ISSN：0037－3796

神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第33回　日本神経化学会大会論文集

Vol. 29 (No. 1), 1990

日本神経化学会

神経化学

第33回日本神経化学会大会論文集

PROCEEDINGS OF THE 33th ANNUAL MEETING OF
THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於 広 島

10月24日(水), 10月25日(木), 10月26日(金)

Vol. 29 (No. 1), 1990

日 本 神 経 化 学 会

編集委員（ABC順）

鬼頭昭三　（放送大学）
中村重信　（広島大・医・第三内科）
仲田義啓　（広島大・医・薬効解析）
西尾廣昭　（広島大・医・薬効解析）
更井啓介　（サライ神経科）
瀬川富朗（代表）　（広島大・医・薬効解析）
魚住徹　（広島大・医・脳外科）
山脇成人　（広島大・医・神経精神）

目　　次

1. 脳虚血時の神経細胞特異的蛋白質を用いた免疫組織化学的検索
— 細胞下コンパートメントマーカーとしてのMAP2, Synapsin 1の有用性について —……28
北川　一夫，松本　昌泰，祖父江　憲治**，多賀谷　昌史，桑原　敬介，
秦　龍二，半田　伸夫，福永　隆三，木村　和文*，新延　道夫***，
御子柴　克彦***，鎌田　武信
（大阪大・医・第一内科，バイオ研・核医*，高次研・神経薬理生化**，
大阪大・蛋白研***）

2. 神経細胞の虚血耐性獲得に関する検討 — Ischemic tolerance phenomenon found in the brain —……30
松本　昌泰，北川　一夫，多賀谷　昌史，桑原　敬介，秦　龍二，
中林　才治，半田　伸夫，福永　隆三，木村　和文*，新延　道夫**，
御子柴　克彦**，鎌田　武信
（大阪大・医・第一内科，バイオ研・核医*，大阪大・蛋白研**）

3. 慢性脳血流低下状態に於ける細胞骨格蛋白の変化……32
工藤　喬，多田　國利，武田　雅俊，山下　正，田中　稔久，
服部　英幸，谷向　知，森田　仁，播口　之朗，西村　健
（大阪大・医・精神医学）

4. スナネズミ海馬領域脳虚血性細胞外グルタミン酸濃度の上昇及びCA1ニューロン死に対する低脳温の効果……34
三谷　章，片岡　喜山　（愛媛大・医・第一生理）

5. 遺伝的甲状腺機能低下症マウス小脳Bergmann細胞のGPDH活性発現に及ぼすホルモンの効果とその臨界期……36
杉崎　哲朗，野口　鉄也　（東邦大・医・第二生理）

6. 自然発症てんかんラットの脳内伝達物質関連酵素活性……38
小暮　美樹，今村　与志子，九穂　泰三，石川　紘一，伊藤　和夫*，
芹川　忠夫**
（日本大・医・薬理，京都大・医・第一解剖*，動物実験施設**）

7. 恐怖条件付けによる視床下部ノルアドレナリン放出に対する影響
— 脳内透析法による検討 —……40
横尾　秀康，田中　正敏，吉田　真美，津田　彰，田中　隆彦，
溝口　克弘　（久留米大・医・薬理）

8. ニーマンピック病モデルマウスにおけるコレステロールエステル化障害に関して……42
草野　薫，所　敏治，鈴木　英明，宮脇　茂樹*，衛藤　義勝
（慈恵医大・小児科，日本新薬㈱・中央研*）

9. シャトルボックス回避試験による実験的母胎性フェニールケトン尿症ラットにおける脳内モノアミン含有量の変動……44
成田　裕保，金松　知幸，中井　健而*，平野　修助
（東邦大・医・第二生理，総研*）

10. Globoid cell leukodystrophy (GLD, Krabbe 病) のサイコシンの蓄積と病態代謝……46
野沢　政代，井田　博幸，松井　和隆*，所　敏治，衛藤　義勝
（慈恵医大・小児科，第二内科*）

11. Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (NCL) の病因：蛋白質代謝との関連性に関する研究……48
津田　隆，松井　和隆*，原田　恵美子，川目　裕，所　敏治，衛藤　義勝
（慈恵医大・小児科，第二内科*）

12. 家族性アルツハイマー病患者の培養線維芽細胞にみられる細胞骨格蛋白の変化……50
武田　雅俊，工藤　喬，中村　祐，田中　稔久，楯林　義孝，谷向　知，
多田　國利，播口　之朗，西村　健　（大阪大・医・精神医学）

13. アルツハイマー型痴呆患者剖検脳における酸性線維芽細胞成長因子の免疫組織化学……52
遠山　育夫，原　靖*，安原　治**，秋山　治彦**，P. L. McGeer***，
木村　宏
（滋賀医大・分子神経研，脳外科*，京都大・医・神経内科**，British Columbia大***）

14. 精神分裂病患者での心房性 Na 利尿ペプチド (ANP) とバゾプレッシン (AVP) の分泌動態 ……54
大沢　弘吉，岸本　年史，嶋吉　徳人，松村　一矢，法山　良信，
東浦　直人，木寺　克樹，平井　基陽，井川　玄朗
（奈良県医大・精神科）

15. NG108-15 細胞におけるムスカリン性アセチールコリン受容体サブタイプによる Ca 電流抑制 ……56
橋井　美奈子，東田　陽博　（金沢大・医・神経情報研・神経物性）

16. ヒト T リンパ球 (Jurkat 細胞) の M1 ムスカリン性受容体応答 ……58
金田　利夫，野村　靖幸　（北海道大・薬・薬効）

17. 中枢コレシストキニン受容体の細胞内応答について ……60
鬼頭　昭三，三好　理絵*，野本　照子*
（放送大，東京女子医大・薬理*）

18. *In vivo* brain dialysis 法による細胞内情報変換機構の研究 ……62
大津　洋，山本　敏文*，加藤　武*
（東工大・総合理工・生命化，横浜市大・総合理・分子認識*）

19. $GABA_A$ 受容体 α_1 サブユニット mRNA の発現 ……64
廣内　雅明，大熊　誠太郎，馬　福海，栗山　欣弥
（京都府医大・薬理）

20. アクロメリン酸とカイニン酸投与後のマウス脳内 c-fos mRNA 発現の検討 ……66
中島　孝，石田　美知子*，後藤　泰徳*，宮武　正，篠崎　温彦*
（新潟大・脳研・神経内科，都臨床研・薬理*）

21. カイニン酸誘発けいれん時におけるラット脳でのインターロイキン1β mRNA の発現 ……68
南　雅文，倉吉　泰，佐藤　公道　（京都大・薬・薬理）

22. 視交叉上核におけるソマトスタチン mRNA の発現量の日周リズム ……70
竹内　潤一，篠原　一之，井上　慎一
（三菱化成生命研・脳神経生理）

23. 抑制性グリシン受容体のcDNAクローニングと機能的受容体の発現……72
赤木　宏行，平井　啓子*，菱沼　文男*
（群馬大・医・薬理，三菱化成生命研・分子遺伝*）

24. 老齢ラットにおけるhigh K^+刺激によるシナプトゾーム内Ca^{2+}濃度上昇に対するNMDA antagonistの効果……74
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*）

25. ラット脳後シナプス肥厚部におけるNMDA受容体／チャネル活性のプロテインキナーゼCによる増強……76
宮崎　敦広，北村　佳久，野村　靖幸　（北海道大・薬・薬効）

26. NMDAレセプター複合体の多様性……78
米田　幸雄，荻田　喜代一　（摂南大・薬・薬理）

27. NMDAレセプター複合体におけるグリシンの役割……80
荻田　喜代一，米田　幸雄　（摂南大・薬・薬理）

28. NMDAレセプター複合体に対するイフェンプロジルの作用……82
大垣　孝雄*，荻田　喜代一，米田　幸雄
（摂南大・薬・薬理，中央臨床研*）

29. *shiverer* 及び *jimpy* マウスにおけるミエリン特異的蛋白質遺伝子の転写活性……84
塩田　千代，池中　一裕，御子柴　克彦
（大阪大・蛋白研・機能制御）

30. Myelin-Associated Glycoprotein (MAG) の蛋白分解に関する研究……86
佐藤　修三，藤田　信也，石黒　英明，犬塚　貴，宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科）

31. Myelin-associated glycoprotein (MAG) isoformの中枢および末梢神経系の発達における発現変化……88
犬塚　貴，藤田　信也，佐藤　修三，中野　亮一，石黒　英明，
馬場　広子，宮武　正　（新潟大・脳研・神経内科）

32. マウスミエリン塩基性蛋白質の新しいアイソフォームの検出……90
有賀　純，岡野　栄之，御子柴　克彦
（大阪大・蛋白研・機能制御）

33. 末梢神経ミエリン特異蛋白質 P_0 の DRG ニューロン軸索突起伸展に及ぼす効果……92
矢崎　貴仁*，三浦　正幸，阿相　皓晃，星　道生，戸谷　重雄*，
植村　慶一　（慶応大・医・生理，脳外科*）

34. ミエリン蛋白質の系統及び個体発生上の発現様式……94
竹居　光太郎，北村　邦男*，植村　慶一
（慶応大・医・生理，埼玉医大・第一生理*）

35. ミクログリア分泌性プロテアーゼの性質……96
中嶋　一行，下条　雅人，濱之上　誠，石浦　章一*，杉田　秀夫*，
高坂　新一　（国立精神神経センター・神経研・代謝，疾病第一*）

36. 中枢神統系ミエリンにおけるプロテインキナーゼC……98
由村　健夫，小林　卓郎，後藤　幾生
（九州大・医・脳研・神経内科）

37. サイトカインによるミクログリアの形態・機能・増殖能の変化について……100
錫村　明生，丸野内　棣*，山本　纊子
（藤田学園保衛大・神経内科，応用細胞*）

38. グリア因子で分化された神経芽腫細胞は新生期脳由来抗がん因子 NBCF に対する感受性を減少する……102
三羽　信比古，長尾　則男，土井　澄江，中村　豊郎*，伊藤　菁莪**
（広島県大・生物資源，伊藤ハム・中研*，協和発酵・東京研**）

39. グリア線維酸性蛋白に対するリン酸化及び脱リン酸化の影響……104
中村　祐，武田　雅俊，K. J. Angelides*，多田　國利，田中　稔久，
楯林　義孝，播口　之朗，西村　健
（大阪大・医・精神科，ベイラー医大・生理*）

40. グリア線維酸性蛋白質によるBリンパ球の抗体産生に及ぼす効果についての検討……106
中村　和子，加藤　佳也*，田中　稔久，武田　雅俊，多田　國利，
播口　之朗，西村　健
（大阪大・医・精神神経科，国立療養所・松籟荘*）

41. アルギニンのアストロサイトへの局在 — 免疫組織化学的考察 —……108
青木　英子，仙波　禮治，御子柴　克彦*，柏俣　重夫
（愛知県コロニー研，大阪大・蛋白研*）

42. アストロサイト培養上清中の内皮細胞遊走促進蛋白……110
石崎　泰樹，室田　誠逸　（東京医歯大・歯・顎研機能）

43. グルタミン酸によるラット脳初代培養アストロサイトのswelling……112
小山　豊，馬場　明道　（大阪大・薬・薬理）

44. マウス初代培養グリアおよび神経細胞からのアラキドン酸代謝産物の遊離……114
大曲　清，J.-P. Pin*，J. Bockaert*
（九州大・医・精神科，CCIPE., France*）

45. 中隔野初代分散培養系における〔^{3}H〕-アセチルコリン合成活性及び〔^{3}H〕-コリン取り込み活性の発現……116
福嶋　伸之，小鹿　幸生*，入江　恒正
（住友製薬・研，名古屋市大・医・第二内科*）

46. NG108-15細胞のcAMP-response element (CRE) 結合蛋白質に対するモルヒネおよびエタノールの長期投与の作用……118
大杉　武，谷浦　秀夫，三木　直正
（大阪大・医・第一薬理）

47. C6グリオーマ細胞におけるグルタミン酸毒性の機序について — シスチン輸送系の阻害を中心として……120
加藤　聖，石田　外樹，根岸　晃六
（金沢大・医・神経情報研・伝達）

48. IL-1β 及びANGIOTENSIN IIによるラット培養アストロサイトからの
PGE₂分泌とその作用機序 ……122
勝浦　五郎，P. E. Gottoschall*，R. R. Dahl*，A. Arimura*
（塩野義製薬㈱・研，US-Japan Biomed. Res. Labs., Tulane Univ. Med. Ctr., USA*）

49. 複素環式アミンTrp-P-1とTrp-P-2のカテコールアミンならびにインドールアミン代謝への影響……124
直井　信，高橋　勤*，太田　明**，太田　深雪***，丸山　和佳子****，
永津　俊治*****
（名古屋工大，江南女短大*，名古屋大・医・内科第一**，神経内科****，生化第一*****，名古屋市大・医・精神科***）

50. 正常およびGM₂ガングリオシドーシス脳内におけるリゾガングリオシドの蓄積……126
小林　卓郎，後藤　幾生，乾　幸治*，岡田　伸太郎*
（九州大・医・脳研・神経内科，大阪大・医・小児科*）

51. 哺乳動物におけるスペルミジンからN-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンの生成について ……128
上村　宏，川瀬　秀明，長谷川　武史*，橋本　泰道，能登　直，
中嶋　照夫　（京都府医大・精神医学，同位元素*）

52. ラット中枢神経系単一ニューロンのグルコース代謝動態の解析……130
赤林　朗，加藤　尚彦*　（東京大・医・脳研，横浜市大・医・生化*）

53. MK-801投与によるラット脳局所グルコース利用率の変化 — 特に片側entorhinal cortexのchemical lesionの影響……132
車地　暁生，J. McCulloch*
（東京医歯大・医・神経精神科，Wellcome Surgical Inst. & Hugh Fraser Neurosci. Labs., Glasgow Univ.*）

54. 褐色脂肪組織の糖利用に及ぼす寒冷曝露の効果と交感神経の重要性……134
高橋　章，嶋津　孝*
（群馬大・医・神経精神薬理(ツムラ)，愛媛大・医・生化第一*）

55. ストレスとその神経伝達過程に関わる脳内解糖系の変動……136
滝田　正寿，三国　雅彦，高橋　清久
(国立精神神経センター・疾病第三)

56. N-Ethylmaleimide に依るラット脳神経終末からの ATP 放出阻害について……138
都築　紀宏　(名古屋市大・医・生化)

57. 脳の脂肪酸縮合反応に対する促進因子……140
竹下　正純，緒方　健一，吉田　敏*　(大分医大・生化，実験センター*)

58. Methamphetamine 慢性投与が Na^+，K^+-ATPase に与える影響について……142
神崎　昭浩，秋山　一文，奥村　一哉，氏家　寛，大月　三郎
(岡山大・医・神経精神科)

59. Methamphetamine 投与によるラット線条体における Serotonin 放出について：In vivo microdialysis による検討……144
小山　司，中山　誠，村木　彰，大森　哲郎，松原　繁広，山下　格
(北海道大・医・精神医学)

60. メトアンフェタミン断薬後のモノアミン伝達物質代謝の慢性変化
— マウス系統間における比較 —……146
盛政　忠臣，金行　孝雄，岡田　英俊，庄盛　敏廉
(岡山大・医・脳代謝研・病態生化)

61. Methamphetamine 逆耐性および Dopamine 代謝に及ぼす海馬 - 側坐核経路の影響……148
吉川　武男，渡辺　明子，渋谷　治男，金野　滋*，融　道男
(東京医歯大・医・神経精神科，東京医歯大・保健管理センター*)

62. ^{14}C-メタンフェタミンの合成と逆耐性形成ラットにおける脳内動態の検討……150
沼知　陽太郎，吉田　寿美子，菱沼　隆則*，佐藤　光源
(東北大・医・精神医学，薬剤部*)

63. ハロペリドール慢性投与後のラット線条体スライスの dopamine 自己受容体の機能変化……152
山田　茂人，横尾　秀康*，西山　浩二**，三木　浩司**，西　彰五郎
(久留米大・医・脳研，薬理*，精神神経科**)

64. ACAMP-81（ウシ脳，熱安定性，酸性，カルモデュリン結合蛋白質）結合蛋白質の同定……154
水谷　顕洋，徳光　浩，日高　弘義　（名古屋大・医・薬理）

65. 抗うつ薬のGTP結合蛋白質(Gs)－アデニル酸シクラーゼ共役増強作用に対するカルシウム／カルモジュリンの関与……156
小澤　寛樹，斉藤　利和，高畑　直彦　（札幌医大・神経精神医学）

66. 脳ω-conotoxin受容体結合蛋白質……158
西須　英雄，茨木　京子，山口　徹，阿部　輝雄　（新潟大・脳研）

67. IP_3受容体P_{400}のCa放出活性……160
宮脇　敦史**，古市　貞一*，御子柴　克彦**
（基生研・行動制御*，大阪大・蛋白研・機能制御**）

68. 幼若ラット小脳介在ニューロン細胞体内Ca^{2+}濃度調節機序……162
反町　勝，倉元　邦明　（鹿児島大・医・第一生理）

69. 局所脳虚血モデルにおけるMK-801とニモジピンの併用療法の効果
— 細胞内カルシウムイオンの変化を中心に —……164
植松　大輔，荒木　信夫*
（浦和市立病院・神経内科，慶応大・医・神経内科*）

70. ラット脳から調製したシナプス後肥厚部に付随するキナーゼC基質……166
鈴木　龍雄，堂前　純子，田中　亮　（名古屋市大・医・生化第一）

71. Dibutyryl cAMP刺激によるPC12h細胞の分化におけるプロテインキナーゼCアイソザイムの動態……168
下濱　俊，功刀　由紀子*，田村　仁美*，小早川　仁志*，斎藤　綱男**，
木村　淳，谷口　隆之*
（京都大・医・神経内科，京都薬大・生物*，カリフォルニア大サンディエゴ校・神経科学**）

72. 海馬キンドリングにおけるプロテインキナーゼC活性の変化……170
大源　明宏，秋山　一文，伊藤　高，甲平　一郎，森本　清，大月　三郎
（岡山大・医・神経精神医学）

73. 神経組織における *ras* p21 類似 GTP 結合蛋白質 *smg* p25A の発現について……172
本池　俊行，佐野　公彦，中村　肇，畠中　寛**，菊池　章*，
高井　義美*　（神戸大・医・小児科，第一生化*，大阪大・蛋白研**）

74. マウス大脳皮質形成とガラクトース転移酵素……174
森田　規之，池中　一裕，御子柴　克彦　（大阪大・蛋白研・機能制御）

75. 不随意運動に対する Ceruletide の効果……176
宮本　修，板野　俊文，溝淵　雅之*，山口　文徳**，徳田　雅明，
松井　秀樹，大本　堯史*，細川　清**，畠瀬　修
（香川医大・第一生理，脳外科*，精神神経科**）

76. 脳におけるビリルビン結合性タンパクの簡便かつ迅速な検出法……178
青野　幸子，仙波　禮治，佐藤　浩，柏俣　重夫
（愛知県コロニー研・周生期）

77. HIPPOCAMPAL CHOLINERGIC NEUROTROPHIC PEPTIDE (HCNP) の構造解析と合成ペプチドの生物学的活性……180
小鹿　幸生，小島　深一*，植木　靖之*，山本　正彦
（名古屋市大・医・第二内科，住友製薬㈱・研*）

78. 鉄-DOPA によって惹起される脂質過酸化に対する黒質の感受性……182
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，群馬大・医療技術短大*）

79. 細胞内コリン作動性分化因子の部分精製とその性質……184
水野　憲一，栗原　堅三　（北海道大・薬・薬剤）

80. 組み換え型ヒト塩基性線維芽細胞成長因子 (rhbFGF) の初代培養中隔野アセチルコリン神経細胞に対する神経栄養効果について：cytosine-1-β-D-arabinofuranoside (Ara-C) 存在下における作用……186
寿野　正廣，福元　宏明，垣花　満　（武田薬品・生物研）

81. 成熟交感神経細胞の NGF 除去に伴う変性 I — 一過性の細胞質性酵素放出の機構 —……188
田中　秀逸，小池　達郎　（佐賀医大・化学）

82. 牛脳由来神経細胞生存維持因子の同定 ……190
武井　延之，近藤　淳*，長池　一博*，高坂　新一
（国立精神神経センター・神経研・代謝，三菱化成・総研*）

83. 運動ニューロン軸索成長と時間的・空間的に相関して発現される M7412 分子の解析……192
田中　英明　（群馬大・医・薬理）

84. 軸索内輸送と細胞骨格重合状態の加齢変化……194
田代　朋子，関本　澄人，小宮　義璋　（群馬大・医・分子病態）

85. 培養大脳皮質・海馬ニューロン間シナプス形成の機能アッセイおよび電顕による定量的解析 —— ATP の影響……196
黒田　洋一郎，市川　真澄*，村本　和世，川原　正博，小林　和夫，
小倉　明彦**，工藤　佳久**
（都神経研・神経生化，解培発生*，三菱化成生命研・脳神経薬理**）

86. PC12 細胞のユビキチン-蛋白質結合体……198
高田　耕司，波多野　孝史*，大川　清，松田　誠
（慈恵医大・医化，泌尿器科*）

87. 特異的なプロテアーゼ阻害剤による PC12 細胞の突起形成 — 標的分子の精製とその性質 — ……200
斎藤　祐見子，川島　誠一，津吹　聡*，伊藤　尚*，鈴木　春男**
（都老人研・生化，青山学院大・理工*，北里大・医**）

88. NMDA レセプター複合体に対するカルモデュリンアンタゴニストの作用……202
鈴木　竹雄，荻田　喜代一，米田　幸雄　（摂南大・薬・薬理）

89. グルタミン酸によるニューロンの Na ポンプアイソフォームの活性調節に対する W-7 の影響……204
井上　順雄，松井　英男　（杏林大・医・第一生化）

90. $GABA_B$ 受容体の部分精製とその薬理学的性質について……206
大森　敬之，栗山　欣弥　（京都府医大・薬理）

91. 牛脳〔^{3}H〕flunitrazepam 結合阻害物質の精製……208
川嵜　弘詔，伊藤　正敏，中原　辰雄*，納富　昭人，深堀　元文
（九州大・医・精神科，理・化学*）

92. 脳シナプス膜への〔^{3}H〕スペルミジン結合の性質……210
米田　幸雄，荻田　喜代一，榎本　理世　（摂南大・薬・薬理）

93. 興奮性アミノ酸レセプター結合の脳内分布……212
榎本　理世，荻田　喜代一，米田　幸雄　（摂南大・薬・薬理）

94. 脊髄内アミノ酸伝達候補物質の検索……214
藤田　公和，紺野　浩一*，神野　哲夫*，本田　虔夫**，永田　豊
（藤田学園保衛大・医・生理，脳外科*，横浜市民病院**）

95. レセルピン慢性投与のコリン作動性神経機構に及ぼす影響：レセプター結合能測定の有用性……216
浅沼　幹人，羽場　久美子，小川　紀雄，森　昭胤
（岡山大・医・脳研・機能生化）

96. Denbufylline (RBL 30892) の脳内アセチルコリン神経系に及ぼす影響……218
桂　昌司，橋本　恒一，栗山　欣弥　（京都府医大・薬理）

97. フェンサイクリジン (PCP) のラット脳内モノアミン-ニューロン系への部位選択的影響……220
松本　孝，平野　誠，堤　哲之，楯林　義寛，本藤　久雄，橋本　喜次郎，
内村　英幸，中原　辰雄*，黒木　俊秀**，中村　薫***
（情動行動障害センター・国立肥前療養所，九州大・理・化学*，医・精神神経医学**，大牟田労災病院***）

98. マストパランの牛副腎髄質クロマフィン細胞からのカテコールアミン放出に及ぼすアミノ酸置換の効果……222
笠井　久隆，栗田　孝*，伊藤　尚**，今泉　美佳***，熊倉　鴻之助***
（都立大・理・化学，ヘキストジャパン・医総研*，青山学院大・理・化学**，上智大・生命研***）

99. 培養副腎髄質クロマフィン細胞における各種刺激によるイノシトール五リン酸の生成……224
笹川　展幸，中木　敏夫，加藤　隆一　（慶応大・医・薬理）

100. ATP (P2) - 受容体刺激による PC12 細胞からのカテコールアミン放出……226
井上　和秀，中沢　憲一，今泉　美佳，小浜　とも子，藤森　観之助，
高仲　正　（国立衛生試験所・薬理）

101. 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 M_2 - ムスカリン様レセプターによるアセチルコリン遊離調節……228
森　眞由美，神谷　稔夫，津島　宏美，松田　友宏
（名古屋市大・医・薬理）

102. ガングリオシドによるアセチルコリン放出の修飾……230
田中　康一，脇　初枝，近　一夫，安藤　進　（都老人研・生化）

103. Ca^{2+} 非依存性 GABA 放出における抗ユビキチン抗体の効果……232
朝倉　正，高田　耕司，林　敬，松田　誠　（慈恵医大・医化）

104. セロトニン刺激によるヒト血小板内 Ca^{2+} 濃度変化の臨床的基礎検討……234
久住　一郎，小山　司，松原　繁広，山下　格
（北海道大・医・精神医学）

105. ヒト血小板におけるモノアミン受容体機能 — セロトニン2受容体とアルファ2アドレナリン受容体との相互作用 — ……236
加賀谷　有行，三国　雅彦，高橋　清久
（国立精神神経センター・神経研・疾病第三）

106. マウス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（“光療法”）の影響……238
東　均，八木　昭彦，西村　健，大和谷　厚*，和田　博*
（大阪大・医・精神医学，第二薬理*）

107. Serotonin 再取り込み阻害による細胞外（シナプス間隙）Serotonin の増加について：In vivo microdialysis による検討……240
小山　司，木戸　薫*，井上　猛，久住　一郎，松原　良次，
小田垣　雄二，山下　格　（北海道大・医・精神医学，㈱エイコム*）

108. 5-HT$_{1A}$ 作動薬 (8-OH DPAT, ipsapiron) による脳内モノアミン代謝回転の変動……242
丹生谷　正史[*,**]，神庭　重信[*]，木下　徳久[*,**]，鈴木　映二[*]，
八木　剛平[*]，中木　敏夫[***]，加藤　隆一[***]
(慶応大・医・精神神経科[*]，慈雲堂内科病院精神科[**]，
慶応大・医・薬理[***])

109. 血中コルチコステロンよりみたリチウム，電気けいれんショック反復処置の5HT-1A レセプターへの効果……244
山田　健児，穐吉　條太郎，土山　幸之助，宮本　武司，伊東　良伯，
山内　千代，大庭　明子，岡田　久美子，児島　克博，佐々木　一郎，
永山　治男　(大分医大・精神神経科)

110. Adenylate Cyclase 活性を通してみた5-HT 1A 受容体に及ぼす抗うつ剤慢性投与の効果……246
土山　幸之助，穐吉　條太郎，山田　健児，宮本　武司，山内　千代，
大庭　明子，伊東　良伯，岡田　久美子，児島　克博，佐々木　一郎，
永山　治男　(大分医大・精神神経科)

111. 時間制限給餌のラット脳内セロトニン代謝に及ぼす影響……248
奥野　正景，切池　信夫，井上　幸紀，松井　徳造，川北　幸男
(大阪市大・医・神経精神医学)

112. PCR 法によるヒト 5-HT$_{1A}$ 受容体遺伝子のクローニングとその発現……250
望月　大介，藤井　快枝，嵯峨井　均　(東洋醸造・探索研)

113. ラット線条体 Dopamine 取り込み機構に及ぼす Methamphetamine およびNMDA 受容体拮抗薬 (MK-801) 併用反復投与の影響……252
村木　彰，小山　司，中山　誠，大森　哲郎，山下　格
(北海道大・医・精神医学)

114. メタンフェタミン及びハロペリドール慢性投与後のラット D2 ドパミン受容体 m-RNA の検討……254
富田　博秋，曽良　一郎，石津　秀樹，藤原　豊，秋山　一文，
大月　三郎，H. I. Yamamura[*]
(岡山大・医・神経精神医学，アリゾナ大・医・薬理[*])

115. 摂食行動とラット線条体ドパミン代謝について：マイクロダイアリシス法による検討……256
井上　幸紀，切池　信夫，奥野　正景，松井　徳造，川北　幸男
（大阪市大・医・神経精神科）

116. NMDA 受容体を介するラット線条体切片からのドーパミン放出調節作用……258
大森　哲郎，小山　司，松原　繁広，村木　彰，山下　格
（北海道大・医・精神医学）

117. ハロペリドール投与ラットにおけるカタレプシーとドーパミン代謝ならびにセカンドメッセンジャーの変化……260
佐藤　康二，堀越　立，柳沼　典正，柳沼　正俊，白潟　稔，鈴木　裕樹，
宍戸　壽明，金子　元久，熊代　永　（福島県医大・神経精神科）

118. 左右両側視床下部視索上核間の神経連絡……262
津島　宏美，森　眞由美，松田　友宏　（名古屋市大・医・薬理）

119. メタンフェタミン反復投与によるラット線条体ドーパミン取り込み部位の変化 — ドーパミン動態変化がおよぼす影響について……264
中山　誠，小山　司，松原　良次，村木　彰，井上　猛，小田垣　雄二，
山下　格　（北海道大・医・精神医学）

120. 組み換え型ヒト神経成長因子 (rhNGF) のラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 に対する突起伸長作用および acetylcholinesterase 活性上昇作用……266
加藤　浩紀，福元　宏明，垣花　満，岩根　理*，寿野　正廣
（武田薬品・生物研，生物工学研*）

121. 終脳神経細胞に作用する神経繊維伸長因子の特性とその同定……268
田口　隆久，亀井　明仁　（大阪大・基礎工・生物工）

122. 神経成長因子によって発生するカルシウムスパイク……270
山下　明，川名　明夫　（ＮＴＴ基礎研）

123. ヒトグリア細胞増殖抑制因子 (GGIF) の精製とその性質……272
浅井　清文，加藤　泰治，堀田　妙子*，田中　亮*，大塚　隆信**，
松井　宣夫**
（名古屋市大・医・分子医研・生体制御，生化第一*，整形外科**）

124. 交感神経分布促進蛋白の抗体の作製と組織分布……274
黒見　坦　（千葉大・医・高次研・発達生理）

125. 培養中枢ニューロンへの酸素毒性と神経栄養因子……276
榎戸　靖，野々村　健，九島　洋一，畠中　寛
（大阪大・蛋白研・蛋白質生合成）

126. 成熟交感神経細胞のNGFに依存しない生存：細胞内Ca^{2+}の上昇と生存促進因子の放出……278
小池　達郎，田中　秀逸　（佐賀医大・化学）

127. 発生期における視神経線維成長の異常……280
中山　孝　（生理学研）

128. L1接着分子の突起伸展効果とCキナーゼの関与……282
伊藤　康一，阿相　皓晃*，丸山　悠司
（群馬大・医・神経精神薬理（ツムラ），慶応大・医・生理*）

129. 成熟ラット（8週齢）中枢ニューロンの培養……284
西尾　チカ，九島　洋一，畠中　寛　（大阪大・蛋白研・蛋白質生合成）

130. 生後ラット培養中枢ニューロンとインターロイキン-6……286
九島　洋一，濱　登希子*，畠中　寛
（大阪大・蛋白研・蛋白質生合成，三菱化成生命研・脳神経科学*）

131. ヒト14-3-3蛋白質（η鎖）のcDNA単離と構造決定……288
市村　由香，森井　研，荒木　一明*，市村　徹**，礒辺　俊明***，
高橋　康夫*，桑野　良三
（新潟大・遺伝子実験施設，脳研*，大学院自然科学研究科**，
都立大・理***）

132. ラット14-3-3蛋白η鎖のcDNAクローニング及びin situ hybridization法による中枢神経系における発現解析……290
渡辺　雅彦，近藤　尚武，礒辺　俊明*，奥山　典生*，市村　徹*，
桑野　良三**，高橋　康夫**
（東北大・医・解剖，都立大・理・化学*，新潟大・脳研・神経薬理**）

133. ウシ脳由来 Myelin Peptide Amide の分離と同定……292
高松　研，植村　慶一，立元　一彦*
（慶応大・医・生理，スタンフォード大・医・精神科*）

134. 脳に存在する 14kDa 蛋白質の組織分布と成長分化に伴う含量変化について……294
岡橋　育子，柴山　敏子，小俣　久美子，中条　茂男，中谷　一泰，
中村　泰治　（昭和大・薬・生物化）

135. ウシ末梢神経ミエリンの P_0 蛋白に対するモノクローナル抗体の検討……296
根岸　輝彦，吉村　和法*，金子　厚，細川　武，濱口　勝彦，坂本　安*，
北村　邦男*，野村　正彦*　（埼玉医大・神経内科，第一生理*）

136. ウシ末梢神経ミエリン P_0 糖蛋白の硫酸およびウロン酸含有糖鎖の構造解析……298
北村　邦男，坂本　安，田中　早苗，吉村　和法，野村　正彦，
植村　慶一*　（埼玉医大・第一生理，慶応大・医・生理*）

137. ADP-リボシルアルギニン水解酵素の脳内分布とその役割……300
山本　敏文，三村　雄一，加藤　武，山本　秀子*
（横浜市大・総合理・分子認識，都精神研・精神薬理*）

138. 塩基性アミノ酸残基対プロセシング酵素のラット坐骨神経軸索内輸送の可能性……302
山本　敏文，佐藤　重人，篠崎　寛，知久馬　敏幸*，加藤　武
（横浜市大・総合理・分子認識，昭和薬大・薬品分析*）

139. 200KDa ニューロフィラメントのチュブリン重合促進能について……304
田中　稔久，武田　雅俊，中村　祐，工藤　喬，多田　國利，播口　之朗，
西村　健　（大阪大・医・精神医学）

140. メナジオン，Fe-EDTA によるラット脳ミトコンドリア外膜のキヌレニン水酸化反応の活性化……306
平井　久美子，植村　富彦　（都精神研・神経化）

141. マウス脳 MAO に対する種々抗うつ薬の影響……308
江頭　亨，村山　文枝　（大分医大・薬理）

142. 神経発生関連蛋白ドレブリンのラット脳における免疫学的解析と cDNA クローニング……310
白尾　智明，児島　伸彦，井上　明宏，小幡　邦彦　(生理学研・神経化)

143. PC12h-R 細胞を用いた 68kDa ニューロフィラメント遺伝子の発現調節機構の解析……312
中平　健祐，池中　一裕，畠中　寛*，御子柴　克彦
(大阪大・蛋白研・機能制御，生合成*)

144. ミエリン主要構成蛋白質 PLP 遺伝子の非オリゴデンドロサイト系細胞における発現様式……314
鹿川　哲史，池中　一裕，御子柴　克彦　(大阪大・蛋白研・機能制御)

145. Quaking マウスにおける myelin-associated glycoprotein (MAG) 遺伝子の splicing 異常……316
藤田　信也，佐藤　修三，石黒　英明，犬塚　貴，馬場　広子，
栗原　正*，宮武　正　(新潟大・脳研・神経内科，神経薬理*)

146. オリゴデンドログリア特異酵素 CNP の mRNA の Alternative Splicing……318
栗原　正*，桃生　勝己**，崎村　建司，高橋　康夫
(新潟大・脳研・神経薬理，創価大・生命科学研*，
秋田大・医・耳鼻咽喉科**)

147. ラット脳の超らせん DNA 結合タンパク質……320
筒井　公子，岡田　尚志郎，庄盛　敏廉，筒井　研*，関　周司*
(岡山大・医・脳研・病態生化，癌研・生化*)

148. GM1 および α-シアル酸コレステロールによる摘出白鼠神経節内トランスグルタミナーゼの活性化……322
安藤　正人，中島　雄三，永田　豊　(藤田学園保衛大・医・生理)

149. 脳リソゾーム水解酵素群に対する酸性高分子化合物の影響……324
近藤　啓次，水野　龍男，日根野　尚，上野　修一，佐野　輝，
柿本　泰男　(愛媛大・医・神経精神医学)

150. 脳虚血後のラット脳の SOD 様活性の変化……326
金光　秀晃，高木　清，田村　晃，佐野　圭司　(帝京大・医・脳外科)

151. 脊椎動物網膜内における Ornithine Aminotransferase (OAT, EC 2.6.1.13) 分子とその酵素活性の分布……328
加藤　尚彦，中村　史雄*，橋田　誠一**，石川　栄治**，松沢　健夫***
（横浜市大・医・生化，東京大・医・脳研*，宮崎医大・生化**，藤田学園保衛大・医・生化***）

152. 牛脳シトソール Ca^{2+} 非依存性ホスホリパーゼ A_2 の精製……330
平島　豊，高久　晃，L. A. Horrocks*
（富山医薬大・脳外科，The Ohio State Univ., Dept. Physiol. Chem.*）

153. 単離成長円錐の細胞骨格画分に於けるタンパク質構成と内因性リン酸化反応に関する検討……332
森田　光洋，前川　昌平　（東京大・理・生化）

154. C キナーゼ及び CaM キナーゼIIによる，シナプス小胞局在性 58kD 蛋白のリン酸化……334
高橋　正身，藤本　禎子，濱　登希子，宮本　英七*
（三菱化成生命研，熊本大・医・第一薬理*）

155. ラット大脳，海馬，小脳から単離したシナプス後肥厚部に内在する CaM 依存性プロテインキナーゼII基質……336
堂前　純子，鈴木　龍雄，田中　亮　（名古屋市大・医・生化第一）

156. 培養小脳顆粒細胞における CaM キナーゼIIの活性化機構……338
福永　浩司，宮本　英七，T. R. Soderling*
（熊本大・医・第一薬理，バンダービルト大・医・分子生理*）

157. 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：大腸菌の発現系による解析……340
萩原　民雄，大迫　俊二，関原　俊一，渡辺　敦子*，猪飼　篤*，
山内　卓　（都神経研・生化，東工大・生体制御*）

158. カルシニューリンの全一次構造と分子多様性……342
久野　高義，伊東　顕，橋本　健志，向井　秀幸，平井　みどり，
田中　千賀子　（神戸大・医・薬理）

159. カルシニューリンAサブタイプの脳内分布 ……344
斉藤　尚亮，高石　知明，久野　高義，田中　千賀子
（神戸大・医・薬理）

160. 中枢神経内 ^{125}I-endothelins 特異的結合部位……346
丹羽　正美，川口　務*，藤本　明子，前田　哲，栗原　正紀*，
重松　和人**，片岡　泰文，谷山　紘太郎，森　和夫*
（長崎大・医・薬理第二，脳外科*，病理第二**）

161. Neuropeptide Y および Galanin の視床下部内 Norepinephrine Release に及ぼす影響と高血圧における意義について……348
津田　和志，増山　善明，H. Yokoo*，M. Goldstein*
（和歌山県医大・循環器内科，New York Univ. Med. Center*）

162. 長期増強を誘発する内在性ペプチドの探索……350
近藤　哲朗，池中　一裕，藤本　一朗，御子柴　克彦
（大阪大・蛋白研・機能制御）

163. デルタ睡眠誘発ペプチド (DSIP) の Met-enkephalin 遊離作用について……352
中村　明弘，高橋　幸江，境　健司，塩見　浩人
（福山大・薬・第一薬理）

164. 脳シナプス膜へのシグマレセプター結合……354
榎本　理世，荻田　喜代一，米田　幸雄　（摂南大・薬・薬理）

165. ^{3}H-Haloperidol によるラット脳内σ受容体の標識 — 基本的検討と pentazocine および haloperidol 反復投与の影響 —……356
木津　明彦，吉田　幸宏，宮岸　勉　（旭川医大・精神科）

166. PC12D 細胞の神経突起伸張と MAP キナーゼ神経成長因子と繊維芽細胞成長因子の比較……358
北島　哲子，佐野　護　（愛知県コロニー研・形態）

167. NGF 依存性 MAP キナーゼ：部分精製とその性質……360
佐野　護，北島　哲子　（愛知県コロニー研・形態）

168. PC12 細胞のプロテオグリカン：神経成長因子による突起形成に伴う変化……362
仙波　りつ子，大平　敦彦*，柏俣　重夫
（愛知県コロニー研・周生期，発生*）

169. グリア細胞の神経成長因子レセプター……364
天野　武彦，岡部　紀子，山国　徹，小沢　史子，菱沼　文男
（三菱化成生命研）

170. チロシンキナーゼ阻害剤 ST638 による神経成長因子の作用の阻害……366
萩野　顕彦，天貝　裕也*，橋本　誠一**
（奥羽大・歯・生物，生理*，生化**）

171. 成長抑制因子 (GIF-1) の精製と同定……368
内田　洋子，滝尾　擴士*，井原　康夫**，朝長　正徳***
（都老人研・臨床病理，臨床生理**，理研フロンティア*，
東京大・脳研・病理***）

172. 神経組織に多く在存する新しいアクチン結合蛋白質……370
前川　昌平　（東京大・理・生物化）

173. ラット小脳タンパク質Ⅴ-1：細胞分化制御因子及び細胞周期制御因子との
相同性……372
田岡　万悟，礒辺　俊明，奥山　典生，小沢　史子*，菱沼　文男*，
山国　徹*　（都立大・理・化学，三菱化成生命研*）

174. αクリスタリンBの非レンズ組織での分布 — 特異抗体の作製とイムノア
ッセイ法の確立 — ……374
加藤　兼房，篠原　春夫，黒部　直美，稲熊　裕，清水　喜久男*
（愛知県コロニー研・生化，医学生物学研*）

175. 発育期における Eℓ マウス脳のメチオニンエンケファリン — HPLC/RIA
法による検討 —……376
大西　博，小出　誠司，片山　雅文，甲斐　利弘，山上　栄，川北　幸男
（大阪市大・医・神経精神科）

176. PET によるヒスタミン H-1 受容体測定 — イヌ脳，ヒト脳での画像化の試み — ……378
谷内　一彦，渡邉　建彦，畑澤　順*，岩田　錬*，石渡　喜一*，
横山　浩之，伊藤　正敏*，井戸　達雄*
（東北大・医・第一薬理，東北大・サイクロトロンRIセンター*）

177. β-ヒドロキシヒスタミンのヒスタミン受容体に対する作用 ……380
長谷川　武史，橋本　泰道*，佐藤　伸介*，川瀬　秀明*，中嶋　照夫*
（京都府医大・同位元素，精神科*）

178. NG108-15 細胞における外来性G蛋白質 α サブユニットのシグナル伝達系に及ぼす効果……382
額山　敏秀*,**，橋井　美奈子***，亀山　仁彦**東田　陽博***
（京都大・医・医化*，東京大・医・脳研**，金沢大・医・神経情報研***）

179. ムスカリン受容体とG蛋白質の相互作用に対する Mg の効果……384
塩崎　一昌，芳賀　達也　（東京大・医・脳研・生化）

180. ラット大脳における百日咳毒素によるG蛋白の ADP-リボシル化反応に対するリチウムの影響……386
小田垣　雄二，小山　司，松原　繁広，山下　格
（北海道大・医・精神医学）

181. $GABA_B$ 受容体とG蛋白質の相互作用 — その選択性とG蛋白質サブユニットの関与 — ……388
森下　理香，加藤　兼房，浅野　富子　（愛知県コロニー研・生化）

182. G蛋白質 G_{II} のイムノアッセイ法とその脳内分布……390
浅野　富子，篠原　春夫，森下　理香，加藤　兼房
（愛知県コロニー研・生化）

183. 温度-感受性高親和性〔^{3}H〕Tryptamine 結合部位：GTP 結合蛋白質との相互作用について……392
斎藤　道子，木村　光利，武市　正美，石谷　良一
（城西大・薬・薬理）

184. 開口放出の分子機構における GTP 結合蛋白質の関与……394
今泉　美佳，河江　信幸，村松　俊，熊倉　鴻之助
（上智大・生命研・神経化）

185. ウシ脳コート小胞で見られる ^{3}H-GTP 結合 site ……396
諸井　佳代子，久我　哲郎，門田　健*
（千葉大・医・高次研・高次神経，都精神研・神経化*）

186. ラット大脳皮質アデニル酸シクラーゼ系に及ぼす Mastoparan の影響……398
八田　愼一，大鹿　英世　（札幌医大・薬理）

187. 脳タキキニン・ペプタイド受容体サブタイプと循環調節：新しいタキキニン・ペプタイド neuropeptide γ について……400
高野　行夫，萩尾　哲也，中山　靖久，斎藤　亮，永島　亮*，神谷　大雄
（福岡大・薬・薬理，藤沢薬品・探索研*）

188. ラット中枢神経系における CCK 遺伝子の個体発生
— in situ hybridization — ……402
浅尾　敏一，白　先溶，稲垣　忍，高木　宏
（大阪市大・医・第一解剖）

189. 一次知覚神経に存在する神経ペプチドの炎症反応への関与……404
米原　典史，今井　康夫，陳　季強，猪木　令三　（大阪大・歯・薬理）

190. アオウミガメ脳糖脂質の個体発生的変化……406
玉井　洋一，中村　和生，小嶋　久子，北島　理恵
（北里大・医・生化）

191. 白鼠上顎および迷走神経節内への中性アミノ酸取り込み系に及ぼす α-シアル酸コレステロールの効果……408
中島　雄三，安藤　正人，永田　豊　（藤田園保衛大・医・生理）

192. GM1糖脂質あるいは α-シアル酸コレステロールによる摘出白鼠神経節内タンパク代謝の変動……410
中島　雄三，安藤　正人，永田　豊　（藤田学園保衛大・医・生理）

193. PC12 及び NG108-15 細胞の Ca^{2+} 動員に対する小胞体 Ca^{2+}-ATPase 阻害薬 thapsigargin の効果……412
竹村　晴夫，横沢　紀子*，小熊　恵二*，O. Thastrup**，大鹿　英世
（札幌医大・薬理，微生物*，Dept. Clin. Chem., Univ. Hospital, Copenhagen**）

194. A_1 アデノシンレセプターのカルシウムイオンによる活性化……414
川島　誠一，T. Zalewska*
（都老人研・生化，ポーランド科学アカデミー*）

195. 脳に存在する Ca 誘発性 Ca 遊離チャンネルのリン酸化……416
吉田　明，高橋　正身*
（大阪大・理・生物，三菱化成生命研・脳神経化*）

196. 単離成長円錐画分における内因性チロシンリン酸化：130K蛋白質の同定……418
五十嵐　道弘*，斎藤　繁**，小宮　義璋*
（群馬大・医・分子病態*，麻酔・蘇生**）

197. 精神分裂病死後脳におけるキスカル酸レセプターに関する研究……420
車地　暁生，石丸　昌彦，融　道男　（東京医歯大・医・神経精神医学）

198. 精神分裂病死後脳側頭葉皮質のペプチド受容体について……422
澁谷　治男，熊代　新，森　博史，融　道男
（東京医歯大・医・神経精神科）

199. Pick 小体細管の精製と免疫学的性質……424
徳武　哲，山本　明広　（都精神研・分子生物）

200. Eℓ マウス P_2 フラクションの膜流動性について……426
平松　緑，R. D. Velasco，枝松　礼，水川　公直*，河野　雅弘**，
森　昭胤
（岡山大・医・脳研・機能生化，第一解剖*，日本電子・ESR応用研**）

201. Eℓ マウス脳における poly (A) polymerase の諸性質……428
木岡　哲郎，山上　栄，撫井　弘二，大西　博，川北　幸男
（大阪市大・医・神経精神医学）

202. Eℓ マウスに対するオピオイドアゴニスト及びプロテアーゼインヒビターの抗痙攣作用……430
小出　誠司，大西　博，片山　雅文，甲斐　利弘，山上　栄，川北　幸男
（大阪市大・医・神経精神科）

203. WEB1881 の脳内アセチルコリン神経系に及ぼす影響 — AF-64A 投与ラットを用いた解析 — ……432
橋本　恒一，橋本　美佐，栗山　欣弥　（京都府医大・薬理）

204. AF64A-PICRYLSULFONATE のコリン作動性神経系への作用についての行動薬理学的検討……434
稲川　健太郎，井藤　悦朗，原崎　博美，野田　行文
（中外製薬・探索研）

205. WOBBLER MOUSE MOTOR NEURON DISEASE に対する MK801 の治療効果……436
菱田　良平，倉橋　幸造，冨山　誠彦，布村　仁一，三浦　裕之，
松永　宗雄*　（弘前大・医・第三内科，臨床神経*）

206. 脳損傷に伴う脳内 NGF 及び aFGF レベルの変動……438
石川　リカ**，錦織　浩治**，古川　昭栄*
（国立精神神経センター・神経研*，キリンビール・医薬開発研**）

207. 前脳基底部および中隔野損傷ラットの学習記憶障害における相違 — 特に水迷路課題について……440
増田　泰伸，山下　元司，地田　久男　（高知医大・神経精神科）

208. キンドリング・ラット海馬における CaM キナーゼII自己リン酸化の変化……442
小幡　邦彦，鍋田　弥生　（生理学研・神経化）

209. 扁桃核キンドリングラット脳における興奮性アミノ酸受容体の分析……444
秋山　一文，米田　幸雄**，荻田　喜代一**，伊藤　高，大原　明宏，
曾良　一郎*，大月　三郎
（岡山大・医・神経精神科，慈圭病院*，摂南大・薬・薬理**）

210. 培養細胞（Bu-17, human glioma）におけるアミロイドβタンパク前駆体……446
亀谷　富由樹，羽賀　誠一*，田中　喜久子，石井　毅*
（都精神研・分子生物，超微形態*）

211. Trimethyltinによる異常行動と脳内伝達物質の関連性について……448
松本　明，野口　幸男，九穂　泰三，芝軒　信次，淺井　聰，石川　紘一
（日本大・医・薬理）

212. CAN PIRACETAM PROTECT A STABILIZED OPERANT PERFORMANCE AGAINST THE AMNESTIC EFFECTS OF CHRONIC HYPOXIC TREATMENT?……450
E. Chleide*,**，J. Bruhwyler* & K. Ishikawa**
(Dept. Psychol., Fac. Med., Namur Univ., Belgium*，日本大・医・薬理**)

213. ヒトrecombinant SOD（rSOD）の低酸素性神経細胞傷害に対する改善効果……452
木下　章，山田　和雄，莚井　武，甲村　英二，早川　徹
（大阪大・医・脳外科）

214. 低酸素負荷後のグルタミン酸による神経細胞傷害の増強……454
甲村　英二，木下　章，山田　和雄，早川　徹　（大阪大・医・脳外科）

215. 脳虚血によるCA 1遅延細胞死に先行するclathrinの変化……456
吉見　建二，工藤　喬*，岩田　宜芳，武田　雅俊*，山下　正*，
多田　國利*，播口　之朗*，西村　健*
（三共㈱・生物研，大阪大・医・精神神経科*）

216. ラット海馬切片におけるD-アスパラギン酸取り込みの性質……458
桑原　紀，光本　泰秀*，千葉　賢三，毛利　哲郎
（北陸大・薬・創薬研，トロント小児病院・研*）

217. 寒冷ストレス誘発鎮痛の形成と中枢モノアミン動態……460
長谷川　仁美*，武田　弘志*,**，小口　勝司*
（昭和大・医・第一薬理*，東京医大・薬理**）

218. 強制水泳ストレスによるラット脳内イノシトール燐脂質代謝の変動……462
森信　繁，川並　登美子，桑山　紀彦，十束　支朗
（山形大・医・精神神経医学）

219. 老化促進マウス SAM-P/8，R/1 における脳内ヒスタミン濃度の加齢変化……464
目黒　謙一，谷内　一彦*，渡辺　建彦*，前山　一隆*，松澤　大樹**
（東北大・医・第四内科(老人科)，薬理第一*，東北大・抗酸菌病研・放射線医**）

220. 老化促進マウス脳のグルタミン酸含量，放出および受容体の加齢変化……466
北村　佳久，趙　学慧，野村　靖幸　（北海道大・薬・薬効）

221. 老齢ラット脳における NMDA レセプター複合体の減少……468
田丸　政男，米田　幸雄*，荻田　喜代一*，清水　遵，永田　豊
（藤田学園保衛大・医・生理，摂南大・薬・薬理*）

222. 老齢マウスにおける脳損傷に伴う Ia 陽性細胞の出現……470
遠藤　真澄，田平　武　（国立精神神経センター・神経研・疾病第六）

223. キスカル酸レセプター刺激によるイノシトールリン脂質代謝応答の加齢ラット海馬での増大……472
齋藤　巨志，中川　勇三，石原　高文，木村　亨史*，長嶋　和郎*
（サントリー・生物医学研・分子薬理・神経科学，北海道大・医・第二病理*）

224. ラット 28kD Ca^{2+} 結合蛋白質の高感度 EIA 法の確立 — 神経系における局在と発育・加齢に伴う変動 —……474
黒部　直美，篠原　春夫，仙波　禮治*，稲垣　俊明**，佐藤　秩子***，
加藤　兼房
（愛知県コロニー研・生化，周生*，名古屋市厚生院**，愛知医大・加齢研***）

225. ラット胎児脳シナプトソーム画分の 50K タンパク……476
竹田　稔，竹田　二美代，小俣　久美子*，中谷　一恭*，戸部　敞**，
柳沢　富紀子，中村　泰治*，佐藤　永雄
（昭和大・医・生化，薬・生物化*，生理化**）

1　脳虚血時の神経細胞特異的蛋白質を用いた免疫組織化学的検索 -細胞下コンパートメントマーカーとしてのMAP2, Synapsin Iの有用性について-

北川　一夫、松本　昌泰、祖父江　憲治＊＊、多賀谷　昌史、桑原　敬介、秦　龍二、半田　伸夫、福永　隆三、木村　和文＊、新延　道夫＊＊＊、御子柴　克彦＊＊＊、鎌田　武信　（大阪大学医学部第一内科、同バイオ研核医学＊、同高次研神経薬理生化学＊＊、大阪大学蛋白質研究所＊＊＊）

〔要約〕

再現性の良好な砂ネズミ片側脳半球虚血モデルおよび遅発性神経細胞壊死のモデルを用いて虚血性神経細胞障害をシナプス後膜側、シナプス前膜側の特異的蛋白質である微小管結合蛋白２(Microtubule associated protein 2, MAP2)、シナプシンI(Syn I)に対する抗体を用いた免疫組織化学的染色法により検索した。片側脳半球虚血モデルにおいてMAP2の免疫反応は虚血後３分で既に虚血側海馬subiculum-CA1に低下を認め、虚血30分時には海馬、大脳皮質、線条体、視床を含む虚血側の広範な領域でMAP2の免疫反応の脱落を認めたが、Syn Iの免疫反応に変化はなかった。一方非虚血側脳半球においては虚血後１日目までは変化がなかったが３日目に海馬歯状回分子層の内側1/3に限局したSyn Iの免疫反応の脱落が見られ、同部位では７日目に部分的な、28日目には完全なSyn Iの免疫反応の回復が認められた。５分間の前脳虚血後海馬CA1に生ずる遅発性神経細胞壊死の領域ではMAP2の免疫反応はCA1全域で完全に消失しているのに対しSyn Iの免疫反応は保持されていた。以上の結果から、脳虚血時にはシナプス後膜側およびそこに局在するMAP2がきわめて脆弱であるのにたいし、シナプス前膜側は比較的抵抗性を有することが示された。またSyn Iをマーカーとした免疫組織学的検索は非虚血領域に生ずるWallerian変性によるシナプス終末部の脱落およびその後に生ずるシナプス再生現象の評価をとらえるのに極めて有用であることが明らかとなった。

（目的）

神経細胞は虚血に対し最も脆弱な細胞であるが、細胞体、樹状突起、軸索及びシナプス終末部の各部位は虚血に対し異なった易損傷性を有するものと考えられる。近年神経化学領域の進歩により神経細胞、さらには神経細胞の細胞下各コンパートメントに特異的な各種の蛋白質の同定がなされてきている。今回我々は細胞体、樹状突起といったシナプス後膜側に局在する微小管結合蛋白2 (MAP2)と、シナプス終末部に局在しシナプス伝達機構に関与するとされるSynapsin I(Sy I)に注目し、砂ネズミ脳における局在と虚血及び血流再開通時における変化を免疫組織化学的に検索した。

（方法）

動物は成熟砂ネズミ（体重60-80 g）を用いた。MAP2, Syn Iの免疫組織化学的検索は軽エーテル麻酔下に断頭後、ただちに脳を取り出しアルコール酢酸混合液による滲潤固定あるいは深フェノバルビタール麻酔下に開胸し、経心的に0,2%ピクリン酸-2%パラフォルムアルデヒド液により灌流固定した後、脱水透徹しパラフィン包埋した後、作成した薄切切片を抗MAP2抗体あるいは抗Syn I抗体を用いたPAP法による免疫組織化学的染色に供した。

ー砂ネズミ片側脳半球虚血モデルによる検討ー　既報の一時的総頸動脈結紮法(１、３)により結紮後に重症脳虚血を呈しうる砂ネズミを選別し対象とした。これらの選別された砂ネズミを数日後に再度エーテル軽麻酔下に右総頸動脈を露出し、麻酔より覚醒後ただちにクリップした。虚血後神経症状を観察し、3, 5, 10, 15, 30分後に各々４匹ずつ屠殺し、残りの動物は30分間の虚血後、血流再開し24,72時間,7日、28日後に各々４匹ずつ屠殺しそれぞれ免疫組織化学的検索に供した。

ー両側脳半球虚血モデルでの検討ー　砂ネズミを軽エーテル麻酔下に両側総頸動脈を露出し、麻酔より覚醒後クリップし５分間の虚血後血流再開し７日後に、抗MAP2抗体,抗Syn I抗体を用いた免疫組織化学的検索に供した。

（成績）

正常砂ネズミ脳ではMAP2の免疫反応は細胞体、樹状突起に局在するのに対し、Syn Iの免疫反応は樹状突起、細胞体にはみられず、それらを取り囲む密な顆粒状免疫陽性構造として認められた。軸索にはMAP2, Syn Iの免疫反応はともに認められなかった。

一片側脳半球虚血モデルでの検討一右総頸動脈閉塞後全例において重症脳虚血症状が観察された。MAP2の免疫組織染色では虚血後３分時にすでに海馬subiculum-CA1において免疫反応の低下した虚血病変を認め、虚血５分時には新たにCA2にも病変を認めた。虚血10分時にはCA3に、15分時には視床にも虚血病変の出現を認め、30分時には線条体、海馬、視床、大脳皮質を含む虚血側半球の広範な領域で免疫反応の低下した虚血病変を認めた（２）。一方Sy Iの免疫反応は虚血30分時までは虚血側半球を含む脳全体において非虚血時と同程度に保たれていた。30分虚血後血流再開24時間後にはMAP2の免疫反応は虚血側半球の大部分の領域で消失していたが、Syn Iの免疫反応は虚血側視床でのみ低下していた。血流再開３日後には虚血側半球の大部分の領域でMAP2同様Syn Iの免疫反応も低下消失を認めた。一方非虚血側脳半球では24時間後までではMAP2, Syn Iの免疫反応に変化は認められなかったが、72時間後には海馬歯状回分子層の内側1/3 の領域に限局したSyn Iの免疫反応の低下を新たに認めた。同領域ではMAP2の免疫反応はよく保たれておりシナプス終末部の選択的な障害であることが示唆された。分子層全体に対する免疫反応の脱落部位の厚みの割合を％で表示し半定量的に評価したところ36.6±2.6%（N=4, 平均±標準偏差）であった。７日後にも同領域にSyn Iの免疫反応の低下を認めたが、その範囲は72時間後に比し明らかに狭まっており、分子層全体に占める割合は26.8±1.7%(N=4)と減少していた。28日後には非虚血側の海馬のSyn Iの免疫反応は非虚血時と同程度に回復していた。

一両側脳半球虚血モデルでの検討一５分間の虚血後７日目に海馬CA1を観察したところ全例において大部分の神経細胞の脱落を認めた。同領域ではMAP2の免疫反応はほぼ完全に消失しているのに対し、Syn Iの免疫反応は非虚血時と同程度によく保持されていた。

（考察）

通常のHE染色等では病変を検出できない虚血超早期からMAP2の免疫反応が低下消失していくのに対し、Syn Iの免疫反応はよく保持されている事から、シナプス後膜側特にそこに局在する蛋白質であるMAP2が虚血にきわめて脆弱であることが示された。しかもMAP2免疫反応の低下した虚血病変の出現様式は脳内各部位で異なっており、部位部位における虚血に対する脆弱性の違いを示しているものと思われる。この様な結果よりMAP2をマーカーとした免疫組織染色は虚血性神経細胞障害を最も鋭敏にとらえうる手法の一つである事が明らかとなった。さらに選択的神経細胞壊死の典型的なモデルである両側脳半球虚血後に海馬CA1に生ずる遅発性神経細胞壊死においてはMAP2免疫反応が完全に消失しているのに対し、Syn Iの免疫反応が残存していることからシナプス後膜側の選択的な障害、脱落が起こっていることが明らかとなった。非虚血側脳半球にみられたSyn I免疫反応の選択的な脱落はWallerian 変性によるシナプス終末部の脱落、その後の免疫反応の回復はシナプス再生を反映しているものと考えられる。シナプス終末部の脱落や再生を光学顕微鏡的に容易にかつ鋭敏にとらえうる事は、脳虚血のみならず広くシナプス再生に関与した病態の検索や治療法の探索に有用なものであると考えられる。

（文献）1. Kitagawa K., Matsumoto M., Handa N. et al., Brain Res. 479: 263-269, 1989

2. Kitagawa K., Matsumoto M., Niinobe M. et al., Neuroscience 31: 401-411, 1989

3. Matsumoto M., Hatakeyama T., Akai F. et al., Stroke 19: 490-497, 1988

2　神経細胞の虚血耐性獲得に関する検討

-Ischemic tolerance phenomenon found in the brain-

松本　昌泰、北川　一夫、多賀谷　昌史、桑原　敬介、秦　龍二、中林　才治、半田　伸夫、福永　隆三、木村　和文＊、新延　道夫＊＊、御子柴　克彦＊＊、鎌田　武信　（大阪大学医学部第一内科、同バイオ研核医学＊、大阪大学蛋白質研究所＊＊＊）

〔要約〕

砂ネズミ両側総頸動脈閉塞による脳虚血モデルを用いて、神経細胞にとって致死的な虚血負荷を加える前にあらかじめ軽度の虚血負荷を加えておくことが保護効果（虚血耐性現象）を示すかどうか検討した。海馬CA1 神経細胞にとって５分間の前脳虚血は致死的であるが予め１日前または２日前に非致死的な２分虚血を加えておくことにより有意な保護効果がみられ、さらに５分虚血の２日前に１日間隔で２分虚血を２回加えておいたものでは顕著な保護効果がみられた。海馬CA3 神経細胞おいては10分間の前脳虚血は半数以上の細胞が障害を受ける虚血負荷であるが予め10分虚血の２日前にCA3 神経細胞にとっては非致死的な２分あるいは５分虚血を加えておく事により明らかな保護効果が観察された。熱ショックタンパク質72(HSP72) 抗体を用いたWestern blottingによる検討では虚血耐性現象を誘導する２分虚血及び５分虚血ではHSP72 の発現の増加が認められるが、虚血耐性を誘導し得ない１分虚血ではHSP72の発現は認められなかった。以上の結果より予め非致死的ではあるがHSP72を誘導しうるような軽度の虚血負荷を加えておくことがその後に加わる本来致死的な虚血に対し保護効果を示し虚血耐性を誘導しうることが明らかとなった。

（目的）

脳虚血病態の解明に際して、虚血に対する神経細胞の負荷応答の検索は必須である。しかしながら、神経細胞が虚血に対してきわめて脆弱であるため、致死的な虚血負荷に対する神経細胞の応答性に関する報告は散見されるが、非致死的な虚血ストレスが神経細胞の負荷応答性に及ぼす影響について検討した報告は殆ど見られない。今回我々は、砂ネズミ両側総頸動脈閉塞による一過性前脳虚血モデルを用いて、予め加えておいた可逆的な虚血負荷（海馬CA1 神経細胞にとっては2分、CA3 神経細胞にとっては2分、5分）が、その後に加わる神経細胞にとって致死的な虚血負荷（海馬CA1 神経細胞にとっては5分、CA3 神経細胞にとっては10分）に対し保護効果を示すこと（虚血耐性現象-Ischemic tolerance phenomenon）を見いだしたので報告する。さらに虚血耐性を誘導しうるような軽度虚血負荷時にストレスタンパク質の一つであるHSP72 が発現しているかどうかを海馬試料を用いたWestern blottingにより検討した。

（方法）

成熟砂ネズミ（体重60-80 g）を対象とした。脳虚血は軽エーテル麻酔下に頸部皮膚を正中にて切開、両側総頸動脈を露出し、麻酔より覚醒後ただちにクリップする事により作成した。虚血時間はクリップする時間を変更することにより任意に設定した。虚血中の体温は37°Cに保った。

（５分虚血群）61匹の動物を以下の6 群に分類した。A 群:頸動脈を剥離したがクリップをしなかった偽手術群（n=5）、B 群:5 分虚血のみを加えたもの（n=10）、C 群:2 分虚血を負荷した1 日後に5 分虚血を加えたもの（n=9）,D 群:2 分虚血を負荷した2 日後に5 分虚血を加えたもの（n=10）、E 群:2 分虚血を1 日間隔で2 回負荷した2 日後に5 分虚血を加えたもの（n=11）、F 群:2 分虚血を12時間間隔で2 回負荷した12時間後に5 分虚血を加えたもの（n=6）、G 群:1 分虚血を1 日間隔で2 回負荷した2 日後に5 分虚血を加えたもの（n=10）。動物は5 分虚血後血流再開し7 日後に断頭し、脳を摘出した後、アルコール酢酸混合液にて４時間浸潤固定し、脱水透徹の後パラフィン包埋し、作成した背側海馬を含む薄切切片をヘマトキシリンエオジン（HE）染色及び抗微小管結合蛋白２(microtubule associated protein 2, MAP2)抗体を用いた免疫組織化学的染色に供した（１）。海馬CA1 の細胞壊死の程度は以下の4 段階に分類した。Grade 0:全く壊死細胞

を認めない、Grade I:数個の壊死細胞を散見するのみ、Grade II:壊死細胞と正常細胞が混在する、Grade III:大部分の細胞が壊死に陥っている。

（10分虚血群）26匹の動物を以下の３群に分類した。A 群:10分虚血のみを負荷したもの（n=7）、B 群:2 分虚血を負荷した２日後に10分虚血を加えたもの（n=13）、C 群:５分虚血を負荷した２日後に10分虚血を加えたもの（n=6）。動物は10分虚血後血流再開し７日目に５分虚血群と同様に組織学的検索に供した。海馬CA3 神経細胞の障害の程度はGrade 0（10%以下の細胞が障害）、Grade I （10-30%の細胞が障害）、Grade II （30-50%の細胞が障害）、Grade III （50%以上の細胞が障害）の４段階に分類した。

（HSP72の発現に関する検討）対象は無処置成熟砂ネズミ、 １分虚血負荷48時間後、２分虚血負荷48時間後、５分虚血負荷48時間後の成熟砂ネズミ、各々４匹とした。これら動物を断頭屠殺後ただちに氷上にて脳を取り出し両側海馬を摘出し秤量後、10倍量のSample buffer（2% SDS, 5% Mercaptoethanol, 10% glycerol, 62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1%BPB）にてホモジナイズした後、90°C3分間熱処理を加え各群0.5ulずつを電気泳動用サンプルに供した。SDS-PAGEにて電気泳動しニトロセルロース膜に転写したのち、マウスモノクローナル抗HSP72抗体を用いAvidin-biotin peroxidase complex法を用いて可視化した。

（成績）

（５分虚血群）A 群は全例Grade 0 であった。B 群は10例中9 例がGrade III, 1 例がGrade II を各々示していた。C 群では9 例中5 例、D 群では10例中6 例がGrade 0またはI を示し、両群ともB 群に比し有意な保護効果が認められ、さらにE 群では11例全例がGrade 0(n=9)またはGrade I(n=2)を示し顕著な神経細胞保護効果を認めた。F 群6 例、G 群10例はすべてGrade II またはIIIを示し、保護効果を認めなかった（２）。

（10分虚血群）A 群は７例中２例がGrade II, ５例がGrade IIIを示し海馬CA3に明らかな神経細胞障害を示したのに対し、B群では13例中8例、C群では６例全例がGrade 0またはIを示し保護効果が認められた。

（HSP72の発現に関する検討）無処置動物、１分虚血48時間後の動物ではWestern Blottingによる明らかなバンドを認めなかったが、２分虚血48時間後、５分虚血48時間後の動物の海馬試料では明らかに認識しうるバンドを72kDに一致した部分に認めた。

（考察）予め非致死的な虚血負荷を加えておくことが、その後に加わる神経細胞にとって本来致死的な虚血負荷に対する保護効果を示すことが海馬CA1, CA3神経細胞において明らかとなった。さらにこの虚血耐性現象を誘導し得るにはHSP72を発現させる程度の強さの虚血ストレスが必要である事も明らかとなった。従来耐性現象としては熱耐性現象が広く知られており熱ショックタンパク質がその発現に深く関与していることがしめされつつある。今回熱と並んで生体の被りやすいストレスとしての虚血負荷に対し耐性現象が生ずる事を砂ネズミ脳虚血モデルを用いて明らかとした。虚血耐性発現時にHSP72が誘導、合成されている事が示されたが、HSP72そのものが分子機構にどの様に関与しているかは定かでない。この虚血耐性現象の分子レベルでのメカニズム解明は脳虚血病態検索上きわめて重要と思われる。

（文献）1. Kitagawa K., Matsumoto M., Niinobe M., et al. Neuroscience 31, 401-411, 1989.

2. Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M., et al. Brain Res. in press.

3 慢性脳血流低下状態に於ける細胞骨格蛋白の変化

工藤　喬、多田國利、武田雅俊、山下　正、田中稔久、
服部英幸、谷向　知、森田　仁、播口之朗、西村　健
（大阪大・医・精神医学）

〔要約〕砂ネズミの両側総頸動脈に独自に開発したコイル状クリップを装着することにより慢性脳血流低下モデルを作製し、３カ月の飼育後の脳内細胞骨格蛋白の変化について、免疫組織学的手法を用いて検討したところ以下の結果を得た。①抗MAP2抗体を用いた染色によれば、偽手術群の皮質では樹状突起が明瞭に染め出されるのに対し、実験群に於いてはその染色性が低下している部分を認めた。②200KD-neurofilament（NF）の燐酸化されたepitopeを認識すると考えられる抗200KD-NF抗体を用いた染色によれば、実験群の視床の軸索に於いて偽手術群より強い染色性を認めた。③抗GFAP抗体を用いた染色によれば、実験群の視床に於いて抗200KD-NF抗体による染色性が強い軸索に隣接する星状膠細胞の中に染色性の上昇したものが多く認められた。以上のことから、慢性脳血流低下状態において樹状突起、軸索、及びグリア細胞を構成するある種の細胞骨格蛋白が変化を受け、それが引き続いて生じるであろう神経細胞障害の重大な誘引となることが示唆された。

［目　的］

我々はこれまでに砂ネズミの両側総頸動脈に独自に開発したコイル状クリップを装着することにより慢性脳血流低下モデル動物を作製し、その学習能力に低下がみられること、その脳内に於いて軽度のMAP2の減少が認められることを報告した(2)(3)。更に、このモデル動物に改良を加え長期間飼育し、神経病理学的に検討した結果、皮質のひ薄化、白質の粗鬆化、脳室の拡大など、一過性脳虚血後の病理所見と趣を異にする多様な所見が得られ(4)、臨床で遭遇する脳血管性痴呆などの脳血管障害の病態により近いモデル動物と我々は考えている。今回、慢性的な脳血流低下状態がもたらす以上のような組織変化の過程を検討する目的で、いくつかの細胞骨格蛋白に注目し、免疫組織学的手法を用いて検討した。

［方　法］

砂ネズミの片側総頸動脈をpentobarbital麻酔下に露出し、コイル状クリップを装着して狭窄をくわえ、１週間の回復の後、残りの総頸動脈にも同様に狭窄を加えた。３カ月間の飼育の後、生理食塩水及び10%ホルマリンによる経心的還流固定を行った。摘出脳を更に数日間ホルマリン固定後、パラフィン包埋し背側海馬レベルで厚さ６μmの冠状切片を作製した。これら切片を、抗MAP2monoclonal抗体（Amersham社）、抗200KD-NF monoclonal抗体（Amersham社）、抗GFAP monoclonal抗体（Labsystem）を第１抗体として反応させ、DABを発色基質として、avidin biotin peroxidase-complex法（Vectastain ABC kit, Vector Lab.）にて染色したのち、ヘマトキシリンにて核染色を行った。対照には偽手術をしたものを用いた。抗200KD-NF抗体に関しては、それが燐酸化されたepitopeに対するものか否かについて検討した。即ち、Czosnekらの方法(1)により砂ネズミの全脳から粗neurofilament分画を抽出し、Hisanagaらの方法(6)で脱燐酸化し、その免疫反応性についてimmunoblotting法にて検討を行った。

［結　果］

（１）免疫組織学的検討：＜抗MAP2抗体による染色＞偽手術群の皮質では本抗体により明確に樹状突起が染色されるのに対し（図１Ａ）、実験群の皮質では、核染色によって神経細胞脱落が明らかでない部分でも樹状突起の染色性が不明瞭な部分が認められた（図１Ｂ）。また実験群の海馬に於いても樹状突起の染色性が低下している部分が認められた。

＜抗200KD-NF抗体による染色＞実験群の視床に於いて本抗体に強く染色される軸索が偽手術群より多く観察された（図２Ａ，Ｂ）（図３Ａ，Ｂ）。しかし核染色によれば、実験群のその部位は明かな神経細胞脱落を認めなかった。immunoblotting法により本抗体は、脱燐酸化された200KD-NFに対する染色性がかなり低下することから、燐酸化されたepitopeを認識するものと考えられた（図５）。

＜抗GFAP抗体による染色＞実験群のいくつかの部位で、本抗体による染色性の増加した星状膠細胞が認められた。興味深いことに抗200KD-NF抗体により強く染色された視床の軸索に隣接する部位で本抗体の染色性が増大した星状膠細胞を認めた（図４）。

［考　察］

慢性脳血流低下によってMAP2、200KD-NF、GFAPなどの細胞骨格蛋白が神経細胞脱落が起こる以前に変化を受けることが観察され、慢性脳血流低下は軸索、樹状突起、グリアそれぞれに何等かの影響を及ぼすことが示唆された。MAP2はこれまでの我々の検討から一過性の脳虚血直後からカルシウム依存性中性蛋白分解酵素により分解を受けることが示唆されているが(5)(7)、慢性脳血流低下状態に於いても同様の機序が関与しているか否かは、今後の詳細な検討が必要であろう。また、慢性脳血流低下脳に於いて抗200KD－NF抗体に対する染色性が増大した軸索が多く観察される点に関しては、200KD- NFが増生しているのかあるいは使用した抗体の性質から燐酸化されたそれの比率が増加しているのかは現時点では結論づけられないが、何等かの蛋白代謝異常が軸索に生じていることが示唆されよう。グリア細胞も慢性脳血流低下状態に反応して、細胞骨格蛋白の変化を生じることが観察された。しかも蛋白代謝の異常が示唆された軸索と相互に影響し合っている様にみられることも興味深い。今回紹介したような細胞骨格蛋白の変化は引き続いて起こるであろう細胞死をも含めた神経細胞障害の重大な誘引となりうることは想像に難くない。これらの変化を更に検討することは、慢性脳血流低下状態の病態解明に大きな寄与をもたらしてくれるであろう。

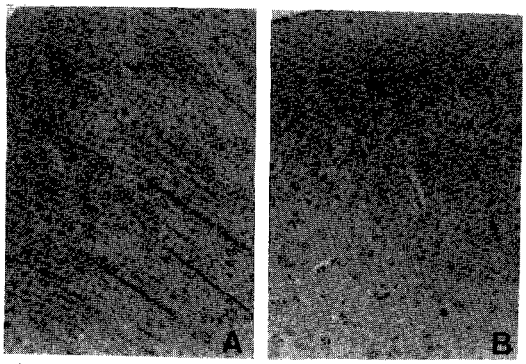


図 1
抗MAP2抗体による皮質の免疫組織（×200）
A：偽手術脳／B：慢性血流低下脳

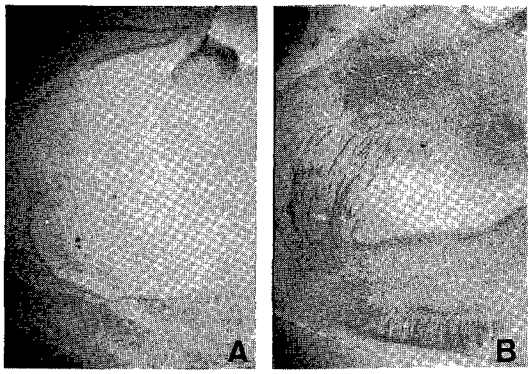


図 2
抗200KD-NF抗体による視床の免疫組織（×20）
A：偽手術脳／B：慢性血流低下脳

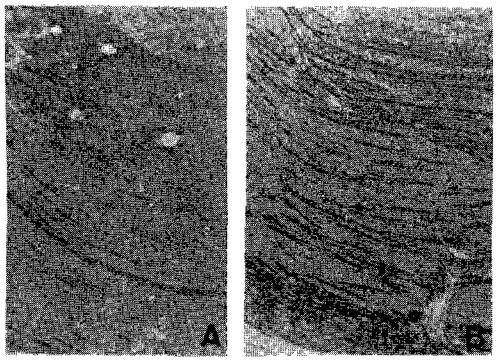


図 3
抗200KD-NF抗体による免疫組織（×100）
（図２の強拡大）
A：偽手術脳／B：慢性血流低下脳

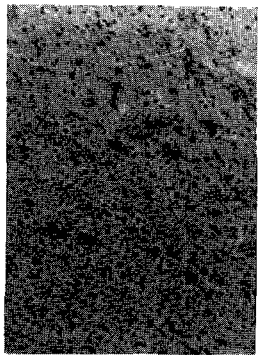


図 4
抗GFAP抗体による
慢性血流低下脳の視床の免疫組織
（×200）

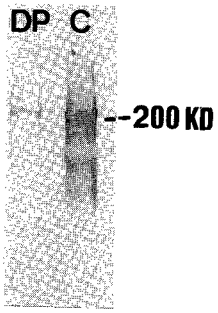


図 5
使用した抗200KD-NF抗体の
immunoblotting法による検討
C：粗ＮＦ分画 ／ＤＰ：脱燐酸化ＮＦ分画

[文 献] (1)H.Czosnek et al:Brain Res.216,387(1981)
(2)T.Kudo et al:Stroke in press
(3)工藤 喬ら:神経化学 27,210-211(1988)
(4)工藤 喬ら:第 31回神経学会総会抄録集(1990)
(5)工藤 喬ら:神経化学 28,480-481(1989)
(6)S.Hisanaga et al:J.Neurosci.9, 959-966 (1989)
(7)山下 正ら:神経化学 24,31-33(1985)

4　スナネズミ海馬領域脳虚血性細胞外グルタミン酸濃度の上昇及びCA1ニューロン死に対する低脳温の効果

三谷 章、片岡喜由
（愛媛大学医学部　第一生理）

〔要約〕

脳虚血中、細胞外に放出されるグルタミン酸量の変化及び数日後に発生する虚血性ニューロン死に対する低脳温の効果をスナネズミ海馬領域において、脳マイクロダイアリシス法により検索した。低脳温化することにより、虚血により誘発される細胞外グルタミン酸の放出は激減し、海馬CA1領域の細胞死は顕著に抑えられた。このことは、虚血中放出されるグルタミン酸量の減少が、低脳温により発現する虚血性ニューロン死の防禦機構の一要因であることを強く示唆している。

［目的］

海馬CA1ニューロンが一過性脳虚血に対して特に脆弱であることが知られており、その原因として、虚血中海馬領域において上昇する細胞外グルタミン酸の神経毒作用が示唆されている。最近、脳虚血時、脳温を数度低下しておくと、その後発生するCA1ニューロン死が防禦されることが報告された。本研究では、この低脳温により生じる虚血性ニューロン死防禦作用発現過程において、細胞外グルタミン酸レベルがどのように変化しているかについて検索した。

［方法］

ハロセン麻酔下のスナネズミに5分間前脳虚血を負荷し、海馬領域に放出されるグルタミン酸を脳内微小透析プローブを用いて回収した。回収液中に含まれるグルタミン酸は、酵素的サイクリング法により 100秒単位（1 μl ）で測定した。脳温は、ケーラー照明装置及び小型のファンを用いて31、33、35または37℃に保持した。虚血負荷7日後に動物を灌流固定し、脳組織標本を作製し、海馬CA1ニューロン死の程度を解析した。

［結果］

脳温37℃で5分間前脳虚血が負荷されたスナネズミにおいては、細胞外グルタミン酸レベルは虚血前の約15倍にまで上昇し（Fig.1a）、一週間後の組織学的検索で海馬CA1領域に著明なニューロン死を観察した（Table 1）。虚血負荷時の脳温を35℃に低下することにより、細胞外グルタミン酸レベルは有意に減少し（Fig.1b）、CA1ニューロン死は約半数の動物で抑えられた。脳温33℃で虚血を負荷した場合には、細胞外グルタミン酸レベルはさらに有意に減少し（Fig.1c）、CA1ニューロン死は全く観察されなかった（Table 1）。脳温31℃で虚血を負荷した場合、細胞外グルタミン酸レベルは33℃の場合よりもわずかに減少し（Fig.1d）、CA1ニューロン死は全く観察されなかった（Table 1）。

［考察］

スナネズミ海馬領域において5分間脳虚血により放出される細胞外グルタミン酸は、脳低温化により有意に抑制された。このことは、虚血中放出されるグルタミン酸濃度の減少が、低脳温により発現する虚血性ニューロン死の防禦機構の一要因であることを強く示唆している。脳温33－37℃の範囲内では、脳温が2℃低下することにより細胞外グルタミン酸の放出レベルは半減する傾向があった。虚血性ニューロン死の防禦作用が現れはじめるのは脳温をわずか2℃下げた35℃の時で、約半数の動物でニューロン死が完全に抑えられ、さらに脳温を下げると全動物でニューロン死は完全にブロックされた。このことから、ニューロン死発生の臨界脳温は35℃と推定された。またそのときの虚血中細胞外グルタミン酸レベルは、37℃のときの約1／2であり、近年注目されている虚血性ニューロン死発症メカニズムにおけるグルタミン酸の神経毒性の見地からすれば、この濃度が虚血性ニューロン死発症臨界細胞外グルタミン酸濃度といえるかもしれない。

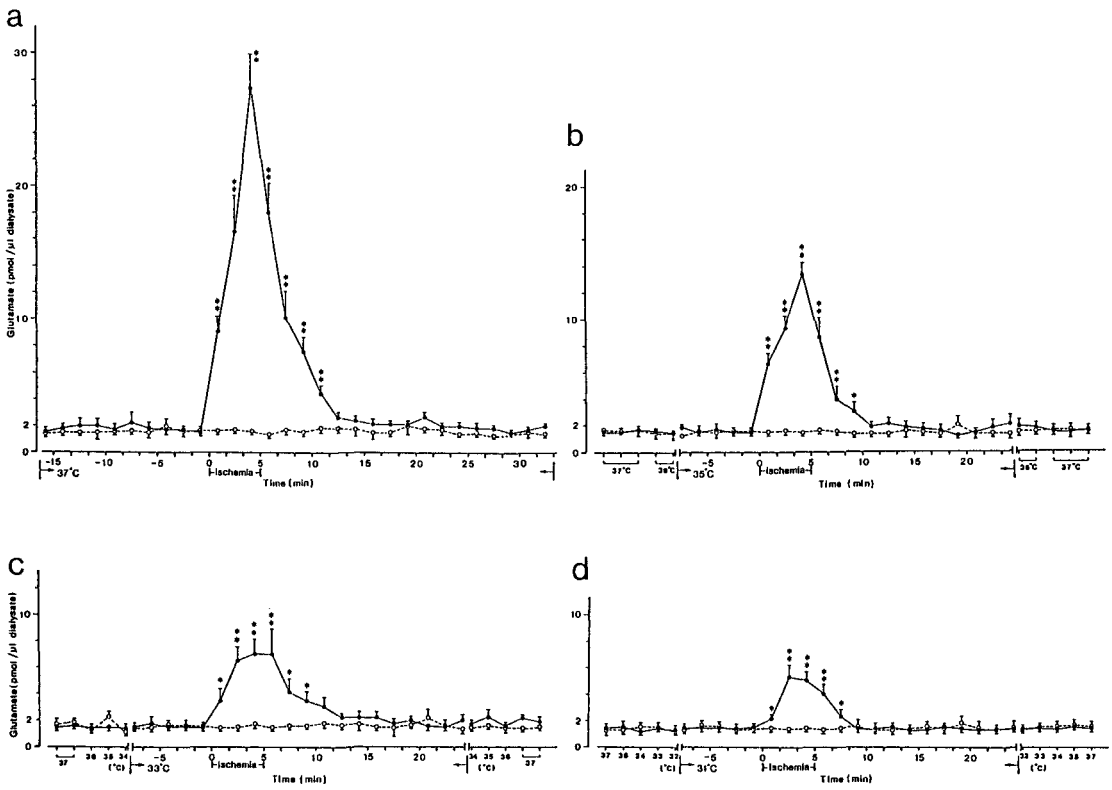


Fig. 1. Time course changes in the dialysate levels of glutamate(pmol/µl) in animals whose brain temperature during ischemia was maintained at 37(a), 35(b), 33(c) and 31°C(d); ischemic animals(●—●), control animals(O--O). The data presented are mean±SEM(bars). Astrisks indicate statistically significant differences compared with the corresponding levels in controls($^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$). Ordinate-glutamate levels in dialysate; abscissa-time(min) before and after the onset of 5-min ischemia and brain temperature.

Table 1. Number of normal-appearing CA1 neurons per grid

Brain temperature (°C)	Number of cells per grid	
	Ischemic group	Control group
37	10.3± 2.7[a](n=8)	94.7±2.1(n=6)
35	63.7±10.8[b,c](n=10)	91.6±1.7(n=6)
33	90.0± 1.2[c](n=8)	91.6±1.7(n=6)
31	95.8± 2.4[c](n=8)	93.8±1.7(n=6)

Cell counts represent mean±S.E.M.
Significantly different from the corresponding control group: [a]$p<0.01$; [b]$p<0.05$ (Student's t-test).
Significantly different from the ischemic group whose brain temperature was maintained at 37°C: [c]$p<0.01$ (two-way ANOVA).

5 遺伝的甲状腺機能低下症マウス小脳Bergmann細胞のGPDH活性発現に及ぼすホルモンの効果とその臨界期

杉崎哲朗、野口鉄也 （東邦大・医・第二生理）

〔要約〕
小脳Bergmann細胞に存在する sn-Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性が低下している二種の先天性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) と先天性甲状腺機能低下症マウス (hyt)－－を用い、成長ホルモン (GH), 甲状腺刺激ホルモン (TSH), サイロキシン (T_4) の単独あるいは併用投与による回復実験を行い、次の如き結果を得た。すなわち、Bergmann細胞のGPDH活性の発現は T_4 に強く依存していること、T_4 依存性が強くなる時期は20日齢から40日齢にかけて（小脳の細胞構築が完了した後）であることが明らかとなった。さらに、dwマウスの実験から、GHがT_4の作用に相乗的に働いていることも示された。このGHの作用は小脳の細胞構築に促進的に働いているものと考えられる。

［目的］：
既にわれわれは小脳Bergmann細胞のsn-Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性の発現に甲状腺ホルモンが強く関与し、これに成長ホルモンが相乗的に働いていることを報告した[9]。今回は、小脳Bergmann細胞GPDH活性低下のみられる二種の先天性内分泌異状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）と先天性甲状腺機能低下症マウス (hyt)－－を用い、成長ホルモン (GH), 甲状腺刺激ホルモン (TSH)、サイロキシン (T_4) の単独あるいは併用投与を行い、GPDH活性発現に対し、どのホルモンが、発育期のどの時期に必要であるかを検討した。

［方法］：
動物： dw, 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 7]に従って自家繁殖し、実験に供した。dwマウスの回復実験は正常対照群 (+/?) とdw/dw群に分け、それぞれ７群の実験を行った。（ａ）非投与群： 生理的食塩水を生下日より40日間背部皮下に投与した。（ｂ）GH+T_4(0-20)群： ブタGH 10ug/g体重とT_4 0.25ug/一匹を生下日より20日間投与した。（ｃ）GH+T_4(20-40)群： ブタGHとT_4を（ｂ）と同量20日齢から40日齢に投与した。（ｄ）GH(0-20)群： ブタGH 10ug/g体重を生下日より20日間投与した。（ｅ）GH(20-40)群： ブタGHを（ｄ）と同量20日齢から40日齢に投与した。（ｆ）TSH(0-20)群： TSH 0.2IU/一匹を生下日より20日間投与した。（ｇ）TSH(20-40)群： TSHを（ｆ）と同量20日齢から40日齢に投与した。

hytマウスの回復実験は正常対照群(hyt/+)とhyt/hyt群に分け、それぞれ３群の実験を行った。（ａ）非投与群： 生理的食塩水を生下日より40日間背部皮下に投与した。（ｂ）T_4(0-20)群： T_4 0.25ug/一匹を生下日より20日間投与した。（ｃ）T_4(20-40)群： T_4を（ｂ）と同量20日齢から40日齢に投与した。

実験動物は全て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GPDH抗体、抗MAPS抗体による免疫組織学的検索はそれぞれ既報の方法[6]、Brionらの方法[1]に従った。

［結果］：
GPDH活性の回復実験： 40日齢のdwマウス小脳でのGPDH活性低下の回復はGH+T_4(20-40)が最も良好で、次いでGH+T_4(0-20)、TSH(20-40), GH(20-40), TSH(0-20), GH(0-20)の順でみられ、それぞれ、非投与群活性の309%、216%、212%、176%、164%、142%と有意に増加していた（図-1F)。hytマウスの小脳ではT_4(20-40)で181%の有意な増加を、またT_4(0-20)で162%の増加傾向がみられた（図-2F)。また、hytマウスの正常対照群の小脳でも同様な酵素活性増加が認められた（図-1C)。しかし、大脳、脳幹では、dwマウスの脳幹でのみGH+T_4(20-40)、GH+T_4(0-20)で有意な増加が認められた以外は（図-1E)、全く有意な差はみられなかった。

免疫組織学的所見： 40日齢小脳皮質を抗GPDH抗体で染めると、Bergmann細胞の細胞体と線維が染め出されないdwマウスは、回復実験により、いずれの投与群でも細胞体、線維ともに染め出された。 また、

Bergmann線維が染め出されないhytマウスでも、回復実験により、線維が染め出され、正常群と差はなくなった。他方、抗MAPS抗体では、どの種のミュータントマウスでもPurkinje細胞とその樹状突起が強く染め出され、組織学的に正常群と全く差は認められなかった。

［考察］：

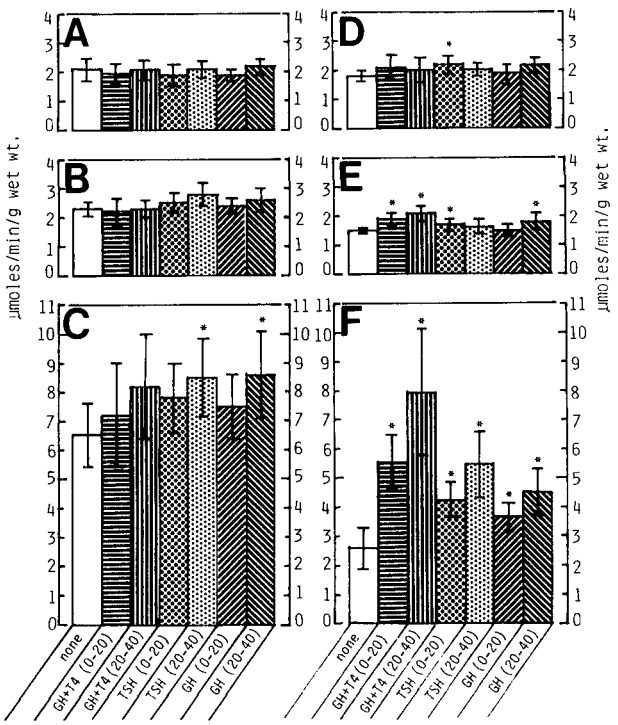
今回の実験の結果から、Bergmann細胞のGPDH活性発現がT_4に強く依存していることが示唆されたが、そのT_4依存性がより強くなる時期は20日齢から40日齢にかけて、すなわち、小脳内顆粒層完成後であることが明らかとなった。また、dwマウスを用いての実験から、GHがT_4の作用に相乗的に働いていることも示された。Fisher[2]、Fisherら[3]はBergmann細胞GPDH発現に細胞間連絡、特にPurkinje細胞との連関が直接関与していることを示唆している。しかし、今回の実験からPurkinje細胞の発育はいずれのミュータントマウスでも良く保たれていること、さらに既報[9]の如くBergmann細胞の構造も良く保たれていることから、甲状腺ホルモンは小脳の細胞構築が完成し、細胞間連絡が出来上がった後にGPDHの発現に必須であって、成長ホルモンは、外顆粒層から内顆粒層への細胞移動を促進することから[8]、小脳の細胞構築の完成に関与していることが示唆された。

［文献］：

(1)Brion,J.P.,Guilleminet,J.,Couchie,D.,Flament-Durand,J.&Nunez,J.(1989)Neurosci.25,139-146.(2)Fisher,M.(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81,4414-4418.(3)Fisher,M.&Mullen,R.J.(1988)Neuron,1,151-157.(4)Kozak,L.P.(1972)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,69,3170-3174.(5)Noguchi,T.&Sugisaki,T.(1984)J.Neurochem.42,891-893.(6)Noguchi,T.,Sugisaki,T.,Kanamatsu,T.,Satoh,I.&Nishikawa,N.(1988)J.Endocr.118,179-185.(7)Noguchi,T.,Sugisaki,T.&Tsukada,Y.(1982)J.Neurochem.38,257-263.(8)Noguchi,T.,Sugisaki,T.,Watanabe,M.,Kohsaka,S.&Tsukada,Y.(1982)J.Neurochem.38,246-256.(9)杉崎哲朗、野口鉄也(1989)神経化学、28,116-117.

図－1

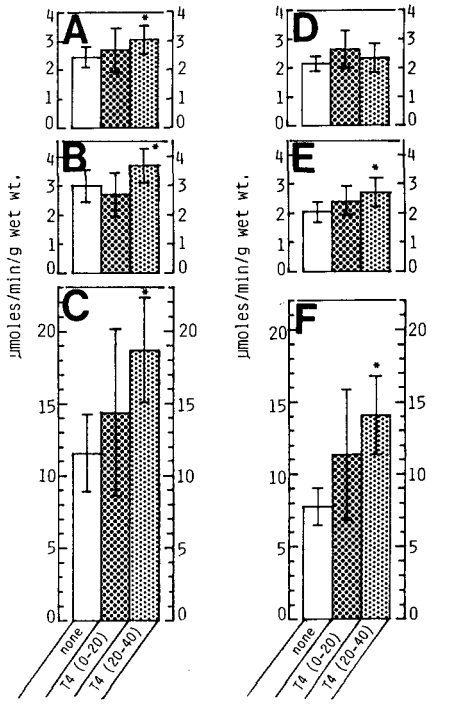
Response of GPDH activity of the 40-day-old normal (+/?) and mutant (dw/dw) mice to various hormonal treatments



(A,D): Cerebrum, (B,E): Brain stem, and (C,F): Cerebellum. Mean values are given from 12 animals. Vertical lines represent 1S.D. All differences from the untreated normal or mutant animals were significantly by Student's t-test. * p<0.01.

図－2

Response of GPDH activity of the 40-day-old normal (hyt/+) and mutant (hyt/hyt) mice to various hormonal treatments



(A,D): Cerebrum, (B,E): Brain stem, and (C,F): Cerebellum. Mean values are given from 12 animals. Vertical lines represent 1S.D. All differences from the untreated normal or mutant animals were significantly by Student's t-test. * p<0.01.

6　自然発症てんかんラットの脳内伝達物質関連酵素活性

小暮　美樹*、今村　与志子*、九穂　泰三*、石川　紘一*、伊藤　和夫**、芹川　忠夫***
(*日本大・医・薬理、**京都大・医・第一解剖、***京都大・医・動物実験施設)

[要約]　自然発症てんかんラット (Spontaneously epileptic rat：SER) 脳内のコリンーアセチル転移酵素 (ChAT)、コリンエステラーゼ (ChE)およびチロシン水酸化酵素 (TH) 活性を測定し、Wistar-Kyoto (WKY)ラットと比較を行った。これら３つの酵素活性は、線条体において最も高かった。SER 線条体においては、ChE およびTH活性がWKY と比較して有意に低く、またChATについては有意の変化ではないまでも、活性が低下していた。しかし他の部位においては、酵素活性に有意の変化は認められなかった。このような結果は、免疫組織化学的な方法を用いて検索しても同様であった。したがって、SER において認められる行動の異常、特に振戦などの症状は、線条体の伝達物質代謝異常が関与しているものと考えられる。

緒　　言

自然発症てんかんラット (Spontaneously epileptic rat: SER) は、振戦を呈する２系統のラット tremor ラットと zitter ラットの交配によって得られた二重突然変異動物であり、外界からの刺激なしにけいれん発作と欠神様発作を繰り返すことが知られている (1)。この動物を用いて各種抗痙攣薬の効果が検討され、モデル動物としての有用性が報告されている (2)。てんかんの発現機構には、脳内のモノアミンやアセチルコリン (ACh) などの伝達物質の異常が想定されており、SER の脳内伝達物質代謝に関する情報は、てんかんの発症機構とともに、有効な薬物の開発に重要な情報を提供するものと考えられる。しかしこれまで、この動物の脳内の神経伝達機構については、系統的に検討されていなかった。本研究においては、カテコルアミン (CA) およびACh の代謝に関係する酵素活性を、生化学的および免疫組織化学的な手法を用いて研究した。

実　験　方　法

実験に用いたSER は京都大学医学部附属動物実験施設で繁殖・飼育され、生後３ヶ月を経過し、行動に明らかな異常の認められた動物である。対照動物としては、tremorラットの起源系統であるWistar-Kyoto (WKY)を用いた。

生化学的酵素活性の測定

動物を断頭によって屠殺し、取りだした脳を速やかに氷冷ガラス板上で Glowinski and Iversenの方法に準じて分画し、直ちに実験に供した。組織に10倍量の緩衝液を加え、ポリトロン・ホモジナイザーによってホモジネートを作成し、30,000 gの遠心分離によって得られた上清を酵素試料とした。コリンーアセチル転移酵素 (3)、コリンエステラーゼ (4)およびチロシン水酸化酵素 (5)の活性は、それぞれ永津らの方法に準じ、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーによって測定した。

①コリンーアセチル転移酵素 (ChAT) ：コリンを基質とし、20分の反応時間中に生成されたACh 量を測定し、酵素活性を求めた。

②コリンエステラーゼ (ChE)：ACh を基質とし、20分の反応時間中に減少したACh の量から酵素活性を求めた。

③チロシン水酸化酵素 (TH) ：チロシンを基質とし、10分の反応時間中にに生成されたDOPA量から酵素活性を求めた。

免疫組織化学的検索

動物をZamboni 液で灌流固定した後、freezing microtomeを用いて脳切片を作製し、ABC 法によってChAT、ChE およびTHを免疫染色し、観察を行った。

実験結果および考察

ACh 分解酵素であるChE の活性は、線条体において他の部位よりも５～10倍程度高かった。これは既に発表されている結果とも一致する。SER においては、対照動物であるWKY と比較して、この部位のChE 活性が有意

表－1　分画脳内のChATおよびChE 活性の比較。数値は nmol/mg protein/20 min で表され、６匹の平均±標準偏差を示している。

Region	ChAT		ChE	
	WKY	SER	WKY	SER
Anterior cortex	66.8 ± 8.8	75.7 ± 10.4	1721 ± 217	1727 ± 198
Posterior cortex	60.9 ± 4.1	66.8 ± 4.0	1319 ± 134	1297 ± 70
Hippocampus	70.6 ± 7.9	76.5 ± 6.9	1472 ± 118	1635 ± 143
Striatum	159.8 ± 26.3	111.4 ± 10.9	10037 ± 924	7480 ± 478*
Midbrain	51.7 ± 13.2	83.4 ± 6.4	2052 ± 149	2150 ± 228
Pons-medulla	103.0 ± 4.1	116.0 ± 9.2	2312 ± 33	2394 ± 157
Cerebellum	4.6 ± 1.6	16.8 ± 3.1	749 ± 72	1058 ± 86

*Significantly different from WKY ($P < 0.01$)

に低下していた（表－１）。しかしこれ以外の部位においては、有意の差は認められず、部位によってはむしろ活性の高い場合もあった。ACh の合成に関係するChATも、線条体において他の部位より高い活性を示した。これら２つの酵素活性の部位ごとの違いは、ACh 濃度の分布と一致していた。ChATの活性においては、分画して得られたどの部位においても、対照動物と比較してSER に有意の差は認められなかったが、線条体において低い傾向が、一方橋－延髄領域においてはむしろWKY よりも高い傾向が認められた（表－１）。

CA合成の律速酵素であるTHの分布も、線条体において最も高かった。SER と対照動物の比較を行うと、大脳皮質や海馬においては、この酵素活性に有意の差はなかったが、SER においてやや高い活性が測定された。しかし線条体においては、SER のTH活性はWKY の半分以下で有意に低かった（表－２）。

以上のように生化学的な実験から、線条体においてACh やCAの合成・代謝に関係した酵素の活性が低下していたが、このような結果は免疫組織化学的な手法を用いた場合にも認められた。例えばTHについて見ると、線条体において免疫活性が低く、海馬を含めて大脳皮質ではむしろ高くなっていた。このようなSER に見られる活性の違いの原因が何であるかは不明であるが、酵素活性の分布が脳内部位によって異なり、生化学実験によって線条体とされた部位でも、微細な組織レベルで観察すると、差異が認められる可能性があるので、詳細な検討を行う予定である。また、脳内微少透析法を用いてACh 遊離に差のないことを確認しているが、さらに分画した脳内の伝達物質濃度についても検討する予定である。

線条体が、特にドパミン作働神経系とコリン作働神経系の調節機構を介して、様々な運動を統合する機能を果していることはよく知られている。したがって今回の実験によって得られた、線条体内の神経伝達物質代謝の異常は、SER において認められる行動上の異常と密接な関係があるものと考えられる。しかし、てんかんの発現に、脳内のどの神経系が最も関係するかについては、今回の実験では明らかにできず、詳細な薬理学的研究が必要であろう。

表－２　分画脳内のTH活性の比較。数値は nmol/mg protein/10 minで表され、６匹の平均±標準偏差を示している。

Region	WKY	SER
Anterior cortex	539 ± 36	593 ± 52
Posterior cortex	355 ± 49	455 ± 39
Hippocampus	336 ± 44	456 ± 55
Striatum	3911 ± 719	1649 ± 125*
Midbrain	671 ± 75	677 ± 125
Pons-medulla	506 ± 109	635 ± 149
Cerebellum	334 ± 65	358 ± 70

*Significantly different from WKY ($P < 0.01$)

文　献

1. Serikawa, T., Ohno, Y., Sasa, M., Yamada, J. and Takaori, S. (1987) Lab. Anim. 21:68-71
2. Sasa, M., Ohno, Y., Ujihara, H., Fujita, M., Yoshimura, S., Takaori, S., Serikawa, T. and Yamada, J. (1988) Epilepsia 29:505-513
3. Kaneda, N and Nagatsu T. (1985) J. Chromatogr. 341:23-30
4. Kaneda, N., Noro, Y. and Nagatsu, T. (1985) J. Chromatogr. 344:93-100
5. Naoi, M., Takahashi, T. and Nagatsu, T. (1988) J. Chromatogr. 427:229-238

7 恐怖条件付けによる視床下部ノルアドレナリン放出に対する影響 －脳内透析法による検討－

横尾秀康、田中正敏、吉田真美、津田彰、田中隆彦、溝口克弘 (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、電撃ストレス負荷によるNA放出の変化について調べ、さらに以前に電撃ストレスを負荷された環境に再びもどすというストレス状況、即ち恐怖条件付けに対する影響を調べた。 前視床下部に透析チューブを植え込まれたラットの灌流は手術24時間後より開始し、灌流液中に回収されたNAを20分毎に測定した。 一定の基礎放出量が得られた所でショック箱に40分間放置した後20分間の電撃ストレスを負荷した。 電撃ストレスによってNA放出は有意な増加を示し、ストレス負荷後もNAの高値は持続した。

その後、NA放出量がストレス負荷前のレベルに回復した所で再びショック箱に20分間放置したが、この処置によってNA放出量の有意な増加を認めた。 以上の結果より、電撃という身体的ストレスのみならず、動物を以前にストレスを受けた環境にもどすというかなり純粋な情動ストレス（条件性恐怖又は不安）においても視床下部NA神経系の活動の亢進を来すことが認められ、ストレスにおける脳内NA神経系の関与が強く示唆された。

種々のストレス状況下で中枢NA放出は著しく亢進し、ストレス解放後もこのNA放出亢進の持続が認められ、またこの現象は広範な脳部位で観察される(5,6,7) 。 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NAの放出亢進が認められることを報告した(8) 。 また、電撃ストレスは拘束ストレス同様視床下部を含む広範な脳部位でNA代謝回転の著しい亢進を来す(7) 。

この電撃ストレス（身体的ストレス）を用い視床下部NA放出に及ぼす影響を調べ、さらにストレス負荷を以前に経験した動物は、その環境に再び遭遇した場合、負の情動反応を示すが、これは恐怖条件付けとよばれている(2) 。 そこで恐怖条件付けの視床下部NA放出に及ぼす影響も合わせて調べた。

（方法）

Wistar系雄性ラット(250 - 300 g) を用いペントバルビタール麻酔下で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(3)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 液を用い 2.5μl/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。 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。 一定したNAの基礎放出量が得られた後ラットをショック箱に移し40分後より20分間電撃 (0.3mA,1sec/60sec) 負荷を施し、その後ホーム・ケージにもどし灌流実験を続けた 160分後NA放出量が基礎値に回復した時点で、再びショック箱に電撃を負荷することなしに20分間移した。 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。 この部位よりのNAの基礎放出量は、2.69±0.41 pg/20 min (n=10) であった。 さらに、電撃負荷 160分後のNA放出量は2.24±0.18 pg/20 min (n=10)とほぼストレス負荷前の値を示した。 また、ショック箱に移したのみ (Box)ではその放出量に変化はみられなかったが、電撃負荷によって著しいNA放出の増加 (100%) が認められ、負荷後の20

分間で有意な増加を認め次第に基礎値への回復が認められた。 電撃負荷 160分後より20分間電撃負荷を行わず再びショック箱に移したところNA放出量の有意な増加 (50%)を認めた。

以上の結果より、電撃ストレスにより視床下部からNA放出の増加がみられ、そしてこの放出増加は電撃負荷後においても認められ約 1時間後には基礎放出レベルとなった。 このことは、電撃ストレスは脳内各部位でNAの代謝産物である MHPG-SO_4 の増加を示し(7) 、海馬(1) 及び大脳皮質(4) の透析灌流液中のNAレベルの増加も引き起こすことと一致する。 また、拘束ストレスを含め種々のストレスによって中枢NA放出亢進が認められる(5,6) 。このように、種々のストレス刺激は中枢NA神経系の活動性の亢進を引き起こす。 さらに、以前に電撃を経験した動物はその環境に再び置くとそれがストレスとなり不安に関連した変化が観察される。この変化は過去に電撃を受けた環境に対する条件性反応であり、条件性恐怖に由来したものと考えられる。我々は、この恐怖条件付けによって脳内NA代謝回転の亢進が起こることを報告している(7) が、今回これを直接的に証明し、この現象に中枢NA神経系の活動の亢進した状態が認められることが考えられる。

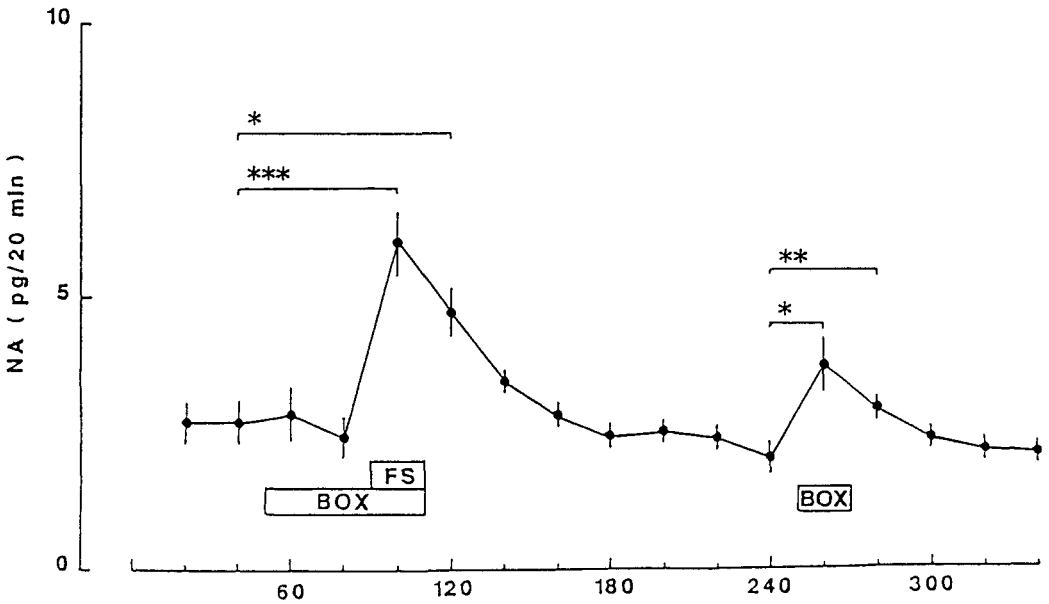


Fig.1. Effect of electrical footshock stress(FS) and conditioned fear on hypothalamic noradrenaline release in vivo. the first BOX ; the animals were placed in the plastic box for 40 min to the novel environment, FS ; electrical footshock for 20 min, the second BOX ; the animals were replaced in the same compartment previously associated with shock without shock for 20 min. Each sample represents a 20 min collection period. The value indicates the mean ±S.E.M. of 5 rats. Statistically significant as compared to each basal values.
* $P < 0.05$, ** < 0.005, *** < 0.001.

(文献)

(1) Abercrombie,E.D.,et al. 1988 Neurosci. 27:897-904. (2) Davis,M.,et al. 1979 Psychopharmacol 65:111-118. (3) Paxinos G. and Watoson C. 1982 The Rat Brain ,Academic Press. (4) Rossetti,Z.L.,et al. 1990 Eur.J.Pharmacol. 176:229-231. (5) Tanaka M.,et al.1982 Pharmacol. Biochem. Behav. , 16:315-319. (6) Tsuda A. and Tanaka M., 1985 Behav. Neurosci. ,99:802-817 . (7) Tsuda,A.,et al. 1986 Pharmacol. Biochem. Behav. 24:115-119. (8) Yokoo,H.,et al. 1990 Experientia 46:290-292.

8 ニーマンピック病モデルマウスにおけるコレステロールエステル化障害に関して

草野　薫*、所　敏治*、　鈴木　英明*、宮脇　茂樹**、衛藤　義勝*

＊東京慈恵会医科大学小児科、　＊＊日本新薬（株）中央研究所

〔要約〕

我々は、ニーマンピック病（ＮＰＤ）モデルマウスとして知られるＣ５７ＢＬ／ＫｓＪ系ｓｐｍ／ｓｐｍマウスのコレステロール代謝を検討した。ＮＰＤマウス皮膚繊維芽細胞をもちい、^{3}H-oleateの^{3}H-cholesterol oleateへの取込より、外因性コレステロールのエステル化障害を、さらに^{3}H-acetate の^{3}H-cholesterol esterへの取込みより、内因性コレステロールのエステル化障害をも見いだした。また、フィリピン染色法や電顕法により細胞内に蓄積したコレステロールが、ゴルジ・ライソゾーム領域に局在することを明らかにした。現在、肝臓のパーコール細胞分画法を用い、コレステロールおよび他のスフィンゴ脂質の細胞内局在と動態を詳細に検討中である。

Ｃ５７ＢＬ／ＫｓＪ系ｓｐｍ／ｓｐｍマウスは、常染色体劣性遺伝形式をとり、進行性の神経障害、肝脾腫等の臨床症状を呈し、スフィンゴミエリン（ＳＭ）、コレステロール（Ｃｈｏ）などの脂質の蓄積を各臓器に認めることより、ヒトＮＰＤ病モデルマウスとして知られている。本症では、ＳＭ分解酵素である酸性スフィンゴミエリナーゼ（ＳＭａｓｅ）活性の低下が報告されているが、依然病因は明らかでない。今回我々は、ヒトＮＰＤタイプＣにおいてコレステロールのエステル化障害が存在することよりＮＰＤマウスのコレステロール代謝、特に細胞内におけるコレステロールのエステル化に関し、生体動物および皮膚繊維芽細胞を用い、本症の病因病態との関連性を検討したので報告する。

［方法］

研究対象には、生後８－９週令のC57BL/KsJ系 のNiemann-Pick(spm/spm)ﾏｳｽおよび正常（＋／＋）マウスを用いた。正常及びミュータント皮膚繊維芽細胞は、anteriol ventral abdomenより採取し１０％牛血清含有ＲＰＭＩ培養液で、培養維持したのち各実験に用いた。

１）形態学的検討；ミュータントおよび正常マウスの各臓器を取出し、２％オスミウム酸にて浸透固定後、電子顕微鏡にて観察。　フィリピン染色による光学顕微鏡検索は、皮膚繊維芽細胞をLipoprotein Deficient Serum（ＬＰＤＳ）含有ＲＰＭＩ培養液で、４日間培養後、２０％牛血清含有ＲＰＩＭ培養液で２日間培養し固定後、フィリピン染色し、蛍光顕微鏡下にて観察した。

２）蓄積脂質の生化学的検討；マウスの肝臓、脾臓、腎臓の各臓器を取出しFolch抽出後、ＴＬＣにてスフィンゴ糖脂質、中性脂質をそれぞれ展開分析。さらにＣｈｏ、コレステロールエステル（ＣｈｏＥ）の定量は、Gambleの方法[2]により行なった。

３）外因性コレステロールエステル化の検討；マウス皮膚繊維芽細胞を、４日間ＬＰＤＳ含有ＲＰＭＩ培養液で培養後、^{3}Ｈ－オレイン酸およびＣｈｏまたはＬＤＬを培養液中に負荷し培養、継時的に細胞を収穫し、Folch法にて抽出後ＴＬＣにて展開、ＣｈｏおよびＣｈｏＥ分画を検討した。

４）内因性コレステロールエステル化の検討；^{14}C-acetate培養液に加え３日間培養後、細胞を収穫。同様に脂質を抽出後ＴＬＣにて展開。オートラジオグラムさらに、^{14}C-acetate の^{14}C-cholesterol 及び^{14}C-cholesterol esterへの取込を検討した。

５）生体動物におけるコレステロール代謝；ＮＰＤマウス及び正常コントロールマウス腹腔内に、^{14}H-acetate, ^{3}H-cholesterolを注入し，マウス肝臓を５分間還流後、ナイトロジェンチャンバーで細胞を粉砕。核成分を遠心除去し、３５％percoll gradientで微小細胞内成分を分画。各分画をＴＬＣにて分析し、脂質の分布、さらに^{3}H-acetateの^{3}H-cholesterol及び他の脂質への取込みを測定。

［結果］

コレステロールの定量分析で、ニーマンピック病マウスの肝臓、腎臓、脾臓において、コントロールマウスの１．５－３．５倍のＣｈｏの増加をみとめた。電顕所見によりミュータントマウスの細胞のライソゾーム内にミエリン様構造物よりなる封入体が観察された。さらにフィリピン染色にて濃染された顆粒をゴルジ・ライソゾーム領域と思われる部位に一致して多数認めた。培養皮膚繊維芽細胞を用いた外因性コレステロールのエステル化の検討で、フリーのＣｈｏ、ＬＤＬをそれぞれ加えた系で、コントロールに比べミュータントにおいて、^{3}Ｈ－オレイン酸負荷６時間以後、著しいエステル化障害を見いだすことが出来た（図１）。^{3}H-acetateの^{3}H-cholesterol esterへの取込も、ＮＰＤマウスで低下し、さらにマウス腹腔内に、^{3}H-acetateを注入した場合にも同じくＮＰＤマウス肝臓で、^{3}H-acetateの著しい^{3}H-cholesterol esterへの取込の低下を認め（表１）、内因性コレステロールエステル化の障害も認めた。３５％percoll gradientを用いた細胞成分分画法で、ライソゾーム・膜分画に著しいＣｈｏ，GL_1，ＳＭ等の脂質の蓄積が確認された。

［考察］

１９８２年北川、宮脇により、ニーマンピック病モデルマウスとして紹介されたＣ５７ＢＬ／Ｋｓ（ｓｐｍ／ｓｐｍ）[1]は、進行性の中枢神経症状と著明な肝脾腫を示し、常染色体劣性遺伝形式を示す疾患である。本症では、Ｃｈｏ，スフィンゴリピッド、ガンリオシドの増加、さらにタンパク質の異常（未発表データー）も見られ、このような多面的生化学異常が、本症の病因をより解りにくいものにしている。特にコレステロールとスフィンゴミエリンの蓄積は、ライソゾームに限局し、お互いの代謝動態に密に影響を及ぼしあっているものと考えられる。近年、Pentchevは、中枢神経症状を呈し諸臓器にスフィンゴミエリンの蓄積をきたす疾患であるヒトＮＰＤタイプＣにおいては、ＳＭａｓｅの著明な低下が見られず、外因性コレステロールのエステル化障害が、存在する事を見いだした。そこで我々は、本ＮＰＤモデルマウスとヒトＮＰＤタイプＣの臨床的及び生化学的類似性より、ＮＰＤモデルマウスのコレステロール代謝の検討を試みた。肝臓、脾臓、腎臓の諸臓器で、コレステロールの増加を認めたが、このＣｈｏの増加は、外因性および内因性コレステロールのエステル化障害　によるものと思われた　（図１）。フィリピン染色および電顕を用いた形態学　的所見および、percoll gradient分画法を用いた生化学所見より、コレステロールの蓄積は、ゴルジ・ライソゾム領域にあり、本症で増加する他の脂質であるＳＭ，GL_1も同部位に存在することが確認されたことより、コレステロールの蓄積が、primaryおよびsecondaryにせよ、ＳＭ，GL_1などのリン脂質やライソゾーム酵素の代謝に影響を与え、本症の病因病態に関与しているものとていると思われる。

［文献］

1. Miyawaki S. Mitsuoka S. Sakiyama T, and Kitagawa T. (1982) The Journal of Heredity. 73, 257-263

Esterification of cholesterol with or without lipoprotein in cultured fibroblasts:

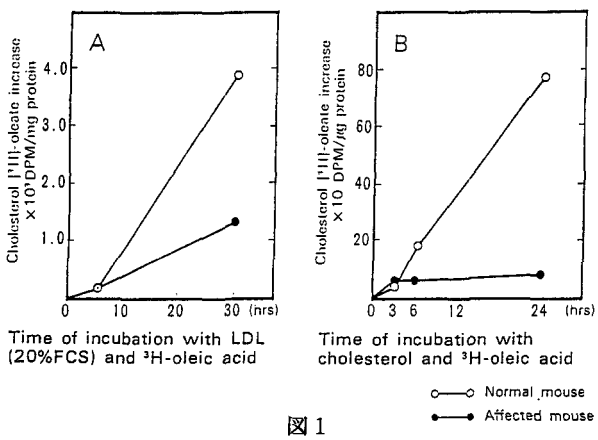


図１

The Incorporation of ^{3}H-Acetic acid into Lipids from Control and Niemann-Pick Mouse Brain and Liver

Tissue	Free Cholesterol	Triglyceride	Cholesterol Ester
LIVER			
Control	7446.6	3431.7	478.5
NPD	102215.7	895.9	656.4
BRAIN			
Control	2356.2	155.3	19.2
NPD	3655.3	137.9	25.1

The values are expressed as dpm per 80mg wet tissue of liver and per 60 mg wet tissue of brain. 1mci of ^{3}H-acetic acid was injected intraperitoneally into each animal. NPD: Niemann-Pick disease.

表１

9　シャトルボックス回避試験による実験的母胎性フェニールケトン尿症ラットにおける脳内モノアミン含有量の変動

成田裕保、金松知幸、中井健而*、平野修助
（東邦大・医・二生理，総研*）

〔要約〕

Sprague-Dawley系の雌ラットを妊娠 10-14日の 5日間、高フェニールアラニン血症状態にし、その F_1出生仔（PKU群）と正常妊娠ラットより出生したF_1（対照群）で、生後 7週目に、シャトルボックスを用いた非連続的条件回避試験を行い、さらに回避試験終了直後の脳内 norepinephrine (NE) および serotonin(5-HT) 含有量を脳部位別に調べ、回避試験未実施の対照群および PKU群の脳部位別 NE, 5-HT 含有量とも比較検討した。回避試験の結果、試験１日目での回避獲得率が、PKU群で対照群と比較して、有意の低値を示した。脳内 NE 含有量は、回避試験を実施することにより、前頭前皮質、視床、海馬および脳幹部で、対照群と PKU群のいずれにおいても有意に減少し、視床および海馬では、PKU群が対照群に比べ、さらに有意の低値を示した。また脳内 5-HT含有量は、回避試験を実施することにより、前頭前皮質、視床で、対照群、PKU群ともに有意に減少し、視床では、PKU群が対照群に比べ、さらに有意の低値を示した。

〔目的〕

ヒトでは遺伝的にフェニールケトン尿症の素因がない場合でも胎生期に高フェニールアラニン血症環境下にあった胎児は、生後精神薄弱をきたすことが報告されている[1]。我々は、ラットにおいても妊娠期間中の血中フェニールアラニン濃度を上昇させることにより、いわゆる maternal PKUのモデルを作製し、生後の脳の発達に及ぼす影響を検索してきた[4,6]。今回、この maternal PKUについてシャトルボックスを用いた非連続的条件回避試験を実施し、回避反応の学習過程における変化を検討した。また、回避試験終了直後の脳内 NE および 5-HT の含有量を脳部位別に測定し、回避試験負荷がそれらの含有量に与える影響を調べると共に、maternal PKUの影響も併せて検討した。

〔実験方法〕

１）実験動物：実験的フェニールケトン尿症ラットの作製は、原田の方法[3]に準じ、L-phenylalanine (味の素)の 2000mg/kg B.W.を 0.5%の tragacanth gumに懸濁し妊娠 10日から 14日まで 1日 3回、強制経口投与し、対照群には 0.5% tragacanth gum懸濁液のみを PKUと同様のスケジュールで経口投与した。

２）シャトルボックス回避試験：生後 7週時に同腹F_1の雄の中から各々 1匹選び、2方向式シャトルボックス（ユニコム）を用いて、非連続的条件回避試験を実施した。回避条件付けは、条件刺激として光とブザー音を 5秒間与え、この間に動物が他方に移動しない場合は、無条件刺激として 100V, 2.5mAの電気刺激を床グリットより与え、5秒間に移動しなければ通電を中止した。この試行を、1日 60試行行い、これを 3日間連続した。

３）脳内 NE および 5-HT 含有量の測定：対照群、PKU群の生後 7週のラット、および生後 7週より 3日間にわたる回避試験の終了直後のラットを断頭し、脳を速やかに取り出し、Glowinski & Iversenの方法[2]により前頭前皮質、線条体、視床、海馬および脳幹部の 5部位に分け、それらの部位を0.1M クエン酸ー0.1M 酢酸ナトリウム bufferーメタノール溶液でホモジネートし遠心した後、上清を窒素ガス下で乾固しそれを、0.01N酢酸溶液で溶解した後、HPLC用エイコムパック MA-ODS, 4.6 X 250mm のカラムを用いモビルフェースとして ギ酸ーアセトン溶液でホモジネートし遠心した後、上清を窒素ガス下で乾固しそれを、0.01N酢酸溶液で溶解した後、HPLC用エイコムパック MA-ODS, 4.6 X 250mm のカラムを用いモビルフェースとして 0.1M クエン酸ー0.1M 酢酸ナトリウム bufferーメタノール溶液を用い、イオンオペレーターとしてオクタスルホン酸ナトリウムを用いた。流速は 1ml/min で定量は、内部標準としてイソプロテレノールを使用し、電気化学検出器（島津 L-ECD-6A）で行った。

「結果と考察」

シャトルボックス回避試験の結果、試験第 1日の 0-30試行目における PKU群の回避率が対照群と比較して有意な低値を示したが、試験第 1日 31試行目以降および第 2-3日の回避率には 2群間で差は認められなかった(Fig.1)。このことから、PKU群での回避獲得遅延の可能性が示唆されたが、その保持には影響はないと推察された。回避試験未実施動物の脳各部位における NE 含有量には、対照群とPKU群との間で有意差は認められなかった。回避試験実施動物では、前頭前皮質、視床、海馬および脳幹部の NE 含有量が対照群および PKU 群のいずれにおいても有意に減少し、視床および海馬では、PKU 群が対照群に比べさらに有意な低値を示した(Fig.2-L)。恐怖条件付けやストレスを負荷することにより脳内での NE の代謝回転が高進することが報告されている[5]。今回の結果では、PKU群の視床および海馬での NE 含有量が対照群と比較して減少していることから、今回用いた条件付けにより NE 代謝回転がより高進されるような素因を PKU群が有していると推察された。また、前頭前皮質および視床での 5-HT 含有量も回避試験を実施することにより有意に減少し、視床での減少は PKU群が対照群と比べさらに有意であった(Fig.2-R)。このことから、回避試験により 5-HT の代謝回転も高進すると考えられ、PKU群は本試験の条件付けにより視床での代謝回転をも高進されうる素因を有するものと推察された。なお同時に脳各部位の各種アミノ酸含有量についても測定を実施しており、それについても若干の考察を加える。

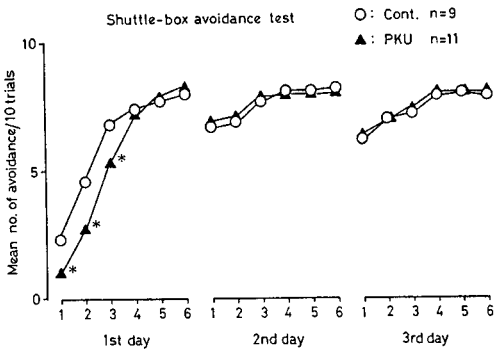


Fig.1 Avoidance ratios in PKU rats with shuttle box. * P<0.05

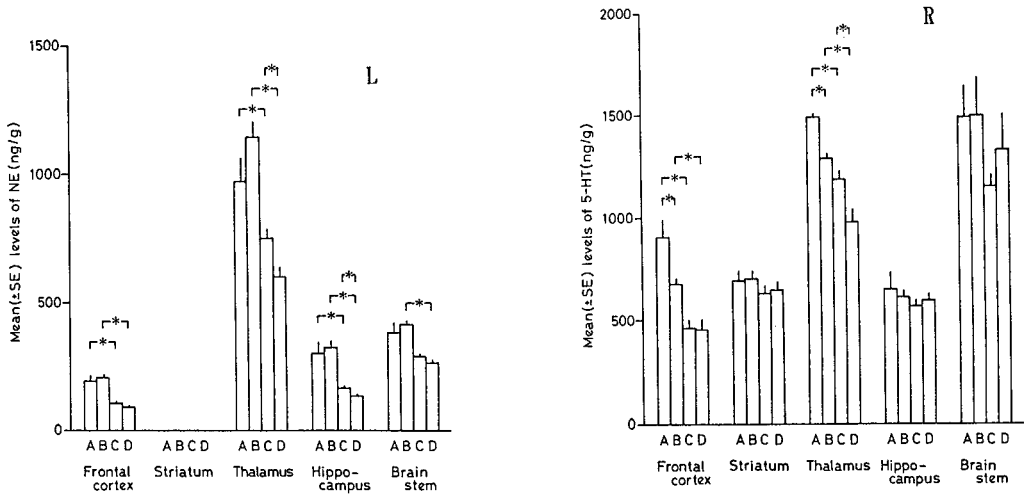


Fig.2. Levels of NE (L) and 5-HT (R) in various brain regions of rats. A: Cont. without avoidance test, B: PKU without avoidance test, C: Cont. with avoidance test, D: PKU with avoidance test. * P<0.05

[文献] 1) Frankenberg,W.K.et al. (1968) J.Pediatr. 73, 560-570. 2) Glowinski,L.& Iversen,L.C. (1966) J.Neurochem. 13. 655-669. 3) Harada,Y.et al. (1987) J.Med.Soc. Toho Univ. 34, 16-27. 4) Hirano,K.& Kanamatsu,T. (1988) J.Med.Soc. Toho Univ. 35, 220-231. 5) 井田能成 他 (1988) 神経化学 27, 300-301. 6) Takagi,Y. (1980) J.Med.Soc. Toho Univ. 27, 565-579.

10 Globoid cell leukodystrophy (GLD, Krabbe病) のサイコシンの蓄積と病態代謝

野沢 政代*、 井田 博幸*、 松井 和隆**、 所 敏治*、 衛藤 義勝*

＊東京慈恵会医科大学小児科

＊＊東京慈恵会医科大学第２内科

［要約］

Ｋｒａｂｂｅ病は、セレブロシド・ベーター・ガラクトシダーゼの欠損によるが、ガラクトセレブロシドは蓄積せず、サイコシンが患者組織に蓄積する。我々は、サイコシンをＨＰＬＣ法により、サイコシンＮＢＤ－Ｆ（４－Ｆｌｕｏｒｏ－７－ｎｉｔｒｏｂｅｎｚｏｆｕｒａｚａｎ）誘導体化して、Ｓｈｏｗｄｅｘ－Ｓｕｇａｒカラムにより分析した。本法は、従来の方法より安定であり且つ特異性が高いと考えられた。サイコシンは、Ｔｗｉｔｃｈｅｒマウスの ＤＲＧなど各組織に於いて著明に増加していた。一方サイコシンをトリチュウムでラベルしてヒトならびにマウスＫｒａｂｂｅ病培養皮膚繊維芽細胞に加えサイコシンとガラクトセレブロシドの分解を検討したところ、ヒト正常細胞ならびにＫｒａｂｂｅ病細胞でのガラクトセレブロシドの分解は、各々７２％、４５％であるのに対しマウス正常細胞並びにＫｒａｂｂｅ病マウスでは、各々７７％、２１％とガラクトセレブロシドの分解障害がマウスＫｒａｂｂｅ病に強く見られた。またＫｒａｂｂｅ病細胞においてサイコシンの分解は、セレブロシドの分解よりも著明な分解障害が見られた。以上のことよりヒトＫｒａｂｂｅ病では、ガラクトセレブロシドの蓄積が 見られず、サイコシンが著明に蓄積する理由と考えられた。またサイコシンからガラクトセレブロシドにマウスＫｒａｂｂｅ病では合成されることより、ガラクトセレブロシドの合成経路としてサイコシン経由のルートがｍｉｎｏｒ ｐａｔｈｗａｙとして存在することが示唆された。

［実験方法］

１）サイコシンのＨＰＬＣでの分析法；サイコシン、グルコサイコシン、スフィンゴシンに０、１Ｍ ホウ酸バッファーを加えこれにＮＢＤ－Ｆエタノールを加え６５°Ｃ１分間加熱し５mM塩酸を加えＳｈｏｗｄｅｘ－Ｓｕｇａｒカラムにより分析、溶出液として９５％アセトニトリル－H_2O（９５：５）を用いて６５°Ｃにて溶出しＥｘ４７０ｎｍ，Ｅｍ５３０ｎｍにてサイコシン誘導体を測定した。

２）^{3}Ｈ－サイコシン並びに^{3}Ｈ－ガラクトサイコシンの培養細胞における分解代謝；^{3}Ｈ－ガラクトセレブロシド、^{3}Ｈ－ガラクトサイコシン（１０Ｘ１０^{4}ｃｐｍ）をホスファチジルセリン１５μｇと一緒に加え１、２、３、１２日とヒト並びにマウス正常並びにＫｒａｂｂｅ病細胞に加え継時的にＦｏｌｃｈの方法に従い脂質を抽出した。脂質の分画は、ＴＬＣとオートラジオグラムにより分析した。

［成績］

１）サイコシンのＨＰＬＣ法のＮＢＤ－Ｆ法による分析では、図１に示すごとくスフィンゴシン、グルコサイコシン、ガラクトサイコシンに分析され、従来のフタールアルデヒド誘導体よりも安定であり、数μｇのサイコシンの定量が可能であり特異性も高かった。サイコシンは、ＴｗｉｔｃｈｅｒマウスＤＲＧ、ミエリン膜に於いて正常と比較し各々５０－８０倍の増加を認めた。

2）^{3}Hーガラクトセレブロシド並びに^{3}Hーサイコシンの GLD培養皮膚繊維芽細胞での分解；表1に示す如くヒト並びにマウスKrabbe病の細胞では、ガラクトセレブロシドの分解は、明らかに障害されていたが、サイコシンの分解障害が著明であり、特に^{3}Hーサイコシンを加えて12日間後の細胞内分解は、コントロール細胞が約40%分解するのに対してGLDマウスでは、約10－12%と著明に低下しておりヒトのGLDでも同様にサイコシンの分解障害が著明であった。また^{3}Hーサイコシンを GLD細胞（ヒト並びにマウス）に加えると小量の^{3}Hーガラクトセレブロシドが合成された（Table 1）。

［考察］

HPLC法によるサイコシンの定量法をNBD－Fによる誘導体を用いてつShowdex－Sugarカラムを用い開発した。本法は、従来の方法より安定であり特異性に優れていた。また^{3}Hーサイコシンの分解代謝を^{3}Hーガラクトセレブロシドと比較してヒト、マウスGLD細胞に於いて共に^{3}Hーサイコシンの分解は、強く障害され、その分解障害の程度は、^{3}Hーガラクトセレブロシドの分解障害より強く障害されていることが明らかにされ、GLD組織でガラクトセレブロシドよりサイコシンが蓄積する病因と考えられた。また、^{3}Hーサイコシンより^{3}Hーガラクトセレブロシドが合成されたことからサイコシンがacylationにより合成される事が示唆された。

［文献］

1. Ida H,.Umezawa F.,Eto Y. and Maekawa K.(1982)
Biochem.Biophys.Res.Commun.109,634-638.

2. Kobayashi T.,Shinoda. and Kuroiwa Y.(1985)
J.Biol.Chem.260,14982-14987.

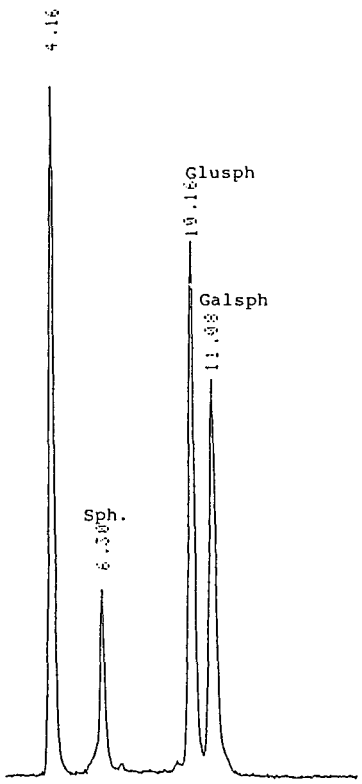
3. Kobayashi T.,Shinoda H. and Suzuki K.(1987)
BiochemBiophys.Res.Commun.144,41-46.

Table 1. The radioactivities of unhydrolyzed [^{3}H]-GalSph and synthesized [^{3}H]-GalCer in fibroblasts from human and murine controls and GLD after the addition of 10×10^4 cpm [^{3}H]-GalSph into the medium

days	mouse		human	
	Control	GLD	Control	GLD
3 days				
[^{3}H]GalSph	0.70×10^4	1.20×10^4	0.52×10^4	1.21×10^4
[^{3}H]GalCer	0.40×10^2	3.04×10^2	n.d.	2.24×10^4
6 days				
[^{3}H]GalSph	0.53×10^4	1.17×10^4	0.24×10^4	1.15×10^4
[^{3}H]GalCer	n.d.	5.28×10^2	n.d.	2.00×10^2
12 days				
[^{3}H]GalSph	0.36×10^4	0.96×10^4	0.12×10^4	0.98×10^4
[^{3}H]GalCer	0.40×10^2	8.80×10^2	n.d.	1.80×10^2

Values are expressed as dpm per mg protein and means in duplicates.
The experimental conditions are described in the text.

図1



Sph; sphingosine
Glusph; glucosylsphingosine
Galsph; galactosylsphingosine

11 Neuronal Ceroid Lipofuscinosis（ＮＣＬ）の病因：蛋白質代謝との関連性に関する研究

津田　隆、松井和隆＊、原田恵美子、川目　裕、
所　敏治、衛藤義勝
（東京慈恵会医科大学小児科、第二内科＊）

〔要約〕

ＮＣＬは遺伝性脳変性疾患であり、最近までその病因に関して明らかではなかったが、最近カテプシンＢ、Ｈの活性低下が報告された。本研究ではＮＣＬの病因と蛋白質代謝との関連性を明らかにする為に、１）チオールプロテアーゼ活性阻害剤であるＥ－６４又は Leupeptin をラット培養神経細胞並びにＰＣ－１２細胞のメジウムに１～５０μg/ml濃度で添加したところＮＣＬ患者脳に蓄積している封入体と形態的に近似した granular な封入体像が電顕レベルで認められた。又生化学的にも特異蛋白質の蓄積がみられた。次に、２）ＮＣＬ患者培養皮膚線維芽細胞の蛋白分解酵素、特にカテプシンＢ、Ｈ、Ｌ活性の測定並びに酵素学的特異性に関して検討を加えた。又蛋白質の組成の異常の有無に関して^{3}Ｈ－ロイシン或いは^{35}Ｓ－メチオニンをＮＣＬ患者培養皮膚線維芽細胞に添加して検討した。その結果ＮＣＬの病因としてカテプシンＢ、Ｈ、Ｌ活性は関与していないことを明らかにした。以上の研究よりＮＣＬの病因に関してカテプシンＢ、Ｈ、Ｌ以外の関与する蛋白分解代謝の異常が示唆された。

［実験方法］

ＮＣＬ患者培養皮膚線維芽細胞は５例の Batten 病並びに１例の Kufs 病のものを患者の承諾のもとに用いた。又各種リソゾーム酵素活性は４ＭＵ誘導体を用いて測定した。カテプシンＢ、Ｈ、Ｌ活性は Barett らの方法に従いZ-Arginine 誘導体を用いて測定した。ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルによる蛋白の分析は Weber & Osborn らの方法によった。^{3}Ｈ－ロイシン並びに^{14}Ｃ－メチオニンは１０μCi/mlの濃度でメジウム内に添加して蛋白質をラベルした後、ＳＤＳ－ゲル分析を行いオートラジオグラムとした。

神経細胞の培養はラット１５日令の脳を用いて dissociated cell culture を行い Leupeptin 又はＥ－６４を０．１～５０μg/ml メジウム内に添加した。同様にＰＣ－１２細胞を用いて同様の濃度を添加し細胞内封入体像を電顕にて検討すると同時に、生化学的には蛋白質をＳＤＳ－ＰＡＧＥ並びに^{3}Ｈ－ロイシンを添加（１０～５０μg/ml メジウム）したのちのＳＤＳ－ＰＡＧＥのオートラジオグラムにより比較検討した。

［成績］

１．ラット並びにＰＣ－１２細胞に対するＥ－６４並びに Leupeptin の効果

Ｅ－６４　１０μg/ml medium の添加によりＮＣＬ患者脳に認められる様な granular な封入体が光顕並びに電顕レベルで観察された。^{3}Ｈ－ロイシンの添加によりラベルされた蛋白質の細胞内蓄積はＥ－６４　３μg/mlの添加で約１．７倍に増加した。蛋白質のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析では、分子量４０ｋに相当するバンド以外に何本かのバンドの増量が認められた。

2．ＮＣＬ患者培養皮膚線維芽細胞でのカテプシンＢ、Ｈ、Ｌ活性、リソゾーム酵素活性並びに^{35}Ｓ－メチオニン、^{3}Ｈ－ロイシン添加後の蛋白質のＳＤＳ－ゲル分析（表１）

ＮＣＬ患者５例（Batten 病）の培養皮膚線維芽細胞でのカテプシンＢ、Ｈ、Ｌの酵素学的特異性(pH,kinetics) に関しては正常と同様であり、カテプシン活性はＮＣＬ患者に於て欠損がないことを証明した。又^{35}Ｓ－メチオニン並びに^{3}Ｈ－ロイシン添加による蛋白質のＳＤＳ－ＰＡＧＥでは対照との間に蛋白質バンドの差異を認めた。

［考察］

１．ラット培養神経細胞並びにＰＣ－１２細胞に於て、チオールプロテアーゼ阻害剤添加によりＮＣＬ患者細胞にみられるものと類似した封入体像が電顕的に認められることを明らかにし、このことからＮＣＬの病因として蛋白質代謝の障害の関連性が示唆された。

２．ＮＣＬ患者（ Batten病 ）患者培養皮膚線維芽細胞では従来カテプシンＢ、Ｈの欠損が報告されていたがカテプシンＢ、Ｈ、Ｌ活性に異常のない事を酵素学的に証明した。又、蛋白代謝の異常を^{3}Ｈ－ロイシン並びに^{35}Ｓ－メチオニンを用いて検討したところ対照との差異を認めたがその意義に関して現在検討中である。

以上の所見よりＮＣＬの病因としてカテプシンＢ、Ｈ、Ｌ以外による蛋白質の分解障害が示唆された。

表１　Cathepsin H,B and L activities in cultured skin fibroblasts from patients with NCL (Spielmeyer-Vogt)

	activities (μmol/mg protein/hr) Cathepsin H	Cathepsin B	Cathepsin L
Control 1	4.75	89.50	126.73
2	3.73	64.53	92.00
3	4.72	82.54	122.90
NCL Patients (S-V)			
Case 1	2.84	49.49	47.18
Case 2	3.79	80.54	96.27
Case 3	6.27	73.29	75.24
Case 4	4.40	27.29	34.50
Case 5	3.34	55.17	68.76

［文献］

Ivy GO, Schottler F, Wenzel J, Baudry M, Lynch G(1984) Inhibitors of lysosomal enzymes; accumulation of lipofuscin-like dense bodies in brain. Science 226: 985-987.

Matsui K, Shirasawa N, Eto Y(1990) cytoplasmic accumulations in rat primary brain cell cultures following treatment with E-64, a thiol protease inhibitor Develop Neurosci 12: 133-139.

Ohashi T, Kanamoto Y, Yamaguchi S, Eto Y(1986) Abnormal excretion of autofluorescent lipids in urine from patients with neuronal ceroid lipofuscinosis. Tohoku J Exp Med 148: 335-339.

Palmer DN, DeLellis M, Frascarelli M , Tomaccini D(1973) Ceroid lipofuscinosis in sheep II. The major component of the lipopigment in liver, kidney, pancreas, and the brain is low molecular weight protein. J Biol Chem 261: 1773-1777.

12　家族性アルツハイマー病患者の培養線維芽細胞にみられる細胞骨格蛋白の変化

武田雅俊　工藤喬　中村祐　田中稔久　楯林義孝　谷向知　多田国利　播口之朗　西村健

大阪大学医学部精神医学教室

［要約］
前年度にアルツハイマー病線維芽細胞に観察されるビメンチン線維配列の特徴的な乱れを報告したが、今年度は主としてウェスタンブロット法によりアルツハイマー病培養線維芽細胞の細胞骨格の変化について検討した。ビメンチンおよびアクチンには差異を認めないが、アルツハイマー病線維芽細胞においてはフォドリンが高い分子量を示していた。精製フォドリンとの比較から健常線維芽細胞内ではフォドリン分子が部分分解を受けているのに対して、アルツハイマー病線維芽細胞内ではフォドリン分子の部分分解産物が極端に少ないことが明らかになった。またコルヒチン処理によりアルツハイマー病線維芽細胞は健常細胞と同様にビメンチン線維の核周囲への集積を認めるが、アルツハイマー病線維芽細胞においてはコルヒチン除去後のビメンチン線維の伸長の速度が健常細胞と比較して低下している。以上の結果からアルツハイマー病線維芽細胞では細胞骨格蛋白の機能や代謝が変化していることが示唆された。

はじめに

最近の研究結果によりアルツハイマー病の全身性疾患としての特徴が明らかにされつつある。アルツハイマー病の線維芽細胞についてニトロソグアニジン(7)や放射線(3)によるＤＮＡ障害の感受性が高いこと、エネルギー代謝の異常(8)、細胞接着能の低下(10)、Ｃａ結合能の変化(5)、Ｃａ代謝の変化(6)、プロテインキナーゼの変化(11)などが報告されている。昨年度の本学会において我々はアルツハイマー病患者から継代培養した線維芽細胞は、基質への細胞接着効率が低下していること、および、中間径線維を形成するビメンチンの配列に特徴的な乱れが生じていることを報告し、ビメンチン蛋白そのものの変化よりもアルツハイマー病線維芽細胞の細胞膜直下の裏打ち構造とビメンチンとの結合の変化を推察した(9)。今回、細胞膜直下に存在するフォドリンについてその代謝を中心に検討した。また線維芽細胞をコルヒチン処理によりキャッピングをきたした後、ビメンチン線維の伸長の程度を比較検討したので報告する。

［材料および方法］

初老期発症の痴呆症状を呈し臨床的にアルツハイマー病と診断された症例の中で、同一家系に３例以上の集積を認めたものを家族性アルツハイマー病、家族性の発生を認めないものを非家族性アルツハイマー病とし、それぞれの患者および健常対照者から皮膚組織片を採取した。皮膚生検にあたっては患者およびその家族に本研究の目的と意義を十分に説明し文書にてその同意を確認した。採取した皮膚組織を10%FCS添加DMEMにて継代培養しその8-15代目の細胞を用いた。

ビメンチンおよびフォドリンの精製　ビメンチンは牛眼水晶体からGeisler&Weberらの方法(2)により、脳フォドリンは牛脳からDavis & Bennettの方法(1)に従い精製した。

使用抗体　抗ビメンチンモノクロナル抗体はAmersham社製、抗アクチンモノクロナル抗体はTransformation Research社製、抗βフォドリンモノクロナル抗体は日本新薬社製、抗フォドリンポリクロナル抗体はTransformation Research社製のものを使用し、第２抗体としてFITC標識抗マウスIgG抗体およびrhodamine標識抗マウス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。

培養線維芽細胞のコルヒチン処理と蛍光免疫染色　30mmディシュ中L-polylysineにてコートしたカバーグラス上に培養した線維芽細胞をコルヒチン添加した10% FCSを含むDMEM培地にて6時間培養した後、細胞を洗浄し新たにコルヒチンを含まない上記の培地にて培養し継時的に細胞を蛍光免疫法にて観察した。蛍光免疫染色は抗アクチンIgM抗体と抗ビメンチンIgG抗体の二重染色により行なった。細胞を洗浄後、氷冷メタノールにて10分間固定し、第１抗体と1時間反応させ、続いて第２抗体としてFITC標識抗マウスIgG抗体、rhodamine標識抗マウスIgM抗体と1時間反応させた後ニコン落射型蛍光顕微鏡にて観察した。

ウェスタンブロッティング　回収した線維芽細胞を4倍量のリン酸バッファーにてホモジェナイズし、7.5%ゲルあるいは5%ゲルにて泳動後、ニトロセルロース膜に転写した蛋白バンドを第１抗体およびペルオキシダーゼ標識第２抗体と反応させ、4-chloro-1-naphtholにて発色させた。

［結果および考察］

コルヒチン処理による細胞骨格蛋白の変化　健常線維芽細胞もアルツハイマー病線維芽細胞も1μMコルヒチン添加培地で12時間培養するとビメンチン線維の核周囲への集積が観察された。アクチン線維の配列は正常に保持されており中間径線維に特徴的なキャッピング現象が観察された。アルツハイマー病細胞のキャッピング現象に対する感受性の程度を検討したが、家族性および非家族性アルツハイマー病細胞のいずれについても健常線維芽細胞と同程度のコルヒチンによりキャッピングが認められ、そのコルヒチン作用に対する差異を認めなかった。1μMコルヒチン処理に続いてコルヒチンを除いた培地で培養を続けると時間と共にビメンチン線維の伸長が観察された。アルツハイマー病線維芽細胞においては、健常線維芽細胞と比較してこのビメンチン線維の伸長速度が遅く図１Ａに示すように健常細胞ではコルヒチン除去後６時間でビメンチンの正常な配列が認められるのに対し、図１Ｂに示すようにアルツハイマー病細胞では６時間後ではまだ完全には回復していなかった。

アルツハイマー病線維芽細胞のフォドリンの変化　アルツハイマー病線維芽細胞のホモジェネイトをビメンチン抗体、アクチン抗体、フォドリン抗体を用いたウェスタンブロット法にて検討した。アクチンはアルツハイマー病線維芽細胞

においても健常細胞のと同じく分子量42Kのシングルバンドを呈していた（図２Ｃ）。ビメンチンはアルツハイマー病線維芽細胞においても健常細胞と同じく分子量50-57Kの間に６本のバンドを呈しており両者において差異を認めなかった（図２Ｄ）。図２Ｄの左端に示すように牛レンズから精製したビメンチンの免疫染色でも６本のバンドが観察され、これらの分子量50K-55Kバンドはビメンチン蛋白のプロテアーゼによる部分分解産物と考えられる(4)。ビメンチンの分解パタンはアルツハイマー病線維芽細胞においても健常細胞と同様であり差異を認めなかった。これに対してフォドリン抗体によるウェスタンブロットの結果はアルツハイマー病線維芽細胞内のフォドリンは健常細胞内のそれと大きく分子量が異なっていた。抗フォドリンポリクロナル抗体による染色バンドはアルツハイマー病線維芽細胞では分子量240Kのメインバンドと180Kのマイナーバンドとを示し、健常細胞においては分子量180Kのバンドが認められた（図２Ａ）。牛脳から精製したフォドリン蛋白との移動度の一致からアルツハイマー病線維芽細胞のフォドリンは分解を受けていないフォドリン分子であり、健常細胞のフォドリンはそれよりも小さい分子であると考えられた。さらにフォドリン分子の変化を検討するためにβフォドリンに特異的なモノクロナル抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。図２Ｂに示すように牛脳から精製したフォドリンと家族性アルツハイマー病線維芽細胞中のバンドとは一致していた。これに対して非家族性アルツハイマー病および健常細胞のバンドは240Kより低分子量であり、フォドリンの部分分解産物のように観察された。アルツハイマー病線維芽細胞中のフォドリンは部分分解産物が殆ど観察されないことからフォドリンの代謝に変化が生じており、なんらかの原因によりフォドリンが部分水解を受けにくくなっていることが示唆される。

今回の報告ではコルヒチン処理後のビメンチン線維の伸長の速度がアルツハイマー病線維芽細胞においては低下していること、および、アルツハイマー病線維芽細胞内においてはフォドリンの部分分解産物が極端に少ないことを示した。この原因は不明であるが、一つの可能性としてアルツハイマー病線維芽細胞内のＣａ代謝の変化が考えられる。フォドリンはＣａ依存性中性プロテアーゼ（ＣＡＮＰ）の基質であることが知られており、またアルツハイマー病線維芽細胞内でのＣａ代謝の異常が報告されている。今後アルツハイマー病線維芽細胞における細胞骨格蛋白のＣａによる調節についての検討を進めていきたい。

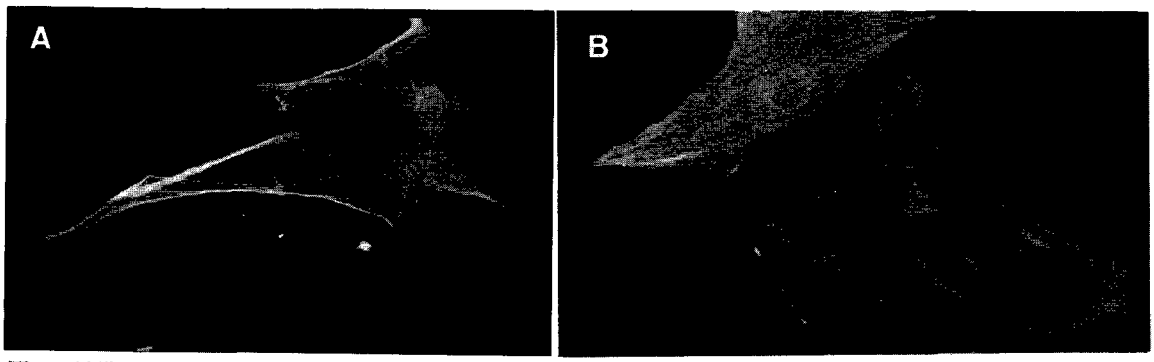


図１．健常細胞（Ａ）および家族性アルツハイマー病線維芽細胞（Ｂ）のコルヒチン処理後６時間の抗ビメンチン蛍光免疫染色像（ｘ４００）

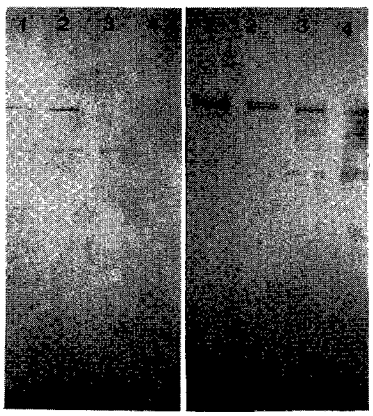
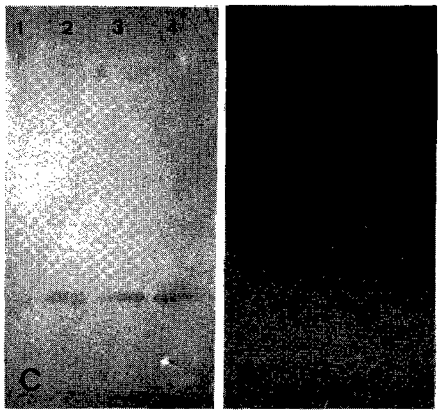


図２

A.抗フォドリンポリクロナル抗体，
B.抗フォドリンモノクロナル抗体，
C.抗アクチン抗体，
D.抗ビメンチン抗体によるウェスタンブロット。
1.精製フォドリン(A,B)、または精製ビメンチン(C,D)、
2.家族性アルツハイマー病、
3.アルツハイマー病、
4.健常細胞。



文献

(1)Davis J & Bennett V. J Biol Chem 258(1983) 7757-7766. (2)Geisler N & Weber K. FEBS Lett 125 (1981) 253-256. (3)Li JC,Kaminskas E. Biochem Biophys Res Commun 129 (1985) 733-738. (4)Ochs DC,McConkey EH,Gurd NL. Exp Cell Res 135 (1981) 355-362. (5)Peterson C,Goldman JE. ProNAS USA 83 (1986) 2758-2762. (6)Peterson C,Ratan RR,Shelanski ML et al. ProNAS USA 83 (1986) 7999-8001. (7)Scudiero DA,Polinsky RJ, Brumback RA,et al. Mutation Res 159(1986) 125-131. (8)Sims NR,Finegan JM,Blass JP. Ann Neurol 21(1987) 451-457. (9)Takeda M,Tanaka M,Kudo T, et al. Acta Neurol Scand,in press. (10)Ueda K,Cole S,Sundsmo M, et al. Ann Neurol 25 (1989) 246-251. (11)Van Huynh T,Cole G,Katzman R et al.Arch Neurol 46(1989)1195-1199.

13 アルツハイマー型痴呆患者剖検脳における酸性線維芽細胞成長因子の免疫組織化学

遠山育夫，原靖*，安原治**，秋山治彦**，McGeer P. L.***，木村宏
（滋賀医大・分子神経研、脳外科*、京大・医・神内**、British Columbia大***）

〔要約〕 アルツハイマー型痴呆患者および正常対照例の大脳皮質における酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）の局在について免疫組織化学的に検索した。正常対照例の大脳皮質では、白質に少数のaFGF免疫陽性グリアを観察したが、灰白質には陽性構造は認められなかった。これに対しアルツハイマー型痴呆例では、白質のみならず灰白質にも強い免疫活性を有するaFGF免疫陽性グリアを多数観察した。とくに灰白質ではaFGF免疫陽性グリアは老人斑の周辺に分布していた。また、aFGF免疫陽性グリアが血管壁に突起をのばしているのがしばしば認められた。これらのことから、aFGFはとくにグリア細胞を通して、アルツハイマー型痴呆の病態に関与していることが示唆された。

〔緒言〕

最近、老年痴呆の病態における成長因子や成長抑制因子の関与が推測されている。なかでも酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）は脳内に豊富に存在する（1）ことから注目されるが、その神経疾患における役割についてはいまだ不明である。そのひとつの理由として、aFGFがどのような細胞群に存在し、痴呆のような神経疾患でどう変化するのかという基礎的知見が得られていないことがあげられる。そこで本研究ではヒト剖検脳を用い、とくに痴呆症で病変の主座となる大脳皮質に焦点をあてて、aFGFの局在について免疫組織化学的に検索した。

〔方法〕

カナダ国ブリティシュコロンビア大学から供与を受けたアルツハイマー型痴呆患者5例（年齢：74±4．6歳）と対照として痴呆のない非神経疾患患者4例（年齢：65±12．1歳）の剖検脳について検索した。死後3時間から15時間の間に側頭葉皮質を摘出し、4％パラホルムアルデヒド液中で24時間から48時間浸漬固定した。15％蔗糖加燐酸緩衝液（pH 7.4）に48時間浸漬後、ミクロトームで30μmの連続切片を作製した。0．3％トリトンX入りの燐酸緩衝液（PBS－T）で4日以上洗浄後、aFGFの免疫組織化学に供した。

aFGF抗体はウシ脳由来のaFGFを家兎に免疫して得たものを用いた。なお、aFGF抗体の作製方法、特異性の検定についての詳細はすでに報告済み（2）なので省略する。標本を0．5％過酸化水素水中に30分間浸して内因性ペルオキシダーゼを破壊した後に、蛋白質の非特異的吸着を阻止するために2％正常ヤギ血清と2時間反応させた。その後一万倍に希釈したaFGF抗体と4℃で3日間反応させた。検出はABC法でおこなった。アストロサイトの増生と比較検討する目的で、アルツハイマー型痴呆例の隣接切片を抗GFAP（glial fibrillary acidic protein）抗体（Dako；一万倍希釈）で免疫染色した。また、一部の切片をチオフラビンSで対比染色して蛍光顕微鏡で観察した。

〔結果〕

正常対照例では、白質に少数のaFGF免疫陽性グリアを観察したが、灰白質には陽性構造は認められなかった（図1A，B）。白質に観察されたaFGF免疫陽性グリアの染色強度はきわめて弱いため、aFGF陽性グリアがどのタイプのグリアに属するかの同定は困難であった。これに対しアルツハイマー型痴呆例では、白質のみならず灰白質でも、強い免疫活性を有するグリア細胞を多数観察した（図1C，D）。GFAP免疫陽性グリアの分布と比較すると、とくに灰白質においてaFGF免疫陽性グリアとGFAP免疫陽性グリアの分布には相違が認められ、aFGF免疫陽性グリアは小集団塊を形成する傾向が認められた（図1C，E）。チオフラビンSで対比染色してみると、aFGF陽性グリアが老人斑のアミロイドを取り囲むように小集団塊を形成していることが認められた（図2A，B）。これらaFGF免疫陽性グリアは星状の細胞体を有し、ときにその突起を血管壁に伸ばしているのが観察された（図2C）。

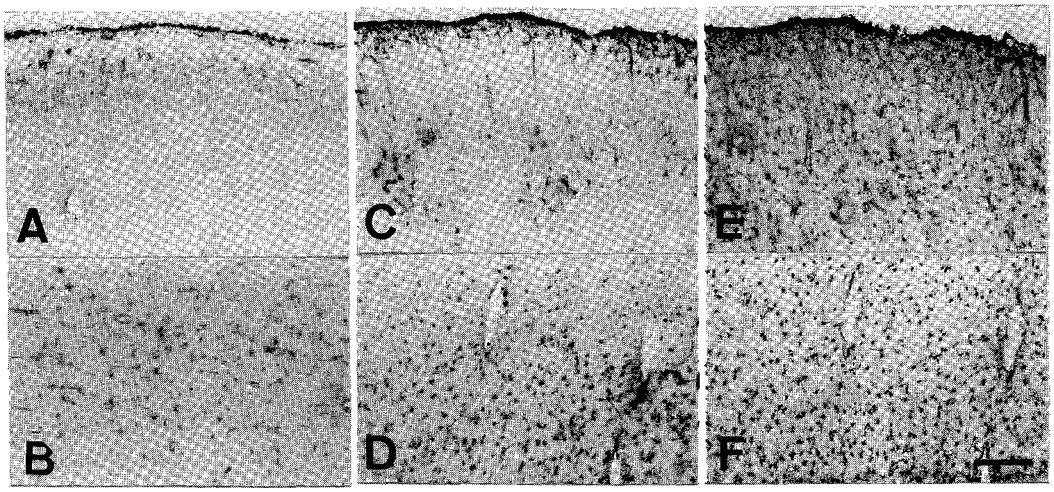


図１　ａＦＧＦ免疫染色（Ａ，Ｂ，Ｃ，Ｄ）およびＧＦＡＰ免疫染色（Ｅ，Ｆ）：Ａ，Ｂは正常対照例の、Ｃ，Ｄ，Ｅ，Ｆはアルツハイマー型痴呆例の側頭葉皮質を示す。Ａ，Ｃ，Ｅは灰白質で、Ｂ，Ｄ，Ｆは白質。Ｃ，ＥおよびＤ，Ｆはそれぞれ隣接切片。スケール＝２００μｍ



図２　アルツハイマー型痴呆例の側頭葉灰白質で観察されたａＦＧＦ免疫陽性グリア（Ａ，Ｃ）ＢはＡと同一切片をチオフラビンＳで対比染色したもの。　スケール＝２５μｍ

［考察］

本研究によって、正常ヒト大脳皮質白質に少数ではあるがａＦＧＦ免疫陽性グリアが存在することが明かとなった。これは正常ラット脳での観察結果とも一致する所見である（２，３）。他方、アルツハイマー型痴呆例では白質のみならず灰白質にも多数のａＦＧＦ免疫陽性グリアを観察した。これらａＦＧＦ免疫陽性グリアはその形態学的特徴からアストロサイトと思われた。しかしアルツハイマー型痴呆例の灰白質では、ａＦＧＦ陽性グリアとＧＦＡＰ陽性グリアの分布には相違が認められ、ａＦＧＦ免疫陽性グリアはとくに老人斑の周辺部に多く分布する傾向が認められた。アルツハイマー型痴呆におけるａＦＧＦの役割については不明であるが、その分布の特徴から老人斑との関連が示唆された。アルツハイマー型痴呆例の灰白質でのａＦＧＦ免疫陽性グリアの増加が、アルツハイマー型痴呆の病態に特異的なものか否か、今後グリアの増加を伴う他の疾患での観察を含め、検討する必要があると考えられた。

［文献］

1) Gospodarowicz D. (1987) Methods Enzymology: 147, 106-119
2) 遠山育夫，原靖ほか (1988) 神経化学，27: 98-99
3) Tooyama I., Kimura H. et al. (1990) Neuroscience (in press).

14　精神分裂病患者での心房性Ｎａ利尿ペプチド（ＡＮＰ）とバゾプレッシン（ＡＶＰ）の分泌動態

大沢弘吉、岸本年史、嶋吉徳人、松村一矢、法山良信、東浦直人、木寺克樹、平井基陽、井川玄朗
（　奈良医大・精神　）

〔要約〕

精神病患者での水中毒発生機序に関わる心房性Na利尿ペプチド（ANP），バゾプレッシン（AVP)の分泌動態を明らかにする目的で、精神分裂病圏の患者15名を対象に水を経口負荷し、血漿浸透圧に対する血漿ANP 濃度および血漿AVP 濃度を測定した。さらに健常対照者15名に水を経口負荷し、同様の測定をし、次の知見を得た。

1)　健常群、患者群のいずれにおいても、血漿浸透圧と血漿AVP の間に正の相関関係があったが、患者群では血漿浸透圧に対するAVP の分泌感度が有意に低下していた。

2)　健常群の下限値以下の低血漿浸透圧域（270 mOsm/ kg以下）で、患者群にAVP の分泌が認められた。

3)　患者群では、健常群に比して有意に高いANP 分泌を認め、また患者群では血漿浸透圧と血漿ANP との間に負の相関があった。

4)　以上より、精神分裂病患者における水中毒の病態は、ANP 分泌をともなったSIADH の一型であるhypo-vasopressinemic antidiuresis　である可能性が示唆された。

Key word: schizophrenia, atrial natriuretic peptide, vasopressin

精神分裂病などの精神疾患患者での水中毒の病態は、多飲とそれに伴い急速に進展する低Na血症であり、ANP が関与していろ可能性が高い。われわれは、すでに水中毒発生機序に関連して精神分裂病患者におけるAVP 分泌動態を検討し、低Na血症の存在の有無にかかわらず精神分裂病患者での浸透圧に対するAVP 分泌感度が低下していることを報告した(1) 。水中毒発生機序を解明する目的で、精神分裂病患者に水を経口負荷しANP　およびAVP 分泌動態を検討した。

［　対象と方法　］

1)　対象は、奈良医大に入院中の心、腎、肝、内分泌障害のない精神分裂病患者13名、分裂感情病患者 2名（DSM-Ⅲ-R）の15名（32.2±9.6 才）である。そのうち、低Na血症の既往のある患者は 7名である。患者には研究の趣旨を説明し、了承を得た。投与中の薬剤は継続した。採血90分前より喫煙を禁じ、また採血30分まえより臥床安静を保った。採血は午後 5時（負荷前）及び同 5時45分（負荷後30分）に行った。健常対照者15名（27.3±3.6 才）も、同様に採血を行った。

2)　水負荷（20ml／kg体重）は、経口的に行い、15分かけて摂取した。

3)　採血後、ただちに血液の一部（約 5ml）は、氷冷したEDTA-2Naを加えた遠沈管に移し、4 ℃、3000回転にて血漿を分離してANP,AVP ，血漿浸透圧（POsm）の測定に供した。残りの血液（1 ml）は、ヘマトクリット（HCT ）と血清Na(S Na)の測定に供した。また採血時、自動血圧計（OMRON,HEM-413C）を用いて血圧と脈拍を測定した。

4)　血漿AVP の測定は、Waters Sep-Pak　C_{18}カートリッジで抽出したのち、三菱油化製キットを用いてRIA て、血漿ANP も同様に抽出したのち三菱油化（株）から提供をうけた抗体を用いてRIA にて、採血後 1月以内に行った。血漿浸透圧は Fiskeオズモメーター－OS型を用いて氷点降下法で測定した。また血清Na濃度は日立蛍光光度型 205型を用いて炎光光度法にて測定した。

［ 結果 ］

1) 水負荷の影響（表１）

HCT は健常群、患者群ともに有意な変化を示さなかったが、平均動脈圧（MBP ）は健常群において有意な低下を認めた。SNa, POsmは両群で低下を示した。PAVPは健常群で低下を示したが、患者群では有意な変化を示さなかった。PANPは健常群で増加を示したが、患者群では有意な変化を認めなかった。患者群のPANPは健常群のそれよりも、それぞれ有意な高値を示した。SNa （x mEq/L）と POsm（y mOsm/kg）との間には有意な正の相関（$y=1.436(x+56.1)$, $r=0.825$, $p<0.01$）があった。

2) 健常群の下限値以下のPOsm域（270 mOsm/ kg以下）で患者群にAVP 分泌があった。またPOsm（x mOsm/kg）と PAVP（ y pq/ml）との間には、健常群で$y=0.04(x-232)$, $r=0.480$, $p<0.01$の正の相関があり、患者群で$y=0.006(x-175)$, $r=0.452$, $p<0.05$ の正の相関があった。回帰分析を行うと、患者群の回帰直線の勾配は健常群のそれよりも有意に小さかった。

3) ANP 分泌動態（図１）

患者群での分泌動態を図１に示す。患者群では、健常群に比して有意に高い ANP分泌を認め、またPANP（ y pq/ml）とPOsm（ x mOsm/kg）との間に有意な負の相関 $y=1.68\times10^{6}\ e^{-0.04x}$、$r=0.53$, $p<0.05$ があった。

Table I

Effect of water loading on hemstocrit(HCT), mean blood presure(MBP), serum sodium(SNa), plasma osmolality(POsm), vasopressin(PAVP), and atrial natriuretic peptide(PANP).

	Control Time (min)		Patient Time (min)	
	0	30	0	30
H C T (%)	44.4 ± 2.7	44.0 ± 2.8	42.2 ± 3.9	41.8 ± 3.8
M B P(mmHg)	100 ± 7	96 ± 6*	101 ± 9	101 ± 12
S N a(mEq/l)	142 ± 2	136 ± 4**	136 ± 8	133 ± 8*
POsm(mOsm/Kg)	286 ± 4	280 ± 5**	272 ± 13	266 ± 13**
PAVP(pg/ml)	1.17 ± 0.39	0.68±0.27**	0.51±0.13	0.48± 0.19
PANP(pg/ml)	4.87 ± 6.24	8.11±7.37*	19 ± 20.6	26.1± 27.3

All valves are expressed as mean ± SD
* p 0.05 and ** p 0.01 vs the basal values before water loading

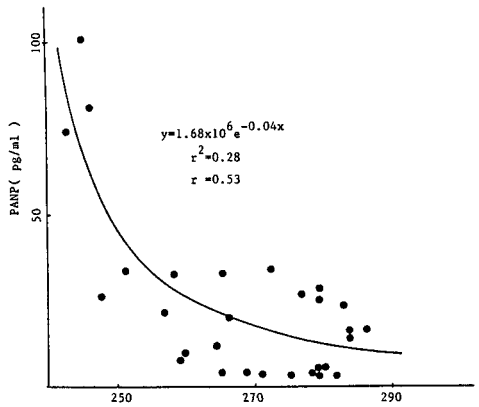


Fig 1
Relationship of PANP levels(y) to plasma osmolality(x) before and after water loading.

［ 考察 ］

患者群での低POsm域での不適切な AVP分泌は、 osmoreceptor の低感受性のための分泌抑制不全であると考えられ、PANPの高値は AVPにより生じた体液貯留に対して分泌された結果であり、さらに低Na血症を促進していると考えられる。したがって、水中毒の病態は、 ANP分泌を伴ったところの血中 AVPは低値ながら抗利尿反応が持続する病態 “hypovasopressinemic antidiuresis “(SIADH) の一型(2) である可能性が示唆された。

抗ANP抗体を提供された三菱油化株式会社に深謝します。

［ 文献 ］

1) 岸本年史、平井基陽、大沢弘吉他： 神経化学 26 : 85-87, 1987

2) Kishimoto T.,Hirai M.,Ohsawa H et al : Jpn J Psychiatr Neurol 43: 161-169, 1989

15　ＮＧ１０８－１５細胞におけるムスカリン性アセチールコリン受容体サブタイプによるＣａ電流抑制

橋井美奈子、東田陽博
（金沢大・医・神経情報研・神経物性）

〔要約〕

ムスカリン性アセチールコリン（mACh）受容体（mAChR）からCa^{2+}チャンネルへの信号伝達機能を、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細胞を用いて調べた。ACh （ 0.0001 － 1 mM）を細胞表面上に投与することにより、ＮＧ１０８－１５細胞の高閾値Ｃａチャンネル電流（I_{Ca}）は、濃度依存性に抑制を受け1mM投与でピークI_{Ca}は、12.8 ± 1.8% (n = 36) の抑制を受けた。ACh 0.1 mM を灌流することによって電流電圧曲線を描くとピークI_{Ca}の抑制は 0 ～ +40 mV の間で顕著であった。Cd^{2+}灌流によるピークI_{Ca}抑制もこの範囲でより顕著に見られたことから、I_{Ca}抑制はＮ型にも起こっていることが確認された。 ACh によるI_{Ca}の抑制は、百日咳毒素（PTx） 前処置にて阻止された（1.4 ± 1.0%, n = 7）。以上の結果は、ＮＧ１０８－１５細胞の高閾値Ca^{2+}チャンネル電流は、百日咳毒素感受性のGTP 結合タンパク質を介して、ｍ４サブタイプmAChRにより抑制を受けることを示唆している。

ムスカリン性アセチールコリンレセプター（mAChR）には４個以上のサブタイプがある(1, 2)。それらはそれぞれ異なる遺伝子によりコードされ、脳には、ｍ１からｍ５まで存在している。神経細胞において mAChR が刺激を受けるとI_{Ca}を抑制、或は増強することがわかっているが(3)、どのサブタイプがどのような機序を介してそれをモジュレートするかについては不明な点が多い。さらに抽出されたmAChRサブタイプ遺伝子によって研究された例はない。そこで、mAChR とCa^{2+}チャンネルとを備えているＮＧ１０８－１５細胞を用いて、mAChR受容体からCa^{2+}チャンネルへの信号伝達様式を検討した。

[方法]

ＮＧ１０８－１５細胞は dibutyryl cyclic AMP にて２～３週間分化させた。$BaCl_2$ 50 mM を含む溶液(4) で灌流し、ホールセルクランプにて２種類の高閾値I_{Ca}（トランジェントＮ型、及び、サスティンドＬ型）を記録した後、0.0001 ～ 1 mM x 3 μl AChをその細胞表面上に滴下、または、0.1 mM AChをＢａ溶液に溶解して灌流しACh による変化を観察した。ACh によるI_{Ca}抑制率は、ACh 投与後の投与前に対する peak電流値減少率により算出した。抑制率は、mean± S.E.M.で表した。PTx 処理は、測定の４～１０時間前に PTx（500 ng/ml）を培養液中に添加することにより行った。

[結果と考察]

ACh をＮＧ１０８－１５細胞に投与すると、ピークI_{Ca}は抑制され（図１）、その抑制は用いたACh の濃度に依存的であった。１mM ACh 投与では、平均12.8 ± 1.8% の抑制を受けた（n = 36）（図２）。ACh 0.1 mMを含む溶液で細胞外を灌流し、その前後で電圧－電流曲線を描くと、ピーク電流、持続性電流ともに指令電位（Vc）＋20 mV を中心に0 ～ －＋40 mVの範囲で顕著に抑制された（Vc = ＋20 mV におけるピークI_{Ca}の最大は抑制率は42%）。一方、

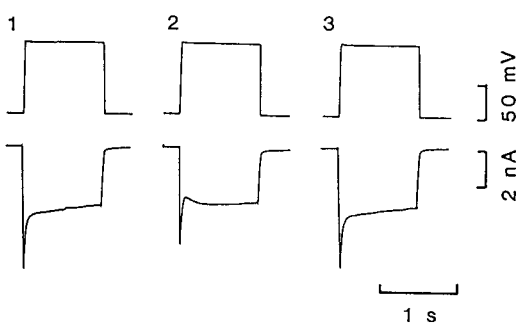
Vc ≦ -20 mVでは明らかな抑制は認めなかったので、T型Ca^{2+}電流はAChにより抑制されないことが示唆された。Cd^{2+} 0.5 mMを含む溶液での灌流を試みたところ、Cd^{2+}はVc ≧ +10 mVでI_{Ca}をより抑制することがわかった。従って、AChによるCa^{2+}電流抑制は、N型にも強く現れていることが確認された。PTx (500 ng/ml) にて前処置を施すこと、ACh (1 mM x 3 μM) 投与によるピークI_{Ca}の抑制率は、1.4 ± 1.0% (n = 7) となりI_{Ca}の抑制はほぼ完全に阻止された。PTxのIC_{50}は約 0.6 ng/ml であった。

以上の結果はNG108-15細胞におけるCa^{2+}チャンネル電流への信号伝達様式としては、ノルアドレナリン受容体やオピエート受容体同様(4)、PTx感受性GTP結合蛋白質を介して、m4サブタイプのmAChRにより抑制を受けることが示唆された。現在m1からm4 mAChRサブタイプ遺伝子をNG108-15細胞にトランスフェクトし、サブタイプ特異的にCa電流を抑制するか調査中である。プレリミナリーな結果では、m2もm4同様にCa電流を抑制することがわかっている。

[文献]

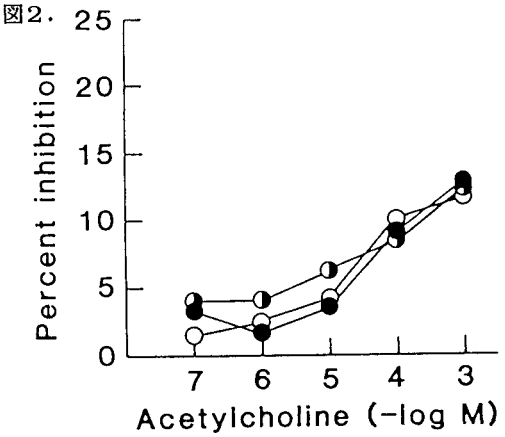
1. Bonner, T. I., Buckley, N. J., Young, A. C. & Brann, M. R. (1988) Science 237: 527-532.
2. Fukuda, K., Higashida, H., Kubo, T., Maeda, A., Akiba, I., Bujo, H., Mishina, M. & Numa, S. (1986) Nature 335: 355-358.
3. W-Wray, D., Norman, R. I. & Hess, P. A. (1989) Ann. N. Y. Acad. Sci. 560: 1-475.
4. Tsunoo, A. M., Yoshii, M. & Narahashi, T. (1986) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 83: 9832-9836.

図1.



[図1] ACh (1 mM x 3 μl) の細胞表面上への滴下によるCa^{2+}チャンネル電流抑制。NG108-15細胞を−80 mVに膜電位固定し、+100 mV, 1秒の矩形波パルスを10秒おきに与え、I_{Ca}を測定した。上段は電圧を、下段は電流を示す。1はACh投与前、2はACh投与5秒後、3は回復期のI_{Ca}を示している。ACh投与により、ピークI_{Ca}は23%の抑制を受けた。

図2.



[図2] AChによるピークI_{Ca}抑制の濃度依存性。異なる5種類の濃度 (10^{-7} − 10^{-3} M) のACh (3μl) を3 ～5分毎に滴下、投与5秒後にI_{Ca}を記録し投与前に対するピークI_{Ca}の減少率を算出した。各々の点は9～ 44個の細胞で調べた平均値を示している。●はNG108-15細胞を、◑・○はそれぞれNG108-15細胞にベクターのみを組み込んだコントロール細胞 (NGV101、NGV102) を示す。

16　ヒトTリンパ球（Jurkat細胞）のM1ムスカリン性受容体応答

金田利夫　，　野村靖幸
（北大・薬・薬効）

［要約］
Acethylcholine (ACh)のTリンパ球機能に対する作用の有無、作用機構を解明するため、ヒトT細胞株のJurkat細胞におけるoxotremorine-M(Oxo-M; M_1アゴニスト)の細胞内Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]i$)、イノシトールリン酸（IP）、ならびにcAMP濃度に対する効果を検討し次の結果を得た。1）Oxo-Mは$[Ca^{2+}]i$を一過性に上昇させた。2）pirenzepine (M_1アンタゴニスト)はAF-DX 116 (M_2アンタゴニスト)よりも強くOxo-Mの$[Ca^{2+}]i$上昇作用を抑制した。3）細胞外液にEGTAを添加してもOxo-Mの$[Ca^{2+}]i$上昇作用は認められた。4）コレラ毒素前処理は phytohemaggultinin (PHA) の$[Ca^{2+}]i$上昇作用を完全に抑制したが、Oxo-Mの作用にほとんど影響しなかった。5）Oxo-MはIP_3蓄積をひき起こした。6）ジギトニン処理により透過性にした細胞に Gpp(NH)p またはIP_3を作用させると$[Ca^{2+}]i$上昇が認められた。7）Oxo-MはcAMPレベルに影響を及ぼさなかった。以上の結果より、Jurkat細胞おそらくTリンパ球細胞には1）M_1-ACh受容体が存在すること、2）この受容体はコレラ毒素非感受性のG蛋白質に共役し、phospholipase C(PLC) を活性化、その結果産生されたIP_3が貯蔵Ca^{2+}を放出すること、3）さらにこのM_1-Ach受容体－PLC系は抗原受容体－PLC系とは独立していることが示唆された。

［緒言］
最近、神経系が免疫機能を修飾することを示す知見、すなわち胸腺、脾臓における迷走神経の存在[1]、リンパ球におけるムスカリン性受容体の存在が報告されている[2]。ムスカリン性受容体刺激はT細胞内cGMP蓄積を促進するとの報告[2]も考えると、神経由来の acethycholine (ACh) がムスカリン性受容体を介してリンパ球機能をコントロールすることが推定される。そこで我々はヒトT細胞株であるJurkat細胞を使用し、oxotremorine-M (Oxo-M; M_1アゴニスト）の細胞内情報伝達系への作用、とくに細胞内 Ca^{2+} 濃度（$[Ca^{2+}]i$)、inositol 1,4,5-trisphosphate （IP_3)、およびcAMP濃度への影響を検討し以下の新知見を得た。

［方法］
Jurkat細胞の培養
実験にはJurkat JP111株を用いた。培養は10％牛胎仔血清（FCS）を含むダルベッコ改変イスコフ培地（IMEM）を用い、250 mlフラスコにおいて37 ℃、10 %CO_2－90 %airの条件下で行った。約2－5x10^5 cell/mlの細胞密度とした後、FCSを除去し18時間培養した対数増殖期の細胞を実験に用いた。
イノシトールリン酸の測定
$[^3H]$ myo-inositol(4 μCi/ml)を加え48時間インキュベートすることによりラベルしたJurkat細胞を0.1％BSA、10mM LiClを含むTyrode-Hepes buffer (20 mM Hepes, 137 mM NaCl, 3.3 mM KH_2PO_4, 0.7 mM $MgCl_2$, 1.0 mM $CaCl_2$, 5.0 mM dextrose (pH 7.4)) に浮遊させた。37 ℃、10分間のプレインキュベーションの後、各種濃度のOxo-Mを加えさらに10分間反応させた。0.1 N 塩酸（最終濃度）を加え反応を止め、2,000xg、5分間遠沈後の上清をDowex 1－X8樹脂にてIP、IP_2、IP_3画分に分離し[3]、その放射活性を測定した。
$[Ca^{2+}]i$の測定
FCSを除いたIMEM中の細胞に3 μM Fura-2/AMを加え15分間インキュベートした。この細胞浮遊液を10倍容のfresh IMEMで希釈し、さらに37 ℃、30分間インキュベートした。150xg、3分間の遠沈により得られた細胞をTyrode-Hepes bufferで洗浄した後、同溶液にて石英セル中に再浮遊させ蛍光を測定した。$[Ca^{2+}]i$はGrynkiewickzらの励起光の比（340 nm/380 nm）による方法[4]より算出した。

［結果と考察］
図1に示すようにM_1ムスカリン性アゴニストであるOxo-Mの添加により一過性の $[Ca^{2+}]i$ の上昇が認められた。この作用はMcN-A 343（ムスカリン性部分アゴニスト)、oxotremorine (M_2アゴニスト）では弱く、一方 nicotine では全く認められなかった。Oxo-M の$[Ca^{2+}]i$上昇効果に対するpirenzepine (M_1アンタゴニスト)とAF-DX 116(M_2アンタゴニスト)の抑制効果を検討した。図2に示すようにAF-DX 116に比較してpirenzepineは、Oxo-Mの$[Ca^{2+}]i$上昇効果のEC_{50}値を約10倍増大さ

せた。これよりOxo-MはJurkat細胞上に発現するM$_1$ムスカリン性受容体を介して［Ｃａ$^{2+}$］ｉを上昇させると推定した。また外液に２ ｍＭ ＥＧＴＡを添加した場合にもOxo-Mの効果は認められたことから細胞内ストアから動員されたＣａ$^{2+}$が［Ｃａ$^{2+}$］ｉ上昇の原因であると推定した。

Jurkat細胞においては抗原受容体をモノクローナル抗体(mAb)やphytohemagglutinin (PHA) などのレクチンによりクロスリンキングさせるとイノシトールリン脂質（ＰＩ）代謝が促進され細胞内ストアからのＣａ$^{2+}$の動員にひき続いて、細胞内へのＣａ$^{2+}$の流入が起こることが知られている[5]。PHAの添加による［Ｃａ$^{2+}$］ｉ上昇作用は１５分間前後持続した。（Oxo-Mによる［Ｃａ$^{2+}$］ｉの上昇は約４分間でｂａｓａｌのレベルに戻った。）Jurkat細胞でのPHAのＰＩ代謝促進効果はコレラ毒素処理によって消失したことから、その抗原受容体はコレラ毒素感受性のＧ蛋白質を介してＰＬＣを活性化させると[5]考えられる。しかしながらコレラ毒素処理によってOxo-Mの作用は全く影響を受けなかった（図３）。また百日咳毒素、ボツリヌスＣ型毒素の前処理によってもOxo-Mの［Ｃａ$^{2+}$］ｉ上昇効果は有意な影響を受けなかった。一方Oxo-Mは濃度依存的にＩＰ$_3$生成を増加させた（図４）。１５ μＭジギトニン処理により透過性細胞を調製し、２００ μＭ ＩＰ$_3$を添加したところ［Ｃａ$^{2+}$］ｉが上昇し、さらに２００ μＭ Gpp(NH)pの添加によっても［Ｃａ$^{2+}$］ｉが上昇した。したがってOxo-Mはコレラ毒素非感受性のＧ蛋白質を介してＰＩ代謝を促進し、その結果［Ｃａ$^{2+}$］ｉの上昇がひき起こされると推定した。また4β-phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) 処理（10 nM, 18 hr）によって、Oxo-Mの［Ｃａ$^{2+}$］ｉ上昇作用は完全に消失したがPHAの作用は影響を受けなかった。以上の結果よりJurkat細胞上に発現するM$_1$受容体の少なくともＰＬＣ活性化に至るまでの経路は抗原受容体と全く独立していることが示唆された。このＴリンパ球のM$_1$受容体の生理的意義について検討中である。

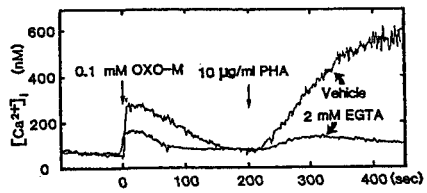


図１　Oxo-MとPHAの［Ｃａ$^{2+}$］ｉの上昇作用と外液へのＥＧＴＡ添加効果

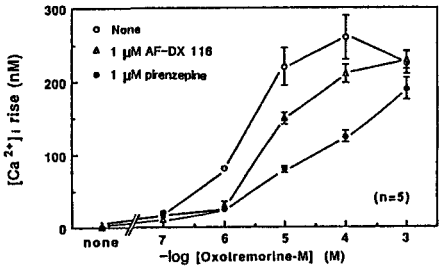


図２　Oxo-Mの［Ｃａ$^{2+}$］ｉ上昇効果に対するアンタゴニストの抑制効果

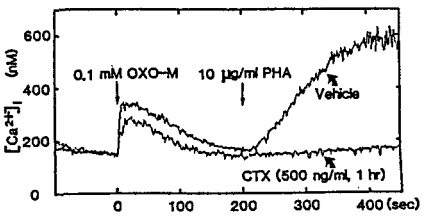


図３　OXo-MとPHAの［Ｃａ$^{2+}$］ｉに対するコレラ毒素前処理の影響

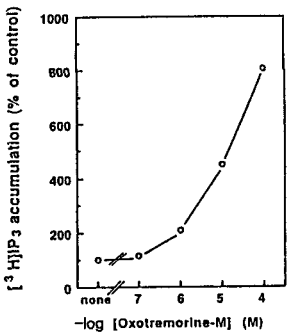


図４　Oxo-MによるＩＰ$_3$生成の濃度反応曲線

［文献］

（１）Bulloch,K.:Neuroanatomy of lymphoid tissue ed. by R.Guillem in et al. :Neural Modulation of Immunity, 111-141, Raven Press, New York, (1985).

（２）Strom,T.B., Lane,M.A. and George,R. :J.Immunol. 127, 705-710 (1981).

（３）Berrige,M.J., Downes,P.C. and Hanley,M.R. :Biochem. J. 206, 587-595 (1982).

（４）Grynkiewicz,G., Poenie,M. and Tsien,R.Y. :J. Biol. Chem. 260, 3440-3450 (1986).

（５）Imboden,J.B., Shoback,D.M., Pattison,G. and Stobo,J.D. :Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5673-5677 (1986).

17　中枢コレシストキニン受容体の細胞内応答について

鬼頭昭三，三好理絵*，野本照子*
（放送大学，東京女子医科大学薬理学教室*）

〔要約〕

コレシストキニン（ＣＣＫ）は中枢神経系で神経伝達物質あるいは神経修飾物質として作用すると考えられている。ＣＣＫ受容体の細胞内応答については、膵臓など末梢組織ではイノシトールリン脂質代謝（PI turnover)に連関することが確認されている（１）が、中枢神経系での反応は未だ明らかにされていない。そこで我々はラット線条体においてＣＣＫ－８とそのアナログであるセルレインのPI turnover-Ca^{2+}シグナリング系に及ぼす影響を検討した。これらのペプチドはPI turnoverを変化させなかった。しかし、fura-2蛍光法による細胞内カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]i$)測定の結果、ＣＣＫは一相性の$[Ca^{2+}]i$上昇を引き起こすことが認められた。この作用は濃度依存性であり、細胞外液をCa^{2+}-freeにすることにより完全に抑制された。また、Ｎ型Ca^{2+}チャンネル拮抗薬であるω-conotoxinはＣＣＫの応答を完全に阻害した。以上の結果から、中枢ＣＣＫ受容体は末梢のそれとは異なり、PI turnoverを介さずにＮ型Ca^{2+}チャンネルを通して$[Ca^{2+}]i$上昇をもたらすものと考えられる。

［目的］

ＣＣＫは脳腸管ペプチドに含まれており、中枢神経系においては食欲制御、抗痙攣、鎮痛などの神経機能に関与している。また、ＣＣＫは黒質－線条体系や中脳－辺縁系のドパミン神経系と密接な関連を持ち、臨床的には各種の不随意運動の治療薬として開発されている。中枢神経系でのＣＣＫの主な型はＣＣＫ－８であり（２）、上記の中枢作用はＣＣＫ－８受容体を介しているものと推定されている。中枢神経系内でＣＣＫ－８受容体の存在は確認されており、膵臓の受容体とは薬理学的及び生化学的性質を異にしている（５，６）。ＣＣＫ受容体活性化後の細胞内応答については、膵臓の受容体はPI turnoverを亢進させることが確認されている（１）が、中枢神経系ではアデニル酸シクラーゼ系やPI turnoverなどの二次情報伝達系に連関するといった明確な証明はなされていない。今回、我々はＣＣＫ－８とそのアナログでＣＣＫ－８そのものよりはやや安定なセルレインのPI turnover-Ca^{2+}シグナリング系に及ぼす影響をラット線条体を用いて検討した。

［方法］

Wistar系オスラット（体重180-200 g）の線条体スライスを用いてPI turnoverを測定した。

$[Ca^{2+}]i$の測定には線条体培養神経細胞を用いた。胎生１６日齢のラットから線条体を取り出しdissociated cell cultureを行なった。培養には、５％牛血清、５％馬血清、１mMピルビン酸、５０ＩＵ／ｍｌペニシリンを含むＤＭＥＭ培地を用い、10% CO_2, 90% airのもとで１４－１６日間維持した。培養３日目に線維芽細胞やグリア細胞の増殖を抑えるためにシトシンアラビノシドで処理した。$[Ca^{2+}]i$は単一細胞レベルでfura-2蛍光法により測定した。測定中、細胞の灌流液にはbalanced salt solutionを用い、Ca^{2+}の自発的な流入を抑えるため1μM テトロドトキシンを加えた。ペプチドなどの試薬はすべて灌流投与とした。

［成績］

PI turnover測定の結果、ＣＣＫ－８及びセルレイン共に、濃度、作用時間にかかわらずこの代謝を変化させなかった。一方、図１に示すように、これらのペプチドは一相性の$[Ca^{2+}]i$上昇を引き起こした。神経細胞のbasalの$[Ca^{2+}]i$は50-100 nM であり、10^{-5} Mセルレインを３０秒間灌流投与することにより、ピーク値が約320 nMの$[Ca^{2+}]i$上昇が見られた。ＣＣＫ－８の反応はセルレインより弱かった。セルレイン刺激に反応した細胞は全神経細胞数の約２０％であり、残りの細胞は反応しなかった。セルレインの作用は濃度依存性であった。次に、セルレインによる$[Ca^{2+}]i$上昇の性質を調べた。図２はCa^{2+}供給源に関する実験結果であるが、セルレインの効果は細胞外液をCa^{2+}-freeにすることにより完全に抑制された。また、セルレインの作用はω-conotoxin で細胞を前処理することに

より完全に阻害された。しかし、ジヒドロピリジン系のCa^{2+}拮抗剤であるニフェジピンやベラパミールは作用を及ぼさなかった。

［考察］

膵臓と中枢神経系のＣＣＫ受容体は、ＣＣＫアナログに対する反応性や生化学的性質が異なり（５，６）、両方の受容体は異なった様式でグアニンヌクレオチドにより調節されることが報告されている（３）。殊に、中枢神経系のＣＣＫ受容体は百日咳毒素にもコレラ毒素にも非感受性であり、新しいタイプのＧＴＰ結合蛋白質への連関が示唆されている（７）。しかしながら、中枢ＣＣＫ受容体の細胞内情報伝達系の次のステップは明らかでない。ＣＣＫペプチドのアデニル酸シクラーゼ系への作用はいくつか報告されているが、亢進させる場合もあり変化させない場合もあり、現在のところＣＣＫ受容体は直接にはアデニル酸シクラーゼに連関しないとみなされている（４）。我々の今回の実験から、ラット線条体においてＣＣＫは PI turnoverを介さずに $[Ca^{2+}]i$上昇をもたらすことが明らかとなった。細胞外液をCa^{2+}-freeにすることによりセルレインの作用が抑制されたことから、Ca^{2+}は細胞外から供給されると考えられた。また、Ca^{2+}チャンネル拮抗剤を用いた結果からＣＣＫ受容体はＮ型Ca^{2+}チャンネルに連関すると思われる。

中枢神経系において $[Ca^{2+}]i$上昇がＣＣＫ受容体活性化後の重要な反応であり、このペプチドの種々の生理作用発現に寄与していると示唆される。

［文献］

1. Dixon, J.F., and Hokin, L.E. (1984) J. Biol. Chem. 259, 14418-14425
2. Dockray, G.J., Gregory, R.A., and Hutchison, J.B. (1978) Nature 274, 711-713
3. Innis, R.B., and Snyder, S.H. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 6917-6921
4. Morency, M.A., Ross, G.M., Kajiura, J.S., and Mishra, R.K. (1988) Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat. 12, 331-336
5. Sakamoto, C., Williams, J.A., and Goldfine, I.D. (1984) Biochem. Biophy. Res. Commun. 124, 497-502
6. Van Dijk, A., Richards, J.G., Trzeciak, A., Gillessen, D., and Mohler, H. (1984) J. Neurosci. 4, 1021-1033
7. Wennogle, L., Wysowskyj, H., Steel, D.J., and Petrack, B. (1988) J. Neurochem. 50, 954-959

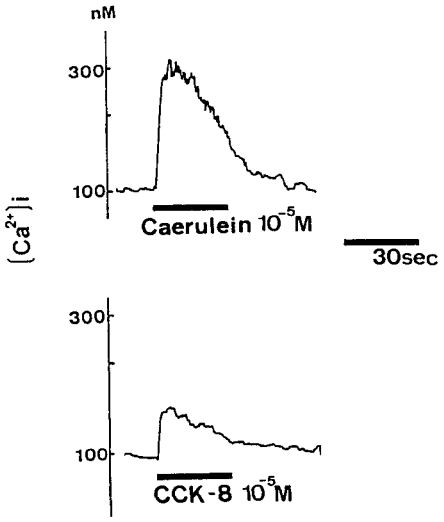


図１　同一の線条体培養神経細胞における
ＣＣＫ－８とセルレインの $[Ca^{2+}]i$に与える影響

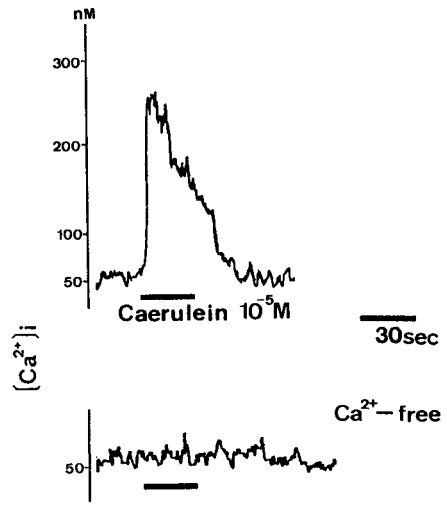


図２　セルレインの $[Ca^{2+}]i$上昇におけるCa^{2+}供給源の決定。
同一神経細胞において上段はnormal buffer、下段は
Ca^{2+}-freeの溶液で灌流した際の結果である。

18 *In vivo* brain dialysis 法による細胞内情報変換機構の研究

大津　洋[1]、山本　敏文[2]、加藤　武[2]
([1]東工大・総合理工・生命化学、[2]横浜市大・総合理・分子認識)

〔要約〕

神経伝達物質放出の調節に関わる細胞内情報変換システムを知る目的で *in vivo* brain dialysis 法を用いて、線条体内の、アセチルコリン受容体を介するドーパミン放出について検討した。ニコチン性、ムスカリン性作用薬はドーパミン放出を促進し、ムスカリン性作用薬の効果は百日咳毒素（IAP）の前処理により抑制された。これよりアセチルコリンのムスカリン受容体がGoを介してドーパミン放出を促進することが示唆された。さらに、ニコチン性、ムスカリン性作用薬によるドーパミン放出の促進作用はカルシウムチャンネル阻害剤（verapamil）の前処理により抑制された。以上の結果は、線条体内のニコチン性、ムスカリン性受容体はドーパミン放出を促進し、この放出はカルシウムイオンチャンネルを介した機構で行なわれていることが強く示唆された。そして、この方法は従来の *In vitro* の方法と同様に、脳内の細胞内情報変換機構の研究に有用であることを明らかにした。

私共は、*in vivo* brain dialysis 法を用いて線条体内のドーパミン、アセチルコリン放出を測定し、神経細胞間の線維連絡について研究してきた（1、5）。この方法は slice やシナプトソームを用いた *in vitro* の実験系と同様に、細胞内の情報変換機構の解明に役立てばより生理的条件下における機構を知ることができ、大変有用と思われる。

そこで今回は、アセチルコリン受容体の作用薬によるドーパミン放出がどのような細胞内情報変換を介して行なわれているかを検討した。

方法：Wistar系雄性ラット（200-300g）をネンブタール麻酔（40 mg / kg, i.p.）し、ステレオに固定してU字型透析用カニューレを右側の線条体（A : 0.0 mm, L: 2.8 mm from bregma ; V: 6.0 mm from dura）に挿入し、デンタルセメントで固定した。手術2日後にRinger液（147 mM Na^+、2.3 mM Ca^{2+}、4 mM K^+、155.6 mM Cl^-）を4 µl / minで灌流し、15分間隔で透析液を氷中に集め、その50 µlをHPLC-ECDに注入し、ドーパミン、DOPAC、HVAを定量した（5）。IAP（2 µg / µl）は透析用カニューレの挿入1時間前に線条体へ投与した。薬物はすべて、Ringer液に溶解して用いた。

結果：ムスカリン性受容体の作用薬Oxotremorine（10^{-4}M）、McN-A-343（10^{-7}M）を灌流液を介して線条体内に作用させると、ドーパミン放出がそれぞれ33%、20%増加した（図1）。DOPACとHVAのレベルはOxotremorineによって増加したが、McN-A-343では変化しなかった。前もってIAPを線条体に投与した動物では、McN-A-343によるドーパミン放出の増加は見られなかった（図1）。

ニコチン性作用薬lobeline（10^{-4}M）はドーパミン放出を一過性に230%まで増加させ、その後、コントロールレベルまで下げた（図2）。DOPAC、HVAはあまり変化しなかった。

次にカルシウムチャンネルの阻害剤verapamilを3 x 10^{-4}Mの濃度で作用させると、ドーパミン放出は、徐々に減少して50%前後まで抑制された。DOPACは、やや増加の傾向にあったが（図3）、HVAのレベルは何ら変化を受けなかった。3 x 10^{-4}M verapamilを作用させた後、10^{-4}M Oxotremorineと10^{-4}M lobelineを1時間後に加えても、ドーパミン放出は回復しなかった（図3）。DOPAC、HVAも同様に変化しなかった。

考察：これまで *in vivo* brain dialysis 法で測定した伝達物質放出がvoltage-dependentであることを示すために、テトロドトキシンを用いたり（2、5）、Ca^{2+}-dependentであることを示すためにEDTAなどを用いた研究報告はある。またWestrinkらはこの方

法を用いて、チロシン水酸化酵素の活性測定（4）、voltage-dependent, -independent な薬物（2）、細胞外カルシウムの影響（3）についての検討も行なっている。しかし、細胞内情報変換機構の研究をこの方法で行なったグループはほとんどない。

今回私共はアセチルコリンのムスカリン受容体が Go を介してドーパミン放出を促進していることを示した。また、ムスカリン受容体の活性化がプロテインキナーゼ C の阻害剤ポリミキシン B 処理によって抑制されることから（6）、ムスカリン受容体の M_1 はプロテインキナーゼ C を活性化し、ドーパミン放出を促進させることが明かとなった。

ニコチン性作用薬 lobeline とムスカリン性作用薬 Oxotremorine によってドーパミン放出は促進されるが、Ca^{2+}チャンネル阻害剤 verapamil を前処理すると、それらの促進効果が阻害されることから、lobeline も Oxotremorine も Ca^{2+} チャンネルに依存したドーパミン放出であると推察される。しかしながら、Westrink らは haroperidol + GBR12909 によるドーパミン放出は verapamil 前処理によっては阻害されないことを報告している（3）。従ってこの他に、ドーパミン放出で Ca^{2+} チャンネルを介さないあるいは verapamil-insensitive な経路が存在するか否かを現在検討中である。尚、本研究は徐曼との共同研究によるものである。

1）Ajima,A. et al., Brain Res. (in press)

2）Westrink,B.H.C. et al., Arch. Pharmacol. 336, 502-507 (1987)

3）Westrink,B.H.C. et al., Arch. Pharmacol. 337, 373-378 (1988)

4）Westrink,B.H.C. et al., J. Neurochem. 54, 381-387 (1990)

5）Xu,M. et al., Brain Res. 495, 232-242 (1989)

6）Xu,M. et al., J. Neurochem. 54, 1917-1919 (1990)

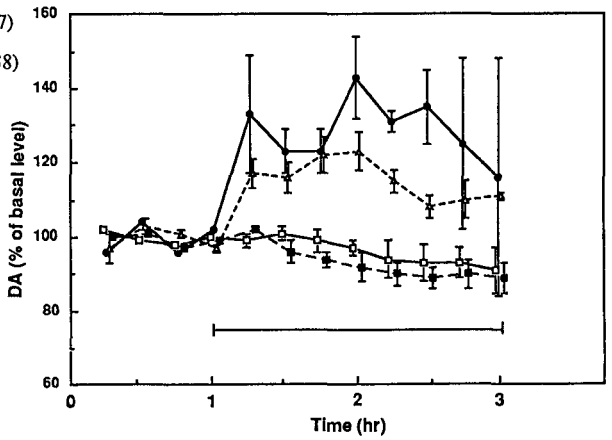


図1．ムスカリン性作用薬による DA 放出

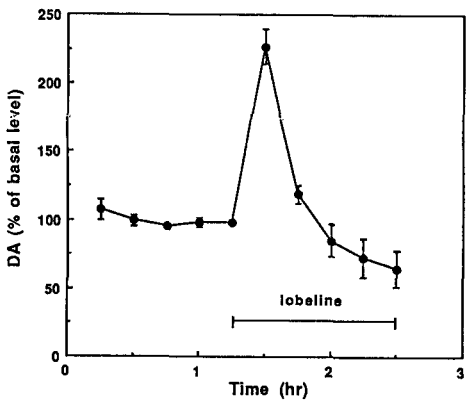


図2．ニコチン性作用薬による DA 放出

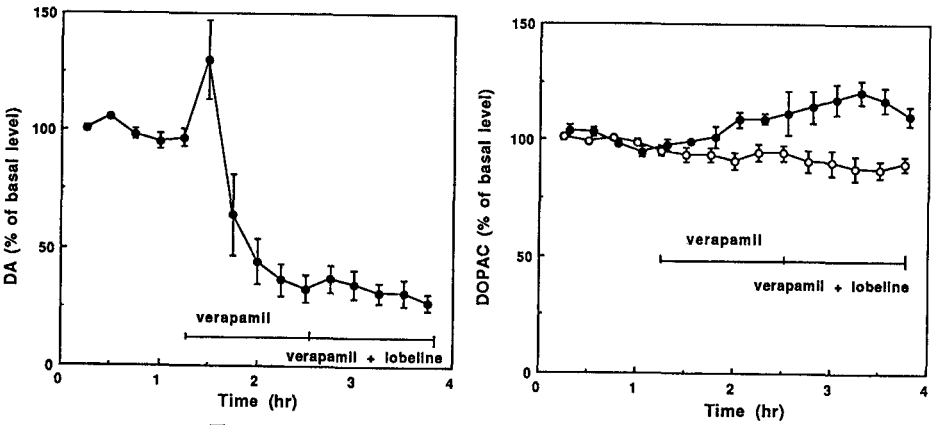


図3．verapamil 前処理によるニコチン性作用薬の DA 放出の抑制

verapamil ($3x10^{-4}$M) + lobeline (10^{-4}M), n=3

control, n=5

19 GABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNAの発現

廣内雅明、大熊誠太郎、馬 福海、栗山欣弥
（京都府立医大・薬理）

〔要約〕

GABA$_A$受容体の構造と機能を明らかにする目的で分子クローニングを試み、ヒト脳GABA$_A$受容体α_1サブユニットのcDNAをクローニングした。脳組織中での発現をノーザンブロットハイブリダイゼーション法により検討したところ、ヒト及びウシでは単一のmRNAの存在を示した。一方、マウス及びラットでは2種類のmRNAの存在が明かとなった。マウス大脳皮質の場合、胎児及び新生児の様な発達過程では、成熟マウスのものよりこれらの発現量は少なかった。またマウス大脳皮質の初代培養神経細胞においても2種類のmRNAの存在が確認され、両者は培養日数の経過とともに急速なmRNA発現量の増加を示した。従ってGABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNAは、脳の発達にともないその発現量が急速に増加するものと考えられる。

GABA$_A$受容体はサブユニット構造をとる巨大蛋白分子であり、そのサブユニットが集合してCl^-チャネルを形成すると考えられている。我々はGABA$_A$受容体の構造と機能を解明する目的で、分子クローニングを行って来た。最近、GABA$_A$受容体には数種のサブユニットとその分子多様性の存在が明かとなっているが、我々はヒトGABA$_A$受容体α_1サブユニットのcDNAをクローニングした[1]。今回、このcDNAを用いて脳組織中におけるGABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNAの発現について検討した。

［方法］

脳組織あるいは細胞中のmRNAの調製は、その可溶化分画をSDSとプロテアーゼで処理した後、オリゴdTセルロースカラムを用いて行い、poly(A)$^+$RNAを得た。GABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNAの解析は、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて行った。プローブにはヒトGABA$_A$受容体α_1サブユニットcDNAの幾つかのフラグメントを、ランダムプライマー法でラベルしたものを用いた。

神経細胞の単離及び初代培養は、胎齢15日目のマウス胎児の新皮質を用いて行った[2]。

［結果・考察］

ヒトGABA$_A$受容体α_1サブユニットcDNAを用いて脳組織中での発現を調べたところ、ヒトとウシの大脳皮質及び小脳においては単一のmRNAの発現を認めた。そのサイズはヒトで約4.5Kb、ウシで約4.8Kbであった(Fig.1)。一方、ラットとマウス全脳を用いて調べたところ、両者は上記のものと類似のサイズの2種類のmRNAの存在を示した(Fig.2)。GABA$_A$受容体α_1サブユニットのcDNAクローニングはヒト[1]、ウシ[3]及びラット[4]で行われており、これらの配列を比較するといずれも高いホモロジーを示すことが明かとなっている。またαサブユニットには分子多様性が存在し、それぞれのmRNAは異なるサイズを有することが知られている[5]。しかしながらヒトのcDNAをプローブに用いた場合、いずれも同様のサイズを認識し、他のαサブユニットとは異なるサイズを示しているので、このハイブリダイゼーションの条件下では、他のものとのクロスハイブリダイズはないものと考えられる。従って、今回の各種の脳を用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果は、GABA$_A$受容体α_1サブユニットのmRNAを認識しているものと考えられる。

マウスの胎児及び新生児の大脳皮質を用いて発達過程における変化についても検討したところ、mRNAの発現は成熟マ

ウスのものと比べて弱いものであり、この時期における著明な発現量の変化は認められなかった。さらにマウス大脳皮質を用いた初代培養神経細胞中にもGABA$_A$受容体α_1サブユニットのmRNAが発現し、培養４日目から14日目にかけて培養日数の増加とともに著明な発現量の増加が認められた(Fig.3)。特に培養14日目では、成熟マウス脳に相当する発現を示していた。これらの結果より、GABA$_A$受容体α_1サブユニットのmRNAは、マウス脳の幼若期からの発達にともない増加するものと考えられる。また、成熟マウスで認められた２種類のmRNAの存在は、胎児及び新生児、あるいは初代培養神経細胞の培養初期の段階から認められた。これらの結果はハイブリダイゼーションを行うときに、5'noncoding領域, coding領域, 3'noncoding領域などのcDNAをプローブに用いた場合でも同様であった。以上の結果より、マウスやラット脳において２種類のmRNAが発現するのは、GABA$_A$受容体α_1サブユニットの遺伝子がmRNAに転写される場合、その転写開始点が２ヶ所存在する、あるいはpoly(A)$^+$付加部位が２ヶ所存在するためによるものと推定され、ヒトやウシとは遺伝子レベルで異なる調節機構を有していると考えられる。

［文献］

1. Hirouchi,M. et al. (1989) Neurochem.Int. 15, 33-38
2. Ohkuma,S.et al. (1986) Int.J.Dev.Neurosci. 4, 383-395
3. Schofield,P.R. et al. (1987) Nature 328, 221-227
4. Lolait,E.S. et al. (1989) FEBS Lett. 246, 145-148
5. Levitan,E.S. et al. (1988) Nature 335, 76-79

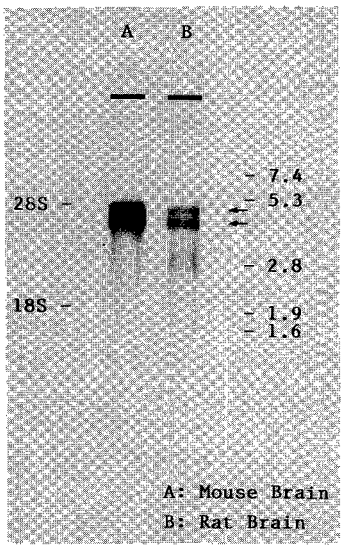


Fig.2 Northern Blot Analysis of Poly(A)$^+$RNA from Mouse and Rat Brains

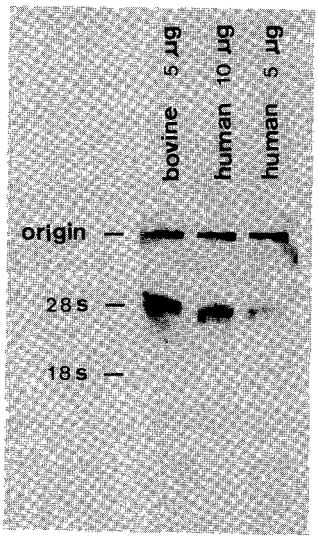


Fig.1 Northern Blot Analysis of Poly(A)$^+$RNA from Human and Bovine Cerebella

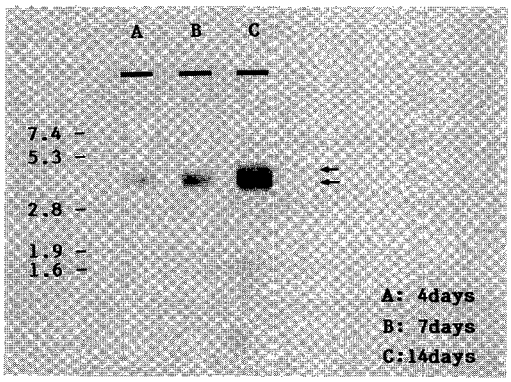


Fig.3 Northern Blot Analysis of Poly(A)$^+$RNA from Mouse Cerebral Cortical Neurons in Primary Culture

20 アクロメリン酸とカイニン酸投与後のマウス脳内 c－f o s　mRNA発現の検討

中島孝、*石田美知子、*後藤泰徳、宮武正、*篠崎温彦
（新潟大・脳研・神内、*東京都臨床研・薬理）

〔要約〕

ドクササコより抽質された興奮性アミノ酸であるアクロメリン酸の脳内作用点をc-fos mRNA 発現の脳内分布により検討した。アクロメリン酸の投与後c-fos mRNAの脳内分布は歯状回顆粒細胞に限局しておりカイニン酸投与後の脳内c-fos mRNAの分布と異なっていた。行動レベル、病理レベルの以前の報告にくわえ、この事実はアクロメリン酸は構造的にカイノイドに分類され薬理学的にNMDA受容体サブタイプ以外の受容体に作用すると考えられているものの、アクロメリン酸とカイニン酸の脳内作用部位は異なり、おそらく受容体レベルでの作用点が異なっていることを示唆した。

（はじめに）

アクロメリン酸は毒キノコのドクササコより抽質された興奮性アミノ酸である。アクロメリン酸はその分子内にカイニン酸と共通の炭素骨格を持ち、カイノイドに分類されている(1)。アクロメリン酸はCNQXやDNQXにより脱分極は抑制されるがNMDAの選択的遮断薬によっては影響を受けないので、カイニン酸と同様NMDAタイプ以外の受容体サブタイプに結合すると考えられている。行動レベル、形態レベルではカイニン酸は全身投与すると特徴的な辺縁系てんかんを起こし海馬の錐体細胞、皮質の神経細胞の脱落を呈するが、一方アクロメリン酸では後肢のみの強直性伸展を呈し、生き延びたものは強直性対麻痺を示し、下部脊髄灰白質の小型神経細胞の脱落をきたす。このようにアクロメリン酸はカイノイドではあるが中枢神経系に対する作用がカイニン酸と異なっていることが明らかにされている(1)。
細胞性癌遺伝子c-fosは転写制御因子であり、c-AMP, Ca-influx,c-kinaseの活性化などのいわゆる細胞内ｼｸﾞﾅﾙﾄﾗﾝｽﾀﾞｸｼｮﾝ系の活動に対応して発現することが知られている(2,3)。
今回の研究では、c-fos mRNAを細胞内ｼｸﾞﾅﾙﾄﾗﾝｽﾀﾞｸｼｮﾝ系の活動のマーカーとして利用し、アクロメリン酸投与後のc-fos mRNAの発現の脳内分布をin situ ハイブリダイゼーションを用いカイニン酸投与後と比較した。

（方法）

アクロメリン酸6mg/kgまたは生食を皮下注射によりマウス（ICR,male,20-25g）（各々n=3)に投与した。アクロメリン酸投与群は特徴的な後肢の伸展がみられたのを確認した後、投与後48分から62分の間に断頭し全脳をすばやく-45°Cｲｿﾍﾟﾝﾃﾝにて凍結し-80°Cにて保存した。カイニン酸60mg/kgまたは生食を同様に投与し（各々n=3)カイニン酸投与群はpraying postureを確認した後(投与後80分）断頭し同様に処理した。各々の生食投与群も同時に作成した。Cryostatにより15umのcoronary cut sectionを作成した。Multirandam primer methodを使いマウスc-fos DNA probe (Hind III,BamHI fragment, Lofstrand Lab. Ltd., U.S.A)を35SdCTPでラベルした。in situ hybridizationはHarper and Marsell等の方法を一部変更して行った(2)。slideは4%paraformaldehyde/1xPBSで4分固定後70%ethanol中で4°Cで保存した。2xSSCで洗浄後、0.1M triethanolamine hydrochloride 及び0.25%acetic anhydride中にて10分間処理し、その後0.1Mglycine及び0.1MTris-HCL中にて30分処理した。ハイブリダイゼーションはlabelled probe 0.1 ng/ul,5x10⁴dpm/ul,50%formamide,10%dextransulfate,3xSSC,1mg/ml sheared salmon sperm DNA、2mg/ml bovine serum albumin, 1mg/ml yeastRNA及び10mMDTT中で42°C12時間行った。そののち2XSSC 及び50%formamide中にて42°Cで10分4回洗浄した。脱水乾燥後、kodak Xomat filmに48時間感光した後現像した。

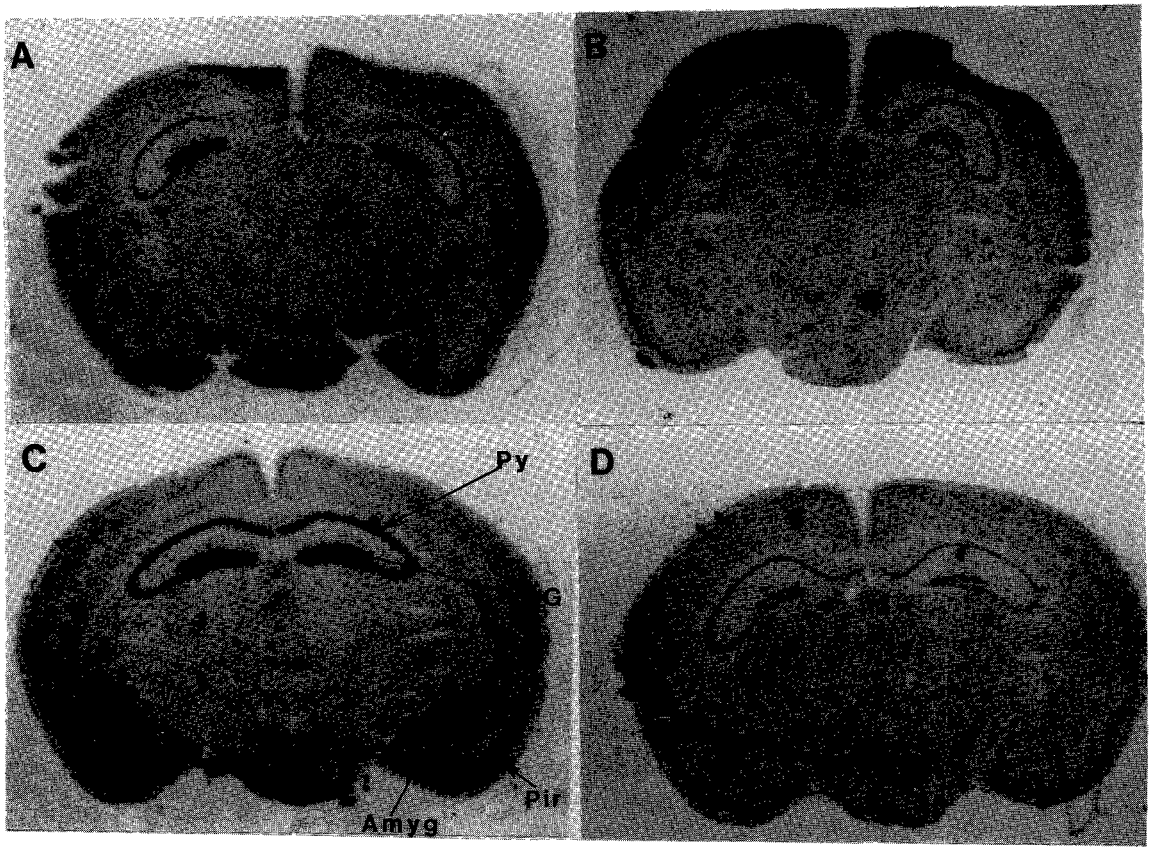
（結果）

アクロメリン酸投与によりc-fos mRNAは生食を投与したコントロールと比較し有意に脳内に発現した。その脳内分布は海馬の顆粒細胞層にのみ限局していた（図1A,B)。またカイニン酸投与によりc-fos mRNAは生食を投与したコントロールと比較し有意に脳内に発現した。その脳内分布は歯状回顆粒細胞層のみならずCA1を中心とする錐体細胞層に強く発現していた。そのほかには扁桃体、梨状皮質、嗅内野などにもコントロールに比して有意に発現していた（図1C,D)。アクロメリン酸投与後の脳内c-fos mRNA分布はカイニン酸投与後の分布と明らかに異なっていた(図1A,C)。

（考察）

アクロメリン酸投与では脳にはほとんど変化を認めず下位脊髄の小型神経細胞の変性を認めるがカイニン酸投与では大脳皮質や海馬のCA1領域の神経変性を示すことを著者らは以前報告した(1)。今回の研究では、通常脳内では極

僅かにしか発現されておらず、各種のセカンドメッセンジャーの刺激により細胞レベルで一過性に発現するc-fos mRNAを神経細胞内ｼｸﾞﾅﾙﾄﾗﾝｽﾀﾞｸｼｮﾝ系の活動の指標と考え(2),両者の薬剤の作用発現部位を比較した。アクロメリン酸は非NMDA型のアゴニストであり構造からカイノイドに分類されているがc-fos mRNAの脳内発現分布がカイニン酸と異なっており作用する受容体レベルでの相違を示唆した。



(図1)
アクロメリン酸及びカイニン酸投与後のc-fos mRNA in situ hybridization (マウス脳冠状断)
A:アクロメリン酸6mg/kg投与後. B:Aのコントロール (生食投与) .C:カイニン酸60mg/kg投与後. D:Cのコントロール (生食投与)
略語 :DG;歯状回顆粒細胞 Py;海馬錐体細胞 Amyg;扁桃体 Pir;梨状皮質

(文献)
1)Shinozaki H., Ishida M., Gotoh Y., and Kwak S. (1989) Brain Res. 503,330-333
2)Nakajima T., Daval,J-L., Morgan T., Post R.M. and Marangos P.J. (1989) Brain Res.501,307-311
3)中島孝 医学のあゆみ(1989) Vol.151,321-324

21 カイニン酸誘発けいれん時におけるラット脳でのインターロイキン1β mRNAの発現

南 雅文、 倉石 泰、 佐藤 公道
（京都大・薬・薬理）

〔要約〕

けいれん誘発作用を有するカイニン酸の投与によってラット脳内にインターロイキン1β(IL-1β)の mRNA の発現が誘導された。カイニン酸腹腔内投与 1時間後では海馬でのみ mRNA の発現が見られた。投与 2.5時間後では、mRNAは、大脳皮質、視床、視床下部で強く発現しており、海馬、線条体では比較的弱かった。中脳、延髄、小脳では、IL-1β の mRNA の発現は検出されなかった。抗けいれん作用をもつジアゼパムの前処置は、けいれんの発生および IL-1β の mRNA の発現ともに抑制した。この結果は神経の興奮によって、中枢神経系のニューロンないしはグリアで IL-1β の mRNA が発現することを示唆している。さらに、糖質コルチコイドの合成アナログであるデキサメタゾンは、けいれんの発生に影響を与えることなく、IL-1β の mRNA の発現を抑制した。

［目的］インターロイキン1 (IL-1) は、末梢における免疫反応や炎症反応に関与するだけでなく、中枢神経系のニューロンやグリアにも存在しホルモンの分泌、睡眠、食欲、痛覚などの制御に関与している可能性が示唆されている。中枢神経系では、IL-1 は LPS(4)や物理的な損傷(2)、 あるいは、インターフェロン(1) などの他のサイトカインの投与によって発現することが報告されている。しかし、神経の活動の亢進によって IL-1 の生合成が変化するかどうかについてはまだ報告がない。今回、我々は、神経の強い興奮が中枢神経系におけるIL-1β の生合成にどのような影響を及ぼすかを調べる目的でラットにけいれん誘発作用のあるカイニン酸を投与し、脳の様々な部位における IL-1β mRNA の発現の程度を調べた。さらに、末梢あるいは in vitro の系において IL-1β mRNAの発現を抑制することが報告されている糖質コルチコイドの合成アナログであるデキサメタゾンの効果も検討した。

［方法］実験には、雄性SD系ラット (6-7 週齢) を用いた。カイニン酸 (10 mg/kg) を腹腔内に注射し、種々の時間の後、脳を取り出し部位分けした。デキサメタゾン (0.3-3 mg/kg i.p.) とジアゼパム(10 mg/kg i.p.) は各々、カイニン酸投与 10 分前あるいは 5分前に腹腔内注射した。各々の部位は 2-3 匹分プールした。total RNA は MacDonald ら(3) の方法にしたがって抽出し、1 レーンあたり 20または30μgの total RNAを用いて northern blot分析を行った。プローブは、ラット IL-1β cDNA Eco RIフラグメント(4)を用い、ランダムプライマー法にて標識した。一部の実験では、cDNAを pGEM にサブクローンし、^{32}P標識した cRNAを作成してプローブとして用いた。

［結果］無処置ラットの脳の各部位から抽出したtotal RNA 20μg を用いて northern blotを行ったところすべての部位において IL-1β の mRNA は検出されなかった。カイニン酸の投与により、投与の約 1時間後から "wet dog shake" 行動が観察され始め、さらにその 1-1.5時間後にはカイニン酸に特有のけいれんが始まった。そこでカイニン酸投与 2.5時間後に脳を取り出し各部位から抽出したtotal RNA 20μg を用いて northern blotを行った。IL-1β の mRNA は、大脳皮質、視床、視床下部で強く発現し、海馬や線条体でも弱いながら発現が見られた。中脳、延髄、小脳では、 IL-1β mRNA は検出されなかった (Fig.1)。抗けいれん作用を有するジアゼパムの前処置によってけいれんおよび、mRNAの発現ともに抑制された(Fig.2)。 大脳皮質、海馬、視床、視床下部の 4部位について、発現の時間経過を調べたところ、カイニン酸投与の 1時間後では IL-1β の mRNA は海馬でのみ検出されたが、1.5 時間後では 4つの部位すべてで検出された。投与72時間後にはすべての部位で mRNA は検出されなかった。 mRNA の発現のピークは部位により違っており、大脳皮質では 1.5時間後、視床では 2.5 時間後、視床下部では 3.5時間後であった。海馬での発現の程度は他 3つの部位に比べると弱かったが、最も早くから発現が見られ、同程度の発現が長時間続いた。カイニン酸による IL-1β mRNA

Fig. 1

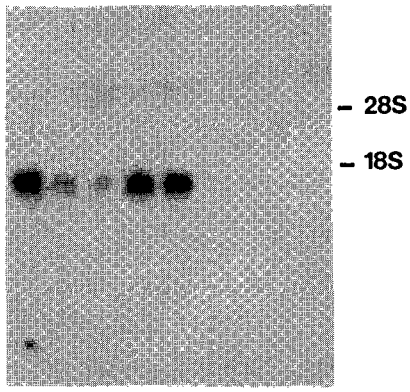


Fig. 2

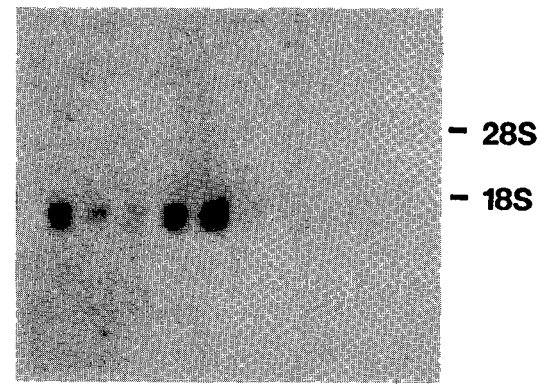


Fig. 1 IL-1ß mRNA expression in the brain 2.5 h after an injection of kainic acid (10 mg/kg, i.p.). Total RNA (20 μg) was blotted on each lane, and hybridized to ^{32}P-labeled cDNA probe. Lane 1: cerebral cortex; lane 2: hippocampus; lane 3: striatum; lane 4: thalamus; lane 5: hypothalamus; lane 6: midbrain; lane 7: pons-medulla; lane 8: cerebellum.

Fig. 2 Effect of diazepam on the induction of IL-1ß mRNA by kainic acid. Total RNA (20 μg) was blotted on each lane, and hybridized to ^{32}P-labeled cDNA probe. Lanes 1-5: kainic acid (10 mg/kg, i.p. for 2.5 h) alone; lanes 6-10: diazepam (10 mg/kg, i.p.) 5 min before the injection of kainic acid (10 mg/kg); lanes 1 and 6: cerebral cortex; lanes 2 and 7: hippocampus; lanes 3 and 8: striatum; lanes 4 and 9: thalamus; lanes 5 and 10: hypothalamus.

の誘導に対するデキサメタゾンの効果を大脳皮質、海馬、視床下部で調べたところ 1mg/kg (i.p.)の用量で IL-1β の mRNAの発現を抑制することがわかった。このときデキサメタゾンはけいれんの発生は抑制せず、また、けいれんによって誘導される c-fos mRNA の発現も抑制しなかった。

[考察] 以上の結果は、けいれんなどの強い神経興奮によって脳内で IL-1β mRNAの発現が誘導されることを示唆している。各部位間における mRNA の発現の程度の違い、あるいは、発現の時間経過の違いなどから考えて、これらの mRNA の発現は、血球に由来するものではなく、ニューロンないしグリアで起こっているものと考えられる。

デキサメタゾンは、けいれんの発生およびそれに伴う c-fos mRNA の発現には影響を及ぼすことなく、IL-1β mRNA の発現のみを抑制した。グルココルチコイドはカイニン酸、抗代謝剤、虚血などによる神経の変性を増悪させること(5) が報告されているが、今回観察された IL-1β mRNAの発現の抑制は、神経の変性に対する増悪作用に関与しているのかもしれない。けいれん時に誘導されるIL-1βが、NGF などの神経成長因子の産生の誘導を介し、異常な神経興奮によるダメージからの回復に関っている可能性が考えられる。

[謝辞] IL-1β cDNA を御供与下さった大塚製薬株式会社細胞工学研究所の平井嘉勝所長と中井哲主任研究員に深謝いたします。

[文献]

(1) Dopp,J.M.,and Olschowka,J.A.(1989) Soc.Neurosci.Abst. 15,715.

(2) Giulian,D.,and Lachman,L.B.(1985) Science 228,497-499.

(3) MacDonald,I.J.,Swift,G.H.,Przybyla,A.E.,and Chirgwin,J.M.(1987) Methods Enzymol.152,219-227

(4) Nishida,T.,Hirato,T.,Nishino,N.,Mizuno,K.,Sekiguchi,Y.,Takano,M.,Kawai,K.,Nakai,S.,and Hirai,Y.(1988) in Progress in Leucocyte Biology (M.C.Powanda,J.J.Oppenheim,M.J.Kluger,and C.A.Dinarello Ed.) Vol VIII 73-78. Alan R. Liss,Inc. New York.

(5) Sapolsky,R.M.(1985) J.Neurosci.5,1228-1323.

22 視交叉上核におけるソマトスタチンmRNAの発現量の日周リズム

竹内 潤一、篠原 一之、井上 慎一
（三菱化成生命研・脳神経生理）

〔要約〕

哺乳動物においては視交叉上核（SCN）が日周リズムの中枢であることが明らかにされている。この日周リズムの生成に遺伝子の発現制御過程が含まれる可能性を検討する目的で、明暗条件に同期させたラットから時間毎にSCNの組織を取り出し、RNAを抽出して、ノーザンブロット法で各時間毎のソマトスタチンおよびVIP/PHImRNAの相対的発現量を調べた。SCNにおいてソマトスタチンmRNAの発現量は、明期の始まりに多く暗期の始まりに少ない顕著な日周性を示した。それに対して視床下部前部や大脳皮質では明確な日周変動は見られなかった。一方VIP/PHImRNAはSCNに強く局在していが、その発現量は一日を通してほぼ一定であり明確な日周性はみられなかった。以上の結果はソマトスタチンmRNAの発現量の日周変動が日周リズムの生成あるいは伝達と深く関わり合っている可能性を示唆している。

【目的】

単細胞生物から人間に至るまで、生物があまねく日周リズムを持っていることが広く知られている。こうした日周リズム（サーカディアンリズム）は、生体に備わった計時機構に支配されており、特に哺乳類ではその中枢は視床下部の視交叉上核（suprachiasmatic nucleus, SCN）に限局していることが様々な方法で示されている[1,2]。しかしそのSCNの細胞がどのような機構で約24時間の日周リズムを作り出すかに関しては、まだ殆ど明らかにされていない。我々はこのリズム生成に遺伝子の発現制御が関与している可能性を考え、SCNに比較的限局して存在する神経ペプチドであるソマトスタチンとVIP/PHImRNA対するプローブを作製し、mRNAの発現量の日周変動を調べリズム生成との関わりを検討した。

【方法】

Wistar系雄性ラット（3週令）を9時～21時、21時～9時の12時間：12時間の明暗条件下にて2週間飼育した後、麻酔下で盲目とし、更に2日間飼育したものから4時間ごとに脳を取り出し、SCN、視床下部前部（anterior hypothalamus, AH）および大脳皮質（cerebral cortex, CX）を組織片として切り出し、フェノール―クロロフォルム法により、total RNA を抽出した。プローブとして、ラット プレプロソマトスタチン gene および VIP/PHI gene より42base の oligonucletide を作製し ^{32}P でラベルし、ノーザンブロット ハイブリダイゼーションを行った。mRNAの相対的発現量は、イメージングプレートに感光後イメージアナライザー（Fuji BAS 2000）で定量した。

【結果】

盲目にしたラットにおいて、SCNのソマトスタチンmRNAの相対的発現量は、明らかな日周変動を示し、朝方（CT0～CT4）に最高となり、夕方（CT12～16）に最低値をとるパターンを持つことがわかった（図1、4）。SCNを含まないAH、およびCXにおいては明確な日周変動は見られなかった（図2）。また、SCNにおいても、VIP/PHImRNAの相対的発現量は、一日を通してほぼ一定であり、日周変動は見られなかった（図3）。

【考察】

今回の実験から、盲目にしたラットのSCNにおいてソマトスタチンのmRNA量が日周変動すること、VIP/PHImRNA量はほぼ一定であることが明かとなった。AlbersらはVIP/PHImRNA量に明かな昼夜差がみられると報告しているが[3]彼らは我々とは異なり明暗条件下で実験を行っていることから、このVIP/PHImRNAの変動は外界の明暗への反応を反映しているものと考えられる。

今回見られたＳＣＮにおけるソマトスタチンｍＲＮＡの日周変動の位相は、従来報告されているいずれのリズムの位相とも異なっており、電気的活動や代謝活動の日周変動の位相に対し、約６時間前進していた。このことから一つの可能性として、ソマトスタチン等の神経ペプチドのｍＲＮＡ量の変動が神経ペプチド量の変動をもたらし、このことがＳＣＮの電気的活動等の変動を調節していることが考えられた。転写阻害剤や蛋白合成阻害剤を投与した場合、特定の時間帯にのみ、リズムの周期や位相に対する影響があらわれるという報告[4,5]はこの可能性を支持していると考えられる。 今後ＳＣＮにおけるソマトスタチン量の変動を測ることや他のｍＲＮＡの変動を調べることによって日周リズムの生成および伝達機構を明らかにして行きたいと考えている。

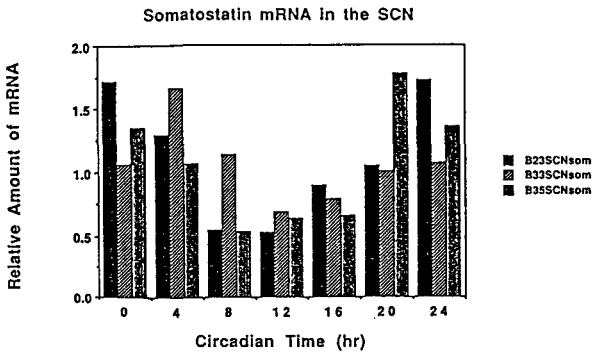


図１：ＳＣＮにおけるソマトスタチンｍＲＮＡ発現量の日内変動
結果は、B23SCN、B33SCN、B35SCNの各サンプル毎の平均を１として標準化した。
（各時間毎ｎ＝４）

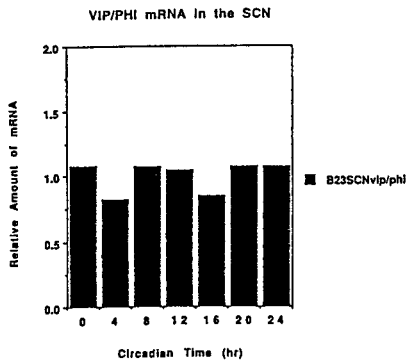
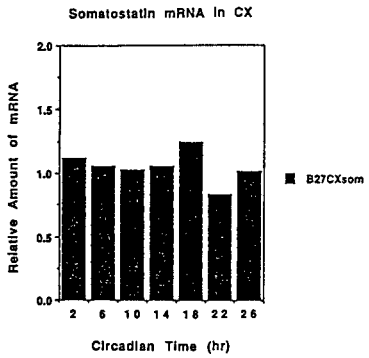
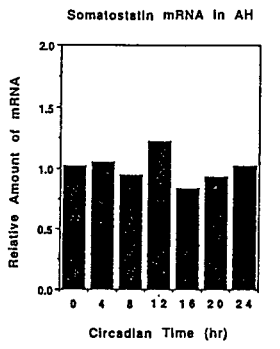


図３：ＳＣＮにおけるＶＩＰ／ＰＨＩのｍＲＮＡ発現量
B23SCNsomと同一のフィルターを使用した。





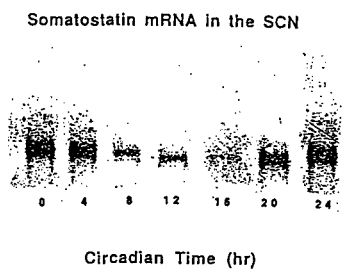


図２：ＡＨおよびＣＸにおけるソマトスタチンｍＲＮＡの発現量
標準化の仕方は図１と同じ。各１サンプルずつを示した。（各時間毎ｎ＝４）

図４：ノーザンハイブリダイゼーションの一例（B23SCNsom）
各レーン毎の全ＲＮＡ量はCTOより各々24、24、22、22、15、27、24μg。

【文献】

(1) Inouye, S. T. & Kawamura, H. (1979) PNASU: 76, 5962-5966.

(2) Schwartz, W. J. & Gainer, H. (1977) Science: 197, 1089-1091.

(3) Albers, H. E. et al. (1987) Brain Research: 437, 189-192.

(4) Inouye, S. T. et al. (1988) Am. J. Physiol.: 255, R1055-R1058.

(5) Ramasubban, S. & Eskin, A. (1990) Abstract of 2nd Meeting of SRBR: pp111.

23 抑制性グリシン受容体のｃＤＮＡクローニングと機能的受容体の発現

赤木宏行、平井啓子*、菱沼文男*

（群馬大学・医・薬理、三菱化成生命研・分子遺伝*）

〔要約〕

抑制性伝達物質であるグリシンに応答する受容体の構造と機能との関係を明らかにすることを目的とし、受容体cDNAクローニングを試みた。ラット脊髄mRNAを鋳型にして作製したcDNAライブラリーを合成オリゴヌクレオチドをプローブに用いてスクリーニングし、複数の陽性クローンを得た。構造解析の結果、これらのクローンにはグリシン受容体のcDNA断片が挿入されており、それらを組み合わせることによりタンパク翻訳領域の全長をカバーするものであることがわかった。cDNA断片をつなぎ合わせてpSPTベクターに組み込み、それを基にして合成したRNAを注入したアフリカツメガエルの卵母細胞からグリシンの適用に応じてクロライド電流が記録された。この反応は低濃度のストリキニンで可逆的に抑制された。グリシン受容体はGABA受容体と異なり、単一サブユニットのアセンブリーにより機能的なチャネルを形成しうることが示された。

抑制性アミノ酸伝達物質であるグリシンおよびそれに応答する受容体（ストリキニン結合性タンパク質）は脊髄に豊富に存在する。これと平行して、グリシン受容体をコードするmessenger (m) RNA の存在量も大脳皮質などと比べてかなり多い(1)。我々のグループは、グリシンに応答する受容体mRNAには成熟ラット脊髄に多く存在するものと、出産数日後の幼若期脊髄に多量に含まれるものの、少なくとも２種類の異なる分子が存在することをこれまでに示してきた(2,3)。このヘテロな受容体mRNAの構造、それにより翻訳される受容体タンパクの機能的性質の違い、さらにはその生理的意味を明らかにするには、それぞれの受容体mRNAに相補的なDNAをクローン化することが重要と考え、それを試みてきたが、今回まず成熟ラットのグリシン受容体cDNAをクローン化することに成功した。成熟型受容体に関しては、既に、Grenninglohらがストリキニン結合タンパクの精製を経て、cDNAクローニングを行い、その部分構造を報告している(4)。しかし、彼らがクローン化したcDNAはタンパク翻訳領域(open reading frame; ORF)のうち翻訳開始コドンを含む上流部分が欠損しており、受容体タンパクの全長をコードするものではなかった。これに対し、我々がクローン化したcDNAはORFの全長を含むものであり、さらに、これをもとに機能的グリシン受容体をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させることができた。

〔方法〕

cDNAクローニング　成熟期（１０－１２週令または２５日令）のラット脊髄より抽出、精製した全poly (A)$^+$ RNA、あるいはさらに超遠心分画したRNAを鋳型にして二重鎖cDNAを合成し、ベクター(λgt10またはλZAPII)に組み込んで数種類の異なるcDNAライブラリー (bank size; $3x10^5$-$3X10^7$ pfu/ml)を作製した。既報(4)の構造を基に合成した２種類のオリゴヌクレオチド(ASM3, 30 mer; ASLBS, 39 mer; 図１参照)をプローブに用いてライブラリーのスクリーニングを行なった。陽性クローンついては挿入DNAを切り出した後、プラスミド(pUC18, 19)にサブクローニングし、構造解析を行った。一部のDNA断片はpoly (A)$^+$ RNAを鋳型にしてPolymerase chain reaction(PCR)法により調製した。

受容体の発現と電気生理学的解析　ORFの全長をカバーするcDNAを構築したのち発現ベクター(pSPT18, 19)に組み込んで増幅した。精製したプラスミドDNAを鋳型にしてin vitroでRNAを合成し、それをアフリカツメガエルの卵母細胞に注入した。１－５日間培養したのち、電気生理学実験に用いた。２本のガラス微小電極を刺入して-70mVに膜電位固定した卵母細胞から膜電流を記録した。薬物は灌流液に加えて適用した。

〔結果〕

ライブラリーをスクリーニングしたところ、４種類の陽性クローンがえられた（図１）。構造解析の結果、これらのクローンはいづれもストリキニン結合タンパクのcDNAの一部をコードしていることがわかった。それぞれの陽性クローンのDNA塩基配列の一部が相互に重なり合うことから、単一のタンパクをコードするcDNAの断片であることが示唆された。クローンp201, p903およびp1201の挿入DNAの上流域にATGが存在し、前後の関係からこれが翻訳開始コドンであることが

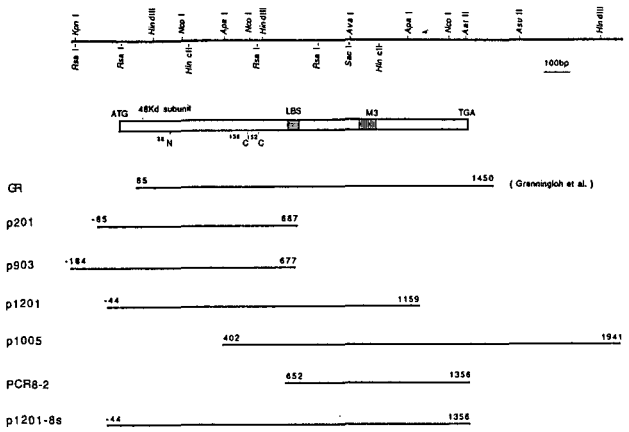


図1（左図）
スクリーニングによりえられた陽性クローンに挿入されたグリシン受容体cDNA断片の位置関係とその制限酵素地図。PCR8-2はPCR法を用いて調製した。

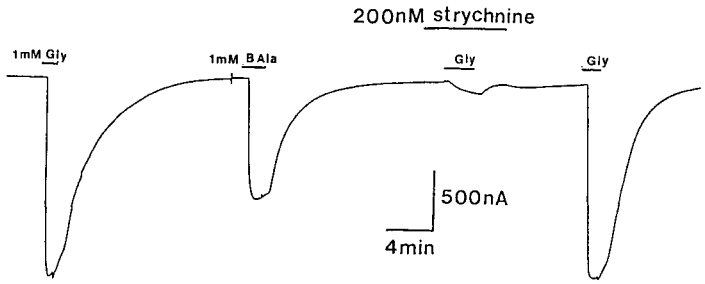


図2（右図）
グリシン受容体RNAを注入した卵母細胞から記録されたグリシンおよびβーアラニンに応答する反応とストリキニンによる抑制。下向きのトレースは膜電位を-70 mVに固定した時にえられた内向き電流を示す。

推定された。p1201とPCR8-2の挿入DNAを継ぎ合わせて作製したORF全長を含むDNA(p1201-8S)を発現ベクターに組み込み、in vitroで転写されたRNAを注入した卵にグリシン(1 mM)を灌流適用したところ、内向き電流が記録された（図2）。これにより、クローン化DNAが機能的グリシン受容体をコードするものであることが確かめられた。

発現された受容体のアゴニスト特異性を調べたところ、βーアラニン(1 mM)にも応じて膜電流を惹起したが、同濃度のGABA、αーアラニン、タウリン、グリシルグリシンに対してははほとんど応答しなかった。グリシンおよびβーアラニンに対する反応は低濃度(200 nM)のストリキニンの存在下で著しく減弱されたが、GABAアンタゴニストであるピクロリンでは抑制されなかった（図2）。グリシン反応はClイオンの平衡電位である-20 mV付近に逆転電位をもち、さらに外液のCl濃度を下げることにより、逆転電位が脱分極方向にシフトしたことから、電流の主たるキャリアーはCl^-であることが推測された。

〔考察〕

本研究により、グリシン受容体サブユニットをコードするcDNAの5′非翻訳領域184 bp、ORF1350 bp、3′非翻訳領域591 bpの塩基配列が明らかにされた。この中で、3′非翻訳領域の29 bpの配列がGrenninglohらにより報告された配列と異なっていた。ORFの構造から推定されるグリシン受容体サブユニットの全体骨格は４ヶ所の膜貫通部位をもつなどの点で、ニコチン性アセチルコリン受容体や$GABA_A$受容体のそれと極めて類似している。しかし、単一種のRNAを注入しただけで十分な大きさのグリシン電流が生じることから、卵母細胞に発現したグリシン受容体は単一サブユニットの集合体（おそらく４または５量体）で構成されるものと考えられる。現在のところ、ニューロンにおいてもグリシン受容体が単一サブユニットだけで構成されるか否かは不明である。現在、受容体cDNAの塩基配列の一部を改変した変異DNAを調製しており、これらを用いたグリシン受容体の構造と機能の関係についても報告したい。

〔文献〕

1. Akagi, H. and Miledi, R. (1988) *Neurosci. Lett.* 95 262-268.
2. Akagi, H. and Miledi, R. (1988) *Science* 242 270-273.
3. Akagi, H. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 8103-8107.
4. Grenningloh, G. *et al.* (1887) *Nature* 328 215-220.

24　老齢ラットにおけるhigh K^+刺激によるシナプトゾーム内Ca^{2+}濃度上昇に対するNMDA antagonistの効果.

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^+刺激によるシナプトゾーム内のCa^{2+} 濃度([Ca^{2+}]i)上昇とこれに及ぼす種々のNMDA antagonistの効果を老齢ラット（24ヵ月齢）を用い、若年ラット（3ヵ月齢）のそれと比較検討した。若年ラットにおいては拮抗型NMDA antagonistであるAP7（1-100μM）および非拮抗型NMDA antagonistであるdextrorphan（DX、1-100μM）、MK801（0.1-10μM）の3分間前処置は、15mM K^+刺激による[Ca^{2+}]i上昇にほとんど影響することはなかった。しかし、非拮抗型NMDA antagonistである0.1μM phencyclidine（PCP）は[Ca^{2+}]i上昇を有意に増強した。一方、老齢ラットでは15mM K^+刺激による[Ca^{2+}]i上昇は若年ラットに比べて低く、1μM AP7、1μM DXおよび0.1μM MK801の3分間前処置によって有意に増強されたが、PCP（0.1-10μM）では有意な変化は認められなかった。以上の結果から、15mM K^+刺激による[Ca^{2+}]i上昇は加齢によって低下し、NMDA antagonistの作用も加齢によって変化することが示唆された。

脳虚血やhypoxia後に生じる機能障害や記憶障害にはNMDAレセプターの過剰な活性化による細胞内Ca^{2+} overloadが深く関与していると考えられている[1]。さらに、加齢による機能障害にも細胞内Ca^{2+}動態変化が関係していることが近年明らかになってきた[2]。我々はすでに、若年ラットにおいてnormoxia条件下とhypoxia条件下ではNMDA antagonistの15mM K^+刺激による[Ca^{2+}]i上昇への作用が異なっていることを報告した（第31回神経化学会、1988）。そこで、今回は、NMDA antagonistが老齢ラットのCa^{2+}動態にどのような影響を与えるか若年ラットのCa^{2+}動態における NMDA antagonist の効果と比較検討した。

（方法および結果）
Nagy & Delgado-Esceutaの方法[4]に従って若年（3ヵ月齢）および老齢（24ヵ月齢）Fischer 344系雄性ラットの全脳シナプトゾームを調製し、Ca^{2+}感受性蛍光色素Rhod-2を負荷した。Rhod-2の蛍光変化は日立蛍光分光光度計F2000を用い、励起波長550nm、蛍光波長570nmで測定した。

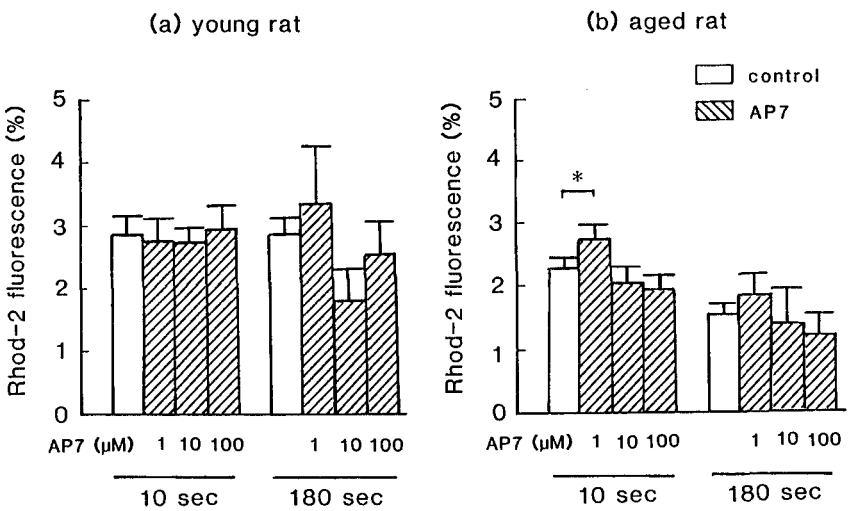


図1　AP7の15mM K^+刺激による[Ca^{2+}]i上昇に対する効果
＊ $p<0.05$

Rhod-2を負荷したシナプトゾームを20分間インキュベートした後、15mM K^+で刺激し、脱分極10および180秒後の$[Ca^{2+}]i$の変化を測定した。NMDA antagonistはすべて15mM K^+刺激3分前に加えた。図.1は若年ラットと老齢ラットの15mM K^+刺激による$[Ca^{2+}]i$上昇に及ぼすAP7の効果を示している。若年ラットにおいてAP7（1-100μM）は$[Ca^{2+}]i$上昇に影響を与えなかった。一方、

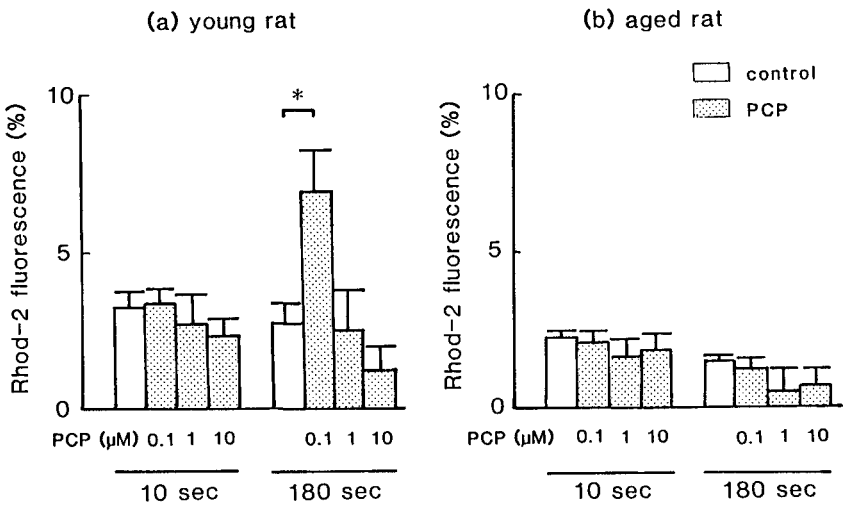


図2　PCPの15mM K^+刺激による$[Ca^{2+}]i$上昇に対する効果
*　$p<0.05$

老齢ラットにおいては1μM AP7は$[Ca^{2+}]i$上昇を有意に増強した。同様に、DX（1-100μM）およびMK801（0.1-10μM）も若年ラットの$[Ca^{2+}]i$上昇には影響を与えず、1μM DXおよび0.1μM MK801は$[Ca^{2+}]i$上昇を有意に増強した。図2は若年ラットと老齢ラットの15mM K^+刺激による$[Ca^{2+}]i$上昇に及ぼすPCPの効果を示している。若年ラットでは0.1μM PCPによって$[Ca^{2+}]i$上昇は有意に増強された。一方、老齢ラットではPCP（0.1-10μM）は$[Ca^{2+}]i$上昇に影響しなかった。

（考察）以上、老齢ラットでは15mM K^+刺激による$[Ca^{2+}]i$上昇は低下し、拮抗型および非拮抗型のNMDA antagonistはこの$[Ca^{2+}]i$上昇を増強した。しかし若年ラットではNMDA antagonistの$[Ca^{2+}]i$上昇への影響は認められなかった。このことは、加齢によって神経終末内Ca^{2+}制御機構が変化し、その結果、神経伝達系も低下していること、これを低濃度のAP7、DXおよびMK801が改善する可能性があることを示唆している。一方、非拮抗型のNMDA antagonistであるPCP、DXおよびMK801はNMDA/PCPレセプター複合体のPCPレセプターに作用すると考えれている[3]。それにもかかわらず、PCPのCa^{2+}動態への影響はDXやMK801と異なっており、DXやMK801の作用は拮抗型のNMDA antagonistであるAP7と類似していた。PCPは強いK^+チャンネル抑制作用を有しており[5]、PCPの$[Ca^{2+}]i$上昇に及ぼす効果はNMDAレセプターを介したものではない可能性も考えられた。

(references)
1. Barnes, DM, Science, 239, 254-256 (1988).
2. Landfield, PW and Pitler TM, Science, 1089-1091 (1984).
3. Musacchio, JM, Klein, M and Paturzo, JJ, Mol. Pharmacol., 35, 1-5 (1989).
4. Nagy, A and Delgado-Esceuta, AV, J. Neurochem., 43, 1114-1123 (1984).
5. Rothman, S, J. Pharmacol. Exp. Ther., 246, 137-142 (1988).

25 ラット脳後シナプス肥厚部におけるＮＭＤＡ受容体／チャネル活性のプロテインキナーゼＣによる増強

宮崎敦広，北村佳久，野村靖幸
（北大・薬・薬効）

〔要約〕
ラット脳後シナプス肥厚部(postsynaptic density:PSD)画分への[^{3}H]MK-801（NMDA受容体／チャネルの open channel blocker）結合活性は、N-methyl-D-aspartate (NMDA)、glutamate (Glu)および glycine (Gly)の添加により増加した。このPSD画分を、精製ラット脳プロテインキナーゼC(PKC)-IIによってあらかじめ処理しておくとNMDA, Glu, Glyの[^{3}H]MK-801結合の増加効果は増強された。しかし、PKC-IおよびIIIによる前処理では有意な変化は認められなかった。以上のことより、脳の後シナプス肥厚部においてβ型PKCは、NMDA受容体／チャネルをおそらくリン酸化し、その活性を増強すると推定した。

《緒言》
Ca^{2+}／リン脂質依存性プロテインキナーゼ(PKC)のうち、γ型PKC (PKC-I)、β型PKC (PKC-II)、ならびにα型PKC (PKC-III)がよく知られている[6]。シナプス伝達の長期増強(long-term potentiation:LTP)が観察される海馬にはβ型，およびγ型PKCが高活性に存在すること[8]、このLTPの発現にはPKC[1]とともにNMDA受容体／チャネルが関与すること[4]が報告されている。一方、NMDA受容体／チャネルの性質としては、1) Glu, Glyによって開口され、Ca^{2+}流入をひき起こすこと、2) Glu, Glyによる本チャネルの開口はMK-801によって遮断される子とも明らかになっている。最近、海馬ＣＡ１領域の錐体細胞においてNMDA受容体とβ型およびγ型PKCの分布が類似しており、さらに後シナプス肥厚部 (postsynaptic density:PSD)にはGlu受容体が高密度に存在し[3]、その近傍にはβ型PKCが存在することが報告された[8]。そこで今回、ラット脳よりPSD画分を調製し、本画分におけるNMDA受容体／チャネルの[^{3}H]MK-801結合活性に対し、PKC前処理がどのように作用するかについて検討し、以下の新知見を得た。

《実験方法》
1) PKCの精製： ラット脳よりPKCを、Kikkawaら の方法[5]に準じてDEAE-Sephacel, Ultrogel AcA-34, Phenyl-Sepharoseを順次使用し、PKCを分画後、さらにhydroxyapatite column chromatographyによりPKC-I, II, IIIを部分精製した[7]。
2) PSDの調製とＰＫＣ処理： ラット全脳（小脳を除く）からの後シナプス肥厚部(PSD)画分の調製は、Carlinらの方法に準じて行なった[2]。PSD画分のPKC前処理は、PSD（蛋白量,約 6 mg/ml)を精製 PKC（蛋白量,約 1.2 pmol/ml)、2 mM $CaCl_2$、100 μg/ml phosphatidylserine、1 μM TPA、10 mM $MgCl_2$、10 μM ATPの存在下、30 ℃, 15 分間インキュベートすることによって行なった。
3) [^{3}H]MK-801結合： PKC前処理したPSD(蛋白量,約 100μg)を 50 mM Tris·HCl (pH 7.4)中で、[^{3}H]MK-801（最終濃度,10 nM）存在下、30 ℃, 60 分間インキュベート後、0.3 % polyethylenimine前処理したGF/Cガラスフィルター上にPSDを回収し、その放射活性を測定することにより行った。

《結果》
調製したPSDの[^{3}H]MK-801結合活性は、0.1 μM ～ 100 μM Gluまたは 0.1 μM ～ 100 μM NMDA添加により濃度依存的に増加し、この結合増加は10 μM Glyの添加によりさらに増加した。
10 μM Glyおよび10μM Glu または10 μM NMDA の存在下での[^{3}H]MK-801結合活性は、PKC-I、またはIII前処理によりほとんど影響は認められなかったが、PKC-II前処理によって有意に増加した （図１）。
一方、PSDをPKC-II前処理しても、GluおよびGly非存在下では[^{3}H]MK-801結合は影響されなかった。しかし、Gluの濃度依存的な[^{3}H]MK-801結合増加作用は、Glyの存在下、非存在下のいずれにおいてもPKC-II前処理によって増加した （図２）。

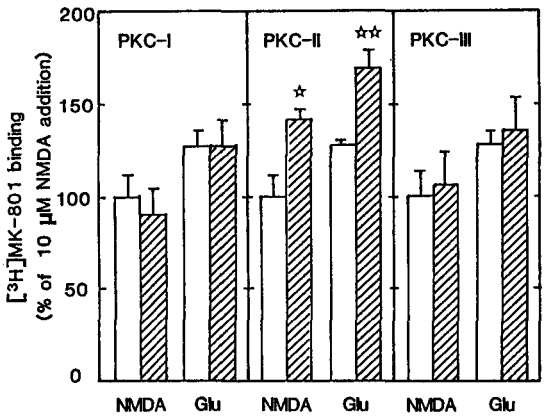


図１．PSD画分の[³H]MK-801結合活性への
PKC-I,IIおよびIII処理の影響
10 μM Gly 存在下、10 μM NMDA
または 10 μM Gluを添加した
□ control, ▨ PKC処理
☆ p<0.05, ☆☆p<0.01 vs. control

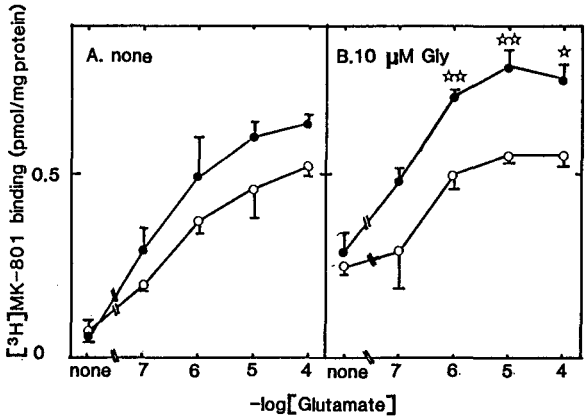


図２．Glutamateによる[³H]MK-801結合増加に対する
PKC-II処理の影響
○ control, ● PKC-II処理
☆ p<0.05, ☆☆ p<0.01 vs. control

《考察》

PSDは、後シナプス膜内に存在する電子密度の高い部位であり受容体応答に関与する可能性が考えられている(9)。このPSDは、高濃度Triton X-100 (0.5%～1%)処理でも不溶性であること、さらにこのPSDには、Glu受容体が豊富に存在することが報告されている(3)。ラット脳PSDへの[³H]MK-801の結合活性は、Glu, NMDAおよびGlyによって著しく増加した。Glu, NMDA およびGlyによりNMDA受容体が活性化され、そのチャネルが開口状態となったため [³H]MK-801結合が増加したものと考えられる。Glu, NMDAおよびGlyによる[³H]MK-801結合の増加は、精製PKC-IIを前処理した PSDではさらに増加した。しかし、PKC-I、ならびにIIIは著しい変化を与えなかった。PKC-IIはβIおよびβII型PKCを含んでおり(6)、また海馬ＣＡ１の後シナプスにβII型が存在する(8)。以上のことから、PSDにおいてβ型PKCが、PSD中に存在するNMDA受容体／チャネルをおそらくリン酸化することにより、グルタミン酸によるNMDA受容体／チャネル開口を促進させるという生理的調節機構の存在が推定された。

《参考文献》

(1) Aker, R.F., Lovinger, D.M., Colley, P.A., Linden, D.J., and Routtenberg, A. (1986) Science 231, 587-589
(2) Carlin, R.K., Grab, D.J., Cohen, R.S., and Siekevitz, P. (1980) J. Cell Biol. 86, 831-843
(3) Fagg, G.E., and Matus, A. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6876-6880
(4) Harris, E.W., Ganong, A.H., and Cotman, C.W. (1984) Brain Res. 323, 132-137
(5) Kikkawa, U., Go, M., Koumoto, J., and Nishizuka, Y. (1986) Biochm. Biophy. Res. Commun. 135, 636-643
(6) Kikkawa, U., Ono, Y., Ogita, K., Fujii, T., Asaoka, Y., Sekiguchi, K., Kosaka, Y., Igarashi, K., and Nishizuka, Y. (1987) FEBS Lett. 217, 227-231
(7) Shearman, M.S., Naor, Z., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1987) Biochm. Biophy. Res. Commun. 147, 911-919
(8) Tsujimoto, T., Kose, A., Saito, N., and Tanaka, C. (1990) J. Neurosci. 10, 870-884
(9) Wu, K., Carlin, R., and Siekevitz, P. (1986) J. Neurochem. 46, 831-841

26 NMDAレセプター複合体の多様性

米田幸雄、荻田喜代一
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
N-メチル-D-アスパラギン酸感受性(NMDA)レセプターと連関するイオンチャネルを反映する[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合の性質を大脳皮質、海馬および小脳について検討した。反応時間16時間の場合、海馬および小脳におけるアミノ酸無添加時の結合は、ともに競合的NMDAアンタゴニストおよび競合的Gly_Bアンタゴニストにより著明に阻害された。また、この両部位において、グルタミン酸(Glu)単独存在下の結合とGluおよびグリシン(Gly)共存下の結合の間に、有意差は認められなかった。反応時間30分間の場合、大脳皮質および海馬における結合は、Gluの添加によりそれぞれ無添加時の約7倍および10倍に増強された。さらに、これらの結合はGlyおよびスペルミジン(SPD)により著明に増強された。それに対して、小脳ではGluおよびGlyの結合増強作用は比較的弱く、またSPDの添加では全く増強されないことが明らかとなった。以上の結果より、NMDA感受性レセプター複合体におけるイオンチャネルの活性化調節が脳内部位により異な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、そのアゴニスト刺激によりイオンチャネルが開放して、Ca^{2+}およびNa^+イオンの流入が惹起される(6)。このNMDAチャネルの開放頻度は、Glyにより増加することが電気生理学的研究により明らかにされた(1)。また、非競合的NMDAアンタゴニストのMK-801(7,12)や、N-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine(TCP)(11)の標識化合物の脳シナプス膜への結合が、GluやNMDAにより著明に増強され、Glyがその結合をさらに増強することが示されている。このGlyの作用はストリキニーネ非感受性であることから、筆者らはこのGly認識部位をGly_B部位と命名した(2)。また、ポリアミンの一つであるSPDが、Glu/Gly共存下の結合をさらに増強することが明らかにされている(5,8)。したがって、NMDA感受性レセプターにおけるイオンチャネルは、NMDAアゴニストのみならず、GlyおよびSPDなどのポリアミンにより調節を受けると理解されている(9)。本研究では、このようなNMDAチャネルの活性化調節機構の脳内部位による相違を検索する目的で、大脳皮質、海馬および小脳における[^{3}H]MK-801結合の性質を検討した。

〔実験方法〕
Wistar系雄性ラットの大脳皮質、海馬および小脳のそれぞれより調製した粗シナプス膜標品を、50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)を用いて3回洗浄した。得られた膜標品は0.32 Mショ糖溶液に懸濁して-80℃で凍結保存した。実験当日に懸濁液を室温融解したのち、0.08% Triton X-100で、2℃、10分間の前処理を行った。前処理後、上述の洗浄操作を2回行った膜標品を結合実験に供した(3)。[^{3}H]MK-801結合実験は、膜標品と5 nM [^{3}H]MK-801(NEN/DuPont, 833 GBq/mmol)を上記緩衝液中で、30℃、30分間あるいは16時間反応させて行った(10)。非特異的結合の測定は、10^{-4} M MK-801存在下で行った。反応は、Whatman GF/Bグラスフィルターを用いた吸引濾過法により停止した。

〔結果〕
[^{3}H]MK-801結合が完全に平衡状態レベルに達する反応時間16時間において、海馬は小脳に比べて約10倍高い結合が観察された。海馬におけるアミノ酸無添加時の結合は、競合的NMDAアンタゴニストである(±)-3-(2-carboxy-piperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid(CPP)やD-2-amino-5-phosphonovaleric acid(D-AP5)、および競合的Gly_Bアンタゴニストの7-chlorokynurenic acidや6,7-dichloroquinoxaline-2,3-dioneにより、10^{-7} M以上の濃度で濃度依存的に阻害された。また、反応時間16時間では、Glu存在下にのGlyを添加しても増強は認められなかった。同様な結果が小脳でも得られた。次に、結合が平衡状態レベルに到達しない反応時間30分間で検討を進めた。アミノ酸無添加時の結合は大脳皮質が比較的高かったが、海馬と小脳の間では有意差は認められなかった(大脳皮質; 37.5±5.5 fmol/mg protein, 海馬; 16.0±2.5, 小脳; 11.1±2.0)。大脳皮質および海馬の結合は、10^{-7} M以上の濃度のGluにより濃度依存的に増強され、10^{-4} M Glu添加時ではそれぞれアミノ酸無添加時の約7倍および10倍となった。一方、小脳における結合は、10^{-4} M Gluの添加により結合は約1.8倍に増強された(図1)。10^{-5} M Glu存在下にGlyを添加すると、いずれの部位でも1.5-2倍の結合の上昇が見られた(図2)。大脳皮質および海馬の場合、10^{-5} M Gluおよび

図1. Glu の増強作用

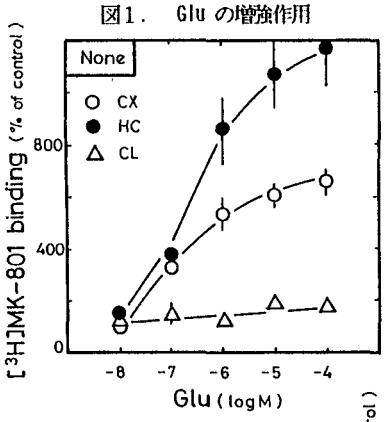


図2. Gly の増強作用

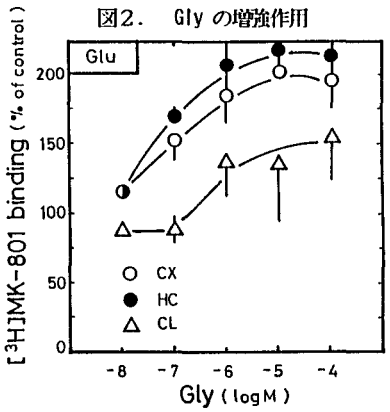
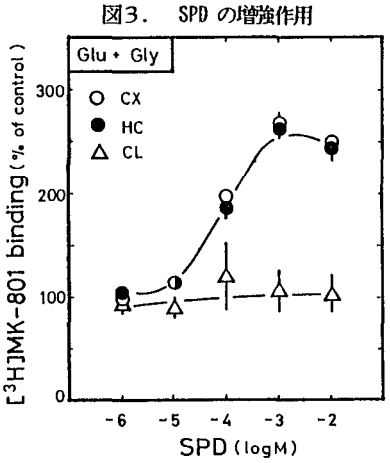


図3. SPD の増強作用



10^{-5} M Gly共存下の結合はSPDにより著明に増強されたが、小脳ではこのようなSPDの増強作用は、全く認められなかった(図3)。

〔考察〕

本研究において、大脳皮質および海馬と小脳の間で、[³H]MK-801結合におけるSPDの作用が著明に異なることが示された。このことは、NMDAチャネルのSPDによる活性化調節が部位により異なり、小脳では極めて微弱である可能性を示唆するものである。このNMDA感受性レセプターの多様性については、キノリン酸の感受性により"NMDA1"と"NMDA2"に分類できる可能性が示唆されている(4)。すなわち、小脳や脊髄にはキノリン酸非感受性のNMDA1レセプターが存在し、一方大脳皮質および海馬にはキノリン酸感受性のNMDA2レセプターが存在するという。したがって、小脳には、キノリン酸・SPD非感受性のNMDA1レセプターが存在する可能性が推察される。

〔文献〕

1. Johnson, J.W. and Ascher, P. (1987) Nature 325, 529-531.
2. Ogita, K., Suzuki, T. and Yoneda, Y. (1989) Neuropharmacol. 28, 1263-1270.
3. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
4. Perkinson, M.N. and Stone, T.W. (1983) Brain Res. 259, 172-176.
5. Ransom, R.W. and Stec, N.L. (1988) J. Neurochem. 51, 830-836.
6. Robinson, M.B. and Coyle, J.T. (1987) FASEB J. 1, 446-455.
7. Wong, T.H.F., Knight, A.R. and Woodruff, G.N. (1988) J. Neurochem. 50, 274-281.
8. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1990) NEUROTRANSMITTER RECEPTOR: NEURORECEPTOR MECHANISMS IN BRAIN (Kito, S. Segawa, T. and Olsen, R. eds), Plenum, New York, in press.
9. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1990) Neurosci. Res. in press.
10. Yoneda, Y. and Ogita, K (1989) Brain Res. 499, 305-314.
11. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T. (1988) Neurotransmitter: Focus on Excitatory Amino Acids (Kanazawa, I., ed.), pp. 47-65, Excerpta Medica, Tokyo.
12. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T. (1990) J. Neurochem. 55, 237-244.

27

NMDAレセプター複合体における グリシンの役割

荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)感受性レセプター複合体上のグリシン(Gly)認識部位(Gly_B部位)の特異的アンタゴニストを検索し、そのアンタゴニストを用いて本レセプター機構におけるGlyの役割を解析した。用いたキノキサリン誘導体の中で、[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合および[^{3}H]Gly結合を最も強力に阻害した化合物は、6,7-dichloroquinoxaline-2,3-dione(DCQX)および6,7-dichloro-3-hydroxy-2-quinoxaline-carboxylic acid(DHQXC)であった。また、7-chlorokynurenic acid(7-ClKYNA)も[^{3}H]MK-801および[^{3}H]Gly結合を強く阻害した。DHQXCおよび7-ClKYNAは、[^{3}H]グルタミン酸(Glu)結合および [^{3}H](±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid(CPP)結合に対しても著明な阻害作用を示した。一方、DCQXは[^{3}H]Glu結合部位に対してほとんど親和性を持たず、Gly_B部位に特異性が高いことが明らかとなった。NMDAアンタゴニストのCPPやD-2-amino-5-phosphonovaleric acid(D-AP5)は、[^{3}H]MK-801結合のGluの増強作用を競合的に阻害した。一方、DCQXおよび7-ClKYNAは、Glyによる増強を競合的に阻害するばかりでなく、Gluの増強作用を非競合的に阻害した。以上の結果は、NMDA感受性レセプター機構発現にGlyの存在が必須であることを示唆するものである。

NMDA感受性レセプターは、その複合体上のアゴニスト結合部位以外に、ストリキニーネ非感受性Gly_B部位により機能調節を受けることが知られている。すなわち、GlyやD-serineなどが、NMDAによるNMDAチャネルの活性化を増強することが電気生理学的研究から明らかとなり(1)、また、活性化状態のNMDAチャネルを反映する[^{3}H]MK-801結合が、NMDAアゴニスト存在下にGlyにより増強されることが示されている(3,7,10)。さらに最近、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現されたNMDAチャネルの活性化に、Glyが必須であることが示唆されている(2)。本研究では、NMDA感受性レセプター機構におけるGly_B部位の役割を明らかにする目的で、特異的Gly_Bアンタゴニストの検索と、そのアンタゴニストの[^{3}H]MK-801結合に対する影響について検討した。

〔実験方法〕

Wistar系雄性ラットの全脳より調製した粗シナプス膜標品を、50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)を用いて3回洗浄した。得られた膜標品は0.32 Mショ糖溶液に懸濁して-80℃で凍結保存した。実験当日に懸濁液を室温融解したのち、0.08% Triton X-100で、2℃、10分間の前処理を行った。前処理後、上述の洗浄操作を2回行った膜標品を結合実験に供した(4)。[^{3}H]MK-801結合実験は、膜標品と5 nM [^{3}H]MK-801(NEN/DuPont, 833 GBq/mmol)を上記緩衝液)中で、30℃、30分間反応させて行った(6)。また、[^{3}H]Glu(9)、[^{3}H]CPP(8)および[^{3}H]Gly結合(5)は、それぞれ10 nM [^{3}H]Glu(ARC, 2220 GBq/mmol)、10 nM [^{3}H]CPP(NEN/DuPont, 1140 GBq/mmol)および10 nM [^{3}H]Gly(ARC, 1110 GBq/mmol)を膜標品と上記緩衝液中で、2℃、10分間反応させて測定した。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。

〔結果〕

種々のキノキサリン誘導体およびキヌレン酸誘導体について、Gly_B部位を反映する[^{3}H]Gly結合部位に対する親和力を検討したところ、7-ClKYNA(IC_{50}値: 0.36±0.06 μM)、DHQXC(0.49±0.07)、およびDCQX(0.62±0.11)が高い親和力を持つことが判明した。一方、NMDA認識部位の指標である[^{3}H]Gluおよび[^{3}H]CPP結合に対して、DHQXCおよび7-ClKYNAは比較的強い阻害作用を示したが、DCQXは両結合に著変を与えなかった。また、3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone(HA-966)は、[^{3}H]Gluおよび[^{3}H]CPP結合を阻害せず、[^{3}H]Gly結合にのみ弱い阻害作用を示した(IC_{50}値: 8.25±2.15 μM)。次いで、[^{3}H]MK-801結合に対するNMDAアンタゴニストおよびGly_Bアンタゴニストの影響について検討を進めた。[^{3}H]MK-801結合はGluの添加(10^{-8}-10^{-4} M)により著明に増強されたが、NMDAアンタゴニストのCPPおよびD-AP5は、Gluの最大反応を阻害することなく、Gluの結合増強能を低下させた。一方、7-ClKYNAおよびDCQXはGluのEC_{50}値に変化を与えることなく、Gluの最大反応を抑制した。また、10^{-5} M DCQXあるいは7-ClKYNA存在下では、Gluの増強作用は完全に消失することが判明した(図1、表1)。[^{3}H]MK-801結合は、Glu存在下にGlyの添加

図1. Glu の増強に対する各種アンタゴニストの影響

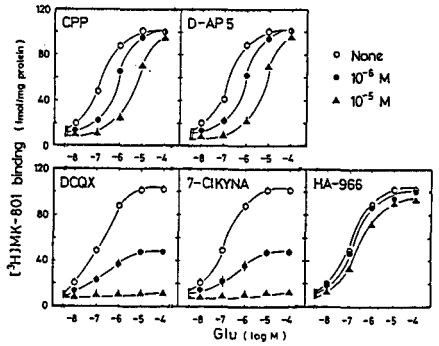


図2. Gly の増強に対する各種アンタゴニストの影響

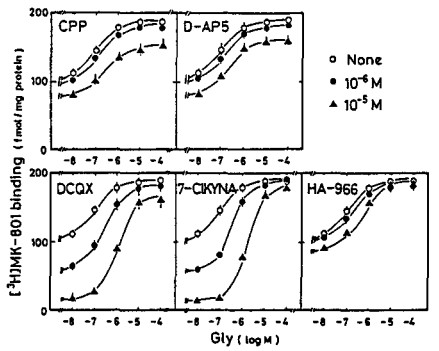


表1. Glu およびGly のEC$_{50}$値に対する各種アンタゴニストの影響

Antagonist (log M)	EC$_{50}$ (μM) Glu	Gly
None	0.18±0.01	0.10±0.02
CPP		
(-6)	0.71±0.07 **	0.11±0.02
(-5)	4.16±0.64 **	0.18±0.03
D-AP5		
(-6)	0.78±0.04 **	0.16±0.04
(-5)	4.63±0.65 **	0.14±0.03
DCQX		
(-6)	0.41±0.15	0.23±0.04 *
(-5)	—	0.87±0.06 **
7-ClKYNA		
(-6)	0.39±0.19	0.31±0.03 *
(-5)	—	1.53±0.12 **
HA-966		
(-6)	0.17±0.02	0.17±0.04
(-5)	0.20±0.02	0.39±0.08 **

(10^{-8}-10^{-4} M)により増強されたが、CPPおよびD-AP5はGlyのEC$_{50}$値に著変を与えなかった。また7-ClKYNAおよびDCQXは、Glyの最大反応を抑制することなく、EC$_{50}$値を有意に増加させた(図2、表1)。

〔考察〕

本研究で、DCQXがGly$_B$部位に高い選択性を持つ競合的アンタゴニストであることが明らかとなった。7-ClKYNAはGly$_B$部位に高い親和力を持つが、NMDA認識部位に対しても親和性を示すことから、その選択性に問題があると思われる。また、HA-966はGly$_B$部位に高い選択性を持つが、その親和力が極めて弱い。したがって、競合的Gly$_B$アンタゴニストとしては、DCQXが最も有用であると思われる。[³H]MK-801結合のGluによる増強は、競合的Gly$_B$アンタゴニストで内在性Glyの効果を遮断することにより完全に消失した。このことは、GluによるNMDAチャネルの活性化にGlyが必須であることを示唆するものである。一方、Glyは細胞外液に高濃度に存在して、Gly$_B$部位を飽和していると考えられる。したがって細胞外Glyは、"co-agonist"よりむしろ、"sensitizer"であると解釈するのが妥当であろう。

〔謝辞〕

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(02857365)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. Kleckner, N.W. and Dingledine, R. (1988) Science 241, 835-837.
3. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1990) J. Neurochem. 54, 699-702.
4. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
5. Ogita, K., Suzuki, T. and Yoneda, Y. (1989) Neuropharmacol. 28, 1263-1270.
6. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Brain Res. 499, 305-314.
7. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. 164, 841-849.
8. Yoneda, Y., Ogita, K., Kouda, T. and Ogawa, Y. (1990) Biochem. Pharmacol. 39, 225-228.
9. Yoneda, Y., Ogita, K., Ohgaki, T., Uchida, S. and Meguri, H. (1989) Biochim. Biophys. Acta 1012, 74-80.
10. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T. (1990) J. Neurochem. 55, 237-244.

28

NMDAレセプター複合体に対するイフェンプロジルの作用

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〕
脳代謝異常改善薬であるイフェンプロジル(IFP)のN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)感受性レセプターに対する作用を検討した。活性化状態のNMDAチャネルを標識する[^{3}H]N-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine(TCP)、および[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)は、IFPにより著明に阻害され、そのHill係数は1.0より小さいことが判明した。トリトン処理膜標品への[^{3}H]MK-801結合において、IFPはグルタミン酸(Glu)存在下の結合を著明に阻害したが、グリシン(Gly)の添加によりその阻害能は減弱した。Glu存在下およびGlu/Gly共存下の結合速度および解離速度はIFPにより減少したが、平衡状態レベルには変化が見られなかった。またIFPは[^{3}H]MK-801結合のGlu、Glyおよびスペルミジン(SPD)による増強を抑制した。さらに、[^{3}H]Glu、[^{3}H](±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid(CPP)、[^{3}H]Gly、[^{3}H]DL-α-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionic acid(AMPA)および[^{3}H]カイニン酸(KA)のいずれの結合に対しても、IFPは著変を与えなかった。以上の結果より、IFPはNMDAチャネルに対する負のアロステリック効果を持ち、その薬理作用の少なくとも一部は、NMDA感受性レセプターを介して発現する可能性が示唆される。

IFPは、αアドレナリンレセプターのアンタゴニストとしての作用により、脳血管を拡張して脳虚血時などの脳代謝異常改善作用を発揮すると理解されている。一方、競合的および非競合的NMDAアンタゴニストは、様々な条件下で誘発される神経細胞壊死を防御することから、神経細胞壊死の発生にNMDA感受性レセプターの関与が推察されている(10)。このNMDA感受性レセプターは、イオンチャネル部位、NMDA認識部位、ストリキニーネ非感受性Gly認識部位(Gly_B部位)、およびポリアミンによる調節部位により構成される複合体であると考えられている(5,6,9)。本研究では、IFPの薬理作用の発現とNMDA感受性レセプターの関連性を明らかにする目的で、NMDA感受性レセプター複合体の各部位に対するIFPの作用を検討した。

〔実験方法〕
ラット全脳より調製した粗シナプス膜標品を、50,000g、30分間の遠心分離操作により1回洗浄した膜標品(非洗浄膜標品)、上記洗浄操作を3回行った後、使用時に2回洗浄した膜標品(未処理膜標品)、および使用時に0.08% Triton X-100で前処理した膜標品(トリトン処理膜標品)の3種類に分類して結合実験に供した。[^{3}H]MK-801(7)および[^{3}H]-TCP結合実験(2)は、上記のいずれかの膜標品と5 nM の各放射性リガンドを、30℃、30分間反応させて行った。また、トリトン処理膜標品を用いた[^{3}H]MK-801結合実験は、10 μM Gluあるいは10 μM Gluおよび10 μM Glyを添加して測定した。[^{3}H]Glu(4)、[^{3}H]CPP(8)、[^{3}H]Gly(3)、[^{3}H]AMPA(1)、および[^{3}H]KA結合は、トリトン処理膜標品と10 nMの各放射性リガンドを、2℃で10分間あるいは30分間反応させて測定した。反応はいずれも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。

〔結果〕
非洗浄膜標品を用いて、[^{3}H]MK-801結合に対する種々のαアゴニストおよびアンタゴニストの影響を検討したところ、用いた薬物の中でIFPが最も強力に結合を阻害した(表1)。また、IFPは未処理膜標品への[^{3}H]MK-801および[^{3}H]TCPの両結合を10^{-7} M以上の濃度で濃度依存的な阻害し、そのIC$_{50}$値はそれぞれ1.47±0.58 μMおよび1.25±0.51 μMであった(図1)。そのHill係数は1.0よりも小さく、負の協同性を示すことが判明した(Hill係数: [^{3}H]MK-801結合 ;0.37±0.06, [^{3}H]TCP結合; 0.45±0.12)。次いで、トリトン処理膜標品を用いて検索を進めたところ、Glu存在下の[^{3}H]MK-801結合に対するIFPの阻害能は、未処理膜標品の場合と同様であったが、Glu/Gly共存下の結合に対する阻害能は、Glu単独存在下の場合に比べて有意に減少した(IC$_{50}$値(μM): Glu存在下; 1.83±0.75, Glu/Gly共存下; 36.6±10.9)。またIFPは、Glu存在下およびGlu/Gly共存下の見かけ上の結合速度定数を有意に減少させたが、結合の平衡状態レベルには影響を与えなかった。さらにIFPは、Glu存在下およびGlu/Gly共存下の解離速度をともに減少させることが明らかとなった。[^{3}H]MK-801結合に対するGluおよびGlyの増強作用は、IFPの添加(10^{-6}-10^{-4} M)

表1．　α－アゴニストおよびアンタゴニストの影響

Drugs (10^{-4} M)	[^{3}H]MK-801 binding (% of control)
Phenylephrine	92.3±3.1
Clonidine	91.8±2.7
Ifenprodil	41.9±3.1 **
Prazosin	96.4±3.6
Yohimbine	80.4±2.3 **
Phenoxybenzamine	88.4±1.4 **

図1．　IFP の阻害作用

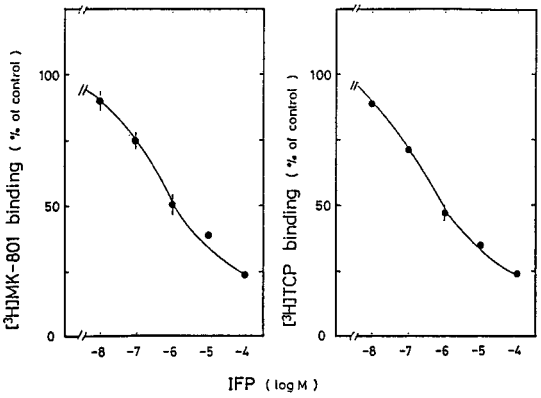
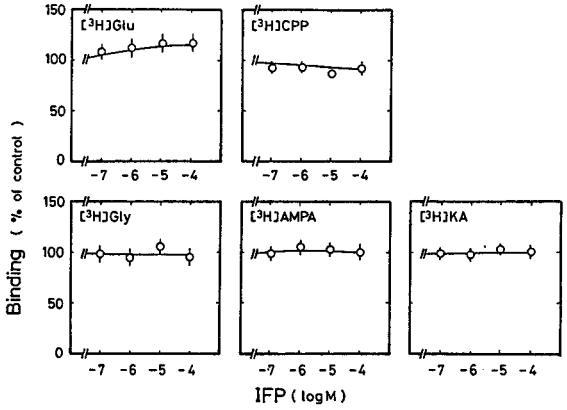


図2．　各種結合に対するIFP の影響



により非競合的に阻害された。また、SPDの増強作用もIFPの添加により抑制された。IFPは、[^{3}H]Glu、[^{3}H]CPP、[^{3}H]Gly、[^{3}H]AMPAおよび[^{3}H]KAのいずれの結合に対しても著変を与えなかった(図2)。

〔考察〕

IFPが[^{3}H]MK-801結合に対して著明な阻害作用を示すことから、IFPの脳代謝異常改善作用などの薬理作用の少なくとも一部は、NMDAチャネルの阻害により発揮される可能性が示唆される。IFPが、[^{3}H]Glu、[^{3}H]CPPおよび[^{3}H]Gly結合に対して影響を与えないことから、IFPの作用はNMDA認識部位やGly$_S$部位を介したものでないことは明白である。また、IFPのHill係数から、IFPは負のアロステリック効果により[^{3}H]MK-801結合を阻害していると考えられる。今後、このIFPとNMDAチャネルとの相互作用についての詳細な解析が望まれる。

〔文献〕

1. Murphy, D.E., Snowhill, E.W. and Williams, M. (1987) Neurochem. Res. 775-782.
2. Ogita, K., Suzuki, T., Enomoto, R., Ohgaki, T., Katagawa, J., Uchida, S., Meguri, H. and Yoneda, Y. (1990) Neurosci. Res. in press.
3. Ogita, K., Suzuki, T. and Yoneda, Y. (1989) Neuropharmacol. 28, 1263-1270.
4. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
5. Wroblewski, J.T. and Danysz, W. (1989) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 441-474.
6. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1990) Neurosci. Res. in press.
7. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Brain Res. 499, 305-314.
8. Yoneda, Y., Ogita, K., Kouda, T. and Ogawa, Y. (1990) Biochem. Pharmacol. 39, 225-228.
9. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T. (1988) Neurotransmitter: Focus on Excitatory Amino Acids (Kanazawa, I., ed.), pp. 47-65, Excerpta Medica, Tokyo.
10. 米田幸雄、荻田喜代一 (1988)　神経精神薬理　10, 139-157.

29 shiverer及びjimpyマウスにおけるミエリン特異的蛋白質遺伝子の転写活性

塩田千代、池中一裕、御子柴克彦
（大阪大・蛋白研・機能制御部門）

〔要約〕
ミエリン形成不全を呈する shiverer 及び jimpy 突然変異マウスにおける proteolipid protein（ＰＬＰ）とミエリン塩基性蛋白質（myelin basic protein: ＭＢＰ）遺伝子の転写活性を nuclear run-off assay によって定量した。正常マウスではこれらミエリン特異的蛋白質遺伝子の転写活性はミエリン形成の開始とともに上昇し、生後 18 日目をピークとして以後ミエリン形成の完了に伴って低下した。ＭＢＰ遺伝子に大きな欠失がある shiverer マウスでは、ＭＢＰの転写活性は生後 90 日目まで上昇を続け、ＰＬＰの転写活性も生後 18 日目以降減少傾向にあるものの減少の程度は小さかった。shiverer マウスではミエリン形成が不完全なため成熟後も高い転写活性が維持されるものと考えられた。ＰＬＰ遺伝子に異常のある jimpy マウスでは、ＭＢＰの転写活性は著しく低下しており、これはミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの変性脱落によるものと考えられた。一方、ＰＬＰの転写活性はオリゴデンドロサイトの減少にもかかわらず正常の 40～75% 認められ、オリゴデンドロサイト以外の細胞でＰＬＰ遺伝子が転写されている可能性が示唆された。

proteolipid protein（ＰＬＰ）とミエリン塩基性蛋白質（myelin basic protein: ＭＢＰ）はともに中枢神経系の主要構成成分で、これらの蛋白質の欠失あるいは変性は shiverer 突然変異マウスや jimpy 突然変異マウスなどに見られるように重篤なミエリン形成不全を引き起こす。我々はこれまでに shiverer 及び jimpy 突然変異マウスにおけるこれら両蛋白質の遺伝子発現を in situ hybridization 法で組織化学的に解析してきたが[1]、さらに nuclear run-off assay を行って、転写活性を定量・解析したので報告する。

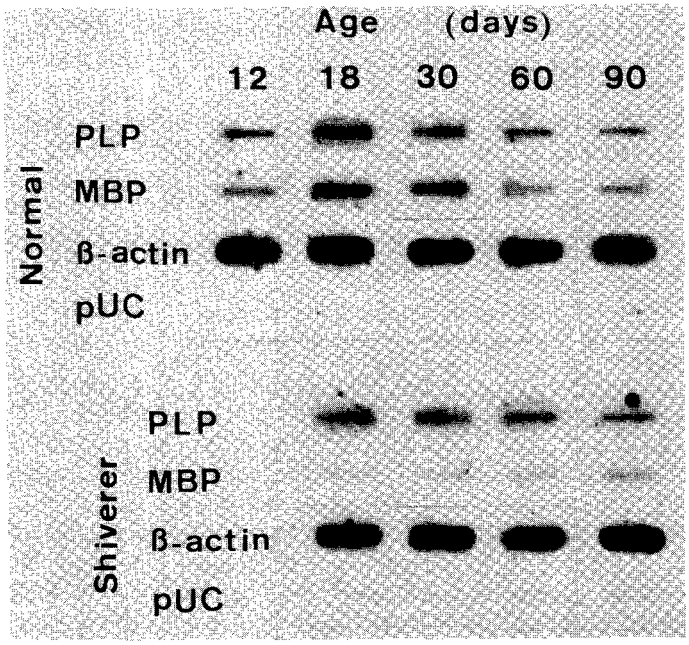
【材料及び方法】

実験には生後 12、18、30、60、90 日目の shiverer 突然変異マウスと、生後 12、25 日目の jimpy 突然変異マウスを用いた。対照には同日齢の BALB/c マウスを用いた。細胞核は各々のマウスの脳から Marzluff と Huang の方法[2]に準じてショ糖密度勾配遠心法にて調製した。nuclear run-off assay は Greenberg と Ziff の方法[3]に 従っておこなった。^{32}Ｐで標識されたＲＮＡは“Quick Spin”カラム（Boehringer-Mannheim）を用いて精製した後、ニトロセルロース膜上の ラットＰＬＰ ｃＤＮＡ（ｐ27、Sutcliffe 博士より譲渡）、マウス 14 kd ＭＢＰ ｃＤＮＡ（ｐＭＢＰ－２）、ニワトリ β-actin ｃＤＮＡ（ｐＡ１） 及び ｐＵＣ ＤＮＡとハイブリダイズさせた。転写活性の定量はオートラジオグラムのデンシトメトリーによった。

【結果及び考察】

正常マウスでは、ＰＬＰ、ＭＢＰ いずれの転写活性もミエリン形成開始とともに著しく増加し、生後 18 日目をピークとして以後低下し、生後 90 日目の転写活性は 18 日目のそれの 20－30% であった（図 １）。ＭＢＰ遺伝子に欠失がある shiverer マウスではＭＢＰの転写は生後 90 日目まで増加し続けた（図 １）。なお、本実験では、ＭＢＰ ＲＮＡ の検出には、エクソン 1,3,4,5 及び 7 からなる 14 kd ＭＢＰ ｃＤＮＡ を用いたが、

shiverer のＭＢＰ遺伝子はエクソン 3 から 7 を欠失しているので、shiverer マウスにおけるＭＢＰの転写活性を正常マウスのそれと比較することはできなかった。 shiverer マウスにおけるＰＬＰの転写活性は、生後 18 日目では正常マウスに比べて低いが、成熟に伴う減少の程度が小さいために、生後 60、90 日目では正常マウスよりむしろ高かった（図 1）。 正常マウスではミエリン形成の完了とともにＰＬＰ、ＭＢＰの転写活性が低下するが shiverer マウスではミエリン形成が不完全なために、成熟後もこれらミエリン特異的蛋白質遺伝子の高い転写活性が維持されるものと考えられる。 一方、ＰＬＰ遺伝子に１塩基の置換があり、異常なＰＬＰを合成している jimpy マウスでは、ＭＢＰの転写は生後 12 日目、25 日目いずれにおいても認められなかった（図 2）。 これは jimpy マウスではミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトが変性脱落のために著しく減少しているためと考えられる。 しかしながら、オリゴデンドロサイトの減少にもかかわらず jimpy におけるＰＬＰの転写活性は生後 12 日目では正常の 75%、生後 25 日目では 44% であった。 この結果は、ＰＬＰ遺伝子がオリゴデンドロサイト以外の細胞、たとえばアストロサイトなどの細胞でも転写されている可能性を示唆する。



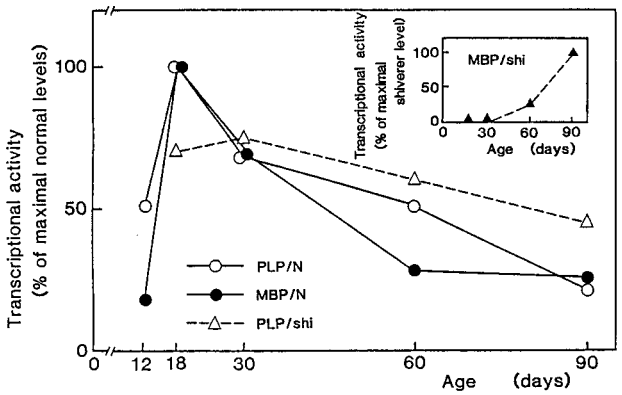


図 1　shiverer(shi)及び正常マウス(N)における ＰＬＰ，ＭＢＰの転写活性。 nuclear run-off assayのオートラジオグラム(上図)と、デンシトメトリーによる定量結果(下図)。

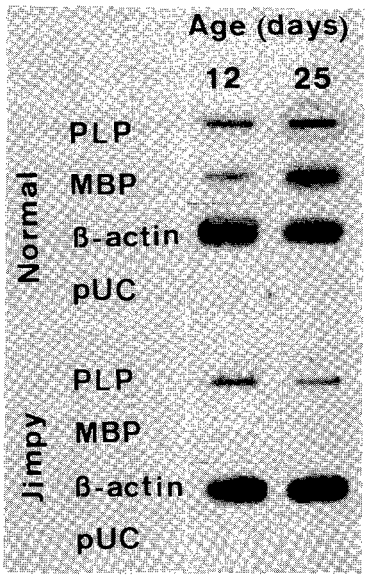


図 2　jimpy における ＰＬＰ，ＭＢＰの転写活性。

【文献】(1)Shiota, C. et al. (1988)神経化学 27、44.
(2)Marzluff, W. F. et al. (1984) in Transcription and translation. IRL press, Oxford.
(3)Greenberg, M. E. et al. (1984) Nature 311、433.

30 Myelin-Associated Glycoprotein (MAG) の蛋白分解に関する研究

佐藤修三、藤田信也、石黒英明、犬塚　貴、宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科）

〔要約〕 myelin-associated glycoprotein(MAG)は ミエリンと神経軸索との相互作用上重要な分子と考えられており、ヒトの脱髄疾患との関連でも重要な役割を担っていると考えられている。MAGはミエリン内因性プロテアーゼにより分子量約100KDaから90KDaまで限定分解を受け、ミエリン膜から遊離することより、分解を受ける部分は細胞質側のC末端であろうと予測されていた。またMAGにはlarge form(L-MAG)と small form(S-MAG)の２種類のisoformが知られており、それらはalternative splicing によりC末端のアミノ酸配列が異なっていることが明かにされている。ここではそれぞれのC末端の配列に基づいた合成ポリペプチドにて抗体を作製し、ヒトおよびマウスのMAG蛋白の発現と分解について分子レベルで検討した。限定分解を受けたMAGはC末端に対する抗体では認識されず、C末端を欠いていることが明かにされた。ヒトのMAGは抗L-MAG抗体によってのみ認識された。マウスのMAGの分解はL-MAGよりS-MAGの方が速やかであった。

myelin-associated glycoprotein(MAG) は中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)のミエリンに特異な糖蛋白で、含有量は微量だがミエリンと神経軸索との相互作用上重要な分子と考えられている。ヒトの脱髄疾患との関連では、多発性硬化症（ＭＳ）の患者脳内の脱髄巣周辺にて、他のミエリン蛋白に比べてMAGが最も減少していること(1)、またM蛋白血症を伴った多発性神経炎患者のM蛋白そのものがモノクローナル抗MAG抗体であった(2)ことなどより、MAGがヒトの脱髄疾患において重要な役割を担っていると考えられている。われわれはMAGがミエリン内因性プロテアーゼにより限定分解を受けミエリン膜から離脱すること(3)、さらにこの反応がＭＳ患者脳のミエリンでは促進していることなどを報告してきた(4)。またMAGにはlarge form(L-MAG)と small form(S-MAG)の２種類のIsoformが知られており、それらはalternative splicing によりC末端のアミノ酸配列が異なっていることが明かにされている(5)。ここではMAGの発現と分解に関して分子レベルでの詳細を明かにするため、合成ペプチドによる抗体などを用いて検討した。

＜方法＞

１）合成ペプチドによるL-MAGとS-MAGに対する特異抗体の作製：cDNAクローニングにより得られた塩基配列から予測されたL-MAG に特異なＣ末端21個のアミノ酸からなるポリペプチド、およびexon12内のs-MAGにのみ存在する10個のアミノ酸配列を基にしたポリペプチドを、ABIのペプチド合成機を用いて合成した。これらの精製物と牛血清アルブミンをグルタールアルデヒド法にて結合させ、Freundの完全アジュバントと共に家兎に免疫し抗血清を得た。

２）抗L-MAG抗体および抗S-MAG抗体とL-MAGおよびS-MAG に特異なポリペプチドを各種の組み合わせにて混合し、吸収試験を行いimmunoblotにて検定した。

３）ヒトおよびマウス脳よりNortonらの方法に従ってミエリンを精製した後、10mM Tris-HCl バッファー(pH7.4)に浮遊し、インキュベートした。浮遊液を凍結乾燥し、11%ポリアクリルアミドにて電気泳動した後、ニトロセルロース膜にブロットして各種の抗MAG抗体にて免疫染色した。

＜結果＞

１）抗L-MAG抗体はL-MAGに特異な配列の合成ポリペプチドによってのみ、抗S-MAG抗体はS-MAGに特異な配列の合成ポリペプチドによってのみ、それぞれ吸収され、それぞれの抗体の特異性が証明された。

２）ミエリン浮遊液のインキュベーションによって、MAGは約100KDaから90KDaまで分子量が減少した(derivative of MAG:dMAG)。このdMAGは精製MAGつまりMAG分子全体で免疫して作製した抗体によっては染色されたが、抗L-MAGおよび抗S-MAG抗体では全く染色されなかった。

３）ヒトのCNSミエリンのimmunoblotでは、抗L-MAG抗体ではMAGが染色されたが抗S-MAG抗体では、全く染色されるバンドはみられなかった。

４）マウスのCNSミエリンでは、インキュベーションによるMAGの限定分解は、L-MAGよりS-MAGの方が速やかであった。

５）ヒトの白質脳症のうち、病因不明のズダン好性白質脳症の１例にて、in situにdMAGが存在していた。

＜考察＞

これまでの研究にてcalcium activated neutral protease(CANP)がミエリン内に存在することが確認されており(5)、プロテアーゼ阻害剤による研究などにてMAGをdMAGまで限定分解する酵素はCANPであろうと考えられている。dMAGがミエリン膜より離脱することより、MAGの分解を受ける部分は細胞質側のC末端であり、dMAGはC末端約10KDaが欠損した分子であろうと予測されていたが、実証されてはいなっかった。今回MAG分子のC末端を認識する抗

体を用いたimmunoblotによる検索ではdMAGは全く検出されず、dMAGにはMAG分子のC末端が存在しないことを明かにした。白質脳症の一部にてin situにdMAGが存在することは、MAGのC末端の欠損がミエリン形成障害や脱髄の機序に関与している可能性を示した。

<文献>

(1)Johnson,D.,Sato,S.,Quarles,R.H et al.(1986) J.Neurochem.46,1086-1093.
(2)Braun,P.E.,Frail,D.E, & Latov,N. (1982) J.Neurochem.39,1261-1265.
(3)Sato,S., Quarles,R.H. & Brady,R.O. (1982) J.Neurochem.39.97-105.
(4)Sato,S.,Quarles,R.H.,Brady,R.O. et al.(1982) Ann.Neurol. 15,264-267.
(5)Yanagisawa,K., Sato,S., O'Shannessy,D.J. et al.(1988) J.Neurochem.51,803-807.

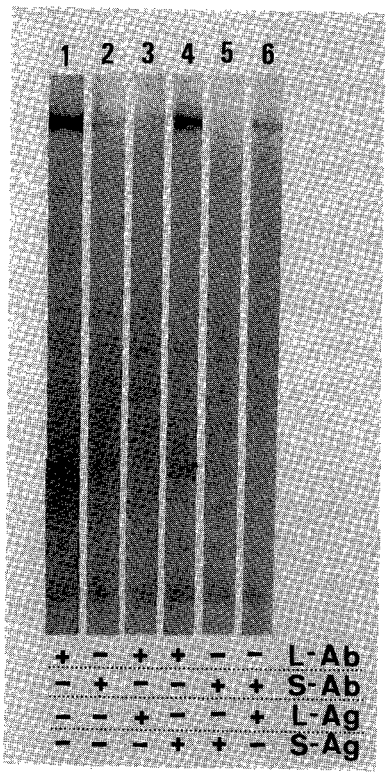


図1：抗L-MAG抗体(L-Ab)、抗S-MAG抗体 (S-Ab)のL-MAG特異合成ポリペペプチド(L-Ag)及びS-MAG特異合成ポリペプチド(S-Ab) による吸収。

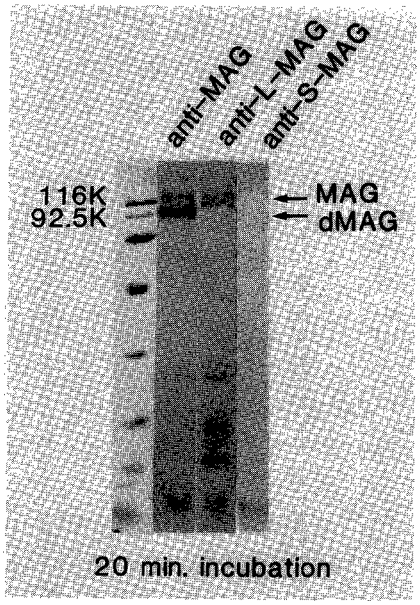


図2：ヒト脳の精製ミエリンを10mM Tris-HClbuffer中でインキュベーション し、ポリアクリルアミドにて電気泳動後ニトロセルロース膜にブロットし各種抗MAG抗体にて免疫染色したもの。

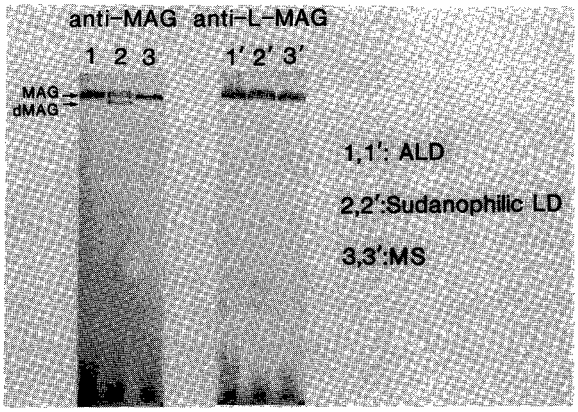


図3：各種白質脳症患者脳の白質のホモジネートを電気泳動後MAG分子全体に対する抗体(anti-MAG)及びL-MAGに特異な合成ポリペプチドに対する抗体(anti-L-MAG)で免疫染色したもの
ALD(adrenoleukodystrophy),MS(multiple sclerosis).

31 Myelin-associated glycoprotein (MAG) isoform の中枢および末梢神経系の発達における発現変化

犬塚 貴、藤田信也、佐藤修三、中野亮一、石黒英明、馬場広子、宮武 正
(新潟大学・脳研究所・神経内科)

〔要約〕
Myelin-associated glycoprotein(MAG)は、ミエリンと神経軸索との相互作用に重要な役割を担っていると考えられている(1)。マウスにおいて MAGは一つのMAG遺伝子からalternative splicing の機構により L-MAGと S-MAGの2種類の isoform がつくられる(2)。我々はL-MAG とS-MAG をそれぞれ特異的に認識する抗体を作り(3)、中枢および末梢神経系(CNS,PNS)の発達における発現の変化を蛋白レベルで調べた。これまで PNSでの L-MAGは CNSと異なり in vitro translation、 Northern blotting、Western blottingで検出されないか(4)、検出されてもごく僅かで(5) L-MAG蛋白のPNSでの発現は確認されてなかった。 今回特異的抗体を用いた免疫ブロット法で L-MAGは CNSと同様 PNSでも S-MAGに先行してミエリン形成が盛んな時期に出現することを明らかにした。しかしその出現は CNSと異なり生後5日目に単峰性のピークを示した。我々は既に、ミエリン形成不全を呈する quaking mouse で L-MAGが CNSで殆ど検出されず、ミエリン形成に際しL-MAGが何らかの重要な役割を果たしている可能性を報告しており(6)、今回の結果から PNSでもL-MAGの同様な役割が推察される。

(はじめに)
Myelin-associated glycoprotein(MAG)は、ミエリンと神経軸索の接着分子の役割を担っていると考えられている(1)。マウスにおいては一つの MAG遺伝子からexon12のalternative splicingの機構により終止コドンのあるexon12を含む mRNAからは分子量67kDaのsmall MAG(S-MAG)が、含まないmRNAからは分子量72kDaのlarge MAG(L-MAG)ポリペプチドが作られる(2)。中枢神経系(CNS)ではL-MAGのmRNA がS-MAGのmRNAに先行してミエリン形成の盛んな時期にピークとなることが知られている(4,5)。またミエリン形成不全を呈する quaking mouseで L-MAGのmRNAおよび蛋白が CNSで殆ど検出されないことが報告されており(3,6)、ミエリン形成に際してL-MAGの重要な役割が示唆されている。 末梢神経系(PNS)では CNSと異なり L-MAGは in vitro translation、Northern blotting、 Western blottingで 検出されないか(4)、されてもごく僅かで(5)L-MAG蛋白は確認されていない(7)。今回 L-MAGと S-MAGをそれぞれ特異的に認識する抗体を作製して CNSおよび PNSの発達におけるそれぞれの発現を検討した。

(方法)
1.合成ペプチドによる抗体の作製:MAG cDNAの塩基配列から予測されるL-MAGのC末端21個のアミノ酸からなるペプチド及び exon12に相当する部分の10個のアミノ酸のN末端にLysを付加したペプチドを、ABIのペプチド合成機を用いて作成した。
これらのペプチドと牛血清アルブミンを1%グルタールアルデヒドの存在下でかくはんし、Freundの完全アジュバンドと共に家兎に数回免疫した。 得られた血清をそれぞれ抗L-MAG抗体、抗S-MAG抗体とし免疫ブロット法に用いた。
2.実験動物:生後各時期(3d<10>,5d<10>,8d<10>,10d<8>,15d<5>,20d<4>,30d<4>40d<4>,180d<3>,<匹数>) の ddYマウスから座骨神経と脳幹を摘出し、ホモジネートをつくり凍結乾燥した。
3.免疫ブロット法:試料をSDS-PAGEで分離し電気的にニトロセルロース膜に移し抗L-MAG抗体(800倍希釈)、抗S-MAG(300倍希釈)を一次抗体とし、ペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG(H&L)(300倍希釈)を二次抗体とし4-chloro-1-naphtol で発色した。発色バンドをデンシトメトリーして最高値を100として経時的に表示した。

(結果) Fig.1
L-MAGはマウスの CNS、PNS共にS-MAGに先行してミエリン形成が盛んな時期に出現した。ピークはCNSでは生後15日、PNSでは生後5日であった。 CNSではピーク後も高いレベルが持続したが、PNSでは減少して低値となった。 S-MAGは

L-MAGに引き続いて出現しCNSでは生後15-20日に急な立ち上がりをみた後加齢に伴い増加した。PNSでは生後5日から急増し15日にピークとなり180日ではその80%となった。

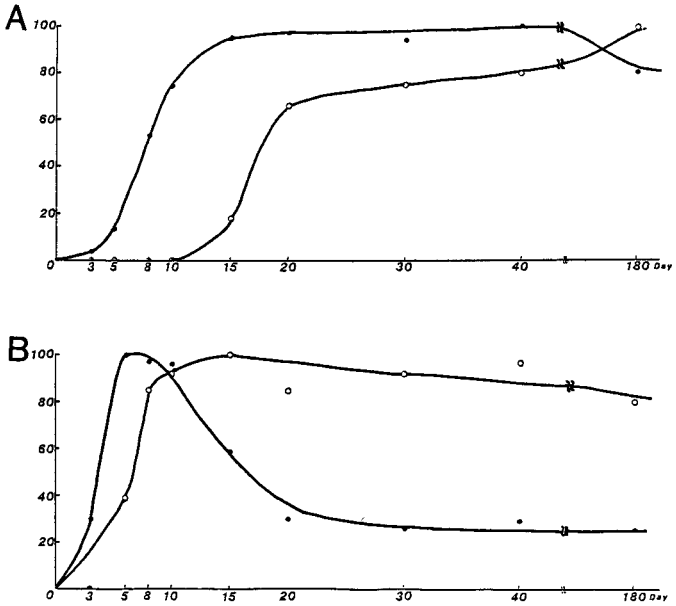
(考案)

マウス CNSでの L-MAG,S-MAG蛋白の発現は、これまで報告されてきたそれぞれの mRNA の動きを反映するものであった。L-MAGの mRNAは脊髄で16日付近でピークなり減少するが(5) L-MAG 蛋白は180日でもピークの80%と高く蓄積効果があると考えられる。S-MAGのmRNA はL-MAGのmRNA に遅れて出現した後増加しており、S-MAG蛋白の経時的増加に反映していると思われる。PNSでのL-MAGについては、生後10日ラットの座骨神経を用いた in vitro translationで検出されてない(4)。Tropakら(5)は生後2-10日ラット座骨神経を用いたNorthern blottingで僅かに検出しているが Norohnaら(7)の抗L-MAG monoclonal抗体ではL-MAG蛋白は確認されなかった。今回我々の作成した抗L-MAG抗体はPNSにおける生後5日での一過性のピークを捕らえることができた。L-MAGは リン酸化部位があり、CNSでもPNSでも S-MAGに先行して発現しており、またミエリン形成不全を呈する quaking mouseで L-MAGが CNSで殆ど検出されず(3,6)ミエリン形成に何らかの重要な役割を果している可能性がある。マウスでは CNS,PNS 共にMAGのisoformの分子量が近似しており、これまでL-MAGとS-MAG を区別してそれらの変化を評価することは困難であったが、我々の作成した各isoformに対する特異的抗体はミエリンの発達や再生の研究に有用と思われる。

(文献)

1)Quarles RH. Dev.Neurosci.6,285-303,1984
2)Lai C. et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,4337-4341,1987
3)Fujita N. et al. J.Neurochem.(in press)
4)Frail DE. et al. J.Neurochem.45,1308-1310,1985
5)Tropak MB. et al. Mol.Brain Res.4,143-155,1988
6)Fujita N. et al. FEBS Lett.232,323-327,1988
7)Noronha AB. et al. J.Mol.Neurosci.1,159-170,1989

Fig. 1 CNS (A), PNS (B) におけるL−MAG(closed circle)とS−MAG(open circle)蛋白の発達による発現変化。最大値をとる時点を１００として表示した。



32 マウスミエリン塩基性蛋白質の新しいアイソフォームの検出

有賀　純，岡野栄之，御子柴克彦
（大阪大　蛋白研・機能制御）

〔要約〕

中枢神経系ミエリンの主要な構成蛋白質であるミエリン塩基性蛋白質にはマウスでは現在まで５種のアイソフォームの存在が知られていた。我々はPCR法により新たに２種のアイソフォームcDNAの単離に成功した。このcDNAは今まで知られていなかったエキソン(exon 5a)を含んでおり19.7kD、21kDの分子をコードすることが推定された。このエキソンは脊髄に比較的多く存在し、valineに富む疎水性の領域を形成することが明らかになった。

ミエリン塩基性蛋白質(MBP)は中枢神経系ミエリンの主要な構成蛋白質であり、ミエリンのcompactionに関わる分子と推定されている。マウスのMBP遺伝子は７個のエキソンによりコードされ、約30kbの領域にわたる(1,2)。近年、分子生物学的手法を用いた研究により、マウスで５種のmRNAの存在が確認されてきた(2,3,4,5)。それらはexon 2, 5, 6の選択的使用(alternative splicing)により生成される（図１A）。一方、immunoblotによる解析からさらに分子量の異なるアイソフォームの存在することが示されている(6)。今回、我々はPCR法を応用したcDNAクローニングにより新しいアイソフォームを探索した。その結果、未知のエキソンを含む２種のアイソフォームを見いだし、その構造、分布について検討したので報告する。

［実験方法］

1.cDNA合成およびPolymerase Chain Reaction (PCR)　BALB/cマウスの脊髄より抽出したRNAに対して逆転写反応、PCRをFrohmanら(7)の方法に従って行った。PCRに用いたプライマー（図１A）は以下の通りである。

NCO1; 5'-CAAGTACCATGGACCATGA-3'、NCO7; 5'-GTCTCGCCATGGGAGATCC-3'。

2.Southern blotting およびクローニング　PCR の産物は5%ポリアクリルアミド電気泳動の後、電気的にナイロンフィルターにトランスファーし、マウスMBPのエキソン3を含むプローブとハイブリダイゼーションを行った。目的のDNA断片をゲルより切り出し、NcoIサイトを持つように改変されたBluescriptベクターに挿入した。塩基配列の決定はSangerらのdideoxy法(8)に従って行った。

3.RNase protection　MBP遺伝子のエキソン5a、5bを含むプローブをT7 RNA polymeraseにより合成した。RNase protectionはMeltonら(9)の方法に従って行った。

［結果及び考察］

MBPのcDNAを特異的に増幅するためにMBP遺伝子のexon 1および7の塩基配列をもとにしたプライマーを合成し（図１A中のNCO1,NCO7）、マウス脊髄cDNAをtemplateとしてPCRを行った。このPCR産物を　Southern blot解析した結果（図１B）、340bp、420bp、460bp、540bpの4本の主要なバンドが認められ、これらはそれぞれ、14kD、17kD(2 types)、18.5kD、21.5kD MBP cDNAに対応するものと考えられた。更に510bp付近に弱いバンドが検出され、これは未知のcDNAに由来するものであろうと推測された。このバンドに相当する部分のDNA断片をプラスミドにクローン化し解析した。このうち2クローン(pMBP20、pMBP21)は制限酵素地図の解析から既知のMBP cDNAに対応しないことが明らかとなった。これらのクローンの塩基配列を決定したところ、由来不明の66bpの配列が従来の17kDタイプ(pMBP20)、18.5kDタイプ(pMBP21)のexon 4とexon 5の間に挿入されていることが判明した（図２）。この配列の挿入は従来のMBPのreading frameをくずさず、推定分子量19.7kD、21kDのMBPのアイソフォームをコードすることが考えられた。

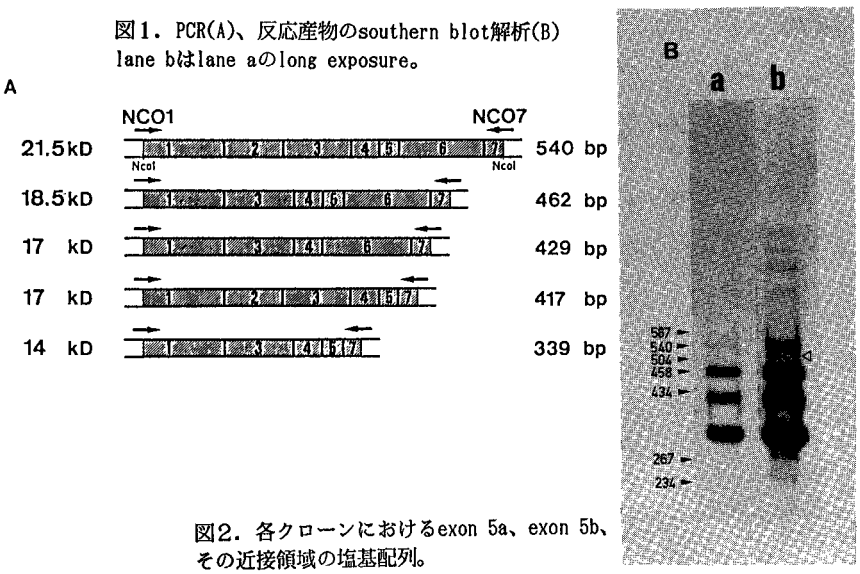
この配列は22アミノ酸残基よりなる疎水性の領域をコードし、Chou and Fasman(10)のアルゴリズムからはbeta-sheet構造をとることが予測された。18.5kDタイプのMBPでは５個の疎水性の領域が存在しこれらがanti-parallel型

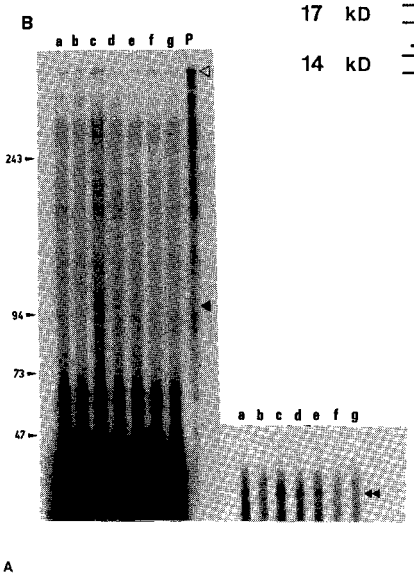
のbeta-sheet構造をとることが予測されており(11)、この配列が加わることにより大きな構造上の変化は起きないのではないかと推測された。

次にこの66bpの配列の由来を検討した。MBP遺伝子を含むクローン（cosBJAB15(12)）よりexon 5ならびにその隣接領域を含むDNA断片をサブクローン化し、その塩基配列を決定した。その結果この配列は従来のexon 5の5'側に隣接して位置することが明らかとなった（図2）。我々はこの66bpの配列をexon 5aと命名し、従来のexon 5をexon 5bと呼んで区別することにした。またexon 5aの5'隣接領域の塩基配列(TGTTGGTTTCAG:GAC)は、真核細胞生物のスプライシングのコンセンサス配列と一致していた。

exon 5aを持ったmRNAが神経組織中に存在していることを確認するためにRNase protection解析を行った。exon 5a, 5b、ならびにその隣接領域を含むアンチセンスRNAプローブを合成し、マウス全脳、脊髄、坐骨神経より抽出したtotal RNAに対し、RNase protectionを行った（図3）。exon 5a+5b （◀）、exon 5b (◀◀) に対応するバンドが認められた。exon 5aは脊髄にやや多く存在し、全神経組織中に存在している可能性が高いと考えられた。

図1. PCR(A)、反応産物のsouthern blot解析(B)
lane bはlane aのlong exposure。





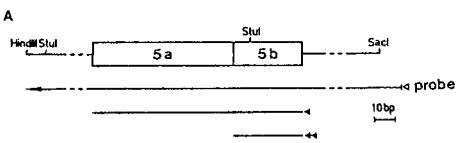


図3. RNase protectionによるexon 5aを持った転写産物の検出。(A)使用したプローブ。(B)右図は左図の下の部分のshort exposure。5ug(lanes a、c、e)または1ug(lanes b、d、f)の全脳(lanes a、b)、脊髄(lanes c、d)、坐骨神経(lanes e、f)のtotal RNA、yeast tRNA(lane g)を用いた。lane Pは未消化のプローブ。 ◀ ;exon 5a+5b、◀◀;exon5bに対応するprotected band。

図2. 各クローンにおけるexon 5a、exon 5b、その近接領域の塩基配列。

```
                exon 4                          exon 5a
MBP 17kD cDNA   TCCCAAGGGAAG----------------------------------------------------
                ::::::::::::
pMBP20          TCCCAAGGGAAGGACTTTGTCCCGGGCGATCACCACGTCAATGTTTCTGTCGTCACTGTTTCT
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pMBP21          TCCCAAGGGAAGGACTTTGTCCCGGGCGATCACCACGTCAATGTTTCTGTCGTCACTGTTTCT
                          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
MBP gene        TGTTGGTTTCAGGACTTTGTCCCGGGCGATCACCACGTCAATGTTTCTGTCGTCACTGTTTCT
product                   AspPheValProGlyAspHisHisValAsnValSerValValThrValSer

                exon 5a                 exon 5b                 exon 7
MBP 17kD cDNA   ---------------GGGAGAGGCCTGTCCCTCAGCAGATTTAGCTGGGGAGGAAGAGAC
                               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pMBP20          TTCTCTTCCTCACAGGGGAGAGGCCTGTCCCTCAGCTGATTAGCTGGGGAGGAAGAGAC
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::  exon 6
pMBP21          TTCTCTTCCTCACAGGGGAGAGGCCTGTCCCTCAGCAGATTTAGCTGGGGGGCCGAGGGG
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
MBP gene        TTCTCTTCCTCACAGGGGAGAGGCCTGTCCCTCAGCAGATTTAGCTGGGTAGGTGATGAC
product         PheSerSerSerGlnGlyArgGlyLeuSerLeuSerArgPheSerTrp
```


（文献）
1) Takahashi,N. et al.(1985) Cell 42,139.
2) deFerra,F. et al. (1985) Cell 43,721.
3) Zeller,N. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 42,139.
4) Mentaberry,A. et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83,1111.
5) Newman,S.L. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84,886.
6) Campagnoni,A.T. (1988) J.Neurochem. 51,1.
7) Frohman,M.A. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85,8998.
8) Sanger,F. et al. (1980) J. Mol. Biol. 143,161.
9) Melton,D.A. et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12,7035.
10)Chou,P.Y. and Fasman,G.D. (1978) Adv. Enzymol. 47,45.
11)Stoner,G.L. (1984) J.Neurochem. 43,433.
12)Okano,H. et al. submitted.

33 末梢神経ミエリン特異蛋白質P_0のDRGニューロン軸索突起伸展に及ぼす効果

矢崎貴仁*, 三浦正幸, 阿相皓晃, 星 道生, 戸谷重雄*, 植村慶一
(慶應大・医・生理, 脳神経外科*)

〔要約〕

P_0蛋白質は, 末梢神経ミエリン蛋白質の50%以上を占める主要膜糖蛋白質であり, 最近その細胞接着因子としての機能が注目されている。今回われわれは, P_0遺伝子導入C6グリオーマ細胞及びマウス後根神経節(DRG)ニューロンを用い, P_0の神経軸索突起伸展に及ぼす役割につき検討を行った。rat P_0 cDNAの全長を, β-アクチンプロモーター下流に挿入し, P_0発現ベクターを構築した後, リン酸カルシウム法を用いてC6グリオーマ細胞に導入した。免疫組織学的スクリーニングを行い, 発現量の多いものを選択, クローン化し, 更にWestern blot法により膜分画でのP_0の発現を確認した。P_0導入C6グリオーマ細胞をフィーダーとしてDRGニューロンを培養し, その軸索突起伸展について解析した。P_0遺伝子を導入していないC6グリオーマ細胞をフィーダーとした対照に比べ, P_0遺伝子を導入したC6グリオーマ細胞をフィーダーとした群では, DRGニューロンの軸索突起伸展が促進された。

〔はじめに〕

P_0は, 末梢神経ミエリン蛋白質の50%以上を占める主要膜糖蛋白質(28K)で[5], cDNAクローニングおよび蛋白質化学的解析により, ラット[8]・ウシ[11]・トリ[2]・サメ[10]において, 全アミノ酸配列が決定されている。この蛋白質は, ミエリン形成の初期に塩基性蛋白質に先立って出現し[3], ミエリンの多重層形成と維持に重要な役割を果たす。又, ホモフィリックな結合様式により細胞膜同士の接着に関与することが証明された[4][9]。今回, P_0遺伝子導入C6グリオーマ細胞のフィーダー上に, DRGニューロンを培養し, その軸索突起伸展に及ぼすP_0の効果について検討を加え, その結果P_0遺伝子導入細胞において軸索突起伸展の促進が観察された。

〔材料及び方法〕

(1) 培養: C6グリオーマ細胞は, Dulbecco's MEM, 10% FCSで培養した。DRGニューロンは, マウス生後4日目の脊髄より単離した。

(2) P_0発現ベクターの構築: pβAct STneoにrat P_0 cDNA (G. Lemke博士より譲渡)を挿入, P_0発現ベクターを構築した。上流にあるβ-アクチンプロモーターに対して, rat P_0 cDNAが正方向に入ったベクターを, pβAct P_0, 逆方向に入ったベクターをpβAct P_0'と命名した(Fig.1)。これらは, 同一プラスミド上に, SV40プロモーターで発現するネオマイシン耐性遺伝子をもっており, G418による遺伝子導入クローンの選別を可能にしている。

(3) 遺伝子導入: P_0発現ベクターは, リン酸カルシウム法により, C6グリオーマ細胞へ導入した。導入後, 安定な形質転換株を得るため, G418 (600 μg/ml)による選別を行った。

(4) 免疫組織化学: 1次抗体としてanti bovine P_0, 2次抗体としてFITC conjugated anti rabbit IgGを用いた蛍光抗体法, 及び2次抗体にanti rabbit IgG Peroxidase (HRP)を用いたPAP法により, P_0発現の確認を行った。

(5) Western blot: 細胞をラバーポリスマンで回収した後, 粗核画分と膜画分を得た。12.5% SDS-PAGE[7]にて電気泳動後, 1次抗体にanti bovine P_0, 2次抗体にalkaline phosphatase conjugated anti rabbit IgGを用い, NBTとBCIPを基質として発色させた。

(6) C6及びDRGニューロンの共培養: P_0を発現しているC6グリオーマ細胞(C6P_0)のフィーダー上に, DRGニューロンをco-cultureし, 経時的に, その軸索突起伸展につき観察を行った。軸索突起の染色は, L_1ポリクロナール抗体及びチュブリン抗体を用いた免疫組織化学的手法により行った。

〔結果及び考察〕

(1) C6グリオーマ細胞での導入遺伝子の発現

a) 免疫組織化学による解析: 蛍光抗体法及びPAP法により, 21クローン中9クローンにおいて, P_0の発現が確認された(Fig.2・3)。

b) Western blotによる解析: C6 P_0粗細胞膜画分において, 32KD付近に特異的なバンドが観察された(Fig.4)。又, 粗核画分においては, ごく薄いバンドとして観察され, 対照(P_0遺伝子導入を行っていないC6グリオーマ細胞)ではバンドは検出されなかった。このことより, リン酸カルシウム法によって導入されたP_0 cDNAは, 細胞膜に発現していることが確認された。

(2) C6 P_0-DRGニューロン co-culture assay：共培養開始後3時間・6時間・9時間・12時間・24時間・48時間にて経時的観察を行ったところ，C6 P_0をフィーダーとしたDRGニューロンは，対照と比べ明らかに軸索突起伸展の開始がはやく，又軸索突起伸展の促進傾向を示した(Fig. 5・6)。

接着性Igスーパーファミリーには，NCAM[1]，L_1[1]，ファクシリンII[6]，アマルガム[12]，MAGなどがあり，これらは神経回路網形成に重要な役割を果たしている。その特徴は，Ig homology unitであるVドメインとCドメインの両方又は一方のみを細胞外にもっていることである。L_1あるいはミエリンに存在するMAGは，ニューロンの突起伸展能があることが既に判明している。今回の結果から，接着性Igスーパファミリー中，最も単純で，IgドメインはV領域と相同のものが細胞外にひとつだけ存在するP_0が，単にミエリン膜の構造維持のみならず，軸索の何らかの因子と相互作用し，神経軸索突起の伸展促進にも関与することが示唆された。

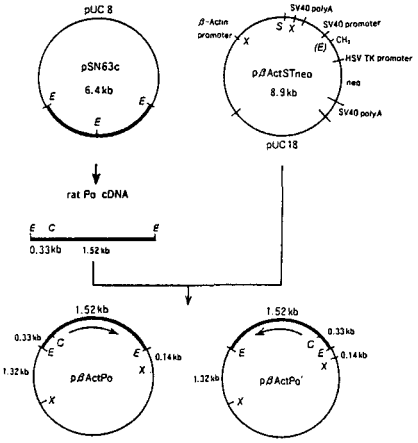


Fig. 1 P_0発現ベクターの構築

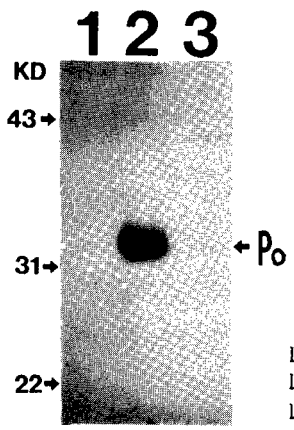


Fig. 4
Western blot法による解析

レーン1：control
レーン2：遺伝子導入細胞粗細胞膜画分
レーン3：遺伝子導入細胞粗核画分

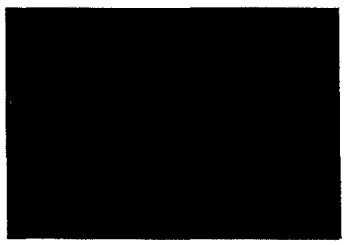


Fig. 2 P_0抗体による免疫組織化学（control）

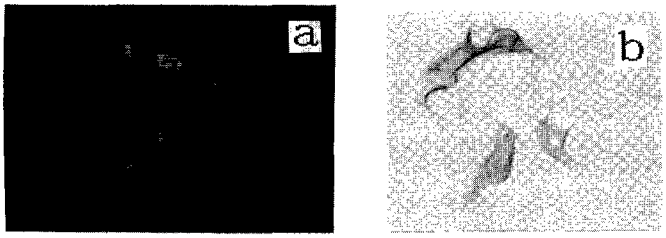


Fig. 3 P_0抗体による免疫組織化学（遺伝子導入細胞）
a：蛍光抗体法　　b：PAP法



Fig. 5
C6－DRGニューロン共培養（L_1染色）

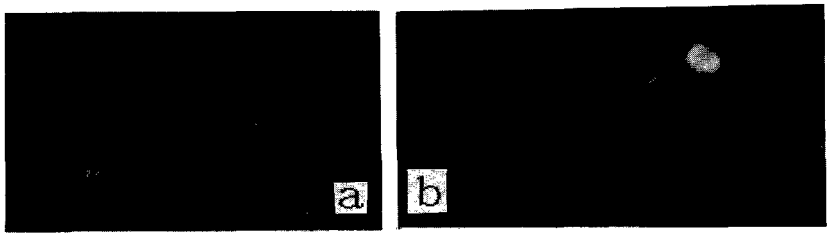


Fig. 6 C6 P_0－DRGニューロン共培養
a：L_1染色　　b：チュブリン染色

〔文 献〕

1) Asou, H. et. al. (1990) Shinkei Kenkyu no Shinpo, 34: in print. 2) Barbu, M. et. al. (1990) J. Neurosci. Res., 25: 143. 3) Bollensen, E & Schachner, M. (1987) Neurosci Lett., 82: 77-82. 4) Donatella D'Urso. et. al. (1990) Neuron, 2: 449-460. 5) Eylar, E. H. et. al. (1979) Neurochem Res, 4: 289. 6) Harrelson, A. L. et. al. (1988) Science, 242: 700. 7) Lehrach, H. et. al. (1977) Biochemistry, 16: 4743-4751. 8) Lemke, G. et. al. (1985) Cell, 40: 501. 9) Marie, T. Filbin, et. al. (1990) Nature, 344: 871-872. 10) Saavedra, R. A. et. al. (1989) J. Mol. Evol., 29: 149. 11) Sakamoto, Y. et. al. (1987) J. Biol. Chem., 262: 4208. 12) Seeger, M. A. et. al. (1988) Cell, 55: 589.

34 ミエリン蛋白質の系統及び個体発生上の発現様式

竹居光太郎、北村邦男＊、植村慶一
（慶応大・医・生理、埼玉医大・第一生理＊）

〔要約〕
哺乳類(ヒト、ラット)、両生類(ウシガエル)および魚類(コイ)の中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)からミエリン画分を精製し、その構成蛋白質について主として Western Blotting 法を用いて比較検討した。系統発生上、ヒト、ラット、ウシガエルではP0はPNSに特異的に発現していたが、コイではPNSとCNSの双方に抗P0抗体と反応する蛋白質が存在し、特異的な発現様式を示した。コイのCNS及びPNSの抗P0抗体と反応する蛋白質のN末端アミノ酸配列は哺乳類のP0と5残基までは同一であり、高い相同性を示すことが示唆された。他方、ウシガエルでは変態前の幼生のCNSミエリンには抗P0抗体及び抗PLP抗体と反応する蛋白質が存在した。ウシガエルにおいて、成体ではCNSにPLP、PNSにP0が存在するのに対し、個体発生上の幼若期にはPLPとP0の双方が存在する可能性が示唆された。

哺乳類においてはCNSとPNSのミエリン構成蛋白質が明らかに異なっていることが知られている[1 3 4]。即ち、CNSではPLPとMBPが主であるのに対し、PNSではP0が50%以上を占め、その他にP2やMBPが存在する。最近、ある種の魚類ではCNSに抗P0抗体に反応する蛋白質が存在するという報告[2 5]もあり、ミエリン蛋白質の比較生理化学的解析は興味ある課題の一つである。そこで、哺乳類(ヒト、ラット)、両生類(ウシガエル)及び魚類(コイ)のCNSとPNSよりミエリンを精製し、その構成蛋白質を比較検討した。

【方法】
各種脊椎動物(ヒト、ラット、ウシガエル、コイ)のCNS及びPNSよりショ糖の密度勾配遠心法によってミエリン画分を調製し、SDS-PAGE法で電気泳動して Western blotting を行った。一次抗体として、抗ウシP0ポリクローナル抗体、抗ラットPLPポリクローナル抗体(国立精神・神経センター、田平博士より供与)、抗ウシP2ポリクローナル抗体、抗マウスMBPポリクローナル抗体、抗マウスL2モノクローナル抗体(ハイデルベルク大、シャハナー博士より供与)を用いた。抗体反応の検出はアルカリフォスファターゼ検出法、アビジン・ビオチン複合体検出法、ナフソール検出法などで行った。また、N末端からのアミノ酸配列は気相式シークエンサー(Applied Biosystems 477A)を用いて検討した。

【結果と考察】
抗P0抗体は、PNSにおいて、ヒト、ラットでは約30K、ウシガエルでは約35K、コイでは27Kと29K付近の各々doubletのバンドと反応し、CNSではヒト、ラット、ウシガエルでは全く反応を示さず、コイの27Kと25K付近の各々doubletのバンドとのみ反応した(図1)。抗PLP抗体はコイを除く他の動物種のCNSの約23Kの主要バンドと反応した。抗MBP抗体もコイとは反応しなかったが、ヒト、ラット、ウシガエルではCNS及びPNSの20Kを中心とする分子量域の複数のバンドと反応を示した。また、抗P2抗体はウシガエルとコイとは反応しなかったが、ヒトとラットのPNSの約15Kのバンドと反応した。以上から、哺乳類や両生類のミエリン構成蛋白質は、動物種間に分子量の相違はあるものの、同様の存在様式を示したのに対し、魚類のミエリンではCNSとPNSの双方に抗P0抗体と反応する蛋白質が存在するという他の動物種には見られない特徴を示した。そこで、コイのCNS及びPNSに存在する抗P0抗体と反応した蛋白質について、N末端からのアミノ酸配列を調べた。PNSの約27K、29KとCNSの約25K、27Kのどの蛋白質もN末端から5残基までは全く同一(I-V-V-Y-T-)であり、ウシやラットのそれとも同一であった。抗P0抗体と反応するこれらの蛋白質は哺乳類のP0と相同性の高いものと考えられる。従って、PNSに存在するP0は系統発生学的に下等な動物種にも存在する蛋白質であることが示された。

他方、神経系の細胞接着分子L1と共通の糖鎖を部分的に有すると考えられているL2の糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いて同様の検討を行った。抗L2抗体はラットとは反応しなかったが、ヒト、ウシガエル、コイのPNSおよびコイのCNSの抗PO抗体と反応したバンドに対して特に強い反応を示した(図2)。抗PO抗体と反応するこれらの蛋白質はL2と類似の糖鎖構造の一部を有するものと考えられる。

次に、変態を介して短期間に幼生から成体型に変わる両生類(ウシガエル)の幼生のCNSからミエリンを精製し、上記と同様の各種抗体を用いて検討した。上述の様に、成体のCNSには抗PO抗体と反応する蛋白質が存在しなかったのに反し、幼生のCNSには、成体のPNSと同様の約35Kに抗PO抗体と反応する蛋白質が存在していた(図3)。更に、幼生のCNSには、成体のCNSと同様に抗PLP抗体と反応する蛋白質(約23K)が存在していた。抗MBP抗体に関しては、CNSでは幼生と成体では相違は認められなかった。これらのことから、ウシガエルでは個体発生上幼若期の個体のCNSにはPO類似の蛋白質が存在する可能性が示され、CNSとPNSの各々のミエリン主要構成蛋白質であるPLPとPOの双方が幼若個体のCNSには共存することが示唆された。系統発生学的に下等な動物種のCNSに存在することが示されたPO類似の蛋白質が個体発生上の幼若時期にはCNSにも存在するということは、生物学的見地からみても大変興味深いものであり、今後の更に詳細な解析が期待される。

Fig. 1 *Immunoblot by anti-PO*

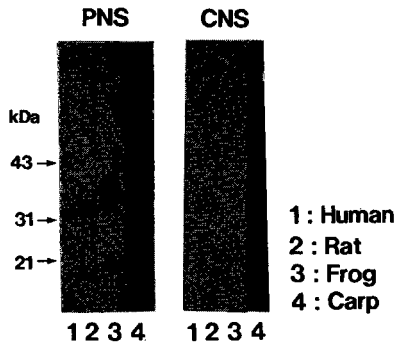


Fig. 2 *Immunoblot by anti-L2*

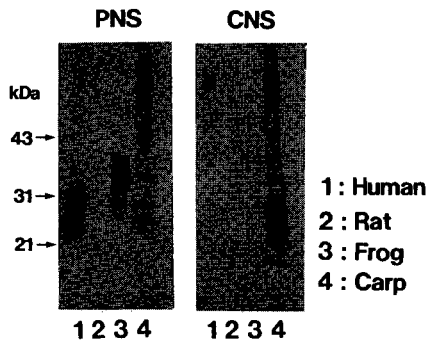
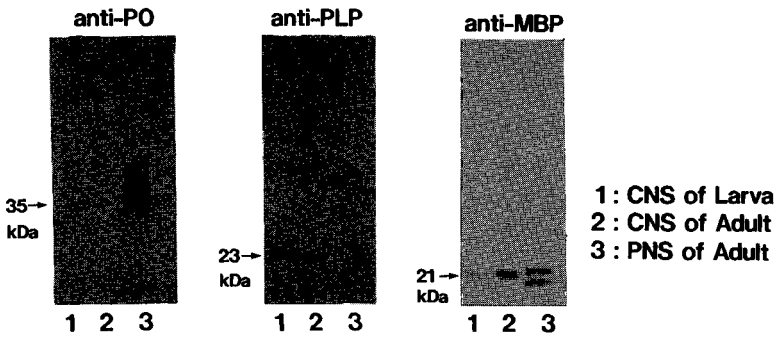


Fig. 3 *Changes of myelin proteins between larva and adult in bullfrog*



【文献】

(1)Greeenfield, S. et al., J.Neurochem. 20:1207-1216(1973)

(2)Kirschner,D.A. et al.,J.Neurochem.53:1599-1609(1989)

(3)Uyemura,K. et al., J.Neurochem. 19:2607-2614(1972)

(4)植村慶一他、蛋白質核酸酵素29:1056—1068(1984)

(5)Waehneldt,T.V. et al., J.Neurochem. 52:1941-1943(1989)

35 ミクログリア分泌性プロテアーゼの性質

中嶋一行，下条雅人，濱之上誠，石浦章一*，
杉田秀夫*，高坂新一
（国立精神・神経センター，神経研，代謝，*疾病一部）

〔要約〕
ラット脳よりミクログリアを分離培養し、本細胞の培養上清中に分泌されてくるプロテアーゼにつき検討を加えた。ミクログリアの培養上清にミエリン塩基性蛋白(MBP)を分解するプロテアーゼ活性を認めた。至適pHは中性付近であり、ミクログリアの細胞ホモジネート中に認められるプロテアーゼのそれとは異なっていた。この酵素活性は1mM PMSFで約60%、40 μM エラスタチナールで約50%の阻害をうけた。またゲル濾過により、分子量約25KDの位置に活性が溶出された。SDS-PAGE後、エラスターゼ抗体を使用したウェスタンブロッティングを行うと、分子量約25KDのタンパク質が染色された。これらの結果より、ミクログリアの培養上清中にはエラスターゼまたはエラスターゼ様プロテアーゼが分泌されることが示された。

近年、ミクログリアからIL-1, IL-6, NGF, TNFなどのサイトカインや、神経栄養因子が分泌されることが報告され[1]、ニューロンの生育またはグリアの増殖調節に働くことが示唆されている。我々は従来の方法を改良して簡便な方法で純度の高いミクログリアを大量に調製する方法を確立し、ミクログリアとニューロンの細胞間相互作用を検討している。ミクログリアの培養上清にはアストロサイトに匹敵するニューロンの生存維持および突起伸展活性が検出されたことから、現在ミクログリアの分泌性物質について検索を進めている。今回、我々はミクログリアの培養上清中に分泌性と考えられるプロテアーゼ活性を見い出し、その性質を調べたので報告する。

〔方法〕

ミクログリアは胎生２０日～生後３日のラット大脳の初代培養系より既報の如く[2]簡便に分離した。ラテックスビーズのとり込み能およびED1の反応性から純度は98%以上であった。

ミクログリアの培養上清は以下の方法にて採取した。ミクログリアの接着しているシャーレを充分量の無血清DMEM (3.7% $NaHCO_3$, 40 U/ml ペニシリン, 40 μg/ml ストレプトマイシン)で３回洗浄し、最後に75 cm^2のシャーレ当たり5 mlのDMEMを添加した。15～48時間後に培地を回収し、1500 rpm, 5分間の遠心により上清を集めた。さらにアミコンの限外濾過(YM5)装置により濃縮、PBSによる洗いを繰り返し、濃縮ミクログリア培養上清(Mic-CM)とした。

プロテアーゼの活性は全量50 μl中に20 mM Tris HCl (pH 7.5), 基質として精製MBP 5 μgおよび酵素画分を含む反応液中で37°C、30分～2時間インキュベートし、SDS-PAGEを行い、MBPの減少をDensitometerで定量化することにより測定した。また各種人工基質を用いた測定法[3]も併用した。

ウェスタンブロッティングは常法に従い、イモビロンに転写後行った。分子量マーカー、その他蛋白パターンはクマシーブルー染色により示した。

〔結果および考察〕

ミクログリア分泌性の生理活性物質を検索中、培養上清にプロテアーゼ活性が見い出されたため、濃縮し、その性質について検討を加えた。図１に示すようにMic-CMによるMBPの分解は用量依存性に進むことが認められた。MBP以外、カゼイン，ヒストンも基質となったが分解される程度は低かった。

MBP分解性の至適pHを検討してみると、図2に示した如くMic-CM中のプロテアーゼの至適pHは、pH 7~8であった。一方ミクログリアの細胞ホモジネートではpH 5付近が至適であり、Mic-CMとは異なるプロフィルを示した（図2）。ミクログリアは細胞内にカテプシンを豊富にもつことは以前に示したが[2]、Mic-CMにはそれとは異なる種類のプロテアーゼが含まれることが示唆された。

次にこの酵素活性に対する各種カチオン、金属、プロテアーゼインヒビターの影響を調べた。表1に示すようにCa^{2+}, Mg^{2+}の添加では活性促進はみられず、Co^{2+}, Fe^{3+}は30~40%の阻害を示した。0.05% トリトンXはほとんど影響を与えなかったが0.05% SDSは約95%の阻害を示した。プロテアーゼインヒビターの効果を調べた実験では1 mM PMSFが60%の阻害を示すのに対しペプスタチン、ロイペプチン、E64, EDTAなどはほとんど効果を示さなかった。このことからMic-CM中のプロテアーゼはセリン型と考えられたが、TLCKおよびTPCKではまったく阻害されないことからトリプシン、キモトリプシン様の酵素ではないことが示された。しかしその他種々のインヒビターの効果を検討した中でエラスタチナールの効果が認められたため、Mic-CM中に含まれるプロテアーゼとしてエラスターゼが候補にあげられた。またSuperose 12を使用したゲル濾過によると分子量約2~3万の位置に活性が溶出された。

次にMic-CMを15%ポリアクリルアミドゲルを使用したSDS-PAGEにかけ、エラスターゼ抗体によるウェスタンブロッティングを行った。その結果、分子量約25KDの位置に一本のバンドが強く染色された。以上の事からミクログリアの培養上清に認められたプロテアーゼ活性はエラスターゼまたはエラスターゼ様プロテアーゼであることが明らかとなった。この酵素の生理的意義は現在のところ不明であるが、中枢神経系の構築、再生過程への関連性も考えられ興味深い。

〔文献〕

1. 中嶋一行, 濱之上誠, 下条雅人, 高坂新一: 神経研究の進歩（1990）印刷中
2. Nakajima, K, Hamanoue, M, Shimojo, M, Takei, N and Kohsaka, S: Biomed. Res. 10 (S3), 411-423, (1989)
3. Ishiura S, Sugita H: J. Biochem. 100, 753-763 (1986)

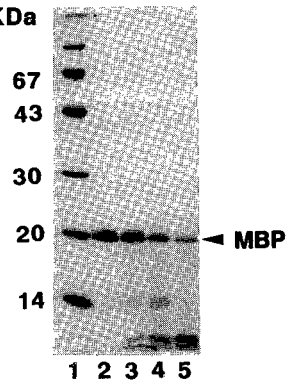


図1 ミクログリア培養上清のプロテアーゼ活性
1. 分子量マーカー。ミクログリア培養上清の存在下(3~5)、非存在下(2)で37° C, 30分間反応を行った。3~5ではそれぞれ0.25 μg, 0.5 μg, 1.0 μgタンパク量を添加した。

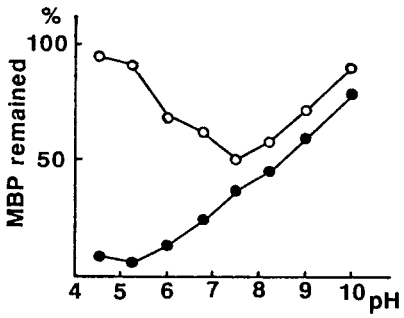


図2 ミクログリアの培養上清および細胞ホモジネートのpH依存性
基質としてMBPを使用し、残存量を示した。
○—○ ミクログリア培養上清
●—● ミクログリア細胞ホモジネート

表1 種々のカチオン、金属、界面活性剤およびインヒビターの影響

添加物	濃度	阻害(%)
—		0
Ca	1 mM	6
Mg	1 mM	9
Co	1 mM	40
Fe	1 mM	36
SDS	0.05%	95
Triton X-100	0.05%	4
PMSF	1 mM	59
E64	10 μM	0
ロイペプチン	10 μg/ml	0
ペプスタチン	10 μg/ml	< 0.5
EDTA	1 mM	< 1.0
O-フェナントロリン	1 mM	< 0.5
エラスタチナール	40 μM	48

36

中枢神経系ミエリンにおける プロテインキナーゼC

由村健夫，小林卓郎，後藤幾生

（九州大・医・脳研・神経内科）

〔要約〕

ラット脳のミエリンを Triton X-100 で可溶化した分画に、Ca^{2+}とリン脂質で活性化されるプロテインキナーゼ、すなわちプロテインキナーゼ C (PKC)活性が存在した。この PKC活性はヒストンとミエリン塩基性蛋白 (MBP)をともにリン酸化したが、後者がより強くリン酸化された。また後者を基質とした場合のほうが、Ca^{2+}とリン脂質に対する依存性は低かった。MBP のリン酸化は serine 残基を介していた。 PKCに対するモノクロナール抗体を用いて Western blot で調べると、PKC のtypeⅡとⅢが存在することが分かった。ミエリンのPKC 活性は生後５週に高く、髄鞘形成の活発な時期より少し遅れていた。

MBP はPKC の基質となることが知られている。しかしながら、単離したミエリンで検討すると、MBP のリン酸化はCa^{2+}では活性化されるが、リン脂質では活性化されず、サイコシンによっても抑制されない[1)]。種々の方法でミエリンを処理してはじめて、Ca^{2+}およびリン脂質で活性化されるキナーゼ活性が明らかになってくる[2)3)]。今回我々はミエリンにPKC 活性が存在することを確認するとともに、PKC 蛋白が存在することを抗PKC 抗体を用いて検討した。またミエリンのPKC 活性の developmental change を検討した。

〔方法〕

1．PKC 活性はMg^{2+}, Ca^{2+}, phosphatidylserine (PS) 存在下で、ヒストンあるいはMBP への^{32}P の取り込みをみた。
2．ミエリンの単離はラット大脳－脳幹から行ない、bufferで６回 wash してcytosol を完全に除いた。その後 0.2 % Triton X-100を含む buffer でミエリン膜を可溶化した。一部の実験ではこの可溶化分画を使用した。さらにこの可溶成分を DEAE-Cellulose カラムにかけて NaCl 勾配をかけてPKC 活性を溶出した。
3．PKC 分子の確認はPKC アイソザイムのモノクロナール抗体を用いて行なった。
4．リン酸化アミノ酸の検出はリン酸化されたMBP を加水分解し、セルロースTLC を用いて、高電圧電気泳動で行なった。

〔結果〕

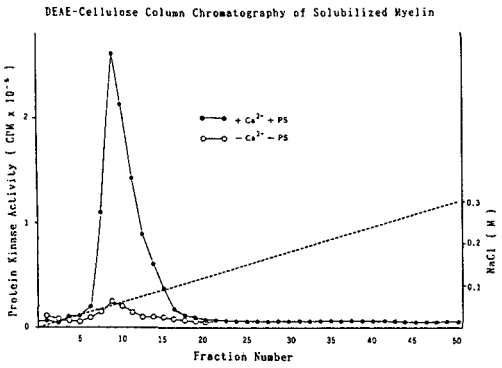
ミエリンの Triton 可溶分画にはCa^{2+}、PSで活性化されるキナーゼ活性が存在した（図１）。この fraction はヒストンをCa^{2+} PS 両者の存在下ではじめて強くリン酸化した。MBP も同様にCa^{2+} PS の存在下で強くリン酸化され、その程度はヒストンを基質とした場合の約３倍であったが、Ca^{2+}あるいはPSそれぞれの単独の場合でもある程度リン酸化された（図２）。サイコシンによる抑制は、PSの濃度が 100μM の条件で検討し、サイコシン濃度が約 100μM で50% の抑制がかかった（図３）。リン酸化されたMBP のリン酸化アミノ酸を調べるとserine 残基であった。Western blotで DEAE-Cellulose カラムで溶出したPKC 活性を持つ fraction を調べると、typeⅡとⅢの抗体に反応したが、typeⅠには反応しなかった。その分子量は約８万であり、intactなPKC 分子と考えられた（図４）。ミエリンの Triton 可溶分画のPKC 活性を年令で調べると、生後35日がピークであった(図５)。

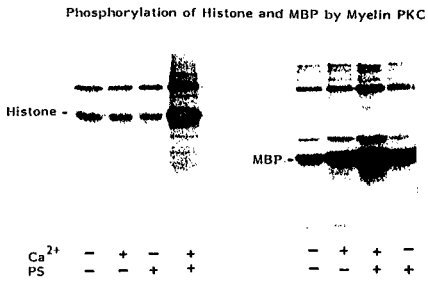
［考案］

ミエリンの Triton 可溶分画のPKC 活性とともにPKC 分子も確かに存在することが分かった。このことからミエリンにおいてMBP をリン酸化する酵素が、in vivo でもPKC である可能性は十分あると考えられた。またMBP のリン酸化はヒストンを基質とした場合ほどの依存性はないものの、Ca^{2+}とPS両者の存在によって活性化され、MBP のリン酸化は PS の存在のみによって活性化されるとする Bazzi[4]の結果と異なるものであった。またミエリンのPKC は分子量約９万の intact な形で存在し、Ca^{2+}とPS非依存性の蛋白分解をうけたものではないことが示された。リン酸化アミノ酸は従来の in vivo[5] in vitro[6]の報告通り serine 残基であった。ミエリン Triton 可溶分画のPKC 活性は生後35日頃ピークに達し、ミエリン形成の活発な時期より遅れており、ミエリン形成よりも維持に関与している可能性が考えられた。

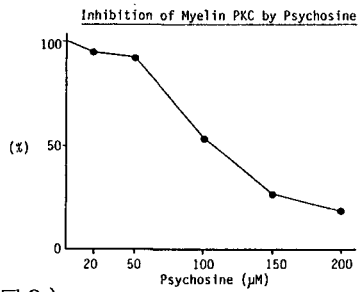
［文献］

1 Yoshimura,T. et al. Neurochem.Res.,(in press)
2 Turner,R.S. et al.(1982) J.Neurochem. 39, 1397.
3 Murray,N., and Steck,A.J. (1986) J.Neurochem. 46, 1655.
4 Bazzi,M.D. and Nelsestuen,G.L. (1987) Biochemistry 26, 1974.
5 Agrawal,H.C. et al. (1981) J.Biol.Chem. 256, 12243.
6 Kishimoto,A. et al. (1985) J.Biol.Chem. 260, 12492.

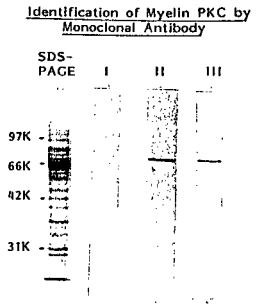




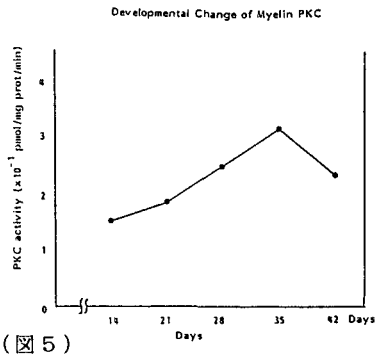
（図２）



（図３）



（図４）



（図５）

37　サイトカインによるミクログリアの形態・機能・増殖能の変化について

錫村明生，丸野内　棣＊，山本繻子

（藤田学園保健衛生大・神経内科，応用細胞＊）

〔要約〕
ミクログリアは，発達段階および病態下で種々の形態変化をおこす．今回，種々の炎症性サイトカイン，アストロサイト由来の液性因子，マクロファージを活性化する因子を用いてミクログリアの形態変化を観察し，同時に酸フォスファターゼ活性，O_2^-産生能，サイトカイン産生能などの活性化の指標と分裂能を検索した．この結果，分離・培養したミクログリアはameboid，rod-shape，ramified，に形態変化しうること，ameboid型は酵素活性は上昇しているが分裂能をもたない活性型，rod-shape型は分裂型，ramified型は酵素活性の上昇も分裂能も認められない休止型であることが示唆された．さらにアストロサイトがミクログリアを休止型にする因子を出すことが明らかになった．

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，細胞起源および機能については不明な点が多く残されている．ミクログリアは周産期に脳内に出現し，当初はアメーバ状(ameboid)の形態をとるが，生後2週目頃より，その数を減じ枝わかれした(ramified)ミクログリアに変化する．中枢神経系の炎症および外傷などの種々の病態下では再びameboid となったミクログリアが多数認められ，ある種の感染症では細長いrod-shapeのミクログリアが出現する．

今回我々は，ミクログリアがin vitroで種々のサイトカイン刺激により形態変化をおこすことに着目し，種々の炎症性サイトカイン，マクロファージを活性化する因子，さらにアストロサイトからの液性因子のミクログリアの形態変化に及ぼす影響を調べた．同時に，種々の形態変化に伴うミクログリアの酵素活性およびサイトカイン産生能と増殖能の変化を調べ，病態下に出現する各種のミクログリアの機能的特徴の解析を試みた．

［方法］

C3H/HeN新生仔マウス脳より一次混合グリア細胞培養を作製し（４），培養14日目に既報（５）の振とう法にてミクログリアを分離した．これらを種々の刺激下で培養し，3-5日目に形態変化を観察し，同時に酸ファスファターゼ活性，O_2^-産生能（３），腫瘍壊死因子(TNFα)産生能（２）を既報の方法で測定した．増殖能はbromodeoxyuridine (BrdU)のとりこみで測定した（６）．すなわち，5×10^4/14mm径カバースリップのミクログリアを刺激下および非刺激下で培養し，2日目から16時間10μg/mlのBrdUでパルスし，抗BrdU抗体(Becton-Dickinson)を用いた直接蛍光抗体法にて細胞核内へのBrdUのとりみを測定した．同時に，ロダミン標識抗ラット免疫グログリンにより非特異的にFcレセプターを染色しミクログリアを同定した．

刺激として用いたものはrecombinant interleukin 1 (IL-1)，IL-2，IL-3，IL-4，IL-5，IL-6，γ-interferon(γIFN)，gronulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)，TNFα，lipopolysaccharide(LPS)，TPA，L929培養上清(LCM)とLPS刺激したアストロサイトの上清(Ast-Sup)で，サイトカインは1-100U/ml，LPSは0.1-10μg/ml，TPAは1-100ng/ml，培養上清は1-25%で刺激した．

［結果］

形態変化：γ-IFN，LPS，TPAはミクログリアをameboidに，GM-CSFとLCMはrod-likeに変化させ，Ast-Supはramifiedに変化させた（図１）．Ast-Supのこの作用は透析にて10KD以下の低分子のものを除去しても同様に認められた．

機能的変化：γ-IFN，LPS，TPAとはTNFαミクログリアの酸フォスファターゼ活性，O_2^-産生能を増強したが，他の刺激では有意な変化はみられなかった．

増殖能：GM-CSFとLCMがdose-dependentにミクログリアのBrdUのとりこみを増強させた．TPAも同様の効果を有していたが，他の刺激はいずれも増殖能には影響を与えなかった．

TNF産生能：IL-1，LPS，TPAはTNF産生能を増強させた．

[考察]

今回の成績から種々の因子が，in vitroでミクログリアの形態変化を誘導することが示された．同時に行った酸フォスファターゼ活性，O_2^-産生能，増殖能の検索より，ameboidに変化した時には酸フォスファターゼ活性，O_2^-産生能ともに亢進し活性化されているが，増殖能はもたず，rod-shapeのミクログリアは増殖能をもつが活性化はされていないことが示された．さらにramifiedのミクログリアは増殖能ももたず活性化もされておらず，いわゆるresting microgliaの特徴を備えていた．TNF産生に関しては，これらのミクログリアを活性化する因子の他にIL-1もTNF産生能を高め，さらに，このTNFは自身の活性化に作用することが明らかとなった．我々はミクログリアがIL-1，TNFαを産生することを確認しており，さらにアストロサイトがGM-CSF，TNFαを産生することも示した（1，2）．今回示した，Ast-Supの作用はGM-CSFやTNFαとは異っており，アストロサイトがミクログリアをrestingにする別のサイトカインを出す可能性が示唆された．

これらの成績は，炎症細胞よりのサイトカインまたは，グリア細胞由来のサイトカインがautocrine又はparacrineにミクログリアの機能を調節していることを示しており，種々の病態におけるミクログリアの機能を考える上で重要な所見であると考えられた．

[文献]

1) Ohno, K., Suzumura, A., Sawada, M., and Marunouchi, T. (1990) Biophys. Biochem. Res. Com. in press.

2) Sawada, M., Kondo, N., Suzumura, A., and Marunouchi, T. (1989) Brain Res. 491, 394-397.

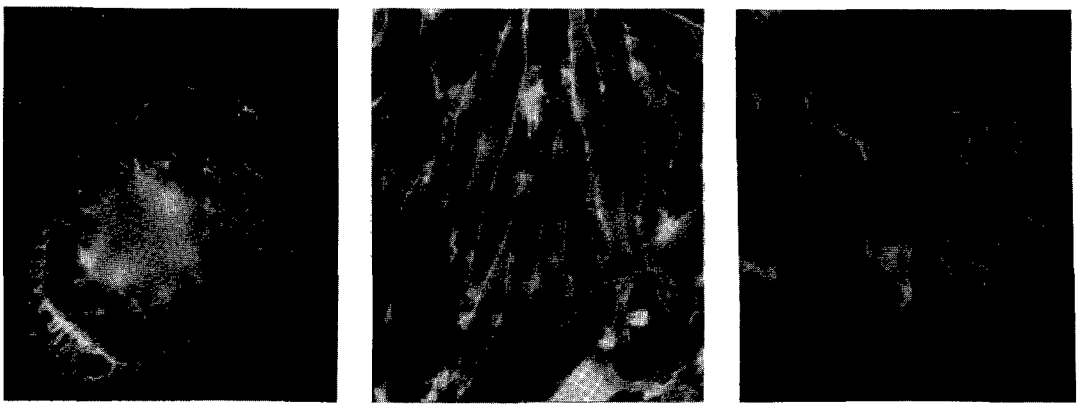
3) Sawada, M., Suzumura, A., Yamamoto, H., and Marunouchi, T. (1990) Brain Res. 509, 119-124.

4) Suzumura, A., Bhat, H., Eccleston P.A., Lisak, R.P., and Silberberg, D.H. (1984) Brain Res. 324, 379-383.

5) Suzumura, A., Mezitis, S.G.E., Gonatas, N.K., and Silberberg, D.H. (1987) J. Neuroimmunol. 15, 263-278.

6) Suzumura, A., Sawada, M., Yamamoto, H., and Marunouchi, T. (1990) J. Neuroimmunol. in press.

Fig. 1. Morphological transformation of microglia (stained with anti-Mac I).



ameboid (LPS 1 ug/ml)　rod-shape (LCM 10 %)　ramified (Ast-Sup 10 %)

38　グリア因子で分化された神経芽腫細胞は新生期脳由来抗がん因子ＮＢＣＦに対する感受性を減少する

三羽信比古[1]、　長尾則男[1]、　土井澄江[1]、中村豊郎[2]、伊藤菁莪[3]
（[1] 広島県大・生物資源、　[2] 伊藤ハム・中研、　[3] 協和発酵・東京研）

〔要約〕
マウス大脳はプログラム細胞死を起こす時期に呼応して抗癌因子ＮＢＣＦを分泌する。ＮＢＣＦは、非神経系の正常細胞のＤＮＡ合成と増殖をほとんど抑制しない投与濃度で、各種腫瘍細胞のうち特に神経芽細胞腫に対して、顕著な増殖抑制作用あるいは致死作用を示す。ヒト神経芽腫ＮＢ１細胞は、ヒトグリア芽腫Ａ１７２細胞由来のグリア因子で処理すると、神経突起を多数生じるとともに、ＮＢＣＦへの感受性が低下することが判明し、この感受性低下は、新たな蛋白質合成を必要とし、ＤＮＡ・ＲＮＡ合成は直接関与しないことを示した。

［緒言］
胚発生・変態・分化の決められた時期に器官内の特定の部域で一定数の細胞が必然的に死滅することをプログラム細胞死と言う。脳の発生過程でのプログラム死は、線虫などでは遺伝的に決まった「机上プラン優先」であるのに対し、高等動物の脳は「現場修正可能」で標的器官サイズの増減や組織環境の変化に対応できる融通性がある[(1)]。脳のプログラム死の原因として神経栄養（生存）因子の不足や枯渇が考えられてきたが、体外培養と違って体内ではNGF やbFGFの他にも多種の未知の神経栄養（生存）因子が存在し、また、脳のプログラム死は各部域の40-70%もの大量の細胞が短期間で死滅するので、脳でも他の器官のプログラム死と同様に、積極的に細胞死を誘引するキラー液性因子の関与があると考えられる[(1-4)]。
我々は、マウス脳が、脳のプログラム死の起こる新生期と胎生末期にのみ細胞増殖抑制性の蛋白質を分泌することを見出だした[(5-8)]。しかし、増殖抑制蛋白質は４種産生され、また、増殖促進性因子も同時に分泌されていた。これら混合物から、正常細胞よりも腫瘍細胞に選択的に増殖抑制する活性を指標に[(9)]分画と精製を進めた結果、腫瘍細胞選択的なＤＮＡ合成抑制と増殖抑制活性を示す蛋白質が、新生期に分泌されることを見出だした。この蛋白質は、他の時期や他の組織では産生されないので、新生期脳由来抗癌因子ＮＢＣＦ(neonatal brain-derived carcinostatic factor)と命名し、62kDa 、pI9.1 の単一糖蛋白質として精製した[(7)]。ＮＢＣＦは、その産生様式・物性・化学構造・作用様式に関して報告してきた[(5-8)]が、今回は、神経芽細胞腫のＮＢＣＦ感受性が、細胞分化の程度と相関することを見出だしたので報告する。
［方法］　ＮＢＣＦとヒトグリア芽腫Ａ１７２細胞由来グリア因子（GF-A172)はゲル濾過・アニオン交換ＨＰＬＣでの精製標品を用い、ヒト神経芽腫ＮＢ１細胞に投与した。神経突起は細胞体以上の長さのものを計測し、細胞増殖はコールターカウンターで、細胞生残率はＭＴＴ法で各々定量した。
［結果と考察］
ヒト神経芽腫ＮＢ１細胞の増殖は、ヒトグリア芽腫Ａ１７２細胞から得たグリア因子（GF-A172)を低濃度(0.05mg/ml以下）に添加すると促進され、高濃度(0.15mg/ml以上）添加なら抑制された。この中間の濃度(0.1 mg/ml)のGF-A172 はＮＢ１細胞の増殖に影響しなかった。この細胞増殖を著減させないGF-A172 の添加濃度の範囲では、ＮＢ１細胞の神経突起はGF-A172 濃度に依存して増加し、かつ、GF-A172 添加後３日間増加した。0.1 mg/ml のGF-A172 は、増殖を増減させない濃度であると同時に、神経突起を増加させる最低必要濃度だった。この濃度のGF-A172 を添加した後、８－２４時間で神経突起は急速に増加し、２４時間後は徐々に増加し、３日後には細胞当たり３－４個の突起となった。一方、GF-A172 を添加しないと、神経突起は徐々にしか増加せず、３日後でも細胞当たり１突起だけだった。
ＮＢ１細胞はＮＢＣＦ感受性であり増殖抑制や致死作用を受けるが、単独投与では増殖に影響しない濃度のGF-A172 で前処理するとＮＢＣＦによる増殖抑制作用を受けにくくなった（図１）。この時、ＭＴＴ色素還元能で見た生残率は回復し、神経突起も増加していた。したがって、ＮＢ１細胞は形態的に分化促進されるとＮＢＣＦによる増殖抑制作用を受けにくくなることが判明した。これを定量的に調べるために、ＮＢ１細胞を0.1 mg/ml のGF-A172 で０－３日間の各期間前処理して、細胞当たり１－４個のいろいろな神経突起数を揃え、ＮＢ

ＣＦ0.6 μg/mlで処理すると、同一細胞密度の条件下での比較が可能となる。この結果、ＮＢ１細胞の神経突起が増加すると、ＮＢＣＦによる増殖抑制作用が低下するという逆相関性が示された（図２）。

このＮＢＣＦ感受性低下は、予めＮＢ１細胞をサイクロヘキシイミドで前処理すると起こらなくなったが、同時に、神経突起の増加も抑制された。しかし、シトシンアラビノシドやアクチノマイシンＤでの前処理は感受性低下を変えなかった（図３）。これらの結果より、神経芽腫細胞のＮＢＣＦに対する感受性低下は、グリア因子添加によって新たに合成された蛋白質が形態的な分化を誘導することによると示唆される（図４）。

［文献］ 1 三羽：「細胞死が生命を形造る」 pp.1-256, ＮＴＴ出版、1990 2 三羽：「新しいサイトカイン」（今西二郎編） pp.111-128, 金芳堂,1990 3 三羽：Human Cell 3(2) in press 1990 4 三羽： Biotherpy 2, 311-317, 1988 5 Miwa et al.: J.Cancer Res.Clin. Oncol. 110,196-202,1985. 6 Miwa et al.: J. Cell. Physiol.132, 538-544, 1987 7 Miwa, N. et al.: Biochim.Biophys.Acta in press 1990 8 Matsuno, T. & Miwa, N.: Med.Sci.Res. 17, 425-426, 1989. 9 Miwa, N. et al.: J.Antibiotics 36, 715-720, 1983.

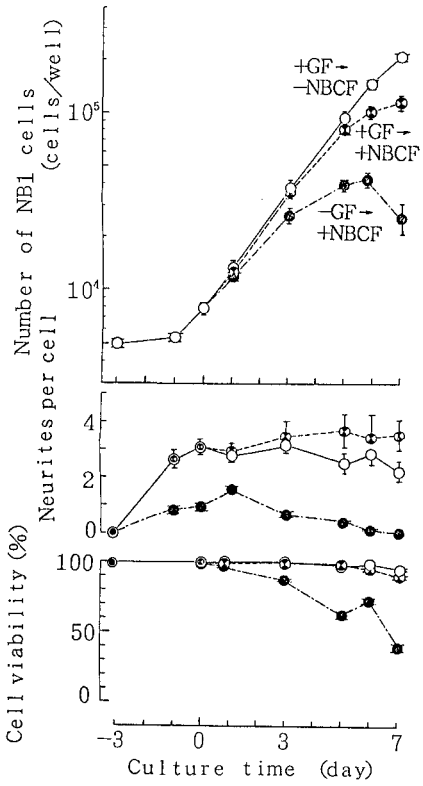


図１ グリア因子で前処理されたＮＢ１細胞のＮＢＣＦ感受性の低下。ＮＢ１細胞はＧＦ（Ａ１７２細胞由来のグリア因子）で予め３日間処理するとＮＢＣＦ抵抗性になり、増殖も生残率もＮＢＣＦ非投与の場合と変わらず、神経突起も多数生じた。

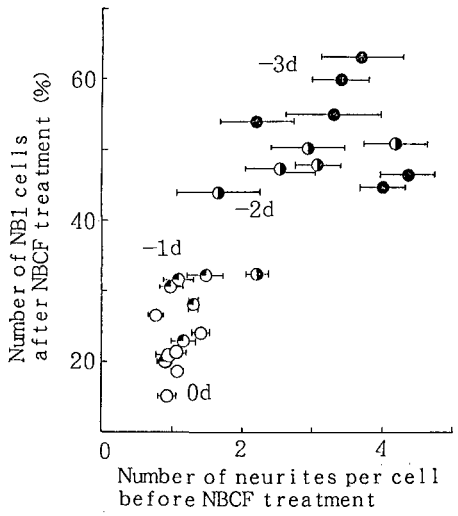


図２ ＮＢＣＦ処理したＮＢ１細胞での増殖抑制効果と神経突起の相関。ＮＢＣＦ処理０－３日前から（0d～-3d)GF-A172 処理して各数の神経突起を生じさせてＮＢＣＦを投与すると、ＮＢＣＦ感受性と神経突起の数は逆相関した。

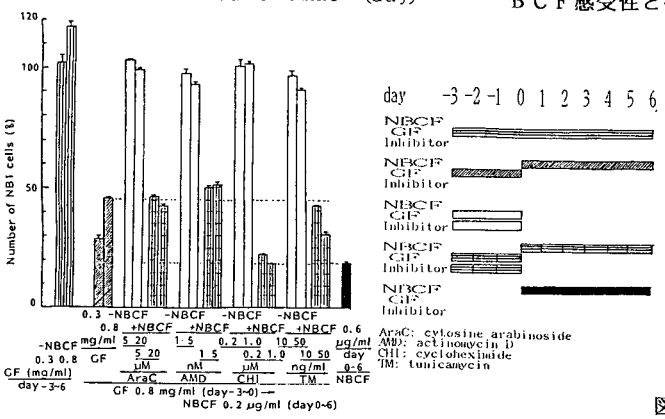


図３ 蛋白質合成を阻害したＮＢ１細胞でのグリア因子によるＮＢＣＦ感受性低下の復旧。ＣＨＩで３日間前処理すると、その後６日間のＮＢＣＦ処理からＧＦで救済できなくなった。

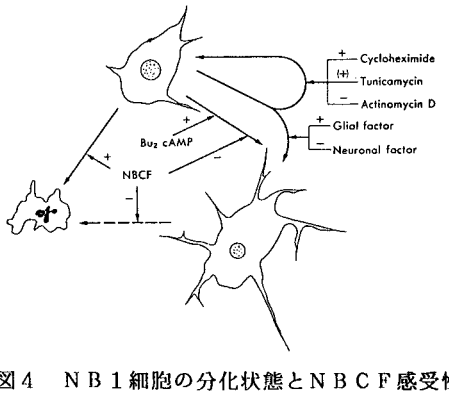


図４ ＮＢ１細胞の分化状態とＮＢＣＦ感受性の相関。分化誘導剤で分化促進すると神経突起が増加しＮＢＣＦ感受性が低下するが、蛋白質合成阻害されると分化抑制され感受性が復元。

39 グリア線維酸性蛋白に対するリン酸化及び脱リン酸化の影響

中村　祐、武田　雅俊、Angelides K.J.*、多田　國利、
田中　稔久、楯林義孝、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）の動態に対するリン酸化及び脱リン酸化の影響をfluorescein-maleimideによりGFAPを蛍光標識することにより検討した。GFAPは、cyclic AMP dependent protein kinase（以下A kinase）によりリン酸化されると中性領域における重合能を全く失なった。また、脱リン酸化によりGFAPは重合におけるマグネシウムイオン感受性を失い、15-20 nmの径の線維を形成した。リン酸化及び脱リン酸化をうける部位はそのHEAD領域であることが示唆され、HEAD領域が重合の調節に重要であり、リン酸化により調節を受けていることが考えられる。

我々は中間系線維が動的な平衡状態にあることを蛍光標識した中間径線維蛋白を用いて報告してきた[1,4,6]。vimentin[2], desmin[3], 最近ではneurofilament(NF-L)[5]がリン酸化により脱重合することが報告されており、中間径線維の平衡状態に対してリン酸化が影響をもたらすと考えられる。今回我々は、GFAPの動態に対するリン酸化及び脱リン酸化の影響について検討を行った。

［方法］

1：GFAPの再構成：buffer D（5mM Tris·HCl/ 1mM EGTA/ pH 7.5）に溶解したGFAPに対して1/4量の重合buffer (0.5M imidazole·HCl/5mM EGTA /pH7.1)を加え、30℃にて60分インキュベートを行う[4]。尚、GFAPの精製・蛍光標識は前回報告した方法に従う[4]。

2：蛍光エネルギー共鳴（fluorescein self-quenching）に基づいた重合度測定

：先に報告した原理・方法に従う[1,4,6]。

$Q = (Fi - F) / F_{SDS}$　　% assembly = Q／Qf x100

：F＝各時点における蛍光強度：Fi＝重合bufferと混合直後の蛍光強度

F_{SDS}＝SDS混合後の蛍光強度（final:1%SDS：Qf＝800μg/mlの濃度におけるQ値（%quench）

3：GFAPのリン酸化：8M尿素に溶解した蛍光標識GFAP（1mg/ml）をbuffer Dに対して透析を行い、10μg/ml A kinase(catalitic subunit/Sigma)/ 1mM DTT/ 0.1mM $MgCl_2$/ 0.2mM ATPとし、37℃にて2時間インキュベートを行い、H-8（final 1mM）にて反応を停止した[5]。

4：GFAPの脱リン酸化：8M尿素に溶解した蛍光標識GFAP（1mg/ml）を50mM Tris·HCl/ 1mM $MgCl_2$/ 1mM EGTA/pH 8.5に対して透析を行い、GFAP 1mgに対して20 unitsのunweaned calf intestinal ALP(Sigma)を加え、30℃にて24時間インキュベートを行った後、8M尿素buffer中にてDE52を用いて精製した。

［結果］

1：低張bufferに未重合の状態にあるGFAPに対するリン酸化の影響：bufferDに対して透析を行ったGFAPに対してリン酸化を行うと、リン酸化されたGFAPは重合bufferを加えても重合しなくなることが電子顕微鏡及び蛍光エネルギー共鳴を用いた重合度測定において観察された。また更に1mMの$MgCl_2$又は120mMのNaClを加えても重合は見られなかった。[図1]

2：GFAPの重合・形態に対する脱リン酸化の影響：8M尿素中にて精製した脱リン酸化蛍光標識GFAPをbuffer Dに対して透析を行い、対象蛍光標識GFAPと重合buffer添加による各蛋白濃度における重合度及び1mM $MgCl_2$の影響を比較した。Mg^{2+}非存在下では対照GFAPに比して重合の程度が少し悪く、重合curveが濃度の高い方へshiftすることが観察された。また、1mM Mg^{2+}存在下では対象GFAPは著しい重合度の亢進が見られるが、脱リン酸化したGFAPではその作用はほとんど見られなかった。また、脱リン酸化したGFAPは形態においても対象GFAPと異なり、10nmよりも径の広い（15-20nm）の線維が電子顕微鏡上観察され、これは1mMの$MgCl_2$の存在下においても同様の線維が見られた。[図1][図2]

3：リン酸化・脱リン酸化を受ける部位の検討

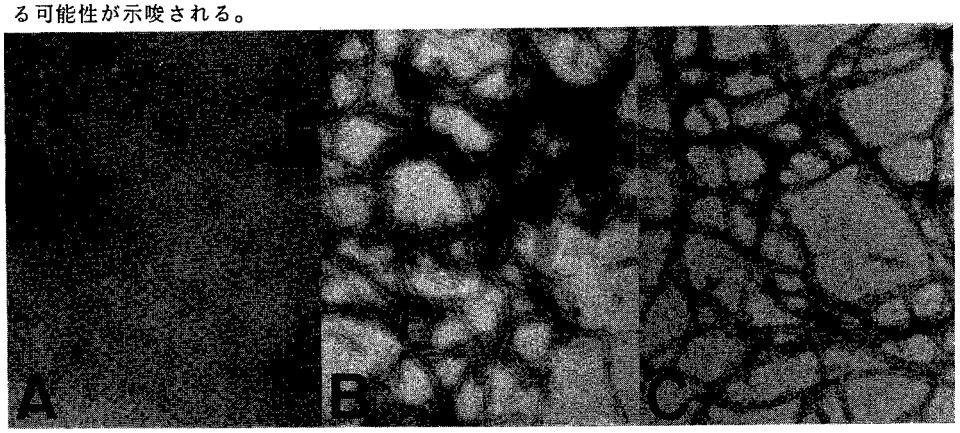
a)GFAPのThrombin処理：GFAP（50K）はthrombin処理により44KDaのfragmentに分解される。また、GFAPはCTNB処理により32KDaと18KDaのfragmentにCys残基のところで切断される。sequenceの上から32KDaのfragmentはHEAD領域を含むfragmentである。Thrombin処理を行った44KDaのfragmentを更にCTNBで処理すると 26KDaと 18KDaのfragmentに分かれ、これらのことからThrombin処理によりHEAD領域が約6KDa失われる。[図3]

b)リン酸化される部位の検討：[γ-^{32}P]ATPを用いてリン酸化の程度を測定すると1モルGFAP当り1-2モルの燐酸基が入り、約30分の反応時間でplateauに達することが観察された。また、[γ-^{32}P]ATPにてリン酸化したGFAPをThrombinにて処理しHEAD領域のないGFAPにすると放射活性は失われ、またlysyl endopeptidaseにて処理を行いHEAD領域のみにすると、HEAD領域に放射活性の集積が見られ、HEAD領域が特異的にリン酸化されていることが示唆された。[図4]

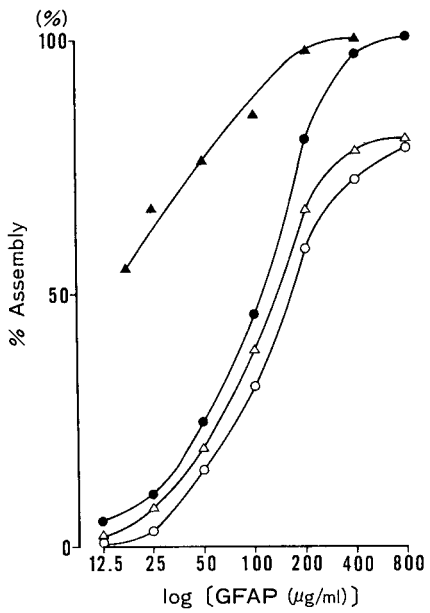
c)脱リン酸化される部位の検討：GFAP及びThrombin処理した44KDaのfragmentを脱リン酸化し、等量の15%TCAを加え、遊離した無機リンの量をアンモニウムモリブデン法を用いて定量を行った。1モルのGFAPからは約1.1モルの無機リンが遊離するが、44KDaのfragmentからは無機リンの遊離は見られなかった（1モルfragment当り0.1モル以下）。これらのことからHEAD領域が脱リン酸化されている可能性が示唆される。

［考察］

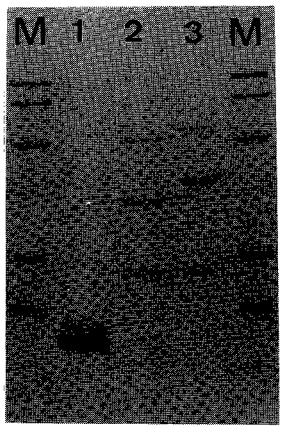
従来、中間径線維はstaticな構造であると考えられてきたが、最近、neurofilamentやGFAPが動的な平衡状態にあること[1,4,6]やvimentin[2]、desmin[3]、neurofilament[5]がリン酸化により脱重合がおこることが報告され、その動態の制御機構が注目されるようになってきた。今回、我々は先に動的な平衡状態にあることを報告したGFAPにおいてリン酸化及び脱リン酸化の影響を調べ、生体内におけるリン酸化によるGFAP動態の制御について検討を加えてみた。GFAPは1分子当り1-2個のリン酸基がHEAD領域に入ることにより10nm線維への重合能を失うことが観察された。また、脱リン酸化することにより10nm線維よりも径の大きい線維に重合し、nativeのGFAPに見られる著名なマグネシウムに対する感受性も失われる。脱リン酸化される部位もまたHEAD領域にあると推定され、in situにおいて合成されたGFAPがなんらかのkinaseによりリン酸化を受け、nativeなGFAPに見られる性質を獲得するものと考えられる。これらのことからHEAD領域のリン酸化が生体内におけるGFAPの動態の調節に関与している可能性が示唆される。



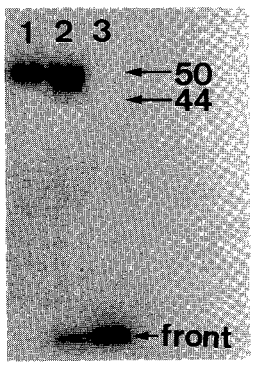
［図1］
A：リン酸化GFAP
B：nativeGFAP
C：脱リン酸化GFAP
(800μg/ml)
(negative staining 48,000X)



［図2］
脱リン酸化の重合度に及ぼす影響
－●－：対照GFAP 0mM $MgCl_2$
－▲－：対照GFAP 1mM $MgCl_2$
－○－：脱リン酸化GFAP 0mM $MgCl_2$
－△－：脱リン酸化GFAP 1mM $MgCl_2$



［図3］12% SDS-PAGE
1:Lysyl endopeptidase処理GFAP (6.5K)
2:Thrombin-digested GFAPを更にCTNBに処理したもの(44K, 26K, 18K)
3:CTNB処理GFAP(50K, 32K, 18K)
M:分子量marker（高い方から 94K, 67K, 43K, 30K, 20K, 14.4K)



［図4］autoradiography
(10-20% gradient SDS-PAGE)
1:phosphorylated GFAP
2:1のThrombin処理(30 min)
(10 units/ 1mg GFAP)
3:1のThrombin処理(120 min)

［参考文献］

1]Angelides KJ, Smith KE, Takeda M, J.Cell Biol.(1989)108,1495-1506.
2]Inagaki M, Nishi Y, Nishizawa K, Nature(1987)328,649-652.
3]Inagaki M, Gonda Y, Matsuyama M, J.Biol.Chem.(1988)263,5970-5978.
4]中村　祐、武田雅俊、Angelides KJ, 神経化学(1989)28,302-303.
5]Nakamura Y, Takada M, Angelides KJ, BBRC(1990) in press.
6]武田　雅俊、Angelides KJ、中村　祐、神経化学(1987)26,268-270.

40 グリア線維酸性蛋白質によるBリンパ球の抗体産生に及ぼす効果についての検討

中村和子、加藤佳也*、田中稔久、武田雅俊、多田國利、播口之朗、西村　健
（大阪大・医・精神神経科、国立療養所・松籟荘*）

〔要約〕

アルツハイマー病患者に認められる免疫反応の異常を明らかにするために、末梢リンパ球の刺激に対する反応性をin vitroにて検討した。アルツハイマー病患者と健常対照者の末梢血よりリンパ球を分離し、pokeweed mitogen(PWM)、Interleukin 2(IL-2)による刺激を加えて培養し、培養上清中の、免疫グロブリン(Ig)産生量及び抗GFAP(glial fibrillary acidic protein)抗体価を測定した。また同様の方法で、GFAP刺激に対する反応性も検討した。その結果、アルツハイマー病末梢リンパ球では、Ig産生が高進しており、さらにGFAP刺激に対する反応性も高いことが示唆された。

［目的］

我々は、グリア線維酸性蛋白質(glial fibrillary acidic protein;GFAP)に対する自己抗体がヒト血清中に存在しており、IgG classの抗体価が、アルツハイマー病患者血清中で特異的に高いことを報告した(6)。さらに、その抗体が培養リンパ球上清中にも認められ、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した(4)。今迄に、いわゆるmitogenと言われているものの他にサイトカイン(2)並びにT cellを分化誘導するものとしてorosomucoid glycoprotein(5)が知られている。今回我々は、リンパ球培養上清中のIg産生量を標準曲線から計算して求め、GFAPが抗体産生に与える影響を検討した。また、細胞増殖は、MTT法にて確認した。

［材料と方法］

1) GFAPの精製と調整：牛脊髄からcrude neurofilament分画をTriton処理法により抽出し、DE-52カラムクロマトグラフィーで精製した。その後、1mM $NaHCO_3$にて透析後、10倍濃縮したRPMI-1640(GIBCO)と9:1の割合で混合し、450nmのミリポアフィルターにて濾過した。蛋白濃度はLowry法にて測定した。

2) リンパ球の単離：アルツハイマー病(case1;age 73:sex M:duration 5years, case2;59:F:7years)及びcontrol(case1;age 59:sex F,case2;57:F)の肘静脈より採取したヘパリン加末梢血をMono-Poly Resolving Medium(Flow)に重層後、300x g,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) GFAPによるリンパ球の刺激：20% FCS(Bioproducts)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$5x10^5$ /wellに調整したリンパ球に対して、GFAPが終濃度10μg/ml,50μg/ml,100μg/mlになるように加えた。さらに、GFAPと共にInterleukin-2(rIL-2)(武田薬品より供与)を250IU/mlになるように加えた。positive controlとして、PWM(Sigma)を2.5μg/ml culture media のものを用いた。

4) MTT法による細胞増殖の確認：培養後、3日目にMTT assay(3)を行ない、刺激により細胞が増殖していることを確かめた。

5) IgG及びIgMによる標準曲線の作成：マイクロプレート上でanti-human IgA+IgG+IgM(KPL)を500倍希釈したものを4℃で12時間静置し、0.1% BSA-Tris緩衝生理食塩水-0.02% Tween20(TBS-T)にて3回洗浄後、3% BSA-TBS-Tで1時間blockingした。再び洗浄後、human IgG(Immunotech)及びhuman IgM(chemicon international)のの希釈系列を作り、それを50μlずつ入れて1時間反応させた。同様に洗浄しながらbiotinylated anti-human IgG又はIgM(Vector)x5000を加えて室温で1時間、続いてhorseradish peroxydase-Avidin D(Vector)x10000を加えて室温で30分間静置した後、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、Igの定量が可能であることを確認した。

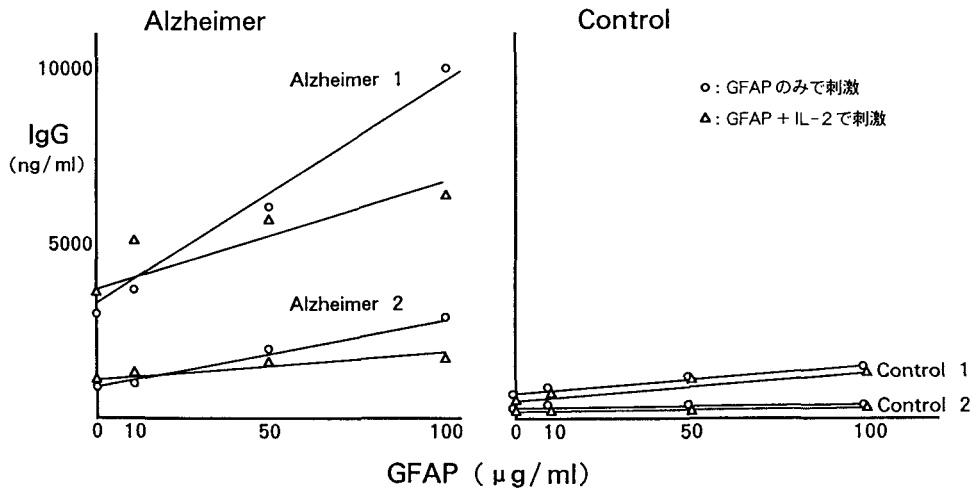
6) 培養上清中のIgGの定量：anti-human IgA+IgG+IgMを固相化した後に、培養後7日目の培養上清を希釈したもの(IgG測定にはx100,IgM測定にはx10)を50μl加えて上記と同様に吸光度を測定した。そのOD価から標準曲線よりIgの濃度を計算により求めた。

7) 抗GFAP抗体価の測定；GFAP 0.01mg/mlを固相化抗原とし、4℃で12時間静置し、0.1%BSA-TBS-Tで3回洗浄後、3%FCS-TBS-Tにて1時間blockingした。再び洗浄後、polyclonal anti-GFAP(Biomeda)の希釈系列を作り、biotinylated anti-rabbit IgG(Vector)を用いて上記と同様に、Avidin-Biotin法でELISAの標準曲線を描いた。培養上清中の抗体価は、第1反応に培養上清50μl,第2反応にはbiotinylated anti-human IgGを用いて測定した。

［結果］
図に示すように、リンパ球培養上清中のIgGは、無刺激にても検出されるが、アルツハイマー病で、健常者よりも高値を示していた。GFAP刺激を加えると、抗体産生の増強が、GFAP100μg/mlまで認められた。また、IL-2を加えた場合、単独では効果は見られなかったが、GFAPと共に加えると、アルツハイマー病において、IgGの産生が高進していた。IgMにおいても同様で、GFAP及びIL-2の刺激による抗体産生の増強がアルツハイマー病において認められた。また、抗GFAP抗体価に関しては,アルツハイマー病、健常者共に無刺激のときよりはPWMにより抗体価が高くなることが観察され、さらにアルツハイマー病ではGFAP及びIL-2刺激にて抗体価が上がる例が見られた。

［考察］
GFAP刺激によりIg抗体産生が上昇する事よりGFAPそのものがB細胞に働きかけてpolyclonalにB細胞を活性化させていることが示唆される。また、アルツハイマー病では、GFAP存在下でT細胞のIL-2反応性が高進していたことが考えられる。アルツハイマー病において、グリア細胞の増殖は神経原線維変化、老人斑に伴い認められるが、全脳においてもGFAPの過剰生産や集積が認められるとする報告もある(1)。この事よりGFAP産生が増加しておりそのGFAPそのものがリンパ球自体を何らかの方法で刺激して免疫系に影響を与えていると推察される。また、抗GFAP抗体産生B細胞群は2次性免疫応答により生じていると考えられるが,GFAPそのものについてもmitogen様のリンパ球活性化の働きがあることが推定される。今後もアルツハイマー病患者における免疫反応の異常を検討することで、アルツハイマー病の病因、病態との関与が示唆されるであろう。

［文献］
(1)Delacourte A.,1990 Neurology 40;33-37
(2)Kishimoto T.,Hirano T.,1988 Annu.Rev.Immunol.6;485-512
(3)Mosmann T.,1983 J.Immunol.Methods 65;55-63
(4)中村和子他、1989 神経化学 28;50-51
(5)Singh V.K.et al,1986/1987 Immunol.Lett.14;9-13
(6)Tanaka J.et al,1989 Acta Neurol.Scand.80;554-560



図;アルツハイマー病及び健常対照者のGFAP,IL-2刺激下におけるIgG産生量の比較

41 アルギニンのアストロサイトへの局在 － 免疫組織化学的考察 －

青木英子、仙波禮治、御子柴克彦*、柏俣重夫
（愛知県コロニー研究所、*阪大蛋白研）

〔要約〕

一酸化窒素（NO）がグアニル酸シクラーゼを活性化し、この NO がアルギニンに由来することが最近知られてきた。そこでモルモットで抗アルギニン抗体を作成、精製し、免疫組織化学的に脳内のアルギニンの所在を検討した。ラット脳と脊髄においては主にアストロサイトに反応がみられ、小脳 Bergmann グリア細胞と血管周囲のアストロサイトの突起が特に顕著に染色された。これらの結果は、アストロサイトがアルギニンを介して脳の機能を調節している可能性を示唆しているものと考えられた。

［はじめに］

最近、cGMP を増大させ血管の弛緩を起こす内皮細胞由来血管拡張因子（EDRF）が内在性の NO そのものであり(1)、この NO が脳においては可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し、cGMP の濃度を増加させ(1,2)、またその NO は L-アルギニンのグアニド基からつくられること(3)が報告されている。そこで抗アルギニン抗体を作成、精製し、脳内のアルギニンの所在を免疫組織化学的に検討した。

［方法］

抗アルギニン抗体は以下のようにして作成した。L-アルギニン 100 μmol を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）1 ml に溶かし、ホルマリン 120 μmol を加え、30 分後にグルタールアルデヒド（GAL）50 μmol をさらに加えた。30 分後に上記緩衝液 1 ml に溶かしたモルモット血清アルブミン（GPSA）12 mg を加え、L-アルギニン-GAL-GPSA 複合体を作成した。3 時間後に水素化ホウ素ナトリウム（4 mg/ml）0.1 ml を加えて反応を終了させ、上記緩衝液に対して透析した。完全フロイントアジュバントと混和し、モルモットに反復注射した。得られた抗血清はアルギニン - ホルミルセルロファインを用いて精製した。他のアミノ酸と精製抗体との交叉は dot immunobinding assay によりチェックした。

2 ヶ月齢の SD 系ラットを Schmechel らの固定液で潅流固定した。ビブラトームで 30 μm 切片を作成し、PAP 法と DAB を用いて染色した。

［結果と考察］

dot immunobinding assay の結果、精製抗体は他のアミノ酸（L-オルニチン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、GABA、グリシン、タウリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリン、β-アラニン、ヒスタミン、L-ヒスチジン、L-システイン、L-シスタチオニン）とアルブミンとの複合体とは反応しなかった。免疫染色したところ、抗アルギニン抗体には主にグリア細胞が反応を示した。大脳皮質、脳梁、内包、視床、脳幹、小脳脚、小脳、脊髄で多くのアストロサイトが反応した。血管周囲のアストロサイトと小脳 Bergmann グリア細胞が特に顕著な反応を示した（図、1- a, b）。一方 3 日齢、10 日齢のラット脳の隣接切片を各々抗アルギニン抗体と抗 MBP 抗体とで反応させたところ両者の染色部位は一致せず、抗アルギニン抗体はオリゴデンドロサイトと反応しないものと思われた。小脳核、前庭神経核などの一部のニューロンの細胞体も染色されたが、強いものではなかった。脳幹から脊髄を通る神経線維の一部ははっきりした染色像を示した。

今回、脳組織中のアルギニンは主にアストロサイトに存在することが示された。生体内のアルギニンはアルギノコハク酸リアーゼによって生成し、アルギナーゼでオルニチンと尿素に分解される。アルギノコハク酸リアーゼはニューロンよ

りグリア細胞に多く存在し、アルギナーゼの活性はニューリノーマ、グリオーマで観察されているが(4)、これらの生化学的データは我々の組織学的結果を支持する。また、小脳の Bergmann グリア細胞で顕著な染色像がみられたが、小脳は脳内でアルギニン濃度が一番高い部位であるという報告(5)と合致する。

数年前、ラット脳で L-アルギニンが可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化することが報告された(6)が、最近カルモジュリン依存性 NO 合成酵素の働きによって L-アルギニンのグアニド基から NO が生成され(3)、この NO が可溶性グアニル酸シクラーゼ活性を増大させ、細胞内 cGMP 値を上げることが報告されている(1,3)。最近内皮細胞では L-アルギニンから EDRF すなわち NO が生成されることが報告された(2)が、生体では血管周囲のアストロサイトの突起から L-アルギニンが放出され、血管内皮細胞に取り込まれ、NO が生成されるのではないかと想像される。また、NO 合成酵素が小脳プルキンエ細胞に存在することはまだ確かめられていないが、カルモジュリン、グアニル酸シクラーゼ、cGMP がプルキンエ細胞に高濃度に存在することを考えると、小脳皮質においても同様な機構、すなわち Bergmann グリア細胞から L-アルギニンが放出され、隣接したプルキンエ細胞によって取り込まれ、そこで NO が生成され可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化する機構が働いているのではないかと推測される。アルギニンがアストロサイトに局在しているという今回の結果は、アストロサイトが、L-アルギニンを通して、神経系の制御に関与している可能性を示すものと考えられた。

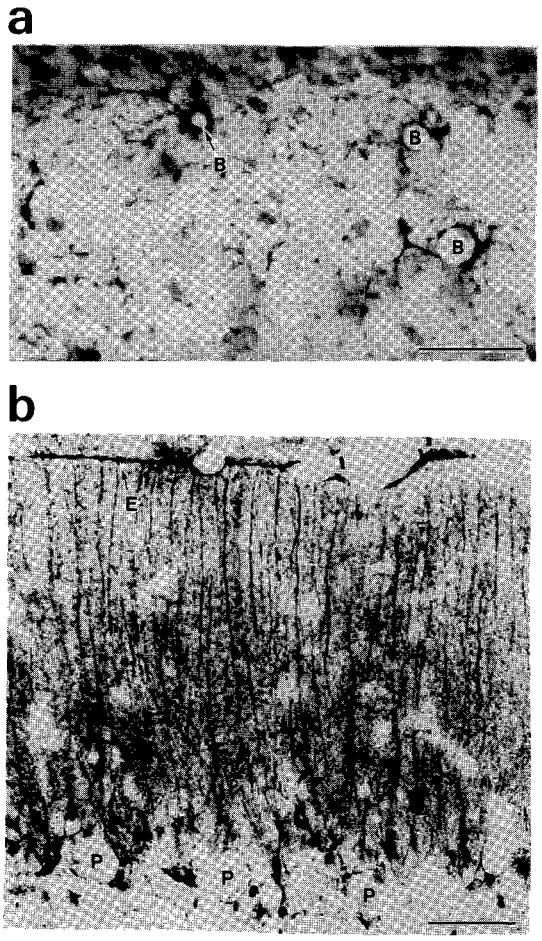


図１、２ヶ月齢ラット小脳におけるアルギニンの分布

a、血管内皮細胞の周囲を囲むアストロサイト（矢印）とその突起が染色されている。B; blood vessel, Bar=30μm

b、Bergmann グリア細胞が強く染まっている。E; endplate of Bergmann glial cell, P; Purkinje cell, Bar=50μm

[文献]

1. Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. and Moncada, S. (1987) Nature 327, 524-526.
2. Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M.J. and Monkada, S. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5159-5162.
3. Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. and Moncada, S.(1988) Nature 333, 664-666.
4. Trapeznikova, S.S., Navasadaryantz, D.G., Levchenko, L.I., Khalansky, A.S. and Khokhlov,A.P. (1986) Vopr. Med. Khim. 32, 29-34
5. Perry, T.L., Berry, K., Diamond, S. and Mok, C. (1971) J. Neurochem. 18, 513-519
6. Deguchi, T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7617-7619

42 アストロサイト培養上清中の内皮細胞遊走促進蛋白

石崎泰樹、室田誠逸
（東京医歯大・歯・顎研機能）

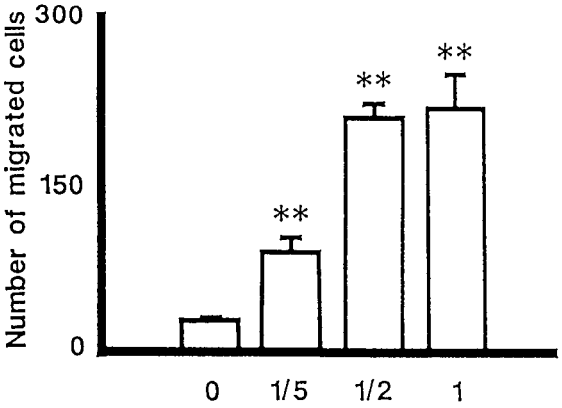
〔要約〕
ラット胎児脳よりアストロサイトを分離・培養し、その培養上清の、ウシ頸動脈由来内皮細胞の運動性に及ぼす影響を検討した。アストロサイトの培養上清は、血管内皮細胞の運動性を著明に亢進させた。この運動性促進活性は血管内皮細胞に対してchemotacticかつchemokineticに作用した。この活性は線維芽細胞の運動性は亢進させなかった。この活性は分画分子量30,000の限外濾過膜を透過せず、熱処理及びトリプシン処理で失活した。以上より培養アストロサイトは血管内皮細胞の運動性を亢進させる蛋白を合成・分泌することが、明かになった。

アストロサイトが血液・脳関門の形成・維持に関わっていることを示唆する知見が近年集積しつつある。脳内の微小血管の基底膜側がアストロサイトの足突起によって殆ど完全に覆われているという極めて特異な構造が、アストロサイトの、血液・脳関門の形成・維持機構への関与の構造的基盤であると考えられるが、如何にしてこの特異な構造が誘導・維持されるのかに関しては未だ全く知見が得られていない。このような構造が成立する原因として、(1)微小血管がアストロサイトの足突起を自らの側に引き付ける、(2)アストロサイトが微小血管を自らの方向に引き寄せる、(3)両者が互いに引き寄せ合う、という３つの可能性が考えられる。そこで我々はアストロサイトが微小血管を自らに引き寄せている可能性を検証するために、アストロサイトを培養し、その培養上清が、血管内皮細胞の遊走に対して如何なる影響を及ぼすかを検討した。

［実験方法］
アストロサイトはSprague-Dawleyラット19日胚の大脳より分離し、単層培養系が得られるまで10%ウシ胎児血清（FBS）を添加したDulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）中で培養した。単層培養系が得られた時点でリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で２回洗浄した後、0.5%ウシ血清アルブミン（BSA）を添加したDMEMに培地交換し、この培地中で４日間培養し、培養上清を採取した。培養上清は孔径0.22 μmのフィルターで濾過した後、実験に用いた。血管内皮細胞はウシ頸動脈より分離し10%FBSを添加したDMEM中で培養したものを用い、血管内皮細胞遊走能の測定は、Boyden chamber法により行った。フィルターは孔径8 μm、厚さ10 μmのものを用い、下室にアストロサイト培養上清を、上室に血管内皮細胞懸濁液を添加後、CO_2 インキュベーター内で４時間静置し、フィルターの下面に遊走した細胞をヘマトキシリンで染色し計数した。

［結果］
アストロサイトの培養上清は用量依存的に血管内皮細胞の遊走を促進した（図１）。濃度勾配が無い場合でも内皮細胞の遊走を促進したが（chemokineticに作用）（図２ｃ）、濃度勾配がある場合に最も強力に内皮細胞の遊走を促進した（chemotacticに作用）（図２ｂ）。線維芽細胞の運動性に対しては影響を及ぼさなかった。培養上清を熱処理（100°C 、10分間）、トリプシン処理（0.05%、37°C、30分間）した後に、内皮細胞遊走能に及ぼす影響を検討したところ、促進効果は全く認められなくなった（図３）。培養上清を分画分子量30,000の限外濾過膜により分画したところ、遊走促進活性は限外濾過膜を透過せず、濾過膜上にのみ回収された。またこの活性はCM-52には吸着せず、DE-52に吸着し0.6MのNaClで溶出されることから、acidic な蛋白であることが示唆された。

図1



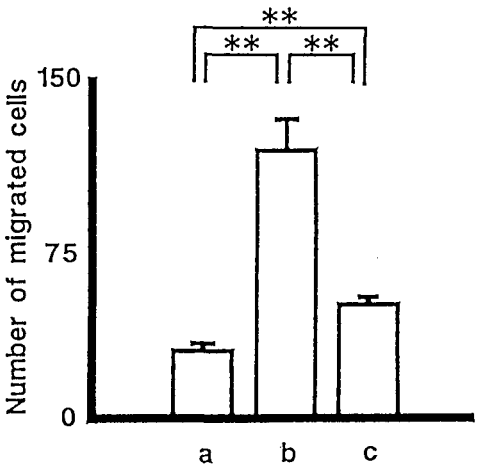
0：コントロール（0.5% BSAを添加したDMEM）

1/5：５倍希釈したアストロサイト培養上清

1/2：２倍希釈したアストロサイト培養上清

1：アストロサイト培養上清

図2



a：コントロール（上室・下室の双方に0.5%BSAを添加したDMEMが存在）

b：下室のみにアストロサイト培養上清が存在

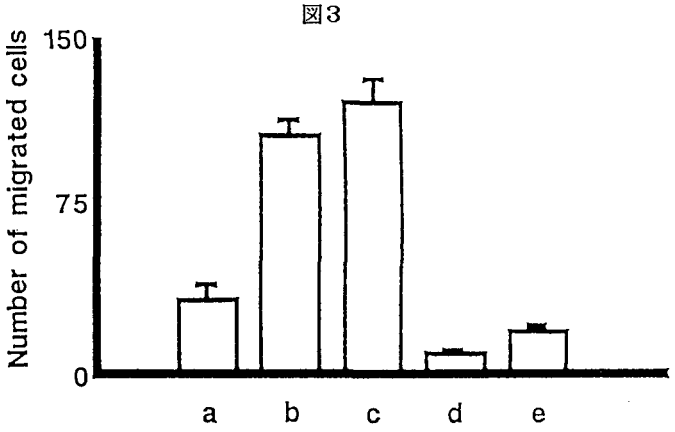
c：上室・下室の双方にアストロサイト培養上清が存在

［考察］

我々の結果より、培養アストロサイトは血管内皮細胞に対して強力な遊走促進作用を示す蛋白を合成・分泌することが明かになった。この蛋白の生理的意義は未だ明かではないが、アストロサイトがこの蛋白を介して微小血管を自らに引き寄せ、脳内の微小血管の特異な構造を誘導している可能性が考えられる。

最近細胞の運動性を亢進させる蛋白が線維芽細胞、メラノーマ細胞などの培養上清から３種類単離され、これらが共通の性質を有することが示され大きな注目を集めている（1-3）。アストロサイト培養上清中の内皮細胞運動促進因子のこれらの蛋白との異同を現在検討中である。

図3



a：コントロール（0.5% BSAを添加したDMEM）

b：アストロサイト培養上清

c：アストロサイト培養上清＋トリプシン・インヒビター

d：トリプシン処理したアストロサイト培養上清＋トリプシン・インヒビター

e：熱処理したアストロサイト培養上清

［文献］

1. Gherardi, E. et al. (1989) Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 86, 5844-5848

2. Grey, A.M. et al. (1989) Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 86, 2438-2442

3. Liotta, L.A. et al. (1986) Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 83, 3302-3306

43　グルタミン酸によるラット脳初代培養アストロサイトのｓｗｅｌｌｉｎｇ

小山　豊，馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

〔要約〕

グルタミン酸(Glu)により生じる初代培養アストロサイトのswellingにおけるＣａ$^{2+}$の関与を^{3}H-O-methyl-glucose(^{3}H-OMG)を用いて検討した。0.5 mM Glu処置による^{3}H-OMG space増加のタイムコースには、処置後10分で認められる部分と、30分後より生じる部分が認められた。細胞外液からのＣａ$^{2+}$の除去は30 分以上の処置で認められる部分のみを消失させた。Furosemide(2 mM)は、Ｃａ$^{2+}$存在,非存在下両条件下での^{3}H-OMG space増加を抑制したが、verapamil(0.1 mM)、diltiazem(0.1 mM)、ketamine(1 mM)の抑制作用はＣａ$^{2+}$存在下でのみ認められた。Ｃａ$^{2+}$非存在下でのswellingは可逆的であったが、Ｃａ$^{2+}$存在下では、その可逆性は認められなかった。アストロサイトの有する細胞容積の調節機構は、この細胞の機能発現に重要な役割をもつ。GluがＣａ$^{2+}$の流入を介してそのswellingを不可逆的にしたことは、アストロサイトにおけるGlu伝達の病理学的意義を示す。

【目的】

脳虚血などの脳障害時に認められる神経細胞の脱落が、グルタミン酸（Glu）受容体の活性化によって生じた過剰なＣａ$^{2+}$の流入によって生じることが明らかにされ、Gluを介する神経伝達の異常の病理学的な重要性が論じられている。アストロサイトは、中枢神経系において細胞外液のイオン濃度や浸透圧の調節などを行ない神経細胞の活動を支える細胞である。Gluはアストロサイトにswellingを引き起こすことが知られているが、(1,4)その発生機構および生理学的あるいは病理学的意義は明かではない。一方、近年Glu受容体の活性化がアストロサイトの細胞内Ｃａ$^{2+}$濃度を増加させることが報告された(3)。そこで今回、GluによるアストロサイトのswellingにおけるＣａ$^{2+}$依存性について、ラット大脳初代培養細胞を用い検討した。

【方法】

初代培養アストロサイトは、生後1-2日のSD系ラット大脳より Kimelberg の方法(4)に従い調製した。10%の牛胎児血清を含む Eagle-最小培地でアストロサイトを14日培養した後、培地中に0.25 mM dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP)を加え更に10-12日培養し実験に用いた。本培養条件で得られた細胞は、92%以上がGFAP陽性であった。

アストロサイトのswellingは、平衡時に細胞内に取り込まれた^{3}H-O-methyl-glucose(^{3}H-OMG)量を測定し、細胞の容積(^{3}H-OMG space)を直接算出することで評価した。培地を除去し、Krebs-Ringer液(KR)で2時間プレインキュベートした後、0.1-0.5 mMのGluでアストロサイトにをswelling を惹起させた。^{3}H-OMGは、それぞれの反応停止の20分前にKR中に添加した(0.5 μCi, 1.0 mM.)。細胞内に取り込まれた^{3}H-OMG量は、反応液を除去し 1 mM phloretinを含む氷冷KRで細胞表面を洗浄後 0.1 mM NaOHで細胞を可溶化し、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し求めた。

【結果】

図1 にDBcAMPで分化誘導させた初代培養アストロサイトにおける、Gluによる^{3}H-OMG space増加のタイムコースを示す。^{3}H-OMG spaceは、0.5 mM Glu処置 10分で有為な増加が認められ、20 分まで細胞容積はほぼ一定であった。そして 30分以上のGlu処置では、^{3}H-OMG spaceは更に増加し、約60分の処置で最大となった。細胞外のＣａ$^{2+}$を除いた場合でも、 10分のGlu処置でアストロサイトの^{3}H-OMG spaceの増加が認められたが、60 分までの処置時間では更に増加

することはなかった。 A23187(5 μM)は^{3}H-OMG spaceを変化させなかった(111 ± 12%:対照と比し)。また、外液からのCa^{2+}およびCl$^-$両者の除去は、Gluの作用を完全に消失させた(91 ± 4%:対照と比し)。外液Ca^{2+}の存在、非存在下それぞれの条件下で、 GluによるswellingにたいするイオンN輸送阻害薬の影響を検討した。アニオン輸送阻害薬furosemide(2 mM)は、両条件下において0.1 mM Glu、60 分の処置による ^{3}H-OMG spaceの増加を抑制した(表1)。Ca^{2+}チャンネル阻害薬であるverapamil(0.1 mM)、diltiazem(0.1 mM)、ketamine(1 mM)は、Ca^{2+}存在下の^{3}H-OMG spaceの増加のみを抑制した。GluによるアストロサイトのswellingのN可逆性を検討した。0.1 mMGlu処置で生じた^{3}H-OMG spaceの増加は、Glu除去後も持続した(図2)が、Ca^{2+}非存在下での増加は、Glu除去後30 分で認められなくなった。

【考察】

GluによるアストロサイトのswellingのN発現には、時間経過の異なる2つの部分があることが明かとなった(図1)。そして、遅れて生じるswellingは、Ca^{2+}除去で消失した。 このことは、GluはCa^{2+}依存的および非依存的にswellingを惹起することを示す。一方、A23187がswellingを惹起しないことよりCa^{2+}の効果は、Cl$^-$の流入で生じたswellingを増強するものであると考えられる。また、GluによるCa^{2+}の流入がアストロサイトのswellingを非可逆的にすることが明らかにされた。アストロサイトは自らの細胞容積を変化させ、細胞外液のイオン濃度および浸透圧の調節を行う(2,5)。従って、swellingの非可逆性は、この細胞の機能低下につながる。現在、脳の病態時にみられるGluの神経毒性が注目されているが、この神経細胞の変性が Gluによるアストロサイトの機能低下にも起因することが示唆された。

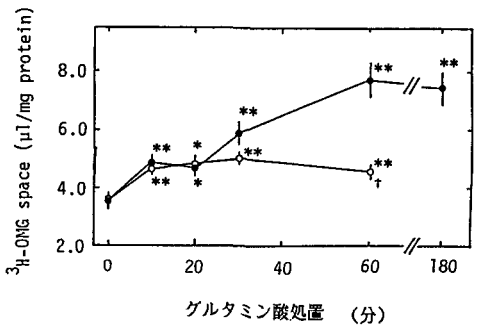


図1．グルタミン酸処置によるアストロサイトの^{3}H-OMG space増加のタイムコース．(●): normal KR, (○): Ca^{2+}-free KR
*p < 0.05, **p < 0.01 Glu非処置との比較

表1．グルタミン酸によるswelling に対するイオン輸送阻害薬の作用

	^{3}H-OMG space (μl/mg protein)	
	Normal	Ca^{2+}-free
Control	3.33 ± 0.19 (10)	3.35 ± 0.17 (7)
0.1 mM L-Glu	5.40 ± 0.31 (10)**	4.25 ± 0.23 (7)*
+ 2 mM Furosemide	3.60 ± 0.37 (5)†	3.25 ± 0.14 (3)†
+ 0.1mM Verapamil	3.97 ± 0.48 (5)†	4.68 ± 0.44 (3)
+ 0.1mM Diltiazem	4.20 ± 0.19 (5)†	4.58 ± 0.50 (4)
+ 1 mM Ketamine	4.02 ± 0.28 (4)†	4.48 + 0.41 (3)

値は平均 ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01 コントロールとの比較、
†p < 0.05 0.1 mM Glu との比較 ( ) は例数

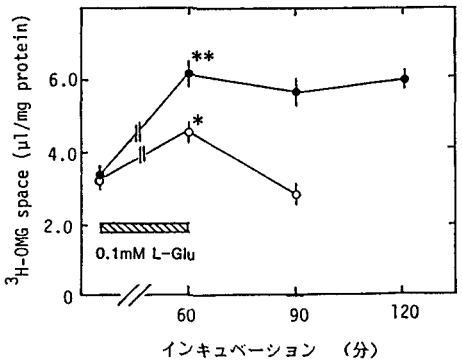


図2．グルタミン酸によるswellingの可逆性．
Ca^{2+}存在下(●)および非存在下(○)、アストロサイトを0.1mM Gluで60 分インキュベートした後、Gluを除去し^{3}H-OMGの取り込みを行った。
*p < 0.05, **p <0.01 Glu非処置との比較

【文献】

1) Chan, P.H. and Chu, L. (1989) Brain Res., 487, 380-383

2) Dietzel, I., et al. (1982) Exp. Brain Res., 46, 73-84

3) Jansen, A.M. and Chiu, S.Y. (1990) J. Neurosci., 10, 1165-1175

4) Kimelberg, H.K. (1987) J. Physiol. (Paris), 82, 294-303

5) Walz, W. and Hinks, E.C. (1985) Brain Res., 343, 44-51

44 マウス初代培養グリアおよび神経細胞からのアラキドン酸代謝産物の遊離

大曲 清, Jean-Philippe PIN*, Joel BOCKAERT*
(九大・医・精神科, *CCIPE Montpellier France)

〔要約〕
初代培養グリアおよび神経細胞を用いて、ionomycinおよびグルタミン酸（Glu）受容体刺激によるアラキドン酸（AA）代謝産物の遊離について調べた。線条体、皮質、小脳の初代培養神経細胞を[^{3}H]－AAでラベルし、グルタミン酸受容体アゴニストおよびionomycinによるCa^{2+}流入で刺激すると、放射性活性物質が遊離された。この[^{3}H]－AA代謝産物をクロロホルムで抽出した後、逆相HPLCで分離し放射性活性を調べたところAAのピークのみが得られた。この結果から、神経細胞からたとえprostaglandins（PGs）やhydroxyeicosatetraenoic acids（HETEs）が遊離されるとしてもその量はAA全体の1／5000以下であると考えられる。一方グリア細胞からは，ionomycinによってAA代謝産物が遊離され、逆相HPLCでPGD_2，PGE_2，$PGF_{2\alpha}$，HHT，HETE（主に15，11，5）が分離された。PGs遊離はcyclooxygenaseの阻害剤indomethacinによって完全に抑制された。

AAおよびその代謝産物は様々な生理活性を有することが知られている。Piomelli（1）はAplysiaの神経を使ってAAのlipoxygenaseによる代謝産物がセカンドメッセンジャーである可能性を示唆している。またAAおよびその代謝産物が海馬のグルタミン酸シナプスのlong term potentiation（LTP）に関与していることが示唆されている。また更にDumisら（2）は初代培養神経細胞を使ってNMDA受容体刺激により[^{3}H]－AAが遊離されることを報告し、これはNMDAチャンネルを介したCa^{2+}流入によるPLA_2の活性化の結果であると考えた。哺乳動物の脳において、多くのAA代謝産物が報告されているが、これらの大部分は微小血管や血液由来のものである。哺乳動物のastrocyteやAplysia神経でPGsやHETEsの遊離も報告されているが、これらの代謝産物の由来する細胞についての詳細な報告はまだない。今回初代培養グリアおよび神経細胞を使ってグルタミン酸受容体刺激およびCa^{2+}流入によって遊離されるAA代謝産物について検討した。

（材料と方法）

1 細胞培養： 初代培養細胞の作成はWeissら（3）の方法によって行った。線条体、大脳皮質は、14－15週令のマウスの胎児脳から切り出し、パスツールピペットで解離した後、poly-L-ornithine前処置し、牛血清を含む培養液を入れたコースター上にうえつけた。小脳顆粒細胞の培養には7週令のマウス胎児脳を用い、25mM－KClおよび5％馬血清を培養液に加えた。培養開始48時間後に、arabinosideを添加した。グリア細胞の培養は線条体と同様に切り出して解離し、うえつけたあと週に2回培養液を交換した。この条件下で、グリア細胞の大部分はastrocyteであった。

2 [^{3}H]－AA代謝産物の測定： 神経細胞は培養開始後12－13日後に、グリア細胞は20－22日後に実験に使用した。前日10μCiの[^{3}H]－AAでラベルし、24時間後に、2ml Krebs bicarbonate bufferで細胞を5分おきに、5回洗浄した。その後15分間細胞を1mlの100μM－Glu，10μM－ionomycinで刺激した。そのmediumの1／10量の放射性活性を測定し、残りをHPLCにかけた。コースターの細胞内に残留している放射性活性は0．2M－NaOH，0．5％TritonX 100で溶解した後液体シンチレーションで測定した。

3 [^{3}H]－AA代謝産物のHPLCによる分離： Mediumをまずformic acidでpH3．5に調整し、クロロフォルムで2回抽出した後speed－vacで脱気した。HPLCはBeckman 114型2台、システムコントローラーを用いた。逆相HPLCの溶媒は水、アセトニトリルで流速を3ml／mとした。順相HPLCは ヘキサン、酢酸、およびイソプロパノールを用い流速を1．5ml／m とした。フラクションコレクターでそれぞれ1．5mlずつ集め各分画を液シンでカウントした。

（結果）

1　線条体、皮質、小脳顆粒神経細胞からの［^{3}H］－ＡＡ代謝産物の遊離：　Ｇｌｕおよびｉｏｎｏ－ｍｙｃｉｎ刺激によってｍｅｄｉｕｍの放射性活性が増加した（Ｔａｂｌｅ　1）。このｍｅｄｉｕｍをＨＰＬＣにかけたところＡＡのピークのみが得られ、ＰＧｓ，ＨＥＴＥｓは検出されなかった。線条体細胞で　ｉｏｎｏ－ｍｙｃｉｎ刺激のサンプルを３つプールし、感度を３倍にしてもＰＧｓ，ＨＥＴＥｓのピークは得られなかった。

2　線条体グリア細胞からの［^{3}H］－ＡＡ代謝産物の遊離：　Ｉｏｎｏｍｙｃｉｎ添加刺激により神経細胞より高い放射性活性の遊離が見られた。Ｇｌｕ添加刺激では変化がなかった。ＭｅｄｉｕｍをＨＰＬＣで分離したところPGD_2，PGE_2，$PGF_{2\alpha}$，および１５，１１，５ＨＥＴＥのピークが得られた（Ｆｉｇ．１）。

3　グリア細胞から遊離されるＰＧｓの特定：　Ｃｙｃｌｏｏｘｙｇｅｎａｓｅの阻害剤であるｉｎｄｏ－ｍｅｔｈａｃｉｎ　２．５μＭ前処置により、ＰＧｓのピークは完全に抑制された（Ｆｉｇ．１）。しかしＡＡの量は変化を受けなかった。

4　グリア細胞から遊離されるＨＥＴＥｓの特定：　２つの非特異的ｌｉｐｏｘｙｇｅｎａｓｅ阻害剤ＮＤＧＡ，ＥＴＹＡにより、ＨＥＴＥｓの遊離は大部分抑制された。（Ｆｉｇ．１）　ＡＡおよびＰＧｓ遊離も部分的に阻害された。遊離されるＨＥＴＥｓをさらに詳細に明らかにするために逆相ＨＰＬＣで分離した後、ＨＥＴＥｓの分画を脱気後、さらに順相ＨＰＬＣにかけ分離した。その結果遊離されるＨＥＴＥｓは１５，１１，５，１２，８，９ＨＥＴＥであることが明らかになった。

（考察）

今回の研究の結果、哺乳動物の神経細胞で、ｃｙｃｌｏｏｘｙｇｅｎａｓｅおよびｌｉｐｏｘｙｇｅｎａｓｅを介したＡＡの代謝産物は検出されなかった。この結果から神経細胞では、これらの酵素の活性は非常に低いと考えられる。一方、中枢神経のグリア細胞からは、Ca^{2+}流入によりＰＧｓやＨＥＴＥｓが遊離され、これらの細胞には、ｃｙｃｌｏｏｘｙｇｅｎａｓｅやｌｉｐｏｘｙｇｅｎａｓｅが存在することが示唆される。また神経細胞から遊離されたのがＡＡのみであったため、ｅｉｃｏｓａｎｏｉｄがＬＴＰに関与しているとしても、それはＡＡ自身であることが示唆された。またＡＡがｃｙｃｌｏｏｘｙｇｅｎａｓｅ，ｌｉｐｏｘｙｇｅｎａｓｅによって代謝されるのは主にグリア細胞においてであり、これらのＡＡ代謝産物が神経とグリアの相互作用に重要な役割りを果たしている可能性が示唆された。

（文献）

1) Piomelli, D. A. et al. Nature, 328 38-43 (1987)

2) Dumis, A. et al. Nature, 336 68-70 (1988)

3) Weiss, S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 2238-2242 (1986)

Table 1

	Total [^{3}H]-AAM released from culture neurons (%)			
	Striatum (6)	Striatum (13)	Cortex (13)	Cerebellum (13)
Base	2.09 ± 0.29 (7)	2.70 ± 0.15 (13)	2.03 ± 0.07 (3)	2.70 ± 0.22 (3)
Ionomycin	12.4 ± 1.47 (4) ^{a}	11.0 ± 0.79 (8) ^{a}	5.31 ± 0.52 (3) ^{a}	5.80 ± 0.38 (3) ^{a}
Glutamate	4.03 ± 0.46 (4) ^{b}	4.36 ± 0.16 (11) ^{a}	3.04 ± 0.23 (3) ^{b}	4.04 ± 0.45 (3) ^{b}

Table 1

Total [3 H]-AA metabolites released from primary cultures of neurons from different brain regions.Result are means±SEM of (n) experiments.When compared to the Base, t-test analysis revealed statistical difference with a p<0.001; b p<0.05.

Fig.1

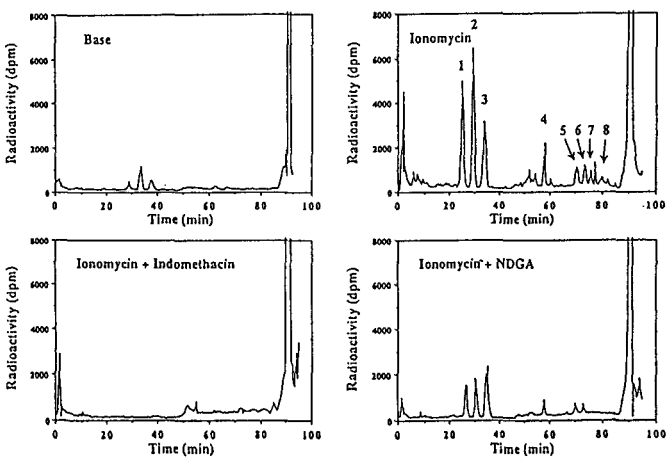


Fig.1

Revers-phase HPLC analysis of the [3 H]-AA metabolites release from glia cell cultures.The retention time of unlabelled standards PGF_2,PGE_2,PGD_M,HHT ,15HETE,11 HETE, 12HETE and 5HETE corresponding to peak number 1,2,3,4,5,6,7,and 8 respectively.

中隔野初代分散培養系における［^{3}H］－アセチルコリン合成活性及び［^{3}H］－コリン取り込み活性の発現

45

福嶋伸之、小鹿幸生＊、入江恒正
（住友製薬・研究所、＊名市大・医・第２内科）

〔要約〕

中隔野初代分散培養系を用いて、コリン作動性神経の発達期の［^{3}H］－アセチルコリン合成活性及び［^{3}H］－コリン取り込み活性の発現を調べた。この系において、溶液中のNaに依存した［^{3}H］－アセチルコリン合成活性、［^{3}H］－コリン取り込み活性(Na依存性高親和性[HAChU]及びNa非依存性低親和性[LAChU])及びコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)活性が認められたが、それぞれの発現には時間的なずれがあった。培養後期（培養５－７日）においては成熟動物と同様なHAChUとChATの機能的な連関が示唆されたが、培養初期（培養２－３日）には両者の機能的な連関は認められなかった。これらのことから、コリン作動性神経の表現型(phenotype)と考えられるHAChUとChATの発現の様式は異なっていると思われた。

［目的］

中隔野はコリン作動性神経を豊富に含む部位であり、その発達を調べる目的で初代分散培養系が広く用いられている。既にNGF等の神経栄養因子の作用が、この系においてChAT活性や生存活性を指標にして調べられてきた(1､2)。しかしながら､発達過程における神経の活動性を生化学的に知るためには神経伝達物質の合成能力を調べることも重要である。一方､①HAChUは､コリン作動性神経のphenotypeの１つであると考えられること②成熟動物のコリン作動性神経の終末部においてアセチルコリン合成はこのHAChUと連関していることから、コリン作動性神経の発達期のアセチルコリン合成活性、HAChUやChATの発現を調べ、比較することは興味深いことである。今回、我々は、中隔野初代分散培養系においてこれらの機能の発現について検討した。

［実験方法］

中隔野初代分散培養；ラット胎仔（１５日胚）より中隔野をとりだし、0.25%Trypsin及び0.01% DNase Iにより細胞を分散した。10%FCSを含むD/F培地(DMEM/F-12=1/1,30nM Sodium selenite, 15 mM Hepes,20μg/ml Gentamicin)に懸濁し、あらかじめPoly-DL-ornithineでｺｰﾄされた24穴ﾌﾟﾚｰﾄに10^6/wellの密度でまき37℃､5%CO_2の培養下においた(day0)。1日後(day1)にD/F/TIP培地(100μg/ml Transfferin,5μg/ml Insulin,20nM Progesteroneを含むD/F培地)に変えてさらに培養を続けた。

［^{3}H］－アセチルコリンの合成活性及び［^{3}H］－コリンの取り込み活性の測定;Ojikaらの方法(3)に従った。細胞をhigh-K-Tyrode溶液で37℃10分間preincubationした後、[^{3}H]-cholineを含むCa-free normal Tyrode溶液またはCa,Na-free Tyrode溶液中でさらに30分間incubationした。その後、1N formic acid/aceton(15/85)による抽出、減圧乾燥を行いnormal Tyrode溶液に溶解した。１部を［^{3}H］－コリン取り込み活性用に計測し、残りはcholine kinaseでfreeの[^{3}H]-cholineを[^{3}H]-phos-phocholineに変換し[^{3}H]-acetylcholine(Ach)のみをtetraphenylboronでトルエン層に抽出、計測することで［^{3}H］－アセチルコリン合成活性を算出した。

ChAT活性の測定；Fonnumの方法(4)に従った。

［実験成績］

中隔野初代分散培養系において、溶液中にNaが存在するとき［^{3}H］－アセチルコリン合成活性はday3では認められなかったが、day5より出現しday7ではday5の約9倍となった。しかしながら､Na freeの溶液下では、day7においても［^{3}H］－アセチルコリン合成は認められなかった(Fig.1)。一方、［^{3}H］－コリン取り込みを調べたとき、Naに依存しない取り込み活性とNaに依存した取り込

み活性がday2より認められ、day7では、それぞれday5の約2,4倍となった(Fig.2)。Naに依存して取り込まれた[^{3}H]-cholineから[^{3}H]-Achに変換された割合を、Fig.3に示した。day5においては8%の[^{3}H]-cholineが[^{3}H]-Achに変換したが、day7ではその割合は18%に上昇した。さらに、この変換効率はChAT活性を反映していると考えられることから、ChAT活性を測定し両者を比較した(Fig.3)。ChAT活性は、day2から認められday3からday7にかけて上昇したが、変換効率の上昇の時間経過とは異なるものであった。

[考察]

中隔野初代分散培養系の[^{3}H]-アセチルコリン合成活性はNaに依存しており、系の発達と共に出現することがわかった。また、この系においては、Naに依存した[^{3}H]-コリン取り込み活性が認められ、これは成熟動物でみられているHAChUに相当すると考えられる。成熟動物においては、アセチルコリン合成に関与するHAChU及びChATは機能的に連関していることが知られている(5)。今回用いた系におけるアセチルコリン合成もNaに依存していたことから、成熟動物と同様にHAChUが関与していると考えられる。しかしながら、day3ではHAChU及びChAT活性は存在するもののアセチルコリン合成は認められなかった。また、day2ではHAChUはみられたがChAT活性は非常に低いものであった。これらのことは、コリン作動性のphenotypeと考えられるHAChU及びChATの発現の様式が異なっていることを示唆している。従って、培養初期の時点ではHAChUとChATはまだ機能的に連関していないか、連関していてもレベルが低く検出感度以下であると考えられる。このことは、ChAT活性とcholineからAchへの変換が認められる時期が両者で異なることからも推測される。

[文献]

1)Hartikka,J.and Hefti,F. (1988) J.Neurosci., 8,2967 2)Hatanaka,H.and Tsukui,H. (1986) Dev. Brain Res.,30,47 3)Ojika,K.and Appel,S.H. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.,81,2567 4)Fonnum,F. (1975) J.Neurochem.,24,407 5)Kuhar,M.J.and Murrin,L.C. (1978) J.Neurochem.,30,15

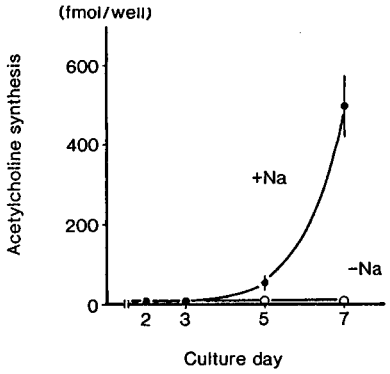


Fig.1 Time dependent [^{3}H]-acetylcholine synthesis in septal culture

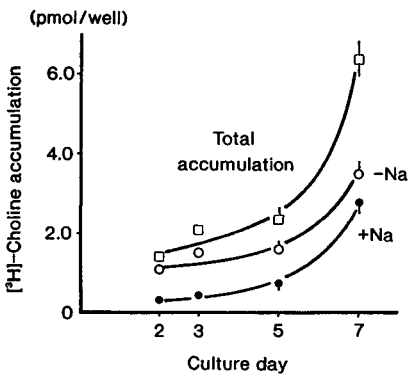


Fig.2 Time dependent [^{3}H]-choline uptake in septal culture

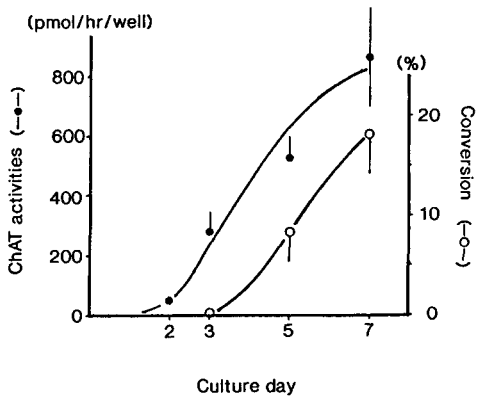


Fig.3 Time dependent ChAT activities and conversion of choline to acetylcholine in septal culture

46　ＮＧ１０８－１５細胞のｃＡＭＰ－ｒｅｓｐｏｎｓｅｅｌｅｍｅｎｔ（ＣＲＥ）結合蛋白質に対するモルヒネおよびエタノールの長期投与の作用

大杉　武、谷浦秀夫、三木直正
（大阪大・医・第一薬理）

〔要約〕

NG108-15細胞はモルヒネやエタノールの慢性投与によりアデニレートシクラーゼ系に変化を生じる。この細胞を一定期間モルヒネ、エタノールと培養してから核蛋白質を抽出した。この核蛋白質とソマトスタチンのプロモーター領域のcAMP-response element(CRE)との結合をゲルシフト法を用いて調べた。モルヒネ(50 μM)、あるいはエタノール(100mM) の長期投与によりCRE-蛋白質複合体量が減少した。このことより、cAMPにより調節を受ける遺伝子の転写活性が、モルヒネ及びエタノールの慢性投与により大きく影響を受けることが示唆された。

［緒言］

細胞内情報伝達にcAMPが重要な働きをしている。薬物耐性を生じるモルヒネやエタノールはアデニレートシクラーゼ系に変化を起こすことが知られている。NG108-15細胞にはオピエート受容体が存在し、モルヒネの短期投与によりGTP 結合蛋白（Gi）を介してアデニレートシクラーゼを抑制し、長期投与によりアデニレートシクラーゼ活性が上昇すること（１）、エタノールの急性反応としてcAMP量が増し、慢性投与によりGTP 結合蛋白質（Gs）のαs mRNAが減少することが報告されている（２）。従って、モルヒネやエタノールの慢性投与が遺伝子の発現に影響を与えることが推測される。

細菌から哺乳類の細胞まで広く、cAMPにより転写が活性化される多くの遺伝子が存在している。最近の知見から、遺伝子の転写開始点より上流のプロモーター領域にcAMPにより転写が活性化される部分―cAMP-response element(CRE)―があり、このCRE に結合する蛋白質により転写が調節されていることが知られている。今回、ソマトスタチン遺伝子のCRE を含むオリゴヌクレオチドに結合する蛋白質（CREB）がNG108-15細胞の核抽出液にあり、モルヒネやエタノールの長期間処理によりCRE-CREB複合体量が大きく変動する結果を得たので報告する。

［実験方法］

培養　　NG108-15細胞は5%牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル最少培地にて培養した。細胞数が80% 飽和になった時に薬物を投与し毎日、培養液と薬物を交換した。

核抽出液　　細胞核の抽出液の調整はDignamらの方法（３）に従って核を単離し、0.42M NaClで核蛋白質を抽出後、20 mM Hepes(pH 7.9)、 20% glycerol 、0.1M KCl、 0.2mM EDTA、0.5mM PMSF、0.5mM DTTの溶液で透析して3-5mg/mlの核蛋白質抽出液を得た。

ゲルシフト法　ソマトスタチンのCRE を含む36マーのオリゴDNA を合成し、[γ-^{32}P]ATPとT4 polynucleotide kinaseを用いて5'末端を標識した。この標識オリゴDNA と核抽出液とを室温で30分間反応した後、4% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、オートラジオグラフィーを行い、DNA-蛋白質複合体量をデンシトメーターで定量した。

［結果及び考察］

ゲルシフト法の結果（図　１）より、NG108-15細胞の核抽出液中にソマトスタチンのCRE に結合する蛋白質が存在し、非標識のCRE のオリゴDNA を加える事により移動度の遅いDNA-蛋白質複合体のバンドは消失するが、移動度の速い遊離プロー

ブに近いバンドは影響を受けなかったことから、移動度の遅いバンドがCRE と特異的に結合していると考えられる。50μM モルヒネを加えた培地で細胞を培養すると対照群に比べ、モルヒネ処理群では１日目からDNA-蛋白質複合体量が減少した（図２）。このモルヒネの作用はアンタゴニストのナロキソンで阻害された。また、100mM エタノールによっても同様にDNA-蛋白質複合体が減少した。しかし、これらの薬物の長期投与は細胞増殖には影響しなかった。モルヒネやエタノールの短時間処理（30分間）は細胞内のcAMP量を変化させるが、DNA-蛋白質複合体量には変化が無かった。 PC12細胞から精製されたCRE 結合蛋白質（43 kDa）はprotein kinase Aでリン酸化されるが、DNA 結合能には影響を与えないという報告もあり（４）、cAMP量の変化が直接にDNA-蛋白質複合体に作用しているのではなく、他の作用の関与が示唆さている。現在、 CRE結合蛋白質は数種類知られているが（５）、NG108-15細胞のCRE 結合蛋白質が既知の蛋白質と同一かどうか、またモルヒネやエタノール処理によってCRE-蛋白質複合体量が減少するのが、蛋白質の構造変化や他の阻害因子によるのかどうかなどを検討している。モルヒネやエタノールによる薬物耐性が、CRE を含む遺伝子の転写レベルに変化を与えることにより、生じる可能性が考えられ、興味深い。

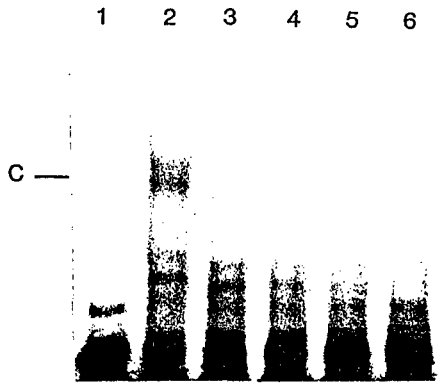


図１．ソマトスタチンCRE に結合する核蛋白質
１ ：標識プローブのみ
２ ：標識プローブとNG108-15細胞核蛋白質
3-6 ：非標識プローブを10、50、100、300倍量加えた。 C ：CRE-蛋白質複合体

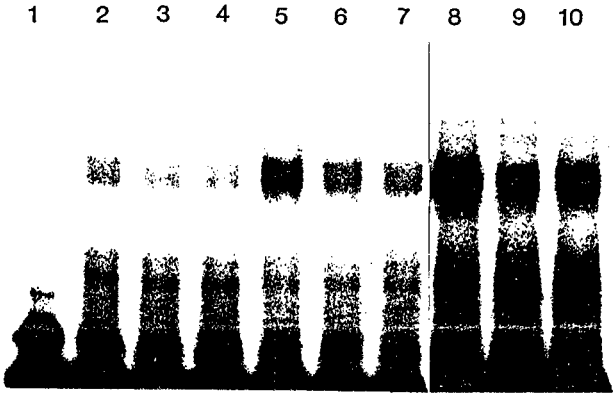


図２．モルヒネ、エタノール慢性投与によるCRE-蛋白質複合体量の変化
50μM モルヒネ、100mM エタノールを添加後、1、2、4 日目に核抽出液を調整し、ゲルシフト法でCRE-蛋白質複合体量を測定した。
１ ：標識プローブのみ
2-4 ：処理１日目（蛋白量５μｇを用いた）
5-7 ：処理２日目（蛋白量８μｇを用いた）
8-10：処理４日目（蛋白量11μｇを用いた）
2、5、8:対照群、 3、6、9:モルヒネ処理群、
4、7、10: エタノール処理群

［文献］

1) Sharma, S.K. et al., (1975) Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 72, 3092-3096

2) Mochly-Rosen, D. et al., (1988) Nature 333, 848-850

3) Dignam, J.D. et al., (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1475-1489

4) Yamamoto, K.K. et al., (1988) Nature 334, 494-498

5) Maekawa, T. et al., (1989) EMBO J. 8, 2023-2028

47 C6グリオーマ細胞におけるグルタミン酸毒性の機序について － シスチン輸送系の阻害を中心として

加藤 聖，石田外樹，根岸晃六
（金沢大・医・神経情報研伝達）

〔要約〕

C6グリオーマ細胞に10mMのL-グルタミン酸を添加すると，培養12～24時間後に遅延型の細胞変性＝細胞死が誘発される。このグルタミン酸による細胞死は，L-シスチンの共存下により完全に抑えられる。また，培養液のL-シスチンを除くと，グルタミン酸と同様なゆっくりした細胞死が招来された。そこで，[^{35}S] シスチンの取り込みに対する，L-グルタミン酸，[^{3}H] グルタミン酸の取り込みに対するL-シスチンの影響を調べたところ，いづれも拮抗的阻害を示した。このことは，C6細胞において，シスチンとグルタミン酸とが共通の輸送系を有し，かつ向きが逆，即ち対向輸送であることを意味する。また，このC6細胞において，グルタチオン（還元型）の生合成は，シスチンの取り込み（細胞内でシステインに還元）に大きく依存していた。更に，L-グルタミン酸添加に伴い，培養3～4時間後から，急速に細胞内グルタチオンレベルが減少した。以上から，C6グリオーマ細胞におけるグルタミン酸毒性は，L-シスチンの取り込み阻害並びに，その結果としてのグルタチオンの de novo 合成の抑制によるものと思われた。

［序］ 興奮性アミノ酸の一種である，L-グルタミン酸による神経毒性が，種々の中枢神経系変性疾患や脳虚血発作時の細胞変性発症に重要な役割を演じていると考えられるようになり，L-グルタミン酸の3種の受容体サブタイプとの関連で多くの報告がなされている[1,2]。また，それとは別に最近，受容体ではなく，L-グルタミン酸輸送系の見地から，このグルタミン酸神経毒性を論じる報告もあり[3,4]，混沌としているのが現状である。そこで我々は培養C6グリオーマ細胞をモデル細胞として，このグルタミン酸細胞毒性発症の機序を探るため本実験を行なった。

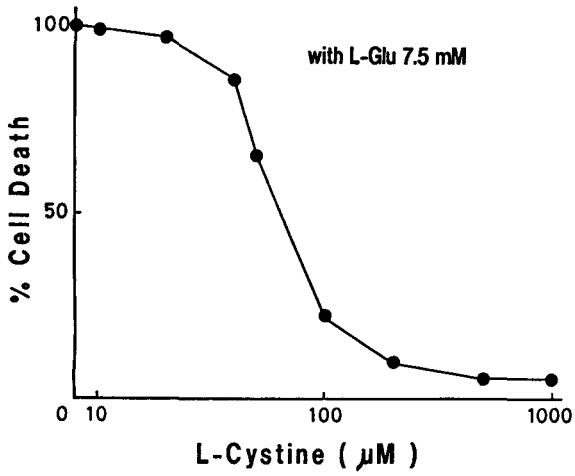
［方法］ C6グリオーマ細胞はDMEM培地（0.25 mM L-シスチン，5％牛胎児血清含有）で培養された[5]。無シスチンDMEMはNBL社製を使用した。細胞死の判定はトリパンブルー排泄試験並びにコロニー形成法にて行なった。[^{35}S] シスチンや [^{3}H] グルタミン酸の取り込みは4日間培養した stationary phase のC6細胞を用い，最終濃度（10μM-1mM），37℃，10分間インキュベートし，フィルター法にてカウントした。システイン，シスチン，グルタチオン（酸化，還元型）の分離，定量は蛍光色素によりプレラベリングし，逆相ODS，HPLC法[6]にて行なった。[^{35}S] シスチンからのグルタチオン分画へのインコーポレーションは，種々の時間取り込ませた後，過塩素酸にて除タンパクした上清を上記HPLC法で分画採取し，そのカウントから求めた。

［結果］ C6グリオーマ細胞にL-グルタミン酸を添加したところ，12～24時間後から細胞の変性がおこり大部分の細胞は死滅した。なお，アスパラギン酸やカイニン酸の添加では決して，細胞死は招来しなかった[5]。L-シスチン（0.5 mM）の共存により，このグルタミン酸毒性は完全に抑えられた（Fig. 1）。培養液からL-シスチンを除いた無シスチンDMEMで培養すると，やはり12～24時間後にグルタミン酸と同様な細胞死が誘発された。次いでC6細胞の [^{35}S] シスチンの取り込みに対してグルタミン酸は拮抗阻害を示し，他方 [^{3}H] グルタミン酸の取り込みに対してシスチンは拮抗的に阻害した。また，[^{35}S] シスチンから還元型グルタチオン分画へのインコーポレーションを調べたところ，きわめて速やかにグルタチオン分画に取り込まれることが判明した。更に，C6細胞にブチオニンスル

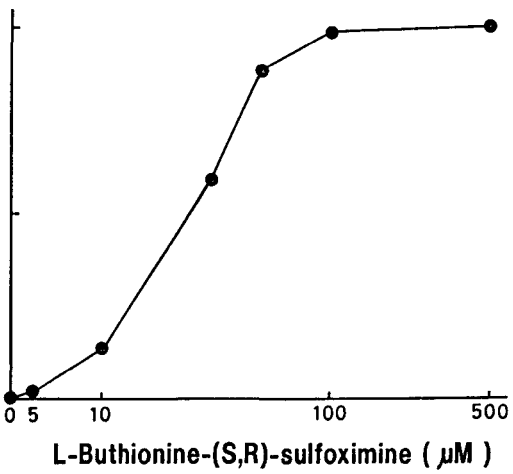
ホキシミン（グルタチオン合成阻害剤）を添加し培養したところ，ゆっくりした細胞死が観察された（Ｆｉｇ．２）。因みにこのブチオニンスルホキシミンによる細胞死にシスチンの添加は無効であった。最後にＬ－グルタミン酸（１０mM）添加後の細胞内グルタチオン濃度を測定したところ，培養初期（３～４時間後）から，急激なグルタチオンレベルの減少が見られた（Ｆｉｇ．３）。

［考察］　以上のデータからＣ６グリオーマ細胞におけるグルタミン酸毒性の機序として　１）大過剰の細胞外グルタミン酸による，グルタミン酸－シスチン対向輸送の阻害　２）その結果による細胞内グルタチオンの de novo 合成の阻害　３）細胞内酸化的ストレスによる細胞死が考えられる。

Ｆｉｇ．１．Ｌ－シスチンによるグルタミン酸毒性の阻害



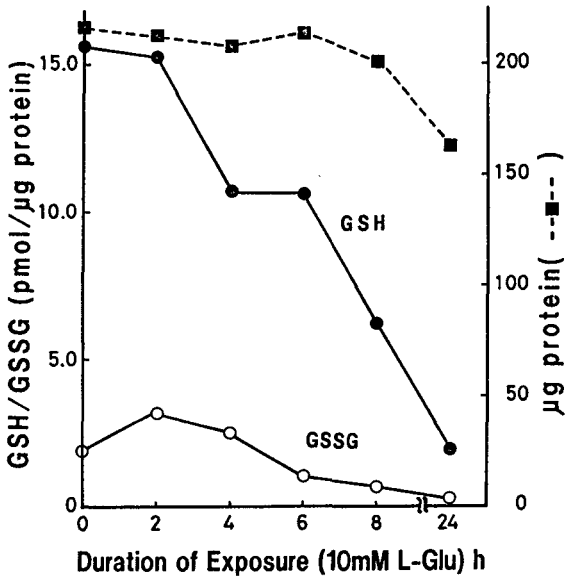
Ｆｉｇ．２．ブチオニンスルホキシミンによる細胞死



［文献］

1. Coyle, J. T. and Schwarcz, R. (1976) Nature 263, 244-246.
2. Rothman, S. M. and Olney, J. W. (1986) Ann. Neurol. 19, 105-111.
3. Zaczek, R., Balm, M., Arlis, S., Drucker, H. and Coyle, J. T. (1987) J. Neurosci. Res. 18, 425-431.
4. Murphy, T. H., Miyamoto, M., Saster, A., Schnaar, R. L. and Coyle, J. T. (1989) Neuron 2, 1547-1558.
5. Kato, S., Higashida, H., Higuchi, Y., Hatakenaka, S. and Negishi, K. (1984) Brain Res. 303, 365-373.
6. Toyooka, T., Uchiyama, S. and Saito, Y. (1988) Analy. Chim. Acta 205, 29-41.

Ｆｉｇ．３．Ｌ－グルタミン酸による細胞内グルタチオンの減少



48 IL-1β及びANGIOTENSIN IIによるラット培養アストロサイトからのPGE₂分泌とその作用機序

勝浦 五郎、Paul E. Gottoschall*, Raymond R. Dahl*, Akira Arimura*
塩野義製薬(株)研究所、* US-Japan Biomed. Res. Labs., Tulane Univ. Med. Ctr., LA., USA

〔要約〕 Recombinant human interleukin-1β(IL-1β)並びにangiotensin II(AII)はラット培養アストロサイトからprostaglandin E_2(PGE_2)の分泌を刺激し，その分泌促進作用はCa^{2+}チャネル阻害剤(verapamil)、細胞内Ca^{2+} redistributionの抑制剤(TMB-8)及びcalumodulin inhibitor(W-7)によって完全に消失した。一方、Ca^{2+} ionophore(A23187)はアストロサイトから著名なPGE_2分泌をおこした。さらに、アストロサイトの細胞内IP_3の合成がIL-1β及びAIIによって有意に増加した。しかし、IL-1βは細胞内cAMPおよびcGMPレベルに変化を及ぼさなかった。これらの結果から、IL-1β並びにAIIはそれぞれのレセプターを介してphosphoinositideのhydrolysisによるIP_3の増加をおこし、細胞内Ca^{2+}の上昇とそれに伴うCa^{2+}/calumodulin系の活動化をひきおこしてPGE_2の分泌を誘発すると考えられる。

はじめに

Interleukin-1(IL-1)は活性化されたmacrophageから分泌され、免疫反応をつかさどる重要な因子であり、IL-1α並びにIL-1βの2種類が同定されている。最近、IL-1が神経内分泌系の活動を調節していることが明らかにされ、脳-内分泌-免疫系の相互作用を考えるうえでの調節因子としての役割に注目がよせられている。我々はすでに、IL-1βのラット側脳室内あるいは静脈内投与により血中ACTHレベルの上昇を認め、このACTH分泌はprostaglandin E_2(PGE_2)並びにcorticotropin releasing hormone(CRH)の放出を介していることを報告し(2)、脳内に高親和性のIL-1β receptorが存在することも確認した(3)。さらに、organum vasculosum of lamina terminalis(OVLT)が末梢血中のIL-1βのACTH分泌のための脳内の第一次作用部位であることをOVLTの破壊実験並びにPGE合成阻害剤のOVLTへの投与により明らかにした(4)。また、primary culturesをちいてIL-1は脳内PGE_2の主な産生細胞であるアストロサイトから用量反応性にPGE_2を分泌した(5)。そこで、今回の実験で、IL-1のアストロサイトでのセカンド メッセンジャー系へ及ぼす作用と、PGE_2分泌との関係についてラット培養アストロサイトをもちいて検討した。

実験材料と方法

ラット培養アストロサイトは生後一日目の新生児からsingle-transfer methodによって調整した(5)。Recombinant human IL-1β(1×10^6thymogenic units/mg protein: Cistron, USA)及びangiotensin II (AII)(10^{-9}M)を加えて3時間培養し、培養液中のPGE_2をAmershamのPGE_2 assay kitで測定した。細胞内inositol phosphates(IP)はBerridgeらの方法(1)に従って測定した。また、細胞内cAMP並びにcGMPはAmershamのassay kitで、培養細胞のタンパク含量はBioRadのタンパク定量kitで測定した。

実験結果

培養アストロサイトにIL-1(10^{-9}M)を加えて3時間培養すると、培養液中のPGE_2はコントロールのおおよそ2倍に増加し、この反応はverapamil(50μM)、TMB-8(100μM)並びにW-7(10μM)によって消失した(図 1A)。AII(10^{-9}M)によっても培養液中PGE_2含量はコントロールの2.7倍に増加し、verapamil(50μM)及びTMB-8(100μM)によって完全に抑制された(図 1B)。一方、Ca^{2+} ionophore、A23187(0.5μM)によってPGE_2の値はコ

ントロールの2.5倍に増加した(図 1A)。次に、細胞内のセカンド メッセンジャー系に及ぼすIL-1の作用について検討した。培養細胞に[^{3}H]-myo-inositolを20時間前に取り込ませて、IL-1β(10^{-9}M)と培養し、経時的にIP_3を測定した。その結果、培養5分後にIP_3の有意な増加が認められた(図 2)。しかし、IL-1刺激後のcAMPとcGMPレベルは30分間にわたって全く変化を認めなかった。AII(10^{-9}M)でも同様に30分間の培養でIP_3の値はコントロールの2倍に増加した(図 3)。

考察

この実験結果から、IL-1βはアストロサイトに作用してphophoinositideのhydrolysisによりIP_3を増加させ、それによって細胞内Ca^{2+}の上昇、さらにCa^{2+}/calumodulinの活性化が引き起こされ、PGE_2の分泌にいたると考えられる。また、IP_3と共にアラキドン酸カスケイドもIL-1βによって刺激されPGE_2の供給となる。このように、アストロサイトでのIL-1βのセカンド メッセンジャーはIP_3であることが示唆される。今後、他の神経伝達物質との相互作用についても研究が進むものと考えられる。

文献

(1) Berridge,M., et al., Biochem. J., 212: 473-482, 1983

(2) Katsuura,G., et al., Endocrinology, 122: 1773-1779, 1988

(3) Katsuura,G., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 156: 61-67, 1988

(4) Katsuura,G., et al., Am. J. Physiol., 258: E163-E171, 1990

(5) Katsuura,G., et al., Endocrinology, 124: 3125-3127, 1989

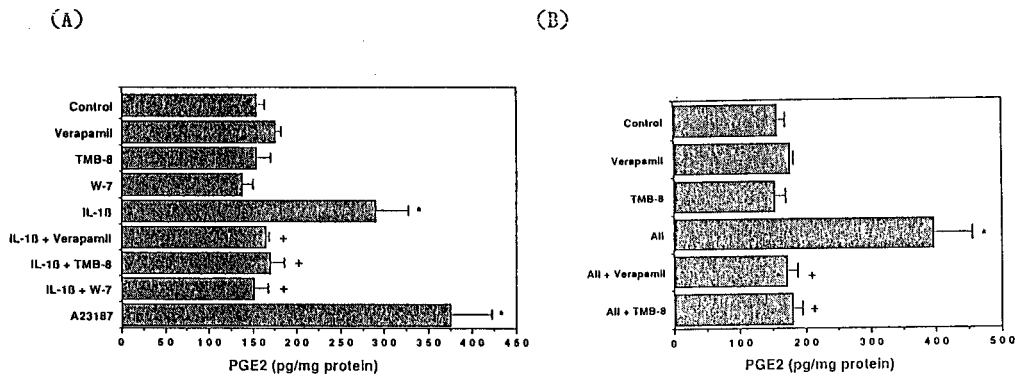


図 1. 培養アストロサイトからのPGE_2分泌に及ぼすIL-1β(A)またはAII(B)の影響とCa^{2+}の関与

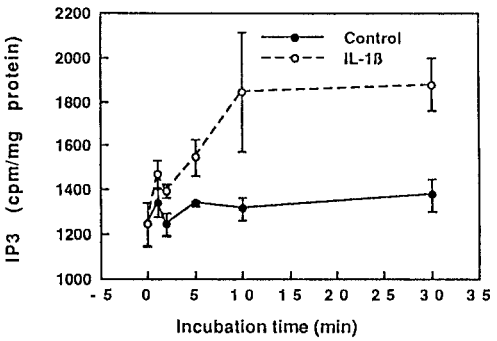


図 2. IL-1によるIP_3の経時的変化

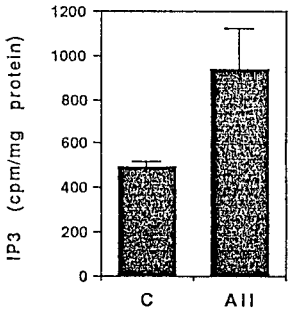


図 3. AIIによる刺激30分後のIP_3含量

49 複素環式アミンTrp-P-1とTrp-P-2のカテコールアミンならびにインドールアミン代謝への影響

直井信[1]，高橋勤[2]，太田明[3]，太田深雪[4]，
丸山和佳子[5]，永津俊治[6]
（名工大[1]，名大・医・生化一[6]，内科一[3]，
神経内科[5]，江南女短大[2]，名市大医・精神科[4]）

〔要約〕

トリプトファンの熱分解生成物である3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1)，3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2)がカテコールアミンとインドールアミン代謝を阻害することが明かとなった。In vitro の実験系でTrp-P-1，Trp-P-2は共に，チロシン水酸化酵素(TH)とトリプトファン水酸化酵素(TPH)を基質と拮抗し阻害し，芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)を補酵素ピリドキサル-5-リン酸(PLP)と拮抗し，更にA型モノアミン酸化酵素(MAO-A)を基質と拮抗し阻害した。ラット褐色細胞腫PC12h細胞を用いたin vivo系ではTHとAADCの活性の著明な低下があり，更にTHタンパクの生成が阻害される可能性が示唆された。

［目的］

ヒトにおけるパーキンソン病様の症状を発症させる1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)が発見されて以来，特定の神経細胞に神経毒性を有する物質の検索が広く行われるようになった。一方，Trp-P-1，Trp-P-2などのトリプトファン由来の一連の複素環式アミンは発癌性のあることが知られているが，最近神経毒性があることが発見され、in vivo，in vitroでの実験でチロシン水酸化酵素(TH)とモノアミン酸化酵素(MAO)が阻害されることが明かとなった[2]。またドーパミン(DA)細胞モデルとしてラット褐色細胞PC12h細胞を用い，培地にTrp-P-1，Trp-P-2を添加するとTH，芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)の活性が著明に低下した[3]。このため今回Trp-1とTrp-2のTH、トリプトファン水酸化酵素(TPH)，AADC，MAOなどの活性の阻害の機序を反応速度論的に検討し、更にin vivoでのTH活性の低下の機序を明らかにしようとした。

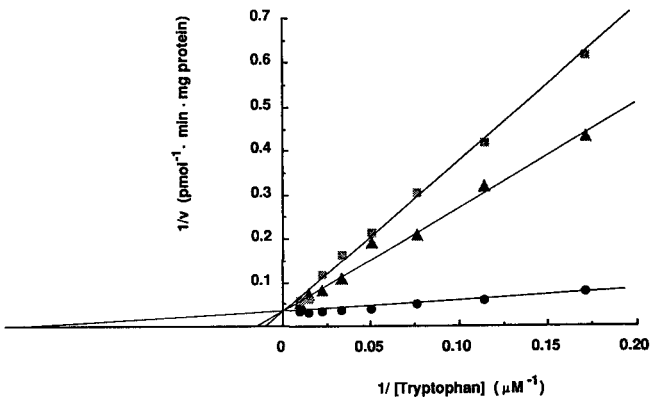
［方法］

活性への影響は，THはPC12h細胞，TPHはラットP-815系肥満細胞腫細胞，AADCはこの二種の細胞とヒト脳よりの可溶化標品，MAOはヒト脳シナプトゾーム内ミトコンドリアよりの可溶化標品を用いて検討した。TH[4]，AADC[5]活性はHPLC-ECD，TPHはHPLC-FD[6]，MAOは蛍光法[7]を用い測定した。

［結果と考察］

Ⅰ：in vitro でのTH，TPH，AADC，MAOへの影響：Trp-P-2はTHを阻害しIC50は10nMと得られた。TPHに対しては基質トリプトファンと拮抗的に阻害しKi値は約４０μMと得られた（Fig. 1.)。また補酵素,(6R)テトラヒドロビオプテリンと非拮抗的に阻害した。次にL-DOPAを基質とした場合，AADCを補酵素ピリドキサル-5-リン酸(PLP)と拮抗して阻害し，ヒト脳より得た酸素標品でKi値は163μMと得られた(Fig.2.)。更にTrp-P-2はヒト脳より可溶化したA型ならびにB型 MAOを基質Kynuramineと拮抗して阻害し，Ki値はそれぞれ0.84μM，137μMと得られた(Fig.3)。Trp-P-1は同様にTH，TPH，AADC，MAOを阻害したがKi値はTrp-P-2に比し数倍高かった。またこれら

Fig.1 Trp-P-2(■),Trp-P-1(▲)によるTPHの阻害



酵素への阻害はいづれも可逆的であった。構造阻害相関を検討した所，TPHに対する阻害には インドール環，イミダゾール環が必要であった。

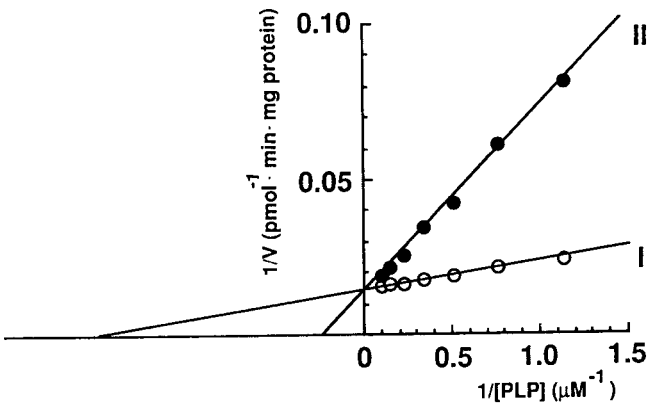
II：in vivoでのTHへの影響：10^{-4}～10^{-7}MのTrp-P-1，Trp-P-2の存在下PC12h細胞を1～6日培養し，TH活性の変化を検討した。Table 1に示すようにTrp-P-1により活性が低下した。しかしMAO活性には有意の変化はなかった。10^{-5}Mの存在下では1～2日の培養で活性の低下が認められた。またTH の mRNA のexpressionを検討した所、Trp-P-1の濃度に従い低下が認められた。

以上の結果から，Trp-P-1，Trp-P-2など食品中に存在する化合物が，TH，TPH，AADC，MAOなどの生理活性アミンの代謝系に関与する酵素を阻害することが明らかとなった。特にTHにおいて酵素タンパクの生成そのものが阻害されることが認められた。これら複素環式アミンは，PC12h細胞にDAの取り込み機構により取り込まれることが見い出されているので[8]，ヒト脳のDA細胞などにも選択的に取り込まれ，蓄積し，神経毒性を呈する可能性が考えられた。

Table 1. Effect of Trp-P-1 (10 μM) on tyrosine hydroxylase activity in PC12h cells

	Tyrosine hydroxylase (pmol/min/mg protein)	Monoamine oxidase
3 days' culture		
Control	201	533
Sample	85	677
6 days' culture		
Control	210	451
Sample	164	436
2 days' washing-out		
Control	384	433
Sample	199	367

Fig.2 Trp-P-2によるAADCの阻害



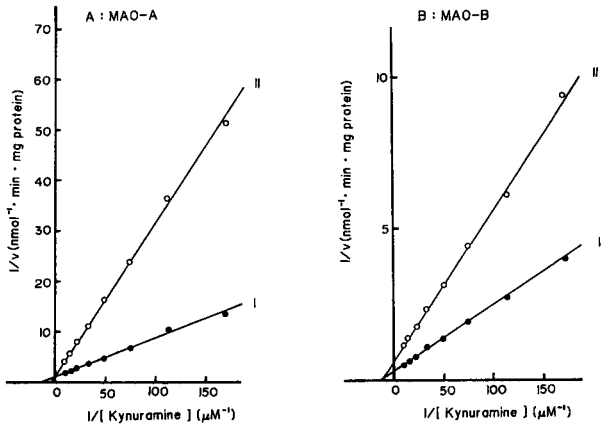


Fig.3 Trp-P-2による MAO-A，-Bの阻害

[謝辞]
この研究は，文部省、重点研究の援助によった。

[文献]

1. Sugimura, T., Science, 233, 312.(1986)
2. Ichinose H., et al., Biochem Pharmacol, 37, 3289. (1988)
3. Naoi M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 157,494.(1988)
4. Naoi, M., et al., J. Chromatogr., 427, 229.(1988)
5. Naoi, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 152, 15 (1988)
6. Yamaguchi, T., et al., Biochem. Int., 2, 295.(1981)
7. Kraml M., Biochem. Pharmacol., 14, 1683.(1965)
8. Naoi, M., et al., Neurosci. Lett., 99, 317.(1989)

50

正常およびGM₂ガングリオシドーシス脳内におけるリゾガングリオシドの蓄積

小林卓郎*，後藤幾生*，乾　幸治**，岡田伸太郎**
（九州大・医・脳研・神経内科*，大阪大・医・小児科**）

〔要約〕

逆相HPLCを用いたモノシアロリゾガングリオシドの高感度微量測定法を開発した。マウス、牛、ヒト脳灰白質5-300mg より総脂質抽出、Folch 分画、DEAE-Sepharose、AG-1カラムで単離ののちO-フタルアルデヒドで蛍光をを発色させた後、逆相HPLCにて検出した。本法では LGM_1、LGM_2、LGM_3 の分子種（$C_{18:1}$，$C_{18:0}$，$C_{20:1}$，$C_{20:0}$）の分離が可能で、その１つを内部標準にすることでそれぞれのリゾガングリオシドの測定は数pmolより可能であった。正常動物脳灰白質内には 0.4-2.0pmol/mg protein のLGM_1(18:1,20:1) が存在していた。３例のTay-Sachs 病、１例のSandhoff病、脳内には 55-170 pmol/mg protein のLGM_2が蓄積し、さらに 10-60pmol/mg protein のアシアロ LGM_2(LGA_2) が蓄積していた。Sandhoff病とTay-Sachs 病では LGM_2 の含量の差はなかったが、LGM_2は前者に多かった。これらリゾガングリオシドの異常蓄積は GM_2ガングリオシドーシスの病態に関与している可能性がある。

ガングリオシドを含むスフィンゴ糖脂質は少糖とセラミドよりなり、セラミドはスフィンゴシンと脂肪酸により構成される。これらの脂質は動物細胞の天然膜構成成分であり、とくに神経系に多いことが知られている。脂肪酸のないスフィンゴ糖脂質はリゾスフィンゴ糖脂質といわれ、従来正常組織には存在しないと信じられていた。しかし、我々はそれらの高感度測定法を開発し、正常組織内に遊離スフィンゴシン（１）、ガラクトシルスフィンゴシン（２）、リゾスルファチド（３）が存在し、後２者はそれぞれKrabbe病、異染性白質ジストロフィー症で著明な蓄積を示すことを報告してきた。リゾガングリオシドではLGM_3が正常培養細胞にて認められ（４）、GM_2 ガングリオシドーシスにてLGM_2の蓄積が報告されている（５，６）。我々はHPLCを用いたモノシアロリゾガングリオシドの高感度測定法を開発し、正常および GM_2ガングリオシドーシス脳内のリゾガングリオシドを検討したので報告する。

〔材料と方法〕

ヒトの組織は凍結剖検材料を用い、C57BL マウス、牛では新鮮な脳を切り出し凍結した。GM_1, GM_2, GM_3 はそれぞれ牛脳、GM_2 ガングリオシドーシス脳、ヒト肝より精製した。標準リゾガングリオシドの作成はNeuenhoferら（７）および Noresら（８）の方法を用いた。すなわちガングリオシドをアルカリ加水分解し、De-N-acetyl リゾガングリオシドを精製ののちシアル酸の再アセチル化をリポゾーム、DEC を用いて行ない、最終的な精製はHPLCを用いて行なった。それぞれの分子種は逆相HPLCにて分取した。これらのリゾガングリオシド標品は TLC、HPLCにて単一ピークを示した。組織中のリゾガングリオシドの単離はクロロフォルム／メタノール（１：２）（２：１）による抽出、Folch 分画、DEAE-Sepharose、AG-1カラムにて行ない、アミノ基への蛍光はO-フタルアルデヒドを用いて発色させた。この場合目的外のリゾガングリオシドを内部標準としてはじめのサンプルに入れた。

〔結果と考察〕

標準リゾガングリオシド LGM_1、LGM_2、LGM_3 とそれぞれの分子種$C_{18:1}$，$C_{18:0}$，$C_{20:1}$，$C_{20:0}$は逆相HPLC，10mM NaCl を含むテトラヒドロフラン／メタノール／水で分離された。本法では 5-1000pmol の間で測定可能であった（図１）。組織内リゾガングリオシドの場合回収率が50%であったが、内部標準があるため20-1000pmolで測定可能であった。正常脳では LGM_1,18:1,20:1 に一致するピークが見られ、その量は0.4-2.0pmol/mg protein であった。牛脳300gより上記の方法でリゾガングリオシドを単離すると、TLC にてLGM_1に一致したスポ

ットを認めた。GM_2 ガングリオシドーシスではLGM_2の著明な蓄積を認めた（図２，表１）。Tay-Sachs 病とSandhoff病とはLGM_2の蓄積量に差はなかった。これらの値はNeuenhoferら（５） およびRosengren ら（６）のそれとほぼ同様であった。一方ガラクトシルスフィンゴシンと同様の方法で測定したアシアロ $LGM_2(LGA_2)$ はSandhoff病脳内により多く蓄積していた。これら異常蓄積したリゾスフィンゴ糖脂質は細胞毒性を持つことが知られており、GM_2 ガングリオシドーシスの病態に関与している可能性がある。

〔文献〕

1 Kobayashi,T., Mitsuo,K., Goto,I. (1988) Eur.J.Biochem. 172, 747-752.

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

3 Toda,K., Kobayashi,T., Goto,I., Kurokawa,T., Ogomori,K. (1989) Biochem.Biophys.Res.Commun. 159, 605-611.

4 Hanai,N., Nores G.A., MacLeod C., Torres-Mendez C.R., Hakomori,S. (1988) J.Biol.Chem. 263, 10915-10921.

5 Neuenhofer,S., Conzelmann E., Schwarzmann G., Egge,H., Sandhoff,K. (1986) Biol.Chem. Hoppe-Seyler 376, 241-244.

6 Rosengren B., Mansson J.E., Svennerholm L. (1987) J.Neurochem. 49, 834-840.

7 Neuenhofer,S., Schwarzmann G., Egge,H., Sandhoff,K. (1985) Biochemistry 24, 525-532.

8 Nores G.A., Hanai,N., Levery, S.B., Eaton,H.L., Salyan M.E.K., Hakomori,S. (1988) Carbohydr.Res. 179, 393-410.

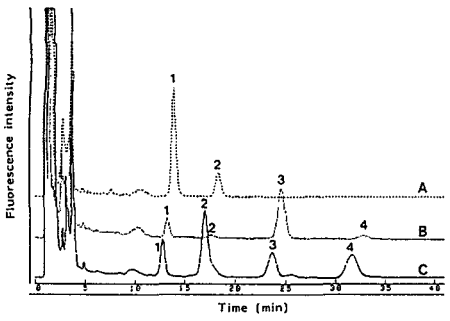


図１．標準リゾガングリオシドのHPLCクロマトグラム
A，LGM_3；B，LGM_2 ；C，LGM_1
１，$C_{18:1}$；２，$C_{18:0}$；３，$C_{20:1}$；４，$C_{20:0}$

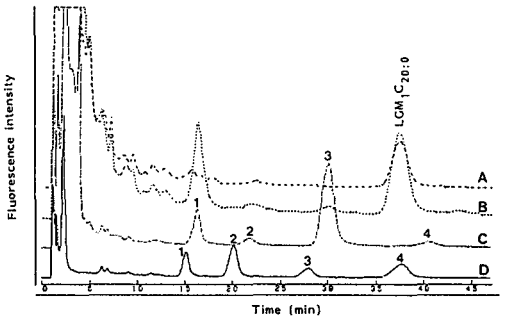


図２．Sandhoff病脳内リゾガングリオシド
A，正常脳；B，Sandhoff病；C，標準LGM_1
D，標準LGM_2；番号は図１と同じ。
$LGM_1C_{20:0}$は内部標準。

表１．GM_2 ガングリオシドーシス脳内リゾスフィンゴ糖脂質

	LGM_2	LGA_2
Sandhoff	55-100	45-60
Tay-Sachs ＃１	170	10
＃２	96	10
＃３	64	15
Control(n=4)	n.d.	n.d.

pmol/mg protein

51 哺乳動物におけるスペルミジンから N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンの生成について

上村 宏*、川瀬秀明*、長谷川武史**、橋本泰道*、
能登直*、中嶋照夫*
（京都府医大 *精神医学、**同位元素）

〔要約〕^{14}C-スペルミジンのラット脳室内および腹腔内投与により、代謝産物であるN-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オン、プトレアニおよびレソプトレアニンの生成と分布の検討を行った。脳ではプトレアニンが優位であり、他の臓器と異なってイソプトレアニンへ代謝される経路はごくわずかであった。尿中では^{14}Cの放射活性はイソプトレアニン、N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンとプトレアニンの3つのピークに分布し、代謝産物のうちでN-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンが最も高値であった。以上の結果より、N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンがスペルミジンの主な最終代謝産物である可能性が示唆された。

ポリアミンは、細胞の増殖や成長にかかわる重要な生理的機能を有すると考えられている。しかし動物細胞内でのポリアミンの代謝産物については、未だ不明な点が多く、その代謝経路の検索も十分に行われてきた。本論文ではラットにおいて^{14}C-スペルミジンが関与するのかを明らかにするために、^{14}C-N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンに代謝されるポリアミンおよびその代謝産物を脳、肝臓および尿において^{14}C-スペルミジンと比較し、興味ある知見を得たので報告する。

〔方法〕

I. 実験にはWistar系雄性ラット（180g）を用いた。259kBqの^{14}C-スペルミジンを脳室内に投与し、36時間後に断頭、脳を取り出した。同量の^{14}C-スペルミジンを腹腔内に投与し、36時間塩酸上に採尿後、断頭至死せしめ、脳と肝臓を摘出した。脳および肝臓の全量は過塩素酸溶液でホモジネートとし、尿は濾過した後Dowex 50x2（100-200 mesh H^+型、10ml）のカラムにかけ、水洗後、各50mlの1M ピリジン，2N NH_4OH，3N NH_4OH in 50% EtOH および 7.5N NH_4OH in 50% EtOH で溶出を行った。ポリアミンおよびその代謝産物はAmberlite IR 120 Type 1（NH_4^+型、20ml、5ml毎に分取）のカラムおよび高圧濾紙電気泳動で分離、同定し（2）、各分画の放射活性は液体シンチレーションカウンターで測定した。

II. 代謝産物の加熱酸水解処理
Iで得たスペルミジンの未同定代謝物の一つを6N 塩酸1.5mlに溶かし、100℃および140℃で10時間加熱処理をした。140℃加熱処理物を標識体以外に一種Iと同様の条件で分析の化合物はイソプトレアニンと同じ挙動をし化合物を得た。このものを化合物とイソプトレアニンと同じ挙動をし紙電気泳動クロマト分析の結果、イオン交換クロマト及び高圧濾めた。

III. N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンの合成とスペルミジン代謝産物との比較
10ml，アクリロニトリル 5ml，2-ピロリドン 5ml，炭酸カリウム 1g にジシクロヘキシル-18-クラウン-6 を少量加えて攪拌した後、綿にて炭酸カリウムを濾過し、濾液を20mlのアルミナカラムにかけ、目的化合物を酢酸エチ200mlで溶出した。溶出液を蒸発乾固した後、残さをメタノール 20ml溶かし，酢酸 1ml，酸化白金 100mgを加えて、水素加圧下にて還元した。濾過により酸化白金を除き、溶媒を除去した。得たムにかけた。水、1M ピリジン各500mlで残さを水に溶解しAmberlite IR 120 Type 1（H^+型、50ml）のカラムを洗浄した後、3N NH_4OH 500mlにて塩基性成分を溶出した。カラム溶出液の一部を電気泳動にかけ目的化合物の流出を確認し、その分画を集め、N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンを得た。このものをイオン交換クロマト及び高圧濾紙電気泳動クロマト分析と水解反応結果とIで得た代謝産物の挙動と比較した。比色のための発色にはDubinの方法（1）をもちいた。

[結果]

I. 未同定標識代謝産物の同定：脳および肝臓のホモジネートと尿のDowex 50x2 (100-200 mesh H^+型) カラムの結果、2N NH_4OH流出物中に未同定標識体が確認された。この分画のAmberlite IR 120 NH_4^+型のカラムでの精査の結果、3N NH_4OH175-235mlに未同定標識体が流出してきた。この標識体はカラムクロマト、電気泳動、酸水解などの検討の結果と100℃加熱ではほとんど変化を観測しえなかった点から、未同定標識体はN-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンと推定されたので推定化合物を合成した。合成の結果、上記未同定標識体はN-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンと同定した。

II. 表1に各分画及び分離されたポリアミンの放射活性を%表示した。放射活性比はN-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オン、プトレアニン、イソプトレアニンについて次のようにまとめることができた。脳室内投与では、脳組織中においてプトレアニン：(イソプトレアニン+N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オン≒14:1となり、腹腔内投与では、尿中においてプトレアニン：イソプトレアニン+N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オン≒1:3.6となった。

[考察]

I. ^{14}C-スペルミジンの未同定代謝産物の一つがN-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンと同定されたことはSeilerらのポリアミンの分析の結果(3)を支持するものであった。

II. ^{14}C-スペルミジンの代謝産物に関しては筆者らの未同定のものは分析法がついてらいくつかの化合物残それの定興味あるを程同で実事実が明らかになった。ポリアミン間の相互変換を除いて、脳でのスペルミジン代謝産物はプトレアニン、およびN-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンが主で、他の臓器と異なってイソプトレアニンに排泄代謝産物のレドクトリえれた。

Table 1. Incorporation of radioactivity (%) in brain, liver and urine

	Brain	Liver	Urine
Total(%)	100	100	100
Water	0.23	1.31	31.99
1M Pyridine	0.10	0.33	9.85
2N NH_4OH	0.95	1.86	25.11
3N NH_4OH in 50%EtOH	0.97	0.69	17.35
7.5N NH_4OH in 50%EtOH	83.09	91.08	8.82
Putrescine	4.29	1.21	7.84
Spermidine	54.58	66.46	6.33
Spermine	4.89	10.56	0.29
Putreanine	0.2485	0.3987	2.0921
Isoputreanine	0.0061	0.0098	0.0242
N-(3-aminopropyl)-2-pyrrolidinone	0.0118	0.0784	7.4637
N-monoacetylspermidine	0.069	0.042	4.039

ごくわずかしか代謝されない。さらに興味あることは尿中のかアンよりもかなり多いことである。このような事実の形成酵素の存在が想定され、その同定が今後の課題と考えられた。

[文献]

1. Dubin,D.T. (1960) J. Biol. Chem. 235, 783-786
2. Nakajima,T., Noto,T. and Kato,N. (1980) Physiol. Chem. & Physics 12, 401-410
3. Seiler,N. and Kodgen,B. (1983) Int. J. Biochem. 15, 907

52 ラット中枢神経系単一ニューロンのグルコース代謝動態の解析.

赤林 朗*, 加藤 尚彦**
(*東大・医・脳研, **横浜市大・医・生化)

〔要約〕
DG と DG6P の酵素的超微量測定法に基づく, 高感度グルコース利用率(Glucose Utilization Rate; GUR) 測定法により, ラット中枢神経系単一ニューロンの in vivo におけるエネルギー代謝動態を解析した. ラットに 0.25 mmol/kg 体重の DG を静注し, 2 分及び4 分後に液体窒素中に投入して瞬間凍結し, 調製した凍結乾燥切片より脊髄前角運動ニューロン細胞体及びその近傍のニューロピル, 後根神経節細胞体及び小脳プルキニェ細胞体を切り出し, それら微小試料中の DG, DG6P, glucose 及び glucose-6-phosphate (G6P) 濃度を定量した. 昨年度報告した理論に基づき, GUR と glucose の取り込み活性を表す Distribution volume (DV) を算出した. 前角運動ニューロン細胞体とニューロピルでは, DV はほぼ同じであったが, GUR はニューロン細胞体はニューロピルの 2.0 倍と高値を示した. それに対し後根神経節細胞体では, DV は他の細胞群に比して高値を示したが, GUR 値は最低であった. プルキニェ細胞体では GUR, DV ともに近傍の小脳顆粒層及び分子層よりやや高い値を示し, ニューロンの種類により特異的な glucose の代謝特性を持っていた.

我々は昨年度, DG と DG6P の酵素的微量測定法(1)を用い, 中枢神経系微小領野の GUR を測定するための理論と高感度実験系を開発したことを報告した(2). この方法は Sokoloffら(3)の開発した ^{14}C-DG 法に比べ短い実験時間, 定量性, 感度等の点で優れている. 今回この高感度測定系をラット中枢神経系の単一ニューロン群に適用し, 初めて細胞レベルで in vivo におけるグルコース代謝動態を解析した.

実験方法 [測定試料] 1) 凍結乾燥切片; ラット (Sprague-Dawley, オス, 6 週齢, 190-200g) の尾静脈より 0.25 mmol/kg 体重 の 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. 腰部脊髄, 後根神経節及び小脳皮質の厚さ 10-20μm の凍結乾燥切片を調製し, それらより脊髄前角運動ニューロン細胞体及びその近傍のニューロピル, 後根神経節細胞体及び小脳プルキニェ細胞体を切り出し, 高感度水晶糸バランス(4)で秤量した (0.6-6.2 ng 乾燥重量). 2) 動脈血試料; 液体窒素中で瞬間凍結したラットの心臓血塊 (左心室) を -20 ℃下で収取し秤量したものを用いた.

[測定方法] 上記試料中の DG, DG6P, glucose 及び G6P 濃度を, 既報の酵素的超微量測定法(1)を用い測定した. また別の実験で glucose 及び DG の動脈血漿と全血の濃度比を, 今回の実験条件下であらかじめ求めた. その結果より動脈血漿濃度を心臓左心室全血濃度値の 1.6 倍とした. これらの値より昨年度報告した理論(2)により各ラットにおける GUR と DV を算出した.

結果及び考察 1) DG 静注後 4 分の単一神経細胞内の DG+DG6P, DG, glucose+G6P, G6P 濃度 (図1, 2): 4 匹のラットより各 7 個, 28 試料の単一神経細胞体試料の濃度分布を示す. DG+DG6P, DG6P 濃度は 1.10 - 4.24, 0.233 - 2.17 mmol/kg 乾燥重量であり, 昨年度報告した様に, 生理的な glucose 代謝の定常状態には影響しない濃度範囲であった.

2) ラット中枢神経系微小領野及び単一神経細胞の GUR 及び DV [細胞内濃度 (mol/g)/血漿濃度 (mol/ml)] (図3): 脊髄前角運動ニューロン細胞体とニューロピルでは, 取り込み活性を表す DG の DV は 0.624 (ml/g; 以下同単位を用いる), 0.600 とほぼ同じであったが, GUR はニューロン細胞体は 2.04 (μmoles/g wet wt./min; 以下同単位を用いる) で, ニューロピルの値 (1.02) の 2.0 倍と高値を示した. 神経細胞体とニューロピルの glucose 利用については一定の結論は出ていない. ネコ大脳皮質の Betz 細胞体は, Cartesian diver を用いて glucose を基質として O_2 の消費を測定する実験では, ニューロピルの 10 倍以上の O_2 消費率を示す(5); 或は [^{3}H]-DG を用いたオートラジオグラフ法

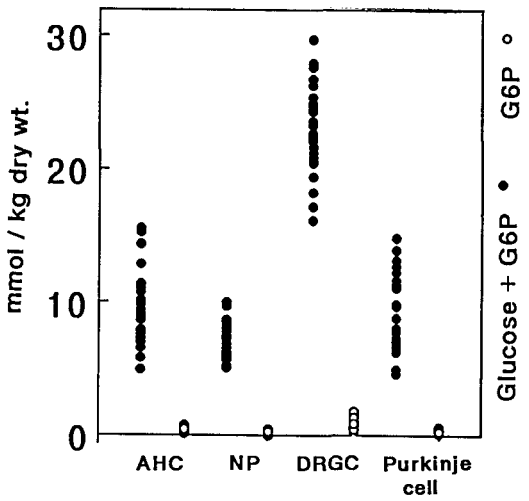


図1　Ｇｌｕｃｏｓｅ＋Ｇ６Ｐ及びＧ６Ｐの定常濃度レベル．
ＤＧ（0.25 mmol/kg 体重）静注後４分に測定．４匹のラットより各７試料（計 28 試料）の測定値．AHC：脊髄前角運動ニューロン細胞体，NP：AHC 近傍のニューロピル，DRGC：後根神経節細胞体，Purkinje cell：小脳プルキニェ細胞体．

では，ラット中枢神経系では両者ともほぼ同じ DG の取り込みを示す(6)；領野により異なる部位もある(7)；等様々な報告がある．今回の結果により，脊髄前角運動ニューロン細胞体の GUR はその近傍のニューロピルの2.0 倍という定量的な値を初めて知ることができた．また glucose や DG の取り込み活性を表す DV は，細胞体とニューロピルで大差なく，従ってニューロン細胞体の高い活動性は，glucose 取り込み活性よりは，glucose の利用率が高いことによって支持されており，解糖系をはじめとする代謝酵素群によりコントロールされていることが初めて直接的に証明された．

後根神経節細胞体では，他のニューロン群に比して非常に高い DV 値（0.899）を示したが，GUR 値は最低（1.15）であった．プルキニェ細胞体では GUR (1.61)，DV (0.697) ともに近傍の小脳顆粒層，分子層よりやや高い値を示した．このように，in vivo の glucose の代謝特性は各ニューロン間で異なっていた．Kato ら(8)のウサギの単一ニューロン試料を用いた in vitro の至適条件下の Hexiokinase 最大酵素活性（μmoles/g wet wt./min; 存在する酵素蛋白量に比例すると考えられる）は脊髄前角運動ニューロン細胞体(6.10)と後根神経節細胞体(5.77)ではほぼ等しく，プルキニェ細胞体では低く(1.07)，種差の問題はあるが今回求められた in vivo の GUR 活性の順位とは異なっている．以上より各ニューロン及び領野内では，エネルギー源としての glucose の需要に応じて，各種細胞に特有の glucose 代謝制御が行われていると考えられた．

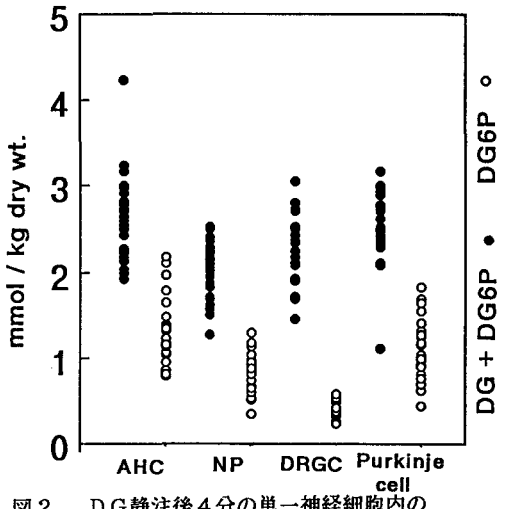


図2　ＤＧ静注後４分の単一神経細胞内の
ＤＧ＋ＤＧ６Ｐ及びＤＧ６Ｐ濃度．
静注ＤＧ量，測定部位，試料数は図１と同じ．

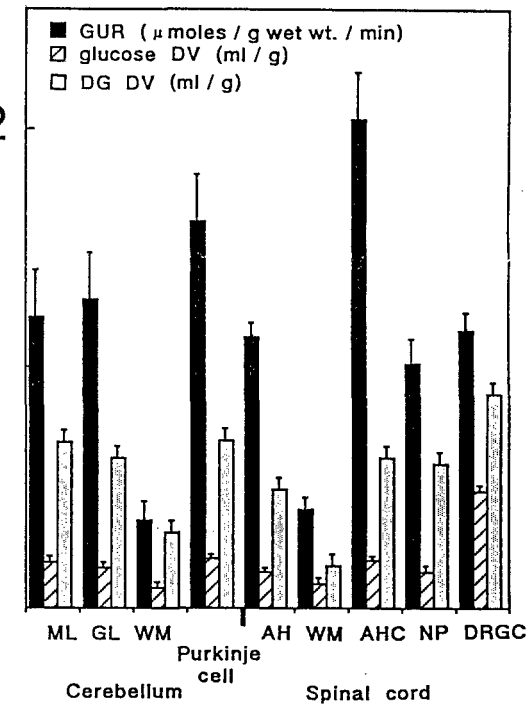


図3　ラット中枢神経系微小領野及び単一神経細胞のＧＵＲ及びＤＶ．計算法は本文参照．４－６匹の値の平均値を示す．ML：小脳分子層，GL：小脳顆粒層，WM：白質，AH：脊髄前角．Tは SEM 値を示す．ニューロン間の GUR の有意差は AHC > NP, DRGC ($p<0.01$); AHC > Purkinje cell ($p<0.2$); Purkinje cell > NP, DRGC ($p<0.05$) で認められた．

［文献］ 1) Akabayashi, A. et al. (1989) Biomed.Res. 10, 173-177. 2) 赤林　朗，加藤　尚彦．(1989) 神経化学 28, 30-31. 3) Sokoloff, L. et al.(1977) J.Neurochem. 28, 897-916. 4) 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. 5) Epstein, M.H. and O'Conner, J.S. (1965) J.Neurochem. 12,389-395. 6) Sharp, F.R. (1976) Brain Res. 110, 127-139. 7) Duncan, G.E. et al. (1987) Brain Res. 401, 43-49. 8) Kato, T. and Lowry O.H. (1973) J.Neurochem. 20, 151-163.

53　ＭＫ－８０１投与によるラット脳局所グルコース利用率の変化
－特に片側 entorhinal cortex の chemical lesion の影響

車地　暁生*、James McCulloch **
*東京医科歯科大学医学部・神経精神科　**Wellcome Surgical Institute & Hugh Fraser Neuroscience laboratories, Glasgow University

〔要約〕

ラットの片側の entorhinal cortex に ibotenic acid を用いて chemical lesion を作製し、さらに、N-methyl-D-aspartate (NMDA) の非競合的アンタゴニストである MK-801 (0.5mg/kg, i.v.)を投与して、定量的[^{14}C] 2-deoxyglucose autoradiography法 (Sokoloff et al., 1977) を用いて、脳局所グルコース利用率の変化を調べた。Ibotenic acid 処置 14 日後、グルコース利用率は、lesion 側の entorhinal cortex では減少していたが、反対側の entorhinal cortex および entorhinalcortex から perforant path によって投射を受ける脳部位 (dentate gyrus, hippocampus molecular layer)では両側とも変化が見られなかった。また、MK-801 投与により、偽処置群では、両側の entorhinal cortex 及び dentate gyrus, hippocampus molecular layer のグルコース利用率が増加し、処置群の lesion 反対側でも同様の変化が見られたが、lesion 側の entorhinalcortex, dentate gyrus および hippocampus molecular layer においては、グルコース利用率の増加が有意に抑制された。このことから MK-801 投与による dentate gyrus, hippocampus molecular layer でのエネルギー代謝の増大には、正常な perforant path の神経活動が必要であることが示唆された。

(+)-5-methyl-10.11-dihydro-5H-dibenzo(a,b)cyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801)は強力でかつ特異性の高い N-methyl-D-aspartate (NMDA) の非競合的アンタゴニストであり、NMDA レセプター複合体のイオンチャンネルに関連した部位に結合する (Wong et al., 1988)。 この MK-801 には抗けいれん作用、抗不安作用、筋弛緩作用、交感神経興奮作用および脳阻血状態における神経細胞保護作用などがあることが知られている。MK-801 をラットに投与すると、entorhinal cortex やその部位からグルタミン酸作動性ニューロンを含む投射 (perforant path, White et al., 1977)を受けている dentate gyrus と hippocampus molecular layer のグルコース利用率が増加することが報告されている(Kurumaji et al.,1989)。[^{14}C]2-deoxyglucose autoradiography を用いた実験において、グルコース利用率の変化は主に神経細胞の軸索末端でのエネルギー代謝の変化を反映することが知られている。 Dentate gyrus や hippocampus molecular layer でのグルコース利用率の上昇もこの perforant path の神経末端におけるエネルギー代謝が増大したことが考えられ、本実験では、entorhinal cortex をchemical lesion して、MK-801 投与による海馬領域におけるグルコース利用率に変化を調べた。

実験方法

Sprague-Dawley 系の雄性成熟ラット(320 g) を用いて実験をおこなった。グルコース利用率測定の 14 日前に、ラットを麻酔下で、定位脳手術法により、0.5 μl の ibotenic acid (10μg/μl)を片側の entorhinal cortex に局所注入した。偽処置群には、50mM phosphate buffered saline を同量投与した。Stereotaxic coordinates : A-8.5, L-5.5, V-7.0 (Paxinos and Watson).

[^{14}C]2-deoxyglucose autoradiograpohy 法は Sokoloff ら(1977)の方法を用いた。MK-801 (0.5 mg/kg, i.v.) または生理食塩水は、グルコース利用率測定実験の 10 分前に投与した。統計学的解析には、一元分散分析と Bonferroni correction を加えた Student's t-test を用いた。

結果

Ibotenic acid 処置後、グルコース利用率は、lesion 側の entorhinal cortex では減少していたが、反対側の entorhinal cortex および両側の dentate gyrus, hippocampus molecular layer, CA1 および CA3 では変化がみられなかった。MK-801 投与により、偽処置群では、両側の entorhinal cortex, dentate gyrus および hippocampus molecular layer のグルコース利用率が増大し、処置群の lesion 反対側でも同様の変化が見られたが、lesion 側の dentate gyrus と hippocampus molecular layer では、MK-801 投与によるグルコース利用率の増加が著明に抑制された。

Table 1. Effects of entorhinal cortex lesions and local cerebral glucose use.

	Ipsilateral to entorhinal cortex				Contralateral to entorhinal lesion			
	Sham		lesion		Sham		Lesion	
Structure	Saline	MK-801	Saline	MK-801	Saline	MK-801	Saline	MK-801
Dentate gyrus	61±2	102±3**	66±2	66±3 ++	62±2	102±5**	68±2	94±2**
Hippocampus								
molecular layer	74±3	119±7**	79±5	80±3 ++	76±2	113±8**	82±4	107±2*
CA1	57±2	55±5	63±2	54±2	56±2	56±5	61±2	56±2
CA3	69±2	76±8	80±4	72±3	72±2	77±8	81±4	75±2
Entorhinal								
cortex	58±2	112±11**	40±5 +	48±6 ++	54±2	87±4*	63±3	103±10*

Data are derived from 22 animals and are presented as mean ± SEM (n = 5 or 6 per group). Glucose use : umol / 100 g / min.
* p < 0.05, ** p < 0.005 for statistical comparison between MK-801-treated group and saline-treated group.
+ p < 0.05, ++ p < 0.005 for statistical comparison between sham and lesion group.

考察

Entorhinal cortex から海馬への投射繊維 (perforant path)が損傷された 14 日後において、海馬でのグルコース利用率に変化がみられなかったのは、entorhinal cortex の lesion 後、従来から報告されているようなシナプスの再編成、コリン作動性ニューロンの神経終末や軸索の sprouting といった海馬における代償的な変化が起こったことによると考えられる。

一方、lesion 側の dentate gyrus と hippocampus molecular layer において MK-801 投与によるグルコース利用率の上昇がみられなかったことから、NMDA レセプターを遮断したことによって生じるこの両部位でのエネルギー代謝の亢進には、intact な perforant path の神経活動性が必要であることが考えられる。

文献

A.Kurumaji et al., 1989, Brain Res. 496 : 268-284.

L.Sokoloff et al., 1977, J. Neurchem. 28 : 897-916.

W.F.White et al., 1977, Nature 270 : 356-357.

E.H.F. Wong et al., 1988, J. Neurochem. 50 : 274-284.

54 褐色脂肪組織の糖利用に及ぼす寒冷曝露の効果と交感神経の重要性

高橋 章、 嶋津 孝*
（群馬大・医・神経精神薬理（ツムラ）、 *愛媛大・医・生化一）

〔要約〕
ラット肩甲間の褐色脂肪組織(BAT) での寒冷曝露に伴う glucose 利用並びに細胞内 glucose 輸送体動態の変化とそれらの効果における交感神経の作用を調べた。寒冷曝露によってglucose の取り込みは著しく増加し、glucose 輸送体量は plasma membraneで増加が、microsomal membrane では減少が認められた。glucose 輸送体の Kd 値には変化がなかった。glucose 取り込みの増加は、組織に分布する交感神経を外科的に切除しておくと著しく抑制され、plasma membrane の glucose輸送体は逆に減少し、交感神経の重要性が明らかになった。しかし、著しいglucose 取り込みの増加に比してplasma membrane の glucose輸送体量の変化は必ずしもパラレルではなく、また、glucose 輸送体自体の活性化が認められなかったことから、この交感神経を介したglucose 利用亢進の詳細な機序については不明な点も残されている。

寒冷に馴化したラットではBAT の肥大と糖利用が増大することが知られ、細胞内glucose 輸送体動態の変化も報告されている[3]。今回我々は、生理的な交感神経刺激とも考えられる短期間の寒冷曝露がBAT の糖利用、細胞内glucose 輸送体動態、glucose 輸送体自体の活性にどのような変化を与えるのか、また、これらの効果にBAT を支配する交感神経がいかなる役割を果しているのかを明らかにする目的で以下の検討を行った。

［方法］
雌 SD Rat を用い、左右の BATのうち左側組織に分布する交感神経を外科的に切除し、２日後 24 ℃の飼育室から４℃の低温室に移して寒冷曝露した。組織のglucose 利用速度は、^{3}H-2-deoxyglucose と ^{14}C-sucroseを頚静脈内に投与し、Sokoloffの方法の変法[5]によって Ki(rate constant for net tissue uptake)値を求めることより算定した。また、細胞内のglucose 輸送体動態を調べるために BATから plasma membrane と microsomal membraneを調製して[2]、D-glucose 存在下で抑制を受ける特異的な cytochalasin B の結合量及びその親和性を解析[1]した。さらに、glucose 輸送体そのものの活性を in vitro にて解析するため調製したplasma membrane のmembrane vesicles での D-glucose uptake を equilibrium-exchange 法[4]、すなわち 200μM の D-glucose と L-glucoseを含む medium にて preincubationし、平衡化せしめた後、^{3}H-D-glucoseと ^{14}C-L-glucoseを含む同濃度(200μM)の medium を添加して反応を開始し、１、２秒後に 3mM $HgCl_2$で反応を止め、millipore filter 上に吸引濾過するという手法で測定した。

［結果並びに考察］
ラットを寒冷曝露すると BATへの glucose 取り込み速度は、６時間で約10倍に達し、１日で13倍、２日では14倍と増加した。この効果は、局所の交感神経を切除しておくと著しく抑制された（図１）。各群でそれぞれ BAT より plasma membraneと細胞内 glucose輸送体プールとしてのmicrosomal membrane を調製して、glucose 輸送体の細胞内動態を cytochalasin B の特異的結合量で解析した。その結果、plasma membrane のglucose 輸送体量は２日間で 165%にまで増加し、microsomal membrane では 60 %に減少していた。一方、交感神経切除された側の組織では、microsomal membrane に変化がなく、plasma membrane の輸送体量は逆に45%にまで減少することが判った（図２、３）。しかしこれらの成績は、寒冷曝露時の著しい glucose取り込み増加から推して glucose 輸送体の細胞内プールから plasma membraneへの移行という図式だけでは十分な説明とはなり難く思わ

れた。そこでglucose 輸送体そのものの活性化の可能性を探るために、plasma membrane vesicles の系を用いて、D-glucose の取り込みを測定した。D-glucose の取り込みは、ほぼglucose 輸送体量に比例して増加しており、輸送体自体の活性化は認められなかった（図４、２）。

上記の結果から、寒冷曝露によるglucose 利用亢進は交感神経の作用を介すること、その機序には plasma membraneのglucose 輸送体量の増加が関与すると思われるが必ずしも十分ではないことが示された。交感神経を介した他の要因、例えば細胞内代謝活性の増加や血流増加などの寄与も考慮する必要があると思われる。

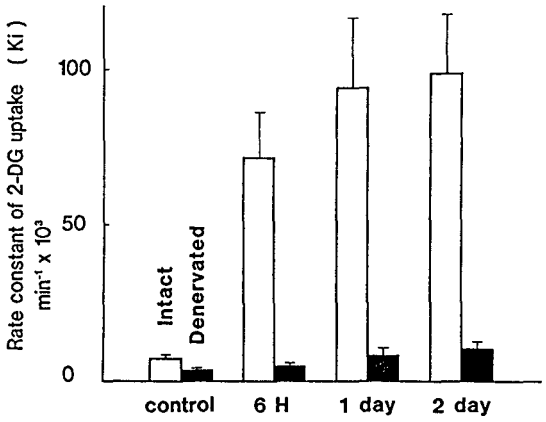


図１．寒冷曝露が glucose取り込みに及ぼす影響と交感神経切除の効果

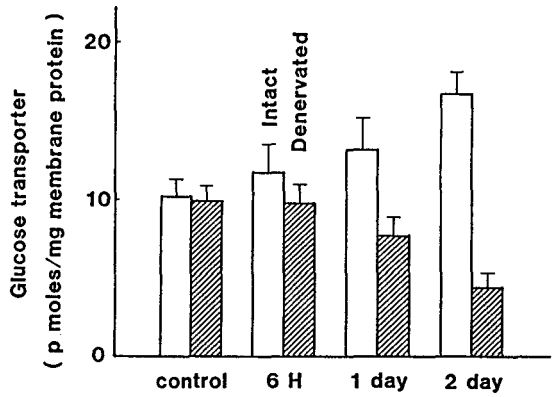


図２．plasma membrane における glucose 輸送体の寒冷曝露による変動

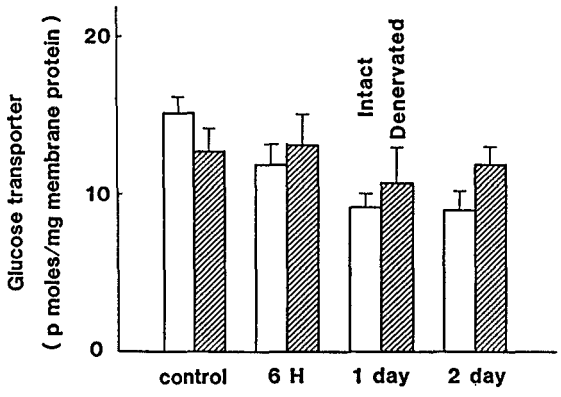


図３．microsomal membrane における glucose 輸送体の変動

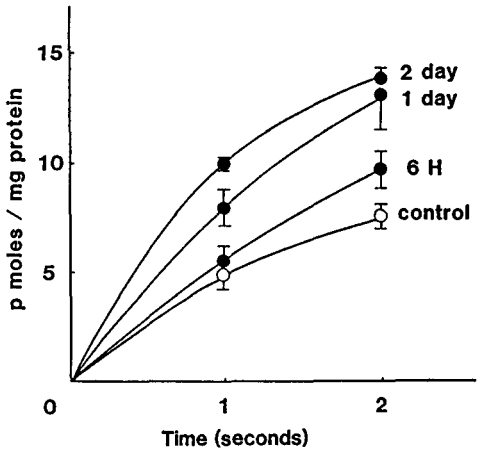


図４．plasma membrane vesicle での D-glucose 取り込み

[文献]

1) Cushman, S.W. et al. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4758

2) Giacobino, J.P. (1978) J. Supramol. Struct. 11, 445

3) Greco, R. et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 7732

4) Grimditch, G.K. et al. (1985) Am. J. Physiol. 249, E398

5) Hom, F.G. et al. (1984) Diabetes 33, 141

55　ストレスとその神経伝達過程に関わる脳内解糖系の変動

滝田正寿、三国雅彦、高橋清久
（国立精神神経センター・疾病研究第３部）

〔要約〕

脳内の糖代謝を経時的に観察するために、解糖系の一最終産物である乳酸をON-LINE BRAIN MICRODIALYSIS法を用いて測定した。数種のストレス性刺激により、ラット内側前頭葉皮質での糖利用は一過性に促進された。初めの刺激の一時間後に、再度同一刺激を行った時、その反応性は低下していた。この反応に関与する神経伝達物質とその過程を以下に報告する。

〔はじめに〕

脳内糖代謝系は、脳機能を統合的に観察したり機能局在を知る上で重要と考えられる。近年のPET、MRI、オートラジオグラフィーを用いた研究から重要な知見が集積しているが、これらの画像分解能と時間分解能は生化学的解析には不十分であった。我々は、乳酸が糖代謝系のひとつの最終産物である事に着目し、自由行動下、局所脳内糖代謝系を観察する手段として乳酸をON-LINE上で測定した。

〔方法〕

SD系雄性ラットを麻酔し、脳定位固定装置を用い内側前頭葉皮質(mpFC; B:-2.7mm, L:1.0 mm, V:3.5mm under dura) へ自作のU字型微小透析チューブを装着した。翌日、無麻酔無拘束下リンゲル液を2.5μl/minの流速で灌流した。回収液はT字管の一方につなぎ、他方より流入する酵素液と直接反応させた。T字管から流出するこの反応液を、flow cellを装備した蛍光検出器に流入させ、ON-LINE上経時的に測定した。数種のストレス性刺激を用い、各種薬物を用いてその性質を調べた。統計処理は、コクラン一コックステストを用いた。

〔結果〕

基礎放出が安定した後、刺激として1分間のテイルピンチ、 5分間の100dBホワイトノイズ、5分間の拘束を行った。刺激開始直後、mpFCの乳酸放出は一過性に増加した(Fig.1abc)。90分間の拘束に対するこの反応は、他の5分以下のストレス性刺激と同様に刺激直後の初期過程にあった(Fig.1d)。また、初めの3種の刺激を、一時間後に再び繰り返した時に、この反応性は初めより低値であった(Fig.1abc, Table 1)。5分間の拘束はmpFCの乳酸放出を増

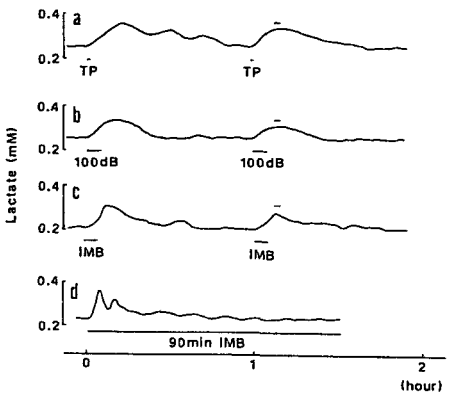


Fig.1 Effects of several stressful stimuli on the extracellular lactate levels in rat mpFC. Two periods of (a)1min tail pinch(TP), (b)5min 100dB white noise(100dB), (c)5min immobilization(IMB) were applied to the animals. And the effect of (d)90min IMB on mpFC lactate-release was demonstrated.

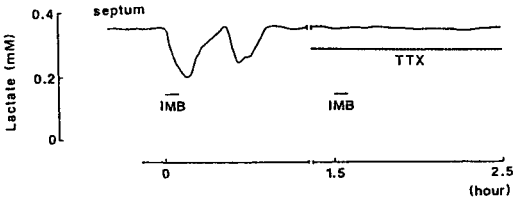


Fig.2 Effect of the 5min IMB on septal lactate-release with TTX treatment.

Table 1 Effects of two periods of 1min TP and/or 5min IMB on the release of endogenous lactate(ΔS1 and ΔS2, peak-baseline) from rat mpFC *in vivo*.TTX were perfused for 30min before the second stimuli.

	base line	ΔS1	ΔS2	ΔS2 (% of ΔS1)
1min tail pinch	0.21±0.02	0.06±0.01	0.04±0.02	65.5±7.1 *
5min immobilization	0.22±0.03	0.11±0.03	0.06±0.02	54.4±6.4 **
TTX	0.21±0.02	0.07±0.01	0.00±0.06	-0.2±6.9 **§

*. p<0.05, **. p<0.001 vs ΔS1
§. p<0.001 vs control ΔS2 (Cochran-Cox test)

加したが、中隔野では逆に一過性の減少を示した(Fig.2)。ストレス性刺激によるmpFCの乳酸放出反応に関して、以下の実験を行った。レゼルピン(RES)を皮下注射した15時間後には、mpFCの乳酸基礎放出は観察されなかった。またそのとき、3種のストレス性刺激に対する反応も消失した(Fig.3a)。擬似糖2-deoxy-D-glucose(2DG)の局所灌流もこの基礎放出を完全に抑制したが、ストレス性刺激に対する乳酸放出反応は観察された(fIg.5b)。ストレス性刺激による細胞外乳酸の反応性は、mpFCと中隔野の両部位で異なったが、共にテトロドトキシン(TTX)感受性の変化であった (Fig.2, 3c and Table 1)。また、抗不安薬ジアゼパム(DZP)の腹腔内注射はmpFCの乳酸基礎放出を変えず、ストレスに対する反応性のみを抑制した(Fig.3d)。RES処置により乳酸の放出が観察されなくなった後、数種のモノアミン作動薬を皮下注射した。この時、カテコールアミン作動薬は乳酸の放出を発現させた(Fig.4a-e)。

〔考察〕

我々の観察したmpFCの乳酸放出は脳局所糖利用を反映することが、以下の理由から示唆された。1)2DGの局所灌流はmpFCの細胞外乳酸の基礎放出を完全に抑制した。2)この2DG用量で全血糖を置換することは不可能である。3)TTXの局所灌流でストレス性刺激による乳酸放出反応のみを抑制した。

ストレス性刺激によるmpFCの乳酸放出の増加反応はRESとTTX感受性であったことから、モノアミンの神経活動が一次的にこの反応に関与すると考えられた。更に、2DG灌流下にこの反応が観察され、phasicな調節を受けることが示唆された。mpFCの乳酸基礎放出は、RES処置により完全に抑制され、TTXにより抑制されなかった。また、RES処置後、アポモルフィンとイソプロテレノールはmpFCの乳酸放出を発現した。以上からmpFCの乳酸の基礎放出は、活動電位依存性Na^+チャンネルが関与しないCA神経の基礎活動に由来し、神経細胞もしくはグリア細胞上のCA受容体シナプス後機能を介しtonic に調節されていることが示唆された。このストレス性刺激によるmpFCの乳酸放出は再度の同一刺激に対してその反応性を減弱したことは、短期適応に関わる過程を観察していると考えられる。また、1)二度の刺激間に１時間と言う十分な間隔が開けられている、2)この反応に感覚特異性が無い、3)新規な刺激に対しては反応性の減少がみられない(Fig.3b)、ことからこの短期反応性の変化は神経疲労(fatigue)によるものでは無いと言える。

我々の観察したストレス性刺激によるmpFCの乳酸放出反応と個々の神経伝達との関係を今後明かにすることが重要であるが、総合的なシナプス後反応としての脳内の糖利用の観察は有用であると考えられた。更なる検討を行い、加えて報告する。

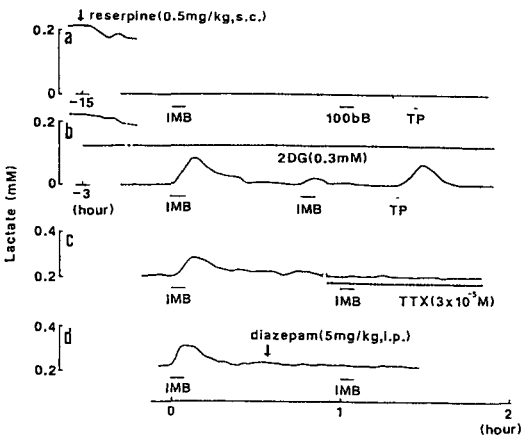


Fig.3 Effects of several stressful stimuli on mpFC lactate-release after the treatment of several drugs: (a)reserpine(0.5mg/kg, s.c.), (b)2DG, (c)TTX, and (d)diazepam(5mg/kg, i.p.).

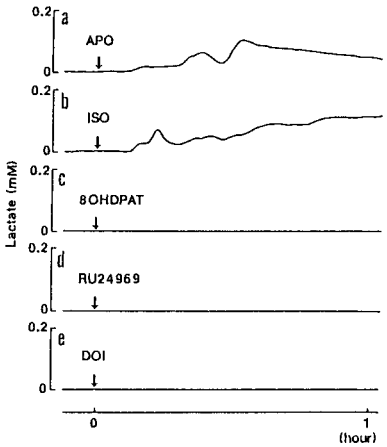


Fig.4 Effects of several receptor stimulants on the extracellular lactate level in mpFC after treatment of reserpine. The subcutaneous were made as follow:
(a)(-)apomorpine (0.5mg/kg), (d)RU24969 (2mg/kg)
(b)D,L-isopreterenol (20mg/kg), (e)DOI (2mg/kg)
(c)8OHDPAT (0.5mg/kg),

56　N-Ethylmaleimide に依るラット脳神経終末からのＡＴＰ放出阻害について。

都築紀宏（名古屋市大・医・生化学）

〔要約〕
神経伝達物質の放出機構を解明する目的で、ラット脳神経終末からのATP放出並びに阻害について実験し以下の結果を得た。 1）神経終末標品(0.8-1.1mg protein/ml)を 5-10μM digitoninで刺激するとATPの放出と並行してlactate dehydrogenase(LDH) の遊離が見られた。ATP放出はCa^{2+}添加を必要とせず 1mM N-ethylmaleimide (NEM)でほぼ完全に抑制されたが LDHの遊離は阻害されなかった。 2）NEM はATPの自然流出も抑制した。 3）Mastoparan 刺激によるATPとLDH 遊離についても同じ結果が得られた。 4）Veratridineやoxatomideによる刺激の場合 LDH 遊離は起こらないが、ATP放出はNEM 阻害を受けた。 5）Ouabainや carboxy-atractyloside (inhibitor for ATP/ADP translocater of mitochondria)は ATP放出を阻害しなかったが、1mM NaN_3は50-60%抑制した。 6）Ammonium vanadate(0.62mM) 及び trifluoperazine(0.24mM) による阻害は見られなかった。 7）これらの結果より、ATPは自然流出の場合も含めて SH-基を持つ蛋白性の担体を介して放出されている可能性が考えられ、阻害剤の作用から判断すると種々のATPases、ATP/ADP輸送体は担体候補から除かれよう。

［序］神経伝達物質の放出過程はCa^{2+}依存性であることは一般に認められているが、veratridineやmastoparan（蜂毒ペプチド）などで神経終末を刺激した際のATPの放出は、反応液にCa^{2+}を加えなくても起こることを昨年までに報告し、細胞内Ca^{2+}が動員されたと解釈した(1,2)。開口放出説ではシナプス小胞に含まれるATPが伝達物質と一緒に放出されると解釈しているが、私の昨年までの結果では細胞質に存在するATPが放出されている可能性が充分あった。今回、神経終末をdigitoninまたは mastoparanで刺激すると ATPとLDHの放出が並行して起るが、ATPの放出はNEMでよく阻害されるにも拘らず LDHの方は阻害されないと言う不統一が有った。これは双方が異なった機構で放出されていることや、ATPの放出は蛋白性の輸送担体が関与している可能性を示していると思われるので、これらの結果について報告する。

［実験材料と方法］ 神経終末標品（シナプトソーム）：５週齢･雄 Wistar rats脳よりP_2分画を調製後 ショ糖密度不連続勾配上で遠心分画し 45mM Na/phosphate-0.32M sucrose-10mM glucose buffer, pH 7.4 に懸濁した(8-12mg protein/ml)。 ＡＴＰの放出： 神経終末標品から放出されるＡＴＰは既報(1,2)の様にルシフェリンールシフェラーゼ系を用いて発光測定した（ﾗﾎﾞｻｲｴﾝｽ社ATP-photometer使用）。反応液；上記 buffer, 0.2ml; luciferin-luciferase sol., 0.1 ml; synaptosomes, 0.8-1.0mg prot./ml。 神経終末へのfura 2AMの負荷と終末内遊離Ca^{2+}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を冷却遠心除去した。この終末標品を用いて遊離Ca^{2+}を蛍光測定した(exc. 335nm, emit. 495nm)。 LDH 活性測定： 上記緩衝液に 5mM pyruvate, 0.2mM NADHを加え340nmにおけるNADHの吸光度減少より測定した。 Digitonin, veratridine, carboxyatractyloside, ouabain, NEMはSigma Chem.より購入。Mastoparanはペプチド研（大阪箕面市）より、ammonium vanadate、trifluoperazineは片山化学より入手した。Oxatomideは協和発酵より恵与された。尚これらの試薬はＡＴＰ発光反応及びLDH 活性測定反応自身を妨害することはなかった。

［結果と考察］ Digitoninによるpermeabilization： ジギトニンはコレステロールとよく反応し、生体膜に作用させるとその透過性を増すことが知られている(3)。図１に示した様に神経終末標品にジギトニンを加えてゆくと Ca^{2+}を添加しなくても 3-5μM位からATPとLDHの漏出が並行して見られる様になる。

NEMによるATP放出阻害： 神経終末を1mM NEM (SH-試薬)と2-3分pre-incubateした場合、ジギトニン刺激に依る

このATPの放出はほぼ完全に抑えられるが LDH放出の抑制は起らなかった(図2、3)。昨年報告した様にmastoparanで刺激してもATPとLDHの放出が見られるが、後者はNEM 抑制を受けなかった。Veratridine刺激の場合LDHの放出は起らないが ATP放出はNEMで阻害された。又、図4に示した様に NEMはATPの自然流出に対しても強い抑制を示した。

これらの結果から判断するとdigitonin及びmastoparan刺激の場合LDH (MW=134,000)が漏出可能な大きさの穴(100A?)が形成され、このpermeabilizationが神経終末の脱分極をもたらしATP放出を促すと思われる。Veratridineでは脱分極のみ起り これがATP放出の引金となる。NEM 阻害の有無から推測すると、ATPがこの穴から放出されているとは考え難い。またATPの自然放出もNEMで阻害されるので 自然放出と脱分極後の放出とは同じ機構で起っていると考えられる。SH-基を持った蛋白性の輸送体の関与が考え易い。

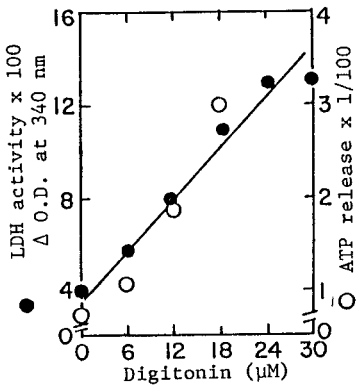


Fig. 1. Release of ATP & LDH

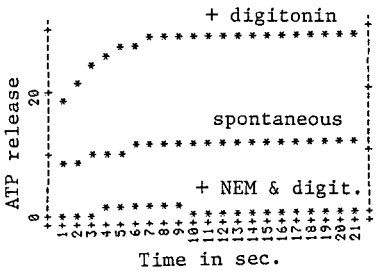


Fig. 2. Inhibition by NEM

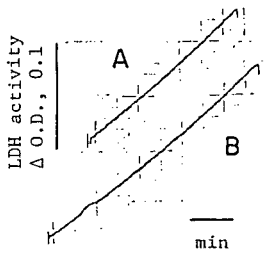


Fig. 3. LDH release (A) was not inhibited by NEM (B).

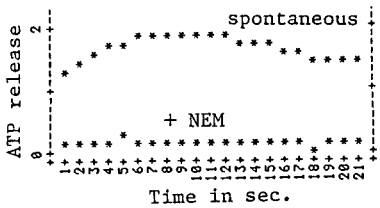


Fig. 4. Spontaneous release inhibited by NEM

Table I. Inhibition of ATP Release.

1.0mM NEM,	>94 %;
1.0mM Azide,	50-60 %.
0.7mM Ouabain,	1.0mM atractyloside,
0.6mM vanadate,	0.1mM nomifensine, and
0.24mM trifluoperazine	were inert.

<u>種々の試薬のATP放出への影響：</u> SH-基を含む成分はどんなものか？殆どのATPasesはNEMの阻害を受けるが(4)、5価のバナジュウムに依っても強く阻害される(5)。しかし vanadateはこのATP放出には全く阻害作用を示さなかった。Na,K-ATPaseの特異的阻害剤 ouabainも影響を及ぼすさなっかた。Azideはミトコンドリアなどの ATPaseを阻害するが、ATP放出を50%ほど抑制した(ouabain存在下でも同じ阻害度を示した)。しかしミトコンドリアATP輸送体の阻害剤carboxyatractylosideやカルモジュリン作用を抑える trifluoperazineはATP放出に影響を示さなかった。これらの結果は表Ⅰに纏めてある。

<u>Oxatomideの影響：</u> Oxatomideは抗アレルギー剤として用いられているが、CNSに作用することも知られている。上述の様に神経終末に投与するとoxatomideはATP放出を促進したが 終末内Ca^{2+}の動員は検出できなかった。このATP放出もやはりNEMで強く阻害された。

カテコルアミンの放出がNEMで阻害される事は古くから知られている(3)。その作用機序は明らかでないが分泌顆粒標品に含まれるATPaseが阻害される為かと言われている(6)。しかし 神経終末は刺激を受けてから 急いで分泌顆粒にカテコラミンをパックして開口放出しているとは思えないので このパッケジ段階でのNEM 阻害がカテコラミン放出を抑制しているとは考え難い。現実験条件下でのATPに付ても同様で、輸送担体を介した細胞質ATPの放出を仮定した方が理解し易い。ATPはカテコラミンの膜透過性を増すので(7) この蛋白の燐酸化も有り得る。種々の物質輸送に付て NEM 阻害が知られている(8)。

[文献] 1) 都築紀宏、神経化学 26, 601-603 (1987). 2) 左同 28, 332-333 (1989). 3) Wilson, S.P. & Kirshner, N.(1983) J. Biol. Chem. 258, 4994-5000. 4) Tsudzuki, T. (1979) J. Biochem. 85, 567-574. 5) Michaelis, E.K., Michaelis, M.L., Chang, H.H. & Kitos, T.E. (1983) J. Biol. Chem. 258, 6101-6108. 6) Kirshner, N., Kirshner, A.G. & Kamin, D.L.(1966) Biochim. Biophys. Acta 113, 332-335. 7) Morita, K., Ishii, S., Uda, H. & Oka, M.(1988) J. Neurochem. 50, 644-649. 8) Zafra, F. & Gimenez, C.(1988) Biochim. Biophys. Acta 946, 202-208.

57 脳の脂肪酸縮合反応に対する促進因子

竹下正純，緒方健一，吉田 敏＊
（大分医大・生化学，実験センター＊）

〔要約〕

脳ミクロソームにおける脂肪酸伸長反応の第1段部分反応である16:0-CoAを基質とした縮合反応に対して、熱処理ミクロソームが反応促進作用を示した。この熱処理標品を水層および脂質層に分画したが、両層とも顕著な活性化は認められなかった。一方、牛血清アルブミン(BSA) が熱処理ミクロソームと同様、最高 5.8倍の反応促進効果を示した。脂肪酸freeの BSAは、比較的少量で活性促進が上限に達し以後低下したが、脂肪酸含有標品(Cohn fraction V) では、添加量に応じてさらに活性促進を示した。縮合反応のミクロソーム量に対する関係は、この因子なしではS字状を示したが、上記の因子を添加することにより直線性を示した。 BSAは20:0-CoA縮合反応に対しても最高 4.3倍程度の活性促進を示した。卵アルブミンや脂肪酸結合タンパクなどは効果がなかった。この反応促進効果は、熱処理ミクロソームあるいは BSAと縮合反応によって生成されたβ－keto体との相互作用による可能性が考えられる。

脳における脂肪酸伸長反応は、ミエリン形成に関連して重要である。本伸長反応は縮合、還元、脱水、還元の4段階の部分反応からなる。我々はこれら各段階の反応機構について研究を続けてきた (2, 4, 6)。このうち、第1段の縮合反応が全伸長反応の律速であり(6)、代謝調節上重要である。この縮合反応において、ミクロソーム酵素量と活性の間に直線関係が成立せず、いわゆるS状曲線を示した。この原因を明らかにすべく検討した結果、熱処理ミクロソームあるいは、牛血清アルブミン(BSA) により反応の促進と直線性の回復をみたので報告する。

［方法］ 脂肪酸縮合反応測定のための酵素源は、生後20日前後のラット脳から前回報告したsubmicrosomal membrane (3) あるいは、庶糖密度勾配法(5) によって調整したミクロソームを用いた。縮合活性測定法はFig. 1のとおりで必要に応じてラジオガスクロマトグラフィーなど(6) による測定を行った。熱処理ミクロソームは、上記ラット脳ミクロソームを 100℃、20分処理した。これから水層および脂質層の分画はFig. 2に示した。

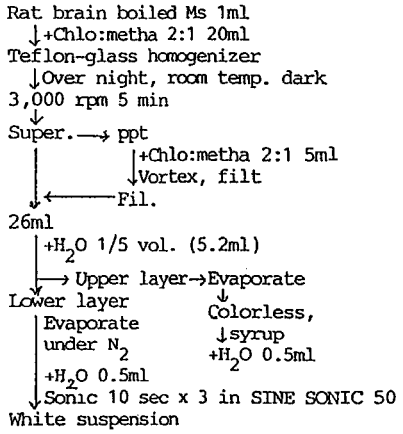
［成績］ 熱処理ミクロソームは 4 mg/mlまで、ほぼ直線的に約 4.2倍まで縮合反応促進を認め、以後 plateauに達した(Fig 3)。ミクロソーム量と活性の関係は、低濃度ミクロソームでlag があり、いわゆるS状曲線を示すが、これに熱処理ミクロソームを加えると直線性を示した（データ略)。Table 1に熱処理ミクロソームの分画の添加について示す。水層はむしろ反応抑制。脂質層は高々 1.5倍程度で両者を合わせても2倍に達しなかった。脂質画分の溶解性を考えて BSA を添加したところ BSAのみで 4 倍の反応促進を示した。これは同時に測定した同タンパク量の熱処理ミクロソームより良い値とな

Fig. 1 Condensation Assay

KPB, pH 7.4	100	μM
Malonyl-CoA	50	〃
16:0-CoA or 20:0-CoA	40	〃
[2-^{14}C]Malonyl-CoA	50	nCi
Boiled Ms or BSA	0.8	mg
Microsomes (LSM)	0.15	mg
Total	0.2	ml
37°C 10 min		
15% KOH-MeOH	0.2	ml
65°C 30 min		
1M H_3PO_4	0.35	ml
nHexane	3	〃
0.96% Digitonine in 57% EtOH	50	μl
0.4% Omuniflora-toluene	10	ml

Sintillation counter

Fig. 2 Extraction of Lipids from Boiled Brain Microsomes



っている。BSAに脂質分画を加えても、それ以上には反応促進は見られなかった。

シグマ社のfraction V (fr V)とessentially fatty acid free BSA (FA free-BSA)を比較したところ、fr Vは比較的高濃度まで反応促進を示したのに対してFA free-BSA は2.5 mg/ml 以上では促進の程度が低下した(Fig. 4)。従って以後の実験ではfr Vを用いた。S字状のミクロソーム量／活性関係は BSAを加えることによりミクロソームタンパク 2 mg/mlまでほぼ直線的に推移した(Fig. 5)。20:0-CoA縮合反応に対する BSAの効果は、16:0-CoAの場合より少量(2 mg/ml) でピークに達するがそれ以上では促進の低下をきたした(Fig. 6)。

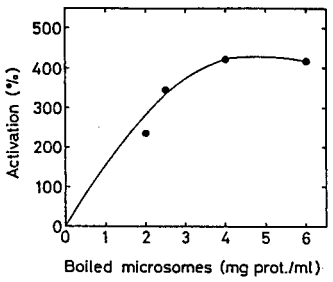


Fig. 3 Activation of 16:0-CoA with boiled microsomes. Light smooth microsomes (LSM) 0.75 mg/ml were used for the assay.

Table 1 Effect of Boiled Microsomal Extracts

Extracts	volume ml/ml RM[a)]	Condensation of 16:0-CoA (nmol/ml)	Ratio
Control	-	0.08	1
+ Water layer	0.35	0.06	0.8
+ Lipid layer	0.35	0.12	1.5
+ Water layer + Lipid layer	0.35	0.14	1.8

Effect of Boiled Microsomal Extracts and BSA

Addition	Amount per ml RM	Condensation of 16:0-CoA (nmol/ml)	Ratio
Control	-	0.11	1
BSA	5 mg	0.44	4.0
Ms[b)] lipid[c)]	0.7 ml	0.22	2.0
BSA + Ms lipid[c)]	1 mg 0.7 ml	0.45	4.1
Boiled Ms	5 mg	0.36	3.3

a) RM: reaction mixture
b) Ms: microsomes
c) Sonicated 10 sec x 5 in SINE SONIC 50

卵アルブミン(1～5 mg/ml)は殆ど効果がなく、またラット脳から部分精製した脂肪酸結合タンパクはかえって反応抑制を示した。

[考察] Nagiらはβ－ketoacyl化合物が BSAとの相互作用により303 nm吸収の増大をきたすことを報告している(1)。本研究における熱処理ミクロソームあるいは BSAによる反応促進効果も生成ケト化合物とタンパクの相互作用による可能性が考えられる。細胞内に促進因子はあるか、また反応促進機構の詳細について研究を進めている。

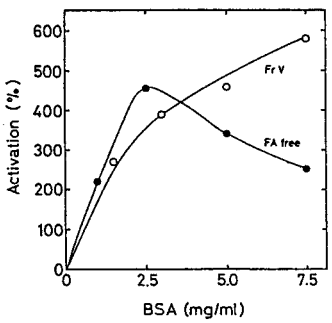


Fig. 4 Effect of fraction V (fr V) and fatty acid free (FA free) bovine serum albumin (BSA) on 16:0-CoA condensation. LSM 0.75 mg/ml were used for the assay.

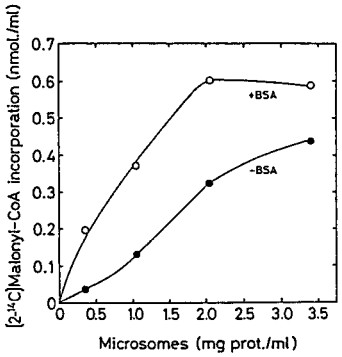


Fig. 5 Effect of BSA on concentration of microsomes vs. 16:0-CoA condensation. Fraction V of BSA (7.5 mg/ml) when added and various amount of LSM as microsomes were used.

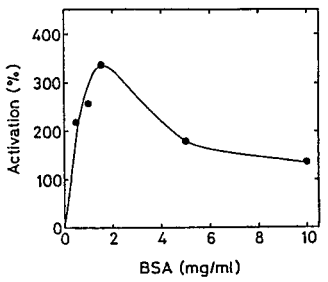


Fig. 6 Effect of BSA on 20:0-CoA condensation. Different concentrations of fraction V of BSA and 0.75 mg/ml of LSM were used.

[文献]
1. Nagi, M.N., Cook, L., Seneja, S.K., Osei, P., and Cinti, D.L. (1989) Anal. Biochem. 179, 251-261
2. Takeshita, M., Tamura, M., Yoshida, S., and Yubisui, T. (1985) J. Neurochem. 45, 1390-1395
3. 竹下正純, 吉田敏 (1989) 神経化学 28, 274-275
4. Yoshida, S., Saitoh, T., and Takeshita, M. (1988) Biochim. Biophys. Acta 958, 361-367
5. Yoshida, S., and Takeshita, M. (1984) Biochim. Biophys. Acta 795, 137-146
6. Yoshida, S., and Takeshita, M. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 254, 180-187

58 Methamphetamine慢性投与がNa^+,K^+-ATPaseに与える影響について

神崎昭浩，秋山一文，奥村一哉，氏家寛，大月三郎
（岡山大学医学部神経精神科）

〔要約〕
Methamphetamine(MAP)慢性投与による逆耐性モデルに、Na^+-K^+-ATPaseがどのように関連しているのかを検討した。ラットを用いて、実験群には MAP(4 mg/kg)を14日間腹腔内投与し、対照群には同量の生理的食塩水を同期間投与した。最終投与から 7日後に脳内微小透析法でNa^+,k^+-ATPaseの特異的阻害剤であるouabain(100μM)を線条体に灌流すると、ouabainはDA levelを増加させ、その増加の程度はMAP群ではcontrol群に比べて有意に大きかった(P<0.01)。reserpine(5mg/kg)前処置にても同様な変化(P<0.01)を示したが、α-methyl-p-tyrosine(250mg/kg)前処置では両群間には有意差が認められなかった。これは、MAP慢性投与群では、対照群に比べて、Na^+,K^+-ATPaseの阻害による影響を受けやすく、この阻害によって新しく合成されたDAの放出の増大が起こることを示している。最終投与から 7日後の [^{3}H]ouabainによるオートラジオグラフィーでは線条体の特異的結合は両群間で有意差は認められなかった。Na^+-K^+-ATPase活性は、MAP慢性投与後にMAP(4 mg/kg)を再投与した群では、MAP慢性投与のみの群に比べて、有意な増加を認めた (P<0.05)。しかし、生理的食塩水慢性投与後にMAPを再投与しても非再投与の群とは有意差を認めなかった。MAP慢性投与後では、対照群よりもMAPを再投与することによってNa^+,K^+-ATPase活性が、著明に増大することが示された。以上より、MAP慢性投与によってNa^+,K^+-ATPaseをより必要とする状況へと変化する可能性が示唆された。

[はじめに]
Na^+-K^+-ATPaseは細胞膜に存在する酵素で、細胞内Na^+と細胞外K^+の能動的輸送を行っている。この酵素は神経伝達物質の放出とも関係するとされ、ouabainによって特異的に阻害される。脳内微小透析法では、ouabainを脳内に灌流することによって amphetamine (AMP)による線条体でのDA放出が増大することが報告されている[1]。さらに、AMPの急性投与によって線条体 Na^+-K^+-ATPase活性が増大することも知られている[2]。これらの報告は、Na^+,K^+-ATPaseの作用によって、DA放出の増大が是正されていることを推測させる。今回は、methamphetamine(MAP)慢性投与による逆耐性モデルに、Na^+-K^+-ATPaseがどのように関連しているのかを検討したので報告する。

[対象と方法]
250-280 g のSprague-Dawley系雄性ラットを用いた。実験群はMAP hydrochloride(4 mg/kg)を14日間腹腔内投与し、対照群には同量の生理食塩水を同期間投与した。

実験Ⅰ. 脳内微小透析法を用いた。最終投与から 7日後に、ouabain(100 μM)を線条体に灌流し、灌流液を20分毎に 180分間採取した。灌流液のDAは電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーで測定し、灌流前の 3サンプルの平均を基礎値として基礎値に対する割合で示した。また、ouabain によって放出された DAの由来を確認するために、reserpine(5 mg/kg)または α-methyl-p-tyrosine(250 mg/kg)をouabain灌流 180分前に投与した。

実験Ⅱ. オートラジオグラフィー法を用いた。ラットは最終投与から 7日後に断頭しすぐに脳を凍結し、cryostatを用いて線条体を20μmの切片にした。切片を5mM ATPと20nM[^{3}H]ouabainでincubationした。non-specific bindingは50μMのunlabeled ouabain存在下の結合とした。切片をtritium-sensitive filmに 6日間曝した後現像した。定量化は computer-assisted densitometerを用いて、1つの検体の特異的結合(fmol/mg tissue)を得るために、3連続切片の左右 6カ所の平均をとった。

実験Ⅲ. Na^+-K^+-ATPase活性を測定した。MAP反復投与群を最終投与から 7日目にMAP(4 mg/kg)を再投与して 1時間後に断頭した群(M-M 群)と非再投与のまま断頭した群(M 群)に分けた。生理的食塩水投与群についても同様に処理しS-M群と S群に分けた。断頭後、すぐに線条体からmitochondrial fraction(P_2)を遠沈分離した。P_2 を50mM Tris-HCl(pH 7.5), 3mM MgATP, 80mM NaCl, 10 mM KCl, ±1mM ouabain でincubationし、吸光度850nmで測定した。Na^+,K^+-ATPase活性(μmol Pi/mg protein/min)はouabainの存在、非存在下でのリン生成量の差とした。

有意差の検定は 2元分散分析、t検定をおこなった。

[結果と考察]
実験Ⅰ. ouabain は DA level を増加させ、その増加は MAP群では control群に比べて有意な上昇を示した(P<0.01)(Fig.1)。reserpine前処置にても同様な動態を示した(P<0.01)(Fig.2)。α-MPT前処置は DA levelを減少させ、ouabainの灌流によってもDA levelの増加は認められなかった(Fig.3)。これらより、MAP慢性投与群では、control群に比べて、Na^+,K^+-ATPaseの阻害による影響を受けやすく、この阻害によって新しく合成されたDAの放出の増大が起こることが示された。

実験II. 特異的結合(fmol/mg tissue)はMAP群では899±98, control群では933±124(mean±SD)と両群間に有意 差は認められなかった。

実験III. Na^+-K^+-ATPase活性は、M-M群では M群と比較して153.2 %と有意な上昇を示した(P<0.05)(Table.1)。しかし、S群とS-M群との間には有意差は認められなかった。MAP慢性投与後では、MAPを再投与することによってNa^+,K^+-ATPase活性が、対照群よりも著明に増大することが示された。

従来の報告ではAMP(5 mg/kg)急性投与でNa^+-K^+-ATPase活性が上昇することが示されている[1]。また、Na^+-K^+-ATPaseを阻害するouabain(10 μM)を灌流しながらAMP(4 mg/kg)を腹腔内投与するとAMP単独投与よりもDA放出が増大することも報告されている[2]。これら2つのことは、AMPによるDA放出が Na^+-K^+-ATPaseによって是正されることを示唆している。今回われわれは、MAP慢性反復投与群において、MAP再投与がNa^+-K^+-ATPase活性を増大させることを示した。また、MAP慢性投与群ではNa^+-K^+-ATPase阻害によってDA放出の増大が起こりやすいことも示した。以上より、Na^+,K^+-ATPaseは MAPが細胞に与える影響を是正すると考えられ、しかも MAP慢性投与によってNa^+,K^+-ATPaseをより必要とする状況へと変化する可能性が示唆された。

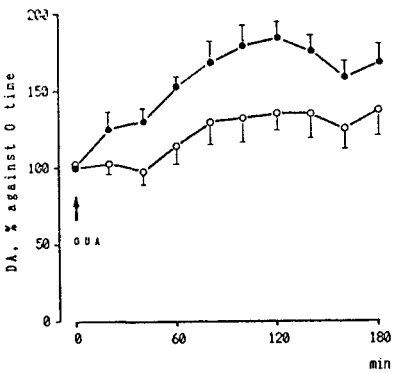


Fig.1 Effects of ouabain(OUA)(100 μM) on dopamine efflux in striatal perfusates from rats pretreated with MAP(● 4mg/kg/day, 14days, n=6), or from saline-pretreated control rats (○ n=6). The data are expressed as % (mean±S.E.M.)of the zero time value.(P<0.01)

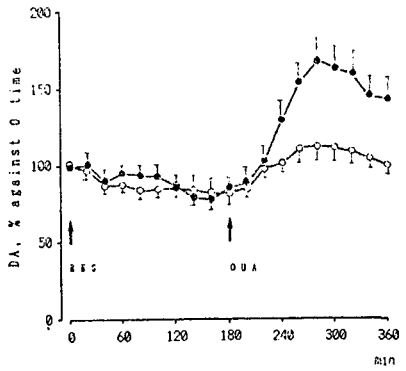


Fig.2 Effects of reserpine(RES)(5 mg/kg) on ouabain(OUA)(100 μM) induced striatal DA efflux from rats pretreated with MAP(● 4mg/kg/day, 14days, n=6), or from saline-pretreated control rats (○ n=6). RES was injected 180 min prior to ouabain infuson. The data are expressed as % (mean±S.E.M.) of the zero time value.(P<0.01)

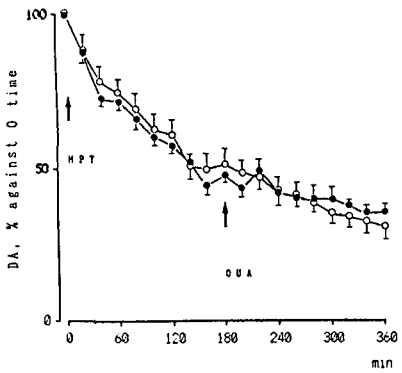


Fig.3 Effects of α-methyl-p-tyrosine(MPT) (250 mg/kg) on ouabain(OUA)(100 μM) induced striatal DA efflux from rats pretreated with MAP(● 4mg/kg/day, 14days, n=6), or from saline-pretreated control rats (○ n=6).MPT was injected 180 min prior to ouabain infuson. The data are expressed as % (mean±S.E.M.) of the zero time value.

Table 1.
Effect of subchronic methamphetamine treatment on Na^+,K^+-ATPase activity

	Na^+,K^+-ATPase[a]
control	0.432±0.084
control + MAP	0.509±0.122
subchronic MAP	0.376±0.059
subchronic MAP + MAP	0.575±0.186*

[a] Values are expressed as μmol Pi/mg protein/min (mean±S.D.).
* significantly different from subchronic MAP, P<0.05, n=7.

[文献]
1) Butcher,S.P.,et al.(1988) J.Neurochem. 50, 346-355.
2) McNulty,J.,et al.(1977) Biochem. Pharmac.27, 1049-1053.

59 Methamphetamine投与によるラット線条体におけるSerotonin放出について：In vivo microdialysisによる検討

小山　司、中山　誠、村木　彰、大森哲郎、松原繁広、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Serotonin(5-HT)放出について検討した。MAP投与後、細胞外5-HT量は急激に増加し、投与量1-25mg/kgで明瞭な用量依存性を確認した。5-HT最大放出量は、MAP25mg/kgで、基礎値の平均約56.2倍に達し、同時に検出されたDopamine(DA)最大放出量が基礎値の約15倍であり、MAPによる5-HT放出促進は、DAをはるかに上回っていた。神経終末における小胞内5-HT貯蔵プールの枯渇剤であるReserpine前処置は、MAP高用量(25mg/kg)、低用量(5mg/kg)のいずれにおいても、5-HT放出量の増加を約20%前後に抑制した。一方、5-HT合成阻害剤であるp-Chlorphenylalanine(PCPA)前処置は、MAP投与による5-HT放出量の増加に対して、約70%前後の部分的な抑制効果を示した。以上の結果から、MAP投与による5-HT放出の起源は、新しく生合成された5-HTプールと小胞内5-HT貯蔵プールの両方から動員されたものの総和であるが、その大部分は小胞内5-HT貯蔵プールに由来するものと推定される。

【はじめに】

覚醒剤精神病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、線条体DA系の感受性亢進が重要視されてきた。我々は、これまでに、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、in vivo microdialysis を導入することによって、この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きた(1､2)。さらに、最近、このMAP反復投与にシナプス間隙DA放出量の増大の所見は、新しく生合成されたDAプールの増大に基づくことを明らかにした（3､4)。しかし、多彩な臨床像を呈する覚醒剤精神病の神経化学的基盤を、DA系のみに求めることには慎重でなければならず、他の神経伝達系も含め、幅広く知見を集積することが妥当と思われる。今回は、5-HT系に焦点をあて、MAP投与による線条体における5-HT放出について、in vivo microdialysisを用いて検討したので報告する。

【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、脳定位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、内径195μm、膜厚30μm)を、ガイドステンレス管より5mm線条体内に露出させて固定した。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l-cysteine(0.02mg/ml)を含む0.05Mの酢酸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5-HTおよび5-HIAA量は電気化学検出器(EICOM ECD-100)付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって測定した。5-HTおよび5-HIAA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、MAPおよびReserpineは皮下投与により、PCPAは腹腔内投与によった。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5-HTおよび5-HIAA量の変化(Fig.1、Fig.2)

MAP投与後、透析液中の5-HT量は急激に増加し、投与量1-25mg/kgで明瞭な用量依存性を確認した。投与後40-60分で最高値を示し、以後基礎値に向かって減少した。これらの細胞外5-HT量の動態は、MAP投与による5-HT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。5-HT最大放出量は､MAP25mg/kgで、基礎値の平均約56.2倍に達した。同時に検出されたDA最大放出量は基礎値の約15倍であったことから、MAPによる5-HT放出促進効果はDAのそれをはるかに上回ることが明らかとなった。この結果は他のMAP投与量においても同様であった。5-HT代謝産物の5-HIAA量は、MAP投与量2.5mg/kg以上で、投与120分から有意に減少し、最大70-80%にまで達した。しかし、このMAP投与による5-HIAA減少には、用量依存性が認められなかった。

（2）MAP投与による5-HT放出量の増加に及ぼすReserpine前処置の影響(Fig.3)

MAP投与200分前にReserpine5mg/kgを前処置した際の5-HT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前処置群の約20%前後に抑制された。このReserpine前処置で神経終末における小胞内5-HT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5-HTの約70-80%は神経終末貯蔵プールに由来するものと推定される。

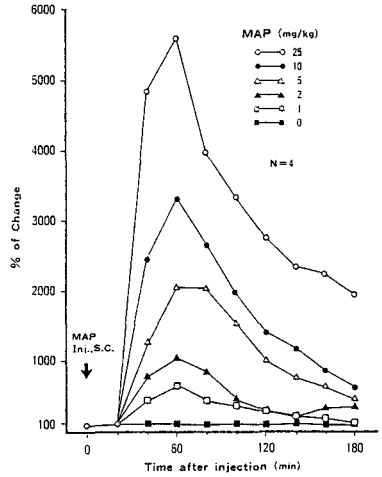


Fig.1 Effect of MAP treatment on 5-HT efflux in dialysates collected from rat striatum

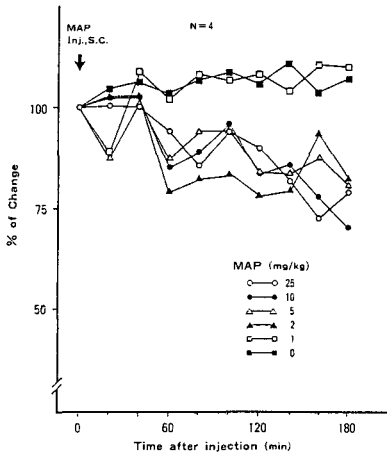


Fig.2 Effect of MAP treatment on 5-HIAA efflux in dialysates collected from rat striatum

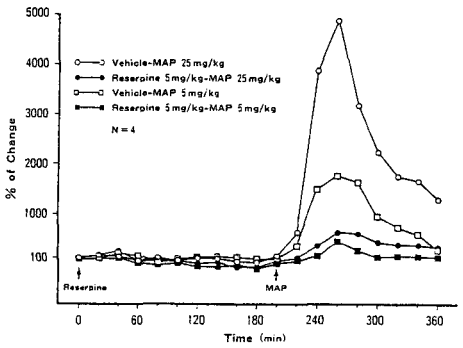


Fig.3 Effect of reserpine pretreatment on MAP-induced alteration in 5-HT efflux in dialysates collected from rat striatum

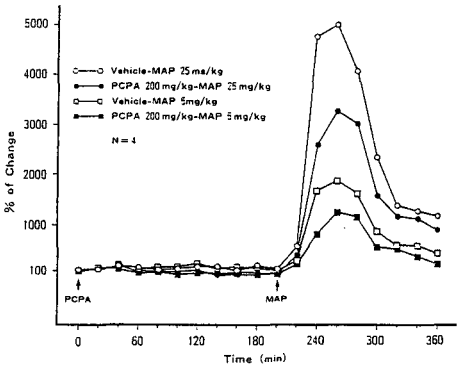


Fig.4 Effect of PCPA pretreatment on MAP-induced alteration in 5-HT efflux in dialysates collected from rat striatum

（3）MAP投与によるDA放出量の増加に及ぼすPCPA前処置の影響(Fig. 4)

5-HT合成阻害剤であるPCPA200mg/kgの前処置は、MAP投与(5mg/kgおよび25mg/kg)による5-HT放出量の増加をvehicle前処置群の約70%前後に抑制した。したがって、MAP投与の際の5-HT放出の起源の一部は新しく生合成された5-HTプールにもあると考えられる。

以上の結果から、MAP投与による5-HT放出の起源は、新しく生合成された5-HTプールと小胞内5-HT貯蔵プールの両方から動員されたものの総和であるが、その大部分は小胞内5-HT貯蔵プールに由来するものと推定される。我々は、以前、MAP投与によるDA放出過程をin vivo microdialysisを用いて検討し、Reserpine前処置がMAP投与によるDA放出量の増加に影響を与えなかったのに対し、DA合成阻害剤であるα-MPTの前処置がほぼ完全に抑止したことから、MAP投与によるDA放出は、小胞内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推定した(3、4)。これらの結果から、MAP投与による5-HTとDAの放出はその起源を異にしていることが明らかとなり、この知見はMAPによる5-HT放出促進効果がDAのそれをはるかに上回っているという今回の結果を説明するものと考えられる。

【文献】

1) 市川淳二 他 (1986) 神経化学、25、280-282
2) 小山 司 他 (1988) 精神神経誌、90、853-862
3) 小山 司 他 (1989) 神経化学、28、484-485
4) 小山 司 他 (1990) 精神医学、32、629-635

60　メトアンフェタミン断薬後のモノアミン伝達物質代謝の慢性変化　－マウス系統間における比較－

盛政忠臣、金行孝雄、岡田英俊、庄盛敏廉
（岡山大・医・脳代謝研・病態生化学）

〔要約〕
メトアンフェタミン（MAP；覚醒剤）を４週間持続投与（経口）した後、投与中断後４週間後の steady state における線条体内モノアミン伝達物質と代謝産物濃度の変化を、マウスの系統（クローズドコロニー；CD-1、その突然変異系；CD-1-nu、近交系；BALB/c,DBA1,DBA2,C57BL,NZB）間で比較した。

アルビノのCD-1系においては、何等の有意な変化も認められなかったが、その突然変異系の CD-1-nuにおいては、ノルアドレナリン（NA）濃度のみに有意な変化が認められた。近交系においては、有色特に黒色毛の方の系統に、より大きな、複数の物質濃度に変化が認められた。

これらの結果から、①MAP断薬後の伝達物質放出代謝の変化の発現には、マウス系統間に差が示され、遺伝情報の関与が強く示唆された。②そのような遺伝情報と、毛色発現に関与する遺伝情報との間に、何等かの近接関係が示唆された。③これらの系統間の交配等によって最大の変化を示す動物を作成して、遺伝情報の解析に耐え得るMAP「逆耐性」モデル動物が作成される可能性が考えられた。

【緒言】

覚醒剤後遺症は、「逆耐性」または「フラッシュバック」といった、長期持続的な再発性の機構が成立していることが重要な特徴の一つである。このような側面からも、本症は、分裂病の病態モデルとしての研究の対象とされてきた。一方、覚醒剤乱用者における慢性・再発性の精神症状の発現に関与するのは、覚醒剤の投与量だけではなくて、覚醒剤に対する感受性の個体差も大きく寄与しているだろうという、臨床的な体験がある。

急性または亜急性の行動薬理学的な実験からは、覚醒剤またはその類縁物質に対する感受性が、実験動物の系統間に差異のあることは既に報告（1,2,3,4,5）されている。しかしながら、それらの慢性化に至る過程と神経化学的な変化の機構に関しては、実験動物の種・系統差を比較した検討はなされていない。

そこで本研究においては、実験動物の中で最も多くの系統が入手できるマウスを用いて、覚醒剤（MAP）断薬後の伝達物質代謝の慢性的な変化について、それら系統間で比較検討を行った。

【実験方法】

実験動物は、１３系統のマウス（クローズドコロニー；１系統、近交系；７系統、Ｆ１；３系統、突然変異；２系統）である。MAPの投与は、４週齢時に開始して、水溶液による自由摂取で４週間投与（推定投与量；5-15mg/kg/day）した。投与終了後４週間後の１２週齢の steady state において、マイクロウエーブ処理後得られた脳部位からHPLC-ECDによるモノアミン伝達物質（DA,NA, 5HT）と代謝産物（DOPAC, HVA, 3MT, 5HIAA）の測定を行った。MAP投与中に、異常行動特に相互殺傷によって顕著に個体数が減少した系統は、解析から除いた。

【結果】

アルビノCD-1系においては、いずれの伝達物質と代謝産物にも有意な変化は示されなかった。その突然変異のヌードマウスCD-1-nu においては、NA濃度に有意な増加が示された。一方のアルビノBALB/c系においては DOPAC濃度に増加の傾向が示された。淡茶のDBA1とDBA2系においては、各々、DA濃度または 3MTとNA濃度に有意な変化が示された。黒色毛の C57BL/6と NZB系においては、DAと 5HIAA濃度に増加傾向と 3MTとNA濃度に有意な変化、または、 HVAと 3MT濃度に有意な変化を、各々示した（Table 1）。

		DA	DOPAC	HVA	3MT	NA	5HT	5HIAA
CD-1	C (6)	765±236	60±16	59± 9	7±1	22± 5	42± 6	15±2
	M-4(6)	1020±346	72±10	57±10	7±1	22± 4	44± 9	17±2
CD-1nu	C (6)	1223±206	56±11	65±12	8±1	21± 5	42± 6	17±2
	M-4(5)	1094±118	62± 8	57±13	6±1	37±12↑	47±11	17±3
BALB/c	C (5)	1015±242	35± 8	58± 7	10±1	23± 1	38± 4	12±1
	M-4(4)	1030±273	55±13(↑)	58±04	10±1	29± 8	39± 3	12±1
DBA1	C (6)	602± 72	42± 5	46± 7	6±1	20± 7	43± 5	12±1
	M-4(5)	479± 73↓	39± 7	46± 5	5±1	26± 9	43± 4	11±1
DBA2	C (6)	1075±259	85±10	43± 4	5±1	43±12	47± 9	11±1
	M-4(4)	1088±164	90±11	39± 2	4±1↓	27± 6↓	41± 7	10±1
C57BL	C (4)	979±172	45± 3	63± 6	7±1	40±15	54± 5	18±1
	M-4(6)	1312±307(↑)	51± 8	58± 8	6±1↓	57±15↑	58± 5	19±2(↑)
NZB	C (5)	1193±110	81± 6	63± 4	4±1	24± 2	49± 4	24±1
	M-4(6)	1089±133	91±13	76±10↑	3±1↓↓	21± 5	47± 5	26±2

Table 1. Striatal monoamines and the metabolites(pmol/mg protein, mean±SD, number of animals in parentheses) at the steady state of 4-weeks withdrawal after methamphetamine treatment (M-4) in mice. (↑);$p<0.10$, ↑;$p<0.05$, ↑↑p;<0.01 vs controls(C).

【考察】

モノアミン伝達物質の放出代謝に関与する機構は、ＭＡＰ断薬後４週間目の steady state において、マウスの系統間で特徴的な互いに異なった変化を示すことが明らかにされた。従って、この機構には、これらの動物系統の間で、遺伝情報それ自体またはその発現制御過程の何れかに互いに異なる点の存在することが示唆された。

従って、これらの動物を交配して新しく作成された系統の中から、これらの機構に最大変化を生じる動物を選択することによって、覚醒剤投与後の慢性再発性の変化の機構を、「蛋白質・核酸」のレベルで研究の対象となりうる「逆耐性」動物を作成できるものと考えられた。

また、これらの伝達物質放出代謝の変化を示した度合が、マウスの有色（毛）特に黒毛の系統において大きいことが示された。このことから、これら両者の遺伝子座の近接関係を検討出来る可能性が示唆された。

【文献】

1)Anisman H(1976)Psychopharmacology, 48, 165-173. 2)Kitahara K. & Valtax JL(1979)Psychopharmacology 66, 189-194. 3)Jeste DV,Stoff DM,Rawlings R & Wyatt RJ(1984)Psychopharmacology 84,537-540. 4)栗原久、平林牧三(1985)神経精神薬理 7, 421-439. 5)Moisset B(1977)Psychopharmacology 53, 263-267.

61 Methamphetamine逆耐性およびDopamine代謝に及ぼす海馬一側坐核経路の影響

吉川武男[1]、渡辺明子[1]、渋谷治男[1]、金野滋[2]、融道男[1]
（東京医科歯科大学 医 神経精神科[1]、東京医科歯科大学保健管理センター[2]）

〔要約〕
ラットに少量のMethamphetamine(MAP)を反復投与すると、移所行動の増強（逆耐性）が観察されるが、あらかじめ海馬一側坐核経路の一部であるfimbria fornixを両側電気破壊しておくと、行動の増強は阻止された。次に、MAP の反復投与で一旦行動の増強が確立された動物にfimbria fornixの破壊を施行してMAP のchallenge を試みたところ、MAP に対する反応性は破壊前よりは若干低いが有意差のないレベルが再現された。これらの結果から、逆耐性の成立過程と保持の過程では異なる機構が関与している可能性が示唆された。また生化学的検索では、fimbria fornix破壊後MAP を反復投与した動物のMAP challenge の際のDopamine(DA)代謝回転は、DOPAC/DAを指標にした場合、破壊をせずMAP の反復投与を経験した動物とは対照的に有意に抑えられていると判断された。

［はじめに］
MAP 反復投与によって動物に生じる逆耐性現象は、覚醒剤精神病あるいは精神分裂病の再燃性のモデルとしてこれまでにDA系を中心に多くの研究がなされてきているが、この現象の、長期にわたって持続することや薬物の投与を受ける際の動物のおかれた環境の影響を受ける(1) といった、一種の記憶に類似した側面をDA系の機能変化だけで説明することは難しい。海馬のventral subiculum から側坐核へは、移所行動に促進的に働くグルタミン酸性ニューロンが投射しているがこの経路(fimbria fornix)を破壊すると、移所行動を指標にした行動感作が阻止されることをわれわれは昨年報告した(2)。今回は、これをもう１度確認するとともに、一旦逆耐性が成立した動物でfimbria fornixの破壊を加えた場合のMAP感受性を調べ、さらにこれらの処置を施した動物のDA代謝動態についても検討を加えた。

［方法］
実験には280-310gのWistar系雄性ラットを用いた。Fimbria fornixの破壊は次のように行った。ラットをネンブタール麻酔下、脳固定装置を用いて、先端0.5mm を除いて絶縁されたステンレススチール電極をAP +7.2, L +0.5, H +6.9 （基準点はear bar)(3)まで下げ、2mA,5secの直流電流を通電した。偽手術群は、電極を挿入しただけで通電はしなかった。①行動実験その１：手術後（各群ｎ＝12）１週間の回復期間をおいてから、MAP を毎回0.5mg/kg i.p.，４日間隔で計８回投与した(4)。各回でMAP 注射後150 分間動物の行動をAnimex（室町K.K.）を用いて測定した。②行動実験その２：無処置のラットに上記と同じスケジュールでMAP を反復投与し、８回目が終了したところで手術を施行し（各群ｎ＝12）、１週間おいてからさらに３回のMAP 反復投与を加えた。各回の行動測定は上記の通りである。③生化学的測定：fimbria fornix破壊動物（ｎ＝12）と偽手術動物（ｎ＝12）に前記と同じ手順でMAP を計８回反復投与し、最終投与後４日後に各群半数に生食、残り半数にMAP 0.5mg/kg i.p. をchallenge し、60分後に断頭。脳を摘出・凍結し、前額切片を作成し側坐核部分をpunch out 。カテコールアミンの抽出を行って、高速液体クロマトグラフィーにてDA,DOPAC,HVAを測定した。

［結果および考察］
①逆耐性成立過程に及ぼすfimbria fornix破壊の影響（Fig.1）
偽手術群では、MAP の反復投与により次第に発現する行動量が増加し、第６、７、８回目の反応は初回の反応に比べて有意差がみられた（$p<0.05$）。これとは対照的にfimbria fornix破壊群では、MAP 投与を重ねても行動量は増加せず、

最終投与までほぼ初回のレベルで推移した。なおこの際観察では、毎回出現する行動は移所行動中心で、常同行動の混入等行動の質にも変化は生じなかった。最近、逆耐性も含めて種々の神経系の可塑的現象が、NMDA型のグルタミン酸受容体拮抗薬で阻止されることが報告されているが(5,6)，この結果はそれらの説明の解剖学的基盤を与え得るかも知れない。

②逆耐性成立後のfimbria fornix破壊の影響（Fig. 2）

8回のMAP 反復投与によりMAP に対する感受性が亢進したところで偽手術ないしfimbria fornix破壊をすると、その後の3回のMAP 投与に対する反応性は、両群とも若干低くなるところもあるが、8回目と比べて有意に減少することはなかった。このことは、逆耐性の維持にはfimbria fornix以外の要素の関与が示唆される。

③DA代謝動態（表1）

偽手術群、fimbria fornix破壊群各々について、生食challenge の場合のDA代謝産物の値を100%ととし、MAP challenge の際の各代謝産物の変化を見てみると、DAは両群で同程度に増加、DOPAC はfimbria fornix破壊群でより大きく減少したが有意差はみられなかった。しかしDOPAC/DAについてみると、両群で生食challenge に比べて減少がみられたが、偽手術群では有意差がなく、fimbria fornix破壊群で有意差が認められた。 これらのことから、fimbria fornix破壊群では偽手術群とは対照的に、MAP challenge の際のDA代謝回転が有意に抑えられていると解釈できる。

[文献]

1. Schiff SR (1982) Biol Psychiatry 17, 135-154.
2. Yoshikawa T et al (1990) Neuroscience Research: suppl. in press.
3. Paxinos G & Watson C (1986) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edn. (Academic, Sydney)
4. Hayashi T et al (1987) Japan. J. Pharmacol. 43, 283-290.
5. Karler R et al (1989) Life Sci. 45, 599-606.
6. Criswell HE (1990) Brain Res. 512, 284-290.

Fig. 1 Effect of fimbria fornix lesion

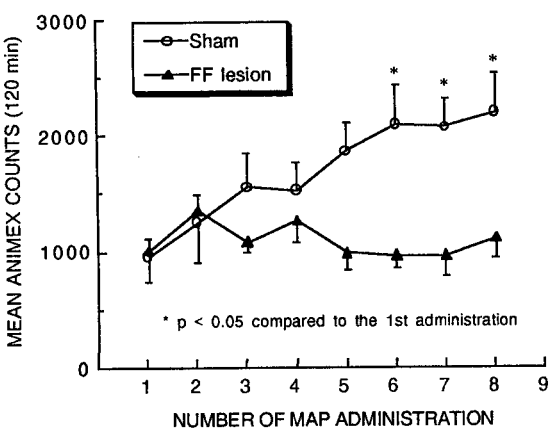


Fig. 2 Effects of 'post-Reverse Tolerance' Surgery

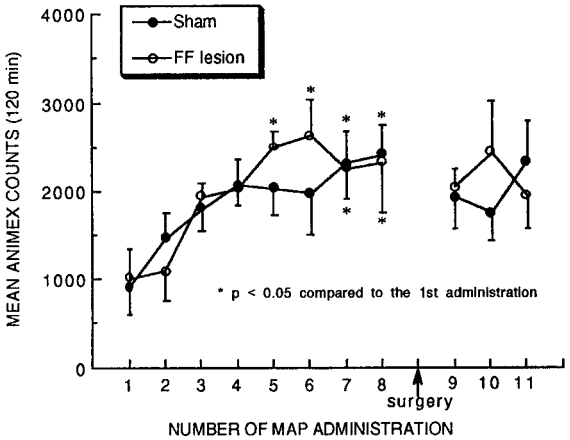


Table 1. The % changes of DA and its metabolites after MAP challenge

Lesion	DA	DOPAC	HVA	DOPAC/DA
Sham	114	99.5	91.0	87.4
Fimbr fornix	114	92.1	99.5	81.6*

* p < 0.01 compared to saline challenge

62 ^{14}C-メタンフェタミンの合成と逆耐性形成ラットにおける脳内動態の検討

沼知陽太郎、吉田寿美子、菱沼隆則*、佐藤光源
（東北大学医学部精神医学教室、医学部薬剤部*）

〔要約〕
メタンフェタミン(MAP) 反復投与による逆耐性現象は覚醒剤精神病における発病・再発脆弱性の研究モデルとされている。その基盤に脳ドパミン(DA)系の持続性の変化が想定されているが、その詳細は確定されていない。逆耐性現象に伴い、神経終末におけるMAP のとりこみ自体が変化してDA遊離が促進されている可能性があるので、本研究を行った。^{14}C-MAP を合成し、これをMAP 逆耐性形成ラットと正常対照ラットとに投与して線条体と側坐核／嗅結節における放射活性を測定したところ、いずれの脳部位にも、逆耐性群に有意な放射活性の増加がみられた。この結果から、逆耐性形成時に線条体と中脳辺縁領域でMAP 取り込み機構に持続性の変化が生じている可能性が示唆された。

［はじめに］
MAP 逆耐性の機序として線条体におけるMAP への反応性DA遊離の増加が報告されているが、それがなぜ起こるのかは自己受容体の低感受性，DA再とりこみ機構の障害、6-OHDAによる破壊など諸説があって確定されていない現状にある。アンフェタミンが神経終末内にとりこまれDAを遊離する(2) ことから、逆耐性現象に対応したMAP のとりこみの変化を検討する必要がある。このため^{14}C-MAP を合成し、これをMAP 逆耐性ラットと正常対照ラットに投与して、線条体と側坐核／嗅結節における放射活性を測定した。その成績に若干の考察を加えて報告する。

［対象と方法］
1.^{14}C-MAP の合成と精製：東北大学医学部薬剤部協力の下に、トリフルオロアセチルアンフェタミンを^{14}C-ヨウ化メチル(NEN社) でN-(^{14}C)-メチル化し、加水分解して^{14}C-MAP を合成した。これをカラムクロマトグラフ（充填剤：シリカゲル、展開溶媒：n-ヘキサン＋イソプロパノール）を用いる溶出分離法にて１-100までの分画に分離し、β-counting で高い放射活性を示した３分画を同定し、それらをHPLC法で分離精製した。HPLC移動相の組成は980ml ジクロロメタン＋20mlエタノール＋1ml水＋0.25ml ジエチルアミンで、溶出速度1ml/min にて標準MAP の保持時間に一致したピークの分画を採取した。これらのβ-counting を行い、他の分画に比べてきわめて高い放射活性があることを確認してこれを^{14}C-MAP とし、塩酸化して本実験に供した。
2.MAP 逆耐性ラットの作成：SD系雄性ラット（7週齢）を用い、これを2群に分けて、12時間の明暗周期下で飼育した。１群にはMAP （4mg/1mlSALINE液を使用） 4mg/kgを１日１回明期に21日間連続腹腔内投与し（MAP群、n=7）、他の１群は対照群として相当量の生理食塩水を１日１回明期に21日間連続腹腔内投与した（SALINE群、n=7）。MAP群では初回および最終投与日にMAP 投与後30分における異常行動をCreeseとIversenによる常同行動評価法(1) にもとづいて評価した。
3.^{14}C-MAP のラットにおける脳内動態の検討：７日間の断薬期間をおいて^{14}C-MAP を両群のラットに腹腔内投与し、15分に断頭し、脳を採取した。^{14}C-MAP の投与は、１匹あたり27000 count/min.(CPM) とし、非標識MAP 4mg/kgに加えて投与した。直視下で線条体及び嗅結節／側坐核（図１）を採取し、各脳部位についてLSC 法によるβ-counting 法で放射活性を測定し、differential absorption ratio (DAR) を算出した。

［結果］
Creese & Iversenの常同行動評価法(1) で評定した結果、投与開始日（平均スコア１点）に比べ、21日後（平均スコア4.5点）には明らかに異常行動が増加し、逆耐性が獲得されていた。放射活性については図２・図３に示したように、脳内各部位の放射活性(単位重量当り)・DAR ともに、MAP 群ではSALINE群に比し有意に増加していた。MAP 群では、最

終投与日の常同行動得点が同程度であったこともあり、その得点と放射活性の集積との間の相関はみられなかった。

［考察］

逆耐性現象に伴う生物学的変化としての一致した成績は、覚醒アミン再投与時の線条体における遊離ドパミン量の過剰な増加である(3)。その機序として、神経終末上のドパミン自己受容体の低感受性(5)や遊離ドパミンの再取り込み部位の障害(3)が提唱されている。このうち前者に関してはなお成績に不一致がめだち、最近はむしろ後者が注目されている。^{3}H-ドパミンを用いた取り込み実験では逆耐性モデル動物の線条体で取り込みが低下するという報告(6 7)が多いが、一方で増加するという報告(8)やMAP 逆耐性形成動物に再取り込み阻害作用をもつコカインを再投与したさいにも線条体で遊離ドパミン量が著増するという報告(3)がある。今回黒質線条体系と中脳辺縁系の２つのドパミン系の終末部位で^{14}C-MAP による放射活性が逆耐性ラットにおいて有意に増加していたことは過去に報告をみないものであり、^{11}C-MAP を用いた水柿らの成績(4)を確認したものである。ドパミン再取り込み部位におけるMAP とドパミンとの交換拡散モデル(2)を考慮にいれ、さらに^{14}C-MAP の放射活性が組織中のMAP 濃度を直接反映するとすれば、神経終末におけるMAP 取り込み能自体が逆耐性形成時に持続的に増大しているのかもしれない。このため神経終末における膜の異常、とくにその透過性を規定する膜蛋白の変質や、同様の変化が生じる脳部位の特定をめぐってさらに検討を要する。

［参考文献］

(1)Creese,I.,Iversen,S.D. (1973) Brain Research 55,369-382

(2)Fischer J.F., Cho A.K. (1979) J.Pharmacol.Exp.Ther. 208, 203-209

(3)Kazahaya,Y.,Hamamura,T.and Otsuki,S. (1989) Biol.Psychiatry 25,903-912

(4)水柿道直ら(1989) 科学技術振興調整費総合研究第Ⅱ期研究報告書, 19-27

(5)Muller,P.and Seeman,P. (1983) Eur.J.Pharmacol. 66,149-157

(6)Steranka,L.R. (1983) Eur.J.Pharmacol. 96,159-164

(7)Wagner,G.C.,Ricaurte,G.A.,Seiden,L.S. et al. (1980) Brain Research 181,151-160

(8)Yamada,S.,Kojima,H.,Yokoo,H.et al. (1988) Biol.Psychiatry 24,399-408

図1

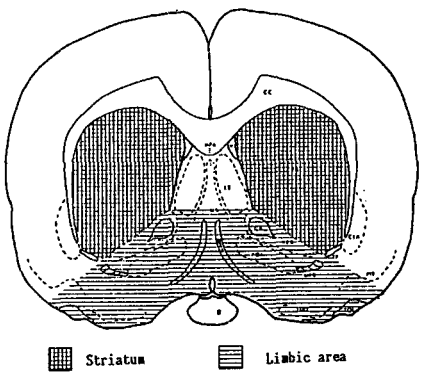


図2: ^{14}C-MAP distribution in rat brain (1)

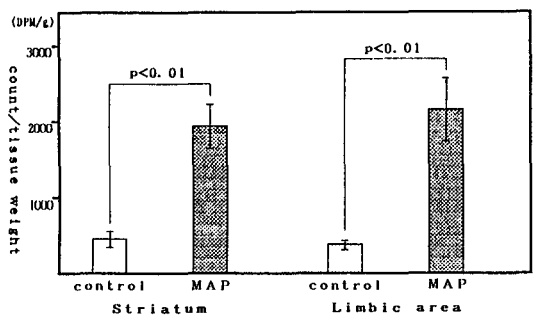
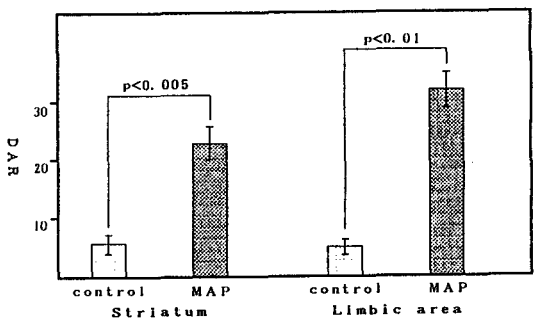


図3: ^{14}C-MAP distribution in rat brain (2)



63 ハロペリドール慢性投与後のラット線条体スライスのdopamine自己受容体の機能変化

山田茂人、横尾秀康、西山浩二、三木浩司、西 彰五郎
久留米大学医学部脳研、薬理学講座、精神神経科

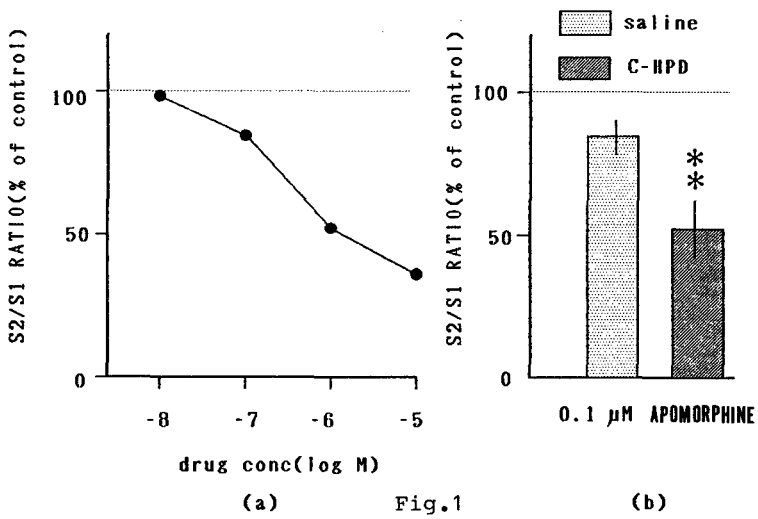
〔要約〕

ラット線条体スライスを用いて灌流実験を行い電気刺激誘発性dopamine(DA)遊離の変化を指標として、ハロペリドール(HPD)慢性投与後のDA自己受容体の機能変化について検討した。灌流液中のsulpirideは0.01 μM- 1 μMまで濃度依存性に電気刺激誘発DA遊離を増加させた。HPD慢性投与(6mg/kg/day, 21日間, i.p.)の直後から3日目まではこのsulpirideによる電気刺激誘発DA遊離増強作用は対照群と差はなかったが、休薬4日目以降ではHPD投与群で有意な増加が認められた。一方灌流液中のapomorphineは濃度依存性に電気刺激誘発DA遊離を抑制した。この抑制効果はHPD慢性投与群で断薬3日目に有意な増強が認められた。以上の結果はいずれもHPD慢性投与後に線条体DA神経終末にあるDA自己受容体の過感受性を示唆しているが、この実験系に於いては DA antagonistに対する過感受性は断薬後数日して発現してくることが示された。

Key Words chronic haloperidol, dopamine release, striatal slices

抗精神病薬の慢性投与後に小量のDA agonistを投与すると脳内dopamine(DA)神経の発火率の減少(1)、DA代謝回転の減少(4)、DA神経終末からの^{3}H-DA遊離に対するapomorphine反応性の増強(3)等が報告されている。これは抑制性のDA自己受容体の過感受性によるものだと考えられているがそのほとんどはDA agonistに対する過反応性を認めた研究であり、DA antagonistに対する反応性の変化を観察した報告は少ない(2)。我々は灌流装置を用いてラット線条体スライスからの内因性DA遊離を観察する方法によりhaloperidol(HPD)慢性投与後の線条体スライスからの電気刺激誘発DA遊離に対するDA agonist(apomorphine)およびDA antagonist(sulpiride)の影響について検討した。

(方法) Wistar系雄性ラット(200-260 g)に毎日1回21日間1mg/kgのHPDを腹腔内投与し断薬2日から8日目に断頭し実験に供した。尚、対照群には溶媒のみを同様に投与した。ラットは断頭後速やかに脳を取り出しマイクロスライサーにて冷Krebs液中で厚さ0.35mmの前額断切片を作成した。この切片から線条体部分を直径3mm のステンレス製円筒にてパンチして取り出し、両端に電気刺激用のプラチナ電極を装備した容量1mlのアクリル製灌流槽に封入して0.7ml/minの流速で酸素を飽和したKrebs液で持続的に灌流した。実験方法の詳細に付いては昨年の抄録に記している。灌流開始40分後より5分間の流出液を分取し(B1)その後一回目の電気刺激(20mA,1HZ,60sec)を行い刺



(a) Fig.1 (b)

激開始後5分間の流出液(S1)を分取した。種々の濃度のapomorphineまたはsulprideを含むKrebs液を30分間灌流しその後同様な電気刺激を行い刺激前後5分間のfractionを分取した(B2,S2)。測定は内部標準物質としてdihydroxybenzylamine を加えた後alumina吸着法にてDAを抽出し、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーにて行った。結果の検定にはStudent's t testを用いた。

(結果) 1、電気刺激誘発性DA遊離に対するapomorphineの影響: 対照群のS2/S1比は1.54±0.25であり、Krebs液中のapomorphineは0.1 μMから10 μMまで濃度依存性にS2/S1比を抑制した(Fig.1,a)。 対照群のS2/S1比は 0.1 μM apomorphine により12%の抑制を受けるが,HPD投与群では51%抑制され両群間に有意差を認めた(Fig.1,b,** P<0.01)。

2、電気刺激誘発性DA遊離に対するsulprideの影響: Krebs液中の(-)-sulprideは0.01 μMから1 μMまで濃度依存性にS2/S1比を増加させた。一方(+)sulprideによるS2/S1比の増加作用は(-)-sulprideの1/100以下であり、sulprideのDA遊離増強作用に立体特異性が認められた(Fig.2)。sulpride(1 μM)による電気刺激誘発性DA遊離の増加作用はHPD慢性投与後断薬2日目では対照群と差は認められないが、4日目および8日目においてHPD慢性投与群でsulprideによる増加作用が有意に増強しておりsulprideに対するDA遊離の過反応性はHPD断薬後数日を経て発現してくることが示された(Fig.3, * P<0.05, ** P<0.01)。

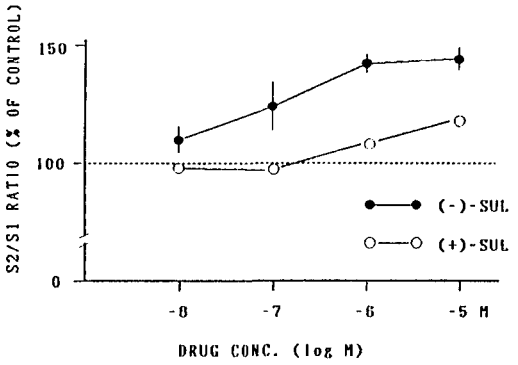


Fig.2

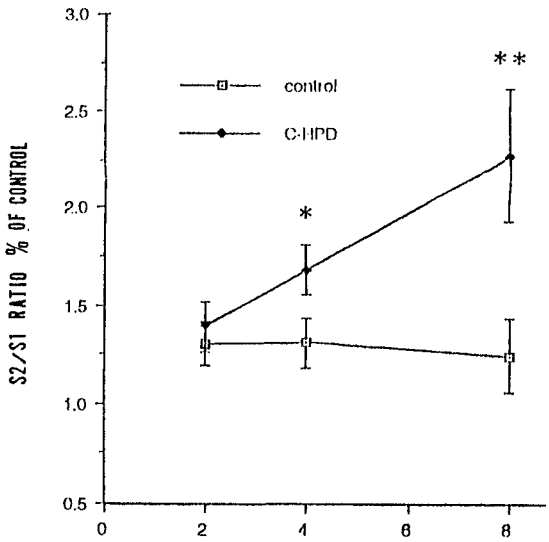


Fig.3

(考察) 今回の結果からHPD慢性投与後のDA神経終末からの刺激誘発性DA遊離はDA agonistであるapomorphineの抑制作用とDA antagonist であるsulprideによる増加作用のどちらも増強していることが認められた。このことはHPD慢性投与後のDA自己受容体の過感受性を示唆している。

これまでのHPD慢性投与後のDA遊離の変化を観察した研究ではウサギ尾状核からの^{3}H-DAの遊離を指標とした実験でNowakらはHPD慢性投与後断薬2日目におけるapomorphineのDA遊離抑制作用の増強を認めた(3)。しかしsulprideのDA遊離増加作用は逆に減少しておりHPD慢性投与後のDA antagonistに対する作用には低感受性を認めている。しかし今回の結果ではsulprideに対する過反応性は断薬4日目から認められその後更に増強することが明らかになった。これはHPD慢性投与後組織内に残存するHPDがDA受容体の過感受性をマスクしていることが考えられ、蓄積したHPDの消失後にDA受容体のDA antagonistに対する過感受性が発現するのかも知れない。

1)Gallager D.W. et al. (1978) Nature, 273, 309-312
2)車地暁生 他(1985) in" 生物学的精神医学 最近の進歩" pp181-185
3)Nowak J.Z. et al. (1983) J.Pharm.Exp.Ther. 226,558-564
4)Wheeler and Roth (1980) Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharm. 312, 151-159

64　ＡＣＡＭＰ－８１（ウシ脳、熱安定性、酸性、カルモデュリン結合蛋白質）結合蛋白質の同定

水谷　顕洋、徳光　浩、日高　弘義
（名大・医・薬理）

〔要約〕

我々は既にウシ脳膜画分により熱安定性、酸性、カルモデュリン結合蛋白質（ＡＣＡＭＰ－８１）の精製及びその生化学的特徴を報告した。今回、ＡＣＡＭＰ－８１の生理的機能を検討する目的でＡＣＡＭＰ－８１結合蛋白質の検索を試み、同定し得たので報告する。

精製したＡＣＡＭＰ－８１を^{125}Ｉで標識し、ウシ脳の種々の画分について^{125}Ｉ-ＡＣＡＭＰ－８１ overlay method にて検索したところ、0.6 M NaCl 抽出画分に80 kDa のＡＣＡＭＰ－８１結合蛋白質を認めた。この0.6 M NaCl 抽出画分よりゲル濾過、陰イオン交換クロマトグラフィにてＡＣＡＭＰ－８１に結合する80 kDa 蛋白質を部分精製したところ、この80 kDa 蛋白質がsynapsin Ｉ であることを１次元phosphopeptide mapping等にて同定した。また精製したsynapsin Ｉ についてもＡＣＡＭＰ－８１との結合を確認した。更に、ＡＣＡＭＰ－８１存在下ではsynapsin Ｉ のcAMP依存性燐酸化酵素による燐酸化の抑制がみられ、また、synapsin Ｉ をシステイン残基特異的に切断して得られたmiddle/tail 由来の51 kDa フラグメントにＡＣＡＭＰ－８１は結合した。

以上の結果より、ＡＣＡＭＰ－８１が synapsin Ｉ に結合し、神経伝達物質の放出等に何等かの関与をしている可能性が示唆された。

ＡＣＡＭＰ－８１（acidic, calmodulin binding protein 81 kDa）はウシ脳膜画分よりカルモデュリンアフィニティカラムを用いて精製された新しいカルモデュリン結合蛋白質である。カルモデュリンとは１：１のモル比で結合し、その見かけ状の解離定数は 0.65 uM であった(5)。また、ＡＣＡＭＰ－８１は等電点が 4.3 と酸性で、沈降定数 2.05s、ストークス半径 52A と細長い形状をした分子であることも特徴の１つである。更にＡＣＡＭＰ－８１は、in vitro においてカルシウム／燐脂質依存性蛋白質燐酸化酵素(PKC)、cAMP依存性蛋白質燐酸化酵素(A-kinase)、カルシウム／カルモデュリン依存性蛋白質燐酸化酵素 II(CaM kinase II) によって燐酸化されることが判明した。(submitted data)。以上のことからＡＣＡＭＰ－８１は神経系の細胞内情報伝達に於て重要な役割を果たしていると考えられ、ＡＣＡＭＰ－８１の生理的機能を解明する目的でＡＣＡＭＰ－８１結合蛋白質を検索し、同定したので報告する。

[方法]

ＡＣＡＭＰ－８１の精製及び^{125}Ｉによる標識：ウシ脳の 1% Triton X-100 可溶化画分より既報(5)に従い、ＡＣＡＭＰ－８１を精製した。精製したＡＣＡＭＰ－８１を Bolton-Hunter 法により^{125}Ｉにて標識した。

^{125}Ｉ-ＡＣＡＭＰ－８１ overlay ：検索する試料を12.5% SDS-PAGE にかけ、続いてPVDF membraneに転写する。この membrane を0.1 % BSA を含む bufferにて blocking を施した後、^{125}Ｉ-ＡＣＡＭＰ－８１を含む buffer A (25 mM Imidazole-HCl (pH7.0), 40 mM NaCl, 2 mM EGTA, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.1 % BSA)中に4°Cで４時間 incubate し、その後 buffer A にて membrane を十分洗浄した後、autoradiography を行いＡＣＡＭＰ－８１結合蛋白質を検索した。

１次元 phosphopeptied mapping ：A-kinase、CaM kinase IIによって [γ-^{32}P] ATP を用いて燐酸化されたSDS-PAGE上の蛋白バンドを切り出し、V8 protease で消化し、１次元phosphopeptide mappingを行った。

Synapsin Ｉ のシステイン残基特異的切断：W.Schiebler らの方法(4)に従って精製した synapsin Ｉ を 6 M グアニジンで変性させた後、M.Bahlerらの方法(2)に従って2-nitro-5 thiocyano benzoic acid (NTCB) にてcysteine specific cleavage を行った。

［結果］

ウシ脳の種々の画分について^{125}I-ACAMP－81 overlay にて結合蛋白質を検索したところ、0.6 M NaCl 抽出画分中に 80 kDa のACAMP－81結合蛋白質を認めた(Fig.1 a-1,b-4)。この0.6 M NaCl抽出画分を出発材料としてゲル濾過、陰イオン交換クロマトグラフィ(Q-sepharose)を用いて 80 kDa ACAMP－81結合蛋白質（p80）の精製を試みた。p80はゲル濾過上 52 A（ストークス半径）、陰イオン交換カラムよりは低イオン強度(0.1 M NaCl）で溶出された。この段階で p80 は SDS-PAGE 上主要蛋白質となり(Fig.1,a-2,b-5)、characterizationを行った。

p80の生化学的特徴を検討したところ、p80は上記のようなカラムからの溶出条件に加えて、熱非安定性であり、A-kinase, CaM kinase II の良い基質となることが判明した。A-kinase、CaM kinase II各々による燐酸化p80をV8 protease による１次元phosphopetide mapping を施行したところ、精製したsynapsin I のそれと同様のパターンを呈し、p80はsynapsin I と同定された。また精製したsynapsin I もACAMP－81と結合することが確認された(Fig.1,a-3,b-6)。 Synapsin I のA-kinaseによる燐酸化はACAMP－81の存在下で抑制された。これに対してCaM kinase II によるsynapsin I の燐酸化はACAMP－81存在下でも著明な変化を受けなかった。

続いて精製した synapsin IをNTCBによりシステイン特異的に切断したところ、51 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 29 kDa, 15 kDa の各フラグメントが得られ、これらに対して^{125}I-ACAMP－81 overlay を施行した。^{125}I-ACAMP－81は synapsin I の middle/tail protion 由来の 51 kDa フラグメントに結合した。

［考察］

ACAMP－81とsynapsin I との結合について述べたが、ACAMP－81が酸性蛋白質(pI=4.3)であるのに対して、synapsin I は塩基性蛋白質(pI=10.3)であり、非特異的な結合が問題となる。しかし、1):0.6M NaCl 抽出粗画分中の80 kDa 蛋白質のみしか^{125}I-ACAMP－81が認識しないこと、2):他の塩基性蛋白質であるヒストン H1 や、ミエリン塩基性蛋白質とは結合しないことなどからACAMP－81とsynapsin I との結合は特異的なものと考えられた。

Synapsin I はシナプス小胞、F－アクチン、チューブリンと結合し、CaM kinase II, A-kinase により燐酸化を受けることによってシナプス前膜からの神経伝達物質放出機構に重要な役割を果たしていると考えられている。(1,3,4) ACAMP－81がこのsynapsin I と結合することはACAMP－81が神経伝達物質の放出、或は神経系細胞の細胞骨格調節などに関与する可能性が示唆された。

［文献］

1. Bahler, M. et al (1987) Nature 326, 704-707
2. Bahler, M. et al (1989) J. Cell Biol. 108, 1841-1849
3. Baines, A. J. et al (1986) Nature 319, 145-147
4. Schiebler, W. et al (1986) J. Biol. Chem. 261, 8383-8390
5. Tokumitsu, H. et al (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 581-588

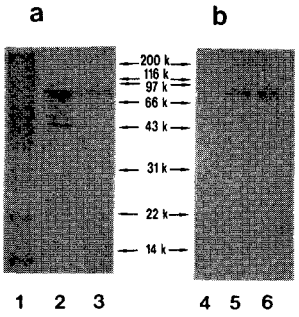


Fig.1

a: protein staining

b: 125I-ACAMP-81 overlay

1,4: 0.6 M NaCl extract of bovine brain

2,5: partially purified ACAMP-81 binding protein

3,6: purified synapsin I

65 抗うつ薬のＧＴＰ結合蛋白質（Ｇｓ）-アデニル酸シクラーゼ共役増強作用に対するカルシウム／カルモジュリンの関与

小澤寛樹、斉藤利和、高畑直彦
（札幌医科大学・神経精神医学講座）

［要約］
抗うつ薬慢性投与によるラット大脳皮質膜標本を用いて、抗うつ薬のＧＴＰ結合蛋白質-アデニル酸シクラーゼ共役増強作用に対するカルシウム／カルモジュリンの影響について検討した。
ＥＧＴＡ存在下の条件では抗うつ薬投与により基礎活性には変化は認められなかったが、GppNHp刺激アデニル酸シクラーゼ（ＡＣ）活性はmonophasicに変化し、そのVmaxは有意に増強した。ＥＧＴＡ非存在下の条件では基礎活性は抗うつ薬投与により有意に増強を示し、GppNHp刺激アデニル酸シクラーゼ活性はbiphasicに変化し、いずれの濃度のGppNHpおいても抗うつ薬投与により増強した。カルモジュリン非存在下ＡＣ活性のＣａ濃度依存反応は基礎活性では変化はなく、抗うつ薬投与よりGppNHp刺激ＡＣ活性のみ有意に上昇を示した。カルモジュリン存在下ＡＣ活性のＣａ濃度依存変化は基礎活性、GppNHp刺激ＡＣ活性双方抗うつ薬慢性投与により有意に上昇を示した。これらのカルシウム／カルモジュリン依存性ＡＣ活性の抗うつ薬による感受性変化は抗うつ薬慢性投与によりＧ蛋白質とＡＣとの共役機構の増強のため生じる可能性が示唆された。

最近抗うつ抗そう薬の研究は単独の受容体数、機能の検討から複数の神経伝達系の相互関係や受容体以降の神経伝達系への作用の検索へと移行してきている（１、２）。カルシウム／カルモジュリンはイノシトール脂質代謝回転、ＡＣ系、Ｇ蛋白質、ＰＤＥなどの各種細胞刺激応答に関連し、それぞれの情報伝達系の相互作用に影響していると考えられている。我々は先に抗うつ薬慢性投与ラット大脳皮質膜においてGsとＡＣとの共役の増強とGi/oとGsの相互関係の変化を報告した（３、４）。そこで今回、この抗うつ薬によるＧ蛋白質-ＡＣ系への効果に対するカルシウム／カルモジュリンの影響を検索した。

［方法］
Sprauge-Dawly系雄性ラット（１５０－２００ｇ）に、amitriptyline,iprindole（各々１０ｍｇ／Ｋｇ）または生理食塩水を１日１回連続２１回経腹膜的に投与した。最終投与２４時間後に断頭し、Ozawaらの方法（３）により大脳皮質膜標本を作成した。カルシウム／カルモジュリンの影響を直接検索する場合は大脳皮質膜標本を１ｍＭＥＧＴＡを含むbufferで２回洗浄した。ＡＣ活性は[^{32}P]-ATPを基質として用い、生成された[^{32}P]-cAMPをSalomonの方法（５）に従って分離し測定した。

［結果及び考察］
１ｍＭ　ＥＧＴＡの添加しない状態では、基礎活性が約２倍に上昇をした。ＥＧＴＡ存在下の膜標本ではGppNHpの濃度に依存してＡＣ活性が上昇するのに対してＥＧＴＡ非存在下ではGppNHp低濃度ではＡＣ活性の抑制、GppNHp高濃度ではＡＣ活性の抑制解除が観察された(Fig 1 A,B)。これらのことはカルシウム／カルモジュリンがＡＣ活性の上昇に関与し、この増強されたＡＣ活性は抑制性Ｇ蛋白質（Ｇｉ）が作用する上で重要であることが示唆された。このような条件において抗うつ薬によるGppNHp刺激ＡＣ活性の増強はＥＧＴＡ存在下では基礎活性に変化なく、高濃度GppNHp刺激ＡＣ活性において観察された。ＥＧＴＡ非存在下では基礎活性、いずれの濃度のGppNHp刺激ＡＣ活性においても抗うつ薬によるGppNHp刺激ＡＣ活性の増強が認められた。GppNHp低濃度範囲のＡＣ活性抑制率には対照群、抗うつ薬投与群間に変化はなかった。

カルシウム／カルモジュリンの影響をより明確にするためにＥＧＴＡ洗浄膜標本を用いて、カルモジュリンの存在下、非存在下おけるＡＣ活性のカルシウム濃度依存性を検索した。カルモジュリン非存在下では基礎活性はカルシウムにより影響をうけず、対照群、抗うつ薬投与群間に差は認められなかった。GppNHp刺激ＡＣ活性はカルシウム濃度依存性に抑制され、抗うつ薬投与群は対照群に比べ増加を示した(Fig 2 A)。カルモジュリン存在下では基礎活性はカルシウム濃度１０$^{-6}$Ｍで最大になり、この時抗うつ薬のＡＣ活性の増強が認められた。GppNHp刺激ＡＣ活性はいずれのカルシウム濃度においても抗うつ薬のＡＣ活性の増強が認められた(Fig 2 B)。これらの変化により基礎活性における抗うつ薬によるＡＣ活性の増強効果はカルシウム／カルモジュリンに依存していることが示唆された。Fig1で示されるようにカルシウム／カルモジュリンはGi機能の作動に重要な役割をしているのに加え、Ｇｓに直接的に作用あるいはフォースコリンと同様な作用点を有しているという報告がされている（６、７、８）。従って、本研究の結果は抗うつ薬慢性投与によりＧ蛋白質とＡＣのcouplingの増強が生じ（３）、このためカルシウム／カルモジュリンによるＡＣ活性が変化したと考えられた。　カルシウム／カルモジュリンのＡＣ系への影響は脳部位、臓器によりその機構が異なることが知られいており（９）、また、抗うつ薬によるＡＣ活性の増強効果も脳内部位、臓器に特異性を有していることが報告されている（４、１０）。今後、これらの視点よりこの抗うつ薬の作用とカルシウム／カルモジュリンの部位特異性の関係について検索する予定である。

[文献]

(1) Lachman, H. M. and Papolos, D. F. (1989) Life Sciences. 45, 1413-1426.

(2) Heninger, G. R. and Charney, D. S. (1987) The Third Generation of The Psychopharmacology, Raven Press, New York, pp. 535-544

(3) Ozawa, H. and Rasenick, M.M. (1989) Mol. Pharm. 36, 803-809

(4) Ozawa et al. (1990) Biogenic. Amines. (in press)

(5) Salomon, Y. (1979) Adv. Cyclic. Nucleotide Res. 10 35-54.

(6) Ahlijanian, M. K. and Cooper, D. M. F. (1987) Mol. Pharm. 32, 127-132.

(7) Mickevicius, C.K. et al. (1986) Mol. Pharm. 30, 469-475

(8) Harrison, J. K. et al (1989) J. Biol. Chem. 264, 15880-15885.

(9) Ahlijanian, M. K. et al (1987) J. Neurochem. 49, 1308-1315

(10) Newman, M. E. amd Lerer, B. (1989) Eur. J. Pharm. 162, 345-352.

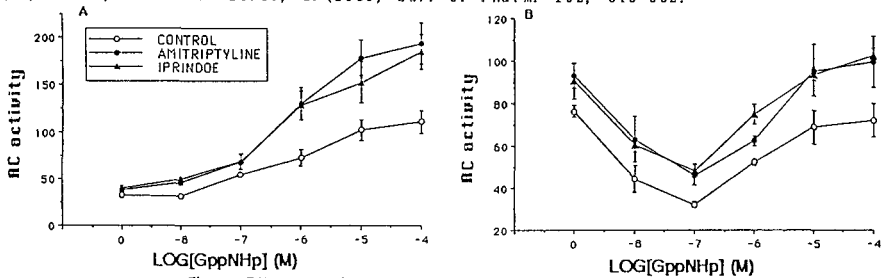


Fig 1 : Effect of antidepressant treatment on adenylate cyclase(AC) activity in presence (A) or absence (B) of EGTA.
AC was assayed at 30 C for 10min with 5mM MgCl2 in presence or absence of 1mM EGTA. (n=6-8) AC activity : pmol / mg protein / min

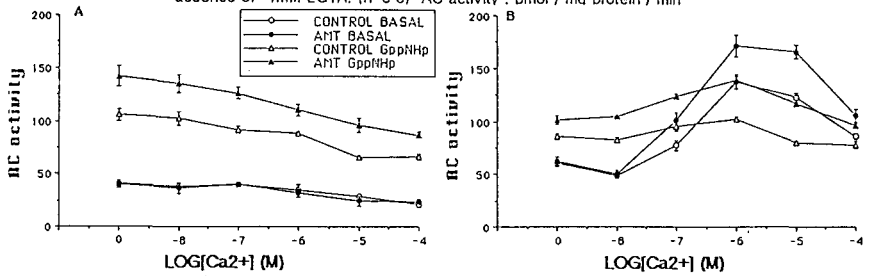


Fig 2 : Effect of antidepressant treatment on Ca2+ dependent AC activity in absence (A) or presence (B) of Calmodulin.
Synaptic membranes were resuspended twice in HEPES buffer containing 1mM EGTA. AC was assayed at 30 C for 10min with 5mM MgCl2,0.2 mM EGTA and 1uM GppNHp in presence or absence of 1uM Calmodulin (n=3-4) AC activity : pmol / mg protein / min

66 脳ω－conotoxin受容体結合蛋白質

西須英雄、茨木京子、山口　徹、阿部輝雄
(新潟大学脳研究所)

〔要約〕

われわれの作製した、可溶化した脳のω-conotoxin受容体の一部を沈降させる単クローン抗体(SPM-1およびSPM-2)は、カエルから哺乳動物まで広く存在するそれぞれ分子量36 kDaおよび28 kDaの蛋白質を認識した。これらの蛋白質はそれぞれ一方の抗体とのみ反応し、他方の抗体とは交差しない。これらの蛋白質は、イムノブロットで調べた組織のうち、神経系以外では副腎髄質にのみ存在した。また、これらの蛋白質のペプチドマップはこれらが異なった蛋白質であることを示した。脳の低張処理P2分画をジギトニンで抽出して蔗糖密度勾配遠心にかけ、得られた分画のイムノブロットの結果から、これら2種の蛋白質の大部分はω-conotoxin受容体とは共存していなかった。SPM-1-あるいはSPM-2-セファローズに脳ジギトニン抽出物をかけると、その抗体の認識する蛋白質ともう一方の蛋白質の一部が結合した。これらの結果は36 kDaおよび28 kDaの蛋白質がω-conotoxin受容体の固有のサブユニットではなく、おそらくそれに結合した蛋白質であることを示唆する。

神経系の電位感受性カルシウムチャネルは多様であり、これまでに、T, L, NおよびP型の少なくとも4種が報告されているが(2)、これらの型の分子的差異は明かでない。ω-conotoxin GVIA (GVIA)は神経系のカルシウムチャネルの一部を特異的に阻害するペプチドである。しかし、脳神経系におけるその受容体(カルシウムチャネル分子)の実体は不明である。われわれはすでに、哺乳類脳のGVIA受容体分子の大部分が1,4-dihydropyridine(DHP)受容体分子とは異なることを証明した(1)。また、脳シナプス膜分画を抗原として、可溶化した脳のGVIA受容体の一部を沈降させる2種の単クローン抗体(SPM-1とSPM-2)を得て、それらがそれぞれ分子量36 kDaおよび28 kDaの蛋白質を認識することを報告した(3)。　今回、これらの抗体を用いて、その抗原蛋白質の分布、GVIA受容体との関連等を追究した。

［実験方法］

低張処理したウシ脳P2分画を0.3 nMの[^{3}H]-propionyl GVIA ([^{3}H]Pr-GVIA)で標識した後、ジギトニンで抽出したもの(4)を5-20%(w/v)蔗糖(0.1%ジギトニンを含む)密度勾配遠心にかけ、得られた分画をSDS電気泳動した後、ニトロセルロース上へブロットし、SPM-1およびSPM-2とインキュベートすることにより、抗原を検出した。また、脳より可溶化したGVIAおよびDHP受容体の免疫沈降は抗マウスIgG-セファローズを用いて既報の手順(1)によった。

［結果と考察］

ウシおよびラット脳から調製したシナプス膜分画(SPM)で免疫したBALB/cマウスの脾臓細胞をミエローマ細胞(PAI)と融合させ、得られたハイブリドーマの培養上清の可溶化GVIA受容体沈降能をアッセイすることにより(1)、2種の単クローン抗体(SPM-1とSPM-2)を確立した(3)。SPM-1とSPM-2はイムノブロットでそれぞれ36 kDa、28 kDaの蛋白質を認識するが、SPM-1と28 kDa蛋白、SPM-2と36 kDa蛋白は反応しない。また、脳膜分画のジギトニン抽出物をSPM-1-セファローズにかけると、36 kDa蛋白の他に28 kDa蛋白が結合する。これらの結合蛋白質をSDSで溶出した後、SDS電気泳動によって分画した。それぞれのバンド

をきりだし、リジンエンドペプチダーゼで消化したものをSDS電気泳動にかけ、そのペプチドマップを比較すると、分子量の同じペプチドは見いだされなかった。したがって、36 kDaと28 kDaの蛋白質は互いに異なる蛋白質であることがわかる。SPM-1とSPM-2によるイムノブロットでこれらの蛋白質の分布を検討した。これらの蛋白質はカエル脳から哺乳類の脳にいたるまで存在したが、魚(ニジマス)の脳では反応成分が観察されなかった。また、これらの蛋白質は調べた組織のうちで、脳および末梢神経以外では副腎髄質にのみ存在した(図1)。したがって、これらの蛋白質は神経系およびパラニューロンに局在するものと予想される。

低張処理したウシ脳P2分画を[^{3}H]Pr-GVIAとインキュベートして、GVIA受容体を予め標識しておいてから、ジギトニンで抽出して蔗糖密度勾配遠心にかけて、分画した。図2に示すように放射能の単一ピークが観察されるが、この位置は[^{3}H]Pr-GVIAで標識しない場合のGVIA受容体と同一である(4)。このピークはP2を[^{3}H]Pr-GVIAで標識する前に1 μMの非標識GVIAで処理しておくことにより消失するので、GVIA受容体をあらわしている。イムノブロットによって36 kDaおよび28 kDaの蛋白質の分布を調べると、これらの蛋白質がこのピークにも少量存在するが、大部分はそれよりもサイズの小さな位置にあることがわかった。また、SPM-1-あるいはSPM-2-セファローズにウシ脳低張処理P2分画のジギトニン抽出物をかけるとそれぞれの認識する蛋白質の他にもう一方の蛋白質の一部が特異的に結合した。以上の結果は36 kDaおよび28kDa蛋白質がGVIA受容体の固有のサブユニットではないことを示唆する。これらの蛋白質の一部はおそらくGVIA受容体に結合しているものと思われる。

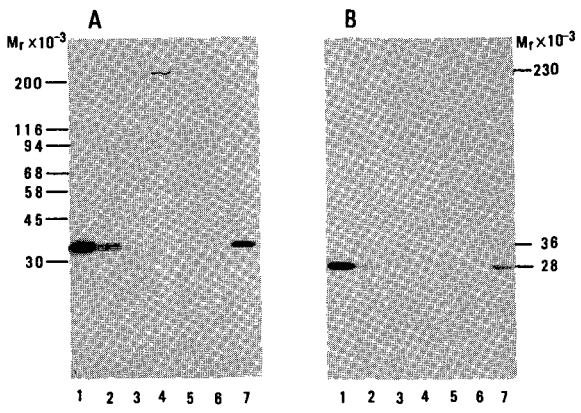


図1 抗原の組織分布(イムノブロット)。
A, SPM-1; B, SPM-2. lane 1から順に脳、交感神経節、肝、腎(ラット)、ウサギ骨格筋、ウシ心筋、ウシ副腎髄質。

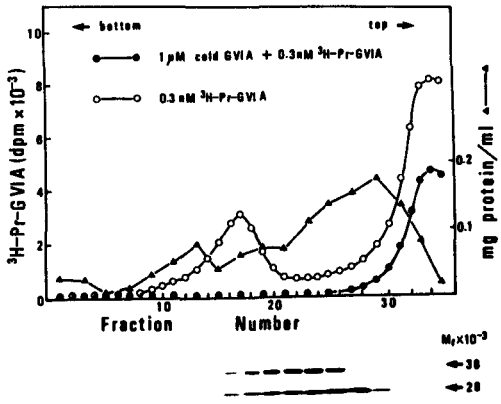


図2 ラット脳低張処理P2分画([^{3}H]Pr-GVIA標識)ジギトニン抽出物の蔗糖密度(5-20%)勾配遠心。
1 mlずつ分画。各分画の一定量をとり、SPM-1とSPM-2でイムノブロット。

[文献]

1. 早川直彦、森田貴雄、山口徹、三井宏美、西須英雄、阿部輝雄 (1989) 神経化学 28, 310-311.
2. Hess, P. (1990) Annu. Rev. Neurosci. 13, 337-356.
3. 山口徹、茨木京子、三井宏美、西須英雄、阿部輝雄 (1989)第13回神経科学学術集会予稿集 168.
4. Yamaguchi, T., Saisu, H., Mitsui, H. and Abe, T. (1988) J. Biol. Chem. 263, 9491-9498.

67 ＩＰ３受容体／Ｐ４００のＣａ放出活性

宮脇敦史*、**、古市貞一*、御子柴克彦*、**
（基生研　行動制御*、阪大蛋白研　機能制御**）

〔要約〕マウス線維芽細胞L cellを用いて、マウス小脳由来のIP3受容体／P400 cDNAを大量発現するtransformantを作製したところ、cDNA由来IP3受容体は小胞体など細胞内膜系に発現し、小脳IP3受容体と等しいIP3結合様式を示した。内膜系を用いた$^{45}Ca^{2+}$放出実験から、このL cell transformantに於いてIP3感受性カルシウムプールのサイズとIP3に対する感受性が対照と比べて増大している事がわかった。よってIP3受容体が生理的膜上でIP3に応答してカルシウム動員を引き起こす事が証明された。IP3受容体／ P400は、内膜系のligand operated ion channelとして、リアノジン受容体とならんで新しい知見を与えてくれるものと思われる。

【緒言】多くの細胞で、agonistの刺激に応じてIP3が形質膜から遊離し細胞内カルシウムストアよりカルシウムを動員する。一昨年、昨年の本学会で、我々は、マウス小脳cDNA libraryよりP400 cDNAを得、このcDNAに由来する蛋白質がIP3結合能を持つ事を報告した(3,8)。さて、IP3受容体は IP3依存性カルシウム放出に如何に係わるのか。IP3と結合する事によって、この受容体が自らカルシウムチャネル活性を発揮するのか、それともカルシウムイオンの移動には他の分子の関与が必要なのか。古市らは、IP3受容体の一次構造が、筋小胞体上のカルシウムチャネル、リアノジン受容体のそれと部分的ながら高い相同性を示す事を報告した(4)。また前田らは、精製IP3受容体を電子顕微鏡にて観察し、リアノジン受容体の電顕像とよく似た四量体構造を認めた(6)。最近 Ferrisらは、リポソームにIP3受容体を再構成する系を用いて、この分子がカルシウムチャネル活性を持つ事を証明した(2)。今回、我々は実際に生理的膜上で IP3受容体がカルシウム動員に関与する事を、cDNAの培養細胞内発現系を用いて証明した(7)ので報告する。

【方法】

１）pBactSTneoB:expression vector　pBactSTneoBのSalI siteにSalI linkerを付けた P400全長cDNA を挿入した。cDNA はベータアクチンプロモーターの下に発現される。またこのvectorは、neomycin resistant gene を有する。

２）Transfection　Chen and Okayama の方法(1)に従い、マウス線維芽細胞L cell lineにplasmidを導入した。neomycin耐性のクローンを更に抗P400モノクローナル抗体（4C11、10A6、18A10）でスクリーンし、P400を安定に大量発現するtransformant（L15）を得た。　pBactSTneoBのtransformant(Lvec）を対照とした。

３）免疫組織、細胞の分画、Western blotting、IP3 binding assay は既報の方法(4,7)に従った。蛍光免疫組織像の断層撮影は、共焦点レーザー顕微鏡 Bio Rad laser sharpを用いた。

４）$^{45}Ca^{2+}$放出実験　　L15とLvec細胞を同時に同じ条件下で処理してsampleとした。　6-8×10^5 cells／dishの密度でまいた細胞を3日後に回収し膜画分を調整しJean and Kleeの方法(5)に従ってアッセイした。　即ちATP存在下で$^{45}Ca^{2+}$をvesicle内に取りこませ、IP3によって$^{45}Ca^{2+}$を放出させた。放出カルシウム量を、IP3投与前のvesicle内カルシウム量の百分率で評価した。

【結果と考察】L15細胞は抗P400モノクローナル抗体によって強く染色されるが（図1B）、Lvec細胞はほとんど染色されない（図1A）。 蛍光免疫染色されたL15細胞の断層像（図1C）から、cDNA由来IP3受容体が細胞内膜系に均一に発現している事がわかる。Scatchard analysis（図2A）、Western blotting（図2B）、Competition assay （図3）を行い、cDNA由来IP3受容体のIP3結合様式を小脳IP3受容体のそれと比較した。 その結果、結合の親和性（Kd値が両者とも約20nM）、結合容量（L15細胞、小脳の膜画分に於いて図2Bから予想されるIP3受容体の濃度比が、図2AのBmaxの比にほぼ等しい）、1,4,5-IP3に対する特異性（図3）が極めて似ている事が明らかになった。 次に、L15、Lvec細胞の膜画分を用いた$^{45}Ca^{2+}$放出実験の結果（Dose-Response relationship curve）を図4に示した。Lvec細胞に比べて、L15細胞に於いてはカルシウム最大放出量が約2倍に、またEC_{50}（最大放出量の50%の放出を起こす

べきIP3濃度）が1/10に変化した。細胞内のカルシウムプールは、IP3受容体の有無によりIP3感受性及び非感受性プールに区別される。今回のデータは、大量のcDNA由来のIP3受容体の導入によってL細胞のIP3非感受性プールがIP3感受性に変わった事、またIP3感受性プールについてみても、そのIP3感受性が高まった事を示唆させる。IP3受容体が生理的膜上で起こるカルシウム動員に関与する事を証明するとともに、細胞内カルシウムプールの構成について我々の考えを提出する。

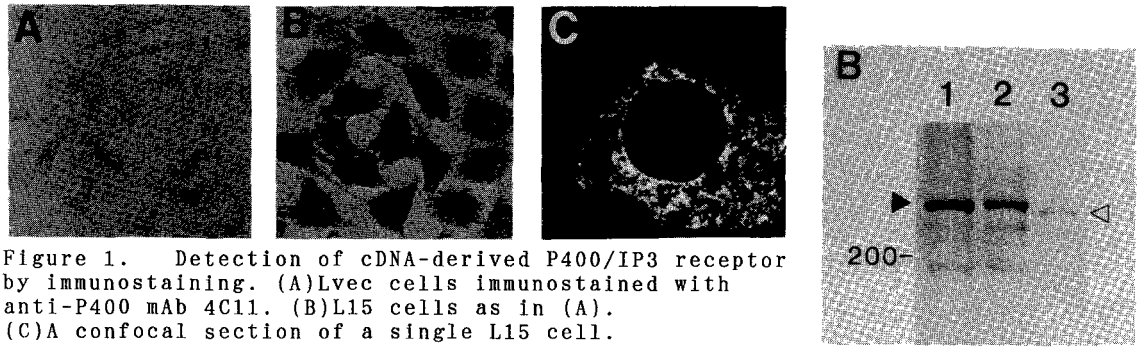


Figure 1. Detection of cDNA-derived P400/IP3 receptor by immunostaining. (A)Lvec cells immunostained with anti-P400 mAb 4C11. (B)L15 cells as in (A). (C)A confocal section of a single L15 cell.

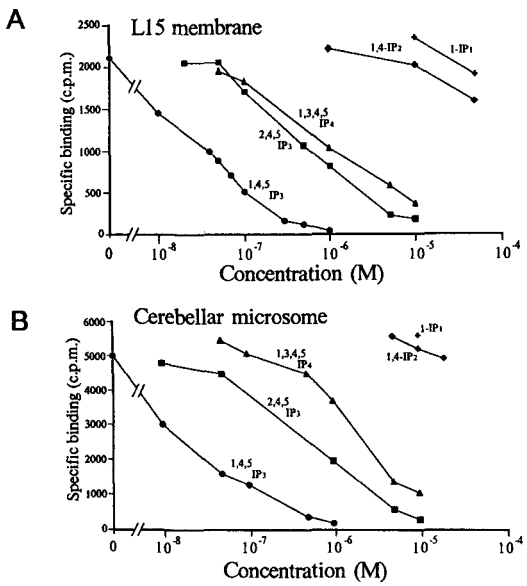


Figure 3. Inhibition of specific [^{3}H]IP3 binding to the L15 cell membrane fraction(A) and the cerebellar microsome(B) by various inositol phosphates.

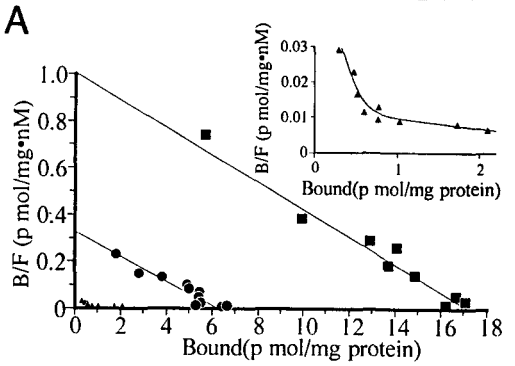


Figure 2. (A)Saturation analysis of [^{3}H]IP3 binding to the cerebellar microsome(squares), membrane fractions of L15 cells(circles) and Lvec cells (triangles). (B)Western blot analysis lane 1, 5μg of the cerebellar microsome; lanes 2 and 3, 13.5μg of membranes from L15 and Lvec cells,respectively.

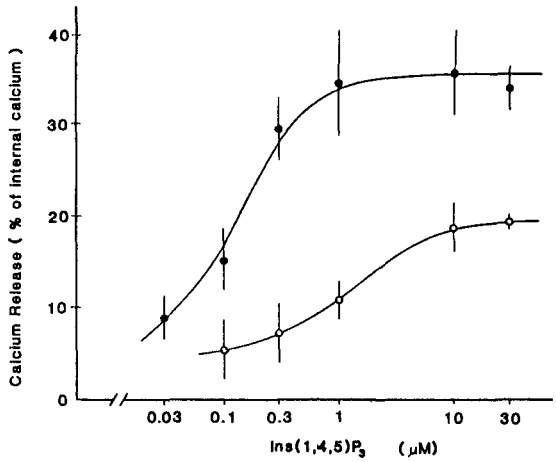


Figure 4. Dose-response curves for IP3-mediated Ca release with membrane fraction of L15(filled circles) and Lvec(open circles) cells.

【文献】

1)Chen, C. and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987)

2)Ferris, C. D. et al. Nature 342, 87-89 (1989)

3)Furuichi, T. et al. 神経化学 27, 46-47(1988)

4)Furuichi, T. et al. Nature 342, 32-38 (1989)

5)Jean, T. and Klee, C. B. J. Biol. Chem. 261, 16414-16420 (1986)

6)Maeda, N. et al. EMBO J. 9, 61-67 (1990)

7)Miyawaki, A. et al. Neuron in press (1990)

8)Miyawaki, A. et al. 神経化学 28, 72-73(1989)

68 幼若ラット小脳介在ニューロン細胞体内Ca^{2+}濃度調節機序

反町　勝、倉元　邦明
鹿大・医・第一生理

〔要約〕
生後5−11日のラット小脳の酵素処理により分離した細胞に、Fura-2／AMを負荷し、個々の細胞内Ca^{2+} 濃度（[Ca]$_{in}$）変化を顕微測光法を用いて測定した。サイズがプルキンエ細胞と顆粒細胞の中間に位するニューロンでは、しばしば（NMDA+glycine ）添加により [Ca]$_{in}$の上昇がみられた。NMDAに反応する細胞の内少数は、自発的な [Ca]$_{in}$動揺を示したが、安定な低 [Ca]$_{in}$を示す細胞に、K^{+}チャネル阻害剤（Tetraethylammonium、4-aminopyridine）やVeratridineを添加すると、著しい [Ca]$_{in}$動揺が誘発された。これらの [Ca]$_{in}$ 動揺は、TTX、D600、GABA により消失することより、Na^{+} 、Ca^{+} チャネルの関与が示唆された。（NMDA+glycine）による [Ca]$_{in}$ 上昇は、外液Ca^{2+} に依存するが、外液Na^{+}除去下でもみられ、D600により消失しないことより、膜電位依存性Ca^{2+}チャネルのみならずNMDA受容体チャネルを介したCa^{2+}流入が関与することが示唆された。

〔目的〕
最近、幼若動物より分離した個々のニューロンは、しばらく生存することが示され、電気生理学的手法によるイオンチャネルの研究に用いられているが、細胞内Ca^{2+}濃度（[Ca]$_{in}$）の測定は、ほとんど行われていない。幼若ラットより分離した小脳プルキンエ細胞は、種々の刺激に反応し、 [Ca]$_{in}$の上昇が見られることをすでに報告したが（1）、今回は、NMDAに反応するニューロンの [Ca]$_{in}$ 上昇機序を検討した。

〔方法〕
生後5-11日ラット小脳スライスを、37℃、40分間dispase（協和発酵，1000u protease／ml）処理した後、パスツールピペットで吸引、排出をくり返すことにより個々のニューロンに分離した。poly-L-Lysineをコートしたカバーグラスにニューロンを接着させ、2μM Fura-2 ／AMを、37℃、60分負荷した。細胞表面にたえず灌流液を流しながら日本分光CAM-200を用いて、340、380nmの2波長励起によって得た蛍光比より [Ca]$_{in}$を測定した。

〔結果〕
1）自発的 [Ca]$_{in}$変化。Mg^{2+}除去下に、NMDA-glycine により [Ca]$_{in}$上昇を示す全細胞の内数%の細胞は、小さな自発的 [Ca]$_{in}$動揺を示したが、1μM TTX ，10μM GABA ，50μM D600，Ca^{2+}除去によりこの動揺は消失した。
2）大多数の細胞は、低い安定な [Ca]$_{in}$を示したが、10mM tetraethylammonium，2mM 4-aminopyridineのようなK^{+}チャネル阻害剤の存在下で著しい [Ca]$_{in}$上昇や動揺を示した。この変化は、TTX、GABA、D600により消失した。又、Na^{+}チャネル活性化剤であるVeratridineにより [Ca]$_{in}$上昇又は動揺がひきおこされたが、TTX，D600，GABAにより消失した。従って、Na^{+} ，Ca^{2+}チャネル活性化による [Ca]$_{in}$上昇機序が示唆された。

3) Ca^{2+}チャネルアゴニストであるBay-K-8644の添加は、いくつかのニューロンでGABA、D600により抑制されるが、TTXには影響されない、$[Ca]_{in}$上昇をひきおこした。

4) (NMDA+glycine)刺激による$[Ca]_{in}$上昇反応は、外液Ca^{2+}除去、2APV(NMDAアンタゴニスト)MK801(NMDA受容体チャネル阻害剤)、Mg^{2+}添加により著しく抑制された。しかし、外液Na^{+}除去やD600添加により$[Ca]_{in}$上昇反応は減弱しても消失することはなかった。

〔考察〕

(NMDA+glycine)に反応するニューロンの内、かなりの数はEnkephalin様免疫反応を示し、Golgi細胞と考えられた。しかし、一部のニューロンはこの免疫反応マイナスであるので、今回の$[Ca]_{in}$変化の測定はbasket, stellate cellにおける反応も含んでいる可能性がある。自発的およびTEA, 4AP, Veratridine により誘発した$[Ca]_{in}$変化は、TTX, GABA, D600により消失することより、脱分極によるNa^{+}チャネル活性化がCa^{2+}チャネルを活性化すると考えられる。Bay-K-8644による$[Ca]_{in}$上昇は、GABA, Ca^{2+}チャネル阻害剤により抑制されるが、TTXにより抑制されないことより膜電位が少し脱分極しているニューロンのCa^{2+}チャネルが直接Bay-K-8644により活性化される結果と思われる。他方、NMDA受容体刺激は、Na^{+}脱分極によるCa^{2+}チャネル活性化のみならず受容体チャネルにおけるCa^{2+}流入をもひきおこすと考えられた。

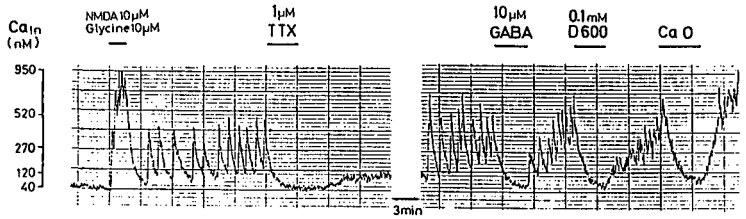


図 1.
(NMDA+glycine) 刺激後に生じた $[Ca]_{in}$ の自発的動揺。

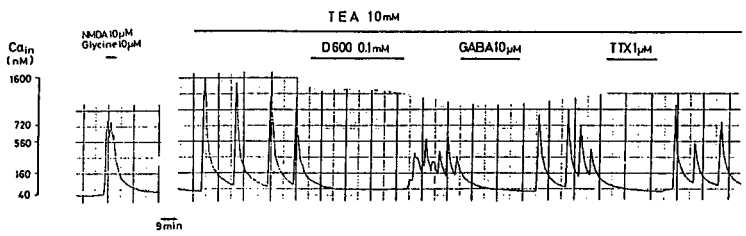


図2.
TEAによって誘発された $[Ca]_{in}$ 動揺。

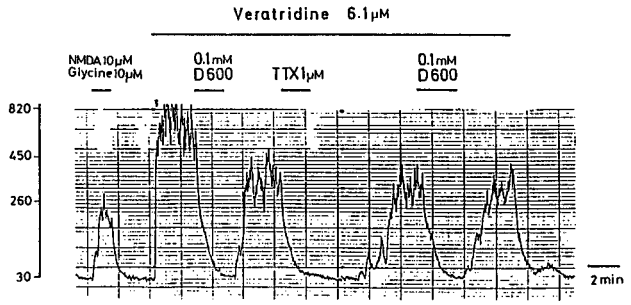


図3.
Veratridineによる $[Ca]_{in}$ 上昇。

文献 (1) Sorimachi, M., Morita, Y,. and Nakamura, H. (1990) Neurosci.Lett. 111. 333-338.

69 局所脳虚血モデルにおけるMK－８０１とニモジピンの併用療法の効果
－ 細胞内カルシウムイオンの変化を中心に －

植松大輔*、 荒木信夫**
（* 浦和市立病院神経内科、 **慶應義塾大学神経内科）

〔要約〕

脳虚血後、細胞内 Ca^{2+} の上昇によって引き起こされる脳細胞障害を抑制する目的で、猫中大脳動脈閉塞(MCAO)・再開通モデルにおいて MK-801 と nimodipine の併用療法を試みた。 細胞内 Ca^{2+} は蛍光性Ca^{2+} 指示薬 indo-1 を用いた in vivo 蛍光測光法によって大脳皮質より経時的に測定した。 MK-801単独投与によっても脳虚血中および再開通後の細胞内 Ca^{2+} の上昇は抑制され組織学的障害が軽減されたが、両剤の併用によりその効果がより増強され相乗効果が期待された。

［目的］

脳虚血後の不可逆性細胞障害の進展に細胞内 Ca^{2+} の異常な上昇が重要な役割を果たすと考えられている。高度の脳虚血が生じてから数分後細胞外 Ca^{2+} は主として膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルと N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体作動性イオンチャンネルから流入する。 本研究では猫中大脳動脈閉塞・再開通モデルにおいて、この 2 つのチャンネルからの Ca^{2+} の流入を抑制する目的で dihydropyridine 系 Ca 拮抗薬である nimodipine と非競合性 NMDA 拮抗薬である MK-801 の併用療法を試み、細胞内 Ca^{2+} の上昇と組織学的障害に対する効果を検討した。

［方法］

実験には成猫 24 匹を用い 1.5% halothane 吸入麻酔下に人工呼吸器にて調節呼吸とした。 大腿動脈と静脈にカニューラを挿入し、血圧測定、動脈血ガス分析そして薬剤の注入に使用した。 頭皮を剥離し左中大脳動脈領域直上に相当する頭蓋骨に直径 1 cm の burr hole を作成し、硬膜を慎重に剥離した。 人工髄液を満たし、脳表潅流用のチューブと脳波電極を備えた石英ガラス製の頭窓を装着し密閉した。 すでに報告したように (2)、膜透過型の indo-1-AM, 7 μM を 90 分間脳表より潅流することによって蛍光性 Ca^{2+} 指示薬 indo-1 を大脳皮質約 500 um までの脳細胞内に取り込ませた。 In vivo 落射蛍光装置を用いて340 nmの紫外線を脳表より間歇的に照射し、340 nm の反射光と 400, 464, 506 nm における蛍光の強度を 4 種のband pass filter を介し photomultiplier tube にて測定した。 反射光の強度は脳表血液量と反比例することから、Dora ら (1) の方法に従って脳表血液量の変化と局所血液通過時間より局所脳血流量 (lCBF) を算出した。 464 nm の蛍光は NADH 蛍光のピークに近くしかも indo-1-Ca^{2+} 蛍光の isoemission point に相当するためこの波長において NAD/NADH redox state の変化を測定した。 反射光と NADH 蛍光の変化による影響を修正した後、400 と 506 nm における蛍光強度の比をとり (indo-1-Ca^{2+} 蛍光比)、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化の指標とした。

Mayfield の動脈瘤手術用クリップを用いて中大脳動脈の起始部を経眼窩的に 1 時間閉塞し、再開通した。9 匹の猫には閉塞 5 分後 MK-801, 2 mg / kg を静注した (MK 群)。 他の 9 匹には閉塞 5 分後 MK-801 を同量静注すると同時に nimodipine を 5 μg / kg / min の速度で最初の 3 分間静注し、その後実験終了まで 1 μg / kg / min で持続注入した (MK + N 群)。 6 匹の猫には溶媒のみを同様のスケジュールで投与し対照群とした (V 群)。 再開通 3 時間後、脳を 3 % glutaraldehyde 溶液にて潅流固定し、さらに 10 % formaldehyde 溶液にて 5 日間固定し組織学的検索を行った。

図 1

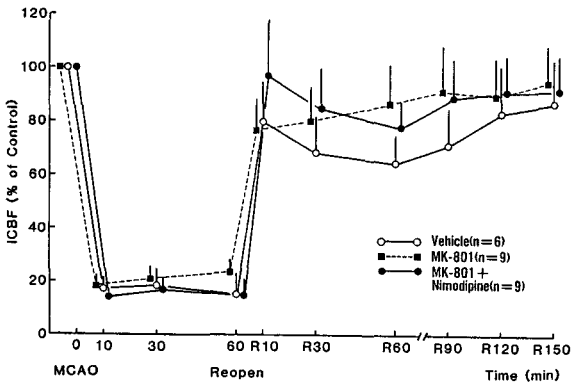
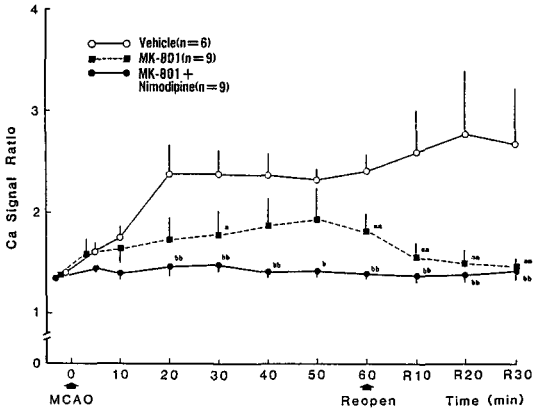


図 2



MK-801 vs vehicle : a:p<0.05, aa:p<0.01

MK+Nimo.vs vehicle: b:p<0.05, bb:p<0.01

[成績]

血圧、動脈血ガス濃度そして血糖値には 3 群間に有意な差は認められなかった。脳波の振幅は中大脳動脈閉塞直後より著明に減少し、5 分後には閉塞前の MK 群 9 ± 2 %, MK + N 群 18 ± 3 %, V 群 15 ± 4 % となったが、閉塞中は 3 群間に有意な差はなかった。 血流再開後は MK + N 群の脳波の回復が他の 2 群と比べ有意に良好であった。 局所脳血流量 (lCBF) は 3 群とも閉塞 10 分後には前値の 20 % 以下に低下した。 閉塞中の血流には 3 群間に有意な差は認めなかった。 再開通後脳血流は3 群とも直ちに前値の 80 ～ 100 % に回復したが V 群では再開通 30 ～ 90 分後に血流の低下傾向を認めた (図 1)。 Indo-1-Ca^{2+} 蛍光比 は V 群では図 2 に示すように閉塞 5 分後より有意に増加し始め閉塞中高値を持続し再開通後も上昇傾向を示した。 MK 群では閉塞中の Indo-1-Ca^{2+} 蛍光比の上昇は V 群に比べて少なく (閉塞 30 分後 1.78 ± 0.24 vs 2.37 ± 0.24)、再開通後 30 分でほぼ前値に復した。 MK + N 群では中大脳動脈閉塞・再開通後を通して Indo-1-Ca^{2+} 蛍光比の有意な上昇は認めなかった。 NAD/NADH redox state は 3 群とも虚血中 NADH の増加すなわち還元に傾き、再開通後回復した。 測光を行ったのと同一部位の大脳皮質における組織学的障害の範囲はMK + N 群が最小、ついで MK 群、もっと大きいのが V 群であった。

[考察]

高度の脳虚血時には energy failure のため細胞膜の脱分極が生じ膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルから Ca^{2+} が細胞内へ流入する。 また興奮性神経伝達物質である glutamate が放出され NMDA 受容体イオンチャンネルからも大量の Ca^{2+} が流入する。 我々はすでに猫中大脳動脈閉塞・再開通モデルにおいて虚血約 5 ～ 10 分後から細胞内 Ca^{2+} が有意に上昇すること、そしてこの虚血中の Ca^{2+} の上昇と再開通後生じる Ca^{2+} の再上昇が脳細胞の不可逆性障害に深く関与することを証明した (2, 3)。 Nimodipine 単独投与の実験 (4) でも細胞内 Ca^{2+} の上昇が抑制されたが、今回の実験で Ca^{2+} 流入の主たる 2 つのルートを同時にブロックすると細胞内 Ca^{2+} の上昇と組織学的障害が共により著明に抑制された。これは血流改善による二次的なものではなく、イオンチャンネルに対する直接作用と考えられた。 NMDA 拮抗薬と Ca^{2+} 拮抗薬を併用することにより相乗効果が得られ、減量により麻酔作用などの副作用が軽減される可能性が示唆された。

[文献]

(1) Dora E, Tanaka K, Greenberg JH, Gonatas NH, Reivich M (1986) Ann. Neurol. 19, 536 - 544.

(2) Uematsu D, Greenberg JH, Reivich M, Karp A (1988) Ann. Neurol. 24, 420 - 428.

(3) Uematsu D, Greenberg JH, Hickey WF, Reivich M (1989) Ann. Neurol. 26, 280 - 283.

(4) Uematsu D, Greenberg JH, Hickey WF, Reivich M (1989) Stroke 20, 1531 - 1537.

70　ラット脳から調製したシナプス後肥厚部に付随するキナーゼC基質

鈴木龍雄、堂前純子、田中亮
名古屋市立大学.医学部.生化I

〔要約〕　大脳のシナプス後肥厚部（ｐｏｓｔｓｙｎａｐｔｉｃ　ｄｅｎｓｉｔｙ，ＰＳＤ）中には、カルシウム・ホスファチジルセリン添加により、特異的にリン酸化される、分子量１７Ｋのタンパク質が内在していた。このタンパク質はｍｙｅｌｉｎ　ｂａｓｉｃ　ｐｒｏｔｅｉｎ，ＭＢＰと近い位置に泳動されるが、１０～２０%グラディエントゲルを用いた電気泳動でＭＢＰとは区別された。電気泳動後、この１７Ｋタンパク質とＭＢＰを含むバンドをそれぞれ切り取り、^{32}Ｐの取り込みを測定した。この結果から１７Ｋタンパク質はＰＳＤに内在するキナーゼＣにより、ＭＢＰより強くリン酸化されることがわかった。このタンパク質の等電点は中性から弱酸性領域にあり、ＭＢＰとは大きな差がみられた。さらに、このタンパク質は抗ＭＢＰ抗体では染色されなかった。なお、ＰＳＤ中の含量にはばらつきがみられた。

〔緒言〕　脳のさまざまな部位の神経細胞樹状突起で、種々のキナーゼCアイソザイムの局在が知られており、シナプス前側（シナプス終末）ばかりでなく、シナプス後部側でもキナーゼCが働いている可能性が示されている。脳から単離したシナプス後肥厚部（Ｐｏｓｔｓｙｎａｐｔｉｃ　ｄｅｎｓｉｔｙ，ＰＳＤ）画分にもキナーゼＣ活性が検出されている[1][2][3]。今回、ラット脳各部位からＰＳＤ画分を単離し、そこに内在するキナーゼＣ活性について調べた。

〔方法〕ラット前脳、大脳皮質、海馬、小脳からＷｕらの方法[4]に準じてＰＳＤ画分を調製した。この画分を用いて ｉｎ　ｖｉｔｒｏ の系で ^{32}Ｐ－ＡＴＰを加えてリン酸化反応を行ない、一次元、または、二次元電気泳動後、オートラジオグラフィを行なった。また、バンドへの^{32}Ｐ取り込みをカウントした。他に、抗ミエリンベーシックプロテイン（ＭＢＰ）抗体を用いてウエスタンブロットをおこなった。

〔結果と考察〕　大脳皮質、海馬、小脳から調製したＰＳＤ画分中には、カルシウム・ホスファチジルセリン添加により、特異的にリン酸化される、分子量１７Ｋのタンパク質が内在していた（図１）。この内在性基質のリン酸化量でみる限り、ＰＳＤ画分中のキナーゼＣ活性は、小脳、海馬、大脳皮質の順に高かった（図１）。このタンパク質はＭＢＰと近い位置に泳動されるが、１０～２０%グラディエントゲルを用いた電気泳動でＭＢＰとは区別された(図２)。通常のゲル濃度では二者の分離はわかりにくい。図２のレーン２（大脳皮質ＰＳＤ）の分子量１７Ｋ付近のタンパク質（Ｎｏ．１～４）のうちＮｏ.４がＭＢＰを含むバンドである(レーン１，ｒａｔ　ｍｙｅｌｉｎ　ｐｒｏｔｅｉｎ，参照)。電気泳動後、Ｎｏ．３と４のバンドを切り取り^{32}Ｐの取り込みを測定した（ｔａｂｌｅ　Ｉ）。この結果からＮｏ．３タンパク質は内在性のキナーゼＣにより、ＭＢＰより強くリン酸化されることがわかった。Ｎｏ．３プロテインの等電点は中性から弱酸性領域にあり、ＭＢＰとは大きな差がみられた。このタンパク質は抗ＭＢＰ抗体では染色されなかった（図３）。なお、ＰＳＤ中の含量にはばらつきがみられたので、このタンパク質が神経細胞内でも真にＰＳＤにａｓｓｏｃｉａｔｅしているかどうかについては、免疫電顕による局在の研究を待たねばわからない。

(1) Wolf, M., Burgess, S., Misra, U. K., and Sahyoun, N. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 140, 691-698
(2) Wolf, M. and Sahyoun, N. (1986) J. Biol. Chem. 261, 13327-13332
(3) Suzuki, T. and Siekevitz, P (1989) J. Neurochem. 53, 1751-1762
(4) Wu, K., Carlin, R. and Siekevitz, P. (1986) J. Neurochem. 46, 831-841

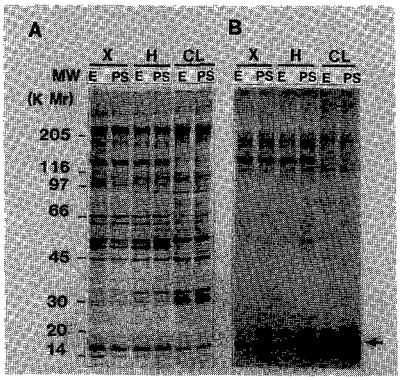


図１．　７－１７％ゲル電気泳動
Ａ，　タンパク染色
Ｂ，　^{32}Ｐのオートラジオグラフ
Ｘ，　ｃｏｒｔｅｘ　ＰＳＤ
Ｈ，　Ｈｉｐｐｏｃａｍｐｕｓ　ＰＳＤ
ＣＬ，　ｃｅｒｅｂｅｌｌｕｍ　ＰＳＤ
Ｅ，　ＥＧＴＡ存在下でのリン酸化反応
ＰＳ，Ca^{2+}－ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｓｅｒｉｎｅ
存在下でのリン酸化反応
矢印は、１７Ｋのキナーゼ基質の位置を示す。

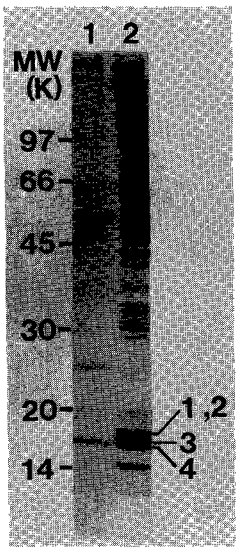


図２．　１０－２０％ゲル電気泳動
１，　ラットミエリン画分
２，　ｃｏｒｔｅｘ　ＰＳＤ
低分子のタンパク質
に１－４のナンバー
を添付した。

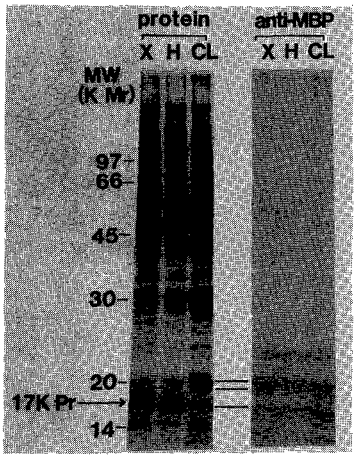


図３．　抗ＭＢＰ抗体を用いたｗｅｓｔｅｒｎ　ｂｌｏｔ
Ｘ，Ｈ，ＣＬは図１と同じ。

Table I.

Phoshorylation of PSD proteins by the kinases endogenous to the fraction.

PSD	condition of phospohrylation	protein bands			
		#3		#4	
		cpm	%	cpm	%
CTX-D	EGTA	1280±171		1344±65	
	Ca^{2+}/PS	3753±284	293%	2158±326	161%
Hipp-D	EGTA	1456±211		1550±133	
	Ca^{2+}/PS	8059±538	544%	3479±256	224%
CBL-D	EGTA	1817±243		3292±221	
	Ca^{2+}/PS	9558±566	526%	7708±1710	227%

バンド＃３と＃４は図２を参照
＃４は　ＭＢＰ　を含むバンドである(図２）。

71 Dibutyryl cAMP 刺激による PC12h 細胞の分化におけるプロテインキナーゼCアイソザイムの動態

下濱 俊，功刀由紀子*，田村仁美*，小早川仁志*，斎藤綱男**，木村 淳，谷口隆之*

京都大・医・神経内科，京薬大・生物*，カリフォルニア大サンデイエゴ校・神経科学**

〔要約〕

シグナル伝達機構の相互作用を検討するために，cAMP により誘導される PC12h 細胞の分化過程でのプロテインキナーゼCアイソザイムの動態について，イムノブロッティング法を用いて調べた。PC12h 細胞では，主にαタイプとβⅡタイプのプロテインキナーゼCが発現していた。βⅠタイプおよびγタイプは認められなかった。dibutyryl cAMP で刺激すると，αタイプのプロテインキナーゼCは急速に出現し，一過性の増加を示したが，βⅡタイプは刺激後24時間まで長期に持続する傾向を示した。これらの結果より，cAMP により誘導される PC12h 細胞の分化過程で見られる細胞の反応に，αタイプとβⅡタイプのプロテインキナーゼCが，それぞれ特異的に寄与していることが示唆された。

〔目的〕 これまでに，PC12細胞が，NGF，basic FGF，cAMP 類縁物質やプロテインキナーゼC（PKC）の活性化物質であるホルボールエステルなどの物質で，神経細胞の形態に分化しうることが報告されている。この分化過程に伴い，c-fosやβ−actin 遺伝子の活性化，いくつかの蛋白のリン酸化などの生理学的反応が認められるが，それらのシグナル伝達の分子機構については不明である（1, 2, 3, 4, 5）。初期には，cAMP がこれらのシグナル伝達のセカンドメッセンジャーと考えられていたが，最近では，疑問を投げかける報告もみられる。Cキナーゼの関与についても不鮮明である。NGF 作用は，少なくとも一部は，PKC の活性化を引き起こし，PC12 細胞の分化に NGF と cAMP の synergistic な作用があるので，PC12 細胞の分化には，いくつかの異なるシグナル伝達機構が働いていると考えられる。さらに，PC12 細胞を NGF または dibutyryl cAMP で処理すると，PKC の基質である GAP43 の細胞内局在に変化が起こることが報告されている(6)。PC12h 細胞の分化過程での，PKC 依存性シグナル伝達に対する cAMP 依存性シグナル伝達の作用を明らかにするために，PKC アイソザイム（α，βⅠ，βⅡ，γ）に対する抗体を用いて，dibutyryl cAMP で刺激された PC12h 細胞での各アイソザイムの動態について検討した。

〔方法〕 PC12h 細胞は5％ CO_2，95％ air の環境下で，5％馬血清および5％新生仔血清を含む DMEM／Ham's F12 培養液で37°Cで維持した。細胞は通常の方法で継代し，poly-L-lysin でプレコートしたプラスチックⅢにまいた。神経突起伸長の研究のためには，培養液を継代1日後に，インスリン，トランスフェリン，プロゲストロン，sodium selenate を含む無血清培地に替え，最終濃度1 mMの dibutyryl cAMP を添加した。PKC アイソザイムのイムノブロッティング解析には，まず，PC12h 細胞を集め，1 mM PMSF，10 μg／ml leupeptin，1 mM EDTA，1 mM EGTA を含む PBS で洗浄し，0.25 M sucrose，1 mM PMSF，10 μg／ml leupeptin，1 mM EDTA，1 mM EGTA，12.5 mM Tris-Mes（pH 7.4）のバッファーでホモジナイズした。イムノブロッティング解析は，Towbin らの方法(7)に従い，DAB で発色を行った。抗体は，ヒト PKC アイソザイム（α，βⅠ，βⅡ，γ）の各C末端配列より合成したペプチドに対する抗体を用いた（8, 9）。

〔結果〕 イムノブロッティング解析では，PC12h 細胞にはαタイプとβⅡタイプの PKC が検出された。ともに，分子量，約72 kDaの蛋白バンドとして認められた。1 mM の dibutyryl cAMP を添加すると，PC12h 細胞は約30分で神経突起の伸長を開始したが，この時点では，神経突起の幅も細かった。添加後，24時間たつと，神経突起の幅も広くリボン状になった。dibutyryl cAMP を添加していないコントロール細胞では，ごく僅かに神経突起の伸長を認めたのみであった(図1)。dibutyryl cAMP を添加した PC12h 細胞のホモジネートを用いたイムノブロッティング解析では，αタイプとβⅡタイプの PKC が，特異的に制御されていることが明らかとなった。αタイプは，5分以内に一過性に増加し，1時間後には，急速に減少した。それに伴い，分子量約35 kDa の蛋白バンドが増加した。βⅡタイプも5分以内に急速に増加したが，その後約24時間まで持続した。dibutyryl cAMP の添加により，βⅠタイプおよびγタイプの PKC には変化は認められなかった。dibutyryl cAMP を添加していないコントロール細胞では，αタイプとβⅡタイプの PKC の濃度に変化は認められなかった(図2)。

〔考察〕 PC12h 細胞では，αタイプとβⅡタイプの PKC が検出され，ともに，分子量，約72 kDa の蛋白バンドとして認められた。dibutyryl cAMP の添加によっても，αタイプとβⅡタイプのみ検出された。脳では，αタイプとβⅡタイプのほかに，βⅠタイプおよびγタイプの PKC も認められ（8, 9），このことは PC12h 細胞のさまざまの細胞反応ではαタイプとβⅡタイプの PKC が重要な働きをしていることが予想される。一方，神経細胞に豊富に存在し，ある種の神経機能に必須と考えられるβⅠタイプおよびγタイプの PKC を欠如していることより，PC12h 細胞は，ある種の神経機能を発揮することはできないと思われる。dibutyryl cAMP の添加後の PC12h 細胞のホモジネートを用いたイムノブロッティング解析で，

αタイプとβⅡタイプの PKC が，時間経過で異なる動きを示したことより，PC12h 細胞の分化過程で，それぞれのアイソザイムが，異なる細胞過程に作用し，それぞれ特異的な生理学的反応を制御していることが示唆された。PC12h 細胞への，dibutyryl cAMP や NGF の添加後数分間で，細胞表面や細胞骨格蛋白の形態変化がおこり，その後に，神経突起の伸長が始まることが明らかにされている[10]。dibutyryl cAMP の添加により誘導されたαタイプ PKC の一過性の増加は，細胞表面や細胞骨格蛋白の形態変化に関与しているのかもしれない。持続性のβⅡタイプ PKC の増加は，神経突起の伸長に重要な働きをしている可能性がある。この意味で，dibutyryl cAMP 刺激後の PC12 細胞で，PKC の基質であり，軸索の伸長や神経伝達物質の遊離に関係し，さらに NGF レセプターに共存するともいわれている GAP43のトランスロケーションが観察されているのは興味深い。今回の結果は，cAMP 依存性のシグナル伝達機構と PKC 依存性のシグナル伝達機構間の相互連関を示唆しており，今後，さらに検討が必要である。

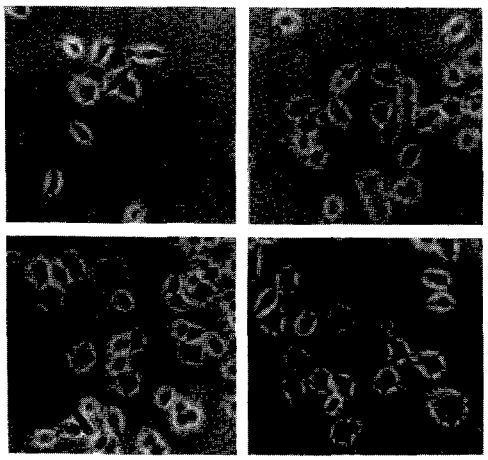


図 1

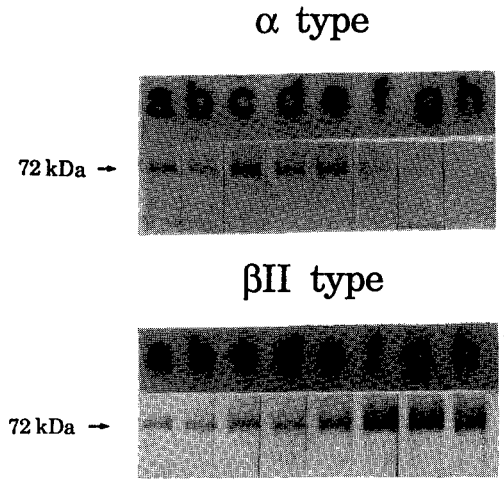


図 2

図 1. Dibutyryl cAMP 刺激による PC12h 細胞の形態変化。a. dibutyryl cAMP 投与前の細胞，b. 30分処置後，c. 2 時間処置後，d. 24時間処置後。

図 2. 特異抗体を用いたイムノブロッティング解析。a. dibutyryl cAMP 投与前，b. 2 分処置後，c. 5 分処置後，d. 10分処置後，e. 30分処置後，f. 2 時間処置後，g. 5 時間処置後，h. 24時間処置後。

〔文献〕

1. Halegoua, A., and Patrick, J. (1980) Cell 22, 571－581.
2. Schubert, D., and Whitlock, C. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 4055－4058.
3. Schubert, D., Lacorbiere, C., Whitlock, C., and Stallcup, W. (1979) Nature 273, 718－723.
4. Sigmund, O., Naor, Z., Anderson, D. J., and Stein, R. (1990) J. Biol. Chem. 5, 2257－2261.
5. Milbrandt, J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 4789－4793.
6. Van Hooff, C. O. M., Holthuis, J. C., Oestreicher, A, B., Boonstra, J., De Graan, P. N., and Gispen, W. H. (1989) J. Cell Biol. 108, 1115－1125.
7. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 4350－4354.
8. Masliah, E., Cole, G., Shimohama, S., Hansen, L., De Teresa, R., Terry, R. D., and Saitoh, T. (1990) J. Neurosci., in press.
9. Shimohama, S., Saitoh, T. and Gage, F. H. (1990) J. Chem. Neuroanat., in press.
10. Connolly, J. L., Greene, L. A., Viscarella, R. R., and Riley, W. D. (1979) J. Cell. Biol., 82, 820－827.

72 海馬キンドリングにおけるプロテインキナーゼC活性の変化

大源明宏、秋山一文、伊藤高、甲平一郎、森本清、大月三郎
（岡山大・医・神経精神医学教室）

［要約］
背側海馬キンドリングラットを用いて最終発作から7日後におけるプロテインキナーゼC（PKC）活性の変化を扁桃核と海馬において各々可溶性画分と膜画分に分けて測定した。可溶性画分ではいずれの脳部位にも有意な変化は認められなかった。膜画分ではキンドリングラットの両側海馬において有意な増加を認めたが、扁桃核においては変化していなかった。DE-52 カラム溶出前のタンパク濃度は、キンドリングラットの膜画分で左側海馬において有意に増加していた。DE-52 カラム溶出後のタンパク濃度は、キンドリングラットにおいて膜画分の両側海馬だけでなく可溶性画分の左側海馬においても有意な増加が認められた。

［はじめに］
PKCは、イノシトールリン脂質の代謝回転に伴って生成されるジアシルグリセロールにより活性化されるカルシウム・リン脂質依存性のタンパク質リン酸化酵素である。PKCは特に脳に高濃度に存在し、近年その中枢神経系における役割が注目されてきている（5）。今回我々は、背側海馬キンドリングラットを用いてその海馬及び扁桃核におけるPKC活性の変化について検討したので報告する。

［対照及び方法］
1） 海馬キンドリングラットの作製
SD系雄性ラット（体重 260-280g）の左側背側海馬（AP -2.6, L 2.3, D 3.2）に慢性深部電極を挿入した。発作段階が Racine 分類（6）の stage 0-4 では 200-300 μA, 60 Hz の正弦波で1秒間、1日2回電気刺激した。発作段階が Racine 分類の stage 5 に達した後は2日に1回電気刺激し、2次性全汎化発作が連続5回以上安定して認められるようになった時点で海馬キンドリングの完成とし、キンドリングラットを最終発作から7日後に断頭し、PKC活性を測定した。なお対照群には慢性深部電極の挿入のみを行った。
2） プロテインキナーゼC活性の測定
ラットを断頭後、速やかに氷上にて両側扁桃核と右側及び左側海馬を切り出した。PKC活性は、Kikkawa らの方法（4）に準拠して測定した。各脳部位を Homogenization Buffer [20 mM Tris-HCl, 0.25 M Sucrose, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 20 μg/ml leupeptin を含有、pH 7.5] 中でホモゲナイズした後、100,000 g で 60分間超遠心分離してその上清を可溶性画分とした。その沈渣を 1% Triton X-100 を含有する Homogenization Buffer 中でホモゲナイズした後、氷上にてマグネットスターラーで 30分間撹拌し再び同様の条件下に超遠心分離してその上清を膜画分とした。各画分はさらに DE-52 カラムにいったん吸着させたのち、120 mM NaCl を含有する平衡化 Buffer（20 mM Tris-HCl, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol を含有、pH 7.5）により溶出しPKC活性を測定した。反応混合液中には 5 μmol Tris-HCl, 1.25 μmol Mg-acetate, 2.5 nmol [γ-^{32}P]ATP, 50 μg H1 Histone と各酵素画分が含まれる。PKC活性は、125 nmol $CaCl_2$, 2 μg PS, 0.2 μg DO の存在下と非存在下において 30 ℃、3 分間インキュベートした後に、基質である H1 Histone に結合した^{32}Pの放射活性の差から求めた。タンパク濃度は、DE-52 カラム溶出前後で各々測定し、PKC活性は溶出前のタンパク濃度で補正して求めた。2群間有意差検定には、Student's t test を用いた。

［結果］
海馬キンドリング完成ラットのPKC活性の変化を Fig.1 に示す。可溶性画分におけるPKC活性はいずれの脳部位でも変化していなかった。膜画分におけるPKC活性は、キンドリング群の両側海馬において最終発作から7日後に有意に増加していた（右側海馬で２６％、左側海馬で３０％）が、扁桃核では変化していなかった。

DE-52 カラムでの溶出前のタンパク濃度の変化を Fig.2 に示す。可溶性画分では有意な変化は認められなかった。膜画分では刺激側の左側海馬において有意の増加が認められ、右側海馬では増加傾向を認めたが有意な変化ではなかった。扁桃核では変化していなかった。

DE-52 カラムでの溶出後のタンパク濃度の変化を Table 1 に示す。膜画分における両側海馬だけでなく可溶性画分における刺激側の左側海馬においても有意の増加が認められた。その他の部位では有意な変化は認められなかった。

［考察］

キンドリング現象における痙攣準備性は、いったん獲得されるとそれはなかば永続的であり神経系の可塑性のモデルと考えられている。現在までに、キンドリングとの関連においては、扁桃核キンドリングで海馬の CA1 領域で mossy fiber の sprouting が生じること (7)、脱分極性の刺激によりＰＫＣの活性化、ＰＫＣの基質であるＦ１タンパクのリン酸化ならびに神経伝達物質の放出が併行して引き起こされること (2)、ＰＫＣが海馬の CA1 錐体細胞のイオンチャンネルを修飾することにより細胞の興奮性を増大させること (1)、発作活動に伴い c-fos mRNA 及び c-fos タンパクが一過性に上昇すること (3)、などが報告されている。こうした事実と今回の実験結果より、ＰＫＣがキンドリング現象において、シナプスの sprouting、神経伝達物質の放出の亢進、神経細胞膜の興奮性の増大、遺伝子の発現などになんらかの役割を果していることが示唆された。これまでキンドリング現象に伴うタンパク量の増大は報告されておらず、今回の実験でキンドリングにより膜画分においてタンパク濃度が増加することが示されたことは興味深いがその詳細は不明であり、今後の検討に待たねばならない。

今後、最終発作より４週間後までのＰＫＣ活性の変化についても検討し、長期持続性の有無に関しても学会当日に発表する予定である。

［文献］

(1) Braban, J.M. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:2538-2542. (2) Dekker, L.V. et al. (1989) J. Neurochem., 52:24-30. (3) Dragnow, M. et al. (1988) Exp. Neurol., 102:261-263. (4) Kikkawa, U. et al. (1983) Methods Enzymol., 99:288-298. (5) Nishizuka, Y., (1988) Nature, 334:661-665. (6) Racine, R., (1972) Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol., 32:281-294. (7) Represa, A. et al. (1989) Neurosci. Lett., 99: 345-350.

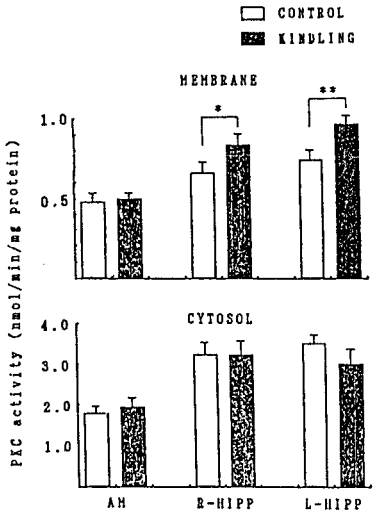


Fig.1 Membrane-associated and cytosolic protein kinase C (PKC) activity in the amygdala (AM), right hippocampus (R-HIPP) and left hippocampus (L-HIPP). The data represent the maen ± S.E.M. of 9 determinations. *P<0.05, **P<0.02 as compared to the control.

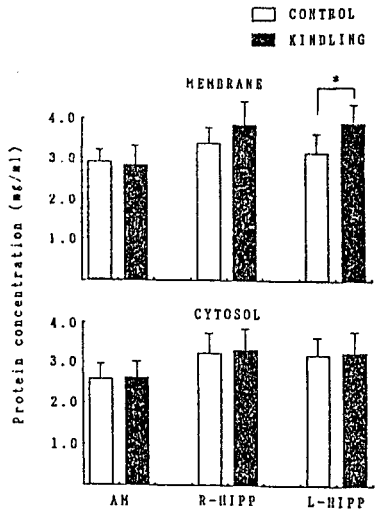


Fig.2 Protein concentration in the crude membrane and cytosolic preparation in the amygdala (AM), right hippocampus (R-HIPP) and left hippocampus (L-HIPP). The data represent the maen ± S.D. of 9 determinations. *P<0.02 as compared to the control.

Table 1. Protein concentrations of the fraction co-eluted with PKC through DE-52 columns. The data represent the mean ± S.D. of 9 determinations. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 as compared to the control.

	Protein concentration (μg/ml)		
	AM/PC	R-HIPP	L-HIPP
Membrane			
Control	96.3±12.7	112.9±18.8	109.4±17.1
Kindled	98.8±20.9	142.3±25.9**	155.4±23.3***
Cytosol			
Control	133.3±18.7	171.5±26.9	169.0±14.2
Kindled	134.0±29.1	181.3±18.4	195.2±33.2*

73　神経組織における ras p21 類似ＧＴＰ結合蛋白質 smg p25A の発現について

本池俊行、佐野公彦、中村　肇、畠中　寛**、菊池　章*、高井義美*

（神戸大・医・小児科、*第一生化、**大阪大学・蛋白研）

〔要約〕

ras p21類似ＧＴＰ結合蛋白質 smg p25A の生体内での機能を明らかにする目的で、神経芽腫細胞株、培養中枢神経細胞、および発達期ラット小脳をもちいて、smg p25A の発現を調べ検討を加えた。　１）培養神経芽腫細胞においては cAMP、レチノイン酸等の添加による神経細胞様分化にともない、神経分泌顆粒の増加と平行して smg-25A mRNA の発現の増加が見られた。　２）培養中枢神経細胞においても、免疫染色により smg p25A が神経細胞に特異的に存在することが示されると同時に、シナプトフィジンとは異なる細胞内分布を示すことが明らかになった。　３）発達期ラット小脳を用いた免疫組織染色では、シナプス形成にともない smg p25A の発現の増加が認められると同時に、シナプトフィジンとは異なる細胞内分布を示すことが明らかとなった。　以上のことより、smg p25A は神経細胞、特に神経終末に多く存在することが確認され、シナプトフィジンとは異なった軸索輸送により、神経終末に運搬されることが示唆された。

（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蛋白質の一員である(2,3)。　これまでの研究により、smg p25A は神経組織、特に神経終末に高濃度に存在することが明らかになっている(4)。　また、免疫組織化学的解析から、唾液腺、膵外・内分泌腺などの regulated secretion を行う組織においてもその発現が観察されている(5)。これらの事実より、smg p25A は哺乳類において、神経組織をはじめとする regulated secretion を行う組織の分泌反応に関与している可能性が示唆されている。

今回、我々は神経組織において、smg p25A が神経細胞に特異的に発現していることを明らかにし、さらに、その細胞内分布につきシナプトフィジンとの比較により検討を加えた。

（実験方法）

smg-25A cDNA および 抗 smg p25A 抗体は既報のものを用いた（3,5）。　１）各種神経芽腫細胞株を cAMP、レチノイン酸添加、および無血清下におき、３－７日後に smg-25A mRNA の半定量を行うと同時に、突起内微細構造につき電顕的に検討を加えた。　２）生後５日ラット脳より海馬細胞を分離、培養して抗 smg 25A 抗体、および抗シナプトフィジン抗体（Boehringer Mannheim社）を用いて、ペルオキシダーゼ-DAB による免疫染色を行った。　３）生後ラット小脳を各発達段階（生後１０、１５日、成熟ラット）において灌流固定を行い、抗 smg p25A 抗体、および抗シナプトフィジン抗体を用いて蛍光抗体による免疫組織染色を行った。

（結果）

１）　神経芽腫細胞株における smg-25A mRNA の発現（図１）

神経芽腫細胞株である NB-1 株、SY5Y 株をそれぞれ cAMP、レチノイン酸で刺激することにより、神経細胞様の突起の伸長が認められ、電顕的には神経分泌顆粒の増加が認められた。　それに伴い smg-25A mRNA の発現の増加が観察された。　一方、GOTO 株は無血清下におくことにより、神経細胞様に分化したが、分化に伴う神経分泌顆粒の増加も smg-25A mRNA の発現の増加も認められなかった（図1）。

２）　培養中枢神経細胞における smg p25A の発現（図2）

単層グリア細胞層上の培養神経細胞（5×10^3 cells/cm^2、培養５日目に固定、染色）において、抗 smg p25A 抗体により神経細胞が特異的に染色され、グリア細胞は染色されなかった（図2-A）。　また、ポリエチレンイミン上の培養細胞（5×10^5 cells/cm^2、培養１５日目に固定、染色）において、抗 smg p25A 抗体により神経突起および細胞体が染色されたが、抗シナプトフィジン抗体では神経突起のみが染色され、細胞体は染色されなかった（図2-B）。

３）　発達期ラット小脳における smg p25A の発現（6）

・ 小脳分子層は生後日数の経過に伴いその厚さを増し、抗 smg p25A 抗体、および抗シナプトフィジン抗体により濃染された。

・ プルキンエ細胞は抗 smg p25A 抗体により生後１０、１５日において、その細胞体が明瞭に染色されたが成熟ラットではわずかに染色されるのみであった。　一方、抗シナプトフィジン抗体ではいずれの段階においても、その細胞体はわずかに染色されるのみであった。

・ 神経細胞軸索の走行路である白質は抗 smg p25A 抗体により生後１５日において、明瞭に染色され、成熟ラットにおいては染色されなかった。 一方、抗シナプトフィジン抗体ではいずれの段階においても白質は染色されなかった。

（考察）

以上の結果より、smg p25A が神経細胞、特にシナプス部に高密度に存在することが確認された。 また、神経芽腫を用いた系により、たとえ神経細胞様分化を遂げても分泌顆粒を持たない細胞では smg p25A の発現が増加しないことが明らかとなった。 現在までに我々は細胞分画法および免疫電顕的解析から smg p25A が前シナプス膜、シナプス小胞のみならず、前シナプス細胞質にも存在することを明らかにしている(4)。

最近、我々は GDP 結合型の smg p25A に結合し smg p25A の GDP/GTP 交換反応を抑制する蛋白質を均一にまで精製し、ＧＤＩ(GDP dissociation inhibitor) と命名している。また、我々は GDP 結合型と GTP 結合型の smg p25A は共に前シナプス膜とシナプス小胞膜に結合するが、ＧＤＩの存在下では GDP 結合型の smg p25A の前シナプス膜とシナプス小胞膜への結合が阻害されることを、in vitro の系において明らかにしている(1)。生体内において、smg p25A からのＧＤＩの解離により GDP と GTP との交換が行われ GTP 結合型となった smg p25A がシナプス小胞膜などの分泌顆粒膜と結合することにより、分泌反応に関与している可能性がある。 培養神経細胞、および発達期ラット小脳において、smg p25A が同じシナプス特異的蛋白質でも、シナプス小胞特異的蛋白質であるシナプトフィジンとは異なる細胞内分布を示すことからも、smg p25A が単にシナプス小胞に存在しているのみならず、ＧＤＩ存在下において GDP 結合型の smg p25A が 前シナプス細胞質に存在し、smg p25A がシナプトフィジンとは異なる合成・軸索輸送系を有していることが示唆された。 酵母細胞においては、同じ低分子量Ｇ蛋白質の一員である SEC4 が GDP-GTP 交換反応を通じて分泌反応を司るモデルが実証されており(7)、SEC4 とのアナロジーにおいて smg p25A が神経細胞において、GDP-GTP 交換反応を通じて神経分泌反応に関与している可能性がある。

（文献）

1) Araki, S., Kikuchi, A., Hata, Y., Isomura, M., and Takai, Y. J. Biol. Chem. in press
2) Kikuchi, A., Yamashita, T., Kawata, M., Yamamoto, K., Ikeda, K., Tanimoto, T., and Takai, Y. (1988) J. Biol. Chem. 263, 2897-2904
3) Matsui. Y., Kikuchi, A., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y., and Takai, Y. (1988) J. Biol. Chem. 263, 11070-11074
4) Mizoguchi, A., Kim, S., Ueda, T., Kikuchi, A., Yorifuji, H., Hirokawa, N., and Takai, Y. J. Biol. Chem. in press
5) Mizoguchi, A., Kim, S., Ueda,T., and Takai, Y. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 162, 1438-1445
6) Motoike, T., Sano, K., Tsuneishi, S., Nakamura, H., and Takai, Y. submitted for publication
7) Walworth, N.C., Goud, B., Kabcenell, A.K., and Novick, P.J. (1989) EMBO J. 8, 1685-1693

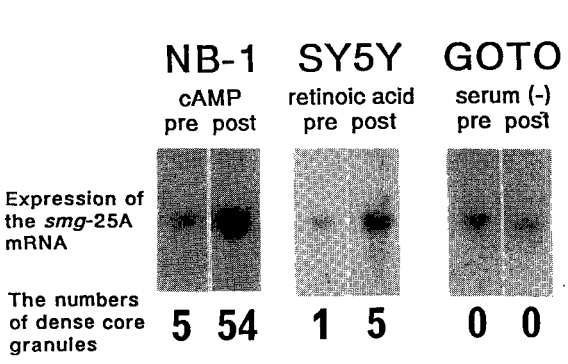


図１

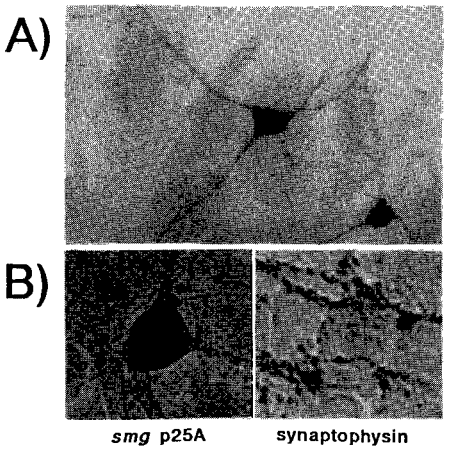


図２

74 マウス大脳皮質形成とガラクトース転移酵素

森田規之、池中一裕、御子柴克彦
（大阪大・蛋白研・機能制御）

〔要約〕

大脳皮質形成期の神経芽細胞移動に対するガラクトース転移酵素の関与を、マウス胎仔大脳皮質スライス培養法を用いて検討した。糖供与体である UDP-galactoseを培養液中に添加することで実際に細胞が運動している条件下で in situ で反応を行ったところ、転移反応生成物が回収されガラクトース転移酵素の活性を検出することが可能となった。オートラジオグラフィーによるガラクトース受容分子の組織内分布の結果も考え併せて、検出された酵素活性は、細胞外で行われた反応に由来するものと考えられた。さらに、ガラクトース受容分子が皮質原基よりも脳室近くに多く見いだされたことから、細胞移動の早い段階に細胞外のガラクトース転移酵素が関与していることが示唆された。

【緒言】

近年、細胞表面ガラクトース転移酵素が、個体発生や、形態形成に関与することを示唆する報告がいくつかなされている(1)(2)。中枢神経系の皮質形成部位での細胞構築異常が認められる reeler ミュータントマウスにおいても、脳内ガラクトース転移酵素の活性低下が報告されており(5)、我々もこのミュータントの解析が皮質形成、並びに神経細胞の移動の機構の解明につながると考え、脳内糖蛋白質 N-結合型糖鎖の解析や脳内ガラクトース転移酵素活性の測定を行い、本学会で報告してきた(3)。さらに我々は、マウス胎仔大脳皮質スライスを用いて、皮質形成期の細胞移動を in vitro で生体に近い形で解析することが可能な培養系を確立しており(4)、この系を用いて細胞移動に関わる分子の検索を進めているところである。今回、ガラクトース転移酵素の大脳皮質形成期の神経芽細胞の移動への関与を検討するため、大脳皮質スライス培養法を用いて解析を進めたところ若干の興味ある知見が得られたので報告する。

【実験方法】

1)スライス培養；ICR マウス胎仔（E16、プラグ確認日を E0 とする）から脳を取り出し、マイクロスライサー（堂阪イーエム、DTK-1000）を用いて厚さ 200 μmの前額断スライスとした後、皮質部分を切り出した。これを 0.5% FCS、1% Nutridoma SP（ベーリンガー）、2mM グルタミンを含む F-12 培養液中 5% CO_2 下、37℃で静置培養した。

2)培養スライスを用いた糖転移酵素活性測定；上述の培養液中に糖供与体として UDP-galactose [galactose-6-^{3}H] (ARC,Inc.) あるいは、UDP-N-acetyl-D-glucosamineN glucosamine-6-^{3}H(N)] (ARC,Inc.) を 25μCi/ml、200μM となるよう添加して脳スライスを培養した後、氷冷 PBS を加えて反応を停止し、洗浄した後 PBS 中でホモジナイズした。ここに終濃度 10% トリクロル酢酸（TCA）を加えて得た沈澱物を PROTOSOL (DuPont) で溶解し、AQUASOL-2 (DuPont) を加えて液体シンチレーションで計数した。

3)オートラジオグラフィー；上述の方法で in situ でガラクトース転移反応を行った脳スライスをエタノール固定した後、パラフィン切片を作製した。乳剤（Kodak NTB-2）をコートし 4℃で感光させた。

【結果と考察】

1)培養脳スライスにおける糖転移酵素活性；我々の確立したマウス胎仔大脳皮質スライス培養法は、大脳皮質内において神経上皮細胞のエレベーター運動やその後の神経芽細胞の移動を観察できる生体に近い形の in vitro 解析系である。このような実際に細胞が運動していると考えられる条件で培養している胎生 16 日（E16）大脳皮質スライスの培養液中に糖供与体を加えて in situ で糖転移反応を行い、脳スライスの 10% TCA 沈澱物中に回収された転移反応生成物の量を示したのが図1 である。糖供与体として UDP-galactose を用いたところ、反応時間に対して良好な直線関係が得られ、この系でのガラクトース転移反応を検出することができた。しかも、今までのところ糖供与体である糖ヌクレオチドを細胞外から細胞質へと輸送する経路は知られていないため、これは

細胞表面あるいは細胞間での転移反応を反映していると考えられる。次に糖供与体として UDP-N-acetyl-D-gulcosamine を用いて同様に E16 の大脳皮質スライスで比較したところ、転移反応生成物は認められたものの、大幅に減少していた（図1）。このことにより、数ある糖転移酵素のなかで少なくともガラクトース転移酵素が、マウス大脳皮質形成期に細胞外で有意に活性を有することが明かとなった。現在、我々の系でガラクトース転移酵素が皮質形成期に特異的に活性を発揮しているかを検討している。

2)オートラジオグラフィー；培養大脳皮質スライスに検出されたガラクトース転移反応生成物の組織内分布を明らかにするため、活性測定と同一の条件で 5 時間培養した E16 大脳皮質スライスのオートラジオグラフィーを行った。図2a に示すように生成物由来のグレインは細胞を取り囲むように存在しており、糖供与体の UDP-galactose が培養液中からゴルジ装置内へと輸送されることは考えにくいことと併せると、細胞表面あるいは細胞間にガラクトース転移酵素が存在し、その場所で転移反応が行われたことを強く示唆するものである。図2bの低倍像においてグレインは脳室に近いところに多く分布し、皮質原基にはわずかであった。これは、神経芽細胞移動の早い段階に細胞外のガラクトース転移酵素が関与していることを示唆するものであり極めて興味深い。現在、大脳皮質スライス培養の系にガラクトース転移酵素の特異性や活性を変調する薬物を添加して、細胞移動に与える影響を検討すると共に、培養スライスで in situ でガラクトースを受容した分子の解析を進めている。

図1　培養大脳皮質スライスにおける糖転移酵素活性

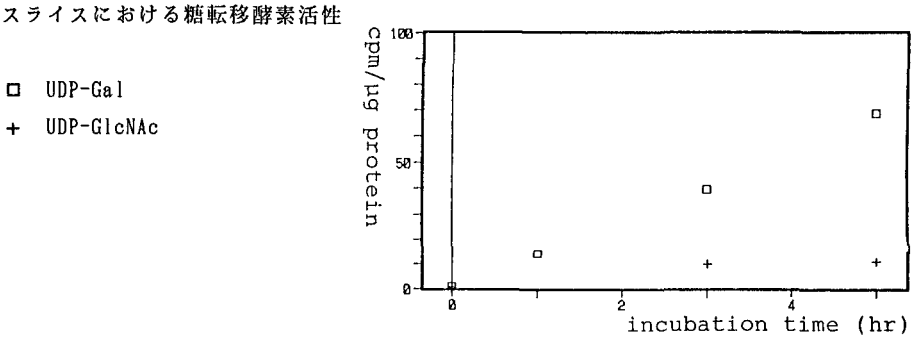
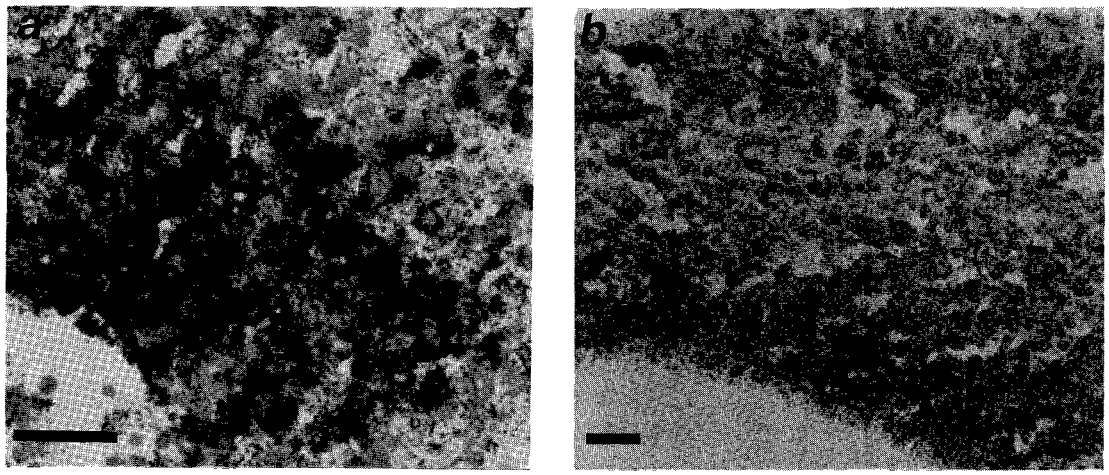


図2　ガラクトース受容分子の組織内分布　　スケールバーは 25μm



【文献】

(1) Bayna, E.M., Shaper, J.H. and Shur, B.D. (1988) Cell 53, 145-157

(2) Begovac, P.C. and Shur, B.D. (1990) J. Cell Biol. 110, 461-470

(3) 森田規之、長谷純宏、池中一裕、御子柴克彦（1987）第30回日本神経化学会大会論文集 634-636

(4) 森田規之、池中一裕、藤野一郎、小川正晴、御子柴克彦（1989）第13回神経科学学術集会予稿集 77

(5) Shur, B.D. (1982) J. Neurochem. 39, 201-209

75 不随意運動に対するＣｅｒｕｌｅｔｉｄｅの効果

宮本修，　板野俊文，　溝淵雅之*，　山口文徳**
徳田雅明，　松井秀樹，　大本堯史*，　細川清**，　畠瀬修
（香川医科大学・第一生理，脳神経外科*，精神神経**）

〔要約〕
6-hydroxydopaminによる回転モデルラットおよび、L-DOPAによりジスキネジアが誘発される一側中脳腹内側被蓋野破壊のサルを用いて、ceruletide（CLT）の不随意運動に対する効果を検討した。ラットにおいては、CLTの腹腔内投与によりapomorphineおよびamphetamine誘発の回転運動が約５０％抑制され、その効果は３日以上持続した。サルにおいては、CLTの末梢あるいは中枢投与によりL-DOPAおよびドーパミンにより誘発されるジスキネジアが１００％抑制され、その効果は長期間持続した。さらに、CLTは中枢で直接作用している可能性が示唆された。

（緒言）

神経ペプチドの一つであるコレシストキニン（CCK）は、脳内では８個のアミノ酸から成るオクタペプチド（CCK-8）が９０％以上を占めている[1]。CCK-8は黒質線条体系ではドーパミンニューロンと共存しており[2]、線条体ではドーパミン（DA）の作用を抑制するとされている[3]。近年CCK-8のアナログのceruletide（CLT）が、舞踏病,振戦などの不随意運動に対し有効で、かつその効果が長期間持続する例が報告されている[4]。

今回、CLTの作用機序を探る目的で、6-hydroxydopamine（6-OHDA）による回転モデルラット,および一側中脳腹内側被蓋野（VMT）破壊後にL-DOPAによってジスキネジアが誘発されるサル[5]を用いてCLTの効果の程度,持続期間,作用部位などの検討を行ったので報告する。

（実験方法）

１．ラットにおける実験

体重250-350gのＳＤ系雌ラットを用い、麻酔下に一側の黒質緻密質に6-OHDA 20μgを定位的に注入し、同部位を破壊する。破壊後３週間以降にapomorphine（APOM）1mg/kgあるいはamphetamine（AMP）2.5mg/kgをそれぞれ腹腔内投与して、１分間に７回以上回転するものを選んで実験に用いた。まず、CLT 200μg/kgを腹腔内投与し、２０分後,１日後,２日後にそれぞれAPOM 1mg/kgあるいはAMP 2.5mg/kg腹腔内投与し、回転数を測定した。

２．サルにおける実験

中国赤毛ザルおよび日本ザルの一側（右）のVMTに、lesion generatorを用いて、電気的熱凝固巣を作製した。術後、破壊側の散瞳,対側の上下肢の無動症状を呈した。このサルに一定量のL-DOPAを負荷すると、対側の上下肢と口舌に一定のジスキネジアが常に誘発される。

（ａ）L-DOPA 130mg/kgを経口投与し、投与後の行動変化（興奮の状態,四肢のchorea様運動と口舌のジスキネジアの程度,持続時間など）を観察した。

（ｂ）次に、CLT 50μg/kg筋注後、L-DOPAを（ａ）と同様に投与し、CLTのL-DOPA誘発ジスキネジアに対する効果を観察した。

（ｃ）中枢でのCLTの作用をみる目的で、まず日本ザルのVMT破壊側の尾状核背内側部にDA 40μg/kgを微量注入し、誘発されるジスキネジアの程度を観察した。次いで、CLT 20ng/kgを直接同局部に注入後、同量のDA注入により誘発

されるジスキネジアに対するCLTの効果を検討した。さらに、この中枢投与したCLTのL-DOPA誘発ジスキネジアに対する効果も検討した。

（結果および考察）

１．ラットの実験においては、あらかじめCLTを投与しておくと、投与当日では、APOMにより誘発される回転運動が、CLT投与前を１００とすると５３に減少した。さらに、CLT投与３日後でも抑制効果が持続していた。また、AMPによる回転運動に対しても同様の抑制効果を示した。CLTが、APOMおよびAMPによる回転運動を抑制することから、後シナプスドーパミンレセプターと拮抗している可能性が示唆された。しかし、CLTの作用点が終末からのDA遊離伝達機構にあることを示唆する報告もあり[6]、この点についてはさらに検討が必要である。

２．中国赤毛ザルにL-DOPAを経口投与すると、無動を呈していた左上下肢および口舌に、約１時間後から６時間続くジスキネジアが誘発された。次に、CLTを筋注し、２０分後にL-DOPAを経口投与しても、ジスキネジアは全く誘発されなかった。その９日後にL-DOPAを再投与してもジスキネジアは誘発されなかったが、１８日後にL-DOPAを再投与すると、CLTの投与前と同様のジスキネジアが誘発された。したがって、このサルにおいては、ジスキネジアに対するCLTの抑制効果は投与直後から発現し、９日以上持続することが判明した。

日本ザルを用いて、VMT破壊側の尾状核背内側部にDAを直接注入すると、その直後から対側上下肢に強いジスキネジアが誘発され、約２.５時間続いた。次に、微量（20ng/kg）のCLTを直接同部に注入し、その５分後に同量のDAを注入したが、ジスキネジアは誘発されず、DAの効果は全く抑制されていた。さらに、その３日後にL-DOPAを経口投与しても、ジスキネジアは出現せず、CLTの効果は持続していた。

臨床例でもCLTの１回／週の投与で、十分に臨床効果が得られることが報告されているが[7]、CLTの長期効果がラットおよびサルにおいても明かになった。また、CLTの効果の機序として、血液脳関門を通過して直接脳内に作用するのか、あるいは末梢の迷走神経を介して働くのか未だ明かではない[8)9)]。しかし、今回の我々の実験では、末梢あるいは中枢投与のCLTが、ともにDAのジスキネジア誘発作用を抑制したことから、CLTは中枢内で直接に長期間作用している可能性が示唆された。短い半減期にもかかわらずCLTの効果が長期にわたり持続する理由として、CLTがリセプターを介して細胞の機能を二次的に変化させている可能性もある[10]。しかしこの点については、CLTの脳内移行の問題も含めて、さらに詳しく調べていく必要がある。

（文献）

1)Dockray,G.J.(1980)Brain Res.188:155-165

2)Hökfelt,T.,Rehfeld,J.F.,Skirboll,L.,Ivemark,B.,Goldstein,M. and Markey,K.(1980)Nature 285:476-478

3)Hökfelt,T. and Holets,VR. (1986)Prog. Brain Res.68:33-70

4)大本堯史,三野章呉(1988)神経ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞの基礎と臨床:386-392

5)Ohmoto,T.(1987)Eur.Neurol.26(suppl.1):47-55

6)秋吉節,松下淳,池田正人,木原毅,松原且明(1990)神経ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞの基礎と臨床:269-277

7)大本堯史,三野章呉(1989)神経ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞの基礎と臨床:339-343

8)Ushijima,K. and Kawata,K. et al.(1984)Biomed. Res.5:117-122

9)Hamamura,T. and Kazahaya,Y. and Otsuki,S.(1989)Brain Res.483:78-83

10)鬼頭昭三,下山正憲,三好理絵(1990)神経ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞの基礎と臨床:38-42

76 脳におけるビリルビン結合性タンパクの簡便かつ迅速な検出法

青野幸子、仙波禮治、佐藤浩、柏俣重夫
（愛知県コロニー・研究所・周生期）

〔要約〕
ビリルビンに親和性をもつビリルビン結合性タンパク（BBP）を、簡便かつ迅速に検出する方法を開発した。この方法を用いて、ラット大脳および小脳における BBP について検討したところ、大脳には少なくとも 5 種類の BBP が見いだされ、分子量はそれぞれ 14K、15K、17K、18K、90K であった。一方小脳ではそれらに加え 30K、31K の BBP も見いだされた。14K および 90K のタンパクは可溶性タンパクであり、他は膜タンパクであった。15K・18K タンパクは小脳では核画分 P_1 を更に分画して得られた P_1D 画分に、17K タンパクは P_1A 画分に、30K タンパクは $P_1B \cdot P_1C$ 画分に、31K タンパクは $P_1C \cdot P_1D$ 画分に主に分布していた。

遺伝的に高ビリルビン血症を示す Gunn ラット（1）ホモ接合体（j/j）では、新生仔期に侵入したビリルビンが原因で高度な小脳発育障害（小脳低形成）が誘発されるのみならず、種々の条件下で大脳基底核や小脳内顆粒細胞層にビリルビンによる限局性黄染が観察される（2）が、これらのビリルビン性脳障害の成立機構は未だ十分には解明されていない。ビリルビンの標的部位を明らかにするために、我々は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）および electro-blotting 法と ^{14}C-ビリルビンによるオートラジオグラフィーを組み合わせて BBP を検出する方法を開発し、ラット小脳における BBP を検索したところ、小脳には少なくとも 6 種類の膜 BBP の存在が明らかになった（3）。しかし、^{14}C- および ^{3}H-ビリルビンは価格も高く、またオートラジオグラフィー像を得るために日数を要するなど、この方法にはいくつかの短所がみられた。またこの方法では、牛血清アルブミン（BSA）よりビリルビンに対する親和性の高い肝グルタチオントランスフェラーゼ（GST）を BBP として検出することはできたが、BSA および Z タンパクに関しては必ずしも有効ではなかった。今回は、後二者を含め、ビリルビンに対してより親和性の低い BBP をより簡便かつ迅速に検出できるよう改良を加え、小脳・大脳において新たにいくつかの BBP の存在を認めることができたので報告する。

［材料と方法］BBP の検出法: ラット肝 GST、Z タンパク、BSA をニトロセルロース膜上に直接 dot blot するか、あるいは SDS-PAGE 後、Towbin ら（4）の方法に従い electroblot した。SDS-PAGE は Laemmli（5）の方法に準じて行い（6）、ポリアクリルアミドの濃度は 5-20 % とした。blot したニトロセルロース膜は blocking reagent として 1 % BSA (fraction V, BSA V; 15 μM) あるいは 卵白アルブミン（OVA; 23 μM）を含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 7.4）中で 1 時間インキュベートした。その後、0.2 ml の 0.1 N NaOH に溶解した 2 mg のビリルビン（Merck）を、最終濃度 0.002 % となるよう上記の緩衝液中に加え、更に 1 時間インキュベートした。蒸留水で軽く水洗後、Fouchet's reagent（7）に浸した。これらのビリルビン染色操作は室温、遮光下で行なった。ビリルビンの BSA および OVA に対するモル比はそれぞれ約 2.3、1.5 であった。小脳・大脳における BBP の検索: 断頭採取した 30 日齢 Sprague-Dawley 系ラット小脳および大脳を 4 倍量の 50 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 7.4）中で氷冷下ホモジェナイズした。105,000 x g、4 ℃ で 60 分遠心後、その上清および沈澱を試料として用いた。ホモジェネートを最終濃度として 3% SDS、10% グリセロール、1% メルカプトエタノール含有 0.0625 M トリス-塩酸緩衝液（タンパク可溶化用緩衝液; pH 6.8）中で 100℃、3 分間処理し、電気泳動用試料とした（100μg/20μl）。SDS-PAGE 後 electroblot し、上記のようにビリルビン染色を行なった。分子量のマーカーとしては低分子量測定キット（Pharmacia）を用い、タンパク定量は Lowry ら（8）の方法に従った。小脳に特徴的な BBP の細胞下分布: 7 頭の30 日齢ラットより採取した小脳を 9 倍量の 1 mM $MgSO_4$/0.3 M しょ糖/50 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 7.4）中で氷冷下ホモジェナイズし、そのホモジェネートを 900 x g、4 ℃で 10 分間遠心した沈澱を核画分とした。Tapia ら（9）の方法に従って、この核画分をしょ糖密度勾配遠心（53,000 x g、2 時間、4 ℃）にか

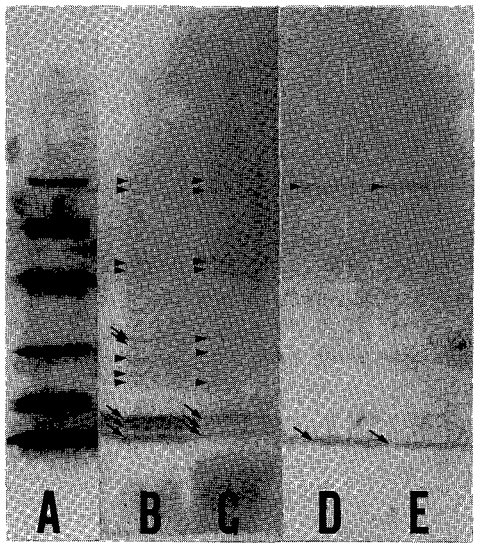


Fig. 1 Bilirubin binding proteins (BBPs) in the rat cerebellum. Ovalbumin was used as a blocking reagent. A, 0.1 % Amido Black staining; B-E, bilirubin staining. A, standard proteins (from bottom, 14.4, 20.1, 30, 43, 67 and 94 kDa); B and C, membrane proteins; D and E, soluble proteins; B and D, cerebellum; C and E, cerebrum. BBPs are indicated by arrowheads. Arrows indicate BBPs that are also detectable even in the presence of bovine serum albumin as a blocking reagent.

け再分画した。0.3-0.8 M、0.8-1.2 M、1.2-1.4 M の境界線上に集まった画分をそれぞれ P_1A、P_1B、P_1C、沈澱を P_1D とし、タンパク可溶化用緩衝液で処理し、電気泳動用試料とした（100μg/20μl）。

［結果］この方法を用いた場合、BBP は薄青色を背景に濃青色の dot あるいは band として検出された。blocking reagent として BSA V を用いた場合 GST が、OVA を用いた場合 GST、BSA、Z タンパクがビリルビン染色された。脳では、BSA V 存在下で 15K、17K、18K、30K、31Kの 5 種類の膜タンパクが染色され、以前の報告（3）を確認することができたが、OVA 存在下では更にいくつかの膜タンパクが陽性反応を示した（Fig. 1, B and C）。また、可溶性タンパクとして 14K、 90K の BBP が見いだされた（Fig. 1, D and E）が、前者は BSA V 存在下でも認められた。15K・18K タンパクは小脳のP_1D 画分に、17K タンパクは P_1A 画分に、30K および 31K タンパクは大脳には認められず、それぞれ小脳の P_1B・P_1C、P_1C・P_1D 画分に主に分布した。

［考察］今回の実験から、blocking reagent として BSA と OVA を使い分けることによって、ビリルビンに対する親和性の異なる BBP を検出できることが明らかになった。BSA 存在下で、脳において検出された 5 種類の膜タンパクおよび 1 種類の可溶性タンパクは BSA より強い親和性を持ち、OVA 存在下で検出可能となった他のタンパクは BSA より弱く、OVA より強い親和性を持つといえよう。

Tapia ら（9）によると P_1A 画分は large myelinated axon-segment、P_1B 画分は myelinated axon-segment、P_1C 画分は glomerulus particle、P_1D 画分は nucleus からなる。BBP の細胞下分布を考えると、15K および 18K タンパクは nucleus に、17K タンパクは myelinated-segment に存在する可能性が強い。30K・31K タンパクは小脳に特徴的なタンパクと考えられており（3）、Gunn ラットにみられる小脳発育障害や小脳 glomerulus に限局するビリルビン沈着（2）と密接に関連するタンパクである可能性も示唆される。

(1) Gunn, C. K. (1938) J. Hered. 29, 137-139. (2) Aono, S. and Kashiwamata, S. (1989) Med. Sci. Res. 17, 321-324. (3) Aono, S., Semba, R., Sato, H., and Kashiwamata, S. (1988) Bull. Japan. Neurochem. Soc. 27, 262-263. (4)Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354. (5)Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685. (6) Kashiwamata, S., Aono, S., and Semba, R. K. (1980) Experentia 36, 1143-1144. (7) Hawkinson, V., Watson, C. J., and Turner, C. R. H. (1945) J. Am. Med. Assoc. 129, 514-515. (8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275. (9) Tapia, R., Hajos, F., Wilkin, G., Johnson, A. L., and Balazs, R. (1974) Brain Res. 70, 285-299.

77 HIPPOCAMPAL CHOLINERGIC NEUROTROPHIC PEPTIDE (HCNP)の構造解析と合成ペプチドの生物学的活性

小鹿幸生*、小島深一**、植木靖之**、山本正彦*、
*名市大(医)第2内科　**住友製薬(株)研究所

〔要約〕 Hippocampal Cholinergic Neurotrophic peptide (HCNP) の構造決定を Chymotrypsin や Acylamino acid releasing enzyme による断片化、その断片のHPLCによる分取、アミノ酸組成分析と protein sequencer によるアミノ酸配列、更に Carboxpeptidase-Y による CooH-terminal アミノ酸の同定や、microidentification 法による NH_2-terminal アミノ酸の同定などにより行った。その結果、Acetyl-Ala-Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leu-OH が HCNP の構造と決定され、homology 検索により新ペプチドであることも判明した。また、Boc 法により<HCNP>と NH_2-terminal アミノ酸が block されていない<free-HCNP>を合成し生物学的活性を検討した。<HCNP>の16日目ラット培養中隔核の Ach 産生能に及ぼす ED_{50}は約120pg/ml,<free-HCNP>のそれは約6pg/ml であり、生体内では<free HCNP>が活性因子として作用している可能性が示唆された。

〔緒言〕 我々は海馬－中隔核系を用い、中枢神経系における標的組織由来 Neurotrophic factor の検索を実施し、海馬組織内に中隔核培養組織コリン作動性神経のアセチルコリン (Ach) 産生を促進する因子群が存在することを報告してきた[1)-5)]。これら因子群の内、分子量 5000 dalton 以下の micromolecule の一因子を精製し、最終標品のペプチド量は約4 μg であったこと、更にそのアミノ酸組成は Asx (1)、Glx(1)、Ser (1)、Gly (1)、Ala (3)、Pro (1)、Ile (1)、Leu (1)、Trp (1) であることも報告した[6)]。今回はこの成分の構造解析と合成ペプチドの生物学的活性について検討したので報告する。

〔方法〕 (1)ペプチドのアミノ酸配列は Applied Biosystems 社製 477A 型 Protein sequecerと120A型 PTH analyzer を用い実施した。 (2) Chymotrypsin 消化は、ペプチドを100 μl の 0.05M NH_4HCO_3 溶液に溶解、0.4 μg の Chymotrypsin (sigma)を添加、37°C で incubation、6時間後に更に 0.4 μg の Chymotrypsin を添加、終夜 incubation を実施した。 (3) Acylamino acid releasing enzyme (AARE) 消化はペプチドを 50 μl の 0.1M phosphato buffer (pH 7.2) に溶解、0.1Uの AARE(宝酒造)を加え、37°C で incubation、5 時間後と8.5 時間後に更に 0.05Uづつ AARE を添加、合計22.5時間 incubation した。 (4) Carboxy peptidase-Y(CP-Y)消化は、ペプチドを 340 μl の 100mM pyridine acetate buffer (pH 5.5)に溶解、110 pmol の CP-Y (宝酒造)を添加、37°C で incubation した。Incubation sample を経時的に少量づつ分取、95°C 2分間の加熱により反応を停止した。 (5)アミノ酸組成分析は、加水分解または PC-Y 消化により得られたアミノ酸を PTC アミノ酸に変換後、Pico-Tag アミノ酸分析システム(Water 社製)を用いて実施した。 (6)HPLC system；Chymotrypsin および AARE 消化産物は、逆相系カラムTSK-120T(4×250mm)を用いHPLCで分析、分取した。BufferはA：0.05%TFA, B：0.05%TFA+95% acetonitrile, 流速は1ml/minで実施、紫外部吸収 220nmと280nmで monitorした。 (7) Amino-terminal acylamino acid の同定は Tsunasawa,S. et al[7)]の方法に従い、microidentification 法を用いた。 (8)ペプチドの合成は、Beckman 社製 system 990 synthesizer を用い、Boc 法で実施した。保護基の除去はフッ化水素法を用い、合成ペプチドの精製は YMC－A363 (S-5) ODSカラムを用いHPLCで実施した。 (9)生物学的活性測定法は既報告[1)-6)]に従うが、本実験では胎令16日目のラット中隔核培養組織に合成ペプチドを添加、Ach 産生能に及ぼす影響について検討した。

〔結果および考察〕 精製されたHCNP約 0.5 μg を Protein sequencer とPTH analyzer により、その構造解析を試みたが PTH amino acid は検出されず、HCNP の NH_2-terminal は block されていると考えられた。精製 HCNP 0.8 μg を Chymotrypsin 消化後 HPLC で断片を分析した。保持時間 24分と36分に二つの peak(CH1, CH2) が認められ (図1)、同部を分取した。CH1のアミノ酸組成を検討後 protein sequencer にてアミノ酸配列決定を試み、Ala-Gly-Pro-Leu が得られた。Leu が CooH terminal アミノ酸であることは CP－Y 消化によるアミノ酸配列決定でも確認されたことから、H-Ala-Gly-Pro-Leu-OH と H-Ala-Gly-Pro-Leu-NH_2 の両ペプチドを合成、HPLCにて保持時間を比較検討し、CH1の CooH terminal は Leu-OH であると決定した。CH2は protein Sequencer でアミノ酸配列を決定することが出来なかったので、CP－Y消化によりその配列を試み、Ile-Ser-Gln-Trp がCH2の一部構造として明らかにされた。また、CH2を AARE 消化後HPLCで断片を分析、保持時間 37分に明らかな peak(CH2-AR1) が得られ、これを分取した。CH2とCH2-AR1 のアミノ酸組成の検討、更にCH2のCP－Yによるアミノ酸配列検討と CH2-AR1 の protein sequencer によるアミノ酸配列検討から、CH2は(Ala)－Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp のアミノ酸配列を有し、NH2-terminal アミノ酸である(Ala)は block されていると考えられた。

精製されたHCNP約2 μg を AARE 消化後HPLCで全行程を1ml／min／fraction に分画、分取した。保持時間

43分に明らかなpeak（AR1）が認められた(図2）。AR1はアミノ酸組成分析と Protein sequencer によるアミノ酸配列の検討から Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leu であると決定された。また、AARE により切断された NH_2-terminal アミノ酸を同定すべく、ＨＰＬＣの fraction 1～20までの各 fraction から少量の sample を分取、加水分解後アミノ酸組成分析を実施した。fraction3と4に Ala が同定されたが、他の fraction にはアミノ酸は同定されなかった。以上より NH_2-terminal アミノ酸は acyl-Ala であると考えられたので、各種の既存 acyl-Ala 誘導体とfraction3と4の acyl-Ala を Tsunasawa et al の方法[7]により比較検討し、ＨＣＮＰ の acyl-Ala は acetyl-Ala であると決定した。更に Acetyl-Ala-Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leu を合成、この合成ペプチドと精製されたＨＣＮＰのＨＰＬＣ における保持時間を比較、同一であることを確認しＨＣＮＰの全構造を決定した。また、このＨＣＮＰは homology 検索の結果、今までに知られていない新しいペプチドであることが判明した。

合成ペプチドの生物学的活性を検討すべく、精製したＨＣＮＰと同様 NH_2-terminal アミノ酸が acetyl 化されている<ＨＣＮＰ>と acetyl 化されていないＨＣＮＰ、<free-ＨＣＮＰ>を合成した。<ＨＣＮＰ>の中隔核培養組織の Ach 産生能に及ぼす影響を図3に示すが、<ＨＣＮＰ> は濃度依存性に Ach 産生能を増加しＥD_{50}は約 120pg/ml であった。このＥD_{50}は既報告[6]の精製ＨＣＮＰのＥD_{50}≒200pg/ml と類似するものと思われた。また、<free-ＨＣＮＰ>の中隔核培養組織の Ach 産生能に及ぼす影響を図4に示す。<ＨＣＮＰ>と同様濃度依存性に Ach 産生能増加を示すが、そのＥD_{50}は約6pg/ml と非常に低濃度であり、<free-ＨＣＮＰ>は<ＨＣＮＰ>に比較し、約20倍の生物学的活性を有している可能性が示唆された。このことから生体内では<ＨＣＮＰ>よりむしろ<free-ＨＣＮＰ>が活性因子として作用しているものと思われた。

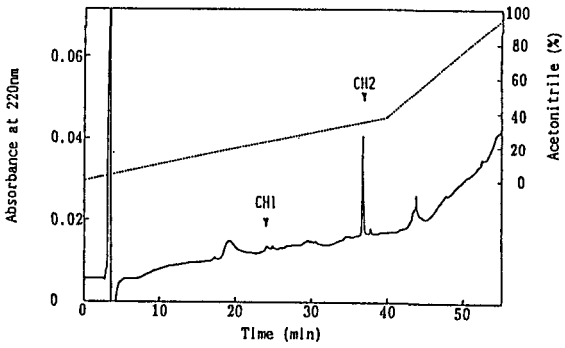


図1 HPLC chromatograph of chymotrypsin-digested peptide of HCNP

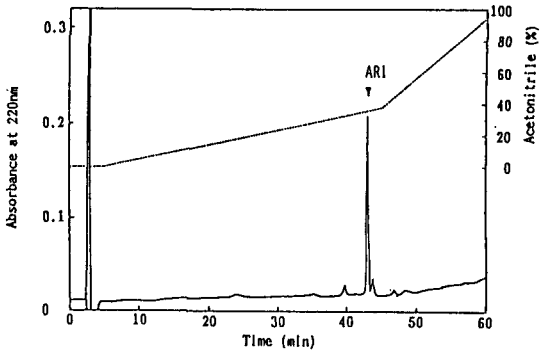


図2 HPLC chromatograph of AARE-digested peptide of HCNP

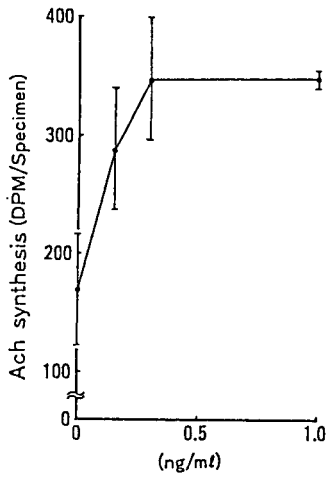


図3
<HCNP>の中隔核培養組織 Ach産生能に及ぼす影響

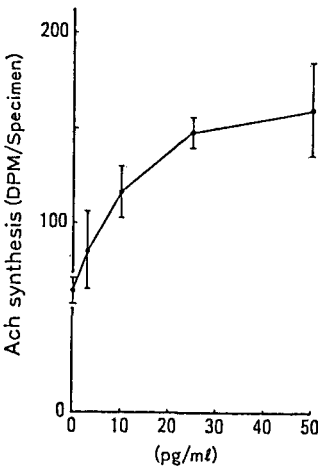


図4
<free-HCNP> の中隔核培養組織 Ach 産生能に及ぼす影響

〔文献〕：(1)Ojika, K. et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 81:2567-2571, 1984, (2)小鹿幸生 他、神経化学、23:351-353, 1984, (3)小鹿幸生 他、神経化学、24:493-495, 1985, (4)小鹿幸生 他、神経化学、25:412-414, 1986, (5)小鹿幸生, 薬物・精神・行動、7:447-451, 1987, (6)小鹿幸生 他、神経化学、28:374-375, 1989. (7)Tsunasawa, S. et al, Methods in Enzymology. 91:84-92, 1983.

78 鉄－DOPAによって惹起される脂質過酸化に対する黒質の感受性

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期大学部）

〔要約〕
鉄存在下にDOPAやdopamine，およびその代謝関連物質が惹起する脂質過酸化反応が Parkinson病における黒質神経細胞の変性・脱落に関与するならば，黒質と同様にこれらの物質を豊富に含む線条体においても同様の変化が起こる可能性がある．しかし Parkinson病脳の線条体の病理変化は軽微であることから，この反応に対する黒質と線条体の感受性に相違があることが期待される．この点を明らかにするために以下の実験を行い，黒質がこの反応に対してより脆弱であることを見いだした．生後12か月の雄ラットの黒質および線条体のホモジネートに Fe^{3+}-ADP cmplexとDOPAを作用させて，酸素消費量とthiobarbituric acid-reacting substance(TBA-RS) を測定し，脂質過酸化の指標とした．線条体に比べ黒質の酸素消費量は高度であり，TBA-RSの定量によっても脂質過酸化が黒質でより顕著であることが裏付けられた．この感受性の相違が Parkinson病の病因と関連する可能性を指摘した．

＜目的＞
Parkinson 病はdopamine作動性神経細胞の変性・脱落を主体とする変性疾患であり，dopamineおよびその代謝関連物質とParkinson 病の病因との関連が注目されてきた．私たちは前回の本学会で Fe^{3+}-ADP cmplexの存在下にDOPAやdopamineなどのcatecholが生体膜のリン脂質過酸化反応を惹起し，DOPAの作用が最も強力であることを見いだし報告した(1, 2)．またこの反応によって培養神経細胞が脱落し，黒質においても類似の機序による神経細胞の変性・脱落が生じる可能性を指摘した (3)．しかしDOPAやdopamine，およびこれらの代謝関連物質は鉄とともに黒質ばかりでなく線条体にも豊富に存在することが知られているが，Parkinson 病における線条体の病理学的変化は軽度であるとも事実である．もし鉄とDOPAによって惹起される脂質過酸化反応がParkinson 病の黒質変性の原因と関連するならば，黒質は線条体に比べ両物質によって惹起される脂質過酸化反応に感受性が高いことが予想される．今回はこの点を検証するためにラットの黒質と線条体を用いて，Fe^{3+}-ADP complexとDOPAが惹起する脂質過酸化を酸素消費量とTBA-RSを指標として検討したので報告する．

＜方法＞
1．生後12か月の雄ウイスターラットを0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4)を含む生理的食塩水で灌流・脱血後，中脳黒質と線条体（尾状核・被殻）を切り出した．氷冷下で10倍量の0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.4)を加えホモジネートを作成しsampleとした．これを直ちに以下の実験に用いた．

2．酸素消費量の測定にはInstech社製Oxygenometer（クラーク電極）を用いた．酸素消費量測定の反応系は，全容量を3.8mlとし，0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4)中で，A:sample (300μl) + Fe^{3+}(0.10 mM)-ADP(1.67 mM) complex + DOPA(0.05 mM)，B: sampleのみ，C: sample + Fe^{3+}-ADP complex，D: sample + DOPA，E: A + deferoxamine *mesylate*(0.2 mM)とした．各系とも37℃で30分間にわたって経時的変化を観察した．

3．TBA-RS測定系は添加試薬，濃度，緩衝系，温度を上記A～Eの反応系と同一として，全容量は2ml，sample 158μlを加えた．反応開始後10分および30分後の試料について，八木法によってTBA-RSを定量した．またsampleの蛋白量を定量し，蛋白量あたりのTBA-RSを求めた．

＜成績＞
線条体(CP)は，反応Aにより30分後には溶存酸素が約80 nmol/mlに低下した（図，CP-A）．黒質(SN)は，反応AによりCPよりさらに顕著な溶存酸素濃度の低下を示し，30分後にはほぼすべての溶存酸素が消費された（図，SN-A）．反応 Bでは CPにおいて溶存酸素の低下は軽度であったが（図，CP-B），SN（図，SN-B）ではこれにFe^{3+}-

ADP complexを加えたCPの変化（図，CP-C）と同程度の酸素消費がみられた．他の反応系(D，E)では CPにおいてCP-Bとほぼ同様の変化を示し，SN では SN-Bよりも酸素消費を抑制する傾向がみられ，CP-Bと類似の変化を示した（図，省略）．

TBA-RSの定量結果は，SNでは反応Aにより，10分後に0.44，30分後に1.69 nmol/mg protein，反応Cによりそれぞれ，0，0.17 nmol/mg protein であった．一方，CPでは TBA-RSは反応Aにより，0.61（10分），1.33 nmol/mg protein（30分），反応Cにより，0（10分），0.19 nmol/mg protein（30分）であった．他の反応系(B，DおよびE)では SNにおいても CPにおいてもTBA-RSは検出されなかった．

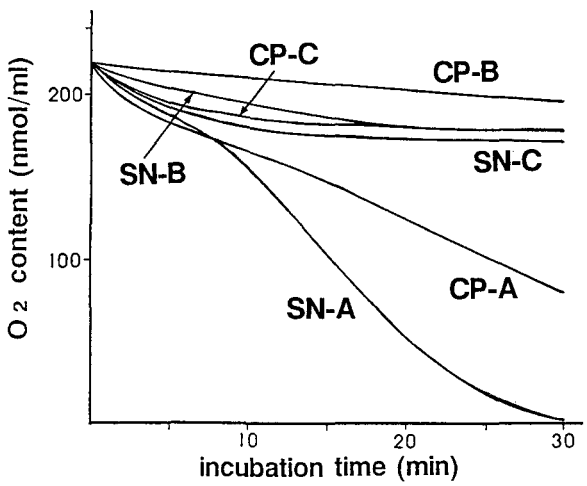
以上の成績から，Fe^{3+}-DOPA complex によって惹起される脂質過酸化は，酸素消費量を指標とした場合に黒質と線条体では著しく異なり，黒質において高度であることが明らかとなった．これはTBA-RSの定量からも裏付けられた．

＜考察＞

中脳黒質は鉄を多く含み，Parkinson 病ではこれがさらに高度であることが知られている(4)．またParkinson病患者の黒質には脂質過酸化物も増加しており，黒質神経細胞の変性・脱落に脂質過酸化反応が関与していることが示唆されている（5)．DOPA，dopamine，およびこれらの代謝関連物質が鉄存在下に強力な脂質過酸化を引き起こすことはin vitroでは明確である．しかしdopamine濃度が黒質よりさらに高く，鉄も豊富に存在する線条体は，Parkinson 病においても形態変化が少ないことも知られている．これをDOPAおよびその関連物質と鉄によって惹起される脂質過酸化の立場から説明しようとすれば，第一にDOPAまたはdopamineが鉄よりも過剰であるために，かえってこの反応を抑制している可能性（1)，第二に黒質と線条体では脂質過酸化に対する感受性が異なる可能性，第三に黒質神経細胞に含まれる melaninの関与する可能性などがあげられる．今回の検討から，黒質は線条体に比べDOPAと鉄による脂質過酸化反応に対して感受性が高いことが明らかになった．この感受性の相違の原因として黒質と線条体とでは，1）脂肪酸組成，2）脂質過酸化の阻害因子（α-tocopherol など）や助長因子（ascorbic acidなど）の含有量，3）鉄あるいはDOPAとの親和性，などが異っている可能性が考えられる．この黒質の脆弱性の原因を明らかにすることによって，Parkinson 病の病因解明の手がかりが得られる可能性があるため，今後さらに検討を加えてゆく必要があると思われる．

＜文献＞

(1)外松明美ら(1989) 神経化学 28:362-363. (2)田中　真ら(1989)神経化学 28:354-355. (3)田中　真ら(1990) 臨床神経 30:379-383. (4)Riederer, P. et al.(1989) J. Neurochem. 52:515-520. (5)Dexter, D.T. et al. (1989) J. Neurochem. 52:381-389.



図：Oxygenometerによる溶存酸素の経時的変化
SN = substantia nigra
CP = caudate and putamen （線条体）
-A，-B および -Cは，SN または CPを下記の反応A，BおよびCで処理することを示す．
A: sample + Fe^{3+}-ADP complex + DOPA
B: sample のみ
C: sample + Fe^{3+}-ADP cmplex

79 細胞内コリン作動性分化因子の部分精製とその性質

水野憲一、栗原堅三
（北海道大・薬・薬剤）

〔要約〕

レチノイン酸およびグリア細胞腫の培養液により分化した神経芽細胞腫ＮＧ１０８－１５の細胞内には、コリン作動性神経分化を誘導するタンパク性因子が発現する。このタンパク質の精製を試みた。

コリン作動性の神経芽細胞腫ＮＧ１０８－１５細胞は、レチノイン酸あるいはＣ６グリア細胞腫の培養液（ＧＣＭ）により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）活性が増加する。このような異なる外因性因子による細胞刺激は、作用点は異なっていても同じ細胞内シグナルに変換され、同じ分化形質の発現が起こることが考えられる。われわれはコリン作動性神経分化のモデルとしてＮＧ１０８－１５細胞を用い、レチノイン酸またはＧＣＭで刺激した細胞の細胞質画分を未処理の細胞に導入することにより、ＣｈＡＴ活性が増加することを報告した（１）。このことはレチノイン酸あるいはＧＣＭの刺激により発現するコリン作動性神経分化に関与する細胞内のシグナルの存在を示唆する。

一方、レチノイン酸あるいはＧＣＭによるＣｈＡＴ活性の増加は、ＮＧ１０８－１５細胞のみならず、副腎随質由来のＰＣ１２細胞、ラット胎児脳の初代培養細胞でもみられる（２、３）。またわれわれはレチノイン酸およびＧＣＭによりＣｈＡＴ活性が増加する細胞では、分子量約 27 kDa (27 K) のタンパク質のリン酸化の増加が共通してみられることをから、コリン作動性分化に対して 27 K タンパク質リン酸化が関与している可能性を示唆した（３、４）。今回細胞質画分を細胞内に導入することにより、ＣｈＡＴ活性を増加させる細胞内コリン作動性分化因子を部分精製すると同時に、各フラクションについて 27 K タンパク質のリン酸化活性を検討したところ、ＣｈＡＴ活性を増加させる画分に 27 K タンパク質リン酸化活性が含まれることが確認されたので報告する。

実験方法

レチノイン酸で１２時間から２日間刺激したＮＧ１０８－１５細胞を 20 mM Bis-tris propan pH 7.0, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.1 mM PMSF でホモジナイズし、500 x g, 10 min の遠心上清をさらに100,000 x g, 1 hr 遠心し，細胞質画分を得た。この画分を 20 - 40 % の硫安沈澱を行い、Sephacryl S-300 によるゲルろ過、Mono Q によるイオン交換クロマトグラフィーにより部分精製を行った。コリン作動性分化誘導活性は、各フラクションをリゾフォスファチジルコリンによる方法で細胞内に導入し、導入後４日目の細胞のＣｈＡＴ活性を測定することにより検討した。タンパク質リン酸化変化は、未処理のＮＧ１０８－１５細胞のホモジネートと各フラクションを [γ-^{32}P]ATP と 30 ℃、2 分間インキュベートし、SDS-PAGE を行った後にオートラジオグラフィーで比較した。

結果

細胞質画分に含まれるコリン作動性分化誘導活性は、レチノイン酸を作用させてから１２時間から２４時間でピークとなる。レチノイン酸で刺激した細胞の細胞質画分を、50 mM KCl 存在下でゲルろ過を行うと、分子量約 60 kDa の画分 (Fraction No. 6, 7) にコリン作動性分化誘導活性がみられたが、150 mM KCl 存在下でゲルろ過を行うと分子量約 60 kDa (Fraction No. 6, 7) と 30 kDa (Fraction No. 9, 10, 11, 12, 13) の２つのピークに分かれた（図１）。一方 27 K タンパク質のリン酸化も、レチノイン酸を作用させてから１２時間でピークとなる。同じゲルろ過の画分でリ

ン酸化を比較すると 27 K タンパク質のリン酸化も 50 mM KCl 存在下では 60 kDa (Fraction No. 6, 7) の単一ピークを得たが、150 mM KCl の条件では 60 kDa と 30 kDa (Fraction No. 10, 11, 12, 13) の２つのピークに分かれた（図２）。これらのリン酸化活性のピークはいずれもＣａ依存的であり、0.5 mM EGTA 存在下で阻害された。ゲルろ過による 60 K 画分について Mono Q によるイオン交換クロマトグラフィーを行ったところ、コリン作動性分化誘導活性を有する画分と、27 K タンパク質リン酸化活性を有する画分は一致した。

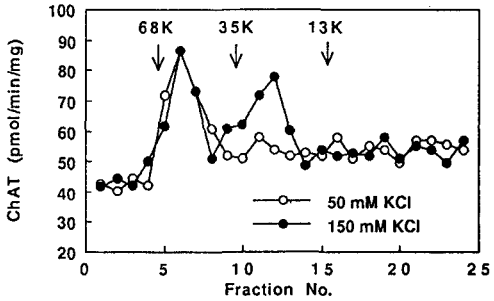


図１　Sephacryl S-300 によるゲルろ過画分のコリン作動性分化誘導活性

50 mM KCl（○）存在下および 150 mM KCl（●）存在下でゲルろ過を行ったときの各画分のコリン作動性誘導活性を示した。

考察

27 K タンパク質リン酸化の増加は、Ｃａ依存的であること、cAMP や cGMP に依存しないこと、H-7 や EGTA によりリン酸化が阻害されることなどから、27 K リン酸化タンパク質はＣａ依存性タンパク質リン酸化酵素の基質であると考えられる。27 K タンパク質リン酸化増加が、基質の量的な変化であるのか、タンパク質リン酸化酵素の活性化によるものであるのかは不明である。しかしクロマトグラフィーによる各画分のみでリン酸化反応を行っても 27 K タンパク質のリン酸化変化はみられず、27 K タンパク質リン酸化がみられない未処理の細胞のホモジネートを加えてリン酸化反応を行うと、27 K タンパク質リン酸化がみられる画分が存在することから、少なくとも 27 K リン酸化タンパク質はタンパク質リン酸化酵素ではないと考えられる。現在さらに精製を進めているが、27 K タンパク質リン酸化増加がコリン作動性神経分化に対して直接関与している可能性が示唆された。

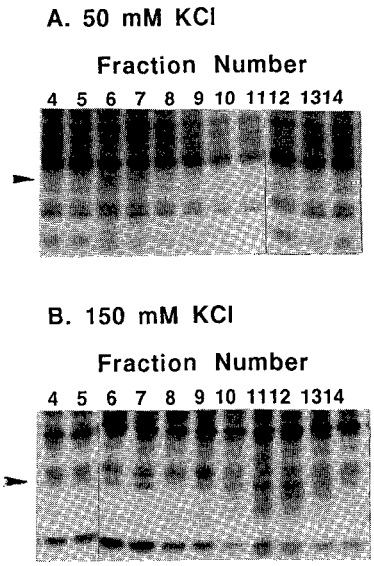


図２　Sephacryl S-300 によるゲルろ過画分の 27 K タンパク質リン酸化活性

50 mM KCl（A）存在下および 150 mM KCl（B）存在下でゲルろ過を行ったときの各画分のタンパク質リン酸化活性を表わした。矢印に 27 K タンパク質を示した。

参考文献

1) 水野憲一、栗原堅三 (1989) 神経化学 **24**, 86-87
2) Mizuno, N., Matsuoka, I., and Kurihara, K. (1989) Dev. Brain Res. **50**, 1-10
3) 水野憲一、栗原堅三 (1989) 生化学 **61**, 893
4) Matsuoka, I., Mizuno, N., and Kurihara, K. (1989) Brain Res. **502**, 53-60

80 組み換え型ヒト塩基性線維芽細胞成長因子（rhbFGF）の初代培養中隔野アセチルコリン神経細胞に対する神経栄養効果について： cytosine-1-β-D-arabinofuranoside (Ara-C)存在下における作用

寿野正廣、 福元宏明、 垣花 満
（武田薬品、生物研究所）

〔要約〕
組み換え型ヒト塩基性線維芽細胞成長因子（rhbFGF）は神経栄養因子（NTF)様作用を有する。今回、rhbFGFが脳神経細胞に直接作用するのか、あるいはアストログリア細胞を介して作用するのかを明らかにする目的で、増殖阻害剤、cytosine-1- β-D-arabino-furanoside（Ara-C）の影響について検討した。妊娠17日目のラット胎仔脳より採取した中隔野神経細胞を、無血清完全合成培地で初代培養した。 Ara-C（10^{-6}M)存在下においては、アストログリア細胞の増殖が抑制された。 Ara-C存在下に、種々の濃度のrhbFGF（0.1 ～100 ng/ml)を添加すると、濃度依存的に中隔野神経細胞の choline acetyltransferase（CAT）活性、ならびにアセチルコリン（ACh)量の著明な増加が認められた。その作用は、30 ng/mlの濃度で最大に達し（ED_{50}: 約 3 ng/ml）、Ara-C 非存在下におけるよりも著明であった。rhbFGFの修飾タンパク、CS23も同様の作用を示した。本条件下において、rhbFGFと神経成長因子（NGF)のACh 量に対する作用を比較すると、rhbFGFの方がはるかに強力であることが分かった。また、rhbFGFとNGF を共存させた場合、ACh 量は相加的に増加した。以上の結果から、rhbFGFは中隔野神経細胞に直接作用し、栄養因子様作用を発現するものと推察された。

〔目的〕
我々は、昨年度の本学会において、組み換え型ヒト塩基性線維芽細胞成長因子（recombinant human basic fibroblast growth factor: rhbFGF)が脳神経細胞に作用して、神経栄養因子(NTF）様作用を示すことを報告した(1)。すなわち、rhbFGFは初代培養中隔野および海馬神経細胞に対して、生存延長作用、神経突起伸長作用、およびアセチルコリン（ACh）量の増大を惹起する。しかし、rhbFGFは、脳アストログリア細胞に対して増殖因子として働き、神経成長因子（NGF)の分泌を促進する（昨年度の本学会にて発表(2)）。従って、rhbFGFが先ずアストログリア細胞に作用し、その結果誘発された NGFが NTFとして作用している可能性が考えられる。この事を確かめる目的で、増殖阻害剤によってアストログリア細胞の増殖を抑制し、rhbFGFの作用がいかなる影響を受けるかについて調べた。

〔方法〕
中隔野神経細胞は、妊娠17日目のラット胎仔脳より採取した。トリプシン処理、濾過、および遠心操作により単離神経細胞を得た。血清を含まない完全合成培養液 DME/F12/N2 培養液に浮遊させた神経細胞を、予め poly-L-ornithine（100 μg/ml）で処理した培養皿に 1×10^{6} cells/cm^2 の割合でseeding した。培養開始後 4時間目に 0.1% ovalbumin/PBS で希釈したrhbFGF、あるいは NGFを添加し、さらに 4日間培養した。増殖阻害剤は培養開始後、最初の 2日間処理した。ACh の定量は既報の方法によった(3)。また、CAT 活性の測定は、畠中等の方法を用いた(4)。有意差検定には、shef-fe's test および Dunnett's t-test を用いた。rhbFGFおよびその修飾タンパク、CS23は当研究所で作成された。

〔結果および考察〕
中隔野神経細胞を、種々の濃度のAra-C（3×10^{-7}M, 10^{-6}M または 3×10^{-6}M)で処理し、rhbFGFを添加した時の蛋白量（細胞増殖）とACh 量の変化を Table Iに示す。 Ara-C存在下では、いずれの Ara-C濃度においてもrhbFGFによる蛋白質量の上昇はほぼ完全に抑制された(このrhbFGFによって増殖する細胞は、アストログリア細胞の特異的抗原、GFAPに対する染色から、主としてアストログリア細胞であった）。 一方、 ACh量は Ara-C非存在下で、rhbFGFの添加によって有意に増加したが、このACh 量の増加は Ara-C処理によって更に増強された。wellあたりに換算した場合、 Ara-C非存在下では1.3 倍の上昇であるのに対して、存在下では、約２倍の上昇を示した。このことは、単位蛋白あたりのACh 量で表現するとより顕著であった。以上の結果は増殖阻害剤として FdU/Uを用いて場合においても同様であった（Table I)。

Fig. 1に蛋白量およびACh 量に及ぼすrhbFGFとNGF の濃度依存性を示す。蛋白量は（Fig. 1, A)、 Ara-C非存在下においては、rhbFGFにより濃度に依存した著明な増加が認められた。 Ara-C存在下においては、rhbFGF 0.1-3 ng/mlの間でほぼ完全に抑制され、10 ng/ml以上の濃度では若干増加する傾向を示した。しかし、その増加率は Ara-C非存在下と比較すると軽度であった。 一方、ACh 量は、 Ara-C存在下において、rhbFGFの濃度 0.1～10 ng/mlの間で、濃度依存的な、極めて著明な増加が認められ、10 ng/ml以上の濃度で最大になった。この濃度においては、 Ara-C非存在下では、逆に抑制される傾向を示した(Fig.1, B,C)。NGF は中隔野神経細胞の ACh量を増加させることが知られているが、図にみられるよ

うに、 Ara-C存在下におけるrhbFGFの方が、はるかに強力であり、NGF が 1.5倍の増加に対して、rhbFGFは約3倍の増加を示した。 Fig. 2に Ara-C存在におけるrhbFGFの CAT活性に及ぼす影響を示す。ACh 量の変化とほぼ同様の、濃度依存的な活性の上昇が認められた。ED_{50}は、3 ng/ml であった。 rhbFGFの安定な修飾タンパクCS23も同様の作用を示した。

最後にrhbFGFとNGF の併用効果について検討した(Fig. 3)。低濃度のrhbFGF (3 ng/ml)とNGF (100 ng/ml) および高濃度のrhbFGF (100 ng/ml)と NGF (100 ng/ml)、それぞれ Ara-C非存在下および存在下における ACh量に及ぼす影響を調べた。いずれの条件においてもrhbFGFとNGF の作用は相加的であり、 Ara-C存在下において極めて著明な ACh量の増加が認められた。以上、rhbFGFが中隔野神経細胞に作用してACh 量ならびにCAT 活性を上昇させること、その作用は増殖阻害剤の存在下で著明な増強を受ける事を示した。アストログリア細胞から NGFを始め種々の栄養因子が分泌されていることが知られている。しかし、増殖阻害剤によりアストログリア細胞の関与を無くした場合、rhbFGFのNTF 様作用は消失しないのみか、逆に増強された。従って、rhbFGFはアストログリア細胞を介して作用しているのではなく直接ACh 神経細胞に作用しているものと推察される。また、アストログリア細胞の増殖を抑制することによってrhbFGFの作用が増強されるという現象は極めて興味深い。現在のところ、どの様なメカニズムによっているのか明らかではないが、FGF と神経細胞とグリア細胞との相互作用を考える場合、重要な示唆を与える現象であると思われる。

〔文献〕 1) 垣花 満、寿野正廣；神経化学、28, 394-395 (1989)
2) 福本宏明ら；神経化学、28, 392-393 (1989)
3) 垣花 満ら；Jpn. Soc. Neurochem., 27, 166-167(1988)
4) 畠中 寛ら；Devel. Brain Res., 30, 47-56 (1986)

Table I Effects of various concentrations of cytosine-1-β-D-arabinofuranoside (Ara-C) or fluorodeoxyuridine/uridine (FdU/U) on ACh content induced by rhbFGF in the septal neurons.

	Protein	ACh content	
	μg/well	p mol/well	p mol/mg protein
Without Ara-C (or FdU/U)			
control	70.7±1.2	16.6±0.5	234±7
rhbFGF	82.5±1.0*	22.0±0.3*	267±3
Ara-C (3×10^{-7}M)			
control	56.7±0.7*	23.7±0.6*	418±11*
rhbFGF	58.8±0.8*	39.7±0.3* #	676±12* #
Ara-C (10^{-6}M)			
control	52.7±1.2*	16.1±0.4	307±13*
rhbFGF	54.2±0.9*	31.6±0.6* #	584±12* #
Ara-C (3×10^{-6}M)			
control	49.9±1.3*	15.4±0.6*	309±12*
rhbFGF	48.7±0.7*	28.3±0.5* #	583±12* #
FdU/U (15/35 μg/ml)			
control	58.0±2.1*	15.7±0.8	273±23
rhbFGF	53.7±1.4*	33.2±0.6* #	621±26* #

Concentration of rhbFGF was 3 ng/ml. Values are the mean±S.E.M. of 4-5 wells. *p<0.01 vs. control without Ara-C (or FdU/U). #p<0.01 vs. control with Ara-C (or FdU/U).

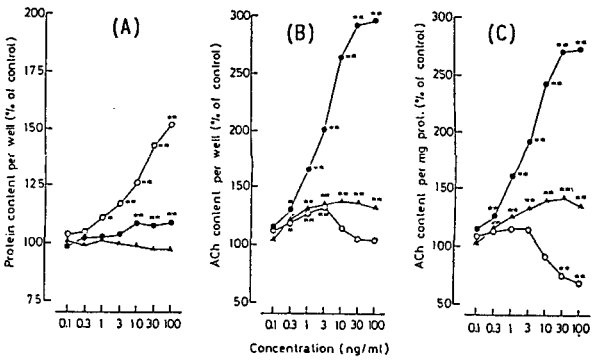


Fig. 1 Effects of various concentration of rhbFGF and NGF on protein(A), ACh content per well(B) and ACh content per mg protein(C).
○; rhbFGF without Ara-C, ●; rhbFGF with Ara-C, ▲; NGF with Ara-C
*p<0.05, **p<0.01 vs. control (without drugs)

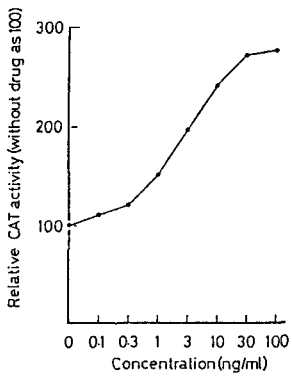


Fig. 2 Effect of rhbFGF on choline acetyltransferase (CAT) activity.
Septal neurons suspended in DME/F12/N2 medium were seeded at a density of approximately 5×10^5 cells/cm². rhbFGF was added 4 h after the seeding and cultured for 4 days. The neurons were treated with Ara-C (10^{-6}M) during the first 2 days.

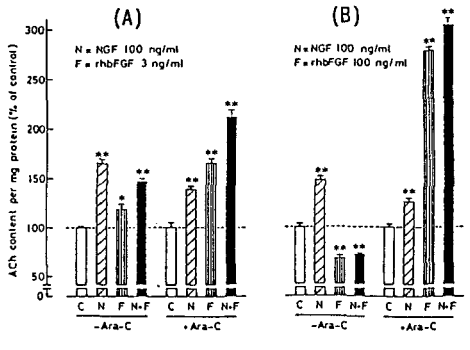


Fig. 3 Effect of the combination of low (A) and high (B) concentration of rhbFGF with NGF on ACh content in septal neurons.
Each bar represents the mean ± S.E.M. of 5-6 wells. *p<0.05, **p<0.01 vs. control (letter C in figure).

81

成熟交感神経細胞のＮＧＦ除去伴う変性Ⅰ 一過性の細胞質性酵素放出の機構

田中 秀逸, 小池 達郎

(佐賀医大 ・化学)

〔要約〕

ラットの上頸神経節（SCG）細胞は、長期（３～５週間）培養すると神経成長因子（NGF）に依存せず生存するが、培地から NGF を除去すると変性することが判った。その変性は ３つの独立した過程からなり、(1)突起先端部での growth cone の消失・突起の短縮化、(2)細胞の収縮、(3)一過性の細胞質性の酵素アデニル酸キナーゼ（AK）の放出が起こることが判った。この(3)の過程をさらに詳しく調べてみると、放出は高 K^+ ， 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate（TPA），8-(4-chlorophenylthio)-cAMP（CPT-cAMP）により抑えられた。 TPA の効果は H-7 で抑えられることからＣキナーゼ系を介するものと考えられる。高 K^+ の効果は H-7 では阻害されず TPA とは別の系路で働いていることが解った。一方細胞死は高 K^+ 、 CPT-cAMP により阻止されるもののＣキナーゼの活性化によっては阻止されなかった。 NGF 除去は細胞にＣキナーゼ・Ａキナーゼの down regulation をもたらし、これが膜の不安定化に関わると考えた。

ラットの交感神経節のひとつである SCG の細胞は、その生存と分化に NGF を必要とする。この細胞の生存への NGF 依存性は、細胞内 Ca^{2+} 濃度によって変化すること、すなわち細胞内 Ca^{2+} 濃度が高まるように処理すると細胞は NGF 除去後も生存可能になることを見いだした[1]。この細胞は、長期培養すると、 NGF に依存せず生存可能となることが知られているが[2]、我々は細胞内 Ca^{2+} 濃度も３週間内に徐々に高くなることを見いだした[3]。さらに、３週間以上培養した SCG 細胞では NGF 除去により、(1)突起先端部での growth cone の消失・突起の短縮化、(2)細胞の収縮、(3)一過性の細胞質性酵素 AK の放出 の３つの独立した変性過程がおこることを見いだした。今回、特にこの一過性の細胞質性酵素の放出について調べたので報告する。

[実験方法]

SCG 細胞の培養：ラット新生児から SCG を単離し、コラーゲナーゼ処理後コラーゲンコートした 48well plate にまいた（0.3神経節／well）。細胞は10%牛胎児血清，50 ng／ml NGF を含む MEM 培地で培養した。

細胞死のアッセイ法：NGF の除去は培地中に0.5%のマウス NGF に対する抗体を加え、 NGF を中和することによりおこなった。抗体添加後48時間おきに換えた培地中及び細胞内の AK 活性を測定した。 AK は通常では３～６%培地中に放出されるが細胞死に伴ない20～50%放出される。

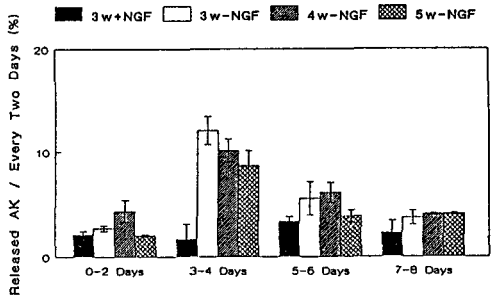


図１．培養時間に伴う細胞生存の NGF 依存性の低下
□は培養時間（週）を示す。

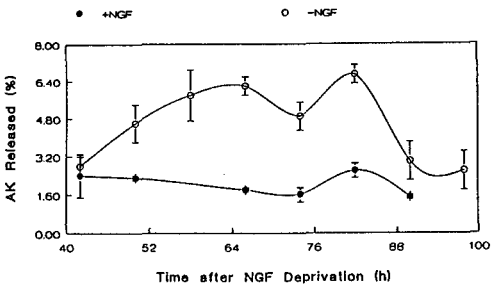


図２． NGF 除去に伴う成熟 SCG 細胞での一過性の AK 放出
培地は８時間おきに換えその AK 活性を測定した。

［結果と考察］

新生児ラットより単離した SCG 細胞は、約３週間の培養で NGF がなくても生存可能となる。図１は、 NGF 除去後の細胞死を培地中に放出される AK 活性の割合で見たものである。３～５週培養すると幼若 SCG 細胞の細胞死の指標となる NGF 除去後０～２日の AK 放出がなくなり２～５%となった。この値は NGF 存在下での放出量と同じであり、細胞は NGF がなくても２週間以上生存していた。さらに、３～５週間培養した細胞では NGF 除去後３～４日に10～15%の一過性の AK 放出が見られた（図１）が生細胞数に変化はなかった。この一過性の AK 放出は、やはり NGF 除去後におこる突起先端部での growth cone の消失・突起の短縮化，細胞の収縮とは関係なくおこっていた。３～４日の AK 放出は、図２に示すように、 NGF 除去48時間以後に徐々に放出されはじめ60～80時間後をピークとして90時間頃まで続いた。またこの AK放出は、高 K^+ 培地にすること，培地に CPT-cAMP ，ホルボールエステルのひとつである TPAを加えることにより完全に抑えられた（図３－Ａ）。 TPA（10 nM）による AK 放出の抑制は H-7（10 μM）を同時に処理することで見られなくなることから、この TPA の効果へのＣキナーゼ系の関与が考えられる（図３－Ｂ）。高 K^+（40 mM）の効果は、培地中の Na^+ 濃度を高めることでは再現できなかった。このことから、高 K^+ による細胞の脱分極が AK 放出の抑制を導いているものと推測される。現在、 NGF 除去後の細胞内 Ca^{2+} 濃度との関係を調べている。また３～４日の AK放出は、 NGF を除き48時間後再び NGF を加えることでは完全に抑えることができないにもかかわらず高 K^+ の効果は48時間後からでも十分に働いた（図３－Ｃ）。これらは高 K^+ の効果が非常に急性に働くことを示している。高 K^+ の効果は H-7 で阻害されない（図３－Ｃ）ことから、脱分極がＣキナーゼ系とは別の系路で AK 放出抑制に働いていると思われる。CPT-cAMP は幼若細胞の細胞死を抑えるが NGF の作用機構とは異なっており[4]、physiological な効果ではないかもしれない。現在のところ AK 放出の機構は不明であるが、 NGF 除去後のＣキナーゼ・Ａキナーゼの down regulation が細胞膜に変化を生じさせ、一過性に細胞質性の酵素が放出されるのではないかと考えている。若い SCG 細胞の NGF 除去による細胞死はＣキナーゼの活性化によって遅延されるものの阻止されないことから、幼若 SCGの系では膜変化と killer 蛋白質の生成とがカップルしていることを示唆していると思われる。生体での意義を考えると、栄養因子欠乏の危機をグリア細胞に伝えるシグナルの放出に伴うものとも考えられる。これらの事柄も含め解析を進めている。

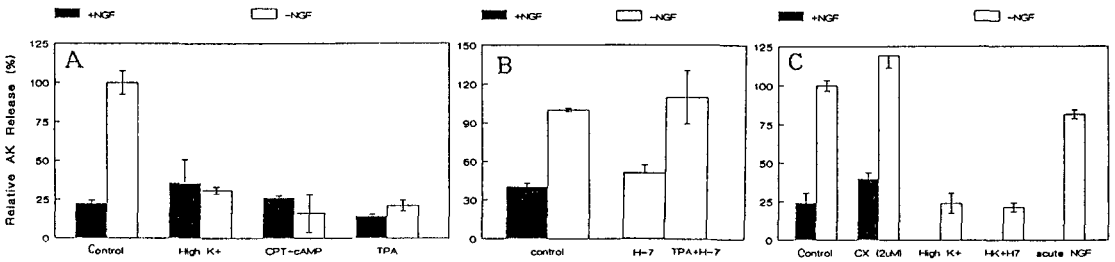


図３． NGF 除去後３～４日に見られる一過性の AK 放出

対照での３～４日の AK 放出量を100%とした相対値で示した。

Ａ：高 K^+, CPT-cAMP, TPA による AK 放出抑制； Ｂ： AK 放出を抑える TPA の効果；

Ｃ： AK 放出を抑える高 K^+ の効果, High K^+, cycloheximide(CX), acute NGF は NGF 除去48後に加えた。

［参考文献］

1. T. Koike et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6421-6421(1989)

2. K. J. Lazarus et al., Brain Res., 113:159-164(1976)

3. T. Koike and S. Tanaka, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Neurobiology, TX, USA, April, 1990; J. Cell. Biochem. 14F, 90(1990)

4. R. E. Rydel and L. A. Greene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,85:1257-1261(1988)

82 牛脳由来神経細胞生存維持因子の同定

武井延之，近藤 淳*，長池一博*，高坂新一
（国立精神・神経センター，神経研，代謝，
*三菱化成，総研）

〔要約〕
牛海馬組織の抽出液中に存在する神経細胞生存維持因子を同定し、その作用についてラット胚の大脳皮質ニューロンの初代培養系を用いて検討した。硫安沈澱，イオン交換，ゲル濾過により部分精製した生存維持因子を抗原としてウサギに免疫し、活性を中和する抗体を得た。その抗体の認識する蛋白をウェスタンブロットにより調べたところ、分子量44KDaのバンドが認められた。この44KDa蛋白のアミノ酸配列を調べ、データベース上で検索したところニューロン特異的エノラーゼ(NSE)と同一である事が判明した。さらに市販のNSE標品も初代培養大脳皮質ニューロンに対して用量依存的に同様の生存維持作用を示した。また我々の部分精製した因子は抗NSE抗体と交叉し、またNSEは我々の調製した抗体と交叉した。以上の事より、脳組織抽出液中に存在する神経細胞生存維持因子の少なくともひとつはNSEである事が明らかとなった。

中枢神経系における神経細胞の分化、成熟あるいは生存維持といったプロセスにおいて神経栄養因子と呼ばれる一群の物質が重要な役割をはたしている事が明らかにされつつある。我々も脳組織の抽出液中に神経栄養因子活性が存在する事をラット胎児の大脳皮質の初代培養系を用いて明らかにしてきた(1)。その結果牛海馬の抽出液中に神経細胞の生存を維持する因子がある事を認め、部分精製してきた(2)。今回、自家調製した抗体を用いた方法により、この因子を同定し、その作用を調べた。

〔実験方法〕

・生存維持活性の測定

胎生16日のラット大脳半球を摘出し、0.1% トリプシン／0.015 DNase Iで消化し、分散した。Poly-L-lysineでコートした24 wellのプレートに5 x 10^4 cells/mm^2の細胞密度で播種し、1%牛胎児血清およびinsuline, transferrin, selenium, putrescineを含むMEM培地で培養する。部分精製した因子や各種抗体等は培養開始より24時間後に添加し、さらに5〜6日間培養を続けた後、1 mm^2あたりの生細胞数を位相差顕微鏡下で数視野計測し平均値をもとめた。

・神経細胞生存維持因子の同定

既報の通り(2)、牛海馬抽出液の30〜80%硫安分画をDE-52に吸着させ、200 mM NaClで溶出したものに活性が認められたため、この分画を更にDE-52のイオン交換クロマトグラフィーにかけ50 mM〜200 mMのNaCl濃度のliner-gradientで溶出した。またここで得られた活性分画をゲル濾過し、分子量50KDa以下の分画を抗原としてウサギに免疫し抗体を得た。

・アミノ酸配列の決定

上記抗体を用いたウェスタンブロットにより染色されてくる蛋白バンドをポリアクリルアミドゲルより切り出し、抽出してHPLCにて精製後、酵素で消化した。逆相HPLCにて断片を得、気相式のアミノ酸シークエンサーにより、このペプチド断片の配列を決定した。

〔結果と考察〕

DE-52によるクロマトグラフィーの結果、生存維持活性はNaCl濃度120 mMと200mM付近に回収された（図1）。それぞれをF14，F23と名付けた。予備的なゲル濾過の実験から、これらの因子の分子量は50KDa以下である事が予測されたため、F14，およびF23をゲル濾過にかけ、各々50KDa以下の分画を集め、ウサギに免疫した。生存活性の阻害を指標として抗体を

得た（図2）。F14，F23各々の活性を阻害し、しかも交叉しない二つの抗体、aF14とaF23が得られた。次にこの抗体が認識している蛋白の分子量を知るためにウェスタンブロットを行った。aF14はF14の約30KDaの蛋白をaF23はF23の約44KDaの蛋白をそれぞれ認識していた。そこでこのF23の44KDaのバンドをゲルから切り出し、アミノ酸配列を調べたところ二つのペプチド断片のアミノ酸配列が得られた（表1）。この配列をデータベースで検索した結果ラットのニューロン特異的エノラーゼ(NSE)と同一である事が判明した。

そこで市販のNSEおよび抗NSE抗体を用いてウェスタンブロットおよびニューロンの生存維持アッセイを行った。aF23はNSEを認識し、抗NSE抗体はF23の44KDaの蛋白を認識した。さらに市販のNSEは神経細胞に対し生存維持作用を有しており、その作用は用量依存的であった（図3）。以上の事よりF23の44KDa蛋白はNSEと同一でありNSEには神経細胞生存維持活性がある事が明らかになった。

NSEは神経細胞に特異的に存在するエノラーゼアイソザイムであるが、なぜ神経系に特異的であるのかは不明であった。さらにNSEの脳内での発現はニューロンの発達過程によく並行しており、NSEが正常な発達過程において、あるいは損傷時などの急性期において神経細胞から放出、あるいは漏出し、神経栄養因子として働いている可能性を示唆している。

〔文献〕

1. Yoshida, K. et al. Neurosci. Lett. 66, 181-186 (1986)
2. 吉田一成、他 神経化学 26, 211-213 (1987)

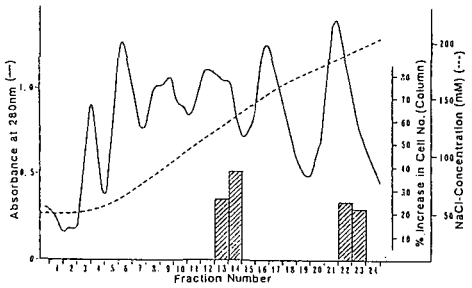


図1　イオン交換クロマトグラフィーによる生存維持因子の部分精製

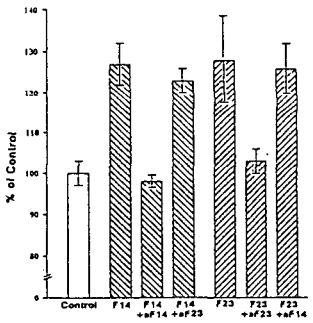


図2　抗体による生存維持因子の活性阻害

表1　F23の44KDa蛋白断片のアミノ酸配列

	Amino-acid sequences of 44KDa protein of F23
1.	Met-Val-X-Gly-Met-Asp-Val-Ala-X-Ser-X-Phe-X-Arg
2.	Ser-X-Ala-Pro-Ser-Arg-X-X-X-Gly

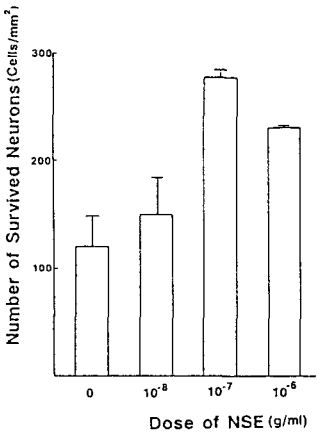


図3　ニューロンの生存維持を作用するNSEの用量依存性

83 運動ニューロン軸索成長と時間的・空間的に相関して発現されるM7412分子の解析

田中英明
（群馬大・医・薬理）

〔要約〕

ニワトリ胚運動ニューロン軸索成長と時間的・空間的に相関して発現される M7412 分子をニワトリ全胚から精製した。M7412 抗原は RCA, LCA, PHA, WGA などのレクチンの結合する膜蛋白であり、分子量は SDS-PAGE において還元状態で63,000、非還元状態で57,000であった。M7412 分子は未知の蛋白分子と予想していたが、そのN末端のアミノ酸配列はcDNAより予想されるニワトリNGFレセプター分子と同じであった。また抗血清によりクローニングしたcDNA 5個のうち 3個はNGFレセプターのcDNAと同じであった。これらのことより、M7412 分子はNGFレセプター分子である可能性が強いと考えられた。

運動ニューロンと骨格筋との間に形成される選択的な神経筋接合部は、どの筋を支配するかを運命付けられた運動ニューロンが正しい標的筋に到達する選択的な軸索成長によって形成される。この現象に関与する分子を明らかにする目的で、ニワトリ初期胚の膜分画を抗原としてモノクローナル抗体を作製し，免疫組織学的スクリーニングにより得た M7412 抗体は、硬節の前半部、肢芽の予定神経幹領域、筋管の間隙など運動ニューロンの伸びるすべての道筋、肢を支配する運動ニューロン、シュワン細胞などに結合する(1)。この染色性は発生過程において一過性であり、運動ニューロンの軸索成長が消失するとともに消失する。この M7412 分子を解析するために、ニワトリ全胚から抗体アフィニティーカラムにより精製し、ウサギ抗血清によりλgt 11のcDNAライブラリーからcDNAをクローニングした。

＜実験方法＞

M7412 抗原は、ニワトリ全胚における抗原の量が最大になる10-12日目のニワトリ胚 0.5～1.0 kgを10 mMEDTA, 1 mMPMSFをふくむ PBS 中でホモジナイズし、膜分画を得、1% NP40で可溶化後、超遠心した上清をアフィゲル10に結合したモノクローナル抗体アフィニティーカラムにかけ、pH 10.0のバッファーで洗った後、50 mMグリシンバッファー pH 2.5で溶出することにより精製した。精製した M7412 抗原を抗原としてウサギ抗血清を作製し、λgt 11に組みこまれた10日目ニワトリ全胚のcDNAライブラリーをスクリーニングし、得られたcDNAをシークエンスした。

＜結果と考察＞

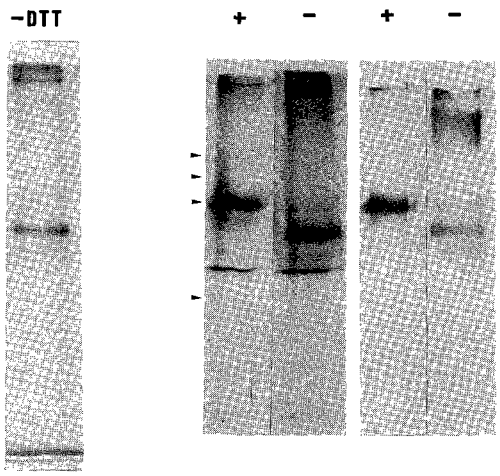
抗体アフィニティーカラムにより精製した M7412 分子は、SDS-PAGEの銀染色により分子量約 6万であり、またそれが凝集したと考えられる高分子のバンドが見られ(図 1A)、DTT存在下では非存在下に比べ若干移動度が遅くなる(図 1B)。ニトロセルロース膜に転写した M7412 分子に、HRP標識レクチン(RCA, LCA, PHA, WGA)が結合した。M7412分子のN末端アミノ酸配列は図 2に示すようで、ラットNGFレセプターcDNAとのハイブリッドから得られたニワトリNGFレセプターcDNAから予想されるアミノ酸配列のうち(2,3)、最初のメチオニンから矢印までのシグナルペプチドが取れた部分と一致した。抗血清によりクローニングしたcDNA 5個のうち、3個はニワトリNGFレセプターcDNAの一部であった(図3)。これらの結果は、M7412 分子がNGFレセプターである可能性を示唆している。しかし、NGFと構造が類似しているBDNF(4)、NT-3(5,6,7)の存在が報告され、そのレセプター分子もNGFレセプターと構造が類似していると考えられるため、M7412 分子がNGFレセプターそのものかどうかをさらに検討している。

［この報告は、近藤　淳・寺西　豊博士（三菱化成・総合研）、縣　明美氏との共同研究である］

<文献>

1. Tanaka H., Agata A. and Obata K., Dev. Biol. (1989) 132, 419-435.
2. Large T.H. et al., Neuron (1989) 2, 1123-1134.
3. Heuer J.G. et al., Dev. Biol. (1990) 137, 287-304.
4. Leibrock J. et al., Nature (1989) 341, 149-152.
5. Hohn A. et al., Nature (1990) 344, 339-341.
6. Maisonpierre P.C. et al., Science (1990) 247, 1446-1451.
7. Rosenthal A. et al., Neuron (1990) 4, 767-773.

図 1。



銀染色　　銀染色　　イムノブロット

マーカー：Galactosidase, Phosphorylase, BSA, OVA.

図 2。

MAGFVPLLLLLLPAGPTWGSKEKCLTKMYTTSGECCKA

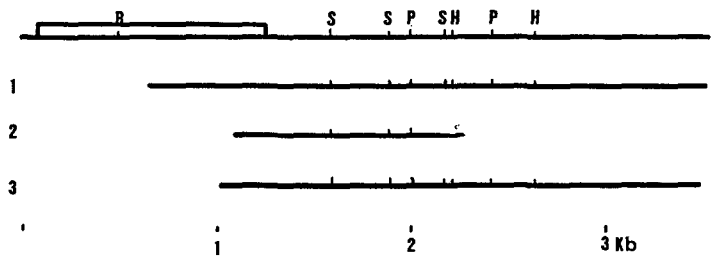
SKEK?LTKMYTTSGE??KA

上： cDNAから推定されたアミノ酸配列

下： 精製 M7412 分子

図 3。

ニワトリNGFレセプター cDNAと抗血清により得られた cDNA



84 軸索内輸送と細胞骨格重合状態の加齢変化

田代朋子・関本澄人・小宮義璋
（群馬大学医学部分子病態）

〔要約〕
ラット脊髄前角に L-[^{35}S]メチオニンを注入し、1-6週後に坐骨神経運動繊維内を輸送される標識細胞骨格蛋白を分析することにより、加齢に伴う軸索内輸送変化と細胞骨格重合状態の変化を解析した。

1.低温下、1% Triton に対する溶解性により標識チューブリンを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。幼若期（4週齢）には両者が一体となって 2mm／日の速度で輸送されるが、7週齢では、安定重合型の大部分を含む成分 I（1.5mm／日）とダイナミック型を多く含む成分 II(3mm／日）の二つの速度成分に分化する。安定重合型の速度は、加齢に伴って減速し、老化の進行する80週齢では、安定重合型チューブリン及びニューロフィラメント(NF)蛋白の通過障害が顕著となる。細胞骨格の実際の輸送型は脱重合型であるので、安定重合型はダイナミック型への変換を経て輸送されると考えられる。従って安定重合型の減速はこの変換頻度の低下を反映すると考えられる。

2. 4週齢では標識後のどの時点においても安定重合型とダイナミック型の比率は 1:1であるが、30週齢、80週齢では標識後の時間経過とともに安定重合型が減少することから、速度の低下した安定重合型が選択的に蛋白分解されると考えられる。

我々は、細胞骨格蛋白の供給過程である遅い軸索内輸送の解析から、軸索細胞骨格蛋白が軸索特有の安定重合型と、重合－脱重合平衡にあるダイナミック型の二種の重合状態をとることを示した(7)。二つの型の輸送速度の違いは、細胞骨格がこれまで考えられてきたように重合体のまま輸送されるのではなく、局所的な重合－脱重合の繰り返しにより輸送されることを示唆している(5,6,7)。動物の成長および加齢に伴い遅い輸送は顕著に減速することが知られている(2,3)。これと並行して、神経損傷後の再生過程でも、加齢により再生開始までの潜伏期間が長くなると同時に再生速度が低下する(4)。今回、我々は、このような加齢に伴う減速が細胞骨格の動態変化を反映するものと考え解析を行ったところ、老化により安定重合型とダイナミック型の相互変換が阻害されることを示唆する結果を得たので報告する。

＜方法＞　4、7、30、80の各週齢の雄ラットを用いて実験を行った。脊髄前角 L_3-L_5に L-[^{35}S]メチオニン 50uCi(0.2ulx2) を注入し、1-6 週間後に坐骨神経を摘出して 6mmの連続切片にした。各切片を凍結破砕後、1% Triton、50mM Tris(pH 7.5)、25mM KCl、1mM $MgCl_2$、5mM EGTA、0.2mM DTT を含む Triton 抽出液でホモジェナイズし、0.25M 蔗糖を含む同液に重層して 100,000g、1時間遠心して可溶性分画(S) と不溶性分画 (P)に分別した。可溶性分画中の蛋白はトリクロル酢酸を加えて沈殿として回収した。両分画中の標識蛋白を SDSゲル電気泳動で分離した後、フルオログラフィーで検出するとともに、チューブリン、アクチン、ＮＦ蛋白を各々切り出して Soluene 350で溶出し、その放射活性を測定した。

＜結果と考察＞　本実験条件で低温下、1% Triton に不溶性のチューブリンは、他の微小管脱重合条件でも可溶化されず、軸索特有の安定重合型微小管に対応すると考えられる。一方、1% Triton 可溶性のチューブリンは、ダイマーと平衡にあるダイナミック型微小管を形成している。幼若期（4週齢）には、図.1に明らかなように、両者はほぼ 1:1の割合で存在し、一体となって 2mm／日の速度で輸送される。ＮＦ蛋

白も同じ速度を示す。7週齢では、安定重合型の大部分とＮＦ蛋白が形成する1.5mm/日の主ピーク（成分Ｉ）に加えて、ダイナミック型を多く含んだこれより速いピーク（成分II）が出現する(7)。これらは他の系でも認められる遅い輸送の二つの速度成分SCa,SCb に対応する(1)。個体の成長が停止する30週齢では成分Ｉの速度は 1.1mm／日、成分IIの速度も 2mm／日と低下する。老化の進行する80週齢では成分Ｉは 0.8mm／日と更に減速する。図.1には標識3週後の状態を示したが、4週、6週と経過するに従い、老齢ラットでは安定重合型およびＮＦ蛋白の通過障害が顕著になり、輸送されるのはほとんどダイナミック型のみとなる。

軸索チューブリンは図.2に示すような何段階かの安定化機構によって軸索固有の高次架橋構造を形成する。これまでの我々の実験(5,7)及び最近の形態的研究(6)から明らかなように、チューブリンの実際の輸送形態は脱重合型と考えられるので、安定重合型はダイナミック型へ変換した後、脱重合して輸送されることになる。幼若神経では、変換が活発であるために二つの型は一体となって輸送されるが、加齢によって変換が遅くなると両者が分離し、安定重合型の減速が起こると解釈される。

このような速度低下に加えて、二つの型の存在比にも変化が現れる。4週齢では、標識後のどの時点においても安定重合型とダイナミック型の比率は1:1であるが、30週齢、80週齢では時間経過とともに安定重合型が減少する。特に、標識6週以後は減少が著しく、安定重合型が選択的に蛋白分解をうけることを示している。これは、成長期を過ぎた神経では、細胞骨格の輸送速度の低下と蛋白分解による処理機構がバランスを保っていることを示唆する。

＜文献＞ (1)Black,M.M. & Lasek,R.J. (1980) J. Cell Biol., 86, 616 (2)Hoffman,P.N. et al. (1985) J.Neurosci., 5, 2920 (3)Komiya,Y.(1980) Brain Res., 183, 477 (4)Komiya,Y. (1981) Exp. Neurol., 73, 824 (5)Komiya,Y. & Tashiro,T. (1988) Cell Motil. Cytoskel.,11, 151 (6)Okabe, S. & Hirokawa,N. (1990) Nature,343, 478 (7) Tashiro,T. & Komiya,Y.(1989) J.Neurosci.,9,760

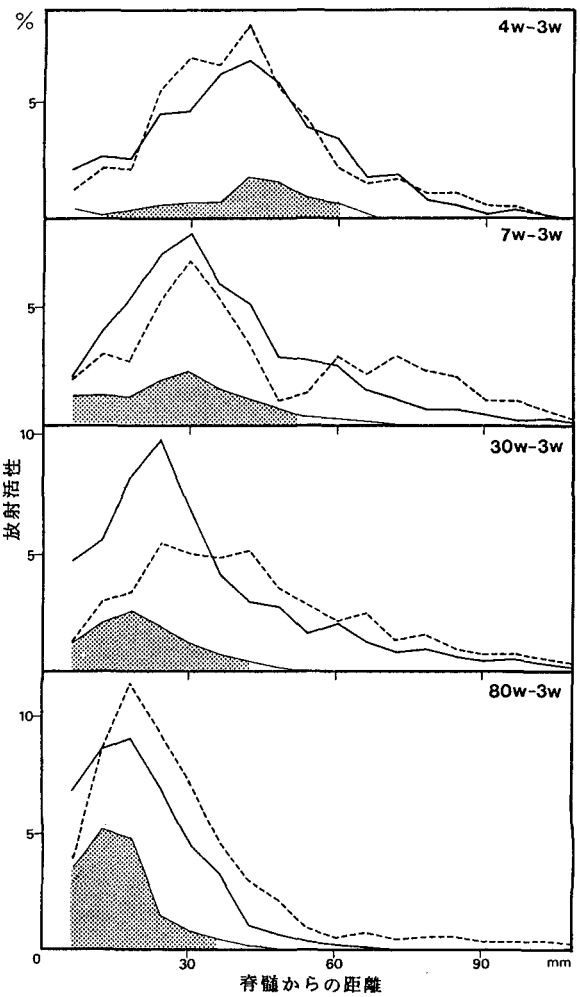
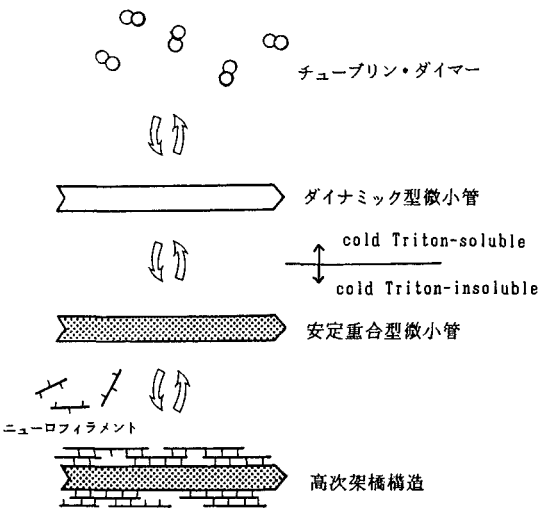


図.1 加齢に伴うチューブリン輸送の変化。
4,7,30,80 の各週齢のラット坐骨神経を用い、放射標識 3週後の安定重合型(——)及びダイナミック型(----)チューブリンの放射活性分布を示す。

図.2 軸索チューブリンの存在状態。



85　培養大脳皮質・海馬ニューロン間シナプス形成の機能アッセイおよび電顕による定量的解析――ＡＴＰの影響

黒田 洋一郎、¢市川真澄、村本 和世、川原正博、小林 和夫、＊小倉明彦、＊工藤佳久
東京都神経科学総合研究所・神経生化、¢解剖発生、＊三菱化成生命科学研究所・脳神経薬理

〔要約〕
ラット（胎令18日）脳から大脳皮質・または海馬をとり出し、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モニターし、ニューロン内の同期するCa^{2+}濃度の変動を指標にシナプス形成を解析した。さらに機能シナプスが形成された培養ニューロン系を、電顕で観察するとin vivoで見られるようなシナプスが多数証明された。このin vitroシナプス形成系にＡＴＰを長期添加すると、シナプス形成は促進される傾向を示した。ＡＴＰγＳの長期添加は抑制作用を示した。さらにこの培養ニューロン間シナプス形成系における同期したCa^{2+}変動の頻度は電顕で観察されたシナプス数と比例した。これらの結果は、プロテイン・キナーゼ阻害剤によって示された細胞外に活性をもつ蛋白質リン酸化酵素(ecto-protein kinase)[2]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という考えをさらに支持している。

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[5]。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・伸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[4]、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ecto-protein kinaseの阻害剤と考えられるK-252bがこのシナプス形成を阻害することを報告したが[6],今回は(1)in vitroの機能シナプスの形成が認められた標本中で、電顕によりシナプス構造の存在を証明し、かつ定量的解析に成功したこと、(2)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から類推されるATPの影響などについて報告する。

［実験方法］
ラット大脳皮質・海馬ニューロンの培養は既報のように[9]、Banker & Cowan法[1]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+}濃度の観察もすでに報告された方法[3]を用いた。電顕用の固定包埋はparaformaldehydeとglutalaldehydeを用いた常法[8]により、１試料当り任意に選んだ20枚以上の電顕写真（5000倍）から単位面積（200μm^2）当りのシナプスを計測した。

［実験結果と考察］
電顕による培養大脳皮質ニューロン間に形成されたシナプスの観察の計測。
培養開始後７日の大脳皮質ニューロン系は前回の本学会でも報告したように多数のニューロンが同期した細胞内Ca^{2+}濃度の変動を示した。この系を固定包埋し、電顕で観察すると、図１に示すようなシナプス構造が多数認められ、１サンプル当りの観察視野数を多くして平均値を取ることにより定量化することができた。
ATPおよびATPγSの長期添加の影響。
培養開始時からATP（10～160μM）を長期添加して７日目にニューロン内Ca^{2+}変動の頻度を指標にした機能アッセイを行い、その後同じサンプルを電顕用に固定した。図２にみられるように無添加sister cultureの対照に比し、ATP添加のcultureではCa^{2+}変動の平均振動数および単位面積あたりの

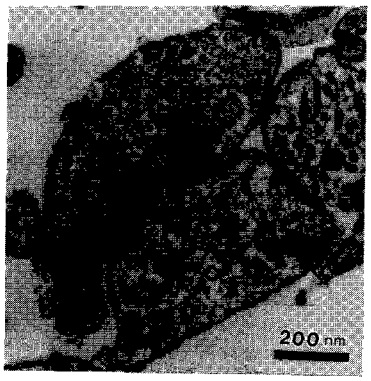


図１培養ラット大脳皮質ニューロン間で形成されたシナプス（65000倍）

形成シナプス数とも増加の傾向を示した。この結果はecto-protein kinaseの阻害剤と考えられるK-252bがこの系でのシナプス形成を抑制したことから考えられる「細胞外ATPによる細胞表面たん白質のリン酸化がシナプス形成の促進に重要である」という仮説を支持している。一方ATPγS（5～40μM）の長期添加はほぼ濃度依存的に双方を減少させた。2-chloroadenosineなどアデノシン誘導体は、中枢神経系シナプス前膜に広く分布するアデノシン受容体（ADO-1、又はA1）を介して、神経伝達物質の放出を阻害することによりシナプス伝達を抑制する[7]。このアデノシン短期投与による抑制は上記培養ニューロン系（培養開始後14日）におけるシナプス活動においても見られたが、ATPおよびATPγSでは高濃度でもそのような阻害は見られなかった（図3）。またATPまたはATPγSの添加は両方ともニューロン内Ca^{2+}濃度の一過性の増加をももたらす（図3）ので、Ca^{2+}濃度の上昇がシナプス形成・維持の促進原因ではない。培養大脳皮質ニューロン間シナプス形成・維持の細胞外ATPによる促進はecto-protein kinaseによるリン酸化と考えて現在のところ矛盾はないがATPγSによる抑制のメカニズムについてはより詳細な検討が必要である。

なおニューロン内Ca^{2+}変動の同期を指標としたアッセイと、電顕観察による形成されたシナプスの実数の測定値との間に見られる正の相関（図2；r=0.90）はより一般にも見られ、機能アッセイ系によりシナプス形成の解析が簡便に行えることが明らかになった。この系により培養系におけるシナプス形成・維持の分子メカニズムについて広範な情報が得られ、脳内シナプス結合の可塑性ばかりでなく、アルツハイマー病など脳の老化関連神経疾患の治療法や予防法の開発にも役立つことが期待できる。

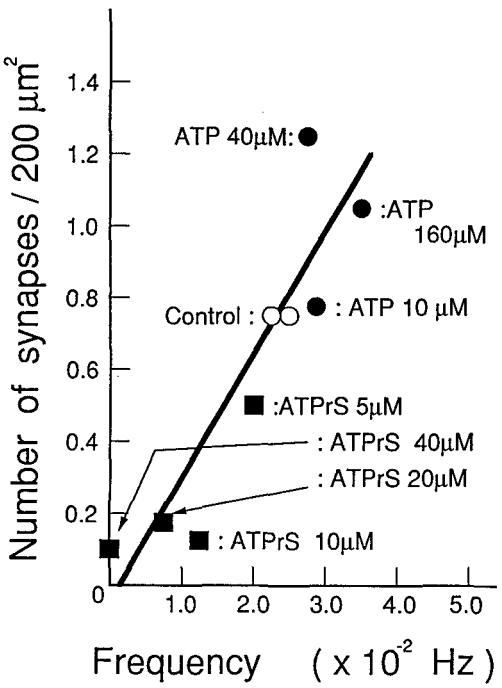


図2　ATPおよびATPγSの長期添加による培養大脳皮質ニューロン間シナプス形成に対する影響。培養開始時より薬物を添加し、培養7日目で機能アッセイと電顕観察を行った（ニューロン内Ca^{2+}変動の周期とシナプス数に正の相関がみられることに注意）

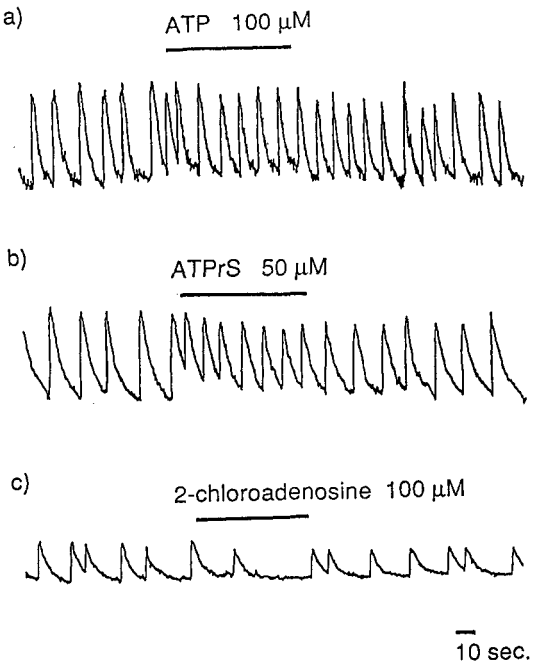


図3　ATP, ATPγS, 2-chloroadenosineの培養大脳皮質ニューロン間に形成されたシナプスにおけるシナプス伝達に対する影響。
形成されたシナプスにおけるシナプス活動を培養開始14日目にCa^{2+}変動でモニターし、薬物は灌流投与した。（縦軸は340nmの蛍光強度でニューロン内Ca^{2+}濃度の変化を示す）。

[文献]
1) Banker,G.A.and Cowan,W.M.(1977)Brain Res.126:397. 2) Ehrlich,Y.et.al.(1986)Nature 320:67. 3) Ogura,A.et.al.(1987)Neurosci.Let.78:69. 4) Kudo,Y.and Ogura,A.(1986)Brit.J.Pharmacol.89:191. 5) Kuroda,Y.(1989)Neurochem.Intern.14:309. 6) 黒田洋一郎,他 (1989)神経化学 21:142. 7) Kuroda,Y.(1978)J.Physiol.Paris. 74:463. 8)Peters,A(1970)Contemporary Research Methods in Neuroanatomy,pp56-76. 9) Muramoto,K.et al.(1988)Proc.Japan Acad. Ser.B 64:319.

86 ＰＣ１２細胞のユビキチン－蛋白質結合体

高田耕司、波多野孝史*、大川　清、松田　誠
（慈恵医大・医化学、泌尿器*）

〔要約〕

神経細胞の分化過程における蛋白質のユビキチン化を検討する目的で、PC12h細胞のユビキチン-蛋白質結合体を分析した。同細胞の0.25% Triton X-100可溶性画分を用いたin vitroの実験系において、多くの蛋白質がATP依存性に^{125}I-ユビキチンと結合した。神経成長因子（NGF）添加5日間培養した細胞では、形成される^{125}I-ユビキチン-蛋白質結合体の量が対照群よりも少なかった。抗ユビキチン単クローン抗体で検出される高分子量（約40kDa以上）の内在性ユビキチン-蛋白質結合体の中で、0.25% Triton X-100可溶性のものは、NGF添加培養10日目でわずかに増加傾向を示したが、Triton不溶性のものは、NGF添加10日間培養で激減した157kDaの成分を除けば、NGF添加2,5,10日間培養において増加した。以上の結果から、(i) PC12h細胞にも実際に蛋白質のユビキチン化を触媒する酵素システムが存在すること、(ii) そのシステムよって形成されるユビキチン-蛋白質結合体の量は、in vitroにおいてもNGFによる分化によって変化すること、(iii) 内在性のユビキチン-蛋白質結合体を0.25% Triton X-100可溶性分画と不溶性分画に分けると、分化過程において各々異なった動態を示すこと、(iv) 分化に伴い早期から増加するユビキチン-蛋白質結合体は主に0.25% Triton X-100不溶性であることが示された。

［目的］　ユビキチンは8.6kDaの蛋白質であり、一連の酵素作用により細胞内の蛋白質と結合する（2）。ユビキチンが結合した蛋白質は26S proteaseによる分解を受け易くなるため、ユビキチン化は蛋白質分解のシグナルとしての役割を担っている（2）。一方、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の変性部位に存在する神経原線維変化には、ユビキチン化された細胞骨格系蛋白質が多量に蓄積している（4,7）。このことは、神経変性におけるユビキチン系の何等かの関与を示唆している。我々は、昨年度の本学会報告以来、ユビキチン-蛋白質結合体の検出法に改良を進め、極めて特異性の高い抗ユビキチン単クローン抗体を用いたimmunoblot系を作成し、PC12h細胞の分化に伴う内在性ユビキチン-蛋白質結合体の変化を調べた(第21回米国神経化学会大会で報告)。しかし、神経の分化や変性に伴う蛋白質のユビキチン化現象の詳細は依然不明である。本研究は、神経の分化過程における蛋白質のユビキチン化の動態を理解する目的で、PC12h細胞のin vitroユビキチン化反応とユビキチン-蛋白質結合体の性質の検討を行なった。

［方法］試料の調製：培養は、Inoueら（3）に従い、抽出は、0.25% Triton X-100, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM DTT（Triton液）ないしは、SDS-PAGE用試料液で行なった。Triton液での抽出は4°C 15分放置で行ない、15000rpm 30分遠心の上清（可溶性分画）と沈殿（不溶性分画）に分離した。NGFは、Mobeyら（6）の方法にもとづき調製し、細胞を分化させる際に、50ng/mlの濃度で培養液に添加した。

^{125}I-ユビキチンの調製：ユビキチンは、Bolton and Hunterの変法（1）でヨウ素化した。

抗体の作成：ヘモシアニンと結合させたユビキチンを抗原にして常法により、BALB/cマウスから抗ユビキチン抗体産生ハイブリドーマを作成し、immunoblot分析に適する抗体を産生するUb5F9クローンを選択した。Meyerらの方法（5）による分析の結果から、本抗体は、ATP枯渇下で調製した兎網状赤血球の蛋白質とは交差しないが、ユビキチンおよびATP依存性に形成される同赤血球のユビキチン-蛋白質結合体に対しては高い結合性を示した。

In vitro ユビキチン化反応：Triton可溶性分画（120μg蛋白質）を^{125}I-ユビキチン（300kcpm）と37°Cで反応（総量30μl）させた。その際、ATP枯渇化群にはdeoxyglucoseとhexokinaseを、ATP供給群にはATP、creatine kinaseとcreatine phosphateを添加した。SDS-PAGE用試料液の添加で反応停止し、SDS-PAGE後、オートラジオグラフィーを行なった。

SDS PAGE-immunoblot：細胞抽出液をSDS-PAGEで泳動分離（30μg蛋白質/lane）後、PVDF膜（ミリポア）に転写した。その際、15% gelには0.22μmの、10% gelには0.45μm孔径の膜を使用した。転写後の膜は、120°C 30分オートクレーブ後、5% skimmilkでブロッキングし、Ub5F9産生抗ユビキチン単クロン抗体（25μg/ml）とインキュベートした。膜上の抗原と結合した抗体は、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgs抗体と反応後、NBTとBCIPを基質に用い発色した。

［結果と考察］

PC12h細胞抽出液の蛋白質は、in vitroにおいてATP依存性に^{125}I-ユビキチンとの結合を示した（図1）。この結合は、SDS、還元剤および煮沸処理に耐性であることから、ユビキチンC末端のカルボキシル基と基質蛋白質のlysine側鎖やN

末端のアミノ基の間で生じた共有結合であると考えられる。したがって、PC12h細胞にも蛋白質をユビキチン化する酵素システムとその基質となる蛋白質が実際に存在することが証明された。このin vitroのユビキチン化反応は、抽出液中の内在性ATPによってもわずかに進行し、ATP供給の有無にかかわらず約60分間の反応でほぼ平衡に達する。また、NGF添加5日間培養した細胞では、形成される^{125}I-ユビキチン-蛋白質結合体の量が、ATP供給下および未添加のいずれの場合においても対照群よりも少なかった（図2）。NGFがユビキチン化酵素システムだけでなく基質蛋白質や26S proteaseにも作用している可能性もあるため、この結果の解釈にはさらに検討が必要である。

NGFを添加した培養による分化で生じるPC12h細胞の内在性ユビキチン-蛋白質結合体の顕著な変化は、ユビキチン化ヒストン2A（23kDa）の減少と高分子量（約40kDa以上）ユビキチン-蛋白質結合体の増加である（図3）。抽出液を0.25 % Triton X-100に対する溶解性で分画したところ、可溶性の高分子量ユビキチン-蛋白質結合体は、NGF添加培養2,5日目では対照とほとんど変らず、NGF添加培養10日目でわずかに増加傾向を示した（図4）。一方、不溶性の同結合体のうち、157kDaの成分はNGF添加10日間培養により激減したものの、他のほとんどの成分はNGF添加2日、5日および10日間培養のいずれにおいても増加した（図4）。これらの結果から、内在性ユビキチン-蛋白質結合体のTriton可溶性および不溶性分画は、分化過程において各々異なった動態を示し、分化に伴い早期から増加するユビキチン-蛋白質結合体は主にTriton不溶性であると思われる。現在、両成分の動態について、より詳細な検討を進めている。

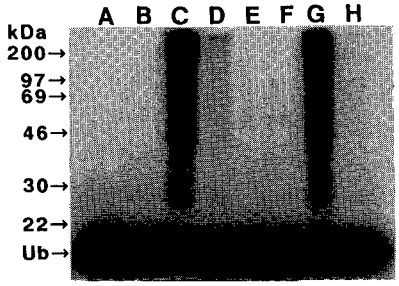


図1 In vitro ユビキチン化反応.
対照培養の細胞抽出液（A,B,C,D）または
NGF添加5日間培養の細胞抽出液（E,F,G,H）を
下記の条件で^{125}I-ユビキチンと反応後、
各試料（60μg蛋白質）をSDS-PAGE(12.5%gel)で
分離しそのオートラジオグラムを作成した.
A,E：ATP枯渇下で60分反応
B,F：ATP供給下で 0分反応
C,G：ATP供給下で60分反応
D,H：ATP未添加で60分反応
（Ub：ユビキチン）

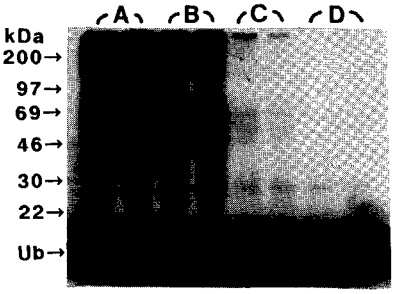


図2 In vitro ユビキチン化反応.
対照培養の細胞抽出液（A,C）または
NGF添加5日間培養の細胞抽出液（B,D）を
下記の条件で^{125}I-ユビキチンと反応後、
各試料（60μg蛋白質）をSDS-PAGE(12.5%gel)で
分離しそのオートラジオグラムを作成した.
A,B：ATP供給下で60分反応
C,D：ATP未添加で60分反応
（各群は独立した2つの培養皿由来の試料からなる）

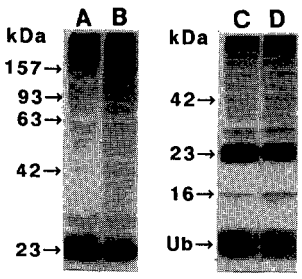


図3 抗ユビキチン抗体によるユビキチン-蛋白質結合体の検出.
対照培養（A,C）または NGF添加10日間培養（B,D）の
細胞をSDS-PAGE sample bufferで抽出し、
ゲル濃度10%（A,B）または15%（C,D）でSDS-PAGE後、
immunoblot法によって分析した.

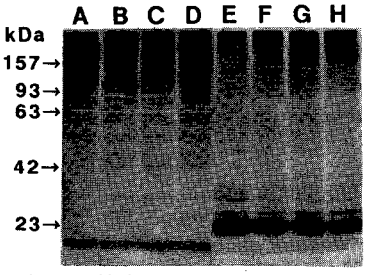


図4 抗ユビキチン抗体によるユビキチン-蛋白質結合体の検出.
対照培養（A,E）または NGF添加 2日間（B,F）、
5日間（C,G）、10日間培養（D,H）の細胞を
0.25% Triton X-100液で抽出し、可溶性（A,B,C,D）
および不溶性（E,F,G,H）分画に分けた後、各々を
SDS-PAGE sample bufferで再抽出し、
SDS-PAGE(10%gel)後、immunoblot法によって分析した.

[文献] 1. Carlson,N. and Rechsteiner,M.(1987) J.Cell Biol. 104, 537-546.
2. Hershko,A. (1988) J.Biol.Chem. 263, 15237-15240.
3. Inoue,N. and Hatanaka,H. (1982) J.Biol.Chem. 257,9238-9241.
4. Lowe,J. et al.(1988) J.Pathol. 155, 9-15.
5. Meyer,E.M. et al. (1986) J.Biol.Chem. 261, 14365-14368.
6. Mobey,W.C. et al. (1976) Biochemistry 15, 5543-5551.
7. Mori,H. et al.(1987) Science 235, 1641-1644.

87　特異的なプロテアーゼ阻害剤によるＰＣ１２細胞の突起形成 -標的分子の精製とその性質-

斎藤祐見子　川島誠一　津吹聡*　伊藤尚*　鈴木春男**
（都老人研・生化学部、*青山学院大・理工、**北里大・医）

〔要約〕
昨年の日本神経化学会において我々は、低濃度でＰＣ１２細胞の突起伸長を誘導するプロテアーゼ阻害物質，Benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Leu-aldehyde (ZLLLal) 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 33K タンパク質を検出したことを報告した。その後、ラットの様々な臓器のホモジネートをアフィティカラムにかけたところ、生後１日ラットの全脳・心臓、成熟ラットの筋肉・心臓でこの 33K タンパク質と同じ挙動を示すものが cytosol，particulate 両分画に認められた。ラット全脳ホモジネートにおいて、 33K タンパク質は胎生１５日には非常に少ないが、生後１日から３日にかけて多く検出され、生後１４日以降急速に減少する。このことは、 33K タンパク質はＰＣ１２細胞においてばかりではなく、 in vivo での神経発生に関与することを示唆している。さらに詳しく 33K タンパク質の性質を探るため、成熟ラットの筋肉を材料として精製したところ、Glx の多い酸性タンパク質であることが判った。

（はじめに）
神経突起伸長の調節にトロンビン、プラスミノーゲンアクチベーター、メタロプロテアーゼとその阻害物質が関与していることが報告されている（１、２、３）。しかし、調節能力を持つと同定された分子は非常に少なく、他に未知のプロテアーゼ系が存在する可能性が強い。

我々はこれまで、神経細胞分化のモデル系となるＰＣ１２細胞と化学修飾の容易な低分子合成プロテアーゼ阻害物質を組み合わせることにより、ＰＣ１２細胞には神経突起形成を調節する新しいタイプのプロテアーゼが存在することを示唆してきた（４、５）。プロテアーゼ阻害物質のなかでも Benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Leu-aldehyde (ZLLLal) は 25-30nM という低濃度でＰＣ１２細胞の神経突起伸長を開始・促進する。そこで Leu-Leu-Leu-al をリガンドとするアフィニティカラムを作製し、特異的に結合する分子を検索したところ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（６）。今回は、様々な臓器におけるこのタンパク質の局在を調べるとともに、ラット筋肉を材料として精製し、その性質を調べたので報告する。

（方法）
①ＰＣ１２細胞の培養、突起形成の評価、アフィニティカラムの作製は既報（５、６）によった。

②アフィニティクロマトグラフィ
材料：　ＰＣ１２ｈ細胞、生後１日ラットの全脳・肝臓・腎臓・脾臓・心臓、成熟ラット（６ヶ月令）の全脳・肝臓・腎臓・脾臓・心臓・肺・筋肉、胎生１５日・生後３日・１４日ラットの全脳

それぞれを、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, pH 7.3)- 0.2M NaCl に対して透析した。それぞれの分画に Triton X-100 を最終濃度 1% になるように加え、①のカラムにチャージし充分洗浄後、クエン酸緩衝液 (0.1M

, pH4.0)、続いて 6M 尿素 (0.1M クエン酸緩衝液中) にて結合したタンパク質を溶出し、TCA 沈澱の後、SDS-PAGE を行なった。

③2次元電気泳動　三川の方法（７）によった。　④アミノ酸分析　② の SDS-PAGE 後、ゲルをニトロセルロース膜に転写し、ポンソーＳにて染色する。33K バンドを切り出し、（８）の方法に準じて抽出、加水分解後、Pico-Tagアミノ酸分解システム (Waters 社製) を用いて実施した。　⑤ペプチドマップ　Cleveland らの方法（９）によった。

（結果と考察）

ＰＣ１２細胞の突起伸長に必要な濃度は Z-Leu-Leu-X-al の３位のアミノ酸残基により大きく変化し（例えば X = Gly : 40 uM, X = Phe : 0.05 uM）、Leu の場合に最も低い濃度 (25-30nM) で突起を形成できる。また、Z-Leu-Leu-Leu-al からの残基数の減少 (Z-Leu-Leu-al) は有効濃度を 3000 倍にも上昇させ(100 uM)，残基数の増加(Z-Leu-Leu-Leu-Leu-al)は有効濃度には影響は与えないものの突起形成率をかえって若干低下させた。このことは、Z-Leu-Leu-Leu-al のとる３次元構造が突起形成に関与するタンパク質の活性部位にフィットしていることを示唆している。従って Leu-Leu-Leu-al をリガンドとしたアフィニティカラムを標的タンパク質の検索に用いることは極めて有用と考えられる。既報（６）のように、このアフィニティカラムによりＰＣ１２細胞の培養上清ではなく、細胞本体から pH4 で溶出する 33K タンパク質を検索することができた。ラットの各臓器ホモジネートを同様にアフィニティカラムにチャージしたところ、生後１日の脳・心臓、成熟ラットの心臓・筋肉において pH4 で溶出する 33K タンパク質が SDS-PAGE 上で明瞭に検出できた。これらのゲルバンドを切りとって、Ｖ８プロテアーゼによりペプチドマッピングし、それぞれ比較したところどれも同様のパターンを示した。従って、33K タンパク質は培養下に特殊に見られるものではなく、生体にも存在することが判った。

成熟ラット脳ホモジネートでは生後１日のものに比べて 33K タンパク質がかなり減少していたため、発生過程での変化を調べてみた。その結果、胎生１５日では非常に少ないが、生後１-３日にかけて最大のレベルに達し、生後１４日からは急速に減少した。このことは、33K タンパク質はＰＣ１２細胞の突起形成ばかりでなく、in vivo での神経発生にも何らかの関連を持つことを示唆している。

33K タンパク質が効率よくアフィニティカラムに結合並びに溶出するためにcytosol 分画をチャージする際にも TX-100 のような detergent の存在が必要である。従って、33K タンパク質は会合体を形成しているか、あるいは他のmacro-molecules と結合していることが予想される。

このタンパク質の性質を更に詳しく探るため、ラット筋肉より精製し、２次元電気泳動、Pico-Tag 法によるアミノ酸分析を行なった。その結果、等電点３-４の、Glx が多い酸性タンパク質であることが判明した。また、Ｎ末端はブロックされていた。現在、マイクロシークエンス法により、部分アミノ酸配列を決定中である。

（参考文献）

(1) Monard, D.: Trend Neurosci., 11: 541-544 (1988)
(2) Pittman, R.N. and Patterson, P.H.: J. Neurosci., 7: 2664-2673 (1988)
(3) Machida, C.M. et al.: Neuron, 2: 1587-1596 (1989)
(4) Saito, Y. and Kawashima, S.: Neurosci. Lett., 89: 102-107 (1988)
(5) Saito, Y. and Kawashima, S.: J. Biochem., 106: 1035-1040 (1989)
(6) 斎藤、川島、津吹、伊藤　神経化学 28: 400-401 (1989)
(7) 三川隆　生体の科学 32: 74-78 (1981)
(8) Parekh, B.S. et al.: Anal. Biochem., 148: 87-92 (1985)
(9) Cleveland, D.W. et al.: J. Biol. Chem., 252: 1102-1106 (1977)

88

ＮＭＤＡレセプター複合体に対するカルモデュリンアンタゴニストの作用

鈴木竹雄、荻田喜代一、米田幸雄
（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ネルの指標である、[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合に対するカルモデュリンアンタゴニストの作用について検討した。N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide(W-7)、N-(6-aminohexyl)-1-naphthalene sulfonamide(W-5)、trifluoperazineおよびchlorpromazineは、いずれも非洗浄膜標品への[^{3}H]MK-801結合を濃度依存的に阻害した。Scatchard解析により、W-7は本結合の親和力には著変を与えず、最大結合部位密度を減少させることが判明した。トリトン処理膜標品への本結合において、W-7はグルタミン酸(Glu)存在下の結合速度を有意に抑制したが、Gluおよびグリシン(Gly)共存下の結合速度には著変を与えなかった。またW-7は、Glu存在下およびGlu/Gly共存下における本結合の解離速度を減少させた。さらに、W-7はGlu、Glyおよびスペルミジン(SPD)のすべての結合増強作用に対して抑制効果を持つことが明らかとなった。以上の結果より、NMDA感受性レセプター機構にカルモデュリンが関与する可能性が示唆される。

NMDA感受性レセプター複合体は、イオンチャネル部位、NMDA認識部位およびストリキニーネ非感受性Gly認識部位(Gly_B部位)により構成されると考えられている(7,12)。これらの各部位は、それぞれ[^{3}H]MK-801(8,9)や[^{3}H]TCP(1,3)、[^{3}H]Glu(5)や[^{3}H]CPP(2,11)および[^{3}H]Gly(4)により標識される。さらに、この複合体上の4番目の部位として、SPDやスペルミンなどのポリアミンによる調節部位の存在が示唆されている(6,10)。本研究では、このNMDA感受性レセプター機構におけるカルモデュリンの関与の可能性を追究する目的で、[^{3}H]MK-801結合に対する種々のカルモデュリンアンタゴニストの作用について検討した。

〔実験方法〕
ラット全脳より調製した粗シナプス膜標品を、50,000g、30分間の遠心分離操作による洗浄操作を1回行った膜標品を非洗浄膜標品とした。また、上記洗浄操作を3回行い、さらに実験当日に0.08% Triton X-100で前処理した膜標品をトリトン処理膜標品とした。結合実験は、膜標品と5 nM [^{3}H]MK-801(NEN/DuPont, 833 GBq/mmol)を50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)中で、30℃、30分間反応させて行った。また、トリトン処理膜標品を用いた結合実験では、10 μM Gluあるいは10 μM Gluおよび10 μM Glyを添加して行った。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により行った。

〔結果〕
種々の阻害剤の中で、カルモデュリンアンタゴニストのW-7、W-5、chlorpromazine、trifluoperazineが最も強力に非洗浄膜標品への[^{3}H]MK-801結合を阻害した(表1)。W-7およびW-5は、いずれも30 μM以上の濃度で濃度依存的に本結合を阻害し、そのIC$_{50}$値はそれぞれ24.8±5.6および14.6±1.4 μMであった。また、chlorpromazineおよびtrifluoperazineのIC$_{50}$値は、それぞれ38.7±1.9および103.0±11.7 μMであった。これらの化合物のHill係数は、いずれも１付近であった。W-7の非添加時および添加時でScatchard解析した結果、いずれの場合も本結合は単一成分系を示し、非添加時のKd値およびBmax値は、それぞれ9.9±1.4 nMおよび0.71±0.05 pmol/mg proteinであることが判明した。W-7の添加(10^{-5} M)は、本結合の最大結合部位密度の減少を惹起したが、親和力に著変を与えないことが明らかとなった(Kd = 10.4±0.5 nM, Bmax = 0.52±0.03 pmol/mg protein)(図1)。トリトン処理膜標品への[^{3}H]-MK-801結合において、Glu存在下およびGlu/Gly共存下の見かけ上の結合速度(K_{obs})は、それぞれ0.65±0.07および1.00±0.06 min^{-1}であった。W-7の添加(10^{-6} M)は、Glu存在下の結合速度を減少させたが、Glu/Gly存在下の結合速度には有意な変化を与えなかった(K_{obs} (min^{-1}): Glu; 0.44±0.04, Glu/Gly; 0.78±0.15)。また、W-7によりGlu存在下およびGlu/Gly共存下の結合解離速度の抑制が認められた。W-7は本結合のGluおよびGlyの増強作用を抑制したが、GluおよびGlyのEC$_{50}$値には有意な変化を与えなかった。さらにW-7は、SPDの結合増強作用に対しても抑制作用を発揮し、SPDのEC$_{50}$値を有意に増強させた。(EC$_{50}$ (μM):none; 40.7±3.2, W-7(10^{-6} M); 58.8±11.9, W-7(10^{-5} M);

表1． 各種阻害剤の影響

Drugs (10⁻⁴M)	[³H]MK-801 binding (% of control)
W-7	3.1±2.3 **
W-5	9.7±2.3 **
Chlorpromazine	12.8±1.1 **
Trifluoperazine	47.9±3.6 **
H-7	92.8±1.9
TPA	100.8±1.9
Nifedipine	60.7±2.3 **
Diltiazem	82.1±2.0 **
Verapamil	82.8±2.0 **
Cytochalasin B	88.6±1.8 **
Podophyllotoxin	92.7±2.6
Colchicine	95.7±2.4

図1． Scatchard 解析

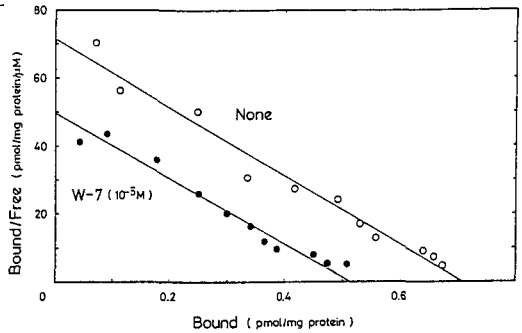
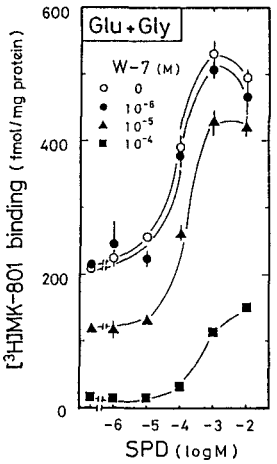


図2． SPD の増強作用に対するW-7 の影響



129±19, W-7(10^{-4} M); 434±42)(図2)。

〔考察〕

本研究では、カルモデュリンアンタゴニスト、プロテインキナーゼ阻害剤、カルシウムチャネル阻害剤、および細胞骨格系阻害剤の中で、カルモデュリンアンタゴニスト作用を持つ化合物がすべて、強力に[³H]MK-801結合を阻害することが明らかとなった。このことは、NMDAレセプター機構にカルモデュリンが関与する可能性が考えられる。しかしながら、カルモデュリン関与の直接的証拠はなく、また用いた化合物の結合阻害作用が非特異的である可能性も考えられることから、最終的結論を出すためには今後の詳細な解析が必要であろう。W-7はSPDのEC_{50}値を増加させることから、ポリアミン部位に対して競合的に作用する可能性が考えられる。しかしながら、高濃度のW-7が非競合的な結合阻害作用を示すことから、W-7のポリアミンアンタゴニスト作用については、今後の慎重な解析が望まれる。

〔文献〕

1. Fagg, G.E. (1987) Neurosci.Lett. 76, 211-227.
2. Murphy, D.E., Schnerder, J., Boehm, C., Lehmann, J. and Williams, M. (1987) J. Pharmacol. Exp. Ther. 240, 778-784.
3. Ogita, K., Suzuki, T., Enomoto, R., Ohgaki, T., Katagawa, J., Uchida, S., Meguri, H. and Yoneda, Y. (1990) Neurosci. Res. in press.
4. Ogita, K., Suzuki, T. and Yoneda, Y. (1989) Neuropharmacol. 28, 1263-1270.
5. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
6. Ransom, R.W. and Stec, N.L. (1988) J. Neurochem. 51, 830-836.
7. Robinson, M.B. and Coyle, J.T. (1987) FASEB J. 1, 446-455.
8. Wong, T.H.F., Knight, A.R. and Woodruff, G.N. (1988) J. Neurochem. 50, 274-281.
9. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Brain Res. 499, 305-314.
10. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1990) NEUROTRANSMITTER RECEPTOR: NEURORECEPTOR MECHANISMS IN BRAIN (Kito, S. Segawa, T. and Olsen, R. eds), Plenum, New York, in press.
11. Yoneda, Y., Ogita, K., Kouda, T. and Ogawa, Y. (1990) Biochem. Pharmacol. 39, 225-228.
12. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T. (1988) Neurotransmitter: Focus on Excitatory Amino Acids (Kanazawa, I., ed.), pp. 47-65, Excerpta Medica, Tokyo.

89 グルタミン酸によるニューロンのＮａポンプアイソフォームの活性調節に対するＷ－７の影響

井上順雄，松井英男
（杏林大・医・第一生化）

〔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，ニューロンに存在するＮａポンプアイソフォーム（脳型，普遍型）の活性が調節を受ける．今回，カルモデュリンアンタゴニストのＷ－７が，この活性調節を抑えることを見いだした．すなわち，Ｗ－７非存在下では，グルタミン酸刺激によって，脳型Ｎａポンプの活性が３倍以上上昇することによって，全体のＮａポンプ活性は２倍近く上昇する．この時，普遍型Ｎａポンプの活性は約８割に低下する．しかし，２００μMＷ－７存在下では，グルタミン酸刺激による脳型活性の上昇，普遍型活性の低下，及び全体の活性の上昇が全く起こらなかった．このＷ－７の効果は濃度依存的（IC_{50}＝約５０μM）であった．なお，Ｗ－７はグルタミン酸無刺激のニューロンにも作用を示し，特に普遍型Ｎａポンプ活性を３分の１程度に阻害した．

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必須のものである．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：以下普遍型）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型とαⅢ型：以下脳型）が存在することを明らかにした（１－３）．そして，ニューロンをグルタミン酸で刺激すると全体のＮａポンプ活性が高まるが，そのとき脳型Ｎａポンプの活性が飛躍的に上昇し，普遍型Ｎａポンプの活性がわずかに低下することも見いだした（４，５）．今回，我々は，このグルタミン酸刺激によるＮａポンプアイソフォームの活性調節が，どの様な機構で起こるか解析するためにＷ－７などの薬物の効果を検討した．

［実験方法］

ニューロンは，Wistar系ラットの１７日胚大脳から分離し，24穴マルチウェル上に培養した（１－５）．ニューロンのＮａポンプ活性測定は，既報（２－５）に基づき行った．すなわち，細胞を標準反応液［130mM NaCl，2mM KCl，0.8mM $MgCl_2$，1.8mM $CaCl_2$，5mM glucose，0～2 mM ウアバイン，25mM Hepes-Imidazole緩衝液(pH7.3)］中に，37℃で２０分間おいた後，グルタミン酸で細胞を１２分間刺激する．その後，^{42}KClを添加した標準反応液中で，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(脳型)と低感受性型(普遍型)のアイソフォームの活性に分別した．Ｗ－７などの薬物の効果を調べるためには，グルタミン酸の刺激前，及び刺激時に，反応液に種々の濃度の薬物を添加した．

［実験結果と考察］

ニューロンのＮａポンプ全活性は，脳型の活性と普遍型の活性に分けられる（２－５）．Ｗ－７非存在下では，

実験条件	Ｗ－７非存在下			２００μMＷ－７存在下		
	全活性	脳型活性	普遍型活性	全活性	脳型活性	普遍型活性
	（K^+取り込み活性：nmol/min/mg protein）					
無刺激	36.2 ± 2.0	14.0 ± 1.2	22.2 ± 1.2	19.6 ± 1.0[b]	11.9 ± 0.6	7.7 ± 0.6[b]
グルタミン酸刺激	61.0 ± 1.6[a]	44.3 ± 1.8[a]	16.7 ± 1.2[a]	21.2 ± 1.6[b]	13.4 ± 1.6[b]	7.8 ± 0.5[b]
グルタミン酸刺激／無刺激 （%）	172 ± 11[a]	338 ± 40[a]	75.3 ± 3.2[a]	108 ± 4	111 ± 8	104 ± 8

表１．培養ニューロン（１１～１４日間）のグルタミン酸（１００μＭ）刺激によるＮａポンプ活性の調節に対するＷ－７の影響．　平均値±SEM (n=7)．
[a] $p<0.01$，グルタミン酸無刺激に比較して有意；[b] $p<0.01$，Ｗ－７非存在下に比較して有意．

昨年も報告（５）した様に，ニューロンをグルタミン酸で刺激すると，Ｎａポンプ活性が調節を受ける（表１）．即ち，全体のＮａポンプ活性が上昇（１．７倍）し，この時，脳型のＮａポンプの活性が選択的に上昇（３．４倍）し，普遍型のＮａポンプ活性は低下（０．８倍）した．ところが，２００μMW－７存在下では，細胞をグルタミン酸で刺激しても，Ｎａポンプアイソフォームの活性は変化しなかった（表１）．これは，グルタミン酸刺激によるＮａポンプ活性の調節（全活性の上昇，脳型活性の上昇，普遍型活性の低下）が，Ｗ－７によって抑えられることを示す．こうしたＷ－７の効果は，図１Ｂに示すようにＷ－７の濃度に依存した．またここには示さないが，Ｗ－７より特異性が低く弱いアンタゴニストであるＷ－５は，２００μＭにおいても，グルタミン酸の効果を５０％以下しか抑えなかった．既に報告したように，グルタミン酸がレセプターと結合することにより，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，Ｎａポンプ活性の調節が起こる（５）．今回の結果は，グルタミン酸刺激によるＮａポンプ活性の調節の過程において，カルモデュリンが何らかの関与をしていることを示すものと考えられる．

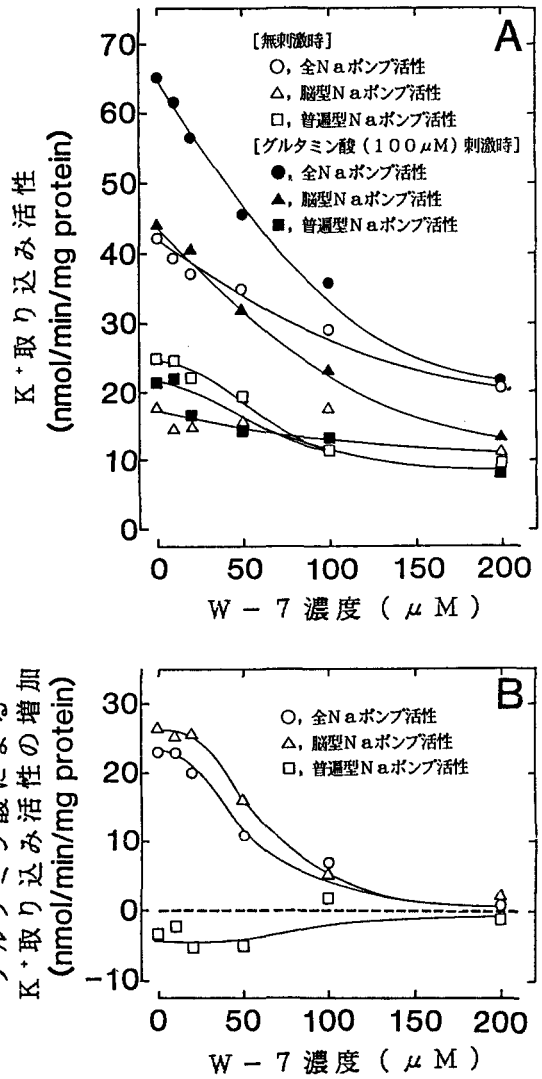


図１．Ｗ－７による培養ニューロンのＮａポンプ活性変化：Ｗ－７濃度の影響．
Ａ．無刺激時，及びグルタミン酸（１００μＭ）刺激時におけるＮａポンプ活性．
Ｂ．グルタミン酸（１００μＭ）刺激時と無刺激時のＮａポンプ活性の差．

一方，Ｗ－７はグルタミン酸刺激によるＮａポンプアイソフォームの活性調節に対する作用の他にも，Ｎａポンプの活性に影響を与えた．すなわち，図１Ａに示されるように，グルタミン酸で刺激していないニューロンで，Ｗ－７は濃度に依存して，普遍型Ｎａポンプの活性を阻害し，全体のＮａポンプ活性を阻害した．そして，２００μMW－７は普遍型のＮａポンプ活性を３５％に阻害し，この時全体のＮａポンプ活性は５５％となった（表１）．しかし，脳型Ｎａポンプの活性はＷ－７によってほとんど阻害を受けなかった．

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.

5．井上順雄，松井英男（1989）神経化学，28，138-139.

90 GABA$_B$受容体の部分精製とその薬理学的性質について

大森敬之、栗山欣弥
京都府立医大・薬理

〔要約〕

アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる脳内GABA$_B$ 受容体の精製と、 その薬理学的性質について検討を行った。CHAPSを用いて脳シナプス膜より可溶化した標品を、バクロフェンを固定化リガンドとしたバクロフェン－エポキシ活性化セファロース6B によるアフィニティーカラムに適用し、1M KCl で溶出したところ、GABA$_B$受容体の結合能を保持した蛋白の溶出が認められ、 その精製倍率は可溶化標品と比較して約2800倍であった。この分画で認められた[^{3}H]GABA 結合は、GABA、バクロフェンおよび2-ヒドロキシサクロフェンによって阻害された。またこのGABA$_B$ 受容体結合は、Scatchard 解析によって単一の結合部位よりなることが判明し、[^{3}H]GABA 結合の平衡解離常数(K_D) は64.4 nM 、最大結合量(Bmax) は103.8 pmol/mg protein であった。 一方、GABA$_B$ 受容体への[^{3}H]GABA 結合はGTP およびMgSO$_4$ によって影響されなかったが、CaCl$_2$の濃度に依存して増大した。 この条件下でカルシウムチャンネルブロッカーであるジルチアゼムの影響を検討したが、 変化は認められなかった。以上の結果より、 本アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いることによりGABA$_B$ 受容体の部分精製が可能であること、また得られた精製GABA$_B$受容体では、GTP 結合蛋白質およびカルシウムチャンネルとの機能的な共軛は消失しているものの、カルシウムによる調節機構は保持されているものと考えられる。

【目的】 脳内GABA$_B$ 受容体と細胞内情報伝達系との共軛に関しては、特にシナプス膜レベルで多くの研究が行われており、GTP 結合蛋白質(1,3)をはじめ、カルシウムチャンネル(4)、カリウムチャンネル(5)、アデニレートサイクレース系(6,9)およびイノシトールリン脂質代謝回転系(2,8)との共軛が知られている。 これらの共軛の分子機構、さらにはGABA$_B$受容体そのものの性質を明らかにするためにもGABA$_B$受容体の精製は重要であるが、 現在までのところGABA$_B$受容体の精製に関する報告は極めて少ない。 GABA$_B$受容体が各種界面活性剤によって容易に可溶化されることが知られていることから(7)、 今回アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いたGABA$_B$受容体の精製法の確立と得られた精製受容体の薬理学的性質について検討を行った。

【実験方法】 アフィニティーゲルの作製は、バクロフェンとエポキシ活性化セファロース6Bを37℃で24時間反応させることにより行い、未反応の活性基を1M エタノールアミンでブロックしたのち、 0.2% コール酸ナトリウム、0.02% アゾレクチンを含む50 mM Tris-HCl(pH7.4)緩衝液でゲルを平衡化した。1.2% CHAPS/0.2% アゾレクチンでシナプス膜分画より可溶化した標品を、0.12% CHAPS および0.02% アゾレクチンを含む50 mM Tris-HCl 緩衝液中で十分に透析したのちカラムに適用し、1M KCl による溶出を行った。 [^{3}H]GABA 結合の測定は、精製標品と12.5 nM [^{3}H]GABA を0℃、60 min 反応させて行い、さらにγ－グロブリン(0.5mg/ml)およびポリエチレングリコール(15%) を加えて0℃で5 min 放置したのち、 Whatman GF/C グラスフィルターを用いた吸引濾過法により行った。

【結果】アフィニティーカラムクロマトグラフィーによるGABA$_B$受容体の精製を行ったところ、素通り分画には[^{3}H]GABA 結合能はほとんど認められなかったが、 1M KCl によってGABA$_B$ 受容体分画は単一ピークとして溶出された(Figure 1)。この段階におけるGABA$_B$受容体の精製倍率は約2800倍で、回収率はカラムに適用した可溶化標品の約75%であった(Table 1)。さらに1～2 M NaSCN による溶出を行ったところ、蛋白は溶出されたものの、この分画には[^{3}H]GABA 結合能は認められなかった。 一方、エポキシ活性化セファロース6B の活性基をすべてエタノールアミンで置き換えたゲルを用いて同様の精製操作を行ったが、KCl 溶出分画中に[^{3}H]GABA 結合能は認められなかった。 前記の[^{3}H]GABA 結合は、GABA、バクロフェンおよびGABA$_B$受容体拮抗薬である2-ヒドロキシサクロフェンによって濃度依存的に阻害された。この結合のScatchard 解析は一相性を示し、K_D 、Bmax 値はそれぞれ64.4 nM 、103.8 pmol/mg protein であった(Figure 2)。 CHAPS による可溶化分画において[^{3}H]GABA 結合はGTP によって濃度依存的に抑制されたが、この効果は精製標品では認められなかった。 またMgSO$_4$ の添加も何ら影響を与えなかった。一方、CaCl$_2$ によって結合能の有意な増大が認められ、この増強効果は2 mM で最大値を示したが、

このCaCl₂ による結合能の増大は、カルシウムチャンネルブロッカーのジルチアゼムによって拮抗されなかった。

【考察】 今回新しく作製したバクロフェンを固定化リガンドとするアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって、GABA$_B$受容体の部分精製が可能であることが明かとなった。得られたGABA$_B$受容体はその結合能がGTPおよびMgSO₄ によって影響されず、 CaCl₂ による結合能の増大もカルシウムチャンネルブロッカーによって拮抗されなかったことから、GTP 結合蛋白質およびカルシウムチャンネルとの共軛は消失しているものの、 カルシウムチャンネル以外の部位における CaCl₂ による調節機構を保持した単一の結合部位からなる受容体として精製されるものと考えられる。SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動により数本のバンドが確認され、 さらにGABA$_B$受容体に関してはフォトアフィニティーラベリング法が確立されていないためGABA$_B$受容体の分子量を決定するには至らなかったが、他のカラムクロマトグラフィーとの組合せにより、GABA$_B$受容体に関する純化精製法が確立できるものと考えられる。

【文献】

(1) Asano, T., et al. (1985) J. Biol. Chem. 260, 12653-12658.
(2) Crawford, M.L., et al. (1988) J. Neurochem. 51, 1441-1447.
(3) Hill, D.R., et al. (1984) J. Neurochem. 42, 652-657.
(4) Holz IV, G.G, et al. (1986) Nature 319, 670-672.
(5) Newberry, N.R. and Nicoll, R.A. (1984) Nature 308, 450-452.
(6) Nishikawa, M. and Kuriyama, K. (1989) Neurochem. Int. 14, 85-90.
(7) Ohmori, Y. et al. (1990) J. Neurochem. 54, 80-85.
(8) Ohmori, Y. and Kuriyama, K. (1989) Neurochem. Int. 15, 359-363.
(9) Wojcik, W.J. and Neff, N.H. (1984) Mol. Pharmacol. 25, 24-28.

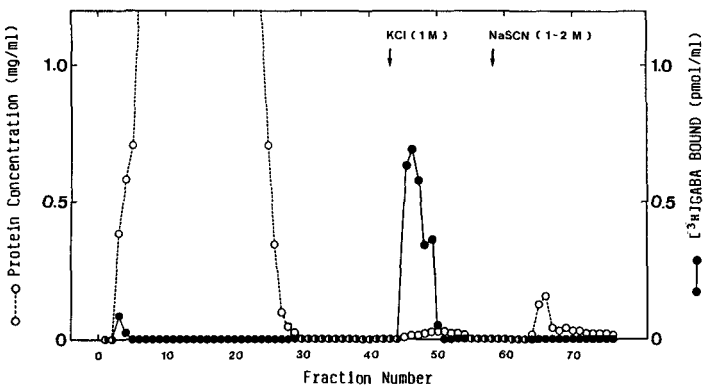


Figure 1 Affinity column chromatography using baclofen-epoxy-activated Sepharose 6B of solubilized fraction from bovine cerebral cortex.

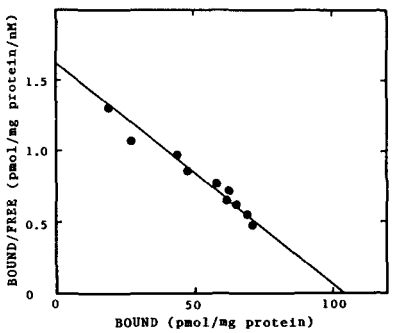


Figure 2 Scatchard plots of [³H]GABA binding to GABA$_B$ receptor.

Table 1 Summary on chromatographic separation of CHAPS-solubilized GABA$_B$ receptor from bovine cerebral cortex.

Step	Total protein (mg)	Total activity (pmol)	Specific activity (pmol/mg)	Recovery (%)	Purification fold
Solubilized	345.6	3.51	0.01	100	1
Purified	0.092	2.64	28.70	75	2828

91　牛脳 [^{3}H]flunitrazepam 結合阻害物質の精製

川嵜弘詔、伊藤正敏、中原辰雄*、納富昭人、深堀元文
（九州大・医・精神、理・化学*）

〔要約〕
牛大脳より酢酸抽出を用いて、[^{3}H]flunitrazepam 結合阻害活性を持つ内在性物質の精製を行なった。この結果、Sephadex G-10 を用いたゲル濾過にて３種類の結合阻害活性を持つ分画が分離され、そのうち低い分子量を持つ２種類の分画は（Peak 2, Peak 3)、薄層クロマトグラフィにて、それぞれ inosine, hypoxanthine と同定された。 Peak 1 については更に、陰イオン、陽イオン交換クロマトグラフィ、two-step reversed-phase HPLC を用いて均一に精製した。精製された物質は、[^{3}H]flunitrazepam 結合に対して拮抗型かつ用量依存型の阻害形式を持つことが示されたが、[^{3}H]Ro 5-4864 結合を阻害しなかった。またゲル濾過により 500 ダルトン以下の分子量を持つことが推定され、蛋白分解酵素、熱処理によって阻害活性は減少しなかった。紫外線吸収スペクトルにおいて最大吸収は 314nm であった。現在までの報告との比較検討より、この物質は中枢性ベンゾジアゼピン受容体に対する未知の結合阻害物質であることが示唆された。

ベンゾジアゼピン系薬物は、抗不安作用、抗痙攣作用、筋弛緩作用、鎮静作用などの効果を持ち、広く使用されている薬剤のひとつであるが、近年、哺乳類の中枢神経系において、ベンゾジアゼピン系薬物に対する特異的な飽和性高親和性結合部位が見出され[3]、GABA 受容体、chloride ionophoreと機能的にreceptor complexを構成することが報告されている[4]。ベンゾジアゼピン系薬物はその受容体を介して薬理学的な効果を発現することが示唆されている[5]。同時に受容体に特異的に結合し、生理学的な意義を持つ内在性リガンドの存在が想定され、現在までに種々の物質の分離精製の報告がなされているが、それらはベンゾジアゼピン受容体に対する内在性リガンドとして明確に確定されているわけではない[2]。今回、我々は牛脳よりベンゾジアゼピン受容体に対して拮抗型の阻害形式を持つ低分子量の物質を均一に精製し、その性質について検討したので報告する。

[実験方法]

材料は牛大脳を用い、1M 酢酸にてホモジナイズし、90℃, 30分間抽出を行なった。限外濾過にて、分子量10,000以上の物質を除去した。緩衝液は 50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)を用いた。これを Sephadex G-10, DEAE-Sephadex A-25, SP-Sephadex C-25, two-step reversed-phase HPLC の各クロマトグラフィで分画することにより精製を行った。逆相カラムは、μ Bondasphere C_{18} (Nihon Waters; 19 mm x 15 cm)、μ Bondapak C_{18} (Waters; 3.9 mm x 30 cm) をそれぞれ使用した。Peak 2, Peak 3 の分画の同定は薄層クロマトグラフィにより行なった。ベンゾジアゼピン結合阻害活性の測定は、[^{3}H]flunitrazepam (91.3mCi/mmol) を用いた受容体結合実験にて行なった。膜試料は牛大脳より調製したものを用い、非特異的結合には20uMのクロナゼパムを用いた。

[結果と考察]

Sephadex G-10 カラムによるゲル濾過にて [^{3}H]flunitrazepam の結合阻害活性をもつ３種類のピークが観察された (Fig.1)。薄層クロマトグラフィによる Peak 2, Peak 3 の解析の結果、 Peak 2, Peak 3 はそれぞれinosine, hypoxanthineと同一のRf値を示した(Peak 2:inosine; Rf=0.36)(Peak 3:hypoxanthine; Rf=0.50)。また Peak 2, Peak 3 は、共に拮抗型の阻害形式を示し、これらの結果は現在までの報告と矛盾しないものである[1]。Peak 1を更に、両陰陽イオン交換樹脂にて分画したが、結合阻害活性は共に run-through 分画に溶出された。このことよりこの物質は、イオン化されにくい性質を持つものであると考えられる。Two-step reversed-phase HPLC の結果を Fig.2 に示した。μ Bondapak C_{18} カラムにおいて結合阻害活性は、単一のピークとして精製された (Fig.2 B)。精製された物質の Scatchard解析の結果、Bmax 値は変化せず(control;2.19, inhibitor;2.16 (pmol/mg protein))、Kd値の変化のみを伴う (control;2.04,

inhibitor;5.99 (nM)) 拮抗型の結合阻害形式を示した (Fig.3)。また結合阻害活性は用量依存的に増加し、末梢性ベンゾジアゼピン受容体のリガンドである [^{3}H]Ro 5-4864 結合を阻害しなかった。このことは我々が精製した物質が中枢性ベンゾジアゼピン受容体においてベンゾジアゼピン結合部位と同部位に作用することを示すものである。ゲル濾過による分子量推定により、この分画の分子量は約 500 ダルトン以下と推定され、また紫外線吸収スペクトルにおいて最大吸収は 314nm であった。蛋白分解酵素 (trypsin, α-chymotrypsin, pronase)、熱処理 (100°C, 20 min or 60 min) によっても結合阻害活性は減少しなかった。現在までの報告において、我々の精製した物質と一致する性質を持つものはない。これらの結果は、今回我々が精製した物質が、中枢性ベンゾジアゼピン受容体に対して結合阻害活性を持つ新しい内在性リガンドである可能性を強く示唆するものである。現在我々は、この物質の同定を行っているところであるが、今後更に性質、生理活性についての検討を行うことにより、GABA 神経系についての新しい知見が得られるものと期待される。

[文献]

1) Asano, T. and Spector, S. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 977-981.

2) Hamon, M. and Soubrie, P. (1983) Neurochem. Inter. 5, 663-672.

3) Mohler, H. and Okada, T. (1977) Science. 198, 849-851.

4) Olsen, R. and Vender, C. eds. (1986) Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels: structural and functional properties. Alan Liss, Inc., New York.

5) Tallman, J.F. and Gallager, D.W. (1985) Ann. Rev. Neurosci. 8, 21-44.

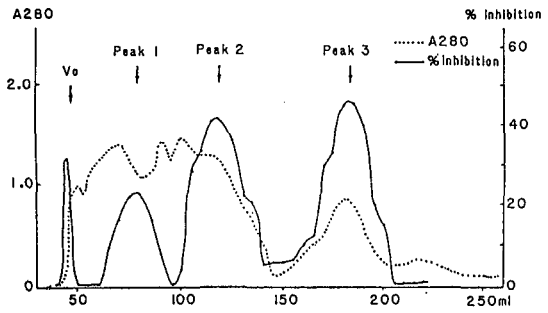


Fig.1 Chromatography on a Sephadex G-10 (1.6 cm x 60 cm) of the acidic extract of bovine brain after ultrafiltration.

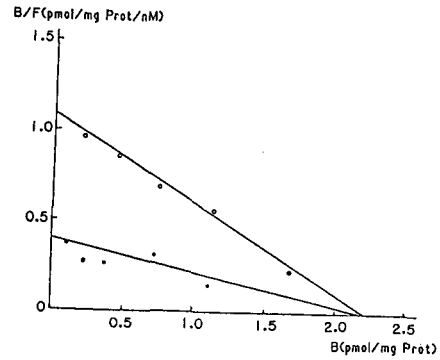
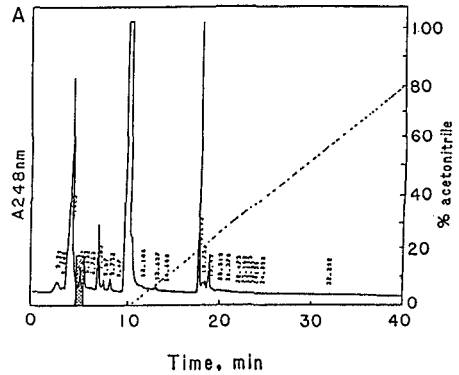


Fig.3 Scatchard analysis of the inhibition of [^{3}H]FNZ binding to bovine synaptosomal membranes by the purified endogenous inhibitor. [^{3}H]FNZ (concentration range = 0.5-40 nM) was incubated in 50 mM KPB (pH 7.4) for 120 min at 0°C in the absence (○) or presence (●) of the purified substance.



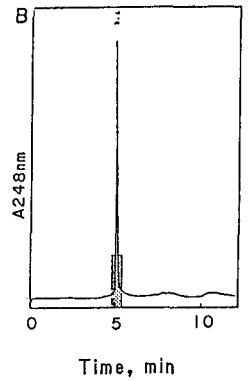


Fig.2 Elution profiles of the active fractions from SP-Sephadex C-25 by two-step reversed-phase HPLC. A: Chromatogram from a preparative μ Bondasphere C_{18} reversed-phase column with an acetonitrile gradient. B: This peak was further purified on a analytical μ Bondapak C_{18} reversed phase column. Inhibitory activity to the [^{3}H]FNZ binding was expressed as a dotted column.

92

脳シナプス膜への [^{3}H] スペルミジン結合の性質

米田幸雄、荻田喜代一、榎本理世
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
ラット脳シナプス膜標品を用いて、[^{3}H]スペルミジン(SPD)結合の検索を行い、その性質について検討した。[^{3}H]SPDの特異的結合は、用いた脳シナプス膜標品の量に比例して増加した。反応温度30℃の場合には、本結合は反応開始後1分以内に平衡状態レベルに到達するが、反応温度2℃では10分以内に平衡状態レベルに達した。また、本結合はいずれの反応温度においても、非放射性SPDの添加により速やかに解離した。Scatchard解析の結果、本結合は見かけ上単一成分系であり、そのKd値およびBmax値はそれぞれ161.8 μMおよび5.89 nmol/mg proteinであった。活性化状態のN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)チャネルを反映する[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]-cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合を増強するSPD、スペルミン(SPN)およびbis-(3-aminopropyl)amine(BAA)は、すべて本結合を強力に阻害したが、[^{3}H]MK-801結合の増強作用を持たない種々のポリアミンの結合阻害作用は極めて微弱であった。脳内各部位の中で、橋・延髄に最も高い結合が検出され、次いで中脳、線条体、小脳、視床下部、海馬、および大脳皮質の順であった。以上の結果より、脳内には[^{3}H]SPD結合部位が存在することが明らかとなり、本結合部位がNMDA感受性レセプター複合体と連関する可能性が推察される。

NMDA感受性レセプターは、イオンチャネル部位、NMDA認識部位およびストリキニーネ非感受性Gly認識部位(Gly_B部位)により構成される複合体と考えられている(4,7)。最近、イオンチャネルの生化学的指標である[^{3}H]MK-801結合がSPDやSPNなどのポリアミンにより増強されること(2,8)や、他の内在性のポリアミンが[^{3}H]MK-801を阻害すること(3)などが明かとなり、NMDA感受性レセプター複合体上の第4番目の部位としてポリアミン部位の存在が示唆されている(5,6)。本研究では、NMDA感受性レセプター複合体上のポリアミン部位の標識を目的として、[^{3}H]SPD結合部位の検索とその性質について検討した。

〔実験方法〕
ラット全脳より粗シナプス膜標品を調製し、50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)を用いて、50,000g、30分間の遠心分離により3回洗浄した。得られた膜標品は0.32 M ショ糖溶液に懸濁して-80℃で凍結保存した。使用時に懸濁液を室温融解したのち、0.08% Triton X-100で、2℃、10分間の前処理を行った。この前処理後、上述の洗浄操作を2回行った膜標品を結合実験に供した(1)。[^{3}H]SPD結合は、膜標品と20 nM [^{3}H]SPD(NEN/DuPont, 1100 GBq/mmol)を上記緩衝液中で、2℃、10分間反応させて行った。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濾過法により行った。非特異的結合は、非放射性の10 mM SPDを添加して測定した。

〔結果〕
[^{3}H]SPDの特異的結合は、用いた膜標品の量に比例して直線的に増加した(図1)。反応温度2℃の場合、本結合は反応開始後10分間以内に平衡状態レベルにまで到達した。反応温度を30℃に上昇させると、結合速度は著明に増加し、反応開始後1分間で最大結合を示した。反応温度2℃の場合の結合は、反応温度30℃の場合の約2倍であり、本結合が反応温度に逆依存することが明らかとなった。結合が平衡状態レベルに到達した時点で、大過剰の非放射性SPDを添加すると、結合は速やかに解離した。結合は用いたリガンド濃度に比例して増加し、600 μMのリガンド濃度でほぼ飽和状態に到達した。これをScatchard解析したところ、本結合は見かけ上単一成分系であり、そのKd値およびBmax値はそれぞれ161.8±14.7 μMおよび5.89±0.53 nmol/mg proteinであった(図2)。種々のポリアミンの本結合に対する阻害効果を検討した結果、[^{3}H]MK-801結合に対して増強作用を示すSPD、SPNおよびBAAが、本結合に対しても強い阻害作用を発揮した。これらのポリアミンの[^{3}H]MK-801結合に対するEC_{50}値(SPN; 12±1, BAA; 49±8, SPD; 59±8 μM)と、[^{3}H]SPD結合に対するIC_{50}値(SPN; 22±1, BAA; 173±41, SPD; 238±55 μM)には相関性が認められた。また、[^{3}H]MK-801結合を増強しないポリアミン(putrescine、cadaverine、1,6-diaminohexane、1,7-diaminoheptane、1,8-diaminooctane、およびputreanine)は、本結合に対する阻害作用も弱いことが判明した。本結合の脳内分布の検索を進めたところ、本結合部位は脳内に不均一に存在することが明らかとなった(表1)。また、本結合の親和力は、

図1．　タンパク質依存性

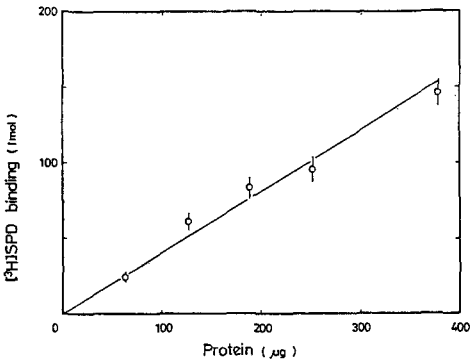


図2．　Scatchard 解析

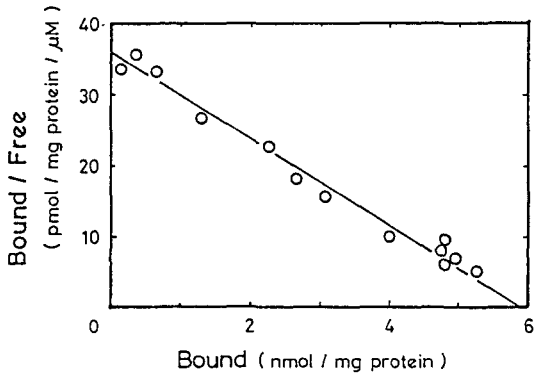


表1．　[3H]SPD 結合の脳内分布

Region	Bmax (nmol/mg protein)
Medulla-Pons	2.66±0.13
Midbrain	1.92±0.15
Striatum	1.48±0.11
Cerebellum	1.28±0.09
Hypothalamus	1.03±0.16
Hippocampus	0.90±0.12
Cerebral cortex	0.84±0.10

いずれの部位も同等であったが、最大結合部位密度に有意差が認められた。脳内各部位の中で、橋・延髄に最も高い結合が検出され、次いで中脳、線条体、小脳、視床下部、海馬、および大脳皮質の順であった。

〔考察〕

脳シナプス膜標品中には、構造選択性、可逆性および飽和性を有する[3H]SPD結合部位の存在が明らかとなった。本結合の機能的役割については、種々のポリアミンの本結合に対する阻害力と[3H]MK-801結合に対して増強作用が相関性を示すことから、本結合がNMDA感受性レセプター複合体と関連性を持つ可能性が考えられる。しかしながら、本結合の親和力が極めて低く、最大結合部位密度も大きいことや、その脳内分布が[3H]MK-801や[3H]グルタミン酸結合部位とは異なることなどから、[3H]SPDがNMDA感受性レセプター複合体にのみ結合している可能性は低いと思われる。したがって、本結合がNMDA感受性レセプター複合体上のポリアミン部位を反映するか否かについては、慎重な検討が必要であろう。一方、ポリアミンのNMDA感受性レセプターへの作用が、レセプター複合体以外のポリアミン親和性部位を介して発現する可能性も否定できないので、本結合とNMDA感受性レセプター複合体との関連性については、今後詳細なる検討が望まれる。

〔文献〕

1. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
2. Ransom, R.W. and Stec, N.L. (1988) J. Neurochem. 51, 830-836.
3. Williams, K., Romano, C. and Molinoff, P. B. (1989) Mol. Pharmacol. 36, 575-581.
4. Wroblewski, J.T. and Danysz, W. (1989) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 441-474.
5. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1990) Neurosci. Res. in press.
6. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1990) NEUROTRANSMITTER RECEPTOR: NEURORECEPTOR MECHANISMS IN BRAIN (Kito, S. Segawa, T. and Olsen, R. eds), Plenum, New York, in press.
7. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T. (1988) Neurotransmitter: Focus on Excitatory Amino Acids (Kanazawa, I., ed.), pp. 47-65, Excerpta Medica, Tokyo.
8. 米田幸雄、荻田喜代一 (1989) 神経化学　28, 136-137.

93 興奮性アミノ酸レセプター結合の脳内分布

榎本理世、荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
興奮性アミノ酸レセプターの脳内分布を生化学的な結合実験により検討した。N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)感受性レセプター複合体上のNMDA認識部位を標識するNMDA感受性[^{3}H]グルタミン酸(Glu)結合は、海馬および大脳皮質に最も高く、次いで線条体、視床下部、中脳、小脳、および橋・延髄の順であった。また、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)結合は、ともに[^{3}H]Glu結合の場合と類似した脳内分布を示した。Scatchard解析の結果、いずれの結合においても、その分布の不均一性が親和力の差異ではなく、最大結合部位密度の相違に起因することが判明した。以上の結果より、NMDA感受性レセプター複合体の各サブコンポーネントは、極めて類似した分布を示すことが示唆される。

興奮性アミノ酸レセプターには、アゴニストの感受性により少なくとも3種類のサブタイプに分類される。すなわち、NMDA感受性、DL-α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA)感受性(キスカル酸感受性)およびカイニン酸(KA)感受性レセプターである(3)。その中で、NMDA感受性レセプターは、[^{3}H]MK-801で標識されるイオンチャネル部位(6,7)、[^{3}H]Glu(4)や[^{3}H]CPP(9)で標識されるNMDA認識部位、および[^{3}H]Glyで標識されるストリキニーネ非感受性Gly認識部位(Gly_B部位)(5,8,10)の少なくとも3種のサブコンポーネントから構成されると理解されている。一方、AMPA感受性およびKA感受性レセプターは、それぞれアゴニスト認識部位への[^{3}H]AMPAおよび[^{3}H]-KA結合により検出されている(3)。本研究では、この興奮性アミノ酸レセプターの脳内分布を明らかにする目的で、脳内各部位より調製した膜標品への各種放射性リガンドの結合能を測定した。

〔実験方法〕

膜標品を調製：Wistar系雄性ラットの脳を、Glowinski and Iversenの方法(2)により大脳皮質、海馬、線条体、中脳、小脳、視床下部、および橋・延髄の7部位に分画した。各組織を40倍量の1 mM EDTA、0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluorideおよび0.01% bacitracinを含む5 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)でホモジナイズし、そのホモジネートを同量の50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)を用いて、50,000g、30分間の遠心分離により3回洗浄した。得られた膜標品は、0.32 M ショ糖溶液に懸濁して-80℃で凍結保存した。使用時には懸濁液を室温融解した後、0.08% Triton X-100で、2℃、10分間の前処理を行った。前処理後、上記洗浄操作を2回行った膜標品を結合実験に供した。

結合実験：[^{3}H]Gluおよび[^{3}H]Gly結合は、それぞれ10 nM [^{3}H]Glu(ARC, 2220 GBq/mmol)および10 nM [^{3}H]Gly(ARC, 1110 GBq/mmol)と膜標品を50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)中で、2℃、10分間反応させて測定した。[^{3}H]MK-801結合の測定は、5 nM [^{3}H]MK-801(NEN/DuPont, 833 GBq/mmol)と膜標品を、10 μM Gluおよび10 μM Glyを含む上記緩衝液中で、30℃、16時間反応させて行った。また、[^{3}H]AMPAおよび[^{3}H]KA結合は、それぞれ10 nM [^{3}H]AMPA(NEN/DuPont, 1021 GBq/mmol)および10 nM [^{3}H]KA(NEN/DuPont, 2220 GBq/mmol)を用いて、30℃で30分間反応させて測定した。反応停止は、いずれの結合実験においてもWhatman 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。

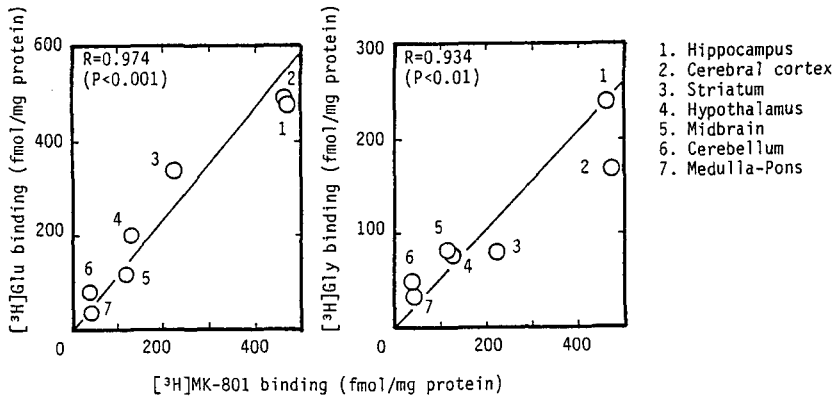
〔結果〕

NMDA感受性レセプター複合体の各サブコンポーネントを反映する結合の分布を表1に示す。NMDA感受性[^{3}H]Glu結合、ストリキニーネ非感受性[^{3}H]Gly結合およびGlu/Gly存在下の[^{3}H]MK-801結合は、いずれも海馬および大脳皮質が最も高く、次いで線条体、視床下部および中脳が続き、小脳および橋・延髄で最も低値を示した。これらの各結合の分布には高い相関性が認められた(図1)。各部位についてScatchard解析を行ったところ、[^{3}H]Glu結合の場合、その親和力には部位間で有意差は見られなかったが、最大結合部位密度に著明な差が認められた(Bmax値(pmol/mg protein): 海馬; 2.42±0.07, 大脳皮質; 2.15±0.18, 線条体; 1.44±0.12, 視床下部; 0.85±0.11, 中脳; 0.62±0.04, 小脳; 0.44±0.05, 橋・延髄; 0.25±0.04)。同様な結果が[^{3}H]Gly結合および[^{3}H]MK-801結合にも観察された。[^{3}H]-

表1． NMDAレセプター複合体の脳内分布

Region	Binding (fmol/mg protein)		
	[^{3}H]Glu	[^{3}H]Gly	[^{3}H]MK-801
Hippocampus	493.8±14.8	242.6± 8.7	456.4±58.5
Cerebral cortex	475.4±10.5	170.6±14.6	467.4±52.5
Striatum	339.6±19.4	81.4± 8.4	221.3±31.0
Hypothalamus	200.1±10.5	79.0± 8.0	131.0±22.0
Midbrain	122.2± 6.7	83.7± 4.0	115.1±15.8
Cerebellum	80.2± 4.3	50.6± 5.3	36.9± 3.4
Medulla-Pons	38.3± 4.7	34.3± 4.0	39.6± 5.0

図1． 各結合の相関性



AMPA結合および[^{3}H]KA結合もまた脳内に不均一に分布して、海馬および大脳皮質に比較的高いことが判明した。

〔考察〕

本研究で行った生化学的手法では、オートラジオグラフィー法のような微細な分布の検討は困難であるが、標品を充分に洗浄することにより、結合部位の正確な親和力と最大密度を算出することが出来るという利点がある。このことはGluやGlyのような内在性アミノ酸の結合部位を検出する場合に極めて重要なことである。本研究で得られた結果は、オートラジオグラフィー法の結果(1)とよく一致しており、NMDA感受性レセプター複合体の各サブコンポーネントの分布が高い相関性を示すことが明らかとなった。さらに、各結合部位の親和力がいずれの部位でもほぼ同一であることが示された。これらのことは、脳内のすべての部位のNMDA感受性レセプターが、イオンチャネル部位、NMDA認識部位およびGly_B部位から構成されることを示唆するものである。

〔文献〕

1. Cotman, C.W., Monaghan, D.T., Ottersen, O.P. and Storm-Mathisen, J. (1987) Trends Neurosci. 10, 273-280.
2. Glowinski, J. and Iversen, L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669.
3. Monaghan, D.T., Bridges, R.J. and Cotman, C.W. (1989) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 365-402.
4. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
5. Ogita, K., Suzuki, T. and Yoneda, Y. (1989) Neuropharmacol. 28, 1263-1270.
6. Wong, T.H.F., Knight, A.R. and Woodruff, G.N. (1988) J. Neurochem. 50, 274-281.
7. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Brain Res. 499, 305-314.
8. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. 164, 841-849.
9. Yoneda, Y., Ogita, K., Kouda, T. and Ogawa, Y. (1990) Biochem. Pharmacol. 39, 225-228.
10. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T. (1990) J. Neurochem. 55, 237-244.

94 脊髄内アミノ酸伝達候補物質の検索

藤田公和・紺野浩一＊・神野哲夫＊・本田虔夫＊＊・永田　豊
（藤田学園保健衛生大学・医・生理、＊脳神経外科、＊＊横浜市民病院）

［要約］　脊髄内を走行している神経線維の変性・脱落と遊離アミノ酸含量の関係を調べるため、筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者脊髄（頸髄）中の遊離アミノ酸含量およびサルのを一側の大脳皮質運動野の焼灼・破壊手術後の脊髄内遊離アミノ酸含量を測定し、それぞれの対照例と比較した。その結果ALS患者脊髄では、正常人のものと比較して脊髄横断面各部位でのアスパラギン酸（Asp）とグルタミン酸（Glu）含量に有意な減少が観察された。一方、術後１週間のサルの脊髄では、脊髄内各部位でいずれのアミノ酸含量にほとんど変動が見られなかった。しかし術後５週間経過すると対照側に比較して手術側脊髄側索部のAspとGlu含量に低下傾向が見られた。このことから脊髄内下行性神経の変性とAspおよびGlu含量の減少にはには強い相関があり、これは第一次運動ニューロンの神経伝達候補物質としてAspとGluが関与している可能性を強く示唆するものである。

［序］　脊髄前角に神経細胞体を有し、骨格筋にその軸索を伸長している第二次運動ニューロンの伝達物質はアセチルコリンであることが既に確定している[1)]。しかし、大脳皮質運動野から脊髄を下行している第一次運動神経が利用している伝達物質については、種々な物質が候補にあげられているものの確定的な証明がなされておらず、充分解明されたとは言いがたい。我々は以前にラットを用いて、大脳皮質運動野の除去手術後、脊髄横断面各部の神経伝達候補物質含量を測定して、第一次運動ニューロンの伝達物質を検索しようと試みた。その結果、患側の頸髄および胸髄でノルエピネフリンやドーパミンなど、モノアミンの一部に減少傾向がみられたものの、それらの物質が伝達物質として利用されているかどうかを断定するまでには至らなかった[2)]。今回の研究は以下のような二種類の実験、すなわちヒト筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者の脊髄内各部の遊離アミノ酸含量を測定し、それを非患者のものと比較する方法およびサルの大脳皮質運動領野の破壊後にみられる脊髄内各部のアミノ酸含量を測定しそれを非手術側のものと比較する実験を行った。そしてこれらの測定値を比較検討することによって、脊髄内を走行している神経の変性と遊離アミノ酸含量との相関を調べ、第一次運動神経の伝達物質を推定しようと企図した。

［実験材料および方法］　１）筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者脊髄中の遊離アミノ酸含量の測定：　ヒトALS患者（５例）の死後比較的速やか（数時間以内）に脊髄（頸髄）を摘出し、－８０℃に凍結した。この凍結脊髄をドライアイス上で数mmの厚さに横断して、それぞれ側索、前角（前索を含む）、後角および後索に分割した組織片を作製した。各組織片は微小ホモゲナイザーを用い７０％エタノール中で磨細し、その除蛋白上清液中に含まれる遊離アミノ酸含量をアミノ酸自動分析装置（日立８３５型）で定量した。また非神経疾患で死亡したヒトの脊髄（２例）をコントロールとして用い、同様の手順で遊離アミノ酸を分析した。　２）サルを用いた大脳皮質運動野焼灼・除去手術後の脊髄内遊離アミノ酸含量の測定：　体重３ｋｇ前後のサルをネンブタール麻酔下で頭頂部の頭蓋骨を剥離し、左側の大脳皮質運動野を電気メスで焼灼・破壊した。手術後、麻酔から回復させたサルは右手および右足の完全な運動麻痺が認められ、少なくとも５週間までは回復しなかった。術後１週間目（３例）および５週間目（３例）に、再び麻酔下にサルの大脳および脊髄組織を全長にわたって摘出した。脊髄は頸・胸および腰部を厚さ数mmに横断してそれぞれ左右の前角（前索を含む）、後角（後索を含む）および側索部分の組織片に分割し、各組織中の遊離アミノ酸含量を測定した。

［結果］　１）ALS患者脊髄（頸髄）組織内の遊離アミノ酸含量：ALS患者脊髄（頸髄）組織内では前角、後角および後索ではAspが、後角でGluがそれぞれ有意な低下が認められた。また、有意ではなかったけれどもALS頸髄側索部ではAspの減少傾向がみられ、Glu含量も脊髄横断面各部で低下傾向が認められた。一方、グリシン（Gly）、タウリン（Tau）および　γ－アミノ酪酸（GABA）は非患者脊髄内各部とALS患者の各値と比較して著明な差異は認められなかった（表１）。　２）片側大脳皮質運動野を破壊したサルの脊髄内遊離アミノ酸含量の比較：摘出した脊髄横断面では、非患側（左側）脊髄各部位と比較して、患側（右側）脊髄各部の遊離アミノ酸含量には有意な変動は観察されなかった。しかし、術後５週間、すなわち片側四肢の運動マヒが持続していた脊髄標本側索部分のみにAspとGlu含量の減少傾向が見られたが、Gly、GABAおよびTau含量はいずれの部位でも大きな変動は観察されなかった　（表２）。

［考察］　脊髄を下行する第一次運動ニューロンの軸索大脳皮質および皮質下核にある細胞体を発して大部分が脊髄外側に位置する側索部を通ることが知られている。また、哺乳動物の神経組織ではAsp、Gluは興奮性、

Gly、GABA、Tauは抑制性の神経伝達物質と考えられている。、ALS患者脊髄横断標本の病理所見からも、病名の由来からも示されている如く、側索部で神経線維の変性による染色性の低下が認められている。今回の実験ではALS患者脊髄標本で、脊髄側索部のみならず脊髄全体でAspとGlu含量が著明に減少しており、この変化は神経の走行路とは必ずしも一致しないという結果であった。吉野ら[3,4]はALS患者脊髄内各部位の遊離アミノ酸含量を測定した結果、非患者脊髄の値と比較してAsp,Glu含量のみならずTau量の著明な増加を認めており、これは脊髄ニューロンの変性の結果、細胞外に遊出した結果ではないかと推測している。しかし今回の我々の測定は彼らのものとは相反した成績であり、脊髄内第一次ニューロンの伝導経路や介在ニューロンの長期間にわたる変性・脱落によって、これらニューロン内に含まれているアミノ酸伝達候補物質の減少が期待される。さらに、サルを用いた実験で、片側（左側）大脳皮質運動野を破壊して１週間後では右片側の手足の麻痺を生じた患側脊髄の各横断面では、対照側（左側）脊髄組織と比べてアミノ酸含量の変動がほとんど認められなかったのに対して、術後５週間を経過したサル脊髄では対照側と比較して患側側索内で特に興奮性アミノ酸であるAspとGlu含量の低下傾向が認められた。したがって、大脳皮質運動領野に細胞体を有する第一次運動ニューロンは、興奮性神経伝達物質としてAspとGluを利用している可能性を強く示唆するものと考えられた。既にYoungら[5]はサル片側運動領野を除去して８週間後の体側脊髄標本の^{3}H-Glu取り込みの明かな減少がみられた事から、我々とほぼ同様の考察を行っている。

［文献］　１）Nagata.Y.et.al(1982) Brain Res.224.223-229.　２）藤田公和ら(1989)藤田学園医学会誌　13,223-228.　３）吉野佳一ら(1976) 臨床神経 16.768-773.　４）吉野佳一ら(1987) 臨床神経 27.143-150.
５）Young,B.A.et al(1983) Neurology.33.　1513-1516.

表１　正常人および筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）患者の頸髄内遊離アミノ酸含量（μmol/g wet weight）

	Asp	Glu	Gly	GABA	Tau
Lateral column	0.801±0.316	3.335±0.331	1.472±0.735	0.254±0.100	2.379±0.079
	0.502±0.254	**2.103±0.588**	**1.585±0.502**	**0.204±0.096**	**2.462±0.658**
Ventral horn	0.870±0.016	4.209±0.411	2.310±0.661	0.640±0.065	2.341±0.057
	0.383±0.233*	**2.269±0.958**	**1.852±0.812**	**0.413±0.171**	**2.441±0.646**
Dorsal horn	1.143±0.086	4.465±0.281	1.719±0.604	0.622±0.017	2.364±0.525
	0.532±0.214*	**2.656±0.695***	**1.857±0.819**	**0.430±0.158**	**2.757±0.875**
Dorsal column	1.099±0.193	3.639±0.360	1.519±0.578	0.181±0.107	2.209±0.410
	0.418±0.121**	**2.119±0.803**	**1.380±0.715**	**0.114±0.068**	**2.402±0.836**

上段は正常人試量（２例）、下段は患者試量（太文字、５例）中の含量を示す。
数値は平均値±標準偏差　＊P<0.05　＊＊P<0.01

表２　大脳皮質焼灼・除去手術後１週間および５週間目の脊髄側索内遊離アミノ酸の変動

		Asp	Glu	Gly	GABA	Tau
Cervical	C:	100	100	100	100	100
	1W:	96±28	93±34	104±6	100±28	104±37
	5W:	84±10	94±17	113±28	97±42	106±40
Thoracic	C:	100	100	100	100	100
	1W:	91±29	99±20	101±41	--	102±13
	5W:	87±21	82±14	93±8	--	91±29
Lumbar	C:	100	100	100	100	100
	1W:	106±32	121±46	104±51	113±60	122±13
	5W:	86±29	74±13	105±12	84±20	107±17

脊髄左側（コントロール）の数値を１００％として示した。数値は平均値±標準偏差、Ｃ：Control side（左側）　１Ｗ：術後１週間目の脊髄右側　５Ｗ：術後５週間目の脊髄右側

95 レセルピン慢性投与のコリン作動性神経機構に及ぼす影響：レセプター結合能測定の有用性

浅沼幹人＊，羽場久美子，小川紀雄，森　昭胤
（岡山大・医・脳研・機能生化学）

〔要約〕ラットへのレセルピン慢性投与により、広範に脳内のモノアミン濃度は減少し、線条体のD_2レセプターは増加した。脳内各部位でのアセチルコリン(ACh)濃度には変化が認められなかったにもかかわらず、線条体と前頭皮質においてM₁レセプター（[³H]pirenzepine結合による）は親和性の変化を伴わないBmaxの減少を呈した。これはカテコールアミン減少によりACh放出が亢進し、それによりM₁Rがdown-regulateされ、さらにACh合成が代償性に亢進し見かけ上ACh濃度が正常化しているためではないかと考えられる。以上のように神経回路網の相互間連を検討する際にはレセプター結合能測定が有用であると考えられる。

[目的] 脳機能を解明する上で、神経回路網間の相互間連を知ることは重要である。近年カテコールアミン(CA)作動性神経のコリン作動性神経に及ぼす影響について神経伝達物質レベルではいくつか研究がなされている。特に黒質－線条体系のドーパミン(DA)作動性神経は線条体内コリン作動性神経に投射しており、DAレセプターを介してアセチルコリン(ACh)含量およびその放出を制御していると考えられている(2)。今回DA作動性神経のコリン作動性神経機構に対する影響をたんにACh濃度だけでなく、ムスカリン性AChレセプター（mAChR)も含め、しかも脳内各部位について明らかにする目的で、ラットにレセルピン(RES)を慢性投与して脳内CA濃度，ACh濃度、D_2レセプター(D_2R)，mAChRのうち脳に特異性の高いM₁レセプター(M₁R)への影響について検討した。

[方法] 8週齢の雄性SD系ラットにRESを0.5mg/kg/day,14日間皮下注射し、対照群には生食を投与した。最終投与6時間後に、屠殺し速やかに7部位に分けた。モノアミン，ACh濃度は既報に従いマイクロウェーブ照射脳よりHPLC法にて定量した(3)。D_2R,M₁Rは、断頭屠殺脳から得た粗膜標品を用いて、それぞれ[³H]spiperone(SP),[³H]pirenzepine(PZ)によるradiolabeled receptor assay (RRA)にて検討した(4)(5)。非特異的結合はそれぞれ10μM sulpiride,1μM atropine存在下での結合とした。

Table 1. Changes of catecholamines, their metabolites and acetylcholine by chronic reserpine (RES) treatment.

	(n)	NA (ng/mg protein)	DA (ng/mg protein)	DOPAC (ng/mg protein)	HVA (ng/mg protein)	5HT (ng/mg protein)	5HIAA (ng/mg protein)	ACh (nmol/mg protein)
Striarum								
Control	(6)	5.70±0.52	67.3±5.33	5.42±0.25	6.40±0.37	7.78±0.78	6.47±0.65	0.98±0.11
RES	(8)	2.67±0.34**	6.63±0.88**	2.90±0.44**	2.36±0.39**	0.69±0.18**	7.08±1.06	0.81±0.09
Frontal cortex								
Control	(6)	4.52±0.75	4.44±1.45	2.30±0.67	1.53±0.25	7.00±0.82	6.23±0.91	1.09±0.27
RES	(8)	1.28±0.17**	0.66±0.12*	1.25±0.25	1.34±0.25	0.87±0.18**	7.60±1.20	1.08±0.13
Hippocampus								
Control	(6)	5.19±0.72	0.76±0.10	0.25±0.06	0.40±0.05	4.18±0.45	0.84±0.06	0.43±0.06
RES	(8)	0.31±0.06**	0.29±0.10**	0.31±0.06	0.29±0.06	0.50±0.09**	0.97±0.16	0.37±0.04

Values are mean±S.E.M. *p<0.05, **p<0.01 compared with control group(one-way ANOVA).

Table 2. Effects on pirenzepine and spiperone bindings by chronic reserpine (RES) treatment.

PZ-RRA(n)	Striatum		Frontal cortex		Hippocampus	
	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg protein)	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg protein)	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg protein)
Control(4)	14.60±3.26	0.48±0.08	15.66±3.84	0.79±0.21	11.46±0.72	0.61±0.27
RES (4)	7.09±1.93	0.24±0.05*	5.54±0.66	0.13±0.03*	9.28±1.67	0.51±0.08

SP-RRA	Striatum	
Control(5)	0.10±0.02	0.13±0.01
RES (5)	0.17±0.04	0.18±0.02*

Values are mean±S.E.M.
*$p<0.05$ compared with control group (one-way ANOVA).

[結果] 脳内ノルアドレナリン(NA),DA,セロトニン(5HT)濃度はRES投与群では対照群に比し有意に減少した(Table 1)。特に線条体のDAの減少は著明で正常の10%に減少した。代謝産物、DOPAC,HVA は線条体においてのみ有意に減少し、他の部位では減少傾向がみられたのにとどまった。また5HIAAには変化が認められなかった。ACh濃度もいずれの部位においても有意な変化を認めなかった(Table 1)。

線条体のD_2RではKd値には変化がなかったが、BmaxはRES投与により有意に増加していた。M_1RはACh濃度に変化が見られないにもかかわらず線条体と前頭皮質においてBmaxの有意な減少が認められ、Kd値は減少傾向があるものの有意差はなかった(Table 2)。

[考察] RESの単回投与によりCAは沽渇しCA代謝回転が亢進することが知られているが、我々はRES慢性投与を行った。線条体以外の部位ではCAは減少していたが、代謝産物には変化がみられなかった。これに対して線条体では代謝産物(DOPAC,HVA)も減少していた。これはRES慢性投与によるDAの減少が特に線条体において最も顕著であったことと対応している。RES投与群における線条体D_2Rの増加は、慢性DA沽渇状態に対してD_2Rがup-regulateされたものと考えられる。一般にDA作動性神経は線条体内コリン作動性神経に対し抑制性に働くと考えられている(2)が、作用様式の詳細については数多くの報告があり一定した結果が得られていない(1,5,6)。D_1アンタゴニスト投与により線条体内AChの放出が減少しACh含量が増加するが、D_2アンタゴニスト投与では逆にACh放出は増加しACh含量は減少するという報告(1)がある。 今回我々はRES慢性投与により線条体と前頭皮質でACh濃度に変化がないにもかかわらずM_1Rが減少していることを見いだした。これはCA減少によりACh放出が亢進し、それによりM_1Rがdown-regulateされ、さらにAChの合成が代償性に亢進し見かけ上ACh濃度が正常化しているためではないかと考えられる。現在コリンアセチルトランスフェラーゼ活性について検討しており、またいずれのCA作動性神経が前頭皮質のM_1Rをdown-regulateさせているのかについても検討中である。以上の成績より、神経回路網の相互間連を検討する際にはレセプター結合能測定が必要であると考えられる。

[文献]

1. Bertorelli, R. and Consolo, S. (1990) J. Neurochem., 54, 2145-2148
2. De La Mora, M. T. and Fuxe, K. (1977) Brain Res., 135, 107-122
3. Haba, K. et al. (1990) Neurochem. Res., 15, 487-493
4. Ogawa, N. et al. (1987) Eur. Neurol., 26 (suppl. 1), 16
5. Pittaluga, A. et al. (1987) Fundam. Clin. Pharmacol., 1, 317-325
6. Scatton, B. (1982) Life Sci., 31, 2883-2890

96 Denbufylline (RBL 30892) の脳内アセチルコリン神経系に及ぼす影響

桂　昌司、橋本恒一、栗山欣弥
（京都府立医大・薬理）

〔要約〕

Denbufylline (RBL 30892, Denb.)の脳内アセチルコリン(ACh)神経系に及ぼす影響について検討した。Denb.(0～30 mg/kg, p.o.) の単回投与により、脳内ACh含量は用量－依存的な低下を示したが、choline acetyltransferase(CAT)活性ならびにacetylcholinesterase(AChE)活性は何ら影響を受けなかった。また、線条体切片への[^{3}H]choline取り込みに対しても、Denb.(10^{-8}～10^{-4} M)のin vitro添加は抑制効果を示さなかった。一方、線条体切片からの高K^+(20 mM)刺激に伴う内在性AChの放出量は、Denb.(10^{-4} M)のin vitro添加により著明な増加を示した。Denb.(30 mg/kg, p.o.)の単回投与は、脳内cyclic AMP(cAMP)含量を増加させた。更に、線条体切片においてcAMP含量の増加と共に認められた高K^+(20 mM)刺激に伴う内在性ACh放出量の増加は、dibutyryl cAMP(5×10^{-3} M)のin vitro添加時においても同様に認められた。次に、in vivo microdialysis系を用いて検討したところ、Denb.(30 mg/kg, i.p.)の投与は線条体からの自発性ACh遊離量には何ら影響を及ぼさなかったが、高K^+(100 mM)刺激に伴う内在性ACh放出量を増加させた。したがって、Denb.は脳内cAMP含量を増加させることにより、脳内AChのシナプス性放出を促進させる作用を持つ薬物である可能性が示唆される。

〔目的〕

Denb.[1,3-di-n-butyl-7-(2-oxopropyl)-xanthine]は、phosphodiesterase type Ⅲに選択的阻害作用を示す[1]新規アルキルキサンチン誘導体である。これまでに、薬効薬理実験において、実験的脳浮腫抑制作用、学習記憶改善作用が認められ、更に脳虚血モデルにおいて大脳皮質酸素分圧上昇作用[2]および血液性状改善作用[3]等が報告されていることから、脳循環・代謝改善薬としての有用性が期待される。したがって、今回我々はDenb.の脳内ACh神経系に及ぼす影響について検討した。

〔方法〕

Wistar系雄性ラット(200～250 g)を使用した。

1)脳内AChおよびcAMP含量、ならびに関連酵素活性の測定：Denb.(0～30mg/kg, p.o.)投与1時間後に、含量の測定についてはラット頭部にマイクロウェーブ照射(5KW, 1.1sec)により代謝酵素を不活化した後、また、酵素活性の測定については速やかに断頭放血致死させた後、大脳皮質、海馬および線条体を分画[4]し、ACh含量[5]、cAMP含量(RIA kit, NEN)、CAT活性[6]およびAChE活性[7]の測定を行った。

2)[^{3}H]Choline取り込み量ならびに内在性ACh放出量の測定：ラット線条体切片(200 μm)を作成し、[^{3}H]choline取り込み量の測定については、線条体切片をKreb's-Ringer(KR)液(pH 7.4) 中で[^{3}H]choline(10 nM)存在下に37℃、20分間反応させることにより行った。また、高K^+(20 mM)刺激に伴う内在性ACh放出量の測定については、線条体切片をKR液中でphysostigmine(10^{-5} M)存在下に反応液を1分毎に順次交換し、合計30分間の反応を行った。内在性ACh放出量は、反応開始後5分ならびに20分に20mM KClによるAChの刺激反応性放出を行い、刺激2回目に遊離されたACh量(S_2)の1回目(S_1)に対する比(S_2/S_1)で算出し、薬物処置はK^+刺激2回目5分前より行った。

3)In vivo microdialysisを用いたACh放出量の測定：ハロセン麻酔下に、ラット線条体領域に透析プローブ(BAS 2 mm, CMA10)をBregmaよりA0.0, L3.5 mmの位置にプローブ先端より4.5 mmの深さまで挿入し、直ちに灌流実験を行った。ラット体温を36.0±0.2℃に保ち、physostigmine(10^{-5} M)を含むRinger液(pH 7.4)を2 μl/minの流速で灌流し、氷冷下に20分毎に灌流液を回収し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によりAChを測定した。なお、高K^+(100 mM)刺激に伴う内在性ACh放出量の測定は、線条体切片の場合と同様に、自発性ACh遊離量の安定後20分ならびに100分にそれぞれ10分間、100mM KClを含むRinger液を灌流することにより行った。また、薬物処置はK^+刺激2回目30分前より行った。

〔結果および考察〕

Denb.(0～30mg/kg, p.o.) の単回投与後1時間におけるACh含量は、大脳皮質、海馬および線条体において用量依存的

な低下を示した(Fig. 1)。そこで、本作用が何に起因するものなのかについて、先ずコリン作働性ニューロンの機能状態の指標となるCAT 活性ならびにAChE活性に及ぼす影響について検討したが、 Denb.(30 mg/kg, p.o.)はいずれの酵素活性に対しても何ら影響を及ぼさなかった。 したがって、Denb.はコリン作働性ニューロンにおけるACh 代謝には何ら影響を及ぼさないことが示唆される。つぎに、cholineのニューロンへの取り込み、ならびにシナプスからのACh放出の変化に及ぼす影響について、線条体より得られた切片を用いて検討した。 [^{3}H]choline取り込みに対し、 Denb.(10^{-8}～10^{-4} M)のin vitro添加は何ら影響を及ぼさなかった。一方、線条体切片からの高K^+(20mM)刺激に伴う内在性ACh放出量は、Denb.(10^{-4} M)のin vitro添加により増加した(Fig. 2A)。 したがって、Denb.は線条体AChニューロンに直接作用することにより、choline の取り込みを抑制するのではなく、 シナプスからの内在性ACh放出を促進することにより、ACh代謝回転を亢進させることが強く示唆される。Denb.は phosphodiesterase type Ⅲに選択的阻害作用を示すことから、 つぎにDenb.の脳内cAMP含量に及ぼす影響について検討を行い、併せてACh放出の変化との相関性についても検討した。Denb.(30 mg/kg, p.o.)の単回投与により、 大脳皮質、海馬および線条体のいずれの部位においてもcAMP含量は著明な増加を示した(Fig. 3)。さらに、線条体切片においてcAMP含量の増加と共に認められた高K^+(20 mM)刺激に伴う内在性ACh放出量の増加は、dibutyryl cAMP(5×10^{-3}M)のin vitro 添加時においも認められた(Fig. 2B)。したがって、Denb.は脳内cAMP含量を増加させることにより、脳内ACh のシナプス性放出を促進させる作用を持つ薬物である可能性が示唆される。

つぎに、in vivo microdialysis 法を用い、Denb.の脳内ACh系に及ぼす影響について検討した。 Denb. (30 mg/kg, i.p.)は線条体からの自発性ACh 遊離量には何ら影響を及ぼさなかったが、 高K^+(100 mM)刺激に伴う内在性ACh 放出量を増加させた(Fig. 4)。 したがって、Denb.は脳内AChのシナプス性放出を促進させる作用を持つ薬物である可能性が、in situ における解析においても示唆された。

以上の成績より、 Denb.は脳内cyclic AMP含量の増加を招来するとともに、 コリン作働性シナプスにおけるACh放出を促進させる作用を有する薬物であると考えられる。

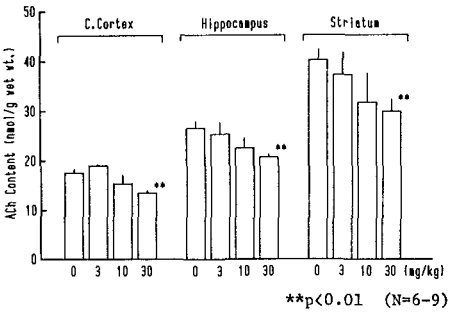


Fig. 1 Effect of single administration of denbufylline on cerebral acetylcholine(ACh) content in rat.

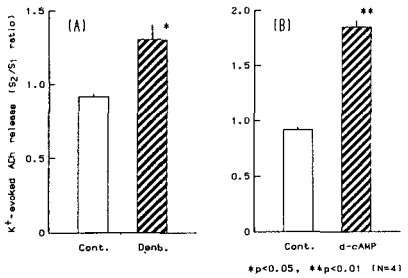


Fig. 2 Effect of in vitro additions of denbufylline(A) and dibutyryl cyclic AMP(d-cAMP, B) on K^+-evoked endogenous acetylcholine(ACh) release from striatal slices of rat.

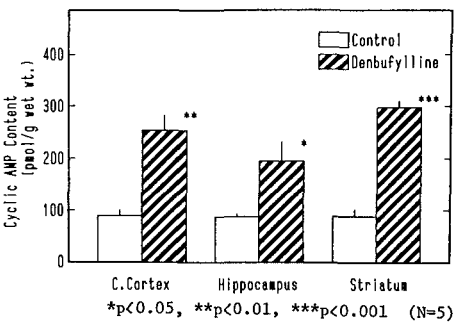


Fig. 3 Effect of single administration of denbufylline on cerebral cyclic AMP content in rat.

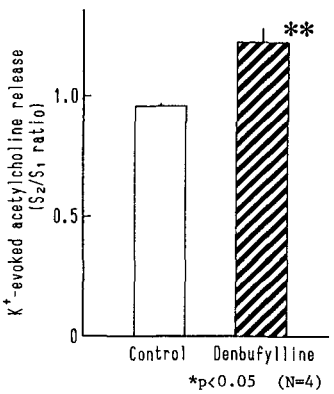


Fig. 4 Effect of denbufylline on K^+-evoked acetylcholine(ACh) release in rat striatum in vivo.

〔文献〕

1) Nicholson, C.D., et al. (1987) Br. J. Pharmacol., **92**, 680P 2) Angersbach, D., et al. (1984) Arzneimitterelforsch., **34**, 1274-1278 3) Jukna, J.J., et al. (1987) Naunyn-Schmiedebeg's Arch. Pharmacol., **335**, 445-448 4) Glowinski, J. et al. (1966) J. Neurochem., **13**, 655-669 5) Potter, P.E., et al. (1983) J. Neurochem., **41**, 188-194 6) Fonnum, F. (1975) J. Neurochem., **24**, 407-409 7) Ellman, G.L., et al. (1961) Biochem. Pharmacol., **7**, 88-95

97 フェンサイクリジン（PCP）のラット脳内モノアミン-ニューロン系への部位選択的影響

松本孝、平野誠、堤哲之、楯林義寛、本藤久雄、橋本喜次郎、内村英幸、中原辰雄*、黒木俊秀**、中村薫***
（情動行動障害センター－国立肥前療養所、九州大学－理－化学教室*、医－精神神経医学教室**、大牟田労災病院***）

〔要約〕
フェンサイクリジン(PCP：7.5 mg/kg)をラットに単回投与し脳内モノアミンへの経時的な影響を神経終末および細胞体について検討した。神経終末では前頭前野(FCM)，側坐核(AC)及び扁桃核(AM)でドーパミン(DA)代謝産物DOPAC、HVAが上昇し、DA代謝の亢進がみられた。尾状核－被核(CP)においては、DA関連物質の変化は観察されなかった。細胞体部位では、腹側被蓋野(VTA;A_{10})でDOPACの増加がみられたが、黒質(SN;A_9)では代謝産物の変化はなく、これらの細胞体領域に起始する神経終末領域での変化と対応した所見であった。ノルアドレナリン系の細胞体部位である青斑核(LC;A_6)のDA代謝も亢進(DOPACの増加）していた。セロトニン(5-HT)及びその代謝産物は、測定した神経終末及び細胞体領域いずれにおいても変化はなかった。これらの結果から、PCPのモノアミン関連物質への作用には中脳皮質・辺縁系DAニューロンに特異的であることとなり、PCPのN-methyl-D-aspartate(NMDA)型興奮性アミノ酸受容体を介した作用が部位的に異なっている可能性が示唆された。

〔目的〕PCP服用者で分裂病に酷似した症状がみられ、PCP投与動物で常同行動などの異常行動がみられることから分裂病の病態モデルとして注目され行動薬理的及び神経化学的な検討がされている。PCP投与によるモノアミンへの影響については脳組織あるいは脳内透析法を用いた研究がある(1,5,6)。ところが、脳組織を用いた場合ではPCP投与後の経時変化は詳細に検討されておらず、脳内透析法では部位別の検討に限度がある。そこで今回、ラット脳組織を用いてPCP投与後のモノアミン系への影響を経時的にしかも神経終末及び細胞体部位の領域について詳細に検討した。

〔方法〕Wistar系雄性ラット(250-350 g)を用いた。PCP(7.5 mg/kg)を腹腔内投与後15，30，60及び120分時に断頭し、速やかに脳を摘出し-80℃で凍結した。凍結脳よりクリオスタット(-12℃)内で300μmの連続切片を作製し、-20℃のプレート上で前頭前野、側坐核、扁桃核、尾状核－被殻、腹側被蓋野、黒質、青斑核、背側縫線核及び内側縫線核の9部位を切り出した。組織内のモノアミン関連物質を既報(7)の高速液体クロマトグラフィー-電気化学検出(HPLC-ECD)法により測定した。

〔結果〕①神経終末部位の変化(Fig.1-upper)：測定した全部位でのDAは有意な変化はなかった。DAの代謝産物であるDOPACは前頭前野(120分時を除く)、側坐核及び扁桃核で全ての時間において増加(+28%～+90%)していた。代謝産物であるホモバニリン酸(HVA)の変化が前頭前野(60分,+65%; 120分,+30%)、側坐核(30分,+25%; 60分,+60%;120分,+50%)及び扁桃核(15分,+30%; 30分,+38%; 60分,+37%)でみられた。尾状核－被殻のDA関連物質の変化はみられなかった。セロトニン(5-HT)及びその代謝産物である5-HIAAの変化はなかった。②細胞体領域の変化(Fig.1-lower)：DAの変化は測定した部位全てでなかつた。DOPACは腹側被蓋野(30分,+41.6%; 60分,+38.1%)、青斑核(15分,+76%; 30分,+68%; 60分,+95%; 120分,+52%)で増加していた。HVAの変化は腹側被蓋野で増加傾向がみられたが統計学的には有意ではなかった。他の細胞体部位ではDA関連物質の変化はなかった。5-HT及び5-HIAAは測定した細胞体部位全てで変化はなかった。

〔考察〕PCP単回投与後における脳部位別モノアミンニューロン系への影響を経時的に検討した。神経終末部位のDA系については切り出した４部位でDAの変化はなかったが、代謝産物であるDOPAC，HVAレベルは前頭前野、側坐核及び扁桃核で増加していた。この所見は、PCP投与による前頭前野、側坐核及び扁桃核のDOPAC、HVAへの影響についての他の報告と一致しており、今回脳部位別の経時変化をみることで、PCP単回投与により中脳皮質・辺縁系DAニューロンでのDA代謝亢進が起こることを確認した。PCPの脳内DA代謝亢進作用は中脳皮質・辺縁系に限られており黒質線条体系DAニューロンの神経終末ではみられなかった。このPCP作用の部位選択性が認められる理由は明かではないが、PCPのN-methyl-D-aspartate(NMDA)型興奮性アミノ酸受容体を介したDA伝達への影響が部位的に異なる可能性が考えられる。しかし、PCPはσ受容体、$5\text{-}HT_2$受容体や、

DA再取り込み機構にも作用するので、これらとの関連もさらに検討するべきである。

細胞体領域については測定した5部位でDA及びHVAの変化はなかったが、腹側被蓋野及び青斑核のDOPACが増加していた。Deutchら(1)もPCP投与60分で腹側被蓋野のDOPACが増加すると報告しており、腹側被蓋野でみられるDA代謝の亢進はこの起始細胞体の投射する神経終末の変化と対応することは興味深い。これまでPCPの青斑核への生化学的影響に関する報告はなく、今回われわれの見い出した所見は注目される。ノルアドレナリン系の細胞体部位である青斑核のDAニューロンは腹側被蓋野から起始していることが証明されている(4)。また、PCPにはノルアドレナリン放出作用もある。従って青斑核でのDA代謝亢進は腹側被蓋野と青斑核のDA系を介した機能的連関を反映している可能性も考えられる。

5-HT関連物質に対するPCPの影響は測定した全ての部位でみられなかった。脳内透析法を用いて側坐核で5-HT放出をみた報告(2)もあるが、PCPは低用量では5-HT放出作用、高用量では5-HT_2受容体に直接作用する(3)とも考えられている。今回は高用量投与であったことから、PCPの5-HT代謝への影響は認められなかったのかもしれない。

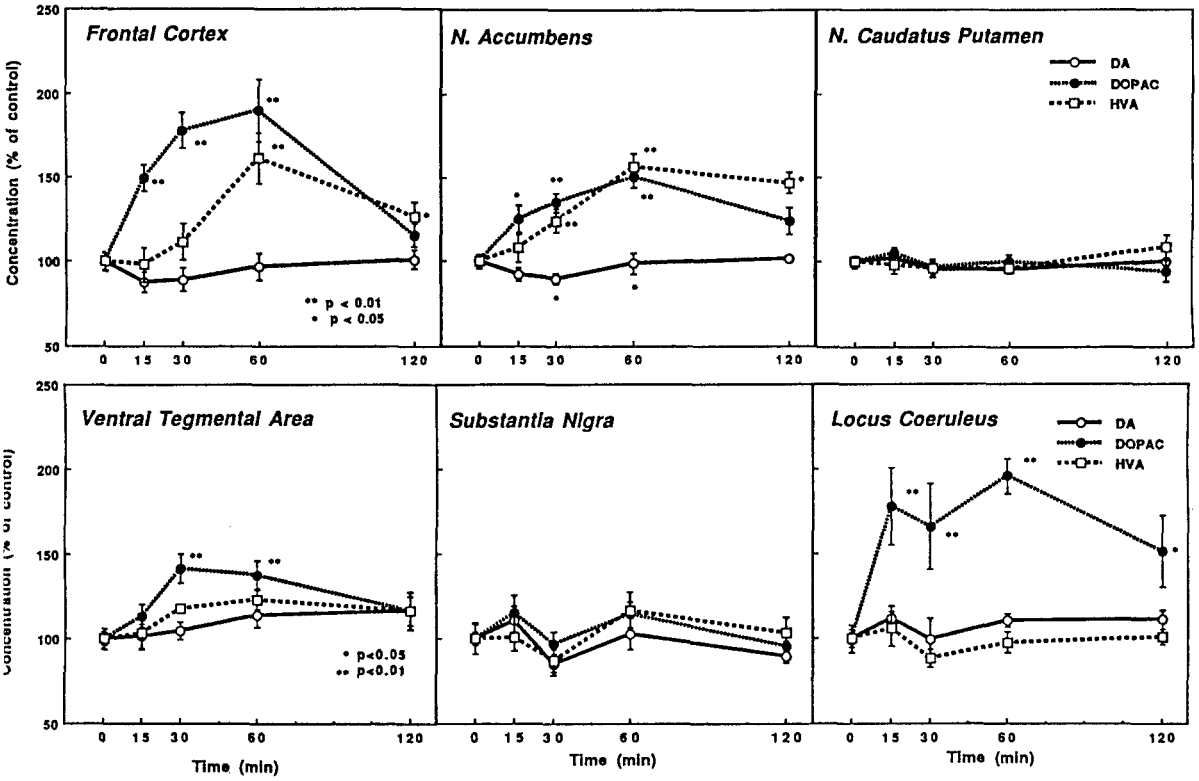


Fig.1. Time-course of the effect of PCP (7.5 mg/kg, i.p.) on the DA and its metabolites concentrations in DA terminals (upper) and cell bodies (lower) of rat brain. Control values were ;prefrontal cortex(DA:0.62±0.03, DOPAC:0.25±0.01, HVA:0.60±0.03), nucleus accumbens (DA:87.39±2.63, DOPAC:14.26±0.47, HVA:6.60±0.28), nucleus caudatus putamen(DA:116.11±3.45, DOPAC:13.35±0.39, HVA:7.89±0.30), ventral tegmental area(DA:30.43±1.87, DOPAC:6.84±0.40, HVA:4.42±0.18), substantia nigra(DA:22.88±2.01, DOPAC:4.52±0.42, HVA:3.64±0.14) and locus coeruleus (DA:4.95±0.25, DOPAC:5.23±0.40, HVA:2.44±0.19 ng/mg protein, mean±S.E.M.)

〔文献〕1)Deutch, A.Y. et al.(1987) Eur. J. Pharmacol., 134, 257-264; 2)Hernandez, L. et al.(1988) Life Sci., 42, 1713-1723; 3)鍋島俊隆(1987) 薬学雑誌, 107, 548-569; 4)Ornstein, K. et al.(1987) J. Neural Transm., 70, 183-191; 5)Rao, T.S. et al.(1990) Neuropharmacol., 29, 225-230; 6)Tanii, Y. et al.(1990) Neurosci. Lett., 29, 225-230; 7)楯林義寛ら(1989) 神経化学, 28, 478-479

98 マストパランの牛副腎髄質クロマフィン細胞からのカテコールアミン放出に及ぼすアミノ酸置換の効果

笠井久隆[1]、栗田孝[2]、伊藤尚[3]、今泉美佳[4]、熊倉鴻之助[4]（都立大学・理・化学[1]、ヘキストジャパン・医総研[2]、青山学院大学・理・化学[3]、上智大学・生命研[4]）

〔要約〕

ハチ毒ペプチドであるマストパラン（ＭＰ）の誘導体を固相合成し、牛副腎髄質クロマフィン細胞からのカテコールアミン（ＣＡ）放出活性に及ぼすアミノ酸置換の効果を検討した。ＭＰのＣ末端のアミド基を除去するとＣＡ放出活性が消失するが、Ｃ末端にＧｌｙ－NH_2を伸長しても活性に影響しない。また、Ｎ末端側の３残基のアミノ酸を除去すると活性は消失するが、Ｎ末端側の１～３位のアミノ酸を置換すると、置換したアミノ酸残基の疎水性の増加にしたがってＣＡ放出活性も増大する。殊に１～３位を全てＬｅｕに置換したＬ－Ｌ－Ｌ－ＭＰではＭＰの約４倍に活性が増大した。さらに、Ｌ－Ｌ－Ｌ－ＭＰのＮ末端のＬｅｕをイソカプロイル（ＩＣ）基に置換したＩＣ－Ｌ－Ｌ－ＭＰではＭＰの約１１倍にＣＡ放出活性が増大した。

マストパラン（ＭＰ）はスズメバチ毒腺中に含まれるアミノ酸１４残基からなるペプチド[4]で、肥満細胞からのヒスタミン放出作用[4]、副腎髄質クロマフィン細胞からのカテコールアミン（ＣＡ）放出作用[8]及び中枢コリナージックニューロンからのアセチルコリン放出活性[6]などがある。ＭＰは牛培養副腎髄質クロマフィン細胞からのＣＡ放出作用に関して、１）一過性である、２）脱感作がない、３）細胞外液、あるいは細胞内貯蔵のCa^{2+}の動員なしにＣＡを放出する等の特性をもつ[6]。既に我々はＭＰアナログの合成について報告しているが[7]、今回さらに数種誘導体を合成し、ＣＡ遊離作用に及ぼすＭＰのアミノ酸置換の効果を検討した。

［実験方法］ＭＰ誘導体はペプチドシンセサイザー（４３０Ａ，ＡＢｉ社製）を使った固相法により合成した。精製はＯＤＳカラム（資生堂）を用いたＨＰＬＣにより行なった。牛浮遊培養クロマフィン細胞からのＣＡ放出活性は Cell Bed Perfusion-ECD systemによるReal-Time Monitoring[5]で測定した。図１に示す通り、マストパランの放出活性を基準にするためマストパランはマストパラン誘導体の前後にインジェクトした。細胞が被曝するペプチド濃度は５μＭあるいは２５μＭで行なった。

［結果及び考察］合成したマストパラン誘導体の略号及び構造を表に示した。また、合成マストパラン誘導体のＨＰＬＣ溶出パターンを図２に示す。これらマストパラン誘導体のＣＡ放出活性はマストパランの活性を１００とした時の相対値で表に示した。これらのＣＡ放出活性の比較により以下のことが明らかになった。①マストパランのＣ末端アミド基を除去するとＣＡ放出活性は消失する（ＭＰ－ＣＯＯＨ）。②マストパランのＣ末端にＧｌｙ－NH_2を伸長しても活性には影響しない(ＭＰ－Ｇｌｙ－NH_2)。③５、８位のＡｌａが１残基でもＧｌｙに置き換わると活性が極端に低下する。④Ｎ末端側の１～３位のアミノ酸残基を除去すると活性が完全に消失したためマストパランの活性発現には１～３位が必要である。⑤マストパランの１～３位のアミノ酸残基を置換した誘導体では、ＧＧＧ，ＧＡＡ，ＧＬＡ，ＧＬＬ，ＬＬＬ－ＭＴの順で、置換アミノ酸残基の疎水性の増加にしたがって活性も増強された（ＬＬＬ－ＭＴではＭＰの３．８倍に活性が増大した）。ＧＬＡ，ＬＬＬ－ＭＰについても同様であった。つまり、１～３位のアミノ酸残基の疎水性が高いほどＣＡ遊離活性は増大する。つぎに、ＬＬＬ－ＭＰの１位のＬｅｕをイソカプロイル（ＩＣ）基に置換したＩＣＬＬ－ＭＰは活性が元のＭＰの約１１倍に増大した。したがってＭＰの牛副腎髄質クロマフィン細胞からのＣＡ放出活性の増強に関してはα－アミノ基の除去が最も効果的であった。

今後、ＭＰ及びＭＰ誘導体のエキソサイトーシスにおける作用機作の解明にはＭＰに内在するLysis活性[1]（類縁ペプチド・メリチンとの比較）、ホスポリパーゼA_2活性化作用[2]及びＧＴＰ－結合蛋白への結合活性[3]との関連を含めてさらに検討が必要である。

Fig. 1 CA Release by MP and ICLL-MP

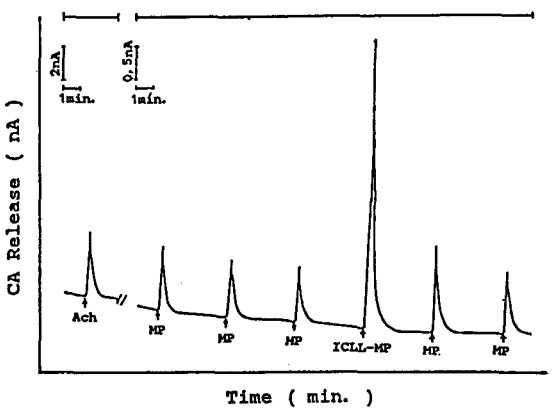
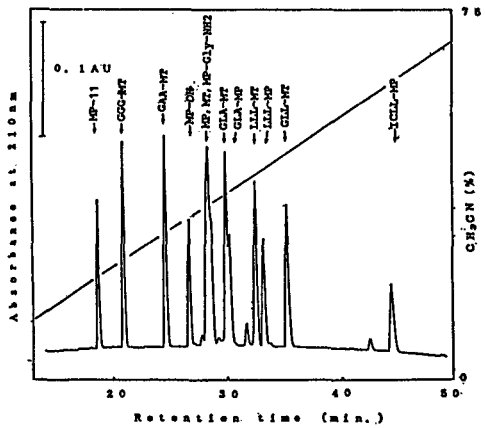


Fig. 2 HPLC Pattern of Mastoparans



Weight of Samples: 15μg each
Column: SHISEIDO CAPCELLPAK C18
SG-120 S-5 (4.6ϕ x150mm)
Mobile phase: 10～75% CH3CN/0.1% TFA
Flow rate: 1.0ml/min.
Column temp.: Room temp.

Table
Sequences and Catecholamines Releasing Activities of Mastoparan and its Derivatives

Name	Sequence (1 3 5 8 14)	Activity
Mastoparan (MP)	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L-NH_2	100
GLA-MP	G-L-A-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L-NH_2	175
LLL-MP	L-L-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L-NH_2	362
ICLL-MP	IC-L-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L-NH_2 (IC: $(CH_3)_2CHCH_2CH_2CO$-)	1091
MP-Gly-NH_2	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L-G-NH_2	104
MP-OH	I-N-L-K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L-COOH	0
MP-11	K-A-L-A-A-L-A-K-K-I-L-NH_2	—
Mastopatan T (MT)	I-N-L-K-A-I-A-A-F-A-K-K-L-L-NH_2	68
GGG-MT	G-G-G-K-A-I-A-A-F-A-K-K-L-L-NH_2	18
GAA-MT	G-A-A-K-A-I-A-A-F-A-K-K-L-L-NH_2	51
GLA-MT (T' -AA)	G-L-A-K-A-I-A-A-F-A-K-K-L-L-NH_2	84
GLL-MT	G-L-L-K-A-I-A-A-F-A-K-K-L-L-NH_2	144
LLL-MT	L-L-L-K-A-I-A-A-F-A-K-K-L-L-NH_2	380
T' -AG	(5 8) G-L-A-K-A-I-A-G-F-A-K-K-L-L-NH_2	19
T' -GA	G-L-A-K-G-I-A-A-F-A-K-K-L-L-NH_2	8
T' -GG	G-L-A-K-G-I-A-G-F-A-K-K-L-L-NH_2	3
T' -GG-11	K-G-I-A-G-F-A-K-K-L-L-NH_2	0

REFERENCES:

(1) Argiolas, A. and Pisano, J. J. (1984) J. Bio. Chem. 259, 10106-10111

(2) Argiolas, A. and Pisano, J. J. (1983) J. Bio. Chem. 258, 13697-13702

(3) Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T. and Ross, E. M. (1988) J. Bio. 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) 熊倉鴻之助、武井延之、今泉美佳、笠井久隆；神経化学会（１９８９），28, 334-335

(7) 栗田孝、木村貴志、伊藤尚、今泉美佳、熊倉鴻之助、笠井久隆；第６２回日本生化学会要旨集（１９８９）

(8) Kuroda, Y., Yoshioka, M., Kumakura, K., Kobayashi, K. and Nakajima T. (1980) Proc. Jpn. Acad. Ser. B 56, 660-664

99 培養副腎髄質クロマフィン細胞における各種刺激によるイノシトール五リン酸の生成

笹川展幸、 中木敏夫、 加藤隆一
（慶応大・医・薬理）

〔要約〕
中枢神経系、また内分泌細胞の良いモデルとされる副腎髄質クロマフィン細胞を用いて、イノシトール五リン酸の生成機構と生理活性について検討することを目的とし以下のような結果を得た。 1. ニコチン、高カリウムで細胞を刺激すると、刺激後15秒を最大とするような著明でかつ急速なイノシトール1,3,4,5,6-五リン酸の生成が認められた。 この動態は、イノシトール1,4,5-三リン酸の生成と良く似ていたが、刺激前、後どちらのレベルともに約 3 倍高かった。また、急速かつ著明なカルシウム取り込みが認められた。 2. アンギオテンシンII による刺激もイノシトール1,3,4,5,6-五リン酸の生成を惹起したが有意なカルシウム取り込みは認められなかった。 3. これらの刺激はゆっくりとした時間経過で、イノシトール1,3,4,5-四リン酸および、イノシトール六リン酸をわずかに生成した。 これらの結果は、イノシトール1,3,4,5,6-五リン酸生成には、カルシウム取り込みに依存した機構と依存しない機構が存在する可能性、また副腎髄質クロマフィン細胞におけるシグナルトランスダクションにイノシトール1,3,4,5,6-五リン酸生成が何らか関与する可能性を示唆しているものと思われた。

［目的］
刺激に伴いイノシトール三リン酸、四リン酸生成が増加することは多くの細胞で知られており、その生理活性についても解明されつつある。 イノシトール五リン酸が各種細胞に含まれていることは知られていたが、刺激によってその量が変動するという報告はほとんどなく(1)、イノシトール五リン酸の生成経路や生理活性についての研究は数少ない。 さらに、ラット脳幹部にイノシトール五リン酸を注入すると血圧が著明に下がることが報告され、中枢神経系において、血圧調節機構のセカンドメッセンジャーとして働いている可能性が示唆され興味深い。 本研究では、中枢神経系、また内分泌細胞の良いモデルとされる副腎髄質クロマフィン細胞を用いて、イノシトール五リン酸の生成機構について検討した。

［方法］
細胞培養：牛副腎髄質クロマフィン細胞はコラゲナーゼ灌流法で単離し、differential plating による精製の後、10% 牛胎児血清を含む MEM 中で培養した (2,3)。 実験には培養後 5日目の細胞を用いた。
イノシトール多リン酸生成の測定：培養牛副腎髄質クロマフィン細胞を[^{3}H]イノシトール(50 μCi/well)で 48 時間ラベルし、各種アゴニストで刺激した後、10% TCA でイノシトール三リン酸、四リン酸、五リン酸の各種異性体、更にイノシトール六リン酸を抽出し HPLC を用いたイオン交換クロマトグラフィーによって分離し(2,3)、その放射活性を連続測定し定量した。
カルシウム取り込みの測定：細胞を $^{45}CaCl_2$ (1 μCi/well) を含む Lock's 液中で刺激し洗浄後、細胞内に取り込まれた放射活性を測定した。

［結果及び考察］
Fig.1 は、クロマフィン細胞内で生成される各種イノシトールリン酸を HPLC を用いた anion exchange chromatography によって分離したときの溶出パターンを示している。刺激前また刺激後共にイノシトール三リン酸、四リン酸に比べ多量のイノシトール1,3,4,5,6-五リン酸の放射活性が認められた。 各刺激(15 秒間)に伴いイノシトール1,4,5-三リン酸、イノシトール1,3,4,5,6-五リン酸生成が増加した。 Fig.2 では、各種イノシトールリン酸生成の time course を検討した。 ニコチン (10 μM) (4), 高カリウム (KCl 56 mM), アンギオテンシンII (10 μM)で細胞を刺激すると、刺激後15秒を最大とするような著明でかつ急速なイノシトール1,3,4,5,6-五リン酸の生成が認められ、以後減少し、２分後にはほぼ刺激前のレベルに戻った。その生成動態はイノシトール1,4,5-三リン酸と良く似ていた。 これらの刺激薬物はゆっくりとした時間経過で、イノシトール1,3,4-三リン酸、イノシトール1,3,4,5-四リン酸および、イノシトール六リン酸を生成した。 また、図には示していないが、ニコチン, 高カリウム刺激は急速なカルシウム取り込みが認められたが、アンギオテンシンII 刺激では認められなかった。 イノシトール1,3,4,5,6-五リン酸が急速にかつ、イノシトール1,4,5-三リン酸、イノシトール1,3,4,5-四リン酸よりも多量に生成される事実の解釈として以下のような可能性が考えられる。現在の仮説に従うと、イノシトール1,3,4,5,6-五リン酸はイノシトール1,3,4,6-四リン酸のリン酸化によって生成される(5)。 したがって、イノシトール1,4,5-三リン酸 イノシトール1,3,4,5-四リン酸 イノシトール1,3,4-三リン酸 イノシトール1,3,4,6-四リン酸 イノシトール1,3,4,5,6-五リン酸の反応が非常に早く、相対的にイノシトール1,3,4,5,6-五リン酸の分解が遅いという可能性である。 しかし、イノシトール1,3,4,5,6-五リン酸の蓄積が一過性であることから分解経路も活性化されていることを示していると思われる。また、本結果はトリチウムでラベルしたイノシトールを細胞に取りこませ、生成されたイノシトールリン酸の放射活性を測定しており絶対量を測定しているわけで

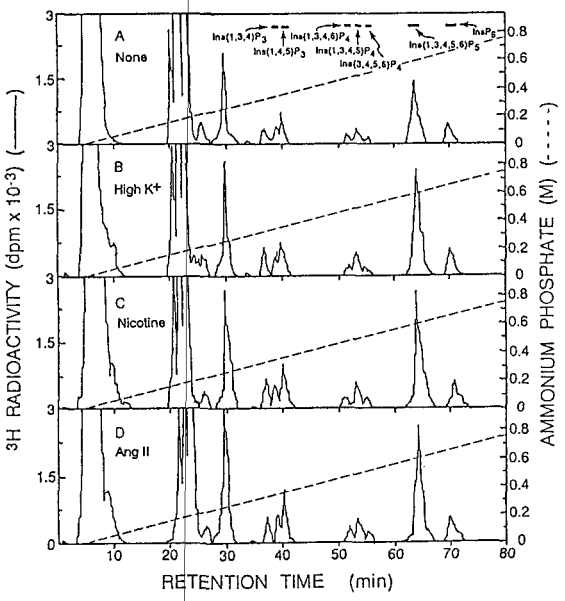


Fig. 1. Typical elution profiles of inositol polyphosphates of intact adrenal chromaffin cells separated by HPLC. Panel A, basal levels; B, high K^+ (56 mM); C, nicotine (10 μM); D, Ang II (10 μM) for 15 s, respectively. The standard of each [^{3}H]*inositol polyphosphate* was eluted from the column as one major peak at the position indicated by the arrows.

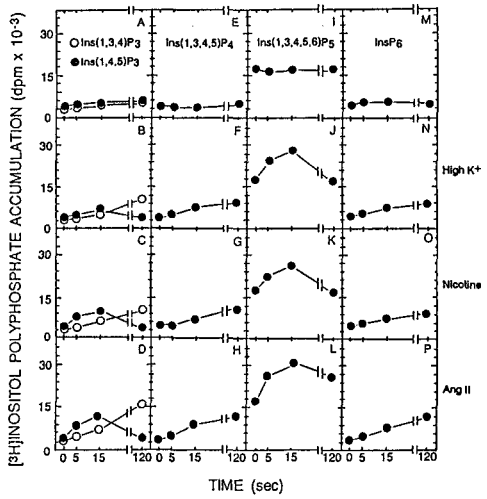


Fig. 2. Time courses of stimulated inositol polyphosphate accumulation in adrenal chromaffin cells. Panels represent the accumulations of [^{3}H]Ins(1,3,4)P_3 and [^{3}H]Ins(1,4,5)P_3 (A-D), [^{3}H]Ins(1,3,4,5)P_4 (E-H), [^{3}H]Ins(1,3,4,5,6)P_5 (I-L) and [^{3}H]InsP_6 (M-P) and the basal levels (A,E,I and M), high K^+ (56 mM)-stimulated ones (B,F,J and N), nicotine (10 μM)-stimulated ones (C,G,K and O) and Ang II (10 μM)-stimulated ones (D,H,L and P). In the panels of (A-D), open and closed symbols represent the *accumulations of* [^{3}H]Ins(1,3,4)P_3 and [^{3}H]Ins(1,4,5)P_3, respectively.

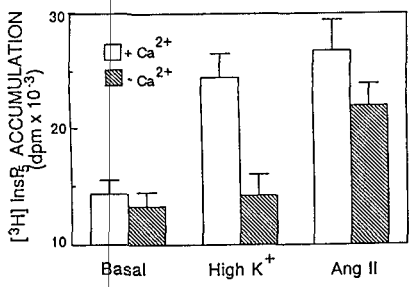


Fig. 3. Effect of removal of extracellular Ca^{2+} on InsP$_5$ accumulation in adrenal chromaffin cells. The cells were preincubated with the Locke's solution containing 10 mM LiCl and 0.1 % bovine serum albumin for 29 min, followed by a replacement with 0.1 mM EGTA-containing and Ca^{2+}-depleted Locke's solution or with the complete Locke's solution. Thereafter the cells were treated with or without the stimulants for 15 s.

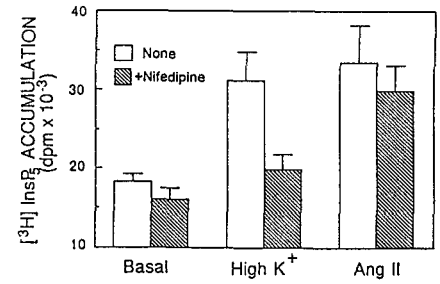


Fig. 4. Effect of nifedipine on InsP$_5$ accumulation in adrenal chromaffin cells. Nifedipine (10 μM) was added to the medium 5 min before the addition of the stimulants. Thereafter the cells were treated with or *without the stimulants* for 15 s.

はないので各イノシトールリン酸の specific activity を測定しなければ細胞内含量の正確な情報は得られない事も念頭に置かなければならない。 更に、イノシトール1,3,4,5,6-五リン酸がホスファチジルイノシトール3,4,5,6-四リン酸から直接生成される可能性も考えられるが、ホスファチジルイノシトール3,4,5,6-四リン酸の存在は現在のところ証明されていないので推測の域を出ない。 イノシトール五リン酸の生成機構を検討する目的で、外液カルシウム濃度（Fig.3）とカルシウムチャネル拮抗薬の nifedipine の効果を検討した（Fig.4）。 外液カルシウム除去及び nifedipine 処置により、高カリウム刺激によるイノシトール1,3,4,5,6-五リン酸生成は抑制されたが、アンギオテンシンII 刺激は抑制されなかったことから、副腎髄質クロマフィン細胞におけるイノシトール1,3,4,5,6-五リン酸生成には、カルシウム取り込みに依存した機構と依存しない機構が存在する可能性が示唆された。

［参考文献］

1. Pittet, D., Schlegel, W., Lew, D. P., Monod, A., and Mayr, G. W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 18489-18493
2. Sasakawa, N., Nakaki, T., Yamamoto, S., and Kato, R. (1989) *Cell. Signal.* **1**, 75-84.
3. Sasakawa, N., Nakaki, T., Yamamoto, S., and Kato, R. (1989) *J. Neurochem.* **52**, 441-447.
4. Sasakawa, N., Nakaki, T., and Kato, R. (1990) *FEBS Lett.* **261**, 378-380.
5. Berridge, M. J., and Irvine, R. F. (1989) *Nature*, **341**, 197-205.

100 ＡＴＰ（Ｐ２）－受容体刺激によるＰＣ１２細胞からのカテコールアミン放出

井上和秀、中沢憲一、今泉美佳、小浜とも子
藤森観之助、高仲正
（国立衛生試験所・薬理部）

〔要約〕

外液ＡＴＰによるＰＣ１２細胞からのカテコールアミン（ＣＡ）放出ならびに細胞内カルシウム濃度に対するＰ２ブロッカー，スラミンの作用を検討した．ＡＴＰによるＣＡ放出ならびに細胞内カルシウム（Ｃａ）濃度上昇は外液Ｃａ依存性であり，receptor-operated Ca influx によるものと推察された．ＡＴＰ(100μM)によるドーパミン（ＤＡ）放出および細胞内Ｃａ濃度上昇をスラミンは 30 μM より用量依存的に抑制した．ＤＡ放出抑制作用の解析から，スラミンのＡＴＰに対する作用はほぼ完全な競合的阻害作用であることが分かった．以上の結果ならびに我々が既に報告した電気生理学的成績から，ＡＴＰはＰ２受容体を刺激し，receptor-operated Ca influx を惹起しその結果ＣＡ放出を引き起こすことが示唆される．

［目的］

シナプスにおいて神経伝達物質とともに神経終末から放出されるＡＴＰの生理的意義については未だ不明であるが，末梢神経系では神経伝達物質あるいはモデュレータとしての役割が示唆されてきた．神経伝達物質放出に関しては，presynaptic inhibition として神経伝達物質遊離を抑制するとの報告が多い．一方，最近外液ＡＴＰが神経細胞を脱分極し，Ｃａを含むカチオンの細胞内流入を惹起することが明らかになり，シナプス伝達を興奮性に制御しうる可能性が出てきた．これに関し我々は，外液ＡＴＰにより脱分極とＣａ流入が惹起され，またあらかじめ取り込ませた^{3}Ｈ－ノルエピネフリン(NE)の放出がＡＴＰの用量依存的に起きることをＰＣ１２細胞で明らかにしている（１，２）．今回の目的は，ＡＴＰのこれらの作用がいかなる受容体を介するものであるかを薬理学的に明らかにすることにある．

［方法］

ＰＣ１２の調製ならびにＮＥ放出量測定は既報（３）に従った．ＤＡ放出は次のようにして測定した．ＮＥ放出と同様に準備したＰＣ１２のディッシュを以下の組成の緩衝液（ＢＳ）で２回洗浄した．ＢＳの組成（mM）；NaCl 150, KCl 5, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 1.2, NaH_2PO_4 1.2, glucose 10, EDTA 0.1, HEPES 25 (pH は NaOH で 7.4 に調整した．)．その後ＡＴＰおよび薬物を含むＢＳ1mlに替え，通常１分間室温にてインキュベーションし，直ちにそのＢＳ 0.8ml を回収し同時に１N PCA（過塩素酸）0.2mlを加えた．残りのディッシュには 0.2N PCA を１ｍｌ加え，細胞とともに集め超音波処理後遠心（1000xg, 1分）した．この上清ならびに回収ＢＳ中の ＤＡ含量は HPLC-ECD により定量し，それぞれ値ＢおよびＡとした．ＤＡ放出量は次の式で算出した．
ＤＡ放出量＝100 x A/(A+B)．　細胞内Ｃａ濃度は3x10^{6}個のＰＣ１２細胞懸濁液を用いて既報（４）に準じて測定した．

［結果および考察］

ＡＴＰ(100μM)による細胞内Ｃａ濃度上昇は外液Ｃａ濃度が1.8mMで認められ，外液Ｃａ濃度が100nMではまったく認められなかった（Fig. 1）．他の細胞では外液Ｃａ非存在下でもＡＴＰ刺激によりＧ蛋白を介しＩＰ3経由の細胞内Ｃａ上昇が報告されているが，ＰＣ１２では細胞内Ｃａ濃度上昇は外液Ｃａ依存性であった．この事はＡＴＰによりＣａ流入が生じていることを示唆する．またＡＴＰは既報（１）に示したように用量依存的にＮＥ放出を惹起するが，この放出はやはり外液Ｃａ依存性であった(Fig. 2)．しかも，既報（１）の結果とよく一致して，膜電位依存性Ｃａチャンネル（ＶＧＣ）ブロッカーのニカルジピン（いわゆるＬタイプＶＧＣブロッカー）およびカドミウム（いわゆるＴ，Ｌ，Ｎいずれをもブロックする）はまったくＡＴＰ－誘発ＮＥ放出を抑制しなかった．一方，これらブロッカーは同じ濃度で高濃度Ｋ（１５５ｍＭ）によるＮＥ放出を抑制した．ＡＴＰはＰＣ１２の膜電位を脱分極すること，そしてこの脱分極は主としてＮａイオンに依ることはすでに報告したが（１）仮に，ＶＧＣがこのＮＥ放出に何等かの寄与をしているならば，Ｎａイオン非存在下ではＡＴＰは脱分極を起こさないのでＮＥ放出も抑制されるはずであるが，実験結果では，Ｎａフリーでもまったく ＮＥ放出量は変化しなかった (Fig. 2)．以上により，ＡＴＰは直接Ｃａ流入を刺激しその結果ＮＥ放出を惹起させると考えられる．事実，ＡＴＰによってＣａをも通すカチオンチャンネルが活性化されることを我々は見いだし既に報告した（２）．

では，ＡＴＰはどの受容体を刺激するのであろうか．ＡＴＰ類縁化合物およびアデノシン等の作用強度比は既

に報告したように（５）ＡＴＰ＞＞ＡＤＰの順であり，ＡＭＰ，アデノシンおよびβ,γ-methylene-ATPはまったくＮＥ放出を惹起しなかった．この事からＡＴＰはＰ２受容体を刺激してＮＥ放出を惹起することが示唆される．そこでＰ２受容体ブロッカーのスラミンを用い，ＡＴＰ(100μM)による細胞内Ｃａ濃度上昇ならびにＤＡ放出に対する影響を検討した．その結果，スラミンは30μMから用量依存的にいずれをも抑制した（Fig.3および4）．スラミンはまたＡＴＰのＤＡ放出作用の用量作用曲線を右にシフトさせた(Fig.5)．シルドプロットの傾きから，スラミンによる抑制作用は競合的阻害であることが明らかとなった．これらスラミンの作用は既報の（６）ＡＴＰ誘発電流に対するそれときわめてよく一致した．

以上により，ＡＴＰはＰ２受容体を刺激し，receptor-operated Ca permeable channel を活性化し，流入したＣａによりＣＡ放出を惹起すると考えられる．

［文献］

1. K.Inoue, K.Nakazawa, K.Fujimori, and A.Takanaka. Neurosci.Let., 106, 294-299, 1989
2. K.Nakazawa, K.Fujimori, A.Takanaka, and K.Inoue. J.Physiol.(London), in press, 1990
3. K.Inoue and J.G.Kenimer. J.Biol.Chem., 263, 8157-8161, 1988
4. G.Grynkiewicz, M.Poenie, and R.Y.Tsien. 260, 3440-3450, 1985
5. K.Inoue, K.Nakazawa, K.Fujimori, T.Obama, and A.Takanaka. Jap.J.Pharmacol., 52, supple.p100, 1990
6. K.Nakazawa, K.Fujimori, A.Takanaka, and K.Inoue. Br.J.Pharmacol., in press, 1990

図１
ＡＴＰによる細胞内Ｃａ濃度の上昇

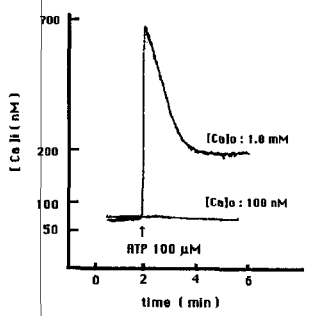


図２
ＡＴＰ誘発ＮＥ放出に対する膜電位依存性ＣａチャンネルブロッカーおよびＮａフリーの影響

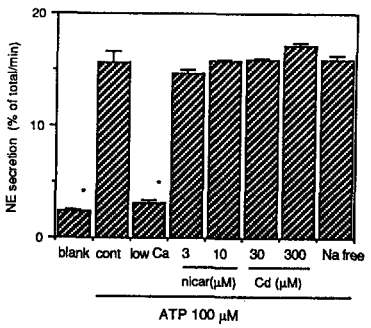


図３
ＡＴＰ誘発細胞内Ｃａ濃度上昇に対するスラミンの影響

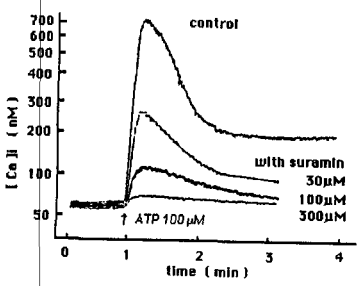


図４
ＡＴＰ誘発ＤＡ放出に対するスラミンの効果

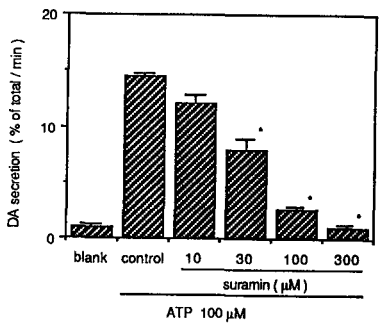
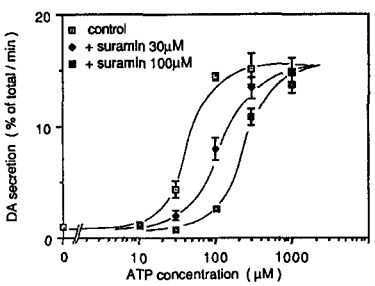


図５
ＡＴＰ誘発ＤＡ放出の用量作用曲線に対するスラミンの影響



101　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M₂－ムスカリン様レセプターによるアセチルコリン遊離調節

森貞由美，神谷稔夫，津島宏美，松田友宏
（名古屋市大・医・薬理）

〔要約〕

ラット視床下部バゾプレッシンニューロン神経核（視索上核、ＳＯＮ）におけるアセチルコリン（ＡＣｈ）遊離調節機構をマイクロダイアリシス法を用いて検討した。ムスカリン様アンタゴニスト、アトロピン（非選択性）、ピレンゼピン（M_1－選択性）をＳＯＮ灌流液中に添加すると、用量依存的にＡＣｈ遊離の増加が認められ、添加後２０～４０分で最大となった。アトロピンとピレンゼピンのＥＤ５０値はそれぞれ約５×１０$^{-8}$Ｍと１×１０$^{-4}$Ｍであった。アトロピンによるＡＣｈ遊離増加作用は、ムスカリン様アゴニスト、オキソトレモリンの同時添加により抑制された。以上の結果により、ＳＯＮにおけるＡＣｈの遊離はムスカリン様レセプターを介するnegative feedback 調節をうけていることが示唆された。また、ピレンゼピンに比べてアトロピンの低濃度で作用が発現されることから、介在するムスカリン様レセプターのサブタイプとしては主としてM_2－レセプターであることが示唆された。

視索上核、supraoptic nucleus（ＳＯＮ）は抗利尿ホルモン、バゾプレッシンを合成・遊離するニューロンの細胞体が存在する視床下部神経核であり、免疫組織化学的にコリン作動性神経終末の局在が認められている。我々はこの神経核に種々のコリンアゴニストとアンタゴニストを直接微量注入することにより、ムスカリン様レセプターを介してバゾプレッシンの遊離が促進されていることを明らかにしてきた[2,3]。今回はマイクロダイアリシス法により、無麻酔・無拘束ラットのＳＯＮにおけるＡＣｈの遊離を検討した。ムスカリン様アンタゴニストとしてアトロピン（非選択性）とピレンゼピン（M_1－選択性）、ムスカリン様アゴニストとしてオキソトレモリンを用いて作動しているムスカリン様レセプターのサブタイプについても研究した。

［実験方法］

ウィスター雄性ラット（３００－３７０ｇ）を用い、ペントバルビタール麻酔下、ＳＯＮにガイドカニューレをKönig ら[1]のアトラスに従って装着した。翌日ガイドカニューレに透析プローベ（エイコム，ＢＤＰ－Ｉ－１２－０２）を挿入し、無麻酔・無拘束状態でプローベを介して１０$^{-4}$Ｍエゼリンを含む生理食塩水でＳＯＮを灌流した（２μｌ／ｍｉｎ）。ＳＯＮ灌流液（４０μｌ）中のＡＣｈはＨＰＬＣ－ＡＣｈ微量分析システムにより分離カラムでＡＣｈとコリンに分離したのち、アセチルコリンエステラーゼとコリンオキシダーゼの固定化酵素カラムにかけて発生するH_2O_2を電気化学検出器で測定した。プローベによるＡＣｈの回収率は３×１０$^{-7}$～１×１０$^{-6}$Ｍでそれぞれ９．８±１．４、９．７±１．６％（ｎ＝５）であった。ムスカリン様アンタゴニスト（ピレンゼピン，アトロピン）、ムスカリン様アゴニスト（オキソトレモリン）は灌流液中に添加し、ＡＣｈ遊離に及ぼす効果について調べた。各２０分間のＡＣｈ遊離は添加（オートインジェクション）前のコントロール値に対する％で表した。

［実験結果］

ＡＣｈ遊離に及ぼすアトロピンの効果：アトロピン低濃度（１０$^{-8}$Ｍ）を灌流液中に添加した時、ＳＯＮにおけるＡＣｈ遊離は添加直後より増加し、添加後２０－４０分で最大に達した（１５２．４±１６．５％，ｎ＝３）。その例をＦｉｇ．１に示す。ＡＣｈ遊離に及ぼすピレンゼピンの効果：ピレンゼピン１０$^{-6}$Ｍを灌流液中に

添加した時、ＡＣｈ遊離は増加傾向を示し、10^{-3}Mでは約２倍の増加が認められた（Ｆｉｇ．２）。ムスカリン様アンタゴニストによるＡＣｈ遊離作用の用量作用曲線：アトロピン（10^{-8}～10^{-3}M）、ピレンゼピン（10^{-6}～10^{-3}M）を灌流液中に添加するといずれの場合もＳＯＮにおいて用量依存的なＡＣｈ遊離増加が認められた（Ｆｉｇ．３）。アトロピンの用量作用曲線はM_1－選択性のピレンゼピンよりも約１０００倍左にシフトしていた。アトロピンによるＡＣｈ遊離増加に対するムスカリン様アゴニストの効果：灌流液中にアトロピン10^{-6}Mとオキソトレモリン10^{-5}Mを同時に添加するとＡＣｈ遊離は１５７．３±１４．６％（ｎ＝５）に増加したが、これはアトロピン10^{-6}M単独の場合（２５６．０±２５．６％，ｎ＝５）に比べて有意に減少していた（Ｆｉｇ．４）。

［考察］

以上の結果、ＳＯＮにおいてはムスカリン様アンタゴニストによりＡＣｈ遊離が増加し、その作用はムスカリン様アゴニストのオキソトレモリンで抑制されることから、ムスカリン様レセプターを介したＡＣｈ遊離のnegative feedback 調節機構が作動していることが示された。このアンタゴニストによるＡＣｈ遊離増加作用はM_1－レセプターに選択的なピレンゼピンよりも非選択性のアトロピンの方が著しいことから、ＡＣｈ遊離に関与するムスカリン様レセプターは主としてM_2であることが示唆された。

［文献］ 1) König, J. F. R. and Klippel, R. A. (1963) The Rat Brain, A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem. Williams and Wilkins Co., Baltimore. 2) Mori, M., Tsushima, H. and Matsuda, T. (1984) Japan. J. Pharmacol., 35, 27-36. 3) Mori, M., Tsushima, H. and Matsuda, T. (1989) Japan. J. Pharmacol., 49, 357-364.

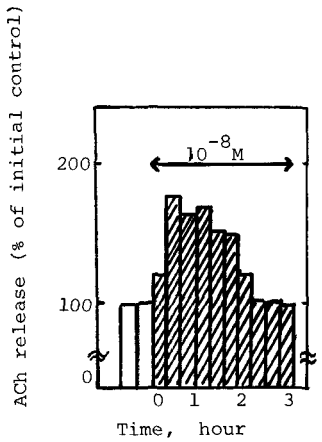


Fig.1. Effect of atropine on ACh release in SON-microdialysate

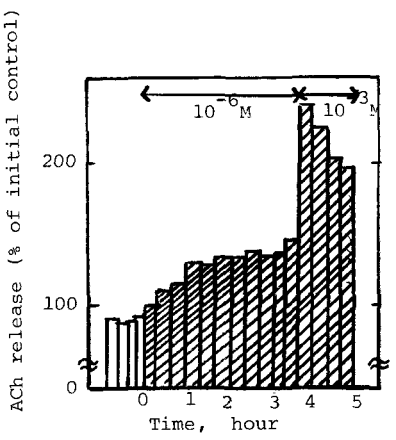


Fig.2. Effect of pirenzepine on ACh release in SON-microdialysate

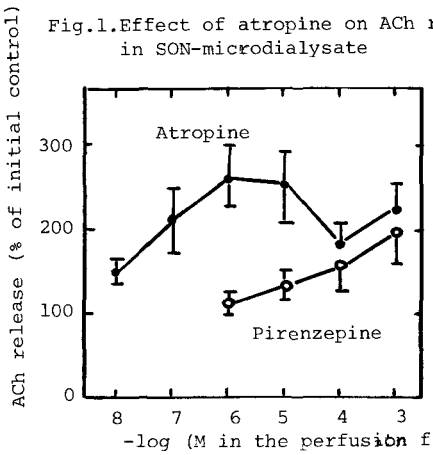


Fig.3. Dose-effect curves for the effects of muscarinic antagonists

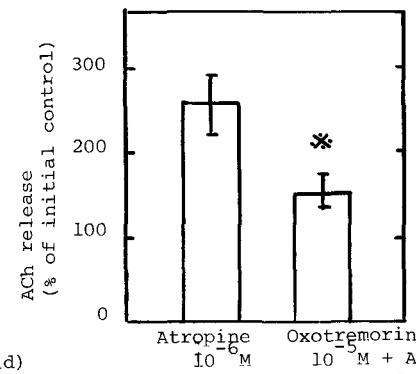


Fig.4. Inhibitory effect of oxotremorine on ACh release induced by atropine
※ $P < 0.05$

102 ガングリオシドによるアセチルコリン放出の修飾

田中康一、脇 初枝、近 一夫、安藤 進
（東京都老人総合研究所、生化学）

〔要約〕
シナプス機能に対する外因性ガングリオシドの効果を、マウス大脳皮質より調製したシナプトゾームを用いて検討した。シナプトゾームにおけるコリン(Ch)産生及びアセチルコリン(ACh)合成にはガングリオシドの添加効果は認められなかったが、高カリウム刺激によるACh放出は促進された。このACh放出促進作用は、モノシアロガングリオシドよりもポリシアロガングリオシドにおいて強くみられた。

ガングリオシドは、脳組織に特に豊富に存在するシアロ糖脂質である。遺伝性ガングリオシド蓄積症の一つであるGM1ガングリオシドーシス患者に巨大神経突起が生じていることから、モノシアロガングリオシドGM1が神経繊維伸展を促進している可能性のあることがPurpuraらによって指摘された（４）。その後、ガングリオシドが培養神経細胞の突起伸展を促進することや（２）、蛋白質のリン酸化を促進すること（５）が実験的に認められ、ガングリオシドは、ニューロンの分化因子あるいは生存因子であると考えられるに至っている。さらに、ガングリオシドが海馬の長期増強(LTP)を促進するとの報告もなされ(７)、脳の可塑性への関与も注目されている。本実験では、ガングリオシドが前シナプス機能にどのように関与しているかを明らかにするために、マウス大脳皮質から調製したシナプトゾームにおけるACh合成及び高カリウム刺激によるACh放出へのガングリオシド添加の効果を検討した。

（実験方法）
雌性C58BL/6マウス（生後4～6か月）の大脳皮質よりFicollの密度勾配遠心法（３）によってシナプトゾーム標品を得た。サル脳より調製し単一に精製されたガングリオシドを含むKrebs-Ringer液(100 μM エゼリン含有）中でシナプトゾームを37℃、30分インキュベートした。このシナプトゾームに高濃度カリウム溶液を加えさらに5分間インキュベート後、遠心し遠心上清を得て試料とした。 Ch産生量及び、ACh合成量あるいはACh放出量は固定化酵素カラムを用いる電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC ECDシステム、BAS社製）で定量した。

（結果と考察）
Krebs-Ringer液に添加したガングリオシドのシナプトゾームへの取り込みを検討した。シナプトゾームと150 μMのGM3、GM1、GQ1bをそれぞれ37℃、30分インキュベートした場合、シナプトゾームにおけるガングリオシドのシアル酸量は、GM3で33%、GM1で19%、GQ1bで75%増加し、外因性に加えたガングリオシドは確実にシナプス膜に取り込まれることが認められた。図１に示したように外因性ガングリオシドは、シナプトゾームにおけるACh生合成には影響を与えなかった。また、シナプトゾームはACh合成に用いるChを自ら産生出来るが（６）このCh産生能もガングリオシド添加によって何ら影響されなかった。しかしながら

50 mMの高カリウム刺激によるシナプトゾームからのACh放出はガングリオシドによって促進された（図２）。この場合、GM3やGM1のようなモノシアロガングリオシドよりGD3、GT1b、GQ1bなどのポリシアロガングリオシドのほうが放出促進効果が顕著であった。興味あることにシナプス膜の主要ガングリオシドのGD1a（シナプス膜全ガングリオシドの45%以上を占める）には添加効果が認められなかった。また、ガングリオシドは無刺激時のAChの自然放出を若干抑制する傾向があるように思われる（図２）。私達は、シナプス膜流動性の変化とシナプス膜ガングリオシドの関わりを検討した結果、膜流動性がガングリオシドによって調節される可能性を報告している（１）。本実験で認められたACh放出促進は、ガングリオシドがシナプス膜流動性を変化させAChの開口放出に影響を与えたものと考えることができる。一方、外因性ガングリオシドが電位依存性カルシウムチャンネルの調節に関わり、ACh開口放出のトリガーとなるカルシウムイオンの流入を変化させる可能性も想像される。

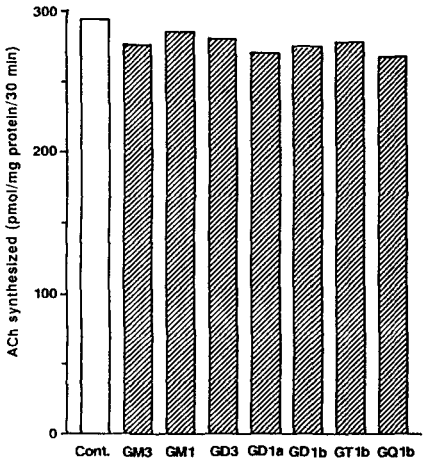


図１
外因性ガングリオシド添加によるACh合成への効果
150 uMの各ガングリオシドをKrebs-Ringer液に添加し37℃、30分のインキュベーションを行った。

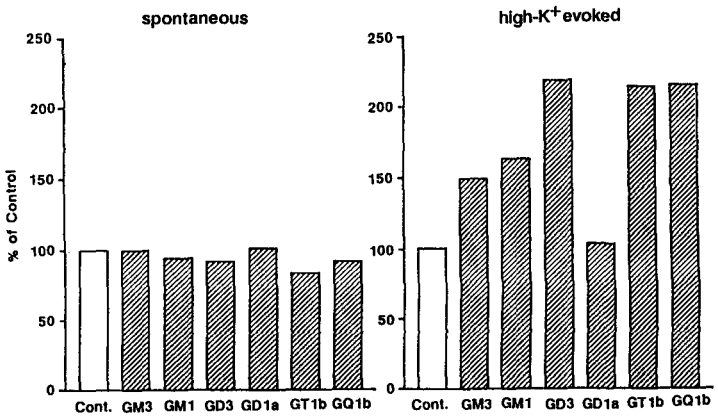


図２
ガングリオシドによるシナプトゾームからのACh放出への効果
35℃、30分のインキュベーションでガングリオシドを取り込ませた後、高カリウム存在下、5分間のインキュベーションでに放出されたAChを定量した。

（文献）

1) Ando,S., Tanaka,Y.,and Kon,K.,(1986) In:Gangliosides and neural plasticity. pp 105-112

2) Ando,S. (1983) Neurochem.Int., 5:507-537

3) Booth,R.F.G., and Clark,J.B. (1978) Biochem.J., 176:365-370

4) Purpura,D.P., and Baker,H.J. (1977) Brain Res., 143:13-26

5) Tsuji,S., Nakajima,J., Sasaki,T., and Nagai,Y. (1985) J.Biochem., 97:969-972

6) Yavin,Y., Tanaka,Y., and Ando,S. (1989) J.Neurosci.Res., 24:241-246

7) Wieraszko,A., and Seifert,W. (1985) Brain Res., 345:159-164

103 Ca^{2+}非依存性GABA放出における抗ユビキチン抗体の効果

朝倉正、高田耕司、林　敬、松田　誠
（慈恵医大・医化学）

〔要約〕
γ-アミノ酪酸（GABA）のシナプトゾームへの取り込みおよび高K^+脱分極刺激によるシナプトゾームからのGABA放出、特にCa^{2+}非依存的放出における抗ユビキチン抗体の効果を調べた。シナプトゾームを抗ユビキチン抗体で処理（37℃、20分）すると、濃度依存的に^{3}H-GABAの取り込みは阻害され、5μg／mlでその取り込みは50%、10μg／mlで60%阻害された。この取り込みはpreimmune rabbit Igs処理では全く阻害されなかった。一方、シナプトゾームに^{3}H-GABAを取り込ませた後、抗ユビキチン抗体で処理し刺激による^{3}H-GABA放出を調べると、Ca^{2+}依存性、Ca^{2+}非依存性共に抗ユビキチン抗体の効果は全く見られなかった。さらに、抗ユビキチン抗体で処理したシナプス膜からシナプトゾームゴーストを作成し、刺激による^{3}H-GABAの放出を測定したが抗ユビキチン抗体の効果はほとんど見られなった。以上のことから、GABAの取り込みとCa^{2+}非依存性の放出とは異なった機構によるものと考えられる。

シナプトゾームからの高K^+脱分極刺激によるGABAの放出は、Ca^{2+}依存性、Ca^{2+}非依存性の両放出が認められ(2)、Ca^{2+}依存性放出は主にvesicleのexocytosisによるものであり、Ca^{2+}非依存性放出はcarrier protein によるGABA uptake systemの逆機構によるものと考えられている。一方、GABAを含む種々のアミノ酸伝達物質のセロトニン、コリン等のシナプトゾーム内への取り込みを、抗ユビキチン抗体が阻害することが報告されている(5,6)。そこで、抗ユビキチン抗体のGABA取り込みに対する阻害作用を利用し、GABAのCa^{2+}非依存性放出と取り込みの相関性について検討した。

［方法］シナプトゾームの調製：マウス（５週齢、雄性DDy）脳からGrayら(3)の方法により粗ミトコンドリア分画を得、さらにSellstrom ら(7) 方法に準じてシナプトゾーム分画を調製した。

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、牛血清アルブミンと結合させたユビキチンを抗原に用いて兎を免疫し、得られた抗血清をユビキチンを固定化したAffigelカラムで精製後、実験に供した。抗体の特異性は、ATPを枯渇化させた兎網状赤血球の蛋白質を試料としたimmunoblot系(5)で検定し、ユビキチンまたはユビキチン化蛋白質との強い反応性とその他の細胞内蛋白質との非交差性を確認した。

^{3}H-GABAのシナプトゾームへの取り込み：Ca^{2+}-free Ringerで懸濁したシナプトゾーム（～1mg protein／ml）を抗ユビキチン抗体（1～20μg／ml）と37℃、20分間反応後、0.1μM ^{3}H-GABA (0.2μCi) を添加し37℃、2分間incubate後、20,000xg,5分遠心し、沈澱中の^{3}H-GABAをDowex 50(H^+)カラムで分離測定した。

シナプトゾームからの^{3}H-GABA放出：シナプトゾーム（～1mg protein／ml）に0.1μM ^{3}H-GABA (2μCi)を添加し37℃、2分間incubate後、遠心（20,000xg,5分）した。沈澱をCa^{2+}-free Ringer液で懸濁後、抗ユビキチン抗体(5μg／ml)と37℃20分反応後、潅流法により放出実験を行った(2)。流速は0.5ml／minとし、潅流開始16分後、Ca^{2+}-freeあるいは2.5mM Ca^{2+}を含む56mM K^+ Ringer液で4分間刺激し、Ca^{2+}-free Ringer液に戻した。刺激開始後16分間の潅流液中の^{3}H-GABAを分離測定した。ここで

Ca^{2+}-independent release=(Ca^{2+}-free 56mM K^+ release)-(basal release)

Ca^{2+}-dependent release=(2.5 mM Ca^{2+} 56mM K^+ release)-(Ca^{2+}-free 56mM K^+ release)

シナプトゾームゴーストからの^{3}H-GABAの放出：シナプトゾームを低張処理後、Whittakerら(8)に準じてシナプス膜を調製した。得られたシナプス膜（～1mg protein／ml）を5μg／ml抗ユビキチン抗体と37℃20分incubate後、遠心（20,000xg,10分）し、沈澱を1μM ^{3}H-GABA,0.13M potassium phosphate buffer (pH 7.4)で懸濁（～10mg protein／ml）し、凍結－融解によりシナプトゾームゴーストを得た(1)。得られたゴーストをシナプトゾームの場合と同様に、潅

流法により^{3}H-GABA放出量を測定した。

［結果および考察］

GABA取り込み

シナプトゾーム内へのGABAの取り込みは37℃で^{3}H-GABA添加後急速に行われ、2分でほぼ飽和に達するので反応時間は2分間とした。このGABAの取り込みは図１に示すように抗ユビキチン抗体処理により阻害され、5μg／ml抗ユビキチン抗体では50％の阻害が認められた。また対照として用いたpreimmune serum由来のIgsには20μg／mlまでの範囲で阻害効果は認められず、これは抗ユビキチン抗体に特異的であると考えられた。

GABA放出

高K^{+}脱分極刺激によりシナプトゾームからGABAはCa^{2+}依存的、非依存的の両放出が認められる。これらはそれぞれ5.7％、9.2％であった。一方、シナプトゾームを抗ユビキチン抗体で処理しても刺激によるGABA放出には、影響が見られなかった（図２ａ）。この実験では、抗ユビキチン抗体はシナプス膜の外側だけに結合すると考えられるので、次に、シナプトゾームを低張処理後、得られた膜分画を抗ユビキチン抗体と反応後、ゴーストを作成し刺激によるGABA放出を調べた。図２ｂに示すように抗ユビキチン抗体の効果はほとんど認められなかった。以上より、GABAの取り込みとCa^{2+}非依存的放出とは異なった機構であり、以前からいわれている取り込みの逆機構によるCa^{2+}非依存的放出は、存在しても非常に少ないものと考えられる。

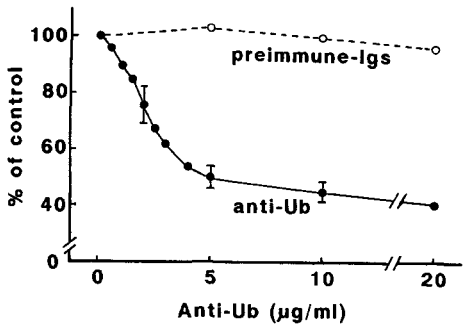


図１：GABA取り込みにおける抗ユビキチン抗体の効果

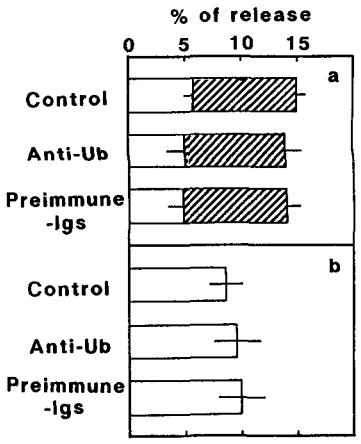


図２：GABA放出における抗ユビキチン抗体の効果．ａ；シナプトゾーム、ｂ；シナプトゾームゴースト．open column:Ca^{2+}非依存性、hatched column:Ca^{2+}依存性

1. Asakura, T. and Matsuda, M., 1987. Jikeikai Med. J. 34:1-13
2. Asakura, T. and Matsuda, M., 1990. Neurochem. Res., 15:295-300
3. Gray, E.G. and Whittaker, D.P., 1962. J. Anat. 96:79-88
4. Haas, A.L. and Bright P.M., 1985. J. Biol. Chem., 260:12464-12473
5. Meyer, E.M. et al., 1986. J. Biol. Chem., 261:14365-14368
6. Meyer, E.M. et al., 1987. J. Neurochem., 49:1815-1819
7. Sellstrom, A. et al., 1975. J. Neurochem. 25:393-398
8. Whittaker, V.P. et al., 1964. Biochem. J. 90:293-303

104　セロトニン刺激によるヒト血小板内Ca^{2+}濃度変化の臨床的基礎検討

久住一郎、小山　司、松原繁広、山下　格
（北海道大学医学部　精神医学教室）

〔要約〕
セロトニン（5-HT）刺激によるヒト血小板内Ca^{2+}濃度上昇反応について検討した。この反応は薬理学的検討から5-HT_2受容体を介していると考えられた。正常群の検討では、個人内変動は10％前後であり、性差は認められなかった。また、採血時間、食事、運動によって有意な影響は認められず、臨床研究に応用しうる比較的安定した指標と考えられた。感情障害における5-HT_2受容体機能異常の有無を検討する目的で、感情障害患者群で予備的測定を行ったところ、正常群に比し、5-HTによるCa^{2+}濃度上昇反応が亢進している傾向が認められた。今後、横断面的検討にとどまらず、病型、症状経過や薬物反応性との関連などの縦断的検討を行っていくことが重要と思われる。

【はじめに】
抗うつ薬の作用機序や神経内分泌学的所見との関連から、感情障害の成因の一つとして脳内5-HT_2受容体機能の異常が想定されている。中枢5-HT作動性神経の末梢モデルとされる血小板は5-HT_2受容体を持ち、イノシトールリン脂質系を介する細胞内Ca^{2+}濃度の上昇により凝集反応が引き起こされることが知られている。従って、5-HT刺激によるヒト血小板内Ca^{2+}濃度変化は感情障害の生物学的指標としての有用性が期待され、予備的な臨床的検討が報告されてきているが(2)、極めて鋭敏な指標であるだけに、測定系に影響を与える可能性のある諸因子について十分検討を加えておくことが必要と思われる。今回われわれは蛍光Ca試薬fura-2を用いて、5-HT刺激性血小板内Ca^{2+}濃度変化を測定し、この反応に対するin vitro での種々の薬物の影響を検討するとともに、健康成人を対象に個人内変動、日内変動、性差、食事あるいは運動の影響について検討した。また、感情障害患者群についても予備的ながら検討を加えた。

【方法】
研究目的を説明して同意を得た未服薬の健康成人及び感情障害患者から静脈血採血（ACD10%混合）し、200g，15分間の遠心により得た血小板濃厚浮遊液に4uM fura-2/AM を添加して、37℃，15分間インキュベーション後、650g，15分間遠心して血小板沈渣を得た。これをHepes緩衝液（pH 7.4）に1×10^8／mlの濃度で浮遊させ、励起波長 340nmと 380nm、蛍光波長 510 nmで蛍光強度を測定し、その比から血小板内Ca^{2+}濃度を算出した。日内変動は、４時間おきに計７回測定し、運動負荷の影響については、1.5kmのランニングの前後で比較検討した。食事の影響の検討では、朝食前、朝食30分後、及び４時間後で測定を行った。

【結果】
（１）血小板内Ca^{2+}濃度は5-HT刺激により濃度依存的に増加し、10μMで最大反応を示し、EC_{50}は0.4μMであった。この反応は5-HT_2受容体拮抗薬で抑制され、種々の薬物による抑制能もその5-HT_2受容体結合親和性とほぼ相関していた（Table 1）。
（２）5-HT刺激反応の個人内変動は、変動係数［ＳＤ／平均値×100（％）］で10％前後であった。
（３）正常群では、5-HT刺激反応に性差はなく、４時間ごとの採血で日内変動は認められなかった（Fig 1）。また、朝食前後及び運動負荷前後でも反応に有意な変化はみられなかった（Fig 2,3）。
（４）10uM 5-HT刺激による最大反応は、正常群に比し、大うつ病群でやや高い傾向が認められた（Fig 4）。

【考察】
5-HT刺激によるヒト血小板内Ca^{2+}濃度上昇は、従来からの報告(1,2)に一致して、5-HT_2受容体を介する反応であることが確認された。in vitroでの向精神薬による影響は、その5-HT_2受容体結合親和性とほぼ相関しており、気分安定剤として注目されるLithium（～10mM）、Carbamazepine（～100μM）、Valproic acid（～300μM）、Clonazepam（～10μM）ではいずれも有意な変化はみられなかった。同一個人内の変動係数は10％前後と比較的大きいが、採血時間、運動、食事の影響はなく、性差も認められなかった。従って、感情障害における中枢5-HT_2受容体機能異常の有無を検討していく一手段として、比較的容易な手法で臨床研究に応用できると考えられた。未治療の感情障害患者群の測定はいまだ予備的段階であるが、正常群に比してCa^{2+}上昇反応がやや高い傾向が認められた。この反応が感情障害における何らかの生物学的指標となりうるかどうかを確認するためには、今後、症例数を増やすとともに、病型、症状、薬物反応性、治療経過との関連などの縦断的検討を十分に行っていく必要があると思われる。

【文献】
(1)Kagaya, A., Mikuni, M., Kusumi, I., Yamamoto, H. and Takahashi, K.(1990) J. Pharmacol. Exp. Ther. in press.
(2)山脇成人，杉原順二，加藤匡宏，清水雅美，慈幸由起（1989） 神経化学，28，152-153.

Table 1. Inhibitory potency of various drugs

	IC50(nM)
Zotepine	1.1
Ketanserin	1.3
Metergoline	1.4
Amoxapine	1.6
Spiperone	2.1
Pipamperone	9.3
Ritanserin	17
Clozapine	18
Mianserin	32
Pimozide	52
Chlorpromazine	210
Trifluoperazine	310
Clomipramine	2100
Yohimbine	4900
Imipramine	14000
Desipramine	28000
(-)propranolol	73000
Diazepam	>300000
Alprazolam	>300000

	IC50(nM)
Verapamil	2300
Nicardipine	>10000
Flunarizine	>10000
Nilvadipine	>30000
Diltiazem	>100000
Clonazepam	>10000
Carbamazepine	>100000
Valproic acid	>300000
Lithium	>10000000

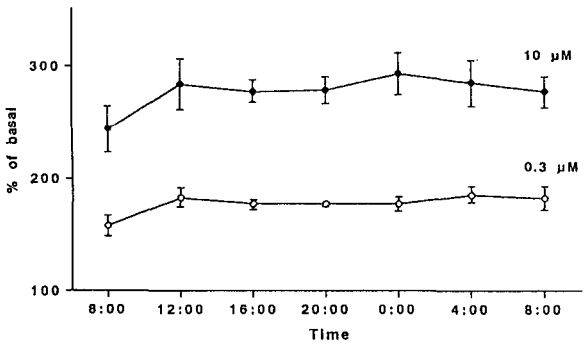


Fig. 1. Diurnal variation in 5-HT-stimulated intracellular Ca concentration increase in human platelets (N=6)

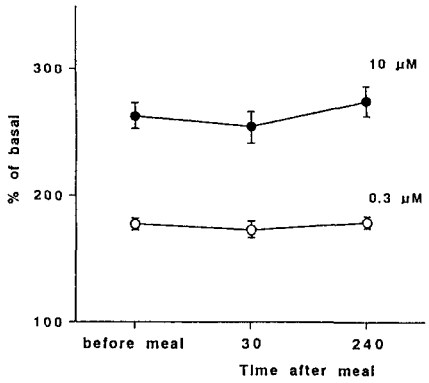


Fig. 2. Effect of meal on 5-HT-stimulated intracellular Ca concentration increase in human platelets (N=6)

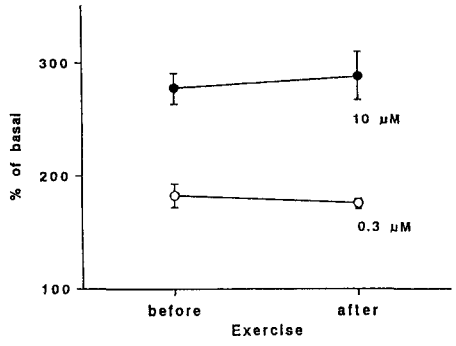


Fig. 3. Effect of exercise on 5-HT-stimulated intracellular Ca concentration increase in human platelets (N=6)

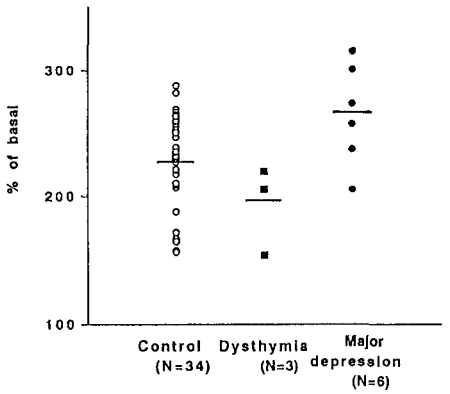


Fig. 4. 5-HT(10μM)-stimulated Ca increase in normal controls and untreated depressed patients

105 ヒト血小板におけるモノアミン受容体機能
セロトニン2受容体とアルファ2アドレナリン受容体との相互作用

加賀谷有行、三国雅彦、高橋清久
(国立精神神経センター神経研究所疾病研究第３部)

ヒト血小板におけるセロトニン(5HT2)受容体、アルファ2-アドレナリン(α2)受容体を介した細胞内カルシウム濃度([Ca++]i)変化について検討した。両受容体とも作動薬による受容体刺激に続いて[Ca++]iを増加させ、それらはprotein kinase Cによるfeedback調節を受けていた。さらにこれらの受容体は互いの受容体機能を亢進させることが明らかになった。この異種受容体感受性亢進には同種脱感作とは違いprotein kinase Cは関与していなかった。一方、この感受性亢進はNaF前処置により抑制されたことから、GTP binding proteinを介した反応であることが示唆された。

脳内5HT受容体には、5HT1,5HT2,5HT3 typesが同定されており5HT1受容体は5HT1A,5HT1B,5HT1C,5HT1D,5HT1E subtypesに細分類されている。さらに5HT1A,5HT1B,5HT1Dはadenylyl cyclaseと抑制性に連関していること、5HT1C,5HT2はphosphoinositide(PI)代謝回転に連関していることが明らかになっている。一方血小板にも5HT2受容体があることが知られている。我々はこれまでに血小板5HT2受容体がPI代謝と連関して[Ca++]iを変化させ、これはprotein kinase Cにより脱感作されることを報告した(2)。

一方、脳内α2受容体と薬理学的に同一の受容体が血小板にも存在することが知られている。このα2受容体は多くの組織でadenylyl cyclaseと抑制性に連関していることがわかっているが一部にはCa channel(3), PI代謝(4,5)と連関しているという報告もある。そこで今回我々は、血小板でα2受容体を介した[Ca++]i変化を調べ、さらに5HT2受容体とα2受容体との相互作用と、それにおけるGTP binding proteinの関与について検討したので報告する。

方法

健康成人より採血し、15% ACD存在下、400g,5分間の遠心により調整した血小板浮遊液に3 μM fura-2/AMを添加し37℃ 15分間incubationの後、700g,10分間遠心して血小板沈渣を得た。これをKrebs-Ringer HEPES buffer(145mM NaCl, 5mM KCl, 0.5mM Na_2HPO_4, 1mM $MgSO_4$, 10mM Dextrose, 0.2mM $CaCl_2$, 10mM HEPES)に浮遊させ、日立F-2000を用いてGrynkiewiczら(1)の方法に準じて励起波長340nmと380nm、蛍光波長510nmでfura-2の蛍光強度を測定し、Kd=224nMとして[Ca++]iを求めた。

結果

α2受容体作動薬であるノルエピネフリン(NE)は、その濃度依存性に[Ca++]iを上昇させ,100μM NE刺激による[Ca++]i増加は30nMだった。このNE刺激性[Ca++]i上昇はprotein kinase C activatorであるmezereinの前処置により抑制され、mezereinの効果はprotein kinase C inhibitorであるH-7により阻害された。NE刺激4分後に再度NEで刺激をすると[Ca++]iの増加は見られなかった。これらの結果から血小板α2受容体はPI代謝と連関して[Ca++]iを変化させ、さらにprotien kinase Cによるnegative feedback調節を受けていることが明らかになった。NE 100μM前処置後では10μM 5HT刺激により[Ca++]iは130nM 増加し、NE未処置のそれより有意に高値を示した。一方、5HT 10μM前処置後では100uM NE刺激により[Ca++]iは50nM 増加し、5HT未処置のそれより有意に高値を示した。これらの感受性亢進状態はH-7の前処置では影響を受けなかった。しかし、GTP bindingを直接活性化すると言われているNaFを前処置するとこれらの感受性亢進状態は抑制された。

考察

以上の結果から、血小板においてα2受容体はPI代謝と連関し、[Ca++]iを調節することが示唆された。α2受容体におけるadenylylcyclaseと[Ca++]iのように薬理学的に単一種類の受容体が複数のsecond messenger systemと連関している理由についてはまだ解明されていない。受容体とsecond

messengerを結ぶGTP binding proteinが機能的に何らかの役割を担っているのかもしれない。前回も示したように、5HT2受容体、α2受容体における同種受容体脱感作はprotein kinase Cによるnegative feedbackを介した反応であることが明らかになった。それに対して、異種受容体間での感受性亢進はH-7では抑制されず、protein kinase C pathwayは関与していなかった。このことから、この感受性亢進は同種脱感作とは別の経路を介していると考えられる。さらに感受性亢進状態がNaFの前処置により抑制されたことはこの反応がGTP binding proteinを介していることを示唆している。GTP binding proteinを活性化すると言われているNaFが受容体刺激によるCa動員を促進するのではなく、感受性亢進を抑制する詳細な機構は不明である。
しかし、一方の受容体を刺激すると異種受容体と連関しているGTP binding proteinの機能が活性化され、そのために受容体刺激によるCa動員が亢進するのかもしれない。NaFがこの活性化を抑制したことから、GTP binding protein のGTP binding siteが機能的に重要な役割を担っていることが示唆される。

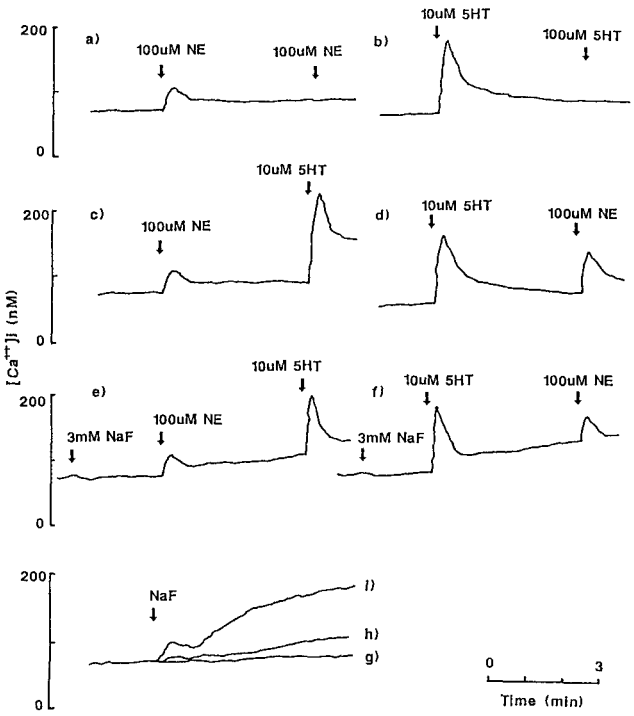


Table 1. Effect of H-7 on the supersensitization of [Ca++]i in human platelets

pretreatment	100uM NE	pretreatment	10uM 5HT
(control)	29±4.4	(control)	110±8.0
300uM H-7	39±4.3	300uM H-7	110±14
10uM 5HT	52±3.0*	100uM NE	132±7.2**
300uM H-7/10uM 5HT	68±15*	300uM H-7/100uM NE	136±11**

Values show increase(nM) in [Ca++]i in human platelets. Each value represents the mean±S.E.M. of 5 separate experiments. *P<0.05, **P<0.01 compared with control.

Table 2. Effect of NaF on the supersensitization of Ca++ mobilization in human platelets.

pretreatment	100uM NE	pretreatment	10uM 5HT
(control)	30±2.1	(control)	106±10
1mM NaF	29±2.9	1mM NaF	105±15
3mM NaF	30±3.3	3mM NaF	104±7.1
10uM 5HT	51±5.1**	100uM NE	125±11**
1mM NaF/10uM 5HT	40±4.3*	1mM NaF/100uM NE	119±14*
3mM NaF/10uM 5HT	33±3.9	3mM NaF/100uM NE	100±6.3

Values show increase(nM) in [Ca++]i in human platelets. Each value represents the mean±S.E.M. of 5 separate experiments. *P<0.05, **P<0.01 compared with control.

文献

(1)Grynkiewicz et al.J.Biol. Chem.260,3440-3450(1985)
(2)Kagaya et al.J.Pharmacol. Exp.Ther. (in press)
(3)McFadzean et al.,Neuron 3,177-182(1989)
(4)Michel et al.J.Biol.Chem. 264,4986-4991(1989)
(5)Mori et al.Life Sci. 44,741-747(1989)

106 マウス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（"光療法"）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〕ヒトの季節感情障害（ＳＡＤ）に対する光療法と同様に、明期の一時期に高照度光を照射する条件で飼育したNZBマウスに関し、高照度光照射の長さおよびタイミングがNZBマウスの松果体インドール化合物の日内変動に与える影響を検討した。12時間の明期の全期間を 2000 lux の高照度光で飼育したマウスでは、10 lux の照明で飼育した対照のマウスに比べて、暗期のN-acetylserotonin（NAc5HT）の上昇が約１時間遅れていた。これに対して、明期開始直後２時間のみ 2000 lux で照明し、明期の他の時間は 10 lux で飼育したマウスでは、対照群に比べてNAc5HTの上昇は、約１時間早まっていた。また、明期終了直前の２時間のみ 2000 lux の照明で飼育したマウスでもNAc5HTの上昇は早まる傾向が見られた。これらの結果は、実験動物においても、明期の高照度光照明の長さやタイミングによって、暗期の松果体の活動のリズムに与える影響に差があることを示しており、このことがＳＡＤに対する光療法の作用機構と関係する可能性が示唆された。

【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。松果体は数種のインドール化合物を含有するが、特に松果体のメラトニン（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。しかし、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（６）、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 の上昇の位相が早まるとの報告もみられる（４）が、これを裏づける基礎的研究は十分ではない。

我々は、先に、明期の光強度が、ラットおよびマウスの暗期の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を報告した（２）が、今回は、ＳＡＤの光療法と同様の、明期のうちの一定時間の高照度光刺激が、NZBマウスの暗期の松果体インドール化合物の日内変動に与える影響を検討した。

【対象と方法】 実験には、雄の NZB マウスを用いた。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、明期の照明の仕方によって４群に分けた。全明期高照度照明群（Ｂ群）では、40W白色蛍光灯８本を装着した照明装置を用い、明期の全時間（8:00 - 20:00）、ケージ内の照度が約 2000 lux になるように調整した。朝方高照度照明群（ＭＢ群）では、明期開始からの２時間（8:00 - 10:00）の間のみ、Ｂ群と同じ照明装置を用いてケージ内の照度が約 2000 lux となるようにし、明期のその他の時間（10:00 - 20:00）は 10 lux の照度とした。夕方高照度照明群（ＥＢ群）では、明期終了前２時間（18:00 - 20:00）を 2000 lux、明期のその他の時間（8:00 - 18:00）を 10 lux とした。対照とした低照度照明群（Ｄ群）は、明期の期間中（8:00 - 20:00）、ケージ内の照度が約 10 lux となるようにした。暗期は完全暗とした。実験群、対照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、直上の頭骨とともに松果体を取り出し、測定まで -80℃で凍結保存した。なお、暗期には写真用赤外線ランプのみの照明下で断頭した。インドール化合物の定量には、ＨＰＬＣ蛍光法（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、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。

【結果および考察】 実験用に分離された多くの系統のマウスでは、メラトニン合成酵素である N-acetyltransferase (NAT) および hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) を欠損しているため、松果体でのNAc5HTおよびMLTの合成がみられないとされているなかで、NZBマウスは、NAT活性を有しており、その活性に日内変動もみられると報告されている（３）。我々は、NZBマウス松果体のインドール化合物を系統的に定量し、MLTは明暗いずれの時期にも検出出来ないのに対して、NATの産物であるNAc5HTは存在し、暗期に高く明期に低い日内変動を示すことを確認した（２）。ところで、MLT合成の律速酵素はNATであると考えられるため、HIOMTを欠損するNZBマウスにおけるNAc5HTのレベルは、他の

種の動物におけるMLTと同様、NAT活性の変化を反映し、松果体の活動のリズムの指標として用い得ると考えられる。そこで、我々は、NZBマウスを用いて、明期光強度が暗期の松果体NAc5HTリズムに与える影響を検討した。

12時間の明期の全期間を 2000 lux の高照度照明下で飼育したマウスでは、10 lux の低照度照明下で飼育したマウスに比べて、NAc5HTの上昇の開始が約1時間遅れ、明期の光強度が暗期の松果体の活動に影響を与えていることが確認された（Tab.1）。 ところで、ヒトのＳＡＤに対する光療法では、朝あるいは夕方の一定時間高照度光を照射するという方法がとられることが多い。そして、この照射の時刻により抗うつ効果に差があり、朝の照射が夕方の照射に優るという報告がある一方、照射の時刻によって抗うつ効果に差は無いとの報告もあり、結論は得られていない。また、光療法の作用のメカニズムについてもはっきりしていない。この様な点を基礎的に研究するため、我々は、明期のうちの一定時間の高照度照明が、暗期の松果体インドール化合物のリズムに与える影響について検討した。

明期開始直後の２時間のみ、2000 lux の高照度光を照射する条件下で飼育したマウス（ＭＢ群）では、対照群に比較して、午前２時および午前３時のNAc5HTのレベルが高く、NAc5HTの上昇が１時間早まったものと考えられた（Tab.2）。これは、明期の全期間 2000 lux の高照度光で飼育した群（Ｂ群）で、NAc5HTの上昇が１時間遅れたのと対照的な結果で、明期の高照度光照射のタイミングおよび長さによって、暗期の松果体の活動に及ぼす変化に差がでることを示している。一方、朝の照射でNAc5HTの上昇のリズムが早まったことは、ＳＡＤに対する光療法が、MLT分泌の開始を早め生体のリズムを前進させることによって奏功するという仮説を支持する結果であると考えられる。

次に、2000 lux の光照度光を明期終了直前の２時間照射するという条件で飼育したマウスの場合について検討した。この群のマウス（ＥＢ群）でも午前３時のNAc5HTが対照群より高く、ＭＢ群の場合と同様に、NAc5HTの上昇が早まっている傾向が見られた（Tab.3）。これは、光療法が朝の照射でも夕方の照射でも有効であるとする主張を説明するには都合がよいが、ヒトで夕方の光照射で血中MLTの分泌開始が遅れるとの報告（４）とは一致しない。これには、NZBマウスのNAc5HTの分泌のパターンが、暗期開始後数時間は上昇せず暗期の後半に上昇するというパターン（Reiterの分類（５）のII型）を示すことが関係している可能性が考えられる。今後、ラットなど他の種の動物でも検討してみることが必要であろう。

Hour	Group	5HT	5HIAA	5HTOL	NAc5HT
22:00	B	102.3±9.9	6.9±0.8	1.0±0.2	0.4±0.1
	D	125.6±4.6	8.7±2.2	0.8±0.1	0.3±0.1
2:00	B	103.9±9.9	6.1±0.5	0.9±0.2	0.5±0.1 **
	D	118.1±3.6	7.2±1.7	1.2±0.4	1.0±0.1 **
3:00	B	115.0±6.8	5.1±0.4	0.9±0.2	0.9±0.1 **
	D	122.3±5.2	6.4±0.6	0.7±0.1	1.6±0.2 **
4:00	B	128.1±10.8	5.6±0.5	0.7±0.1	2.9±0.1
	D	131.5±9.3	6.3±0.7	1.0±0.2	2.8±0.4
5:00	B	116.4±3.0	7.0±0.4	0.8±0.1	2.8±0.4
	D	126.6±4.5	6.6±0.2	0.9±0.1	3.0±0.1
6:00	B	125.2±4.9	7.7±0.4	1.3±0.3	2.7±0.7
	D	150.7±7.0	10.1±0.7	1.1±0.1	2.5±0.4
10:00	B	162.2±5.7	12.3±1.0	1.4±0.2	0.2±0.1
	D	184.6±24.1	16.2±1.9	1.5±0.1	0.2±0.1

Table 1. Diurnal variations of NZB mouse pineal indoles (22:00 - 10:00)
B: Animals kept under illumination at high intensity (2000 lux) during the light period (8:00 - 20:00).
D: Animals kept under illumination at low intensity (10 lux) during the light period.
Values (pmol/pineal) are means±SEs for four or five determinations. ** p<0.01

参考文献

1) 東 均、八木 昭彦、西村 健、大和谷 厚、和田 博 (1987) 神経化学, 26, 553-555
2) 東 均、八木 昭彦、西村 健、大和谷 厚、和田 博 (1989) 神経化学, 28, 388-389
3) Ebihara,S., Marks,T., Hudson,D.J. and Menaker,M. (1985) Science, 231, 491-493
4) Lewy,A.J., Sack,R.L., Miller,L.S. and Hoban,T.M. (1987) Science, 235, 352-354
5) Reiter,R.J. (1983) in: The pineal and its endocrine role (Axelrod,J., Fraschini,F. and Velo,G.P. eds), pp. 227-241, Plenum
6) Reiter,R.J. (1985) Ann.N.Y.Acad.Sci., 453, 215-230

Hour	Group	5HT	5HIAA	5HTOL	NAc5HT
0:00	MB	129.3±8.7	7.3±0.6	1.0±0.2	0.3±0.1
	D	117.5±8.1	7.2±0.8	0.8±0.1	0.3±0.1
1:00	MB	122.0±6.5	6.9±0.2	0.8±0.1	0.3±0.1
	D	125.1±4.5	6.8±0.5	0.8±0.1	0.2±0.1
2:00	MB	147.5±3.5	7.4±0.5	0.9±0.1	1.0±0.1 *
	D	150.4±7.9	6.7±0.7	1.1±0.2	0.5±0.1 *
3:00	MB	165.9±10.1	6.1±0.2	0.7±0.1	2.1±0.2 **
	D	164.8±3.5	6.9±1.4	1.2±0.2	1.1±0.1 **
4:00	MB	171.8±3.6	6.9±0.4	0.8±0.1	2.7±0.2
	D	169.6±6.7	5.9±0.6	0.7±0.1	2.3±0.3

Table 2. Diurnal variation of NZB mouse pineal indoles.
MB: Animals kept under illumination at 2000 lux (8:00 - 10:00) and at 10 lux (10:00 - 20:00)
D: Animals kept under illumination at 10 lux (8:00 - 20:00) Values (pmol/pineal) are means ± SEs for four determinations . ** p<0.01 * p<0.05

Hour	Group	5HT	5HIAA	5HTOL	NAc5HT
1:00	EB	124.6±7.8	5.4±0.4	0.8±0.2	0.3±0.1
	D	134.3±10.1	6.1±0.7	0.8±0.1	0.3±0.1
2:00	EB	133.8±5.8	5.4±0.3	1.0±0.2	0.5±0.1
	D	139.0±4.8	5.7±0.7	0.9±0.1	0.4±0.1
3:00	EB	153.2±4.0	5.5±0.4	0.8±0.1	1.5±0.1 *
	D	154.0±6.1	5.1±0.3	0.7±0.1	1.0±0.1 *
4:00	EB	155.2±4.0	5.6±0.2	0.8±0.1	2.5±0.2
	D	166.5±4.5	5.2±0.4	0.7±0.1	2.1±0.2

Table 3. Diurnal variation of NZB mouse pineal indoles.
EB: Animals kept under illumination at 10 lux (8:00 - 18:00) and at 2000 lux (18:00 - 20:00)
D: Animals kept under illumination at 10 lux (8:00 - 20:00) Values (pmol/pineal) are means ± SEs for four determinations. * p<0.05

107 Serotonin再取り込み阻害による細胞外(シナプス間隙)Serotoninの増加について：In vivo microdialysisによる検討

小山　司、木戸　薫*、井上　猛、久住一郎、松原良次、小田垣雄二、山下　格
北海道大学医学部精神医学教室、*(株)エイコム

〔要約〕

ラット線条体において、in vivo microdialysisを用い、Serotonin(5-HT)再取り込み阻害薬投与による細胞外5-HT動態について検討した。透析チューブ固定後、灌流４時間後の細胞外5-HTの基礎値は1-2pg/50μlであった。5-HT再取り込み阻害能を有するとされる抗うつ薬のCitalopram、Milnacipranと脳代謝改善薬のIndeloxazine、Bifemelaneを対象として、薬物濃度を2.5μMに一定とし灌流すると、細胞外5-HT量は徐々に増加した。その際の増量効果はCitalopram＞Milnacipran＞Indeloxazine＞Bifemelaneの順で大であった。ヒト血小板を用いて得られた各薬物の5-HT再取り込み阻害能(IC_{50}値)から算出したpKi値と灌流180分後の細胞外5-HT最大増加量との間には統計的に有意な正の相関関係が認められた。このうちIndeloxazineをとりあげ、灌流液中の薬物濃度を展開すると、1-25μMの範囲で明瞭な用量依存性が確認された。以上の結果は、5-HT再取り込み阻害による細胞外5-HT量の増加、すなわちシナプス間隙における5-HT利用率の亢進を実証したものといえる。

【はじめに】

5-HT再取り込み阻害能は、従来より抗うつ効果との関連が指摘され、躁うつ病の5-HT仮説を支持する根拠として重要視されてきた。また、最近、脳血管障害の意欲・感情障害や学習・記憶障害の改善効果が注目され、その臨床応用が始められている。これらの薬物は神経終末における5-HT再取り込み過程を阻害し、結果としてシナプス間隙における5-HTの利用率を亢進させることが前記の臨床効果につながるものと推定されている。しかし、このシナプス間隙における5-HT増量を直接的に証明した資料はなく、一方、5-HT再取り込み阻害薬投与によって5-HT代謝回転の低下が生じることが知られている。したがって、5-HT再取り込み阻害薬によるシナプス間隙5-HTの増量効果はいまだ推定の域を出ていないといえる。今回、我々は高感度の電気化学検出器と理論段数の高いHPLCカラムを用いることにより、in vivo microdialysis法で線条体細胞外5-HT、すなわち神経終末からシナプス間隙における5-HTの増加を証明するとともに、5-HT再取り込み阻害力価との相関についても検討したので報告する。

【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、脳定位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、内径195μm、膜厚30μm)を、ガイドステンレス管より5mm線条体内に露出させて固定した。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0.05Mの酢酸50μlを入れておいた試験管に20分ごとに回収した。線条体の細胞外5-HT量に与える5-HT再取り込み阻害薬の影響については、各薬物を一定濃度に溶解したリンゲル液を灌流液として切り替えることにより検討した。5-HT再取り込み阻害能を持つ薬物としてCitalopram、Milnacipran、Indeloxazine、Bifemelaneの4剤を対象とした。透析液の5-HT量は電気化学検出器(EICOM ECD-100)付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって測定した。HPLCはUltrasphere-IP(BECKMAN社製、5μ、4.6mm×25cm)を用いた。移動相は0.1M、pH4.5酢酸緩衝液、10%メタノール、35mg/L sodium octyl sulfate、250mg/L EDTAで、酸化電位は、＋0.55ボルトに設定した。5-HT動態は薬物灌流前の基礎値(20分ごとの連続した3フラクションの平均値)に対する灌流液の変化の割合で表示した。実験終了後、断頭して切片標本を作製して透析チューブの挿入位置とその周辺の出血の有無について確認した。

【結果と考察】

我々が確立したHPLC-ECD法によって、ラット線条体透析液中の5-HTの検出が可能となった。透析液チューブ固定後、４時間後の透析液中の5-HTの基礎値は1-2pg/50μlであった。5-HT再取り込み阻害能を有すると報告さ

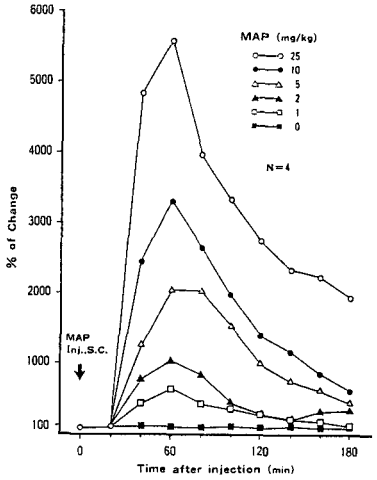


Fig.1 Effect of MAP treatment on 5-HT efflux in dialysates collected from rat striatum

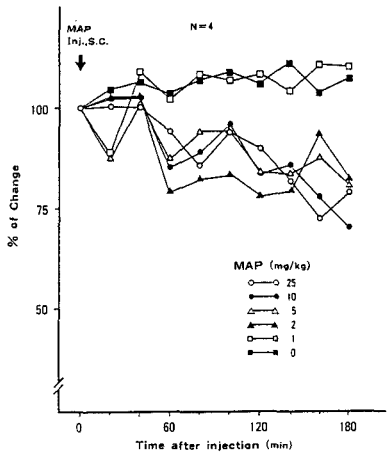


Fig.2 Effect of MAP treatment on 5-HIAA efflux in dialysates collected from rat striatum

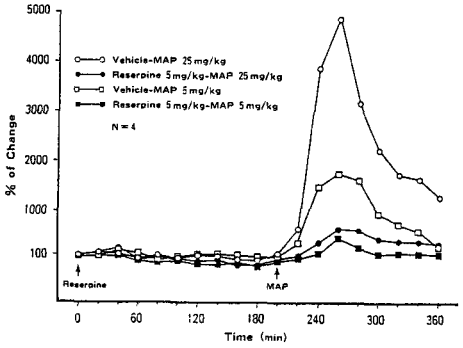


Fig.3 Effect of reserpine pretreatment on MAP-induced alteration in 5-HT efflux in dialysates collected from rat striatum

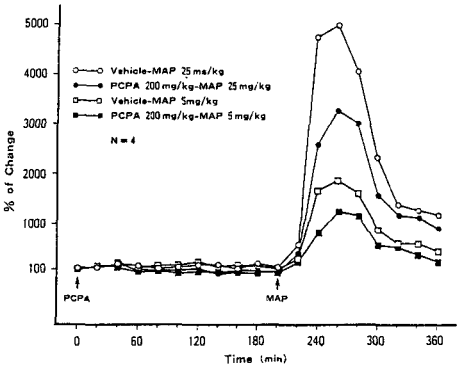


Fig.4 Effect of PCPA pretreatment on MAP-induced alteration in 5-HT efflux in dialysates collected from rat striatum

（3）MAP投与による5-HT放出量の増加に及ぼすPCPA前処置の影響(Fig.4)

5-HT合成阻害剤であるPCPA200mg/kgの前処置は、MAP投与(5mg/kgおよび25mg/kg)による5-HT放出量の増加をvehicle前処置群の約70%前後に抑制した。 したがって、MAP投与の際の5-HT放出の起源の一部は新しく生合成された5-HTプールにもあると考えられる。

以上の結果から、MAP投与による5-HT放出の起源は、新しく生合成された5-HTプールと小胞内5-HT貯蔵プールの両方から動員されたものの総和であるが、その大部分は小胞内5-HT貯蔵プールに由来するものと推定される。我々は、以前、MAP投与によるDA放出過程をin vivo microdialysisを用いて検討し、Reserpine前処置がMAP投与によるDA放出量の増加に影響を与えなかったのに対し、DA合成阻害剤であるα-MPTの前処置がほぼ完全に抑止したことから、MAP投与によるDA放出は、小胞内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推定した(3、4)。これらの結果から、MAP投与による5-HTとDAの放出はその起源を異にしていることが明らかとなり、この知見はMAPによる5-HT放出促進効果がDAのそれをはるかに上回っているという今回の結果を説明するものと考えられる。

【文献】

1) 市川淳二 他 (1986) 神経化学、25、280-282
2) 小山 司 他 (1988) 精神神経誌、90、853-862
3) 小山 司 他 (1989) 神経化学、28、484-485
4) 小山 司 他 (1990) 精神医学、32、629-635

108　5-HT1A作動薬(8-OH DPAT,ipsapiron)による脳内モノアミン代謝回転の変動

丹生谷正史*,** 神庭重信* 木下徳久*,** 鈴木映二*
八木剛平* 中木敏夫*** 加藤隆一***
*慶応義塾大学精神神経科 **慈雲堂内科病院精神科 ***慶応義塾大学薬理学教室

〔要約〕 ベンゾジアゼピン系薬物(BZDs)とは作用機序の全く異なる新しいタイプの抗不安薬としてbuspirone,ipsapirone,SM3997等のpyrimidinyl-piperazine誘導体が5-HT1A受容体のpartial agonistとして開発されており、依存・耐性・退薬時の禁断・筋弛緩・鎮静・アルコールとの相互作用といった従来のBZDs系抗不安薬の副作用を持たないことから、広く臨床での使用が期待されている。我々はfreely movingの状態で脳内神経伝達物質の変動を知ることが可能なin-vivo microdialysisの手法をもって、特異的な5-HT1A agonistとされている8-OH DPAT,及び上述のipsapirone投与後の線状体および海馬におけるセロトニン（5-HT)系・ドーパミン(DA)系代謝産物の変動を測定し、5-HT系と不安現象の関連について考察を加えたのでここに報告する。代謝産物量でみる限りでは、8-OH DPAT,ipsapironeともに線状体・海馬における5-HT系代謝回転を抑制したが、線状体におけるDA系については両薬物による反応に相違がみられた。すなわち、ipsapironeではDA系代謝回転の促進が見られたが、8-OH DPATではこの事実が確認されなかった。これがipsapironeの持つわずかながらのDA受容体に対する親和性によるものなのか、あるいは8-OH DPAT独自の線状体自身に対する作用によるものなのかについては,今後さらに検討が必要である。

従来のBZDs系抗不安薬は、GABA系の伝達増強によってDA・5-HT・ノルエピネフリン・アセチルコリン等の脳内神経伝達を広汎に抑制する。このうち5-HT系に対する抑制と抗不安作用の相関が従来より、主にneurophysiologicalな立場より指摘されてきたが、現在では各種セロトニン受容体の細分化・各々に対する特異的リガンドの発見・作用の解明によって、この問題をneuropharmacologicalな側面より問直すことが可能となっている。

（実験方法）雄性SD系rat（250-350gr)を用い定位固定装置により、guide canulaを挿入した（線状体：bregma anterior 0.7mm,lateral 3mm,brain surfaceよりdepth3.5mm　海馬：bregma posterior 6mm,lateral 5mm,brain surfaceよりdepth3mm)。術後1-4日後に透析チューブ（線状体3.5mm、海馬2mm)を持つprobeを挿入し、HANK bufferを流速3μl/minで透析灌流し、数時間後の回収産物量の安定を待ったあと実験を施行した。モノアミン代謝産物の定量はHPLC-ECD systemを用い、薬物投与前の各物質量は最低３回の測定を行い、平均値をとり、その値を各実験におけるBase値100%とした。Ipsapirone投与量は5mg/kg,8-OH DPAT投与量は500μg/kgとした。なお、実験終了後にprobe部分が目的位置に挿入されていることを肉眼的に確認した。

（実験結果）線状体においては両薬物によって5HIAA量の減少が見られたが、ipsapironeでみられるDOPAC,HVA 量の上昇は8-OH DPATでは認められなかった(fig1,2)。しかしながら、海馬ではipsapirone同様8-OH DPATでも5-HIAA量の減少,及びDOPAC,HVA量の増加が確認された。

(考察) 特異的な5-HT1A full agonistとされている8-OH DPATと、5-HT1A partial agonistであり若干他の受容体に対するaffinityをもったipsapironeを使用して脳内モノアミン系代謝産物の細胞外液中での変動を観察した。この結果、両部位において、各薬物による5-HIAA量の減少が確認された。これは縫線核中の5-HT作動神経の細胞体上の抑制性5-HT1A自己受容体に対する作用の結果と考えられた。

一方、線状体におけるDA系代謝産物の動向には差異が見られた。Ipsapironeによる線状体DA代謝産物量の上昇の理由はいくつか考えられる。過去にneurophysiolosicalな側面より、線状体に至る5-HT神経系の作用減弱によって線状体内DA代謝回転の増強することが指摘されている[1]。しかしながら、特異的な5-HT1A agonistとされている8-OH DPAT投与により5-HT系代謝回転を減少させても、この増強が観察できないことからこの考え方は疑わしい。ただ、8-OH DPATには線状体自身に対する作用もあることが報告されており、逆方向の作用の相殺によって8-OH DPAT投与時にipsapironeと異なった反応を示している可能性は存在する。別の考えとしては、ipsapironeの持つわずかながらのドーパミン受容体に対する親和性によってDA系代謝回転の上昇の起きている可能性も存在するが、5-HT1A受容体への親和性に比しあまりに低い[2](5-HT1A:IC50=10,D2:IC50=3000)ことから考えにくい。加えて、ipsapirone以上にドーパミン受容体に対する親和性を持つbusp ironeでも同様のドーパミン代謝回転増加の報告がされているが、prolactin levelで見た場合、buspironeは放出を促進する方向に作用しipsapironeでは抑制の方向に作用することが最近知られている[3]。このことから、同じpyrimidinyl piperazine誘同体でもDA神経系に対する作用に関しては相違があり、理解は容易ではない。ただ、このprolactin levelの報告より見る限り、今回われわれの観察したDA系代謝回転上昇は、シナプス後部位に対する拮抗作用による間接的結果というよりは、むしろシナプス前部位への促進的作用の直接的結果であると考えている。海馬において、両薬物ともドーパミン系代謝回転の見られたことは、線状体における5-HT1A受容体の特殊性を示唆していると推測している。

抗精神病薬服用時の副作用であるアカシジア・ジストニア出現時には身体的な錐体外路症状とともに、精神症状として不安・焦燥の存在することが知られており[4]、またPar kinson病患者において不安障害が高頻度でみられることも最近注目されている[5]。今回の我々の得た結果は、錐体外路症状出現時の不安現象に対するpyrimidinyl piperazine系抗不安薬投与の有効性を示唆するものであると考えらる。

fig1

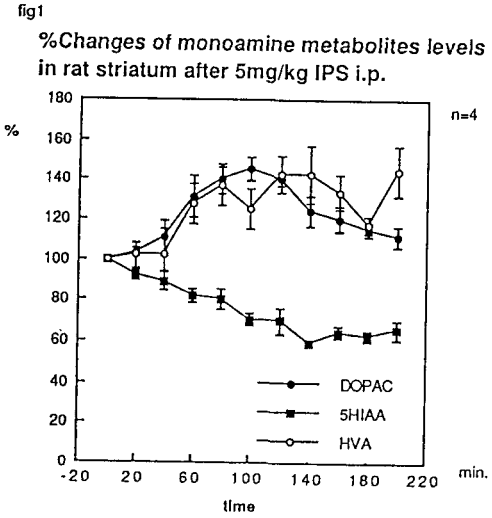
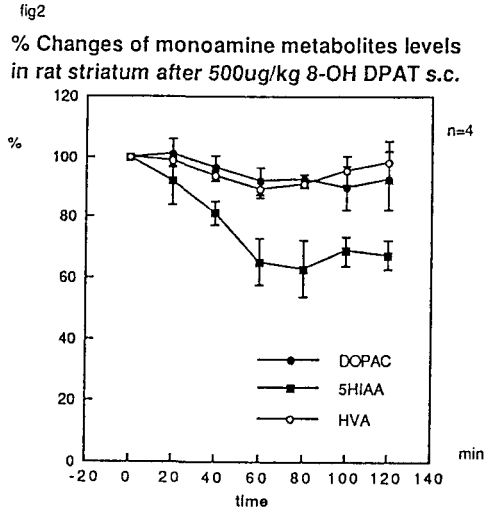


fig2



（文献）1)Dray,A. et al.,Brain Res.,113:45-57,1976.2)Peroutka,S.J. et al.,Biological psychia try.,20:971-979,1985.3)Nash,J.F. et al.,J Pharmacol.Exp.Ther.,249:236-241,1989.4)八木剛平,精神神経学雑誌.,76:757-777,1974.5)Stein,M.B.et al.,Am.J.Psychiatry.,147:217-220,1990.

109　血中コルチコステロンよりみたリチウム，電気けいれんショック反復処置の５ＨＴ－１Ａレセプターへの効果

山田健児，穐吉條太郎，土山幸之助，宮本武司，伊東良伯，山内千代，
大庭明子，岡田久美子，児島克博，佐々木一郎，永山治男
（大分医科大学　精神神経科）

［要約］
Lithium，電気けいれんショック（ECS）を反復投与および処置し，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) による血中コルチコステロンを有意に増加することを報告した。【1】8-OH-DPATは濃度依存的に血中コルチコステロンを増加させた。【2】Parachlorophenylalanine (PCPA)前投与は，8-OH-DPATによる血中コルチコステロンの増加に対して影響を及ぼさなかった。【3】lithiumの21日間慢性投与は，8-OH-DPAT投与による血中コルチコステロン増加作用に影響を及ぼさなかった。ECSを10日間反復処置は，血中コルチコステロンの基礎値を上げたが8-OH-DPAT投与による増加作用は抑制した。このECSの抑制は5HT-1Aレセプター系を介するものと考えた。

［目的］
われわれは抗うつ剤mianserin，desipramine，doxepin，amitriptyline，trazodoneの慢性投与が5HT-1Aレセプターの高親和性部位のBmaxを有意に増加させることを見いだした。
昨年の本学会で抗うつ薬mianserin，desipramine，doxepinの慢性投与が5HT-1Aレセプターのアゴニストである8-OH-DPATによる血中コルチコステロンを有意に増加することを報告し，うつ病における5HT-1Aレセプター系の重要性を指摘してきた。
本研究はこの変化がlithiumやECSの慢性投与や処置でも起こるか否かを検討する目的で行った。

［方法］
18:00から6:00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。【1】8-OH-DPAT(0.5or 0.75 mg/kg)を10:00-12:00に投与し30分後に断頭し躯幹血を採取した。【2】PCPA(150mg/kg)またはsalineを3日間腹腔内投与し，最終投与の18時間後に8-OH-DPAT(0.5mg/kg))を投与し30分後に断頭し躯幹血を採取した。【3】lithium(3mEq/kg)を21日間，ECSを10日間施行し最終投与の18時間後に8-OH-DPAT(0.5mg/kg)を投与し30分後に断頭し躯幹血を採取した。

［結果］
【1】8-OH-DPATは濃度依存的に血中コルチコステロンを増加させた(Fig. 1)。【2】8-OH-DPATによる血中コルチコステロンの増加は，PCPAの前処置によっては影響を受けなかった(Fig. 2)。【3】（1）lithium慢性投与後に8-OH-DPATを投与した群では，（lithium＋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，（saline＋8-OH-DPAT）投与群に比べて有意な増加はみられなかった。（Fig. 3）（2）ECS慢性投与後に8-OH-DPATを投与した群では，（ECS＋saline）投与群に比べて血中コルチコステロンは有意な増加はみられなかった。しかし，（ECS＋saline）投与群は（sham ECS＋saline）投与群に比べて有意に増加していた。また，（ECS＋8-OH-DPAT）投与群も，（sham ECS＋8-OH-DPAT）投与群に比べて有意に増加していた。（Fig. 4）

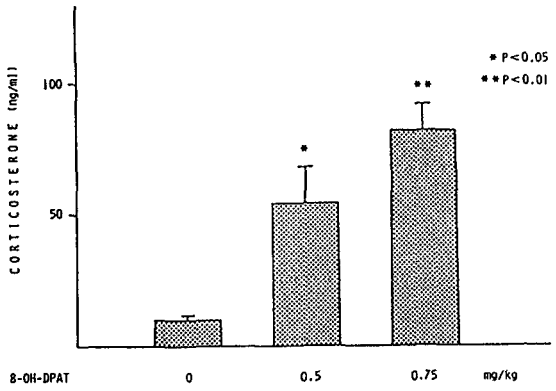


Fig.1: Effect of 8-OH-DPAT on plasma corticosterone concentration.

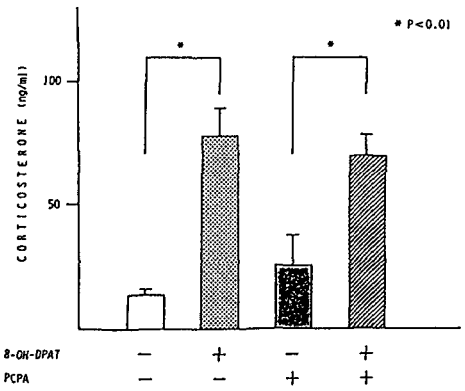


Fig.2: Effect of pretreatment with PCPA (150mg/kg/day for three days) on the 8-OH-DPAT induced increase in plasma corticosterone concentration.

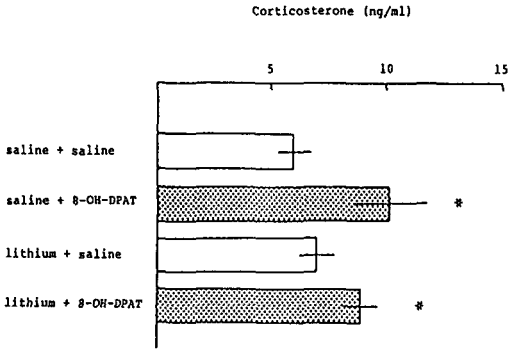


Fig.3: Effect of pretreatment with lithium (3mEq/kg for 21 days) on the 8-OH-DPAT induced increase in plasma corticosterone concentration. *<0.05.

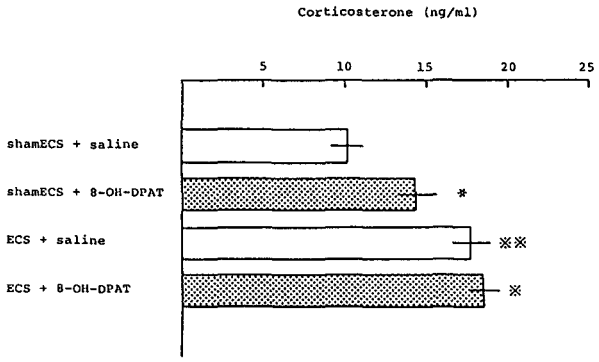


Fig.4: Effect of pretreatment with ECS (100V, 1A. for 10 days) on the 8-OH-DPAT induced increase in plasma corticosterone concentration. *, ※ <0.05 ※※ <0.01.

[考察]

8-OH-DPATは濃度依存的に血中コルチコステロンを増加させることがわかった。しかし，この増加はPCPAによって影響受けないことよりポストシナプスに存在する5HT-1Aレセプターを介しているものと考えた。lithium慢性投与は，8-OH-DPATによるコルチコステロンの増加に対して影響を及ぼさなかった。lithiumを慢性投与し8-OH-DPAT投与後の低体温は影響を受けないとする報告と一致している。lithium慢性投与は，5HT-1Aレセプター系に影響を及ぼさないと考えた。ECS投与群はsham ECS投与群に比べ有意に増加していた。すなわち，ECSのみで有意にコルチコステロンを増加させる作用があると考えられる。これがどのニューロンを介したものか今後検討する必要があると思われる。（ECS＋8-OH-DPAT）投与群は（ECS＋saline）投与群に比べ有意な増加を示さなかった。ECSを反復処置し8-OH-DPAT投与後の低体温は抑制され，セロトニン症候群は減弱すると報告と一致している。この変化は，慢性ECSにおける5HT-1Aレセプターを介する系の低下を示唆しているものと考えた。

[文献]

(1) 穐吉條太郎，他(1989)神経化学,28,252.(2) Akiyoshi, J., et. al.(1990) Pharmacol Biochem Behav in press (3) Goodwin, G. M., et al.(1986) Psychopharmacology 90,488. (3) Goodwin, G. M., et al. (1987) Psychopharmacology 91,500.

110 Adenylate Cyclase活性を通してみた5-HT 1A受容体に及ぼす抗うつ剤慢性投与の効果

土山幸之助，穐吉條太郎，山田健児，宮本武司，山内千代，大庭明子，
伊東良伯，岡田久美子，児島克博，佐々木一郎，永山治男
（大分医科大学　精神神経科）

【要約】

うつ病におけるセロトニン(5-HT)１Ａ系の役割をセカンドメッセンジャーレベルで解明することを目的として，本研究を行った。ラットの海馬膜標品を用い，forskolin刺激性Adenylate Cyclase(AC)活性に対する8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin(8-OH-DPAT)の抑制効果を測定した。8-OH-DPATは濃度依存性の抑制を示し，最大抑制率は約１７％であった。Trazodone 10mg/kg,desipramine 10mg/kg,mianserin 5mg/kgの慢性投与は，8-OH-DPATによるAC活性抑制に対し有意な効果を及ぼさなかった。また，Parachlorophenylalanine (PCPA 300mg/kg)は5-HT 1A系に連関したAC系に対し有意な効果を及ぼさなかった。以上から，シナプス後部に存在する5-HT 1A系を介したAC活性に対し抗うつ剤は影響を及ぼさないことが示唆された。

【目的】

われわれはこれまで，うつ病におけるセロトニン(5-HT)１Ａ系の役割について，検討を重ねてきた。その中で抗うつ剤 mianserin 2mg/kg，desipramine 5mg/kg,doxepine 5mg/kg，amitriptyline 5mg/kg,trazodone 10mg/kgの慢性投与が5-HT 1Aレセプターの高親和性部位のBmaxを有意に増加させることを見いだしてきた[3]。本研究はこのレセプターレベルの変化が，セカンドメッセンジャー系の変化としてそのまま反映されるかどうか，すなわちレセプターの数の変化が機能面に反映されるか否かを検討する目的で行った。

また，本実験系でみた5-HT 1A系を介したAC活性がラット海馬においてシナプス前部に存在するか，あるいシナプス後部に存在するかについても検討した。

ちなみに,Newmanら[4]はforskolin刺激性AC活性に対する5HTの抑制効果をdesipramineの慢性投与が減弱させたと報告している。一方，小田垣ら[1]は減弱しなかったと報告しており，現段階では見解の一致は得られていない。

【方法】

18:00から6:00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。Trazodone 10mg/kg,desipramine 10mg/kg,mianserin 5mg/kgまたはsalineを3週間腹腔内投与し，最終投与の18時間後に断頭し，海馬を取りだした。De Vivo＆Maayaniの方法[2]に従って，膜標品を作成した。Incubationは30℃，10分間行い，5-HT 1Aレセプターを介するAC活性の機能は，forskolin(50μM)刺激性AC活性に対する8-OH-DPAT(1μM)の抑制率によって調べた。また，PCPA(300mg/kg)またはsalineを3日間腹腔内投与し，最終投与の24時間後に断頭し，同様に5-HT 1A系を介するAC活性を測定した。

【結果】

１．ラット海馬のAC活性は，添加したforskolinの濃度依存性に増加した。forskolin非存在下に比べ，10μMのforskolin存在下では約3.5倍，50μMのforskolin存在下では約7倍，100μMのforskolin存在下では約10倍に増加した。

２．forskolin(50μM)刺激性AC活性にたいして8-OH-DPATは濃度依存性の抑制を示した．最大抑制率は約17％であった。

3．Trazodone 10mg/kg,desipramine 10mg/kg,mianserin 5mg/kgの慢性投与は，forskolin刺激性AC活性に対する8-OH-DPATの抑制効果に有意な影響を及ぼさなかった(Table 1)。

4．PCPA(300mg/kg)の投与は，forskolin刺激性AC活性にたいする8-OH-DPATの抑制効果に，有意な影響を及ぼさなかった。

【考察】

5-HT 1Aレセプターは，ラット海馬ではシナプス後部に存在すると考えられている．今回のPCPAを用いた実験結果は，このことをセカンドメッセンジャーレベルで再確認しているといえよう。

抗うつ剤の慢性投与実験では,8-OH-DPATによるAC活性の抑制に対する有意な効果は認められなかった。これは，5-HT 1Aレセプターの高親和性部位のBmaxの増加を抗うつ剤がもたらしたとするわれわれの過去の所見とは一見矛盾している。この解釈として二つの可能性が考えられる。第一は今回は海馬を用い，一方レセプター結合実験では大脳皮質を用いており，部位による相違に基ずく可能性である。第二は，レセプター数の増加は機能の変化を必ずしも意味しないという可能性である。

今後，これらの可能性をふまえて，他の抗うつ剤についても検討する予定である。

【文献】

1. 小田恒雄二，小山司，松原繁広，他 (1989) 神経化学 28(1), 80-81
2. De Vivo, M., and Maayani, S. (1986) J. Pharmacol. Exp. Ther., 238, 248-253
3. 永山治男，穐吉條太郎，土山幸之助，他(1989) そううつ病の発症機序に関する生物学的研究，昭和63年度研究報告書， 23-28
4. Newman, M.E. and Lerer, B. (1988) Eur. J. Pharmacol., 148, 257-260

Table 1. Effect of long-term treatment of antidepressants on the inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity by 8-OH-DPAT in rat hippocampal membranes

	N	Percent inhibition of forskolin-stimulated AC
Experiment I		
Control	12	12.0 ± 1.3
Trazodone	11	15.0 ± 1.9
Experiment II		
Control	9	16.9 ± 2.7
Desipramine	10	14.1 ± 2.4
Mianserin	10	14.3 ± 1.7

111 時間制限給餌のラット脳内セロトニン代謝に及ぼす影響

奥野正景、切池信夫、井上幸紀、松井徳造、川北幸男
（大阪市大・医・神経精神医学教室）

〔要約〕
制限給餌の摂餌行動ならびに脳内のセロトニン代謝に及ぼす影響について調べるために、Wistar系雌性ラットに1日2時間の制限給餌を14日間施行し、1、7、14日目の脳内7部位における Tryptophan (TRP), 5-Hydroxytryptamine (5-HT), 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 量を HPLC-ECD 法により 同時定量し、これらの結果を同時期に自由摂餌させたラットの結果と比較した。1日2時間の制限給餌を14日間繰り返すと2時間当りの摂餌量が6.46g（1日目）～11.73g（13日目）と著明に増加した。そして、1日目の22時間絶食後では線条体を除く全部位において、7日目の22時間絶食後では脳幹、海馬、嗅球においてTRP量が増加し、セロトニン代謝が亢進した。そして、これが2時間の摂餌後に抑制された。しかし、14日目の22時間絶食後ではTRP量は対照群と異ならず、線条体、視床、視床下部でセロトニン代謝回転の低下がみられ、これが2時間の摂餌後でも回復しなかった。

〔はじめに〕
Anorexia nervosa や Bulimia の発症に、不食や摂食制限が密接に関連している。また症状として生じる過食や抑鬱気分に脳内セロトニン代謝異常の関与が推定されている。さらにラットに絶食や制限給餌を行うと脳内セロトニン代謝が亢進することが知られている[1)2)3)5)6)]。そこで、摂食障害の生物学的な基盤を解明するために、ラットに1日2時間の制限給餌を繰り返し行い、これの摂餌行動ならびに、脳内セロトニン代謝に及ぼす影響について検討を加えた。

〔方法〕
8時－20時を暗期、20時－8時を明期とする明暗恒常条件下で、1匹ずつ個別の飼育用プラスチックゲージで飼育したWistar系雌性ラット（12週令、200～250g）を実験に供した。飼料としては日本クレア株式会社製 CE-2（水分:8.7%,粗蛋白質:25.2%,粗脂肪:4.6%,粗繊維:4.3%,粗灰分:7.2%,可溶性無窒素物:50%）を用いた。実験群には水分摂取は自由にさせ、1日のうち暗期の11時～13時の2時間に摂餌させる時間制限給餌を14日間にわたって施行し、その間の摂餌量、摂水量及び体重の変化を測定記録した。そして制限給餌開始後の1日目、7日目及び14日目に2時間の制限給餌を施行する直前及び直後に断頭を行い、脳内のTRP、5-HT、5-HIAA含量を測定した。対照群はこの間自由に摂餌と摂水をさせ、実験群と同時期に断頭した。断頭後速やかに脳髄を摘出し、0℃の低温下にてGispen[4)] らの方法にしたがって、大脳皮質、橋＋延髄、線状体、視床、視床下部、海馬、嗅球の7部位に分割した。各脳組織は内部標準物質 Nw-metyl-5-hydroxytryptamine (NM-5-HT) を含む 10% ZnSO4 + 0.02% Ascorbic Acid を0.5-2ml加えてホモジナイズ後、－80℃にて保存。試料は測定直前に解凍し、15,000rpm、15分間、4℃下で遠心後、その上清を HPLC-ECD に注入し、TRP、5-HT、5-HIAA量を同時に定量した。統計的解析には一元配置分散分析法及び Welch test を用いた。

〔結果及び考察〕
1日2時間の制限給餌により、1日の総摂餌量は1日目で対照群の33.9%、7日目で48.5%、13日目で53.3%と低下した。しかし、2時間当りの摂餌量でみると実験群は13日目で平均 11.73gと、対照群の平均 1.83gに対し有意に多かった。体重について、対照群は平均 2.4g/日ずつ増加したのに対して、実験群では1日目から7日目までは平均 0.88g/日ずつ減少し、7日目から14日目までは平均 0.76g/日ずつ増加し、13日目には同時期の対照群の約83%と有意に低体重であった。

Fig.1に1日目、7日目、14日目の22時間の絶食後と2時間の制限給餌後の脳内各部位のTRP、5-HT、5-HIAA含量の変化を示した。

1日目の22時間の絶食後では、TRP量は対照群に比し、線条体を除く全部位において、5-HT量は橋＋延髄、視床、嗅球において、5-HIAA量は嗅球を除く全部位において増加した。これが2時間の摂餌によりTRP量は視床下部、海馬、嗅球において、5-HT量は大脳皮質、橋＋延髄、線条体、視床、嗅球において、5-HIAA量は、嗅球を除く全部位において減少した。これは、22時間の絶食により脳内全部位においてセロトニン代謝が亢進し、これが2時間の摂餌により抑制されたものと考えられた。

7日目の22時間絶食後では、TRP量は対照群に比し大脳皮質、橋＋延髄、線条体、海馬において増加した。5-HT量は大脳皮質、海馬において減少し、5-HIAA量は橋＋延髄、海馬、嗅球で増加し、これらの部位でのセロトニン代謝の亢進が示唆された。これが2時間の摂餌により、TRP量は全部位において減少し、5-HT量は海馬で増加し、5-HIAA量は大脳皮質、脳幹、海馬で減少した。このことから、7日目の22時間の絶食後でも橋＋延髄、海馬、嗅球においてTRP量が増加し、セロトニン代謝が亢進し、これが2時間の摂餌により抑制された。

14日目の22時間の絶食後ではTRP量は全部位において対照群と異ならず、5-HT量は橋＋延髄、海馬で5-HIAA量は線条体、視床、視床下部において減少し、線条体、視床、視床下部においてセロトニン代謝回転が低下していることが示唆された。これが2時間の摂餌によりTRP量は全部位において著名に減少し、5-HT量は、視床を除く全部位で増加し、5-HIAA量は全部位で減少した。2時間の摂餌により5-HTは増加するもののセロトニンの代謝回転は低下していた。　これらの変化は制限給餌に対してラットが合理的に適応していく過程と考えられた。

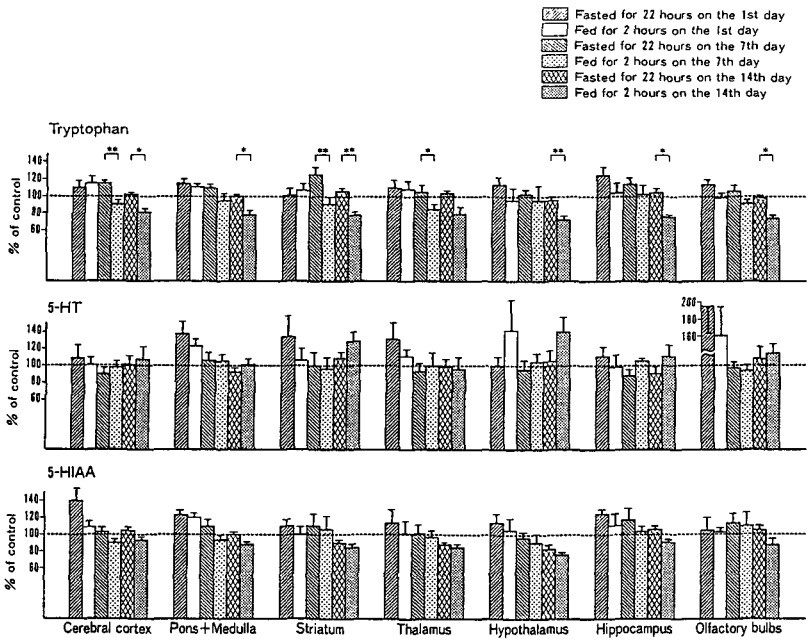


Fig.1 Effects of a 22hr fasting and a 2hr feeding on the concentration of TRP, 5-HT and 5-HIAA in different brain regions of rats on the 1st, 7th and 14th days.
Values are expressed as mean±S.E.M. ＊P<0.05 ＊＊P<0.01 (n=6)

〔文献〕 1) Curzon, G. et al. (1972) J. Neurochem. 19, 1967-1974. 2) Fuenmayor, L. D. (1979) J. Neurochem. 33, 481-485. 3) Fuenmayor, L. D. et al. (1984) Br. J. Pharmac. 83, 357-362. 4) Gispen, W. H. et al. (1972) Neuroendcrinol. 9, 285-296. 5) Kantak, K. M. et al. (1977) Pharmacol. Biochem. Behav. 6 (2), 221-225. 6) Knott, P. J. et al. (1974) J. Neurochem. 22, 1065-1071.

112

PCR法によるヒト5-HT_{1A}受容体遺伝子のクローニングとその発現

望月大介、藤井快枝、嵯峨井均
(東洋醸造・探索研)

〔要約〕
ＰＣＲ法により5-HT_{1A}受容体遺伝子をクローニングし、その塩基配列を確認したところ、既に報告されているものと２カ所でアミノ酸配列が異なるタンパク質をコードする遺伝子であった。この遺伝子を大腸菌およびCOS細胞に導入させることにより、^{3}H-8-OH-DPAT特異的結合を見いだすことができた。^{3}H-8-OH-DPAT結合実験より、COS細胞において薬剤結合能を保持し、かつＧＴＰ結合タンパク質と共役した形の5-HT_{1A}受容体が発現していることが示唆された。

＜緒言＞
現在、5-HT受容体はその薬理学的特徴から5-HT_{1A},5-HT_{1B},5-HT_{1C},5-HT_{1D},5-HT_{2},5-HT_{3}に分類されているが、さらに細分化(5-HT_{1E},5-HT_{2A},5-HT_{2B},5-HT_{4})される傾向がある(1,4,5)。また、近年の遺伝子工学の発達に伴い、5-HT_{1A},5-HT_{1C},5-HT_{2}の遺伝子がクローニングされその一次構造が決定されている(2)。
今回、既に報告されている塩基配列を基に5-HT_{1A}受容体遺伝子をＰＣＲ法によりクローニングし、その塩基配列を確認したところ、原報(3)と２カ所でアミノ酸配列が異なるタンパク質をコードする遺伝子であった。このクローニングした遺伝子が薬理活性をもつ5-HT_{1A}受容体を発現させることができるかどうか検討したので報告する。
＜実験方法＞
5-HT_{1A}受容体遺伝子のクローニング：ヒトゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲ法を用いて遺伝子増幅を行い5-HT_{1A}受容体遺伝子のクローニングを行った。
発現系：大腸菌での発現はピルビン酸オキシダーゼ遺伝子と5-HT_{1A}遺伝子を結合したベクターを作成しtransformationすることにより行った。COS細胞の場合は、pSVLベクターに5-HT_{1A}遺伝子を組み込みリン酸カルシウム法により細胞に導入した。
結合実験：5-HT_{1A}受容体に選択的なアゴニストとされる^{3}H-8-OH-DPATをもちいて行った。
＜結果および考察＞
ＰＣＲ法によりクローニングした5-HT_{1A}受容体遺伝子の塩基配列より決定したアミノ酸配列を図１に示した。原報のアミノ酸配列(3)と比較すると２カ所で違いが認められ、^{151}Pro Argが$^{}$Arg Ala Ala、^{417}Asnが^{418}Lysとなっていた。すなわち原報より１つ多い４２２個のアミノ酸をコードする遺伝子であった。
この遺伝子を大腸菌で発現させることを試みたが、そのままの形ではリガンドと結合能のある受容体は検出できなかった。そこでピルビン酸オキシダーゼとの融合蛋白として発現を試みることにより、^{3}H-8-OH-DPAT特異的結合を見いだすことができた。しかしその特異的結合は非常にわずかなものであった（表１）。COS細胞においては、著明な^{3}H-8-OH-DPAT特異的結合を認め、ラット海馬ホモジネートと同程度の発現量を示した（表１）。このCOS細胞で認められた^{3}H-8-OH-DPAT特異的結合は、低濃度(nM)の8-OH-DPATおよび5-HTで阻害され、5-HT_{2}受容体のアンタゴニストであるketanserinでは弱く、5-HT_{3}受容体のアンタゴニストであるICS205-930ではほとんど阻害されなかった（図２）。また、各種ヌクレオチドに対する影響について検討したところ、^{3}H-8-OH-DPAT結合はGTPγSおよびGpp(NH)pにより著明に抑制され、GDP,GMPとなるにつれて阻害作用は弱くなった。cGMPやATPは結合に対して有意な変化を与えなかった。これらの成績より、ＰＣＲ法でクローニングした5-HT_{1A}受容体遺伝子は原報と一部異なるアミノ酸配列をしているが、COS細胞において薬剤に対する結合能を保持し、かつＧＴＰ結合タンパク質と共役した形の5-HT_{1A}受容体として発現していることが示唆された。今後、細胞内情報伝達系との関連について検討する予定である。

primer作成部位
CGAATCTTCGCGCTGCTTTTTCTTCCCTCCCCCTTCCCGCGCCGGGCGCGCAGGC

MDVLSPGQGNNTTSPPAPFETGGNTTGISDVTVSYQVITSLLLGT 45
M1 M2
LIFCAVLGNACVVAAIALERSLQNVANYLIGSLAVTDLMVSVLVL 90
M3
PMAALYQVLNKWTLGQVTCDLFIALDVLCCTSSILHLCAIALDRY 135
M4
WAITDPIDYVNKRTPRRAAALISLTWLIGFLISIPPMLGWRTPED 180
M5
RSDPDACTISKDHGYTIYSTFGAFYIPLLLMLVLYGRIFRAARFR 225

IRKTVKKVEKTGADTRHGASPAPQPKKSVNGESGSRNWRLGVESK 270

AGGALCANGAVRQGDDGAALEVIEVHRVGNSKEHLPLPSEAGPTP 315
M6
CAPASFERKNERNAEAKRKMALARERKTVKTLGIIMGTFILCWLP 360
M7
FFIVALVLPFCESSCHMPTLLGAIINWLGYSNSLLNPVIYAYFNK 405
primer作成部位
DFQNAFKKIIKCKFCRQTGATGACGGAGGAGTAGCCGGCCAGTCGAGGCTACAGGATCCGTCCCATTCACT 422

図 1　PCR法でクローニングした5-HT_{1A}受容体アミノ酸配列とその前後の塩基配列

表1　^{3}H-8-OH-DPAT(0.5nM)特異的結合

	(fmol per mg protein)
normal E.coli C strain	N. D.
transformed E.coli C strain	5.2
normal COS cell	N. D.
transfected COS cell	177.2
rat hippocampus	168.7

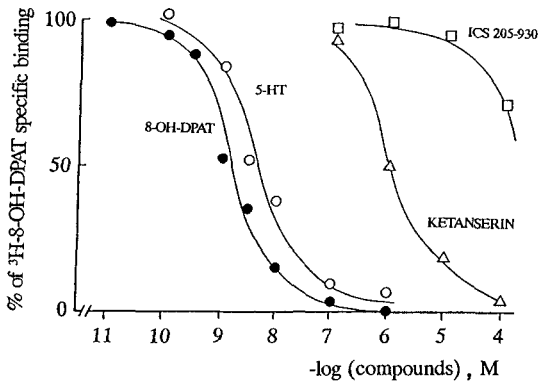


図2　5-HT_{1A}受容体を発現させたCOS細胞での^{3}H-8-OH-DPAT(0.5nM)阻害曲線

＜文献＞
1. Clarke,D.E.,Craig,D.A. and Fozard,J.R. (1989) Trends Pharmacol. Sci. 10,385-386
2. Hartig,P.R. (1989) Trends Pharmacol. Sci. 10,64-69
3. Kobilka,B.K.,Frielle,T.,Collons,S.,Yang-Feng,T.,Kobilka,T.S.,Francke,U.,Lefkowitz,R. J. and Caron,M.G. (1987) Nature 329,75-79
4. Leonhardt,S.,Herrick-Davis,K. and Titeler,M. (1989) J. Neurochem. 53,465-471
5. Schmidt,A.W. and Perourka,S.J. (1989) FASEB J. 3,2242-2249

113 ラット線条体Dopamine取り込み機構に及ぼすMethamphetamineおよびNMDA受容体拮抗薬(MK-801)併用反復投与の影響

村木　彰、小山　司、中山　誠、大森　哲郎、山下　格
(北海道大学医学部・精神医学教室)

〔要約〕
Methamphetamine(MAP)反復投与によるラット線条体Dopamine(DA)取り込み部位の減少に対するN-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体拮抗薬MK-801の影響について、[³H]GBR 12935結合実験を用いて検討した。MK-801は、単独ではDA取り込み部位に影響を与えなかったが、MAP投与の前処置として反復投与することにより、MAPによる同部位の減少を完全に抑止した。近年、NMDA受容体が種々の神経細胞障害に関与することが明らかになりつつあるが、今回の結果から、われわれがすでに報告したMAP反復投与による線条体DA神経終末の障害の成因として、NMDA受容体が何らかの関与をすることが示唆された。

【はじめに】
覚醒剤精神病の急性期において、妄想型分裂病に酷似した精神症状が認められ、治療に当たっては抗精神病薬投与が奏効することが知られている。われわれは、従来より精神分裂病の病態解明のための実験的研究を重ね、覚醒剤精神病の実験モデルとして、MAP反復投与後に認められるラットの行動感作を取り上げてきた。さらに、この現象の神経化学的基盤に、MAP再投与時の線条体DAシナプス間隙におけるDA大量増加を想定し、その発現機序のひとつに長期にわたるDA取り込み部位の減少を指摘した(5)。

一方、近年興奮性アミノ酸ニューロンの脳内における分布や生理的機能に関する知見が集積され、興奮性アミノ酸受容体のひとつであるNMDA受容体とDAニューロンの関係も注目を集めている。また、MK-801などのNMDA受容体拮抗薬が、低酸素、低血糖などによる神経細胞の障害を阻止するという報告(2,4)も相次いでなされている。

今回われわれは、上述のMK-801の神経細胞障害抑止効果という面に着目し、MAP反復投与によるDA取り込み部位の減少に対するMK-801の影響について、同部位を最も選択的に標識するとされる[³H]GBR 12935を用いた飽和結合実験を用いて検討した。

【対象と方法】
200-300gのWistar-King系雄性ラットを使用した。MAP処置は、大量連続投与による身体毒性を避け、また臨床的な乱用状況に近づけるため、MAPを1日に2回、1回量 2.5、5、7.5、10mg/kgと漸増しながら、1日おきにラットに皮下投与した。同時に、対照群には生理的食塩水1ml/kgを投与した(Table 1)。また、それぞれの群において上記処置の各30分前にMK-801 1mg/kgないし生理的食塩水1ml/kgを腹腔内投与した。断頭は、各薬物の影響が完全に消失したと考えられる処置終了後7日目に行った。

膜標品の調製は、断頭し氷上にて切り出した後、-70℃で保存した線条体を、200倍容の0.32M Sucroseを加えポリトロンでホモジナイズし、1,000gで10分間遠心分離後、上清を23,000g,20分間遠心分離し、得られた沈渣を5mg/mlの組織濃度で120mM NaClを含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.7)に懸濁した。[³H]GBR12935結合実験は、Janowskyら(1)の方法を一部改変し、50μM Mazindol存在下の結合量を非特異的結合量とし、膜標品0.2mlに0.28～9.21nMと濃度展開した[³H]GBR12935を加え(総容量2.0ml)25℃で45分間インキュベーションした後、WhatmanGF/Bフィルター上で吸引濾過し反応を停止させ、液体シンチレーションカウンターで濾紙上のベータ線を測定した。Scatchard解析により結合親和性(Kd)、最大結合数(Bmax)を求めた。統計学的検討は分散分析を用い、多重比較はTukeyの方法によった。

【結果および考察】
[³H]GBR 12935結合実験の結果は、MAP単独投与群ではBmax値が対照群に対して25%の有意な低下が認められたが、MK-801前処置群ではそれが完全に抑止された。一方、MK-801単独投与群では対照群との間に有意差を認めなかった。また、各群間でKd値に変化はなかった(Table 2)。つまり、従来われわ

れが報告してきた、MAPの隔日漸増投与による線条体DA取り込み部位の減少が、NMDA受容体拮抗薬であるMK-801により阻止されることが示された。

前述のように、近年、興奮性アミノ酸が、脳虚血、低血糖症、てんかん重積状態などの病態で生ずる神経細胞障害に重要な役割を果していることが、明らかになりつつある。そのメカニズムとして、興奮性アミノ酸のNMDA受容体への結合→Ca^{2+}イオンの流入→細胞の構造破壊という仮説が考えられており、NMDA受容体拮抗薬がこの異常興奮過程を抑止するとされている。

一方、最近、MK-801がMAPの反復投与によるDA神経終末のTyrosine Hydroxylase活性低下を阻止するという報告(3)がなされ、MAPによるDA神経終末の障害にもNMDA受容体が関係する可能性が示唆された。そのDA神経終末の障害に対するMK-801の効果を、DA取り込み部位に着目して検討した研究は、今回が初めてと思われる。われわれは、従来より覚醒剤モデルラットにおけるDA取り込み部位の減少という構造病変を指摘してきたが、そのメカニズムとして、MAP投与がDAの放出を促進した結果、シナプス間隙に大量に流出したDAが、何らかの機序により病変の出現に関与する可能性を想定している。今回得られた所見を、他の神経細胞障害と同様に、興奮性アミノ酸との関連から一元的にとらえるのは困難であるが、線条体は大脳皮質から多量の興奮性アミノ酸ニューロンの投射を受けており、また、われわれはNMDAが線条体スライスからのDA放出を促進するという知見も得ている。従って、今回の結果についても、MK-801の前処置がMAP投与時におけるDA大量放出に影響を及ぼした可能性を考えることもできる。興奮性アミノ酸とDAニューロンの相互作用については、今後さらに検討を要する課題と思われる。

Table 1 Methamphetamine treatment regimen

Days	1	2	3	4	5	6	7
MAP treatment (mg/kg x2/day)	2.5	0	5	0	7.5	0	10
Saline treatment (ml/kg x2/day)	1	0	1	0	1	0	1

0 : no administration

Table 2 Effects of coadministration of MAP and MK-801 on the [^{3}H]GBR12935 binding in rat striatum. The results shown are the mean±S.E.M.

	Kd (nM)	Bmax (pmol/g wet tissue)
Saline−Saline	1.78±0.13	323.0±5.2
Saline−MAP	1.88±0.12	242.6±18.2★
MK-801−Saline	1.93±0.12	331.8±7.3
MK-801−MAP	1.96±0.13	332.7±9.5

★$p<0.01$

【文献】

1.Janowsky,A.,Berger,P.,Vocci,F.,et al.(1986) J.Neurochem.,46,1272-1276
2.McDonald,J.,Silverstein,F.S.,and Johnston,M.V. (1987) Eur.J.Pharmacol.,140, 359-361
3.Sonsalla,P.K.,Nicklas,W.J.,and Heikkila,R.E. (1989) Science,243,398-400
4.Wieloch,T. (1985) Science,230,681-683
5.山下 格、中山 誠、小山 司、他 (1989) ポジトロンCT等を用いる薬物依存メカニズム解明に関する研究班昭和63年度報告書,14-18

114　メタンフェタミン及びハロペリドール慢性投与後のラットD2ドパミン受容体m-RNAの検討

富田博秋，曽良一郎，石津秀樹，藤原　豊，秋山一文，大月三郎，　H.I.Yamamura*
（岡山大・医・神経精神医学教室，*アリゾナ大・医・薬理学教室）

〔要約〕　ラットにメタンフェタミン（MAP）やハロペリドール（HPD）を慢性投与した際のD2ドパミン受容体m-RNAの変化をとらえる目的でin situ ハイブリダイゼイションを行った。その際、長・短２種類のD2受容体をコードするm-RNAのそれぞれに特異的にハイブリダイズすると考えられる合成オリゴヌクレオチドプローブを用いた。その結果、線条体では長D2受容体が短D2受容体よりも多く発現している傾向が見られたが，MAPやHPDの慢性投与によっては，それぞれのm-RNAに有意な変化を認めなかった。

［目的］

抗精神病薬の長期投与による脳内D2ドパミン受容体の増加や，覚醒剤の慢性投与による同受容体の減少の機序に関しては不明な点が多い。最近，ラットのD2受容体をコードしている遺伝子がクローンニングされ，その塩基配列が報告された(1)ことから，D2受容体に特異的なプローブによるm-RNAの研究が可能になった。脳内でD2受容体自身の分布と一致してこのm-RNAは尾状核，被殻，側坐核，嗅結節，黒質緻密層，中脳被蓋野などに多いことが，in situ ハイブリダイゼイションによって明らかとなった(5)。その後，RNAスプライシングの違いから，D2受容体に長・短２種類の受容体蛋白があることが判明し(2)，それぞれの受容体蛋白の組織内での分布や発現の程度が異なる可能性がでてきた。そこで本研究では，抗精神病薬または覚醒剤をラットに慢性反復投与した際の脳内での２種類のD2受容体m-RNAの変化をとらえることを目的にin situ ハイブリダイゼイションを行った。

［方法］

Sprague-Dawley(SD)系雄性７週ラットを無作為に３群に分け，このうちMAP群にMAP 4mg/kg/day を，HPD群にHPD 1mg/kg/day を，対照群に生理食塩水を２週間１日１回腹腔内注射した。２日間の休薬期間をおいて断頭し，すみやかに摘出した脳を，O.C.T.コンパウンドで包埋してドライアイスーアセトンで凍結した。その後，１週間以内にコールドトームを用いて，-20℃にて16μm の組織切片を作成し，ゲラチンをコートしたスライド上に密着させた。大きさが異なる２つのD2受容体m-RNAを識別するために，長D2受容体m-RNAと特異的にハイブリダイズする"Insert"(In) プローブ(5'-CATGATAACGGTGCAGAGTTTCATGTCCTCAGGGTGGGTACAGTTGCC-3'),短D2受容体m-RNAと特異的にハイブリダイズする"Spanning"(Sp)プローブ(5'-CTCCTGAGCTCGGCGGGCAGCATCCTTGAGTGGTGTCTTCAGGTTGGC-3')、非特異的な結合を示すものとしてセンスの配列を利用した"センス"プローブ(5'-TCAAGCACCAGCCCCCCAGAGAGGACCCGGTATAGCCCCATCCCTCCC-3')を用いた。これを^{35}S-dATPを用いて３'-エンドラベリングを行い，１切片当たり1×10^6 dpm/100μlの緩衝液(1×SCC,50%formamid,Denhardt's solution,salmon sperm DNA,100mM DTT,10%dextran sulfate)のもとに上記の３群の組織切片に 37℃,18時間 ハイブリダイズした。55℃で15分間、４回、室温で１時間、1×SCCで洗浄し，トリチウム感受性フィルムをのせ，２週間感光させた後，現像した。この画像の背外側線条体領域の optic density をコンピューター化された画像解析装置でアイソトープの放射活性として定量化した。長・短２つのD2受容体m-RNA量は，In,Sp 各プローブの放射活性からバックグラウンドであるセンスプローブの放射活性を引いた値を用いた。統計解析は分散分析，two-tailed paired t-Testを使った。

[成績]

In,Sp 両プローブとも脳内では線条体、側坐核、黒質緻密層などで強くハイブリダイズした。図に線条体での Inプローブによる代表的なオートラジオグラフィー画像を示した。長D2受容体m-RNA量は分散分析を用いてMAP，HPD，生食群に有意差はなかった。また短D2受容体でもこの3群間に有意差は見られなかった。長D2受容体と短D2受容体を比較するとHPD群，MAP群でともに有意差はなかった。しかし，生食群では長D2受容体は短D2受容体よりも多い傾向がみられた($p<0.1$)。

表　ラット線条体での長・短D2受容体m-RNA量　　(単位；dpm)

	Saline(n=6) (mean±SD)	Haloperidol(n=5) (mean±SD)	Methamphetamine(n=5) (mean±SD)
長D2受容体(Inﾌﾟﾛｰﾌﾞ)	3976±1226	4582±1391	3034±1160
短D2受容体(Spﾌﾟﾛｰﾌﾞ)	2649±481	3203±611	2562±755

[考察]

HPDの慢性投与でラット脳内D2受容体m-RNAが上昇したという報告(4)と，不変という報告(3)があるが，これらの研究は長・短2種類のD2受容体m-RNAを区別していない。我々は，長・短D2受容体を区別して検討したが抗精神病薬の慢性投与により長・短D2受容体m-RNAは増加していたが有意ではなかった。一方，覚醒剤の慢性投与により長・短D2受容体m-RNA量は減少したがこれも有意な変化ではなかった。この変化は有意ではないがD2受容体結合実験の結果と一致するものと考えられる。

生食，抗精神病薬，覚醒剤のいずれも長D2受容体m-RNAが短D2受容体よりも多く，長D2受容体の発現が多いことがうかがえるが，今回の結果は有意差はなく確認できなかった。ただ，生食群でのみ有意傾向であったことは，長・短D2受容体の発現の差がHPD，MAP処置で消失する可能性も考えられる。

[謝辞]

In,Sp両プローブは E.I.Du Pont De Nemours and Co, M.C.Tyler氏より，"センス"プローブは田辺製薬より提供して頂いた。

[文献]

1)Bunzow,J.R.et al.(1988)Nature 336:783-787

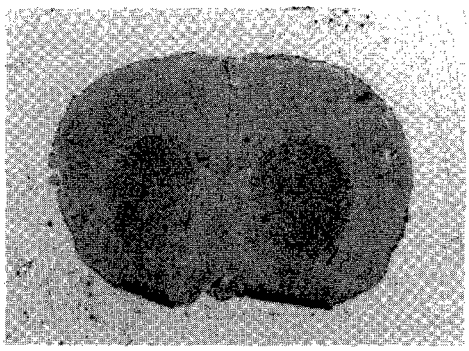
2)Giros,B.et al.(1989)Nature 342:923-926

3)Hubert,H.M.et al.(1990)Neurosci.Lett.111:303-308

4)Le Moine,C.et al.(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 87:230-234

5)Weiner,D.M.et al.(1989)FEBS lett.253:207-213

[図]



115 摂食行動とラット線条体ドパミン代謝について：マイクロダイアリシス法による検討

井上幸紀，切池信夫，奥野正景，松井徳造，川北幸男
（大阪市大・医・神経精神）

〔要約〕

摂食行動における線条体ドパミンの役割を明らかにするために、Wistar系雌性ラットに１日２時間の制限給餌を７日間にわたり施行し、１日目と７日目の制限給餌の前・中・後の線条体細胞外液中のdopamine (DA)、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) 及び homovanillic acid (HVA) をマイクロダイアリシス法により20分毎に採取し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) により測定した。１日目の２時間の制限給餌の間、DOPAC及び HVA濃度は有意に上昇し、ドパミン代謝が亢進した。さらに７日目ではHVAは１日目よりも増加し、よりドパミン代謝が亢進していた。そしてこの変化は、摂食行動が終了しても最低２時間は持続していた。これらのことから、線条体ドパミンは摂食行動において、食物の感覚刺激や空腹により誘発される食物獲得行動の促進、及び摂食行動の強化に関与している可能性が示唆された。

【はじめに】

摂食行動において側坐核ドパミンは代謝亢進し、食物などの感覚刺激に対して、食物報酬の認知とその強化において重要な役割を果していると考えられている[1)3)4)]。しかし摂食行動により線条体ドパミン代謝は亢進する[2)]と変化しない[1)3)4)]という報告があり、いまだこの点については不明である。しかし摂食行動において、食物獲得行動、口の運動、咀嚼などの運動面の機能発現が必要であり、線条体の関与が推定される[5)]。そこで本研究ではマイクロダイアリシス法と高速液体クロマトグラフィーにより、自由行動下におけるラットの摂食行動と線条体ドパミンとの関係について検討を加えた。

【方法】

Wistar系雌性ラット (12週令、180～210 g) をchloral hydrate (400 mg/kg) 麻酔下で脳定位固定装置を用いて、Paxinos and Watsonの図譜[6)]に従い外形0.9 mmのguide cannulaを線条体 (AP +0.5 mm, L +3.0 mm, V −3.5 mm from bregma and dura surface) に挿入し、固定した。ラットを８時～20時を暗期とする明暗恒温条件下で飼育し、術後10日間以上の回復期間の後、１日２時間 (11時～13時) の制限給餌 (24.8% crude protein, 4.4% crude fat, 3.5% crude fiber, 7.0% crude ash, 8.7% water, 345.2 cal/100g) を７日間にわたり施行した。実験期間中、水分摂取は自由にさせた。１日目と７日目の21時に長さ3 mmのＩ字型透析probe (BDP-1-8-03,Eicom) を挿入し、自由行動下でRinger液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 4.5 mM $CaCl_2$) を 0.25μl/minの流速で10時間灌流し、その後1μl/minの流速で制限給餌前・中・後の各２時間の期間中、線条体細胞外液中のDA、DOPAC及びHVA濃度を20分毎に自動的に電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) にて測定した。実験終了後、ラット大脳切片を作成し、鏡顕下で正しくprobeが線条体内に挿入されていることを確認した。統計的解析は、ラット間における基礎値のばらつきが大きいため、測定値を各基礎値６点の平均値の百分比として表し、Welch testを用いて行った。

【結果及び考察】

２時間の制限給餌前・中・後の線条体細胞外液中DA、DOPAC及びHVA濃度の変化をFig. 1に示した。

１日目のDA、DOPAC及び HVAの基礎値の平均は、各々39.1±2.9 pg/20μl、3896±1644 pg/20μl、3160±844 pg/20μl (±S.E.M., n=5)であった。２時間の制限給餌により4.0±0.8 g摂餌し、その間、DOPACは基礎値に比し112% ($p<0.05$)、HVAは124% ($p<0.05$) と有意に増加した。そしてこれらの増加は摂餌終了後２時間以上持続した。これらの結果より、線条体においてドパミン代謝が摂食により亢進することが示唆された。

一方、７日目のDA、DOPAC及びHVAの基礎値の平均は、各々25.2±4.6 pg/20μl、1248±355 pg/20μl、及び2150±902 pg/20μl（±S.E.M., n＝5）であった。２時間の制限給餌により9.3±4.5 g摂餌し、これは１日目に比し有意に増加していた。また、DA及び DOPACは基礎値に比し、各々145%、117%まで増加したが、統計的には有意ではなかった。しかしHVAは132%（p＜0.01）と有意に増加した。これらの結果より７日目の制限給餌においても線条体ドパミン代謝が摂餌により亢進していると考えられた。

以上の結果と、大脳基底核は外界の事象と記憶などの情報に基づき、状況に適した運動を選びだし、組み立てて発現させる働きをしており、このうち線条体は運動調節に深く関係していることを考えあわせると[3)5)]、線条体ドパミンは、摂食行動において、食物の感覚刺激や空腹により誘発される食物獲得行動の促進及び口の運動、咀嚼などの摂食行動の強化に関与しているものと考えられた。

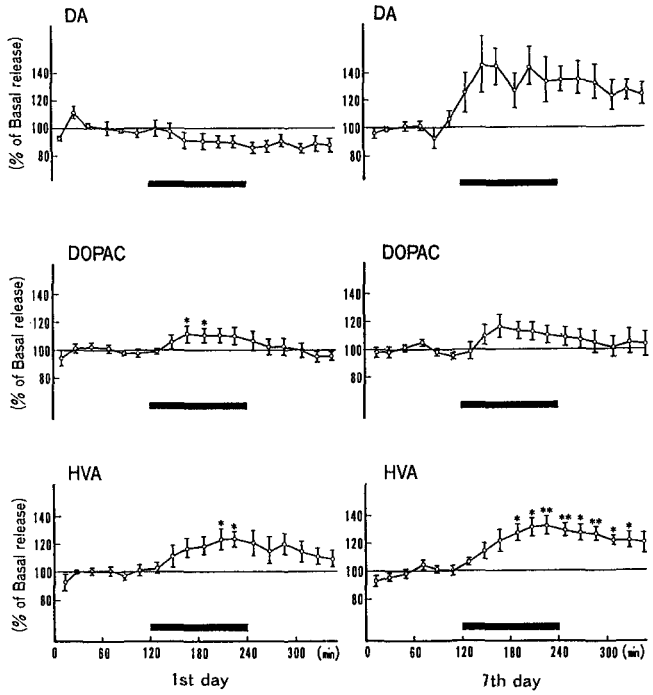


Fig.1 Effects of 2 hours restricted scheduled feeding on extracellular DA, DOPAC and HVA levels in rat striatum on the 1st (left side) and 7th (right side) day. Feeding periods are shown as closed column (▬). Values are expressed as mean±S.E.M.
＊P＜0.05　＊＊P＜0.01

【参考文献】

1) Blackburn, J. R., and Phillips, A. G. (1988) Dopamine and preparatory behavior: II. A neurochemical analysis. Behavioral Neuroscience 103, 15-23.

2) Church, W. H., Justice, J. B., Jr., and Neill, D. B. (1987) Detecting behaviorally relevant change in extracellular dopamine with microdialysis. Brain Research 412, 397-399.

3) Hernandez, L. and Hoebel, B. G. (1988) Feeding and hypothalamic stimulation increase dopamine turnover in the accumbens. Physiol. behav. 44, 599-606.

4) Hoebel, B. G., Hernandez, L., Schwartz, D., Mark, G. P., and Hunter, G. A. (1990) Microdialysis studies of brain norepinephrine, serotonin, and dopamine release during ingestive behavior. Annals New York Academy of sciences 575, 171-193.

5) 木村実 (1989) 大脳基底核と運動調節・体性感覚. Clinical Neurosci. 7, 476-481.

6) Paxinos, G. and Watson, C. (1982) The Rat Brain, Academic Press.

116 ＮＭＤＡ受容体を介するラット線条体切片からのドーパミン放出調節作用

大森哲郎、小山　司、松原繁広、村木　彰、山下　格

（北海道大学医学部　精神医学教室）

〔要約〕

ラット線条体切片を in vitro で灌流し、N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）の内在性ドーパミン（DA）遊離に及ぼす影響を検討した。NMDAは用量依存性にDAの遊離を促進し、この作用は生理的濃度の Mg^{++}(1.2mM)存在下では消失した。NMDAの効果はテトロドトキシン（TTX）存在下でも観察された。NMDA受容体の競合的拮抗薬 APVおよび非競合的拮抗薬 MK-801は、NMDAによるDA遊離促進作用を用量依存性に抑制した。同受容体のアロステリック調節部位であるグリシン部位の拮抗薬キヌレン酸はNMDAの作用を抑制し、この抑制作用は同結合部位作動薬のグリシンによって阻害された。これらの結果は、線条体DA神経終末において、NMDA受容体を介するDA放出調節機構が存在することを示唆している。

［緒言］

精神分裂病の生物学的病態仮説として現在最も有力なものは、ドーパミン(DA)過剰仮説である。このDAの神経終末からの放出をグルタミン酸が制御している可能性が最近実験的に示された。また、NMDA型グルタミン酸受容体の非競合的遮断薬フェンサイクリジンが、精神分裂病に酷似した精神症状を発現させることが、臨床的に知られている。これらは、グルタミン酸・DA系の活動と精神症状発現との関連を示唆している。

我々は（１）、ラット脳切片からの内在性のDAの放出を　in vitro で測定する方法をすでに確立している。NMDA受容体は膜電位依存性にMg^{++}による抑制を受けているので、細胞外液組成を容易に調節できるin vitroでの測定法は、この受容体を介した神経伝達物質の放出反応を観察するのに適している。今回この方法を用いて、線条体からのDAの放出に及ぼすNMDAの効果と、それに対するNMDA受容体の競合的拮抗薬 APVおよび非競合的拮抗薬 MK-801の影響について検討した。さらに同受容体のアロステリック調節部位であるグリシン部位の作動薬グリシン及び拮抗薬キヌレン酸の作用に関して検討を加えた。

［方法］

雄性Wistar-King ラットの脳より、brain cutting block を用いて、厚さ2.0mmの線条体を含む冠状面を切り出した。これをtissue chopper で 500um厚にスライスし、約8片の線条体切片を、内容積約 60ul の chamberに封入した。95% O_2、5% CO_2 の混合ガスで飽和した Mg^{++}を含まないKrebs緩衝液を、0.5ml/min の流速で、37°C の恒温漕中において灌流し、遊離されるDAをアルミナ抽出し、HPLC-ECD(エイコム)にて定量した。灌流液の採取は、灌流開始後約70分から７分間隔で行った。基礎遊離量を観察後、灌流液にNMDAを添加してDA遊離反応の変化を測定した。結果は基礎遊離量に対する反応遊離量の比を取って表示した。APV, MK-801, グリシン及びキヌレン酸は、NMDA添加の14分前から灌流液に加えた。グリシン及びキヌレン酸の影響を見る実験は、1uMのストリキニン存在下で行った。

［結果］

図１に示すように、NMDA添加はDA遊離を促進し、生理的レベルのMg^{++}(1.2mM)を灌流液に加えると、促進作用は消失した。このMg^{++}非存在下におけるNMDAのDA遊離促進作用は、1uMから1mM にかけて用量依存的であった（図２）。0.5uMのテトロドトキシン（TTX）は、基礎遊離量及び反応遊離量とも30%程度減少させたが、前者に対する後者の比には変化を与えなかった。図３に示すように、APVおよびMK-801は、30uMのNMDAによるDA遊離促進作用を用量依存性に抑制した。図４に示すように、キヌレン酸（100uM）はNMDAの作用を抑制した。グリシン（30uM）は単独では、この作用に変化を与えなかったが、キヌレン酸の抑制作用発現を阻害した。

［考察］

今回の結果は、線条体からのDA放出が、NMDA受容体刺激により用量依存性に促進されること、さらに同受容体の競合的拮抗薬 APV および非競合的拮抗薬 MK-801 がこの促進を用量依存性に抑制することを示している。またNMDA 受容体アロステリック調節部位であるグリシン部位によるDA放出調節作用の存在も示している。TTX存在下でもNMDAの効果は観察されることから、NMDAの作用点は主としてDA神経終末上にあると推定される。これらの結果は、[^{3}H]DAを用いた報告（2、3、4）とほぼ一致する。さらに我々は、線条体のみでなく、内側前頭葉皮質のDA放出においてもNMDA受容体を介する調節機構が存在することを示唆する予備的な結果を得ている。今後、精神分裂病のDA仮説を検証し発展させる上で、グルタミン酸系とDA系の相互作用の研究は重要な課題となると思われる。

［文献］

1)大森哲郎ら(1989)神経化学、28、236-237

2)Snell,L.D.et.al.(1986)J.Pharmacol.Experi.Therapeutics,238,938-946

3)Ransom,R.W.et.al.(1989)Neuroscience Letters,96,323-328

4)Krebs,M.et.al.(1989)Eur.J.Pharmacol.166,567-570

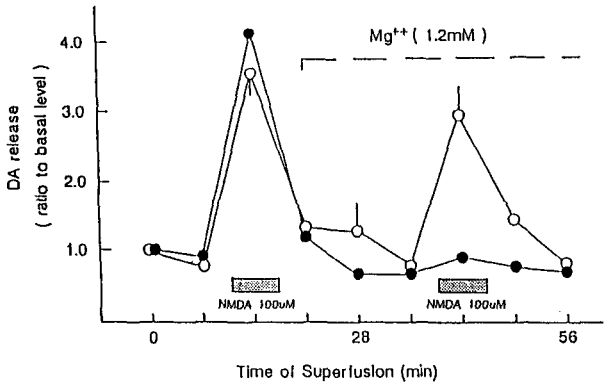


図1　NMDAによるDA遊離促進作用
Mg^{++}存在下では（黒丸　2回目の刺激）反応は消失（N=3）

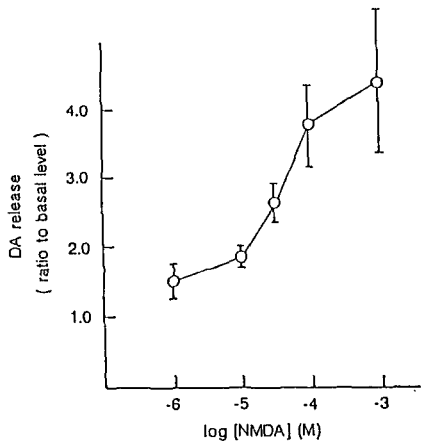


図2　NMDAによるDA遊離促進作用
用量依存性（N=4）

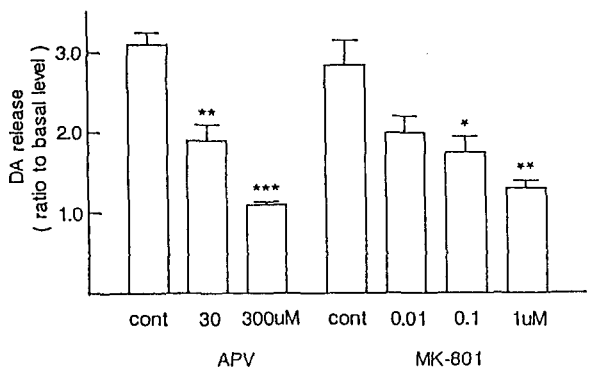


図3　NMDAによるDA遊離促進作用に対するAPVおよびMK-801の影響
(N=4　* p<0.05、** p<0.01, *** p<0.001)

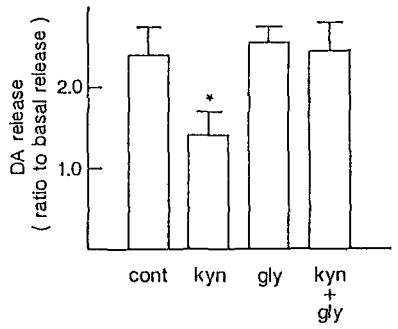


図4　NMDAによるDA遊離促進作用に対する
キヌレン酸およびグリシンの影響
(N=4　* p<0.05)

117　ハロペリドール投与ラットにおけるカタレプシーとドーパミン代謝ならびにセカンドメッセンジャーの変化

佐藤康二，堀越　立，柳沼典正，柳沼正俊，白潟　稔，鈴木裕樹，宍戸壽明，金子元久，熊代　永
福島県立医科大学・神経精神科

〔要約〕

Haloperidol(Hal)の抗dopamine(DA)作用に関連したsecond messengerの変化を検討するため、Hal(5mg/kg, i.v.)投与時に出現するcatalepsy と線条体のDA代謝などを指標としながら、線条体のcAMPとinositol trisphosphate(IP_3) を継時的に測定した。その結果、(1)Hal 投与５分後に中等度のcatalepsy が出現し、一旦減弱した後、投与60分後に再度重度のcatalepsy の出現をみ、 120分を越える持続が認められた。(2)catalepsy の出現時におけるDA代謝をみると、DAには変化はなかったが、DOPAC とHVA の増加が認められた。(3)cAMPはHal 投与15分後にピークを示し、60分後まで増加が持続していた。また、IP_3 も15分後には増加を示したが、そのピークは30分後であり、60分後まで増加が持続していた。以上の結果から、Hal の抗DA作用によるとされるcatalepsy の出現時には、DA代謝回転が昂進しており、これに関連してsecond messengerではcAMPのみならずIP_3 も増加していることが示唆された。

Ⅰ．はじめに

現在抗精神病薬として最も使用頻度の高いHaloperidol(Hal)の抗dopamine(DA)作用に関連したsecond messengerの変化を検討するため、Hal 投与時に出現するcatalepsy と線条体のDA代謝などを指標としながら、線条体のcAMPと inositol trisphosphate(IP_3) を継時的に測定したので報告する。

Ⅱ．実験方法

(1)Catalepsy の評価法：実験動物はWister系雄性ラット（体重200g）を使用した。Hal を尾静脈より5mg/kg投与し、５分ごとにcatalepsy を評価した。評価の方法はWirth らの方法[4] に準じ、高さ 6cmと12cmのコルクを用いて測定した。左右の前肢をそれぞれコルクの上に置き、その状態を10秒以上維持した場合をカタレプシー陽性と判定し、 catalepsy score は、各前肢につき、 6cmのコルクで 0.5点、12cmのコルクでは１点とし、最高点を３点とした。 (2)DA代謝物と5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA)の測定：pentobarbital による麻酔下でラット脳線条体内にguide cannula を挿入し１週間後に、microdialysis 法によってfree moving の状態でDA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC), homovanillic acid(HVA), 5-HIAA を測定した。dialysis probeは、2μl/min の速さでRinger液を還流させ、これを20分ごとに採取した。測定値はHal 投与前値との百分率で示した。 (3)second messengerの測定：Hal 投与、15, 30, 60, 120分後に microwave により脳内の反応を停止させてから断頭して脳を切り出した。線条体のcAMPとIP_3 を6%過塩素酸にて抽出した後、cAMPはヤマサcAMP測定キットを用い、またIP_3 はAmershamIP_3 測定キットを用いて測定した。

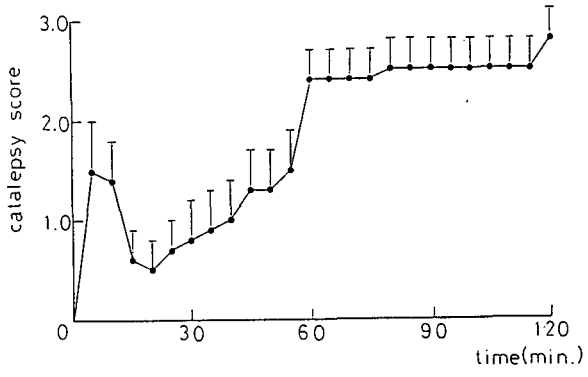


図１．Haloperidol 投与ラットにおけるcatalepsy score の継時的変化　(N=12, mean±S.E.)

Ⅲ. 結果

(1)Hal 投与後のcatalepsy score の継時的変化は図1に示すように、投与5分後に中等度のcatalepsy が出現し、さらに投与60分後に重度のcatalepsy の出現をみ、120分を越える持続が認められた。(2)表1にHal 投与20, 40, 60, 120分後の線条体におけるDA, DOPAC, HVA, 5-HIAA の変化率を示した。すなわち、DAと5-HIAAには変化を認めなかったが、これに対してDOPAC とHVA は20分後から明らかな増加を示し、120 分後まで持続していた。(3)図2はHal 投与後の線条体におけるcAMPとIP_3 の継時的変化を示したものである。すなわちHal 投与15分後にcAMPは最高値を示し、control (無処置群) に比し1.5 倍の増加であった。cAMPの増加は60分後まで持続していた。一方、IP_3 も15分後には増加を示したが、そのピークは30分後であり、2倍以上の著明な増加を示した。cAMPと同様に増加は60分後まで持続していた。

表1. Haloperidol 投与後のラット線条体におけるDA代謝および5-HIAAの継時的変化

(N=5, mean±S.E. ★P<0.05 ★★P<0.01)

	0 分	20 分	40 分	60 分	120 分
DA	100 %	102± 3.1	101± 6.3	107±12.3	119±15.0
DOPAC	100	113± 5.4★	137± 7.0★	145± 9.4★	149±13.3★
HVA	100	111± 6.3★	131± 8.1★	149± 7.3★	174± 7.4★★
5-HIAA	100	97± 1.5	98± 3.3	97± 3.4	91± 2.4

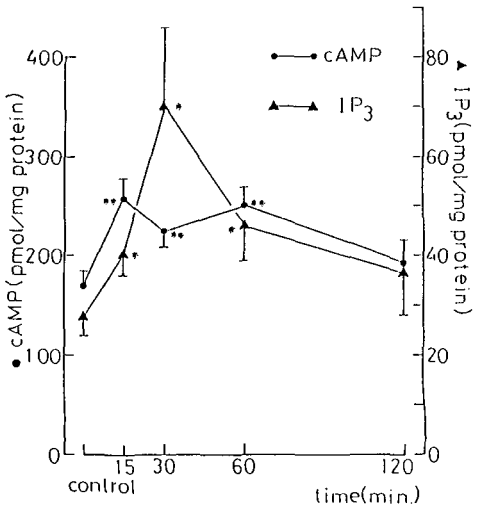


図2. Haloperidol 投与後のラット線条体におけるcAMPとIP_3 の継時的変化

(N=8, mean±S.E. ★★P<0.01 ★P<0.05)

Ⅳ. 考察

Hal の抗精神病薬としての主作用はdopamineD_2 受容体 (D_2 受容体) の遮断作用にあるとされており、また、そのためにDAの代謝回転が昂進すると考えられている。今回の結果でも、catalepsy の出現に伴い線条体においてDOPAC やHVA が増加したことは、Hal のD_2 受容体の遮断作用によって、DA代謝回転の昂進が生じたことを示唆している。また、D_2 受容体はadenylate cyclase 抑制系と共役しており、D_2 受容体の遮断作用はcAMPの生合成の抑制を遮断するためcAMPを増加させることが知られている。また、cAMPをsecond messengerとする系とイノシトールリン脂質代謝系とが関連している細胞が存在すること[1] や、ラット線条体を用いた実験でD_2 受容体のagonist による刺激がcAMPを減少させるばかりでなく、イノシトールリン脂質代謝をも減少させること[2] 、さらにchlorpromazineがC6 glioma cellsでinositol phosphates を増加させることなど[3] も報告されている。すなわちHal のD_2 受容体の遮断作用によってイノシトールリン脂質代謝も影響されることが推測されている。そこで今回の結果をみると、Hal 投与後に線条体のcAMPとIP_3 が増加を示したが、まずcAMPが15分後にピークを示し、次いでIP_3 がcAMPより遅れて30分後にピークを示し、しかも、IP_3 の増加率はcAMPよりも大きかった。このことはHal のD_2 受容体の遮断作用がcAMPのみならずイノシトールリン脂質代謝にも影響している可能性を示唆したものと思われる。しかし、高濃度のHal はイノシトールリン脂質代謝と共役している5-HT_2 受容体などにも作用するため、さらに今後の検討が必要と思われる。

〔文献〕(1)加藤裕之, 竹縄忠臣：油化学, 37:832-845, 1988. (2)M. Pizzi, M. DaPrada, A. Valerio et al:Brain Research, 456:235-240, 1988. (3)U. Leli, U. Ananth and G. Hauser:J. Neurochem., 53:1918-1924, 1989. (4)W. Wirth, et al:Arch. int. Pharmacodyn. Ther. 115:1-31, 1958.

118 左右両側視床下部視索上核間の神経連絡

津島宏美，森真由美，松田友宏
（名古屋市立大・医・薬理）

〔要約〕
左右両側視床下部視索上核(SON)間の神経連絡路とその生理的意義を検討するため、薬物をSONに微量注入し尿流出量を測定した。ノルエピネフリン(NE)を右側、左側、左右両側のSONに微量注入するといずれも著明な抗利尿作用が発現した。その作用は左右両側SON同時投与で最も強く、相乗効果が認められた。右側SONにおけるNEの抗利尿作用は左側SONへのアトロピン前処置により影響を受けなかったが、左側SONへのフェノキシベンザミンあるいはチモロール前処置により抑制された。以上の結果より、左右両側SON間にはなんらかの神経連絡路が存在していること、右側SONから左側SONへアドレナリン作動性神経を介する神経連絡路が機能していることが示唆された。

視床、視床下部、延髄等の神経核は左右両側に対称的に存在し、それぞれ同じ生理作用を担っているものと思われる。しかし、これら左右両側神経核間の神経連絡路、相互作用、機能的意義についてはほとんど知られていない。

我々は、これまでバゾプレッシンニューロン細胞体が局在する視床下部視索上核(SON)の右側のみへ薬物を微量注入し、その神経伝達物質受容機構について検討してきた。その結果、カテコールアミン系、アセチルコリン系、オピオイド系受容機構が存在することを報告した[1-4]。しかし、生理的条件下では左側SONあるいは、もう一つのバゾプレッシンニューロン細胞体が局在する視床下部室傍核(PVN)との相互作用により尿流出量を調節しているものと思われる。また解剖学的研究から左右両側SON、PVN間相互の神経連絡路の存在が明らかにされている[5]。そこで今回左右両側SON間の神経連絡路およびその生理的意義を明らかにするため、ノルエピネフリン(NE)を右側、左側、左右両側のSONに微量注入しその尿流出量への影響、さらにその作用に対する拮抗薬の影響を検討した。

［実験方法］

約18時間絶食したWistar系雄性ラットを用いた。水(5 ml/100g体重)負荷し、45分後同量の12%エタノールを経口投与し麻酔した。SONの位置はKönigら[6]のアトラスにより定め、微量注入用のカニューレを両側に挿入した。薬物(1 μl)はすべてこのカニューレより微量注入した。実験中は、頸静脈カニューレより3%エタノールロック液を持続注入(0.1 ml/min)した。膀胱カニューレからの尿流出量は10分毎に測定し、その変化は薬物投与前10分間の尿流出量に対する百分率であらわした。

［実験結果］

NEの右側SONへの微量注入は著明な抗利尿作用を発現し、その作用は約30分で最大となり、90分でほぼ回復した。左側あるいは左右両側へのNE微量注入も抗利尿作用を発現し、その時間経過はよく似ていた。左右両側への同時投与が最も強い作用を示し、次いで左側、右側の順であった(Fig. 1)。ED50値は右側投与で約25 nmol、左側投与で約15nmol、両側同時投与で約1.5 nmol(一側への投与量)であり、両側同時投与の作用は他より有意に強く、相乗効果が認められた。右側SONへのNE(20 nmol)投与による抗利尿作用は、左側SON投与のアトロピン(300 nmol)前処置によって抑制されなかったが、左側SON投与のフェノキシベンザミン(20 nmol)あるいはチモロール(100 nmol)前処置よって抑制された(Fig. 2)。

［考察］

今回、NEの左右両側SON同時投与が最も強い抗利尿作用を発現し相乗効果を示したこと、右側SON投与NEの抗利尿作用が左側SON投与のα-、β-アドレナリンアンタゴニスト前処置により抑制されたことを報告した。これは、左右両側SON間に神経連絡路が存在し右側から左側SONへ刺激が伝達されること、この神経連絡路にはアドレナリン作動性神経が含まれていることを示唆している。我々は、すでに右側SON投与のNEがその神経核内のα-、β-アドレナリンレセプターを介しバゾプレッシンを遊離促進し抗利尿作用を発現していることを報告した[1,3]。したがって、右側SON投与のNEは、右側SON内のα-、β-アドレナリンレセプターに作用した後、アドレナリン作動性神経を介して左側SON内へその刺激を伝達しバゾプレッシン遊離促進し抗利尿作用を発現させているものと思われる。

今後、SON破壊、交連神経線維切断等の実験を行い、より詳細な検討をする予定である。

［文献］

1) 津島宏美, (1985) 名古屋市立大学医学会雑誌, 36, 255-268.

2) Mori,M.,Tsushima,H. and Matsuda,T.(1984) Japan.J.Pharmacol.,35, 27-36.

3) Tsushima,H.,Mori,M. and Matsuda,T.(1985) Japan.J.Pharmacol.,39, 365-374.

4) Tsushima,H.,Mori,M. and Matsuda,T.(1987) Japan.J.Pharmacol.,45, 449-457.

5) Silverman,A.J.,Hoffman,D.L. and Zimmerman,E.A.(1981) BrainRes.Bull.,6, 47-61.

6) König,J.F.R. and Klippel,R.A.(1963) The Rat Brain, A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

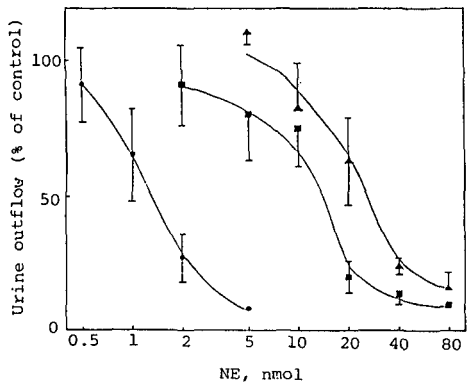


Fig.1 Dose-effect curves for antidiureses induced by NE microinjected into the SON.

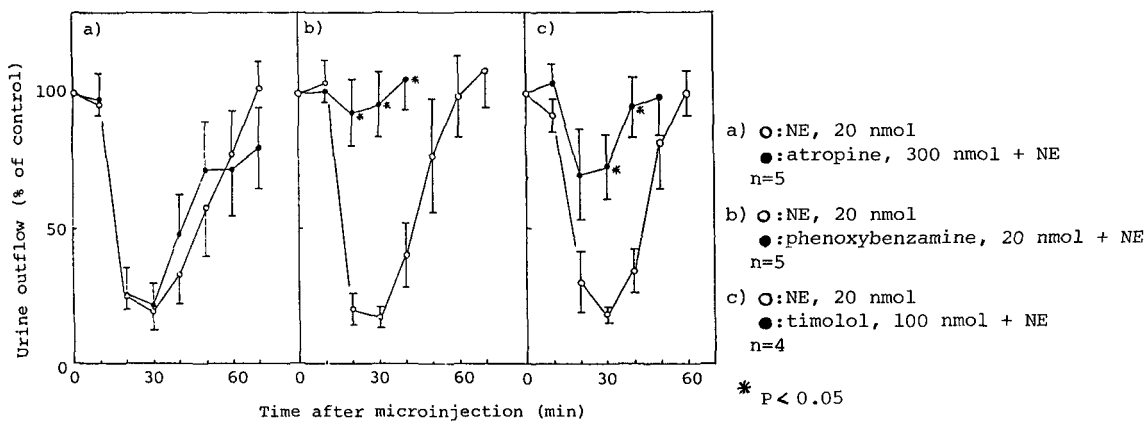


Fig.2 Effects of antagonists microinjected into the left SON on antidiureses induced by NE microinjected into the right SON.

119　メタンフェタミン反復投与によるラット線条体ドーパミン取り込み部位の変化
——— ドーパミン動態変化がおよぼす影響について

中山　誠、小山　司、松原良次、村木　彰、井上　猛、小田垣雄二、山下　格
（北海道大学医学部　精神医学教室）

〔要約〕

覚醒剤精神病の実験モデルとして、メタンフェタミン（ＭＡＰ）反復投与後に認められるラットの行動感作Behavioral Sensitizationを取り上げた。この現象に対応する神経化学的所見として、ＭＡＰ再投与時の線条体シナプス間隙におけるドーパミン（ＤＡ）大量増加が想定され、この機序の一つとして、長期にわたるＤＡ取り込み部位の減少が指摘される。このＤＡ取り込み部位減少に対して、ＤＡ生合成阻害剤α-Methyl-p-Tyrosine(α-MPT)、ＤＡ枯渇剤Reserpine、ＤＡ取り込み阻害剤Amfonelic Acid（AFA）、ならびにそれぞれ選択的D_1、D_2受容体拮抗薬であるSCH23390（SCH）、YM-09151-2(YM)の前処置が与える影響について、ＤＡ取り込み部位を選択的に標識する[^{3}H]GBR12935飽和結合実験を用いて検討した。その結果、AFA、α-MPT、SCH、YMの前処置はＭＡＰ反復投与によるＤＡ取り込み部位減少を阻止することが明らかとなった。α-MPT前処置はＤＡが新たに生合成される過程を妨げ、AFA前処置は大量に放出されたＤＡの取り込みを阻害し、さらにSCH、YMによる反復したD_1、D_2受容体の遮断が、ネガティブ・フィードバック機構を介して、ＤＡ代謝回転の低下をひきおこした結果、ＭＡＰ反復投与による取り込み部位減少が阻止された可能性が推測された。

【はじめに】

覚醒剤精神病における精神症状の遷延化、覚醒剤の再使用などによる精神症状の再燃の脳内機序を探ろうとする試みの中で、覚醒剤のラットへの反復投与により常同行動への過敏反応性を獲得した状態、いわゆる行動感作 Behavioral Sensitization（逆耐性現象）が、その実験モデルとして数多く取り上げられてきた。この行動感作成立後の行動の増強に対応する神経化学的所見として、われわれも脳内透析法を用いた検討から、メタンフェタミン（ＭＡＰ）再投与時の線条体シナプス間隙におけるドーパミン（ＤＡ）大量増加を見いだした[1]。この大量に増加した細胞外液中のＤＡは、その多くが神経終末からの大量放出によるものと考えられるが、われわれはもう一つの機序として、放出されたＤＡを不活性化するＤＡ取り込みの変化の関与について検討してきた。これにはＭＡＰを反復投与したラット線条体を用いて、直接[^{3}H]ＤＡ取り込み実験を行うとともに、ＤＡ取り込み部位を選択的に標識するとされる[^{3}H]GBR12935飽和結合実験を行い、それぞれ最大反応速度Ｖmax、最大結合量Ｂmaxをもとめ、ＤＡ取り込み過程の変化の指標とした。

結果はＭＡＰ反復投与終了７日目に断頭したラット線条体について、それぞれの実験でのＶmax値、Ｂmax値がＭＡＰ反復投与群で有意に減少していた。さらにＭＡＰ反復投与終了30日目に断頭したラット線条体についても、[^{3}H]GBR12935飽和結合実験でのＢmax値はＭＡＰ反復投与群で有意な、しかも７日目と同程度の減少が認められた。すなわちＭＡＰの反復投与により、行動感作の成立したラットではＤＡ取り込み自体が減少するとともに、この機能的変化の背景としてＤＡ取り込み部位の減少が生じ、しかもこれが長期にわたって持続していることが明らかとなった[3]。

われわれはＭＡＰ投与がＤＡの放出を促進した結果、シナプス間隙に大量に流出したＤＡが取り込まれた後、何らかの機序により、取り込み部位減少に関与する可能性を想定している。従って神経終末におけるＤＡ動態を変化させたうえで、ＭＡＰを反復投与することは、ＤＡ取り込み部位減少の機序解明に、有益な示唆を与えるであろうことが予想される。このため今回は、以下の薬物の前処置が、ＭＡＰ反復投与によるＤＡ取り込み部位数の減少所見に与える影響について検討を加えた。すなわち前シナプス性にＤＡ動態を変化させると考えられる、ＤＡ生合成阻害剤α-Methyl-p-Tyrosine(α-MPT)、小胞内に貯蔵されているＤＡの枯渇剤であるReserpine、ＤＡ取り込み阻害剤Amfonelic Acid（AFA）の前処置、ならびにそれぞれ選択的D_1、D_2受容体拮抗薬であるSCH23390（SCH）、YM-09151-2(YM)によりD_1、D_2受容体の遮断を行った上で、ＭＡＰを反復投与した各群について[^{3}H]GBR12935飽和結合実験を行い、そのＢmax値すなわちＤＡ取り込み部位数を比較検討した。

【対象と方法】

実験にはWistar系雄性成熟ラット（体重200～250g)を用いた。

ＭＡＰ反復投与は大量連続投与による身体毒性を避け、また臨床的な乱用状況に近づけるため、従来の実験と同じくＭＡＰを１日に２回、１回量 2.5、5、7.5、10mg/kgと漸増しながら、１日おきにラットに皮下投与した(Table１）。各回のＭＡＰ処置30分前にAFA 0.5mg/kg i.p.(AFA前処置群)、Reserpine１mg/kg s.c.（Reserpine前処置群）、α-MPT 60mg/kg i.p.(α-MPT前処置群)、生食１ml/kg s.c.（ＭＡＰ単独処置群）の前処置を行った［実験Ｉ］。さらにSCH 0.5mg/kg、s.c.(SCH前処置群)、YM 1mg/kg、s.c.(YM前処置群)、生食１ml/kg s.c.(ＭＡＰ単独処置群)の前処置を行った30分後に、ＭＡＰの反復投与を行った［実験Ⅱ］。対照にはやはり生食１ml/kg s.c.の前処置と処置を行った。

各薬物の影響が完全に消失したと考えられる処置終了後７日目に断頭し、氷上にて切り出した後 －70℃で保存した線条体を、200倍容の0.32M Sucroseを加えポッター・ホモジナイザーでホモジナイズし、1.000gで10分間遠心分離後、上清を23.000g、20分間遠心分離し、得られた沈渣を５mg/mℓの組織濃度で 120mM NaClを含む50mMTris-HCl緩衝液(pH7.7)に懸濁した。[^{3}H]GBR12935結合実験は50μM Mazindol存在下の結合量を非特異的結合量とし、膜標品0.2mℓに0.28～9.21nMと濃度展開した[^{3}H]GBR12935を加え(総容量2.0mℓ)、25℃45分間インキュベーションした後、WhatmanGF/Bフィルター上で吸引濾過し反応を停止させ、液体シンチレーションカウンターで濾紙上のβ線を測定した。Scatchard plotによりKd、Ｂmaxを求めた。

【結果】

［実験Ⅰ］それぞれの薬物の前処置後にＭＡＰを反復投与したラット線条体における[^{3}Ｈ]GBR12935飽和結合実験の結果は、各群間でＫd値には変化なかったが、Ｂmax値はやはりＭＡＰ単独処置群において他の群に対し有意な減少を示し、さらにReserpine前処置群においてこれを大きく上回る減少を示した。一方、AFA、α-MPT前処置群、対照群との間に有意差はみられなかった（Fig. 1）。

［実験Ⅱ］やはりKdは各群間で変化なかった。ＢmaxはMAP単独処置群でやはり対照群に対し有意な減少を示したが、SCH前処置群、YM前処置群ではこの減少を有意に抑制した（Fig. 2）。

【考察】

われわれが以前行った脳内透析法を用いた検討からは、ＤＡ生合成阻害剤の投与により新たに生合成されたＤＡ(newly synthesized ＤＡ)が減少した状態では、ＭＡＰによるＤＡ大量放出はおこらないこと、小胞内に貯蔵されているＤＡの枯渇は、ＭＡＰによるＤＡ大量放出に影響しないことが明らかとなっている[2)]。従ってＤＡの生合成阻害については、各回のα-MPT前処置により newly synthesized ＤＡは減少しており、ＭＡＰを投与してもそのＤＡ放出効果が発現せず、取り込み部位減少に関与すると考えられるシナプス間隙ＤＡは増加しないために、反復投与後もＤＡ取り込み部位の減少は認められなかったと考えられた。またReserpineがおよぼす効果については、各回の Reserpine前処置により貯蔵プールからＤＡを枯渇させておいても、その後のＭＡＰ処置によりシナプス間隙には充分大量のＤＡが放出され、これがＤＡ取り込み部位減少に寄与すると考えられた。またＤＡ取り込み阻害であるが、われわれがＭＡＰ反復投与によるＤＡ取り込み部位減少のプロセスの一つとしている、大量に放出されたＤＡの神経終末への取り込みをAFAが阻害するため、ＭＡＰを反復投与してもＤＡ取り込み部位減少は認められなかったものと推測された。

さらにD_1、D_2受容体の遮断が、ＭＡＰによるＤＡ取り込み部位減少を阻止した機序であるが、反復したD_1、D_2受容体の遮断が、前シナプスへのネガティブ・フィードバック機構を介して、ＤＡ代謝回転の低下をひきおこし、取り込み部位減少への関与が考えられるＤＡの放出量は減少するため、ＭＡＰ反復投与による取り込み部位の変化が生じなかった可能性が推測された。すなわちこの結果からも、ＤＡ取り込み部位減少には前シナプス性機序が関与していることが示唆され、今後はこのD_1、D_2受容体の反復した遮断によるＤＡ生合成能、ＤＡ代謝などへの影響の検討が必要と考えられた。

Table 1 MAP treatment regimen

Days	1	2	3	4	5	6	7
MAP treatment (mg/kg x2/day)	2.5	0	5	0	7.5	0	10
Saline treatment (ml/kg x2/day)	1	0	1	0	1	0	1

0 : no administration

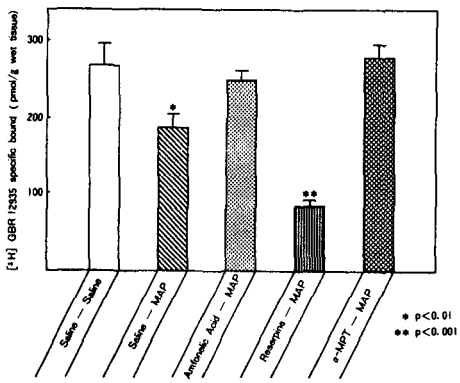


Fig.1 Effects of biochemical and pharmacological manipulations on the Bmax values of [^{3}H]GBR12935 binding reduced by MAP in the rat striatum. The results shown are the means±S.E.M.

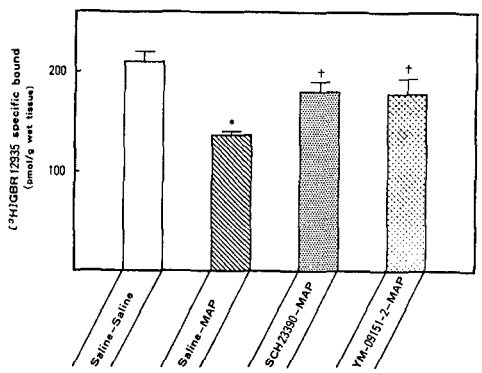


Fig.2 Effects of SCH23390 and YM-09151-2 pretreatment on the Bmax values of [^{3}H]GBR12935 binding reduced by MAP in the rat striatum. The results shown are the means±S.E.M. *P<.01 vs. saline alone; +<.05 vs. MAP alone.

【文献】

1) 市川淳二（1988）薬物・精神・行動，8，389-403
2) 小山　司，中山　誠，松原良次，他（1989）神経化学，28，484-485
3) 山下　格，中山　誠，小山　司，他（1989）ポジトロンCT等を用いる薬物依存メカニズム解明に関する研究班 昭和63年度研究報告書，14-18

120　組み換え型ヒト神経成長因子（rhNGF）のラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 に対する突起伸長作用および acetylcholinesterase 活性上昇作用

加藤　浩紀、　福元　宏明、　垣花　満、　岩根　理*、寿野　正廣
（武田薬品・生物研究所、生物工学研究所*）

〔要約〕
組み換え型ヒト神経成長因子（rhNGF）を Chinese hamster ovary（CHO）細胞を用いて発現させ、単一物質として精製することに成功した。rhNGF の生物活性をラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 を用いて検討し、マウス神経成長因子（mNGF）と比較した。血清存在下で培養した PC12 cell に対し、rhNGF は添加後数日間の遅延の後に 3 - 100 ng/ml の範囲で濃度依存的に突起を伸長させた。この作用は、mNGF と作用様式も作用強度もほぼ同じであり、ED_{50} は約 20 ng/ml であった。同様な培養条件において、rhNGF は添加後 4 日目をピークとして、1 - 100 ng/ml の範囲で濃度依存的に acetylcholinesterase（AChE）活性を上昇させた。この作用も mNGF と同等であり、ED_{50} は約 10 ng/ml であった。一方、酵素免疫測定法（ELISA）により rhNGF の抗原性を mNGF と比較したところ、マウスβ-NGF に対する monoclonal 抗体 Mab 27/21 を一次抗体として用いた場合には等価な反応が得られたが、mNGF に対する polyclonal 抗体を用いた場合には rhNGF の抗原活性は mNGF の約 1/13 であった。以上の結果から、rhNGF が PC12 cell において mNGF と同等の活性を有すること、および mNGF と共通の抗原決定基を有する部分があり、抗体を選択すれば mNGF を standard とする ELISA 法でヒトNGF の定量が可能であることが示され、rhNGF が天然のNGF と同じ三次構造ならびに活性を持つことが示唆された。

〔緒言〕　NGF は中枢神経系においては cholinergic neuron に対して neurotrophic factor として働くことが、培養神経細胞における実験から明らかとなっている（1,2）。In vivo においても破壊等による中枢 cholinergic neuron の変性死をNGF が抑制することが知られている（3,4）。Alzheimer 病においては脳内の cholinergic neuron の変性脱落が著明であることから、NGF は Alzheimer 病の治療に有効である可能性がある。NGF を臨床に用いるには、活性のあるヒトNGF を得る必要があるが、これまでに報告されている組み換え型ヒトNGF は天然のマウスNGF に比べて活性が極めて低い（5,6）。我々はヒトNGF の genomic DNA を CHO細胞に入れ、組み換え型ヒトNGF を大量に発現させ、それを精製するのに成功した。今回、その生物活性ならびに抗原性について検討し、天然の NGF と同等の高い活性が得られたので報告する。

〔方法〕　PC12 cell は 10% FCS/DMEM で 37 ℃、10% CO_2 下に培養した。Neurite outgrowth の測定には 24 well plateに 3,000 cells/well の密度で細胞をまき、rhNGF あるいは mNGF を最終濃度 0.3 - 300 ng/ml となるように添加して培養した。7 日間の培養の後に位相差顕微鏡下に細胞を計数し、細胞体の直径の 2 倍以上の突起を持つ細胞の割合を算出した。Acetylcholinesterase（AChE）活性の測定には、24 well plate に 25,000 cells/well の密度で細胞をまき、3 日間培養した後に rhNGF を最終濃度 0.3 - 100 ng/ml となるように添加した。経日変化を調べる場合にはさらに 1 － 6 日間、それ以外の実験では 4 日間培養を続けた後に、1% Triton X-100 を含む Tris-HCl buffer で可溶化し、radiometric assay により AChE 活性を測定した。NGF 量は Korsching et al.(7) および Larkfors et al.(8) の方法に準じた酵素免疫測定法（ELISA）により定量した。monoclonal 抗体は、Boehringer Mannheim 社の Mab 27/21 を、polyclonal 抗体は Collaborative Research Inc. の 2.5S NGF antiserum (rabbit) を用いた。タンパク量は Bradford (9) の方法により定量した。

〔結果〕　mNGF を standard とした ELISA 法に rhNGF を適用したところ、一次抗体として mNGF に対する monoclonal 抗体 Mab 21/27 を用いた場合には 1.5 - 100 pg/ml の濃度範囲で mNGF とほぼ同等の濃度反応曲線が得られたが、一次抗体として mNGF に対する polyclonal 抗体を用いた場合は、rhNGF の濃度反応曲線は mNGF のそれよりも約13倍高濃度側に得られた（Fig. 1）。

PC12 cell に rhNGF 100 ng/ml を添加して培養すると、1 日目には細胞の形態にほとんど変化は見られなかったが、2 日目には短い突起を伸ばしているのが観察され、8 日間培養すると、長い突起を持った細胞が多数観察された。この

形態上の変化は mNGF 100 ng/ml を添加した場合とほとんど同じであった。細胞体の2倍以上の突起を持つ細胞数の比率に対する NGF の dose-response curve は、rhNGF と mNGF でほとんど同じであり、ともに最小有効濃度が 3 ng/ml 付近、最大反応誘発濃度は 100 ng/ml 付近で、ED_{50} は約 20 ng/ml であった (Fig. 2A)。

rhNGF 50 ng/ml は PC12 cell の AChE 活性を添加時間に依存して上昇させた。添加後1、2、4および6日後の活性を比較すると、4日後の活性が最大で controlの約4倍となり、6日後では controlの2倍まで低下した。添加後4日目で dose-response をとると、rhNGF および mNGF ともにほぼ同じカーブが得られた。最小有効濃度は 1 ng/ml 付近、最大反応誘発濃度は 100 ng/ml 付近で、ED_{50} は約 10 ng/ml であった (Fig. 2B)。

[考察] mNGF に対する monoclonal 抗体 Mab 27/21 は rhNGF と mNGF にほぼ等価の affinity を示した。rhNGF と mNGF の間には 90% 以上のアミノ酸配列の homology があり、Mab 27/21 は両NGF の共通配列を認識するものと考えられる。二次抗体も同じ Mab 27/21 であるので、rhNGF は mNGF と同様な、βサブユニットの二量体構造をとっているものと考えられる。この結果は mNGF を standard とした ELISA によりヒトNGF が定量できることを示している。rhNGF は PC12 cellに対して mNGF と等価の突起伸長作用および AChE 活性上昇作用を示した。これらの事実から、rhNGF は天然のNGF の三次構造と活性を完全な形で保持していると考えられる。

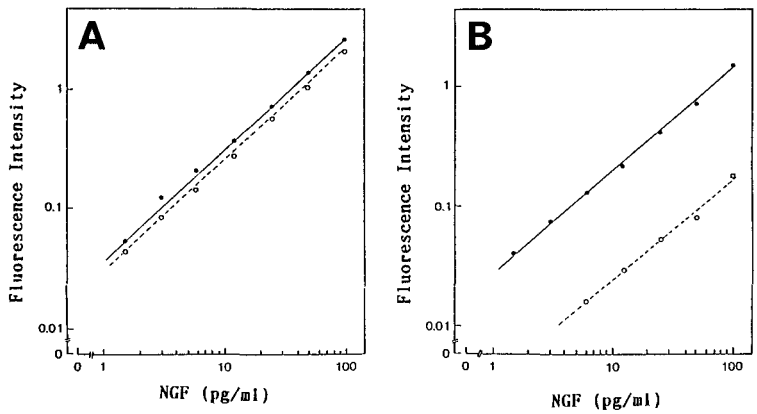


Fig. 1 Dose response curves of rhNGF (●) and mNGF (○) in an ELISA for NGF using a monoclonal antibody against mouse β-NGF, Mab 27/21 (A) or a polyclonal antibody against mouse NGF (B) as the primary antibody.

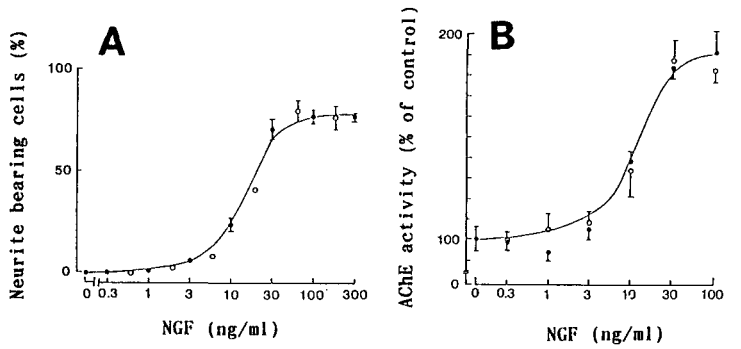


Fig. 2 Dose response curves of rhNGF (●) and mNGF (○) on neurite outgrowth (A) and acetylcholinesterase activity (B) in PC12 cells cultured in the presence of NGF.

[文献] 1) H. Hatanaka et al. (1988) Dev. Brain Res. 39, 85-95. 2) J. Hartikka and F. Hefti (1988) J. Neurosci. 8, 2967-2985. 3) F. Hefti (1986) J. Neurosci. 6, 2155-2162. 4) L.R. Williams et al. (1986) PNAS 83, 9231-9235. 5) G.-L. Hu and K.E. Neet (1988) Gene 70, 57-65. 6) E. Kanaya et al. (1989) Gene 83, 65-74. 7) S. Korsching and H. Thoenen (1985) Meth. Enzymol. 147, 167-185. 8) L. Lorkfors and T. Ebendal (1987) J. Immun. Meth. 97, 41-47. 9) M. Bradford (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254.

121 終脳神経細胞に作用する神経繊維伸長因子の特性とその同定

田口隆久、　亀井明仁
（大阪大学基礎工学部生物工学科）

〔要約〕
培養ニワトリ胚終脳神経細胞から特異的に神経繊維を伸長させる活性がニワトリ脚筋抽出液中に存在することを見いだした。さらに、この因子について解析を進め以下のような点が明らかになった。（１）この因子は、培養皿の底面に接着して活性を示すような因子であり、培養液に添加するだけでは効果をしめさない。（２）蛋白質分解酵素で処理すると活性がなくなるので、この因子は蛋白性である。（３）ＣｏｎＡの結合で活性が失われるが、糖鎖切断酵素処理の後も活性が残ったので、糖蛋白質ではあるが活性部位は蛋白部分にある。この因子を同定するために、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫法を用いて、部分精製した筋抽出液の成分に対するモノクローナル抗体を調製し、抗原の神経繊維伸長活性を測定することによりスクリーニングした。得られた抗体は、イムノブロットにより、分子量２８ｋの蛋白質を認識した。

ニワトリ脚筋抽出液中に運動ニューロンから神経繊維を伸長させる活性をもつ因子が存在し、さらにこの因子がニワトリ胚の脳各部の培養系のうち終脳神経細胞に対して特異的に神経繊維伸長活性を示すことはすでに報告した。[1] 今回我々は、この因子の分子としての性質を調べ、さらに、モノクローナル抗体を調製することによりこの因子の同定を試みた。

［方法］

培養系：ふ卵５日目のニワトリ胚より終脳のみを実体顕微鏡下で取り出し、トリプシン処理の後ピペットで細胞を解離し、２５０００／ｃｍ^2 の密度で培養皿に添加した。培養液は、Ｈａｍ’ｓＦ１２を基本培地として用い、５％CO_2 存在下３７℃で培養した。

神経繊維伸長活性測定：終脳神経細胞を２４時間培養したのち、細胞体の直径の２倍以上の神経繊維を持つ細胞数の全体に対する割合を計測した。

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫法によるモノクローナル抗体の作成：Ｂａｌｂ／ｃマウス脾臓の解離細胞を調製し抗原存在下で４日間培養する。常法に従って脾臓細胞をミエローマ細胞と融合させ、ＨＡＴ培地で培養を続ける。ＥＬＩＺＡにより抗体産生細胞の存在するウェルを検出し、その各ウェルの抗体に抗原を結合させ洗浄の後、酸性条件で抗原を解離し、それを別のウェルに移し、そこで終脳神経細胞を培養し抗原の持つ神経繊維伸長活性の有無を検討した。

［結果］

ニワトリ脚筋抽出液を培養開始前後のいろいろな時間に添加した場合の神経繊維伸長を調べた結果が図１に示されている。細胞添加と同時あるいはそれ以前に抽出液を添加した場合には通常の活性を示す。しかし、細胞添加２時間後には活性をほとんど示さなくなる。この結果は、ここで注目している神経繊維伸長活性が、培養基質に接着している因子によ

ってもたらされていることを示している。さらにその因子は、細胞と基質の間に存在していないと活性を示さない。このことを確認するために、抽出液をあらかじめ、あるウェルに添加していろいろな時間放置後に培養液を別のウェルに移し、それぞれのウェルで細胞を培養した（図示せず）。その結果、約１時間を境にして、移した方の培養液をいれたウェルから移す前のウェルへ活性が移行した。このことから、この因子が基質に接着して神経繊維伸長活性を示すことが明確になった。この因子の培養基質への接着性を利用してこの因子の分子としての性質を調べた。この因子はｐＨに対し比較的安定であり（ｐＨ２－１１）、高塩濃度や界面活性剤処理にも影響を受けなかった（図示せず）。次に、この因子活性の蛋白質分解酵素に対する抵抗性を調べた。図２にトリプシンで処理した場合の結果を示した。明らかにこの因子は蛋白性である。同様な結果は、キモトリプシンやプロナーゼを用いても得られた（図示せず）。この因子は分泌性の蛋白質と考えられるので糖蛋白質である可能性がある。ＣｏｎＡの結合による因子活性の阻害（図３）がそれを支持している。ここで活性を担っているのが糖蛋白質の糖鎖部分なのか蛋白部分なのかが問題になる。グリコペプチダーゼＦでこの因子を処理しても活性は失われなかった（図示せず）ため、蛋白部分に活性部位があるものと思われる。

次に、この因子を同定するためにモノクローナル抗体を作成した。抗原量が少なくてすむ、生体毒性の影響を受けないという利点からin vitro免疫法を採用した。神経繊維伸長活性をもつ抗原を認識する抗体が得られ、ウェスタンブロット解析により分子量２８ｋの抗原であることが示された（図示せず）。

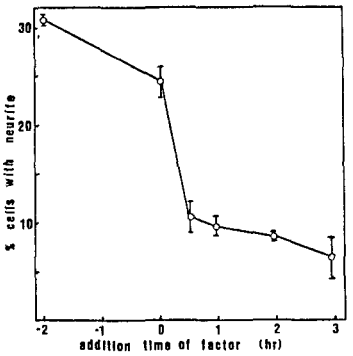


図１　脚筋抽出液添加時期と神経繊維伸長活性

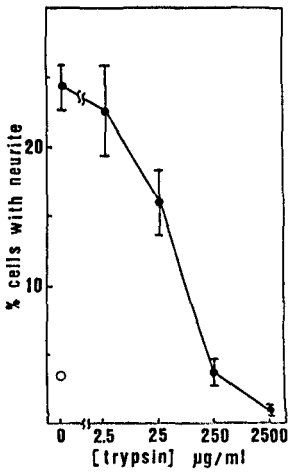


図２　トリプシン処理と神経繊維伸長活性

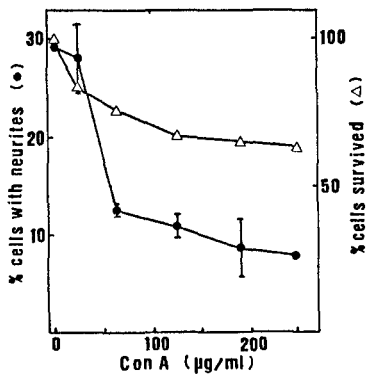


図３　ＣｏｎＡの結合と神経繊維伸長活性

［考察］

以前報告したように[2]、この因子に対する阻害物質がspinal muscular atrophyと関連している可能性が高いため、この因子のさらに詳細な解析によりこの病因が明らかになるであろう。実際の脳の発生過程では脳内で産生される同様な因子が関与しているものと思われる。これを支持する結果も我々の実験より得られている。ここで得られた抗体の認識した２８ｋ蛋白質の精製と分子生物学的解析も進められている。

［文献］ 1) T.TAGUCHI et al.(1987) Dev.Brain Res. 37:125-132
2) C.E.HENDERSON et al.(1987) Neurology 37:1361-1364

122　神経成長因子によって起きるカルシウム濃度変化

山下　明，川名　明夫
（ＮＴＴ基礎研）

〔要約〕

培養したニワトリ胚の脊髄後根神経節細胞に神経成長因子を与えると、細胞体部分で一過性のカルシウムイオン濃度変化が起こる。この濃度変化は細胞外液のカルシウムイオンを除いても発生する事から、細胞内に貯蔵されたカルシウムの放出によって起こっていると考えられる。また神経成長因子を神経突起の先端部に与えても細胞体で濃度変化が起こる事から、突起先端から入った神経成長因子が、突起を通って細胞体に達し、そこでカルシウムイオン濃度の変化を引き起こしている事が考えられる。

序　神経成長因子（ＮＧＦ）が脊髄後根神経節（ＤＲＧ）細胞の突起成長を著しく促進することは既に知られている。しかし、そのメカニズムについてはまだよく分かっていない。カルシウムイオンが関与している可能性も指摘されてはいたが、ＮＧＦとカルシウムイオンを直接結びつける実験はあまりなかった。

我々はＮＧＦが細胞体の部分に一過性のカルシウムイオン濃度変化を引き起こすことを見出した。この濃度変化は、ＮＧＦの添加から発生までの遅延時間が２０分程度と長いのが特徴であるが、そのメカニズムや突起成長との関連は明らかでない。

実験　試料は１２～１４日目のニワトリ胚の脊髄後根神経節細胞を１日培養したものを使った。培地としては、福田ら[1]により報告されている無血清培地を用い、２０ｎｇ／ｍｌの７ＳマウスＮＧＦを加えた。細胞内カルシウムイオンの測定には蛍光色素fura-2を使った。測定２時間前に培養液をＮＧＦを含まないものに換え、fura-2を負荷した。

測定装置の概略を図１に示す。３４０、３６０ｎｍで交互に励起した蛍光画像を、高感度ＴＶカメラで撮影してビデオに記録した。その際チョッパー出力を基に、どちらの波長で励起したかを示すマーカーをビデオの音声トラックに書き入れた。同時に、細胞上の数点を選んで、輝度をＡ／Ｄ変換し、経時変化を画像処理装置に表示した。ＮＧＦは２μｇ／ｍｌの溶液をピコインジェクターで細胞近くの液中に添加した。測定終了後にビデオのデータを画像処理してカルシウムイオン濃度を算出した。Ｓ／Ｎ比の向上のため、画像処理は連続した１０フレームずつの蛍光画像の平均を取って行なった。

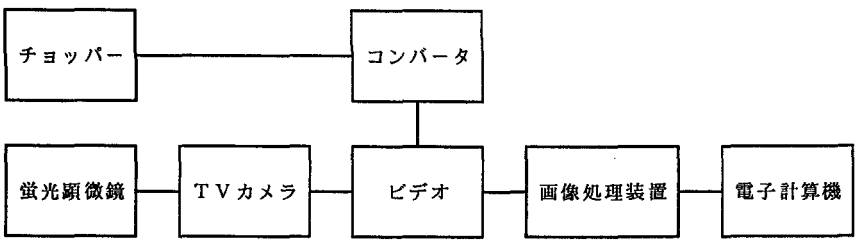


図１　細胞内カルシウムイオン測定装置

結果と考察　ＮＧＦを細胞体近辺に加えた場合、２０分程度の遅延時間を経て、細胞体で１回ないし数回の細胞内カルシウム濃度の増加とそれに続く減少が起きる。

まずこの現象が励起紫外線やＮＧＦに含まれる不純物によるのではなく、ＮＧＦそのものによって引き起こされていることを確かめる必要がある。紫外線の影響を確かめるためには、ＮＧＦを加えずに１時間以上紫外線励起しながら観測したが、カルシウム濃度の変化は見られかった。また不純物の可能性を除くため、初めにＮＧＦとＮＧＦ抗体（anti－ＮＧＦ）の混合液を加えたが、カルシウム濃度は変化しなかった。その後ＮＧＦを単独で加えると濃度変化が起きた。以上の実験によって、ＮＧＦがカルシウム濃度の変化を引き起こす事が確かめられた。

またこの濃度変化が、カルシウムイオンの細胞外からの流入によるものか、細胞内からの放出であるかを調べるため、外液をカルシウムーｆｒｅｅの培養液に換え、更にＥＧＴＡを加えて、外液からカルシウムイオンを除いた。そのために細胞内カルシウムイオンの初期濃度は低くなっているが、ＮＧＦにより濃度は変化し、遅延時間にも変化は認められなかった。その結果を図２に示す。このことから、カルシウム濃度の変化は、活動電位等によるものでなく、細胞内に貯蔵されているカルシウムイオンの放出によって起きている事がわかった。

成長した神経細胞では、ＮＧＦは突起先端から取り込まれて、神経突起を通って細胞体に運ばれると考えられている。[2]従って、濃度変化が起きるまでの遅延時間として、突起先端から取り込まれたＮＧＦが細胞体に運ばれるまでの時間をも考えることができる。そこで外液のカルシウムイオンを除いた上で、長く延びた神経突起の先端にＮＧＦを加えたところ、３５分後に細胞体で濃度変化が起きた。。図３に示したように、突起が長く延びている方が遅延時間が長くなっているのは、突起内を移動するに要する時間と考えると説明できる。しかし突起が短い場合でもかかる２０分程度の遅延時間の原因は不明である。

1）　J. Fukuda, K. Yamaguchi, S. Akimoto, and Y. Tada, Neurosci. Res., 2, 460(1985).

2）　V. Hamburger, V. J. K. Brunso-Bechtold, and J. W. Yip, J. Neurosci., 1, 60(1981).

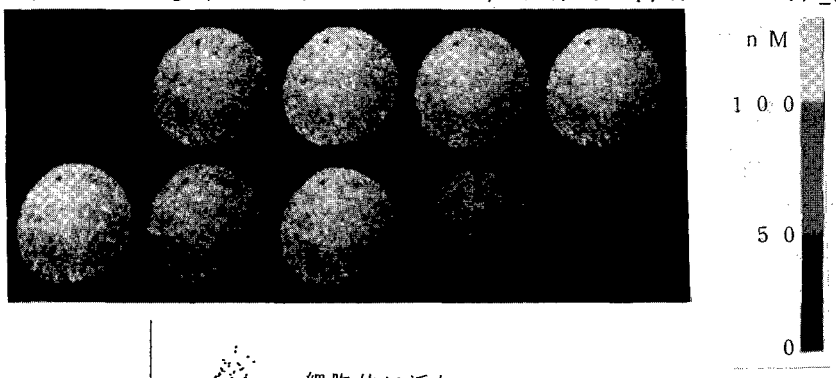


図２　細胞体のカルシウムイオン濃度の経時変化。左上から順に、ＮＧＦを加えて１９分後から１０秒毎の変化を示す。

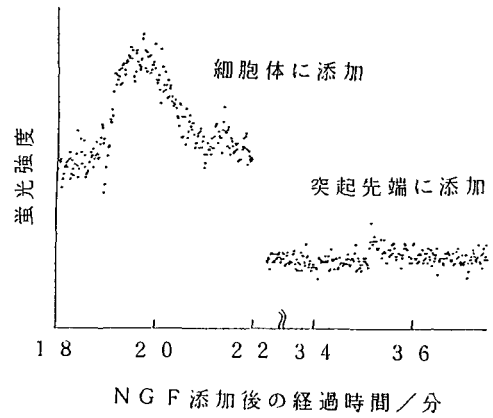


図３　ＮＧＦ添加後の細胞体でのfura-2蛍光強度の変化。３４０ｎｍ励起。

123 ヒトグリア細胞増殖抑制因子（ＧＧＩＦ）の精製とその性質

浅井清文[1]、加藤泰治[1]、堀田妙子[2]、田中　亮[2]、大塚隆信[3]、松井宣夫[3]
（名古屋市立大学・医学部・分子医研生体制御[1]、生化Ⅰ[2]、整形外科[3]）

〔要約〕

Von Recklinghausen氏病患者より得られた神経線維腫（neurofibroma）組織中にグリオーマ細胞（C6,354A細胞）に対し、DNA合成抑制作用を示すグリア増殖抑制因子 glial growth inhibitory factor（GGIF）が存在することを見いだし、部分精製を行った。GGIFは神経線維腫の粗抽出液よりアフィニティークロマト、陰イオン交換カラム、疎水性クロマト、ゲル濾過にて部分精製した。GGIFは、酸、熱、パパイン処理で失活した。ゲル濾過法より、分子量は約93,000と推定された。

我々は、第32会本学会にて、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DNA合成を促進するペプチド性因子 neuronotrophic factor（NTF）が存在し、その精製を行ったことを報告した。さらに、同じ粗抽出液中にGGIFが存在することも報告したが、今回、このGGIFの部分精製を試み、GGIFもタンパク性因子であることが判明した。脳発達過程において、ニューロン、グリアの増殖、分化には、各種液性因子が関与していることが知られており、このGGIFも、グリア細胞の増殖分化を調節する因子と考えられる。

［実験方法］

1、生物活性測定法：細胞は、ラットアストロサイトーマ細胞（C6）を用いた。96ウェルプラスティックプレートに1×10^5個／well（150μl／well）の細胞をまき、37℃、4時間インキュベートした。これに、各画分を10μl～20μl加え、さらに［^{3}H］-チミジンを加え、37℃、18時間インキュベートした。セルハーベスターを用い、細胞をろ紙上に採取し、乾燥させた後、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。

2、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、20mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）中でホモジェネートした後、遠心分離（12,000rpm、1時間）して不溶物を除去した。得られた上清をブルートヨパールカラムに添加し、素通り画分を回収した。次に、陰イオン交換カラム（DEAE-Sephacel）に吸着させ、Ａ）20mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）＋1mM DTTから、Ｂ）Ａ液＋1M 塩化ナトリウムへのグラジエントをかけ溶出した（Fig.2）。活性画分は0.15M～0.3Mに溶出した。この画分をメンブレンフィルター（アミコン、PM-10）を用いて濃縮した後、塩化ナトリウムを4Mとなるよう加えた。この溶液を疎水性クロマトカラム（ブチルトヨパール）に吸着させ、Ａ）20mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）＋1mM DTT＋4M 塩化ナトリウムから、Ｂ）20mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）＋1mM DTTへのグラジエントをかけ溶出した（Fig.3）。活性のある画分は0.2M付近に溶出した。さらに、この画分をゲル濾過カラム（Sephacryl S-300）を用いて、20mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）＋1mM DTTにて分画した。

3、細胞培養法：ラットグリオーマ細胞（C6）は10%NBS含有F-10にて継代培養した。活性測定時には、10%FBS含有F-10を用いた。

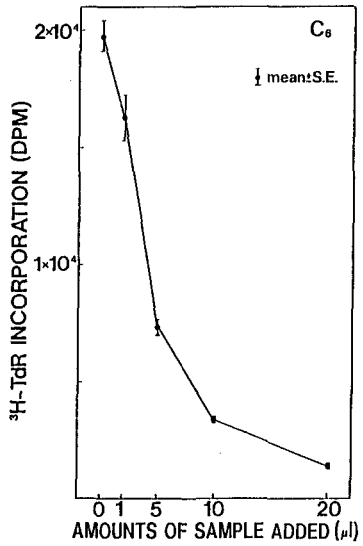


Fig.1 GGIFのDNA合成抑制活性

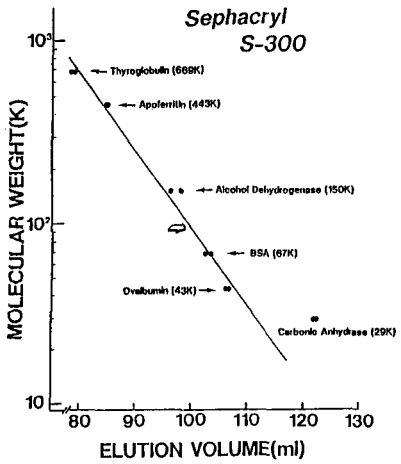


Fig.4 ゲル濾過法による分子量の推定

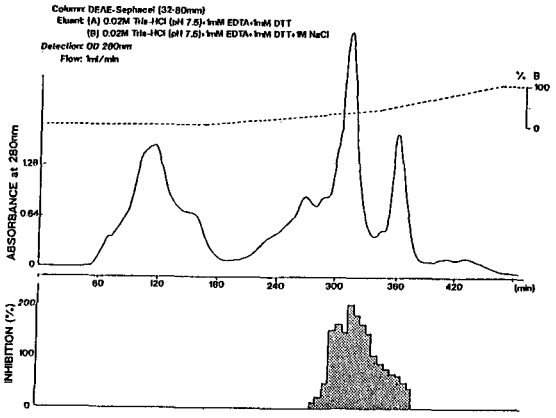


Fig.2 陰イオン交換カラムによる溶出パターン

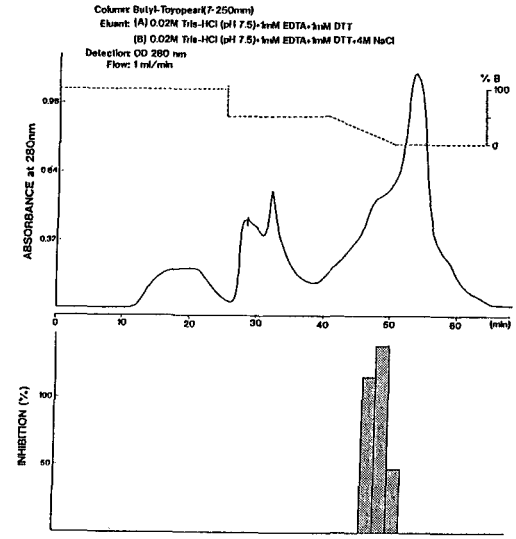


Fig.3 疎水性クロマトカラムによる溶出パターン

[結果および考察]

GGIFの部分精製を試みたところ、ゲル濾過法より、分子量約93,000と推定された（Fig.4）。またGGIFは、酸処理（pH 2.3）、熱処理（100℃、10分）、パパイン処理（37℃、5時間）にて活性がなくなり、タンパク性の因子と考えられた。さらに、精製過程において、GGIFのDNA合成抑制活性は徐々に失われる傾向がみられたが、SH基酸化防止剤であるDTTを加えることにより、活性を保つことができた。

以前、我々が報告した[1),2)]、マウス腹水型神経芽腫細胞（NAs-1）が産生するラットGGIFは、分子量35,000～40,000であり、これに比して、今回部分精製した、ヒトGGIFはより大きな分子量を示した。また、このGGIFはTGF、TNF、Interleukinsとは物理化学的性質が異なるものであることが明かとなった

[参考文献]

(1) Kato, T. et al. (1987) Brain Res., 430, 153-156

(2) Ito, J. et al. (1987) Neurochem. Interntl. 11, 331-337

124 交感神経分布促進蛋白の抗体の作製と組織分布

黒見　坦
千葉大学医学部高次機能制御研究センター発達生理

〔要約〕

（要約）

培養系で交感神経の分布を促進する分子量370Kダルトンの蛋白に対する抗体をアフィニティーカラムを用いて得、この蛋白の組織分布を免疫組織化学的に調べた。ニワトリ第二翼羽開張筋、血管、心臓にこの蛋白様免疫活性物質が観察されたが、骨格筋にはほとんど観察されなかった。前三組織は高いノルアドレナリン含有量を示したが、骨格筋組織のノルアドレナリン量は非常に低レベルであった。一方、ラミニン様免疫活性物質は四組織に同様に観察された。上記の末梢器官のノルアドレナリンは器官に分布している交感神経由来と考えられるので、この蛋白が末梢器官への交感神経支配過程に関与しているという仮説をさらに支持するものである。また、この蛋白様免疫活性がラミニン様免疫活性と同じ様に細胞表面に観察されたことは、この蛋白が細胞外マトリックス成分のひとつであるということを支持する知見である。

（目的）

発達過程において、ニューロンは神経線維を伸し、その標的器官と特異的シナプス結合を形成する。神経末端と標的器官の間には、この結合を仲介する分子が存在する可能性がある。生体において、交感神経はニワトリ第二翼羽開張筋に高密度で分布しているが、その隣の骨格筋には全く分布していない(1,2)。培養法を用いて、第二翼羽開張筋由来物質は交感神経線維の分布を促進するが、骨格筋由来物質は交感神経線維の分布を排除する活性があること、を検出できる系を確立した(3)。この検定法によって、心筋細胞培養液から、基質となって交感神経線維の分布を促進するSDS-PAGEで単一のバンド（370Kダルトン）を示す蛋白を得た(4)。今回は、この蛋白の役割をさらに明らかにするために、抗体を作製し、その組織分布をしらべた。

（方法）

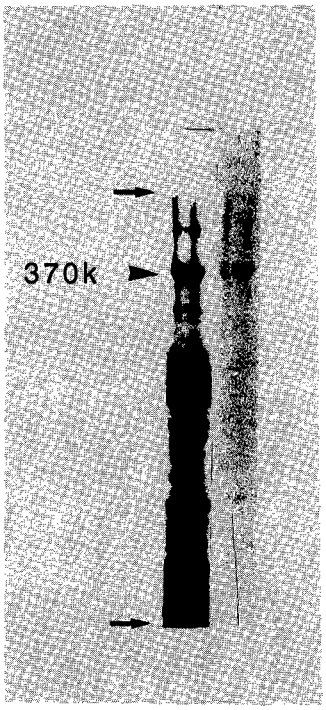
ニワトリ胚心筋細胞培養上澄から部分精製した分画をウサギに免疫し抗血清を得た。370Kダルトン蛋白に対する特異的抗体は、この抗血清を370kダルトンーアフィニティーカラムにかけ、分離した。370kダルトン蛋白は、部分精製した心筋培養液をSDS-PAGEにかけ、相当する部分を切出し、ELECTROELUTION法によって溶出した。このようにして得られた蛋白をCNBr activated Sepharose 4Bに結合させ、アフィニティーカラムを作製した。ニワトリの各組織をZamboni液で固定後、クリオスタットで 20 um の切片とし、ABC免疫組織染色に供した。組織カテコーラミン量はHPLC法によって測定した。

（結果）

(1) アフィニティーカラムで得られた抗体はWestern blot法により370Kダルトンの蛋白に特異性をもつものであることが確認された(図ー1)。(2)ニワトリ各組織の免疫組織化学では、370Kダルトン蛋白様免疫活性が第二翼羽開張筋、脳血管、心房、心室、で認められたが、脳、骨格筋では観察されなかった。一方、ラミニン様免疫活性は上記組織のうち脳だけで観察されなかった。(3)組織のノルアドレナリン量は、表ー1に示すように、第二翼羽開張筋、血管、心臓、骨格筋の順であった。

（考察）

ニワトリ心筋細胞由来の370Kダルトンの蛋白は培養系において、基質として交感神経線維の分布を著明に促進すること、その効果はラミニンの100倍以上であることはすでに報告した(4)。また、部分精製した分画に対する抗血清をニワトリに投与すると、6-OHDA投与後の交感神経の再生が妨げられる、ことも報告した(5)。今回、370Kダルトンの蛋白に対する特異的抗体を作製し、その組織分布を調べ、一方、組織の交感神経分布の指標としてノルアドレナリン含量を測定した。その結果、交感神経分布が多い器官にはこの蛋白様免疫活性物質が存在することが観察された。　このことより、この蛋白が交感神経とその標的器官のシナプス形成に重要な役割を果しているという説が支持された。



図ー1 Western blot 解析
矢印は top と bottom を
示している。

表ー1

器官	ノルアドレナリン	免疫活性	
		370Kダルトン蛋白	ラミニン
第二翼羽開張筋	+++	++	++
血管	++	++	++
心臓	+	+	++
骨格筋	−	−	++

（文献）

(1) Bennett,T. and Malmfors,T. (1970) Z.Zellforsch. 106, 22-50. (2) Kuromi,H. (1978) Eur.J.Pharmacol. 51, 285-289. (3) Kuromi,H. (1987) Japan.J.Pharmacol. 43, 45P. (4) Kuromi,H. (1898) Japan.J.Pharmacol.49, 137P. (5) Kuromi,H. (1990) Japan.J.Pharmacol. 52, 133P

125 培養中枢ニューロンへの酸素毒性と神経栄養因子

榎戸 靖、野々村健、九島洋一、畠中 寛
(大阪大学蛋白質研究所・蛋白質生合成部門)

〔要約〕 ニューロンの生存に対する酸素の役割を調べるために、生後ラット(P3)脳から中隔野ニューロンをパパインで分散し、インキュベーター内気相酸素濃度を変えて培養した。その結果、通常の酸素気相(20%酸素)よりもむしろ50%酸素気相下の培養の方が、多くのニューロンが生存し得ることが見いだされた。一方、10%酸素気相では、少数のニューロンの生存しか見いだせなかった。ラット胚(E17)中隔野ニューロンで同様の実験を行ったところ、P3の場合と逆に低酸素気相下でニューロンの生存が維持され、高酸素気相下ではほとんど生存が出来なかった。これらE17ニューロンの高酸素気相下での死は繊維芽細胞増殖因子(bFGF)の添加によって著しく改善されることが分かった。同様に、未分化ニューロンのモデル細胞であるPC12h細胞の高酸素気相下での死もbFGFによって抑制された。以上の結果は、分化促進因子として知られるbFGFがニューロンに対する酸素毒性回避に深く関与していることを示唆するものである。

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。またニューロンは酸素欠乏や一過性の虚血など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。昨年度の本学会において、生後ラット前脳基底野コリナージックニューロンの生存が、インキュベーター内気相を高酸素にすることにより高まることを報告した(1)。今回、未分化ニューロンおよびPC12h細胞の高酸素負荷に伴う細胞死が、ニューロンの分化促進因子として知られている神経栄養因子bFGFによって著しく改善されたので報告する。

【実験方法】

胚および生後ラット脳からの中隔野ニューロンは既報に従って培養した(2)(3)(4)。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1cm^{2}に0.75ラット分あるいは5×10^{5}cellsとして48-well plate(培養面積1cm^{2}あるいは0.65cm^2、polyethyleneimine-コート済)に、まいた。培地は、1μMのcytosine arabinosideを含み、6日間培養した。bFGFはヒト組み替え型で酸化され易い2つのCys残基をSerに置き換えたmutant (武田薬品㈱) を用いた。PC12h細胞の培養も既報に従って培養した(5)。CO_2 incubatorはタバイN_2-O_2-CO_2型(BNP-110M)を用いた。

【結果と考察】

生後ラット(P3)脳の主として中隔野を含む領域のパパイン分散細胞を培養し、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20%(空気)、50%、10%と変えて6日間培養した後に生存した総ニューロン数を抗MAP2抗体(6)で

Culture condition	Number of MAP2-positive neurons (cells/well)	(%)
20% O_2	37200 ± 2600	(100 ± 7)
50% O_2	45000 ± 3100	121 ± 8
10% O_2	23300 ± 2200	63 ± 6

表1．20%(空気)、50%、10%酸素気相下で培養した生後ラット(P3)中隔野ニューロンの生存数の変化。
P3ラット中隔野を含む領域を切り出し、パパインで消化の後、ポリエチレンイミン被膜上に異なった酸素気相条件で6日間培養した。抗MAP2抗体(6)に陽性の細胞数を示す。

表２．50%酸素気相下で培養したPC12h細胞に対するNGFおよびbFGFの細胞死保護効果。
PC12h細胞は35mmディッシュのコラーゲン被膜上に3×10^4cells/cm^2（ＤＮＡ量として表に示すようにディッシュ当り3.6μg）でまいた。培養は、血清培地でNGFおよびbFGFを加え、50%酸素気相下に9日間行った。ＤＮＡ量は細胞数を反映し、蛋白量／ＤＮＡ量は細胞の大きさをあらわすと思われる。PC12h細胞は50%酸素気相でほとんど死滅するが、NGFおよびbFGFがその死を防護していることがわかる。また、その時、細胞の肥大が観察される。

Days in culture	Factor added	Cellular contents of DNA (μg/dish)	Protein	Ratio Protein/DNA
0 day	none	3.6 ± 0.7	89.7 ± 15.1	26.9 ± 2.7
9 days	none	0.7 ± 0.1	45.0 ± 7.0	65.5 ± 9.7
9 days	NGF (50 ng/ml)	2.8 ± 0.6	179 ± 20	65.6 ± 12.2
9 days	basic FGF (50 ng/ml)	1.4 ± 0.4	84.0 ± 27.0	55.0 ± 9.1

染色し数えた。その結果を表１に示す。、50%酸素気相下の培養では、20%の場合よりむしろMAP2陽性細胞数は多かった。一方、10%酸素気相の場合は、低い値に留まった。この培養下に一部混在して来るアストログリア細胞からの間接的な作用であるかどうかを調べるために、抗GFAP抗体での染色を行った。その結果、アストログリア細胞の数および形態には、これら異なる酸素気相条件でほとんど影響がみられなかった。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おり、昨年度報告した生後ラット前脳基底野コリナージックニューロンの培養下での生存が高酸素気相で高まった結果と一致している(1)。即ち、ニューロンの酸素毒性回避のなんらかの機構が、ニューロンの分化成熟に伴って出現して来るものと予想される。未分化ニューロンとしてラット胚(E17)中隔野ニューロンを培養し以上の異なる酸素気相下でのニューロンの生存維持を調べた。その結果、E18ニューロンは、50%また40%の高酸素気相で殆ど生育が出来ないことが観察されたが、この時bFGFを添加すると、酸素毒性に起因すると思われるニューロンの死は、顕著に改善された。一方、神経成長因子(NGF)で分化されるモデル細胞PC12hはNGF存在下でのみ、高酸素気相で生育できることを我々は見いだしているが(7)、表２に示すように、bFGFで分化させたPC12h細胞も同様に生育可能であることが分かった。

現在まで、虚血に伴うニューロンの死がbFGFなどの神経栄養因子によって抑えられるとする報告が幾つか出されているが、事実、我々も、P3中隔野ニューロンの低酸素気相(10%)での培養において、著しいその生存維持活性を示すことを見いだしている。これらのことから、高酸素条件だけでなく、低酸素負荷でのニューロンの生存維持に関するbFGFの作用についても更に検討を進めている。

【謝辞】 抗MAP2抗体を戴きました阪大・蛋白研の新延、御子柴両先生、およびヒト組み替えbFGFを供与戴きました武田薬品㈱に深く感謝致します。

【文献】 (1)畠中寛、津久井弘子、西尾チカ、神経化学、28 (1989) 90-91. および Y.Kushima, H.Tsukui, C.Nishio, Y.Enokido and H.Hatanaka, submitted.
(2)H.Hatanaka, H.Tsukui, Dev. Brain Res., 30 (1986) 47-56.
(3)H.Hatanaka, H.Tsukui, I.Nihonmatsu, Dev. Brain Res., 39 (1988) 85-95.
(4)畠中寛、津久井弘子、実験医学、6 (1988) 1211-1217.
(5)H.Hatanaka, Brain Res., 222 (1981) 225-233.
(6)M.Niinode, N.Maeda, H.Ino, and K.Mikoshiba, J.Neurochem., 51 (1988) 1132-1139.
(7)Y.Enokido and H.Hatanaka, submitted.

126 成熟交感神経細胞のＮＧＦに依存しない生存: 細胞内Ca^{2+}の上昇と生存促進因子の放出の役割

小池 達郎, 田中 秀逸
(佐賀医大 ・化学)

〔要約〕
幼若な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から細胞内Ca^{2+}の上昇によって神経細胞死は阻止されることが判った。この結果をもとに交感神経節細胞の生存のNGF依存性と細胞内Ca^{2+}との関係についてCa^{2+}セットポイント仮説を提唱した。この仮説を当否を検証するために交感神経節細胞を培養し、そのNGF依存性の変化とfura-2標識した神経の細胞内Ca^{2+}濃度の測定を行った。神経細胞の成熟に伴い、細胞はNGFに依存せず生存し、同時に細胞内Ca^{2+}の上昇が起こった。又、成熟神経細胞の栄養因子非依存的生存は神経細胞によるautocrine factorの放出も伴っていることを見いだした。

幼若な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)に依存することが知られている。即ちNGFを除くと神経細胞死が起こる。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ると細胞内Ca^{2+}の上昇によって交感神経細胞の生存はNGFに非依存的即ち自律的に生存することが判った[1)]。この結果をもとに神経細胞の生存の神経栄養因子依存性と細胞内Ca^{2+}との関係についてCa^{2+}セットポイント仮説を提唱した[1)]。この仮説によれば幼若な神経細胞はその細胞内Ca^{2+}は低く、生存に神経栄養因子の存在を必要とするが、成熟した神経細胞は細胞内Ca^{2+}濃度が示適濃度のため神経栄養因子の助けなしに生存すると考えられる。実際、交感神経節細胞は培養後3-5週間でNGFの存在なしに生存することが知られている。そこで細胞内Ca^{2+}を測定することによりCa^{2+}セットポイント仮説の検証を行った[2)]。さらに成熟交感神経細胞のNGFに依存しない生存にはautocrine factorの分泌が関与している可能性を示した。

[実験方法]

上頸神経節細胞の培養[1)]：ラット新生児から上頸神経節を単離し、分散後、コラーゲンコートした48well plateにまき、10%牛胎児血清、50ng／ml NGFを含むMEM培地で培養した。Conditioned Mediumの実験は無血清培地（N2培地）を用いて行った。

細胞死のアッセイ法[1)]：NGFの除去実験は培地中に１%のマウスNGFに対する抗体を加え、NGFを中和することにより開始した。抗体添加後48時間後、培地中及び細胞内のアデニレートキナーゼ活性を測定した。このcytoplasmic enzymeは通常では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。又は、トリパンブルー染色によって生細胞数を数えた。

細胞内Ca^{2+}濃度の測定[2)]：交感神経細胞をfura-2でラベルした後、細胞内Ca^{2+}濃度をアルガス100画像解析装置により測定した。

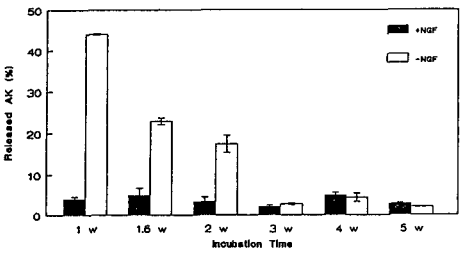


図1 培養交感神経細胞のNGF依存性
1-5週間培養後NGFを除き2日後
AK活性の放出を測定した。

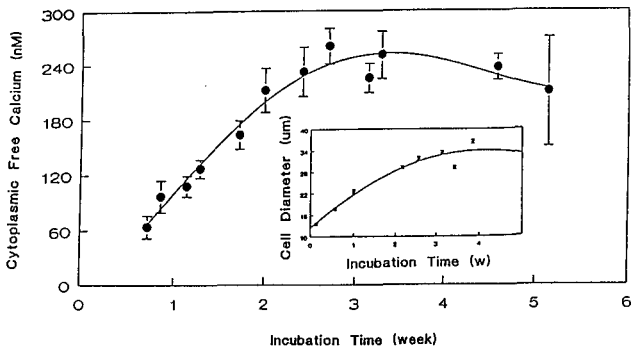


図2 細胞内Ca^{2+}濃度のin vitroでの
培養に伴う上昇。NGFを含む培地で培養した。
insertはcell sizeの増加を示す。

［結果及び考察］

交感神経節細胞を1-5週間培養後、培地液中からNGFを除去してアデニル酸キナーゼ(ＡＫ)活性の培地中への放出即ち細胞の生存がNGFに依存しているかどうかを調べると（図1）、3週でNGFに依存せず生存することが判った。それぞれの時期にfura-2でloadした神経細胞の細胞内Ca^{2+}濃度の測定を行った（図2）。その結果細胞内Ca^{2+}濃度は1週間培養後では93.0±10.5nMであったが、3週間後には241±7nMとなりプラトーに達した。この細胞内Ca^{2+}濃度は高K^+培地（35mM）で長期培養した交感神経細胞のそれ（247±14nM）と良く一致した。又、この細胞内Ca^{2+}濃度の上昇は図2に示すように交感神経細胞の成熟（cellular Hypertrophy）を伴っていることが判った。従って培養に伴う細胞内Ca^{2+}の上昇は細胞の生存のみならず、栄養効果をも制御している可能性を示唆すると考えられる。3週間培養した交感神経細胞はNGFなしに2週間まで生存したが、その間に細胞体の収縮が起こった。この変化は可逆的であり、NGFを加えるとhypertrophyが起こった。この系を利用して交感神経細胞におけるNGFの作用機構の研究が可能と思われる。

一方何故細胞内Ca^{2+}の上昇は神経細胞の生存は自律的になるのであろうか？まず考えられる可能性は上昇した細胞内Ca^{2+}によるautocrine factorの合成と放出である。図3に1週間又は3週間培養した交感神経細胞のconditioned mediumを作り、その効果を幼若な細胞を用いてassayした結果を示してある（図5に細胞の写真を載せた）。この結果から3週間培養した神経細胞はautocrine factorを分泌していることを示す。幼若な細胞は高K^+（35mM）処理をしても活性はなかった。図4にはconditioned mediumの希釈と活性との関係を示した。この交感神経生存因子（SNSF）は80° C10 minで失活し、トリプシン感受性であった。インターフェロン（特にｶﾞﾝﾏ）は交感神経節の細胞死の遅延を起こす事が知られているが、他のリンホカインは効果がない[3]。他の成長因子は現在の所効果はない（東京都老人研加治博士との共同研究による）。この因子の分子的性状について興味が持たれる。

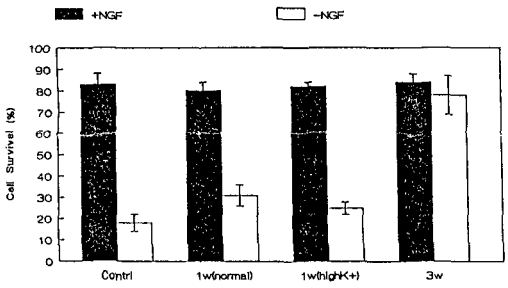


図3　Conditioned Mediumの幼若交感神経細胞の生存に対する効果

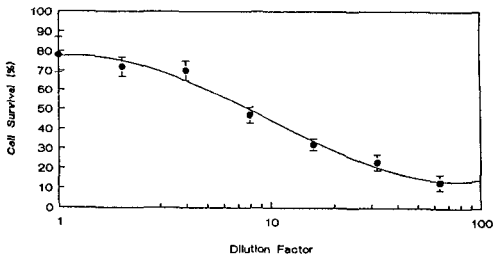


図4　3週間培養した交感神経細胞のconditioned Mediumの希釈効果

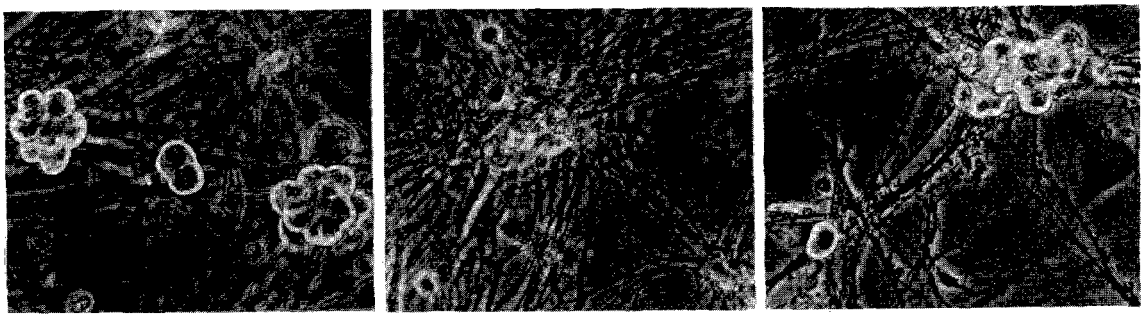


図5　位相差顕微鏡写真（A:+NGF、B:-NGF、C:-NGF+Conditioned Medium）

［参考文献］

1. T. Koike et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,86:6421-6425(1989)
2. T. Koike and S. Tanaka, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Neurobiology, TX, USA, April,1990; J. Cell.Biochem.14F,90.1990.
3. J.C. Chan et al., submitted for publication.

127

発生期における視神経線維成長の異常

中山　孝
（生理学研究所）

〔要約〕

孵卵６日目以降のニワトリ・エンブリオの眼を実験材料にもちい、網膜における視神経線維の伸展形態を蛍光色素ＤｉＩをトレーサーとして観察した。神経節細胞体はＤｉＩにより逆行性に染色されるが、固定した網膜中で視乳頭とは逆方向すなわち遠心性に軸索を伸展させている誤りが数多く見られた。この事は全ての視神経軸索が正確に視乳頭に向っているのではなく、多くの誤りが正常発生中に起こっていることを示している。

視神経回路を含めて、中枢神経の回路網形成がどのような機序で構築されるのかほとんど不明のままである。最近細胞間および細胞外マトリックス間との接着機構が、回路網形成のための軸索の成長に重要な役割を果す事実が多く示されるようになった。私達もニワトリ・エンブリオの視交叉において、膜糖蛋白質の軸索内輸送を阻害することによって異常が生じることを明らかにした[5]。ここでは網膜のなかにある時の視神経線維がどのような形態をとって伸展しているか、蛍光色素のＤｉＩで順行・逆行性に染色して調べた。ＤｉＩは組織を固定したあとでも神経細胞膜に溶け込み拡散する[1]。この特徴を利用した観察結果を述べたい。

〔方法〕

孵卵６日目以降のニワトリ・エンブリオから眼をとり出し網膜に切れ目を入れて、メンブレン・フィルター上に平坦になるように視神経線維層側を上向きにし広げる[4,6]。ＤｉＩは水に懸濁し超音波処理により細かく破砕した後風乾する。ＤｉＩの小さな結晶片を伸展した網膜の上にのせ、パラホルムアルデヒド・グルタルアルデヒドで固定するかまたは培養液を加えてCO_2インキュベーター中で培養した。トリプシン処理は０．２５％トリプシン液で室温１～２分網膜を処理した後、０．１％ダイズマメ・トリプシン・インヒビター液中で反応を停止した。

〔結果〕

ＤｉＩによる視神経のトレース

フィルター上に伸展した網膜にＤｉＩ結晶片をのせて培養し視神経を染色したとき、１時間に２～３００μｍの速さでＤｉＩが視神経軸索膜中を拡散していく。ほぼ一昼夜でＤｉＩが逆行性に拡散して神経節細胞体に、また順行性に拡散して成長円錐にまで達し蛍光顕微鏡による観察が可能となる。従来の鍍銀法等に比べてはるかに迅速であった。また固定した場合でも、生きた網膜の数倍の時間はかかるが同様の結果が得られた。

逆行する視神経軸索

図１に固定した網膜でのＤｉＩによる視神経線維の染色パターンを示した。ＤｉＩから左方向が正常な視乳頭への成長方向であるが、正常な軸索の中に逆行性で染められた神経節細胞体が見られる。明らかに遠心方向に伸長させた軸索を通じて細胞体がＤｉＩで染まったものであり、固定した時点すなわち正常発生時にこのような誤った投射があることを示している。最も多い場合、一つのＤｉＩ結晶で染まる全細胞体数の約１５％までがＤｉＩと視乳頭の間に存在していた。また最初から逆行するものだけでなく、途中でＵターンをする軸索も見られたが数は僅かであった（図２）。

トリプシン処理による影響

網膜をトリプシン処理することにより、細胞接着の機構が傷害を受けると考えられるが、その時視神経の成長形態にどのような影響が及ぼされるか調べた。トリプシン処理前に既に伸長していた視神経の形態には何の影響も見られないが、図３に示すように新たに成長してきた視神経は横への側枝を多く持ち、曲がったり軌道を外したような行動が見られた。また成長円錐も未処理のものと比べて鋭く尖っていた。

［考察］

ニワトリ・エンブリオの視神経では、正常発生をしている固体でも視交叉で同側の視蓋や対側の眼に向って誤った投射をすることが既に報告されている[2,3]。しかしその誤りは、今回報告する網膜中での誤った投射にくらべてごく僅かである。軸索成長の誘導を説明するために、成長促進因子や細胞接着の勾配が考えられている。しかし網膜の神経節細胞に多くの誤りが見られることは、逆行する軸索に対してこれらの勾配があったとしても有効に作用していないことを意味する。むしろトリプシン処理の結果から考えれば、細胞接着は成長する軸索に迷いのない最大の成長促進作用を及ぼしているだけに思える。従ってもし神経節細胞の細胞極性が誤って決定され軸索が伸びれば、網膜中の接着機構は逆行する軸索にも同じく作用するであろう。この誤った投射がずっと維持されるのかまたは消滅するのかは、孵卵がすすむと視神経線維の束が密になるためＤｉＩを使った方法では今のところ決定できない。

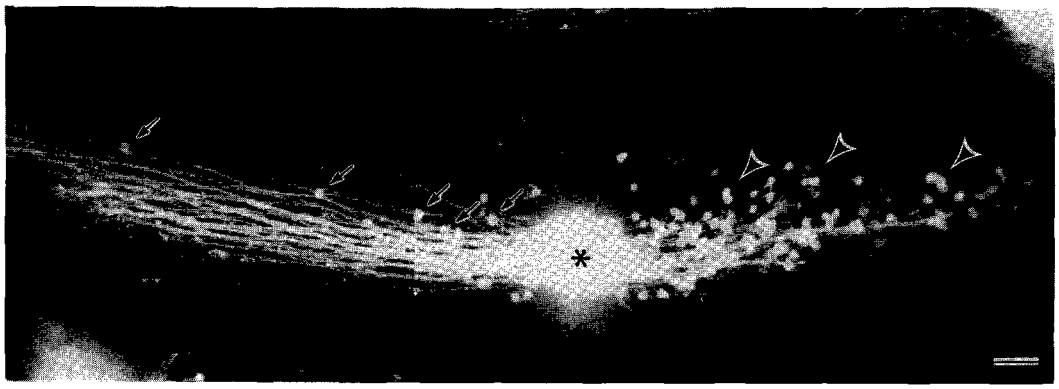


図１　固定した孵卵７日目の網膜のＤｉＩトレース像。軸索を逆方向に伸長させている神経節細胞（矢印）および正常なもの（矢尻）がＤｉＩ結晶片（＊）により逆行性に蛍光染色される。視乳頭は左方向。スケール　１００μｍ。

ＤｉＩ：1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine, Perchlorate

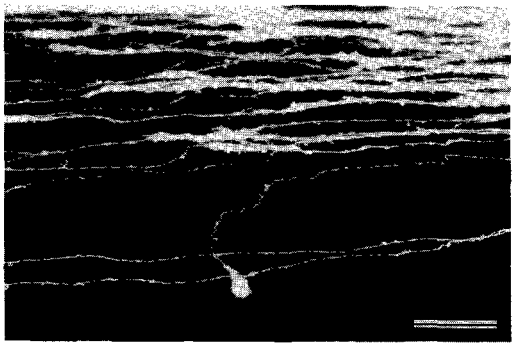


図２　図１と同じ条件。はじめは正常方向に伸長していた軸索が方向転換し逆行する。スケール　５０μｍ。

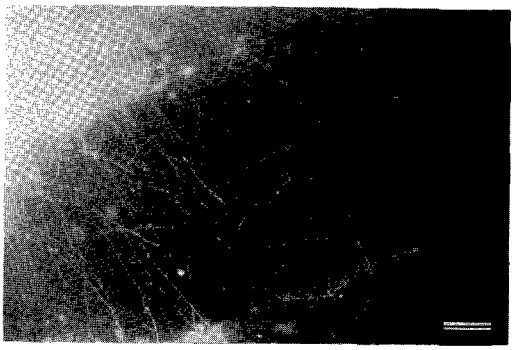


図３　網膜をトリプシン処理後ＤｉＩとともに培養し、新らしく伸長してくる軸索を観察。軸索が湾曲しまた側枝が多い。スケール　１００μｍ。

［文献］

(1) Godement, F. et al. (1987) Development 101, 697-713.

(2) Halfter, W. (1987) Dev. Biol. 119, 322-335.

(3) McLoon, S. C. and Lund, R. D. (1982) Exp. Brain Res. 45, 277-284.

(4) Nakayama, T. (1990) Dev. Brain Res. (in press)

(5) Nakayama, T. and Furuya, S. (1989) Exp. Brain Res. 76, 559-562.

(6) Nakayama, T., Sugiyama, H. and Furuya, S. (1989) Dev. Brain Res. 49, 145-149.

128 L1接着分子の突起伸展効果とCキナーゼの関与

伊藤康一、阿相皓晃*、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〕

われわれは神経突起の伸展に伴う細胞接着分子(L1 と NCAM)の効果とその機構におけるCキナーゼの関与について検討した。すなわち、L1分子溶液を塗布した培養皿で培養した神経細胞の突起伸展の程度は、対照とするポリリジン(PL)塗布のものよりおよそ250%伸長し、NCAM分子ではPL上と同等であることを確認した。次に培養液中にCキナーゼの活性化剤であるホルボールエステル(PMA) 100ng/mlを添加すると、L1分子上での突起の伸長が約70%抑制された。なお、PLおよびNCAM上での突起伸展には顕著な変化は認められなかった。これらの結果から細胞外に塗布したL1分子には神経突起の伸展を助長するなんらかの作用があり、この機構にCキナーゼが関与する傍証を得た。

［はじめに］

神経突起の伸展には、1)遺伝因子、2)成長因子（例えば NGF）、3)基質（例えばラミニン）との結合などの要素が相互的に関与することが知られている。一方、近年において細胞表面に局在する種々の分子が突起伸展を誘導することが報告され、突起伸展における細胞接着分子の役割が示唆された[4]。先にわれわれは、細胞接着分子に対するCキナーゼの作用について報告したが[2,3]、細胞内タンパク質のリン酸化に関するCキナーゼもこの伸展誘導の機構に関与していることが報告された[1]。本実験ではこれら２つの可能性を確認するため、細胞接着分子として知られる L1 および N-CAM分子を用い、これら分子の神経突起伸展効果と、それに伴うCキナーゼとの相互作用について検討したので報告する。

［材料と方法］

神経細胞の培養には、ICR 系の胎生15日目の胎児脳を使用した。胎児を断頭、しゃ血後、イーグル最少基本培地 (MEM)中で大脳皮質を取出し実体顕微鏡下で軟膜および血管類をできるだけきれいに取り除いた。取出した大脳皮質を適当な大きさに切り、ディスパーゼ II (0.4 mg/ml) で20分間消化させ、上清を捨てたのち DNase I (0.004%) を加え、パスツールピペットで 15-20回ピペッティングしたのち、 800 rpmで 5分間遠心し、そのペレットを 0.004% DNase I 液で洗浄した。最後に 10% FCS 加 MEMに細胞を浮遊させた。37℃の恒温槽で２時間振とうし、さらに37℃、5% CO_2インキュベーター内で overnight培養後、10% FCS 加MEM で洗浄したのち各種基質でコーティングした培養皿上に接種した。

PL (0.1 mg/ml)を各培養皿表面を覆うのに十分な量を加え、２－４時間放置後滅菌蒸留水で３回洗浄した。L1 と N-CAM分子のコーティングは、PL処理した培養皿に 1ug/ul 濃度で1-5ul スポットしたのち MEM(Ca, Mg 不含）で軽く洗浄した。

PMA はジメチルスルフォキシド (DMSO) で 0.1 mg/mlとなるように溶解し、使用時まで －20℃で保存した。PMA の添加濃度は 100ng/ml(162nM)になるように培養液で稀釈した。

細胞の形態変化は、位相差顕微鏡(Nikon) を使用して観察した。神経突起の長さの測定は位相差顕微鏡下で無作為に視野を選択し細胞を一定倍率で写真撮影した。それを画像解析処理装置 (COSMOZONE-98, Nikon)で計測した。

［結果］

PLをコントロール（100%）としたとき、L1分子上の神経細胞は約250%の突起の伸長が認められ、N-CAM 分子上における結果はほとんど対照と変らなかった（図１）。次に培養系に PMAを100ng/ml添加し18時間後に突起の長さを測定したところ、 L1 分子上の神経突起の伸展は約70%阻害されていることが判かった（図１）。

［考察］

本実験より、L1分子には神経突起を伸展させる効果のあることが認められた。しかし、同じ免疫グロブリンスーパーファミリーの N-CAM分子には、まったくこのような効果は認められなかったことから、この効果は L1 分子に特有なものであると考えられた。この系にＣキナーゼ活性化剤であるPMA を添加すると、L1分子上での突起伸展がPL上のものと同等にまで抑制されたことから、L1分子によって誘導された突起伸展にはＣキナーゼが関与していることが示唆された。すなわち、細胞接着分子と細胞内情報伝達系の間に何らかの相互作用があり、その変化により神経突起の伸展が誘導されると推察された。

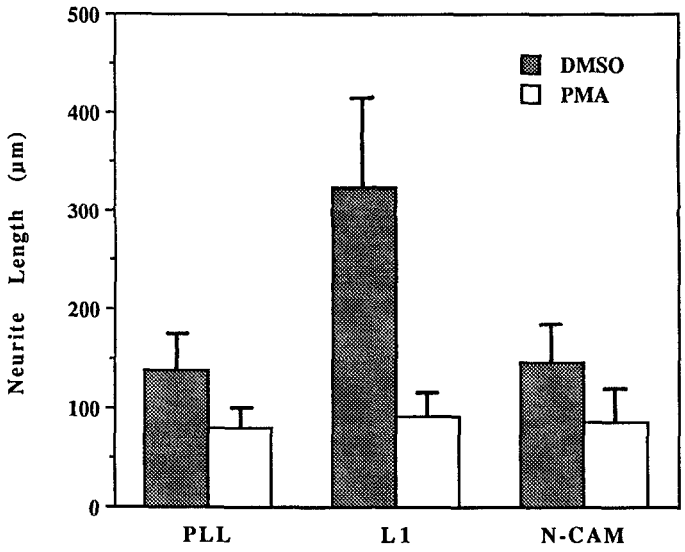


図１．ポリリジン、L1分子および N-CAM分子上における
神経突起長におよぼす PMAの効果
（PLL:ポリリジン）

［文献］

1) Bixby, J.L. (1989) Neuron 3, 287-297

2) Itoh, K. et al., (1989) Neuroscience Research, 6, 350-357

3) 伊藤康一他 (1989) 神経化学、28(1), 406-407

4) Seilheimer, B. and Schachner, M. (1988) J. Cell Biol., 107, 341-351

129 成熟ラット(8週齢)中枢ニューロンの培養

西尾チカ、九島洋一、畠中 寛
(大阪大学蛋白質研究所・蛋白質生合成部門)

〔要約〕 生後8週齢のラットを用い中隔野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、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、アセチルコリンエステラーゼ(AChE)染色による陽性細胞を数えることによって行った。その結果、NGFの生存維持効果は以前に報告した生後2週齢ラットからの培養中隔野コリナージックニューロンに対する生存維持作用に比べ低下していた。しかし、その効果は依然認められ、十分な神経繊維の再生を観察した。生後5週齢前後のラット中隔野コリナージックニューロンの培養でも、ほぼ同様の結果を得ている。これらの結果は、以前報告した我々の結果と合わせ考えると、培養下でNGF応答性は、シナプス形成開始期(E16～P3)ではChAT活性を促進し、シナプス形成終期(P10～P15)ではニューロンの生存維持作用を強く示し、その後young adult ratではNGFによる生存維持作用は低いレベルになるものと思われる。

前脳基底野大型コリナージックニューロンは、脳の老化に伴う疾患として近年社会問題化しているアルツハイマー型痴呆症と関連して注目されている。特に、NGFはこのニューロンに選択的に作用し、このニューロンの死の防止に役立っている可能性が指摘されている(1)。我々は、数年前よりラット脳より切り出した中隔野コリナージックニューロンが培養下でNGFに応答するが、その応答性は発達の段階によって異なる。即ち、幼若期のシナプス形成開始期（胎生と生後直後）ではNGFは、ChAT活性を強く促進し、コリナージック機能を高める(2)。一方、ニューロンの成熟期であるシナプス形成の後期（生後2週齢前後を我々は用いている）ではNGFはコリナージックニューロンの生存維持作用を示す(3)(7)。しかし、一昨年度の本学会において報告したように、生後の3週齢を越えると、培養は不可能となりNGF応答性を見ることが出来なかった(4)。今回、更に培養系を工夫し、8週齢に至るいわゆるyoung adult ratからの中隔野コリナージックニューロンの培養に成功し、NGF応答性を調べたので報告する。

【実験方法】

生後ラット脳からの中隔野ニューロンの培養は既報に従って培養した(3)(5)。用いたラットは、Wistar系ST(♂、♀)であり、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、細胞の破片を遠心で注意深く除き、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1cm^{2}のコースター社製または0.65cm^{2}の住友ベークライト社製、共にあらかじめアストログリア細

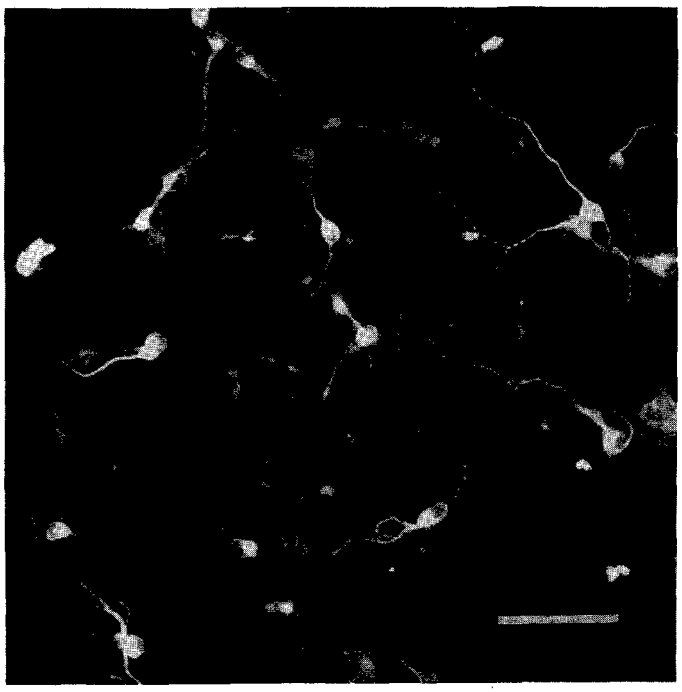


図1．培養ラット(P58)中隔野ニューロンのMAP2陽性細胞
生後ラット(P58)ニューロンを5日間培養の後、抗MAP2抗体(8)を用いた間接蛍光抗体法による染色を行った。
スケールは50μm。

表1。培養ラット(P16とP58)中隔野ニューロンの生存数におよぼすNGFの作用。
生後ラット(P16とP58)中隔野のパパイン分散後の生細胞数は、7.5×10^5および1.7×10^5cells/ratであった。細胞を0.5rat/cm^{2}でまき、NGF(100ng/ml)存在および非存在で5日間培養した後、AChEの活性およびMAP2の間接蛍光抗体による同時染色を行った。この表のP16は血清培地での培養、P58では無血清培養を行っている。別に行った2週齢前後のラット(P12)での無血清培養でAChE陽性細胞のNGF応答性が、血清存在下の培養結果とほとんど変わらないことを確認している。即ち、control; 67.3 ±10.6およびwith NGF; 221.9 ±36.7 AChE-positive cells/cm^{2}であった。

	P16 Septal Culture		P58 Septal Culture	
	MAP2-positive cells/cm^2	AChE-positive cells/cm^2	MAP2-positive cells/cm^2	AChE-positive cells/cm^2
control	5813 ± 1010	85.8 ± 3.0	2690 ± 301	20.0 ± 4.6
with NGF (100ng/ml)	5818 ± 772	210.0 ± 17.0	2505 ± 455	29.0 ± 11.5

胞で被膜している)にまいた。培地はラット血清を含む血清培地を用いた。培地は翌日交換し血清培地を用いるときは、1μMのcytosine arabinosideを加えた。また別に、無血清培地の培養も行った。NGF(100ng/ml)存在および非存在下で5日間培養した。

【結果と考察】

図1は、今回培養に成功した生後8週齢ラット(P58)脳の中隔野ニューロンのMAP2陽性細胞を示している。培養下に多数のニューロンを見ることができ、また、十分に長い神経繊維を伸ばしていることが観察された。表1にNGF存在および非存在下で、5日間培養したあと、生存MAP2陽性細胞の数を示した。P16での結果と比べ生存数が少し低下していた。NGFの存在はMAP2陽性細胞の生存数に対してはいずれにしても影響が見られなかった。このことは、P58ではパパイン消化後に得られる分散生細胞数がP16に比べかなり少ないことによるものと思われる。培養下のP58中隔野コリナージックニューロンはAChE活性染色で、長いコリナージック神経繊維を伸ばしていることが観察された。表1にAChE陽性細胞数の結果を示した。P16での結果と異なり、NGFの生存維持作用は大きく低下していることが観察された。しかし、NGF添加群の方がAChE陽性細胞の生存数で有意差はないものの約1.5倍と多く、NGF応答性は残っていたと思われる。また、コリナージック神経繊維の伸長はNGFにより高められていた。

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(1)。既に我々は、これらのニューロンの生存維持作用を生後2週齢前後のラットを用い検討し、神経栄養因子として、NGFおよびIL-6の役割を明らかにしてきた(6)(7)。本報告は、シナプス形成を終えしばらく経たコリナージックニューロンへの種々の神経栄養因子の持つ役割を明らかにする上で、ここで成功した成熟ラット中枢ニューロンの培養系はすぐれた系となると考えられ、今後NGF以外の種々の神経栄養因子の果たす役割を明らかに出来ると思われる。この点について、現在までの我々の予備的な実験によれば、NGF依存性の生存維持活性の低下は、繊維芽細胞増殖因子(bFGF)によって部分的に改善されることを見いだしている。

【謝辞】 抗MAP2抗体を供与して戴きました阪大・蛋白研の新延、御子柴両先生に感謝いたします。また、bFGFはヒト組み替え型で、武田薬品㈱より戴いたものです。

【文献】 (1)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)
(2)H.Hatanaka, H.Tsukui, Dev. Brain Res., 30 (1986) 47-56.
(3)H.Hatanaka, H.Tsukui, J.Nihonmatsu, Dev. Brain Res., 39 (1988) 85-95.
(4)畠中寛、久永欣哉、津久井弘子、西尾チカ、神経化学、27 (1988) 168-168.
(5)畠中寛、津久井弘子、実験医学、6 (1988) 1211-1217.
(6)T.Hama, M.Miyamoto, H.Tsukui, C.Nishio, H.Hatanaka, Neurosci.Lett., 104 (1989) 340-344.
(7)H.Hatanaka, C.Nishio, Y.Kushima and H.Tsukui, Neurosci.Res., in press.
(8)M.Niinobe, N.Maeda, H.Ino and K.Mikoshiba, J.Neurochem., 51 (1988) 1132-1139.

130 生後ラット培養中枢ニューロンとインターロイキン-6

九島 洋一、濱 登希子*、畠中 寛
（大阪大学蛋白質研究所・蛋白質生合成部門、*三菱化成生命研・脳神経科学）

【 要約 】

インターロイキンをはじめとする様々な細胞成長因子類が神経細胞に対しても作用することが明らかにされつつある。昨年度の本大会で我々はB細胞分化因子として知られているインターロイキン-6(IL-6)が、生後ラット中脳カテコラミナージックニューロンに対して生存維持作用を持つことを示した。今回、IL-6添加後の生後ラット中脳カテコラミナージックニューロンの生存数の時間的変化を調べた結果、IL-6の生存維持効果が現れるまでは時間がかかり、添加一日後ではカテコラミナージックニューロンの数は逆にIL-6添加群の方が低く、IL-6の作用は単純な生存維持作用だけではないことが示された。また、IL-6の生存維持作用は、これを添加する時期を遅らせるほど強くなった。また、IL-6の生存維持作用は複数の種類のニューロンに効果があると考えられるが、IL-6の作用を受けないニューロンもあると考えられた。これら生後カテコラミナージックニューロンの生存維持作用に対して、前回も一部報告したように、胎児からのカテコラミナージックニューロンに対しての分化促進作用は低いことが示された。

中枢神経系は多くの神経細胞の複雑な連絡網を形成することでその機能を発揮している。神経細胞は分化・成熟した後は一般に分裂することはない。従ってこの回路網を安定して維持するために幾重もの機構があることが考えられる。そのようなものの一つとして神経栄養因子が注目されている。それらのなかでも我々はIL-6に注目してその神経栄養因子活性について調べており、すでに生後ラットコリナージックニューロン及びカテコラミナージックニューロンに対するIL-6の生存維持作用について報告してきた(4),(6)。今回、生後ラット中脳カテコラミナージックニューロンに対するIL-6の作用をさらに詳しく検討した結果、この作用として単純な生存維持作用だけではなく、培養初期のIL-6の添加直後の作用として生後ラット中脳カテコラミナージックニューロンに対してcytotoxicityを有することが示されたので報告する。

【 実験方法 】

生後及び胎児ラット中枢ニューロンの培養はすでに報告されている方法に従って行った(1)。即ち、切り出した脳の組織を、生後のものからは酸素通気下のL-15培地中に集め、パパインにより消化した後アストログリア細胞の単層培養上またはポリエチレンイミンコート上に、5%準胎児牛血清／5%馬血清／1%ラット血清／89%DF(DME:F12=1:1)の培地を用いてまいた。無血清での培養は上記培地で3時間以上または一晩おいた後、TIP/DF培地に変更して培養した。培地交換は2または3日おきに行った。ヒト組み替え型IL-6(3)を添加して変化するカテコラミナージックニューロン及びトータルニューロンの生存数の測定は、

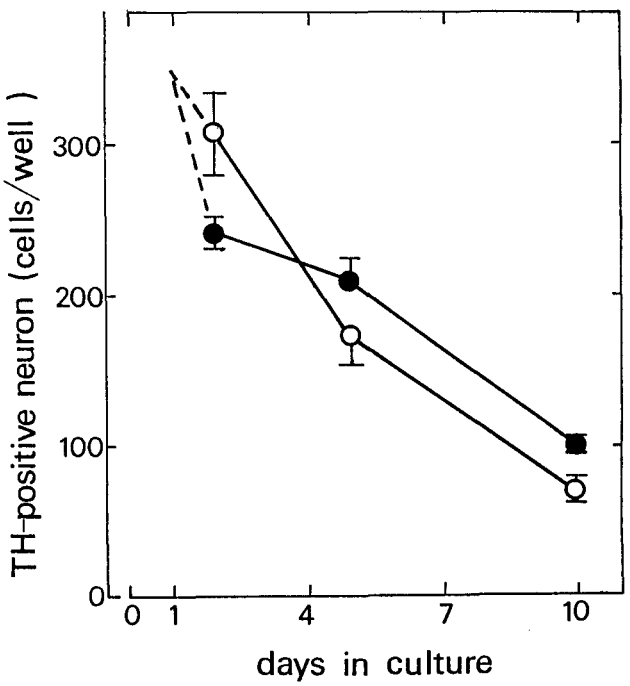


図1　生後ラット培養カテコラミナージックニューロンのIL-6添加後の生存数の時間的変化
生後15日目のラット中脳部分をアストログリア細胞上で培養し、培養1日目からIL-6を50ng/mlで添加した。IL-6非添加群を（－○－）で、IL-6添加群を（－●－）で表す。　値はmean±S.D.　n=4。

表1　IL-6の生後ラット培養カテコラミナージックニューロンへの生存維持効果に対する添加時期の影響

IL-6の添加時期		TH陽性細胞の生存数　(コントロールに対する%)		
		添加1日後	添加3〜6日後	添加7〜10日後
培養当日または翌日	−	100± 7.5	100±12.4	100± 9.0
	+	88± 6.0 (N=6)	105±12.7 (N=3)	127±12.6 (N=5)
培養4日目	−	100±10.4	100± 6.7	100±11.4
	+	97±20.4 (N=2)	115±41.4 (N=3)	160± 3.0 (N=1)

生後15日目のラット中脳部分の培養を、IL-6 (50ng/ml)存在、非存在下で行った。数字はコントロールに対する%を平均値±標準誤差でNは独立した実験回数を表す。各実験はn=4で行った。

抗チロシン水酸化酵素(TH)抗体(2)及び抗MAP2抗体(7)による免疫組織化学を行い、陽性細胞を数えることで行った。ドーパミン(DA)の取り込み活性はトリチウムラベルしたDAを用いて測定した。

【 結果と考察 】

昨年度の本大会で報告した通り、生後15日齢のラット中脳カテコラミナージックニューロンの生存に対するIL-6の効果を濃度を変えて調べたところ、培養一週間後ではIL-6の生存維持作用は濃度依存的であり、最大効果は50ng/mlでみられたが、100ng/mlでは生存維持作用は弱くなった。このことはIL-6がある条件ではcytotoxicityを有するのではないかと予想させた。そこで、その生存数の時間的変化を調べたところ、図1に示すように培養翌日にIL-6を添加した次の日では、IL-6添加群の方がカテコラミナージックニューロンの生存数は低かった。しかし一週間以上IL-6を添加し続けて培養したところ、コントロール群に比べてIL-6添加群の方がカテコラミナージックニューロンの減少が抑えられていた。この生存維持効果は表1に示すようにIL-6を添加するのを遅らせるほど強くなった。また、抗MAP2抗体を用いた免疫組織化学から、IL-6による生存維持作用は複数の種類の神経細胞に働くと考えられるが、IL-6の作用を受けない神経細胞もあると考えられた。

ところで胎児からの脳幹カテコラミナージックニューロンに対するIL-6の生存維持作用は5ng/mlで最大効果を示し、その効果も生後のものに対する効果より弱いようであった。この効果はアストログリア細胞のフィーダー層上でもポリエチレンイミンのコート上でも変わらなかった。また、胎児のTH陽性細胞あたりのDAの取り込み活性はIL-6によって大きく促進されることはなかった。このことから、IL-6は胎児期からのカテコラミナージックニューロンの分化を促進する作用は弱いと考えられる。

IL-6が神経細胞に直接作用する機構が存在することは、放射能ラベルしたIL-6の結合実験でニューロンが強く標識されたこと(6)、生後ラット中隔野コリナージックニューロンに対するIL-6の効果はアストログリア細胞の少ないような条件の方が強かったこと(4)、PC12細胞にIL-6レセプターが存在するという報告(5)などから充分考えられる。しかしIL-6はアストログリア細胞やマクロファージにも作用することが知られており、これらを介した作用もあることが考えられる。この点に関してはIL-6レセプターを含む研究が必要であろう。例えば、今回観察されたcytotoxityは損傷を受けた細胞をマクロファージまたはミクログリア細胞が貪食するのをIL-6が活性化したことによるのかも知れない。また、脳内でのIL-6の生産細胞として、IL-1やM-CSFなどの刺激を受けたアストログリア細胞及びミクログリア細胞が想定されている。さらに損傷時に脳血液関門が破壊されることもある。これらのことと今回の結果から、IL-6は脳内での神経細胞の損傷修復及び損傷に関して重要な働きをしていると考えられる。

【 文献 】

(1)Hatanaka, H., et al., Neurosci. Res., in press
(2)Hatanaka, H. and Arimatsu, Y., Neurosci. Res., 1, 253-263 (1984)
(3)Hirano, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 5490-5494 (1985)
(4)Hama, T., et al., Neurosci. Lett., 104, 340-344 (1989)
(5)Satoh, T., et al., Mol. Cell. Biol., 8, 3546-3549 (1988)
(6)滋登希子、他、神経化学、28, 90-91 (1989)
(7)Niinobe, M., et al., J. Neurochem., 51, 1132-1139 (1988)

【 謝辞 】

この研究を行うにあたり、IL-6を快く御提供下さいました平野俊夫先生（阪大バイオメディカル研究センター）、岸本忠三先生（阪大細胞工学センター）に深く感謝します。また、抗MAP2抗体をお分け下さいました新延道夫先生、御子柴克彦先生（阪大蛋白研・機能制御部門）に深く感謝します。

131 ヒト14-3-3蛋白質（η鎖）の cDNA 単離と構造決定

市村 由香[1]、森井 研[1]、荒木 一明[2]、市村 徹[3]、礒辺 俊明[4]、高橋 康夫[2]、桑野 良三[1]

（新潟大 [1]遺伝子実験施設，[2]脳研究所，[3]大学院自然科学研究科，[4]都立大 理学部）

〔要約〕

14-3-3蛋白質を免疫ブロット法を用いてヒト脳に検出した。ヒト脳cDNAライブラリーをウシ14-3-3η鎖のcDNAでスクリーニングし、陽性cDNAプラークを選別した。塩基配列を決定したところ全長で1730bpで、191bpの5'非翻訳領域、738bpの翻訳領域、801bpの3'非翻訳領域から構成されていた。この配列から予想されるヒト14-3-3η鎖のアミノ酸残基数は 246で、分子量は 28,196であった。塩基配列、アミノ酸配列ともにウシ14-3-3η鎖と高い相同性（各々85%，99%）を示し、また特にチロシン／トリプトファン水酸化酵素の活性化領域や、蛋白質キナーゼCの阻害領域と推定されている構造も共通に認められた。これらの結果より、14-3-3蛋白質の推定されている機能はヒトの場合においても保存されているものと推察した。

（はじめに）

14-3-3蛋白質（以下14-3-3）は、脳可溶性蛋白質の約１%を占める酸性蛋白質であり、構造の類似した７種類の分子種（α-η鎖）を含む一群の蛋白質ファミリーを形成している[1]。本蛋白質はモノアミン生合成系の律速段階酵素であるチロシン及びトリプトファン水酸化酵素を、CaM／キナーゼIIのリン酸化反応に依存して活性する能力を持ち、ゆえに、脳のモノアミンレベルを制御する調節因子として働いていると考えられている[1-3]。一方最近、14-3-3η鎖のアミノ酸配列[3]がキナーゼCの阻害因子のアミノ酸配列と75%以上の相同性を示す[4]ことから、本蛋白質の持つ別の生物活性も示唆されてきている。これまでの研究によりウシ14-3-3β，γ，η鎖の構造とそれらの組織特異的発現が明らかになってきている[5,6]が、ヒトを含む他種動物脳における14-3-3の構造やその遺伝子構造、また各種ヒト神経疾患との関わりについては未だ明らかにはなっていない。本研究ではヒト14-3-3η鎖の cDNA クローニングを行ない、その全構造を決定したので報告する。

（実験方法）

1．抗血清の調製と Western blot 解析：抗血清はウシ14-3-3のゲルバンドを切り出しウサギに投与して調製した。Western blot 解析は、真鍋らの方法[7]に従った。

2．cDNA クローンの調製と塩基配列決定：ヒト脳から poly(A)$^+$RNA を調製し、Gubler and Hoffman 法により cDNA を合成した。この cDNA をλgt10 の EcoRI site に挿入しライブラリーを作成した。プラークハイブリダイゼーションは、ウシ14-3-3η鎖 cDNA のほぼ全長にあたる1464bpと、翻訳領域の上流にあたる188bpの２種類のcDNA をプローブに用いて行った。塩基配列の決定は、dideoxy 法、Maxam and Gilbert 法を用いて行った。

3．Northern blot 解析： ヒト脳から抽出した total RNA を電気泳動し、ニトロセルロース膜にブロットした。その後今回得られたヒト14-3-3η鎖 cDNA の翻訳領域422bpと、3'非翻訳領域369bpの２種類をプローブにしてハイブリダイズさせた。プローブの cDNA 断片はランダムプライマーで^{32}P標識した。

（結果と考察）

1．Western blot 分析によるヒト14-3-3の検出：図１はウシ14-3-3で調製した抗血清を用いて、ヒト脳抽出液中の14-3-3の検出を試みた Western blot 分析の結果である。調製した抗血清はウシ14-3-3に高い親和性を示し（ドット分析によると 8pg 14-3-3 蛋白質／mm^2 まで検出可能であった）、またそれはウシ脳蛋白質中、14-3-3とのみ特異的に反応した（図１ lane 1）。さらにヒト脳抽出液を用いて同様に行った分析の結果、ヒト脳においてもウシ脳中の同一分子量（27kDa）のポリペプチドのみが本抗体と交差性を示すことがわかった。（図１ lane 2）。この結果より、ヒトとウシの14-3-3は size 及び免疫化学的な諸性質が似通っているものと推察した。

2．ヒト14-3-3η鎖の cDNA クローニングとウシ14-3-3η鎖との構造比較：ヒト λgt10 cDNA ライブラリーを実験方法に記した手順でスクリーニングし陽性プラークを選別した。これを PUC118 に挿入してサブクローニングを行い、５種類のクローン（図２，SC1-SC5）を分離、配列決定を行った（図２）。決定した配列は全長で 1730bpであり、G，C含量の高い（79.6%）191bpの5'非翻訳領域、738bpの翻訳領域、801bpの3'非翻訳領域から構成されていた。3'非翻訳領域中には３か所の poly(A) 付加シグナルが存在したが、poly(A) tailは認められなかった。RNA ブロット分析により、ヒト14-3-3η鎖 mRNA の size は約1900塩基と推察されたので、ウシ14-3-3η鎖 mRNA （poly（A）部分を除いて1696塩基）との比較により、決定した配列はほぼ全長を含んでいると考えられた（図３）。この塩基配列から推定されたヒト14-3-3η鎖のアミノ酸残基数は 246で分子量は 28,196であった。ウシ14-3-3との相同性は塩基配列で 71%（5'非翻訳領域）、90%（翻訳領域）、84%（3'非翻訳領域）であった。またアミノ酸配列では、２か所のアミノ酸変異（Ala^{102}→Ser^{102},His^{164}→Gln^{164}）を認めるものの、全体では99.2%が一致していた。また、この配列中にはチロシン及びトリプトファン水酸化酵素活性化領域[3]、蛋白質キナーゼC阻害領域[4]と推定されている構造や、

cAMP 或は Ca^{2+}依存性のリン酸化配列も共通に認められた。これらの結果は上記 Western blot 分析での観察を支持するものであり、14-3-3の構造、またその推定されている機能はヒトの場合でもよく保存されているものと結論した。今後この cDNA を用いてヒト腫瘍細胞での14-3-3の発現も解析する予定である。

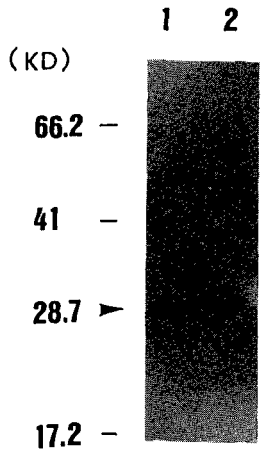


図 1. Western blot 分析
lane 1. ウシ脳 (20 ug)
lane 2. ヒト脳 (20 ug)

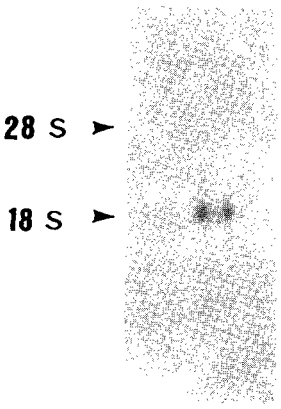


図 3. Northern blot 分析
ヒト脳 (8 ug)

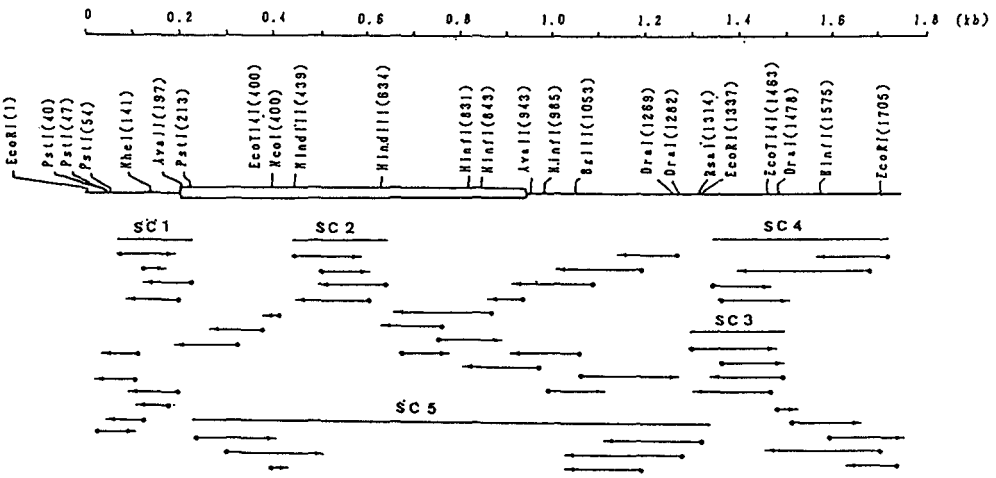


図 2. ヒト14-3-3 cDNA の制限酵素地図とシークエンスの方法

(文献)
1. 磯辺 俊明, 市村 徹, 奥山 典生 (1990) 蛋白質 核酸 酵素 35, 597-611.
2. Ichimura,T., Isobe,T., Okuyama,T.,Yamauchi,T. & Fujisawa,H. (1987) FEBS Lett. 219, 79-82.
3. Ichimura,T., Isobe,T., Okuyama,T.,Takahashi,N.,Araki,K.,Kuwano,R. & Takahashi,Y. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7084-7088.
4. Aitken,A., Ellis,C.A., Harris,A., Sellers,L.A. & Toker,A. (1990) Nature 344, 594.
5. 市村 徹, 磯辺 俊明, 奥山 典生, 荒木 一明, 桑野 良三, 高橋 康夫 (1989) 神経化学, 28, 324-325.
6. Isobe,T., Ichimura,T., Okuyama,T., Takahashi,N., Kuwano,R. & Takahashi,Y. J. Mol. Biol. submit.
7. Manabe,T., Takahashi,Y. & Okuyama,T. (1984) Anal.Biochem. 143, 39-45.

132 ラット14-3-3蛋白η鎖のcDNAクローニング及び in situ hybridization法による中枢神経系における発現解析

渡辺雅彦、近藤尚武、磯辺俊明*、奥山典生*、市村徹*、桑野良三**、高橋康夫**
（東北大・医・解剖，都立大・理・化学*，新潟大・脳研・神経薬理**）

〔要約〕

14-3-3蛋白はモノアミン生合成活性化因子として知られているが、神経系における本蛋白の遺伝子発現を解析する目的で、ラット脳cDNAライブラリーから14-3-3蛋白η鎖のcDNAを単離し、これをプローブとして14-3-3蛋白η鎖のmRNAの発現を in situ hybridization法により解析した。その結果、ラット14-3-3蛋白η鎖のアミノ酸配列はウシのそれと完全に一致していた。さらにラット14-3-3蛋白η鎖の発現は、青斑核や縫線核等のモノアミン合成ニューロンに認められたが、、他の非モノアミン性ニューロンにより強い発現が観察された。以上の所見から、14-3-3蛋白の生理的機能はモノアミン生合成の活性化だけではなく、神経細胞の活動に必須でかつ共通した何らかの細胞機能に深く関わっていることが示唆された。

カテコールアミンやセロトニン生合成の調節において、その合成系の律速段階酵素であるチロシン及びトリプトファン水酸化酵素（以下、TH,TRH）の制御が重要な役割を果たしている。中でも、リン酸化反応による短期及び長期的なこれら酵素活性の制御機構として広く注目されているが、Ca^{2+}/ カルモジュリン依存性キナーゼII（以下、Ca^{2+}/CaM-PKII ）による本酵素の活性化には、別の蛋白因子が必要でありこれが14-3-3蛋白であることが近年明らかにされた[1),2)]。14-3-3は脳に最も高濃度に存在し全可溶蛋白の約１％を占める主要な蛋白の一つに数えられ、７種のサブタイプからなることが知られている[3),4)]。脳に多量に存在する事実に加え、カテコールアミンやセロトニンを発現しない他の多くの組織にも14-3-3の存在が報告されていることから、本蛋白の機能が Ca^{2+}/CaM-PKII 依存性のTH,TRHの活性化だけではなく、他の生理的役割を果たしていることが予想される。本研究では、詳細な中枢神経内発現分布の解析に適するラットに注目し、ラット脳cDNAライブラリーより14-3-3蛋白η鎖のcDNAを単離し、この構造を決定した。さらに、単離したcDNAをプローブとして in situ hybridization法により、中枢神経系における本遺伝子発現をモノアミンニューロンとの関連性に注目して解析を行なった。

＜実験方法＞ cDNA クローンの調製と塩基配列決定：ラット脳cDNAライブラリーより、ウシ14-3-3蛋白η鎖cDNAの翻訳領域[4)]をプローブにしてスクリーニングを行い、陽性クローンを分離した。塩基配列はSangerの方法[5)]に従った。ノザンブロット解析：グアニジウム／塩化セシウム法により得られたtotal RNA 20μg を1.5%アガロース／ホルムアルデヒドゲルで泳動後、ラット14-3-3蛋白η鎖cDNAの3'非翻訳領域をプローブにして反応を行なった。 in situ hybridization：ラット脳及び脊髄の凍結切片上で、^{35}S 標識の3'非翻訳領域cDNAをプローブにして反応を行い、エマルジョンオートラジオグラフィー法により検出した。

＜結果と考察＞

ラット14-3-3蛋白η鎖のcDNAは、 246個のアミノ酸をコードする1.7kb 長のcDNAであり（図１）そのアミノ酸配列はウシのそれと完全に一致し翻訳領域の塩基配列においても90％の高い相同性を示した。

ノザンブロット分析では、脳において 1.8kbのRNA に単一のバンドとして強い反応が認められたことから、脳での高濃度の発現を確認するとともに、今回用いた3'非翻訳領域のプローブがη鎖に特異的であることを示した（図２）。一方、肝臓のRNA に対しては何ら反応は認められなかった。

14-3-3蛋白η鎖の遺伝子発現は、カテコールアミン合成ニューロンである嗅球の傍糸球体細胞や黒質、青斑核およびセロトニン合成ニューロンである縫線核に明らかに認められた（図３）。しかし、より強い発現が、嗅球の僧帽細胞や、海馬、小脳プルキンエ細胞などの大型の非モノア

ミンニューロンに観察された。さらに種々の程度の発現強度を含めると、中枢神経系に存在する大部分の神経細胞が本遺伝子を発現していることが明らかとなった。一方、グリア細胞には本遺伝子の発現は観察されなかった。

以上の所見から、14-3-3蛋白η鎖は中枢神経系では神経細胞に特異的かつ広範に発現していることが明らかとなった。これは、14-3-3蛋白の機能が、 Ca^{2+}/CaM-PKII 依存性のTH,TRHの活性化といった特定のニューロンに限られた機能の調節にとどまらず、神経細胞に基本的で必須な機能の制御に関わっていることを示唆するものと考えられる。さらに、cDNAの非翻訳領域が、その他の14-3-3蛋白のサブタイプも含めた発現解析に有用であることを示した。

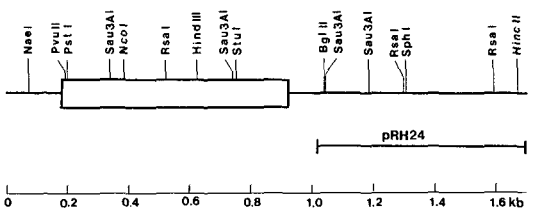


図1　ラット14-3-3蛋白η鎖cDNAの制限酵素地図。

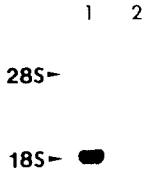


図2　ノザンブロット解析。
lane 1：脳、lane 2：肝臓

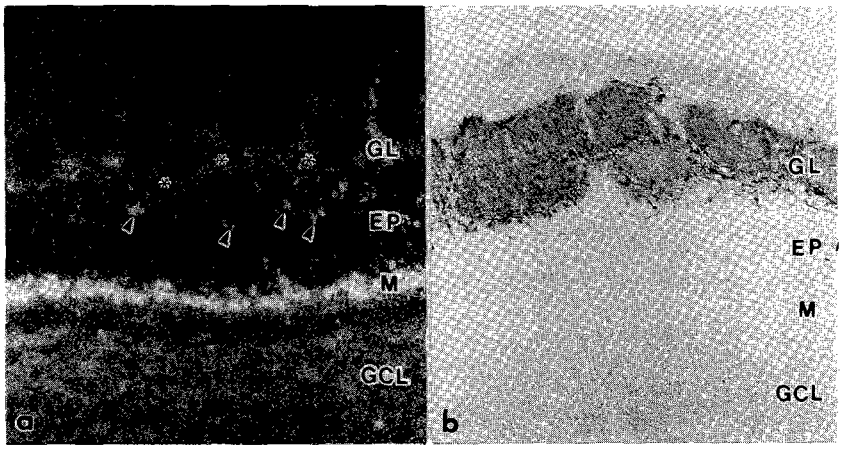


図3　ラット嗅球における14-3-3蛋白η鎖の遺伝子発現（a）とチロシン水酸化酵素の免疫組織化学（b）。14-3-3蛋白η鎖の発現は、僧帽細胞（M）に最も強く、次いで房飾細胞（矢頭）にも強く観察される。これに対し、チロシン水酸化酵素陽性を示す傍糸球体細胞（星印）には、14-3-3蛋白η鎖の弱い発現しか認められない。EP: 外網状層、GCL:顆粒細胞層、GL: 糸球体層。

＜文献＞

1) Yamauchi, T., Nakata, J., & Fujisawa, H. (1981) J. Biol. Chem. 256, 5404-5409
2) Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama,T., Yamauchi, T., & Fujusawa, H. (1987) FEBS Lett. 219, 79-82
3) Boston, P.F., Jackson, P., Kynoch, P.A.M., & Thompson, R.J. (1982) J. Neurochem. 38 1466-1474
4) Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Takahashi, N., Araki, K., Kuwano, R., & Takahashi, Y. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7084-7088
5) Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 -5467

133 ウシ脳由来 Myelin Peptide Amide の分離と同定

高松　研、植村慶一、立元一彦*
（慶応大・生理、スタンフォード大・精神*）

〔要約〕
ウシ脳組織酢酸抽出液中のC末端アミド化ペプチドについて、タンパク分解酵素処理により遊離されるアミノ酸アミドを指標としてスクリーニングを行ったところ、HPLCの挙動上新規と思われるC末端チロシンアミド及びアラニンアミドを有するペプチドを見いだした。分離精製後、構造決定を行ったところ、これらはいずれもミエリン塩基性タンパク(MBP)のN末端断片がアミド化された構造を有していた。このことから、Myelin Peptide Amide (MPA) と命名した。MPAは何れもMBPより生成されると考えられるが、MBPの構造より推定されるMPA前駆体は、従来知られているアミド化酵素の作用を受けなかった。一方、活性水酸基処理によって MPA前駆体のモデル基質のアミド化が認められることから、生体内でのMPAの生成に活性酸素が関与している可能性が示唆された。

生体内生理活性ペプチドの多くはC末端アミド構造を有することが知られている(1)。そこで、ウシ脳に含まれるC末端アミド構造を有する分子量1000～3000のペプチドで100 pmole/kg以上の濃度で存在するものについて、スクリーニングを試み、HPLCの挙動上新しい２種類のアミド化ペプチドを見いだした。そこでこれらについて、分離精製を行い、構造決定を行った。

〔実験方法〕

１．ウシ脳ペプチド分画の調整；約50kgのウシ脳を100° Cで15分間加熱処理した。その後、0.5M酢酸にてペプチドの抽出を行い、Alginic Acidで吸着させた後0.2M塩酸で溶出した。溶出分画をSephadex G25にかけ、分子量約1000～3000の分画を得、粗ペプチド分画とした。　２．HPLC；逆層分配型カラムを用い、0.1% TFA及び5mM Sodium Phosphate pH6.5を溶媒とし、アセトニトリルの濃度勾配で溶出した。　３．C末端アミドの同定；標品をタンパク分解酵素処理した後、ダンシル化した。ダンシルアミノ酸アミドをアルカリ条件下で酢酸エチル層に分配し、TLC プレート上で展開して、アミノ酸アミドを同定した(2)。　４．アミノ酸組成は5.7N HCL, 110℃ で20時間加水分解を行い、アミノ酸自動分析機で行った。　５．アミノ酸配列の決定には、Applied Biosystems A470 を用いた。　６．分子量の測定は、日本電子 JMS-AX505H を用いた。

〔結果及び考察〕

１．MPA の精製；　粗ペプチド分画をMCIgel 10Uカラムにて0.1% TFA、アセトニトリルの濃度勾配にて溶出した各分画について、C末端アミドの分析を行った。いくつかの分画に於てアミドの存在が確認されたが、Fig.1-a に示した如く、２つの分画に於て既知のペプチドとは溶出位置の異なるアミドの存在が確認された。そこでこれらのペプチドについて精製を行い(Fig.1-b～e)、単一精製標品を得た。

２．構造決定；　これら精製標品について、アミノ酸組成分析を行ったところ、チロシンアミドのペプチドは12残基、アラニンアミドのペプチドは16残基のアミノ酸からなり、お互いに類似していた。N末端よりアミノ酸配列の決定を試みたが、PTH アミノ酸は同定されず、いずれもブロックしているものと思われた。そこでリシルエンドペプチダーゼ、トリプシン、サーモライシンを用いて限定分解を行い、各断片についてアミノ酸配列の決定を行った。一方、サーモライシン消化によりアセチルアラニンと溶出位置を同じくするピークが認められ、またブロックしていたトリプシン断片のアシルアミノ酸遊離酵素処理により同様のピークが認められた。これら結果から、Fig.2 に示した構造が推定された。これら精製ペプチドについて質量分析を行ったところ、チロシンアミドのペプチドは1459、アラニンアミドのペプチド

は1802であり、Fig.2 に示した構造から計算された値と一致した。これらペプチドの構造はミエリン塩基性タンパクのN末端断片に一致していたことから、これらをMyelin Peptide Amide (MPA)-12, -16と命名した。

3．MPA 生成機構； これまで知られている生体内でのペプチドのアミド化は、アミド化酵素により触媒されるものであり、アミド化を受ける次のアミノ酸残基がグリシンであるという構造上の特徴を持っている(3,4)。しかし、MPAの場合には、これらが MBPより生成されるとするとアミド化を受ける次のアミノ酸残基はロイシンあるいはセリンとなる。実際、合成基質として Ser-Lys-Tyr-Leu, Ala-Ser-Ala-Serを用いた場合、ウシ下垂体より粗精製した酵素標品(5)はアミド化反応を示さなかった。一方、 in vitro の系では、活性水酸基によると思われるアミド化反応が報告されている(6)。 そこで、フェントン反応を利用した活性水酸基を上記合成基質と反応させたところ、アミノ酸アミドの生成が認められた。このことは、生体内で MPAの生成に活性酸素が関与している可能性を示唆するが、未知の酵素の存在を否定するものではなく、今後の検討を必要としている。

4．MPA の生理的意義； 現在のところ全く不明であるが、ブタ脳においても同様のペプチドの存在が認められており、動物種を問わず広く存在するものと思われる。

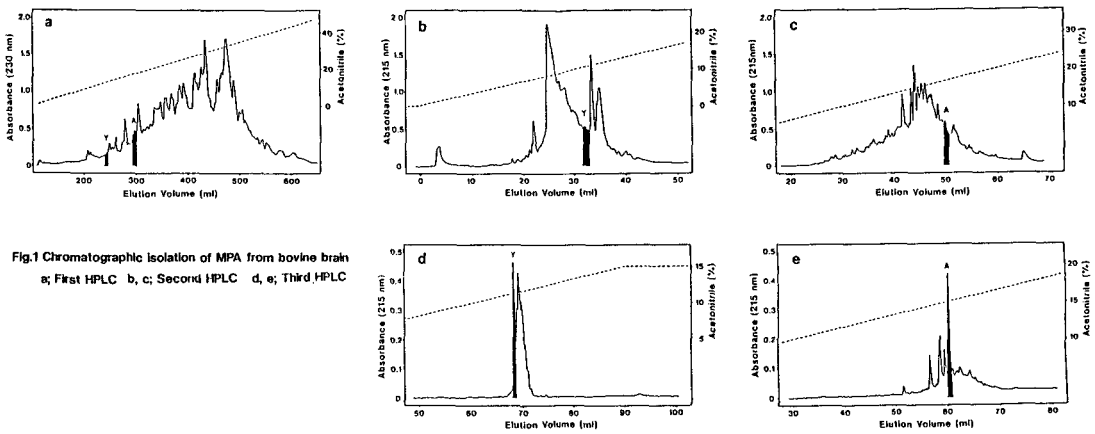


Fig.1 Chromatographic isolation of MPA from bovine brain
a; First HPLC b, c; Second HPLC d, e; Third HPLC

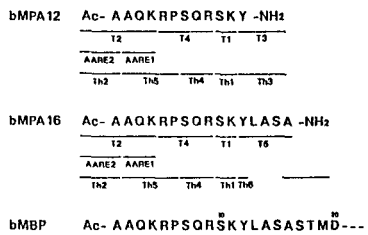


Fig. 2 Complete amino acid sequence of bMPAs

〔文献〕

1. Narita, K. et al, in Protein Sequence Determination (ed. Needleman, S.B.), Springer, pp30-130 (1975)
2. Tatemoto, K. and Mutt, V., Proc. natl. acad. sci. U.S.A., 75, 4115-4119 (1981)
3. Nakanishi, S. et al, Nature, 278, 423-427 (1979)
4. Bradbury, A.F. et al, Nature, 298, 686-688 (1982)
5. Kizer, J.S. et al, Proc. natl. acad. sci. U.S.A., 81, 3228-3232 (1984)
6. Bateman, R.C. et al, J. Biol. Chem., 260, 9088-9091 (1985)

134 脳に存在する１４ｋＤａ蛋白質の組織分布と成長分化に伴う含量変化について

岡橋育子 柴山敏子 小俣久美子 中条茂男 中谷一泰
中村泰治 （昭和大・薬・生物化学）

〔要約〕

当教室で見い出した脳に局在する酸性の１４ｋＤａ蛋白質についてその存在部位を検索し加齢に伴う含量変化を観察した。本蛋白質は、細胞分画では、核には無く、サイトゾール分画に多くシナプトソーム分画ミクロソーム分画にも存在した。また他の臓器にも僅かに存在するが脳での含量が著しく高い事が明かとなった。ラット成長分化の過程での変化を見ると本蛋白質は胎児脳には微量にしか存在せず生後の授乳期に著しく増加した。また胎生期、授乳期には同じ抗原決定基を持つと思われる５５ｋＤａ蛋白質が存在し生後の授乳期に減少し成熟ラットでは完全に消失した。

〔目的〕

我々は、脳のサイトゾール分画から熱処理を含む精製法で新しい酸性蛋白質を単離しアミノ酸の一次構造やその化学的性質を明らかにし（１）（２）更にｃＤＮＡクローニングを行った事を既に報告した（３）が、今回は本蛋白質の機能を推察するために、その存在部位を詳細に検索すると共に加齢に伴う含量変化をラット脳を用いて観察した。

〔方法〕

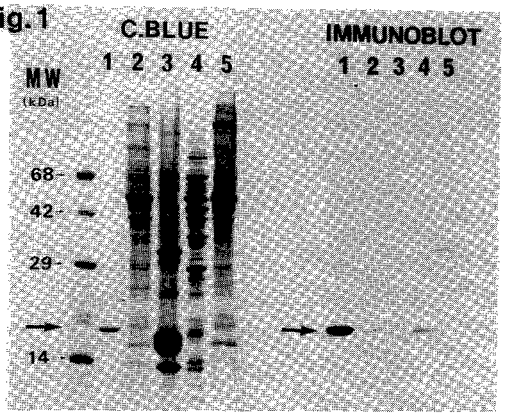
牛脳より単離した１４ｋＤａ蛋白質に対する抗体をアフィニティー精製した。この抗体は、ラット脳に存在する１４ｋＤａ蛋白質とも反応したのでラットの各組織や脳各部位のホモジネートの１６０００×ｇ上清、及び細胞各分画調製しイムノブロットを行った。二次抗体には、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギーＩｇＧ抗体を反応させＢＣＩＰ／ＮＢＴで発色後デンシトメーターにより定量した。検出限界は０．５ｎｇであった。組織分布及び成長分化に伴う含量変化は組織のホモジネートの１６０００×ｇ、１０分遠心上清を用いて実験した。

〔結果〕

アフィニティー精製した抗体は熱処理の有無に関わらず特異的に脳ホモジネート中の１４ｋＤａ蛋白質とのみ反応した。従って１４ｋＤａ蛋白質は、高分子蛋白質からの分解物でないと思われる。また本蛋白質の含量は、脳の全蛋白質の　０．０５％であった。その６０％は、１６０００×ｇ、１０分遠心上清に存在していた。脳組織に於ける１４ｋＤａ蛋白質の細胞内分布を調べると、核には存在せず大部分がサイトゾール分画に存在するが、P_2分画、ミクロソーム分画にも僅かに存在することが分かった（Ｆｉｇ．１）。　更にP_2分画よりシナプトソーム膜分画を分離したところ、本蛋白質はこの分画に明らかに存在した。ラット各組織分布では調べた８つの組織全てに存在していたが、脳での含量が他の臓器と比べ著しく高かった（Ｆｉｇ．２－Ａ、Ｂ）。また脳の大脳皮質、髄質、間脳、中脳、橋、延髄、小脳、について調べたところ全ての部位に同程度存在していた。脳の成長分化に伴う含量変化について調べてみると、１４ｋＤａ蛋白質は胎児脳には殆ど存在せず生後の授乳期に合成が活発になる事が分かった。成熟ラット脳に於ける含量の７５％が生後１４日目には存在していた。また胎生期、授乳期には同じ抗原決定基を持つと思われる５５ｋＤａの蛋白質が存在し、生後の授乳期に除じょに減少し成熟ラットでは完全に消失する事が判った（Ｆｉｇ．３－Ａ、Ｂ）。　現在小脳凍結切片を蛍光抗体法により染色し染色部位について研究中である。

〔文献〕（１）Ｎａｋａｊｏ，Ｓ．，ｅｔ　ａｌ．，（１９９０）Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．ｉｎ　ｐｒｅｓｓ
（２）中村泰治ら　（１９８８）神経化学　２７，　８４
（３）田中篤孝ら　（１９８９）神経化学　２８，　４４０

Fig.1



１４ｋＤａ蛋白質の細胞内分布

１：１４ｋＤａ蛋白質

２：P_2分画

３：核分画

４：サイトゾール分画

５：ミクロソーム分画

Fig.2-A

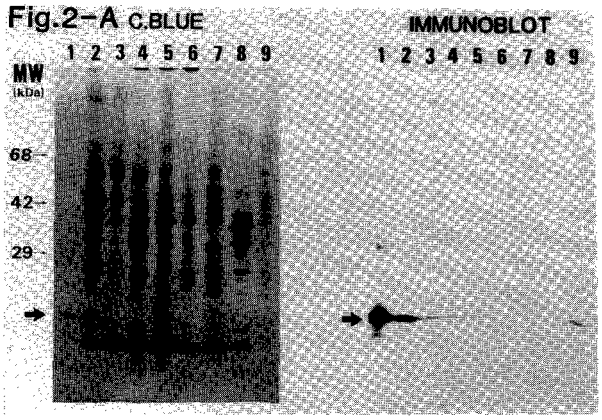
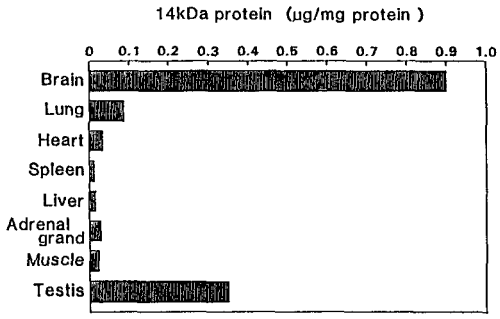


Fig.2-B



１４ｋＤａ蛋白質の組織分布：電気泳動及びイムノブロットのパターン（Ａ）と各組織の存在量（Ｂ）

１：１４ｋＤａ蛋白質　２：脳　３：肺　４：心臓　５：脾臓

６：肝臓　７：副腎　８：筋肉　９：精巣

Fig.3-A

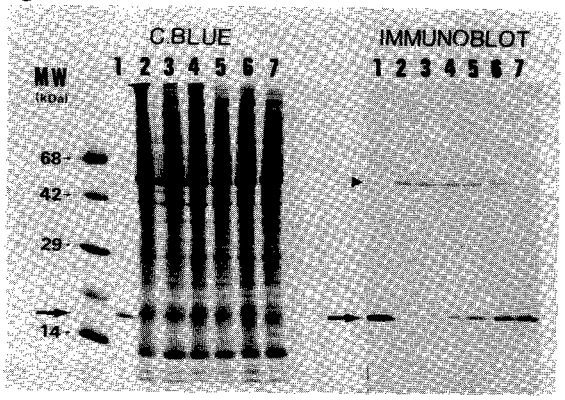
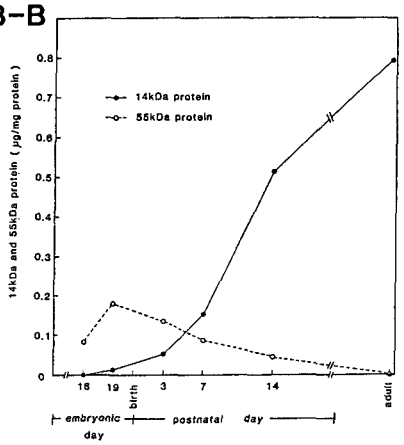


Fig.3-B



ラット脳の成長分化に伴う１４ｋＤａ蛋白質の変化：電気泳動及びイムノブロットのパターン（Ａ）と１４ｋＤａ（●）および５５ｋＤａ（○）タンパク質量の経時変化（Ｂ）

１：１４ｋＤａ蛋白質　２：胎児１６日目　３：胎児１９日目

４：生後３日目　５：生後７日目　６：生後１４日目　７：成熟　脳

135 ウシ末梢神経ミエリンのＰ０蛋白に対するモノクローナル抗体の検討

根岸輝彦[1)]，吉村和法[2)]，金子厚[1)]，細川武[1)]，濱口勝彦[1)]，坂本安[2)]，北村邦男[2)]，野村正彦[2)]

（埼玉医科大学・神経内科[1)]，第一生理[2)]）

〔要約〕ウシ末梢神経ミエリンの主要構成成分であるＰ０蛋白に対する２種類のモノクローナル抗体（58A，46E）を作製し、それらの抗原特異性を検討した。免疫組織化学的な検討の結果、両抗体はラットの末梢神経および脳とは反応せず、ウシ、ウサギ末梢神経ミエリンと反応することから、種による抗原性の違いが示唆された。またＥＬＩＳＡ法においても検討した範囲ではウシ、ウサギ末梢神経ミエリンおよびウシＰ０蛋白に対して有意の反応性を認めた。両抗体に反応する抗原は、ウエスタンブロット法による検討の結果分子量28KのＰ０蛋白であることが確かめられ、さらに糖鎖を除去したＰ０蛋白とも同様の反応性を示したことから抗原部位はＰ０蛋白のポリペプチド部位であることが判明した。また中枢神経ミエリンとは、反応を示さなかったことより中枢神経ミエリンに存在するMyelin associated glycoprotein (MAG)とは共通の抗原性を有しないと考えられる。今後これらの抗体を用いてＰ０蛋白の抗原決定基と生理機能の分析を進めたい。

［目的］本年度神経学会総会にて、我々はウシＰ０蛋白にて免疫したラット抗ウシＰ０ポリクローナル抗体の動物末梢神経内注入により、末梢神経ミエリン層に膨化および脱髄が生じることを発表した。この事は、抗体系の脱髄への関与を示唆するものであり、その機序を解明するために、Ｐ０蛋白の特定部位と反応し、定量的な分析が容易なＰ０蛋白特異的モノクローナル抗体が必要と考え作製を試みた。

［実験方法］

1)抗原の調製：抗原としたＰ０蛋白はKitamuraらの方法(3)に従い、ウシ末梢神経ミエリン画分よりＳＤＳゲル濾過法により精製した。

2)モノクローナル抗体の作製：Akagawa らの方法(1)に従い、Ｐ０蛋白を抗原として、BALB/Cマウスに免疫し、免疫後、その脾臓細胞を取り出してミエローマ細胞ＮＳ－１と細胞融合を行なった。そのハイブリドーマ培養上清についてウシ組織および各種組織凍結切片上、間接蛍光抗体法とELISA法によりスクリーニングを行って、Ｐ０蛋白陽性クローンを検出し、増殖させ、Ｐ０蛋白特異的モノクローナル抗体の産生を行わせた。

3)間接蛍光抗体法による検討：4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定した動物より得た末梢神経ミエリンおよびその他組織を4%パラフォルムアルデヒドで固定後、30%蔗糖に置換した後、O.C.T. Compoundで包埋した。それをクライオスタットで12umの厚さのセクションにし、間接蛍光抗体法を行った。

4)ELISA法による検討：ウシ、ラットおよびウサギ末梢神経ミエリン蛋白を4ug/ml、ウシＰ０蛋白を2ug/mlの濃度に調製した後、microplateにcoatingし、一次抗体として50倍に希釈した培養上清を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を反応させた。その後、ABTSにて発色させ414nmでの吸光度を測定した。

5)Glycopeptidase F 処理：酵素濃度を２倍にした以外はBollensenらの方法(2)に従い行った。

6)ウエスタンブロット法による検討：Laemmliの方法(4)に従い、12.5% ポリアクリルアミドゲルを作製し、末梢、中枢神経ミエリン蛋白、ウシＰ０蛋白およびGlycopeptidase F 処理後のＰ０蛋白を泳動後膜に転写し、２倍希釈した培養上清、つづいてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体と反応させた後DABで発色させ、反応部位を検討した。

［結果］

1)ウシ末梢神経ミエリンを抗体58Aで間接蛍光抗体法を用いて染色したものでは、位相差顕微鏡でのミエリンの層構造に一致した部位が選択的に染色されていた（図 1.A，B）。抗体46Eでも同様にミエリン層が染色された。

ウサギとラットの末梢神経および脳を用いた組織化学的検討では、両抗体はウサギ末梢神経ミエリンと反応を示したが、ラット末梢神経およびラットとウサギの脳とは反応を示さなかった（表 1）。

2)ELISA 法による検討ではウシ、ウサギ末梢神経ミエリンおよびウシＰ０蛋白と反応し、ラット末梢神経ミエリンとは反応せず組織化学的な検討の結果を支持した（表 1）。

3)イムノブロット法による検討において、ウシ末梢神経ミエリン中の分子量２８KのＰ０蛋白に反応することが確かめられた。またGlycopeptidase F 処理によって糖鎖を除いたＰ０蛋白とも反応性を示した（図. 2）。

［考察］今回われわれが作製したモノクローナル抗体は免疫組織化学的に末梢神経ミエリンの一部分が染色され、ELISA法でもウシ、ウサギ末梢神経ミエリンおよびウシＰ０蛋白と反応を示した。さらにウエスタンブロット法で分子量２８Kの部位、すなわちＰ０蛋白と特異的に反応し、脱糖鎖化により低分子化したＰ０蛋白もまたその抗原性を保持していたので、ウシＰ０蛋白のポリペプチド部位を認識する特異的モノクローナル抗体と考えられた。また中枢神経ミエリンのどの成分蛋白とも反応を示さなかったことから中枢神経ミエリンに存在するMyelin associated glycoprotein (MAG)とは共通抗原性を有しないと考えられた。Ｐ０モノクローナル抗体に関してヒトとラットを認識するがマウスは認識しないもの(2)またヒトとウシを認識するがラットは認識しないもの(5)などの特異的モノクローナル抗体の存在が報告されているが、今回我々の得た抗体は少なくとも前者らの抗体とは異なっていた。現在ヒトとの交差性についても検討中である。今後エピトープの詳細についての解析を行い、これら抗体を用いて抗体系がどのような機序で脱髄に関与しているのか、その可能性を定量的に解明してゆく予定である。

［文献］

1) Akagawa,K et al.(1986) Brain Res.,383, 110 2) Bollensen,E et al.(1990) J.Neurochem.,54, 1110 3) Kitamura,k et al.(1976) Biochim. Biophys. Acta., 455, 806 4) Laemmli,U.K et al.(1970) Nature, 227, 680 5) Miller,S.L et al.(1984) J.Neurochem.,43, 394

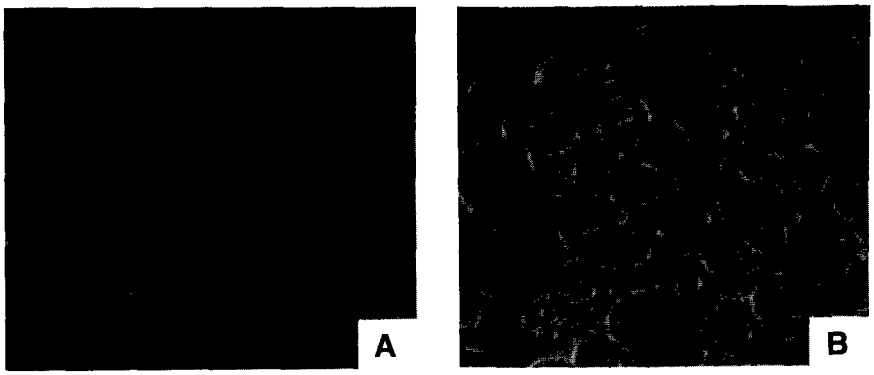


図１．ウシ末梢神経ミエリン
A: 間接蛍光抗体法
B: 位相差顕微鏡

表１　組織化学およびELISA法による検討

	抗体 ５８A		抗体 ４６E	
	組織	ELISA	組織	ELISA
ウシ 末梢ミエリン	＋	＋	＋	＋
ウシ Ｐ０蛋白		＋		＋
ウサギ 末梢ミエリン	＋	＋	＋	＋
ウサギ 脳	—	—	—	—
ラット 末梢ミエリン	—	—	—	—
ラット 脳	—	—	—	—

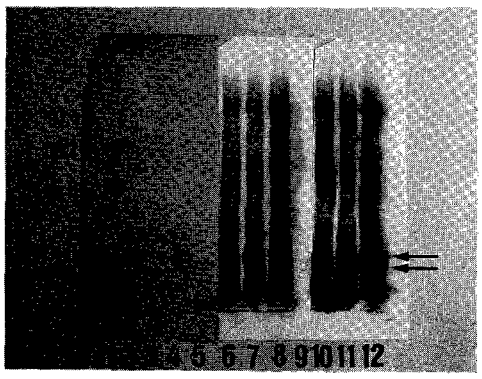
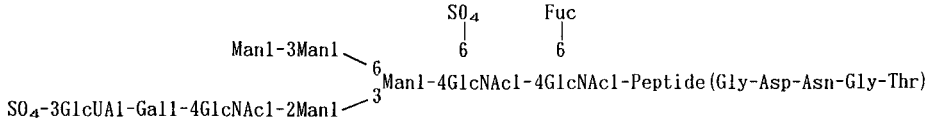


図２．ウエスタンブロット分析
レーン 1～5: ｺﾏｼｰﾌﾞﾙｰ染色　レーン 6～12: ｲﾑﾉﾌﾞﾛｯﾄ
(レーン 6～9: 抗体 58A　レーン 10～12: 抗体 46E)
レーン 1: 分子量ﾏｰｶｰ
レーン 2,6,10: glycopeptidase F 処理 P0 蛋白 (各 1.5ug)
レーン 3,7,11: P0蛋白 (各 1.5ug)　レーン 4,8,12: P0蛋白 & glycopeptidase F 処理 P0 蛋白 (各 1.5ug)
レーン 5,9: ウシ脊髄 (3.0ug) 矢印はｲﾑﾉﾌﾞﾛｯﾄで陽性のﾊﾞﾝﾄﾞを示す

136 ウシ末梢神経ミエリンＰＯ糖蛋白の硫酸およびウロン酸含有糖鎖の構造解析

北村邦男・坂本安・田中早苗・吉村和法・野村正彦・植村慶一*
(埼玉医大・一生理、慶大・医・生理*)

〔要約〕末梢神経ミエリン構成蛋白質の約５０％を占めるＰＯ糖蛋白質の糖鎖構造解析を行なったところ、今までに知られている糖蛋白質には報告されていない極めて珍しいウロン酸を含む糖鎖が存在することが確かめられた。ウシ末梢神経ミエリンＰＯ糖蛋白質は１本の糖鎖が結合しているが、その糖鎖は不均一性があり、少なくとも５つの構造（ＧＰＩ～ＧＰＶ）が示唆されていたが、今回その内のＧＰＶについての構造解析を試みた。ＧＰＶは既に報告した硫酸およびシアル酸を各１モル含有するＧＰⅣの構造に似ていると推定され、シアル酸は含まず２モルの硫酸とウロン酸様物質が存在する点が異なっていると考えられていたが、今回そのウロン酸様物質がグルクロン酸にガラクトースが結合した二糖であることが液体クロマトグラフィー－ＦＡＢ質量分析（ＬＣ－ＦＡＢ－ＭＳ）によって確かめられた。又、ＦＡＢ－ＭＳ分析によってＧＰＶの糖鎖部分の分子量は 1919 であることが示され、２モルの硫酸とウロン酸を含むことが確かめられた。スミス分解によってウロン酸は酸化されずにいることからそのＣ３位に置換があることが示唆された。以上のことと既知のＧＰⅣの構造との比較から、３位の置換基は硫酸であると考えられ、ＧＰＶの構造は下記の様に推定された。



非還元末端の硫酸化グルクロン酸構造は末梢神経に存在する硫酸化グルクロン酸含有糖脂質（ＳＧＧＬｓ）の構造と一致していた。従って、ＰＯ蛋白質が硫酸化ウロン酸をエピトープとする抗 L2/HNK1 抗体に陽性であるという結果の説明が可能となった。

近年、神経組織のイムノグロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着蛋白質には共通の糖鎖構造が存在することを示唆する結果が蓄積されつつある。抗 L2/HNK-1 抗体やある種のニューロパチーのＭたん白が MAG (myelin associated glycoprotein) の糖鎖や末梢神経に存在する硫酸化グルクロン酸含有糖脂質 (SGGLs) の糖鎖をエピトープとすることが知られ、SGGLs 構造中の硫酸化グルクロン酸をエピトープとすることが明らかとなっている(1,2)。ウシ末梢神経ミエリンに存在するＰＯ糖蛋白は抗 L2/HNK-1 抗体との反応性を示すこと、糖鎖結合部位は１つであること、その糖鎖は少なくとも５つの構造不均一性（ＧＰＩ～ＧＰＶ）があること、ＧＰⅢとⅣとⅤは硫酸を含有すること、ＧＰＶにはウロン酸様の物質が存在すること等を報告した(3,4,5)。今回ＧＰＶの構造解析を行なった結果、ＧＰＶは硫酸化グルクロン酸を含む極めてめずらしい糖鎖構造であることが判明したので報告する。

[実験方法]

糖ペプチドの精製：既報の方法(5)に従い、ウシ末梢神経ミエリンの希酸抽出後の不溶性画分を Streptomyces griseus protease (Sigma Type XIV)で消化し、塩およびペプチドをゲル濾過にて除去した後、DEAE-Sephadex にてＧＰＩ～ＧＰＶに分画した(4)。各分画は Shodex DEAE-825 或いは Shodex AXpak WA-624 カラムを用いた HPLC にて、水から 0.3M 食塩までの濃度勾配溶出により精製した。

ＧＰＶの glycopeptidase A 消化：130 nmole のＧＰＶおよび 0.1mU の Almond glycopeptidase A （生化学工業）を用い、50 ul の 0.1M sodium citrate-phosphate buffer, pH5.0 中 にて 37℃ 17時間消化した後、0.05% TFA を溶出液とする Asahi GS310による HPLC にて遊離した糖鎖を分離精製した。

硫酸の定量：10～20 nmoleの試料を 25% 蟻酸中にて 100℃ 24 時間分解後、蟻酸を除去してから、 2.3 mM Tris-2.5mM フタル酸, pH4.1 を溶出液とする Shodex I-524P カラムおよび Shodex IC 検出器 (CD-2) を用いた HPLC にて硫酸を定量した。

ウロン酸の定量：ウロン酸はカルバゾール－硫酸による直接定量(6)、あるいは Dowex 50X8(50-100mesh, H^+型)存在下 0.05N HCl にて 100℃24時間の分解後、LCR3 樹脂(JEOL) を用いた液体クロマトで同定並びに定量をした(5)。

Negative fast-atom-bombardment 質量分析(FAB-MS)：日本電子製 AX-505W 質量分析計を使用した LC-MS 法および直接 FAB-MS 法を行なった。

その他の分析：Smith 分解およびメチル化は既報の方法で行なった(5)。

[結果および考察]

ＧＰＶは、既報(5)のごとくＧＰＩからⅤに共通の Man 3, Gal 1, GlcNAc 3, Asp 2, Gly 2, Thr 1 モルの成分を含有し、それらに加えて硫酸２モルおよびウロン酸１モルを含有していた。また、そのメチル化分析のパターンはＧＰⅣのそれとほぼ一致しており、基本的な構造はＧＰⅣと同じであることが推定されたが、ウロン酸由来のメチル化物は検出されなかった。しかしながら、ウロン酸を遊離させる条件として知られる加水分解により、カルバゾール-硫酸法に陽性のピークがＬＣＲ３イオン交換クロマトで検出された。このピークの溶出位置は既知のウロン酸やそれらのラクトンと異な

っており、その構造は決定出来なかったが(5)、今回、ＬＣ－ＭＳ法を用いて調べたところ、その分子イオンピーク355 $[M-1]^-$はウロン酸とヘキソース各１モルよりなる二糖の分子量 356 に一致した（図１）。この二糖を種々の条件で加水分解を行なったところ、ガラクトースとグルクロン酸が遊離することからＧＰＶ由来のカルバゾール陽性物質はグルクロン酸とガラクトースよりなる二糖であることが明らかとなった。しかしながら、この二糖がＧＰＶの糖ペプチドに混入する不純物由来である可能性、あるいは糖鎖ではなくペプチド部分に結合している可能性があるため、グリコペプチダーゼ処理により得たＧＰＶの糖鎖の全質量をネガティブーＦＡＢ－ＭＳで検討した。その結果、質量数 1919 $[M-1]^-$の分子イオンピークが明らかに認められ（図２）、これはウロン酸および２モルの硫酸を含むと仮定した糖鎖構造の質量に完全に一致したことから、上記の可能性は完全に否定出来た。

以上の結果とＧＰⅣの構造解析の結果(5)とを考えあわせると、ＧＰＶは図３で示されたような硫酸化グルクロン酸をもつ極めて珍しい構造であると推定された。近年、末梢神経に硫酸化グルクロン酸を含有する糖脂質が存在することが示されており、このものが 抗 L2/HNK-1 抗体のエピトープであるとの考えが有力となってきている(1,2)。 抗 L2/HNK-1 抗体は N-CAM や MAG との反応性を示すことからそれらの蛋白質の糖鎖構造が注目されているが、その存在量や糖鎖の複雑性のために今だ明かとなっていない。ＰＯ蛋白質もまた抗 L2/HNK-1 抗体に対し陽性であり(3)、今回の結果はその結果と矛盾せず、糖蛋白糖鎖にも硫酸化グルクロン酸が存在することを明らかにし得た。

最後に質量分析を行なって下さいました日本電子株式会社応用研究室の方々に感謝致します。

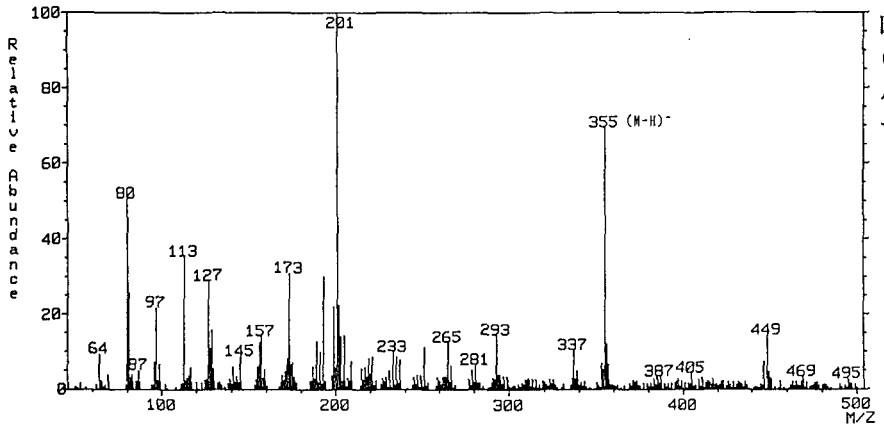


図１．
ＧＰＶ由来のカルバゾール硫酸陽性物質のネガティブＬＣ－ＭＳ

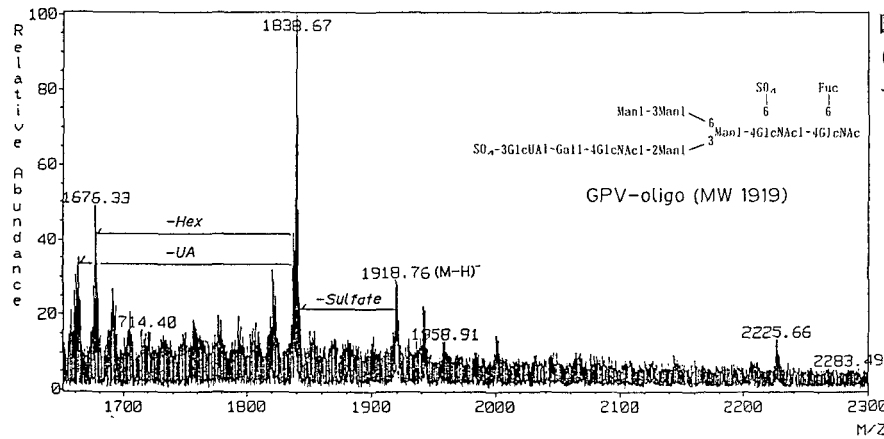


図２．
ＧＰＶの糖鎖部分のネガティブＦＡＢ－ＭＳ

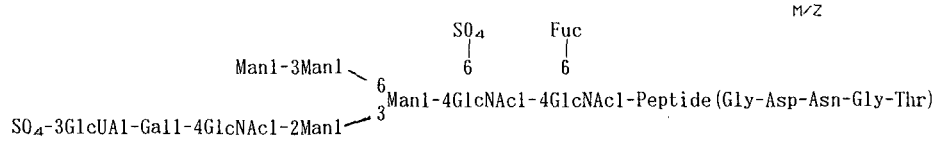


図３．ＧＰＶの推定構造

［文献］

(1)Ariga,T., Kohriyama,T.,Freddo,L.,Latov,N.,Saito,M.,Kon,K.,Ando,S.,Suzuki,M.,Hemling,M.E.,Rinehart,Jr.K.L., Kusunoki,S. and Yu,R.K.(1987) J.Biol.Chem.,262,848-853 (2)Chou,K.H.,Ilyas,A.A.,Evans,J.E.,Quarles,R.H. and Jungalwala,F.B.(1985) Biochem.Biophys.Res.Commun.,128,383-388 (3)植村慶一,鈴木勝,坂本安,田中早苗,野村恭一(1987)神経化学,26,568-570 (4)Kitamura,K.,Suzuki,A.,Suzuki,M. and Uyemura,K.(1979)FEBS Lett.,100,67-70 (5)北村邦男,坂本安,植村慶一(1982)神経化学,21,282-284 (6)Bitter,T. and Muir,H.M.(1962)Ana.Biochem.,4,330-334

137 ADP-リボシルアルギニン水解酵素の脳内分布とその役割

山本敏文、三村雄一、加藤武、*山本秀子
（横浜市大・総合理・分子認識、*東京都精神医学総合研・精神薬理）

〔要約〕
ＡＤＰ－リボシルアルギニンメチルエステルを酵素基質にして、ラット脳内のモノＡＤＰ－リボシルアルギニン水解酵素活性を測定した。 水解酵素反応は速く、反応の直線性は10分まで認められた。 本酵素は可溶性画分に主に存在するが、大脳皮質では膜画分（P_2）にも可溶性画分のおよそ40%程度存在することが明かとなった。 脳内各部位（大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、小脳）の可溶性の本水解酵素は比活性がシチメンチョウ赤血球膜の酵素活性に比べ高い値を示し（約 300 pmol/min/mg protein）、広範囲にわたりその存在が認められた。 以上の結果は受容体・情報伝達系においてモノＡＤＰ－リボシル化タンパク水解酵素がモノＡＤＰ－リボース転移酵素とならび、脳内での神経伝達の調節に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

モノＡＤＰ－リボース転移酵素の細胞内情報伝達系における重要性はコレラ毒素や百日咳毒素などの細菌毒素を用いて研究されてきている。最近の研究からモノＡＤＰ－リボシル化を受ける標的タンパクのアミノ酸残基がアルギニン（コレラ毒素）、システイン（百日咳毒素）などであることが明かとなってきた(1,2)。 一方モノＡＤＰ－リボシル化を受けたタンパク・酵素はその特異的な水解酵素群によってＡＤＰ－リボースを遊離することが、シチメンチョウ赤血球などを用いた研究で明かになった(2)。 このモノＡＤＰ－リボース転移酵素、および水解酵素サイクルが酵素活性やタンパクの機能調節に深く関わっていることが推察されたため、我々は最近報告された簡便なHPLC-UV 法(1)を用いて、ＡＤＰ－リボシルアルギニンメチルエステルを基質にモノＡＤＰ－リボシルアルギニン水解酵素の脳内での活性、および分布を調べた結果、従来報告のある赤血球の本酵素と比較して高い水解活性を示すことが明かとなったので報告する。

（実験方法）
Wistar系雄性ラットを用い、脳内各部位を切り出し 1mM EDTAを含む 20mM Phosphate buffer(pH7.5) でホモジネートし 45000xg 30分遠心し、その上清を酵素標品とした。 細胞内分布の実験では大脳皮質を常法に従ってP_1,P_2を調製し残りの上清を可溶性画分とした。 モノＡＤＰ－リボシルアルギニン水解酵素活性の測定は既報(3)の方法に従い、基質であるＡＤＰ－リボシルアルギニンメチルエステルの合成も同様に行った。 酵素反応は30°Cで10分間行い、100°C 5分間熱処理により酵素活性を失活させた標品をブランクとして用いた。

（結果）
ラット大脳皮質可溶性画分によるモノＡＤＰ－リボシルアルギニン水解反応は速やかに起こり、反応は10分まで直線性を示した(Fig. 1)。 加熱失活後の水解活性は5% 程度で脳内の本酵素活性測定の際の非特異的反応は少なかった。 水解酵素活性の細胞内分布は赤血球の場合と同様に可溶性画分に最も多く認められたが、一部粗ミトコンドリア分画にも（可溶性画分の40%）認められた(Fig. 2)。 比活性は可溶性画分が最も高く他の二画分ではその20%程度の値しか示さなかった。

脳内分布を見た結果は、Fig. 3 に示したように脳全体にわたって広範囲に、同程度のしかも高い水解活性が存在することを示した。 下垂体および脈絡叢にも活性が認められたが、大脳皮質などに比べ低い活性値を示した。

（考察）

モノＡＤＰ－リボース転移酵素ならびにその水解酵素はシチメンチョウ赤血球を用いて研究が行われており比較的研究が進んでいるが(4,5)、脳はもちろんのこと他の組織（肝臓、腎臓などの末梢組織）についてはあまりわかっていなかった。今回の報告により、モノＡＤＰ－リボシルアルギニン水解酵素は脳内に広く分布していることが明かになった。 しかもその酵素活性は赤血球(5)の4-5倍高い値を示し、同様に脳に高い酵素活性を持つアデニル酸シクラーゼ(7)との関連も推測される。 アデニル酸シクラーゼと共役している促進性のＧ－タンパク、Ｇｓはコレラ毒素によりアルギニン残基にＡＤＰ－リボシル化を受けシクラーゼ活性を上昇させる。 従って、正常な受容体－Ｇタンパク－アデニル酸シクラーゼ系の機能調節のなかでは活性の高い脳内モノＡＤＰ－リボシルアルギニン水解酵素が、内因性モノＡＤＰ－リボース転移酵素によるシクラーゼ系の活性化を制御している可能性を示唆している。 特に今回明かとなった膜結合性の水解酵素についても注目しておりさらに検討を加えている。

[References]

1. Van Dop,C.,Tsubokawa,M.,Bourne,H.R., Ramachandran,J.(1984) J.Biol.Chem. 259, 696-698.
2. Hisa,J.A.,Tsai,S-C.,Adamik,R.,Yost, D.A.,Hewlett,E.K.,Moss,J.(1985) J.Biol.Chem. 260, 16187-16191.
3. Kim,E-S.,Graves,D.J.(1990) Anal. Biochem. 187,251-257.
4. Moss,J.,Oppenheimer,N.J.,West,R.E., Stanley,S.J.(1986) Biochemistry 25, 5408-5414.
5. Moss,J.,Tsai,S-C.,Adamik,R.,Chen,H-C., Stanley,S.(1988)Biochemistry 27, 5819-5823.
6. West,R.E.,Moss,J.(1986)Biochemistry 25,8057-8062.
7. Yamamoto,T.,Shimizu,H.(1985)Neurochem. Int. 7, 357-361.

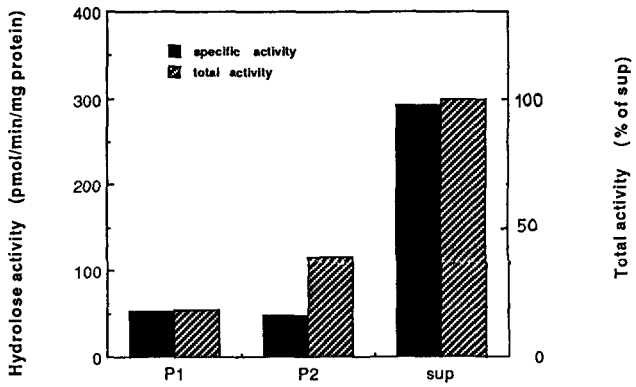


FIG.2. Subcellular distribution of mono-ADP-ribosylarginine hydrolase in rat cerebral cortex.

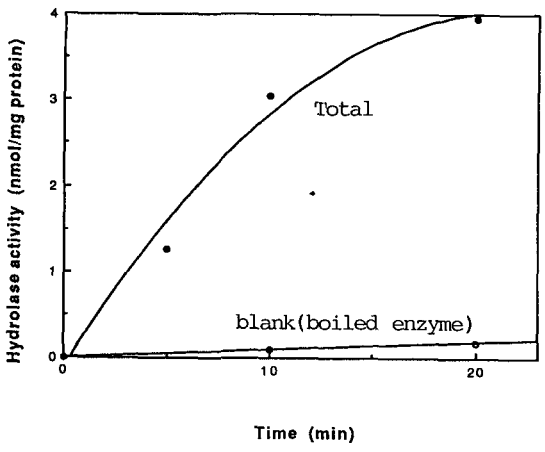


FIG.1. The time course of mono-ADP-ribosyl-arginine hydrolase in rat cerebral cortex.

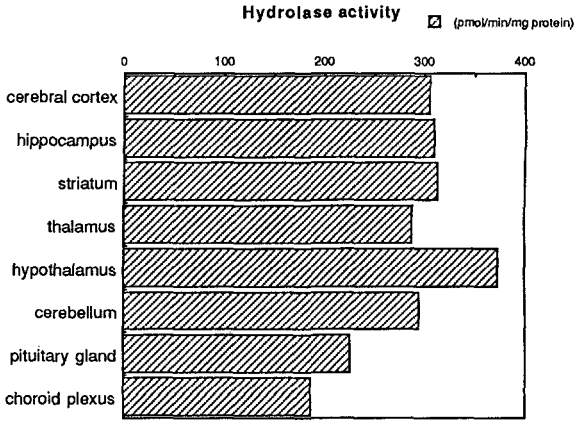


FIG. 3. Regional distribution of mono-ADP-ribisylarginine hydrolase activity in rat brain.

138 塩基性アミノ酸残基対プロセシング酵素のラット坐骨神経軸索内輸送の可能性

山本敏文[1]、佐藤重人[1]、篠崎寛[1]、知久馬敏幸[2]、加藤武[1]
([1]横浜市大・総合理・分子認識、[2]昭和薬大・薬品分析)

〔要約〕

神経ペプチドは前駆体蛋白質からプロセシング酵素によって生合成される。一般にペプチダーゼは基質特異性が低いため、生理的機能をもった酵素であるか否かを決めることは大変難しい。今回は、ラット坐骨神経を用いて、プロセシング酵素の軸索内輸送について検討した。坐骨神経結紮三日後、細胞体側にC-末端アミド化酵素と塩基性アミノ酸残基対プロセシング酵素が経時的に増加し、その後減少したことから、これらの酵素が順行性に輸送されている可能性を示唆した。

神経伝達物質あるいは修飾因子としての神経ペプチドが沢山発見されている。ペプチド性神経の制御機構を明かにすることは神経科学の発展に大変重要と思われる。しかし、神経ペプチドの生合成に関与する酵素の候補は報告されてはいるものの、生理的に機能していると思われる酵素はほとんどない。

これまでの研究においてプロセシング酵素は軸索内輸送されることから（1－3）、神経ペプチドのプロセシングは軸索内輸送中あるいは神経終末上で行なわれていると考えている。最近C-末端アミド化酵素（PAM）が単離精製され、遺伝子構造も明かとなった（4、5）。生理的に機能しているプロセシング酵素を見つける方法として坐骨神経の軸索内輸送は大変有用であり、今回PAMおよび塩基性アミノ酸残基対プロセシング酵素（DAAPE）の坐骨神経内の軸索内輸送について検討した。

方法：Wistar系雄性ラット(250-350g)をネンブタール(40mg/kg, i.p.)麻酔し、坐骨神経を1cmの間隔で2ケ所で結紮した。結紮12, 24, 48, 72, 120時間後断頭し、坐骨神経約3cmを切り出し、氷上にて3mmずつに分けた。これらの組織に緩衝液(10mMTris-HCl (pH7.0))100μlを加え、超音波破砕後、100,000g 60分間遠心し、その上清を酵素液とした。PAM活性は合成基質 Dns-Tyr-Val-Glyを用いて酵素反応後、生成した Dns-Tyr-Val-$CONH_2$をHPLC－蛍光法にて分離定量した（6）。DAAPE活性はMizunoらの方法に従い合成基質 Boc-Gly-Arg-Arg-MCAを用いた（4）。生成したAMCの蛍光強度(Ex.380nm,Em.460nm)からDAAPE活性を求めた。上清液の一部はSephacryl S300 またはSuperose 6 にて部分精製し、酵素の性質を調べた。

結果：ラット坐骨神経結紮72時間後のPAM活性は図2に示したように、P_1に特異的に増加した。D_1～D_3、M_1～M_3には酵素活性の増加は見られなかった。図には示していないが、PAM活性は結紮72時間まで増加し、その後減少した。分子サイズは 70 kDa であり、90％以上の酵素は可溶化されていた。

坐骨神経内のDAAPE活性は図2に示したように、結紮後、P_1、D_1に比較的早い時間から活性が見られた。12時間後ではD_1～D_3の活性が全体的に増加し、その内でもD_1が一番高い活性を示した。P_1にも有意な酵素活性の増加が見られ、M_1～M_3に比べて三倍程増加した（図3A）。

24, 48, 72, 120 時間後の軸索内輸送も12時間の場合と同じようなパターンであった。ただし、図には示していないが72時間後のP_1のDAAPE活性は120時間とあまり差はなく、ほぼ定常状態になった。そして120時間後のD_1のDAAPE活性は72時間に比べて減少した（図3C）。一方M_1～M_3の活性は結紮後連続的に増加した。ゲル濾過により部分精製した後、酵素活性を測定したところ、主に3種類の分子種からなっていた。

考察：PAM活性は坐骨神経を順行性にのみ軸索内輸送されていることが明かとなった。また分子サイズも1種類しか見つけていないが、さらに検討が必要である。DAAPEもPAMと同様な順行性軸索内輸送が行なわれているものと思われるが、今回用いた合成基質は逆行性に輸送される酵素によっても加水分解された。結紮72時間後のP_1、M_1、M_3、D_1をそれぞれ Superose 6 でゲル濾過し、DAAPE活性を示す酵素の分子量を調べたところ、3種類の分子サイズがあり、その内のどの酵素が生理的に機能しているかをさらに検討することが必要である。脳シナプ

トソームから部分精製したDAAPEも同様な分子種が存在することから、ラット坐骨神経を軸索内輸送しているBoc-Gly-Arg-Arg-MCA 水解酵素の一部がＤＡＡＰＥであると考えられる。現在、坐骨神経から部分精製した酵素が前駆体ペプチドのプロセシングに関与しているか否かを確認している。また、これまでＤＡＡＰＥと思われる酵素が色々な組織から精製されているが（７、８）、それらの分子量、阻害剤の性質などをラット坐骨神経の酵素と比較検討中である。

1）Kato,T. et al., Neurosci. Res., 4,241-248(1987).
2）Okada,M. et al., Neurosci. Res., 2,421-433(1985).
3）Koshiya,K. et al., Brain Res., 324,261-270(1984).
4）Mizuno,K. et al., Biochem.Biophys.Res.Commun., 148,546-552(1987).
5）Stoffers,D.A. et al., Proc.Natl.Acad.Sci., 86,735-739(1989).
6）Tozawa,K.et al., J.Neurochem.(in press).
7）Satoh,M.et al., J.Biochem., 103,493-498(1988).
8）Shen,F,S.et al., J.Biol.Chem., 264,15600-15605(1989).

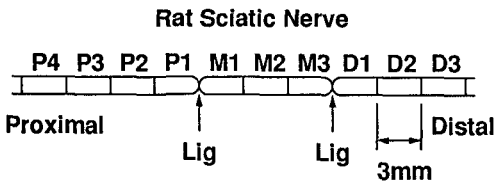


図１．坐骨神経軸索の結紮部位

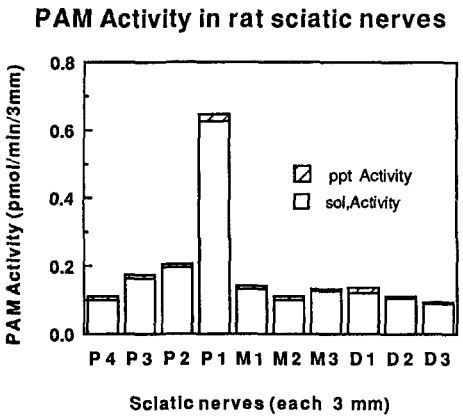


図２.結紮７２時間後のC-末端アミド化酵素の活性
☑：100,000g沈殿区分の活性
□：100,000g上清区分の活性

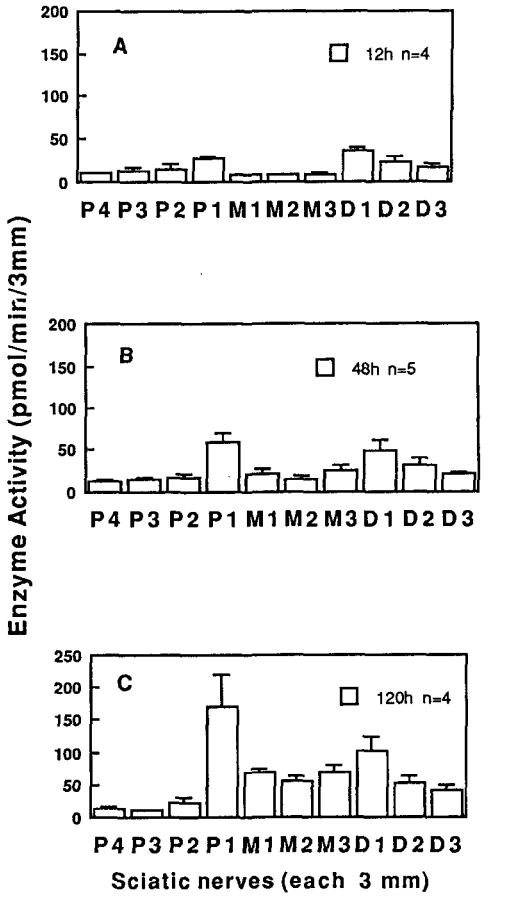


図３.結紮 12,48,120 時間後の塩基性アミノ酸残基対プロセシング酵素の活性
(mean±SEM)

139 200KDaニューロフィラメントの チュブリン重合促進能について

田中稔久、武田雅俊、中村祐、工藤喬、多田國利、播口之朗、西村健
（大阪大・医・精神医学）

〔要約〕・ニューロフィラメント200KDaサブユニットの機能について検討した。牛脊髄より精製したニューロフィラメント200KDaサブユニット蛋白をα-キモトリプシンにて部分分解することによりそのテイルフラグメントを単離した。またアルカリフォスファターゼ処理により脱リン酸化したニューロフィラメント200KDaサブユニットを調整した。ニューロフィラメント200KDaサブユニットのマイクロチュブルとの相互作用を検討するために、牛脳より精製したチュブリンの重合に対する精製ニューロフィラメント200KDaサブユニット、脱リン酸化したニューロフィラメント200KDaサブユニット、および、ニューロフィラメント200KDaのテイルフラグメントの作用について検討した。ニューロフィラメント200KDaサブユニットにはチュブリンの重合促進能が認められたが、脱リン酸化したニューロフィラメント200KDaサブユニットにはその促進作用が認められなかった。また、ニューロフィラメント200KDaのテイルフラグメントにもチュブリンの重合促進作用が認められた。以上の結果から、ニューロフィラメント200KDaサブユニットはそのテイル領域でチュブリンに作用しており、テイル領域のリン酸化によりマイクロチュブル系との相互作用が調節されていることが示唆された。

〔目　的〕

神経細胞内の細胞骨格を形成するニューロフィラメントは細胞の分化・成熟における機能、軸索輸送における役割などが推定されている。ニューロフィラメントを構成するトリプレット(NF-L,NF-M,NF-H)の中でも他の組織の中間径線維と比較して最も特徴的なNF-Hの機能については不明なところも多い。形態学的観察からはニューロフィラメント表面に存在しwhisker状のクロスブリッジを構成していることが報告されており(5,6)、その局在からはニューロフィラメントと他の細胞骨格系・細胞内小器官・膜との相互作用が推定される。また、NF-Hは高度にリン酸化されていることが知られており、多くのリン酸基はテイル領域に存在していると考えられている。我々はニューロフィラメントの機能を明らかにする目的で、まずニューロフィラメントとマイクロチュブルとの相互作用について検討した。今回はNF-Hのチュブリン重合に対する影響について検討し、NF-Hによるチュブリン重合促進作用はNF-Hのテイル領域に存在しており、特にこの領域のリン酸化によりチュブリンの重合が調節されている可能性が示唆される結果を得たので報告したい。

〔方　法〕

1．ニューロフィラメントの調整と部分加水分解・脱リン酸化

ニューロフィラメントは牛脊髄より得たcrude neurofilament分画を(3)、8M尿素にて可溶化し、DE-52カラム(Whatman)、ヒドロキシアパタイト(Bio Rad)カラムにて200KDaサブユニット(NF-H)を精製した(4,12)。1mM EGTA/50mM MES(pH6.5)にて透析した精製NF-Hをα-キモトリプシン(Sigma)処理(蛋白重量比1/30,000,30℃,2分)し(7)、ふたたび8M尿素/1mM EGTA/10mM Bis-Tris(pH6.5)にて透析した後、DE-52カラムによりNF-Hのテイルフラグメントを精製した。

NF-Hの脱リン酸化は、2mM $MgCl_2$/1mM EGTA/0.1mM DTT/50mM Tris(pH8.5)中、基質蛋白1mg当り60単位のE.Coli由来alkaline phosphatase(Sigma)により35℃にて５時間処理し(6)、脱リン酸化の程度は電気泳動の移動度の変化から推察した。

2．チュブリンの精製

牛脳からマイクロチュブル蛋白をShelanskiの方法により精製した(11)。マイクロチュブル蛋白からさらにホスホセルロースカラム(P11:Whatman)によりチュブリンを精製した(13)。

3．チュブリン重合度の測定

チュブリンの重合度はOD_{350}の変化で測定した。チュブリン(3mg/ml)を1mM EGTA/6mM GTP/6mM $MgCl_2$/5mM phosphoenol pyruvate/pyruvate kinase(1.75 IU/ml)/100mM MES(pH6.5)中にて加温することにより重合を開始させ、添加蛋白(NF-H、脱リン酸化NF-H、NF-Hのテイルフラグメント)によるチュブリン重合度の変化を最終濃度0.3mg/mlまで加えることにより検討した。

〔結　果〕

牛脊髄から精製したNF-Hは、SDS-PAGEにて分子量160Kの位置にわずかなNF-Mの混入を認めるが、200Kの位置にメインバンドを認めた（図１ａ）。精製NF-Hをα-キモトリプシンにて処理すると200Kバンドの減少と共に160Kの

位置にバンドが出現する。また、40Kの位置にも薄いバンドが出現しており、α-キモトリプシンの作用により200K蛋白が切断され、160Kフラグメントと40Kフラグメントが生じたものと判断される（図１ｂ）。α-キモトリプシンとのインキュベイションの時間を長くすると図に示す160Kのフラグメントもさらに分解され120K前後の領域に分解産物が認められたため、以下の実験には２分間のα-キモトリプシン処理により得られた分解産物を使用した。この分解産物を8M尿素に透析後、DE-52カラムで精製すると160Kの位置に単一バンドを持つフラグメントが得られた（図１ｃ）。このフラグメントはNF-Hのテイルフラグメント（ｃ末端側）と判断される(7)。　図２に重合条件下のチュブリンのOD_{350}の経時的変化を示す。MAPsをはずしたチュブリンをインキュベイトするだけでは重合は認められないのに対して、精製チュブリンに精製NF-Hを加えると光散乱の経時的な上昇が観察され、NF-Hによるチュブリン重合の促進作用が認められた。しかしながら、同量の脱リン酸化したNF-Hを加えてもチュブリンの重合促進作用は認められなかった。同様の測定系に精製NF-Hから部分加水分解により得られたNF-Hテイルフラグメントを加えてチュブリンの重合度を見たところ、NF-Hテイルフラグメントにも精製NF-Hと同程度の重合促進作用が認められた。

［考　察］

ニューロフィラメントを構成するトリプレット（NF-L、NF-M、NF-H）の中でもNF-Lは10nm線維のコアを形成し、NF-Hは10nm線維の表面に局在することが知られているが、それぞれの機能については充分に解明されていない。NF-Hについては、長いテイル領域を持つことや、そのテイル領域が高度にリン酸化されていることなど他の中間径線維にはない大きな特徴が知られている。またNF-Hのアミノ酸配列にはtauとの部分的相同性があり(8)、抗NF-H抗体の中にはMAP2と交差反応を起こすものがあるとの報告もあり(1)、NF-HとMAPsとの間に共通した性質が知られている。今回NF-Hの細胞骨格蛋白との相互作用機能について検討した。NF-Hはチュブリンの重合促進機能を持つこと（9)、脱リン酸化NF-Hにはその機能が減弱していること(10)は既に報告されているが、今回の結果からテイルフラグメントのみでもその機能を持つことが示された。NF-Hテイル領域はクロスブリッジの構成部分であることや、Ca^{2+}との結合部分であること(2)が報告されており、NF-Hのテイル領域はニューロフィラメント線維の表面に存在し、他の細胞骨格蛋白や調節因子と直接の相互作用を担っているものと考えられる。

［文献］

(1) Allende,M.L.et.al. J.Neurosci.Res.(1989) 22,130-133
(2) Chin,T.K. et.al. Biochem.J.(1989) 264,53-56
(3) Czosnek,H. et.al. Brain Res.(1981) 216,387
(4) Geisler,N. et.al. J.Mol.Biol.(1981) 151,565
(5) Hirokawa,N. et.al. J.Cell Biol.(1984) 98,1523-1536
(6) Hisanaga,S. et.al. J.Neurosci.(1989) 9(3),959-966
(7) Julien,J.P. et.al. J.Biol.Chem.(1983) 258,6,4019-4025
(8) Lee,J.F. et.al. EMBO J.(1988) 7,7,1947-1955
(9) Minami,Y. et.al. J.Biochem.(1983) 94,2023-2033
(10) Minami,Y. et.al. FEBS Lett.(1985) 185,2,239-242
(11) Shelanski,M.L. et.al. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(1973) 70,765
(12) Tokutake,S. et.al. Biomed.Res.(1984) 5,235
(13) Weingarten,M.D. et.al. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(1975) 72,1858

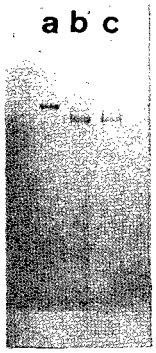


図１．精製NF-H、NF-Hテイルフラグメントの泳動パタン
a:精製NF-H。b:α-キモトリプシン処理後。c:α-キモトリプシン処理した160K分解産物をDE-52カラムにて精製したもの。

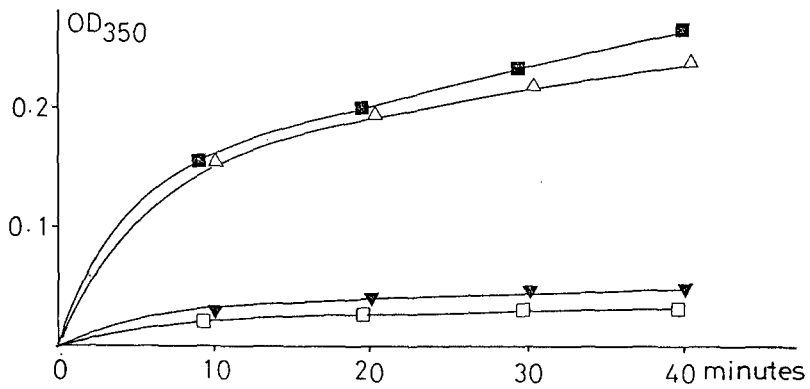


図２．チュブリン重合の経時的変化
チュブリン(3mg/ml)のみ(□)、チュブリンにNF-Hを加えたもの(■)、脱リン酸化したNF-Hを加えたもの(▼)、NF-Hテイルフラグメントを加えたもの(△)。

140 メナジオン、Fe－EDTAによるラット脳ミトコンドリア外膜のキヌレニン水酸化反応の活性化

平井　久美子，　植村　富彦
（精神研　神経化学）

〔要約〕
私達は、既にラット脳ミトコンドリア(Mt)のキヌレニン水酸化酵素活性が、或種の電子受容体の添加により増大することを報告している[4]。今回、私達はメナジオン(Vit.K_3)の添加により増大した水酸化酵素活性が、iron-EDTA complex の添加により更に著しく増大することを見出した。この活性化機序を検討するため、本酵素の局在が知られているミトコンドリア外膜(OM)をラット脳より分離し、内膜の標識酵素（シトクロムC酸化酵素）活性をほぼ示さないミトコンンドリア外膜を得た。このミトコンドリア外膜に、メナジオン、iron-EDTA complexを添加すると、水酸化酵素活性が著明に増加した。この活性が、真にproductである3-ハイドロキシキヌレニン(3-OHK)であることは、ラット肝上清より部分精製されたキヌレニナーゼの添加による３－ハイドロキシアントラニール酸(3-OHA)の出現により確かめられた。またこの活性化は、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、カタラーゼおよび水酸ラジカル(·OH)消去剤の一つであるマニトールの添加により抑制された。
以上の結果より、メナジオン、iron-EDTA complex存在下に見られる水酸化活性の増加は、外膜内で生成される $O_2^{\cdot-}$ を介して生ずる ·OHが関与している可能性が示唆された。

＜序論＞
脳内トリプトファン代謝経路中キヌレニンは、excitotoxic なキノリン酸[11]を介して NAD 合成に至る経路および、neuroprotectiveな作用を示すキヌレン酸[2]に変換する経路、両者の分岐点に位置しており、前者の第一段階は、ミトコンドリア外膜に存在するキヌレニン３－モノオキシゲナーゼにより行われる。ラット脳ミトコンドリアのキヌレニン水酸化酵素活性は、或種の電子受容体（メナジオン等）の添加により増大することを報告した[4]。今回、Fe-EDTA 存在下に Vit.K_3 を添加すると、各々単独添加時よりも更に著明な増加を見た。この活性化機序を検討した結果、ミトコンドリア外膜での $O_2^{\cdot-}$を介する水酸ラジカル(·OH)の生成及び、生じた·OH によるキヌレニンの水酸化反応の可能性を示唆する結果を得たので報告する。
＜実験方法＞
Mit.の調製：Wistar rat ♂(150-200g)を用い、文献[1]に従って行った。外膜の調製：低張処理法による Parsonsらの方法[8]を一部改良し行った。改良点は、Swelling液を10mM Tris-HCl buffer, pH 8.3 にまた、Swelling時間を90minにしたこと、最終段階の Sucrose gradient 濃度を低めたことである。キヌレニン水酸化酵素活性の測定：既に報告した方法[3,13]に従って測定したが、今回は内部標準であるα－メチルドーパは用いなかった。キヌレニナーゼの精製：ラット肝上清より文献[12]に従って行った。最終比活性は3-OHKを基質とした場合、3-OHA生成量約140nmol min^{-1} mg $prot^{-1}$であった。
＜結果＞OMの酵素活性に及ぼすVit.K_3/Fe-EDTA添加効果とproductの同定：図１はOMのキヌレニン水酸化酵素活性を示している。(a)Basal Complete System,(b)Vit.K_3/Fe-EDTA添加,(c)(b)の反応後キヌレニナーゼ添加。(b)では、(a)と比較して3-OHKのpeakの著明な増加が見られる。この増加は(c)に見られるように、キヌレニナーゼの添加で3-OHKのpeakが減少し、新たに3-OHAのpeakが出現した事から、確かに3-OHKの増加といえる。Whole Mt及びOMにおけるNAD(P)H依存性酵素活性の活性化の比較（表１）：Whole Mt、OMにVit.K_3、又はFe-EDTAを各々単独添加すると、NADPH系ではWhole Mtは無添加時に比較して軽度の活性の上昇を示した。Vit.K_3/Fe-EDTA共存下では、無添加時に比べ両膜標品とも著明な活性の上昇を示した。なお両膜標品とも electron donor specificityに関しては、Control活性は、両電子供与体による差は見られなかった。Vit.K_3/Fe-EDTA添加時の活性は、Whole MtではNADH系の方がNADPH系より優位（約２倍）であり、OMにおいてもNADH系がやや高い傾向を示した。キノン類の一電子還元体は酸素と反応し易く、活性酸素種を生成することが知られている[5]。そこで、今回のキヌレニン水酸化反応活性の増大に、活性酸素種が関与しているかどうかを調べた。Vit.K_3/Fe-EDTAによる活性増大に及ぼす活性酸素種消去剤の添加効果（図１）：(d)は(a)にSODを添加したもので、basalの活性はSODにより影響されない事を示している。(e)は(b)にSODを添加したもので、Vit.K_3/Fe-EDTAにより増大した活性は約７０％抑制されている。(f)は(b)にカタラーゼを添加したもので、約４０％抑制されている。なお·OH 消去剤であるマニトールでも約２０％の阻害が見られた。

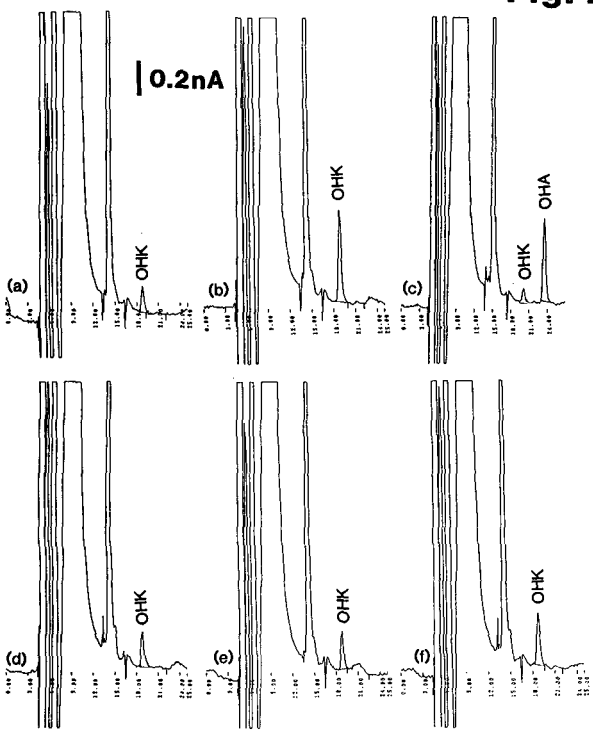
＜考察＞

外膜の純度について：外膜標品は、Whole Mtと比較して、外膜標識酵素(MAO)の比活性は約１０倍上昇し、内膜標識酵素（シトクロムＣ酸化酵素）活性は分光学的に全く検出されなかった。従って内膜電子伝達系の外膜への混入は、ほぼないと考えられる。Productの同定：Vit.K_3/Fe-EDTA complex添加によるproduct peakの増加が、確かにハイドロキシキヌレニン由来である事は、キヌレニナーゼの添加によるpeak shiftにより確かめられた（図１）。しかし、以前報告したシトクロムＣを電子受容体とした場合のpeakの増加[4]は、peak shiftを示さなかったので真のproductの増加ではないことが判明した。･OHによる芳香環の水酸化反応はよく知られており、Salicylic acid[10], Aniline, Phenol[9], Phenylalanine[6]の水酸化反応産物は、いずれもstructural isomerismを示す。今回のHPLC条件下では、活性化された場合もproduct peakは一見単一peakである（図１）が、はたして3-OHKのみかどうかは、今後明らかにしなければならない。

Vit.K_3/Fe-EDTAによる活性化機序：Vit.K_3が外膜電子伝達系（ロテノン不感受性NADH-シトクロムＣ還元酵素又はキヌレニン水酸化酵素→OM b型シトクロムか否かは不明）でもNAD(P)H依存性に一電子還元されVit.$K_3H^{\cdot}$(Semiquinone)となり、これが酸素と反応して$O_2^{\cdot-}$を生成し、生じた$O_2^{\cdot-}$とH_2O_2からFe-EDTA触媒下に･OHを生じ、この･OHがキヌレニンを水酸化する可能性が考えられるが、その詳細は今後更に研究を重ねる必要がある。

HPLC elution profiles of the product in the presence of Vit.K_3 and Fe-EDTA and the effect of kynureninase, SOD or catalase

Fig. 1



(a) Control (b) Vit.K_3+EDTA-$FeSO_4$, (c):(b)+ 3mU Kynureninase, (d): (a)+300U SOD, (e):(b)+ 300U SOD, (f): (b)+1860U Catalase, *20μM Menadione, 50μM EDTA, 5 μM$FeSO_4$,*

Table 1

Activation of Kynurenins Hydroxylation in Rat Brain Mitochondria and Mitochondrial Outer Membrane by Menadione in the Presence of Fe-EDTA Complex

Electron Donor	Compounds	*Whole Mitochondria* pmol x min^{-1} x mg $prot^{-1}$	Fold	Mitochondrial Outer Membrane pmol x min^{-1} x mg $prot^{-1}$ (Expt.1)	(Expt.2)	Fold
NADPH	No addition	0.59 ± 0.11 (3)	x1	4.64	4.58	x1
	Menadione	1.39 ± 0.33 (3)	x2	4.57	n.d.	x1
	EDTA-$FeSO_4$	1.82 ± 0.16 (3)	x3	13.90	19.48	x4
	Menadione + EDTA-$FeSO_4$	9.27 ± 0.67 (3)	x16	35.56	41.74	x8
NADH	No addition	0.61 ± 0.13 (3)	x1	3.63	n.d.	x1
	Menadione + EDTA-$FeSO_4$	25.75 ± 2.08 (3)	x42	44.76	n.d.	x12

1mg of mitochondrial protein, 100μM EDTA, 5μM $FeSO_4$, 100μM Menadione
80μg of OM protein, 50μM EDTA, 5uM $FeSO_4$, 20μM Menadione n.d. :not determined

＜文献＞

[1] Booth, R. F. G. and Clark, J. B. (1978) Biochem. J. 176, 365-379 [2] Foster, A. C., Vezzani, A. M., French, E. D. and Schwarcz, R. (1984) Neurosci. Lett. 48, 273-278 [3] Hirai, K. and Uemura, T. (1987) Bull. Jap. Neurochem. Soc. 26, 586-588 [4] Hirai, K. and Uemura, T. (1988) 第61回日本生化学会大会抄録号 60, p.655 [5] Kappus, H. and Sies, H. (1981) Experientia, 37, 1233-1241 [6] Kaur, H., Fagerheim, I., Grootveld, M., Puppo, A. and Halliwell, B. (1988) Anal. Biochem. 172, 360-367 [7] Okamoto, H., Yamamoto, S., Nozaki, M. and Hayaishi, O. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 309-314 [8] Parsons, D. F., Williams, G. R. and Chance, B. (1966) Ann. N. Y. Acad. Sci. 137, 643-666 [9] Radzik, D. M., Roston, D. A. and Kissinger, P. T. (1983) Anal. Biochem. 131, 458-464 [10] Richmond, R. Halliwell, B., Chauhan, J. and Darbre, A. (1981) Anal. Biochem. 118, 328-335 [11] Schwarcz, W. O., Whetsell, JR. and Mangano R. M. (1983) Science 219, 316-318 [12] Takeuchi, F., Otsuka, H. and Shibata, Y. (1980) J. Biochem. 88, 987-994 [13] Uemura, T. and Hirai, K. (1990) in Progress in Tryptophan and Serotonin Research 1989, in the press

141 マウス脳 MAO に対する種々抗うつ薬の影響

江頭　亨、村山　文枝
（大分医大・薬理）

〔要約〕
種々抗うつ薬、viloxazine(Vl), amitriptyline(Am), maprotiline(Mp), nomifensine(Nm) をマウスに連続投与し、脳ミトコンドリア MAOに対する影響を検討した。5-HT および β-phenylethylamine (β-PEA) を基質にした場合、 Mp をのぞき MAO 活性は 20 -30%の減少が見られた。この減少を酵素化学的に検討したところ、β-PEA 基質では、すべての薬物で Km 値の増加と Vl および Nm で Vmax 値の減少が見られた。いずれの薬物も in vitro で MAO 活性を阻害し、その作用強度は Am, Mp, Nm, Vl の順で、β-PEA を基質にした場合の方が強く阻害した。また、5-HT 基質では competitive, β -PEA基質では non-competitive な阻害態度を示した。 一方、これら薬物はサル脳 MAO を、マウスのそれに比較してより強く阻害し、 5-HT 基質で著明であった。これらの抗うつ薬はマウス脳ミトコンドリアのB型 MAO を強く阻害するが、動物種によりその作用が相違するものと思われる。

うつ病の成因に関しては未だ不明であるが、脳内アミンの量的変動が脳の機能異常をおこし、うつ病に特有な症状を誘発すると考えられている[1,2]。これらアミン仮説にのっとり種々の抗うつ薬が開発されているが、これら薬物の作用である NE や 5-HT の取り込み阻害作用と臨床上の抗うつ効果とは一致しない場合が多い[3,4]。最近ではより本質的な作用をアミン受容体の機能変化に求めている[5,6]。そこで、今回種々抗うつ薬をマウスに長期間連続投与し、中枢神経系への機能変化の一つとして、 脳内 MAO 活性に対する影響について検討した。

方法：マウスに抗うつ薬である、 viloxazine(Vl), amitriptyline(Am), maprotiline(Mp) および nomifensine(Nm) をそれぞれ30mg/kg 腹腔内に 30 日間、連続投与した。その後、脳を摘出し常法に従いミトコンドリア分画を得、これを MAO 酵素標品とした。 MAO 活性は A 型 MAO の基質として ^{14}C-5-HT を、B型 MAO の基質として ^{14}C-β-PEA を用い、ラジオアイソトープ法で測定した。 Km 及び Vmax 値は Lineweaver-Burk 法を用い、5-HT(50～250 μM) , β-PEA(2～10 μM) の濃度範囲で測定した。in vitro での抗うつ薬による阻害実験では、100 μM 5-HT および 10 μM β -PEA を用いた。また、種々抗うつ薬の濃度は10^{-3}～10^{-6} M の範囲を用い、37°C, 20 分間 preincubation した。

結果：Vl, Am, Nm 30 日間投与で 5-HT 及び β -PEA 基質のいずれの場合も、マウス脳ミトコンドリア MAO 活性は約 20 %減少していた。しかし、Mp 投与の場合は ほとんど変化は認められなかった。この MAO 活性の減少を 酵素化学的に検討したところ、5-HT 基質でVl 及び Nmの場合に僅かな Vmax 値の減少が見られた。一方、β -PEA 基質は、すべての抗うつ薬で Km 値の著明な増加と、Vl 及び Nm の場合に Vmax 値の減少が認められた（表１）。

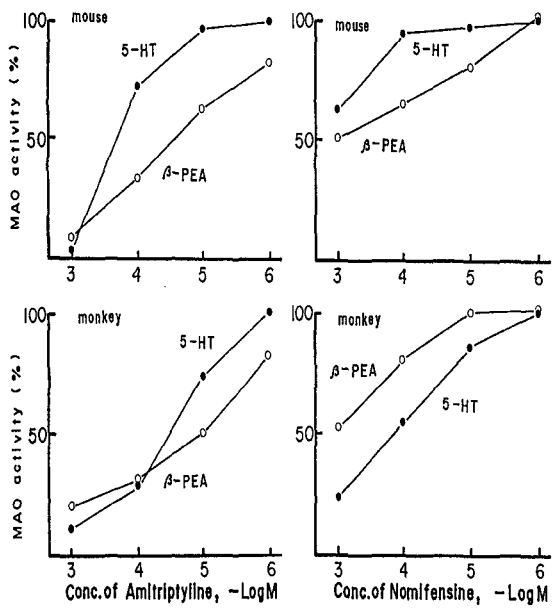
次に種々抗うつ薬によるマウス脳ミトコンドリア MAO に対する影響を in vitro で検討した。4種薬物とも 10^{-6} M から高濃度に成るにつれ MAO 活性は阻害され、その阻害強度は、Am, Mp, Nm, Vl の順であった（図1では Am, Nm のみ表記）。これは 5-HT および β-PEA 基質でも同様であった。一方、5-HT と β-PEA を基質とした場合の阻害強度を比較したところ、いずれの抗うつ薬の場合も、β-PEA を基質にした場合の方が MAO 活性を強く阻害した。また、これら薬物による阻害態度をみたところ、いずれの抗うつ薬も MAO 活性を 5-HT 基質では competitive に、β-PEA では non-competitive に阻害した。ところが、これら抗うつ薬による阻害効果をサル脳ミトコンドリアを酵素材料として、検討したところ、マウス脳ミトコンドリア MAO の場合とは相違した。阻害強度はマウスの場合と同様に Am, Mp, Nm, Vl の順であったが、Vl を除き他の3種の薬物はマウス脳 MAO よりサル脳 MAO を強く阻害した。また、Nm, Mp ではマウスの場合とは反対に、5-HT 基質にした場合の方がMAO 活性を強く阻害した。一方、Am の場合、10^{-6} M から 10^{-4} M では β-PEA 基質の方が強く阻害されたが、10^{-4} M ～ 10^{-3} M では 5-HT 基質で強く阻害された。

Vmax and Km values of MAO in brain mitochondria of mice

	5-HT		β-PEA	
	Km	Vmax	Km	Vmax
control	120.3±1.4	1.35±0.05	9.46±0.58	1.96±0.07
viloxazine	134.6±22.6	1.05±0.05*	15.86±0.29**	1.39±0.04*
amitriptyline	119.6±0.8	1.29±0.05	16.50±0.40**	1.70±0.13
maprotiline	118.3±0.8	1.33±0.23	20.73±4.60*	1.81±0.27
nomifensine	122.0±1.5	1.02±0.09*	20.90±1.05**	1.22±0.13*

Km : μM, Vmax : nmol/min/mg of protein, * $p<0.05$, ** $p<0.01$

考察：二環、三環、四環およびその他の抗うつ薬も長期間連続投与する事により弱いながらも、脳内 MAO 活性を阻害した。特に B型 MAO 活性の減少は、Km 値の増加によるものであった。また、in vitro の実験より β-PEA 基質の場合、これら抗うつ薬は MAO を non-competitive に阻害した。この事はこれら薬物による in vivo のB型 MAO 活性阻害は間接的な作用によるものと思われる。一般に、三環系抗うつ薬である imipramine はB型 MAO を強く阻害すると言われているが[7,8]、in vitro で検討したところ、これら薬物はすべてマウス脳B型 MAO を強く阻害した。ところが、サル脳 MAO を用いた場合、マウス脳よりも強く阻害され、かつ、それはA型 MAO に特異的であった。これらのことは、種々抗うつ薬による MAO 阻害作用は動物の種類により相違するものと思われ、今後抗うつ薬の作用を検討する上で、使用する動物に注意を払う必要があるものと思われる。



References
1)Schilkraut JJ et al:Am J Psychiat 122,509(1965)
2)Coppen A.:Br J Psychiat 113,1237(1967)
3)Oswald I et al.:Br J Psychiat 120,673(1972)
4)Charney DS et al.:Arch Gen Psychiat 38,1160(1981)
5)Wolfe DB et al.:J Pharmac Exp Ther 207,446(1978)
6)Conn PJ et al.:J Pharmac Exp Ther 234,195(1985)
7)Roth JA et al.:Biochem Pharmac 23,2537(1974)
8)Edward DJ and Burns MO:Life Sci 15,2045(1974)

142

神経発生関連蛋白ドレブリンのラット脳における免疫学的解析とｃＤＮＡクローニング

白尾智明、児島伸彦、井上明宏、小幡邦彦
（生理学研究所、神経化学）

〔要約〕
ラットドレブリンＥおよびＡの組織特異性を抗ドレブリンモノクローナル抗体M2F6を用いてウェスタンブロッティングにより解析したところ、ドレブリンＡは神経組織にしかなかったが、ドレブリンＥは生後１日目ラットの筋組織でも検出された。神経組織におけるドレブリンＥからＡへの変換はニワトリと同様発生が進むに従い起きるが、成熟後も少量のドレブリンＥは存在し続けた。特に小脳では成熟後もドレブリンＥとＡはほぼ等量であった。成熟ラット脳の免疫組織化学ではドレブリンの抗原性は、ニワトリでと同様にneuropil領域に偏在していたが、ラット小脳では分子層にもドレブリンの抗原性が認められニワトリとは異なった。次に成熟ラット海馬よりドレブリンcDNAをクローニングした。ニワトリとラットでドレブリンのアミノ酸配列を比べるとＮ末396残基とＣ末140残基の相同性が高かった。特にドレブリンＡ中に存在する神経細胞に特異的な挿入配列の相同性は非常に高かった。

ドレブリンは神経系の発生過程で特徴的に発現する蛋白質であり、最初ふ卵１０日目のニワトリ胚脳より精製された。ニワトリではドレブリンは３種の蛋白質アイソフォームＥ１，Ｅ２，Ａ（以前はそれぞれ S5, S6, S54蛋白と呼ばれていた(2)。）よりなり、それぞれのｍＲＮＡは１種類の遺伝子から可変スプライシングの機構により作られる(4)。スプライシングパターンは発生が進むに従いＥ１，Ｅ２，Ａの順に変化する。成熟後にも存在するドレブリンＡは神経特異蛋白で、視蓋や小脳皮質においては樹状突起にのみ偏在している。一方抗体との交差反応性から、ラットを初めとしてマウス、ウサギ、ネコ、ブタ等の哺乳類にもドレブリン様蛋白質が見つかってきている(3)。そこでラットのドレブリン様蛋白質のより詳細な解析を試みた。

〔実験方法〕

生後一日および６カ月のラットより種々の組織を取り出し、湿重量測定後10倍量のSDS sample bufferでホモジナイズして試料を調整した。Laemliの系で６％ゲルを用いてSDS電気泳動を行い、その後抗ドレブリンモノクローナル抗体M2F6 を用いて常法によりウェスタンブロッティングを行った。免疫組織化学用の切片は４％パラホルムアルデヒドで還流固定後、脳を取り出しパラフィン包埋により作製した。染色は常法により行い、発色にはDABを用いた。cDNAライブラリーは成熟ラット海馬のmRNAより、ファージベクターλgt10を用いて作製した。スクリーニングのプローブとしてはニワトリドレブリンE2のcDNA (1)を用いた。塩基配列のの決定はキロシークエンス法によって作製した欠失クローンについて、DNAシークエンサー（ABI モデル370A）によって決定した。

〔結果及び考察〕

ウェスタンブロッティングによる解析からラットには幼若型のドレブリンＥと成熟型のドレブリンＡが存在することが判った（図１Ａ）。大脳におけるドレブリンＥからＡへの変換は生後３週を境として起きた。また成熟ラットにおいてはニワトリと同様にドレブリンは神経組織にしか存在しないことが判った（図１Ｂ）。大脳及び海馬においてはドレブリンＡがほとんどでドレブリンＥがわずかにある程度であるが、小脳、脊髄においてはＥもＡと同量以上存在した。生後一日のラットにおいては筋組織からも少量ではあるがドレブリンＥが検出された。

免疫組織化学によればラット脳におけるドレブリンの分布はneuropil領域に偏在しニワトリでの結果と一致した。ニワトリ小脳ではおもに顆粒層にドレブリンＡが偏在したが、ラットでは分子層、顆粒層共にドレブリンが存在した。この分布の相違はニワトリとラットにおける小脳でのドレブリンＥの存在量の違いを反映しているのかも知れない。

成熟ラット海馬はウェスタンブロッティングの解析から、大脳と同じく比較的多量ドレブリンＡを含んでいる脳部位で

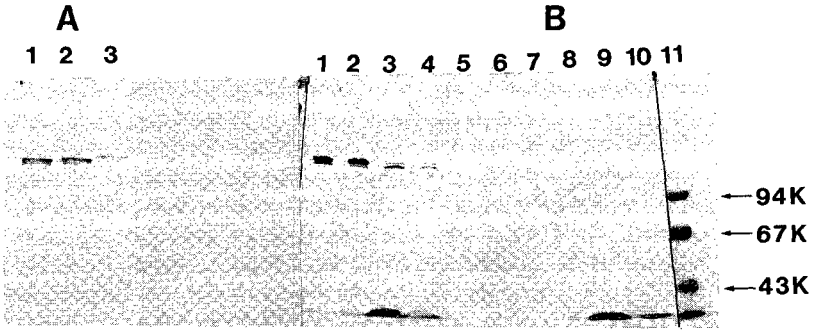


図1（A）発生過程におけるラットドレブリンの変化と（B）成熟ラットにおけるドレブリンの組織特異性
A. 1: 14日胎仔脳； 2: 生後1日大脳； 3: 成熟ラット大脳。 B. 1:大脳；2:海馬；3:小脳；4:脊髄；5:後根神経節；6:座骨神経；7:胸筋；8:心筋；9:小腸；10:肝；11:分子量マーカー。

ある事が判ったので、ここから常法により1,875,000個の独立クローンを含むｃＤＮＡライブラリーを作製した。このライブラリーより100,000個のクローンをドレブリンE2のcDNAをプローブとして用いてスクリーニングし４個の陽性クローンを単離した。この中でインサートの最も長いクローンgDrh24 (2,335 bp) の5' 配列100塩基をプローブとしてさらに40万個のクローンをスクリーニングし３個の陽性クローンgDrh26,38,102を単離した。これらの中でインサートの最も長いクローンgDrh102 の塩基配列を決定した。このクローンはポリ（A）配列を含み全長は2,775 bpであった。ノーザンブロッティングの結果からはラットドレブリンのmRNAの大きさは約 2.7 kb であったので、このｃＤＮＡはラットドレブリンmRNAのほぼ全長を含んでいると考えられた。このｃＤＮＡ配列から想定されるアミノ酸配列をニワトリのドレブリンAのアミノ酸配列と比べてみると、N末396残基とC末140残基の相同性が高かった。中でもドレブリンAにある神経特異挿入配列ins2からN末端までと３５４残基とC末端の５８残基は８０％以上の相同性を示した（図２）。一方挿入配列ins1の類似性は約５０％であった。

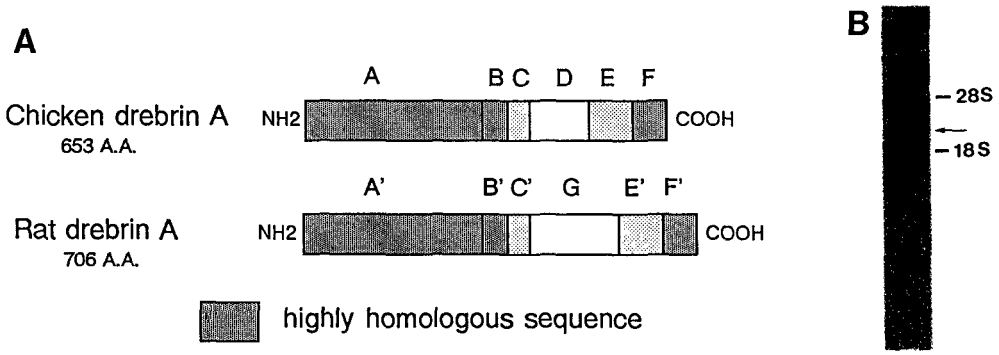


図2（A）ニワトリとラットのドレブリンAのアミノ酸配列の比較。B:挿入配列ｉｎｓ２， C:挿入配列ｉｎｓ１
（B）ラット海馬のノーザンブロッティング。３μｇのmRNAをホルマリンゲルで電気泳動後、ナイロン膜に転写し、gDrh24のインサートをプローブとしてドレブリンmRNAを検出した。

〔文献〕

(1) Kojima, K., 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., Kojima, K., Nabeta, Y. and Obata, K. (1989) Proc. Japan Acad. 65: 169-172.
(4) Shirao, T., Kojima, K., Terada, S. and Obata, K. Neuroscience Res. in press.

143 ＰＣ１２ｈ－Ｒ細胞を用いた６８ｋＤａ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、池中一裕、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-R（旧称PC12h-AG8）において、神経細胞に特異的に発現する中間径線維蛋白質である68kDaニューロフィラメント(NF-L)遺伝子のmRNA量は、神経成長因子(NGF)投与後すみやかに増大する。この発現調節は、post transcriptionalな機構による。今回、PC12h-Rとよく似た性質を持つPC12Dについて検討したところ、同様のNF-L mRNAの発現調節が観察された。遺伝子導入法を用いてこの発現調節に関与する領域の解析を行ったところ、mRNAの5'末端部分+1から+74までの領域が重要な役割を果たしていることが示唆された。

〔はじめに〕

ラット褐色細胞腫PC12hの亜株PC12h-R（旧称PC12h-AG8）は、神経成長因子(NGF)に対しPC12hより敏速に応答し、約３日でほぼすべての細胞が突起を形成する。我々は、神経細胞に特異的に発現する中間径線維蛋白質であるニューロフィラメント(NF)遺伝子の発現調節機構の解析をおこなってきたが、これまでに、このPC12h-Rにおいて68kDa NF(NF-L)のmRNAの発現が、突起伸展と同様に、きわめて敏速にNGFに対して応答することを報告した(1)。NF-L遺伝子からは第４エクソンのpoly(A) siteのalternate useにより2.5kb、3.4kbの２種のmRNAが産生される(2)が、それらのNGFに対する応答のパターンは異なっており、2.5kb mRNA は3hrで一過性の増加を示し、その後減少するが、3.4kb mRNAは、6hr後に増加し、24hr後にも変わらない。さらに、この NF-L mRNA の増加は転写量の増加によるものではなく、mRNA の安定化によるものであり、PC12h-R において、NF-L mRNA の発現は、post transcriptional に制御されていると考えられた(1)。今回、この調節機構のうち2.5kb mRNAについて検討を行いmRNAの5'末端が重要な役割を果たしていることを示唆する結果を得たので報告する。

〔材料と方法〕

細胞培養：PC12h-R、PC12Dは、10%牛胎仔血清、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または、100ng/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。cytoplasmic RNAの調製はGreenbergらの方法(3)に従った。細胞への遺伝子導入は、エレクトロポーレーション法により400V/cm、10msec、の条件で、2x10⁶ cellsあたり20μg のDNAを用いて行った。

Northern blot解析：１レーンあたり20ugのcytoplasmic RNAを用いた。NFプローブには マウスNF-L cDNA（NF68(4)；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。

〔結果と考察〕

PC12h-RにおけるNF-L遺伝子の素早い応答がこの細胞に特異的なものかどうかを調べるため、PC12D細胞(5)（佐野護博士より恵与）を用いてNF-L遺伝子の発現を検討した（図１）。PC12DはPC12h-R同様、NGFに対してすばやく応答して突起を形成することが知られており形態的にもPC12h-Rとよく似ている。ノーザンブロット解析の結果PC12D細胞においてもNF-L遺伝子はPC12h-Rの場合と同様の応答を示した。したがって、PC12h-Rにおいて見いだされたNF-L遺伝子の発現調節機構は、PC12Dにも共通なNF-L遺伝子の発現調節機構の一つであると考えられる。

このようなNF-L mRNAの転写後の調節機構を明らかにするために、NF-L遺伝子に改変を加えてPC12h-R細胞に導入し、発現した2.5kb mRNAの量が３時間のNGF処理によって増加するかどうかを指標にして制御因子を解析することを考えた。まず、マウスNF-L遺伝子に識別のために230bpのDNAフラグメントを挿入したもの（図２－Ｂ）をPC12h-Rに導入し、230bpのDNAフラグメントをプローブとしてノーザンブロット解析したところ、２種のmRNAが発現し、NGFの添加による増加が観察された（図３－Ａ）。したがって、導入されたNF-L遺伝子由来のmRNAは内因性のmRNA同様にNGFに応答しうるものである。ここで、mRNAの発現量を増やすために、マウスNF-L遺伝子を+74の位置でメタロチオネインプロモーターの下流に接続し（図２－Ｃ）、PC12h-Rに導入しmRNAを強制発現させてNGFに対する応答を解析した。ところが、ノーザンブロット解析の結果、予想された２種のmRNAの発現は認められたが、

NGFに対する応答は観察されなかった（図３－Ｂ）。この導入遺伝子のmRNAは、+1から+74までが欠失している（メタロチオネイン由来の配列とおきかわっている）ため、この領域に制御因子が存在する可能性が考えられた。そこで、逆に、+74の位置までを含むNF-LプロモーターをlacZ遺伝子に接続したもの（図２－Ｄ）をPC12h-Rに導入したところ、NGFに対する応答が観察された。以上の結果からNGFによる2.5kb mRNAの発現制御には、mRNAの5'末端領域が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。この領域には非常にC、Tの多い配列が含まれており制御因子である可能性が考えられる。

NF-Lの2.5kbと3.4kbの２種のmRNAの安定性が異なることを我々はすでに明らかにしている。この２種のmRNAは共通の5'末端部分と、poly(A) siteのalternate useにより生じる異なった3'末端構造を持つので、遺伝子の3'末端付近にも制御因子が存在するはずである。今回存在が示唆された5'末端領域の制御因子と相互に関連している可能性も考えられ興味深い。。

図１.

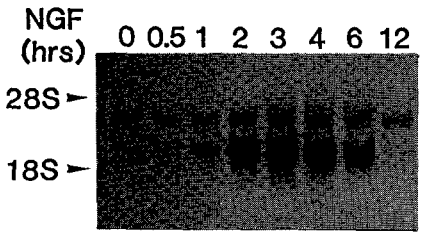


図１．　PC12D細胞におけるNF-L mRNA の
NGFによる誘導
NGF添加の 0, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12時間後に
cytoplasmic RNAを回収し、Northern blot解析した。

図２.

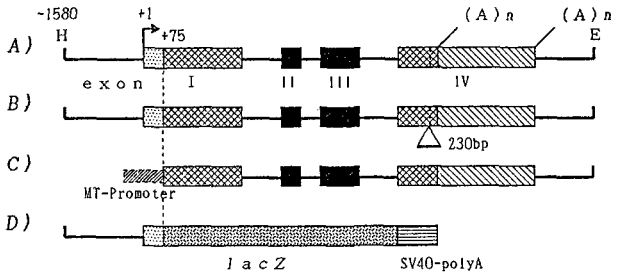


図２．マウスNF-L遺伝子の構造及び、遺伝子導入に用いた組換え体
A）NF-L遺伝子　exonをboxで示した。　B）pNFg+230
C）pMTNFg　D）pKNN112'0

図３.

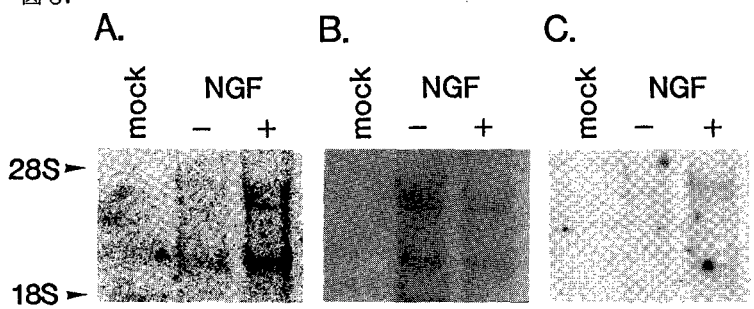


図３．　PC12h-R細胞における導入遺伝子の発現
NGF添加の３時間後にcytoplasmic RNAを回収し、Northern blot解析した。
A）pNFg+230　B）pMTNFg　C）pKNN112'0
probeには（A）挿入した230bpフラグメント（B）MT promoter領域（C）lacZ遺伝子　を用いた。

［文献］
(1) Nakahira, K. et al. J. Biol. Chem. in press
(2) Ikenaka, K. et al. J. Biol. Chem. in press
(3) Greenberg, M. E. et al. (1984) Nature 311, 433-438
(4) Lewis, S. A. et al. (1985) J. Cell Biol. 100, 843-850
(5) Katoh-Semba, R. et al. (1987) J. Neurosci. Res. 17, 36-44

144 ミエリン主要構成蛋白質ＰＬＰ遺伝子の非オリゴデンドロサイト系細胞における発現様式

鹿川哲史、池中一裕、御子柴克彦
（大阪大・蛋白研・機能制御）

〔要約〕
ミエリンプロテオリピド蛋白質（ＰＬＰ）の遺伝子に変異を持つジンピー突然変異マウスでは（５）、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトがＰＬＰの発現する以前に変性脱落すること、およびこのジンピーのオリゴデンドロサイトは正常なマウスのアストロサイトの培養上清で延命することから（１）、ＰＬＰ遺伝子産物がオリゴデンドロサイトの分化、生存に因子様の働きを有することが示唆されていた（２）。そこで、我々はアストロサイトの初代培養系でＰＬＰ遺伝子の発現を詳細に検討するためにＰＣＲ法を導入してＰＬＰとＤＭ20のmRNAを区別し高感度に検出する系を確立した。その結果、アストロサイトにおいてＰＬＰ遺伝子が多量に発現していること、しかもＰＬＰに対してＤＭ20の割合が全脳RNAの場合と比べ非常に高く、アストロサイトにＤＭ20が発現していることが明らかになった。ラット・アストロサイトーマＣ６細胞は、グリア線維性酸性蛋白質（ＧＦＡＰ）を発現しておりアストロサイトのモデルとして考えられている（４）。この細胞を分化誘導するとＰＬＰ遺伝子の発現量が増大するが、ＰＣＲ法を用いて解析するとＰＬＰは全く発現しておらず、ＤＭ20のみを発現していたことが明かとなった。ＤＭ20は、ＰＬＰの第３エクソンの一部がスプライシングを受け35アミノ酸を欠失したアイソフォームであり、膜貫通ドメインを含むその他の領域はＰＬＰと同一であるため、ＰＬＰと同様に中枢神経系ミエリンに局在し、ミエリン膜の層構造の安定化に寄与していると考えられてきた蛋白質である。しかし、ＤＭ20はオリゴデンドロサイトのみでなく、アストロサイトをはじめとする他の神経系培養細胞でも広く発現しており、神経系においてＰＬＰとは異なる機能を有することが考察された。

〔目的〕
ＰＬＰは中枢神経系ミエリンに局在し、その疎水性の強さから、ミエリン膜の層構造の維持に関与していると考えられている25kDaの蛋白質である。ＰＬＰ遺伝子のオルタナティブ・スプライシング産物であるＤＭ20も親水性領域の35アミノ酸の欠失以外はＰＬＰと同一の一次構造であり、蛋白質を分画するとミエリン画分に回収されることから、ＰＬＰとほぼ同様の分布を示し機能を持つと考えられていた（２）。しかし、我々は、ＰＬＰ遺伝子に変異を持つジンピー突然変異マウスにおいて（５）、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトがＰＬＰの発現する以前に変性脱落することから、ＰＬＰ遺伝子産物がオリゴデンドロサイトの分化、生存に因子様の働きを有するのではないかと考えていた。近年、Skoffらが、初代培養系を用い正常マウスのアストロサイトの培養上清中にジンピーマウスのオリゴデンドロサイトを延命する因子が含まれていることを報告した（１）。この因子はジンピーでは発現しておらず、ＰＬＰ遺伝子産物がミエリンの主要構成蛋白質としてミエリンの安定化に寄与するだけでなく、他の機能を有していることが示唆された。今回我々はＰＬＰ遺伝子の発現をＰＣＲ法を用い検討した結果、アストロサイトの初代培養系でＤＭ20が発現していることを見い出した。ＤＭ20がＰＬＰと異なる機能を持つ可能性を追求するため、各種培養細胞を用いてさらに詳細な解析を行った。

〔実験方法〕
１）細胞培養　細胞は10％牛胎仔血清を含むＤＭＥＭで培養した。Ｃ６細胞の分化誘導には血清を除いたＤＭＥＭを用いポリエチレンイミン処理した培養皿で２日、４日間培養した。アストロサイトの初代培養系はSkoffらの方法にしたがった（１）。
２）全RNAの調製　CsClを用い超遠心法で回収した。
３）ＰＣＲ法　全RNAから逆転写酵素を用いてcDNAを得た。第１エクソン（PCR-primer-1）から第７エクソン（PCR-primer-2）までをTaqポリメラーゼ５unitsを用いて15サイクル反応させた後、さらにTaqポリメラーゼ５unitsを加え30サイクル反応させた。検出はＰＬＰまたはＤＭ20の種々の領域のオリゴヌクレオチドを^{32}Ｐで標識してハイブリダイゼーションさせオートラジオグラフィーした。

〔結果と考察〕
Skoffらが、初代培養系を用い正常マウスのアストロサイトの培養上清中にジンピーマウスのオリゴデンドロサイトを延命する因子が含まれていることを示したので（１）、ＰＬＰ遺伝子がアストロサイトなどオリゴデンドロサイト以外の細胞で発現している可能性を検討した。アストロサイトの初代培養系から全RNAを回収し、ＰＬＰcDNAプローブを用いてノーザンブロット解析すると3.2kbのバンドが強く検出された。このmRNAの構造を詳細に解析するために、ＰＣＲ法を導入し、高感度に検出する方法を開発した。これにより、ＰＬＰmRNAからは1023bp、ＤＭ20mRNAからは918bpの長さのcDNAが増幅され、ＰＡＧＥで分離することができるようになった。また図１に示

したプローブを使い分けることによりＰＬＰ及びＤＭ20のmRNA量をそれぞれ区別して定量することも可能となった。このＰＣＲ法を利用したところ、アストロサイトの初代培養系は全脳RNAと比べＰＬＰに対してＤＭ20の割合が非常に高く、アストロサイトにＤＭ20が発現していることが示唆された。これに関してラットのアストロサイトーマＣ６細胞を用いてさらに検討した。Ｃ６細胞は、グリア繊維性酸性蛋白質（ＧＦＡＰ）を発現しておりアストロサイトのモデルとして考えられている（４）。我々はすでにノーザンブロット解析によりＣ６細胞にわずかながらＰＬＰ遺伝子の発現が認められること、また培養液から血清を除くことによりその発現が増大することを報告している（３）。今回ＰＣＲ法を用いて解析を行ったところ図２に示すようにＰＬＰ－ＡＴＧＳプローブとＤＭ20プローブで陽性のバンドが検出され、ＰＬＰ－ＯＮＬＹプローブでは検出されないことから、Ｃ６細胞で発現しているのはＤＭ20のみであることがわかった。そこで次に、グリア系以外の細胞も含めて、各種の培養細胞におけるＰＬＰ遺伝子の発現を検討した。その結果を図３に示した。マウス繊維芽NIH3T3細胞ではＰＬＰ遺伝子の発現はまったく検出されなかったが、各種神経系培養細胞には広く発現が認められ、しかもそれはＤＭ20であることが明かとなった。ＤＭ20が神経系にのみ広範に分布していることから、神経系の発生、分化に関わる分子であることが考えられた。

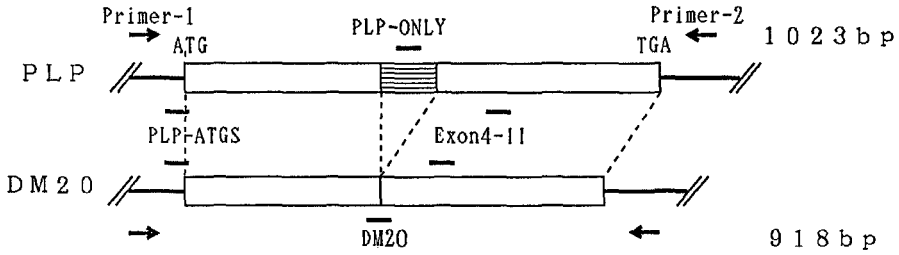


図１　ＰＬＰ及びＤＭ20のmRNAの構造と解析に用いたオリゴヌクレオチド
boxは蛋白質翻訳領域を示した。
→←はＰＣＲ法に用いたオリゴヌクレオチドプライマー
ーは検出に用いたオリゴヌクレオチドプローブ
図右にＰＣＲにより増幅されたcDNAの長さを示した。

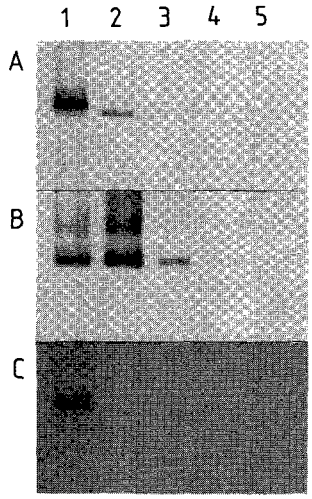


図２　Ｃ６細胞の分化誘導とＰＣＲ法を用いた
ＰＬＰ遺伝子の発現の解析
プローブとして、図１に示した　A；PLP-ATGS、B；DM20、C；PLP-ONLY　をそれぞれ用いた。レーン１にはcontrolとしてマウス全脳、レーン２、３、４はそれぞれ除血清後、４、２、０日目のＣ６細胞、レーン５はPC12h細胞の全RNAを用いてＰＣＲしたものを用いた。

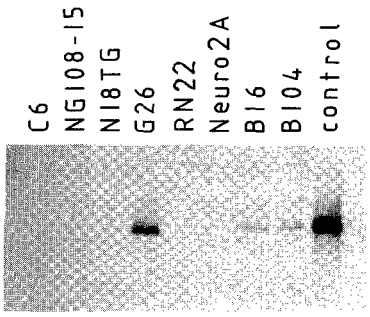


図３　神経系の各種培養細胞におけるＰＬＰ遺伝子の発現
プローブとして図１の　Exon4-II　を用いた。

〔参考文献〕

1. Bartlett, W. P. et al.(1988) Glia 1, 253-259
2. Campagnoni, A. T. and Macklin, W. B. (1988) Molecular Neurobiology 2, 41-89
3. Iwasaki, Y. et al. (1987) 第30回日本神経化学会大会論文集
4. Miura, M. et al. J. Neurochem. in press.
5. Moriguchi, A. et al. (1987) Gene 55, 333-337

145　Quakingマウスにおけるmyelin-associated glycoprotein(MAG)遺伝子のsplicing異常

藤田信也、佐藤修三、石黒英明、犬塚　貴、馬場広子、栗原　正*、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)のcDNAクローニングを行い、３種類のfull lengthのクローンを得た。その内１種類は、従来ラットで報告されているexon2 もexon12も含まないものであった。既に我々はexon 12を含まないmRNAは、ミエリン形成の最も盛んな時期に多く発現し、quakingマウスではその発現が著しく抑制されていることを報告してきた[1]。MAGはalternative splicingにより、１つの遺伝子から２つのポリペプチドを作るが、exon12を含まないmRNAから作られる分子量の大きなL-MAGが中枢神経系のミエリン形成に重要な役割を果たしていると考えられる。今回このL-MAGとexon12を含むmRNAから作られる分子量の小さなS-MAGのポリペプチドに特異的な抗体を作製し、その発現を主にquakingマウスについてimmonoblottingと免疫組織染色で検討した。更に、quakingマウスのexon12周辺の遺伝子の構造を調べた。

Myelin-associated glycoprotein(MAG)は、神経軸索周囲に局在し、軸索とミエリンの接着分子の役割を担っていると考えられる。Rodentsにおいては、１つのMAG遺伝子から、exon12のalternative splicingの機構により、２種類のポリペプチドが作られることが知られている。exon12に終止コドンが含まれており、これを含むmRNAからは分子量67kDaのsmall MAG(S-MAG)が、又含まないmRNAからは分子量72kDaのlarge MAG(L-MAG)が作られる。一方、ラットでは、非翻訳領域のexon2が、exon12とalternateな挿入をしていると考えられていた。我々は、マウスについてMAGのcDNAクローニングの研究を進め、３種類のfull-lengthのcDNAを得、exon2とexon12の関係を検討した。一方、既に我々はミエリン形成不全マウスであるquakingでexon12のalternative splicingに異常があり、L-MAGをコードするmRNAがほとんど発現していないことを報告してきた。今回、このquakingマウスのexon12周辺の遺伝子の構造を正常マウスと比較すると共に、L-MAGとS-MAGをそれぞれ特異的に認識する抗体の作成して蛋白レベルでL-MAGのquakingマウスにおける発現を検討した。

（方法）

１．マウスMAGのcDNAクローニング：生後15日令のマウス脳よりpolyA+ RNAを抽出し、Gubler & Hoffmanらの方法によりcDNAライブラリーを作製した。このライブラリーを既に我々が得ているマウスcDNAクローンでスクリーニングした。

２．合成ペプチドによる抗体の作製：MAG cDNA の塩基配列から予測されるL-MAGのC末端21個のアミノ酸から成るペプチド及びexon12に相当する部分の10個のアミノ酸のN末端にLysを付加したペプチドを、ABIのペプチド合成機を用いて作成した。これらのペプチドと牛血清アルブミンを1%グルタールアルデヒドの存在下で攪半し、Freundの完全アジュバンドと共に家兎に数回免疫した。得られた血清をそれぞれAnti-L-MAG抗体及びAnti-S-MAG抗体とし、immunoblottingと免疫組織染色に用いた。

３．QuakingマウスにおけるMAG遺伝子の解析：Exon11とexon13の部分をプライマーにして正常及びquakingマウスから抽出した遺伝子に polymerase chain reaction(RCR)をかけ、その産物を直接シークエンスして、exon12周辺の塩基配列を比較検討した。

（結果）

３種類のfull lengthのマウスMAG cDNAクローンが得られた。Exon2を含みexon12を含まないもの、及びexon2を含まずexon12を含むものは、既報のラットのalter-native splicingと同じパターンであったが、それとは別に、exon2もexon12も含まれないものがあった[2]。Exon12の配列はラットと同じであったが、53bpのexon2の配列は12 base置換がみられた。L-MAGとS-MAGにそれぞれ特異的な抗体は、Western blotでL-MAG，SMAG両方を認識する抗体

と同様、分子量約10万の位置にバンドを与えた。一方、quakingマウスではL-MAGに特異的な抗体にはほとんどバンドを認めず、S-MAGでは分子量の大きな位置にバンドを認めた（Fig .1）。免疫組織染色においても、L-MAG抗体では、quakingの小脳はほとんど染色されなかった（Fig. 2）。PCRによるexon12周辺の遺伝子の解析では、イントロンとエクソンの間のコンセンサスな配列に違いを認めなかった。

（考察）

L-MAGをコードするmRNAとS-MAGをコードするmRNAは１つのMAG遺伝子からexon12のalternative splicingの機構によって作られる。これまで、我々はexon12を含むmRNA、含まないmRNAに特異的に反応するプローブを使ってその発現を正常発育、脱髄後の再生及びミエリン形成不全マウスであるquakingについて検討してきた。その結果、正常発育において、exon12を含まないL-MAGをコードするmRNAがミエリン形成のもっとも盛んな時期や脱髄後の再生初期に優位に発現し[3]、S-MAGをコードするmRNAがそれより遅れて発現すること、又quakingにおいて、L-MAGをコードするmRNAがほとんど発現していないことがわかった。これらの事実を蛋白のレベルで確認することは重要である。今回我々は、L-MAG及びS-MAGをそれぞれ特異的に認識する抗体を作製することに成功した。 Western blotの結果、quakingではL-MAGがほとんど検出されないことがわかった[4]。一方、従来からquakingでは分子量の大きなMAGが存在することが知られていたが、この分子量の大きなMAGは異常な糖鎖を有するS-MAGであろうと思われる。L-MAGとS-MAGは、細胞外の構造は全く同じであるが、細胞内がL-MAGが 45アミノ酸長くなっている。この部分には、phosphorylation siteがあり、second messengerへ情報を伝達する役割を果たしていると考えられる。中枢神経のミエリン形成に際し、exon12が splice outされ作られるL-MAGが何らかの重要な役割を果たしていると考えられ、quakingで幼若期にexon12をsplice outしておく機構が損なわれていると推測された。

1) Fujita,N., Sato,S., Kurihara,T. et al.(1988) FEBS Lett. 232, 323-327.

2) Fujita,N., Sato,S., Kurihara,T. et al.(1989) Biochem. Biophys.Res.Commun. 165, 1162-1169.

3) Fujita,N., Ishiguro,H., Sato,S. et al. (1990) Brain Res. 513, 152-155.

4) Fujita,N., Sato,S. Ishiguro,H. et al. (1990) J.Neurochem. (in press)

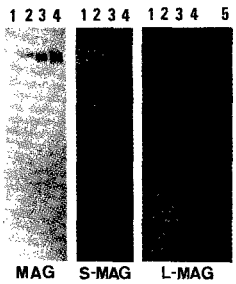


FIG. 1. Immunoblots of quaking and control mouse brain myelin stained with anti-mouse MAG antiserum (diluted 1:500), anti-S-MAG antiserum (diluted 1:500), and anti-L-MAG antiserum (diluted 1:500). Twenty micrograms of myelin protein from the brains of 15-day-old quaking (lane 1) and control (lane 3) and adult quaking (lane 2) and control (lane 4) mice was loaded. Forty micrograms of myelin protein from the brains of 15-day-old quaking mice was also loaded (lane 5).

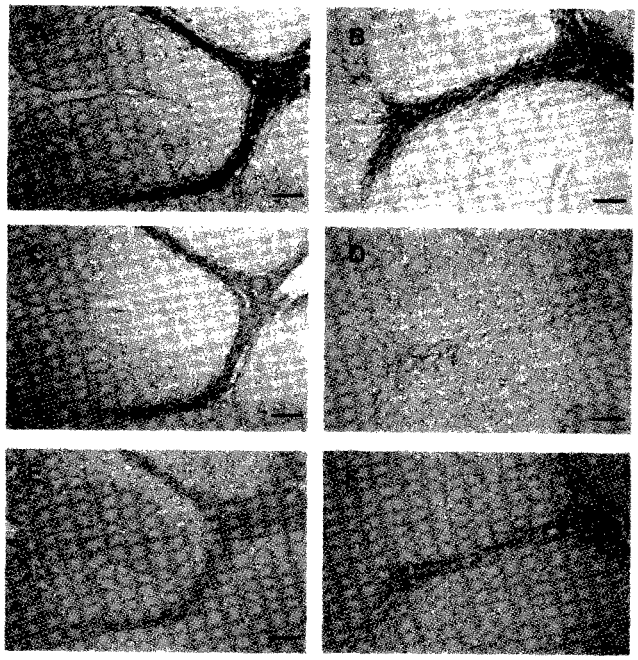


FIG. 2. Cerebellum of 15-day-old normal (A, C, and E) and quaking (B, D, and F) mice immunostained with anti-mouse MAG antiserum (diluted 1:5,000) (A and B), anti-L-MAG antiserum (diluted 1:5,000) (C and D), and anti-S-MAG antiserum (diluted 1:5,000) (E and F). Bar = 100 μm.

146　オリゴデンドログリア特異酵素CNPのmRNAのAlternative Splicing

栗原　正*，桃生勝己**，崎村建司，高橋康夫
（新潟大　脳研　神経薬理，*現　創価大　生命科学研，**現　秋田大　医　耳鼻咽喉科）

〔要約〕

マウス脳CNP 420 アミノ酸をコードする第2のcDNA（cDNA II）を分離した．前に得た 400 アミノ酸をコードするcDNA（cDNA I）とは 5'端の 53 bp のみが異なる．cDNA II の配列をマウスCNP遺伝子の配列と比較すると，exon 1 の内部に splice acceptor site があることが判明した．cDNA II の 5'端の配列は exon 1 の上流の遺伝子領域に見出され，第2の転写開始点が同定された．

非常に高い 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase（CNP）活性が脳及び脊髄に存在し，オリゴデンドログリアが特異的にCNPを発現していることが示されている（1-3）．CNP mRNA の発現はミエリン形成期にピークに達し，その後次第に減少していく（4）．CNPはSDS-PAGE上で泳動度がわずかに異なる2つのタンパクバンドとして存在する．このような分子の多様性は，他のオリゴデンドログリア特異タンパクと同じように，alternative splicing によってもたらされている可能性がある．しかしながら，現在までにクローン化されたCNPのcDNAは種により 400-404 アミノ酸をコードし，すべて homologous に見える（5-9）．本研究ではマウスCNP 420 アミノ酸をコードする第2のcDNA（cDNA II）を分離し，前に得た 400 アミノ酸をコードするcDNA（cDNA I）及びCNP遺伝子の配列と比較した．その結果，exon 1 の中ほどで alternative splicing が起きていることが明らかになった．

＜実験方法＞

前に用いたのと同じcDNAライブラリー（9）から，プローブD陽性かつプローブA陰性のクローンを選択し（プローブは図1に説明），プラスミドを調製してcDNAを同定した．遺伝子の解析には前に分離したクローン 071（9）のサブクローン 5 及び 7（図2）を用いた．

＜実験結果及び考察＞

マウス脳CNP 420 アミノ酸をコードする第2のcDNA（cDNA II）を分離した．前に得た 400 アミノ酸をコードするcDNA（cDNA I）（9）とは 5'端の 53 bp のみが異なる．cDNA I の 5'端（プローブA）は大きい方のmRNAバンドとしか反応しない（図1）．一方cDNA II の 5'端（プローブA'）は小さい方のmRNAバンドとしか反応しない（図1）．cDNA I は大きい方のmRNA（mRNA I），cDNA II は小さい方のmRNA（mRNA II）に相当すると思われる．

cDNA II の配列をマウスCNP遺伝子の配列と比較すると，図2に示すように，exon 1 の内部に splice acceptor site があることがわかる．cDNA II の 5'端（プローブA'）は exon 1 の約 800 bp 上流の遺伝子領域と反応した．そこでこの領域のヌクレオチド配列を決定したところ（図2，"Sequencing"），cDNA II の 5'端 53 bp の配列が遺伝子上に見出された．遺伝子上のこの配列の上流には，GC-rich な配列の中にコンセンサスTATA-box に近い配列（TATGAA）があり，プロモーターのコアーと考えられた．プライマー伸長，S1ヌクレアーゼ保護分析の成績はTATGAAの 26 bp 下流に転写開始点があることを示した．exon 1 のさらに上流に見出された第2の 5'端 exon を exon 0 と名付けた（図2）．

図2に示すように，alternative splicing の結果 mRNA II は mRNA I より 20 アミノ酸長いポリ

ペプチドをコードする．20 アミノ酸には塩基性アミノ酸が多く，長い方のポリペプチドの方が短い方のポリペプチドより塩基性であるという二次元電気泳動での観察（10）と一致する．ここで述べた alternative splicing は２つのプロモーターの発現に全面的に依存していることが明らかである．

＜文献＞

(1) Nishizawa et al. (1985) Neurochem. Res. 10, 1107-1118; (2) Trapp et al. (1988) J. Neurochem. 51, 859-868; (3) Goto et al. (1989) Acta Anat. Nippon. 64, 406; (4) Kurihara et al. (1989) Mol. Brain Res. 5, 247-250; (5) Kurihara et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 3256-3261; (6) Vogel and Thompson (1987) FEBS Lett. 218, 261-265; (7) Bernier et al. (1987) J. Neurosci. 7, 2703-2710; (8) Kurihara et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 152, 837-842; (9) Monoh et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 165, 1213-1220; (10) Bradbury and Thompson (1984) Biochem. J. 221, 361-368

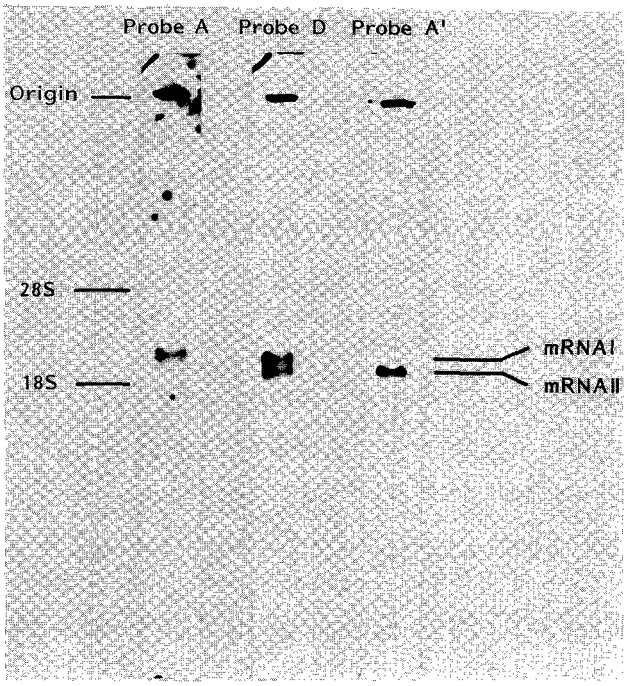


図１　ノーザンハイブリッド形成

25日令マウス脳ポリ（A）$^+$ＲＮＡ各 5 μg を電気泳動させた．プローブＡ，ｃＤＮＡ Ｉ の 5'端； プローブＤ，ｃＤＮＡ Ｉ 及び II に共通のｃＤＮＡ部分； プローブＡ'，ｃＤＮＡ II の 5'端．

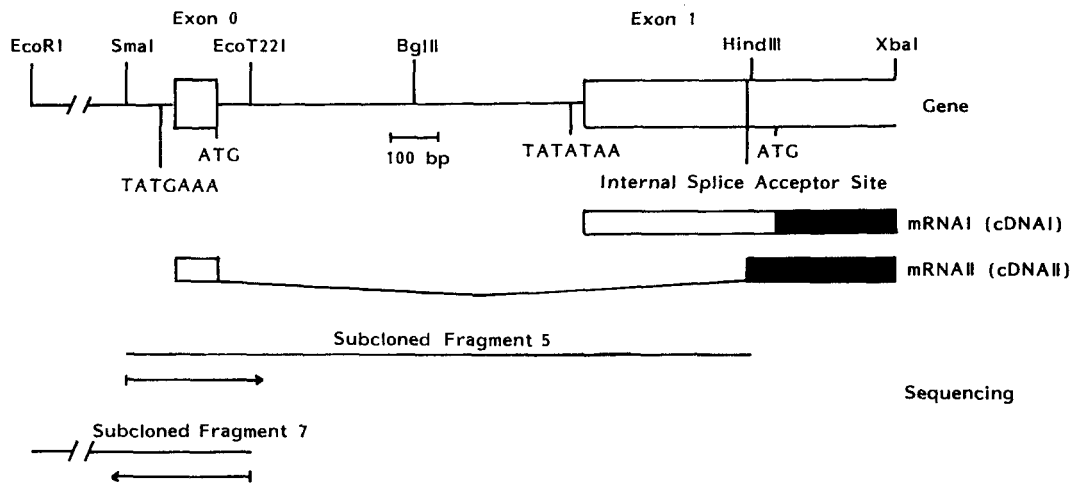


図２　マウスＣＮＰ遺伝子の 5'端領域

遺伝子上のボックスは exon 部分を示す．ｍＲＮＡ上の黒塗り部分は翻訳される部分を示す．ヌクレオチド配列はジデオキシ法で決定した．

147　ラット脳の超らせんＤＮＡ結合タンパク質

筒井公子、岡田尚志郎、庄盛敏廉　（岡山大、医、脳研病態生化）
筒井研、関周司　（岡山大、医、癌研生化）

〔要約〕　ラット脳の細胞核をDNA intercalating agentであるEthidium Bromide(EtBr)で処理すると、分子量７５Ｋと４８Ｋの超らせんDNA結合タンパク質が選択的にreleaseされた。この７５Ｋタンパク質と、核骨格に分画されてくる７５Ｋタンパク質はほぼ同じDNA結合特性を持つことがわかった。ラット肝、腎、脾の細胞核ではこれらのタンパク質のreleaseはほとんど見られなかった。DNA intercalating agentを利用して超らせんDNA結合タンパク質の精製を試み、７５Ｋタンパク質の単一標品を得たところ、0.3M NaCl存在下ではホモオリゴマーを形成していた。

細胞核内のDNAは核骨格につなぎ止められループ構造をとっている。ループ状のDNAは超らせん構造をとることができ、複製、転写と深く関わっていることが示唆されている。我々は、ラット脳細胞核の塩可溶性画分に、脳に特異的な１６５Ｋ超らせんDNA結合タンパク質を見いだし報告した（４）。脳の核骨格にも超らせんDNA結合活性を認め（２）、分子量７５Ｋのタンパク質を超らせんDNA結合タンパク質として同定した（３）。DNAの負の超らせん構造は、EtBrなどのDNA intercalating agentsにより解消する。従って、EtBrを細胞核に作用させることによりreleaseされるタンパク質のなかには超らせんDNA結合タンパク質が含まれると予想される。この方法を用いて７５Ｋタンパク質の精製を行った。

［実験方法］　細胞核の精製および核タンパク質の塩抽出：２週齢SDラットの脳、肝、腎、脾から（１）および（２）の方法を用いて行った。　核のEtBr処理：精製核を20mM EtBr/10mM Tris-HCl(pH7.0)/5mM $MgCl_2$/2mM $CaCl_2$/10mM DTT/0.2 mM PMSFで処理し、releaseされるタンパク質を遠心上清として得た。　超らせんDNA結合タンパク質の検出：ビオチン標識したplasmid DNA（I型）をプローブとしたSouthwestern Blot法によった（４）。

［結果と考察］ラット脳、肝、腎、脾の細胞核にEtBrを作用させてreleaseされてくるタンパク質のSDS-PAGE染色像を図１Ａに、Southwestern (SW)ブロット像を図１Ｂに示す。脳の細胞核では超らせんDNA結合活性を持つ分子量７５Ｋと４８Ｋのタンパク質が選択的にreleaseされた。しかし他の細胞核ではこれらのタンパク質のreleaseはほとんど認められず、肝で７５Ｋのバンドがわずかに検出されるのみであった。核の塩抽出により、脳と肝では同じ程度の超らせんDNA結合７５Ｋタンパク質が検出されていたため（４）、この矛盾を調べる目的で脳および肝の塩、あるいはEtBrによりreleaseされる核タンパク質のDNA結合特性を比較した。脳細胞核よりの７５Ｋタンパク質は塩抽出、EtBr抽出いかんに関わらず同じ結合特性を示し、これは核骨格に分画されてくる７５Ｋタンパク質と同じであった。しかし肝細胞核の塩抽出液は７５Ｋタンパク質と移動度が同じの、ストレプトアビジン－アルカリホスファターゼ複合体を結合する物質を含み（図２Ｂ）、これをDNA結合タンパク質と誤認したものと思われる。脳細胞核の塩抽出液中にはこの物質は存在しない（図２Ａ）。以上の結果から、超らせんDNAを選択的に結合する７５Ｋタンパク質も１６５Ｋタンパク質と同様に、他の臓器に比して脳に多量に存在することが示唆された。４８Ｋタンパク質はEtBrでは脳細胞核より特異的にreleaseされるが、全核タンパク質、核骨格構成タンパク質のSWブロットではほとんど検出されず、核の塩抽出によりわずかに認められることがあるのみでさらに検討の必要がある。次に、EtBrで特異的に抽出される性質を利用して７５Ｋタンパク質の精製を試みた。脳の細胞核を低塩(0.2M)で処理し、上清にくるタンパク質（図３Ａ２およびＢ２）を除いた後、核をEtBr抽出すると、図Ａ４およびＢ４で示すように７５Ｋ、４８Ｋタンパク質に富む画分が得られた。これをさらにイオン交換カラム、ゲル沪過カラムで分画し、ほぼ均一な標品を得た。７５Ｋタンパク質は0.3M NaCl存在下のゲル沪過では約３８０Ｋとして挙動することから

４－５分子が会合したホモオリゴマーとして存在していると思われる。

REFERENCES

1)Tsutsui,K., Tsutsui,K., Sakurai,H., Shohmori,T.,and Oda,T.(1986) Biochem.Biophys.Res.Commun.138,1116-1122.

2)Tsutsui,K., Tsutsui,K., and Muller,T.(1988) J.Biol.Chem. 263, 7235-7241.

3)筒井公子、庄盛敏廉、筒井研 (1988) 生化学 60、711.

4)筒井公子、岡田尚志郎、筒井研、庄盛敏廉、関周司 (1989) 神経化学 28、124-125.

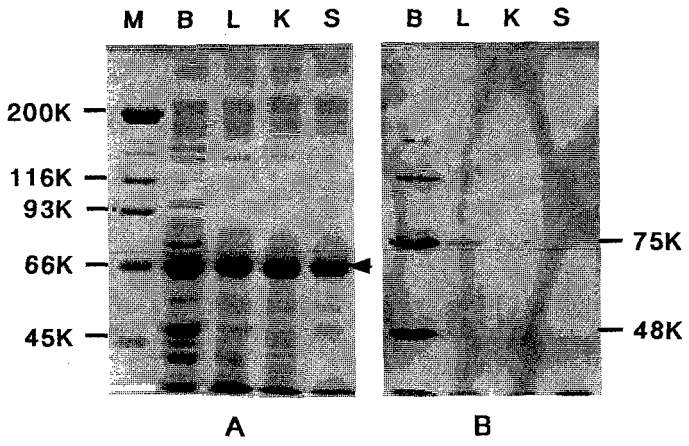


Fig.1 Supercoiled DNA-binding proteins released by EtBr from nuclei. Nuclei (1 mg DNA) isolated from rat brain (B), liver (L), kidney (K) and spleen (S) were treated with 100 µl of 20 mM EtBr-containing buffer as described in Methods. Released proteins were precipitated in 90% ethanol and separated by 7.5% SDS-PAGE. A) CBB-stained gel. The arrow head shows BSA added as a carrier prior to ethanol precipitation. Migration of molecular weight markers is shown on the left margin. B) proteins blotted on a PVDF membrane were incubated with biotinylated pG 19/45 DNA (form I) in the presence of excess E.coli DNA.

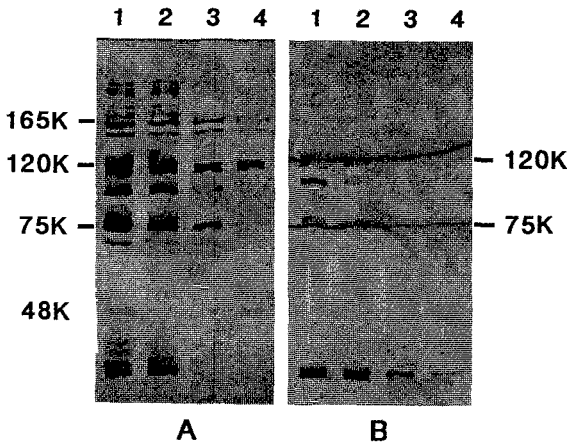


Fig.2 Southwestern blotting of extracts from brain and liver nuclei. Proteins were extracted from brain (A) and liver (B) with 0.35M NaCl and blotted on a PVDF membrane. Incubation with biotinylated pG 19/45 DNA (form I) was carried out in the absence (lanes 1, 2) and the presence of E.coli DNA (form III) in excess (lanes 3, 4). Neocuproine (lane 2) and unlabeled pG 19/45 (form I) (lane 4) were added into the reaction mixture.

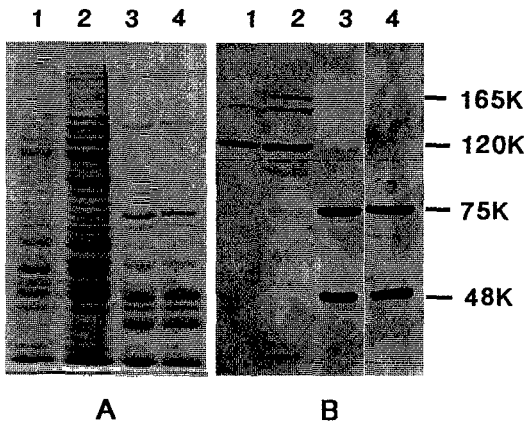


Fig.3 Sequencial extraction of brain nuclei with NaCl and EtBr. Rat brain nuclei (280 µg DNA) were treated with NaCl and extracted proteins were analyzed by 7.5% SDS-PAGE (A, CBB staining) and Southwestern blotting (B, biotinylated form I pG 19/45 DNA was used as a substrate in the presence of excess form III DNA). After the NaCl treatment, the nuclei were suspended in 20mM EtBr and released proteins were analyzed as above. Proteins released by 0.1M NaCl and 0.2M NaCl are shown on lanes 1 and 2, respectively. Proteins released by EtBr from 0.1M NaCl-treated nuclei and 0.2M NaCl-treated nuclei are shown on lanes 3 and 4, respectively.

148 ＧＭ１およびα－シアル酸コレステロールによる摘出白鼠神経節内トランスグルタミナーゼの活性化

安藤正人・中島雄三・永田　豊
（藤田学園保健衛生大・医・生理）

〔要約〕脳組織由来のGM1糖脂質や合成α-シアル酸コレステロール(α-SC)が、白鼠上頸交感神経節(SCG)と迷走神経節(NG)組織内のエネルギーの利用とタンパク合成能を抑制する時に、細胞の退行・変性過程で生化学的指標となるトランスグルタミナーゼ(TG)活性がこれらシアル酸含有化合物によってどのような影響を受けるかを、両神経節標本で比較検討した。［1］GM1(5nM)やα-SC(100μM)を含む生理溶液中で摘出SCGあるいはNGをインキュベートすると、両神経節内TGは5-15分から急激な活性上昇が見られ、何れも30分後には最大の活性化効果が認められた。この極めて短時間でのTG活性化効果はタンパク合成阻害剤添加によって全く影響されなかった。また、このTG酵素反応の速度論的解析から、GM1あるいはα-SCは共に神経節内でTG酵素と基質の親和性を増大するのみならず、反応速度の促進を示した。このことから、TGタンパクの合成誘導ではなく酵素分子内の構造変化（修飾）に起因した変化と考えられた。［2］GM1添加による両神経節のTGの活性化はGM1糖鎖を特異的に隠蔽するコレラ毒素B(250ng/ml)によって有意に抑制されたこと、およびコレステロール(20μM)添加よりもα-SCによる酵素の活性化が著明であることから、TGの活性化はシアル酸部分の作用によることが明かとなった。［3］両神経節内TGは環状ヌクレオチド添加よりもprotein kinase C(PKC)を活性化するphorbol ester(TPA;1μM)添加により GM1やα-SCとは反対に著明な抑制効果を示したことから、シアル酸残基はPKCの活性調節系と密接に関連してTGの活性化に至る情報伝達系に関与している可能性が考えられた。

〔序〕細胞質に局在するトランスグルタミナーゼ(TG)は、ペプチドのグルタミン残基へのポリアミンの付加反応を触媒して、異なるポリペプチド鎖間のcross-linkageを増大させるために、細胞内タンパクの流動性あるいは細胞構造の統合性を消失させるように作用していることが示されている(4)。従って、生体に種々の刺激が与えられた時に急速に進行する細胞の退行・変性過程を生化学的に検知するうえで、TG活性の変動の測定は有用な指標となる。既に我々は、神経突起の伸展や分化を引き起こすことが知られている、天然のGM1糖脂質(GM1)あるいは人工合成したα-シアル酸コレステロール(α-SC)は、成熟白鼠より摘出した上頸交感神経節(SCG)と感覚性の迷走(節状)神経節(NG)内への［^{3}H］leucineの取り込みを組織特異的に著明に減少させ、この時神経節組織内のエネルギー担体（ATPとクレアチン・リン酸）含量の蓄積の増大を認めた(2)。そこで、GM1やα-SCがSCGとNG標本の代謝活性を低下させた時に、これら化合物が神経節内のTG活性にどのような影響をおよぼすのかを両神経節標本で比較検討して、TGの活性化発現の調節機序を追求した。

〔実験材料および方法〕①成熟白鼠よりSCGおよびNG標本の摘出は既報(2)に従い実施した。②TG活性の測定は、通常予め生理溶液中で37°C好気的にインキュベートした神経節標本を酵素標品として、［^{3}H］putrescine (1110GBq/mmol)がN, N'-dimethylcasein タンパクに取り込まれる放射活性から求めるLorandらの方法(7)に準じて実施した。

〔実験結果および考察〕［1］GM1あるいはα-SCによる神経節内TG活性の経時変化ならびに酵素反応機構の解析：摘出SCG標本をGM1(5nM)を含む生理溶液中で好気的にインキュベートすると、15分から30分まで急激な神経節内TG活性の上昇が見られ、対照SCGの酵素活性値の約5.4倍に達したが、さらに2時間迄インキュベーションを続けると、このTGの活性化効果は僅かに低下したが、かなり高い活性値が維持された（図１）。　同様に、α-SC(100μM)の添加によってSCG標本のGM1の活性化効果よりも著しいTGの活性上昇が短時間(5分以内)から見られ、30分後に最大（約8.5倍）となり、以後時間経過と共にやや減少したが、GM1添加と同様に高い活性値が保たれるのが示された（図１）。一方、NG標本ではGM1又はα-SCの添加によって、SCG標本の場合とほぼ同様に、急速な神経節の　TG活性の上昇効果が認められ、30分後にそれぞれ活性化の最大効果（約1.3倍および約2.2倍）が示された（図１）。そこで、以下のインキュベーション時間は30分とした。既に著者らは、ポリアミン合成過程の律速酵素のオルニチン脱炭酸酵素(ODC)が、SCGのホルモンや神経伝達刺激によって、3～4時間以上の潜時を経て著明に活性化されることを報告した(1)。そして、この活性増大効果はタンパク合成阻害剤のcycloheximide(CHX)の同時添加によって消失することから、新たなODCタンパクの誘導新生による活性化現象であることを確認している(1)。しかし、今回のGM1やα-SCによるTG活性の両神経節内の上昇は、CHX(10μg/ml)添加によって全く抑制されなかった（表１）ことから、これらシアル酸化合物がTG酵素タンパク分子のconformation変化（修飾）を引き起こして、極めて短時間に酵素の活性化を引き起こしたものと考えられた。さらに、この機構を動力学的に解析すると何れのシアル酸化合物も両神経節内TGの見かけのKm値を約1/2に低下させ、一方Vmax値を著明に上昇させる効果が認められた（当日発表）。このことから、GM1やα-SCによるTGの活性化は、基質に対する神経節TG酵素の親和性の増大のみならず、触媒能の亢進に起因することが明かとなった。［2］GM1 あるいはα-SCによる両神経節のTG活性化調節系におよぼすコレラ毒素B、環状nucleotide、TPAあるいはTFPの影響：GM1による神経節内TGの活性化効果は、GM1糖鎖部分を特異的に隠蔽するコレラ毒素B(250ng/ml)をさらに添加すると SCGでは約1/2に低下するのに留まったが、NG神経節ではほぼ完全に拮抗された（表１）。　一方、疎水性のコレステロール(20μM:最大溶解濃度)の単独添加によって両神経節のTG活性は何れも有意に上昇したが、この効果はα-SCによるSCGあるいはNG標本のTG活性化よりもかなり低値であった（表１）。すなわち、天然あるいは人工のシアル酸含有化合物添加による神経節内のTG活性化効果は、GM1分子内の親水性糖鎖およびα-SC内シアル酸部分が有効に作用した結果であ

ることが明らかである。最近、培養小脳顆粒神経細胞のprotein kinase C(PKC)活性がGM1によって低下することが認められており(8)、またα-SCが脳由来のグリア芽細胞の形態分化を促進する際に、細胞内環状AMP生成の増大が起こらないことが指摘されている(6)。そこで、これらシアル酸化合物の刺激によるTGの活性化を調節する細胞内情報伝達系の関与を神経節標本で検討した。細胞によって分解されない環状AMPあるいはGMPのdibutyryl誘導体(100μM)を添加しても、SCGおよびNG神経節内TG活性には有意な変動は見られなかった（表２）。一方、TPA(phorbol ester;1μM)で両標本のPKC活性を刺激する(5)とSCGでは約20%、NGでは約55%ものTG活性の著明な抑制効果が示された（表２）。逆に、TFP(trifluoperazine;10μg/ml)を添加してPKC活性を抑制した(3)条件では、何れの神経節内TGも約2倍前後に活性化されることが認められた（表２）。したがって、TGは細胞内Caイオンに依存して活性発現する酵素である（表１）(4)ので、シアル酸残基はおそらく細胞内Caイオンによって生理的に変動するPKCの活性調節系と密接に関連したcascade反応系に組み込まれて、神経節細胞内TGの活性化を引き起こしている可能性が強く考えられた。

〔謝辞〕本研究の一部は、文部省科学研究費（重点領域・ガングリオシド # 022592018）の援助に依った。

〔文献〕(1)Ando et al.(1984)Cell.Mol.Neurobiol.4,79-90.(2)Ando et al.(1990)Mol.Chem.Neuropathol.(in press)(3)Chakrabarti et al.(1990)J.Neurochem.54,1816-1819.(4)Fesus and Thomazy(1988)Adv.Exp.Med.Biol.231,119-134.(5)Georges et al.(1989)J.Neurochem.52,1156-1161.(6)Kato et al.(1988)Brain Res.438,277-285.(7)Lorand et al.(1972)Analyt.Biochem.50,623-631.(8)Vaccarino et al.(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,8707-8711.

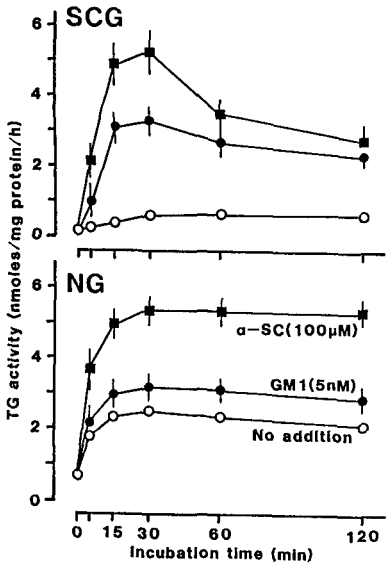


図１.GM1あるいはα-SC による摘出神経節内TG活性化の経時変化.

表１．摘出神経節内TG活性におよぼすGM1あるいはα-SCの影響.

Conditions	TG activity (nmoles/mg protein/h)	change %	
Intact SCG	0.120 ± 0.008 (8)	100	
no addition	0.618 ± 0.055 (8)	515	100
+cycloheximide(10μg/ml)	0.605 ± 0.051 (4)	504	98
+EGTA(1mM)/Ca-free	0.055 ± 0.008 (4)[b]	46	9
+GM1(5nM)	3.339 ± 0.367 (5)[b]	2783	540
+cholera toxin B(250ng/ml)	1.242 ± 0.112 (4)[b]	1035	201
+GM1+toxin B	1.710 ± 0.137 (4)[b]	1425	277
+α-SC(100μM)	5.295 ± 0.635 (5)[b]	4413	857
+cholesterol(20μM)	1.512 ± 0.288 (4)[b]	1260	245
Intact NG	0.681 ± 0.060 (8)	100	
no addition	2.478 ± 0.204 (8)	364	100
+cycloheximide(10μg/ml)	2.295 ± 0.190 (4)	337	93
+EGTA(1mM)/Ca-free	0.214 ± 0.013 (4)[b]	31	9
+GM1(5nM)	3.294 ± 0.362 (5)[a]	484	133
+cholera toxin B(250ng/ml)	2.751 ± 0.330 (4)	404	111
+GM1+toxin B	2.577 ± 0.232 (4)	378	104
+α-SC(100μM)	5.376 ± 0.367 (5)[b]	789	217
+cholesterol(20μM)	4.113 ± 0.452 (4)[b]	604	166

平均値±SD(例数)　[a]p<0.05, [b]p<0.001 SCG or NG alone と比較.

表２.摘出神経節内TG活性におよぼす環状ﾇｸﾚｵﾁﾄﾞ、TPAおよびTFPの影響

Conditions	TG activity (nmoles/mg protein/h)	change %
control SCG	0.618 ± 0.055 (8)	100
+dbcyclic AMP(100μM)[a]	0.564 ± 0.050 (4)	91
+dbcyclic GMP(100μM)[a]	0.570 ± 0.053 (4)	92
+TPA(1μM)	0.491 ± 0.047 (4)[b]	79
+TFP(10μg/ml)	1.133 ± 0.070 (4)[c]	183
control NG	2.478 ± 0.204 (8)	100
+dbcyclic AMP(100μM)[a]	2.309 ± 0.210 (4)	93
+dbcyclic GMP(100μM)[a]	2.414 ± 0.213 (4)	97
+TPA(1μM)	1.082 ± 0.078 (4)[c]	44
+TFP(10μg/ml)	5.215 ± 0.303 (4)[c]	210

dbcyclic AMP, dibutyryl cyclic AMP ; dbcyclic GMP, dibutyryl cyclic GMP ; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate ; TFP, trifluoperazine.　[a]IBMX (1mM)を含む. [b]p<0.05 [c]p<0.001.

149 脳リソゾーム水解酵素群に対する酸性高分子化合物の影響

近藤啓次、水野龍男、日根野尚、上野修一、佐野輝、柿本泰男
愛媛大学医学部神経精神医学

〔要約〕 脳血管障害等の脳の器質的障害における、リソゾーム性水解酵素による組織侵襲破壊を天然酸性高分子化合物をもって阻止する治療法の開発を目的とし、以下の実験を行なった。ラット脳の各種リソゾーム性水解酵素活性は、生体内酸性高分子であるDNA, RNA, Heparin, Heparan Sulfate, Chondroitin Sulfateといった核酸や多糖によって阻害を受けるものが多かった。酸性β-Glucosidaseを例にとれば、上記5種の化合物はいずれも濃度依存性に酵素活性に阻害をかけ、各化合物20μg/mlの濃度でいずれも50%以上の阻害を与えた。一方、ラット脳で断頭虚血を行なうと、10分後よりβ-Glucosidase活性が、60分後よりα-Glucosidase活性が上昇した。しかし、ラット四動脈閉塞脳虚血モデルでは、虚血後24時間まで各種酵素活性に変化は見られなかった。今後、脳血管障害モデルの検討を行ない、in vivoにおける上記酸性高分子化合物の影響を検討したい。

〔目的〕 脳血管障害は、我が国の死因第3位を占め、老人の痴呆の第1の病因であり、新たな治療法の開発が急務である。一般に、炎症、出血、梗塞などの組織侵襲の際に、リソゾーム性水解酵素群が活性化されることはよく知られている[1]。実験的脳虚血動物においても、一部のリソゾーム水解酵素が活性化されることが報告されている[2]。最近、我々はin vitroにおいて酸性高分子化合物である核酸が種々のリソゾーム性水解酵素に対し阻害作用を持つことを発見した[3]。同様に、ヘパリンやコンドロイチン硫酸といった酸性多糖類はin vitroにおいてラット肝臓のリソゾーム性リバーゼに阻害をかけることが報告されている[4]。これら酸性高分子化合物がin vivoにおいてリソゾーム水解酵素群を阻害し、脳血管障害等の脳の組織損傷過程を食い止める可能性が予想され、実験的脳虚血モデルを用いて以下の実験を行なった。

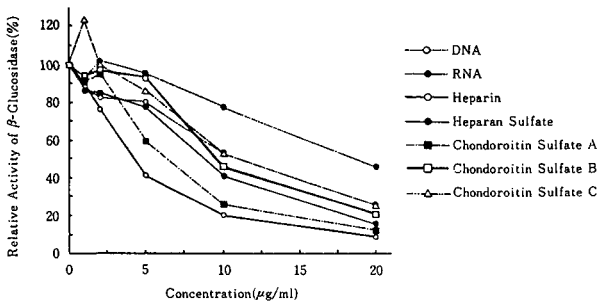


Fig. 1 The effects of acidic polymers on rat brain acid β-glucosidase.

Table 1 The effects of acidic polymers on rat brain lysosomal hydrolases.

Acid Hydrolases	DNA	RNA	Heparin	Heparan Sulfate	Chondroitin Sulfate		
					A	B	C
β-Glucosidase	25	45	8	15	12	21	25
α-Glucosidase	105	113	105	112	106	106	104
β-N-Acetylglucosaminidase	27	32	35	51	85	84	82
β-Glucuronidase	81	101	73	83	83	74	88
β-Galactosidase	58	74	74	105	121	124	124
Sulfatase	14	20	10	14	39	42	45
Phosphatase	42	16	0	1	19	15	18

Each 20 μg/ml concentration of compounds was used. Relative enzyme activities were shown in % of control.

〔方法〕 1）動物および手術手技：ラットはウィスター系雄、体重330-390 gのものを用いた。ラット四動脈閉塞脳虚血モデルの作成には杉尾の方法[5]を用いた。すなわち、ラットをネンブタール麻酔下に第2頚椎レベルにて両側椎骨動脈を電気的に焼却し、翌日クリップで両側総頚動脈を15分間遮断した。また、断頭による虚血モデルにおいては、軽いエーテル麻酔下に両側股静脈を切開し、左心室から生理的食塩水で全身性に灌流をよく行なった後、断頭を行ない以後室温で放置し時間経過を追った。

2）酵素活性の測定：七種類のリソゾーム性酸性水解酵素の活性測定には佐野らの方法[4]を用いた。すなわち、基質には各種メチルウンベリフェリル化合物を使用し、酵素反応後生じるメチルウンベリフェロンの蛍光を測定した。

〔成績〕 1）各種酸性高分子化合物の脳リソゾーム酵素に対する影響

ラット脳ホモジネートを酵素標品とした場合の酸性β-Glucosidase活性に対する各種酸性高分子化合物の影響をFig. 1に示した。DNA, RNA, Heparin, Heparan Sulfate, およびChondroitin Sulfate A, B, Cはすべて濃度依存性の強

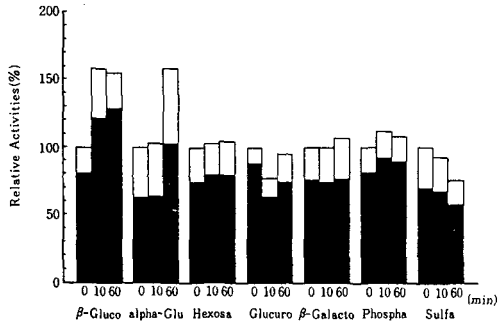


Fig. 2 The changes of the activities of rat brain acid hydrolases *after decapitation*. (N=3)
Total enzyme activities of the supernatant and the pellet at 0 min are shown as 100 %. Open colums are the activities in the supernatant and closed columns are the activities in the pellet. ß-Gluco: ß-Glucosidase; alpha-Glu: α-Glucosidase; Hexosa: Hexosaminidase; Glucuro: ß-Glucuronidase; ß-Galacto: ß-Galactosidase; Phospha: Phosphatase; Sulfa: Sulfatase.

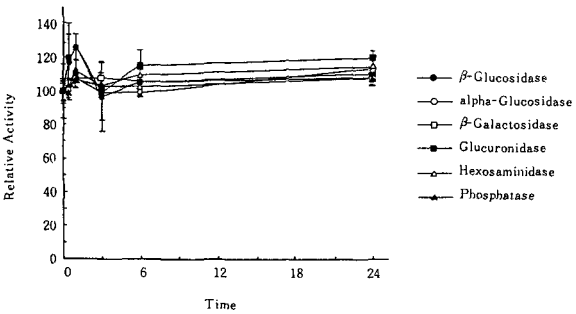


Fig. 3 The effects of ischemia on rat brain lysosomal hydrolases. (N=3)

い阻害活性を示し、各化合物 20μg/ml の濃度ではいずれも 50% 以上の阻害を与えた。次にその他の 6 種のリソゾーム酵素について各種酸性高分子化合物を 20μg/ml の濃度に加え活性を測定した（Table 1）。他の Glycosidases, Sulfatase, Phosphatase においても同様に阻害を受けたものが見られたが、α-Glucosidase ではすべての化合物で活性がやや上昇する傾向が見られた。またβ-Galactosidase は Heparan Sulfate および Chondroitin Sulfate A, B, C で活性の軽度上昇が見られた。

2）断頭虚血の脳リソゾーム酵素に対する影響

断頭後、総活性としてβ-Glucosidase は 10 分および 60 分後に約 1.5 倍に、α-Glucosidase は 60 分後に約 1.5 倍に上昇した。しかし、その他の Glycosidases, Sulfatase, Phosphatase では活性に変化は見られなかった。また、すべての酵素において、等張緩衝液でのホモジネートの 30,000 g の遠心上清および沈殿の活性の割合には断頭後の時間的な変化は見られなかった（Fig. 2）。

3）ラット四動脈閉塞脳虚血モデルにおけるリソゾーム酵素の変化

ラットは両側椎骨動脈焼却の翌日、両側総頚動脈クリッピングで15 分間虚血後再灌流させ、0, 0.5, 1, 3, 6, 24 時間後に断頭し、素早く脳を取り出して液体窒素中にて凍結させた。その後 1 mM PMSF を含む 10 mM Na-リン酸緩衝液（pH 7.0）でホモジナイズしホモジネートを酵素標品としてリソゾーム性酸性水解酵素の活性測定を行なった（Fig. 3）。虚血後 24 時間まで各種リソゾーム酵素活性の有意な変化は見られなかった。

[考察] 我々は、先にウシ脾臓の酵素を用いて酸性高分子である核酸がリソゾーム性酸性水解酵素群に非競合性阻害作用を示すことを明らかにした[3]。また、Kariya と Kapran はラット肝臓のリソゾーム性リパーゼに対して、Heparin および Chondroitin Sulfate が阻害作用を持つことを報告している。今回我々は、ラットの脳リソゾーム性酸性水解酵素群に対しても核酸、Heparin および Chondroitin Sulfate が阻害作用を持つことを明らかにした。加えて、Heparan Sulfate にも同様の阻害作用があることが示された。核酸のリソゾーム酵素に対する阻害様式は、非競合的であることを我々はすでに報告したが[3]、これら酸性高分子が酵素の活性部位に基質と競合するのではなく、何らかの間接的影響を活性部位に与えてそれらの阻害作用を与えることが推察される。In vivo における脳の虚血がリソゾーム性水解酵素群に与える影響は、我々の知るかぎりでは、Clendenon らによって示されている[2]のみである。彼らによると、総活性において、酸性 phosphatase, arylsulfatase が虚血負荷 3 時間後に、各々 1.4, 1.2 倍に活性が上昇し、24 時間後には元に戻ることを示している。今回我々が得た結果では、断頭虚血により酸性α-およびβ-Glucosidase に活性が約 1.5 倍に上昇した。また、Clendenon らは虚血脳の遠心上清中のリソゾーム酵素活性の割合が高くなることを示している[2]。しかし、今回の我々の断頭虚血モデルでは、遠心上清と沈殿の活性比の変化は認められなかった。また、四動脈閉塞脳虚血モデルではリソゾーム酵素活性に虚血の影響は有意に認められなかった。この点が、単に虚血モデルによるものかどうかさらに今後モデルの検討を行ない、in vitro で見いだした上記酸性高分子のリソゾーム水解酵素群の阻害の治療応用の可能性を検討したい。

[文献] 1. Clendenon, N. R., Allen, N., Komatsu, T., Liss, L. Gordon, W., A., and Heimberger, K. (1971) Arch. Neurol. 25, 432-448; 2. Kariya, M. and Kaplan, A. (1973) J. Lipid Res. 14, 243-249; 3. Pitt, D. in *Lysosomes and Cell Function*, New York, Longman; 4. Sano, A. and Radin, N., R. (1988) Biochem. J. 254, 297-300; 5. Sugio, K., Horigome, N. Sakaguchi, and T. Goto, M. (1988) Stroke 12, 922

150 脳虚血後のラット脳のＳＯＤ様活性の変化

金光秀晃、高木清、田村晃、佐野圭司
（帝京大学・医・脳神経外科）

〔要約〕

中大脳動脈(MCA)閉塞による脳虚血後のラット脳のＳＯＤ活性とアスコルビン酸レベルの経時的変化を測定した。透析前と透析後の試料について、ＳＯＤ活性はＥＳＲ－Spin Trapping法でアスコルビン酸はＨＰＬＣ－ＥＤ法を用いて行なった。MCA閉塞後時間経過とともに虚血側のＳＯＤ活性は低下を示し、虚血24,48時間後においてはコントロールに比べて有意な低下がみられた。また、透析群と非透析群を比較してみると、ＳＯＤ活性もアスコルビン酸レベルも透析群の方が非透析群に比べて有意な低下がみられた。

［目的］

虚血傷害において活性酸素が関与している[1]といわれているが、まだその実体は明らかでない。われわれは生体内における活性酸素の発生系の一つであるキサンチンオキシダーゼ系に注目してオキシプリンの脳虚血後の変化を測定して、その変化が酵素的であることを示した[2-5]。今回はO_2^-のスカベンジャーであるＳＯＤとアスコルビン酸に着目して脳虚血後の変化を追ってみた。

［方法］

8-10週齢の雄Sprague Dawleyラットの左MCA を2%ハロセン吸入麻酔下で閉塞した。手術は田村ら[3]のMCA閉塞モデルを用いた。動物を側位に固定し、経眼窩的に電気双極凝固鑷子によって左MCA を永久的に閉塞した。対照群としては、無処置の正常ラットを用いた。

ラットは手術後、30分、4,24,48 時間後に断頭し、大脳を素早く摘出し、虚血中心である尾状核被殻を含む切片を作製した。この切片を虚血側（左）と非虚血側（右）に分け、重量を測定して、9倍量の氷冷した1mMEDTAを含む50mMリン燐酸緩衝液(pH 7.8)を加えて30秒間ポリトロンで均一化した。そのホモゲネートを4°C、12,000rpmで20分間遠心した。この上清を二分し、一方はそのまま試料として用い、他方は一夜50mMリン酸緩衝液(pH 7.8)で透析して試料とした。それらの試料についてＳＯＤ活性はＥＳＲ-spintrapping法[6]、アスコルビン酸はＨＰＬＣ－ＥＤ法[2]で測定した。

統計学的検討はWilcoxon testにて行なった。

［成績］

図１に示すように、虚血側のＳＯＤ活性は脳虚血後時間が経つにつれて弱くなり、24時間では46.2±5.0、48時間後では36.5±3.8と対照群75.5±10.1に比べてそれぞれ約60％（$p<0.05$）、約50％（$p<0.01$)と有意に低下した。一方、反対側に関しては殆ど変化がなかった。

透析群と非透析群を比較すると透析群の方が有意に低い値を示した。（図１）

図２に示すようにアスコルビン酸に関してもＳＯＤ活性と同様な結果が得られた。

［考察］

虚血後の組織傷害にO_2^-が関与していることが言われ、そのスカベンジャーであるＳＯＤ投与により治療方法が検討されている。我々の知る限りでは、虚血後のＳＯＤ活性を測定した報告例はない。我々は初めて虚血後ＳＯＤ活性の有意な低下を認めた。しかしながら、MCA閉塞24,48時間後における虚血側ＳＯＤ活性の低下がどのような機構で起こるかは色々考えられるが今後の研究を俟たなければならない。

ＳＯＤ活性とアスコルビン酸において透析群と非透析群の間に有意な低下を認められたことから、ＳＯＤ活性の測定には透析によりアスコルビン酸等のＳＯＤ様活性をもつ低分子の影響を除外する方

がより良いと思われる。

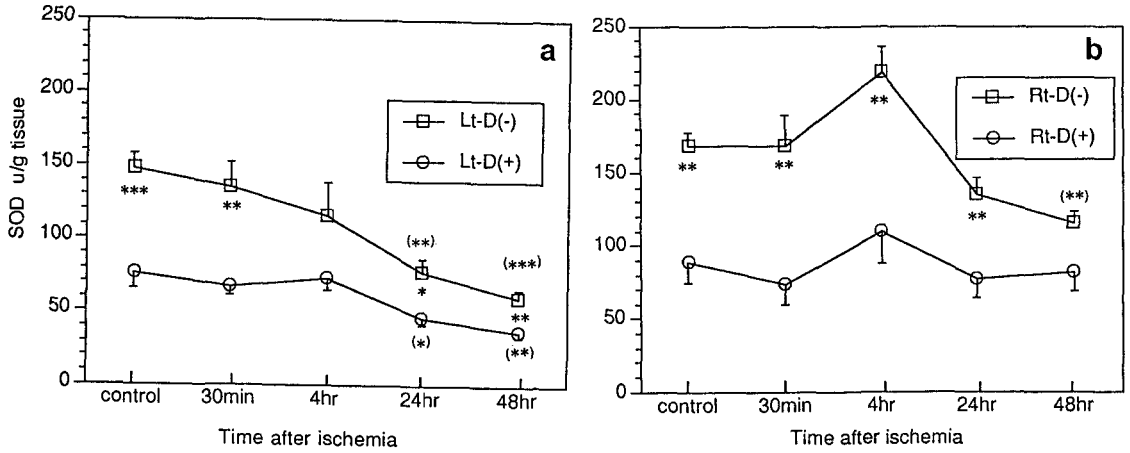


FIG. 1. Change of SOD activity following focal cerebral ischemia in dialysis and non-dialysis groups:(a) left (ischemic) side (b) right (opposite) side. All values are average ± standard error. Each value of the MCA-occluded group was compared with that of the control group: (*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p<0.001. Each value of the dialysis group was compared with that of the non-dialysis group. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

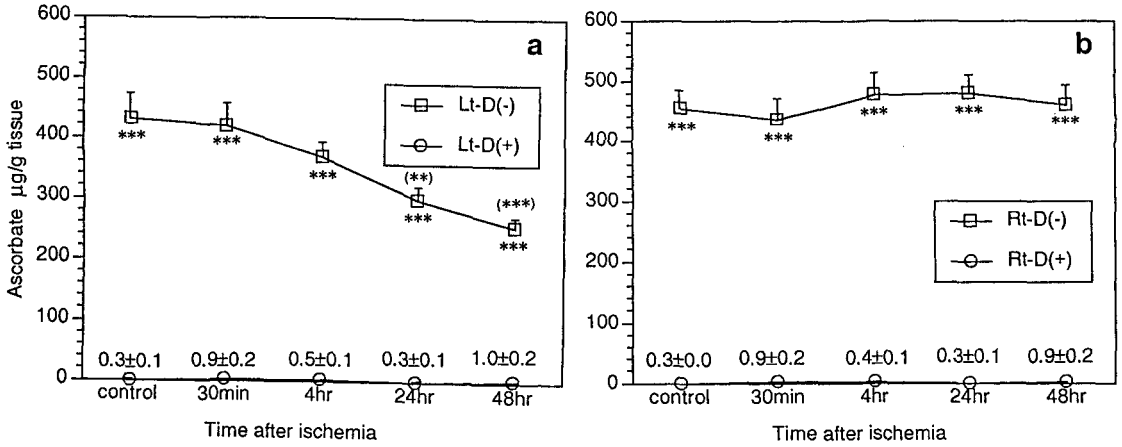


FIG. 2. Change of ascorbate level following focal cerebral ischemia in dialysis and non-dialysis groups:(a) left (ischemic) side (b) right (opposite) side. All values are average ± standard error. Each value of the MCA-occluded group was compared with that of the control group: (**) p<0.01, (***) p<0.001. Each value of the dialysis group was compared with that of the non-dialysis group. *** p<0.001.

[文献]

1) McCord, J. M. (1985) New Engl. J. Med. 312:159-163,1985.
2) Kanemitsu, H., Tamura, A., Sano, K., et. al. (1986) J. Neurochem. 46:851-853(1986)
3) Kanemitsu H, Tamura, A., Kirino, T., et. al. (1988) J. Neurochem. 51:1882-1885.
4) Kanemitsu, H., Tamura, A., Kirino, T., et. al. (1989) Brain Research 499:367-370
5) Nihei, H., Kanemitsu, H., Tamura, A., et. al. (1990) Neurosurgery 25:6139-617
6) 河野雅弘 (1989) Lab. Clin. Pract. 7:65-71

151) 脊椎動物網膜内における Ornithine Aminotransferase (OAT, EC 2.6.1.13) 分子とその酵素活性の分布

〔加藤尚彦，中村史雄*，橋田誠一**，石川栄治**，松沢健夫***
〔所〕(横市大・医・生化，東大・医・脳研*，宮崎医大・生化**，藤田保衛大・医・生化***)

〔要約〕 Mitochondria の matrix enzyme である OAT の酵素分子と酵素活性について，網膜各層間の分布を分析した．マウスとラットの網膜層の凍結乾燥試料(10～68 ng)を調製して秤量した後，新たに工夫した OAT の微量酵素免疫測定法と微量活性測定法を用いて測定した．OAT は脈絡膜と，内網膜特に Muller 細胞の足部が存在する神経節細胞層に多く含まれ，酵素分子と活性の分布は良く一致した．mitochondria が密集している内節には，マウスの網膜では他の層より高い酵素濃度と活性が見られ，ラットの網膜では両者ともに低かった．turnover number を計算すると，各層で平均 60/sec となり，ラットの大脳ホモジェーネートや肝 mitochondria の抽出液の値と一致した．in vivo で活性を持った OAT 分子が網膜内に分布しており，種によって mitochondria の OAT 含量が異なることが明らかとなった．

OAT は mitochondria の matrix enzyme であり，脳回転網膜脈絡膜萎縮症 (gyrate atrophy of the choroid and retina)ではその遺伝子が欠損し，患者には高 ornithine 血症と網脈絡膜萎縮による失明が起きる．正常な網膜内で OAT を多く含む構造が高 ornithine 血症の毒性の影響を最も受け安いと考えられるので，gyrate atrophy の病態を明らかにするため，OAT の微量免疫測定法 (Micro-EIA) と微量活性測定法を開発して，酵素分子とその活性の網膜層間の分布を調べた．

実験方法 [網脈絡膜層凍結乾燥切片] マウス (C57BL strain,雄,6週齢，21-22 g体重) およびラット (Wistar strain,雄,6週齢,190-200g体重) の眼球を液体窒素に投入して瞬間凍結し，厚さ15-20 μm の凍結乾燥切片を調製し，図 1，2 に示した層試料を切り出した (10～68 ng 乾燥重量，ref.5)．[OAT 活性測定法] 22～50 nl の OAT 反応液に，高感度水晶糸バランスを用いて秤量した試料を直接加えて反応 (ornithine + 2-oxoglutarate→L-glutamate γ-semialdehyde + L-glutamate) を行い，生成された glutamateを微量測定した(1,2)．[Micro-EIA] 表面に抗ラットOAT抗体を固定した直径 100 μm のガラスビーズ240～580個の小塊に，54～150 nlの緩衝溶液に秤量した試料を加えて抽出したOAT 溶液を加えて，OAT をビーズ表面に固定した．続いて同じ抗体の Fab'-β-D-galactosidase (Gal-ase) conjugate を OAT に結合させて，Gal-aseの活性を 4-methylumbelliferyl-β-D-galactoside を基質として蛍光測定した(ref.4)．

結果及び考察 [OAT 分子とその活性の並行分布] マウス網膜内では，OAT の定量的な免疫反応性 (酵素蛋白分子の量を表すと考えられる) は，酵素活性と良く並行して分布した (図1)．酵素分子と活性ともに脈絡膜と神経節細胞層に多かったが，視細胞内節層に著しく高い値が見いだされた．これらの結果は，脈絡膜と Müller 細胞の足部 (神経節細胞層にある) に多く含まれる mitochondoria が OAT を含むが，内節に密集する mitochondria も十分 OAT を含有する事を意味している．従来の免疫組織化学的手法による染色では，ラットの網膜の内節は殆ど染まらず，内節の mitochondria は OAT を含まないのではないかと考えられていた (3,6)．そこでラット網膜を定量的に分析すると，酵素分子と活性はやはり並行分布し，内節は脈絡膜や神経節細胞層と比較して低い酵素分子濃度と活性を持っていた (図1)．従ってラットの内節の mitochondria は他の部分の mitochondria に比べて OAT の含有量が低く，組織化学では相対的に低い染色度を示すので，染色のコントラストの為 OAT を含まぬ様に見えると考えられる．免疫組織化学の限界を示す一例である．酵素比活性値を酵素分子濃度で除して 1 mol 当りの活性 (turnover number, k_3) を計算すると，ラットの大脳ホモジェネートや肝 mitochondria の抽出液の turnover number と良く一致していた (図3)．つまり OAT 酵素蛋白は in vivo で活性を持つ蛋白として分布しており，またここに述べた超微量分析技術が信頼度の高い方法であ

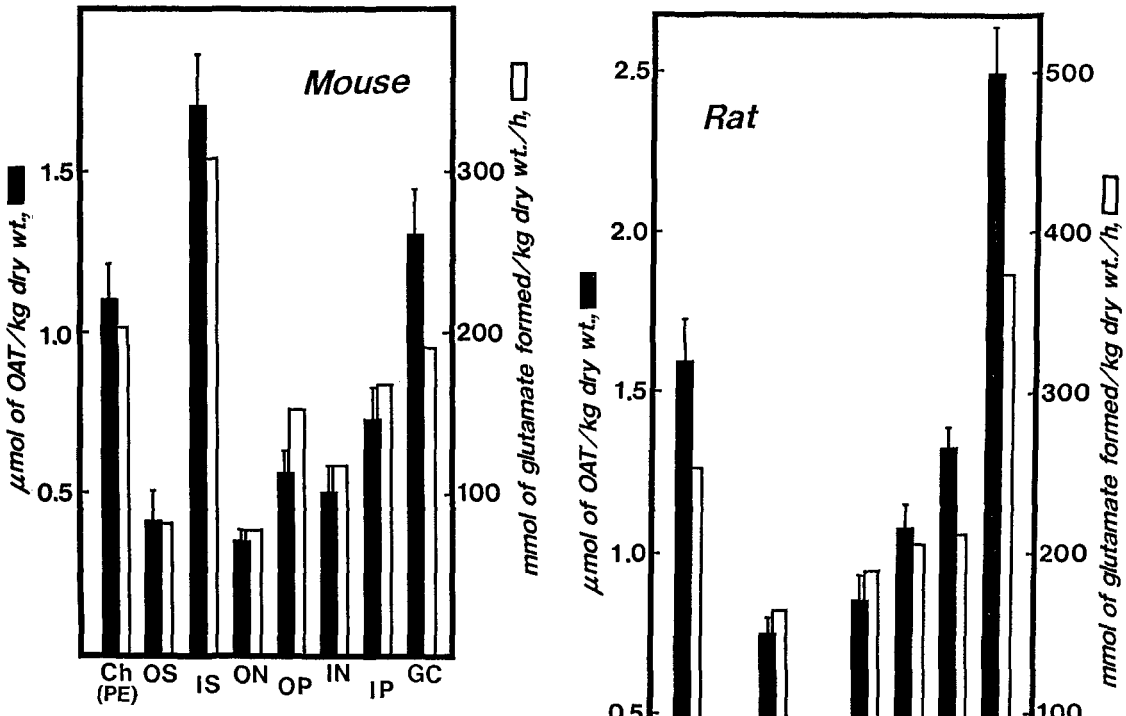


図1　OAT 分子と酵素活性の網膜内分布
左縦軸に酵素分子濃度を，右縦軸に酵素活性を示す．横軸の下に網膜層を略字で表す：Ch (PE),脈絡膜（網膜色素皮を含む）；OS,外節層；IS,内節層；ON,外顆粒層；OP,外網状層；IN,内顆粒層；IP,内網状層；GC,神経節細胞層．マウスの OS の活性は IS の混入による．ラット網膜層の酵素濃度と活性はマウスより高く，IS は OAT を含まぬ事に注意．

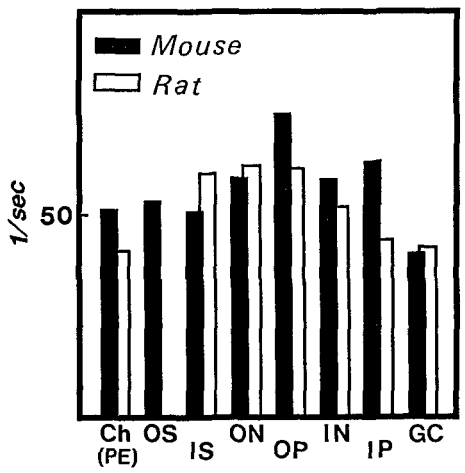


図2　網膜層内の OAT の Turnover Number
縦軸に turnover number を，横軸の下に網膜層の構造を示す．略字の意味は図1を参照．ラットの大脳ホモジェネートと肝 mitochondria 抽出液の turnover number は，それぞれ 57.2 と 60.3/sec であった．

る事を意味している．

［文　献］

1) Akabayashi,A. and Kato,T. (1989) Anal. Biochem. 182, 129-135. 2) Hotta,Y. and Kato,T. (1989) Inv. Ophthal. Vis. Sci. 30, 1173-1177. 3) Kasahara,M., Matsuzawa,T., Kokubo,M., Gushiken,Y., Tashiro,K., Koide, T., Watanabe,H. and Katunuma,N. (1986) J. Histochem. Cytochem. 34, 1385-1388. 4) Kato,K., Fukui,H., Hamaguchi,Y. and Ishikawa,E. (1976) J. Immunol. 116, 1554-1560. 5) Lowry,O.H. and Passonneau,J.V. (1972) in "A Flexible System of Enzymatic Analysis", Academic Press, New York, pp.223-249. 6) Takahashi,O., Ishiguro,S., Mito,T., Hayasaka,S.,Shiono,T. Mizuno,K., Ohura,T. and Tada,K. (1987) Inv. Ophth. Vis. Sci. 28, 1617-1619.

152 牛脳シトソールCa²⁺非依存性ホスホリパーゼA₂の精製

平島 豊, 高久 晃, Lloyd A. Horrocks*
(富山医薬大・脳外, The Ohio State University, Department of Physiological Chemistry*)

〔要約〕蛍光物質でラベルしたエタノールアミンリン脂質を基質とし、牛脳シトソールからCa^{2+}非依存性ホスホリパーゼA_2を精製した。40%飽和硫安分画の透析後、Ultrogel AcA54によるゲル沪過で二つの活性を有するピークを得た（PeakⅠ、PeakⅡ）。さらにアフィニティークロマトグラフィーとHPLCで精製し、各々約1500、1000倍精製された。SDS-PAGEでPeakⅠは100、110KDaの二つのバンド、PeakⅡは40KDaを主とするバンドを得た。PeakⅠはジアシルと1－アルキル－2－アシル型だけを基質としたが、PeakⅡはそれに加えて、プラズマローゲンをも加水分解した。

［はじめに］ホスホリパーゼA_2（EC3,1,1,4）は近年多くの真核細胞にもその活性が報告されている[8]。脳でもミトコンドリアにホスホリパーゼA_2活性が強く、ジアシル型のリン脂質を優先的に分解する事が知られている[10]。一般的にはホスホリパーゼA_2はプロスタグランディン、ロイコトリエンの生成、ＰＡＦ合成のための前駆体の生成に関与していると考えられているが、その他にワーラー変性[9]、実験的アレルギー性脳脊髄炎（ＥＡＥ）[11]、虚血脳の病態[1]に重要な役割を演じていると言われている。今回我々は牛脳シトソールのCa^{2+}非依存性ホスホリパーゼA_2を精製したのでそれを報告する。

［方法］パイレンスルホニル標識エタノールアミンリン脂質の合成とホスホリパーゼA_2活性測定法：蛍光標識プラズマローゲン（PlsEtn(pyr)）の他ジアシル型と1－アルキル－2－アシル型エタノールアミンの混合（diacylGroPEtn(Pyr)+PakEtn(Pyr)）をも基質に使用した。これらの合成とホスホリパーゼA_2活性測定はすでに報告済みである[3,4]ので省略する。

ホスホリパーゼA_2の精製：シトソールの40%飽和硫安分画を透析し、Ultrogel AcA54カラムでゲル沪過すると、二つの酵素活性を有するピーク、PeakⅠとPeakⅡを得た。次に各ピークをPlsEtnをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーでさらに精製した。次に各ピークをHRLC MA7Qカラムを用いたHPLCでもう一度精製を行った。

その他の方法：蛋白量測定はBroadflowの方法[2]、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動はLaemmliの方法[5]を用いた。リン量測定はRouser等の方法[7]によった。

［結果］Ultrogel AcA54カラムでゲル沪過を行ったが、溶出液に1M KClを含まぬ時にはすべて活性はvoid volumeに溶出したが1M KClを含むものではvoid volume（PeakⅠ）の他に39KDaの質量に相当するピークが（PeakⅡ）が分離された。前者はdiacylGroPEtn(Pyr)+PakEtnのみに活性を有するが、後者はPlsEtn(Pyr)をも加水分解した（Fig.1）。次に両ピークをPlsEtnをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーでさらに精製を試みた。PeakⅠ、PeakⅡはそれぞれ0.17%、0.27%のTriton X-100で溶出した。次にTriton X-100を除去後、両ピークをMA7Qカラムを備えたHPLCに応用した。PeakⅠは415mM NaClで溶出し、PeakⅡは160mM、175mM NaClで二つのピークに分かれた。PeakⅡの前者はPlsEtn(Pyr）に、後者はdiacylGroPEtn(Pyr)+PakEtn(Pyr)に特異性を有した（Fig.2 A,B）。SDS-PAGEの結果は、PeakⅠは100と110KDaの二つのバンドを示した。PeakⅡは40KDaが最も主なバンドであった（Fig.３）。最終的にPeakⅠは1480倍精製され、PeakⅡはPlsEtn(Pyr)に対して1160倍、diacylGroPEtn(Pyr)+PakEtn(Pyr)に対しては940倍精製された。PeakⅠとPeakⅡの至適ｐＨはそれぞれ8.0、7.4であった。Triton X-100の至適ｐＨはPeakⅠが0.05%、PeakⅡでは基質にかかわらず0.1%であった。EGTA/$CaCl_2$の緩衝系[6]を用いてそれぞれのCa^{2+}イオンに対する感度を検討したが、両ピークともCa^{2+}－非依存性であった。

［考察］最近我々は蛍光ラベルプラズメニールエタノールアミン（PlsEtn(Pyr)）を合成し、PlsEtn(Pyr)を加水分解するホスホリパーゼA_2に特異的な測定法を開発した[3,4]。これに1,2diacylGroPEtn(Pyr)と1-alkyl-2-acylGroPEtn(Pyr）の混合脂質を基質としたホスホリパーゼA_2活性も測定し、今回牛脳シトソールホスホリパーゼA_2を精製した。Ultrogel AcA54ゲル沪過で1M KCl含溶出液はPeakⅠとPeakⅡを分離したが、KClなしではすべての活性はvoid volumeに溶出した。おそらくPeakⅠとPeakⅡの二つのペプタイドの凝縮が1M KClによって解離されたものと考えられる。しかし

PeakⅠ、PeakⅡがそれぞれサブユニットをなしこれらが一つの本来の酵素を構成していることも考えられる。いずれにしても、HPLCによって両酵素がさらに精製されたが、興味あることはPeakⅡが基質特異性を異にするisoformsを含んでいることである。基質特異性の異なるホスホリパーゼA_2 のfamily、isoformsの存在はリン脂質のsubclassから特異的に脂肪酸を遊離すること、又、血小板活性化因子（ＰＡＦ）の前駆体の生成に関与していると考えられる。中枢神経系におけるCa^{2+}－非依存性ホスホリパーゼA_2 の意義は生理的にも病態生理学的にも不明な点が多いが今後の発展が期待される。

［文献］

1. Edgar, A.D., Strosznajder, J., and Horrocks, L.A. (1982) J. Neurochem. 39, 1111-1116.
2. Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254.
3. Hirashima, Y., Mills, J.S., Yates, A.J., and Horrocks, L.A. (1990) Transactions of the American Society for Neurochemistry 21, 139.
4. Hirashima, Y., Mills, J.S., Yates, A.J., and Horrocks, L.A. (1990) Biochem. Biophys. Acta in press
5. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
6. Portzehl, H., Caldwell, P.C., and Ruegg, J.C. (1964) Biochim. Biophys. Acta 79, 581-591.
7. Rouser, G., Fleischer, S., and Yamamoto, A. (1970) Lipids 5, 494-496.
8. Van den Bosch, H. (1980) Biochem. Acta. 604, 191-246.
9. Webster, G.R. (1973) J. Neurochem. 21, 873-876.
10. Woelk, H., and Porcellati, G. (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 90-100.
11. Woelk, H., Kanig, K., and Peliler-Ichikawa, K. (1974) J. Neurochem. 23, 745-750.

Fig.1

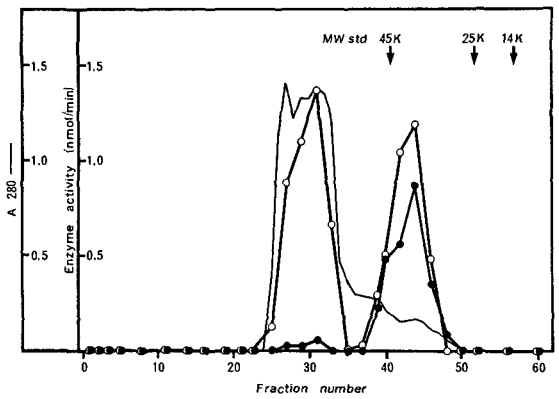


Fig.3

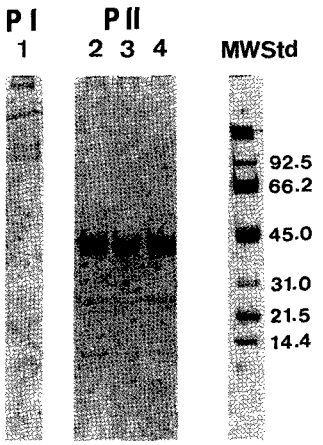
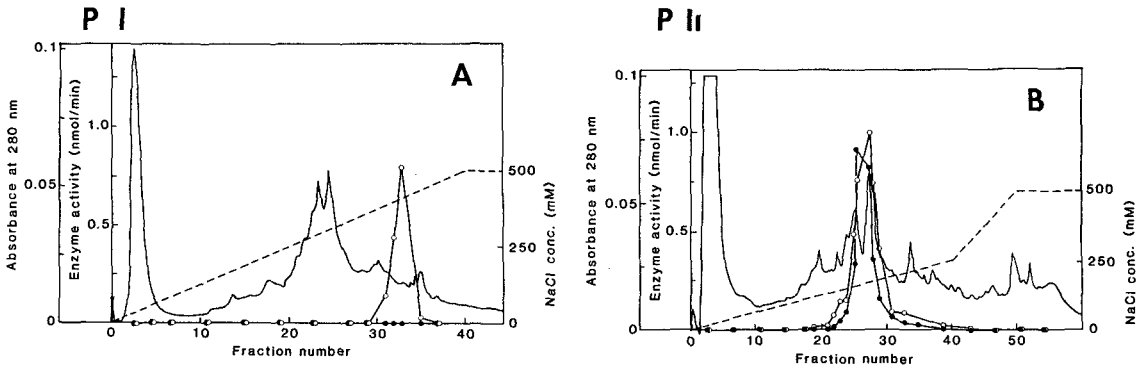


Fig.2



153 単離成長円錐の細胞骨格画分に於けるタンパク質構成と内因性リン酸化反応に関する検討

森田光洋　前川昌平
（東大、理、生化）

〔要約〕
胎生17日ラットの脳より単離した神経成長円錐画分に対し界面活性剤、高イオン強度等の処理を行い細胞膜を可溶化した後に不溶性沈澱として回収される画分を神経成長円錐細胞骨格画分とし、その構成タンパク質と、細胞運動の調節にに重要な役割を担っていると考えられるリン酸化反応について検討をおこなった。
この画分を二次元電気泳動にかけると、多種類のタンパク質がみられたが、その中でもチューブリンとアクチンが多く、さらに神経成長円錐画分よりその細胞骨格画分を調製する過程でチューブリンと分子量50K程度の酸性タンパク質（以下50Aとする）の濃縮がみられることがわかった。また、この画分における内因性リン酸化反応を調べた結果、非常に顕著なチューブリンのリン酸化がみられ、この反応はcAMP不要で、Ca^{2+}により阻害される一方、Mg^{2+}、Mn^{2+}といった二価イオンの濃度効果がc-srcキナーゼとは異なるため、既知のキナーゼが単一で行っているものとは考えにくいことがわかった。

【序論】
神経成長円錐は神経細胞が神経突起を形成する際の先端の構造物であり、高い運動性を有しており、その細胞運動性により神経突起伸展の維持、成長方向の認識やシナプス形成において重要な役割を果していると考えられる。一方、細胞運動において細胞骨格が重要な役割を果たしている例が多く知られており、神経成長円錐の機能を細胞骨格とその調節という視点から明らかにしようとする試みが近年なされてきている。本研究では、この視点にたち、単離神経成長円錐画分より更にその細胞骨格部分を分画し、そこに存在する細胞骨格調節分子を明らかにしようとする目的で行われた。

【方法】
１）神経成長円錐細胞骨格画分の単離方法
(2)で報告されている分画方法に従いラット胎児脳より成長円錐画分を単離した後、まず1% Triton X-100を含んだ緩衝液Ａ（10mM Tris-HCl pH 7.8 , 1mM $MgCl_2$, 1mM EGTA）に懸濁後、超遠心（242,000 xg , 40min）によって沈澱画分を回収する。更に0.3M Na_2SO_4を含む緩衝液Ａに懸濁し、同様の超遠心によって沈澱画分を回収し、最終的に胎児脳の1/20 容の緩衝液Ａに懸濁してこれを細胞骨格画分と呼ぶことにした（この名称は(1)による）。

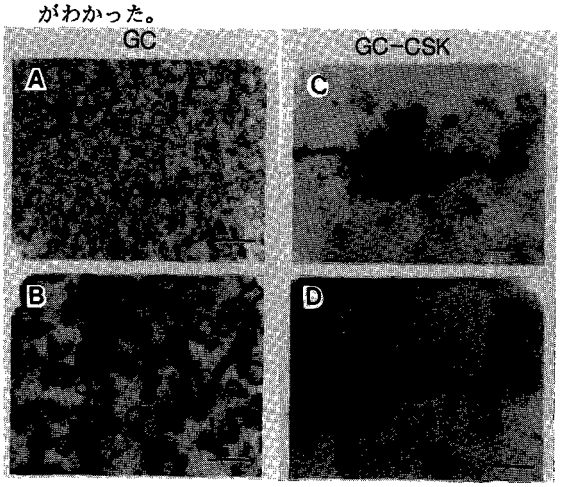
２）リン酸化反応の測定
リン酸化反応は50μM（γ-^{32}P）ATPと所定の反応液中で25'C、20分間インキュベートした後、Laemmliのサンプル処理液あるいは9M尿素を加えて反応を停止させた。

【結果と考察】
１）神経成長円画分及びその細胞骨格画分の電子顕微鏡観察
得られた神経成長円錐画分について超薄切片法による電子顕微鏡観察を行った結果、ほぼ一定の大きさ、電子密度、形態を有する膜画分が含まれていることがわかった（Fig1-A,B）。これらの膜画分は、神経成長円錐特有のclear vesicleを含んでいることなどから(2)に示されている神経成長円錐と考えられる。更にその細胞骨格画分を酢酸ウラニウムで染色して電子顕微鏡観察すると、不均一な大きさで、繊維構造をとらず、一様に電子密度の高い像が得られた（Fig.1-C,D）。
２）神経成長円錐画分及びその不溶性細胞骨格画分の構成タンパク質と内因性リン酸化反応
得られたそれぞれの画分について構成タンパク質と内因性リン酸化反応を調べるため、それぞれの画分を方法に於て述べた手順に従ってリン酸化反応を行った後、二次元電気泳動を行った。二次元電気泳動及び、そのゲルのオートラジオグラフの結果は（Fig.2）に示す通りであった。
神経成長円錐画分は非常に多種のタンパク質を含んでいるが、その不溶性細胞骨格画分ではチューブリンの他、数種のタンパク質が主要な構成成分であることが見いだされた。その中でも非常にユニークなものは分子量がチューブリンに近い50kDa付近で、チューブリンよりも酸性側に存在する50Aである。このタンパク質は神経成長円錐画分から不溶性細胞骨格画分を分画するにしたがって濃縮され、又CBB染色により他のタンパク質が青く染色されるのに対し、紫色に染色される特徴を持っている。
又、それぞれの画分に於いてチューブリンが強くリン酸化されることが分かった。特にチューブリンの多い神経成長円錐細胞骨格画分では著しいリン酸化がみられたが、50Aについてリン酸化はみられなかった。
３）神経成長円錐細胞骨格画分の内因性チューブリン燐酸化反応についての検討
内因性チューブリン燐酸化反応についてその反応条件について簡単に調べた結果、pHは7.8で最もよく反応が起こるほか、Mg^{2+}は20mM、Mn^{2+}は7.5mM（Fig.3-A）、反応時間約20分（Fig.3-B）でプラトーに達し、pCa7.0～7.5

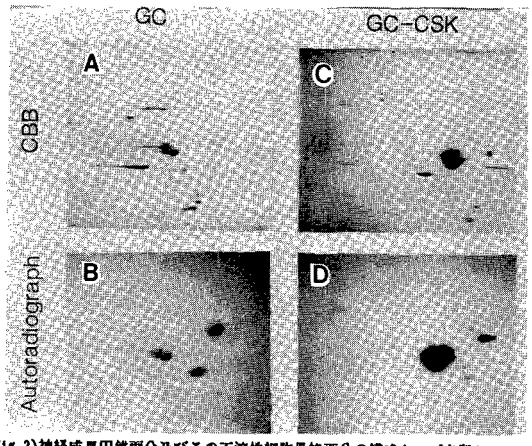
のCa^{2+}により阻害されることなどが分かった（Fig.3-C）。よってこのリン酸化反応は、cAMP不要で、Ca^{2+}により阻害されることからAキナーゼ、Cキナーゼと異なり、また二価イオン濃度に対する特異性から神経成長円錐に多く存在するといわれているc-srcとも異なっており、このような既知のキナーゼ単独によって起こっている反応とは考えにくいことがわかった。さらにホスファターゼの阻害剤を加えることにより反応の経時変化に違いがみられるためこの画分にホスファターゼ活性が存在することが示唆された。

4）神経成長円錐細胞骨格画分の可溶化の試み

細胞質性微小管は一般に低温で脱重合すると考えられている。神経成長円錐細胞骨格画分の分画は一貫して低温中で行う。それにもかかわらずその分画にチューブリンが主成分として存在するということは、この画分内でチューブリンが何らかの形で不溶化されている可能性が示唆される。そこでこの画分の抽出性についてより詳しく調べるため、神経成長円錐細胞骨格画分の可溶化を試みた。分画最終段階の神経成長円錐細胞骨格画分を6M 尿素 ,0.6M KI ,または1mM $CaCl_2$ を含む緩衝液Aを加え、懸濁後再度超遠心を行い上清と沈澱に分け、沈澱は上清と等量の緩衝液Aに懸濁し、それぞれについて電気泳動を行い含まれているタンパク質を調べた。その結果6M 尿素でほとんどのタンパク質の可溶化がみられたが、それ以外すべて条件かでは不溶性のままであった、よって神経成長円錐細胞骨格画分はチューブリンが脱重合するような条件に於いても安定な状態で保持されていることがわかった。

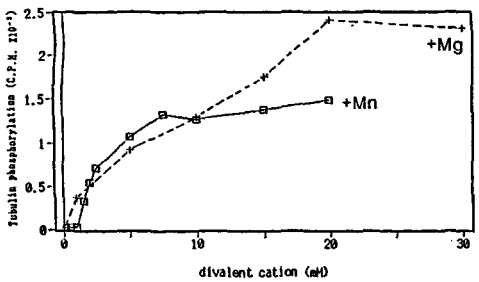


(Fig.1)神経成長円錐画分及びその細胞骨格画分の電子顕微鏡観察
(A)神経成長円錐画分、barの長さは1μm
(B)神経成長円錐画分、barの長さは0.3μm
(C)神経成長円錐細胞骨格画分、barの長さは0.5μm
(D)神経成長円錐細胞骨格画分、barの長さは0.25μm

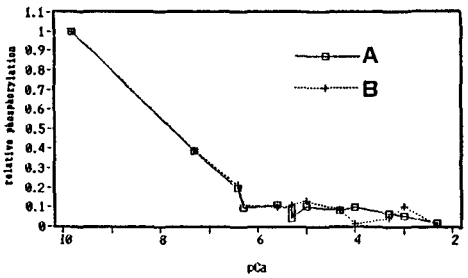


(Fig.2)神経成長円錐画分及びその不溶性細胞骨格画分の構成タンパク質と内因性リン酸化反応
(A)神経成長円錐画分の二次元電気泳動
(B)神経成長円錐細胞骨格画分の二次元電気泳動
(C)神経成長円錐画分を二次元電気泳動後オートラジオグラフにかけたもの
(D)神経成長円錐細胞骨格画分を二次元電気泳動後オートラジオグラフにかけたもの

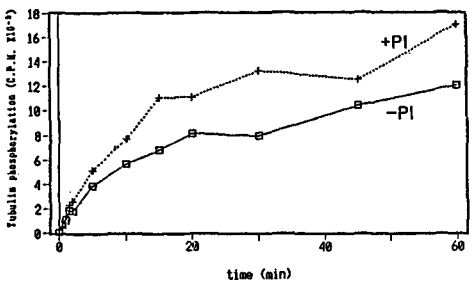
(A) Effect of Mg and Mn



(C) Effect of Ca



(B) Time course



(Fig.3) チューブリン燐酸化反応の特性
(A) 二価イオンの影響（20mM Tris-HCl pH 7.8 , 1mM EGTA , ホスファターゼ阻害剤存在下）
(B) 経時変化（PI はホスファターゼ阻害剤; 12mM β-Glycerophosphate、0.25mM Na_2VO_3）
(C) Ca^{2+}の影響（A;内因性リン酸化反応におけるチューブリン燐酸化、B;基質としてenolaseを加えた場合のリン酸化反応）

Reference (1) N.Cheng et al. J.B.C. 263 3835～3842 (1988)
(2) P.H.Phenninger et al. Cell 35 573～584 (1983)

154 Cキナーゼ及びCaMキナーゼIIによる、シナプス小胞局在性58kD蛋白のリン酸化

高橋正身、藤本禎子、濱登希子、宮本英七*
(三菱化成生命研、熊大・医・第一薬理*)

〔要約〕

58kD蛋白は中枢及び末梢神経細胞のシナプス小胞膜及び前シナプス膜に局在する糖蛋白質である。精製したラット脳の58kD蛋白及びシナプス小胞膜標品を用い、種々のキナーゼによる58kD蛋白のリン酸化を調べた。ラット脳膜分画をCHAPSで可溶化し、58kD蛋白に特異的なモノクローナル抗体(mAb1D12)を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーによって精製した58kD蛋白は、CキナーゼやCaMキナーゼIIによって速やかにリン酸化を受け、それぞれ58kD蛋白1モルあたり最大値0.47モル及び0.94モルのリン酸が取り込まれた。シナプス小胞膜をこれらキナーゼでリン酸化した場合にも、CHAPSで可溶化した後mAb1D12で免疫沈降するとリン酸化58kD蛋白を免疫沈降することができた。一方58kD蛋白はcAMP依存性あるいはcGMP依存性キナーゼによってはリン酸化を受けなかった。これらの結果はシナプス終末において58kD蛋白がCキナーゼ及びCaMキナーゼIIの基質となっていることを示唆している。

神経伝達物質の遊離調節にはCキナーゼやCa^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII（CaMキナーゼII）等によるリン酸化反応が関与している事が示唆されている。リン酸化を介した神経伝達物質遊離調節は海馬における長期増強現象の形成等にも深く関わっていると考えられており、その機構解明はシナプスにおける情報処理機構を分子レベルで理解する上できわめて重要な課題となっている。

昨年度の本大会で我々はヒヨコシナプス膜で免疫したマウスを用いて得られたモノクローナル抗体(mAb 1D12)が可溶化したωコノトキシン結合部位を免疫沈降すること、主要抗原蛋白の分子量が58,000であること、抗原分子が中枢及び末梢神経細胞のシナプス小胞膜と前シナプス膜に局在している事等を報告した[1-3]。その後更に詳しく解析を進めた結果、前シナプス膜に存在している58kD蛋白の一部にωコノトキシン結合蛋白が強固に会合しており58kD蛋白自身はωコノトキシン結合活性を持っていないことが明かとなった[4]。また非常に興味深いことに58kD蛋白がCキナーゼによってリン酸化を受けることを見いだし、58kD蛋白がキナーゼを介した神経伝達物質遊離調節に重要な働きをしている可能性が示唆された[4]。今回58kD蛋白とそのリン酸化の役割を明らかにしていくため種々のキナーゼによる58kD蛋白のリン酸化を調べた。

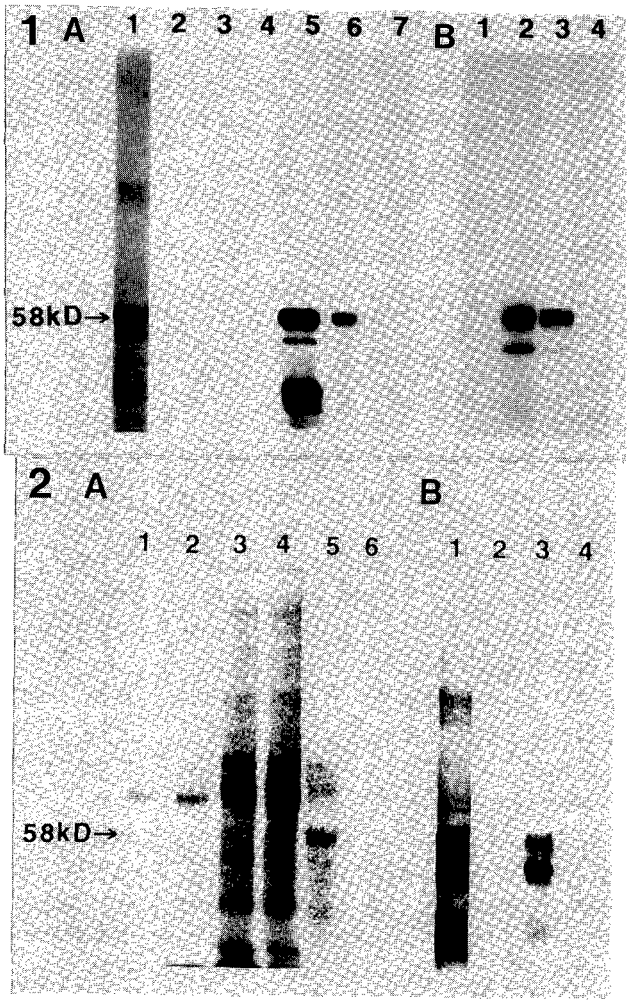
［方法］　CキナーゼおよびCaMキナーゼIIはラット脳から精製した。ウシ肺から精製したcGMP依存性プロテインキナーゼは国立循環器病センターの古川博士より供与された。Aキナーゼの触媒サブユニットはシグマ社から購入した。抗体カラムは精製した1D12抗体をプロテインAセファロースに架橋剤を用いて固定して作成した。ラットシナプス膜分画を1%CHAPS, 0.2M NaCl, 20mM HEPES-Tris, pH 7.3で可溶化し、抗体カラムに吸着させた後アルカリ条件下で溶出した。精製した58kD蛋白のリン酸化は 0.1 % CHAPS, 0.3 mM $CaCl_2$, 6 mM $MgCl_2$, 50 mM HEPES-Tris, pH 7.3, 30℃で 0.066 μM 或は 0.4 mM[γ-^{32}P]ATPを加えて行い、シナプス小胞蛋白のリン酸化は 0.32 M sucrose, 0.3 mM $CaCl_2$, 6 mM $MgCl_2$, 50 mM HEPES-Tris, pH 7.3, 30℃で 30 μM[γ-^{32}P]ATPを加えて行った。反応停止後 SDS-PAGEによってリン酸化蛋白を分離し、オートラジオグラフィー法、あるいは富士のイメージアナライザーを用いてリン酸化蛋白の同定、定量を行った。

［結果及び考察］

図1Aに示したように、抗体カラムで精製した標品をCa，フォスファチジルセリン，ダイオレイン存在下で

Cキナーゼによるリン酸化を行うと58kD蛋白が強くリン酸化された。58kD蛋白のリン酸化はCキナーゼを加えない場合にはみられず、CaやCキナーゼの活性化物質を加えない場合には著しく低かった。リン酸化された58kD蛋白は58kD蛋白を認識する1D12抗体によって特異的に免疫沈降された。図2Bに示すように58kDa蛋白はCaMキナーゼIIによってもCa依存的にリン酸化され、この場合もリン酸化された58kDa蛋白は1D12抗体によって特異的に免疫沈降した。今回用いた条件下では58kD蛋白1モルに対しCキナーゼでは0.47モル，CaMキナーゼIIでは0.94モルのリン酸が取り込まれた。これに対してcAMPやcGMP依存性キナーゼによっては58kDa蛋白の有意なリン酸化は認められなかった。

既に示したように58kDa蛋白は膜に組み込まれた構造をしていると考えられる[4]。膜に組み込まれた状態でも58kD蛋白がリン酸化を受けることが出来るか否かを調べるため、庶糖密度勾配法で精製したシナプス小胞膜分画を用いてリン酸化を調べた。図2Aに示すようにシナプス小胞膜分画の多くのタンパク質がCキナーゼによってリン酸化を受けた。リン酸化した後膜をCHAPSで可溶化し、1D12抗体で免疫沈降を行うとリン酸化された58kDaが特異的に回収された。一方図2Bに示すようにCaMキナーゼIIでシナプス小胞膜分画のリン酸化を行うと分子量58,000及び50,000の蛋白が強くリン酸化された。CHAPSで可溶化した後免疫沈降を行うととそれらの成分は共に1D12抗体で特異的に免疫沈降された。これらの結果は58kDa蛋白はシナプス小胞膜に組み込まれた状態でもCキナーゼやCaMキナーゼIIの基質になることを示している。今後は生きた細胞中での58kD蛋白のリン酸化や分泌機能との関連を明らかにしていきたいと考えている。



（図1）A；Cキナーゼによる精製した58kD蛋白のリン酸化。 (1)CBB染色 (2)－Cキナーゼ (3)－Ca^{2+} (4)－PS/DO (5)完全系 (6)mAb1D12による免疫沈降物 (7)コントロールマウスIgGによる免疫沈降物。 B；CaMキナーゼによる精製した58kD蛋白のリン酸化。(1)－Ca^{2+} (2)完全系 (3)mAb1D12による免疫沈降物 (4)コントロールマウスIgGによる免疫沈降物。

（図2）A；Cキナーゼによるシナプス小胞膜蛋白質のリン酸化。(1)－Cキナーゼ(2)－Ca^{2+} (3)－PS/DO (4)完全系 (5)可溶化し、mAb1D12によって免疫沈降したもの (6)コントロールマウスIgGによる免疫沈降物。B；CaMキナーゼによるシナプス小胞膜蛋白質のリン酸化(1)－Ca^{2+} (2)完全系 (3)可溶化し、mAb1D12によって免疫沈降したもの (4)コントロールマウスIgGによる免疫沈降物。

［参考文献］

(1)高橋、藤本(1989)神経化学,28:304-305
(2)藤田ら(1989)神経化学,28:306-307
(3)有松ら(1989)神経化学,28:308-309
(4)高橋ら(1990)第63回生化学会大会

155　ラット大脳、海馬、小脳から単離したシナプス後肥厚部に内在するＣａＭ依存性プロテインキナーゼⅡ基質

堂前純子、鈴木龍雄、田中亮（名市大・医・生化Ⅰ）

〔要約〕ラット大脳皮質、海馬、小脳よりシナプス後肥厚部（postsynaptic density, PSD）画分を調製し、ここに内在するカルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡ（CaM KinaseⅡ）の基質について調べた。

1）大脳皮質PSD、海馬PSDには６種（250k, 200k, 180k, 140k, 60k, 51k Mr）の、小脳PSDには４種（250k, 200k, 180k, 60k Mr）の主要な内在性基質が認められた。

2）大脳皮質、海馬、小脳のPSDに含まれる250k MrのCaM KinaseⅡ基質は、P_{400}タンパク質ないしその類縁タンパク質と考えられた。

3）200k MrのCaM KinaseⅡ基質はミオシンである可能性が示唆された。

4）大脳皮質PSD、海馬PSD中には、CaM KinaseⅡのαサブユニットとは異なる50k Mrの基質が見いだされた。

5）PSD中のフォドリン、アクチン、チュブリン、CaMはリン酸化されなかった。

［目的］

CaM KinaseⅡは神経系に活性が高く、神経機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられている。PSDにはPSD結合型CaM KinaseⅡが高濃度に局在し、単離されたPSD標品中にも高い活性が認められる。一方、PSDは脳内の部位により形態、タンパク質組成に相違のあることが知られ、シナプス伝達におけるタンパク質リン酸化反応の役割も異なるものと考えられる。今回、ラット大脳皮質、海馬、小脳PSD(CTX-PSD, Hipp-PSD, CBL-PSD)画分中のCaM KinaseⅡについて、その活性と内因性基質を比較した。

［方法］

PSD調製はWuらの方法(1)に準じて行った。リン酸化反応はSuzuki and Siekevitzの方法(2)に従った。25μgないし100μgのPSDを用いて内在性リン酸化反応を行った後、１次元および２次元電気泳動、次いでオートラジオグラフィー、あるいは切り出したバンド中の^{32}Pのカウント測定を行ってリン酸化基質を検出、同定した。

［結果と考察］

CTX-PSD, Hipp-PSDのタンパク質組成は、CBB染色上著しい相違は見られなかったが、Hipp-PSDで60k, 51k Mrのバンドがやや強く染色された。CBL-PSDのタンパク質組成はCTX-PSD, Hipp-PSDのものとはかなり異なっていた（図１Ａ）。

Ca^{2+}, CaM添加で^{32}P取り込みが増加する基質として、CTX-PSD, Hipp-PSDには250k, 200k, 60k, 51k Mrのタンパク質ならびに180k Mr領域，140k Mr領域のタンパク質群が認められた。両者のリン酸化パターンはほぼ同一であったが、60k, 51k Mrタンパク質の^{32}P取り込み率はHipp-PSDの方がやや高く、全体の^{32}P取り込み量もHipp-PSDで高い傾向がみられた。CBL-PSDの場合は、上に述べた６種の基質のうち、51k Mrタンパク質と140k Mr領域タンパク質を除く４種が認められた。また、180k Mr領域のタンパク質も、CTX-PSD, Hipp-PSDのものとは異なっていた（図１Ｂ）。

51k, 60k Mrタンパク質はそれぞれCaM KinaseⅡのα，βサブユニットであるが、αサブユニットとは別の50k Mrのリン酸化スポットが新たに見いだされた（図２）。

250k MrのCaM KinaseⅡによるリン酸化バンドはすべてのPSDに見られたが、CBB染色で同定できたのはCBL-PSDのものだけであった。CBL-PSDの250k Mrタンパク質はConA結合能を持ち、そのpIは5.5-7.5、SDS-PAGEでゲル濃度の変化により異なる移動度を示す等、小脳Purkinje cellに多量に存在するとされるP_{400}タンパク質と同様の性質を示した。CTX-PSD, Hipp-PSDに見られる250k Mr基質のV

8プロテアーゼを用いたホスホペプチドマップは、CBL-PSD中の250k Mr基質のものと一致していた（図３）。従って、CTX-PSD, Hipp-PSD中の250k Mrリン酸化基質はP400ないし類縁タンパク質であると考えられた。このCTX-PSD, Hipp-PSD中の250k Mrタンパク質は、PSD画分中の濃度がかなり低いにもかかわらず、内在するCaM KinaseIIにより非常によくリン酸化を受けるため、250k MrタンパクPSD中でのCaM KinaseIIとの密接な関連が推測される。

平滑筋ミオシンに対する抗体を用いたウェスタンブロッティングでは、すべてのPSDの200k Mrの位置にバンドが検出された。一方骨格筋ミオシンに対する抗体では、CTX-PSD, Hipp-PSDに190k Mr付近のバンドが染色されたがごく弱い反応であった。PSD中の200k MrのCaM KinaseII基質はミオシンかもしれない。

なお、どの部位のPSDにおいても、細胞骨格タンパク質であるフォドリン、アクチン、チュブリンのリン酸化は認められなかった。CaMもリン酸化されなかった。

［文献］

(1)Wu et al.(1986) J. Neurochem., 46, 831-841.
(2)Suzuki and Siekevitz (1989) J.Neurochem., 53, 1751-1762.

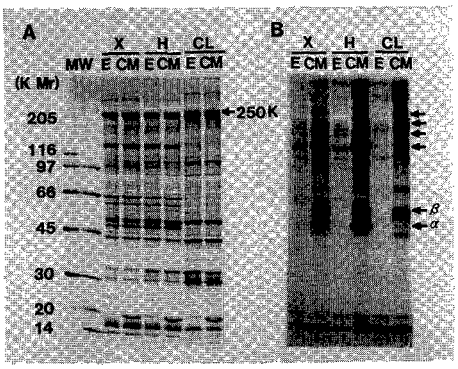


図１　PSDのタンパク質組成および内在性リン酸化基質
（7-17% SDS-PAGE）
A：CBB染色　　矢印は250K Mrタンパク質を示す
B：^{32}Pのオートラジオグラフ
矢印は主要なリン酸化タンパク質の位置を示す
X：cerebral cortex PSD
H：hippocampus PSD
CL: cerebellum PSD
E：EGTA存在下でのリン酸化反応
CM: Ca^{2+}, CaM存在下でのリン酸化反応

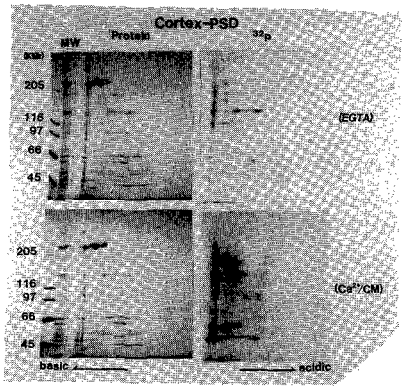


図２　PSDのタンパク質組成および内因性リン酸化基質
（２次元電気泳動　IEF/5-10% SDS-PAGE）
EGTA　：EGTA存在下でのリン酸化反応
Ca^{2+}/CM: Ca^{2+}, CaM存在下でのリン酸化反応

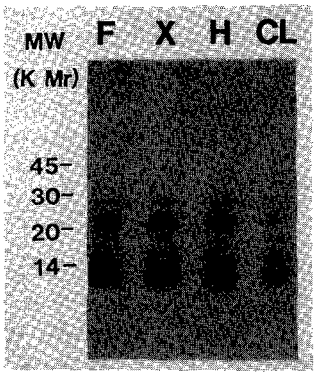


図３　250k Mrタンパク質のホスホペプチドマップ
（12-20% gel）
F：forebrain PSD
X,H,CL:図１に示したのと同じ

156 培養小脳顆粒細胞における CaMキナーゼIIの活性化機構

福永浩司，宮本英七，T.R. Soderling*
（熊本大学・医・第一薬理，*バンダービルト大学・医・分子生理）

〔要約〕
培養小脳顆粒細胞を用いて，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）の活性化機構について調べた．1）無刺激の細胞では，CaM キナーゼIIの Ca^{2+} 非依存型活性は 4～5%であった．脱分極刺激により Ca^{2+} 非依存型活性は 15秒以内に 9%に上昇し，10分後に 5～6%に低下した．2）ionomycin 刺激により 10%に活性が上昇し，この活性は 15分以上持続した．3）プロテインフォスファターゼ阻害剤オカダ酸処理により，Ca^{2+} 非依存性活性は 7～8%に上昇し，脱分極，ionomycin の効果が促進された．4）細胞抽出液を用いて調べたところ，Ca^{2+} 非依存性活性を消失させるプロテインフォスファターゼにはオカダ酸感受性と非感受性の両者が存在していた．5）細胞をあらかじめ放射性無機燐酸でラベルし，in vivo での自動燐酸化部位について検討した．本酵素の Ca^{2+} 非依存型活性の上昇は 286／287（α／βサブユニット）番目のスレオニンの自動燐酸化の程度と相関した．以上の結果は，これまでの in vitro の結果と一致するものであり，本酵素の Ca^{2+} 非依存型活性のシナプス可塑性における役割を示唆している．

CaM キナーゼIIは神経細胞に高濃度に存在し，神経伝達物質の生合成，放出および細胞骨格蛋白質の機能を調節している．従来の研究により，in vitro において，CaM キナーゼIIは Ca^{2+}／CaM による活性化に伴い，酵素のN末端より 286／287番目（α／βサブユニット）のスレオニンが自動燐酸化され，Ca^{2+} 非依存型に変化することが知られている[5-7]．この Ca^{2+} 非依存型活性は海馬 CA1 領域のシナプス伝達の長期増強など，シナプスの可塑性に関与している．今回，我々は初代培養神経細胞を用いて，CaM キナーゼIIの活性化機構について解析した．さらに，in vivo において，286／287番目のスレオニンの自動燐酸化が Ca^{2+} 非依存型活性の発現に必要であることを確認した[2]．

【実験方法】
小脳顆粒細胞の初代培養は，生後７日目ラットより Gallo らの方法[3]により行なった．刺激後，細胞は液体窒素にて凍結し，プロテアーゼおよびプロテインフォスファターゼ阻害剤を含む緩衝液にてホモジナイズ後，細胞抽出液を得た．細胞抽出液中の CaM キナーゼIIの Ca^{2+} 非依存型活性（EGTA 存在下）および全活性（Ca^{2+}／CaM 存在下）の活性は Syntide 2 を基質として測定した[2]．in vivo での CaM キナーゼIIの自動燐酸化部位の解析は，細胞を ^{32}P-燐酸でラベルし，ホモジナイズ後，細胞抽出液より，CaM キナーゼII特異抗体[1]を用いて，本酵素を分離精製して行なった．

【結果と考察】
Krebs-Ringer HEPES（KRH）溶液中での神経細胞において CaM キナーゼIIの全活性の 4～5%が Ca^{2+} 非依存型の活性であった．KRH 溶液より Ca^{2+} を除くと，本活性は 1～2%に減少した．その後，細胞を 56 mM K^+ あるいは ionomycin を含む KRH 溶液で刺激すると，Ca^{2+} 非依存型活性は各々 9%，10%に上昇した（図１）．脱分極刺激では，活性化は 5分後 5～6%に減少するのに対して ionomycin では活性化が持続した．脱分極刺激による活性化は細胞外 Ca^{2+} に依存した（図１）．

次に，プロテインフォスファターゼⅠとⅡAの阻害剤であるオカダ酸[4]の効果について検討した．オカダ酸存在下に細胞をインキュベートすると，Ca^{2+} 非依存型活性は 4%から 8%に上昇した．さらに脱分極刺激効果は増強されたが，オカダ酸存在下においても，30分後には刺激前のレベルに低下した（図２）．細胞抽出液を用いて，Ca^{2+} 非依存型活性の消失に関与するプロテインフォスファターゼについてオカダ酸を用いて調べた結果，オカダ酸感受性ならびに非感受性の酵素が関与していた．これらの結果は，CaM キナーゼIIの 286／287番目のスレオニンの脱燐酸化反応において，オカダ酸非感受性酵素の重要性を示唆している．

CaM キナーゼIIの 286／287番目のスレオニンの自動燐酸化が Ca^{2+} 非依存型活性の発現に必要であること[5-7]，306 と 307番目（βサブユニット）のスレオニンの燐酸化は CaM の結合を阻害し，全活性を抑制することが in vitro の実験により知られている．次に，無傷の神経細胞を用いて，in vivo での CaM キナーゼIIの燐酸化部位について調べた．細胞を ^{32}P-無機燐酸でラベルし，刺激後，特異抗体で CaM キナーゼIIを免疫沈殿し，SDS-PAGE を行なった．小脳顆粒細胞の CaM キナーゼIIは 58 と 60 kDa のサブユニットからなり，脱分極刺激により，酵素の自動燐酸化は刺激前を 100%とすると刺激後 30秒で 159±8%に増加し 5分後には 132±10%になった．58～60 kDa サブユニット

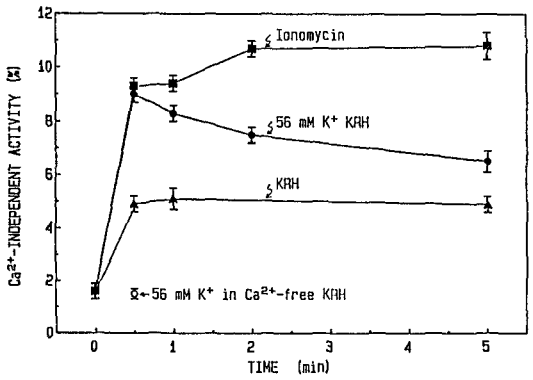


図1．CaM キナーゼIIの Ca^{2+} 非依存型活性に対する脱分極，ionomycin の刺激効果

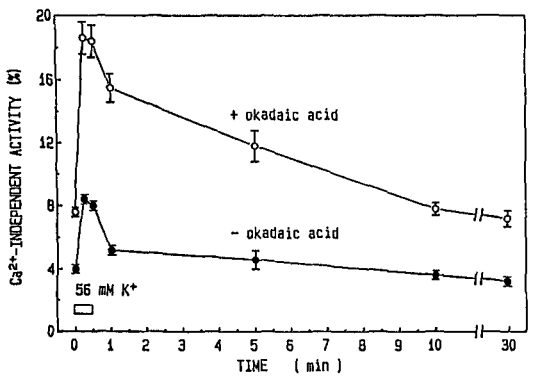
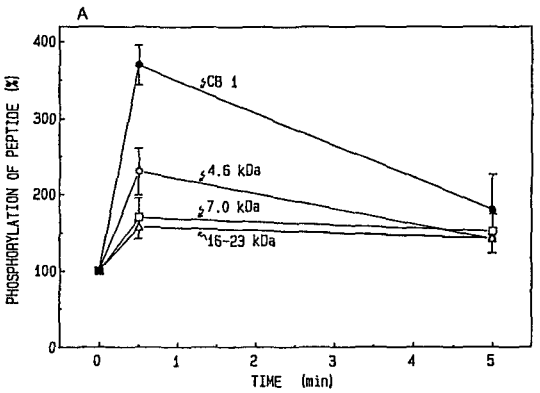


図2．脱分極刺激におけるオカダ酸の促進効果



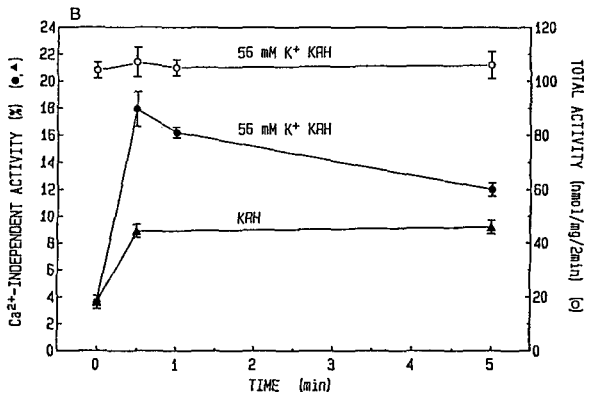


図3．Ca^{2+} 非依存型活性発現と CB1 ペプチドの燐酸化との相関
A．CaM キナーゼIIの限定分解後のペプチドへの燐酸の取り込み
B．オカダ酸存在下での脱分極刺激効果
全活性(○)，Ca^{2+} 非依存型活性(●，▲)

をゲルから抽出し，臭化シアンで限定分解後，尿素－SDS-PAGE にてペプチドマップを行なった．286／287番目のスレオニンを含む分子量約 3,000 の CB1 ペプタイドの燐酸化は刺激前に比べて刺激後 30秒で 369％に増加し，5分後には 180％に低下した（図３Ａ）．CB1 の燐酸化の程度は他の部位の燐酸化に比べて優位に上昇した．この燐酸化の時間経過は Ca^{2+} 非依存型活性の時間経過と相関していた（図３Ｂ）．また，全活性は脱分極刺激により変化しないことから，306，307番目のスレオニンの燐酸化はこの条件では起こらないと考えられる．したがって，この燐酸化の生理的意義は不明である．

以上の結果は，286／287番目のスレオニンの燐酸化に関してはこれまでの in vitro の結果と一致するものである．また，数種のプロテインフォスファターゼがこの脱燐酸化反応に関与することを示唆している．さらに現在，神経伝達物質，特に興奮性アミノ酸による CaM キナーゼIIの活性化機構について検討している．

【文　献】

1. Fukunaga, K., Goto, S., & Miyamoto, E. (1988) J. Neurochem. 51, 1070-1078.
2. Fukunaga, K., Rich, D.P., & Soderling, T.R. (1989) J. Biol. Chem. 264, 21830-21836.
3. Gallo, V., Ciotti, M.T., Coletti, A., Aloisi, F., & Levi, G. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7919-7923.
4. Hescheler, J., Mieskes, G., Ruegg, J.C., Takai, A., & Trautwein, W. (1988) Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 412, 248-252.
5. Miller, S.G., Patton, B.L., & Kennedy, M.B. (1988) Neuron 1, 593-604.
6. Schworer, C.M., Colbran, R.J., Keefer, J.R., & Soderling, T.R. (1988) J. Biol. Chem. 263, 13486-13489.
7. Thiel, G., Czernik, A.J., Gorelick, F., Nairn, A.C., & Greengard, P. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6337-6341.

157 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：大腸菌の発現系による解析

萩原民雄、大迫俊二、関原俊一、渡辺敦子*、猪飼篤*、山内卓（東京都神経研・生化学、*東工大・生体制御）

〔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、欠失および部位特異的変異法を用いて変異ｃＤＮＡを作成し、大腸菌で発現させ、その性質を調べた。大腸菌で発現したαおよびβサブユニットをそれぞれＳＤＳ－ＰＡＧＥ上均一に精製し、酵素学的性質を調べると、αおよびβサブユニットは大脳キナーゼⅡと比較して、比活性は10%と低いが、その他の酵素学的性質ははほぼ同等であった。しかし、αサブユニットはβサブユニットに比べて不安定であった。また、αサブユニットの結合部位を欠失させた変異酵素α-Ⅱ（1-358）はCa^{2+}、カルモデュリン依存性に酵素活性を示すのに対して、結合部位と調節部位の両方を欠失させた変異酵素α-Ⅰ（1-282）は活性を発現するが、その活性はCa^{2+}、カルモデュリンに依存せず、常に活性化した酵素であった。α-Ⅰよりさらに小さな変異酵素α（1-249）は活性を発現しなかった。これらのことからαサブユニットは触媒部位のみでも十分なキナーゼ活性を発現し、変異酵素α-Ⅰはほぼその最小単位に相当するものと考えられる。

キナーゼⅡは脳神経系において高い活性を示し、伝達物質生合成酵素をはじめとする多くの内在性タンパク質を燐酸化することから、神経系において重要な役割を果たしていると考えられている[1)]。すでにキナーゼ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、２つのサブユニットが高いホモロジーを持ち、それぞれに触媒部位、調節部位、結合部位が存在し、サブユニット間のわずかな違いは特異的配列の挿入（あるいは欠失）であることが明らかにされた[2,3)]。キナーゼⅡの機能を理解する上でそれぞれのサブユニットの酵素学的性質を調べることは重要であるため、我々は培養細胞の発現系を用いて解析を行ってきた[4)]。今回、αおよびβサブユニットを大腸菌で発現させ、それぞれの精製標品を得ることができたので、これを用いてαおよびβサブユニットの酵素学的性質を調べた。また、αサブユニットｃＤＮＡに欠失あるいは部位特異的変異を起こさせた変異ｃＤＮＡを大腸菌で発現させ、キナーゼⅡの構造と機能の関係についても検討を行った。

〔実験方法〕

αおよびβサブユニットのｃＤＮＡおよびそれぞれの変異ｃＤＮＡは制限酵素で切断後、あるいは合成オリゴヌクレオチドとsite-directed mutagenesis kit (Boehringer)を用いて作製し、これらをＴ７プロモーターを持つ大腸菌の発現ベクターｐＥＴに組み込み、IPTGによりタンパク質合成を誘導した。発現したαおよびβサブユニットを含む大腸菌抽出物から硫安沈澱、カルモデュリン－アフィニティークロマトグラフィーおよびP-celluloseクロマトグラフィーにより精製した。

〔実験結果・考察〕

IPTGによる誘導でαおよびβサブユニットは大腸菌で効率よく発現し，それぞれの抽出物よりSDS-PAGE上均一に精製することができた（図１）。大腸菌で発現したαおよびβサブユニットは大脳キナーゼⅡと同じく、SDS-PAGE上でそれぞれ50kDaおよび60kDaであり、Ca^{2+}、カルモデュリン存在下に自己燐酸化がみられた。合成ペプチドsyntide-2[5)]を基質とした場合、精製αおよびβサブユニットの比活性はキナーゼⅡの約11%と低い値であったが、ＡＴＰおよびsyntide-2に対するＫｍ値は大脳キナーゼⅡとほぼ同様の値を示した。カルモデュ

リンに対するKa値はβサブユニットでは大脳キナーゼIIと同等であるのに対して，αサブユニットは6倍ほど高く，カルモデュリンに対する親和性が低いことが明らかになった。また、キナーゼIIは自己燐酸化によりCa^{2+}非依存性活性を生じるが，αおよびβサブユニットも0℃でCa^{2+}、カルモデュリン存在下に自己燐酸化した後に、大脳キナーゼIIとほぼ同等のCa^{2+}非依存性活性を生じた。しかしながら、30℃では、αサブユニットは自己燐酸化した場合に活性の低下がみられ，βサブユニットに比べてαサブユニットは不安定であった（表1）。

αサブユニットの欠失cDNAα-I（1-282）はキナーゼドメインのみを、α-II（1-358）はキナーゼドメインおよび調節ドメインを含むがこれらも大腸菌で発現することができた。α-IIはCa^{2+}、カルモデュリンに依存した活性を示し、Ca^{2+}非依存性活性はほとんど現れないのに対して，α-Iは活性にCa^{2+}，カルモデュリンを必要とせず、常に活性化している酵素であった。α-IはATPに対するKmがやや高いが、syntide-2に対するKmは大脳キナーゼIIとほぼ同様であった。しかし、さらに小さいタンパク質をコードするcDNAα（1-249）ではタンパク質は生成するが、酵素活性は発現しなかった。また，カルモデュリン結合部位のみを欠失させたcDNAα（△291-315）を発現させたところ、Ca^{2+}非依存性活性を示したが、発現したタンパク質は予想される分子量より小さくなっていた。

これらのことからαサブユニットは触媒部位のみでも十分なキナーゼ活性を発現し、α-Iは活性型酵素のほぼ最小単位に相当するものと考えられる。現在、自己燐酸化部位およびカルモデュリン結合部位の変異酵素について検討を続けており、さらにキナーゼIIの活性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) Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1983) Eur. J. Biochem., 132, 15-21

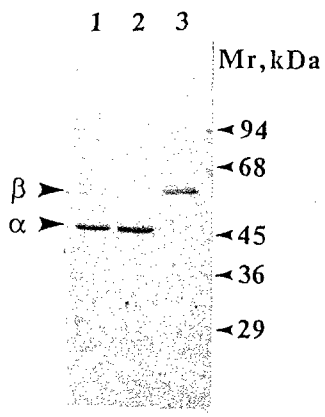
2) Bennett, M. K. and Kennedy, M. B. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 1794-1798

3) Lin, C. R., et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 5962-5966

4) Yamauchi, T., et al. (1989) J. Biol. Chem., 264, 19108-19116

5) Hashimoto, Y. and Soderling, T. R. (1987) Arch. Biochem. Biophys., 252, 418-425

Fig.1



1. Brain Kinase II
2. Expressed α protein
3. Expressed β protein

Table 1

Appearance of Ca^{2+}-independent activity by autophosphorylation

Enzyme	autophosphorylation		Assay +Ca^{2+}	Assay -Ca^{2+}
	℃	CaM	sp. act (%)	sp. act (%)
α	0	+	1000 (100)	401 (40.1)
		-	949 (94.9)	29 (2.9)
	30	+	365 (36.5)	158 (15.8)
		-	693 (69.3)	36 (3.6)
β	0	+	1047 (100)	414 (39.5)
		-	1023 (97.7)	37 (3.6)
	30	+	1131 (108)	375 (35.8)
		-	895 (85.5)	0 (0)
Kinase II	0	+	9248 (100)	4726 (51.1)
		-	9895 (107)	18 (0.2)
	30	+	7408 (80.1)	3348 (36.2)

158 カルシニューリンの全一次構造と分子多様性

久野高義、伊東　顕、橋本健志、向井秀幸、
平井みどり、田中千賀子
（神戸大・医・薬理）

〔要約〕

ラット脳 cDNA ライブラリーから、Ca^{2+}／カルモジュリン依存性蛋白質フォスファターゼ（カルシニューリン）の触媒サブユニット（Aサブユニット）をコードすると思われる、2種類の cDNA クローンを単離した。これらは、521及び525アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており、それぞれをカルシニューリンAα、Aβと名付けた。AαとAβのアミノ酸配列の間には、81%の相同性が認められた。Aα、AβともにN末側に約250アミノ酸残基にわたる、1型や2A型の蛋白質フォスファターゼと高い相同性（約50%）を示す部分を持ち、C末側には24アミノ酸残基からなるカルモジュリン結合領域と考えられる部分を持っていた。Aα、Aβともに、脳での発現が最も高く、他の組織でも低いながら発現が認められた。これらの結果より、カルシニューリンには分子多様性が存在し、それぞれ、異なった細胞機能に関与する可能性が示唆された。

Ca^{2+}／カルモジュリン依存性蛋白質フォスファターゼ（カルシニューリン）は、Aサブユニットと呼ばれる触媒サブユニットと、Bサブユニットと呼ばれるカルモジュリン類似のCa^{2+}結合蛋白質からなるヘテロダイマー構造を持つ蛋白質で、中枢神経系、特に神経細胞に多く存在している。これまで、NMDA受容体刺激後の細胞内応答や電位依存性Ca^{2+}チャネルの機能調節などにおける役割が示唆されているが、カルシニューリンの生理的機能に関する確定的な報告はない。また、その一次構造についても部分的に明らかにされていただけであった。今回、我々はカルシニューリンAの全一次構造及び分子多様性を cDNA クローニングにより明らかにしたので報告する。

［実験材料と方法］

ラット脳のλgt10 cDNA ライブラリーを合成オリゴヌクレオチドプローブによりスクリーニングし、カルシニューリンAαの cDNA を得た。同ライブラリーをAα cDNA をプローブとして、low stringency な条件でスクリーニングし、Aβの cDNA を得た。ヌクレオチド配列は Sanger 法で決定した。Northern blot 解析ではラット各組織から抽出したtotal RNA を電気泳動し、ニトロセルロース膜にブロットし、それぞれの cDNA をプローブとして用いた。

［結果及び考察］

カルシニューリンAαは、開始コドンでコードされる Met を含めて、521アミノ酸残基からなる蛋白質であると考えられた（図1）。Aαのアミノ酸配列中には、牛脳から精製されたカルシニューリンの部分配列と完全に一致した配列が認められた。また、すでに報告されていたマウスの部分配列（C末307残基）とも完全に一致していた。78から329番目までの約250アミノ酸残基は1型や2A型の蛋白質フォスファターゼとそれぞれ、42、45%の高い相同性を示し、本領域が酵素の触媒機能に関与することが示唆された。なお、2C型やフォスフォチロシンを脱燐酸化する蛋白質フォスファターゼとの相同性は認められなかった。391から

４１４番目までの２４アミノ酸残基はカルモジュリン結合部位としての特徴的な配列を示していた。このようにカルシニューリンＡαはＮ末側に触媒部位、Ｃ末側にカルモジュリン結合部位を持つキメラ的酵素であることが明らかになった。Ａβは Met を含めて、５２５のアミノ酸からなり、Ａαと全体で８１％の相同性を示した（図１）。触媒機能に関与すると思われる領域や、カルモジュリン結合領域ではさらに高い、それぞれ、９１、９６％の相同性を示した。また、Ｎ末端近くに、Pro が１０個並ぶ、特徴的な配列が認められた。Northern blot の結果、mRNA 量はＡα、Ａβともに脳での発現が最も高く、他の組織でも低いながら発現が認められた。これらの結果より、カルシニューリンには分子多様性が存在し、それぞれ、異なった細胞機能に関与する可能性が示唆された。

［参考文献］

1. Ito, A., Hashimoto, T., Hirai, M., Takeda, T., Shuntoh, H., Kuno, T., and Tanaka, C. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 1492-1497

2. Kuno, T., Takeda, T., Hirai, M., Ito, A., Mukai, H., and Tanaka, C. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun., 165, 1352-1358

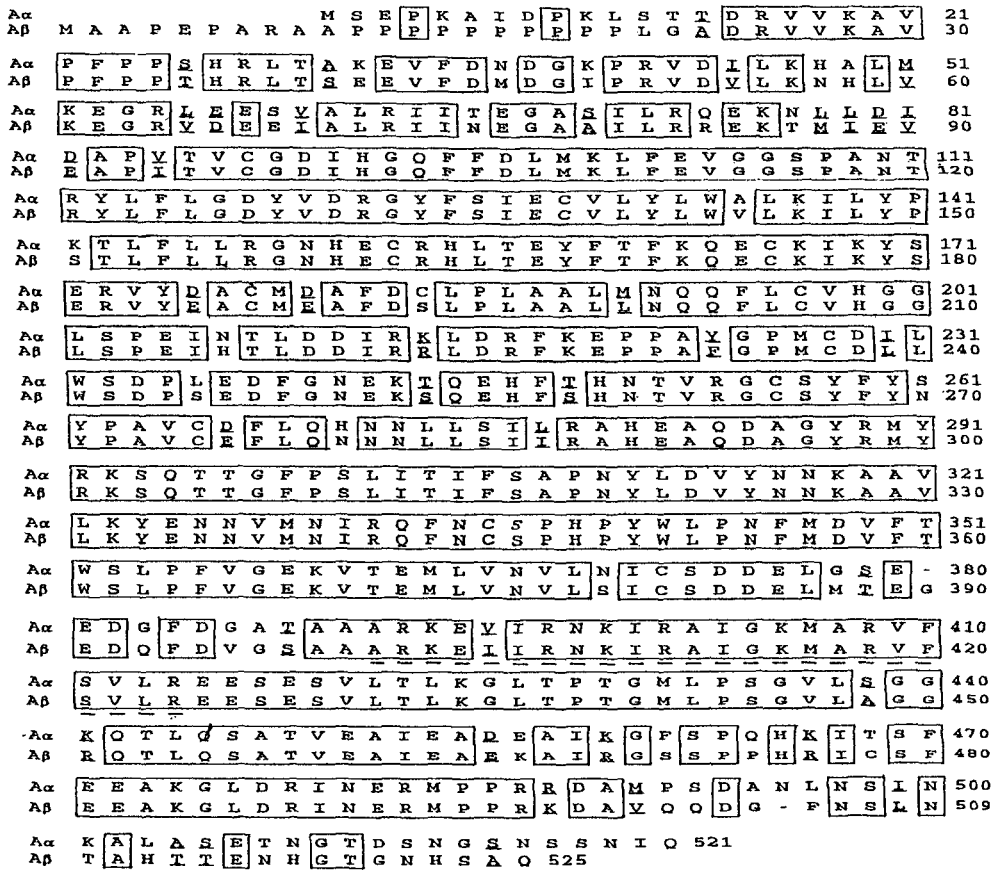


図１．カルシニューリンＡαとＡβのアミノ酸配列

同じアミノ酸は四角で囲い、性質が類似しているアミノ酸には下線を付した。破線部はカルモジュリン結合部位を示す。

159 カルシニューリンAサブタイプの脳内分布

斉藤尚亮、高石知明、久野高義、田中千賀子
（神戸大・医・薬理）

〔要約〕

カルシニューリンAサブユニット（CaNA）の2つのアイソザイム、CaNAαおよびCaNAβの脳におけるmRNAの分布をノーザンブロット法と in situ hybridization 法を用いて検討した。CaNAα mRNA、CaNAβ mRNAともに海馬錐体細胞層、歯状回顆粒細胞層には高濃度に認められた。CaNAα mRNAは線条体に多く、大脳皮質ではⅡ、Ⅲ層に特に多量に認められ層構造が明瞭であるのに対し、CaNAβは線条体にはむしろ少なく、大脳皮質層構造は不明瞭であった。これらの結果から、2つのカルシニューリンAサブユニットは異なる神経機能に関与している可能性が示唆された。

種々の細胞内情報伝達機構において蛋白質燐酸化反応が中心的な役割を果していることは既によく知られているが、蛋白質フォスファターゼ（PP）はこの燐酸化反応のスウィッチオフを司る酵素として蛋白質燐酸化酵素と共に重要な酵素と考えられている。PPはPP1、2A、2B、Cに分類され、このうちカルシニューリンはPP2Bに相当する、カルシウム、カルモジュリン依存性の蛋白質脱燐酸化酵素である。本酵素はカルモジュリンが結合するAサブユニットと、カルシウムが結合するBサブユニットからなるホロ酵素であり、中枢神経系に特に多量に存在している。我々はこのAサブユニットの2種のアイソザイムをラット脳 cDNAライブラリーから単離することに成功し、それぞれをAα、Aβと名付けた（1、2）。AαとAβのアミノ酸配列は80%以上のホモロジーを持ち、アミノ基側とカルボキシル基末端にのみ異なった配列が認められ、Aα、Aβ共に脳に非常に高濃度に存在していた。これらの結果からこの2種のアイソザイムが中枢神経系においてそれぞれ異なる神経機能に関与している可能性があると考えられるため、我々は今回 in situ hybridization 法を用いてカルシニューリンAαとAβのmRNAの分布を比較し機能的な相違について推定した。

［方法］

1) カルシニューリンAサブユニットの2種のアイソザイムのmRNAに相補的な45塩基のオリゴヌクレオチドをDNAシンセサイザーにて合成した（Aα；塩基番号1365-1409, 1710-1754, Aβ；塩基番号1344-1388, 1570-1614）（1、2）。ノーザンブロット法にはプローブの5'末端を ^{32}P-γ-dATP と T4 polynucleotide kinase を用いて標識したものを用い、in situ hybridization 法には ^{35}S-α-dATP と terminal deoxynucleotidyl transferase で3'末端を標識して使用した。

2) ノーザンブロット法には Guanidine isothiocyanate／Cesium chloride 法で調整したRNA各25μgをフォルムアルデヒドゲル中で電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写後 ^{32}P－標識プローブと42℃で18時間ハイブリダイズさせた。

3) in situ hybridization 法には4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定したラット脳の20μm切片を用いアセチル化、脱水、脱脂後にハイブリダイゼーションを行った。

［結果と考察］

我々が合成した4種のオリゴヌクレオチドプローブは、Northern blot においてＡα１、Ａα２は 4.1 ｋβ、Ａβ１，Ａβ２はともに 3.3 ｋβのそれぞれ単一のｍＲＮＡバンドを認識し、そのサイズはｃＤＮＡを用いて得られたｍＲＮＡのものと一致した（図１）。この結果は今回用いたオリゴヌクレオチドプローブ、Ａα１，Ａα２はカルシニューリンＡα，Ａβ１，Ａβ２はカルシニューリンＡβのみとハイブリダイズすることを示し得られたオートラジオグラムはそれぞれのｍＲＮＡが存在をすることを示している。これら４種のプローブをもちいてカルシニューリンＡαとカルシニューリンＡβの脳内分布を検討すると、カルシニューリンＡαは海馬、大脳皮質に次いで線条体に多く存在するのに対して、カルシニューリンＡβは海馬、大脳皮質には多いが線条体よりもむしろ嗅球に多く認められ、この２種のＡサブユニットの脳内分布は異なっていることが明らかとなった（図２）。さらに詳細に分布を検討するために in situ hybridization を行った。カルシニューリンＡαｍＲＮＡ、カルシニューリンＡβｍＲＮＡともに海馬錐体細胞層に最も多く存在したが、カルシニューリンＡαは、線条体に多くまた大脳皮質ではⅡ、Ⅲ層に特に多量に存在し層構造が明瞭であった。一方、カルシニューリンＡβｍＲＮＡは線条体に比較的低濃度であるが、大脳皮質には高濃度に見られ、層構造はあまり明瞭ではなかった。これらの所見から、カルシニューリンＡαとＡβは脳内で明らかに異なる局在を示し、異なる神経機能に関与している可能性が示唆された。

［文献］

1．Ito, A., Hashimoto, T., Hirai, M., Takeda, T., Shuntoh, H., Kuno, T., and Tanaka, C. (1989) Biochem, Biophys. Res. Commun., 163, 1492-1497

2．Kuno, T., Takeda, T., Hirai, M., Ito, A., Mukai, H., and Tanaka, C. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun., 165, 1352-1358

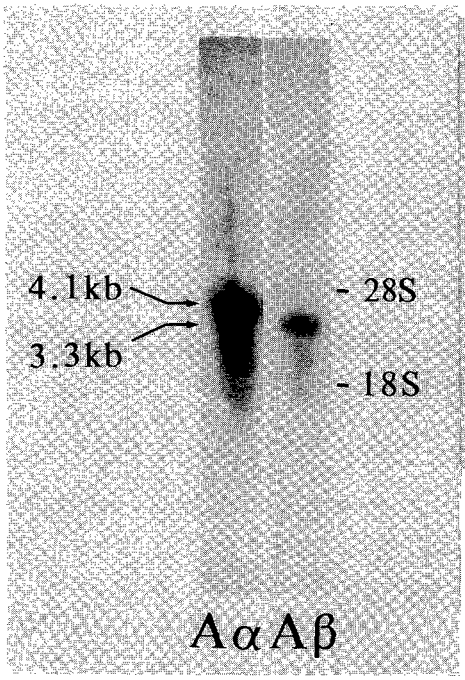


図１　ＣａＮＡα、Ａβのノーザンブロット

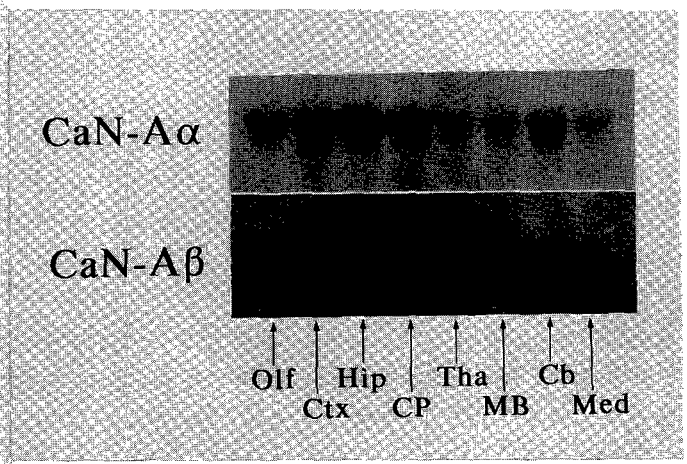


図２　ＣａＮＡα、Ａβｍ ＲＮＡの脳部位別分布

160 中枢神経内 ^{125}I-endothelins 特異的結合部位

丹羽正美[1]、川口務[2]、藤本明子[1]、前田哲[1]、
栗原正紀[2]、重松和人[3]、片岡泰文[1]、谷山紘太郎[1]、
森和夫[2]
（長崎大・医・[1]薬理学第２、[2]脳神経外科、
[3]病理学第２）

〔要約〕定量的 receptor autoradiography 法による ^{125}I-endothelin-1 (^{125}I-ET-1) 高密度結合の分布は、ラット脳では、subfornical organ (SFO)、choroid plexus (ChP)、anterior thalamic nuclei、海馬 lacunosum molecular layer (LMol)、小脳 granular layer (GC)、ブタとヒト脊髄では、Ⅰ-Ⅲ層、Ⅹ層および intermediolateral cell column (IML) であった。ラット脳内 ^{125}I-ET-1 の結合特性は、SFO と GC では Kd 値約 5 nM、ChP と LMol では約 0.6 nMであった。Affinity cross-linking 法で、^{125}I-ET-1 と ^{125}I-ET-3 特異的標識タンパクを検索したところ、ラット小脳では、主に 43 KDa と 33 kDa で、わずかに 87 kDa も存在した。ChP では、主に 49 kD で、33 kDa も存在した。中枢神経内 ETs 受容体の存在と、その多様性が示唆された。

Endothelins (ETs) は神経ペプチドとして中枢神経内で作用しているらしい (1、2、3) が、受容体についての知見は少ない。中枢神経内に存在する ETs の意義を探るため、ラット脳、ヒトとブタ脊髄の ^{125}I-ET-1 特異的結合部位の分布と特性を検索し、さらに、Ca^{2+} チャンネル関連ペプチドである ^{125}I-ω-conotoxin GVIA (^{125}I-CgTx) 結合の分布と比較した。また、^{125}I-ET-1 と ^{125}I-ET-3 結合タンパクを、SDS-PAGE を用いた affinity cross-linking 法で同定した。

［方法］^{125}I-ET-1 と ^{125}I-CgTx 特異的結合部位の比較は、既報の定量的 receptor autoradiography 法 (4) で行った。膜分画標本と ^{125}I-ET-1 および ^{125}I-ET-3 を、50 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA-2Na, 1 mg/ml bacitracin, 4 μg/ml leupeptin, 2 μg/ml chymostatin) 中で、25℃、2 時間で結合させた後、0.78 mM bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS) で架橋させ、SDS-PAGE (5 - 20% 濃度勾配ゲル) 電気泳動にかけた。ゲルを乾燥後、autoradiogram を得て、特異的結合タンパクの解析を行った。

［結果および考察］^{125}I-ET-1 特異的結合は、ラット脳では SFO、ChP、anterior thalamic nuclei、海馬 LMol、および小脳 GC に高密度存在した (図1)。ブタとヒト脊髄では、後角Ⅰ-Ⅲ層 (Rexed)、Ⅹ層に高密度で、さらに胸髄では交感神経節前ニューロン起始核である IML にも存在した (図2)。ラット脳で、^{125}I-CgTx 結合は SFO には存在したが、ChP には存在しなかった。海馬 stratum radiatum (Or) と stratum oriens (Ra) に高密度結合が認められたが、^{125}I-ET-1 結合が存在する海馬 LMol には存在しなかった。小脳では、^{125}I-CgTx は molecular layer を特異的に標識するが GC には特異的結合は存在しなかった。脊髄後角における分布の差は興味深く、^{125}I-CgTx は、^{125}I-ET-1 より広い領域のⅠ-Ⅳ層を高密度に標識した。IML には両者が特異的に結合するがⅩ層には ^{125}I-CgTx 結合は存在しなかった。

ラット脳 SFO、ChP、LMol、GC での ^{125}I-ET-1 結合特性は、SFO と GC では、それぞれ Kd 値 4.2 nM、5.3 nM と低親和性であったのに対して、LMol は 620 pM、ChP は 520 pM と、高親和性であった。^{125}I-ET-1 結合に対する非標識同族ペプチドによる置換能力は、低親和性の SFO と GC で ET-1 = ET-2 = ET-3 > sarafotoxin S6b (STX) の順で、高親和性の LMol と ChP では ET-1 >ET-2 > ET-3 = STX であった。

ラット小脳と choroid plexus (ChP) から得られた粗膜分画 (総タンパク量 82 μg) と 930 pM ^{125}I-ET-1、^{125}I-ET-3 を結合させた後、架橋剤 BS と反応させてアフィニティ・ラベリングを行った。図 3 に示したように、ラット小脳から得た膜分画標本では、^{125}I-ET-1、^{125}I-ET-3 ともに、最も多量に 44 kDa タンパクを特異的に標識し、次いで 33 kDa で、さらに 87 kDa も標識された。興味深いことに、ChP では主に 49 kDa で、小脳の 44 kDa と比較して明きらかに分子量サイズが違った。低分子バンドは 33 kDa で同一であった。図 3 にはラット肺の ^{125}I-ETs 特異的結合バンドも呈示してある。^{125}I-ET-1、^{125}I-ET-3 ともに、主バンドは 33 kDa であったが、^{125}I-ET-3 は、さらに 67 kDa と87 kDa も特異的に標識した。

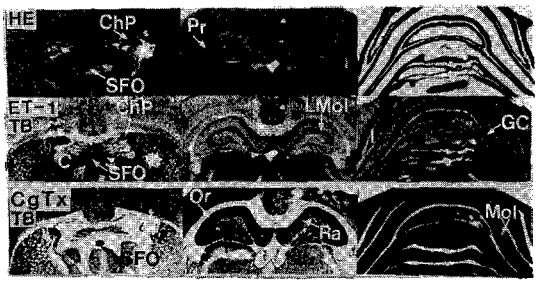


図1. ラット脳における ^{125}I-ET-1 (ET-1) および ^{125}I-CgTx (CgTx) 特異的結合部位の分布。略号は本文参照。

脊髄および視床下部下垂体後葉系では ETs はニューロン内で発現し、神経ペプチドとして作用していると思われる(1、2、3)。^{125}I-ET-1 特異的結合部位の分布は現在まで報告された ETs 含有ニューロンと、脊髄後角を除いて必ずしも一致していない。最近、神経膠細胞での ET の産生と受容体の存在が報告された (5、6)。広範な ^{125}I-ET-1 結合部位の分布を考えると神経膠細胞で産生された ETs が、自らに作用するばかりでなく、ニューロンに存在する受容体に作用して神経機能を調節することも示唆される。L 型と N 型 Ca^{2+} チャンネル拮抗物質とされる CgTx の特異的結合部位との分布の差は、中枢神経内における Ca^{2+} チャンネルの多様性を意味するものかも知れない。ラット脳内で ^{125}I-ET-1 と ^{125}I-ET-3 が特異的に標識するタンパクは、複数存在し受容体の多様性を強く支持する。少なくとも今回検索された脳内 2 部位では、^{125}I-ET-1 と ^{125}I-ET-3 が標識する分子量サイズには差はなかったが、ラット肺では両者に差があり、この 2 つの放射性受容体リガンドを用いた詳細な検討が望まれる。

[文献] (1) Yoshizawa, T. et al. (1989) Neurosci. Lett. 102, 179-184. (2) Giaid, A. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 7634-7638. (3) Yoshizawa, T. et al. (1990) Science 247, 462-464. (4) Yamasaki, H. et al. (1989) Eur. J. Pharmacol. 168, 247-250. (5) MacCumber, M.W. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2359-2363. (6) Marsault, R. et al. (1990) J. Neurochem. 54, 2142-2144.

図3. ^{125}I-ET-3 (ET-3) と ^{125}I-ET-1 (ET-1) を用いたラット肺(A) 小脳(B) 脈絡叢(C) 膜分画のアフィニティ・ラベリング。レーン 1 は、^{14}C-タンパク質分子量マーカー (a: 200 kDa, b: 97.4 kDa, c: 69 kDa, d: 46 kDa, e: 30 kDa)。レーン 2 は 100 nM 非標識 ET-1 あるいは ET-3 存在下、レーン 3 は非存在下で得られた。

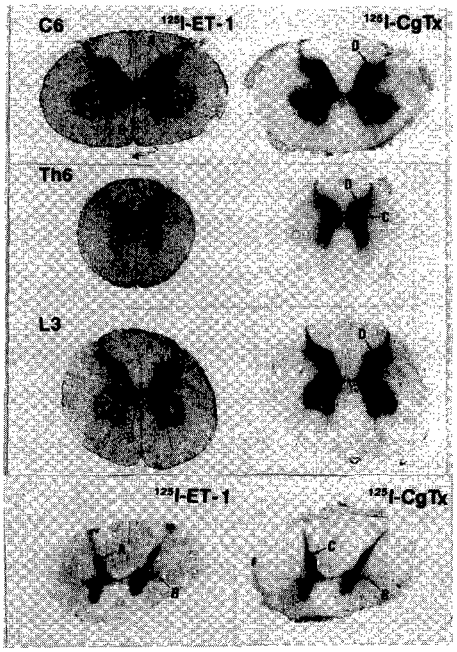
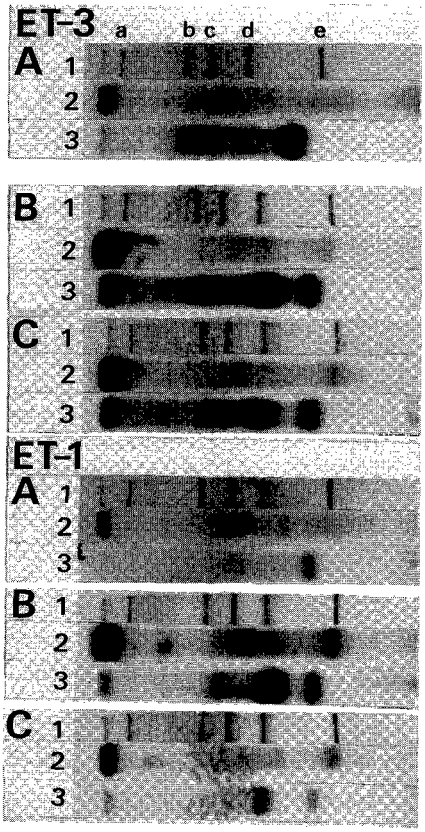


図2. ブタ脊髄 (上段 3 列) とヒト胸髄 (最下段) ^{125}I-ET-1 および ^{125}I-CgTx 特異的結合部位の分布。



161 Neuropeptide Yおよび Galaninの視床下部内 Norepinephrine Releaseに及ぼす影響と高血圧における意義について

津田　和志，増山　善明，Hideyasu Yokoo*，Menek Goldstein*
和歌山県立医科大学循環器内科，New York University Medical Center*

〔要約〕

Neuropeptide Y (NPY) および Galanin (Gal)の中枢情報伝達機構と高血圧における意義について検討するため、これらペプチドの視床下部内 Norepinephrine (NE) Release に及ぼす影響を観察した。NPY,Gal は電気刺激時の視床下部からの NE release を濃度依存性に抑制した。α_2-agonist, UK 14,304 も NE release を抑制したが、その作用は低濃度NPY,Galにより増強された。α_2-antagonistである RX 781094 存在下や Ni-protein inhibitor である pertussis toxin存在下ではNPY,Galの NE release 抑制作用は減弱した。高血圧自然発症ラット(SHR)の視床下部においても α_2-agonist, UK 14,304 およびNPYは NE release を抑制するが、その程度は正常血圧対照群に比し有意に減弱していた。以上よりNPY,Galは視床下部内 NE release を抑制し、その作用の一部は presynaptic α_2 受容体、さらには抑制系GTP-binding proteinを介するものであることが示された。またSHRにおいてNPYの NE release 抑制作用が減弱していることは高血圧のNPYに対する感受性の低下を示唆し、高血圧の発症に一部関与する可能性が考えられた。

(目的)

NPY (36-amino acid peptide) および Gal (29-amino acid peptide) は神経組織に広範囲に分布するペプチドであるが神経細胞内では catecholamine と共存することが知られ、これらペプチドの交感神経活性調節機序が注目されている。中枢神経系においてはNPY,Galはlocus coeruleus から由来する noradrenergic neuron に多く含まれ視床下部に密な分布をすることが報告されているが[2]、その生理的意義については不明な点が多い。そこで本研究ではNPY,Galの視床下部内 NE release に及ぼす影響を観察し、その作用機序を特にα_2受容体およびGTP-binding proteinとの関連から検討した。さらにSHRを用いて高血圧の中枢交感神経活性調節におけるNPYの役割について検討を加えた。

(対象と方法)

体重 150～200 gの雄 Sprague-Dawley ラットおよび 9～10週齢 SHR,WKY を断頭後速やかに視床下部を摘出し、[1] brain slice を作成した。Slice は 0.1 μM の (^{3}H)NE と incubate した後、両端に platinum electrodes を装着した温浴槽内 (37℃) に入れ、Krebs-Ringer bicarbonate buffer にて表面灌流を行なった。そして灌流を開始してから67分後 (S_1) と 116分後 (S_2) に電気刺激 (1Hz, 2ms duration, 20mA 2分間) を行なった。灌流液は 7分毎に採取し、その中に含まれる^{3}H量を liquid scintillation spectrometry を用いて測定した。また UK 14,304, NPY,Gal の影響はこれらをS_2の14分前に灌流液中に投与し、S_2/S_1 ratio〔(^{3}H)NEの比〕の変化として観察した。一方、α_2-antagonist, RX 781094 を用いた実験ではS_1の28分前にbuffer内に RX 781094 を 1×10^{-8}M 加えておき、その際のNPY,Gal の S_2/S_1 ratio に対する影響を検討した。また抑制系GTP-binding proteinとの関連については brain slice 作成後直ちに抑制系GTP-binding protein inhibitorである pertussis toxin(8μg/ml) と 1時間(37℃)incubateし、その後上記と同様の方法でrelease experimentに供した。統計方法は分散分析法およびWilcoxon rank-sum testによった。

(成績)

(1)NPY,GalはSDラット視床下からの電気刺激時 (^{3}H)NE release を濃度依存性に抑制した (IC_{50} value : NPY 1.1×10^{-8}M, Gal 6.8×10^{-8}M)。(2)α_2-agonist, UK 14,304 も電気刺激時 NE release を抑制したが、その作用は低濃度 NPY (1×10^{-9}M), Gal (1×10^{-8}M) によって増強された。(3)α_2-antagonist, RX 781094 存在下ではNPY,Gal の NE release 抑制作用は拮抗された。(4) Pertussis toxin処理により UK 14,304, NPY,Gal の NE release抑制効果は有意に減弱した (NE release 抑制の IC_{40} value : UK 14,304, vehicle $1.6\pm0.3\times10^{-9}$M, IAP後 $8.2\pm1.0\times10^{-9}$M, n=5, $P<0.05$; NPY, vehicle $8.0\pm0.7\times10^{-9}$M, IAP後 $3.0\pm0.4\times10^{-8}$M, n=6, $P<0.05$; Gal, vehicle $4.8\pm0.6\times10^{-8}$M, IAP後

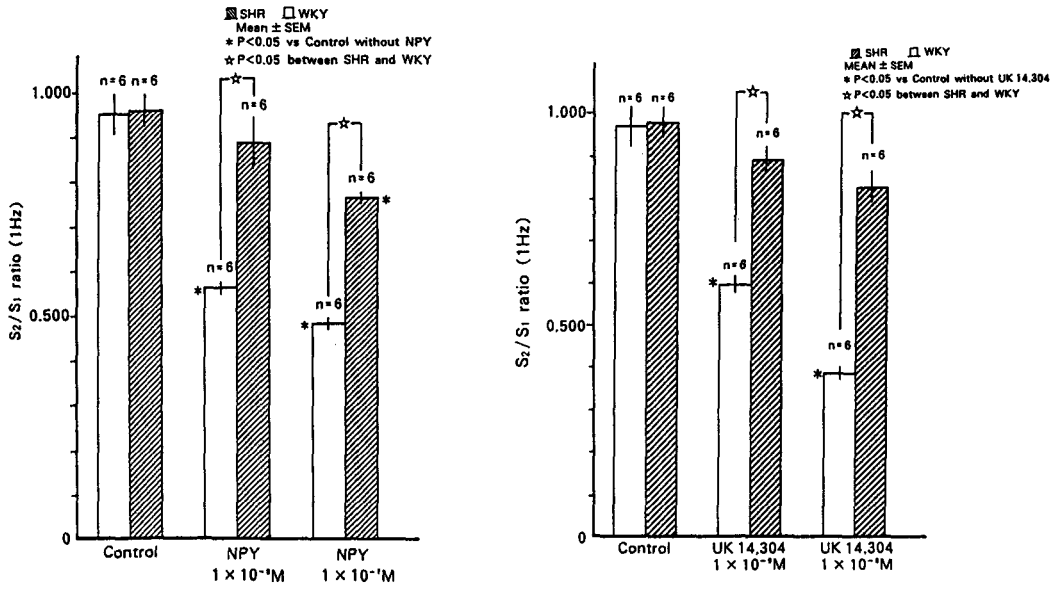


Fig.1 Effects of NPY and UK 14,304 on stimulation-evoked (^{3}H)-NE release in hypothalamic slices of SHR and WKY

$2.0\pm0.4\times10^{-7}$M, n=6, P<0.05)。(5) SHR視床下部からの電気刺激によるNE releaseはWKYに比し大であった。また、UK 14,304およびNPYはSHRの電気刺激時NE releaseを抑制するが、その程度はWKYに比し有意に減弱していた(図1)。

(考案と結論)

NPY,Galは神経細胞内においてはcatecholamine, 特にNEと共存することがよく知られている。今回の成績からNPY,Galは1Hz電気刺激時の視床下部内NE releaseを抑制することが示された。この成績は中枢NE releaseの調節機序にNPY,Galが重要な役割を果たしていることを示唆している。さらにα_2-agonist, UK 14,304のNE release抑制作用は低濃度NPY,Galによって増強され、またα_2-antagonist, RX 781094によってNPY,Galの効果は拮抗されることより、これらペプチドの作用の一部はpresynaptic α_2受容体を介するものであると考えられる。最近、神経伝達物質や各種ホルモンの細胞膜での作用機序としてGTP-binding proteinの関与が注目されている。そしてpertussis toxinは抑制系GTP-binding protein (Ni-protein)を不活性化し一連の情報伝達系を遮断するspecificな薬剤として知られている[3,4,5]。今回sliceをpertussis toxinで前処理しておくとNPY,Galの(^{3}H)NE release抑制作用は有意に減弱した。このことはNPY,Galの作用が一部Ni-proteinを介するものであることを示す成績と考えられる。一方SHRの視床下部においてUK 14,304およびNPYのNE release抑制作用は正常血圧対照群に比し有意に減弱していた。これらの感受性の低下は高血圧の成因に関連するのか、あるいは高血圧による二次的な結果なのかは明らかではないが、高血圧ではpeptidergic regulationの異常が中枢交感神経活性の変化に一部関与している可能性が示唆された。

(文献)

1) Glowinski, J. and Iversen, L.L. (1966) J.Neurochem., 13:655-669.

2) Holets, V.R., Hökfelt, T., Rökaeus, A., Terenius, L. and Goldstein, M. (1988) Neuroscience, 24: 893-906.

3) Katada, T. and Ui, M. (1981) J. Biol. Chem., 256:8310-8317.

4) Stryer, L. and Bourne, H.R. (1986) Ann. Rev. Cell Biol., 2:391-419.

5) Wreggett, K.A. (1986) J. Receptor Res., 6:95-126.

162 長期増強を誘発する内在性ペプチドの探索

近藤哲朗、池中一裕、藤本一朗、御子柴克彦
（大阪大・蛋白研　機能制御）

〔要約〕

MCDペプチド(Mast Cell Degranulating peptide)は海馬スライスの系で長期増強(LTP)を誘発することが知られている(1)。MCDペプチドに対する特異抗体、^{125}I-MCDを調製し、radioimmunoassay(RIA) 及び binding assay を行い、内在性LTP誘発ペプチドの探索を進めたところ、ラット脳ペプチド画分中に、MCDペプチドに類似の物質が存在することを見いだした。

［はじめに］

既に我々はguinea pig 及び ラット海馬CA1領域において、合成MCDペプチドがシナプス伝達効率の長期増強（LTP）様の現象を誘発することを報告した(2)。また、ラット脳内には、MCDの高親和性結合部位（Kd=180pM）が存在し、それは蛇毒の一種Dendrotoxin I（DTX-I）の結合部位である電位依存性K^+channelと同一であることが報告されている(3)。さらに、ブタ脳抽出物中に、MCDペプチド類似の物質が存在する可能性も示されており(1)この内在性物質を同定、単離し、その機能解析を行うことは、長期増強の分子機構を解明するうえで、有用な知見を与えるものと考えられる。

そこで本研究では、合成MCDペプチドに対する抗体と、^{125}I-MCDペプチドを作製し、radioimmunoassay 及び、binding assayを行い、ラット脳ペプチド画分中に、MCDペプチドに類似の物質を見いだしたので報告する。

［方法］

1)^{125}I-MCDの調製；クロラミンT法に従い、MCD ペプチドのヒスチジン残基に^{125}I を導入し、TSK SP-5PW ion exchange HPLC を行いmono iode体を分離した。

2)抗体の作製；MCD ペプチドと bovine serum albumin (BSA) を water soluble carbodiimide (WSC) を用いて conjugateを作製後、家兎に免疫し、抗MCD抗体を得た。

3)脳内ペプチド画分の抽出；Wister rat(adult)脳摘出後、約10倍容の1M 酢酸でboil(100 C,10分)しホモジェナイズ後、10,000xg 4 C 40分遠心した上清に対してアセトン沈澱（75%）を行った上清を粗ペプチド画分とした。

4)Radioimmunoassay；50mM Tris-HCl(pH8.0),5mM EDTA,0.5% NP40,150mM NaCl,1mg/ml BSA,0.1mg/ml protamine chlorideを含む緩衝液中に、抗MCD血清（10^4希釈）、約10^4CPM(12fmol)の^{125}I-MCDと非標識MCDあるいは各種ペプチドを一夜4 Cでincubateした後、抗原抗体complexを遠心した沈澱の放射活性を測定した。

5)シナプトソーム画分の調製及び Binding Assay；Taylorらの方法(4)に従った。

［結果］

1)抗体の特異性；還元型MCDをBSAと結合させたものを抗原として得た抗MCD抗血清は還元型のMCDを認識することができたが、天然型MCDは認識しなかった。しかし天然型MCDとBSAの結合物を追加免疫して得た抗血清は還元型、天然型共に認識した。

2)Radioimmunoassay;図1に^{125}I-MCDと抗MCD抗体の結合に対する非標識MCDによる阻害効果を示す。50%阻害濃度は$1x10^{-10}$Mであった。^{125}I-MCD結合に対する90%から10%のMCD displace濃度は$2x10^{-11}$Mから$6x10^{-10}$Mであり、500μlの系でおこなった場合、1 Assay で10fmolから300fmol(26pgから780pg)のMCDを定量できる系を確立した。

3)Binding Assay;ラット全脳（小脳を除去）シナプトソーム膜分画に対する^{125}I-MCDの結合を図2に示す。1μM非標識MCD存在下に於ける結合を非特異的結合とし、^{125}I-MCDの全結合からこれを差し引いた値を特異的結合とした。図1に^{125}I-MCD のシナプトソーム膜標品への結合に対するMCD の阻害効果を示した。MCD による50%阻害濃度は$3x10^{-9}$Mであった。

4)各種誘導体などによる結合阻害；^{125}I-MCD結合部位に対するMCDの特異性を検討する目的で以下のペプチドによる結合阻害効果を解析した。図3にその結果を示す。$_D$-MCD（MCDの構成アミノ酸をすべてD体で置換したもの）とApaminは阻害効果はみられなかったが、DTX-IはMCDよりさらに強い阻害効果を示した。また、図4に抗MCD抗体と^{125}I-MCDの結合に対する各ペプチドの阻害効果を示した。$_D$-MCD,Apamin,DTX-Iいずれも阻害効果はみられなかった。

5)ラット脳ペプチド画分を用いた結合実験；ラット全脳よりペプチド画分を調製し、MCD様の内因性物質が存在するかどうか検討した。RIAを行った結果、^{125}I-MCDの抗MCD抗体への結合は 0.75匹の脳ペプチド画分により約90%の阻害がみられ、binding assay では、^{125}I-MCDのシナプトソーム膜への結合は0.2匹の脳ペプチド画分により約95%の阻害がみられた。

［考察］

MCDペプチドは分子内に2個のSS結合を有する塩基性ペプチドである。我々はNMRを用いた実験で、MCD分子には2個のSS-bridgeで固定されているα-helixを形成する部分が存在することを明らかにした(5)。即ち、MCDペプチドは、その機能発現の上で極めて特異的な高次構造が重要である可能性が考えられる。抗MCD抗体作製にあたり、天然型のMCDを抗原とした場合のみ天然MCDに反応性を示す抗血清を得たことから今回得られた抗体はMCDの高次構造を非常に厳密に区別して認識しているものと考えられる。

最近の報告によるとMCDペプチドはDTX-I結合部位、即ちある種の電位依存性K^+channelに特異的に結合（KD=180pM）することが明かとなっている(3)。本研究では^{125}I-MCDの結合に対して、確かにMCD、^{125}I-MCD, DTX-Iでは阻害効果が見られたが、MCDペプチドの光学異性体であり、物理化学的性質は同一と考えられるD-MCDや、SS－結合のかかり方やα-helixを有することで立体構造が酷似しているApaminについては、阻害効果は全く見られなかった（図3）。そしてさらに、これらのペプチドの抗MCD抗体に対する免疫交差性を見たところ、D-MCD や、Apaminのみならず、同じK^+channelに結合するDTX-Iに対しても、抗MCD抗体は厳密に区別して認識した（図4）。以上のことから本研究で用いているRIAの系は、非常に免疫的特異性が高いものであることが考えられる。今回ラット脳ペプチド画分に見いだされた物質は、MCDペプチドと非常に高い特異性を有する免疫交差性を示すものであり、さらに機能面においてはMCD（あるいはDTX-I）結合部位に対して結合能を有する物質であることが示唆された。

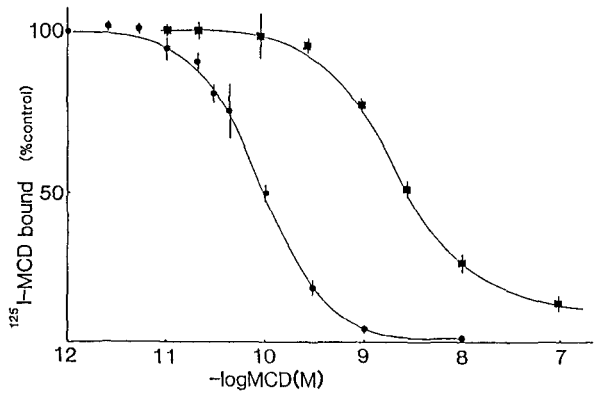


図1. ^{125}I-MCDの抗MCD抗体(●)及び、シナプトソーム膜(■)への結合に対する非標識MCDによる阻害効果

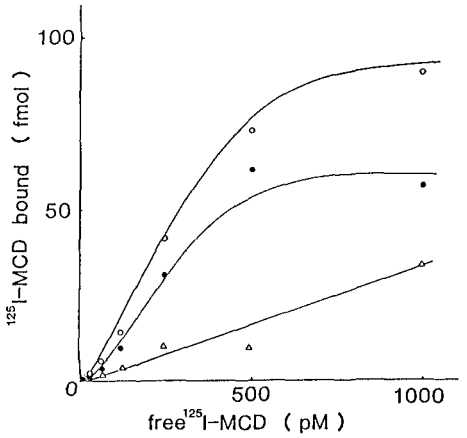


図2. 脳シナプトソーム膜に対する^{125}I-MCDの結合 (○)全結合、(●)特異的結合、(△)非特異的結合

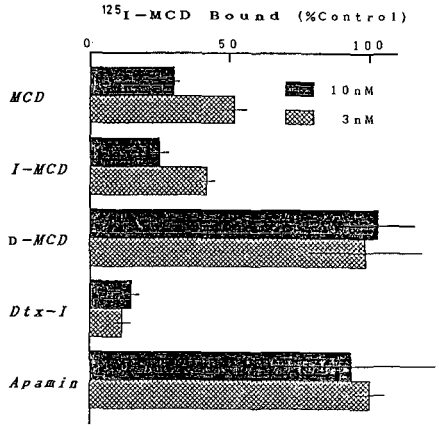


図3. ^{125}I-MCDのシナプトソーム膜画分への結合に対する各種ペプチドによる影響

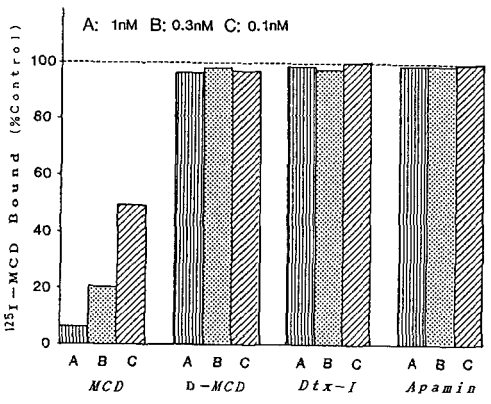


図4. ^{125}I-MCDの抗MCD抗体への結合に対する各種ペプチドによる影響

［文献］

1) Cherubini, E. et al. (1987) Nature 328, 70-73
2) 近藤哲朗ら、(1988) 第３１回日本神経化学会大会論文集 270-271
3) Rehm, H. et al. (1988) Biochem. 27, 1827-1832
4) Taylor, J. W. et al. (1984) J. Biol. Chem. 259, 13957-13967
5) Kobayashi, U. et al. Neurochem. Intnl. submitted

163 デルタ睡眠誘発ペプチド(DSIP)のMet-enkephalin遊離作用について

中村明弘，高橋幸江，境 健司，塩見浩人
（福山大・薬・第一薬理）

〔要約〕

シナプトゾームからのMet-enkephalin(Met-ENK)遊離に及ぼすDSIPの影響とその特性について検討した。ラットの大脳皮質・海馬・視床・視床下部・中脳・延髄の各部位より調製したシナプトゾームからのMet-ENK遊離量をDSIPは有意に増加したが、線条体からのMet-ENK遊離に対しては有意な影響を及ぼさなかった。一方、視床下部シナプトゾームからのLeu-enkephalin(Leu-ENK)の遊離に対してDSIPは有意な影響を及ぼさなかった。延髄シナプトゾームにおけるDSIPのMet-ENK遊離増加作用は、インキュベート溶液中のCa^{2+}に対して依存性を示したが、tetrodotoxin (TTX)では抑制されなかった。またDSIPは延髄シナプトゾームへの$^{45}Ca^{2+}$取り込みを濃度依存的に増加した。

以上の結果より、DSIPは脳の特定部位において特異的にMet-ENKの遊離を増加し、その作用機序としては神経終末内へのCa^{2+}流入が関与していることが明らかとなった。

【目的】

デルタ睡眠誘発ペプチド（Delta-Sleep-Inducing Peptide：DSIP）は、睡眠誘発活性を有する内因性の睡眠物質候補である(5)。近年このDSIPが、睡眠誘発活性以外にも多くの薬理活性を有していることが明らかとなってきた(2)。我々も、このDSIPが強力な鎮痛作用を有していることを見出し、その作用機序の解明を行ってきた(3,4)。その結果、DSIPは内因性Met-ENKの遊離増加作用を有していることが、ラット延髄スライスを用いた灌流実験において明らかとなった(4)。このDSIPのMet-ENK遊離増加作用は、DSIPの鎮痛作用発現に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで本研究においては、さらにこのDSIPのMet-ENK遊離作用の特性を明らかにするために、脳内各部位より調製したシナプトゾーム標本からのMet-ENK遊離に及ぼすDSIPの影響とその作用機序に関して検討を行った。また併せて、Met-ENKと同じ内因性オピオイドペプチドであるLeu-ENKの遊離に及ぼすDSIP影響についても検討した。

【方法】

実験には、体重200-250gのSprague-Dawley系雄性ラットを使用し、断頭後直ちに脳を摘出して、GlowinskiとIversenの方法(1)に従い脳を各部位に分けた。脳の各部位は、10倍容量の0.32M sucrose中でホモジナイズした後、1,000gで10分間遠心分離した。得られた上清(S1)をさらに15,000gで20分間遠心分離し、得られた沈澱(P2)を粗シナプトゾームとして以後の実験に用いた。シナプトゾームのインキュベート溶液としては、Krebs-HEPES medium (KHM)(pH7.4)を使用した。

1) Enkephalinsの遊離測定：各シナプトゾームは、DSIPを含むインキュベート溶液中で37℃で10分間インキュベートした。インキュベートは、氷冷Ca^{2+} free KHMを加えて停止し、GF/Cフィルターによりシナプトゾームとインキュベート溶液を分離した。濾液中のMet-ENKおよびLeu-ENKは、Sep-Pak C_{18}を用いて精製した後、radioimmunoassayにより測定した。

2) $^{45}Ca^{2+}$の取り込み測定：シナプトゾームをCa^{2+}-free HBM中で10分間37℃でプレインキュベートした後、DSIPを含むHBM（2mM $^{45}Ca^{2+}$：0.2μCiを含む）を加え、さらに1分間インキュベートした。反応は5mM EGTA含有Ca^{2+} free HBMを加えて停止し、GF/Cフィルターによりシナプトゾームを濾取した。フィルターを同溶液で洗浄した後、その放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

【成績】

脳の各部位より調製したシナプトゾームからのMet-ENKの遊離に及ぼすDSIPの影響を検討した結果、0.1nMのDSIP は、延髄のほかに皮質・視床下部・中脳においても有意にMet-ENKの遊離を増加し、1nMのDSIPは前記部位に加えてさらに海馬・視床においても有意にMet-ENKの遊離を増加した(Fig.1)。しかしながら、線条体においてはこれらのDSIP濃度においてMet-ENK遊離量の有意な変化は認められなかった。一方、視床下部より調製したシナプトゾームからのLeu-ENKの遊離に対してDSIPは、0.1-10nMにおいて有意な影響を及ぼさなかった(Table 1)。

延髄シナプトゾームを用いてさらにこのDSIPのMet-ENK遊離増加作用の特性について検討した結果、DSIPによるMet-enkephalin遊離増加作用は、溶液中のCa^{2+}を除いた場合には消失したが、TTX(0.3μM)では影響を受けなかった。さらにこの延髄より調製したシナプトゾームへの$^{45}Ca^{2+}$の取り込みに及ぼすDSIPの影響について検討した結果、シナプトゾームの$^{45}Ca^{2+}$取り込み量はDSIPの濃度(1-100pM)に依存して増加した。

【考察】

先に延髄の灌流スライス標本において観察されたDSIPのMet-ENK遊離増加作用が、線条体を除く脳各部位においても認められた。脳内においてMet-ENK含量が最も多い線条体においてDSIPの作用が認められなかったことは、DSIPのMet-ENK遊離増加作用が部位特異的であることを示している。DSIPのMet-ENK遊離増加作用が部位特異性およびTTX非感受性であり、さらにLeu-ENKの遊離には影響を及ぼさなかったことから、DSIPは特定の部位において特異的にMet-ENKの遊離を増加 するようである。

このDSIPのMet-ENK遊離増加作用の機序としては、Ca^{2+}依存性を示し$^{45}Ca^{2+}$の取り込みを増加したことから、神経終末内へのCa^{2+}流入増加が考えられる。

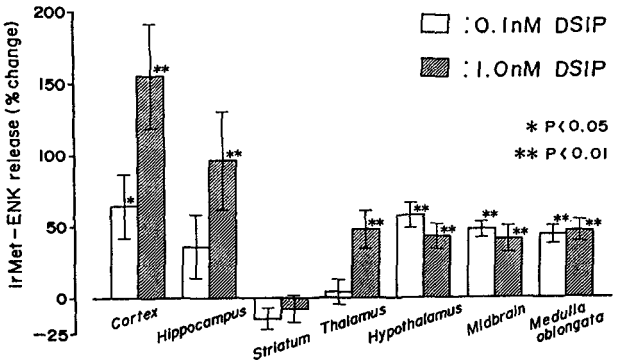


Fig. 1 Effects of DSIP on the release of Met-ENK from the rat brain synaptosomes. The percentage changes in the Met-ENK release are shown by means ± SEM from at least four separate experiments.

Table 1 Effect of DSIP on the release of Leu-ENK from the hypothalamic synaptosomes

	Release of irLeu-ENK (fmol/10min/mg protein)
Control	137.5 ± 14.4
DSIP 0.1 nM	151.3 ± 23.5
1 nM	157.0 ± 15.9
10 nM	152.8 ± 16.0
K^+ 50 mM	249.2 ± 20.4**

Values are means ± SEM of five separate experiments.
** P<0.01 compared with the control

DSIPの鎮痛作用および睡眠誘発作用は、オピオイド拮抗薬のnaloxoneで抑制されるので(3,6,7)、本実験によって明らかとなった脳各部位におけるDSIPのMet-ENK遊離増加作用が、DSIPの鎮痛並びに睡眠誘発作用発現に重要な役割を果たしているものと考えられる。

【文献】

1. Glowinski,J., and Iversen,L.L. (1966) *J.Neurochem.* 13, 655-669. 2. Graf,M.V., and Kastin,A.J. (1986) *Peptides* 7, 1165-1187. 3. Nakamura,A., Nakashima,M., Sugao,T., Kanemoto,H., Fukumura,Y., and Shiomi,H. (1988) *Eur.J.Pharmacol.* 155, 247-253. 4. Nakamura,A., Nakashima,M., Sakai,K., Niwa,M., Nozaki,M., and Shiomi,H. (1989) *Brain Res.* 481, 165-168. 5. Schoenenberger,G.A. (1984) *Eur.Neurol.* 23, 321-345. 6. Tissot,R. (1981) *Neuropsychobiology* 7, 321-325. 7. Young,A.M.J., and Key,B.J. (1984) *Neuropharmacology* 23, 1347-1350.

164 脳シナプス膜へのシグマレセプター結合

榎本理世、荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
大脳皮質、海馬および小脳のシナプス膜標品への[³H]1,3-di-o-tolylguanidine(DTG)結合の性質を比較検討した。大脳皮質シナプス膜標品への本結合は、低濃度のTriton X-100の前処理によりほぼ完全に消失した。反応温度2℃の場合、本結合は反応開始後30分で平衡状態レベルに達した。反応温度の上昇により結合速度の増大が見られた。また本結合は、非放射性ハロペリドールの添加により速やかに解離し、その解離速度は反応温度に依存性を示した。大脳皮質、海馬および小脳のシナプス膜標品への本結合は、いずれもハロペリドール、DTGおよび(+)-3-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine(3-PPP)で阻害されたが、その阻害強度は海馬および小脳より大脳皮質の場合の方がはるかに強力であった。以上の結果より、脳のシグマレセプターは、ハロペリドールの感受性の相違に基づく多様性を示す可能性が示唆される。

シグマレセプターは、N-allylnormetazocine(SKF 10,047)などのベンゾモルファン系オピエートの持つ幻覚や多幸感などの精神異常作用の発現に関係すると理解されている(4)。また、解離性麻酔薬のフェンシクリジン(PCP)やその誘導体の幻覚などの作用が、シグマレセプターを介して発現すると考えられる。近年、[³H]SKF 10,047結合部位には、PCP部位とシグマレセプターの異なった2種類が存在し、互いに関連性を持つ可能性が示唆されている(7)。このPCP部位はN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)感受性レセプターのイオンチャネルと同定され、[³H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)や、[³H]N-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine(TCP)により標識されることが明らかにされた(3,9,10)。一方、シグマレセプターの選択的リガンドとして、[³H]DTG(8)および[³H]3-PPP(2)が報告されている。本研究では、NMDA感受性レセプター複合体とシグマレセプターの関連性を解明する一端として、脳内[³H]DTG結合部位の性質を検討した。

〔実験方法〕
Wistar系雄性ラット(200-250 g)の大脳皮質、海馬および小脳の3部位から、それぞれ粗シナプス膜標品を調製し、50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)を用いて、50,000g、30分間の遠心分離により3回洗浄した。得られた膜標品は、0.32 M ショ糖溶液に懸濁して-80℃で凍結保存した。使用時には室温融解した後、上述の洗浄操作を2回行った膜標品を結合実験に供した(11)。結合実験は、5 nM [³H]DTG(NEN/DuPont, 1447 GBq/mmol)と膜標品を、上記緩衝液中で、2℃、30分間反応させて行った。非特異的結合は、10^{-4} M ハロペリドール存在下で測定した。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により行った。

〔結果〕
大脳皮質のシナプス膜標品への[³H]DTGの特異的結合は、600 μgまで用いたタンパク質量に比例して増加した。一方、膜標品を0.08% Triton X-100で2℃、10分間、前処理することにより(5)、本結合はほぼ完全に消失した(図1)。したがって、以下の実験はTriton X-100未処理膜標品を用いて行った。反応温度2℃では、本結合は反応時間に依存して増加し、反応開始後30分で平衡状態レベルに到達した(図2)。反応温度を30℃に上昇させることにより結合速度は増大し、反応開始後約10分で最大結合値を示した。平衡状態レベルに達した時点で、非放射性ハロペリドール(10^{-4} M)を添加すると、いずれの反応温度の場合も速やかな解離が起こった(図2)。本結合は、ハロペリドール、DTGおよび3-PPPにより10^{-7} M以上の濃度で濃度依存的に阻害された。大脳皮質、海馬および小脳のシナプス膜標品におけるハロペリドール、DTGおよび3-PPPの結合阻害能を比較した結果、ハロペリドールの阻害能は大脳皮質で最も強く、他の部位の5-10倍強力であった(表1)。また、DTGおよび3-PPPでも同様な結果が得られた(表1)。次に、本結合に対するNMDA感受性レセプター複合体に作用する化合物の影響を検討したところ、NMDA、グルタミン酸、グリシン(Gly)、競合的NMDAアンタゴニストの(±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid(CPP)やD-2-amino-5-phosphonovaleric acid(D-AP5)、および競合的Glyアンタゴニストの7-chlorokynurenic acidや6,7-dichloroquino-xaline-2,3-dione(6)はいずれも、すべての部位の本結合に対して著変を与えなかった。一方、非競

図1．　Triton X-100による前処置の影響

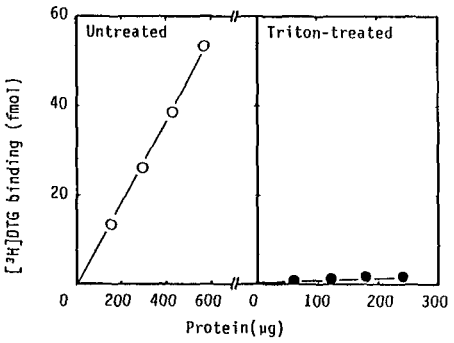


図2．　反応時間の影響

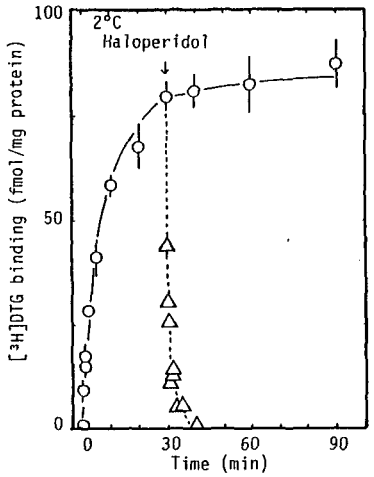


表1．　[3H]DTG 結合に対するIC50値

Drug	IC50 (μM)		
	Cerebral cortex	Hippocampus	Cerebellum
Haloperidol	0.63± 0.20	6.82± 2.08	2.65± 0.54
DTG	1.34± 0.67	13.4 ± 2.8	25.1 ± 7.6
3-PPP	32.1 ±18.2	>100	>100

合的NMDAアンタゴニストのMK-801は、すべての部位の結合に対して弱い阻害作用を示した。

〔考察〕

本研究では、[3H]DTG結合に対するハロペリドールやシグマリガンドの親和力が、脳内部位によって異なることが明かとなり、シグマレセプターの性質が部位によって異なる可能性が示唆された。今回得られたハロペリドールやシグマリガンドのIC50値は、Weberらが報告した値の約100倍であった(8)。これは用いた膜標品の違いに起因する可能性がある。すなわち、Weberらはホモジネイトを22,000g、20分間の遠心分離操作で得られた標品を用いているのに対して、本研究では粗シナプス膜標品を用いており、これが親和力の相違を引き起こす可能性は充分に考えられる。本結合がNMDA感受性レセプター複合体上のNMDA認識部位やGly認識部位のアゴニストおよびアンタゴニストにより影響を受けないという結果は、シグマレセプターとNMDAチャネルが異なった部位であることを支持するものである。一方、行動薬理学的研究で、競合的NMDAアンタゴニストがPCPと同様な精神異常作用を発現することが報告されており(1)、このNMDA感受性レセプターとシグマレセプターの相互作用に関する今後の解析が望まれる。

〔文献〕

1. Kaek, W., Woods, J.H. and Ornstein, P. (1986) Life Sci. 39, 973-978.
2. Largent, B.L., Gundlach, A.L. and Snyder, S.H. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 4983-4987.
3. Loo, P., Braunwalder, A., Lehmann, J. and Williams, M. (1986) Eur. J. Pharmacol. 123, 467-468.
4. Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E. and Gilbert, P.E. (1976) J. Pharmacol. Exp. Ther. 217, 517-532.
5. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 510-517.
6. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1990) J. Neurochem. 54, 699-702.
7. Su, T.P. (1982) J. Pharmacol. Exp. Ther. 223, 284-290.
8. Weber, E., Sonders, M., Quarum, M., McLean, S., Pou, S. and Keana, J.F.W. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 8784-8788.
9. Wong, T.H.F., Knight, A.R. and Woodruff, G.N. (1988) J. Neurochem. 50, 274-281.
10. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Brain Res. 499, 305-314.
11. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1987) Brain Res. 400, 70-79.

165

^{3}H-haloperidol によるラット脳内σ受容体の標識

－基礎的検討とpentazocine およびhaloperidol 反復投与の影響－

本津明彦、吉田幸宏、宮岸　勉
（旭川医大・精神）

〔要約〕 ラット脳内各部位において、^{3}H-haloperidol によってσ受容体を標識する実験条件を検討した。次いで、ラットにpentazocine およびhaloperidol の反復投与（14日間）を行い、σ受容体の変化を観察した。前者の反復投与の結果、大脳前頭皮質においては ^{3}H-haloperidol 結合のKd値の有意な増加がみられたが、Bmax値に変化はみられなかった。小脳においてはKd、Bmax値とも変化がなかった。一方、後者の反復投与の結果、大脳前頭皮質と海馬においてはBmax値の減少がみられたが、小脳では変化がなかった。また、Kd値はいずれの部位においても変化が認められなかった。以上の所見は、それぞれの薬剤の慢性暴露に対するσ受容体の適応的変化を示すものと考えられる。

σ受容体はある種の抗精神病薬や精神異常惹起作用を持つbenzomorphan類が結合する受容体として注目されているが、その調節機構については十分明らかにされていない。そこで我々は、^{3}H-haloperidol（^{3}H-HAL)を用いてラット脳内σ受容体を標識する実験条件を検討し、次いで、この結合部位に対する薬物反復投与の影響を観察した。投与した薬物は、Largent ら(3) 、Tam ら(9) などの報告からσ受容体アゴニストと想定されているpentazocine(PEN)、およびアンタゴニストと想定されているHAL である。

＜方法＞　実験にはWistar系雄性ラット(200～300 g)を用いた。膜標品の調整：ラットを断頭後、各脳部位を取り出し、50倍容の50 mM Tris-HCl緩衝液（pH7.7 、25℃）とともにホモジナイズした。さらに、35,000 gで15分間の遠心分離を２回繰り返し、得られた最終沈渣を同緩衝液に懸濁して膜標品として用いた。^{3}H-HAL 結合実験：膜標品に ^{3}H-HAL と必要に応じて各種薬物を加え、最終用量を1 mlとし、25℃で90分間反応させた。その後フィルター上に吸引沪過し、結合型 ^{3}H-HAL のβ線を測定した。なお、^{3}H-HAL の濃度は結合阻害実験においては3 nMとし、結合飽和実験においては2 ～48 nM の異なる６点に展開した。薬物の反復投与：各群５～６匹のラットにPEN (7.5 mg/kg) あるいはHAL(2 または4 mg/kg)を14日間連日皮下注射した。対照群には生理食塩水を同じ注射法で投与した。PEN の反復投与実験では最終投与の48時間後に、HAL の反復投与実験では24時間後にラットを断頭した。統計解析：平均値の差の検定にはStudent's t-test あるいは一元配置分散分析に基づく多重比較（Dunnett の方法）を用いた。

＜結果＞　１）基礎的検討：^{3}H-HAL の結合反応は60分間で平衡に達した。この全結合に対するspiperone(SPI)による結合阻害実験を行ったところ、線条体および大脳前頭皮質においては二相性の阻害曲線が観察されたが、海馬および小脳においては阻害曲線は一相性であった（図１）。HAL とSPI の薬理学的特性に関するこれまでの報告から(3)(7)、線条体と大脳前頭皮質で観察されたSPI 高親和性の ^{3}H-HAL 結合部位は，dopamine 2(D2)およびserotonin 2(S2) 受容体に相当すると考えられるため、以後、これら２部位における結合実験は30 nM のSPI の存在下（D2およびS2受容体を遮断した条件下）で行うことにした。次に、σ受容体に対する結合特異性が高いと考えられる薬物、すなわち(+)3-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine((+)3PPP) 、SKF 10047 、PEN などによる結合阻害実験を行い、その結果に基いて、非特異結合量は30 または100 μM の(+)3PPP 存在下での結合量

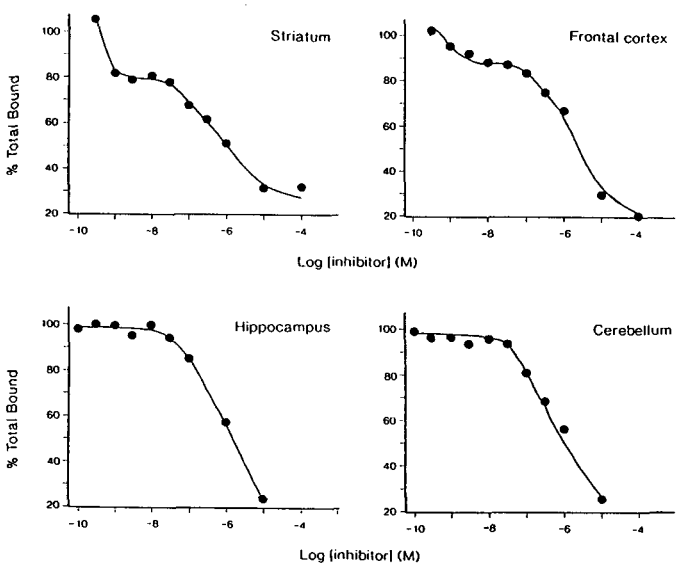


Fig.1 Inhibition of total binding of 3 nM ^{3}H-HAL by SPI in rat striatum, frontal cortex, hippocampus, and cerebellum. Points are means of duplicate determinations from typical experiments which were repeated 2-3 times.

として決定することにした。このようにして求められる ^{3}H-HAL (3 nM)のσ特異結合（以後 ^{3}H-HAL 結合）は、大脳前頭皮質においては、全結合の約40%であった。2）結合阻害実験：大脳前頭皮質において、各種薬物の ^{3}H-HAL 結合に対する阻害能とpseudo Hill 係数を調べたところ、表1に示すような結果が得られた。3）結合飽和実験：大脳前頭皮質で飽和実験を行い、Scatchard 解析を行ったところ、1成分と考えられる結合部位の存在が示された（Kd: 15.8±1.71 nM 、Bmax: 1.23±0.08 pmol/mg protein, N=8)。4）PEN およびHAL 反復投与実験：PEN の反復投与後、大脳前頭皮質においては ^{3}H-HAL 結合のKd値の有意な増加がみられたが、Bmax値に変化はなく、また、小脳においてはKd値、Bmax値とも変化は認められなかった（表2(A)）。一方、HAL 反復投与後、大脳前頭皮質および海馬ではBmax値の有意な減少がみられたが、小脳ではこのような変化はみられなかった。また、Kd値については、いずれの部位においても変化は認められなかった（表2(B)）。

Table 1 Inhibition of 3 nM ^{3}H-HAL binding to rat frontal cortex by various drugs

Drug	IC_{50} (nM)	nH
Perphenazine	77.2	0.97
(±)Pentazocine	89.3	0.62
(-)Butaclamol	229	1.22
Thioridazine	275	0.74
Spiperone	282	0.78
Imipramine	296	1.02
(+)3PPP	326	0.52
Chlorpromazine	435	0.72
(±)SKF 10047	1250	0.56
(+)Butaclamol	2070	0.81
Carbamazepine	>10000	–
Sulpiride	>10000	–

IC_{50} values and pseudo-Hill coefficients (nH) were determined from Hill plots of the data. Values are means of 2 experiments.

＜考察＞　本実験で得られた ^{3}H-HAL 結合の結合親和性や、この結合に対する各種薬剤の阻害能およびpseudo Hill 係数の値は、これまでに報告されたσ受容体結合実験の結果(1)(3)(8) とよく合致しており、σ受容体を標識できたものと考えられる。次に、PEN 反復投与の結果、大脳前頭皮質で認められた ^{3}H-HAL 結合の親和性の低下は、脳内に薬物が残存した結果としても生じ得ると考えられるが、PEN は投与後数時間のうちに脳組織から消失することが知られており(6) 、さらに、反復投与実験での投与量の2倍にあたる15 mg/kgのPEN を1回投与し、24時間後すなわち反復投与実験の2分の1の離脱時間の後に断頭して ^{3}H-HAL 結合を調べたところ、Kd、Bmax値に変化はみられなかった。したがって、この変化はPEN 慢性暴露に対するσ受容体の何らかの適応的変化の結果と考えられる。一方、HAL 反復投与の結果、大脳前頭皮質と海馬においてBmax値の有意な減少が観察された。σ受容体に対するHAL 反復投与（7 ～21日）の影響に関しては、Itzhakら(2) やMatumotoら(5) も受容体数の減少を報告している。このような変化が生ずる機序については現在のところ不明であるが、アンタゴニスト反復投与による受容体数の減少は、S2受容体でも知られており(4) 、σ受容体においてもこれと類似の調節機構が存在するのかもしれない。ところで、本実験ではPEN およびHAL 反復投与後、小脳では ^{3}H-HAL 結合に変化はみられなかった。したがってσ受容体に対する両薬剤の作用には部位特異性が存在するものと推測される。

Table 2 ^{3}H-HAL binding in rat brain following 14 days administrations of PEN and HAL

Treatment	N	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg protein)
(A) Administrations of PEN			
Frontal cortex			
Saline	5	13.6±2.75	1.51±0.08
PEN(7.5 mg/kg)	5	24.5±3.73*	1.47±0.13
Cerebellum			
Saline	5	17.6±2.78	1.47±0.11
PEN(7.5 mg/kg)	5	21.3±1.87	1.61±0.11
(B) Administrations of HAL			
Frontal cortex			
Saline	6	16.1±1.25	1.36±0.09
HAL(2 mg/kg)	6	21.1±0.98	1.24±0.05
HAL(4 mg/kg)	6	19.3±1.88	1.09±0.05*
Hippocampus			
Saline	6	20.0±2.61	1.49±0.07
HAL(2 mg/kg)	6	14.6±1.92	1.17±0.07**
HAL(4 mg/kg)	6	14.8±1.33	1.22±0.06*
Cerebellum			
Saline	6	19.0±2.31	1.74±0.15
HAL(2 mg/kg)	6	26.0±2.37	1.89±0.11
HAL(4 mg/kg)	6	21.5±1.62	1.64±0.07

Values are mean±SEM. *:P<0.05 compared to the controls using Student's t-test. *:P<0.05, **:P<0.01 compared to the controls using Dunnett's test.

＜文献＞

1)Contreras,P.C. et al.(1988) in Sigma and Phencyclidine like Compounds as Molecular Probes in Biology (Domino,E.F. and Kamenka,J.M. eds) pp327-334, NPP Books, Ann Arbor.
2)Itzhak,Y. and Alerhand,S.(1989) FASEB J. 3, 1868-1872.
3)Largent,B.L. et al.(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 81, 4983-4987.
4)Leysen,J.E. et al.(1986) Psychopharmacology. 88, 434-444.
5)Matumoto,R.R. et al.(1990) INRC Abstracts '89, 125-128.
6)Paalzow,L. and Arbin,A.(1972) J.Pharm.Pharmacol. 24, 552-556.
7)Seeman,P.(1981) Pharmacol.Rev. 32, 229-313.
8)Tam,S.W. and Cook,L.(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 81, 5618-5621.
9)Tam,S.W. et al.(1988) in Sigma and Phencyclidine like Compounds as Molecular Probes in Biology (Domino,E.F. and Kamenka,J.M. eds) pp383-396, NPP Books, Ann Arbor.

166 # PC12D細胞の神経突起伸張とMAPキナーゼ

神経成長因子と繊維芽細胞成長因子の比較

北島哲子，　佐野　護

（愛知県コロニー研、形態学部）

〔要約〕

PC12D 細胞をNGFあるいはdbcAMP処理すると、微小管結合蛋白を基質とする蛋白燐酸化酵素の活性が上昇する。その後、誘導される細胞からの神経突起の伸張は、この蛋白燐酸化酵素の活性化と深く関わる可能性を示唆してきた(2,3)。 繊維芽細胞成長因子(FGF),上皮成長因子(EGF) によっても、PC12D細胞で、MAP 燐酸化活性の上昇作用が認められた。 また EGFではわずかであったが、FGF によっても、突起の伸張が確認された。 これらの効果は、NGF 抗体の影響を受けなかった。 MAP 燐酸化活性の上昇および突起伸張の誘導いずれも、FGF, EGFの作用はNGF で十分促進したレベルを更に増加させる事はなかった。 一方dbcAMP, PMA などはNGF の効果を相加的に増大させた。 以上より、 FGF,EGFは、PC12D 細胞においてNGF 依存性 MAPキナーゼを部分的に活性化し、突起伸張を誘導する可能性が示された。

PC12D 細胞 (1) は, NGF 或いは cAMP上昇薬で処理すると数時間で突起を伸ばす。 NGFとdbcAMPによる突起伸張は相加性を示し、異なった機構が推測された。 NGF、dbcAMP による突起伸張はそれぞれ異なった蛋白質燐酸化酵素阻害剤で特異的に阻止された (2,3,4)。 微小管蛋白の燐酸化が突起伸張の制御にかかわる可能性を想定し、微小管結合蛋白の燐酸化活性をin vitroで調べた結果、dbcAMP、NGF で数分処理された細胞には、別の酵素が活性化される事実を認めた。 前者はA-キナーゼと推測され、後者は従来知られる酵素と異なることから、NGF依存性MAPキナーゼと名付けた (2,3)。 PC12D細胞を FGF, EGF, PMA,デキサメタゾンなど他の因子で処理した時、微小管蛋白を燐酸化する酵素活性の変化、およびそれらの突起誘導作用との関連性について，NGF およびdbcAMPの作用と比較し、検討をおこなった。

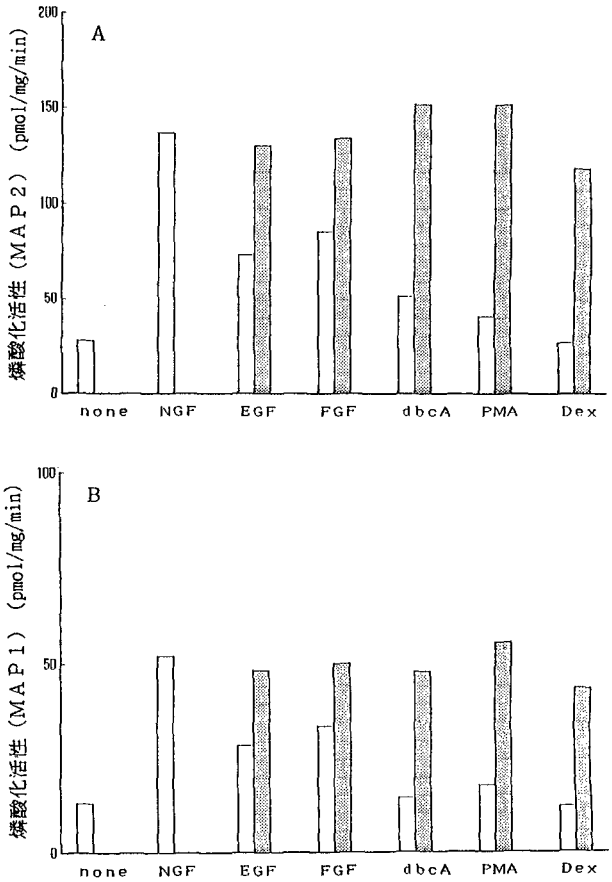
［実験方法］①突起伸張の測定、特定の視野における 300個以上の細胞を調べた。 細胞の直径の 2倍以上の長さの突起を有する細胞の比率を％で表した。 ②細胞抽出液、5% 牛胎児血清、10%馬血清、DMEMで、9cm 培養皿に培養したPC12D 細胞をHEPES-Hanks で洗浄後、同液中で、NGF, FGFなどを加え、37℃, 10分インキュベートし、冷HEPES-Hanks で洗い、50mM HEPES(pH7.4),2mM EDTA, 1mM EGTA, 2mM DTT, 20mM β-glycerophosphate, プロテアーゼ阻害剤 (1mM PMSF, 10μM AMFH, 2mM ベンザミジン、アポロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン) を加えた溶液0.6mlでかきとり、直ちに超音波処理し、マイクロフュージで15,300rpm,30分の上清を-80℃で保存した。

③ MAP燐酸化活性の測定、牛脳より得た微小管蛋白を基質とし(66μg/ｱｯｾｲ)、10mM $MgCl_2$, 100μM[^{32}P]ATP(0.15MBq), 20μgの酵素蛋白を75μlの反応液で、30℃, 2分後、25μlのSDS 混液を加え反応を止め、２分煮沸した。 反応液 40μlを 5%SDS-PAGEにかけ、ゲルの上半を染色、脱色、乾燥後、MAP1, MAP2バンドを切りだし、液シンにて放射能を測定した。

［結果と考察］NGF 処理したPC12D細胞抽出液中には、MAP2, MAP1燐酸化活性が、それぞれ対照の 5倍或いは 3倍上昇した (図1)。 5ng/mlのEGF, 1μg/mlのFGFでも、MAP2では、約 2倍と 3倍、MAP1では約 2倍と2.5倍の上昇が認められた。 EGF は1ng/ml以下で効果があり、5ng/mlで最大値を示した。 FGFは数10ng/mlより1μg/mlまで濃度依存的に MAP 燐酸化活性を上昇させた。 同濃度のEGF, FGFはPC12D細胞に対する突起伸張の誘導作用において

もNGFよりは低いレベルで確認された(表１)。 FGFよびEGFによるこれらの作用は、NGF 抗体の影響を受けなかった事より、微量の NGFの混在による効果である可能性は排除された。 NGF とdbcAMPの作用は、突起伸張、 MAP燐酸化活性ともに相加性が見られる事実は既に報告したとうりである（図１、表１）(2,3)。 １方、FGF, EGFは NGFの十分量と同時に加えても、突起伸張およびMAP燐酸化活性の増大を示さなかった（図１、表１）。 これはFGF, EGF, NGF がこれらの作用については、作用部位を共有している可能性を示している。 またPC12細胞をクロ マフィン細胞へ分化させるデキサメタゾンは、 NGFによる突起伸張を阻害し（表１）、NGF によるMAP燐酸化活性の増加を抑制した(図１)。 Cキナーゼの活性化剤
PMAは MAP燐酸化活性を少し上昇させた。
この場合、 NGFによる効果とは相加的であった。
これら結果はPC12D 細胞において、FGFとEGFも、NGF依存性MAPキナーゼを部分的に活性化し、それが突起伸張を誘導する可能性を示唆している。
dbcAMP, PMA などはそれとは別の酵素、恐らく、A-キナーゼ、C-キナーゼの活性化を通じて、PC12D細胞の突起伸張を惹起するものと考えられる。

図１、MAP燐酸化活性に対する各種因子の効果および NGFによる効果との相加性。



各種成長因子などでPC12D細胞を37℃、10分処理した細胞抽出液によるのMAP1(B)，およびMAP2(A)へのリン酸の取込み活性、NGF, 100ng/ml; EGF, 2.5ng/ml; FGF, 1μg/ml; dbcAMP, 1mM; PMA, 0.1μM; dexamethasone, 10μMを用いた。 暗色カラムは、各因子と NGFを同時に投与した結果である。

表１、PC12D細胞の突起形成に対する各種因子の効果および NGFの作用との相加性。

添加因子	突起を有する細胞(%)
無添加	7.3 ± 2.8
NGF(100ng/ml)	63.7 ± 3.1
FGF(1μg/ml)	50.9 ± 3.2
EGF(5ng/ml)	16.1 ± 1.0
dbcAMP(0.5mM)	53.0 ± 2.9
デキサメタゾン(10μM)	10.7 ± 2.4
NGF + dbcAMP*	75.5 ± 6.7
NGF + FGF*	60.3 ± 4.1
NGF + EGF*	59.5 ± 0.4
NGF + デキサメタゾン	46.4 ± 2.0

培養24時間後、4又は8*計測値の平均±S.D.

文献]

(1) Katoh-Semaba,R., Kitajima,S., Yamazaki,Y., Sano.M. (1987) J. Neurosci. Res., 17, 36.

(2) 北島哲子、佐野護 (1989) 神経化学, 28, 160.

(3) Sano,M., Nishiyama,K., Kitajima,S. (1990) J. Neurochem., 55(2) in press.

(4) Chijiwa,T., Mishima,A., Hagiwara,M., Sano,M., Hayashi,K., Inoue,T., Naito,K., Toshioka,T., Hidaka, H. (1990) J. Biol. Chem., 265, 5267.

167 NGF依存性MAPキナーゼ：部分精製とその性質

佐野　護、　北島哲子
（愛知県コロニー研、形態学部）

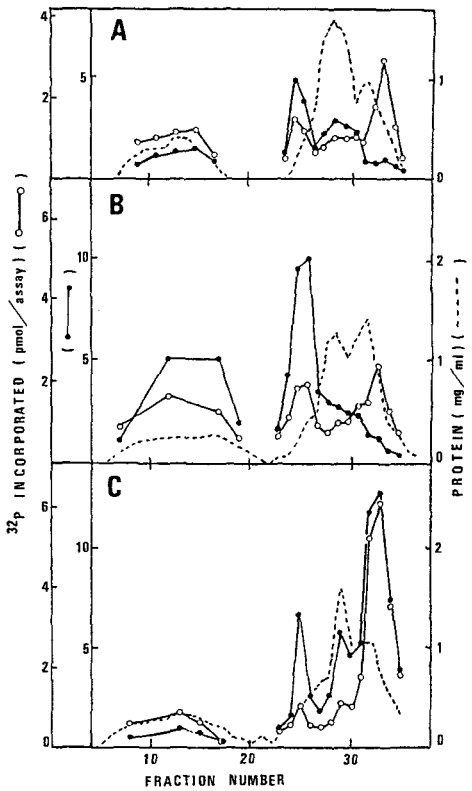
〔要約〕
NGF によるPC12細胞の神経突起伸張に関わることが示唆された NGF依存性MAPキナーゼは、細胞抽出液をDEAEセファロースより、塩濃度勾配で溶出すると、MAP 燐酸化活性としては、３番目のピークとして得られた。ピーク１は、細胞をdbcAMP処理すると上昇し、A-キナーゼと思われる。　前者を更にゲル濾過し、部分精製酵素として性質を調べた。　分子量約 50kDaで、MAP2をMAP1の2倍程度燐酸化した。　5mM の Mg^{2+}で最大活性値を示した。

PC12D 細胞は，NGF 或いは cAMP上昇薬で処理すると数時間で突起を伸ばす(1)。　NGF による突起伸張は蛋白質燐酸化酵素阻害剤 K-252a で特異的に阻害される (2)。　逆にdbcAMPによる突起伸張は、A-キナーゼの特異的阻害剤 H-89 によって特異的に阻害された (3)。　この事実は、２種の因子による神経突起の伸張がそれぞれ、異なった蛋白燐酸化酵素の活性を介して制御されている可能性を示唆している。　神経突起伸張の制御に深く関わっていることが推察されている微小管結合蛋白の燐酸化活性をin vitroで調べた結果、dbcAMP、NGF,によって異なった酵素が活性化される事実を認めた (2)。　前者はA-キナーゼと推測され、後者は従来知られる酵素と異なることから、NGF 依存性MAP キナーゼと名付けた (2)。この酵素を他の酵素活性と分離出来たので、その性質を調べた。

［実験方法］　9cm培養皿(50枚)に増殖させたPC12D 細胞をHEPES Hanks 溶液中で NGF或いはdbcAMPを添加し，37℃、10分処理後、50mM HEPES(pH7.4),5mM EDTA, 2mM EGTA, 1mM DTT, 25mM β-glycerophosphate, 40mM p-nitrophenylphosphate, プロテアーゼ阻害剤を加えた溶液中で超音波処理し、その超遠心上清(約 50mg蛋白）を、 1.3 x 13cm DEAEセファロースカラムにかける。　20ml の　Buffer A (10mM HEPES,pH7.4, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 10mM β-glycerophosphate, プロテアーゼ阻害剤)でカラムを洗浄後、0-0.6M NaCl 濃度勾配(BufferA) で蛋白を溶出した。NGF依存性MAPキナーゼ分画はアミコンで濃縮後、Ultrogel AcA44カラムでゲル濾過し、その活性ピーク分画を部分精製酵素標品とした。 MAP1, MAP2 は、牛脳より得た微小管より、P-セルロース、セファロース-C14Bカラムで精製した。　燐酸化活性の測定は、既に述べたが (2)、簡単に示すと、10mM $MgCl_2$、100μM　[^{32}P] ATP で、30℃ 5分反応後、反応液を SDS ポリアクリルアミド電気泳動、MAP1, MAP2バンドの放射能を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］　DEAEセファロースカラムより溶出された分画について、微小管蛋白を基質として、MAP1, MAP2に対する燐酸化活性を検討したところ、３つの活性のピークが認められた。　dbcAMP処理細胞の抽出液では、ピーク１が増加し、NGF 処理細胞抽出液ではピーク３が増加した（図１）。　前者は MAP1 よりもMAP2を良く燐酸化した。　後者はそれに比較して、MAP1を良く燐酸化した。　この結果は粗抽出液で得られた、cAMPおよびNGF で上昇する燐酸化活性の性質と一致する (2)。各々、A-キナーゼおよび NGF依存性MAP キナーゼと思われる。ピーク３を濃縮し、Ultrogel AcA44カラムにかけると、単一の活性ピークとして得られ、分子量約 50kDaであった。　この部分精製MAP キナーゼを用いると、30℃ の反応で、30分間直線的に燐酸化の上昇が認められた。　精製したMAP1, MAP2, tubulin を基質として、この NGF依存性 MAPキナーゼの活性を調べたところ、tubulin は殆ど燐酸化されなかった。　単位蛋白あたりでは、MAP2をMAP1の２倍位多く燐酸化し、基質濃度の変化に対して直線性が確認され

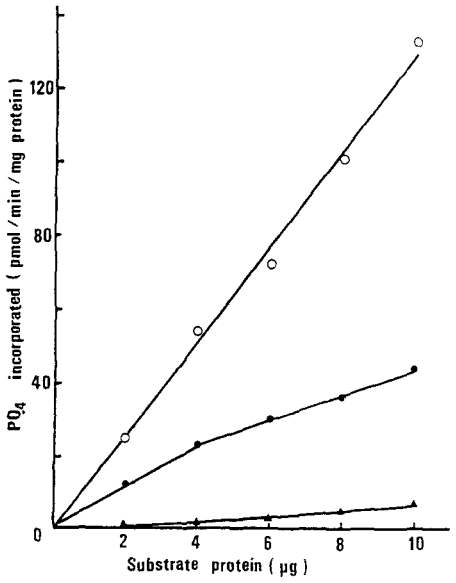
図1、DEAEセファロースカラムによるMAP
燐酸化酵素の分離。



未処理(A)、dbcAMP処理(B)、NGF処理(C)した各細胞抽出液を 0-0.6M NaClで溶出、各分画を微小管蛋白を基質として燐酸化を行い、MAP1(○)、MAP2(●)の燐酸化活性を示した。

た（図2）。 基質がいずれの場合も、5mM Mg^{2+} で最大活性値を示した。

図2、NGF依存性MAPキナーゼによるMAP1, MAP2, tubulin の燐酸化。



部分精製酵素標品を用いて、精製したtubulin(▲)、MAP1(●)、MAP2(○)を基質として、蛋白量を変えた。

類似した酵素が、他の研究者によっても報告されている。 Rowlandらが、THを基質として見付け、N-キナーゼと名ずけた酵素はS6キナーゼであった (4)。 Smithらの報告した MAP2/pp250 キナーゼは、K-252aで阻害され、良く似ている (5)。 Miyasakaらが報告したMAP2キナーゼは、トリトン抽出液より得られ、K-252a非感受性、分子量が40Kdであるなど、性質を異にする (6)。ほぼ同時にNGF 感受性で、MAP2を燐酸化する酵素として見いだされた同じ酵素であろう。 精製および、我々が主張している突起形成との関係、活性化機構の検討が今後の問題である。

［文献］

(1) Katoh-Semaba, R., Kitajima, S., Yamazaki, Y., Sano, M. (1987) J. Neurosci. Res., 17, 36.

(2) Sano, M., Nishiyama, K., Kitajima, S. (1990) J. Neurochem. 55 (2) in press.

(3) Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T., Hidaka, H. (1990) J. Biol. Chem., 265, 5267.

(4) Rowland-Gagne, E., Greene, L. A. (1990) J. Neurochem., 54, 424.

(5) Smith, D. S., King, C. S., Person, E., Gittinger, C. K., Landreth, G. E. (1989) J. Neurochem., 53, 800.

(6) Miyasaka, T., Chao, M. V., Sherline, P., Saltiel, A. R. (1990) J. Biol. Chem., 265, 4730.

168 PC12細胞のプロテオグリカン：神経成長因子による突起形成に伴う変化

仙波りつ子、大平敦彦＊、柏俣重夫
（愛知県コロニー研・周生期、＊発生）

〔要約〕
神経成長因子（NGF）によるPC12細胞の突起形成過程におけるプロテオグリカン（PG）の構造的変化について調べた。1）PC12細胞はヘパラン硫酸（HS）PGとコンドロイチン硫酸（CS）PGを産生していた。 2）細胞層のHSPGのサイズはNGFによって変化しなかったが（セファロースCL6Bで Kav=0.38）、HSの分子量はNGF存在下で10K、非存在下で12Kであった。CSPGのサイズはNGF存在下でKav=0.34、非存在下で0.38、CSの分子量はそれぞれ20，15Kであった。一方、CSPGのコアプロテインの分子量はいずれの条件下でも92Kであった。これらの変化は突起形成開始前の細胞ですでに観察された。 3）培養液のPGはほとんどがCSPGであった。CSPGは硫酸化の程度、分子量の違いから４種類に分かれたが、コアプロテインを解析すると、もっとも分子サイズの大きいCSPGで105K、その他のCSPGでは15，16Kであった。CSPGの分子サイズの違いはCSの分子量（15-25K）に依存していた。CSPG、CSのサイズは、NGF存在、非存在で大差はなく、培養日数にも影響されなかったが、 硫酸化の程度の高いCSPGの相対含量は分化した細胞で高かった。4）PGの構造変化は細胞層に顕著に観察されること、また、この変化は丸い細胞が扁平になる時期、神経突起形成に先立って起きることが明らかとなった。

神経系の発達過程において、神経細胞は細胞内、細胞外の情報に反応して、劇的な形態変化をする。細胞外物質の一つであるプロテオグリカン（PG）も神経細胞の形態変化に関与していることが示唆されている。私達は神経細胞の分化にともなうPGの量的、質的変化について、また細胞外のPGが神経細胞の形態におよぼす影響について調べてきた。これまでに、脳のCSPGがPC12D細胞の突起形成を阻害すること（1）、神経成長因子（NGF）で扁平な形態になったPC12細胞で、 PGの糖鎖部分であるグリコサミノグリカン（GAG）の量的増加がみられること（2）、 扁平な形態を有するPC12D細胞でHSPGの量的増加、質的変化のあることを明らかにした（3,4）。今回は、NGFによるPC12細胞の分化にともなうPGの構造変化につて検討した。

［実験方法］ PC12細胞の培養には10%馬血清、5%牛胎児血清,100 U/mlペニシリンを含むダルベッコ改変培地（ピルビン酸含有）を用い、ポリリジンコートした100 mmの培養皿に5 x 10^5個の細胞を蒔いた。NGF存在下、非存在下で細胞を培養し、３、６、９日目に細胞、培養液からPGを調製した。PG、グリコサミノグリカン（GAG）の解析には［^{35}S］無機硫酸でラベルした培養系を用い、コアプロテインの解析には、セリン不含、無機硫酸100 μMの培養液を用い、［^{3}H］セリン、［^{35}S］無機硫酸でダブルラベルした培養系を用いた。PGの調製、部分精製、解析は先に示したように行なった（4）。

［結果と考察］ 細胞層からSDSで可溶化した高分子画分をDEAEカラムにかけると、0.4 M NaCl付近にPGと思われる［^{35}S］のピークが溶出された。この画分はコンドロイチナーゼ（CHase）、 亜硝酸に感受性があり、プロナーゼ・アルカリ処理で分子サイズが小さくなることから、CSPGとHSPGを含んでいると考えられた。 この画分を、CHaseあるいはヘパリチナーゼ処理後セファロースCL6Bカラムにかけたところ、一部は消化され、残りは未処理のPG画分とほぼ同じ位置に溶出された。このことからCSPG、HSPGの２種類のPGがPC12細胞によって産生されることが明らかとなった。 この結果は、NGFによって分化した細胞でも同じであった。表１に、CL6Bの溶出位置から求めたCSPG、HSPG、CS、HS の分子サイズを示す。 HSPGのサイズは、いずれの条件でも同じであったが（SDS電気泳動で100-200K）、HSの分子量はNGF存在下で小さかった。一方、CSPG、CSはいずれもNGF存在下でやや大きかったが（NGF存在下でそれぞれ120-190K; 20K、非存在下で120-150K; 15K）、コアプロテインは92Kと変わらなかった。 これらの変化は培養３日目ですでに観察され、突起形成に先だって（丸い細胞が扁平になる時期）起こる変化と考えられた。扁平な形態を有するPC12細胞の亜株、PC12DのHSPG、HSの分子サイズがNGF処理したPC12細胞の産生するHSPG、HSと一致することから、丸い形態から扁平な形態への変化には、HSPGの量的増加のみならず、糖鎖部分におけ

Table 1 Changes in the properties of cell-associated PGs during NGF-induced neuritogenesis.

	Culture (days)	Elution position on Sepharose CL6B (Kav) -NGF	+NGF
HSPG (HS)	3	0.38 (0.60)	0.38 (0.65)
	6	0.39 (0.59)	0.39 (0.65)
	9	0.39 (0.60)	0.39 (0.64)
MW of HS		12 K	10 K
CSPG (CS)	3	0.38 (0.54)	0.34 (0.50)
	6	0.37 (0.56)	0.34 (0.50)
	9	0.37 (0.55)	0.34 (0.50)
MW of CS		15 K	20 K

Table 2 Relative contents of CSPGs in the medium released from PC12 cells with or without neurites.

Culture (days)	CSPG	Relative amount (%) -NGF	+NGF	Ratio of +NGF/-NGF
3	II	69	69	1.7
	III	31	31	2.6
9	II	79	56	0.8
	III	21	45	2.8

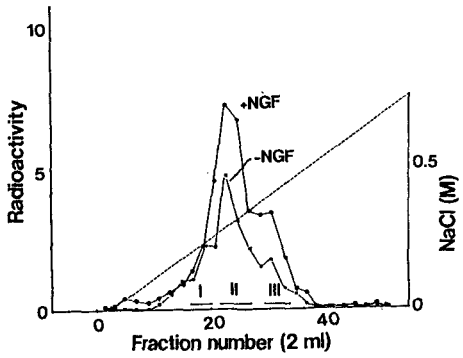


Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography of [^{35}S] sulfate-labeled macromolecules prepared from the medium at 3 days of culture.

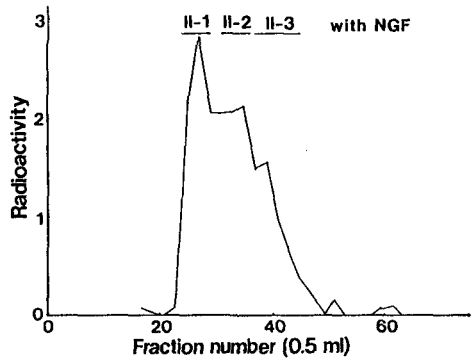


Fig. 2. Sephadex G200 gel filtration of fraction II eluted from a DEAE-cellulose column

る構造変化が伴うことが明らかとなった。

培養液の高分子画分をDEAEカラムにかけると、0.3 M、0.4 M NaCl付近に溶出される [^{35}S] のピークがみられ、硫酸化の程度の異なるPGが存在していた（図１）。0.3 M NaCl付近に溶出される画分をセファデックスG200でゲル濾過すると、３つの画分にわかれた（図２）。これらのピークは、すべてCHase 感受性であり、プロナーゼ、アルカリ処理で分子量が小さくなることから、CSPGであると考えられた。培養３日の培養液から調製されたもっとも分子量の大きいCSPG II-1（セファクリールS300でKav=0.14, 130-170K、CSとして32K）のコアプロテインは105Kであったが、その他のCSPGでは15K,16K（CSとしては15K-25K）であった。NGFによるCSPGの種類、コアプロテインのサイズに変化はなかった。また、分化した細胞が放出するCSPGも、その種類、構造に大きな変化はみられなかったが、表２に示すように、長い突起を有するPC12細胞の放出するCSPGのうち、硫酸化の程度の高いCSPG（図１，III）の細胞当りの量は3倍、その相対含量は未分化な細胞のそれと比べ２倍高く、細胞の分化との関連が示唆された。CSPGの生理作用は必ずしも明らかではないが、細胞外のCSはPC12細胞の突起形成を修飾するという報告があり（5）、事実、私達は脳のCSPGがPC12細胞の突起形成を阻害することを報告している(4)。

以上、分化にともなうPGの構造変化は細胞層で顕著であり、糖鎖部分で起きていると考えられた。HSPGの構造変化は、PC12細胞の丸い形態から扁平な形態への変化に密接な関係があり、突起形成に先立つ変化と考えられた。

[文献] 1) 大平敦彦、松井ふみ子、仙波りつ子 (1989) 神経化学 28 162-163. 2) Katoh-Semba R., Oohira A. and Kashiwamata S. (1990) J. Neurochem., in press. 3) Katoh-Semba R., Oohira, A., Sano M., Watanabe K., Kitajima S. and Kashiwamata S. (1989) J. Neuochem., 52, 889-895. 4) Katoh-Semba R., Oohira A., Sano M., Watanabe K., Kitajima S. and Kashiwamata S. (1989) Biomed. Res., 10, 499-508. 5) Damon D.H., D'amore P.A. and Wanger J.A. (1988) J. Cell. Physiol., 135, 293-300.

169　グリア細胞の神経成長因子レセプター

天野(武)彦、岡部紀子、山国徹、小沢史子、
菱沼文男　（三菱化成生命科学研究所）

〔要約〕
グリア細胞クローンC6Bu1と神経系のNG108-15細胞の神経成長因子(NGF)およびNGFレセプター(NGFR)のメッセンジャーRNA(mRNA)の産生の受容体によるその調節機構を特異的なヌクレオチドプローブを用い　Northern blot hybridization法で調べた。
1）グルタメイトレセプターのアゴニストであるN-methyl-D-aspartate(NMDA), quisqualate, kainateをそれぞれ１０　μM 24時間作用させてのち、NGF, NGFRのmRNA量を測定すると、NMDAはNGF, NGFRのmRNAをともに増加させたが一方, kainateはNGFのmRNAの産生を減少させたがNGFRのmRNAの産生には変化は認められなかった。
2）一方ニューロンのモデルとしてのニューロブラストーマグリオーマハイブリッド細胞NG108-15脱分極剤ベラトリジン、グルタメイトレセプターアゴニスト NMDA, quisqualate, kainate はすべてNGFRのmRNAを増加させた。
以上の結果で神経回路においてグルタメイトアゴニストを介してグリア細胞のNGF分子の増加と神経系細胞におけるNGFR分子を介するシグナルの伝達は回路の可塑的な機構の研究について二つの細胞がモデルとして用いられる可能性を提出する。

最近グリア細胞がグルタメイトレセプターを 持っていることがあいつで報告され脳においてニューロンとともに機能していることが明かになった（1,2）。グリア細胞のNGFとNGFレセプター発現とグルタメイトレセプターとの関係をmRNAのレベルでしらべたので報告する。

方法：細胞はラットグリオーマア細胞C6Bu1とマウスニューロブラストーマ雑種細胞　NG108-15 を用いた。培養はすでに報告した条件で(3)薬剤はphosphate bufferまたはalcoholにとかしたものを最終濃度10 μMになるように加えた。細胞よりRNAの抽出、poly(A)RNAの精製は既報の方法に従いNorthern Blot Hybridizationは山国らの方法によった(3)。NGFのプローブは山国らの50ケのヌクレオチドを、NGFRのプローブはErnfosらの50ケのヌクレオチドを合成したものを用いた。

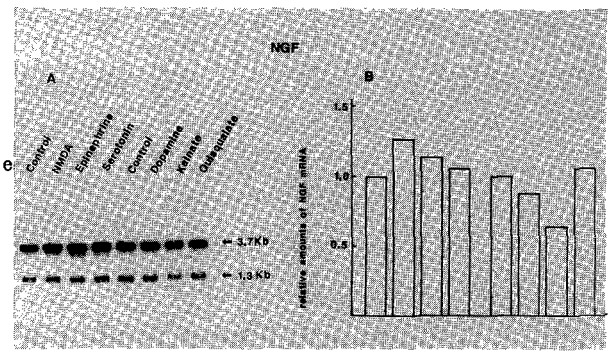


Fig.1 Northern Blot Analysis of NGF in C6Bu1 glioma cells
A. Each lane contains 10 μg of poly (A)RNA. NGF mRNA correspond to 1.3 kilobases (Kb). B. Densitometric analysis of each bands in Northern blot analysis in A. Ordinate indicates relative amounts of NGF mRNA.

3'一端を（α－^{32}P）dATPでterminal deoxynucleotidyl transferaseで標識しspecific activityは約 5x10^{8} cpm/ugであった。hybridizationは２ｘＳＳＣ、０.１％ＳＤＳ，４２℃、２０時間で行い、washingは 2xSSC,0.1%SDS,42℃ 15分２回行った。オートラヂオグラフで検出したバンドはデンシトメーターまたはべつにイメージアナライザーで定量的に測定した。

実験結果：Fig.1に示すごとくNGFのmRNA 1.3 Kbに一致して検出されNMDAとエピネフリンはコントロールと比較して有意の増加をしめした（Bの棒グラフ）。kainate,quisqualateではコントロールと比較して変化は認められなかった。

NGFレセプターではFig.2のごとくNMDA,epinephrine,dopamineで有意のmRNA の増加が認められた。NG108-15細胞を用いた結果では（Fig.3）脱分極剤ベラトリジン、NMDA,dopamineがNGFレセプターを増加させた。

アストロサイトと可塑性との関係につて最近多くの研究があるが、グリア細胞と神経系細胞のNGF,NGFRについて上の結果を得た。

NGFレセプターのhigh,low affinityの部位についても考察を加えたい（未発表）。

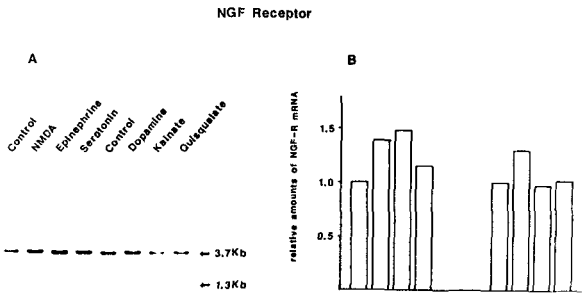


Fig.2 Northern Blot Analysis of NGFR in C6Bul Glioma Cells.
A. Each lane contains 10 ug of poly(A) RNA. NGFR mRNA correspond to 3.7 Kb.
B. Densitometric analysis of each band in Northern blot analysis in A. Ordinate indicates relative amounts of NGFR mRNA From left,control,NMDA, epinephrine, serotonin,control,dopamine, kainate and quisqualate.

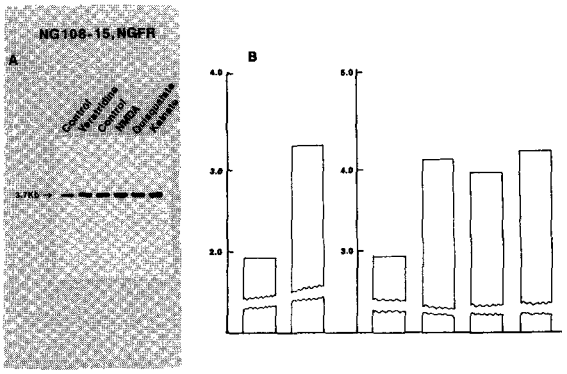


Fig.3 Northern Blot Analysis of NGFR in NG108-15 Cells
A.Each lane contains 10 ug of poly(A) RNA.NGFR mRNA correspond to 3.7 Kb.
B.Densitometric analysis of NGFR in A. Ordinates indicate relative amounts of NGFR mRNA. From left,control, veratridine,control,NMDA,quisqualate,and kainate.

文献

1)Ernfors,P.,et al (1989)Neuron 2,1605-1613
2)Usowicz,M.M.,Gallo,V.,&Cull-Candy,S.G.(1989)Nature,339, 380-383
3)Yamakuni,T.,et al (1988)FEBS Letts 223,117-121

170 チロシンキナーゼ阻害剤ＳＴ６３８による神経成長因子の作用の阻害

萩野顕彦・天貝裕地*・橋本誠一**
（奥羽大学・歯・生物・生理*・生化**）

〔要約〕PC12h細胞に神経成長因子（NGF)を作用させると NGF感受性 S6 キナーゼが燐酸化され活性化し、結果としてリボソーム S6 蛋白の燐酸化レベルが一過性に上昇する。チロシンキナーゼ阻害剤 ST638は、NGF による S6 燐酸化増加作用に対して 100μM の濃度から阻害作用を示し、300 μM でほぼ完全に阻害した。また、上皮成長因子（EGF)および塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）による S6 燐酸化増加作用も ST638（300 μM)でほぼ完全に阻害された。したがって、EGF および bFGF のみならず NGF によって惹起される S6 燐酸化増加作用の作用発現機構にもチロシンキナーゼの活性化のステップが含まれることが示唆された。一方、蛋白質燐酸化酵素阻害剤として知られる K-252a は、NGF の作用をより特異的に阻害した。即ち、 300 nM の濃度で EGFおよび bFGF の作用にほとんど影響を与えずに NGF の S6 燐酸化増加作用をほぼ完全に阻害した。

私達は、PC12h 細胞に 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35,000 D蛋白の燐酸化が増加すること、また、この NGFの作用は wheat germ agglutinin(6)や蛋白質燐酸化酵素阻害剤である K-252a (3)あるいは 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。また、分子量 35,000 蛋白はリボソーム S6 であり、NGF による S6 燐酸化増加作用は、Ａキナーゼや Ｃキナーゼの活性化を介して惹起されるのではなく、Ａキナーゼや Ｃキナーゼとは異なる NGF感受性の特異的な蛋白質燐酸化酵素の活性化を介して発現されることを示した(5)。ところで、Maher は、抗燐酸化チロシン抗体を用いて NGFが作用初期一過性に蛋白質チロシン残基燐酸化を増加させることを示した(7)。さらに、K-252aが NGFによるチロシン残基燐酸化増加作用を阻害することから、K 252aは、NGF によって活性化されるチロシンキナーゼを阻害することにより NGFの全ての作用を阻害するという考え方を示した(8)。そこで私達は、チロシンキナーゼ阻害剤である ST638を用いて NGFの作用発現機構にチロシンキナーゼの活性化のステップが含まれるか否かを NGFによる S6 燐酸化増加作用を指標として検討した。

［実験方法］ PC12h 細胞の培養、細胞レベルでの蛋白質燐酸化、SDS-PAGE, およびオートラジオグラフの作成は、すでに報告した方法にしたがって行なった(3)。実験に用いた bFGF (Recombinant human basic FGF-mutein CS23 (10)) およびチロシンキナーゼ阻害剤 ST638 (11) は、それぞれ武田薬品工業株式会社および鐘淵化学工業株式会社より供与いただいた。

［結果］ PC12h 細胞に NGF (50 ng/ml) を作用させると、リボソーム S6 蛋白への^{32}Ｐの取り込み増加がみられる。この増加は、細胞を予め ST638で処理することにより消失した。ST638 による NGFの作用の阻害は、100 μM から認められ 300μM で完全に阻害された (Fig. 1) 。 EGFおよび bFGF も NGF と同様に S6 燐酸化増加作用を示すが、作用の程度は NGFで最も強く bFGF では弱かった。 ST638は、NGF の作用を完全に阻害する300 μM の濃度で EGFおよび bFGF の作用もほぼ完全に阻害した (Fig. 2) 。一方、蛋白質燐酸化酵素阻害剤であるK-252aは、300 nMの濃度でNGF のS6燐酸化増加作用を完全に阻害したが、EGF および bFGF の作用には影響を与えなかった (Fig. 3) 。K-252aが EGFおよび bFGF の作用をほぼ完全に阻害するには、それぞれ3000 nM および1000 nM とNGF に対するよりも高濃度を要した (Fig. 3) 。

［考察］ Halegoua and Patrickは、PC12細胞にNGF を作用させるとチロシン水酸化酵素やリボソーム S6蛋白などいくつかの特異的な蛋白質の燐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 と同じ蛋白質燐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キナーゼにより燐酸化されることによって惹起されることを示唆した(9)。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)。一方、私達は NGFによる S6 蛋白の燐酸化の増加作用にＡキナーゼおよびＣキナーゼは関与せず、Ａキナーゼや Ｃキナーゼとは異なる特異的な NGF感受性蛋白質燐酸化酵素の活性

化を介してNGF の作用が発現されることを示唆した(5)。今回の私達の研究により NGFによる S6 蛋白燐酸化増加作用の作用機構の中にチロシンキナーゼ活性化のステップが含まれる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., 53:1675-1685.
(5) Hashimoto, S., and Hagino, A. (1990) J. Neurochem., in press.
(6) Hashimoto, S., Ikeno, T., and Kuzuya, H. (1985) J. Neurochem., 45:906-912.
(7) Maher, P. A. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:6788-6791.
(8) Maher, P. A. (1989) J. Neurosci. Res., 24:29-37.
(9) Matsuda, Y., and Guroff, G. (1987) J. Biol. Chem., 262:2832-2844.
(10) Seno, M. et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun., 151:701-708.
(11) Shiraishi, T. et al. (1989) Cancer Res., 49:2374-2378.

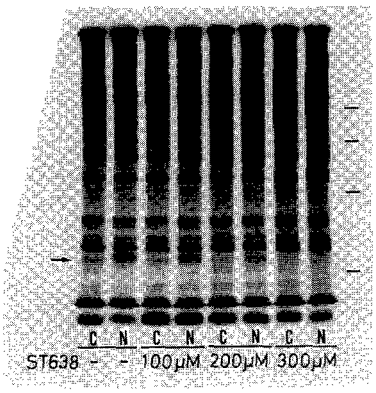


Fig. 1. Blockage by ST638 of NGF-induced increase in the phosphorylation of ribosomal protein S6. Experiments were carried out as described in the legend of Fig. 2. The arrow indicates the position of ribosomal protein S6.

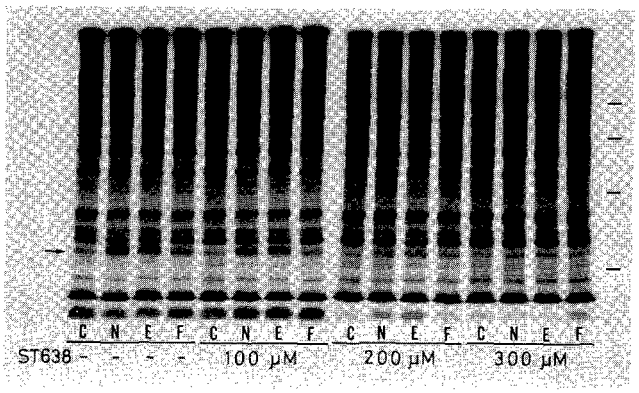


Fig. 2. Comparison of the effect of ST638 on NGF-, EGF-, and FGF-induced increase in the phosphorylation of ribosomal protein S6. PC12h cells were labeled with [^{32}P]orthophosphoric acid (100 μCi/ml) in DME supplemented with 7% FBS and 7% horse serum for 120 min. Shown is an autoradiogram from SDS-PAGE (10%) of 0.2% Triton X-100 detergent-insoluble fractions from PC12h cells treated with control culture medium (C) for the 120-min labeling period or with NGF (50 ng/ml)(N), EGF (50 ng/ml)(E), or bFGF (20 ng/ml)(F) for the last 60 min of the 120-min labeling period. As indicated, other similar cultures received various concentration of ST638 (100 μM, 200 μM, or 300 μM) that was present during the last 75 min of the 120-min labeling period. The arrow indicates the position of ribosomal protein S6.

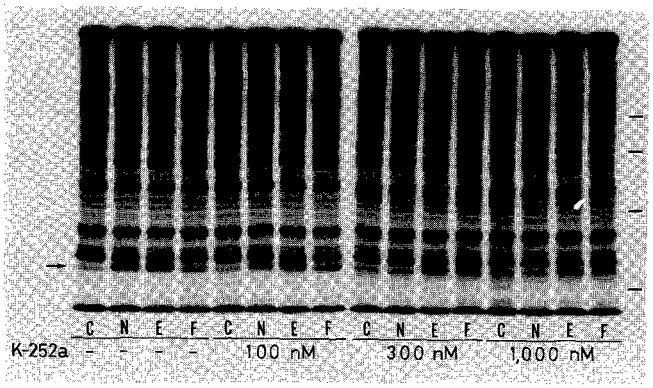


Fig. 3. Comparison of the effect of K-252a on NGF-, EGF-, and FGF-induced increase in the phosphorylation of ribosomal protein S6. Experiments were carried out as described in the legend of Fig. 2 except that K-252a was used instead of ST638. The arrow indicates the position of ribosomal protein S6.

171　成長抑制因子（ＧＩＦ－１）の精製と同定

内田洋子、滝尾擴士、井原康夫、朝長正徳
（都老人研臨床病理、理研フロンティア
都老人研臨床生理、東大脳研病理）

〔要約〕
アルツハイマー病（ＡＤ）脳で活性が無くなっている成長抑制因子（growth-inhibitory factor）の一つ、ＧＩＦ-１を正常老人脳より精製し、その性質を同定した。精製にはDEAE-Sephacelカラムクロマトグラフィ、ゲルろ過、逆相HPLCを使用した。ＧＩＦ-１は１分子中に亜鉛３原子と銅４原子を含み、６８個のアミノ酸からなる熱に安定な酸性蛋白であった。そして、その分子量はゲルろ過で約２０Ｋ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで約５Ｋであったが、アミノ酸配列から計算すると７４２３であった。ＧＩＦ-１のアミノ酸配列はmetallothioneinに類似していたが、市販のmetallothioneinにはＡＤ脳抽出液中の神経栄養因子活性を抑制する作用はなかった。

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だけではなく、異常なsproutingがおきていて、それが老人斑やneurofibrillary tangle、curly fiberの形成に関与していると考えられている(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がおきるのか培養系を使って調べることであり、これまで、ＡＤ脳では成長抑制因子の活性がなくなるため、見かけ上、栄養因子活性が高くなって、ニューロンに異常なsproutingをおこさせることがわかった(3,4)。今回は、成長抑制因子の一つ（ＧＩＦ-１と命名）を精製し、その性質を明らかにしたので報告する。

＜方法＞

成長抑制活性の測定：新生ラットより大脳皮質を取り出し、trypsin-DNase1でdissosiateして細胞を得た。Gelatin-polyornithine coatした6mmのmicroplateに、1.75x10⁴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(125μg/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、その遠心上清をDEAE-Sephacelのカラムクロマトグラフィーや TSKG2000SWおよびSenshu Pak. VP-318を使ったＨＰＬＣで抑制因子を精製した。

アミノ酸配列の決定：精製したＧＩＦ-１のＮ末端はブロックされていた。そこで、ＧＩＦ-１を還元、ピリジルエチル化した後、酸やＢｒＣＮ、またはtrypsin、endo-protease Asp-N、V8 proteaseで限定分解し、ペプチド断片を逆相ＨＰＬＣで分離した。各ペプチド断片のアミノ酸配列はApplied Biosystem 477A sequencerによって調べた。

＜結果と考察＞成長抑制活性は大脳皮質の白質よりも灰白質で高いため、正常老人の大脳皮質灰白質から、DEAE-Sephacelによるイオン交換クロマト、ゲル ろ過、逆相ＨＰＬＣによって抑制因子（ＧＩＦ-１）を分離・精製した。正常老人の灰白質４０ｇから約２００μｇの精製標品が得られた。精製標品をＳＤＳ－電気泳動したところ、非還元下では１４－３０ｋＤａ付近にスメアーとして検出されたが、還元下では約５ｋＤａのところに１本のバンドとして検出された（Fig.1）。ＧＩＦ-１の抑制活性のhalf-maximalは約１００ｎｇ／ｍｌであった（Fig.2）。ＧＩＦ-１のＮ末端はブロックされていたため、限定分解して得たペプチド断片のアミノ酸配列から、全sequenceを決定した。ＧＩＦ-１は６８個のアミノ酸からなり、そのアミノ酸配列はヒトmetallothionein（ＭＴ）に類似していた（ヒトＭＴ－２と７０％のidentity）。また、原子吸光分析の結果、１分子中に３原子の亜鉛と４原子の銅を含んでいることがわかったため、ＧＩＦ-１の分子量は７４２３と計算された。市販のＭＴ（ウマ腎とウサギ肝由来）にアルツハイマー病の脳抽出液中の栄養因子活性を抑制する作用があるかどうかを調べたが、ＧＩＦ-１とは異なり、抑制活性は認められなかった。

以上のことから、正常脳抽出液に含まれる成長抑制因子の一つであるＧＩＦ-１は特殊なＭＴであることがわかった。ＭＴは微量ではあるが血中に存在していることから(5)、細胞内で合成されて細胞外に分泌される。ＧＩＦ-１も同様に合成・分泌されると考えられ、ニューロン外で、またはニューロンに取り込まれた後で、神経栄養因子の作用を抑制することが推測できる。アルツハイマー病の脳ではＭＴのgene expressionが促進されている(6)のに対して、ＧＩＦ-１はＭＴの一種であるにもかかわらず，アルツハイマー病の脳ではその発現が抑えられていることも示唆された。

＜謝辞＞原子吸光分析を行って頂いたﾊﾞﾘｱﾝ ｲｽﾂﾙﾒﾝﾂ ﾘﾐﾃｯﾄﾞの渋谷寿志さんに感謝する。本研究の一部は文部省科学研究費重点領域(1)(02240104)のもとに行った。

＜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)Garvey,J.S. & Chang,C.C.: Science,214:805-807 (1981) (6)Duguid,J.R. et al.: Pro.Natl.Acad.Sci.,86:7260-7264 (1989)

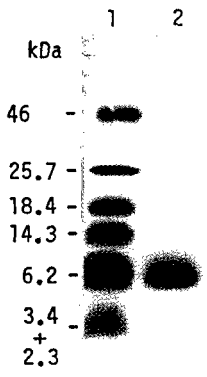


図１．GIF-1の還元下でのSDS-PAGE
1：分子量マーカー、2：GIF-1

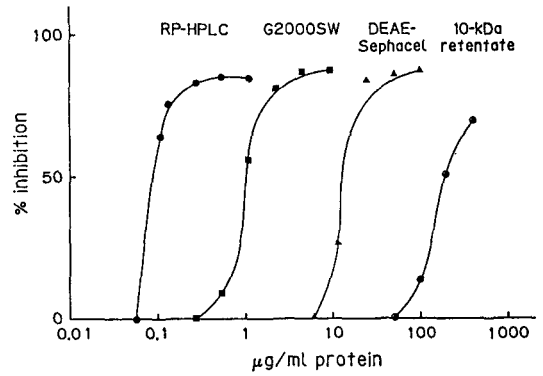


図２．精製の各分画における成長抑制活性の用量反応曲線

172 神経組織に多く存在する新しいアクチン結合蛋白質

前川昌平
東大・理・生物化学

要約 神経組織が高度の回路網を形成するためにはその形成時において細胞体が高い運動能を有する必要があると考えられる。事実、幼若脳より低温下で得られる粗抽出液は加温することによりゲル化することが知られている。このゲルを構成している蛋白質を知る目的で今回ゲルの構成成分に対するモノクローン抗体を作成する試みを行い数種のモノクローン抗体を得た。この内の1つは SDS-PAGE で分子量 150K の蛋白質と反応した。この蛋白質の機能を知る為、ウシ脳よりの精製法を確立した。得られた蛋白質は 150 Kの重鎖と、33K と 35K の軽鎖をもつ複合体でありアクチン繊維と定量的に結合しこの結合はトロポミオシンによって阻害されずイオン強度の変化によってもあまり影響をうけなかった。免疫ブロットの結果はこの蛋白質が他の組織に比して脳組織に非常に多いことを示した。

神経系の構築とその維持に細胞骨格系蛋白質が重要な役割を演じていることはよく認識されているが様々な場面でどの様な蛋白質がどんな役割を演じているのかは現在活発な研究が行われている段階である。幼若ラットの脳抽出液を加温すればゲルを形成するという発見は脳内におけるアクチン結合蛋白質の同定を容易にした(5)。我々は既にこのゲル化産物中の主要な蛋白質の1つである分子量 53K の蛋白質が以前我々により成体の脳抽出液よりアクチンとの結合性を指標にして精製された蛋白質と同一の物であること、またこの産物中の分子量 110K の蛋白質もアクチン繊維結合性であり興味深い細胞内分布を示すことを報告してきた(1-3)。今回、ゲル化産物中の蛋白質に対するモノクローン抗体を得ることを試み数種の抗体を得た。この内未知であると思われる分子量 150K の蛋白質について抽出条件、カラムでの挙動等を免疫ブロット法により検討し材料が多量に得られるウシ脳よりこの蛋白質を精製することを得た。

方法 モノクローン抗体はラット脳ゲル化産物でマウスを免疫後、ミエローマ細胞と融合させ、ブロット法でハイブリドーマをスクリーンすることで得た。ゲル化産物は Palmer らの方法(5)を一部改変して得た。SDS-PAGE, Western blotting 等は以前に報告した方法を用いた(4)。ウシ脳よりの精製は大脳部をホモゲナイズ後、1000xg の上清を 10,000xg で遠心し得られた沈澱をもう一度洗った後 高イオン液で抽出し、得られた上清を Phenyl column にかけ 低イオン液で洗浄後、60% エチレングリコール液で溶出させる。目的の蛋白質を含む画分を透析後、DEAE cellulose, hydroxyapatite 等のカラムを用いて行った。アクチンは兎筋肉よりトロポミオシンはウシ胃平滑筋より調製した(3)。

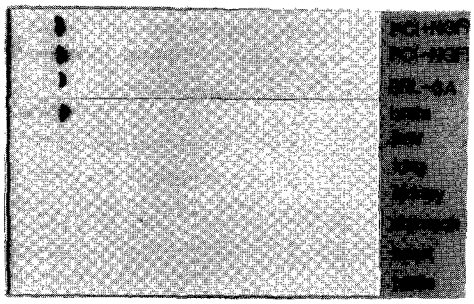
結果 ゲル化産物とモノクローン抗体によるその blotting を図1に示す。今回注目した蛋白質は高分子量成分の内の主要なものの1つで フォドリンや 110K蛋白質とは SDS-PAGE や immunoblotting によって区別される。ラットの各臓器の粗抽出液の blotting の結果はこの蛋白質が脳に特異的に多いことを示している(図2)。また培養細胞では BRL-3A や PC12 の抽出液にはよく反応するが 3Y1 の抽出液とはほとんど反応しなかった。ラット脳抽出液を種々のカラムで分画しこの蛋白質の挙動を blotting で調べたところ Phenyl column に強く吸着し溶出には 60% エチレングリコールを要することがわかった。ウシ脳の膜画分の高イオン抽出液をこのカラムで分画してみるとこの分画で既に SDS-PAGE でバンドの同定が出来るほど精製出来ることがわかったので 以下のカラム操作では SDS-PAGE でバンドの同定を行った。続く2種のカラム操作の結果、この蛋白質はほぼ精製された。興味深いことにこの蛋白質は 150K のバンド (heavy chain) の他

に 35K と 33K のバンド (light chains)を 伴っておりこれらはさらにゲル濾過やショ糖密度勾配遠心を行っても挙動を共にするので複合体を形成していると考えられる（図３）。物理化学的測定により得られたストークス半径は146Å、沈降係数は 8.6S でこれより計算される分子量は 530K。精製蛋白質を SDS-PAGE にかけ densitometer で各バンド間の比を求めると 150K:35K:33K = 3.6:1:2 となり 150K:35K:33K =3:1:2 の複合体と考えると分子量は 550K となりほぼ推定分子量と一致する。アクチン繊維との結合を共沈法でみると 10^6以上の結合定数を持つことがわかった。アクチンとの結合は トロポミオシンによって阻害されないのでフォドリンや 110K蛋白質、α－アクチニンとは機能的にも異なっている。

考察　モノクローン抗体での同定を手がかりにウシ脳よりアクチン結合蛋白質を精製した。この蛋白質は その分子構成において既知のアクチン結合蛋白質とは異なっており免疫学的な知見もこれを裏付けている。この蛋白質は疎水性カラムに強く結合することや膜画分にある程度存在することより細胞膜とのなんらかの相互作用が予想されるが現在この点について検討中である。またその分子構成からこの蛋白質がある種の mechanochemical enzyme である可能性も考えられ現在この点についても検討を進めている。

図 1　　図 2　SDS-PAGE ⟶　　図 3





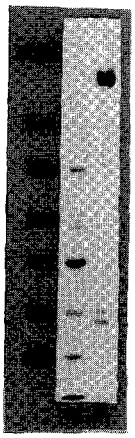


図 1。ゲル化産物の SDS-PAGE 後の蛋白染色(G)とそのモノクローン抗体による blotting(B)、分子量マーカーを(M)に示す。
図 2。ラットの各臓器並びに培養細胞粗抽出液の blotting（PC は PC12 細胞，+NGF は NGF で突起を形成させたもの）。
図 3。精製蛋白質(P)と分子量マーカー(M) のSDS-PAGE。

文献

1. Maekawa,S. et al. (1983) J. Biochem(Tokyo) 94 1329-1337
2. Maekawa,S. et al. (1988) Cell Struct.Funct. 13 373-385
3. Maekawa,S. et al. (1988) Exptl. Cell Res. 178 127-142
4. Maekawa,S. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264 7458-7465
5. Palmer,E. et al. (1984) J. Neurochem. 43 994-1002

173 ラット小脳タンパク質V－1：細胞分化制御因子及び細胞周期制御因子との相同性

田岡万悟、礒辺俊明、奥山典生、小沢史子*、菱沼文男*、山国徹*
（都立大・理・化、三菱化成生命研*）

〔要約〕
ラット小脳の成熟の過程で組織内含量が一過性に最大となるタンパク質（V-1）を２次元高速液体クロマトグラフィーシステムにより検出、分離した。精製タンパク質の解析により決定したV-1のアミノ酸配列は117残基から構成され、N末端はブロックされていた。アミノ酸配列の一部をもとに合成したオリゴヌクレオチドプローブでラット脳cDNAライブラリー（2x10⁶）をスクリーニングし、陽性クローンを１個単離した。このクローン化cDNAの翻訳領域から推定されるアミノ酸残基数は118で、initial Metを除いた配列はV-1タンパク質の解析で得られた結果と一致した。V-1は33アミノ酸から成るドメインが分子中央で２回繰り返した構造を持っており、それぞれのドメインは細胞周期の制御や細胞の分化、形態形成に関わる一連のタンパク質に共通のcdc10/SW16リピート構造を持っていた。ノーザンブロット分析の結果から、V-1mRNAnのサイズは約3kbで、小脳だけでなく、中枢神経系に広く発現していると予想された。以上の結果から、V-1は神経系の分化や形態形成に関与していると推定された。

＜はじめに＞

ラット小脳は出生後に分化、成熟することが知られており、脳の形態形成や神経回路の形成過程を分子レベルで解析するための好適な材料である。我々は、これらの過程に直接関与するタンパク質の検索を目的として、ラット小脳の成熟に伴う121種類のタンパク質の生後変化を２次元高速液体クロマトグラフィー(2D-HPLC)システム[5]で定量的に解析し、未成熟の小脳で存在量が特徴的に増加する２種類のタンパク質を検出した[6]。本大会では、生後７日に小脳内での含量が一過性に最大となるタンパク質（V-1）のアミノ酸配列、cDNAクローニング、およびノーザンブロット分析の結果について報告する。

＜材料と方法＞

V-1タンパク質は、生後７日のラット小脳抽出液を直接2D-HPLCシステムに導入して分離し、逆相HPLCによるリクロマトグラフィーで精製した。V-1タンパク質のアミノ酸配列は、タンパク質化学的な方法による精製標品の直接的な解析と、cDNAクローニング法により決定した。cDNAライブラリーは、生後７日のラット小脳から、GTC-LiCl法[3]で調製したRNAをオリゴdTセルロースで精製し、さらにGubler&Hoffmanの方法で得たcDNAをλgt10に挿入して構築した。オリゴヌクレオチドプローブには、V-1のN末端近傍のアミノ酸配列から推定された17merの塩基配列と、C末端近傍の配列から推定された30merの塩基配列を化学合成して使用した。プローブは5'末端を^{32}Pで標識し、ニトロセルロース膜上でアルカリ変性、固定したプラークDNAとハイブリダイゼーションを行った。単離した陽性クローンのcDNAの塩基配列はDideoxy法により決定した。組織poly(A)RNAのノーザンブロット分析には、ニックトランスレーション法でラベルしたV-1CDNAの全長をプローブとして使用した。

＜結果と考察＞

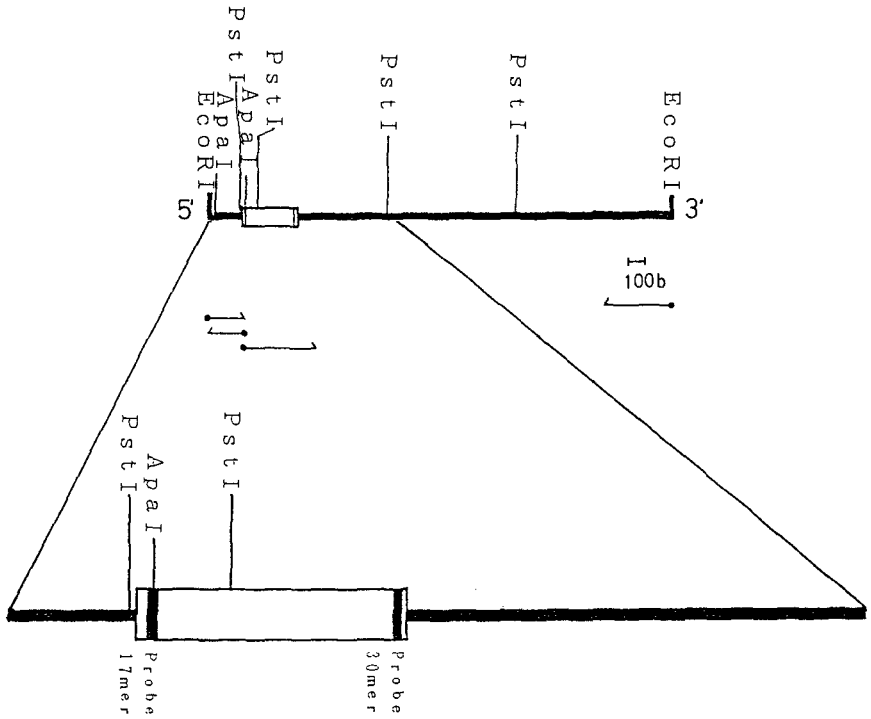
湿重量38gのラット小脳から精製したV-1は40ug、収量から求めた全タンパク質中でのV-1の含量は約0.001％であった。精製タンパク質はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドを示し、分子量は11,000であった。限定分解で得られた各種のフラグメントの解析により決定したV-1のアミノ酸配列は117残基から構成され、N末端はブロックされていた。糖鎖は存在しなかった。

一方、このアミノ酸配列をもとにして合成したオリゴヌクレオチドをプローブとしてラット脳cDNAライブラリー（2X10⁶クローン）をスクリーニングし、１個の陽性クローンを単離した。そのcDNAの制限酵素地図を図１に示した。このクローンは2.8kbのcDNAを含み、174bの5'非翻訳領域、354bの翻訳領域、および約2.3kbにおよぶ長い3'非翻訳領域から構成されていた。翻訳領域にコードされるアミノ酸残基は118、initial Met を除いた配列はタンパク質の解析からの結果と一致していた。したがって、V-1はリーダー配列などを含まない典型的な細胞質タンパク質と考えられた。

以上で決定したV-1のアミノ酸配列の特徴と、これと類縁のタンパク質の有無を知る目的で、各種の遺伝子およびタンパク質データベースを検索した。V-1タンパク質は、33アミノ酸から成るドメインが分子中央で２回繰り返した構造をもっていた。また、それぞれのドメインは、"cdc10"[1]や"Notch"[4]など、細胞周期の制御や細胞の分化、形態形成に関わる一連のタンパク質に共通の" cdc10/SW16リピート構造" [2] と相同の構造をもっていた。したがってV-1は、酵母や線虫、ショウジョウバエなど、各種の生物で同定が進んでいるcdc10/SW16 familyの一員と考えられる。V-1は脊椎動物の脳で見いだされたこのfamilyの第一の例であり、またこのfamilyが実際の細胞で発現していることをタンパク質の単離によって証明した第一の例である。

V-1cDNAをプローブとしたノーザンブロット分析の結果を図2に示した。V-1mRNAのサイズは約3kbで、生後7日の小脳だけでなく、海馬その他の中枢神経系領域に広く分布していることが予想された。

以上の結果から、V-1タンパク質は脳の発生と分化、あるいは形態形成に関わる細胞間相互作用の調節に関与していると推定された。



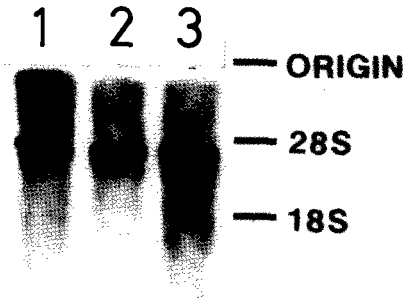


図1：V-1cDNA の制限酵素地図
上図はV-1cDNA の全長の制限酵素地図
下図は翻訳領域付近の拡大図
←矢印は塩基配列を決定した方向
と部位を□は翻訳領域を示した

図2：ノーザンブロット分析
LANE 1　ラット海馬 Poly(A)RNA
　　生後21日
LANE 2　ラット小脳 Poly(A)RNA
　　生後7日
LANE 3　ラット全脳 Poly(A)RNA
　　生後7日

(1) Aves, S.J., Durcacz, B.W., Carr, A. and Nurse, P. (1985) EMBO J. 4, 457-463
(2) Breeden, L and Nasmyth, K. (1987) Nature 329, 651-654
(3) Cathala, G., Savouret, J.F., Mendez, B., West, B.L., Karin, M., Martial, J.A., and Baxter, J.D. (1983) DNA 2, 329-335
(4) Takonas, S.A. (1988) Trends in Genetics 4, 95-100
(5) 田岡　万悟、礒辺　俊明、真鍋　敬、奥山　典生、山国　徹(1988)神経化学 27, 256-257
(6) 田岡　万悟、礒辺　俊明、奥山　典生、山国　徹(1989)神経化学 28, 98-99

174 αクリスタリンBの非レンズ組織での分布
ー 特異抗体の作製とイムノアッセイ法の確立 ー

加藤兼房、篠原春夫、黒部直美、稲熊　裕、清水喜久男*
（愛知県コロニー・研・生化、医学生物学研究所*）

〔要約〕
1)ウシの眼球レンズよりα-クリスタリンのAとBサブユニット（αAとαB）を精製し、それぞれをウサギに免疫して抗血清を得た。またαBのC末端decapeptide（αBpep）に対する抗血清も作成した。2)それぞれの抗血清より抗原-結合セファロースカラムを用いて特異抗体を精製したところ、αAおよびαBで作製した抗体は、ともにαAとαBの両サブユニットと反応する抗体であった。しかし、αBpepで作製した抗体は、αBと特異的に反応し、抗原との親和性も高かった。
2)ラット各組織におけるαBの分布を酵素抗体間接法を用いて免疫組織化学的に検索した。神経組織ではシュワン細胞、希突起膠細胞と思われるグリア細胞と一部の神経細胞が陽性染色された。非神経組織では骨格筋、心筋、腎臓の一部の尿細管・集合管とヘンレのわな及び精巣精細管では一部の精細胞、などが陽性染色された。
3)精製した抗αBpep抗体と抗αA＆B抗体を用いて、αBを特異的に測定できる高感度エンザイムイムノアッセイ法を確立した。

レンズの主構成蛋白質であるα-クリスタリンは分子量約２万のαAとαBより成り、分子量約80万の重合物として存在している(1)。αAとαBの間ではその一次構造に57%の相同性がある(2)。α-クリスタリンはレンズのみに局在する蛋白質とされてきたが、最近、非レンズ組織（神経系、筋組織および腎など）でのαBの存在が報告されている(3-5)。一方、Alexander病は中枢神経組織におけるミエリンの減少、欠損およびアストログリア細胞への異常沈着物質（Rosenthal fiber）を特徴的所見とする疾患だが、患者アストログリア内に蓄積する物質がαBであることが明らかになり(4)、αBの生物学的意義および生理活性の解明が期待されている。今回、我々はα-クリスタリンの非レンズ組織における局在を明らかにし、神経系におけるαBの挙動を知るために、αBの特異抗体を調整し、免疫組織化学的局在を検討したのでその結果を報告する。さらに、最近、αBの高感度エンザイムイムノアッセイ系を確立したので、測定系を用いてαBの定量的組織分布、および血中と脳脊髄液中のαB濃度につても明らかにする。

【方法および材料】
α-クリスタリンはウシレンズよりSpectorらの方法(6)で精製した。αAおよびαBは6 M尿素存在下のchromatofocusingにて分離(7)した。αBのC末ペプチド（KPAVTAAPKK）(2)はペプチド研究所で合成されたものを使用した。αA、αBはcomplete adjuvantと混合しウサギ皮下に注射（1 mg/rabbit）した。αBpepは同量のヘモシアニンとグルタールアルデヒドで結合後、上記のように２週間隔で免疫し、２カ月後より採血した。抗血清中の抗体は50%硫安飽和で塩析し、これをαB-結合セファロースカラムに吸着・溶出して精製した。Wistar系成獣雄ラットをSchmechelの固定液(8)で固定し、パラフィン包埋切片を精製抗αBpep抗体（1μg/ml）を用いて酵素抗体間接法にて染色した。また、ポリスチレン球に不溶化した精製抗体$F(ab')_2$と大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ標識抗体Fab'を用いるサンドイッチEIA系(9)を作製し、各組織ホモジネート上清中のαB濃度を測定した。

【結果】
抗体の特異性：イムノブロットにて抗体の特異性を調べたところ、αAおよびαBを免疫原として作製し、精製した抗体はともにαAとαBの両サブユニットと反応した。しかし、αBpepで作製した抗体はαBとのみ反応する特異抗体であった。
免疫組織化学染色：神経系では、海馬の錐体細胞、嗅球の僧帽細胞、脳幹や脊髄の神経細胞、希突起膠細胞と思われるグリア細胞とシュワン細胞が染色性を示した（図1a）。腎臓では近位尿細管直部、ヘンレのわなの細い部分、集合管、ボーマン嚢が陽性染色された。心臓と舌においては筋細胞はモザイク状の染色性を示した（図1b）。一方、精巣の精細管では精娘細胞と精子細胞が陽性染色された（図1c）。
αBの高感度EIA系：抗αA＆B抗体あるいは抗αBpep抗体を不溶化したポリスチレン球と、ガラクトシダーゼで標識した抗αBpep抗体Fab'より成るサンドイッチEIA法の検量線を図2に示した。10 pg/試験管の微量のαBが

検出・測定できた。αAとは交叉反応しなかった。この系を用いてラット組織におけるαBの分布を測定中である。心筋と骨格筋（特に赤筋であるヒラメ筋）に多く、次いで腎、中枢神経組織に比較的高濃度存在している。ヒト正常血清(<1 ng/ml)および脳脊髄液(<0.3 ng/ml)中では検出できなかった。

【考察】

ワニや鳥類のレンズの主成分であるε-クリスタリンは乳酸脱水素酵素(LDH)であり、鳥類と爬虫類の胎児レンズの主成分であるδ-クリスタリンはヒトのurea cycleの酵素argininosuccinate lyaseと約60%のhomologyがあることが明らかにされている。一方、α-クリスタリンはsmall heat shock proteins (shsp)などと類似の一次構造を持っていることも明らかにされている。このようにレンズを構成するいわゆるtaxon-specific crystallinsはある種の酵素蛋白質そのものか、あるいはそれに非常に類似の一次構造をもつことが明らかになっている(1)。αBが非レンズ組織にもかなり広く分布し、神経系ではおもにグリア細胞に存在するがその生理的意義は不明である。今回確立したαBの測定法は、αBの未知の機能の解明およびAlexander病患者の生前診断のためには有力な手段となると考える。

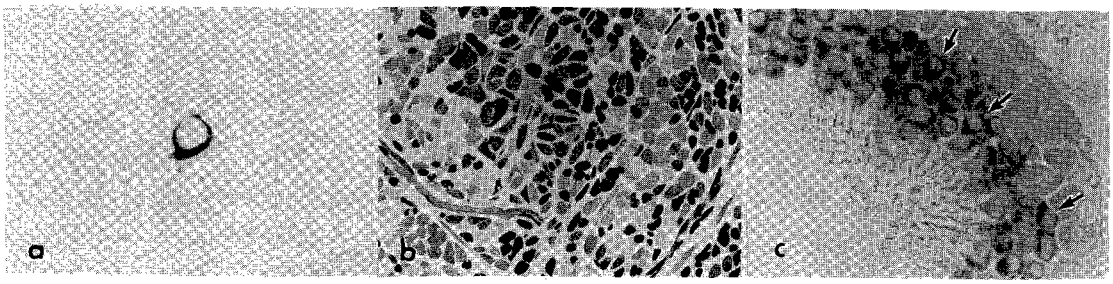


図 1　a：橋における、希突起膠細胞と思われるαBpep陽性細胞。b：舌筋の横断像で、各筋線維はモザイク状のαBpep染色性を示す。c：精巣精細管におけるαBpep陽性の精娘細胞と精子細胞（矢印）。

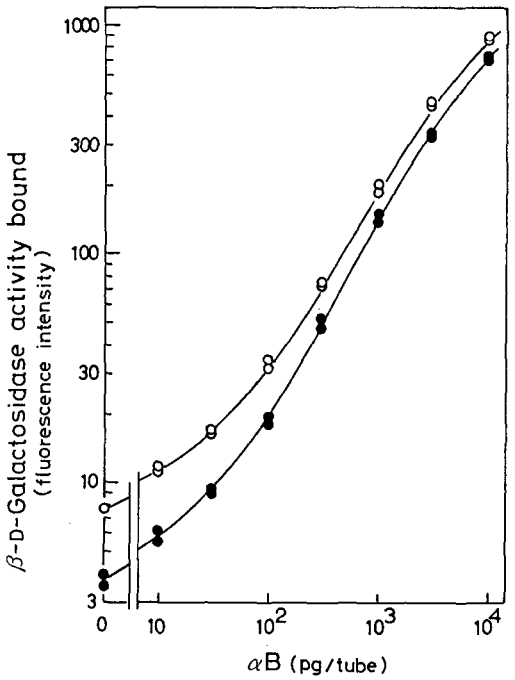


図 2
αB測定系の検量曲線
●：抗αA&B F(ab')₂結合球を使用
○：抗αBpep F(ab')₂結合球を使用

REFERENCES

1. G.J. Wistow & J. Piatigorsky, Annu. Rev. Biochem. 57: 479-504, 1988
2. F.J. Van Der Ouderaa et al., Eur. J. Biochem. 49: 157-168, 1974
3. Y.J. Jiang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 1423-1439, 1989
4. T. Iwaki et al., Cell 57: 71-78, 1989
5. T. Iwaki et al., J. Histochem. Cytochem. 38: 31-39, 1990
6. A. Spector et al., Biochem. J. 124: 337-343, 1971
7. H. Bloemendal & G. Groenewoud, Anal. Biochem. 117: 327-329, 1981
8. D.E. Schmechel et al., Brain Res. 190: 195-214, 1980

175 発育期におけるE1マウス脳のメチオニンエンケファリン——HPLC/RIA法による検討——

大西　博，小出誠司，片山雅文，甲斐利弘，
山上　栄，川北幸男

（大阪市大・医・神経精神）

〔要約〕

遺伝性てんかんモデルのE1マウスにおいて、脳のペプチド画分を逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で50画分に分離溶出し、メチオニンエンケファリン（ME）の radioimmunoassay（RIA）でスクリーニングした。発作間歇期の成熟E1(+)の大脳皮質と中隔野については、ME様免疫活性（ME-LI）のパターンは ddYのそれに類似したが、海馬と線条体ではE1(+)はddYと異なるパターンを示した。生理活性を有するMEの画分を放り上げ刺激前の生後25日、不全発作発現期の50日、強直間代発作発現後の成熟期の150日について定量した。 ME量は、25日の海馬と中隔野で、E1(+)と刺激を受けていないE1(o)の50日の中隔野と大脳皮質で、150日の中隔野、大脳皮質、線条体で、ddYに比べて有意に減少した。 これらの結果は、成熟E1マウスの海馬と線条体のオピオイドペプチドのmetabolic profileがddYと異なること、内因性MEの減少がE1マウスの発作の病因に密接に関係していることを示唆する。

我々は既に、E1マウス脳のオピオイドδレセプター密度がddYに比べて増加すること[1]、ME-LIが減少すること[2,3]を報告した。RIA は微量なペプチドを特異的に定量できる利点はあるが、組織抽出物中の目的とする活性ペプチド以外にも、その前駆体や代謝物などとcross-reactする可能性がある[4]。 HPLCは構造の類似しているオピオイドペプチドを異なる保持時間で分離溶出できる利点を持つ。 HPLCとRIAを組み合わせることにより、目的とする活性ペプチドを正確に定量でき[5]、RIAでスクリーニングすることにより cross-reactivityを利用して、オピオイドペプチドのmetabolismのprofileをみることができる。 今回、ME-LIにddYと比べて差が見られた脳の４部位[2]からペプチドを HPLCで分離溶出し、MEの保持時間に相当する活性ペプチドのMEを定量すると共に、50画分（Fr.）をMEのRIAでスクリーニングした。

【方法】 E1マウスを生後28日から週１回の割合で、40回の放り上げ刺激を行った。50日前後で刺激時に不全発作、75日以後に強直間代発作を示した。 刺激の有無でE1(+)とE1(o)に分け、E1(+)は刺激３日後の発作間歇期に断頭した。４℃で脳を４部位にきりだし、１M 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後0.5％トリフルオロ酢酸（TFA)に溶解し、Sep-Pak C_{18} cartridgeを用いて50％アセトニトリル(CH_3CN)：50％ 0.05％ TFAでpeptide-rich fractionを溶出した。凍結乾燥後0.05％ TFAに溶解し、C_{18} HPLCカラム（Chemcosorb ODS-H, 80-Å, 7μm; φ4.6×250 mm）を使用しペプチドを分離溶出した。UV220 nmでモニターし、移動相には0.05％ TFAを用いCH_3CN濃度20－40％で40分間の直線勾配溶出を行い、40分から50分は 100％のCH_3CNで溶出した。流速1.2 ml/minで、１分毎にフラクションコレクターで回収し、50 Fr. を凍結乾燥後MEのRIAを行った。RIAは前報[2]に従った。対照群としてE1の母系のddYマウスを用いた。

【結果】 Fig. 1は生後150日のddYとE1(+)の海馬のHPLCクロマトグラムとME-LIのパターンを示す。ME（Fr.no.10）以外にddY、E1(+)とも数個のME-LIのピークが出現し、ddYは Fr.no.4，7のhydrophilicなペプチドFr.にもME-LIがみられるが、E1(+)では ME-LIは14分以後の hydrophobicなFr.に溶出される傾向を認めた。線条体では、ddYは ME（Fr.no.12）以外に幾つかのFr.でME-LIが溶出されるのに対して、E1(+)では ME以外には、ME-LIはほとんど溶出されなかった（Fig. 2）。一方、大脳皮質と中隔野では、E1(+)のME-LIのパターンは ddYのそれに類似した（当日発表）。MEの保持時間に相当する Fr.の生理活性MEを４部位について定量した（Table Ⅰ）。E1の25日の海馬と中隔野、E1(+)とE1(o)においては50日の中隔野と大脳皮質、さらに150日の中隔野、大脳皮質、線条体のME量は、ddYに比べて有意に減少した。

【考察】 150日のE1(+)マウスについて、大脳皮質と中隔野のME-LIのパターンはddYと類似し、海馬と線条体ではそのパターンが異なっていた。このことは、成熟 E1(+)の海馬と線条体でのオピオイドペプチドのmetabolic profileがddYと異なることを示唆する。50日のME量は、25日と150日のそれに比べて低値を示し線条体で著明であった。ddYとE1のMEが 共に減少することから、50日でのMEの減少が、これらのマウスに特異的なものかどうか、他の系のマウスとの比較や種差[6]についても考慮する必要があろう。E1マウス脳における内因性MEの減少は、それが主に結

合するオピオイドδレセプターのup-regulation[1]に対応している。生後25日で既にEl の海馬と中隔野において、中隔野においてはさらに50日と150日でもEl(+)とEl(o)のMEがddYに比べて減少していることは、これらの部位の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。50日と150日の大脳皮質において、El(+)とEl(o)のMEが共に低下していることから、大脳皮質のMEの減少は痙攣の結果ではなく、痙攣発現に関係すると推定される。これまでの成績から[1,2,3]、抗痙攣作用を有する内因性MEの減少が、Elマウスの発作の病因に重要な役割を果たしていると考えられる。

【文献】

1) Onishi, H. et al. (1989) Neurochem. Res. 14, 31-35

2) 小出誠司ら (1989) 神経化学 28, 246-247

3) Onishi, H. et al. (1990) Neurochem. Res. 15, 83-87

4) Desiderio, D. M. (1984) Analysis of Neuropeptides by Liquid Chromatography and Mass Spectrometry 75-113

5) Hong, J.-S. et al. (1983) Methods in Enzymology 103, 547-564

6) Missale, C. et al. (1983) J. Neurochem. 40, 20-24

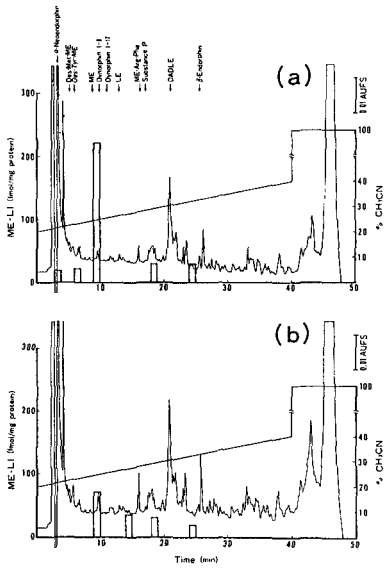


Fig. 1. HPLC chromatograms and RIA data of the peptide-rich fraction in the hippocampus of 150-day-old ddY (a), and El(+) (b) mice.

Table I. Methionine enkephalin (fmol/mg protein) content in discrete brain regions of 25, 50, and 150-day-old mice of ddY and El strains

Region	Strain (25-day-old)		
	ddY	El	
Cerebral cortex	173±41.8	70.2±17.3	
Hippocampus	131±11.2	69.0±19.5[a]	
Septal area	2200±117	1440±182[a]	
Striatum	2910±592	2600±322	
Region	**Strain (50-day-old)**		
	ddY	El(o)	El(+)
Cerebral cortex	108±3.2	30.4±4.1[c]	48.9±6.9[c]
Hippocampus	54.3±9.5	70.4±5.9	65.5±10.6
Septal area	2050±358	561±172[a]	679±108[a]
Striatum	459±105	791±157	951±74.1
Region	**Strain (150-day-old)**		
	ddY	El(o)	El(+)
Cerebral cortex	178±28.2	37.5±6.2[a]	71.3±11.7[b]
Hippocampus	142±18.3	67.1±17.9	119±36.2
Septal area	4660±646	1110±97.6[c]	2470±409[a]
Striatum	5280±565	1330±378[c]	1510±406[c]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$, [c]$P<0.001$; compared to ddY.

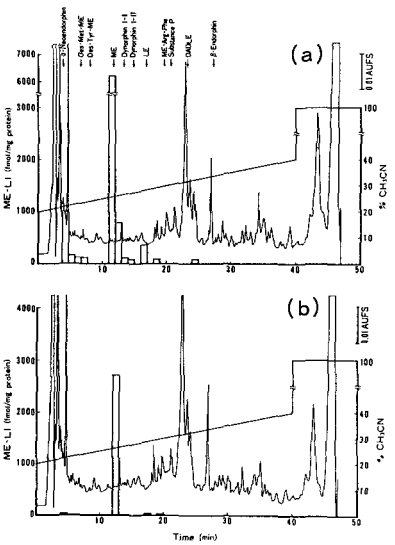


Fig. 2. HPLC chromatograms and RIA data of the peptide-rich fraction in the striatum of 150-day-old ddY (a), and El(+) (b) mice.

176　ＰＥＴによるヒスタミンＨ－１受容体測定

－イヌ脳、ヒト脳での画像化の試み－

谷内一彦[1)]、渡邉建彦[1)]、畑澤順[2)]、岩田錬[2)]、石渡喜一[2)]、横山浩之[1)]、伊藤正敏[2)]、井戸達雄[2)]

[1)]東北大学医学部第一薬理　[2)]東北大学サイクロトロンＲＩセンター

〔要約〕ヒスタミンH_1受容体のantagonistである[^{11}C]pyrilamineと[^{11}C]doxepinをビーグル犬に投与してPET (Positron Emission Tomography)にて脳の放射能を測定し画像化した。[^{11}C]pyrilamine、[^{11}C]doxepinとも同じように大脳皮質（特に前頭葉）に多く分布し、線条体、小脳に少なく分布した。この分布は別に測定したin vitroでの[^{3}H]pyrilamineの結合の分布とよく一致した。さらにこの結合は多量の抗ヒスタミン薬(triprolidine)にてdisplace された。以上の結果を踏まえて、正常ボランティアに[^{11}C]pyrilamineを投与しPET像を得た。

はじめに　我々はPET(Positron Emission Tomography)によるヒスタミンH_1受容体測定法の開発をめざして、in vivoにおける[^{3}H]pyrilamineのモルモット脳への結合がH_1受容体であることを報告した(1)。我々はポジトロン放出核種である^{11}C（半減期20.4分）にて標識したpyrilamine, doxepinを用いてイヌ脳の画像化を試み(2)，その結果を踏まえて[^{11}C]pyrilamineのヒトへの臨床応用をおこなっている。

方法　サイクロトロンの^{14}N（p,α）^{11}C 反応にて作られた$^{11}CO_2$より高比放射能$^{11}CH_3I$を合成し、pyrilamine, doxepinのN-desmethyl体と反応させ、HPLCにて精製した(3)。Beagle犬（雄、体重17-19 kg）をペントバルビタールにて麻酔し動静脈にカニュレーションをおこない静脈より 5-7 mCiの標識薬剤を投与した。標識薬剤の比放射能は200 mCi/μmol以上、放射化学的純度 >99% 、化学的純度 >95% であった。ヒトの検査に先立ち、東北大学サイクロトロン医薬品の臨床応用のための臨床委員会の承認を得た。神経学的異常のない３人のボランティア (22, 33, 51 y.o.)に10-12 mCiの[^{11}C]pyrilamineを投与し、PETにて脳の放射能を計測した。投与時の比放射能は > 1000 mCi/μmolであった。[^{3}H]Pyrilamineによる37° C、in vitroでの結合はChangらの方法によった(4)。

結果　図１に示す如く、[^{11}C]pyrilamine、[^{11}C]doxepinとも同じように大脳皮質に多く集積した。線条体、海馬、小脳（より下の断面）への集積は少なかった。この分布は別に測定したin vitroでの[^{3}H]pyrilamineのイヌ脳への 結合のBmax（表１）とよく相関した。In vitro, 37° Cでの K_Dは5.9±1.0 nMであった。また[^{3}H]pyrilamineのイヌ脳への 結合のpyrilamine, doxepinの K_Iは、それぞれ11.7±1.1, 2.8±0.6nMであった。[^{11}C]pyrilamineより[^{11}C]doxepinのほうが放射能が貯留している（図２）のはイヌ脳に対してdoxepinのほうがよりaffinityが強いためである。Triprolidine 1 mg/kgを前投与、あるいは[^{11}C]pyrilamine静注後30分に投与した時の脳の放射能の時間経過を図３に示す。多量の高ヒスタミン薬により特異的結合を遮断することができた。ヒト剖検脳の37° C、in vitroでの[^{3}H]pyrilamineの結合を調べるとK_D

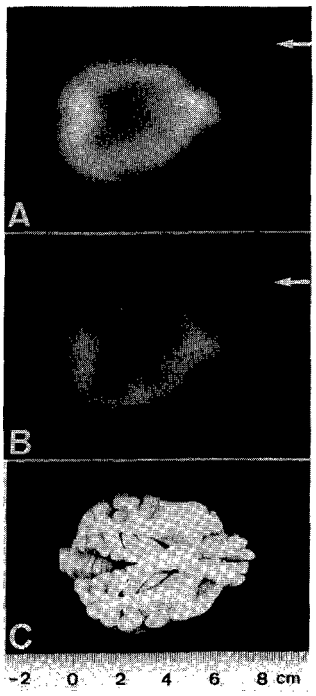


図１
イヌのPET像
A：ピリラミン
B：ドキセピン
C：解剖図
矢印：眼球

図2　時間放射能曲線

A：^{11}C-Pyrilamine

B：^{11}C-Doxepin

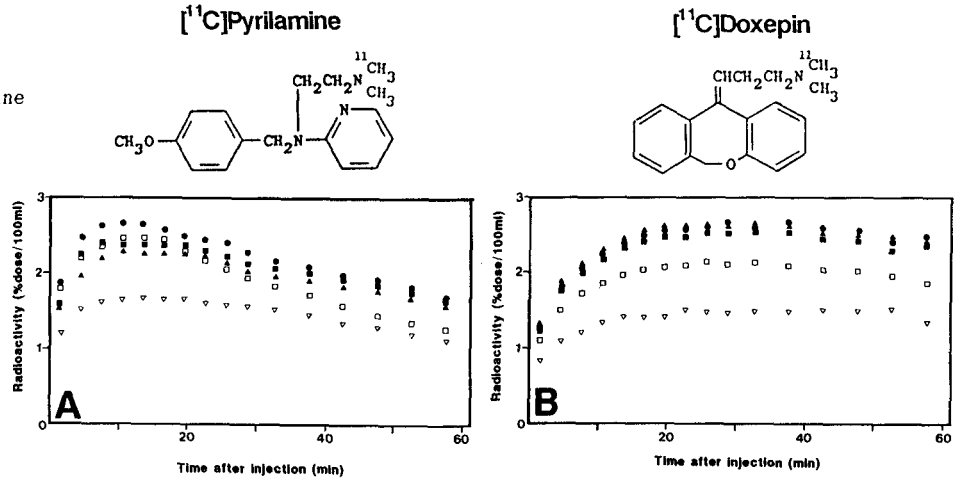
● 前頭葉

▲ 側頭葉

■ 後頭葉

□ 線条体

▽ 小脳



は1.6 nMで十分高い親和性があった。よってまず[^{11}C]pyrilamineを臨床応用し、３人のボランティアに投与しPET像をえた。大脳皮質（特に前頭葉）、視床に高い放射能の集積があり、小脳、後頭葉に少なかった（図４）。

結語　PETによるヒスタミンH_1受容体測定法を開発した。

謝辞 様々な助言、手助けをしていただいた目黒謙一先生（東北大第四内科）、松澤大樹名誉教授に深く感謝します。

表1　イヌ脳のH_1受容体(in vitro at 37° C)

Regions	Bmax(pmol/g)
前頭葉	14.4
側頭葉	13.3
後頭葉	13.1
嗅球	11.6
視床下部	8.88
海馬	7.56
線条体	6.95
視床	6.70
小脳	2.41

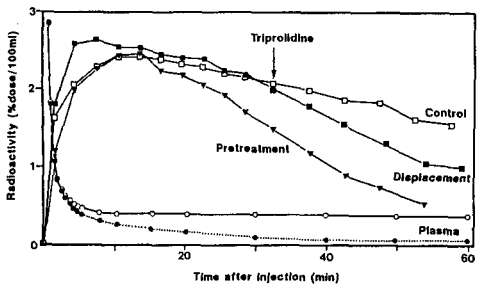


図3　Pretreatment, displacement 実験（イヌ）。 1mg/kg のtriprolidineを前投与（▼）、標識薬剤投与30分後に投与（■）した時の前頭葉の放射能。Control実験は（□）でプロットしている。血漿中の全放射能（○）代謝物を除いた^{11}C-pyrilamineの濃度（●）も同じ単位で示している。

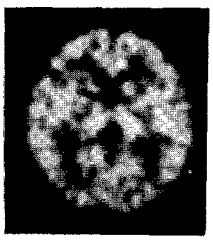


図4　ヒト脳の^{11}C-pyrilamineのPET像
視床、前頭葉に高い集積がある。
51才　男性

文献

(1) Yanai, K., Yagi, N., Watanabe, T., et al. (1990) J. Neurochem. 55 in press.

(2) Yanai, K., Watanabe, T., Hatazawa, J., et al. (1990) Nerosci. Lett in press.

(3) Yanai, K., Dannals, R. F., Wilson, A. A., et al. (1988) J. Nucl. Med. Biol. 15, 605-610

(4) Chang, R. S. L., Tran, V. T., Snyder, S. H. (1978) J. Neurochem. 32, 1653-1663

177 β－ヒドロキシヒスタミンのヒスタミン受容体に対する作用

長谷川武史*、橋本泰道**、佐藤伸介**、川瀬秀明**、中嶋照夫**
（京都府医大・同位元素*、精神**）

〔要約〕

β－ヒドロキシヒスタミンのヒスタミン受容体に対する作用を、cAMP産生刺激を指標として検討した。培養細胞としては、初代培養神経細胞、大脳初代培養グリア細胞、胎児心室、胃粘膜、回腸を用いた。β－ヒドロキシヒスタミンはこれらの細胞に対して、ヒスタミンと同様の刺激作用を示した。ヒスタミンに対する相対的活性は、胎児心室（心室）では100％、胃粘膜では32.0％、回腸では93.3％であった。

<言語>

神経系におけるヒスタミン（HA）ニューロンの細胞体は結節乳頭核にあり、その繊維は大脳皮質をはじめ中枢全体に広く展開している（1）。その機能は睡眠、摂食、摂水などの重要な生理に関与すると考えられているが、詳細について、不明な点が多く、新たな研究展開が期待されている。筆者らも、HAニューロンの機能の詳細をしるべとして、中枢HAレセプターの調節法の検討を行ってきた。薬物パーキンソン氏病治療の経験（2）より、薬物的前駆体の末梢投与により、中枢導入可能で、立体化学的に興味あるβ－ヒドロキシヒスタミン（β－HOHA、図1）を用いてみた。既に報告したが、薬物的にβ－ヒドロキシヒスチジンの投与の結果（3）、β－HOHAは検知されるが、少量ながら中枢にも導入されうる可能性をしめした。今回は、中枢H2受容体と心臓および胃粘膜H2受容体に対するβ－HOHAの作用について、若干の知見をえたので報告する。

<方法>

1）各臓器を用いたcAMP産生刺激：受容体試料；ハートレイ系guinea pig（♂，250g）を断頭し、直ちに、心室、胃粘膜、回腸を取り出し、ガラスポッター型ホモゲナイザーにて15倍量の50mMのTRIS緩衝液下で各臓器を粉砕し、ガーゼにて粗大繊維類を除き各臓器のホモジネートをえた（4）。刺激条件；反応液、100mMTRIS緩衝液（pH7.4、0.1mMGTP、2mMMgCl$_2$、4mMTheophylline、50μl受容体試料、0.1mMアゴニスト、1mMATPを含む）、最終容量0.5ml。反応温度、時間、各30℃、10min。反応は50μlの10mMATP加えてはじめ、2分間煮沸によって停止した。cAMPの測定；遠心分離（2500xg，15min）により反応混合物より固形物を除き、得た上清を60倍希釈して測定試料（50μl）とし、cAMPの算定にはRIA法（Amersham社製I-125cAMP測定kit）を用いた。

2）初代培養細胞を用いたcAMP産生刺激：受容体試料；ウイスター系ラット胎児（妊娠、16日）全脳を取り出し、細片した。得た試料をグリア細胞生育抑制したN$_2$培地にて11日間培養し、受容体試料とした。刺激条件；アゴニスト0.1mMを含む反応液（1mMイソブチルメチルキサンチン、クレブスーヘンゼレート緩衝液）、1ml。細胞数、ca3x10^5/a well。反応は上記反応液の注入によって開始し、反応液の除去後、直ちに1mlの7％TCAを注入することによって停止した。温度、37℃。時間、各0，15，30，40，50，60，70，80，90，120sec。cAMPの測定；遠心分離（2500xg，15min）により抽出混合液より固形物を除き、更に生じた上清よりエーテルにてTCAを除去することによって測定試料（50μl）をえた。以下、1）と同じ方法によってcAMPの算定を行った。

<結果>

1）HAのcAMP産生刺激を基準にして、R－β－HOHAのHA受容体に対する作用を検討したところ0.1mMの濃度で以下の結果をえた。心室、32.0％、胃粘膜、93.3％HAと同程度のアゴニスト作用を示した。回腸については産生量が小さく数値を示しえなかった。詳細は表1に示した。

2）大脳初代培養細胞を用いたR－β－HOHAによるcAMP産生刺激は投与後の経時変化を追って検討した。60－70secでプラトーに達し増減を

繰り返す。HAに比して時間で20-30sec遅れて集積が始まった。詳細は図2に示した。

＜考察＞

アデノシン受容体との関連よりcAMP産生刺激をもって直ちにR-β-HOHAが中枢H2受容体に反応したとはいえないが、心室及び胃粘膜の結果より、β-HOHAがH2受容体にアゴニスト様反応を示したと示唆される。また、刺激のズレよりHAより親和性低いと考えられる。このような事実より、受容体レベルからみると薬物的前駆体のβ-ヒドロキシヒスチジンの投与によって、R-β-HOHA中枢に導入された場合、アゴニスト様効果が期待されるが、しかし効果を得るためには多量投与が必要かもしれない。現時点ではR-β-HOHA代謝とHA代謝への影響及びH3に対する影響が明らかにされていないのでβ-HOHAの真の生理活性は未知である。

＜文献＞

1. Inagaki N., Yamatodani A. and Wada H. (1989) Endogenenous Neuroactive Subustance Chugai-Igakusha Tokyo, pp279-291
2. Nakajima T., Kudo Y. and Kaneko Z.(1978) Folia Psychiatr. Neurol. Jpn. 32 223-230.
3. Kamimura H., Hasegawa T. and Nakajima T. (1989) Biomed. Res. 10 Sup. 3241-250
4. Johson C. L. and Mizoguchi H. (1977) J. Pharmacol. Exp. Therap. 200 174-186

β-HOHA C	10^{-5}M	10^{-4}M
心室	21.5%± 4.3	32.0%± 10.3
胃粘膜	42.1%± 5.9	93.3%± 20,2

表1 R-β-HOHAの10^{-4}MHAを基準にした%刺激

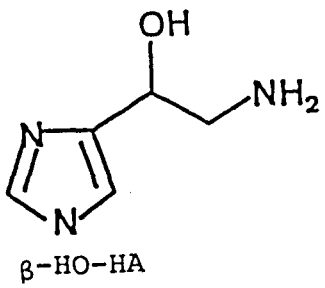


図1

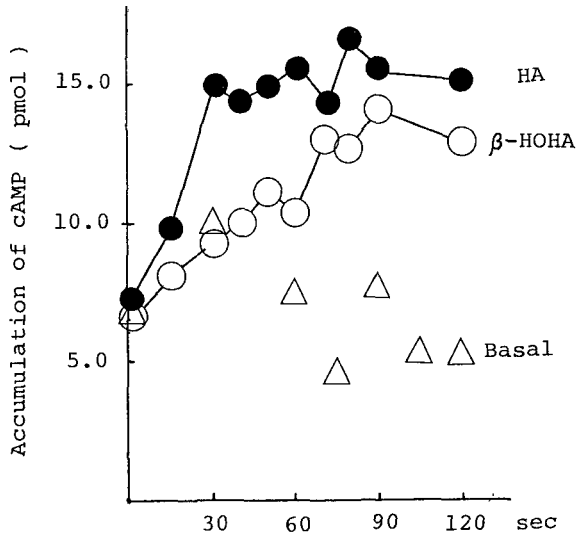


図2 β-HOHA及びHAによるcAMP刺激産生

178　NG108－15細胞における外来性G蛋白質αサブユニットのシグナル伝達系に及ぼす効果

額田　敏秀[1,2]、　橋井　美奈子[3]、　亀山　仁彦[2]、　東田　陽博[3]
([1] 京大・医・医化学、[2] 東大・医・脳研、[3] 金沢大・医・神経情報研)

〔要約〕
G蛋白αサブユニット（Gα）の細胞内における生理的役割を明らかにするため、ラット神経膠腫xマウス神経芽腫雑種NG108-15細胞を用い、各種G蛋白αサブユニット（αi1・αi2・αi3・αo）cDNAの発現を試みた。RNA ブロットハイブリダイゼーション解析で、NG108-15細胞は内在性のαi2・αi3に対する mRNA を有したが、αi1・αo に対する mRNA は認められなかった。このNG108-15細胞にαi1、αi2、αi3及びαo cDNA を組み込んだ発現ベクターをトランスフェクションし、各々のGαcDNAが安定に発現しているクローンを選別した。αi1が発現しているクローンでは、ブラジキニンによるホスファチジルイノシトール(PI)代謝回転の亢進が効果的に抑制された。またαo 及びαi3が発現しているクローンでは電位依存性カルシウム電流がムスカリン性アセチルコリン受容体を通じて抑制された。このように、各々のGαは受容体による情報伝達系に特異的に連関することが示唆された。

G蛋白は、α・β・γサブユニットより構成される三量体で、PI代謝回転、イオンチャンネル等の受容体による情報伝達において重要な役割を果たしている。αサブユニットは、GTPase活性、GTP 結合能を有し、多くの受容体を介する情報伝達系において促進的或いは抑制的に作用することが知られている。現在のところαサブユニットは少なくとも9種類存在し、そのアミノ酸の一次構造はいずれも相同性が高い。従って、類似性の高いαサブユニット同志の夾雑を除外可能な実験系が、各々のαサブユニットの機能を調べるうえで必須となっている。この問題を解決するため、我々は各G蛋白αサブユニットcDNAをNG108-15細胞中で発現させ、細胞の有するPI代謝回転及び電位依存性カルシウム電流に対する影響を検討した。

〔方法〕
アミノ酸コード全領域を含むαi1・αi2・αi3・αo cDNA をSV40初期プロモーター及び *neo*マーカー遺伝子の有する発現ベクターに組み込み、NG108-15細胞に導入した（1）。G418(800μg/ml）を含む培地で約2週間培養することにより、G418耐性の転換クローンを得た。これらのクローンより総RNA を抽出し、導入したGαcDNAをプローベとしたRNA ブロットハイブリダイゼーションを行い、期待されるサイズの mRNA を発現しているクローンを選別した。また、それぞれの mRNA に対する翻訳産物の同定は、αi1及びαo のC末10個のペプタイド(αi1とαi2では同一）に対する抗血清と各クローンの細胞膜を用いたウェスタンブロッティングにより行った。以上の結果、αi1、αi2、αi3及びαo cDNA が安定に発現しているクローンとして、NGi1-1・NGi1-3、NGi2-5・NGi2-6・NGi2-10 、NGi3-6・NGi3-13 及びNGo-13・NGo-18をそれぞれ選別し、以下の実験に用いた。

〔結果及び考察〕
RNA ブロットハイブリダイゼーションにより、トランスフェクションしていないNG108-15細胞では、内在性のαi2・αi3に対する mRNA の存在が認められた。αi2に比べ、αi3に対する mRNA 含有量はより少なかった。一方、αi1・αo に対する mRNA は検出できなかった。また、αo ・αi1(αi2）に対する抗血清を用いたウェスタンブロットで、内在性の分子量39K及び40～41Kの免疫反応性のバンドがそれぞれ認められた。39K の蛋白はαo に、40～41Kの蛋白はαi2に相当するものと考えられる(2) 。最近、免疫学的に区別出来ない4種類のαo 蛋白の存在が脳で報告されている（3）。従って、NG108 細胞におけるαo 含有量が mRNA のレベルと蛋白のレベルで喰い違う理由の一つとして、内在性のαo は、トランスフェクションに用いたcDNA由来のαo とは異なる亜種である可能性が考えられる。

ブラジキニン（BK）受容体刺激により、 NG108細胞でPI代謝回転の亢進がみられ、その結果イノシトール3燐酸（IP_3）とジアシルグリセロールの産生が生ずることが知られている。外来性のGαのPI代謝回転に対する影響を調べるために、IP_3 産生のピークに相当する10秒間の、BK未添加時に対するBK添加時のIP_3 産生の比率を各クローンで検討した（Table 1 ）。即ち、αi1の発現しているクローンNGi1-1・NGi1-3で、BK刺激によるIP_3 産生の明らかな減少がみら

れた。αo 発現クローンでも多少の減少がみられたが、αi2・αi3発現クローンでは全く減少が見られなかった。従って、外来性のαi1は、BKによるPI代謝回転亢進を特異的に抑制することが示唆された。NG108細胞では、PI代謝回転の結果産生されたIP_3 が細胞内カルシウムを遊離させ、カルシウム依存性カリウム電流を誘発することが報告されている（4）。αi1発現クローンでは、BK添加時に誘発されるカルシウム依存性カリウム電流の減少も観察され、PI代謝回転の抑制がさらに確認された。

NG108細胞では、脳より精製したαo 蛋白が電位依存性カルシウムチャンネルを局所的に抑制することが知られている（5）。従って、どのタイプのαo が有効であるのか、或いは他のGαはどの様な影響をカルシウム電流に与えるのかを調べるため、各クローンで電位依存性カルシウム電流測定を行った。αo 発現クローンで、アセチルコリン(Ach)添加により、高閾値性（6）電位依存性カルシウム電流の抑制が顕著に認められた（Fig 1）。抑制は細胞外液の洗浄により、すみやかにAch 添加前の状態に戻った。抑制は、高閾値の一過性の電流の部分により強くみられた（Fig 1）。従って、この部分の抑制を指標にし、他のGα発現クローンにおいてもカルシウム電流のAch による抑制効果を検討した（Table 2）。その結果、αo 及びαi3発現クローンでAch による電位依存性カルシウム電流の抑制がより強く生ずることが認められた。αi1・αi2発現クローンでは、カルシウム電流の抑制の増加はみられなかった。これらのカルシウム電流の抑制は全て百日咳毒素の前処理で消去した（Table 2）。以上により、外来性のαo 、αi3が、電位依存性カルシウム電流を特異的に抑制することが示唆された。トランスフェクションしていないNG108 細胞は、我々が用いたαo に対する mRNA が検出できないこと、αi3に対する mRNA 含有量が少ないことより、外来性のαo 、αi3がこれらを補った結果、電位依存性のカルシウム電流の抑制増加がみられたのではないかと考えられる。

Table 1 Bradykinin-induced responses in transformed NG108-15 cells

Transformed with	Clone	BK-stimulated [^{3}H]inositol trisphosphate formation (ratio to control) Each clone	Pooled responses
None	NG108-15	2.4 ± 0.32 (6)	
αi1	NGi1-1	1.4 ± 0.12 (3)	1.3*
	NGi1-3	1.3 ± 0.35 (3)	
αi2	NGi2-5	2.4 ± 0.07 (2)	
	NGi2-6	2.0 ± 0.42 (2)	2.2
	NGi2-10	2.1 ± 0.42 (2)	
αi3	NGi3-6	1.9 ± 0.35 (3)	2.5
	NGi3-13	3.1 ± 0.85 (2)	
αo	NGo-13	1.8 ± 0.29 (3)	1.7
	NGo-18	1.6 ± 0.05 (3)	

Table 2. Acetylcholine-induced inhibition of high-threshold transient Ca^{2+} current

Transformed with	Clone	% inhibition Control Each clone	Control Pooled responses	PTX-treatment Each clone	PTX-treatment Pooled responses
None	NG108-15	12.8 ± 1.8 (36)		1.4 ± 1.0# (7)	
αi1	NGi1-1	11.0 ± 2.8 (10)	10.1	1.1 ± 2.6 (3)	1.65#
	NGi1-3	9.2 ± 3.3 (13)		2.2 ± 0.8 (5)	
αi2	NGi2-5	11.6 ± 3.8 (10)		ND	
	NGi2-6	6.4 ± 2.9 (10)	9.8	0.4 ± 2.9 (6)	
	NGi2-10	11.4 ± 2.0 (6)		ND	
αi3	NGi3-6	21.0 ± 3.6* (9)	21.4*	2.3 ± 3.1# (5)	2.5#
	NGi3-13	21.7 ± 8.7 (6)		2.8 ± 0.8 (5)	
αo	NGo-13	15.2 ± 4.3 (13)	19.6	-0.8 ± 0.8# (5)	-0.8#
	NGo-18	24.0 ± 6.2 (16)		-0.8 ± 2.1# (5)	

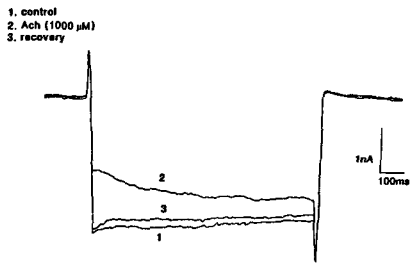


Fig. 1 Enhancement of Acetylcholine-Induced Inhibition of High-Threshold Voltage-Dependent Ca^{2+} Currents in Clone NGo-18.

〔文献〕

1. Nukada, T., et al., FEBS Lett., 211, 5-9 (1987)
2. Asano, T., et al., J. Neurochem., 53, 1195-1198 (1989)
3. Kobayashi, I., et al., FEBS Lett., 257, 177-180 (1989)
4. Higashida, H. and Brown, D. A., Nature, 323, 333-335 (1986)
5. Hescheler, J., et al., Nature, 325, 445-447 (1987)
6. Tsunoo, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9832-9836 (1986)

179

ムスカリン受容体とG蛋白質の相互作用に対するMgの効果

塩崎一昌　芳賀達也
（東京大学医学部脳研生化学）

〔要約〕

ムスカリン受容体とG蛋白質の相互作用に対するMgの効果を、心房から精製した受容体（m2サブタイプ）と大脳から精製したG蛋白質（Gi,Go）の試験管内再構成系で検討し、以下の結果を得た。(1)GTP（GDP）感受性高親和性アゴニスト結合がMgの有無に関わらず観察されたが、親和性はMgの有無により異なっていた。高親和性成分のカルバコールに対する見かけの解離定数はMg 10mMの時0.27μM、Mg 1 μM以下の時13μMで、低親和性成分の解離定数は160μMであった。(2)カルバコール存在下でのGDPに対する親和性の低下が、(a)[^{35}S]GTPγS結合のGDPによる阻害曲線のカルバコールによる右側へのシフト、(b)高親和性アゴニスト結合を低親和性に変えるのに必要なGDP濃度の増加、として観察された。これらの効果はMg存在下にのみ見られ、Mgがない時には見られなかった。(3)GTPに対する親和性は、カルバコールあるいはMgの有無によってGDPの場合ほど顕著な変化が見られなかった。これらの結果は、２種類のアゴニスト・受容体・G蛋白質複合体が存在すること、アゴニストに高親和性でGDPに低親和性な複合体生成にはMgの存在が必要なこと、を示している。

ムスカリン受容体とG蛋白質の相互作用は精製標品の試験管内再構成系で調べられてきた。両者の相互作用はGTP又はGDP感受性高親和性アゴニスト結合およびアゴニストによるGDP（GTP）放出促進として観察され[2,3]、これらの実験結果はアゴニスト・受容体・G蛋白質複合体の生成を仮定するモデルによって定性的に説明された[4]。このモデルでは、受容体に高親和性と低親和性２つの状態を仮定し、GTPとGDPは同じように作用すると仮定している。ところが最近、アゴニストのGTP結合とGDP結合に対する効果が異なることが示唆されている[1,5,6,9]。また予備的な実験において、Mgのない条件ではGTP感受性高親和性アゴニスト結合が存在するが、アゴニストによるGTPγS結合の促進は見られないことが分った。これらの結果は、先のモデルが単純すぎることを示唆している。そこで、両者の相互作用特にMgの影響を詳しく調べた。

［実験方法］：心房ムスカリン受容体の精製[8]、G蛋白質の精製[2]、両者の再構成[2,3]は既報に従って行なった。G蛋白質としてはGiとGoの混合物を主に用いたが、それぞれ単独でも基本的に同じ結果が得られた。反応液（液量0.2 ml）の組成は、受容体、0.3 nM；G蛋白質、2.5 nM；Hepes-KOH (pH 8.0), 20 mM；NaCl, 0.16 M；DTT, 5 mM；EDTA, 5 mM；$MgCl_2$, 0.5 or 15 mM、である。他に、[^{3}H]QNB結合実験の時は1.3 nM [^{3}H]QNB ± 0.1 mM GTPを、[^{35}S]GTPγS結合実験の時は40 nM [^{35}S]GTPγS + 1 mM カルバコール(または10 μM アトロピン)を加えた。EDTA 5 mMと$MgCl_2$ 0.5 mMある時の遊離Mgイオン濃度は、pH 8でのEDTAとMgの見かけの解離定数0.37μMより、40 nMと計算される。反応温度は30°Cで、[^{3}H]QNB結合の場合60分後、[^{35}S]GTPγS結合の場合20分後、受容体もしくはG蛋白質に結合した標識化合物をガラス繊維濾紙に回収し計測した。

［結果］：図１は、遊離Mg濃度が40 nMと10 mMの時の[^{3}H]QNB結合のカルバコールによる阻害曲線を示す。GTP添加で阻害曲線は右にシフトし、カルバコールに対する親和性はMg濃度にかかわらずほぼ同じであった（見かけの解離定数(Kd) 160μM）。GTPを加えない時の阻害曲線を、親和性の異なる２成分を仮定し非線形最小二乗法で解析すると、約70%が高親和性で30%が低親和性（Kd約160μM）であった。高親和性成分のKdは、10 mM Mg存在時0.27μM、40 nM Mg存在時13μMであった。この結果は、Mgの有無にかかわらず受容体の約70%はG蛋白質と複合体を生成しアゴニストに高親和性を示すようになること、しかしMgの有無により親和性に50倍の差があることを示している。

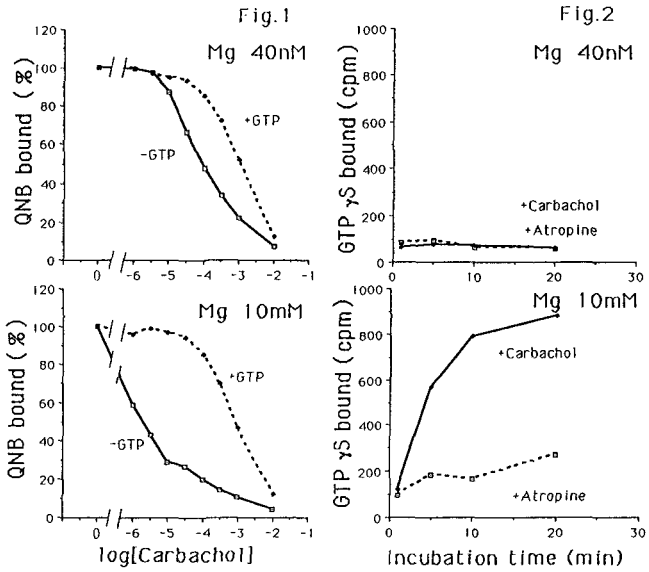
図２は、２つのMg濃度での4μMGDP存在下での[^{35}S]GTPγS結合に対するカルバコールの促進効果を示す。Mg存在時にのみカルバコールの効果か観察される。また、このカルバコールの効果はGDP存在下でのみはっきり観測される。図３は[^{35}S]GTPγS結合のGDPによる阻害曲線を示す。Mgがある時にカルバコール存在下での阻害曲線の右側へのシフトが観察された。一方、GTPによる阻害曲線はMgの有無にかかわらずカルバコール存在の影響をほとんど受けなかった（図4）。

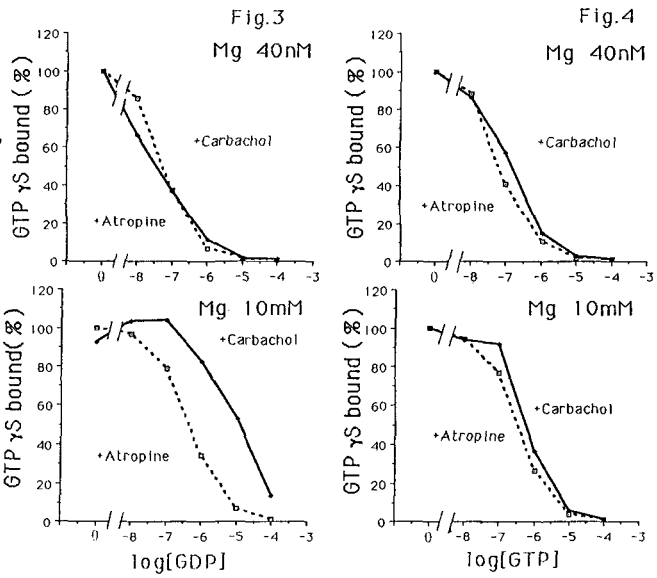
図５(B)は、100μMカルバコール存在下での[^{3}H]QNB結合に対するGTPとGDPの濃度の効果を示す。GTPまたはGDP添加によるカルバコールの高親和性から低親和性への移行を反映している（図５(A)）。効果発現に必要なGTP濃度はMgの有無によらないが、GDPの場合はMg存在下に高濃度が必要であった（図５(B)）。この結果は図３、４の結果と符合し、GDP

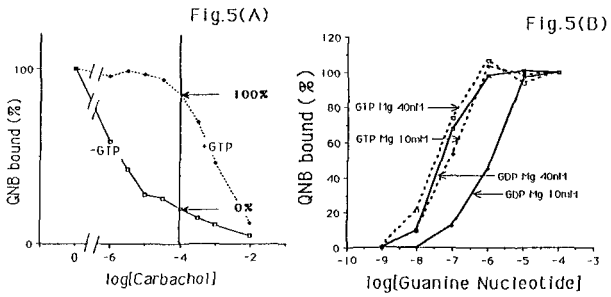
に対する親和性だけがMg存在時に特異的に減少することを示している。

［考察］：[^{3}H]QNB結合実験の結果は、ムスカリン受容体がアゴニストに対する親和性で区別される、少なくとも３種の状態をとりうることを示している。最も親和性の低いのは遊離の受容体、最も高親和性なのはMg存在時の受容体・Ｇ蛋白質複合体で、Mgない時の複合体は中間の親和性を示す。Mgない時の高親和性が受容体・Ｇ蛋白質複合体の生成を反映していることは、Ｇ蛋白質添加で見られるようになること、GTP又はGDP添加で低親和性に転換することから明らかである。しかしこの複合体生成によってはGDPに対する親和性の変化が見られなかった。すなわち、GTP感受性高親和性アゴニスト結合の存在あるいは受容体・Ｇ蛋白質複合体の存在が必ずしも受容体のＧ蛋白質への作用を意味しない例と考えられる。このような状態は、人工的な状態である可能性があると同時に、Mgを必要とする過程の前段階で止った状態を反映している可能性も考えられる。心臓の膜標品でも３種の異なる親和性の存在が報告されているが(7)、ここでの３種の状態との関係は現在不明である。

[^{35}S]GTPγS結合実験の結果は、Mg存在下でのアゴニスト・受容体・Ｇ蛋白質複合体の生成によってG_{GDP}からのGDPの遊離が促進されるか、生成されるアゴニスト・受容体・Ｇ蛋白質複合体がGDPに低親和性であるか、いずれかあるいは両方であることを示すと解釈される。いずれにせよ、この複合体は受容体のＧ蛋白質に対する作用の中間過程を反映していると考えられる。ＧＤＰに対する親和性が低下しＧＴＰに対する親和性は変化しないという結果は、ＧＤＰとＧＴＰの交換を促進するという目的に適合している。受容体のＧ蛋白質に対する作用においてMgが生理的役割を担っているのか、担っているとすればその標的が受容体なのかＧ蛋白質なのか、といった問題が今後に残されている。







［文献］：(1) Florio, V.A., & Sternweis, P.C., J. Biol. Chem., 264,3909-3915(1989). (2) Haga, K., et al, J. Biol. Chem., 261,10133-10140(1986). (3) Haga, K. et al., Mol. Pharmac., 35,286-294 (1989). (4) Haga, T., & Haga, K., Biomed. Res., 8,149-156(1987). (5) Hilf, G., et al., Eur. J. Biochem., 186, 725-731(1989). (6) Ikegaya, T., et al., J. Mol. Cell Cardiol., 22,343-351(1990). (7) Mizushima, A., et al., Eur. J. Pharm., 135,403-409(1987). (8) Nishiyama, T., et al., Biomed. Res., 10, 251-260(1989). (9) Tota et al., Biochemistry, 26,8175-8182(1987).

180 ラット大脳における百日咳毒素によるG蛋白のADP-リボシル化反応に対するリチウムの影響

小田垣雄二，小山　司，松原繁広，山下　格
（北海道大学医学部・精神医学教室）

〔要約〕
ラットの大脳皮質および海馬の膜標品を用い，百日咳毒素(pertussis toxin, IAP)によってADP-リボシル化されるGTP 結合蛋白質(G) の性質を調べ，リチウム(Li)の影響の有無についても検討した。IAP によりADP-リボシル化を受ける蛋白質はSDS-PAGEにて40-41kDaの分子量を示し，$MgCl_2$ の存在下では GTPγS またはGpp(NH)pの添加によりこの反応は完全に抑制された。2 μM の [^{32}P] NAD を基質としたIAP によるADP-リボシル化反応は37℃にて約90分で最大に達し，以後一定であった。大脳皮質，海馬とも30-60 μg/tubeの範囲では蛋白量とADP-リボシル化の程度は比例し，この範囲では定量的に用いうることが示された。60-70 μg/tubeを越えるとADP-リボシル化は逆に用量依存的に抑制された。Liは*in vitro*にて5mM の濃度まで影響を与えず，Liを長期投与したラットから得た大脳皮質および海馬における反応も対照群と差を認めなかった。

【はじめに】
Liは躁うつ病の治療薬として広く精神科臨床で用いられているが，その作用機序は現在なお不明である。われわれは，躁うつ病のモノアミン仮説に鑑み，ラットに炭酸Liを長期投与した後に認められる脳内モノアミン受容体およびadenylate cyclase (AC) 活性について検討を重ねてきた。その結果，大脳皮質のβ－アドレナリン性（β）受容体はLi長期投与によりdown-regulation を受け，β受容体に連関するAC活性も受容体の変化に相応する低下を示すのに対し，海馬の5-HT_{1A}受容体-AC 系については，受容体数は減少する(4) が5-HT_{1A}受容体を介するACの抑制には変化を認めない(3) ことが明らかとなった。これらの点をさらに詳細に検討するためには，受容体とACとの間に介在して情報伝達を調整するG蛋白について研究を進めることが不可欠と考えられる。今回は，大脳皮質および海馬膜標品を用い，IAP によるG蛋白のADP-リボシル化反応を利用し，この反応に対するLiの影響を*in vitro*および*ex vivo* にて検討した。

【対象と方法】
200-300gのSprague-Dawley系雄性ラットの大脳皮質と海馬を切り出し，1mM EDTA，2mM $MgCl_2$，10% sucroseを含む50mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)中でhomogenizeし，遠心，洗滌を繰り返して膜標品を調整した。IAP によるADP-ribosylationは，20mM isonicotinic acid hydrazide，1mM 3-acetylpyridine adenine dinucleotide，10mM thymidine，10mM dithiothreitol，1mM ATP，0.1% Triton X-100 を含む150mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 中で [^{32}P] NAD(2または10μM)と膜標品を37℃にて10分間incubateし，あらかじめ活性化したIAP(10μg/ml) を加えてさらにincubationを行った。EDTA(50mM)，$MgCl_2$(10mM) およびguanine nucleotideの添加の有無は図中に示した。反応停止後，SDS-PAGEを施行し，ゲルを乾燥後autoradiography を行った。得られたbandに一致する部位のゲルを切り出し，液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。Li投与は0.2%の炭酸Li含有飼料として３週間経口的に行った。

【結果】
10μM の [^{32}P] NAD 存在下で37℃にて30分間incubationを行った場合の結果をFig.1 に示した。SDS-PAGE上40-41 kDa の部位に認められるbandは GDPβS またはGTP によって増強された。 GTPγS およびGpp(NH)pは$MgCl_2$ 非存在下，50mM EDTA 存在下ではADP-リボシル化反応を増強したが，EDTA非存在下，10mM $MgCl_2$存在下ではこの反応は完全に抑制された。この結果より，以下の実験においては50mM EDTA，100μM GDPβS の存在下での反応を検討した。2 μM の [^{32}P] NAD の存在下でのADP-ribosylationは約90分で最大に達し，以後一定であった。蛋白量とADP-リボシル化反応

量との関係をみると，蛋白量30-60 μg/tubeの範囲では蛋白量とADP-リボシル化との間には比例関係が成り立つが，蛋白量60-70 μg/tubeでの反応をピークに，それ以上では蛋白量を増やすとADP-ribosylationは逆に抑制された(Fig.2)。直線性の得られる蛋白量の範囲でLiの影響を*in vitro*で検討したが，5mM の濃度まで有意な影響を与えなかった（データは示していない）。また，Liを長期投与したラットより得た膜標品を用いて測定したADP-リボシル化反応は対照群のそれと有意差を認めなかった(Table I)。

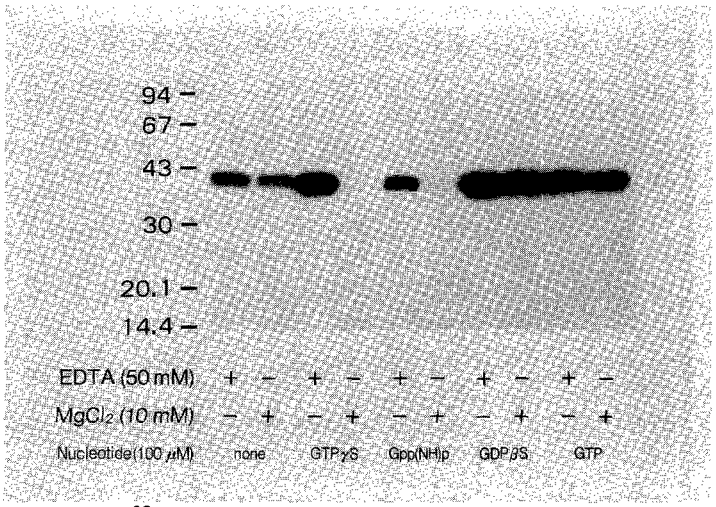


Fig.1 [^{32}P]ADP-ribosylation of rat cerebral cortical membrane proteins catalyzed by IAP on various conditions. Membranes were incubated in the presence of 50mM EDTA or 10mM $MgCl_2$ and the presence of indicated guanine nucleotide.

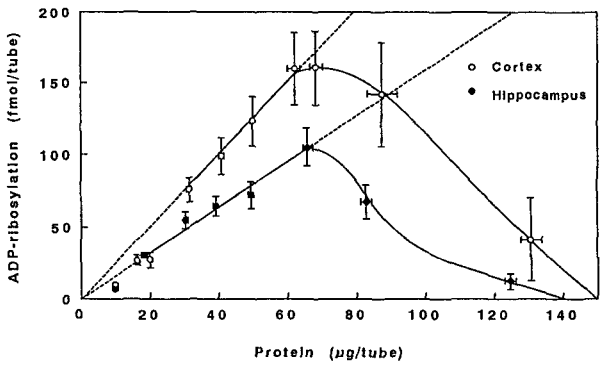


Fig.2 Relationship between the membrane proteins and the [^{32}P]ADP-ribosylation catalyzed by IAP. Each point represents mean ± SEM of 2-12 experiments.

【考察】

IAP によってADP-リボシル化反応を受ける分子量40-41kDaのbandは，50mM EDTA の存在下，非水解性のGTP アナログである GTPγS またはGpp(NH)pにより増強されたが，$MgCl_2$ の存在下ではこれらのguanine nucleotideの添加により消失し，GiおよびGoと考えられる(1)。今回用いた方法ではGiとGoを分離することは不可能であったが，限られた蛋白量の範囲では定量的に用いうることが示された(Fig.2)。この範囲の蛋白量を用いてLiの効果を*in vitro*および*ex vivo* で検討したが，いずれもGi/Go のIAP によるADP-ribosylationには影響を与えなかった(Table I)。この結果はラットの心筋細胞を用いた報告(2) とは一致しないが，それが心筋と脳との違いによるものかどうかは明らかではない。今後はより厳密なG蛋白定量法を用いての検討が望まれる。

Table I Effect of long-term lithium treatment on [^{32}P]ADP-ribosylation catalyzed by IAP in rat cerebral cortical and hippocampal membranes

	[^{32}P]ADP-ribosylation (pmol/mg prot.)	
	Cortex	Hippocampus
Control	1.84 ± 0.46 (5)	1.53 ± 0.09 (6)
Lithium-treated	1.97 ± 0.24 (5)	1.47 ± 0.12 (6)

Values are means ± SEM

【文献】

1. Katada, T., Oinuma, M., and Ui, M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 8182-8191
2. 川本日出雄，渡辺康裕，今泉太郎，三崎尚之，大柳光正，岩崎忠昭，吉田博 (1988) 神経化学 27, 28-29
3. 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 (1989) 神経化学 28, 80-81
4. Odagaki, Y., Koyama, T., Matsubara, S., Matsubara, R., and Yamashita, I., *J. Psychiat. Res.*, in press.

181

$GABA_B$受容体とG蛋白質の相互作用

ー その選択性とG蛋白質サブユニットの関与 ー

森下理香、加藤兼房、浅野富子

（愛知県コロニー・研・生化）

〔要約〕

ＧＡＢＡB受容体とＧ蛋白質との共役に選択性があるかどうか、またＧ蛋白質のどのサブユニットが選択性を決定しているかを検討した。Ｎ－エチルマレイミドで処理して内在性のＧ蛋白質を受容体と共役できなくしたウシ脳膜標品に精製Ｇ蛋白質を加えて再構成する方法を用い、再構成した膜のＧＡＢＡB受容体へのＧＡＢＡ結合量の上昇を測定し共役の指標とした。

(1) Go、Go*、G_{i1}で再構成した時のＧＡＢＡ結合はほぼ同程度に、濃度依存的に上昇し、ＧＡＢＡB受容体はこれらのＧ蛋白質と同程度に共役することを示した。

(2) G_{i2}を加えて再構成した時にはＧＡＢＡ結合はわずかしか上昇せず、共役しないことを示した。

(3) ウシ脳Ｇ蛋白質のβγサブユニットはDEAEクロマトグラフィーでγサブユニットの異なるβγ複合体に分離される。これらの異なるβγをGoとG_{i2}のαサブユニットと混合して種々の３量体を作製し、同様の再構成実験を行った。いずれのG_{i2}もＧＡＢＡ結合を上昇しなかったが、Goは上昇作用を示し、受容体-Ｇ蛋白質間の選択性にはαサブユニットが主に関与していることを示した。しかしGoの効果については各βγサブユニット間に差が見られ、βγもある程度関与していると考えられる。

ＧＡＢＡB受容体はＧ蛋白質と共役することが知られており、我々はすでにGo、G_iと共役することを報告した(1,2)。しかし最近G_iは相同性の高いG_{i1}、G_{i2}、G_{i3}の３つの分子種からなること(3)、また新たにGo*が脳に存在することが報告された(4)。そこで今回Go、Go*、G_{i1}、G_{i2}を精製し、ＧＡＢＡB受容体との共役に選択性があるかどうかを、Ｎ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）処理した膜標品を用いた再構成実験により検討した。またＧ蛋白質のどのサブユニットが選択性を決定しているかを検討するために、GoαとG_{i2}αを脳の種々のβγサブユニットと混合して作製した種々の３量体についても同様の再構成実験を行った。

［実験方法］

Ｇ蛋白質の精製：Go、G_{i1}、G_{i2}は脳および肺よりKatada(5)らの方法、Go*はGoldsmith(4)らの方法で精製した。βγサブユニットは、精製ウシ脳Ｇ蛋白質のβγサブユニットを0.3% Lubrol PX存在下でTSK-GEL DEAE-5PWクロマトグラフィーを行い、βγ-1、βγ-2およびこれらの混合物として３種類を得た(6)。Fig.1に示すようにβγ-1は36-kDa βと6-kDa γ（γ-1）、βγ-2は36/35-kDa βと4.5-kDa γ（γ-2）からなる。

再構成実験：ウシ脳の膜標品を百日咳毒素(1)やＮＥＭ(2)で処理すると、内在性のＧ蛋白質はＡＤＰ－リボシル化あるいはアルキル化され、受容体と共役することができなくなる。その結果ＧＡＢＡB受容体へのＧＡＢＡの親和性が低下する。これら処理した膜標品に精製Ｇ蛋白質を加えて再構成すると高親和性ＧＡＢＡ結合が回復する。この時のＧＡＢＡ結合量の上昇を測定することによりＧＡＢＡB受容体-Ｇ蛋白質間の共役の指標とすることができる。今回既報の方法(2)に従い、ＮＥＭ処理膜標品に種々の濃度の精製Ｇ蛋白質を加え再構成しＧＡＢＡ結合量を測定した。ＧＡＢＡ結合量の測定は、10 nM［^{3}H］ＧＡＢＡをリガンドとし、反応は25℃、10分間行った。非特異的結合測定には100 μM バクロフェンを加え、バクロフェンで置換する結合をＧＡＢＡB受容体結合とした。

［結果および考察］

ＮＥＭ処理したウシ脳膜標品を各精製Ｇ蛋白質で再構成した時のＧＡＢＡB受容体結合の変化をFig.2に示した。Go、Go*、G_{i1}を加えた時ＧＡＢＡ結合はほぼ同程度に、濃度依存的に上昇した。これら３種類のＧ蛋白質はＧＡＢＡB受容体と同じ効率で共役していると考えられる。 一方、脳および肺より精製したG_{i2}ではいずれもＧＡＢＡ結合の上昇はわずかであった。２種類のG_{i2}を比較した時、脳G_{i2}は肺G_{i2}よりＧＡＢＡ結合の上昇にやや効果的であった。しかし脳G_{i2}には約10%のGoの混在が認められたので、脳と肺G_{i2}の差はこの混在するGoによるものと考えられる。 肺G_{i2}を500 pmol/mlで再構成した時のＧＡＢＡ結合量はGo、Go*、G_{i1}を15 pmol/mlで再構成した時とほぼ同じであり、ＧＡＢＡB受容体との共役に約30倍の差が見られた。

各精製Ｇ蛋白質はSDS-PAGE上、αのみならずβγサブユニットにも差が見られたので、今回認められた受容体との選択性はどのサブユニットによって決定されているのかを次に検討した。脳βγサブユニットより分離したβγ-1、βγ-2およびその混合物と、GoおよびG_{i2}のαサブユニットをそれぞれの組合せで、等モルに混合し種

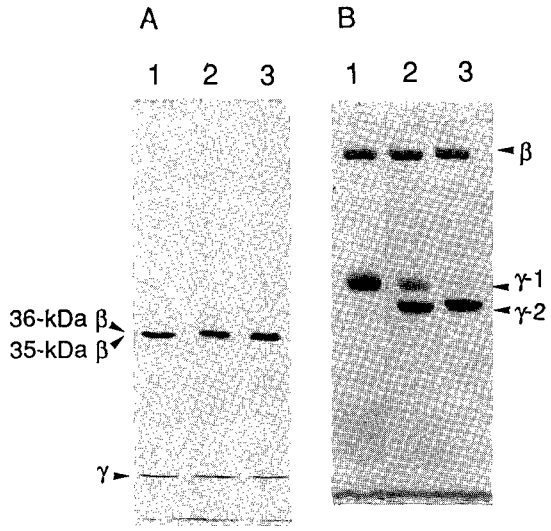


Fig. 1. SDS-PAGE (A) and urea/SDS-PAGE (B) patterns of βγ-1, βγ-2 and their mixtures. lane 1; βγ-1, lane 2; a mixture of βγ-1 and βγ-2, lane 3; βγ-2

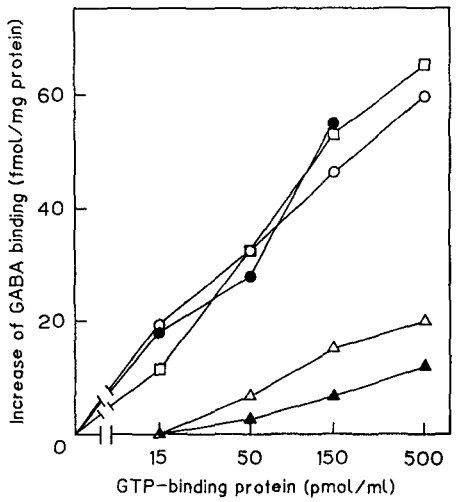


Fig. 2. Effect of purified G proteins on [^{3}H]GABA binding to NEM-treated membranes. G_o (○), G_o^* (●), G_{i1} (□), brain G_{i2} (△), lung G_{i2} (▲)

々の3量体を作製した。これらのGo、G_{i2}でNEM処理した脳膜標品を再構成した時の結果をTable 1に示した。いずれのG_{i2}もGABA結合の上昇に効果を示さなかったが、Goはいずれのβγでも上昇作用を示し、αサブユニットが選択性に重要であることを示した。しかしGoの場合、βγ-1との複合体はβγ-2との複合体に比べ効果が弱くβγの種類も共役に影響を与えていることが判明した。

今回の結果よりGABA$_B$受容体はGo、Go*、G_{i1}と共役するがG_{i2}とはほとんど共役しないことが明らかとなった。我々はこれまでにGoとG_{i2}の分布や発育に伴う濃度変化などの対照的な結果(7,8)より、Goは神経機能に、G_{i2}は各細胞に共通な機能に関与している可能性を示唆した。これはGABA$_B$受容体がGoと共役し、G_{i2}とは共役しないという今回の結果と一致するものである。

Table 1. Increase of GABA binding to NEM-treated membranes by G_o or G_{i2} composed of different βγ complexes

Addition	Increase of GABA binding (fmol/mg protein)	
	$G_o\alpha$	$G_{i2}\alpha$
none	5.2	0.0
βγ-1	14.1	0.0
βγ-2	41.6	0.6
βγ-1/2[a]	46.8	0.5

[a] A mixture of βγ-1 and βγ-2.

[文献]

(1) Asano, T., Ui, M., and Ogasawara, N. (1985) J. Biol. Chem. 260, 12653-12658.
(2) Asano, T., and Ogasawara, N. (1986) Mol. Pharmacol. 29, 244-249.
(3) Neer, E.J., and Clapham, D.E. (1988) Nature, 333, 129-134.
(4) Goldsmith, P., Backlund, P.S.Jr., Rossiter, K., Carter, A., Milligan, G., Unson, C.G., and Spiegel, A. (1988) Biochemistry 27, 7085-7090.
(5) Katada, T., Oinuma, M., Kusakabe, K., and Ui, M. (1987) FEBS Lett. 213, 353-358.
(6) Asano, T., Morishita, R., Kobayashi, T., and Kato, K. (1990) FEBS Lett. 266, 41-44.
(7) Asano, T., Semba, R., Kamiya, N., Ogasawara, N., and Kato, K. (1988) J. Neurochem. 50, 1164-1169.
(8) Asano, T., Morishita, R., Semba, R., Itoh, H., Kaziro, Y., and Kato, K. (1989) Biochemistry 28, 4749-4754.

182 G蛋白質G_{i1}のイムノアッセイ法とその脳内分布

浅野富子、篠原春夫、森下理香、加藤兼房
(愛知県コロニー・研・生化)

〔要約〕

ウシ肺より精製したＧＴＰ結合蛋白質G_{i1}のαサブユニット（$G_{i1}\alpha$）と、$G_{i1}\alpha$のアミノ酸配列に一致した合成ペプチドに対する２種類の抗体を作成した。前者すなわち$G_{i1}\alpha$蛋白質に対する精製抗体は$G_{i1}\alpha$および$G_{i3}\alpha$と反応し、$G_{i2}\alpha$や$G_o\alpha$とは反応しなかった。後者すなわち$G_{i1}\alpha$ペプチドに対する精製抗体は$G_{i1}\alpha$とのみ反応し、$G_{i2}\alpha$、$G_{i3}\alpha$、$G_o\alpha$とは交叉しなかった。そこでこの２種類の抗体を用いたサンドイッチエンザイムイムノアッセイ系を作成した。測定系は$G_{i1}\alpha$と反応し、$G_{i2}\alpha$、$G_o\alpha$、$\beta\gamma$サブユニットとは交叉しなかった。G_{i1}の最小検出限度は25 fmolであった。ラット神経系各部位の組織をコール酸で可溶化し、G_{i1}の濃度をイムノアッセイ法で測定した。G_{i1}はすべての部位に存在し、嗅球で最も高く、脊髄で最も低かった。抗$G_{i1}\alpha$蛋白質抗体を用いて免疫組織化学的に検討すると、G_{i1}は嗅球や小脳の分子層など樹状突起の多い部位に多く存在していた。

G蛋白質は細胞膜受容体と共役して細胞外からの情報を細胞内へ伝達すると考えられている。G蛋白質のなかでもG_iとG_oは相同性が高く、それぞれの識別には免疫学的方法が最も有効な手段である。したがって、粗標品におけるそれらの定量もイムノブロットまたはイムノアッセイ法以外には方法がない。我々は、すでに$G_o\alpha$、$G_{i2}\alpha$、$\beta\gamma$のエンザイムイムノアッセイ（ＥＩＡ）法を作成し(1-3)、これらG蛋白質の分布を明らかにした。今回は$G_{i1}\alpha$の抗体およびそれを用いたイムノアッセイ系を作成し、G_{i1}の分布について検討したので報告する。

［実験方法］

抗体作成：　ウシ肺より精製した$G_{i1}\alpha$（$G_{i3}\alpha$を少し含む）でウサギを免疫し抗血清を得、精製ウシ脳G_{i1}結合セファロースカラムで精製した（抗$G_{i1}\alpha$蛋白質抗体）。$G_{i1}\alpha$のアミノ酸配列(159-168)に一致した合成ペプチドをヘモシアニンに結合し(4)、同様にウサギを免疫し、精製抗体を作成した（抗$G_{i1}\alpha$ペプチド抗体）。

ＥＩＡ系の作成：　抗$G_{i1}\alpha$蛋白質抗体$F(ab')_2$をポリスチレン球に結合させた固相と、抗$G_{i1}\alpha$ペプチド抗体Fab'-ガラクトシダーゼ複合体は既報の方法にて調製した(1)。

組織抽出液の調製およびＥＩＡ：　Wistar系ラット脳の各部位の組織を20 mM Tris-HCl (pH 7.5)/1 mM EDTA/5 mM β-メルカプトエタノール/2% コール酸ナトリウムでホモジナイズし、ついで超音波処理した。ホモジネートを100,000 x g, １時間遠心して得られた上清中の$G_{i1}\alpha$をＥＩＡで測定した。ＥＩＡは$G_o\alpha$の場合と同様に行った(1)。

免疫組織化学的検索：　ラットをSchmechelの固定液(5)で固定し、パラフィン包埋した。厚さ５μmの切片を作成し、抗$G_{i1}\alpha$蛋白質抗体を用いた酵素抗体間接法で染色した。

［結果］

精製抗体の特異性をイムノブロットで検討すると、抗$G_{i1}\alpha$蛋白質抗体は、$G_{i1}\alpha$および$G_{i3}\alpha$両者と反応し、他のG蛋白質とは反応しなかった。一方、抗$G_{i1}\alpha$ペプチド抗体は$G_{i1}\alpha$とのみ反応し、$G_{i3}\alpha$をはじめ他のG蛋白質とは交叉しなかった。両抗体より成る$G_{i1}\alpha$のサンドイッチＥＩＡ系の検量線と$G_{i2}\alpha$、$G_o\alpha$、$\beta\gamma$との交叉性を図１に示した。測定系は$G_{i1}\alpha$に特異的で$G_{i2}\alpha$、$G_o\alpha$、$\beta\gamma$とは交叉しなかった。$G_{i1}\alpha$は$\beta\gamma$の存在下でもほぼ同程度の反応性を示した。最小検出限度は25 fmolであった。この方法を用いて、ラット神経系の各部位におけるG_{i1}の濃度を測定した結果を、G_{i2}、G_oの値と共に表１に示した。G_{i1}は嗅球で最も高く、脊髄で最も低かった。抗$G_{i1}\alpha$蛋白質抗体を用いて$G_{i1}\alpha$の局在を免疫組織化学的に検討すると、いずれの部位も細胞体は染まらず、neuropilがよく染色された。特に嗅球や小脳の分子層、大脳皮質、海馬の多形細胞層や放射線維層が強く染色された。

［考察］

精製$G_{i1}\alpha$蛋白質に対する抗体は精製、吸収などを行ってももG_{i1}、G_{i3}両者と反応し、両者間の非常に高い相

同性を考えると、おそらく共通抗体と思われる。一方、$G_{i1}\alpha$ペプチド抗体はすでに報告されているように(4)、$G_{i1}\alpha$とのみ反応し、$G_{i3}\alpha$とは交叉しなかった。両抗体を用いたＥＩＡ系はG_{i1}と反応するが、G_{i3}についてはnativeな、純度の高いG_{i3}が得られていないので検討できなかった。しかし、脳内にはG_{i3}は抗体で検出できるほど存在しないと報告されているので(6)、今回ＥＩＡで得られた値はほとんどG_{i1}の濃度を反映していると考えられる。G_{i1}の脳内分布は嗅球で最も高かったが、これは今までにわかっているG_oやG_{i2}の分布(1,3)とは異なるものであった。他の部位ではほぼ$G_o\alpha$に似た分布を示した。免疫組織化学的検索に抗$G_{i1}\alpha$ペプチド抗体を用いたところ、よく染色できなかったので、抗$G_{i1}\alpha$蛋白質抗体を用いて行った。免疫組織化学的検索では、$G_{i1}\alpha$は樹状突起の多い部位に多く存在し、$G_o\alpha$と類似していた(1)。

［文献］

(1) Asano, T., Semba, R., Ogasawara, N. and Kato, K. (1987) J. Neurochem. 48, 1517-1623

(2) Asano, T., Kamiya, N., Morishita, R. and Kato, K. (1988) J. Biochem. 103, 950-953

(3) Asano, T., Morishita, R., Semba, R., Itoh, H., Kaziro, Y. and Kato, K. (1989) Biochemistry 28, 4749-4754

(4) Goldsmith, P., Gierschik, P., Milligan, G., Unson, C. G., Vinitsky, R., Malech, H. L. and Spiegel, A. M. (1987) J. Biol. Chem. 262, 14683-14688

(5) Schmechel, D. E., Brightman, M. W. and Marangos, P. J. (1980) Brain Res. 190, 195-214

(6) Goldsmith, P., Backlund, P. S., Jr., Rossiter, K., Carter, A., Milligan, G., Unson, C. G. and Spiegel, A. (1988) Biochemistry 27, 7085-7090

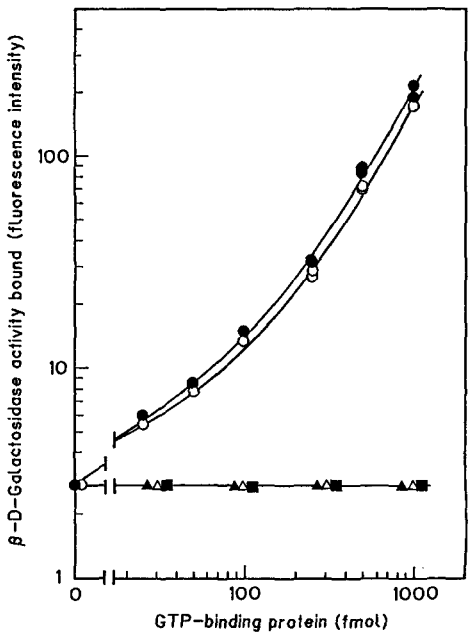


図１．$G_{i1}\alpha$の検量線と他のG蛋白質との交叉性
●；$G_{i1}\alpha$、○；G_{i1}、▲；$G_{i2}\alpha$、△；$G_o\alpha$、■；$\beta\gamma$

表１．ラット神経系におけるG_{i1}，G_{i2}、G_oの分布

Region	G_{i1}	G_{i2}	G_o
	(pmol/mg protein)		
Olfactory bulb	35.6 ± 2.2	7.39 ± 1.4	83.6 ± 10.4
Cerebral cortex	30.1 ± 2.6	5.81 ± 0.93	95.1 ± 7.2
Hippocampus	27.5 ± 2.4	6.40 ± 1.24	75.9 ± 6.0
Striatum	25.4 ± 1.6	6.57 ± 0.67	90.6 ± 16.4
Cerebellum	25.1 ± 1.8	5.04 ± 1.36	60.3 ± 9.3
Mid brain	23.7 ± 3.3	5.46 ± 0.69	55.3 ± 13.8
Hypothalamus	22.7 ± 3.5	10.1 ± 1.4	69.8 ± 4.5
Brain stem	20.2 ± 1.6	4.72 ± 0.67	28.2 ± 6.3
Spinal cord	16.5 ± 0.9	4.17 ± 0.3	27.7 ± 2.6

Data are mean ± SD values from five rats.

183 温度－感受性高親和性 [³H] Tryptamine結合部位：GTP結合蛋白質との相互作用について

斎藤道子，木村光利，武市正美，石谷良一
〈城西大・薬・薬理〉

〔要約〕
本実験では、百日咳毒素（PT）及びコレラ毒素（CT）をラット側脳室内に注入4日後の各大脳皮質シナプス膜を試料とし、温度－感受性高親和性 [³H]tryptamine 結合部位とGTP結合蛋白質との相互作用について検討した。得られた結果をまとめると、対照群とCT処理群間では共に上記 [³H]tryptamine 結合能は GTPγS 100 μM の存在下で 40 % 抑制されたが、PT処理群では GTPγS 非存在下でも同結合能の低下が認められた。Displacement 実験からは、対照群及びCT処理群での competition curve は共に [High] と [Low] の2種類の結合部位の存在を示す shallow curves（Hill 係数 = 0.61）を呈し、GTPγS 存在下では [Low]－親和性部位のみの steepness（Hill 係数 = 0.94）の様相を呈した。然るに、PT処理群では GTPγS の存否に拘らず steep curves を呈した。以上の結果依り、温度－感受性高親和性 [³H]tryptamine 結合部位はGTP結合蛋白質（Gi）と連関している事が明らかとなった。

Tryptamine は中枢神経組織に存在するトレースアミンの一つであり、近年神経刺激伝達物質としての可能性が報告されており（2）、更には同受容体の存在（1）も示唆されているが、その神経伝達機構に関しては未だ不明である。我々も温度－感受性高親和性 [³H]tryptamine 結合部位の特異的識別法を開発し（3）、同結合部位の受容体としての特性を分子構築面から検討して来た（4，5）。本実験では、上記高親和性 [³H]tryptamine 結合部位の受容体としての更なる可能性を生理機能面より明らかにすべく、情報伝達系との連関機構をGTP結合蛋白質との相互作用から検討した。

［実験材料及び方法］

体重 150～200 g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを pentobarbital 麻酔下、脳固定器にて固定した。PT、CT及び対照群としてBSA、それぞれ 3 μg/3 μl saline を側脳室内注入した。投与4日目に、大脳皮質を摘出し 0.32 M sucrose にて 10 % homogenate を作製後、不連続ショ糖密度勾配遠心法にてシナプス膜分画を得た。同膜成分は最終的に 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 に懸濁し、液体窒素下急速凍結させ -75°C で保存した。凍結膜試料を急速解凍後、膜懸濁液（2 mg protein/ml）を 37°C 55 分間 preincubate（up-regulation 操作）した。Preincubation 後の膜分画を standard assay medium（5.7 mM ascorbate, 10 μM pargyline in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4）に懸濁（mg protein/ml）し、radioreceptor-結合実験に供した。上記試料（0.3～0.5 ml）を用いて、各種条件下で一定濃度の [³H]tryptamine と 0°C 60 分間 incubate した後、rapid-filtration 法にて特異的 [³H]ligand 結合量を計測した。

［結果及び考察］

温度－感受性高親和性 [³H]tryptamine 結合部位とGTP結合蛋白質との連関の可能性を、同結合部位の agonist 結合能に対するGTP効果の発現面から検討した。その結果を Table 1 に示したが、[³H]tryptamine 結合は 100 μM GTPγS の存在下で 40 % 抑制される事、及び同効果は ATPγS では発現しない事が判明した。GTP結合蛋白質には種種の subtypes が存在するが、その内PTは抑制性のGiを、CTは興奮性のGsをそれぞれ ADP-ribosylation する事が報告されている（6）。本実験ではPT、CTで前処理後の膜試料にて、同 [³H]tryptamine 結合能に対する GTPγS の抑制効果を検討した所、CT処理群と対照群間では同効果に何らの差異も認められなかったが、PT処理群では GTPγS 非存在下でも [³H]tryptamine 結合能の低下が認められ、GTPγS は見掛け上それを増大させた。更に、上記機構をより詳細に検討すべく、displacement 実験を行った（Fig. 1）。対照群及びCT処理群の両者では、それぞれの

[^{3}H]tryptamine 結合の competition curve は [High] と [Low] の結合部位の存在を示唆する shallow curves (Hill 係数 = 0.61) を呈したが、GTPγS 存在下では [Low]－親和性結合部位のみの steepness (Hill 係数 = 0.94) の様相を呈した。然るに、ＰＴ処理群では GTPγS に依る有意の抑制効果は認められず、GTPγS 非存在及び存在下それぞれ Hill 係数 0.86 と 0.93 の steep curve を呈した。(Scatchard 解析からも同様の事が指摘された。) 以上の結果依り、温度－感受性高親和性 [^{3}H]tryptamine 結合部位はＧＴＰ結合蛋白質 (即ち、Ｇｉ) と連関している事が明らかとなった。尚、本シリーズの最終目標である、tryptamine 受容体と細胞内情報伝達系との相関関係をイノシトール燐脂質応答との知見からも言及したい。

Table 1. Effect of nucleotides on [^{3}H]tryptamine binding to cerebral cortical synaptic membranes prepared from rats pretreated with PT, CT or vehicle

Pretreatment	[^{3}H]Tryptamine bound (%)		
		+GTPγS	+ATPγS
Vehicle	100.0 ± 2.1	60.3 ± 1.9*	93.9 ± 1.6
PT	68.8 ± 1.5*	54.7 ± 1.6*	66.4 ± 1.5*
CT	100.6 ± 2.4	59.8 ± 1.1*	93.1 ± 1.9

Specific binding was measured with 12 nM [^{3}H]tryptamine. Nucleotides were added at 100 μM final concentration. The data are expressed as a percent of the control value (mean ± S.E.M. of 4 experiments). Significantly different from the control value at *P < 0.01.

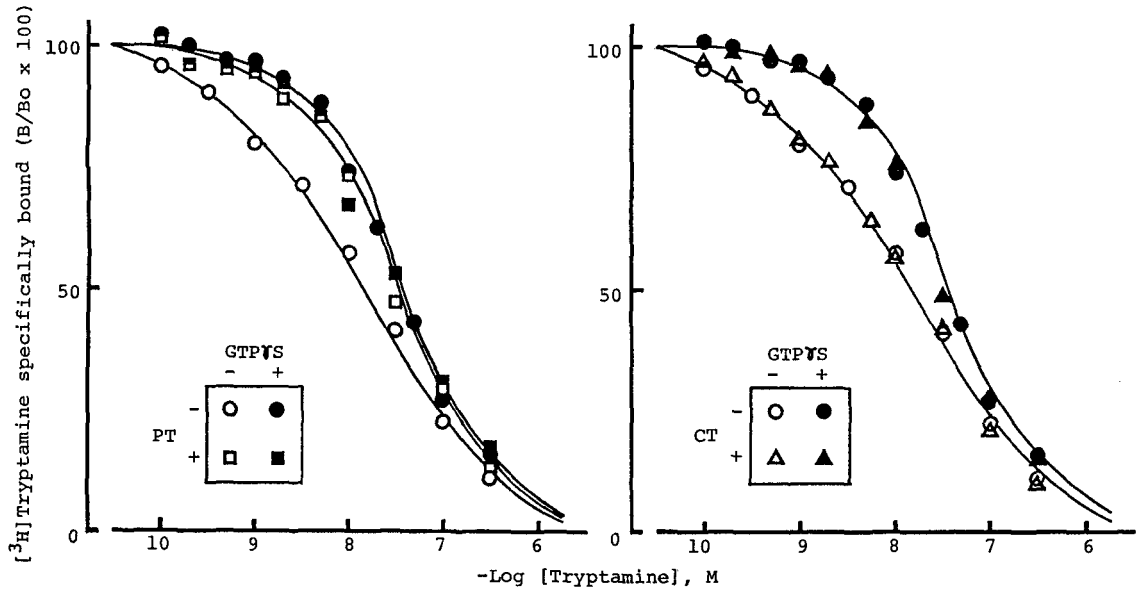


Fig. 1. Effect of PT and CT on high affinity, guanine nucleotide-sensitive agonist binding. Membrane preparations were incubated with 12 nM [^{3}H]tryptamine and the indicated concentrations of unlabelled tryptamine in the absence or presence of 100 μM GTPγS.

[参考文献]

1) Cascio, C.S. and Kellar, K.J. (1983) Europ. J. Pharmacol. 95, 31-39

2) Jones, R.S.G. (1982) Prog. Neurobiol. 19, 117-139

3) Karasawa, A., Serikyaku, S. and Ishitani, R. (1986) Life Sciences 38, 1331-1337

4) Serikyaku, S. and Ishitani, R. (1988) Life Sciences 42, 207-214

5) Serikyaku, S., Saito, M. and Ishitani, R. (1990) Japan. J. Pharmacol. 52, 51-57

6) Ui, M. (1984) Trends Pharmacol. Sci. 5, 277-279

184 開口放出の分子機構におけるＧＴＰ結合蛋白質の関与

今泉美佳・河江信幸・村松　俊・熊倉鴻之助
（上智大学・生命研・神経化学）

〔要約〕
開口放出の分子機構へのＧＴＰ結合蛋白質（Ｇ蛋白質）の関与を明確にする目的で、leaky細胞にした初代培養副腎髄質クロマフィン細胞からのカテコールアミン（CA）放出に及ぼす百日咳毒素（IAP）とGTP-γ-Sの作用を検討した。ジギトニン処理により調製したleakyクロマフィン細胞における Ca^{2+} 依存性CA放出を調べると、IAP前処理した細胞では放出が増大しており、Ca^{2+}濃度に対する依存曲線の解析よりこの増大はCa^{2+}の未知の標的分子のCa^{2+}に対する親和性の増大によることが示唆された。また、leaky細胞をGTP-γ-Sで処理すると Ca^{2+}親和性の低下によるCA放出抑制が引き起こされた。一方、GTP-γ-Sはそれ自体 Ca^{2+}非存在下でleaky細胞から用量依存性にCA放出をもたらし、その作用はIAP前処理によって阻害された。これらの結果から副腎髄質クロマフィン細胞では開口放出の分子機構においてIAP感受性Ｇ蛋白質が抑制的及び促進的の異なる二つの様式で関与することが示唆された。

様々な分泌細胞において、開口放出の分子機構にＧ蛋白質の関与が示唆されてきている[1,2]。牛副腎髄質クロマフィン細胞ではIAPによって特異的にADPリボシル化される39,40,41KDaのＧ蛋白質の存在が報告されており[7]、開口放出にこのＧ蛋白質が何らかの役割を担っていることが推測されているが、不明点が多い[4]。昨年より我々はクロマフィン細胞開口放出に及ぼすIAPの作用の研究を進めており、IAPによりCA放出が増大することを見い出し、この増大は細胞内においてCa^{2+}のefficacyが高められた結果によるものであることを示唆した[3,6]。今回我々は開口放出の分子機構へのIAP感受性Ｇ蛋白質の関与をより明確にする目的でleaky細胞にした副腎髄質クロマフィン細胞からのCA放出に及ぼすIAPとGTP-γ-Sの作用を検討した。

［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。leaky細胞の調製及びleaky細胞からのCA放出の測定には、まず培養細胞を Ca^{2+}-free Locke's液で洗浄後、ジギトニン buffer (10 μM digitonin, 140 mM Na-glutamate, 20 mM PIPES, 5 mM glucose, 5 mM EGTA, pH 6.8)に置き換え、37℃、10 分間incubationして leaky細胞を調製した。次にCa-EGTA buffer (140 mM Na-glutamate, 20 mM PIPES, 5 mM glucose, 5 mM $MgSO_4$, 5 mM ATP, 5 mM EGTA 及び各濃度の$CaCl_2$, pH 6.8)に置き換え、任意の遊離Ca^{2+}濃度存在下で10分間放出刺激を行なった。Ca-EGTA buffer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[5]。なお、IAP前処理は予め100 ng/ml IAP（科研）を培養液中に加えて20時間IAP処理を行なった。

［結果および考察］　ジギトニン処理により調製したleakyクロマフィン細胞においてCa^{2+}によって引き起こされるCA放出を調べると、予めIAP前処理した細胞では放出が増大した。また、leaky細胞をGTPの非水解性アナログであるGTP-γ-Sで処理した場合、Ca^{2+}依存性CA放出が逆に減少する結果となった。この作用の分子機構を検討するために、leaky細胞でのCA放出のCa^{2+}依存曲線を調べ、このCa^{2+}依存曲線に及ぼすIAP及びGTP-γ-Sの作用を検討したものが図１である。IAP前処理細胞では、CA放出のCa^{2+}依存曲線が全体的に大きく左にシフトする結果となり、反対にGTP-γ-S処理の場合は右へシフトする結果となった。さらにこれらCa^{2+}依存曲線の逆プロットによる解析を行った結果、最大応答であ

るVmax値は両処理ともcontrolと同じ値を示したが、開口放出を引き起こす Ca^{2+}の half-maximal concentration (Km) はIAP処理により6.2μMから1.6μMに大きく減少し、GTP-γ-S処理では38μMに増加した。従ってIAP処理によるleaky細胞からのCa^{2+}依存性CA放出の増大は、開口放出のCa^{2+}親和性の増大によること、また、GTP-γ-S処理でのCA放出抑制は開口放出のCa^{2+}親和性の低下によることが示唆された。これらの結果より、IAP感受性G蛋白質(Griと呼ぶ)がCa^{2+}依存性開口放出の分子機構に関与し、標的分子である未知のCa^{2+}受容分子のCa^{2+}に対する親和性を低下させる方向に調節している可能性が推察された(図5)。

一方、GTP-γ-Sは、それ自体 Ca^{2+}非存在下でleaky細胞から用量依存性にCA放出をもたらし(図3)、その作用はIAP前処理によって阻害された(図4)。このことから、開口放出機構のCa^{2+}非依存性部分に別のIAP感受性G蛋白質(Grsと呼ぶ)が直接共役している可能性が推察される(図5)。これらの結果から副腎髄質クロマフィン細胞では開口放出の分子機構においてIAP感受性G蛋白質が抑制的及び促進的の異なる二つの様式で関与することが示唆された。

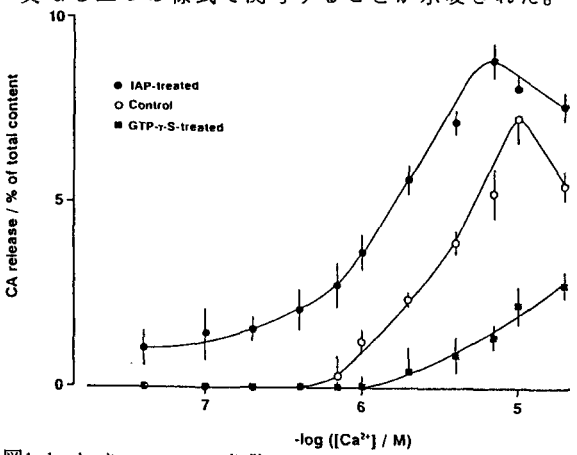


図1. leakyクロマフィン細胞でのCA放出のCa^{2+}依存曲線に及ぼすIAPとGTP-γ-Sの作用 (IAP: 100 ng/ml for 20h, GTP-γ-S: 100 μM)

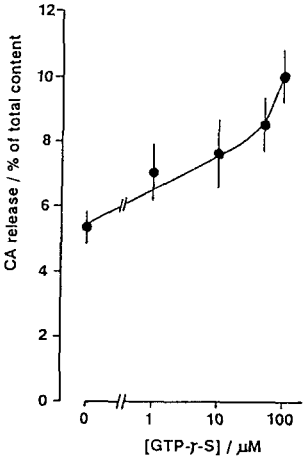


図3. Ca^{2+}非存在下でのGTP-γ-SによるCA放出

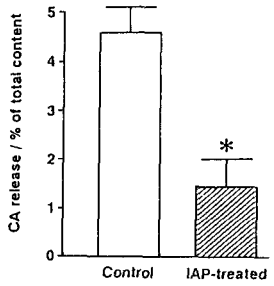


図4. Ca^{2+}非存在下でのGTP-γ-SによるCA放出に及ぼすIAPの効果 (IAP:100 ng/ml for 20h GTP-γ-S: 100 μM)

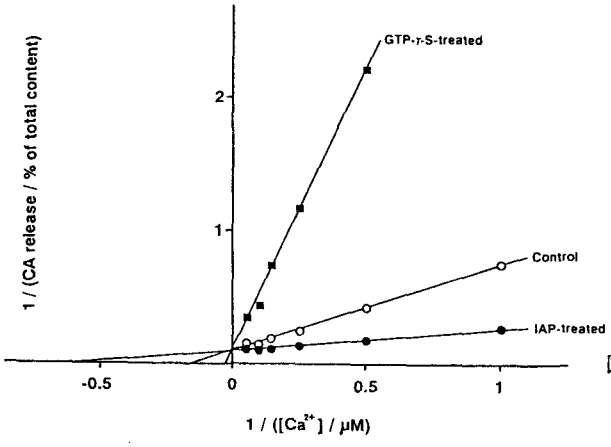


図2. IAPとGTP-γ-Sによる開口放出のCa^{2+}親和性の変化:図1の逆プロット (IAP: 100 ng/ml for 20h, GTP-γ-S: 100 μM)

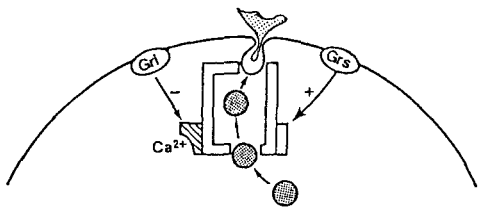


図5. 開口放出の分子機構における抑制的、促進的IAP感受性G蛋白質の関与

[文献]

1. Barrowman, M.M., Cockcroft, S., and Gomperts, B.D. (1986) Nature 319, 504-507
2. Cockcroft, S., Howell, T.W., Gomperts, B.D. (1987) J. Cell. Biol. 105, 2745-2750
3. 今泉美佳, 河江信幸, 武田京子, 熊倉鴻之助 (1989) 神経化学 28, 328-329
4. Knight, D.E., von Grafenstein, H., and Athayde, C.M. (1989) Trends Neurosci. 12, 451-458
5. Kumakura, K., Ohara, M., Sato, G.P. (1986) J. Neurochem. 46, 1851-1858
6. Ohara-Imaizumi, M., Takeda, K., Kawae, K., and Kumakura, K. (1990) Neurosci. Lett. 110, 167-171
7. Toutant, M., Aunis, D., Bockaert, J. Homburger, V., and Rouot, B. (1987) FEBS Lett. 215, 339-344

185 ウシ脳コート小胞で見られる^{3}H－ＧＴＰ結合ｓｉｔｅ

諸井佳代子、久我哲郎、門田健＊
（千葉大学医・高次研・高次神経、＊東京都精神研・神経化学）

〔要約〕
ウシ大脳皮質より分離したコート小胞画分におけるＧＴＰ結合蛋白質の存在を明らかにするため［^{3}H］guanosine 5'-triphosphate(［^{3}H］GTP)結合siteについて検討を加えた。(1)［^{3}H］ＧＴＰはコート小胞に高い親和性をもって結合し、その結合は飽和性であり可逆的であった。(2)この結合は1μMの非標識GTP、guanosine diphosphate (GDP)、guanosine 5'-(3-O-thio)triphosphate (GTPγS)、guanosine 5'-(β,γ-imino)triphosphate (Gpp(NH)p) によって完全に置換された。(3)［^{32}P］8-azido-GTPによるphotoaffinity labelingでは150K-180KDa、92K-100KDa、50K-57KDaの蛋白bandが強く標識され、さらに40K-45KDa, 31K-36KDaのbandも標識された。(4)百日咳毒素(IAP) により分子量39K-41KDaのbandがＡＤＰ－ribosylationされた。これらの結果は、コート小胞内にはＧＴＰ結合蛋白質のＧｉ(o)αが存在すること、さらに構成蛋白のクラスリン（重鎖、軽鎖）および54KDaの蛋白（チューブリン？）がＧＴＰと結合することを示した。

コート小胞は細胞内小器官の一つであり形質膜からのendocytosisやゴルジ体膜からの芽出によって形成される。その機能として、分泌蛋白や酵素等の運搬や、形質膜表面上の受容体に結合した血清中の巨大分子ートランスフェリンやインスリン、神経成長因子、などを細胞内にとりこむことが報告されている(1)。神経伝達物質の受容体の形質膜への運搬や、形質膜からの取り込みに関与しているであろうことも示唆されており、すでにα、およびβアドレナリン受容体やムスカリニックアセチルコリン受容体の存在がコート小胞に示されている(2、3、4)。今回我々は、これらの受容体の調節にあずかるＧＴＰ結合蛋白質がコート小胞に存在しているかどうかを明らかにするため、本小胞の［^{3}H］ＧＴＰの結合siteについて検討を加えた。

［実験方法］

コート小胞の分離：ウシ大脳皮質から、Pearseら(5)の方法を改変して、30%-50%の連続庶糖密度勾配遠心にてコート小胞を精製した。より均一な小胞が必要な場合は再度5-30%の連続庶糖密度勾配遠心を行った。コート小胞の純度は電子顕微鏡にてしらべ、蛋白量はLowry法にて測定した。

結合実験：30-100μg蛋白量のコート小胞標品を［^{3}H］ＧＴＰ(0.5-100nM)と0°Ｃ，３０分インキュベートし、反応液をWhatmann GF/B濾紙にて吸引濾過することで反応を停止した。非特異的結合は100μMの非標識ＧＴＰ存在下の結合とした。K_d値およびB_{max}値は飽和実験のデータより計算した。

Photoaffinity labeling：Northup らの方法(6)に従い30ー70μgのコート小胞を２μM［^{32}Ｐ］8-azido ＧＴＰと0°Ｃ、３０分インキュベートした。最後の１０分間254nmのＵＶランプで紫外線照射を行った。10%ＴＣＡで反応を停止後、沈査はＳＤＳを含む緩衝液で溶解変性、ＳＤＳ－ポリアクリルアミド電気泳動を行い、次いでオートラジオグフィーを行った。

ＩＡＰによるＡＤＰ－ribosylation：Bokochらの方法(7)にしたがい30-70μgのコート小胞を25ug/mlのＩＡＰ、１μM［^{32}Ｐ］ＮＡＤ存在下１時間インキュベートした。反応後上記と同様電気泳動しオートラジオグラフィーを行った。

［実験結果］

コート小胞［^{3}H］ＧＴＰと特異的に結合した。この結合が飽和に達する時間は0°Ｃ，２０－３０分であった。図１に飽和実験の結果を示した。見かけ上のK_d値とB_{max}値はそれぞれ１．９nM、３．４pmole／mg蛋白と計算された。コート小胞を０．５Mトリス塩酸緩衝液(pH,8.0) で処理することで得られるコート画分でも［^{3}Ｈ］ＧＴＰ結合が見られた。この［^{3}H］ＧＴＰ結合は１μMの非標識ＧＴＰ、ＧＤＰ、ＧＴＰγＳおよびGpp(NH)pによりほぼ完全に置換された（図２）。

$MgCl_2$による結合の増加は見られなかった。[^{32}P] 8-azido-GTPによるphotoaffinity labelingとADP-ribosylationの結果を図3に示した。

Fig. 1. Saturation curve of ^{3}H-GTP binding to the coated vesicles

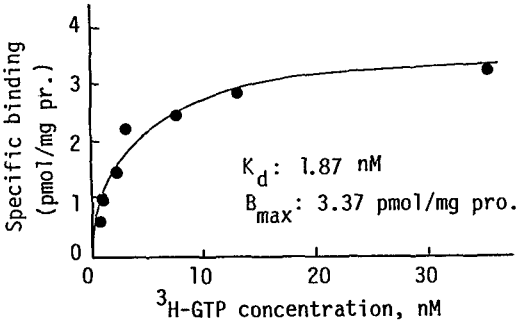


Fig. 2. Displacement of ^{3}H-GTP binding by several GTP analogues

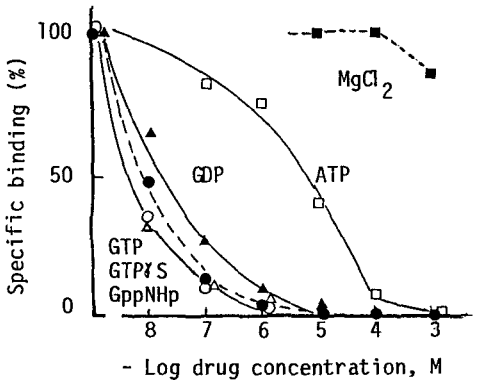
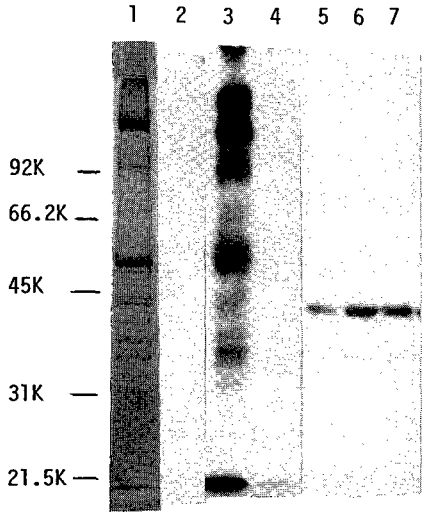


Fig. 3. Photoaffinity labeling of coated vesicles (CV) with 8-azido 32P-GTP and ADP-ribosylation by IAP



Line 1, Coomassie blue stain of CV; line 2, CV plus 8-azido GTP with no UV exposure; line 3, CV plus 8-azido GTP with UV exposure; line 4, in the presence of 1mM GTP S; line 5, CV plus 25ug/ml of IAP; line 6, in the presence of 100μM GTP; line 7, in the presence of 1 mM ATP

150K-180K, 92K-105K、50K-58KDaのbandが強く標識され、40K-45K, 31K-36KDaのbandも標識された。これらのbandの標識は紫外線照射のない場合や、1mMGTPγS存在下では見られなかった（図3、line 2,4）。150-180Kおよび31K-36KDaのbandはクラスリン（重鎖および軽鎖）のbandと一致した。IAPによるADP-ribosylationではGTP結合siteのうち 39K-41KのbandがIAPで標識された（図3、line 5、6,7）。このbandは分子量41KDaのGiαと39KDaのGoαを含むものと思われるが、今回の実験条件では両者を分離出来なっかた。

[考察]

今回の結果はコート小胞にGTP結合蛋白質のsubunitであるGi（Go）αが含まれることを明らかにした。またコート小胞の主成分である180KDa（クラスリン重鎖）、100KDa, 54KDa（チューブリン？）、31K-36KDa（クラスリン軽鎖）が[^{32}P] 8-azidoGTPで標識されることを示した。これらのことがコート小胞で見いだされる神経伝達物質の受容体(4)や蛋白キナーゼ(8)とどの様な関連をもつものかさらに検討を加える予定である。

[文献]

(1)Goldstein J.L. et al. (1979) Nature 279, 679-685、(2)Chuang D-M et al. (1986) J. Neuroscience、6、2578-2584, (3)Silva W.I. et al.(1986) J.Biol.Chem. 261、14788-14796, (4)Moroi K. et al.(1989) Japan. J. Pharmacol. 51, 128-131, (5)Pearse B.M.S. & Bretscher M.S.(1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 85-101, (6)Northup J.K. et al.(1982) J. Biol. Chem. 257、11416—11423, (7)Bokoch、G.M. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258、2072-2075, (8)Takahasi A. et al. (1985) J. Biochem. 98, 63-68

186　ラット大脳皮質アデニル酸シクラーゼ系に及ぼす Mastoparan の影響

八田愼一、大鹿英世

（札幌医科大学・薬理）

〔要約〕 Mastoparanのアデニル酸シクラーゼ(AC)系に対する作用について、ラット大脳皮質粗膜標品を用いて検討した。 Mastoparan によってGppNHp刺激性AC活性の増強と、GppNHpによるAC活性化の EC_{50} 値の低下がみられた。 このMastoparanの作用は、膜標品とMastoparanとのIncubation後２分の時点から観察された。Forskolin 刺激性 AC 活性のGppNHpによる抑制反応や、Isoproterenol 刺激性AC活性ではMastoparanによる影響はみられなかった。これらの結果から、大脳皮質膜標品を用いた実験系では、MastoparanはGs蛋白質に対して促進的に作用し、その作用の一部はGs蛋白質のguanine nucleotideに対する親和性の上昇によること、他方、Gi蛋白質に対する作用はさほどないことが示唆された。

【目的】 スズメバチ毒の一種であるMastoparanは、肥満細胞からのヒスタミン放出、血小板からのセロトニン放出、クロマフィン細胞からのカテコールアミン放出などの作用を示すことが知られている (3,4)。近年、Higashijima et al. は、精製Go蛋白質とGi蛋白質を用いた再構成系で、Mastoparanが直接 Go、Gi 蛋白質に作用することを示唆している(2)。 さらに、1321N1ヒト星状神経細胞で、 Mastoparan がホスホリパーゼCの活性化に関与しているG蛋白質に作用することが示されている(5)。 Mastoparanは分子内に親水性部位と疎水性部位をもつ両親媒性ペプチドであり、前述のG蛋白質に対するMastoparanの作用は特定の受容体を介するものではなく、agonist の結合によって活性化された受容体とG蛋白質との共役機構に類似した様式によるものであることが推測されている(2)。 今回、我々はラット大脳皮質粗膜分画を用い、G蛋白質ーアデニル酸シクラーゼ(AC)系に関するMastoparanの作用について検討した。

【方法】 実験には雄性Wistar系ラットを用いた。大脳皮質粗膜標品の調製およびAC活性の測定は先に報告した方法(1) によって行った。ACの50% 最大活性化に必要な刺激薬の濃度(EC_{50})はHanes-Woolf plotによって求めた。

【結果】 Basal 活性およびForskolin 刺激性AC活性では、ともに、10^{-6}～3×10^{-5} M のMastoparanでは変化なかったが、10^{-4} M ではそれぞれMastoparan非存在下と比較して有意に促進された(Fig. 1)。しかしながら、MastoparanによるAC活性の抑制はいずれの条件下でも観察されなかった。以後の実験はMastoparanの効果が認められた10^{-4} Mの濃度を用いて行った。次にGppNHp刺激性AC活性に対するMastoparanの影響について検討した。10^{-8}～10^{-4} MのGppNHpによって対照膜標品（Mastoparan非存在下）でのAC活性はBasal 活性値の約390%まで促進された（Fig. 2）。Mastoparan によってGppNHp刺激性AC活性は有意に増強され(Fig. 2)、さらに、GppNHp用量ー反応曲線からHanes-Wool plot によって求めたEC_{50}値はMastoparanによって有意に低下した(Fig. 2、挿入Table)。 このMastoparanによる増強効果は、粗膜標品とのIncubation開始後２分の時点から観察され、さらに、Mastoparanによって、GppNHpのAC活性化 lag time の短縮が推測された(Fig. 3)。 Forskolin刺激性AC活性のGppNHpによる抑制反応は、Gi蛋白質機能を反映していることがSeamon and Dalyによって示されている(6)。対照膜標品でのForskolin刺激性AC活性は10^{-6} MのGppNHpで約28% 抑制された(Fig. 4)。しかしながら、GppNHpによる抑制反応様式でMastoparanによる著しい変化はみられなかった(Fig.4)。Nakahata et al. は1321N1星状神経細胞で、 Mastoparan がIsoproterenol によるcyclic AMP蓄積反応を抑制することを

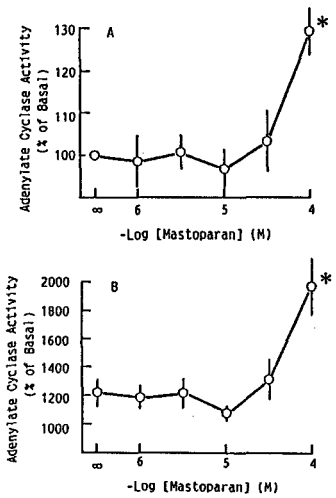


Fig. 1 Effect of mastoparan on basal (A) and forskolin (100 uM)-stimulated (B) adenylate cyclase activity. Adenylate cyclase activity is expressed as a percentage of the basal activity in control. *:P<0.05 when compared with the corresponding control.

報告している(5)。大脳皮質粗膜標品で、Isoproterenol 刺激性AC活性に対するMastoparanの効果について検討した結果、MastoparanによるAC活性の抑制は観察されず、むしろ促進される傾向が示された(Fig. 5)。また、$MnCl_2$ (20 mM) 刺激性AC活性は、対照で2495.6 ±66.3 pmol/mg protein/min、一方、Mastoparan存在下で 2509.4 ±21.2 pmol/mg protein/minの値が得られ、両群での差は認められなかった。

【考察】 Mastoparanはこれまでに、主としてGo、Gi蛋白質 (2,5) およびホスホリパーゼCの活性化に関与している百日咳毒素非感受性G蛋白質(5) に作用を及ぼすことが示唆されている。今回の実験結果では、AC活性の抑制に関するMastoparanの効果は観察されず (Fig. 1、4、5)、Gi蛋白質に対するMastoparanの作用は、大脳皮質膜標品では認められなかった。この違いがどのような原因によるものかは明かではないが、1)Gi、Go蛋白質のみを用いている再構成実験系と、Gs蛋白質あるいは他の種類の膜蛋白質も存在している膜標品を用いた実験系との違い、2) 無傷細胞系と破壊細胞系との違い、3)Gi蛋白質の亜種の違いなどによることが考えられ、Mastoparanの作用様式との関連も含めてさらに検討が必要であろう。MastoparanによってGppNHp刺激性AC活性は増強され、さらにGppNHpのEC_{50}値の低下が認められた(Fig. 2、3)。これらの結果から、MastoparanはGs蛋白質に対しても作用を及ぼすことが示唆され、その作用の一部はGs蛋白質のguanine nucleotideに対する親和性を上昇させることによるものであることが推測された。

【文献】(1) Hatta, S., Marcus, M.M. and Rasenick, M.M.(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5439-5443. (2)Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T. and Ross, E.M. (1988) J. Biol. Chem. 263, 6491-6494. (3) Hirai, Y., Yasuhara, T., Yoshida, H., Nakajima, T., Fujino, M. and Kitada, C. (1979) Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 27, 1942-1944.(4) Kuroda, Y., Yoshioka, M., Kumakura, K., Kobayashi, K. and Nakajima, T.(1980) Proc. Jpn. Acad. 56, 660-664.(5)Nakahata, N., Abe, M.T., Matsuoka, I. and Nakanishi, H.(1990) FEBS Lett. 260, 91-94. (6)Seamon. K.B. and Daly, J.W.(1982)J. Biol. Chem. 257, 11591-11596.

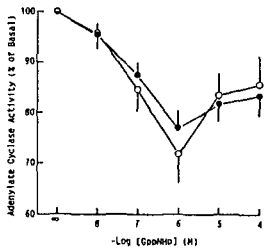


Fig. 4 Effect of mastoparan on GppNHp inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity. Adenylate cyclase was assayed in the presence of 100 uM forskolin and is expressed as a percentage of the basal activity.

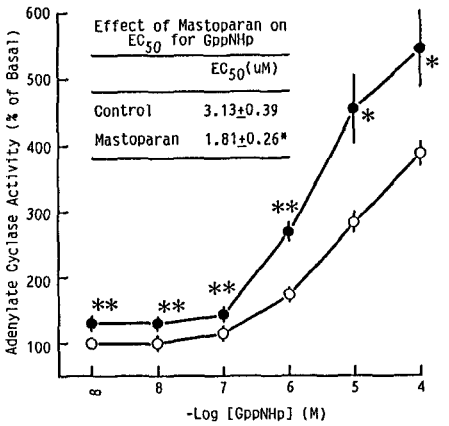


Fig. 2 Effect of mastoparan on GppNHp-stimulated adenylate cyclase activity. adenylate cyclase is expressed as a percentage of the basal activity in control. *,**:P<0.05, P<0.01 when compared with the corresponding control.

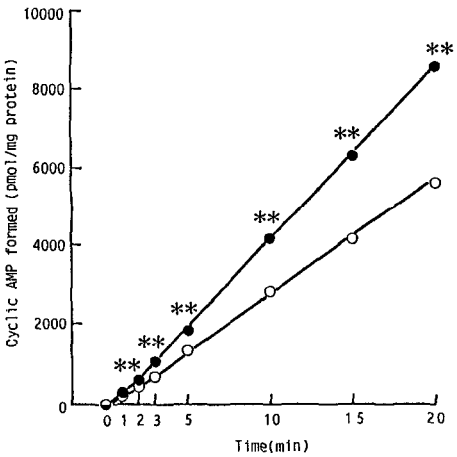


Fig. 3 Effect of mastoparan on the rate of activation of GppNHp-stimulated adenylate cyclase. Adenylate cyclase activity was assayed in the presence of 10 uM GppNHp. **:P<0.01 when compared with control.

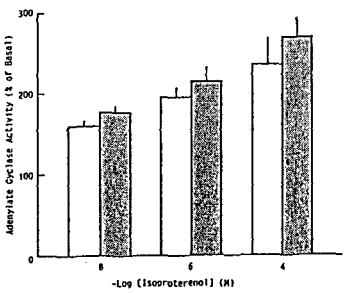


Fig. 5 Effect of mastoparan on isoproterenol-stimulated adenylate cyclase activity. Adenylate cyclase activity was assayed in the absence (□) and presence (▨) of mastoparan, and is expressed as a percentage of the basal activity in control.

187 脳タキキニン・ペプタイド受容体サブタイプと循環調節：新しいタキキニン・ペプタイドneuropeptide γについて

高野行夫，萩尾哲也，中山靖久，斎藤 亮，永島 亮*，神谷大雄
（福岡大・薬・薬理，（現）*藤沢薬品・探索研）

〔要約〕substance P，neurokinin A，neurokinin Bに加え，さらに2つのタキキニン・ペプチド，neuropeptide Kとneuropeptide γが最近哺乳動物より分離同定された．今回，我々はタキキニン・ペプチドの一つであるneuropeptide γの生理的意義を調べる目的で，neuropeptide γの側脳室内投与による中枢性血圧上昇作用について検討し，他のタキキニン・ペプチドと比較検討した．neuropeptide γによる中枢性昇圧作用は，substance Pやneurokinin Aと同様に節遮断薬やα受容体遮断薬によって抑制されたことから，主に交感神経系を介していることが示唆された．一方，substance Pとは別の遺伝子に由来するneurokinin Bの昇圧作用は，vasopressin受容体拮抗薬の末梢投与により抑制されたことから，neuropeptide γやsubstance Pとは異なり，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-NH2 の共通のアミノ酸構造を持ち，種々の生理活性を発現する．最近の研究から，タキキニン・ペプチドのうちsubstance P，neurokinin A，neuropeptide K，neuropeptide γ はpreprotachykinin A (PPT-A) geneに由来し，neurokinin Bはpreprotachykinin B (PPT-B) geneに由来することが明らかにされている(2,4)．さらにタキキニン・ペプチドの受容体には3つのサブタイプ(NK-1，NK-2，NK-3型)が存在することが機能的にも生化学的にも確認されている(2,5)．我々はすでにneurokinin Bの脳内分布や中枢性血圧調節に関して報告した(3,7)．今回は，substance Pと共通の遺伝子，PPT-Aから発現する新しいタキキニン・ペプチドneuropeptide γに注目し，その生理的意義を調べる目的で中枢性血圧調節機構におけるneuropeptide γの役割を調べ，他のタキキニン・ペプチドと比較検討した．

[実験方法]

血圧・心拍数の測定：Wistar系雄性ラット(250-300g)をウレタン(0.9g/kg，i.p.)で麻酔し，脳固定装置にセットした．血圧および心拍数は既に報告した方法(3,6,7)に従って，大腿動脈より圧トランスデューサーを介して測定した．タキキニン・ペプチドは人工脳脊髄液に溶解後，右側脳室に10μlを1分間で注入した．

血漿vasopressin (AVP)量の測定：血漿中のvasopressin量はラジオイムノアッセイ法（AVP-RIAキット，三菱油化）により測定した．

[結果および考察]

タキキニン・ペプチドをラットの側脳室内に投与すると，いずれも濃度依存的に持続性の血圧上昇および心拍数増加を引き起こした．タキキニン・ペプチドのなかでも特にneuropeptide γの昇圧作用が最も強かった．この結果neuropeptide γが中枢性血圧調節に関与している可能性が示唆された．そこで，これらタキキニン・ペプチドによる昇圧の作用機序を調べる目的で，末梢自律神経系やvasopressinの関与について検討した．

図1に示すように，substance P，neurokinin Aおよびneuropeptide γ脳室内投与による血圧上昇は，節遮断薬のpentolinium (10mg/kg，i.v.)やα受容体遮断薬のphentolamine (10mg/kg，i.v.)によって有意に抑制された．しかし，これらの昇圧作用はvasopressin受容体拮抗薬 d(CH_2)$_5$OMe (Tyr)-AVP (1μg/kg，i.v.)では抑制されなかった（図1 A－C）．一方，neurokinin Bのアナログであるsenktide（NK-3型受容体サブタイプの刺激薬）による血圧上昇は上記vasopressin受容体拮抗薬の静脈内前処置で著しく抑制されたが，節遮断

薬やα受容体遮断薬では影響を受けなかった（図1 D）．

次に，タキキニン・ペプチドの脳室内投与による血漿中のvasopressin量の変化を調べた．substance P (10μg,i.c.v.), neurokinin A (10μg,i.c.v.)およびneuropeptide γ (1μg,i.c.v.)脳室内投与後5分および20分の血漿vasopressin量は，対照の人工脳脊髄液投与群と比べて有意な変化は認められなかった．一方，senktide (10μg,i.c.v.)を投与すると，5分および20分後の血漿vasopressin量は有意に上昇した（図2）．

neuropeptide γによる昇圧作用はsubstance Pやneurokinin Aと同様に節遮断薬やα受容体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．最近，脳においてneuropeptide γの結合部位や含量の分布が報告されているが(1,8)，今回のneuropeptide γの中枢性昇圧作用が脳のneuropeptide γの特異的受容体を介して引き起こされたのか，あるいは他のサブタイプ（例えばNK-2型）による反応なのかは今後の課題である．一方，PPT-B gene由来のneurokinin Bによる昇圧作用は，視床下部のNK-3型受容体サブタイプを介した下垂体からのvasopressinの遊離によると考えられる．

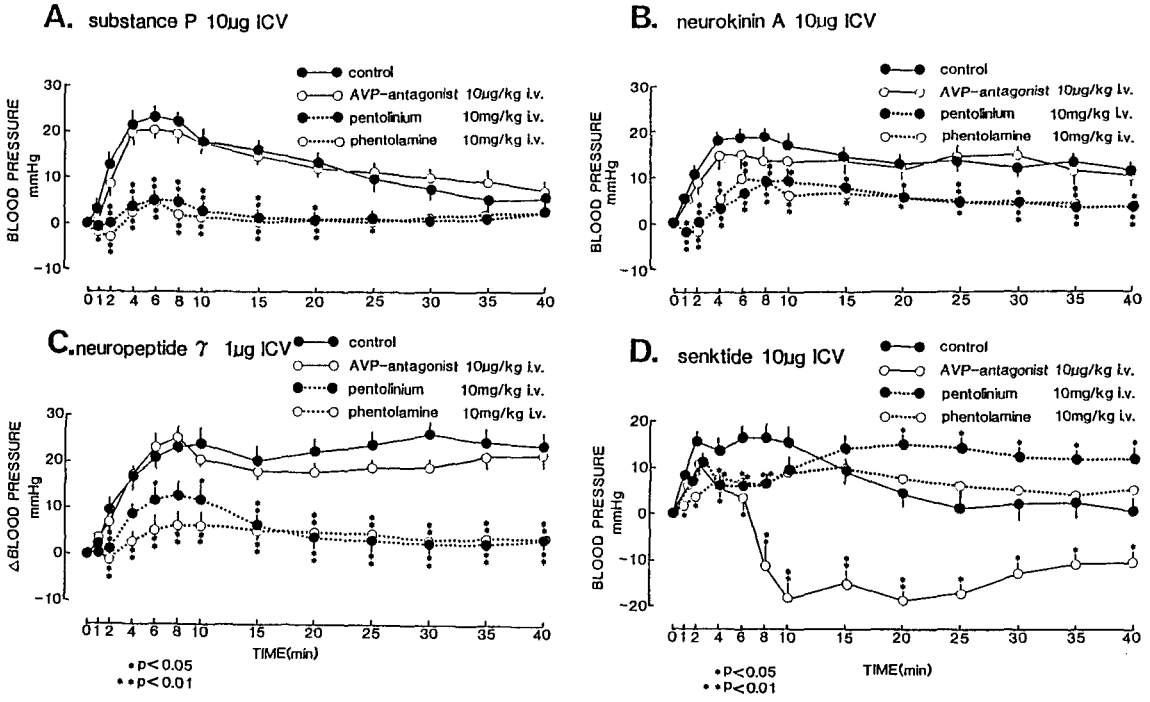


図1．タキキニン・ペプチド脳室内投与による血圧変化に対する交感神経系およびvasopressin系の関与

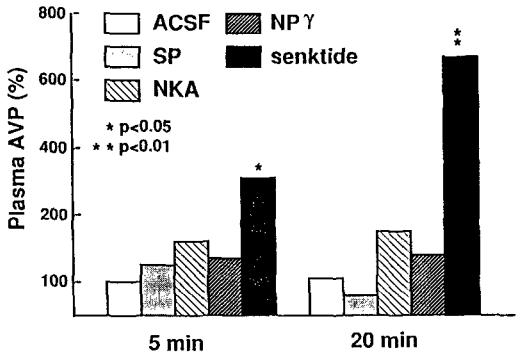


図2．タキキニン・ペプチド脳室内投与による血漿vasopressin量の変化

【文献】
(1)T-V Dam et al.,(1990)Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 246-250.
(2)J.E.Krause et.al.,(1989)BioEssays, 10, 62-69.
(3)A.Nagashima et.al., (1989) Brain Res., 499, 198-203.
(4)S.Nakanishi,(1987)Physiol. Rev., 67, 227-241.
(5)Y.Sasaki and S.Nakanishi, (1989) B. B. R. C., 165, 695-702.
(6)Y.Takano et.al., (1988) Brain Res., 445, 188-192.
(7)Y.Takano et.al., (1990) Brain Res., in press
(8)Y.Takeda et al., (1990) Regul. Peptides, 28, 323-333.

188 ラット中枢神経系におけるＣＣＫ遺伝子の個体発生 - in situ hybridization -

浅尾敏一、白先溶、稲垣忍、高木宏

（大阪市立大学・医・第一解剖）

〔要約〕

^{35}Ｓ－標識合成ＣＣＫプローブを用いたin situ hybridization 法によりてラット中枢神経系のＣＣＫ遺伝子の個体発生について検討した。生後０日齢（０ｄ）でＣＣＫ遺伝子は大脳皮質、海馬、視床、黒質、腹側被蓋野、Edinger-Westphal核などの各部位に発現していた。特に視床、黒質、腹側被蓋野では０ｄで成熟齢に匹敵するほど豊富に発現していた。一方大脳皮質や海馬では発育につれて次第に発現量が増し、各層に発現した。一方、乳頭体に於いてはＣＣＫは０ｄで出現しているが、その後減少し、成熟齢では発現が観察されなかった。

ＣＣＫは哺乳類の神経系、特に大脳皮質に豊富に分布しており(2)神経精神疾患との関連が報告されている。これまでに免疫組織学的手法を用いてＣＣＫペプチドの個体発生について報告した。しかしながら、in situ hybridization 法を用いると免疫組織化学法では殆ど検出されない視床などに豊富な遺伝子の発現が検出される。本研究では、ラットの中枢神経系に於けるＣＣＫmRNAの個体発生をin situ hybridization 法を用いて検討した。

［方法］

生後０日齢（０ｄ）、１週齢（１ｗ）、２週齢（２ｗ）、４週齢（４ｗ）のウィスター系ラットをﾍﾟﾝﾄﾊﾞﾙﾋﾞﾀｰﾙ（50mg/ml)を腹腔内投与で麻酔下、脳を取り出し、ｸﾘｵｽﾀｯﾄで10um厚の凍結切片を作製しｽﾗｲﾄﾞｸﾞﾗｽに貼付した後、10%ﾎﾙﾏﾘﾝで固定し、アセチル化を行った。ＣＣＫのmRNAに相補的な^{35}Ｓ標識合成ﾌﾟﾛｰﾌﾞと42° C下１晩 hybridization 後、56° C で１ｘＳＳＣで4回洗浄し、ﾐｸﾛｵｰﾄﾗﾃﾞｵｸﾞﾗﾌｨｰ を行った。4° Cで２－３週間暴露後，暗視野及び明視野顕微鏡で観察した．また，非ＲＩﾌﾟﾛｰﾌﾞを用いた実験も行った。

［結果］

ＣＣＫのmRNAは０ｄで既に脳の各部位に豊富に発現していた．特に，視床，黒質，腹側被蓋野，Edinger-Westphal核では，４ｗに匹敵するほど豊富に観察された．視床では網様核，手綱核，外側膝状体腹側部，pretectal nuclei 等を除く大部分の神経核に発現し，とくに腹側前核，後核，外側膝状体背側部で豊富でありその後４ｗまで漸増した．一方，大脳皮質では０ｄではＣＣＫmRNAの発現はおもに深層に認められたが，その後，表層にも発現し、２ｗでは第２・３層に豊富なＣＣＫmRNAの発現が観察された。 海馬では０ｄで錐体細胞層にＣＣＫmRNAの発現がみられ、特に、ＣＡ１で最も顕著であった。その後、海馬の発達と共に分子層や放線層の散在するニューロンに発現し始め、２ｗ以降で大変顕著であった。 他方、以上の大部分のＣＣＫmRNAの発現パターンと異なる神経核として乳頭体が挙げられた。乳頭体においては、０ｄで既にＣＣＫmRNAが発現していたが、その後次第に減少し、２ｗ以降では消失した。

［考察］

ラット中枢神経系において、ＣＣＫmRNAは０ｄで大部分の神経核に豊富に発現しており，その後４ｗまで増加した。これらに大脳皮質，海馬，視床，黒質，腹側被蓋野，Edinger-Westphal核があった。大脳皮質や海馬な

どでは脳の発達につれて，様々な部位にmRNAの発現するようになった。さらに、乳頭体のようにＯｄで発現しているのに、その後減少し、２ｗ以降消失した部位も観察されたことから、ＣＣＫmRNAは神経核により異なった発現パターンを示し、各神経機能の発現に関連していることが示唆された。これらの結果は免疫組織化学やNorthern blotの研究結果（２、４）とおおよそ一致する。また、視床でのＣＣＫmRNAのin situ hybridizationの研究結果（１）ともほぼ一致し，Ｏｄで多数の視床のニューロンが既にＣＣＫmRNAを発現していた．

免疫組織化学法でＣＣＫﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞがほとんど検出されない（２）のにmRNAが豊富に発現する部位に視床やEdinger-Westphal核があるが（３）、これは細胞内で産生されたＣＣＫの輸送が大変早いためにＣＣＫﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞの検出が困難である可能性が考えられる。これらの神経核では出生時に既にmRNAの発現がみられた。一方，免疫組織化学法では視床下部の室傍核にＣＣＫ免疫活性陽性のニューロンが多数観察されるが（２），in situ hybridization ではあまりmRNAの発現が観察されなかったことは，室傍核においてはＣＣＫﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞが余り消費されなくて産生が少ない可能性や，免疫組織化学法で用いる抗体が他の物質と交叉している可能性などが考えられる。

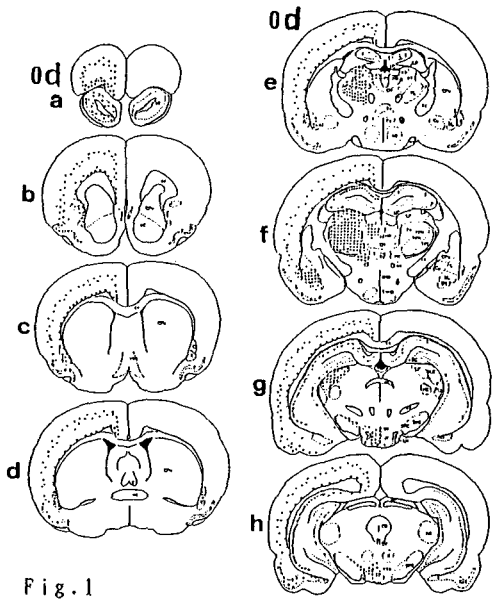


Fig.1
Ｏｄにおける前脳と脳幹のＣＣＫ遺伝子の分布を示すシェーマ。
前頭断切片、左側に点で示す。

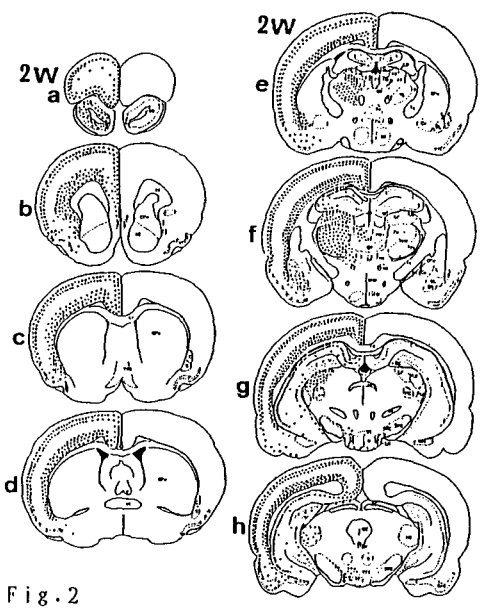


Fig.2
２ｗにおけるＣＣＫ遺伝子の分布を示すシェーマ。Fig.1参照。

［文献］

1. Burgunder,J-M. and Young III, W.C. (1989) Develop.Brain Res. 46, 221-232

2. Cho, J.H., Shiotani, Y., Shiosaka S. et al. (1983) J. Comp.Neurol., 218, 25-41.

3. Ingram, S.M., Krause II, R.G., Baldino, Jr.F. (1989) J.Comp.Neurol., 287, 267-272.

4. Takeda, K., Koshimoto, H., Uchiumi, F. (1989) J. Neurochem., 53, 772-778.

189

一次知覚神経に存在する神経ペプチドの炎症反応への関与

米原典史，今井康夫，陳季強，猪木令三
（大阪大・歯・薬理）

〔要約〕一次細径知覚神経の炎症反応への関与を検討するため，一次知覚神経含有ペプチドであるタヒキニン（サブスタンスP(SP)，ノイロキニンA(NKA)）およびカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)のラット足背面皮下灌流液中での変動を調べた．またこれらペプチドの血管透過性に対する影響についても検討した．ラット後肢を47℃の温水に30分間浸漬することにより灌流液中で著明なSPならびにCGRPの遊離増加が観察された．この遊離増加は，カプサイシン前処置ならびに坐骨，伏在両神経の切断により有意に抑制された．NKAの遊離は熱刺激により影響を受けなかった．SP，CGRPおよびNKAのマウス後肢への皮下投与は，投与量に依存し血管透過性亢進作用を発現した．この効果の強さはSP > CGRP > NKAの順であった．SPの血管透過性亢進作用は，SP拮抗薬であるスパンタイド前処置により拮抗された．SPとCGRPの併用投与では，CGRPはSPによる血管透過性亢進作用を増強する傾向を示した．

〔目的〕

炎症反応は侵害刺激に対する局所の防衛反応であり，この反応の最も特徴的な組織反応は，局所組織に分布する細動・静脈および毛細血管の循環障害（血管拡張，血管透過性亢進）である．この炎症性循環障害を引き起こす因子として，炎症ケミカルメディエーターと呼ばれるさまざまな物質の関与が明らかにされている．炎症時，局所の血管反応（発赤，腫脹，局所の温度上昇）と共に痛みが生じることは経験的に広く知られているが，これは炎症の出現に関与する多くのケミカルメディエーターが，痛み情報を中枢へ伝える一次細径知覚神経を興奮させることによる．この様に生体防御系（炎症反応）と警告信号系（痛み）は別々の独立した系ではなく炎症時には一体として働いているものと考えられる．痛覚機構が，炎症反応に積極的に関与している可能性は，19世紀後半以来示唆されている(2)．最近の免疫組織化学的研究あるいは薬理学的研究は，一次知覚神経末梢端が細動・静脈周辺にも分布し，この神経末梢端に含まれる神経ペプチドが炎症ケミカルメディエーターと共に炎症の発現，維持に関与することを明らかにしつつある(7)．それ故炎症機構を解明する一端として本研究では，ラット後肢足背面およびマウス後肢足蹠を用い一次知覚神経内に存在するペプチドの炎症反応への関与について検討した．

〔方法〕

1．ラット後肢足背面の皮下灌流

Sprague-Dawley (SD)系雄性ラット(130～180g)を用いウレタン麻酔下実験を行った．Rocha e Silva(6)らの方法に準じ，ポリエチレン製の二重同軸チューブを後肢足背面皮下に挿入した．ペリスタルティックポンプを用い内筒よりプロテアーゼ阻害薬であるベスタチン，カプトプリルを含む生理食塩水を流速100μl/minでpushし，外筒より滴下液を氷冷下採集した．灌流開始後一定時間経過した後，灌流足に熱刺激を加えた．得られた試料は，凍結乾燥を行った後サブスタンスP(SP),カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP),ノイロキニンA(NKA)のラジオイムノアッセイに使用した．

2．マウス色素漏出実験

一群10匹以上のddY系雄性マウス(20-25g)を用いた．5% Pontamine sky blue (125mg/kg)を尾静脈内に投与し，1分後種々の濃度の神経ペプチド(SP,CGRP,NKA,コレシストキニン(CCK))を足蹠皮下に10μl投与した．5分後屠殺し，直ちに両側足蹠を切断した．湿重量測定後細切し，4 mlホルムアルデヒドに浸漬し60℃で17時間インキュベートすることにより血管外に漏出した色素を抽出した．色素量は620nmの吸光度で測定した．

〔結果〕

1．灌流液中でのSP,CGRP,NKA量の変動

灌流開始直後，著明なSP量の上昇が認められた．その後時間の経過と共に徐々に減少し，灌流開始30分後にはほぼ一定値に達した．47℃の温水に足蹠を浸漬した場合，SP量は著明に増大した．一方0℃（冷刺激）あるいは25℃（室温），

37℃（体温）では灌流液中のSP量には変化が認められなかった（図１）．CGRP量は47℃の熱刺激により著明に増加した（図２）．SPの類似タヒキニンであるNKAの灌流液中での量は，熱刺激により影響を受けなかった．熱刺激に伴うSPならびにCGRP量の増加は，後肢の知覚神経を含む坐骨および伏在両神経の切断あるいはカプサイシン前処置により有意に抑制された．

２．一次知覚神経内に存在するペプチドの炎症反応への関与

マウス色素漏出実験ではSP > CGRP > NKAの順に強い血管透過性亢進作用が観察された．CCKには，血管透過性亢進作用は認められなかった．SPの作用はSPの拮抗薬であるspantideにより有意に拮抗された（図３）．CGRPは低濃度ではSPの作用を相乗的に増強し，高濃度では相加的な協力作用を示した．

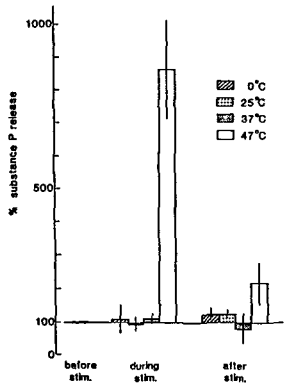
〔考察〕

今回の研究において，47℃の熱刺激によりラット後肢足背面皮下灌流液中でSPおよびCGRP量が増加し，この増加はカプサイシン前処置あるいは知覚神経切断により抑制された．熱刺激に対する侵害受容器の閾値は皮膚の場合約45℃と言われておりこの温度はヒトの熱疼痛閾値と比較的一致している(1)．またカプサイシンは，主として一次細径知覚神経の変性と，それに伴う疼痛閾値の上昇を引き起こすことが明らかにされている(4)．さらに免疫組織化学による研究より，一次細径知覚神経では，しばしばSPがCGRPと共存することが観察されている(3)．これらの事実を考慮すれば，熱刺激に伴い灌流液中で増加が観察されたSPおよびCGRPは，一次細径知覚神経に由来するものと考えられる．マウス足蹠色素漏出実験において，CCKを除くSP,CGRP,NKAは比較的強い血管透過性亢進作用を示し，またSPとCGRPの併用投与では協力作用が観察されたことは，炎症性侵害刺激により一次細径知覚神経の末梢側から遊離されるSPおよびCGRPは，協力しながら侵害刺激受容部位に分布している細動・静脈および毛細血管に作用し循環障害（血管拡張，血管透過性亢進）の発現，維持に関与しているものと考えられる．最近SPの前駆体には，SPのみを産生するものばかりではなく，SPとNKAを産生するものも見いだされており，これらのいずれの前駆体も一次知覚神経内に存在することが明らかにされている(5)．この事実にもかかわらず，熱刺激によりNKAの遊離増加が観察されなかったことは，SPのみを含む一次知覚神経とSPおよびNKAが共存する一次知覚神経では侵害刺激に対する感受性が異なっている，あるいは同一神経でもSPとNKAの遊離機構の間に違いが存在している等の可能性が考えられるものの現在の研究結果のみではその詳細は不明である．

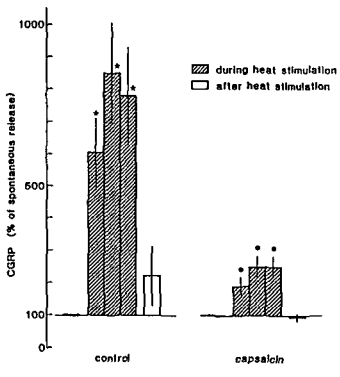
NKAの抗体を提供していただきました高野行夫助教授、神谷大雄教授（福岡大・薬・薬理）に深く感謝致します。

〔文献〕

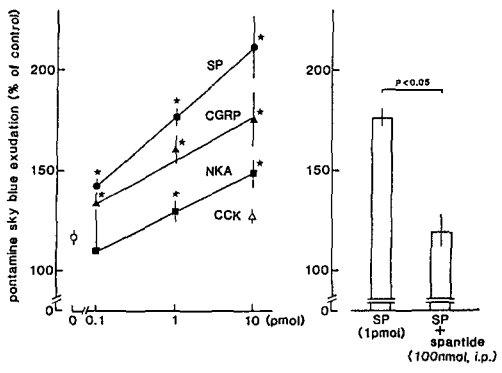
(1)Fleischer, E., Handwerker, H.O. and Joukhadar, S.(1983)Brain Res. 267, 81-92. (2)Goltz, F.(1874) Pfluegers Arch. Ges. Physiol. 9, 174-197. (3)Ishida-Yamamoto, A., Senba, E. and Tohyama, M.(1989) Brain Res. 491, 93-101. (4)Nagy, J.I., Vincent, S.R., Staines, W.A., Fibiger, H.C., Reisine, T.D. and Yamamura, H.I.(1980) Brain Res. 186, 435-444. (5)Nawa, H., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S. and Nakanishi, S. (1983) Nature 306, 32-36.(6)Rocha e Silva, M. and Antonio, A.(1960)Med. Exp. 3, 371-382. (7)Yonehara, N., Shibutani, T. and Inoki, R. (1987) J. Pharmacol. Exp. Ther. 242, 1071-1076.



（図１）



（図２）



（図３）

190 アオウミガメ脳糖脂質の個体発生的変化

玉井洋一、中村和生、小嶋久子、北島理恵
（北里大・医・生化）

〔要約〕
アオウミガメ脳の糖脂質組成を、孵化前から成体に至る発達過程について調べた。CMH と CSE の脳重量当りの含有量は孵化後 3ヶ月 より急激に増加し、2－2.5年でピークに達した。CMH の構成糖は孵化前にはグルコースが主成分であったが孵化とともにガラクトースが主成分となった。脂肪酸組成は孵化前は 18:0、孵化後3ヶ月より 24:1 と 24h:1 が主成分となった。以上の知見からアオウミガメ脳のミエリン形成が孵化後から3ヶ月の間に始まり、2－2.5年で完成することが分かった。ガングリオシド量は発達過程を通じてほぼ一定であったが、組成は著しく変化した。GD1a は孵化前から成体まで最主要成分であった。GQ1b は孵化前に豊富に含まれ、個体発生とともに減少し、成体では殆ど検出されなかった。

［目的］

糖脂質は神経系細胞膜の主要構成成分であり、各分子種はそれぞれ神経機能発現の上で重要な役割を担っていると考えられている。ところで、脊椎動物脳を系統発生学的に見ると、カメの脳は新皮質が出現するという特徴がある。しかしカメ脳の脂質構築の個体発生的変化については殆ど知られていない[1]。本研究はアオウミガメの孵化前から成体に至る発達過程における脳のスフィンゴ糖脂質組成の変化を解析することを目的とした。

［実験方法］

実験材料： アオウミガメ（Chelonia midas）は小笠原・父島で採取した。孵化直前1（体重 6 g），孵化直前2（14 g），孵化直後（24 g），3ヶ月，6ヶ月（403 g），2－2.5年（2.2 kg），年齢不明（10 kg）及び成体から脳を採取した。

糖脂質の分離・分析： 糖脂質をクロロホルム：メタノールで抽出後、弱アルカリ処理、イアトロビーズカラム、DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより CMH，CSE，ガングリオシドを分離、精製した。各脂質の定量、GLC による構成成分の分析は常法に従った。

［実験結果と考察］

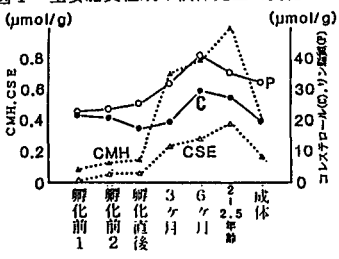
脂質組成の個体発生的変化（表1，図1）： 脳重量当りの CMH と CSE 量は孵化後3ヶ月より急増し、2－2.5年でピークに達し成体でやや減少した。CDH は微量ではあるが 孵化前後にのみ検出され、発達とともに消失した。コレステロールとリン脂質は孵化前から成体に近いレベルで含まれ、糖脂質よりやや遅れて増加し、6ヶ月でピークに達した後発達とともに減少し成体レベルになった。これらの脂質に比べガングリオシド濃度は全発達段階を通じてほぼ一定であった。以上の脂質組成の変化からアオウミガメの脳は孵化後から3ヶ月迄の間にミエリン形成が始まり、その後2年を経てミエリンが完成するものと推定された。本データは我々が既に示した知見[1]、即ち脊椎動物脳は系統発生的にミエリン成熟度の低い動物ほどコレステロール／リン脂質比が大きいこと、ミエリン形成過程でコレステロール、リン脂質、糖脂質の動態が並行していないという知見と対応するものであった。

表1 アオウミガメ脳の脂質組成

脂質 / 試料	コレステロール（C）	リン脂質（P）	セレブロシド CMH	CDH	スルファチド CSE	モル比（C／P／G）	ガングリオシド
孵化前1	21.2	22.5	0.077	0.027	0.014	1:1.06:0.004	1.00
孵化前2	20.9	23.4	0.12	0.05	0.043	1:1.12:0.008	0.78
孵化直後	17.8	25.5	0.14	trace	0.048	1:1.43:0.011	-
3カ月	19.1	31.6	0.69		0.23	1:1.66:0.048	0.58
6カ月	29.2	41.0	0.78		0.28	1:1.40:0.036	0.87
2-2.5年齢	27.1	35.1	0.99		0.37	1:1.30:0.050	0.61
成体	19.4	32.2	0.39		0.15	1:1.66:0.028	0.65

脂質の値はμmol/g 湿組織で示す。またガングリオシドはシアル酸μmol/g で示す。糖脂質 G＝CMH＋CSE

図1 主要脂質組成の個体発生的変化



ガングリオシド分布の個体発生的変化（図2、3）：　胚から成体に至る全発達過程を通じて、GM2, GM1, GD3, GD1a, GD2, GD1b, GT1b, GQ1b が検出された。この中で、GD1a は2－2.5年齢以外の全段階で最も多く含まれていた。次いで GM1 と GT1b の割合が大きかった。最も顕著な変化を示したのは GQ1b で孵化前の段階で最も多く含まれ、以後発達とともに減少し、成体ではほとんど検出されなかった。このようなガングリオシド組成の変化は神経細胞の成熟過程を反映しているものと推測された。更にガングリオシドの DEAE-Toyopearl カラムによるシアル酸数による分画の結果、GM3 および GQ1b よりも極性の高い成分も検出された（データ省略）。

図2　アオウミガメ脳ガングリオシドの薄層クロマトグラフィー

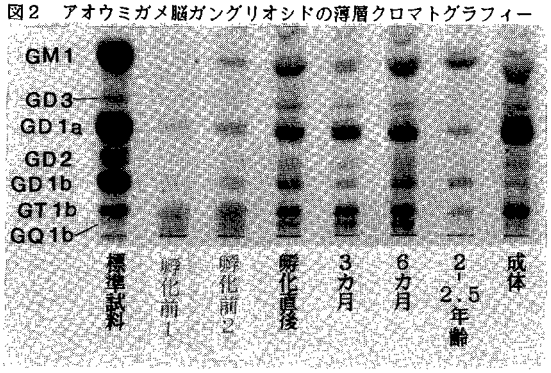
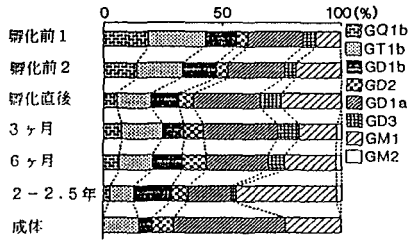


図3　ガングリオシド組成の個体発生的変化



ガングリオシドの糖と脂肪酸組成（図4）：　糖はグルコース、ガラクトース、N－アセチルガラクトサミン及びN－アセチルノイラミン酸より構成されていた。脂肪酸は 18:0 が主成分で他に 16:0 と 24:1 も含まれていた。16:0 はミエリン形成期で減少し、24:1 は発達とともに増加する傾向にあった。

CMH と CSE の糖と脂肪酸組成（図5、6）：　孵化直前1の CMH はグルコースが 68% を占め、以後発達とともにガラクトースが 32% から 97% へ増加した。CMH と CSE の脂肪酸組成は発達とともに顕著な変化が観察された。即ち孵化前には 18:0 が主要成分であったが、孵化後は 24:1 が急激に増加し 18:0 は減少した。ハイドロオキシ酸についても同様の傾向が観察された。このような CMH と CSE 構成成分の変化はその量的変化（図2）に対応するものであり、アオウミガメ脳のミエリン形成が孵化後から3ヶ月迄の間に開始し、2－2.5年で完成することを示した。また、脂肪酸組成の変化はヒト胎児からの発達過程の変化とも対応するものであった。

図4　ガングリオシドの脂肪酸組成

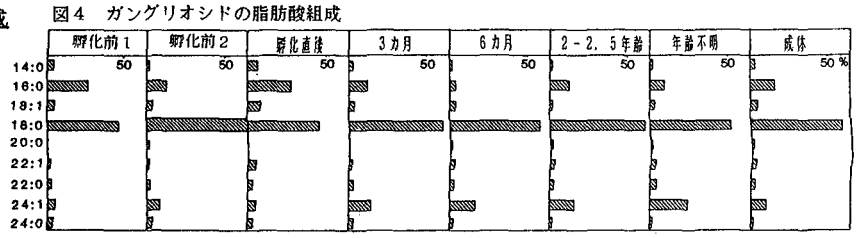


図5　CMH の糖組成

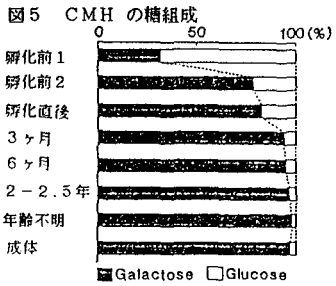
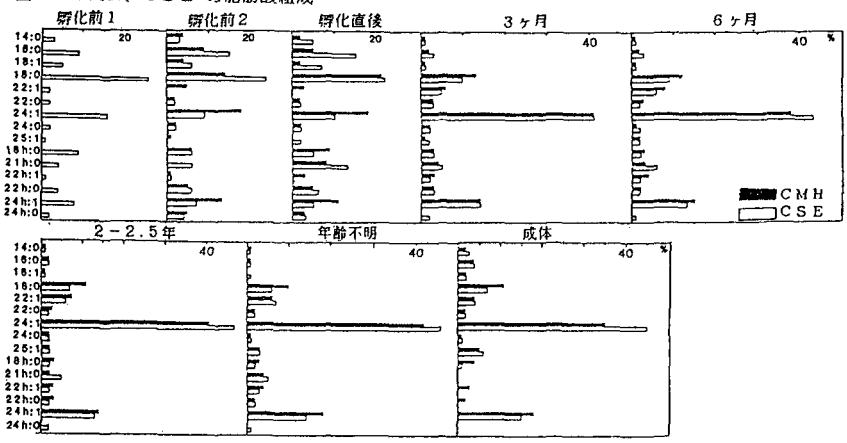


図6　CMH、CSE の脂肪酸組成



［謝辞］アオウミガメの採集に際し倉田洋二先生（小笠原海洋センター）のご協力を得ました。

［文献］1）玉井洋一：生化学 57,1249(1985)

191 白鼠上頸および迷走神経節内への中性アミノ酸取り込み系に及ぼすα－シアル酸コレステロールの効果

中島雄三・安藤正人・永田 豊
(藤田学園保健衛生大・医・生理)

〔要約〕シナプス結合を多く含む摘出白鼠上頸交感神経節(SCG)およびそれを含まない節状(迷走)神経節(NG)を生理溶液中で好気的に37°Cでインキュベートした時、これら神経節へのアミノ酸(AIB)取り込み、膜輸送酵素(Na^+, K^+-ATPase)活性およびエネルギー担体(ATPおよびCrP)レベルにおよぼす人工合成シアル酸コレステロール(α－SC)の効果を検討した。また、GM1によるSCGとNG標本内へのAIB取り込み系の抑制と促進の作用をさらに解明するため、GM1糖鎖を特異的に隠蔽するコレラ毒素BをGM1と共に添加した効果も両神経節標本で比較検討し以下の結果を得た。[1]GM1は極めて低濃度 (5nM)でSCG内Na^+, K^+-ATPase活性の低下を伴ってAIBの取り込みを抑制したが、この効果はさらにコレラ毒素B(250ng/ml)の添加で完全に拮抗された。一方GM1によるNGのAIB と膜輸送酵素活性の増大効果は、コレラ毒素Bをさらに添加しても完全には拮抗されなかった。[2]α－SCはSCGのみならずNG内へのアミノ酸取り込みと膜輸送酵素活性を共に著明に抑制した。しかし、コレステロール添加単独によってはこれらの効果が殆ど示されなかった。つまり、α－SCやGM1で示されるこれらの生理効果の発現には、シアル酸あるいはそれと結合した糖鎖部分が不可欠と思われた。[3]GM1あるいはα－SCはSCGのNa^+, K^+-ATPase活性を抑制するため、神経節内の高エネルギー・リン酸化合物(ATP およびCrP)の蓄積を増大させた。従って、GM1のみならず合成シアル酸化合物分子内の親水性シアル酸部分が、物質代謝系に与るエネルギーの積極的な利用を抑制して膜輸送を低下させていると推察された。

〔序〕既に我々は、培養神経腫瘍細胞株 (Neuro 2a) の神経突起の伸展や分化を引き起こすことで知られるGM1糖脂質が、極めて低濃度 (5nM) で成熟白鼠より摘出した上頸交感神経節 (SCG) の細胞膜輸送系酵素のNa^+,K^+-ATPase活性を抑制して、中性アミノ酸 (AIB) の細胞内への取り込みを低下させることを認めた。一方、感覚性の節状(迷走)神経節 (NG) 標本ではGM1がその組織内膜輸送酵素を活性化してAIBの取り込みを促進することを報告した(5)。今回は、GM1糖鎖部分を特異的に隠蔽することで知られるコレラ毒素Bサブユニット(4) を添加した時に、SCGとNG標本で見られたGM1による相反した膜輸送系への作用が、GM1分子内のどの部分で引き起こされる現象であるかを追求した。また最近、天然に存在する糖脂質の他にシアル酸を含む人工合成コレステロール化合物 (α-シアル酸コレステロール, α－SC) が、Neuro 2a細胞の神経突起の伸展やグリオーマ細胞の分化を促進することが示されている(3,6)。そこで、このα－SC がこれら神経組織の膜輸送酵素活性、アミノ酸輸送系にどのような効果をおよぼすかについても両神経節標本で比較検討した。さらに、α－SC やGM1が Na^+,K^+-ATPase の基質であるエネルギー担体の ATPあるいは creatine phosphate (CrP) の利用にどのような影響をおよぼすかについても併せて検討し、GM1あるいは合成シアル酸コレステロールの代謝におよぼす作用機構を解明しようと試みた。

〔実験材料および方法〕① Wistar 系成熟白鼠を用い、SCG およびNG標本の摘出は既報(1)に従い実施した。② GM1およびα－SC はMECT社 (東京) より供与された。③ 摘出神経節内へのAIBの取り込み(5)、Na^+,K^+-ATPase 活性の測定(5)およびATP あるいはCrP レベルの測定(2)はそれぞれ従来の文献に記載された方法に依って実施した。

〔実験成績および考察〕 [1] GM1刺激によるSCGおよびNG標本のAIB取り込みとNa^+,K^+-ATPase 活性変動におよぼすコレラ毒素Bの効果: 摘出SCGおよびNG標本を[^{3}H]AIB(46.3 KBq/ml:100μM)を含む生理溶液中で好気的に37°Cでインキュベートすると、AIBは能動的に数時間に亘り神経節組織内へ取り込まれる。この溶液中にGM1(5nM)を添加して2時間インキュベートするとSCG内へのAIBの取り込みは有意に抑制され、また膜輸送酵素のNa^+,K^+-ATPase 活性も減少傾向が認められた(5) (表１)。一方、NG標本ではGM1の添加は明瞭なAIB取り込みの増加と膜輸送酵素活性の上昇を引き起こした(5) (表１)。コレラ毒素Bサブユニット(250ng/ml)を添加してGM1分子の糖鎖を隠蔽すると、 SCG で見られたAIB取り込みの抑制とNa^+,K^+-ATPase 活性の減少の何れも阻止されて、対照レベルにまで回復するのが示された (表１)。しかし、NG標本ではGM1により促進したアミノ酸の取り込みと膜輸送酵素活性は、毒素Bの添加によってやや低下したが、SCGの場合のような完全な拮抗作用は認められなかった (表１)。 既に我々は、シアル酸部分を欠いているasialo-GM1が両神経節標本でAIBの取り込みと、Na^+,K^+-ATPase の活性調節作用を全く生じさせないことを見い出している(5)が、コレラ毒素BがGM1のアミノ酸取り込み機構を変動させる作用を阻害することから、GM1によって生ずるこれらの作用はGM1分子中のシアル酸のみならず糖鎖部分の関与も不可欠であることが示唆された。

[2] α－SCによるSCGおよびNG節内へのAIB取り込みとNa^+, K^+-ATPase の活性調節: 種々の濃度のα－SC(Na塩)を溶液中に添加してインキュベートすると、神経節内へ取り込まれるAIB量は、NG標本では低濃度の0.01μMから有意な減少が認められα－SCの濃度を増加させてもそれ以上殆ど変化しなかった(2)。しかし、SCG標本ではα－SCによるAIB取り込みの抑制は濃度依存性で、α－SCの濃度が100μMでほぼ最大に達した(2)。さらに、SCGおよびNGでα－SC添加に

よってアミノ酸の取り込みが抑制された条件では、Na^+,K^+-ATPase活性の著明な低下が何れの神経節標本でも認められた（表１）。しかし、α－SC分子内の疎水性部分であるコレステロールの単独添加(20μM:最大溶解濃度)によっては、両神経節でアミノ酸取り込みと膜輸送酵素活性への影響は殆ど示されなかった（表１）。つまり、α－SCが引き起こした神経節標本のAIB取り込みとNa^+, K^+-ATPase活性の抑制効果は、分子内のシアル酸部分に依存した作用の結果であることが判明した。このように、神経突起の伸展や細胞の分化など培養神経腫瘍細胞の形態的変化を誘発する合成シアル酸コレステロールは、GM1糖脂質が神経細胞膜レベルで示した種々の生理活性作用と同様な機構で膜輸送系を調節する役割を有していることが明かとなった。[3] SCG内のATPおよびCrP含量におよぼすGM1またはα－SCの効果: シナプスを殆ど含まないNG標本に比較して、神経伝達機能に伴う活発な物質代謝活性を有するSCG神経節は、外液にエネルギー基質のブドウ糖の存在下で好気的にインキュベートすると、急速にATPおよびCrPを産生して高濃度に蓄積する（図１）。この時、GM1(5nM)を溶液中に添加すると、SCG内に含まれるATPとCrPレベルは共に2倍以上に上昇したが、さらに毒素Bを添加するとこの効果は阻止された（図１）。また、α－SC(100μM)添加によっても やはりSCG組織内にこれら高エネルギー・リン酸化合物が著明に蓄積された（図１）。すなわち、GM1のみならずα－SCは、何れもSCG組織の膜輸送酵素 Na^+,K^+-ATPase活性の触媒作用の低下を引き起こすため、アミノ酸の能動輸送のために必要なATPの分解・利用を減少させる結果、高エネルギー・リン酸化合物の組織内への蓄積の増大が認められたものと考えられる。以上のような実験成績から、GM1のみならず合成シアル酸化合物分子内の親水性シアル酸部分は、物質代謝系に与るエネルギーの積極的な利用の調節を介して神経膜の物質輸送系現象に密接に関与している可能性が強く示唆された。

〔謝辞〕本研究の一部は、文部省科学研究費（重点領域・ガングリオシド # 022592018）の援助に依った。

〔文献〕(1)Ando et al.(1984) Cell. Mol. Neurobiol. 4, 79-90 (2)Ando et al.(1990) Mol. Chem. Neuropathol. (in press) (3)Kato et al.(1988) Brain Res. 438, 277-285 (4)Kellie et al.(1983)J. Cell. Biol. 97, 447-454 (5)Nagata et al.(1987) J. Neurochem. 49, 201-209 (6)Tsuji et al.(1988)J. Neurochem. 50, 414-423

表１．摘出神経節内へのAIB取り込みとNa^+,K^+ATPase活性に及ぼすGM1あるいはα-SCの影響．

	AIB uptake (μmol/mg protein) Value		%	Na^+, K^+-ATPase activity (nmol of Pi/mg protein/30min) Value		%
SCG alone	48.2±2.6	(12)[b]	100	1,340±120	(8)[b]	100
+GM1(5nM)	35.2±2.2	(6)[a,b]	73	1,219±166	(4)[b]	91
+cholera toxin B(250ng/ml)	55.8±3.4	(6)	116	1,294±136	(4)	97
+GM1+toxin B	51.0±2.8	(6)	106	1,311±130	(4)	98
+α-SC(100μM)	29.4±1.9	(6)[a]	61	467±55	(4)[a]	35
+cholesterol(20μM)	46.1±2.5	(6)	96	1,302±125	(4)	97
NG alone	27.9±3.3	(6)[b]	100	246±60	(4)[b]	100
+GM1(5nM)	51.6±3.7	(4)[a,b]	185	688±110	(4)[a,b]	280
+cholera toxin B(250ng/ml)	28.9±3.6	(4)	104	252±59	(4)	102
+GM1+toxin B	45.4±3.0	(4)[a]	163	515±114	(4)[a]	209
+α-SC(100μM)	15.9±2.1	(4)	57	64±20	(4)[a]	26
+cholesterol(20μM)	27.7±3.0	(4)	99	227±91	(4)	92

平均値±SEM（例数）。 [a]$p<0.001$ SCG or NG alone と比較． [b]Nagata et al.(1987).

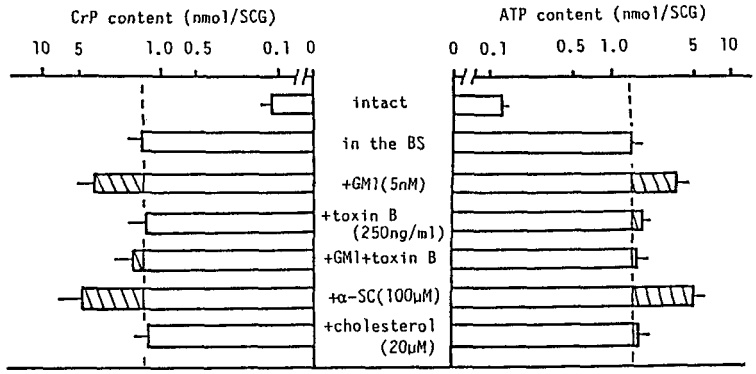


図１．摘出SCG内ATPおよびCrP含量におよぼすGM1あるいはα-SCの影響．

192 ＧＭ１糖脂質あるいはα－シアル酸コレステロールによる摘出白鼠神経節内タンパク代謝の変動

中島雄三・安藤正人・永田　豊
(藤田学園保健衛生大・医・生理)

〔要約〕天然のGM1糖脂質あるいは合成α-シアル酸コレステロール(α-SC)が、成熟白鼠上頸神経節 (SCG) あるいは節状(迷走)神経節 (NG)組織のタンパク合成能におよぼす影響を検討するため、神経節標本を[^{3}H]leucineを含む生理溶液中で好気的にインキュベートした後、酸不溶性分画に取り込まれた放射能を測定して検討した。[1] GM1(5nM)を溶液中に添加すると、SCG内タンパク分画への[^{3}H]leucineの取り込みは有意に減少した。この効果は、GM1糖鎖を特異的に隠蔽するコレラ毒素B(250ng/ml)をさらに添加すると完全に消失した。すなわち、SCGタンパクの合成はGM1分子内のシアル酸のみならずその糖鎖部分が抑制的に作用することが明確となった。[2] α-SC(100μM)を含む溶液中でインキュベートすると、両神経組織内への[^{3}H]leucineの取り込みは何れも著明に低下した。また、両神経節標本で疎水性のコレステロール(20μM)の単独添加では、α-SCによる抑制効果を上回るタンパク基質取り込みの低下が示された。つまり、α-SC内のシアル酸はコレステロールのタンパク代謝の傷害作用を一部回復させる効果を示した。[3] SCG内タンパク分画の電気泳動所見で、シアル酸化合物添加によって[^{14}C]leucine で標識されるタンパクspotsの量的な減少と、おそらく中性糖タンパクの質的な影響(等電点の変化)が見られた。従って、GM1によってSCG組織特異的に現れたタンパク合成能の抑制効果は、合成α-SC内のシアル酸によっても同様に認められた。[4] GM1あるいはα-SCによってSCGとNGでそれぞれ組織特異的に示されたのタンパク代謝の抑制効果は、溶液中のCa^{2+} 低下条件で著明に増強され、この変化はCa ionophoreの添加でやや回復するのが見られた。よって、これらシアル酸含有化合物は、細胞内Caイオン濃度環境に影響をおよぼして、タンパク代謝を調節している可能性が示唆された。

〔序〕脳組織由来のGM1糖脂質のみならず人工合成α-シアル酸コレステロール(α-SC) 化合物の分子内親水性シアル酸部分が、成熟白鼠上頸神経節(SCG)あるいは節状(迷走)神経節(NG)組織の膜輸送系酵素(Na^+,K^+-ATPase)活性をそれぞれ抑制あるいは活性化した結果、両神経節標本内へのタンパク代謝基質のアミノ酸（α-アミノイソ酪酸、AIB）の取り込みの低下あるいは増大効果が示されている(1)。そこでは、このようにして組織内に取り込まれたアミノ酸が、タンパク合成の基質として直接利用される過程に、GM1あるいはα-SC がどのように作用しているのかを、両神経節を[^{3}H]leucineを含む生理溶液中で好気的にインキュベートしたのち、その組織タンパク分画中への取り込みを調べた。さらに、両神経節のタンパク分画を二次元電気泳動法で分離して[^{14}C]leucineの標識タンパクを検索した。　また、GM1やα-SCはそれぞれ神経腫瘍細胞(Neuro 2a)や小脳顆粒細胞の培養液から細胞膜内外のCaイオンの透過性を増大することが報告(6)されているので、溶液中のCa^{2+}がアミノ酸(AIB)取り込みあるいはタンパク合成能におよぼすシアル酸化合物の効果をどのように修飾するかについても検討した。

〔実験材料および方法〕①ウレタン麻酔下にWistar 系成熟白鼠からSCGとNG標本を摘出した(1)。②神経節内タンパク分画への[^{3}H]leucine (9.25 KBq/ml)の取り込みあるいは[^{3}H]AIBの節内への取り込みは、HEPES を含むKrebs-Ringer buffer (pH7.4)中で37°C、2時間好気的にインキュベートした後、酸不溶性あるいは可溶性画分に回収された放射活性から、それぞれタンパク合成能(1)あるいはアミノ酸取り込み量(4)を求めた。③一方、[^{14}C]leucine(9.25MBq/ml)と共に取り込み実験と同様の条件下でpulse labelした神経節標本は、さらに常法(2)に従って二次元電気泳動法でタンパクを分離した後、ラベルされたspotsを比較検討してこれらシアル酸化合物の効果を分子レベルで検索した。

〔実験成績および考察〕 [1] 摘出SCG およびNG のタンパク分画への[^{3}H]leucine 取り込みとそのタンパク泳動像に及ぼすGM1あるいはα-SC の効果: 摘出神経節標本を[^{3}H]leucineを含む生理溶液中で好気的にインキュベーションした後、その組織内酸不溶性分画への放射能の取り込みは、細胞内のアミノ酸から新らたに生合成されるポリペプチドの代謝基質として直接利用される過程を知る指標となる。溶液中にGM1(5nM)を添加すると、SCG内タンパク分画への[^{3}H]leucine の取り込みは有意に減少するのが認められ、この効果は、GM1糖鎖を特異的に隠蔽するコレラ毒素B(250 ng/ml)(3)の添加によって、ほぼ完全に消失した。しかし、NG標本タンパク内への[^{3}H]leucine の取り込みにはGM_1や毒素Bの添加効果は全く認められなかった（表１）。このことは、SCGでみられたGM1のアミノ酸輸送系の抑制効果(1)と対応して、タンパク合成の過程にも GM1分子内のシアル酸のみならず糖鎖部分が抑制的に作用することを示唆している。一方、α-SC(100μM)はSCGあるいはNG内タンパクへの[^{3}H]leucine の取り込みを、何れも著明に低下させた。しかし、コレステロール(20μM:最大溶解濃度)の単独添加では、α-SC よりも強い[^{3}H]leucine 取り込みの減少が両神経節標本で認められた（表１）。つまり、コレステロールが示す極めて強いタンパク代謝の傷害作用をα-SC 内の

シアル酸部分が部分的に回復させる作用を現すことが示された。一方、[^{14}C]leucineでpulse labelしたSCGタンパクを二次元電気泳動的に分離してそのfluorogramパターンから、GM1あるいはα-SC添加によるタンパクspotの量的減少のみならずその感光度の低下傾向が見られた（当日発表）。したがって、これらシアル酸化合物によるタンパク基質取り込みの低下と対応したタンパク合成能の抑制効果が、分子レベルでも起こっていることが示された。また、中性領域で60kD（付近）のタンパクspotが特にα-SC刺激によって等電点(pI)のみを異にする数個のsub-spotsに分離する現象が認められた（当日発表）。これは、添加したα-SC内シアル酸基に依存した糖タンパクの修飾に起因して、pIが変化したものと解される。何れにしても、天然 GM1がSCG組織特異的にひきおこしたタンパク合成能の抑制効果は、人工α-SC 内のシアル酸によっても同様に認められた。　[2] GM1およびα-SC によるAIBあるいは[^{3}H]leucine取り込み調節作用に及ぼすCaイオンの影響: GM1あるいはα-SC分子内のシアル酸残基は、陰イオンに荷電する性質から、細胞内外のCa^{2+}をキレートして細胞内Ca濃度環境を変調させる可能性が考えられる(5)。そこで、溶液中のCa^{2+}を除去[EGTA(1mM)を添加]した生理溶液、あるいは逆にCa ionophore (A23187; 2μM)を溶液中に添加してCaの細胞内へのin-fluxを強制的に増加させた条件で、SCGあるいはNGをインキュベートすると、AIBの取り込みには有意な影響は見られなかった。さらに、GM1またはα-SCを添加しても、それぞれSCGで見られたAIB取り込みの抑制効果、あるいはNGで認められたGM1による促進効果、およびα-SCによる抑制効果は、何れも溶液中のCa^{2+}濃度変化によって大きな影響を受けなかった（図１）。　一方、　[^{3}H]leucineを含みEGTAを添加して生理溶液中のCa^{2+}を除去して神経節をインキュベートすると、SCGでは約25%、NGでは約50%にそれぞれタンパク分画への[^{3}H]の取り込みが強く抑制された。また、A23187を添加した条件でも両神経節標本で有意なleucine取り込みの減少効果が示されたが、Ca^{2+}除去の場合よりはその抑制効果は少なかった。これらのことから、神経節内タンパク代謝過程は、細胞内外の至適なCa^{2+}濃度環境に強く依存して行われていることが推察された。さらに、それぞれSCGあるいはNG神経節でみられたGM1およびα-SCによるタンパク代謝の抑制効果は、溶液中のCa^{2+} 除去によって著明に増強された。しかし、A23187添加で細胞内のCa^{2+}濃度を上昇させた条件では、GM1やα-SCの示すタンパク合成のレベルにまで回復する傾向が認められた（図１）。このことは、GM1やα-SCなどシアル酸を含む化合物は、細胞内のCa^{2+}濃度環境に依存してタンパク代謝に影響を及ぼしている可能性が強く示唆された。

〔謝辞〕本研究の一部は、文部省科学研究費（重点領域・ガングリオシド # 022592018）の援助に依った。

〔文献〕(1)Ando et al.(1990)Mol.Chem.Neuropathol.(in press).(2)Hammerschlag et al.(1989)J.Neurosci.Res. 23,416-424.(3)Kellie et al.(1983)J.Cell Biol.97,447-454.(4)Nagata et al.(1987)J.Neurochem.49,201-207.(5) Rahmann H.(1983)Neurochem.Int.5,539-547.(6)山下ら(1988)神経化学27,174-175.

表１.摘出神経節内への [^{3}H] leucine 取り込みにおよぼすGM1あるいはα-SCの影響.

	[^{3}H] leucine incorporation (dpm/ganglion)		%
SCG alone	32,140± 716	(12)	100
+GM1(5nM)	26,033±2,516	(10)[a]	81
+cholera toxin B(250ng/ml)	35,031±3,153	(6)	109
+GM1+toxin B	34,390±3,164	(6)	107
+α-SC(100μM)	12,213±1,050	(10)[b]	38
+cholesterol(20μM)	7,329± 650	(4)[b]	23
NG alone	48,212±4,538	(12)	100
+GM1(5nM)	47,739±5,729	(10)	99
+cholera toxin B(250ng/ml)	51,587±6,190	(6)	107
+GM1+toxin B	49,176±4,672	(6)	102
+α-SC(100μM)	37,605±3,685	(10)[b]	78
+cholesterol(20μM)	24,589±2,213	(4)[b]	51

平均値±SEM (例数). [a]p<0.05, [b]p<0.001 SCG or NG aloneと比較.

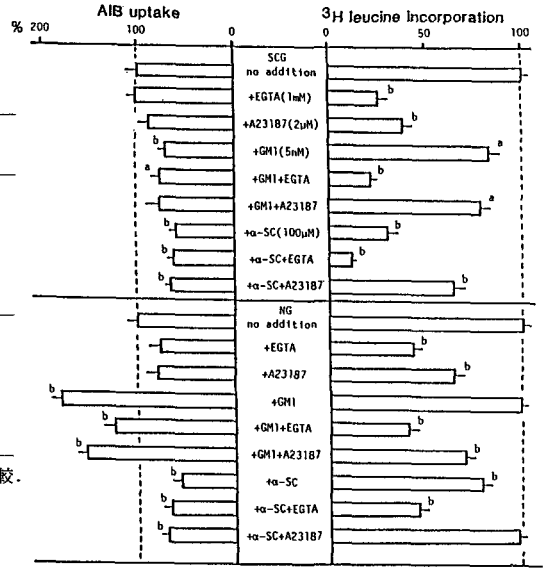


図１. GM1あるいはα-SCによる摘出神経節内 AIB および [^{3}H] leucine 取り込みにおよぼすCaイオンの影響.　[a]p< 0.05, [b]p< 0.001

193 PC12及びNG108-15細胞のCa^{2+}動員に対する小胞体Ca^{2+}-ATPase阻害薬thapsigarginの効果

竹村晴夫、横沢紀子*、小熊恵二*、O. Thastrup§、大鹿英世
（札幌医大・薬理、微生物*、Dept.Clin.Chem., Univ.Hospital, Copenhagen§）

〔要約〕
小胞体Ca^{2+}-ATPase阻害薬thapsigargin（TG）のPC12及びNG108-15細胞内Ca^{2+}（$[Ca^{2+}]i$）に対する作用を検討した。PC12細胞において、カルバコール（CCh）刺激による$[Ca^{2+}]i$は一過性に上昇した後、なお刺激前より高いレベルを持続的に保持した。TGはCChよりもさらに$[Ca^{2+}]i$を増加させ、その高いレベルを維持させた。細胞外液Ca^{2+}除去下で、CCh及びTGによる$[Ca^{2+}]i$の持続は消失し、一過性の上昇を示した。これらのことから、CChやTGによる$[Ca^{2+}]i$の高いレベルの持続は外液Ca^{2+}の流入によると思われる。CCh添加後のTGによる$[Ca^{2+}]i$はわずかに抑制される程度であったが、逆に、TG添加後ではCChは全く$[Ca^{2+}]i$を上昇させなかった。他方、NG108-15細胞では、ブラジキニン（BK）は細胞外液Ca^{2+}存在、非存在にかかわらず、一過性の$[Ca^{2+}]i$の増加を引き起した。TGにより上昇した$[Ca^{2+}]i$は時間と共に減少したが、なお高いレベルを持続した。この持続は細胞外液Ca^{2+}非存在下で消失した。BKの前処置でもTGによる$[Ca^{2+}]i$はほとんど影響を受けなかったが、TGの前処置後BKは$[Ca^{2+}]i$を増加させなかった。以上のことから、TGはイノシトール1,4,5-三リン酸（IP_3）感受性及び非感受性両細胞内貯蔵部位からCa^{2+}を遊離すること、さらに、容量性Ca^{2+}流入(3,4)が興奮性細胞にも存在することが示唆される。

【目　的】
興奮性細胞におけるCa^{2+}の流入は主として膜電位依存性及び受容体作動性Ca^{2+}チャンネルを介して生じるが、前者に比較して後者の活性化機構は良くわかっていない。非興奮性細胞において、Putneyは細胞内貯蔵部位のCa^{2+}が減少するとCa^{2+}流入が活性化するという容量性Ca^{2+}流入を提唱し(3)、我々はその存在を唾液腺(4,5)や涙腺細胞(2)を用いて実証した。今回、小胞体のCa^{2+}-ATPaseを選択的に阻害するTGを用いて、この容量性Ca^{2+}流入が興奮性細胞にも当てはまるかどうかを、褐色細胞腫PC12及びニューロブラストーマ×グリオーマNG108-15両細胞のCa^{2+}動員を解析することにより検討した。

【方　法】
細胞培養：PC12細胞の培養はコラーゲンコーティングした9 cmディッシュ上で、10%馬血清、5%牛胎仔血清（FCS）を含むRPMI-1640培地にて行った。NG108-15細胞は9 cmディッシュ上で、5% FCSを含むDMEM-HAT培地で培養した。いずれの細胞も37℃、8% CO_2の条件で48～72時間培養し、実験に用いた。
$[Ca^{2+}]i$の測定：ディッシュの培養液を除去し、2μM fura-2/AMを含んだKrebs-Ringer-Hepes solution (KRH; 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)にて、室温中で100% O_2を通気しながら30分間負荷した。その後、細胞を新鮮なKRHで洗浄した後、同溶液にてキュベット中に再浮遊させ、fura-2のリークを避けるため32℃で蛍光を測定した。

【結　果】
図1に示されるように、PC12細胞において、最大刺激濃度の1μM TGは$[Ca^{2+}]i$を上昇させ、その高いレベルを維持した。この維持レベルはnimodipine（1μM）で影響されなかった。100μM CChにより$[Ca^{2+}]i$は上昇したがピークはTGによるものより小さかった。この$[Ca^{2+}]i$はその後時間と共に減少したが、静止レベルより高いレベルを維持した。細胞外液Ca^{2+}除去下で、TGは一過性の$[Ca^{2+}]i$の増加を生じたが、この後にCChで再刺激しても$[Ca^{2+}]i$は増加しなかった。同条件下で、CChはTGと同じく一過性に$[Ca^{2+}]i$を上昇させ、この後にTGを添加すると、$[Ca^{2+}]i$の上昇はTG単独のものよりわずかに抑制される程度であった。図2にNG108-15細胞における$[Ca^{2+}]i$の変化を示した。細胞外液Ca^{2+}存在下で、1μM BKは$[Ca^{2+}]i$を一過性に上昇した。TGにより増加した$[Ca^{2+}]i$はピーク後減少したが、ある高いレベルを持続した。この持続は細胞外液Ca^{2+}除去下で消失した。BKによる$[Ca^{2+}]$

iが静止レベルに戻った後、TGを添加するとほぼTG単独の$[Ca^{2+}]i$の上昇が認められた。しかし、最初のTG添加後にBKで再び刺激しても$[Ca^{2+}]i$は上昇しなかった。このことは細胞外液Ca^{2+}非存在下でも観察された。

【考　察】

PC12及びNG108-15両細胞において、TGは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液からCa^{2+}を流入して$[Ca^{2+}]i$を上昇させたことから、興奮性細胞にも、容量性Ca^{2+}流入が存在することが示唆された。TGはイノシトールリン酸を産生しないし、Ｃａイオノフォアとしても作用しない(1,6)。TGの$[Ca^{2+}]i$を上昇させる機序は小胞体にあるCa^{2+}-ATPaseを選択的に阻害するために、小胞体からリークしたCa^{2+}が再取り込みされないためと考えられている(1,6)。細胞外液Ca^{2+}非存在下での両細胞において、ＩＰ$_3$を産生する薬物の前処置でもTGによる$[Ca^{2+}]i$の増加は余り影響されないことと、逆に、TG添加後ＩＰ$_3$を上昇させる薬物で再刺激しても$[Ca^{2+}]i$は増加しなかったことから、TGはＩＰ$_3$に感受する細胞内貯蔵部位ばかりではなくＩＰ$_3$に感受しない貯蔵部位からもCa^{2+}を遊離することが示唆される。さらに、TGによる$[Ca^{2+}]i$の維持レベルがNG108-15細胞におけるよりも高いことは、細胞内貯蔵部位とCa^{2+}流入部位との連関性がPC12細胞の方が高いことを示唆する。

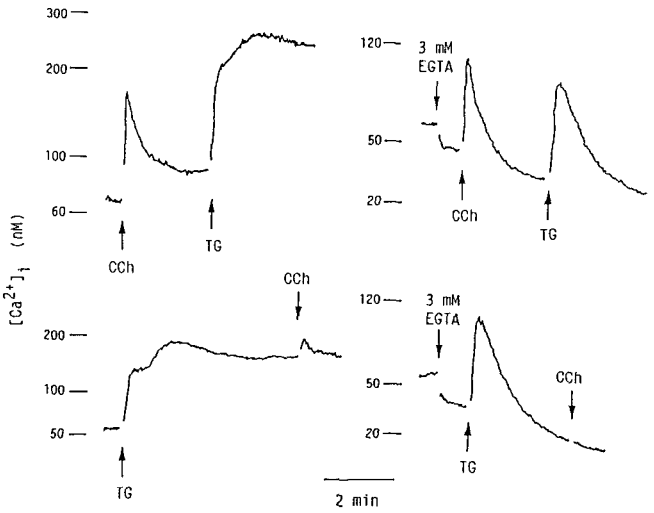


図１　細胞外液Ca^{2+}存在及び非存在下でのPC12細胞の$[Ca^{2+}]i$に対するCCh及びTGの効果

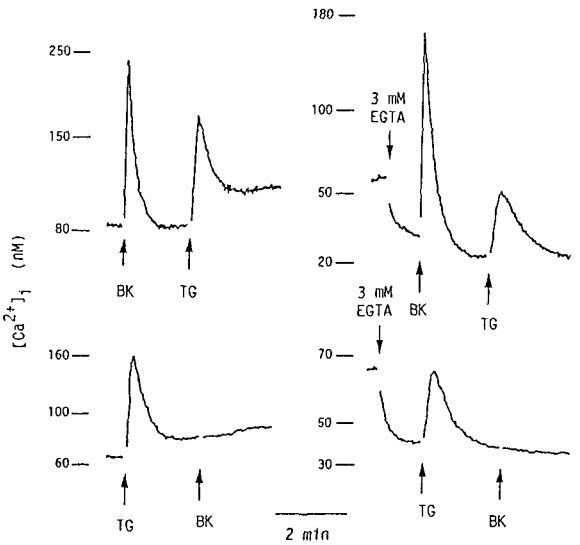


図２　細胞外液Ca^{2+}存在及び非存在下でのNG108-15細胞の$[Ca^{2+}]i$に対するBK及びTGの効果

【文　献】

1) Jackson, T.R., Patterson, S.I., Thastrup,O. and Hanley, M.R. (1988) *Biochem.J.* 253, 81-86.　2) Kwan, C.Y., Takemura, H., Obie, J.F., Thastrup, O. and Putney,J.W.,Jr. (1990) *Am.J.Physiol.* 258, C1006-C1015. 3) Putney, J.W.,Jr. (1986) *Cell Calcium* 7, 1-12.　4) Takemura, H. and Putney, J.W., Jr. (1989) *Biochem.J.* 258, 409-412. 5) Takemura, H., Hughes, A.R., Thastrup,O. and Putney, J.W., Jr. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 12266-12271.　6) Thastrup, O., Dawson, A.P., Scharff, O., Foder, B., Bjerrum, P. and Hanley, M.R. (1989) *Agents Actions* 27, 17-23.

194 A_1アデノシンレセプターのカルシウムイオンによる活性化

川島誠一，Teresa Zalewska
（都老人研・生化学，ポーランド科学アカデミー）

［要約］
ラット脳のA_1アデノシンレセプターに対するカルシウムイオンの影響を検討した。A_1レセプターに特異的なアゴニストであるシクロヘキシルアデノシン（CHA）の結合は、EGTA存在下で調製した膜では減少していた。このことは、内在性カルシウムイオンによりレセプターが活性化されることを示唆している。活性化はレセプターの親和性が上昇した結果で、レセプター数には変化がなかった。この膜標品をカルシウムあるいはカルシウムおよびカルシウム依存性中性プロテアーゼ（CANP）で処理してもCHAの結合は増加せず、またEGTA非存在下での膜調製過程にCANPの阻害剤であるロイペプチンを共存させても結合の低下は認められなかった。一方、カルシウムにより活性が制御されているリン脂質代謝系の酵素であるホスホリパーゼA_2の阻害剤であるメパクリンやシクロオキシゲナーゼの阻害剤であるインドメサシンはカルシウムによるレセプターの活性化を阻止したが、ホスホリパーゼCの阻害剤であるネオマイシンには阻害効果がなかった。さらにプロスタグランジン自身の効果を検討したところ、PGE_2は効果がなく$PGF_{2\alpha}$に結合増加作用が認められた。

［目的］
中枢神経末端では神経伝達物質レセプターの質的・量的変化によりその機能が調節されている。種々の因子が細胞膜レセプターの変化に関与し、単離細胞での研究が進んでいる。しかし、脳における機作については知見が乏しい。アデノシンはヌクレオチドの代謝中間体であるのみでなく、強力な神経調節物質でもある。中枢神経細胞には高親和性のA_1アデノシンレセプターが存在し、アデノシンが結合することにより自発性および誘発性活性が低下する *(1)*。一方、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸のレセプター活性や抑制性伝達物質であるGABAのレセプター活性はカルシウムイオンによる調節を受けていることが知られている。そこで、A_1アデノシンレセプター活性におよぼすカルシウムイオンの効果およびカルシウム依存性のタンパク質分解・リン脂質代謝の関与を検討した。

［実験方法］
ラット脳の膜標品はBrunsらの方法 *(2)* に準じて調製し、アデノシンデアミナーゼ処理により内在性アデノシンを分解後レセプター活性を測定した。A_1アデノシンレセプターのリガンドとしては［^{3}H］シクロヘキシルアデノシン（CHA）を用い、25℃で15分間温置後フィルター上に膜を集め、結合した放射活性を測定した。非標識CHA存在下での結合を差し引き、特異的結合とした。タンパク質はLowryらの方法 *(3)* により定量した。

［結果と考察］
EGTA存在下で膜を調製すると、CHAの特異的結合は減少していた。スキャッチャードプロット分析から、K_DはEGTA非存在下での6.4 nMに対しEGTA存在下では17.5 nMと増加していたが、B_{max}はEGTAの存否にかゝわらず360 fmol/mgタンパク質であった。このことは、EGTAを含まない条件で膜を調製すると、レセプター数には変化がないがレセプターのリガンドへの親和性が増大することを示している。即ち、内在するカルシウムイオンによりA_1アデノシンレセプターが活性化される。その可能性の一つ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。しかし、EGTA存在下で調製した膜をカルシウムあるいはカルシウムおよび精製CANPで処理してもCHAの結合は上昇せず、またCANPの阻害剤であるロイペプチンをEGTA非存在下での調製過程に共存させても結合の上昇は抑えられなかった。従って、CANPによる膜タンパク質の分解はA_1アデノシンレセプターのカルシウムによる活性化に関与しないと結論した。しかし、カルシウム存在下での膜調製過程で非可逆的なレセプターの活性化が起こることは事実である。そこで次の候補としてリン脂質に注目した

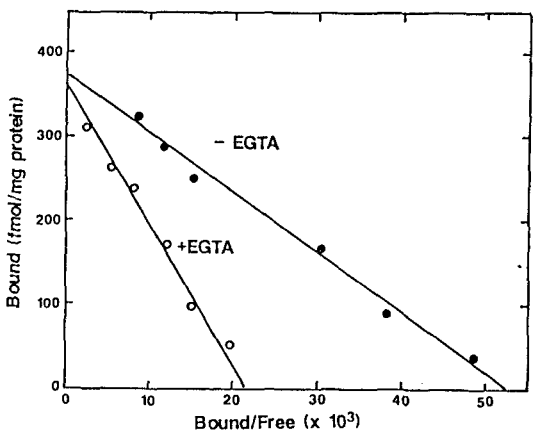
(4)。リン脂質代謝を司る酵素であるホスホリパーゼC（PLC）とホスホリパーゼA_2（PLA_2）の活性はカルシウムイオンにより昂進する。リン脂質の分解産物がA_1レセプターの調節に関与している可能性を検討するため、これらの酵素の阻害剤の影響を調べた。膜調製過程にPLA_2の阻害剤であるメパクリン *(5)* やシクロオキシゲナーゼの阻害剤であるインドメサシン *(6)* を添加すると、得られた膜のCHA結合活性は低下した。即ち、カルシウムによるレセプターの活性化を阻止した。インドメサシンの阻害効果はレセプター数の減少（B_{max}=200 fmol/mgタンパク質）によるものであり、一方メパクリンの効果は主として結合定数の低下（K_D=13.0 nM）による。PLCの阻害剤であるネオマイシンに阻害効果がないことを考え併せると、PLA_2の活性化による膜リン脂質からのアラキドン酸の遊離がA_1レセプターとCHAの結合に重要であることを示している。生成したアラキドン酸はシクロオキシゲナーゼの作用によりプロスタグランジンへ変換するか、あるいはリポキシゲナーゼの作用によりロイコトリエンへ変換するものと思われる。上述のようにシクロオキシゲナーゼの阻害剤（インドメサシン）活性化を阻害する。他のアラキドン酸代謝経路の関与を検討するため5-リポキシゲナーゼの阻害剤であるAC-5-1 *(7)* の効果を調べたところ、結合の増加が認められた。これは、他のリポキシゲナーゼ阻害剤であるカフェイン酸で報告 *(8)* されているように、AC-5-1によりシクロオキシゲナーゼが活性化されプロスタグランジンの生成が促進された結果によるものであろう。そこでプロスタグランジン自身の効果を検討したところ、PGE_2は若干の結合阻害作用が認められたが、$PGF_{2\alpha}$には濃度依存的な結合増加作用が認められた。

膜レセプターの性質はその周辺の局所的環境により変化する。一方、膜脂質がレセプターとリガンドの相互作用に関与していることも知られている *(9)*。本研究の結果から、中枢神経系のA_1アデノシンレセプターとアデノシンの結合は$PLA_{2\alpha}$やシクロオキシゲナーゼによるリン脂質代謝産物によって調節されていると結論された。

［文献］

1. Lee,K.S., Schubert,P., Reddington,M., and Kreutzberg,G.W. (1983) *Neurosci. Lett.* **37**, 81-85.
2. Bruns,R.F., Daly,J.W., and Snyder,S.H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **77**, 5547-5551.
3. Lowry,O.H.,Rosenbrough,N.J., Farr,A.L., and Randall,R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
4. Abood,L.G., Butler,M., and Reynolds,D. (1980) *Molec. Pharmacol.* **17**, 290-294.
5. Irvine,R.F. (1982) *Biochem. J.* **204**, 3-16.
6. Vane,J.R. (1971) *Nature New Biol.* **231**, 232-235.
7. Koshihara,Y., Fujimoto,Y., and Inoue,H. (1988) *Biochem. Pharmacol.* **37**, 2161-2165.
8. Koshihara,Y., Neichi,T., Murota,S., Lao,A., Fujimoto,Y., and Tatsuno,T. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **792**, 92-97.
9. Loh,H.K., and Law,P.Y. (1980) *Ann. Rev. Pharmacol.* **20**, 201-234.

ラット脳の膜とCHAの特異的結合
（スキャッチャードプロット）
K_D= 6.4±0.6nM（−EGTA）
=17.5±1.4nM（+EGTA）
B_{max}はいずれも360±25fmol/mgタンパク質



195 脳に存在するＣａ誘発性 Ｃａ遊離チャンネルのリン酸化

吉田　明、高橋　正身＊
〈大阪大・理・生物、＊三菱化成生命研・脳神経化学〉

〔要約〕

脳に存在するＣａ誘発性Ｃａ遊離チャンネル（ＣＩＣＲチャンネル）について心筋ＣＩＣＲチャンネルを認識するモノクローナル抗体Ｒｙ－４（１、２）を用いて検討を行った。ラット脳から調製したミクロソーム標品は、外液Ｃａに依存した^{45}Ｃａ遊離活性を示し、またＣＩＣＲチャンネルの指標である［^{3}Ｈ］リアノジン結合活性を有していた。さらにそのリアノジン結合活性は、抗体Ｒｙ－４により特異的に免疫沈降された。この抗体Ｒｙ－４により３５０ｋＤａのタンパク質が特異的に免疫沈降され、このタンパク質が心筋型ＣＩＣＲチャンネルと同様にｃＡＭＰ依存性キナーゼによってリン酸化されることを見いだした。以上の結果は、脳に存在するＣＩＣＲチャンネルが心筋型あるいは、心筋型に類似したものであることを示唆している。

神経細胞内Ｃａ貯蔵部位からのＣａ遊離には、ＩＰ$_3$誘発性の遊離の他にリアノジン感受性のＣａ遊離が存在することが知られている。しかし脳に存在するリアノジン感受性の遊離に関わるＣａチャンネルはまだ同定されていない。骨格筋および心筋からは、リアノジン感受性Ｃａ遊離チャンネルがリアノジン受容体自身として精製されているが、両者は異なる分子であることが示されている。今回、心筋のＣＩＣＲチャンネルに対するモノクローナル抗体Ｒｙ－４を用いて、ラット脳のＣＩＣＲチャンネルについて検討を行った。

【方法】

脳ミクロソームの調製はショ糖密度勾配遠心法を用いて行った。Ｃａ遊離活性の測定は、ラット脳ミクロソームを^{45}ＣａＣｌ$_2$とともにインキュベートし^{45}Ｃａを受動的に取り込ませた後、種々のＣａ－ＥＧＴＡバッファーで希釈し一定時間後小胞内に残存した放射活性を計測することによって行った。ミクロソームの可溶化には、１％ ＣＨＡＰＳ、０．５％ フォスファチジルコリン（ＰＣ）、１Ｍ ＮａＣｌ、２ｍＭＤＴＴ、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ－Ｔｒｉｓ ｐＨ７．４を用いた。可溶化ミクロソームと抗体Ｒｙ－４またはコントロール抗体をインキュベートした後、プロテインＡセファロースを用いて免疫沈降を行った。タンパク質のリン酸化は、免疫沈降後に１％ ＣＨＡＰＳ、０．５％ ＰＣ、６ｍＭ ＭｇＣｌ$_2$、６ｍＭ ＥＧＴＡ、２μＭ［γ－^{32}Ｐ］ＡＴＰ、２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ－Ｔｒｉｓ ｐＨ７．４とｃＡＭＰ依存性キナーゼの触媒サブユニット存在下で行った。［^{3}Ｈ］リアノジン結合測定は、膜標品及び可溶化標品とも３０μＭ ＣａＣｌ$_2$存在下で行った。

【結果】

ラット脳ミクロソームからのＣａ遊離を測定すると、外液のＣａ濃度をμＭレベルに上げることにより小胞からのＣａ遊離量の増大が観察された。この結果は、脳ミクロソームの一部がＣＩＣＲチャンネルを有するＣａ貯蔵部位であることを示唆している。また、ラット脳の膜画分には特異的なリアノジン結合活性が認められ、特にＰ$_3$画分に最も高い結合活性が認められた。心筋ＣＩＣＲチャンネルに対するモノクローナル抗体Ｒｙ－４は、可溶化したラット脳のリアノジン結合活性を特異的に免疫沈降できた。この条件下で免疫沈降された可溶化タンパク質を電気泳動後銀染色により検出すると、心筋膜可溶化標品からＲｙ－４により特異的に免疫沈降されるＣＩＣＲチャンネルと同じ移動度を示す分子量約３５０ｋＤａのタンパク質がこの抗体特異的に免疫沈降されていることがわかった（図１）。このタンパク質を免疫沈降した後、その沈澱をｃＡＭＰ依存性キナーゼと［γ－^{32}Ｐ］ＡＴＰを共にインキュベートすると、心筋ＣＩＣＲチャンネルの場合（２）と同様^{32}Ｐの取り込みがみられた（図２）。ラット脳膜画分の中では、Ｐ$_3$画分より得られた

免疫沈澱中に最も多くの^{32}P取り込みがみられ、リアノジン結合活性の細胞内分布とよく相関した。

【考察】

細胞内Ｃａ貯蔵部位からのＣａ遊離は、種々の細胞において観察されている。このＣａ遊離を起こすＣａチャンネルとしては、リアノジン受容体とＩＰ$_3$受容体が知られている。最近神経細胞の細胞内Ｃａ遊離にもリアノジン感受性な成分があり、ある種の刺激はそれを通じて細胞内Ｃａ濃度の上昇を引き起こしていると考えられるようになってきている。リアノジン受容体の脳での存在については報告されているが、未だその実体については不明なままである。今回の実験では、ラット脳には免疫学的性質や、リアノジン結合活性、分子量、及びｃＡＭＰ依存性キナーゼによってリン酸化されるなどの点で非常に心筋型のＣａチャンネルに類似したタンパク質が存在することが明かとなった。今後さらにこの脳リアノジン受容体の局在やリン酸化による機能変化について検討していきたい。

【引用文献】

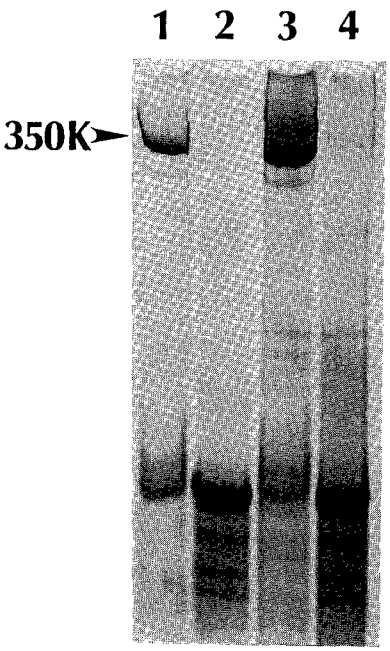
1．Imagawa, T. et al.　J. Biochem. (1989) 106, 342-348

2．Takasago, T. et al.　J. Biochem. (1989) 106, 872-877

【謝辞】

本研究において用いたモノクローナル抗体Ｒｙ－４並びに御助言を頂きました国立循環器病センターの重川宗一先生、今川敏明先生に深く感謝します。

図１．　免疫沈澱の銀染色



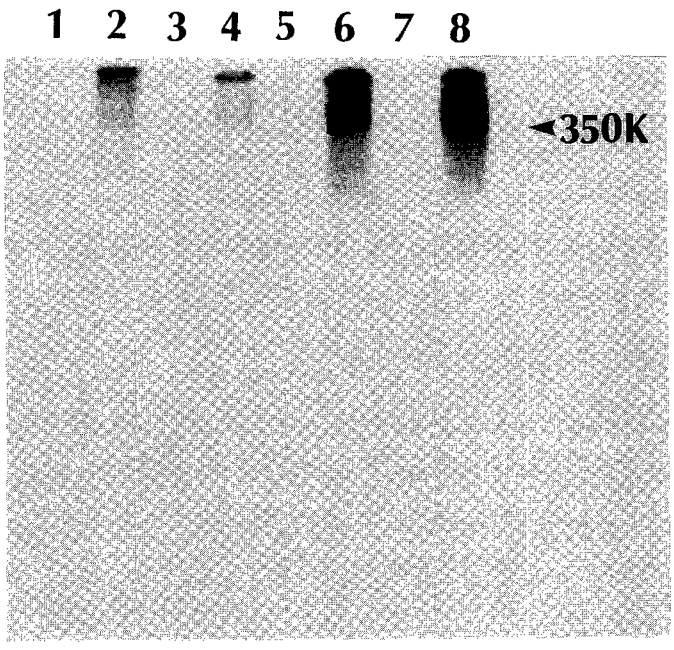
1，3　Ｒｙ－４抗体

2，4　コントロール抗体

1，2　トリ心臓

3，4　ラット脳

図２．　免疫沈澱のｃＡＭＰ依存性キナーゼによる^{32}Ｐリン酸化



1，3，5，7　コントロール抗体

2，4，6，8　Ｒｙ－４抗体

1，2　ラット脳Ｐ$_1$画分

3，4　ラット脳Ｐ$_2$画分

5，6　ラット脳Ｐ$_3$画分

7，8　トリ心臓

196 単離成長円錐画分における内因性チロシンリン酸化：130K蛋白質の同定

五十嵐道弘[1)]、斎藤　繁[1),2)]、小宮義璋[1)]
（群馬大・医・[1)]分子病態学、[2)]麻酔・蘇生学）

〔要約〕ラット胎生17日目の脳より単離した成長円錐画分の内因性チロシンキナーゼで、顕著にリン酸化される分子量13万の蛋白質（130K蛋白）の性状を詳しく検討した。二次元電気泳動上、リン酸化された130K蛋白はpI 7に近い位置に移動した。またリン酸化された130K蛋白は、細胞骨格画分に回収された。以上の性質より、130K蛋白がvinculinである可能性が示唆されたので、130K蛋白と抗vinculin抗体との反応性を免疫沈降法、免疫ブロッティング法で調べたところ、130K蛋白はvinculinと同一の挙動をとることが確認された。また130K蛋白の^{32}P のとりこみは、成長円錐画分の方が核周囲部を含む画分や軸索を含む画分にくらべて高かったが、免疫ブロッティング法でみる限り、vinculinの成長円錐画分における集積は認められず、成長円錐画分におけるチロシンキナーゼ活性の高さに特徴があるものと思われた。

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、突起の伸長とその経路の誘導に重要な役割を果たすことが推定されている（4)。成長円錐がその機能を果たすために必要な情報伝達機構を検討するため、既に演者らはラット胎仔脳より細胞分画法により単離した成長円錐の生化学的性状を検討してきた（6,8)。今回は昨年の本学会で発表した(5)、成長円錐画分に存在し、内因性チロシンリン酸化を受ける分子量13万の蛋白（130K蛋白）の性状をさらに詳しく検討した外、胎仔脳由来の他の画分のリン酸化と比較したので、報告する（7)。

【方法】①成長円錐画分の調製：ラット胎生17日目の脳より、Pfenninger法(12)の変法を用いて採取した（8)。②成長円錐画分における内因性のチロシン蛋白リン酸化：チロシンリン酸化の反応は、昨年の本学会で報告した方法（Zn^{2+}, VO_3^-, Mn^{2+}を含む系）に従った（5,7)。リン酸化された蛋白は一次元のSDS-PAGEまたはO'Farrell の二次元電気泳動法で分析した。但し、両性担体の組成は(pH 5-7): (pH3.5-10) = 4:1とした。電気泳動後は、オートラジオグラムを作成して、ラベルされた蛋白を分析した。③細胞骨格画分及び膜画分の調製：リン酸化終了後、Gordon-Weeksの方法(3) により（Triton X-100の終濃度は 1 %とした）、細胞骨格画分を得た。また粗膜画分は80,000 gで 1時間遠心して、そのpelletを得た。④抗vinculin抗体との反応性：免疫ブロッティング法にはヒト子宮筋由来のvinculinに対するモノクローナル抗体（Chemicon社より購入）を、免疫沈降法ではラット肝由来のvinculinを抗原とするポリクローナル抗体を用いた。免疫ブロッティング法は一次元及び二次元電気泳動について行なった。免疫沈降法にはPansorbin（Calbiochem社より購入）を用いて、Niggliらの方法(10)に従って行なった。⑤他の胎仔脳由来の画分におけるリン酸化：成長円錐画分におけるリン酸化と同様にして行い、総蛋白量は15 μgに揃えた。

【結果】二次元電気泳動の像から、130K蛋白はpI 7に近い等電点をもつ蛋白であることが見いだされた（図1 (a)）。またリン酸化後に細胞骨格画分を分離すると、130K蛋白は細胞骨格画分（Triton X-100不溶性画分）に回収された（図1 (b)）。一方、リン酸化された130K蛋白は、可溶性画分より粗膜画分に多く回収された。130K蛋白のこれらの性質は、vinculinの性質ときわめてよく一致する。抗vinculin抗体と反応する成長円錐蛋白は、130K蛋白と同一の挙動を示した（図2）。またリン酸化後に、ラット肝由来のvinculinを加えて抗vinculin抗体と反応させたところ、130K蛋白の位置はこれと一致した。免疫沈降法でも130K蛋白は抗vinculin抗体と反応した（図3）。

他の胎仔脳由来の画分でのチロシンリン酸化と比較すると、^{32}Pの取込みは成長円錐画分で顕著だったが、免疫ブロッティングでvinculinの分布を調べると、vinculinの成長円錐への集積は認められなかった。

【考察】成長円錐の内因性チロシンリン酸化の基質としては、55K蛋白（tubulin）と130K蛋白が最も顕著であり、130K蛋白は生化学的な挙動がすべてvinculinと一致し、抗vinculin抗体との特異的な反応性が見いだされた。よって、成長円錐画分の内因性リン酸化を受ける130K蛋白は、vinculinと結論される。成長円錐の膜画分に局在する内因性チロシンキナーゼの基質として糖蛋白性の115K蛋白が見いだされ、integrinのβ-subunitである可能性が示唆されているが(1)、相分離実験の結果などから130K蛋白とは別の蛋白と考えられる。Vinculinは細胞内のadhesion plaque の部位に局在し(11)、アクチン繊維と形質膜の連結に重要な蛋白であり、そのリン酸化は成長円錐の機能である運動性と分子認識による接着性に深く関わっている可能性が推測される。また、成長円錐画分における130K蛋白の顕著なリン酸化は、この画分に内在するチロシンキナーゼ活性が高いことが原因と考えられる。胎仔脳由来の成長円錐画分においてpp60$^{c\text{-}src}$ の高い比活性が既に報告されているが(9)、それ以外のチロシンキナーゼについても検討したい。またvinculinの総量には部位差が見られなかったが、リン酸化されたvinculinは細胞骨格に集積するため(2)、細胞骨格性の部分について、さらに検討を進めたい。

〔ポリクローナル抗vinculin抗体を供与いただいた月田承一郎教授（生理研・液性調節）、ラット肝由来のvinculinを供与いただいた月田早智子博士（生理研・液性調節）に深謝する。〕

【文献】(1) Cheng, N. & Sahyoun, N. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 2417-2420. (2) Geiger, B. (1982) J. Mol. Biol. **159**, 685-701. (3) Gordon-Weeks, P.R. & Lang, R.D.A. (1988) Dev. Brain Res. **42**, 156-160. (4) 五十嵐道弘 (1990) **蛋白質核酸酵素 35**, 464-479. (5) 五十嵐道弘、小宮義璋 (1989) **神経化学 28**, 404-405. (6) Igarashi, M. & Komiya, Y. (1990)Neurosci. Res. **11**(Suppl.) (in press) (7) Igarashi, M., Saito, S. & Komiya, Y. (1990) Eur. J. Biochem. (in press) (8) Igarashi, M., Waki, H., Hirota, M., Hirabayashi, Y., Obata, K. & Ando, S. (1990) Dev. Brain Res. **51**, 1-9. (9) Maness, P.F., Aubry, M., Shores, C.G., Frame, L. & Pfenninger, K.H. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 5001-5005. (10) Niggli, V., Sommer, L., Bruuner, J. & Burger, M.M. (1990) Eur. J. Biochem. **187**, 111-117. (11) Otto, J.J. (1990) Cell Motil. Cytoskel. **16**, 1-6.
(12) Pfenninger, K.H., Ellis, L., Johnson, M.P., Friedman, L.B. & Somlo, S. (1983) Cell **35**, 573-584.

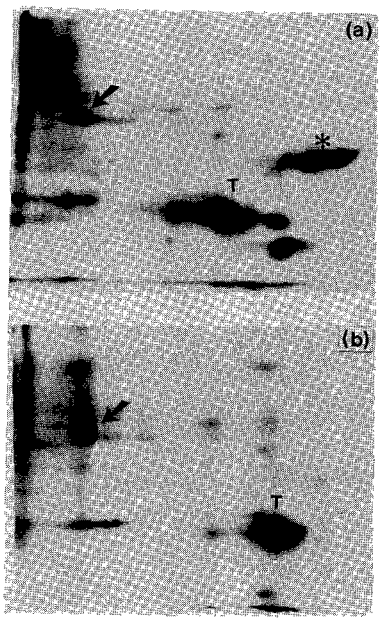


図1　成長円錐画分でチロシンリン酸化を受ける蛋白の二次元電気泳動像
(autoradiogram)
(a) 全成長円錐画分のチロシンリン酸化像
(b) (a) の細胞骨格成分
（矢印：130K蛋白；　T：tubulin　；　＊：pp80）

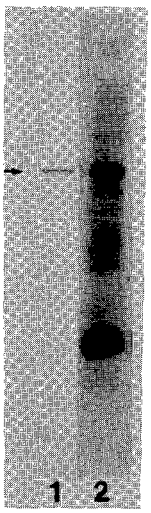


図2　抗vinculin抗体による免疫ブロッティング(1)と130K蛋白(2)の比較
1. 抗vinculin抗体と反応する成長円錐画分の蛋白 (immunostaining)
2. 成長円錐画分のチロシンリン酸化像(autoradiogram)

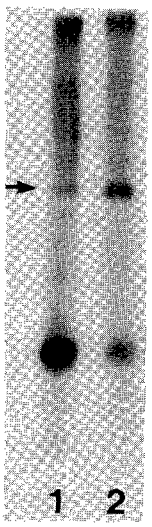


図3　抗vinculin抗体による免疫沈降(autoradiogram)
1. 成長円錐画分のチロシンリン酸化像
2. 1.のうち、抗vinculin抗体で沈降する成分

197 精神分裂病死後脳におけるキスカル酸レセプターに関する研究

車地 暁生、石丸昌彦、融 道男
東京医科歯科大学医学部神経精神医学教室

〔要約〕
慢性分裂病死後脳の膜標品を用いて、興奮性アミノ酸レセプターのサブタイプのひとつであるキスカル酸レセプターに関して、[³H]α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA)をリガンドとして用いたレセプター結合実験を行った。[³H] AMPA 結合は 100 mM KSCN 存在下では、高親和性 (Kd = 5.82 nM, Bmax = 247 fmol/mg prot)と低親和性 (Kd = 214 nM, Bmax = 424 fmol/mg prot) 結合部位の二つにわかれた。[³H] AMPA 結合 (6 nM)は、前頭前野、側頭葉、および頭頂葉において、分裂病群は対照群と比較して変化していなかった。

興奮性アミノ酸のレセプターは、一般的には、３つのサブタイプに分類されている、すなわち、N-methyl-D-aspartate (NMDA), カイニン酸およびキスカル酸である。麻酔薬として臨床使用されていた phencyclidine (PCP)がヒトに精神分裂病に酷似した精神症状を引き起こし、この PCP が強力な NMDA の非競合的アンタゴニストであることから、興奮性アミノ酸と精神分裂病の病態との関連が注目されてきており、分裂病死後脳の研究ではカイニン酸結合が前頭前野で増加していることが報告されている (Nishikawa, 1983)。本実験では、[³H] AMPA をリガンドとして用いて、分裂病死後脳の大脳皮質におけるキスカル酸レセプター結合実験を行った。

実験方法 分裂病群は 13 例、対照群は 10 例で、死亡年齢、死後凍結時間において両群の間に差はなかった。各脳部位の分割方法はすでに報告した通りである (Toru, 1988)。４倍容の 0.32 M の sucrose 中で -80 ℃ で凍結保存されていた脳ホモジュネートを融解し、約 50 倍容の 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4, 4 ℃) 中でポリトロンを用いてホモジュナイズした後、遠心分離をおこなった (18,000 rpm, 30 min)。同様の遠心分離操作を２回行った後、脳膜標品は 0.08% Triton-X 100 と氷冷下で 10 分間反応させ、その後同上の遠心分離操作を２回行い、以下の結合実験に使用した。この膜標品は、100 mM KSCN を含有した 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4, 4 ℃) 中で[³H] AMPA (NEN, 29.2 Ci / mmol) と 4 ℃ で 60 分間反応させた。結合反応は Whatman GF/Bグラスフィルターを用いて吸引濾過によって、停止させた。非特異的結合は 1 mM glutamate 存在下 でおこなった結合実験から得た。統計学的解析は Mann-Whitney の検定を用いた。

結果 100 mM KSCN を含有した 50 mM Tris/HCl buffer を用いた [³H] AMPA 結合の Scatchard 解析では、[³H] AMPA 結合は高親和性部位 (Kd = 5.82 nM, Bmax = 247 fmol/ mg prot)と低親和性部位 (Kd = 214 nM. Bmax = 424 fmol/mg prot)の２部位に分かれた (Figure 2)

高親和性結合部位のほぼ Kd 値のリガンドの濃度 (6 nM)で測定した[³H] AMPA 結合は，前頭前野の３部位 (medial frontal, orbitofrontal cortex, eye-movement area)と somesthetic cortex で比較的濃度が高く、superior temporal gyrus や supra-marginal cortex では比較的低い値を示し、その他の脳部位では、中間の値であった。しかし、今回測定した前頭前野、側頭葉お

よび頭頂葉では、分裂病群と対照群では、統計学的に有意な変化は見られなかった（ Table 1 ）。

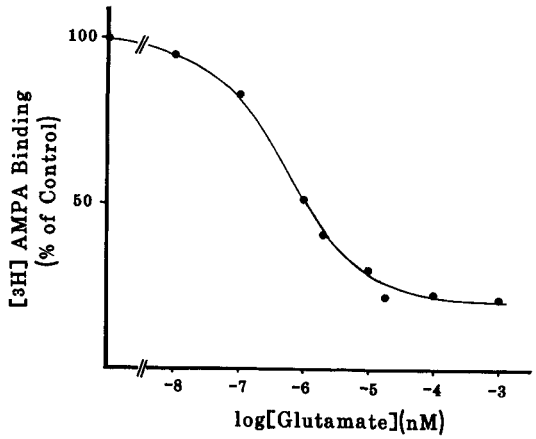


Figure 1. Glutamate の影響

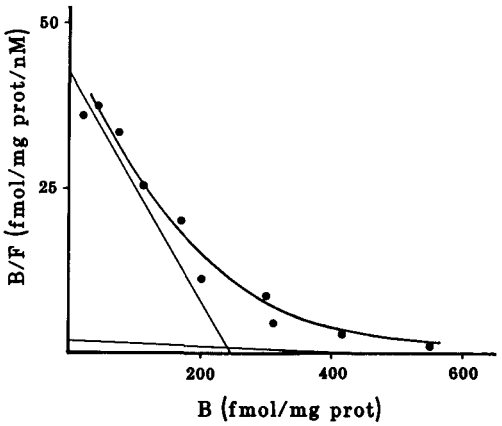


Figure 2. Scatchard 解析

Table 1. 精神分裂病死後脳における [³H] AMPA 結合

	対照群	分裂病群
Prefrontal cortex		
Medial frontal cortex	44.8 ± 5.2	33.6 ± 2.4
Orbitofrontal cortex	42.9 ± 6.6	41.3 ± 3.4
Eye-movement area	38.7 ± 4.9	35.4 ± 3.4
Orbital cortex	16.4 ± 2.3	15.8 ± 2.9
Temporal cortex		
Superior temporal gyrus	10.5 ± 1.2	9.9 ± 0.9
Med.& Inf.temporal gyrus	14.7 ± 2.5	20.2 ± 2.4
Lat. occipito-temporal gyrus	24.2 ± 2.6	24.1 ± 2.3
Insula	17.7 ± 1.6	22.2 ± 3.8
Temp. posterior gyrus	19.9 ± 2.7	17.4 ± 3.1
Parietal cortex		
Somesthetic cortex	34.7 ± 3.3	34.2 ± 2.4
Supra-marginal cortex	9.4 ± 0.8	12.3 ± 1.5
Superior parietal cortex	18.8 ± 1.8	21.7 ± 2.0
Angular gyrus	23.7 ± 2.8	30.6 ± 2.9

Data are presented as mean ± SEM.

考察

ラット脳において、 KSCN 存在下の [³H] AMPA 結合は、高親和性と低親和性の２部位に結合部位がわかれること報告されており（ Honore and Drejer, 1988 ），ヒト死後脳の大脳皮質を用いた実験でも、同様な結果が得られた。今回測定した大脳皮質において、AMPA 感受性のキスカル酸結合に部位差が見られ、temporal lobe が prefrontal lobe や parietal lobe に比べて 1.5 -２倍、[³H] AMPA 結合が高いという Jansen らの報告（ 1989 ）とは一致していなかったが、各脳部位でのキスカル酸レセプターの機能的役割の重要性に違いがある可能性が考えられた。しかしながら、今回測定した大脳皮質13部位で、[³H] AMPA 結合には分裂病群と対照群では差が見られず、AMPA 感受性のキスカル酸レセプターは分裂病の病態にはあまり関与していないことが示唆された。

文献 T. Nishikawa et al., Neurosci. Lett. (40)1983: 245-250. / T. Honore and J. Drejer, J. Neurochem. (51)1988:457-461. / M. Toru et al., Acta. Psychiatr. Scand..(78)1988 :121-137. / K.L.R. Jansen et al., Neurosci. (32)1989:587-607.

198 精神分裂病死後脳側頭葉皮質のペプチド受容体について

澁谷治男、熊代新、森博史、融道男
（東京医科歯科大学、医学部、神経精神科）

〔要約〕

精神分裂病 １１例、対照１０例の側頭葉皮質のオピオイド受容体およびコレシストキニン受容体の測定をした。μーオピオイド受容体は^{3}H-DAGOをリガンドとして、δーオピオイド受容体は^{3}H-DADLEを用いて結合量を測定した。また、コレシストキニン受容体には^{3}H-CCK-8をリガンドとしてもちいた。側頭葉皮質は、外側後頭側頭回、中および下側頭回、上側頭回、側頭葉後部に分けた。その結果、^{3}H-DAGO結合量、^{3}H-DADLE結合量ともに分裂病群で高い傾向は認めたが有意な差異はなかった。側頭葉皮質のメチオニンエンケファリン免疫活性に変化がなかったことを合わせ考えると、分裂病で側頭葉のエンケファリン作動系には異常がないものと推察される。^{3}H-CCK-8結合量も分裂病群と対照群の間に明らかな差異は検出できなかった。

側頭葉に器質障害を持つ側頭葉てんかんが、時に幻覚や妄想を伴うてんかん性精神病に至ることはよく知られており、側頭葉が分裂病の成因に関与している可能性はある。これまでに分裂病死後脳のエンケファリンおよびコレシストキニン免疫活性を測定し、今回は側頭葉皮質のこれらペプチドの受容体を測定したので報告する。

［対象と方法］

測定試料として用いたのは分裂病脳１１例、対照脳１０例である。分裂病群は男６例、女５例、死亡時平均年齢６１．１歳。脳凍結保存期間は１０７．７カ月であった。死亡直前４０日以上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例、女３例で死亡時平均年齢は６６．７歳、脳の凍結保存期間は９１．８カ月であった。側頭葉皮質は外側後頭側頭回（Brodmannの領野３５、３６、２０の一部）、中および下側頭回（領野２０、２１）、上側頭回　（領野２２、９８、４１、４８）および側頭葉後部（領野３７）に分けて粗膜分画を作製した。μーオピオイド受容体結合量の測定は^{3}H-DAGOをリガンドに用いて、δーオピオイド受容体の測定は^{3}H-DADLEをリガンドにして 10^{-7}MのDAGO存在下で行った（1）。コレシストキニン（CCK）受容体結合量の測定は^{3}H-CCK-8(r.s. 70Ci/mmol)を用い、BSA、BacitracinおよびEGTAを含む20mM HEPES緩衝液（pH 7.4)中で25° C、150分間インキュベーションした後 、減圧吸引濾過法で結合型と遊離型を分離した。10^{-5}Mのセルレイン存在下での結合量を非特異的結合量とした。統計処理はMann-WhitneyのU-検定（両側）を用い、$p<0.05$ 以下を有意とした。

［結果］］

μーオピオイド受容体活性を示すと考えられる^{3}H-DAGO結合量は外側後頭側頭回、側頭回後部で比較的高く、中および下側頭回、上側頭回で低い傾向を示す分布差があった。しかし　分裂病群と対照群の間に差異を認めない。また抗分裂病薬服用の影響も明かではなかった。

δーオピオイド受容体活性を示す^{3}H-DADLE結合においても、同様に外側後頭側頭回で最も多く、中および下側頭回で少ないという分布差を認めた。外側後頭側頭回、中および下側頭回の^{3}H-DADLE結合量は、それぞれ分裂病群では対照群の１．６倍、あるいは２．１倍と増加傾向を認めたが個体間の差が大きく有意な差には至らなかった。上側頭回および側頭葉後部においても両群の間に有意差はなかった。

ヒト脳前頭葉皮質の粗膜分画を用いて^{3}H-CCK-8受容体結合の基礎的検討を加えた。その結果、^{3}H-CCK-8結合は25° Cインキュベーションでは120分で平衡に達した。^{3}H-CCK-8結合量は150μgから1200μgの膜分画蛋白量の間で直線的に用量依存的に変化した。Scatchard解析によるとKd:14.9nM、Bmax:1018fmol/mg proteinであった。側頭葉皮質の^{3}H-CCK-8結合量は上側頭回皮質で最も低く、側頭葉後部で高い傾向は示したものの部位差はわずかであった。また分裂病群と対照群の間に有意差はなく、服薬による変化も検出できなかった（表）。

［考察］

我々は、以前に同じ試料の側頭葉皮質のメチオニンエンケファリン免疫活性を測定して、分裂病群と対照群の

間に差のないことを認めた。今回一点測定ではあるがμーオピオイド受容体およびδーオピオイド受容体の結合量を測定して同様に変化がなかったことは、分裂病において側頭葉皮質のエンケファリン作動系の活動状態に変化がないことを示唆している。

我々は以前にCCK-8免疫活性およびCCK-33免疫活性を測定して、一般に分裂病脳においてはCCK-8免疫活性の増加傾向とCCK-33免疫活性の減少傾向を認めた（2）。　とりわけCCK-33免疫活性は大脳辺縁系領域で変化が著しく、海馬支脚、扁桃体の皮質内側核群、梨状葉皮質、外側後頭側頭回で有意に減少していた。側頭葉のCCK-33免疫活性については、外側後頭側頭回においてのみ有意な変化を認め分裂病服薬群、非服薬群ともに、それぞれ対照群の４４％、６８％に低下していた。今回測定した側頭葉皮質４部位のCCK-8受容体結合量は、分裂病群で差異を認めなかった。しかしながら、外側後頭側頭回のCCK-8　受容体結合量は中および下側頭回、上側頭回、海馬のCCK-33免疫活性と有意な負の相関を示した。また上側頭回のCCK-8受容体結合量も海馬アンモン角のCCK-33免疫活性と負の相関をみた。我々はかねてCCK-33免疫活性の低下はCCK生合成の低下を示していると推察しているが、今回の側頭葉受容体測定の結果から、分裂病ではCCKニューロンのシナップス前部位に異常があり、後シナップス部位では大きな変化がないことを示唆していると考える。

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鳥飼みちよさんに感謝いたします。

精神分裂病死後脳側頭葉皮質のペプチド受容体結合量

	外側後頭側頭回	中・下側頭回	上側頭回	側頭葉後部
^{3}H-DAGO結合量				
対照群	34.4±7.25 (10)	17.7±3.77 (7)	21.6±3.59 (8)	35.8±6.04 (8)
分裂病群	48.0±5.62 (9)	22.2±3.38 (6)	23.8±2.44 (5)	39.0±2.80 (9)
非服薬群	44.9±10.3 (5)	24.3±1.50 (3)	23.8±2.44 (5)	35.4±3.14 (5)
服薬群	51±2.44 (4)	20.0±7.04 (3)	23.7±1.64 (4)	43.6±4.26 (4)
^{3}H-DADLE結合量				
対照群	23.2±4.74 (8)	7.50±2.06 (6)	21.9±2.12 (9)	20.1±4.10 (7)
分裂病群	36.7±2.95 (7)	15.9±4.23 (6)	24.9±1.05 (8)	17.5±2.26 (11)
非服薬群	36.3±1.27 (3)	10.6±1.01 (3)	24.5±1.15 (4)	15.6±2.45 (6)
服薬群	37.0±5.44 (4)	21.1±7.79 (3)	25.2±1.94 (4)	19.9±4.08 (5)
^{3}H-CCK-8結合量				
対照群	16.4±2.50 (10)	15.3±2.45 (7)	12.6±1.94 (6)	20.0±2.06 (8)
分裂病群	20.9±2.61 (9)	12.2±2.26 (6)	16.8±3.57 (9)	23.0±7.31 (11)
非服薬群	18.0±2.75 (5)	12.3±3.60 (3)	12.7±2.78 (5)	28.7±13.3 (6)
服薬群	24.5±4.52 (4)	12.1±3.55 (3)	21.9±6.90 (4)	16.2±3.11 (5)

平均値±標準誤差（症例数）（fmol/mg protein）

［文献］

1　渋谷治男、森博史、高橋良、融道男、西川徹　（1989）神経化学　28 122-123

2　渋谷治男、深間内文彦、高橋良、三ツ汐洋、野田恭平、高嶋瑞夫、市川伸宏、融道男、（1984）神経化学　23 409-411

199 Ｐｉｃｋ小体細管の精製と免疫学的性質

徳武　哲、山本明広
（都精神研・分子生物）

〔要約〕

Pick病の脳よりPick小体の精製を試みた。Pick小体はAlzheimer 病の脳に見い出される老人斑や神経原線維変化に比べると、機械的にはあまり堅固ではなく、全体の形を保持して精製することは難しかった。じかし、小体の中に含まれている細管は、８M尿素による可溶化や酵素分解に安定で、最終不溶性画分に濃縮することができた。ネガティブ染色法を用いた電顕による観察では、４本のサブユニットから構成されているように思われたが、神経原線維変化のpaired helical filaments（ＰＨＦ）ような規則性のあるねじれ構造は見られなかった。この画分をギ酸で可溶化したものを抗原として兎にうちこみ、Pick小体と特異的に反応する抗体を作ることができた。

［はじめに］

Pick病はAlzheimer 病と同様に、進行性の痴呆を主な症状とし、臨床的には両者は区別し難いこともあるが、剖検脳の病理学的検索により、神経細胞内に特異的なPick小体が見られることによりAlzheimer 病と区別される。Pick小体には細管構造が観察されるが、その径が10－20nmで、Alzheimer 病の神経細胞にみらるＰＨＦと似ていることから(2,4,5)，同じあるいは類似の成分からできているのではないかと考えられ、両者の免疫学的類似性を示した多くの報告がある（1,3,6)。本実験ではPick小体細管を濃縮した画分を抗原としてPick小体と特異的に反応する抗体を得たのでその結果について報告する。

［実験法］

１．実験材料．　本実験に用いた剖検脳は、生前より重い痴呆症状を呈し、５５才で死亡した女性のものを用いた。剖検脳の半球はホルマリンで固定し神経病理学的検索に用い、半球を生化学的検索のために－７０℃に保存した。神経病理学的検索により、Pick小体含む神経細胞が沢山見出された(Fig.1a)。Pick小体以外にも多量のアミロイド小体(corpora amylacea)が観察されたが(Fig.1b)、老人斑や神経原線維変化は見られなかった。

２．Pick小体細管の精製．　Pick小体細管の精製は老人斑や神経原線維変化の精製法を参考にして行なった。剖検脳５ｇを５倍量の0.85M蔗糖溶液でホモジナイズ後遠心して沈殿を集めた。さらに沈殿を 1.5M蔗糖溶液でホモジナイズ後遠心し沈殿を集めた。沈殿は８M尿素溶液に懸濁し一夜放置後ナイロンメッシュで濾過した。濾液を遠心し沈殿を集め、50mM Tris (pH 7.6)溶液に懸濁しコラーゲナーゼを加え３７℃で１時間消化した。消化液を 1.5M蔗糖溶液にのせ遠心し沈殿画分（P_2）と蔗糖液浮遊画分（P_2'）を集めた。

［結　果］

１．Pick小体細管の形態．

P_2 およびP_2'画分をヘマトキシリン、トルイジンブルー、コンゴーレッドで染色し光学顕微鏡で観察したが、全体の形を保持したPick小体は見られなかった。しかし、ホルマリンで固定した脳を用いた場合は、全体の形を保持したPick小体がP_2 画分に見られた。光学顕微鏡では共存物としてアミロイド小体、リポフスチン、結合組織断片が見られた。

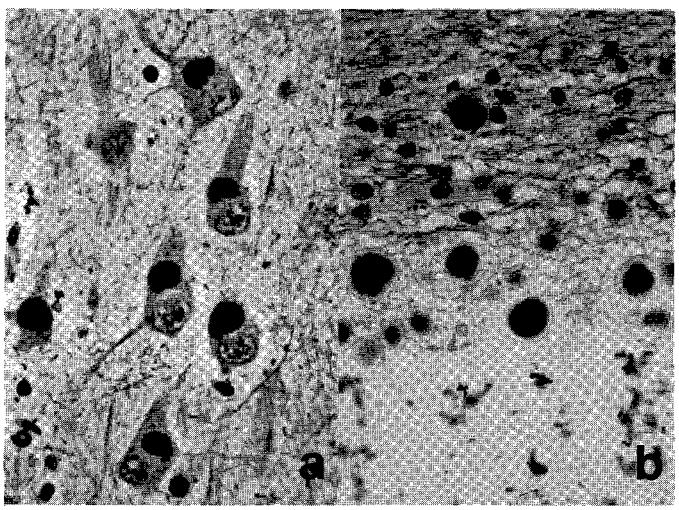


Fig.1. Pick bodies (a) and corpora amylacea (b) in the brain of Pick's disease stained by Bodian method.

ネガティブ染色法を用いた電顕による観察ではP_2画分にPick小体細管と思われるものが観察された（Fig.2)。細管の径は10－20nmで平行に並んだ４本のサブユニットが観察された(2a)。しかし、ＰＨＦのようにそれがさらに二層になっているかどうかは定かでない(7,8)。また、ねじれた細管がみられたが、ＰＨＦのような規則性はなく、長さも短かかった(2b)。

２．抗体の作成と免疫学的性質.

P_2画分を90% ギ酸で処理し、不溶性成分を遠心して除いてからギ酸溶液を真空乾燥し、残った成分を0.1N NaOH で溶かし1N AcOH で中和後Freund adjuvant と共に兎にうち抗体を作成した。剖検脳のパラフィン切片を用い、抗体とPick小体との反応性を調べたところ強く反応することが確かめられた(Fig.3a)。この抗体は老ノ斑や神経原線維変化とは反応しなかった。また、イムノブロット法を用い、この抗体と反応するタンパク質成分を調べたところ、M.W.70kDa の成分と反応したが、この成分がNF-LあるいはAlz-50と同一かどうかまだ明確でない。ニューロフィラメントの主要３成分(NF-H,-M,-L)および微小管タンパク質（チューブリン、MAP-2, タウ）の抗体は、Pick小体よりもむしろそのまわりの細胞質と反応しているように思われた(Fig.3b)。

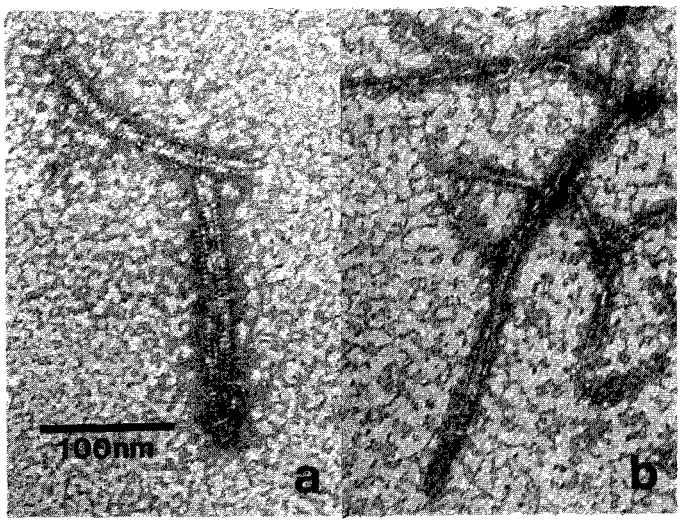


Fig.2. Electronmicrograph of Pick body fibrils. Partially purified fibrils were stained negatively with 1% uranyl acetate.

［考　察］

Pick病はAlzheimer 病と同様痴呆を呈する神経疾患であるが、Alzheimer 病ほど多くは見られないので、研究例もあまり多くない。Pick小体細管は神経原線維変化のＰＨＦと似ている点もあるが、よく似ているとはいえない。Pick小体を含む神経細胞内にニューロフィラメントや微小管タンパク質の蓄積が見られることは、これらの細胞骨格タンパク質がなんらかの修飾か分解を受けて小体細管になっている可能性を強く示唆していると思われるので、イムノゴールド法を用いてその確認を急いでいる。

尚、本実験は当研究所超微形態研究室の小柳新策先生との共同研究である。

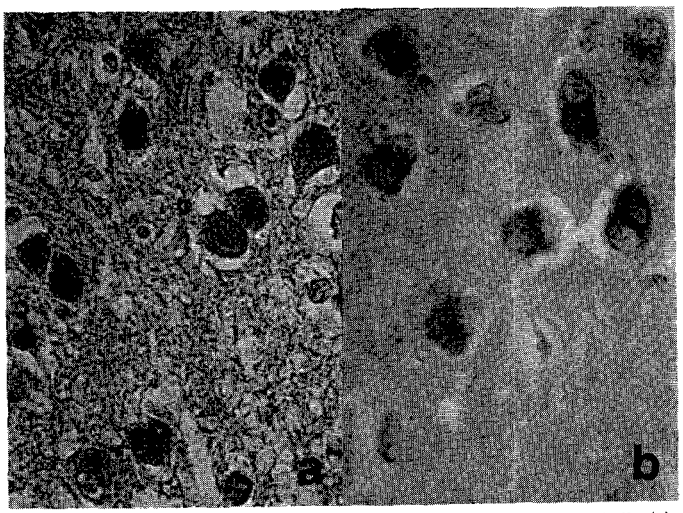


Fig.3. Pick bodies stained by rabbit antibodies to Pick body fibrils (a) and NF-L (b). As second antibody, peroxidase conjugated anti-rabbit goat serum was used and colour was developed with 4-chloro-1-naphthol.

［文　献］
(1) Love, S., Burrola, P., Terry, R.D. et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol., 15, 223-231 (1989)
(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) Rasool, C.G., & Selkoe, D.J., New Eng. J. Med., 312, 700-705 (1985)
(4) Sparkman, D.R., Johnson, S.A., Hammon, K.M. et al., J. Neurol. Sci., 80, 173-184 (1987)
(5) Takauchi, S., Hosomi, M., Marasigan, S. et al., Acta Neuropathol., 64, 344-348 (1984)
(6) Ulrich, J., Haugh, M., Anderton, B.H. et al., Acta Neuropathol., 73, 240-246 (1987)
(7) Wischik, C.M., Crowther, R.A., Stewart, M. et al., J. Cell Biol., 100, 1905-1912 (1985)
(8) Wisniewski, H.M., Merz, P.A. & Iqbal, K., J. Neuropathol. Exp. Neurol., 43, 643-656 (1984)

200 E1マウスP_2フラクションの膜流動性について

平松 緑、Raymond D. Velasco、枝松 礼、水川公直*、河野雅弘**、森 昭胤

（岡山大・医・脳研機能生化、*第一解剖学教室、**日本電子、ESR応用研）

【要約】

E1マウス脳のP_2フラクションにおける膜の流動性をスピンラベルを用いてESR spectrometryにより検討し、さらにコレステロール／リン脂質比並びにスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性を測定して、けいれん素因を有さないddYマウスと比較検討した結果、(1)E1マウスの膜中心部の流動性は海馬で低く、小脳で高いこと、および表面に近い部位においては大脳皮質と海馬で低く、小脳と橋延髄では高いこと、またS-蛋白については大脳皮質、海馬および小脳において高いこと、(2)E1マウスのコレステロール／リン脂質比は、海馬で高く、小脳で低いこと、およびSOD活性は海馬で高く、線条体、中脳、橋延髄および小脳で低いこと、が認められた。以上の成績は、E1マウスシナプス膜には動態の異常が存在することを示すものであり、これらの異常がけいれん感受性に密接に関与していることが示唆された。

【目的】

さきに、抗てんかん薬のphenobarbital[3]，valproic acid[5]およびdiazepam[2]は、マウスおよびラット脳の膜の流動性を増加させることが明らかにされている。今回は、spontaneous seizuresを起こすE1マウスを用い、脳7部位におけるP_2フラクションの膜流動性をけいれんを有さないddYマウスと比較検討した。また、これら膜中のコレステロール／リン脂質比およびスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性についても測定し、けいれん感受性をシナプス膜の立場から解析した。

【方法】

(1)実験動物：生後16週令のE1およびddYマウスを使用した。E1およびddYマウスは日本クレア㈱、および日本エスエルシー㈱より購入した。

(2)P_2フラクションの調整：マウスを断頭し、直ちに脳を摘出後、大脳皮質、海馬、線条体、中脳、視床下部、橋・延髄、および小脳を取り出した。ついでこれら組織よりP_2フラクションをZaleskaら(1989)[6]の方法に従って精製した。

(3)膜流動性の測定：スピンラベルには膜の極性頭部付近と疎水部付近の流動性を示す5-および16-doxyl-stearic acid (5NS, 16NS)と蛋白質のSH基に結合する N-(1-oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinyl)-maleimide (MSL)を使用した[4]。各P_2フラクションを100μlとり、これに8μg/mg protein の各スピンラベル剤を加え、5-および16-NSにおいては37℃で60分間、MSLにおいては4℃で一晩インキュベーションした。ついでこれらの試料を electron spin resonance (ESR) spectrometerを用いて分析し、各パラメーターを算出後、膜の流動性を分析した[4]。

(4)コレステロールおよびリン脂質の測定：三光純薬㈱製サンアッセイキットを使用した。

(5)SOD活性の測定：われわれの方法[1]に従い、ESR spectrometerを用いて測定した。

(6)有意差検定は、Student's t-testを用いて行なった。

【結果】

(1) E1マウスの16NSのモーションパラメーター(τ_0)は、ddYマウスに比べて海馬において高く、小脳において低下しいた。E1マウスの5NSのオーダーパラメーター(S)は、海馬および大脳皮質において高く、小脳と橋延髄において低下していた。MSLのw/s比はE1マウスにおいては大脳皮質と海馬及び小脳において高値を示していた (Fig.)。

(2) コレステロール／リン脂質比：E1マウスのコレステロール／リン脂質比は、ddYマウスに比べて海馬で高く、小脳で低値を示していた (Table 1)。

(3) SOD活性：E1マウスのSOD活性は、ddYマウスに比べて海馬で高く、線条体、中脳、橋延髄および小脳において低値を示していた (Table 2)。

【考察】

膜の流動性は、神経伝達物質の細胞内への情報伝達、物質の透過性および膜酵素に影響を及ぼすことが知られている。また、膜の流動性は、過酸化により低下すること、およびコレステロール／リン脂質比の変動は膜の流動性に影響を及ぼすことが知られている。

今回の実験成績から、シナプス膜内の疎水部付近と極性頭部付近の流動性は、ddYマウスとE1マウスとでは大脳皮質、海馬、小脳および橋延髄において異なることがあきらかとなった。次にコレステロール／リン脂質比について調べると

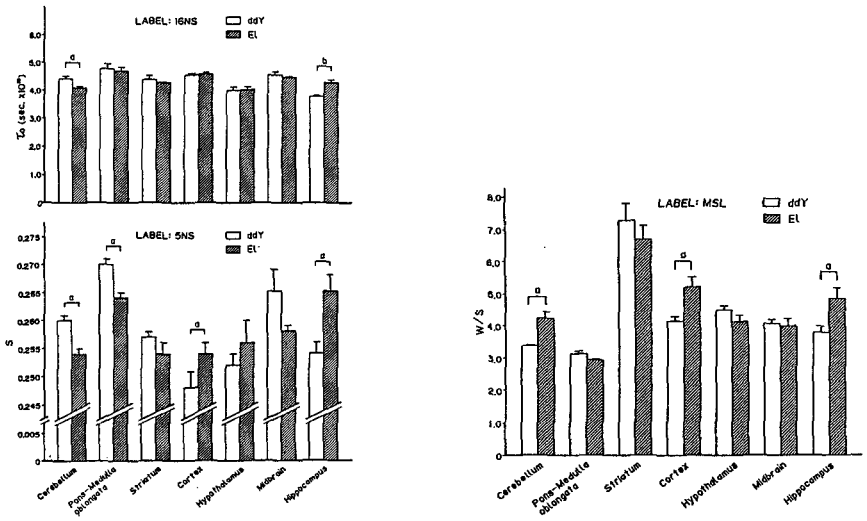


Fig. Order parameter (S), motion parameter (τ_0) and w/s ratio in mouse brain synaptosomal membranes. Each value represents the mean ± SEM of 5-6 samples. a,$p<0.05$, b,$p<0.005$ as compared with ddY mice.

Table 1. The ratio of cholesterol/phospholipid in P_2 fraction of El and ddY mouse brain

	cholesterol/phospholipid (mg/mg) El		ddY
Cortex	0.7507±0.0453 (8)		0.7244±0.0689 (8)
Cerebellum	0.7641±0.0405 (8)	a	0.8379±0.0785 (7)
Hippocampus	0.6393±0.1077 (7)	a	0.4837±0.1179 (6)
Midbrain	0.9153±0.3095 (6)		1.0479±0.0915 (6)
Medulla oblongata +pons	0.9528±0.1961 (8)		1.0567±0.0942 (8)
Striatum	1.0646±0.2196 (6)		0.8054±0.1713 (6)
Hypothalamus	1.1293±0.3823 (6)		0.9462±0.1735 (6)

Each value represents mean ± SD with experimental numbers in parentheses.
a,$p<0.05$ as compared with ddY mice.

Table 2. Superoxide dismutase (SOD) activity in P_2 fraction of El and ddY mouse brain

	SOD activity (unit/mg protein) El		ddY
Cortex	2.1517±0.4434 (8)		2.3869±0.2141 (7)
Cerebellum	2.5588±0.3079 (9)	a	2.9748±0.3361(10)
Hippocampus	2.5847±0.2701 (9)	b	1.9970±0.2735 (7)
Midbrain	1.8536±0.2550 (6)	a	2.7962±0.6812 (6)
Medulla oblongata +pons	2.0580±0.4600 (9)	a	2.8542±0.5679 (7)
Striatum	1.5934±0.2548 (8)	c	2.3846±0.2428 (8)
Hypothalamus	2.0562±0.5455 (5)		2.8462±0.5852 (3)

Each value represents mean ± SD with experimental numbers in parentheses.
a,$p<0.05$, b,$p<0.005$, c,$p<0.001$ as compared with ddY mice.

Elマウスにおいてはddyに比べて海馬では高く、小脳では逆に低いことが認められ、膜の組成の相違が膜の流動性を変えていることが示された。また、海馬においてのみSOD活性の亢 進がみられたが、これは、過剰のO_2^-が膜の流動性を低下させていることを想定させた。以上より、Elマウスのシナプス膜には異常な動態が認められ、これらがけいれん感受性に密接に関与していることが想定された。

【文献】

1. Hiramatsu, M. and Kohno, M. (1987) JEOL NEWS 23A, 7-9.
2. Mennini, T., Ceci, A., Caccia, S., Garattini, S., Matsturzo, P. and Salmona, M. (1984) FEBS 173, 255-258.
3. Mitchell, M. A., Peris, J. and Harris, R. A. (1985) Pharmacol. Biochem. Behav. 22, 955-960.
4. Nagy, K., Simon, P. and Zs.-Nagy, I. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 117, 688-694.
5. Perlman B. and Goldstein D.B. (1984) Mol. Pharmacol. 26, 83-89.
6. Zaleska, M. M., Nagy, K. and Floyd, R. A. (1989) Neurochem. Res. 14, 597-605.

201 El マウス脳における poly (A) polymerase の諸性質

木岡哲郎、山上　栄、撫井弘二、大西　博、川北幸男
（大阪市立大学医学部神経精神医学教室）

〔要約〕

Poly(A)polymerase はhnRNA の3´末端にpoly(A)tail を添加、伸長する酵素[6]で、それぞれII型とI型と呼ばれている。El マウスとddY マウスの脳について両酵素活性を測定した。発作間歇期のEl マウス脳のII型活性は、ddY マウス脳よりも有意に低値であり、I型活性では逆に高値であった。II型のこの傾向は生後14日と放り上げ刺激を加え始める生後28日以後に顕著になることを明らかにし得た。この結果はEl マウスでpoly(A)tail の添加が抑制されていることを示唆している。El マウスの発作後においては、I型で発作直後と30分後とで間歇期の35%と45%にそれぞれ減少し、II型では30分後で55%まで低下した。この成績は以前に見出だした発作によるpoly-adenylation の抑制がpoly(A)polymerase によって制御されることを反映している。

（目的）電撃痙攣[1]や薬物痙攣[10]によってhnRNA 合成が著しく変化する。我々[5][12]も癲癇モデルであるEl マウスの発作によって脳のhnRNA 合成の阻害とpolyadenylation の抑制を報告した。今回はEl マウスの発作や発育期においてpolyadenylation がpoly(A)polymerase によってどのように調節されるかについて検討を加えたので報告する。（方法）マウスの脳または肝を9 倍容の2.2M蔗糖,15mM $MgCl_2$ 、0.25mM spermidine の溶媒に懸濁し、12,000g,60分間遠心した。沈殿を50mM Tris-HCl buffer(pH8.5),1mM $MgCl_2$,0.1mM EDTA,2mM dithiothreitolの溶媒に懸濁後、保存したものを 7,000g 10分間遠心し、これをI型とした。II型は上の懸濁液を glass-glass homogi-nizer でpestleを25回上下に動かしホモジナイズした後、同様に遠心した。この上清にglycerolを50%になるように加え、-20 ℃で保存し酵素標品とした。Poly(A)polymerase 活性の測定[9]はサンプル40μl（蛋白量60～100 μg）50mM Tris-HCl buffer(pH8.0),50mM KCl,0.125mM $MnCl_2$,90 μgpoly(A)primer,[2,5',8-^{3} H]ATP 15,0000cpmを含む反応混液で、37℃,60 分間インキュベートした後、4mM 燐酸Naを含む10%TCA を加え、反応を停止させた。この反応液をWhatman GL/C glass fiber filter で濾過し、放射能を計測した。蛋白はLowry らの方法[4]で定量した。

（結果と考察）Table 1 にddY, E l (0),発作間歇期のE l (+) マウスの脳と肝でのpoly(A)polymerase I, II型活性を示した。I型ではE l (+), E l (0) の活性がddY より有意に高値であったが、II型ではE l (+), E l (0) が ddY より有意に低かった。肝においてはこれらの間で有意差は認められなかった。Fig.1,と2 に発育期脳の酵素活性の変化を示した。I型では、生後14日でE l とddY マウスでそれぞれ、4.5 ±0.4 と6.0 ±0.6 nmole/mg蛋白/hで、E l マウスが低値であったが、21日ではE l :6.8±0.6,ddY:5.6 ±0.1 となり逆にE l マウスが高値になる。他方、II型では14日でE l :3.0±0.4,ddY:5.2 ±0.2 となり、E l よりddY が有意に低値であった。21日、28日と活性の差は少くなるが、再び強直間代痙攣のひき起こされる56日よりE l (+) の活性が低下して、ddY との差が拡大する。肝の活性はI型、II型とも発育期のどの時期においても3群マウスの間で有意差は認めなかった。この結果より生後14日に見られたE l マウスのI型、II型活性の低下は遺伝的な発作感受性に何ら

Enzyme type	mice ddY	El(0)	El(+)
	(n mole AMP/mg protein)		
Brain			
Form I	4.29±0.22	5.83±0.53**	6.26±0.41**
Form II	3.49±0.45	2.41±0.53**	1.34±0.28**
Liver			
Form I	1.30±0.44	1.43±0.51	1.42±0.38
Form II	1.71±0.12	1.87±0.22	1.62±0.11

(n=6)　**：P<0.01

Table 1 The comparison of poly(A)polymerase activities in both the brain and liver of inter ictal El(+),El(0),ddY

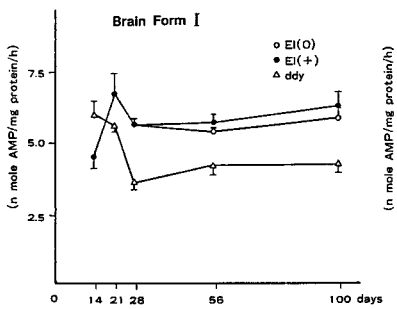


Fig.1

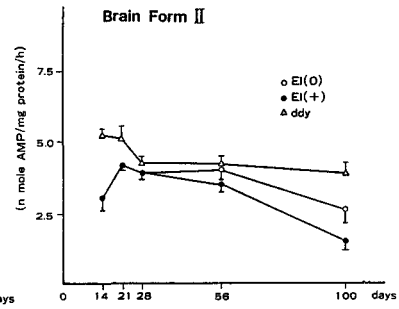


Fig.2

かの相関があり、56日以後におけるII型活性の低下、I型活性の上昇は発作の直接的な影響ではないかと推測される。I型、II型に対するEIマウスの固有の発作の影響を発作間歇期の酵素活性を対照として百分率で表した(Fig 3)。I型の活性は発作直後に35%まで低下し、その後30分と60分とで回復を示し、100 分後にはほぼ対照のレベルとなった。II型ではI型より遅れて、発作30分後で55%と低下し、I型と同様に100 分後にはほぼコントロール値までに達した。肝における本酵素活性はともに発作後で顕著な変化が認められなかった。以前に我々は^{14}Cと^{3}Hとの二重標識法によりhnRNA のポリ(A) 鎖合成が発作後60分で一時的に阻害されることを報告したが[5]、今回の実験によってポリ(A) 合成阻害はpoly(A) polymerase活性の低下に起因することが明らかになった。I型、II型共に活性が低下するためhnRNA にpoly(A) の添加、伸長が起こらず核内でのprocessingが十分に行われないもの[3]と思われ、完成したmRNAが細胞質に転移し[2]ないことを意味し、既に発表した様にポリゾーム中のポリ (A)$^{+}$ mRNAの欠損[11] が起こる要因のひとつとなるとも推測される。本酵素の活性に影響を与えるSpermin, Spermidine, Actinomycin D, cGMP, cAMP, DDT を加え、活性を測定したが3群マウス間で相違は認められず、これまで他臓器で見られた変化と同じであった。他方EI(+) とddY あるいはEI(0) とddy 両酵素を等量ずつ加えて反応を比較したが、いずれも単独に反応させた場合と同じ酵素活性を示し、上昇や低下はみられなかったので, Richter&Schumm [8]が肝で指摘しているようなprotein kinaseによる燐酸化や脱燐酸による変化ではないと思われる。次にLineweaver-Burk plotによりKm, Vmaxを算出した(Fig. 4)。I型のKmはEI(+) :2.9×10^{-6}M, EI(0):3.0×10^{-6}M, ddy:2.6×10^{-6}M であり、II型のKmはEI(+):1.8×10^{-6}M, EI(0):1.8×10^{-6}M, ddy:1.3×10^{-6}M であった。3群間で顕著な差異は認められず、酵素のConfiguration に相違はないものと推察し得る。さらに牛脳を用いて酵素II型について肝[7]で行われているように DEAE-Sephadex, Phosphocellulose, Hydroxyapatite の順序でカラムクロマトグラフィーによって精製を試みたが、部分的にしか精製に成功していない。このことはSchumm&Richter[9]も述べているところで、肝と脳のこの酵素の性質になんらかの相違があるものと推測される。

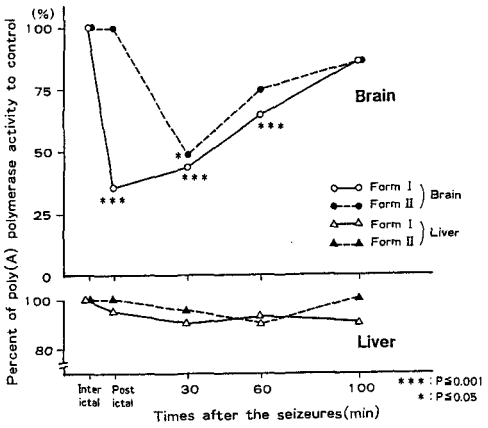


Fig. 3. Alteration of poly(A)polymerase activity by the seizeures

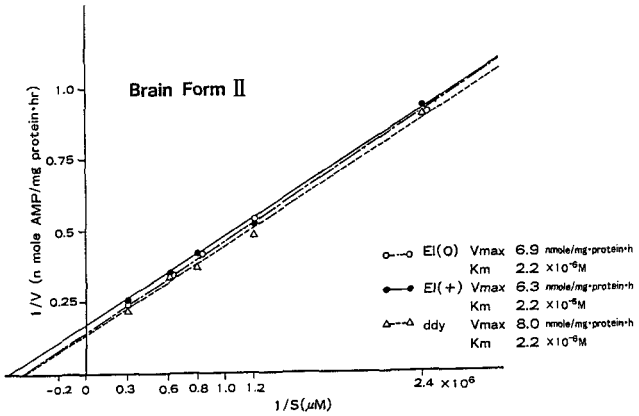


Fig. 4. The values of Km and Vmax obtained by Lineweaver-buek plot of brain form II enzyme

(文献)

1)Cupello, A. F. et al., Exp. Neurol. 63, 451-457(1979) 2)Darnell, J. E. et al., Science 174, 507-510(1971) 3)Derman, E. & Darnell, J. E., Cell 3, 225-264(1974) 4)Lowry, O. H. et al., J. Biol. Chem. 193, 265-275(1957) 5)Onishi, H. et al., Exp. Neurol 83, 98-107(1984)6)Rose, K. M. et al., Nature 279, 260-262(1979) 7)Rose, K. M. & Jacob, S. T., Eur. J. Biochem. 67, 11-21(1976) 8)Rose, K. M. & Jacob, S. T., J. Biol. Chem. 254, 10256-10201(1976) 9)Schumm, D. E. &Richter, R., J. Neuroch. 83, 925-1930(1982)10)Wynter, C. V. A. et al., Biochem. J. 152, 449-467(1975) 11)Yamagami, S. et al., Acta. Neurol. Scand. 80, 327-332(1989) 12)Yamagami, S. et al., Exp. Neurol. 95, 167-177(1987)

202 E1マウスに対するオピオイドアゴニスト及びプロテアーゼインヒビターの抗痙攣作用

小出誠司、大西　博、片山雅文、甲斐利弘、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 E1マウスに、オピオイドアゴニスト及びメチオニンエンケファリン(ME)の分解を阻害するプロテアーゼインヒビターを投与し、痙攣に及ぼす影響を調べた。オピオイドアゴニスト (morphine, D-Ala^2-D-Leu^5-enkepharin)は、全身投与と大槽内投与共に、用量依存性に痙攣を抑制し、この抗痙攣作用は、アンタゴニストのnaloxoneの前処置によって拮抗された。プロテアーゼインヒビター(amastatin, Des-Pro^2-bradykinin, phosphoramidon)を、大槽内投与した場合にも、用量依存性に抗痙攣作用を示し、naloxoneによって拮抗された。またプロテアーゼインヒビター投与時の脳内MEが、生食投与の対照群に比べて有意に増加した。このことは、E1マウスでは、オピオイドアゴニストと内因性MEが、脳内オピオイドレセプターを介して発作を抑制することを示唆する。

〔緒言〕

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みられる[2]。我々はこれまで、発作間歇期のE1マウス脳のメチオニンエンケファリン様免疫活性(ME-LI)が、ddYマウスに比べて減少し[3]、それに対応してオピオイドδレセプターが up-regulateすること[4]を報告した。今回、E1マウスの痙攣と脳内オピオイド系との関係をさらに明らかにするために、オピオイドアゴニスト及びMEの分解を阻害するプロテアーゼインヒビターを、E1マウスに投与し、痙攣に及ぼす影響を検討し、さらにプロテアーゼインヒビター投与時の脳内MEをHPLC/RIA法[5]で測定した。

〔方法〕

1）実験動物：遺伝的に痙攣素因を有するE1マウスを用いた。放り上げ刺激の履歴で強直間代発作を示す成熟期において、痙攣発作後７日目の放り上げ刺激前に、下記の薬物を投与した。対照群としては生食をE1マウスに投与した。

2）痙攣発作の評価：Seizure scoreとして、Grade 0：放り上げ刺激80回加えて、発作なし、Grade 1：放り上げ刺激80回以内で、不全発作、Grade 2：放り上げ刺激40回以内で、不全発作、Grade 3：放り上げ刺激80回以内で、強直間代発作、Grade 4：放り上げ刺激40回以内で、強直間代発作に分類した。Incidenceとしては、Grade 0 以外のものを、パーセント表示した。

3）オピオイドアゴニスト：オピオイドμアゴニストとして morphine、δアゴニストとして D-Ala^2-D-Leu^5-enkephalin (DADLE)を使用し、全身投与の皮下注射と、Uedaらの方法[6]に従い、脳室内投与の大槽内投与法を用いて投与した。

4）プロテアーゼインヒビター：MEは、主にaminopeptidase、angiotensin converting enzyme(ACE)、enkephalinase A によって加水分解される。これらに対して選択的に阻害する amastatin、ACE inhibitor(Des-Pro^2-bradykinin)、phosphoramidon及びこの３つの合剤を、大槽内に投与した。オピオイドアンタゴニストとしては、naloxone 2mg/kg, s.c.を、放り上げ刺激の１０分前に投与した。

5）HPLC/RIA法によるME量測定：E1マウスに、大槽内投与法で、プロテアーゼインヒビターを投与し、１５分後に断頭し、大脳から酢酸抽出法で分離された上清を凍結乾燥後、 Sep-pak C_{18} cartridgeを用いて、 peptide-rich fractionを溶出し、それを逆相HPLCで、生理活性ペプチドのMEに相当する画分を回収し、RIAで測定した。

〔結果〕

オピオイドアゴニストは、morphineとDADLEが共に、皮下注射と大槽内投与法の両方で、用量依存性に抗痙攣作用を示した。また、この抗痙攣作用は、naloxoneの前処置によって拮抗された(TABLE Ⅰ,Ⅱ)。プロテアーゼインヒビターも 、amastatin、ACE inhibitor、phosphoramidon及び３合剤が共に、用量依存性に抗痙攣作用を示した。また、この抗痙攣作用は、naloxoneの前処置によって拮抗された(TABLE Ⅲ)。プロテアーゼインヒビター投与時のME量は、対照群に比べてそれぞれ有意に増加した(TABLE Ⅳ)。

〔考察〕

E1マウスにおいて、オピオイドアゴニストが用量依存性に抗痙攣作用を示し、アンタゴニストの naloxoneによって拮抗されたことは、オピオイドペプチドがオピオイドレセプターを介して発作を抑制することを意味する。さらに、プロテアーゼインヒビターもnaloxoneで拮抗される用量依存性の抗痙攣作用を示し、その時の生理活性ペプチドのME

が脳内で増加した。このことは、プロテアーゼインヒビターそのものでなく、増加した内因性MEが発作を抑制したことを示唆する。以上の結果は、我々のこれまでの報告[3)4)]と対応し、Elマウスでは、enkephalinergic neuronが、痙攣に対して抑制的に働き、その機能低下が痙攣発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

〔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) 小出誠司ほか (1989) 神経化学 32,246-247 4) Onishi, H. et al. (1989) Neurochem. Res. 14, 31-35 5) Hong, J-S. et al (1983) Methods in Enzymology 103, 547-564 6) Ueda, H. et al.(1989) Europian. J. Pharmacol. 56, 265-268

TABLE I. *Effects of opioid agonists administered by subcutaneous injection*

Treatment(mg/kg)		Incidence(%)	Seizure score
Controls		93.5	3.40±0.11
Morphine	1	87.5	3.50±0.46
	10	57.1[a]	2.29±0.75
	25	54.5[b]	1.82±0.51[c]
	50	63.6[a]	2.09±0.49[c]
	75	37.5[c]	1.25±0.58[c]
	100	33.3[c]	1.11±0.53[c]
	150	91.7	2.75±0.29
	200	85.7	2.57±0.45
	25+NLX	100.0	4.00±0.00
	50+NLX	100.0	3.80±0.18
	75+NLX	100.0	4.00±0.00
	100+NLX	83.3	3.17±0.60
DADLE	0.1	100.0	4.00±0.00
	1	71.4	2.71±0.66
	10	66.7	2.50±0.74
	20	62.5[c]	2.33±0.38
	40	25.0[c]	0.88±0.54[c]
	80	50.0[b]	2.00±0.82
	20+NLX	100.0	4.00±0.00
	40+NLX	100.0	4.00±0.00

TABLE II. *Effects of opioid agonists administered by intracisternal injection*

Treatment(μg/animal)		Incidence(%)	Seizure score
Controls		92.3	3.35±0.25
Morphine	1	85.7	3.29±0.52
	9	66.7	2.33±0.57
	15	57.1	2.00±0.67[a]
	20	45.5[b]	1.64±0.55[b]
	50	61.5[a]	1.78±0.54[b]
	100	100.0	4.00±0.00
	20+NLX	85.7	3.14±0.55
	50+NLX	100.0	4.00±0.00
DADLE	0.01	85.7	3.29±0.52
	0.1	66.7	2.56±0.61
	1	50.0[a]	1.65±0.58[b]
	5	40.0[a]	1.60±0.88
	25	41.7[b]	1.58±0.55[b]
	50	46.2[b]	1.39±0.52[c]
	100	37.5[b]	1.25±0.57[b]
	150	71.4	2.86±0.68
	200	50.0	1.89±0.67
	25+NLX	83.3	3.17±0.60
	100+NLX	83.3	2.83±0.60

Mean±SEM, NLX:naloxone 2mg/kg, s.c.
[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$, [c]$P<0.001$; compared with controls

TABLE III. *Effects of protease inhibitors administered by intracisternal injection*

Treatment(nmol/animal)		Incidence(%)	Seizure score
Controls		92.3	3.35±0.25
Amastatin	3	85.7	3.43±0.53
	9	70.0	2.40±0.55
	15	66.7	2.67±0.63
	30	58.3[a]	2.09±0.68
	30+NLX	87.5	3.50±0.47
ACE inhibitor	1.5	100.0	3.83±0.15
	4.5	85.7	3.43±0.53
	7.5	62.5	2.38±0.66
	15	55.6[a]	2.11±0.86
	15+NLX	71.4	2.86±0.68
Phosphoramidon	3	85.7	3.43±0.53
	9	62.5	2.38±0.66
	15	60.0	2.27±0.49
	30	42.9[a]	1.71±0.75[a]
	30+NLX	71.4	2.86±0.68
3 inhibitors	X1	83.3	3.00±0.58
	X2	66.7	2.57±0.61
	X3	62.5	2.25±0.63
	X5	64.3	2.57±0.51
	X10	50.0[a]	2.00±0.82
	X10+NLX	85.7	3.43±0.53

Mean±SEM, NLX:naloxone 2mg/kg, s.c.
3 inhibitors X1:amastatin 3 + ACE inhibitors 1.5 + phosphoramidon 3 nmol
[a]$P<0.05$; compared with controls

TABLE IV. *Methionine enkephalin (fmol/mg protein) content after intracisternal injection of protease inhibitors*

Controls	640±31
Amastatin 30 nmol	970±100[a]
ACE inhibitor 15 nmol	840±43[b]
Phosphoramidon 30 nmol	830±66[a]
3 inhibitors X10	1360±41[c]

Mean±SEM
[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$, [c]$P<0.001$; compared with controls

203 WEB 1881の脳内アセチルコリン神経系に及ぼす影響 －AF-64A投与ラットを用いた解析－

橋本恒一，橋本美佐，栗山欣弥
（京都府立医大・薬理）

〔要約〕
脳内コリン作働性神経系の神経毒とされるエチルコリンアジリジニウムイオン（AF-64A；2.0nmol,i.c.v.）投与に伴う海馬内コリン作働性神経の機能低下に対する，WEB 1881連続投与の影響について検討した．AF-64A処置によりラットの海馬内アセチルコリン(ACh)含量は対照群に比して有意に低下し，AChの合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ(CAT)活性も同様に低下を示した．この条件下において，明暗箱を用いたstep-through法によるラットの受動的回避反応を検討したところ，記憶保持能の著しい低下が認められた．このAF-64A誘発性のACh含量の低下に対して50mg/kg,p.o.のWEB 1881の1週間連続投与は拮抗作用を示さなっかたが，100mg/kg,p.o.の連続1週間投与は有意な拮抗作用を示し，CAT活性の低下に対しても有意な阻止作用を示した．また，AF-64A誘発性の受動的回避反応における記憶の保持能の低下に対しても100mg/kg,p.o.1週間のWEB 1881投与は，著明な改善作用を示した．一方，海馬顆粒分画における[^{3}H]QNB結合はAF-64A処置によっても影響を受けなかった．以上の結果より，WEB 1881は低下した脳内コリン作働性神経系を賦活させる作用を有する薬物である可能性が考えられる．

［目的］
WEB 1881(4-aminomethyl-1-benzylpyrrolidin-2-one-hemifumarate) はピロリジノン骨格を有する薬物で，低酸素条件下での動物の死亡率を減じ，大脳皮質における血流量を増加し，酸素分圧を高めるなどの作用を有すること，さらに脳内グルコース代謝を促進し，虚血時のグルコース，ATP，クレアチン燐酸等の低下を軽減することなどが知られている．そこで今回我々は，記憶との関連が深いとされる脳内コリン作働性神経系に及ぼすWEB 1881投与の影響について，コリン作働性神経の神経毒とされるAF-64Aを投与したラットを用いて行動学的および神経化学的観点から検討を加えた．

［実験方法］
実験動物及び薬物投与：Wistar系雄性ラット（体重200-250g）に50mg/kg及び100mg/kgのWEB 1881を，それぞれ1日1回，7日間連続経口投与した．AF-64A処置は，Fisherらの方法(1)に従い，前駆物質であるacetylethylcholine mustard Cl(acetyl-AF64)より調製したAF-64Aを，ペントバルビタール麻酔下に脳固定装置を用いて，ラット脳アトラスに従い両側の脳室内に0.1～2.0nmolずつを10分間掛けて注入することにより行った．各種含量の測定：脳内AChおよびモノアミン類の定量は，マイクロウェーブ照射により屠殺した動物の脳を，Glowinski and Iversen(2)の方法に従い大脳皮質，線条体及び海馬に分画した後，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行った．CAT活性の測定：脳内CAT活性の測定は[^{14}C]Acetyl CoAを基質として用いた放射酵素活性法により行った．膜分画の調製と[^{3}H]QNB結合実験：各分画脳を50mM Tris-HCl(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2回繰り返し膜標品とした．[^{3}H]QNB結合能の測定は，膜標品を[^{3}H]QNB(0.2nM)と37℃，60分間インキュベートした後，GF/Bグラスフィルターを用いた吸引濾過法により行なった．受動的回避反応の測定：AF-64A投与後6日目に暗箱内にて5.0mA，2秒間の電撃ショックを与え，7日目に明室から暗室への移動の潜時を測定することにより記憶保持能の検討を行なった．

［結果］
AF-64A処置に伴う脳内の生化学的変化及び行動学的変化：AF-64A(0.1～2.0nmol)投与により，大脳皮質，線条体および海馬において用量依存的なACh 含量の低下が認められた．特に2.0nmol投与群においては全ての脳内部位において有意なACh含量の低下が認められ，海馬においては0.5nmol投与時にもACh含量の低下が認められた．CAT活性に関しては，2.0nmol投与により全ての脳内部位において活性の低下が認められ，特に海馬においては対照群の約40%にまで低下していた．脳内ノルエピネフリン(NE)，ドーパミン(DA)およびセロトニン(5-HT)の含量に

関しては，　2.0nmolのAF-64A処置によっても著明な含量の変化は招来されなかった．ラットの行動に関しては，AF-64A処置 2-3日後に自発運動の上昇が認められた．　受動的回避反応についてみると，　対照群に比してAF-64A (2.0nmol)処置により明室から暗室への移動の潜時の短縮が認められ，明らかな記憶保持能の低下が認められた．

WEB 1881投与の影響：WEB 1881 50mg/kgをAF-64A(2.0nmol)処置した日から7日間連続経口投与したが，AF-64A誘発性の海馬におけるACh含量の低下には拮抗しなかった．　また受動的回避反応に関しても，AF-64A処置群との間に著明な差はみられなかった．　一方，　WEB 1881 100mg/kgの7日間連続投与は，海馬におけるAF-64A誘発性のACh含量の低下に有意な拮抗を示した(Fig.1)．　また同様なWEB 1881の拮抗作用は，AF-64A誘発性のCAT活性低下に関しても認められた(Fig.2)．さらにAF-64Aによる受動的回避反応における記憶保持能の低下に対しても，WEB 1881 100mg/kgの7日間連続経口投与は拮抗作用を示し，記憶保持能の回復が認められた(Fig.3)．[^{3}H]QNB結合に関しては，AF64-A(2.0nmol)投与により線条体において有意な結合能の低下が認められたのみで，　WEB 1881 100mg/kg連続投与による影響は認められなかった．

[考察]

AF-64A はコリン作働性神経系の神経毒として知られており，脳内に投与された場合，　コリン作働性神経の機能を低下させることが知られている（3,4）．　今回我々はAF-64A用いて，脳内コリン作働性神経系の機能及び記憶保持能の低下した動物を作製し，WEB 1881連続投与の影響を検討した．　AF-64Aの脳室内投与により脳内ACh含量の用量依存的な低下が認められ，特にその変化は海馬において著明であった．　このACh含量の低下は，ACh合成酵素であるCAT活性の低下を伴っていた．　同時にstep-through法を用いて受動的回避反応による記憶保持能についても検討したが，AF-64A投与により記憶保持能の明らかな低下が認められた．　他の神経伝達物質，　すなわちNE,DAおよび5-HT含量に関してはAF-64A投与によりその含量に著変が認められなかったことより，　AF-64A投与により比較的選択的にコリン作働性神経系が障害を受け，その結果として記憶保持能の低下を引き起こしたものと考えられる．　このAF-64A誘発性の海馬内コリン作働性神経系の低下に対して，50mg/kg,p.o.のWEB 1881の1週間連続投与は有意な阻止作用を示さず，行動上の改善効果も認められなっかた．　しかしながら，100mg/kg,p.o.のWEB1881の連続投与は，AF-64A投与により低下した ACh含量を有意に回復させた．またこのACh含量の上昇作用はCAT活性の回復も伴っていた．　またAF-64Aによる記憶保持能の低下に対してもWEB 1881(100mg/kg)の連続投与は拮抗作用を示し，海馬内コリン作働性神経の機能賦活作用と共に記憶の障害に対する改善効果も認められた．これらの結果は，WEB 1881がAF-64Aによるコリン作働性神経の変性に対して拮抗作用を持ち，しかも低下したコリン作働性神経系を賦活させ，記憶の改善作用を持つ薬物である可能性を示唆するものと考えられる．

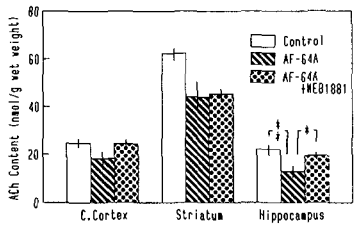


Fig.1 Effect of WEB 1881(100mg/kg,p.o.,7days) on AF-64A-induced changes in cerebral acetylcholine content. *p<0.05, **p<0.01

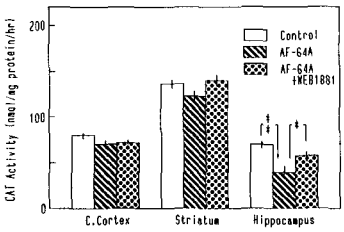


Fig.2 Effect of WEB 1881(100mg/kg,p.o.,7days) on AF-64A-induced changes in cerebral choline acetyltransferase(CAT) activity. *p<0.05, **p<0.01

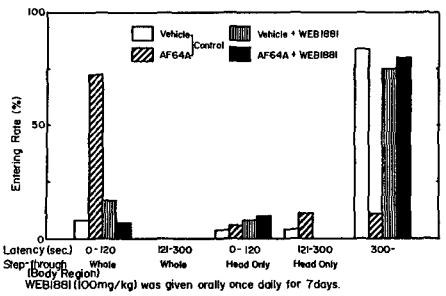


Fig.3 Effect of WEB 1881(100mg/kg,p.o.,7days) on AF-64A-induced changes in passive avoidance response in rat.

References
1. Fisher, A.et al(1982)J.P.E.T.,222,140-145
2. Glowinski, L. and Iversen, L.L.(1966)J.Neurochem.,13, 655-669
3. Bailey, E.L.et al(1986)Behav.Neural Biol.,45,263-274
4. Mantione, C.R.et al(1983)J.Neurochem.,41,251-255

204 AF64A－PICRYLSULFONATEのコリン作動性神経系への作用についての行動薬理学的検討

稲川健太郎・井藤悦朗・原崎博美・野田行文
中外製薬・探索研究所

要約1）ethylcholine mustard aziridinium picrylsulfonate(AF64A-P)のコリン作動性神経系への作用を、行動薬理学的実験により検討した。2）先ず、AF64A-Pの脳内注入量を検討したところ、10^{-6}Mの溶液注入でも非特異的組織変性が観察された。3）0.1nmol/2sidesのAF64A-P側脳室内投与により、海馬のコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)活性が対照の約50%まで低下したが、一方、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)活性には有意な変化がなかった。4）次に、AF64A-Pの効力を行動実験で検討するため、側脳室注入ラットの放射状迷路課題による作業記憶を検討したところ、約6カ月後においても課題の遂行障害が生じていた。5）コリンエステラーゼ活性阻害作用を持つ Tetrahydroaminoacridine (THA) 投与によりこの行動障害は有意に改善された。6）以上の結果より、AF64A-Pを用いることにより安定したコリン作動性神経系障害モデルを作製しうることが結論される。

＜はじめに＞

中枢神経系のコリン作動性神経系が記憶という高次神経機能に深く関わっているという記憶のコリン仮説による記憶障害の動物モデル作製には、従来、コリン系拮抗薬であるスコポラミンやコリン系神経毒ethylcholine mustard aziridinium (AF64A)などがしばしば用いられてきている(4)。AF64Aはスコポラミンよりも特異性が高い(2)と考えられているが、この物質は化学的に不安定であることなどの短所を持ち、安定した記憶障害モデルを作製しにくいことが報告されている(8)。そこで、本研究では、より安定した記憶障害モデルを作製するための基礎検討として、AF64に対して化学的により安定であり、かつ活性が極めて高いことが知られているethylcholine mustard aziridinium-picrylsulfonate(AF64A-P)のコリン作動性神経系への作用を行動薬理学的に検討した。

＜実験方法＞

Fischer系雄性ラット（体重;350-400g）を使用した。AF64A-Pは京都女子大 田口弘康 教授から供与され、^{1}H-NMRスペクトルで化学的物性を確認した。予備検討の結果、先ず、10^{-6}M の溶液注入でも非特異的変性が生じていることが観察された。次いで海馬のコリン系を選択的に障害するAF64A-Pの濃度を検討し、0.1nmol/2 sidesとした。注入方法：動物はペントバルビタール麻酔下(50mg/kg)にPaxinos & Watson のアトラスに従って、両側側脳室注入を行った。AF64A-Pは Artificial -CSF(pH 7.4)に溶解し、対照群には $5x10^{-5}$Mのピクリン酸を含む Artificial CSF (A-CSF) を注入した 。生化学的測定：コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)活性はFonnumの方法(3)、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)活性はAlbers & Brady の方法(1)、蛋白量はLowry法(5)を用いて測定した。行動実験：8アーム放射状迷路を用い、Oltonの方法(6)にしたがって作業記憶を測定した。即ち、1試行で最大16選択までアームを自由に選択させ(異なる8本のアームを選択することで1試行終了)、最初の8選択のうち未選択アームの選択数を指標(正反応)とした。手術後9日間の回復期をおき、その後約6ケ月にわたって、1日1試行行った。約6ケ月後、コリンエステラーゼ阻害作用を持つTetrahydroamino-acridine(THA)を投与し、行動障害への作用を検討した。薬理学的処置：THA (3,10,および 30 mg/kg, sigma)は、1 ml/kg となるように調整し、行動実験開始 30 分前にpo投与した。投与は intra-subject 法により薬物と saline を一日毎、交互に投与した。

＜結果＞

先ず、AF64A-P側脳室内投与10日後の海馬ChATおよびGAD活性を示す。AF64A-P 投与群(N=5)の海馬でのChAT活性は、34.9±6.7 nmol/mg protein/hr であり、対照群(A-CSF投与群:N=5, 75.6±5.1 nmol/mg protein /hr)に対し有意な低下($p<0.01$)を示した。一方、GAD 活性は、AF64A-P 投与群(N=5)で 22.5±1.1 nmol/mg protein/hr であり、対照群(A-CSF投与群: N=5,

26.4±2.7 nmol/mg protein/hr)に対して有意な変化を示さなかった。行動実験：手術10日目の課題遂行において、AF64A-P注入群は対照群に対して有意な正反応の低下を示した($p<0.01$)。注入後10日めから1週間および約6ヶ月後のデータを示す(Fig.1)。対照群の課題遂行レベルに対するAF64A-P投与群の差は続く実験期間中観察された。さらに、約 6ケ月後に、THA(3、10、および 30 mg/kg) の効果を検討したところ、THA 10 mg/kg 投与時にsaline 投与時の正反応数に対して、有意な正反応数の増加($p<0.01$)が観察された(Fig.2)。

＜考察＞

本研究で用いられた行動課題である放射状迷路課題は、作業記憶を測定する課題である(7)。さらにこの行動の中枢機構については、海馬(6)及びコリン系(4)が重要な役割を果たしていることが示されてきている。従って、この課題はAF64A-Pの効力を行動実験により検討するために適切であると考えられる。さて、AF64A-P投与後 10 日目に観察された放射状迷路課題遂行障害は、ChAT 活性が特異的に低下しているという結果より、コリン作動性神経系の活性低下に因ると考えられる。また、AF64によるコリン作動性神経系の障害は時間経過に伴い回復していくことが報告されているが(8)、本実験ではAF64A-Pによる放射状迷路課題遂行障害は約6ケ月持続することが示された。さて、AF64A-P投与後約6ケ月後に観察された課題遂行障害はアセチルコリン分解酵素阻害作用をもつTHA(10 mg/kg)投与により有意に改善された。この結果は、約6ケ月持続した課題遂行障害がコリン作動性神経系の機能低下によることを示唆する。

＜謝辞＞

AF64A-Picrylsulfonateを提供していただいた京都女子大　田口弘康　先生ならびに滋賀医科大学木村　宏　先生に感謝致します。

＜文献＞

(1) Albers, R.W. and Brady, R.O.(1959) J. Biol. Chem. 234, 926-928.

(2) Fisher,A. and Hanin,I. (1986) Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol. 26,161-181.

(3) Fonnum,F.(1975) J. Neurochem. 24, 407-409.

(4) Hagan,J.J. and Morris,G.M.(1988) In Handbook of Psychopharmacology Vol.20 (Iversen L.L.et al eds.):237-324、Plenum、New York

(5) Lowry, O.H.et al. (1951) J. Biol. Chem. 193:265-275.

(6) Olton,D.S. (1983) In Neurobiology of Hippocampus (Seifert,W.ed.) 335-373 Academic Press, New York

(7) Olton, D.S. and Samuelson,R.J. (1976) J.Exp.Psychol:Animal Behav.Proc.2,97-116

(8) 山下元男ら (1987) 神経化学 598-600

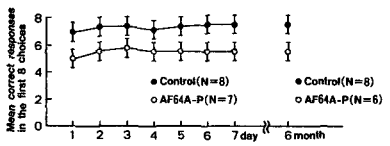


Fig.1 Radial-maze performance of AF64A-P or vehicle injected rats. Each point is represented in terms of mean ± s.e.

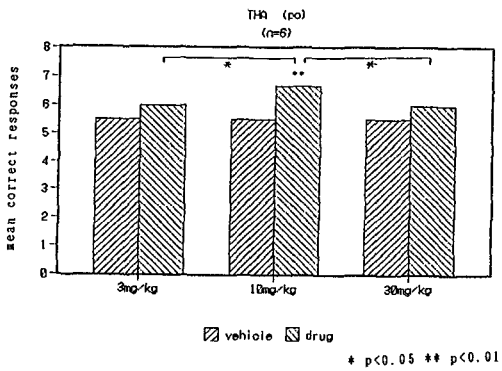


Fig.2 Effects of THA on radial maze performance deficits caused by AF64A-P

205 WOBBLER MOUSE MOTOR NEURON DISEASEに対するMK801の治療効果

菱田良平　倉橋幸造　冨山誠彦　布村仁一　三浦裕之　松永宗雄＊
（弘前大医学部第三内科、同臨床神経＊）

〔要約〕

下位運動ニューロン病モデルであるwobbler mouse[1]を用いて,興奮性アミノ酸阻害剤であるMK-801の治療効果を検討した。４週齢のwobbler miceにMK-801[2](2mg/kg)を週３回３週間、腹腔内に投与した。対照群には同量の生食を投与した。評価は Lange,D.J. et alらの方法に準じて行動評価及び握力、体重を測定した。本試験終了後、頸髄を摘出し蛋白をSDS-PAGE法にて分析した。行動評価では　５週齢よりMK-801群は生食群に比し症状進行は有意に遅延した。握力、体重は差異を認めなかった。蛋白分析ではwobbler mice両群で対照群に較べ、有意に増加を示す２バンドを認めたが（GFAP[3]及び12kDの未知バンド）、wobblerの両群間では差は認めなかった。以上よりMK-801はwobbler mouseにおける運動ニューロン症状進行を抑制することが示された。

筋萎縮性側索硬化症(ALS)でグルタミン酸代謝異常[4,5]が報告されており、その中枢神経毒性が前角神経障害に関与している可能性が指摘されている。MK-801は non-competitive NMDA antagonistであり、既に脳梗塞急性期において細胞障害過程を抑制することが報告されている。また実験的脊髄損傷に対してもMK-801が神経細胞保護作用を有するとの報告[6]がある。本実験では運動ニューロン病モデルwobbler mouseを用いてMK-801の治療効果を検討した。

（実験方法）

１）臨床評価：運動ニューロン症状の明らかな第４週齢のwobbler miceに対しMK-801(2mg/kg)を週３回、３週間、腹腔内投与した（n=10)。対照としては同量の生食投与群（n=9)を置いた。投与は午後8～11時の間に行ない,個々の臨床評価は薬剤投与直前に行なった。評価法は Lange, D.J.et alの方法[7]に基づいて行なった。パラメータとして小箱持上げ（score 0～3)、格子登攀（score 0～3)、歩行状態（score 0～4)をそれぞれスコアーで示し、その合計値を算出した。他にバネ秤を用いての握力、及び体重を経時的に記録した。

２）生化学的検討：本試験終了７週齢において、MK-801投与wobbler mouseのうち５匹、非投与wobbler mouseのうち５匹、同じくMK-801非投与の健常同胞mouse３匹を用い、頸髄C6-8での蛋白は非連続性10%SDS-PAGEに供した。試料は2ug蛋白/ulに調整し、40ug蛋白相当を用いた。染色はクマシーブルーで行ない、その結果はデンシトメトリー（ DENSITRON model PAN-FV, Jookoo Co,LTD)により分析した（Fig.2)。

（実験結果）

１）臨床評価：MK-801群（n=10),及び生食群(n=9)とも全マウスは本実験終了まで生存した。行動評価ではFig.1に示すように,５週齢よりMK-801群は生食群に比し有意に（$p<0.05$及び0.01）症状進行の遅延を認めた。握力ではMK-801群は生食群に比し全般的に勝っていたが有意ではなかった。体重では両群間で有意な差は認めなかった。

２）生化学的検討：健常同胞mouseと、MK-801投与wobbler mouse非投与wobbler mouseを較べると、Fig.3で示すように後２者では２バンドが増加していた。そのうち、50kDaのものは先に報告したGFAP(グリア特異性線維性蛋白）と考えられた。図中Aで示したバンドは特定されていないが、両蛋白ともMK-801投与と非投与の　wobbler mouse の間では有意の差を認めなかった（Table.1)。

(考察)

神経壊死におけるグルタミン酸の役割を仮定する説がある。周知のようにグルタミン酸は興奮性伝達物質であると同時に強力な神経毒でもあり、同神経系の過剰発火は神経死の直接的トリッガーであることが、例えば一過性脳虚血実験などで示されている。同様の機転をALSはじめとする原因不明な神経変性疾患でも想定する立場がある。本実験では wobbler motor neuron diseaseにおいて、グルタミン酸受容体NMDA アンタゴニストMK-801がその神経筋症状の進行を

有意に遅らせることを明かにした。生化学的なマーカーとして、同薬の脊髄レベルでの蛋白パターンも見たが、GFAPと12kDの未知蛋白がwobbler 群では健常群と較べると有意に増加していた。後者の蛋白に関してはその意義は不明だが,グリア特異蛋白GFAPの増加はおそらくgliosisの程度と相関するものであり、この増加は間接的ではあるが前角での神経細胞脱落の程度を反映するものと考えられる。しかしながら、MK-801投与群と非投与群間で、GFAPの増加の程度に差は見られなかった。臨床的に認めた改善が、果たして前角ニューロンの脱落を遅延させた結果なのか、それとも、変性過程を修飾したのではなく、単に機能的な促通効果を示しただけであるのかという問題は、今後、他の形態学的あるいは生化学的マーカーによってさらに解析を要するとしても、MK-801の投与がwobbler mouseにおける臨床症状の進行を有意に遅らせるという今回の成績はきわめて重要な知見である。

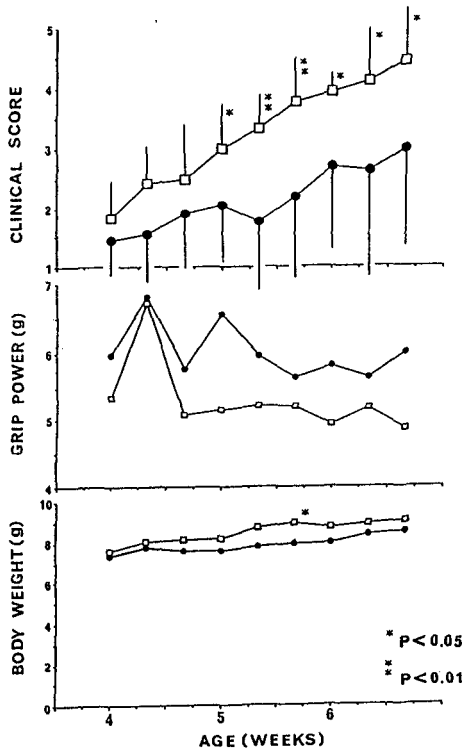


Fig. 1 Clinical effect of MK-801 on Wobbler mouse
MK 801 (●)
saline (□)

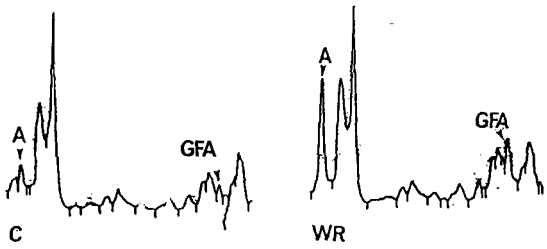


Fig. 2 Densitogram of SDS PAGE

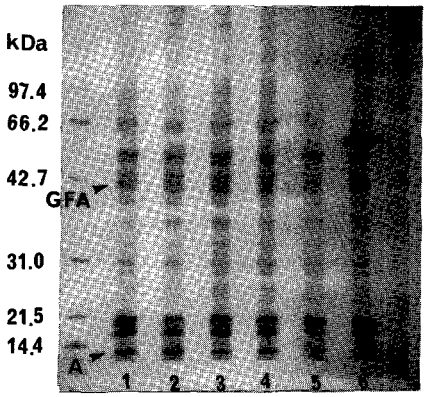


Fig. 3 Representative SDS PAGE
Lane 1,2: Wr MK801 (+)
Lane 3,4: Wr MK801 (−)
Lane 5,6: Control

Table. 1 MK801 Effect on proteins in the cervical cord in wobbler mutant

	protein A	ProteinB(GFAP)
healthy littermates(4)	8.3+3.5	4.2+1.8
wobbler MK801+ (5)	15.7+3.0	6.9+1.0
wobbler MK801- (5)	16.8+5.9	6.7+0.8

Mean ± SD *P < 0.1 , **P < 0.05

(1)Bird,M.T.et al(1971)Acta Neuropathol.19,39-50 (2)Wong,E.H.F.et al (1986)Proc.Natl.Acad.Sci.USA.83,7104-7109 (3)Kurahashi,K.et al(1988) Rinshoushinkei.28,1449-1450 (4)Plaitakis,A.et al(1987)Ann.Neurol.22, 575-579 (5)Hugon,J.et al(1989)Neurol.39,956-958 (6)PinillaF.G.(1989) Exp.Neurol.104,118-124 (7)Lange,D.J.et al(1983)J.Neurol.Sci.61,211-216

206 脳損傷に伴う脳内ＮＧＦ及びａＦＧＦレベルの変動

石川リカ[1,2]、錦織浩治[2]、古川昭栄[1]
（国立精神神経センター神経研究所[1]、キリンビール医薬開発研究所[2]）

〔要約〕
脳損傷後の自己防御反応機構における種々の神経栄養因子の役割を探るために、今回、脳損傷に伴う脳内の神経成長因子（ＮＧＦ）及び酸性線維芽細胞成長因子（ａＦＧＦ）のレベルの変化について検討した。大脳皮質一部の吸引除去による損傷の後、組織除去部位への滲出液中に、損傷 4 時間後よりＮＧＦが検出され、時間とともに増加し、 16 時間後に最高値を示した。その後 6 日後までは比較的高レベルを保ち、 30 日後にはもとのレベルまで低下した。一方この滲出液中には ａＦＧＦも検出されたが、その時間経過はＮＧＦの場合とは明らかに異なり、損傷後 10 日から 30 日にかけて増加傾向にあった。損傷部位周辺の組織のこれらの因子のレベルを測定した結果、 30 日後のＮＧＦレベルにおいてのみ増加する傾向が認められたが、他にはほとんど変化が認められなかった。これらのことから、脳損傷後の神経機能修復においてこれらの因子がそれぞれ異なった役割を持つことが推測される。

【諸言】脳は、ある種の損傷を受けたとき、神経栄養因子の合成量を高め、その後の神経再生を有利に導く自己防御反応機構を持つと考えられる。しかし、もっとも実体が明確な神経栄養因子であるＮＧＦについて、この間の動態はまったく不明である。ＮＧＦについては、既に、 in vitro においてアストログリアが細胞増殖依存的に合成することが示されており(1) 、また、損傷後の脳内でアストログリアの局所的増殖が見られること(2) を考えあわせると、損傷後の脳内でＮＧＦの合成が高まる可能性がある。一方、 ａＦＧＦは、本来中胚葉由来細胞に増殖刺激活性を持つとされていたが、近年培養神経細胞の生存維持活性も見いだされている。しかし、典型的な分泌シグナル配列がないためにその分泌機構が不明であるなどＮＧＦとは異なる点が多い。そこで我々は、今回、これらの異なるタイプの栄養因子が損傷後の神経機能修復にどのように関与するかを知るために、損傷後の動態についてそれぞれに特異的な酵素免疫測定法を用いて検討した。

【方法】７週齢雄 Wistar ラットをネンブタール麻酔後、脳定位固定装置に固定した。皮膚を正中切開後、ドリルを用いて骨窓を開け、正中より 3 mm 左方、冠状縫合に接して後方に直径 3 mm にわたってアスピレーションにより大脳皮質部分の吸引除去を行った。これらの動物より、経時的に脳を摘出し、損傷部位周辺の大脳皮質組織及びこの除去部分への滲出液について、ＮＧＦ及び ａＦＧＦレベルを測定した。これらの因子は、組織からはソニケーションによる抽出の後、それぞれに特異的な酵素免疫測定法(3) にて定量した。測定感度はそれぞれ約 10 pg/ml、0.2 ng/mlであり、組織からの因子の回収率はいずれも 90 % 以上であった。細胞増殖については、免疫組織化学染色の手法を用いて、あらかじめ行った bromodeoxyuridine(BrdU)投与によりラベルされたＳ期細胞を、抗 BrdU モノクローナル抗体を用いて検出した。

【結果】大脳皮質を除去した部分への滲出液中のＮＧＦレベルの変化を図 1A に示す。損傷直後は検出されなかったＮＧＦが 4 時間後には認められ、時間の経過とともに急速に増加し、 16 時間後に最高値を示し、その後 6 日までは比較的高い値を保ち、それ以降は徐々に減少し、 30 日後には約 50 pg/ml 以下となった。 BrdU 陽性細胞は損傷部位周辺の組織中に損傷 1 日後より現れ、3 日後にピークとなった（図 1B ）。この時期は、滲出液中のＮＧＦレベルが比較的高値に保たれる時期（ 3-6 日後、図 1A ）にほぼ一致した。一方 ａＦＧＦは、滲出液中に損傷 10 日後に初めて検出され、その後増加傾向がみられた（表 1 ）。損傷周辺の組織中のＮＧＦレベルについては、損傷部位に極めて接近した部位でのみ 30 日後にわずかな上昇傾向が認められたものの、そのほかの部位ではほとんど変化がみられなかった。またこれらの組織中の ａＦＧＦレベルは損傷後 30 日まで変化は認められなかった。

【考察】大脳皮質除去空隙において、脳損傷後にＮＧＦはきわめて初期から検出されたのに対して、 ａＦＧＦはこれ

に遅れてＮＧＦレベルが漸減しつつある時期に増加し、これらの動態は対照的であった。損傷後の脳内において損傷 3-10 日後にアストログリアの局所的な増殖がおこることは既に知られており、本実験の損傷においても観察された。一方 in vitro におけるアストログリアの培養系で、血清添加による静止期から増殖期への移行がおこる場合、血清添加後 6-8時間以内からの著しいＮＧＦ合成が報告されている[1]。したがって、今回、脳損傷後の極めて早い時期 （ 16 時間後）に、その部位への滲出液中のＮＧＦレベルが大きく上昇したことは、この現象が in vivo でも反映されていると考えられる。すなわち、損傷部位に接触しているアストログリアが損傷に伴う血液に触れ、ＮＧＦ合成が引き起こされた可能性が考えられる。また、脳損傷後 3 - 6 日で観察されたＮＧＦレベルの緩やかなピークは、 BrdU 陽性細胞の出現時期と一致することから、この時期の増殖しつつあるアストログリアに起因するものと考えられる。これらの損傷後初期に出現するＮＧＦの生理的意義は不明であるが、除去された部位に軸索投射している前脳基底核コリン作動性神経細胞に対する迅速な保護的機能と考えることもできる。一方、損傷 30 日後に起こる損傷部位周辺の大脳皮質組織中のＮＧＦレベルの増加は、時間経過を考慮すると、損傷に伴う神経細胞の変性の結果生じた二次的なＮＧＦ合成量の変化を反映していると思われる。またこの時期に aＦＧＦが滲出液中で増加することもこの神経細胞の変性、死を反映しているのかもしれない。 aＦＧＦには明確なシグナルペプチドがなく分泌されないとすると、細胞外への遊離は細胞死のときに限られることになるからである。ＮＧＦと aＦＧＦは応答神経細胞が異なる、生成過程も異なる（分泌型、非分泌型）ことと今回得られた結果を考えあわせると、これらの因子が異なった機構で損傷後の修復過程に寄与していることが示唆された。

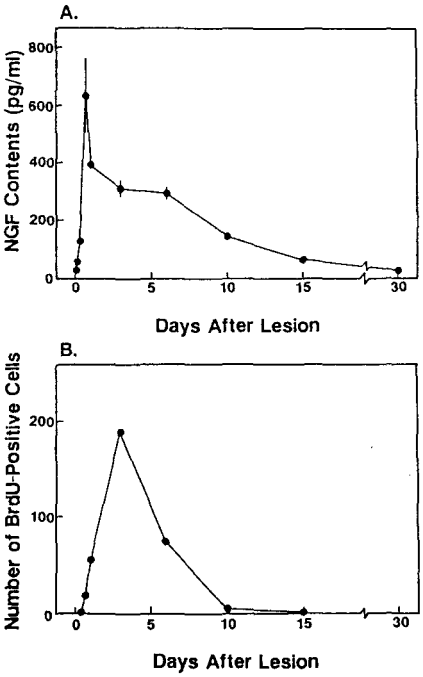


図１　大脳皮質除去後の滲出液中のＮＧＦレベル：平均±SE (n=5) （Ａ）及び損傷周辺大脳皮質の BrdU 陽性細胞数：平均 (n=3) （Ｂ）の経時的変化

表１　大脳皮質除去後の滲出液中のａＦＧＦレベルの経時的変化

Time after lesioning	aFGF content (ng/ml)
4 hr	< N.D.
16 hr	< N.D.
1 d	< N.D.
3 d	< N.D.
6 d	< N.D.
10 d	4.42 ± 0.90
15 d	3.54 ± 0.41
30 d	8.57 ± 1.26

値は平均±SE (n=5)、N.D.は検出限界 (2.0 ng/ml) 以下を示す。

【参考文献】

(1) Furukawa,S.,Furukawa,Y.,Satoyoshi,E.,Hayashi,K. (1987) Biochem.Biophys.Res.Commun. 142, 6

(2) Nieto-Sampedro,M.,Berman,M.A.(1987) J.Neurosci.Res. 17, 214

(3) Furukawa,S.,Kamo,I.,Akazawa,S.,Furukawa,Y., Satoyoshi,E.,Itoh,K.,Hayashi,K. (1983) J.Neurochem. 40, 734

207 前脳基底部および中隔野損傷ラットの学習記憶障害における相違 ー特に水迷路課題について

増田泰伸，山下元司，池田久男
（高知医大・神経精神）

〔要約〕

脳内コリン作動性神経系の起始核であるbasal forebrain （BF）あるいは medial septum （MS） の損傷がラットの空間記憶におよぼす質的差異について水迷路課題を用いて検討した。BF損傷とMS 損傷共に記憶の保持障害が観察された。訓練２日目の１回目のblock においてはBF損傷ラットはMS 損傷ラットに比べ逃避潜時が有意に長く、BF損傷の方がMS 損傷よりも記憶障害が強く現れた。一方、これら起始核からの投射部位である前頭葉と海馬のアセチルコリン（ACh） 濃度を測定した。BF損傷により前頭葉ACh 濃度の低下がみられたが、MS 損傷ラットにおいては海馬ACh 濃度に変化は認めなかった。以上のことから、水迷路課題においてBF損傷とMS 損傷の両者共に記憶の保持障害を示すが、BF損傷ではMS 損傷よりも長期の記憶が強く障害されるものと考えられた。

〔緒言〕

ラットのような小動物を用いて学習記憶を検討する場合、複雑な判断力を必要とする知能検査は困難である。記憶学習行動試験の中でも水迷路課題は空間記憶、参照記憶をみるのに適した行動評価試験であり （5）、また、８方向放射状迷路学習や弁別学習とは異なり摂食制限が不要で、かつ、比較的短期間で試験が終了することが長所である。中枢神経系のコリン作動性神経系が学習記憶において重要な役割を果たしていることは知られている （1）。ヒトにおいて前脳のコリン系はマイネルト基底核から大脳皮質へ投射する系と中隔核から海馬へと投射する系に大別される。これまでアルツハイマー型老年痴呆のモデルとしてこれらコリン系の起始核を損傷したものが用いられているが、１つのモデルが疾患のすべての側面をもってはいないので、いくつかのモデルを組み合わせ判断することが重要であると思われる。ラットにおいてBF損傷とMS 損傷の学習能力の差を水迷路課題を用いて検討したものは我々の知る限り宮本らの報告 （3）があるのみであるが、それぞれの起始核の損傷方法が異なっており、直ちに２つの核の機能を比較することはできない。そこで今回、神経毒であるイボテン酸を用いてラットのBFおよびMS をそれぞれ損傷させ、水迷路課題における両者の相違について調べた。

〔実験方法〕

１）実験動物：15週齢（体重300－350g ）のWistar 系雄性ラットを用いた。

２）コリン系損傷手術：手術はpentobarbital （50mg/kg,i.p.）麻酔下にて行った。生理食塩緩衝液（PH 7.2）に溶解したイボテン酸を脳定位的に脳局所に注入した。BFには30 nmolesを両側に、また、MS には18 nmolesを５分間かけて徐々に注入して神経を損傷させた。対照として溶媒のみを同部位に同量注入したSham 群を設けた。

３）水迷路課題：学習訓練は損傷手術後14日目から開始した。方法はMorris の報告 （4）に準じて行った。直径 120cm、深さ40cmの水槽で、深さ25cmまで約21℃の水をはり、水面下１cmの位置に表面が10×10cmのプラットフォームを置いた。水面には粒状の発泡スチロールを浮かし、ラットに避難場所のプラットフォームが見えないようにした。水槽の縁には North、 South 、 West またはEast の４ポイントをとり、水面を４分画した。装置の周囲には実験者、照明用蛍光灯などラットにとって視覚的手がかりとなる事物があり、これらの空間的手がかりは水槽内のラットに見えるものであり、実験期間を通じて常に一定にした。また、避難場所の位置は訓練期間を通じて一定にした。水槽の中にラットを入水させ、ラットが避難場所へ逃避するまでの潜時を測定した。また、最大逃避潜時を120 秒とした。ラットが避難場所に到着し、10秒間放置した後ホームゲージに戻した。ラットの入水は４ポイントよりランダムに行った。２試行を１Block として１日に２Blocks の訓練を連続３日間施行した（学習訓練）。また、各試行間の間隔は10～20分とした。学習訓練終了の翌日、避難場所を除去しラットを１分間だけ水槽に入

れ、避難場所の位置を記憶しているか否か確認した。

4）脳内ACh　濃度の測定：水迷路課題終了の翌日、ラット頭部にmicrowave を照射し（8 kw，1.5 sec）、前頭葉と海馬を取り出し、ACh　濃度を電極検出器を装着した高速液体クロマトグラフィー（HPLC−ECD）により測定した（1）。

［実験成績および考察］

学習訓練において偽手術のSham 群が第1日目は逃避潜時が長かったものの2日目以降は短縮し、速やかにプラットホームの空間的な位置を学習できたのに対し、BF損傷群およびMS 損傷群共にSham 群と比べ潜時が長く、BF損傷群では訓練2日目と3日目の各1回目のblock　においてSham 群に比べ有意に逃避潜時が長く学習の障害が観察された（Fig. 1）。一方、MS 損傷ラットも訓練3日目の1回目のblock　においてはSham 群と比べ潜時の延長を認めた。2日目の1回目のblock　ではBF損傷群よりも潜時が有意に短く（$p < 0.05$）、BF損傷の方がMS 損傷よりも記憶障害が強く現れた（Fig. 1）。プラットフォームを除去した試験においてはSham 群では訓練時にプラットホームが存在していた区域での滞在時間が約27秒と長かったのに対し、BFおよびMS 損傷群は両群共にSham 群と比べて有意に滞在時間は短く（$p < 0.01$）、記憶の保持障害が観察された。滞在時間においてBF損傷群とMS 損傷群との間に差は認めなかった（Fig. 2）。

我々の以前の研究結果では8方向放射状迷路課題においてBF損傷ラットは学習記憶の獲得、維持の低下を認めなかったが、今回の水迷路課題のような長期の参照記憶を要する試験では学習記憶の障害が観察された。宮本らはBFをイボテン酸、MS を電気凝固を用いて損傷させているが、水迷路課題の学習訓練においてBF損傷の方がMS 損傷よりも記憶障害が顕著に現れ、記憶の保持障害においてもBF損傷ラットはMS 損傷ラットよりも強い傾向がみられたと報告している（3）。今回の我々の成績においてもイボテン酸によるBF損傷、MS 損傷により、両者共に記憶の保持障害を示し、学習訓練においてはBF損傷の方がMS 損傷よりも障害が強い傾向が観察された。相違点は宮本らの報告ではBF損傷とMS 損傷の両者共に長期の記憶だけでなく、短期の記憶においても障害がみられているが、今回の結果では両者共に障害が長期の記憶にのみ観察されていることである。今回の結果からも、BF損傷の方がMS 損傷よりも長期記憶が強く障害されるものと推察された。また、今回ACh　濃度を測定したが、BF損傷ラットでは前頭葉においてACh　濃度の低下を示したのに対し、MS 損傷ラットでは海馬ACh　濃度に変化は認めなかった（Fig. 3）。このことが両者の学習障害の差異として現れているのかも知れない。

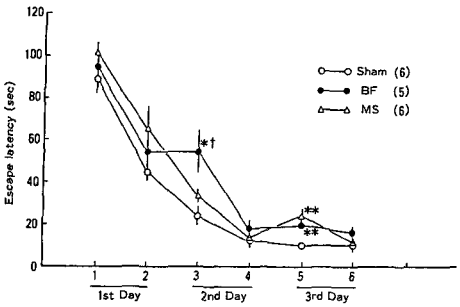


Fig. 1　Escape latency to the hidden platform in rats with lesion of the BF or MS in the Morris water task.
Each points represent the means±S.E.M..
*p<0.05, **p<0.01, compared with Sham-operated controls.
†p<0.05, compared with MS lesiond rats using ANOVA followed by Newman-Keuls test.

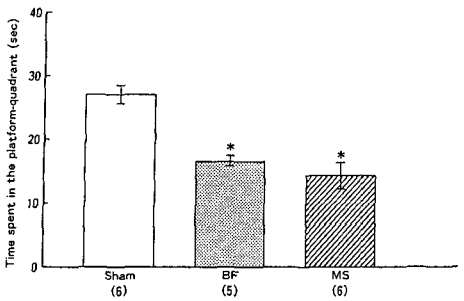


Fig. 2　Time spent in the platform-quadrant where a platform had been placed during training.
The data are expressed as the means±S.E.M..
*p<0.01, compared with Sham operated controls using ANOVA followed by Newman-Keuls test.

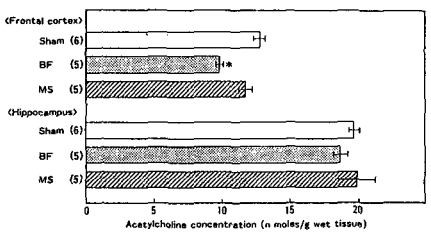


Fig. 3　Acetylcholine concentration in frontal cortex and hippocampus of rats with BF or MS lesion.
The data are expressed as the means±S.E.M..
*p<0.01, compared with Sham operated controls using ANOVA followed by Newman-Keuls test.

［参考文献］
1. Bartus, R.T., Dean Ⅲ, R.L., Beer, B., and Lippa, A.S. (1982) Science 217,408−417.
2. Fujimori, K., and Yamamoto, K. (1987) J. Chromatogr. 414,167−173.
3. Miyamoto, M., Kato, J., Narumi, S., and Nagaoka, A. (1987) Brain Res. 419,19−31.
4. Morris, R.G.M. (1981) : Learn. Motiv. 12,239−260.
5. Morris, R.G.M. (1984) : J. Neurosci. Meth. 11,47−60.

208 キンドリング・ラット海馬におけるCaMキナーゼII自己リン酸化の変化

小幡邦彦，鍋田弥生
（生理学研究所・神経化学）

[要約]
内側中隔を刺激して作成したキンドリング・ラットの海馬及び大脳皮質の粗膜画分につき，内因性のタン白質リン酸化をしらべた。リン酸化はCa^{2+}カルモジュリン(CaM)の存在下で著しく促進され，特に50, 60, 80 kDaに著明であった。この50および60 kDaタン白はCa^{2+}/CaM依存性プロテインキナーゼII(CaMキナーゼII)で，その自己リン酸化が進行するものと考えられた。キンドリング海馬では，これらのリン酸化がコントロールに比べ低下し，これはキンドリング完成後の期間によらず同程度であった。キンドリング刺激の期間中では中程度の低下がみられた。抗CaMキナーゼII抗体によるウェスタンブロットによりCaMキナーゼIIのタン白量は変化していないと考えられた。一方，大脳皮質ではコントロールとキンドリングで，リン酸化の差はみられなかった。

キンドリングは扁桃体や海馬及びその入力系に微弱な刺激を連日与えると，初め何の行動変化も示さなかった刺激に対して全身けいれんで反応する現象で，この状態が達成されると長期間の休止後も同じ刺激でけいれん反応が起こるので，脳の可塑性のモデルと考えられる。キンドリングの際の神経伝達物質の変動については多くの研究があるが(1)，必ずしも一定の結果は得られておらず，キンドリングにおける分子レベルの変化を明らかにするにはさらに系統的な分析が必要である。

我々はラット内側中隔の刺激によりキンドリングを作成し，その海馬においてタン白質とmRNAの特異的発現や変化をしらべている。タン白質の二次元電気泳動パターンの比較からタン白質量には差が見出されなかったので，本研究ではそのリン酸化を検討した。

[方法]
7週齢のウィスター系雄性ラットにおいて左側の内側中隔に刺激用電極(両極間距離0.5mm)を設置した。手術後10日目より300μA，5msec，60Hzの刺激を1秒間，1日1回与えた。全身けいれんが3日間続けて起ると，キンドリングの完成として，刺激は中止した。平均20日でキンドリングが完成した。コントロールとしては同じ強度の刺激を6Hzで10秒間与えた。断頭放血後，両側の海馬と大脳皮質をとり出し，粗膜画分(P2)を調製した。リン酸化反応は5μM[γ-^{32}P]ATP存在下で37 ℃30秒間行ない，SDS - PAGEで分離後オートラジオグラフィーにかけた。

[成績]
1. SDS-PAGEのCBB染色において，タン白質のパターンにキンドリングとコントロールで差がなかった(図1, 左から2, 3レーン)。 2. リン酸化はCa^{2+}によって促進され(図示せず)，さらにCaM添加により著しく促進された(図1)。サイクリックAMPまたはCa^{2+}とフォスファチヂルセリンではほとんど変化しなかった(図示せず)。 3. Ca^{2+}及びCa^{2+}/CaMで促進される50及び60 kDaタン白のリン酸化は，キンドリング海馬において

コントロール海馬よりも低かった(図1)。 4. このリン酸化はキンドリングの完成直後から1ヵ月以上にわたって同程度に保たれていた。また刺激期間中は中間レベルであった。 5. 大脳皮質の50及び60 kDaタン白リン酸化にはキンドリングで明らかな変化がなかった。 6. 50及び60 kDaタン白は分子量及び抗CaMキナーゼII抗体の特異的結合から，CaMキナーゼIIであるとみなされるが，ウェスタンブロットの染色度にキンドリングとコントロールで差がなかった。 7. ニトロセルロースブロットに対する^{125}I - CaMの結合は50及び60 kDaタン白に対してみられ、これはキンドリングとコントロールで差がなかった。

[考察]

キンドリング脳のタン白質リン酸化についてはCaMキナーゼII自己リン酸化の低下(2)，45 kDaタン白での促進(3)，180 kDa糖タン白での低下(4)が報告されている。本実験においてキンドリング海馬でin vitroのリン酸化の低下がみられた50及び60 kDaタン白はCaMキナーゼIIのα及びβサブユニットとみなされ，Wasterlain，Farberら(2)が見出した所見に一致する。ウェスタンブロット及びCaM結合の結果から，CaMキナーゼIIのタン白量は不変と判定されるので，本実験(post hocアッセイ)においてキンドリング海馬でこのリン酸化が低下していたことは，生体内で脱リン酸化状態のものが少ないことを示し，リン酸化が亢進していると考えられる。さらにこのリン酸の変化はキンドリング刺激中から進行し，完成後はほぼ同じレベルに維持されることが見出された。

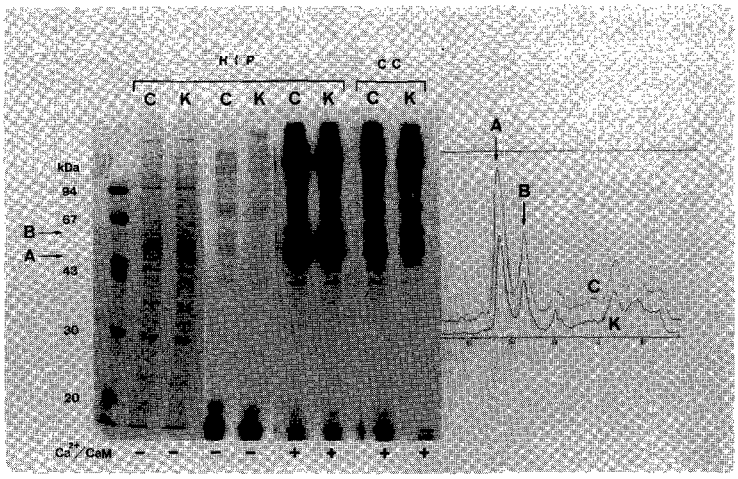


図1. キンドリング(K)及びコントロール(C)ラットの海馬(HIP)及び大脳皮質(CC)粗膜画分のリン酸化。左よりレーン1 - 3，マーカー・タン白及び標品タン白のCBB染色。レーン4 - 9，オートラジオグラム。標品及び条件は上下に示す。右，レーン6，7をデンシトメータで計測。50(A)，60 kDa(B)のバンドに差がみられる。

[文献]

(1) 秋山一文，佐藤光源(1990)蛋白質核酸酵素35，1206 - 1213。
(2) Goldenring, J. R., Wasterlain, C. G., Destreicher, A. B. et al. (1986) Brain Res. 377, 47 - 53.
(3) Patel, J., Marangos, P. J., Contel, N. et al. (1984) J. Neurochem. 43, 169 - 173.
(4) Bank, B., Gurd, J. W. and Chute, D. L. (1986) Brain Res. 399, 390 - 394.

209 扁桃核キンドリングラット脳における興奮性アミノ酸受容体の分析

秋山一文[1]、米田幸雄[3]、荻田喜代一[3]、伊藤高[1]、大源明宏[1]、曾良一郎[2]、大月三郎[1]
（岡山大・医・神経精神[1]、慈圭病院[2]、摂南大・薬・薬理[3]）

〔要約〕
完成した扁桃核キンドリングラットを最終痙攣から７日後に断頭し、５脳部位に於て興奮性アミノ酸受容体をサブタイプ別に一斉分析した。[^{3}H](+)5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine (MK-801)結合は反応時間30分で無添加、glutamate(glu)単独存在下、glu/glycine(gly)共存下では変化なかったが、glu/gly/spermidine(SPD)共在下での30分の反応、及びglu/glyまたはglu/gly/SPD共存下での平衡状態（反応時間16時間）では、キンドリング群の扁桃核でのみ有意に減少し、他の脳部位では有意差はなかった。N-methyl-D-aspartate(NMDA)感受性[^{3}H]glu, [^{3}H]gly, [^{3}H]SPD, [^{3}H]DL-α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA), [^{3}H]kainate結合はどの脳部位でも両群間で有意差はなかった。以上より刺激部位である扁桃核のNMDAチャネル自身に変化が生じている可能性が示唆された。

[はじめに]キンドリング完成後において興奮性アミノ酸受容体を結合実験によって調べた従来の報告[1-4]では一致した結論は得られていない。これには膜標品作成法の相違が関係している可能性もある。さらにNMDA受容体複合体については、内因性のglu結合部位、イオンチャネル、gly結合部位に加え、最近ではSPD結合部位の存在が見いだされている。今回、扁桃核キンドリングラットの５脳部位に於いて興奮性アミノ酸受容体をサブタイプ別に一斉分析したので報告する。

[対象と方法]

キンドリングラットの作成：ＳＤ系雄性ラット(14匹)の左側扁桃核(AP 0, L 5.0 8.0)に慢性深部電極を植え込み、150μA, 60 Hzの正弦波で１秒間、１日１回電気刺激した。二次性全汎化発作が連続５回安定して認められるようになった後、キンドリングラットをsham operationを施した対照ラット(14匹)とともに最終発作から７日後に断頭し、扁桃核、海馬、線条体、前頭皮質、小脳を切り出した。

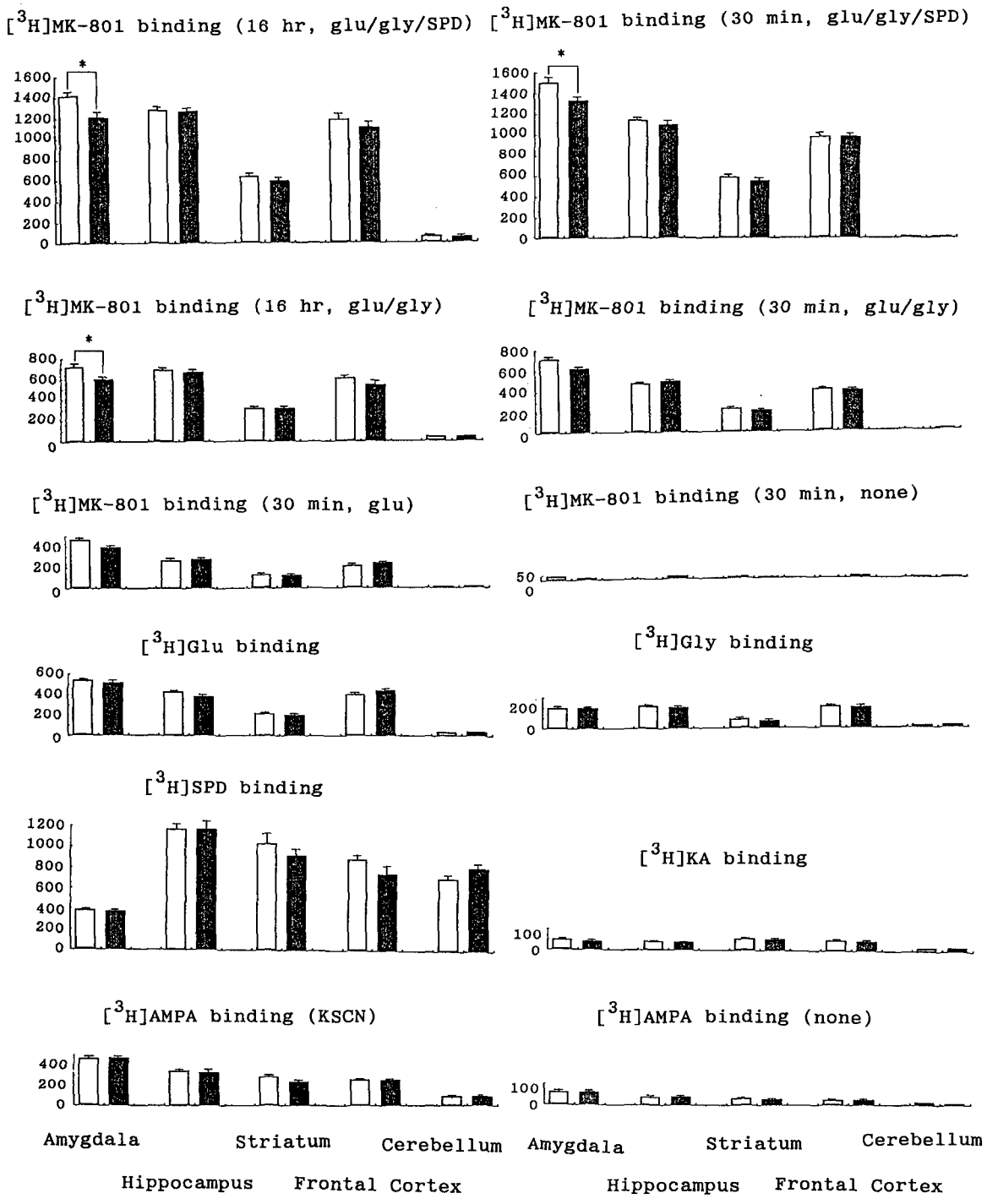
結合実験：組織を速やかに40倍量の5 mMトリス酢酸緩衝液 (1 mM EDTA, 0.01% bacitracin, 0.1 mM PMSF含有, pH 7.4)中でホモゲナイズし、50,000g, 30分間で遠心分離した。得られた沈渣を同量の50 mMトリス酢酸緩衝液(pH 7.4)に再懸濁し、同様な遠心分離をさらに３回繰り返した。膜標品を８倍容量の0.32M sucroseに懸濁し、凍結した。膜標品を室温で融解したのち、0.08 % Triton X-100と2℃で10分間前処理した。この前処理を50,000g, 20分間の遠心分離で停止後、得られた沈渣を40倍量の50 mMトリス酢酸緩衝液(pH 7.4)に懸濁して再度50,000g, 20分間の遠心分離を行った。こうして得られた沈渣を同緩衝液に懸濁した状態で結合実験に供した。なお、本実験に用いた緩衝液および水溶液はすべて使用前に孔径0.45μmのニトロセルロース膜を通過することにより除菌処理を行った。[^{3}H]MK-801 (5 nM)結合は既報[5]に従い、アミノ酸無添加、10 μM glu単独添加、10 μM gluと10 μM gly共存下、あるいは10 μM gluと10 μM glyと1 mM SPD共存下で行った。NMDA感受性[^{3}H]glu (10 nM)結合は既報[6]、[^{3}H]gly (10 nM)結合は既報[7]、[^{3}H]SPD (20 nM)結合は既報[8]、[^{3}H]AMPA (10 nM), [^{3}H]kainate (10 nM)各結合は文献[9]に従い行った。いずれの結合もキンドリング群、対照群がN=7となるように行い、値は特異的結合(fmoles/mg protein)で表示した。２群間の比較にはStudent·s t testを用いた。

[結果及び考察]

[^{3}H]MK-801結合はアミノ酸非添加条件下では平衡状態に達するまで24時間以上を要したが、glu/gly添加の条件下ではこの結合速度は著明に促進され、さらにSPDを添加した条件下では平衡状態での結合数も著明に増加した。[^{3}H]MK-801結合は反応時間30分で無添加、glu単独存在下、glu/gly共存下では両群間に差はなかったが、glu/gly/SPD共在下での30分の反応、及びglu/glyまたはglu/gly/SPD共存下での平衡状態（反応時間16時間）では、キンドリング群の扁桃核でのみ有意に減少し、他の脳部位では有意差はなかった。NMDA感受性[^{3}H]glu, [^{3}H]gly, [^{3}H]SPD, [^{3}H]AMPA (100 mM KSCN存在下、非存在下), [^{3}H]kainate結合はどの脳部位でも両群間で有意差はなかった（図）。今回、減少が認められた[^{3}H]MK-801結合の測定条件はglu/glyまたはglu/gly/SPD存在下であり、いわばNMDAチャネルがuse dependentに開口した状態を反映すると考えられる。Yehら[4]が報告したような海馬でのglu結合部位、NMDAイオンチャネル、gly結合部位の増加は確認されず、むしろ刺激部位である扁桃核のNMDAチャネル自身が減少していることが示唆された。

[文献]

1 Sircar R, Ludvig N, Zukin SR and Moshe SL Eur J Pharmacol 141:167-168, 1987.
2 Jones SM and Johnson KM Exp Neurol 106:52-60, 1989.
3 Okazaki MM, McNamara JO and Nadler JV Brain Res 482:358-364, 1989.
4 Yeh GC, Bonhaus DW, Nadler JV and McNamara JO Proc Natl Acad Sci USA 86:8157-8160, 1989.
5 Yoneda Y and Ogita K Brain Res 499:305-314, 1989.
6 Yoneda Y, Ogita K, Ohgaki T, Uchida S and Meguri H Biochem Biophys Acta 1012:74-80, 1989.
7 Ogita K and Yoneda Y J Neurochem 54:699-702, 1990.
8 Yoneda Y and Ogita, K in Neurotransmitter Receptor: Neuroreceptor Mechanisms in Brain (Kito S, Segawa T and Olsen R eds) in press, Plenum Press.
9 Murphy DE Snowhill EW and Wiiliams M Neurochem Res 12:775-782, 1987.



Values of fmoles/mg protein are expressed as mean ± S.E.M of seven independent determinations.

* $p < 0.05$ as compared to the control (Student's t test)

□ : Control ■ : Kindling

210 培養細胞（Bu－17，human glioma）におけるアミロイドβタンパク前駆体

亀谷 富由樹[1]，羽賀誠一[2]，田中喜久子[1]，石井毅[2]

東京都精神医学総合研究所・分子生物[1]，超微形態[2]

[要約]

アミロイドβタンパク前駆体(APP)の代謝異常がアルツハイマー病脳におけるアミロイド沈着の原因と考えられているが，アミロイド生成機序は未だに不明である．我々はこの生成機序解明のための一手段として培養細胞におけるAPPの検索を行った．培養細胞(Bu-17, human glioma)では抗APP subsequence抗体に対する反応が細胞表面上に顆粒状に見られ，特に突起様部分強く観察された．またこの細胞の培養上清中には抗APP subsequence抗体との反応はみられず，一方膜画分にはAPPおよびAPP関連タンパクが同定された．これらのことからBu-17細胞のAPPはその大部分が細胞膜上に存在し，細胞接着等に関与していると推定された．

[目的]

アルツハイマー病脳中には老人斑が特徴的にみられ、そこにはアミロイド物質が沈着し，その病因と密接に関連していると考えられている．このアミロイド物質は分子量約4Kdのβ/A4タンパクを主要構成成分とし，その前駆体(APP)は細胞膜上に存在する受容体様膜タンパクであると推定されている(1)．最近このAPPはβ/A4タンパク部分のN末端から15-16番目のアミノ酸でプロセシングが起こり，分泌されることが報告され(2)，プロセシングの異常によりアミロイドが生じると推定されている．しかしこのAPPからβ/A4タンパクにいたる過程については未だに不明である．我々はこれまでにアミロイド生成機序解明を目的として，β/A4タンパクおよびそのAPPの脳内での存在・分布，各種培養細胞におけるAPPの検索等の研究を行ってきた(3-5)．本研究では培養細胞(Bu-17, human glioma)におけるAPPおよびその関連タンパクの解析を行った．

[方法]

抗体：APPに対する抗体には図1に示した抗R35(アミノ酸残基274-286)，抗R36(アミノ酸残基527-540)，抗β（アミノ酸残基597-620)，抗R37(アミノ酸残基681-695)を用いた(1)．これらの抗体の特異性はすでに報告した(4)。

免疫組織化学：培養した細胞の細胞膜表面の観察には冷Hanke's平衡塩類溶液(1% BSA, 0.1% アジ化ナトリウムを含む)で細胞を洗浄後，未固定のまま，直接上記のアミロイドβタンパク前駆体のsubsequenceに対する抗体で処理した．以下通常の方法に従い，蛍光抗体間接法による観察を行った．

APPおよびAPP関連タンパクの同定：細胞培養上清中に分泌されたAPPについて検索するためにアフィゲルヘパリンを用いてアフィニティクロマトグラフィーを行った．また培養細胞細胞膜に存在するAPPを検索するために培養細胞を100mM Tris-HCl/100uM PMSF, pH7.6緩衝液でホモゲナイズしたのち，その不溶画分より100mM Tris-HCl/1% Triton X/100 uM PMSF, pH7.6緩衝液を用いて膜結合型APPを抽出した．さらにこの画分からイオン交換クロマトグラフィーおよび抗β抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィによりAPPおよびAPP関連成分の精製を試みた．

[結果]

免疫組織化学：Bu-17細胞は未固定の条件下で，細胞表面および突起様部分が抗R35，抗R36，抗β抗体と反応した（図2，表1）．陽性蛍光は顆粒状に分布し，特に突起様部分が強く反応した．APPの細胞膜に近接する部分に対する抗体ほど反応性は弱くなり，細胞内部分に対する抗R37抗体では反応が見られなかった．また吸収抗体，コントロール抗体は反応しなかった．

APPおよびAPP関連タンパクの同定：Bu-17細胞膜分画では表1に示したように，いずれの抗体とも反応がみられ，陽性タンパクの分子量は45-130kDaであった．一方培養上清ではこれらの抗体と反応するものはほとんどみられなかった．

[考察]

APPはβ/A4タンパク領域の中でプロセシングを受け分泌することが最近報告された．ここに示したBu-17細胞では，1)細胞表面，突起様部分に抗R35，R36，β抗体との陽性蛍光が観察されたこと，2)膜分画にこれらの抗体と反応するタンパクが存在し，培養上清中には反応するタンパクが検出されなかったこと，3)さらに免疫電顕においても陽性反応が細胞膜上に観察されたことから（未発表データ），APPは分泌されずに細胞膜上に存在していると推定できる．このことはプロセシングを受けずに細胞膜上にとどまり，細胞接着等の作用を担うAPPも存在する可能性を示している．これらのことについては今後さらに検討が必要である．

[文献]

(1) Kang, J. et al. (1987) Nature 325, 733-736
(2) Esch, F.S. et al. (1990) Science 248, 1122-1124
(3) Kametani, F. et al. (1989) Biomedical Research 10, 179-183.
(4) Ishii, T. et al. (1989) Neuropathol. Appl. Neurobiol. 15, 135-147.
(5) Kametani, F. et al. (1990) J. Neurol. Sci. 97, 43-52.

表1

Summary of immunoreactivities of cultured Bu-17 cells using antibodies to subsequences of APP

	anti-R35	anti-R36	anti-β	anti-R37
Fluorescence	++	+++	+	-
Cell homogenate	+	+	+	+
(membrane fraction)		45-130 kDa		
Conditional cultured medium	+-	-	-	-

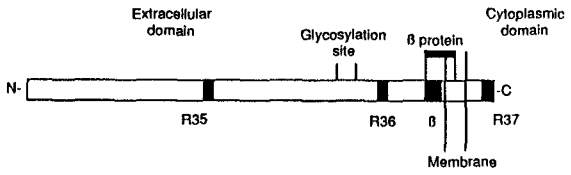


図1　予想されるAPPの模式図．
合成ペプチドの位置を示した．

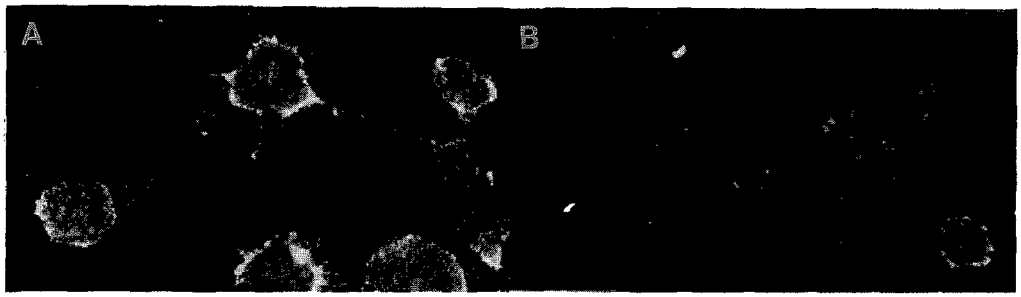


図2 Bu-17細胞の(A)抗R35抗体，(B)抗R36抗体による蛍光染色(x320)．

211 Trimethyltinによる異常行動と脳内伝達物質の関連性について

松本 明、野口 幸男、九穂 泰三、芝軒 信次、淺井 聰、石川 紘一
（日本大・医・薬理）

[要約] ラットに trimethyltin を経口投与すると、この物質は長期間にわたって脳内に残留した。また薬物の投与初期に、aggressionやhyperreactivity などの異常行動が観察された。この時期の病理所見には、軽度の変性細胞が散在するのみであったが、noradrenaline、dopamineおよび 5-hydroxytryptamine などのモノアミン伝達物質が相応して減少し、これらの変化が異常行動の発現に関係する事が示唆された。一方壊死や細胞の脱落などの病理所見は遅延して出現し、この際脳内のacetylcholine の減少が認められた。TMT を投与した場合、学習行動の異常を起こすことが報告されており、この作用にコリン作働神経系が関与している可能性が示唆された。

緒　言

近年、有機スズ化合物による中枢神経系の傷害について研究がなされ、病理学的所見としてneuronal necrosis と細胞脱落が報告された (1)。これら変性は、海馬を含む大脳辺縁系に著明である事から、行動および記憶学習に影響をおよぼす研究用薬物として用いられている (2,3)。

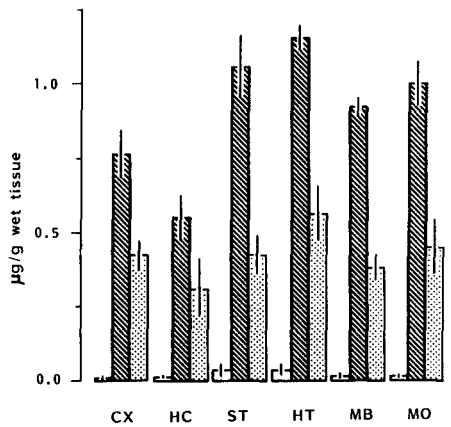
しかし、薬物投与後の神経伝達物質変化についての報告はほとんどなく、一致した知見は得られていない (4,5)。今回の実験では、一定量の trimetyltin (TMT) を投与したときの、脳内スズ残留濃度の推移と、それに伴う神経伝達物質およびそれら代謝産物濃度の変化を経時的に測定した。また屠殺時までに発現した行動変化を観察するとともに、一部の動物においては、組織学的検査を行った。

実　験　方　法

ラットに一定量のTMT を経口投与した後、痙攣の出現、Animex meterによる運動量の変化、soft touchおよびair puffによるjumping や疾走、mouse-killing behaviorなどの行動変化を観察した。また薬物投与の 4、10および38日後にマイクロウェーブ (5 KW、1.3 秒間) を照射して屠殺し、Glowinski and Iversen の方法に準じて摘出した脳を分割した。脳内のnoradrenaline (NA)、dopamine (DA)、5-hydroxytryptamine (5-HT) とacetylcholine (ACh) およびそれら代謝産物の測定は、石川らの方法 (6)に準じて抽出した後、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーにて測定した。脳内スズ濃度の測定は、薬物投与 1時間および21日後に断頭し、同様に脳を分割した。この脳組織は、濃硝酸にて加水分解し、濃縮乾固した後、再び0.05 N塩酸にて溶出して元素分析を行った。病理標本の作成は、10%ホルマリンで固定後、パラフィンに包埋し薄切切片を作成した後、Luxol fast blue による染色および anti-glial fibrillary acidic protein 抗体による免疫組織染色を行い観察した。

実　験　結　果

ラットにTMT を10 mg/kg以上投与すると、痙攣や振戦を起こし、多くの場合48時間以内に死亡した。Aggressionは8 mg/kg 投与において、またhyperreactivity は7 mg/kg 投与において最もよく発現し、薬物投与後４～14日にわたって観察された。しかしそれ以後に



図－1　TMT 投与後の脳内スズ濃度。
カラムは左から無投与（白）、１時間後（斜線）、21日後（点）の順である。CX：大脳皮質、HC：海馬 ST：線条体、HT：視床下部、MB：中脳、MO：橋・延髄

おいては、対照群と比較して行動上に著しい相違を認めなかった。一方Animex meterによる運動量は実験の全経過にわたって著しい差を示さなかった。

5 mg/kg のTMT を投与し、1時間および21日後に測定した脳内のスズ分布を図－1に示す。スズの脳内分布には差異が認められ、視床下部（HT）や線条体（ST）において最も高く、海馬（HC）が最も低かった。また21日目に測定した場合、脳内濃度は1 時間後の約半分になった。 TMT の8 mg/kgを投与し、4、10および28日後の脳内モノアミン伝達物質およびACh 濃度を表－1に示す。NAおよびDAなどのモノアミン類は、薬物投与の4および10日後において多くの部位で有意な減少を示したが、28日においては対照群のそれとほぼ同様の値に回復した。一方ACh は、投与初期より線条体や視床下部で有意に減少し、28日においても回復しなかった。

表－1　脳内伝達物質濃度に及ぼすTMT の作用。数値はng/g湿重量で表され、6匹の平均±標準偏差を示す。 *有意の差（P < 0.01）のあることを示している。

Region		NA	DA	5-HT	ACh
CX	Control	639 ± 61	883 ± 95	469 ± 42	2640 ± 146
	4 days	461 ± 44*	810 ± 18	417 ± 50	2586 ± 161
	10 days	576 ± 77	625 ± 31*	426 ± 23	2340 ± 112*
	28 days	562 ± 80	815 ± 141	407 ± 62	2470 ± 88*
HC	Control	683 ± 103	122 ± 20	582 ± 63	2915 ± 316
	4 days	546 ± 22*	174 ± 42	542 ± 40	2922 ± 130
	10 days	641 ± 75	149 ± 31	677 ± 51*	2825 ± 116
	28 days	668 ± 162	154 ± 31	577 ± 57	3019 ± 184
ST	Control	219 ± 27	11892 ± 1416	607 ± 71	9116 ± 605
	4 days	185 ± 24*	11845 ± 1118	650 ± 92	9014 ± 673
	10 days	199 ± 21	9531 ± 1937*	496 ± 87*	6395 ± 460*
	28 days	193 ± 25	13235 ± 2433	643 ± 72	8132 ± 423*
HT	Control	1096 ± 143	389 ± 46	551 ± 72	3131 ± 189
	4 days	754 ± 98*	305 ± 26*	482 ± 38	2719 ± 142*
	10 days	664 ± 92*	328 ± 52	409 ± 75*	2738 ± 194*
	28 days	878 ± 125	438 ± 88	484 ± 37	2827 ± 153*
MB	Control	572 ± 59	335 ± 38	761 ± 93	3607 ± 379
	4 days	430 ± 56*	215 ± 50*	688 ± 5*	2886 ± 220*
	10 days	447 ± 71*	200 ± 40*	627 ± 86*	3227 ± 239*
	28 days	494 ± 84	323 ± 42	663 ± 97	3237 ± 206*
MO	Control	1005 ± 77	97 ± 15	745 ± 49	2885 ± 141
	4 days	777 ± 55*	73 ± 13*	721 ± 45	3033 ± 160
	10 days	738 ± 69*	72 ± 13*	616 ± 68*	2654 ± 53*
	28 days	1033 ± 63	95 ± 8	683 ± 64	2660 ± 89*
CB	Control	686 ± 56	46 ± 8	172 ± 11	508 ± 40
	4 days	505 ± 26*	54 ± 10	145 ± 16*	458 ± 48
	10 days	518 ± 39*	24 ± 7*	143 ± 20*	442 ± 29*
	28 days	584 ± 60	39 ± 10	166 ± 22	504 ± 44

病理所見として細胞の変性、壊死と脱落、および免疫組織染色の結果から、micro glia とastrocyteの増殖が認められた。これらの変化は用量依存的で、薬物投与後４日から出現して漸次増強して、観察の最終時に最も強い変性が認められた。

考　　察

ラットにTMT を投与すると、生物学的半減期が約20日と長く、脳組織に残留することが明らかになった。しかし行動変化は薬物投与後４～14日にわたって観察されたのみで、TMT による急性刺激作用が関係するものと考えられる。一方病理所見では、投与初期においては、萎縮細胞が散在するのみで著しい変化を認めなかった。しかし脳内モノアミン伝達物質の変化は、投与後早期に起こることから、これら異常行動の発現と関係しているものと考えられる。一方、細胞壊死や脱落は投与の１週間以後に認められ漸次増強した。ACh の減少は投与後28日においてもなお認められることから、細胞の壊死・脱落はACh の変化と関係するものと考えられる。長期間継続的に投与されたTMT が学習記憶機構を傷害すると報告されているが (2,3)、この作用機序としてコリン作働神経系に対する作用が関与するものと考えられる。

文　　献

1. Whittington, D.L., Woodruff, M.L., Baisden, R.H. (1989) Neurotoxicol. Teratol. 11:21-33
2. Messing, R.B., Bollweg, G., Chen, Q., Sparber, S.B. (1988) Neurotoxicology 9:491-502
3. Peele, D.B., Farmer, J.D., Coleman,J.E. (1989) Psychopharmacology, 97:521-528
4. Mailman, R.B., Krigman, M.R., Frye, G.D., Hanin, I. (1983) J. Neurochem., 40:1423-1429
5. De Haven, D.L., Walsh, T.J., Mailman, R.B. (1984) Toxicol. Appl. Pharmacol., 75:182-189
6. Ishikawa, K., Shibanoki, S. (1986) Anal. Biochem., 147:441-450

212 CAN PIRACETAM PROTECT A STABILIZED OPERANT PERFORMANCE AGAINST THE AMNESTIC EFFECTS OF CHRONIC HYPOXIC TREATMENT?

Eric CHLEIDE*/**, Jacques BRUHWYLER* and Koichi ISHIKAWA**.
(*Department of Psychology, Faculty of Medicine, Namur University, Belgium and **Department of Pharmacology, Nihon University School of Medicine, Tokyo 173, Japan)

[SUMMARY] Two experiments were undertaken in order (I) to study the effects of hypoxia on the stabilized performance of rats in a fixed-interval schedule and (II) to study the effects of piracetam on hypoxia-induced decrements of performance. Rats were submitted to one daily FI 60 sec (FI 60) session for 30 days. For the subsequent 3 sessions, hypoxia (3.5% O_2 for 10 min) was induced once a day, for 3 days, immediately after the FI session. The performance was disturbed from the very first post-hypoxia FI session. There was a sharp drop in responses rate, and changes in the temporal distribution of responses occured. Piracetam, when given 30 min before each FI session followed by hypoxia, efficiently protected the performance against the amnestic effects of hypoxia. A third experiment was undertaken to analyze the effects of hypoxia on the release of acetylcholine (ACh) by using a brain dialysis technique. The results indicated that marked decreases in ACh release occured during hypoxia.

INTRODUCTION

Many papers have been devoted to hypoxia as an effective amnestic agent in animals. In the explanation of hypoxia-induced retrograde amnesia in animal learning, two groups of hypotheses have been put forward: the consolidation hypothesis and the retrieval hypothesis (1). The first argues that retrograde amnesia can be explained by partial or total disturbance of the consolidation process. According to the second hypothesis, hypoxia disrupts the process through which the stored information is read out and influences the subsequent behaviours.

In our first experiment, we examined the influence of hypoxia on the stabilized performance of rats in a fixed-interval (FI) schedule. Employing the FI schedule seems to be a worthwhile undertaking since no systematic study of the effects of hypoxia on performance in a FI schedule has yet been carried out. Moreover, by stabilizing the performance, we ensured that storage of the critical information was completed prior to the amnestic treatment. We could therefore study more specifically the effects of hypoxia on retrieval rather than on consolidation of the FI performance.

The aim of the second experiment was to examine the effects of piracetam in the same experimental paradigm as in experiment 1. Many papers have indicated that piracetam (UCB-6215) protects learning and memory against hypoxia in animals (see reviews 2,3). In view of these data, the second experiment analyzed the extend to which piracetam could also protect the stabilized performance against an hypoxic brain insult.

METHODS

Experiment 1: fourteen Wistar rats (250-300 g) were assigned to 2 groups. For the first 30 days, the treatment was the same for both groups. After 3 sessions to shape the bar press response, all rats were submitted to one daily FI 60 session (FI 60) for 30 days. For the next 3 following days (sessions 31 to 33), one group was submitted to hypoxia (3.5% O_2 - 96.5% N_2) immediately after the FI 60 session, after which their were returned to their home cage. For the last 6 sessions (sessions 34 to 40), no hypoxia treatment was given after the FI 60 sessions.

Experiment 2: the procedure was broadly the same as in experiment 1 except for the second part of the experiment. After 29 FI 60 sessions, the rats of both groups were exposed to hypoxia immediately after each daily session (sessions 30 to 34). However, one group received an injection of piracetam (100 mg/kg) at 30 min before the FI 60 session, while the other group received a saline injection. No pre- or post-treatment was applied for the sessions 34 to 40.

A two-factor fixed design analysis of variance for repeated measures was employed to evaluate the results. Four dependant variables were analyzed: the curvature index (4), the post-reinforcement pause duration (5), the response rate and the number of late responses (i.e. responses made more than 70 sec. after obtaining the previous reinforcement). The distribution of responses (TDR) (5) in successive segments of the schedule was available for every session.

Experiment 3: the method for estimating the ACh striatal release was the same as that described previously (6,7). Determinations were carried out at 20, 10 and 5% of oxygen.

RESULTS and DISCUSSION

For both experiments 1 and 2, the performance was stabilized from the 15th FI 60 session. In experiment 1, the FI 60 sessions consecutive to hypoxia were mainly characterized by significant decreases in responses rates (fig 1), changes in the TDR and an increase of the late responses (fig 2a). We observed a recovery in these 3 parameters during the last 6 sessions (from day 35 to 40), but the recovery was not realized completely for the response rate. There were no significant effects for the pause duration or curvature index (data not shown). In the second experiment, the saline group exhibited the same disruptions of performance (figs 2b and 3) as the hypoxia group in experiment 1. The pause duration was also significantly decreased by hypox-

ia (fig 4). This second study demonstrated clear protective effects of piracetam on the hypoxia-induced impairments of performance. The results of both experiments can be evaluated with reference to the 3 stage model of memory formation (8). It can be argued that the decrements of performance may be due to the effects of hypoxia on retrieval mechanisms associated with long-term memory. However, we cannot exclude the possibility of hypoxia-induced cerebral damage despite the recovery of performance observed in both experiments. The data for piracetam are in agreement with those previous studies showing its protective effect on impairments of performance induced by hypoxia (2,3). The third experiment revealed a constant and significant decrease of ACh release during hypoxia. After 60 min of hypoxia, the ACh output was 57.5% and 53.1% (with respect to the control value) for 10% and 5% O_2 respectively. These data are consistent with ACh playing an important role in the mediation of the cerebral effects of hypoxia.

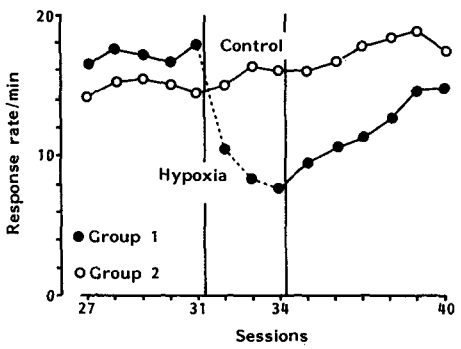


Fig 1. Response rates for the 5 sessions of the stabilized performance (days 27 to 31), the 3 sessions consecutive to hypoxia or non-hypoxia (days 32 to 34) and the 6 last sessions (days 35 to 40).

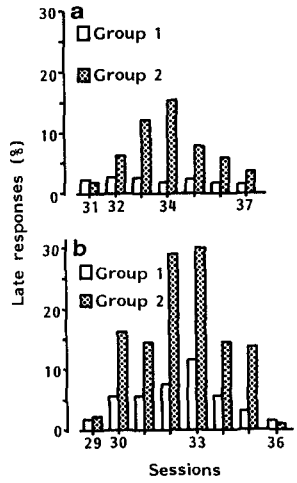
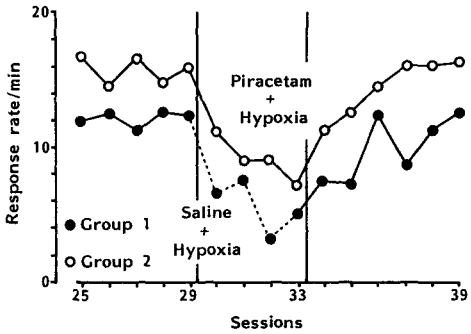


Fig 2. Evolution of the late responses for the experiment "Hypoxia versus non-hypoxia" (fig 2a) and the experiment "saline+hypoxia versus piracetam+hypoxia" (fig 2b).



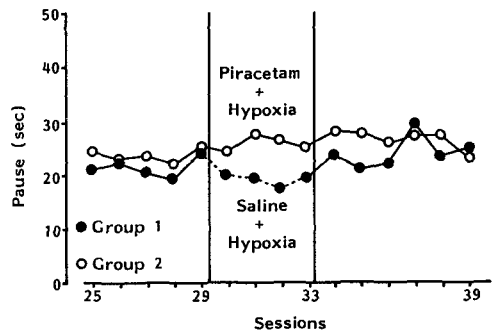


Fig 3 and 4. Response rates (left) and pause duration (right) for the 5 last sessions of the stabilized performance (days 25 to 29), the 4 sessions preceded by piracetam or saline injection and followed by hypoxia (days 30 to 33) and the 6 following sessions (days 34 to 39).

REFERENCES

1. Flohr, H. In: Brain Mechanisms in Memory and Learning. Brazier, M.A.B. (Ed.). Raven Press (1979) pp 277-291.
2. Giurgea, C. and Salama, M. (1977) Prog. Neuro-Psychopharmacol. 1:235-247.
3. Schindler, U., Rush, D.K. and Fielding, S. (1984) Drug Develop. Res. 4:567-576.
4. Fry, W., Kelleher, R.T. and Cook, L. (1960) J. Exp. Anal. Behav. 3:193-199.
5. Richelle, M. and Lejeune, H. (1980) Time in Animal Behaviour. Pergamon Press.
6. Damsma, G., Westerrink, B.H.C., de Vries, J.B., Van den Berg, C.J. and Horn, A.S. (1987) J. Neurochem. 48:1523-1528.
7. Ajima, A. and Kato, T. (1987) Neurosci. Lett. 81:129-132.
8. Allweis, C., Gibbs, M.E., Ng, K.T. and Hodge, R.J. (1984) Behav. Brain Res. 11:117-121.

213 ヒトrecombinant SODの低酸素性神経細胞傷害に対する改善効果

木下 章，山田和雄，莚井 武，甲村英二，早川 徹
（大阪大学医学部脳神経外科）

〔要約〕
遺伝子組換え技術により合成されたヒトrecombinant SOD(rSOD)の低酸素性神経細胞傷害に対する改善効果を，胎仔大脳皮質ニューロンの初代培養系を用いて検討した。培養ニューロンに4時間の低酸素負荷を加えた場合，通常酸素条件に戻すと30分後から神経細胞内に取り込まれたnitroblue tetrazoliumが過酸化反応により還元型formazanに変化したものが出現し，4時間後までformazan陽性細胞が増加することが確かめられた．rSODは通常状態ではニューロンに取り込まれないが，KClによる細胞膜の一時的な脱分極操作を行ったりﾘﾎﾟｿｰﾑ封入体を用いるとrSODがニューロンの細胞質内に移行することを免疫染色により明らかにした．またこの条件下では細胞内に取り込まれたrSODは培養神経細胞の低酸素性傷害を改善した。以上のことから，低酸素負荷後にみられる過酸化反応に対し，特定の条件下でrSODは有効に働きうることが明かとなった．

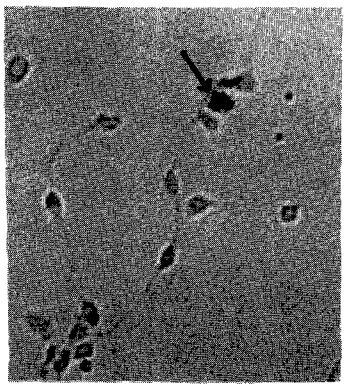
大脳虚血や低血糖負荷時にfree radicalsの産生とそれに続く脂質過酸化反応が神経細胞傷害を惹起することが指摘されている[1)4)5)8)9)13)15)]．また，in vivoでfree radical scavengersがその傷害反応の抑止に効果があったと報告されている[3)14)]．本研究ではnitroblue tetrazolium(NBT)を用いてfree radicalsの細胞内反応を直接観察するとともに，遺伝子組換え技術により合成されたヒトrecombinant superoxide dismutase(rSOD，日本化薬より提供)[10)]がニューロンの低酸素負荷による傷害に対して有効かどうかを検討した．

【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24 well上に2.1 x 10^{2}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)と交換した(Day 0)．また低酸素負荷はViblsreth、Heftiらの方法に準じて24 wellをhypoxic chamberに入れ95%N_2 5%CO_2で満たし、４時間の低酸素状態を保つことにより行った[6)7)12)]。実験系として以下の7系を組んだ。
(1)Day 0にNBT(5mM)を添加しDay 3に低酸素負荷を行った後通常酸素濃度に戻し過酸化反応による青色のformazanの産生率の時間経過を調べた．
(2)Day 3にrSODを500,1000,2000,4000,8000(units/ml)の5段階の濃度で加え，さらに２日間培養した系
(3)Day 3にrSODを5段階の濃度で加え，直後に低酸素負荷をかけさらに２日間培養した系
(4)Day 3にdepolarizing medium (55 mM K^+)[9)]とrSODを5段階の濃度で加え，30分後にもとのmediumに戻した後に（同じくrSODを5段階に加えてある），さらに２日間培養した系
(5)Day 3にdepolarizing medium (55 mM K^+)とrSODを5段階の濃度で加え，30分後にもとのmediumに戻した後に（同じくrSODを5段階に加えてある），その直後に低酸素負荷をかけさらに２日間培養した系
(6)Day 3にﾘﾎﾟｿｰﾑに封入したrSOD[2)]を5段階の濃度で加え，さらに２日間培養した系
(7)Day 3にﾘﾎﾟｿｰﾑに封入したrSODを5段階の濃度で加え，直後に低酸素負荷をかけさらに２日間培養した系
それぞれの系の実験終了後２％Paraformaldehydeで細胞を固定し，位相差顕微鏡でニューロンを計数した。ニューロンは明るい核を持ち100μm以上の長い突起を持つものとして算定した。
2．rSODの細胞内移行の有無をチェックするため上と同じ方法でニューロンを培養し，Day 3にrSODのみ，rSODと細胞膜の脱分極処置，ﾘﾎﾟｿｰﾑに封入したrSODの3者をそれぞれ2000 units/mlで添加し4時間の培養後に2%paraformaldehydeで細胞を固定した後，抗rSOD抗体(ﾗﾋﾞｯﾄﾎﾟﾘｸﾛｰﾅﾙ;日本化薬より提供)を用いて免疫染色を行った．
【結果】
1．低酸素負荷直後にはニューロンはNBT-derived formazanで染色されていなかった．しかし，reoxygenation後30分より染色陽性細胞数が増加し始め，その傾向は4時間後まで続いた．また生存細胞数は4時間後より徐々に減少し始めた（Fig. 1）．
2．通常酸素濃度で培養した場合rSODは4000units/mlまでニューロンの生存に影響を及ぼさなかった．低酸素負荷により生存細胞数は4分の1以下に減少したが，rSODを加えただけでは生存数に変化はなかった．しかし，脱分極操作によってrSODの細胞内移行を促した場合，2000 units/ml以上のrSOD添加により生存ニューロンが増加し，低酸素性神経細胞傷害が改善された(Fig.2)．また，ﾘﾎﾟｿｰﾑに封入したrSODを用いて細胞内移行を図った場合，脱分極操作よりも少量のrSODで有意な神経細胞死の防止効果が確認された（Fig. 3）．
3．negative control及びrSODのみの共存培養例では細胞内へのrSODの移行は確認できなかった．脱分極操作を加えた例やﾘﾎﾟｿｰﾑに封入したrSODを用いた例では細胞質内に偏在してrSOD陽性染色像が得られた（Fig. 4）．
【考察】
以上の実験結果より低酸素負荷によるO_2^-の蓄積はreoxygenation30分後に始まり4時間後まで徐々に増加することが明かとなった．位相差顕微鏡の観察では低酸素負荷直後にはニューロンは形態，数とも殆ど変化せず，その後徐々に膨化，突起の消失を経て死にいたることが確かめられている．この経過は細胞内のNBT-derived formazanの出現と関連しており，過酸化反応がニューロンの死と密接に関連することが示唆される．今回用いたSODはO_2^-による過酸化反応を消去する作用を有するものであるが，rSODの細胞内移行とその効果が平行することから，ヒトのrecombinant SODにも生理活性があることが示唆された．rSODの細胞内移行を計るために我々はKClによる一時的な脱分極操作とﾘﾎﾟｿｰﾑ封入体を用いたが，脱分極操作ではrSODの濃度上昇にともなって生存ニューロンが減少する傾向が示された．これはrSODそのものの毒性と脱分極操作による細胞傷害がその原因として考えられる．これに対しﾘﾎﾟｿｰﾑ封入rSODを用いたものではこのような傾向は少なく，より低濃度からその有効性が示された．この原因の一つとして細胞内半減期の差が考えられる．即ち，ﾘﾎﾟｿｰﾑに封入したrSODはrSOD単独に比して半減期が6分から4.2時間へと著明に延長されることがわかっている[11)]．従って今後in vitroで最も有用であったﾘﾎﾟｿｰﾑ封入rSODのin vivoでの実験を行う必要がある．

【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. Beckman JS, et al., Biology and Medicine. Amsterdam, Elsevier, pp 602-607 (1985) 2. Chan PH, et al., Trans Am Soc Neurochem 17: 281 (1986) 3. Chan PH, et al., Ann Neurol 21: 540-547 (1987) 4. Demopoulus HD, et al., Acta Physiol Scand 492: 91-119 (1980) 5. Flamm ES, et al., Stroke 9: 445-447 (1978) 6. Kinoshita A, et al., Expl Cell Biolo 57: 310-314 (1989) 7. Kinoshita A, et al., J Neuroscience Res 25: 324-330 8. Rehncrona S, et al., J Neurochem 34: 477-486 (1980) 9. Saez JC, et al., Proc Natl Acad Sci USA 84: 3056-3059 (1987) 10. Senoo Y, et al., Acta Med Okayama 42: 169-174 (1988) 11. Turrens JF, et al., J Clin Invest 73: 87-95 (1984) 12. Vibulsreth S, et al., Brain Res 422: 303-311 (1987) 13. Watson BD, et al., J Neirochem 42: 268-274 (1984) 14. Wieloch T, et al., J Neurochem 43: 160-168 (1984) 15. Yoshida S, et al., Brain Res 245: 307-316 (1982)



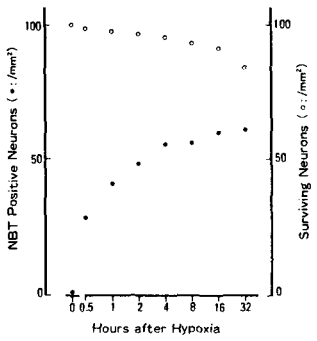


Fig. 1 NBT staining for detection of hypoxia-induced peroxidation and density of NBT-derived formazan-positive neurons after hypoxic injury.
Data represent mean of 6 data.
Arrow indicates a formazan-positive neuron.

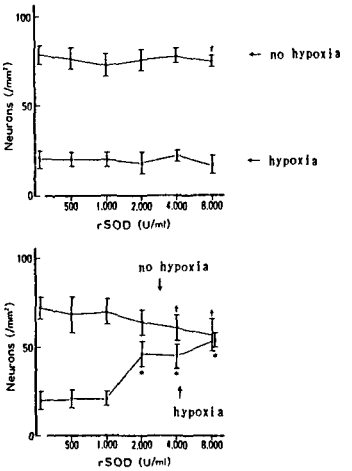


Fig. 2 Effect of rSOD on hypoxic conditions.
top: without pretreatment of membrane depolarization
bottom: with pretreatment of membrane depolarization
Data represent mean ± SD of 6 data.
Statistical analysis by Wilcoxon test.
*: $p < 0.01$
+: $p < 0.05$

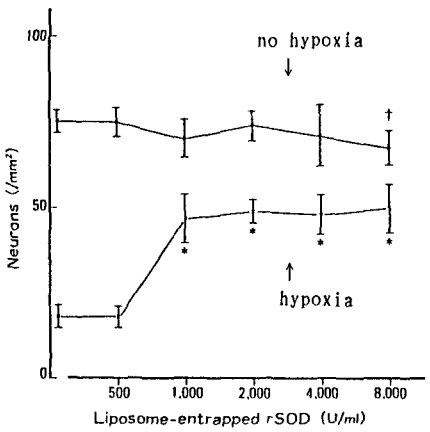


Fig. 3 Effect of liposome-entrapped rSOD on hypoxic conditions.
Data are mean ± SD of 6 data.
Statistical analysis by Wilcoxon test.
*: $p < 0.01$
+: $p < 0.05$

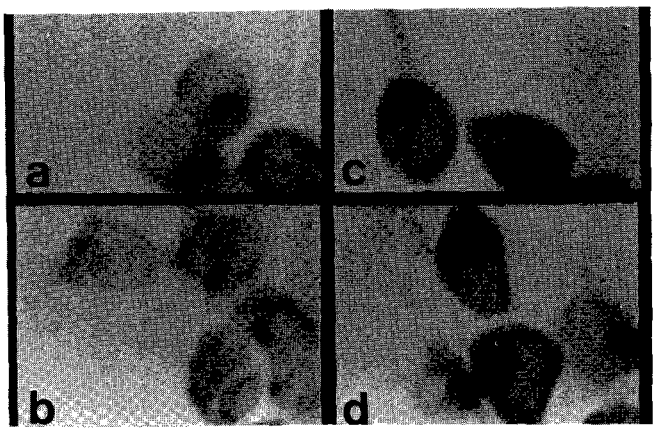


Fig. 4 Immunocytochemical staining for incorporated rSOD on Day 3 without hypoxia (x 400).
a: negative control
b: rSOD without pretreatment of depolarizing solution
c: rSOD with pretreatment of depolarizing solution
d: liposome-entrapped rSOD

214 低酸素負荷後のグルタミン酸による神経細胞傷害の増強

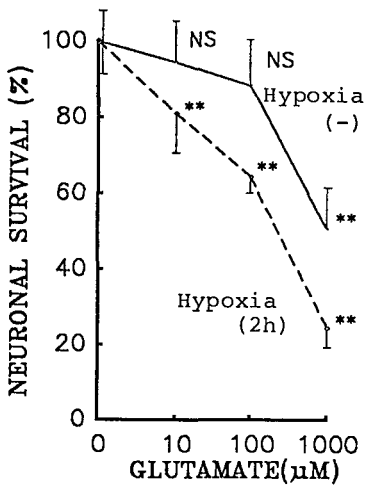
甲村 英二、木下 章、山田 和雄、早川 徹
（大阪大学・脳神経外科）

〔要約〕 海馬神経細胞の低密度培養系において、低酸素負荷後の神経細胞のグルタミン酸に対する感受性の変化を検討した。subcriticalな低酸素負荷を加えられた後には、より低濃度(10μM～)のグルタミン酸により、神経細胞死が惹起された。この増強された細胞傷害は、MK-801では部分的に改善されたが、CNQX(5μM)により完全に抑制された。この結果より神経伝達物質であるグルタミン酸による細胞傷害機序にはNMDA、non-NMDAレセプター両者の関与が示唆された。

【目的】脳虚血やてんかん病変における神経細胞傷害のメカニズムにはグルタミン酸の関与が示唆されている。しかし、グルタミン酸は生理的神経伝達物質であり、神経毒としての作用発現に至る機序には未だに明確でない点が存在する。海馬神経細胞低密度培養系を用いて、低酸素負荷を与えた後のグルタミン酸に対する神経細胞の感受性変化を検討した。また、選択的NMDAレセプター拮抗剤であるMK-801 ((+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate)及びnon-NMDAレセプターに対する拮抗剤のCNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dion)を用いて、細胞傷害機序を検討した。

【方法】Bankerの方法[1]に準じて、妊娠18日齢ラットよりエーテル麻酔下に胎仔を取りだし大脳を摘出し、実体顕微鏡下に髄膜を十分に除去した後海馬を切離した。取り出した海馬組織は、細片化した後に0.25%トリプシン溶液中で37℃15分間処理した。10%FCS含有MEM溶液で洗浄した後ピペッティングにより単離細胞化した。得られた海馬ニューロンは、あらかじめ2μg/ml poly-L-lysineで表面処理を行っておいた12ウェルプレート上に100生細胞/mm²の細胞密度で散布した。12時間後に培養液を無血清培地(MEM, 1mM pyruvate, modified N1 supplements)と交換した。培養3日目に低酸素負荷[2]を加えた。低酸素容器は真空乾燥器を流用し、プレートを入れた後に陰圧吸引と5%CO_2/95%N_2の注入を繰返すことにより容器中の酸素濃度を1%以下とした。このような操作の後でも培養液中の溶存酸素濃度は直ちには変化せず、時間経過とともに指数関数的に低下し約40mmHgとなるまでに2時間、25mmHgまでには3時間を要した。その間低酸素容器は恒温培養器に入れ、37℃に保った。低酸素負荷終了後、プレートは培養器(5%CO_2/air, 37℃)に戻し24時間後に固定した。各種の薬剤は低酸素負荷の前あるいは直後に加えた。死滅細胞のほとんどは24時間の培養中に脱落するが、位相差顕微鏡下で付着しているニューロンのうち樹状突起の消失したものや、神経細胞体の膨化空泡化を来したものは死滅細胞とみなした[3]。各ウェルあたり10視野(X100)の生存ニューロンを計数しその平均を代表値とし、6ウェルの平均により統計的処理を行った(Student t test)。

Fig. 1



** p<0.01

【結果】低密度培養を行うことによって個々の神経細胞は独立して生着しており、また無血清培地のためグリア細胞の増殖は無視し得た。したがって、本実験系では各種添加薬剤の神経細胞に対する直接の作用を評価し得ると考えられた。2時間の低酸素負荷により24時間後の生存神経細胞数は対照の79.1±7.3%(p<0.01)となり、3時間では31.7±13%(p<0.01)となった。したがって、2時間の低酸素負荷はsubcriticalな低酸素条件を作り出していると考えられた。グルタミン酸の神経毒性を本実験系で検討してみると、10または100μMの濃度では生存率に有意の変化はなく、1mMの高濃度ではじめて神経毒性が認められた。しかしながら、グルタミン酸を2時間の低酸素負荷の直後に投与すると、10μMの濃度からすでに有意の神経細胞傷害を惹起し、100μMでは低酸素負荷を加えない場合の1mMグルタミン酸に匹敵する細胞傷害を認めた。(Fig. 1) 以上の結果から、subcriticalな低酸素負荷を加えられたニューロンはより低濃度のグルタミン酸に対して感受性を有することが明らかとなった。 グルタミン酸レセプターのうち、NMDAレセプターはカルシウムチャンネルを開くことで細胞傷害機序に密接に関与していることが推察される。NMDAによる細胞傷害を同様の方法で検討してみたところ、低酸素負荷の有無にかかわらず、1mMの濃度が必要であり、低酸素負荷後の毒性増強はなく、グルタミン酸の場合とは異なっていた。このようなグルタミン酸による神経細胞傷害機序を検討する

ために、MK-801及びCNQXによる拮抗効果を調べてみた。まず2μMのMK-801は低酸素負荷の有無にかかわらず1mMのNMDAによる神経細胞傷害を完全に抑制し得た。グルタミン酸に関しては通常培養条件ではMK-801は無効であった。低酸素負荷後のグルタミン酸の神経細胞傷害に関しては、低濃度グルタミン酸に対してはMK-801は完全に拮抗し得たが、100μM、1mMといった濃度のグルタミン酸に対しては改善効果は示すが部分的にとどまった。(Fig. 2) 他方CNQX5μMは低酸素負荷後に生じたグルタミン酸(10μM, 100μM)による神経細胞傷害を完全に防止し得た。(Fig. 3)

Fig. 2

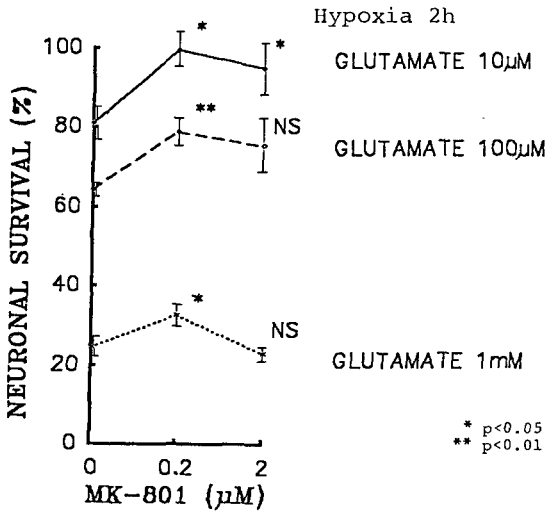
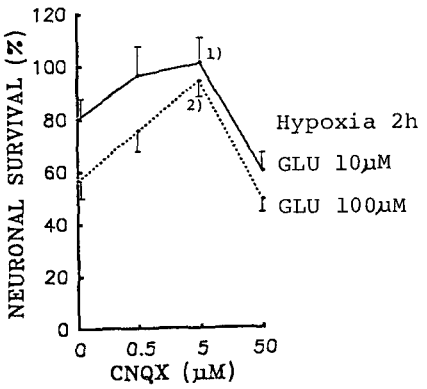


Fig. 3



1),2) ; p>0.1 compaired with corresponding cultures without glutamate

【考察】選択的拮抗剤を用いての実験により、グルタミン酸による神経細胞傷害には以下のような機序が作用していることが推察された。グルタミン酸はmixed agonistであり、NMDA, kainate, quisqualateレセプターに対して作用する。細胞傷害と密接な関係を有すると考えられるNMDAレセプターは、通常Mg^{2+}により膜電位依存性にブロックされている。non-NMDA receptor を介してグルタミン酸が作用することによりNa^{+}が流入し膜の脱分極が引き起こされるが、細胞内エネルギーレベルが十分に保たれている状態では、膜の脱分極状態は持続せず、NMDAレセプターは開かないと考えられる。したがって、低濃度のグルタミン酸は細胞傷害をもたらさない。高濃度の(1mM)グルタミン酸の場合は、大量の流入するNa^{+}を処理しきれずosmolysisを起こすと推察される。しかしながら、subcriticalな低酸素負荷後には、細胞内エネルギーレベルは低下し、低濃度のグルタミン酸刺激によりnon-NMDAレセプターを介しての膜の脱分極が持続し、NMDAレセプターのブロックがはずれ、NMDAレセプターを介してCa^{2+}流入が、引き起こされると推察される。そのため、低濃度のグルタミン酸により、この場合には神経細胞死が惹起されると考えられる。このような低酸素負荷後のグルタミン酸による神経細胞傷害の増強は、虚血周囲脳組織における神経細胞傷害メカニズムの解明の一助になると考えられる。

【文献】

1) Banker, G.A., Cowan, W.M., Brain Res. 126, 397-425, 1977.
2) Kinoshita, A., et al., Exp. Cell. Biol. 57, 310-314, 1990.
3) Mattson, M. et al., J Neurosci 8, 2087-2100, 1988.

215 脳虚血による CA1 遅延細胞死に先行する clathrin の変化

吉見建二、工藤喬*、岩田宜芳、武田雅俊*、山下正*、多田國利*、播口之朗*、西村健*
三共(株)生物研究所, *大阪大学医学部精神神経科

〔要約〕 海馬 CA1 細胞は一過性脳虚血に対し特に脆弱であり、また細胞体の萎縮が脳虚血後 3-4 日という遅延時間をおいて生じる事がよく知られている[6]。今回我々は、スナネズミを用いた一過性脳虚血モデルにおける免疫組織化学的検索から、CA1 において遅延細胞死に先行して clathrin 様免疫反応性が増強するという知見を得たので、MAP2 様免疫反応性との比較を交えて報告する。

［実験方法］

各群 4 匹のスナネズミ(10-11 週齢、♂)についてその両側総頸動脈を 5 分間閉塞後再開通し、直後、1 時間、2 日、4 日、8 日後に 2 % paraformaldehyde により灌流固定した。海馬を中心とした脳組織について冠状断、厚さ 40 μm の凍結切片を作成し、Hematoxylin-Eosin 染色、および免疫染色により染色した。monoclonal anti-clathrin (clone CHC5.9 ,mouse IgM ,Progen 社 0.25μg/ml で使用)[1]、monoclonal anti-MAP2 (clone 5F9 , mouse IgG ,Amersham 社 2.5-5.0 μg/ml で使用)[8]を用い 18 時間一次抗体液中で 25°c にて振盪の後、ABC 法により染色した。非特異的染色の確認には精製マウス IgM (ZYMED社, 0.25-5.0μg/ml)、精製マウス IgG (Chemicon 社,10-50μg/ml)を用いた。抗体の特異性を確認するため、正常のスナネズミ脳ホモジネートを 7.5 % polyacrylamide スラブゲル電気泳動に供し、イムノブロットを行った。

［成績］

細胞体の萎縮 HE 染色では、CA1 細胞層は閉塞 1 時間後までは特に変化を認めなかった。2 日後ではやや濃染したが、著しい細胞体の萎縮は認められなかった。4 日, 8 日ではほとんどの CA1 細胞が萎縮していた。CA1 に隣接する内側部 (仮に Pala Median hippocampus : PM とする) および CA2 では閉塞 2 日後に細胞の萎縮が観察された。その他の領域、CA3 、CA4 ,歯状回では特に明瞭な変化を認めなかった。

抗体の特異性 イムノブロットの結果、使用した抗体はいずれも抗原とする蛋白の分子量にあたるバンドとのみ結合した（図１）。

MAP2 MAP2 様免疫反応性染色は樹状突起内に線維状に見られ、細胞質にも見られた。核、白質は全く染色されず、過去の報告[2,7]と良く一致した像が得られた。PM および CA2 において MAP2 様免疫反応性は閉塞、再開通 2 日後に著しく減少した。一方、CA1 においては 2 日後でも減少はみられなかった。2 日後において、CA1 よりも CA3 の方が染色が弱いが、これは CA3 において全体的に MAP2 様免疫反応性が減弱したのか、CA1 において増強したのかはよく判らない。Kitagawa, Matsumoto ら[7]の報告の写真においても同様に見える。4 日、8 日後では CA1 領域の MAP2 様免疫反応性は著しく減少した。樹状突起内の MAP2 様免疫反応性の線維が完全に消滅しているニューロンと完全に残存しているニューロンが混在しており、細胞ごとに全か無かの反応性を示した（図２）。MAP2 様免疫反応性の脱落は、細胞体の萎縮を生じた領域に一致していた。脳虚血の有無に関わらず、特に免疫化されていない精製 IgG では全く染色されなかった。

clathrin clathrin 様免疫反応性は脳組織のほぼ全域にわたり、粒状に見られた。正常動物では海馬における染色は弱かった。脳虚血動物では、再開通 1 時間後までは偽手術と同様の反応であったが、2 日後には CA1 細胞層の染色が明らかに強くなった（図３）。4 日後には CA1 細胞層の染色は再び弱くなったが、樹状突起層(strata radiatum)が全体的に染色された。一次抗体を精製 IgM に置換えた場合は strata radiatum などにおいてアストログリアがわずかに染色されたのみで、CA1 では全く染色が見られなかった。

［考察］

先の電気泳動法による研究[9,12]によれば、脳虚血によって海馬可溶性分画の MAP2 は急激に減少し、calspectin および clathrin は徐々に減少すると報告されている。本研究において、MAP2 様免疫反応性が PM 、CA2 において脱落した事が MAP2 の早期の減少に対応すると思われる。clathrin 様免疫反応性は CA1 錐体細胞層において逆に増強した。clathrin はほとんどが膜に結合しており可溶性分画には少ない[3,5]ので、膜分画では増加しているのかもしれない。あるいは clathrin の重合状態の変化による抗原性の上昇、樹状突起中の clathrin の細胞体への移動などの可能性も考えられる。CA1 において、MAP2 様免疫反応性も脳虚血 2 日後に強くなっている様に見えるので、脳虚血により CA1 錐体細胞層が免疫染色されやすく変化している可能性も否定できないが、20 倍濃度の精製マウス IgM によっても CA1 錐体細胞層は全く染色されないので、少なくとも非特異染色の増強ではない。

CA1 細胞の萎縮が始まる約一日前の時点において、clathrin 様免疫反応性は CA1 錐体細胞層に限って変化を示した。clathrin 様免疫反応性の増加と関連した現象が遅延細胞死のメカニズムをになっている事を示唆するものと考えられよう。clathrin は coated vesicle の主要な構成蛋白であり、受容体エンドサイトーシス [10]、ゴルジ体からの小細胞の移動 [11]、あるいは神経終末における膜のリサイクル [4] における機能が想定されている。脳虚血により遅延細胞死を引き起すメカニズムとして、このような coated vesicle に関係した変化が生じているのかもしれない。

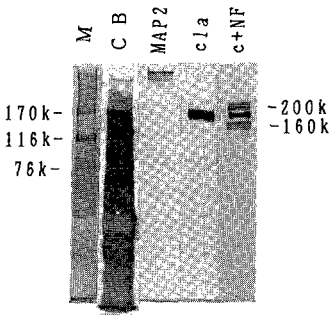


図1：使用抗体の特異性の検討
スナネズミ脳ホモジネートを 1500 xg にて 10 分間遠心した上澄を SDS 化し、7.5% ポリアクリルアミド電気泳動後、イムノブロットを行った。
M：分子量マーカー、CB：クマシーブルー染色
cla：cHc5.9 、MAP2：5F9 、c+NF：cHc5.9 と抗 neurofilament M, H による三重染色。
cHc5.9 は 約 200k と 約 160k の間の 180k の蛋白のみを認識している。

図2：海馬切片における MAP2 様免疫反応性。
上：sham、中：脳虚血 2 日後、下：4 日後

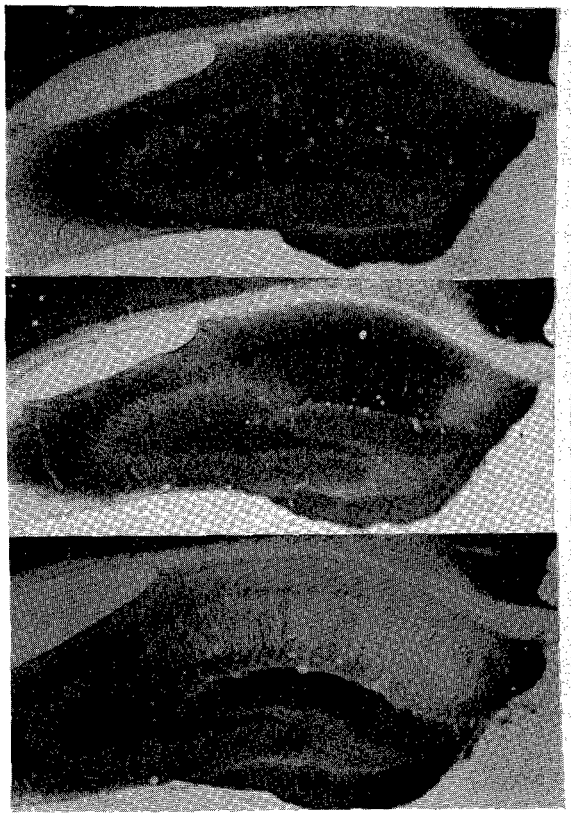


図3：海馬切片における clathrin 様免疫反応性。
上：sham、中：脳虚血 2 日後、下：4 日後



引用文献 (1) Bruder, G., Wiedenmann, B. (1986) Exp. Cell. Res. **164**, 449-462 (2) Camilli, P. et al. (1984) Neuroscience **11**, 819-846 (3) Goud, B. et al. (1985) J. Cell Biol. **100**, 521-527 (4) Heuser, J. E., Reese, T. S. (1973) J. Cell Biology **57**, 315-344 (5) Keen, J. H. (1979) Cell **16**, 303-312 (6) Kilino, T. (1982) Brain. Res. **239**, 57-69 (7) Kitagawa, K. et al. (1989) Neuroscience **31**, 401-411 (8) Kosik, K. S. et al. (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. **81**, 7941-7945 (9) Kuwaki, T. et al. (1989) Stroke **20**, 78-83 (10) Pearse, B. M. F., Crowther, R. A. (1985) Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **16**, 49-68 (11) Thomas, K. et al. (1989) J. Biol. chem. **264**, 3140-3145 (12) Yamashita, T. (1987) J. Ohsaka Univ Med School **39**, 101-108

216 ラット海馬切片におけるD－アスパラギン酸取り込みの性質

桑原紀，光本泰秀*，千葉賢三，毛利哲郎
（北陸大・薬・創薬研
*現トロント小児病院研究所）

［要約］
ラット海馬切片におけるD-アスパラギン酸(D-ASP)の取り込み機構と低酸素、無グルコース及び代謝阻害剤による影響を検討した。D-ASPの取り込みは、Na^+依存性(高親和性，Km= 128 μM)とNa^+非依存性（低親和性，Km=6 mM)の 2成分より成っていた。又、Na^+ 存在下、D-ASPの取り込みは DL-threo-β-hydroxy aspartic acid(THA)，L-グルタミン酸(L-GLU)，L-ASPによって濃度依存的に阻害され、D-GLU、グリシン、ロイシン、リジンでは影響を受けなかった。この取り込みは低酸素や無グルコース条件下および 代謝阻害剤 ($NaCN, ICH_2COOH$)によって低下が認められたが、Na^+非存在下の取り込みは、これらによって影響を受けなかった。
以上の結果、興奮性アミノ酸の不活化機構に関与していると考えられているNa^+依存性の高親和性輸送系は低酸素、無グルコース条件下で低下することが示され、この低下が、虚血時の細胞間隙の興奮性アミノ酸濃度の上昇に関わっていることが示唆された。

［序］
海馬が脳虚血に対して脆弱な部位であることは、その主要な神経回路においてグルタミン酸が興奮性の神経伝達物質として働いているためである[1]。また、脳虚血時においては細胞外グルタミン酸の著明な増加が認められ[2]、この増加したグルタミン酸の過剰な興奮が神経細胞壊死の原因と言われている[3]。虚血時における細胞外グルタミン酸濃度の上昇を誘起する原因としては、細胞内エネルギーレベルの低下に伴う取り込みの減少、ならびに過剰な放出が考えられているが[3),4]、その詳細な機構については不明な点が多い。我々は、今回ラット海馬切片におけるD-ASPの取り込み機構と低酸素、無グルコース条件下および代謝阻害剤による影響を検討した。

［方法］
Wistar系雄性ラット(200-300g)から摘出した海馬より、マイクロスライサーを用いて、酸素飽和させたKrebs-bicarbonate medium (124 mM NaCl, 1.24 mM KH_2PO_4, 2.46 mM $CaCl_2$, 26mM $NaHCO_3$, 10 mM glucose)中で厚さ300 μm の横断切片を作製した。作成した切片を 同mediumで 37℃、1時間プレインキュベーションして取り込み実験に用いた。D-ASPの取り込みはフィルター法により D-[2,3-^{3}H]-ASP (0.8 μCi/ml) を用いて行った。取り込み測定時には、純酸素を吹き込んだ HEPES-buffered Krebs medium(124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.24 mM KH_2PO_4, 1.3 mM $MgSO_4$, 1.23 mM $CaCl_2$, 10 mM glucose)または、Na^+free medium として、組成中の NaCl を Choline Cl に置き換えたものを用いた。各種条件として、無グルコース条件ではmedium組成中のグルコースを除いたもの、低酸素条件ではmediumを純窒素で1時間以上脱酸素を行い溶存酸素が元のレベルの 10% 以下に低下したもの、あるいはそれら同時処理条件を用いて実験を行った。代謝阻害剤の実験には，NaCN, ICH_2COOH を 各々 5 mM 15分間処理した。また、THAやアミノ酸阻害実験では、^{3}H-ASP添加 5分前から、それらを切片に加えた。

［結果］
D-ASPの取り込みは温度依存性を示し、Na^+依存性、非依存性の両成分より成る(Fig-1)。Na^+存在下の取り込み（1分間）は、L-GLU、L-ASP、ジヒドロカイニン酸 (DHK)、DL-threo-β-hydroxy aspartic acid (THA) によって濃度依存的 (10μM-1mM)に阻害されたが、D-GLU、グリシン、ロイシン、リジンでは阻害を受けなかった。D-ASP取り込みの速度論的解析を行うと、Na^+存在下の取り込みは、2相性を示し (Fig. 2A)、高親和性(Km=191 μM) と低親和性(Km=8 mM)の 2成分から成り、Na^+非存在下の取り込みは、低親和性 (Km=6 mM) のみ示された(Fig. 2B)。Na^+存在下の取り込みは、30分間の低酸素、または無グルコース、及び両者同時処理により各々 32%，33%，40%の有意な低下を示したが、Na^+非存在下の取り込みは、殆ど影響されなかった(Fig. 3)。ICH_2COOH 及び、NaCN の 15分間処理時の取り込みにおいてもNa^+存在下の取り込みのみ阻害を受け、Na^+非存在下の取り込みは、影響を受けなかった。

Fig.1

Effect of temperature on the uptake of D-aspartic acid in the presence or absence of external sodium ion by rat hippocampal slices

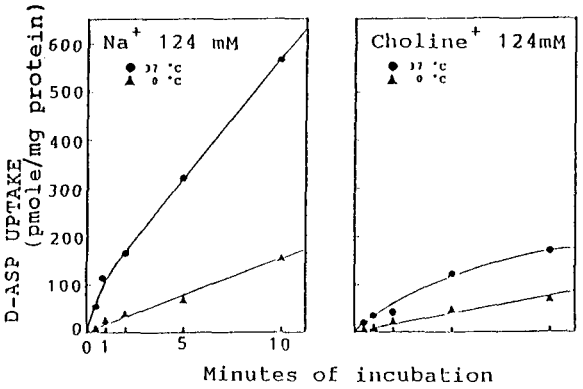


Fig.2

Double-reciprocal plots of the uptake of D-aspartic acid in the presence or absence of external sodium ion by rat hippocampal slices

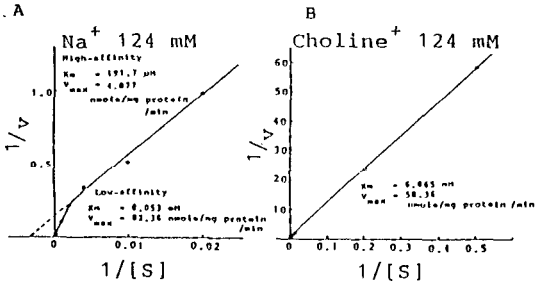
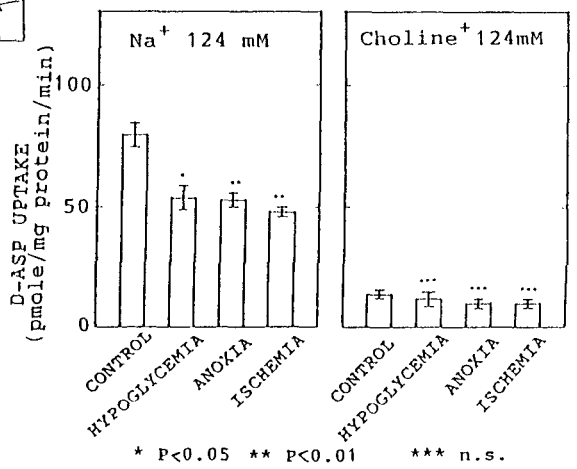


Fig.3

Effect of anoxia, hypoglycemia or ischemia on the uptake of D-aspartic acid in the presence or absence of external sodium ion by rat hippocampal slices



[考察]

大脳皮質切片におけるD-ASPの取り込みについてDaviesと Johnstonは、高親和性の単一成分によってNa⁺依存的に取り込まれることを報告している[5]。今回の実験結果では海馬切片におけるD-ASPの取り込みは、明らかにNa⁺依存性と非依存性の2成分からなり、各々高親和性及び低親和性の輸送系を介していることが示唆された。又、Na⁺依存性の取り込みは低酸素、無グルコース条件下及び代謝阻害剤によって低下することからエネルギー依存的な輸送系を介しており、虚血時の細胞間隙の興奮性アミノ酸濃度の上昇にこの輸送系の低下がその原因の一つになっていることが考えられる。それに対して、エネルギー非依存的なNa⁺非依存性の取り込みは低親和性で高い取り込み能力を有しているため、高濃度に蓄積したアミノ酸をシナプス間隙から排除するために機能していることが考えられる。今後、虚血時の興奮性アミノ酸放出に対する影響も含めてシナプス間隙における高濃度アミノ酸蓄積機構に関して詳細に検討していく予定である。

[文献]

1) Johansen, F . F ., Jorgensen, M. B. and Diemer, N. H.,
In "Excitatory Amino Acid Transmission" Alan R. Liss, Inc. (1987)
2) Benvenise, H., Drejer, J., Schousboe, A. and Diemer, N. H.,
J. Neurochem. 43, 1369-1374 (1984)
3) Rothman, S. M. and Olney, J. W., Ann. Neurol. 19, 105-111 (1986)
4) Bosley, T. M., Woodhams, P. L., Gordon, R. D. and Balazs, R.,
J. Neurochem. 40, 189-201 (1983)
5) Davies, L. P. and Johnston, G. A. R., J. Neurochem. 26, 1007-1014 (1976)

217 寒冷ストレス誘発鎮痛の形成と中枢モノアミン動態

長谷川仁美1)，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〕

寒冷ストレス誘発鎮痛の発現過程におけるラット脳、脊髄内ノルアドレナリン、ドーパミンおよびセロトニン作動性神経系の動態について神経化学的に検討し、その発現機序に一考察を加えた。寒冷ストレス負荷（4℃の環境下に0.25，0.5，1 あるいは 2 時間放置）により、著明な疼痛域値の上昇が生じた。また、この寒冷ストレス誘発鎮痛は、負荷時間に依存して、二段階のパターンで増強されることが認められた。寒冷ストレスの 0.25，0.5 あるいは 1 時間負荷誘発鎮痛の発現時には、中脳一視床、視床下部、延髄一橋において、NE含量の減少あるいはMHPG含量の増加が生じた。また、これらの部位に於て、5-HT および 5-HIAA 含量の増加傾向が認められたが、中脳一視床を除く部位の DA およびその代謝物含量には、何ら変動が生じなかった。さらに、頸髄、胸髄および腰髄においても、NE 含量の減少と 5-HT，5-HIAA 含量の有意な増加が認められた。一方、2 時間負荷誘発鎮痛時には、特記すべき変動は生じなかった。以上の所見から、寒冷ストレス負荷により、疼痛域値が上昇することが明らかとなった。また、軽度な寒冷ストレス誘発鎮痛の発現には、脳、脊髄内ノルアドレナリンおよびセロトニン作動性神経系が関与し、強度な鎮痛発現には、これら神経系の関与が少ないことが示唆された。

〔目的〕

疼痛は、外界からの侵害刺激に対する生体の警告反応と理解できる。我々は、先に、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検討し、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、また、熱あるいは圧侵害刺激が誘発する疼痛の発現にお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を明らかにした(4)。一方、侵害刺激に対する生体の興味深い防御機構の一つにストレスが誘発する鎮痛がある。従来、このストレス誘発鎮痛の発現には、内因性オピオイド物質、中枢ノルアドレナリン作動性神経系あるいは、タンパク質合成系などの関与が示唆されているが、その多様性も伴い、未だ不明な点が多い。本研究では、疼痛制御機構研究の一環として、寒冷ストレスが誘発する鎮痛の発現並びにこれら発現過程における脳、脊髄内ドーパミン、セロトニン及びノルアドレナリン作動性神経系の動態を神経化学的に検討し、その発現機序を考究した。

〔実験方法〕

(1)寒冷ストレス負荷と鎮痛効果の測定

実験には、220～250g の Sprague-Dawly 系雄性ラットを用いた。寒冷ストレスの負荷は、4 ℃の環境下に 0.25，0.5，1 あるいは 2 時間放置することにより施した。寒冷ストレス負荷の解除後、直ちに、熱侵害刺激（55 ℃）を用い、Tail Flick Latency 法(1)により鎮痛効果を測定した。なお、熱侵害刺激の cut off time は 10 秒とした。

(2)脳、脊髄内 catecholamine，indoleamine 及びその関連代謝物の測定

寒冷ストレスが誘発する鎮痛効果の測定後、直ちに、ラットを断頭により屠殺し、脳および脊髄を摘出した。さらに、脳は、ドライアイス上にて、大脳皮質、線条体、海馬、視床下部、中脳一視床、延髄一橋、小脳および下垂体の部位に、また、脊髄は、頸髄、胸髄および腰髄の部位に分割し、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、0.1N perchloric acid，0.1M ethylenediaminetetracetic acid，1M sodium hydrogen sulfate および内部標準物質（deoxyepinephrine，5-hydroxy-Nω-methyltryptamine）を含む混合液中にてホモジネートした。その後、遠心分離（20,000× g，15 分間）をおこない、上清液 10μl をクーロメトリー高速液体クロマトグラフィーシステム(2,3,5)に直接注入し、catecholamine〔norepinephrine(NE)，epinephrine(E)，dopamine(DA)〕、indoleamine〔5-hydroxytryptamine(5-HT)〕および関連代謝物〔4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol(MHPG)，3,4-dihydroxy-phenylacetic acid(DOPAC)，homovanillic acid(HVA)，3-methoxytyramine(3-MT)，5-hydroxyindole-3-acetic acid(5-HIAA)〕量を測定した。

〔実験結果〕

(1)寒冷ストレス誘発鎮痛

寒冷ストレス負荷による痛覚域値の変化を Fig.1に示した。0.25 及び 0.5 時間の寒冷ストレス負荷により、著明な潜時の増加が認められた。さらに、1 および2 時間の長時間ストレス負荷に於いても負荷時間に依存した潜時の有意な増加が生じた

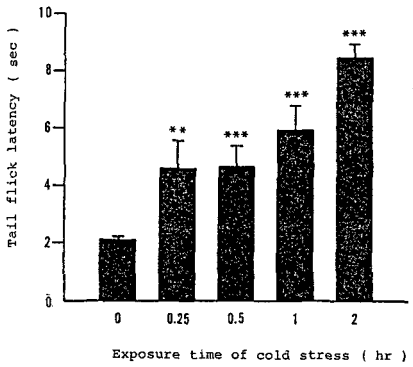


Fig.1 Changes in pain latency after cold stress exposure. Each column represents the mean ± S.D. of 4-6 animals. **p<0.01 and ***p<0.001

(2)寒冷ストレス誘発鎮痛時の脳及び脊髄内生理活性アミン動態

(a)脳

中脳一視床の NE 含量は、寒冷ストレスの 0.25,0.5 および 1 時間負荷誘発鎮痛時で減少し、MHPG含量は逆に増加傾向を示した。また、DA および HVA 含量は、0.5 時間負荷誘発鎮痛時で有意な増加が認められたものの、DOPAC および 3-MT 含量には大きな変動が認められなかった。5-HTおよび5-HIAA含量は、0.25, 0.5あるいは 1 時間負荷誘発鎮痛時において増加傾向が認められ 2 時間ではコントロールレベルの値を示した(Fig.2)また、視床下部の NE 含量は 0.25, 0.5 および 1 時間負荷誘発鎮痛時に減少傾向が認められ、特に、0.5 時間では有意な減少を示した。一方、DAおよびその代謝物含量には、何ら、変動は認められなかった。5-HT および 5-HIAA 含量は、NE の動向とは逆に、0.25, 0.5および 1 時間負荷誘発鎮痛時に於いて増加傾向が認められた。延髄一橋において、NE含量は特記すべき変動は生じなかったが MHPG 含量は 0.25, 0.5 および 1 時間負荷誘発鎮痛時に有意な増加が認められた。また、他の部位と同様、DAおよびその代謝物含量には著明な変動はみられなかった。さらに、5-HT 含量は増加傾向を示した。下垂体のDA および DOPAC 含量は、0.25, 0.5 あるいは 1 時間負荷誘発鎮痛時に於いて減少が認められた。

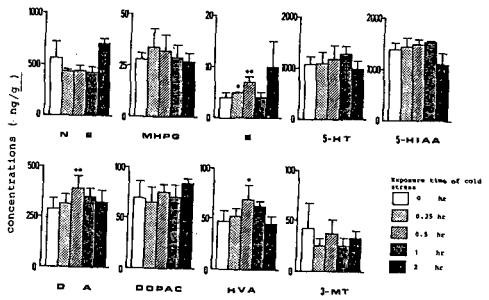


Fig.2 Changes in catecholamines, indoleamines and related metabolites concentrations in midbrain-thalamus of rat with cold stress-induced analgesia. Each column represents the mean ± S.D. of 4-6 animals. *p<0.05 and **p<0.01

(b)脊髄

寒冷ストレス誘発鎮痛時に、頸髄および腰髄の NE 含量の減少が認められた。この減少は、頸髄、腰髄で、それぞれ 0.25, 1 時間負荷誘発鎮痛時に於いて有意であった。一方、DA およびその代謝物含量は、脊髄のいずれの部位に於いても、特記すべき変動は生じなかった。また、頸髄、胸髄および腰髄の 5-HT, 5-HIAA 含量は、0.25, 0.5 あるいは 1 時間負荷誘発鎮痛時に有意な増加を示したが、2 時間では、コントロールレベルの値を示した。

〔考察〕

本研究で得た所見から、寒冷ストレスは、熱侵害刺激が誘発する疼痛の域値を上昇することが明らかとなった。さらに、この寒冷ストレス誘発鎮痛はそのストレス負荷時間に依存して 2 段階のパターンで増強されることが示唆された。また、軽度な寒冷ストレス誘発鎮痛の発現には、脳及び脊髄内ノルアドレナリン作動性神経系と共にセロトニン作動性神経系の活性亢進が関与し、強度な鎮痛には、これら神経系以外の機構の関与が示唆された。

〔文献〕

(1)D'Amour, F. E. et al.(1941) J. Pharmacol. Exp. 72, 74p.
(2)Sugiyama, H. et al.(1988) Japan. J. Pharmacol. 46, 252p.
(3)Takeda, H. et al.(1989) J. Pharmacobio-Dyn. 12, s-3.
(4)武田弘志、小口勝司 (1989) 神経化学 28, 226-227.
(5)Takeda,H. et al. (1990) J. Chromatogr. (in press)

218 強制水泳ストレスによるラット脳内イノシトール燐脂質代謝の変動

森信　繁、川並登美子、桑山紀彦、十束支朗
山形大学精神神経医学講座

〔要約〕

ストレスの脳内セロトニン（５ＨＴ）神経伝達・ノルアドレナリン（ＮＡ）神経伝達・アセチルコリン（Ａｃｈ）神経伝達に及ぼす影響を検討する目的で、今回我々は、強制水泳施行後のラット大脳皮質スライスにおける、大脳皮質５ＨＴ$_2$受容体・ノルアドレナリンα_1（ＮＡα_1）受容体・アセチルコリン性ムスカリン（ＡｃｈＭ）受容体及びそれぞれの受容体と共役したＰＩ代謝のストレスによる変動を検討した。その結果、強制水泳ストレスは、大脳皮質前頭部５ＨＴ$_2$受容体・ＮＡα_1受容体・ＡｃｈＭ受容体それぞれの最大結合数及び解離定数に、影響を及ぼさないことが分かった。しかし、ストレス負荷後の大脳皮質内の各受容体agonist刺激によるイノシトール燐脂質（ＩＰ）の蓄積は、５ＨＴ神経系及びＡｃｈ神経系で有意な低下をみた。

うつ病の病態仮説の一つとして、ストレスの関与が提唱されており、ストレスによって引き起こされる、脳内の神経伝達物質受容体やセカンド・メッセンジャー機能の変化を検討することは、うつ病の成因解明に有力な手段となることが期待されている。これまで我々は、ストレスとして強制水泳法を用いて、ラット大脳皮質５ＨＴ$_2$受容体とこれに共役しているフォスファチジルイノシトール（ＰＩ）代謝回転の変動を検討してきた。そこで今回我々は、ストレスの脳内各種神経伝達機能に及ぼす影響を明かとする目的で、強制水泳施行後のラット大脳皮質内５ＨＴ$_2$受容体・ＮＡα_1受容体・ＡｃｈＭ受容体及び、これらの受容体と共役した細胞内情報伝達物質であるＰＩ代謝の変動を測定した。

【実験方法】

１）実験動物

今回の実験には、Wistar系雄性ラット（体重220g前後）を用いた。ラットは５匹ずつ一つのケージに入れ、固形飼料や飲量水は自由に摂取出来る環境にて飼育した。

２）強制水泳手法

強制水泳の方法は、Porsolt[4]らの方法に従って、底面直径約25cm、深さ約45cmのシリンダーに、20°Cの水を約25cmの高さまで満たした条件にて行った。今回用いた強制水泳はいずれも単回であり、５ＨＴ刺激時では水泳時間5, 10, 15, 20分の４条件を、ＮＡ刺激時及びCarbachol刺激時では水泳時間15分の１条件を用いた。

３）ＰＩ代謝産物の測定

ラット断頭後ただちに脳を取り出し、スライサー（山形大学第二生理学加藤ら製作）にて大脳皮質前頭部スライス（350μm）を作製し、95%O_2, 5%CO_2 混合ガスを通気した37°CのKrebs-Hensleit 緩衝液に浮遊させ、１時間のインキュベーションを行った。

ＰＩ代謝産物の測定は、Berridgeら[2]、Brownら[3]の方法に従って行った。インキュベーション後、大脳皮質スライスを[^{3}H]myo-inositol（１スライス当り２μCi）を含んだK-H 緩衝液に移し、37°C, 90分間のインキュベーションを行った。その後スライスを洗浄し、再びK-H 緩衝液に浮遊させ、7.5mMの炭酸リチウム存在下で各々の受容体に対するagonist（５ＨＴ：10μM, ＮＡ：100μM, Carbachol：100μM）とともに 45分間の再インキュベーションを行った。再インキュベーション終了後、トリクロロ酢酸にて反応を停止させ、遠心操作にて上清を得、これを十分量のジエチルエーテルにて洗浄し、Dowex AG-1 カラムに注いだ。200mM蟻酸アンモニウム・100mM蟻酸混合溶液をカラムに流入させ、ＰＩの代謝産物であるイノシトール１燐酸（IP_1）を抽出した。抽出液に液体シンチレータＡＣＳ－Ⅱを加え、放射活性を液体シンチレーションカウンターにて計測した。

なお、各サンプルの放射活性はそれぞれのスライスに取り込まれた放射活性で補正を行い、IP_1蓄積はagonist刺激を行わない条件下でのIP_1蓄積を100%とし、これに対して各agonist刺激下でのIP_1蓄積を%を用いて表した。

４）受容体の測定

大脳皮質前頭部を氷冷した20倍量の50mM Tris・HCl緩衝液（pH 7.4）でホモジナイズした後、4°C, 50,000gにて20分間遠心分離し、沈渣を20倍量の同一緩衝液に懸濁した。同一条件で再遠心して得た沈渣に、20倍量の同一緩衝液を加え、粗膜標品として実験に用いた。

５ＨＴ$_2$受容体の測定は、[^{3}H]ketanserinをligandにして行った。非特異的結合は、100μMの５ＨＴを用いて測定した。ＮＡα_1受容体の測定は、[^{3}H]prazosinをligandにして行った。非特異的結合は2μMのphentolamineを用いて測定した。ＡｃｈＭ受容体の測定は、[^{3}H]quinuclidinyl benzilateをligandにして行った。非特異的結合は1μMのAtropineを用いて測定した。粗膜標品に各ligandやdisplacerを入れ、各測定条件に適した温度・時間にてこれをインキュベート後、WhatmanGF/Cフィルターにて吸引濾過した。これに液体シンチレータを加え、放射活性をシンチレーションカウンターにて計測した。全結合と非特異的結合の差を特異的結合とし、受容体数と解離定数はScatchard解析から得た。

５）統計処理

統計解析は一元配置分散分析にて行い、２群間の有意差の検定はStudent's-t検定にて行った。

【成績】

1）Agonist刺激性ＩＰ$_1$蓄積の変動

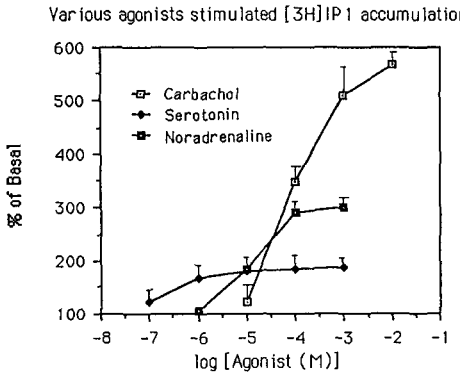
未処置ラット大脳皮質スライス（以下、対照群と表示）における各agonist刺激性ＩＰ$_1$蓄積の結果は、ほぼ各agonist濃度依存性に蓄積の増大がみられ、５ＨＴ刺激ではＩＰ$_1$蓄積の最大反応は100μMの５ＨＴ存在下にて得られ、１８８%であった。ＮＡ刺激では、ＩＰ$_1$蓄積の最大反応は1mMのＮＡ存在下で得られ、２９０%であった。Carbachol刺激時の、ＩＰ$_1$蓄積の最大反応は1mMのcarbachol存在下で得られ、５１０%であった（図１）。

2）受容体の強制水泳ストレスによる変化

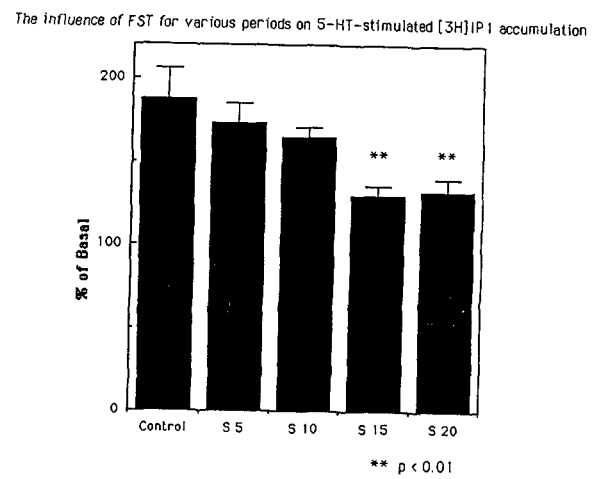
１５分強制水泳条件下にて、大脳皮質内５ＨＴ$_2$受容体・ＮＡα_1受容体・ＡｃｈＭ受容体の変動を測定した。その結果、１５分間強制水泳ストレス負荷では、５ＨＴ$_2$受容体・ＮＡα_1受容体・ＡｃｈＭ受容体の最大結合数及び解離定数に、特に有意な変化はみられず、この程度のストレス状況では受容体に変化のないことが示された。

3）強制水泳ストレスのagonist刺激性ＩＰ$_1$蓄積の変動に及ぼす影響

大脳皮質内５ＨＴ刺激性ＩＰ$_1$の蓄積は、強制水泳15分間施行後では１３０%であり、対照群に比べて危険率１%で有意な蓄積低下を示していた（図２）。強制水泳負荷後の大脳皮質内ＮＡ刺激性ＩＰ$_1$の蓄積は、対照群に比べて有意な変化は示さなかった。強制水泳負荷後の大脳皮質内Carbachol刺激性ＩＰ$_1$の蓄積は、対照群に比べて危険率１%で有意な蓄積低下を示していた。



（図１）



（図２）

【考察】

今回は、強制水泳というストレスを用いて、ラット大脳皮質スライスにおける５ＨＴ・ＮＡ・Carbachol刺激性ＰＩ代謝のストレスによる変動を検討したが、その結果５ＨＴ刺激性ＩＰ$_1$蓄積及びCarbachol刺激性ＰＩ代謝は、対照群に比して有意な低下となっていた。その一方で、今回の受容体結合実験では、水泳時間１５分というストレスは、大脳皮質内各種受容体に変化を及ぼしていないことが示された。この結果は、ストレスによって受容体に変化が引き起こされる以前に、５ＨＴ$_2$及びＡｃｈＭ受容体以降の信号伝達過程に変化が引き起こされている可能性を示唆している。特に、リチウムやある種の抗うつ薬が、ＧＴＰ結合蛋白に影響を及ぼすことも報告されており[1)5)]、今後はストレスのＧＴＰ結合蛋白への作用を検討することが、うつ病の成因の解明に必要と思われる。

【文献】

1) Avissar S, Schreiber G, Danon A and Belmaker R H (1988) Lithium inhibits adrenergic and cholinergic increase in GTP binding in rat cortex. Nature, 331: 440-442.
2) Berridge M J (1983) Rapid accumulationof inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. Biochem J., 212: 345-360.
3) Brown E, Kendall D and Nahorski R (1984) Inositol phospholipid hydrolysis in rat cerebral cortical slices: I. Receptor characterisation. J. Neurochem., 42: 1379-1387.
4) Porsolt R D, Anton G, Blavet N and Jarfre M (1978) Behavioral despair in rats: A new model sensitive to antidepressants treatments. Eur. J. Pharmacol., 47, 379-391.
5) Yamamoto H, Kagaya A, Kuroda Y, Mikuni M, and Takahashi K (1990) Effect of antidepressants on the GTP binding sites in rat brain homogenate. Jp. J. Psychiat. Neurol., 44: 133-134.

219 老化促進マウスＳＡＭ－Ｐ／８、Ｒ／１における脳内ヒスタミン濃度の加齢変化

目黒謙一１）谷内一彦２）渡辺建彦２）前山一隆２）松澤大樹３）
１）東北大学医学部第４内科（老人科）
２）東北大学医学部薬理学第一講座
３）東北大学抗酸菌病研究所放射線医学研究部門

〔要約〕

［目的］

老化に伴い Ach 等の神経伝達物質の脳内における濃度が変化することはよく知られている。その多くは老化と共に減少し、また Alzheimer 病等の異常老化においても減少することから、二次的なものと考えられてきた。しかし神経伝達物質／修飾物質であることが明らかにされてきたヒスタミンについては、老化に伴い増加するが Alzheimer 病では減少するという報告１）２）と、老化に伴い減少するが Alzheimer 病では増加するという報告３）４）があり、その一致をみるに到っていない。そこで今回我々は、学習記憶障害をきたすＳＡＭ－Ｐ／８とそのコントロールＲ／１を用いて脳内ヒスタミン濃度の加齢変化を調べ新しい知見を得たので報告する。

［対象と方法］

１）摂食・飲水自由のコンベンショナル飼育下のＳＡＭ－Ｐ／８（♂）YOUNG（１ヶ月齢）×１１匹、OLD（１０ヶ月－１２ヶ月齢）×１１匹、ＳＡＭ－Ｒ／１（♂）YOUNG×１０匹、OLD×１１匹を用いた。それらの脳を前脳（大脳皮質、海馬）、中脳、後脳（小脳、脳幹部）の３部位に分けた。
２）それらに対しイオン交換カラムによる High Performance Liquid Chromatography５）により、部位別ヒスタミン濃度を測定した。
３）部位別に、ヒスタミンの前駆物質であるヒスチジン濃度を測定した（ＳＡＭ－Ｐ／８、Ｒ／１とも OLDで♂×５匹、♀×５匹の１０匹ずつ）。

［結果］

１．Ｐ／８、Ｒ／１とも老化に伴って前脳、中脳のヒスタミン濃度は有意に増加した（$P<0.05$）が、後脳では差を認めなかった。
２．YOUNGのＰ／８、Ｒ／１の間には部位別ヒスタミン濃度に差を認めなかった。
３．OLDのＰ／８はＲ／１に比べ、前脳においてヒスタミン濃度が有意に増加していたが（$P<0.05$）中脳、後脳では差がなかった。
４．OLDのＰ／８、Ｒ／１の間でヒスチジン濃度は各部位に差を認めなかった。

［考察］

今回の結果は脳内ヒスタミンはＳＡＭ－Ｐ／８、Ｒ／１とも老化に伴って増加

すること、とくに前脳、中脳にその傾向が認められること、また異常老化を示すP／8の前脳においてその傾向が著しいことを示している。そしてヒスチジンに差を認めなかったことより、ヒスタミンの増加は前駆体の増加によるものでない。ヒスタミン作動性ニューロンは、視床下部後部、乳頭体に細胞体を有し、広範囲に神経線維を送っている6）。それらのニューロンが老化、特に異常老化に伴って何等かの変化をきたすと考えられるが、肥満細胞中のヒスタミンの寄与も否定できず、現在検討中である。

[参考文献]

1）I.M.Mazurkiewicz-Kwilecki, G.D.Prell(1984)
Agents and Actions 14:554-557

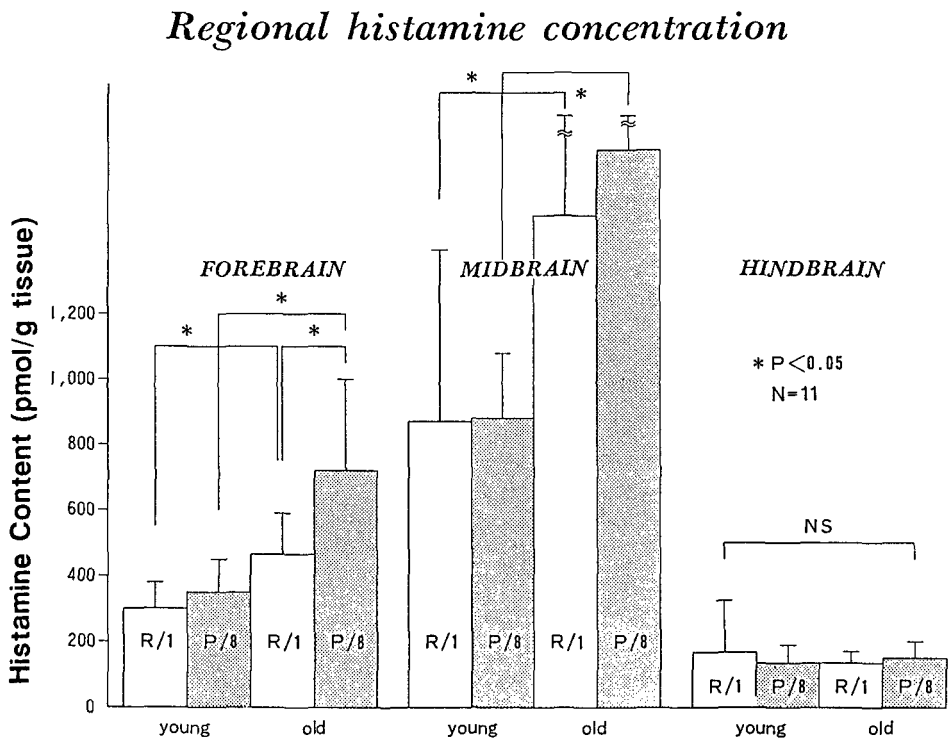
2）I.M.Mazurkiewicz-Kwilecki, S.Nsonwah(1988)
Can J Physiol Pharmacol 67:75-78

3）R.Cacabelos, H.Niigawa, T Nishimura(1987)
Jap J Neuropsychopharmacol 9:13

4）R.Cacabelos, A.Yamatodani H.Niigawa et al(1989)
Meth Find Exp Clin Pharmacol (in press)

5）A.Yamatodani, H.Fukuda, H.Wada et al(1985)
J Chromatogr 344:115-123

6）T.Watanabe, Y.Taguchi, S.Shiosaka et al(1984)
Brain Res 295:13-25



220 老化促進マウス脳のグルタミン酸含量、放出および受容体の加齢変化

北村佳久、趙学慧、野村靖幸
（北大・薬・薬効）

〔要約〕

老化促進マウス（ＳＡＭ）のP/8系は、老化モデルおよび学習記憶障害モデルとして有用であることが明らかにされつつある。このSAM-P/8系の大脳皮質、海馬のグルタミン酸およびグルタミン含量を測定したところ、対照のR/1系に比較して２～14ヶ月齢では有意に高いことが判った。また大脳／海馬切片からの50 mM KClによる内因性グルタミン酸の放出活性は、R/1系において加齢により低下し、P/8系では早期において低下する傾向が認められた。大脳皮質の細胞膜画分への[^{3}H]MK-801結合のBmax値は、R/1系に比較しP/8系は加齢に伴って有意に減少した。以上のことから、SAM-P/8系の老化促進および学習記憶障害には一部グルタミン酸神経系の異常が関与するものと示唆された。

《緒言》

中枢神経系組織のグルタミン酸は、学習、記憶機能に関与し、一方では虚血、低酸素、低血糖時におけるニューロンの損傷に関与することが知られている。老化促進マウス（SAM-P/8系）は、その対照系統（SAM-R/1系）との比較によって老化モデル[4]および学習記憶障害モデル[1]として有用であることが示唆されている。我々は、これまでSAM-R/1系に比しSAM-P/8系における過酸化脂質代謝に関与するマロンジアルデヒド(MDA)含量の増加およびスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性の低下[2]、さらにN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)による[^{3}H]ノルアドレナリン放出活性の低下[6]を見いだした。今回、ＳＡＭ脳におけるグルタミン酸神経系の機能とその加齢に伴う変化を明らかにするため、グルタミン酸の含量、内因性グルタミン酸と[^{3}H]アセチルコリンの脳切片からの放出活性およびNMDA受容体／チャネル活性について検討した。

《実験方法》

生後２～14ヶ月齢のSAM-P/8系とSAM-R/1系の雄を使用した。大脳皮質および海馬のグルタミン、グルタミン酸含量は、エイコムパックー電気化学検出器(HPLC-ECD)システムにより定量した。海馬／大脳皮質切片を調製し、内因性グルタミン酸放出活性を表面灌流法により測定した[6]。放出されたグルタミン酸量はHPLC-ECDによって定量した。NMDA受容体／チャネルについては、[^{3}H]MK-801結合活性を測定することにより検討した。また[^{3}H]アセチルコリンの放出活性は、脳切片に[^{3}H]コリンを取り込ませた後、表面灌流法によって放出される[^{3}H]アセチルコリンの放射活性を測定した。有意差検定には、２元配置分散分析を用いた。

《結果》

大脳皮質および海馬においてグルタミン酸およびグルタミン含量は、生後２ヶ月齢のP/8系においてR/1系に比較しすでに高い傾向を示し、加齢による変化は認められなかった（図１）。また、大脳皮質／海馬切片からの 50 mM KCl 刺激による内因性グルタミン酸の放出活性は、R/1系では加齢に伴って低下した。一方P/8系では早期においては低下したが、９ヶ月齢以降逆に増加した（図２）。大脳皮質膜画分への[^{3}H]MK-801結合のK_D値には有意差は認められなかったが、P/8系のBmax値はR/1系に比較し加齢に伴い有意に減少した（図３）。さらに、NMDAによる[^{3}H]アセチルコリンの放出活性は、P/8系で加齢に伴い著しく低下した。

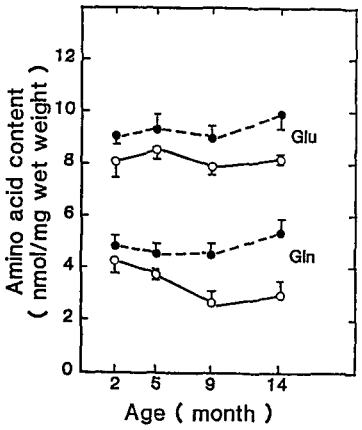


図１：海馬におけるグルタミン酸(Glu)、グルタミン(Gln)含量の加齢変化
○，R/1；●，P/8

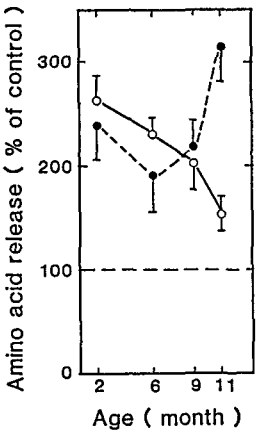


図２：海馬／大脳皮質切片からの50 mM KClによる内因性グルタミン酸放出活性の加齢変化
○，R/1；●，P/8

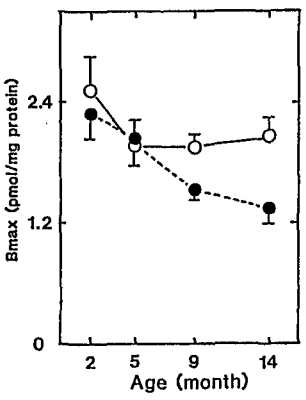


図３：大脳皮質膜における[³H]MK-801結合のBmax値の加齢変化
○，R/1；●，P/8

《考察》

学習記憶機能障害が早期に観察される P/8 系において、(i)生後２ヶ月以降に多数の空泡性変性、(ii) NADPH-diaphorase陽性神経細胞（アセチルコリンニューロン）が加齢に伴う萎縮と神経細胞数の減少[5]、(iii)生後８ヶ月齢で海馬錐体細胞の樹状突起spine密度の減少が認められる[3]。我々は、前回の本学会においてNMDAおよび高濃度KClによる[³H]ノルアドレナリンの放出活性が、P/8系において加齢に伴って著しく低下することを報告した[6]。今回、P/8系において２ヶ月齢ですでにグルタミンおよびグルタミン酸含量がR/1系に比較して高いことを示した。さらに50 mM KCl による内因性のグルタミン酸放出活性は早期において低下、９ヶ月齢以降逆に増加することを見いだした。脳切片にとって高濃度KClは drasticな刺激であり、P/8系の９ヶ月齢以降で活性が逆転したのはKClによって神経終末部が破壊されたためかもしれない。すなわち、P/8 系の９ヶ月齢以降のグルタミン酸神経の終末部は、R/1系のそれと比し脆い状態になっているものと推定された。また、NMDA受容体／チャネル数は加齢に伴って減少することが明らかとなった。さらに、NMDAによる[³H]アセチルコリン放出活性も加齢に伴って低下した。以上のことから、P/8系脳内においては早期にグルタミン酸合成および／またはグルタミン－グルタミン酸サイクルが亢進され（あるいはグルタミン酸代謝が抑制され）、おそらく過剰の遊離グルタミン酸がニューロン毒性をひき起こすのであろう。その結果Glu系－アセチルコリン系およびGlu系－ノルアドレナリン系機能の低下を生ずると考えられる。これらの神経障害がP/8系の学習記憶機能障害に一部関与するかもしれずさらに検討している。

《参考文献》

1. Miyamoto, M., Kiyota, Y., Yamazaki, N., Nagaoka, A., Matsuo, T., Nagawa, Y. and Takeda, T. (1986) Physiol. Behav. 38, 399-406.
2. Nomura, Y., Wang, B.X., Qi, S.B., Namba, T. and Kaneko, S. (1989) Exp. Gerontol. 24, 49-55.
3. 杉山、秋山、秋口、亀山、竹田 (1987) 臨床神経学 27, 841-845.
4. Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Ishii, M. and Yamamuro, T. (1981) Mech. Aging Dev. 17, 183-194.
5. 竹田俊男　抗痴呆薬の開発のストラテジー （星和書店） p35-43.
6. Zhao, X.H. and Nomura, Y. (1990) Int. J. Develop. Neurosci. 8, 267-272.

221 老齢ラット脳におけるNMDAレセプター複合体の減少

田丸政男，米田幸雄＊，荻田喜代一＊，清水 遵，永田 豊
（藤田学園保健衛生大・医・生理，＊摂南大・薬・薬理）

[要約]
Fischer344系雄性ラットの大脳皮質及び海馬より得られた膜標品について，興奮性アミノ酸及びムスカリン性アセチルコリン（mACH）レセプターの加齢に伴う変動を検討した。NMDAレセプター複合体におけるN-methyl-D-aspartate (NMDA) 感受性 [^{3}H]Glutamate (Glu)結合は，7及び29ヶ月齢の両脳部位で2ヶ月齢（対照）に比し有意な減少が見られ，また，strychnine非感受性Glysine(Gly)結合部位への[^{3}H]Gly結合も，29ヶ月齢脳で対照に比し著しい低下が認められた。さらにMNDAレセプターの非競合的阻害剤の[^{3}H](+)5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate(MK-801)結合は，Glu，Gly及びspermidine(SPD)添加による活性化状態で，29ヶ月齢脳でそれぞれ対照に比し有意な活性低下が示された。この29ヶ月齢脳における[^{3}H]Glu及び[^{3}H]Mk-801結合の減少は，Scatchard解析により，何れも親和性の変化によるものではなく，結合密度の低下によるものであった。一方、quisqualate(QA)のagonistである[^{3}H]DL-α-amino-3-hydro-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA)結合は，100mM KSCN存在下での活性化状態でのみ，29ヶ月齢の両脳部位で有意な低下が見られたが，KSCN非存在下での[^{3}H]AMPA，[^{3}H]Kainate(KA)結合及びmAChレセプターのagonistである[^{3}H]Quinuclidinyl benzilate (QNB)結合は，何れの部位でも老化に伴う変化が見られなかった。以上の結果から，老化に伴って大脳皮質及び海馬のNMDAレセプター複合体の機能が特異的に低下することが示唆された。

老化に伴う記憶力の減退はよく知られた事実であるが，実験的には抗コリン剤の scopolamine投与により学習が阻害されることから(1)，記憶とコリン作動系との関係が裏付けられている。更に，記憶障害を主症状とする老年性痴呆患者(SDAT)脳では著しいコリン作動性ニューロンの脱落が知られているが，mAChレセプター量には大きな変化がないとされている(2)。一方、L-グルタミン酸(Glu)は，哺乳動物の中枢神経系で興奮性神経伝達物質として機能し，更にそのレセプターはNMDA，quisqualate (QA)及びkinate (KA)の少なくとも3種類以上のレセプターの存在が提唱されている(3,4)。特にNMDAレセプターは，記憶や学習などの中枢神経系の可塑性形成過程のモデルである長期増強現象に重要な役割を持つばかりでなく(5)，SDAT脳(6)や虚血性脳障害(7)などにおける病態生理学的意義が注目されている。また，齧歯類の脳では，NMDAレセプターの定量的オートラジオグラフィーの検索で，老化に伴う減少が報告されている(8,9)。本実験では，29ヶ月の老齢ラットを用いて，記憶力などの高次神経活動に関与するとされる大脳皮質及び海馬より得られた膜標品について，上記興奮性アミノ酸３種のレセプター及びmAChレセプターへの各種放射性リガンドの結合活性の老化に伴う変動を検索した。

[実験方法] 2，9及び29ヶ月齢のFischer344系雄性ラットを断頭屠殺し，摘出脳は大脳皮質及び海馬に分け，50 mM トリス酢酸緩衝液（1mM EDTA，0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride及び0.01% bacitracin含有；pH 7.4）でホモゲナイズした後，50,000g，30分間遠心分離し，沈渣は50mMトリス酢酸緩衝液で3回洗浄し，0.32Mショ糖液に懸濁し-80℃で凍結保存した。使用時に凍結懸濁液を室温融解後，0.08% Triton X-100で2℃，10分間の前処理を行い，結合実験に供した(10)。[^{3}H]Glu及び[^{3}H]Gly結合実験は，膜標品（100μg蛋白）を，何れも10nMの濃度で2℃，10分間反応させて行った。5nM [^{3}H]MK-801結合活性は，10μMのGlu及びGlyあるいはSPDの存在下で，30℃，16時間反応させた。また，10nMの[^{3}H]AMPA及び[^{3}H]KA結合は，2℃，30分間反応させ，反応停止は Whatman GF/Bガラスフィルターを用い吸引濾過法により行い、filter上の放射活性を測定した。[^{3}H]QNB結合は、Triton未処理の膜標品について Yamamura & Snyder(11)の方法に従い，蛋白量はLowryら(12)の方法に従って実施した。

[結果] (1)膜標品中の組織重量当りの蛋白含量：各月齢動物における膜標品中の組織重量当りの蛋白含量は，加齢に伴って大きな変動を示さなかった。(2)NMDAレセプター複合体：NMDA感受性[^{3}H]Glu結合活性は，7ヶ月齢及び29ヶ月齢脳の皮質で2ヶ月齢（対照）脳の約15%及び30%の有意な低下を，海馬では7ヶ月齢脳において既に対照の約30%の低下が認められた（図A）。strychnine非感受性Glysine(Gly)結合部位への[^{3}H]Gly結合も，29ヶ月齢脳の両部位で対照の約30～40%にも達する著しい低下が見られたが，7ヶ月齢脳では変化がなかった（図B）。NMDAレセプターの非競合的阻害剤の[^{3}H]MK-801結合は，Glu/Gly及びGlu/Gly/SPD添加の活性化状態で，29ヶ月齢脳の両部位で対照よりも約30～40%の有意な活性低下が示された（図C,D）。29ヶ月齢脳での [^{3}H]Glu及び[^{3}H]MK-801結合のScatchard解析では，何れの脳部位でもKd値には変化がなかったが，Bmax値が有意に低下しいた（表）。(3)[^{3}H]AMPA，[^{3}H]KA及び[^{3}H]

QNB結合：[^{3}H]AMPA結合は，100mM KSCNを添加した後のの両脳部位で，7ヶ月齢脳で約15%，29ヶ月齢脳では約25～30%の有意な低下を示したが（図F），[^{3}H]KA結合能には変化がなかった（図E,G）。また，1nM及び0.05nM[^{3}H]QNB結合能は，皮質では変化が認められなかった。

［考察］老齢ラット脳では不溶性の蛋白の増加による，相対的なレセプター濃度の減少の可能性が考えられるために，膜標品中の組織重量当りの蛋白含量を測定した。しかし，各々の月齢動物膜標品の比較では変化がなかったことから，レセプターの結合活性の低下は，相対的な低下でないことが示された。哺乳動物の中枢神経系にある興奮性アミノ酸レセプターは，少なくとも３種のサブタイプに分類されるが(3,4)，今回の実験で大脳皮質及び海馬では，特にNMDAレセプター複合体が特異的に老化に伴って著明に減少することが明らかになった。そして，その減少は結合部位の親和力の低下によるものでなく，結合部位の密度の低下であることが示された。一方，mAChレセプターについては，老化に伴い低下する報告や変化がないとする報告等があるが(7)，同一膜標品を用いた本実験では変化がなく，老化に伴う記憶減退は，コリン作動系の障害よりはむしろNMDAレセプター複合体の機能低下による可能性が示唆された。

［謝辞］老齢ラットを御供与下さいました埼玉医大，野村正彦教授に感謝致します。

［文献］(1)Peterson, R.C.(1978) Psychopharmacol. (Berline) 52,283-289. (2)Bartus, R.T. et al. (1982) Science 217,408-417. (3)Foster,A.C. and Fagg, G.E.(1984) Brain Res. Rev. 7,103-164. (4)Watkins, J.C. and Evans, R.H.(1981) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21,165-204. (5)Collingridge, G.L. and Bliss,T.V.P.(1987) Trends Neurosci. 10,288. (6)Greenamyre, J.T. et al.(1987) J.Neurochem. 48,543-551. (7)Simon, R.P.et al.(1984) Science. 226,850. (8)Monaghan,D.T. et al.(1988)Soc. Neurosci. Abstr. 14,486. (9)Peterson, C. and Cotman, C.W. (1989) Neurosci. Lett. 104,309-313. (10)Yoneda, Y.(1989) Brain Res. 499, 305-314. (11)Yamamura,H.I. and Snyder, S.H.(1974)Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71,1725-1729. (12)Lowry, O.H. et al. (1951)J. Biol. Chem. 193,265-275.

図　加齢に伴う各種放射性リガンドの結合活性の変化

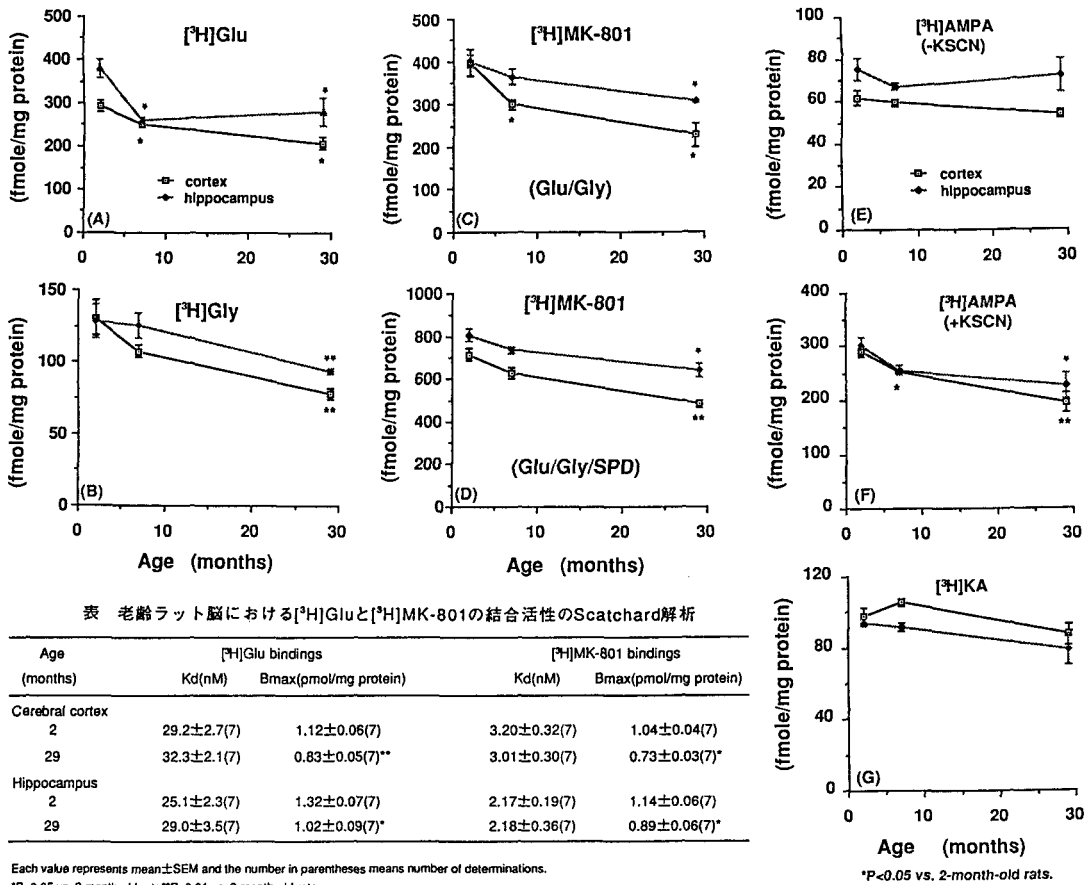


表　老齢ラット脳における[^{3}H]Gluと[^{3}H]MK-801の結合活性のScatchard解析

Age (months)	[3H]Glu bindings Kd(nM)	[3H]Glu bindings Bmax(pmol/mg protein)	[3H]MK-801 bindings Kd(nM)	[3H]MK-801 bindings Bmax(pmol/mg protein)
Cerebral cortex				
2	29.2±2.7(7)	1.12±0.06(7)	3.20±0.32(7)	1.04±0.04(7)
29	32.3±2.1(7)	0.83±0.05(7)**	3.01±0.30(7)	0.73±0.03(7)*
Hippocampus				
2	25.1±2.3(7)	1.32±0.07(7)	2.17±0.19(7)	1.14±0.06(7)
29	29.0±3.5(7)	1.02±0.09(7)*	2.18±0.36(7)	0.89±0.06(7)*

Each value represents mean±SEM and the number in parentheses means number of determinations.
*P<0.05 vs. 2-month-old rats**P<0.01 vs. 2-month-old rats.

*P<0.05 vs. 2-month-old rats.

222 老齢マウスにおける脳損傷に伴うIa陽性細胞の出現

遠藤　真澄、田平　武
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部

〔要約〕

脳損傷によるIa陽性細胞の遠隔部位における出現を老齢BALB/cマウスにおいて確認した。出現したIa抗原の量は、若齢マウスと比べ有意差がなかった。損傷によるIa陽性細胞出現のシグナルとして、γ-interferon(γ-IFN)の関与が示唆された。この研究を更に発展させることにより、アルツハイマー病患者脳に出現するクラスII陽性microgliaの意義を明らかにすることができると考える。

近年、HLA-DR⁺の反応性microgliaがアルツハイマー病患者大脳に多数出現することが報告され(1-3)、このmicroglia出現の意義・メカニズムを明らかにすることはアルツハイマー病の病態を考える上で極めて重要なことと考えられるが、依然不明である。一方最近、大脳皮質の損傷により遠隔部位（視床）にMHCクラスII抗原陽性のmicrogliaが出現することも報告された(4)。これはアルツハイマー病患者脳でのMHCクラスII抗原陽性microglia出現の機序を考える上で興味深い結果であり、また実際アルツハイマー病においても同様の機序でクラスII抗原陽性細胞が出現している可能性も考えられる。そこで今回我々は、老齢マウスを用い脳損傷に伴うIa陽性細胞の出現について検討した。また、γ-IFNが脳損傷に伴うIa抗原出現に及ぼす影響についても検討を加えた。

「実験方法」

実験には８-１０週齢の雌BALB/cAnNCr1Brマウス及び１２ヶ月齢・２４ヶ月齢のBALB/cNNIAマウスを用いた。損傷脳は、マウスをペントバルビタール麻酔下に頭蓋骨を露出し正中線より右約２mm・前頂より後約４mmの位置にドライアイスを数秒間接着させ作製した。その後経時的にリン酸緩衝液または4% paraformaldehydeで灌流し組織学的及びIa抗原定量の検討に用いた。組織学的検討はアビジン－ビオチン法を用いて凍結切片を免疫染色して行ない、一次抗体としてはMK-D6由来抗I-A^{d}抗体を用いた。Ia抗原の定量は、0.5% NP-40を含むリン酸緩衝液による損傷脳homogenate上清を検体とし、２抗体法を用いたELISAで行なった。また、一日当り1 x 10^4 Uのrecombinant γ-IFNを損傷脳作製後５日間連日静注してIa抗原出現に及ぼす影響について検討した。

「結果」

大脳皮質の損傷により、若齢BALB/cマウスにおいて損傷後７日から１４日目において遠隔部位（損傷側の視床）にIa陽性細胞の出現を認めた(Fig. 1)。また視床以外のIa陽性細胞の分布領域は、損傷部周辺の大脳皮質、損傷部直下の白質からcorpus callosum、内包、対側の大脳白質等であった。この損傷によるIa陽性細胞の出現は１２ヶ月齢、２４ヶ月齢のマウスでも認められ、分布領域も８週齢マウスとほぼ同様のものであった。そこで次に、８週齢及び２４ヶ月齢マウスにおいて損傷により出現するIa抗原の量をELISAにより経時的に測定した(Table 1)。その結果、Ia抗原の量は８週齢・２４ヶ月齢共同様に７日から１４日目頃に最高に達し、また８週齢・２４ヶ月

齢の間に抗原量の有意差は認められなかった。8週齢マウスにおいて損傷脳作製後γ-IFNを投与してIa抗原を定量した結果、損傷後7日目においてγ-IFN投与群におけるIa抗原の量が有意に増加していた(Table 2)。

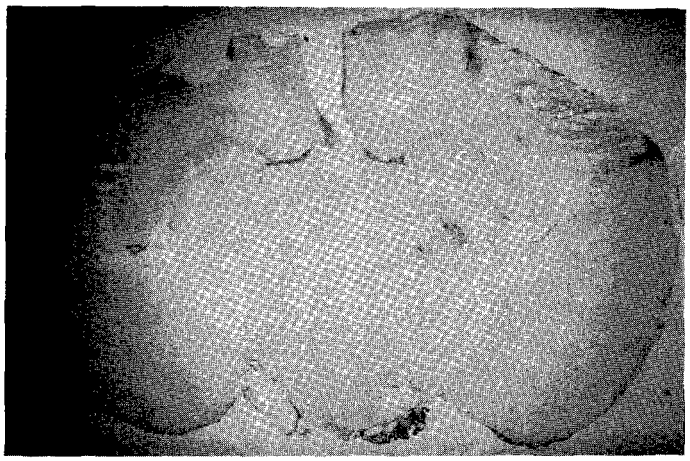


Fig. 1 Ia-immunoreactivity of the mouse cerebrum following cold injury

「考察」

今回、脳損傷に伴うIa陽性細胞の出現を老齢マウスにおいても確認したことは、アルツハイマー病のリスクファクターの一つに外傷等による組織障害を挙げる研究者が多くみられることも考えあわせると、老年期痴呆あるいはアルツハイマー病患者脳におけるMHCクラスII抗原陽性microglia出現の意義を考える上で重要なことと考える。そして損傷によって生じるどの様なシグナルがIa抗原を誘導するか、また損傷によって生じたIa陽性細胞がどの様な役割を担っているのかを明らかにする必要がある。現在、γ-IFNは中枢神経組織にIa抗原の出現を誘導しうる物質として知られているが、今回このγ-IFNが損傷により出現するIa抗原の量を増加傾向に導くことを明らかにした。また一方、軸索切断後のmotor neuronがγ-IFN陽性となることも最近報告されており(5)、従ってIa陽性細胞出現のシグナルとしてγ-IFNが関与している可能性が考えられる。(厚生科学助成金痴呆、受託研究山之内)

「文献」

(1) McGeer, PL. et al., (1987) Neurosci. Lett., 79, 195-200.
(2) Rogers, J. et al., (1988) Neurobiol. Aging, 9, 330-349.
(3) Luber-Narod, J. and Rogers, J. (1988) Neurosci. Lett., 94 17-22.
(4) Konno, H., et al., (1989) J. Neuroimmunol. 25, 151-159.
(5) Olsson, T. et al., (1989) J. Neurosci., 9, 3870-3875.

Table 1 Levels of Ia protein in cold-lesioned brains from young and old mice

Days after injury	8 wk	24 mo
1	0.041 ± 0.050	0.015 ± 0.026*
3	0.007 ± 0.012	0.007 ± 0.012
5	0.044 ± 0.052	0.036 ± 0.024
7	0.078 ± 0.050**	0.109 ± 0.064
10	0.123 ± 0.021	0.093 ± 0.047
14	0.143 ± 0.046**	0.119 ± 0.034*
21	0.105 ± 0.086	N.D.
28	0.090 ± 0.073*	0.052 ± 0.047*

Data for the amount of Ia proteins are expressed as optical density at 492 nm (mean ± SD, n=5, *n=4, **n=7).

Table 2 Expression of Ia protein after injection of γ-IFN in young mice

Days after injury	Injury	γ-IFN	γ-IFN + Injury
7	0.078 ± 0.050	0.015 ± 0.020	0.157 ± 0.065*
10	0.123 ± 0.021	0.008 ± 0.011	0.149 ± 0.030

* $p < 0.05$ (t-test, compared with Injury group)

223 キスカル酸レセプター刺激によるイノシトールリン脂質代謝応答の加齢ラット海馬での増大

齋藤巨志，中川勇三，石原高文，木村亨史*，長嶋和郎*
（サントリー生物医学研究所・分子薬理・神経科学；北海道大学・医・第二病理*）

〔要約〕

ラット海馬シナプトニューロゾーム画分を用いてキスカル酸レセプター刺激応答の生後発達および加齢変化を調べた。キスカル酸刺激で誘発されるイノシトールリン脂質代謝回転は，顕著な生後発達変化が認められた。一方，カイニン酸はイノシトールリン脂質代謝応答に影響を与えなかった。次に2年齢ラットにおけるキスカル酸（10μM）刺激応答を9週齢ラットと比較したところ，有意な刺激応答亢進反応が認められた。一方，カルバコール（1mM）刺激の場合には両群に差は認められなかった。以上の結果は，キスカル酸刺激で誘発したイノシトールリン脂質代謝応答が，海馬でのシナプス新生や代償的応答に重要な役割を有していることを示唆している。

［はじめに］

脳内での興奮性アミノ酸（EAA, excitatory amino acid）レセプターのサブタイプは，特異的アゴニストの脱分極作用によって少なくとも4つのタイプ；NMDA (N-methyl-D-aspartate)型，QA (quisqualate) / AMPA（α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate）型，KA (kainate) 型，AP4 (2-amino-4-phosphonobutyrate) 型に大別されているが，近年，さらにイノシトールリン脂質（PI, phosphatidylinositol）代謝とカップルした新しいクラスの EAA レセプター（代謝調節型 EAA レセプター）の存在が指摘され，このレセプターの機能的役割が注目されている(3)(14)(15)。代謝調節型 EAA レセプターに対するアゴニストとしては，キスカル酸(3)(12)，グルタミン酸，イボテン酸(10)，trans-ACPD (trans-1-aminocyclopentyl-1,3-dicarboxylic acid)(3)および L-CCG-Ⅰ((2S,3S,4S)α-(carboxycyclopropyl)glycine)(9) が認められているが，特異的アンタゴニストは存在しない現状である。このような背景の中で，このレセプター刺激によって誘発される PI 代謝応答活性が，海馬でのシナプス新生時期(10)(12) や神経変性時(6)(11) に高まることが報告されている。そこで我々は，海馬における生後発達および加齢変化を知るために，海馬シナプトニューロゾーム画分を用いて，キスカル酸刺激による PI 代謝回転の応答変化を調べ，カルバコール刺激の場合と比較した。

［実験方法］

シナプトニューロゾーム画分の調製：生後1，2，3，9週，11ヶ月および2年齢の Fischer系ラット海馬を Hollingsworth(4) らの方法に従い，シナプトニューロゾーム画分を得た。シナプトニューロゾーム画分の電顕的観察：2.5% グルタールアルデヒドで前固定したシナプトニューロゾームを1% 四酸化オスミウムで室温2時間後固定後，定法に従い，脱水・置換・エポキシ樹脂包埋・ULTRACUT による超薄切片の作成を行ない，HITACHI H-800 透過型電子顕微鏡で観察した。イノシトールリン脂質代謝回転の測定：シナプトニューロゾーム画分に myo-［2-^{3}H］inositol (15μCi/ml) を 37℃，95% O_2，5% CO_2 気相下で2時間インキュベートし，その後，遠心・洗浄したものを標識シナプトニューロゾームとした。標識シナプトニューロゾーム 200μl に 10mM LiCl を加え，37℃ 10分反応させた後，各種アゴニスト 50μl 添加し，20分間反応させた。イノシトールリン酸の分離は，Berridgeら(2) の方法を一部改変して行った。

［実験結果］

ラット海馬の電顕観察（6万倍拡大）を図1に示す。シナプス小胞を含む前シナプス部分（シナプトゾーム）と後シナプス膜部分が再封されたニューロゾームとが付いた典型的なシナプトニューロゾームが認められた。以後この画分にアゴニストを作用させ，PI 代謝回転に及ぼす効果について検討を行った。キスカル酸刺激応答は QA/AMPA 型アンタゴニストである CNQX (20μM)(6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoxaline) に非感受性を示し，テトロドトキシン（2μM）存在下および Ca-free・EGTA (0.1 mM) 条件下で影響を受けなかった。　図2に異なるレセプターアゴニストでの用量－反応曲線を示す。キスカル酸は約 10μM で飽和を示したが，カルバコールは1mM でも見かけ上飽和を示さなかったが，10 mM に用量を上げても最大反応に変化は認められなかった。キスカル酸刺激で誘発される PI 代謝応答は顕著な発達変化を示し，特に1週齢に高い応答がみられ，2，3および9週齢と週齢に伴って最大応答の低下が認められた。一方，カイニン酸は，100μM においても PI 代謝応答に影響を与えなかった（図に示さず）。他の興奮性レセプターアゴニストであるカルバコールで誘発される PI 代謝応答にも発達変化は認めら

れたが，キスカル酸の場合ほどではなかった。さらに，9週齢と2年齢ラットでの PI 代謝応答変化を比較したものを表1に示す。2年齢ラットのキスカル酸（10μM）刺激応答は有意な（$p<0.05$；t-検定）亢進反応を示し，一方，カルバコール（1mM）刺激応答には有意な変化は認められなかった。

［考察］

海馬での代謝調節型 EAA レセプター刺激によって誘発される PI 代謝応答が生後1週齢前後に高く，以後，減弱する結果は，Nicoletti ら(9) および Palmer ら(12) の報告と一致したものであった。今回我々は，キスカル酸刺激応答が9週齢と比較して2年齢ラット海馬において有意に亢進していることを新たに認めた。このメカニズム解明には，レセプター数を調べる必要性があるが，現在，代謝調節型 EAA レセプターを特異的に標識する有用なリガンドがないため解析は困難である。類似のキスカル酸刺激応答の亢進が神経変性時の海馬において認められている(6)ため，代償的メカニズムとも考えられる(7)(8)(13) が，Massicotte ら(5) は，ホスホリパーゼC処理シナプス膜が QA/AMPA 型レセプターの感受性亢進を引き起こすことを認めていることから，加齢ラット脳シナプス膜脂質の微小環境変化(1) が代謝調節型 EAA レセプターの感受性亢進を誘発するのかもしれない。さらに詳細な検討が必要である。

［文献］

1) Ando, S., Tanaka, Y. and Kon, K. (1986) in Gangliosides and Neuronal Plasticity (ed. Tettamani, G.), Liviana Press, 105-112.
2) Berridge, M.J., Dawson, R.M.C., Downes, C.P., Heslop, J.P. and Irvine, R.F. (1982) Biochem. J. 212, 473-482.
3) Cotman, C. and Monaghan, D. (1989) in Calcium, Membranes, Aging, and Alzheimer's disease (eds. Khachaturian, Z.S., Cotman, C.W. and Pettegrew, J.W.), Ann. N.Y. Acad. Sci. 568, 139-148.
4) Hollingsworth, E.B., McNeal, E.T., Burton, J.L., Williams, R.J., Daly, J.W. and Creveling, C.R. (1985) J. Neurosci. 5, 2240-2253.
5) Massicotte, G., Kessler, M., Lynch, G. and Baudry, M. (1990) Mol. Pharmacol. 37, 278-285.
6) Nakagawa, Y. and Baudry, M. (1989) Neuroscience 32, 363-369.
7) Nakagawa, Y. and Ishihara, T. (1988) Brain Res. 439, 11-18.
8) Nakagawa, Y., Nakamura, S., Kase, Y., Noguchi, T. and Ishihara, T. (1987) Brain Res. 408, 57-64.
9) Nakagawa, Y., Saitoh, K., Ishihara, T., Ishida, M. and Shinozaki, H. (1990) Eur. J. Pharmacol., in press.
10) Nicoletti, F., Iadarola, M.J., Wroblewski, J.T. and Costa, E. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 1931-1935.
11) Nicoletti, F., Wroblewski, J.T., Alho, H., Eva, C., Fadda, E. and Costa, E. (1987) Brain Res. 436, 103-112.
12) Palmer, E., Nangel-Taylor, K., Krause, J.D., Roxas, A. and Cotman, C.W. (1990) Dev. Brain Res. 51, 132-134.
13) Seubert, P., Nakagawa, Y., Ivy, G., Vanderklish, P., Lynch, G. and Baudry, M. (1989) Neuroscience 31, 195-202.
14) Sladeczek, F., Récasens, M. and Bockaert, J. (1988) Trends Neurosci. 11, 545-549.
15) Sugiyama, H., Ito, I. and Hirono, C. (1987) Nature 325, 531-533.



図1．海馬シナプトニューロゾーム画分の電顕像

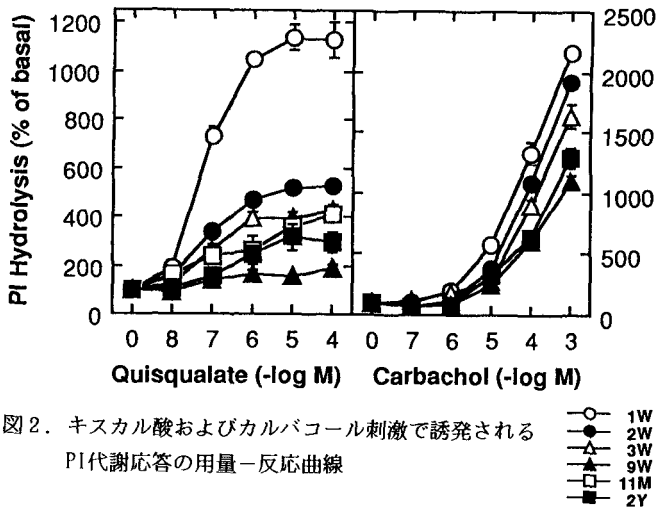


図2．キスカル酸およびカルバコール刺激で誘発される PI代謝応答の用量－反応曲線

表1．9 週齢と 2年齢とのPI代謝応答の比較

	PI hydrolysis (% of basal)	
Agonist	9 weeks	2 years
Qisqualate (10μM)	*196.3 ± 27.0*	*280.6 ± 14.5**
Carbachol (1mM)	969.0 ± 82.5	1192.3 ± 62.2

224 ラット28kD Ca^{2+}結合蛋白質の高感度EIA法の確立
― 神経系における局在と発育・加齢に伴う変動 ―

黒部直美、篠原春夫、仙波禮治[1]、稲垣俊明[2]、佐藤秩子[3]、加藤兼房
(愛知コロニー.・研・生化、周生[1]、名古屋市厚生院[2]、愛知医大・加齢研[3])

〔要約〕
1)ラット腎より28kDのvitamin D-dependent calcium binding protein (CaBP)を精製し、これをウサギで免疫して抗血清を得た。抗血清中の特異抗体を抗原-結合セファロースカラムを用いて精製した。精製抗体は小脳粗抽出液のイムノブロットで、CaBPに相当する位置に単一バンドを示した。
2)精製特異抗体$F(ab')_2$フラグメントを用いて、ポリスチレン球を抗体不溶化固相として使い、大腸菌由来のβ-D-ガラクトシダーゼを標識酵素としたサンドイッチEIA系を確立した。測定系は高感度で、1 pgの微量のCaBPが測定できた。パルブアルブミン、S-100α、S-100β、カルモジュリンとは全く交叉反応を示さなかったが、ヒト腎のCaBPとはほぼ完全交叉した。
3)ラット各組織のホモジネート上清中のCaBPを測定した。小脳と腎に高濃度存在し、大脳皮質などその他の中枢神経系にも中程度の濃度で存在したが、腸管を含む他の組織には僅かに検出されるにすぎなかった。
4)CaBPの免疫組織化学的局在は従来の報告を確認する結果であった。即ち、神経組織のCaBPは一部の神経細胞と上衣細胞に存在し、小脳ではプルキンエ細胞の細胞質、核、軸索および樹状突起が強く染色された。

Viatamin D 投与によって誘導される分子量28kDのCaBPに関する多くの研究がある。その精製法も確立され、特異抗体を使った、免疫組織化学的および免疫電顕的局在についても多くの報告(1-4)がある。しかし、神経系におけるCaBPを定量的に解析した報告(5)は少ない。今回、我々はラット腎よりCaBPを精製し、特異抗体を作製して、これを用いたCaBPの高感度イムノアッセイ系を確立したので、測定系およびこの方法を用いて解析したCaBPの組織分布、神経組織の発育および加齢に伴う変動などを報告する。

【材料と方法】

CaBPの精製：Hitchmanらの方法(6)に準じて、凍結保存したラット腎約70ｇのホモジネートを熱処理して、その抽出液を最初にEDTA存在下で、次いでCa^{2+}存在下でDEAE-セファデックスカラムクロマトを二度行い、これをセファデックスG-75カラムを通した。最終標品はSDS-PAGEで単一バンドを示した。

特異抗体の調製：精製したCaBP(0.5 mg/rabbit)を２週間隔でウサギ皮下に注射し、２カ月後より採血した。抗血清のIgG画分をCaBP-結合セファロースカラムにかけ、吸着した特異抗体をpH 2.5のグリシン緩衝液で溶出した。このようにして得た抗体はCaBPと特異的に反応し、小脳粗抽出液のイムノブロットで精製CaBPの位置に単一バンドを示した。

エンザイムイムノアッセ系：特異抗体IgGをペプシン処理して得られた抗体$F(ab')_2$を用いて測定系を作製した。$F(ab')_2$を物理的に吸着させたポリスチレン球と、マレイミド法により大腸菌由来のβ-D-ガラクトシダーゼで標識した抗体Fab'フラグメントよりなる系(7)である。

ラット組織検体：凍結保存したウイスター系ラット各組織あるいはドンリュウ系ラットの脳を10倍量の50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 7.5)中でホモジナイズし、遠沈(20,000 x g, 20 min)上清をイムノアッセイで分析した。免疫組織化学染色はウイスターラットの各組織のパラフィン切片を、上記の精製特異抗体とペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGを用いる酵素抗体間接法にておこなった。

【結果と考察】

CaPBのEIA法の測定感度と特異性：図1にラットCaBP測定の標準曲線と他のEF-hand型カルシウム結合蛋白質との交叉性を示した。測定系は高感度で、1 pgの微量のCaBPが検出・測定できた。パルブアルブミン、S-100蛋白質、カルモジュリンとは交叉しなかったが、ヒト腎より精製したVitamin D-dependent CaBPとは、ほぼ100％の交叉性を示した。即ち、測定系はvitamin D-dependent CaBPに特異的で、この測定系でヒトCaBPの測定もできることが示唆された。ラット大脳皮質抽出液を検体として測定した際の測定系の精度は、日内および日差変動係数ともに11%以下であった。

ラット各組織における濃度分布：各組織の可溶性画分のCaBP濃度を表１に示した。CaBPは、ラットではおもに

中枢神経系と腎に局在し、特に小脳と腎に多く存在した。大脳、脳幹では小脳の1/10以下であった。その他の組織では胃、食道および副腎などに僅かに存在することが分かった。ヒトおよびラットの正常血清中では検出されなかったが、ヒトの脳脊髄液および尿中では検出測定できた。

免疫組織化学的局在：神経系では海馬の一部錐体細胞、嗅球糸球体層の糸球細胞、脳室の上衣細胞が染色された。とくに小脳切片では、プルキンエ細胞の細胞質と核、軸索および樹状突起が強染色された。腎では、一部の遠位尿細管の上皮細胞が染色された。

神経系の発育、加齢に伴う変動：大脳のCaBP濃度は、生後間もないラットでは成獣の数分の一であるが、発育に伴って増加し、生後1-2ヵ月で成獣レベルに達することが分かった。成獣の神経組織および腎でのCaBP濃度は、統計的有意差はなかったが、加齢に伴って減少する傾向が認められた。しかし、ヒトのアルツハイマー病脳とage-match対照老人脳との間では、CaBP濃度の差は認められなかった。

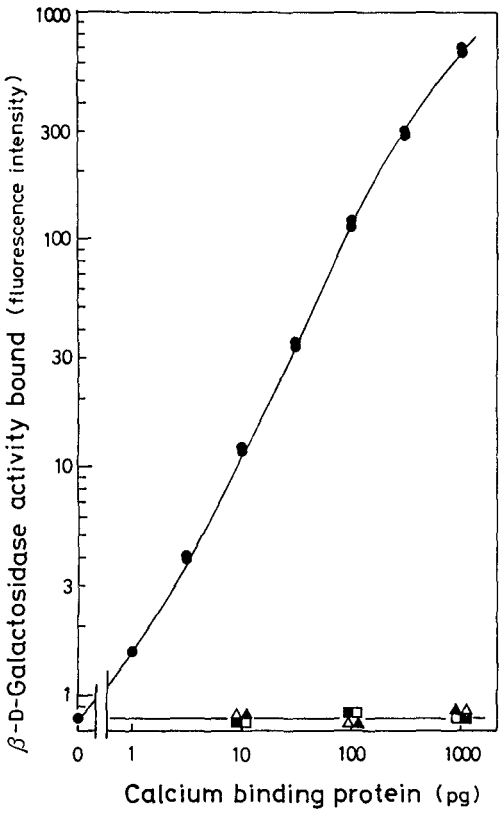


表 1
ラット各組織における28kD CaBPの分布

組織	ng/mg protein
大脳皮質	350 ± 54
小脳	4550 ± 540
脳幹	379 ± 114
海馬	272 ± 30
腎	1760 ± 170
胃	16.4 ± 1.1
食道	7.5 ± 1.1
十二指腸	<0.1
空腸	1.3 ± 0.8
回腸	2.0 ± 0.8
直腸	1.5 ± 0.1
副腎	6.5 ± 1.9
脂肪組織	4.8 ± 2.6
膀胱	3.0 ± 1.3
舌	2.5 ± 2.0
横隔膜	2.4 ± 1.2
心臓	0.5 ± 0.1
剣状軟骨	0.5 ± 0.1
精巣	0.4 ± 0.2
脾	0.4 ± 0.1
肺	0.3 ± 0.1
肝	0.1
ヒラメ筋	0.ッ ± 0.3
大腿直筋	0.3 ± 0.1

平均±標準偏差(n = 5)

図 1
ラットCaBPのEIA法の標準曲線（●）と、他のEF-hand型カルシウム結合蛋白質（△: human S-100α, ▲: human S-100β, □: rat parvalbumin, ■: bovine calmodulin）との交叉性。ヒトCaPBはラットCaBPとほとんど同じ反応性を示した(not shown)。

【文献】

1 K.G. Baimbridge & J.J. Miller (1982) Brain Res. 245: 223-229
2 S.C. Feldman & S. Christakos (1983) Endocrinol. 112: 290-302
3 L.M. Garcia-Segura et al. (1984) Brain Res. 296: 75-86
4 M. Antal et al. (1990) J. Comp. Neurol. 295: 467-484
5 K.G. Baimbridge et al. (1982) Brain Res. 239: 519-525
6 A.J.W. Hitchman et al. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 155: 221-222
7 加藤兼房 (1990) 蛋白質 核酸 酵素 35: 612-621

225 ラット胎児脳シナプトソーム画分の５０Ｋタンパク

竹田　稔、竹田二美代[1]、小俣久美子[2]、中谷一恭[2]
戸部　敞[3]、柳沢富紀子、中村泰治[2]、佐藤永雄
（昭和大・医・第２、第１[1]生化、薬・生物化学[2]
薬・生理化学[3]）

〔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。今回２０日令胎児ラットシナプトソーム画分より電気泳動法、ゲル濾過の組み合わせにより、分子量５万のタンパク質の部分精製を行なった。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 amino acid 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。今回更にsequenceを決定し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、polyoma virus の DNA 結合タンパクと一部 homology を示すことが判明した。このタンパクを Neuroblastoma の培養系に加えると、10^{-8}M でcellの増殖を約２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。昨年の本学会で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、並びに胎児に特異的に存在する分子量５万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報告を行った。今回 Fetal 50K タンパクの部分一次構造と培養神経細胞に対する作用について報告する。

＜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 PUT 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P_2 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P_2 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。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.1)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 等との類似性は認められない。この fetal 50K のTPCK-trypsin消化後のHPLC上での Chromatogram は Fig.2 に示すようなパターンを示す。この中で量的に多いPeak Bについてアミノ配列を決定するとFig.3 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。この配列はポリオーマウイルスのDNA 結合タンパクと一部ホモロジーを示すが、ラット胎児脳においてこのタンパク質がDNA 結合能を有するか否かは不明である。 fetal 50K タンパクの脳内および細胞内局在については確定しおらず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)のチミジンの取り込みに対して10^{-8}Mの濃度でコントロールに比して約２倍の促進活性を示した。(Fig.4) この増殖に対する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

Fig. 1 SDS-PAGE of Fetal 50K

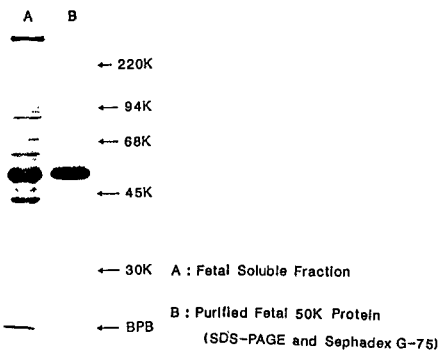
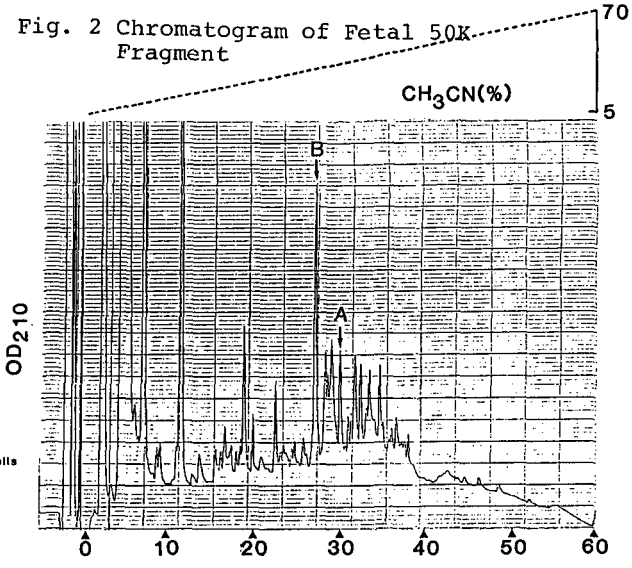


Fig. 2 Chromatogram of Fetal 50K Fragment



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

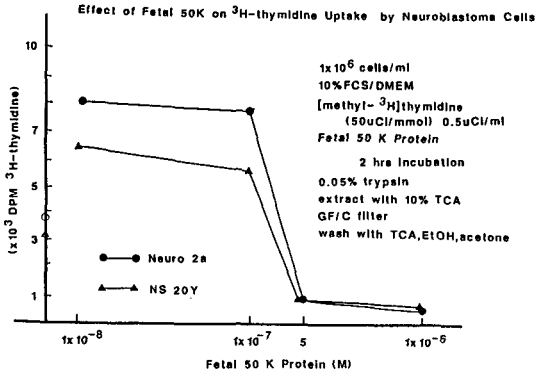


Fig. 3 Partial Amino Acid Sequence of Purified Fetal 50K Fragments

Peak A N-Ala-Val-Phe-Val-Asp-Glu-Glu-Pro-Gln---

Peak B N-Phe(Ala)-Ile-Leu-Val-Phe-Leu-Glu(Ala)-Pro-Phe-Asn-Met-Asp-Phe-Val-Trp---

人名索引（ABC順）

〔数字は掲載ページを示す〕

(A)

阿部輝雄……158
赤林朗……130
赤木宏行……72
秋山治彦……52
秋山一文…142・170・254・444
穐吉條太郎……244・246
天貝裕也……366
天野武彦……364
安藤正人…322・408・410
安藤進……230
Angelides, K. J.……104
青木英子……108
青野幸子……178
荒木一明……288
荒木信夫……164
Arimura, A.……122
有賀純……90
浅井清文……272
淺井聰……448
朝倉正……232
浅野富子……388・390
浅沼幹人……216
浅尾敏一……402
阿相皓晃……92・282
東均……238

(B)

馬場明道……112
馬場広子……88・316
白先溶……402
Bockaert, J.……114
Bruhwyler, J.……450

(C)

陳季強……404
千葉賢三……458
知久馬敏幸……302
Chleide, E.……450

(D)

Dahl, R. R.……122
大源明宏……170・444
土井澄江……102
堂前純子……166・336

(E)

枝松礼……426
江頭享……308
遠藤真澄……470
榎戸靖……276
榎本理世…210・212・354
衛藤義勝……42・46・48

(F)

藤井快枝……250
藤本明子……346
藤本一朗……350
藤森観之助……226
藤本禎子……334
藤田公和……214
藤田信也……86・88・316
藤原道弘……74
藤原豊……254
深堀元文……208
福元宏明……186・266
福永浩司……338
福永隆三……28・30
福島伸之……116
古市貞一……160
古川昭栄……438

(G)

Goldstein, M.……348
後藤幾生……98・126
後藤泰徳……66
Gottoschall, P. E.……122

(H)

羽場久美子……216
羽賀誠一……446
芳賀達也……384
萩野顕彦……366
萩尾哲也……400
萩原民雄……340
濱登希子……286・334
濱口勝彦……296
濱之上誠……96
半田伸夫……28・30
原靖……52
原田恵美子……48
原崎博美……434
播口之朗……32・50・104・106・304・456
長谷川仁美……460
長谷川武史……128・380
橋田誠一……328
橋井美奈子……56・382
橋本健志……342
橋本喜次郎……220
橋本美佐……432
橋本誠一……366
橋本恒一……218・432
橋本泰道……128・380
秦龍二……28・30
畠中寛…172・276・284・286・312
波多野孝史……198

畠瀬　修……176
畑澤　順……378
八田慎一……398
服部英幸……32
早川　徹……452・454
林　敬……232
日高弘義……154
東田陽博……56・382
東浦直人……54
日根野　尚……324
平井啓子……72
平井久美子……306
平井みどり……342
平井基陽……54
平井俊策……182
平松　緑……426
平野　誠……220
平野修助……44
平島　豊……330
廣内雅明……64
菱田良平……436
菱沼文男……72・364・372
菱沼隆則……150
本田虔夫……214
本藤久雄……220
堀越　立……260
Horrocks, L. A.……330
星　道生……92
細川　清……176
細川　武……296
堀田妙子……272

(I)

茨木京子……158
市川真澄……196
市村　徹……288・290
市村由香……288
井田博幸……46
井戸達雄……378
五十嵐道弘……418
井原康夫……368
猪飼篤……340
井川玄朗……54
池田久男……440
池中一裕……84・174・312・314・350
今井康夫……404
今泉美佳……222・226・394
今村与志子……38
稲垣忍……402
稲垣俊明……474
稲川健太郎……434
稲熊裕……374
猪木令三……404
井上明宏……310
井上和秀……226
井上幸紀……248・256
井上順雄……204
井上慎一……70
井上猛……240・264
乾　幸治……126
犬塚貴……86・88・316
入江恒正……116
石田美知子……66
石黒英明……86・88・316
石原高文……472
石井毅……446
石川栄治……328
石川紘一……38・448
Ishikawa, K.……450
石川リカ……438
石丸昌彦……420
石田外樹……120
石谷良一……392
石浦章一……96
石渡喜一……378
石崎泰樹……110・254
礒辺俊明……288・290・372
板野俊文……176
伊東顕……342
井藤悦朗……434
伊藤尚……200・222
伊藤和夫……38
伊藤康一……282
伊藤正敏……208・378
伊藤菁莪……102
伊藤高……170・444
伊東良伯……244・246
岩根理……266
岩崎克典……74
岩田宜芳……456
岩田錬……378

(K)

門田健……396
鹿川哲史……314
加賀谷有行……236
甲斐利弘……376・430
垣花満……186・266
柿本泰男……324
鎌田武信……28・30
亀井明仁……268
亀谷富由樹……446
亀山仁彦……382
神谷大雄……400
神谷稔夫……228
金井裕子……182
金松知幸……44
神庭重信……242
金田利夫……58
金子厚……296
金子元久……260
金光秀晃……326
金野滋……148
金行孝雄……146
神野哲夫……214

神崎昭浩……142
笠井久隆……222
柏俣重夫…108・178・362
片岡喜由……34
片岡泰文……346
片山雅文……376・430
加藤兼房…374・388・390・474
加藤浩紀……266
加藤隆一……224・242
加藤聖……120
加藤泰治……272
加藤尚彦……130・328
加藤武…62・300・302
加藤佳也……106
桂昌司……218
勝浦五郎……122
河江信幸……394
川口務……346
川原正博……196
川北幸男…248・256・376・428・430
川目裕……48
川名明夫……270
川並登美子……462
川嵜弘詔……208
川瀬秀明……128・380
川島誠一……200・414
木戸薫……240
菊池章……172
木村宏……52
木村淳……168
木村和文……28・30
木村光利……392
木村亨史……472
木下章……452・454
木下徳久……242
木岡哲郎……428
切池信夫……248・256
岸本年史……54
北川一夫……28・30
北島理恵……406
北島哲子……358・360
北村邦男…94・296・298
北村佳久……76・466
木寺克樹……54
鬼頭昭三……60
木津明彦……356
小早川仁志……168
小林和夫……196
小林卓郎……98・126
小暮美樹……38
小出誠司……376・430
小池達郎……188・278
小嶋久子……406
児島克博……244・246
児島伸彦……310
小島深一……180
小宮義璋……194・418
近一夫……230
近藤尚武……290
近藤淳……190
近藤啓次……324
近藤哲朗……350
紺野浩一……214
甲平一郎……170
甲村英二……452・454
河野雅弘……426
高坂新一……96・190
小山司…144・234・240・252・258・264・386
小山豊……112
九穂泰三……38・448
工藤喬……32・50・304・456
工藤佳久……196
久我哲郎……396
熊倉鴻之助……222・394
熊代永……260
熊代新……422
久野高義……342・344
功刀由紀子……168
倉橋幸造……436
倉石泰……68
倉元邦明……162
栗原堅三……184
栗原正紀……346
栗原正……316・318
栗田孝……222
栗山欣弥…64・206・218・432
黒部直美……374・474
黒田洋一郎……196
黒木俊秀……220
黒見坦……274
車地暁生……132・420
草野薫……42
九島洋一…276・284・286
久住一郎……234・240
桑原敬介……28・30
桑原紀……458
桑野良三……288・290
桑山紀彦……462

(M)

馬福海……64
前田哲……346
前川昌平……332・370
前山一隆……464
丸野内棣……100
丸山悠司……282
丸山和佳子……124
増田泰伸……440
増山善明……348

松原良次……240・264
松原繁広…144・234・258・386
松田誠……198・232
松田友宏……228・262
松井秀樹……176
松井英男……204
松井和隆……46・48
松井宣夫……272
松井徳造……248・256
松本明……448
松本昌泰……28・30
松本孝……220
松村一矢……54
松永宗雄……436
松沢健夫……328
松澤大樹……464
McCulloch, J. ……132
McGeer, P. L. ……52
目黒謙一……464
三木浩司……152
三木直正……118
御子柴克彦……28・30・84・90・108・160・174・312・314・350
三国雅彦……136・236
三村雄一……300
南雅文……68
三谷章……34
光本泰秀……458
三浦裕之……436
三浦正幸……92
三羽信比古……102
宮岸勉……356
宮本英七……334・338
宮本修……176
宮本武司……244・246
宮武正……66・86・88・316
宮脇敦史……160
宮脇茂樹……42
宮崎敦広……76
三好理絵……60
溝淵雅之……176
溝口克弘……40
水川公直……426
水野憲一……184
水野龍男……324
水谷顕洋……154
望月大介……250
桃生勝巳……318
森昭胤……216・426
森博史……422
森和夫……346
森眞由美……228・262
森井研……288
盛政忠臣……146
森本清……170
森信繁……462
森下理香……388・390
森田仁……32
森田光洋……332
森田規之……174
諸井佳代子……396
本池俊行……172
毛利哲郎……458
撫井弘二……428
向井秀幸……342
村木彰…144・252・258・264
村松俊……394
村本和世……196
村山文枝……308
室田誠逸……110
筵井武……452

(N)

鍋田弥生……442
長池一博……190
長尾則男……102
永島亮……400
長嶋和郎……472
永田豊…214・322・408・410・468
永津俊治……124
永山治男……244・246
中林才治……30
中川勇三……472
中原辰雄……208・220
中平健祐……312
中井健而……44
中嶋一行……96
中島孝……66
中嶋照夫……128・380
中条茂男……294
中木敏夫……224・242
中村明弘……352
中村史雄……328
中村肇……172
中村薫……220
中村和子……106
中村和生……406
中村豊郎……102
中村泰治……294・476
中村祐……50・104・304
中野稔……182
中野亮一……88
中島雄三…322・408・410
中谷一泰……294・476
中山誠…144・252・264
中山孝……280
中山靖久……400
中沢憲一……226
直井信……124

成田裕保……44
根岸晃六……120
根岸輝彦……296
丹生谷正史……242
新延道夫……28・30
西彰五郎……152
錦織浩治……438
西村健……32・50・104・106・238・304・456
西尾チカ……284
西山浩二……152
丹羽正美……346
野田博美……434
野口鉄也……36
野口幸男……448
野本照子……60
野村正彦……296・298
野村靖幸……58・76・466
野々村健……276
法山良信……54
能登直……128
納富昭人……208
野沢政代……46
額田敏秀……382
沼知陽太郎……150
布村仁一……436

(O)

小浜とも子……226
小幡邦彦……310・442
小田垣雄二……240・264・386
緒方健一……140
小川紀雄……216
荻田喜代一……78・80・82・202・210・212・354・444・468
小口勝司……460
小熊恵二……412
小倉明彦……196
小鹿幸生……116・180
岡部紀子……364
岡田英俊……146
岡田久美子……244・246
岡田三津子……74
岡田伸太郎……126
岡田尚志郎……320
岡橋育子……294
岡野栄之……90
奥村一哉……142
奥野正景……248・256
奥山典生……290・372
小俣久美子……294・476
大庭明子……244・246
大垣孝雄……82
大平敦彦……362
大川清……198
大熊誠太郎……64
大曲清……114
大森哲郎……144・252・258
大森敬之……206
大本尭史……176
大西博……376・428・430
大迫俊二……340
大沢弘吉……54
大鹿英世……398・412
大杉武……118
太田明……124
太田深雪……124
大津洋……62
大塚隆信……272
大月三郎……142・170・254・444
小沢史子……364・372
小澤寛樹……156

(P)

Pin, J.-P.……114

(S)

嵯峨井均……250
西須英雄……158
齋藤巨志……472
斎藤道子……392
斎藤尚亮……344
斎藤亮……400
斎藤繁……418
斉藤利和……156
斎藤綱男……168
斎藤祐見子……200
境健司……352
坂本安……296・298
崎村建司……318
佐野輝……324
佐野圭司……326
佐野公彦……172
佐野護……358・360
笹川展幸……224
佐々木一郎……244・246
佐藤浩……178
佐藤康二……260
佐藤公道……68
佐藤光源……150
佐藤重人……302
佐藤伸介……380
佐藤修三……86・88・316
佐藤秩子……474
佐藤永雄……476
関周司……320
関原俊一……340
関本澄人……194
仙波禮治……108・178・474
仙波りつ子……362
芹川忠夫……38
芝軒信次……448
柴山敏子……294
渋谷治男……148・422

重松和人……346
嶋吉徳人……54
嶋津孝……134
清水遵……468
下濱俊……168
下条雅人……96
篠原春夫…374・390・474
篠原一之……70
篠崎温彦……66
篠崎寛……302
塩見浩人……352
塩田千代……84
塩崎一昌……384
白潟稔……260
宍戸壽明……260
清水喜久男……374
白尾智明……310
祖父江憲治……28
Soderling, T. R.……338
曽良一郎……254・444
反町勝……162
外松明美……182
杉崎哲朗……36
杉田秀夫……96
寿野正廣……266
鈴木映二……242
鈴木春男……200
鈴木英明……42
鈴木裕樹……260
鈴木竹雄……202
鈴木龍雄……166・336
錫村明生……100
庄盛敏廉……146・320

(T)

田平武……470
多田國利……32・50・104・106・304・456
多賀谷昌史……28・30
田口隆久……268
高田耕司……198・232
高木宏……402
高木清……326
高橋章……134
高橋清久……136・236
高橋正身……334・416
高橋勤……124
高橋康夫…288・290・318
高橋幸江……352
高畑直彦……156
高久晃……330
高井義美……172
高石知明……344
高松研……292
高仲正……226
高野行夫……400
竹田二美代……476
武田弘……460
武田雅俊……32・50・104・106・304・456
竹田稔……476
竹居光太郎……94
武井延之……190
武市正美……392
竹村晴夫……412
竹下正純……140
竹内潤一……70
滝尾擴士……368
滝田正寿……136
玉井洋一……406
田丸政男……468
田村仁美……168
田村晃……326
田中千賀子……342・344
田中英明……192
田中喜久子……446
田中真……182
田中正敏……40
田中亮…166・272・336
田中早苗……298
田中秀逸……188・278
田中隆彦……40
田中稔久……32・50・104・106・304
田中康一……230
谷口隆之……168
谷向知……32・50
谷浦秀夫……118
谷山紘太郎……346
田岡万悟……372
田代朋子……194
楯林義寛……220
楯林義孝……50・104
立元一彦……292
Thastrup, O.……412
戸部敞……476
所敏治……42・46・48
徳田雅明……176
徳光浩……154
徳武哲……424
富田博秋……254
冨山誠彦……430
朝長正徳……368
融道男…148・420・422
遠山育夫……5
十束支朗……46
戸谷重雄……9
津吹聡……20
土山幸之助……244・248
津田彰……4
津田和志……34
津田隆……4
津島宏美……228・266
筒井研……32
筒井公子……32

堤　哲之……220
都築紀宏……138
(U)
内田洋子……368
内村英幸……220
植木靖之……180
植松大輔……164
上村　宏……128
植村慶一……92・94・292・298
植村富彦……306
上野修一……324
氏家　寛……142
浦江明憲……74
(V)
Velasco, R. D.……426
(W)
和田　博……238
脇　初枝……230
渡辺明子……148
渡辺敦子……340
渡辺雅彦……290
渡辺建彦……378・464
(Y)
八木剛平……242
八木昭彦……238
山田和雄……452・454
山田健児……244・246
山田茂人……152
山上　栄……376・428・430
山口文徳……176
山口　徹……158
山国　徹……364・372
山本明広……424
山本秀子……300
山本纊子……100
山本正彦……180
山本敏文……62・300・302
Yamamura, H. I.……254
山下　明……270
山下　格……144・234・240・252・258・264・386
山下元司……440
山下　正……32・456
大和谷　厚……238
山内　卓……340
山内千代……244・246
柳沼正俊……260
柳沼典正……260
柳沢富紀子……476
谷内一彦……378・464
安原　治……52
矢崎貴仁……92
横尾秀康……40・152
Yokoo, H.……348
横沢紀子……412
横山浩之……378
米田幸雄……78・80・82・202・210・212・354・444・468
米原典史……404
吉田　明……416
吉田真美……40
吉田　敏……140
吉田寿美子……150
吉田幸宏……356
吉川武男……148
吉見建二……456
吉村和法……296・298
由村健夫……98
(Z)
Zalewska, T.……414
趙　学慧……466

神経化学　第29巻　第1号

平成2年9月30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　中本総合印刷株式会社