2fmol/mg) に存在し、kaolin大槽内注入による実験水頭症ラットでは、ETの最大結合能 (Bmax) は低値を示したが、親和性の変化は認められなかった。これらの傾向は、先天性水頭症においても同様に認められた。以上の結果より、ラットの脈絡叢には、ET特異受容体が存在し、この受容体は髄液産生系に重要な役割を演じていることが示唆された。

(はじめに) endothelin (ET)は血管内皮細胞由来の血管収縮因子として発見されたペプチドで(1)、血管、心臓、肺、腎臓などの標的臓器に存在する特異受容体を介して種々の作用をもたらすことが報告されている。更に、その特異結合部位が脳弓下器官、海馬、小脳、脈絡叢、などの中枢神経系にも存在することが明らかとなり(2,3)、神経ペプチドとしての役割もまた注目されているが、未だ、その働きについて不明である。今回、我々は中枢神経系の中でも特にET結合部位が高濃度存在する部位の一つである脈絡叢に着目し、定量的autoradiography法を用いてラット側脳室内脈絡叢におけるET結合を解析すると共に水頭症病態での変化について観察し、脈絡叢におけるET受容体の役割について検討した。

(方法) 1) 検体：4週齢Wistarラットより摘出後、速やかに凍結した脳を対照群(A群) としてET結合解析に用いた。実験水頭症(B群)は、生後1週齢のWistarラットの大槽内に25%Kaolin懸濁液を注入することにより作成、注入後3週目に断頭した。更に、4週齢の先天性水頭症ラット(HTX)を用いて明らかな水頭症を有するものをC群、水頭症のないものをD群とした。凍結した脳より、−16℃下で16 $\mu$mの凍結連続切片を作成し、gelatin-coated slide glassに貼付して、4℃で一晩吸引乾燥し検体とした。 2) ET結合：検体をHank's solution(pH7.4)中で、10分間preincubate (25℃下) した後incubation buffer(40 $\mu$g/ml bacitoracin, 4 $\mu$g/ml leupeptin, 2 $\mu$g/ml chymostatin含有)、pH 7.4 中で1.5nM $^{125}$I-ET(endothelin-1)及び種々の非標識ETと共に90分間 (25℃下) incubateした。Hank's solution (4℃) 中で3回洗浄 (各1分間) し、冷風下に乾燥した後、$^{125}$I-standards (Amersham)と共に$^3$H-Ultrofilmに感光させ、autoradiogramを得た。 3) 結合部位測定：computer装着microdensitometry を用いてautoradiogramにおける監視領域のoptical densityを測定し、$^{125}$I-standardsのそれと比較することにより結合部位濃度を求めた(4)。尚、結合部位の解析には、computer LIGAND program を用いて、Scatcherd analysisを行った。統計解析には、ANOVA法を用いた。

(結果) 1) 結合特異性 (A群における検討)：脈絡叢における$^{125}$I-ET結合は、時間及び温度依存性に増加し、4℃、25℃下 共に60分で飽和に達した。また、本結合は、endothelin-1(ET-1)、endothelin-3(ET-3)により濃度依存性に抑制され、50%抑制濃度 (IC50) は、それぞれ$1.7\times10^{-9}$M、$1.9\times10^{-9}$Mであった (Fig 1、黒丸：ET-1、白丸：ET-3)。尚、種々のペプチド性神経毒 ($\omega$-conotoxin, tetrodotoxin), Ca 拮抗剤(nicardipine, nitrendipine), 心房性Na利尿ペプチド等では、抑制されなかった。Scatchard analysisは、高親和性単一($Ka=2.6\pm0.3\times10^9/M$)のET結合部位の存在を示し、結合総数(Bmax)は、36.2±2.5 fmol/mgであった(Fig 2 黒丸)。
2) 水頭症病態における変化：実験水頭症群では、脈絡叢におけるET結合部位数は、対照群の45%(16.3±0.6fmol/mg)と有意($P<0.01$)の低下を示していたが(Fig 3 左端：total binding：上段：A群、下段：B群、中段：n

on-specific binding)、結合親和性の有意な変化は認められなかった(Table 1, Fig 2 白丸)。尚、Fig 3右端(H.E.染色,x120)に示す様に水頭症ラットの脈絡叢には著明な組織変化は見られなかった。これらの所見は先天性水頭症ラットでも同様で、明らかな水頭症の見られたC群のET結合部位数はD群に比較して有意に低下していた(P<0.01)(Fig 4)。

(考察) 中枢神経系におけるETの特異結合部位は、脳弓下器官、海馬、小脳、脈絡叢等に存在することが知られているが、その生理的役割は、未だ不明である。このうち脈絡叢は、重要な髄液産生部位であり、我々の結果が示す如く脈絡叢に高親和性単一のET結合部位が高濃度に存在することは、髄液産生の調節にETが重要な役割を演じていることを示唆している。脈絡叢における髄液産生は、上皮細胞の基底側細胞膜に存在する$Na^+$ tansport system, 細胞質内 carbonic anhydrase、及び脳室側細胞膜に存在する$Na^+$,$K^+$ATPaseなどにより能動的に行われていることが知られている(5)。一方、血管平滑筋細胞において、ETが$Na^+$,$K^+$ pump及び$Na^+$,$K^+$,$Cl^-$ cotransport systemを促進させることが報告されており(6)、ETが脈絡叢上皮細胞の特異受容体を介して$Na^+$,$K^+$ATPaseや$Na^+$ transport systemを刺激することにより、髄液産生の調節を行っている可能性が考えられる。

今回、実験水頭症ラットや先天性水頭症ラットで見られたET結合部位数の減少の機序は、明らかではないが、結合親和性の変化は認められないこと、及び脈絡叢に著明な組織学的変化が認められなかったことから、水頭症に基ずく代償性変化とも考えられる。水頭症病態における血中及び髄液中のETの変化について今後の検討が必要である。

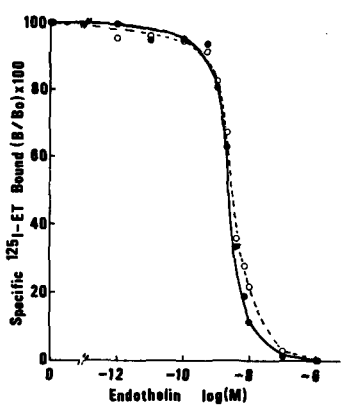



Fig 1

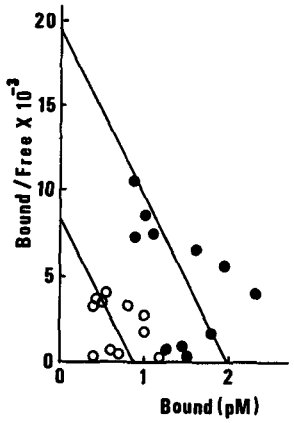



Fig 2

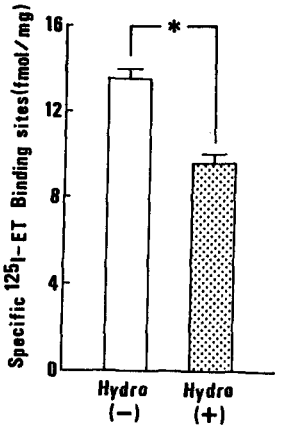



Fig 4

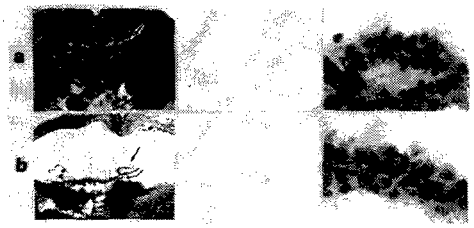



Fig 3

Endothelin Binding Sites in the Choroid Plexus of Rats with Kaolin-Induced Hydrocephalus

| Group | Binding capacity (Bmax) (fmol/mg) | Binding affinity (Ka) ($x10^9 M^{-1}$) |
|---|---|---|
| Control | 36.2 ± 2.5 * | 2.6 ± 0.3 |
| Hydrocephalus | 16.3 ± 0.6 | 3.5 ± 0.5 |

Values are means ±S.E.M., n=5, *p<0.01

Table 1

(文献)
(1)Yanagisawa M, et al: Nature, 332:411-415,1988
(2)C.R.Jones, et al: Neuroscience Letters 97:276-279,1989
(3)Koseki C, et al: Am.J.Physiol. 256:R858-R866,1989
(4)Tsutsumi K, et al: Neuroscience Letters 87:93-98,1988
(5)Saitou Y, et al: J Physiol 336:635-648,1983
(6)Garay,R et al: J. Cardiovasc.Pharmacol. 13:Suppl,5:S213-S215,1989

# 225 ラット脳およびヒト死後脳におけるσ受容体

森博史、渋谷治男、高橋良
（東京医歯大・精神）

〔要約〕

ラット脳とヒト死後脳でσレセプターの特異的なリガンドである$^{3}$H-1,3-di-o-tolil guanidine($^{3}$H-DTG)を用いてラジオレセプターアッセイを行い、陽イオン、アミノ酸の$^{3}$H-DTG結合への影響を検討した。さらに分裂病死後脳と対照脳の各部位におけるσーレセプターの結合量を測定し比較した。その結果、ラット、ヒト脳共に$^{3}$H-DTGに親和性を示す結合部位が存在し、haloperidolが強い阻害作用を示した。ラット脳においてNaイオンの存在下で結合量が低下し、ヒト脳においてはグルタミン酸、アスパラギン酸、グリシンの存在下では結合量が増加した。分裂病死後脳および対照脳のMedial Frontal Cortex、Orbitofrontal Cortex、Eye Movement Area、Orbital Cortexにおける$^{3}$H-DTG結合量を測定したが、結合量には4部位共に有意差はなかった。服薬群と非服薬群の間にも有意差はなかった。

幻覚、多幸感、離人症などを惹起するSKF10047（N-allinormetazocine）の作用を伝達するレセプターをσレセプターとMARTINらは命名した[1]。また鎮痛作用を持つ麻酔薬として使用されていたPhencyclidine(PCP)やその類似物質は幻覚や躁的興奮や焦燥を引き起こすことが知られており、SKF10047と同様に分裂病の成因に関与するのではないかと考えられた。当初PCPとSKF10047は一つの結合部位に作用すると考えられσ/PCPレセプターと命名された。しかし近年の研究の結果おのおのに選択的なリガンドやディスプレーサーが確立され、またリガンドの脳内の各部位への結合分布に相違がみられることよりσレセプターとPCPレセプターとは異なることがわかった。現在ではSKF 10047はσレセプターだけではなくPCPレセプターにも結合する非特異的なリガンドであり、σレセプターに結合する特異的なリガンドとして$^{3}$H-1,3-di-o-tolilguanidine($^{3}$H-DTG）などが適当であると報告されている[2]。今回われわれは$^{3}$H-DTGを用いラット全脳およびヒト脳前頭葉皮質の膜標品におけるラジオレセプターアッセイの条件を確立し、陽イオン、アミノ酸の$^{3}$H-DTG結合への影響を検討した。さらに分裂病死後脳と対照脳の前頭前野皮質各部位におけるσーレセプターの結合量を測定し比較した。

（実験方法）

ラットは、Wistar系雄性ラットを使用し、ヒト脳は前頭前野皮質を用いた。分裂病死後脳及び対照脳での測定に使用した脳は分裂病群は１２例平均年齢60.4歳（男８、女４・服薬群６、非服薬群６）対照群は１０例平均年齢66.7歳（男７・女３）であった。平均年齢に有異差はなかった。

脳を 0.05M Tris-HCl buffer(pH7.4, 4℃)中でホモジネート後40,000gで15分間遠心、再浮遊を３回繰り返してえられた粗膜分画を用いた。σレセプターアッセイでは$^{3}$H-DTG（比放射能52.3Ci/mmol）をリガンドとして用い、脳組織分画を0.05M Tris-HCl buffer(pH7.4, 25℃)中で90分間インキュベーション後polyethylenimine処理したWattman GF/Bフィルターを用い、吸引濾過法により結合型、遊離型を分離した。

（結果）

１．ラット脳およびヒト死後脳における$^{3}$H-DTG結合の薬理学特性

$^{3}$H-DTG結合に対する各薬物（haloperidol(HPD)、DTG、R(+)-3-(3-hydroxy-phenyl-propyl-piperidine(3PPP)）の阻害能を比較したところHPDが最も親和性が強く$IC_{50}$及びはヒトで$IC_{50}$=97.9nM、ラットで62.3nM、であった。DTG,3PPPは$IC_{50}$がヒトでそれぞれ381.5nM、151.3nM、ラットでそれぞれ250.3nM、227.1nMであった。それ故$10^{-5}$MHPD存在下での結合量を非特異結合とした。

２．$^{3}$H-DTG結合に対する陽イオンの影響

一価陽イオンとしてNa,K（それぞれ100mM)二価陽イオンとしてMn,Mg,Ca（それぞれ4mM)を用意して、これら陽イオンのσレセプター結合への影響を検討した。ラットにおいてNaイオンを100mM加えたとき結合量は約40%に減少した。その他のイオンはヒト・ラットに対して影響を与えなかった。

図1 ³H-DTG結合に対するアミノ酸の効果

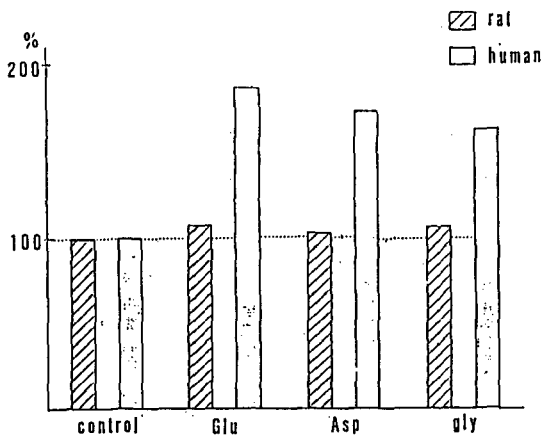
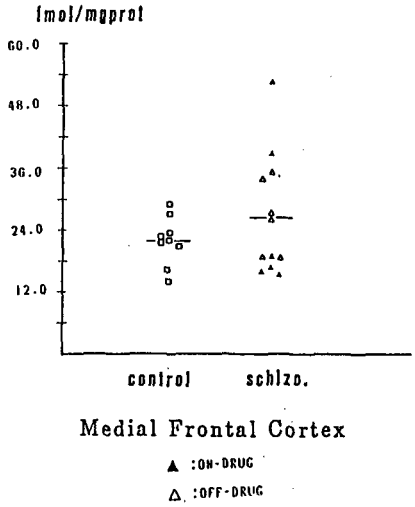



図2 ³H-DTG結合量




Medial Frontal Cortex

▲ :ON-DRUG

△ :OFF-DRUG

3．³H-DTG結合に対するアミノ酸の影響

各1uMの グルタミン酸(Glu) アスパラギン酸(Asp) グリシン(Gly) のレセプターアッセイへの影響を検討した。図－1にcontrol に対する各アミノ酸を加えた結合量を非添加時の結合量と比較した。ラット脳では、各アミノ酸とも ほとんど影響がみられなかったが、ヒト脳では、各アミノ酸とも160% 以上の増加を示しとくにグルタミン酸を加えると、90% の結合量の増加がみられた。またグルタミン酸は$10^{-6}$Mで最大の増強効果を示した。

4．分裂病死後脳および対照脳の4部位でのσ－レセプター結合量の測定

分裂病死後脳および対照脳は、それぞれMedial Frontal Cortex、Orbitofrontal Cortex、Eye Movement Area、Orbital Cortexにおける³H-DTG結合量を測定した（図2）。分裂病死後脳および対照脳における結合量には4部位共に有意差はなかった。服薬群・非服薬群に分けて検定したが有意差はなかった。99%の確立で有意差はみとめられなかった

（考察）

以上の結果よりラット及びヒト脳膜標品においても³H-DTG結合部位すなわちσレセプターが存在し、ラットにおいてはNaイオンにより結合量は減少し、ヒト脳においてはグルタミン酸、アスパラギン酸、グリシンで増加した。今回ラットおよびヒト脳のσレセプターに対するナトリウムイオン、アミノ酸の効果に差異を認めたが今後の検討を要する点である。³H-DTG binding でのHPDの$IC_{50}$はヒトで97.97nM ラットで62.36nM という結果であった。

Weber[3]らのモルモットでの実験では5.0±0.3nMというであり、これは種差あるいは脳内の分布の差のためと思われる。アミノ酸 による結合量の増加はσレセプターがNMDAレセプターの近傍にありNMDAレセプターにアミノ酸が結合しでそのアロステリック変化によりσレセプターの親和性が高まることに起因していると考えられる[4]。分裂病死後脳と対照脳における結合量には差がみられなかった。Weissmanらはσレセプターはモルモットにおいて8カ月間安定であるという結果を得ている[5]。今回使用した人脳はいずれも死亡から84カ月以上経っているのでレセプター量の変化があった可能性もあり今後の検討を要する。

謝辞） 精神分裂病及び対照死後脳資料を提供してくださった信州大学精神科融道男教授、国立精神神経センター疾病研究第三部の諸先生方、ならびに実験に協力くださった東邦大学生物科の林菜海子さん、橋本千鶴子さんに感謝致します。

（文献）

1)Martin et al;The effect of morfin-and nalorphin-like drugs in the nondependent and morfin-dependent chronic spinal dog ;J Pharmacol.Exp.Ther;1976

2)3) Weber,E, et al Proc.Natl Acad .Sci.USA 83, 8784 1984

4)Sonders, et alPhencyclidine and psychotomimetic sigma opiates ;TINS Vol. 11, No. 1 1988

5)Weissman,Sigma Receptors in Post-Mortem Human Brains. J.of pharma.ex.ther.vol.247 No.1 1988

# 226 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：経時的変化に関する検討

楯林 義寛・平野 誠・黒木 俊秀・松本 孝・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**、大牟田労災病院***)

〔要約〕
メタンフェタミン(MAP)の比較的高用量(15mg/kg)投与後のモノアミン神経系の経時的変化をラット脳内部位別に検討した。反復投与群のラットにはMAP15mg/kg1日1回、7日間投与し、単回投与群のラットには同用量のMAPを7日目のみ1回投与した。最終注射7日後または14日後の定常状態におけるドーパミン(DA)、セロトニン(5-HT)および各代謝産物の変化を脳内各部位別に検討した。その結果、単回投与群では神経終末領域および細胞体部位いずれもモノアミン系の変化は認められなかった。それに対して反復投与群では神経終末領域の中で皮質および辺縁系の各部位で投与7日ないし14日後もなお5-HT系の低下が持続していた。DA系は全ての部位で変化は認められなかった。以上の結果から、MAP15mg/kgの反復投与により皮質および辺縁系を中心とした神経終末領域に5-HTニューロン系に対するneurotoxicな影響が及んでいることが示唆された。

＜緒言＞ 覚醒剤中毒において精神症状が遷延持続化するタイプの存在が今日的課題であるがその生化学的基盤は解明されていない。この病像との関連で、アンフェタミン類の大量あるいは持続投与により中枢モノアミン神経に変性が生じる(neurotoxicity)との報告(1,3,4)が着目されるが、病態モデルとしては投与量や投与方法に難点があり、また神経終末領域だけでなく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。我々は先にラットへMAP15mg/kgという比較的高用量を単回又は7日間反復投与し、最終投与1日後の定常状態におけるモノアミン系の変化を調べたところ、モノアミン神経終末部位の広い範囲で5-HTとその代謝産物である5-HIAAが低下していることを認めたことから、DA神経系よりも5-HT神経系へのMAPのneurotoxicな影響が示唆されることを報告(7)した。今回は前回みられた5-HT系への選択的影響が持続的な変化であるか否かまた脳内の諸部位における変化の相違を検討するためMAP15mg/kgを投与しモノアミン神経系の変化を経時的に脳内各部位別に調べた。

＜実験方法＞ 成熟Wistar系雄性ラット(280-340g)を用いた。MAP15mg/kgを7日間、毎日1回腹腔内投与する反復投与群と、生食水を同様に投与し最終7日目のみMAP15mg/kgを投与する単回投与群の2群に分け、さらに最終投与後7日後に断頭する群および14日後に断頭する群に分けた。対照群には7日間生食水を投与した。断頭後速やかに脳を摘出し、-80℃で凍結後、クリオスタット(-12℃)内で300μmの連続切片を作製した。各切片は-20℃のプレート上でアトラス(2)に従って各部位をマイクロナイフで切り出した。切り出した各組織に400μM $NaHSO_3$、50μM アスコルビン酸及び内部標準物質isoproterenolを含む0.1Mギ酸200μlを加えてホモジナイズし、一部を蛋白定量用に分け、遠心(15000xg,10min,-5℃)した。その上清を更に孔径0.45μmの遠心濾過チューブにて濾過したもの20μlをHPLC-ECDに注入した。カラムは逆相(Eicompak MA-ODS,4.6φx250mm)を用い、移動相として340mg/l sodium-octanesulphate(S.O.S.)、10mg/l $Na_2EDTA$および17%メタノールを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH3.8～4.2)を17～20℃下1ml/minの流速で還流した。作用電極はグラファイトカーボン電極(Eicom)を使用し、電圧はAg/AgCl参照電極に対して750mVに設定した。測定感度は10pg/injection以下であった。標準物質を用いて各モノアミンはホモジナイズ溶液中では室温下でも48時間以上安定である事を確認した。試料の蛋白量はLowryの方法で測定した。統計学的検討はStudent's t 検定を用いた。

＜結果及び考察＞ まず測定した黒質線条体および中脳辺縁・皮質系DAニューロンの神経終末では、DA、DOPACおよびHVAは、単回投与群および反復投与群とも最終投与7日後および14日後で有意な変化はなかった。細胞体部位でも投与7日および14日後ではいずれの部位においてもDA、DOPACおよびHVAの有意な変化は認められなかった。一方、5-HT系は単回投与群では投与7日および14日後では神経終末のほとんどの部位で5-HTおよび5-HIAA

に有意の変化はなかった。しかし反復投与群で最終投与7日および14日後でも側坐核、扁桃核、前部帯状回皮質及び前頭前野内側部で５－ＨＴの低下(-28～-37%)がみられ、５－ＨＩＡＡもほぼ同様の部位で低下(-21～-33%)していた。尾状核-被殻は前部、後部とも投与7日および14日後では有意の変化は認めなかった。細胞体部位では、単回、反復投与群とも投与7日および14日後では５－ＨＴ、５－ＨＩＡＡに有意の変化はなかった。以上の結果をTable 1、2にまとめて示した。これらの所見は、比較的高用量のＭＡＰ15mg/kg反復投与により、最終投与7日および14日後の定常状態においても依然として皮質および辺縁系を中心とした神経終末領域で５－ＨＴ系の機能低下が持続している事を示しておりＭＡＰのneurotoxicな作用が選択的に５－ＨＴ系に及んでいると考えて妥当と思われる。従来覚醒剤のneurotoxicな作用を検討した研究は極めて高用量(25～100mg/kg)のアンフェタミン類を急性単回投与した実験が多い。今回の実験ではＭＡＰ15mg/kgという比較的高用量を単回および反復投与して比較することにより、単回投与群では反復投与群で見られたような持続性の５－ＨＴ系の低下は認められなかった。この事は同一用量であっても連続反復して覚醒剤が投与された場合の方がneurotoxicな変化が生じやすい事を意味していると思われる。しかし投与方法に関しては漸増法、持続投与法など投与方法により必ずしも一致した結果が報告(4,5,6)されていないので今後更に検討の余地があろう。さらに今回経時的変化を脳内部位別に詳細に検討することで、部位による感受性の相違もより明らかになったように思われる。尾状核-被殻ではＭＡＰ15mg/kg反復投与1日後では５－ＨＴおよび５－ＨＩＡＡは20～25%低下していることを報告(7)したが、今回検討した7日および14日後ではほとんど対照値近くにまで回復しており、皮質および側坐核、嗅結節、扁桃核などの辺縁系の各部位が7日および14日後も1日後と同様に持続性の変化がみられた事と異なっていた。このようにＭＡＰを反復投与した影響が線条体や細胞体領域よりも皮質または辺縁系の５－ＨＴ系に選択的かつ長期持続して及んでいることは、これらの部位が情動系に関連の深いことを考え合わせると、覚醒剤中毒の持続性の精神病状態を生じる生化学的基盤との関連から興味深い。

Table 1. The time responses of methamphetamine (15 mg/kg) for serotonin and their metabolite levels in discrete dopaminergic terminal areas of rat brain.

| Areas | Treatment | 5-HT | | 5-HIAA | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 7 days | 14 days | 7 days | 14 days |
| 1. The nigro-striatal dopaminergic terminals | | | | | |
| N. caudate putamen ant. | acute | 4.00 ± 0.37 | 3.76 ± 0.50 | 2.88 ± 0.27 | 3.03 ± 0.14 |
| | chronic | 3.50 ± 0.22 | 3.41 ± 0.37 | 2.41 ± 0.25 | 2.56 ± 0.20 |
| | control | 3.73 ± 0.33 | 3.80 ± 0.11 | 2.42 ± 0.48 | 2.95 ± 0.46 |
| N. caudate putamen post. | acute | 7.16 ± 0.68 | 7.56 ± 0.33 | 4.56 ± 0.33 | 5.01 ± 0.37 |
| | chronic | 6.47 ± 0.49 | 6.27 ± 0.54 | 4.30 ± 0.56 | 4.26 ± 0.33 |
| | control | 7.17 ± 0.24 | 7.31 ± 0.55 | 4.89 ± 0.16 | 4.87 ± 0.29 |
| 2. The meso-limbic dopaminergic terminals | | | | | |
| Nucleus accumbens anterior | acute | 6.05 ± 0.61 | 5.96 ± 0.51 | 4.21 ± 0.13 | 3.94 ± 0.22 |
| | chronic | 4.69 ± 0.51** | 4.18 ± 0.55** | 3.50 ± 0.36 | 3.22 ± 0.29** |
| | control | 6.63 ± 0.24 | 6.36 ± 0.19 | 3.98 ± 0.53 | 4.07 ± 0.13 |
| Tuberculum olfactorium | acute | 10.41 ± 1.25 | 10.05 ± 0.50 | 3.74 ± 0.32 | 3.48 ± 0.26 |
| | chronic | 6.64 ± 1.01* | 8.79 ± 0.92 | 3.44 ± 0.38 | 3.07 ± 0.43 |
| | control | 10.77 ± 0.25 | 10.50 ± 0.67 | 3.51 ± 0.20 | 3.74 ± 0.14 |
| Amygdala | acute | 11.54 ± 0.79 | 10.22 ± 0.48* | 4.23 ± 0.14 | 3.96 ± 0.17 |
| | chronic | 8.54 ± 0.88** | 9.07 ± 0.97** | 3.75 ± 0.32 | 3.44 ± 0.41* |
| | control | 12.11 ± 0.92 | 12.32 ± 0.80 | 4.24 ± 0.07 | 4.43 ± 0.22 |
| 3. The meso-cortical dopaminergic terminals | | | | | |
| Prefrontal cortex medial field | acute | 11.30 ± 1.31 | 10.24 ± 0.40 | 4.18 ± 0.34 | 4.46 ± 0.14 |
| | chronic | 8.58 ± 1.01* | 8.10 ± 0.99** | 3.51 ± 0.42* | 3.00 ± 0.35** |
| | control | 11.51 ± 0.53 | 11.33 ± 0.61 | 4.32 ± 0.13 | 4.60 ± 0.32 |
| Anterior cingulate cortex | acute | 6.24 ± 0.38 | 6.33 ± 0.92 | 5.23 ± 0.45 | 5.44 ± 0.57 |
| | chronic | 4.15 ± 0.59** | 3.94 ± 0.57** | 3.85 ± 0.32* | 3.74 ± 0.37* |
| | control | 6.28 ± 0.33 | 6.27 ± 0.73 | 5.57 ± 0.66 | 4.75 ± 0.57 |

Values are mean ± S.E.M. (ng/mg protein). The number of determinations were 4 ~ 8 rats. *p<0.05, **p<0.01 compared with controls (Student's t-test).

Table 2. The time responses of methamphetamine (15 mg/kg) for serotonin and their metabolite levels in discrete cell body areas of rat brain.

| Areas | Treatment | 5-HT | | 5-HIAA | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 7 days | 14 days | 7 days | 14 days |
| Nucleus raphe dorsalis | acute | 51.42 ± 3.30 | 52.73 ± 2.85 | 29.24 ± 2.05 | 25.79 ± 0.74 |
| | chronic | 47.35 ± 1.16 | 52.98 ± 2.60 | 24.91 ± 0.64 | 25.19 ± 1.00 |
| | control | 51.20 ± 1.96 | 59.18 ± 0.97 | 24.69 ± 1.81 | 30.18 ± 1.05 |
| A9 (Substantia nigra pars compacta) | acute | 25.26 ± 0.76 | 26.10 ± 2.01 | 6.51 ± 0.12 | 6.81 ± 0.10 |
| | chronic | 22.22 ± 1.31 | 24.16 ± 1.38 | 5.85 ± 0.43 | 5.83 ± 0.20 |
| | control | 27.82 ± 1.98 | 26.53 ± 0.57 | 7.09 ± 0.37 | 7.12 ± 0.22 |
| A10 (Ventral tegmental area) | acute | 23.26 ± 0.90 | 21.31 ± 0.82 | 12.15 ± 0.71 | 11.95 ± 0.30 |
| | chronic | 22.26 ± 0.66 | 22.69 ± 0.71 | 10.84 ± 0.56 | 10.16 ± 0.44 |
| | control | 22.47 ± 1.12 | 24.70 ± 0.79 | 11.37 ± 0.60 | 13.14 ± 0.69 |
| A6 (locus coeruleus) | acute | 18.33 ± 0.87 | 16.71 ± 0.41 | 6.51 ± 0.20 | 5.65 ± 0.18 |
| | chronic | 16.38 ± 1.03 | 16.78 ± 0.45 | 5.31 ± 0.37 | 5.51 ± 0.16 |
| | control | 19.12 ± 1.65 | 19.00 ± 1.14 | 6.35 ± 0.34 | 6.63 ± 0.14 |

Values are mean ± S.E.M. (ng/mg protein). The number of determinations were 4 ~ 8 rats.

＜文献＞ 1) Hotchkiss,A.J. et al.(1979) Life Sci., 25:1373-1378. 2) Konig,J.F.R. and Klippel,R.A.(1963) The rat brain.Williams & Wilkins,Baltimore,Md. 3) Morgan,M.E.and Gibb,J.W.(1980) Neuropharmacol.,19:989-995. 4) Ricaurte,G.A. et al.(1984) Brain Res.,303:359-364. 5) Robinson,T.E. and Camp,D.M.(1987) Pharmacol.Biochem.Behav.,26:821-827. 6) Schmidt,C.J. et al.(1985) J.Neurochem.,44:852-855. 7) 楯林義寛ら.(1988) 神経化学,27:242-243.

# 227　脳虚血による微小管蛋白の変化について

工藤　喬、多田國利、武田雅俊、山下　正、播口之朗、西村　健
（大阪大・医・精神医学）

〔要約〕
砂ネズミを用いて一過性脳虚血（５－15分虚血）を作成し、虚血直後の微小管蛋白の変化及びその機序について、抗MAP2抗体、抗tau抗体、抗tubulin抗体を用いたimmunoblotting法などで検討したところ、以下の結果を得た。① MAP2は、短時間の虚血においても虚血直後から数個の分解産物に分解される。② 一過性脳虚血直後、tauにも減少が認められた。③ 一過性脳虚血直後、tubulinには大きな変化はなかった。 ④ 虚血直後のMAP2の分解パターンは、in vitroで、MAP2をカルシウム濃度依存性に分解させたパターンと酷似していた。 ⑤ 同様のin vitroの系において、tauもカルシウム濃度依存性に変化をうけた。 以上のことから、一過性脳虚血直後には微小管付随蛋白質、中でもMAP2が敏感に分解を受け、それらの発現機序にはカルシウム依存性中性蛋白分解酵素（CANP）の関与が示唆された。

［目　的］
我々はこれまでに砂ネズミの両側総頚動脈を一過性に閉塞することにより脳虚血を作成し、脳蛋白質の変化を検討してきた。一過性脳虚血後の脳において水溶性蛋白のうちの MAP2(microtuble associated protein 2)、calspectin、clathrinなどに変化が生じていること、特にMAP2は虚血早期より減少することを報告した[5]。また、砂ネズミの両側総頚動脈に実験的に狭窄をくわえ、慢性脳血流低下モデルを作成したところ、学習能力の低下が認められ、このモデルにおいても 軽度のMAP2 の減少が認められた[2]。今回、我々はこれらの脳虚血におけるMAP2の減少の機序とその他の微小管構成蛋白の脳虚血による変化について検討した。

［方　法］
（１）５分・10分・15分脳虚血直後のMAP2、tau、tubulinの変化についての検討
砂ネズミの両側総頚動脈を以前我々が報告したように、5分、10分、15分間閉塞し、再開通直後に、脳を摘出し、4℃下で前頭葉皮質、線条体、海馬に分離した[5]。各々を4倍容の10mM phosphate buffer （pH 7.2）でhomogenizeし、100,000×g、30分間遠心し、得られた水溶性分画を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で分析し、抗MAP2抗体、抗tau抗体、抗tubulin抗体を用い、immunoblotting法にて検討した。第１抗体として、抗MAP2抗体にはAmersham社製monoclonal抗体、抗tau抗体にはSigma社製monoclonal抗体、抗tubulin抗体にはアドバンス社製polyclonal抗体を用いた。また、第２抗体として、KPL社製peroxidase標識抗rabbit IgG抗体と抗mouse IgG抗体を用いた。対照には偽手術をしたものを用いた。
（２）MAP2及びtauの変化とカルシウム濃度の関連についての検討
砂ネズミの全脳を４℃の条件下で４倍容の20mM imidazole buffer［20mM imidazole-HCl(pH 7.2), 100mM NaCl, 0.1mM dithiothreitol, 1mM EGTAを含むbuffer］でhomogenizeし、100,000xg、30分間遠心後の上清を、同bufferにて４℃下12時間透析し、脱塩した。このようにして得られた脳水溶性分画70μlに最終濃度0、0.9、1.0、1.1、1.2 mM となるような $CaCl_2$ を含む上記buffer10μlを添加し、30℃、30分incubateし、各試料をSDS-PAGEで分析し、(1)と同様に、抗MAP2抗体、抗tau抗体を用いて、immunoblotting法にて、検討した。同時にproteaseの阻害効果をみるために、10μg/mlのE-64、20μg/mlのpepstatin Aを加え同様の操作を行った。

［結　果］
（１）一過性脳虚血直後のMAP2、tau、tubulinの変化
MAP2は短時間の虚血直後より数個の分解産物が認められ、虚血時間が長くなるほど、その分解産物は増加する傾向を示した。また部位間の比較では海馬で分解が著明であった（Fig.1）。tauも海馬で脳虚血直後に分解することが認めらた。tauはMAP2に比べると虚血時間がやや長くなって変化し始める傾向を示した（Fig.2）。tubulinは、５－15分間の虚血直後では大きな変化を受けなかった（Fig.2）。
（２）MAP2及びtauの変化のカルシウム濃度依存性
MAP2はほぼカルシウム濃度依存性に分解を受け、その分解パターンは、最終カルシウム濃度が1.0-1.1mMで、15分脳虚血直後の海馬におけるパターンとほぼ一致していた。また、そのカルシウムによる分解は、E-64により多少の抑制を受けるが、pepstatin Aでは抑制されなかった（Fig.3）。tauもカルシウム濃度依存性に変化を受け、最終カルシウム濃度が1.1-1.2mMで減少を示した。これもE-64により僅かながら抑制を受けたがpepstatin Aでは抑制されなかった（Fig.4）。

［考　察］
一過性脳虚血直後においては、微小管蛋白質のうち、微小管付随蛋白であるMAP2とtauに変化がみられた。特にMAP2は短時間の虚血直後から分解が観察された。また、MAP2の分解は海馬で著しくいわゆる選択的脆弱性を示した。脳虚血では、虚血早期において細胞内外からカルシウムが動員され、様々な障害を及ぼすと言われている[4]。また、MAP2はCANPの基質となるという報告がいくつかある[1][4]。そこで我々はMAP2の脳虚血による分解とカルシウム濃度について検討を加えた。in vitroにおいて、MAP2はカルシウム濃度依存性に分解を受けた。この分解は、cystein protease inhibitorであるE-64である程度阻害された。更に、in vivoで一過性脳虚血直後の海馬におけるMAP2の分解パターンは、このin vitroの最終カルシウム濃度1.0-1.1mMのパターンとほぼ一致した。これらのことから一過性脳虚血後のMAP2の減少にはCANPによる分解の関与が示唆された。tauの変化についても

カルシウム濃度との関係を検討したところ、in vitroでカルシウム濃度依存性に変化を受け、E-64で若干の阻害を受けることが示された。しかしtauのin vitroにおける変化は、in vivoにおけるものとやや異なっており、in vitroの変化がどこまでin vivoを反映しているかは今後の検討が必要と考えられる。MAP2やtauなどの微小管付随蛋白は、神経細胞内において架橋蛋白質として重要な役割を担っており、これらの蛋白が一過性脳虚血直後に変化を受けることは、以後に起こりうる神経機能の変化や神経細胞死に少なからず影響を及ぼすものと考えられる。

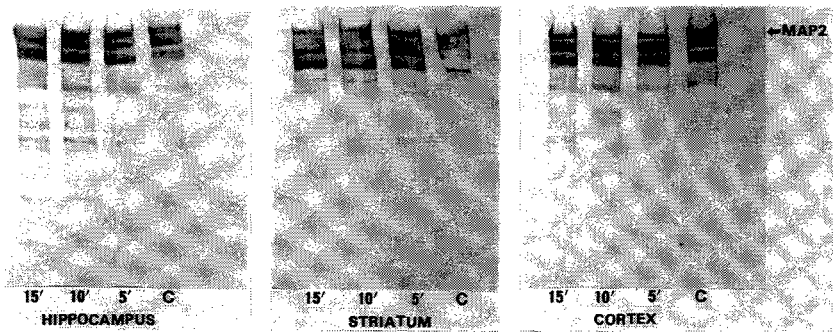



Fig.1
5分、10分、15分
脳虚血直後のMAP2の
各部位での
分解パターン
（抗MAP2抗体を用いた
immunoblotting）
c：control

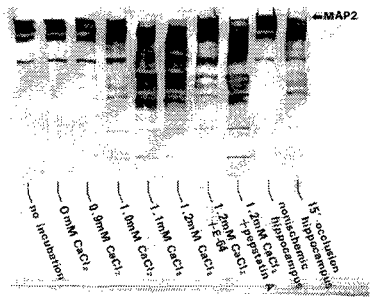



Fig.2
in vitroにおけるMAP2分解の
カルシウム濃度依存性についての検討
（抗MAP2抗体によるimmunoblotting）
0-1.2mM $CaCl_2$：添加塩化カルシウムの
最終濃度を示す。

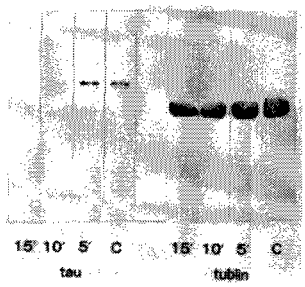



Fig.3
5分、10分、15分脳虚血後の海馬における
tau、tubulinの変化
（抗tau抗体、抗tubulin抗体によるimmunoblotting）
c：control

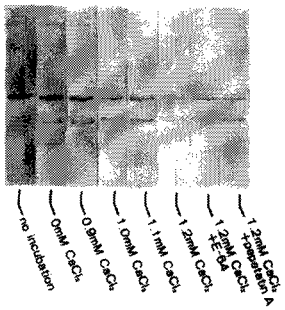



Fig.4
in vitroにおけるカルシウム濃度によるtauの変化
（抗tau抗体によるimmunoblotting）
0-1.2mM $CaCl_2$：添加塩化カルシウムの
最終濃度を示す。

[文 献]
1）Klein,I.V. et al: Arch.Biochem.Biophys. 208,520-527 (1981)
2）工藤 壽ら：神経化学 27,210-211 (1988)
3）Sandoval,I.U.et al: Eur.J.Biochem.92,463-470 (1978)
4）Siesjö,BK.: Clin.Toxico 23(4-6),267 (1985)
5）山下 正ら：神経化学 24,31-33 (1985)

# 228　ロイペプチン投与ラット老化モデル脳における中間径フィラメントおよびアルツハイマー病アミロイド蛋白前駆体メッセンジャーRNAの変化

野沢明美、相沢貴子、吉川和明
（東京都精神研・分子生物）

〔要約〕

蛋白分解酵素阻害剤であるロイペプチンを70日齢の雄性ラットの脳室内に２週間持続投与すると、大脳皮質内ニューロン内にリポフスチン様物質の蓄積が認められた。このラット脳内領域のneurofilament-L (NF-L) mRNA glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA および amyloid protein precursor(APP) mRNA の濃度をNorthern法で分析したところ、新皮質ではNF-L mRNAとAPP mRNAが、海馬ではNF-L mRNA濃度が減少した。しかし、小脳ではNF-L mRNAおよびAPP mRNA濃度共に変化がなかった。一方、これらの３部位ではGFAP mRNAの顕著な増加が認められた。したがって、ロイペプチン投与は大脳皮質のニューロンに障害を与えるが、アストログリアにも影響を与えるものと推定される。

蛋白分解酵素阻害剤であるロイペプチンを若齢ラット脳内に投与した場合、リポフスチン様物質の蓄積、小脳プルキンエ細胞の軸索の変性や細胞の脱落など、ヒト老化脳の病理学的変化と類似の変化を誘発することが知られている［1］。今回、この老化モデル脳における生化学的もしくは分子レベルでの変化について検討するため、ニューロンとアストログリアの細胞体密度の指標として中間径フィラメントであるneurofilament-L(NF-L) mRNAとglial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNAを、また、脳内ニューロンに高濃度に存在するアルツハイマー病脳アミロイド蛋白前駆体(APP)mRNAの変化を検討した。

【実験方法】　Ivyの方法［1］によって、Sprague-Dawleyラット（70日齢雄性）の側脳室にミニポンプ（Alzet 2002）を用いて生理食塩水、50mg/mlまたは75mg/mlのロイペプチン（各２～３匹）を0.5μl/hrの速度で14日間持続投与した。その後、ラット脳を摘出し、前脳皮質(NC)、海馬(HC)、小脳(CB)の部位に分離した。一部は凍結切片を作製して、モノクローナル抗体（当研究所石井毅博士より供与）を用いた免疫組織化学(ABC法)によってリポフスチンを検出した。また、既報［4-6］にしたがって、残りの組織からRNAを抽出し、Northern法とNF-L、GFAP、APP、β-actinのcDNAを用いたhybridization法によってmRNAを検出した。

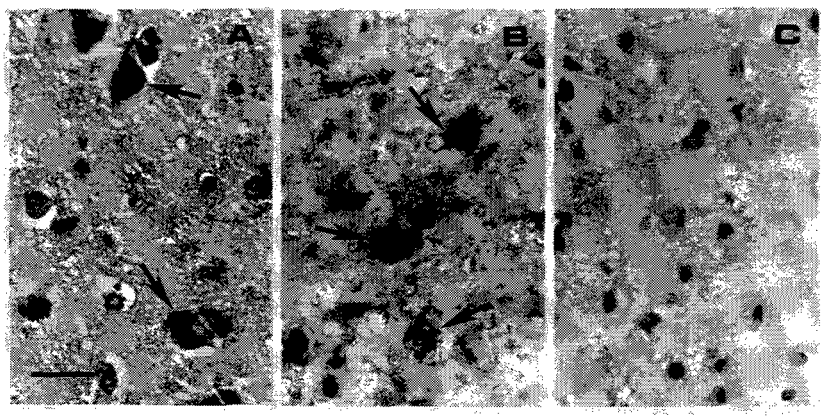



Fig.1　Lipofuscin-like immunoreactive materials in the neocortical neurons.
A; aged human brain (a 73-year-old female), B; leupeptin (75 mg/ml)-treated rat brain, C; control rat brain (0.9% NaCl). Bar= 20μm. The arrows indicate clusters of lipofuscin-like materials reacting with a monoclonal antibody.

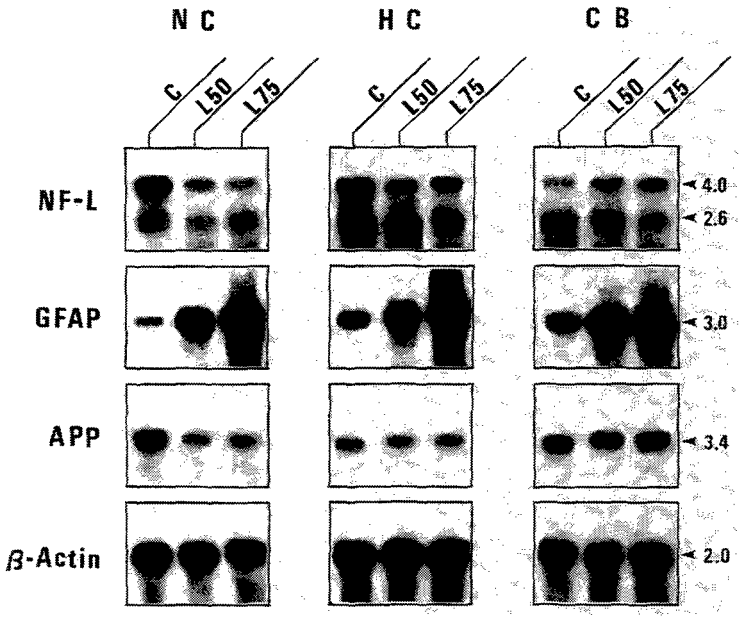



Fig.2 Northern blot analyses of mRNAs encoding NF-L, GFAP, APP, and β-actin in discrete brain regions of leupeptin-treated rats (2 μg total RNA per lane).
Brain regions: NC; neocortex (frontal cortex), HC; hippocampus, CB; cerebellum
Treatments: C; control(0.9% NaCl), L50; leupeptin (50 mg/ml), L75; leupeptin (75 mg/ml)
Numbers at the right are the sizes of hybridized signals in kilobases.

【成績】 ロイペプチン投与ラット脳内新皮質のニューロンの細胞体(B)にはヒト老化脳(A)と同様にリポフスチン免疫陽性顆粒が蓄積していた（Fig.1）。同様の変化は海馬でも認められたが、小脳では認められなかった。次にロイペプチン投与ラットの各脳部位でのNF-L、GFAP、APP、 β-actinのmRNAを測定した（Fig.2）。 新皮質(NC)ではNF-L mRNAとAPP mRNAは減少したが、GFAP mRNA濃度はロイペプチンの濃度依存的に増加した。海馬(HC)ではNF-L mRNA濃度が減少し、GFAP mRNA濃度は増加したが、APP mRNA濃度には顕著な変化が認められなかった。これらの知見はロイペプチンによって新皮質や海馬でNF-L mRNA濃度の低下を伴うニューロンの変性が起こっていることを示唆する。また、新皮質ではAPP mRNAを含む細胞は障害を受けるが、海馬では抵抗性があることが推定される。これに対して、小脳(CB)ではNF-L mRNAやAPP mRNA濃度は低下が認められなかったが、GFAP mRNA濃度は上昇した。したがって、小脳ではアストログリアはロイペプチンに反応するが、大多数のニューロンは反応しないものと考えられる。

【考察】 今回の実験から、従来の病理学的知見に加えてNF-L mRNAやGFAP mRNAがロイペプチンによって起こる脳の病理学的変化のマーカーとなることが明らかになった。私達はNF-LやGFAPの免疫組織化学によってロイペプチン投与による染色性の変化は見い出せなかった（発表予定）。したがって、ロイペプチンによるこれらのmRNAの変化は従来の形態学的方法に比べてニューロンの変化を高感度に検出できるものと考えられる。NF-L mRNA濃度はアルツハイマー病患者の脳 [2] やアルミニウム中毒ウサギ脊髄 [3] で減少することが知られているが、今回の結果と考え合わせると、NF-L mRNA濃度の減少はニューロン変性に伴う共通の特徴とも考えられる。

【文献】
[1] Ivy, G.O.(1987) in " Neuroplasticity, Learning, and Memory" pp.125-150, Alan R. Liss, Inc.
[2] McLachlan, D.R.C., Lukiw, W.L., Wong, L., Bergeron, C., and Bech-Hansen, N.T. (1988) Mol. Brain Res. 3, 255-262.
[3] Muma, N.A., Troncoso, J.C., Hoffman, P.N., Koo, E.H., and Price, D.L. (1988) Mol. Brain Res. 3, 115-122.
[4] Yoshikawa, K., Williams, C., and Sabol, S.L. (1984) J. Biol. Chem. 259, 14301-14308.
[5] Yoshikawa, K. and Aizawa, T. (1988) Mol. Brain Res. 4, 87-96.
[6] Yoshikawa, K., Aizawa,T., and Nozawa, A.(1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. (in press)

# 229 Methamphetamine投与によるラット線条体におけるDopamine放出について：In vivo microdialysisによる検討

小山　司、中山　誠、松原良次、井上　猛、
小田垣雄二、大森哲郎、市川淳二、山下　格
（北海道大学医学部・精神医学教室）

〔要約〕

ラット線条体において、in vivo microdialysisを用い、Methamphetamine(MAP)投与によるDopamine(DA)放出について検討した。MAP投与により、DA放出量は急激に増加し、投与量0.5-25mg/kgで明瞭な用量依存性を確認した。神経終末における小胞内DA貯蔵プールの枯渇剤であるReserpine前処置は、MAP投与によるDA放出量の増加に全く影響を与えなかった。一方、DA合成阻害剤であるα-Methyl-p-tyrosine(α-MPT)前処置は、MAP高用量(25mg/kg)、低用量(5mg/kg)のいずれにおいても、DA放出量の増加を完全に抑止した。MAP反復投与および生食反復投与の両群において、MAP(5mg/kg)投与時のDA放出に対するReserpineおよびα-MPT前処置の影響を検討すると、α-MPTは両群ともにDA放出量の増加を阻止したが、Reserpine前処置ではDA放出の増加が両群で認められ、MAP反復投与群のDA放出量の増加は、生食反復投与群と比較して、有意に上回っていた。

［はじめに］

覚せい剤精神病の成因、遷延化、再燃現象の神経化学的基盤について、近年、数多くの知見が集積され、MAP反復投与によって動物に生じる行動感作（あるいは逆耐性現象）を実験モデルとして、線条体DA系の感受性亢進が重要視されるようになった。われわれは、これまでに、in vivo microdialysisを用いて、MAP投与時の線条体細胞外DA量と常同行動を同時測定することにより、MAP反復投与による行動感作の成立に、線条体シナプス間隙DA放出量の増大が関与することを報告して来た(1、2、3)。今回、MAP投与による線条体DA放出が神経終末におけるどのDAプールに起源を有するかを明らかにする目的で、Reserpineおよびα-MPT前処置の影響を検討したので報告する。さらに、MAP反復投与によって出現するシナプス間隙DA放出量の増大に対して、これらの前処置が及ぼす影響についても検討を加えた。

［対象と方法］

実験には250-300gのWistar系雄性ラットを用いた。ネンブタール(40mg/kg) 麻酔下、脳固定装置を用いて線条体へU字型微小透析チューブ(Cordis Dow社製、ケン化セルロースエステル膜)を固定した。24時間後、無麻酔無拘束下、リンゲル液を2.5μl/minの流速で灌流した。灌流液は1-cysteine(0.02mg/ml)を含む0.2Nの過塩素酸50μlを入れておいた試験管に20分ごとに回収した。透析液のDA量は電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーによって測定した。DAは薬物投与前の基礎値（20分ごとの連続した3フラクションの平均値）に対する投与後の変化の割合で表示した。薬物投与法はすべて皮下投与によった。MAP反復投与は、1日1回、1回量2.5、5、7.5、10mg/kgと順次増量し、隔日でラットに皮下投与した。有意差の検定には、Wilksのラムダ統計量によるMANOVAを用いて多変量解析して行った。

［結果と考察］

（1）MAP投与による細胞外DA量の変化(Fig. 1)

MAP投与により、DA量は急激に増加し、投与量0.5-25mg/kgで明瞭な用量依存性を確認した。投与量10mg/kg以下では、投与40-60分で最頂値を示し、以後、基礎値に向かって減少した。MAP 25mg/kgの高用量では、最高値が80-100分で、180分後でも投与前値の約10倍の高値が持続した。これらの細胞外DA量の動態は、MAP投与によるDAの神経終末からシナプス間隙への放出の促進を反映するものと考えられる。

（2）MAP投与によるDA放出量の増加に及ぼすReserpine前処置の影響(Fig. 2)

MAP投与200分前にReserpine5mg/kgを前処置した際のDA放出の動態は、MAPの高用量(25mg/kg)、低用量(5mg/kg)のいずれにおいても、vehicle前処置群と有意差を示さなかった。このReserpine前処置で神経終末における小胞内DA貯蔵プールが枯渇することが知られていることから、MAP投与によって放出されるDAは神経終末貯蔵プールに由来するものではないと推定される。

（3）MAP投与によるDA放出量の増加に及ぼすα-MPT前処置の影響(Fig. 3)

DA合成阻害剤であるα-MPT250mg/kgの前処置は、MAP投与(5mg/kgおよび25mg/kg)によるDA放出量の増加をほぼ完全

に抑止した。したがって、MAP投与の際のDA放出の起源は新しく生合成されたDAプールにあると考えられる。

（4）MAP反復投与ラットにおけるReserpineおよびα-MPT前処置の影響(Fig. 4)

MAP反復投与終了7日後、MAP 5mg/kg投与によるDA放出量の増加に及ぼすReserpineおよびα-MPT前処置の影響を生食反復投与群と比較検討すると、α-MPTは両群ともにDA放出量の増加を阻止したが、Reserpine前処置ではDA放出の増加が両群で認められ、しかも、MAP反復投与群のDA放出量の増加は、生食反復投与群と比較して、有意に上回っていた($p<0.01$)。

以上の結果から、MAP投与による線条体におけるDA放出は、小胞内DA貯蔵プールに由来するものではなく、新しく生合成されたDAがただちに放出過程に動員されてくるものと考えられる。さらに、われわれが報告してきたMAP反復投与によるシナプス間隙DA放出量の増大の所見は、この新しく生合成されるDAプールの増大によるものと推定される。

[文献]

1) 市川淳二、小山　司、三国雅彦、山下　格（1986）神経化学、25、280-282

2) 市川淳二（1988）薬物・精神・行動、8、389-403

3) 小山　司、市川淳二、中山　誠、井上　猛、松原良次、小田垣雄二、山下　格(1988)精神神経誌、90、853-862

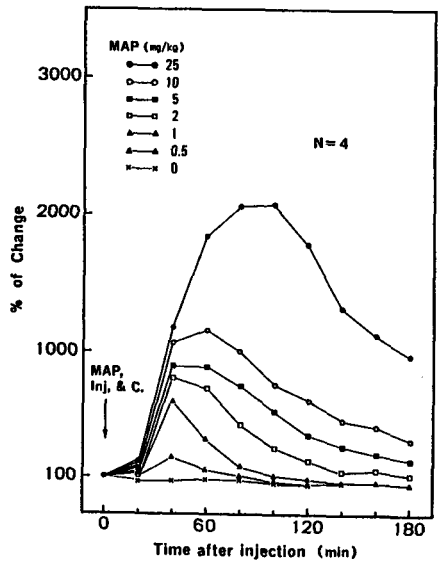



Fig. 1 Effect of MAP treatment on DA efflux in dialysates collected from rat striatum.

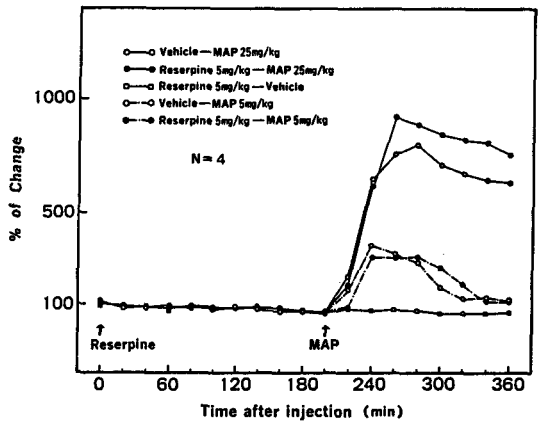



Fig. 2 Effect of reserpine pretreatment on MAP-induced alteration in DA efflux in dialysates collected from rat striatum.

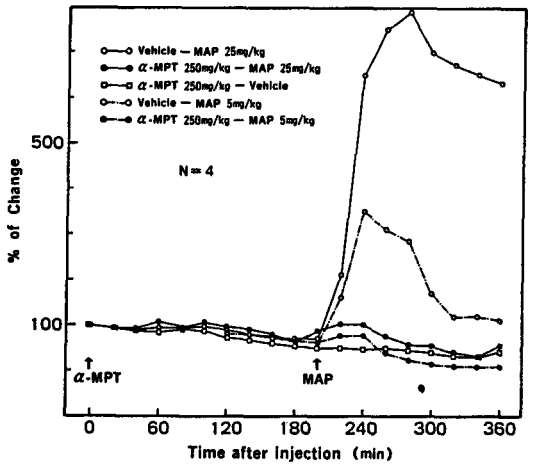



Fig. 3 Effect of α-MPT pretreatment of MAP-induced alteration in DA efflux in dialysates collected from rat striatum.

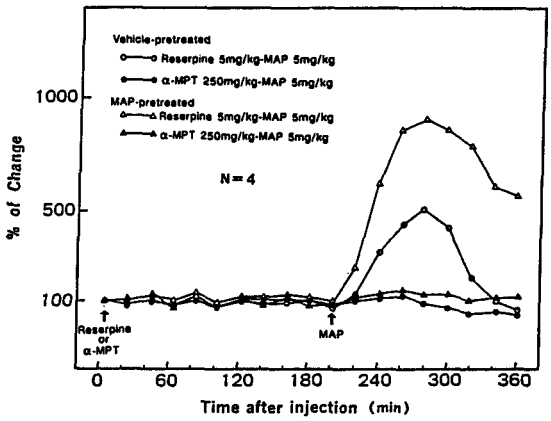



Fig. 4 Effect of reserpine or α-MPT treatment of MAP-induced alteration in DA efflux in dialysates collected from striatum of MAP-pretreated rat.

# 230 神経型日本人Ｇａｕｃｈｅｒ病の遺伝子解析

川目　裕、衛藤義勝
東京慈恵会医科大学小児科

〔要約〕
神経症状を伴う日本人 Gaucher病（Type2 3例、Type3 2例）5例に関して、PCR（Polymerase chain reaction）法を用い、β-glucocerebrosidase 遺伝子の触媒部位（catalytic site）(2) を含む 800bpを増幅、その塩基配列を検討した。その結果、Type2 1例とType3 1例に、S.Tujiらの報告した Leu→Pro(444)の点突然変異(6)をheteroallelicに認めた。そのほかの部分の塩基配列には異常を認めなかった。

〔目的〕
Gaucher 病はライソゾーム水解酵素の 1つであるβ-glucocerebrosidase の遺伝的欠損により、その基質であるglucocerebrosideの蓄積をきたす先天代謝異常症の 1つである。その臨床像からこのGaucher 病は 3つのサブタイプに分類されている。そのうち Type1は中枢神経症状を欠くが、Type2、Type3は中枢神経症状を伴うものである。現在のところ同一の酵素欠損でありながらなぜこれらの相違が生じるのか、そのメカニズムは解明されていない。しかし最近、S.Tujiらが、Type2、3あわせて16例中15例にみられ、Type1 では20例中4例にのみみられる点突然変異、Leu→Pro(444)を見いだしており、遺伝子上の変異と中枢神経症状の発現になんらかの相関のあることが考えられている。

そこで我々は、神経型日本人Gaucher 病 5例に関して 1)S.Tujiらの報告した神経型 Gaucher病に多くみられる変異の有無と、2)glucocerebrosidaseの触媒部位（catalytic site）における遺伝子異常の有無を、ゲノム DNAのエクソンＩＸよりエクソンＸＩ までの領域をPCR法にて増幅し塩基配列を決定し検討した。

〔方法〕
高分子 DNAは患者の白血球、および剖検で得られた肝臓、脾臓よりBellらの方法(1) にて抽出した。PCR 法は Saikiらの方法に従い、反応には Taq polymerase（Stratgene社）を用いた。オリゴヌクレチドプライマーは図 1に示すように20 merのプライマーをDNA Synthesizer Model 381A（ABI 社）にて作製した。β-glucocerebrosidase の偽遺伝子の増幅をさけるため、プライマー1を偽遺伝子上にて欠損のある領域に作製した(4)。塩基配列の決定は$^{32}$Pにてラベルした上記プライマーをもちいてDideoxy-termination 法にてR.Higuchiらの方法(3)に従って行った。反応にはSeaquanase（USB社）を使用した。

〔結果〕
5 例のエクソン部分の塩基配列を検討したところ、S.Tujiらの報告したLeu→Pro(444)の変異が 2 例（Type2 1例、Type3 1例）に heteroallelicにみられた。catalytic siteを含み他の部分の塩基配列は O'Neillらの報告(5) と一致し、変異はみられなかった。今回観察し得たsplicing

junctionに関しても異常はみられなかった。

〔考察〕

今回の我々の検討では、神経型 Gaucher病に特異的と考えられている突然変異Leu→Pro(444)は5 例中 2例にheteroallelic に認められ、homoallelic に認めるものはみられなかった。このことからこの変異がGaucher 病における神経症状の発現を単一に決定するものとは考えられなかった。S.Tujiらは、homoallelic にこの変異をもつ神経型のなかでもType2とType3と臨床型が異なるのは、この変異の他に転写、翻訳、プロセッシング、酵素の局在化などに関与する因子の存在を示唆しており、本検討からも推測された。一方、日本人のGaucher 病においてもこの変異が認められたことは、本疾患の原因であるかいなかは別としてこの変異が遺伝子上のホットスポットによるものであることも推測される。

今後、我々は変異の認められた家系の遺伝子分析とさらに詳細な日本人各臨床タイプの遺伝子解析が必要であると思われる。

〔文献〕


1. Bell,G.I., Karam,J.H., and Rutter, W.J. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 5759-5763
2. Dinur,T., Osiecki,K.M., Legler,G., Gatt,S., Desnick,R.J., and Garabowski,G.A. (1986) Proc, Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 1660-1664
3. Higuchi,R., Beroldingen,C.H., Sensabaugh,G.F., and Erlich,H.A. (1988) Nature 332, 543-546
4. Horowitz,M., Wilder,S., Horowitz,Z., Reiner,O., Gelbart,T., and Beutler,E. (1989) Genomics 4, 87-96
5. O'Neill,R.R., Tokoro,T., Kozak,C.A., and Brady,R.O. in press
6. Tuji,S., Choudary,P.V., Martin,B.M., Stubblefield,B.K., Mayor,J.A., Barranger,J.A., and Ginns,E.I. (1987) N. Engl. J. Med. 316, 570-575

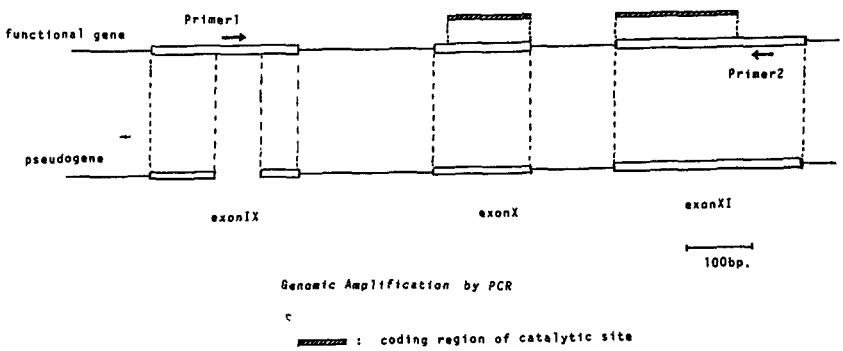




図 1

# 231 Twitcherマウスにおけるミエリン塩基性蛋白のposttranslation modification

由村健夫，　小林卓郎，　後藤幾生
（九州大　医　脳研　神経内科）

〔要約〕

Twitcher マウス (Twi)の脱髄機序を解明するため、ミエリンの主要な蛋白であるミエリン塩基性蛋白（MBP ）のposttranslation modificationを脳ー脊髄で調べた。 Brain slice を[$^3$H]methionine とともにincubationすると、MBP のメチル化に Twiと正常との間には差がなく、メチル化に必要な ATP は十分供給されていると考えられた。ミエリンにおける MBPのリン酸化は、 $Ca^{2+}$ で活性が増加し、$Ca^{2+}$ + phosphatidylserine (PS)ではそれ以上の増加は見られなかったが、ミエリンを部分脱脂すると $Ca^{2+}$ + PS でさらに増加があり、これは galactosylsphingosine (psychosine, Psy) によって抑制されたことから、MBP のリン酸化は一部はミエリンに内在する protein kinase C によると考えられた。しかしリン酸化の程度に正常とTwi とのあいだに差がなく、Twi の組織内の異常蓄積物質による protein kinase に対する抑制は in vivo では見られないと判断された。

Twi はヒトの遺伝性脱髄性疾患である Krabbe 病のモデルであり、galactosylceramidase I の活性低下により全身臓器に Psy が蓄積するのを特徴とする（１）。Psy は in vitro でミトコンドリアの cytochrome c oxidase を抑制し（２）、また protein kinase C の強力な inhibitor であることが知られている（３）。我々は Twi においてミエリンのもう一つの主要な蛋白である proteolipid protein のアシル化が低下していることを報告したが（４）、今回 MBPのメチル化とリン酸化を調べることによりTwi の脱髄機序を検討した。Methionine をメチル化の donor とする場合、methionine は ATPにより S-adenosylmethionine に活性化される必要があり、その程度は細胞内エネルギー状態を反映するものと考えられる。MBP のリン酸化はミエリンに内在するprotein kinase よると考えられており、Twi で低下している可能性がある。

［方法］

１．Twi のコロニーは我々の実験室で維持されており、normal, carrier, twitcher の区別は尾の galactosylceramidase活性を調べることにより決定した（５）。使用したのは生後２５日のマウスである。

２．MBP のメチル化はマウスの脳幹ー脊髄の slice を [$^3$H]methionine とともに95 % $O_2$、5 % $CO_2$ の存在下で３時間 incubation することにより行なった。その後、脳幹ー脊髄よりミエリンを取り出し MBP を抽出し、加水分解後 Dowex 50W-X2 のイオン交換により塩基性アミノ酸(arginine)を分離し、結合した放射活性を測定した。

３．MBP のリン酸化はマウス脳幹ー脊髄よりミエリンを取り出し、40 μM EGTA, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$ の存在下に[$^{32}$P]ATP とともに incubation した。Protein kinase C の活性化のためには 100 ug/ml の PS を加えた。SDS-PAGE後 MBP のバンドを切り出して放射活性をカウントするか、autoradiogram を作製した。一部の実験では新鮮なミエリンを ether-ethanol(3:2) で部分脱脂したミエリンを用いた。

［結果］

１．Brain slice 実験における MBP の arginine residue のメチル化は正常マウスに対してTwi では 95 % と大きな低下はなかった（表１）。すなわち methionine の ATPによる S-adenosylmethionine への活性化も、S-adeno-

sylmethionine を MBP へ transfer する活性(methyltransferase) にも差がないことが分かった。また MBP の methionine residue の放射活性も正常に対して 102 % と低下していなかったことから、MBP のpeptide backbone の合成もミエリンへの輸送も障害のないことが示唆された。

2．ミエリンの kinase による MBP のリン酸化は $Ca^{2+}$ の存在によって 150-160 % に活性が増加したが、PS をさらに加えても増強されなかった（表2）。部分脱脂したミエリンを用いると、$Ca^{2+}$の存在で 160 %、$Ca^{2+}$ + PS の存在で 260 % までリン酸化は増加し、さらにそれに Psy 2 μM、200 μM を加えると 260 % からそれぞれ 172 %、67 %に低下したことから、MBP のリン酸化の少なくとも一部は protein kinase C が関与していることが示された。MBP のリン酸化を正常と Twi マウスで比較すると、通常のミエリンで $Ca^{2+}$ 存在下で差がなく、脱脂したミエリンでも $Ca^{2+}$ + PS の存在下で差がなかった（図2）。

〔考案〕MBP のメチル化で見る限り in vitro で見られる Psy のミトコンドリア酵素抑制の影響は見られず、ミエリンのエネルギー代謝には障害を与えていないと判断された。Twi ではミエリンにも Psy が蓄積しているが（4）、MBP のリン酸化には低下はなかった。これは MBP のリン酸化が主として protein kinase C 以外の kinase によっているためか、Psy の protein kinase C に対する抑制効果がミエリンに大量に存在するリン脂質によって相殺されているためと考えられる。

（表1）Incorporation of [$^3$H] methionine in brain slice

| | Methyl-arginine | Methionine |
|---|---|---|
| | dpm/mg MBP | |
| Normal | 10183 (100 %) | 9930 (100 %) |
| Twitcher | 9680 (95) | 10175 (102) |

average of two experiments

（表2）Effects of various reagents on endogenous phosphorylation of MBP in normal fresh myelin

| Effectors | $^{32}$P incorporation |
|---|---|
| | 100 % |
| EGTA | |
| EGTA + $CaCl_2$ | 153 ± 6.2 |
| EGTA + $CaCl_2$ + PS | 152 ± 8.9 |

EGTA 40 μM, $CaCl_2$ 1 mM, PS 100 μg/ml
average of three experiments ± S.D.

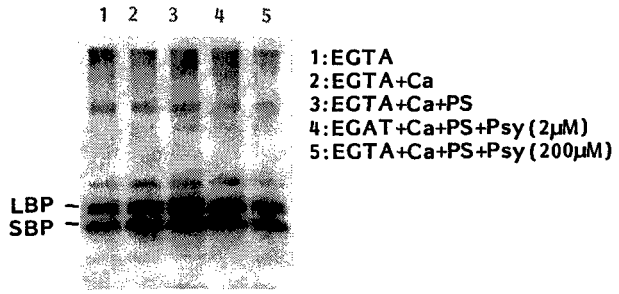



Fig. 1 Effect of various reagents on phosphorylation of MBP in delipidated myelin from normal mouse

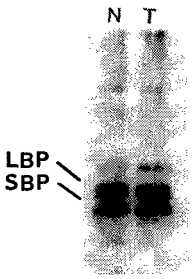



Fig. 2 Phosphorylation of MBP of normal(N) and twitcher(T) in delipidated myelin

1. Kobayashi, T. et al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 144, 41-46
2. Igisu, H. and Nakamura, M. (1986) Biochem. Biophys. Res. commun. 137, 323-327
3. Hannun, Y. A. and Bell, R. M. (1987) Science 235, 670-674
4. Yoshimura, T. et al. (1989) J. Neurochem. 52, 836-841
5. Kobayashi, T. et al. (1982) Biochem. Med. 27, 8-14

# 232 感情調整作用を持つ薬物の慢性投与後のラット脳内サブスタンスP含量に及ぼす影響

三ツ汐洋，高嶋瑞夫，高橋清久
（国立精神・神経センター　疾病研究第三部）

〔要約〕バルプロ酸とクロナゼパムを40日間ラットに経口投与して脳内のサブスタンスP（SP）とGABAの変化を検討した。バルプロ酸ではリチウムやカルバマゼピンと同様に黒質および線条体でSPが用量依存性に増加していたが、GABAには変化はみられなかった。一方クロナゼパムでは黒質のSPは減少し、GABAには変化はみられなかった。これらの結果は、バルプロ酸もクロナゼパムも共に抗躁および躁うつ病相予防効果があるといわれている薬物であるが、SPへの作用という点からみると、バルプロ酸はリチウム・カルバマゼピンと共通の作用を持ち、一方クロナゼパムはむしろ抗精神病薬や抗うつ薬の効果と同様の作用を持つことが分かった。

【はじめに】　リチウムとカルバマゼピンは共に抗躁作用および躁うつ病相の発現に対して予防的効果をもつ薬物として知られており、臨床で用いられて効果をあげてきている。これらの薬物の作用機序はまだ十分解明されていないが、共通した神経化学的な作用として、これまでにわれわれは慢性投与時にSPがドーパミン関連領域で増加し、同時にGABAも増加するが、ドーパミンの代謝は変化しないことを報告してきた[6]。最近では元来抗てんかん薬として知られているバルプロ酸や、クロナゼパムにもリチウムやカルバマゼピンと同様の抗躁および病相予防効果があることが報告されてきている[2)4)1)]ので、今回我々はバルプロ酸およびクロナゼパムの慢性投与がSPとGABA含量に及ぼす影響ついて検討した。

表1．　バルプロ酸経口40日間投与の体重、飼料摂取量、薬物摂取量、および血液中濃度。

| | N | DOSE | BODY WEIGHT | | FOOD INTAKE | DRUG INTAKE | PLASMA CONC.[a] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | starting | final | | | |
| | | (g/kg food) | mean ± SE(g) | mean ± SE(g) | (g/kg/day) | (mg/kg/day) | mean ± SE(μg/ml) |
| Control | 11 | —— | 214 ± 2.6 | 288 ± 4.5 | 57.1 | —— | —————— |
| VPA 2.5 | 9 | 2.5 | 214 ± 1.7 | 280 ± 3.5 | 52.0 | 130 | 10.5 ± 0.43 |
| VPA 5.0 | 9 | 5.0 | 217 ± 1.7 | 279 ± 1.3 | 55.3 | 277 | 23.5 ± 0.76 |
| VPA 10 | 9 | 10.0 | 216 ± 1.2 | 260 ± 4.7** | 53.9 | 539 | 55.3 ± 3.23 |

**: $p < 0.01$ vs. Control by Dunnett,s test.
a: measured by EMIT .

表2．　クロナゼパム経口40日間投与の体重、飼料摂取量、薬物摂取量。

| | N | DOSE | BODY WEIGHT | | FOOD INTAKE | DRUG INTAKE |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | starting | final | | |
| | | (mg/kg food) | mean ± SE(g) | mean ± SE(g) | (g/kg/day) | (mg/kg/day) |
| Control | 9 | — | 242 ± 2.3 | 393 ± 5.4 | 68.4 | —— |
| CLO 20 | 9 | 20 | 243 ± 3.3 | 388 ± 6.1 | 62.9 | 1.26 |
| CLO 40 | 9 | 40 | 242 ± 2.4 | 395 ± 8.5 | 57.5 | 2.30 |
| CLO 80 | 9 | 80 | 238 ± 2.9 | 392 ± 5.4 | 59.3 | 4.74 |

【方法】 バルプロ酸ではＷｉｓｔａｒ系雄性ラット（成長の遅いもの）を用い、クロナゼパムではＷｉｓｔａｒ ＳＴラット（成長の速いもの）を用いた。バルプロ酸ナトリウムおよびクロナゼパムは飼料１ｋｇ中にそれぞれ2.5，5.0，10ｇおよび 20，40，80 ｍｇを混入したものを４０日間自由に摂取させて投与した。対照群には標準飼料を投与した。実験開始時体重、最終体重、１日当りの飼料摂取量および薬物摂取量は、表１、２に示した通りである。ラットは４０日目の午前９時から１０時の間に断頭し、体幹から採血を行った。頭部は直ちに砕氷中に埋めて冷却し、１時間以内に脳を取り出して－８０℃で凍結保存した。既報[6]にしたがって、線条体、黒質、縫線核を凍結切片から切り出し、ＳＰはＲＩＡで、ＧＡＢＡは酵素蛍光法で測定した。バルプロ酸の血液中の濃度はＥＭＩＴ$^{R}$を用いて測定した。

【結果】 バルプロ酸の４０日間経口慢性投与で、飼料摂取量には差はみられなかったが、10ｇ群で有意の体重減少がみられた。薬物摂取量及び血液中濃度は投与量に比例して増加していた。血液中のバルプロ酸濃度は、10ｇ群でも55.3μｇ／ｍｌであり、臨床的に有効とされる血液中濃度(50-100μｇ／ｍｌ)以下であった。ＳＰは黒質及び線条体で用量依存性に増加しており（図１）、縫線核では変化はみられなかった。黒質のＧＡＢＡ含量は変化がみられなかった（図１）。クロナゼパムの４０日間経口慢性投与で飼料摂取量にはやや減少がみられたが、体重は対照群との間で差はみられなかった。ＳＰは黒質において用量依存性の減少がみられた（図２）。線条体および縫線核では変化はみられなかった。黒質のＧＡＢＡ含量は変化はみられなかった（図２）。

図１． バルプロ酸経口４０日間投与時の黒質のサブスタンスＰおよびＧＡＢＡ含量の変化。

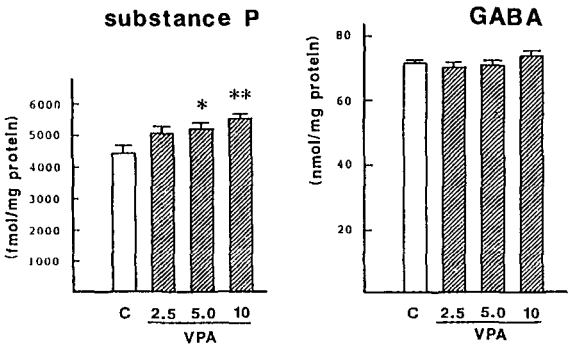
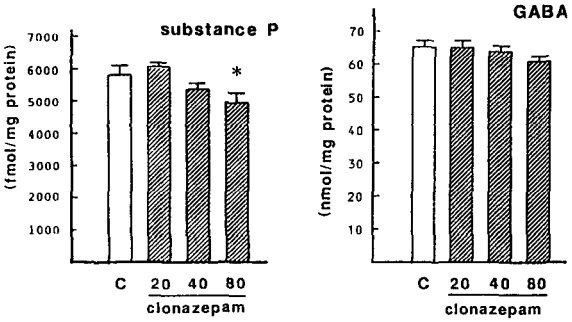



図２． クロナゼパム経口４０日間投与時の黒質のサブスタンスＰおよびＧＡＢＡ含量の変化。




*: P<0.05, **:P<0.01

【考察】 リチウムやカルバマゼピンと同様にバルプロ酸でも慢性投与後にＳＰの増加がドーパミン関連領域で起こることが分かった。バルプロ酸の急性投与で増加することが知られているＧＡＢＡ[3]は、増加がみられなかったが、血液中濃度が治療域下限であったため十分な効果が得られなかった可能性と、ＳＰとドーパミンとが変化していてＧＡＢＡには変化がみられなかった可能性とが考えられる。線条体のドーパミンを測定することによっていずれであるか明らかになると考えられる。これまでベンゾジアゼピン系薬物のＳＰに対する効果の報告はなかったが、クロナゼパムではＳＰは減少することが分かった。ＳＰへの作用からみると、クロナゼパムはリチウム・カルバマゼピン・バルプロ酸とは作用機序が異なっているようであり（図５）、むしろ慢性投与でＳＰを減少させる作用を持つ抗精神病薬や抗うつ薬[5]に似ていると考えられる。

表３． 抗躁および躁うつ病相予防効果を持つ薬物の慢性投与のサブスタンスＰ、ＧＡＢＡ、ドーパミンに及ぼす影響。

| | Li | CBZ | VPA | CZP |
|---|---|---|---|---|
| ＳＰ （黒質） | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ |
| ＧＡＢＡ（黒質） | ↑ | ↑ | → | → |
| ＤＡ代謝（黒質） | → | → | ? | ? |

【文献】 1) Chouinard,G.: J. Clin. Psychiatry, 48 (1987)10(suppl)29-36. 2) Emrich, H. M. et al.: Archiv. Psychiat. Nervenkr., 229(1980)1-16. 3) Johnston, D.: Epilepsia, 25(supple 1)(1984)s1-s4. 4) Mcelroy, S. L. et al.: J. Clinic. Psychopharmacol., 7(1987)16-24. 5) 三ツ汐洋，他: 薬物・精神・行動，6(1986)79-80. 6) Mitsushio, H. et al.: J. Pharmacol. Exp. Ther., 245(1988)982-989.

# 233 脊髄小脳変性症剖検脳の小脳における セカンドメッセンジャー系の変化

小牟禮 修*・**，北村 登*，橋本健志*，西野直樹*，久野貞子**，田中千賀子*
神戸大・医・薬理，**国療宇多野病院・神経内科

〔要約〕 脊髄小脳変性症剖検脳の小脳皮質および歯状核におけるセカンドメッセンジャー系の変化について検討した。1)$^{3}$H-forskolin結合量は小脳皮質でのみ有意な低下を認め、主として顆粒細胞の変性脱落を示唆する所見と思われた。2)$^{3}$H-phorbol 12,13-dibutyrate($^{3}$H-PDBu)結合量および$^{3}$H-inositol 1,4,5-trisphosphate($^{3}$H-IP$_3$)結合量は小脳皮質および歯状核において有意な低下を認め、主としてプルキンエ細胞の変性脱落を示すものと思われた。両領域において、PDBuおよびIP$_3$結合量とGABA濃度との間ならびにPDBu結合量とIP$_3$結合量との間には強い正の相関が認められた。以上の結果から、小脳の神経回路においてGABAニューロンにはイノシトールリン脂質系が、顆粒細胞(グルタメイト性)にはcAMP系がそれぞれ局在し、小脳の神経活動の制御に関与していることが考えられた。

ホルモンや神経伝達物質などの細胞外情報は、主にアデニレートシクラーゼ(AC)を活性化させcAMPを生成する系と、フォスファチジルイノシトール4,5-二リン酸の加水分解により、ジアシルグリセロール(DG)とイノシトール1,4,5-三リン酸(IP$_3$)を生成する系によって細胞内に伝達されることがほぼ確立されてきた。Forskolinは、ACを選択的に賦活し、促進性GTP結合蛋白質(Gs)とACとの複合体に対して高い親和性を持っている(7)。DGの標的はプロテインキナーゼC(PKC)であり、ホルボールエステル(PDBu)により標識することができ(3)、IP$_3$は細胞内$Ca^{2+}$貯蔵部位に作用する(1)。ラット脳におけるautoradiographyでは、$^{3}$H-forskolin, $^{3}$H-PDBuならびに$^{3}$H-IP$_3$結合はいずれも小脳に高濃度に存在しており、プルキンエ細胞の脱落したミュータントマウス(Nervous)ではPDBuおよびIP$_3$結合の著明な減少が、顆粒細胞の脱落したミュータントマウス(Weaver)ではforskolin結合の著明な減少が報告されている(6,7,8)。

脊髄小脳変性症(SCD)は小脳失調を主徴とし、病理組織学的にはオリーブ橋小脳系に病変を認め、小脳ではプルキンエ細胞の脱落が一義的であるとされている。今回私達は、SCD剖検脳を用いて、小脳皮質および歯状核におけるセカンドメッセンジャー系の変化について検討し、プルキンエ細胞密度および神経伝達物質(GABA, グルタミン酸)との相関についても検討をした。

【方法】対象：臨床病理学的に確定診断の得られたSCD 11例と、死亡時年齢，死後剖検までの時間を対応させた正常対照14例よりなる。プルキンエ細胞密度：プルキンエ細胞層1mm当りの核を有するプルキンエ細胞体を数えた。GABA, グルタミン酸(Glu.)濃度：高速アミノ酸分析計にて測定した。$^{3}$H-forskolin結合実験：Seamonらの方法(5)に従い減圧下吸引濾過法にて行った。$^{3}$H-PDBu結合実験：Nishinoらの方法(2)に従いポリエチレンイミン前処置ガラスフィルターを用いた減圧下吸引濾過法にて行った。$^{3}$H-IP$_3$結合実験：Youngらの方法(9)に従い減圧下吸引濾過法にて行った。

【結果】1)SCDでは、小脳皮質においてプルキンエ細胞密度、GABAおよびGlu.濃度、forskolin、PDBuならびにIP$_3$結合量の有意な低下を認めた。歯状核ではGABA濃度、PDBuおよびIP$_3$結合量の有意な低下を認めたが、Glu.濃度，forskolin結合量は変化を認めなかった(Table 1)。2)PDBuおよびIP$_3$結合量の減少は歯状核においてより高度であり、プルキンエ細胞密度との間にも有意な正の相関(ともにr=0.83)を認めた。3)両領域において、PDBuおよびIP$_3$結合量とGABA濃度との間には強い正の相関(小脳皮質：r=0.87,0.90、歯状核：r=0.78,0.84)が認められたが、Glu.濃度との間には有意な相関はみられなかった。Forskolin結合量はGABA,Glu.濃度のいずれとも有意な相関は認めなかった。4)両領域において、PDBu結合量とIP$_3$結合量との

間には強い正の相関(小脳皮質:r=0.80、歯状核:r=0.90)が認められたが、forskolin結合量はPDBu, $IP_3$結合量のいずれとも有意な相関を認めなかった。

**Table 1. Purkinje Cell Density, GABA and Glutamate Levels, $^3$H-Forskolin, $^3$H-PDBu and $^3$H-$IP_3$ Bindings in Controls and Patients with Spinocerebellar Degeneration (SCD)**

| | Purkinje cells (/mm) | GABA (mM) | Glutamate (mM) | Forskolin binding (fmol/mg prot.) | PDBu binding (pmol/mg prot.) | $IP_3$ binding (fmol/mg prot.) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cerebellar cortex | | | | | | |
| Control | 6.67±0.32 | 1.81±0.13 | 8.50±0.38 | 29.33±3.24 | 6.30±0.76 | 377±35 |
| SCD | 1.88±0.24 | 1.14±0.10 | 5.21±0.23 | 18.81±1.67 | 3.27±0.38 | 195±31 |
| Difference(%) | -72*** | -37** | -39*** | -36* | -48** | -48** |
| Dentate nucleus | | | | | | |
| Control | | 4.29±0.21 | 4.41±0.36 | 12.05±0.74 | 4.92±0.68 | 529±72 |
| SCD | | 2.08±0.38 | 4.19±0.31 | 10.59±1.10 | 1.78±0.29 | 148±34 |
| Difference(%) | | -52*** | NS | NS | -64*** | -72*** |

Values were expressed as mean ± SEM. NS = no significant difference.
Statistical significance was assessed with Student's t test: * P<0.01 ; ** P<0.005 ; *** P<0.001.

【考察】ラット小脳において、$^3$H-forskolin結合は顆粒細胞の平行線維に局在している(7)。顆粒細胞はGlu.を神経伝達物質とするとされている。SCDでは小脳皮質においてのみforskolin結合量およびGlu.濃度の有意な低下がみられたが、これは顆粒細胞の変性脱落を示唆する所見と考えられる。

PKCには現在では少なくとも7種の分子種が存在する。ラット小脳皮質ではγ-PKCがプルキンエ細胞に、βIが顆粒細胞層に、βIIが分子層に局在しており、γ-PKCが最も高濃度に存在するとされている(4)。深部小脳核(歯状核)ではプルキンエ細胞の神経終末にγ-PKCが存在することが知られている(4)。一方$IP_3$受容体はプルキンエ細胞にほぼ選択的に存在すると考えられている(8)。SCD小脳におけるPDBuおよび$IP_3$結合量の減少は主としてプルキンエ細胞の変性脱落を反映しているものと思われる。しかし、小脳皮質における両結合量の減少は歯状核ほど高度ではなく、また小脳皮質における両結合量とプルキンエ細胞密度との間には歯状核で認められた様な有意な正の相関はみられなかった。このことは、ヒト小脳において、PKCについてはラット小脳と同様の多様性および局在性が存在することを示唆しているが、$IP_3$結合部位についてはラットとは異なり必ずしもプルキンエ細胞にのみ局在するものではない可能性を示唆している。歯状核における高濃度の$IP_3$結合部位は、プルキンエ細胞密度との間に強い正の相関を認めたことより、プルキンエ細胞の神経終末が主たる結合部位と考えられる。小脳皮質、歯状核の両領域において、PDBu結合量, $IP_3$結合量, GABA濃度の3者の間には各々強い正の相関が認められた。このことより、小脳GABAニューロンにはPKCおよび$IP_3$結合部位が高濃度に共存し、イノシトールリン脂質系メッセンジャーにより神経活動が共働的に制御されているものと思われる。

病理学的検索に御協力頂いた滋賀医大病理2：河合　潤・笹原正清先生，挟間章忠教授に深謝致します。

【文献】

1) Berridge M. J. and Irvine R.F.(1984) Nature 312, 315-321.
2) Nishino N. et al.(1989) J. Mol. Neurosci. 1, 19-26.
3) Nishizuka Y.(1984) Nature 308, 693-698.
4) Nishizuka Y.(1988) Nature 334, 661-665.
5) Seamon K. B. et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5081-5085.
6) Worley P.F., Baraban J.M. and Snyder S.H.(1986) J. Neurosci. 6, 199-207.
7) Worley P.F. et al.(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4053-4057.
8) Worley P.F., Baraban J.M. and Snyder S.H.(1989) J. Neurosci. 9, 339-346.
9) Young L.T. et al.(1988) Neurosci. Lett. 87, 283-287.

# 234 Zotepineの神経薬理学的研究
## ―ヒト死後脳$D_2$および5-$HT_2$受容体に対する高親和性―

神庭重信，八木剛平，中木敏夫*，鈴木恵子，小口江美子，加藤隆一*
（慶應大学医学部精神神経科学教室，薬理学教室*）

〔要約〕

Zotepineは，少数例のオープン試験ではあるがいくつかの報告で比較的特異的な抗そう作用を持つと示唆されている興味深い抗精神病薬である。今までにも，数多くの神経薬理学的研究が報告されており，他の抗精神病薬と明確に区別されうる特徴として，ラット脳ホモジネイトにおいて，5-$HT_{1B}$受容体に対し強い阻害作用を持つことが示唆されている。ところがヒト脳では，5-$HT_{1B}$は存在しないとされており，抗そう作用の機序はいまだ明らかではない。

そこで我々は，正常ヒト死後脳を用いて，各種受容体に対する親和性（平衡解離定数，KDs）を系統的に求め，従来の抗精神病薬との比較検討を行うことにした。今回，$D_2$，$D_1$受容体，DA取り込み部位，5-$HT_{1A}$，5-$HT_2$受容体に対するKDsを求めた結果，それぞれの受容体に対するKDsは，7.8nM，29nM，840nM，260nM，2.3nMであり，$D_2$および5-$HT_2$受容体に最も強い親和性を持つことが判明した。この性質は錐体外路系副作用を起こさないとされ，最近注目されている抗精神病薬risperidoneの持つ性質に類似しており興味深い。また，Hill定数はいずれの受容体に対してもおよそ1であった。

Zotepine（ZTP）はthiepin骨格を有する抗精神病薬であり，臨床的に著明な抗そうおよび鎮静作用を持つことが知られている。抗そう効果についてはいくつかの少数例オープン研究ではあるが，その有効性を示唆する結果も得られている[2,5]。これまでにも，この特徴的な作用についての神経薬理学的研究も多く報告されている。Shimomura[7]，原田ら[1]，山脇ら[9]はラットを用いた受容体結合実験あるいは行動薬理学的研究から，ZTPが5-$HT_1$および5-$HT_2$受容体阻害作用を持つことを報告している。原田らはZTPの5-$HT_1$受容体阻害作用，特に5-$HT_{1B}$受容体阻害作用が抗そう作用との関連性を指摘しており，また，山脇らは，ZTPの慢性投与後に5-$HT_2$受容体の機能低下がみられることから，抗そう作用と5-$HT_2$受容体機能の役割を重視しているなどいまだその作用機序に関しては議論が多い。ところが，ヒト脳では5-$HT_{1B}$受容体の存在は確認されておらず[3]，5-$HT_{1B}$受容体阻害効果を直ちに抗そう作用と結び付けるわけにはいかない。また，ZTPには急性投与時にも著明な鎮静，抗そう作用がみられることから，急性期薬理作用をさらに明らかにする必要がある。

そこでわれわれは，正常ヒト死後脳を用いて中枢神経各種受容体に対するZTPの持つ親和性を系統的にスクリーニングすることにした。今回は，$D_2$，$D_1$，DA取り込み部位，5-$HT_{1A}$，5-$HT_2$の受容体に対する平衡解離定数を求め，従来の抗精神病薬との比較検討を行った。

〔方法〕

ヒト脳組織はMayo Clinic，Psychopharmacology Laboratory（Richelson，E.）より入手した。その詳細については文献[4,6]を参照されたい。ホモジネイト調製法を簡潔に述べると，可能なかぎり白質を取り除き，Brinkmann Polytronを用いて，10倍量（v/v）の50mM Tris buffer（pH7.4）でホモジナイズし，35,000g 20分間遠心を2回繰り返した。得られたペレットは1mM EDTAを含む50mM Tris bufferを用いて，最終濃度を10mg wet weight/mlとした。受容体結合実験法の詳細については文献[6]を参照されたい。簡潔に述べると，表1にあるように各種受容体に選択的放射性リガンドをヒト脳組織ホモジネイト，ZTP（あるいは非特異性結合を決定するための高濃度の受容体親和性物質）と表に示した条件下でインキュベイトし，Whatman GF/B filterを通し吸引ろ過した。その後直ちに15mlの氷冷bufferで洗浄し，シンチレーションカウンターにてフィルターの放射活性を測定した。

〔結果〕

表1に示したように，ZTPの$D_2$，$D_1$，DA取り込み部位，5-$HT_{1A}$，5-$HT_2$受容体に対するKDsは，それぞれ7.8nM，29nM，840nM，260nM，2.3nMであった。また，それぞれの受容体に対する結合のHill定数は1に近く，結合部位が単一であることを示唆している。興味深いことに，ZTPは5-$HT_2$受容体および$D_2$受容体に対して最も強い親和性を持っていることがわかった。

Table 1. Kds of zotepine for various central receptors of human brain

| Receptors | Ligand | Tissue | Incubation total volume | Buffer | Zotepine Kd (nM) | Zotepine Hill coefficient |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $D_1$ | [3H] SCH23390 | caudate N. 2.5 mg/tube | 37℃, 30' 1 ml | Tris (50 mM, pH 7.4) | 29 | 0.82 |
| $D_2$ | [3H] spiperone | caudate N. 2.5 mg/tube | 37℃, 60' 1 ml | 〃 | 7.8 | 0.92 |
| DA uptake | [3H] mazindol | caudate N. 3.5 mg/tube | 0℃, 60' 1 ml | 〃 | 840 | 1.1 |
| 5-$HT_{1A}$ | [3H] 8-OH-DPAT | frontal C. 5-7.5 mg/tube | 25℃, 30' 1 ml | Tris (50 mM, pH 7.4 1 % ascorbic acid) | 260 | 1.3 |
| 5-$HT_2$ | [3H] ketanserin | frontal C. 5 mg/tube | 37℃, 60' 1 ml | Tris (50 mM, pH 7.4) | 2.3 | 1.3 |

(mean of 2-3 experiments)

## 〔考察〕

今回の結果は，ZTPが正常ヒト脳ホモジネイトにおいて，$D_2$受容体及び5-$HT_2$受容体に強い阻害作用(KDs=7.8nM, 2.3nM)を有することが明らかにされた。ヒト脳ホモジネイトでの従来の研究で，haloperidolの持つ抗$D_2$および抗5-$HT_2$作用は4nM，36nMであり，chlorpromazineでは，それぞれ20nM，1.4nMと報告されている[6,8]。したがって，ZTPは抗$D_2$作用においてhaloperidolよりやや弱いが匹敵し，また抗5-$HT_2$作用においてchlorpromazineと同等である。

近年ベルギーのJanssen社で合成され，錐体外路症状(EPS)を起こしにくく，EPS-free maintenance therapyの面から特に注目されているrisperidoneの持つ性質に類似しており実に興味深い。Risperidoneは抗$D_2$，5-$HT_2$受容体阻害効力($IC_{50}$)が，それぞれ8nMおよび9nMと強いことが報告されている[10]。さらに，ZTPも錐体外路症状が出にくいと報告されており，5-$HT_2$受容体に対する強い阻害作用が錐体外路症状の予防と関連している可能性を支持する。また逆に，ZTPの持つ強い鎮静作用を5-$HT_2$受容体阻害に求められるかどうかは，ritanserinに同様の鎮静，抗そう作用があるかどうかを調べることで明らかにされるであろう。ほかにも，haloperidolに匹敵する抗$D_2$作用を持ちながら，錐体外路系副作用を起こしにくいため十分な量(haloperidolの約10倍)を投与できるため著明な抗そう作用を発揮するとも考えられる。さらに鎮静作用と関連する強い抗ヒスタミン$H_1$，抗NA作用を持っている可能性もあり，今後これらの受容体についての阻害効力を求めていく予定である。

稿を終えるにあたり，ホモジネイトを分けていただいたMayo ClinicのRichelson教授に感謝します。なお，この研究の一部は青梅慶友病院(大塚宣夫 院長)，井之頭病院(斎藤昌治 院長)の研究費によった。

## 文 献

1. Harada, T., Sato, M., and Otsuki, S. (1985) Folia Psychiatr. Neurol. Jpn. 39, 551-558.
2. Harada, T. and Otsuki, S. (1986) Clin. Ther. 8, 406-414.
3. Hoyer, D., Waeber, C., Pazos, A., Probst, A., and Palacios, J.M. (1988) Neurosci. Lett. 85, 357-362.
4. Kanba, K. S., Kanba, S., Nelson, A., Okazaki, H., and Richelson, E. (1988) J. Neurochem. 50, 131-137.
5. 西園昌久，福井 敏 (1983) 精神医学 25, 295-309.
6. Richelson, E. and Nelson, A. (1984) Eur. J. Pharmacol. 103, 197-204.
7. Shimomura, K., Satoh, H., Hirai, O., Mori, J., Tomoi, M., Terai, T., Katsuki, S., Motoyama, Y., Ono, T. (1982) Jpn. J. Pharmacol. 32, 405-412, 1982.
8. Wander, T. J., Nelson, A., Okazaki, H., and Richelson, E. (1987) Eur. J. Pharmacol. 143, 279-282.
9. Yamawaki, S. (1987) Pharmacopsychiatry. 20, 4-7.
10. Janssen Reseach Products Information Service, N54952.

# 235 脳内微小血管アセチルコリンエステラーゼのアルツハイマー病における変化

辻　輝之　中野　智　三森　康世　中村　重信
京都大学医学部神経内科

〔要約〕

ヒト剖検脳から分離した微小血管で高い活性を示したacetylcholinesterase (AChE)についてそのAlzheimer型痴呆(ATD)での変化を検討した。AChE活性は脳実質ではATD群では有意に低下するのに対し、分離血管ではATD群に有意の高値を示した。血管にみられるAChEは高分子量のものが中心で、collagenaseによってG4型に解離したが、ATD群ではcollagenaseの効果は十分ではなかった。脳実質に比べると血管ではasymmetric form(A型)やnon-extractableなAChEの比率が高く、血管のA型AChEはATD群で正常対照群に比べ有意に増加していた。しかし中心をなすのはglobular form(G型)であり血管基底膜で重合したG型が含まれていると考えられた。以上よりATDでは脳実質のAChEは減少するのに対し血管では蓄積される傾向にあり、その原因としてATDでのA型の増加あるいは血管基底膜での蛋白代謝の変化の可能性が考えられる。

【目的】

ヒト剖検脳より分離した微小血管のacetylcholinesterase(AChE)の比活性は脳実質に比べ高値であることは既に報告した(3)。AChEは血管壁の支配神経終末に由来するものは少なく、神経細胞から間質へ分泌されたいわゆる分泌型AChEが血管基底膜に蓄積したものと考えられる(4)。ATDの血管変化として、アミロイドの蓄積と血管基底膜の肥厚が知られており、蛋白分解酵素活性の変化が関与している可能性も考えられている。今回は脳内血管のAChE活性とmolecular formについてATDを正常例と比較検討した。

【方法】

Ⅰ．脳内微小血管の分離：　Tsujiら(5)の方法を用い-80℃に凍結保存されたヒト剖検脳から脳内微小血管を毛細血管（capillary）とより径の大きい微小血管（large microvessel：MV）に分けて分離した。

Ⅱ．AChE活性の測定：　1.分光学的測定法　Ellmanら(1)の方法に準じacetylthiocholine iodide及びbutyrylthiocholine iodideの分解速度を分光学的に測定しその結果からNakanoら(6)の方法により算出した。2.radiometric assay　Johnsonら(2)の方法により［$^{14}$C］acetylcholineから生じた［$^{14}$C］acetateを液体シンチレーションカウンターにてcountした。

Ⅲ．AChE molecular formの検討：　血管を1M NaCl,1% Triton含むbufferでhomogenizeし100,000×G,60 min遠沈した。その上清を5-20%の連続蔗糖密度勾配に上層し125,000×G,17.5 hr遠沈し100μlずつに分画した。

Ⅳ．AChEの分画：　AChEをYounkinら(7)の方法で可溶性の違いにより三種類に分画した。1%Triton x-100を含むlow salt(0.01M NaCl)bufferでhomogenizeして3,9000G,60分間遠沈して得られる上清をS1,そのpelletを同様の方法でhomogenize,遠沈して得た上清をS2、その沈渣を1MのNaClを含むbufferでhomogenize、遠沈を繰り返して得られた上清をS3,S4、その沈渣をP4とする。G型主としてS1とS2、A型はS3とS4、nonextractable AChEはP4に分画された。

【結果】

Ⅰ．AChE活性：AChE活性はATD群の脳実質で低下するのに対し、脳血管（capillary又MV）では高値を示した。（図1）

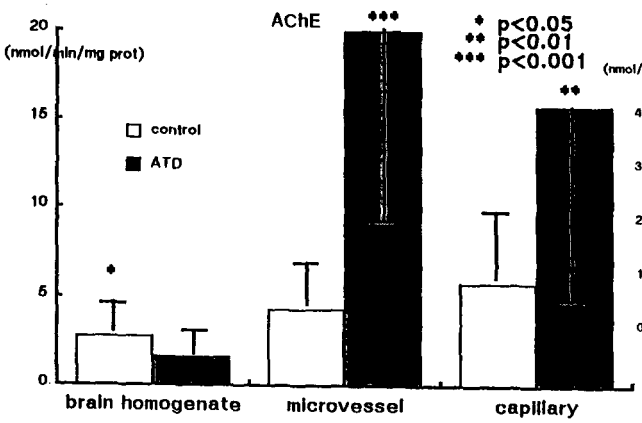
Ⅱ．AChE molecular form：脳実質のAChEがglobular form特にG4型であった。血管にみられるAChEはG4型のpeakは小さく脳実質ではみられない高分子量領域の不整なpeakが認められた。同じsampleにcollagenaseを作用させたものでは高分子量領域のAChEがG4型に転換された。（図2）

ATDでは正常対照群と同様にG4型のpeakははっきりせず、高分子量領域のものが中心であった。しかしcollagenase処理に対する反応は正常対照群とは異なって、容易にG4型には転換されなかった。（図3）

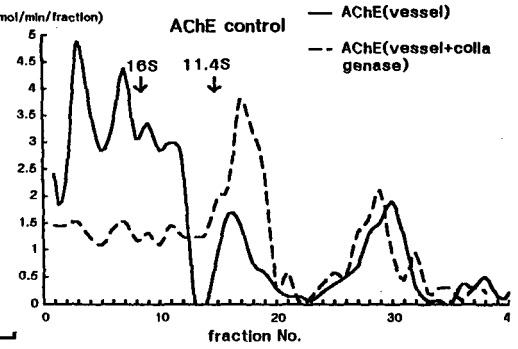
Ⅲ．AChE分画：脳実質ではA型やnon-extractableなAChEはごく僅かであった。（図4）
これに対し血管では両者の比率が増加しておりATDではcontrolにくらべA型の比率が高かった。（図5，6）

【考察】

分離血管の密度勾配法による実験ではG4型は殆ど認めず高分子量のAChEが存在した。このAChEはcollagenase処理によりG4型に変換される点からcollagenを介して重合したものと考えられる。しかし活性の比率ではG型分画のAChE活性が全体の70-80%をしめ、A型は脳実質に比べると高い割合を占めるが10-15%前後で、密度勾配法で認めた高分子量の不整なピークにはG型（重合したもの）も含まれると推測される。G型AChEが血管基底膜に蓄積し、そこで重合するものと考えられるが、その機序の解明にはなお検討が必要である。ATDにおける脳血管のAChE活性の変化の原因として、AChE分子の変化（A型の増加）によりcollagenを介して血管基底膜に強く組み込まれていることが考えられる。これは血管基底膜の構造や蛋白代謝の変化がAChEの蓄積に促進的に働いていた可能性が想定される。また食塩濃度による分画の実験でもATDではA型の比率が増加していた。今回示した血管分画のAChEがATDではcollagenaseによっても容易にG4型に解離しない点は、ATDでAChEの血管での重合がより強固であることをうかがわせる。

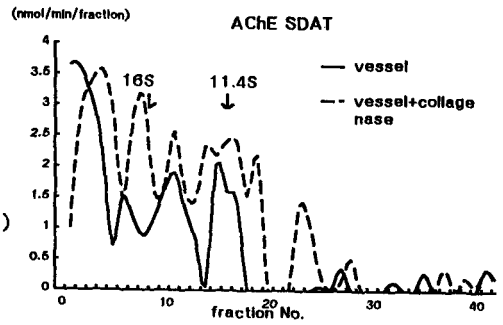


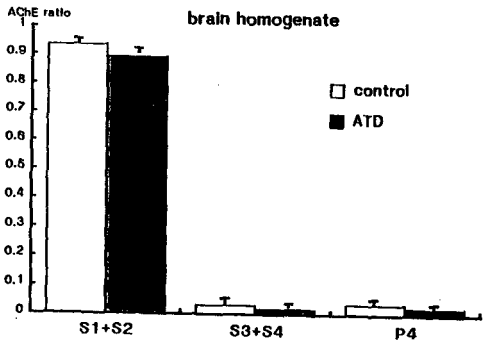

（図１）



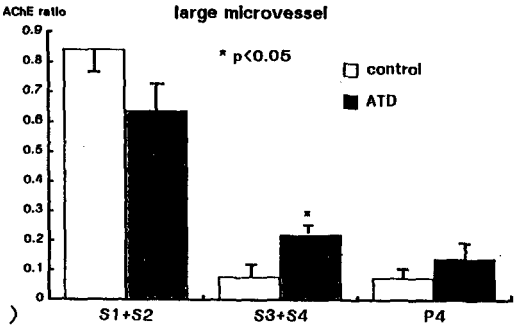

（図２）

（図３）

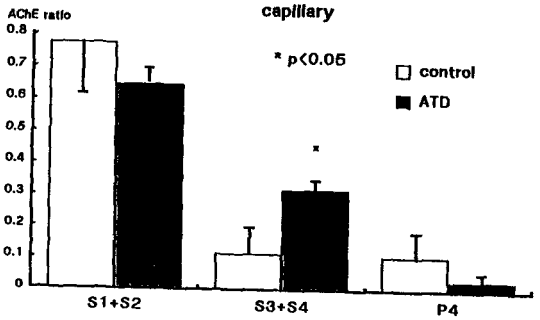



（図４）




（図５）




（図６）

文献

1.Ellman,G.L.et al.(1961) Biochem.Pharmacol., 7,88-95., 2.Johnson,C.D.et al.(1975) Annalytical Biochem., 64, 229-238., 3.辻ら(1987) 動脈硬化、15, 773-779., 4.辻ら(1987) 神経化学、26, 436-438., 5.Tsuji,T.et al.(1987) J.Neurochem., 49,1797-1800., 6.Nakano,S.et al.(1986) J.Neurol. sci., 75, 213-223., 7.Younkin,S.G.et al.(1982) J.Biol.Chem., 257, 1363-1367.

# 236 精神分裂病における$^3$H-8OH-DPAT結合部位の変化

北村　登、梶本康雄*、白井　豊*、酒井規雄、橋本健志、中井　隆*、西野直樹*、
三田達雄*、田中千賀子　（神戸大学医学部薬理学教室、同精神神経科学教室*）

〔要約〕
5-HT1A受容体を標識するとされる$^3$H-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin ($^3$H-8OH-DPAT) を用い、精神分裂病患者死後脳において結合実験を行なった。その結果、1)ヒト前頭葉皮質における$^3$H-8OH-DPAT特異結合は飽和性で、Scatchard解析の結果、解離定数は2.9 nM、最大結合量134 fmol/mg proteinの高親和性の単一成分からなっていた。2)ヒト前頭葉皮質における$^3$H-8OH-DPAT特異結合に対し5-HT1A受容体アゴニスト作用をもつ8OH-DPAT、ipsapirone**、buspirone**、SM-3997**、gepirone**のIC50値は、それぞれ2.2, 43, 146, 207, 451 nMであった。5-HT1A受容体アンタゴニスト作用を持つspironeは189 nMの阻害値を示した。一方、5-HT2受容体アンタゴニストのketanserin、mianserinは10μMの濃度でも阻害を示さなかった。3)ヒト脳における$^3$H-8OH-DPAT特異結合は前頭葉皮質≒海馬＞視床＞尾状核＞小脳の順であった。4)分裂病群の前頭葉皮質における$^3$H-8OH-DPAT特異結合は正常対照群に比べ約50%の有意の増加を示した。尾状核では、対照群との間に有意の差を認めなかった。パーキンソン氏病患者死後脳では前頭葉皮質、尾状核の両部位において結合量の変化を認めなかった。分裂病群の前頭葉皮質において$^3$H-8OH-DPAT特異結合が増加していたことから、分裂病の病態にセロトニンを介する神経伝達の変化が関与している可能性が示唆された。

［目的］
セロトニン神経は主に縫線核に細胞体をもち、その神経線維を中枢神経系全域に投射している。セロトニンは徐波およびREM睡眠の発現、摂食、飲水、攻撃、学習行動などに、また不安や恐怖など情動反応に関与していると考えられている。セロトニン受容体は、セロトニンに高親和性の5-HT1、低親和性の5-HT2、さらに最近中枢神経系においても存在が確認された5-HT3受容体の３種類に分類されている。5-HT1受容体は薬理学的特性により5-HT1A、5-HT1B、5-HT1C受容体に細分類されている。LSDなどのインドール化合物が幻覚などの精神異常を惹起すること、spironeなど多くの抗精神病薬はセロトニン受容体アンタゴニストの特徴を併せもつことなどから、精神分裂病の病態にセロトニン神経系の異常が関与している可能性が示唆されている。われわれは、5-HT1A受容体を特異的に標識するとされる$^3$H-8OH-DPAT[1]を用いて、ヒト死後脳における$^3$H-8OH-DPAT結合の特性を解析し、分裂病者死後脳で5-HT1A結合部位の変化の有無を検索した。

［方法］
対象：対照群として精神神経疾患の既往のない30症例を用いた。分裂病群は20症例で、診断はDSM-IIIによった。さらにパーキンソン氏病群8症例も対象に加えた。３群の間で、平均年齢および死後剖検時間の平均値に有意差はなかった。剖検脳は超低温槽（-80 °C)で凍結後、Brodmann, Rileyの図譜に従い分割した。

$^3$H-8OH-DPAT結合実験：脳組織を20vol氷冷50mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)中でポリトロン(Kinematica; セット7, 20秒)を用いてホモジナイズ後、48, 000×g、10分間で３回遠沈、再浮遊を繰り返した。得られた膜分画を粗膜標品として結合実験に用いた。粗膜標品と$^3$H-8OH-DPAT（128 Ci/mmol)を緩衝液中で37 °C、10分間インキュベート後、減圧下急速沪過法によりガラス繊維濾紙にトラップされた放射活性を測定した。特異結合は10μM 非標識 8OH-DPAT存在下および非存在下の結合量の差と定義した。蛋白定量はLowry法によった。

［結果及び考察］
$^3$H-8OH-DPAT結合の薬理学的特性：前頭葉皮質(Brodmann Area 10)において$^3$H-8OH-DPAT飽和結合実験 (0.25-15 nM)を行

** 住友製薬（株）より提供を受けた。

なった。$^3$H-8OH-DPAT特異結合は飽和性で、Scatchard解析の結果、$^3$H-8OH-DPAT特異結合は単一成分よりなり、解離定数は2.9 nM、最大結合量は134 fmol/mg proteinであった（Fig.1)。ヒト前頭葉皮質での$^3$H-8OH-DPAT特異結合の解離定数はラット大脳皮質の報告[1)3)]とほぼ同じ値を示した。前頭葉皮質において$^3$H-8OH-DPAT特異結合に対する各種セロトニンアゴニスト、アンタゴニストの阻害能を検討した。5-HT1A受容体アゴニスト作用をもつ8OH-DPAT、ipsapirone、buspirone、SM-3997、gepirone[2)4)]のIC50値は、各々2.2, 43, 146, 207, 451 nMであり、5-HT1A受容体アンタゴニスト作用をもつspiperoneは189 nMの阻害値を示した。一方、5-HT2受容体アンタゴニストのketanserin、mianserinは10μMでも阻害を示さなかった。以上の結果より、ヒト前頭葉皮質での$^3$H-8OH-DPAT特異結合は5-HT1A受容体を標識していると考えられる。

<u>$^3$H-8OH-DPAT特異結合のヒト脳内分布</u>：ヒト脳における1nM $^3$H-8OH-DPAT特異結合は、不均等な分布を示し、前頭葉皮質≒海馬＞視床＞尾状核＞小脳の順で高値を示した。ラット脳における$^3$H-8OH-DPAT特異結合は海馬で最も高く大脳皮質の２倍以上の値を示したが[4)]ヒト脳ではラット脳とは異なり大脳皮質と海馬とほぼ同じ値を示した。

<u>分裂病患者死後脳における$^3$H-8OH-DPAT特異結合の変化</u>：分裂病群前頭葉皮質における$^3$H-8OH-DPAT特異結合は対照群に比べ約50%の有意の増加を示した。尾状核では対照群との間に有意差はみられなかった。パーキンソン氏病群では前頭葉皮質、尾状核の両部位において結合量に変化はなかった。また分裂病群を死亡前一ケ月以上抗精神病薬を服薬していなかった群と、死亡直前まで服薬していた群に分け検討をしたが、両群間に$^3$H-8OH-DPAT特異結合の差を認めなかった（Fig. 2)。分裂病群前頭葉皮質での$^3$H-8OH-DPAT特異結合の増加は、分裂病の病態にセロトニンを介する神経伝達の異常が関与している可能性を示唆している。

Fig. 1) Scatchard plots for specific $^3$H-8OH-DPAT binding in the prefrontal cortex (Area 10)

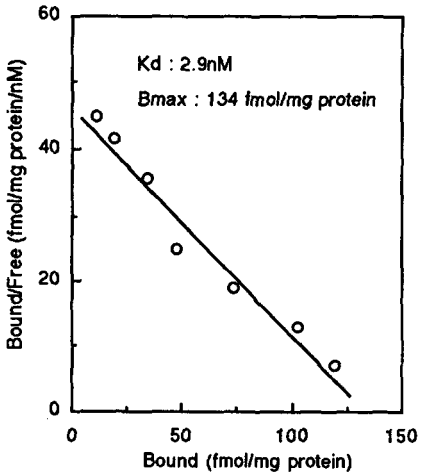
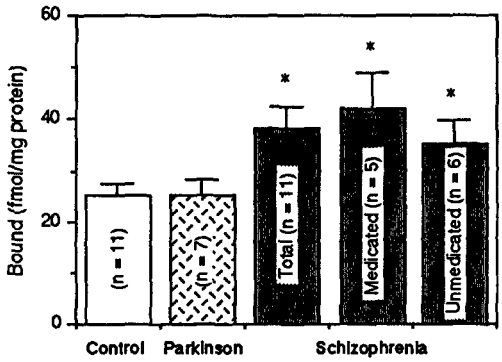



Fig. 2) Specific $^3$H-8OH-DPAT binding (1nM) to the prefrontal cortex from controls, Parkinsonians and schizophrenics. (Mean ± SEM, * P < 0.05)




［謝辞］貴重な薬剤を提供していただいた住友製薬（株）、龍野　徹博士に深謝いたします。

［文献］

1 ) Hall, M. D., El Mestikawy, S., Emerit, M. B., Pichat, L., Hamon, M., and Gozlan, H. (1985) J. Neurochem., 44, 1685 - 1695.

2 ) Jorg, T., and Glaser, T. (1987) Trends. Pharmacol. Sci., 8, 432 - 437.

3 ) Peroutka, S. J. (1986) J. Neurochem., 47, 529 - 540.

4 ) Shimizu, H., Tatuno, T., Hirose, A., Tanaka, H., Kumasaka, H., and Nakamura, M. (1988) Life Science, 42, 2419 - 2427.

# 237 脳内微小透析法を用いた急性拘束ストレスマウスの海馬におけるGABA-serotonin系の検討

福西勇夫　村上哲英＊　根木哲郎＊　細川　清

（香川医科大学　精神神経科　＊生物）

〔要約〕

急性拘束ストレスをddN系マウスに与え，脳内微小透析法を用いて，海馬におけるGABA-serotonin系の動態について検討した。その結果，GABAは減少を，5-HIAAは二相性の変化を示した。Diazepam 5 mg/kgの投与では，有意なGABAの増加，5-HIAAの減少がみられた。一方，$GABA_B$ 受容体agonist のbaclofen 5 mg/kgの投与では，GABAの減少，5-HIAAの増加がみられ，この変化は $GABA_B$ 受容体antagonistであるphaclofen 5 mg/kg によって消失した。これらの結果は，$GABA_B$ 受容体がシナプス前膜に存在し，autoreceptorとして作用することを示唆しているのかもしれない。また，5-HIAAの変化はGABAの変化と対応しており，GABA系を介し二次的に5-HT系に作用していると推測された。

Key Words: stress, microdialysis, GABA, 5-HIAA, baclofen, phaclofen

［目　的］

Diazepamなどのbenzodiazepine (BZP)系抗不安薬は$GABA_A$/BZP receptor complexを介し，5-HT代謝回転の抑制作用を有すると考えられており，これまでにストレス状態下におけるGABA -serotonin 系が注目されてきた。一方，$GABA_A$ 受容体とは異なる薬理学的性質を有する$GABA_B$ 受容体については，未だ不明な点が多いのが現状である。近年，海馬において$GABA_B$ 受容体とserotonin 受容体が同じ$K^+$channelを共有すると報告されている[1]。そこで我々は，脳内微小透析法を用いて，拘束ストレスマウスの海馬におけるGABA-serotonin系，とくに$GABA_B$ 受容体の機能について，神経化学的に検討を試みた。

［方　法］

実験には，25-30gのddN系雄性マウス43匹を用いた。定位的にBregmaから P 2.0mm，L 2.0mm に barr holeを開け，硬膜から深さ1.5mm の位置にガイド・カニューラを挿入した。術後10日間以上の回復期間中にハンドリングを施行したマウスに，無麻酔下にて透析プローブ(BAS社,CMA/10)を挿入した。そして，無麻酔無拘束下において，標準リンゲル液を用いて３μ/minの流速で灌流した。最低２時間以上の灌流の後，灌流液の回収（10分毎）を始めた。回収開始１時間後から拘束ストレス (Fig.1)を１時間与えた。

ストレス負荷直前にsaline (N=10) , diazepam 5 mg/kg (N=11) , baclofen 5 mg/kg (N=11) を，負荷の直前直後にbaclofen 5 mg/kg，phaclofen 5 mg/kg （N=11) をそれぞれ腹腔内投与した。

<u>GABA，5-HIAAの測定</u>：回収した透析液 30 μl から，電気化学検出器付きHPLCを用いて，GABA，5-HIAAを測定した。GABAの測定は，KehrとUngerstedtの方法[2]に従い，0.1M酢酸Na,0.5mM EDTA-2Na,pH5.4,22%アセトニトリルを移動相として用い，OPA 反応を利用して行った (Fig.2)。5-HIAAの測定は，0.1 mM酒石酸，0.1 mM酢酸Na,0.5mM EDTA-2Na，pH7.0,７%アセトニトリルを移動層として用い行った。

実験終了後，脳を摘出し10%ホルマリンで固定の後，切片標本により挿入したプローブの位置を確認した。

統計学的処理は,one way ANOVA ならびに Studentのｔ検定を用いた。

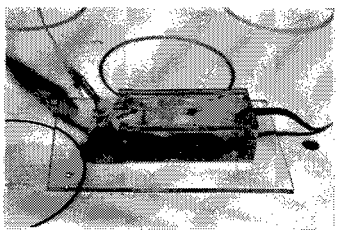


Fig.1 Acute sterss (60 minutes)

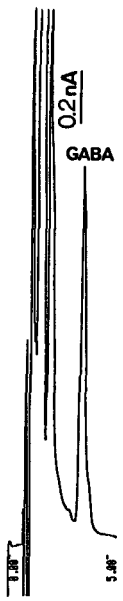



Fig.2
Chromatogram of GABA

[結果と考察]

ストレス負荷によるラット脳内GABA濃度は，線条体と視床下部において増加を，海馬では変化がみられないと報告されているが[3]，脳内微小透析法を用いた本研究では，海馬において，ストレス負荷直後からGABAの減少がみられた。5-HIAAは負荷直後から一過性の減少を示し，その後の増加といった二相性の変化がみられた。

以上の変化はdiazepam投与により消失し，GABAの増加，5-HIAAの減少がみられた。これは，シナプス後膜に存在する$GABA_A$/BZP receptor complexに作用したことによると考えられる。これに対して，baclofenの投与ではdiazepam投与とは逆に，GABAの減少，5-HIAAの増加がみられ，この変化は$GABA_B$受容体のantagonist であるphaclofen によって拮抗された。

これらの結果は，$GABA_B$受容体がシナプス前膜に存在するとの報告[4]を支持し，$GABA_B$受容体がautoreceptorとしてnegative feedback作用を有することを示唆しているのかもしれない。

さらに，$GABA_B$受容体のagonist，antagonistに対する，5-HTの代謝産物である5-HIAA濃度の変化は，GABA濃度の変化に対応しており，GABA系を介した二次的な変化であると推測された。

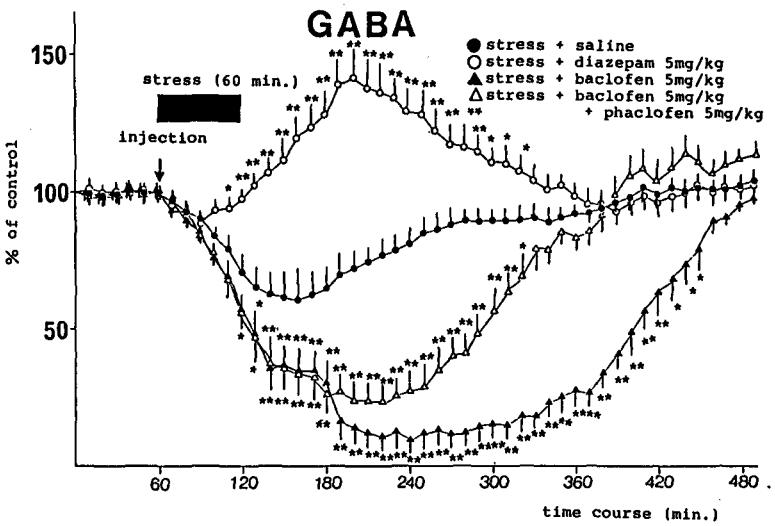



Fig.3 The time course in the levels of GABA (mean±SEM).
All data are expressed as percent of control.
* Significantly different from stress+saline group P<0.05
**Significantly different from stress+saline group P<0.01

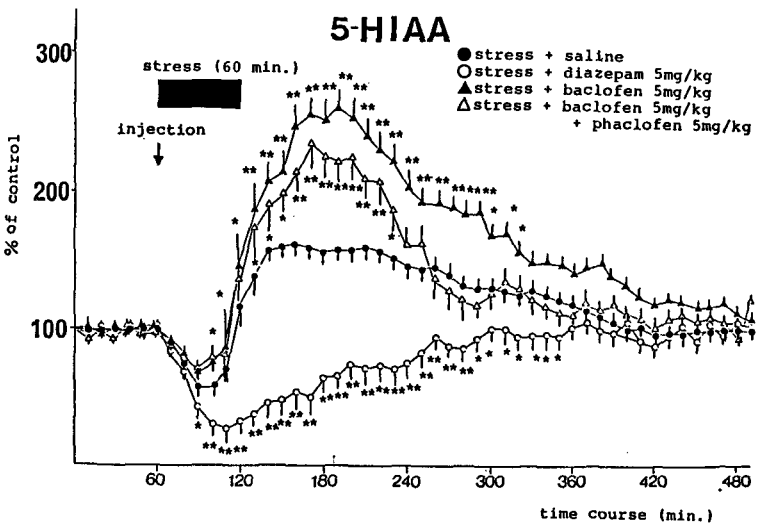



Fig.4 The time course in the levels of 5-HIAA (mean±SEM).
All data are expressed as percent of control.
* Significantly different from stress+saline group P<0.05
**Significantly different from stress+saline group P<0.01

REFERENCES
1) Andrade,R.,Malenka,R.C.,Nicoll,R.A.(1986)Science 234,1261-1265
2) Kehr,J.and Ungerstedt,U.(1988)J.Neurochem.51,1308-1310
3) Yoneda,Y.,Kanmori,K.,Ida,S.et al.(1983)J.Neurochem.40,350-356
4) Bowery,N.G.,Hill,D.R.,Hudson,A.L.et al.(1980)Nature 283,92-94

# 人名索引（ABC順）

〔数字は掲載ページを示す〕


(A)

Abecassis,J. ……340
阿部充志 ……120
阿部輝雄 ……310
阿部俊夫 ……408
足立淳 ……186
相川久志 ……288
相沢貴子 …376・378・482
赤林朗 ……30
秋口一郎 ……54・410
秋元潔 ……460
秋山一文 ……458
穐吉條太郎 ……252
安藤正人 ……96
安藤進 ……398・462
Angelides,K.J. ……302
青木継稔 ……112
有賀純 ……104
有賀敏夫 ……462
有松靖温 ……308
浅井清文 ……430
荒井裕一朗 ……470
荒木一明 ……324
荒木亘 ……210
荒木伸 ……82
朝倉幹雄 ……58・344
朝倉正 ……280
浅野富子 ……74・368
阿相皓晃 ……166・406
東均 ……388

(B)

Becker,D.P. ……270
Bignon,E. ……340
Black,K.L. ……270

(C)

Cacabelos,R. ……390
Crow,T.J. ……76

(D)

大源明宏 ……458
Daval,J-L ……432
堂前純子 ……168

(E)

戎弘志 ……192
江頭亨 ……356
江藤誠司 ……114
衛藤義勝 …38・102・170・486

(F)

藤木嘉明 ……290
藤本禎子 …304・306・308
藤澤仁 ……348
藤島正敏 ……316
藤田春洋 …28・452・454
藤田公和 ……192
藤田道也 ……180
藤田信也 ……106・434
藤田忍 ……306
藤森基次 ……94
藤原道弘 ……350
藤山修 ……262
深堀元文 ……34
福元宏明 ……392
福永浩司 ……258
福西勇夫 ……500
福山幸夫 ……288
古市貞一 ……72
古川宏 ……140
古川昭栄 ……278・410
古川美子 ……278

(G)

郷保正 ……230
五味慎太郎 ……50
権藤雄二 ……384・386
後藤文男 ……50
後藤幾生 …172・176・488
後藤薫 ……130
Gèrard,R. ……396
Gilbert,J. ……340
Greenberg,J.H. ……282

(H)

羽場久美子 ……456
蜂須賀貢 ……42
蜂矢隆久 ……342
芳賀和子 ……188
芳賀達也 ……188
萩野顕彦 ……158
萩尾哲也 ……118
萩原正敏 ……342
濱登希子 ……92
濱口勝彦 ……448
浜村貴史 ……460
浜岡利之 ……118
Hammerschlag,R. ……96
花井洋行 ……180
半田譲二 ……54
播口之朗 ……50・78・300・302・366・390・480
原厚 ……414
原靖 ……54
原田寧 ……164
原田博之 ……40
長谷川和夫 …58・186・344

長谷川宏幸……284
橋本健志……492・498
橋本誠一……158
橋本泰道……318
橋本喜次郎……34
畑裕……82
畠中寛……90・92・126
畠瀬修……114
八田愼一……212
早石修……276
早川直彦……310
早川徹……380・382
林恭三……278
林昌亮……426
林要喜知……156
日高弘義……342
東田陽博……268
樋口宗史……254
日根野尚……174・352
平井俊策……354・362
平野誠……316・442・478
平野修助……44・164
平沼豊一……42
平田みどり……416
平谷勝彦……352
菱田良平……238
本田教一……468
堀田妙子……430
細田弘吉……416
細川清……114・500
細川武……448

(I)

市川淳二……484
市村徹……324
井田博幸……102
伊賀耕三……144
五十嵐道弘……404
五十嵐康……406
井原康夫……444
飯島昇……84
飯田達能……272
飯田利博……272
飯尾正明……28・452・454
飯塚多美恵……42
池上亮介……278
池田和正……272
池田和隆……338
池田淑夫……290
池中一裕……126
池内聡……444
池崎清信……270
今福淳……58・344
今井伸一……184
今泉美佳……328・334
今泉太郎……78・220
今村一博……48
今村与志子……250
井門等……144
稲垣直之……326
稲垣俊明……368
伊野美幸……186
猪股光司……446
井上順雄……138
井上猛……80・236・484
犬塚貴……464
石田信一……466
石黒英明……106
石原直毅……50
石井晃……436
石井澄和……56
石井豊……420
石川尚志……28・452・454
石川博……38
石川紘一……250・420
石丸浩平……238
石岡憲昭……148・264
石崎泰樹……36
礒辺俊明……98・324
磯村光男……82
板野俊文……114
伊藤あつ子……416
伊藤尚……400
伊藤仁一……168・240
伊藤康一……406
伊藤正敏……34
伊藤高……458
伊藤哲一彦……290
伊東平隆……210
岩倉克臣……220
岩佐厚……254
岩崎克典……350
岩田大二……286
岩田光良……194

(J)

慈幸由紀……152
Johnson,Jr.E.M……314

(K)

加太英明……262
門福強樹……94
替地恭介……278
加賀谷有行……154・232・234
梶本康雄……498
垣花満……392・394
柿本泰男……174・352
郭哲輝……130
釜谷好美……242
亀山正邦……364
神谷大雄……118・244
金井裕子……354
金松知幸……44・112
金岡祐一……260
神庭重信……494
神田啓子……338
金行孝雄……412

金子元久……468
金田典雄……436
菅野智行……468
假屋哲彦……182
笠井久隆……334
柏原健一……460
柏俣重夫……178
片山容一……472
片岡喜由……144
片岡泰文……358
加藤兼房……74・368
加藤隆一……494
加藤泰治…168・240・430
加藤尚彦……30
加藤匡宏……150・152
加藤武……66
加藤由美子……42
河江信幸……328
川口務……474
川北幸男……246
川又達朗……472
川目裕……486
川本日出男……220
川嵜弘詔……34
川崎博己……248
河瀬恵信……88
川島誠一……400・446
金馬義平……356
慶野宏臣……178
吉川潮……340
菊池章……82
木村永一……208
木村宏……54
木鞭宏育……470
木下章……380・382
木野高明……464
木皿憲佐……470
木本英爾…28・452・454
岸野淳二……326
北畠克顕……84
北口暢哉……210
北島理恵……108
北島哲子……160
北村邦男……450
北村登……492・498
北村佳久……184・428
鬼頭昭三……216
小林和夫……142
小林雅文……146
小林秀……444
小林卓郎…172・176・488
小林利雄……140
小暮美樹……250
香田知子……196・200
甲村英二……380・382
高坂新一……84・88・436
小出誠司……246
小出直……192
小泉修一……358
小池達郎……314
小嶋久子……108
児島克博……252
児島伸彦……438
小島深一……374
小宮義璋…296・298・404
小牟禮修……492
小長谷正明……292
小長谷陽子……292
近一夫……398・462
近藤尚武……130
近藤啓次……174
近藤俊三……308
紺野邦夫……294
小笹貴史……190
古瀬明子……416
越川憲明……146
小山司…80・236・484
久保博彦……144
九穂泰三……250
窪田博……58・344
工藤喬……366・480
工藤佳久……128
熊倉鴻之助…328, 334・358
熊代永……466・468
久野貞子……492
倉橋幸造……238
蔵本悦郎……286
倉岡幸令……294
栗原一浩……448
栗原堅三……86・206
栗原正紀……358・474
栗原正…106・108・110・434
栗岡晋……148・264
栗山欣弥……360
栗山卓弥……360
黒部直美……368
黒田真也……82
黒田安計…154・232・234
黒田洋一郎……142
黒木俊秀…34・316・442・478
黒沢淳……230
黒須泰行……264
黒住公一……62
九島洋一……92
櫛谷悦子……128
久住一郎…80・154・234・236
桑野良三…106・132・324・434


(M)


前田信明……68
前田典昭……418

前川昌平……336
Maines,S.……96
Marangos,P.J.……432
Miquel,J-F.……340
丸野内棣……46・48・52
丸山敬……376・378
丸山悠司……406
増子博文……468
松田誠…148・280・422
松田友宏……266
松田譲…142・256・408
松口直成……384・386
松原良次…80・236・484
松原繁広……80・236
松井ふみ子……162
松井秀樹……114
松井英男……138
松井宏晃……186
松井和隆……38
松井宣夫……430
松本明……250
松本光比古……312
松本清治……466
松本孝…316・442・478
松永宗雄……238
松岡信也……418
松岡雄治……118
松下正明…28・452・454
松浦貞郎……370
門蒂声……94
Menniti,F.S.……214
三木直正……130・156
御子柴克彦……68・72・104・126
美原盤……50
三国雅彦…154・232・234
三森康世……496
三村俊二……178
南方宏之……242
箕越靖彦……32
三崎尚之……220
三田達雄……498
三谷章……144
三井宏美……310
三ツ汐洋……490
宮川太平……258
宮本篤……208
宮本英七……258
宮本真美……92・308
宮武正…106・434・462・464
宮脇敦史……72
宮脇茂樹……170
溝部裕子……252
溝淵雅之……114
溝渕宗秀……422
溝渕睦彦……352
溝口克弘……384・386
水野有武……422
水野憲一……86
水野龍男……174
明星康裕……268
望月貴年……326
最上平太郎……380・382
桃生勝己……110
桃井真里子……288
桃井隆……288
Morgan,P.F……432
森昭胤……262・456
森博史……122・476
森啓……444
森和夫……474
森眞由美……266
森則夫……466
森俊夫……84
森井博史……276
森井研……132
盛政忠臣……412
森沢啓一郎……112
森下理香……368
森田育男……36
森田仁……78・300
森田貴雄……310
本橋伸高……182
村上哲英……500
村木彰……80・236
村本和世……142
村山俊彦……62
室田誠逸……36


(N)


鍋島俊隆……140
長江秀利……178
永井克孝……256
長尾哲彦……316
永島亮……118
長田賢一……344
永田豊……192・194
永津俊治……370・436
永山治男……252
中川滋木……272
中川敏幸……104
中原辰雄…316・442・478
中平健祐……126
中井隆……498
中井康光……294・440
中島孝……432
中嶋照夫……40・318
中島雄三……194
中木敏夫……494
中村博彦……228
中村薫……442・478
中村和子……50
中村和生……108
中村誠……252

中村光夫……114
中村紀夫……444
中村重信……210・496
中村泰治……94・440
中村祐……300・302・366
中西純一……186・344
中西哲……142
中野稔……354・362
中野智……496
中谷一泰……440
中山仁……260
中山誠……80・236・484
直井信……370
名竹洋子……264
夏苅直己……180
根木哲郎……500
根岸輝彦……448
新延道夫……68
新川久義……390
二宮治明……364
西彰五郎……320
西川徹……56・122・288
西村健……50・78・300・302・366・388・390・480
西野直樹……492・498
西尾チカ……90
西尾健資……410
西山浩二……316・442・478
西崎純……186・344
西塚泰美……340
丹羽正美……358・474
野口かおり……92
野口鉄也……112・116
野本享資……242
野村正彦……372・424
野村靖幸……62・184・222・428
埜中征哉……288
野路久仁子……168・240
能登直……40
野沢明美……378・482
貫周子……248
温田隆……224
沼田吉彦……468

(O)

小幡邦彦……438
落合英彦……440
小田垣雄二……80・236・484
小川紀雄……456
小川百合子……58・186
小木曽学……164・406
荻田喜代一……134・136・196・198・200・202・204
荻田浩司……340
大星博明……316・442・478
大垣孝雄……202・204
大平敦彦……162
大川清……408
大久保佳孝……418
大森哲郎……80・236・484
大本堯史……114
大西博……246
大庭明子……252
大野和茂……46・48・52
大鹿英世……208・212・214
大迫俊二……346
大域公恵……290
大須賀伸佳……468
太田恵子……462
大田昌子……164
大塚隆信……430
大月三郎……458・460
小片寛……140
小口江美子……494
小口勝司……226
小倉明彦……128・268
小倉博雄……190
小鹿幸生……374
岡田文彦……76
岡田英俊……412
岡田久美子……252
岡田三津子……350
岡田尚志郎……124
岡村邦博……424
岡野栄之……104
奥村一哉……460
奥山典生……98・324
奥山真司……290
小野信文……244
小野妙子……252
尾上太一……458
小山勝幸……470
小澤寛樹……218
小澤光一郎……64・224

(P)

Putney,J.W.Jr.……214
Post,R.M.……432
Paul,M.……396

(R)

Robert,G.W.……76
Rasenick,M.M.……212・218
Reivich,M.……282

(S)

佐渡島省三……316
西須英雄……310
斉藤昌之……120
斉藤尚亮……416
斉藤利和……218
斎藤祐見子……400
酒井規雄……498
榊原真人……88
阪越信雄……220

坂本　安……450
崎村建司…106・128・434
櫻井真夫……426
佐野　輝……174
佐野　護……160
更井啓介……150
佐々木一郎……252
佐々木和彦……312
佐々木卓也……82
佐藤厚子……186・344
佐藤光源……460
佐藤公道……70
佐藤信範……470
佐藤修三…106・434・464
佐藤秩子……368
佐藤永雄……94
佐藤若生……286
澤田　誠……46・52
Schachner,M.……166
瀬川富朗……64・224
関　周司……124
関原俊一……346
関本澄人……296
仙波りつ子……162
芝軒信次……250
柴田牧子……344
渋谷治男……122・476
渋谷正人……342
鹿野博義……260
島田明範……294
島田静雄……286
嶋津　孝……32・120
清水浩光……140
清水雅美……152
下浜　俊……364
下澤定志……342
下條貞友……38
下山政憲……216
篠原一之……56
塩田清二……294
塩江邦彦……182
白井　豊……498
白石昭雄……442・478
白尾智明……438
白澤信行……38
設楽信行……228
祖父江憲治……338
相馬俊子……246
反町　勝……330
外松明美……354・362
Stephenson,J.D.……146
首藤　誠……32
末吉圭子……384・386
菅谷愛子……450
菅谷英一……450
菅谷慶三……94
杉原順二……150・152
杉田虔一郎……342
杉山英子……414
杉崎哲朗……112・116
寿野正広……392・394
鈴木富士子……368
鈴木恵子……494
鈴木竹雄…134・196・200
錫村明生……46・48・52
勝二郁夫……82
庄盛敏廉……124・412

(T)

田渕和雄……270
多田國利…50・300・302・366・480
只野　武……470
多賀千明……40・318
田口淳一……360
高畑直彦……218
高田耕司……408
高橋　章……32
高橋　昭……48
高橋秀夫……272
高橋純子……312
高橋清久…56・154・232・234・490
高橋正身…304・306・308
高橋保之……210
高橋　良……122・476
高橋　勤……370
高橋康夫…106・108・110・128・132・324・434
高井義美……82
高倉公朋……228
高野行夫……118
高崎浩一朗……248
高嶋瑞夫……490
高嶋修太郎……60
高杉あおい……206
高津　修…28・452・454
高山千利……126
高柳哲也……292
竹田二美代……294
武田弘志……226
武田京子……328
武田雅俊……50・78・300・302・366・480
竹田　稔……94・294
武井延之……92・334
竹村晴夫……214
竹村基彦……326
竹下英康……34
竹下正純……274
武富　保……414
竹内　宏……242
竹内裕子……276
玉井洋一……108

田丸政男……194
田村晃……464
田村亨……472
田村滋規……70
田辺敬貴……366
田中篤孝……440
田中千賀子…416・492・498
田中耕太郎……50
田中真……354・362
田中雅子……366
田中正敏…322・384・386
田中亮…168・240・374・430
田中早苗……450
田中秀逸……314
田中隆彦……322
田中稔久……302
田中康一……398
田中祥貴……426
谷寿恵……42
谷浦秀夫……156
田岡万悟……98
田代朋子……296
立石カヨ子……118
楯林義寛…316・442・478
寺田庄一……438
戸部敬……440
飛松孝正……348
戸田健一……176
東田道久……222
藤堂具紀……228
東海林正……454
融道男……122・140
遠山育夫……54
所敏治……170
徳田雅明……114
徳光幸子……76
徳武哲……402
富岳亮……448
富田基郎……440
冨山誠彦……238
友田桂子……290
朝長正徳……100
戸谷重雄……436
豊島至……298・464
坪川孝志……472
土橋宣昭……466
土山幸之助……252
津吹聡……400
津田彰…322・384・386
津田整……450
都築紀宏……332
辻元宏……40・318
辻輝之……496
辻崇一……256
辻省次……462
辻野健……416
塚田裕三……436
塚本徹……58・344
津久井弘子……90・126
津島宏美……266
筒井研……124
筒井公子……124
堤哲之…316・442・478
(U)
内田耕一……436
内田洋子……100
内村英幸…316・442・478
宇田川慶子……148
植田弘師……70
上田國寛……210
植木昭和……358
植松大輔……282
上野修一……174
植村慶一……166・450
油布文枝……356
浦江明憲……350
臼田信光……342
碓井由美子……94
内海裕美……288
(W)
和田博……326・388
和田健太郎……126
脇初枝……398
渡辺厚……468
渡辺恭良……276
渡辺康裕……78・220
Way,E.L.……406
(Y)
矢作友保……462
八木昭彦……388
八木剛平……494
八木康之……422
八尾博史……316・442
保田和美……450
安原治……54
安島綾子……66
安川節子……258
山田和雄……380・382
山田茂人……320
山上栄……246
山形要人……130
山口文徳……114
山口勇……418
山口徹……310
山口時男……66
山口知子……396
山国徹……98
山本明広……402
山本英樹……256
山本秀子…154・232・234
山本秀幸……258
山本纊子……52
山本正彦……374

山本敏晴……170
山西嘉晴……190
山下正……480
山下格…80・236・484
山下達朗……256
大和谷厚……326・388
山津清實……190
山内千代……252
山内惟光……290
山内卓……346
山脇成人……150・152
柳沼正俊……468
柳沢勝彦……464
柳内務……468
横井功……262
横越英彦……372
横尾秀康……320・322
横山秀克……466
米田幸雄…134・136・196・198・200・202・204
吉田博…78・220・254
吉田敏……274
吉原千佳……416
吉井清哲……206・260
吉川和明…376・378・482
吉川真悟……72
由村健夫……488

(Z)

趙学慧……428
Zalewska,T.……446

**神経化学　第28巻　第1号**

平成元年8月31日発行

編集兼発行者　日本神経化学会
代表者　柿本　泰男
発行所　日本神経化学会
〒113 東京都文京区弥生2－4－16
財団法人　日本学会事務センター内
印刷所　北海道大学生活協同組合印刷事業部「北大印刷」