ISSN：0037－3796

神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第34回　日本神経化学会大会論文集

Vol. 30 (No. 1), 1991

日本神経化学会

神経化学

第34回日本神経化学会大会論文集

PROCEEDINGS OF THE 34th ANNUAL MEETING OF

THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於　東　京

10月14日(月), 10月15日(火), 10月16日(水)

Vol. 30 (No. 1), 1991

日 本 神 経 化 学 会

編集委員（ABC順）

衛藤義勝　（慈恵医大・医）
藤田　忍　（三菱化成生命研）
芳賀達也　（東京大・医・脳研）
岩森正男　（東京大・医）
石川紘一　（日本大・医）
加藤尚彦　（横浜市大・医）
北川照男　（日本大・医）
小宮義璋　（群馬大・医）
高坂新一　（国立精神神経センター）
黒田洋一郎　（都神経研）
永井克孝（代表）　（都臨床研）
野口鉄也　（東邦大・医）
融　道男　（東京医歯大・医）
辻　崇一　（理研・糖遺伝情報）
植村慶一　（慶応大・医）

目　　次

1．NMDA認識部位への[^{3}H]CGP39653結合の性質 …… 28
荻田喜代一、米田幸雄（摂南大・薬・薬理）

2．興奮性アミノ酸レセプター結合のプロトンによる調節 …… 30
榎本理世、荻田喜代一、米田幸雄（摂南大・薬・薬理）

3．[^{3}H]5,7-ジクロロキヌレン酸によるグリシン認識部位の標識 …… 32
鈴木竹雄、荻田喜代一、米田幸雄（摂南大・薬・薬理）

4．大脳皮質内GABA作働性神経よりの[^{3}H]GABA放出調節機構について …… 34
橋本恒一、朱　　和、桂　昌司、栗山欣弥（京都府立医大・薬理）

5．卵母細胞再構成系におけるボツリヌス毒素C3酵素のセロトニン（5-HT$_{1c}$）受容体応答抑制効果 …… 36
中村順司、東田道久、成宮　周*、野村靖幸
（北海道大・薬・薬効、*京都大・医・薬理）

6．グリシン受容体遺伝子発現の多様性 …… 38
佐藤康二、藤田昌宏*、高辻功一*、遠山正彌*
（大阪大・医・バイオ研・第二解剖、*神経解剖）

7．NG108-15細胞におけるEgr-1mRNAの発現誘導 …… 40
津田正明（岡山大・薬・微生物薬品化学）

8．PC12細胞におけるNGF刺激にともなうp21^{ras}・GTP量の増加と神経分化について …… 42
室屋賢康、服部成介、中村　俊（国立精神神経センター・診断研究部）

9．シナプス小胞蛋白synaptotagminを欠失したPC12細胞亜株の樹立と性質の解析 …… 44
笠井陽子、小倉明彦、佐藤一紀、近藤俊三、藤本禎子、高橋正身
（三菱化成生命研）

10．ツメガエル卵母細胞再構成系におけるＮＭＤＡ誘発電流に対するプロテインキナーゼＣの増強作用機序 …… 46
漆原尚巳、東田道久、野村靖幸（北海道大・薬・薬効）

11. 脳切片におけるTrans-DL-amino-1,3-cyclo-pentanedicarboxylic acid刺激性イノシトール三リン酸の応答と痙攣との関係について…… 48
平松　緑、金野郁雄*、門脇　大*、大庭幸子*、劉 健 康*、森　昭胤*
（山形県テクノポリス財団、*岡山大・医・脳研機能生化）

12. イノシトール三燐酸レセプターmRNAのスプライシングによる多様性の発現：組織特異的及び、発達特異的発現とその脳内サブタイプの*in situ* hybridizationによる解析…… 50
中川敏幸*1、有賀　純*1,2、岡野栄之*1、御子柴克彦*1,2
（*1大阪大・蛋白研・機能制御、*2東京大・医科研）

13. 中枢サブスタンスP結合部位の単離精製と抗体作成…… 52
仲田義啓、西尾廣昭、瀬川富朗、秋澤俊史、平井裕子、秋山實利
（広島大・医・薬効解析）

14. NG108-15細胞上に存在する心房性ナトリウム利尿ペプチド受容体の性質とcGMP産生制御機構…… 54
今泉　玲、東田道久、野村靖幸（北海道大・薬・薬効）

15. K-アゴニスト，U-50488HのTyrosine Kinase活性化作用 …… 56
丹羽雅之、河野健一、野崎正勝、鶴見介登（岐阜大・医・薬理）

16. ニューロン特異性カルシウム結合タンパクカルレチニンによるシナプトソーム膜タンパクのリン酸化調節…… 58
山口知子、Winsky Lois、Jacobowitz David M.（東京女子医大・生化）

17. 脳ガングリオシドによるCaMキナーゼIIの活性化機構 …… 60
福永浩司、宮本英七（熊本大・医・第一薬理）

18. 特異抗体によるカルモジュリンキナーゼIIの自己リン酸化の検出…… 62
鈴木龍雄、野路久仁子、小倉明彦*、工藤佳久*、田中　亮
（名古屋市大・医・生化Ⅰ、*三菱化成生命研・脳神経薬理）

19. ラット中枢神経系グリア細胞膜小胞の分離とその性質…… 64
久保博彦*1,2、伊賀耕三*1,3、中村洋一*1、片岡喜由*1
（*1愛媛大・医・第一生理、*2第一外科、*3整形外科）

20. 海馬グリア細胞膜小胞のグルタミン酸輸送機構…… 66
伊賀耕三*1,2、中村洋一*1、片岡喜由*1（*1愛媛大・医・第一生理、*2整形外科）

21. 培養アストロサイトからの低酸素低グルコース処理による興奮性アミノ酸放出…… 68
尾形直則*1,2、中村洋一*1、片岡喜由*1（*1愛媛大・医・第一生理、*2整形外科）

22. 低酸素低グルコース処理によるアストロサイトのエネルギー状態及び興奮性アミノ酸含量の変化…… 70
中村洋一*1、尾形直則*1,2、片岡喜由*1（*1愛媛大・医・第一生理、*2整形外科）

23. ニューロンにおけるNaポンプアイソフォームの選択的活性調節の発達 …… 72
井上順雄、松井英男（杏林大・医・第一生化）

24. [1-^{13}C]-D-glucoseを用いたMRSによるラット脳発達におけるアミノ酸代謝の変化について…… 74
金松知幸、塚田裕三、平野修助*（創価大・生命科学研、*東邦大・医・第二生理）

25. α_2-マクログロブリンの中枢ニューロン突起伸展作用機序 …… 76
飯島　昇*1,2、宮本　豊*2、斎藤茂治*1、森　俊夫*2、北畠克顕*2、高坂新一*1
（*1国立精神神経センター・代謝、*2アサヒビール中研）

26. プロテアーゼ阻害剤によるPC12細胞の分化誘導の解析
——神経突起形成とクラスリン——…… 78
斎藤祐見子、中沢真理子*1、小倉明彦*1、大海　忍*2、門田朋子*3、津吹　聡*4、
伊藤　尚*4、川島誠一
（都老人研・生化、*1三菱生命研・脳神経薬理、*2東京大・医科研、
*3千葉大・医・解剖、*4青山学院大・理工）

27. コプチシンおよびベルベリンによるPC12細胞の神経突起形成作用 …… 80
藤田　興、坂本秀生、池亀　守、葛谷博磁（藤田保衛大・総医研・分子生物）

28. NG108-15細胞における神経突起維持作用へのGAP-43の関与 …… 82
熊谷千尋、東田道久、野村靖幸（北海道大・薬・薬効）

29. 神経突起伸展因子受容体(NOFR)のcDNAクローンの単離 …… 86
谷浦秀夫、平　英一、三木直正（大阪大・医・第一薬理）

30. 神経突起伸展活性を持つペプチドの構造解析…… 86
田代謙一郎、武市昌士（佐賀医大・精神医学）

31. 神経栄養因子探索のための固相バイオアッセイの開発…… 88
中島光業*1,2、林要喜知*2、川島拓司*2、林　恭三*1、古川昭栄*1
(*1岐阜薬大・薬、*2森永乳業・生科研)

32. 梗塞周囲脳における塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)の発現と外因性bFGFによる梗塞後視床変性の修復…… 90
山田和雄、甲村英二、坂口健夫、木下　章、早川　徹、和中明生*、遠山正爾*
(大阪大・医・脳神経外科、*第二解剖)

33. Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (HCNP)作用の生物学的特異性 …… 92
子鹿幸生、山本正彦、田中　亮*1、植木靖之*2
(名古屋市大・医・第二内科、*1第一内科、*2住友製薬研究所)

34. PC12D細胞の神経突起伸張とMAPキナーゼFGF,EGFの作用とK-252a …… 94
佐野　護、北島哲子、岩永　操(愛知県コロニー研)

35. PC12h-R細胞における低親和性NGFレセプターの発現制御 …… 96
高橋信明、小島正己、池内俊彦、畠中　寛(大阪大・蛋白研・蛋白質生合成)

36. 新しい成長因子, Pleiotrophin (PTN)の神経系個体発生における遺伝子発現 …… 98
加藤英政、和中明生、遠山正彌、E.M.Johnson Jr.、T.F.Deuel、J.Milbrandt
(大阪大・医・第二解剖)

37. アルツハイマー病脳、老年者脳における神経原線維変化、neuropil threadsの免疫細胞化学 ——共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡による観察—— …… 100
岩坪　威、長谷川成人、江崎行芳*、井原康夫
(東京大・医・脳研病理、*都老人医療センター・病理)

38. ヒト脳におけるphosphatidylinositol-specific phospholipase C活性
——アルツハイマー病脳での変化——…… 102
下濱　俊、藤本貞毅*1、谷口隆之*2、木村　淳
(京都大・医・神経内科、*1京都薬大・生化、*2生物)

39. アルミニウムの大脳皮質培養細胞に対する神経毒性：アルツハイマー病との関連の検討…… 104
川原正博、村本和也、小林和夫、黒田洋一郎(都神経・神経生化)

40. アルツハイマー病線維芽細胞のCa調節異常 …… 106
楯林義孝、武田雅俊、田中稔久、谷向　知、車谷隆宏、大河内正康、関山敦生、
播口之朗、西村　健　（大阪大・医・精神医学）

41. アミロイド前駆体蛋白に点状突然変異を示す家族性アルツハイマー病患者線維芽細胞の性質…… 108
武田雅俊、楯林義孝、田辺敬貴、勝谷友宏、三木哲郎、細川宏一、榊　佳之、
橋本重夫、西村　健　（大阪大・医・精神医学）

42. アルツハイマー病アミロイド蛋白質前駆体のCOS細胞における代謝の検討 …… 110
丸山　敬、宇佐美美穂子、針ケ谷和花子、亀谷富由樹、田中喜久子
（都精神研・分子生物）

43. Pick小体の精製…… 112
徳武　哲（都精神研・分子生物）

44. 老人斑、正常脳、赤血球、骨格筋アセチルコリン・エステラーゼに対する阻害薬の効果… 114
湯川素子、三森康世、中村重信（広島大・医・第三内科）

45. ビンスワンガー型脳血管性痴呆脳にみられる白質蛋白の変化について…… 116
犬塚　貴、佐藤修三、湯浅龍彦、宮武　正（新潟大・脳研・神経内科）

46. ヒト脳腫瘍の分類とガングリオシドの含量及び組成の変化…… 118
杉山英子、武富　保（信州大・医・心脈管研・脂質生化）

47. メラニンと鉄によって惹起される脂質過酸化反応
——スーパーオキシドの介在について——…… 120
田中　真、外松明美、平井俊策、中野　稔（群馬大・医・神経内科）

48. 神経疾患における髄液中28kDa vitamin D-dependent calcium-binding protein値 …… 122
清澤和弘、杢野謙次、吉田英治、高橋　昭、村上信之*1、安田武司*2、加藤兼房*3
（名古屋大・医・神経内科、*1国療東名古屋・神経内科、
*2名古屋第二日赤・神経内科、*3愛知県コロニー研・生化）

49. βA4タンパクの一次構造…… 124
小河原緑、瀧尾拡士*、森　啓
（都老人研・神経生理、*理化学研・バイオメディア）

50. キンドリングモデルにおけるてんかん準備性と亜鉛の役割 …… 126
板野俊文、岡田泰士*1、根木哲郎*2、村上哲英*1、畠瀬　修
（香川医大・生理、*1生物、*2保健体育）

51. 気分安定作用のある抗けいれん薬の作用機序に関する研究
——アデノシン受容体との関連—— …… 128
本橋伸高、塩江邦彦*1、三ツ汐洋*2、假屋哲彦*1
（広島大・医・精神科、*1山梨医大・精神科、*2国立精神神経センター・疾病第三）

52. 脳血管攣縮における血小板活性化因子PAFの役割 …… 130
平島　豊、遠藤俊郎、大辻常男、野村耕章、高久　晃、唐沢　健*
（富山医薬大・脳神経外科、*帝京大・薬・薬品物理化学）

53. ドーパミン神経毒TetrahydroisoquinolineのN-メチル化 …… 132
丸山和佳子、丹羽利充*1、太田深雪*2、高橋　勤*3、長谷川真一、高橋　昭、
永津俊治*4、直井　信*5
（名古屋大・医・神経内科、*1名古屋大・医・分院内科、*2名古屋市大・医・精神科、
*3江南女子短大、*4藤田保衛大、*5名古屋工大）

54. NMDA受容体を介する神経毒性に及ぼす細胞外pHの影響 …… 134
高寺恒雄、毛利哲郎（北陸大・薬・創薬研）

55. ラット線条体Dopamine取り込み機構に及ぼすMethamphetamineおよび競合的NMDA
受容体拮抗薬(SDZ EAA 494)併用反復投与の影響 …… 136
村木　彰、小山　司、大森哲郎、山下　格（北海道大・医・精神医学）

56. 新規NMDAアンタゴニストES-242類の培養中枢神経細胞系におけるグルタミン酸毒性
保護効果 …… 138
野沢美香、土岐眞一郎、松田　譲（協和発酵東京研究所）

57. 小脳顆粒細胞におけるNMDAレセプターを介するTRE及びCRE結合活性の誘導 …… 140
櫻井宏明、津田正明（岡山大・薬・微生物）

58. NMDA感受性および非感受性[^{3}H]グルタミン酸結合部位の部分精製 …… 142
荻田喜代一、鈴木竹雄、韓　大　健、米田幸雄（摂南大・薬・薬理）

59. 微生物由来の新規NMDAアンタゴニスト・ES-242-1のラット小脳におけるcGMP産生に及ぼす影響 …… 144
土岐眞一郎、野沢美香、松田　譲（協和発酵東京研究所）

60. 2価カチオンによるNMDAレセプター複合体の調節機序 …… 146
韓 大 健、榎本理世、荻田喜代一、米田幸雄（摂南大・薬・薬理）

61. 海馬と小脳のNMDAレセプター複合体の相違 …… 148
米田幸雄、荻田喜代一（摂南大・薬・薬理）

62. NMDA受容体非共役フェンサイクリジン(PCP)結合部位の脳内分布 …… 150
山本敏文、加藤　武、山本秀子、諸治隆嗣
（横浜市大・大学院総合理学研究科・分子認識）

63. NMDA受容体を介するDA遊離反応に及ぼす扁桃核キンドリングの影響 …… 152
大森哲郎、小山　司、中村文裕、王　　平、山下　格（北海道大・医・精神医学）

64. 無麻酔無拘束ラットの海馬セロトニン遊離におよぼすclonidineの影響 …… 154
松本真知子、吉岡充弘、富樫広子、斎藤秀哉（北海道大・医・薬理第一）

65. C6BU-1細胞における5-HT-2受容体刺激性Ca^{2+}動員に及ぼすdexamethasoneの影響 …… 156
村岡新一郎[1,2]、三国雅彦[*1]、加賀谷有行[*1]、斎藤和子[*1]、松本　啓[*2]、高橋清久[*1]
（[*1]国立精神神経センター・疾病第三、[*2]鹿児島大・医・神経精神医学）

66. 高K^+刺激によるノルアドレナリン，ドーパミン，セロトニン放出反応に及ぼすリチウム投与の影響 ——微小脳内透析法による検討—— …… 158
小山　司、小田垣雄二、大森哲郎、井上　猛、山下　格
（北海道大・医・精神医学）

67. ATP受容体刺激によるドーパミン放出と膜電位依存性Caチャンネル抑制 …… 160
井上和秀、中沢憲一、綿野智一、藤森観之助、高仲　正（国立衛生試験所・薬理）

68. ストレスによるラット脳内ノルアドレナリン放出亢進に対するMorphineとDiazepamの相乗的抑制作用 …… 162
松口直成*、横尾秀康、田中正敏、溝口克弘、清水知己、中沢洋一*
（久留米大・医・薬理、*精神）

69. GABA$_B$受容体の精製と同定 …… 164
水谷　宏、中安博司、韓　　達、栗山欣弥（京都府立医大・薬理）

70. ラット中枢神経系におけるGABA$_A$受容体各種サブユニットmRNAの分布 …… 166
荒木敏之、佐藤　真、木山博資、遠山正彌（大阪大・医・第二解剖）

71. フェノバルビタール依存性ラットにおけるGABA$_B$受容体について …… 168
田中佐知子、青木公子、吉田武美、山元俊憲*、黒岩幸雄
（昭和大・薬・毒物、*薬理）

72. ラット脳におけるカイニン酸及びキスカル酸受容体mRNAの分布の検討 …… 170
富田博秋、藤原　豊、引地　充、秋山一文、大月三郎、H.I.Yamamura*
（岡山大・医・神経精神、*アリゾナ大・医・薬理）

73. カイニン酸によるラット脳内NGFの変動 …… 172
橋本吉秀*1、尾前二三雄*2、古川昭栄*3
（*1三井製薬・生科研、*2三井東圧LS研、*3岐阜薬大・分子生物）

74. ウシ脳線条体より分離されたコート小胞に存在するドパミンD_2受容体とGTP結合蛋白質 … 174
尾崎直子、諸井佳代子*1、門田朋子*2、門田　健*3、鈴木史郎
（金沢医大・薬理、*1千葉大・医・高次研・高次神経、
*2解剖、*3都精神研・神経化学）

75. G蛋白質Goの2種類のサブタイプの分布 …… 176
浅野富子、森下理香、加藤兼房（愛知県コロニー研・生化）

76. ウシ脳コート小胞で見られるGTP結合site:カゼインキナーゼIIとの関連 …… 178
諸井佳代子、木村定雄、門田　健*（千葉大・医・高次神経、*都精神研）

77. 抗うつ薬のGTP結合蛋白質への直接作用：G蛋白質及び薬物特異性について …… 180
小澤寛樹、片村能也、芦沢　健、鍋島あけみ、橋本恵理、鎌田裕樹、池田官司、
高畑直彦、斉藤利和　　（札幌医大・神経精神）

78. グアニル酸シクラーゼを活性化するセロトニン受容体 …… 182
東田道久、野村靖幸（北海道大・薬・薬効）

79. ラットセロトニン$_{1A}$受容体遺伝子の発現 ——[^{3}H]80H-DPAT結合による解析—— …… 184
藤原　豊、富田博秋、引地　充、大月三郎、曽良一郎*2、柏原健一*2、
H.I. Yamamura*2、大貫哲男*1、浜岸安太郎*1、沖俊一*1
（岡山大・医・精神神経、*1ブリストルマイヤーズ・スクイブ研究所、
*2アリゾナ大・薬理）

80. 5HT$_2$受容体を介する細胞内情報伝達経路に対する抗うつ薬の効果：ヒト血小板を用いた研究 …… 186
金子元久、大須賀伸佳、菅野智行、桝内　務、増子博文、熊代　永
（福島県立医大附属病院・神経精神）

81. 老齢ラットの中枢コリン作動性神経系の生化学的マーカーの性質 …… 188
江頭　亨、須藤慎治、河野俊郎（大分医大・薬理）

82. ディジタル画像解析による中隔野分散細胞培養系におけるアセチルコリンエステラーゼ陽性神経細胞の分化発育に関する検討 …… 190
松本智明、宮本亜紀、大原たかね（ヘキストジャパン・医薬総合研）

83. 脳神経終末におけるアセチルコリン合成と放出の加齢変化 …… 192
田中康一、安藤　進（都老人研・生体膜）

84. アセチルコリン受容体遺伝子移入NG108-15細胞におけるイノシトールリン酸産生とc-fos誘導作用 …… 194
佐久間聡子、熊谷千尋、東田道久、東田陽博*、野村靖幸
（北海道大・薬・薬効、*金沢大・医・神経情報研・物性）

85. 成長円錐膜ムスカリン性アセチルコリン受容体の薬理学的性質について …… 196
斎藤　繁*1,2、五十嵐道弘*1、小宮義璋*1（*1群馬大・医・分子病態、*2麻酔・蘇生）

86. 培養ウシ副腎髄質細胞におけるニコチン性およびムスカリン性アセチルコリン受容体へのリガンド結合に対する低酸素の影響 …… 198
李　　憲、越村邦夫*、三輪聡一*（岐阜大・医・小児、*京都大・医・薬理）

87. PC12細胞におけるムスカリン受容体を介した[^{3}H]ノルアドレナリン放出とPI代謝 …… 200
高島明彦、井上和秀*1、kenimer G. James*2
（三菱化成生命研、*1国立衛生試験所、
*2Lab.Cellular Physiology, Food and Drug Administration）

88. ムスカリン受容体キナーゼによるロドプシンの光依存性リン酸化：G蛋白質$\beta\gamma$サブユニットによる促進 …… 202
芳賀和子、芳賀達也（東京大・医・脳研・生化）

89. ムスカリン性受容体刺激による平滑筋収縮におけるGTP結合タンパク質の関与 …… 204
本多健治、高野行夫、神谷大雄（福岡大・薬・薬理）

90. ムスカリニックm3受容体刺激とアミロイドβ蛋白前駆体mRNAの発現との関連 …… 206
安部明夫、中村重信、Joan Heller Brown*
（広島大・医・第三内科、*University of California,San Diego, Pharmacology）

91. 実験水頭症における脳内カテコールアミンの変動 …… 208
三宅博久、坂本貴志、森　惟明（高知医大・脳神経外科）

92. PC12細胞における分泌小胞局在性58kDリン酸化タンパク質(synaptotagmin)の発現とその欠失細胞 …… 210
吉田　明、笠井陽子、藤本禎子、高橋正身（三菱化成生命研・脳神経化学）

93. ラット大脳CaM依存性プロテインキナーゼⅣの自己リン酸化反応 …… 212
亀下　勇、藤澤　仁（旭川医大・第一生化）

94. テトラヒドロビオプテリンの生合成酵素であるヒトセピアプテリンリダクターゼのcDNAクローニング …… 214
一瀬　宏、永津俊治（名古屋大・医・生化第一）

95. 脳におけるDNAトポイソメラーゼIIアイソザイム …… 216
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、*分子細胞医学研・病態分子生物）

96. ミクログリア分泌性プラスミノーゲンアクチベーターについて …… 218
中嶋一行、津崎尚子、下条雅人、濱之上誠、高坂新一
（国立精神神経センター・代謝）

97. スフィンゴ脂質活性化蛋白(saposin)の一次構造及び遺伝子構造 …… 220
津田正彦、崎山武志、北川照男（日本大・医・小児）

98. Establishment of GABAergic and glutamatergic like neuronal cell line ····· 222
Takeuchi Alice Mayumi、Gallyas Ferenc Jr.、Takahashi Keikichi、
Tabira Takeshi (NCNP, National Institute of Neuroscience, 6th division)

99. コリナージックニューロン細胞株SN-6のChAT活性に及ぼすIa陽性マクロファージ培養上清の効果 ····· 224
遠藤真澄、田平　武（国立精神神経センター・疾病第六）

100. シトシンアラビノサイドによる初代培養海馬ニューロンの細胞死誘導効果 ····· 226
林要喜知、中島光業、吉川和明*（森永乳業・生物科学研、*都精神研・分子生物）

101. 神経細胞におけるNO合成酵素の活性 ····· 228
馬 麗 娟、石崎泰樹、森田育男、室田誠逸（東京医歯大・歯・顎研機能）

102. ラット大脳初代培養細胞の[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDING ····· 230
山本秀子、山本敏文*、諸治隆嗣
（都精神研・精神薬理、*横浜市大・総合理学・分子認識）

103. Ca^{2+}電流のうち、T型はもつがN型、L型を欠くニューロブラストーマ雑種細胞 ····· 232
橋井美奈子、木村康宏、東田陽博（金沢大・医・神経物性）

104. ニワトリ胚の菱脳における細胞内レチノイン酸結合タンパク(タイプI)と核内レチノイン酸レセプター(β) ····· 234
桃井　隆、富田幸子*、川井ゆか
（国立精神神経センター・疾病第五、*東京女子医大・循環器小児）

105. Bt_2cAMP処理によって分化させたNG108-15細胞における特異的[^{3}H](+)PN200-110結合の性質について ····· 236
中崎聡理、岸野浩行、秋元孝文、和田哲幸、市田成志（近畿大・薬・生物化学）

106. 神経成長因子によるPC12h細胞の突起誘導過程におけるチロシンキナーゼの関与 ····· 238
塚田泰且、千葉賢三、毛利哲郎（北陸大・薬・創薬研）

107. 塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)の脳内分布 ····· 240
松山晃文、岩田　弘*、今泉和則*、塩坂貞夫
（大阪大・医・バイオ研・神経解剖、*田辺製薬）

108. ヒト神経接着因子L1のcDNAクローニングと構造解析 …… 242
小林正明、三浦正幸、阿相皓晃、植村慶一（慶応大・医・生理）

109. 培養アストロサイトでのラミニンの発現およびin vitro転写系を用いたメカニズムの解析 … 244
澤田　誠（藤田保衛大・総医研・応用細胞）

110. 培養生後ラット中隔神経の生存に対する脱分極の効果とCaイオンの関与 …… 246
浜田　淳、腰本裕之、岩田邦男（日本たばこ安全性研究所）

111. ff-lesionラットにおけるHCNPの細胞脱落保護作用 …… 248
岸野晶祥、入江恒正、*子鹿幸生（住友製薬研究所、*名古屋市大・医・第二内科）

112. 興奮性アミノ酸神経毒性に拮抗する筋由来因子 …… 250
山本智浩、田口隆久（大阪大・基礎工学・生物工学）

113. 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
——CNQXは後投与によっても神経傷害を改善し得る—— …… 252
甲村英二、木下　章、山田和雄、早川　徹（大阪大・医・脳神経外科）

114. ヒト大脳皮質における[^{3}H]AMPA結合に関する研究 …… 254
車地暁生、融　道男（東京医歯大・医・精神）

115. 視細胞の細胞極性とレクチン結合能 …… 256
中山　孝、古家園子（岡崎生理学研）

116. 座骨神経における神経成長因子(NGF)と脳由来神経栄養因子(BDNF)の異なる発現調節 … 258
松岡一郎、M.Meyer*、M.Hofer*、H.Thoenen*
（北海道大・薬、*Max-Planck精神医学研）

117. NGFまたはBt2cAMPの処理によって分化させたPC12h細胞における^{45}Ca uptakeの性質について …… 260
岸野浩行、中崎聡理、秋元孝文、和田哲幸、市田成志（近畿大・薬・生物化学）

118. ^{45}Caオーバーレイ法によるラット脳カルシウム結合タンパク質の検索 …… 262
堂前純子、鈴木龍雄、田中　亮（名古屋市大・医・第一生化）

119. ラット初代培養アストロサイトに対するプロスタグランジン$F_{2\alpha}$の作用 …… 264
北中純一、尾上浩隆*、馬場明道（大阪大・薬・薬理、*大阪バイオサイエンス研）

120. 脳ω-conotoxin受容体を免疫沈降させる単クローン抗体 …… 266
茨木京子、堀川　洋、西須英雄、阿部輝雄（新潟大・脳研）

121. 低分子量GTP結合蛋白質 *smg* p25Aの調節蛋白質GDI(GDP dissociation inhibitor: *smg* p25A GDI)の機能および発現について …… 268
本池俊行、佐野公彦、中村　肇、菊池　章*、貝淵弘三*、高井義美*
（神戸大・医・小児科、*第一生化）

122. A substitution of glycine by valine at position 49 of Gsα subunit confers a differentiation potential to it in a cAMP-independent manner in PC12 cells …… 270
Kabir MD. Ahmed、Nakamura Shun（国立精神神経センター・診断研究部）

123. モルヒネ及びエタノール感受性1本鎖cAMP response element(CRE)結合蛋白質(sCRE-BP)の性質と精製 …… 272
大杉　武、池本光志、田中秀和、谷浦秀夫、三木直正（大阪大・医・第一薬理）

124. 大脳皮質内c-fos mRNA発現に及ぼす生理的食塩水単回および反復投与刺激の影響 …… 274
浅沼幹人*1、小川紀雄*1、平田　洋*1,2、羽場久美子*1、周 希 誠*1、田中健一*1、
森　昭胤*1　（*1岡山大・医・脳代謝研・機能生化、*2第三内科）

125. ラット脳におけるコレシストキニンのc-fos mRNA発現に及ぼす影響 …… 276
三好理絵、鬼頭昭三*、野本照子（東京女子医大・薬理、*放送大）

126. カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIによるc-fos遺伝子の転写調節 …… 278
大迫俊二、山内　卓（都神経研・遺伝）

127. カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの構造 …… 280
山内　卓、杉浦弘子、金関　憲、池内容子（都神経研・遺伝）

128. 神経特異的14kDaタンパク質はチロシンキナーゼの基質である …… 282
中条茂男、塚田和彦、古山泰雄、中村泰治、中谷一泰（昭和大・薬・生物化学）

129. イノシトール1,4,5-三燐酸受容体における多様性の抗体による解析 …… 284
中出真嗣*1、濱中裕喜*1、藤井重元*1、前田信明*1、新延道夫*1、御子柴克彦*1,2
（*1大阪大・蛋白研・機能制御、*2東京大・医科研・化学）

130. ジアシルグリセロールとシス型不飽和脂肪酸によるプロテインキナーゼC分子種の相乗的な活性化 …… 286
篠村徹太郎、松島真司、西塚泰美（神戸大・医・第二生化）

131. 14-3-3蛋白質による蛋白質キナーゼCの活性化 …… 287
礒部俊明、比屋根ゆり子、奥山典生、市村　徹*1、中条茂男*2、中谷一泰*2
（都立大・理・化学、*1新潟大・自然科学研究科、*2昭和大・薬・生化）

132. スタウロスポリンによるPC12細胞の分化 …… 290
小嶋久子、北島理恵、玉井洋一（北里大・医・生化）

133. マウス脳発生過程における神経分化特異的核蛋白質NECDINの遺伝子発現 …… 292
相沢貴子、丸山　敬、*近藤ひろみ、吉川和明（都精神研・分子生物、*神経病理）

134. マウス中枢神経系発生におけるレチノイン酸受容体の発現と局在 …… 294
山形崇倫、山門　誠*1、桃井　隆*2、桃井真里子
（自治医大・小児、*1第一解剖、*2国立精神神経センター）

135. Cytokine,dibutyryl cAMP,sodium butyrateによるアストロサイト、線維芽細胞のNGF産生調節 …… 298
吉田一成、左合正周、大谷光弘、Fred H.Gage*、戸谷重雄
（慶応大・医・脳神経外科、*Dept. of Neurosci., UCSD）

136. 分化した神経芽腫細胞における新生脳由来抗癌因子NBCFに対する感受性低下：NBCF拮抗因子と細胞内カルシウムイオンの関与 …… 298
三羽信比古、長尾則男、土井澄江、中村豊郎*1、伊藤青莪*2
（広島県立大、*1伊藤ハム、*2協和発酵）

137. 形態形成期の脳に特異的に存在するプロテオグリカン：モノクローナル抗体を用いた研究 …… 300
大平敦彦、松井ふみ子、前田信明（愛知県コロニー研・発生）

138. 脳可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカンによるPC12細胞の増殖阻害 …… 302
仙波りつ子、大平敦彦*（愛知県コロニー研・周生期、*発生）

139. Type 1, Type 2 アストロサイト細胞系譜(Cell lineage)に伴う膜表面中性糖脂質の変化 …… 304
矢崎貴仁、阿相皓晃、植村慶一（慶応大・医・生理）

140. SV40 ori-によるマウスO-2A lineage cellのcell line化 …… 306
大谷邦彦、錫村明生*2、丸野内棣*3、中島　泉*1、高橋　昭
（名古屋大・医・神経内科、*1免疫、*2藤田保衛大・神経内科、*3応用細胞）

141. 神経細胞接着因子L1のエピトープを共有する新しいL1関連分子について …… 308
阿相皓晃、三浦正幸、小林正明、宮崎唯雄、植村慶一（慶応大・医・生理）

142. 細胞接着分子SC1 …… 310
田中英明（群馬大・医・薬理）

143. ラット神経細胞接着因子L1のcDNAクローニング：新しいアイソフォームの同定と発現 … 312
三浦正幸、小林正明、阿相皓晃、植村慶一（慶応大・医・生理）

144. ヒトドレブリン蛋白質の免疫学的解析とcDNAクローニング …… 144
戸田正博*1,2、白尾智明*1、浅田英穂*1、戸谷重雄*2、植村慶一*1
（*1慶応大・医・生理、*2脳神経外科）

145. ラット脳mRNAの死後安定性に対する生理的食塩水による環流およびGTL液の効果 …… 316
平田　洋*1,2、小川紀雄*1、浅沼幹人*1、羽場久美子*1、周 希 誠*1、森　昭胤*1
（*1岡山大・医・脳代謝研・機能生化、*2第三内科）

146. 虚血耐性現象におけるOxygen Radical Stressの関与について …… 318
松本昌泰、大槻俊輔、鈴木敬一郎*1、多賀谷昌史、秦　龍二、小川　智、和中明生、
上田周一、半田伸夫、木村和文*2、谷口直之*1、鎌田武信
（大阪大・医・第一内科、*1生化学、*2バイオ研核）

147. 一過性脳虚血負荷によるエンドセリン産生に関する免疫組織化学的検索 …… 320
山下樹三裕、片岡泰文、丹羽正美、重松和人*1、小泉修一*2、C.R.Jones*3、
谷山紘太郎　（長崎大・医・薬理二、*1病理二、*2九州大・薬・薬理、
*3Marion Merrell Dow Research Institute）

148. 一過性脳虚血後の海馬CA1、CA3、歯状回、大脳皮質及び線条体におけるNGF含有量
の経時的変化 …… 322
小豆原秀貴、小野寺宏、仙波りつ子、加藤兼房、山崎靖人、小暮久也
（東北大・医・神経内科）

149. 加齢による脳虚血脆弱性とアミノ酸放出…… 324
大星博明、八尾博史、井林雪郎、佐渡島省三、藤島正敏、中根　博*、松本　孝*、
平野　誠*、内村英幸*　（九州大・医・第二内科、*国立肥前療養所）

150. ラット脳内におけるシトクロムP-450$_{s21}$ (P-450XXIAI)の分布と機能 …… 326
中村和彦、岩橋和彦、久郷敏明、細川　清、市川佳幸*
（香川医大・精神神経、*生化）

151. 抗hippocampal cholinergic neurostimulating peptide抗体を用いたラット中枢神経組織化学…… 328
林謙一郎、小鹿幸生、三竹重久、藤森　修*[1]、国松巳歳*[2]、佐々木實*[2]、植木靖之*[3]、
福島伸之*[3]（名古屋市大・医・第二内科、*[1]第二解剖、*[2]第二生化、*[3]住友製薬）

152. 線維芽細胞成長因子受容体に対する抗体作製とその脳内での免疫組織化学的応用およびmRNAの検出…… 330
花井一光、松尾明典、安原　治、遠山育夫、磯部正治、大村　裕、木村　宏
（滋賀医大・分子神経）

153. 自傷行為モデルラットのドーパミン神経系と受容体：I 新生仔期6-OHDA投与ラットの行動特性及びドーパミンニューロンの傷害部位…… 332
岡村　均、横山ちひろ*、田口淳一、一谷幸男、井端泰彦
（京都府医大・第二解剖、*精神）

154. ヒト末梢神経ミエリンに存在するネオラクト系ガングリオシド…… 334
後藤希代子、舟本規昭、太田雪子、阿部敏明、長嶋和郎*
（帝京大・医・小児、*北海道大・医・病理）

155. ミクログリア由来のグリオージス誘導因子について…… 336
錫村明生、*[1]澤田　誠、*[2]杢野謙次、*[3]加藤兼房、*[1]丸野内棣、山本纊子
（藤田保衛大・神経内科、*[1]応用細胞、*[2]名古屋市大・医・神経内科、
*[3]愛知県コロニー研・生化）

156. Paraneoplastic cerebellar degeneration患者血中抗体が認識する神経系Zinc Finger蛋白 … 338
佐藤修三、中野亮一、犬塚　貴、藤田信也、崎村建司、三品昌美、宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科）

157. ヒト末梢血リンパ球のIL-2産生およびDNA合成に対するムスカリン性受容体の促進的関与 …… 340
矢田　武、北村佳久、野村靖幸（北海道大・大学院薬学研究科・薬効）

158. GABA受容体関連薬の末梢投与によるラット脳内コレシストキニン8S免疫活性の変化 …… 342
横山俊英*、高橋真司、武田克道、山本敏文、加藤　武
（横浜市大・総合理学・分子認識、*元東工大・生命化学）

159. Desipramine慢性投与時の側坐核におけるα_2-アドレナリン受容体機能の変化について——*in vivo* brain dialysis法による検討—— …… 344
関谷　紫、杉田倫太郎*[1]、澤　　温*[2]、野村総一郎*[3]、伊藤哲一彦
（藤田保衛大・医・精神、*[1]トヨタ記念病院、*[2]さわ病院、*[3]立川病院）

160. 線条体へのドパミン系薬物の注入がラット線条体ドパミン放出に及ぼす効果：脳透析法による検討 …… 346
富山勝則、越川憲明、小林雅文（日本大・歯・薬理）

161. 一酸化炭素負荷により誘発される線条体dopamine,serotoninおよびそれら代謝物濃度の変化 …… 348
平松正行、横山靖司、鍋島俊隆*、亀山　勉
（名城大・薬・薬品作用、*名古屋大・医・薬剤部・医療薬）

162. 視床下部内神経性ヒスタミン遊離の日内リズムについて …… 350
望月貴年、大和谷厚、岡倉　薫、堀井　新*、和田　博
（大阪大・医・第二薬理、*耳鼻咽喉科）

163. ヒスタミンH_3リガンドと合成酵素阻害剤のマウス自発運動量に及ぼす影響 …… 352
坂井也彦、小野寺憲治*、山崎誠治、谷内一彦、前山一隆、渡辺建彦
（東北大・医・薬理、*歯・薬理）

164. ヒト及びウシCNPのダブレットの起源 …… 354
栗原　正、遠山陽子、山本純子、金松知幸（創価大・生命科学研）

165. オリゴデンドロサイト分化・生存の分子機構～ミエリン形成不全を伴うジンピーマウスを用いた解析 …… 356
鹿川哲史*[1]、池中一裕*[1]、御子柴克彦*[1,2]
（*[1]大阪大・蛋白研・機能制御、*[2]東京大・医科研・化学）

166. Myelin-associated glycoprotein (MAG)の遺伝子解析 …… 358
中野亮一、藤田信也、佐藤修三、犬塚　貴、崎村建司*、三品昌美*、宮武　正
(新潟大・脳研・神経内科、*神経薬理)

167. Neuropeptide Y 遺伝子のグルココルチコイドによる転写調節エレメントの解析 …… 360
三崎尚之、樋口宗史、山形要人、三木直正 (大阪大・医・第一薬理)

168. アゴニスト刺激によるGABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNA発現の調節 …… 362
廣内雅明*1、大熊誠太郎*1、橋本　保*2、辻村　敦*2、栗山欣弥*1,2
(*1京都府立医大・薬理、*2老化研・神経化学・分子遺伝)

169. 網膜におけるアマクリン細胞の特異抗原分子HPC-1の一次構造解析およびその組織発現様式 …… 364
井上明宏、小幡邦彦、赤川公朗 (岡崎生理学研・神経化学)

170. ヒト筋肉及びウシ脳組織からの$\alpha\beta$クリスタリンの精製 …… 366
篠原春夫、稲熊　裕、後藤幸代、森下理香、浅野富子、加藤兼房
(愛知コロニー研・生化)

171. ヒト低分子量熱ショック蛋白質HSP27の精製と組織分布および(HSP27/αBクリスタリン)複合体の証明 …… 368
加藤兼房、篠原春夫、稲熊　裕、後藤幸代 (愛知県コロニー研・生化)

172. 熱ショックによるグリオーマ細胞中のαBクリスタリンと HSP27の動態について …… 370
稲熊　裕、篠原春夫、後藤幸代、加藤兼房 (愛知県コロニー研・生化)

173. スフィンゴ脂質活性化蛋白質前駆体の精製と性質 …… 372
近藤啓次、佐野　輝、日根野尚、上野修一、柿本泰男 (愛媛大・医・神経精神)

174. マウス胎仔大脳皮質細胞表面のガラクトース転移酵素の性質について …… 374
宮村　毅*1、森田規之*1、池中一裕*1、加藤郁之進*2、御子柴克彦*1,3
(*1大阪大・蛋白研、*2宝酒造、*3東京大・医科研)

175. ラットアストロサイトのマイクロフィラメント再構成とその組成 …… 376
伊藤仁一、*加藤泰治、田中　亮
(名古屋市大・医・生化Ⅰ、*分子医研・生体制御)

176. Salsolinolによるトリプトファン水酸化酵素の阻害 …… 378
太田深雪、永津俊治*1、直井　信*2
（名古屋市大・医・精神、*1藤田保衛大・総医研、*2名古屋工大）

177. クロマフィン細胞の開口放出に対する58kD蛋白(p65, シナプトタグミン)抗体の影響 …… 380
村松　俊、今泉美佳、熊倉鴻之助、高橋正身*
（上智大・生命研・神経化学、*三菱化成生命研）

178. ウシ脳の新しいカルシウム結合タンパク質(neurocalcin)の精製とその性質 …… 382
寺澤　求、小林良二、日高弘義（名古屋大・医・薬理）

179. 培養神経芽細胞におけるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼII α サブユニット
cDNA導入の形態に及ぼす影響 …… 384
五嶋良郎*、大迫俊二、山内　卓（都神経研・遺伝学、*横浜市大・医・薬理）

180. ラット脳における遊離D-セリンの同定 …… 386
橋本　篤、西川　徹、林　時司、藤井紀子*、原田　馨*、岡高　恵、高橋清久
（国立精神神経センター・疾病第三、*筑波大・化学系）

181. 遊離型メチルアルギニンの定量と組織内分布 …… 388
上野修一、佐野　輝、胡谷和彦、近藤啓次、柿本泰男（愛媛大・医・神経精神）

182. 先天性水頭症ラットHTXの脳における神経細胞障害及びその短絡術の効果について …… 390
須田喜久夫、新井　一、佐藤　潔（順天堂大・医・脳神経外科）

183. イボテン酸によるラット海馬破壊部位におけるamyloid β-precursor protein及び細胞
骨格蛋白の変化(破壊後長期経過) …… 392
中村　祐、武田雅俊、新川久義、播口之朗、北嶋省吾*、西村　健
（大阪大・医・精神、*日生病院・精神）

184. Amyloid β-precursor protein沈着の経時変化
——イボテン酸による海馬破壊部位の検討—— …… 394
新川久義、中村　祐、武田雅俊、播口之朗、西村　健（大阪大・医・精神医学）

185. 海馬キンドリングラットの海馬及び扁桃核における脳湿重量及びプロテインキナーゼC活性の長期持続性変化 …… 396
甲平一郎、秋山一文、大源明宏*1、伊藤　高、小野光弘、森本　清、大月三郎、曽良一郎*2
（岡山大・医・精神医学、*1十全第二病院・精神、*2アリゾナ大・医・薬理）

186. マイネルト基底核破壊ラットにおける大脳皮質アストログリアの反応性の検討 …… 398
姉崎利治、柳沢勝彦*2、高橋　均*1、生田房弘*1、宮武　正*2
（新潟大・脳研・神経内科、*1実験神経病理、*2東京医歯大・医・神経内科）

187. In vitro ischemiaによる脳$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性の低下 …… 400
松田敏夫、馬場明道（大阪大・薬・薬理）

188. 中枢神経内Acetylcholine Releaseに及ぼすCa拮抗薬(Verapamil)の影響
——高血圧自然発症ラットを用いた検討—— …… 402
津田和志、西尾一郎、増山善明*1、Menek Goldstein*2
（和歌山県立医大・循環器内科、*1東京労災病院、
*2New York University Medical Center）

189. 実験的ラットIUGR胎仔脳におけるNSEとアセチルコリンエステラーゼ活性の変化 …… 404
植野信水、前田宗徳、天野　完、西島正博、小嶋久子*、北島理恵*、玉井洋一*
（北里大・医・産婦人科、*生化）

190. 覚醒剤断薬4週間後のsteady stateにおける神経核レベルの神経伝達物質代謝の変化とマウス系統間の特徴的差異 …… 406
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）

191. 塩基性繊維芽細胞成長因子による酸素毒性の回避 …… 408
榎戸　靖、茜谷行雄、九島洋一、新延道夫、御子柴克彦*、畠中　寛*
（大阪大・蛋白研・蛋白質生合成、*機能制御）

192. Pygmyマウス(pg)の神経化学的研究 …… 410
杉崎哲朗、野口鉄也（東邦大・医・第二生理）

193. Gunnラット小脳における限局性黄染と関連するビリルビン結合タンパク …… 412
青野幸子、仙波禮治、佐藤　浩*1、慶野宏臣、柏俣重夫*2
（愛知県コロニー研・周生期、*1滋賀医大・生物、*2刈谷保健所）

194. SH-SY5Y細胞におけるカルバコールのサイクリックAMP産生系増強作用について …… 414
八木-中川勇三、斉藤康成、高田吉弘、高山　衛
（雪印乳業・生物科学研・神経化学）

195. てんかん性大脳皮質サイクリックAMP合成系のアデノシンおよびそのアナログに対する応答 …… 416
服部幸雄、森脇晃義、林　泰資、堀　泰雄（岡山大・医・第一生理）

196. 新規ANPアンタゴニストHS-142-1の株化神経細胞におけるcGMP産生抑制作用について … 418
土岐眞一郎、松田　譲（協和発酵東京研究所）

197. C-erb $A\alpha_2$ mRNAのラット中枢内局在部位 …… 420
鯉淵典之、山岡貞夫、鈴木光雄*（獨協医大・第一生理、*群馬大・内分泌研）

198. ras-トランスフォーマントにみられる周期的Ba内向き電流 …… 422
星　直人、橋井美奈子、野田百美、野沢義則*、東田陽博
（金沢大・医・神経物性、*岐阜大・医・生化）

199. 中枢神経細胞内カルシウム動態に対するendothelinの作用 …… 424
小泉修一、片岡泰文*1、山下樹三裕*1、丹羽正美*1、渡辺繁紀、工藤佳久*2
（九州大・薬・薬理、*1長崎大・医・第二薬理、*2三菱化成生命研）

200. 抗うつ薬のラット脳培養神経細胞内Ca^{2+}濃度上昇作用 …… 426
清水雅美、西田　朗、早川　浩*、山脇成人*
（国立呉病院・臨床研究、*広島大・神経精神）

201. ラット脳CaBP23K：Ca依存性膜結合蛋白質の精製とその性質 …… 428
高松　研、野口鉄也、平野修助、植村慶一*
（東邦大・医・第二生理、*慶応大・医・生理）

202. 百日咳毒素(IAP)によるADP-リボシル化反応
——ラット脳およびヒト血小板膜標品における検討—— …… 430
小田垣雄二、小山　司、山下　格（北海道大・医・精神医学）

203. ラット脳，膜画分におけるガングリオシド依存性タンパクリン酸化 …… 432
中岡隆志、辻　崇一、永井克孝*（理研・糖遺伝情報、*都臨床研）

204. 摘出白鼠交感神経節の脱分極刺激依存性トランスグルタミナーゼ活性化におよぼすGM1あるいはシアル酸化合物の効果 …… 434
中島雄三、安藤正人、鈴木由美子、永田　豊（藤田保衛大・医・生理）

205. コリンおよびアドレナリン作動性神経伝達物質による白鼠神経節内トランスグルタミナーゼ活性調節の相反効果と$^{45}Ca^{2+}$-influx …… 436
安藤正人、鈴木由美子、中島雄三、永田　豊（藤田保衛大・医・生理）

206. リン脂質への[^{3}H]MK-801吸着反応 …… 438
鈴木竹雄、荻田喜代一、米田幸雄（摂南大・薬・薬理）

207. 時間制限給餌後に自由摂餌させたラットの摂餌行動と脳セロトニン代謝 …… 440
奥野正景、切池信夫、井上幸紀、伊藤英樹、川北幸男（大阪市大・医・神経精神）

208. Conditioned fear stressの脳内セロトニン代謝におよぼす影響 …… 442
井上　猛、小山　司、山下　格（北海道大・医・精神医学）

209. ラット線条体へのsulpiride投与の摂餌行動およびドパミン代謝におよぼす影響について … 444
井上幸紀、切池信夫、奥野正景、伊藤英樹、川北幸男（大阪市大・医・神経精神）

210. Gunnラット脳のglutathione S-transferase活性について …… 446
都築紀宏（名古屋市大・医・生化）

211. 老化促進マウス脳における神経伝達物質受容体の加齢変化 …… 448
山中庸次郎、北村佳久、野村靖幸（北海道大・薬・薬効）

212. Elマウス脳におけるmRNAの翻訳活性 …… 450
中西亜紀、撫井弘二、山上　栄、木岡哲郎、大西　博、川北幸男
（大阪市大・医・神経精神）

213. Elマウス発作時における脳のc-fos mRNAの発現 …… 452
勝元栄一、尾崎宜洋、山上　栄、横谷　昇、撫井弘二、大西　博、川北幸男
（大阪市大・医・神経精神）

214. Elマウスの発育に伴う脳内β-エンドルフィン様免疫活性の変化 …… 454
片山雅文、大西　博、小出誠司、甲斐利弘、山上　栄、川北幸男
（大阪市大・医・神経精神）

215. ラット凍結損傷脳における神経栄養活性…… 456
筵井　武、提中順一、佐藤好威、木村喜代史（日本新薬・中央研究所）

216. 坐骨神経のaFGFレベルの損傷による変動 …… 458
石川リカ*1,2、錦織浩治*2、古川美子*1、林　恭三*1、古川昭栄*1
（*1岐阜薬大・分子生物、*2キリンビール・医薬研）

217. 酸性・塩基性繊維芽細胞成長因子は神経成長因子除去によるPC12細胞の細胞変性を阻止する…… 460
小池達郎、田中秀逸、加治和彦*（佐賀医大・化学、*都老人研・アイソトープ部）

218. 神経成長因子除去によるPC12細胞の変性におけるc-fosの活性化 …… 462
田中秀逸、高島明彦*、小池達郎（佐賀医大・化学、*三菱化成生命研）

219. 中間径線維蛋白のユビキチン化と神経変性—特にニューロフィラメントのユビキチン化について…… 464
田中稔久、武田雅俊、楯林義孝、谷向　知、車谷隆宏、大河内正康、関山敦生、
播口之朗、西村　健　（大阪大・医・精神医学）

220. 家族性アルツハイマー病血液buffy coatの継代接種により生じるハムスター脳内病変について…… 466
谷向　知、武田雅俊、工藤　喬、新川久義、田中稔久、楯林義孝、車谷隆宏、
関山敦生、大河内正康、多田國利、播口之朗、西村　健　（大阪大・医・精神医学）

221. 細胞骨格蛋白刺激によるマウス脾臓リンパ球の免疫応答…… 468
田中稔久、武田雅俊、中村和子、加藤佳也*、車谷隆宏、大河内正康、関山敦生、
播口之朗、西沼啓次*、西村　健　（大阪大・医・精神医学、*国立療養所松籟荘）

222. 海馬破壊がラット学習行動に及ぼす影響 —2つの課題を用いて …… 470
松本　明、九穂泰三、芝軒信次、小暮美樹、石川紘一（日本大・医・薬理）

223. ラット扁桃核キンドリングにおけるプトレッシンの役割…… 472
林　泰資、服部幸雄、森脇晃義、堀　泰雄（岡山大・医・第一生理）

224. 受容体オートラジオグラフィ法による移植海馬ニューロン機能の解析…… 474
小野寺宏、杉本　晃、小暮久也（東北大・医・神経内科）

225. 覚醒剤反復投与によるラット線状体のドーパミンD-2受容体，G蛋白の変化 …… 476
門田　健、岡田瑛子、諸井佳代子、尾崎直子、門田朋子（都精神研・神経化学）

226. 慢性硬膜下血腫患者の血漿および血腫の脂質分析
——血膜腫増大機構への血小板活性化因子(PAF)の関与——…… 478
平島　豊、長堀　毅、西嶌美知春、遠藤俊郎、高久　晃、中川靖一*
（富山医薬大・脳神経外科、*北里大・薬・衛生化学）

227. 脳内Oncogene Productの分布とAging …… 480
竹田　稔、塩田清二*2、竹田二美代*1、菅谷慶三、塩田富紀子、中井康光*2、
佐藤永雄　（昭和大・医・第二生化、*1第一生化、*2第一解剖）

228. ヒト髄膜腫の生化学的分析—良性および悪性髄膜腫に特徴的な脂質組成…… 482
脇谷健司、中村　治*1、岩森正男*2
（東京警察病院・脳神経外科、*1都立駒込病院・脳神経外科、
*2東京大・医・第二生化）

229. 癌患者の血清及び脳脊髄液中のペプチドC末端アミド化酵素活性…… 484
宮崎則幸、植村富彦*1、大倉久直*2、野村和弘*3、渋井荘一郎*3、高山　順*4
（都精神研・RI、*1神経化学、*2国立がんセンター病院・内科、
*3脳神経外科、*4小児）

230. Glycine prodrug milacemideのラットCSFアミノ酸におよぼす影響 …… 486
仙波純一、P.N.Patsalos*
（東京医歯大・医・精神、*Institute of Neurology,London）

231. 神経変性疾患患者脊髄のアミノ酸およびタンパク分画の検索…… 488
藤田公和、安藤正人、永田　豊、田丸政男、本多虔夫*
（藤田保衛大・医・生理、*横浜市民病院）

232. 慢性分裂病死後脳におけるストリキニーネ非感受性グリシン結合部位に関する研究…… 490
石丸昌彦、車地暁生、融　道男（東京医歯大・医・神経精神）

233. 精神分裂病死後脳のグリシン及びセリン含量の測定…… 492
渡辺明子、熊代　新、車地暁生、融　道男（東京医歯大・医・神経精神）

234. 精神分裂病死後脳のコレシストキニン受容体とシグマ受容体…… 494
澁谷治男、森　博史、融　道男（東京医歯大・医・神経精神）

235. 精神分裂病者の血清インターロイキン-6(IL-6)濃度 …… 496
新谷　太、神庭重信（慶応大・医・精神神経）

236. ラットにおける学習課題遂行時脳内モノアミン変動の*in vivo* dialysis法による検討 …… 498
堀　耕治、入野誠郎*、田中淳一、田中早苗、野村正彦、久保浩一*、濱口勝彦*
（埼玉医大・第一生理、*神経内科）

237. フェンサイクリジンの脳内アミノ酸への影響 …… 500
米沢裕次、松本　孝、堤　哲之、中村　薫、平野　誠、本藤久雄、橋本喜次郎、
内村英幸、中原辰雄*
（情動行動障害センター・国立肥前療養所、*九州大・理・化学）

238. ロイシンによるチロシン過剰毒性の軽減作用
——血液・脳・網膜中アミノ酸濃度とモノアミン代謝—— …… 502
横越英彦、堀江健二、守田昭仁（静岡県立大・食品栄養・栄養化学）

239. LHRHの海馬神経伝達物質遊離に与える影響 —*in vivo* dialysis実験 …… 504
下山政憲、三好理絵*、鬼頭昭三（放送大、*東京女子医大）

240. ガングリオシド治療後に発症した筋萎縮性側索硬化症様の神経障害 …… 506
結城伸泰、佐藤修三、杉山和彦*、片桐　忠*、佐々木英夫*、宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科、*山形大・医・第三内科）

241. グリアの細胞体を認識するモノクローナル抗体3C4について …… 508
吉村和法、北村邦男、野村正彦（埼玉医大・医・第一生理）

242. V-1タンパク質の組織分布と小脳形態形成過程での発現様式 …… 510
田岡万悟、礒部俊明、奥山典生、渡辺雅彦*1、近藤尚武*1、桑野良三*2、森井　研*2、
宋　時栄*3、山国　徹*3
（都立大・理・化学、*1東北大・医・解剖、*2新潟大・遺伝子実験施設、
*3三菱化成生命研）

243. 一部の神経核に強く発現するコンドロイチン硫酸プロテオグリカン …… 512
前田信明、松井ふみ子、大平敦彦（愛知県コロニー研・発生）

244. 選択的海馬サーキット障害後に見られる神経細胞機能の可塑性：カルシニューリン免疫組織染色からのアプローチ…… 514
山崎靖人、小野寺宏、足立一男*、小豆原秀貴、松尾嘉之、小暮久也
（東北大・医・神経内科、*カナダ・シンファー研究所）

245. 神経細胞特異タンパク質14KDの脳組織および細胞内分布と成長分化における含量変化について…… 516
柴山敏子、岡橋育子、浜登希子*3、小俣久美子、中条茂男、落合英彦*2、
中井康光*2、佐藤和恵*1、中谷一泰、中村泰治
（昭和大・薬・生物化学、*1分析センター、*2医・第一解剖、
*3三菱化成生命研・脳神経科学）

246. ラット中枢神経系におけるサブスタンスP結合蛋白質の免疫組織化学…… 518
野村哲也、稲垣　忍、仲田義啓*、高木　宏
（大阪市大・医・第一解剖、*広島大・医・薬効解析）

247. ヒトS100蛋白α，β鎖遺伝子の構造と染色体局在 …… 520
森井　研、高橋康夫*1、蓑島伸生*2、福山隆一*2、清水信義*2、桑野良三
（新潟大・遺伝子実験施設、*1脳研・神経薬理、*2慶応大・医・分子生物）

248. N_2O鎮痛の発現機序におけるsubstance Pおよびnoradrenaline系神経の関与…… 522
石川敏三、重冨美智男、田和聖子、山本智久、前川剛志、坂部武史
（山口大・医・麻酔蘇生）

249. 脳虚血によるCA1遅延細胞死に先行するclathrinの変化（II） …… 524
吉見建二*、岩田宜芳*、工藤　喬、武田雅俊、中村　祐、西村　健
（大阪大・医・精神神経、*三共・中枢神経研）

250. 高血圧自然発症ラット（SHR）を用いた脳虚血モデルの慢性期における脳内アセチルコリン系各種パラメーターの変化…… 526
羽場久美子*1、小川紀雄*1、水川公直*2、田中健一*1、浅沼幹人*1、平田　洋*1,3、
森　昭胤*1　（*1岡山大・医・脳研・機能生化、*2第一解剖、*3第三内科）

251. 一過性前脳虚血に伴う海馬NT-3転写産物の減少 …… 528
武田　篤、小野寺宏、山崎靖人、小暮久也（東北大・医・脳疾患研・神経内科）

252. ラット黒質刺激による線条体脳血流の変化とドーパミン系神経伝達物質との関連
——レーザードップラー血流計とマイクロダイヤリシス法による測定——…… 530
和田博夫、飯島　節、折茂　肇、井藤英喜*1、佐藤昭夫*2
（東京大・医・老年病学、*1都老人医療センター、*2都老人研）

253. 脳微小血管内皮細胞による組織型plasminogen activatorの産生について …… 532
森本　正、石崎泰樹*1、吉本智信、杉原英光*2、佐々木富男、高倉公朋、室田誠逸*1
（東京大・医・脳神経外科、*1東京医歯大・顎研機能、*2日本化薬総合研究所）

254. 一過性前脳虚血および虚血耐性現象発現におけるMn-SOD, Cu, Zn-SODの動態…… 534
大槻俊輔、松本昌泰、鈴木敬一郎*1、多賀谷昌史、秦　龍二、小川　智、和中明生、
上田周一、半田伸夫、木村和文*2、谷口直之*1、鎌田武信
（大阪大・医・第一内科、*1生化、*2バイオ研核）

255. 興奮性アミノ酸レセプター結合の脳虚血による変化…… 536
鈴木竹雄、荻田喜代一、田中祥裕*、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理、*住友製薬研究所）

256. 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)とカルシニューリン(CaN)の脳虚血後における変化…… 538
森岡基浩、福永浩司*、永廣信治、生塩之敬、宮本英七*
（熊本大・医・脳神経外科、*第一薬理）

1　NMDA認識部位への[^{3}H]CGP 39653結合の性質

荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕

ラット脳におけるN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプター複合体上のNMDA認識部位の解析を目的として、新規競合的NMDAアンタゴニストであるD,L-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentenoate(CGP 39653)の放射性化合物を用いた結合実験を行った。脳シナプス膜への本結合は、膜標品を低濃度のTriton X-100で前処理をすることにより約2倍に増加した。また本結合は、反応開始後60分間で平衡状態に到達し、非放射性グルタミン酸(Glu)の添加により速やかに解離した。反応速度論的解析により、本結合の解離定数(Kd値)は3.6 nMであることが判明した。本結合は、NMDAアゴニストおよび競合的NMDAアンタゴニストによりほぼ完全に阻害されるばかりでなく、グリシン(Gly)、D-セリン(D-Ser)およびD-アラニン(D-Ala)により部分的阻害を受けた。これらのGly認識部位(GlyB部位)アゴニストによる本結合の阻害作用は、種々のGlyBアンタゴニストにより拮抗された。以上の結果より、[^{3}H]CGP 39653はNMDAレセプター複合体上のNMDA認識部位の標識に極めて有用であることが明らかとなった。さらにNMDA認識部位は、GlyB部位と機能的連関を有する可能性が示唆される。

哺乳動物中枢神経系の興奮性アミノ酸レセプターのサブタイプの一つであるNMDAレセプターは、カチオンチャネル部位、NMDA認識部位、GlyB部位およびポリアミン部位の少なくとも4種類のサブコンポーネントから構成される複合体であると理解されている(5)。これらの中でNMDA認識部位は、従来[^{3}H]Glu(2)および[^{3}H](±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonate(CPP)(4)を用いて標識されている。この[^{3}H]Glu結合および[^{3}H]-CPP結合は、そのアゴニストおよびアンタゴニストの感受性の相違から、それぞれアゴニスト型部位およびアンタゴニスト型部位を反映することが示唆される(3)。しかしながら、[^{3}H]CPPはその結合部位への親和性が低いばかりでなく、NMDA認識部位に対する選択性にも疑問が持たれる(1)。したがって本研究では、競合的アンタゴニストであるCGP 39653の放射性リガンドによるNMDA認識部位の標識を検討するとともに、本結合部位とNMDA感受性[^{3}H]Glu結合部位の性質を比較検討した。

〔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 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)で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。結合実験当日に膜標品を室温融解した後、0.08% Triton X-100を用いて2℃で30分間の前処理を行い、上記洗浄操作をさらに2回行った膜標品を結合実験に供した。[^{3}H]CGP 39653結合は、膜標品と2 nM [^{3}H]CGP 39653を氷水中で60分間反応させて測定した。またNMDA感受性[^{3}H]Glu結合の測定は、膜標品と10 nM [^{3}H]Gluを氷水中で10分間反応させて行った。反応停止は、いずれもWhatman GF/Bグラスフィルターを用いた迅速吸引濾過法により行った。また非特異的結合は、いずれも100 μM Glu存在下で測定した。

〔結果〕

Triton X-100で前処理した膜標品を用いた場合の[^{3}H]CGP 39653結合は、少なくとも200 μgまでは用いた蛋白質量に比例して増加した。その結合量は未処理膜標品を用いた場合の約2倍であった。したがって、以下の実験はTriton X-100前処理膜標品を用いた。本結合は反応時間依存性に増加し、反応開始後60分間で平衡状態に到達した。その時点で非放射性Glu(10^{-4} M)を添加することにより結合は速やかに解離した。この反応速度論的解析より、結合速度定数(K_{+1})、解離速度定数(K_{-1})およびKd値(K_{-1}/K_{+1})は、それぞれ0.038±0.006 $nM^{-1}\cdot min^{-1}$、0.126±0.002 min^{-1}および3.63±0.49 nMと算出させた。本結合はNMDAアゴニストのGlu、NMDAおよびN-メチル-L-アスパラギン酸(NMLA)ばかりでなく、NMDAアンタゴニストのCPP、D-2-amino-5-phosphonovalerate(D-AP5)およびD-2-amino-7-phosphonoheptanoate(D-AP7)により強力に阻害された。これらの阻害強度を[^{3}H]Glu結合の場合と比較したところ、[^{3}H]CGP 39653結合に対するNMDAアゴニストの阻害作用は、[^{3}H]Glu結合の場合よりも弱いのに対して、

表1. NMDAアゴニストおよびNMDAアンタゴニストの阻害作用

Drug	IC_{50} (μM)	
	[^{3}H]Glu	[^{3}H]CGP 39653
Glu	0.022±0.002	0.085±0.031
NMDA	1.95 ±0.31	2.82 ±0.21
NMLA	10.8 ±2.2	22.9 ±4.78
CPP	0.67 ±0.21	0.18 ±0.08
D-AP5	0.67 ±0.14	0.15 ±0.02
D-AP7	3.14 ±0.85	0.48 ±0.07

表2. GlyBアゴニストの影響

Drug (10^{-4} M)	% of control	
	[^{3}H]Glu	[^{3}H]CGP 39653
Gly	87.8±4.8	69.5±3.3**
D-Ser	95.6±5.1	68.3±1.9**
D-Ala	104.3±4.6	77.6±3.3*

表3. Glyの阻害に対するGlyBアンタゴニストの影響

Gly (M)	[^{3}H]CGP 39653 binding (% of control)			
	None	DCQX(10^{-4} M)	DCKA(10^{-4} M)	MNQX(10^{-4} M)
10^{-8}	97.4±1.3	99.4±0.7	101.6±2.1	102.4±1.4*
10^{-7}	89.8±1.1	97.4±3.1*	99.2±2.9*	97.6±4.6
10^{-6}	84.2±1.7	92.8±3.4*	95.1±0.9**	105.7±3.5**
10^{-5}	80.2±2.4	81.6±2.6	86.4±3.2	96.5±5.5*
10^{-4}	67.9±4.3	62.5±3.8	62.9±6.0	86.8±6.1*

NMDAアンタゴニストの阻害作用は[^{3}H]Glu結合より[^{3}H]CGP 39653結合に対する方が強力であった(表1)。Gly、D-SerおよびD-Alaは、[^{3}H]CGP 39653結合を10^{-7} M以上の濃度で有意に阻害したが、[^{3}H]Glu結合に対しては著変を与えなかった(表2)。このGlyの[^{3}H]CGP 39653結合阻害作用は、GlyBアンタゴニストの6,7-dichloroquinoxaline-2,3-dione(DCQX)、5,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione(MNQX)および5,7-dichlorokynurenate(DCKA)により有意に抑制された(表3)。

〔考察〕

[^{3}H]CGP 39653結合は、[^{3}H]Glu結合と比べてアゴニストの感受性が低いばかりでなく、アンタゴニストの感受性が高いことから、アンタゴニスト型NMDA認識部位を反映すると考えられる。また[^{3}H]CGP 39653結合は、従来報告されているNMDA認識部位のリガンドの中で最も高親和性であることが判明した。これらの事実は、[^{3}H]CGP 39653がアンタゴニスト型NMDA認識部位の標識に極めて有用なリガンドであることを示唆するものである。また[^{3}H]CGP 39653結合は、GlyBアゴニストにより部分的に阻害されるばかりでなく、その阻害がGlyBアンタゴニストにより拮抗されることおよび[^{3}H]Glu結合がGlyBアゴニストで著変を受けないことなどから、アンタゴニスト型NMDA認識部位がGlyB部位と機能的連関を持つ可能性が推察される。今後[^{3}H]CGP 39653と[^{3}H]Gluを併用することにより、アンタゴニスト型とアゴニスト型NMDA認識部位の機能的役割および他のサブコンポーネントとの間の機能的連関について解析を進めたい。

〔謝辞〕

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(02304045)の援助のもとに行った。また、本研究の遂行にあたり多大に貢献して頂いた左萍萍博士に深く感謝致します。

〔文献〕

1. Honore, T., Drejer, J., Nielsen, E.O., Watkins, J.C., Olverman, H.J. and Nielsen, M. (1989) Eur. J. Pharmacol. 172, 239-247.
2. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153, 510-517.
3. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1990) Brain Res. 515, 51-56.
4. Yoneda, Y., Ogita, K., Kouda, T. and Ogawa, Y. (1990) Biochem. Pharmacol. 39, 225-228.
5. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1991) Neurosci. Res. 10, 1-33.

2 興奮性アミノ酸レセプター結合のプロトンによる調節

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結合に対するプロトンの影響を検討した。N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプター複合体上のイオンチャネル部位を標識する[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合は、グルタミン酸(Glu)、グリシン(Gly)およびポリアミンの存在下では、pH 6からpH 8までは外液プロトン濃度の減少に伴って増加した。一方、NMDA認識部位への[^{3}H]Glu結合はプロトン濃度の低下に対してほとんど感受性を示さなかったが、NMDAアンタゴニストである[^{3}H](±)-3-(2-carboxypipe-razin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid(CPP)結合や[^{3}H]D,L-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentenoic acid(CGP 39653)結合はいずれもpHの上昇と共に増加してpH 8付近で最高値を示した。Gly認識部位(GlyB部位)への[^{3}H]Gly結合はpH 7.5付近までpH上昇につれて緩やかに増加したのに対して、Glyアンタゴニストの[^{3}H]5,7-dichloro-kynurenic acid(DCKA)結合はpHの上昇に伴って直線的に減少した。また、non-NMDAレセプターへの[^{3}H]α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA)結合はpH変化による影響を受けなかった。一方、kainic acid(KA)レセプターへの[^{3}H]KA結合はCa^{2+}イオン非存在下ではプロトン濃度変化に伴う影響を受けなかったが、Ca^{2+}イオン存在下の結合はpHの上昇に伴って減少した。以上の結果より、NMDAレセプター複合体の機能はプロトン濃度により負の調節を受ける可能性が示唆される。

興奮性アミノ酸レセプターのサブタイプの一つであるNMDAレセプターは、1)NMDA認識部位、2)Gly認識部位および3)ポリアミン部位の少なくとも3種類の正の活性調節部位と、①Mg^{2+}部位、②Zn^{2+}部位および③アロステリックアンタゴニスト部位の少なくとも3種類の負の調節部位から構成されるレセプターイオノフォア複合体である(5)。最近の電気生理学的研究において、培養小脳顆粒細胞(4)や海馬神経細胞(3)におけるNMDA誘発電流が細胞外プロトン濃度の上昇に伴って抑制されるが、細胞外プロトン濃度の低下に伴って増強されることが見いだされ、第4番目の抑制性調節部位としてプロトン部位の存在の可能性が提唱されている。本研究では、レセプター結合実験法を用いて興奮性アミノ酸レセプター結合に対するプロトン濃度変化の影響を検討した。

〔実験方法〕

ラット全脳よりシナプス膜標品を調製し、遠心分離操作により十分に洗浄したのち、-80℃で凍結保存した。これを結合実験当日、室温で融解して0.08% Triton X-100と2℃で30分間前処理し、遠心分離操作によりさらに洗浄した膜標品を実験に用いた(7)。本膜標品はpHの異なる50 mMトリス緩衝液(pH = 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9)中で、興奮性アミノ酸レセプターを標識する各種リガンドと反応させた。反応はWhatman GF/Bグラスフィルターを用いた吸引濾過法により停止した。

〔実験結果〕

反応時間30分の時点での[^{3}H]MK-801結合は、Glu単独存在下、Glu/Glyの共存下およびGlu/Gly/スペルミジン(SPD)共存下いずれの条件下においてもpHの上昇に伴って増加し、pH 8付近でいずれも最高値に到達した(図1)。これを各成分別に解析すると、Glu依存性結合はpH 6からpH 9の範囲内でpHの上昇に伴って増加するのに対して、Gly依存性結合はpHの上昇と共に増加してpH 7.5の時に最大となり、pH 9までほぼ一定の結合を示すことが判明した。また、SPD依存性結合はpH 7で最高値を示したが、以後pHの上昇と共に結合が逆に減少した。反応時間16時間(6)の場合にも[^{3}H]MK-801結合にはGly依存性結合を除いてほぼ同様の傾向が観察された。NMDA認識部位を標識する3種類のリガンドのうち、アゴニストの[^{3}H]Glu結合はpHの上昇によってほとんど影響されなかったが、アンタゴニストの[^{3}H]CPP結合や[^{3}H]CGP 39653結合はともにpH 8付近まではpHの上昇に伴って増加し、その後pH 9までは結合が逆に減少した(表1)。Gly認識部位の指標である[^{3}H]Gly結合はpH 7.5までpHの上昇に伴って緩やかに増加し、以後pH 9まではほぼ一定であったが、[^{3}H]DCKA結合はpHの上昇に伴って結合が逆に減少した(表2)。また、

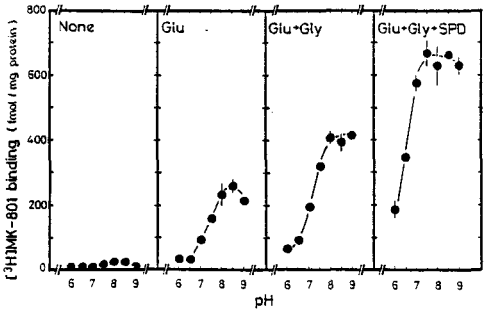


図1. [³H]MK-801結合に対するpHの影響

表1. NMDA認識部位への結合に対するpHの影響

pH	Binding (fmol/mg protein)		
	[³H]Glu	[³H]CPP	[³H]CGP 39653
6	678.7±124.1	29.4±11.6	77.8± 3.0
6.5	696.2±122.5	88.1± 8.0	247.8±10.7
7	652.9± 95.8	190.1±11.9	470.5±19.3
7.5	650.9± 95.5	234.1±14.8	627.1±34.0
8	643.7±122.0	282.9±10.5	635.2±27.3
8.5	646.1± 98.1	238.1±17.7	607.5±28.7
9	545.4± 72.1	184.9±16.3	472.0±19.2

表2. グリシン部位への結合に対するpHの影響

pH	Binding (fmol/mg protein)	
	[³H]Gly	[³H]DCKA
6	83.4± 6.5	1411.5±58.2
6.5	129.4±22.1	1238.6±64.3
7	165.9±13.7	1187.4±57.8
7.5	182.7±12.8	1078.1±69.0
8	163.1± 9.0	925.0±56.0
8.5	175.9±14.8	880.4±57.4
9	126.6±17.4	744.0±58.8

non-NMDAレセプターへの[³H]AMPA結合はSCN^-イオンの存在にかかわらずpHの影響を受けなかった。一方、[³H]KA結合はCa^{2+}イオンが存在しない場合にはpHの変化による影響をほとんど受けなかったが、Ca^{2+}イオンが存在するとpH 7からpH 9の範囲でpHの上昇に従って結合が減少した。

〔考察〕

本研究で得られた結果は、電気生理学的研究において報告されたNMDAレセプターのプロトンによる負の活性調節の可能性を支持するものである。また、NMDA認識部位は脳内分布(1)や薬物感受性(2)などの相違によりアゴニスト選択型とアンタゴニスト選択型に分類できる可能性が示唆されているが、[³H]Glu結合と[³H]CPP結合、あるいは[³H]CGP 39653結合のpH感受性の相違はこの選択型の相違性を反映するものと思われる。さらに、[³H]Gly結合と[³H]DCKA結合のpH感受性が異なる事実は、Gly認識部位にもアゴニスト選択型とアンタゴニスト選択型が存在する可能性を示唆するのかもしれない(8)。一方、電気生理学的研究においてはほとんどプロトンによる調節を受けないとされるnon-NMDAレセプターの中でも、[³H]KA結合がCa^{2+}イオンの存在下にプロトンにより阻害される事実から推察して、プロトンが低親和性[³H]KA結合部位の出現に関与する可能性が考えられる。しかしながら、これら興奮性アミノ酸レセプター結合のpH変化による変動はリガンド自身の荷電状態変化や、あるいは親和力の変化などに起因する可能性も否定できないので、今後慎重に対応する必要があろう。

〔謝辞〕

本研究の一部は、平成2年度精神神経系薬物治療研究基金の援助のもとに行った。

〔文献〕

1. Monaghan, D.T., Olverman, H.J., Nguyen, L., Watkins, J.C. and Cotman, C.W. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 9836-9840.
2. Ogita, K., Kouda, T., Suzuki, T., Ohkawara, A., Enomoto, R., Nabeshima, T. and Yoneda, Y. (1991) Neurochem. Int., 18, 55-62.
3. Tang, C.-M., Dichter, M. and Morad, M. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 6445-6449.
4. Traynelis, S.F. and Cull-Candy, S.G. (1990) Nature, 345, 347-350.
5. 米田幸雄, 榎本理世 (1991) 脳と精神の医学, 印刷中
6. Yoneda, Y., Ogita, K. and Enomoto, R. (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther., 256, 1161-1172.
7. Yoneda, Y., Ogita, K., Suzuki, T., Enomoto, R. and Zuo, P.P. (1991) Neurosci. Res., 9, 114-125.
8. Yoneda, Y. and Suzuki, T. (1991) Drug New & Perspectives, in press.

3 [^{3}H] 5, 7-ジクロロキヌレン酸による グリシン認識部位の標識

鈴木竹雄、荻田喜代一、米田幸雄
(摂南大・薬・薬理)

〔要約〕

ラット脳シナプス膜標品中には[^{3}H] 5, 7-dichlorokynurenate (DCKA)結合が検出されたが、シナプス膜標品の低濃度Triton X-100前処理によりその特異的結合は著明に増加した。Triton X-100前処理シナプス膜標品への本結合は、蛋白依存性、反応時間依存性、反応温度逆依存性、可逆性、構造特異性、高親和性、および飽和性を示した。また、本結合はグリシン(Gly)、D-セリン(D-Ser)、6, 7-dichloroquinoxaline-2, 3-dione (DCQX)、7-クロロキヌレン酸(7-CIKYNA)などにより強力に阻害されたが、ストリキニーネには感受性を示さなかった。以上の結果より、ラット脳シナプス膜標品中の[^{3}H]DCKA結合は、ストリキニーネ非感受性Gly認識部位(GlyB部位)の標識に有用である可能性が示唆される。

中枢神経系内のGlyB部位は、その大部分がN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプターイオノフォア複合体上に存在すると考えられており(3, 7)、この部位の[^{3}H]Glyを用いた標識法については既に報告した(5)。一方、内因性トリプトファン代謝産物であるキヌレン酸は、GlyB部位に対するアンタゴニスト作用を有する。その誘導体であるDCKAは強力かつ選択的なGlyB部位のアンタゴニストであり(2)、[^{3}H]DCKAをリガンドとする結合実験に関する報告も出されている(1)。したがって本研究では、この新しいアンタゴニストであるDCKAとGlyの放射性化合物を用いたリガンド結合実験によりGlyB部位の性質について検討を加えた。

[実験方法]

ラット全脳から粗シナプス膜標品を調製後、本標品を40倍量の50 mMトリス酢酸緩衝液(pH7.4)による懸濁と、50,000g、30分間の遠心分離の組み合わせによる洗浄操作を3回行った。最終的に得られた沈渣は0.32 Mショ糖水溶液に懸濁状態で-80°Cで凍結保存した。使用時には室温融解後、膜標品を0.08% Triton X-100で2°C、10分間の前処理を行った。前処理後、前述の洗浄操作を2回行った標品を実験に供した。[^{3}H]DCKA結合実験は、シナプス膜標品(150-200μg蛋白)を10 nM [^{3}H]DCKAと2°C、10分間同緩衝液中で反応させて行った。反応はWhatman GF/Bグラスフィルターを用いた吸引濾過法で停止した。非特異的結合は1 mM Glyの存在下で測定した。

[実験結果]

Triton X-100で前処理をしない脳シナプス膜標品中にも[^{3}H]DCKA結合が検出されたが、その結合量は前処理した場合の約1/2であった。このTriton X-100前処理膜への[^{3}H]DCKA結合は、約250 μgまでは用いた蛋白質量に比例して直線的に増加した(図1)。本結合は反応温度に逆依存し、反応温度を2°Cから30°Cに上昇させると結合ほとんど検出されなかった(図2)。反応温度2°Cの場合には、反応開始後約10分で結合は平衡状態に到達したが、この時点で非放射性Gly(1 mM)を添加すると結合は急速に解離して10分以内に完全に消失した。GlyBアゴニストの中では、Gly、D-Serや1-aminocyclopropane carboxylate (ACPC)が強い結合阻害能を発揮したが、D-アラニン(D-Ala)の阻害作用はこれらに比べて弱かった。[IC_{50}値(μM)、Gly; 0.23±0.04, D-Ser; 0.22±0.08, ACPC; 0.32±0.07, D-Ala; 1.31±0.46]。GlyBアンタゴニストの中では、キヌレン酸誘導体の7-CIKYNAやDCKA、あるいはキノキサリン誘導体のDCQXや5, 7-dinitroquinoxaline-2, 3-dione (MNQX)が強力に本結合を阻害した[IC_{50}値(μM)、7-CIKYNA; 0.15±0.04, DCKA; 0.05±0.02, DCQX; 0.22±0.06, MNQX; 0.04±0.01]。ポリアミンのスペルミジン(SPD)、スペルミンあるいはbis-(3-amino)propylamineはいずれも[^{3}H]DCKA結合を抑制したが、これらのポリアミンは[^{3}H]Gly結合には著変を与えなかった。これとは対照的に、ポリアミンアンタゴニストと考えられるイフェンプロジルやSL 82.0715は[^{3}H]DCKA結合を増強したが、[^{3}H]Gly結合には著変を与えなかった。1 mM SPDの存在下の[^{3}H]DCKA結合に対するGlyBアゴニストおよびアンタゴニストの阻害作用を検討したところ、アゴニストのIC_{50}値(Gly;0.32±0.02 μM, D-Ser; 0.37±0.13, ACPC; 0.34±0.08, D-Ala; 1.64±0.51)には変化が認められなかったが、アンタゴニストのIC_{50}値(7-CIKYNA; 0.51±0.12 μM, DCKA; 0.21±0.06, DCQX; 0.69±0.17, NNQX;

図1. 蛋白量依存性

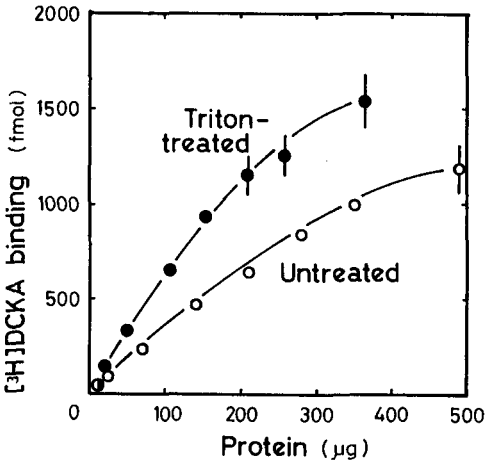
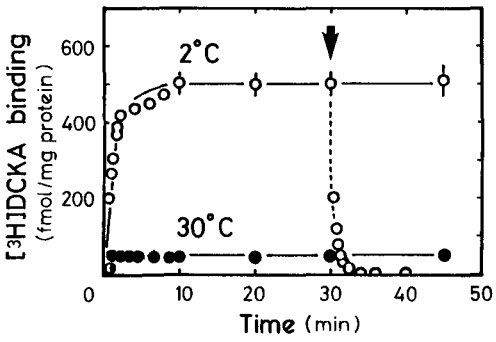


図2. 反応時間および反応温度の影響



0.22±0.01)は 1 mM SPDの添加により有意に増大した。

[考察]

本研究により、ラット脳シナプス膜中には蛋白依存性、反応時間依存性、反応温度逆依存性、可逆性、構造特異性、高親和性および飽和性を示す[^{3}H]DCKA結合部位が存在することが明らかとなった。7-CIKYNAやDCQXなどのGlyBアンタゴニストは小脳より海馬の[^{3}H]Gly結合をより強力に阻害すること(4)や、本研究で観察されたようにポリアミンやそのアンタゴニストの効果が[^{3}H]Gly結合と[^{3}H]DCKA結合では全く異なって出現することなどから、GlyB部位にもアゴニスト選択型とアンタゴニスト選択型が存在する可能性が示唆される(6)。また、[^{3}H]DCKA結合は高濃度のポリアミンによっても完全には阻害されないので、本結合部位にはポリアミン感受性および非感受性部位が存在するものと思われる。さらに、SPDはGlyBアゴニストの結合阻害作用に著変を与えることなく、アンタゴニストの結合阻害作用を有意に減弱させるという事実は、ポリアミンがGlyB部位のアゴニスト選択型には影響を与えずにアンタゴニスト選択型のみを減少させる働きを持つ可能性が推察される。今後、[^{3}H]Glyと[^{3}H]DCKAを併用することにより、アゴニスト選択型およびアンタゴニスト選択型の両GlyB部位の解析を進めたい。

[謝辞]

本研究の一部は、学校法人大阪工大摂南大学中央研究所一般助成金(91-815)の援助のもとに行った。

[文献]

1. Baron, B.M., Siegel, B.W., Slone, A.L., Harrison, B.L., Palfreyman, M.G. and Hurt, S.D. (1991) Eur. J. Pharmacol., 206, 149-154.
2. McNamara, D., Smith, E.C.R., Calligaro, D.O., O'Malley, P.J., McQuaid, L.A. and Dingledine, R. (1990) Neurosci. Lett., 120, 17-20.
3. Ogita, K., Suzuki, T. and Yoneda, Y. (1989) Neuropharmacol., 28, 1263-1270.
4. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther., in press.
5. 米田幸雄、荻田喜代一、鈴木竹雄 (1988) 神経化学、27(1), 406-407.
6. Yoneda, Y. and Suzuki, T. (1991) Drug News & Perspectives, in press.
7. Yoneda, Y., Suzuki, T. and Ogita, K. (1990) J. Neurochem., 55, 237-244.

4 大脳皮質内GABA作働性神経よりの[^{3}H]GABA放出調節機構について

橋本恒一、朱　和、桂　昌司、栗山欣弥

（京都府立医大・薬理）

〔要約〕 大脳皮質内γ－アミノ酪酸(GABA)作働性神経におけるGABAの放出に関する前シナプス性の調節機構について、大脳皮質切片からの高K^+(50 mM)誘発性の[^{3}H]GABAの放出を指標として検討を加えた。$GABA_A$受容体の作働薬であるムシモールは、大脳皮質切片からの[^{3}H]GABAの放出を用量依存的に抑制し、この効果は$GABA_A$受容体の拮抗薬であるビククリンによって拮抗された。しかしながら、$GABA_B$ 受容体作働薬のバクロフェン(1 mM)の添加は、刺激性の[^{3}H]GABAの放出に全く影響を及ぼさなかった。一方、ノルエピネフリン、イソプロテレノール、ドーパミン、セロトニン、ヒスタミンおよびグルタミン酸は、大脳皮質切片よりの[^{3}H]GABAの放出に影響を及ぼさなかったが、ムスカリン受容体の作働薬であるカルバコールは[^{3}H]GABAの放出を有意に抑制した。このカルバコールによる K^+誘発性[^{3}H]GABAの放出の抑制は、ムスカリン受容体の拮抗薬であるアトロピンおよびM_1受容体拮抗薬であるピレンゼピンにより有意に阻止された。以上の結果より、大脳皮質内GABA作働性神経からのGABA放出は、$GABA_A$受容体およびムスカリン性M_1受容体により抑制的な調節を受けているものと考えられる。

［目的］γ－アミノ酪酸(GABA)は、中枢神経系において主要な抑制性の神経伝達物質として作用している。一方、神経終末からの神経伝達物質の放出は、神経終末に存在し、その神経に含有される伝達物質により作働するオートレセプターと、他の神経伝達物質により活性化されるヘテロレセプターにより調節を受けていると考えられている。本研究では大脳皮質内GABA作働性神経よりのGABA放出の調節機構を明らかにする目的で、大脳皮質切片よりの高K^+刺激に伴う[^{3}H]GABAの放出を測定すると共に、GABA受容体の2種類の作働薬および各種神経伝達物質受容体作働薬を用いて、いづれの受容体がGABAの放出機構に関与するかを検討した。

［方法］Wistar系雄性ラットより得られた大脳皮質切片(300 μm)をKrebs-Ringer(KR)液中で25 °C, 15分間プレインキュベートしたのち、底にナイロンメッシュを付した小型プラスチック容器に移し、2 ml KR液中で100 μMアミノオキシ酢酸の存在下に、2 μM [^{3}H]GABAと25 °C, 90分間インキュベートした。5 mlの氷冷したKR液で3回洗浄した切片を、2分間隔で1 mlのKR液を含むバイアルに移行し、KR液中に放出される[^{3}H]GABAの量を測定した。高K^+(50 mM)の刺激は、自発性の放出が安定した16分の時点において、当モルのNaClとKClを置換したKR液中にて行い、KCl誘発により放出された[^{3}H]GABAの量をbasalの値と比較し、%increaseにより表示した。なお各薬物は放出実験に用いたKR液中に添加した。

［結果］1．GABA受容体作働薬の影響：$GABA_A$受容体の作働薬であるムシモール(0.1mM)の添加により、大脳皮質切片よりの高K^+誘発性の[^{3}H]GABAの放出は有意な低下を示した。しかしながら、$GABA_B$受容体の作働薬であるバクロフェン(1 mM)は、高K^+誘発性の[^{3}H]GABAの放出に影響を及ぼさなかった(Fig. 1)。またムシモールによる[^{3}H]GABAの放出の抑制は用量依存的であり、そのIC50値は約1.7×10^{-4} Mであった。さらに、$GABA_A$受容体の拮抗薬であるビククリンの同時添加により、ムシモールによる[^{3}H]GABA放出の抑制は、有意な回復を示した(Fig.2)。

2．他の神経伝達物質受容体作働薬の影響：神経伝達物質受容体作働薬のうち、ノルエピネフリン(NE)，イソプロテレノール(ISP)，ドーパミン(DA)，セロトニン(5-HT)，およびグルタミン酸(Glu)は、大脳皮質切片よりの高K^+誘発性の[^{3}H]GABA放出に影響を及ぼさなかったが、ムスカリン受容体の作働薬であるカルバコール(Carb)により[^{3}H]GABAの放出が有意に抑制された(Fig.3)。このCarbによる[^{3}H]GABA放出の抑制は、用量依存的であり、ムスカリン受容体拮抗薬のアトロピンの添加により有意な回復を示した。さらにM_1～M_3受容体拮抗薬のうち、M_1受容体拮抗薬ピレンゼピンにより、Carb誘発性の[^{3}H]GABA放出の抑制が拮抗された。しかしながら、M_2受容体拮抗薬のAF-DX 116およびM_3受容体拮抗薬の4-DAMPは、Carbによる[^{3}H]GABAの放出抑制に影響を及ぼさなかった(Fig.4)。

［考察］大脳皮質のGABA作働性神経におけるGABA放出機構について、大脳皮質切片よりの高K^+誘発性の[^{3}H]GABAの放出を測定することにより検討を加えた。まず、オートレセプターの面から2種類のGABA受容体の作働薬を用いて検討したところ、$GABA_A$受容体作働薬のムシモールにより[^{3}H]GABAの放出が抑制され、さらに$GABA_A$受容体拮抗薬ビククリンによってムシモールによる[^{3}H]GABA放出の抑制が阻止された。しかしながら、$GABA_B$受容体の作働薬であるバクロフェンは[^{3}H]GABAの放出に影響を及ぼさなかった。GABA作働性神経終末におけるオートレセプターに関しては、$GABA_A$受容体のアゴニストであるムシモール[1]やδ－アミノレブリン酸[2]によりGABAの放出が抑制されるとの報告があると同時に、$GABA_B$受容体のアゴニストであるバクロフェン[3,4]によっても GABA放出が抑制されるとの報告がある。これらの報告の相違に関しては不明な点が多いが、脳内部位による違いなどが考えられる。また$GABA_B$受容体については、親和性の高い拮抗薬が開発されていないことが、これらの研究の妨げになっていると思われる。今回我々が行った実験の結果からは、大脳皮質におけるGABA作働性神経におけるオートレセプターは$GABA_A$受容体であると考えられる。

次に他の神経伝達物質によるGABA放出の調節機構に関して検討したところ、ムスカリン受容体の作働薬であるCarbのみが高K^+誘発性の[^{3}H]GABAの放出を有意に抑制し、ムスカリン受容体拮抗薬アトロピンによって、この抑制は阻止された。さらにムスカリン受容体をM_1～M_3のサブタイプに分類して検討したところ、M_1受容体拮抗薬ピレンゼピンによってのみCarbによる[^{3}H]GABA放出の抑制が拮抗された。

以上の結果より、大脳皮質におけるGABA作働性神経よりのGABAの放出は、オートレセプターとして$GABA_A$受容体、またヘテロレセプターとしてムスカリン受容体のうちM_1受容体により、それぞれ抑制的な調節を受けていると考えられる。

［文献］

1. Kuriyama, K. et al. (1984) J. Neurochem. 42, 943-950
2. Brennan, M.J.W. and Cantrill, R.C. (1979) Nature 280, 514-515
3. Anderson, R.A. and Mitchell, R. (1985) Eur. J. Pharmacol. 118, 355-358
4. Limberger, N. et al. (1986) J. Neurochem. 46, 1109-1117

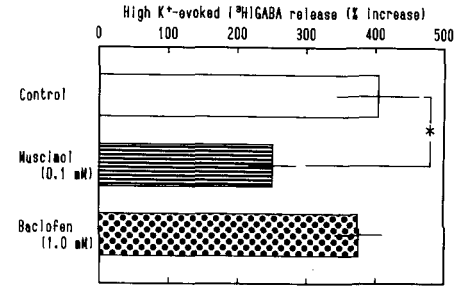


Fig. 1 Effects of muscimol and baclofen on high K^+-evoked release of [^{3}H]GABA from cerebral cortical slices

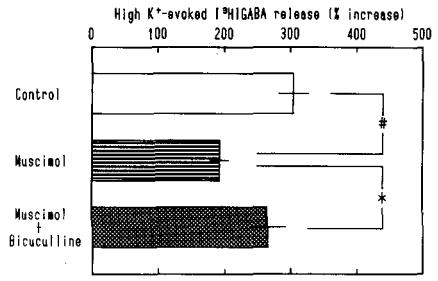


Fig. 2 Effect of bicuculline on muscimol-induced suppression of high K^+-evoked release of [^{3}H]GABA from cerebral cortical slices

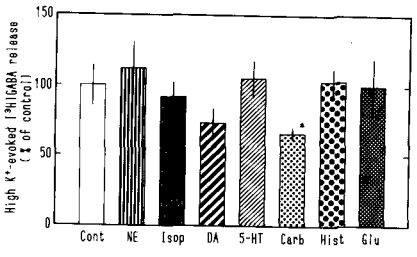


Fig. 3 Effect of various agonists on high K^+-evoked release of [^{3}H]GABA from cerebral cortical slices

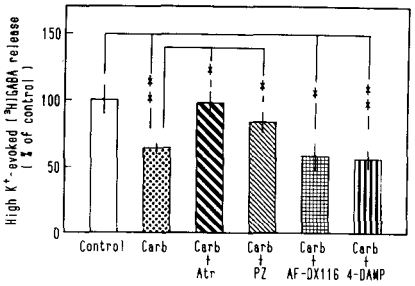


Fig. 4 Effect of muscarinic antagonists on carbachol-induced suppression of high K^+-evoked release of [^{3}H]GABA from cerebral cortical slices

5　卵母細胞再構成系におけるボツリヌス毒素 C3 酵素のセロトニン（5-HT1C）受容体応答抑制効果

中村順司、東田道久、成宮周*、野村靖幸
（北大・薬・薬効、　*京大・医・薬理）

【要約】

低分子量G蛋白質の情報伝達機構への関与を解明するため、ラット脳 mRNA移入ツメガエル卵母細胞におけるセロトニン（5-HT）電流応答へのボツリヌス毒素の効果について検討を加えた。5-HT による内向き電流応答は、BTX-D により抑制されたが、BTX-A は無効であった。BTX-D 処置は、IP_3、および Ca^{2+} 誘発電流には無効であった。BTX-D には ADP リボシル化酵素 BTX-C_3 が含まれていることが示唆されているので、BTX-C_3 の効果について検討したところ、濃度依存的に 5-HT 電流応答を抑制した。この抑制効果は、抗 BTX-C_3 抗体の前処置によって減弱した。一方、BTX-C_3 は卵母細胞膜上の分子量 23 kDa の蛋白質を ADP リボシル化したが、この作用も抗 BTX-C_3 抗体処置により減弱した。このことから 5-HT 受容体刺激による PI 代謝亢進に BTX-C_3 感受性低分子量G蛋白質が関与することが示唆された。

【緒言】

PI 代謝には、G蛋白質が関与していることが示唆されて久しいが、PI 代謝は百日咳毒素（PTX）で抑制されるとする報告と、されないとする報告が見られ、また、最近では低分子量G蛋白質の関与が示唆されるなど、現在に至るまで、そのG蛋白質の実体については依然として明らかにされていない。ツメガエル卵母細胞にラット脳 m RNA を移入すると、5-HT_{1C} 受容体を発現し、PI 代謝を介した 内向き電流を生じることが報告されており、我々は、以前にこの 5-HT 電流応答は、百日咳毒素（PTX）によって抑制されることを示したが、その作用は弱く、また高濃度の PTX を必要とした（1）。そこで、今回、低分子量G蛋白質の PI 代謝への関与を検討するため、BTX-C_3 毒素による 5-HT 電流応答抑制効果と、細胞膜 ADP リボシル化効果について検討した。

【方法】

ツメガエル卵母細胞を用いた 5-HT 電流応答測定：アフリカツメガエルより卵巣を摘出し collagenase 処理（1 mg/ml, 30 min）によってろ胞細胞を除去した卵母細胞にラット全脳より CsCl 法により抽出した total RNA（5 mg/mg）を 50 nl ずつ注入、modified Barth's solution (MBS) 中、22 °C で静置し、2 - 3 日後に電気生理学的測定を -60 mV 電圧固定下で行った。5-HT（1 μM）は 1 分間の外液灌流により適用し、BTX-C_3 処理は測定前に 3 時間インキュベートすることにより行った。卵母細胞膜の調製：ツメガエルより抽出した卵巣を buffer 中ポリトロンで破砕し、105,000 X g で 4°C, 60 分間遠心した沈澱を buffer で再懸濁後、1,000 X g, 4°C , 10 分間遠心して上清を取り、10,000 X g で 4 °C, 20 分間 2 度遠心洗浄して、得られた沈澱を膜画分とした。細胞膜 ADP リボシル化：卵母細胞膜画分を [^{32}P] NAD および BTX-C_3 を含んだ buffer 中 30 °C, 60 分間インキュベートした後、lysing buffer を添加して反応を停止し、15 % ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動後、オートラジオグラフィーにより ADP リボシル化蛋白質を検出した。

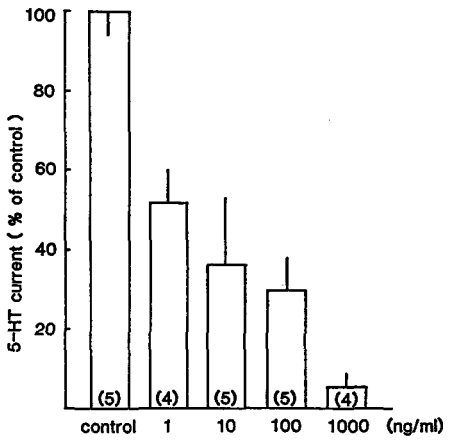


図 1 5-HT 電流応答に対する BTX-C3 の効果

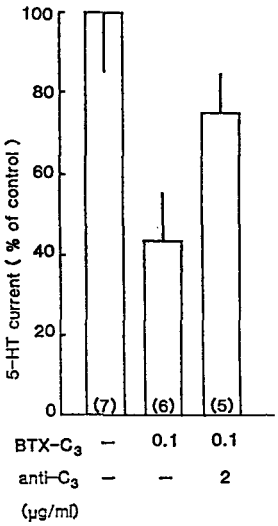
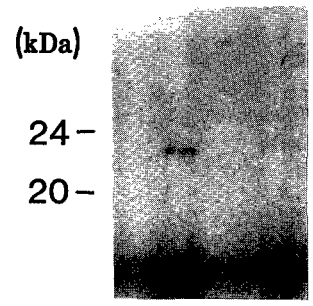


図 2 BTX-C_3 による 5-HT 電流応用抑制効果に対する抗 BTX-C_3 抗体の効果



1.control
2.BTX-C_3 (25ng/ tube)
3.抗 BTX-C_3 抗体 (500ng/ tube)
4.BTX-C_3 + 抗 C_3 抗体

図 3 BTX-C_3 による卵母細胞膜画分の ADP リボシル化と抗 BTX-C_3 抗体の抑制効果

【結果】

BTX-D 毒素は、2 μg/ml で有意な 5-HT 電流応答抑制効果を示したが、IP_3、および Ca^{2+} 誘発電流応答には無効であった。BTX-A 毒素は無効であった。BTX-D 型毒素中には、ADP リボシル化酵素 BTX-C_3 が含まれていることが示されているので、この BTX-C_3 の作用を検討したところ、BTX-C_3 は濃度依存的に 5-HT 誘起電流を抑制し、1 μg/ml ではほぼ完全に抑制した（図１）。100 ng/ml BTX-C_3 処置により 40 % にまで抑制された 5-HT 電流応答は、2 μg/ml の抗 BTX-C_3 抗体処置によって約 75 % にまで回復した（図２）。一方、BTX-C_3 は卵母細胞膜画分の約 23 KDa の蛋白質を ADP リボシル化した（図３）。この ADP リボシル化作用は、抗 BTX-C_3 抗体処置により消失した。

【考察】

卵母細胞膜上の 23 kDa の蛋白質を ADP リボシル化した BTX-C_3 酵素、ならびに、ADP リボシル化酵素を含んでいる BTX-D が 5-HT 電流応答を抑制し、一方、ADP リボシル化活性を有しない BTX-A は無効であったことより、リボシル化蛋白質が卵母細胞の PI 代謝に関与することが示唆された。このことは、抗 BTX-C_3 抗体による ADP リボシル化の抑制により 5-HT 電流応答抑制が消失したことからも支持される。また、BTX-D は IP_3 および Ca^{2+} による電流応答には無効であったことにより、その ADP リボシル化される蛋白質は、IP_3 生成以前の応答に関与しているものと思われる。低分子量Ｇ蛋白質の PI 代謝への関与としては Ha-ras 移入線維芽細胞における報告などがあるが (2)、ras は BTX によっては ADP リボシル化されないことから (3)、ras の関与は否定的である。一方、BTX で ADP リボシル化されるＧ蛋白質としては、3 種の rho や 2 種の rac などが報告されているが (3)、PI 代謝に関与する低分子量Ｇ蛋白質の同定、ならびに、その作用機序の詳細については現在検討中である。

【文献】

1) Nomura, Y., Kaneko, S., Kato, K., Yamagishi,S. and Sugiyama, H. (1987) Mol.Brain Res. 2, 113-123
2) Huang, M., Chida, K., Kamata, N., Nose, K., Kato, M., Honma, Y., Takenawa, T. and Kuroki, T. (1988) J.Biol.chem. 263, 17975-17980
3) 森井　成人，成宮　周 (1988) 実験医学 8, 1885-1889

6

グリシン受容体遺伝子発現の多様性

佐藤　康二※、藤田　昌宏、高辻　功一、遠山　正彌
（大阪大医・バイオ研神経解剖※、第二解剖）

[要約]
グリシン受容体のα_1,βサブユニットmRNAに対する相補的oligoDNA probeを作製し、ラット脳において、in situ hybridization法により、その発現の分布を検討した。また、免疫組織化学的にグリシン受容体の裏打ち蛋白と言われている93kd蛋白についても分布を検討した。その結果、α_1サブユニットは脊髄、下部脳幹に限局して分布し、大脳皮質、海馬、小脳等、では、検出されなかった。それに対してβサブユニット、93kd蛋白は、下部脳幹に限らず、中枢神経系に広く分布することが明らかとなった。これらの事からグリシン受容体は、単一ではなく、少なくとも上位脳においては、多様性を持った組合せによりその作用を発現している事が示唆された。

グリシン受容体は、中枢神経系に於て抑制伝達を司るとされており、成熟ラットに於ては、α_1サブユニット、βサブユニット、93kd蛋白により構成されると考えられている(1-3)。我々は、α_1,βサブユニットについては、in situ hybridization法により、及び93kd蛋白については、モノクロナールを用いた免疫組織化学法により、それぞれ脳内分布を明らかとし、３者の脳内分布について比較検討したので報告する。

[実験方法]
A) In Situ Hybridizationon 法
150gの雄性wistar系ラットをDiethyletherで麻酔後、断頭し、ただちにドライアイスで凍らせた後、クライオスタットにて15-20μmの厚さに切片を切り、シランコートしたスライドグラスにはりつけた。probeは、^{35}S-dATPにて、3'-end labelingを行い、ハイブリバッファーと混ぜ、スライドグラス上にて、24-48h, ハイブリダイゼーションをおこなった。4xSSC,1xSSCで洗浄後、脱水の上、乳剤をかけ、3-4w 後に現像、対比染色を行い、検鏡した。各サブユニットのoligo cDNA プローブは、それぞれ膜貫通部位３と４の間の48塩基対について相補的なものを作製した。

B) 免疫組織化学
150-200gの雄性wistar系ラットをネンブタールで麻酔後、4% パラホルムアルデヒド、0.05%グルタールアルデヒド、0.02%ピクリン酸を含む0.1M燐酸緩衝液で灌流固定後、切片を作製し、avidin-biotin peroxidase complex法にて可視化を行った。

[成績]
α_1サブユニットmRNA含有細胞は、対角帯、束傍核、少数の視床下部核群に散在するものを除き、大部分が下部脳幹に存在する。主な陽性部位は、三叉神経脊髄路核、三叉神経主知覚核、薄束核、楔状束核、蝸牛神経核、前庭神経核群、赤核、脚傍核、網様帯等、であった。
βサブユニットmRNA含有細胞は、下部脳幹はもちろん嗅球から脊髄まで広く分布し、特に大脳皮質、海馬、小脳プルキンエ細胞等に、強い陽性細胞がみられた。
93kd蛋白は、広く脳内に分布しており、下部脳幹に強い反応がみられたが、嗅球、大脳皮質、海馬,視床下部等、上位脳の広い範囲でも陽性反応が見られた。

[考察]
下位脳幹に於ける、α_1、βサブユニット、93kd蛋白の局在は極めて酷似する。例えば、図１A,Cは舌下神経核におけるα_1(C),β(A)サブユニットmRNA含有ニューロンを示すが、量の多少は在るがほとんどの運動ニューロンが両者を有する。このように下位脳幹においては、グリシン受容体は、α_1,βサブユニット及び、93kd蛋白を構成成分として共通に含む可能性が高い（図２A)。ところが、α_1サブユニットとβサブユニットや93kd蛋白の局在が大きく異なる部位が存在する、前脳と小脳である。図１B,Dは、各々、α_1(D),β(B)サブユニットmRNAの小脳内局在を示す。プルキンエ細胞は、βサブユ

ニットを含有するが、α_1サブユニットは含有しないと考えられる（図２B)。このことは、大脳皮質や、海馬でも同様である。もし、αサブユニット、βサブユニット、93kd蛋白の組合せがグリシン受容体の基本構築だと仮定すれば、上位脳において未知のαサブユニットが存在する可能性が考えられる。また、そうでないとすれば、βサブユニットと93kd蛋白のみで作用している可能性も考えられる。いずれにしろ、グリシン受容体は、単一の組合せではなく、多様性を持った組合せにより生体内でその作用を発現している可能性が示唆された。

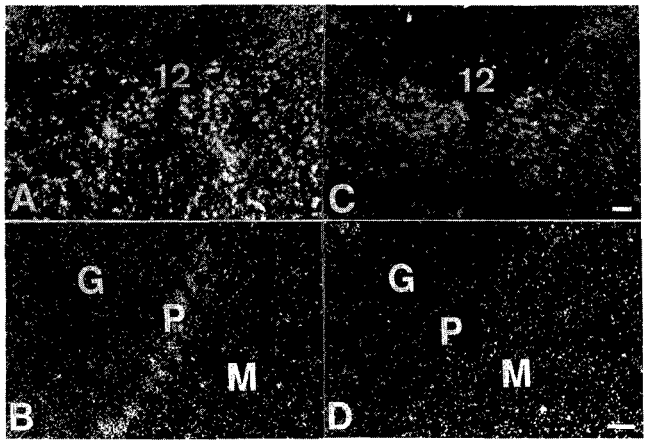


図１.

In Situ Hybridization 暗視野写真
A. 舌下神経核に於けるβサブユニット
B. 小脳に於けるβサブユニット
C. 舌下神経核に於けるα1サブユニット
D. 小脳に於けるα1サブユニット

12;舌下神経核、G;glomerular layer
P;Purkinje cell layer, M;molecular layer

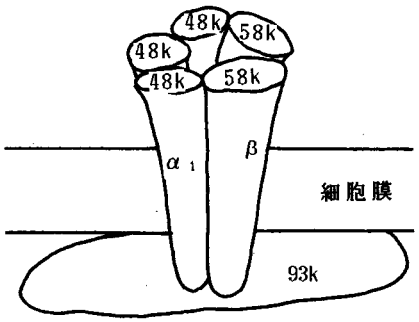


図２A. 舌下神経核におけるグリシン受容体

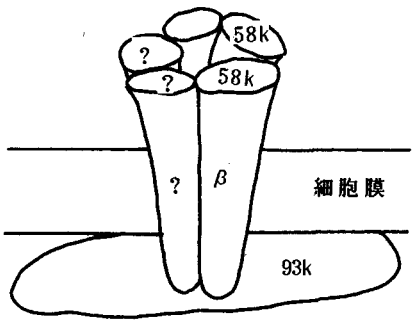


図２B. 小脳プルキンエ細胞におけるグリシン受容体

[文献]
1. Becker,C.M., Hoch,W., and Betz,H.(1989) J. Neurochem. 53,124-131
2. Grenningloh,G, Pribilla,I., Prior,P., Multhaup,G., Beyreuther,K., Taleb,O., and Betz,H. (1990) Neuron 4,963-970
3. Grenningloh,G., Rienitz,A., Schmitt,B., Methfessel,C., Zensen,M., Beyreuther,K., Gundelfinger,E.D. and Betz.H. (1987) Nature 328,215-220

7 NG108-15細胞におけるEgr-1mRNAの発現誘導

津田正明
（岡山大学・薬・微生物）

【要約】
シナプス伝達と遺伝子発現制御系との関連を探るために、NG108-15細胞にカルバコール、ノルアドレナリンなどのアゴニスト類、及び、ブラジキニンなどのペプチド類を加えて、最初期転写制御因子遺伝子Egr-1（あるいはzif/268, NGF-1A, Krox24と呼ばれる）の発現誘導を調べた。その結果、ムスカリン性レセプター、α-アドレナリンレセプター、及びブラジキニンレセプターを介して、Egr-1 mRNAの発現誘導が一過的に引き起こされることがわかった。カルバコールとノルアドレナリンによる発現誘導は、互いにレセプターの脱感作の影響を受け合った。一方、ブラジキニンによる発現誘導は両アゴニストによる脱感作の影響を受けなかった。実際、百日咳毒素に対する感受性が両アゴニストとブラジキニンでは異なっていた。これら薬剤の同時的投与あるいは時間差投与は、Egr-1 mRNAの発現誘導に対して相加的な効果を示した。このように、NG108-15細胞においては、Egr-1 mRNA発現誘導に対して少なくとも二つの情報伝達経路が働く可能性が強い。しかし、これら薬剤による発現誘導は、全てフォルスコリン投与で著しく抑制された。

【目的】
最近、学習・記憶のモデル系として知られる長期増強（long-term potentiation; LTP）において、Egr-1などの最初期転写制御因子遺伝子群（immediate early genes; IEGs）の一過的な発現誘導が引き起こされることが明らかになっている(1)。また、種々のけいれんを動物個体に与えると、IEGs mRNAの発現誘導が脳内に引き起こされる。これら事実は、シナプス伝達によって伝わった情報が核内の転写制御レベルにも伝わっていることを示している。そして、シナプス伝達に関連した遺伝子群、例えば、種々の神経伝達物質合成酵素やレセプター遺伝子群の発現が調節を受け、シナプス伝達効率の変化が生じる可能性が考えられる。この際の応答性は、神経細胞の分化と密接に関わっている。従って、神経細胞のシナプス伝達に対する遺伝的応答性を探ることは、シナプスの可塑性を理解する上でも重要と思われる。このような方向性からの解析を行うにあたって、培養神経細胞系において、神経伝達物質に対するレセプターを介してIEGs mRNAの発現を誘導できる解析系の確立が重要である。そこで、種々の神経伝達物質やニューロペプチドに対する応答性を有するNG108-15細胞に注目して検討を行った。

【方法】
マウスニューロブラストーマN18TG2 X ラットグリオーマC6BU-1融合細胞NG108-15の培養を開始して約12時間後に、種々のアゴニストおよびアンタゴニストを加え、時間毎に細胞を集める。細胞をTris-saline[25 mM Tris (pH7.4), 130 mM NaCl, 5 mMKCl]で洗い、Wilkinsonの方法(2)で細胞質RNAを抽出した。細胞質RNAをグリオキサールで処理した後、ノザン・ブロットハイブリダイゼーションを行った。プローブとしては、全長Egr-1 cDNAを含むプラスミドDNA(3)を用いた。

【結果】
カルバコール、ノルアドレナリン、ブラジキニンをそれぞれ10 μMの濃度で加えた所、1時間後に著しいEgr-1 mRNAの発現誘導が認められた。他のアセチルコリンのアゴニストであるアレコリンやベタネコールでも誘導は認められたが、ニコチンでは認められなかった。また、アドレナリンもノルアドレナリンと同程度に誘導を引き起こした。サブスタンスPは、誘導を引き起こさなかった。これら誘導は、アトロピンやフェントールアミンなどのアンタゴニストによって阻害されたが、α-ブンガロトキシンやプロプラノロールでは阻害を受けなかった。これら事実は、Egr-1 mRNAの発現誘導がムスカリン性レセプターおよびα-アドレナリンレセプターを介して引き起こされていることを示している。また、フォルボール・エステルであるTPA(12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate)投与も、Egr-1 mRNAの発現を誘導した。

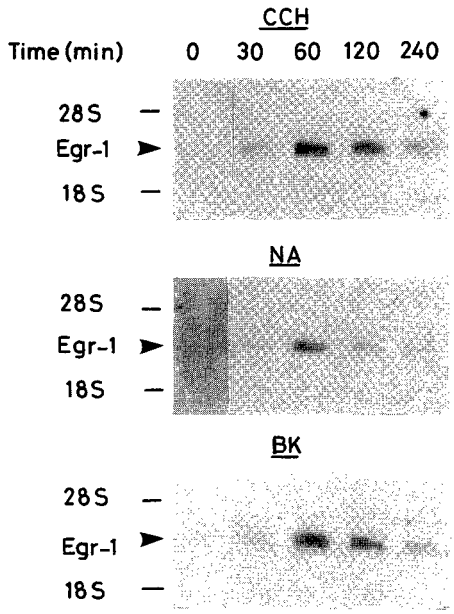


図1. Egr-1 mRNAの発現誘導
CCH(carbachol), NA(noradrenaline), BK(bradykinin)を各々10 μM加えて、Egr-1 mRNA発現の時間経過を追った。

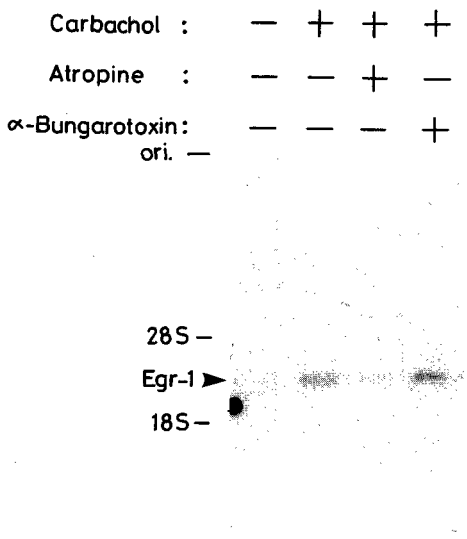


図2. Egr-1 mRNA発現誘導に対するアンタゴニストの影響
Carbachol 10 μMに対し、atropine, α-bungarotoxinを10 μM加え、1時間後にRNAを抽出した。

あらかじめカルバコールあるいはノルアドレナリンでEgr-1の誘導を引き起こしておいてさらにこれら薬剤を加えても、二次的な発現誘導は認められなかった。一方、ブラジキニンやTPAを加えた場合には誘導は認められた。この事実は、ムスカリン性レセプターとα-アドレナリンレセプターとの間に、異種脱感作の生じている可能性のあることをを示している。実際、百日咳毒素処理でこれら両薬剤によるEgr-1 mRNAの発現誘導は完全に抑えられた。一方、ブラジキニンによる誘導は、百日咳毒素処理で部分的にしか抑えられなかった。

カルバコール(100 μM)を加えて1時間以内にブラジキニンを加えると、それぞれの薬剤による個々の発現誘導パターンが認められ、その効果は相加的であった。また、ノルアドレナリンを同時に加えると、その効果も相加的であった。これら薬剤によるEgr-1 mRNAの発現誘導は、フォルスコリン(10 μM)投与で完全に抑えられた。また、ジブチリルcAMP投与でも抑制傾向は認められたが、プロスタグランジンE1投与では抑制は認められなかった。

【考察】

NG108-15細胞では、少なくとも、ムスカリン性レセプター、α-アドレナリンレセプター、及びブラジキニンレセプターを介してEgr-1 mRNAの発現誘導が引き起こされる。ムスカリン性レセプターとα-アドレナリンレセプターは、同種のGTP結合性蛋白質を使って情報を細胞内へ伝えている可能性がある。ブラジキニンは、これとは別の情報伝達経路でEgr-1 mRNAの発現誘導を引き起こしているらしい。また、時間差投与による入力は、発現誘導が引き起こされている最中でも、その効果は相加的にEgr-1 mRNA発現に表される。細胞内のcAMP濃度の急激な上昇は、Egr-1 mRNA発現誘導に対して抑制的に働くと思われる。

【参考文献】

1. Cole, A. J. et al. (1989) Nature 340, 474-476.
2. Wilkinson, M. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 10933.
3. Sukhatme, V. P. (1988) Cell 53, 37-43.

8 PC12細胞におけるNGF刺激にともなう活性型p21^{ras}·GTP量の増加と神経分化について

室屋賢康、服部成介、中村俊
国立精神神経センター神経研究所　診断研究部

［要旨］　*ras*遺伝子産物p21は結合したグアニンヌクレオチドにより活性が調節され、そのGTP/GDPのスイッチング機構を介して様々な増殖・分化因子からの情報を細胞内に伝達していることが明らかにされつつある。我々は、様々な因子でPC12細胞を刺激した後のp21に結合したヌクレオチドを解析することにより、それぞれの情報伝達経路におけるp21の役割を同定することを試みた。NGFとEGFではともに速やかにp21·GTPが形成され、その全p21に対する割合は、2分後に最大値（20%）に達したが、その後の経過には違いがみられ、NGFでは2時間後の時点でも8%のp21·GTPが観察されたのに対して、EGFでは1時間以内に刺激前の状態（2%以下）に戻るという対比を示した。一方、PC12細胞に対して分化を誘導することが知られているbFGF、IL-6、Bt$_2$cAMPはいずれも効果はなく、PMAもp21·GTPの形成を引き起こさなかった。さらに、興味あることに、プロテインキナーゼの阻害剤であり、NGFによる分化を特異的に抑制することが知られているK-252aはNGF刺激によるp21·GTPの形成をほぼ完全に阻害したのに対して、EGFによる応答には無効であった。このことは、NGFによるPC12細胞の分化にはp21·GTPの形成が必須であることを強く支持するとともに、NGFによるp21の活性化にK-252a感受性の特異的なプロテインキナーゼが関与していることを示している。

［目的］　PC12細胞はNGFの作用に応答して知覚・交感神経様の細胞に分化することが知られており、NGFによる神経分化を研究する上での格好のモデル系として広く用いられている。さらに、PC12細胞は、変異型*ras*$^{val\,12}$の強制発現により、NGFによるのとほぼ同様に分化することが明らかにされているが、この事実は、抗p21モノクローナル抗体のマイクロインジェクション、あるいはGDPに親和性のある変異型*ras*の強制発現によりNGFによる分化が抑制されるという報告とともにp21がNGFからの情報伝達経路上に位置し、分化に関して必須の役割を担っていることを示唆している。そこで、我々は、この点を生化学的手法を用いて、より直接的に示すことを第一の目標においた。第二に、PC12細胞に作用する様々な因子とp21の活性化の関連を明らかにすることにより、p21の活性化経路を特定することを試みた。

［方法］（細胞培養）　PC12細胞は10%ウシ胎児血清、5%ウマ血清を含むDMEM中で、5%CO_2、37°Cの条件下で培養した。（p21結合ヌクレオチドの解析）PC12細胞は、35mmディッシュに10^5 cells/cm^{2}の細胞密度で播種してから2日間培養したものを用いた。細胞をトリス緩衝液で2回、リン酸不含DMEMで1回洗った後、0.05 mCi/ml(1 mCi=37 MBq)の［^{32}P］正リン酸を含む1 mlのリン酸不含DMEM中で6時間ラベルした。ラベルした細胞を各因子で刺激した後、細胞抽出液を調製し、Satoh等の方法(5)に従い、抗p21抗体を使った免疫沈降によりp21に結合したヌクレオチドを解析した。薄層クロマトグラフィーで分離した各ヌクレオチドの放射活性はFUJIX画像解析システムを用いて定量化し、p21·GTPの割合は、計算式100xGTP(cpm)/[1.5xGDP(cmp)+GTP(cpm)](%)に従って算出した。

［結果・考察］　我々は、NGFによるp21の活性化を検討するために、PC12細胞を用い、p21に結合したグアニンヌクレオチドを解析した。その結果、p21に結合したGTPの割合はNGF濃度に依存して増加することが観察された（図1）。このことは、NGFからの情報伝達経路においてp21がNGF受容体の下流に位置していることを示している。

次に、p21の活性化がNGFに特異的であるか否かを明らかにする目的でPC12細胞に作用する様々な因子の効果を比較したところ、唯一EGFのみがNGFとほぼ同程度のp21·GTPの形成を誘起した（図2）。一方、分化を誘導することが知られているbFGF、IL-6、Bt$_2$cAMPはいずれも効果がなかった。従って、これらの因子はp21に依存しない経路で情報を伝達しているものと考えられる。

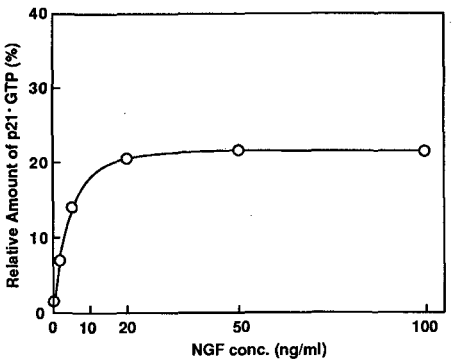


図1．p21·GTP形成のNGF濃度依存性
各濃度のNGFで2分間刺激した後、p21に結合したGDP/GTPを測定した。

特に、bFGF受容体はEGF受容体同様、チロシンキナーゼをコードした膜貫通型の受容体であることが明らかにされており、さらに、同様の構造をしたPDGF受容体が繊維芽細胞においてp21を活性化することから(4)、この結果は意外であった。bFGFのp21に及ぼす影響については、他の細胞系について同様の解析を行なうことなどを検討している。

PMAはT細胞においてp21を活性化することが報告されているが(1)、PC12細胞に対しては効果がなかった。Satoh等も肥満細胞系のIC2-E細胞でやはり効果がないことを見ている(5)。Cキナーゼのp21に対する効果は細胞により異なるものと考えられる。

EGFは、2分間の処理でNGFと同程度にp21を活性化するが、NGFとは異なりPC12細胞を分化を誘導しない。そこで、両者のp21·GTP形成に対する時間依存性を比較した（図3）。両者とも2分以内に速やかなp21·GTPの形成を誘起したが、その後の経過は著しく異なり、NGFでは2時間後の時点でも8%のp21·GTPが観察され、さらに18時間後にも7%のp21·GTPが見られたのに対し、EGFでは1時間以内に刺激前の状態（2%以下）に戻るという対比を示した。Gotoh等(2)は、PC12細胞において、NGFとEGFによるMAPキナーゼの活性化の時間依存性を調べているが、その結果は、今回我々の得たp21の活性化の時間依存性と極めてよく一致している。p21とMAPキナーゼに共通の活性調節機構が存在するか、あるいはMAPキナーゼがp21の活性化因子またはエフェクターである可能性が考えられる。

Koizumi等(3)はK-252aがPC12細胞においてNGFからの分化シグナルを特異的に阻害し、EGF、bFGF、Bt_2cAMPからのシグナルは阻害しないことを報告している。そこで、我々は、NGFとEGFによるp21の活性化に対するK-252aの効果を調べた（図4）。K-252aは50nMでNGFによるp21·GTPの形成をほぼ完全に阻害したが、EGFに対しては効果がなかった。この結果は、NGFによるp21の活性化にK-252a感受性の特異的なプロテインキナーゼが関与していることを示している。最近の報告によれば、NGFからの分化シグナルはチロシンキナーゼ活性をもつ*trk*遺伝子産物の活性化を引き金にして細胞内に伝達される。K-252aが*trk*遺伝子産物からp21までの経路上、どのプロテインキナーゼを阻害しているのかを明らかにすることは今後の課題である。

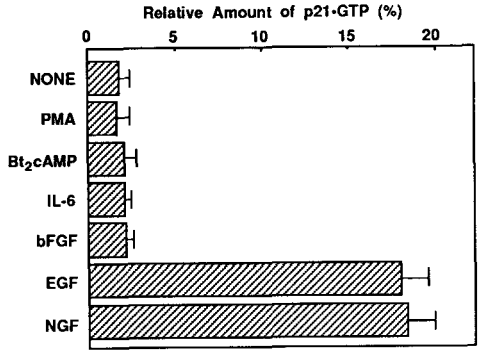


図2．各因子のp21·GTP形成に及ぼす効果
各因子で2分間刺激後、p21に結合したGDP/GTPを測定。各因子の濃度：PMA, 100 ng/ml; Bt_2cAMP, 1mM; IL-6, 25 ng/ml; bFGF, 25 ng/ml; EGF, 25 ng/ml; NGF, 50 ng/ml。

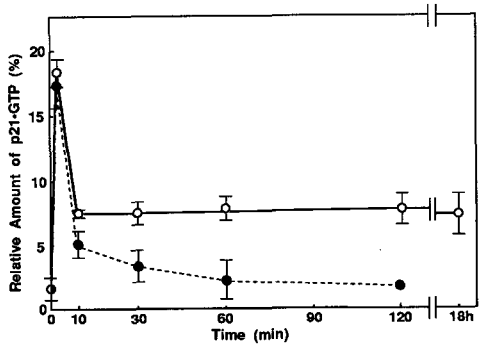


図3．NGF、EGF刺激によるp21·GTP形成の時間依存性
各時間50ng/mlNGF(—○—)、25ng/mlEGF(---●---)で刺激した後、p21に結合したGDP/GTPを測定した。

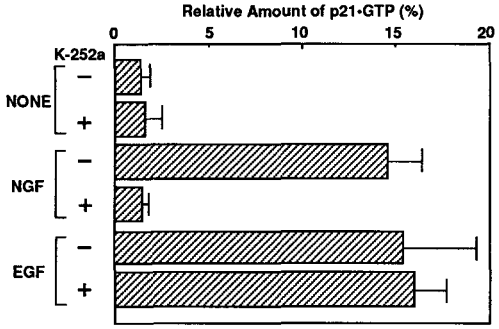


図4．NGF、EGF刺激によるp21·GTP形成に対するK-252aの阻害効果の比較。50nM K-252aで15分間前処理後 (十印) 50ng/ml NGF、25ng/ml EGFで2分間刺激した。

［文献］

1. Downward, J., Graves, J. D., Warne, P. H., Rayter, S. & Cantrell, D. A. (1990) Nature (London) 346, 719-723.
2. Gotoh, Y., Nishida, E., Yamashita, T., Hoshi, M., Kawakami, M. & Sakai, H. (1990) Eur. J. Biochem. 193, 661-669.
3. Koizumi, S., Contreras, M. L., Matsuda, Y., Hama, T., Lazarovici, P. & Gordon, G. (1988) J. Neurosci. 8, 715-721.
4. Satoh, T., Endo, M., Nakafuku, M., Nakamura, S. & Kaziro, Y. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5993-5997.
5. Satoh, T., Nakafuku, M., Miyajima, A. & Kaziro, Y. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3314-3318.

9 シナプス小胞蛋白synaptotagminを欠失したPC12細胞亜株の樹立と性質の解析

笠井陽子、小倉明彦、佐藤一紀、近藤俊三、藤本禎子、高橋正身
（三菱化成生命研）

〔要約〕synaptotagminは中枢およ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する糖蛋白で、神経伝達物質の放出に重要な役割を担っていると考えられている。私どもはsynaptotagminのN末端を認識する抗体を用いてPC12h細胞にキリングを行った後、単一細胞をクローニングしてsynaptotagmin欠失細胞亜株を分離した。異なる抗原認識部位を持つ三種の抗体によるイムノブロット解析でも欠失細胞にはsynaptotagminは検出されなかったが、カテコールアミンの合成能やNGF感受性などの性質に付いては親株細胞と欠失細胞で大きな差は認められなかった。この欠失細胞株はカテコールアミン分泌機能やその調節機能におけるsynaptotagminの役割を明らかにする上で有用と考えられる。

［序論］神経伝達物質の放出機構の特徴のひとつは分泌顆粒による量子放出である。これまでに分泌顆粒構成膜蛋白としてsynapsin、sypaptophysin、synaptotagmin、synaptobrevin、rab3などが同定され、それらの分子構造も明らかにされつつあるが分泌の分子機構は未だ明らかにはされていない。私共は先にヒヨコシナプス膜を免疫したマウスから得たモノクローナル抗体（mAb 1D12）の抗原蛋白（58kD蛋白）がシナプス小胞膜とシナプス前膜に局在していること、58kD蛋白がCキナーゼやカルモジュリンキナーゼIIによってリン酸化を受けること、その一部がN型Caチャンネルと考えられているωコノトキシン結合部位と結合していること等を明かにしてきた[1]。更にそのcDNAクローニングを行った結果、58kDタンパク質が synaptotagmin と同一であり、分子内にCキナーゼの機能調節ドメイン（C2ドメイン）と相同な繰り返し構造を持っていることを明かにした[2,3]。これらのことから58kD蛋白(synaptotagmin)が神経伝達物質放出やその調節に重要な働きをしているのではないかと考えている。

ラット副腎褐色細胞腫由来のPC12細胞はカテコールアミンを合成、貯蔵し、脱分極刺激によって放出できることから神経伝達物質の放出機構を研究する上で良いモデル系である。今回、伝達物質放出機構に於けるsynaptotagminの役割を明らかにするために、synaptotagminを欠失したPC12細胞亜株を分離しその性質を解析した。

［方法］ synaptagminには膜貫通ドメインが一ヶ所あり、N末端が分泌顆粒内部あるいは細胞膜上では細胞の外側にあることがわかっている。私どもはN末端のアミノ酸20残基を合成したペプチドを兎に免疫して得られた抗血清（NtAb）と、補体を用いてsynaptotagminを発現しているPC12h細胞のキリングを繰り返し、synaptotagmin欠失細胞の出現する割合を高めた。その後、 顕微鏡下でマイクロピペットを用いて単一細胞を拾い上げ、クローニングを行なった。

［結果及び考察］ 図1はキリングを10回繰り返した後のPC12h細胞を mAb 1D12で蛍光抗体染色したもので、mAb 1D12では染色されない細胞群が認められた。クローニングを行い、mAb 1D12で細胞が染色されないことを条件に三つのクローンを選別した。今回それらのうちの HaF7 を中心に解析を行った。まずsynaptotagminの発現をmAb 1D12を用いたイムノブロットで解析した結果が図2Aである。キリングの前の親株細胞（wild）から調製したライセイトで検出可能な蛋白量の100倍量に

相当する蛋白を用いても、HaF7では synaptotagmin は検出できなかった。この結果はHaF7において、たとえsynaptotagminがあったとしても親株細胞の１／１００以下であることを示している。図２Ｂはsynaptotagminの Ｎ末端部分に対する抗体 NtAb、図２Ｃは精製したsynaptotagminをマウスに免疫して得られたポリクローナル抗体でイムノブロット解析を行ったもので、mAb1D12とは異なる抗原認識部位を持った抗体を用いた場合にもHaF7ではsynaptotagminは検出されなかった。

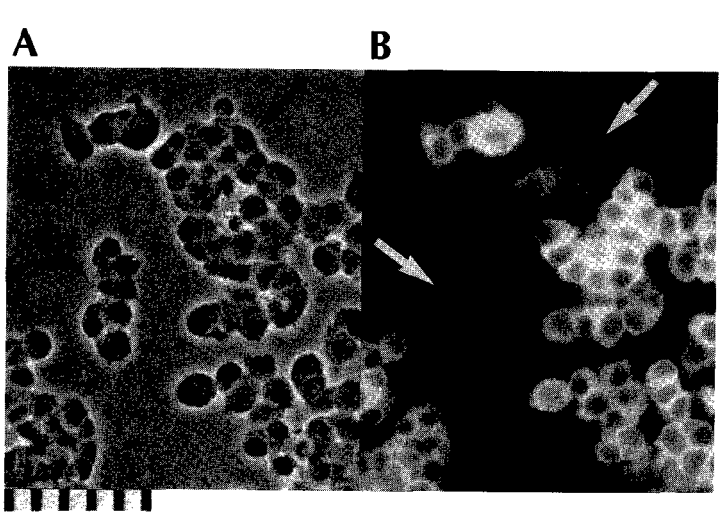
これに対して分泌顆粒に局在しているsynaptophysinの含量に関してはwildとHaF7で大きな差は認められなかった（図２Ｄ）。また、カテコールアミン合成系酵素であるドーパミンβ脱水素酵素（DBH）やチロシン脱水素酵素（TH）については、wildとHaF7でほぼ同量存在することがイムノブロットで確認され（図２Ｅ）、またドーパミン含量に関しても両者の間に大きな差は認められなかった。さらにHaF7をＮＧＦ存在下で培養し続けると突起伸長が見られることから、ＮＧＦレセプターも発現しているものと推察された。今後は、wildとHaF7の分泌機能について比較検討し、分泌機能に対するsynaptotagminの役割を明らかにして行きたいと考えている。

［参考文献］

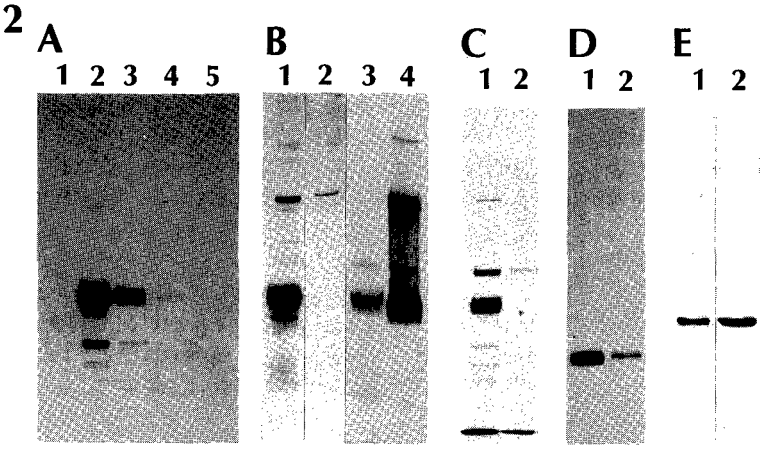
（１）Takahashi, M. et al. (1991) Brain Res. in press.

（２）星野ら(1990)第13回日本分子生物学会大会

（３）Sudhof, T. C., and Jahn, R. (1991) Neuron 6, 665



（図１）キリング後のＰＣ１２
Ａ；位相差顕微鏡
Ｂ；蛍光顕微鏡



（図２）イムノブロット解析
Ａ；mAb 1D12
1,HaF7 2,wild
3,wildを1/10量
4,wildを1/100量
5,wildを1/1000量
Ｂ；NtAb
1,wild 2,HaF7
3,ラットシナプス膜
4,精製58kD蛋白
Ｃ；ポリクローナル抗体
1,wild 2,HaF7
Ｄ；anti-synaptophysin
1,wild 2,HaF7
Ｅ；anti-TH
1,wild 2,HaF7

10 ツメガエル卵母細胞再構成系におけるNMDA誘発電流に対するプロテインキナーゼCの増強作用機序

漆原尚巳、東田道久、野村靖幸
(北大・薬・薬効)

《要約》
ラット脳 mRNA を注入することでアフリカツメガエル卵母細胞上に再構成されるグルタミン酸受容体のうち、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型により誘起される電流応答は、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性化薬である 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) の灌流処置によって約３倍に増強された。一方、TPA処置は non-NMDA 型の応答には変化を与えず、振動性の応答を示すメタボトロピックグルタミン酸受容体の応答を強く抑制した。この NMDA 電流応答の TPA による増強はプロテインキナーゼ阻害薬のスタウロスポリンによって消失した。また、不活性ホルボールエステルの灌流処置は NMDA 電流応答に影響を与えなかった。一方、カルモジュリン阻害薬の W-7 は単独では NMDA 電流応答に変化を与えずに TPA による増強を阻害した。これらのことは NMDA 受容体の調節にプロテインキナーゼ C、そしてカルモジュリンが関わっている可能性を示唆する。

《緒言》
興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体は、海馬における長期増強などの種々の神経の可塑性に関わっていることが示されてきた。グルタミン酸受容体は NMDA 型、non-NMDA 型、metabotropic 型の３種に大別されているが、そのうち NMDA 型受容体の活性化が長期増強につながる種々の過程の"引き金"であると考えられている (1)。また NMDA 受容体活性化に続く Ca^{2+} の流入が PKCを含む Ca^{2+} 依存性酵素の活性化を引き起こし、その結果としてシナプスにおける伝達効率の上昇を導くとされている (2,4)。PKC はその活性化が長期増強の形成に関与していると示唆されているものの、その機序に関してはいまだに明らかにされていない (5,7)。我々は脳 RNA 移入卵母細胞を用いて各種グルタミン酸受容体サブタイプ、とくに NMDA 型の電流応答に及ぼす PKC 活性化の効果について検討した。

《方法》
アフリカツメガエルより卵巣を摘出し、コラゲナーゼ処理 (1 mg/ml、30 min)によってろ胞細胞を除去した後の卵母細胞に、ラット全脳より CsCl法 (8) によって抽出した total RNA (5 mg/ml) を 50 nl ずつ注入し、modified Barth's solution (MBS) 中 22 ℃で静置した。電気生理学的測定は RNA 注入 2 - 5 日後に、Mg^{2+}-free MBS 灌流下、卵母細胞の膜電位を -60 mV に固定することで刺激薬物に対する電流応答測定を行った。ホルボールエステル類、W-7 は灌流によって卵母細胞に10 分間適用させた。その前後において刺激薬物により誘発された電流を測定し、処置前の応答に対して処置後の応答の大きさを示した。

《結果》
ラット脳 RNA 移入ツメガエル卵母細胞は 10 μM glycine 共存下で適用されたNMDA に対し濃度依存的な内向きの電流応答を示した。この応答は glycine 非存在下では認められず、Mg^{2+} または 2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) によって抑制された。1 μM TPA を10 分間灌流処理すると、このNMDA電流応答は処理前の応答と比べて著しく増強された (図1)。この増強は 1 μM スタウロスポリンを同時に適用することで抑制された (図2)。また不活性ホルボールエステル 4-o-methyl-TPA (1 μM) の処理は NMDA 応答に対して無効であった (図2)。灌流外液中 Ca^{2+} の Ba^{2+} への置換、ならびに W-7 を TPA と同時適用することによってこの TPA の増強作用は消失した (図3)。一方、RNA 移入卵母細胞は 50 μM カイニン酸の適用により NMDA と同様な滑らかな内向き電流を生じたが、TPA によるPKC の活性化はカイニン酸の応答には影響を及ぼさなかった。50 μM キスカル酸による代謝型グルタミン酸受容体の振動性応答は逆に強く抑制された。

《考察》
グルタミン酸受容体は、少なくとも3種のサブタイプに大別されており、それぞれのサブタイプの情報伝達機構や制御機構について活発に研究されているが、その詳細は必ずしも明確ではない。今回用いた脳 mRNA 移入ツメガエル卵母細胞は、これら３種のグルタミン酸受容体サブタイプを発現させ、各受容体により異なる特徴的な電流応答を示し

た。TPA による PKC の活性化はそのうちで NMDA 受容体応答のみを選択的に増強することが認められた。この増強は細胞外 Ca^{2+} の Ba^{2+} による置換で消失したこと、またカルモジュリン阻害薬の W-7 がこの増強を抑制したことにより、Ca^{2+} の流入によるカルモジュリン、あるいは関連蛋白質の活性化がこの増強に関与することが示唆された。ラット脳後シナプス肥厚部（PSD）において、精製脳 β型 PKC 処理がグルタミン酸による [^{3}H] MK-801 結合増加を増強することが報告されており、PKC がチャネルの活性制御に関与する可能性が示されている(3,6)。シナプス後部には NMDA 受容体と PKC、CaMキナーゼII が豊富に存在することが示されている(9)。したがって、PKC や CaM キナーゼII が NMDA レセプターチャネル複合体もしくはその関連蛋白質をリン酸化することでそのチャネル機能を調節していることが推定される。

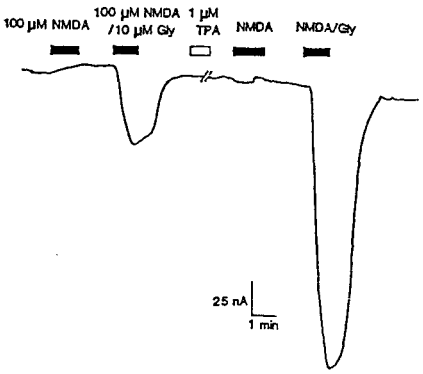


図1. NMDA 電流応答に対する TPA の増強作用

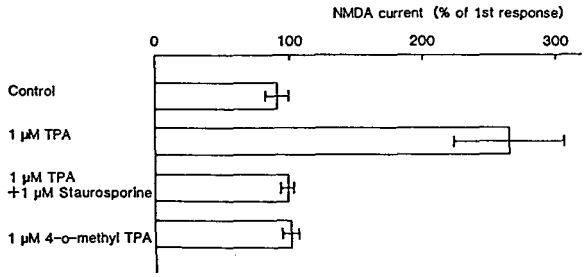


図2. NMDA 電流応答の増強における PKC の関与

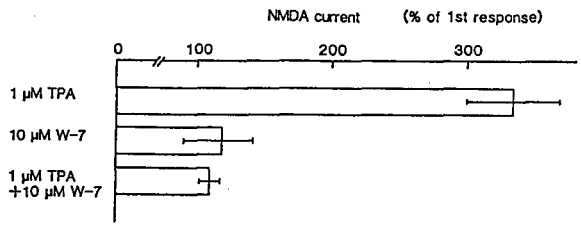


図3. TPA による NMDA 応答増強への W-7 の効果

《参考文献》

1) Collingridge, G.L. and Singer, W. (1990) TiPS 11, 290-296.
2) Davies, S.N., Lester, R.A.J., Reymann, K.G., and Collingridge, G.L. (1989) Nature 338, 500-503.
3) Kitamura, Y., Miyazaki, A., Yamanaka, Y., and Nomura, Y., (1991) Jap. J. Pharmacol. 55, 288P.
4) Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., and Nicoll, R.A. (1989) TINS 12, 444-450.
5) Malinow, R., Schulman, H., and Tsien, R.W. (1989) Science 245, 862-866.
6) 宮崎敦広、北村佳久、野村靖幸 (1990) 神経化学 29, 76-77.
7) Muller, D., Buchs, P-A., Dunant, Y., and Lynch, G. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4073-4077.
8) Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) In Molecular Cloning; a Laboratory Manual, Second edition, pp. 7.19-7.22
9) Tsujino, T., Kose, A., Saito, N., and Tanaka, C. (1990) J. Neurosci. 10, 870-884.

11 脳切片におけるTrans-DL-amino-1,3-cyclo-pentanedicarboxylic acid刺激性イノシトール三リン酸の応答と痙攣との関係について

平松 緑、金野郁雄*、門脇 大*、大庭幸子*、劉 健康*、森 昭胤*
山形県テクノポリス財団、*岡山大医、脳研機能生化

【要約】
亜急性鉄塩誘導てんかん焦点ラットとDIマウスの大脳皮質、海馬、小脳の切片を用い、trans-DL-1-amino-1,3-cyclo-pentanedicarboxylic acid (transACPD)刺激によるイノシトール三リン酸（IP_3）の応答について検討した。鉄塩投与ラット脳においては、海馬がtransACPDによるIP_3の最も顕著な応答を示した。また、DIマウスにおいても同様な傾向を示した。鉄塩投与ラット及びDIマウスの小脳においてはIP_3の応答が抑制していた。

【目的】
セカンドメッセンジャーのイノシトールリン脂質は、レセプターの反応に応じて代謝し、神経細胞内の情報伝達に関与し、興奮性アミノ酸レセプターは、イノシトールリン脂質代謝系と関連していることが知られている。Trans-DL-1-amino-1,3-cyclo-pentanedicarboxylic acid (trans-ACPD)はグルタミン酸のアナログであるが、N-メチル-D-アスパラギン酸あるいはDL-α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalone propionic acid (AMPA) レセプターのアンタゴニストには拮抗されない(4)。 最近、痙攣と興奮性アミノ酸とに関係した報告が数多くなされている。 今回は、外傷性てんかんのモデルである鉄塩誘導てんかん焦点ラット脳とDIマウス脳の切片を用い、trans-ACPD刺激によるイノシトール三リン酸の応答について検討を行った。

【実験方法】
（1）動物
8～11週齢の雄性SDラット及び17～19週齢の雄性ddY及び雌雄DIマウスを使用した。ラットは断頭後に、またマウスは頚椎脱臼後に脳をとりだし、直ちに大脳皮質、海馬及び小脳に分離した後、McIlwain Tissue Chopperで0.2 mm x 0.2 mmに切断し、直ちにIP_3の実験を行った。
（2）鉄塩誘導てんかん焦点の作成
ラットをエーテル麻酔し、頭皮を剥離後、Willmore et al.の方法(7)に従い0.1 Mの塩化第二鉄溶液を5μl注入した。次いで頭皮を縫合し、3週間後に実験に使用した。
（3）IP_3の測定
IP_3の測定は、IP_3(D-myo-Inositol 1,4,5-triphosphate)[^{3}H]アッセイ・キット(TRK.1000, アマシャム・ジャパン株式会社)を一部改変して使用した。すなわち、組織切片に用時調製した1 mM trans-ACPD（Tocris Neuramin、England) (1)を入れ、37度で15秒間のインキュベーションを行った(5,6)。次いで過塩素酸を加えて直ちに反応を停止し、IP_3の抽出を行い、－80度にて保存後、翌日に[^{3}H]IP_3の結合実験を行った。

【実験結果】
ddYマウス及びラットの大脳皮質、海馬及び小脳の切片において、それぞれtransACPDの添加によりIP_3の生成の増加が認められた（Fig. 1 & 2)。 DIマウスの大脳皮質、海馬及び小脳におけるtransACPD添加後のIP_3の増加は、それぞれ28.6, 44.0, 7.2%であった。それに対してddYマウスの大脳皮質、海馬及び小脳においては、24.2, 26.9, 21.3%であった。DIマウスの海馬ではtransACPDによる増加率はマウスの脳いずれの部位に比べて最も大きかったが、有意差は認められず、DIマウスの小脳においても有意差は認められなかった(Fig.1)。
亜急性鉄塩誘導てんかん焦点形成ラット脳においては、大脳皮質、海馬及び小脳のtransACPDによるIP_3の増加率は、21.4, 93.8, 20.6%であり、海馬における応答が顕著であり、小脳における応答は対照群に比べて小さかった。それに対して対照群の大脳皮質、海馬及び小脳では、－4.1, 18.8, 44.4%であり、対照群の大脳皮質においてはtransACPDによるIP_3の増加は認められなかった(Fig. 2)。

【考察】

さきに、Akiyama et al. (2)は、amygdalaキンドリングラットにおいてイボテン酸刺激によるイノシトールリン脂質の代謝がamygdalaとpyriformに促進していることを見いだしている。今回の成績から亜急性鉄塩誘導てんかん焦点形成ラットの海馬においてtransACPDによる顕著なIP_3の応答が認められた。最近、神経腫瘍細胞においてはブラジキニンにより放出されたIP_3は、細胞内貯蔵部位からCa^{2+}を遊離し、その結果増加した細胞内フリーCa^{2+}がCa^{2+}依存性K^+チャンネルを開くことが見出されている(3)。従って、鉄塩投与によるてんかん焦点の形成時も同様に、海馬や大脳皮質において興奮性アミノ酸により増加したIP_3がCa^{2+}依存性K^+チャンネルを開いていることが想定され、Elマウスの海馬においても同様な傾向が認められる。また、Elマウスの小脳では逆にtransACPDによる応答が抑制されていたが、これは興奮性アミノ酸によるイノシトールリン脂質の代謝系にフィードバックがかかったものと思われる。

【文献】

(1) Alexander, S.P.H., Hill, S.J. and Kendall, D.A. (1990) J. Neurochem. 55, 1439-1441.
(2) Akiyama, K., Yamada, N. and Sato, M. (1987) Exp. Neurol. 98,499-508.
(3) 東田陽博(1990)厚生省精神・神経疾患研究委託費、難治てんかんの病態と治療に関する研究9-13.
(4) Monaghan, D.T., Bridges, R.J. and Cotman, C.W. (1989) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 365-402.
(5) Palmer, S., Hughes, K.T., Lee, D.Y. and Wakelam, J.O. (1989) Cellular Signalling 1, 147-156.
(6) Slishima, N., Yada, Y., Nagao, S., Mori, S. and Nozawa, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 1077-1082.
(7) Willmore, L.J., Sypert, G.W., Munson, J.B. and Hurd, R.W. (1978) Science 200, 1501-1503.

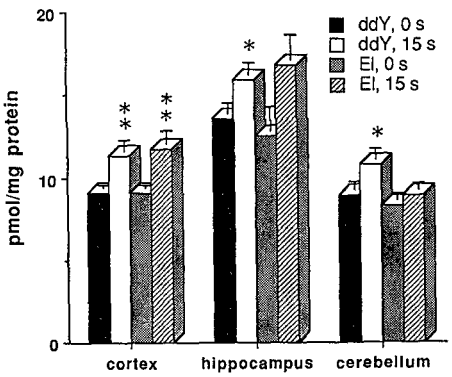


Fig.1. Trans-ACPD induced inositol triphosphate formation in El and ddY mouse slices. Each value represents the mean ± SEM of 5～8 determinations. *p<0.05, **p<0.01 vs 0sec.

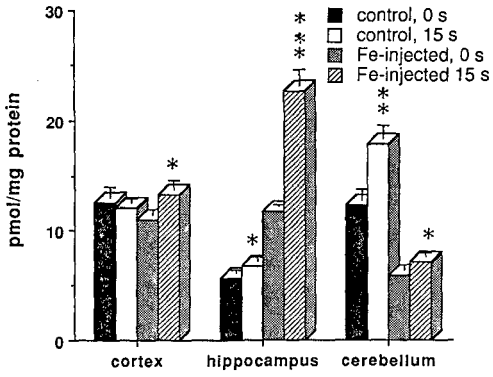


Fig. 2 . Trans-ACPD induced inositol triphosphate formation in iron-induced epileptic rat brain slices. Each value represents the mean ± SEM of 4～8 determinations. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs 0 sec.

12 イノシトール三燐酸レセプター mRNA のスプライシングによる多様性の発現：組織特異的及び、発達特異的発現とその脳内サブタイプの in situ hybridization による解析。

中川敏幸*、有賀 純*,**、岡野栄之*、御子柴克彦*,**
(*大阪大 蛋白研・機能制御、** 東京大 医科研)

〔要約〕

イノシトール三燐酸レセプターは Alternative splicing により数種のサブタイプが存在する。スプライシングは、イノシトール三燐酸結合部位と推測される N 末の近傍部（SI）、と Ca^{2+} チャンネルの調節領域と考えられる二つの燐酸化部位の間（SII）の二ヶ所に存在した。SI 領域はイノシトール三燐酸の親和性への関与が示唆され、SII 領域は組織特異的な発現様式を示した。また、小脳の発達過程に於て SI, SII 領域共に特異的な発現様式を認めた。中枢神経での各サブタイプの発現を in situ hybridization にて検討した。小脳プルキンエ細胞は末梢組織に存在するタイプ以外全てのサブタイプが発現し、海馬では各サブタイプ特異的な発現が認められた。以上より、イノシトール三燐酸を介する情報伝達系に於て各組織及び細胞レベルに於けるイノシトール三燐酸レセプターの多様性ーmRNA の alternative splicing によって引き起こされている可能性ーが示唆された。

【緒言】多くの細胞で、細胞外刺激によりイノシトール燐脂質が代謝され、イノシトール三燐酸（IP_3）ー細胞内 Ca^{2+} を介する情報伝達系が認められ、様々な生理機能の発現に重要な役割を果たしている（1）。前田らは、マウス小脳よりIP_3 受容体を精製し、四量体形成、同一分子に IP_3 結合能と Ca^{2+} チャンネルとしての機能を持つことを報告し（5,6）、また、古市らは cDNA を単離し（3）、さらに、宮脇らは、この cDNA の機能的発現に成功した（8）。さて、我々は、外界情報の多様性に対応して IP_3 受容体がどのように対応してCa^{2+}放出を制御しているかに興味を持ち、IP_3 受容体の多様性に関する検討を進めた。今回、IP_3 受容体にはalternative splicing による数種のサブタイプがあることを見いだし、各組織及び小脳の発達過程に於けるサブタイプの発現様式（9）、さらに、中枢神経でサブタイプの局在（10）を検討したので報告する。

【方法】

1)cDNA及びPCR：ICRマウスよりRNAを抽出し、Frohmanら（2）の方法に従って行った。プライマーは図1の通り作製した。

2)RNase Protection：SI領域またはSII領域を含むプローブをRNA polymeraseにより合成し、Meltonらの方法（7）に従って行った。

3)in situ hybridization：27日令ICRマウスを4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン切片を作成した。RNAプローブによるin situ hybridizationはInghamら（4）、オリゴヌクレオチドプローブはTossら（11）の方法に従った。

【結果と考察】

PCRによりスプライシングは、イノシトール三燐酸結合部位と推測される N 末の近傍部（SI）、と Ca^{2+} チャンネルの調節領域と考えられる二つの燐酸化部位の間（SII）の二ヶ所に存在した（図2）。さらに、SII領域内でスプライシングが認められた。これらサブタイプの発現量はRNase Protectionにより検討した。

Ⅰ）小脳の発達過程；SIサブタイプ（図3a）で$InsP_3RSI$の発現は平行線維とプルキンエ細胞がシナプスを形成する時期をピークにしてその後減少するが、SIIサブタイプ（図3b）は$InsP_3RSIIABC$-は変化しないがその他は徐々に増加した。

Ⅱ）中枢神経内での分布（図4a,b）；mRNA全体量では小脳＞海馬＞大脳皮質＞脊髄で、部位によりサブタイプの割合の違いを示した。

Ⅲ）末梢組織；SIサブタイプでは小脳に比し$InsP_3RSI$の割合が大きく（図5a）、IP_3の親和性の違いを反映していると考えられた。SIIサブタイプでは$InsP_3RSIIABC$- のみが存在し、組織特異性を示した（図5b）。

次に、in situ hybridization により中枢神経に於けるサブタイプの細胞内局在を示した（図6,7）。小脳プルキンエ細胞には$InsP_3RSIIABC$- 以外全て存在し（図6）、ホモテトラマーさらにヘテロテトラマーによりチャンネルとしての機能的な多様性が示唆された。海馬ではサブタイプにより局在に違いが見られた（図7）。これらは、イノシトール燐脂質代謝の関与する情報伝達系（PI-signaling）に関連する分子及びIP_3 受容体の機能を

制御する分子に多様性が存在し、局在にも違いがある事を考慮すると、特に中枢神経すなはち、ニューロンに於てPI-signalingの多様性、さらに、他の燐酸化系などの情報伝達系とのクロストークに伴う情報伝達系に多様性があることが示唆された。

【文献】

1)Berridge, M. J. et al. Nature 312, 315-321 (1984), 2)Frohman, M. A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 8998-9002 (1988), 3)Furuichi, T. et al. Nature 342, 32-38 (1989), 4)Ingham, P. W. et al. Nature 318, 439-445 (1985), 5)Maeda, N. et al. EMBO J. 9, 61-67 (1990), 6)Maeda, N. et al. J. Biol. Chem. 266, 1109-1116 (1991), 7)Melton, D. A. et al. Nucleic Acids Res. 12, 7035-7056 (1984), 8)Miyawaki, A. et al. Neuron 5, 11-18 (1990), 9)Nakagawa, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, in press (1991), 10)Nakagawa, T. et al. submitted, 11)Toss, R. D. et al. EMBO J. 8, 4025-4034 (1989)

Fig.1 The position of primers used for PCR

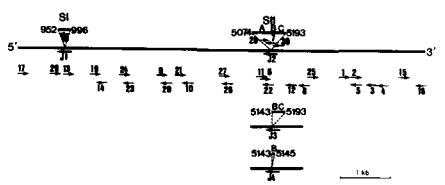


Fig.2 Schematic diagram of the InsP_3 receptor subtypes

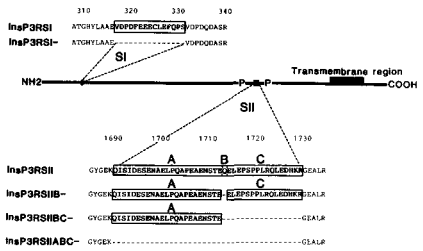


Fig.3

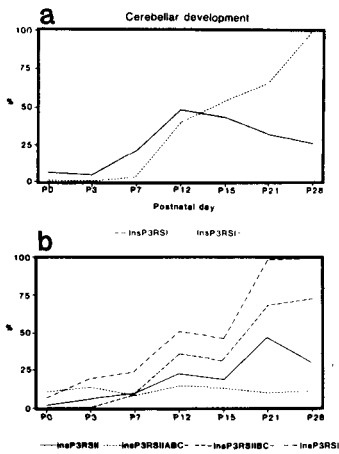


Fig.4

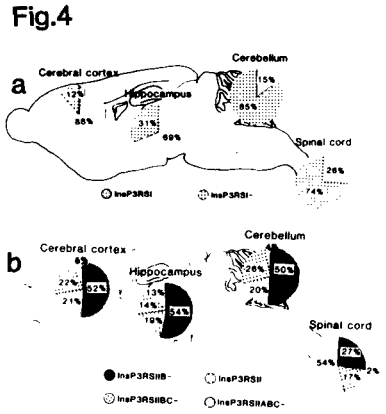


Fig.5

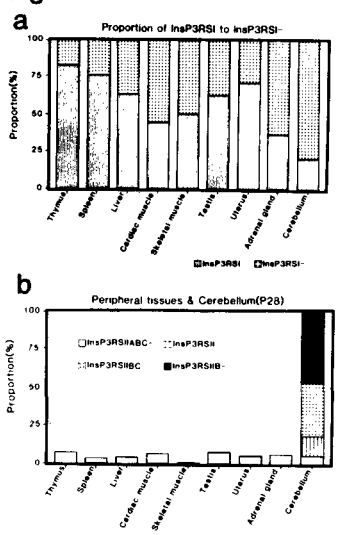


Fig. 3-5 RNase protection analysis during cerebellar development (Fig. 3), in various regions of the CNS (Fig. 4) and in peripheral tissues (Fig. 5). a); SI subtypes, b); SII subtypes

Fig.6

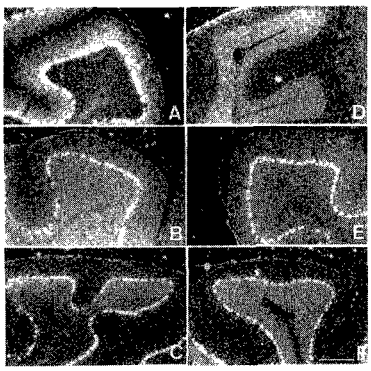


Fig.7

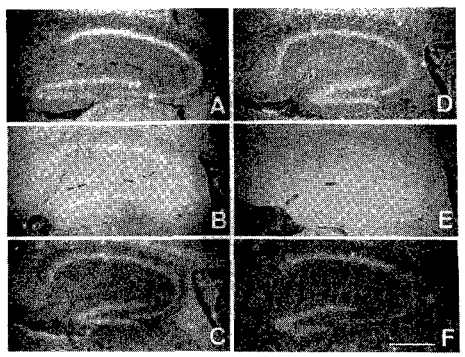


Fig. 6-7 *in situ* hybridization in cerebellum (Fig. 6) and in hippocampus (Fig. 7). A; antisense RNA probe, B-F; oligonucleotide probes. B: InsP_3RSI, C: InsP_3RSI-, D: InsP_3RSIIABC-, E: InsP_3RSIIBC-, F: InsP_3RSIIB-

13 中枢サブスタンスP結合部位の単離精製と抗体作成

仲田義啓、西尾廣昭、瀬川富朗＊、秋澤俊史＊＊、平井裕子＊＊＊、秋山實利＊＊＊
(広島大・医・薬効解析、敦賀女子短期大＊、摂南大・薬＊＊、放影研・放生部＊＊＊)

〔要約〕

1989 年、１１個のアミノ酸から成る神経ペプチドのsubstance P (SP) レセプターの cDNA がクローニングされ、その一次構造が決定された(3)。しかし現在に至るまで、nativeなSP レセプター蛋白質を精製した報告はない。今回、SP結合蛋白質をラット脳より精製し、その抗体の作成をした。ラット脳膜をジギトニンで可溶化後、ゲル濾過法そしてレクチンカラムさらにSP-Sepharose アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、SP 結合蛋白質を得た。分子量はSDS-PAGEの銀染色、還元状態で 74 Kd であった。

このSP結合蛋白質に対するポリクローナル抗体を家兎で作成した。この抗体は、ラットの脳膜画分を用いた[^{3}H]-SP結合を抑制し、Western Blotting法でラット脳膜画分より特異的に約76Kの分子量のバンドを認識した。これらの結果から、作成したポリクローナル抗体はSPレセプターを認識している可能性が示唆された。

サブスタンスP(SP) は 11個のアミノ酸からなり、C 末端に-Phe-X-Gly-Leu-Met-NH_2という共通のアミノ酸構造を有しているタキキニンと呼ばれる一群のポリペプチドファミリーに属している。ほ乳類には、SP 以外に、ニューロキニンA(NKA) およびニューロキニンB(NKB) の存在が知られている。一方、SP, NKA, NKB を内因性リガンドとするレセプターとして、それぞれ NK-1, NK-2, NK-3 が同定されており、近年それぞれのレセプターの cDNA がクローニングされ、アミノ酸配列が決定された。

我々は以前よりSPレセプターの情報伝達機構及びその受容体の可溶化について研究を行ってきた(1)。今回、ラット中枢神経系SPレセプターをラット脳膜可溶化画分より、SP結合活性を指標に精製を試み、その抗体を作成したので報告する。

[実験方法]

1．膜標本の調製

Wistar 系雄性ラットより、脳を摘出し 0.32M sucrose 中でホモジナイズし、1,000xg で 10 分間遠心した。その上清を18,000xg で 20 分間遠心し、得られた沈渣を 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)で 3 度洗浄して膜標本とした。

2．[^{3}H]SP 結合実験

膜標本を、10 mM $MgCl_2$, 0.02% BSA, 各種peptidase inhibitor を含む 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に懸濁させ、[^{3}H]SP と室温で 30 分間インキュベーションさせた。インキュベーション後、0.1% polyethyleneimine で前処置した Whatman GF/B glass filter を用いて吸引濾過することにより B/F 分離を行った。

3．SP レセプターの精製

膜標本を、1% digitonin, 100mM NaCl, 10mM $MgCl_2$ を含む 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に懸濁させ、氷冷下で、40 分間放置することにより可溶化し、100,000xg で60 分間遠心後、得られた上清を Amicon Centriflo CF 25 を用いて濃縮した。濃縮後、Sephadex G-75 カラム(2.7 x 40 cm)でゲル濾過し、[^{3}H]SP 結合活性画分を分取した。その画分を Concanavalin A(Con A)-Sepharose と氷冷下で 2 時間インキュベーション後、100mM α-methyl D-mannoside で抽出される画分を Con A 部分精製画分とした。この画分を SP-Sepharose アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、SP 結合蛋白質を得た。

4．抗体の作成

Sigel らの方法(2)に従って行った。

[実験結果及び考察]

ラット脳膜標本を digitonin で可溶化後、Sephadex G-75 カラムでゲル濾過を行った。ゲル濾過後の可溶化膜標本の [^{3}H]SP 結合活性に対する GTPγS 及び Con A の影響を調べた。GTPγS は膜標本と同様に [^{3}H]SP 結合活性を低下させることから、ゲル濾過後も SP レセプターと GTP 結合蛋白質 (G 蛋白) との共役機構が存在することが示唆された。また、Con A も膜標本と同様に [^{3}H]SP 特異的結合を阻害することから、digitonin により糖鎖構造を保持した状態で可溶化されていると推察された。次に、この可溶化膜標本を ConA-Sepharose を用いて、Con A に結合可能な糖鎖構造を有する蛋白質を精製した。このCon A 部分精製画分での [^{3}H]SP 結合活性に対しては、GTPγS は無影響であった。このことから、この段階で SPレセプターとそれに共役する G 蛋白とを分離できたと考えられる。次に Con A 部分精製画分を、SP-Sepharose を使用して、アフィニティークロマトグラフィーを行い、SDS-PAGE 後、銀染色し精製された蛋白質を調べた。その結果、脳膜標本から還元状態で 74 Kd の分子量である蛋白質が得られた。この蛋白質に対する免疫家兎血清は、ラット脳膜画分と最終希釈100倍で30分前処理することで[^{3}H]SP 結合活性を有意に抑制した。ラット脳膜画分あるいはdigitoninで可溶化後SDS-PAGEを行い、Westen Blotting後、最終抗体濃度500倍で特異的に認識される分子量約76～74Kdの単一のバンドを確認した。

SP レセプター蛋白質は、cDNA 解析の結果から 407 アミノ酸残基からなり、そのアミノ酸配列に相当する分子量は、46,385 dalton であることが知られている(1)。この cDNA 解析から得た分子量と今回精製された蛋白質の分子量の間には差がある。今回精製した蛋白質が生体で存在する機能的なSP レセプターであると仮定すると、この蛋白質には糖鎖構造が存在することが予想され、全体としての見かけの分子量が真の分子量よりも大きくなって解析されたのではないかと推察する。

[謝辞]

抗体作成に助言をいただいた帝京大薬学部・今中常雄先生、高野達哉教授に感謝いたします。

[文献]

1) Segawa, T., and Nakata, Y., (1991) Comp. Biochem. Physiol. 98C 147-156. 2) Sigel, M. B., Sinha, M. B., and VanderLaan, W. P. (1983) Methods in Enzymology 93, 3-12.

3)Yokota,Y.,Sasai,Y.,Tanaka,K.,Fujiwara,T.,Tsuchida,K.,Shigemoto, R.,Kakizuka, Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1989) J. Biol. Chem., 264,17649-17652

14 NG108-15 細胞上に存在する心房性ナトリウム利尿ペプチド受容体の性質と cGMP 産生制御機構

今泉玲、東田道久、野村靖幸
〈北大・薬・薬効〉

【要約】
NG108-15 細胞を心房性利尿ペプチド（ANP）で刺激すると、一過性の細胞内 cGMP 量上昇の後、細胞外への cGMP 放出が認められた。この作用は、外液 Ca^{2+} の除去、BAPTA-AM、N-monomethylarginine 処置によって影響を受けなかったことより、これが膜結合性グアニル酸シクラーゼ（mGC）の活性化を介していることが示唆された。NG108-15 細胞膜画分の [^{125}I] ANP とのアフィニティーラベリングより、膜上に ANP-R1（MW 175, 150 kDa）および R2（MW 70 kDa）サブタイプ受容体が存在することが認められた。また、膜画分を用いて検討したところ、ANP 誘発 cGMP 上昇には、２価カチオン（Mg^{2+} あるいは Mn^{2+}）ならびに ATP の存在が必須であった。一方、Ca^{2+} の mGC 活性化への関与は弱く、逆に cGMP 上昇に対し濃度依存的な抑制作用を示したことから NG108-15 細胞の mGC 活性は Ca^{2+} に依存した何らかの機構によって制御されていることが推定された。

【緒言】
心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）は心臓から分泌されるペプチドホルモンであり、cGMP をセカンドメッセンジャーとして血圧の調節や、利尿に関与している（1）。ANP 受容体は血管平滑筋、腎、副腎皮質、肺などの末梢組織に豊富に存在しているが（2）、脳中にも ANP 類似の脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）が見いだされて以来（3）、神経系での機能についても興味が持たれている。本研究では、ニューロンモデルとして繁用されている NG108-15 細胞およびその細胞膜を用い、細胞上に存在する ANP 受容体の特性について検討を行った。

【実験方法】
細胞培養：NG108-15 細胞は 4% 牛胎児血清（FCS）含有 DMEM-HAT 培地で培養し、confluent になったものを用いた。細胞膜調製：細胞を dish からはずした後、超音波破砕し、分別遠心法により細胞膜画分を得た。cGMP 定量：無傷細胞での定量は 35 mm polyornitine コーティング dish 上の培地を除き、HEPES buffered saline（HBS）900 ml および薬物を添加、全量 1 ml で 37 ℃、10 分間反応させ、1 N HCl 100 μl で反応を停止した。細胞外液と内液を分取する際には、まず上清のみを 1 N HCl 100 μl 含んだマイクロチューブ内に移し、これを外液とし、続いて細胞を洗浄後、0.1 N HCl 1.1 ml 添加し、これを内液とした。細胞膜を用いての定量では、基質としての GTP を含んだ反応 medium 中に 20 - 25 μg の膜蛋白質を添加し、全量 100 μl で 37 ℃、10 分間反応後、0.1 N HCl 400 μl で反応を停止した。各サンプル中 cGMP 量はラジオイムノアッセイ法により定量した。アフィニティーラベリング：10 μg 膜蛋白質を反応 buffer 中、ANP 存在下および非存在下で 1 nM [^{125}I] ANP と混和し、全量 100 μl で 4 ℃、90 分間インキュベート後、さらに 1 mM bis(sulfosuccinimidyl)suberate を添加し 4 ℃、30 分間インキュベートした。これに lysing buffer を加え、遠心により得られた沈査を SDS-PAGE sample buffer 100 μl に懸濁、7.5 % SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後に、オートラジオグラフィーにより検出した。

【結果】
ANP 刺激により、cGMP は、細胞内含量が一過性に上昇したのち、外液中に放出されることが認められた（図１）。この cGMP 上昇に対し、外液 Ca^{2+} 除去、および BAPTA-AM の添加（細胞内遊離 Ca^{2+} 減少）は影響しなかった。さらに可溶性グアニル酸シクラーゼ活性化阻害薬である N-monomethylarginine（NMMA）も無効であった。還元剤存在下、[^{125}I] ANP でアフィニティーラベリングした NG108-15 細胞膜の SDS-PAGE の結果、70 kDa のメインバンドの他、175、150 kDa を含む数本のバンドを検出した（図２）。ANP の作用を膜蛋白質を用いて検討したところ、cofactor として Mg^{2+} あるいは Mn^{2+} の存在下、ATP を添加した時のみ、無傷細胞におけると同様の cGMP 上昇を引き起こした。グアニル酸シクラーゼ活性化に及ぼす２価カチオンの効果を検討したところ、Mg^{2+}、Mn^{2+} は濃度依存的に cGMP 生成を上昇させたが、Ca^{2+} はほとんど影響しなかった（図３）。しかしながら、Ca^{2+} は逆に mGC の活性化を濃度依存的に抑制した（図４）。

【考察】
ANP の受容体は現在、mGC と共役する R1 受容体（MW 130 - 140, 180 kDa）(4,5) と主に ANP の代謝に関与するとされる R2 受容体（MW 64 - 70 kDa；還元剤存在下）(6) の二つのサブタイプに大別されている。アフィニティーラベリングの結果から、NG108-15 細胞上には、R2 サブタイプが多く存在し、それと比較して R1 サブタイプはごく

わずかしか存在しないことが認められた。しかしながら、無傷細胞において、ANP 刺激が cGMP 上昇を引き起こし、その作用は外液 Ca^{2+} 除去、細胞内 Ca^{2+} のキレートおよび NMMA 処置がいずれも影響を及ぼさず、生成された cGMP の外液への流出を認めたこと、膜画分において ANP が cGMP 上昇を引き起こしたことから NG108-15 細胞上の R1 受容体は、量的には僅かであるが、mGC 活性化の機能を有していることが示唆された。細胞膜での GC 活性化は、ANP 刺激のみでは生じず、cofactor として、ATP および Mg^{2+}、Mn^{2+} などの２価カチオンを必要とした。一方、Ca^{2+} は mGC 活性化を抑制することが認められた。ANP 受容体にはプロテインキナーゼドメインが存在することが示唆されており (7)、cofactor としての ATP の必要性から、このキナーゼドメインが mGC 活性を制御している可能性も考えられるが、この点および、ANP 受容体/mGC の機能的役割については現在詳細に検討中である。

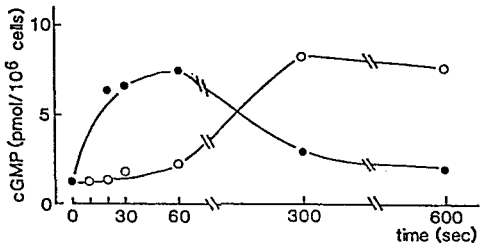


図１　NG108-15 細胞における ANP 刺激による細胞内、細胞外 cGMP の経時的変化

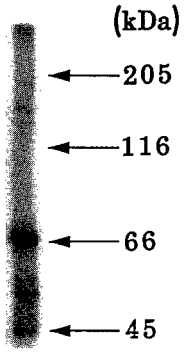


図２　NG108-15 細胞膜 ANP 受容体のアフィニティラベリング

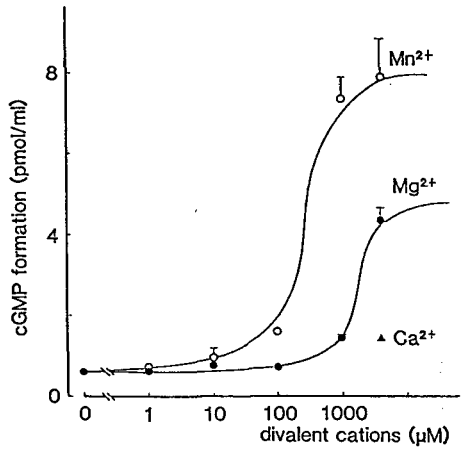


図３　ANP 誘発 cGMP 上昇への２価カチオンの効果

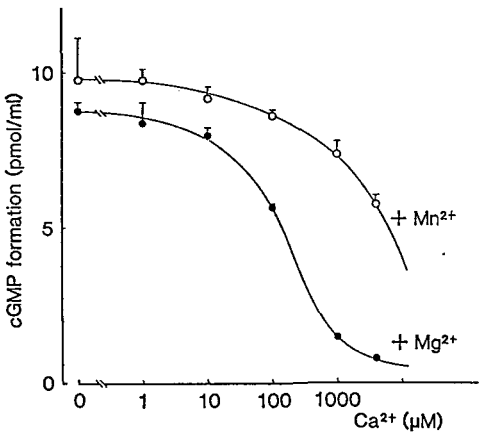


図４　ANP 誘発 cGMP 上昇に対する Ca^{2+} の影響

【参考文献】

1) Genest, J. and Cantin, M. (1988) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 110, 1.
2) Waldman, S. A., Rapoport, R. M., and Murad, F. (1984) J. Biol. Chem. 259, 14332-14334.
3) Sudoh, T., Kanagawa, K., Minamino, N., and Matsuo, H. (1988) Nature 332, 78-81.
4) Chinkers, M., Garbers, D. L., Chang, M. -S., Lowe, D. G., Chin, H., Goeddle, D.V., and S. Schultz. (1989) Nature 338, 78-83.
5) Paul, A. K., Marala, R. B., Jaiswal, R. K., and Sharma, R. K. (1987) Science 235, 1224-1226.
6) Maack, T., Suzuki, M., Almeida, F. A., Nussenzveig, D., Scarborough, R. M., McEnroe, G. A., and Lewicki, J. A. (1987) Science 238, 675.
7) Chinkers, M.,and Garbers, D. L. (1989) Science 245, 1392-1394.

15 κ-アゴニスト，U-50488HのTyrosine Kinase活性化作用

丹羽雅之、河野健一、野崎正勝、鶴見介登
（岐阜大・医・薬理）

〔要約〕
オピオイドκ-受容体選択的アゴニストであるU-50488Hは好中球においてf-MLP刺激による活性酸素産生に対し比較的低濃度で増大効果を、高濃度では抑制効果を示すという、二相性の作用を示した。U-50488Hのこの抑制作用には刺激特異性は無かったが、増大作用はGCSFと同様、チロシンキナーゼ系に対するプライミング効果であると考えられた。またこの増大効果には百日咳毒素感受性G-蛋白質の関与が示唆された。

オピオイドは多形核白血球（PMNs)の機能を修飾することが知られ、PMNsの細胞膜表面にオピオイド受容体が存在することから、その作用はオピオイド受容体を介した反応であるとも考えられるが明らかではない。さらにκ-受容体リガンドについてはほとんど検討されていないと言って過言ではない。一方、我々はすでにラット腹腔浸出細胞におけるformyl-Met-Leu-Phe(f-MLP)刺激によるluminol依存性化学発光（luminol-CL）を指標にした活性酸素産生能を検討し、κ-アゴニストの U-50488Hが低濃度で増強、高濃度で抑制を示すことを報告した[1]。今回我々は、U-50488Hの好中球機能に対する作用をより明確にする目的で、U-50488Hの活性酸素産生能に及ぼす影響を、オピオイドμ-受容体アゴニストのmorphineならびに好中球などでf-MLP刺激に対してプライミング効果を示すと報告されているgranurocyte colony stimulating factor(GCSF)[3]と比較検討した。なお、活性酸素産生はO_2^-に特異性が高いといわれる ウミホタルルシフェリン誘導体である 3,7-dihydro-6-(4-[2-{N'-(5-fluoroescenceeinyl)thioureido}ethoxy]-phenyl)-2-methylimidazo(1,2-a)pyrazin-3-one]Na(FCLA)[2]依存性CL法を主体に測定した。

[方法]
ヒトPMNsは正常人末梢血よりデキストラン-フィコール法にて分離し2×10^5個/mlに調整した。PMNsの活性化には遊走因子のf-MLPならびにフォルボールエステルのPMAを用いた。PMNsからの刺激にともなうLuminolならびにFCLA依存性CLはベルトールド社製 LB-9505にて測定した。オピオイドは原則としてPMNsと5分間インキュベートし、その後刺激剤を添加した。活性酸素産生は cytochrome-C法にても測定した。

[結果及び考察]
好中球を2μMのFCLA存在下f-MLPまたはPMAで刺激すると強い化学発光を生じ、これはそのほとんどがO_2^-に由来していると考えられている[2]。この時、好中球をGCSF(0.01～1μg/ml)で前処置するとf-MLPにより発生するFCLA依存性化学発光(FCLA-CL)はGCSFの濃度依存的に増強された。しかしながらGCSFはPMA刺激に対しては増強効果を全く示さず、むしろ抑制作用が観察された。一方、U-50488Hの前処置はf-MLP刺激によるFCLA-CLに対し、低濃度では増強効果を高濃度では抑制効果を示すという二相性の作用を示した。しかし、PMA刺激に対しては高濃度のU-50488Hが抑制作用を示したのみであった。なおGCSFおよびU-50488Hはその単独ではCLを発生しなかった。さらにGCSFならびにU-50488Hのf-MLP刺激に対する増強効果はcytochrome-C法によっても同様に観察された。 U-50488Hの好中球との処理時間との関連を検討したところ、処理５分間までは時間依存性の増強

効果を示したが、10分間では増強効果は観察されなかった(Fig. 1-B)。また、5分間と8分間の異なった処理時間でU-50488Hのf-MLP刺激にともなうFCLA-CLに対する濃度依存性を検討したところ、5分間処理で観察された増強効果は8分間の処理では観察されず、U-50488Hの高濃度での抑制効果のみが出現した(Fig. 1-A)。

比較として用いたmorphineもf-MLP刺激によるFCLA-CLを濃度依存的に増大したが、morphineはLuminol-CLに対しては逆に濃度依存的な抑制効果を示した。一方、GCSFならびにU-50488HはLuminol-CLに対してもFCLAと同様な作用を示した。

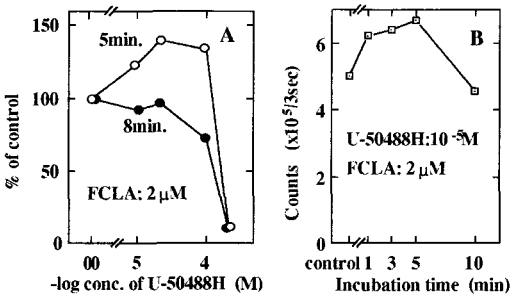


Fig. 1 f-MLP-induced FCLA dependent chemiluminescence in human PMNs. A, Concentration dependent manner of U-50488H preincubated for 5 or 8 min. B, Time course of U-50488H effect.

好中球をチロシンキナーゼ(TY-K)特異的阻害剤の ST-638[4] で処理すると f-MLP刺激後のFCLA-CLに対するGCSFの増強作用は強く抑制された。U-50488Hの増強効果もST-638処理によりその程度は減弱したがmorphineの増強効果は全く影響を受けなかった。なおmorphineの増強効果に対して、C-キナーゼ(PK-C)の特異的阻害剤の staurosporine処理も変化を与えなかった。さらに 好中球を百日咳毒素 (0.5μg/ml, 80min)で処理すると、GCSFの f-MLP刺激に対するFCLA-CL増大作用は抑制され、U-50488Hの増強効果も同様に抑制された。一方、morphineの増強効果は百日咳毒素処理により抑制されなかった(Fig. 2)。

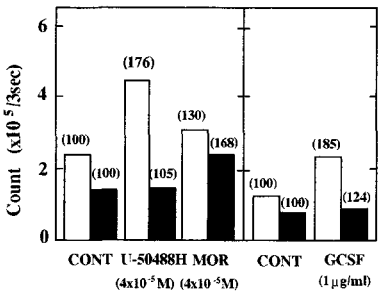


Fig. 2 Effect of pertussis toxin pretreatment on enhancement effect of U-50488H, morphine or GCSF on the f-MLP-induced FCLA dependent chemiluminescence in human PMNs.
□ : Intact PMNs, ■ : PT(0.5μg/ml) treated
(FCLA : 2μM, f-MLP: 500 nM)

以上の成績から、U-50488Hは好中球においてその比較的低濃度でf-MLP刺激に対して増強作用を示し、GCSFと同様のプライミング効果を有すことが示唆された。さらにU-50488Hは比較的高濃度で f-MLP, PMAのいずれの刺激に対しても抑制効果を示すという、異なった二つの作用を持つことも示唆された。U-50488Hのプライミング効果は主にTYR-K系を介したものであり、GCSF同様百日咳毒素感受性G-蛋白質を介した作用であることが確認された。 一方、morphineのCL増強作用は非特異的であり、ひとつの可能性として、morphineが非特異的に細胞機能を抑制した結果 myeloperoxidase系を抑制し、相対的にNADPH-oxidase系が亢進したとも考えられた。

[文献]

1) M. Nakashima, M. Nozaki M. Niwa et al., Jap. J. Pharmacol., 52, 101p (1990)

2) M. Nakano, K. Sugioka, Y. Ushijima et al., Anal. Biochem., 159, 363 (1986)

3) S. Kitagawa, A. Yuo, L. M. Sauza et al., BBRC, 144, 1143 (1987)

4) T. Shiraishi, M. K. Owada, M. Tatsuka et al., Cancer Res., 49, 2374 (1989)

16　ニューロン特異性カルシウム結合タンパクカルレチニンによるシナプトソーム膜タンパクのリン酸化調節

山口知子、Lois Winsky* and David M. Jacobowitz*

(東女医大・生化学、*NIMH)

〔要約〕

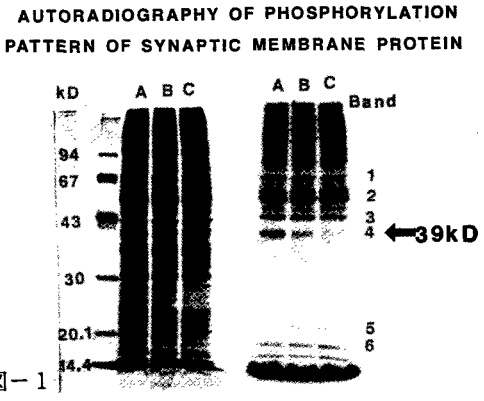
神経細胞に特異的に発現するカルシウム結合タンパクのカルレチニン（ＣＲ）は、２９ＫＤ、ｐＩ＝５.３，１分子当たり６ケのカルシウムを結合しカルビンヂン（ＣＢ）との分子相同性があるが、神経細胞における分子の局在には相補性であることが知られている。ＣＲは特に感覚ニューロンに目立って局在しているが、中枢神経全般にわたって分布しており、その分子機構は解明されていない。脳可溶画分から抽出精製したＣＲは、シナプトソーム膜３９ＫＤタンパクのリン酸化を特異的に阻害することが明らかになった。この阻害効果はカルシウム非依存的、かつ濃度依存的でありシナプトソーム膜タンパクの分子調節機構に関与する可能性が示唆された。

［はじめに］

カルモジュリンの同族分子として、近年Ｒｏｇｅｒｓ[1]によって、Ｃｈｉｃｋ　ｒｅｔｉｎａから、又Ｗｉｎｓｋｙ[2]らによってＣｏｃｈｌｅａｒ　ｎｕｃｌｅｕｓから、ｃ－ＤＮＡ　ｃｌｏｎｅ化された神経細胞に特有に発現されるカルシウム結合タンパクであるカルレチニン（ＣＲ）は、そのアミノ酸配列から腸官のカルシウム輸送体であるカルビンヂン（ＣＢ）にもっとも相同性のあるＥＦファミリータンパクである。Ｗｉｎｓｋｙらによって同定されたＰｒｏｔｅｉｎ　１０[2]はＲｏｇｅｒｓによるＣＲと分子相同性が８６％あり、種差による同一タンパクと結論された。ＣＲはＣＢと異なり、非神経細胞に認められないこと、および両者の中枢での局在は免疫組織化学的および　ｉｎ　ｓｉｔｕ　ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ法によって同一神経部位には局在しておらず、むしろ相補的に分布していることに興味がもたれている。[3]ＣＲは現在のところ感覚ニューロンに目立って存在しているが、中枢神経全般にわたって分布していることが、詳しくマッピングされており[4,5]神経活動の制御因子として興味がもたれている。著者らはＣＲの分子機構について、シナプトソーム膜タンパクのリン酸化にたいする影響を調べて、３９ＫＤタンパクのリン酸化を特異的かつ濃度依存的に著しく阻害し、カルシウム非依存的リン酸化の重要な調節因子である可能性が示唆された。また、カルモジュリン依存性リン酸化にたいしてＣＲはリン酸化を相加的に賦活することが観察され、ＣＲのリン酸化の調節機構の多様性が示された。

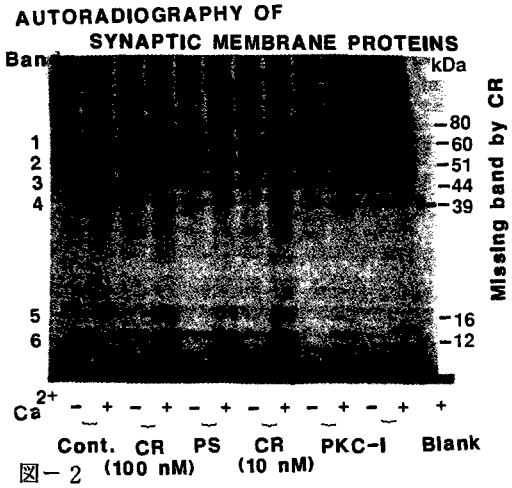
［実験方法］

カレルチニンはＷｉｎｓｋｙら[6]の方法により、モルモット脳可溶画分から硫安分画（６０－８０％飽和）を脱塩し、ＤＥＡＥ－ｃｅｌｌｕｌｏｓｅカラムを通し１ｍＭＥＤＴＡ中で１時間処理して脱塩し、再度ＤＥＡＥ－ｃｅｌｌｕｌｏｓｅカラムに吸着差させ、よく洗浄した後、５０ｍＭＮａＣｌで流した後１００ｍＭＮａＣｌで溶出させた分画を濃縮し、ＴＳＫ３０００ＳＷカラムを通して分画採取し、５０ｍＭＮａ－リン酸緩衝液ｐＨ6.5と１５０ｍＭ　ＮａＣｌの溶出ピークを集め二次元電気泳動でニトロセルロース膜にブロットして、$^{45}CaCl_2$のオートラジオグラムでカルシウム結合タンパクであることを同定した。シナプトソーム膜の調製は、ラット大脳ホモジネートから得たP_2分画を更にショ糖密度勾配法で分離し、シナプトソーム分



図－１

Effect of Calretinin on the phosphorylation of 39 kD synaptic membrane protein. Left:Siver staining,Right: Autoradiogram of ^{32}P.　A=CONTROL, B=CALRETININ(10 nM), C=CALRETININ(100 nM)



図－2

Ⅰ表　Effects of Calretinin on the Phosphorylation of Some Synaptic Membrane Proteins[1]

Band	MW (Da)	Calretinin Effect	Other Effectors	Calmodulin Interaction[2]
1	60,000	Not clear	Ca^{2+}, calmodulin	Yes, ATP dependent?
2	51,000	Stimulation, not Ca^{2+} dependent	Ca^{2+}, calmodulin	Yes
3	44,000	None or slight stimulation	Ca^{2+}, calmodulin	No
4	39,000	Inhibition, not Ca^{2+} dependent	Ca^{2+}	No
5	16,000	Stimulation, not Ca^{2+} dependent	Ca^{2+}, calmodulin	Yes
6	10-14,000	Stimulation, not Ca^{2+} dependent	Ca^{2+}, calmodulin	Yes

[1]Summary of results from three experiments.
[2]Interactions were calcium dependent and effects appeared additive.

画を低張液中で処理して集めた分画を洗浄し、膜分画とした。リン酸化反応は２００uMCaCl$_2$または5mM ＥＥＧＴＡを加えた１２mM ＨＥＰＥＳ（pH7.4）、１０mM MgCl$_2$、0.1 mM ＤＴＴ、１０－３５μMＡＴＰ（１０μＣｉ／１００μｌ、^{32}Ｐ－ＡＴＰ、ＮＥＮ）中で９０秒ｐｒｅｉｎｃｕｂａｔｉｏｎ後、３０°Ｃで６０秒インキュベートした後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥサンプル緩衝液を加えて反応を停止し、９５°Ｃ５分加熱したサンプルについて、一次元ＳＤＳ－ＰＡＧＥを１１％の均一ゲル上で泳動し、銀染色をしたのちゲルを乾燥させてオートラジオグラフィーを施行した。

［結果・考案］

図－１に示されているように、１００ｎＭのＣＲによるシナプトソーム膜タンパクのリン酸化のオートラヂオグラムでは３９ｋＤのバンドが消失していることが認められた。３９ｋＤのリン酸化はＣＲの１０ｎＭでは対照の１２％、１００ｎＭでは６３％の減少がゲルバンドの放射能を液シンカウンターで測定から求められた。３９ｋＤのバンドのリン酸化はカルシウムの存在下では増加するが、ＥＧＴＡ溶液中との差は、このバンドのリン酸化がカルシウム依存性キナーゼによるリン酸化のためではなく、ＣＲがカルシウム結合タンパクであるため、コンフォーメーションの維持に必要なカルシウムの要求性がＥＧＴＡ中でも保たれている可能性が示唆される。３９ｋＤのリン酸化のキナーゼの同定のため、図－２に示された条件でリン酸化を実施した結果がⅠ表にまとめられている。即ち、１００μｇ／ｍｌののホスファチジルセリン（ＰＳ）を加えても１００mMのＰＫＣインヒビター（ＰＫＣペプチド１９－３６）を加えてもこのリン酸化の程度に差が認められず、この結果よりＰＫＣの基質ではない。　またカゼインキナーゼーＩＩの阻害剤である5μｇ／ｍｌのヘパリンを加えても効果がなく、１０μMのカルモジュリン（ＣＡＭ）によっても影響が認められなかった。３９ｋＤのリン酸化を受ける基質の同定と共にＣＲによって影響をうけるリン酸化はキナーゼの阻害によるものにか、あるいはホスファターゼの賦活によるものか、その分子機構の解明に興味がもたれる。

［文献］

[1] Rogers,J.H.(1989) J.Cell Biol.,105,1343-1353.
[2] Winsky,L.,Nakata,H.,Martin,B.M. and Jacobowitz,D.M.(1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86,10139-10143.
[3] Rogers,J.H.,Kahn,M. and Ellis,J.C.(1989) in Pochet,R.,Lawson,D.E.M. and Heinzman,C.W.(Eds.), Calcium Binding Proteins in Normal and Transfected Cells, Plenumn Press,N.Y. pp.195-203.
[4] Jacobowitz,D.M. and Winsky,L.(1991)J.Comp.Neurol.,304,198-218.
[5] Arai,R.,Winsky,L.,Arai,M. and Jacobowitz D.M.(1991) J.Comp.Neurol. in press.
[6] Winsky,L.,Nakata,H. and Jacobowitz,D.M.(1989) Neurochem.Intl.,15,381-389.

17 脳ガングリオシドによるCaMキナーゼIIの活性化機構

福永浩司、宮本英七
(熊本大学・医・第一薬理)

〔要約〕

脳ガングリオシドは 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) をEGTA存在下、濃度依存性に活性化した。調べたガングリオシドの中では、GT1bが最も強い効果を示し、EC_{50} は25 μMであった。アシアロGM1は無効であった。ガングリオシド活性化CaMキナーゼIIは狭い基質特異性を示し、調べた基質の中ではシナプシン1、グリコーゲン合成酵素のみを燐酸化した。さらにガングリオシドから分離、精製したセラミドおよびオリゴ糖では活性化されなかった。つぎにCaMキナーゼIIのCaM結合部位、活性抑制部位、自己燐酸化部位からなるCaMK [281-309] のペプチドを用いてガングリオシドの作用部位について調べた。ペプチドCaMK [281-309] は限定分解により得られるCaMキナーゼIIの活性フラグメントに対して阻害効果を示した。この阻害効果はCaM同様にガングリオシドにより完全に抑制された。以上の結果より、ガングリオシドはCaMキナーゼIIの自己活性抑制部位に作用して本酵素を Ca^{2+} 非依存性に活性化すると考えられる。

中枢神経系において、ガングリオシドは神経伝達物質の放出、受容体への結合の調節、細胞の増殖、神経突起形成の促進など多彩な機能を持っている。in vitroでは種々のプロテインキナーゼの活性がガングリオシドにより調節されることが知られている。

cAMP依存性プロテインキナーゼ、プロテインキナーゼCの活性はガングリオシドにより阻害されるのに対して、CaMキナーゼIIはEGTA存在下に活性化されるという興味ある知見を得た (1)。本研究ではその活性化機構について解析した。

【実験方法】

ラット脳CaMキナーゼIIは既報の方法 (2) に従い精製した。CaMキナーゼIIの活性は合成ペプチドであるシンタイド2またはシナプシン1を基質として既報の方法 (3) に従い測定した。CaMキナーゼIIの活性フラグメントはColbranら (4) の方法に従い作成した。

【結果と考察】

EGTA存在下でCaMキナーゼIIはガングリオシドにより濃度依存性に活性化された (図1)。シンタイド2、シナプシン1を基質として用いた時、ガングリオシドによる活性化は Ca^{2+}/CaM存在下の活性のそれぞれ39 %、41 %であった。Ca^{2+}/CaM存在下でCaMキナーゼIIは広い基質特異性を有している。ガングリオシドにより活性化されたCaMキナーゼIIはシンタイド2、シナプシン1、グリコーゲン合成酵素を燐酸化したが、MAP2、タウ因子、ミオシン軽鎖、ミエリン塩基性蛋白質はほとんど燐酸化しなかった。ガングリオシドの効果に対して Ca^{2+} は促進効果を示さなかった。最近Chan (5) は骨格筋のフォスフォリラーゼbキナーゼ (bキナーゼ) がガングリオシドにより活性化されることを報告した。bキナーゼの場合、Ca^{2+} が促進効果を示した。我々も脳の Ca^{2+}/CaM依存性プロテインフォスファターゼ (カルシニューリン) がガングリオシドにより活性化され、この時 Ca^{2+} が刺激効果を持つことを見い出した。一方、平滑筋のミオシン軽鎖キナーゼに対してはガングリオシドは全く活性化を示さなかった。これらのことは Ca^{2+}/CaM依存性酵素とガングリオシドとの相互作用形式はそれぞれの酵素系で異なることが示唆された。

従来知られているCaM拮抗薬の効果について検討した。非特異的に疎水性相互作用でCaMに作用するトリフルオペラジンは Ca^{2+}/CaM依存性活性と同様にガングリオシド依存性活性を強く阻害し IC_{50} は32 μMであった (図2A)。一方、CaM特異的ペプチド性阻害剤であるマストパランは Ca^{2+}/CaM依存性活性を完全に抑制するが、ガングリオシド依存性活性には3 μMまで影響を与えなかった (図2B)。

CaMキナーゼIIのCaM結合部位、活性抑制部位、自己燐酸化部位はN末端より281-309番目 (αサブユニット) に存在する。ガングリオシドの作用部位を調べる目的で、CaMK [281-309] ペプチドとの相互作用について検討した。あらかじめCaMキナーゼIIをプロテアーゼにて限定分解し、活性フラグメントを得た。CaMK [281-309] はこの活性フラグメントに対しEGTA存在下において阻害効果 (IC_{50} = 0.2 μM) を示した (図3)。この阻害効果に対してガングリオシドは

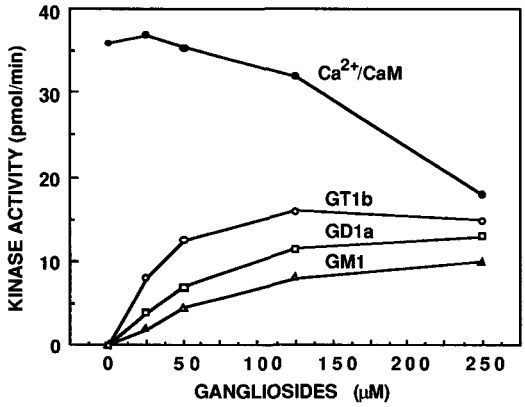


図1 ガングリオシドによる CaM キナーゼⅡの活性化

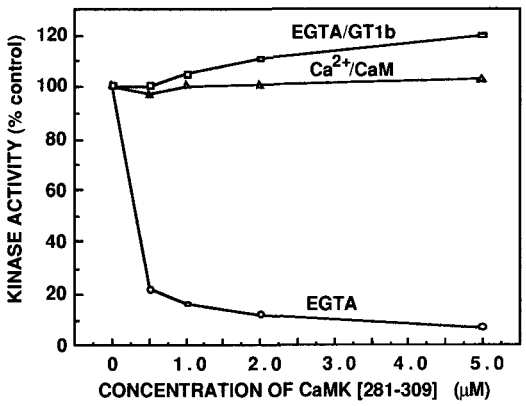


図3 CaMK [281-309] の抑制効果に対する GT1b、Ca^{2+}/CaM の阻害効果

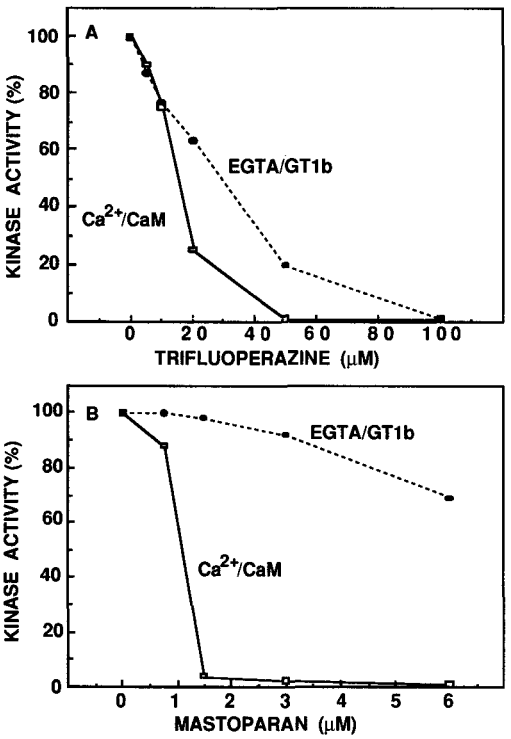


図2 GT1b および Ca^{2+}/CaM 依存性活性に対するトリフルオペラジンとマストパランの効果

CaM 同様に完全に抑制した。このことはガングリオシドの作用点がこれらの自己活性抑制部位付近に存在することが示された。しかしながら、CaM に対して拮抗的には作用しないことから CaM 結合部位そのものではないと考えられる。

ガングリオシドは酵素自体に相互作用することが CaM キナーゼⅡの自己燐酸化反応を促進することからも確かめられた。自己燐酸化反応速度は Ca^{2+}/CaM 存在下に比べ約 20 %であった。自己燐酸化部位について調べると、Ca^{2+} 非依存型活性の発現に関与する 286/287 (α/β サブユニット) のスレオニンへの取り込みが α サブユニットではほとんど見られず、β サブユニットにおいても低かった。自己燐酸化反応による Ca^{2+} 非依存性活性発現の程度も低く、自己燐酸化反応の程度と一致していた。

GT1b からセラミド部分とオリゴ糖部分を分離、精製して、CaM キナーゼⅡに対する効果を調べた。両者とも促進効果を示さなかった。このことから CaM キナーゼⅡの活性化には GT1b の両方の部分が重要であると考えられる。

以上の結果より、脳ガングリオシドが CaM キナーゼⅡの自己活性抑制部位に作用して、本酵素を Ca^{2+} 非依存性に活性化すること、また基質特異性、自己燐酸化部位の違いから活性化機構は CaM と異なることが明らかとなった。さらに培養細胞系を用いて in vivo での相互作用の可能性について検討中である。

【謝辞】

GT1b より分離、精製したセラミド、オリゴ糖を御供与いただいた新潟大学・脳研・神経化学、荒木恵子先生に感謝いたします。

【文献】

1) Fukunaga, K., Miyamoto, E., and Soderling, T.R. (1990) J. Neurochem. **54**, 102-109
2) Fukunaga, K., Yamamoto, H., Matsui, K., Higashi, K., and Miyamoto, E. (1982) J. Neurochem. **39**, 1607-1617
3) Fukunaga, K., Rich, D.P., and Soderling, T.R. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 21830-21836
4) Colbran, R.J., Fong, Y.-L., Schworer, C.M., and Soderling, T.R. (1988) J. Biol. Chem. **263**, 18145-18151
5) Chan, K.-F.J. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 18632-18637

18 特異抗体によるカルモジュリンキナーゼIIの自己リン酸化の検出

鈴木龍雄[1]・野路久仁子[1]，小倉明彦[2]，工藤佳久[2]，田中亮[1]
[1]名市大医・生化１，　[2]三菱化成生命研・脳神経薬理

〔要約〕

カルモジュリンキナーゼII(CaMKII)αサブユニットのMet^{281}からCys^{289}の配列(MHRQETVDC)を持つペプチド(Y-66)を人工合成し、シナプス後肥厚部に富む画分中のCaMKIIでリン酸化後、HPLCにてリン酸化ペプチド(PY-66)を精製した。リン酸化部位はThr^{286}部位に相当する部位であった。PY-66をヘモシアニンと化学結合させたのちウサギを免疫し、得られた抗血清から抗ヘモシアニン成分と抗Y-66成分を除きIgG分画を得た。PY-66に対する特異性はELISAにて確認した。Western blot法ではこの抗体はin vitroで自己リン酸化反応を行なった精製CaMKIIのみを特異的に認識した。また、シナプス後肥厚部に富む画分においてはin vitroでリン酸化反応を行なったサンプル中のCaMKIIのα,β,β'成分と強く反応したが、リン酸化反応を行なわなかったサンプル中のαサブユニットに対しても弱い反応がみられた。anti-PY-66抗体によるCaMKIIバンドの出現の時間経過はCa^{2+}非依存性活性の発現とよく一致していた。培養神経細胞に対しては、NMDA処理あるいはionomycin処理後のニューロンを特異的に染色した。

[はじめに]

カルモジュリンキナーゼIIのThr^{286}（αサブユニット）の自己リン酸化はカルシウム非依存性活性を発現させ、この活性が記憶や、そのモデル系である長期増強のメカニズムとなる可能性が示唆されている[1]。精製カルモジュリンキナーゼIIを用いたin vitroの実験では、カルシウム・カルモジュリン複合体がこの酵素に結合すると、コンフォメーション変化によってATPがそのbinding siteに近接できるようになり、酵素が活性化される。それと同時に最初の自己リン酸化がThr^{286}（αサブユニット）におこる[2,3]。この自己リン酸化により、酵素はさらに活性化されると同時にカルシウム非依存性活性を発現するようになる。ひきつづいておこるThr^{305}やThr^{306}のリン酸化はカルモジュリンに対する親和性を下げるが、Ser^{314}のリン酸化はそれには関係しないとされる[4]。このようにカルモジュリンキナーゼIIの活性と特性は自己リン酸化により巧妙に制御されているらしい。今回、Thr^{286}部位の自己リン酸化を特異的に認識する抗体（anti-PY-66抗体)の作製を試みたので、その結果を報告する。

[方法]

カルモジュリンキナーゼIIαサブユニットのMet^{281}からCys^{289}部分に相当するペプチド(Y-66,MHRQETVDC)を人工合成し(Fujiya Biolaboratory)、postsynaptic density (PSD)に富む画分中のカルモジュリンキナーゼIIで、カルシウム・カルモジュリンを加えてリン酸化を行なった。反応後遠心にてPSDを除いたのち、HPLC (Vidac C18)でリン酸化ペプチド(PY-66)を精製した。PY-66をグルタルアルデヒドによりヘモシアニンとカップルさせたのち、ウサギに免疫した。抗体の力価はELISAにて測定した。得られた血清中の抗ヘモシアニン抗体はヘモシアニン添加後に遠心して除いた。抗Y-66抗体成分はニトロセルロースにブロットしたY-66により除去した。最終的に３３％硫安分画によりIgGを調製した。染色のための培養細胞は胎生１８日のWistarラット脳を１４日間培養して調製した。

[結果]

数回のブースターにより、抗PY-66に対する力価の上昇がみられた。抗ヘモシアニン抗体，抗Y-66抗体成分除去後のIgG画分のELISAでは、PY-66に対して特異性の高い反応を認めた。抗ヘモシアニン成分，抗Y-66成分の力価は、Normal血清と同レベルであった。このIgGを用いてWestern blottingを行なった（図１）。Ca/カルモジュリン存在下で自己リン酸化した精製カルモジュリンキナーゼIIは、この抗体で強く認識された(CaM KII,WB_1＋)が、自己リン酸化を行なわなかったキナーゼIIに対しても弱い反応性を示した(CaM KII,WB_1－)。そこで、このIgGを精製キナーゼIIでさらに吸収して同様のWestern blottingを行なったところ、自己リン酸化を行なわなかったキナーゼIIに対する反応性は消えた(CaM KII,WB_2－)。この抗体を用いて、PSDに富む画分のWestern blotを行なった(図1)。大脳皮質(CTX)・海馬(Hipp)から調製した画分中ではカルシウム／カルモジュリン存在下でのリン酸化反応後α，

βサブユニットに相当するバンドが染まった。小脳(CBL)ではα，β，β′サブユニットと思われるバンドが染まった。リン酸化反応を行なわなかった場合でも、大脳皮質，海馬の画分中のαサブユニットがわずかに染まった。なお、１次抗体との反応を過剰のPY-66存在下で行なうとこれらのバンドの染色はみられなくなった。anti-PY-66抗体によるCaMKIIバンドの出現の時間経過はCa^{2+}非依存性活性の発現とよく一致していた。培養細胞では、NMDA処理あるいは、ionomycin処理を施した場合にニューロンが染まった（図２）。この染色は、抗体をPY-66でpreabsorbした場合にはみられなくなったので特異的染色と考えられた。

[結論]

今回作製した抗体がThr^{286}（αサブユニット）が自己リン酸化されたカルモジュリンキナーゼIIを特異的に認識することを、Western blottingおよび組織染色において明らかにした。今後、この抗体を用いてカルモジュリンキナーゼII自己リン酸化反応の生理的意義の解明が進むことが期待される。

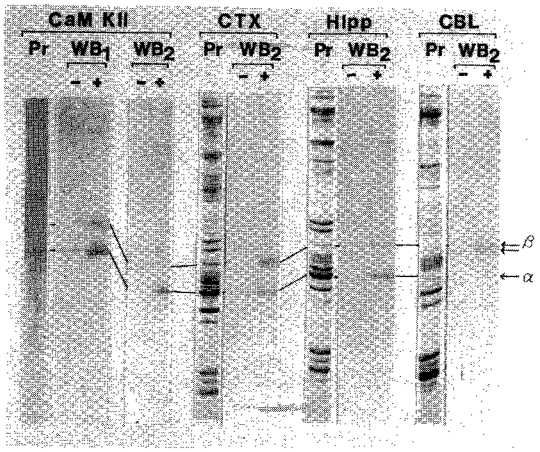


図１．

Specificity of the anti-PY-66 antibody assessed by Western blot analysis.

精製CaMKII(2.5ug)あるいは、PSD含有画分(25 ug)を用いてCa-CaMの存在下(+)あるいは非存在下(-)でリン酸化反応を行ったのち、電気泳動、PVDF膜への転写、anti-PY-66抗体を用いたWestern blotを行った。

CTX，大脳皮質から調製したPSD含有画分

Hipp，海馬から調製したPSD含有画分

CBL，小脳から調製したPSD含有画分

WB_1，抗ヘモシアニン抗体、Y-66抗体除去後のIgG画分のWestern blot

WB_2，WB_1で用いた抗体をさらに精製CaMKIIで吸収したものを使ったWestern blot

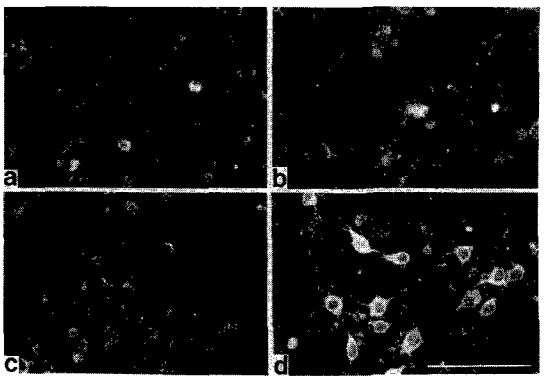


図２．

Immunocytochemical observation of hippocampal cells maintained for 14 days under culture.

a，無刺激細胞，PY-66で吸収したanti-PY-66抗体で染色(nonspecific staining)

b，無刺激細胞，anti-PY-66抗体で染色

c，NMDA処理細胞(100 uM，15min，25°C)，PY-66で吸収したanti-PY-66抗体で染色

d，NMDA処理細胞，anti-PY-66抗体で染色

文献 (1) Miller, S. G. & Kennedy, M. B. (1986) Cell 44, 861-870. (2) Colbran, R. J., Schworer, C. M., Hashimoto, Y., Fong, Y.-L., Rich, D. P., Smith, M. K., & Soderling, T. R. (1989) Biochem. J. 258, 313-325. (3) Schulman, H. & Lou, L. L. (1989) Trends Biochem. Sci. 14, 62-66. (4) Colbran, R. J. & Soderling, T. R. (1990) J. Biol. Chem. 265, 11213-11219.

19 ラット中枢神経系グリア細胞膜小胞の分離とその性質

久保博彦[1)2)]，伊賀耕三[1)3)]，中村洋一[1)]，片岡喜由[1)]
（愛媛大学医学部 第一生理[1)] 第一外科[2)] 整形外科[3)]）

〔要約〕

ラット中枢神経組織のホモジネートからグリア由来の細胞膜小胞をパーコール密度勾配遠心法等で分離分画した。シナプトソームより比重が小さく、ミエリンより軽い分画である。海馬を材料とした場合のこの分画はナトリウムイオン濃度勾配依存的にグルタミン酸、D－アスパラギン酸、γ－アミノ酪酸を高活性に取り込むが、高親和性コリン取り込みやアセチル基転移酵素活性はシナプトソームに比し著しく低かった。ナトリウムチャネルアゴニストであるさそり毒やベラトリジンによるグルタミン酸取り込み阻害はシナプトソームにより強くみられた。この分画にはグリア繊維性酸性タンパク質が多量に含まれていた。電子顕微鏡による観察では直径約 0.2 μm の球型小胞と 0.3 - 0.8 μm の不定型小胞が同分画に豊富にみられた。線条体からも同様にグルタミン酸等を取り込む細胞膜小胞分画が得られたが線条体シナプトソームと異なり、ドーパミンをほとんど取り込まなかった。その他大脳皮質、小脳、脊髄の各部位からも同様な分画が得られた。

［はじめに］

シナプス伝達において放出されたグルタミン酸（Ｇｌｕ）の大部分はアストログリアによりナトリウムイオン濃度勾配依存性に取り込まれるとされている（1-2)。神経の機能を反映しうる生化学的標品としては、脳ホモジネートから得られる神経終末分画いわゆるシナプトソーム（Ｓｙｎ）が従来盛んに用いられてきたが、グリアの機能を検証するための標品はほとんど知られていない。我々はＳｙｎのパーコール密度勾配遠心法による分画(3)の過程で、明らかに神経終末とは異なる成分がＧｌｕを高活性で取り込むことに気付いた。下述の諸性質からこの分画にはグリア細胞膜小胞（Glial Plasmalemmal Vesicle：ＧＰＶ）が豊富に含まれていると結論し、さらに中枢神経組織各部からのＧＰＶ分画の分離も試み、その各種伝達物質輸送能を検討した。

［方法］

ラット海馬を10容量の等張ショ糖液でホモジネートし遠心によりＰ2分画を得た。これをさらにパーコール密度勾配遠心すると、Ｇｌｕ取り込み活性は比重が約 1.06 のＳｙｎと約 1.046 の分画に分かれた（Ｆｉｇ．１）。後者から軽い遠心でミエリンを除きＧＰＶ分画とした。S1分画を 20, 10, 6%のパーコール非連続密度勾配分画することによっても簡便にＧＰＶを分離することができた。他の中枢神経組織各部位からも同様にＧＰＶ分画を得た。

各アミノ酸の取り込み活性は、 140 mM NaCl 存在下で放射性アミノ酸と反応後ミリポアフィルトレーションを行い、冷 0.9% NaCl で洗浄した後のフィルターの放射活性測定値より求めた。

［結果］

海馬ＧＰＶはナトリウムイオン濃度勾配依存的にＧｌｕ、Ｄ－アスパラギン酸（Ｄ－Ａｓｐ）、γ－アミノ酪酸（ＧＡＢＡ）を取り込んだ。これらの活性はＳｙｎの活性と同程度かそれ以上であった。ヘミコリニウム－３で阻害される高親和性コリン取り込み活性はＳｙｎのおよそ５％にすぎなかった。神経終末特異的酵素であるコリンアセチル基転移酵素活性はＳｙｎに比し著しく低かった。大脳皮質、小脳、線条体、脊髄の各部位からも同様な分画が得られた。線条体ＧＰＶはＧｌｕ、Ｄ－ＡｓｐをＧＰＶと同程度の活性で取り込んだが、ＧＡＢＡの取り込み活性は他部位に比し低かった。また線条体Ｓｙｎはドーパミンを高活性に取り込むがＧＰＶは殆ど取り込まなかった。小脳ＧＰＶはＧＡＢＡ取り込み活

性が高く、脊髄ＧＰＶのアミノ酸取り込み活性は一般に低かった。

この分画は Na, K-ATPase の比活性がＰ2 の 3.2 倍と高く、G-6-Pase や Suc-cyt c 還元酵素活性が低いことから細胞膜に由来する分画である。

ナトリウムチャネルアゴニストであるさそり毒やベラトリジンの添加はナトリウム濃度勾配を低下させることによりＧｌｕ取り込みを阻害すると考えられる。この阻害は海馬ＧＰＶでもみられたが、Ｓｙｎでより顕著であった。

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後ウェスタンブロット法でグリア繊維性酸性タンパク（ＧＦＡＰ）の免疫反応性を調べたところ、海馬ＧＰＶにはＳｙｎに比しＧＦＡＰが多量に含まれていた。

電子顕微鏡による観察では直径約0.2 μmの球型小胞と0.3-0.8 μmの不定型小胞が同分画に豊富にみられ、Ｓｙｎやミエリンの分画とは明らかに異なる形態を示した。

［考察］

ＧＰＶ分画はグリア細胞由来の細胞膜成分を豊富に含んでおり、神経終末成分の含量は低い。しかしながらこの分画の神経細胞体あるいは後シナプス成分の含量については不明であり、今後の課題である。ＧＰＶ分画は中枢神経組織各部位から得ることができ、それらの各アミノ酸取り込み活性の大小はその領域の入力繊維の伝達物質種と関係が深い。従来神経細胞の脇役としてしか認識されていなかったグリア細胞が神経機能に直接関与している可能性が指摘され、最近次第に注目を集めつつあるが、前述のごとくグリア細胞の生化学的標品はこれまで知られていなかった。我々が見いだしたＧＰＶ分画が「グリアの神経機能」の解析に利用しうることが期待される。

［文献］

(1) Herts, R. (1979) Progress in Neurobiol. 13, 277-323

(2) Hamberger, A., Chiang, G.H., Sandoval, E., and Cotman, C.W. (1979) Brain Res. 168, 531-541

(3) Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Heath, J.W., Kidd, G.J., and Rostas, J.A.P. (1986) Brain Res. 372, 115-129

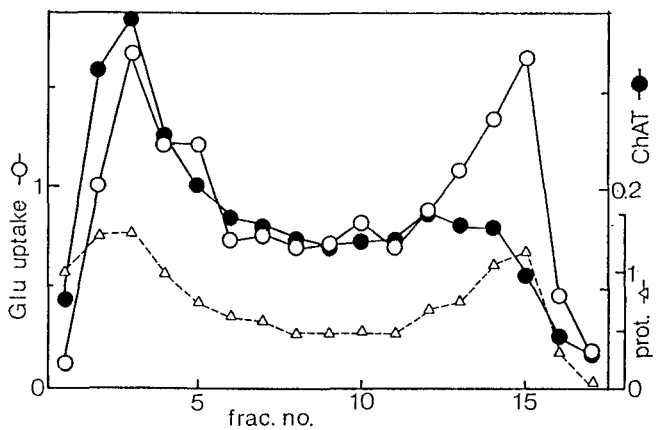


Fig.1. Separation of GPV from synaptosomes by continuous Percoll density gradient centrifugation. Fractions (1.2 ml each) were withdrawn from the bottom of the centrifuged tube and assayed the activities of Glu uptake (open circle;nmol/min/ml) and choline acetyltransferase (ChAT, closed circle; nmol/min/ml), and protein concentration (triangle; mg/ml). Left peak (synaptosomes) shows a high Glu uptake and a high ChAT activities, but right peak (GPV) shows only a high Glu uptake activity.

20 海馬グリア細胞膜小胞のグルタミン酸輸送機構

伊賀耕三[1),2)]、中村洋一[1)]、片岡喜由[1)]
（愛媛大学医学部 第1生理[1)]、整形外科[2)]）

〔要約〕
ラット海馬ホモジネートから Percoll密度勾配遠心法等によりグリア由来の細胞膜小胞を豊富に含む glial plasmalemmal vesicle （GPV）分画を分離精製し、そのグルタミン酸（Glu）取り込み機構について シナプトソーム（Syn）分画との比較実験を行った。GPV分画はSyn分画と同様にナトリウム依存性のGlu取り込み活性が見られ、そしてグルタミン酸濃度依存性に関するKm 及びVmax 値はGPV分画では 4.7μM、 33.4 nmol/mg/min で、Syn分画の 10.9μM、17.4 nmol/mg/min に比較し、Km値は約 1/2で Vmax値は約2倍であった。これはグリア細胞のGlu取り込みがより親和性が高く、速度の速い取り込みであることを示唆する。さらにナトリウム濃度依存性に関して Hill 係数がGPV分画で1.1、Syn分画で2.0という結果が得られ、Glu取り込み時の膜輸送に共役するナトリウムイオンの数が違うことが示唆される。

〔緒言〕
Glu作動性シナプスに於いて伝達物質として放出されたGluは、一部分は直接に神経終末に取り込まれ、他の多くはシナプス周辺に存在するグリア細胞に取り込まれると言われている。放出されたGluの取り込み機構は、神経終末に関してはその生化学的標品であるSynを用いた研究ですでに確立されている[1)]。しかしグリア細胞に関してはSynに相当する標品の分離精製の困難さから研究が立ち遅れている。昨今、Gluは長期増強現象や神経興奮毒性と深く関わることが明らかとなることで益々注目され、このGluのスカベンジャーとしてのグリア細胞の役割が重要視されており、グリア細胞のGlu輸送機構の確立が重要な課題となってきている。我々はラット海馬ホモジネートから Percoll密度勾配遠心法によりグリア由来の細胞膜小胞を分離精製し[5)]、この標品を用いてグリア細胞のGlu輸送機構の酵素反応論的解析をSyn分画と対照させて行った。

〔実験方法〕
ラット海馬ホモジネートを用い、0.32 M sucrose を含む等張な条件で Dunkley の S_1 Percoll procedure[2)]に準じ分画を行った。ホモジネートを遠心分離して得られる S_1分画を 20%、10%、6% の 3-step Percoll gradient の上に重層し 30,000g,5min の密度勾配遠心を行った。得られた 6% Percoll の上層部分を 1000g, 20min 遠心する事でミエリン成分を除き、更に遠心による洗浄を2回行いGPV分画を得た。対照となるSyn分画は 20% Percollの上層部分を同様に2回洗浄して用いた。

Glu取り込み活性は小胞内に取り込まれた [^{3}H] - glutamic acid をミリポアフィルトレイション法[3)]により捕捉洗浄し、scintilation counterにて測定した。取り込み反応は 25℃ で行い、反応液中のGluとナトリウムの濃度を変化させて実験を行った。反応時間はGPV分画は通常 5sec、Syn分画は15sec で行い、得られたデータは蛋白重量あたりで評価した。またGlu濃度依存性の実験に関しては、Glu各濃度で 140mM NaCl 存在下と、 140 mM choline Cl 存在下での活性の差で求められるナトリウム依存性のGlu取り込み活性を評価した。

〔結果及び考察〕
Glu濃度依存性は Fig.1, Table 1 の如く、GPV分画はSyn分画に比較し、Km値は半分でVmax値は2倍であった。従って、グリア細胞はGluに対し親和性のより高い、速度の速い取り込みを行っている事が示唆される。グリア細胞によるGlu輸送のKm、Vmax値はこれまで報告者により非常に大きな差がみられ、グリア細胞と神経細胞の数値の大小関係もまちまちであった[4)]。これは細胞の培養条件の差やそれに起因する細胞内アミノ酸代謝活性の差などに起因するものと思われる。一方、我々はホモジネートを出発材料とし、細胞膜に対するダメージを最小限におさえる

様に工夫した方法により分画した標品を用いたことでこの結果を得ることができたと考える。

またナトリウム濃度依存性は Fig.2, Table 2 の如く、Hill係数がＧＰＶ分画では１．１、Ｓｙｎ分画では２．０という結果が得られた。これは１分子のＧｌｕ取り込み時の膜輸送に共役するナトリウムイオンの数がグリア細胞は１個で神経細胞は２個であることを示唆している。このことは Shousboe ら [4] の培養グリア細胞及び神経細胞での測定の報告と一致している。以上のようなグリア細胞と神経細胞のＧｌｕ輸送機構の相違点がシナプスで繰り広げられる様々の生理現象に深く関わっている可能性が示唆される。

以上、グリア細胞の標品となり得るグリア細胞膜小胞（ＧＰＶ）は神経細胞由来のシナプトソームとは、そのＧｌｕ取り込み機構の特性に於いて明らかに異なることが示された。この標品は神経組織におけるアミノ酸動態の調節機構の研究材料としてだけでなく、グリア細胞の様々な基本的特性の研究に適しており、今後の研究対象として有用なものであると考えられる。

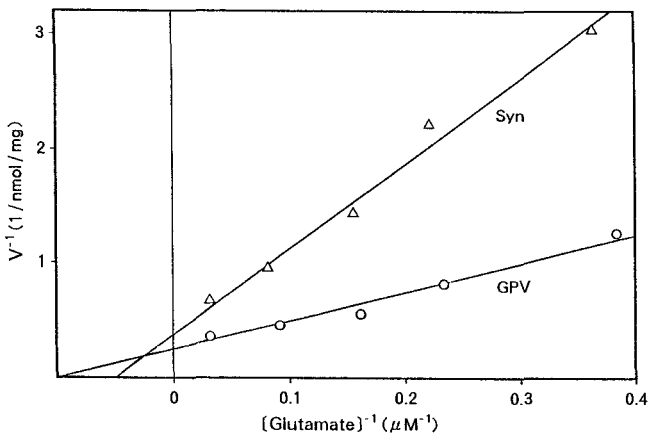


Fig.1 Lineweaver-Burk plot of the dependency of glutamate concentration

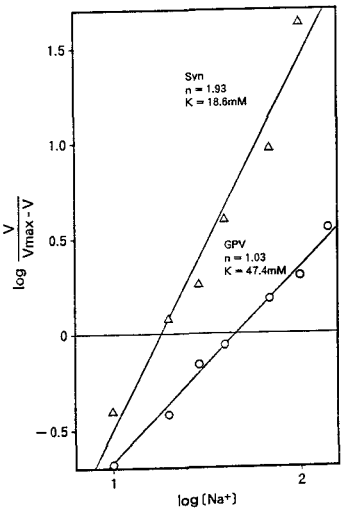


Fig.2 Hill plot of the dependency of Na^+ concentration

Table 1 Km, Vmax of glutamate uptake

Fraction	Km (μM)	Vmax (nmol/mg/min)
GPV	4.7 ± 1.1	33.4 ± 3.8
Syn	10.9 ± 3.1	17.4 ± 1.8

Mean±SD of 5 indivisual determinations

Table 2 Hill's coefficient and K

Fraction	Hill's coefficient	K (mM)
GPV	1.07±0.05	38.4±10.8
Syn	1.99±0.06	19.1± 0.5

Mean±SD of 4 indivisual determinations

［文献］

1) Kanner, B. I. (1978) Biochemistry 17, 3949-3953

2) Dunkley P.R. et.al. (1988) Brain Res. 441, 59-71

3) Divac, I., et.al. (1977) Nature 266, 377-378

4) Shousboe, A. et.al. Glutamine and Glutamate in Mammals, Vol Ⅱ, Kvamme, E., Ed., CRC Press, Inc., Florida 21-35

5) 久保博彦、伊賀耕三、中村洋一、片岡喜由　第３４回　神経化学会大会 論文集

21

培養アストロサイトからの低酸素低グルコース処理による興奮性アミノ酸放出

尾形直則[1)2)]，中村洋一[1)]，片岡喜由[1)]

（愛媛大学医学部 第一生理[1)] 整形外科[2)]）

〔要約〕

虚血神経細胞死の機構における興奮性アミノ酸の役割を明らかにする目的で、我々はラット海馬の培養神経細胞及びアストロサイトを低酸素、低グルコースの虚血状態にし、そのとき放出される興奮性アミノ酸の動態について検討した。5分間の虚血処理により細胞からメディウム中に興奮性アミノ酸が放出された。興味深いことに、アストロサイトからの放出量は神経細胞からのそれをはるかに凌いでおり、しかも放出される興奮性アミノ酸のうち、アスパラギン酸の量の方がグルタミン酸より多かった。これらの結果から、脳虚血時、神経細胞の周囲のグリア細胞から興奮性アミノ酸が放出され、それらに対する受容体を多く持つ神経細胞に持続的Ca^{2+}流入等の異常事態を引き起こし、細胞死に至らしめることが示唆される。

虚血に脆弱な海馬では虚血時に細胞外の興奮性アミノ酸濃度が著しく上昇することが知られている(2)。また海馬スライスを虚血状態にするとスライス全面からグルタミン酸（Ｇｌｕ）が放出されることも観察されている(3)。このＧｌｕ放出に引き続き、細胞内Ca^{2+}の上昇が最初にＣＡ１領域の錐体細胞層で起こる(4)。この領域は海馬の中でも特に虚血に脆弱な部分として知られており、ちょうどＮＭＤＡ受容体が高濃度に存在している部分と一致する。一方培養神経細胞は比較的虚血状態に強いにもかかわらず、低濃度のＧｌｕの添加で容易に死にいたる(1)。これらの事実は、虚血神経細胞死の原因となる興奮性アミノ酸は、ニューロンでなくグリアから放出される可能性を示唆している。この可能性は培養細胞を用いた本研究により実証された。

［実験方法］

Cell preparation：神経細胞；妊娠１７日ラット胎仔より海馬を取り出し、0.25%トリプシンにて 37℃ 15 分間処理し、細胞を解離させる。polyethyleneimine（ＰＥＩ）でコーティングした 11 mm x 11 mm のプラスチックカバースリップ上に最初の24時間は 10%horse serum／5%ＦＣＳ／ＤＭＥＭで培養し、その後は、グリア細胞の増殖を抑えるため無血清培地にて11日間培養した。この操作で得られた細胞の約70%がＭＡＰ２免疫陽性であった。アストロサイト；妊娠19日ラット胎仔海馬に神経細胞と同様な処理を行って得た細胞を、10%horse serum／5%ＦＣＳ／ＤＭＥＭでＰＥＩコートした培養皿に培養し、２回継代し、最後はＰＥＩコートしたカバースリップ上に培養した。この操作により得た細胞の約80%がＧＦＡＰ陽性であり、ＭＡＰ２陽性細胞は見られなかった。

虚血処理：カバースリップ上の細胞を normal medium (5.5 mM glucose加 Heppes buffered Krebs Ringer 液（ＨＫＲ）) で 1-1.5 時間 incubateした後、対照群は *normal medium*、虚血群は ischemic medium (95%N_2／5%CO_2を12分間バブリングした無グルコースＨＫＲ)、それぞれ 500 ul に変えた。この際虚血群では medium にO_2が入らないようにゴム栓し注射針を通して chamber 内へ 95%N_2／5%CO_2を吹き付けた。そして 5分、15分、30分後に medium を sample として採取する。

アミノ酸測定：Sample は細胞断片などの混入を避けるため 10000 rpm、5分間遠心し、上清に同量の 37 mM o-phthal-aldehyde、72 mM 2-mercaptoethanol、0.36 M K-borate (pH 10.4)の反応液と混ぜ、1分後にＨＰＬＣ装置 (Cosmosil 5C 18-AR、4.6 x 150 mm) にinjectした。蛍光は12 ul flow cell、360nm (exitation) 450nm (emission) で測定した。測定感度は、Ｇｌｕ、アスパラギン酸（Ａｓｐ）で、約 50 fmol であった。

蛋白測定：medium を除去した後、細胞を 50 mM NaOH、0.5 mg/ml SDSで溶解し、Bradfordの方法により蛋白を測定した。すべての測定結果は蛋白量あたりの値として評価した。

［結果及び考察］

海馬培養神経細胞及びアストロサイトを虚血処理し、medium 中に放出されるアミノ酸（Ａｓｐ、Ｇｌｕ、グルタミン（Ｇｌｎ）、グリシン（Ｇｌｙ））をＨＰＬＣにて測定した（FIG.1）。神経細胞では虚血によって、medium 中に遊離してくるアミノ酸の量は、対照群に比較してそれほど増加しない。わずかに虚血5分におけるＡｓｐが有意の増加を示す。それに対しアストロサイトでは、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙが著明な上昇を示す（Ａｓｐは 6.7 倍、Ｇｌｕは 2 倍、Ｇｌｙは 4.1 倍）。そしてＡｓｐ、Ｇｌｕは時間と共に減少し、逆にＧｌｎは時間と共に増加していく。medium 中の興奮性アミノ酸が時間とともに減少していくのは、Na^+濃度依存性酸性アミノ酸輸送体による細胞への再取り込みによるものと考えられる。また虚血処理によるＡｓｐ放出量がＧｌｕ放出量を上回ったということは、きわめて意外な結果である。というのは、細胞内の興奮性アミノ酸含有量はＧｌｕの方がＡｓｐよりはるかに多く、用いたアストロサイトのＧｌｕ含有量はＡｓｐの 5.6倍、神経細胞では 6.9倍なのである。それ故虚血処理によるＡｓｐ放出は、単なる細胞からの漏出によるものではないと考えられる。

低酸素 medium（5.5 mM グルコース加ＨＫＲに95％N_2／5％CO_2をバブリングしたもの）や、無グルコース medium（無グルコースＨＫＲ、バブリングしない）による実験も試みたが、対照群に比べ興奮性アミノ酸放出量に著名な変化はみられなかった。またミトコンドリアの呼吸を抑制するＮａＣＮ（1 mM）やO_2を除く目的で $Na_2S_2O_4$（10 mM）を加えても変化は見られなかった。

同じ実験系の神経細胞に対し、60 mM ＫＣｌで脱分極させると、medium中に放出されるＡｓｐは 0.54 から 0.89、Ｇｌｕは 0.86から 2.03 nmol/mg に変化したが、アストロサイトではほとんど変化が見られなかった。

以上の結果より、虚血時において放出される興奮性アミノ酸の少なくとも一部は、神経細胞を取り巻くアストロサイトからであり、しかも虚血初期においては、ＧｌｕよりもＡｓｐが多く放出されるという可能性が示された。このアストロサイトからのＡｓｐ放出が、神経細胞死にどのように関わっているのかということについて、更なる研究が必要であろう。

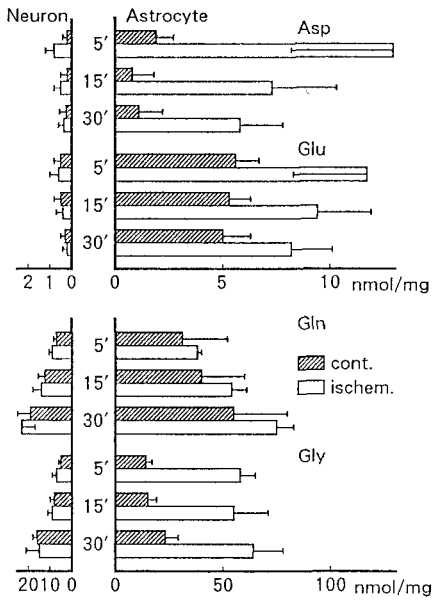


FIG.1 Release of endogenous amino acids from hippocampal cells induced by an ischemic treatment. The amounts (nmol/mg protein) of aspartate, glutamate, glutamine, and glycine in the medium of neuron (left) and astrocyte (right) were measured at 5, 15, and 30 min after changing the medium to the ischemic medium, glucose-free Hepes-buffered Krebs-Ringer solution (HKR) equilibrated with 95% N_2/5% CO_2 (open column), or the normal medium, 5.5 mM glucose in HKR equilibrated with air (closed column) at 37°C. Data are the mean ± SD of 5 experiments.

［参考文献］(1) Choi, D. W., Koh, J., and Peters, S. (1988) J. Neurosci. 8, 185-196.
(2) Mitani, A., Imon, H., Iga, K., Kubo, H., and Kataoka, K. (1990) Brain Res. Bull. 25, 319-324.
(3) Mitani, A., Kadoya, F., Nakamura, Y., and Kataoka, K. (1991) Neurosci. Lett. 122, 167-170
(4) Mitani, A., Kadoya, F., and Kataoka, K. (1990) Neurosci. Lett. 120, 42-45

22 低酸素低グルコース処理によるアストロサイトのエネルギー状態及び興奮性アミノ酸含量の変化

中村洋一[1)]，尾形直則[1)2)]，片岡喜由[1)]
（愛媛大学医学部 第一生理[1)] 整形外科[2)]）

〔要約〕
ラット海馬のアストロサイトが低酸素低グルコース（虚血）処理によりアスパラギン酸（Ａｓｐ）及びグルタミン酸（Ｇｌｕ）を放出する機構の解明のため、虚血処理にともなう細胞内ＡＴＰ含量とD-Ａｓｐ取り込み速度の変化を測定した。５分間の虚血後、ＡＴＰ含量は虚血処理前の約７５％にしか低下しておらず、D-Ａｓｐの取り込み速度も虚血前の約６０％は残っていた。一方虚血後のアストロサイト内のアミノ酸含量を測定すると、Ｇｌｕは放出されるにもかかわらずほとんど変化せず、Ａｓｐにいたっては約５０％増加していた。これらの結果はグリアが虚血刺激に出会う時、取り込み活性の低下以外にも、何らかの機構によりこれら興奮性アミノ酸が細胞内に増え、細胞外に放出することが示唆される。

〔序論〕
我々は培養アストロサイトに低酸素低グルコースという虚血状態を負荷すると興奮性アミノ酸、Ａｓｐ及びＧｌｕ、をメディウム中に放出することを見いだした(1)。この放出を説明する一つの仮説は、エネルギー低下にともなってナトリウム濃度勾配依存性酸性アミノ酸輸送体が逆回転することである。本研究ではまずこの仮説を検証するために虚血処理した細胞のエネルギー状態を反映するＡＴＰ含量とナトリウム濃度勾配を反映していると考えられるD-Ａｓｐの取り込み初速度の変化を実測し、さらに興奮性アミノ酸含量の虚血変化についても測定しＡｓｐ放出機構について考察した。

〔方法〕
アストログリア及びニューロンはラット胎仔海馬から採取し、ポリエチレンイミンでコートしたプラスチックカバースリップ上に培養して用いた(1)。 虚血処理は窒素通気したグルコースを含まない Hepes-buffered Krebs Ringer液（ＨＫＲ）との液交換を空気との接触を可及的に避けて行うことにより負荷した(1)。 ＡＴＰ、ＡＤＰ、ＡＭＰは細胞をＨＫＲで洗浄後、過塩素酸抽出、炭酸水素カリウムによる中和を経てＨＰＬＣ法により測定した：カラム，YMC-ODS-AQ (4.6 x 300 mm)； 移動相，1 mM tetrabutyl ammonium phosphate, 10% acetonitlile, 50 mM Na-phosphate (pH 6.0)； 1 ml/min, 40℃； 260 nm モニター。 アミノ酸含量は細胞を 50 mM NaOH, 0.5 mg/ml SDSで処理し遠心後、o-フタルアルデヒドによりプレラベル後蛍光検出によるＨＰＬＣ法で測定した：カラム，Cosmosil 5C18-AR (4.6 x 150 mm)； 移動相，50 mM Na-phosphate (pH 6.0), 20-70% MeOHの15分間の直線勾配；1 ml/min, 35℃； 340 nm 励起による 450 nm 蛍光モニター。D-Ａｓｐ取り込み速度は虚血処理中の細胞に 1 uM D-[^{3}H]-Ａｓｐをマイクロシリンジで加え、５分後にＨＫＲで洗浄して残った放射活性を取り込み量として求めた。この測定条件では取り込み量は時間とともにほぼ直線的に増加していた。すべての測定において実験後それぞれの蛋白量をＣＢＢ法で測定し、蛋白量あたりの値を評価した。

〔結果及び考察〕
細胞のＡＴＰ含量は虚血処理５分で虚血前の約７５％に低下し、その後ゆっくりと減少したが３０分後でも６５％保持されていた（Ｆｉｇ．１Ａ）。この５分間の虚血処理によって細胞から興奮性アミノ酸が放出されるが(1)、この放出はＡＴＰが完全に枯渇する前に起こっていることになる。またD-Ａｓｐの取り込み初速度は５分間の虚血処理で約６０％に低下したがその後ほとんど変化していなかった（Ｆｉｇ．１Ｂ）。これらの結果から、エネルギー低下にともなってナトリウム濃度勾配依存性酸性アミノ酸輸送体が逆回転することによってアミノ酸放出が起こるという可能性は低いと考えられる。虚血処理により一気にエネルギー枯渇に陥る細胞群とそうでない細胞群が混在しており、前者の細胞内のアミノ酸が

取り込み機構の逆回転により漏出することも考えられるが、以下の実験結果は説明しがたい。

ニューロン及びアストロサイトについて細胞内のアミノ酸含量を測定した（Ｆｉｇ．２）。虚血前の状態ではどちらの細胞でもＧｌｕはＡｓｐの５-６倍含まれていた。ナトリウム濃度勾配依存性酸性アミノ酸輸送体はＧｌｕとＡｓｐを区別せず同様な速度で両アミノ酸を輸送するとされている。もし同アミノ酸輸送体の逆回転によってアストロサイトからＧｌｕとＡｓｐが放出されるならば、ＧｌｕがＡｓｐの５-６倍放出されることになるはずであるが、実際には逆でＡｓｐの方が多かった(1)。５分間虚血後のアストロサイトの細胞内Ｇｌｕ含量を測定すると、かなりのＧｌｕが放出されたにも関わらずほとんど変化しなかった。興味深いことには、Ａｓｐ含量は５分間の虚血後に約５０％増加していた（Ｆｉｇ．２）。このＡｓｐ含量の増加はニューロンでもみられ、この場合はほとんど放出されないせいか約８０％増加していた。

細胞が虚血状態に陥った時には細胞内のアミノ酸代謝に種々の変化が起こりうる。Ｇｌｕ、ＡｓｐどちらもＴＣＡサイクルに直結した代謝物であるし、Ａｓｐはリンゴ酸とともにミトコンドリア内外の還元等量のシャトルとしても機能しているとされている。どのような代謝変化が虚血によるＡｓｐ含量の増加を引き起こすのかは明かではないが、虚血によるＡｓｐ放出の機構に細胞内のこのようなアミノ酸代謝変化が大きく関わっていることが示唆される。

［文献］

(1) 尾形直則，中村洋一，片岡喜由 第34回日本神経化学会大会論文集

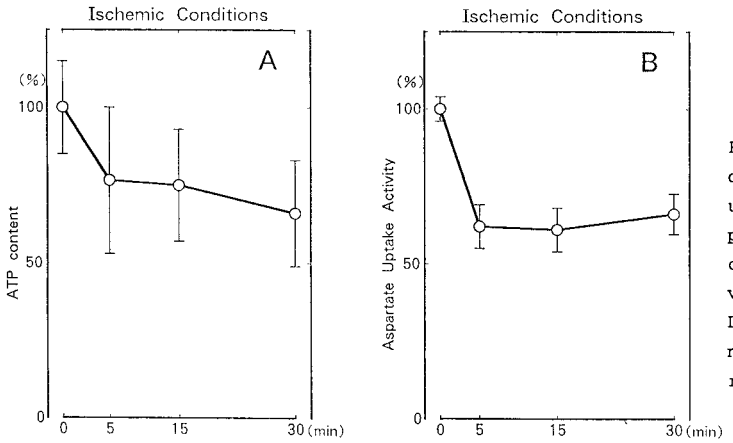


Fig.1. Changes in ATP contents (A) and D-Asp uptake rate (B) of hippocampal astrocytes during ischemic treatment. Control values (time 0) of ATP and D-Asp uptake rate were 137 nmol/mg and 2.8 nmol/mg/min, respectively. n= 3-4

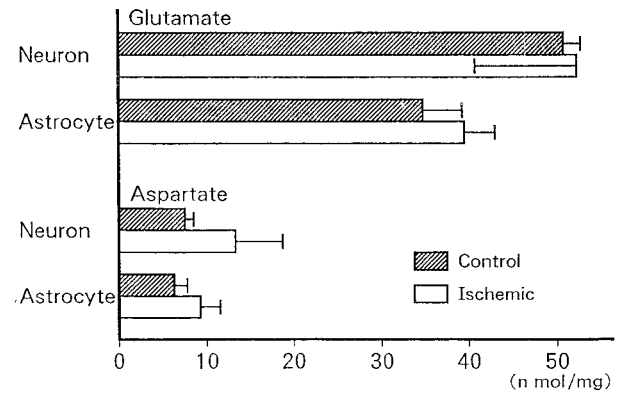


Fig.2. Changes in contents of Glu and Asp of hippocampal neurons and astrocytes by 5 min ischemic treatment. n = 4

23 ニューロンにおけるＮａポンプアイソフォームの選択的活性調節の発達

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（4）．今回，この活性調節が細胞の成熟度によって異なることを見いだした．すなわち，成熟したニューロンではすでに報告したように，グルタミン酸刺激によって普遍型Ｎａポンプの活性が低下し，脳型Ｎａポンプの活性が上昇するという選択的活性調節を受け，全体としてＮａポンプ活性は約2倍上昇した．これに対して，未成熟なニューロンでは，グルタミン酸刺激によって脳型活性も普遍型活性も全体の活性もすべて約2倍上昇した．そして，中間的な成熟度のニューロンでは，グルタミン酸刺激後のＮａポンプ活性の調節も中間的であり，脳型活性と全体の活性は上昇し，普遍型活性は不変であった．以上から，成熟ニューロンで見られるＮａポンプアイソフォームの選択的活性調節は，細胞の成熟と共に発達することが明らかになった．

ニューロンが正常に機能するためには，Ｎａポンプ（Na,K-ATPase）が維持する細胞内外のNa^+とK^+の濃度勾配が必須である．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Ｎａポンプアイソフォームの研究によって，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（α1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（α2型とα3型：以下脳型）が存在すること，そして，細胞の成熟と共に脳型が増加することを明らかにした（1－3）．さらに，成熟したニューロンをグルタミン酸で刺激すると，普遍型Ｎａポンプの活性が低下するにもかかわらず，脳型Ｎａポンプの活性が飛躍的に上昇することによって，全体のＮａポンプ活性が上昇することを見いだした（4）．今回，我々は，成熟ニューロンでみられたこの様なＮａポンプアイソフォームの選択的活性調節が，成熟度の異なるニューロンでも見られるかどうか検討した．

［実験方法］

ニューロンは，Wistar系ラットの１７日胚大脳から分離し，24穴マルチウェル上に２日間から１１日間培養した（1－4）．ニューロンのＮａポンプ活性測定は，既報（2－4）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 グルコース, 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^+の流入量のうち１mMウアバイン添加によって特異的に阻害される量から求める．さらに，種々の濃度のウアバイン存在下でＮａポンプの活性を測定し，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けた．

［実験結果と考察］

図１に示すように，ニューロンのＮａポンプ活性はグルタミン酸刺激によって細胞の成熟度によって異なる影響を受けた．１１日間培養の成熟したニューロンではすでに報告したように，普遍型Ｎａポンプの活性は低下するが，脳型Ｎａポンプと全体のＮａポンプ活性は上昇した（図１Ｃ）．一方，２日間培養の未成熟なニューロンでは，全体の活性も脳型活性も普遍型活性もすべて上昇した（図１Ｂ）．そして，６日間培養の中間的な成熟度のニューロンでは，全体の活性と脳型活性は上昇し，普遍型活性は不変であった（図１Ｃ）．このような活性の変化を定量的に表すために，図１に示すよう

な，Ｎａポンプ活性の２相性のウアバイン阻害曲線をコンピューターで解析して，全体のＮａポンプ活性を脳型と普遍型活性に分け，それぞれのアイソフォームの活性とウアバインに対するK_iを求めた．２日間から１１日間の培養日数のニューロンについての結果が表１である．全体のＮａポンプ活性はグルタミン酸刺激によって，細胞の成熟度と無関係に約２倍上昇した．これは細胞内へのNa^+の流入量も細胞の成熟度と無関係に，グルタミン酸刺激によって約２倍増加した結果（ここには示さず）に対応している．これに対して，脳型活性はすべての培養日数において，約３倍から５倍上昇し，成熟と共に上昇度が増した．一方，普遍型Ｎａポンプはグルタミン酸刺激によって，未成熟の段階では活性が上昇するが，細胞の成熟と共に上昇度は減少し，６日間培養ニューロンでは活性は変化せず，８日目以降では活性は低下した．結果はここに示さないが，このとき，各アイソフォームのウアバインに対するK_iは変化しなかった．

以上から，Ｎａポンプアイソフォームの選択的活性調節が細胞の成熟に伴い発達することが明らかになった．これは選択的活性調節が成熟ニューロンで重要な意味を持つことを示唆しており，「成熟ニューロンにおけるＮａポンプアイソフォームの生理的意義が異なる．（５）」という我々の仮説を支持するものである．

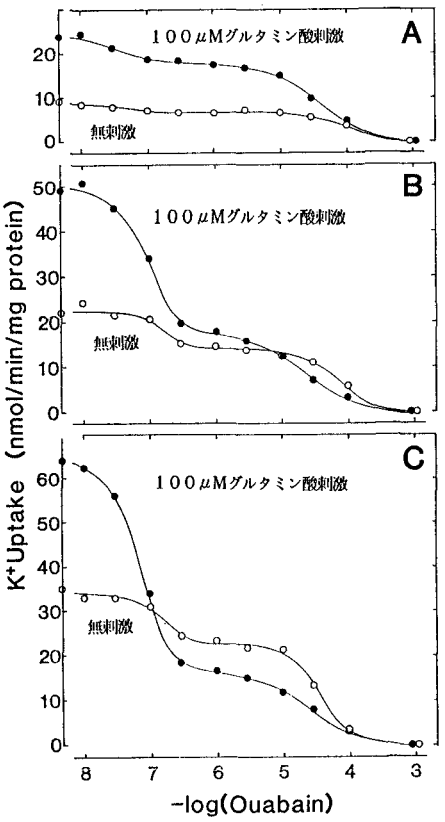


図１．培養ニューロンのグルタミン酸刺激によるＮａポンプ活性の変化．Ｎａポンプ活性のウアバイン阻害曲線．
Ａ．２日間培養ニューロン．　Ｂ．６日間培養ニューロン．
Ｃ．１１日間培養ニューロン．

この研究に用いた^{42}Kは，森永晴彦博士（西ドイツ，ミュンヘン工科大学）が開発した$^{42}Ar-^{42}K$ジェネレーターによって作った．森永博士とジェネレーターを貸与して下さった日本アイソトープ協会に深く感謝いたします．

培養日数	2日間(n=5)	4日間(n=5)	6日間(n=4)	8日間(n=4)	11日間(n=5)
<全活性>					
無刺激	9.2 ± 1.1	14.1 ± 0.6	22.0 ± 1.3	27.4 ± 1.5	35.7 ± 0.9
グルタミン酸刺激	23.8 ± 1.2ᵃ	30.5 ± 0.6ᵃ	49.0 ± 1.7ᵃ	53.6 ± 3.4ᵃ	63.9 ± 2.4ᵃ
（K^+取り込み活性：nmol/min/mg protein）					
グルタミン酸刺激	2.7 ± 0.3	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.1	1.8 ± 0.1
／無刺激 （K^+取り込み活性の比）					
<脳型活性>					
無刺激	2.3 ± 0.4	6.4 ± 0.5	8.5 ± 1.1	11.6 ± 1.0	11.7 ± 1.2
グルタミン酸刺激	6.2 ± 0.9ᵇ	17.6 ± 1.0ᵃ	35.1 ± 1.3ᵃ	42.9 ± 4.1ᵃ	53.6 ± 2.4ᵃ
（K^+取り込み活性：nmol/min/mg protein）					
グルタミン酸刺激	3.3 ± 1.0	2.8 ± 0.1	4.4 ± 0.7	3.8 ± 0.6	4.9 ± 0.7
／無刺激 （K^+取り込み活性の比）					
<普遍型活性>					
無刺激	6.9 ± 0.9	7.7 ± 0.2	13.6 ± 0.2	15.8 ± 1.4	24.0 ± 1.0
グルタミン酸刺激	17.5 ± 0.5ᵃ	12.8 ± 0.8ᵃ	13.9 ± 0.9	10.7 ± 1.6	10.3 ± 1.2ᵃ
（K^+取り込み活性：nmol/min/mg protein）					
グルタミン酸刺激	2.7 ± 0.3	1.7 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.1
／無刺激 （K^+取り込み活性の比）					

表１．培養ニューロンのグルタミン酸（１００μM）刺激によるＮａポンプ活性の変化．
平均値±ＳＥＭ　ᵃ$P<0.01$，ᵇ$P<0.05$，グルタミン酸無刺激に比較して有意．

［文献］

1. 井上順雄，原論吉，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. Inoue, N. and Matsui, H.(1990) Brain Res. 534, 309-312.
5. 井上順雄（1991）生化学，63，356-359.

24

[1-^{13}C]-D-glucose を用いたMRSによる ラット脳発達におけるアミノ酸代謝の変化について

金松知幸　塚田裕三　平野修助*
(創価大・生命科学研究所、東邦大・医学部・第二生理*)

[要約]　[1-^{13}C]-D-glucose (^{13}C-Glc)をラットの腹腔に投与した後、脳組織の可溶性分画を抽出し、それを核磁気共鳴装置(MRS)で分析することにより各アミノ酸の各位の炭素への^{13}Cの組み込み量を測定した。胎生19日目、生後1日目及び成鼠脳を用い発育過程に伴うアミノ酸代謝の変化を経時的に検討した。生後6週令では、グルタミン酸(Glu)、グルタミン(Gln)、γ-アミノ酪酸 (GABA)、アスパラギン酸(Asp)への^{13}Cの組み込みは著しく、投与後、時間とともに増加しているのが認められた。胎仔及び生後1日目では、脳内へのGlcの取り込みが生後6週令より多いにもかかわらず、前記アミノ酸への^{13}Cの組み込み量は少なく、アラニン(Ala)に高い組み込みが認められた。これらのことから脳の発育に伴いアミノ酸代謝が大きく変化していることが確かめられた。また、脳組織サンプリング時に、断頭後速やかに頭部のみを液体窒素中で凍結固定した場合と、ラット全身を液体窒素中で凍結固定した場合とで脳組織の^{13}C-Glc量、^{13}C-乳酸 (Lact)量に大きな差が認められると共に、アミノ酸への^{13}Cの組み込みにもわずかながら差が見られた。

[はじめに]　脳組織では、Glcはエネルギー源として重要であるばかりでなく、脳内に取り込まれたGlcの炭素は、解糖系、TCAサイクルを経て種々のアミノ酸に組み込まれていくことから、Glcの炭素鎖代謝と脳機能との関連に興味が持たれる。したがって、今後Glcの脳内代謝を非侵襲的、経時的に調べ得るならば、高次脳機能の神経化学的基盤を探る上で重要な技術となるものと思われる。現時点では、サーフェイスコイルを用いた研究が行なわれているが[1)]、その解析能力は、必ずしも各アミノ酸の各位の炭素を同定するに至っていない。著者らは、脳は発育に伴い細胞構築が著しく変化することから、[1-^{13}C]-D-Glcを用いてGlcの炭素鎖代謝が脳発育に伴い、どのように変化するのかをアミノ酸代謝を中心に*in vitro*で調べ、興味ある知見が得られたので報告する。

[方法]　実験動物はSD系ラットの生後6週令の雄、生後1日目及び妊娠19日目の胎仔を用いた。体重1g当たり1mgの[1-^{13}C]-D-Glcを、腹腔内（胎仔の場合は母ラットの腹腔）に投与した後、15分、30分後に液体窒素中で急速に凍結固定し、脳をドライアイス上で摘出した。また成鼠の場合、断頭後、頭部を凍結固定したものも用いた。凍結脳組織の湿重量を測定後、75% EtOH中でソニケーションにて粉砕した後、遠沈しその上清に等量の水飽和クロロホルムを加へ強く攪拌振盪後、遠沈し水上層を取りそれを遠心乾燥した。D_2Oで作成したリン酸buffer (pH7.4) でその乾固物を溶解し脳組織400mgに相当するサンプルを sodium trimethylsilyl propionate (TSP) を内部標準としGE-Ω 500及びJEOL EX-400で分析した。TSPのピーク高に対する各アミノ酸各位炭素のピーク高を求めそれをもとに脳組織1g当たりの相対ピーク比を求めた。

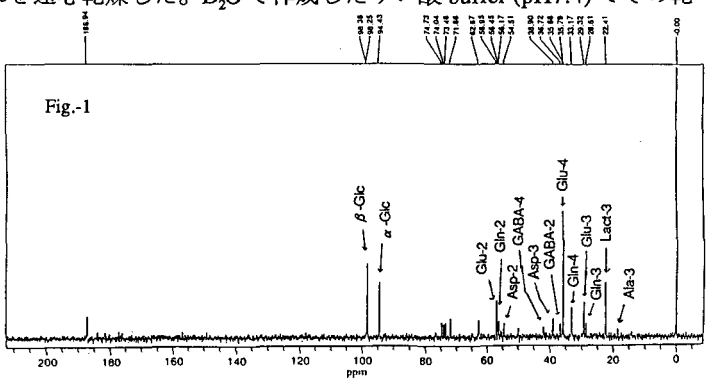


Fig.-1
^{13}C NMR spectrum of adult rat brain extract obtained 15 min after [1-^{13}C]-glucose injection

[結果及び考察]　生後6週令ラットにおいて、^{13}C-Glc

投与後、15分後に全身を液体窒素中で凍結固定した場合、脳抽出液中の^{13}C-Glc と^{13}C-Lact はほぼ等しいピーク高を示していたが（図-１）、断頭後、速やかに頭部のみを液体窒素中で固定した場合は、^{13}C-Glcのピーク高は、著しく減少すると共に、^{13}C-Lact が著明に増加していた（表-１）。また、GABAへの^{13}Cの取り込みが増すなどアミノ酸への^{13}Cの移行にも変化がみられた（表-１）。これらの結果は、脳組織が冷凍固定されるまで血流が維持されているか否かに寄るものと思われた。即ち、断頭されたことによって、脳組織から血液が流出すると共に嫌気的状態になることにより、^{13}C-Glc が減少し、^{13}C-Lact の生成が増加し、アミノ酸への^{13}Cの流れも変化したものと思われる。これらのことから、以後の実験はラットの全身を液体窒素中で固定する方法で行なった。この場合、^{13}C-Glcのピークの主なものは血液由来の可能性が充分考えられる。生後６週令ラットにおいて、^{13}C-Glc 投与後 15 分で、Glu の４位の炭素ピークが最も高く、次に α, β-Glc の１位、乳酸の３位がそれに続き、Glu の 2, 3 位のピークは低かった。また、Glnの４位のピークも明確に認められ、GABA の 2, 4 位、Aspの 2, 3 位、Gln の 2, 3 位のピークも認められた（図-１）。30分後では、各アミノ酸への^{13}Cの組み込みが著しく増加した。生後１日目のラットにおいては、^{13}C-Glc 投与後、15分で、脳内に多量の^{13}C-Glc が認められたものの、アミノ酸のピークには強いシグナルは認められず、Glu の４位、Ala の３位のピークが低いながらも認められるにすぎなかった。30分後でも、アミノ酸への取り込みの増加は Ala 以外では認められなかった。胎生19日目においては、生後1日目とほぼ同様の結果であったが、Ala への組み込み量は、生後1日目より著しかった（図-２）。これらのことは、胎生期及び生後1日では、脳内Ala 濃度が成鼠に比べ高いとの報告[3]と考え合わせると、Ala の代謝が活発であることを意味していると同時に、胎生期及び生後1日ではTCAサイクルの活性が低く、脳発育に伴ってTCA サイクルが活性化され、それに伴いアミノ酸への^{13}Cの組み込みも増加するものと思われた。このように、^{13}C-Glcを用いMRSで分析することにより、脳機能と密接に関連するアミノ酸代謝の変化が各アミノ酸を分離することなく調べられることから、今後、^{13}Cを用いて非侵襲的MRS 及びMRI[2] 技術が開発されるならば、高次脳機能に関するより多くの情報が与えられるものと思われる。最後に、^{13}C-MRSの測定に関してご指導を頂きました、明治薬科大学の梶原正宏教授ならびに試料の測定に関しご協力を頂きました島津東京分析センターの大薮又茂氏に謝意を表します。

Table-1. Relative enrichments of ^{13}C- amino acids and -lactate labeled from [1-^{13}C]-glucose

	ppm	Whole Body	Decapitation
α-Glc	94.43	52.38	17.86
β-Glc	98.25	69.90	18.08
Lact-3	22.41	51.81	168.15
Ala-3	18.50	8.91	9.84
Gln-3	28.61	7.60	4.91
Gln-4	33.17	18.97	19.23
Gln-2	56.45	6.27	8.46
Glu-3	29.31	18.42	20.42
Glu-4	35.80	106.12	115.55
Glu-2	56.95	21.54	29.05
GABA-3	25.99	N.D.	2.18
GABA-2	36.72	8.94	13.79
GABA-4	41.96	5.52	8.50
Asp-3	38.90	11.94	14.19
Asp-2	54.52	9.68	14.23

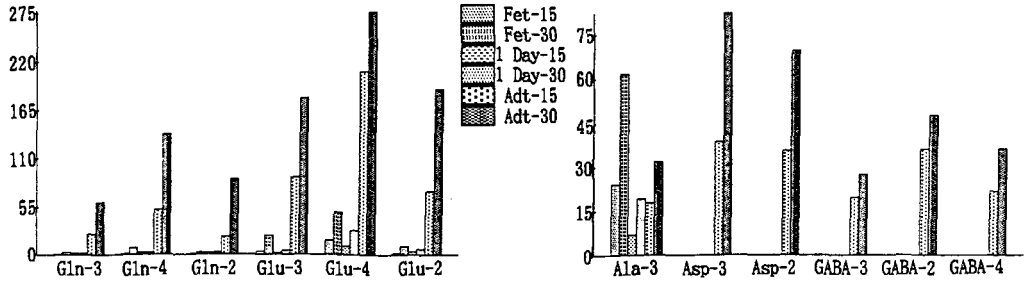


Fig.-2. Time courses of the ^{13}C labelling of amino acids of developing rat brain extracts from [1-^{13}C]-glucose

[文献] 1) Behar, K. L., Petroff, O. A. C, Prichard, J. W., Alger, J. R. and Shulmam, R. G. (1986) Magnetic Resonance in Medicine. 3, 911-920. 2) Kormos, D. W. and Yeung, H. N. (1987) Magnetic Resonance in Medicine. 4, 500-505. 3) Noguchi, T., Nomura, M. and Tsukada, Y. (1980) Neurochemical Research. 5, 1117-1125.

25 α2ーマクログロブリンの中枢ニューロン突起伸展作用機序

飯島　昇[1,2]，宮本　豊[2]，斎藤茂治[1]，森　俊夫[2]，北畠克顕[2]，高坂新一[1]

国立精神・神経センター 神経研，代謝[1]，　アサヒビール　中研[2]

〔要約〕

我々はアストロサイト(As)培養上清(CM)中の中枢ニューロン突起伸展因子の少なくとも1つは、α2-マクログロブリン(α2M)であることを既に報告している[1,2]。今回northern blottingを行い、Asのα2M mRNA発現を認めた。また、^{35}S-メチオニン標識したAsのCM中に、α2Mを免疫沈降により検出した。このことから、AsCMより単離同定したα2MはAsの産生によると考えられた。次に、α2Mのニューロン突起伸展作用機序を明らかにするため以下の実験を行った。α2Mはプロテアーゼインヒビターであることから、PMSF，leupeptin等各種プロテアーゼインヒビターのニューロン突起伸展活性を測定した。この内α2Mのみが有意に突起伸展活性を示した。さらにα2Mのプロテアーゼ阻害作用を消失させたα2M-トリプシン複合体（α2M･T)と native α2Mのニューロン突起伸展効果を比較したところ、α2M･Tはnative α2Mが活性を示さない低濃度(0.1 μg/ml)から高い突起伸展活性を有することが明らかとなった。以上の結果から、α2Mのニューロン突起伸展活性はニューロン上のα2M-receptorを介した作用である可能性が示唆された。

中枢神経系の発達過程において、アストロサイト（As）は、ニューロンの分化、成熟、生存維持に種々の神経栄養因子を介して影響を与えることが知られている。我々はAs培養上清中の中枢ニューロン突起伸展因子の少なくとも一つが血漿プロテアーゼインヒビターとして知られているα2-マクログロブリン（α2M）であることを既に報告した[1,2]。今回、Asがα2Mm RNAを発現し、また、α2Mを生合成していることを確認するとともに、α2Mのプロテアーゼ阻害作用を消失させた場合中枢ニューロン突起伸展活性がいかなる影響を受けるかにつき検討したので報告する。

［方法］

As及びニューロン、ミクログリア、髄膜由来フィブロブラストは既報にしたがって調整した[1-3]。各細胞のα2M mRNAはノザンブロット法によりラットα2M cDNAのEcoRIフラグメント(2.6kb)をランダムプライミング法で標識したプローブを用いて検出した。免疫沈降はGebicke-Haerterらの方法で行った[4]。

ラットα2Mはテレピン油投与したラットの血漿よりLonberg-Holmらの方法にしたがって精製した[5]。α2M-トリプシン複合体(α2M･T)はα2Mにモル比で5倍量のトリプシンを加え37℃ 30分反応後、PMSFを加えQ-Sepharoseにより精製した。

各試料のニューロン突起伸展活性は、胎生17日令のラット大脳皮質ニューロンの培養系を用い既報の方法にしたがって測定した[1,2]。

［結果及び考察］

我々はAs培養上清(AsCM)中のニューロン突起伸展因子としてα2Mを単離同定した。今回Asのα2M生合成を検証するためAs培養系に混入をする可能性のあるニューロン，ミクログリア，髄膜由来フィブロブラストよりRNAを調製し、ノザンブロット法によりα2M mRNAの発現を検討した。Asにおいてのみα2Mプローブとハイブリダイズするバンドが検出されたが、他の細胞においてはα2M mRNAを検出することは出来なかった(図1)。さらに、^{35}S-メチオニンで標識した各細胞の培養上清について抗ラットα2Mを用い免疫沈降を行ったところ、AsCM中にのみα2Mを検出した。以上のことからAsCMより単離同定したα2MはアストロサイトにⅠ来するものと考えられた。次にα2Mのニューロン突起伸展機序を明らかにするためα2Mのプロテアーゼ阻害作用と突起伸展活性の関係につき検討した。まず各種プロテアーゼインヒビターのニュ

ーロン突起伸展活性を測定したところ、ラット及びヒトα2Mのみが突起伸展を有意に促進した(図2)。さらにラットα2Mにトリプシンを反応させ、α2Mのプロテアーゼ阻害作用を消失させたα2M·Tとnative α2Mのニューロン突起伸展における効果を比較検討した。α2M·Tはnativeα2Mが活性を示さない低濃度から明らかに突起伸展活性を示した(図3)。以上の結果からα2Mの示すニューロン突起伸展作用はα2Mのプロテアーゼインヒビターとしての働きでは説明できず、むしろレセプターを介する可能性が考えられた。現在ニューロンにおけるα2Mレセプターの存在について検討中である。

本研究の一部はヒューマンサイエンス振興財団の助成により行われた。

[参考文献]

1)森　俊夫, 飯島　昇, 北畠克顕, 高坂新一 (1989) 神経化学 28, 84-85

2)Mori, T., Iijima, N., Kitabatake, K. and Kohsaka, S. (1990) Brain Res. 527, 55-61

3)Nakajima, K., Hamanoue, M., Shimojo, M., Takei, N. and Kohsaka, S. (1989) Biomed. Res. 10, Suppl.3, 411-423

4)Gebicke-Haerter, P.J., Bauer, J., Brenner, A. and Gerok, W. (1987) J. Neurochem. 49, 1139-1145

5)Lonberg-Holm, K., Reed, D.L., Roberts, R.C., Herbert, R.R., Hillman, M.C. and Kutney, R.M. (1987) J. Biol. Chem. 262, 438-445

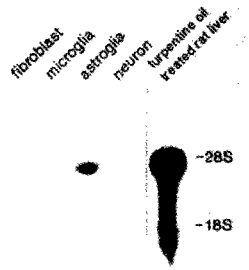


図1 Northern blotting によるα2M mRNAの検出

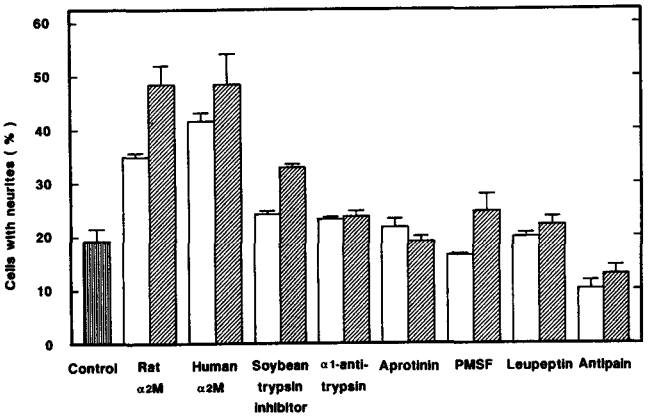


図2 各種プロテアーゼインヒビターの突起伸展活性

10 μg/ml　100 μg/ml

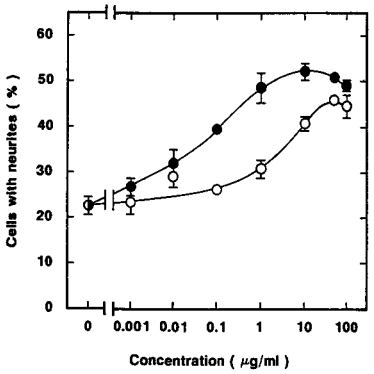


図3 Native α2Mとα2M·Tの突起伸展活性の比較

native α2M　α2M•T

26 プロテアーゼ阻害剤によるPC12細胞の分化誘導の解析－神経突起形成とクラスリン－

斎藤祐見子[1] 中沢真理子[2] 小倉明彦[2] 大海忍[3] 門田朋子[4] 津吹聡[5] 伊藤尚[5]
川島誠一[1]
（都・老人研・生化[1]、三菱生命研・脳神経薬理[2]、東大・医科研[3]、千葉大・医・解剖[4]、青山学院大・理工[5]）

〔要約〕Benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Leu-aldehyde (ZLLLal)は低濃度で PC12細胞に特徴ある神経突起伸長を誘導する。そこで、LLLalをリガンドとしたアフィニティカラムを作成し、結合するタンパク質を精製・同定した。低 pH では 33K,35K が溶出し、6M 尿素(pH 7.3)では 180K が溶出した。それらの部分アミノ酸配列や2次元電気泳動、抗体との交差性などの諸性質から、33K,35K はクラスリン軽鎖、180K はクラスリン重鎖と同定した。ラット肝臓由来のクラスリンやウシ脳由来のクラスリンも LLLal カラムに結合能を持ち、低 pH ではクラスリン軽鎖が、6M尿素(pH7.3)では重鎖が溶出した。軽鎖・重鎖の分離実験から、LLLal に直接結合するのは重鎖であることが判明した。また、ZLLLal による神経突起伸長時にはクラスリン重鎖の局在が変化することも観察された。PC12細胞において神経突起伸長活性を持たない ZLLL-COOH をリガンドとしたカラムには、クラスリンおよびクラスリン重鎖は結合しない。これらの事実から ZLLLal は PC12細胞内でクラスリンと結合し、神経突起形成への経路をたどることが示唆される。

（はじめに）

我々はこれまでロイペプチン誘導体プロテアーゼ阻害剤(Ac-Leu-Leu-Nle-al:ALLNal)が PC12細胞に対し、形態的にも生化学的（神経伝達物質関連酵素の誘導）にも分化を誘導することを示してきた。その分化は細胞体からの1-2本の長い神経突起が誘導されること、初期代謝過程に Aキナーゼ,Cキナーゼ,Ca^{2+}流入が関連しない、分化の諸様相が一時的であること、などの点でPC12細胞における既知の分化因子(NGF, bFGF, dBcAMP)とは異なって特徴づけられる[1,2]。

より特異性の高いプロテアーゼ阻害剤を求めて ALLNal を化学修飾した結果、ALLNal の約50分の1の濃度、25-30nM で ALLNal によるものと形態的に同じ神経突起を誘導できる benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Leu-al (ZLLLal) を得ることができた[3]。そこでLLLal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。PC12細胞で調べたところ、細胞そのものに低 pH で溶出する 33K が検出できた[4]。成熟ラット筋肉を LLLal カラムにかけても低 pH で溶出する 33K が存在し、ペプチドマップ上、PC12細胞由来の 33K と同じ挙動を示した。今回、ラット筋肉を材料に 33K の部分アミノ酸配列を決定し、その他の諸性質からクラスリンそのものが LLLal カラムに結合することが判明したので報告する。

（方法）

(1)PC12細胞の培養、アフィニティカラムの作製、ペプチドマップ、2次元電気泳動は既報[5]によった。PC12細胞はPC12h細胞[6]を用いた。

(2)アフィニティクロマトグラフィー

材料:PC12h細胞、成熟ラット筋肉

それぞれを EDTA、EGTA、ロイペプチン、DFP を含む 0.2M NaCl-0.1Mリン酸緩衝液(pH7.3)中でホモジナイズし、常法によりサイトゾル分画と膜分画を調製し、0.1M リン酸緩衝液-0.2M NaCl(pH7.3)に対して透析した。それぞれの分画にトリトンX-100を最終濃度1%になるように加え、LLLal カラムにチャージし充分洗浄後、0.1M クエン酸緩衝液(pH4.0)で溶出する。0.1M リン酸緩衝液(pH7.3)にて pH を中性に戻した後、6M 尿素(pH7.3)で溶出する。それぞれ TCA 沈澱後、SDS-PAGE を行なった。アフィニティカラムは最後に0.1% SDS で溶出し、残ったタンパク質がないことを確認した。非特異的吸着は突起伸長誘導効果のない ZLLL-COOH をリガンドとした LLL-COOH アフィニティカラムで検出した。

(3)部分アミノ酸配列決定は Aebersold らのマイクロシークエンス法[7]によった。(4)クラスリンの

精製はラット肝臓、ウシ脳を材料に、Blitz ら[8]、Lisanti ら[9]の方法に準じて行なった。(5)クラスリン軽鎖・重鎖の分離は Lisanti ら[9]、Winkler & Stanley の方法[10]に従った。(6)抗クラスリン重鎖抗体による免疫染色は CHC5.9 モノクローナル抗体(Progen社)を用い、Bruder & Wiedenmann の方法[11]に準じた。

(結果と考察)

1. LLLal カラムに PC12細胞のサイトゾル分画、膜分画をそれぞれチャージすると、低 pH により 33K と、量が 33K よりかなり少ない 35K が溶出し、6M尿素(pH7.3)により 180K が溶出した。180K は尿素を含む低 pH 緩衝液によってはほとんど溶出されなかった。培養上清には LLLal カラムに特異的に結合するタンパク質は見られなかったので LLLal の標的は細胞内に存在すると考えられた。実際、15nM で効果的な突起伸長を引き起こす蛍光ラベルしたプロテアーゼ阻害剤(Dans-LLLal)を開発し、レーザー顕微鏡による解析を行なったところ、プロテアーゼ阻害剤は核を除く細胞内へ速やかに透過することが判った。これらの事実から、ZLLLal はPC12細胞のなかに入ってその標的と結合することが立証された。

2. 成熟ラット筋肉を材料にして精製した 33K の部分アミノ酸配列を決定したところ、クラスリン軽鎖βと非常にホモロジーが高かった。2次元電気泳動では、LLLal カラムに結合する 33K,35K はクラスリン軽鎖α、βと同じ位置に移動した。さらに 180K は抗クラスリン重鎖抗体と交差した。また、ラット肝臓、ウシ脳から精製したクラスリンは LLLal カラムに結合し、軽鎖は低pHにより、重鎖は6M尿素(pH7.3)により溶出した。これらのことから、33K/35K はクラスリン軽鎖、180K はクラスリン重鎖と判断した。また、ラット脳ホモジネートを発生段階を追って LLLal カラムにかけた結果、神経突起伸長の最も活発といわれる時期(生後1－14日)に一致してタンパクあたりのクラスリン軽鎖量が豊富に検出できた。これは、in vivo の神経発生にクラスリンが関連することを示唆した結果と考えられる。

3. LLLal カラムに直接結合するのはクラスリンの重鎖か軽鎖かを検討した。ウシ脳由来クラスリンを煮沸後遠心[9](軽鎖は熱耐性であり上清に、重鎖は変性して沈澱に分かれる)またはチオシアン酸ナトリウム[10]により分離し、透析後、それぞれ LLL または LLLal カラムにかけ、尿素で溶出した。その結果、軽鎖はどちらのカラムにも結合しないが、チオシアン酸ナトリウムで分離した重鎖が LLLal カラムに結合した。

以上のことから、ZLLLal は PC12細胞内へ透過し、クラスリン重鎖を介してクラスリン結合することが強く示唆された。また、PC12細胞の突起伸長時におけるクラスリン重鎖の変動を抗体を用いて調べたところ、重鎖の局在の変化は NGF よりも ZLLLal による突起形成で顕著に見られた。この観察も、クラスリンが ZLLLal による突起形成に深く関連していることの傍証である。現在、ZLLLal がクラスリンに対して直接及ぼす効果について再構成クラスリン系を用いて検討を進めている。

クラスリンはエンドサイトーシスや膜輸送の機能を担っているといわれている。本研究は、神経突起形成というめざましい形態変化のごく初期の段階にクラスリンが深く関わっていることを示し、クラスリンの新たな機能を提示した最初の報告である。また同時にプロテアーゼ阻害剤はいわゆるプロテアーゼにのみ働きかけるものではないことを示す好例となった。

(参考文献)

(1)Saito,Y.,Kawashima,S. Neurosci Lett.89,102(1988). (2)Saito,Y., Kawashima,S. J Biochem. 106,1035(1989). (3)Saito,Y. et al. Neurosci Lett.120,1(1990) (4)Saito,Y. et al. Neurosci Res. 13,S97(1990). (5)斎藤ら 神経化学29,200(1990). (6)Hatanaka.,H. Brain Res.222,225 (1981).(7)Aebersold,R.H. et al. PNAS.84,6970(1987). (8)Blitz,A.L. et al. J Cell Biol.75, 135(1977). (9)Lisanti,M.P. et al. Eur J Biochem.125,463(1982). (10)Winkler,F.K.,Stanley, K.K. EMBO J.2,1393(1983). (11)Bruder,G.,Wiedenmannn,B. Exp Cell Res.164,449(1986).

27 コプチシンおよびベルベリンによるＰＣ１２細胞の神経突起形成作用

藤田興、坂本秀生、池亀守、葛谷博磁
（藤田保健衛生大学・総医研・分子生物）

〔要約〕コプチシンおよびベルベリンが、ＰＣ１２細胞に対して神経突起形成作用を有する事を見いだした。コプチシンおよびベルベリンにより、ＰＣ１２細胞のConditioned Mediumおよび細胞中のＮＧＦ量は増加し、抗ＮＧＦ抗体による免疫蛍光染色により明瞭に染色された。従って、これら薬物による神経突起形成作用には、ＮＧＦの何らかの関与が考えられる。しかし、これらによる神経突起形成作用は、抗ＮＧＦ抗体およびK-252bのいずれによっても阻害されなかった。ＰＣ１２細胞内で生合成されたＮＧＦが、細胞内膜のレセプターと結合して作用を発現する可能性を示唆した。

【目的】 コプチシンは黄連に、ベルベリンは黄連および黄柏に含まれるアルカロイドで、ベルベリンは皮下注射により、一過性の血圧降下作用がある。コプチシンの作用については明確な記載はない。脳溢血および高血圧に効果がある漢方薬、黄連解毒湯の生化学的作用を、ラット褐色細胞腫由来のクローン化細胞のＰＣ１２細胞を用いて研究中に、神経突起様の樹状突起形成作用を有することを見いだした。そこでこの製剤の構成生薬のエキスについて調べたところ、黄連エキスおよび黄柏エキスに神経突起様形成作用がある事を見出した。この研究では、黄連および黄柏中に含まれる成分であるコプチシン、ベルベリンの、ＰＣ１２細胞にたいする神経突起様（以後神経突起形成と略す）形成作用を、神経成長因子（ＮＧＦ）の作用との関連で検討した。

【方法】 １．ＰＣ１２細胞の培養および薬物の添加　高グルコースＤＭＥＭ（Dulbecco Modified Eagle's Medium,Gibco430-2100EA）にウシ胎児血清およびウマ血清をそれぞれ7.5%および5.0%になるように添加し、CO_2濃度5%、飽和水蒸気中、３７℃で培養した。ストレプトマイシン100μg/mlおよびペニシリン100units/ml濃度の抗生物質を添加した。コプチシンおよびベルベリンは、ＤＭＥＭに1mg/100mlの濃度に溶解した。0.22μmで口過除菌（不溶物があり完全には溶解しない）し、直接培養に使用した。Cycloheximideは3.5mM濃度に水で溶解し、終濃度2.33 μM濃度に添加した。Ｋ-252bは2mM濃度にＤＭＳＯに溶解し、終濃度200nM濃度に添加した。ＮＧＦは50ng/mlの濃度に添加した。培養液および薬物は２日毎に交換した。

２．ＰＣ１２細胞およびConditioned Medium中のＮＧＦの定量　S.Korsching and H.ThoenenによるTwo-Site Enzyme Immunoassay[1]に従って、蛍光法により測定した。ＮＧＦはオスマウス顎下腺から、Boccini ら[2]の方法で分離し、さらにPBSで緩衝化したTSK-3000SW（東ソー）でゲルロ過した。精製ＮＧＦをウサギに免疫し、抗ＮＧＦ抗血清を作製した。またTresyl-Toyopearlを用いてＮＧＦアフィニテイカラムを作製し、抗ＮＧＦ抗体を精製した。Conditioned Mediumはロ過後そのまま、細胞は冷PBSで洗浄後、PBSを加えて超音波処理をし、各々等量のprotease Inhibitor入り緩衝液を加えたものを試料とした。

３．ＮＧＦの免疫蛍光染色　ＰＣ１２細胞を、低速（約100xg）で10分間遠心分離して採取後、直ちにO.C.T. Compound（Tissue-Tek,Miles）中に凍結し、４－６μmに薄切した。乾燥後、Zamboni液で固定し、抗ＮＧＦモノクローン抗体（オスマウス顎下腺ＮＧＦで免疫されたラット脾細胞とＮＳ－１ミエローマ細胞を融合して作製した）を作用後、抗ラットＩｇＧ抗体－ＦＩＴＣを反応させて染色した。

【結果】 １．神経突起の形成　ＰＣ１２細胞の神経突起形成を写真１に示した。Ａは薬物無添加対照、ＢはＮＧＦ（50ng/ml）を作用させて３日目、Ｃ、Ｄはそれぞれコプチシン（10μg/ml）およびベルベリン（10μg/ml）作用４日目の写真で、神経突起の形成が認められる。

２．ＮＧＦの免疫蛍光染色　写真２に結果を示した。薬物無添加のＰＣ１２細胞でも細胞膜に染色が認められる（Ａ）。ＮＧＦを作用させた細胞では、細胞膜により強い染色が（Ｂ）、コプチシンを作用させた細胞では核内に明瞭に、細胞膜にも弱い染色が認められる（Ｃ）。ベルベリンを作用させた細胞では、細胞膜および核内に明瞭に染色される（Ｄ）。

３．ＮＧＦの定量　２日毎に薬物および培養液を交換し、計６日後に採取したConditioned Mediumと細胞中のＮＧＦを測定した。２５ｃｍ^{2}のフラスコ、培養液７mlで培養して測定した結果（同一試料を３回測定した平均値）

を表１に示した。培養液中および細胞中のいずれについても、総ＮＧＦ量は対照に比べて大きな差は認められないが、単位細胞当り（培養液中および細胞中）および単位タンパク質量当りでは有意に増加した。細胞数当りで比較してみると、コプチシンについては培養液中では１４倍に、細胞中では１７倍に、ベルベリンについては６．７倍と４．６倍に増加した。なおＮＧＦ（50ng/ml）を作用させた時の細胞中のＮＧＦ量は、対照の２４倍に増加した。

４．抗ＮＧＦ抗体、K-252b、Cycloheximideの、ＰＣ１２細胞の神経突起形成作用に及ぼす影響　抗ＮＧＦウサギ抗血清（終濃度２．５％）およびK-252bは、ＮＧＦによる神経突起形成作用を阻害したが、コプチシンおよびベルベリンによるいずれの神経突起形成作用をも阻害しなかった。Cycloheximideは、ＮＧＦ、コプチシンおよびベルベリンによるいずれの神経突起形成作用をも阻害した。

【考察】以上の結果より、コプチシンおよびベルベリンによるＰＣ１２細胞に対する神経突起形成作用は、ＮＧＦの関与が考えられる。ＰＣ１２細胞がＮＧＦを合成すると言う明確な証拠をまだ見ないが、すでに4-alkylcatecholおよびそのDiacetyl誘導体が、アストログリヤ細胞におけるＮＧＦ生合成を促進する事が知られている[3]。ベルベリンの構造は部分的にこれらカテコール誘導体と類似する。抗ＮＧＦ抗体が、コプチシンおよびベルベリンによる神経突起形成作用を阻害しないのは、合成されたＮＧＦが細胞内膜からＮＧＦレセプターに結合し、作用を発現することも考えられる。細胞内に取り込まれないK-252bが、コプチシンおよびベルベリンによる神経突起形成作用を阻害しないのは、細胞外におけるＮＧＦレセプターとK-252bの作用が、細胞内膜でのＮＧＦレセプターとＮＧＦとの反応までには、影響を及ぼさないのかも知れない。Actinomycin DおよびK-252aによる影響については、現在検討中である。ＰＣ１２細胞におけるＮＧＦ生合成の化学的同定、さらにはｍＲＮＡの確認をする必要がある。またコプチシン、ベルベリンによる神経突起形成が、神経細胞様機能的変化を伴っているかについても検討を要する。

写真１　神経突起形成（Ａ；対照、Ｂ；ＮＧＦ、Ｃ；コプチシン、Ｄ；ベルベリン）

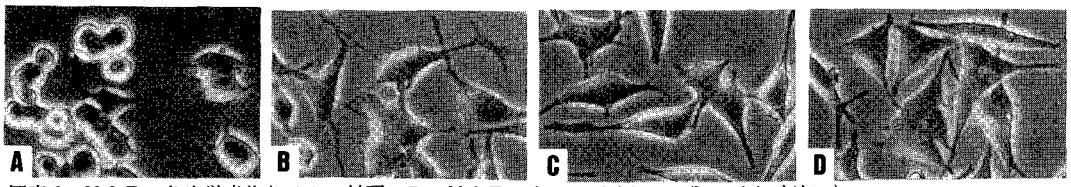


写真２　ＮＧＦの免疫蛍光染色（Ａ；対照、Ｂ；ＮＧＦ、Ｃ；コプチシン、Ｄ；ベルベリン）

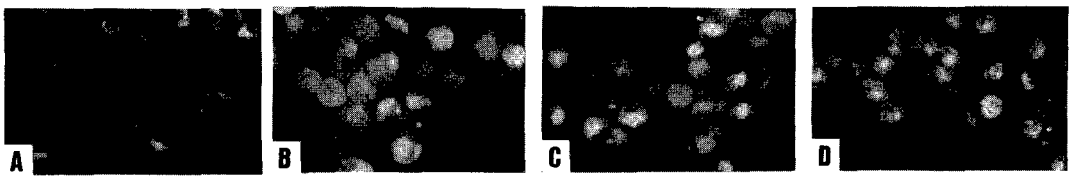


表１　Conditioned Medium中および細胞中のＮＧＦの量(6 Days)*:細胞数１０^{5}個当りの値が示されている。

	NGF/Medium			Cell No.	Protein	NGF	Protein/Cell	NGF/Cell	NGF/protein
	pg/7ml	pg/ml	pg/cell*	x10^5	μg	pg	μg*	pg*	pg/ng
Control	32.2	4.6	0.85	37.8	503	7.4	13	0.19	14.7
NGF	—	—	—	39.9	803	180	20	4.51	224.2
Coptisine	37.8	5.4	12.2	3.1	47	9.8	15	3.16	208.5
Berberine	39.2	5.6	5.7	6.9	150	10.2	21	1.48	68.0

［文献］1). Korsching, S. and Thoenen, H. (1987) Meth. in Enzymol. 147, 167-177. 2). Boccini, V. and Angeletti, P. U. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 64, 787-794. 3). Furukawa, Y., Furukawa, N., Miyama, Y., Hayashi, K., and Furukawa, S. (1990) Biochem. Pharmacol. 40, 2337-2342.

28 NG108−15細胞における神経突起維持作用へのGAP−43の関与

熊谷千尋、東田道久、野村靖幸
(北大・薬学部・薬効学)

【要約】
NG108-15 細胞において、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性化薬の TPA と、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) 活性化薬 dibutyryl cAMP (diBu-cAMP) による 72 時間同時処理の結果、各薬物単独処理の場合に比較して長い神経突起の伸展が認められた。この突起は、培地中からの両薬物除去後も維持された。一方 diBu-cAMP 単独 72 時間処理によって伸展した突起は、培地からの diBu-cAMP 除去により退縮した。TPA あるいは diBu-cAMP 処理細胞において GAP-43 mRNA の誘導がみられ、両薬物の同時 72 時間処理によって増加した GAP-43 mRNA 量は薬物除去後も継続的に誘導された。そこで NG108-15 細胞に GAP-43 cDNA を移入した細胞 (NG-G10) を作製し GAP-43 の過剰発現の影響を検討したところ、diBu-cAMP 単独処理によって伸展した突起が薬物除去後も維持された。以上の結果より、PKC と PKA の協同作用によってのみ引き起こされる神経突起の維持作用には GAP-43 が関与することが示唆された。

【緒言】
Growth-associated protein-43 (GAP-43) は、軸索特にその成長端に豊富に存在する神経特異的タンパク質であり(2)、神経突起伸展に伴なって発現量が増加することが示されている(1)。また、COS 細胞(6)や PC12 細胞(5)への GAP-43 cDNA 移入は突起形成を促進することから、GAP-43 が神経突起形成過程の key molecule であることが示唆されている。NG108-15 細胞は細胞内 cAMP 量上昇によりコリン作動性神経へと分化し、神経突起伸展を生ずることが示されている(4)。しかし、その突起は cAMP を除去すると退縮することから(3)、真の意味での神経分化完成には神経突起維持に関与する何らかの因子が必要であると考えられる。今回、NG108-15 細胞における神経突起の維持に GAP-43 が関与することを見いだしたので報告する。

【実験方法】
細胞培養：NG108-15 細胞は 2% 牛胎児血清 (FCS) 含有 DMEM-HAT 培地で培養した。
神経突起伸展の測定：polyornithine コーティングを施した 60 mm グリッド付き dish 中で各薬物存在下で培養した。24 時間毎に同一視野内 (675 × 450 μm) の 100 μm 以上の突起を有する細胞の割合を算出した。
GAP-43 mRNA の定量：100 mm dish 中で各薬物存在下に培養した細胞の total RNA をグアニジウム/CsCl 法にて抽出し、ラット GAP-43 cDNA をプローブとして Northern blot 解析を行った。
GAP-43 cDNA の移入：真核細胞発現ベクターにラット GAP-43 cDNA 全長を挿入し、これをエレクトロポレーション法にて NG108-15 細胞へ移入し G418 による選別を行った。

【結果】
100 nM TPA 単独あるいは 1 mM diBu-cAMP の単独 72 時間処理によって伸展した突起は、その後培地中から薬物を除去することにより退縮したが、TPA + diBu-cAMP 72 時間処理による突起は少なくとも薬物除去後 48 時間まで維持された(Fig. 1)。各薬物処理した細胞の GAP-43 mRNA を定量したところ、TPA + diBu-cAMP 処理では 24 時間後から、また TPA あるいは diBu-cAMP の単独処理ではそれぞれ 72 時間後において mRNA の誘導が認められた。diBu-cAMP による誘導は薬物除去後、対照群程度にまで減弱したのに対し、TPA 単独および TPA + diBu-cAMP による誘導は薬物除去の 24 時間後も継続した(Fig. 2)。NG108-15 細胞にラット GAP-43 cDNA を移入した細胞、NG-G10 を diBu-cAMP 単独で 72 時間処理した後薬物を除去した場合、除去後少なくとも 48 時間突起が維持された(Fig. 3)。薬物無処理下での形態は、両細胞間では差はなかった。

【考察】
これまで、細胞内 cAMP 量の増加が NG108-15 細胞の分化を引き起こすとされていたが、cAMP からおそらく PKA へつながる経路によって形成された突起あるいはシナプスは、cAMP 量の持続的増加がなければ維持されないことが示されてきた(3)。今回、PKC と PKA の協同作用によって誘導される突起伸展は、薬物除去後においても維持されたことから、PKC 基質が神経突起維持作用に関与していることが予想された。GAP-43 が局在する突起の growth cone 中には PKC も多く存在しており、PKC による GAP-43 の制御が示唆されている。PKC による GAP-43 mRNA の誘導および GAP-43 cDNA 移入 NG-G10 細胞での突起維持効果の結果より、PKC によって誘導され活性制御されるであろう GAP-43 が、神経突起伸展・保持に関与していることが推定されたが、その機序については現在検討中である。

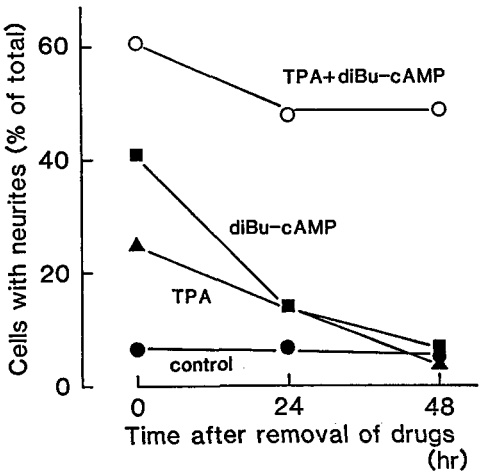


Fig. 1 Effect of the removal of drugs on neurite maintenance

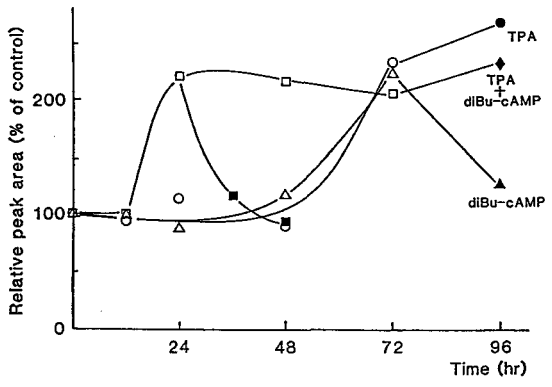


Fig. 2 Northern blot analysis of GAP-43 mRNA in cells treated with TPA and/or diBu-cAMP

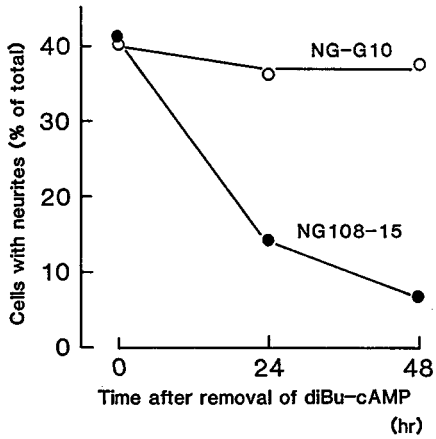


Fig. 3 Neurite maintenance in normal and GAP-43 cDNA-transfected NG108-15 (NG-G10) cells

【参考文献】
1) Costello, B., Meymandi, A. and Freeman, J.A. (1990) J. Neurosci. 10, 1398-1406.
2) Skene, J.H.P., Lacobson, R.D., Snipes, G.J., McGuire, C.B., Norden, J.J. and Freeman, J.A. (1986) Science 233, 783-786.
3) Tohda, M., Kumagai, C. and Nomura, Y. (1991) Neurochem. Int. in press
4) Tohda, M. and Nomura, Y. (1988) Neurochem. Int. 13, 37-42.
5) Yankner, A.B., Benowitz, I.L., Villa-Komaroff, L. and Neve, L.R. (1990) Mol. Brain Res. 7, 39-44.
6) Zuber, M.X., Goodman, D.W., Karns, L.R. and Fishman, M.C. (1989) Science 244, 1193-1195.

29

神経突起伸展因子受容体（ＮＯＦＲ）のｃＤＮＡクローンの単離

谷浦秀夫、○平英一、三木直正
（大阪大・第一薬理）

〔要約〕
ニワトリ胚毛様体神経節ニューロンの突起伸展を引き起こす因子（神経突起伸展因子、NOF）がニワトリ砂嚢平滑筋より精製され、さらにこれに対する受容体(NOFR)が、やはりニワトリ砂嚢平滑筋から精製された。NOFR は約82kDaの糖タンパク質であり、砂嚢の他に網膜視神経や毛様体神経節などにも分布している。このNOFRに対する抗体を用い、λgt11のニワトリ筋肉cDNA発現ライブラリーのスクリーニングを行い、2個の陽性クローンを得た。このクローンの塩基配列を決定したところ、これらは同一のクローンであり、全翻訳領域を含んでいないことがわかった。決定した塩基配列および推定されるアミノ酸配列をデータベースにて検索したところ、既知の配列とホモロジーを示すものはなかった。現在全長を得るため再スクリーニングを行っている。

私達は既に培養系で、毛様体神経節のニューロンの突起伸展を引き起こす因子としてニワトリ砂嚢平滑筋からNOF（神経突起伸展因子）が精製した(1)。NOFは非還元下で700kDa、還元下で210kDaの酸性糖蛋白質であり、免疫組織化学により砂嚢平滑筋の細胞外マトリックスに局在することが明らかになっている。また培養系で交感、副交感神経、脊髄、網膜など幅広いニューロンに作用し突起伸展を引き起こす。細胞外マトリックスの一つであるラミニンもこの様な活性を持つが、NOFはラミニンとの比較の結果、そのファミリーの一員であることが判っている。神経突起伸展のメカニズムをさぐるために、このNOFに対する受容体を精製した(2,3)。この受容体はニワトリ砂嚢平滑筋から精製され、分子量が約82kDaの糖タンパク質であり、他に骨格筋や網膜、毛様体神経節などにも分布することが明らかになった。この神経突起伸展因子受容体（NOFR）はラミニンの受容体であるインテグリンとは分子の大きさや、抗体の交差反応が見られないことなどより、インテグリンファミリーには属さないと思われる。今回、このNOFRの構造を明らかにするためにニワトリ筋肉の λgt11cDNAライブラリーからクローニングを行った。

［方法］

1. 精製されたNOFRに対して作られた抗体を用いて、ニワトリ骨格筋のλgt11cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。次いで、得られたクローンの5'端を用いてニワトリ砂嚢平滑筋のλgt11ライブラリーのプラークハイブリダイゼイション法によるスクリーニングを行った。
2. 得られたクローンの塩基配列を解析するため、挿入部分をプラスミドブルースクリプトに挿入した。そしてdideoxy法により、塩基配列を決定した。
3. エピトープ選択法は、Weinbergerらの方法(4)に従った。
4. 融合蛋白質の調整は、Hoeyの方法(5)に従った。

［結果］

抗NOFR血清を用いて、ニワトリ骨格筋λgt11ライブラリーをスクリーニングし、100万個のプラークより2個の陽性クローンを得た。陽性ファージをY1089に溶原化し、β-galactosidaseとの融合蛋白質をつくらせ、スクリーニングに用いた抗体と反応させるとIPTGで誘導される融合蛋白質のみが反応した（図１）。さらに、得られたクロ

ーンが目的とする蛋白質であるかどうかを同定するためにエピトープ選択法を行った。ニトロセルロース膜上のIPTGで誘導された融合蛋白質と抗NOFR血清を反応させ、特異的に吸着している抗体だけを酸性溶液で溶出した。この抗体を用いてイムノブロットを行うと砂嚢筋の82kDa蛋白質と反応した。しかしIPTGで誘導しなかったニトロセルロース膜から溶出した抗体は反応を示さなかった（図２）。2個の陽性クローンについて制限酵素によりマッピングを行ったところ、同一のものであることが明らかになった。また、このクローンの長さは2.7kbpであり、その塩基配列を決定した。この結果、全翻訳領域はカバーしておらず、またコーディングは5'端の約400bpのみであることが明かとなった。塩基配列をDNAデータベース、蛋白質データベースにて検索したところ今までに明かになっている配列とはホモロジーは見られなかった。

全長を得るため、この2.7kbpをプローブにして再スクリーニングを行ったところ、複数の陽性クローンが得られており、現在解析中である。またノーザンブロットについても検討中である。

［考察］

NOFRに対するcDNAクローンを得、塩基配列を決定した。得られた範囲で推定されるアミノ酸配列は、既知のものたはホモロジーを示さず、インテグリンや68kDaラミニン結合蛋白質とは異なるものと考えられた。NOFRは神経系の発生過程で加齢と共にその発現が減少していくことがわかっている(3)。今後その全構造を明らかにすることにより加齢によるNOFRの発現の調節機構や他の神経系の分化因子の機構との関係などなどを探っていきたいと考えている。

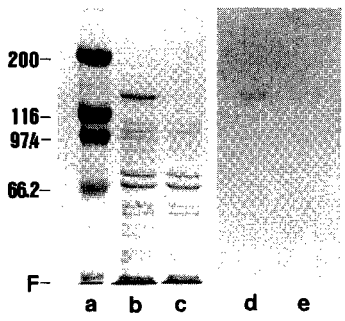


図１　IPTGによる融合蛋白質の発現

a,b,c　CBB染色

d,e　抗NOFR血清によるイムノブロット

b,c　IPTG(+)

c,e　IPTG(-)

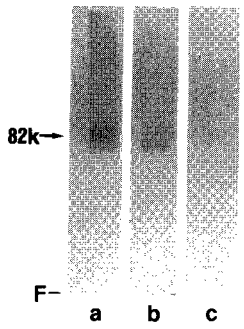


図２　エピトープ選択した抗体によるイムノブロット

a　抗NOFR血清

b　IPTG(+)よりエピトープ選択した抗体

c　IPTG(-)よりエピトープ選択した抗体

(1) Hayashi, Y. and Miki, N. (1985) J. Biol. Chem. 260, 14269-14278.

(2) Taniura, H., Hayashi, Y. and Miki, N. (1988) J. Neurochem. 50, 1572-1578.

(3) Taniura, H., Kuo, C-H., Hayashi, Y. and Miki, N. (1991) J. Cell Biol. 112, 313-322.

(4) Weinberger, C., Hollenberg, S. M., Ong, E. S., Harmon, J. M., Bower, S. T., Cidolowski, J., Thomson, E. B., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M. (1985) Science 228, 742-747.

(5) Hoey, T. (1990) Current Protocols in Molecular Biology 16.5.1-16.5.6.

30 神経突起伸展活性を持つペプチドの構造解析

田代謙一郎・武市昌士

佐賀医科大学　精神医学教室

〔要約〕

演者の発見したラミニンの19mer ペプチドPA22-2は細胞接着作用のほか神経突起伸展、ヘパリン結合、及び神経細胞成長作用を持っている[4]。今回、PA22-2の活性中心であるIKVAV のペプチドを新たに合成して、モノマーとダイマーを精製し、活性の比較とシスチンの有無による生物活性の変化について調べてみた。

その結果以下のことが判明した。（1）シスチンをつけたP-1 はモノマー・ダイマーともほぼ同じ細胞接着、神経突起伸展活性を示し、細胞に対する活性には差がなった。（2）シスチンをアセトアミドメチル基で保護すると(P-2,P-3)、細胞接着・神経突起伸展活性は失われた。（3）シスチンを含まないP-4,P-5 を合成して活性を調べると、細胞接着活性は両ペプチドにあり、アセチル化したP-5 はP-1 ペプチドと同様の神経突起伸展作用を示した。（4）各ペプチドを蒸着させ、1回リンスした後ニンヒドリン反応で調べてみると、coating 率はP-1、P-6が30-40 %、P-2,P-3,P-5 が4-5%,P-4は1%以下であった。

［目的］

ラミニンは分子量約900Kの糖蛋白質で基底膜を構成する主要成分であり、細胞の接着・伸展・移動・分化・増殖・食作用などの細胞生理作用をもつほか、癌細胞転移の促進、神経突起伸展の作用も持っている[1)2)]。最近になり、ラミニンの3つのサブユニットA[3)],B1,B2 鎖すべてがクローニングされたことにより、活性ドメインの研究がさらに発展している。演者はラミニンA 鎖G ドメイン近くに神経突起伸展作用を示すペプチドPA22-2(H-CSRARKQAAIKVAVSADR-NH_2)を発見した。PA22-2は種々の細胞に対し細胞接着作用を示し、その活性中心はIKVAV（イソロイシンーリジンーバリンーアラニンーバリン）の5つのアミノ酸配列である[5)]。

しかし、これまでに使用した合成ペプチドはN 末端にシスチンをつけている為、溶液中ではダイマーを形成しやすく、活性に及ぼす影響は不明であった。そこで、今回、モノマー・ダイマーを分離精製し、それぞれの活性を比較し、またシスチン残基の有無によるIKVAV の活性の変化について検討を行った。また、ニンヒドリン反応を用いてペプチドのcoating 効果も調べてみた。

［方法］

1）細胞接着活性：PC12細胞は7.5%FBS,7.5%Horse serum を含むDMEM培養液で培養した。ペプチドを96穴培養皿に加えにdry up にてcoating した後、1.5% BSAを含むEMEM培養液で非特異結合をbloking しておいてPC12細胞を加えて37°C 1 hr インキュベートした。PBS で1回リンスして接着した細胞を100%エタノールで固定後、クリスタルバイオレットで染色し、0.1% Triton X-100 で抽出して570 nmの吸光度を測定した。

2）神経突起伸展活性：PC12細胞を2日間NGF で全処理した後、ペプチドをcoating した24穴培養皿にいれて非血清培養液中で37°Cの5%CO_2 インキュベーターで神経突起形成を観察し、2日目に撮影した。

3）coating 効果：ペプチドを96穴培養皿に入れdry up した後、1回蒸留水でリンスして74ulの蒸留水、37ulのクエン酸バッファー、89ulのシアン化カリウムーニンヒドリン溶液を加えて、100°C で20分間加熱した。冷却後、570 nmの吸光度を測定した。

［結果］

P-1(H-CSIKVAVS-NH_2) 及びP-6(H-CSGKVAVS-NH_2) のモノマーとダイマーをそれぞれ細胞接着・神経突起伸展・coating 効果について調べると、coating 率はP-1,P-6ともにモノマーが30%、ダイマーが40% でダイマーがcoating されやすかった。細胞接着・神経突起伸展はP-1 にpositiveでモノマーとダイマーとには差がなく、P-6 はnegativeであった（表１）。また、シスチンにアセトアミドメチル基をつけたP-2(H-C*SIKVAVS-NH_2) ,P-3(Ac-C*SIKVAVS-NH_2) 及びシスチンを含まないP-4(H-SIKVAVS-NH_2),P-5(Ac-SIKVAVS-NH_2)について同様に調べると、シスチンがなければcoating されにくく、P-4,P-5 は細胞接着活性を示すが、神経突起伸展活性はアセチル基のあるP-5 のみ示した。しかし、シスチンが保護されるとcoating 率も生物活性も消失することが分かった（表２）。細胞接着活性及びcoating 量はdose response を示した。

表１．生物活性とcoating 効果に対するモノマーとダイマーの比較

peptide	sequence		neurite out.	attachment	coating
P-1	H-CSIKVAVS-NH_2	monomer	++	++	30%
		dimer	++	++	40%
P-6	H-CSGkVAVS-NH_2	monomer	—	—	30%
		dimer	—	—	40%

表２．生物活性とcoating 効果

peptide	sequence	neurite out.	attachment	coating
P-2	H-C*SIKVAVS-NH_2	—	—	4%
P-3	Ac-C*SIKVAVS-NH_2	—	—	4%
P-4	H-SIKVAVS-NH_2	—	++	1%
P-5	Ac-SIKVAVS-NH_2	+	++	5%

［考察］

今回の研究で、細胞接着・神経突起伸展活性を示すペプチドIKVAV の構造はモノマーとダイマーに活性の差はなく、また、シスチンはcoating 効果を上げるが生物活性には重要性を示さないことから、IKVAV 構造そのものが細胞の受容体を介して生物活性を誘導することが考えられる。また、これまではIKVAV のみでは神経突起伸展活性を同定できなかったが、ニンヒドリン反応を用いることで簡単にcoating 量が測定できるようになり、P-5 のようにアセチル基があればcoating 率が数％上昇し、神経突起伸展活性を同定することが可能となった。シスチンに保護基をつけるとその活性が消失するのは、保護基がつくことによってIKVAV の構造が変わり、受容体に結合できないためではないかと推測される。イソロイシンは活性に重要な因子だが、その他のアミノ酸の重要性については現在研究中である。

［文献］

1) Martin,G.R.,Timpl,R.:Ann.Rev. Cell Biol.,3,57-85(1987)

2) Kleinman,H.K.,Cannon,F.B.,Laurie,G.N.,Hassell,J.R.,Aumailley,M.,Terranova,V.P.,Martin,G.R.,Dubois-Dalcq,M.,: J.Cell. Biochem.,27,317-325(1985)

3) Sasaki,M.,Kleinman,H.K.,Huber,H.,Dutzmann,R.,Yamada,Y.: J. Biol.Chem.,262,17111-17117(1987)

4) Sephel,G.C.,Tashiro,K.,Kleinman,H.K.,Sasaki,M.,Yamada,Y.,Martin,G.R.: Biochem.Biophys.Res.Commun.,162,821-829(1989)

5) Tashiro,K.,Sephel,G.C.,Weeks,B.S.,Sasaki,M.,Martin,G.R.,Kleinman,H.K.,Yamada,Y.: J.Biol.Chem.,264,16174-16182(1989)

31 神経栄養因子探索のための固相バイオアッセイの開発

中島光業[1,2]、林要喜知[2]、川島拓司[2]、林恭三[1]、古川昭栄[1]
([1]：岐阜薬科大・薬、[2]：森永乳業・生科研)

〔要約〕
神経栄養因子（ＮＴＦ）の探索、およびそのタンパク質化学的、生物学的特性の同定を容易に行うための新しいバイオアッセイの開発を検討した。このアッセイは、トランスファー膜に固相化したＮＴＦの培養神経細胞に対する生存維持活性を指標とし、固相バイオアッセイ（Ｓｏｌｉｄ－ｐｈａｓｅ　ｂｉｏａｓｓａｙ）と命名した。概略は次の通りである。即ち、ＮＴＦを含むサンプルを電気泳動しタンパク質成分を分離・濃縮後、トランスファー膜に転写して固相化する。つづいて膜を無菌化し、その膜上で神経細胞培養を行う。培養後細胞を固定し、膜を透明化して位相差顕微鏡下で観察する。神経細胞が膜上で局所的に生存していた場合、その部分にＮＴＦが結合していることになる。なお、本アッセイの開発には神経成長因子（ＮＧＦ）－交感神経細胞系を採用した。まず、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後固相バイオアッセイを行った。マウスＮＧＦ３．７ｎｇ／ｌａｎｅ以上の泳動で神経細胞の生存が認められ、ＮＧＦのバンドと一致した部分でピークとなった。さらに二次元電気泳動（非平衡ｐＨ勾配電気泳動およびＳＤＳ－ＰＡＧＥ）による固相バイオアッセイでも、ＮＧＦの二次元電気泳動スポットと一致した部分で神経細胞の生存が認められた。以上の結果は、今回開発した固相バイオアッセイが少なくとも一部のＮＴＦの評価に有用であることを示すものである。

＜緒言＞　脊椎動物の神経細胞は、環境要因によってその運命が大きく左右されると考えられている。ＮＴＦは、その環境要因の一つとして神経細胞の分化成熟、生存、あるいは再生修復に作用する一群のタンパク質性の因子である。従ってＮＴＦの単離同定は、神経系の発生や機能を理解する上で、あるいは脳の老化を考える上で重要なステップの一つと考えられる。これまでに分子としての性質が明らかにされていたＮＴＦはＮＧＦただ一つであったが、1989-90年の間に新しく3つのＮＴＦ：ＢＤＮＦ，ＣＮＴＦ，ＮＴ－３が相次いで遺伝子クローニングされた。しかしその他多数のＮＴＦは、その存在が報告されるにとどまり、分子としての実体は明らかにされていない(1)。そこで本研究では、これら未知のＮＴＦの探索、および物性の解明を容易に行う新しいバイオアッセイの開発を検討した。
＜方法＞　1)マウスＮＧＦ：古川らの方法(2)により、８０日齢雄マウス顎下腺から精製した。
2)電気泳動およびトランスファー膜への転写：ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（８－２５％）はファルマシア社のファストシステムで行った。非平衡ｐＨ勾配電気泳動（ＮＥＰＨＧＥ）(3)はキャピラリーゲル（１ｍｍｘ５０ｍｍ；ｐＨ３．５－９．５）を用い、１００Ｖｈｒ泳動した。試料は、サンプルバッファー（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ：0.25M Tris-HCl,2% SDS,30% glycerol,0.5% bromophenol blue,pH 6.8；ＮＥＰＨＧＥ：80% glycerol,250μg/ml of cytochrome C）と１：１に混合しゲルにアプライした。トランスファー膜にはＰｒｏＢｉｎｄ膜（ファルマシア社）を用い、ファストブロット（ファルマシア社ブロッティング装置）で４５分間転写した。
3)トランスファー膜の無菌化：タンパク質が転写されたトランスファー膜を１０－６０分間０．１％NaN_3液に浸した。
4)培地：ダルベッコ変法イーグル培地とハムＦ１２培地を１：１の割合で混合し、ＨＥＰＥＳ、セレニウム、ペニシリンＧ、ストレプトマイシンをそれぞれ１５ｍＭ、３０ｎＭ、５０Ｕ／ｍｌ、１００μｇ／ｍｌになるよう添加して基本培地（ＤＦ培地）を調製し、５％馬血清を含む培地（５％ＨＳ／ＤＦ）および無血清培地（ヒト・トランスフェリン、ウシ・インシュリン、プロゲステロン、牛血清アルブミンを、それぞれ５μｇ／ｍｌ、５μｇ／ｍｌ、２０ｎＭ、０．５％含む）を作製した。
5)交感神経細胞の培養：孵化１０－１２日鶏胚より交感神経節を摘出し、トリプシン処理後ピペッティングにより分散し、レンズペーパーに通して単個化細胞とした。得られた細胞は、無菌化したトランスファー膜上に$1-3\times10^4$個／cm^2の密度でまいた。はじめは５％ＨＳ／ＤＦ培地を用い、培養２４時間後に無血清培地に交換し、さらに２－３日間培養した。
6)トランスファー膜の透明化：培養後トランスファー膜を４％パラホルムアルデヒド液に浸し、膜上の細胞を固定した。つづいて７０％、９５％、１００％、１００％エタノール液、および１００％キシレン液に順に浸すことで膜を透明化し、オイキット／キシレン液でプレパラートに封入した。膜上に生存する神経細胞は位相差顕微鏡下（ｘ２００）で観察し、５０μｍ以上の突起を有しかつ球状の細胞体を持つ細胞を神経細胞としてカウントした。
7)神経細胞の染色：神経細胞の特異的染色は、抗ニューロフィラメント２００ｋＤ抗体（ベーリンガーマンハイム社）を用い、ＳＡＢ法で行った。
＜結果＞　本研究はトランスファー膜の選択から始まった。即ち、通常のブロッティング操作でタンパク質を吸着し、培養基質としても有用であり、かつ顕微鏡観察が可能となる様何らかの処理で透明になるトランスファー膜を選定した。まず、種々の膜についてキシレンに対する耐性を調べたところ、ナイロン、フッ化ビニリデン、テフロンを素材としたトランスファー膜は灰色に変色してしまった。一方、ニトロセルロース製の膜；バイオラッド社ニトロセルロース，アドバンテック社ニトロセルロース，ファルマシア社ニトロセルロース，ファルマシア社ＰｒｏＢｉｎｄはキシレン処理で透明になることが判明した。そこで、これらニトロセルロースの膜上でC_6 ラットグリオーマ細胞を培養し、キシレン処理後顕微鏡下で細胞観察を行った。その結果、培養基質としての適性、透明度、物理的安定性の点でファルマシア社ＰｒｏＢｉｎｄ膜が本アッセイに最も適していることが明かとなった。また、ＰｒｏＢｉｎｄ膜はタンパク質ブロッティング用に作製されているのでタンパク質の結合性も良く、以後の実験ではこの膜をトランスファー膜として用いることにした。
まず、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いた固相バイオアッセイを検討した。マウスＮＧＦをＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離、濃縮後

トランスファー膜に転写し、その膜上で交感神経細胞を培養した。キシレンで透明化した後、膜上の細胞を観察したところ、図1に示すようにNGFのバンドと一致する部分（21kD付近）に神経細胞の生存が認められた。つづいてNGF3．7，11．1，33．3ng／laneの用量でSDS－PAGE固相バイオアッセイを行った。図2に示すように、用量の増加に伴い21kD付近の生存細胞数が増加した。

次に、二次元電気泳動を用いた固相バイオアッセイを行った。一次元目でNEPHGEによるNGFの分離、濃縮を行い、二次元目でSDS－PAGEを行った。NGFはこの二次元電気泳動により2つのスポットに分離するが、このスポットの部位に一致して神経細胞の生存が認められた（図3）。

＜考察＞　SDSは変性剤として知られているが今回のSDS－PAGE固相バイオアッセイの結果より、少なくともNGFの活性を著しく阻害するものでないことが明かとなった。なお、今回の実験ではNGFの不活性化を避ける意味で、SDS－PAGEの際に還元剤の添加、および加熱処理を行わなかった。また、NEPHGEに用いたゲル中にはアンフォライトが含まれているが、それに続くSDS－PAGEで取り除かれるためその毒性は問題にならなかった。

二次元電気泳動の際、一次元目でNEPHGEを用いた理由はNGFが強塩基性タンパク質（pI9．3）であるためであった。当初、等電点電気泳動（IEF）とSDS－PAGEによる二次元電気泳動を検討したが、IEFによるNGFの分離が不十分であったため、IEFの代わりに塩基性タンパク質の分離能に優れるNEPHGEを採用した。サンプルが強塩基性タンパク質でない場合、IEFとSDS－PAGEによる二次元電気泳動固相バイオアッセイが活用できるものと期待される。

今回の実験結果より、固相バイオアッセイが少なくとも一部のNTFの探索、あるいは物性の解明に有用であることが示唆された。本アッセイの長所としては、1）電気泳動で試料を分離するため、試料中の活性阻害物質あるいは神経細胞に対し毒性を有する物質の影響を受けにくくなる、2）試料を膜にトランスファーするので、ペプチドやタンパク質性因子を対象にアッセイが行え、それ以外の低分子物質ははじめから除外される、3）膜の特定部位に神経細胞の生存がみられた場合、その結果からある程度未知因子の物理化学的特性（分子量、等電点など）が推定できる、また異なる神経細胞を培養に用いることにより生物学的特性の検討も行うことができる、4）事前に試料を透析したり滅菌したりする必要がない、5）幸運ならば膜上に単離、固相化されたNTFが得られ、その後の構造解析に進むことができる、などが考えらる。また短所としては、1）電気泳動を用いる場合、それに不安定な活性因子は対象にできない、2）通常の液相のアッセイに比べ感度が低い、が上げられる。今後は、本固相バイオアッセイを用い新しいNTFの探索を行う予定である。

[参考文献]

(1).Thoenen,H., and Edger,D. (1985) Science 229, 238-242.

(2).Furukawa,S., Kamo,I., Akazawa,S., Furukawa,Y., Satoyoshi,E., Itoh,K., and Hayashi,K. (1983) J. Neurochem. 40, 734-744.

(3).O'Farrell,P.Z., Goodman,H.M., and O'Farrell,P.H. (1977) Cell 12, 1133-1142.

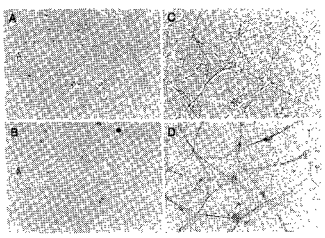


Figure 1. Phase-contrast(A,C) and phase-bright(B,D) micrographs of neurons survived under the condition of SDS-PAGE solid-phase bioassay.
NGF(3.7ng/lane) was applied to SDS-PAGE solid-phase bioassay. Survived neurons were fixed, and stained by immunocytochemistry for neurofilament 200kD protein. Areas outside(A,B) and on(C,D) the NGF band were photographed: A,B and C,D are the same fields, respectively.

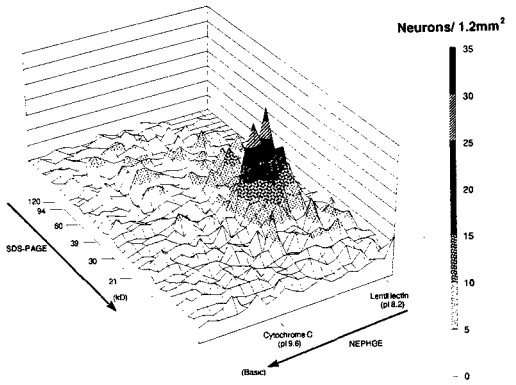


Figure 3. Distribution of NGF activity in two-dimensional electrophoretic solid-phase bioassay.

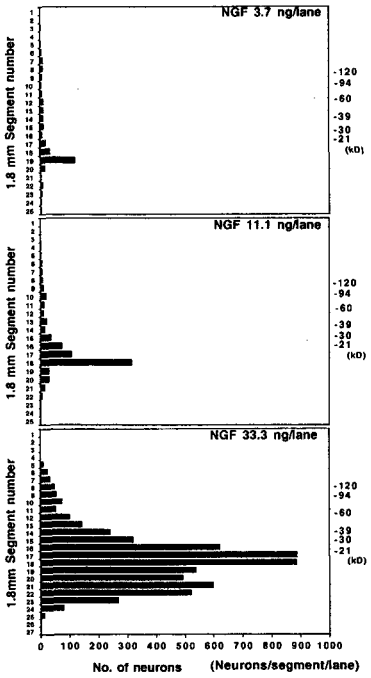


Figure 2. Dose-dependent changes of distribution of NGF activity in SDS-PAGE solid-phase bioassay.

32 梗塞周囲脳における塩基性線維芽細胞成長因子（ｂＦＧＦ）の発現と外因性ｂＦＧＦによる梗塞後視床変性の修飾

山田和雄、甲村英二、坂口健夫、木下　章、早川　徹、和中明生*、遠山正彌*
（大阪大・医・脳外、第2解剖*）

〔要約〕　ラット皮質梗塞脳における塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)の発現を免疫染色とWestern blottingにより検索した。偽手術群では視床下部の一部のニューロンにbFGF陽性のものが認められた。これに対し梗塞周囲皮質には梗塞後4日目からニューロンとグリアにbFGF陽性のものを認め、7日目には特にグリアに強い免疫反応を認めた。しかしグリアでは2週間目から陽性のものはごく一部となるが、皮質ニューロンではbFGF陽性のものは4週間後まで認められた。一方視床では梗塞側、対側とも全期間を通じてbGFG陽性のニューロンやグリアは見られなかった。Western blottingでも視床にはbFGFの発現はみられず、大脳皮質には31kD,45kDに複数のバンドを持つbFGFが認められ、免疫染色の結果を裏付けた。皮質梗塞後、同側の視床では梗塞皮質に投射する後復側核(VPL)ニューロンに徐々に逆行性変性が起こるが、大槽内に虚血後第1日よりbFGF(1μg/0.1ml)を間欠的（週1回計4回）に投与すると、VPLの変性が肉眼的にも顕微鏡的にも有意に抑制された。これらのことから、梗塞後のVPLニューロンの逆行性変性はbFGFがVPLで発現しないことと関連があり、髄腔内に投与した外因性のbFGFが虚血性軸索損傷を受けた視床ニューロンになんらかの作用を示したことが示唆される。

ラットの大脳皮質梗塞後、同側の視床ニューロンは約1カ月で緩徐に変性に陥る。この変性は皮質の体性感覚野に投射する後腹側核(VPL)のニューロンにほぼ選択的に起こることから、軸索や神経終末の虚血性損傷による逆行性変性と判断される。bFGFは幅広い中枢ニューロンに作用を持つ成長因子であり、私どもの培養実験でも視床ニューロンの生存を有意に延長することを確かめている。そこで梗塞周囲脳でのbFGFの発現を免疫染色とWestern blottingで解析し、bFGFの発現と視床萎縮の関連性を検討するとともに、髄腔内に投与した外因性bFGFのVPLニューロン逆行性変性に対する修飾効果を検討した。

【材料と方法】雄性Wistarラット(250-300g)の中大脳動脈を閉塞し、脳梗塞を作成した。梗塞後1、4、7、14、21、28日後に4% para-formaldehydeで灌流固定し、脳を薄切切片とした。これを抗bFGF抗体[1](MAb78;武田薬品工業より供与、500倍希釈）を用いてABC-Eliteキットで染色した。他群のラットでは梗塞7、14日後に深麻酔下に脳を取り出し、梗塞周囲皮質、同側視床、ならびに対側のそれぞれ対応する部位をサンプリングした。これをSDSを含むPBSでホモジネートし、100,000gで60分間遠沈した後上清を得た。ついでモルカットで100kD以下の分画を分離し、12.5%SDS-PAGEゲルで電気泳動した。さらにニトロセルロース膜に転写し、抗bFGF抗体（1000倍希釈）を用いて常法に従い染色した。外因性のbFGFによるVPLニューロン変性の修飾効果をみるため、20匹のラットに脳梗塞を作成した。1日後に安定化リコンビナントbFGF(CS23;1μg/0.1ml溶媒;武田薬品工業より供与)[2]あるいは溶媒（0.2%ラット血清を含む生理食塩水0.1ml)を大槽内に注入し、以後1週間毎に計4回注入した。4週間後に4%paraformaldehydeで灌流固定し、パラフィン包埋後視床を含む冠状切片を作成しNissl染色後、視床VPLのサイズを測定し、対側と比較した。さらに画像解析装置を用いてVPL核の個々の細胞のサイズを測定し、そのヒストグラムをbFGF群と溶媒群で対比検討した。

【結果】

bFGFの免疫染色性：偽手術群ではbFGFの免疫染色性は視床下部の一部のニューロンに認められた。梗塞ラットでは4日目から梗塞周囲の皮質ニューロンと白質アストロサイトの細胞質内にbFGFの免疫活性を認めた（図1）。皮質ニューロンでは　bFGFの免疫染色性は28日後まで持続した。一方白質アストロサイトのbFGF免疫活性は7日後にピークとなったが、14日後にはごく一部のものが染色されるにとどまった。これに対し視床では全期間を通じてニューロン、アストロサイトともbFGFの免疫染色性は出現しなかった（図1）。

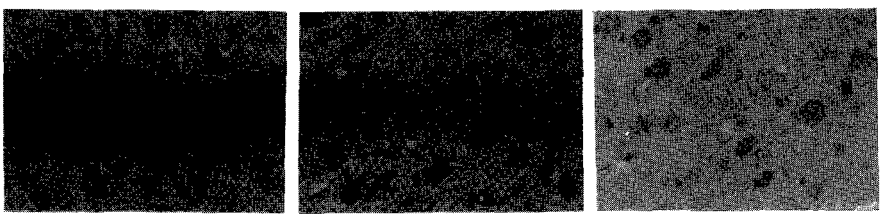


図1．ラット皮質梗塞モデルでのbFGFの免疫染色．左:梗塞4日後の皮質、中央:梗塞4日後の白質、右:梗塞7日後の視床、矢印:bFGF陽性ニューロン、矢頭:bFGF陽性アストロサイト

梗塞脳でのbFGFのWestern blotting: 梗塞7日後には梗塞周囲と対側の皮質に31kD, 45kD付近の分子量を持つ bFGFの発現が認められた。脳内のbFGFはいくつかの分子量を持つものが知られており、その分子量から考えて2量体と3量体ではないかと考えられる。また視床では梗塞側、対側ともほとんどbFGFの発現はみられず、免疫染色の結果と一致した。14日後には梗塞側皮質の bFGF発現は持続するが対側のbFGFは31kD、45kDの両方が低下した。これはbFGF陽性ニューロンの密度が対側では徐々に低下することと関連があろう。視床ではやはりbFGFの発現はみられなかった（図2）。

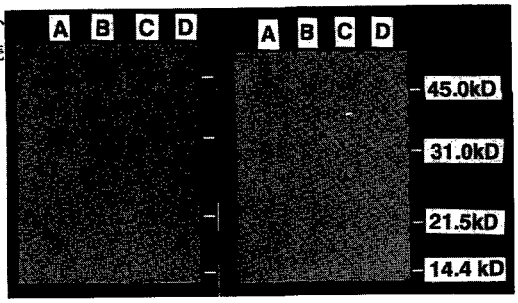


図2. bFGFの梗塞周囲脳での発現。左:梗塞1週間後、右:2週間後
A:梗塞周囲皮質、B:対側皮質、C:梗塞側視床、D:対側視床

bFGFの髄腔内投与による視床ニューロンの逆行性変性の修飾[3]: 肉眼的断面積測定では尾状被殻レベルでの断面積にbFGF群、溶媒群とも差が無いことから、bFGFは梗塞そのものは修飾しないことが明かとなった(図3)。視床VPLの断面積は溶媒群がbFGF群と比べて有意に小さく、bFGFにより視床萎縮が部分的に防止された（図3）。顕微鏡的観察では、溶媒群でVPLニューロンの変性、消失がみられ、これに対しbFGF群ではニューロンの大きさ、形態が比較的保たれていた（図4）。画像解析の結果、400-600ピクセルの神経細胞と判断される大型細胞がbFGF群で比較的保たれており、顕微鏡所見を裏付けた（図5）。

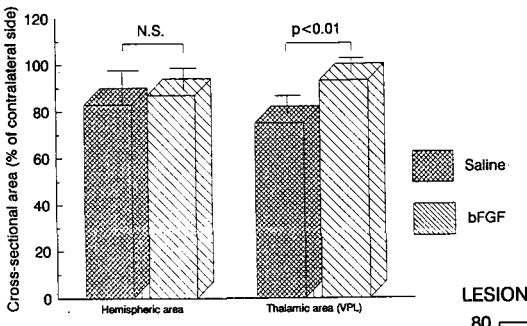


図3. 尾状被殻レベルでの半球面積と視床VPLの断面積（いずれも対側とくらべた%）

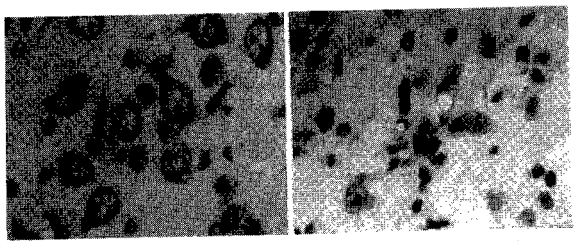


図4. VPLニューロンの顕微鏡像(x200) 左:bFGF群、右:溶媒群

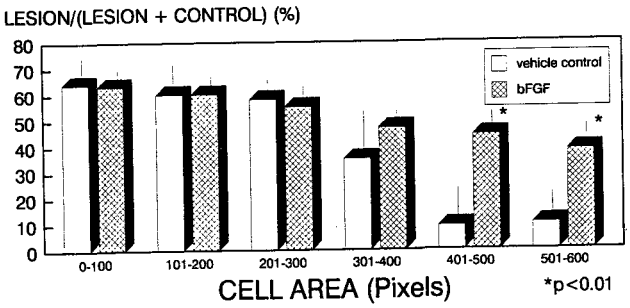


図5. 視床VPLニューロンの大きさのヒストグラム

【考察】

視床VPL核のニューロンはほとんどが皮質感覚野に投射しており、皮質感覚野を切除するとVPLに逆行性変性が起こることが知られている。ラット中大脳動脈閉塞モデルでも皮質感覚野が梗塞性病変の中心となり、従って視床VPLの変性は軸索と神経終末の虚血性損傷による逆行性変性と判断される。梗塞周囲脳でのbFGF発現の検索では、大脳皮質で比較的広範にニューロンとグリアにその発現がみられるのに対し、視床ではほとんど発現がなかった。従って視床VPLの逆行性変性は視床でのbFGF発現の欠如と関連する可能性がある。そこでbFGFを髄腔内に投与したところ、VPLニューロンの逆行性変性が有意に修飾された。この効果はbFGFが直接視床ニューロンに働いたのか、アストロサイトなどを介した間接的な作用であるのかは現在のところ不明である。

【文献】

1. Seno M, Iwane M, Sasada R, Moriya N, Kurokawa T, Igarashi K (1989) Hybridoma 8:209-211
2. Seno M, Sasada R, Iwane M, Sudo K, Kurokawa T, Ito K, Igarashi K (1888) Biochem Biophys Res Commun 151:701-708
3. Yamada K, Kinoshita A, Kohmura E, Sakaguchi T, Taguchi J, Kataoka K, Hayakawa T (1991) J Cereb Blood Flow Metabol 11:472-478

33 HIPPOCAMPAL CHOLINERGIC NEUROSTIMULATING PEPTIDE (HCNP) 作用の生物学的特異性

小鹿幸生*、山本正彦*、田中亮**、植木靖之***

* 名市大（医）第2内科、** 同第1生化、*** 住友製薬（株）研究所

〔要約〕 HCNP はラット中隔核培養組織のアセチルコリン (Ach)産生促進作用を指標に、ラット海馬組織より精製された11個のアミノ酸から構成されるペプチドである。本研究では、このペプチドの Ach 産生促進作用の詳細とその組織特異生について検討した。合成 HCNP および HCNP のN末端アセチルを除いた free-HCNP は中隔核培養組織のコリンアセチルトランスフェラーゼ (CAT) Vmax を増加させるが、コリン取り込み率 (Ch uptake) やアセチルコリンエステラーゼ (AchE) 活性には明らかな影響を示さず、更に、脊髄前角組織や線条体組織の Ach 産生能にも影響を示さなかった。また、free-HCNP を用いその作用を NGF と比較検討したところ、両者の作用様式と作用点には相違が認められた。

〔緒言〕 我々には培養中隔核の Ach 産生を促進する因子群が海馬組織内に存在することを示唆した[1]~[5]。この作用を有する因子の精製[6]~[7]と構造決定の研究から、その一つの因子は Acetyl-Ala-Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leu の構造を有するペプチド (HCNP) であること、更に、合成 HCNP 及び合成 free-HCNP も培養中隔核の Ach 産生を促進することを報告した[8]。本研究はこれらの合成ペプチドの有する Ach 産生促進作用の詳細と作用組織の特異性、更には NGF の作用様式との差異などについて検討したので報告する。

〔方法〕 (1) 培養法、Ach 産生能の測定法、Ch uptake 測定法は既報告[1]~[3][5]に従うが、中隔核、線条体、脊髄前角の各組織はそれぞれ胎令16、15、14日の wistar 系ラット脳から摘出し、1%の FCS を添加した培養液を用い培養した[7]。培養組織に ^{3}H-Ch (555GBg/mmol) を添加、30分の incubation 後に培養組織を formic acid/acetone 溶液中に回収、その少量を Ch uptake に、残りを Ach 産生能測定に用いた。それぞれの値は、培養組織1片が30分の incubation 中に取り込んだ ^{3}H-Ch 量または産生した ^{3}H-Ach 量を fmol/specimen で示した。

(2) CAT 活性測定は培養組織を 200μl/3 dishes の 50mM Tris-HCl (pH7.4) に回収し、sonication にて組織を破壊後、その50μlと基質溶液 (0.5mM Ac-CoA, 40μM neostigmine, 0.05μCi [^{3}H]-Ch, 50mM Tris-HCl pH7.4) 50μlを用い single-vial biphasic liquid extraction assay 法[9]に従って測定した。また、CAT の kinetic study は、回収・破壊した組織溶液 50μlと種々な濃度の Ac-CoA を含む50μlの基質溶液 (40μM neostigmine, 200μM choline chloride, 0.05μCi [^{3}H]-Ch, 50mM Tris-HCl pH7.4) を37℃、45min incubationし、CAT 活性と同様の方法にて単位時間内に産生された [^{3}H]-Ach 量を測定し、double reciprocal plot から CAT の Km と Vmax を求めた。

(3) AchE 活性測定は CAT 活性測定と同様にして回収・破壊した組織溶液 20μlに 30μl の基質溶液 (10mM Ach, 0.1μci [acetyl-1-^{14}C]-choline〈2GBq/mmol〉,50mM sodium-phosphate buffer pH7.0) を添加し、Lehmann, et al[10] の方法に従って実施した。最終測定系に BW 284 C 51 を10^{-5}M 添加した群と、しない群の放射活性の差を特異活性とした。また、活性は培養組織1片に含まれる AchE により単位時間内に遊離された [^{14}C]-acetic acid 量 Pmol/min/specimen で表示した。

(4) NGF と HCNP との作用の相違の検討には飽和量の mouse 2.5S-NGF (1ng/ml) 及び free-HCNP 30pg/ml を、それぞれ単独または同時に中隔核、線条体、脊髄前角組織の培養系に添加、6日目にAch 産生能、Ch uptake, CAT 活性および AchE 活性を測定し比較検討した。

〔結果及び考察〕 Fig.1は中隔核培養組織に50pg/ml の濃度で free-HCNP を添加した群としない control群のcholinergic development を調べたものであるが、両群の Ach 産生能は経時的に増大を示した。しかし、同時に測定した control 群及び free-HCNP 群の ^{3}H-Ch uptake は、それぞれ3日目 14.6±0.6, 15.9±1.0, 6日目 28.4±1.6, 31.7±1.0, 9日目 33.9±4.7, 38.0±1.9 fmol/specimen であった。各測定日で free-HCNP 群の ^{3}H-Ch uptake は高い傾向を示したが統計学的有意差は認められなかった。また、培養6日目の中隔核培養組織の CAT 活性と AchE 活性を同一培養組織を用い測定すると、CAT 活性は free-HCNP の濃度に依存して増加を示したが、AchE 活性は増加を示さなかった(Fig.2)。この結果は HCNP 添加でも同様であった。また、培養6日目の中隔核組織の CAT の Ac-CoA に対する Km と Vmax を測定したところ、Km は control 群、HCNP 300pg/ml 添加群、free-HCNP 50pg/ml 添加群共に4.5~5.0μM と明らかな差を認めなかった。Vmax は HCNP 添加群で control 群の2.0 倍、free-HCNP 添加群で control 群の2.6倍であった。以上の結果は HCNP および free-HCNP が培養中隔核の CAT の親和性を変化させるのではなく、

CAT 量を増大させ Ach 産生を促進するものと考えられ、更に AchE 活性や Ch-uptake の明らかな増加が認められなかったことから、CAT 量の増大は neuron の数の増加によるものではなく、CAT 産生量の増加に基づくものと考えられた。

中隔核組織に対する類似した作用が NGF により報告されていることから[11]、free-HCNP を用い NGF とその作用の相違について検討した。前述の如く free-HCNP は Ach 産生能と CAT の活性を増大させるが、NGF はこれらの生物化学的活性増大のみならず AchE 活性も同時に増大させた (Table)。また Table に示す如く free-HCNPと NGF を同時に添加した中隔核培養組織では、Ach 産生能と CAT 活性はそれぞれの総和またはそれ以上の値を示した。更に、線条体および脊髄前角組織の Ach 産生能は control 群でそれぞれ 9.2±1.7 および 17.3±2.9fmol/specimen であったが、種々な濃度の HCNP または free-HCNP の添加により両培養組織の Ach 産生能は影響を受けなかった。一方NGF の添加で培養線条体の Ach 産生能は 16.6±2.5fmol/specimen と増加を示したが、NGF と free-HCNP の同時添加でも Ach 産生能は 17.5±2.2fmol/specimen と NGF 単独添加と類似した値を示した。また、NGF も培養脊髄前角組織の Ach 産生能には影響を及ぼさなかった。以上の如く、HCNP 及び free-HCNP はNGF とは異なった作用様式と作用点を有し、特定の神経系の成長・分化過程に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

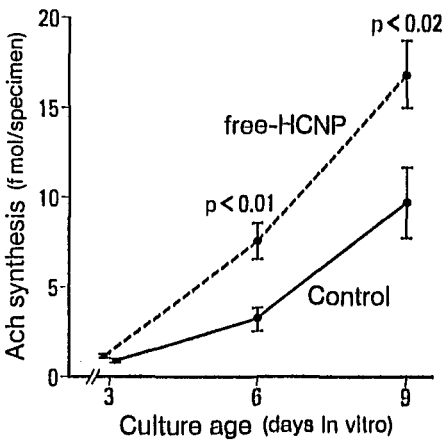


Fig. 1 Culture age and cholinergic development

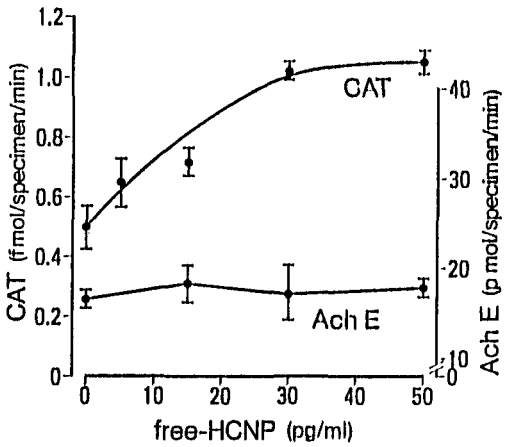


Fig. 2 Dose effect of free-HCNP on CAT and AchE activity

Table Effect of synthetic free-HCNP and/or NGF on biochemical development of medial septal nuclei culture

	AcCho synthesis①	[³H]-choline uptake①	ChATase activity②	AcChE activity③
control	4.1±0.7	30.1±3.2	0.47±0.02	24.4±1.0
free-HCNP	6.4±0.3$^{**,+}$	32.5±4.3	0.74±0.03$^{**,++}$	24.0±1.2^{+++}
NGF	9.8±0.5$^{*,+}$	34.0±2.5	1.00±0.01$^{*,+++}$	30.7±1.3***
free-HCNP plus NGF	20.6±1.3*	47.3±8.8***	1.35±0.06*	28.7±0.9***

①fmol/specimen ②fmol/specimen/45min ③pmol/specimen/min
*p < 0.001, **p < 0.01, ***p < 0.05 (comparison between control and other groups), +p < 0.001, ++p < 0.01, +++p < 0.05, (comparison between free-HCNP plus NGF group and free-HCNP group or NGF group)

〔文献〕 (1) Ojika, K. et al, Banbury Report 15(ed. Katzman.R.) pp 285-292 (Cold Spring Harbor, N.Y.) 1983. (2)Ojika, K. et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 81, 2567-2571, 1984. (3)小鹿幸生 他、神経化学、23:351-353,1984.(4)小鹿幸生 他、神経化学、25:412-414,1986. (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、24:493-495,1985. (7)小鹿幸生 他、神経化学、28:374-375,1989. (8) 鹿幸生 他、神経化学、29:180-181,1990. (9)Rand, J.B. et al, Anal. Biochem. 116:361-371,1981. (10)Lehmann, J.et al, J.Neurochem,30:615-624, 1978. (11)Hefti, F. et al, Neurosci. 14:55-68,1985.

34 PC12D細胞の神経突起伸張とMAPキナーゼ

FGF, EGFの作用とK-252a

佐野 護、北島哲子, 岩永 操
(愛知県コロニー研、形態学部)

〔要約〕PC12D 細胞は、NGFあるいは dbcAMP処理すると数時間で神経突起が誘導される。 アクチノマイシンDによってRNA 合成を阻害しても、突起の誘導は阻害されない。 従って、この反応は既存蛋白質の修飾と解釈される。NGF で細胞を数分処理すると、微小管結合蛋白を基質とする蛋白燐酸化酵素(MAPキナーゼ) の活性が上昇する。その後、誘導される神経突起の伸張は、このキナーゼの活性化と深く関わる可能性を示唆してきた(3,6,7,8)。 繊維芽細胞成長因子(bFGF), 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、それは、NGF 依存性 MAPキナーゼと同様の酵素と考えられる。 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。 K-252aは、NGF による突起形成も MAPキナーゼ活性化も特異的に阻害するが、FGF, EGF の場合は、 MAP キナーゼの上昇および突起伸張誘導いずれも、K-252aによってむしろ促進された。 このK-252a の特異な作用のメカニズムは不明であるが、MAP キナーゼ活性化と突起誘導の関連を考える我々の仮説を強化するものと思われる。

PC12D 細胞 (2) 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。 突起誘導は通常のPC12細胞では RNA合成依存的である事が知られる。 今回 PC12D細胞で RNA合成阻害剤の効果を調べた。 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 (1,3,6)。 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(MAP) の燐酸化活性をin vitroで調べた結果, cAMP 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NGF依存性MAPキナーゼと名付けた (2,3)。 PC12D 細胞をFGF, EGFで処理した時活性化される、微小管蛋白を燐酸化する酵素活性は NGFの場合と同一である可能性を示唆した(7,8)。本報告ではNGF作用の特異的阻害剤であるK-252aの影響をNGF と同時に bFGF, EGFについても調べ、その突起誘導作用との関連性について検討した。

［実験方法］①突起伸張の測定、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 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た細胞の抽出液を酵素標品とした。 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、10mM $MgCl_2$, 100 μM[^{32}P]ATP(0,15MBq)の反応液で、30℃, 2分反応後、 SDS-PAGEにかけ、MAP1, MAP2バンドを切りだし、液シンにて放射能を測定した。(詳しくは文献6,7)

［結果と考察］ PC12細胞は、NGF 添加後突起伸張に4,5 日掛かるが、PC12D 細胞は数時間で伸びる。アクチノマイシンDを培養液に添加すると、25nMでも２日以上になると殆どの細胞が死んでしまう。 従って、PC12細胞では、RNA 合成を阻害して突起伸張を観察出来ないが、PC12D の場合、高濃度の阻害剤の存在下でも、細胞が死ぬ前に突起の伸張が見られる（図１）。PC12D 細胞の数時間内の突起伸張は、既存の細胞骨格蛋白の再構築と解釈出来る。図２は、PC12D 細胞のNGF,EGF,bFGFによる24hr後の突起誘導とそれに対するK-252aの影響を調べた結果である。NGF による突起誘導は、K-252aによって完全に抑制されるが、EGF, bFGF の場合は、むしろ促進されている。 図３は、これらの因子で1処理した時、細胞抽出液中に認められるMAPs燐酸化活性の上昇である。 K-252a を同時添加すると、NGF の効果は阻害され、EGF, bFGF の効果は促進を受けている。K-252aの作用のみならず、各成長因子

の効果も、突起の誘導と一致した。 これらの事実は、既に報告した MAP燐酸化活性の上昇が突起誘導に関連するとの仮説(3,6,7,8)と良く一致する。 EGF,FGF のPC12細胞に対する作用がK-252aにより促進される現象(4)、K-252aの類似物質ストラスポリンが単独で突起形成を促すなどの報告(5) もあり、関連性が考えられるが、メカニズムについては不明である。 またPC12D 細胞では、MAP キナーゼ活性制御と突起形成の制御が正確に一致するとは云え、これらの現象が直列の関係に在るのではなく、単に同時に起こっている可能性は否定出来ない。

図１、突起伸張対するアクチノマイシンDの効果
アクチノマイシンは２時間前に加えた
＊印は、生存細胞殆どなし。

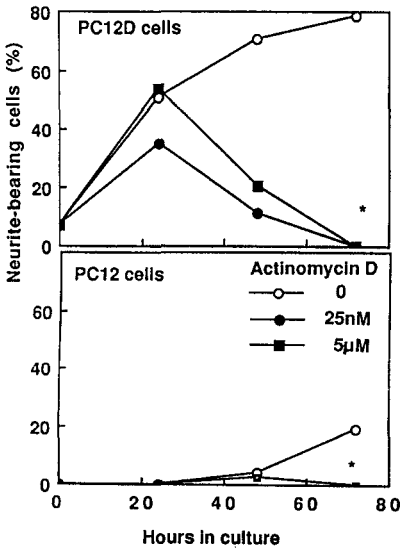


図２、各種因子のよるPC12D 細胞の突起誘導とK-252a

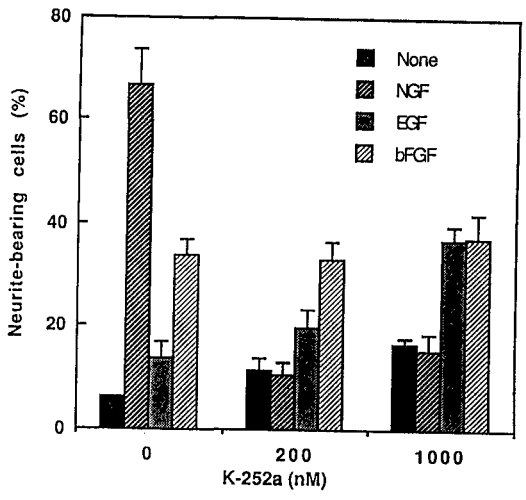
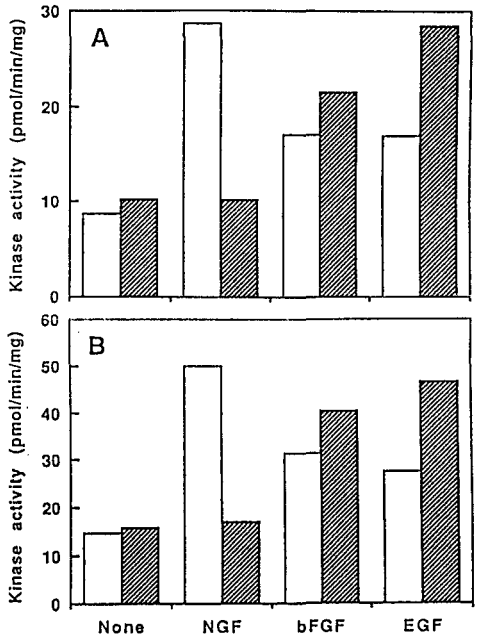


図３、NGF, bFGF, EGFによるMAP燐酸化活性の上昇とK-252a添加の影響
K-252aある（黒）無し（白）で細胞を処理し
抽出液の MAP1(A), MAP2(B)燐酸化活性を測定



［文献］

(1) Chijiwa,T.et al.(1990) J. Biol. Chem., 265, 5267.
(2) Katoh-Semaba,R., Kitajima,S., Yamazaki,Y.,Sano.M. (1987) J. Neurosci. Res., 17, 36.
(3) 北島哲子、佐野護 (1989) 神経化学, 28, 160.
(4) Lazarovici,P. et al.(1989) J.Neurosci.R.,23,1
(5) Hashimoto,S., Hagino,A.(1989) Exptl Cell R.,184, 358
(6) Sano,M.et al. (1990)J. Neurochem., 55, 427
(7,8)佐野、北島 (1990) 神経化学、29, 358, 360

35 ＰＣ１２ｈ－Ｒ細胞における低親和性ＮＧＦレセプターの発現制御

高橋信明、小島正己、池内俊彦、畠中寛

（大阪大学蛋白質研究所・蛋白質生合成部門）

〔要約〕

PC12h細胞およびPC12h-R細胞における低親和性NGF受容体（LNGFR）の発現を、RNAブロット解析によりmRNA、酵素抗体法（ELISA）により蛋白質のレベルで調べた。PC12h細胞においては、NGFによりLNGFRの発現がほとんど変動しないということは既に報告したが（3）、ヒト組換え型塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）により顕著に増加した。ED_{50} 値は、約1ng/mlであった。PC12h-R細胞において、LNGFRの発現を調べたところ、50ng/mlNGF添加後3日で0日に比べ、約3倍高い値となった。しかし、より長期間の培養では、LNGFRの減少が観察された。PC12h-R細胞では、bFGFによりLNGFRの発現に変化はなかった。また、この時、形態的変化も見られなかった。

〔目的〕NGFは、現在最も研究の進んだ神経栄養因子であり、神経細胞の分化、生存維持に寄与すると考えられている（1）。NGFの作用は、まずNGFRに結合することにより始まるが、NGFRのレベルの変動はNGF作用を明らかにする上で必須であると考えられる。LNGFRは、神経細胞の発生や損傷時、さらに、NGFや神経伝達物質アゴニストの投与により発現が上昇することが報告されている。しかし、LNGFRの詳細な発現制御機構については余り調べられていない。そこで、交感神経の分化モデル細胞であるPC12系細胞を用いて検討することにした。PC12h細胞ではNGFによりLNGFRの発現がほとんど変化せず、また、細胞密度に依存して発現が上昇するために、PC12h細胞の亜種でありNGFに対する応答の早いPC12h-R細胞を用いた。

〔方法〕LNGFR蛋白質の定量はDohertyら（2）によるELISAに若干の改良を加えて行った。細胞をコラーゲンコートした培養皿にまき、1日後成長因子等を添加し、培養を続けた。ELISAによる発色用とは別に、培養したものを用いて蛋白質量を決定し、細胞蛋白質当りのLNGFR量として求めた。ELISAは、次のように行った。4%パラホルムアルデヒドで20分間室温固定の後、-20℃のメタノールで30分間処理した。0.5%ゼラチンで希釈した抗LNGFR抗体（MC192）を加え4℃で一晩放置した。抗マウスIgG HRP-conjugatedを加え、室温で1時間反応させた後、ABTSを用いて発色させた。この発色の値がLNGFR蛋白質量に相当すると考えた。RNAブロット解析はAGPC法により抽出したトータルRNAを、ホルムアルデヒドゲルで展開した後、ナイロンメンブランに転移し、LNGFRcDNAプローブでハイブリダイゼーションを行った。

〔結果〕PC12h細胞でLNGFRの発現を蛋白質レベルで調べたところ、100ng/ml bFGFを添加し4日間培養した後では、LNGFRは約2倍になっていた。ED_{50} 値は約1ng/mlであった。そこで、PC12h-R細胞でも同様にLNGFRの発現を蛋白質レベルで調べた。PC12h-R細胞では、50ng/ml NGFを添加することによりLNGFRの発現上昇が観察された。NGF添加後3日目で最大値に達した（図1）。また、bFGF 存在下で2日間培養後では、神経繊維の伸長等の形態的変化はみられず、LNGFRの発現量も変動しなかった。1μM dexamethasone、40mM KCL存在下で2日間培養したものではLNGFRの発現に顕著な差はみられなかった（図2）。

〔考察〕PC12h-R細胞は、PC12h細胞を長時間連続的に培養した後に樹立された亜種で、NGFによりチロシン水酸化酵素活性の上昇がみられ、またPC12h細胞に比べ非常に早く神経繊維を伸ばすことが知られている。今回、我々の得た結果からPC12h細胞とPC12h-R細胞ではLNGFRの発現様式に違いがあることが分かった。PC12h細胞では、LNGFRの発現においては、NGFはほとんど効果はないがbFGFにより増加した。一方、PC12h-R細胞では逆にNGFにより発現上昇がみられたがbFGFは効果がなかった。現状では、神経系の分化初期に、FGFが作用しLNGFRの発現が上昇し、その後NGFが働き分化が進むという可能性が考えられている。したがって、今回報告したFGF作用の相違は、生体内の現象を反映している可能性も考えられる。脱分極下で、NGFを添加し培養すると神経繊維の伸長が非常に顕著となり、また細胞体も大きくなる。しかし、このような状態でもLNGFRのレベルはNGFのみを添加したものと大きな差はみられなかった。従って、LNGFRの発現と神経繊維の伸長との間には相関関係は成立しないと考えられる。最近、proto-oncogene であるtrkの産物が高親和性のNGFR（HNGFR）を形成するのに必要であるという報告がなされた。NGFの生理作用はHNGFRを介して起こると考えられているので、この研究で観察したLNGFRの発現制御と、trkおよびその産物の発現制御との関連に興味がもたれる。

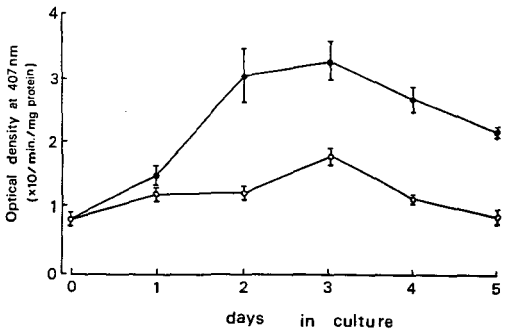


図1 PC12h-R細胞におけるLNGFR蛋白質発現の経時変化
（●）NGF存在下、（○）NGF非存在下

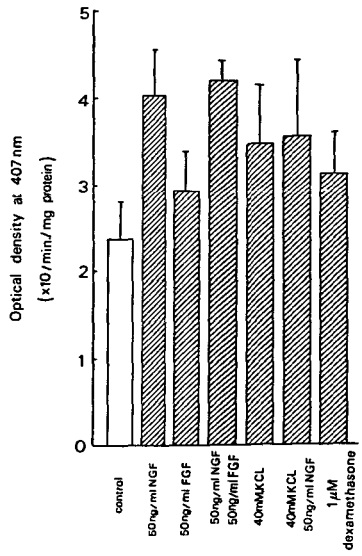


図2 PC12h-R細胞における成長因子等のLNGFR発現に対する効果

〔謝辞〕MC192およびLNGFRcDNAを供与して戴きました、スタンフォード大学のE·M·Shooter教授に感謝します。また、bFGFを提供して下さった、武田薬品（株）に感謝します。

〔文献〕（1）池内俊彦，高橋信明，畠中寛，蛋核酵，36(1991)1211-1219
（2）P. Doherty, P. Seaton, T. P. Flanagan and F. S. Walsh, Neurosci. lett., 92(1988)222-227
（3）高橋信明，池内俊彦，畠中寛，生化学，62(1990)596

36 新しい成長因子、Pleiotrophin(PTN)の神経系個体発生における遺伝子発現

加藤英政、和中明生、遠山正彌、E.M. Johnson, Jr.[a)], T.F. Deuel[b)], J. Milbrandt[b,c)]

(大阪大・医学部第2解剖, Washington University 薬理[a)], 内科[b)], 病理[c)])

〔要約〕

新しく同定され神経突起伸長作用が明らかとされた成長因子、pleiotrophin(PTN)の遺伝子発現をin situ hybridizationを用いて発生過程の神経系において検討した。PTNmRNAは胎生中期の中枢神経系から発現しており、主に分裂期にある前駆細胞層に局在が認められた。生後PTNmRNAはその発現強度が増加しかつ広範囲のグリア細胞に検出された。生後1－2週にPTNmRNAのlevelはpeakに達し、成熟CNSでは一部の神経群に弱い発現が検出されるというような各発生過程で発現量及び部位が制御された特異なパターンをとることが明らかとなった。また成熟CNSではPTNmRNAは機械的損傷に対応してupregulationを受ける事より成熟神経系における何らかの保護因子としての機能が示唆された。末梢神経節では胎生後期に一過性に神経細胞にシグナルが認められる事及び成熟神経節ではsatellite cellに特異的に遺伝子発現が観察される事などより末梢神経系におけるPTNの生理作用も今後の興味深い研究課題と考えられる。以上の結果はPTNが神経系の発生及び維持に重要な役割を担っている事を強く示唆するものと思われる。

＜目的＞

Pleiotrophin(PTN)は牛子宮より線維芽細胞のmitogenとして、単離抽出されたペプチド性成長因子であるが[1]、アミノ酸配列[1]および遺伝子構造の解析[2]より、生後ラット脳に一過性に多量に発現している成長因子Heparin binding-Growth associated Molecule(HB-GAM)[3,4]と同一物質であることが明らかとなった。PTN/HB-GAMの特徴は1)Heparinに親和性を有する分子量約17～18kdの蛋白である。2)これまで報告されているgrowth factorファミリーとは全く構造を異にする。3)培養中枢神経に対してPTM/HB-GAMは神経の個体発生時に一過性(生後1～2週)に発現が増加し、その後低下することが明らかとなっている[2,4]。　今回我々は、ラットPTNのcDNAをtemplateとして合成したcRNA probeを用いてPTN/HB-GAMの遺伝子発現を組織レベルで詳細に検討したのでここに報告する。

＜方法＞

ラットPTN cDNAは文献4の牛cDNAの216-1440のfragmentに相当するfragmentでBluescriptにsubcloneした後Hinf I (sense)、Mva I (antisense)で切断した後、in vitro transcriptionにより[^{35}S]標識のRNA probeを合成した。

in situ hybridizationは既報の方法に順じて行った[5]。　動物はWister rat(妊娠9日、12日、14日、17日、20日、生後1日7日、14日及び成熟)を用い、浸漬(胎児)あるいは還流固定(胎児以外)した後パラフィン処理し、厚さ約12μmの切片を作成、実験に供した。また1部の成熟ラットでは頭頂部頭骸骨に直径13mmの頭窓を作成し、ナイフカット(矢状方向深さ約3mm)を加え、1日、3日、7日後にそれぞれ固定しISHを行った。

＜成績＞

a) 発生過程の中枢神経系におけるPTNmRNA発現

胎生9日の脳よりPTNmRNAは神経上皮層にdiffuseに認められた。胎生14日、17日の脳ではPTNmRNAは主として分裂しつつある前駆細胞より構成される上衣層に強い発現が観察され、外套層には認められなかった。この発現パターンは胎生20日の脳でも継続したが、この時期には上衣層のみならず外套層にもPTNmRNA(+)の細胞がdiffuseに認められるようになった。生後1日の脳では上衣層の標識は認められず、脳全体にPTNmRNA陽性細胞が観察された。生後7日の脳と成熟脳をフィルムオートラジ

オグラフィーで比較すると(図)、明らかに生後7日の脳切片に強く広範囲なPTNmRNAのシグナルが観察され、この結果はNorthern解析の結果とよく一致した。成熟脳ではPTNmRNA発現は胎生期や生後1～2週の脳に比して弱く、かつ特定の神経群(Primary olfactory cortex、海馬ＣＡ1～2領域、梨状葉、大脳新皮質2～3層)に発現が検出された。ミクロオートラジオグラフィーによる生後7日脳と成熟脳の比較では、生後7日脳ではグリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイト)に主に発現を認めるのに対し、成熟脳では主に神経細胞にPTNmRNAのシグナルが検出され、遺伝子発現の量の違いのみならず、発現する細胞の違いがあることが明らかとなった。

ｂ) 発生過程の末梢神経系におけるPTNmRNA発現

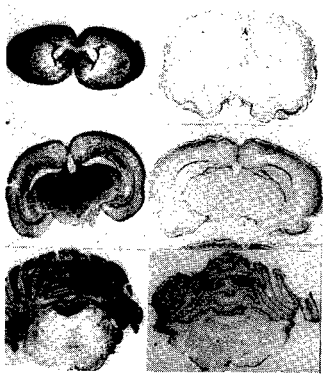
我々は交感神経節(上頸神経節等)、知覚神経節(後根神経節、三叉神経節)においてもPTNmRNA発現を検索した。両者において遺伝子発現の顕著な差は認められなかった。胎生中期(E9～E14)ではPTNmRNAは弱くdiffuseなsignalのみを認めるが胎生後期(E17～E20)ではPTNmRNAは明らかに神経細胞に強く発現していた。PTN遺伝子の発現は生後一旦低下するが、生後2週頃より再び認められ成熟動物では強い発現を示す。この発現は胎生期にPTNmRNAが神経細胞で発現したのに反しSatellite cellに特異的に発現していた。なお、シュワン細胞にはsignalは検出されなかった。

ｃ) 中枢神経損傷におけるPTNmRNA発現

大脳新皮質にナイフカットを加えたラットでは、手術後三日目をpeakとして損傷部位周辺にPTNmRNA陽性細胞が多数認められた。同一切片の対側新皮質にはこのようなup-regulationは観察されなかった。

＜考察＞

以上の結果PTNの神経系における発現は、個体発生の各過程で制御された特異な発現様式をとることが明らかとなった。現時点ではPTNの神経に対する生理作用は培養中枢神経細胞に対する突起伸長効果のみが明らかであるが、胎生期に非常に発現が強く認められた前駆細胞への作用や成熟中枢神経の特定神経群における発現の意義及び時期による発現細胞の違いの意義(神経細胞とグリア細胞)などが今後の研究の課題である。また成熟末梢神経節におけるSatellite cell specificなPTN遺伝子の発現は今までほとんどその機能が論じられていないこの細胞の新しい役割を示唆しているものと考えられる。



図はラット脳前額断切片のフィルムオートラジオグラフィー像を示す。
左側は生後７日令、右側は成熟ラットでこれらの切片は同一のprobeで反応し同一の条件で洗浄した後、並列させて３日間露光した。両者を比較すると明らかなように、生後７日令の脳ではPTNmRNAが極めて強くまた広範囲に発現している。

(References)

1) Milner, P.G. et al. (1989). Biochem. Biophys. Res. Commun. 169, 1096-1103.

2) Li, Y.S. et al. (1990). Science 250, 1690-1694.

3) Rauvala, H. (1989). EMBO J. 8, 2933-2941.

4) Merenmies, J. and Rauvala, H. (1990). J. Biol. Chem. 265, 16721-16724.

5) Wanaka, A. et al. (1990). Neuron 5, 267-281.

37 アルツハイマー病脳、老年者脳における神経原線維変化、neuropil threadsの免疫細胞化学
---共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡による観察---

岩坪 威、 長谷川 成人、 江崎 行芳*、 井原康夫
(東大脳研病理、 都老人医療センター病理*)

〔要約〕

アルツハイマー病脳、老人脳に見られる神経原線維変化(NFT)、neuropil threads(NT)を、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡による二重免疫染色で観察し、NTと正常構造物の関連、NTの伸長方向、NT・NFTに含まれるタウ蛋白のprocessing、リン酸化の状態について検討した。抗タウ蛋白N末端抗体(抗tau-N)で染色されるNTは、主に樹状突起内に形成されたPHFの小束と考えられ、両端にユビキチン免疫反応性を欠くことから、両方向に伸長しているものと考えられた。またその屈曲・蛇行した形態は、PHF束自体の性質によるものと思われた。樹状突起分枝内に多巣性に形成されたNTは、アルツハイマー病における細胞変性、知能障害に関与する可能性が考えられた。細胞内NFTは抗tau-Nで染色されたが、細胞外NFTは染色されなかった。一方タウ蛋白C末端側1/3内に含まれるリン酸化部位を認識するモノクローナル抗体C5は、細胞内、細胞外NFTを共に染色した。C5は、PHF形成に特異的なリン酸化部位を認識していると考えられた。

アルツハイマー型痴呆(Dementia of the Alzheimer type, DAT)を特徴づける主要な神経病理学的所見として、老人斑、アミロイド・アンギオパチーと神経原線維変化 (neurofibrillary tangle, NFT)が知られている。この中でNFTは神経細胞の変性、痴呆症状と最も関係の深い構造物と考えられている。NFTは電顕的にはpaired helical filaments(PHF)の束からなり、PHFは微小管結合蛋白の一つであるタウ蛋白と、非リソソーム蛋白分解系の重要な一要素であるユビキチンより構成されていることが知られている。タウ蛋白免疫染色によって、NFT以外に、ニューロピル内に無数の弯曲した線維状構造が陽性反応を示すことが明らかになった。これらの構造物はneuropil threads(NT)またはcurly fibersと命名され、DAT脳に特徴的な所見の一つと考えられるようになった。NTもやはりPHFを有し、電顕的にシナプス後構造を示すことから、樹状突起としての性質を示す異常神経突起と考えられているが、正常な神経突起との関係や、その伸長様式、病的意義は十分に解明されていない。一方タウ蛋白の異常なリン酸化がPHFの生成に重要な役割を果たしていると考えられており、アルツハイマー病脳内に蓄積したタウ蛋白のリン酸化、processingの様式とその分布の解析は重要である。我々は高解像力で二重免疫染色を行うことが可能な共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡(CLSM)を用いて、NT, NFTの免疫細胞化学的検討を行った。

対象と方法

DAT6例の後頭側頭回及び非痴呆老人6例の海馬、海馬傍回を4° Cで48時間10%緩衝ホルマリン中にて固定後、ビブラトームで50μ厚切片を作製し、二重免疫蛍光染色を行った。一次抗体は以下のように、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体を組合わせて用いた：①抗ヒトタウ・ポリクローナル抗体(h-tau:タウ蛋白N末端側 Ala103-Lys130を認識)と抗非リン酸化ニューロフィラメント(npNF)もしくは抗MAP2モノクローナル抗体 ②抗タウN末端抗体と抗ユビキチン抗体[a: h-tauと抗ユビキチンモノクローナル抗体(DF2)、b: 抗ウシタウ・モノクローナル抗体(tau 2:タウ蛋白N末端側Ala106-Lys119を認識)と抗ユビキチンポリクローナル抗体) ③抗タウN末端抗体(h-tau)と抗PHFモノクローナル抗体(C5;タウ蛋白C末端1/3内のリン酸化部位を認識)。 一次抗体でincubation後、FITC及びTexas Red標識二次抗体で蛍光染色し、CLSMで観察した。③では、核を蛍光染色するpropidium iodineを適宜併用し、NFTと細胞核の関係を観察した。

結果と考察

抗タウN末端抗体によってNFT，NTが陽性に染色され、共にDAT皮質第3，5層に最も密に分布していた。 NFTは錐状・火炎状の細長い形に染色された。NTは不規則に屈曲、蛇行する短い線維状構造としてニューロピル内に分布しており、その一端は腫大したり、先細になって丸く屈曲していた。頂上・基底樹状突起中のNTの一部は胞体内NFTと連続していたが、大部分のNTは胞体内NFTと直接連続していなかった。この他海馬錐体細胞には、胞体がびまん性細顆粒状染色を示す"Stage 0"ニューロン(Bancher)が見られた。

正常な樹状突起、神経細胞体はnpNF，MAP2陽性に染色された。一部のNTはnpNF，MAP2陽性を示す樹状突起分枝の途上で、その内部に生じていることが確認されたが、大部分は正常な樹状突起とは独立してニューロピル内に散在していた。正常樹状突起を染色する細胞骨格蛋白抗体によってNTに連続する細胞質が染色されにくいことから、NTが光顕的に可視化することが困難な、きわめて細い樹状突起分枝内に生じたものである可能性、あるいはPHF束が形成されたことにより周囲の正常細胞骨格が消失した可能性が考えられた。錐体細胞の頂上樹状突起内に、胞体内NFTから連続してtau-N陽性の線維束が強い彎曲を示しつつ伸び出している像が観察されたが、これを容れる頂上樹状突起の形態には屈曲が見られなかった。PHFの束はそれ自体の性質として屈曲・蛇行を示し易いものと考えられる。 NTの細胞骨格は、電顕的にはPHFのみからなることが確認されているので、NTの屈曲・蛇行した形態は、内在するPHF束の形状により規定されている可能性が考えられた。

NTは、tau-Nのみならずユビキチンにも陽性を示したが、その両端はしばしばユビキチン反応性を欠くことがa，b二種類の抗体の組み合せで確認された。現在までの生化学的知見から、形成されて間もない新しいPHFは異常リン酸化を受けた全長タウ蛋白からなり、ユビキチン化されていないこと、修飾を受け高度の不溶性を獲得したタウ蛋白がユビキチン化されてゆくことが示唆されている。これらの知見を考え併せると、NT両端の非ユビキチン化部分はPHF束の新しく形成された部分、即ちその伸長方向を現わしているものと考えられた。

これらの所見から、NTは、細い樹状突起分枝内に形成され、前後に細長く成長してゆくNFTであると考えられた。樹状突起内に多巣性に形成されたNTは、樹状突起の機能・代謝を障害し、DATにおける脳機能障害と細胞変性（樹状突起の変性）に関与する可能性が考えられた。

タウN末端を認識するh-tauと、タウC末端1/3内に存在するリン酸化部位を認識するC5の組み合せにより、蓄積したタウ蛋白がN末端を有しているか、またC末端側の特異的リン酸化を受けているかどうかの検討を行った。h-tauは細胞内NFTとNTをよく染めた。一方C5で染め出されるNFTの数は、h-tauに陽性を示すものの数よりも多く、C5は細胞内NFT，NT以外にも、核を失った細胞外NFTも染色することが分かった。細胞内NFTはタウN末端側の保たれた全長からなるタウ蛋白を有しているが、神経細胞が死滅しNFTが細胞外環境に曝された際、タウ蛋白N末端側は様々なプロテアーゼの作用によりprocessingを受け、消失するものと考えられた。これに対し、タウ蛋白C末端側は細胞外NFTにも残存し、この中に含まれる特異的なリン酸化も保たれていることが明らかになった。一方、NTについては、N末端側の抗原性を失った「細胞外」NTは少なく、大部分は生存神経突起内に存在していると考えられた。NTを有する神経細胞が死滅し、NTが細胞外環境に放出された場合には、プロテアーゼによる処理を受けて分解され、消失しうる可能性も考えられた。h-tau,C5によるNTの染色範囲はほぼ一致していた。従って、NT内のタウ蛋白は、C末端の特異的リン酸化を受け、恐らく PHFを形成しつつ蓄積するものと思われる。モノクローナル抗体C5で認識されるリン酸化部位は、PHFに特異的と考えられ、その部位の正確な同定は重要であると思われた。

38 ヒト脳における phosphatidylinositol-specific phospholipase C 活性 ーアルツハイマー病脳での変化

下濱 俊、藤本貞毅*、谷口隆之**、木村 淳

（京都大·医·神経内科、京薬大·生化学*、生物**）

〔要約〕

ヒト脳における phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) 活性を測定し、アルツハイマー病脳での変化について検討した。ヒト脳でのPI-PLC 活性は可溶性分画と顆粒性分画のいづれにも存在し可溶性分画の方が活性が高かった。ラット脳を室温下で24時間放置していてもPI-PLC 活性には有意な変化は認められなかった。8例の対照群と8例のアルツハイマー病群の剖検脳前頭葉を用いた検討では、可溶性分画と顆粒性分画のいづれにおいてもPI-PLC 活性は両群間で有意な差は認められなかった。酵素活性のカルシウム依存性も両群間で差は認められなかった。これらの結果よりヒト脳でのPI-PLC 活性は可溶性分画と顆粒性分画のいづれにも存在し死後影響が少ないことがわかった。アルツハイマー病脳では、PI-PLC 活性は保たれていることが示唆された。

［目的］

外界情報物質がその受容体に結合すると、細胞膜のイノシトールリン脂質がホスホリパーゼ C（PLC）によって加水分解を受ける。イノシトールリン脂質にはホスファチジルイノシトール（PI）、ホスファチジルイノシトール一4一一リン酸（PIP）、ホスファチジルイノシトール一4,5一二リン酸（PIP2）の3種類が存在するが、いづれもPLCによって加水分解を受けて、ジグリセリド（DG）とそれぞれイノシトール-1一一リン酸（IP1）、イノシトール-1,4一二リン酸（IP2）、イノシトール-1,4,5一三リン酸（IP3）が産生される。DGはプロテインキナーゼCの活性化の引き金となっている（1,2）。私たちは、これまでにアルツハイマー病における神経伝達物質受容体の変動について報告してきた（5,7-11）。さらにプロテインキナーゼCについても検討しアルツハイマー病においての特異的な変化を報告している（4）。これらの結果は外界情報を受容し直接細胞内シグナルを産生する酵素である PLC の解析の重要性を示唆している。今回、私たちはヒト脳でのPI-specific PLC活性について生化学的性質を明らかにするとともに、アルツハイマー病脳での変化について検討した。

［対象］

対照群は8例（年齢70-86歳、男4例、女4例）で、すべて脳に肉眼的異常所見は認められなかった。アルツハイマー病群は8例(年齢73-91歳、男2例、女6例）で、臨床症状ならびに神経病理学的所見より本病と診断されている。年齢、死後剖検までの時間について、対照群との間に有意差は認められなかった。検索部位は前頭葉とした。

［方法］

1) 標品調整

標品調整は Rhee らの方法（6）に準じた。組織を9倍量の抽出buffer (4mM EGTA/ 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride/ 0.5 mM diisopropylfluorophosphate/ 0.1 mM dithiothreitol/ 10mM Tris-HCl pH 7.2) で homogenize した後、105,000 x g で 60 分間遠沈し、その上清を可溶性分画とした。その沈渣を上記の抽出bufferでresuspend した後homogenize し、再び105,000 x g で 60 分間遠沈し、その沈渣を抽出bufferでresuspendし顆粒性分画とした。

2) PI-specific PLC 活性測定法

PI-specific PLC 活性測定は Hofmann らの方法（3）に準じた。活性測定の基質として soybean phosphatidylinositol および放射性ラベルの 30,000 DPM L-α-(myo-inositol-2-^{3}H(N)) を用いた。1mg/ml sodium deoxycholate および1.0 mM CaCl2 を含む 50 mM Hepes buffer (pH 7.0) 中に上記基質および可溶性分画および顆粒性分画の標品を添加することにより反応を開始した。反応は、37^{0} C で 15 分間の incubation で行った。1.0 ml の CHCl3/Methanol/c-HCl (50/50/0.3) を加え反応を終了させた後、0.3 ml の 5mM EGTA/1N HCl を添加、撹拌した後、3,000 x g で 10 分間遠心し、その上清 700 µl を 6ml のScintisol EX-H に加え、その放射活性を測定した。蛋白の測定は、Bicinchoninic acid 法（12）を用いた。脳組織のPI-specifc PLC 活性の死後時間による影響を調べるために、ラットより全脳を取り出した後、室温（22^{0} C）下に 0, 7, 24 時間放置後にその活性を測定した。また、PI-specific PLC 活性のカルシウムイオン濃度による影響を調べるために、ラット脳およびヒト剖検脳を用いて、反応液中のカルシウムイオン濃度を変化させてその活性を測定した。

［結果］

1) 対照脳における PI-specific PLC 活性

ヒト脳標品に対するPI-specific PLC 活性は時間依存性に増加し、少なくとも 30 分に至るまで直線性を示した。また、約 4 mg protein/ml まで直線性の蛋白依存性を示した。ラット脳組織のPI-specifc PLC 活性の死後時間による影響は、表 1 に示す様に少なくとも室温下で 24 時間放置された状態でもその活性に有意な変化は認められなかった。ラット脳組織、ヒト脳組織いづれにお

いてもPI-specifc PLC活性は、1-2 mMのカルシウムイオン濃度で最大の活性値を示した。

2) アルツハイマー病脳におけるPI-specifc PLC活性の変化

アルツハイマー病脳におけるPI-specifc PLC活性は、正常脳に比べ可溶性分画、顆粒性分画いづれにおいてもその活性に有意な差は認められなかった（表2）。また、PI-specifc PLC活性に対するカルシウムイオン濃度の影響を調べてみると、両群間で有意な差は認められなかった。

表1 PI-specific PLC活性の死後時間による影響

放置時間（室温）	可溶性分画	顆粒性分画
0 hours	30.0 + 0.8	9.2 + 0.3
7 hours	35.5 + 0.7	7.9 + 0.4
24 hours	35.9 + 0.4	8.1 + 0.4

数値は3例のラットを用いての平均 + SD
単位は nmole/min/mg protein

表2 ヒト脳における PI-specific PLC活性

	可溶性分画	顆粒性分画
対照群 (n=8)	32.8 + 3.2	9.1 + 0.5
アルツハイマー病群 (n=8)	28.2 + 1.4	10.2 + 0.6

数値は平均 + SEM。単位は nmole/min/mg protein

[考察]

今回の研究でヒト脳における PI-specific PLC活性の性質が明らかとなった。可溶性分画での活性は顆粒性分画の約3倍と高値を示した。またラット脳の活性値と比べ殆ど変らず、種属差の少ないことがわかった。ラット脳組織を用いた検討より、PI-specific PLC活性は少なくとも室温下で24時間放置してもその活性値は殆ど変化せず、ヒト剖検脳を用いた検討でも死後の影響は少ないことが示唆された。アルツハイマー病脳前頭葉での検討では、PI-specific PLC活性は可溶性分画、顆粒性分画ともに対照群に比べ有意な差を認めなかった。さらにPI-specific PLC活性のカルシウム依存性についても両群間で差を認めなかった。これらの結果より、アルツハイマー病脳ではPI-specific PLC活性には変化が少ないことが示唆された。

私たちは、これまでに各種神経伝達物質受容体の変動について検討し、アルツハイマー病の病態生理に細胞膜受容体の変動が関与していることを報告してきた（3-8）。ムスカリン性アセチルコリン受容体およびαアドレナリン受容体は直接細胞膜のイノシトールリン脂質代謝に連関し、DGとそれぞれIP1、IP2、IP3が産生されると考えられる。今回の結果は対照群とアルツハイマー病群間でPI-specific PLC活性には大きな変化がないことを示している。今後さらにPIP-specific PLC活性および PIP2-specific PLC活性について検討する必要がある。特に PLC反応で産生されるDG、IP1、IP2、IP3のなかで、生理活性が認められているのはDGとIP3であるので PIP2-specific PLC活性についての検討が要求される。さらにイノシトールリン脂質に特異的な PLCは現在数種類のアイソザイムから構成されていることが明かにされている。PLC アイソザイム の観点からの検討も必要である。

文献

1. Berridge MJ. and Irvine RF. (1984) Nature 312, 315-320
2. Hawthorne JN. (1982) Nature 295,281-282
3. Hofmann SL. and Majerus PW (1982) J Biol Chem 257, 6461-6469
4. Masliah E., Cole G., Shimohama S., Hansen L., DeTeresa R., Terry RD. and Saitoh T. (1990) J Neurosci 10, 2113-2124
5. Ninomiya H., Fukunaga R., Taniguchi T., Fujiwara M., Shimohama S.and Kameyama M. (1990) J Neurochem 54, 526-532
6. Rhu SH., Cho KS., Lee KY., Suh P-G. and Rhee SG (1986) Biochem Biophys Res Commun 141, 137-144
7. Shimohama S., Taniguchi T., Fujiwara M. and Kameyama M. (1986) J Neurochem 46, 288-293
8. Shimohama S., Taniguchi T., Fujiwara M. and Kameyama M. (1986) J Neurochem 47, 1294-1301
9. Shimohama S., Taniguchi T., Fujiwara M. and Kameyama M. (1987) J Neurochem 48, 1215-1221
10. Shimohama S., Taniguchi T., Fujiwara M. and Kameyama M. (1988) Ann Neurol 23, 404-406
11. Shimohama S., Ninomiya H., Saitoh T., Terry RD., Fukunaga R., Taniguchi T., Fujiwara M., Kimura J. and Kameyama M (1990) J Neural Transm 30, 69-78
12. Smith PK., Krohn RI., Hermanson GT., Mallia AK., Garther FH., Provenzano MD., Fujimoto EK., Goeke NM, Olson BJ. and Klenk DC (1985) Anal Biochem 150, 76-85

39 アルミニウムの大脳皮質培養細胞に対す神経毒性：アルツハイマー病との関連の検討

川原正博、村本和世、小林和夫、黒田洋一郎
（東京都神経科学総合研究所、神経生化学）

〔要約〕

アルミニウムの神経毒性を探るため、ラット大脳皮質培養細胞に対するアルミニウムの作用を細胞内Ca^{2+}振動の同時多点解析によるシナプス形成の機能アッセイ系および免疫組織化学を用いて調べた。その結果、灌流投与あるいは100μMのアルミニウムを8日間短期投与することによっては変化は生じないが、培養開始後22日間長期投与することによって、神経細胞内Ca^{2+}の同期した自発的な振動数はコントロールの60%に減少した。この振動数は既に培養神経細胞間で形成されるシナプス数と正の相関を持つことが知られており、アルミニウムがニューロン間のシナプス形成を抑制している可能性が示唆された。また、neurofilamentの抗体による免疫染色の結果、培養開始後22日間アルミニウムを長期投与すると異常な形態を持つねじれて太いprocessの出現が観察され、軸索など細胞骨格蛋白の代謝に影響する可能性が示唆された。

アルツハイマー病とアルミニウムとの関わりは古くから示唆されて来た。その根拠として、アルツハイマー病患者脳中にアルミニウムが蓄積し、特に老人斑やNFT（アルツハイマー神経原線維変化）を持つニューロン中に局在しているという報告や[1]、アルミニウム投与によってNFTと類似した構造が脳内に生じるという報告[2]などが挙げられるが、否定的な報告も多く、はっきりとした結論は出ていなかった。最近、飲料水中のアルミニウム濃度とアルツハイマー病発症率との間に相関があると言う疫学研究[3]をきっかけとして、アルミニウムとアルツハイマー病との関わりが再び脚光を浴び始めている。アルミニウムが神経毒性を持つことは、透析水中および薬剤中のアルミニウムによって透析患者に痴呆症状が発生した事件[4]や、アルミニウムゲルの脳内投与がてんかんを引き起こすことなどから既に知られている。しかしながら、その機序に関しては未だ不明な点が多い。そこで演者らはアルミニウムの長期投与による影響を、実験条件のコントロールが容易なin vitro系、すなわちラット大脳皮質の初代培養細胞を用いて検討した。アッセイ法としては、既に確立している細胞内Ca^{2+}の同時多点計測システムによる培養ニューロン間シナプス形成の機能アッセイ系[5]を用いるとともに、細胞骨格蛋白に対する抗体による免疫組織化学によりprocessの形態変化を観察したのでここに報告する。

［実験方法］

ラット大脳皮質細胞は既報[6]の様にBanker&Cowan法[7]を若干変えて培養した。ラット胎児脳（18日齢）から大脳皮質を摘出し、パパイン消化した後poly-L-lysineによりコーティングしたカバーグラス上にて培養した。また、後述の免疫染色の際にはgliaのlayer上にて培養を行った。アルミニウムは培養開始後ただちに$AlCl_3$, $Al(NO_3)_3$, または$Al_2(SO_4)_3$の水溶液として加えた。培地は3日間に1度半量ずつ交換した。培養細胞にfura-2を負荷した後、高感度ビデオカメラにより細胞内Ca^{2+}の時間変化を観察した。また、培養神経細胞は4%paraformaldehydeにより固定し、neurofilament(NF)（polyclonal,anti-200kD)、(monoclonal,anti-phospho, anti-nonphosho) あるいはMAP-2（monoclonal）による抗体で二重染色を行い、FITCまたはTexas Redにより蛍光標識を行った。

［実験結果及び考察］

細胞内Ca^{2+}の自発振動によるシナプス形成の機能アッセイ

既に昨年の本学会において報告した様に、ラット大脳皮質培養細胞は培養開始後約1週間たつと細胞内Ca^{2+}濃度の自発的な振動を起こし、その振動はほとんど全てのニューロンで同期している。電顕によるシナプスの定量的な観察の結果、培養ニューロン間のシナプス数と、この細胞内Ca^{2+}濃度の振動数とが正の相関があることが明らかになった($r=0.90$)[5]。従って、一定の条件下でCa^{2+}の振動数を測定することによって培養ニューロン間のシナプス形成を簡便かつ定量的にアッセイすることが可能である。

大脳皮質培養細胞に培養開始後$Al(NO_3)_3$100μMを投与し、この機能アッセイを培養開始後8日、15日、22日目に経時的に行った結果、8日目では対照群との差は見られないが、次第に振動数は減少し、22日目では対照の60%になった（図1）。従って、アルミニウムの長期投与により①培養ニューロン間のシナプス伝達に異常が出た②シナプス数が減少したなどの可能性が示唆された。また、灌流投与によって50~500μMの$Al(NO_3)_3$を短期的に与えた場合には細胞内Ca^{2+}の振動に変

化は起こらなかった。なお、アルミニウムの硝酸塩、硫酸塩、塩酸塩で効果に差は見られなかった。

免疫組織化学

NF抗体（polyclonal）とMAP-2抗体で二重染色を行った結果、アルミニウムを投与した場合、培養22日目でコントロールに比べ、NF抗体でそまる太く数多いprocessが観察された。更に、太く、ねじれた異常形態のprocessも観察され、これはMAP-2抗体では染まらなかった（図２）。これらは$Al(NO_3)_3$のみではなく他のアルミニウム塩$Al_2(SO_4)_3$、$AlPO_4$でも同様に観察された。また、NF抗体（monoclonal，anti-phosphoNF&anti-nonphosphoNFの混合）により培養14日の細胞を染色した所、コントロールに比して50μM、100μM、200μMのアルミニウムを投与した場合processがより濃く染まり、また200μMの場合には円状に細胞が欠落している部分が観察された（図３）。従って、アルミニウムがprocessの形態や細胞骨格蛋白の代謝に異常を起こし得る可能性が示唆された。

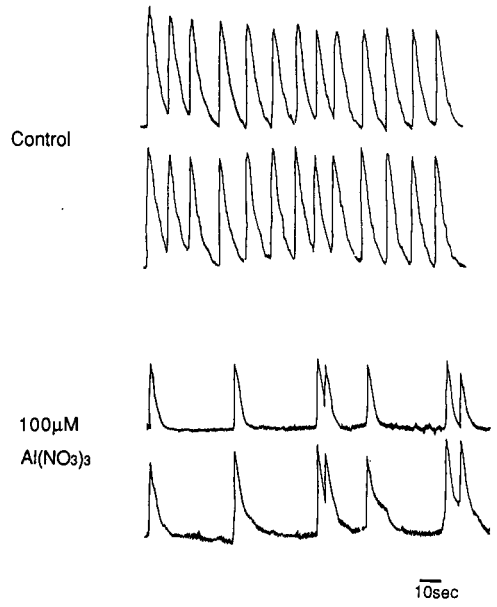


図１fura-2による螢光強度自発振動の比較（培養22日）

これらの結果からアルミニウムの長期投与が培養大脳皮質細胞に対して機能的あるいは形態的な変化をもたらすことが明らかになった。作用機序については現在検討中であるが、アルミニウムはtransferrin[8]、ferritinなどの鉄結合蛋白質、あるいは種々のリン酸化合物特に核酸にも結合することが知られており色々な可能性が考えられる。もちろん、これらの事実が直接アルツハイマー病の原因と繋がる訳ではないが、内田らが構造決定した、アルツハイマー病脳で減少している神経細胞の成長抑制因子（GIF）が亜鉛と銅を含むメタロチオネインの1種であったこと[9]を考えあわせると、生体内における微量金属とアルツハイマー病との関わりには興味深いものがある。また、我々が今回開発したラット大脳皮質細胞の長期培養系並びにそれを用いた機能アッセイシステムはアルミニウムのみならず、各種の神経毒性物質のスクリーニング法としても有用であると考えている。

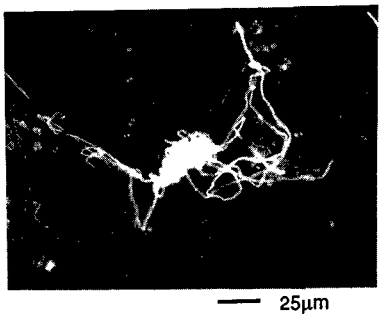


図２ NF抗体染色による異常なproces

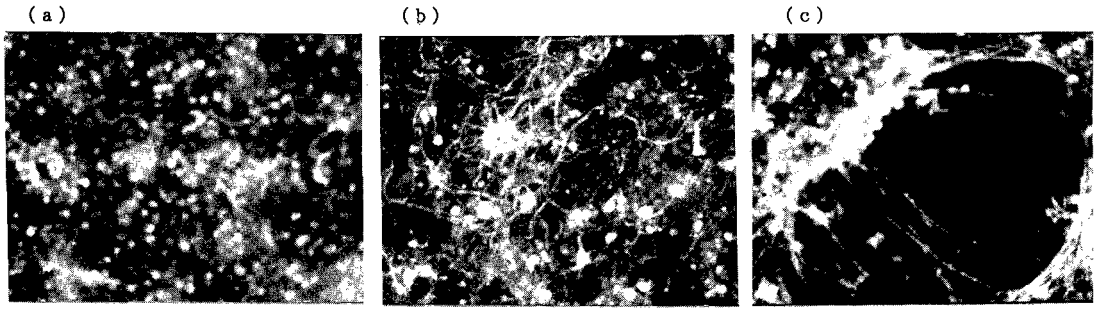


図３ アルミニウム投与によるneurofilamentの変化 （培養14日後）

(a) Control (b) 100μM $Al(NO_3)_3$ (c) 200μM $Al(NO_3)_3$

[文献] (1)Candy,J.M.et al(1986)Lancet 1(8477):354.(2)Bearl,M.F.et al(1989)Neuroscience29:339.(3)Martin,C.N.,et al(1989)Lancet 1(8629):59.(4) Alfrey,A.C.et al(1976)New Eng.J.Med.294:184.(5)黒田洋一郎,他(1990)神経化学29:196.(6)Muramoto,K.et al(1988)Proc.Japan Acad.Ser.B 64:319.(7)Banker,G.A.&Cowan,W.M.(1977)Brain Res.126:397.(8)Roskams,A.J.&Conner,J.R.(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.87:9024.(9) Uchida,Y.et al Neuron:in press.

40 アルツハイマー病線維芽細胞のＣａ調節異常

楯林義孝，武田雅俊，田中稔久，谷向　知，車谷隆宏，大河内正康，関山敦生，播口之朗
西村健
（大阪大学医学部，精神医学教室）

〔要約〕
家族性アルツハイマー病、非家族性アルツハイマー病、健常線維芽細胞のＣａ代謝について検討した。Ｃａ蛍光指示薬（indo-1AM）を細胞に負荷し、Ｃａ濃度と細胞内Ｃａ分布とを蛍光画像解析装置にて測定した。またBradykininを加え、細胞内小胞体より細胞質内へのＣａ放出を比較した。細胞内Ｃａ濃度はBradykinin刺激後ただちに上昇したが、そのピークの濃度は健常線維芽細胞、非家族性アルツハイマー病線維芽細胞と比較して家族性アルツハイマー病線維芽細胞では有意に低かった。また、ピーク後細胞内Ｃａ濃度はただちに刺激前のレベルに戻ったが、家族性アルツハイマー病線維芽細胞内のＣａ濃度は他の細胞に比べて有意に低い濃度を示した。

〔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や放射線によるＤＮＡ障害の感受性が高いこと、エネルギー代謝の異常、細胞接着能の低下、Ｃａ結合能の変化、Ｃａ代謝の変化、プロテインキナーゼの変化などが報告されている一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事、及び、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事を報告した。また、昨年度は、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、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、家族性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、また非家族性アルツハイマー病線維芽細胞内では両者の中間の分解パターンを示すことを報告した。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Ｃａ代謝についての検討も報告されている。本年度は、家族性アルツハイマー病線維芽細胞内でのＣａ代謝について蛍光画像解析装置を用いて検討した。

〔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３－５代目の細胞を用いた。

細胞内Ｃａ濃度測定には日科機ACAS-470を使用した。

35mmディシュ中L-polylysineにてコートした蛍光カバーグラス上に1000 cells/dish の割合で線維芽細胞を10%FCSを含むDMEM培地にて３日間培養した後、細胞を洗浄し新たに1μMindo-1AMを含む上記の培地にて30分間indo-1を負荷した。負荷後十分に細胞を洗浄したのち、Ca-freeの状態で、15秒毎に10分間にわたり細胞内Ｃａ濃度測定した。また、測定開始60秒後に25nMのBradykininを加え小胞体よりのＣａの放出およびその再取り込みを測定した。

家族性アルツハイマー病２例（測定細胞数８０個）、非家族性アルツハイマー病２例（同４０個）、健常対照者３例（同５０個）について解析した。

〔結果〕

1．Bradykinin刺激によるＣａ応答

Bradykinin刺激による小胞体よりのＣａ放出のピークを図１に示した。６４才から７４才の健常対照者の培養線維芽細胞はBradykinin刺激により小胞体よりＣａが放出され再び取り込まれる。それに対して家族性アルツハイマー病線維芽細胞は低いピークを示しており、Bradykinin刺激に対するＣａ応答反応が低下していた。非家族性アルツハイマー病線維芽細胞は健常線維芽細胞に近い反応を示していた。

2．刺激後の細胞内Ｃａ濃度

ピーク後細胞内Ｃａ濃度はすぐに刺激前と同じレベルに戻った。図２にその結果を示すが、これはほぼレスティングレベルのＣａ濃度と一致すると考えられる。健常対照者と非家族性アルツハイマー病線維芽細胞はほとんど同じＣａ濃度を示した。一方、家族性アルツハイマー病線維芽細胞は明かに両者より低いＣａ濃度を示した。

〔考察〕

昨年の本学会において我々は家族性アルツハイマー病線維芽細胞においてフォドリンの部分分解が少ないことを示したが、今回の結果よりそれがＣａ代謝の異常によって引き起こされている可能性が示唆された。既にPetersonらによってアルツハイマー病線維芽細胞のＣａ代謝の異常が指摘されているが、今回の結果はそれとは若干異なり、家族性アルツハイマー病線維芽細胞のみに有意な異常が認められ、非家族性アルツハイマー病線維芽細胞は健常線維芽細胞に近い結果を示した。以上のＣａ代謝の結果は、基本的に小胞体、細胞質間の狭い部分だけしか見ていないため、今後は細胞内外のＣａ代謝についても検討する必要があると考えられる。

〔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)Peterson C.,Goldman J.E. ProNAS USA 83(1986) 2758-2762. (4)Peterson C.,Goldman J.E. Neurobiology of Aging 9(1988) 261-266 (5)Takeda M.,Nishimura T.,et al. Acta Neurol Scand,in press. (4)Takeda M.,Nishimura T.,et al. Acta Neurol Scand 82(1990) 238-244.

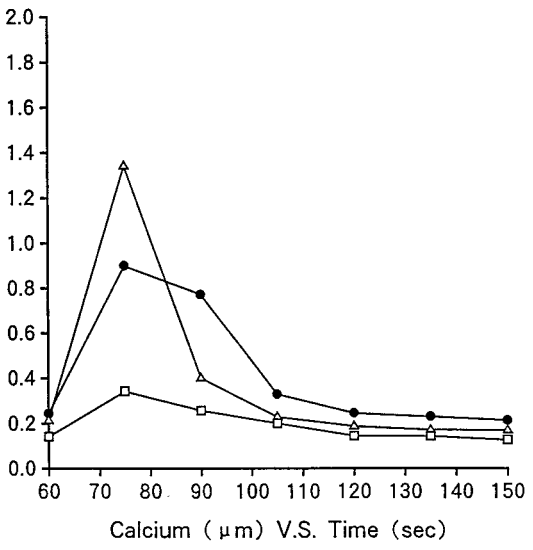


図１

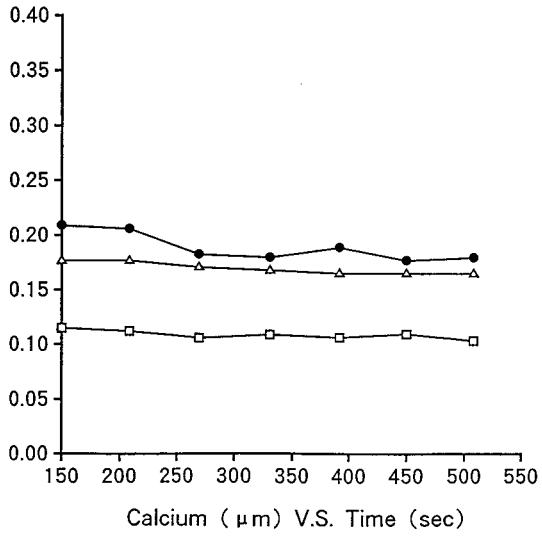


図２

□ Familial Alzheimer's disease
● Normal control
△ Alzheimer's disease

41 アミロイド前駆体蛋白に点状突然変異を示す家族性アルツハイマー病患者線維芽細胞の性質

武田雅俊[1)] 椙林義孝[1)] 田辺敬貴[1)] 勝谷友宏[2)] 三木哲郎[2)] 細川宏一[3)] 榊 佳之[4)] 橋本重夫[3)] 西村 健[1)]

大阪大学医学部精神医学教室1) 同老年医学教室2) 近畿大学医学部第2病理学教室3) 九州大学遺伝情報実験施設4)

〔要約〕

家族性アルツハイマー病の家系の中でアミロイド前駆体蛋白に点状突然変異（APP^{717}Val→Ile）を示す一家系を経験した。この家系の患者2名の皮膚組織から継代培養した線維芽細胞についてその性質を検討した。APP^{717}Val→Ileを有する線維芽細胞の形態・分裂速度は正常細胞と差異を示さないが、基質への接着効率は明かに低下していた。蛍光免疫染色法により細胞骨格蛋白の配列を検討したところ、アクチン・チュブリンの配列には異常を認めないが、ビメンチン線維の配列に関しては特徴的な変化を認めた。また、ウェスタンブロットにてこれら細胞骨格蛋白には変化を認めなかったが、抗フォドリン抗体によるウェスタンブロットではAPP^{717}Val→Ileの変異を有する線維芽細胞内ではフォドリンの部分分解が阻害されていた。これらの知見はAPP^{717}Val→Ileの変異を有する線維芽細胞の細胞膜の内外での変化を示唆する知見と考えられる。

［はじめに］

アルツハイマー病脳の老人斑・血管壁アミロイドの構成蛋白であるアミロイドβ蛋白の配列が同定され、アミロイドβ蛋白は前駆体蛋白（APP）として合成されていることが明らかになった。APP遺伝子は正常人でも多くの末梢組織で発現されており、APPの機能やプロセシングについての研究が進められている。正常細胞において、膜表面蛋白としての構造を有するAPP分子は、β蛋白内で切断され、そのN端側の90-110KDaの分子が分泌されている。このAPP遺伝子は家族性アルツハイマー病の遺伝子(FAD)と同じ21番染色体長腕上に位置し、APP遺伝子の異常と本疾患との関わりが推定される。本年になり、家族性アルツハイマー病のDNA解析からAPP遺伝子のエクソン17におけるポイントミューティションを示す白人2家系(1)、本邦3家系(3)、本邦1家系(6)が報告された。いずれの家系においても共通したAPP^{717}Val→Ileが同定されており、本疾患の発症のメカニズムとの関わりが示唆されている。APP^{717}はβ蛋白の外側、C端から3残基目の膜透過部分にあり、Val→Ileのハイドロフォビックな変化によりAPP分子の性質やプロセシングが変化している可能性が考えられる。我々はこのポイントミューティションを示す患者から得た培養線維芽細胞の性質について検討したので報告したい。

［材料および方法］

1．症例

症例1：（病歴）52歳ごろ物忘れ・意欲低下で発症。53歳時会話が単調となり反響言語が目だった。お金を盗られたなど現実検討能力の低下(+)。家人の判別困難。54歳時に道に迷い家に帰れないことがあった。鏡現象(+)。55歳時大阪大学精神科に検査入院。多幸的で落ち着きがない。構音障害(-)。歩行障害(-)。会話は流暢であるが意味内容を欠き、語性錯語・言語新作を認めジャルゴン失語に近い。着衣失行(+)。口尖反射(+)。手指振戦軽度。筋強剛軽度。HDS=0点。CTにてび漫性大脳皮質の萎縮と側脳室下角の拡大を認めるが、梗塞巣を認めず。SPECTで体性感覚領野・視覚領野以外の皮質全体の血流低下。EEGではα波を認めず6-7Hz10-20μvのθ波を基本波とし4-5Hzの低振幅δ波がび漫性に中程度認められた。しばらく家庭で看護を受けていたが、失禁・徘徊などのため56歳時某病院神経内科に入院。やがて寝た切り状態となり、褥創(+)。感染を繰り返し肺炎にて死亡(2)。（神経病理学的所見）脳重1360g。左前頭葉・小脳歯状核に播種性血管内凝固症(DIC)による出血巣(+)。大脳半球全体に敗血症による微小膿瘍と周囲のグリオーゼ(+)。梗塞巣(-)。アミロイドアンギオパチー(-)。海馬・側頭葉・前頭葉に神経原線維変化・老人斑を多数認める。中脳黒質に一部遊離メラニン(+)、Lewy body(+)、神経脱落(+)。小脳では軽度のプルキンエ細胞脱落(+)、歯状核のグルモース変性(-)。

症例2：症例1の弟。45歳時に物忘れで発症。47歳時にHDS=4点。CTにて脳室・脳溝の拡大(+)。EEGで基礎律動の徐波化。48歳時に徘徊・無断外出などのために入院。自発性の低下、妄想、不潔行為などの出現と共に言語反応が低下。51歳時に全身性の痙攣(+)。52歳後半から寝た切りとなり、発熱を繰り返し、貧血・低蛋白血症(+)。肺炎・敗血症を呈し53歳心不全にて死亡(2)。剖検なし。

2．線維芽細胞の培養

本研究の目的と性質を本人および家族十分に説明し、文書にて同意を確認した上で、上記患者（55才時と52才時）の前腕部の皮膚組織を採取し継代培養した。線維芽細胞は10%FCS添加DMEM培地にて行い、継代数5-12の細胞を用いた。また対照として継代数を一致させた健常者の線維芽細胞を用いた。

3．培養線維芽細胞の接着効率

継代数8-12の線維芽細胞を0.02% EDTA+0.25% trypsinにて回収し、PBS(-)にて十分洗浄し、ファルコンデッシュに$3x10^5$個ずつ10%FCS添加DMEM中にプレートした後、10分毎に接着した細胞の数を培地中に浮遊している細胞を計測することにより算出した。

4．免疫染色

細胞の蛍光免疫染色は、30mmディシュ中polylysineでコートしたカバーガラス上に培養した細胞をFCS(-)培地で7日間培

養後、4%パラホルムアルデヒドにて固定し、抗体と室温1時間反応させ、さらにFITC標識第2抗体と反応させ蛍光顕微鏡で観察した。また細胞ホモジェネイドをウェスタンブロットにより検討した。使用抗体は抗チュブリン(Transformation Res社)、抗アクチン(Transformation Res社)、抗ビメンチン(Amersham社)、抗フォドリン(日本新薬社)、FITC標識抗IgGとIgMはTago社、peroxidase標識抗体はKPL社のものを使用した。

［結果および考察］

症例1の神経病理学的検索では、一般のアルツハイマー病と同様に、大脳新皮質においてBielshowsky染色により多数の神経原線維変化と老人斑が認められた。老人斑についてはmature plaqueもimmature plaqueも同様に認められ、特にAPP^{717}Val→Ileの変異に特徴的な老人斑は観察されなかった（図1）。このような突然変異を有する線維芽細胞について以下の結果を得た。

1．培養線維芽細胞の形態・分裂速度

患者線維芽細胞の形態・成長速度は年齢と継代数を一致させた正常線維芽細胞と比較して差異を示さなかった。ダブリングタイムも40-48時間と正常細胞と比較して差異を認めなかった。従って、APP^{717}Val→Ileの変異は細胞の生存には影響を与えないものと考えられる。しかしながら血清除去後正常細胞は約10日で基質からはがれて浮遊し死滅するのに対して、患者線維芽細胞は死滅後もプレートに付着する傾向を示した。

2．培養線維芽細胞の細胞接着

線維芽細胞の基質への接着を正常細胞と比較したところ、図2に示すように接着効率が明かに低下していた。正常細胞は30分でそのほとんどが接着を完了しているのに対して、患者細胞の接着は25%程度であった（図2）。しかしながら1時間以内の接着効率は低下しているものの、6時間静置後には患者線維芽細胞も90%以上の細胞が接着していた。APP^{717}Val→Ileの変異を持つ線維芽細胞においては細胞膜表面の変化が示唆された。

3．細胞骨格蛋白の配列

チュブリン・アクチン・ビメンチンの配列を蛍光抗体法で検討した。チュブリンおよびアクチンの配列は正常細胞と比較して変化を認めなかったが、ビメンチンの配列には患者線維芽細胞に特徴的な変化が認められた。患者線維芽細胞では、正常細胞に認められるビメンチン線維配列の均一性が失われており、ビメンチン線維の局所的な集積が認められた(図3)。

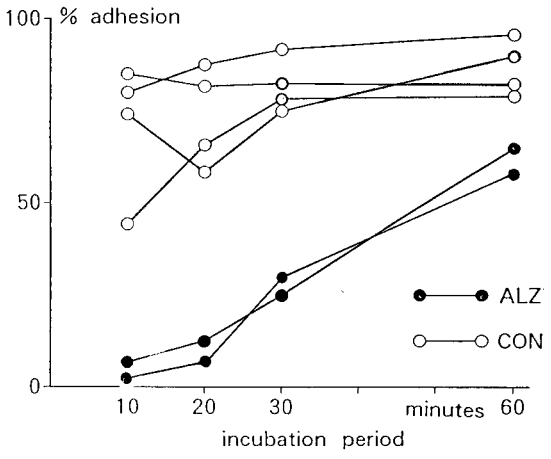
4．細胞骨格蛋白の変化

ウェスタンブロットにより細胞骨格蛋白の異常を検討した。チュブリン・アクチン・ビメンチンには異常を認めなかった。フォドリン抗体によるブロットでは患者細胞においてフォドリン分子の部分分解が抑制されていることを示す知見を得た。

今回の実験結果はAPP^{717}Val→Ileの変異を示す線維芽細胞の細胞膜表面に何らかの変化が生じており、細胞接着の効率の変化、ビメンチンの配列の変化、細胞膜裏打ち蛋白として存在するフォドリンの分解の変化をもたらしているものと考えることができよう。APP^{717}Val→Ileの変異がどのような過程をによりこのような細胞機能の変化を生じるかについて検討することは、アルツハイマー病の発症過程の理解に役立つものと考えられる。

［文献］
1)Goate A et al. Nature 349, 704-706, 1991.
2)勝谷友宏ほか　老年医学雑誌, 投稿中, 1991.
3)Naruse S et al. Lancet 337, 978-979, 1991.
4)Takeda M et al. Acta Neurol Scand 82, 238-244, 1990.
5)Takeda M et al. Acta Neurol Scand, in press, 1991.
6)Yoshioka K et al. BBRC, in press, 1991.

図2 線維芽細胞の基質への接着



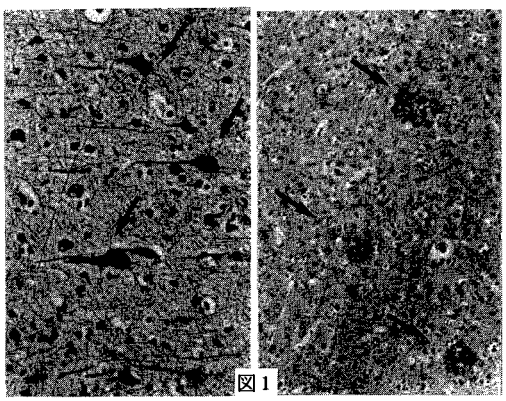


図1

図3



42 アルツハイマー病アミロイド蛋白質前駆体のＣＯＳ細胞における代謝の検討

丸山敬、宇佐美美穂子、針ヶ谷和花子、亀谷富由樹、田中喜久子

東京都精神医学総合研究所・分子生物研究室

〔要約〕

痴呆の原因であるアルツハイマー病（ＡＤ）の病因は未だ不明であるが、老人斑の主成分であるβ蛋白質（βＰ）による神経変性の可能性が示唆されている。このβＰにはアミロイド蛋白質前駆体（APP）の存在が知られており、ＡＤにおけるβＰの沈着は、APPの代謝の異常によるものと考えられる。APPの代謝を検討するために、ＣＯＳ細胞にてそのcDNAを発現させた。発現されたAPPは正常神経細胞と同様にβＰの内部で切断されて分泌され、アミロイドの形成は見られなかった。すでに報告されている２種類の変異（Glu^{618} - Gln、Val^{642} - Ile）を行っても、APPの代謝には変化が見られなかった。また、蛋白質分解酵素阻害部位をもたないAPP695とその部位が挿入されたAPP770とでも代謝に差が見いだされなかった。これらの結果は、異常なβＰの沈着の原因は、βＰそのものの異常よりもその代謝系の異常によるものであることを示唆する。

[緒言]

アルツハイマー病（ＡＤ）の病理学的変化にアミノ酸４２個のβ蛋白質（βＰ）の沈着により形成される老人斑がある。cDNAの解析により、このβＰはアミノ酸６９５個のアミロイド蛋白質前駆体（APP695）に由来することが判明した。APPは、正常な神経組織においても発現され、βＰの配列内で切断され分泌されている。また、APP695に蛋白質阻害配列が挿入されたAPP770も発見され、APPの生理機能解明が期待されている(1)。

ＡＤでは、本来のβＰを形成しないような代謝に異常が生じ、多量のβＰが生成され老人斑として沈着すると考えられる。APPは通常の細胞では発現量が少ないために蛋白質化学的研究が困難である。そこで、サル腎臓繊維芽細胞由来のＣＯＳ細胞にcDNA導入によって、APPを大量に発現させてその代謝過程を検討した。

[実験方法]

ＣＯＳ細胞におけるcDNAの一過性発現は、通常のDEAE-dextran／chloroquine法で行い、約７２時間後に発現を検討した。検出に用いた抗体は、合成ペプチドを抗原としたウサギ・ポリクローナル抗体であり、APPのＮ末（Leu^{18}-Cys^{28}）に対する抗Ｎ末抗体、Ｃ末（Gly^{681}-Asn^{695}）に対する抗Ｃ末抗体を使用した。

[実験結果]

１．ＣＯＳ細胞におけるAPP-cDNAの発現

Fig.1に示されるように、一過性発現を行っているために、短時間で効率良く発現を検討することができた。Ｃ末抗体で検出すると、分子量100 kd程度と9 kd程度の２本のバンドが検出された。9 kdのバンドは、Ｎ末抗体とは反応しなかった。また、すでに報告された、βＰと６０個のＣ末の配列を含んだAPP-C100よりも、分子量が小さい(2)。従って、9 kdは、βＰ内で切断されて生じた断片と言える。この結果は、ヒト胎児腎臓培養細胞で報告された結果と一致する(3)。APP-C100を発現させるとアミロイド様の繊維構造が細胞内に形成される。しかし、APP全体を発現させると、βＰ内で切断されるために、特別な構造形成は確認できなかった。また、培養液中には、抗Ｎ末抗体のみで検出される分子量約100 kdの分泌型APPが確認された。

２．APP695とAPP770の代謝の相違

APP770は、蛋白質分解酵素阻害部位を持つ。このAPP770を発現させた細胞の培養液では阻害作用が確認された（K.Tagawa, K. Maruyama & S.Ishiura未発表データー）。この蛋白質分解酵素阻害作用が、APPの代謝自身に影響を及ぼす可能性がある。APP695とAPP770の100 kdと9 kdの断片の生成は、本研究での結果では、特に差を見られなかった。

３．変異APPの代謝

近年、ＡＤ関連疾患の遺伝子でポイントミュテーションが発見され注目を集めている。一つが出血性脳症で発見されたGlu^{618}-Glnであり(4)、家族性ＡＤのVal^{642}-Ileの変異である(5)。これらの変異は、すべてのＡＤ患者に発見されるわけではないが、βＰの生成の原因の可能性がある。そこで、人工改変を行い上記のような変異を持ったcDNAを発現させた。どちらの変異をもったAPPも、野性型のAPPと同様に代謝され、βＰの作成や異常な代謝は確認できなかった。

[考察]

ＣＯＳ細胞でのcDNAの発現により容易にAPPの代謝を検討することが可能になった。ヒト腎臓細胞での報告と同様に、APPはβＰの内部で切断されて分泌されていると考えられる。

蛋白質分解酵素阻害配列の有無によるAPPの代謝の差は確認されなかった。阻害配列を持ったAPP770は、近年、血小板や血液凝固系との関連が報告されている。また、APPを代謝する酵素への影響も考えられたが、本研究では確認できなかった。

アミロイド生成の原因の一つとしてAPPの遺伝子のポイントミューテションが注目されている。しかし、本研究では、それらの変異をもったAPPと野性型のAPPとでは、特に代謝に差はみられなかった。また、現在までに報告されている変異は、GluがGln、ValがIleといった類似したアミノ酸への変異である。このような保存的で、しかも一箇所のみの変異で、著しい代謝の変化がおこる可能性は低いと考えられる。それが酵素の活性部位などの場合には、性質が激変する場合もあるが、すくなくとも本研究では、変異の影響は確認されなかった。

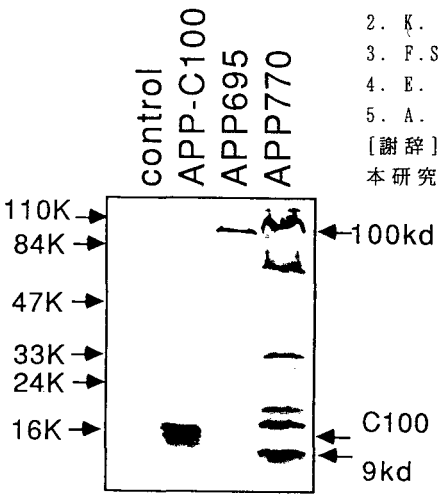
神経組織でのAPPの蛋白質化学的な研究が困難なために、本研究では、腎臓繊維芽細胞由来のＣＯＳ細胞を利用した。当然、神経細胞では特異的な代謝系が機能している可能性がある。また、本研究での結果は、時間的な経過は追及しておらず、すべて７２時間後の全体の結果のみを検討している。今後は、神経関連培養細胞での実験や、パルスラベリングなどにより、より詳しい代謝過程を検討して行きたい。

[文献]

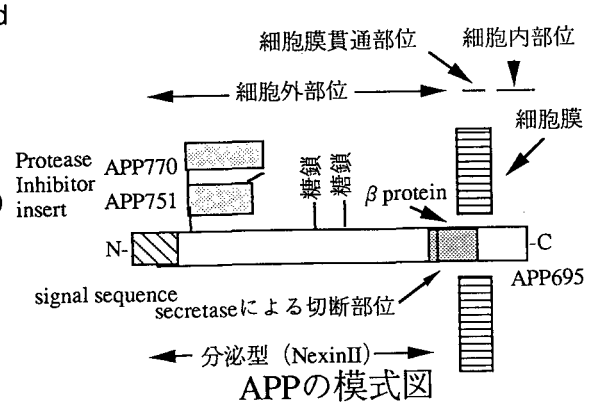
1. D.J. Selkoe (1991) Neuron, 6, 487-498
2. K. Maruyama et al. (1990) Nature, 347, 566-569
3. F.S. Esch et al. (1990) Science, 248, 1122-1124
4. E. Levy et al. (1990) Science, 248, 1124-1126
5. A. Goate et al. (1991) Nature, 349, 704-706

[謝辞]

本研究は、Brain Science Foundationの助成を受けた。



Immunoblotting
by anti-C
Fig.1



APPの模式図

43 Ｐｉｃｋ小体の精製

徳武　哲
（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、あまり堅固ではなく、homogenizeの条件が強いと全体の形を保持して精製することは難しかった。しかし、穏やかな条件でhomogenizeし、金属メッシュ、蔗糖溶液を用いた遠心による分画の後、８Ｍ尿素溶液およびcollagenase 処理により、全体の形を保持したPick小体を精製することができた。また、Pick小体に含まれる細管を、超音波処理により小体を破壊して以前よりも収率よく得ることができた。

〔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たいこともあるが、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 病の神経細胞に見られる straight tubules と似ていることから (2,6,7)、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 (1,3,4,9)。本実験ではPick小体細管の生化学的および免疫学的性質を調べるため小体および細管を収率よく精製することを試み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。パラフィン切片をBodian法で染色すると、Pick小体を含む神経細胞が沢山見い出だされた。Pick小体以外にも多量のアミロイド小体(corpora amylacea)が見い出されたが、老人斑や神経原線維変化は見られなかった。

２．Pick小体の精製．　Pick小体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 (5)。剖検脳５ｇをPotter型homogenizer にとり、0.85M の蔗糖を含んだ10mM Tris-0.1M NaCl (pH 7.6)溶液50mlを加え、手で5 回程pestleを上下させてhomogenizeした。Homogenateを径がそれぞれ1.180, 600, 300, 150, 75 μm の stainless meshを通うし、ロ液を遠心し(Hitachi20-2 rotor, 15.000 rpm, 15 min) 沈澱画分を集めた (P-1)。この画分にさらに1.5Mの蔗糖を含んだ10mM Tris-0.1M NaCl (pH 7.6)溶液50mlを加え、前と同じようにhomogenizeしてから遠心し、沈澱画分を集めた (P-2)。この画分に8M尿素を含んだ10mM Tris-0.1M NaCl (pH 7.6)溶液20mlを加え、homogenizeしてから一夜室温で放置し、さらに径が75, 20 μm のnylon meshを通うしロ液を集め遠心し(Hitachi20-2 rotor, 3.000 rpm, 15 min)、沈澱画分を集めた (P-3)。この画分に50mM Tris-10mM $CaCl_2$ (pH 7.6)溶液10mlを加えhomogenizeし、collagenase(Clostridium histolycum, Type I, Sigma) 1mgを加え、37℃で1 hrさらに4℃ で一夜反応させてから、1.5Mの蔗糖溶液20mlの上に乗せて遠心し(Hitachi20-2 rotor, 15.000rpm, 15 min)沈澱画分(P-4) と蔗糖溶液上のintermediate layer(P-4´)を集めた。Pick小体はP-4´画分に含まれており、アミロイド小体やリポフスチンは、P-4 画分に含まれていた。

〔結　果〕

Fig. 1はP-3 画分にcollagenase を加える前の溶液の一滴をスライドグラスにとり、これに1 % のCongo red 溶液一滴を加え、ガラス棒で攪拌後光学顕微鏡で観察した写真である。神経細胞核が壊されずに残っているのが分かるが、Pick小体の多くは細胞核と結合しており、核と離れた小体は少なかった。小体は核よりもCongo red で強く染色された。この他、染色法としては、Eosin 法で同様の結果が得られたが、Hematoxylin 法および Toluidin-blue 法では核が凝縮して集まってしまい、あまりよい結果が得られなかった。

Fig. 2はP-4´画分をCongo red で染色したもので、核は分解されて見えなかったが、小体は分解されずに全体の形を保持していた。アミロイド小体やリポフスチンも全体の形を保持して残っていたが、これらは比重がさらに高いため、1.5Mの蔗糖溶液を用いた遠心により分別することができた（P-4)。このように小体はかなり精製されたが、細かい不純物がまだかなり残っている。

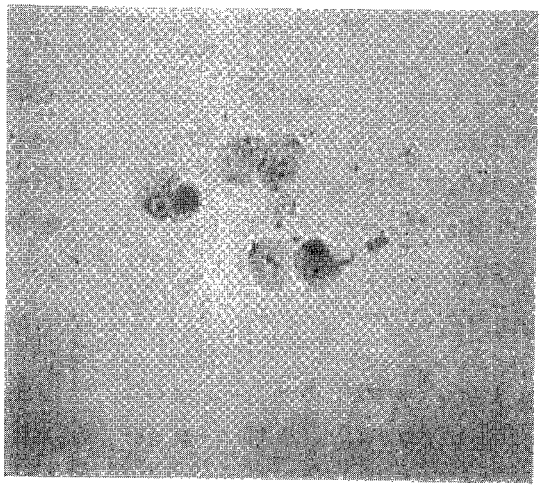


Fig.1. P–3 fraction stained by Congo red.

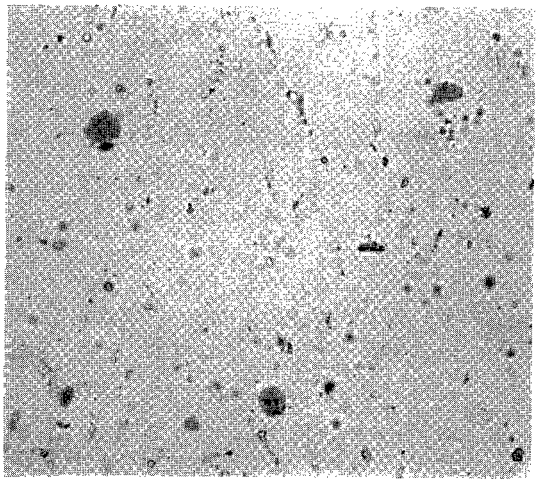


Fig.2. P–4' fraction stained by Congo red.

［考　察］

昨年の本大会では、Pick小体細管の部分精製とそれを抗原として作った抗体を用いた組織染色の結果について報告した（8)。昨年用いたPick小体の精製法では剖検脳をPolytronを用いてhomogenizeしたため小体が壊れてしまい、全体の形を保持した小体を得ることは出来なかった。それでも、今回報告した方法のP-4´あるいはP-4 に相当する画分に僅かではあるがPick小体細管を電顕を用いて見つけることができ、また、不純物がかなり含まれていたにもかかわらず、それらの画分を抗原として兎に打ち込んで、Pick小体と特異的に反応する抗体を得ることができた。Pick小体の微細な構造を電顕を用いて観察すると、細管がかなり含まれているのが分かるが、決して細管が小体を埋め尽くしているわけではなく（2,6,7)，微細構造や化学組成がまだ分かっていない物質が小体の主な成分になっており、抗体が小体のどの部分と反応するかを、金コロイドでラベルした抗体を用い免疫電顕法により調べる必要があった。今回の実験で得られた小体をsonifyerで破壊してから、negative染色して電顕で観察すると、昨年の試料よりもずっと多くの細管を見つけることができ、さらに、金コロイドでラベルした抗体により小体のどの部分と反応するかも確かめることができたおでその結果についても、併せて報告する。

なお、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。

［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) Murayama, S., Mori, H., Ihara, Y. & Tomonaga, M., Ann. Neurol., 27, 394-405 (1990)
(4) Rasool, C.G. & Selkoe, D.J., New Eng. J. Med., 312, 700-705 (1985)
(5) Roher, A.X., Palmer, K.C., Chau, V. & Ball, M.J., J. Cell Biol., 107, 2703-2716 (1988)
(6) Sparkman, D.R., Johnson, S.A., Hammon, K.M. et al., J. Neurol. Sci., 80, 173-184 (1987)
(7) Takauchi, S., Hosomi, M., Marasigan, S. et al., Acta Neuropathol., 64, 344-348 (1984)
(8) 徳武哲、山本明広、神経化学、29，424-425 (1990)
(9) Ulrich, J., Haugh, M., Anderton, B.H. et al., Acta Neuropathol., 73, 240-246 (1987)

44 老人斑、正常脳、赤血球、骨格筋アセチルコリン・エステラーゼに対する阻害薬の効果

湯川素子，三森康世，中村重信
（広島大・第三内科）

〔要約〕
アセチルコリン・エステラーゼ(AChE)は臓器や細胞下分画によりアイソザイムとしての存在様式が異なり、AChE阻害薬に対する感受性にも差がみられた。即ち、老人斑では正常脳と比較して各種AChE阻害薬の影響は僅かであった。赤血球AChE(G2型)はphysostigmineによる阻害が弱く、脳のAChE(G4型)はSDZ ENA 713による阻害が弱く、骨格筋AChE(A型)はすべての阻害薬によって強い阻害を受けた。老人斑中のAChEは阻害されやすいA型であるが、阻害薬が老人斑中のAChEに結合し難いため阻害効果が少なかったと考えられる。

〔はじめに〕
Alzheimer病脳ではacetylcholine濃度の減少が見られる。そのため、分解酵素AChEを阻害してacetylcholineを増加させる治療法が広く行われている。一方、Alzheimer病脳のAChEは正常脳と異なって老人斑でその比活性が最も高いと報告されている(3)。また、AChEには様々のアイソザイムが存在することが知られている。特に、Alzheimer病脳では正常脳とは違って、コラーゲン様の蛋白が結合した巨大分子のA型AChEが老人斑分画に認められる(2)。本研究では老人斑、正常脳、赤血球、骨格筋よりAChEを部分精製し、その標品を用いてAChE阻害薬の影響を検討した。

〔方法〕
老人斑分画はAlzheimer病患者剖検脳よりCandyら(1)の方法を改良して分離した。正常脳はヒト対照群剖検脳およびWistarラット脳を用いた。赤血球は対照群の末梢血より分離し、洗浄後蒸留水にて溶血させた。骨格筋はWistarラットの腹直筋を材料とし、細切した後Younkinら(5)の方法によりAChEを抽出した。組織より抽出したhomogenateは遠沈後、上清をSepharose CL-6BあるいはSephadex G200カラム・クロマトグラフィーにてAChEを分離した。また、老人斑分画およびヒト対照群AChEについては蔗糖密度勾配遠沈によるアイソザイムの検討も行った。AChE活性はthiocholine法によって測定した(4)。amiridin, E-2020, nicergoline, SDZ ENA 713はそれぞれ日研化学、エーザイ、田辺製薬、サンド薬品より供与されたものを使用し、それ以外の薬品は市販のものを使用した。

〔結果〕
1．臓器、細胞下分画によるAChEアイソザイムの差異
老人斑分画のAChEは沈降定数12S, 16Sを示し、collagenase処理により10Sに転換された。このことより、老人斑中のAChEはA型であることが判明した。対照群剖検脳AChEの沈降定数は主として10Sであり、主体はG4型AChEであることが判明した。Wistarラット脳のAChEをSepharose CL-6Bにて分析したところG4型に相当する部位に大きなピークとG1型に相当する部分に小さなピークを認めた。赤血球より得たAChEはSephadex G200カラムにてG2型AChEに相当する部位に活性のピークを示した。骨格筋より抽出したAChEはA型AChEに相当する部位に活性のピークを示した。
2．AChE阻害薬に対する感受性
老人斑分画を用いてAChE阻害薬の効果を検討したところ、physostigmine、tetrahydroaminoacridine(THA)、amiridin、E-2020、nicergolineいずれによっても阻害効果は著明ではなかった。一方、Alzheimer病脳より可溶化した上清分画やG4型主体のヒト対照群より得た上清およびミトコンドリア分画のAChEはいずれのAChE阻害薬によっても

低濃度で阻害を受けた。その一例(THAによる阻害)を図1に示す。ラット赤血球由来のAChEは低濃度(50ng/ml)のE-2020によって強い阻害(阻害率75%)を受けたが、physostigmine(0.5μg/ml)の効果は他のtypeのAChEと比較して軽度であった(阻害率59%)。ラット脳由来のAChEはE-2020や低濃度(50ng/ml)のTHAで阻害されるが(阻害率86%)、SDZ ENA 713(5μg/ml)による阻害は軽度であった(阻害率50%)。ラット骨格筋由来のAChEは低濃度(50ng/ml)のAChE阻害薬で阻害されたが、amiridinとSDZ ENA 713の効果は比較的弱かった。

〔考察〕

Alzheimer病でAChEを阻害してシナプスでのacetylcholineを増加させるのがAChE阻害薬による治療の目標である。AChE阻害薬が老人斑分画には作用が少なく、正常脳やAlzheimer病脳の残存したシナプスより可溶化されたAChEに効果的に作用することは治療面での有用性を示唆するものである。一方、3種の臓器より分離した違った型のAChEアイソザイムは各種AChE阻害薬に対して異なった態度を示した。特に、骨格筋由来のA型AChEは脳由来のG4型AChEより阻害薬に対する感受性は高かった。老人斑分画より抽出された酵素はA型AChEであり、阻害薬によって効率よく阻害されることが想定されたが、老人斑中のAChEはアミロイド蛋白などにより阻害薬がAChEに結合し難い状態にあるのではないかと考えられる。今回の研究結果から考えると、今後AChE阻害薬のin vitroでの効果を検討する際には細胞下分画やアイソザイムの違いによって阻害薬の影響が異なることを念頭に置かなければならないであろう。

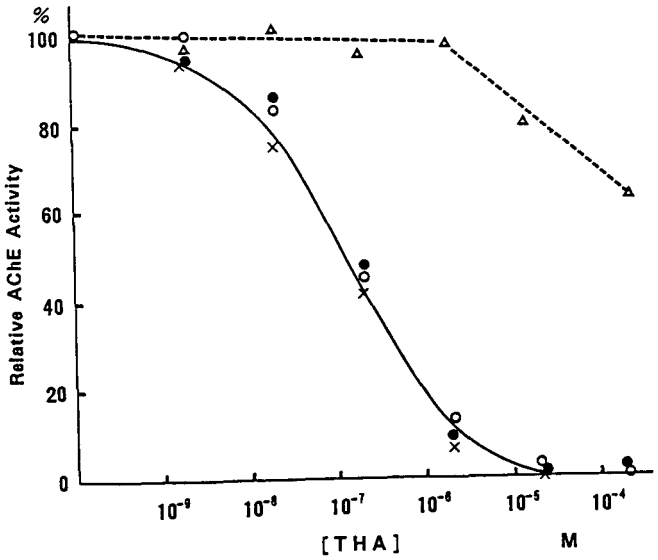


図1　THAによるAChE活性の阻害　●対照群上清　×対照群粗ミトコンドリア　○Alzheimer病脳抽出液上清　△老人斑分画

〔文献〕

1. Candy, J.M., Klinowski, J., Perry, G.H., Perry, E.K., Fairbairn, A., Oskley, A.E., Carpenter, T.A., Atack, J.R., Blessed, G. and Edwardson, J.A. (1986) Lancet, 1, 354-357

2. Nakamura, S. (1990) in Senile neurodegeneration and neurotransmitters (Nagatsu, T. ed), p. 65-78, Excerpta Medica, Amsterdam

3. Nakamura, S., Kawashima, S., Nakano, S., Tsuji, T. and Araki, W. (1990) J. Neural Transm., (Suppl.) 30, 13-23

4. Nakano, S, Kato, T., Nakamura, S., Kameyama, M. (1986) J. Neurol. Sci., 75, 213-223

5. Younkin, S.G., Goodridge, B., Katz, J., Lockett, G., Nafziger, D.M., Usik, M.F. and Younkin, L.H. (1986) Fed. Proc., 45, 2982-2988

45 ビンスワンガー型脳血管性痴呆脳にみられる白質蛋白の変化について

犬塚　貴、佐藤修三、湯浅龍彦、宮武　正
（新潟大学脳研究所神経内科）

〔要約〕

ビンスワンガー型脳血管性痴呆脳の側脳室前角を通る切片を用い、側脳室壁から皮質直下に至る4点から白質組織を採取し、ゲル電気泳動法および免疫ブロット法により白質蛋白の分析を行った。本症の白質では皮質下から側脳室壁に近づくにつれて、プロテオリピド蛋白(PLP)、ミエリン塩基性蛋白(MBP)、ミエリン関連糖蛋白(MAG)、CNP、のようなミエリン蛋白のみならずチュブリン、200kDニューロフィラメントなどの軸索蛋白も減少しており髄鞘と軸索の両者が障害を受けた結果と考えられた。一方白質のアルブミンは逆に増加している。グリア線維性酸性蛋白(GFAP)も本症ではやや増加しているが白質ジストロフィー症(ALD)の脳室周辺にある脱髄巣での著明な増加にははるかに及ばない。以上の生化学的変化は病理形態学的に本症でみられている白質の粗しょう化とグリア細胞の反応性増加が殆どみられないことと一致する。

（はじめに）　ビンスワンガー型脳血管性痴呆は、進行性皮質下脳症ともよばれ白質がよく障害される慢性の虚血性変化とされている。これまで本症は死後病理形態学的診断がなされてきたが、CTやMRIの普及に伴い白質の画像変化が注目され生前診断が可能になってきた。しかしその画像変化をおこす生化学的変化については報告が殆どない。そこで白質障害の特徴を明らかにするために剖検脳をもちいて生化学的に検討した。

（症例・方法）　ビンスワンガー病と病理診断された剖検時56才の男性例。48才時高血圧症を指摘されたが放置。53才時構音障害と不安定歩行がみられ、次第に理解力の低下、無為、無関心、失禁、嚥下困難がおこり、56才脳内出血で死亡した。対照として併発肺炎で死亡した白質障害の軽度な多発性脳梗塞の85才の女性例、疾患対照としは脱髄巣が側脳室壁から皮質にむかって広がる白質ジストロフィー症(ALD)で全経過7年の59才男性例を検討した。剖検時、側脳室前角を通る前頭葉前額断切片をとり-80 Cに凍結保存した。脳室壁から皮質直下までの４点の白質を蛋白分析用に採取して(図1)ホモジネートにして、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ウエスタンブロッティングの後、検索蛋白に対する抗体を用いて免疫染色した。一部のゲルはクマシーブルーで蛋白染色した。検索した白質蛋白は myelin basic protein(BP),proteolipid protein(PLP), myelin-associated glycoprotein(MAG), 2',3'-cyclic nucleotide-3'phosphodiesterase(CNP), 200kD neurofilament(NF), tubulin(tub)である。デンシトメトリーにて予め検量線を確かめた後、一定総蛋白量当りの各検索蛋白を半定量した。多発性脳梗塞の対照例の脳室周辺部白質を100%として表示した。

（結果）　皮質直下の白質では、本症と対照との間には殆ど差がなかった。しかし図2で明かなように本症では脳室に近づくにつれてproteolipid protein(PLP),basic protein(BP)が減少した。 免疫染色では200kD NF, MAG, CNP, tubも同様に減少していることが示された。なかでも200kD NFの減少は著明であった(表1)。逆に白質のalbumin(alb)は増加していた。Glial fibrillary acidic protein(GFAP)は本症での増加は軽度であったが、脱髄巣があるALD深部白質では著しく増加していた(図2)。

（考察）　ミエリンの主要蛋白であるPLP,BPやMAGが脳室に近づくにつれて減少しており本症における髄鞘染色の低下パターンと一致する。またtubやNFを含む高分子蛋白の減少は髄鞘のみならず軸索も障害されていることを示唆している。これらのデータは白質の粗しょう化として報告されている病理形態学的所見[2)]を支持するものである。albの増加は白質

の粗しょう化の結果、白質蛋白が減り組織間液の相対的増加によるものや、脳室壁の障害による髄液の漏出による可能性が考えられる。このようなalbの増加を伴う白質蛋白の障害パターンは急性期多発性硬化症のプラークでみられると報告されているが[1]、本症では炎症細胞浸潤がない。また長期に及んでいるにもかかわらず、ALDの脱髄巣でみられるようなグリオーシスを反映するGFAPの増加も見られない点が特異である。本症とALDの脳室周辺部では、CT,MRIで同様の変化をみせながらも、画像変化の背景となる生化学的変化は異なることが示された。

（謝辞）　本症例を永年診察され、剖検脳の生化学的検索の機会をあたえていただいた佐渡総合病院の本間義章先生、神経病理学的検索をしていただいた新潟大学脳研究所実験神経病理学部門　高橋均先生、武田茂樹先生、生田房弘先生、同神経内科部門 小林央先生に深謝いたします。

（文献）

1) Johnson D. et al.(1986) J.Neurochemistry.46,1086.

2) Yamanouchi H. et al.(1989) J.Neurology. 236,382.

図1.白質組織の採取部位

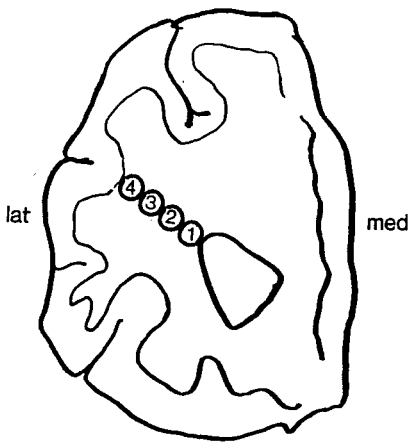


図2.白質蛋白のゲル電気泳動　各レーンとも総蛋白15 ugを泳動　ALD:白質ジストロフィー症　M:対照とした多発性脳梗塞 1-4まで殆ど同じため 1 を代表とした

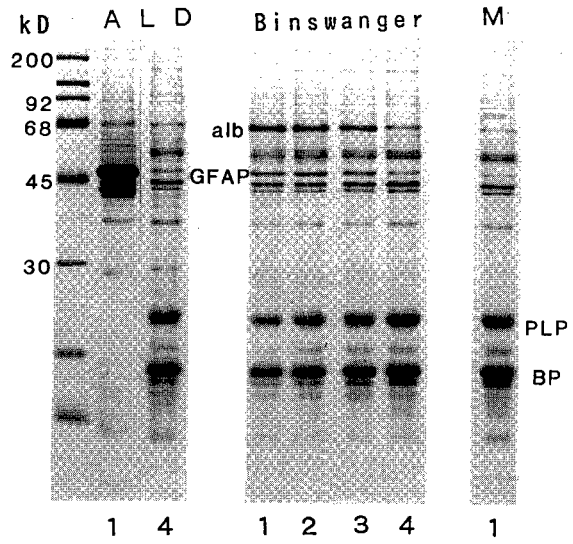


表1.ビンスワンガー型脳血管性痴呆脳の各白質採取点における検索蛋白の半定量（対照としたM1を100%として表示）

	PLP	BP	MAG	CNP	200kD NF	Tubulin
1	54	47	44	58	20	68
2	66	67	72	82	25	78
3	84	79	99	95	44	89
4	102	101	94	109	59	106

46 ヒト脳腫瘍の分類とガングリオシドの含量及び組成の変化

杉山英子，武富　保
（信州大・医・心脈管研・脂質生化）

〔要約〕
種々の脳腫瘍組織のガングリオシドの分析結果はいずれの脳腫瘍も正常脳のガングリオシド含量に比して低値を示した。ガングリオシド組成も質的に違い、とくに、共通してGM3 とGD3 の相対的増加を伴う変化が見られた。　全体として、ガングリオシドの糖鎖不全とポリシアロガングリオシドの減少が認められた。　また、部位別、組織学的分類による悪性度の異なる種々の脳腫瘍で、それぞれに特徴のあるガングリオシド組成を示した。　脳腫瘍の組織学的検索と併行されるガングリオシド分析は腫瘍の分類や悪性度の同定に役立ちうることが示唆された。

最近、腫瘍マーカーとしての糖脂質の研究に大変関心が高まつて来ている。　部位別、組織学的に分類される沢山の脳腫瘍においてもまた当然のことである。　演者らは脳腫瘍の組織学的分類とガングリオシド組成変化の相関性を明らかにすることを目的として脳腫瘍組織のガングリオシド分析を試みたのでその結果を報告したい。

［実験方法］

組織材料：　脳腫瘍組織の材料は信州大学医学部脳神経外科より提供を受けたものである。　全試料は治療のための外科的手術その他一切の説明がなされた後、患者及び家族よりインフォームド・コンセントを得て摘出されたものである。　脳腫瘍の内胚葉性のものは、astrocytoma 3例、oligodendroglioma 1例、glioblastoma　6例、medulloblastoma 1例、ependymoma 4例、choroid plexus papilloma 1例、neurinoma 7例、paraganglioma 1例である。　中胚葉性のものはmeningiomaのmeningotheliomatous type　5例、fibroblastic type 3例、hemangioblastoma　1例である。　外胚葉性のものはpituitary adenoma　3例である。　先天性胎児性のものはteratoma　1 例とepidermoid　1例である。

ガングリオシドの抽出・調製及び分析：　あらかじめ凍結乾燥した組織に充分量のクロロホルム／メタノール／水(4:8:3,v/v) を加えて全脂質を抽出した後、DEAE-Sephadex A-25　カラムで酸性脂質画分を得た。　Sep-Pak C18(Waters) で脱塩後、これを個体別のガングリオシド分画とした。　ガングリオシド含量はresorcinol-HCl法によるシアール酸の定量によつた。　ガングリオシド組成については、HPTLC(Merck)で分離・発色後、デンシトメーター(CS9000)　で分析した。

［結果及び考察］

用いられた脳腫瘍組織はWHO分類によつて纏められた。　脳腫瘍のガングリオシド含量は、表－1に見られるように、正常脳灰白質のそれに比べると、いずれもはるかに減少している。　Glioblastomaとoligodendroglioma は正常脳白質ガングリオシドより多いが、その他は、同程度ものが僅かで、それより低値が殆どであつた。　また、表－1に見られるように、astrocytoma は脳主要ガングリオシドの減少に対して、GD3 の著増とGM3 の増加が見られた。　他方、subependymal giant cell astrocytoma は、むしろ逆にGM3 の著増とGD3 の増加が認められた。　実際には後者が前者より悪性度が高かつた。　Oligodendroglioma は主要ガングリオシドを保つてGD3 の増加が見られた。　Ependymomaは４例とも脳主要ガングリオシドに対してGD3 の著増とGM3 の増加が見られた。　Choroid plexus papilloma　はガングリオシド組成が単純化し、GD3 の著増とGM3 の増加が目立つた。　これらはいずれも、悪性度はそれ程高くなかつた。　Glioblastomaは６例で悪性度は高いが、GD3 の著増とGM3 の増加で、astrocytoma のガングリオシド

組成と比較的類似した。 悪性度の高いmedulloblastoma はGM3,GD3 共に増加し、脳主要ガングリオシド組成もかなり変化した。悪性度の低いneurinoma は７例ともGM3 の増加が見られ、末梢神経系ガングリオシドは比較的保たれた。 Meningiomaのmeningotheliomatous type はGM3 の著増とGD3 の増加と脳主要ガングリオシドの減少が見られたが、他方、fibroblastic type はGD3 の著増が目立ち、主要ガングリオシドは保たれた。 前者が後者より悪性度が高いように思われた。 Hemangioblastomaは低い悪性度に拘らず大半がGM3 とGD3 で、他に、sialylparagloboside の微量のみであつた。 Teratomaは低い悪性度に拘らず、GM3 とGD3 が殆で、その他は僅かであつた。 悪性度の比較的低いepidermoidはGM3 が著増し、その他のガングリオシドは僅かであつた。Pituitary adenoma はGM3,GD3 の増加は比較的少く、主要ガングリオシドは保たれ、悪性度も低かつた。

分類上、種々の脳腫瘍は発生頻度、発生部位、発症年齢、悪性度と共に関心が寄せられている。 本実験のependymoma, subependymal giant cell astrocytoma, epidermoid,teratoma,medulloblastomaの患者は低年齢層に属した。 Fredman ら(1) はmeningiomaのchromosome 22 のmonosomyで、GD3 の増加、他方、正常及び部分欠損chromosome 22 でGM3 の増加を報告しているが、本実験でのmeningotheliomatous と fibroblastic type との関係は不明である。 Mennelら(2) はglioma のgrade II-IV の部位別とガングリオシド組成から診断の可能性と、悪性度の高い程ガングリオシド組成の単純化、低い程正常脳ガングリオシド組成に近いことを示している。 本実験でもガングリオシド組成パターンの違いと部位別及び悪性度との相関性が見られ、病理的検索と共に脳腫瘍の診断に役立ちうることが示唆された。

(表－１) 脳腫瘍の分類とガングリオシド含量と組成

Tumors	Malignancy	sialic acid (nmol/10 mg)	GM3	GM2	GM1	GD3	GD1a	GD1b	GT1b	GQ1b	Others
Astrocytoma	II	46.8 ±9.5	10.2	-	2.1	54.2	6.7	4.4	4.4	3.5	14.5
Subependymal giant cell astrocytoma	I?	82.7	69.5	-	3.4	10.1	4.4	7.1	5.4	-	-
Oligodendroglioma	II	122.0	1.8	-	7.1	27.9	12.7	16.2	13.5	4.7	16.2
Ependymoma	I	52.3 ±20.4	19.0	-	-	41.4	8.4	1.4	12.5	2.6	14.8
Choroid plexus papilloma	I	21.9	71.1	-	-	22.0	-	-	-	-	6.3
Glioblastoma	IV	114.2 ±38.4	22.3	-	5.1	46.1	5.7	2.1	5.1	1.8	11.7
Medulloblastoma	IV	-	24.6	-	-	26.5	13.7	7.1	3.2	-	22.9
Neurinoma	I	35.8 ±12.8	26.3	3.1	18.6	8.3	41.2	-	4.9	-	-
Meningioma fibroblastic	I	53.3	6.9	-	-	58.3	2.1	7.8	19.3	2.0	3.5
meningotheliomatous		22.0±0.6	59.1	1.5	-	23.8	5.2	3.1	2.0	1.7	1.5
Hemangioblastoma	I	55.3	75.3	-	-	23.4	-	-	-	-	1.2
Teratoma	I	19.9	55.7	-	-	30.8	6.1	-	-	-	-
Epidermoid	I?	3.2	68.2	-	-	9.4	10.2	3.8	8.4	-	-
Pituitary adenoma	I	28.2 ±10.7	11.2	-	16.7	9.7	36.4	13.1	12.9	-	-
Normal gray matter		168.7	<1	1.7	14.2	2.0	38.0	16.7	19.7	3.9	3.0
Normal white matter		52.3	<1	1.0	18.8	3.2	36.2	14.8	19.1	4.8	1.6

［文献］

(1)P.Fredman et al. J.Neurochem. 55, 1838-1840 (1990) (2)H.D.Mennel et al. Path.Res.Pract. 187, 157-165(1991)

47 メラニンと鉄によって惹起される脂質過酸化反応
スーパーオキシドの介在について

田中　真，外松明美，平井俊策，中野　稔*
（群馬大学神経内科，*同医療技術短期大学部）

〔要約〕
Dopaの酸化によって生成したdopa-melaninが鉄存在下に脂質過酸化反応を惹起することを見出した．SOD はこの反応を有意に抑制するためsuperoxideが発生し，この反応に介在することが示唆された．他の活性酸素種はそれぞれの消去剤が影響を与えないため，この脂質過酸化反応に関与しないと考えられた．Deferoxamineによって反応系から鉄を除くと反応は完全に阻止された．さらに melaninは鉄存在下に MCLA 依存性化学発光を惹起し，SOD がこれを抑制することからsuperoxideの発生が裏づけられた．中脳黒質には鉄が豊富に存在するとともに，Parkinson 病においてmelanin含有神経細胞が変性・脱落することから，すでに明らかにされている鉄と catecholによる脂質過酸化反応とともに，Parkinson 病の黒質変性の機序として注目する必要があると思われた．

［目的］Parkinson 病における黒質神経細胞の変性・脱落は，黒質神経細胞を特徴づける melaninやdopamineをはじめとする catecholamineが活性酸素を介して神経細胞を障害するためであるとする酸化的ストレス説が従来提唱されてきた．これまでのcatechol類に関する私たちの検討では，黒質に豊富に存在する鉄がcatechol類と複合体を形成して脂質過酸化反応を惹起し(3)，神経細胞を障害することが示唆されている(4)．しかし，この脂質過酸化反応にはいずれの活性酸素種も関与しないことが明らかになっている．今回の研究ではさらに，もう一方の有害な蓄積物質と考えられている melaninについて検討を加えた．すなわちin vitroの系において melaninが脂質過酸化反応を生じ得るか，もし生じるとすれば活性酸素種が介在するかどうかを明らかにし，Parkinson 病の病態解明の糸口を得ることを目的とした．

［方法］l-dopaを硫酸銅を含むTris緩衝液中で酸化しdopa-melaninを作成した．これを塩酸で洗浄し銅イオンを除去した後，凍結乾燥し，用時NaOH溶液に懸濁し使用した．Phospholipid liposome はラット肝ミクロゾームよりリン脂質を抽出し，liposome として使用した．反応系には無機リン濃度として0.85 μmol/mlを添加した．脂質過酸化反応はthiobar-bituric acid-reacting substance (TBA-RS) の定量によって測定した．反応系の構成は phospholipid liposome, dopa-melanin(100μg/ml) およびFe^{3+}(50mμM)-ADP(0.83mM)とし，Tris塩酸緩衝液(0.1M, pH 7.4)中にて37℃で反応させた．この系に deferoxamine mesylate, superoxide dismutase (SOD), catalase, sodium azide, sodium benzoateを添加し，その影響を検討した．化学発光法(2)によるsuperoxideの検出には2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-α]pyrazin-3-one(MCLA)依存性化学発光をAloka社製発光測定装置(BLR-101)にて検出した．

［成績］Dopa-melaninは３価鉄存在下に約20 nmol/mlのTBA-RSを生成し，phospholipidの脂質過酸化反応を惹起することが明らかになった(Fig.1)．この反応はSODによって有意に抑制されたが，過酸化水素消去酵素catalase，一重項酸素消去剤sodium azideあるいは hydorxyl radical消去剤sodium benzoateによる影響は全くみられなかった．強力な鉄キレート剤であるdeferoxamineによってこの脂質過酸化反応は完全に抑制された．さらにdopa-melaninはFe^{3+}-ADPを含む上記緩衝液中でMCLA依存性の化学発光を生じ，これはSODによって完全に抑制された(Fig.2)．

［考察］生体内に存在するmelaninはcatecholamineやその前駆物質であるdopaが酸化され重合体を形成した物質であるが，中枢神経系ではその存在が黒質dopamine作動性神経細胞を特徴づけている．Melaninはある条件下で superoxideやhydroxyl radicalなどの活性酸素を発生させることが示唆されることから，Parkinson病における黒質の変性の一因であると考えられてきた．しかし比較的生理的条件下に活性酸素の発生を明確に証明した報告はなかった．

今回の検討では，dopa-melaninが鉄存在下で phospholipid liposomeの脂質過酸化反応を引き起こすことを証明した．この反応によって生じるTBA-RSが SODによって有意に抑制されること，MCLA依存性化学発光を生じること，さらにその化学発光が SODによって抑制されることなどから，superoxideが発生して脂質過酸化反応に介在していること

が明らかとなった．Dopa-melanin は蛋白成分を欠くが生体内の melaninに比較的類似性が高いとされているが(1)，dopamine-melaninや他のcatecholamine由来のmelaninも同様の反応に関与するか検討する必要があると思われる．さらに黒質神経細胞の変性・脱落に関与すると考える場合，melanin と鉄の惹起する脂質過酸化反応が実際に細胞死の原因となることを証明してゆく必要があると思われる．

Fig. 1 TBA-RS formation in the system containing liposomes, dopa-melanin, Fe^{3+}-ADP and SOD (or none)

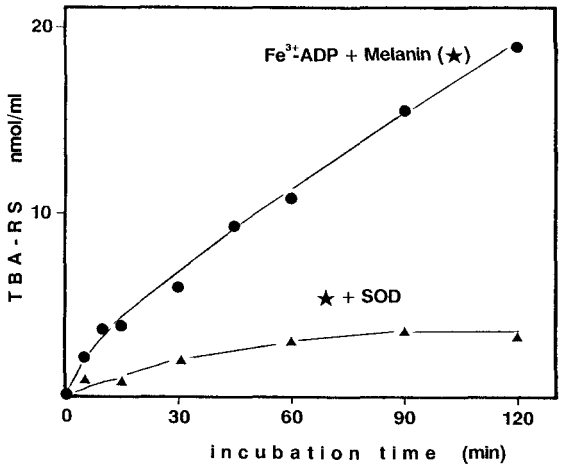
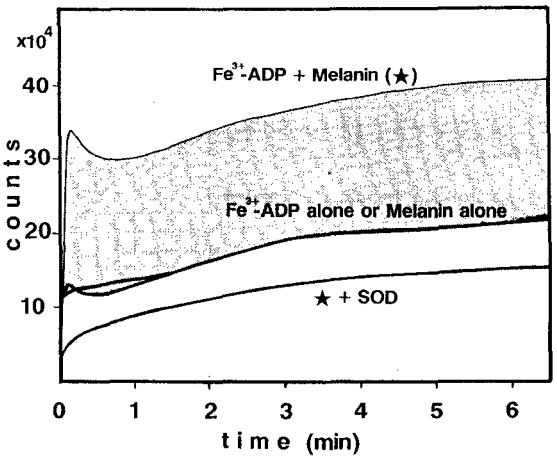


Fig. 2 MCLA dependent chemiluminescence by dopa-melanin in the presence of Fe^{3+}-ADP



[文献]

1)Krystyna, B. et al: Catecholamine melanins. Structural changes induced by copper ions. Biochim. Biophys. Acta, 997:49-54, 1989.

2)Nishida, A. et al.: A sensitive and specific chemiluminescence method for estimating the ability of human granulocytes and monocytes to generate O_2^-. Clin. Chim. Acta, 179:177-182, 1989.

3)Sotomatsu, A. et al.: Phospholipid peroxidation induced by the catechol-Fe^{3+}(Cu^{2+}) complex: a possible mechanism of nigrostriatal cell damage. Arch. Biocem. Biophys., 283:334-341, 1990

4)Tanaka, M. et al.: Dopa and dopmine cause cultured neuronal death in the presence of iron. J. Neurol. Sci., 101:198-203, 1991.

48 神経疾患における髄液中28kDa vitamin D-dependent calcium-binding protein値

清澤和弘，杢野謙次，吉田英治，高橋昭，村上信之*，安田武司**加藤兼房***
（名古屋大・医・神内，国療東名古屋・神内*，名古屋第二日赤・神内**，愛知県コロニー***）

〔要約〕脊髄小脳変性症(SCD)を中心とする各種神経疾患患者96例とコントロール群24例の、髄液中の28kD-Vitamin D-dependent calcium-binding protein(Calbindin-D：CaBP)値をEIA法で測定し、髄液中のCaBP値が小脳障害の指標となり得るかどうか検討した。1)コントロール群のCaBP値は2.5±1.0(mean±SD)ng/mlであった。mean+2SD値(4.5ng/ml)を正常上限値とすると、これを越す異常例はSCD及び二次性の小脳失調症、CVD（いずれも病変はテント上にある)群でより多く認められ、またその上昇程度も高度であった。一方、その他の各種神経疾患では、CaBP値の異常は著明でなかった。2)SCDを含めた小脳失調症群とCVD群で同時にNSE値を測定した。小脳失調症群ではNSE値に対するCaBP値上昇の程度がCVD群と比べ明らかに高く、両群における主たる障害部位の違いを反映していると考えられた。3)SCD群の中では病理学的にプルキンエ細胞の障害が著明であるMSAに高値例が多く、その他のJoseph病、DRPLAでは異常値は少数例に認められるのみであった。以上の結果から髄液中のCaBP値は、小脳障害の指標となる可能性が示唆された。

はじめに

分子量約３万のVitaminD-dependent calcium-binding protein(28kDa Calbindin-D:CaBP)は、EFhand型のカルシウム結合タンパクの一種であり、中枢神経組織に多量に存在する。CaBPの中枢神経組織における分布は均一ではなく、小脳では他の部位に比べ約10倍以上の濃度に存在することが明らかとなっている[1]。また免疫組織化学的検索によりCaBPは神経細胞（あるいは上衣細胞）に広く分布するものの脳の各部位によりCaBP陽性細胞の存在様式は異なり大脳皮質では数%の神経細胞で陽性であるのに対し、小脳神経細胞のプルキンエ細胞では70%以上CaBP陽性であることが明らかにされている[2]。 以上のことからCaBPが神経組織障害により髄液中に漏出し、CaBPが神経障害特に小脳障害の指標となる可能性が示唆される。そこで我々はこの可能性を明らかにするためSCD、及び他の神経疾患について髄液中のCaBP濃度を測定しその有用性について検討した。

対象と方法

今回対象としたのは年齢0～82歳（平均51.7±16.7）の各種神経疾患患者96例（男61例、女35例）で、内訳は、Fig1に示す。ミエロパチー13例は、頚椎症または後縦靭帯骨化症10例、HAM、前脊髄動脈症候群、脊髄損傷、各1例であり、その他の小脳失調症2例は、ウェルニッケ脳症及び肺癌に伴う小脳失調症各1例である。コントロール群は年齢は9～73歳（平均43.8±17.8）の非神経疾患患者24例（男16例、女8例）である。髄液採取は腰椎穿刺で行なった。採取した髄液は従来と同様に遠心し、上清をグリセリンと混合50%溶液とし、測定まで-20℃以下で保存した。ヒトCaBPおよびNSEの測定は、高感度enzyme immunoassay(EIA)法を用いて測定した[3]。

結果，考察

1) コントロール群及び疾患群でのCaBP値：コントロール群のCaBP値は、2.5±1.0(mean±SD) ng/ml(range0.7～4.8）であった。コントロール群の値のmean+2SD(4.5ng/nl)を上限値とし、この値を越えるものを異常とした。

測定結果をFig1に示した。異常値の出現頻度は多い順に、小脳失調症2/2(100%)、SCD12/24(50%)、CVD5/10(50%)、PD6/12(50%)、MND5/11(45%)、HD1/3(33%)、myelopathy1/13(8%)となりmeningitis、neuropathy、MSでは異常値を示す例はなかった。またCaBP値が上限値の2倍(9.0ng/ml)を越すような高度の上昇例は小脳失調症、SCD、CVDに限られており、その他のグループでは上限値を越えてもその上昇程度は軽度であった。

2) SCD群とCVD群におけるCaBP値とNSE値：CVD群ではSCD群小脳失調症と同程度にCaBP高値例があり、今回の検索例は病変がいずれもテント上にあることから小脳障害によりCaBP値が上昇したとは考えにくく、障害組織のCaBP濃度が小脳に比べ低くとも、より広範に障害されたためにCaBP値が上昇したものと推定される。そこでFig2の如くCVD群と小脳失調症群においてCaBP値を神経細胞障害の指標であるNSE値とプロットしてみた。そうするとCVD群ではSCD群、小脳失調症例に比べNSE値の上昇に対するCaBP値上昇の程度は低く、両群でCaBP/NSEが異なることが判り上記の推定が妥当なものと考えられた。

3) SCD群における検討：SCD群を臨床診断に基づき、MSA、Joseph病、DRPLA、Friedreich病、その他(ミオクローヌスてんかん、Holmes型)に分け、CaBP値の上昇態度を比較した(Fig3)。MSA群では異常値を示す例が多く12例中9例で異常値を示したのに対し、Joseph病5例中1例、DRPLAでは3例中1例、Friedreich病の1例が、異常値を示したにすぎなかった。病理学的にMSAではプルキンエ細胞をふくめた小脳皮質神経細胞に高度の障害が認めら

れるのに対し、Joseph病、DRPLA、Friedreich病、その他ではMSAに比べてPurkinje細胞の障害は一般的に軽度であると考えられている。この病理学的所見の相違がCaBP値の上昇の程度に差が生じた可能性も考えられる。

［文献］

1)Baimbridge K.G,et al.(1982)Brain Res.239:519-525. 2)Garcia-Segura.L.M,et al.(1984)296:75-86

3)Zhu.Y,et al.Clin.Chim.Acta.in press. 4)Mokuno.K,et al.(1983)J.Neurol.Sci.,60:443-451

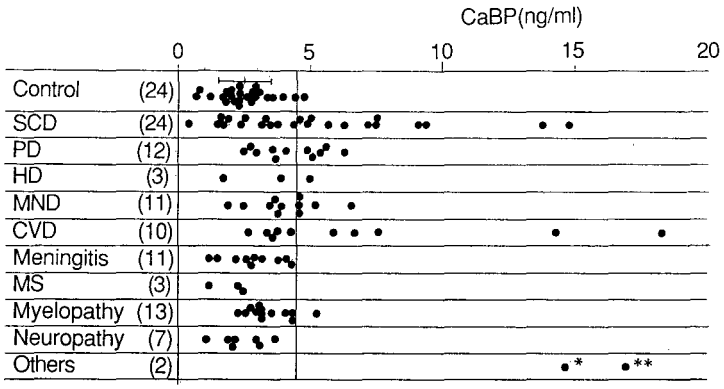


Fig1.CSF CaBP levels in the 96 patients with neurological diseases and controls.

SCD=Spinocerebellar degeneration; PD=Parkinson's disease; HD=Huntington's disease; MND=Motor neuron disease; CVD=Cerebrovascullar disease; MS=Multiple sclerosis; Others=Other cerebellar ataxia; *=Wernicke's encephalopathy; **=Cerebellar ataxia with lung cancer.

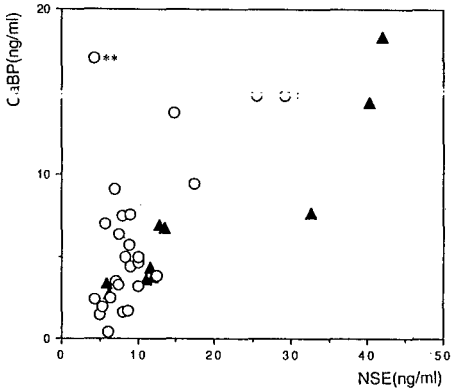


Fig2.Relationship between CSF levels of NSE and CaBP in patients with SCD,Other cerebellar ataxia(○),andCVD(▲).

*=Wernicke's encephalopathy; **=Cerebellar ataxia with lung cancer.

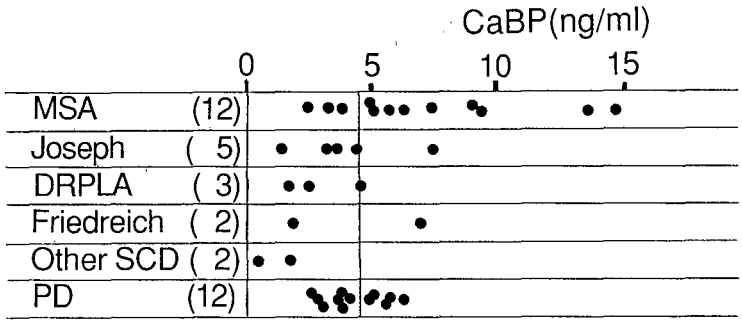


Fig3.CSF CaBP levels in the SCD group.

MSA=Multiple system atrophy; DRPLA=Dentate-rubro-pallido-luysian atrophy.

49 βA4タンパクの一次構造

□ 小河原 緑，瀧尾拡士*，森 啓
（東京都老人総合研究所・神経生理，理化学研究所・バイオメディア*）

〔要約〕

βA4タンパクはアルツハイマー病脳に特異的に蓄積する，分子量約4,000の難溶性タンパクである。βA4タンパクは分子量約110,000の前駆体タンパクから異常プロセッシングにより生成される。本研究では，アルツハイマー病脳内に蓄積するβA4タンパクを精製し，その一次構造をアミノ酸配列と質量分析法によって検討した。βA4タンパクのN末端，C末端は共にヘテロであるが，主成分は二分子種である。1つはアスパラギン酸ではじまる分子種であり，他方はピログルタミン酸をN端末とする分子種である。C端末は40残基目のバリンで終わるものが主成分であったが，43残基目のスレオニンまでの分子種も少量ではあるが同時に確認できた。以上の結果より，βA4タンパクは前駆体タンパクより43残基のペプチドとしてプロセッシングされること，脳内沈着後もさらに両末端の数残基がプロセッシングされていることが示唆された。

βA4タンパクの存在はアルツハイマー病（以下AD）脳を特徴づける。AD以外では高齢者脳およびダウン症脳に限り認められている。この点でもう1つの注目すべき病理像である神経原線維変化の出現より，AD脳に特異的であるといえる。

βA4タンパクの前駆体タンパク（以下APP）はヒトからハエに広く分布するばかりでなく，ほとんどすべての臓器に認められる膜タンパクである(3)。正常脳内ではβA4タンパクのリジン^{16}残基のところで構成的に切断され，さらなるタンパク分解反応に入っていくものと考えられている。AD脳内ではこのリジン残基では切断されず，正常脳にはみられないAPP分解反応が期待される。βA4タンパクの一次構造の完全解明はAD脳に特異な異常プロセッシング機構を考える上で必須の知見である。βA4タンパクのアミノ酸配列に関する従来の報告は必ずしも一致した内容ではなかった。AD脳膜に沈着した血管アミロイドのβA4タンパク（1, 2），あるいは老人班コアのβA4タンパク(4)のN末端アミノ酸配列が決定された研究結果，逆にN末端がブロックされているとする報告もある。さらにアミノ酸残基数が39残基である（7, 8）とする報告から，40残基（2, 5），42残基(3)，42残基(3)までの報告がある。

本研究では，これまでの精製過程で用いられてきたコラーゲナーゼやペプシンなどのプロテアーゼを用いることなく高度に精製したβA4タンパクを用いてそのN末端，C末端の詳細な分析をした。

【材料および方法】

合成ペプチド（図1の42残基）を抗原として得たウサギ抗血清を用いて，AD脳切片を免疫染色した。組織学的に陽性を示したAD脳約100 mgを2%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）/50 mMトリス塩酸pH 7.6，150 mM塩化ナトリウム中でホモジナイズ後，超遠心沈渣を得，Mastersらの方法(4)に従ってギ酸処理後，上清画分を得る。乾燥後，SDSポリアクリルアミドゲル（22.3%～15%グラジエントゲル）電気泳動にかけ，PVDF膜上へ転写したイムノブロットをみた。大量調製には，βA4タンパク含量の高いAD脳約30 gを用い，そのギ酸抽出液を得た。

HPLCによる精製

Baker社C4（4 × 250 mm）を用いTFA存在下に逆相HPLCにかけた。展開は0～80%イソプロパノール/アセトニトリル（7：3）のグラジエントを40分で実行した。βA4タンパクを含む画分を乾燥後，20%ギ酸，4.8 M塩酸グアニジンに溶解し再度逆相HPLCにかけた。展開は0～80%アセトニトリルを40分で実行した。

βA4タンパクのペプチド断片

既報(6)によりリジン残基に特異な *Achromobactor Lyticus* Protease 1（AP1）によって切断後，塩酸グアニジン，メルカプトエタノール，TFAを各々6 M，0.1%，0.3%になるように加え，イソプロパノールの系で逆相HPLCにかけ各ペプチド断片を得た。

アミノ酸配列および質量分析

PVDF膜上に転写したβA4タンパクおよび精製ペプチドのアミノ酸配列はABI社のModel 477 A/120 Aにより，質量分析はABI社のBioIon 20により決定した。

【結果および考察】

βA4タンパク内にはリジン残基が2ケ所ある（図1）ことから，AP1消化により少くとも3つのペプチドが期待できる。図2にその結果をしめす。ピークA，Bは各々図1のAsp[1]，Glu[3]からはじまるペプチド断片を含むことがわかった。またピークCは図1のLeu[17]からLys[28]の内部ペプチド断片を含む。残るピークDはGly[29]からのC末ペプチド断片であり，βA4タンパクの中でも疎水性の高い領域であることが認められた。

ピークBに含まれる断片は質量分析からピログルタミン酸にはじまるペプチドであることが推定されたが，実際にピログルタミン酸アミノペプチダーゼを用いた後，アミノ酸配列を決定することにより確定した。

βA4タンパクのN末端が不ぞろいであるとしたMastersらの報告(4)が本研究においても確認されたが，彼らの主張するほどヘテロではなく主成分はAsp[1]とGlu[3]からはじまる2つの分子種のみであることが注目される。またグルタミン酸が環化していることから，ここでのN末端分解反応が1つの律速段階になっていることが推測される。

これまで老人斑アミロイドコアのN末端がブロックされているとした報告があり，βA4タンパクの不均一性が示唆されていた。同時に，N末端の修飾構造および実際のN末端のアミノ酸が未解決の問題として残されていたが，今回の結果から，Glu[3]がN末端としてプロセッシングされた後，ピログルタミン酸になるものと考えられる。は脳内

ピークDの質量分析結果より，同ペプチド断片のC末端アミノ酸はVal[40]である分子種が主成分として同定されたが，微量成分としてThr[43]がC末端アミノ酸として見出された。これらの結果より，βA4タンパク（Asp[1]→Thr[43]）の脳内沈着後にも，さらに2～3残基のアミノ酸がプロセッシングされていることが推測される。C末のプロセッシングがVal[40]付近で停止するのは，この領域が細胞膜貫通ドメインであり，高度に不溶性であるためと考えられる。

形態的にはコアのみからなる老人斑はburn out型と称され，多様な老人斑（diffuse型，primitive型，mature型）の中でも末期像として理解されている。今回我々の得たピログルタミン酸構造の発見により老人斑コアタンパクがβA4タンパクの切り出し沈着，N末のプロセッシングそして環化反応という複数の反応の最終構造であるとする生化学的知見が上記の形態学的認識と矛盾しない。

ADにおけるβA4タンパクの異常プロセッシング反応は，Lys[16]部位で切断されないこと，Asp[1]－Thr[43]のあと，両末端の限定分解がみられることに特徴がある。これらの反応がどのような機構によっておこるかが今後の重要な課題である。

```
1                  10                  20                  30                  40  43
D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A T
```

図1. βA4タンパクの一次構造

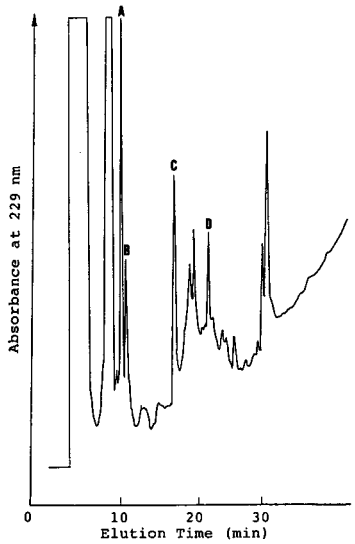


図2. βA4タンパクのAP1消化ペプチドの分離

【文　献】

1) Glenner, G.G. & Wong, C.W. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 885－890.

2) Joachim, C.L. et al (1988) Brain Res. 474, 100－111.

3) Kang, J. et al (1987) Nature 325, 733－736.

4) Masters, C.L. et al (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4245－4249.

5) Miller, M.L. et al (1988) Alzh. Dis. Assoc. Disorders. 2, 243.

6) Mori. H. et al (1987) Science 235, 1641－1644.

7) Prelli, F. et al (1988) J. Neurochem. 51, 648－651.

8) Prelli, F. et al (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 151, 1150－1155.

50 キンドリングモデルにおけるてんかん準備性と亜鉛の役割

板野俊文，岡田泰士*，根木哲郎*，村上哲英**，畠瀬　修
（香川医大・第一生理学，保健体育学*，生物学**）

〔要約〕

扁桃体キンドリングモデルラットを用いて後発射の進展と組織内亜鉛との相関関係を解析した。てんかん準備性の獲得に伴い，海馬の亜鉛の含量は明かな消失を示した。Ｃ５の最終刺激後３日，７日と経過するに従い，再び亜鉛が海馬領域に回復した。また，刺激回数に伴い，ＣＡ４及びＣＡ３領域の錘体細胞群の形態的変化を認めた。以上はてんかん準備性と深く関係するものと考えられる。

［緒言］

キンドリングは頻回の閾値下の刺激を繰り返し与えることで強いけいれん発作を得るヒトてんかんモデルである[1]。しかし，てんかん準備性に関する機序については不明な部分が多い。その中で数種の神経伝達物質の関与と亜鉛の働きが示唆されている[2]。今回我々はてんかん準備性の獲得と組織中の亜鉛の消長について知見を得たので報告する。

［方法］

1.キンドリングモデルの作成：ＳＤ系ラット（ 250～ 300g オス）の扁桃体に双極性慢性電極を刺入し，脳波導出用電極は大脳皮質に埋め，歯科用セメントで固定した。刺激は 100～ 200μA の双極性矩型波を用いて１日に２回行った。

2.Timm染色：各ステージのラットをペントバルビタールで麻酔後開胸，固定液で灌流固定を行う。30～50μm のパラフィン切片を作成後，Zn染色用反応液中（アラビアゴム33%，シトレートバッファー0.1M，ハイドロキノン5.67%，乳酸銀0.73%）で26℃暗所で１～２時間反応後，クレジールバイオレットで対比染色を行った[3]。

［結果と考察］

Timm染色による亜鉛の局在を図に示す。上段は電極のみを挿入し無刺激のコントロールの弱拡大及びＣＡ３の強拡大写真であり，中段は強い後発射Ｃ５の発作を獲得後１０回以上刺激され，最終刺激５時間後に固定されたラットである。特長的なことはＣＡ２，ＣＡ１の領域の亜鉛含量が極端に減少していること，また，歯状回，ＣＡ４，ＣＡ３の部分も減少傾向にある。次に，ＣＡ３の錘体細胞の外側の部分に新しい亜鉛の貯積が認められることは明かな変化である。下段の図はＣ５のけいれん発作獲得１０回以上の刺激，最終刺激後 7日間放置した後に固定したラットである。刺激直後に固定した標本に比較してＣＡ１，ＣＡ２の領域の亜鉛の回復がみられ，他の部位もコントロールに近い状態に戻っている。ＣＡ３の錘体細胞の外側もその沈着が少なくなっている。また，他の実験で，Ｃ５の刺激を３０回以上連続して行うと，ＣＡ３，ＣＡ４の錘体細胞の形態がコントロールに比較して角張り，不均一なものに変化する。

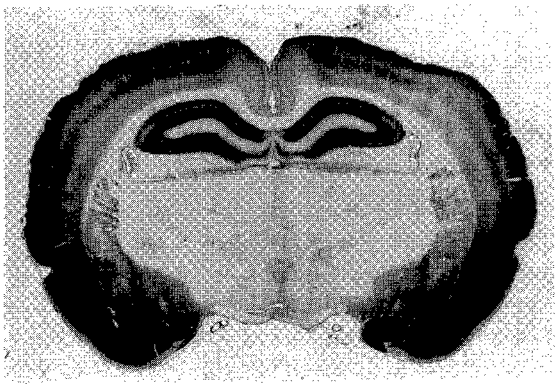
これらより，グルタミン酸の大量放出，亜鉛含量の低下，海馬錘体細胞の変化等の関連とその回復，及びてんかん準備性の関連について考察を行う。

［文献］

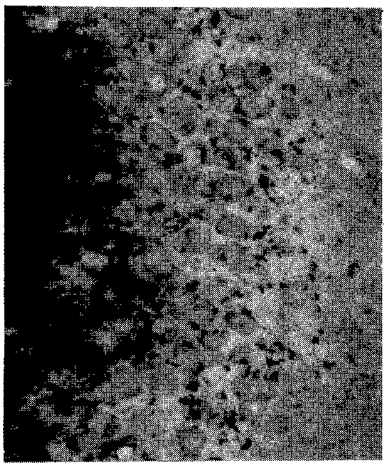
1) Goddard, G.V., McIntyre, P.C. and Leach, C.K., Exp. Neurol., 25(1969)295-330.

2) Ben-Ari, Y. and Represa, A., Trends. in Neurosciences, 13(1990)312-318.

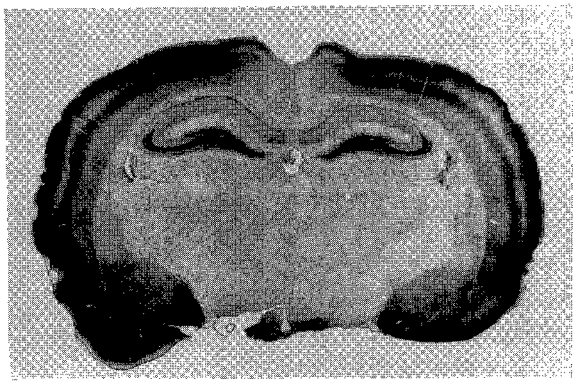
3) Perez-Clausel, J. and Danscher, G., Brain Res., 337(1985)91-98.



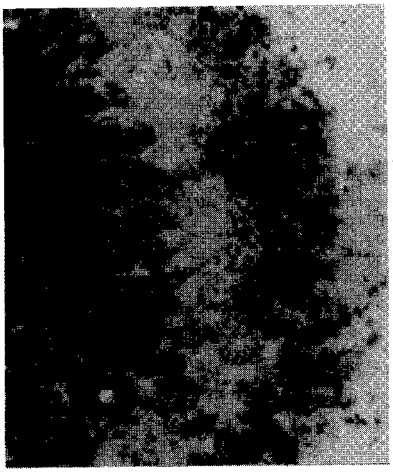
コントロール（ｘ８．５）



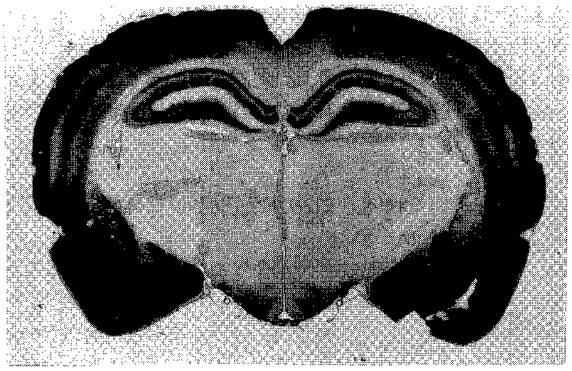
同左　ＣＡ３　（ｘ１３０）



キンドリング獲得　最終刺激後　同日固定（ｘ８．５）



同左　ＣＡ３　（ｘ１３０）



キンドリング獲得　最終刺激後　７日目固定（ｘ８．５）



同左　ＣＡ３　（ｘ１３０）

51 気分安定作用のある抗けいれん薬の作用機序に関する研究—アデノシン受容体との関連—

本橋伸高，塩江邦彦*，三ツ汐洋**，假屋哲彦*

（広島大・医・精神，山梨医大・精神*，国立精神・神経センター神経研究所・疾病研究第３部**）

〔要約〕

気分安定作用のある抗けいれん薬のアデノシン受容体に対する影響を検討した．ラット脳膜標品のアデノシンA_1受容体およびアデノシン取り込み部位の標識には[^{3}H]8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine(DPCPX)と[^{3}H]nitrobenzyl thioinosine(NBI)をそれぞれ用いた．大脳皮質膜標品での結合阻害実験の結果から，カルバマゼピンはヒトの有効血中濃度で[^{3}H]DPCPX 結合に直接作用した．また，クロナゼパムは弱い結合阻害能を示した．[^{3}H]NBI 結合には，クロナゼパムがわずかに作用した．バルプロ酸ナトリウムとクロナゼパムの急性投与では両結合部位に変化はなかった．カルバマゼピン，クロナゼパムの慢性投与により[^{3}H]DPCPXと[^{3}H]NBI結合に変化はなかった．バルプロ酸の慢性投与により両結合は有意に増加した．以上の結果より，気分安定薬の作用機序とアデノシン系を直接結びつけることはできないと思われた．しかし，バルプロ酸の作用の一部はアデノシン系を介している可能性がある．

プリン体であるアデノシンは多くの神経伝達物質の放出をシナプス前部で抑制するほか，シナプス後部への直接作用も示されており，neuromodulatorと考えられている．近年，アデノシン受容体はadenylate cyclase に対して抑制的に働くA_1と促進的に働くA_2の二つのサブタイプに分類されている．さらには，アデノシンの取り込み機構が知られている．アデノシン系はけいれんや脳虚血との関連が指摘されてきた．最近，カルバマゼピン，バルプロ酸，クロナゼパンなどの抗けいれん薬が感情障害の治療や予防に有効であることが示され，これらの薬物はリチウムと共に気分安定薬として分類されている．カルバマゼピン，電気けいれんショックの慢性適用や REM断眠でアデノシンA_1受容体が増加することから，感情障害とアデノシン系の関連が推測される (8)．今回，気分安定薬である抗けいれん薬のアデノシンA_1受容体とアデノシン取り込み部位に与える影響を検討したので報告する．

〔実験方法〕

実験動物にはウイスター系雄性ラット150-250 g を使用した．

アデノシンA_1受容体とアデノシン取り込み部位の標識には[^{3}H]8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)と[^{3}H]nitrobenzylthioinosine (NBI)をそれぞれ用い，脳膜標品を用いての結合実験はKlotzら(3)と Marangosら(5)の方法にそれぞれ従った．

結合阻害実験には大脳皮質膜標品を用い，[^{3}H]DPCPXと[^{3}H]NBIの濃度はそれぞれ0.3 nMと0.1 nMとした．

急性投与実験：バルプロ酸ナトリウムは生理的食塩水に溶解し，150または300 mg/kgをラット腹腔内に投与し，１時間後に断頭した．対照群には生食を投与した．ジアゼパム(5 mg/kg)またはクロナゼパム(1 mg/kg)をラット腹腔内に投与し，１時間後に断頭した．対照群には溶媒を投与した．

慢性投与実験：バルプロ酸ナトリウム (2.5, 5, 10 g/kg)またはカルバマゼピン (1.25, 2.5, 5, 10 g/kg)を含む飼料で40日間飼育したラットを断頭し，前頭葉皮質を取り出した．ジアゼパム(5 mg/kg)またはクロナゼパム(1 mg/kg)を １日１回14日間投与し，最終投与24時間後に断頭し大脳皮質を取り出した．

一点測定では[^{3}H]DPCPXと[^{3}H]NBIの濃度をそれぞれ1 nMと0.1 nMとした．また，飽和結合実験では 0.06-2 nM の[^{3}H]DPCPXと0.02-0.64 nMの[^{3}H]NBIを用い，結果をScatchard 解析し，最大結合数(B_{max})と解離定数(K_D)を求めた．非特異的結合は1 μMのDPCPXまたはNBIの存在下のものとした．

〔結果〕

1.結合阻害実験 (Table 1)：アセタゾラミド，ゾニサミドは100 μMでも[^{3}H]DPCPXと[^{3}H]NBI結合にほとんど作用しなかった．また，リチウムは10 mM でも両結合部位を全く阻害しなかった．

2.急性投与実験：バルプロ酸，ジアゼパム，クロナゼパムの急性投与により大脳皮質の[^{3}H]DPCPXと[^{3}H]NBI結合部位に変化はなかった(データ省略)．

3.慢性投与実験 (Table 2,3)：バルプロ酸慢性投与により特異的[^{3}H]DPCPXおよび[^{3}H]NBI結合は用量依存的に増加した．しかし，カルバマゼピンの投与によっては特異的結合に変化はなかった．また，ジアゼパムとクロナゼパムの投与によっても両結合部位に変化はなかった．

〔考察〕

カルバマゼピンはアデノシンA_1受容体に直接作用し，慢性投与により同受容体数が増加することが示されてきた(

1,6,7)．今回，選択性の高い拮抗薬[^{3}H]DPCPX をリガンドとし結合実験をおこなったところ，これまでの報告と同様に，有効血中濃度でアデノシンA_1受容体に直接作用することが示された．しかし，カルバマゼピンの慢性投与によって[^{3}H]DPCPX 結合に変化はなかった．これまでの研究は比較的選択性の高い作動薬である[^{3}H]cyclohexyladenosine をリガンドとして用いているので (7)，この違いが関係しているかもしれない．さらには，本実験では休薬期間をおかなかったので，これまでの報告は断薬の結果をみている可能性がある．

バルプロ酸は急性投与で[^{3}H]DPCPXと[^{3}H]NBI結合を変えなかったのに対し，慢性投与により両結合を増加させた．今回，5 g/kgの飼料で飼育したラットの断頭時バルプロ酸血中濃度は55 μg/mlであり，ヒトの有効血中濃度に近いことから，バルプロ酸の作用機序の一部にアデノシン系を介するものがあるかもしれない．また，GABAとアデノシンの相互作用についても検討する余地がある．

ジアゼパムとクロナゼパムは，今回の投与量では，ラット大脳皮質の[^{3}H]DPCPXおよび[^{3}H]NBI結合部位に急性，慢性投与とも変化を与えなかった．ジアゼパム慢性投与の結果はこれまでの報告と一致している (2)．最近，クロナゼパムの慢性投与により，マウス大脳皮質スライスに対するアデノシンの作用が強まるとの研究があり (4)，投与量を変えての検討は必要かもしれない．

本研究結果より，気分安定薬である抗けいれん薬の作用機序とアデノシン系を直接結びつけることは無理かもしれない．今後これらの薬物の作用機序を検討することから，感情障害の病態生理の新たな側面の見いだされることが期待される．

〔文献〕

1.Clark, M. and Post, R.M. (1989) Eur. J. Pharmacol. 164, 399-401.

2.Hawkins, M., Pravica, M. and Radulovacki, M. (1988) Pharmacol. Biochem. Behav. 30, 303-308.

3.Klotz, K.-N., Lohse, M.J. and Schwabe, U. (1988) J. Biol. Chem. 263, 17522-17526.

4.Mally, J., Connick, J.H. and Stone, T.W. (1990) Brain Res. 530, 353-357.

5.Marangos, P.J., Patel, J., Clark-Rosenberg, R. and Martino, A.M. (1982) J. Neurochem. 39, 184-192.

6.Marangos, P.J., Post, R.M., Patel, J., Parma, A. and Weiss, S. (1983) Eur. J. Pharmacol. 93, 175-182.

7.Marangos, P.J., Weiss, S.R.B., Montgomery, P., Patel, J., Narang, P.K., Cappabianca, A.M. and Post, R.M. (1985) Epilepsia 26, 493-498.

8.本橋伸高，塩江邦彦，假屋哲彦 (1991) 臨床精神医学 20, 421-427.

Table 1 Inhibition of [^{3}H]DPCPX and [^{3}H]NBI binding by anticonvulsants (% of specific binding)

Drugs	[^{3}H]DPCPX	[^{3}H]NBI
Carbamazepine		
1 μM	94	103
10 μM	61	103
100 μM	11	72
Valproate		
1 μM	107	105
10 μM	99	99
100 μM	76	92
Clonazepam		
1 μM	96	101
10 μM	80	100
100 μM	24	60
Diazepam		
1 μM	101	101
10 μM	88	77
100 μM	22	24
Phenytoin		
1 μM	101	104
10 μM	100	101
100 μM	95	100

Table 2 Effects of chronic treatment with diazepam or clonazepam on [^{3}H]DPCPX and [^{3}H]NBI binding in the cerebral cortex

	[^{3}H]DPCPX		[^{3}H]NBI	
	B_{max}	K_D	B_{max}	K_D
Control	661±31	0.45±0.06	199±5	0.053±0.01
Diazepam	660±70	0.38±0.04	212±15	0.056±0.01
Clonazepam	707±34	0.39±0.03	216±9	0.049±0.01

Results are expressed as the mean±S.E. for 4 rats. B_{max}, fmol/mg protein; K_D, nM.

Table 3 Effects of chronic treatment with carbamazepine or valproate on [^{3}H]DPCPX and [^{3}H]NBI binding in the frontal cortex

Doses	Carbamazepine		Valproate	
	[^{3}H]DPCPX	[^{3}H]NBI	[^{3}H]DPCPX	[^{3}H]NBI
Control	424±17	138±4	420±37	141±7
1.25 g/kg	455±30	129±3	N.D.	N.D.
2.5 g/kg	423±20	136±6	472±13	154±5
5.0 g/kg	469±11	126±4	456±24	163±7*
10 g/kg	427±17	133±2	524±14*	193±9**

Results are expressed as the mean±S.E (fmol/mg protein) for 6 rats. N.D., not determined.
*p<0.05, **p<0.01 as compared to Control.

52 脳血管攣縮における血小板活性化因子ＰＡＦの役割

平島 豊、遠藤 俊郎、大辻 常男、野村 耕章、高久 晃、*唐沢 健
（富山医薬大・医・脳神経外科、*帝京大・薬・薬品物理化学）

〔要約〕
2回自家血大槽内注入によるクモ膜下出血のモデルを用いて、同時に PAF , PAFantagonists (CV6209 , BN52021), antiPAFIgGを注入し、脳血管攣縮による神経学的な変化、脳血管撮影による血管の収縮の変化を検討した。また病理組織学的検討も行った。PAF注入による兎の神経学的 Grade の変化および脳底動脈の増大は dose-dependent であった。PAFantagonists(CV6209,BN52021),antiPAFIgGの注入で全例に神経脱落症状の発現を予防し得た。しかしながら血管の収縮に関しては 100μg antiPAFIgG以外の薬剤では収縮を改善し得なかった。以上の結果からPAFはクモ膜下出血後の脳血管攣縮の症状発現に関与している事が示唆された。

［はじめに］
血小板活性化因子(PAF)は最近、中枢神経系において虚血(4)および外傷後(3)の神経細胞および微細脳血管の障害にが関与する事が知られている。クモ膜下出血後の脳血管攣縮は multifactorial な現象と考えられているが、本実験ではPAFに注目し、その脳血管攣縮への関与を実験的に検討した。

［方法］
体重2.5～3.0kgの雌家兎35羽を本実験に用いた。両側総頚動脈を結紮し、2週間後に大槽穿刺によって第1回目の自家血を注入、次いで2日後に再度自家血を注入するというクモ膜下出血のモデルを作成した。PAF注入群として自家血と同時に大槽内にPAFを1, 2.5, 5.0, 10μgを注入した。CV6209注入群としては10 ,100μgを注入した。BN52021筋注群は10, 100μgを注入した。antiPAFIgG注入群は 50, 500μgを注入した。対照として、生食を血液と同時に注入したもの、25% DMSO生食溶液を血液と同時に注入したものを用意した。また別にPAF自身の作用を見るため10μgPAFを2回、第0、第2日目に単独で大槽内に注入した。初回注入後からEndo等の神経脱落症状のgrading(2)に従って神経症状の追跡を行った。また、血管撮影を経時的に行った。脳底動脈の直径を測定し、第0日目と比較して収縮率を求めた。約2週間後、解剖を行った。

［結果］
自家血と同時PAF10μgを2回にわたって大槽に注入した兎は第1日目より神経症状の悪化(Grade4)を示し、第9日目まで持続しその後改善した。脳血管撮影による脳底動脈の収縮は第4日目が最大でその後緩解した(図1)。第4日目の神経症状、脳底動脈の収縮率を注入したPAF量に関して検討するとPAF量と dose-dependent な関係が認められた(図2, 3)。次にPAFantagonistであるCV6209,BN52021、それにantiPAFIgGを注入した効果を神経症状、脳底動脈の収縮の変化で検討した。おどろいた事にPAFantagonist,antiPAFIgG注入した24羽いずれも神経症状を全く示さなかった(Grade1)。薬剤投与による神経症状発現の防止は明らかであった。一方脳底動脈収縮に関しては,その収縮を改善し得たのは100μg antiPAFIgGを注入した群のみ($p<0.01$)で他の薬剤は統計学的に有意な改善は認めなかった(図4)。PAF単独の効果を検討するために10gμPAFのみを2度注入した2羽の兎は、第4日目の神経症状はGrade2と3で脳底動脈の収縮率は42.5%,41.7%で、神経症状に関しては自家血注入の対照と同程度であるが脳底動脈の収縮は対照よりも強い傾向であった。病理組織学的変化ではPAF群で肉眼的にも認められる梗塞巣を含め、病巣の頻度と広がりが大きかった(図5)。

［考察］
今回の実験でクモ膜下出血家兎にPAFを髄注した場合、神経症状、脳底動脈の収縮の両方がdose-dependentに悪化した事実は脳血管攣縮およびその症状発現にPAFが強く関与する事を示唆している。逆にPAFantagonists,およびantiPAFIgGの注入で神経症状の発現を阻止できたのにかかわらず、脳底動脈の収縮に関してはantiPAFIgG以外は改善し得なかった。この結果は脳血管攣縮において主幹動脈の収縮と神経症状発現は別な問題である事を示している。脳底動脈の収縮に関してはPAFのみでなくエイコサノイドをはじめとする多くのspasmogenic substanceが関与しており、神経症状に関与するmicrocirculationの障害にはPAFが強く関与しているのかも知れない。脳におけるPAFreceptorと同様(4)、血管に存在するPAF receptorも唯一でない事も考えられる。その場合、CV6209,BN52021等 PAFantagonists は一方のreceptorのみと結合する可能性がある。今後アラキドン酸カスケードとPAFとの関連等を含めPAFと脳血管攣縮の問題には解明しなけ

ればならぬ点が多い。

［文献］

1. Domingo, M. T., Spinnewyn, B., Chabroer, P. E., et. al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 151, 730-736.
2. Endo, S., Branson, P. J., Alksne, J. F. (1988) Stroke 19, 1420-1425.
3. Frerichs, K. U., Lindsberg, P. J., Hallenbeck, J. M. et. al. (1990) J. Neurosurg. 73, 223-233.
4. Panetta, T., Marcheselli, V. L., Braquet, P., et. al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 149, 580-587.



Fig. 2

The effect of PAF on neurologic deficit following subarachnoid hemorrhage

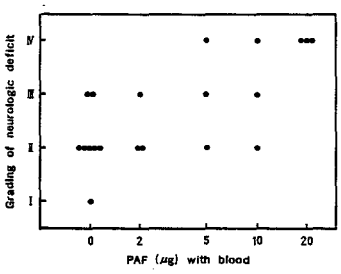
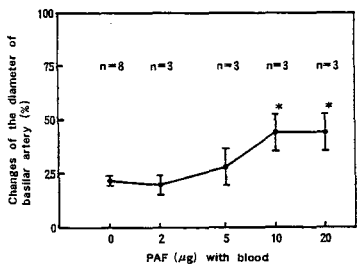


Fig. 3

The effect of PAF on the change of basilar artery diameter following subarachnoid hemorrhage



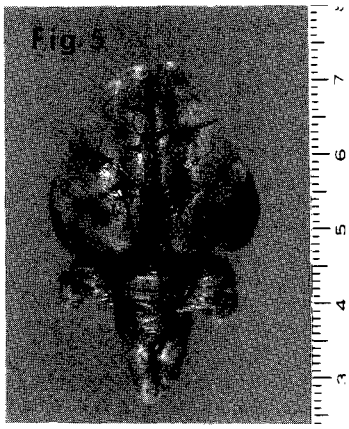
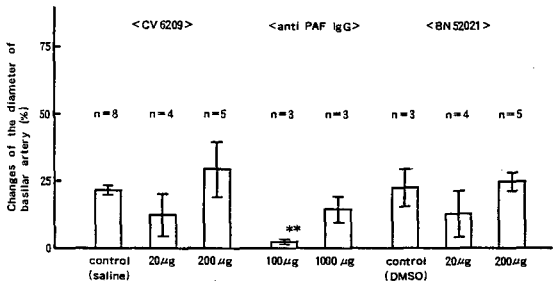


Fig. 4

The effects of anti PAF antagonists on the change of basilar artery diameter following subarachnoid hemorrhage



53 ドーパミン神経毒 Tetrahydroisoquinoline のN-メチル化

丸山和佳子[1]　丹羽利充[2]　太田深雪[3]　高橋勤[4]　長谷川真一[1]
高橋昭[1]　永津俊治[5]　直井信[6]
1)名古屋大神経内科 2)名古屋大分院内科 3)名市大精神科 4)江南女子短大
5)藤田保健衛生大学総医研 6)名工大

要約
ドーパミンとアルデヒド或はケト酸から非酵素的に生成される6,7-dihydrotetrahydroisoquinoline(DHTIQ)が脳内のN-メチル転移酵素によってN-メチル体となることが明かとなった。in vitroでヒト脳より調製した酵素によりS-adenosyl-L-methionineをメチル基供与体として DHTIQからN-methyl-DHTIQ(NMDHTIQ)が生成された。またラットの脳内で生理的条件下でもN-メチル化がおこることがmicrodialysis法よりin vivoで示された。NMDHTIQはドーパミン神経毒1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)に類似した化学構造をもち、事実ドーパミン細胞のモデルであるラット褐色細胞腫 PC12h 細胞に対し細胞毒性を示した。さらにヒト脳でN-メチル化したDHTIQの存在がGC-MSにより確認された。これらの結果からヒト脳内で生成されたDHTIQが更に毒性の高いN-メチル誘導体にと生合成されることが明かとされた

目的
ヒトの脳内で生合成される内因性の神経毒が一部の神経変性疾患の原因ではないかという仮説が存在する。特にヒトの黒質線状体のドーパミン細胞に選択的に毒性を示しParkinsonismを引き起こすMPTPの発見以来、MPTPに構造、作用の類似した内因性神経毒の検索が進められている。構造活性相関の検討からquinolineまたはpyridine誘導体でN-メチル化が脳内でMPTP類似の毒性の高い神経毒を生成するのに必要な段階と考えられる。この酵素反応につきin vitroとin vivo で明かにし、更にヒト脳内のN-メチル体の存在を証明する.

方法
in vitroの酵素活性はヒト脳より部分精製した酵素標品を用い、HPLC-FD及びHPLC-ECDにて検討した(2)。基質のDHTIQとしては哺乳類脳内で存在が報告されている(R)-1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline [(R)-salsolinol] と 6,7-dihydro-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (norsalsolinol)を用いた。In vivoの実験は、microdialysisにはWister ratを、培養細胞の実験にはPC12h 細胞を用いた。microdialysisの透析液中の神経伝達物質の分析にはHPLC-多次元 ECD (NEUROCHEM)を使用した。ヒト脳でのGC-MSによるN-メチル体の同定は既報の方法によった(3)。

結果
(R)-salsolinol, norsalsolinol及びそれらのN-メチル体の化学構造式をFig.1に示す
1) ヒト脳より精製した酵素標品を用いたin vitroでのN-メチル化の実験
S-adenosyl-L-methionineをメチル基供与体として(R)-salsolinolからのN-methyl-(R)-salsolinolの生成が証明された。(R)salsolinolにたいするKm値は1.97+0.88 mM, Vmax値は1.49+0.56 nmol/min/mg proteinであった。
2) ラットを用いたin vivoでのN-メチル化の実験
ラット脳線状体への局所的な(R)-salsolinolの注入によってin vivoでのN-methyl-(R)-salsolinolの生成が証明された。1mMの(R)-salsolinol を2μl/minで注入したところ平衡状態にて約350 μMの(R)-salsolinol と50-350 nMのN-methyl-(R)-salsolinolが透析液中に認められた。
3) PC12h細胞に対するDHTIQ,NMDHTIQの毒性・取り込み実験
(R)-salsolinol, norsalsolinol, N-methyl-(R)-salsolinol,N-methyl- norsalsolinolをPC12h細胞の培養液に添加したところ共に100 μM以上でタンパク量の低下と細胞死がみられた(Fig. 2)。また PC12h細胞を用いた取り込み実験ではN-メチル体ではKmが低下し取り込みの親和性が増加することが明らかにされた(Table 1)。
4) ヒト脳での検出
コントロールおよびパーキンソン病患者の剖検脳にNMDHTIQが存在するかをGC-MSにて検討した。N-methyl-(R)-salsolinolおよびN-methyl-norsalsolinolの存在が証明された (Fig. 3)。濃度は前頭葉で約1 ng/g wet weightであった。

考察
DHTIQはヒトや哺乳類の脳内に存在するquinolineである。これらはドーパミンから生成されることから、ドーパミン細胞に多く含まれ、ドーパミン細胞を特異的に傷害する可能性がある。しかし、今までDHTIQの毒性は低いと考えられてきた。ところが最近tetrahydroisoquinoline(TIQ)がN-methyltransferaseによってN-メチル化され更にモノアミン酸化酵素によって酸化体となること

によりドーパミン細胞に対する神経毒性を増すことが証明された(1)。この代謝系はMPTPがMPP+に酸化され毒性を増すのに類似しており、tetrhydroisoquinoline類のN-メチル化はより毒性の高い化合物の生成を引き起こすと考えられる(Fig.1)。今回の実験ではDHTIQがin vivoでN-メチル化されることが明かとなり、さらにヒト脳内での存在も証明された。NMDHTIQは長期間の間にドーパミン細胞で生成・蓄積され、細胞傷害をひきおこし、ヒトにパーキンソン病をひきおこす可能性があると考えられる。

文献

(1) Naoi, M., Matsuura, S., Parvez, H., Takahashi, T., Hirata, Y., Minami, M. and Nagatsu, T. (1989) J. Neurochem. 52, 653-655.
(2) Naoi, M., Matsuura, S., Takahashi, T. and Nagatsu, T. (1989) Biochem Biophys. Res. Commun. 161, 1213-1219.
(3) Niwa, T., Takeda, N., Yoshizumi, H., Tatematsu, A., Yoshida, M., Dostert, P., Naoi, M. and Nagatsu, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. In press.

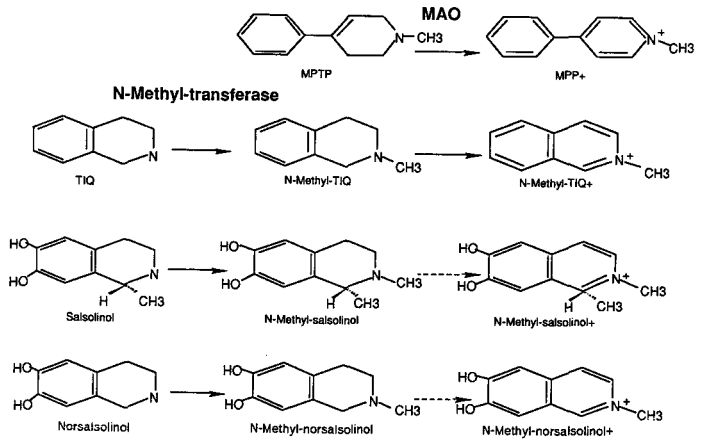


Fig. 1 DTTIQ, TIQ, MPTP の代謝系

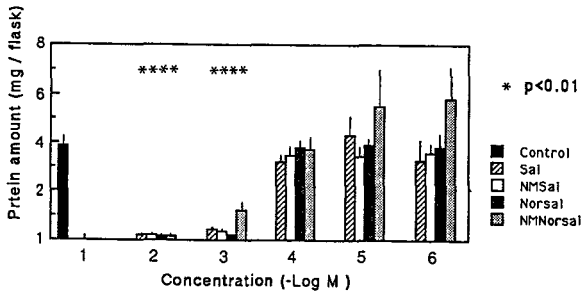
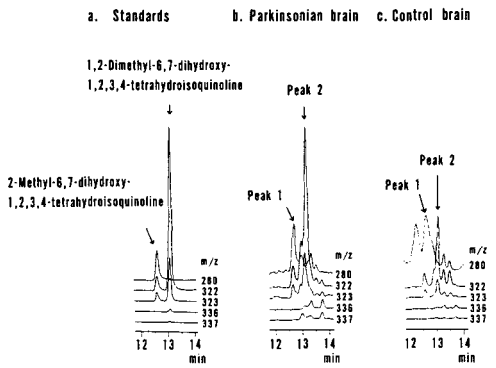


Fig. 2 DHTIQ, NMDHTIQ のPC12h 細胞のタンパク量に対する影響（3日間培養）



DHTIQ	Km (μM)	Vmax (nmol / min / mg protein)
(*R*) Sal	1046 ± 581	8.87± 4.11
(*R*) NMSal	708 ± 437	39.45 ± 17.0
Norsal	1700± 525	0.829 ± 0.242
NMNorsal	162 ± 99.4	1.489 ± 0.687

Mean and SD of duplicate measurements of three experiments

Table 1 DHTIQ, NMDHTIQのPC12h 細胞による取り込みの反応速度論的解析

Fig. 3 パーキンソン及び対照者の前頭葉皮質中のNMDHTIQ (GC-MS)

54 NMDA受容体を介する神経毒性に及ぼす細胞外pHの影響

高寺恒雄、毛利哲郎
（北陸大・薬・創薬研）

〔要約〕

ラット胎児（18日令）の培養大脳皮質培養細胞を用いてNMDA受容体を介する細胞毒性に及ぼす細胞外pHの影響について検討した。細胞をN-メチル-D- アスパラギン酸（NMDA）で処理する時のpHを6.5 から8.0 の範囲で行なうと、18時間後のトリパンブルー染色される細胞数及び細胞外への乳酸脱水素酵素（LDH ）の遊離はpHの上昇に依存して増加した。脱分極を起こすhigh K^+（40 mM）あるいはVeratridine(10 μM)処理による細胞毒性も処理時の細胞外pHの上昇に依存して大きくなった。NMDAの添加による細胞内カルシウムイオン濃度の増加も細胞外pHに依存して大きくなった。また、NMDAアンタゴニストはNMDAや脱分極による細胞毒性及びNMDAによるカルシウムイオンの流入を完全に阻害した。これらの結果からプロトンがNMDAによるカルシウムイオンの流入を阻害することによって神経毒性を抑制していることが示唆された。

グルタミン酸受容体の１つであるNMDA受容体の活性化によってカルシウムイオンが流入し、それがてんかん及び脳虚血時などの細胞死の引き金となることが知られている。最近、ラットの海馬及び小脳の神経細胞を用いた電気生理学的実験からプロトンがNMDAによるイオン電流を阻害することが報告された(3, 5)。さらに、酸素及びグルコース欠乏による細胞障害がアシドーシスによって軽減されることが培養細胞を用いて報告された(1, 4)。そこで、NMDAによる細胞毒性とカルシウムイオンの流入に及ぼす細胞外pH(6.5-8.0) の影響をラット大脳初代培養細胞を用いて検討した。

［実験方法］ ラット大脳初代培養細胞は、ラット17-19 日令の胎児から既報(2) のように調製し、10%準胎児血清を含むDulbecco's Modified Medium(DMEM) 中で培養した。培養8-14日目の細胞を実験に用いた。500 μM NMDA及び 10 μM veratridine を含むTris-buffered salt solution(120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgCl_2$, 15 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 6.5-8.0)あるいは、40 mM KCl を含む同bufferで室温、15分間処理を行なった後10 mM Hepes buffered DMEM で洗い同mediumを加えて18時間、37℃のCO_2 incubator に置いた。細胞毒性はすべて位相差顕微鏡での観察、トリパンブルー染色及び細胞外に遊離したLDH 活性を測定することによって確認した。個々の細胞内pHおよびカルシウムイオン濃度の測定はそれぞれBCECF およびIndo-1を細胞にとりこませて、蛍光解析装置（ACAS）によって行なった。

［結果］ アルカリ側pHでNMDA処理15分間すると、細胞毒性が位相差像やトリパンブルー染色によって観察され、さらに細胞外に遊離したLDH 活性測定によっても確認できた。処理時のpH 6.5では細胞毒性は見られないが、pHの上昇に依存して毒性が強く見られた（Fig. 1）。NMDA を含まないbuffer(pH 6.5-8.0)で15分間処理しても影響はなかった。これらの細胞毒性はNMDAアンタゴニストで抑制された。細胞をpH 6.5、7.4、8.0のbufferで15分間incubation後の細胞内pHはそれぞれ7.20、7.39、7.59 であった。さらに、各pH（6.5-8.0 ）で15分間前処理した後、NMDA処理をpH 7.4で行なうと、すべてのLDH 遊離はpH 7.4の値とほぼ等しくなった。次に脱分極による細胞毒性について調べた。 50 mM K^+ あるいは 10 μM vereatridineで15分間処理するとNMDAと同様な細胞毒性を引き起こす。この脱分極剤による細胞毒性も処

理時のpHの上昇に依存して増大し、その毒性はMK-801の共存によって抑制された（Fig. 2）。一方、NMDAによる細胞内カルシウム濃度の増加も細胞外pHの上昇に依存して増加し、その増加はNMDAアンタゴニストの共存によって抑制された（Table）。

Fig.1 LDH release from cells after treatment with NMDA at various extracellular pH

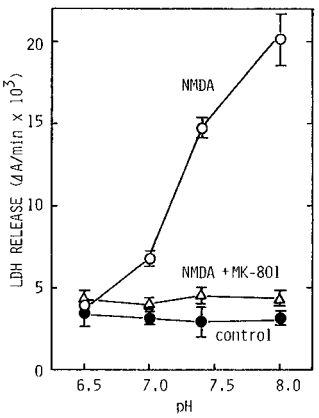


Fig.2 LDH release from cells after treatment with high K^+ or veratridine at various extracellular pH

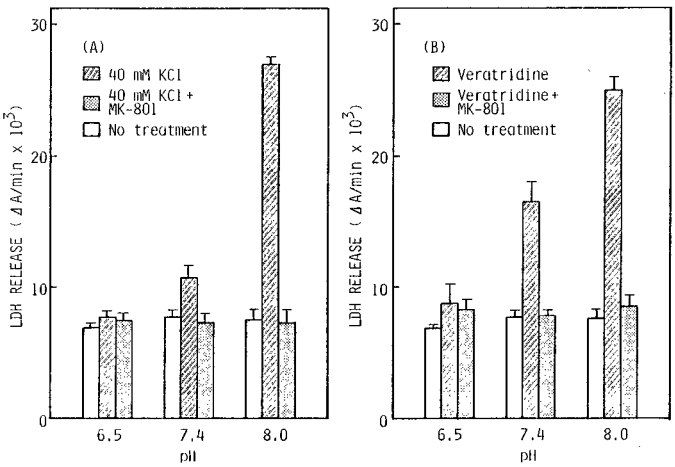


Table The effect of extracellular pH on the NMDA-induced calcium accumulation in cells.

	$[Ca^{2+}]_i$(nM)		
	pH 6.5	pH 7.4	pH 8.0
No addition	63 ± 2	64 ± 2	62 ± 1
NMDA	71 ± 2	142 ± 9	291 ± 29
Ketamine+ NMDA	ND	ND	71 ± 3

［考察］アルカリ側pH中ではNMDAによる細胞毒性が増強され同時にカルシウムイオンの流入が促進されるのに対し、酸性側pHでは逆に細胞毒性が減少し同時にカルシウムイオンの流入が抑制されることが示された。プロトンの作用部位は細胞の外側にあることが電気生理学的実験から示唆されている。細胞をpH 6.5-8.0 のbufferで１５分間incubationした後のpH変化が小さかったことや、細胞外pHの影響がNMDA処理時のpHにのみに依存したことはこの考えを支持する。一方、アルカローシスがてんかん発作を引き起こし、NMDAアンタゴニストで抑制されることや、アルコール離脱症状によるてんかん発作がアルカローシスと相関があり、NMDAアンタゴニストによって抑制されることが報告されている。結論として、グルタミン酸受容体の過剰刺激によって引き起こされる神経細胞壊死にとって細胞外pHは重大な因子であることが示唆された。

［文献］

1. Giffard, R.G., Monyer, H., Christine, C.W. and Choi, D.W. (1990) Brain Research, 506, 339-342
2. Takadera, T., Suzuki, R. and Mohri, T. (1990) Brain Research, 537, 109-114
3. Tang, C.-M., Dichter, M. and Morad, M. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6445-6449
4. Tombaugh, G.C. and Sapolsky, R.M. (1990) Brain Research, 506, 343-345
5. Traynelis, S.F. and Cull-Candy, S.G. (1990) Nature, 345, 347-350

55 ラット線条体Dopamine取り込み機構に及ぼすMethamphetamineおよび競合的NMDA受容体拮抗薬(SDZ EAA494)併用反復投与の影響

村木　彰、小山　司、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競合的N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体拮抗薬SDZ EAA494の影響について、[^{3}H]GBR 12935結合実験を用いて検討した。SDZ EAA494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。前回われわれは、非競合的NMDA受容体拮抗薬であるMK-801が、同様の作用を有することを示したが、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可能性がさらに強く示唆された。

【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(4)。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(2,8)も相次いでなされている。

前回われわれは、上述のNMDA受容体拮抗薬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影響について、同部位を選択的に標識するとされる[^{3}H]GBR 12935を用いた飽和結合実験を用いて検討し、非競合的NMDA受容体拮抗薬であるMK-801が、MAPによる同部位の低下を阻止するという結果を報告した(3)。今回はさらに、競合的NMDA受容体拮抗薬であるSDZ EAA494を用いて、同様の実験を行ったので報告する。

【対象と方法】
200-250g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SDZ EAA494 20mg/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。[^{3}H]GBR12935結合実験は、Janowskyら(1)の方法を一部改変し、50uM 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℃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】
[^{3}H]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、SDZ EAA494前処置群ではそれが完全に抑止された。一方、SDZ EAA494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、競合的NMDA受容体拮抗薬であるSDZ EAA494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。さらに最近、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(6)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。そこで前回われわれは、そのDA神経終末の障害に対するNMDA受容体拮抗薬の効果を、DA取り込み部位に着目して検討し、非競合的拮抗薬であるMK-801が、MAP反復投与による同部位の低下を阻止するという結果を得た。さらに、今回の研究により、NMDA受容体の競合的拮抗薬も同様の効果を有することが示された。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。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放出を促進し、その効果をNMDA受容体拮抗薬が抑制するという知見(5)を得ている。さらに最近、in vivo microdialysisを用いた実験で、MK-801の前処置がMAP投与によるDA放出を抑制するという報告(5)もなされている。従って、これまでの結果についても、MK-801およびSDZ EAA494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は充分可能である。いずれにしろ、NMDA受容体上で異なる作用部位を持つとされるMK-801とSDZ EAA494が、MAPの作用に対して同様の影響を及ぼすということは、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受容体の関与がより強く示唆されたと言える。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 SDZ EAA494 on the [^{3}H]GBR 12935 binding in the rat striatum. The results shown are the mean±S.E.M.; n=8.

	Kd(nM)	Bmax(pmol/g wet tissue)
Saline－Saline	1.80±0.15	325.4±8.6
Saline－MAP	1.83±0.12	245.5±12.7 ★
SDZ EAA494－Saline	1.90±0.14	330.9±7.7
SDZ EAA494－MAP	1.86±0.14	328.7±9.3

★ $p<0.01$

【文献】

1.Janowsky,A.,Berger,P.,Vocci,F.,et al (1986) J.Neruchem.,46,1272-1276
2.McDonald,J.,Silverstein,F.S.,and Johnston,M.V. (1987) Eur.J.Pharmacol.,140,359-361
3.村木 彰、小山 司、中山 誠、他 (1990) 神経化学,29,252-253
4.中山 誠、小山 司、松原 良次、他 (1990) 神経化学,29,264-265
5.大森 哲郎、小山 司、松原 繁広、他 (1990) 神経化学,29,258－259
6.Sonsalla,P.K.,Nicklas,W.J.,and Heikkila,R.E. (1989) Science,243,398-400
7.Weihmuller,F.B.,O'Dell,S.J.,Cole,B.N.,et al (1991) Brain Res.,549,230-235
8.Wieloch,T. (1985) Science,230,681-683

56 新規ＮＭＤＡアンタゴニストＥＳ－２４２類の培養中枢神経細胞系におけるグルタミン酸毒性保護効果

野沢　美香　　土岐　眞一郎　　松田　譲
（協和発酵、東京研）

〔要約〕

新しいタイプのNMDAアンタゴニストES-242類（図１）は、マウス胎児及び新生児由来の中枢神経培養細胞のグルタミン酸毒性による壊死を抑制し、保護効果を示した。海馬及び小脳培養細胞系におけるES-242-1の保護効果は、非拮抗型NMDAアンタゴニストであるMK-801と同程度であった。また、ES-242-1は、カイニン酸及びキスカル酸毒性による細胞壊死に対しては無効であった。その他のES-242類については、[^{3}H]N-(1-[2-thienyl]cyclohexyl)3,4-piperidine(TCP)結合阻害活性の強さとグルタミン酸毒性に対する保護効果の強さの程度はよく相関した。

（目的）

グルタミン酸は脳虚血時において無差別に細胞外に放出され、過剰に神経細胞を刺激して興奮毒性により遅発性神経細胞壊死を引き起こすものと考えられている。この神経細胞壊死には、グルタミン酸レセプターサブタイプのうちNMDAレセプターが重要な役割を演じているものとされている。本研究では、微生物の生産する新しいNMDAレセプターアンタゴニスト・ES-242類の培養中枢神経細胞系における興奮毒性保護効果を調べた。

（方法）

マウス胎児及び新生児の脳より海馬、小脳及び中隔野を摘出した。これを0.25% trypsin及び0.01%deoxyribonuclease処理を行って分散した細胞に5%馬血清、5%牛胎児血清、5mg/ℓ human transferrin、5mg/ℓ insulin、20nM progesterone、30nM selenite、100μM putrescine、20μg/ℓ triiodo-L-thyronine及び1% penicillin-streptomycinを含むダルベッコ変法イーグル培地とハムF-12培地の等量混合培地を用いて12日間培養した。100μMグルタミン酸を含有するMg^{2+} free-Lock's緩衝液（154mM NaCl/5.6mM KCl/3.6mM $NaHCO_3$/2.3mM $CaCl_2$/5.6mM glucose/5mM Hepes,pH 7.4）にその都度ES-242類（ES-242-1、2、4、5の4種）又は、MK-801を種々の濃度になるように溶解し、この溶液を用いて培養細胞を30分間処理した。処理後Lock's緩衝液（1mM $MgCl_2$含有）で一度洗浄し、細胞をconditioned mediumに戻して一晩37℃5%CO_2下でインキュベーション後、15μg/ml fluorescein diacetateと0.46mg/ml propidium iodideを組合せて染色を行い蛍光顕微鏡下で観察した。この染色法により生存細胞は黄色を死細胞は赤色を呈する[1]。このように生存率を算出して保護効果を調べた。また、ES-242-1については、カイニン酸、キスカル酸及びメタノグルタメイトによる毒性についても同様の処理を行い保護効果を調べた。

（結果）

1、ES-242-1のグルタミン酸毒性に対する保護効果

ES-242-1は、海馬培養細胞系において100μMグルタミン酸処理による神経細胞壊死を0.01～1μMの濃度範囲で有意に抑制した。これは、同系におけるMK-801の保護効果と同程度であった（図２）。小脳培養細胞系においてもES-242-1は、0.85～8.5μMの濃度で有意に神経細胞壊死を抑制し、0.85μMにおける保護効果は、2μM MK-801の示す保護効果と同程度であった。中隔野培養細胞系においては、ES-242-1は、0.85と8.5μMの濃度で有意に神経細胞壊死を抑制した。同系ではMK-801は、ES-242-1よりも低濃度で保護効果を示した。

2、ES-242-1のカイニン酸、キスカル酸、メタノグルタメイト毒性に対する保護効果

ES-242-1は、小脳培養細胞系において50μMカイニン酸及び300μMキスカル酸による細胞壊死を1.7と8.5μMで全く抑制しなかった。海馬培養細胞系においては、500μMカイニン酸及び100μMキスカル酸処理による細胞壊死を5μMで抑制しなかった。この系において、非NMDAレセプターアンタゴニストDNQXは、カイニン酸による壊死を有意に抑制した。NMDAレセプターに特異的なアゴニストであるメタノグルタメイト500μM処理による小脳細胞壊死をES-242-1は2μMでほぼ完全に抑制した。MK-801も2μMで同様の保護効果を示した。

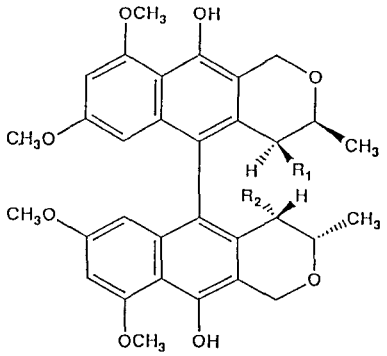
3、レセプター結合実験における阻害活性と培養細胞系における保護効果の相関

[^{3}H]TCP結合阻害実験におけるES-242類の阻害活性の強さは、小脳培養細胞におけるグルタミン酸毒性に対する保護効果の強さの程度とよく相関した。（表１）

（考察）

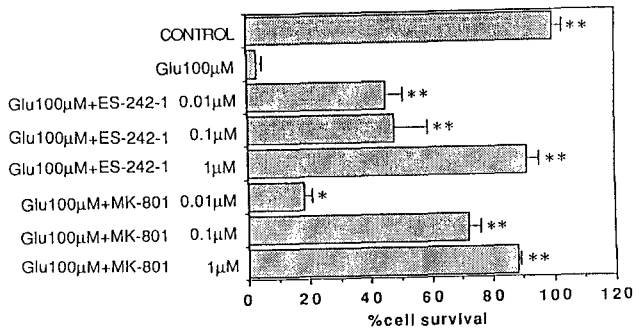
ES-242-1はグルタミン酸刺激による細胞壊死を抑制した。しかし、カイニン酸及びキスカル酸による細胞壊死は抑制せず、NMDAレセプターに特異的なアゴニストによる壊死に対して有効であった。培養細胞を用いた毒性保護作用という観点からES-242-1は、NMDAレセプターの特異的なアンタゴニストであることがわかった。ES-242-1のNMDAレセプターに対する特異性については、cGMP産生阻害実験(2)細胞内へのCa^{2+}流入阻害実験(3)及び[^{3}H]TCP結合阻害実験(4)において既に得られている結果と一致した。細胞壊死保護効果の強さの点において、ES-242-1は、既存の非拮抗型NMDAレセプターアンタゴニストであるMK-801と同程度の保護効果を示す。以上のことよりES-242類は、全く新しいタイプで強活性な新規NMDAレセプターアンタゴニストであるといえる。

（文献）
(1)Favaron,M.,et al.(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85,7351-7355
(2)土岐　眞一郎ら　1991年度　日本神経化学会要旨
(3)佃　英次ら　1991年度　日本生化学会大会要旨
(4)土岐　眞一郎ら　1991年度　日本生化学会大会要旨



ES-242-1 : R_1=H, R_2=$OCOCH_3$
-2 : R_1, R_2=$OCOCH_3$
-4 : R_1, R_2=OH
-5 : R_1=H, R_2=OH

図１：ES-242類の構造式



（*：P≦0.05、**：P≦0.01）

図２：海馬細胞系におけるグルタミン酸毒性に対する保護効果

表１：ES-242類の小脳細胞系における保護効果とレセプター結合実験における[^{3}H]TCP結合阻害活性の相関性

ES-242類(μM)	アゴニスト(μM)	保護効果(%)*1	[^{3}H]TCP結合阻害(IC_{50}:μM)*2
ES-242-1(1.7)	Glu (100)	77	0.12
ES-242-2(1.5)	Glu (100)	0	2.9
(15)	Glu (100)	80	
ES-242-4(16)	Glu (100)	0	2.6
(160)	Glu (100)	81	
ES-242-5(1.5)	Glu (100)	57	0.84
(15)	Glu (100)	81	

*1 コントロール（無処理）及びGlu 100μM存在下での生存率を100及び0として各薬物の保護効果を算出した。

*2 文献(4)参照

57 小脳顆粒細胞におけるNMDAレセプターを介するTRE及びCRE結合活性の誘導

櫻井 宏明、津田 正明 （岡山大・薬・微生物）

【要約】 小脳顆粒細胞の初代培養系を用い、グルタミン酸レセプターを介する転写制御因子の発現をDNA結合活性レベルで検討した。その結果、グルタミン酸レセプターアゴニスト、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)により、TPA-responsive element (TRE)、cAMP-responsive element (CRE)結合活性が誘導された。この際、c-*fos* mRNAの発現誘導も認められた。この誘導は、NMDAレセプターアンタゴニスト、2-アミノ-5-ホスホノ吉草酸(APV)及びMg^{2+}により阻害され、細胞外Ca^{2+}に依存していた。競合実験とproteolytic bandshift analysis の結果、NMDAで誘導される蛋白質は、TREとCREの両方に結合していた。また、CREにはTREによって競合されないCRE特異的結合蛋白質も結合していたが、これはNMDAによって誘導されなかった。一方、別のグルタミン酸レセプターアゴニストであるカイニン酸(KA)は、Mg^{2+}存在下においてもTRE、CRE結合活性を誘導したが、キスカル酸(QA)は誘導しなかった。以上の結果は、シナプスの可塑性とグルタミン酸レセプターとの関連を遺伝子発現レベルで理解するために、重要な手掛かりを与えるものと考えられる。

【目的】 神経伝達物質は、神経細胞間の情報伝達の他にも、神経細胞の成長や生存、可塑性にも関与していることが明らかになりつつある。我々は、シナプス伝達などによる神経機能発現と遺伝子発現との関連を明らかにしたいと考え、神経細胞が神経伝達物質に対して遺伝子発現レベルでどのように応答するのかを検討している。中枢神経系において、ペンテトラゾール投与による痙攣や(1)、シナプスの可塑性のモデルと考えられている長期増強現象などで(2)、*Egr-1*やc-*fos*などのimmediate early genes(IEGs)が一過的に発現誘導されることが知られている。これらの誘導は、グルタミン酸レセプターサブタイプであるNMDAレセプターを介していると考えられている。したがって、グルタミン酸レセプターを介するIEGsの発現機構を解明することは、シナプスの可塑性を遺伝子発現レベルから理解するための重要な手掛かりを与えるものと考えられる。そこで我々は、小脳顆粒細胞の初代培養系を用い、グルタミン酸レセプター、特にNMDAレセプターを介するIEGsの発現を解析した。本研究では、少量の細胞からでも簡便に解析できる系の確立を目指し、IEGs産物のDNA結合活性をゲルシフト法により解析した。

【方法】

細胞培養及び薬剤投与 生後7日目マウス小脳から顆粒細胞の初代培養を行なった。培養後6、7日目に培養液をLocke's溶液(5 mM HEPES(pH7.4)、154 mM NaCl、5.6 mM KCl、3.6 mM $NaHCO_3$、2.3 mM $CaCl_2$、5.6 mM glucose)に交換し、1時間前培養した後、アゴニスト(100 μM)を加えた。アンタゴニストはアゴニストを加える10分前に、$MgCl_2$はLocke's溶液と同時に加えた。

核ミニ抽出液の調製 薬剤投与した2時間後、Schreiberらの方法(3)を用い、蛋白質濃度1.5-2.0 mg/mlの抽出液を約50 μl得た。この方法は、従来のDignamらの方法(4)よりも少量の細胞から、しかも短時間に(約1時間)に核抽出液が調製でき、さらに細胞質分画からRNAも調製することができる。

ゲルシフト法 DNA-蛋白質複合体形成は、反応容量20 μl(20 mM HEPES(pH7.9)、80 mM NaCl、0.3 mM EDTA、0.2 mM EGTA、1 mM DTT、0.2 mM PMSF、10% glycerol、2 μg poly(dI-dC)、0.2 ng ^{32}P-labeled DNA probe、5 μg extracts)を室温で15分間反応させた。プローブDNA(20 base pair)は、片側の5'末端を3、4塩基突出させた合成オリゴヌクレオチドの3'末端を、大腸菌DNA polymerase I (Krenow fragment)でラベルした。競合DNAは、プローブの100倍量加えた。DNA-蛋白質複合体は、4%アクリルアミドゲル(29:1)により遊離プローブと分離した。泳動は、11V/cm、4℃、2.5時間行なった。泳動後、ゲルを固定、乾燥してオートラジオグラフィーを行なった。

Proteolytic bandshift analysis 通常のゲルシフト法の複合体形成反応を行なった後、V8プロテアーゼ(0.1-1 μg)を加え、室温で10分間反応させた。その後、直接上記条件で泳動した(5)。

【結果】 NMDAによりTRE、CRE結合活性が誘導された(図1 lanes 2,9)。この際、c-*fos* mRNAの発現誘導も認められた(6)。この誘導は、NMDAレセプターアンタゴニスト、200 μM D,L-APVや、1 mM Mg^{2+}によって阻害された。また、細胞外Ca^{2+}を除くと誘導は認められず、protein kinase C(PKC)の活性化剤TPAによって誘導された。一方、別のグルタミン酸レセプターアゴニストであるカイニン酸は、Mg^{2+}存在下においてもTRE、CRE結合活性を誘導したが(lanes 3,10)、キスカル酸は誘導しなかった(lanes 4,11)。また、γ-aminobutyric acid(GABA;lanes 5,12)、

carbachol(CCH;lanes 6,13)、norepinephrine(NE;lanes 7,14)も誘導しなかった。競合実験によりTRE、CRE結合蛋白質の認識配列特異性を調べたところ、NMDAで誘導されるTRE結合活性はCREにより競合され(図2 lane 2)、その逆の場合においても同様の結果が得られた(lane9)。また、SV40のTREを含むP3でも競合が認められた(lanes 4,11)。しかし、それぞれを3塩基変異させたもの(TRE-m、CRE-m、P3m3)では、競合は認められなかった(lanes 3,5,7,10,12,14)。したがって、TREとCREには同じ蛋白質が結合しているものと考えられた。この蛋白質の両者への親和性はCREに対する方が大きかった。一方、CREには、TREによって競合を受けないCRE特異的結合蛋白質も結合していたが、これはNMDAによって誘導されなかった。競合実験の結果をさらに明瞭にするために、V8プロテアーゼによるproteolytic bandshift analysisを行なった。その結果、CREには明らかに2つのDNA-蛋白質複合体が存在していた。1つはTRE結合蛋白質と同じ分解パターンを示した。これはTREによって競合され、NMDAによって誘導されるものであった。もう1つはCRE特異的結合蛋白質によるもので、3週令マウス小脳より調製した核抽出液中に多く存在するCRE特異的結合蛋白質と同じ性質を示した。

【考察】　小脳顆粒細胞において、グルタミン酸レセプターを介してTRE、CRE結合活性が誘導されることが明らかになった。したがって、コントロール領域にTRE、CREを有する遺伝子群の発現が、影響を受けることが十分予想される。誘導は、NMDAレセプターチャンネルを介して細胞内へCa^{2+}が流入することが引き金になっていた。流入したCa^{2+}は、PKCやCa/カルモジュリンキナーゼIIなどのCa^{2+}依存性キナーゼの活性化を起こしていると考えられる。核内の遺伝子発現を簡便に検出できるこの系は、そのような解析をするための良い手段を提供するものと期待される。

NMDAで誘導されるTRE、CRE結合蛋白質は、両者への親和性の大きさからc-Fos/c-Junヘテロダイマーではないと考えられる(c-Fos/c-Junヘテロダイマーは、TREに対する親和性が約10倍大きいといわれている)。最近、Fos/JunファミリーとATF/CREBファミリー間のヘテロダイマーが、その組み合わせによって、TRE、CREへの親和性を変えるとの報告もある(7)。今後、NMDAで誘導されるDNA-蛋白質複合体や、それらの標的遺伝子を同定し、シナプスの可塑性と遺伝子発現との関連をさらに検討していきたい。

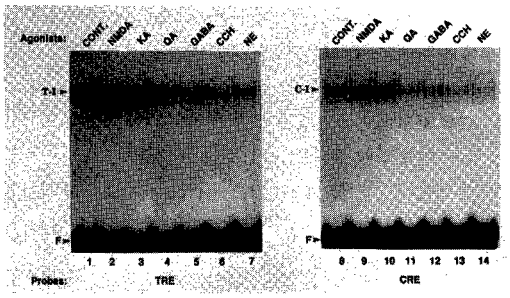


図1 各アゴニストのTRE、CRE結合活性に与える影響
T-I、C-IはDNA-蛋白質複合体を、Fは遊離のプローブを示した。

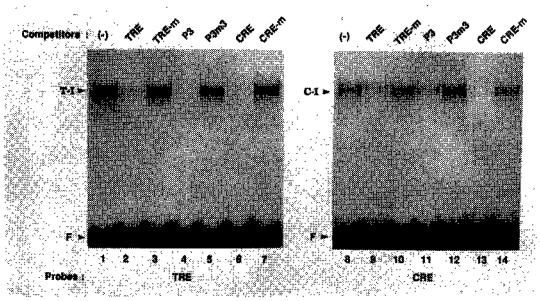


図2 競合実験による認識配列特異性の検討
核ミニ抽出液は、NMDAで誘導したものを用いた。

【文献】
1. Morgan,J.I., Cohen,D.R., Hempstead,J.L., and Curran,T. (1987) *Science* 237, 192-197
2. Cole,A.J., Saffen,D,W., Baraban,J.M., and Worley,P.F. (1989) *Nature* 340, 474-476
3. Schreiber,E., Matthias,P., Muller,M.M., and Schaffner,W. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17, 6419
4. Dignam,J.D., Lebovitz,R.M., and Roeder,R.G. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11, 1475-1489
5. Schreiber,E., Matthias,P., Muller,M.M., and Schaffner,W. (1988) *EMBO J.* 7, 4221-4229
6. Szekely,A.M., Barbaccia,M.L., Alho,H., and Costa,E. (1989) *Mol. Pharmacol.* 35, 401-408
7. Hai,T., and Curran,T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3720-3724

58 NMDA感受性[^{3}H]グルタミン酸結合蛋白質の可溶化および部分精製

荻田喜代一、鈴木竹雄、韓大健、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕

ラット脳のN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプター複合体の可溶化および精製を[^{3}H]グルタミン酸(Glu)結合を指標として試みた。本可溶化標品中の[^{3}H]Glu結合には、NMDA感受性成分と非感受性成分が存在した。NMDA非感受性成分はDL-α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate(AMPA)およびkainate(KA)に感受性を持っていた。本可溶化標品から陰イオン交換クロマトグラフィーにより[^{3}H]Glu結合蛋白質(GAPS)の精製を試みたところ、5種類のGAPS画分（画分Ⅰ～Ⅴ）が得られた。画分Ⅰはquisqualate(QA)感受性であるが、NMDA、AMPAおよびKAのいずれにも非感受性であった。一方、画分Ⅱ～ⅤはAMPA、KAおよびNMDAに感受性を持ち、それらの中で画分ⅡはAMPA・KA感受性成分の割合が高いのに対して、画分Ⅲ～ⅤはNMDA感受性成分の割合が比較的高いことが判明した。以上の結果から、可溶化標品中には数種のGAPSが存在し、画分Ⅲ～Ⅴ中にNMDAレセプター複合体が存在する可能性が示唆される。

イオノトロピック型興奮性アミノ酸レセプターは、NMDAの感受性によりNMDAレセプターとnon-NMDAレセプターに分類される。さらにnon-NMDAレセプターは、AMPA感受性レセプターとKA感受性レセプターに分類されている(5)。その中でnon-NMDAレセプターに関しては、レセプター蛋白質の単離・精製(4)および遺伝子のクローニング(7,1)が成功し、レセプターの全貌が明らかになりつつある。一方NMDA感受性レセプターについては、その可溶化が[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合を指標として成功している(6)が、レセプター蛋白質の精製や遺伝子のクローニングに関する報告は見当たらないのが現状である。本研究では、NMDA感受性[^{3}H]Glu結合を指標としてNMDAレセプター複合体の可溶化および部分精製を試みた。

〔実験方法〕

ラット脳をEDTA、PMSFおよびbacitracinを含む50 mMトリス酢酸緩衝液(pH 7.4)でホモジナイズした後、50,000g、30分間の遠心分離操作により膜標品を得た。この膜標品を同緩衝液で3回洗浄した後、20%グリセリンを含む上記緩衝液に懸濁して-80℃で凍結保存した。膜標品は1% DOCで可溶化され、200,000g、60分間の遠心分離により上清を得た。この上清を20%グリセリンを含む上記緩衝液で平衡化したSephadex G-25カラムに適用し、得られた蛋白質画分に0.2% Triton X-100を添加したものを可溶化標品とした。この可溶化標品をDEAE-Toyopearl 650Mカラムに吸着させ、0.05、0.1、0.2、0.3、および0.5 M KClを用いたステップワイズ法により蛋白質を溶出した。この各溶出画分について蛋白質含量および[^{3}H]Glu結合を測定した。[^{3}H]Glu結合の測定は、試料蛋白質と10 nM [^{3}H]Gluを氷水中で60分間反応させた後、1%ポリエチレンイミンで前処理したWhatman GF/Bグラスフィルターを用いた迅速吸引濾過法により反応を停止して行った。

〔結果〕

本実験条件下の可溶化標品中には、NMDAアゴニスト、グリシン(Gly)およびポリアミンに感受性を持つ[^{3}H]MK-801結合部位が存在する(5)。さらに、本標品中のNMDA感受性[^{3}H]Glu結合および[^{3}H]Gly結合を測定したところ、ともに蛋白質量依存性の特異的結合が検出された(図1)。[^{3}H]Glu結合に対するアゴニストの効果を検討したところ、NMDA、AMPAおよびKAはいずれも濃度依存的に結合を阻害したが、10^{-4} MのNMDA、AMPAあるいはKAの添加時でもそれぞれ40.8±3.7%、58.2±3.7、51.9±4.8の結合が残存していた。NMDA(10^{-4} M)存在下の結合は、Glu、AMPAおよびKAにより完全に阻害された[IC_{50}値(μM)：Glu, 0.17±0.05; AMPA, 6.90±1.12; KA, 0.014±0.006]が、NMDAアンタゴニストの(±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonate(CPP)およびD-2-amino-5-phosphonovalerate(D-AP5)では阻害されなかった。一方、AMPA(10^{-4} M)あるいはKA(10^{-4} M)存在下の結合は、いずれもGlu、NMDA、CPPおよびD-AP5より阻害された[AMPA存在下のIC_{50}値(μM)：Glu, 0.055±0.014; NMDA, 6.60±1.45; CPP, 3.90±1.90; D-AP5, 2.73±0.83；KA存在下のIC_{50}値(μM)：Glu, 0.056±0.008; NMDA, 3.58±

図1. 可溶化標品中の[^{3}H]Glu結合および[^{3}H]Gly結合

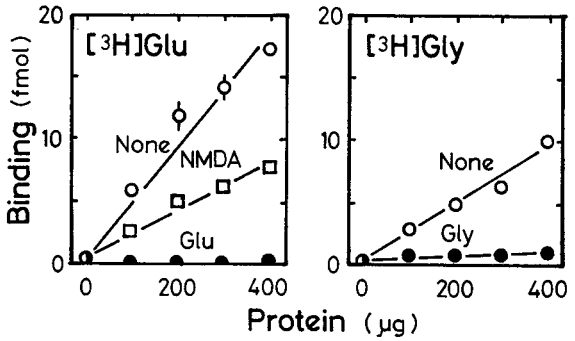


図2. DEAE-Toyopearlカラムクロマトグラフィー

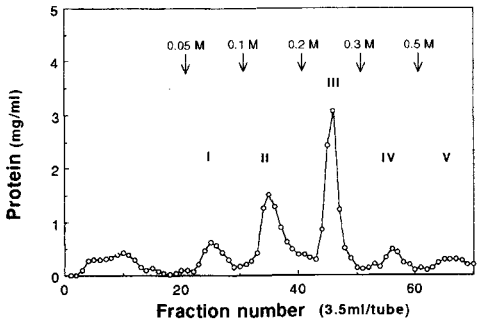


表1. DEAE-Toyopearlカラムクロマトグラフィー溶出画分の[^{3}H]Glu結合

画分	[^{3}H]Glu結合			
	None	NMDA	AMPA	KA
	fmol (%)			
I	483 (100)	499 (103)	594 (123)	499 (103)
II	410 (100)	337 (82)	97 (24)	137 (33)
III	1606 (100)	630 (39)	867 (54)	919 (57)
IV	396 (100)	146 (37)	224 (57)	177 (45)
V	315 (100)	155 (49)	168 (53)	156 (50)

0.73; CPP, 6.58±3.61; D-AP5, 1.48±0.66]。また、AMPAあるいはKA存在下の結合はそれぞれKAおよびAMPAでは著変を受けなかった。次に、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製を試みたところ、0.05、0.1、0.2、0.3および0.5 M KClのすべての溶出画分に[^{3}H]Glu結合が検出され、それぞれ画分Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、ⅣおよびⅤとした(図2)。画分Ⅰの結合はNMDA、AMPAあるいはKAのいずれの添加でも阻害されず、QAでのみ阻害された。一方、画分Ⅱ～Ⅴの結合はすべてのアゴニストにより阻害された。その中で画分ⅡはNMDAによる阻害が比較的微弱であるのに対して、画分Ⅲ～ⅤではNMDAによる阻害成分の割合が比較的高いことが判明した(表1)。

〔考察〕

本研究において、NMDA感受性GAPSの可溶化および部分精製に成功した。以前に報告されたGlu結合蛋白質(GBP)(2)および[^{3}H]CPP結合蛋白質(3)はいずれもNMDAに非感受性であることから、本NMDA感受性GAPSと異なることは明白である。本可溶化標品中にはNMDA感受性GAPS以外にNMDA非感受性(AMPA・KA感受性)GAPSも存在する。このNMDA非感受性GAPSはKAの感受性が極めて高いことからKA結合蛋白質である可能性が考えられる。しかしながら、現時点ではNMDA感受性GAPSと非感受性GAPSの完全な分離には成功していないことから、両GAPSが異種蛋白質であるか否かは不明である。さらに、現在のところ画分Ⅲ～ⅤのGAPSは極めて類似した性質であり、これらのGAPSが同一蛋白質であるか否かについても今後の詳細な解析が望まれる。

〔謝辞〕

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(03771799)の援助のもとに行われた。

〔文献〕

1. Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfild, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C. and Heinemann, S. (1990) Science 249, 1033-1037.
2. Chen, J-W., Cunningham, M.D., Galton, N. and Michaelis, E.K. (1988) J. Biol. Chem. 263, 417-426.
3. Cunningham, M.D. and Michaelis, E.K. (1990) J. Biol. Chem. 265, 7768-7778.
4. Hampson, D.R. and Wenthold, R.J. (1988) J. Biol. Chem. 263, 2500-2505.
5. Monaghan, D.T., Bridges, R.J. and Cotman, C.W. (1989) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 365-402.
6. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1990) J. Neurochem. 55, 1515-1520.
7. Wada, K., Dechesne, C.J., Shimasaki, S., King, R.G., Kusano, K., Buonanno, R., Hampson, D.R., Hunter, C., Banner, C. and Wenthold, R.J., (1990) Nature 342, 684-689.

59 微生物由来の新規ＮＭＤＡアンタゴニスト・ＥＳ－２４２－１のラット小脳におけるｃＧＭＰ産生に及ぼす影響

土岐　真一郎、野沢　美香、松田　譲

（協和発酵・東京研）

〔要約〕

ＳＤ系ラット小脳切片をＮＭＤＡまたはＬ－グルタミン酸で処理すると、組織切片内のｃＧＭＰ量は２～５倍有意に増加した。この増加は、ヘモグロビン、ニトロアルギニン、メチレンブルーにより抑制された。ＮＭＤＡアンタゴニストＥＳ－２４２－１は０．０１～１０μＭの濃度範囲でＮＭＤＡおよびグルタミン酸によるｃＧＭＰ量の上昇を濃度依存的に抑制した。小脳切片内のｃＧＭＰ量はカイニン酸またはニトロプルシッドによっても有意に増加したが、この増加は１０μＭのＥＳ－２４２－１添加によっても影響を受けなかった。以上の結果より、ＥＳ－２４２－１はＮＭＤＡレセプターを介した細胞内のｃＧＭＰ産生をレセプターレベルで特異的に抑制することが明かとなった。

【目的】　ラット小脳において、ＮＭＤＡレセプター活性化による内皮由来血管弛緩因子（ＥＤＲＦ）の産生を介したｃＧＭＰ量の増加が見られることが知られている（１）。我々は、最近、微生物培養液より新規ＮＭＤＡアンタゴニストＥＳ－２４２－１（図１）を単離した（２、３）。ＥＳ－２４２－１の組織での作用特異性を検討するために、ラット小脳切片を用いて各種薬剤によるｃＧＭＰ産生に対するＥＳ－２４２－１の影響を検討した。

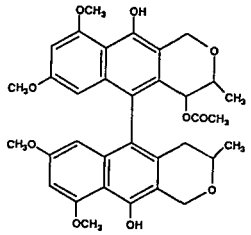
【方法】　実験はGarthwaiteらの方法（４、５）に準じて行った。　８ないし９日令ＳＤラットを断頭し、　Krebs-Henseleit液中ですばやく脳を摘出した。小脳を分離し、手術用メスを用いて切り分け０．５～０．８ｍｍ厚の切片を作成した。この切片をさらに約２×２ｍｍの大きさに切断し実験に用いた。作成した小脳切片は９５％O_2／５％CO_2ガスで置換しながら３７℃、２時間Krebs液中でインキュベートした後、各種薬剤を添加したKrebs液中で３７℃、５分間（ＮＭＤＡ、Ｌ－グルタミン酸、ニトロプルシッド添加時）ないし３分間（カイニン酸添加時）インキュベートした。切片を沸騰水浴中で５分間煮沸することにより反応を停止後、ホモジナイザーによる破砕、凍結融解を行い抽出液を得た。抽出液中のｃＧＭＰ量をラジオイムノアッセイ法を用いて定量した。蛋白量はbicinchoninic acidを用いた蛋白定量法に従い定量した。

【結果】　ＮＭＤＡ（１００μＭ）またはＬ－グルタミン酸（３ｍＭ）添加により小脳切片中のｃＧＭＰ量は２～５倍増加した。このｃＧＭＰ量の上昇はヘモグロビン（１ｍｇ／ｍｌ）、ニトロアルギニン（５０μＭ）、メチレンブルー（２０μＭ）により有意に抑制された。ＥＳ－２４２－１（０．０１～１０μＭ）はＮＭＤＡ（１００μＭ）およびＬ－グルタミン酸（３ｍＭ）によるｃＧＭＰ産生をともに濃度依存的に抑制した（図２）。組織内のｃＧＭＰ量は１００μＭのカイニン酸もしくは１０μＭのニトロプルシッドを添加することによってもそれぞれ約２倍および約２０倍上昇した。これらのｃＧＭＰ産生の増大に対し１０μＭのＥＳ－２４２－１は全く無効であった（図３）。

【考察】　小脳組織内でのＮＭＤＡ、Ｌ－グルタミン酸によるｃＧＭＰ産生は文献値（１）と比較して１／１０～１／２０と低かった。これは手動による切片作成のために十分薄い標品が得られず薬剤の浸透性が悪かったためと考えられる。しかしながら、ヘモグロビン、ニトロアルギニン、メチレンブルーによるｃＧＭＰ産生の抑制が認められたためこの実験系がＥＳ－２４２－１の評価に十分に耐えうるものと考え実験を進めた。ＥＳ－２４２－１がＮＭＤＡおよびＬ－グルタミン酸によるｃＧＭＰ産生を抑制し、カイニン酸やニトロプルシッドによる産生を全く阻害しなかったことよりＥＳ－２４２－１は非ＮＭＤＡレセプターや可溶型グアニル酸シクラーゼには作用せず、ＮＭＤＡレセ

プターに特異的に作用するものと考えられる。ＥＳ－２４２－１のＥＤＲＦ合成酵素に対する作用については未検討であるが、放射性リガンドを用いた結合実験においてＥＳ－２４２－１がＮＭＤＡレセプターに特異的に作用するという結果（２、３）からも、ＥＳ－２４２－１はＮＭＤＡレセプターを介したｃＧＭＰ応答をレセプターレベルで抑制するものと考えられる。

（A）



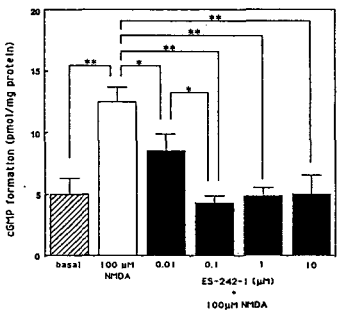
（B）

Radioligands	IC50(μM)
[^{3}H] MK-801	0.066±0.017
[^{3}H] CGS19755	1.06 ±0.4
[^{3}H] glycine	>10
[^{3}H] AMPA	>10
[^{3}H] KA	>10
[^{3}H] 3-PPP	>10

図１、ＥＳ－２４２－１の構造と各種リガンド結合阻害活性

（A）ＥＳ－２４２－１の構造（B）グルタミン酸レセプターリガンドまたはσ－オピオイドレセプターリガンドのラット大脳粗シナプス膜標品への結合に対するＥＳ－２４２－１の阻害活性

（A）



（B）

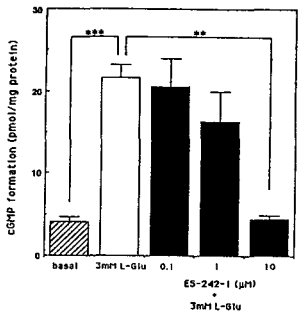
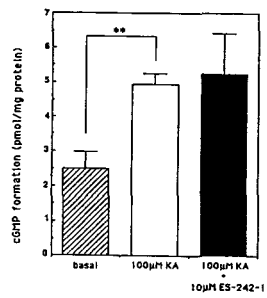


図２、ＮＭＤＡおよびグルタミン酸によるｃＧＭＰ産生に対するＥＳ－２４２－１の影響

小脳切片を１００μＭＮＭＤＡ（A）または３ｍＭグルタミン酸（B）で刺激した。error barは標準誤差を表す。

*;p≦0.05、**;p≦0.01、***;p≦0.001

（A）



（B）

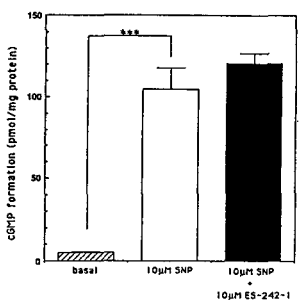


図３、カイニン酸、ニトロプルシッドによるｃＧＭＰ産生に対するＥＳ－２４２－１の影響

小脳切片を１００μＭカイニン酸（A）または１０μＭニトロプルシッド（B）で刺激した。error barは標準誤差を表す。**;p≦0.01、***;p≦0.001

【参考文献】(1)J. Garthwaite et al (1988) Nature 336 385-388 (2)土岐　真一郎、野沢　美香、松田　譲 (1991) 第６４回　日本生化学会大会予稿集（印刷中）(3)土岐　真一郎ら　(1991) 第１回　国際アミノ酸研究会議予稿集（印刷中）(4)J. Garthwaite and R. Balazs (1978) Nature 275 328-329　(5)J. Garthwaite and G. Garthwaite (1987) J. Neurochem. 48 29-39

60 2価カチオンによる NMDAレセプター複合体の調節機序

韓大健、榎本理世、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)感受性イオンチャネルの活性化状態の指標である[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合に対するCa^{2+}、Mg^{2+}およびZn^{2+}の影響について検討を加えた。未処理膜標品を用いた場合、Ca^{2+}およびMg^{2+}はアミノ酸類無添加の結合を有意に増強したが、Zn^{2+}は結合を著明に阻害した。Ca^{2+}は平衡状態の結合に著変を与えることなく結合の初速度を増大させた。一方、Mg^{2+}は結合速度を増大させたが、平衡状態の結合を減少させることが判明した。Ca^{2+}存在下では、グリシン(Gly)による結合増強作用は全く認められなかった。以上の結果より、Ca^{2+}、Mg^{2+}およびZn^{2+}はそれぞれ異なった機構によりNMDAレセプターイオノフォア複合体を調節することが示唆される。さらに、Ca^{2+}はGly認識部位を介して本複合体の機能を調節する可能性が推察される。

興奮性アミノ酸のサブタイプの一つであるNMDA感受性レセプターは、少なくとも4種類のサブコンポーネントから構成されるレセプターイオノフォア複合体であると考えられる(6)。すなわち、1)イオンチャネル部位、2)NMDA認識部位、3)Gly認識部位(GlyB部位)、および4)ポリアミン部位である。本複合体は、その活性化に伴いNa^+およびK^+の透過性を亢進するばかりでなく、Ca^{2+}の著明な透過性亢進が招来される。このNMDAチャネルの活性化は、生理的濃度(1～2 mM)のMg^{2+}およびZn^{2+}によりそれぞれ膜電位依存性および非依存性に抑制されることが電気生理学的に示されている(1)。一方[^{3}H]MK-801結合もまた、これらの2価カチオンにより調節を受けていることが知られている(3)。しかしながら、この2価カチオンの作用は用いる膜標品の調製法の相違により異なった挙動が見られ、統一的見解が未だ得られていないのが現状である。したがって本研究では、これらの2価カチオンのNMDAレセプターイオノフォア複合体に対する調節機序を追究する目的で、[^{3}H]MK-801結合に対する2価カチオンの作用を詳細に検討した。

［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 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)を用いて、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(非洗浄膜標品)、上記洗浄操作をさらに3回行った後、実験当日に上記緩衝液で2回洗浄した膜標品(未処理膜標品)、および同様に3回の洗浄操作行った後、実験当日に0.08% Triton X-100で前処理した膜標品(トリトン処理膜標品)(2)を結合実験に供した。結合実験は、いずれかの膜標品と5 nM [^{3}H]MK-801を50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)中で、30℃、30分間反応させて行った。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い、フィルター上の放射活性を液体シンチレーション法により計測した。

［結果］

非洗浄膜標品を用いた場合、Ca^{2+}およびMg^{2+}はともにスペルミジン(SPD)存在下および非存在下の結合を高濃度(10^{-2} M)で阻害した。また、Zn^{2+}は10^{-4} M以上の濃度で結合阻害作用を発揮した。未処理膜標品の場合、Ca^{2+}およびMg^{2+}はアミノ酸類無添加時の結合を10^{-4} M以上の濃度で濃度依存的に増強したが、グルタミン酸(Glu)、GlyおよびSPD存在下の結合を有意に阻害した(表1)。一方、Zn^{2+}はいずれの場合にも結合を著明に阻害した(表1)。トリトン処理膜標品では、Ca^{2+}はGlu単独存在下の結合を増強させたが、GluおよびGly共存下の結合には著変を与えず、Glu、GlyおよびSPD共存下の結合は有意に阻害した。また、Mg^{2+}はいずれの条件においても高濃度(10^{-2} M)で結合を阻害した。Zn^{2+}はいずれの条件下においても強力な阻害作用を発揮した。次に、未処理膜標品を用いてアミノ酸類の無添加条件下における反応速度論的解析を行った。イオン無添加の場合には、結合が平衡状態に到達するのに約5時間を要し、この平衡状態は少なくとも反応開始後16時間まで持続した。Ca^{2+}の添加(10^{-3} M)は結合の初速度を増大したが、平衡状態の結合には有意な変化を与えなかった。これに対して、Mg^{2+}(10^{-3} M)は同様に

表1　各種2価イオンの影響

Ion (M)	[^{3}H]MK-801 binding (% of Control) None	Glu/Gly/SPD
Ca^{2+}		
10^{-5}	102.4±4.4	101.0±2.3
10^{-4}	132.4±7.4*	102.1±6.5
10^{-3}	154.9±6.9**	79.5±7.5*
10^{-2}	130.8±7.6*	46.6±3.7**
Mg^{2+}		
10^{-5}	116.1±4.6	100.5±1.2
10^{-4}	138.3±9.1*	96.5±1.0
10^{-3}	140.5±6.1**	74.8±1.0**
10^{-2}	103.4±8.3	23.3±0.8**
Zn^{2+}		
10^{-5}	64.8±9.3*	98.4±1.5
10^{-4}	25.3±3.3**	76.7±2.5**
10^{-3}	17.8±2.1**	35.5±2.5**
10^{-2}	15.2±3.4**	5.5±0.8**

表2　グリシンの増強に対するCa^{2+}の影響

Gly (M)	[^{3}H]MK-801 binding (fmol/mg protein) None	10^{-3}M Ca^{2+}
0	321±13	379±16
10^{-8}	361± 7*	374± 6
10^{-7}	352±12	372±10
10^{-6}	375±12*	377±13
10^{-5}	374±17*	378±11
10^{-4}	386±16*	369±13

結合の初速度を増加させたが、平衡状態の結合をイオン無添加の場合の約70%に低下させた。一方、Zn^{2+}(10^{-3} M)存在下の結合はいずれの反応時間でも極めて低いことが明らかとなった。結合が充分に平衡状態に到達した反応時間16時間の時点で非放射性MK-801(10^{-4} M)を添加したところ、Zn^{2+}存在下では結合の解離はほとんど見られないのに対して、Mg^{2+}およびCa^{2+}はともに結合解離速度の増大を惹起した。未処理膜標品への本結合はGlu存在下にGlyの添加で有意に増強されるが、Ca2+の添加はGly無添加時の結合を増強することによりGlyの結合増強作用を消失させた(表2)。

［考察］

本研究において、Mg^{2+}およびCa^{2+}の[^{3}H]MK-801結合に対する効果は用いた膜標品により異なるが、Zn^{2+}の阻害作用はいずれの膜標品を用いても著明に観察されることが明らかとなった。Mg^{2+}とCa^{2+}はともに結合初速度の増加を誘発するが、平衡状態の結合に対する作用が明らかに異なる。この事実は、Mg^{2+}とCa^{2+}のNMDAレセプターイオノフォア複合体に対する作用が異なることを示唆するものである。本研究におけるCa^{2+}の作用は[^{3}H]MK-801結合に対するGlyの作用と極めて高い類似性を示している(7)。さらに、Ca^{2+}がGlyの[^{3}H]MK-801結合増強効果を消失させるという事実は、Ca^{2+}の[^{3}H]MK-801結合に対する作用がGlyB部位を介して発揮する可能性を支持するものである。しかしながら、Ca^{2+}はGlyB部位を反映する[^{3}H]Gly結合に対する直接作用を持たないこと(3)や、[^{3}H]MK-801結合が種々のCa^{2+}受容蛋白質やその阻害剤により調節を受けること(5)などから、最終的結論を導くためには今後の詳細なる検討が望まれる。

［謝辞］

本研究の一部は、平成3年度ヒューマンサイエンス基礎研究事業委託費の援助のもとに行われた。

［文献］

1. Ascher, P. and Nowak, L. (1987) Trends Neurosci. 10, 284-288.
2. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153, 510-517.
3. Ogita, K, Suzuki, T. and Yoneda, Y. (1989) Neuropharmacology 28, 1263-1270.
4. Reynold, I.J. and Miller, R.J. (1988) Eur. J. Pharmacol. 151, 103-112.
5. 鈴木竹雄、荻田喜代一、米田幸雄 (1990) 神経化学 29(1), 202-203
6. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1991) Neurosci. Res. 10, 1-33.
7. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T. (1990) J. Neurochem. 55, 237-244.

61　海馬と小脳のNMDAレセプター複合体の相違

米田幸雄、荻田喜代一
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕

ラット脳の海馬および小脳のN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプター複合体の相同性あるいは相違性を解析する目的で、NMDA感受性[^{3}H]グルタミン酸(Glu)結合部位およびストリキニーネ非感受性[^{3}H]Gly結合部位の性質を比較検討した。海馬と小脳の[^{3}H]Glu結合および[^{3}H]Gly結合はともに、その親和力には有意差は認められなかったが、最大結合密度が著明に異なっていた。両部位の[^{3}H]Glu結合はともに、NMDAおよび競合的NMDAアンタゴニストにより阻害されたが、NMDAアンタゴニストによる結合阻害作用は小脳より海馬に対する方が強力であった。それに対して、NMDAアゴニストの結合阻害強度には両部位間で差異は見られなかった。Gly、D-セリン(D-Ser)およびD-アラニン(D-Ala)は両部位の[^{3}H]Gly結合を同等度に阻害した。また、7-chlorokynurenate(7-ClKYNA)の[^{3}H]Gly結合阻害作用は海馬の方が小脳より強力であったが、6,7-dichloroquinoxaline-2,3-dione(DCQX)および3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone(HA-966)の阻害作用には両部位間で著変は見られなかった。以上の結果より、海馬と小脳のNMDAレセプター複合体は、そのNMDA認識部位およびGly認識部位の性質が異なる可能性が示唆される。

イオノトロピック型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、イオンチャネル部位、NMDA認識部位、Gly認識部位(GlyB部位)およびポリアミン部位の少なくとも4種類のサブコンポーネントが複合体を形成して機能すると理解されている(3)。すなわち、NMDAチャネルの開放には、NMDA認識部位およびGlyB部位の活性化が必須であり(4)、さらにスペルミジンやスペルミンなどの内在性ポリアミンは、NMDAチャネルの開放を著明に増強することが示唆されている(5)。一方NMDAチャネルには、非競合的アンタゴニスト結合部位、Mg^{2+}親和性部位およびZn^{2+}親和性部位の3種類のチャネル開放抑制部位が存在する。このようにNMDAレセプター複合体は多くの異なった部位によりレセプター機能の調節を受けている。本研究では、海馬と小脳におけるNMDA認識部位およびGlyB部位の相同性あるいは相違性を検索する目的で、両部位のシナプス膜標品への[^{3}H]Glu結合および[^{3}H]Gly結合の性質を比較検討した。

〔実験方法〕

膜標品の調製：Wistar系雄性ラットの海馬および小脳のそれぞれから調製した粗シナプス膜標品を50 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)を用いて3回洗浄した。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後、0.08% Triton X-100による前処理を2℃で10分間行った。前処理後、上記洗浄操作をさらに2回行った膜標品を結合実験に供した。

結合実験：[^{3}H]Glu結合および[^{3}H]Gly結合の測定は、それぞれ10 nM [^{3}H]Gluおよび10 nM [^{3}H]Glyと膜標品を氷水中で10分間反応させた後、Whatman GF/Bグラスフィルターを用いた迅速吸引濾過法より反応を停止して行った。

〔結果〕

海馬と小脳において、[^{3}H]Glu結合の解離定数(Kd値)には有意差が見られないが(海馬：40.4±2.2 nM、小脳：43.2±5.3)、最大結合密度(Bmax値)はそれぞれ2.42±0.07 fmol/mg proteinおよび0.25±0.04であった。両部位の[^{3}H]Glu結合に対するNMDAアゴニストおよび競合的NMDAアンタゴニストの影響を検討したところ、アゴニストであるGluおよびNMDAは両部位の結合を同等度に阻害するのに対して、競合的NMDAアンタゴニストの(±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonate(CPP)、D-2-amino-5-phosphonovalerate(D-AP5)およびD-2-amino-7-phosphonoheptanoate(D-AP7)は、いずれも小脳より海馬の結合を強力に阻害することが判明した。一方、6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione(CNQX)および6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione(DNQX)の[^{3}H]Glu結合阻害作用は、小脳の結合に対する方が強力であったが、6,7-dichloro-3-hydroxy-2-quinoxaline-carboxylate(DHQXC)および7-ClKYNAは両部位の[^{3}H]Glu結合を同等度に阻害した(表1)。海馬および小脳の膜標品への[^{3}H]Gly結合部位は、Scatchard解析により算出されたKd値に有意差は認められず(海馬：101±10 nM、小脳：155±59)、Bmax値が

表1. NMDA感受性[^{3}H]Glu結合

Drug	IC_{50} (μM)	
	Hippocampus	Cerebellum
Glu	0.024±0.002	0.023±0.002
NMDA	1.82 ±0.15	2.77 ±0.41
CPP	0.65 ±0.07	25.8 ±4.5
D-AP5	0.54 ±0.06	3.79 ±0.51
D-AP7	2.10 ±0.08	37.5 ±6.8
CNQX	>100	16.2 ±1.9
DNQX	>100	21.4 ±3.9
DHQXC	47.2 ±2.7	39.7 ±4.1
7-ClKYNA	88.8 ±7.2	71.8 ±9.9

表2. ストリキニーネ非感受性[^{3}H]Gly結合

Drug	IC_{50} (μM)	
	Hippocampus	Cerebellum
Gly	0.080± 0.019	0.074±0.009
D-Ser	0.16 ± 0.02	0.20 ±0.03
D-Ala	0.66 ± 0.14	0.53 ±0.08
ACPC	0.19 ± 0.03	4.12 ±0.55
CNQX	11.14 ± 2.67	>100
DNQX	2.52 ± 0.62	2.77 ±0.55
DCQX	0.89 ± 0.19	0.87 ±0.21
DHQXC	1.24 ± 0.28	5.41 ±0.53
HA-966	10.4 ± 1.5	10.6 ±2.1
KYNA	37.5 ±10.9	>100
7-ClKYNA	0.69 ± 0.11	5.38 ±1.14

著明に異なることが判明した(海馬：2.75±0.32 fmol/mg protein、小脳：0.93±0.29)。また、両脳内部位の[^{3}H]Gly結合に対するGlyB部位のアゴニストおよびアンタゴニストの効果を検討したところ、アゴニストの中で1-aminocyclopropane carboxylate(ACPC)は海馬の結合に対して小脳の場合の約20倍強力な阻害作用を発揮したが、Gly、D-SerおよびD-Alaはいずれも両部位間でその阻害作用に差異は見られなかった。またGlyBアンタゴニストの中で、7-ClKYNA、kynurenate(KYNA)、CNQXおよびDHQXCはいずれも海馬において小脳より強力な結合阻害作用を発揮した。一方、DCQX、HA-966およびDNQXの結合阻害強度は両部位間で差異は見られなかった(表2)。

〔考察〕

海馬と小脳のNMDAレセプター複合体の相違については、キノリン酸(2)およびポリアミン(6)の感受性の相違が報告されている。すなわち、海馬の本レセプター複合体はキノリン酸およびポリアミンに高い感受性を持つのに対して、小脳の場合はいずれにも非感受性である。これらの事実から、小脳と海馬のNMDAレセプター複合体をそれぞれ" NMDA1" および" NMDA2" と区別することが提唱されている(6)。本研究では、それらの相違に加えてNMDA認識部位およびGlyB部位の性質が異なる可能性を示した。特に、NMDA感受性[^{3}H]Glu結合のNMDAアンタゴニストの感受性が海馬と小脳で異なることから、アンタゴニスト型NMDA認識部位が海馬と小脳で異なることが推察される。事実オートラジオグラフィー法による研究(1)で、小脳では海馬に比べてアンタゴニスト型NMDA認識部位が多い可能性が示されている。以上のように、本レセプター複合体には脳内部位による多様性の存在が示唆されるが、今後の本レセプター複合体の分子生物学的研究が多様性の全貌を解明することを期待したい。

〔謝辞〕

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(03671074)の援助のもとで行った。

〔文献〕

1. Monaghan, D.T., Olverman, H.J., Nguyen, L., Watkins, J.C. and Cotman, C.W. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 9836-9840.
2. Perkinson, M.N. and Stone, T.W. (1983) Brain Res. 259, 172-176.
3. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1991) Neurosci. Res. 10, 1-33.
4. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 164, 841-849.
5. Yoneda, Y., Ogita, K. and Enomoto, R. (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther. 256, 1161-1172.
6. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1990) NMDA Receptor Related Agents: Biochemstry, Pharmacology and Behavior (eds Kameyama, T., Nabeshima, T. and Domino, E.F.) pp. 29-44.

62 NMDA受容体非共役フェンサイクリジン（PCP）結合部位の脳内分布

山本敏文、加藤武、山本秀子*、諸治隆嗣*
（横浜市大・総合理学分子認識、東京都精神医学総合研究所・精神薬理*）

〔要約〕

NMDA受容体に共役していないフェンサイクリジン(PCP)結合の脳内分布を調べるために[^{3}H]3-OH PCPをリガンドとして大脳皮質、海馬、線条体、視床下部、中脳、橋と小脳から得た膜標品で結合実験を行った。特異的[^{3}H]3-OH PCP結合はすべての部位で25℃、60分で平衡に達し、4℃では120分でも平衡には達しなかった。結合のScatchard解析の結果、中脳を除き他の部位でNMDAアンタゴニストのD-AP5(10μM)の添加により高親和性と低親和性結合の二成分が観察された。グルタミン酸(Glu)およびグリシン(Gly)(10μM)の添加で低親和性結合が失われ高親和性結合成分が増加したことから、NMDA受容体共役型PCP部位が[^{3}H]3-OH PCPの低親和性結合成分と示唆された。D-AP5存在下で調べたNMDA受容体非共役型の結合の脳内分布は大脳皮質が最も高く、海馬、線条体がその1/3と次いで高く、一方で中脳と小脳は有意に検出できなかった。視床下部ではGlu/Gly存在下でも二成分観察されNMDA受容体非共役型が優勢であった。これらの結果は、[^{3}H]3-OH PCPの高親和性結合として検出されるNMDA受容体非共役型結合の分布がNMDA受容体/イオンチャンネル複合体に共役したPCP部位の分布と異なっていることを強く示唆している。

フェンサイクリジン(PCP)は、ヒトで精神分裂病様の精神障害を惹起することや精神分裂病を増悪させることが知られており、その作用部位、作用機構を明らかにすることが病因・病態を解明するために必要とされている。これまでの研究によりPCPの作用部位としてNMDA受容体イオンチャンネル複合体のチャンネル内部に位置して負のアロステリック作用を示す結合部位がよく調べられている(1)一方で、NMDA受容体とは共役していないPCP結合部位についてもσ受容体、ドーパミン取り込み部位などが示唆されているものの(2,3)その実体はまだ明かではない。[^{3}H]PCPやその誘導体の[^{3}H]TCPを使った結合実験により親和性の異なる複数の結合部位の存在を示す報告があり、NMDA受容体共役型高親和性PCP結合部位と非共役型低親和性PCP結合部位の二つが考えられている(4)。前者は大脳皮質、海馬、線条体に多く存在し、後者は小脳、脳幹、視床下部に多く存在する。しかしながらNMDA受容体非共役型PCP結合部位に対するPCPの親和性は低く、この部位が行動異常を惹き起こすPCPの作用部位である可能性は低いと思われている。しかし、最近Itzhakは強力な作用を持つPCP誘導体の一つである3-hydroxyphenyl PCP(3-OH PCP)の^{3}H標識体を用いて、NMDA受容体に共役していない高親和性結合とNMDA受容体に共役した低親和性結合を見いだし、前者を高親和性PCP/ハロペリドール非感受性σ受容体部位であると報告した(5)。現在σ受容体と関連のあるPCP結合部位としての存在と役割に興味が持たれている。本研究は、まだ詳細に調べられていないこの新規リガンド、[^{3}H]3-OH PCPの結合特性を詳細に検討することとともに[^{3}H]3-OH PCP結合の脳内分布を明らかにすることを目的として行った。

【実験方法】

Wistar系雄性ラット(250-300 g)を用い、脳内各部位から調製した粗シナプス膜標品を、5 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)で2回洗浄した後、同一bufferに懸濁し(0.8-1.5 mg protein/ml)結合実験に用いた。[^{3}H]3-OH PCP結合実験は、膜標品と2 nM [^{3}H]3-OH PCP(799.2 GBq/mmol) を 5 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 中で25℃60分間反応させた。反応はMinifold(S&S)を用いた迅速な吸引ろ過法により停止しグラスフィルター(#25;S&S)上に捕集された放射活性を測定した。非特異結合の測定は、10 μM 3-OH PCPの存在下で行った。飽和実験は0.125-40 nMの[^{3}H]3-OH PCPを用いて行い、結果はLIGAND(6)を使用して2-siteモデルの統計的解析を行った。

【結果】

大脳皮質、線条体、脳幹及び小脳の粗シナプス膜への2 nM [^{3}H]3-OH PCPの特異的結合の経時変化は、60分でいずれも平衡に達した(Fig.1)。4℃では反応は遅く、120分でもまだ平衡に達しておらずいずれの部位も平衡時の約50-60%の結合量を示した。図に示した様に、結合は大脳皮質、線条体で高く小脳にはほとんど結合していなかった。非特異結合は順に5%,12%29%,77%で、小脳には高親和性の[^{3}H]3-OH PCP結合部位はほとんど認められなかった。また高濃度の1価、2価陽イオンの添加により特異的結合は低下した。飽和結合実験の結果をScatchard解析すると、Table.Iにまとめた様に、グリシン(Gly)、グルタミン酸(Glu)添加時では視床下部を除きいずれも一相性を示したが、NMDAアンタゴニストのD-AP5(10 μM)の添加で高親和性と低親和性の二つの部位が観察された。この結果は、D-AP5によりNMDA受容体共役型の結合の親和性が低下したためと示唆される。視床下部はGlu/Gly添加時においても高親和性と低親和性の両部位が認められ、D-AP5添加時には低親和性部位の結合量が大きく減少した。中脳はD-AP5の添加によっても一相性を示し、Glu/Gly添加時の親和性を低下させた。Fig.2に大脳皮質、海馬および線条体のD-AP5存在下での結合のScatchard解析の結果を示した。いずれの部位も2-siteモデルに有意に適

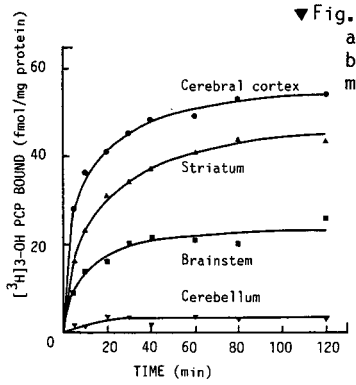
合していた。

【考察】

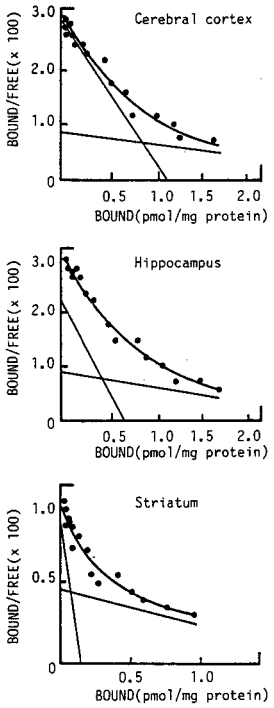
これまでPCPとσ受容体との関連を考えるうえでNMDA受容体と共役していないPCP結合部位に関心が集まってきている中でItzhakらが[^{3}H]3-OH PCPを使い新しい高親和性PCP/σ受容体部位の存在を提唱してきた(5)。このリガンドはNMDA受容体共役型PCP結合部位にも低親和性で結合すると報告されており、両者を区別することが重要である。本研究で明かな様にNMDAアンタゴニストのD-AP5を添加しNMDA受容体共役型PCP結合部位を抑制（親和性を低下させる）することで高親和性PCP/σ受容体部位と低親和性NMDA共役型PCP結合部位を容易に区別することが出来、高親和性PCP/σ受容体部位の脳内分布が明らかとなった。高親和性PCP/σ受容体部位は大脳皮質で最も高く、次いで海馬、線条体で中程度に分布している。特に興味深いのはNMDA受容体と共役したPCP結合部位が少ない視床下部でGlu/Gly存在下でも高親和性PCP/σ受容体部位が明瞭に観察される一方で、中脳にはほとんど低親和性NMDA共役型PCP結合部位しか認められず、D-AP5によってNMDA受容体共役型の結合の親和性だけが低下した(5.5 nM から23 nM)ことである。小脳で高親和性結合が認められないことと併せて、[^{3}H]TCP結合の分布と違いのあることが明らかになった。今回の結果は、[^{3}H]3-OH PCPがNMDA共役型PCP結合部位にも低親和性で結合し、Glu/Gly存在下に高親和性側にシフトし結果として高親和性PCP/σ受容体部位の測定を妨害することを示しており、今後さらにより正確に高親和性PCP/σ受容体部位をみるための最適な条件を検討する必要があると思われる。

【文献】

(1) Kemp,J.A., Foster,A.C., and WONG,E.H.F., Trends Neurosci., 10, 294-298(1987).
(2) Contreras, P.C., Monahan,J.B.,Lanthorn,T.H. et al. Mol. Neurobiol., 1, 191-211(1987).
(3) Vignon,J., Pinet,V., Cerruti,C. et al., Eur. J. Pharmacol., 148, 427-436(1988).
(4) Vignon,J., Chaudieu,I., Allaoua,H. et al., Life Sci., 45, 2547-2555(1989).
(5) Itzhak,Y., Neurosci. Lett., 104, 314-319(1989).
(6) Munson,P.J. and Rodbard,D., Anal. Biochem., 107, 220-239 (1980).



▼Fig. 1. The time course of association of [3H]3OH PCP binding to rat brain membranes.



▶Fig. 2. Equilibrium binding of [3H]3OH PCP to rat brain. Scatchard plot.

Table 1. Regional variation of [^{3}H]3-OH PCP binding in rat brain.

Region	Glu/Gly (10 uM)		D-AP5 (10 uM)			
			high-affinity		Low-affinity	
	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg protein)	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg protein)	Kd (nM)	Bmax (pmol/mgprotein)
Cerebral cortex	5.0 ± 0.7	2.59 ± 0.91	9.8 ± 1.1	1.68 ± 0.75	1700 ± 530	20.8 ± 8.5
Hippocampus	4.9 ± 0.9	3.41 ± 1.35	5.0 ± 1.4	0.671± 0.137	61 ± 3	2.51 ± 0.82
Striatum	5.8 ± 1.3	2.01 ± 0.52	5.8 ± 0.8	0.594± 0.212	110 ± 14	3.03 ± 0.33
Hypothalamus (High)	5.8 ± 0.8	0.597± 0.052	3.0 ± 0.5	0.275± 0.110	73 ± 9	1.35 ± 0.59
(Low)	1340± 250	7.96 ± 1.01				
Midbrain	5.5 ± 0.7	1.32 ± 0.19			23 ± 8	1.24 ± 0.35
Pons	32 ± 11	1.59 ± 0.22	3.5 ± 0.3	0.106± 0.012	970 ± 140	9.04 ± 1.38

63 NMDA受容体を介するDA遊離反応に及ぼす扁桃核キンドリングの影響

大森哲郎、小山　司、中村文裕、王　平、山下　格
北海道大学医学部精神医学教室
060 札幌市北区北15条西7丁目

〔要約〕
最近の電気生理学的研究は、キンドリング形成に伴いNMDA受容体の機能が亢進することを示唆している。また、キンドリングは、ドーパミン(DA)系の機能に影響を与えることも知られている。これらを勘案し、今回我々は、NMDA刺激による線条体切片からのDA遊離反応を指標として、キンドリング過程がNMDA受容体を介したDA放出調節機構に及ぼす影響について検討した。結果は、10uMあるいは100uMのNMDA刺激に対するDA遊離の大きさに、扁桃核キンドリング群と対照群の間に差異は見られなかった。さらに、NMDA受容体と共役するイオンチャンネルに作用点を持つ非競合的拮抗薬 MK-801、あるいはグリシン部位の拮抗薬 7-Cl-キヌレン酸の、DA遊離反応に対する抑制効果においても、両群の間に差はなかった。NMDAによる線条体切片からのDA遊離は主としてDA神経終末上のNMDA受容体を介しているので、以上の結果は、扁桃核キンドリングは少なくともそれら前シナプス性のNMDA受容体機能には影響を与えない事を示唆している。

【緒言】
脳の一定部位に微弱電気刺激を繰り返すと、初めには見られなかった全身痙攣反応を次第に獲得するという現象（キンドリング）は、脳の可塑性のモデルと考えられる。最近の神経生理学的研究は、キンドリング形成後には、グルタミン酸受容体の一亜型であるNMDA受容体の機能が亢進していることを示唆している（２）。一方、キンドリングは、ドーパミン(DA)系の機能に影響を与えることが知られている。たとえば動物の行動を指標にした研究では 、cocaine, apomorphine（５）, methamphetamine（７）あるいはamphetamine（１）によって生じる運動量、常同行動あるいは回転運動が変化すると報告されている。先に我々は、線条体神経終末において、NMDA受容体を介したDA放出調節機構が存在する事を確認している（３）。今回、上記の知見を勘案し、扁桃核キンドリングがこの調節機構に与える影響について検討した。

【方法】
Wistar-King系雄性ラット左扁桃核に、慢性深部電極を挿入手術し、術後５日以上の回復期間を置いた後、100uA, 50Hz,1秒の正弦波刺激を１日２回加えた。最終的にRacine(６)の分類の第５段階の発作を５回以上発現したラットをキンドリング群とし、同様の手術及び通電刺激以外の同様処置を加えたラットを対照群とした。最終発作後６日目から８日目に断頭し、すみやかに脳を取り出し、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 450um厚にスライスし、約10片の線条体切片を、内容積約 100ul 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の恒温槽中において灌流し、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(４)。灌流液の採取は、灌流開始後約60分から6分間隔で行った。基礎遊離量を観察後、灌流液に10uMまたは100uMのNMDAを添加してDA遊離反応の変化を測定した。MK-801(0.1および1uM)及び7-Cl-キヌレン酸(10および100uM)は、NMDA添加の12分前に灌流液に加えた。

【結果と考察】
電気刺激を受けた扁桃核と同側（左側）の線条体においても反対側（右側）においても、10uMあるいは100uMのNMDA刺激に対するDA遊離反応に,キンドリング群と対照群との間に差はなかった（Fig.1及び2)。NMDA認識部位と共役するイオンチャンネル内部に作用点を持つ非競合的拮抗薬MK-801、あるいはアロステリック調節作用を有するグリシン部位の拮抗薬7-Cl-キヌレン酸の100uMのNMDAによるDA遊離反応に対する抑制効果においても、キンドリング群と対照群の間に差はなかった

(Fig.3及び4)。今回の実験系におけるDA遊離は主としてDA神経終末上のNMDA受容体を介していると考えられる(3)。したがって以上の結果は、少なくともDA神経終末上に位置するNMDA受容体においては、扁桃核キンドリングはNMDA認識部位、MK-801結合部位及びグリシン部位のいづれにも影響を与えない事を示唆している。すなわち扁桃核キンドリングは、NMDA受容体を介した線条体DA放出調節機構には影響を与えないものと思われる。

【文献】

1) Mintz,M.et al(1987)Exp. neurol.,96:137-144

2) Mody,I.and Heinemann,U.(1987)Nature, 326:701-704

3) 大森哲郎ら(1990)神経化学, 29:258-259

4) Ohmori,T.et al(1991) Life Sci.,48:283-289.

5) Post,R.M. et al(1981)Psychopharmacol.,72:189-196

6) Racine,R.(1972) Electroenceph. clin. neurophysiol.,32:281-294

7) Sato,M.(1983) Biol. Psychiat.,18:525-536

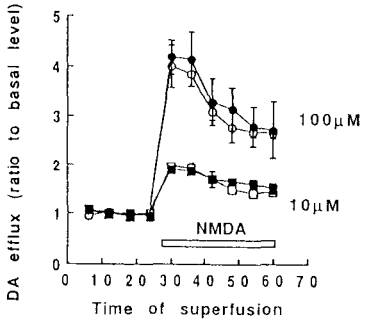


Fig.1 DA efflux induced by NMDA from the left striatal slices of kindled (closed circle and square) and control rats (open circle and square). (n=4).

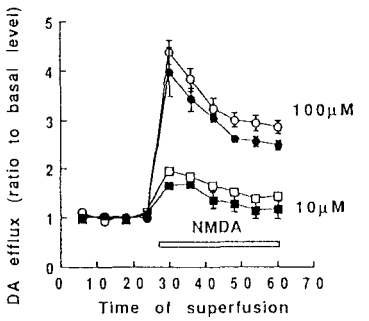


Fig.2 DA efflux induced by NMDA from the right striatal slices of kindled(closed circle and square) and control rats(open circle and square). (n=4).

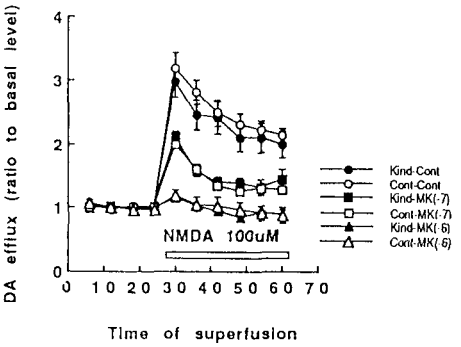


Fig.3 Effects of MK-801(0.1and 1uM) on NMDA-induced DA efflux in kindled and control rats. (n=6-9)

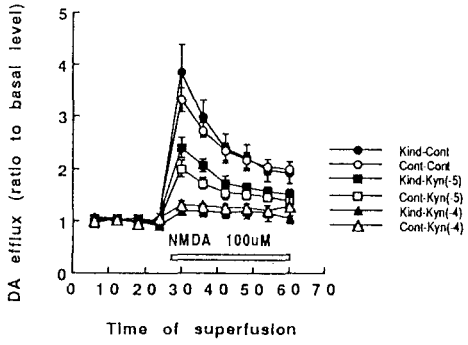


Fig.4 Effects of 7-Cl-kynurenate(10 and 100uM) on NMDA-induced DA efflux in kindled and control rats. (n=5-7)

64 無麻酔無拘束ラットの海馬セロトニン遊離におよぼすclonidineの影響

松本真知子、吉岡充弘、富樫広子、齋藤秀哉

(北海道大学医学部薬理学第一講座)

〔要約〕

セロトニン (5-HT) 作動性神経における神経伝達物質の遊離におよぼすclonidineの影響を *in vivo* microdialysis 法を用いて検討した。無麻酔無拘束ラットの海馬の5-HT遊離量はカリウム (120mM) 刺激により761%まで上昇した。5-HTの主代謝産物である5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) はカリウム刺激により変動しなかった。カリウム刺激により増加した5-HT遊離量は clonidine (10^{-5} M) により有意に抑制された。ノルアドレナリン作動性神経の neurotoxin である 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を前処置したラットにおいても clonidine はカリウム刺激による5-HT遊離を有意に抑制した。以上の結果より、*in vivo* においてラット海馬の5-HT作動性神経終末に存在しているα_2アドレナリン受容体を介して、カリウム刺激による脱分極性5-HT遊離を修飾する機構が存在していることが示唆された。

＜目的＞

中枢神経系の5-HTは神経伝達物質として睡眠、情動、循環調節などに重要な役割を担っている。最近5-HT受容体のサブタイプが数種類に分類されるに従い、5-HT作動性神経の神経伝達物質放出調節機構が詳細に検討されてきている。5-HT作動性神経終末にはオートレセプターの他、α_2アドレナリン受容体、μオピオイド受容体などヘテロレセプターの存在が明らかにされている。脳スライスを用いた*in vitro* の実験では、海馬の5-HTの放出はNE作動性神経によって修飾されている可能性が報告されている(1,2)。しかしながらこれらヘテロレセプターによる5-HT放出調節機構について*in vivo* の報告はほとんどない。

今回の実験は*in vivo* においてα_2アドレナリン受容体による5-HT放出調節機構を解明する目的で、microdialysis法を用い、無麻酔無拘束ラットの5-HT遊離におよぼすclonidineの影響を検討した。解剖学的に縫線核から5-HT作動性神経が、青斑核からNE作動性神経が投射し、互いの神経終末が密に存在していることが知られている海馬に着目した。さらに、NE作動性神経の neurotoxinを用いて5-HT放出調節機構におよぼすclonidineの作用部位についても検討した。

＜方法＞

実験動物は8－12週令のWistar系雄性ラットを用いた。ketamine (100mg/kg, i.p.) 麻酔下で脳定位固定装置を用い、海馬 (rostral-caudal, -5.8mm; lateral, -4.8mm; ventral, -7.0mm from bregma and dura surface)に微小透析 probe を慢性的に埋め込んだ。手術2日後に無麻酔無拘束条件下でRinger溶液を流速2 μl/minで180分間灌流したのち、透析液を回収した。透析液は20分間隔で採取し、ただちにHPLC-ECDにて5-HTならびに5-HIAAを測定した。カリウム (K^+)(120mM)はRinger溶液に、clonidine (10^{-5} M) は K^+-Ringer 溶液に各々溶解し、サンプリング開始40分後に40分間灌流した。6-OHDA (200 μg/rat) は pargyline (25 mg/kg, i.p.) 投与10分後に側脳室内に投与し2週間後に実験に供した。実験終了後断頭し、probeの位置を確認した後、海馬の5-HTおよびNE含量をHPLC-ECDにて測定した(3)。

＜結果と考察＞

本実験条件下での5-HTおよび5-HIAA量の基礎値の平均値は各々26.35 fmol/sampleおよび3.96 pmol/sampleであった。K^+ (120mM) 刺激前値を100%とした百分率変化ではK^+により5-HT遊離量は761%まで有意に上昇した。この5-HTの上昇は clonidine (10^{-5} M)により363%まで有意に抑制された (Fig.1 A)。面積法 (areas under the curves ; AUC) で表すとclonidine投与群は 10×10^3 %·min (n=5) で

control群 (25×10^3%·min) (n=4)に比べ有意に低下した (Fig.1 C)。5-HIAA量はK^+ならびにclonidineにより影響を受けなかった。6-OHDA前処置ラット(n=5)の5-HT量の基礎値の平均値は27.70 fmol/sampleで無処置ラットの5-HT量と有意差はみられなかった。K^+刺激により増加した5-HT量は6-OHDA前処置によっても有意に抑制された。6-OHDA前処置ラットの5-HIAA量の基礎値は 2.77 pmol/sampleであり、K^+およびclonidineにより影響をうけなかった (Fig.1 B, 1D)。

海馬の5-HT含量は無処置ラット (n=5) および6-OHDA前処置ラット (n=6) で各々202.87 ng/gおよび186.66 ng/gと有意差はなかった。NE含量は6-OHDA前処置ラットで16.68 ng/gであり、無処置ラット (294.97 ng/g)に比べ有意に低下していた。

以上、無麻酔無拘束ラットの海馬において灌流液中のclonidineがカリウムによる脱分極性5-HT遊離を抑制したこと、またこの5-HT遊離抑制が6-OHDA前処置により減弱しなかったことより、5-HT作動性神経終末にα_2アドレナリン受容体が存在し、この受容体を介する機能的な5-HT放出修飾機構が存在することが示唆された。

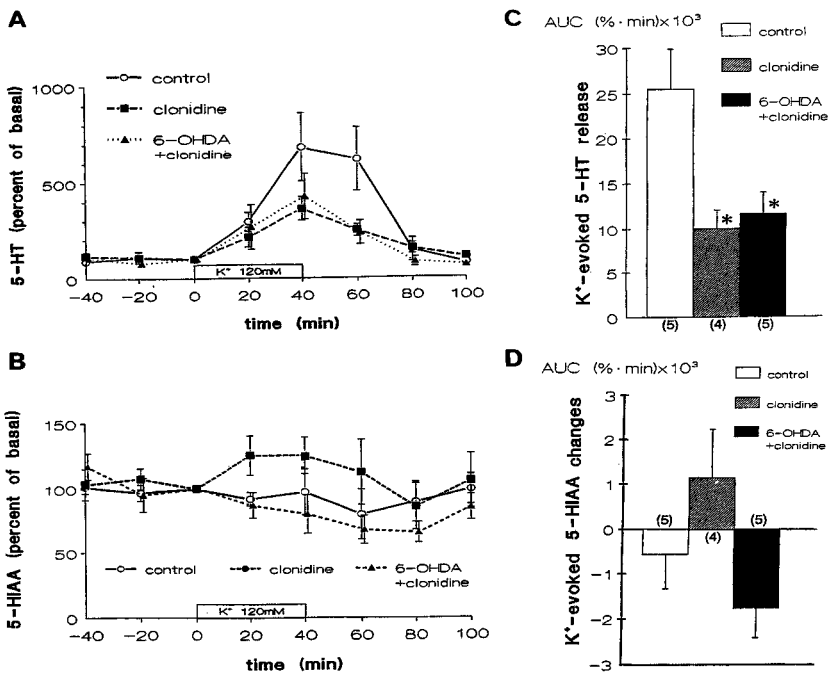


Fig.1 Effect of clonidine on the K^+-evoked 5-HT release and 5-HIAA output in the hippocampus of freely moving rats. A and B: Time course observation. The ordinate is the percentage of changes in 5-HT release or 5-HIAA output from the value obtained before K^+ addition into the perfusion. Each point represents the means±SEM. C and D: Areas under the curves (AUC) of K^+-evoked 5-HT release and 5-HIAA output, respectively. Each column represents the means± SEM. * $P<0.05$ vs. non-treated control rats.

<文献>

1)Frankhuyzen, A.L. and Mulder, A.H. (1980) *Eur. J. Pharmacol.* 63, 179-182.

2)Maura, G., Gemignani, A. and Raiteri, M. (1982) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 334, 323-326.

3)Matsumoto, M., Togashi, H., Yoshioka, M. et al. (1991) *Life Sci.* 48, 823-829.

65 C6BU-1細胞における5-HT-2受容体刺激性Ca^{2+}動員に及ぼすdexamethasoneの影響

村岡新一郎[1)2)]、三国雅彦[1)]、加賀谷有行[1)]、斎藤和子[1)]、松本啓[2)]、高橋清久[1)]
1)国立・精神神経センター神経研究所疾病研究第三部
2)鹿児島大学医学部神経精神医学教室

〔要約〕
ラットグリオーマ細胞クローンC6BU-1を5-Hydroxytryptamine(5-HT)で刺激すると濃度依存性に細胞内Ca^{2+}濃度の増加が引き起こされ、これらは5-HT-2 受容体を介する事を証明した。さらにC6BU-1 細胞の5-HT 刺激性細胞内Ca^{2+}動員はdexamethasone (DEX) 処置によりその濃度、及び時間依存性に増強された。また、48 時間 DEX処置後の5-HT によるdose response curve は無処置の対照群に比べ左にシフトし、この増強された5-HT 刺激性細胞内Ca^{2+}動員はketanserin で濃度依存性に抑制された。さらにこの48時間 DEX処置によるagonist 活性増強作用はtype-II glucocorticoid 受容体を介する事がRU 38486 による抑制効果から明らかとなった。

［目的］C6BU-1 細胞は5-HT刺激によるイノシトールリン脂質の加水分解亢進[1)]や細胞内Ca^{2+}動員[4)]を引き起こす事から5-HT 受容体を持つことが知られているので、我々は、5-HT 受容体の各種 agonist, antagonist を使ってC6BU-1 細胞のCa^{2+}動員を引き起こす5-HT 受容体の亜型を薬理学的に同定する事を試みた。また、glucocorticoid hormones(GC) はラット脳内のGTP結合タンパク質量を変動させると報告されている[3)]ので、このC6細胞における5-HT受容体の細胞内情報伝達系に対するGCの作用を検討するため、DEX処置による5-HT 刺激性細胞内Ca^{2+}動員反応への影響を測定したので報告する。
［材料と方法］ C6BU-1細胞は、１０%牛胎児血清を加えたDMEM培地で、１０%CO_2を含むインキュベーター内で培養した。培養液をKrebs-Ringer HEPES緩衝液に交換した後、2 μM fura-2/AMを添加したC6BU-1細胞を5-HT刺激し細胞内Ca^{2+}濃度増加反応を蛍光光度計（励起340/380nm,蛍光510nm)で測定した[2)]。薬理学的特性を明らかにするため、各種モノアミン受容体拮抗薬を5-HT刺激の３分前に添加し、Ca^{2+}動員に対する抑制能を検索した。次に、100nMの DEXとGC-II受容体拮抗薬、RU38486（１μM）をそれぞれ単独または併用投与し、４８時間インキュベーション後、同様にして5-HT刺激性Ca^{2+}濃度増加反応を測定した。
［結果と考察］C6BU-1 細胞の細胞内 Ca^{2+}濃度の基礎値は平均128nMであり、5-HT 刺激性のCa^{2+}濃度増加反応は飽和性を示し、5-HTのEC_{50} 値は0.2μM であった(Fig.1)。ketanserin と spiperone のIC_{50} 値はそれぞれ1.8, 0.9 nM であり、10μMの(-)propranololやMDL72222では全く阻害されなかった。また、各種5-HT受容体拮抗薬ならびに向精神薬による阻害能はラット脳内ホモジネートの5-HT-2受容体結合に対する阻害能とよく一致していた(Fig. 2)。mCPPや8-OHDPATによる細胞内Ca^{2+}動員も認められなかった。これらの結果から、C6BU-1細胞の細胞内Ca^{2+}動員反応は5-HT-1Cや5-HT-3でなく、5-HT-2受容体を介している事が明らかになった。次に、100nMのDEXを添加した培養液で48時間培養後の10μMの5-HT刺激性細胞内Ca^{2+}動員は、対照に比し50%程度の有意な亢進が観察された。RU38486(1μM) 単独ならびにDEXとの併用処置は、無処置の対照群と差がなかった(Fig.3)。DEXによる5-HT刺激性細胞内Ca^{2+}動員の増強作用はDEX

濃度10nM から1μMの間で認められ、また、その反応は48時間内では時間依存的に増加した(Fig.4)。したがって、このDEX による5-HT刺激性細胞内Ca^{2+} 動員の増強作用はDEXによる受容体への直接作用ではなく、GC-II受容体を介したものであると考えられた。さらに、48時間 DEX処置後の5-HTによる細胞内Ca^{2+}動員のdose-response curveは無処置の対照群のものに比べて左にシフトしており、EC_{50}値は約30nM であった(Fig.1)。またDEX処置後の10μMの5-HT刺激性細胞内Ca^{2+}動員はketanserinによって濃度依存性に阻害され、そのIC50値は2.8nMであった。したがってDEXによる5-HT刺激性細胞内Ca^{2+}動員の増強反応も5-HT-2受容体を介したものであり、5-HTに対する親和性の増大は5-HT-2受容体密度の変化ならびに受容体以降の機能ーすなわち、受容体と効果器の間のカップリング，あるいはプロテインキナーゼ 系の調節作用の変化などに基づくものと推測される。

文献(1)Ananth et al.(1987) J.Neurochem.48,253-261 (2)Grynkiewicz et al.(1985) J.Biol.Chem.260,3440-3450 (3)Saito et al. (1989) Proc. Natl.Acad.Sci.USA.86,3906-3910 (4)Sugino et al.(1984) Brain Research.322,127-130

Fig.1 Effect of dexamethasone on 5-HT-induced Ca^{++} mobilization in C6 glioma cells

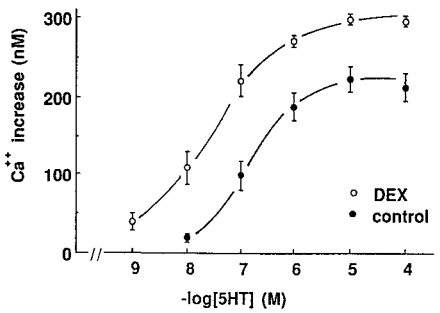


Fig.2 Inhibition by antagonists of 5-HT-induced Ca^{++} mobilization in C6 cells

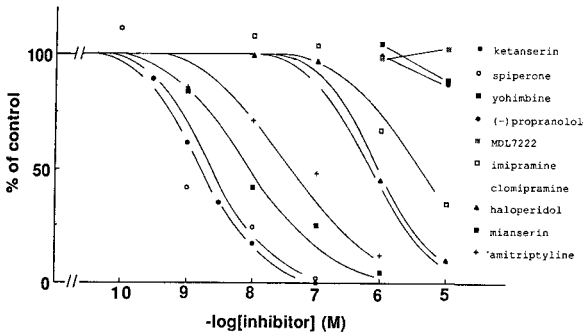


Fig.3 Effect of 48hr treatment with dexamethasone on 5-HT-induced Ca^{++} mobilization in C6 cells

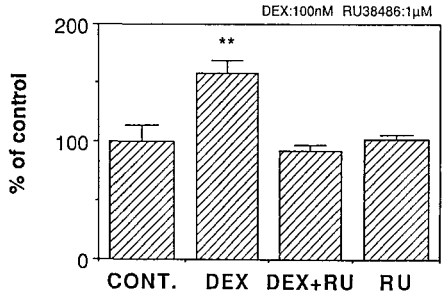
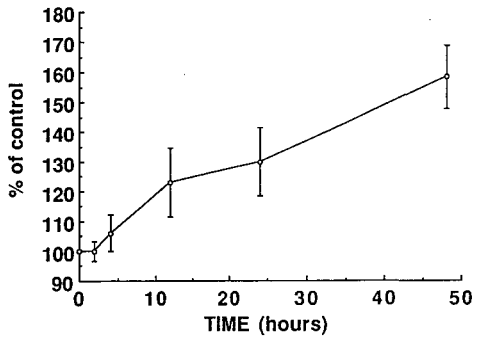


Fig.4 Time course of dexamethasone-induced potentiation of 5-HT response in C6BU-1 glioma cells



66 高K⁺刺激によるノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニン放出反応に及ぼすリチウム投与の影響
－微小脳内透析法による検討－

小山　司、小田垣雄二、大森哲郎、井上　猛、木戸　薫、山下　格
北海道大学医学部・精神医学教室

［要約］
ラット大脳皮質前頭前野において、微小脳内透析法を用い、同一透析液中の細胞外ノルアドレナリン(NA)、ドーパミン(DA)、セロトニン(5-HT)の測定法を確立し、高K⁺刺激による各モノアミンの放出反応の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NA、DA、5-HTの基礎値は各々5.4±0.4pg/30min、1.8±0.2pg/30min、1.2±0.1pg/30min(n=8)であった。１２０分間の高K⁺刺激開始後、６０－９０分で各モノアミンの放出反応が認められた。灌流液中のK⁺濃度を展開すると、３０－１２０mMの範囲で明瞭な用量依存性が確認された。K⁺刺激終了後１２０分で各モノアミン値は徐々に基礎値にもどり、放出反応は消失した。Li７日間投与は、K⁺(60mM)刺激性NA、DA、5-HT放出反応を有意に増強した。以上の結果から、Li投与による脱分極依存性NA、DA、5-HT放出反応の増強効果が示唆された。

［はじめに］
Liはその抗躁効果、躁うつ病相予防効果が確認され、現在では躁うつ病に代表される感情障害の治療に欠くことのできない薬物となっている。また最近、Liの抗うつ効果についても論じられるようになり、特に抗うつ薬の効果増強作用に多くの関心が寄せられている。一方、Liの奏効機転についてもこれまでに膨大な知見が集積されているが、いまだ確定的な結論には至っていない。今回、我々は高感度の電気化学検出器を用いることにより、微小脳内透析法によって得られた同一透析液中の細胞外NA、DA、5-HTの測定法を確立するとともに、ラット大脳皮質前頭前野内側部における高K⁺刺激による各モノアミンの脱分極性放出反応を指標として、Li投与の影響につ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。各モノアミン放出反応のK⁺濃度依存性の検討では、ネンブタール(40mg/kg)麻酔下、脳定位固定装置を用いて、ガイドステンレス管より前頭前野内側部へU字型微小透析チューブを3mm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。高K⁺刺激実験では、リンゲル液中のK⁺濃度を15-120mMの範囲で展開し、Na⁺濃度によって浸透圧を一定に調整した灌流液に切り替えることによって行った。高K⁺灌流時間は１２０分で、その後再びリンゲル液に切り替え１２０分間灌流を続けた。一方、Li投与の影響についての検討では、あらかじめ内筒付きガイドステンレス管を装着したラットに0.23%Li_2CO_3含有飼料を６日間与え、高K⁺(60mM)刺激実験の２４時間前に、軽いエーテル麻酔下でガイドステンレス管の内筒を抜去した後、直管型微小透析チューブ(EICOM,BDP-I-4-03)を前頭前野内側部へ3mm露出させて挿入固定した。透析灌流液はl-cysteine(0.02mg/ml)を含む0.05M酢酸50μlを入れておいた試験管に３０分ごとに回収した。透析液のモノアミン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。回収した透析液の30μlをNA量の測定にあて、カラムはChemcoPak(CHEMCO社製,5μ,4.6mmx25cm)を用い、移動相は0.1M,pH6.0リン酸緩衝液・7%メタノール・430mg/L octanesulfoic acid sodium salt ・250mg/L EDTAで、酸化電位は+0.45ボルトに設定した。DAおよび5-HTの測定には、透析液70μlをあて、測定条件は、HPLCカラム：Ultrasphere-IP　(BECKMAN社製,5μ,4.6mmx25cm)、移動相：0.1M,pH4.5酢酸緩衝液・10%メタノール・27mg/L sodium octyl sulfate・250mg/L EDTA、酸化電位：+0.5ボルトであった。各モノアミン動態は高K⁺刺激前の基礎値（３０分ごとの連続した３フラクションの平均値）に対する変化の割合で表示した。有意差の検定にはrepeated

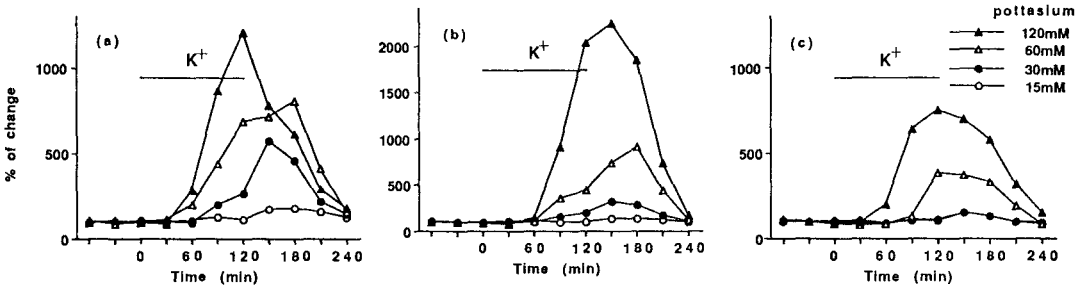


Fig.1 Effect of K^+-infusion during 2 hours on extracellular NA(A), DA(B) and 5-HT(C) in rat prefrontal cortex

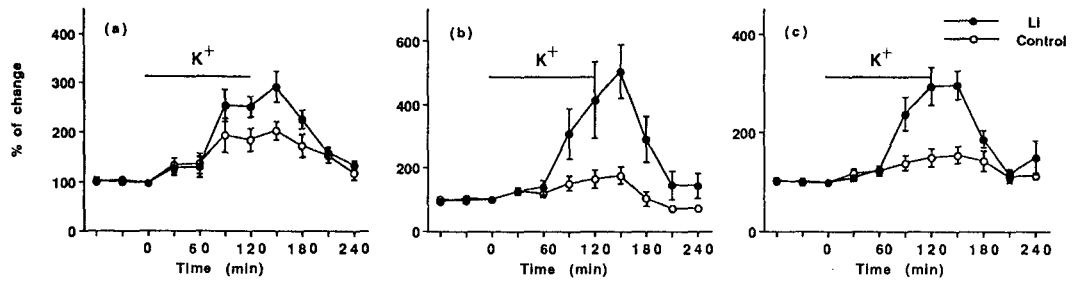


Fig.2 Effect of long-term lithium treatment (7days) on K^+(60mM)-induced alterations in NA(A), DA(B) and 5-HT(C) effluxes in dialysates collected from rat prefrontal cortex (n=8)

measures ANOVAを用いた。

[結果と考察]

我々が確立したHPLC-ECD法によって、ラット前頭前野透析液中のNA、DAおよび5-HTの検出が可能となった。リンゲル液灌流開始４時間後の透析液中のNA、DAおよび5-HTの基礎値は、各々5.4±0.4pg/30min、1.8±0.2pg/30min、1.2±0.1pg/30min(n=8)であった。高K^+刺激開始後６０－９０分で各モノアミンの放出反応が認められ、刺激終了１２０分で基礎値にもどった。灌流液中のK^+濃度を展開すると、30-120mMの範囲で明瞭な用量依存性が確認された(Fig.1)。

Li７日間投与によって、60mMK^+刺激による前頭前野内側部におけるNA、DAおよび5-HT放出反応はいずれも、対照飼料群と比較して有意に増強していた($p<0.01$,n=8)。各モノアミンの基礎値には両群間で差異が認められなかった。実験終了後、断頭採血によって得られた血漿中のLi濃度は0.65±0.05mEq/Lで、臨床的な有効安全血中Li濃度の範囲内にあった。

今回の結果は、高K^+刺激、すなわち脱分極依存性のNA、DAおよび5-HT放出反応がLi投与によって増強されることを示唆している。我々はすでにLi投与による脳内各部位のHVA、DOPAC、5-HIAAの増加所見、さらに芳香族アミノ酸脱炭酸酵素阻害薬NSD 1015投与後のDOPAおよび5-HTP蓄積値の増強所見を報告した(1,2)。これらの知見はLi投与による前シナプスモノアミン神経活動の増強効果を裏付けるものであり、感情障害のモノアミン仮説を勘案すると、Liの感情安定化効果と何らかの関連を有するものと思われる。

[文献]

1.Koyama,T. et al.(1985)Soc.Neurosci.Abstr.11:658

2.Koyama,T. et al.(1990)Clin.Neuropharmacology 13:205-206

67 ＡＴＰ受容体刺激によるドーパミン放出と膜電位依存性Ｃａチャンネル抑制

井上和秀、中沢憲一、綿野智一、藤森観之助、高仲正（国立衛生試験所・薬理部）

〔要約〕

ＰＣ１２細胞を用いて、ＡＴＰ受容体刺激によるドーパミン（ＤＡ）放出に膜電位依存性Ｃａチャンネル（ＶＧＣ）が関与しない理由について検討した。ＡＴＰ10μＭ前処理により細胞内Ｃａ濃度は上昇する。ＡＴＰ10μＭ前処理によりＣａ電流は著明に抑制されたが、Ｂａ電流の抑制は認められなかった。ＡＴＰによるＤＡ放出はＣａ含有外液中ではＶＧＣブロッカーで抑制されなかったが、Ｂａ含有外液中では著明に抑制された。これらから次のことが推察される。Ｃａ含有外液中では、ＡＴＰ刺激により受容体作働性カチオンチャネルから流入したＣａがＤＡ放出と同時にＶＧＣ抑制を起こすためにＶＧＣはＤＡ放出に寄与をしない。一方、Ｂａ含有外液中ではＡＴＰ刺激により流入したＢａはＤＡ放出を惹起するがＶＧＣ抑制を起こさず、脱分極により活性化されたＶＧＣ経由のＢａによりさらにＤＡ放出を増強する。従ってこのＶＧＣ由来ＤＡ放出がＶＧＣブロッカーにより抑制される。

［目的］ＡＴＰは神経伝達物質とともに神経終末から放出される。我々はＡＴＰのシナプス伝達における生理的意味を知る目的からＰＣ１２を用いて研究を進め、次のような仮説にたどりついた。即ちＡＴＰはＰ２受容体を刺激し，受容体作働性Ｃａ流入を惹起しその結果ＤＡ放出を引き起こす（1-6）。このことはシナプス伝達におけるＡＴＰの促進的作用の可能性として重要であるが、この仮説には興味深い疑問が残されていた。それは、ＰＣ１２細胞ではＡＴＰ刺激は一方で脱分極を惹起し、その程度はＶＧＣを活性化するのに充分であるにもかかわらず、ＤＡ放出にＶＧＣは全く寄与していないことである（1）。今回はこれに答えるために、ＡＴＰ刺激に関連したＶＧＣ抑制について報告する。

［方法］ＰＣ１２の調製とＤＡ放出測定は既報（5,7）に従った．細胞内Ｃａ濃度は個々のＰＣ１２細胞を用いて既報（8）に準じて測定した．電気生理的実験は既報に従い行なった（1）。

［結果および考察］ＰＣ１２においてＡＴＰは膜電位を脱分極させるにも拘らず、ＶＧＣがＤＡ放出に関与しないと考える根拠は次のようである。１．ＶＧＣブロッカーのニカルジピン（nicar）およびカドミウム（Ｃｄ）はまったくＡＴＰ誘発ＤＡ放出を抑制しない。２．ＡＴＰは主としてＮａイオンの流入に依り脱分極を惹起するので、Ｎａイオン非存在下ではＡＴＰによる脱分極の程度は極めて小さくなるが、ＤＡ放出量はまったく減少しない。これについて、ＡＴＰ受容体作働性経路からすでにＤＡ放出に充分のＣａ流入があるために、そこにさらにＶＧＣからのＣａ流入があったとしてもＤＡ放出には寄与しないとする可能性もある。そこでまずこの検討を行なった。

ＰＣ１２細胞ではＡＴＰによる細胞内Ｃａ濃度上昇の大部分がＣａ流入による。従ってＡＴＰによる細胞内Ｃａ濃度上昇に対するＶＧＣチャンネル・ブロッカーの影響を検討すればＶＧＣからのＣａ流入の有無が明らかになる。Fig.1はその検討結果であり、左図に示すようにＣｄおよび nicar はＡＴＰ100μＭによる細胞内Ｃａ濃度上昇に全く影響を及ぼさなかった。同濃度のＣｄおよびnicarは高濃度Ｋ（155mM）刺激によるＣａ濃度上昇を著明に抑制した（Fig.1右図）。これらはＡＴＰ刺激によるＣａ流入にはＶＧＣ由来の成分がまったくないことを示している。やはり、ＡＴＰ刺激後なんらかの理由でＶＧＣの活性化が阻害されていると考えるべきである。そこで次に、ＶＧＣの活性化に対するＡＴＰの影響を電気生理的手法により検討した。対照例ではFig.2上段左図の大きさのＣａ電流が惹起されたが、予めＡＴＰ10μＭで前処理した２０秒後に同様の操作をしたところ、Ｃａ電流は対照に比して約１／３程度に減少した（Fig.2上段右図）。ＰＣ１２ではＡＴＰ10μＭは細胞内Ｃａを上昇させることから、この結果は他の細胞系で報

告（9）されているように、ＡＴＰ前処理により流入したＣａがＶＧＣの活性化を抑制したことを強く示唆する。次にＢａイオンでＣａイオンを全置換した外液中で同様の検討を行なった。ＢａイオンはＣａイオン以上にＶＧＣを通るがＶＧＣの抑制を起こさないとされている。その結果、対照例では大きなＢａ電流が得られ、しかも、この大きな電流はＡＴＰ前処理によって少しも損なわれることはなかった（Fig.2下段右図。ＡＴＰ前処理により内向き電流が流れるために膜電位ステップをかける直前のレベルが左図とは異なることに注意。）。即ち、ＡＴＰによるＶＧＣの抑制は外液Ｃａ依存性であることが明かとなった。次にＣａ含有あるいはＢａ含有溶液中でＡＴＰ誘発ＤＡ放出に対するＣｄの影響を検討し、Fig.3の結果を得た。ＣｄはＡＴＰ惹起ＤＡ放出に対して、Ｃａ含有外液中では何の効果も示さなかったが、Ｂａ含有液中では著明に抑制した。

既報及びこれらの結果からつぎのことが考えられる。ＰＣ１２ではＡＴＰ受容体刺激によりカチオンチャンネルが活性化され、そこから流入したＣａはＤＡ放出を惹起するが、同時にＶＧＣの活性化を抑制するためにＶＧＣはＡＴＰによるＤＡ放出に寄与しない。

［文献］ 1.K.Inoue et al., Neurosci.Let.,106,294-299,1989. 2.K.Nakazawa et al., J.Physiol.(Lond),428, 257-272,1990. 3.K.Nakazawa et al., Br.J.Pharmacol.,101,224-226,1990. 4.K.Nakazawa et al., J.Physiol.(Lond),434,647-660,1991. 5.K.Inoue et al., Br.J.Pharmacol.,102,581-584,1991. 6.K.Inoue et al.,Br.J.Pharmacol.,102,851-854,1991. 7.K.Inoue and J.G.Kenimer. J.Biol.Chem.,263,8157-8161,1988. 8.G.Grynkiewicz et al., J.Biol.Chem.,260,3440-3450,1985. 9.R.Eckert et al., J.Phisiol.(Lond),314,265-280,1981.

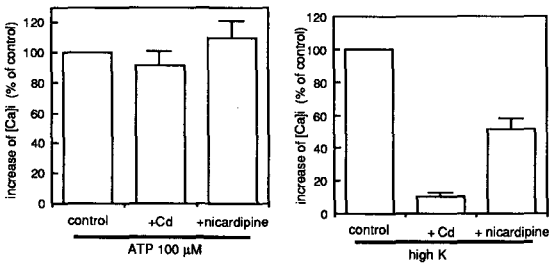


Fig.1 Effects of cadmium and nicardipine on ATP- or high K-stimulated increase of internal Ca.

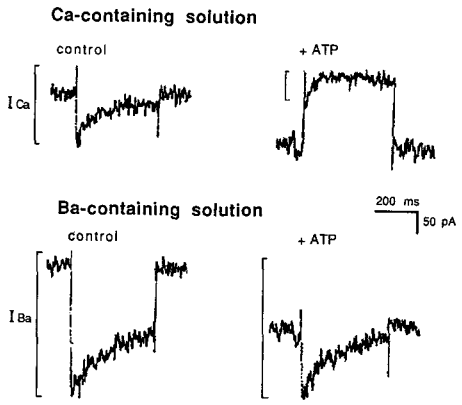


Fig.2 Effects of 10μM ATP-pretreatment on Ca or Ba currents induced by voltage-step.

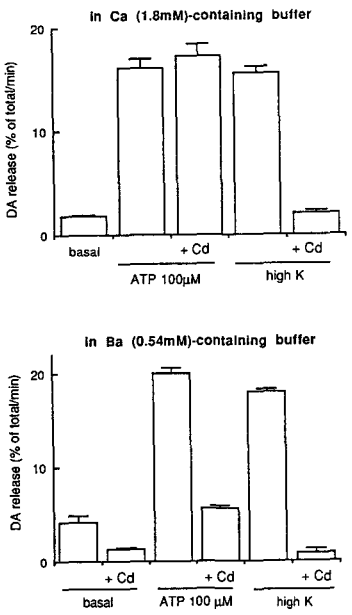


Fig.3 Effects of cadmium on ATP- or high K-stimulated DA release in Ca or Ba-containing buffer.

68 ストレスによるラット脳内ノルアドレナリン放出亢進に対するMorphineとDiazepamの相乗的抑制作用

松口直成＊，横尾秀康，田中正敏，溝口克弘，清水知己，中沢洋一＊
（久留米大・医・薬理，精神＊）

〔要約〕
我々は、ラット脳内noradrenaline(NA)の主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate (MHPG-SO_4)を測定し、ストレスによるNA 放出亢進をdiazepam(DZP)やmorphine(MOR)が減弱することを報告した。今回、拘束ストレス負荷で惹起される中枢NA神経系の活動性亢進に対しDZPとMORの同時投与がより強い抗ストレス効果を発現するかどうかについて検討した。一時間のストレス負荷により、測定した脳の 6部位全てでMHPG-SO_4含量の著明な増加がみられた。この増加に対しストレス負荷前のDZP(5.0 mg/kg, i.p.)投与は、扁桃核、青斑核部、海馬、大脳皮質で有意な減弱作用を、視床下部で減弱傾向を示した。MOR(6.0 mg/kg, s.c.)投与は扁桃核、海馬、視床で有意な減弱作用を、視床下部で減弱傾向を示した。DZPとMORの同時投与は、それぞれの薬物が共に減弱作用を示した視床下部、扁桃核、海馬でのみ単独投与による減弱作用をさらに増強させた。血漿 corticosterone 含量は、ストレス負荷により著明な増加がみられ、これにDZP 投与のみが有意な減弱作用を示した。同時投与は、DZP 単独投与時に比べより一層の減弱作用を示した。両薬物同時投与は、中枢においてより強い抗ストレス効果をもたらすことが示唆された。
Key word: rat brain noradrenaline release, MHPG-SO_4, diazepam, morphine, synergistic effect, stress

ストレスにより広範な脳部位でNA放出亢進がおこり、ストレス負荷前に投与したDZPやMORがこれを減弱することが報告されている(2, 5)。手術患者は、手術を受けることに対する強い不安、恐怖にさらされ、さらに手術そのものも生体にとって強い侵襲となる側面を持っており、生体への精神的、身体的ストレス状況が生じることが考えられる。このような有害刺激を軽減する目的で手術前投薬として opioid系薬物及びbenzodiazepine(BZP)系薬物が用いられている。近年opioid系薬物が BZP系薬物の作用発現時間を短縮しその作用強度を相乗的に増強することが報告されている (1)。DZPとMORの同時投与がより強い抗ストレス作用を発現するかどうか、精神的身体的ストレスを併せ持つ拘束ストレス負荷で惹起される中枢NA神経系の活動性亢進に及ぼす影響を検討した。

（方法）

Wistar系雄性ラット(体重180-200g)を用い、 5群に分けた（ 1群 8匹）。ストレスは 1時間の金網拘束ストレスを負荷した。DZP は、0.3% carboxymethyl cellulose sodium (CMC) 溶液に懸濁し 5mg/kg、Vehicle群は0.3% CMC溶液をそれぞれ100gあたり0.3 ml腹腔内投与した。塩酸MORは、生理食塩水に溶解し、6mg/kg を100gあたり0.2 ml皮下投与した。無処置群、一時間金網拘束ストレスを負荷し、負荷直前にvehicle を投与する群、DZP を投与する群、MOR を投与する群、DZP とMOR を同時に投与する群にわけた。ストレスから解放直後に断頭し、頸部より採血すると共に脳を視床下部、扁桃核、青斑核部、海馬、大脳皮質、視床に分割した。それぞれの脳部位におけるNAの主要代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate(MHPG-SO_4) 含量および血漿 corticosterone 含量を蛍光法 にて定量した。統計学的検定は、Studentの t検定（両側）を用いた。

（結果と考察）

拘束ストレス負荷により、脳の 6部位全てでMHPG-SO_4含量の著明な増加がみられた。この増加に対してストレス負荷前の DZP投与は、扁桃核、青斑核部、海馬、大脳皮質で有意な減弱作用を、視床下部で減弱傾向を示した。MOR 投与は扁桃核、海馬、視床で有意な減弱作用を、視床下部で減弱傾向を示した。同時投与は、視床下部、扁桃核、海馬でそれぞれの

薬物単独による減弱作用をさらに増強させた(Fig. 1)。血漿 corticosterone 含量は、ストレス負荷により著明な増加がみられ、これに対しDZP 投与のみが有意な減弱を示した。同時投与ではDZP 単独投与時に比べより一層著明な減弱作用がみられた(Fig. 2)。

ストレスにより、測定した脳部位でMHPG-SO_4含量の増加がみられ、これらの脳部位でNA放出亢進が生じたことを示唆している。DZP、MOR投与によりこの増加が抑制される部位を認めた。我々はこれらの薬物が BZP受容体及びopioid受容体を介してストレスによるNA放出亢進を減弱し、これがストレス暴露時の不安や恐怖の軽減と関連があることを報告した（2, 5）。同時投与した群は、それぞれの薬物が共に減弱作用を示した 3部位でのみ、より一層の減弱作用を示した。これらの部位がストレスと密接に関係した中枢での役割を担っている可能性が報告されている（4）。同時投与で、ストレスによる中枢変化をこれらの部位で対照群の値まで抑制したことは注目すべき事であると思われる。血漿 corticosterone 含量の著明な増加に対し、DZPは有意な減弱を、MORは増強傾向を示した。これは、我々の報告と一致している（3,5）。同時投与は、DZP単独よりも一層の減弱作用を示した。中枢でのストレス反応の一層の減弱に続く視床下部NAニューロンからの出力減弱を示していることが示唆される。

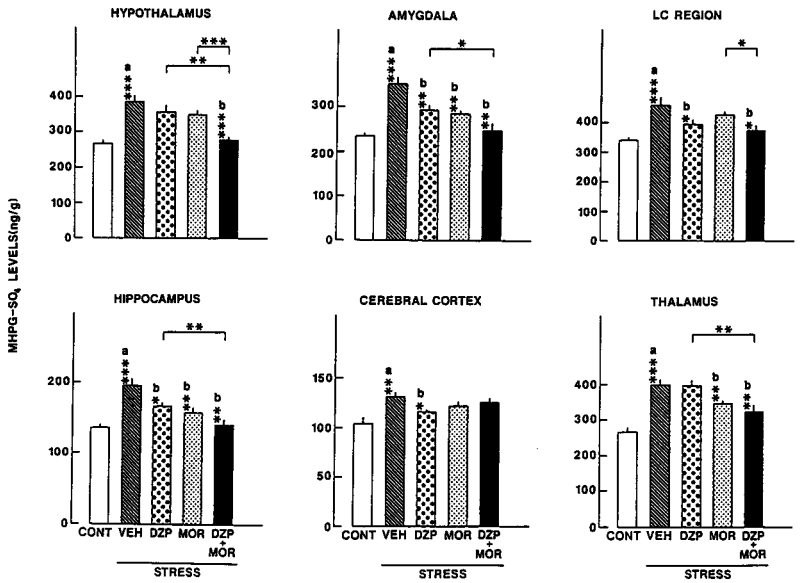


Figure 1. Effect of diazepam, morphine or diazepam-morphine combination on changes in MHPG-SO_4 levels caused by 1 hour immobilization stress. Each value indicates the mean ±S.E.M. of 8 rats. Abbreviations are : CONT: control: VEH: vehicle; DZP: diazepam; MOR: morphine. Statistical significance; (a)vs. control group, (b)vs. vehicle stress group. ＊p<0.05, ＊＊p<0.01, ＊＊＊p<0.001.

Table 1. Effects of diazepam(5.0 mg/kg, i.p.), morphine(6.0 mg/kg, s.c.) or diazepam(5.0 mg/kg, i.p.)-morphine(6.0 mg/kg, s.c.) combination on changes in plasma corticosterone levels caused by 1hour immobilization stress. Each value indicates the mean ± S.E.M. of 8 rats. Abbreviations are: VEH: vehicle; DZP: diazepam; MOR:morphine. Statistical significance; (a) vs. control group, (b) vs. vehicle stress group. **p<0.01, ***p<0.001.

Treatment	Number of subjects	Plasma corticosterone(μg/dl)
Control	8	17.5±1.6
Stress + VEH	8	82.6±3.7 a***
Stress + DZP	8	67.7±2.9 b**
Stress + MOR	8	84.6±8.2
Stress + DZP + MOR	8	35.3±7.4 b***

両薬物同時投与は、より強い抗ストレス効果をもたらすことが示唆された。

（文献）

(1) Dundee JW et al. 1986 Anaesthesia 41: 159-161. (2) Ida Y et al. 1985 Life Sci 37: 2491-2498. (3) Ida Y et al. 1989 Pharmacol Biochem Behav 33: 477-479. (4) 田中正敏 他 1988 神経精神薬理 10: 645-666. (5) Tanaka M et al. 1983 Brain Res 275: 105-115.

69 GABA$_B$受容体の精製と同定

水谷　宏、中安　博司、韓　達、栗山欣弥
（京都府立医大・薬理）

〔要約〕

GABA$_B$ 受容体をウシ大脳皮質シナプス膜分画より1.5% CHAPSにて可溶化し、バクロフェン固定化 AF-エポキシトヨパール650アフィニティカラムに適用した。5mM バクロフェンおよび 5mM GABA での溶出により 61kDのタンパクが特異的に溶出され、このフラクションは GABA$_B$ 受容体結合能を保持していた。この結合活性はバクロフェン、GABA および2-ヒドロキシサクロフェンによって阻害された。さらに、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)後に再活性化したGABA$_B$受容体の結合実験より、61kDの位置に最も高い活性が認められたことからこの 61kD タンパクが GABA$_B$受容体であると同定した。このバクロフェンにて溶出された GABA$_B$受容体フラクションの比活性は165 pmol/mg protein であり、可溶化標品に対する回収率は72%で、精製倍率は 11,000倍であった。

【目的】 脳内GABA$_B$受容体はGTP結合タンパク(1,3)、カルシウムイオンチャンネル(4)、ポタシウムイオンチャンネル(5)、アデニレートシクラーゼ系(6,10)、イノシトールリン脂質代謝回転系(2,8)などと共軛していることが知られ、中枢神経系におけるその機能の重要性が推測されている。しかしながら、これら共軛系のメカニズムのみならず、その薬理学的および構造的性質特性についても不明な点が多く、その分子レベルでの解明のためにも GABA$_B$ 受容体の精製は重要である。我々はすでにバクロフェンを固定化リガンドとするアフィニティカラムクロマトグラフィにより脳内GABA$_B$受容体の部分精製が可能になったことを報告したが(7)、今回、新たにバクロフェン固定化AF-エポキシトヨパール650を用いてその精製を試み、同定を行った。

【実験方法】 GABA$_B$受容体はウシ大脳皮質シナプス膜分画より1.5%CHAPSによって可溶化し、遠心分離後、透析し、0.15%CHAPSを含む50mM Tris-HCl 緩衝液にて平衡化したバクロフェン固定化AF-エポキシトヨパール650アフィニティカラムに適用した。300mlの平衡化緩衝液にて洗浄後、5mM バクロフェン、5mM GABA もしくは 0.5M KCl にて溶出を行った。GABA$_B$ 受容体結合はイソグバシン存在下で[^{3}H]GABA と反応させることにより測定し、1 mMバクロフェン存在下での結合を非特異的結合量とした。 SDS-PAGE 後に再活性化した(9) GABA$_B$ 受容体への [^{3}H]GABA 結合の測定は、0.5M KCl 溶出分画の SDS-PAGE を行った後、2mM $CaCl_2$, 0.1mM イソグバシンを含むTris-HCl 緩衝液にて再活性化し、30nM [^{3}H]GABA を含む緩衝液にてインキュベートした。洗浄後、ゲルを 2mm 幅に切断し、その放射活性を測定した。

【結果】 アフィニティカラムクロマトグラフィにおける素通りおよび洗浄分画には [^{3}H]GABA 結合はほとんど認められなかった。5mM バクロフェンによる溶出を試みたところ、 SDS-PAGE にて特異的に溶出される一本のバンドが認められ、各フラクションを透析後、GABA$_B$ 受容体結合を測定したところ、このバンドと一致する結合能が得られた(Fig.1)。このタンパクは 5mM GABA によっても溶出され、その分子量は SDS-PAGE より 61kD と推定された。バクロフェンにて溶出されたフラクションの GABA$_B$ 受容体結合はバクロフェン、GABA および GABA$_B$ 受容体の特異的拮抗薬である 2-ハイ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 61kD タンパクは 0.5M KCl では他の数本のタンパクとともに溶出され、この溶出分画の SDS-PAGE 後の再活性化 GABA$_B$ 受容体の[^{3}H]GABA 結合を測定した結果、 61kD に対応する位置に最も高い活性が得られた(Fig.2)。 バクロフェンにて溶出されたGABA$_B$ 受容体分画の可溶化標品に対する回収率は 72%で、比活性は165 pmol/mg protein 、精製倍率は 11,000倍であった(Table I)。

【考察】 今回、バクロフェン固定化 AF-エポキシトヨパール650を用いたアフィニティカラムクロマトグラフィにて得られた 61kD タンパクは、バクロフェンおよび GABA によって特異的に溶出され、さらにそのフラクションが $GABA_B$ 受容体結合を保持していること、また、SDS-PAGE後の再活性化 $GABA_B$受容体の結合実験で 61kD の位置に最も高い活性が認められたことから、この 61kDタンパクが $GABA_B$受容体であると同定した。

【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, 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. and Kuriyama, K. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun., 172, 22-27.

(8) Ohmori, Y. and Kuriyama, K. (1989) Neurochem. Int. 15, 359-363.

(9) Spanos, A., et al. (1981) Nucl. Acid Res., 9, 1825-1839.

(10) Wojcik, W.J. and Neff, N.H. (1984) Mol. Pharmacol. 25, 24-28.

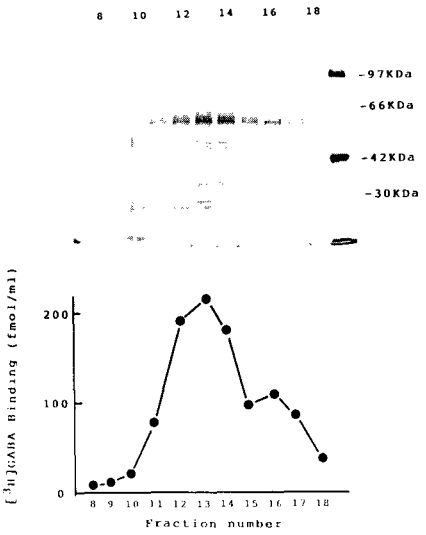


Fig.1 SDS-PAGE pattern and $GABA_B$ receptor binding activities of 5mM baclofen-eluted fractions in affinity column chromatography.

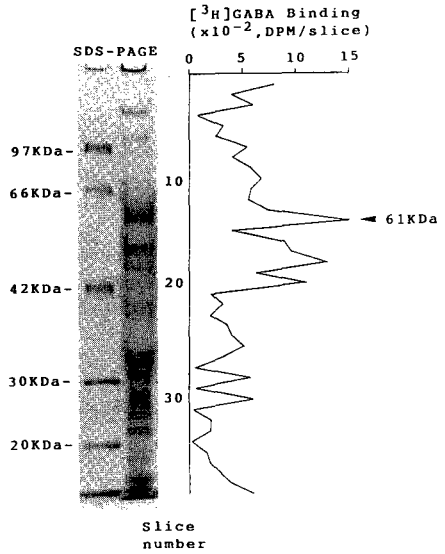


Fig.2 Gel overlay binding assay of $GABA_B$ receptor fractions eluted by 0.5M KCl in affinity column chromatography.

Table I Purification of $GABA_B$ receptor from bovine brain cortex

	Total protein (mg)	Total activity (pmol)	Specific activity (pmol/mg)	Recovery (%)	Purification (-fold)
Supernatant	363	5.45	0.015	100	1
Baclofen-elute	0.024	3.96	165	72	11,000

70 ラット中枢神経系におけるGABA$_A$受容体各種サブユニットmRNAの分布

荒木敏之、佐藤　真、木山博資　遠山正彌
〈大阪大・医・第2解剖〉

〔要約〕
GABA$_A$受容体の各種ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄのうちα_3, α_4、γ_2ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄmRNAのﾗｯﾄ脳における局在を特異的な合成ｵﾘｺﾞﾇｸﾚｵﾁﾄﾞﾌﾟﾛｰﾌﾞを用いたin situ hybridization法により検索した。GABA$_A$受容体のｻﾌﾞﾕﾆｯﾄ構成は脳内各ﾆｭｰﾛﾝ群間で大きく異なることが明らかになった。このことは、各ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄの各ﾆｭｰﾛﾝ群における発現機序はそれぞれのﾆｭｰﾛﾝ群ごとに独自の機序によって調節されていることを示唆する。また、γ_2ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄは、GABA作動性ﾆｭｰﾛﾝに含まれることが多くｵｰﾄﾚｾﾌﾟﾀｰ,或いはGABA-GABA性回路の受容体として作用している可能性が示唆された。

中枢神経系における主要な抑制性神経伝達物質の一つとして知られているGABAの受容体の中でｲｵﾝﾁｬﾝﾈﾙと共役しているGABA$_A$受容体はα_{1-6}、β_{1-3}、γ_{1-2}、δなどの多様なｻﾌﾞﾕﾆｯﾄを持つが、GABA作動性機序を解明するためには脳内のGABA入力を受けるﾆｭｰﾛﾝに存在するGABA受容体がどの様なｻﾌﾞﾕﾆｯﾄ構成によりなっているのかを先ず明らかにしなければならない。このために、我々はα_3、$_4$、γ_2ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄのmRNA含有細胞のﾗｯﾄ脳における局在を合成ｵﾘｺﾞﾇｸﾚｵﾁﾄﾞを用いたin situ ﾊｲﾌﾞﾘﾀﾞｲｾﾞｰｼｮﾝ法を用いた組織化学的方法により詳細に検討し、α_1、β_{1-3}ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄ　mRNAの分布と比較した。

材料と方法

ﾗｯﾄは麻酔後断頭し速やかに脳を取り出しﾄﾞﾗｲｱｲｽにて凍結、厚さ15μmの切片を作成した。ﾊｲﾌﾞﾘﾀﾞｲｾﾞｼｮﾝに際しては、切片は4%ﾊﾟﾗﾌｫﾙﾑｱﾙﾃﾞﾋﾄﾞ液にて10分間の固定を行なった。probeはGABA$_A$受容体$\alpha_{3,4}$、γ_2ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄのcDNAに対して相補的な48merのｵﾘｺﾞﾇｸﾚｵﾁﾄﾞを合成して用いた。ﾌﾟﾛｰﾌﾞの特異性に関しては、DNASISによるhomology search (GenBank,1990) により同じGABA$_A$受容体の他のｻﾌﾞﾕﾆｯﾄとのﾎﾓﾛｼﾞｰが低いこと、（下に述べるγ_1とγ_2以外は54%以下）、RNaseによる吸収試験、RIﾗﾍﾞﾙを行わないprobeによるcompetition testにより、実験結果に述べるような陽性反応が認められないことを確認した。γ_2ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄのprobeはγ_1ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄのcDNA塩基配列と81.25%のhomologyを有していたが、γ_1ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄの、γ_2ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄのprobeとのﾎﾓﾛｼﾞｰのもっとも高い部位に対するprobeを用いたCompetition test によりγ_2ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄmRNA陽性反応には影響がなかったことにより本実験に用いたprobeの特異性には問題のないものと考えられた。^{35}S-dATPにより3'-ｴﾝﾄﾞﾗﾍﾞﾘﾝｸﾞしたｵﾘｺﾞﾇｸﾚｵﾁﾄﾞprobeは、4xSSC, 1xDenhardt's solution, 50% ﾎﾙﾑｱﾐﾄ, 0.12M phosphate buffer, 2.5% tRNA, 10% dextran sulfate, 50mM dithiothreitol を含むhybridization buffer に加え、切片と共に24-48時間のﾊｲﾌﾞﾘﾀﾞｲｾﾞｰｼｮﾝを行い、60度の1xSSCにて1時間洗い、アルコールにて脱水後、乳剤をかけ4-6週間のｵｰﾄﾗｼﾞｵｸﾞﾗﾌｨを行った。

結果

ﾗｯﾄ中枢神経系においてGABA$_A$受容体α_3、α_4, γ_2ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄは互いに異なる非常に広範な分布を示し、陽性部位ごとに陽性反応の強さは様々に異なっていた。α_3ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄのmRNAの強い陽性反応が認められた部位には、吻側より、嗅球の僧帽細胞層，嗅糸球層，前嗅核，大脳皮質，外側中隔野 dorsal endopiriform nucleus，前障，視床の paratenial，室傍，前背側，前腹側，前正中，reuniens，外背側の各亜核と外側膝状体の腹側部，中心亜核を除く扁桃体の各亜核、海馬支脚、海馬傍支脚，海馬前支脚 背側縫線核，脚傍核，青斑核，知覚性三叉神経核，下ｵﾘｰﾌﾞ核などがある。α_4ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄのmRNAの強い陽性反応が認められた部位には、前嗅核，tenia tecta，大脳等皮質,梨状葉 ，dorsal endopiriform nucleus，前障，視床の前核群と外側核群及び視床下部腹内側核，海馬のｱﾝﾓﾝ角の顆粒細胞層と歯状回の分子層、扁桃体，上丘の浅灰白層 と中間灰白層、橋核，腹側前ｵﾘｰﾌﾞ核，台形体核，下ｵﾘｰﾌﾞ核，蝸牛神経核，顔面神経核，知覚性三叉神経核な

どであった。γ_2ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄの強い陽性反応は、嗅球の僧帽細胞層，大脳等皮質，梨状葉，嗅結節の第3層，tenia tecta，対角帯，preoptic area，視床下部外側核，視床網様核．海馬ｱﾝﾓﾝ角の顆粒細胞層と歯状回の分子層，扁桃体外側核，不確帯，視床下核，黒質，視蓋前野，中間灰白層，海馬支脚・傍支脚・前支脚，Darkschwitsch核，赤核，parabigeminal nucleus，外側毛帯，橋核，網状被蓋核，下丘，前庭神経核，脳神経運動核、腹側前ｵﾘｰﾌﾞ核，台形体核，知覚性三叉神経核のうちの吻側部などの核で認められた。これを、$GABA_A$受容体の他のｻﾌﾞﾕﾆｯﾄの分布と比較し、表に示す。

考察

1) $GABA_A$受容体$\alpha_{3,4}$ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄの分布については、従来部分的な報告がなされていたが今回の結果によりα_3、α_4ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄに関しては、報告されていたよりかなり広範な分布が認められることが明かとなった。γ_2ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄについては細胞ﾚﾍﾞﾙの分布の検索により、その発現の非常に強い部位の多く（例えば視床網様核，不確帯、海馬，黒質，Darkshewitsch核，前庭神経核）は、GABAの合成酵素であるｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸脱炭酸酵素(GAD)の分布と一致を認め、γ_2ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄが、GABA性伝達機構におけるｵｰﾄﾚｾﾌﾟﾀｰの構成成分である可能性が示された。、

2) 各ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄの分布は互いに異なっており、完全に分布が一致するｻﾌﾞﾕﾆｯﾄは存在しなかった。この結果は、ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄの分布の比較のみからは各神経核に存在するｻﾌﾞﾕﾆｯﾄの組合せを知る事はできず、個々のｻﾌﾞﾕﾆｯﾄは、それぞれ独自の調節を受けている事を示すものと考えられた。詳細に検討すると、表に示すように、これまでに調べられた全てのｻﾌﾞﾕﾆｯﾄを発現している部位（大脳皮質など）、2種以上のｻﾌﾞﾕﾆｯﾄを発現している部位、1種のｻﾌﾞﾕﾆｯﾄしか発現していない部位（視床網様核など）がある。これらの部位における$GABA_A$受容体の多様性、GABA作用の多様性を考える上で興味深い。各ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄの発現機序及び機能の解明が今後の大きな研究課題といえる。

3) 各ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄの分布はこれまで報告されているGABA受容体抗体による免疫組織化学的陽性構造の分布や、受容体ﾘｶﾞﾝﾄﾞによるｵｰﾄﾗｼﾞｵｸﾞﾗﾌｨ法による受容体ﾘｶﾞﾝﾄﾞの結合部位の検索の結果と部分的な一致を見るのみである。これは、従来のGABA受容体抗体や、ｵｰﾄﾗｼﾞｵｸﾞﾗﾌｨに用いられたﾘｶﾞﾝﾄﾞは、いずれも個々のｻﾌﾞﾕﾆｯﾄを認識するものではないため、また、抗体やﾘｶﾞﾝﾄﾞの結合する部位は、神経突起の先端など神経細胞の様々な部位に存在するが、in situ hybridization法はおもに細胞体を検出する方法であるため、あるいは、各方法の間に感度や特異性の点で差異がみられるため、などの点によっているものと考えられる。

表1　$GABA_A$受容体各種ｻﾌﾞﾕﾆｯﾄの分布。++はS/N比5以上、+は3-5、-は3以下の神経核を示す。

	α1	α3	α4	β1	β2	β3	γ2
Olfactory bulb							
mitral cell layer	++	++	-	++	++	++	++
granular cell layer	++	-	++	-	++	++	+
external plexiform layer	-	++	++	-	++	++	+
Isocortex	++	++	++	++	++	++	++
Caudate putamen	-	-	++	-	+	++	+
Globus pallidus	++	-	+	++	-	++	+
pyramidal cell layer of CA1-4	++	+	++	++	+	++	++
subiculum	++	++	++	++	+	++	++
Thalamus							
lateral	++	++	++	+	++	+	++
reticular	-	-	-	-	-	-	++
Hypothalamus							
preoptic area	+	++	-	+	+	++	++
ventromedial nu.	+	++	++	++	+	++	++
Subthalamus	++	-	+	+	++	+	++
Substantia Nigra							
pars reticulata	++	-	++	+	-	+	++
pars compacta	-	++	++	+	++	+	++
Central Gray	+	+	++	++	+	++	++
Inferior colliculus	+	+	++	-	+	+	++
Lateral vestibular nucleus	-	++	+	+	++	++	++
hypoglossal nucleus	++	++	++	++	+	++	++
Cerebellum							
molecular cell layer	+	++	++	+	+	++	+
Purkinje cell layer	++	-	-	++	++	-	++
granular cell layer	+	-	-	+	++	++	++

主要参考文献

Araki, T., Satoh, M., Kiyama, H. and Tohyama, M. Localization of $GABA_A$-receptor γ_2 subunit in the rat central nervous system. Neurosci. (in press)

Araki, T. and Tohyama, M. Region-specific expression of $GABA_A$ receptor α_3 and α_4 subunits mRNAs in the rat brain. Mol. Brain Res. (submitted)

Zhang, J.-H., Sato, M. and Tohyama, M.(1991) Region-specific expression of the mRNAs encoding β subunits (β_1, β_2, and β_3)of $GABA_A$ receptor in the rat brain. J. Comp. Neurol. 303, 637-657.

71 フェノバルビタール依存性ラットにおける GABA$_B$ 受容体の変化について

田中佐知子、青木公子、吉田武美、山元俊憲*、黒岩幸雄

（昭和大・薬・毒物学、*薬理学）

〔要約〕

薬物混入飼料法により作成したフェノバルビタール（PB）依存性および禁断ラットにおける脳内の GABA$_B$ 受容体の変化について ^{3}H-baclofen をリガンドに用いて検討した。脳シナプトソーム画分の GABA$_B$ 受容体は高親和性と低親和性部位の存在を示し、依存性群および禁断群ともに両親和性部位の Kd 値が低下した。一方、Bmax 値は依存性群および禁断群ともに低親和性部位のみで有意な減少が観察された。^{3}H-baclofen の特異的結合は海馬、小脳および大脳皮質で高いことが示され、脳内分布は依存性群においても、対照群と比較して有意な変化は認められなかった。以上の結果より依存性形成時には親和性増加による GABA$_B$ 受容体での抑制性神経の亢進が生じていることが示唆された。

〔目的〕

フェノバルビタール（PB）は抗けいれん薬として臨床的に用いられているが、連用により身体依存性を生じることが問題となっている。バルビツール酸化合物は γ-アミノ酪酸（GABA）作動性神経を介して中枢作用を発現する(5)とされ、これまでは GABA$_A$ 受容体との関連性について検討が進められてきた(6)。もう一つのサブタイプである GABA$_B$ 受容体はその活性化により K^+ チャンネル開口に伴い過分極を起こすことや、Ca^{2+} イオンチャンネルを抑制することによって神経興奮の抑制および神経伝達物質の遊離機構に関連していると考えられている(4)。本研究においては PB 依存性形成時および禁断症候発現時における GABA$_B$ 受容体の質的および量的変化について検討を行った。

〔実験方法〕

Wistar 系雄性ラット（体重約 100 g）に PB を粉末飼料中に段階的に増量して混入し、摂取させる薬物混入飼料法(7)により 5 週間飼育し依存性ラットを作成した。また、通常の粉末飼料と置換することによって禁断処置とした。ラットの全脳および Glowinski and Iversen の方法(3)により分割した 7 部位の脳よりシナプトソーム画分を調製し、^{3}H-baclofen をリガンドに Bowery らの方法(2)に従って結合実験を行った。非特異的結合は 0.1 mM GABA の添加により求めた。飽和実験の結果は Scatchard 解析し、最大結合数（Bmax）と解離定数（Kd）を求めた。

〔結果〕

1-150 nM のリガンド濃度（但し、30 nM 以上のリガンド濃度の場合には非放射性の baclofen を添加）を用いた時 Scatchard plot は曲線となり GABA$_B$ 受容体は高親和性(Bmax1 0.167 ± 0.04 pmol/mg, Kd1 15.4 ± 2.9 nM) と低親和性（Bmax2 4.316 ± 0.669 pmol/mg, Kd2 3657 ± 1238 nM）の二つの親和性部位を持つことが示された。PB 依存性ラットにおいては両親和性部位の Kd 値と低親和性部位の Bmax の減少が観察された。禁断処置群（禁断後 16 hr: 顕著な禁断症候を発現し始める）においても同様の傾向が観察された。一方、脳部位別における ^{3}H-baclofen の特異的結合は海馬、小脳および大脳皮質において高いことが認められたが、依存性群においても対照群と比較して有意な変

化は認められなかった。

〔考察〕

PB 依存性形成時において ^{3}H-baclofen 結合の低親和性および高親和性部位における親和性の増加が認められたことから $GABA_B$ 受容体による Ca^{2+} チャンネル抑制や K^+ 透過性増大による $GABA_B$ 受容体レベルでの抑制性神経の機能亢進が生じていると考えられる。Bmax は高親和性部位では変化が認められないものの低親和性部位においては減少が観察されたことは親和性の亢進を結合数の減少によって受容体レベルでの調節が働いていると思われる。さらに依存性状態において減少した GABA 含量(1)を $GABA_B$ 受容体レベルでは補う結果になっていると推察される。また、脳部位別の ^{3}H-baclofen 特異的結合において、対照群と依存性群との間に有意な変化は認められなかったことは高親和性部位での Bmax に有意な差がなかった結果を反映していると思われる。さらには $GABA_B$ 受容体と共軛した細胞内情報伝達系レベルでの機能についても詳細に検討する必要がある。

Table I Scatchard analysis of ^{3}H-baclofen binding to synaptic membranes of control, phenobarbital dependent and withdrawn rats.

treatment(n)	K_d (nM) K_{d1}	K_{d2}	B_{max}(p mole/mg protein) B_{max1}	B_{max2}
control(9)	15.4 ± 2.9	3657 ± 1238	0.167 ± 0.040	4.316 ± 0.669
phenobarbital-dependence(9)	4.9 ± 1.3**	313 ± 103**	0.086 ± 0.027	0.808 ± 0.114**
phenobarbital-withdrawal(7)	5.2 ± 1.0**	494 ± 168*	0.081 ± 0.044	0.883 ± 0.288**

Statistically different from control group (*$p<0.05$; **$p<0.01$).

Table II Regional distribution of specific ^{3}H-baclofen binding in the brain of control and phenobarbital-dependent rats.

Brain regions	Specific ^{3}H-baclofen(10 nM) binding (p mole/mg protein) control	dependence
Cerebral cortex	0.079 ± 0.009	0.089 ± 0.008
Cerebellum	0.089 ± 0.021	0.059 ± 0.012
Corpus striatum	0.039 ± 0.006	0.039 ± 0.003
Hippocampus	0.101 ± 0.011	0.082 ± 0.007
Midbrain	0.042 ± 0.005	0.056 ± 0.009
Hypothalamus	0.026 ± 0.004	0.021 ± 0.007
Medulla-pons	0.011 ± 0.005	0.006 ± 0.004

Each data represents the mean ± S.E.M. of triplicate assays.

〔文献〕

(1)Aoki, K., and Kuroiwa, Y. (1982) J. Pharmacobio.-dyn. 5, 88-96

(2)Bowery, N.G., Hill, D.R., and Hudson, A.L. (1983) Br. J. Pharmacol. 78, 191-206

(3)Glowinski, J., and Iversen, L.L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669

(4)Ogata, N., and Tatebayashi, H. (1991) Folia Pharmacol. Japon. 97, 179-189

(5)Olsen, R.W. (1981) J. Neurochem. 37, 1-13

(6)Tanaka, S., Satoh, T., Aoki, K., Yoshida, T., and Kuroiwa, Y. (1989) Jpn. J. Pharmacol. 49, s240

(7)Yanaura, S., Tagashira, E., and Suzuki, T. (1975) Jpn. J. Phramacol. 25, 453-463

72 ラット脳におけるカイニン酸及びキスカル酸受容体mRNAの分布の検討

富田博秋、藤原 豊、引地 充、秋山一文、大月三郎、H.I. Yamamura *
（岡山大学医学部神経精神医学教室、* アリゾナ大学医学部薬理学教室）

〔要約〕ラット脳内のカイニン酸及びキスカル酸受容体mRNAの分布を調べるために in situ ハイブリダイゼイション法を行なった。プローブには Keinanen ら(3)が、クローンした４つのグルタミン酸受容体サブタイプ（A～D）の遺伝子の塩基配列のうち、互いに共通の配列を有さない部分の４８塩基対のオリゴヌクレオチドプローブを用いた。カイニン酸およびキスカル酸受容体mRNAはともに、嗅結節、帯状回、海馬錐体細胞層、歯状回顆粒細胞層に高密度に分布しており、カイニン酸受容体では海馬の中でもCA１よりもCA３の分布の方が高密度である傾向が認められた。また、カイニン酸受容体のみで、嗅神経核、内側手綱核に高密度の傾向を認めた。既に報告されている結合実験と比較すると多少異なる点もあり、受容体蛋白の生合成部位と発現部位とに多少の相違がある可能性を示唆した。

〔 目的 〕 グルタミン酸受容体蛋白の脳内分布は、放射性リガンドによる結合実験から多くの報告がなされている(1,4)が、グルタミン酸受容体mRNAの分布については不明な点が多い。これが明らかになれば、より特異性の高いグルタミン酸受容体サブタイプの分布を知ることができ、また、グルタミン酸受容体の分布を蛋白生合成のレベルで捉えることが可能になると期待される。最近になってグルタミン酸受容体のうちカイニン酸受容体蛋白をコードするcDNAがクローニングされ、その塩基配列が発表された(2)。以前、われわれは、この塩基配列の一部を用いた合成オリゴヌクレオチドを用いて in situ ハイブリダイゼイションを行い、カイニン酸受容体mRNAのラット脳内分布の検討を行い、海馬錐体細胞層、歯状回顆粒細胞層、嗅結節、内側手綱核などに分布が認められることを報告した(5)。その後、keinanen らが、カイニン酸、キスカル酸を含む４つのグルタミン酸受容体サブタイプをクローニングして、その塩基配列を発表した報告(3)によれば、われわれがプローブとして用いた塩基配列は、カイニン酸、キスカル酸に共通した部分の塩基配列を用いており、結果的に特異性の低い分布であることが分かった。そこで今回われわれは、kainenan らの報告による４つのグルタミン酸受容体の塩基配列のうち、互いに共通する塩基配列を有さない部分をプローブに用いて in situ ハイブリダイゼイションを行い、カイニン酸、キスカル酸を含む４つのグルタミン酸受容体サブタイプのmRNAの分布を検討した。

〔 方法 〕 Sprague-Dawley (SD) 系雄性８週ラット６匹を断頭して氷上にてすばやく脳を取り出し、粉末状ドライアイスにて凍結した。１週間以内に -20℃ にてクリオスタットで 10 μm の切片を作り、ゲラチンコートしたスライドグラスに張り付けた。keinanen ら(3)のグルタミン酸受容体サブタイプA～Dのうち共通な塩基配列を有さない部分の４８塩基対を選んでプローブを合成した。グルタミン酸受容体A (GluR-A) 及びB (GluR-B) は各々カイニン酸及びキスカル酸受容体に相当し、グルタミン酸受容体C及びDは、既知のグルタミン酸受容体の３つのサブタイプであるカイニン酸、キスカル酸、NMDA受容体のいずれにも相当しない受容体のクローンである。この４つの塩基配列を [^{35}S]-dATP で 3'- エンドラベリングキット（NEN社）を用いてラベルした。このプローブを以下の組成からなる Hybridization Buffer （ 1×SSC, 50% formamid, 1×Denhardt's solution, 480 μg/ml denatured salmon sperm DNA, 100mM DTT, 10% dextran sulfate ） と１切片当り 1×10^6 dpm / 100 μl となるようにし、これを上記の組織切片と 37℃ で 18 時間ハイブリダイズさせた。その後、55℃ 1×SSC で15 分×4 回、室温 1×SSC で１時間洗浄した。スライドグラスを乾燥させた後、暗室にてトリチウム感受性フィルムをのせ、３週間感光させた後、現像した。このフィルムのうち嗅結節の顆粒層、叢状層、嗅神経核、内側前頭前野、前頭葉皮質、帯状回、梨状葉皮質、線条体、側坐核、中隔核、海馬錐体細胞層のCA１及びCA３、歯状回顆粒細胞層、内側手綱核、扁桃核、中扁桃様核の各部位に相当する部位について、 optic density を Microimage 社の Fast Scan で定量した。

〔 結果 〕 ４つのグルタミン酸受容体サブタイプｍＲＮＡの分布を表１に示した。カイニン酸およびキスカル酸受容体ｍＲＮＡはともに、嗅結節、帯状回、海馬錐体細胞層、歯状回顆粒細胞層に高密度に分布しており、カイニン酸受容体では海馬の中でもＣＡ１よりもＣＡ３の分布の方が高密度である傾向が認められた。また、カイニン酸受容体のみで、嗅神経核、内側手綱核に高密度の傾向を認めた。

表１．各グルタミン酸受容体サブタイプのｍＲＮＡの脳内分布　　(mean ± S.E. , 単位は O.D.)

	GluR-A	GluR-B	GluR-C	GluR-D
	（カイニン酸受容体）	（キスカル酸受容体）		
嗅結節顆粒層	665 ± 94	335 ± 36	309 ± 36	577 ± 85
叢状層	459 ± 66	270 ± 19	259 ± 20	385 ± 49
嗅神経核	603 ± 97	314 ± 37	294 ± 18	414 ± 64
内側前頭前野	411 ± 55	274 ± 17	297 ± 15	371 ± 40
前頭葉皮質	448 ± 78	280 ± 10	392 ± 69	401 ± 37
帯状回	531 ± 94	313 ± 24	463 ± 117	417 ± 38
線条体	424 ± 75	264 ± 14	391 ± 74	393 ± 56
側坐核	431 ± 69	257 ± 7	453 ± 102	384 ± 50
中隔核	445 ± 61	269 ± 6	435 ± 87	418 ± 55
海馬錐体細胞層ＣＡ１	563 ± 109	394 ± 19	395 ± 38	529 ± 37
ＣＡ３	693 ± 168	412 ± 26	364 ± 31	543 ± 22
歯状回顆粒細胞層	626 ± 121	420 ± 24	395 ± 31	596 ± 36
内側手綱核	560 ± 88	358 ± 22	358 ± 30	503 ± 67
扁桃核	403 ± 37	314 ± 9	327 ± 28	435 ± 18
中扁桃様核	547 ± 100	327 ± 7	329 ± 28	548 ± 19

〔考察〕 今回の実験でカイニン酸受容体ｍＲＮＡとキスカル酸受容体ｍＲＮＡの分布を区別することができた。両者は概ね類似した分布を示したが、海馬においてカイニン酸受容体ｍＲＮＡのほうが、キスカル酸受容体ｍＲＮＡよりＣＡ３に多く分布すること、嗅神経核、内側手綱核の分布はカイニン酸受容体に特異的に見られたことなどが異なっていた。以前われわれが報告した分布では中扁桃様核における分布を認めた(5)が、今回の実験では、グルタミン酸受容体ＤｍＲＮＡの分布がこれに相当しており、前回の分布はこれを反映したものと考えられた。[^{3}H] kainate や [^{3}H] AMPA による結合実験 (1,4) と今回の実験結果とは概ね一致するが、結合実験において報告されている線条体における分布は今回の実験では著明には認められなかった。受容体が生合成される部位と発現する部位とに多少の相違が存在する可能性が示唆された。

〔 謝辞 〕Glutamate Receptor A,B,C,D は E.I.Du Pont De Nemours and Co. の M.C.Tyler 氏より提供して頂いた。

〔 文献 〕

1) Greenamyre,J.T.et al. (1985) J.Pharmacol.Exp.Ther.233,254-263
2) Hollman,M. et al. (1989) Nature 342,643-648
3) Keinanen,K et al. (1990) Science 249,556-560
4) Monaghan,D.T. et al. (1983) Nature 306,176-178
5) 富田博秋 他 (1991) 第13回生物学的精神医学会抄録 p.206

73 カイニン酸によるラット脳内ＮＧＦの変動

橋本吉秀[1]、尾前二三雄[2]、古川昭栄[3]
（三井製薬生科研[1]、三井東圧ＬＳ研[2]、岐阜薬大分子生物[3]）

〔要約〕
ラット脳内での、カイニン酸（ＫＡ）によるＮＧＦｍＲＮＡとＮＧＦレベルの経時変化、及び、投与量変化を検討した。ＫＡ（１２ｍｇ／ｋｇ）投与後、ＮＧＦｍＲＮＡレベルは、海馬において投与２～３時間後に、また、皮質において投与９時間後に増加ピークを示した。一方、ＮＧＦレベルは、海馬において投与１～３時間後に一過性の減少を示した後、投与９時間後に増加を示し、また、皮質においては投与２～３時間後に一過性の減少を示した。ＫＡ投与２時間後の海馬でのＮＧＦｍＲＮＡレベルの増加、及び、海馬と皮質でのＮＧＦレベルの減少は、ＫＡ投与量依存的であり、また、これらの増減は、ジアゼパム（ＤＺ）前処置により抑制される傾向が認められた。ＮＧＦｍＲＮＡレベルが増加する以前にＮＧＦレベルが一過性に減少しており、ＫＡ投与により、ＮＧＦｍＲＮＡ発現増加とは異なる機構で、ＮＧＦの合成抑制、または、分解促進が起きていると推定された。

［緒言］
Ｚａｆｒａらは、グルタミン酸レセプターアゴニストであるＫＡ投与により、ラット脳内ＮＧＦ及びＢＤＮＦのｍＲＮＡ発現が増加し、ＤＺ前処置により抑制されることを見い出し、中枢神経系でのＮＧＦ及びＢＤＮＦｍＲＮＡの制御は、ｎｏｎ－ＮＭＤＡタイプのグルタミン酸レセプターやＧＡＢＡレセプターといった神経伝達物質レセプターを介しているという説を提唱した[1,2]。しかしながら、ＫＡ投与後の脳内ＮＧＦあるいはＢＤＮＦの蛋白レベルでの報告はなされなかった。今回、ＫＡ投与後の脳内ＮＧＦｍＲＮＡとＮＧＦレベルの変化を同時に検討した。

［実験方法］
雄性ウィスターラット（６～７週齢）を用い、ＫＡ（６、１２、２４ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内投与した。コントロール群は、生食水投与し、ＤＺ（１０ｍｇ／ｋｇ）投与群は、ＫＡ（１２ｍｇ／ｋｇ）投与１５分前に投与した。ＫＡ投与後、経時的に脳を取り出し部位分けし保存した。ＮＧＦｍＲＮＡは、総ＲＮＡをＡＧＰＣ法により抽出し、ノーザンブロット分析を行った。ＮＧＦは、各部位からソニケーションにより抽出し、酵素免疫測定法にて定量した。

［成績］
ラットの状態は、ＫＡ（６ｍｇ／ｋｇ）投与では大きな変化を示さなかったが、ＫＡ（１２ｍｇ／ｋｇ）投与約２時間後より、激しいＳＥＩＺＵＲＥを起こし、また、ＫＡ（２４ｍｇ／ｋｇ）投与すると約３時間後には、ほぼ全例死亡した。　ＫＡ（１２ｍｇ／ｋｇ）投与（３、６、９、１２、２４ｈｒ）後、ＮＧＦｍＲＮＡレベルは、海馬では投与３時間後、皮質では投与９時間後に増加ピークが認められた。一方、ＮＧＦレベルは、海馬では投与３時間後に減少、６時間後に回復、９時間後に増加、１２時間後には回復するパターンを示した。皮質では、投与３時間後に減少、６時間後には回復するパターンを示した（図１）。　ＫＡ（１２ｍｇ／ｋｇ）投与（１、２、３ｈｒ）後の海馬ＮＧＦｍＲＮＡレベルは、投与２～３時間後より著しく増加していた。一方、ＮＧＦレベルは、海馬では投与１時間後より、皮質では投与２時間後より減少が認められ、以後、急速な回復傾向が認められた。また、ＫＡ投与２時間後のＮＧＦｍＲＮＡ及びＮＧＦレベルの増減は、いずれも、ＤＺの前処置により抑制される傾向が認められた（図２）。ＫＡ投与量依存性を投与２時間後に検討すると、海馬ＮＧＦｍＲＮＡレベル及び海馬、皮質ＮＧＦレベルの増減は、６ｍｇ／ｋｇ投与ではほとんど変化なく、１２、２４ｍｇ／ｋｇ投与でほぼ同程度に変化していた（図３）。

［考察］
ＫＡ投与後のラット脳内ＮＧＦｍＲＮＡレベル増加のタイムコースは、既報[1]とほぼ同等であった。しかし、このＮＧＦｍＲＮＡレベル増加によって引き起こされると考えられるＮＧＦレベルの増加は、海馬においてのみ投与９時

間後に一過性に認められる程度であった。KA投与直後の変化を詳細に検討したところ意外にも、NGFmRNAレベル増加に先立ちNGFレベルが一過性に減少するという現象が認められた。NGFmRNAレベル増加は、結果としてこのNGFレベル低下を補う形で寄与していることが示唆された。KA投与後、極めて短時間に起きるNGFレベル減少は、KA投与量依存性であり、ラットへのダメージと強い相関性が示唆されることから、non-NMDAタイプのグルタミン酸レセプターを介した神経細胞障害の一因とも考えられる。中枢神経系でのNGF制御は、NGFのmRNAと蛋白レベルの変動が解離するという現象を含んでおり、まだ解明すべき種々の要因が残されている。

[参考文献]

(1) F. Zafra et al. (1990) EMBO J. 9, 3545-3550.

(2) H. Thoenen (1991) TINS 14, 165-170.

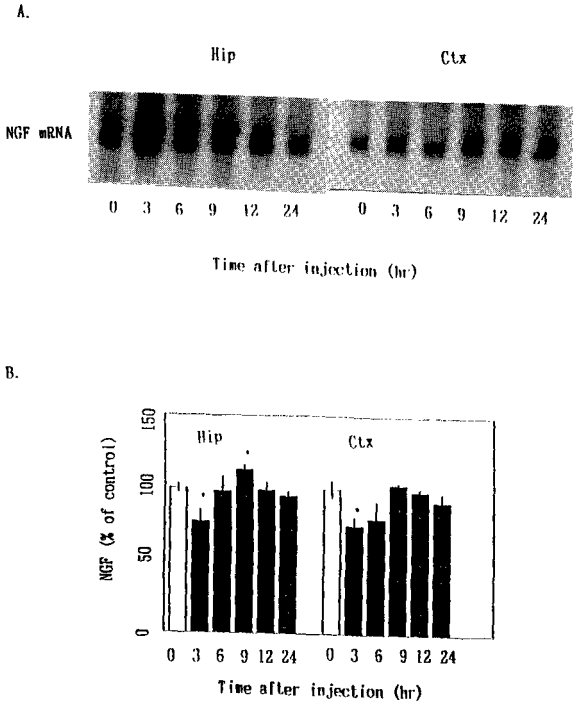


図1　KA投与後のラット脳内NGFmRNA（A）及びNGFレベル（B）の経時変化

KA(12mg/kg)腹腔内投与3, 6, 9, 12, 24時間後に脳を摘出した。

A:1レーンあたり総RNA(20μg)をブロットし、^{32}PラベルしたcRNAプローブでハイブリダイズした。

B:組織湿重量あたりのNGFレベルを、コントロール%で示した:平均±SE(n=4);*, p<0.05;**, p<0.01.

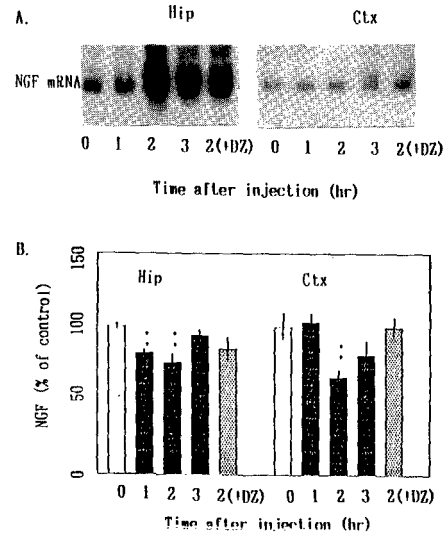


図2　KA投与直後のラット脳内NGFmRNA（A）及びNGFレベル（B）の経時変化とDZ前処置の効果

KA(12mg/kg)腹腔内投与1, 2, 3時間後に脳を摘出した。DZ(10mg/kg)は、KA(12mg/kg)投与15分前に投与し、2時間後に脳を摘出した(+DZ)。

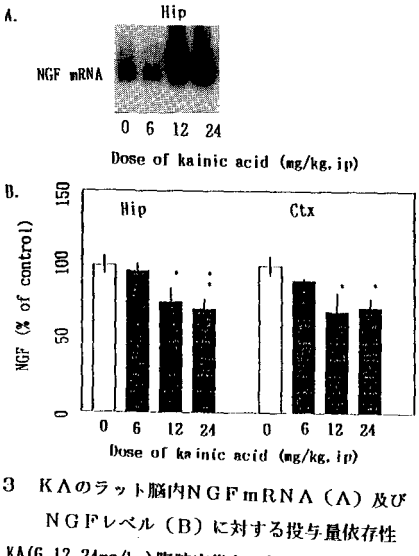


図3　KAのラット脳内NGFmRNA（A）及びNGFレベル（B）に対する投与量依存性

KA(6, 12, 24mg/kg)腹腔内投与2時間後に脳を摘出した。

74 ウシ脳線条体より分離されたコート小胞に存在するドパミンD$_2$受容体とGTP結合蛋白質

尾崎直子、諸井佳代子*、門田朋子*、門田健**、鈴木史郎
(金沢医大・薬理、*千葉大医・高次神経、解剖、
**東京都精神研)

〔要約〕
ウシ脳線条体より分離したコート小胞は^{3}H-spiroperidolをprazosin, ketanserin存在下、特異的に結合した。この結合は飽和性で可逆的だった。見かけ上のKd値は0.5nM, Bmax値は23.1fmol/mg proteinだった。この結合は quinpirole, (-)-sulprideで置換された。また、quinpiroleによる置換曲線は200μMの5'-guanylylimidodiphosphate (Gpp(NH)p)により右側へシフトした。G蛋白質のサブユニット Gsα, Giα, Goα および Gβ に対する抗体を用いたイムノブロッティングにより、52kDa, 45kDa, 41kDa, 39kDa, 35kDaに対応する蛋白が検出され、コート小胞におけるG蛋白質の存在が示された。また、^{32}P-NAD および 百日咳毒素 (IAP) 存在下、約41kDa/39kDaの蛋白質が ADP-リボシル化された。コート小胞におけるアデニル酸シクラーゼ活性は quinpirole および apomorphine 処置により、わずかに抑制された。以上の結果はコート小胞においてもドパミンD$_2$受容体ーGi蛋白質ーアデニル酸シクラーゼ抑制系が存在する可能性を示唆している。

(序論)

コート小胞は外側にコート構造を持つ細胞内小器官の一つである。その機能として、分泌蛋白や酵素などの運搬や、細胞膜上の受容体に結合したホルモンや神経成長因子などをその受容体を介して細胞内に取り込むことが報告されている(1)。また、神経伝達物質の受容体（例えば mAch, アデノシンA$_1$, α_2 、β受容体）のコート小胞における存在が立証されており、これら受容体の細胞膜への運搬や、細胞膜からの取り込み (internalization) に関与していることが示唆されている。コート小胞内に存在するこれら受容体が細胞膜で見られるようにG蛋白質に共役しているかどうかについて検討することは受容体の細胞内動態を知る有用な手がかりとなるだろう。本研究では 主としてドパミンD$_2$受容体について検討した。

(実験方法)

コート小胞の分離：ウシ脳線条体から諸井ら(2)の方法に従って 30-50%連続庶糖密度勾配遠心によって分離した。コート小胞の純度は電子顕微鏡によって調べた。蛋白量はLowry法によって定量した。

受容体結合実験：ドパミンD$_2$ 受容体リガンドとして ^{3}H-spiroperidol(^{3}H-SPD) を用いた。約50-400μg蛋白量のコート小胞標品を各濃度の ^{3}H-SPD と1μM ketanserin, 1μM prazosin 存在下、30℃で1時間インキュベートし、Whatman GF/C濾紙で迅速吸引濾過した。非特異的結合は1μM (+)-butaclamol 存在下の結合とした。

Immunoblotting assay: G蛋白質のサブユニットに対する抗体 (RM/1, AS/7, GC/2 and SW/1 ; New England Nuclear, U.S.A) と コート小胞標品とのイムノブロッティングはSimondsら(3)の方法に準じた。コート小胞はSDS-ポリアクリルアミドゲル(10%)電気泳動後、ニトロセルロース膜へ転写し、約5-30μg蛋白量を含む切片を約500倍に希釈したG蛋白質抗体とインキュベートした。発色は Vectastain® Elite ABC キット (Vecta, U.S.A.)を用いて行った。

ADP-ribosylation: 百日咳毒素またはコレラ毒素によるコート小胞のリボシル化は Bokochら(4)およびTamirとGill(5)の方法を若干改変して行った。コート小胞 (30-70μg蛋白量)を^{32}P-NADと毒素存在下、非存在下でインキュベートした。10% TCAによって反応停止後、遠心沈査をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、その後、オートラジオグラフィーによりADP-リボシル化された蛋白質を検出した。

Adenylate cyclase activity: Gonzalez-Caleroら(6)の方法により ATPを基質として30℃で酵素反応を行い、生成したcyclicAMP(cAMP)をラジオイムノアッセイにより定量することにより測定した。

（実験結果および考察）

コート小胞は^{3}H-SPDを特異的に結合した。特異的結合は全結合量の約30%だった。結合は30℃, 0.5-1時間で平衡に達し、約1nM ^{3}H-SPD で飽和に達した (Fig.1A)。またこの結合は1μM (+)-butaclamolを平衡に達した時点で加えると解離し、結合は可逆的だった。スキャッチャード解析からKd値は 0.5 ± 0.07 nM(mean ± SEM), Bmax値は 23.1 ± 3.22 fmol/mg protein(mean ± SEM) と計算された (Fig.1B)。また、この結合は (-)-sulpiride, quinpirole のようなドパミンD$_2$受容体に対する特異的な薬物によって置換された (Fig.2)。Quinpiroleによる置換曲線は 200μM Gpp(NH)p により右側へシフトした。この結果はコート小胞においてもG蛋白質とドパミンD$_2$受容体の共役が存在することを示唆している。G蛋白質のサブユニットの抗体を用いたイムノブロッティングにより、コート小胞中の 52kDa, 45kDa, 41kDa, 39kDa および 35kDa の蛋白質が染め出されたが (Fig.3A)、これらの蛋白質はコートを除いた小胞でも検出された。従って、コート小胞内に Gsα, Giα, Goα および Gβサブユニット蛋白が存在することが示された。また ^{32}P-NAD, IAP 存在下、約41kDa/39kDa の蛋白質が ADP-リボシル化された。しかし、コレラ毒素による ADP-リボシル化は、今回の実験条件下では検出されなかった (Fig.3B)。コート小胞にはアデニル酸シクラーゼ活性が認められ、これは quinpirole, apomorphine のようなドパミンD$_2$アゴニストによってわずかに減少した。反対に、SKF38393のようなドパミンD$_1$アゴニストによって活性は増加した。ドパミンD$_1$受容体についてはさらに検討が必要である。以上の結果は、ドパミンD$_2$受容体のGi蛋白質を介するアデニル酸シクラーゼの抑制系がコート小胞内にも存在することを示している。ドパミンD$_1$受容体－Gs蛋白質－アデニル酸シクラーゼ系についてはもっか検討中である。

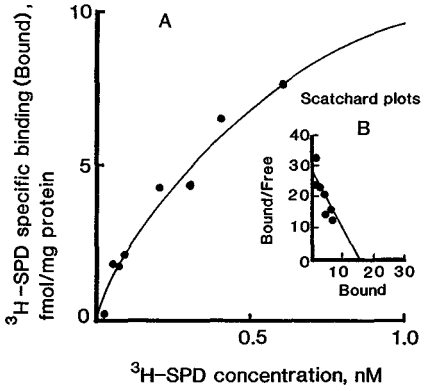


Fig.1 Saturation curve**(A)** and Scatchard analysis**(B)** of ^{3}H-SPD binding to the coated vesicles.

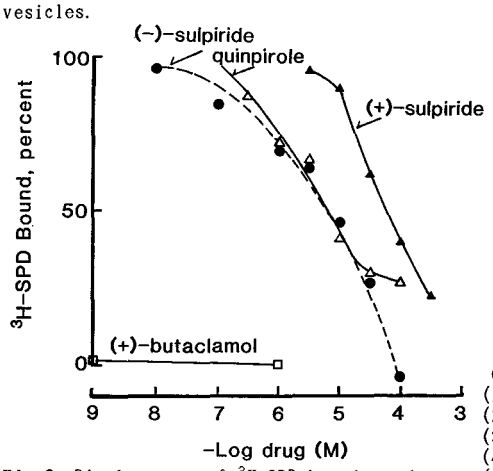


Fig.2 Displacement of ^{3}H-SPD bound to the coated vesicles by agonists and antagonists.

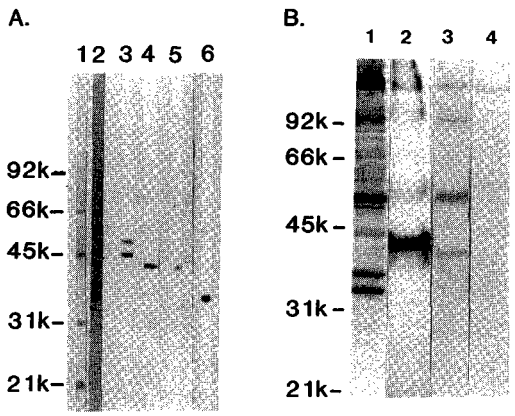


Fig.3 Immunoblotting with G protein antibody**(A)** and ADP-ribosylation by IAP or cholera toxin**(B)** of coated vesicles. **(A)** Component polypeptides and marker proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and then immunoblotted with G protein antibodies. Coomassie blue stain of marker proteins (lane 1) and component polypeptide of coated vesicles (lane 2). Immunoreactive proteins were identified with Gsα (lane 3), Giα (lane 4), Goα (lane 5) and Gβ (lane 6) antibody. **(B)** Coomassie blue stain of SDS-PAGE of coated vesicles(lane 1). Autoradiogram of SDS-PAGE of coated vesicles plus 25μg/ml of IAP(lane 2), coated vesicles alone(lane 3) and coated vesicles plus 25μg/ml of cholera toxin(lane 4). Molecular masses (in kDa) of the marker proteins are indicated on the left.

（文献）

(1)Goldstein, J.L. et al.(1985) Ann.Rev.Cell Biol. 1, 1-39.
(2)Moroi, K. et al. (1989) Japan J.Pharmacol. 51, 128-131.
(3)Simonds, W.F. et al. (1989) Febs Lett. 249, 189-194.
(4)Bokoch, G.M. et al. (1983) J.Biol.Chem. 258, 2072-2075.
(5)Tamir, A. and Gill, D.M. (1988) J.Neurochem. 50, 1791-1797.
(6)Gonzalez-Calero, G. et al.(1990) J.Neurochem. 55, 106-113.

75 G蛋白質Goの2種類のサブタイプの分布

浅野富子、森下理香、加藤兼房
（愛知県コロニー・研・生化）

〔要約〕
マウスのG蛋白質Goのαサブユニット（Goα）のcDNA解析により2種類のGoα（GoAα、GoBα）の存在が予想されている。そこで両アミノ酸配列で異なっている領域に一致したそれぞれのペプチドを合成し、ウサギを免疫して抗体を作製した。一方、脳には2種類のGo型G蛋白質が存在し、主要な蛋白質はGoと呼ばれているもので、少量存在する分子種はGo*と呼ばれている。抗GoAα抗体はウシおよびラットから精製したGoαと反応し、抗GoBα抗体はラットのGo*αとのみ反応した。したがって、GoはGoAにGo*はGoBに対応することが明かとなった。これらの抗体を用いてGoA、GoBの蛋白質レベルでの発現を、種々の組織や細胞で検討した。GoA、GoBとも脳以外では低濃度しか存在せず、GoAは調べたどの組織にもみられ、GoBは脳下垂体、膀胱、腸管、肺、心房、脂肪などに認められた。ラットの発育に伴い脳内のGoA、GoB濃度はともに上昇した。各種クローン化細胞においては、Goα蛋白質に対する抗体でGoを検出できた細胞はいずれもGoAとGoBが存在していた。PC12やNG108-15細胞において、NGFやフォルスコリンによって分化した場合に、GoAは上昇したが、GoBはほとんど変化しなかった。

G蛋白質Goは神経系に最も高濃度存在するG蛋白質で、種々の神経伝達物質の受容体と連関し、神経伝達機構に関与していると考えられている。最近、蛋白質の精製からGoのαサブユニット（Goα）は2種類存在することが報告され、脳の主要な蛋白質で酸性側の等電点(pI)をもつものをGo、新たにみいだされた少量存在する蛋白質で、塩基性側のpIをもつものをGo*と呼んでいる(1)。一方、Goαの遺伝子やcDNAの解析から、alternative splicing により2種類のGoαが産生されることが示唆され、GoAα（またはGo1α）およびGoBα（Go2α）と名づけられた(2-4)。両者はC末端側3分の1が異なっているが、この領域は受容体や効果器と相互作用する部位があると考えられているので、機能的にも両者はかなり異なる可能性がある。しかし、GoαとGo*αがGoAα、GoBαのどちらに相当するのか実際にはまだはっきり示されていない。またそれらの蛋白質レベルでの発現についても報告されていない。そこで今回、私達はGoAαとGoBαのアミノ酸配列に一致するペプチドを合成して、それぞれに対する抗体を作製した。これを用いてGoαとGo*αはどちらに反応するか、また両蛋白質の組織分布などを検討した。

［実験方法］

抗体作製：マウスGoAαのアミノ酸配列(294-308)に一致した合成ペプチド(SNTYEDAAAYIQTQF)、およびGoBαのアミノ酸配列(298-311)に一致した合成ペプチド(TEAVAHIQGQYESK)をヘモシアニンに結合したものでウサギを免疫して、それぞれの抗血清を得た。抗GoAα血清はウシGoαを結合したセファロースで、抗GoBα血清はラットGoα/Go*α混合物を結合したセファロースでそれぞれ精製した。ウシ脳より精製したGoαに対する抗体（抗Goα蛋白質抗体）は既報の方法で作製した(5)。G蛋白質の精製：ラットおよびウシ脳Goαは既報の方法で精製した(5)。ウシ脳Go*はGoldsmithら(1)の方法で精製したのち、抗Goα蛋白質抗体結合セファロースカラムでαサブユニットを単離した(6)。ラット脳Goα/Go*α混合物は抗Goα蛋白質抗体結合セファロースを用いて精製した(6)。イムノブロット：イムノブロットはいずれも2次抗体としてペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG を用い、ジアミノベンチジンの発色、または ECL(Amersham)で行った。

［結果］

精製抗体の特異性を図1と2に示した。抗GoAα抗体はラット、ウシのGoαとよく反応し、ウシGo*α、ラットGi1α、Gi3αとわずかに交差した。一方、抗GoBα抗体はラットのGoα/Go*α混合物とのみ反応し、Goα、ウシGo*α、Giαとはまったく反応しなかった。ラットのGo*αを単離できなかったので、Go*αの代わりにGoα/Go*αの混合物を用いたが、GoαとGo*αをはっきり区別できる等電点電気泳動とそれに続くイムノブロットで抗体の特異性をさらに調べた（図2）。ラット、ウシともに、GoαはpI 5.9から酸性側に複数のバンドを示し、一方、ウシGo*αはpI 6.2のバンドを示した。ラットのGoα/Go*α混合物はGoαと一致するバンドとともにウシGo*αと一致するバンドも示した（図2A）。これらのバンドはすべて抗Goα蛋白質抗体と反応した（図2B）。抗GoAα抗体ではGoαのみが反応し、Go*αはしなかった（図2C）。抗GoBα抗体はラットGoα/Go*α混合物のうちGo*αとのみ反応した（図2D）。これらの結果より、GoαはGoAαと、Go*αはGoBαと対応していることが明かとなった。これ以後はGo、Go*をGoA、GoBと呼ぶ。

つぎに、ラットにおけるGoAとGoBの発現を抗体を用いて検討した。私達はすでに抗Goα蛋白質抗体を用いてGoαの分布について報告しているが(7,8)、そのなかでGoαの比較的高い値を示した組織や細胞についてイムノブロットで調べた。脳以外の組織で

はGoBαは脳下垂体、膀胱、腸管、肺、心房、脂肪などに認められた。GoAαは調べたいずれの組織にも検出できた。ラットの発育に伴い、脳内のGoαは上昇することをすでに報告したが(9)、GoA、GoBはともに上昇することが判明した。クローン化細胞ではPC12, NG108-15, C6, GA-1, G8, 3T3-L1 細胞においてGoA、GoB両者とも発現していた。PC12 と NG108-15 細胞はNGF やフォルスコリンと培養すると突起伸長がみられ、このときGoの濃度が上昇することを報告したが(8)、両細胞とも分化に伴いGoAは上昇し、GoBは変わらないことが明らかになった。

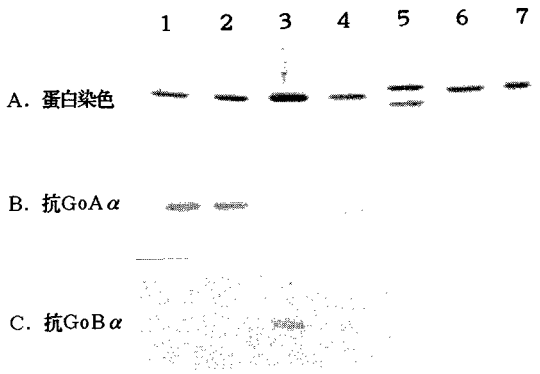


図1. 精製抗体の各種G蛋白質との反応性
lane 1;ラットGoα、2;ウシGoα、3;ラットGoα/Go＊α混合物、4;ウシGo＊α、5;ラットGi1、6;ラットGi2α、7;recombinant Gi3α. lane 3 は0.5μg、5 は0.4μg、他はすべて0.2μg の蛋白質をSDS-PAGEし、蛋白染色(A) またはイムノブロット(B,C)を行った。

［考察］

抗GoBα抗体はラットのGoBとは反応したが、ウシのGoBとは反応しなかったのはこの領域のアミノ酸配列に種差があるものと考えられる。実際、マウスのほかハムスターラット、ヒトのGoBのアミノ酸配列が報告され、この抗体作製に用いたペプチドに相当する領域は、マウス、ラット、ハムスターでは同一であるが、ヒトでは14 個のうち2 個のアミノ酸が異なっていた(2-4)。ウシGoBαのcDNAのクローニングはまだなされていないが、げっ歯類のGoBαの配列とは異なっていることが予想される。一方、抗GoAα抗体はGi1αやGi3αともわずかに交差したが、Gi2αとはしなかった。抗体作製に用いたペプチドに一致する領域のアミノ酸配列を各Giと比較すると、Gi1αとGi3αはGoAαと15個のアミノ酸のうち2個だけ異なっているが、Gi2αは7個も異なっている。したがって、アミノ酸配列の相同性の高さに相関した交差性がみられたものと考えられる。ウシGoBαとの交差性については配列が不明なのでわからない。等電点電気泳動においてみられるGoAαの複数のバンドはGoldsmithら(1)もみいだしているが本体は不明である。ラットにおけるGoA、GoBの組織分布の結果からは顕著な特徴は見いだせなかった。末梢組織のGoのかなりの部分は末梢神経成分由来であるので(7)、神経組織内の両蛋白質の分布を反映しているのかもしれない。私達はすでにウシの心筋および副腎髄質からGoαを抗Goα蛋白質抗体結合セファロースを用いて精製したが、両組織ともGoBが主要な分子種であった(6)。ラットでは両組織ともGoの含有量が少なすぎ、イムノブロットではよく判別できなかった。

［文献］ 1) Goldsmith, P., et al. (1988) Biochemistry 27, 7085-7090. 2) Strathmann, M., et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6477-6481. 3) Hsu, W.H., et al. (1990) J. Biol. Chem. 265, 11220-11226. 4) Tukamoto, T., et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2974-2978. 5) Asano, T., et al. (1987) J. Neurochem. 48, 1617-1623. 6) Asano, T., et al. (1991) J. Biochem. in press. 7) Asano, T., et al. (1988) J. Neurochem. 50, 1164-1169. 8) Asano, T., et al. (1989) J. Neurochem. 53, 1195-1198. 9) Asano, T., et al. (1988) J. Neruochem. 51, 1711-1716.

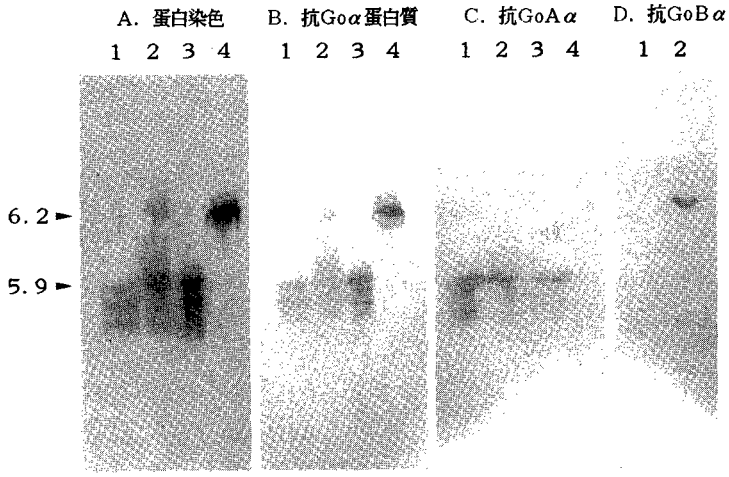


図2. 精製抗体のGoαのサブタイプとの反応性
lane 1; ラットGoα、2;ラットGoα/Go＊α混合物、3;ウシGoα、4;ウシGo＊α. 各G蛋白質 1μgを等電点電気泳動し、蛋白染色(A)、またはイムノブロット(B-D)を行った。左の数字は等電点を示す。

76 ウシ脳コート小胞で見られるＧＴＰ結合ｓｉｔｅ：カゼインキナーゼＩＩとの関連

諸井佳代子、木村定雄、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でみられるＧＴＰ結合について検討を加えた。(1) (^{32}P)8-azido-GTPによるphotoaffinity labelingで150K-180KDa（クラスリン重鎖）、92K-105KDa（アセンブリ蛋白）、50K-57KDa（αチュブリン、その他）の蛋白bandが強く標識され、さらに40K-45KDa，32K-36KDa（クラスリン軽鎖）のbandも標識された。(2) ＧＴＰ結合蛋白の抗体を用いたimmunoblottingによりＧｓα（52KDa、45KDa）、Ｇｉα(41KDa)、Ｇｏα（39KDa）のbandsが染め出された。(3) (^{32}P) ＧＴＰをドナーとしてコート小胞の燐酸化を行うと160KDa、92-105KDa、52-55KDaのbandが燐酸化され、ポリリジン存在下33KDaのbandsも燐酸化された。(4) コート小胞に対する (^{3}H) ＧＴＰ結合及び (^{32}P) azido-ＧＴＰによる蛋白bandの標識もポリリジンにより増強されヘパリンによって抑制された。これらの結果は、コート小胞で見られるＧＴＰ結合部位のうち 40-45KDaはＧＴＰ結合蛋白質のＧｓα、Ｇｉαおよびｇｏαに相当するもの、92-105KDa、52-55KDaおよび31-36KDaはカゼインキナーゼIIの基質蛋白であることを示唆している。

コート小胞は細胞内小器官の一つであり形質膜からのendocytosisやゴルジ体膜からの芽出によって形成される。その機能として分泌蛋白や酵素等の運搬や、形質膜表面上の受容体に結合した血清中の巨大分子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ことも示唆され、すでにいくつかの受容体の存在がコート小胞に示されている(2、3)。第３３回日本神経化学会で我々は、コート小胞に複数のＧＴＰ結合siteが存在し、その一部は受容体の調節にあずかるＧＴＰ結合蛋白質のＧｉ/Ｇｏαであることを報告した(4)。今回このＧＴＰ結合siteがＧi/Go以外のＧＴＰ結合蛋白質およびＧＴＰをドナーとして働くカゼインキナーゼII(5)とどのような関連を持つものか検討した。

［実験方法］

コート小胞の分離：ウシ大脳皮質から、前回と同様(4)30%-50%の連続庶糖密度勾配さらに5-30%の連続庶糖密度勾配遠心を行いコート小胞を精製した。そ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：10-40μg蛋白量のコート小胞標品を 5nM [^{3}H] ＧＴＰと0°C，３０分インキュベートし、反応はWhatmann GF/C濾紙にて吸引濾過することで停止した。非特異的結合は100μMの非標識ＧＴＰ存在下の結合とした。

Photoaffinity labeling：Northup らの方法(6)に従い30−70μgのコート小胞を２uM [^{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（ＰＡＧＥ）を行い、次いでオートラジオグフィーを行った。

Immunoblotting：コート小胞をＳＤＳ−ＰＡＧＥ後ニトロセルロース膜に転写、Simondsら(7)の方法に準じ膜切片を５００倍に希釈したＧＴＰ結合蛋白質の抗体（RM/1, AS/7, GC/2, SW/1, NEN, USA）をもちいて免疫染色した。発色はVestastain®キットを用いて行った。

蛋白キナーゼ による燐酸化：5-10μgのコート小胞を (^{32}P) ＡＴＰまたはＧＴＰとトリス-HCl緩衝液中、２５°C、１０分インキュベートした。ＳＤＳを含む緩衝液で反応停止後電気泳動しオートラジオグラフィーを行った。

［実験結果および考察］

[^{32}P] 8-azidoＧＴＰによるphotoaffinity labelingの結果、150K-180K，92K-105K、70K及び50K-58KDaのbandが強く標識され、40K-45K，32K-36KDaのbandも標識された（図１，lane 2）。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。150-180Kおよび 32K-36KDaのbandはクラスリン（重鎖および軽鎖）の

bandと、92-105KDaのbandはアセンブリ蛋白のbandと一致した。コート小胞を 0.5M トリス塩酸緩衝液(pH、8.0) で処置することで得られるコート画分でも150-180KDa、92-105KDaのbandは標識された(lane 5)。これらのbandの標識はカゼインキナーゼIIの活性化剤ポリリジンの存在下増強し、阻害剤のヘパリン存在下抑制された。図2にimmunoblottingの結果を示した。Gsα, Giα、Goαの抗体により52KDa、45KDa、41KDa、39KDaの蛋白がコート小胞およびコート構造を取り除いた小胞で免疫染色されたが、コート分画では検出されなかった。コート小胞中には二種類の蛋白キナーゼが存在し(5)、その一つはATPのみをドナーとして50KDaの蛋白を燐酸化しヘパリンの影響を受けない (図3, A, lane 2) 。他方、カゼインキナーゼIIはATP、GTPをともにドナーとして用いコート小胞中の160KDa、92-105KDa、52-55KDaの蛋白を燐酸化する。この酵素活性はヘパリン(10ug)で完全に抑制され、ポリリジンで活性化されると33KDaのband (クラスリン軽鎖) が強く燐酸化されてくる (図3、B) 。なお [^{3}H] GTP結合はヘパリン10ug存在下70%まで低下し、ポリリジン存在下用量依存的に増加した。以上の結果はコート小胞中の [^{32}P] 8-azido-GTPで標識されるバンドのうち40-45KDaのものはGTP結合蛋白質のGsα、Giα及びGoαに相当するbandであること、92-105KDa (アセンブリ蛋白) , 52K-54KDa (αチューブリン) 及び32K-36KDa (クラスリン軽鎖) に相当して見られるGTP標識bandはカゼインキナーゼIIの基質蛋白をしめしているものと思われる。クラスリン重鎖で見られるGTP結合の意義についてはさらに検討中である。

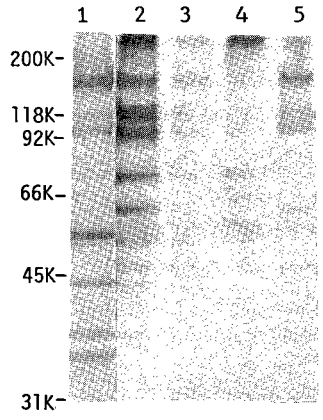


Fig. 1. Photoaffinity labeling of coated vesicles (lane 2), decoated vesicles (lane 4) and coat fraction (lane 5) with [32P]-azido-GTP. lane 1: Coomassie blue stain of CVs. lane 3: in the presence of 1 mM GTP S.

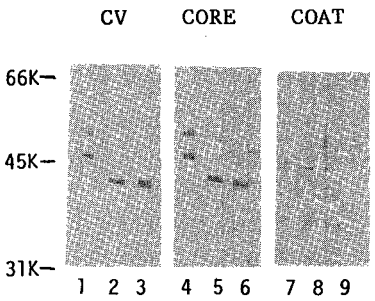


Fig. 2. Immunoblotting of coated vesicles (1-3), decoated vesicles (4-6) and coat fraction (7-9) with antibodies of Gsα (1,4,7), Giα (2,5,8) and Goα (3,6,9).

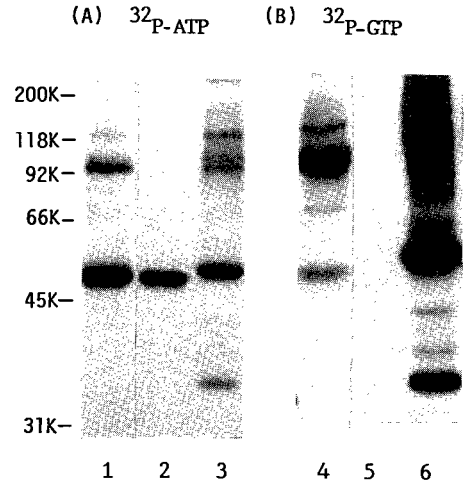


Fig. 3. Phosphorylation of coated vesicles by [^{32}P]ATP (A) or [32P]GTP (B)in the presence of 10μg of heparin (lanes 2, 5) or poly-L-lysine (lanes 3, 6). Molecular masses (Da) of the marker proteins are indicated on the left.

(文献)

(1)Goldstein J.L. et al. (1979) Nature 279, 679-685、(2)Silva W.I. et al.(1986) J.Biol.Chem. 261, 14788-14796, (3)Moroi K. et al.(1989) Japan. J. Pharmacol. 51, 128-131, (4)諸井、久我、門田、(1990) 神経化学、29, 396-397. (5)Takahasi A et al. (1985) J. Biochem. 98, 63-68, (6)Northup J.K. et al.(1982) J. Biol. Chem. 257, 11416—11423 (7) Simonds et al. (1989) FEBS Lett. 249, 189-194.

77 抗うつ薬のGTP結合蛋白質への直接作用：G蛋白質及び薬物特異性について

小澤寛樹、片村能也、芦沢健、鍋島あけみ、橋本恵理、 鎌田裕樹、池田官司、
高畑直彦、斉藤利和
札幌医科大学・神経精神医学講座

[要約]
抗うつ薬の細胞情報伝達系特にGTP結合蛋白質への直接作用に対する影響を光親和型GTPanalog(azidoanilido GTP,AAGTP)のラット細胞膜標本における結合特性を用いて検討した。抗うつ薬は各G蛋白質(GSH,GS,Gi/o,G32) に対するAAGTPの最大結合数(Bmax)を増大させ、親和性を低下させた、特にこの効果は促進性G蛋白質(Gs)に著しく認められた。抗精神病薬にはこの効果は認められなかった。しかし、cognitive enhancerの一部、Ethanolにも抗うつ薬と類似した変化が認められた。本研究よりある種の向精神薬に細胞情報伝達系へ の直接作用が認められた、またその効果にG蛋白質選択性が示唆された。

[緒言]
われわれはこれまでin vivoにおいて抗うつ薬が受容体変化とは 独立してG蛋白質に作用すること(7)、また長期投与においては受容体変化（とくにβ受容体down regulation)またG蛋白質に対する直接的な作用の適応変化としてGsとadenylate cyclaseとの共役の増強が生じることを明らかにしてきた(4,5)。一方、in vitroでは高濃度の抗うつ薬がGi, Goに対して直接的に作用することが示唆されている(2)。そこで今回、in vitroで抗うつ薬のG蛋白質に対する特異性、また他の薬剤と抗うつ薬の比較検討を行なった。

[方法]
Wistar系雄性ラットの大脳皮質膜標本を実験に用いた。[^{32}P]-AAGTPはPfeuffer(6)の方法により作成し、各G蛋白質に対するAAGTPの結合実験はGordon and Rasenick(1)の方法に準じて行なった。各種薬剤存在下のもとで[^{32}P]-AAGTPを10 nMから100 mMまで濃度展開し膜標本(100-150 mg)を容量50 mlの2 mM HEPES(pH 7.4)buffer中で23℃、10分間インキュベートした。インキュベート後同上のbufferにて2回洗浄と遠心を繰り返して非結合のAAGTPを取り除いた。ついでAAGTPを膜に非可逆的に結合させるため、UV(紫外線）を5分間照射した後、4 mM DTT(dithiothretiol) を含むHEPES bufferにて反応を停止させた。SDSを含むTris-HCl bufferに標本を懸濁させ、10%SDS-polyacrylamide gelにて蛋白質電気泳動(PAGE)を行なった。Coomassie blue染色後オートラジオグラフィーを施行し、既にAAGTPにより同定したG蛋白質に相当する部分をオートラジオグラムより確認し、乾燥ゲルより切り出し液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。各G蛋白質に対する[^{32}P]-AAGTPの非特異的結合は各濃度の100倍量の非放射性AAGTP存在下で同様な実験を行ない決定し、全結合と非特異的結合の差を[^{32}P]-AAGTPの特異的結合とした。AAGTP Binding isothermを非線形最小二乗法によりコンピューター解析し、各G蛋白質に対する[^{32}P]-AAGTPの総結合量(Bmax)と親和性(Kd)を求めた。

[結果及び考察]
我々は既にAAGTPがラット脳膜標本でPAGE上52,42,40,32 KDaのバンドに結合し、それぞれGSH [高分子量 促進性G蛋白質（Gs）]、Gs、Gi/o[Gi (抑制性G蛋白質）とGo(other G蛋白質)の混合バンド]であることを同定した(4,5)。また32 KDaのAAGTP結合蛋白質は比較的低分子量のG蛋白質の一種と思われるが、その性質については現在不明である。これらの各G蛋白質に対する[^{32}P]-AAGTPの結合飽和曲線はコンピューター解析よりsingle site modelに適合を示した。single site modelに従って各G蛋白質に対する[^{32}P]-AAGTPのKd,Bmax（総結合量）を求めたところ,抗うつ薬はGSH,GS,Gi/o,G32いずれのG蛋白質に対する[^{32}P]-AAGTPのKd,Bmaxを増加させた。特にGsに対する効果が他のG蛋白質に比べて著しく認められた（Fig1, Table1)。抗精神病薬には上記の効果は認められなかった。抗うつ薬以外の薬物ではcognitive enhancer であるindeloxazineが抗うつ薬と同様な傾向を示した。またethanolがGs選択的に[^{32}P]-AAGTPのBmaxを増加させた(Table 1)。

最近、双極性感情障害者の死後脳においてGsの量が増加が報告されており(8)、感情障害の病因にG蛋白質が重要な役割を持つことが示唆されている。またmastparan, cationic amphiphilic peptides(3)がG蛋白質を直接的に活性化することが報告されている。本研究より向精神薬の細胞情報伝達系への直接作用にG蛋白質及び薬剤特異性が認められたことから、今後、より選択的にG蛋白質機能を修飾する薬物が新しい抗うつ薬・抗精神病薬として可能性を期待される。

[文献]

(1) Gordon ,J.H. and Rasenick, M.M. (1988) FEBS Lett., 235: 201-206.

(2) 三国雅彦.(1991)臨床精神医学. 20, 415-420

(3) Mousli, M. et al.(1990) Trends in Pharmacol. Sci. 11,358-362.

(4) Ozawa, H. and Rasenick, M.M. (1989) Mol. Pharm. 36, 803-809

(5) Ozawa, H. and Rasenick, M.M.(1991) J. Neurochem.

(6) Pfeuffer, T.(1977) J,B.C. 252: 7224-7234, 1977.

(7) 土屋文明、斉藤利和.(1989) 札幌医学雑誌.58:1-10,1989.

(8) Young , L.T. et al (1991) Brain. Res. (in press)

Fig 1: Kinetics of nucleotide binding to G proteins in presence of 300 μM amitriptyline. : Scatchard plots of AAGTP binding

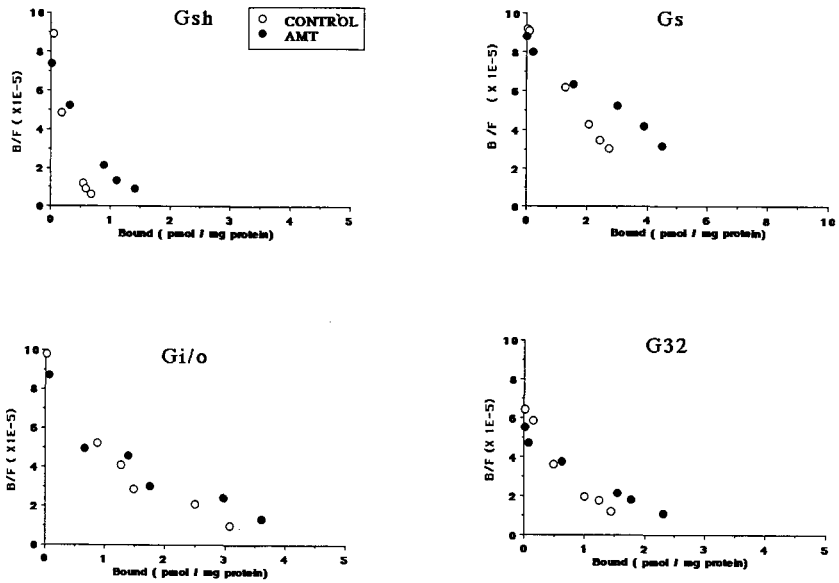


TABLE I : Bmax of [32]-AAGTP binding in addition of various psychotropices for G proteins
The percentage of control binding

Drugs	Gsh	Gs	Gi/o	G32
Desipramine(300uM)	152.1±10.9	210.0±15.3	120.2±20.2	115.3±11.3
Amitriptyline(300uM)	147.3±15.1	232.4±25.1	109.5±11.7	135.9±28.9
Clomipramine(300uM)	222.0±18.8	304.1±36.1	137.0±30.4	152.1±22.9
Mianserin(300uM)	131.6±5.1	303.1±30.9	122.7±15.5	111.0±6.7
Haloperidol(300uM)	92.5±3.8	81.7±4.9	98.2±6.1	108.9±9.8
Sulpiride(300uM)	96.5±6.6	106.0±11.9	104.4±7.9	100.8±5.5
Flunitrazepam(300uM)	118.0±19.1	112.0±9.1	92.0±16.3	91.0±4.7
Ethanol(250mM)	360.9±48.4	371.2±21.1	100.9±20.1	107.1±13.7
Indeloxazine(300uM)	210.1±22.5	286.5±32.4	112.0±10.8	132.2±18.1

78 グアニル酸シクラーゼを活性化するセロトニン受容体

東田道久、野村靖幸
（北大・薬・薬効）

【要約】
NG108-15 細胞へのセロトニン（5-HT）添加により観察される cGMP 上昇の機序についての検討を行った。5-HT は細胞内 cGMP 量の一過性の上昇を引き起こし、その後 cGMP は外液中に放出されることが認められた。20 秒間刺激による初期の cGMP 上昇は ICS 205-930、MDL 72,222 の添加、細胞外 Ca^{2+} 除去、N-methylmonoarginine、BAPTA-AM の前処置により抑制された。一方、10 分間刺激による持続的含量上昇は、これら何れの処置によっても抑制されなかった。また、5-HT による持続的含量上昇は ANP によるものと相加性を示した。以上の結果より、5-HT 刺激による初期の cGMP 量上昇は、5-HT_3 サブタイプ受容体を介した外液 Ca^{2+} 流入、arginine からの NO 生成による可溶性グアニル酸シクラーゼ活性化によること、一方、持続的含量上昇は未知のサブタイプ受容体を介した、ANP 受容体とは共役しない膜結合性グアニル酸シクラーゼの活性化によるものと推定した。

セロトニン（5-HT）受容体は主に薬物親和性から 10 種以上ものサブタイプに細分されており、最近では各々のサブタイプの情報伝達機構ならびに生理作用がさかんに研究されている（1）。我々は以前に NG108-15 細胞を 5-HT で刺激すると cGMP 量が上昇することを報告したが(2)、今回その作用機序について詳細な検討を行ったので、報告する。

【実験方法】

細胞培養：NG108-15 細胞は、牛胎児血清（FCS）含有、DMEM-HAT 培地で培養し、confluent になったものを用いた。細胞膜調製：細胞を dish からはずした後、超音波破砕し、遠心法により細胞膜を調製した。cGMP の定量：無傷細胞を用いての定量は、35 mm polyorinithine コィーテング dish 上の培地を除き、新たに HEPES buffered saline（HBS）900 μl と各種抑制薬等を添加、37 °C で反応させ、1 N HCl を 100 μl 添加することにより反応を停止した。細胞外液と、細胞内液を分取する際には、上清のみをまず 1 N HCl 100 μl 含んだマイクロチューブ中に移した後に、細胞を洗滌、0.1 N HCl を 1.1 ml 添加し、その上清を細胞内液として得た。また細胞膜を用いての定量は、基質としての GTP を含んだ反応 medium 中に細胞膜を添加し、37 °C で 10 分間反応後、0.1 N HCl 0.2 ml を加え、反応を停止させた。各々のサンプル中の cGMP 含量はラジオイムノアッセイ法で定量した。Ca^{2+} 流入量の測定：100 mm polyornithine コーテング dish 上の培地を除き、洗滌後、37 kBq/ml $^{45}Ca^{2+}$ を含む HBS 5 ml または、高濃度 K^+-HBS を加え、37 °C で 5 分間インキュベート後、取り込まれた放射活性を測定した。

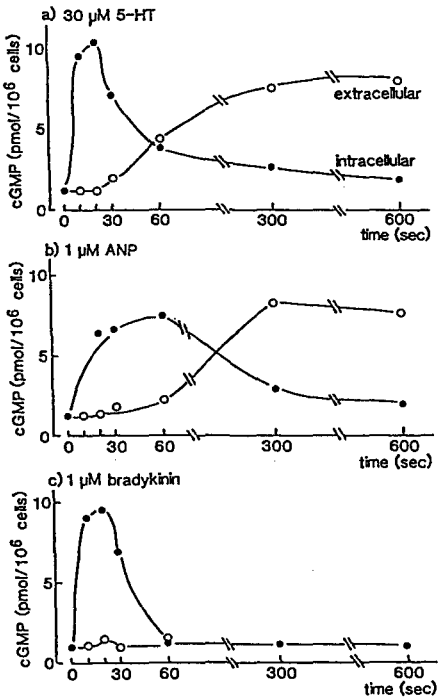


図1　NG108-15 細胞における 5-HT、ANP、bradykinin 刺激による細胞内、細胞外 cGMP 量の経時的変化

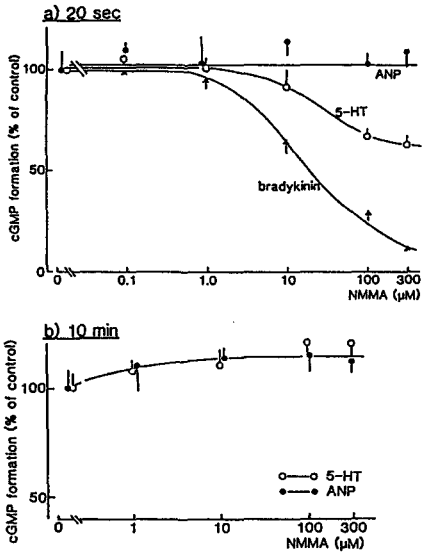


図2　5-HT、ANP、bradykinin 誘発 cGMP 上昇に及ぼす N-monomethylarginine の効果

【実験結果】

5-HT は NG108-15 細胞の cGMP 含量を濃度依存的に上昇させた。5-HT による cGMP 上昇は立ち上がりが早く、少なくとも 10 分間に渡ってその高いレベルを維持した。そこで、細胞内液と外液を分けて cGMP 含量を定量したところ、一過性の内液上昇の後、cGMP が外液に放出されることが認められた（図1）。同様の細胞外への cGMP 放出は ANP 刺激によっても観察されたが、BK 刺激による cGMP 量上昇は内液のみの一過性であった（図1）。GC 活性化に関与する 5-HT 受容体サブタイプの検討を 20 秒間刺激と 10 分間刺激とに分けて行った。30 μM 5-HT 20 秒間刺激による cGMP 量の上昇は、5-HT_3 受容体アンタゴニストである ICS 205-930 および MDL 72,222 により一部抑制された。ところが、5-HT 10 分間刺激による cGMP 量の上昇は、使用したいずれの 5-HT アンタゴニストによっても抑制されなかった。外液 Ca^{2+} の影響を検討したところ、5-HT 20 秒間刺激による cGMP 上昇は、外液 Ca^{2+} の除去により抑制されたが、5-HT 10 分間刺激による cGMP の上昇は、外液 Ca^{2+} を除去してもその濃度依存性には全く影響しなかった。50 mM K^+ による疑似脱分極刺激は、Ca^{2+} 流入量を約 2.2 倍に増大させ、この作用は、電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害薬の verapamil、nifedipine および外液への La^{3+} の添加により有意に抑制された。5-HT 20 sec 刺激による cGMP 上昇は外液への La^{3+} 添加並びに、外液 Ca^{2+} の除去によって抑制されたものの、これら電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害薬によっては影響を受けなかった。さらに、細胞内 Ca^{2+} キレート剤である BAPTA-AM の 効果について検討したところ、100 μM BAPTA-AM 30 分間 処置細胞では、30 μM 5-HT 20 秒間刺激による cGMP 量の上昇は、BAPTA によって一部抑制され、また 1 μM BK 刺激によるものは完全に抑制されたが、30 μM 5-HT 10分間刺激並びに、1 μM ANP 20 秒間および 10 分間刺激は BAPTA 処置により全く影響されなかった。また、5-HT は NG108-15 細胞の PI 代謝には影響しなかった。細胞内遊離 Ca^{2+} は arginine から NO を生成し、cGC を活性化することが示唆されており、この作用を N-monomethylarginine（NMMA）が arginine と競合することによって阻害することが知られている。この NMMA は 1 μM BK 20 秒間刺激による cGMP の上昇を強く抑制し、300 μM 処置によって、ほぼ完全に抑制した(図2)。30 μM 5-HT 20 sec 間刺激による cGMP 上昇は BAPTA-AM の結果と同様、NMMA により一部抑制されたが、1 μM ANP 刺激によるものは全く抑制されなかった（図2）。一方、5-HT および ANP 10 分間刺激による cGMP 上昇は、NMMA によって共に影響されなかった（図2）。5-HT 10 分間刺激によって生ずる cGMP 量の上昇は、ANP によるものと相加性を示した（図3）。さらに、NG108-15 細胞膜の 5-HT 刺激は弱いながらも無傷細胞におけると同様、cGMP 生成量の増大を引き起こした。

【考察】

グアニル酸シクラーゼは大別すると可溶性（cGC）のもの（3）と、膜結合性（mGC）のもの（4）との 2 種類に分けられる。このうち cGC の活性化は arginine から生成される NO が関与すること、ならびに NO 生成は Ca^{2+} 依存性であることが示されている（5)。一方、mGC 活性化には Ca^{2+} は関与せず、また ANP 受容体自体が細胞内に mGC を有することなどが報告されている（6)。NG108-15 細胞の 5-HT 刺激による cGMP 含量上昇は、一過性の立ち上がりの早い細胞内含量の上昇の後、細胞外への cGMP 放出を生ずることが認められたが、前者は cGC を活性化する BK の作用と、後者は mGC を活性化する ANP の作用と類似していた（図1）。そのうちの立ち上がりの早い応答は、5-HT_3 antagonist の ICS 205-930 および MDL 72,222 で抑制されたことから、5-HT_3 受容体が関与することが示唆された。加えて、この応答は、外液 Ca^{2+} の除去、外液への La^{3+} の添加、BAPTA-AM による細胞内 Ca^{2+} のキレート、NMMA の添加により抑制され、脱分極性 Ca^{2+} チャネル阻害薬では抑制されなかったことから、5-HT_3 受容体と共役するカチオンチャネルを介して流入した Ca^{2+} が arginine から NO を生成し、cGC を活性化するため生ずるものと推定した。一方、外液中への cGMP 放出をともなうゆっくりとした応答は、外液 Ca^{2+} 除去、BAPTA、NMMA によって全く影響を受けず、また、膜画分を用いた実験でも cGMP 生成上昇を生じたことから、mGC を介した作用であることが示唆された。この mGC を介した 5-HT の作用は今回検討したいずれの 5-HT antagonist によっても抑制されなかったことから、未知の 5-HT サブタイプ受容体を介したものであるかも知れない。また、ANP の作用と相関性が見られたことから、ANP/mGC とは異なった蛋白質である可能性が高く、さらに検討中である。

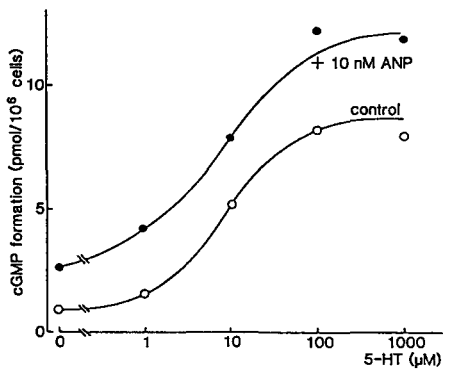


図3 ANP 存在下、および非存在下における 5-HT 誘発 cGMP 量増大効果

【参考文献】

1) Harting, P.R. (1989) TIPS 10, 64-69.
2) 東田道久、野村靖幸 (1989) 神経化学 28, 222-223.
3) Garbers, D.L. (1979) J. Biol. Chem. 254, 240-243.
4) Ward, G.F., Garbers, D.L. and Vacquier, V.D. (1985) Science 227, 768-770.
5) Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M.J. and Moncada, S. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 5159-5162.
6) Chinkers, M., Garbers, D.L., Chang, M., Lowe, D.G., Chin, H., Goeddel, D.V. and Schulz, S. (1989) Nature 338, 78-83.

79 ラットセロトニン$_{1A}$受容体遺伝子の発現 — [^{3}H] 8OH－DPAT結合による解析 —

藤原　豊、富田博秋、引地　充、大月三郎、曾良一郎#、柏原健一#、H.I.Yamamura#、大貫哲男##、浜岸安太郎##、沖俊一##
（岡山大学　精神神経科、#アリゾナ大学　薬理、##ブリストルマイヤーズ・スクイブ研究所）

〔要約〕

クローニングされたラットセロトニン(5HT)$_{1A}$受容体遺伝子を発現ベクターに組み込み、HeLa細胞に導入して発現させ、選択的5HT$_{1A}$作動薬である[^{3}H]8OH-DPATをリガンドとして受容体結合実験を行った。その結果、[^{3}H]8OH-DPATの特異的結合を認め、Kd = 0.3 nM、Bmax = 2 pmol/mg proteinで飽和性の結合を示した。この特異的結合は、GTPによって著明に抑制されるとともに、抗不安薬として開発中であるいくつかの5HT$_{1A}$部分作動薬で置換され、そのIC$_{50}$値は10-150 nMと高親和性で、この値は、ラット海馬の膜標本を用いた結果とほぼ同様であった。

［目的］

神経伝達物質であるセロトニン(5HT)の受容体は、薬理学的にいくつかの亜型に分類されており、このうち5HT$_{1A}$受容体は、不安や抑うつなどの精神症状との関連が指摘されている。最近の分子生物学的手法の進歩によって、ヒトおよびラットの5HT$_{1A}$受容体がクローニングされ(1,2,4,5)、その遺伝子を発現させることで、種々の薬理学的実験が可能となってきた(1,3)。今回我々は、以前に報告した(4)ラット5HT$_{1A}$受容体遺伝子をHeLa細胞に導入し、その発現を確認するとともに、抗不安薬として最近開発されている各種5HT$_{1A}$部分作動薬のこの受容体への親和性を検討し、ラット脳5HT$_{1A}$受容体での値と比較するために[^{3}H]8OH-DPAT結合を行った。

［方法］

＜遺伝子の導入と発現＞

ラットゲノムライブラリーから得られた5HT$_{1A}$受容体遺伝子のいくつかの断片（Xba I -Xba I、BamH I -Xba I、BamH I -Hinc I）を発現ベクターであるRc/RSV(Introgen社)のpolylinker部位に組み込み、さらにリン酸カルシウム法によりHeLa細胞に導入して発現させた。この形質転換株は、10%FCSを含むDulbecco's MEM中で培養し、G418で選択したのちに発育の良いものを増殖させて用いた。

＜受容体膜標本の作製＞

増殖させた細胞を低張緩衝液を加えてかきとり、遠沈（1500 rpm、3 min）した後、TEM緩衝液を加えてホモゲナイズし、再び遠沈（2000 rpm, 5 min）したのち、上清を２回遠沈（20000 rpm, 20 min）して沈渣をTEM緩衝液に再懸濁し、-80°Cにて保存した。

＜受容体結合実験＞

アッセイの際には、50 mMトリス塩酸緩衝液（pH = 7.4、2.5 mM $MgCl_2$）内に解凍した受容体膜標本(約7.5 ug/tube)と[^{3}H]8OH-DPAT（飽和実験では20 pM－10 nM、抑制実験では1 nM）を加えて全用量を0.5 mlとし、30°Cにて30分間軽く振盪しながらインキュベートした後に，Whatman GF/F フィルターを用いて吸引濾過した。その後、3 mlのトリス塩酸緩衝液で2回洗浄し、得られたフィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。非特異的結合は、10 uMの5HT存在下で同様に行なって求めた。

［結果］

ラット5HT$_{1A}$受容体遺伝子をHeLa細胞に導入した際、最も短いBamH I -Xba I 断片を発現ベクターに入れたもののみが、予備的に行った[^{3}H]8OH-DPAT結合実験にて特異結合を有し、受容体の発現を確認できた。また、この細胞から得られたRNAを用いて行ったノーザンブロットにて5HT$_{1A}$のmRNAと思われる約2kbのバンドの存在を確認した。以下の実験はこの形質転換株を用いて行った。20 pM-10 nMの[^{3}H]8OH-DPATを用いた飽和結合実験では、約1 nMで飽和し、コンピューターを用いた解析の結果、Kd = 0.3 nM, Bmax = 2 pmol/mg proteinを示した（図１）。[^{3}H]8OH-DPAT(1 nM)結合における各種薬剤の抑制実験では、5HTならびに8OH-DPATのIC$_{50}$値が2-3 pM、5HT$_{1A}$部分作動薬で抗不安作用を有するとされるbuspirone,

ipsapirone, gepirone, SM3997のIC_{50}値が、10-150 nMを示し、この中ではipsapironeが最も強い抑制作用を示した（表１）。$5HT_2$に親和性の高い抗精神病薬のspiperoneや抗うつ薬のmianserin、ritanserinは、この受容体への親和性は低かった（表１）。さらに、GTPの[^{3}H]8OH-DPAT結合に与える影響をみると、50 uMのGTPが[^{3}H]8OH-DPAT特異的結合を80%以上抑制した。

［考察］

本来$5HT_{1A}$受容体を有しないHeLa細胞に[^{3}H]8OH-DPATの飽和性特異的結合が存在したことよりラット$5HT_{1A}$受容体の発現を確認した。この受容体に対する各種薬物の抑制曲線を求めたところ、ベンゾジアゼピン系薬物に代わる新しい抗不安薬として期待されている$5HT_{1A}$部分作動薬のbuspirone、ipsapirone、gepirone、SM3997は、いずれもIC_{50}値が10-150 nMの高親和性を示した。これらの結果は、従来ラットの海馬で行われた[^{3}H]8OH-DPAT結合における各種薬剤の値とほぼ同様であった(6)。このように神経細胞以外の細胞に発現した$5HT_{1A}$にもこれらの薬物が高親和性に直接結合することが判明した。また、グアニンヌクレオチドによってこの結合が抑制されたことは、この受容体がG蛋白共役型受容体に共通の結合特性を示したものと思われる。

従来の脳組織を用いた受容体結合実験では、組織内の内因性リガンドの存在や、他の受容体との相互作用、シナプス前後の受容体が混在することなどが問題であったが、本来受容体を持たない培養細胞に遺伝子を導入して発現させたものを用いる場合には、より単純な系となるためこれらの問題がなく、今後、種々の実験に応用が可能と思われる。

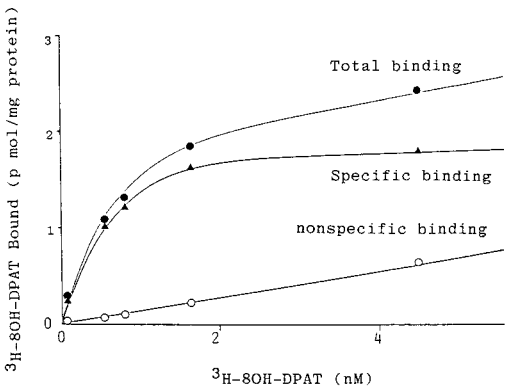
［文献］

1) Albert,P.R., Zhou,Q-Y., Van Tol,H.H.M., et al.(1990) J. Biol. Chem. 265, 5825-5832
2) Fargin,A., Raymond,J.R., Lohse,M.J., et al.(1988) Nature 335, 358-360
3) Fargin,A., Raymond,J.R., Regan,J.W., et al.(1989) J. Biol. Chem. 264, 14848-14852
4) Fujiwara,Y., Nelson,D.L., Kashihara,K. et al.(1990) Life Sci. 47, PL127-PL132
5) Kobilka,B.K., Frielle,T., Collins,S., et al.(1987) Nature 329, 75-79
6) Titeler,M., Lyon,R.A., Davis,K.H., et al.(1987) Biochem. Pharmacol. 36, 3265-3271

表１　ラット$5HT_{1A}$受容体遺伝子を発現するHeLa細胞とラット海馬での特異的[^{3}H]8OH-DPAT(1nM)結合に対する各種薬物のIC_{50}値

薬物	ＩC$_{50}$（nM）	
	HeLa細胞	ラット海馬
5HT	2.40	2.97
8OH-DPAT	2.14	
Buspirone	42.8	47.1
Gepirone	121	126
Ipsapirone	13.7	17.5
SM3997	35.3	17.0
Spiperone	363	
Mianserin	>500	
Ritanserin	>500	

図１ラット$5HT_{1A}$受容体遺伝子を発現するHeLa細胞膜での[^{3}H]8OH-DPAT結合飽和実験



80 $5HT_2$ 受容体を介する細胞内情報伝達経路に対する抗うつ薬の効果：ヒト血小板を用いた研究

金子元久　大須賀伸佳　菅野智行　柳内 務　増子博文　熊代 永
福島県立医科大学 神経精神医学教室

〔要約〕 $5HT_2$ 受容体を介する細胞内情報伝達経路に対する抗うつ薬の効果を検討するため、中枢神経系の$5HT_2$受容体の末梢モデルとされるヒト血小板を用い次のような実験を行った。(1)抗うつ薬の急性投与の効果を検討するため、in vitroで、$5HT_2$ 受容体のantagonist ligandである ^{3}H-ketanserin の結合能、 5HT 刺激による血小板内遊離Ca^{++}濃度の上昇反応、ならびに 5HT induced shape change に対する各抗うつ薬(amoxapine, clomipramine, desipramine, imipramine および mianserin)の効果を検討した。さらに、(2)抗うつ薬の慢性投与の効果を検討するため、正常者26例(平均年齢34.2±9.7歳)と未治療の内因性うつ病者17例(平均年齢38.8±14.5歳)について5HT-induced shape change を測定し、さらにうつ病者ではmianserinにより治療した4例(平均年齢29.8±6.2歳)の治療前、および治療後の寛解状態の5HT-induced shape change をも測定した。その結果、(1)^{3}H-Ketanserin結合、5HT刺激による遊離Ca^{++}濃度の上昇反応、ならびに5HT-induced shape changeに対して各抗うつ薬はいずれも阻害作用を示し、またそれぞれに対する抗うつ薬の抑制能(IC_{50})の間には有意な正の相関が認められた。(2)正常者と未治療の内因性うつ病者の5HT-induced shape changeには差異は認められなかった。次に mianserinによる治療例では、寛解後に全例において5HT-induced shape changeの増加が認められた。以上の結果より、抗うつ薬を急性投与した場合には、$5HT_2$ 受容体の細胞内情報伝達経路に対しては抑制的に作用するが、mianserinを慢性的に投与した場合には、急性投与の場合とは異なり情報伝達経路の最終反応を増強する可能性が示唆された。

$5HT_2$ 受容体を介する細胞内情報伝達経路に対する抗うつ薬の効果については、まだ不明な点が多い。そこで今回われわれは、中枢神経系の$5HT_2$ 受容体に類似した$5HT_2$ 受容体を有し、その末梢モデルとされるヒト血小板を用い、①$5HT_2$ 受容体のantagonist ligandである^{3}H-Ketanserin の結合能($5HT_2$ 受容体の結合能)、②5HT 刺激による血小板内遊離Ca^{++}濃度の上昇反応($5HT_2$ 受容体の2次情報伝達機能の指標)、(3)5HT-induced shape change ($5HT_2$ 受容体を介する生物学的活性の指標)に対する抗うつ薬の急性投与の効果をin vitroで検討した。また慢性投与の効果を検討するため、未治療の内因性うつ病者の5HT-induced shape change を測定し、さらにmianserinによる治療後の寛解状態における変化をも調べた。

〔方法〕 (1)^{3}H-Ketanserin 結合および5HT 刺激による血小板内遊離Ca^{++}濃度の上昇反応の測定に用いる血液には抗凝固剤として10% ACDを、また5HT-induced shape change の測定に用いる血液には 50 mM 2Na EDTAを用い、健康成人より採血した。本実験に用いた抗うつ薬は、amoxapine, clomipramine, desipramine, imipramine および mianserinで、1nMの^{3}H Ketanserin 結合、10^{-6}Mの5HT刺激による血小板内遊離Ca^{++}濃度の上昇反応、10^{-6}Mの5HTによる5HT-induced shape change におよぼす各抗うつ薬の効果を検討した。^{3}H-Ketanserin 結合の測定は三国らの方法[3]を一部改変して行い、また血小板内遊離Ca^{++}濃度はGrynkieviczらの方法[1]で、さらに5HT-induced shape change はPletscherらの方法を一部改変した増子の方法[2]で測定した。(2)うつ病者の治療前後における5HT-induced shape changeの測定については、対象としてRDC(Research Diagnostic Criteria)の診断基準を満たす内因性うつ病者17例(平均年齢38.8±14.5歳)であり、そのうちmianserinで治療した4例(平均年齢29.8±6.2歳)については寛解状態にも測定した。正常対照群は26例(平均年齢34.2±9.7歳)であった。

〔結果〕 (1)^{3}H-Ketanserin 結合、5HT刺激による遊離Ca^{++}濃度の上昇反応、ならびに5HT-induced shape change に対する抗うつ薬の急性投与の効果については各抗うつ薬はこれらのいずれに対しても抑制作用を示し、特にAmoxapineとMianserinは強い抑制作用を示した(Table 1)。これらの各抗うつ薬による ^{3}H-ketanserin 結合に対する抑制能(IC_{50})、遊離Ca^{++}濃度の上昇に対する抑制能(IC_{50})、ならびに5HT-induced shape changeに対する抑

制能(IC_{50})の3者の間には、それぞれ有意な正の相関 ($P<0.01$)が認められた(Table 2)。(2)正常者と未治療時の内因性うつ病者の5HT-induced shape changeには有意差は認められなかった。次に、mianserinによる治療例では、寛解状態において、全例5HT-induced shape changeの増強が認められた(Fig.1)。

〔考察〕 今回の急性投与の実験では、各抗うつ薬が、$5HT_2$ receptor に特異的に結合する ^{3}H-Ketanserin 結合や、二次情報伝達機能を反映するとされる5HT刺激による血小板内遊離Ca^{++}濃度の上昇反応、生物活性の発現としての 5HT-induced shape change のいずれに対しても抑制作用を示し、しかも、これら三者の間にはそれぞれ正の相関関係が存在することが認められた。このことより、$5HT_2$受容体を介する情報伝達経路に対して抗うつ薬の効果は、結合部位以後の情報伝達経路ではなく、結合部位そのものに対する阻害作用によっている可能性が示唆された。しかし、三環系抗うつ薬の場合は$5HT_2$受容体に対する作用は弱く、抗うつ効果に直接関係するものではないと思われる。一方、mianserinについては急性投与の場合、$5HT_2$ 受容体機能に対する抑制作用は強力であったが、慢性投与の場合は$5HT_2$ 受容体を介する情報伝達経路の最終反応である5HT-induced shape change が増強され、急性投与した場合とは異なる結果が得られた。このことは、mianserinの慢性投与の効果は、受容体の結合部位以降の機能に対する作用や他の神経伝達系を介した作用の関与が推測された。

(文献)1. Grynkiewicz et al. (1985) J. Biol. Chem. 260, 3400-3450. 2. 増子博文. (1987) 福島医学雑誌 37, 293-304. 3. 三国 et al. (1986) 神経化学 25, 304-306.

Table 1

Effect of the antidepressants on ^{3}H-Ketanserin binding, 5HT-stimulated $(Ca^{++})i$ increase and 5HT-induced shape change

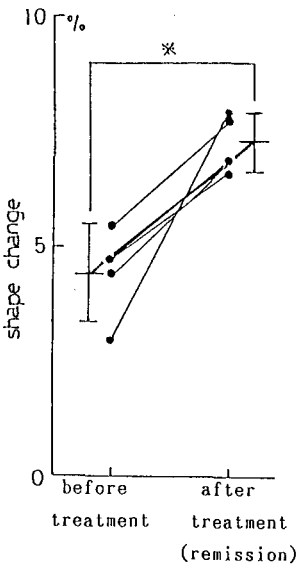
Antidepressants	IC_{50} (nM)		
	^{3}H-Ketanserin binding	$(Ca^{++})i$ increase	Shape change
Amoxapine	6.5±2.3	9.1±2.3	40±13
Mianserin	15±6.0	18±4.2	180±43
Clomipramine	620±200	2100±180	2900±720
Desipramine	1300±470	5000±510	4500±1000
Imipramine	1600±200	7700±3500	6900±1200

(n=3~5, mean±SEM)

Table 2

Correlation among the IC_{50} values of the three parameters

Parameters	IC_{50} of ^{3}H-Ketanserin binding	IC_{50} of $(Ca^{++})i$ increase	IC_{50} of Shape change
IC_{50} of ^{3}H-Ketanserin binding	–	r=0.986 (P<0.01)	r=0.987 (P<0.01)
IC_{50} of $(Ca^{++})i$ increase	r=0.986 (P<0.01)	–	r=0.989 (P<0.01)
IC_{50} of Shape change	r=0.987 (P<0.01)	r=0.989 (P<0.01)	–



※p<0.05, Student's t-test

Fig.1 5HT-induced shape change before and after the treatment with mianserin in the deprossed patients

81 老齢ラットの中枢コリン作動性神経系の生化学的マーカーの性質

江頭　亨、須藤　慎治、河野　俊郎
大分医科大学　薬理学教室

〔要約〕
老齢および若年ラットの中枢コリン作動性神経の生化学的マーカー、muscarinic receptor(mAChR)、choline acetyltransferase(CAT)活性、acetylcholinesterase(AChE)活性およびcholine uptake能を脳2部位、大脳皮質(CR)および間脳部(SS)で比較検討した。老齢ラット脳では若年のそれに比較して、QNB 結合部位(mAChR) ではKdおよびBmax値が、CAT およびAChE活性ではVmax値が、またcholine uptake能はKmおよびVmax値がいずれも減少していた。QNB 結合に対するpirenzepinの影響を見たところ、老齢および若年ともその阻害態度に相違は認められなかったが、老齢ラット脳のSS部の QNB結合は、若年ラットのそれに比べ、低濃度のatropineで阻害された。一方、若年ラット脳のcholine uptake能はhemicholinium(HC-3) で著明に阻害されるが、老齢ラットでは高濃度のHC-3でも完全な阻害は得られなかった。この事は、老齢ラット脳のコリン作動性神経機構の生化学的マーカーは、若年ラットに比べただ単に減少しているのでなく、質的にも変化しているものと思われる。

老年期痴呆症状において、今日、生化学的には種々の神経伝達物質や神経ペプチドに変化が起こる事が明らかにされてきた。特に、脳内アセチルコリン系賦活薬が記憶障害を改善[1,2]し、大脳皮質へ投射するコリン作動性ニューロンの細胞を含む前脳基底部破壊により記憶障害が誘発される[5]こと、さらに老年期痴呆患者の大脳皮質でCAT 活性の低下[9]が見られることから、老年期の記憶障害（痴呆）の成因を脳内コリン作動性神経系の活性低下に求めるという考えが有力視されている。このために物理的[5]および化学的手法[7]を用いて、前脳基底部を破壊した痴呆動物モデルが若年ラットで開発され、使用されている。しかし、老年期痴呆に関して神経化学的に検討する場合には、生理的に正常である老齢期の中枢コリン作動性神経系を総合的に把握しておく必要がある。そこで、老齢ラットを用い、中枢コリン作動性神経機構の生化学的マーカーであるmuscarinic receptor(mAChR)、choline acetyltransferase(CAT)活性、acetylcholinesterase(AChE)活性およびcholine uptake能を指標にし、若年ラットのそれらと比較検討した。

〔実験方法〕
実験動物としてSprague-Dawley系雄性若年（6週齢）および老齢（2年）ラットを用いた。ラット脳を大脳皮質（Cortical regions, CR)および間脳部(Subcortical structures, SS）に分割し、常法によりホモジェナイズおよび遠心分離で粗膜標本および粗シナプトソーム分画を得、これを実験試料とした。 mAChR測定は^{3}H-QNBをリガンドとして Yamamura and Snyderの方法[14] で、CAT 活性はFonnumの方法[4]で、AChE活性は分光学的にEllmanらの方法[3]で、choline uptake能は粗シナプトソーム分画を用いたSorimachi and Kataoka の方法[13] により、それぞれ測定した。ラット脳の粗膜標品および粗シナプトソームの蛋白量はLowry らの方法[6]で測定した。

〔結果および考察〕
老齢ラット脳のQNB 結合はCR部およびSS部のいずれにおいても、若年ラットに比較して有意な低下がみられた（図1）。これをScatchard 解析したところ、老齢ラットでは著明なBmax値の減少がみられた。しかし、同時にKd値の減少も認められた。これは、老化によりmAChR の数は減少するが、その親和性を増加させ、mAChR の機能を維持しようとつとめているものと思われる。一方、QNB 結合に対するmAChR のantagonistであるpirenzepine(Pz)およびatropineの阻害態度を検討したところ、Pzの場合、老齢ラット脳のCR部およびSS部のいずれにおいても、若年ラットの場合と同様な阻害曲線が得られた。しかし、atropineの場合、CR部では老齢と若年ラットではその阻害態度には相違は見られなかったが、老齢ラットのSS部の QNB結合はatropineの低濃度(1～100 pM) でも約20 %阻害された（図2）。脳内にはmAChR のsubtype (M_1, M_2) が存在し、特にM_1は大脳皮質に多く分布し、Pz

はこのM_1と特異的に結合することが知られている[10]。しかし、SS部ではatropineと親和性があるM_1とM_2が混在しており、今回の結果にみられた様に、老齢化によりM_1とM_2の受容体の比が変化するか[8]、高親和性のatropine結合部位（抗コリン剤結合部位）が形成されるのかもしれない。老齢ラット脳の CAT活性は若年ラット脳のそれに比較してCR部およびSS部のいずれにおいても、約30 %の低下を示し、AChE活性は若年のそれに比して、CR部およびSS部においてそれぞれ約10 %および20 %低下していた（図1）。この両酵素活性をLineweaver-Burk plot法で酵素化学的に検討したところ、老齢ラットのいずれの酵素においてもKm値には変化は認められなかったが、Vmax値が減少していた。すなわち、CATおよびAChEの酵素自身による量的減少であった[1,2]。 老齢ラット脳のcholine uptakeは若年ラットのそれに比較してかなり低下しており、CR部およびSS部で若年ラットの約80 %および65 %であった（図1）。このcholine uptakeをLineweaver-Burk plot法で酵素化学的に検討したところ、老齢ラットのcholine uptakeのKmおよびVmax値はいずれも若年ラットに比べ低下していた。このことは、老化によりcholine uptake機構（部位数）は減少するが、Km値も減少していることから、choline uptake機構においてcholineに対する親和性を増加させて、この機構をある程度維持しているのかもしれない。この老齢および若年ラット脳のcholine uptake機構に対するhemicholinium(HC-3) の効果をin vitroで比較した。図3で見られるように、若年ラットの場合、HC-3の低濃度で著明に阻害された。一方、老齢ラット脳のシナプトソームのcholine uptake機構はHC-3では完全に阻害されず、10^{-4} Mの高濃度のHC-3でもCR部およびSS部では、それぞれ20 %および30 %のcholine uptake能が存在した。この事は、老齢化に伴うcholine uptake機構の減少のメカニズムとして、低濃度のHC-3で阻害される部位が減少することから、uptake機構のcarrier molecules の減少によるものかもしれない[11]。また、老化により脳シナプトソーム膜のリン脂質の構成が変動する事が知られており、HC-3にinsensitivなcholine uptake機構が形成されたためかもしれない。これらの結果は、生理的な正常老化においても中枢のコリン作動性神経機構の生化学的マーカーは量的な減少のみならず質的にも変化しており、さらに詳細な検討が必要と思われる。

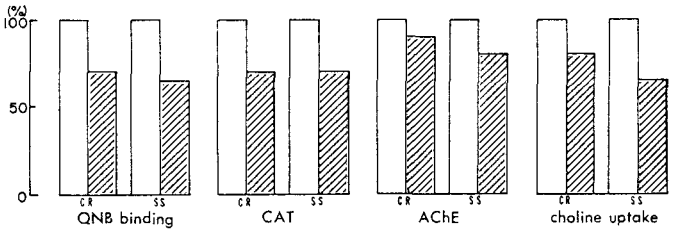


図1．老齢ラット脳のコリン作動性マーカー（若年を100 %）

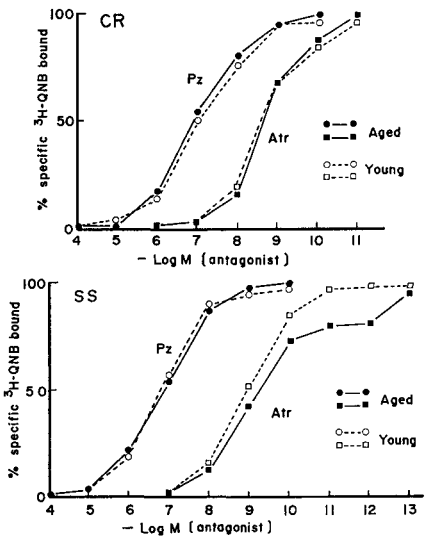


図2．QNB 結合に対するPzおよびatropineの影響

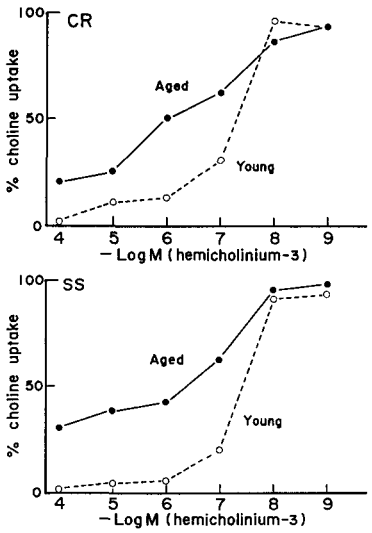


図3．choline uptakeに対するH-3 の影響

〔参考文献〕

1)Altavista, MC. et al. (1988)Brain Res. 455, 177. 2)Bartus, RT. et al. (1982)Science 217, 408. 3)Ellman, GL. et al. (1961)Biochem. Pharmacol. 7, 88. 4)Fonnum, F. (1975)J. Neurochem. 24, 407. 5)Johnston, MV. et al. (1978)Science 201, 274. 6)Lowry, OH. et al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265. 7)Mantione, CR. et al. (1983)J. Neurochem. 41, 251. 8)Mash, DC. et al. (1985)Science 228, 1115. 9)Perry, EK. et al. (1977)Lancet i 189. 10)Raiterai, M. et al. (1984)J. Pharmacol. 228, 209. 11)Sirvio, J. et al. (1988)Pharmacol and Toxicol. 62, 227. 12)Sitram, N. et al. (1978)Science 201, 274. 13)Sorimachi, M. and Kataoka, K. (1974)Brain Res. 72, 350. 14)Yamamura, HI. and Snyder, SH. (1974)Proc. nat. Acad. Sci. USA 71, 1725.

82 ディジタル画像解析による中隔野分散細胞培養系におけるアセチルコリンエステラーゼ陽性神経細胞の分化・発育に関する検討

松本智明、宮本亜紀、大原たかね
ヘキストジャパン、医薬総合研究所

〔要約〕　無血清下に調製、維持したラット胎仔中隔野分散細胞培養系を用い、膜成分を含む新生ラット脳組織抽出物のアセチルコリンエステラーゼ（AChE）陽性神経細胞に対するトロフィック効果を形態学的変化をもとに神経成長因子（NGF）のそれと比較検討した。海馬抽出液は、対照に比し、25倍のAChE陽性細胞数の増加及び細胞当たりのAChE陽性面積の２倍の増大を引き起こした。また、その効果は、脳の他の部位より得られた抽出物よりも低濃度において顕著であった。一方、NGF（100ng/ml）は、細胞当たりの陽性面積を２倍に上昇させたが、陽性細胞数の上昇は、10ng/ml において最大1.4倍に増加させたに過ぎなかった。また、これらの現象は、全測定視野に対するAChE陽性面積の割合をパラメーターとして測定した結果とよく符合するものであった。以上の結果は、NGF以外に胎生期の未分化な中隔野神経細胞に対し、コリン作動性の機能を誘起させる成分が新生ラット海馬に他の脳の部位に比し多量に存在することを示唆している。

［はじめに］　最近の多くの研究は、中隔－海馬系におけるコリン作動性神経の分化・発育・生存・機能維持に対する種々の因子の存在を示している。海馬組織抽出物中の低分子量成分[2]、可溶性成分[1),2)]、膜成分[1)]に他の部位に比し顕著なトロフィック活性が存在すると報告されている。また、NGFが、前脳基底部コリン作動性神経細胞に対する標的由来神経栄養因子であると考えられるに至っている[4)]。しかしながら、その多くの研究が生化学的パラメーターを指標としている点、さらに胎生期の未分化な細胞を用いていることが、そのトロフィック効果の狭義における意味上の解釈を不明確なものにしていたと考えられる。今回、我々は、ディジタル画像解析の技術を応用し、ラット胎仔由来中隔野分散細胞培養系中のAChE陽性神経細胞の体型測定を行うことにより、新生ラット脳組織抽出液及びNGFの効果を比較検討した。

［実験方法］　1）中隔野分散細胞培養：17日齢ラット胎仔脳より中隔野を摘出し、無血清下に初代分散培養を行った。トリプシン処理及びピペッティング操作により分散させた細胞をpoly-L-lysineでコートしたプラスチック製培養皿（φ：35mm）に４～６×10^4cells/cm^2の密度で接着させた。この細胞を完全合成培地(modified N2 medium)[1)]を用いて６日間培養した。なお、培地は隔日に全量を交換し、NGF（2.5S, Sigma）及び脳抽出物はPBSで溶解又は希釈した後、1.5mlの培地にその100μlを培養１日目に添加、以後培地交換とともに再度添加した。2）AChE染色：培養標本をDulbecco's phosphate-buffered saline（PBS）で洗浄、風乾後、４% paraformaldehydeを含む0.1Mリン酸緩衝液により固定し、Tagoらの方法[3)]に従って行った。
3）脳組織抽出物：２週齢の新生ラット脳を大脳皮質、海馬、中隔及びその他の部位に分け、５倍量のPBSでホモジナイズ後、20,000g、45min遠心し、上清を－30℃で保存した。タンパク質量をLowry法により定量した結果、その上清原液のタンパク質濃度はいずれも4.7～5.1mg/mlの範囲であった。4）画像解析：画像解析装置（Luzex II D®、Nikon）に倒立顕微鏡（Diaphoto®、Nikon）をモノクロビデオカメラ（CTC 2600、Ikegami Tsusinki）を介して連結し、入力画像のバックグラウンドの明暗レベルを一定にするため、画素のgray tone Histogramにおいてピーク値が256段階（0：黒、255：白）中192になるように光源強度を設定した。培養標本の画像からAChE反応生成物の顆粒上の沈着が生じている部分を得るため、gray level 170以下の画素を抽出し、二値画像を得、その面積を測定した。全測定面積中のAChE陽性面積の割合（Fractional %）の測定は、×４対物レンズを使用し、2.6×2.3mm^2に相当する画像を１培養皿当たり30～40画面処理することにより行った。細胞当たりのAChE陽性面積は、×40対物レンズを用い、単独で存在している陽性細胞の画像を入力し、マニュアル操作により測定視野を限定し、上記二値化操作により測定した。なお、測定後、30 μm^2/cell以下のものはデータから除外した。また、陽性細胞数は、１×１cm^2の培養領域におけるその数を直接顕微鏡下にカウントした。

［結果及び考察］　ラット脳各部位組織抽出液の添加により、AChE陽性面積（Fractional %）は、濃度依存的に増大した。そして、海馬抽出液のその効果は、大脳皮質、中隔野、その他の脳の部位より得られた抽出

液よりも低濃度において顕著であり、8倍及び4倍希釈液添加において大脳皮質抽出液に対して有意な増大を認めた（Fig. 1）。また、海馬抽出液は、2倍希釈液添加により、対照に比しfractional %の48倍の最大反応が得られたのに対し、それ以外の抽出液では原液の添加によっても、その最大反応を得ることはできなかった。上記抽出液間の活性の差が顕著である2倍から8倍の希釈液添加によるAChE陽性細胞数及び細胞当たりのAChE陽性面積の変化を検討した結果、いずれの抽出液についても、先のfractional %の上昇に相関した陽性細胞数の増加を認めるとともに、約2倍の細胞当たりの陽性面積の増大を観察した（Table 1）。さらに4倍希釈液添加におけるそれぞれの抽出液間の比較により、海馬抽出液が他の部位の抽出液より有意に強く細胞当たりの陽性面積を増大させる活性を有していることが示された。海馬抽出液のgel filtration HPLCを実施し、その溶出液の活性をfractional %をパラメーターとして測定した結果、その主要活性ピークは、約200KDの溶出位置に認められた。一方、1～100ng/mlのNGFも、それら3つのパラメーターを濃度依存的に上昇させたが、その作用の様相は、脳抽出液のそれと異なり、10ng/mlにおいて陽性細胞数を最大1.4倍にするに留まり、細胞当たりの陽性面積を約2倍にする活性は認められたものの、fractional %の増大は、100ng/mlにおいて対照の3.1倍であった（Table 2）。さらに、8倍希釈海馬抽出液の存在下、0.1～300ng/mlのNGFの作用を検討したが、相加的及び相乗的効果を認めることはできなかった。本研究で用いた無血清下でのラット胎仔由来中隔野培養系では、脳抽出液又はNGFの添加により、AChE陽性神経細胞の分化・発育・生存等のトロフィックな現象が同時に亢進されるものと考えらる。したがって、本培養系において正確な意味においてトロフィック効果を上記分類することはできない。しかしながら、本研究で得られた形態学的解析の結果は、NGFがAChE陽性神経細胞の発育を亢進するが、分化を誘起する活性は極めて弱いことを示しており、さらに、NGF以外に、胎生期の未分化な中隔野神経細胞にコリン作動性の機能を誘起させる成分が、新生ラット海馬に他の脳の部位に比較し多量に存在することを示唆している。

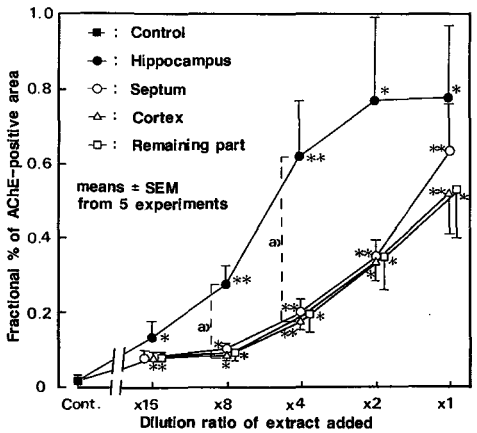


Fig. 1. Dose-response curves of extracts from different rat brain regions on increase of fractional % of AChE-positive area
*p<0.05, **p<0.01 vs. cont.(t-test), [a]p<0.05 (t-test)

Table 1. Concentration-dependent responses on differentiation and development of AChE-positive neurons in septal cultures by treatment with tissue extracts from different rat brain regions

Tissue	Dilution ratio of extract	Morphometric parameter of AChE-positive cells: No. of cells/cm² (% change)	Area, μm² (% change)
Control		24±5	144±9
Hippocampus	x8	209±64 (871)	199±14** (138)
	x4	418±119* (1740)	273±17** (190)
	x2	597±190* (2490)	277±15** (192)
Septum	x8	66±14 (275)	193±14** (134)
	x4	170±25** (708)	212±15**,++ (147)
	x2	270±83* (1130)	301±24** (209)
Cortex	x8	116±21** (483)	222±15** (154)
	x4	133±29* (554)	215±17**,+ (149)
	x2	268±68* (1120)	265±33** (184)
Remaining part	x8	73±18 (329)	166±19 (115)
	x4	156±48 (650)	164±18++ (114)
	x2	205±56* (854)	265±26* (184)

Effects of diluted rat brain extracts were examined in 5 experiments using the cultures seeded at a density of $4x10^4$ cells/cm². Values represent means±SEM. Data of area (μm²/cell) were obtained from 39-55 AChE-positive cels in the 5 cultures. * p<0.05, ** p<0.01 vs. vehicle-treated control (*t*-test); + p<0.05, ++ p<0.01 vs. 4-fold hippocampal extract-treated culture (*t*-test)

Table 2. Morphometric analysis of trophic effects of NGF on AChE-positive neurons in primary cultures of fetal rat septum

Concentration of NGF (10 g/ml)	Morphometric parameter of AChE-positive cells: No. of cells/cm² (% change)	Area, μm²/cell (% change)	Fractional % (% change)
Control	76.8±5.0	138±12	0.023±0.003
0.1	67.0±2.3 (87)	155±24 (112)	0.027±0.005 (117)
1.0	93.5±11.9 (122)	181±20 (131)	0.046±0.005 (200)**
10	109.8±7.4 (143)**	227±23 (164)**	0.056±0.002 (243)**
100	102.0±10.6 (133)	278±26 (201)**	0.071±0.005 (309)**

Effects of various concentrations of NGF were examined in 4 independent experiments using the cultures seeded at a density of $6x10^4$ cells/cm². Values represent means± SEM. Data of area (μm²/cell) were obtained from 32-43 AChE-positive cells in the 4 cultures. ** p<0.01 vs. vehicle-treated control (*t*-test)

[文献] 1) Emerrit, M.B., Segovia, J., Alho, H., Mastrangelo, Jr. M.J. and Wise, B.C. (1989), J. Neurochem. 52, 952-961.

2) Ojika, K. and Appel, S.H. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 2567-2571.

3) Tago, H., Kimura, H. and Maeda, T. (1986), J. Histochem. Cytochem. 34, 1431-1438

4)武井延之、畠中 寛(1987), 代謝 24, 21-28.

83 脳神経終末におけるアセチルコリン合成と放出の加齢変化

田中康一、安藤　進
（東京都老人総合研究所、生体膜部門）

〔要約〕
中枢神経終末（シナプス）でのアセチルコリン合成及び放出の加齢変化について、マウス大脳皮質より調製したシナプトソームを用いて検討した。アセチルコリン合成に加齢変化は認められなかったが、高カリウム刺激によるアセチルコリン放出は老齢マウスで有意に低下していた。老齢マウスでは刺激強度の増加に対する放出量の増加率が若齢の約1/2に低下していた。しかし、アセチルコリン放出のトリガーとなる外液カルシウムイオンの神経終末への流入量には加齢変化は認められなかった。これらの知見から、老齢マウスでの神経終末からのアセチルコリン放出低下はカルシウムイオン流入以降の放出過程の障害による可能性が考えられた。

演者らは、老齢脳のシナプスでは静止膜電位が減少し、シナプスの興奮性が低下している可能性を指摘した(1)。今回シナプスにおけるアセチルコリン代謝の加齢変化を明らかにしようとした。既に、正常老化におけるアセチルコリン合成や放出の加齢変化が報告されているが(2,3)、未だ一定の傾向が示されているとはいえない。従来、アセチルコリンの合成や放出を測定するのには放射性または非放射性の前駆体を用いてなされているが、生体内プールによる前駆体の希釈、目的物質単離の煩雑さ、測定精度等に問題があったと考えられる。本実験では固定化酵素カラムを用いる電気化学検出器付の高速液体クロマトグラフィーを用いて、コリンとアセチルコリンを精度よく定量することにより神経終末におけるアセチルコリンの合成と放出の加齢変化について検討した。

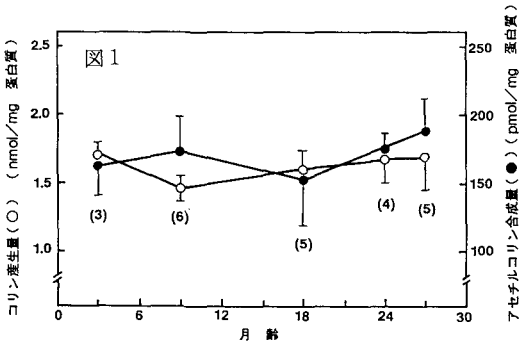
（実験方法）
シナプトソームの調製：若齢から老齢に至る種々の月齢群の雌性C57BL/6マウスの大脳皮質部よりBoothとClarkのFicoll密度勾配遠心法(4)によりシナプトソームを調製した。
アセチルコリン合成量と放出量の測定：エゼリンを含むKrebs-Ringer液にシナプトソームを懸濁し，37℃で30分間インキュベートした。反応を過塩素酸添加によって停止し、内部標準として既知量のエチルホモコリン（EHC）加えた後遠心し、その上清を試料とした。合成されたアセチルコリン量を固定化酵素カラムを接続した電気化学検出器付の高速液体クロマトグラフ（HPLC-ECDシステム、BAS社製）で定量した。アセチルコリン放出は、シナプトソームを37℃で30分間同様にインキュベートした後、懸濁液に高濃度カリウムを含むKrebs-Ringer液を加え最終カリウム濃度を調整し、37℃でインキュベートした。5分間のインキュベーション後、氷冷して反応を停止し、EHCを添加後その上清をHPLC-ECDシステムに導入した。
^{45}Ca取り込み量の測定：シナプトソームを37℃で10分間プレインキュベートした後、0.5μCiの^{45}Caを加えさらに10分間インキュベートした。EGTAとルテニウムレッドを添加することで反応を停止し、反応液をGF/Bフィルターで濾過した。フィルターをKrebs-Ringer液で洗浄後、フィルターに保持されている放射活性を測定した。

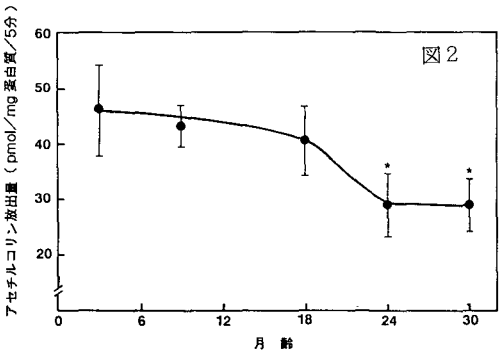
（結果と考察）
1）アセチルコリン合成の加齢変化
若齢から老齢に至る5つの月齢群についてその神経終末でのコリン産生量とアセチルコリン合成量を調べた結果を図1に示す。両パラメータとも加齢による変化は全く認められなかった。インキュベーションメディウム中のグルコースやカリウム濃度を変化させコリン産生やアセチルコリン合成過程への影響をみたが、いずれの条件でも加齢変化は見られなかった。この結果は、神経終末でのコリン産生、アセチルCoA供給、あるいはにアセチルコリン合成酵素活性には加齢変化のないことを示すものと考えられる。

２）アセチルコリン放出の加齢変化

図２に、高カリウム刺激によってシナプトソームから放出されるアセチルコリン量の加齢変化を示す。３か月齢から18か月齢までは放出量に変化はみられないが、24か月齢以降の老齢マウスではアセチルコリン放出量が有意に低下していた。刺激を与えない場合の自然放出量には加齢変化は認められなかった。次に、老齢の30か月齢とその対照として9か月齢のマウスより得たシナプトソームを用いて外液カリウム濃度の変化に対するアセチルコリン放出量の変化を調べた（図３）。外液カリウム濃度の増加（即ち、刺激強度の増加）に伴ってアセチルコリン放出量は増加するが、放出量の増加率は老齢マウスで低く9か月齢の約1/2であった。このように、より強い刺激入力に対するアセチルコリン放出量が老齢で低下することは、老齢動物のニューロンネットワークにおける神経伝達効率の低下を示唆するものと考えられる。

神経刺激に伴う外液カルシウムイオンの神経終末内への流入がトリガーとなって、アセチルコリンは放出されると考えられている。老齢マウスで認められたアセチルコリン放出低下がこのカルシウムイオン流入の減少によってもたらされているか否かを^{45}Caのシナプトソームへの取込で検討した。その結果、老齢（30か月齢）でも6か月齢と同様の取り込み活性を示した。神経終末への外液カルシウムイオン流入の加齢変化を調べた実験の多くは、老齢動物でのカルシウム取り込み量の低下を認め、この取込み低下が伝達物質放出の加齢低下の要因であると報告している(5,6,7)。しかしながら、本実験の結果は、老齢マウス神経終末からのアセチルコリン放出低下は神経終末への外液カルシウムイオン流入量の減少によるものではなく、カルシウムイオン流入以降の放出過程に障害が起こっている可能性を示唆するものと考えられた。





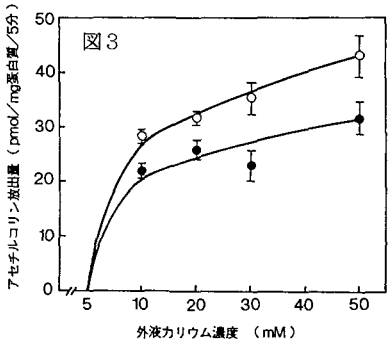


図１　シナプトソームにおけるコリン産生とアセチルコリン合成の加齢変化

図２　高K^+刺激によるシナプトソームからのアセチルコリン放出の加齢変化

図３　外液K^+濃度変化に対するアセチルコリン放出の変化
○は9か月齢、●は30か月齢を示す。（n=4）

（文献）

1) Tanaka,Y. and Ando,S. (1990) BrainRes.506, 46-52
2) Bartus,R.T., Dean,R.L., Beer,B. and Lippa,A.S. (1982) Science, 217, 408-417
3) Dracham,D.A. (1981) In:Brain Neurotransmitters and Receprors inAging and Age-related Disorder pp255-268
4) Booth,R.F.G.and Clark,J.B. (1978) Biochem.J., 176, 365-370
5) Peterson,C. and Gibson,G.E. (1983) J.Biol.Chem., 258, 11482-11486
6) Peterson,C. and Gibson,G.E. (1983) Neurobiol.Aging, 4, 25-30
7) Lwslie,S.W., Chandler,L.J.,Barr,E.M. and Farrar,R.P. (1985) Brain Res., 329, 177-183

84 アセチルコリン受容体遺伝子移入 NG108-15 細胞におけるイノシトールリン酸産生と c-fos 誘導作用

佐久間聡子、熊谷千尋、東田道久、東田陽博*、野村靖幸
〈北大・薬・薬効、 *金沢大・医・神経情報・神経物性〉

【要約】
ムスカリン性アセチルコリン（Mus-R）受容体の各種サブタイプの細胞生理作用を検討する目的で、NG108-15 細胞に m1 - m4 の4種の Mus-R 遺伝子を移入し、イノシトールリン酸量ならびに c-fos mRNA 誘導量を定量した。m1 移入細胞の 1 mM アセチルコリン（ACh）刺激は、血清刺激によるよりも強い c-fos mRNA 誘導を引き起こしたが、m3 移入細胞では ACh 刺激による c-fos mRNA 誘導は血清によるものよりも弱かった。一方、イノシトールリン酸量の増大は、m1、m3 両移入細胞において認められたが、m1 受容体刺激では IP_3、IP_2 の持続的増大を生じたのに対し、m3 刺激では IP_1 のみが持続的に増大した。以上の結果より、m1、m3 両 Mus-R は、共に PI 代謝に関与するものの、イノシトールリン酸生成様式、ならびに c-fos mRNA 誘導には差異が認められることが明らかとなった。

ムスカリン性アセチルコリン受容体（Mus-R）は遺伝学的、薬理学的分類により m1 - m5（M1 - M5）のサブタイプに分けられている。そのうち、m1 と m3 はイノシトールリン脂質代謝促進を、m2 と m4 はアデニル酸シクラーゼ抑制を引き起こすことが示唆されているが、m1 と m3 あるいは m2 と m4 の機能的差異に関しては不明である。そこで今回、ニューロンのモデルとしての NG108-15 細胞に m1 - m4 遺伝子を移入し受容体を発現させ、アセチルコリン（ACh）刺激を行い、細胞情報伝達機構ならびに生理機能についての検討を行ったので、報告する。

【実験方法】

細胞培養：NG108-15 細胞は 4 % 牛胎児血清（FCS）含有 DMEM-HAT 培地で培養した。Mus-R の NG108-15 細胞への移入：Mus-R cDNA を組み込んだ pKNH プラスミドをリン酸カルシウム法により NG108-15 細胞に移入した（1）。イノシトールリン酸の定量：polyornithine コーテングをほどこした 35 mm dish 上で semiconfluent になった NG108-15 細胞の培地を除き、新たに inositol を除去した 2 % FCS 含有 DMEM 培地 3 ml と、100 kBq/dish の [^{3}H] inositol を添加し、17 時間培養した。反応は [^{3}H] inositol 含有培地を除き、洗滌後 HBS 950 µl と ACh 50 µl を加え、37 °C でインキュベートすることにより行った。その後 10 % トリクロロ酢酸（TCA）500 µl を添加して反応を停止、水飽和エーテルで TCA を除去した後、イオン交換樹脂により各種イノシトールリン酸を分離した。c-fos mRNA の検出：polyornithine コーティング 100 mm dish 上で confluent になった NG108-15 細胞上の培地を除き、新たに FCS を含まない培地で 1 時間 preincubation した後、ACh または FCS を添加し、37 °C で 60 分間反応させた。その後、反応培地を除去、洗滌後、グアニジウム/CsCl 法で mRNA を抽出、ノーザンブロット法により c-fos mRNA を検出した。

【結果】

m1 移入 NG108-15 細胞の 1 mM ACh 刺激は、60 分をピークとする時間に依存した c-fos mRNA 誘導を引き起こし、その作用は血清刺激によるものより著しく強かった。同様の c-fos mRNA 誘導は m4 でも見られたが、その作用は血清刺激によるものより弱く、また、m3 移入および、非移入細胞（生来 m4 を有する）ではごくわずかに認められるのみであった（図1）。一方、PI 代謝におよぼす各受容体刺激の影響を検討したところ、1 mM ACh、30 秒間刺激は m1 および m3 移入細胞でイノシトールリ

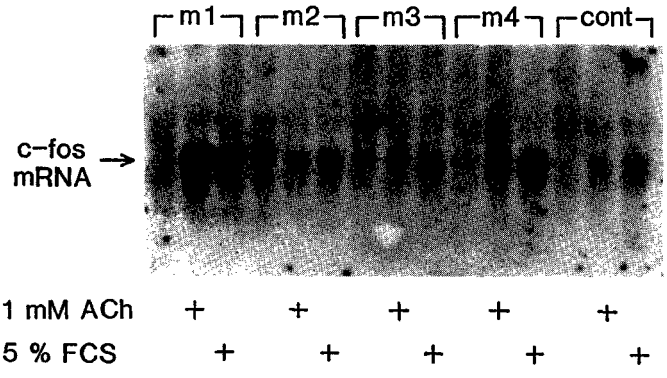


図1 各種ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ遺伝子移入移入 NG108-15 細胞における 1 mM アセチルコリン（ACh）、5 % 牛胎児血清（FCS）刺激による c-fos mRNA 誘導

ン酸量の増大を引き起こした（図2）。しかしながら、m1、m3 間でのイノシトールリン酸の生成様式には差異が認められ、m3 受容体刺激では IP_3、IP_2 生成量はほとんど上昇せずに、ほとんどが IP_1 であるのに対し、m1 受容体刺激では、IP_1 の生成量は m3 と比較して少なく、逆に IP_3、IP_2 の持続的な誘導を引き起こした（図3）。

【考察】

c-fos 遺伝子の転写制御領域におけるコンセンサス配列の活性化には、PI 代謝促進や、cAMP、血清刺激が関与することが示唆されている (2)。一方、Mus-R は m1、m3 が PI 代謝促進を、m2、m4 がアデニル酸シクラーゼ抑制を引き起こすことが示されていることから、m1、m3 刺激により c-fos 誘導を生ずることが予想される。しかしながら、今回の結果からは m1 のみが血清刺激よりも強い c-fos 誘導を引き起こし、m3 の作用は弱いことが認められた。このことより、c-fos mRNA 誘導には、PI 代謝以外の因子が関与するかあるいは、PI 代謝にはいくつかのパターンがあり、c-fos 誘導を生ずるものと生じないものとが存在することなどの可能性が考えられる。m1 刺激によって生ずる PI 代謝は、IP_3 および IP_2 量の 60 分以上に渡る持続的増大を引き起こしたのに対し、m3 によって生ずる PI 代謝ではこの作用は認められなかった。この持続的 IP_3、IP_2 の増大が c-fos 誘導に関与するのかも知れない。また、m1 刺激は cAMP 上昇を生ずることも報告されており (3)、PI 代謝と cAMP 上昇の両作用によって強い c-fos 誘導を生じていることも考えられる。今回の結果は、同じ PI 代謝に共役する m1、m3 2種の Mus-R が、イノシトールリン酸産性様式の差に関連した異なる細胞機能を有することを示唆しており、この2種の受容体の情報伝達機構等の詳細については現在検討中である。

【参考文献】

1) Fukuda, K., Higashida, H., Kubo, T., Maeda, A., Akiba, I., Bujo, H., Mishina, M. and Numa, S. (1988) Nature 335, 355-358.

2) 吉田哲郎、鈴木健之、伊庭英夫 (1990) 実験医学 8, 1487-1494.

3) Buck, M.A. and Fraser, C.M. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 666-672.

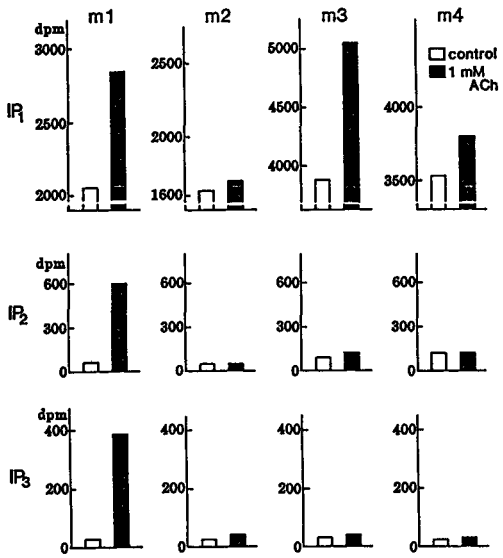


図2　各種ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ遺伝子移入 NG108-15 細胞の 1 mM アセチルコリン (ACh) 30 秒間刺激により生ずるイノシトールリン酸

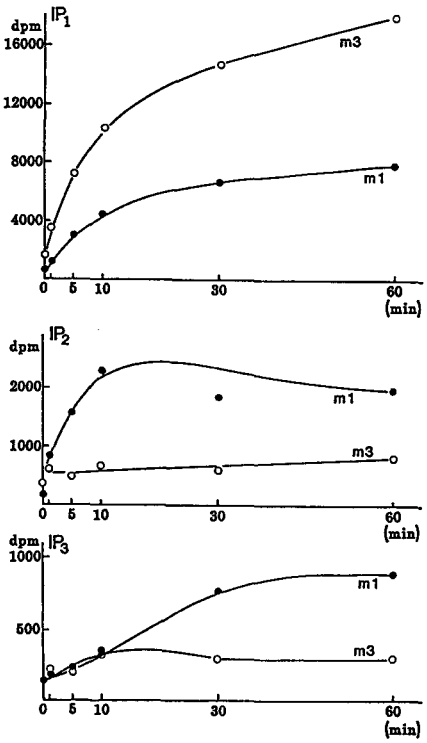


図3　m1 および m3 受容体を移入した NG108-15 細胞の 1 mM アセチルコリン刺激により生ずる各種イノシトールリン酸の経時変化

85 成長円錐膜ムスカリン性アセチルコリン受容体の薬理学的性質について

斎藤繁[1,2]、五十嵐道弘[1]、小宮義璋[1]
（群馬大学医学部　分子病態学[1]、麻酔・蘇生学[2]）

〔要約〕　ラット胎生17日目から生後5日目の前脳より単離した成長円錐膜のムスカリン性アセチルコリン受容体についてその性状を薬理学的に検討した。胎性17日目の段階で成長円錐膜には 557 fmol/mg protein のムスカリン受容体が存在しており、その値は発生の段階を追って増加する傾向が認められた。また、成長円錐膜のムスカリン性受容体は同年齢脳の他の膜画分に比較して有意に濃縮して存在していることが示された。3 種類のムスカリン受容体拮抗物質を用いて成長円錐膜の受容体を薬理学的に検討したところ、各拮抗物質の Kd 値は成長円錐膜と成熟シナプトゾーム膜で特に差は認められなかったが、成長円錐膜では成熟シナプトゾーム膜で優位な M1 サブタイプの比率が低いことが認められた（ E17 GCM; M1:29.5% M2:56.9%, adult SPM; M1:63.6% M2:5.9% ）。

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(3)。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生化学的性状を検討してきた(4,5,6,11)。最近 Gispen らはムスカリン性アセチルコリン受容体が成長円錐での GAP-43 の燐酸化に関与している可能性を示唆した(12)。そこで今回我々は [^{3}H]-quinuclidinyl benzilate (QNB) を用いて成長円錐膜でのムスカリン性アセチルコリンレセプターについてその薬理学的特性を検討したので報告する。

【方法】　①成長円錐画分の調整：成長円錐画分はラット胎生17日目、20日目、生後2日目、5日目の前脳より、Pfenninger法の変法を用いて採取した(6)。②異なる日齢のラット前脳より採取した成長円錐がほぼ均質な組成をもっていることを確認するため、各成長円錐画分を電子顕微鏡を用いて形態学的に、また蛋白質・燐酸化蛋白質の構成を電気泳動を用いて生化学的に比較した(4)。③成長円錐膜画分の調整：成長円錐画分を低張Tris-Bufferで処理し、成長円錐膜画分とした。④P_2膜画分(P_2M)・核周囲膜画分(PNM)の調整：成長円錐膜と同じ日齢のラット前脳の低速遠心沈査を再びホモジェナイズしこの遠心上清を低張処理してPNMを得た。同様に低速遠心上清から(P_2M)を得た。⑤受容体結合実験：各膜画分50 μg蛋白を30℃燐酸Buffer中で１時間[^{3}H]QNBとインキュベートし、この溶液をグラスファイバーフィルター上に吸引濾過した。フィルターにトラップされた放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定しその値をScatchard解析してBmax,Kdを求めた。受容体のサブタイプ構成は、予め[^{3}H]-QNBで飽和させた受容体をpirenzepine, AF-DX 116で置換させた時の置換曲線を解析することによって求めた。

【結果】電子顕微鏡による検討では、胎生17日目から生後5日目の間では、成長円錐画分に形態的に大きな変化は見られず、シナプス小胞やpostsynaptic density等の成熟シナプス要素の混入も認められなかった。生化学的検討では成長円錐膜画分の蛋白質組成に大きな変化は見られず、また、燐酸化蛋白質の構成も変化していないことが示された。成長円錐膜のムスカリン性アセチルコリン受容体は胎生17日目の時点で 557 fmol/mg protein と成熟シナプス膜の約 30% の密度で存在し、生後に向かって次第に増加する傾向が見られた。また、他の膜分画と比較すると成長円錐膜ではムスカリン性受容体が集積して存在していた。[^{3}H]-QNB,atropine,pirenzepine,AF-DX116に対する解離定数(Kd)は成長円錐膜においても成熟シナプス膜においてもほぼ同一の値を示したが、サブタイプ比率ではpirenzepineに対して低親和性・AF-DX116に対して高親和性のM2受容体が成長円錐膜で多かった。

【考察】成長円錐の単離法としては、胎生17日目のラットを用いたPfenninger法(9)と生後5日目のラットを用いたGordon-Weeks法(2)が確立されているが、胎生より生後まで日齢を追って単離しその性状を検討した報告は見あたらない。今回の結果から胎生17日目から生後5日目の間ではほぼ均質な成長円錐が単離可能であり、成長円錐の性状を成熟シナプスの混入に妨げられることなく、時期を追って検索可能であることが示された。

培養神経細胞を用いた実験からセロトニン、サブスタンスP、ＧＡＢＡ、グルタミン酸、アセチルコリン等の神経伝

達物質が神経突起の伸長・停止をコントロールしている可能性が示唆されている(8)。また、単離成長円錐を用いた実験から成長円錐にはcAMP合成系やPI応答系といった細胞内情報伝達機構が備わっていることが示されている(8)。これらの報告と合わせると、今回の実験で成長円錐膜に集積していることが示されたムスカリン性受容体は神経回路網構築の過程で細胞間の情報伝達機構になんらかの役割を担っている可能性が強いと考えられる。また、成長円錐膜では成熟シナプス膜に比較してM2サブタイプの比率が大きいことが示されたが、M2受容体はautoreceptor或はheteroreceptorとして神経伝達物質の放出をコントロールしていると言われている(10)。GABAに関しては成長円錐でのGABAの放出がautoreceptorによってコントローされていると言う報告があるので(7)、成長円錐のM2受容体も同様にautoreceptorとして機能しているのかも知れない。一方、成長円錐膜では脂質構成が成熟シナプス膜のそれと大きく異なっているが(6)、脂質環境は受容体のリガンド親和生に影響を与えることが知られているので(1)、これが成長円錐膜の特異なサブタイプ比率に関与している可能性も考えられる。今後、受容体以後の細胞内情報伝達機構についても更に検討を進めてゆきたい。

〔形態学的検討にあたってご指導頂いた鳴田修先生（群大医・解剖学第二）、受容体結合実験法についてご教示頂いた芳賀達也教授、並びに中村史雄先生（東大脳研・生化学）に深謝いたします。〕

【文献】(1)Berstein G.,Haga T. and Ichiyama A.(1989)Molec.Pharmac. 36,601-607.(2)Gordon-Weeks P.R. and Lockerbie R.O.(1984)Neuroscience 13,119-136.(3)五十嵐道弘(1990)蛋白質核酸酵素 35,464-479.(4)Igarashi M. and Komiya Y.(1991)Biochem.Biophys.Res.Commun.(in press).(5)Igarashi M., Saito S. and Komiya Y.(1990)Eur. J.Biochem.193,551-558.(6)Igarashi M.,Waki H.,Hirota M,Hirabayashi Y.,Obata K. and Ando S.(1990)Devl.Brain Res.51,1-9.(7)Lockerbie R.O.,Gordon-Weeks P.R. and Pearce B.R.(1985)Devl.Brain Res.21,265-275.(8)Mattson M.P.(1988)Brain Res.Rev. 13,179-212.(9)Phenninger K.H.,Ellis L.,Johnson M.P.,Friedman L.B. and Somlo S.(1983)Cell 35,573-584.(10)Raiteri M.,Marchi M. and Paudice P(1990)Ann.N.Y.Acad.Sci. 604,113-129.(11)Saito S.,Komiya Y. and Igarashi M.(1991)Neuroscience (in press).(12)Van Hoof C.O.M.,De Graan P.N.E.,Oestreicher A.B. and Gispen W.H.(1989)J.Neurosci. 9,3753-3759.

図1

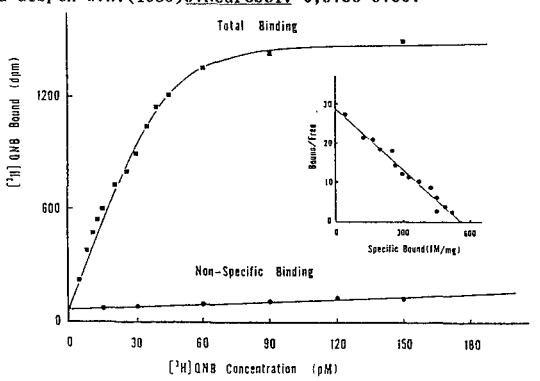


図2

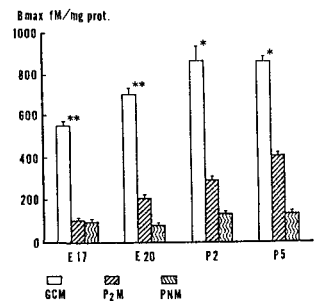


図3

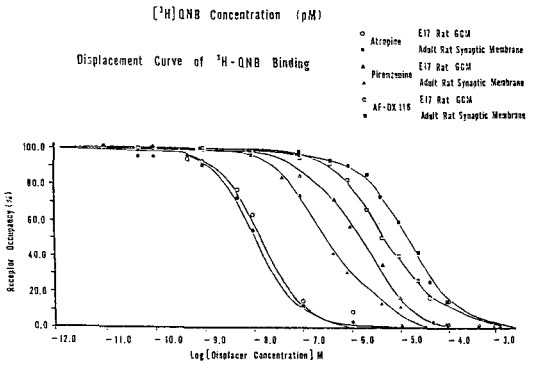


図4

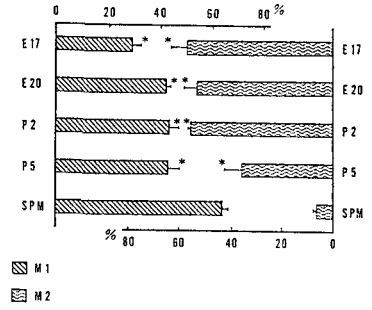


図1：E17ラット前脳GCMでの[³H]QNB飽和曲線とその Scatchard解析

図2：各膜画分での[³H]QNB結合部位；*GCMでのBmax がP₂M 、PNMのものより有意に大きいもの(**P<.01,*P<.05)

図3：E17GCMと成熟SPMでの[³H]QNB結合置換曲線

図4：GCM及びSPMでのM1-、M2-サブタイプの比率； *M1-及びM2-サブタイプの比率がSPMのものと比較して有意に異なるもの(P<.05)

86 培養ウシ副腎髄質細胞におけるニコチン性およびムスカリン性アセチルコリン受容体へのリガンド結合に対する低酸素の影響

李 憲、越村 邦夫*、三輪 聡一*

(岐阜大・医・小児科、京都大・医・薬理*)

〔要約〕

副腎髄質クロム親和細胞の2種類の ACh受容体 (ニコチン性およびムスカリン性) に対する低酸素の影響を明らかにするために、培養副腎髄質クロム親和細胞及び膜分画へのL-[^{3}H]ニコチンおよび[^{3}H]QNB結合に対する低酸素の影響を検討した。L-[^{3}H]ニコチンの細胞に対する特異的結合の飽和曲線を Scatchard plot により解析した結果、解離定数K_Dは、低酸素 (100%窒素/0% 酸素) により約2倍に増加したが、最大結合数B_{max}は、変化しなかった (対照群は、21%酸素/79% 窒素を使用した)。さらに、L-[^{3}H]ニコチンの細胞への特異的結合を経時的に検討した結果、このK_Dの増加は結合定数 (k_1) の低下によることが明らかとなった。しかしながら、膜分画調整後に、低酸素負荷を行なった場合には、L-[^{3}H]ニコチン特異的結合は低酸素により影響を受けなかった。一方、低酸素は、クロム親和細胞への[^{3}H]QNB 特異的結合に対して殆ど影響を与えなかった。これらの結果から、ニコチン性 ACh受容体のニコチンに対する親和性は低酸素により低下するが、受容体の数自体は変化しないこと、また、この親和性の低下は、主として結合速度の低下によることが示唆された。さらに、このニコチン性 ACh受容体の変化は、受容体または膜に対する低酸素の直接作用によるのではなく、細胞内の不明の物質または機構に低酸素が作用した結果、二次的に引き起こされたものであることが示唆された。

[目的]

最近、我々は、ウサギ胸部大動脈条片または培養ウシ副腎髄質細胞を用いて、神経伝達機構に対する低酸素の影響を検討し、カテコールアミン遊離が低酸素により著明に抑制されることを明らかにした (1, 2, 3)。さらに、外来性ノルアドレナリンに対する大動脈条片の用量収縮反応曲線が、低酸素により著明に右方移動を示したことから、α－アドレナリン受容体のノルアドレナリンに対する親和性が低酸素により低下することが示唆された (1, 2)。しかしながら、低酸素による神経伝達物質受容体変化の機構は明らかにされていない。そこで、本研究においては、副腎髄質クロム親和細胞に存在し、カテコールアミン遊離を調節している2種類のアセチルコリン (ACh) 受容体 (ニコチン性及びムスカリン性) に対する低酸素の影響を明らかにするために、それぞれの受容体への特異的リガンド結合に対する低酸素の影響を検討した。

[方法]

培養副腎髄質クロム親和細胞の調整：定法に従って、ウシ副腎髄質より髄質細胞を単離した後、浮遊細胞として培養した。リガンド結合実験に際しては、培養液を取り除いた後、細胞を対照溶液 (21%酸素/79%窒素 で平衡化したKrebs-HEPES 液) または低酸素溶液 (0%酸素/100%窒素 で平衡化した) に再浮遊し、10分間以上プレインキュベーションした後、結合実験を行った。

膜分画の調整：培養液を取り除いた細胞を低張性溶液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4) に再浮遊し、超音波破砕器を用いてホモジネートを調整した後、超遠心を行ない、沈査を膜分画標品とした。沈査は、21%酸素/79%窒素 または0%酸素/100%窒素 で平衡化した溶液に再浮遊し、この溶液中で10分間以上プレインキュベーションした後、膜分画の結合実験に用いた。

L-[^{3}H]ニコチンおよび[^{3}H]QNB結合実験：GF/Cフィルターを用いて、フィルター濾過法によりリガンド結合実験を行った。特異的結合量は全結合量から非特異的結合量を差し引いて求めた。

[結果および考察]

培養副腎髄質クロム親和細胞へのL-[^{3}H]ニコチン特異的結合のSchatchard解析から得られる解離定数K_Dは、低酸素により2倍に増加するが、最大結合数B_{max}は変化しないことが明らかとなった (図1)。これらの結果は、髄質細胞膜上のニコチン性 AChの受容体のニコチンに対する親和性が低酸素により低下するが、受容体の数自体は変化しないことを示唆している。さらに、L-[^{3}H]ニコチン特異的結合の結合および解離の経時的変化を検討したところ、結合速度 (K_1) のみが低酸素により低下し、解離速度k_{-1} は、いずれの条件下においても、変化しないことが明らかとなった (図2)。これらの結果は、低酸素によるニコチン性 ACh受容体の親和性の低下は、結合速度の低下によることを示す。しかしながら、髄質細胞から膜分画を調整した後、膜分画だけを低酸素に曝露した場合には、膜分画に対するL-[^{3}H]ニコチンの特異的結合は低酸素により影響を受けなかった。この結果から、低酸素はニコチン性 ACh受容体そのものあるいは膜に対して直接作用するのではなく、細胞内の不明の物質または機構に対して作用し、その結果二次的にニコチン性 ACh受容体の機能低下を引き起こしていると考えられた。一方、髄質細胞への[^{3}H]QNB特異的結合の結果から、ムスカリン性 ACh受容体は、低酸素の影響をほとんど受けないことが明らかとなった。最近、我々は、摘出ウサギ胸部大動脈条片の外来性ノルアドレナリンに対する用量収縮反応曲線が、低酸素により著明に右方移動を示すことを明らかにし、このことから、α－アドレナリン受容体のノルアドレナリンに対する親和性が低酸素により低下することを示した (1)。これらの結果は、本研究における、ニコチン性 ACh受容体の親和性の低酸素による低下の結果を良く反映している。従って、低酸素は、血管のα－アドレナリン受容体のみならず、副腎髄質クロム親和細胞のニコチン性 ACh受容体の親和性をも低下させることが明らかとなった。しかしながら、同じくクロ

ム親和細胞上に存在するムスカリン性 ACh受容体が低酸素の影響を受けなかったことから、低酸素は、全ての神経伝達物質受容体に対して非特異的に変化を引き起こすわけではないことも示唆された。現在その他の神経伝達物質受容体に対する低酸素の影響および作用機構を検討中である。

以上、低酸素は、副腎髄質クロム親和細胞に存在する２つのタイプのACh 受容体に対して異なる影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち、ニコチン性 ACh受容体のみが低酸素の影響を受け易いということが明らかとなった。

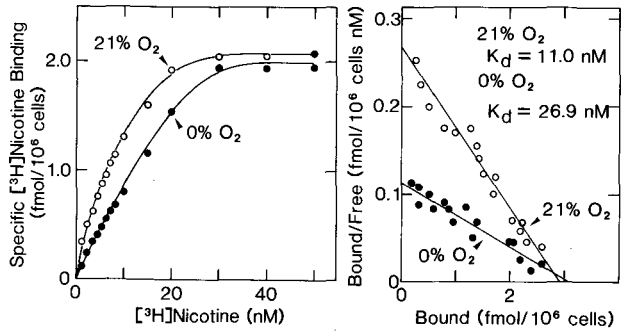


図１．クロム親和細胞へのL-[^{3}H]ニコチン特異的結合の飽和曲線に対する低酸素の影響（左図）及びScatchard plotによる解析（右図）。○；２１%酸素、●；０%酸素。

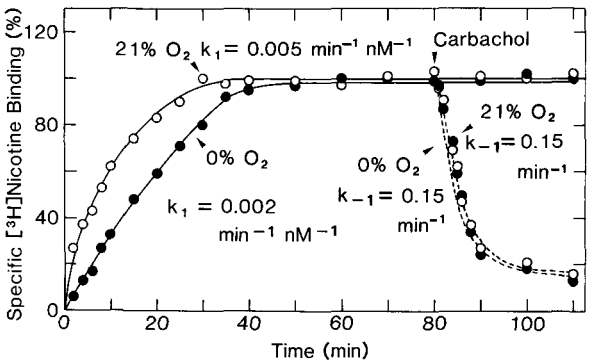


図２．クロム親和細胞へのL-[^{3}H]ニコチン特異的結合の結合及び解離の経時的変化に対する低酸素の影響。○；２１%酸素、●；０%酸素。

[文献]
1）Lee, K. et al.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 338:275-281, 1988.
2）Lee, K. et al.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 339:503-508, 1989.
3）Lee, K. et al.: J. Neurochem. 55:1131-1137, 1990.

87 PC12 細胞におけるムスカリン受容体を介した[^{3}H]-ノルアドレナリン放出とPI 代謝

高島 明彦*[1]、井上 和秀[2]、James G. Kenimer[3]

(1*三菱化成生命研、2国立衛生試験所、3Lab. Cellular Physiology, Food and Drug Administration)

〔要約〕

PC12 細胞ではムスカリン受容体を介して PI代謝こう進とノルアドレナリンの放出が起こる。外液 Ca^{2+} を除くと PI代謝は引き起こされるがノルアドレナリン放出は抑制された。逆にPC12細胞をホルボルエステルで前処理するとムスカリン刺激によっても PI代謝は引き起こされなかった。しかしながらノルアドレナリンの放出は影響を受けなかった。これらのことから PC12細胞では PI代謝とノルアドレナリン放出はそれぞれ独立の機構によって引き起こされると考えられた。更に薬理学的研究により、それぞれの応答は異なるムスカリンレセプターサブタイプを介して引き起こされることが明らかになった。

ムスカリンレセプターは神経組織に広く分布している。多くの細胞ではムスカリン刺激によりPI代謝のこう進を引き起こし生理活性を持った代謝産物（IP_3、ジアシルグリセロール）を生成する。これらは二次メッセンジャーとして働き、IP_3を介して Ca^{2+} mobilization が起こる。細胞内の Ca^{2+}濃度の上昇により伝達物質の放出が行われることが知られている。PC12細胞ではムスカリン受容体を介してPI代謝とカテコールアミン放出が起きる。その際、同時に$^{45}Ca^{2+}$の取り込みも観察された[1]。このことから、PC12細胞に於けるPI代謝とノルアドレナリン放出の関係について検討を行った。

＜方法＞

細胞培養

PC12 細胞は７％馬血清７％牛胎児血清を含む DMEM 中で10% CO_2 37℃の条件下で継代的に培養を行っている。

ノルアドレナリン放出[2]

^{3}H-ノルアドレナリン放出は[^{3}H]-ノルアドレナリンを予め取り込ませた細胞に刺激剤を含む HEPES-buffer を加え medium 中に放出された[^{3}H]-ノルアドレナリン の量を測定した。

PI代謝[3),4)]

PI代謝は [^{3}H]-inositol によって18hr ラベルした後、60mM LiCl を含む HEPES-buffer に刺激剤を加え刺激した後 6% TCA 中に細胞を回収し Berridge らの方法に従い IP_1, IP_2, IP_3 をそれぞれ抽出した。

^{3}H-N-methylscopolamine (NMS) binding assay

1×10^6コの PC12 細胞を 0.5 nM の[^{3}H]-NMS 37℃ 1hr インキュベート後、GF-C フィルター上で洗浄し、細胞に結合している[^{3}H]-NMSの量を測定した。結果の解析はコンピュータープログラム"Ligand"を用いて行った。

＜結果及び考察＞

PC12 細胞は、300μM Methacholine により刺激され PI代謝のこう進とノルアドレナリンの放出が引き起こされる。これらの応答は 10^{-6}M Atoropine によって完全に抑制されており、Methacholine によって引き起こされるこれら２つの応答はムスカリン受容体を介して起こることを示した。Methacholine 刺激によってノルアドレナリン放出とIP_3産生は非常に速い応答を示し PI代謝とトランスミッター放出がカップルした機構であることを支持する結果を得た。更に詳細にPI代謝とトランスミッター放出の関係について検討した。Ca^{2+}-free の条件下では Methacholine 刺激により PI代謝のこう進が引き起こされ、IP_3産生が増加する。しかしながら、この条件下では、ノルアドレナリンの放出は引き起こされなかった。（図１）また逆にホルボルエス

テル処理を行うと Methacholine刺激によるPI代謝のこう進はホルボルエステル濃度に依存して減少し、10^{-6}M で完全にMethacholine による PI代謝こう進は抑制された。Methacholine 刺激によるノルアドレナリン放出はホルボルエステル処理により増加の傾向を示した。（図２）PI代謝こう進がほぼ抑制されるホルボルエステル 10^{-6}Mでは対照の約120%のノルアドレナリンを放出を示した。これらの結果は、PC12 細胞では、ノルアドレナリンの放出はムスカリン受容体を介して、産生されるIP_3による Ca mobilization によって引き起こされるのではなく、むしろそれとは独立の機構（外側からの Ca^{2+}の流入）によって引き起こされる。即ちノルアドレナリン放出とPI代謝こう進はそれぞれ独立に引き起こされる現象であると考えられた。

それぞれのムスカリンレセプターサブタイプに対するアンタゴニスト（Atropine, Pirenzepine Methochramine）を用いて Methacholine によって引き起こされる PI代謝とノルアドレナリン放出の抑制実験を行った。その結果 PI代謝は Atropine ＞ Pirenzepine ＞ Methoctramine の順でノルアドレナリン放出は Atropiene ≧ Methoctramine ＞ Pirenzepine の順が感度で抑制された。又 M_1 アゴニスト McN-A343 では PI代謝、ノルアドレナリン放出共に刺激されなかった。このことは Pirenzepine に対して両者とも低い感受性を示すことと合わせて考えると少なくとも M_1レセプターサブタイプではないと考えられた。更に Methoctramine に対しノルアドレナリン放出は高い感受性を示しPI代謝は低い感受性を示すことから、PI代謝はM_3レセプターサブタイプを介して引き起こされノルアドレナリン放出は M_2 レセプターサブタイプを介して引き起こされると考えられた。更に M_2 と M_3 レセプターサブタイプに対して異なる affinity を持つアンタゴニスト Methoctramine を用いて Binding assay を行った、その scatchard plot の model fittingは 2 site model によく合った。cyclic AMP によって分化させた PC12 細胞では Methacholine刺激によるノルアドレナリンの放出は起こらないが、PI代謝こう進は引き起こされる。この状態の細胞を用いて前述したのと同様に Binding assay を行うと model fitting は 1 site model によく合い、Methoctramine に対する high affinity site (M_2)がなくなっていた。即ち、PC12細胞には少なくとも２つのムスカリンレセプターサブタイプが存在し、methacholineによってM_2とM_3レセプターサブタイプが刺激される、それぞれのレセプターサブタイプを介してPI代謝こう進及びノルアドレナリンの放出が独立に引き起こされる。これらのことはムスカリンレセプターサブタイプに選択的なアンタゴニストを用いた実験によって明らかにされた。M_2レセプターが刺激されると細胞外から Ca の取り込みが起こり、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇しノルアドレナリンの放出がおきる。M_3 レセプターが刺激されると phospholipase C が活性化されPI代謝がこう進しIP_3 及びジアシルグリセロールが産生される。IP_3 は細胞内の Ca storeから Ca放出を促進し、ジアシルグリセロールは proteinkinase C を活性化する。IP_3によって起こるCa mobilization はノルアドレナリン放出を引き起こすには充分ではないと考えられた。

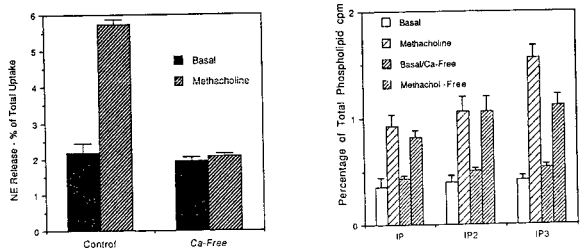


図１．　Ｃａ$^{2+}$（－）の効果

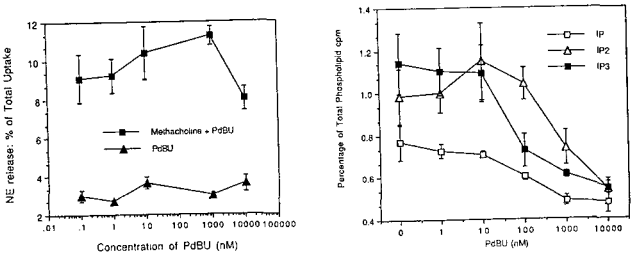


図２．　ホルボルエステルの効果

＜文献＞

1) Inoue, K. and Kenimer, J.G. (1988) J. Biol. Chem. 263 8157-8161.

2) Takashima, A. and Kenimer, J.G. (1989) J. Biol. Chem. 264 10654-10659.

3) Berridge, M.J., et al. (1983) Biochem. J. 212 473-482.

4) Irvine, R.F. and Moor, R.M. (1986) Biochem. J. 240 917-920.

88 ムスカリン受容体キナーゼによるロドプシンの光依存性リン酸化：G蛋白質βγサブユニットによる促進

芳賀和子、芳賀達也
（東大医学部脳研生化学）

〔要約〕
ムスカリン性アセチルコリン受容体（以下mAChR）をリン酸化する蛋白質キナーゼ（以下mAChRキナーゼ）をブタ大脳から、ロドプシンキナーゼをブタ網膜から部分精製し、これらのキナーゼによるmAChRとロドプシンのリン酸化に対するG蛋白質の影響を調べ、以下の結果を得た。(1)mAChRキナーゼはmAChR(m2)をアゴニスト依存性に、ロドプシンを光依存性にリン酸化し、いずれのリン酸化もG蛋白質βγサブユニットによって促進された。Gs、Gi、Goいずれの起源のβγサブユニットも有効であった。(2)ロドプシンキナーゼによるロドプシンの光依存性リン酸化はG蛋白質βγサブユニットによって影響されず、ロドプシンキナーゼによるmAChRのリン酸化は観察されなかった。(3)βγサブユニットはmAChRキナーゼの初速度を約10倍増大させるが、ATPやロドプシンに対する親和性にはあまり影響しなかった。また、活性化に必要なβγサブユニットの濃度は、ロドプシンの濃度によって影響されなかった。これらの結果は、mAChRキナーゼがロドプシンとβγサブユニットに順不同に結合し、生成した3量体が活性型になるという仮定と一致し、βγサブユニットの標的がmAChRではなくmAChRキナーゼであることを示唆する。受容体の作用で生成するG蛋白質αサブユニットは効果体に作用し、βγサブユニットは受容体のリン酸化を促進することによって脱感受性に寄与するという作業仮説が考えられる。

mAChRはロドプシンやβアドレナリン受容体と同様細胞膜7回貫通構造を持つ、G蛋白質共役受容体である。受容体の脱感受性（Desensitization）の分子機作としてリン酸化が想定されている。ロドプシンを光依存性にリン酸化するロドプシンキナーゼ[1]、βアドレナリン受容体（β-AR）をアゴニスト依存性にリン酸化するβ-ARキナーゼ[2,3]の存在が知られており、これらは脱感受性に寄与すると考えられる。mAChRもβ-ARキナーゼそのものあるいはよく似た酵素によってアゴニスト依存性にリン酸化される[4,5]。

我々は、脳から部分精製したキナーゼ（mAChRキナーゼ）によるmAChRのアゴニスト依存性リン酸化がG蛋白質によって2重に調節されることを見出した[6]。グアニンヌクレオチド存在時にはリン酸化の促進のみが見られ、グアニンヌクレオチドがない時は低濃度のG蛋白質で促進、高濃度のG蛋白質で阻害が見られる。阻害効果にはαβγホロG蛋白質の存在が必要で、グアニンヌクレオチド依存性高親和性アゴニスト結合と並行して出現する。アゴニスト・mAChR・G複合体生成によるリン酸化部位の遮蔽によるものと考えられる。一方、促進効果はβγサブユニットのみによって再現され、αサブユニットは影響しない。G蛋白質による受容体キナーゼ活性化の報告はこれが最初で、β-ARキナーゼについては何の報告もない。ロドプシンキナーゼに対するG蛋白質の効果は調べられており、グアニンヌクレオチドがない時の阻害効果だけが観察されている[1,7]。βγによる活性化がどの程度一般的であるのか、またβγによる活性化の有無を決定するのは基質（ロドプシンとmAChR）、酵素（mAChRキナーゼとロドプシンキナーゼ）、G蛋白質（Goとトランスジューシン）いずれであるかを知るため、mAChRとロドプシンのmAChRキナーゼとロドプシンキナーゼによるリン酸化を種々のG蛋白質存在下で調べた。

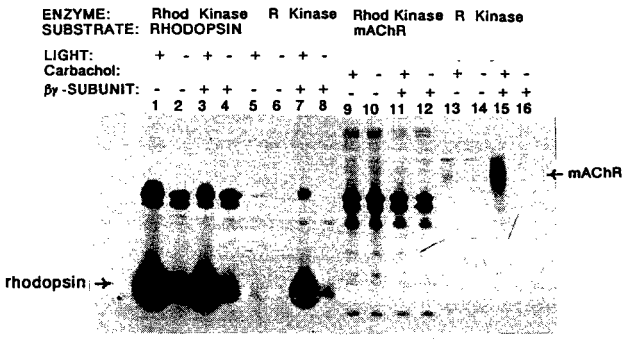
［実験方法］ mAChRはブタ心房[8]とヒトm2mAChRを発現させたSf9細胞から[9]、αβγホロG蛋白質とG蛋白質βγサブユニットはブタ大脳から[10]、網膜外節とロドプシンキナーゼ[11]はブタ網膜から、mAChRキナーゼ[5,6]はブタ大脳から、既報にしたがって精製した。精製したmAChRとG蛋白質を既報に従って粗脂質中に再構成した後[10]、リン酸化反応に用いた。βγサブユニットは、リン脂質に組込んだmAChR又は網膜外節標品に直接添加した。反応後遠心し、沈殿をSDS溶液で可溶化してSDS-PAGEによる分析に用いた[5,6]。

［結果と考察］ 図1にロドプシンとmAChRをロドプシンキナーゼ（図中Rhod Kinase）とmAChRキナーゼ（図中R Kinase）でリン酸化した結果を示す。ロドプシンはロドプシンキナーゼによって光依存性にリン酸化されたが、このリン酸化はG蛋白質βγサブユニットによって影響を受けなかった（カラム1-4）。ロドプシンはmAChRキナーゼによっても光依存性にリン酸化され、このリン酸化はG蛋白質βγサブユニットの存在に依存し、この実験条件ではβγサブユニットがない時にはリン酸化は殆んど見られなかった（カラム5-8）。ここに示した実験にはGs標品から分離したβγサブユニットを使用したが、GiまたはGo標品から分離したβγサブユニットによっても同じ結果が得られた。ロドプシンキナーゼによるmAChRのリン酸化は、アゴニストやβγサブユニットの存在の有無に拘らず検出されなかった。同一の条件で、mAChRキナーゼによるmAChRのリン酸化はアゴニストおよびβγサブユニットの存在に依存して観察されている（カラム9-16）。

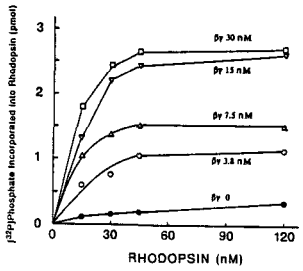
mAChRキナーゼによるロドプシンの光依存性リン酸化を種々の濃度のロドプシンとβγサブユニット存在下で調べた。図２に示すように、飽和するロドプシン濃度はβγサブユニットの濃度によって余り影響されなかった。βγサブユニット添加によって増加するリン酸化量とロドプシン量との関係を、２重逆数プロット（Double Reciprocal Plot）したものを図２(b)に示す。ロドプシンに対する見かけのKmは、βγサブユニットの濃度に依らず約15 nMと計算される。Vmaxは、30 nMβγサブユニット存在時にβγない時の９倍であった。リン酸化量とβγサブユニット濃度の間の２重逆数プロットを図２(C)に示した。50%の効果を示すβγサブユニット濃度は、ロドプシン濃度に依らず16 nMと算出された。ロドプシンとβγに対する見かけの親和性が相互に影響されないという結果は、図２(d)の速度式と合致する。この速度式は、βγサブユニットとロドプシン（Ｒ）が独立に順不同にmAChRキナーゼ（Ｅ）に結合し、ロドプシン・βγ・酵素３量体が活性中間体であるという仮定と一致する。βγとロドプシンが先に結合し、これがmAChRキナーゼの基質になると云う仮定とは合致しない。

以上の結果は、βγサブユニットがmAChRキナーゼを活性化するという可能性を示唆する。しかし、βγがAChRキナーゼと相互作用するという直接の証拠はまだ得られていない。mAChRのアゴニスト依存性リン酸化、Ｇ蛋白質βγサブユニットによるその活性化の生理的意味は現在不明であるが、受容体の作用で生成したＧ蛋白質αサブユニットが効果体(Effector)に作用し、同時に生成するβγサブユニットがmAChRキナーゼを活性化することによって受容体のリン酸化・脱感受性を促進するという作業仮説が考えられる（図４）。

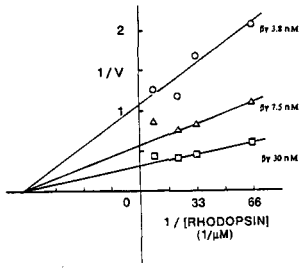
［図１］



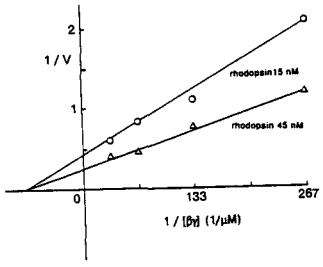
［図２(a)］



［図２(b)］

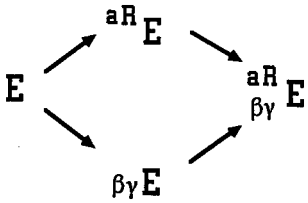


［図２(c)］



［図２(d)］

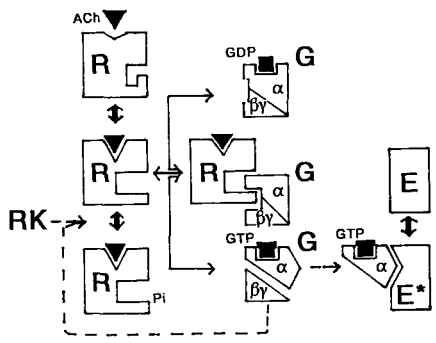
$$v = \frac{V_{max}}{\left(1+\frac{K_1}{[Rhod]}\right)\left(1+\frac{K_2}{[\beta\gamma]}\right)}$$



［文献］

1) H.Kuhn: Prog. Retinal Res. 3,123-156(1987)
2) J.L.Benovic et al.:Ann.Rev.Cell Biol.4,404-28(1988)
3) J.L.Benovic et al.:Science, 246, 235-240 (1989)
4) M.M. Kwatra er al.: Biochem.,28,4543-4547 (1989)
5) K. Haga, T. Haga: Biomed. Res.,10,293-299 (1989)
6) K. Haga, T. Haga: FEBS Lett,268,43-47 (1990)
7) D.J.Kelleher et al.: Mol. Pharmac.34,452-460(1988)
8) T. Nishiyama, et al.: Biomed. Res.,10,251-260(1989)
9) E.M. Parker et al.: J. Biol. Chem.,266,519-27(1991)
10) K. Haga et al.: Mol. Pharm., 35,286-294 (1989)
11) D.J. Kelleher et al.:J.Biol.Chem.,265,2632-39(1990)

［図４］



89 ムスカリン性受容体刺激による平滑筋収縮における GTP結合タンパク質の関与

本多健治，高野行夫，神谷大雄
（福岡大・薬・薬理）

〔要約〕モルモット回腸縦走筋を用いて，ムスカリン性アセチルコリン受容体（m-ACh R）刺激による平滑筋収縮に対するコレラ毒素（CT）および百日咳毒素（IAP）の影響を検討した．

各種m-ACh R作動薬およびhigh K^+刺激による最大収縮はIAP前処理（43 μg/ml）により抑制された．その抑制はM1受容体agonistのMcN-A-343による収縮が最も強く，以下pilocarpine，carbachol，high K^+の順であった．この時，低濃度のcarbacholによる収縮はIAPによって完全に抑制されたが，高濃度のcarbacholの収縮への抑制は不完全であった．一方，CTの前処理によって，epinephrineの弛緩作用は抑制されたが，m-ACh R作動薬やhigh K^+刺激による収縮は影響されなかった．以上の結果より，m-ACh R刺激によって惹起される収縮反応には，IAP感受性およびIAP非感受性GTP結合タンパク質の関与の可能性が示唆された．

モルモット回腸縦走筋におけるm-ACh R刺激による収縮機構には，外液Ca^{2+}の流入と，イノシトールリン酸生成に伴う細胞内Ca^{2+}貯蔵部位からの放出というの2つのCa^{2+}動員系が考えられていた（4）．しかし最近，m-AChR刺激による収縮には，外液Ca^{2+}の流入のみによる機構も報告されている．また，m-ACh RはGTP結合タンパク質と共役して生理反応を引き起こすことが知られている．我々はすでにモルモット回腸縦走筋においてm-ACh R 刺激で惹起されるイノシトールリン酸の生成がGTP結合タンパク質を介していることを報告した（2）．そこで，今回はさらにm-ACh R と共役するGTP結合タンパク質の収縮反応への関与について，IAPおよびCTを用いて検討した．

【実験方法】

収縮の測定：Hartley系モルモット（350-400 g）を断頭後，すばやく回腸縦走筋を摘出した．この標本（長さ10-15 mm）をKrebs液の入ったorgan bath中に懸垂し，静止張力1 gを負荷後，各薬物による等張性収縮を通気下で圧トランスジューサーにより記録した（3）．

イノシトールリン酸の測定：[^{3}H]myo-inositol（6 μCi/ml)を縦走筋に37℃で3時間取り込ませ，10 mM LiClを含むKrebs-Ringer buffer（pH 7.4）中で各薬物と10分間反応させた後，Berridgeら（1）の方法により[^{3}H]IP1，[^{3}H]IP2および[^{3}H]IP3を測定した（3）．

CTおよびIAP処理：薬物投与3時間前にKrebs液中に添加した．

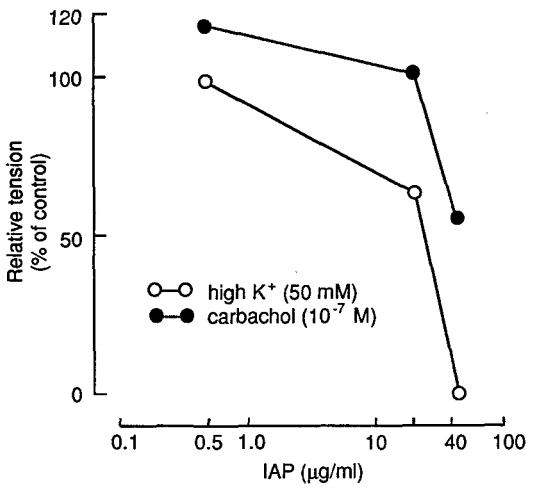


図1. high K^+および carbachol による収縮に及ぼす IAPの効果

【結果と考察】

回腸縦走筋標本をIAPで前処理すると，carbachol（10^{-7}M）とhigh K^+による収縮はIAPの濃度に依存して抑制された（図1）．図2に示すようにIAP（43 μg/ml）により，high K^+ およびm-ACh R 作動薬による収縮は著しく抑制された．特に，低濃度のcarbachol（10^{-7}M）による収縮はほぼ完全に抑制されたが，高濃度のcarbachol（>10^{-6}M）の収縮は一部しか抑制されなかった．さらに，IAP未処理の縦走筋にMcN-A-343（10^{-4}M）や低濃度のcarbachol（10^{-7}M）を添加しても，イノシトールリン酸の有意な生成は認められなかった（図3）．一方，CTはnorepinephrineによる弛緩作用を有意に抑制したが，m-ACh R作動薬やhigh K^+刺激による収縮にはなんら影響を及ぼさなかった．

以上の結果から，M1受容体agonistのMcN-A-343や低濃度のcarbacholよる収縮はIAP感受性GTP 結合タンパク質を介した外液Ca^{2+}の流入によって引き起こされているものと考えられる．一方，高濃度のcarbacholによる収縮は，イノシトールリン酸の生成によるCa^{2+}貯蔵部位からのCa^{2+}放出と，外液Ca^{2+}の流入によって引き起こされると考えられる．同様に，Sasaguriら（4）は血管平滑筋を用いてm-ACh R刺激によるイノシトールリン酸の生成にIAPはなんら影響しないことを報告している．

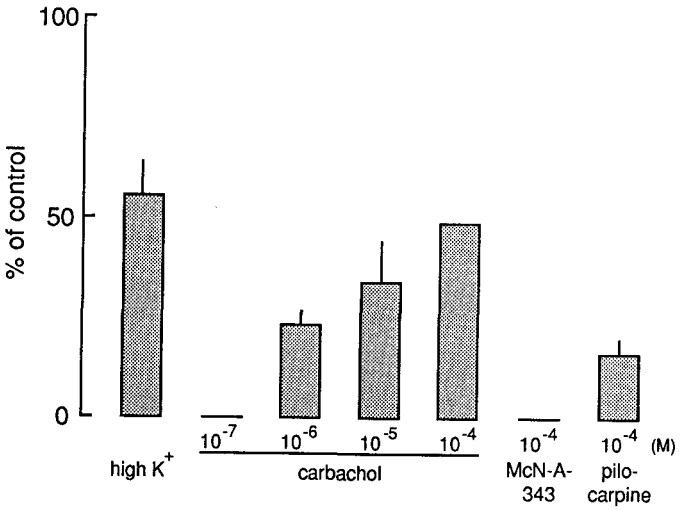


図2. high K^+およびm-Ach R作動薬による収縮に対するIAPの効果

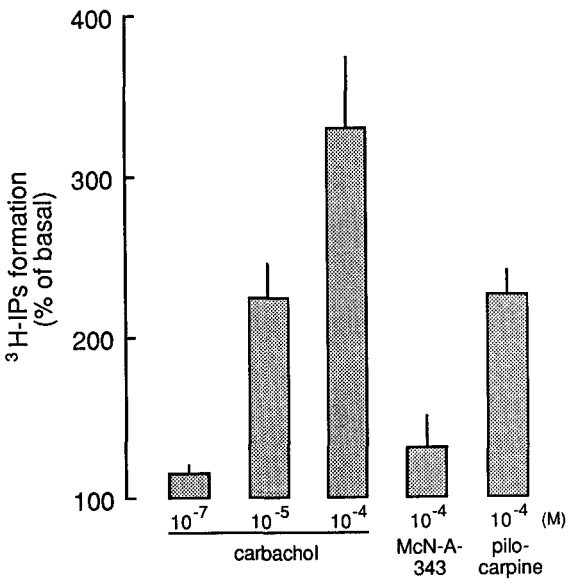


図3. m-ACh R作動薬によるイノシトールリン酸の生成

【謝辞】

CTおよびIAPを御供与下さった化学及血清療法研究所に深謝いたします．

【文献】

(1) Berridge, M.J., Downes, P.C. and Hanley, M.R. (1982) Biochem. J. 206, 587-595.

(2) Honda, K., Takano, Y. and Kamiya, H. (1991) Jpn. J. Pharmacol. 55, suppl. 113p.

(3) Honda, K., Yamada, A., Takano, Y. and Kamiya, H. (1991) J. Pharmacobio-Dyn. in press.

(4) Karaki, H. and Weiss, G.B. (1988) Life Sci. 42, 111-122.

(5) Sasaguri, T., Hirata, M., Itoh, T., Koga, T. and Kuriyama, H. (1986) Biochem. J. 239, 567-574.

90　ムスカリニック　m３　受容体刺激とアミロイドβ蛋白前駆体　mRNA　の発現との関連

安部明夫，中村重信，Ｊ．Ｈ．Ｂｒｏｗｎ＊
（＊広島大・第３内科，＊Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｕｎｉｖ．Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ）

〔要約〕

神経系の培養細胞である SK-N-SH cell を用いて、ムスカリニック m3 受容体（ m3 受容体）を刺激することによるアミロイドβ蛋白前駆体（ APP ）mRNA の発現を経時的に観察したところ、２時間後に増加をはじめ８時間で前値の約４倍の発現を示した。また同じ細胞において同様の刺激に対し、c-fos, c-junの癌遺伝子も約３０分で最大の発現を示した。これら癌遺伝子を調節する protein kinase C （ PKC ）を down-regulate したところ APP の発現は抑制を受けた。以上のことより、m3 受容体刺激による APP の発現は c-fos, c-jun の発現に誘導されたものであり、またこのことは、アセチルコリンによる刺激がアミロイドβ蛋白前駆体産生を増大させる可能性を示唆した。

〔目的〕

APP 産生におけるアセチルコリンの関与を明らかにするために、m3 受容体刺激による APP mRNA の発現を観察し、アセチルコリン刺激とアミロイドβ蛋白形成との関連を調べることを目的とした。

〔方法〕

材料としては SK-N-SH neuroblastoma cell line を用いた。これを、1 mM の carbamylcholine (carbachol) で、c-fos, c-jun mRNA については 15, 30分, 1, 2時間、また APP mRNAについては、1, 2, 4, 6, 8時間刺激した。また培養細胞を 1μM の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で 16時間前処置することで PKC のdown-regulation が行なわれることをこの細胞系で確立し、そのように処置した。Northern blotting の方法は、細胞を guanidineで抽出し、total RNA を cesium chloride を通して遠心した。沈渣の RNA 20 μg ずつ分離し、電気泳動後、Hybond-N Nylon filter へ トランスファーした。プローベの cDNA は ^{32}P-dCTP でラベルし直接 prehybridization 溶液に加えた。 RNA は radio analytic scanning で定量化した。

〔成績〕

c-fos mRNA については 1 mM carbachol で各時間刺激すると、15 分で detect されるようになり、30 分で最大の発現を示し、2時間でほとんど観察されなくなった（図１）。c-jun mRNA についても図のごとく 30 分で最大の発現を示し、その後徐々に減衰していた（図２）。これに対して APP mRNA については、c-fos, c-jun mRNA の発現よりも遅れ、2時間以降増加をはじめ以後経時的に増加し 8時間で最大の発現を示した（図３）。この APP mRNA の発現において、PI 経路の second messenger である PKC の関連を調べるために、PKC-down regulation を行なったところ、m3 受容体による APP mRNA の発現はほぼ完全に抑制されることが明らかになった。

〔考察〕

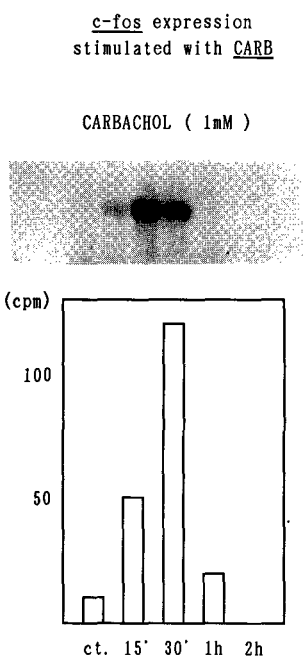
Glenner(1), Master(4)らによりアルツハイマー病の老人斑コアよりβアミロイド蛋白が同定されてより、アルツハイマー病の pathogenesis を考える上で、重要な役割を果たしていると考えられている。ここでは Northern blotting の手法を用いて コリン作動性ニューロンと、APP mRNA の発現との関連を分子生物学的に観察した。今回の実験結果によると carbachol により m3 受容体を刺激すると APP mRNA が経時的に誘導された。この現象は、アセチルコリンそのものが APP の産生に影響する可能性を示唆している。同様な現象を勝沼ら(3)は、副腎髄質の chromaffin

細胞を用いて、APP が存在する顆粒膜中の顆粒の分泌がアセチルコリン作動性であることを示し、アセチルコリンの刺激と APP 産生の関連を示唆している。この現象は、アルツハイマー病の病初期において、神経終末より分泌されたアセチルコリンが、APP の産生を促していると解釈することができる。すなわちアルツハイマー病でも、APP の産生がアセチルコリンにより促される可能性があり、アセチルコリンを介する治療を行なう際に考慮する必要がある。又この APP の産生に時間的に先立ち c-fos, c-jun mRNA が比較的早期に誘導されることが明らかになった。これらの immediate early genes はそのロイシン・ジッパー構造を介して複合体を形成し、APP の如く、そのプロモーター領域に AP-1 region を持つ target gene に結合し、その機能を促進する働きがあると考えられている。すなわち、この APP の誘導にはこれらの immediate early gene がまず誘導されたことが、重要であったと推定することができる。またさらに m3 受容体に直接リンクする second mesenger である PKC を down-regulate させたところ、APP の誘導は完全に抑制された。すなわち m3 受容体刺激による APP の産生は PI経路および immediate early gene の発現の結果生じてくるものであることが示唆された。Greengard ら(2)は phorbol ester により APP のC末端フラグメントが上昇することを明らかにしている。また下浜ら(5)はアルツハイマー病において PKC のアイソザイムが上昇していることを示した。これらの報告は我々のデータと総合すると、アルツハイマー病では PKC 活性が上昇していることにより APP が産生されやすい状態になっており、その条件下でアセチルコリンの刺激が引き金となって、c-fos, c-jun の癌遺伝子が誘導された後 dimerize し complex を形成し、APP の AP-1 region に結合することにより APP が産生されてくるメカニズムが推定された。

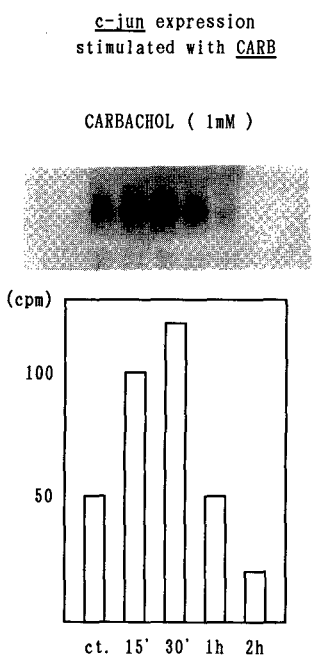
〔文献〕

1. Glenner, G.G.(1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 885. 2. Greengard, P.(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 6003-6007. 3. Katunuma, N.(1990) Brain Medical. 2(3), 51-56. 4. Masters, C.L. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 4245. 5. Shimohama, S.(1990) J. Neural. Transm. 30, 69-78.

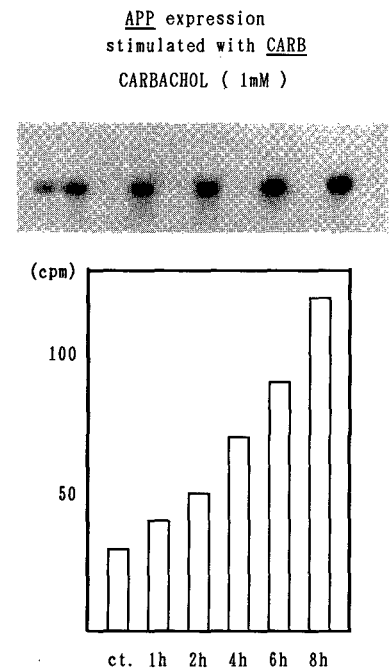
（図1）



（図2）



（図3）



91 実験水頭症における脳内カテコールアミンの変動

三宅博久、坂本貴志、森　惟明
高知医科大学、脳神経外科

〔要約〕
水頭症とは、髄液が脳室またはクモ膜下腔に過剰に貯留した状態をいい、脳神経外科領域において一般的な疾患である。われわれは、水頭症における脳の機能異常を神経生化学的に明らかにするために、実験水頭症ラットを用いて脳内の神経伝達物質であるカテコールアミンの含有量および代謝回転速度の変化を測定し、水頭症がこれらカテコールアミン神経系の機能に及ぼす影響について検討した。カオリン誘発水頭症ラットを用いて、全脳におけるノルエピネフリンとドーパミン含有量を、カオリン注入後１週目に、高速液体クロマトグラフと電気化学検出器を用いて測定した。カテコールアミンの代謝回転速度は、チロシン水酸化酵素阻害剤であるα-メチル-p-チロシン投与後のカテコールアミンの減少速度から求めた。その結果、カオリン水頭症ラットにおいては、全脳内のカテコールアミン含有量は、対照に比べ有意な変化はみられなかったが、代謝回転速度は有意な低下がみられ、カテコールアミン神経活動は低下していることが明らかになった。

〔目的〕
水頭症においては、主として臨床所見から、脳の機能が全般的に低下すると考えられてきた。しかしながら、水頭症における脳の機能異常については、これまで十分な研究がなされていない。そこで今回、カオリン水頭症ラットを用いて、脳の神経伝達物質であるカテコールアミンの代謝回転速度の変化を測定することにより、水頭症がこれらカテコールアミン神経系の機能に及ぼす影響を検討した。

〔方法〕
実験動物は、成熟Wistarラットを用い、バルビタール麻酔下に、大槽内にカオリン溶液を注入し作成した。対照として、同じ方法で生理食塩水を注入した。

ノルエピネフリンとドーパミン含有量は、　高速液体クロマトグラフ(HPLC)および電気化学検出器を用いて測定した。すなわち、ラットを断頭後、全脳を摘出し、それを0.2M過塩素酸(100μM EDTAを含む)にてホモゲナイズしたのち30分氷中保存後、20,000rpmにて遠心沈澱を行ない、その上清をHPLCを用いて測定した。

カテコールアミンの代謝回転速度は、カテコールアミン生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素の阻害剤であるα-メチル-p-チロシン250mg/kg投与すると、脳におけるカテコールアミン含有量は投与後ほぼ８時間に至るまで指数関数的に減少する(2)。　そこで、この阻害剤投与後２時間後の含有量を測定し代謝回転速度とし、神経活動の指標とした。

〔結果〕
カオリン注入により、脳室拡大と脳室周囲組織の浮腫状変化が進行性にみられた。水頭症ラットにおいては、体重減少、運動量の減少、食事摂取量の低下、眼や鼻近傍の色素沈着などがみられ、対照ラットでは、それらはみられな

かった。

Fig.1は、カオリン水頭症ラットにおけるノルエピネフリンとドーパミン含有量に対する水頭症の影響を示したものである。水頭症ラットにおけるカテコールアミン含有量は、対照群に比べ有意な差はみられなかった。

Fig.2は、神経活動に対する水頭症の影響を明らかにするために、チロシン水酸化酵素の阻害剤であるα-メチル-p-チロシン(α-MT)投与後2時間の時点でのカテコールアミン含有量を比較検討したものである。全脳におけるノルエピネフリン含有量は、α-MT投与前では水頭症群と対照群の間で差はみられなかったが、α-MT投与後ノルエピネフリンは水頭症群で減少率が有意に少なかった。

Fig.3には、α-MT投与後の脳内のドーパミン含有量の変化を示した。ノルエピネフリン同様、α-MT投与後水頭症群で減少率は有意に少なかった。

〔考察・結果〕

水頭症においては、脳室内髄液圧の上昇により脳室周囲組織の浮腫が起き、血管構築などが破壊され、脳血流の低下や神経伝達の障害や浮腫の増悪が起きる。これらの変化が水頭症病態に関与しているものと考えられている。その水頭症における神経機能の変化を考えるうえで、神経終末に貯蔵されている神経伝達物質は、合成、遊離、代謝されることにより置き変わっているが、この置換される速度が代謝回転速度といわれる。したがって、神経伝達物質の生合成を阻害しその減少速度を測定することにより、神経伝達物質の代謝回転速度を測定することができる。この場合、代謝回転速度はもっぱら神経終末からの神経伝達物質の遊離速度を反映する。さらに、遊離速度は神経活動に依存すると考えられるので、代謝回転速度は神経活動のよい指標と考えられる(1,2)。

今回の結果より、カオリン水頭症において、脳内のノルエピネフリンとドーパミン神経系の機能は低下していることが示唆された。

〔文献〕

(1) Miwa,S.,Inagaki,C.,Fujiwara,M.,and Takaori,S.,J Neurosurg., 57, 67 (1982).

(2) 三輪聡一、難治性水頭症調査研究班昭和63年度報告書、pp34 (1989).

Fig.1

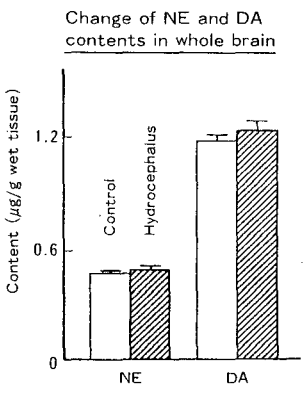


Fig.2

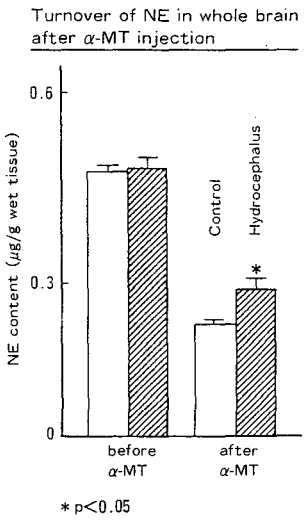
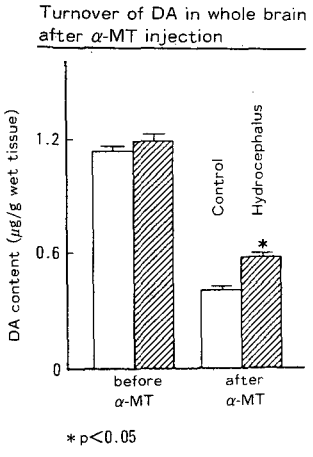


Fig.3



92 PC12細胞における分泌小胞局在性58kDリン酸化タンパク質(synaptotagmin)の発現とその欠失細胞

吉田　明、笠井　陽子、藤本　禎子、高橋　正身
（三菱化成生命科学研究所・脳神経化学研究室）

〔要約〕
58kDリン酸化タンパク質（synaptotagmin）を欠失したラット副腎褐色細胞由来のPC12細胞の亜株（HaF7)におけるsynaptotagmin mRNAの発現について検討した。ノーザンブロット及びＰＣＲによる解析の結果、PC12h細胞に見られるsynaptotagmin及びその類似タンパク質のmRNAの発現はHaF7細胞では検出できなかった。

［序論］

神経伝達物質遊離調節の仕組みを明らかにすることは、神経細胞間での情報伝達の修飾ひいては神経の情報処理機構を分子レベルで理解する上で極めて重要な課題であると考えられる。この神経分泌の調節のあるものは、タンパク質リン酸化を介していることが示唆されている。我々は、これまで分泌調節に関わる重要なタンパク質の候補として、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存在し、Ｃキナーゼ及びＣａＭキナーゼⅡの基質となる糖タンパク質である58kDタンパク質について、そのタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体（１Ｄ１２）を用い研究を行ってきた(1)。ラット脳ｃＤＮＡライブラリーを１Ｄ１２抗体でイムノスクリーニングした結果、この58kDタンパク質が分泌小胞の構成タンパク質の一つであるsynaptotagminであることが明かとなった(2,3)。我々がすでに報告しているように、この58kDタンパク質は電位依存性のＮ型Ｃａチャンネルを構成していると考えられるω－コノトキシン受容体と一部結合しており(1)、そのタンパク質の性質や局在性などから興奮分泌連関と密接に関わり合っているのではないかと考えている。

PC12細胞は神経伝達物質の放出機構を研究する良いモデル系であると考えられている。我々はPC12h細胞からsynaptotagminタンパク質欠失PC12細胞亜株（HaF7）を単離した（本大会で笠井らが発表）。このHaF7細胞でのsynaptotagmin遺伝子の発現について検討を行った。

［方法］

Northern bolt解析：PC12h細胞及びsynaptotagmin欠失細胞（HaF7）より調製したpoly(A)RNAを用いた。ラット脳synaptotagmin-cDNA（星野博士より恵与(2)）をランダムプライマー法にて標識したものをプローブとして用いた。
PCR法：上記調製poly(A)RNAからPCRに用いるプライマーによりcDNAを合成後、タンパク質読みとり枠を全て含むよう設計したPCRプライマーを用いてPCRを行った。

［結果と考察］

ラット脳、ヒト網膜、ショウジョウバエ頭部からすでに synaptotagmin の cDNA がクローニングされている(3)。この synaptotagmin タンパク質は、神経伝達物質の遊離に深く関わっていると考えられているが、生理的にはどの様な働きを担っているのかは明かではない。神経伝達物質遊離の良いモデル系である PC12 細胞を用いてこの synaptotagmin の生理機能を研究しようと考えその欠失細胞（HaF7）を作成した（本大会で笠井が発表）。

PC12h 細胞及び HaF7細胞より調製したpoly(A)RNAを用いて、ノーザンブロット解析を行った（図１）。ラット脳 synaptotagmin-cDNA をプローブとしたところ、PC12h細胞には4.8kbのmRNAの発現が見られた。一方、HaF7細胞には特異的に標識されるバンドは見いだされず、synaptotagminがmRNAの発現のレベルで欠失していることが明

かとなった。

ラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングした際、途中からsynaptotagminの配列とは異なるsynaptotagmin類似タンパク質の存在を示唆するデータを得ていた。そこでこのような類似タンパク質のmRNAが、実際に発現されているかどうかについて検討を行った。このsynaptotagmin及び類似タンパク質の読みとり枠下流のアンチセンスプライマーとsynaptotagminの読みとり枠上流のセンスプライマーを作成し、PC12h及びHaF7細胞mRNAより得たcDNAに対してPCRを行った。その結果PC12h細胞では、synaptotagmin及び類似タンパク質のアンチセンスプライマーを用いた場合、それぞれに対応して1.3kb及び1.5kbのDNAが増幅され、synaptotagmin-cDNAをプローブとして用いたサザンブロット解析ではこの両方のバンドが認識された。このことから5'側がsynaptotagminと同じで3'側に異なる配列を持つsynaptotagmin類似タンパク質をコードするmRNAが実際にPC12h細胞で発現していることが予測される。これに対してsynaptotagminタンパク質が欠失しているHaF7細胞では、1.3kb及び1.5kbのDNAの増幅は見られなかった。この結果からHaF7細胞ではsynaptotagminだけではなくその類似タンパク質に関しても欠失していると考えられる。

HaF7細胞はsynaptotagminタンパク質を欠失している以外には、NGFに対する応答やいくつかのタンパク質は正常に保持されていることが確認されており、また今回のノーザンブロット解析やPCRの結果からmRNAのレベルでもsynaptotagminが欠失していることが明かとなり、今後この欠失細胞を用い細胞内でのsynaptotagminの機能的役割について解析が進められるものと期待される。

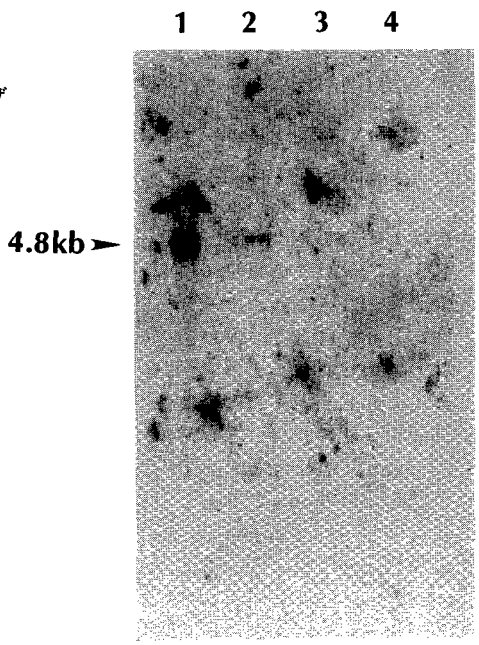


図1．PC12h及びHaF7細胞におけるsynaptotagmin mRNAの発現。PC12h及びHaF7細胞よりpoly(A)RNAを調製しsynaptotagmin-cDNAをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。
1. PC12h 3μg RNA, 2. PC12h 0.6μg RNA,
3. PC12h 0.12μg RNA, 4. HaF7 3μg RNA

［参考文献］

1. Takahashi, M. et al. (1991) Brain Res. in press.
2. 星野ら(1990)第13回日本分子生物学会大会
3. Sudhof, T. C., and Jahn, R. (1991) Neuron 6, 665

93 ラット大脳ＣａＭ依存性プロテインキナーゼⅣの自己リン酸化反応

亀下 勇、藤澤 仁
（旭川医大・第一生化学）

〔要約〕

ニューロン特異的ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣの活性調節機構を明かにする目的でラット大脳からＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣを精製し、そのリン酸化反応について検討した。大脳の酵素はＳＤＳ電気泳動上で分子量６３、０００の単一バンドを示し、Ca^{2+}／ＣａＭ依存性の自己リン酸化活性が検出された。ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣは自己リン酸化反応により酵素１分子に約１ｍｏｌのリン酸が取り込まれ、これに伴って酵素の著しい活性化がみられた。この自己リン酸化反応は、酵素量と反応の比活性の関係から分子間反応と考えられた。

Ｓｉｋｅｌａら(1)がマウス脳ｃＤＮＡから見いだしたＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣは、アミノ酸配列から判断してＳａｈｙｏｕｎら（２）が後にＣａＭ－ｋｉｎａｓｅＧｒと命名した酵素と同一の酵素と考えられている。ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣはｃＤＮＡから見いだされた酵素であるため、酵素化学的性質に関する詳しい報告は未だ少ない。最近、我々はラット小脳の本酵素が非対称形をしたモノマー酵素であることを明かにし、また本酵素がＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅡと同様基質特異性の広い多機能性の酵素であることを示した（３）。今回、我々はラット大脳からＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣを精製し、その自己リン酸化反応による本酵素の活性調節に関する若干の知見を得たので報告する。

［実験方法］

ラット大脳皮質の粗抽出液からP-cellulose、DEAE-TOYOPEARL、ＣａＭ－sepharose、Sepharose 6Bの各クロマトグラフィーによりＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣを約３４０倍精製した。ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣ活性は、合成基質のｓｙｎｔｉｄｅ－２（Pro-Leu-Ala-Arg-Thr-Leu-Ser-Val-Ala-Gly-Leu-Pro-Gly-Lys-Lys)あるいはｐｅｐｔｉｄｅ－γ(Lys-Ser-Asp-Gly-Gly-Val-Lys-Lys-Arg-Lys-Ser-Ser-Ser-Ser)を用い、１分間の反応で基質に取り込まれるリン酸の量を測定した。

［結果］

ラット大脳より精製したＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣは，図１Ａに示したように小脳の酵素と異なりＳＤＳ電気泳動上６３ｋＤａの単一バンドとして観察された。ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣはCa^{2+}／ＣａＭ依存性に自己リン酸化され、オートラジオグラフィーにより高分子側にシフトしたバンドとして検出された（図１Ｂ）。自己リン酸化反応に伴い酵素１分子あたり約１ｍｏｌのリン酸が取り込まれ、酵素活性は数倍上昇した。この酵素リン酸化反応に伴う活性化の程度は活性測定をする反応液のｐＨに依存し、特にｐＨ７．５－８．５で著しい活性化が見られた。しかし、ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅡの場合と異なり自己リン酸化後もＣａＭ非依存性活性の比率は増大しなかった（図２）。ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣの自己リン酸化反応が分子内反応か分子間反応かを調べる目的で酵素濃度を変えた時の自己リン酸化反応の比活性をプロットしてみたところ、図３Ａに示した様に濃度に依存して比活性の増大がみられた。また、ｖａｎ’ｔ Ｈｏｆｆ プロットの傾きが１．７であったことから（図３Ｂ）、このリン酸化反応は分子内反応ではなく分子間反応であると考えられた。

［考察］

ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣは自己リン酸化反応により顕著な活性化がみられるものの，ＣａＭ非依存性活性の比率は増大せず，ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅡとは異なった活性調節機構を持つものと考えられた。ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣはモノマー酵素であり分子間でリン酸化反応をすることや、さらにＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣがＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅡの部分アミノ酸配列に対応するｐｅｐｔｉｄｅ－γをリン酸化することなどから，酵素自身だけでなく他のプロテインキナーゼとの間での相互活性調節の可能性も示唆された。最近、小脳のＣａＭ－ｋｉｎａｓｅＧｒが分子内での自己リン酸化反応により活性化され、ＣａＭ非依存性活性が出現すると報告されたが（４）、大脳の酵素を用いた本研究の結果と異なっており、今後さらに検討が必要である。

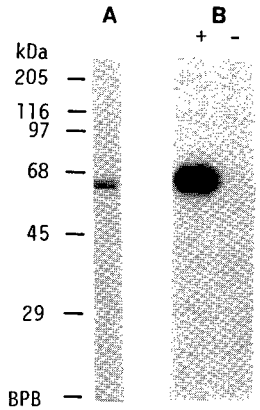


図1．大脳ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣの自己リン酸化反応．
A、精製酵素の蛋白染色．B，ＣａM存在下（＋）ならびに非存在下（－）での自己リン酸化反応のオートラジオグラフィー。

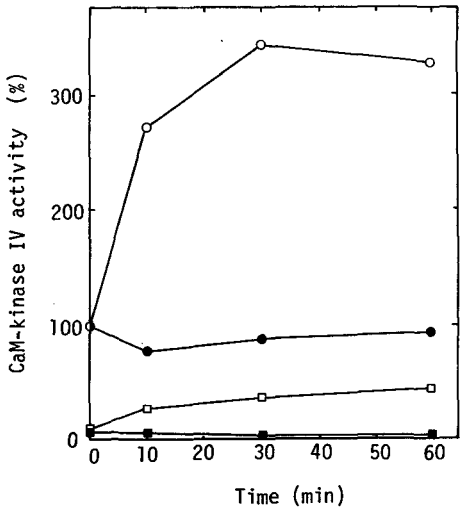


図2．自己リン酸化に伴うＣａM依存性（○、●）ならびにＣａM非依存性（□、■）ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣ活性の変化．
ＣａＭ－ｋｉｎａｓｅⅣを自己リン酸化条件下（○、□）あるいは酵素のみ（●、■）でインキュベートした後、ｓｙｎｔｉｄｅ－２リン酸化活性を測定した。

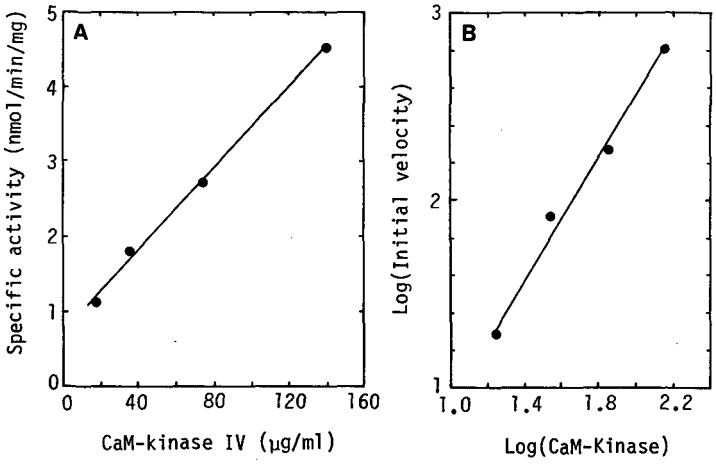


図3．自己リン酸化活性に及ぼす酵素濃度の影響（A）ならびにそのｖａｎ’ｔ Ｈｏｆｆ プロット（B）

[文献]
(1) Sikela,J.M. et al. (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 84, 3038-3042
(2) Ohmstede,C-A.,Jensen,K.F., and Sahyoun,N.(1989) J.Biol.Chem. 264, 5866-5875
(3) 宮野、亀下、藤澤 (1991) 第64回 生化学会大会
(4) Frangakis,M.V.,Ohmstede,C-A., and Sahyoun,N.(1991) J.Biol.Chem.266,11309-11316

94 テトラヒドロビオプテリンの生合成酵素であるヒトセピアプテリンリダクターゼのｃＤＮＡクローニング

一瀬宏、永津俊治
(名古屋大学・医学部・生化学第一)

[要約]
テトラヒドロビオプテリンの生合成酵素の一つであるセピアプテリンリダクターゼの全アミノ酸のコード領域を含むｃＤＮＡを、ヒト肝臓のライブラリーから単離し塩基配列を決定した。塩基配列の解析の結果、ｃＤＮＡは２６１アミノ酸からなる分子量28,047のタンパク質をコードしていた。ヒトセピアプテリンリダクターゼのアミノ酸配列を報告されているラットのアミノ酸配列と比較したところ、７４％のアミノ酸が一致していた。また、セピアプテリンリダクターゼのN-末端領域に、ヒトのカルボニルリダクターゼ、エストラジオール１７β-デヒドロゲナーゼ、３β-ヒドロキシ-５エン ステロイドデヒドロゲナーゼとのホモロジーがみられた。

テトラヒドロビオプテリンは、芳香族アミノ酸水酸化酵素（チロシン水酸化酵素・フェニルアラニン水酸化酵素・トリプトファン水酸化酵素）の補酵素として働いている。最近、生体内での一酸化窒素の生成にも関与することが見いだされている。テトラヒドロビオプテリンは、ＧＴＰから４段階を経て生合成される。セピアプテリンリダクターゼ (sepiapterin reductase; SPR) は、生合成の中間体である6-pyruvoyl tetrahydropterin の側鎖のカルボニル基の還元反応を触媒する。

昨年、Citronらにより、ラットＳＰＲのクローニングが報告されたが(Citron et al., 1990)、彼らのクローンは、Ｎ－末端のアミノ酸が欠けているものであった。我々は、同じくラットのアミノ酸配列をタンパク質化学的な方法により、全体の９６％にあたる領域のアミノ酸配列を決定し(Oyama et al., 1990)、Citronらの結果と合わせて、ラットＳＰＲの全構造を決定した。我々は、今回ラットのｃＤＮＡをプローブとして、ヒトのＳＰＲのcDNAクローニングに成功したので報告する。

[方法]
上記２つのラットＳＰＲの一次構造に基づきプライマーを作製した。ラット脳から調製したＲＮＡを鋳型として、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を行いラットＳＰＲを増幅した後プラスミドベクターに組み込んだ。

λgt11をベクターとし、ランダムプライミングにより作製されたヒト肝臓のｃＤＮＡライブラリー（徳島大学の蛯名博士より提供された）を用い、ラットＳＰＲのｃＤＮＡをプローブとしてスクリーニングを行った。

[結果及び考察]
RT-PCR法によりクローニングしたラットＳＰＲのｃＤＮＡをプローブとして、3×10^5のヒト肝臓のｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることにより７ケの陽性クローンを得た。それぞれを単離し、プラスミドベクターに組み込み、一部の塩基配列を決めた。その結果、一つのクローン（hSPR 8-25）が、全アミノ酸のコード領域を含むことが明かとなり、このクローンの全塩基配列を決定した。

hSPR 8-25は、261コのアミノ酸からなる分子量28,047のタンパク質をコードしていた。塩基配列から推定されたアミノ酸配列をラットのアミノ酸配列と比べると、ラットの方が１アミノ酸長いけれども、74%のアミノ酸が一致していた（図１）。

ラットで見いだされたプテリンの結合部位と考えられるAla-Gly-Leu-Leu-Serの配列は、ヒトにおいてもAla-Ser-Leu-Leu-Serとなっており、Ala-Xxx-Leu-Leu-Serの配列が保存されていた。

ヒトＳＰＲのアミノ酸配列をさらに他の酵素とも比較した。ヒトＳＰＲのＮ－末端側約６０アミノ酸は、ヒトのカルボニルリダクターゼ(Forrest et al., 1990)と33%のアミノ酸が一致しており、相同のアミノ酸も数えると相同性は71%となった。また、リダクターゼの逆反応であるデヒドロゲナーゼとの比較では、同じくＮ－末端側約６０アミノ酸の範囲でヒトエストラジオール１７β-デヒドロゲナーゼ(Luu et al.,

```
        1        10        20        30        40        50        60
human   MEGG-LGRAVCLLTGASRGFGRTLAPLLASLLSPGSVLVLSARNDEALRQLEAELGAERS
        **** ** ***.**********.*** **.********.****.*. ****..** ....
 rat    MEGGRLGCAVCVLTGASRGFGRALAPQLAGLLSPGSVLLLSARSDSMLRQLKEELCTQQP

       61        70        80        90       100       110       120
human   GLRVVRVPADLGAEAGLQQLLGALRELPRPKGLQRLLLINNAGSLGDVSKGFVDLSDSTQ
        **.** ..****.*.*.****.*.******. **********.********....* ..
 rat    GLQVVLAAADLGTESGVQQLLSAVRELPRPERLQRLLLINNAGTLGDVSKGFLNINDLAE

      121       130       140       150       160       170       180
human   VNNYWALNLTSMLCLTSSVLKAFPDSPGLNRTVVNISSLCALQPFKGWALYCAGKAARDM
        ******************...*.**..****..*****************.**********
 rat    VNNYWALNLTSMLCLTTGTLNAFSNSPGLSKTVVNISSLCALQPFKGWGLYCAGKAARDM

      181       190       200       210       220       230       240
human   LFQVLALEEPNVRVLNYAPGPLDTDMQQLARETSVDPDMRKGLQELKAKGKLVDCKVSAQ
        *.****.***.****.********.*********.**..*. **.*...*.**** .***
 rat    LYQVLAVEEPSVRVLSYAPGPLDTNMQQLARETSMDPELRSRLQKLNSEGELVDCGTSAQ

      241       250       260
human   KLLSLLEKDEFKSGAHVDFYDK
        ******..*.*.*********
 rat    KLLSLLQRDTFQSGAHVDFYDI
```

図1、ヒトセピアプテリンリダクターゼのｃＤＮＡより推定されたアミノ酸配列とラットセピアプテリンリダクターゼのアミノ酸配列との比較

ヒトのアミノ酸配列の第５番目に１コのギャップを入れてある。同一のアミノ酸は*で、相同なアミノ酸は・で表されている。予想されるプテリンの結合する配列は下線を引いて示してある。

1989a)と37%の同一性と63%の相同性を、3 β-ヒドロキシ-５エン ステロイドデヒドロゲナーゼ(Luu et al., 1989b)とは、25%の同一性と62%の相同性を示した。予想されるプテリン結合部位やＳＰＲの補酵素であるNADPHの結合部位もＮ－末端領域に存在しており、Ｎ－末端領域にみられる相同性と合わせ考えると、この領域に活性部位が存在することが示唆された。

（本研究は、明海大学の加藤節子博士・末岡照美博士、藤田保健衛生大学の千谷晃一博士・藤田啓介博士らとの共同研究により行われた。）

［文献］

Citron, B. A., Milstien, S., Gutierrez, J. C., Levine, R. A., Yanak, B. L., and Kaufman, S. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 6436-6440.

Oyama, R., Katoh, S., Sueoka, T., Suzuki, M., Ichinose, H., Nagatsu, T., and Titani, K. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun., 173, 627-631.

Forrest, G. L., Akman, S., Krutzik, S., Paxton, R. J., Sparkes, R. S., Doroshow, J., Felsted, R. L., Glover, C. J., Mohandas, T., and Bachur, N. R. (1990) Biochim. Biophys. Acta, 1048, 149-155.

Luu, T. V., Labrie, C., Zhao, H. F., Couët, J., Lachance, Y., Simard, J., Leblanc, G., Côté, J., Bérubé, D., Gagné, R., and Labrie, F. (1989a) Mol. Endocrinology, 3, 1301-1309.

Luu, T. V., Lachance, Y., Labrie, C., Leblanc, G., Thomas, J. L., Stickler, R. C., and Lablie, F. (1989b) Mol. Endocrinology, 3, 1310-1312.

95 脳におけるDNAトポイソメラーゼIIアイソザイム

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、＊分子細胞医学研、病態分子生物）

〔要約〕
ラット脳で発現しているDNAトポイソメラーゼII（トポII）のアイソザイム２種（AとB）のcDNAクローンを得て、アイソザイムの発現と脳の発育との関係をNorthern Blotにより調べた。トポIIAのmRNAは胎児期の脳で多く生後すみやかに減少し、トポIIAと細胞分裂との密接な関わりが示唆された。トポIIBは胎児期、成熟期を通じて発現しており、神経細胞、グリア細胞の分化後の機能と関わっている可能性が示された。

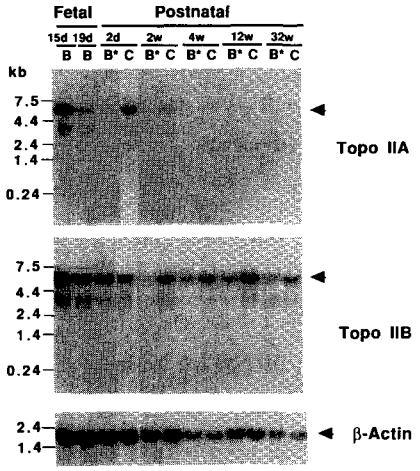
DNAトポイソメラーゼII（トポII）はDNAの２本鎖を切断、再結合しDNAのトポロジーを調節する酵素で、細胞分裂における染色体分離に必須である。我々はトポII活性を成熟ラット脳の神経細胞核画分に見いだした（２）。しかし、分裂能を失った細胞核にトポIIの存在する意味は不明であった。最近ヒト培養細胞で２種類のトポIIアイソザイムの存在が報告された（１）。ヒトのトポIIアイソザイムcDNAの塩基配列を基に、ラット脳より類似のトポIIアイソザイムのcDNAをクローン化することが出来た〔投稿準備中）。得られたトポIIアイソザイムのcDNA（トポIIA,トポIIB）を用いて、ラット脳の発育とトポIIの発現との関係をNorthern Blotにより解析した。

実験方法

ラット胎児の頭部、生後２日および２週齢から３２週齢ラットの小脳と小脳を除いた全脳をguanidinium thiocyanate液中で手早くhomogenizeし、RNAを分離した。２M formaldehydeを含む１％ agarose gelでRNAを分け、ナイロンメンブレインにブロットした後トポIIAおよびBのmRNAをハイブリダイゼイションにより検出した。検出に用いたプローブは以下のように調製した。HeLa細胞トポIIの塩基2209から2891に相当する683塩基対のラットトポIIAおよびトポIIBのcDNAフラグメントをpUC18のSmaI siteに挿入し、multi cloning siteに隣接するM13 primer pairを用いてPCRにより増幅した。マウスβ-actin cDNA（塩基332から988、pTZ18に挿入されたもの）も同様に処理した。ハイブリダイゼイションは6x SSC, 5x Denhardt's reagent, 0.1% SDS, 100 μg/ml salmon testis DNA中で65°C, 20時間行った。

結果

トポIIAのcDNAを用い、mRNAの発現を調べると、15日めの胎児脳で高い発現が認められた（図、Topo IIA）。mRNAのサイズは約6.5kbでヒトのものと同じであった。19日めの胎児では発現が激減し、小脳を除いた脳では生後2日でかすかに認められる程度で、生後2週めでは発現はほとんど認められなかった。しかし、小脳では、生後2日でもトポIIA mRNAの発現レベルは高く、生後2週めで著明に低下した。4週齢以降のラットでは小脳でも小脳を除いた脳でもトポIIA mRNAの発現は認められなかった。このトポIIA mRNAの発現は、これまでに知られている神経細胞の分裂、増殖様態とよく相関する。また我々が先に発表したDNAポリメラーゼαの活性動態とも一致していた（２）。



図、トポIIアイソザイムAおよびBのNorthern Blot
ラット胎児頭部（B）、生後ラットの小脳（C）、小脳を除く全脳（B*）より得たRNA 10μgを1% アガロースゲルで分離したあとナイロン膜（Hybond-N$^+$）にブロットした。ラットトポIIアイソザイムAおよびBのcDNAフラグメントを^{32}Pラベルし、ハイブリダイズさせた後、オートラジオグラムをとった（Topo IIA, Topo IIB）。β-actinのcDNAも同様に^{32}Pラベルし、トポIIA の検出に用いたメンブレインからプローブをはずした後にハイブリダイズさせた（β-Actin）。

トポIIBのmRNAはラットの胎児期および生後２日の脳で高い発現を示した（図、Topo IIB）。2週齢以降の小脳を除いた脳でも発現が認められ、32週齢ラットでも発現は不変であった。小脳では他の脳部分より発現が高く、生後を通じてこの発現レベルが保持されていた。

Northern Blotのコントロールとして、β-actinのmRNAを検出した。トポIIAおよびBの検出に用いたナイロンメンブレインからcDNAプローブをはずし、β-actin プローブを再びハイブリダイズさせると、どちらのメンブレインからも、図、β-Actinで示すパターンを得た。トポIIBと同様に胎児期の脳では発現レベルが高く、生後も一定した発現が見られた。

考察

中枢神経組織は胎児期に活発な細胞分裂を繰り返し、出生後には分裂の頻度が劇的に低下するが、タンパク合成など他の生理的活性は高く保たれる。脳の発育を経時的に調べることにより、トポIIアイソザイムの役割分担の差異を明確に示すことが出来た。従来から報告されている細胞分裂に関与するトポIIはトポIIAであると考えられる。脳においては特に小脳できれいな分裂ー活性相関を示した。我々が先に報告した、分化し細胞分裂能を持たない神経細胞の核で検出したトポII活性は、トポIIBによるものと思われる。4週齢のラット脳の核でも高い活性を保っていた（２）ことと、mRNAの発現が32週齢に至るまでよく保たれているという今回の結果とはよく一致する。トポIIBはほとんどの臓器で発現していたが、特に小脳と肺とで高かった（データは示さず）。この酵素は細胞の分化後の機能と深く関わっているものと思われる。

REFERENCES:

1) Chung,T. D. Y., Drake, F. H., Tan, K. B., Per, S. R., Crooke, S. T., and Mirabelli, C. K. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9431-9435.

2) Tsutsui, K., Tsutsui, K., Sakurai, H., Shohmori, T., and Oda, T. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 1116-1122.

96 ミクログリア分泌性プラスミノーゲンアクチベーターについて

中嶋一行、津崎尚子、下条雅人、濱之上誠、高坂新一
（国立精神・神経センター、神経研、代謝）

〔要約〕

ラット脳ミクログリアの培養上清にプラスミノーゲン依存性にMyelin Basic Protein (MBP)を分解するプロテアーゼ活性が認められた。セファデックスG-150カラムクロマトグラフィーでは分子量約50kDaおよび25kDaの２つの活性ピークを検出した。これら２つの活性はザイモグラフィーにおいても検出され、分子量はそれぞれ47kDa,28kDaと推定された。これらのプラスミノーゲン依存性プロテアーゼは、分子量およびウロキナーゼ抗体の反応性よりウロキナーゼタイプのプラスミノーゲンアクチベーター(uPA)と考えられた。低分子量のプラスミノーゲンアクチベーター（25kDa）は培地の濃縮中、47kDaから生じた分解物と考えられた。また培地中のプラスミノーゲンアクチベーター活性はミクログリアの培養時間に依存して増加すること又、種々の刺激に応答して変化することから分泌性と考えられた。

我々はラット脳より分離、培養したミクログリアの培養上清にMBP分解活性を見いだした。昨年報告したように、その主なプロテアーゼとしてエラスターゼ様の酵素を同定した[1]。しかし、同培地中にはこの酵素の他、プラスミノーゲン依存性のMBP分解活性も認められ、プラスミノーゲンアクチベーター(PA)の存在が示唆されてきた。近年、神経系においてPAが細胞移動[2]、神経突起伸長[3]、細胞分裂[4]に関与することが報告されており、その産生および機能が注目されつつある。今回、我々はミクログリア培養上清に検出されたPA活性の性質および分泌性について生化学的に検討したので報告する。

［方法］

ミクログリアは既報のごとく、ラット新生児大脳の初代培養系より簡便法により分離、培養した[5]。純度は98%以上であった。ミクログリアの培養上清(Mic-CM)は昨年報告した方法により調整した[1]。分離したミクログリアを無血清のDMEMで洗浄後、同培地で0-48時間培養した。回収した培地はアミコンの限外濾過(YM5)装置により濃縮して使用した。MBPの分解活性は昨年報告したように、MBPの分解反応後、SDS-PAGEおよびデンシトメーターを使用して測定した[1]。PA活性検出用のザイモグラフィー(zymography)には、２%カゼイン、100 ug/mlのプラスミノーゲンを含む１%アガロースゲルを使用した。反応は、アガロースゲルに2.5%Triton X-100でSDSを除去したアクリルアミドゲルを密着させ、37℃で行った。ゲルは0.5%アミドブラックを使用して染色した。

［結果および考察］

ミクログリアの培養上清に含まれるプロテアーゼの一つとして既にエラスターゼを同定したがそれ以外にプラスミノーゲン依存性のプロテアーゼ活性を検出した（図１）。Mic-CM(0.3 ugタンパク)単独では約８%のMBP分解活性しか持たず、又、プラスミノーゲン(1 ug)単独でも全く分解活性は認められなかった。しかし両者を同時に加えるとMBPの分解は著しく促進された。これらの結果よりMic-CM中にプラスミノーゲンアクチベーター(PA)の存在が強く示唆された。

Mic-CMをセファデックスG-150でゲル濾過し、プラスミノーゲン依存性のMBP分解活性を測定した（図２）。PA様活性は分子量約50kDaと25kDa付近に溶出した。更にMic-CM中のPAの存在を確認するために、ザイモグラフィーを行った（図３）。ゲル濾過の結果と一致するように、２つのバンドが認められ、ヒトウロキナーゼの分子量をマーカーとすると、

2つのPAはそれぞれ47kDa、28kDaと推定された。このザイモグラフィでアガロースゲルにプラスミノーゲンを添加しないと両バンドともに検出されないことからプラスミノーゲン依存性の反応であることが示された。2つのPAの中で28kDaはMic-CMを高度に濃縮した際、顕著に出現し、またMic-CMを保温すると28kDaが増加することから、このタイプは47kDaがMic-CM中のプロテアーゼにより限定分解されて生じたものと考えられた。

真核生物のPAは組織タイプPA(tPA)とウロキナーゼタイプPA(uPA)の2種類に分類され、それらは異なる遺伝子産物であり、免疫学的にも区別される。Mic-CM中に含まれるPAのタイプを推測するためにヒトウロキナーゼ抗体を使用したウェスタンブロッティングを行ったところ、48kDa,28kDaともに陽性であった。したがって、この抗体反応性と分子量からMic-CM中のPA活性はウロキナーゼタイプと考えられた。

またミクログリアの培地中に検出されるPA活性は、培養時間に(0-48hr)に依存して増加することが認められた。しかもその分泌量はIL-1やbFGFの添加により有意に増加した。これらの結果からMic-CM中に検出されるPAは分泌性であり、その量は種々の因子により調節されている可能性が考えられた。

PAは種々の細胞から分泌されることが知られ、線溶系はもとより組織の分解や再構成、細胞の移動、侵入の過程に働くとされている。最近、神経系細胞でもその存在が報告されており、神経突起の伸長[3]、アストロサイトの分裂[4]などに関与するといわれている。ミクログリア由来のPA活性がどのように調節され、又、神経系の機能とどのように関与するかは今後の課題である。

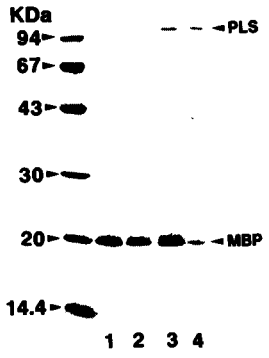


図1 MBP分解活性
1;コントロール,
2;Mic-CM,(0.3 μg),
3;プラスミノーゲン(1 μg),
4;Mic-CM+プラスミノーゲン

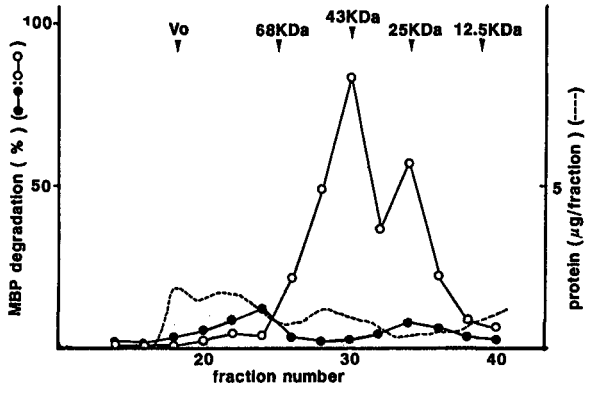


図2 Mic-CMのSephadex G-150カラムクロマトグラフィーによるMBP分解活性の解析
プラスミノーゲン存在下(○－○),
非存在下(●－●)

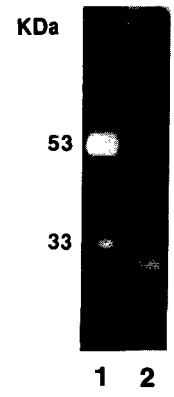


図3 Mic-CMのザイモグラフィー
1, ヒトウロキナーゼ
2, Mic-CM(2.3 μg)

[文献]

(1)中嶋一行, 下条雅人, 濱之上誠, 石浦章一, 杉田秀夫, 高坂新一：神経化学 29, 96-97 (1990)

(2)Moonen G, Garu-Wagemants MP. and Selak I: Nature 298, 753-755 (1982)

(3)Pittman RN, Ivins JK. and Buettner HM: J. Neurosci. 9, 4269-4286 (1989)

(4)Moonen G, Grau-Wagemans MP, Selak I, Lefebvre PP, Rogister B, Vassali JD and Belin D Dev. Brain Res. 20, 41-48 (1985)

(5)Nakajima K, Hamanoue M, Shimojo M, Takei N and Kohsaka S: Biomed. Res. 10(S3), 411-423 (1989)

97 スフィンゴ脂質活性化蛋白(saposin)の一次構造及び遺伝子構造

津田正彦，崎山武志，北川照男
（日本大学医学部　小児科）

【要約】

ヒトスフィンゴ脂質活性化蛋白(saposin) cDNAをプローブとし，マウス肝cDNAライブラリーをスクリーニングした。最も長いcDNAはその5' 末端にre-arrangementを認めたため，2番目に長いcDNA(msap-25)の塩基配列の全てを決定した。msap-25は2547bpであり1つの長いopen reading frameをもち，コードされていた553個のアミノ酸はコンピューター解析によりヒトsaposin 及びラットsertoli cell glycoprotein と高い相同性があるこが判明した。ヒトsaposin と同様にマウスsaposin にも4つのドメインが認められ，いずれもほぼ同一の場所にcystein，proline及び糖鎖結合部位が認められた。また，msap-25 以外のクローンをいくつか解析した結果，マウスsaposin mRNAにheterogeneityがあることが判明した。このマウスsaposin cDNAをプローブとして遺伝子ライブラリーをスクリーニングし，2種類の陽性プラークを単離した。サザン法，塩基配列等による解析から，マウスsaposin 遺伝子は1コピーであり，少なくとも10のエクソンより構成されており，全てのエクソン・イントロン接続部はAG-GTルールに一致していた。また，mRNAのheterogeneityはalternating splicingにより説明された。

【目的】

saposin は，熱安定性で分子量の比較的小さな(8-13KDa) 糖蛋白質であり，さまざまなリソゾーム酵素を活性化することにより，各スフィンゴ脂質の分解を促進することが知られている。近年，分子生物学的アプローチにより，4種のsaposin が，同一の前駆体に出来しproteolytic processingにより分解されることが判明している[1]。

我々はヒトスフインゴ脂質蓄積症の病態の解明及び治療の可能性を追求するため，ヒトNiemann-Pick病の動物モデルであるマウスを用いて研究を重ねている。saposinの3つ目のドメインはglucocerebrosidaseのみならず，sphingomyelinaseをも活性化するために，この病態に深く関係すると思われる。また，アメリカでは，glucocerebrosideとsphingomyelinが同時に蓄積するマウスモデルも見出されており，その一次的病因が，saposin の遺伝的異常である可能性が高い。これらの病態を解明する目的で我々はまずマウスsaposin の一次構造及び遺伝子構造の同定を試みた。

【方法】

Stratagene社より購入したマウス肝cDNAライブラリーを大腸菌に感染させ，ペトリデッシュに1×10^6 個まき，ナイロン膜に転写後 ^{32}Pでラベルしたヒトsaposin cDNAで56℃，6×SSC の条件で一夜ハイブリダイズし，0.1×SSC,56℃ 30分の最終条件で洗浄し，増感紙を用いて一夜感光させた。陽性プラークは全てin vivo excisionしてplasmid に変換し，Eco RI(Takara)で消化しアガーロースゲルでサイズを調べた。各種制限酵素(Takara)で消化した各々の断片をpGEM-4Z plasmid (Promega)にサブクローニングして，二重鎖DNA 用に修正されたdideoxy chain termination 法（シークエナーゼ(USB) を使用）にて塩基配列を決定した。アミノ酸配列，相同性の検討はコンピューター解析GENETYX(SDC)を用いて行った。

また，マウス遺伝子ライブラリーをmsap-25 をプローブとして，上記と同様の方法でスクリーニングを行った。陽性プラークは，Xbalで消化し，各々の断片をpGEM-4Z plasmid にサブクローニングした後，各種制限酵素地図を作製し，遺伝子塩基配列を決定し，上記と同様の方法でコンピューター解析を行なった。

正常及びNiemann-Pickマウスの肝よりDNA を分離し，制限酵素にて消化してサザン法にてナイロン膜へ転写し，msap-25をプローブとして，上記と同様の条件でハイブリダイズを行なった。

【結果】

マウス肝cDNAライブラリーを1×10^6個スクリーニングして50個の陽性プラークが得られたことから，マウスのsaposin

mRNAは肝では約 0.005～0.01%存在することが明らかになった。最も長いcDNA (msap-4, 約2.7kb)の塩基配列よりその5'末端のre-arrangementが判明し，2番目に長いcDNA (msap-25)の塩基配列の全てを決定した。msap-25 は2547bpでその3'末端にpoly(A)tail を持っていた。1つの長いopen reading frameが認められ，コードされた 553個のアミノ酸はコンピューター解析によりヒトsaposin及びrat sertoli cell glycoproteinと高い相同性があることが判明し，その相同性はヒトと約63%，ラットとは約90%であった。ラットとの塩基の相同性はコード領域のみならず，3'末端非コード領域にまで認められた。ヒトsaposin と同様にマウスsaposin にも4つのドメインが認められ，それらには，ほぼ同一の場所にcystein，proline及び糖鎖結合部位が認められた。各々のドメインのアミノ酸配列は種を越えて保存されていたが，ドメインDが最も保存されており，ドメインCにおいてはヒトでいくつかのアミノ酸の欠失が認められ，その保存度は最も低かった。msap-25 以外のクローンをいくつか解析した結果，ヒトで認められるのと同様に9つの余分な塩基を持つクローンも存在し，また，3'末端に3つの余分な塩基を持つクローンも認められ，マウスsaposin mRNAにheterogeneityがあることが判明した。

マウス遺伝子ライブラリーを 1×10^6 個スクリーニングして2種類の陽性プラークが得られた。陽性クローンの解析により，マウスsaposin 遺伝子は全長約20kbで，少なくとも10のエクソンから構成され，全てのエクソン・イントロン接続部はAG－GTルールに従っている事が明らかになった。また，mRNAに認められたheterogeneity は alternating splicingにより生ずることが判明した。

正常及びNiemann-Pickマウスの遺伝子サザンブロットの解析により，Niemann-Pickマウスには少なくともsaposin 遺伝子上に大きな欠失は認められないことが明らかとなった。また，マウスsaposin 遺伝子は単一であることが判明した。

【考案及び結論】

saposin が遺伝的に欠損する疾患としては，saposin B の異常による異染性白質変性症とsaposin C の異常によるGaucher 病が知られている。近年，glucocerebroside とsphingomyelin の2種の物質の蓄積を認めるマウスの報告があるため，Niemann-Pick病においてもsaposin が一次的な原因となる可能性があると思われる。

我々はマウスsaposin cDNAを単離しその一次構造のほとんどを決定した。コンピューター解析によりその一次構造はrat sertoli cell glycoprotein[2] のそれと酷似していた事や，塩基配列の相同性が3'末端非コード領域にまでおよんでいることなどより，これらの2つの蛋白は同一のものである事を確認した。その一次構造はヒトのそれとも高い相同性があり，同様に4つのドメインが認められた。各ドメインは構造的に互いに酷似していることから，遺伝子のduplicationにより生じたものと思われる。また，ヒトと同一の部位に9つの余分な塩基をもつクローンがあることや，3'末端にもheterogeneity が認められることよりマウスsaposin mRNAにはalternating splicingが存在することが推定された。種族間におけるアミノ酸の比較に於て，ヒトsaposin Cにいくつかのアミノ酸に欠失が認められたことは興味深い。

また，マウスsaposin 遺伝子の構造解析により，mRNAにalternating splicingの存在が確診されたが，ヒトにおいてこの部分に突然変異の好発部位があることは興味深い。遺伝子構造が決定されたことにより，saposin の異常による疾患の遺伝子診断をより容易にしたといえる。今後これらのデータをもとにし，Niemann-Pickマウスやその他のマウスにおけるsaposin の役割を決定する予定である。

【文献】

1) Coding of two sphingolipid activator proteins (sap-1 and sap-2) by same genetic locus: J.S.O. Brien et al.: Science 1988, 241, 1098-1101

2) Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 1 secreted by rat sertoli cells: similarity with the 70-kilodalton precursor to sulfatide/G_{M1} activator: M.W. Collard et al.: Biochemistry 1988, 27, 4557-4564

98 Establishment of GABAergic- and Glutamatergic-like Neuronal Cell Lines from Hippocampus

TAKEUCHI, A.M.*; GALLYAS, F.Jr.; TAKAHASHI, K. and TABIRA, T.
NCNP . National Institute of Neuroscience, 6th Division *

(要約)
SUMMARY

Here we describe the generation of cell lines from hippocampus immortalized by retrovirus vectors transducing the SV40 large T-Ag, tsA58-3 mutant T-Ag or v-myc oncogenes. These cell lines express characteristics of embryonic precursor cells and mature neuronal phenotype. Among these lines we found clones that contain the neurotransmitters glutamate and gamma-aminobutiric acid (GABA).

INTRODUCTION

Primary culture has been used to study the complexity of neuronal interaction and development in the CNS, but this technique has some limitation by the great heterogeneity of cell preparations and limited life-spans, restricting studies of specific neural cell type. To overcome this problem the generation of cell lines from specific regions has been very useful. Some groups have reported the generation of immortalized cells by oncogene transfer with recombinant retroviral vectors (CEPKO et al.,1984; JAT et al., 1986; FREDERIKSEN et al.,1988). We had established immortalized neuronal cell lines by recombinant retroviral vector-mediated transduction of the SV40 T Ag, tsA58-3 or v-myc oncogene into hippocampal cells. Depending on the culture conditions these lines displayed either undifferentiated or neuronal characteristics as for example the expression of neurofilaments. Furthermore some of these cell lines expressed glutamate and GABA neurotransmitter, revealed by immunocytochemical and amino acids analysis. This type of permanent neural precursor cell line which can be differentiated to neuronal cell is potentially useful for further studies on the differentiation signaling pathway of neural cells.

MATERIALS AND METHODS

Generation of cell lines: Balb/c mouse embryos and Wistar rat embryos with 15 and 16 embryonic day respectively were used. The brain was removed and hippocampus was dissected and dissociated in Dulbeccos modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% of fetal bovine serum (FBS) followed by an incubation in 0,03% trypsin and 0,4mg/ml DNAse I at 37°C for 5 min. Cells were centrifuged and washed in DMEM + 10% FBS. 2 x 10^5 cells were seeded on 10ug/ml poly-l-lysine 35 mm coated dishes and incubated at 37°C in the presence of 5% CO_2. After 1h the medium was changed for fresh one. Subsequently cells were incubated at 37°C for 24 h in 8 ug/ml polybrene with the recombinant retroviruses carrying the oncogene and the genetecin resistance genes. Cells infected with tsA58-3 were incubated at permissive temperature of 32°C. After 5-7 days 0,3mg/ml of genetecin (G418-sulfate) was added. The G418 resistant colonies were isolated, expanded, cloned and subcloned by limiting dilution method.

Immunofluorescence: Cells were seeded 2-3 days before immunocytochemical assays. Immunofluorescence was performed according to HARLOW & LANE, 1988.The following Abs were used: anti-NF 200 kD clone NE14 (Sigma); anti-NSE and anti-GFAP (DAKO); anti-A_2B_5, anti-galactocerebroside and anti-SV40 T-Ag (ATCC); anti-v-myc (Sigma); anti-glutamate and anti-GABA (Chemicon).

Cell culture: Cells were routinelly maintained in DMEM + 10% FBS and differentiated in DMEM containing 0,5mM dcAMP, 2-10mM retinoic acid, 10ng NGF or 10ng bFGF. In case of tsA58-3 cell lines, the temperature was raised to 39°C.

RESULTS

Progenitor neuronal cell lines designed H16-1, H16-2, H16-3, H16-4 and HV22-3 were immortalized with v-myc oncogene, H5-1 with SV40 T-Ag and HT1, HT7-2, HT9, HT18-2 and HRT24-3 with temperature sensitive form of SV40 T-Ag, tsA58-3. They were stable in their characteristics after continuous passage, freezing and thawing without changing of cellular morphology or immunostaining pattern. Here we are describing the cell lines HV16-1 and

HT18-2 as other have similar characteristics. Line HV16-1 when grown in DMEM + 10% FBS displayed undifferentiated characteristics marked by bipolar, fibroblast-like appearance with rare neurites extensions. Immunocytochemical analysis revealed expression of A_2B_5 a bipotential glia progenitor cell marker. For anti-NF Ab just a faint immunostaining was visualized and no expression of the glial marker GFAP was observed. Phenotype of cells changed when maintained in serum free medium, characterized by bipolar, phase bright cell bodies with short neurites extensions and immunoreaction for anti-NF Ab. These changes were accentuated when cells were exposed to 0,5 mM dcAMP or 2-10 uM R.A. Within 2 days they were well differentiated to neuron-like cells, marked by ovoid somata, long neurites extensions with varicosities and growth cones. These neurites preferentially grew toward other cells contacting their cell bodies or extensions. Strong immunoreaction for anti-NF Ab was observed while immunostaining using anti-GFAP Ab was completely negative. Striking difference of morphology was observed in tsA58-3 cell line HT18-2 when incubated at different temperatures. At 32°C in 10% FBS containing medium cells displayed a stellate morphology with cobblestone appearance. When switched to 37°C the cell body changed to ovoid form with extension of some processes and at 39°C considerable long and thick neurite extensions were observed. For NF expression three distinct immunostaining patterns were obtained: at 32°C a faint immunoreaction, at 37°C some weak staining and at 39°C a strong immunolabel. Addition of NGF and bFGF enhanced cell survival and extension of neurites but did not cause significant morphology changes.

Expression of NF mRNA from immortalized cell lines was confirmed by northern blot analysis using the NF 200 kD cDNA as probe. Neurotransmitter content was examined by using immunocytochemistry and amino acid analyzer. 2 cell lines designed H16-3 and HT18-2 showed positive glu-immunoreactivity (IR) and 3 lines H16-1, H16-2, H16-4 showed positive GABA-IR. We were not able to detect positive correlation between glu-IR and cell morphology changes due to temperature variation since the temperature-sensitive line HT18-2 showed positive glu-IR when maintained either at 32 or at 39°C. On the other hand positive GABA-IR was observed just when cells were differentiated, losing this property when they regained the immature phenotype. With addition of dcAMP or R.A. into the cell culture no immunostaining for GABA and for glu was visible. Using the amino acid analyzer, the line HT18-2 showed the highest concentration of glutamate. Lines H5-1, H16-1 and H16-2 contained the highest level of GABA among the measured glial and neuronal cell lines of septal, hippocampal and cerebellar origin.

DISCUSSION

Our results suggest that these cell lines can express genes that are normally expressed specifically in precursor cells or neurons. LUSKIN et al., 1988, had also reported that distinct populations of neuroblasts and glioblasts are present in the ventricular zone at ED14. A different view had emerged from other groups. RYDER et al.,1990; FREDERIKSEN,1988 produced clones containing both neurons and glia properties, providing evidence of multipotent progenitor cells.

The tsA58-3 cell lines acquired neuronal features at 39°C and regained the undifferentiated morphology at 32°C. These lines can be potentially useful in transplant experiments, since at the non permissive temperature of the core body cells will display differentiated neuronal properties. The glu-IR in HT18-2 line was displayed either in undifferentiated or differentiated cells. In contrast the GABA-IR was detected just when cells were differentiated. By immunocytochemistry LAUDER et al.,1986 had reported that in the rat hippocampal area cell bodies of gabaergic neuron were dectable just at ED18. This suggest that we had immortalized precursor cells from specific stage maybe predetermined to develop along neural cell with GABA property. According to amino acid analysis some inverse correlation between glutamate- and GABA-concentration were observed among the measured cell lines.

In conclusion the described cell lines can be potentially useful to examine the role of glutamatergic and gabaergic neurons in differentiation and cell-cell interaction.

99 コリナージックニューロン細胞株SN-6のChAT活性に及ぼすIa陽性マクロファージ培養上清の効果

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〕
MHCクラスII抗原陽性macrophage培養上清中にコリナージックニューロン細胞株SN-6のコリンアセチル基移転酵素(ChAT)活性を著明に増加させる因子を見い出した。抗体による吸収実験から、この因子がγ-IFN, β-NGFである可能性は否定的であった。この事は、アルツハイマー患者脳あるいは脳の損傷により出現するMHCクラスII抗原陽性細胞 (microglia/macrophage)が、ニューロンの生存維持あるいは修復に関与している可能性を示唆するものと考える。

＜目的＞

アルツハイマー病患者大脳や、脳の損傷等によるニューロンの脱落に伴い、MHCクラスII陽性細胞が出現することが多数報告されているが、我々も昨年の本学会において、マウス大脳皮質の損傷により視床にMHCクラスII(Ia)抗原陽性macrophage/microgliaが出現することを報告した (1)。このクラスII陽性細胞出現のメカニズム並びに損傷によって生じたIa陽性細胞が脳内でどの様な役割を担っているかを明らかにすることは興味深い。そこで今回は、ニューロンの脱落に伴うMHCクラスII抗原陽性細胞出現の意義を明らかにする目的で、マウスmacrophageおよびマウスコリナージックニューロン細胞株SN-6.10.2.2を用いて、in vitroの系において検討を行なった。

＜実験方法＞

macrophage培養上清の調整： BALB/cマウスmacrophage細胞株RAW264.7(ATCC)を 4×10^5/mlで無血清培地 (DMEM : F12=1 : 1)にて48時間培養し、その培養上清をcontrol conditioned medium (Mφ CM) とした。macrophageの活性化は同様に 4×10^5/ml (DMEM:F12=1:1)をrecombinant mouse γ-IFN 100U/ml (Genzyme)又はLPS 1μg/ml (SIGMA)で24時間刺激した後、無血清培地で充分洗浄し、その後無血清培地で48時間培養しその上清を活性化macrophage conditioned medium (IFN-Mφ CM, LPS-Mφ CM)とした。また、BALB/cマウス由来腹腔macrophageについても同様にMφ CM, IFN-Mφ CMを調整した。

SN-6の培養とChAT 活性の測定：SN-6.10.2.2細胞は10% FCSを含むDMEMで継代した。継代7－10日後にSN-6をHBSSで2回洗浄後，各 macrophage conditioned medium 50% (v/v)を含む無血清培地（インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、ハイドロコルチゾン等を含む）にて 1×10^5/ml の細胞濃度で培養した。48時間後細胞を回収し、Fonnumの方法 にてChAT活性を測定した。抗マウスβ-NGF抗体 (Boehringer)並びに抗マウスγ-IFN抗体 (clone R4-6A2, ATCC)は、各々 0.1μg/mlをIFN-Mφ CMと共にassay系に加えた。

flowcytometry：活性化macrophageを抗MHCクラスII抗体 (anti-I-A^d, clone MK-D6, ATCC) 引続きFITC-anti-mouse IgGで染色してIa陽性率を解析した。

γ-IFN活性の測定：培養後1、24、48時間において活性化macrophage培養上清のγ-IFNの活性をELISA (HBT mouse IFN-γ ELISA testkit) にて測定した。

β-NGF活性の測定：活性化macrophage培養上清中のβ-NGFの活性を2抗体法を用いた

ELISAにて測定した（2）。

＜結果＞

活性化macrophageのIa陽性率は、γ-IFN刺激で６０％、LPS刺激で３６％の細胞がIa$^+$であった。IFN-Mφ CM，LPS-Mφ CMを添加したSN-6のChAT活性は、Mφ CM添加に比べ有意に増加し、特にIFN-Mφ CMの添加では平均２６７％の増加を示した（Table 1）。γ-IFNで活性化した腹腔macrophageの培養上清を添加した場合も同様にSN-6のChAT活性が増加する事を確認した。IFN-Mφ CM添加によるChAT活性の上昇を、抗γ-IFN抗体あるいは抗β-NGF抗体によりblockすることはできなかった（Table 1）。γ-IFN刺激培養後４８時間のmacrophage培養上清中にのみ0.5 - 1.5 U/mlのγ-IFNの活性が認められたが、同濃度のrecombinant mouse γ-IFNの添加は、SN-6のChAT活性に何ら影響を与えなかった。また、活性化macrophage培養上清中のβ-NGF活性について検討中である。

＜考察＞

今回の結果より、クラスII陽性macrophageがSN-6のChAT活性を増加させる液性因子を産生することが示唆された。この因子が何であるかは現在検討中であるが、最近γ-IFNがニューロンに直接作用して突起伸展を促進することが明らかされており（3）、またLPS刺激によるbrain macrophageがNGFを産生する事も報告されている（4）。今回の結果からは、γ-IFNである可能性は否定的であり、またNGFに関しては培養上清中の活性を検討中である。今後この液性因子を明らかにし既知因子との比較検討を行うと共に、実際脳内においてクラスII陽性microglia/macrophageがニューロンに対して擁護的な役割を果たしているかどうかの検討が必要である。（受託研究山之内）

Table 1　Effect of macrophage(RAW264.7)-conditioned medium on ChAT activities of SN-6.10.2.2

conditioned medium	n	Specific Activity (pmoles/min/mg)	Total Activity (pmoles/hr/well)	Relative Activity(%)
Mφ CM	6	76.7 ± 13.6	553.4 ± 68.5	100
IFN-Mφ CM	6	142.9 ± 15.8	1442.4 ± 140.1	267
+α-IFN	3	145.8 ± 12.2	1522.9 ± 170.5	280
+α-NGF	3	137.4 ± 10.8	1377.2 ± 206.8	249
LPS-Mφ CM	3	107.6 ± 8.9	890.7 ± 97.3	160

＜文献＞

(1) 遠藤真澄，田平　武，神経化学．29，470-471（1990）
(2) Weskamp, G. and Otten, U., J. Neurochem. 48, 1779-1786 (1987)
(3) Barish, M. et. al, Dev. Biol. 144, 412-423 (1991)
(4) Mallat, M. et. al, Dev. Biol. 133, 309-311 (1989)

100 シトシンアラビノシドによる初代培養海馬ニューロンの細胞死誘導

林要喜知[1]、中島光業[1]、吉川和明[2]

(1；森永乳業・生科研、2；東京都精神研・分子生物)

〔要約〕

ラット胎児海馬より調整したニューロンをビタミンEを含む無血清培地で培養すると、低細胞密度条件下でもほとんどのニューロンは1週間以上生存する。しかし、培養開始後4－6日目にシトシンアラビノシド（ＡｒａＣ）を添加すると2－3日のうちにほとんどのニューロンが死滅した。サイクロヘキサマイドやアクチノマイシンDを共存させたところ、ＡｒａＣによる細胞死が部分的に阻止された。高カリウム溶液中でも同程度に細胞死が阻止できた。また、他の細胞分裂抑制剤として知られるヌクレオシドアナログであるアデニン・アラビノシド、チミン・アラビノシド、およびフルオロデオキシウリジンはＡｒａＣと同じ濃度では、顕著な細胞死促進効果を示さなっかた。血清存在下で培養した一部のニューロンでは、ＡｒａＣにたいして抵抗性が増した。これらのことより、幼若な中枢神経系ニューロンでは、ＡｒａＣに特異的な細胞死誘発機構が存在することが示唆される。

（目的）

ラット新生児交感神経節ニューロンをＮＧＦ存在下で長期培養した後、ＮＧＦを除去するとニューロンは速やかに死滅する。しかし、蛋白質やＲＮＡの合成阻害剤により、細胞死が抑制出来る[3]。すなわち、細胞死の過程に、積極的な遺伝子発現が関与する一種の「自殺プログラム」の存在が示唆されている。長期培養により成熟しつつある交感神経節ニューロンでは、ＮＧＦに対する依存性が低下し、自殺プログラムが抑制されている状況になる。小池らは、この変化が細胞内Ca^{2+}濃度の上昇と対応していることを見いだした[1]。このプログラムは、ＮＧＦのみならず、ＢＤＮＦ(Brain derived neurotrophic factor)やＣＮＴＦ(Ciliary neurotrophic factor)依存性のニューロンでも認められる[5]。一方、Ｊｏｈｓｏｎらは、ＮＧＦ除去の代わりにＡｒａＣを添加した場合に、類似した機構が作動する可能性を報告した[4]。そこで筆者らは、中枢神経系ニューロンにおいても同様の自殺プログラムが働き得るか否かを調べる目的で、ＡｒａＣのニューロン死滅効果を検討した。

（実験方法）

海馬ニューロンの培養：　ラット胎児（１７－１８日齢）から海馬をとりだし、トリプシン処理後、ポリオルニチン塗布皿（１６ｗｅｌｌ）にまいた（$-3x10^4$ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^2）。このニューロンを１０％牛胎児血清を含むＤＭＥＭ培地で１３－１７時間培養した後、Ｄ／Ｆ（ＤＭＥＭとＦ１２を１対１にまぜたもの）を基本培地とした無血清培地にビタミンＥ（10^{-6}Ｍ）を加えたもので[2]、さらに５－９日間培養した。

細胞生存率の算出：一定日数培養したニューロンにそれぞれの薬物を加え、さらに2－3日間培養した。各ウエルあたりの生存率をトリパンブルーによる染色後に算出した。

（結果及び考察）

ＡｒａＣの濃度にたいする細胞死滅率を求めたところ、用量依存性を示した。１５０μＭでほぼ最大細胞死滅率が得られた。ＥＣ５０は、約３５μＭであった。この致死作用は、百分の１量のデオキシシチジン同時添加で完全に阻止された。他の塩基アナログによる細胞死誘発は、ＡｒａＣほど強くなかった。１００μＭでは、アデニン・アラビノシド（ＡｒａＡ）で弱い作用があるものの、チミン・アラビノシド（ＡｒａＴ）やフルオロデオキ

シウリジン（ＦｄＵ）では認められなかった（図１）。ＦｄＵでは、１ｍＭの濃度でもまったくニューロンの生存に影響がなっかった。

次に、蛋白質やＲＮＡの合成阻害の効果を調べるため、サイクロヘキサマイド（ＣＨＸ）やアクチノマイシンＤ（ＡｃＤ）処理をおこなった。図２に示したように、これらの薬物単独でも若干生存率に影響を与えた。これは、無血清条件下で培養したニューロンは日数経過にともない次第に脆弱になっていくためと考えられる。ＡｒａＣ単独添加では、著しい細胞死が観察されたが、ＣＨＸやＡｃＤの同時添加により有為な死滅阻止が認められた。しかし、この死滅阻止は完全ではなく、その後、ニューロンの生存率は次第に低下した。高カリウム処理もＡｃＤと同様に、死滅阻止活性はあるが、この処理自体で生存率が幾分低められた。一方、本実験に用いたニューロンは、グルタミン酸による細胞毒性がほとんど認められなかったことから、ニューロンが未成熟であると想像される。そこで、１０％ＦＣＳ存在下でニューロンを長期培養したところ、一部のニューロンは、ＡｒａＣにたいして抵抗性が増してきた。また、生後３日齢ラットでも、胎児ニューロンと同様にＡｒａＣによる細胞死が認められた。

以上のことより、中枢神経系ニューロンでも１種の細胞死滅プログラム（自殺プログラム）が働く可能性が示唆される。しかしながら、このＡｒａＣによる死滅プログラムが、ＮＧＦ除去実験などにより示されたものと同じプログラムを介して作用するのかは、さらに検討して行きたい。また、ＡｒａＣ処理により生合成が変化する分子や、ニューロンにＡｒａＣ抵抗性を与えるような因子など、死滅プログラムに関わる分子機構を解明したい。

文献

1) Koike,T. and Tanaka,S.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88,3892-3896.

2) Nakajima,M.,Kashiwagi,K.,Hayashi,Y.,Saitoh,M.,Kawashima,T.,Furukawa,S. and Kobayashi,K.(1991)Neurosci. Lett.,in press.

3) Martin,D.P.,Schmidt,R.E.,Distefano,P.S.,Lowry,O.H.,Carter,J.G.and Johnson,Jr.,E.M.(1988)J. Cell Biol.,106,829-844.

4) Martin,D.P.,Wallace,T.L. and Johnson,Jr.,E.M.(1990) J. Neurosci.,1018 4-193.

5) Scott,S.A. and Davies,A.M.(1990)J.Neurobiol.,21,630-638.

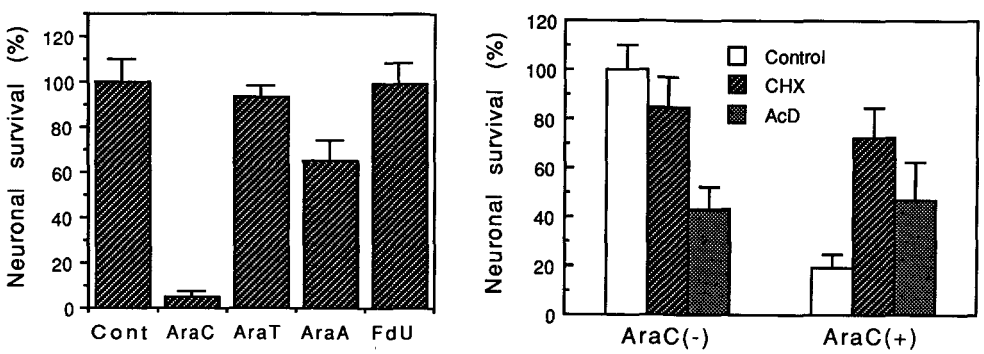


図１　ヌクレオシドアナログによる海馬ニューロンの死滅誘導。ニューロンを無血清条件下で５日培養し、各ヌクレオシドアナログ（１００μＭ）を加えてさらに４８時間培養した。

図２　ＡｒａＣによるニューロン死滅と薬物による阻止。図１と同じ条件で培養し、ＡｒａＣ（１００μＭ）添加時に、ＣＨＸ（１μｇ／ｍｌ）あるいはＡｃＤ（０.１μｇ／ｍｌ）を加え、３６時間培養した。

101 神経細胞におけるＮＯ合成酵素の活性

馬 麗娟，石崎 泰樹，森田 育男，室田 誠逸
（東京医歯大・歯・顎研機能）

〔要約〕
神経細胞にＮＯ合成酵素が存在しているかどうかを生化学的に明かにする目的で、ラットの各脳部分及び胎児大脳のホモジネートを用い、ＮＡＤＰＨとCa^{2+}の存在下におけるＮＯ合成酵素の活性を調べた。実験に際しては^{3}H-L-arginineから本酵素により生成される^{3}H-L-citrullineの量を測定した。その結果、成熟及び胎児ラット大脳のホモジネートにもＮＯ合成酵素の存在が認められたが、小脳および嗅球にはより高い活性が認められた。さらに胎児大脳から神経細胞を単離培養したところ、この培養神経細胞にもＮＯ合成酵素活性が認められ、神経細胞系におけるＮＯの重要性が示唆された。

内皮細胞由来血管弛緩因子の本体であることが明かとされたＮＯは、近年、内皮細胞ばかりでなく種々の細胞や組織においても産生されることが明かとなってきている。特に、神経系では小脳をはじめ各部位でＮＯがつくられ神経情報伝達に関与している可能性が示めされている[1,3,4,6]。Bredtらは、免疫組織化学的研究によりＮＯ合成酵素が大血管内皮と神経系に局在することを報告した[2]。しかしＮＯ合成酵素が１種類だけでないことが明かとなり、生化学的手法による各組織での検索が必要となってきた。 そこで、演者らは、成熟ラットの脳の各部位および胎児ラット大脳のホモジネートを用い これらの組織におけるＮＯ合成酵素活性を比較するとともに、神経細胞を培養に移したのち培養系でのＮＯ合成酵素活性もあわせて検討した。

［方法］成熟ラットより大脳、小脳、嗅球を、また１９日目の胎児ラットより大脳を単離し、HEPES buffer (pH7.4)でホモジナイズし、^{3}H-L-arginineと37 ℃で10分間反応させたのちHEPES buffer(pH5.5)/3mMEDTAの添加により反応を止めた。^{3}H-L-arginineより生成された^{3}H-citrullineをAG50WX-8カラムにより^{3}H-arginineと分離、溶出し、その放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。また、ＨＰＬＣにより、この分画は^{3}H-citrullineのみが含まれていることを確認した。ラット胎児大脳からの神経細胞の培養は酵素処理したのちpolylysineをコートしたディッシュに播種し、neuron specific enolaseの抗体染色にて同定した。

［成績］AG50WX-8カラムを用いた方法により成熟ラットの脳においては大脳、小脳、嗅球ともＮＡＤＰＨとCa^{2+}存在下に^{3}H-citrullineの合成が認められたが、その合成活性は、小脳＞嗅球＞大脳の順であった。また、これらＮＯの合成活性は、ＮＯ合成酵素の阻害剤であるN^{G}-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)の添加により、抑制された（Ｆｉｇ．１）。また、ラット胎児大脳にもＮＯ活性が認められたが、成熟ラットの大脳における活性より低値であった（Ｆｉｇ．２）。つぎに胎児大脳より単離培養した神経細胞におけるＮＯ合成活性を測定したところ、Ｆｉｇ．３に示すようにＮＡＤＰＨとCa^{2+}の存在下に citrulliineの合成が 有意に増加し、L-NMMAにより有意に抑制された。

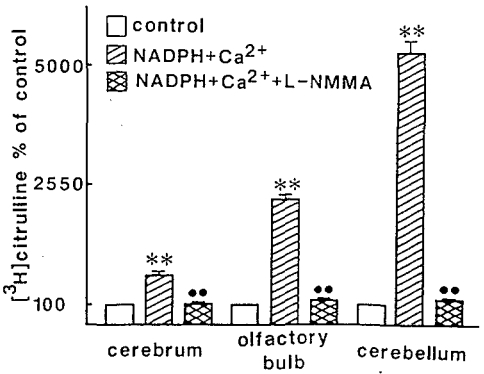


Figure 1. NO synthase activity in the homogenate of various regions of adult rat brain.

** P<0.01(compared with control group)
•• P<0.01(compared with NADPH+Ca^{2+}group)

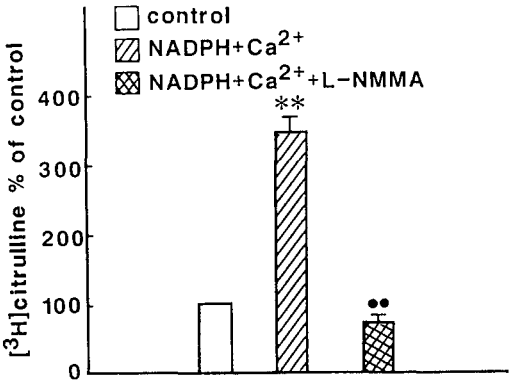


Figure 2. NO synthase activity in the homogenate of rat embryonal cerebra.
** P<0.01(compared with control group)
•• P<0.01(compared with NADPH+Ca2+group)

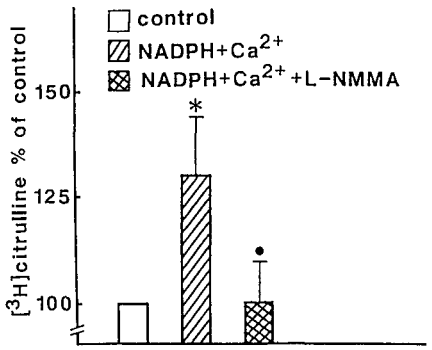


Figure 3. NO synthase activity in the homogenate of cultured neurons from rat embryonal cerebra.
* P<0.05(compared with control group)
• P<0.05(compared with NADPH+Ca2+group)

［考察］今回得られた結果は、免疫組織化学的方法によるＮＯ合成酵素の脳内分布を支持するものであった。また、１９日目の胎児大脳にもＮＯ合成活性が認められたことから、ＮＯは個体発生の初期段階からその役割を果たしている可能性が示された。ＮＯの神経系における役割はまだ明かでない点が多いが、演者らは、ＮＯに反応してアストロサイトの細胞質ｃ-ＧＭＰレベルが上昇することをすでに報告している[5]。以上のことから、神経細胞で合成されたＮＯがアストロサイトの生理活性に何らかの影響を与えている可能性が強く示唆された。

［文献］

1. Bredt, D.S. and Snyder, S.H., Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87(1990)682-685.
2. Bredt, D.S., Hwang, P.M. and Snyder, S.H., Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide, Nature(London), 347(1990)768-770.
3. Forstermann, U., Gorsky, L.D., Pollock, J.S., Schmidt, H.W., Heller, M. and Murad, F., Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain, Biochem. Biophys. Res. Commun., 168(1990)727-732.
4. Garthwaite, J., Charles, S.L. and Chess-Williams, R., Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA recepors suggests role as intercellular messenger in the brain, Nature(London), 336 (1988)385-388.
5. Ishizaki, Y., Lijuan Ma, Morita, I. and Murota, S., Astrocytes are responsive to EDRF, Neurosci. Lett., 125 (1991)29-30.
6. Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M.J. and Moncada, S., Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89(1989)5159-5162.

102

ラット大脳初代培養細胞の[³H]TCP INTACT CELL BINDING

山本秀子、山本敏文、諸治隆嗣
（東京都精神研・精神薬理、横浜市大・総合理・分子認識）

〔要約〕初代培養神経細胞の生理的条件下での[³H] TCPの結合に影響する因子について検討した。18日令胎児大脳より調製した細胞に対する5nMの[³H] TCPの結合はMgによる阻害を示し、室温5%CO_2存在下で特異的に結合した。この生細胞に対する[³H] TCPの結合はフェンサイクリジン(PCP)とσリガンドで解離された。σリガンドのうちではハロペリドール(HAL)が最も強く、そのIC$_{50}$は0.396μMであった。PCP,MK801とDTG、HALは[³H] TCPの結合の置換曲線が異なっており、制御様式に差異が存在する可能性が考えられた。牛胎児血清刺激はNMDAまたはグルタミン酸レセプターのアンタゴニストによる結合量の低下を促進させることからNMDA/イオンチャンネルに関与するPCP結合部位を増加させることを示唆した。1μM HALまたは20μM (アンフェタミン)AMPの8日間の無血清培養液への添加はこの[³H] TCP結合部位を増加させた。INTACT CELL BINDINGは細胞上の生理的な薬物反応を解析する上で有効な方法であり、IN VITROにおいてsubchronicなAMP添加は、培養神経細胞上の[³H] TCP結合量を増加させることを見いだした。

(はじめに)

分裂病様症状惹起薬のうちPCP、その誘導体TCPなどがNMDAレセプターのアンタゴニストでありチャンネル内に結合部位を持ち、イオンの流れを阻害することが明らかになった。このPCP-NMDAイオンチャンネルコンプレックスは膜画分に対する結合実験からその多様な影響因子が解析されている。またPCPはシグマ(σ)受容体及びドーパミン取り込み部位にも親和性を持つことが知られている。PCPのIN VIVOにおける生理作用を説明するには生理的条件下での生細胞で研究することが望ましい。そこでラット大脳初代培養細胞に対する[³H] TCPの結合に影響する因子について検討を行ったので報告する。

(実験方法)

Wistar系ラット18日令胎児の大脳(大脳皮質、線条体、海馬、側座核を含む)を小倉等の方法(1) によりtrypsin処理後、lens paperを通して単細胞化したのち、poly-L-lysineでコートした24wellに約1x10^6/mm^{2}の濃度で蒔き無血清培養を1週間行った。血清による影響を調べるには次の1週間、無血清培養液に5%牛胎児血清を加えて培養した。また AMP等の薬物のsubchronicな添加は最初1週間無血清培養を行った後、20μmのメンブランフィルターで無菌状態にした薬物を加えて8日間培養することにより 行った。デシプラミン(DMI)、スルピリド(SUL)も同様に処置した。 HALは100%エタノールで溶かした後、培地で希釈して添加した。細胞は、培養2週間から3週間目に使用した。結合実験はまず 5%CO_2/95%O_2で飽和させた37℃の Locke medium (154mM NaCl,5.6mM KCl,1.8mM $CaCl_2$,1mM sucrose,6mM $NaHCO_3$,10mM glucose,0.5μM Tetradotoxin, 2mM Hepes(pH 7.2))で2回洗い、薬物を加えて30分間37℃のCO_2インキュベーターにおいた後、室温で5%CO_2存在下で5nMの[³H] TCPを加え、所定の時間インキュベートした後、速やかに氷冷Phosphate buffered saline(PBS)で3回洗浄した。細胞に結合した[³H] TCPは液体シンチレーションカウンターで測定した。Nonspecific bindingには0.3mMのPCPを加えた。蛋白量はBio RadのProtein Assay Kitを用いて測定した。

(結果及び考察)

INTACT CELLに対する[³H] TCP結合は25℃では7-10分で飽和し、2mM Mgにより46%まで低下した。nonspecific bindingは約10%であった。結合はPCP及びσリガンドで阻害された。そのIC$_{50}$はHAL>DMI>PCP≧DTGで0.396, 2.04, 11.31, 25.81μMであった。また7分間、3μMのNMDA存在下で結合した[³H] TCPは0.1mMのHAL,DTG,PCPおよび MK801で解離したがPCP,MK801は速やかに結合量を低下させたのに対してHAL,DTGは緩やかに作用した(図1)。この阻害曲線はPCP,MK801のように[³H] TCP結合部位に直接親和性を持つ薬物は速やかにdisplaceするがHAL,DTGのようにσ結合部位に親和性の高い薬物は間接的に作用すると考えられた。[³H] TCP結合量はNMDA存在下で若干低下する。これはNMDAレセプターのアロステリックアゴニストがPCPレセプターからのリガンドの解離を促進するという報告(2)と一致する。この[³H] TCP結合量は5%牛胎児血清存在下で1週間培養すると増加するが血清刺激後の培養細胞は10μM NMDA+30μM Mgで結合量が低下する割合が増加することとNMDAレセプターのアンタゴニスト10μMのAPVで阻害される割合が増加することからNMDAレセプター/イオンチャンネルに関与しているPCP結合部位が増加していることが示唆された。更にσリガンドは[³H] TCP結合部位を強く阻害したが、その割合は牛胎児血清で培養した場合と差は見られなかった(図3)。しかし無血清培養下ではAPVとHALが相加的に阻害することはこの[³H] TCP結合部位が血清刺激によりσリガンド結合部位と異なる相互作用を持つ部位または細胞が増加することを示唆している。

次にこの[³H] TCP結合部位が薬物のsubchronicな暴露による変化を図4に示した。1μM HALまた20μM AMPはこの[³H] TCP結合量を増加させたが、1μM DMI及び10μM SULの8日間の無血清培養液への添加は際だった増加はもたらさなかった。AMPは

PCPと同様幻覚妄想惹起薬であり、近年分裂病に興奮性アミノ酸が関与する可能性が論議されているのでAMPが[^{3}H] TCP結合部位を増加させたことは興味深いと考えられる。

(文献)

1.小倉明彦、工藤佳久、組織培養、14(1988)14-18。

2. Kloog,Y. et al., Biochemistry, 27(1988)843-848.

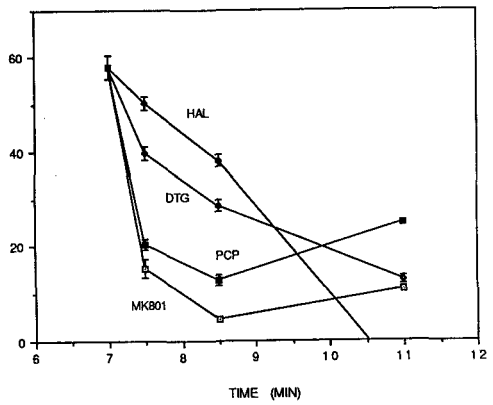


Fig.1. Plots of the dossociation of [^{3}H]TCP binding of the primary serum-free neuronal culture in the presense of 3μM NMDA by 10μM of Haloperidol, DTG, PCP or MK801, respectively. The binding was performed at 25°C, and quickly terminated by washing with ice-cold PBS, pH7.4.

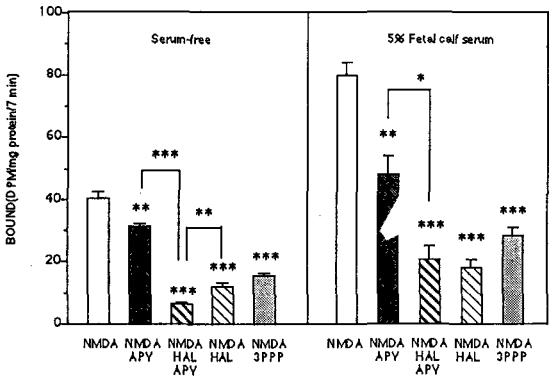


Fig.3. [^{3}H]TCP binding of primary cultures in the presense or absense of 5% fetal calf serum(FCS) was examined. The concentraitons of drugs were 3μM NMDA, 3μM NMDA + 100μM APV, 3μM NMDA + 100μM APV + 1μM HAL, 3μM NMDA + 1μM HAL, 3μM NMDA + 10μM 3-PPP.

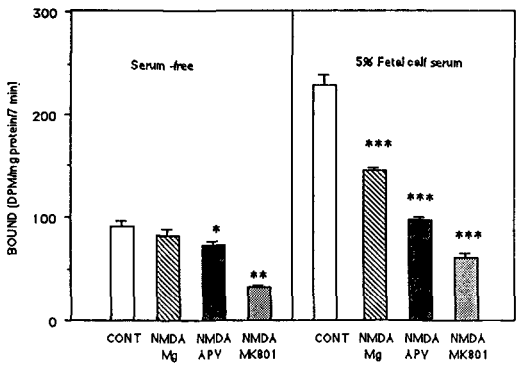


Fig.2. [^{3}H]TCP binding of primary cultures in the presense or absense of 5% fetal calf serum(FCS) was examined. The concentrations of drugs were 10μM NMDA + 30μM Mg, 10μM NMDA +10μM APV, 10μM NMDA + 10μM MK801, 10μM NMDA + 1μM HAL.

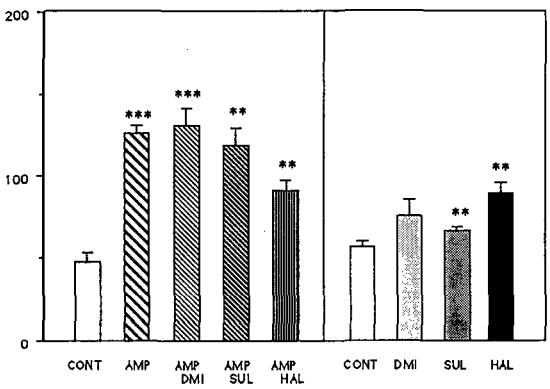


Fig.4. The effect of subchronic exposure of amphetamine, desipramine, sulpiride and haloperidol on the [^{3}H]TCP binding was examined. Drug were added to the serum-free culture medium for 8 days and used in the binding study after washout these drugs. The concentration of amphetamine was 20μM, sulpiride 10μM, other drugs were 1μM.

103 Ca^{2+}電流のうち、T型はもつがN型、L型を欠くニューロブラストーマ雑種細胞

橋井美奈子、木村康宏、東田陽博
（金沢大・医・神経情報研・神経物性）

〔要約〕

マウスニューロブラストーマ×ラットグリオーマ雑種細胞である140-3 細胞と141-B 細胞のCaチャンネル電流の性質と脱分極刺激による細胞内Ca濃度変化をしらべ、T，N，L型Caチャンネルを有する雑種細胞NG108-15細胞と比較した。分化させた140-3と141-B細胞において、50 mM Ba溶液下、膜電位を-80 ～ -40 mV に固定して刺激により生じたCa電流はトランジェント型のみで、サステインド電流（L型）は見られなかった。Baykを添加しても、約10 %の細胞でごくわずかな内向き電流が指令電位+20 mV付近で見られるにすぎなかった。トランジェント電流は不活性化キネチクス、Ni^{2+}に対する反応性より、T型と考えられた。さらに、140-3，141-BともKCl 脱分極刺激による細胞内Ca^{2+}濃度増加は見られなかった。以上より、140-3と141-B細胞はT型は発現しているがL型やN型Caチャンネルをほとんど発現していない細胞であることがわかった。又、結果は高K^+液による脱分極刺激による細胞内Ca増加は、主にLやN型によるという以前からの考え方を支持する。

［目的］

ニューロブラストーマ×ラットグリオーマ雑種細胞であるNG108-15細胞は、脱分極刺激によって３種類のCa電流を発生し、アセチールコリンを分泌することが知られている(1)。 同じかけあわせの雑種140-3と141-B細胞(2) は、アセチールコリン合成酵素活性を持ちアセチールコリンを含有することがわかっているが、脱分極ー分泌関連機能に欠陥を有するのではないかと想像されている(3)。 そこで、両細胞のCa電流の性質と、脱分極刺激による細胞内Ca濃度変化とを調査し分泌機能との関係を検討した。

［方法］

NG108-15、140-3、141-B細胞とも、dibutyryl cyclic AMPあるいはプロスタグランディンE_1 ＋ティオフィリンにて２～３週間分化させた。$BaCl_2$ 50 mMを含む溶液(4)で灌流し、ホールセル膜電位固定法にてCa電流を記録した。一部の細胞ではBayK 8644 10 μMを添加したBa溶液で灌流し、サステインド(L) 電流の活性化の有無を観察した。Cd^{2+}（40 μM）、あるいはNi^{2+}（100 μM） を添加し、不活性化の速いT型とN型を識別した。脱分極刺激による細胞内Ca濃度の変化は、Fura 2-AM を負荷した細胞を80 mM KCl 溶液で灌流することにより調べた。

［結果と考察］

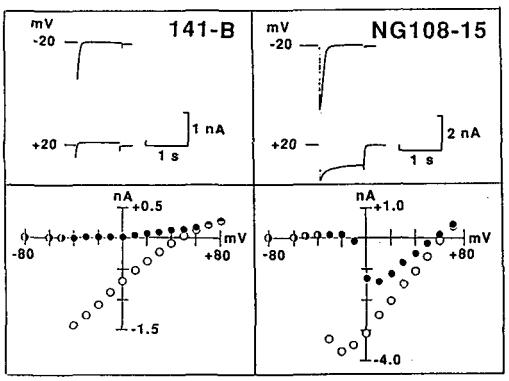
dibutyryl cyclic AMP にて分化させた140-3・141-B細胞群において、50 mM Ba溶液下、膜電位を-80 mV、-60 mV、-40 mVに固定した時のCa電流は速い不活性化を持つトランジェント型のみで、不活しないサステインド電流（L型）の出現は両細胞ともに認めなかった。BayK添加によりサステインド電流を強調してみると、140-3で10 % 、141-B で14 % の細胞において、わずかな内向き電流が指令電位+20 mV 付近で見られた。分化の方法をプロスタグランディンE_1 ＋テオフィリンにかえても、サステインド型電流は記録されなかった。トランジェント型のピーク電流の不活性

化キネチクスより、1/2不活性化電位は140-3と141-B 細胞で共に-50 mV付近にあった。NG108-15細胞の不活性化キネチクスの解析で、T型は-49 mV、N型は-27 mVであったので、140-3と141-B両細胞のトランジェント電流をT型と断定した。また、Cd^{2+} (40 μM) より、Ni^{2+} (100 μM) に感受性を持つ事もこの結論を支持する。一方、KCl 脱分極刺激により細胞内Ca濃度変化をみると、刺激前後でNG108-15では約12.7 倍、140-3と141-B では全く変化を認めなかった。A23178による強制的な細胞内Ca増加は3群の間に有意差を認めなかった。

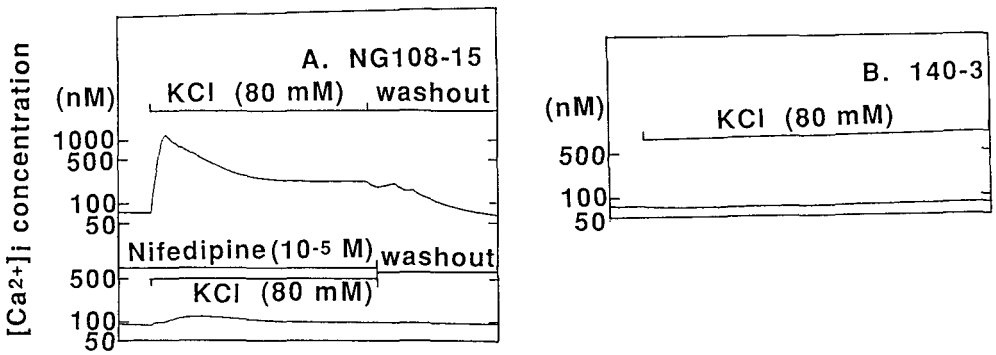
以上の結果より、140-3と141-B細胞はLやN型Caチャンネルをもたないか、あっても非常に少なくその発現が非常に小さい事がわかった。その結果、脱分極刺激による細胞内Ca増加が生じず、従ってアセチールコリンも分泌しないのではないかと想定された。これらの細胞は興奮分泌応答を研究する上で、有用な細胞になると考えられる。

[文献]

1. Higashida, H. (1988) J. Physiol. 397: 209-222.
2. Minna, J., Glazer, D. & Nirenberg, M. (1972) Nature New Biology 235: 225-231.
3. Nirenberg, M. et al. (1983) Science 222: 794-799.
4. Higashida, H. et al. (1990) Proc. Roy. Soc. London B 242: 68-74.



[図1] -80 mVに膜電位固定した時の電流波形と電圧－電圧曲線。141-B 及びNG108-15細胞を50 mM Baを含む溶液灌流し、+20 ～ +160 mV、1秒間のく形波パルスを与えた時の種々の指令電位におけるCa電流 (I Ca) (図の上段)。サステインドCa電流● 及びピークCa電流○をプロットした (下段)。141-B ではサステインド電流は認めない。



[図2] KCl 刺激による細胞内Ca濃度の変化。Fura 2-AM を負荷したNG108-15細胞及び140-3 にKCl (80 mM) 脱分極刺激を与えた。A: NG108-15では、刺激直後より細胞内Ca濃度は増加し始め、ピーク値は前値の約17倍であった。この増加はニフェジピン (10^{-5} M) による抑制を受けた。B: 140-3 ではKCl 刺激による細胞内Ca濃度増加はみられなかった。

104 ニワトリ胚の菱脳における細胞内レチノイン酸結合タンパク（タイプⅠ）と核内レチノイン酸レセプター（β）

桃井　隆[1]、富田幸子[2]、川井ゆか[1]
1）国立精神神経センター　疾病研究5部＊
2）東京女子医大　循環器小児科

〔要約〕

Humberger-Hamilton（以下 H.H.）ステージ15-16および20のニワトリ胚菱脳部分における細胞内レチノ結合蛋白（ＣＲＡＢＰタイプⅠ）およびレチノイン酸レセプター（ＲＡＲβ）の発現分布を免疫組織染色によって検討した。H.H.ステージ15-16の菱脳部分でＣＲＡＢＰタイプⅠの発現は分節パターンを示し、ロンボメア1、2、4、6、のmarginal zoneにその発現が認められた。しかし、H.H.ステージ20ではこの分節パターンは消失した。ＣＲＡＢＰタイプⅠのロンボメアにおける発現分布はニューロフィラメントの発現と対応することが明らかとなった。分節パターンを示すＣＲＡＢＰタイプⅠはLumsudenらの神経細胞の分化が分節単位でおこることを支持するとともに、神経細胞分化にレチノイン酸が関与していることを示唆するものと思われる。

［目的］　近年、ニワトリ胚の菱脳部分にショウジョウバエと同じような分節構造の存在が発見され（１）、Hox2クラスターKrox-20等の遺伝子発現が分節に従って発現していることが明らかにされてきた（４、５）レチノイン酸は様々な細胞の増殖や分化を調節する因子として、またニワトリ肢芽の形態形成因子としてその生理作用が注目されている。レチノイン酸の作用は、細胞内レチノイン酸結合蛋白と核内レチノイン酸レセプター（ＲＡＲ）を介して行なわれると考えられており、我々は1987年の当学会において最初にニワトリ胚（H.H.ステージ19-21）の神経管にＣＲＡＢＰタイプⅠが特異的に発現することを報告している（２、３、）。今回、我々はH.Hステージ15-16、20の正常ニワトリ胚菱脳部分におけるＣＲＡＢＰタイプⅠ及びＲＡＲ－βの発現と分布を免疫組織染色によって検討した。

［方法］　HHステージ15-16,20のニワトリ胚菱脳部分を4%パラホルムアルデヒドを用いて固定した後、パラフィン包埋し、6μmの切片を作成した。菱脳におけるＣＲＡＢＰタイプⅠの分布はＣＲＡＢＰタイプⅠに対する特異抗体（ウサギ）を用いて、ABC Kit（ベクター社）によるパーオキシダーゼ反応の検出をジアミノベンジジンを用いて行なった。

［結果］　H.H.ステージ15-16のニワトリ胚菱脳部分では、ＣＲＡＢＰタイプⅠの発現分布はニューロフィラメントの分布（図１-c）と同様に分節パターンを示し、ロンボメア1、2、4、6（図１-a,b）のmarginal zoneにその発現が認められた。HNK-1の分布も分節パターンを示したが、陽性反応はロンボメア3、5、6のventricular zoneに強く認められた。しかし、ＲＡＲ－βの発現分布は菱脳全体に認められ、分節パターンは認められなかった。

H.H.ステージ20の菱脳部分では、ＣＲＡＢＰタイプの発現（図２-a）はニューロフィラメント（図２-b）と同様、分節パターンを示さず、菱脳全体にその発現が観察された。HNK-1の分布（図２-c）は、H.H.ステージ20でも分節パターンがわずかながら観察された。

［結語］　ＣＲＡＢＰタイプＩの発現分布はニューロフィラメントの発現と対応することが明かとなった。またＲＡＲ－βの発現分布はＣＲＡＢＰタイプＩの分布と一致しないことが明かとなった。我々の結果は、Lumsden らの神経細胞分化にレチノイン酸がＣＲＡＢＰタイプＩの発現を介して関与していることを示唆するものと思われる。

現在、脊索の移植を行なったニワトリ胚菱脳部分におけるＣＲＡＢＰタイプＩの発現分布の検討を行なっている。

［参考文献］

1) A. Lumsden and Keynes R. (1989) Nature 337, 424-428

2) T. Momoi, Kitamoto T., Senoo H. and Momoi M. (1988) Proc. Japan Acad. 64, 294-297

3) T. Momoi, Kitamoto T., Sato K.J., Senoo H. and Momoi M. (1989) Biomed. Res. 10, 43-48

4) P. Murphy, Davidson D.R. and Hill R.E. (1989) Nature 341, 156-159

5) D.G. Wilkinson, Bhatt S., Cook M., Boncinelli E. and Krumluff R. (1989) Nature 341, 405-409

図１

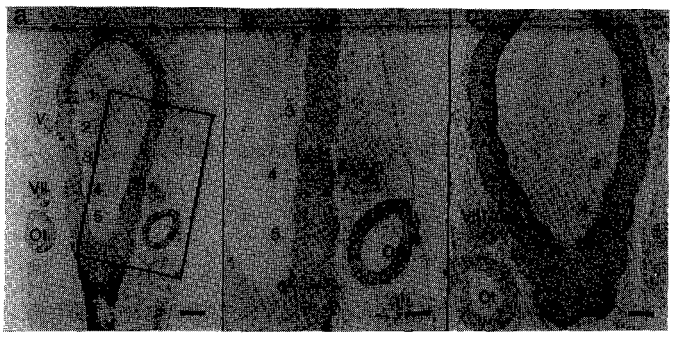
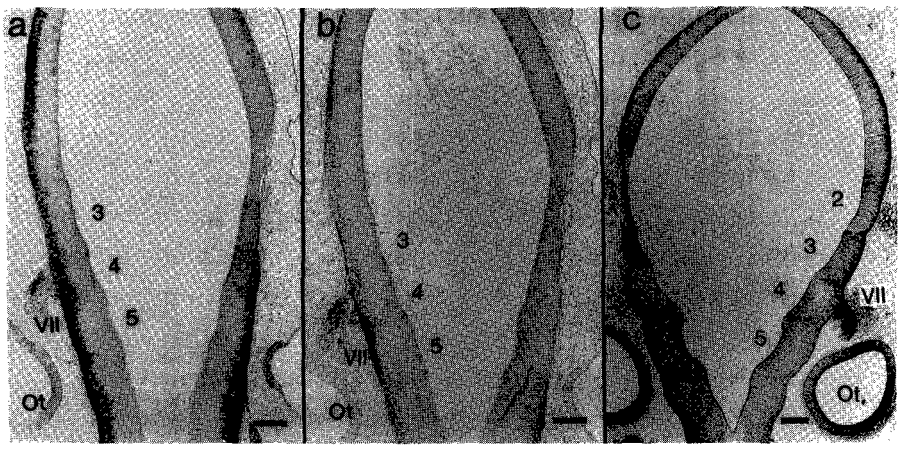


図２



105 Bt2cAMP処理によって分化させたNG108-15細胞における特異的 [^{3}H] (+) PN200-110結合の性質について

中崎聡理，岸野浩行，秋元孝文，和田哲幸，市田成志
（近畿大・薬・生物化学）

[要約]

Bt2cAMP 存在下で培養することにより分化させた NG108-15 細胞およびそのコントロールの細胞より調製した粗製膜分画における，[^{3}H]PN200-100 [ジヒドロピリジン (DHP) 誘導体] の特異的結合の性質を検討した．Bt2cAMP 処理によって分化させた細胞における特異的結合の Kd 値に変化は認められなかったが，Bmax 値は有意に処理細胞の方が高かった．この結果から，Bt2cAMP により分化された NG108-15 細胞における DHP 感受性L型Caチャンネルは量的に増加している可能性が示唆された．

Bt2cAMP 存在下で培養することにより分化させた NG108-15 細胞（処理細胞）はそのコントロールである未分化状態の細胞（未処理細胞）に比べて，高濃度 KCl 適用によって生じた ^{45}Ca uptake (K-stimulated ^{45}Ca uptake)の量的な増加が認められること，さらにその ^{45}Ca uptake の性質は主として末梢性のL型電位依存性Caチャンネルを介している可能性があることを，我々はすでに報告している(1)．

今回，Bt2cAMP処理および未処理細胞より調製した粗製膜分画における，[^{3}H](+)PN200-110 (PN，ジヒドロピリジン誘導体）の特異的結合の性質について検討したので報告する．

[方法]

① NG108-15 細胞の培養：Nelson らの方法(2)に準じて行った．Poly L-ornitine で処理した 75ml フラスコを用いて培養し，24時間後に処理細胞の場合は Bt2cAMP (0.75mM) を添加し，未処理細胞の場合は等量の PBS(+) を添加した．培養後６日目に，それぞれの細胞から粗製膜分画を調製した．

② 粗製膜分画の調製：処理および未処理細胞を PBS(-) 溶液で剥し，130g 10分間遠心を２回行って洗浄した後，沈澱を10mM HEPES/NaOH (pH 7.4 at 4℃) で懸濁し，これを -76℃で冷凍保存した．用時，融解し超音波処理を充分行った後，結合実験に用いた．

③ 結合実験：Ichida et al.(3)の方法に準じて行った．通常，2nM [^{3}H](+)PN200-110 をリガンドとして用い，30℃ 50 分間反応させた．反応は Whatman GF/C フィルターを用いた吸引ろ過により停止した．

[結果]

① 0.3～5.0 nM [^{3}H](+)PN を用いて特異的 [^{3}H](+)PN 結合を調べたところ，処理細胞および未処理細胞とも飽和曲線を示し，各濃度における [^{3}H](+)PN の特異的結合量は未処理細胞よりも処理細胞の方が 70～144 % 有意に多かった (Fig. 1)．Scatcherd 解析を行うと処理細胞および未処理細胞とも単一成分系の直線が得られ，Kd 値はそれぞれ 2.6 および 3.4 nM，Bma 値は処理細胞の方が大きく 79.9 fmol/ mg proteinであり，未処理細胞の場合は 50.5 fmol /mg proteinであった (Fig. 2)．Hill 係数はそれぞれ 1.26 および 1.10 であり，特異的[^{3}H](+)PN 結合の結合部位間の相互作用は認められなかった (Fig. 3)．

② 処理細胞の粗製膜分画における 2nM [^{3}H](+)PN の特異的結合に対する Ca agonist および種々の Ca antagonists の効果を調べたところ，BayK8644，nitrendipine，(+)PN，および (-)PN により抑制された．その IC_{50} 値はそれぞれ 5.50，0.62，0.14および 5.25 μMであった．この様に，PN に関しては抑制効果に立体特異性が認められた (Fig. 4)．一方，10^{-7}～10^{-4} Mの Diltiazem および Verapamil，10^{-10}～10^{-6} M のω－コノトキシンGVIA (ω-CgTX) により，ほとんど 2nM [^{3}H](+)PN の特異結合は影響されなかった．

[考察]

今回の実験結果より，Bt2cAMP 存在下で培養することによって分化させた NG108-15 細胞における K-stimulated ^{45}Ca uptake 量の増加(1)は，１つの可能性として [^{3}H](+)PN の特異的結合部位がNG108-15細胞の分化によって量的な変化を受けた結果生じた可能性があることを示唆している．

また，処理細胞における特異的 [^{3}H](+)PN 結合の性質は，Ca antagonists などの結果からラットの骨格筋，心筋や脳の粗製膜分画で認められた性質(3)と類似していた．さらに，PN の抑制効果に立体特異性が認められたことや ω-CgTX の効果が認められなかったことなど，処理細胞の K-stimulated ^{45}Ca uptake に対する各種 Ca antagonists の効果(1)の傾向とも類似している点がかなり認められた．

[文献]

(1) 松田成久ら (1989) 生化学, 61, 1191.

(2) Nelson, P. et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 123.

(3) Ichida, S. et al. (1989) J. Biochem. 105, 760.

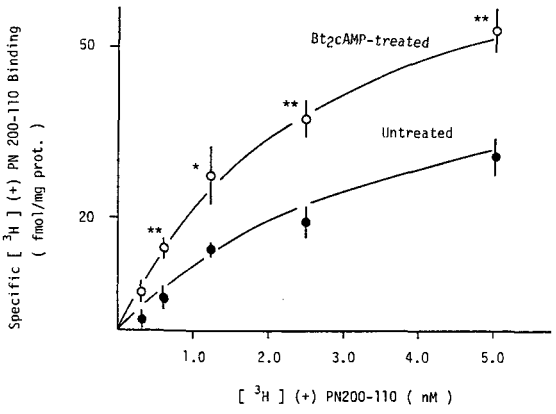


Fig. 1 [^{3}H](+)PN の効果

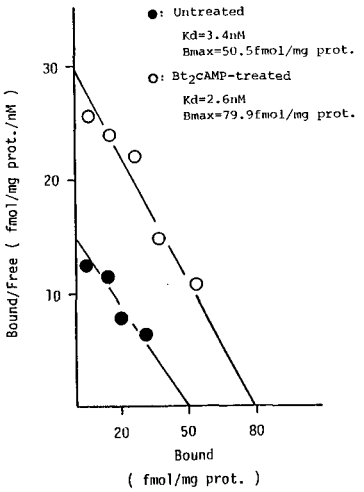


Fig. 2 Scatchard 解析

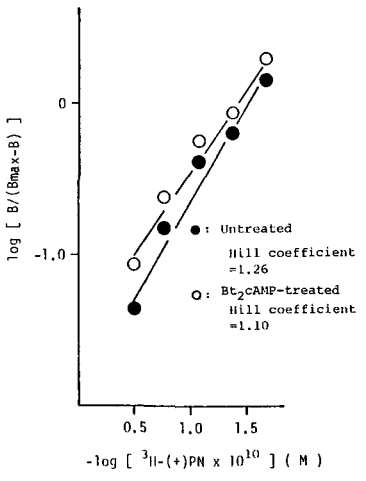


Fig. 3 Hill プロット

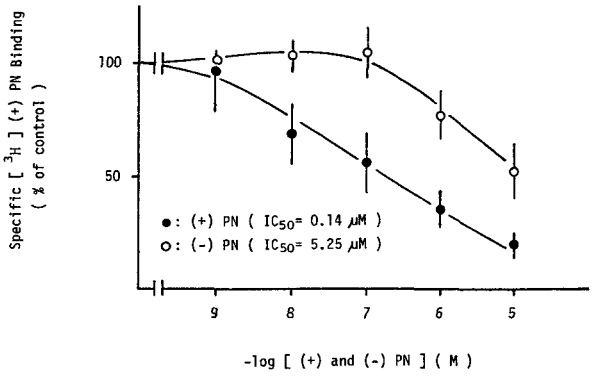


Fig. 4 (+)PN および (-)PN の効果

106 神経成長因子によるPC12h細胞の突起誘導過程におけるチロシンキナーゼの関与

塚田泰且，千葉賢三，毛利哲郎
（北陸大・薬・創薬研）

〔要約〕

我々は、PC12h細胞を用い突起伸展を指標として神経成長因子(NGF)による突起誘導と維持作用とを区別するため、NGF処理30 min以上の時間で突起伸展の検討を行い、突起誘導の観察に適する60 min処理後の突起伸展に対するﾁﾛｼﾝｷﾅｰｾﾞ阻害剤、及びその酵素によって活性化される可能性のある種々の酵素阻害剤の効果を検討した。NGFによる突起伸展はﾁﾛｼﾝｷﾅｰｾﾞ阻害剤であるST 638(10 uM)で有意に抑制された。PC12h細胞においてもNGFにより細胞内Ca^{2+}濃度の上昇を確認し、細胞内Ca^{2+}動員を特異的に抑えるTMB-8 (100 uM)が細胞内Ca^{2+}濃度上昇、及び突起保有率を抑制した。さらに、ﾎｽﾎﾘﾊﾟｰｾﾞA_2阻害剤であるp-ﾌﾞﾛﾓﾌｪﾅｼﾙﾌﾞﾛﾏｲﾄﾞ(100 nM)、ｼｸﾛｵｷｼｹﾞﾅｰｾﾞ阻害剤であるｲﾝﾄﾞﾒﾀｼﾝ(1 mM)によっても保有率の抑制が見られた。従って、突起誘導過程にﾁﾛｼﾝｷﾅｰｾﾞを介した、細胞内Ca^{2+}動員、及びｱﾗｷﾄﾞﾝ酸代謝経路の活性化が関与していることが示唆された。

PC12系細胞は、NGFに反応して神経様突起の伸展と維持を行うことから、神経細胞の分化過程のﾓﾃﾞﾙとして広く用いられている。NGFによるPC12系細胞の分化過程において、種々の酵素群が活性化されることが報告されているが、突起誘導あるいはその維持との関連については不明な点が多い。そこで我々は、PC12h細胞を用い、突起伸展を指標としてNGFによる突起誘導と維持作用とを区別できる簡便な系を検討すると共に、最近報告されたNGF高親和性受容体のﾁﾛｼﾝｷﾅｰｾﾞ[1]の突起伸展における関与について種々酵素阻害剤等の影響の面から検討を行った。

〔方法〕

PC12h細胞は、10 % CO_2存在下、90 % DMEM, 5 %準胎児牛血清，5 %熱非働化馬血清を含む培養液を用い、ｺﾗｰｹﾞﾝｺｰﾄした35 mmﾃﾞｨｯｼｭに2-3 x 10^4 cells/mlの密度でまき、37 ℃で維持した。24 hr後、50 % DMEM・50 % Ham's F-12培地にﾌﾟﾛｹﾞｽﾃﾛﾝ,ｲﾝｽﾘﾝ,ﾄﾗﾝｽﾌｪﾘﾝ,ｾﾚﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑを加えた無血清培地に交換した。100 ng/ml NGF(7S)処理は60 minとし、阻害剤を加える場合は20-30 min前処理後、同様にNGFと60 minｲﾝｷｭﾍﾞｰﾄした。その後、培地で2回洗うことによりNGFを除き、24 hrごとに突起保有率を測定した。<u>突起保有率の測定</u>：2枚のﾃﾞｨｯｼｭについて各5視野ずつ(～ 200 cells)ﾗﾝﾀﾞﾑに選び、顕微鏡下一定面積内にある全細胞数に対して、細胞体以上の突起を有する細胞の割合を %で示した。<u>細胞内Ca^{2+}濃度変化</u>：Ca^{2+}感受性蛍光色素であるFluo-3/AMをあらかじめ細胞に取り込ませた後、HEPES-buffered Krebs mediumに置換し、100 ng/ml NGFを加え、励起波長及び蛍光波長をそれぞれ488 nm、530 nmとして、Fluo-3蛍光の経時変化をACAS 570 ﾚｰｻﾞｰｻｲﾄﾌﾙｵﾛﾒﾄﾘｰにより測定した。

〔結果及び考察〕

NGF存在下で培養を続けた場合、突起保有率は2～3日でﾋﾟｰｸを示し、その後ほぼ一定となったが、NGF処理時間を30～120 minとすると2～3日でﾋﾟｰｸを示した後、著しい保有率の低下が見られた(Fig. 1)。そこで以後の実験を60 min NGF処理で行う事とした。この条件下、突起保有率のNGF濃度依存性は飽和曲線を示し、ED_{50}は約20 ng/mlであった。この突起伸展は40 nM ｱｸﾁﾉﾏｲｼﾝ Dで著しく抑制された。以上のことから、NGF 60 min処理による突起伸展はNGFの高親和性受容体を介し、ﾀﾝﾊﾟｸ合成を伴うものであり、1～2日は主に突起伸展活性を反映し、3日目以降の保有率の減少はNGFの維持作用を主に反映していると思われる。よって、この条件を用いて種々の酵素阻害剤等の突起伸展活性に対す

る効果を検討した。今回のｱｯｾｲ系で、すでに NGFによる突起伸展を特異的に抑える事が知られている[2] K252a(200 nM)は、NGF による突起保有率を著しく抑制した。最近、NGF 高親和性受容体がﾁﾛｼﾝｷﾅｰｾﾞ活性を有することが報告されており、K252aがﾁﾛｼﾝｷﾅｰｾﾞ阻害活性を有することが報告[3]されているので、ﾁﾛｼﾝｷﾅｰｾﾞの特異的阻害剤である[4] ST 638(10 uM)を用いて検討した結果、1日目に約 50 % の抑制を示した(Fig.2)。よって NGF による突起伸展の誘導にﾁﾛｼﾝｷﾅｰｾﾞが関与することが示唆された。又、ﾁﾛｼﾝｷﾅｰｾﾞがﾎｽﾎﾘﾊﾟｰｾﾞ C(γ)(PLC(γ))をﾘﾝ酸化すること[5]、及び PC12細胞において NGF が PI 代謝回転を活性化すること[6]から、NGF による細胞内 Ca^{2+}動員について検討した。NGF による Fluo-3蛍光の応答は、細胞により要する時間に差が見られたが約 2 倍の強度の増大が観察され、この応答は細胞内 Ca^{2+}動員の阻害剤である 100 uM TMB-8 で完全に抑えられた(Fig.3)。さらに同濃度の TMB-8 は 1日目の保有率も有意に抑制したことから、突起伸展の誘導に細胞内 Ca^{2+}ｽﾄｱｰﾙからの Ca^{2+}の動員が関与していることが示唆された。PC12細胞においては、NGF がｱﾗｷﾄﾞﾝ酸遊離を促進することが報告されている[7]。そこでﾎｽﾎﾘﾊﾟｰｾﾞ A_2(PLA_2)が細胞内 Ca^{2+}動員によって活性化されている可能性があるので、PLA_2 の阻害剤である p-ﾌﾞﾛﾓﾌｪﾅｼﾙﾌﾞﾛﾏｲﾄﾞ(100 nM)、及び ｼｸﾛｵｷｼｹﾞﾅｰｾﾞ阻害剤であるｲﾝﾄﾞﾒﾀｼﾝ(1 mM)を用いて検討した。両阻害剤共に NGF による突起保有率を有意に抑制した。以上の結果から、NGFによる突起誘導にはその受容体を介したﾁﾛｼﾝｷﾅｰｾﾞ、それに続く PLC(γ)の活性化による細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇、及びその結果活性化される PLA_2 を介したｱﾗｷﾄﾞﾝ酸ｶｽｹｰﾄﾞが関与していることが示唆された。

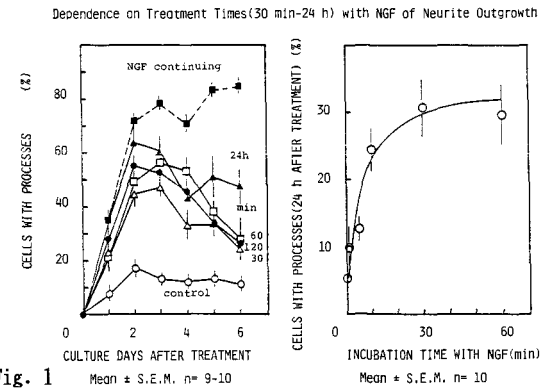


Fig. 1

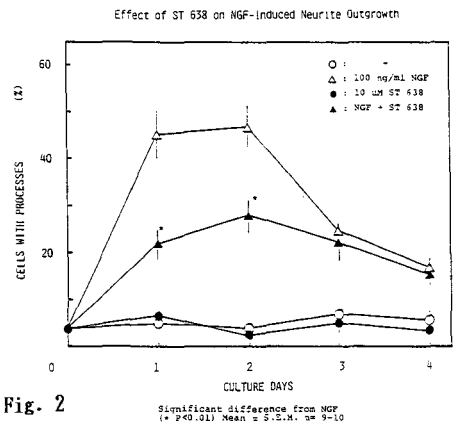


Fig. 2

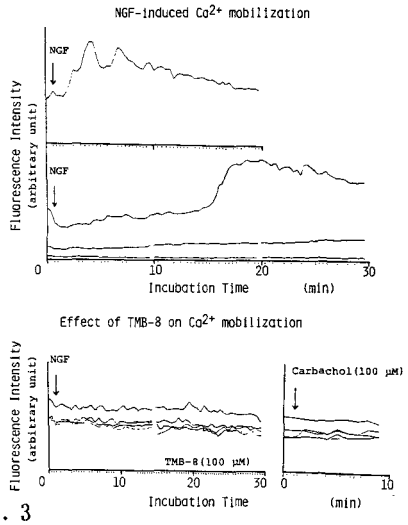


Fig. 3

〔文献〕

(1) Barbara L. Hempstead et al. (1991) Nature 350, 678-683
(2) Koizumi S. et al. (1988) J. Neurosci. 8, 715-721
(3) 萩野頴彦 他 (1990) 神経化学 29 366-367
(4) Shiraishi T. et al. (1989) Cancer Res. 49, 2374-2378
(5) Uh-Hyun Kim et al. (1991) J. Biol. Chem. 266 1359-1362
(6) Margarita L.C. et al. (1987) J. Neurochem. 48, 1466-1472
(7) DeGeorge J.J. et al. (1988) J. Neurosci. Res. 21 323-332

107 塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）の脳内分布

松山晃文、岩田弘*、今泉和則
塩坂貞夫（大阪大学・バイオ研・神経解剖、田辺製薬）

〔要約〕

塩基性線維芽細胞成長因子の成熟ラット脳における分布を免疫組織化学により検討したところ、広範な陽性細胞と陽性終末の分布を認めた。免疫陽性細胞は大脳皮質、嗅球、中隔核、大細胞性基底核、視床、視床下部、淡蒼球、海馬、扁桃体、赤核、中脳中心灰白質、小脳、背側被蓋領域、網様体、運動性脳神経核および脊髄等に認められ、また陽性線維も豊富に存在する。これらの結果はbFGFが限られたニューロングループによって産生あるいは保持されていることを示している。又、一部の上衣細胞もbFGFを含有していた。

〔目的〕

塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）は、Gospodarowicz(1)により線維芽細胞の増殖因子として発見され、その後培養神経細胞にも突起伸展、生存維持にも関係することが明かとされてきた。さらに最近では神経成長因子と同様に中隔野マイネルト核のコリナージックニューロンの成長維持に関すると言われ、アルツハイマー病への関与も示唆されている。このように神経系に重要な生理作用が示唆されているにも関わらず、脳内におけるこの因子の分布様式は殆ど明かとされていなかった。本研究はｂＦＧＦの脳内分布を免疫組織化学によって明らかにするのが目的である。

〔方法〕

bFGFのＮ端１２残基の合成アミノ酸より作製された抗体を用い、酸性線維芽細胞成長因子との交叉性がないことを確かめた(2、3、4)。本抗体を用い、イムノブロッティングにより脳各部位のbFGFを検討した、。蛍光抗体法、ＰＡＰおよびＡＢ法により、ラット脳内のbFGFの分布を検討した。

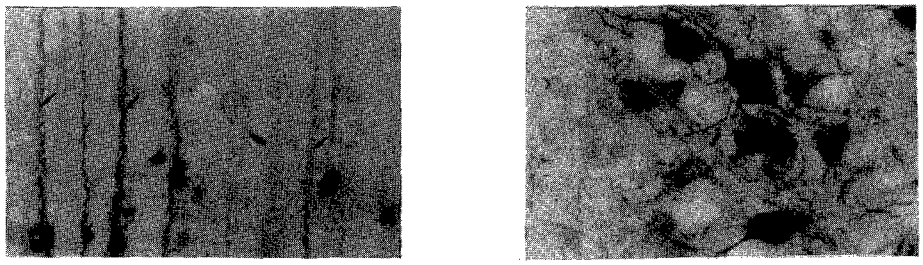
〔成績〕

bFGF免疫陽性細胞群は特に前脳において極めて豊富に認められた。即ち、嗅球、大脳皮質第５層の錐体細胞群(図１Ａ)、海馬中核野、対角帯、淡蒼球には大型の神経細胞がbFGF抗体により強く染色された。さらに、視床全域にはやや免疫反応は弱いながらも極めて数多くの陽性ニューロンが見出された。線条体は、数少ない大型の細胞が染色されたが、陽性細胞の数は極めて少なく通過線維のみが陽性であった。

視床下部にはやはり数多くの陽性細胞があったが、特に室傍核、視索上核の大型細胞が染色され、これらより起始したと考えられる線維群は正中隆起部の内層部に至った。そのほか中脳領域では赤核にきわめて強い陽性細胞が認められた（図１Ｂ）。下位脳幹部では全体として陽性細胞が希薄であったが、全ての運動性脳神経核は陽性であった。その他、小脳プルキンエ細胞が強く染色された。

〔考察〕

以上の結果は従来考えられてきたように、成熟動物において全ての神経細胞がbFGFを含有するわけでなく、特定の細胞のみがこれを含有することを示している。



A　　B

図１

〔文献〕

1. Gospodarowicz, D. (1974) Nature, 249, 123-127.
2. Okumura, N., Takimoto, K., Okada, M. and Nakagawa, H. (1989) J. Biochem., 106, 904-909.
3. Iwata, H., Matsuyama, A., Lee, Y., Okumura, N. and Shiosaka, S. (1991) Brain Res., 550, 329-332.
4. Matsuyama, A., Iwata, H., Imaizumi, K., Lee, Y., Okumura, N. and Shiosaka, S. (1991) J. comp. Neurol., in press.

108 ヒト神経接着因子Ｌ１のｃＤＮＡクローニングと構造解析

小林　正明、　三浦　正幸、　阿相　皓晃、　植村　慶一
（　慶應大学・医学部・生理学教室　）

〔要約〕
ヒト胎児脳由来cDNAライブラリー、及びＰＣＲ法によって、ヒト神経接着因子Ｌ１のcDNA を単離し、全塩基配列を決定した。得られた cDNA は、 3774 bp の蛋白質翻訳領域を持ち、1257 残基のアミノ酸からなる推定分子量 139,928 da. のポリペプチドをコードしていた。蛋白質の構造解析の結果から、ヒトＬ１蛋白質は、細胞外領域に6個の immunoglobulin C2 様領域と、それに引き続く5個の fibronectin type III 領域の繰り返し構造を持つ、膜貫通型蛋白質であることが判明した。概に報告されているマウス Ｌ１ cDNA から予想されるアミノ酸配列とのホモロジーは 86.8 % であり、特に細胞内領域は完全に保存されていた。しかしながら、報告されているヒトメラノーマ細胞株 M21由来のＬ１ cDNA 部分配列からの予想アミノ酸配列と比較すると、M21由来Ｌ１では、細胞内領域に R･S･L･E の４アミノ酸欠損があり、同種間で alternative form が存在していることが示唆された。

［緒言］
神経接着因子Ｌ１は、分子量約 200 kd の膜貫通型糖蛋白質で、神経細胞の接着(1), 神経軸索の伸展(2)、軸索束形成(3) ,細胞体の移動(4),等に関与していることが知られている。これまでに、マウス脳由来Ｌ１ cDNA のクローニング(5)が報告され、またヒト非神経由来Ｌ１(6)、ラット脳由来Ｌ１（ＮＩＬＥ (6)）で cDNA の部分クローニングが行われているが、全長にわたっての構造比較は十分に検討されていない。今回、我々は、ヒト神経由来Ｌ１の全 cDNA クローニングを行い、種間、及び、神経組織－非神経組織間でＬ１分子の構造比較を行ったので報告する。

［実験方法］
マウスＬ１cDNA塩基配列(5)を基に、蛋白質翻訳領域の 5'端,及び 3'端に相当する各 366 bp, 219bpの cDNA をポリメラーゼ連鎖反応(PCR) により作成し,プローブとして用いた。ヒト胎児脳由来 cDNA ライブラリー(Clontech Labs.USA) をスクリーニングし、マウス cDNA の蛋白質翻訳領域に対応するＮ末端の一部を欠く、２つのクローン, Ｎ４及びＩＮ３を単離した。残された部分は、ヒト白血球由来ゲノム DNA ライブラリー（慶應大・医・微生物・平岡博士より譲渡。）をスクリーニングし、塩基配列情報を得、ヒト神経組織からの全 RNA を用い、PCR 法により、cDNA クローンＮＰＣＲ５を得た。塩基配列の決定はdideoxy 法を用いて行った。

［結果と考察］

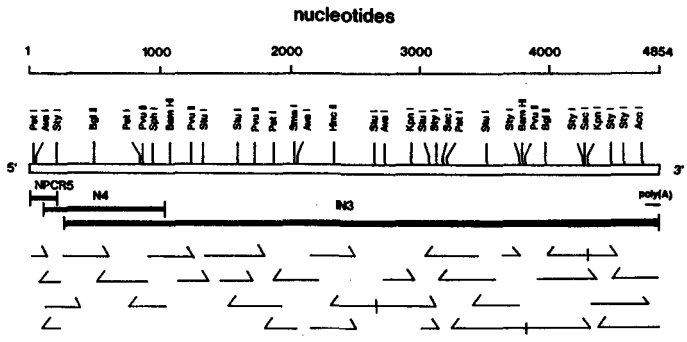


図１　ヒトＬ１cDNA の制限酵素地図と塩基配列の決定

4854 bp のヒト脳由来Ｌ1 cDNA の塩基配列を決定した(図１)。蛋白質翻訳領域は 3774 bpの塩基対から成り、1257 残基のアミノ酸をコードしていた。翻訳領域について、マウスＬ１と比較した場合、塩基配列で 84.8 %, 塩基配列から推定されるアミノ酸配列で 86.8 % のホモロジーを認めた。予想アミノ酸配列と hydropathy plot から、ヒトＬ１はマウスＬ１と同様、ｼｽﾃｲﾝ-ﾄﾘﾌﾟﾄﾌｧﾝ-ｼｽﾃｲﾝ を特徴とする約 100残基の immunoglobulin C2 様領域６個と、それに続き、ﾄﾘﾌﾟﾄﾌｧﾝ-ﾁﾛｼﾝを特徴とする約100残基の fibronectin

type III領域 の繰り返し配列５個を細胞外に持つ,膜貫通型蛋白質として確認された（図２）。領域別のアミノ酸配列をヒト-マウス間で比較してみると、マウスＬ１では６番目の immunoglobulin C2 様領域に２つ存在している、フィブロネクチン等の細胞外 マトリックス成分 で明かにされている細胞接着部位と考えられるＲＧＤ(Arg-Gly-Asp)配列が、ヒトＬ１では最初の配列だけが保存され（図３）、マウス-ヒトで保存されているＲＧＤ配列の機能的重要性が示唆される。また、各領域中、細胞内領域が最もホモロジーが高く、114 個のアミノ酸すべてが保存されていた。この､種間で保存されている細胞内領域は、細胞内因子、或いは細胞骨格系蛋白質と結合することにより、Ｌ１の機能発現を担っているものと考えられる。しかしながら、概に報告されているヒトメラノーマ細胞株M21由来のＬ１cDNA部分配列から予想される細胞内アミノ酸配列（図３）では､-ＲＳＬＥ-の４アミノ酸が欠損していた。ヒトＬ１で､神経組織-非神経組織間に認められたアミノ酸配列の変異は、alternative form の存在を示唆するものであり、機能面での解析が待たれる。

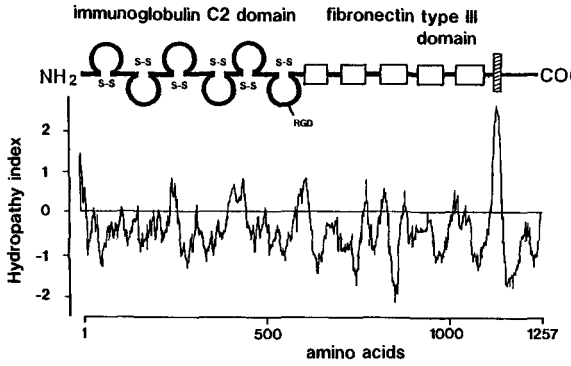


図２　　ヒトＬ１アミノ酸配列の hydropathy plot

［文献］

1) Keilhauer,G. et al. Nature 316,728-730 (1985)
2) Chang,S. etal. J.Cell Biol. 104,355-362 (1987)
3) Fischer,G. et al. J.Neurosci. 6,605-612 (1986)
4) Lindner,J. et al. Nature 305,427-430 (1983)
5) Moos,M. et al. Nature 334,701-703 (1988)
6) Harper,J.R. et al. J.Neurochem. 56,797-804.(1991)

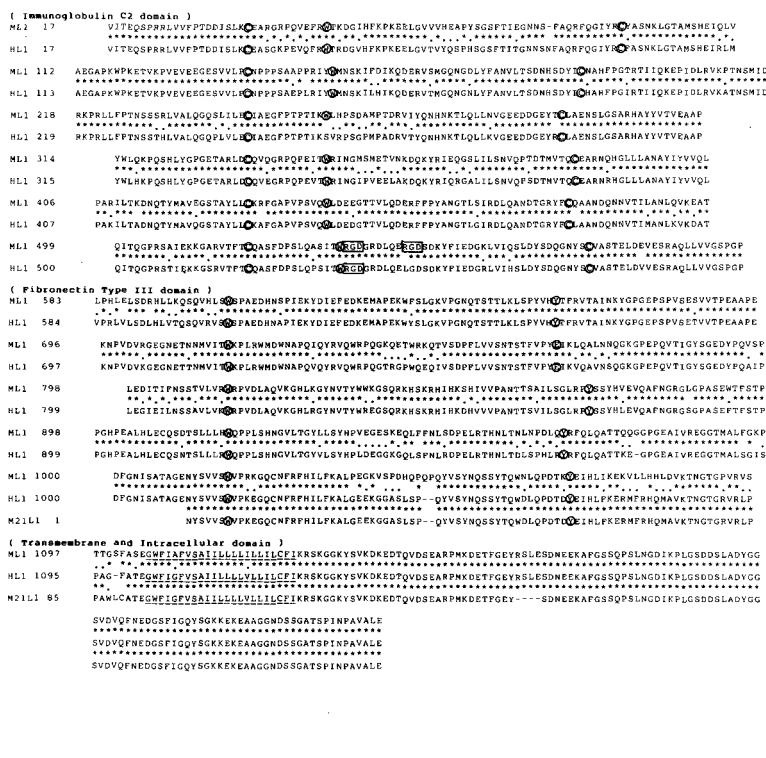


図３　Ｌ１アミノ酸配列の構造比較

マウス(ML1)
ヒト(HL1)
ヒトメラノーマ(M21L1)
各領域最初のアミノ酸残基を示した。

109 培養アストロサイトでのラミニンの発現および in vitro転写系を用いたメカニズムの解析

澤田誠
保健衛生大総医研応用細胞

〔要約〕
精製マウスアストロサイトにおけるラミニンを構成する３つのポリペプチド鎖(A,B1,B2)のmRNAの発現をreverse PCR法による半定量的測定でまたアストロサイトの粗核抽出液を用いてin vitro転写系でその発現のメカニズムを調べた。通常の培養条件下ではほぼconfluentに達したアストロサイトではB1,B2のmRNAはともに高発現であったが、A鎖のmRNAは検出できなかった。ところが細胞密度を下げてアストロサイトを増殖期に移行させるとA鎖のmRNAが発現するようになった。この効果は増殖を促進するTPAで増大し、反対に増殖を抑制して分化を誘導するdibutyryl cAMPで減少した。このときB1,B2のmRNAには大きな変化はみられなかったが、アストロサイトを無血清培地で培養したときには発現がほとんどなくなった。in vitro転写系において無血清条件下で培養したアストロサイトから抽出した粗核抽出液はB2鎖プロモーターのコア部分を持つレポーター遺伝子をテンプレートにしたときにはその転写活性には変化がなかったが、いくつかの上流部域を結合すると転写活性に有為な減少がみられた。以上の成績はラミニンの中枢神経系での神経再生や変性、または脳の発生や構築におけるラミニン遺伝子発現の調節メカニズムと深く結び付いていると考えられる。

〔目的〕
神経系において、神経細胞を取り巻く環境は神経の発生、分化、再生や保守にとって非常に重要な制御因子であり、それは神経とそのプロセスの間隙を埋めているグリア細胞により形造られている。細胞外環境因子としては成長因子などの液性因子、イオン環境、栄養性物質、接着基質としての細胞外マトリックス(ECM)など様々なものをあげることができる。このうちECMタンパクは最近特に注目されているが、これはそれら分子が細胞接着以外の種々の生物活性を持つほか、個体の発生や分化、加齢に伴って特徴的に変動し、神経の発生や構築に積極的な役割を果たしていると考えられているためである。ECMタンパクのうち、ラミニン、ファイブロネクチン、プロテオグリカンなどについて神経突起伸展活性や細胞増殖の調節など興味ある活性が報告されている。このうちラミニンは中枢神経系において発生の一時期に高発現を示すが、成熟動物脳ではほとんど見られなくなる。しかし人為的に神経に損傷を与えるとその部位に限局された発現がアストロサイト上で見られるようになるため、神経の変性や再生におけるアストロサイト上のラミニンの役割やその発現の調節については大変興味深い。そこで今回そのモデル系として培養アストロサイトを用いてまずラミニンの３つの鎖についてmRNA発現を調べ、次にラミニンB2鎖をモデルとしてその遺伝子の5'上流部域を用いたin vitro転写系を確立し、遺伝子発現調節のメカニズムについて検討した。

〔方法〕
培養アストロサイトは新生マウス脳より得られる混合グリア培養を培養開始３週間後から１週間毎にトリプシン処理を４回繰り返して精製(1)した高純度細胞を用いた。各種薬物や無血清培地によるアストロサイトの刺激は培地交換後薬物等を加えさらに３日間培養をした後にフェノール－グアニジン法(2)によりtotal RNAを調製した。また粗核抽出液は同様の刺激をしたアストロサイトを用いてMiskiminsらの報告(3)を一部改変した方法により調製した。F9細胞は4.5g/lのグルコースと10%FCSを含むDMEMで培養したものを用いた。F9の分化誘導は1mM dbcAMPと0.1μMレチノイン酸により行った。得られたRNAは20μgをノーザン法によるmRNAの検出に、また１μgをreverse PCR法によるmRNAの検出に用いた。PCR法ではmRNA量を比較するためにサンプル中には存在しないDNAとそのプライマーを加えて増幅する半定量的PCRを行った(4)。in vitro転写系に用いるテンプレートDNAはマウスラミニンB2遺伝子の5'上流部域のいくつかの断片を含むDNAを

大腸菌由来のCAT遺伝子に結合しレポーターとして用いた。このテンプレートを粗核抽出液と混合して試験管内でCAT mRNAを合成した後、プライマー伸長法により新生mRNAを定量して核抽出液中の転写活性および5'上流部域の調節部位について調べた。

[結果]

培養アストロサイトではB1およびB2 mRNAは通常のNorthern blot法により検出できるものの、A鎖mRNAは検出できなかった。このためさらに高感度なreverse PCR法を用いて実験を行った。その結果A鎖mRNAの発現は静止期アストロサイトでは検出できないが増殖期アストロサイトで発現することが判った。さらにA鎖mRNAの発現はTPAのようなアストロサイトの増殖を促進する薬物により増大し、反対にdbcAMPのようにアストロサイトの増殖を止め分化形質の発現を促進する薬物により減少した。このときB1,B2鎖のmRNAには大きな変化はみられなかった。一方B1,B2鎖のmRNAは無血清培養条件下でその発現が減少することがわかった。この状態の細胞から抽出した粗核抽出液を用いたin vitro 転写系では5'上流部域の1.5kbを含むB2遺伝子プロモーターを用いたときに有為な活性の減少がみられた。しかしプロモーターのコア塩基配列を含む0.8kbのプロモーターを用いた場合にはほとんど減少がみられなかった。ところが上流に存在する2kbのNdeIフラグメントを変化の見られなかった0.8kbのプロモーターに結合しレポーター遺伝子としてテンプレートに用いた場合には顕著な転写活性の減少がみられた。

[考察]

ラミニンは基底膜に存在する分子量約900KDの巨大な糖タンパクで、A、B1、B2の３つの鎖からなる。分子内にはいくつかの活性部位が同定されているが、このうち神経細胞の突起伸展に関与する部分として長腕末端のE8フラグメントが知られている。更に合成ペプチドを用いた実験からその活性中心としてA鎖のC末端に近い部分にあるIKVAVが同定された。今回の成績はこの神経突起伸展活性を持つA鎖mRNAがアストロサイトの増殖時に発現することを示したが、この細胞の増殖は脳損傷などの神経変性部位で見られるほか、脳の形成時期でのグリア細胞の増殖が神経細胞の移動の停止、神経突起伸展の開始と一致すること、さらに増殖アストロサイトがNGFを多く産生することなどからこの結果はきわめて興味深い。このA鎖の独立した発現に関しては、ラミニンの３つのポリペプチド鎖をコード刷る遺伝子がそれぞれ異なる遺伝子座に存在し独立したプロモーターによって転写調節を受けているという事実を支持する。このことは組織によっては必ずしも３本のポリペプチド鎖からなる複合体を形成するわけではなく、各遺伝子は組織で必要とされるものを転写することを意味する。したがって今回B2遺伝子上流部域に存在することを示したDNAの調節部分はその特異的発現の調節に関与している可能性がきわめて強く、その部分に結合するDNA結合タンパク質が脳での発現の特異性を規定しているように思われる。

個体の系統発生は各個体でほぼ完全に再現されるので、これは遺伝子によって規定されたプログラムによって起こるものと考えられている。特に脳においては非常に複雑な構造が正確に構築されるのでそれを制御するメカニズムもかなり複雑であることが予想される。ところで近年、ECMが単に細胞の接着を行う分子として働く以外に細胞の分化増殖や組織、個体の形成における第一義的な作用分子の１つとして考えられるようになってきており、ラミニンを含むECMの遺伝子の発現メカニズムを解明することが前述した脳での特異性を明らかにするばかりでなく、細胞内の遺伝子にプログラムされた発生過程の神秘の一端を解きあかすことになるかも知れない。

[文献]

1 Sawada M et al. (1990) Brain Res 509: 119-124.

2 Chimczynski P and Sacchi N (1987) Analyt Biochem 162: 156-159.

3 Miskimins WK et al. (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82: 6741-6744.

4 Sawada M and Yamada Y (1991) in preparation.

110 培養生後ラット中隔神経の生存に対する脱分極の効果とCaイオンの関与

浜田淳、腰本裕之、岩田邦男
（日本たばこ　安全性研究所）

〔要約〕

培養交感神経系において、Nerve Growth Factor(NGF)除去によっておこる神経細胞死が脱分極によって抑制されることが報告されている。我々はNGFが培養生後ﾗｯﾄ中隔神経系に対して生存維持作用を示すことに着目し、High Potassium(K^+)含有培地を用いて培養生後ﾗｯﾄ中隔神経の生存に対する作用を検討した。培養生後ﾗｯﾄ中隔神経の生存は培地中の添加K^+の濃度に依存して維持され、20mM以上のK^+添加で作用はほぼﾌﾟﾗﾄｰに達した。我々は培養生後ﾗｯﾄ中隔神経に対するHigh K^+含有培地の生存維持効果が、Ca^{++} agonistであるBayK-8644処理により添加K+の作用用量曲線が低濃度側にshiftすること、Ca^{++} channel blockerであるNifedipine及びVerapamilを共存させることにより減少すること、を見いだした。このことから、High K^+による生存維持作用は細胞内Ca^{++}ｲｵﾝ濃度上昇を介して発現することが示唆された。

（目的）

畠中等は生後1週以後のﾗｯﾄ中隔神経の培養系においてはNGFが生存維持に作用することを報告している(1)。このことは生後ﾗｯﾄ中隔神経の培養系がNGF除去によって神経細胞死を誘発する系であると考えられる。一方、小池等は培養交感神経系においてNGF除去によって起こる神経細胞死を、High K^+添加培地等、神経の脱分極を誘発させる処理によって抑制できることを報告している(2)。

我々は、NGF除去による神経細胞死が神経の脱分極処理によって抑制できるという現象が培養末梢交感神経に限られたものなのか、NGFが生存維持作用を示す中枢神経系においても認められるのか、を検討するために、培養生後ﾗｯﾄ中隔神経系を用いてHigh K^+添加培地の神経生存維持効果を検討した。また、小池等は神経脱分極処理による神経細胞死抑制効果が、脱分極後の細胞内Caｲｵﾝ濃度上昇を介して起こることを報告していることから、培養生後ﾗｯﾄ中隔神経系における神経細胞の脱分極による生存維持作用に対するCa channel agonistおよびantagonistの効果を併せて検討した。

（方法）

生後ﾗｯﾄ中隔神経の培養

畠中等の方法(1)に従って行った。すなわち、取り出したﾗｯﾄ中隔を酸素通気下のL15培地中に集め、50-75Unitsのﾊﾟﾊﾟｲﾝ(Elastin product製)で消化した後、ｱｽﾄﾛｸﾞﾘｱ細胞を単層培養した48穴ﾌﾟﾚｰﾄ上に、5%牛胎児血清/5%馬血清/1%ﾗｯﾄ血清/89%DF(DMEM:F12=1:1に15mM HEPES-Na及び30nM Seleniumを添加したもの)の培地を用いてまき、一晩培養後、無血清培地(DF/TIP：上記DF培地に5ug/ml Transferin、5ug/ml Insulin、20nM Progesteroneを加えた)に培地交換して培養した。用いたﾗｯﾄは出生日を1日とした時の生後9-10日目のものを用いた。細胞の生存は、ｳｪﾙ内のChAT活性、AchE染色陽性細胞数を測定することによって計測した。ChAT活性測定は畠中等の方法(3)、AchE染色法はHefti等の方法(4)にしたがって行った。

High K^+培地調製法

$NaHCO_3$-freeのDMEM及びF12粉末培地を用い、それぞれ加えるべき$NaHCO_3$と等ﾓﾙの$KHCO_3$を加えて希釈滅菌した。両者を1:1の割合で混合し、DF培地同様 HEPES-Na、Selenium、Transferin、Insulin、Progesteroneを加えて30mM K^+添加培地とした。30mM以下のHigh K^+培地は、30mM K^+添加培地を、通常のDF/TIP培地で希釈することにより、調製した。

（結果と考察）

生後10日目のﾗｯﾄ中隔細胞を、10,15,20mMの濃度のK^+添加培地中で6日間培養したところ、ｳｪﾙ内のChAT活性及びAchE染色陽性細胞数はK^+の濃度に依存して増加し、20mM K^+処理時にはNGF処理(50ng/ml)時とほぼ同程度のChAT活性、AchE陽性細胞数を示した(Fig1)。しかしｳｪﾙ内のChAT活性をAchE陽性細胞数で割ったAchE陽性細胞当りのChAT活性は無処理を含めたいずれの場合にも不変であることから、培養生後ﾗｯﾄ中隔神経に対するHigh K^+処理の効果は、NGFと同様生存維持作用であると考え

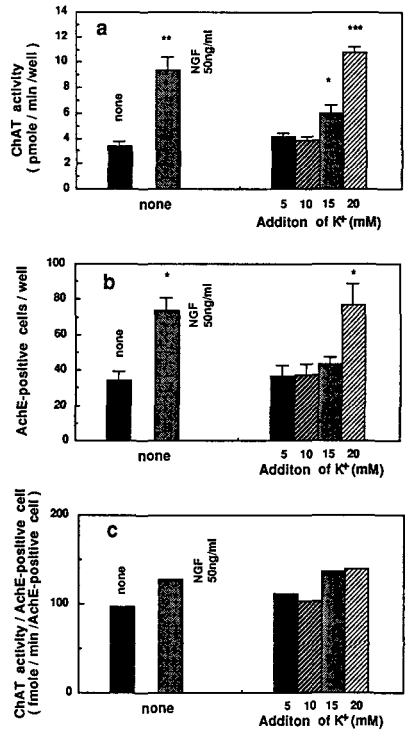


Fig1 Effect of High K^+ on neuronal survival in culture from P10 rat septum

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 VS control

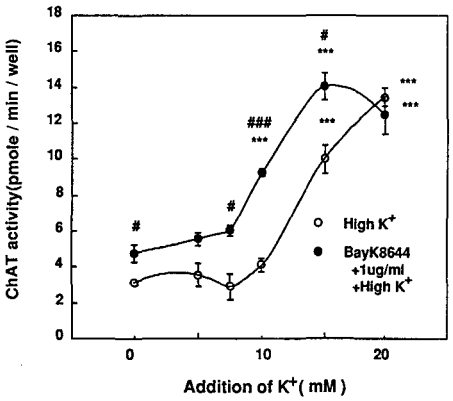


Fig2 Effect of BayK8644 on High K^+- induced neuronal survival in culture from P9 rat septum

**: P<0.01, ***: P<0.001
VS control (DF+TIP medium) with / without BayK8644 treatment

られた。20mM K^+処理時の培養中隔神経のAchE染色像はNGF処理時と肉眼的な差異は認められなかった。また、単独で生存維持作用を有する濃度のNGFをHigh K^+培地に共存させても相加及び相乗効果は見いだされなかった。

High K^+の生存維持作用における細胞内Ca^{++}ｲｵﾝの関与を検討するため、Ca channel agonistであるBayK-8644共存下での、High K^+の生存維持作用の用量曲線をChAT活性を示標に検討した。Fig2に示すように、K^+の作用用量曲線は1ug/mlのBayK-8644により有意に左側にshiftした。また1ug/ml BayK-8644単独でもChAT活性が有意に上昇をした。このことから細胞内へのCaｲｵﾝ流入が生存維持効果を高めることが示唆された。BayK-8644の生存維持増強効果はｳｪﾙ内ChAT活性だけでなく、AchE陽性細胞数の有意な上昇からも確認された。一方、神経生存維持作用を有する20mM K^+添加培地に、Ca^{++} channel antagonistであるNifedipine及びVerapamilをそれぞれ1ug/ml共存させて培養したところ、High K^+の神経生存維持活性(ｳｪﾙ内ChAT活性、AchE染色陽性細胞数)は、有意に抑制された。しかし、NGFによる神経生存維持作用に対してCa^{++} channel antagonistは抑制作用を示さなかった。

以上の結果より、NGFに依存した生存を示す培養生後ﾗｯﾄ中隔神経に対して、High K^+による脱分極刺激は細胞内Ca^{++}ｲｵﾝ濃度上昇を介して生存維持作用を発現することが示唆された。

（文献）
(1)Hatanaka H. et.al. Neurosci.Letters, 79,(1987), 85-90
(2)Koike T. et.al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 86,(1989), 6421-6425
(3)Hatanaka H. et.al. 組織培養研究, 6,(1988), 23-29
(4)Hefti F. et. al. Neurosci., 14, (1985), 55-68

111 ff-lesionラットにおけるHCNPの細胞脱落保護作用

岸野晶祥、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〕 海馬組織に存在する、HCNP(Hippocampal Cholinergic Neurostimurating Peptide)について、in vivo での作用を検討するため、中隔野－海馬投射線維切断ラット(ff-lesion ラット)を作成し、HCNPが、中隔野コリナージックニューロンの変性脱落を防止するかどうかを検討した。lesion後、３週間、カニューレによりHCNPを頻回投与し、中隔野切片をアセチルコリンエステラーゼ(AChE)活性染色、あるいは、２週間、オスモティックポンプにより持続投与し、中隔野をコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)免疫染色した結果、いずれの方法でも中隔野コリナージックニューロンの脱落は、減少していた。また、細胞体の萎縮についても、これを防止する作用があることがわかった。

［緒言］ 我々は、海馬組織内に、中隔野培養組織コリナージックニューロンの ACh 産生を促進する因子が存在することを見いだし、精製の結果、それは11個のアミノ酸よりなるペプチド（HCNPと命名）であったこと、また、その合成HCNPもラット胎児の培養中隔野組織に対して高いAChe産生促進活性を持つことを報告した[1]。

中枢神経系の主要なコリン系のひとつである内側中隔野－海馬系の連絡路(ff,fimbria-fornix)を切断すると、起始核である内側中隔野および対角帯垂直部において、神経細胞体の萎縮、脱落が起こる。これは、海馬から逆行性軸索輸送される栄養因子が、絶えたためと考えられている。NGF を脳室内投与することにより、このような萎縮、脱落を防止できることが、F.H.Gage[2], F.Hefti[3], S.Varon[4] らによって報告されている。

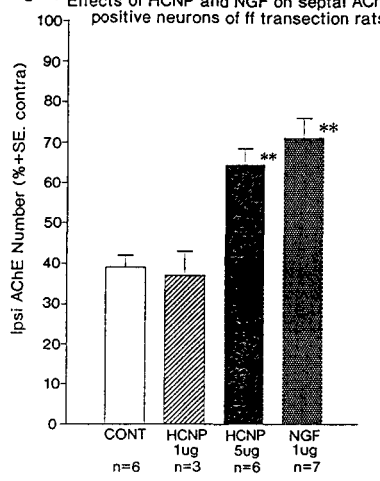
今回、HCNPについてこのような作用を持つかどうかを検討した。

［方法］ 体重、約200gの雄性Wistar系ラットを用いて以下の２通りの方法で実験を行った。

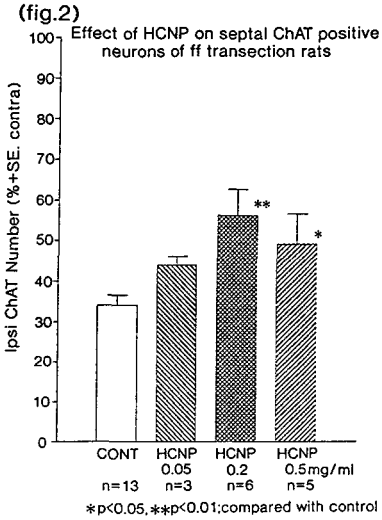
a.カニューレ+AChE活性染色： 抱水クロラールにて麻酔したラットの片側の頭蓋骨に穴を設け、カミソリの刃を加工した幅４mmのナイフをマニピュレーターにて刺入し、ffを切断した。次にステンレスパイプを 脳室に挿入し、歯科用セメントで固定した。手術後、生理食塩水に溶かした合成HCNP、１ug,５ug、マウスNGF１ug、あるいは、生理食塩水のみを、マイクロシリンジにて投与した。以後、同量を１週間に２回×３週間、投与した。投与終了後DFP(ジイソプロピルフルオロホスフェート)1.2 mg/kgを筋注し5-6時間後、４％ホルムアルデヒドにて灌流固定し、脳を摘出、30％シュクロース浸漬の後、ビブラトームにて30umの脳切片を作製した。中隔野、対角帯部分の切片を一枚おきにAChE活性染色を行った。方法は,Butcherら[5]の方法に従った。プレパラート作製後、内側中隔野および対角帯垂直部のAChE陽性細胞をカウントし、非lesion側の細胞数に対する生存率を算出した。

b.オスモティックポンプ+ChAT免疫染色： a.と同様にして骨窓を設けた後、幅 0.7mmのマイクロナイフでstereotaxicに片側ffを切断した。切断後、PBSに 0.2mg/ml BSAと共に 0.05mg/ml,0.2mg/ml,0.5mg/mlの合成HCNPを溶かしたもの、あるいは、BSAのみを満たした、ミニオスモティックポンプ(Alzet.2002, flow rate 0.5ul/h)に接続したL型カニューレ（ニューロサイエンス）を脳室に刺入、歯科用セメントで固定し、ポンプを頸部皮下に埋め込んだ。２週間の生存後、クリオス

(fig.1)



(fig.2)



タットにて、30umの脳切片を作製した。抗ChAT抗血清(CHEMICON)、ABCキット(Vectastain)を用い、常法にてChATの免疫染色を行った。プレパラート作製後、lesion 側の生存率を求めた。また、control, 0.2mg/ml ＨＣＮＰ について、TOYOBO V1 Image Analyzer で細胞体の大きさを計測した。

［結果］

a.カニューレ+AChE活性染色： ff-lesion 後３週間で、中隔野、対角帯垂直部のAChE陽性細胞は、平均38％に減少していた。NGF投与では、生存率は、72％となり、有意に脱落から保護されていた。ＨＣＮＰ投与群では、５ugで、64％となり有意に保護されていた。１ugでは脱落保護作用は、見られなかった。(fig.1)

b.オスモティックポンプ+ChAT免疫染色： ff-lesion 後２週間で、ChAT陽性細胞数は、平均34％に減少していた。ＨＣＮＰを 0.2 mg/mlあるいは、0.5mg/ml、投与すると、生存率は、56％、49％となり有意に脱落から保護されていた。(photo 1) 0.05ug/ulでは、脱落保護の傾向は見られたものの有意な差は得られなかった。(fig.2) また、細胞体のサイズについてはcontrol群は,非lesion側と比較して、萎縮が見られたが、ＨＣＮＰ 0.2 mg/ml 投与により生存していた細胞は、非lesion側とほぼ同様な、サイズ分布の傾向を保っていた。(fig.3)

［考察］ 今回の実験は、コリナージックニューロンのマーカーとしてAChE活性、およびChATの免疫性を用いた染色を行ったが、いずれの陽性細胞も脱落から保護されていた、よってＨＣＮＰは、ff lesion による、中隔野、対角帯垂直部－海馬系コリナージックニューロンの retrograde な変性を防止する作用があることが示された。細胞サイズについては、NGFが細胞脱落に先んずる細胞体の萎縮を防止、回復させる作用を持つことが、S.Varonら[4]によって報告されているが、ＨＣＮＰにより萎縮が防止されることは、ＨＣＮＰは、その作用機序は不明であるが、単に細胞の消滅を防ぐだけでなく、栄養因子的にニューロンの生存を維持する可能性を示唆する。現在、NGF,FGF,インターロイキンが ff lesion モデルで細胞脱落保護作用を持つことが、知られているが、それらは、ニューロンネットワークの形成、維持や損傷からの回復等に関与していると考えられている。ＨＣＮＰが同様の作用を持つことは、これらに比べ、格段に低分子でありながら、中枢コリナージックニューロンネットワークの生存維持に関与している可能性を示しており、たいへん興味深い。

［参考］

1)小鹿幸生、小島深一、植木靖之、山本正彦 1990、神経化学、29、180-181

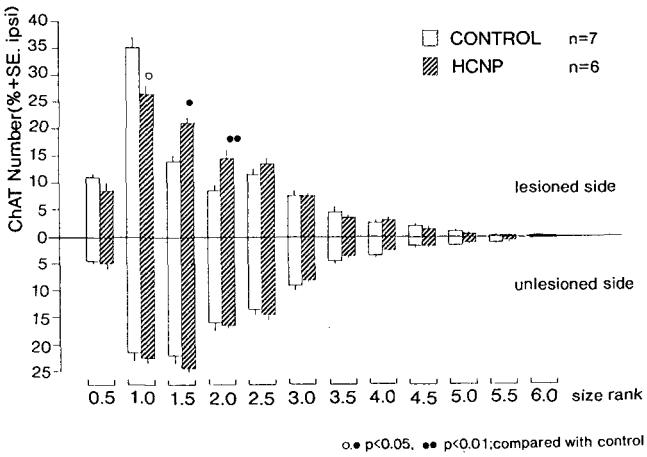
2)Williams,L.R.,Varon,S.,Perterson,G.M.,Wictorin,K.,Fisher,W. Bjorklund,A.and Gage,F.H.1986,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,83, 9231-9235

3)Montero,N.and Hefti,F. 1988,J.Neurosci.,8(8),2986-2999

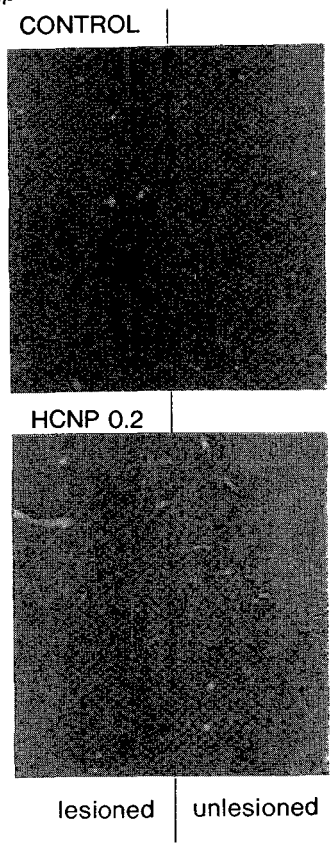
4)Hagg,T.,Fass-Holmes,B.,Vahlsing,H.L.,Manthoroe,M.,Conner,J.M. and Varon,S.,1989,Brain Res.,505,29-38

5)Butcher,L.L.and Hodge,G.K.1976,Brain Res.,106,223-240

(fig.3) Effects of ff transection and HCNP treatment on somal size of septal cholinergic neurons



(photo 1)



112 興奮性アミノ酸神経毒性に拮抗する筋由来因子

山本智浩、田口隆久
（大阪大学基礎工学部生物工学科）

〔要約〕 ニワトリ胚終脳神経細胞の初代培養系においてもグルタミン酸神経毒性が観察され、更にその効果がニワトリ脚筋由来の因子により抑制されることを見いだした。この系における既知の物質によるグルタミン酸毒性の阻害効果を調べたところ、シスチン、２－メルカプトエタノール、還元型グルタチオンに同様の効果が認められた。したがって、グルタミン酸輸送系を介した毒性にこの因子が関与している可能性がある。しかし、アスパラギン酸で観察された比較的弱い毒性もこの因子が抑制したので、グルタミン酸受容体を介した系へのこの因子の関与の可能性も残っている。この因子の性質を検討した結果、分子量が数千の、中性付近で負に荷電した分子であることが明らかになった。紫外吸収からペプチドである可能性が高いが、いくつかの蛋白質分解酵素処理では、活性は減少しなかった。分子量や培養神経細胞への作用機構の違いから、この因子は、ニワトリ脚筋抽出液中の神経繊維伸長因子とは別の分子である。

脳神経細胞の生存維持機構は、他の組織の細胞に比較して驚異的に長い生存期間のために、その機構解明という生物学的関心と脳神経疾患の治療への応用という医学的関心から注目を集めている。脊髄の運動ニューロンの細胞死が肢芽の存在に依存することから標的由来の因子の存在が示唆されている。実際、ＮＧＦ，ＢＤＮＦ，ＣＮＴＦ等が、部位特異的にニューロンに対して生存維持活性を持っていることも示されている。我々は、以前、筋抽出液の中にニワトリ胚の終脳ニューロンの神経繊維伸長と生存に影響を及ぼす因子の存在することを報告した（１）。前者の分子的特徴については、前回報告した（２）が、後者については解析が遅れていた。今回は、この因子について解析を進め、それが、神経繊維伸長因子とは別の分子であり、興奮性アミノ酸神経毒性に拮抗する作用を持つことが明らかになったので報告する。

【方法】 ニワトリ胚（Ｅ５）より終脳を実体顕微鏡下で切りだし、酵素処理で細胞を解離し、２５，０００／cm² の密度で培養した。培養液は、ＭＥＭを基本培地として、グルコース、グルタミン、抗生物質、微量添加物を加えたものを用いた。薬物、因子等は、培養開始３－４時間後に加えた。生存細胞数は、最小限の時間でビデオ記録した５視野に含まれる細胞を計測することにより求めた。

【結果】 筋抽出液中に含まれるある種の因子がグルタミン酸神経毒性に拮抗する作用を持つことを示す結果が得られた。。ニワトリ胚終脳神経細胞の初代培養系の中に、培養開始後３時間後にグルタミン酸と筋抽出液を加えた。グルタミン酸のみを加えると対照群に比べて顕著な細胞死が観察される。それに対して筋抽出液も培地に加えた場合にはグルタミン酸の効果が弱められたと考えられる結果が得られた（図示せず）。筋抽出液を用いたのではさらに高濃度での実験が不可能なため、まず、この因子の部分精製を行った。筋抽出液をセファデックスＧ－２５のカラムで分画すると低分子側に活性が認められた。以下の実験では、すべてこの分画を用いた。図１に示したように５mMグルタミン酸の細胞毒性は、この活性分画を添加することによって完全に抑制された。ここで用いているニワトリ胚終脳ニューロンの培養系に対するグルタミン酸の

効果は図２で示してある。これは培養３日後の生存率を表しているが、０．５mMですでに毒性が認められる。図３には用いた活性分画の効果の容量依存性が示してある。丸で示した線がグルタミン酸毒性に拮抗していることを示しており、また四角で示した線は活性分画のみを培養系に加えた結果を示している。後者は、この分画が終脳細胞の生存自体にも効果のあることを意味する。この系における既知の物質によるグルタミン酸毒性の阻害効果を検討したところ、シスチン（１mM）、２－メルカプトエタノール（２－５μM）、還元型グルタチオンなどに効果が認められた。これらの結果は、グルタミン酸輸送系を介した効果を示唆している。そのうえ、NMDAの添加（６mMまで）ではグルタミン酸様の毒性は見られなかったのであるが、カイニン酸の効果が培養上の問題から十分に検討できないこととアスパラギン酸で観察された比較的弱い毒性をこの活性分画が抑制することから、グルタミン酸受容体を介した系の関与の可能性も残っている。ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンもこの培養系で強い（数１０μM）神経毒性を示すが、これに対しては、この活性分画は何の効果も示さなかった。次に、この活性分画に含まれている因子の実体を検討した。ゲル濾過と透析によるとこの活性を担っている物質の分子量は数千である。また、イオン交換クロマトグラフィーの結果からは、中性付近で負に荷電している分子であることが解った。活性の強い分画と紫外吸収の相関からこの分子がペプチドである可能性が高いが、数種類の蛋白質分解酵素処理では活性は減少しなかった。現在、この因子の同定が進められている。

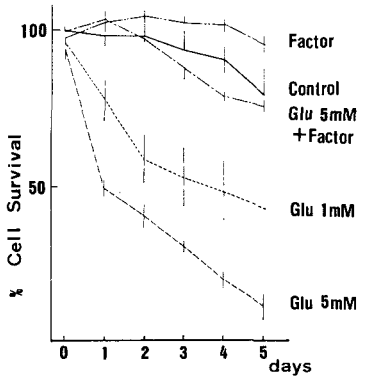


図１　活性分画による
グルタミン酸毒性の抑制

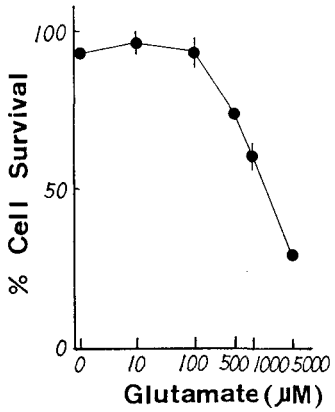


図２　終脳細胞生存に対する
グルタミン酸の効果

【考察】 この研究で用いているグルタミン酸濃度が生理的条件に較べて高いという批判もあるが、脳虚血による細胞外カリウムイオン濃度の上昇にともなうグルタミン酸の再取り込み機構の逆転による細胞外グルタミン酸濃度の上昇（３）のように、脳内の局所的濃度が高くなる可能性と、生理的には低濃度で遅延的に細胞死が進行している可能性もあるため、ここで見いだされた因子は生理的活性を担っているかもしれない。ここで得られた結果から、終脳神経細胞の生存維持に関与する因子は、神経繊維伸長活性を担うものとはまったく別の分子であることが明らかになった。

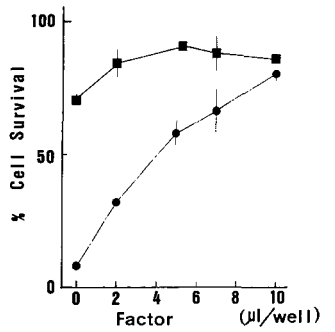


図３　活性分画の終脳細胞生存維持効果

【文献】 (1) Taguchi,T.,et al.(1987) Dev. Brain Res. 37:125-132
(2) 田口、亀井 (1990) 神経化学 29:268-269
(3) Nicholls,D.,and Attwell,D. (1990) TiPS 11:462-469

113 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 －ＣＮＱＸは後投与によっても神経傷害を改善し得る－

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〕

前回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は、グルタミン酸に対する感受性が増加し、通常では神経傷害を惹起しない濃度のグルタミン酸によって細胞傷害を受けることを報告した。さらに今回の研究によりNMDAあるいはAMPA単独ではそれぞれ神経細胞傷害を生じ得ない濃度でも、その両者が同時に存在すると神経細胞傷害が惹起されることが示された。またAMPAレセプター拮抗剤のCNQX(5μM)は低酸素負荷後に認められる100μMグルタミン酸による神経細胞傷害をも完全に抑制し得た。さらには、Glu投与3時間後にCNQXを添加しても、神経細胞傷害は有意に改善されることが示された。

【目的】近年、脳虚血やてんかん病変における神経細胞傷害機構へのグルタミン酸(Glu)の関与が示唆されている。これまで、海馬神経細胞の低密度培養系において、低酸素負荷を受けた後の神経細胞はGluに対する感受性が増加し、通常では神経傷害を惹起しない濃度のGluによって容易に細胞傷害を受けることを報告してきた(1)。今回はその細胞傷害機序をさらに検討する目的でGluレセプターの各サブタイプに対する選択的アゴニストのうち、NMDA(N-methyl-D-aspartate)、及びAMPA(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate)の作用を検討した。さらに、AMPAレセプター拮抗剤のCNQX(6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dion)が非常に有効であった(2)ことから、今回はCNQXをGlu投与後に時間をおいて投与しその効果が認められるかどうかを検討した。

【方法】既報の方法により(1, 2)、妊娠18日齢ラットより海馬を取り出し、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生細胞100個/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：各ウェルあたり1ml)と交換した。培養3日目に2時間の低酸素負荷を加えた。低酸素負荷終了後にプレートを取り出し、GluあるいはNMDA、AMPAを加え培養器(5%CO_2/air, 37℃)に戻し、さらに24時間培養した後生存神経細胞数を計測した。CNQXはGluの添加直後、または時間間隔をおいて培養液に加えることにより実験を行った。生存細胞の判定は形態学的基準にしたがって行った。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。各ウェルあたり10視野(X100)の生存ニューロンを計数し平均をそのウェルの代表値とした。それぞれの実験条件において6ウェルの平均値を求め同時に行ったシスターカルチャーでの生存細胞数との比より生存率を算出し統計的処理を行った(Student t-test)。

【結果】低酸素負荷を行わない場合には培養海馬ニューロンに対するGluの細胞毒性は、1mMの濃度ではじめて認められた(50.3±11%, $p<0.01$)。他方、低酸素負荷直後にGluを加えると生存率は10μM以上のGlu濃度で有意の減少をみた(10μM: 80.9±10%, 100μM: 64.1±4.1%, $p<0.01$)。NMDAによる神経毒性は低酸素負荷の有無にかかわらず1mMの濃度で認められた(57.1±4.2%, $p<0.01$)。低酸素負荷後の神経細胞に対して、10あるいは100μMのNMDA、10μMのAMPAはそれぞれ単独では神経細胞を惹起しなかった。しかしながら、この両者が同時に投与されると有意の神経細胞傷害を惹起した(Fig. 1)。前回報告したごとく、CNQXは低酸素負荷後の100μM Gluの神経毒性をも完全に抑制し得たが(hypoxia 2h + Glu100μM + CNQX 5μM; 94.2±6.1%, 対照との有意差を認めず)、3時間後までの後投与においても、神経細胞傷害を有意に改善し得た。しかしながら5時間後の投与では、CNQXは無効であった(Fig. 2)。

【考察】グルタミン酸はmixed agonistであり、NMDA、non-NMDAレセプターに対して作用する。これまで、Caチャンネルと結合したNMDAレセプターが細胞傷害と密接な関係を有すると考えられ精力的な研究が進められてきた。選択的アゴニスト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NMDA、AMPA両者の活性化が必要と考えられた。さらには、AMPAレセプターの拮抗剤であるCNQXはグルタミン酸投与から3時間後の投与によっても有効であることが示された。後投与による有効性は、治療を考える際に有益な特質である。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や前脳虚血モデルにおける遅発性海馬神経細胞死の機序の解明の一助になると考えられる。Sheardownらは、gerbilの両側頸動脈一時閉塞モデルにおいて、血液脳関門透過性のnon-NMDAレセプター拮抗剤NBQXが、海馬CA1神経細胞の遅発性神経細胞死を防止し得る事を報告している(3)。AMPAレセプター拮抗剤の今後の応用が期待される。

Fig. 1

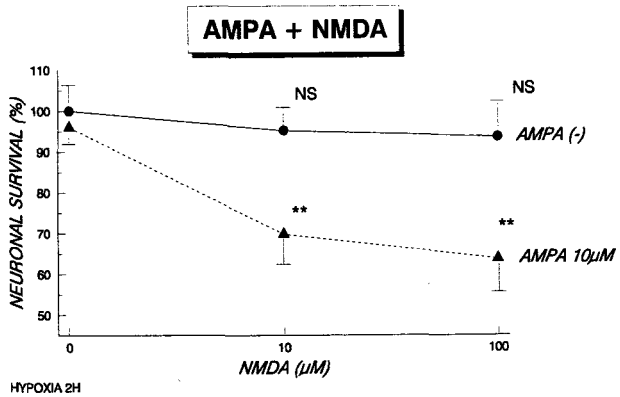
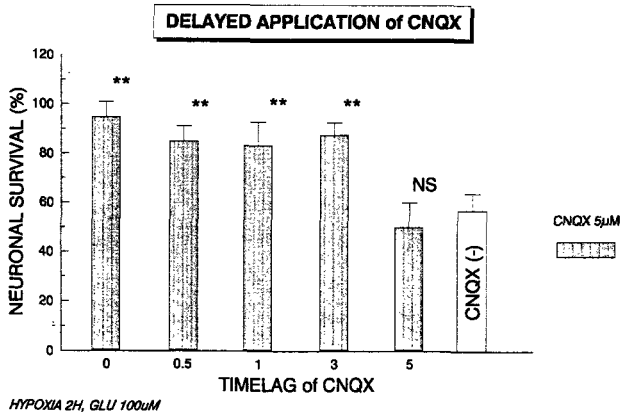


Fig. 2



【文献】

1) Kohmura, E., Yamada, K., Hayakawa, T., Kinoshita, A., Matsumoto, K., Mogam, i H. (1990) J. Cereb. Blood Flow Metabol. 10, 877-884.

2) Kohmura, E., yamada, K., Hayakawa T., Kinoshita, A. (1991) Neurosci. Lett. 121, 159-162.

3) Sheardown, M.J., Nielsen, E.O., Hansen, A.J., Jacobsen, P., Honore, T. (1990) 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. Science 247, 571-574.

114 ヒト大脳皮質における［３Ｈ］ＡＭＰＡ結合に関する研究

車地暁生、融　道男
東京医科歯科大学神経精神医学教室

〔要約〕
ヒト大脳皮質の膜標品を用いて，[3H]α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 結合に対する興奮性アミノ酸関連物質の抑制実験を100 mM KSCN 存在下でおこない、IC50 (μM)を算出した。興奮性アミノ酸レセプターの prototypic agonist では、quisqualate(0.0063μM)<AMPA(0.0083μM)<<kainate(5.8μM)<<NMDA(>2000μM)の順に抑制効果を示し、内在性物質では、S-sulpho-L-cysteine (0.32μM), L-glutamate(0.82μM) の抑制効果が強く、L-homocysteine sulphinic acid(3.2μM), L-homocysteic acid(4.3μM) は中等度、L-cysteic acid(38.7μM), L-cysteine sulphinic acid(45.5μM)では弱い抑制効果が認められたが、L-aspartate, N-acetylaspartylglutamate, 及び quinolinate は 1 mM においてもわずかしか抑制しなかった。Non-NMDAの antagonistである DNQX(0.67μM), CNQX(0.86μM) は比較的強力な抑制効果を示したが、ジョロウグモ毒素の類似化合物である 1-naphthylacetyl spermine は 1 mM においても全く抑制しなかった。外在性神経毒であるβ-oxalylamino-L-alanine(BOAA)(0.11μM)は強力に[3H] AMPA結合を抑制したが、β-N-methylamino-L-alanine(BMAA)(180μM)は弱い効果しかみられなかった。以上のことから、ヒト大脳皮質における[3H]AMPA 結合は quisqualate に対する高い親和性を示し、内在性物質としては L-glutamateが重要であり、内在性神経毒と考えられている S-sulpho-L-cysteine と外在性神経毒のひとつである L-BOAA はAMPA 結合部位に作用することが示唆された。

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は、現在 AMPA 感受性のイオンチャンネルにカップルしたレセプターと AMPA 非感受性のフォスファチジル・イノシトル燐酸代謝とカップルしたレセプターの２種類に分類される(Collingridge & Lester, 1989)。 AMPA 感受性キスカル酸レセプターは、脳内で NMDA レセプターとほとんど一致した分布パターンを示し、NMDA レセプターと共同的な機能を果たしている可能性がある。 本研究では、興奮性アミノ酸関連物質のヒト大脳皮質膜標品の[3H]AMPA 結合に対する抑制効果を調べ、 AMPA 感受性キスカル酸レセプターに対する親和性を検討した。

実験方法 精神神経疾患に罹患していない死亡時年齢53-74歳の７例の死後脳を用いて実験を行った。死後凍結時間は 1.8-9.9 時間で、大脳皮質の分割方法は既に報告した通りである(Toru et al.,1988)。４倍容の 0.32 M の sucrose 中で -80 ℃で凍結保存されていた大脳皮質（体性感覚領野、または運動領野）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 (18,000 rpm, 30 min) をおこなった。同様の洗浄遠心分離操作を２回おこなった後、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回おこない、以下の結合実験に使用した。この脳膜標品は,100 mM KSCN を含有した 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4, 4 ℃) 中で 10 nM [3H] AMPA (NEN,29.2Ci / mmol)および興奮性アミノ酸関連物質と 4 ℃ で 60 分間反応させた。結合反応は、Whatm-an GF/B グラスフィルターを用いた吸引濾過法によって停止させた（車地ら、1990 ）。

結果および考察

各種興奮性アミノ酸関連物質のヒト大脳皮質における[3H] AMPA 結合に対する抑制実験から IC50 を算出し、その値を表1に示した。

表1　ヒト大脳皮質[3H] AMPA 結合に対する興奮性アミノ酸関連物質の抑制効果

PHARMACOLOGICAL COMPOUNDS	IC 50 (Mean ± SEM μM)(n)
Prototypic agonists	
Quisqualate	0.0063 ± 0.0014 (4)
(RS)AMPA	0.0083 ± 0.0027 (3)
Kainate	5.8 ± 0.69 (4)
NMDA	> 2,000 (4)
Endogenous agonists	
L-glutamate	0.82 ± 0.055 (4)
L-aspartate	> 10,000 (3)
N-acetylaspartylglutamate	2000 ± 200 (4)
Quinolinate	> 2,000 (4)
Sulfur-containing amino acids	
L-cysteic acid	39 ± 5.2 (4)
L-cysteine sulphinic acid	45 ± 3.5 (4)
L-homocysteic acid	4.3 ± 0.36 (4)
L-homocysteine sulphinic acid	3.2 ± 0.34 (4)
S-sulpho-L-cysteine	0.32 ± 0.068 (4)
Non-NMDA antagonists	
CNQX	0.86 ± 0.083 (4)
DNQX	0.67 ± 0.080 (4)
1-naphtylacetyl spermine	No effect up to 1 mM
Exogenous agonists	
L-BOAA	0.11 ± 0.0044 (4)
L-BMAA	180 ± 28 (4)

＊ L-BOAA と L-BMAA の抑制実験は運動領野を、その他の薬物は体性感覚領野を用いた。

Prototypic agonist では quisqualate が強力な抑制効果を示し、kainate でも抑制効果がみられたが、NMDA は非常に弱い効果しか示さず、[3H] AMPA はヒト大脳皮質においてもラット脳と同様に、quisqualate に対して特異性の高いリガンドであることが示唆された。Endogenous agonist のなかでは L-glutamate が最も強力な抑制効果を示し、AMPA 感受性のキスカル酸レセプターに対する神経伝達物質として重要な作用をしていると考えられる。Sulfur-containing amino acid のひとつで内在性の神経毒と考えられている S-sulpho-L-cysteine と外在性神経毒である L-BOAA は [3H] AMPA 結合を強力に抑制し、これらの神経毒作用は AMPA レセプターを介して発現している可能性が考えられる。Non-NMDA のアンタゴニストとして合成された CNQX と DNQX は比較的強力な抑制効果を示し、ヒト大脳皮質の AMPA 感受性キスカル酸レセプターに対しても親和性の高いアンタゴニストであることが示唆されたが、ジョロウグモ毒素の類似化合物である 1-naphtylacetyl spermine (Asami et al, 1989)は 1 mM においても全く抑制効果がみられず、AMPA 感受性キスカル酸レセプターには直接作用しないことが示唆された。

謝辞　実験に協力していただいた豊田博子さんに感謝いたします。

文献　車地暁生 ら、神経化学 (1990) 29:420-421. / G.L.Collingridge and R.A.Lester, Pharm. Review (1989)40:143-210. / T.Asami et al., Biomedical Research (1989) 10:185-189. / M.Toru et al., Acta. Psychiatr. Scand.,(78)1988:121-137.

115 視細胞の細胞極性とレクチン結合能

中山　孝・古家　園子
（生理学研究所）

〔要約〕

孵卵７～８日目の鶏胚網膜を分散培養し視細胞の発生過程を観察した。培養を開始した直後から鶏の錐体視細胞の特徴である油滴が認められ、培養がすすむにつれて単一の細胞極性を示す細長い細胞に形態が発達してくる。蛍光標識したマッシュルーム・レクチンで視細胞を染色したところ、内節と外節に対応する未分化な構造に強い結合が認められ核周辺部や突起部分は染色されなかった。細胞極性の確立による、このような培養視細胞内でのレクチン結合能の違いは、生体の網膜組織中で見られる視細胞のレクチン結合パターンと部位および発生時期が一致していた。これらのことは分散し初代培養した視細胞でも単独で孵卵１５～１６日目の段階までは、細胞極性を確立し分化する能力があることを示している。

〔緒言〕

神経細胞が最終分裂を終えて移動し、そしてその細胞極性が正しく確立されることによって神経回路網の形成過程が開始される。最近、神経節細胞の極性に誤りが生じることによって逆方向に視神経の投射が起こることを正常発生中の鶏胚網膜で明らかにした[3]。今回、神経細胞の極性がどのように確立していくかをあきらかにするため、鶏胚網膜からの視細胞を初代培養し、その細胞極性の形成過程を調べた。　視細胞は特徴的な細長い細胞極性を示し、また油滴（Oil Droplet)を細胞内に持つことにより発生の初期から錐体視細胞としての同定が容易である。培養した視細胞の形態変化と極性を糖鎖のGal-GalNAcに特異的なマッシュルーム・レクチン（Agaricus Bisporus Agglutinin, ＡＢＡ）との結合で調べた。

〔方法〕

１．初代培養[4]　孵卵７～８日目の網膜を小さく切り刻み、０．１％トリプシン中で酵素処理をする。トリプシン・インヒビターで反応停止後、ピペッテイングで分散し３２μｍのナイロン・メッシュで濾過する。得られた細胞浮遊液を２～５×１０^5 cells/mlの密度でポリ・リジン処理した培養皿に播いた。培養液にはＤＭＥＭ・Ｆ１２（１：１）にＮ$_2$ｓｕｐｐｌ．および１％牛胎児血清と１％鶏血清を添加した培地を用いた。

２．レクチンによる組織化学　培養した視細胞を固定後、ローダミン標識のＡＢＡ（豊年製油）と反応させその結合部位を蛍光染色した。またいろいろな発生時期の鶏胚網膜をとり出しグルタルアルデヒドで固定する、光顕用にはアラルダイトをまた電顕用にはＬＲホワイトをもちいて包埋し切片を作製した。脱エポン後ビオチン標識したＡＢＡと切片を反応させ、光顕ではストレプトアビジンーＨＲＰを、また電顕のpost·embed法ではストレプトアビジンー金コロイド粒子を用いて結合部位を染色し観察した。

〔結果〕

孵卵７～８日目の鶏胚網膜をトリプシンにより分散し培養すると、細長い形態を示す視細胞が観察されるようになる（図１－Ａ）。多方向へ突起を伸展させる他の神経細胞と異なり、視細胞は単一の極性を示し容易に区別できる。また多くの視細胞が円錐細胞のマーカーである油滴を細胞内に持っていた。このような培養で蛍光標識したマッシュルーム・レクチンと視細胞との結合を調べた。図１－Ｂに示したようにＡＢＡは視細胞の内節とその先端に拡がる膜構造にのみ結合がみられ、視細胞の核周辺部および突起部分には全く結合が見られなかった。また他の神経細胞に対しても特異的な結合は見いだせなかった。ＡＢＡ結合の局在化がいつ行なわれるか、培養下での時間経過を観察したところ孵卵１２日目相当（７日目の鶏胚からだと培養５日目）に、全ての視細胞で内節および先端膜構造のみが染まるようになった。発生１２日目は生体内では視細胞の内節が形成される時期であり、初代培養に移した視細胞でも同じスケジュール

で発生・分化が進んでいた。どのような膜糖蛋白質とＡＢＡが結合するか、培養視細胞の膜蛋白質をＳＤＳ－ＰＡＧＥ後ブロッティングし染色して調べた。図２に示すように５８ｋと５１ｋに強いバンドがみられ、３０ｋから３００ｋまで多種類の膜糖蛋白質がＡＢＡと結合した。

次に生体にある視細胞でのＡＢＡ結合の分布を明かにするため、いろいろな発生時期の鶏胚また孵化直後のヒヨコの網膜をもちいて光顕・電顕レベルで結合を調べた。その結果、各発生時期において全ての視細胞の内節および外節がＡＢＡによって染まり、また外境界膜から外側のミュラー細胞の突起も染まっていた。

［考察］

初代培養して細長い形態を示すようになった視細胞において、ＡＢＡで染まる細胞部位と染まらない部位があり分子レベルで細胞極性が発現することが明らかとなった。これはピーナッツ・レクチン（ＰＮＡ）[1] やオプシンに対する抗体[2] を用いた報告と一致する。しかしＰＮＡが円錐細胞にのみ結合するのに対し、ＡＢＡは全ての視細胞に結合し細胞極性が一般的に存在することを明らかにした。またＡＢＡをもちいることにより、培養した視細胞の内節構造がｉｎ　ｖｉｖｏにある時と同じ発生スケジュールで出現し、またＡＢＡ結合糖蛋白質を局在化させる機構があることが分かった。このことは視細胞は単独で発生１５～１６日目まで分化し、内節および未分化な外節を形成できることを示している。しかしながら培養した視細胞は、ディスク構造等の完成した形態形成にまでは至っておらず、これは他細胞との相互作用を含めた何らかの因子が欠如しているためと考えられる。今後ＡＢＡをマーカーとしてさらに視細胞における分化機構解明を進めていきたいと考えている。

［文献］

(1) Adler, R. (1986) Dev. Biol. 117, 520-527. (2) Adler, R. et al. (1984) J. Cell Biol. 99, 1173-1178.
(3) Nakayama, T. (1990) Dev. Brain Res. 56, 117-122.
(4) Nakayama, T. and Furuya, S. (1991) Dev. Brain Res. (in press).

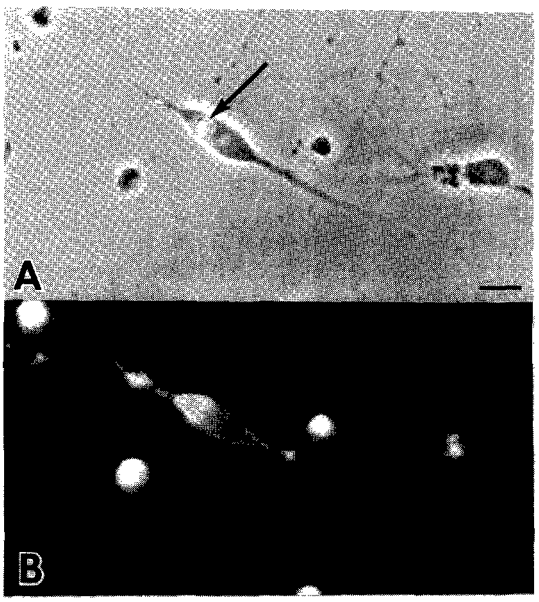


図１　（Ａ）培養７日目の位相差像。細胞内に油滴（矢印）を持った単一極性の細長い視細胞が観察される。
（Ｂ）同じ細胞をローダミン標識ＡＢＡで染めた蛍光像。内節およびその先端膜構造のみが染まる。
スケール　１０　μｍ。

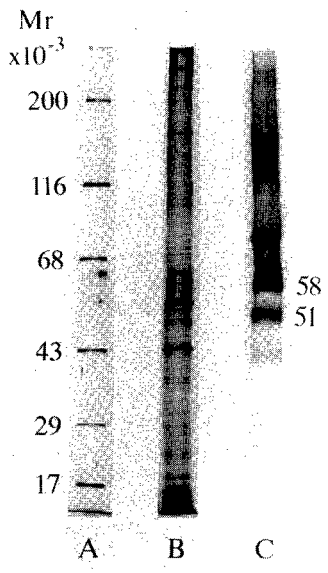


図２　培養視細胞膜蛋白質のＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびブロッティング・パターン。
Ａ．分子量マーカー。
Ｂ．膜蛋白質の銀染色像。
Ｃ．ＡＢＡで染まる膜糖蛋白質。

116 座骨神経における神経成長因子（ＮＧＦ）と脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）の異なる発現調節

松岡一郎，M. Meyer、M. Hofer、H. Thoenen
（北大、薬学部、Max-Planck精神医学研究所）

〔要約〕
従来、末梢における存在が明かでなかった脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）のｍＲＮＡが、器官培養下のラット座骨神経および同神経由来のシュワン細胞において発現していることを見いだし、その発現調節をＮＧＦｍＲＮＡの発現調節と比較解析した。培養座骨神経において、インターロイキン－１（ＩＬ－１）はＮＧＦｍＲＮＡに対する著しい増加作用を有するが、ＢＤＮＦｍＲＮＡレベルは変化させなかった。培養シュワン細胞において、アデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリン（ＦＫ）は、ＮＧＦｍＲＮＡに対する増加作用とは対照的にＢＤＮＦｍＲＮＡを減少させた。また、Ca^{2+}イオノフォアであるイオノマイシン（Ｉｏｎ）はＢＤＮＦｍＲＮＡを著しく増加させた。

〔はじめに〕
神経成長因子（ＮＧＦ）と脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）はアミノ酸一次構造において高い相同性を有し、最近その存在が明らかにされたニューロトロフィン遺伝子ファミリーのメンバーであるが、標的神経細胞については一部重複はあるものの、それぞれ異なった神経細胞群に作用することが知られている（１）。以前よりＮＧＦに関して末梢、中枢を通じて、その産生部位、産生調節機構などが詳しく解析されてきた。しかしＢＤＮＦに関しては、主たる産生部位が中枢の神経細胞であることが知られているが、末梢あるいは非神経細胞における産生は殆ど知られていない。今回我々は培養下のラット座骨神経、あるいは座骨神経から分離したシュワン細胞がＢＤＮＦｍＲＮＡを発現していること、そしてこの系におけるＢＤＮＦｍＲＮＡの発現様式はＮＧＦｍＲＮＡのそれと非常に異なっていることを見いだしたので報告する。

〔方法〕
１．培養：座骨神経の器官培養は、新生あるいは成体Wistar系ラットより座骨神経を取りだし５ｍｍの長さに切断後、２４ウェルプレートを用いて１０％牛胎児血清（ＦＣＳ）を含むＤＭＥ培地で３日間培養した（２）。シュワン細胞を得るためには、新生ラットより取りだした座骨神経をコラゲナーゼ／トリプシンで処理して細胞を分散させ、１０μＭ Ａｒａ－Ｃ、１０％ＦＣＳを含むＤＭＥ培地で培養し、混入する繊維芽細胞を除いた（約１週間）。続いて培地よりＡｒａ－Ｃを除いた後、１０μＭフォルスコリン（ＦＫ）を加えてシュワン細胞を選択的に増殖させ（約１週間）、さらにＦＫを培地より除いた後、実験に用いた（３）。繊維芽細胞は、成体ラットの座骨神経をコラゲナーゼ／トリプシンで処理して細胞を分散させ、１０％ＦＣＳを含むＤＭＥ培地を用いて２－３代に渡り継代培養して得た（４）。
２．ノーザンブロット解析：培養下の座骨神経または細胞より酸性グアニジウムーフェノールークロロホルム法（５）に従ってtotalＲＮＡを抽出した。TotalＲＮＡをグリオキザールで変性後、１．５％アガロースゲル中で電気泳動し、ナイロン膜に転写後、^{32}P標識ＮＧＦ－あるいはＢＤＮＦ－ｃＲＮＡプローブと６８℃で１８時間ハイブリダイズした。

〔結果と考察〕
正常座骨神経においてはＮＧＦｍＲＮＡおよびＢＤＮＦｍＲＮＡの発現レベルは共に非常に低いが、切断等の傷害を与えるとＮＧＦｍＲＮＡの発現が２相性の時間経過で著しく高まることは既に報告されたとうりである（６）。しかしＢＤＮＦｍＲＮＡに関してはこのような傷害後の発現誘導は観察されなかった。新生あるいは成体ラットの座骨神経を器官培養すると有意のレベルのＢＤＮＦｍＲＮＡの発現がＮＧＦｍＲＮＡと共に観察された（図１）。器官培養においてＮＧＦｍＲＮＡはインターロイキン－１（ＩＬ－１）あるいはアデニル酸シクラーゼの活性化剤であるＦＫに応答してその発現が著しく増加する（図１）。このとき、ＩＬ－１に応答する成分は座骨神経内に存在する繊維芽細胞であった（図２）。ＦＫに応答する成分は座骨神経内のシュワン細胞であり（図３）、シュワン細胞のｃＡＭＰを増加させる細胞外因子としては主としてβリセプターに作用するカテコールアミンが考えられる（３）。一方器官培養の座骨神経においてＢＤＮＦｍＲＮＡはＩＬ－１やＦＫによって増加しないが、Ca^{2+}イオノフォアであるイオノマイシン（Ｉｏｎ）によって著しく増加した（図１）。培養繊維芽細胞においてはＢＤＮＦｍＲＮＡの発現レベルは非常に低くＩＬ－１あるいはＦＫによる発現誘導も見られなかった（図２）。一方培養シュワン細胞においては、有意のレベルのＢＤＮＦｍＲＮＡが発現していた（図３）。シュワン細胞のＢＤＮＦｍＲＮＡはＩｏｎにより著しく増加し、このＩｏｎの作用はさらにフォルボールエステル（ＴＰＡ）によりさらに増強された（図３）。Ｉｏｎの作用は、蛋白合成阻害剤（シクロヘキシイミド）により、より抑制されずむしろ増強されるため、ｆｏｓ，ｊｕｎなどの最初期遺伝子産物の発現を介さないと考えられる。一方ＦＫあるいはｃＡＭＰアナログはシュワン細胞においてＮＧＦｍＲＮＡに対するとは対照的にＢＤＮＦｍＲＮＡを著しく減少させ、Ｉｏｎの増加作用も打ち消した。（図３）。

座骨神経の発達あるいは傷害後の再生には、繊維芽細胞とシュワン細胞がそれぞれ異なる刺激（ＩＬ－１およびｃＡＭＰ連関刺激）に応答して産生するＮＧＦが重要な働きをすると考えられる。一方、傷害直後に発現誘導の見られないＢＤＮＦの座骨神経再生に対する役割は現時点では明かではない。しかし、シュワン細胞におけるＮＧＦと対照的なＢＤＮＦの発現調節機構は、従来知られていなかったＢＤＮＦの末梢神経系ににおける作用様式を明らかにする上で重要な手がかりを与えるものと考えられる。

図1．座骨神経器官培養におけるＮＧＦｍＲＮＡとＢＤＮＦｍＲＮＡの発現調節：

培養開始後３日目の新生ラット座骨神経に以下の薬物処理（３時間）を行った、ＩＬ－１（３０Ｕ／ｍｌ）、ＦＫ（２０μＭ），Ｉｏｎ（１μｇ／ｍｌ）．

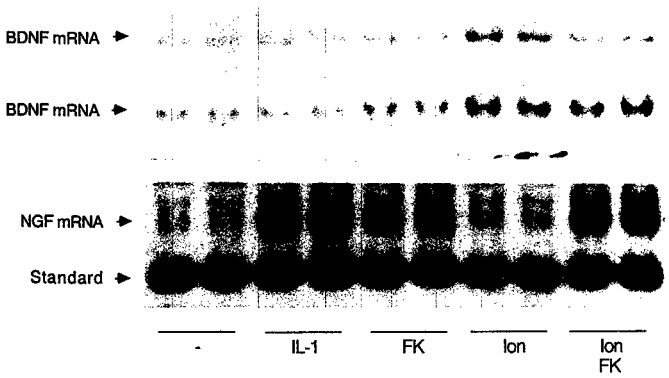


図2．座骨神経由来繊維芽細胞におけるＮＧＦｍＲＮＡとＢＤＮＦｍＲＮＡの発現調節：

薬物処理は３時間、薬物濃度は図１に同じ。

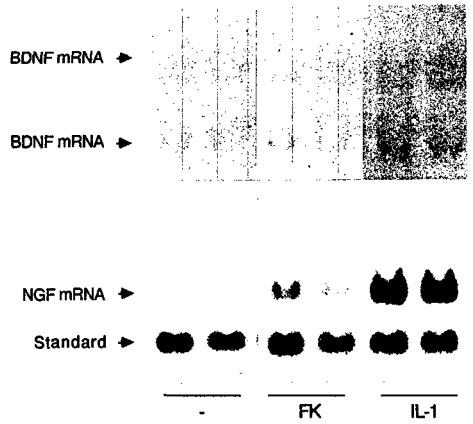
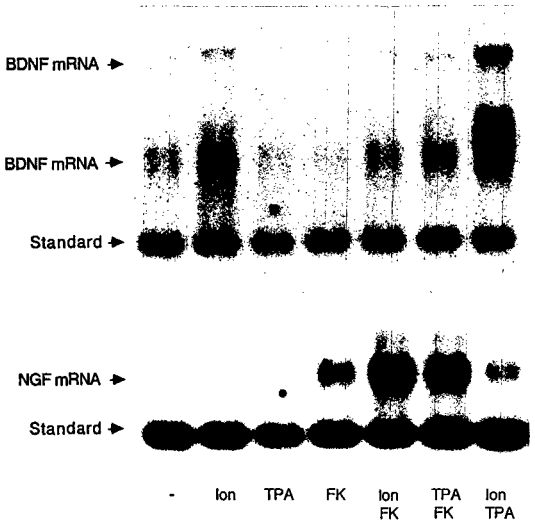


図3．座骨神経由来シュワン細胞におけるＮＧＦｍＲＮＡとＢＤＮＦｍＲＮＡの発現調節：

薬物処理は３時間、　ＴＰＡ（０．１μｇ／ｍｌ）、他の薬物濃度は図１に同じ。



〔文献〕

(1) Thoenen, H. (1991) Trends Neurosci. 14, 165-170.
(2) Lindholm, D. et al. (1987) Nature 330, 658-659.
(3) Matsuoka, I. et al. (1991) J. Neurosci. 11, in press.
(4) Lindholm, D. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 16348-16351.
(5) Chomzinski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159.
(6) Heumann, R. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8735-8739.

117 NGFまたはBt2cAMPの処理によって分化させたPC12h細胞における^{45}Ca uptakeの性質について

岸野浩行，中崎聡理，秋元孝文，和田哲幸，市田成志
（近畿大・薬・生物化学）

[要約]

NGF または Bt_2cAMP の存在下で培養することにより分化させた PC12h 細胞（NGF 処理処理細胞または Bt_2cAMP 処理細胞）における，高濃度KClの適用によって生じた ^{45}Ca uptake (K-stimulated ^{45}Ca uptake) の性質を調べた．PC12h 細胞の場合，NGF またはBt_2cAMP によって分化させても K-stimulated ^{45}Ca uptake 能に変化は認められなかった．しかし，NGF 処理および未処理細胞とも PC12h 細胞における K-stimulated ^{45}Ca uptake に対する Ca antagonists の効果の性質は NG108-15 細胞と類似していた．この様に，たとえ PC12h 細胞と NG108-15 細胞における K-stimulated ^{45}Ca uptake の性質が類似しており，しかも，分化誘導剤により同じ様に分化させることができた場合でも，用いた細胞によって K-stimulated ^{45}Ca uptake 能が変化する場合としない場合の両方存在することが明らかとなった．

NG108-15 (NG) 細胞を Bt_2cAMP の存在下で培養することにより分化させた時，高濃度 KCl の適用によって生じた ^{45}Ca uptake (K-stimulated ^{45}Ca uptake) 量は増加することを，すでに我々は報告している(1)．

PC12h 細胞は NG 細胞と同様に神経細胞のモデルとしてよく用いられている(2)．

そこで，NGF または Bt_2cAMP の存在下で培養することにより分化させた PC12h 細胞における，K-stimulated ^{45}Ca uptake の性質は NG 細胞の場合と同様に変化するかという点について検討したので報告する．

[方法]

① PC12h 細胞の培養：Hatanaka (3) の方法に準じて行った．コラーゲンで処理した 60mm ディッシュを用いて培養し，24 時間後に NGF 処理細胞の場合は 25 ng/ml β-NGF を，Bt_2cAMP 処理細胞の場合は 0.75 mM Bt_2cAMP を，添加した．それらの対照としては等量のPBS(+)を添加した（未処理細胞）．それぞれ，添加後７日目の細胞を K-Stimulated ^{45}Ca uptake の測定に使用した．

② K-stimulated ^{45}Ca uptake の測定：松田らの方法(1)に準じて行った．各々のディッシュ中の培養液を吸引除去し，洗浄後，反応液中で 15 分間プレインキュベートした．次に，$^{45}CaCl_2$ (1μCi/dish) + 50mM KCl または 50mM NaCl を添加し，さらに通常 37℃ 30 秒間反応した．各種の Ca antagonists の効果を観察する場合は $^{45}CaCl_2$ の添加 5 分前にそれぞれの Ca antagonist を添加した．K-Stimulated ^{45}Ca uptake 量は $^{45}CaCl_2$ + KCl の添加によって得られた ^{45}Ca uptake 量から $^{45}CaCl_2$ + NaCl の添加によって得られた ^{45}Ca uptake 量を差し引くことによって求めた(4)．反応の停止は反応液を吸引することにより行った後，氷冷した反応液 + 0.1mM La^{3+} を含む溶液で２回洗浄した後，0.1% DOC で可溶化し，^{45}Caの放射能量を測定した．

[結果]

① NGF 処理および未処理細胞とも，K-stimulated ^{45}Ca uptake (反応時間は 30 秒)は NGF 添加後２日目でほぼ平衡状態となった．しかし，添加後７日目までの Ca 流入量に有意な差は両細胞間で認められなかった (Fig. 1A, 1B)．

② ジルチアゼム，ベラパミル，ニトレンジピンおよび (+)PN200-110 (PN) により，NGF 処理および未処理細胞における K-stimulated ^{45}Ca uptake は抑制され，しかも PN の抑制効果については立体特異性が認められた．一方，NGF 処理および未処理細胞の K-stimulated ^{45}Ca uptake は BAYK8644により増強され，Cd^{2+}により顕著に抑制された．しかし，Ni^{2+}によりほとんど抑制されなかった．

③ 中枢性N型およびL型Caチャネルに作用するω-コノトキシン（1nM～1μM）は NGF 処理および未処理細胞における K-stimulated ^{45}Ca uptakeをほとんど抑制しなかった.

④ PC12h 細胞は Bt_2cAMP 処理によっても神経突起を形成した. しかし, 形態的には NGF を処理した細胞と比べて少し異なっていた. この Bt_2cAMP 処理および未処理細胞における K-stimulated ^{45}Ca uptake (反応時間 30 秒)は, NGF の場合とは異なり Bt_2cAMP 添加後７日目まで徐々に増加し続けた. しかし, NGF 処理の場合と同様 Bt_2cAMP 処理および未処理細胞についても添加後７日目まで K-stimulated ^{45}Ca uptake 量に有意な差は認められなかった (Fig. 2A, 2B).

［考察］

NGF処理および未処理細胞における K-stimulated ^{45}Ca uptake に関与していると思われる PC12h 細胞のCaチャネルの性質は Ca antagonists などの効果から, NG 細胞と類似していると想像され, そのCaチャネルのタイプは末梢神経性L型の電位依存性Caチャネルであると考えられる. しかし, NGF または Bt_2cAMP 存在下で培養することによって分化させた PC12h細胞における, K-stimulated ^{45}Ca uptake能は未処理細胞と比較してあまり変化は認められなかった. それゆえ, NGF や Bt_2cAMP のような分化誘導剤により同じように分化させた場合でも, 細胞により K-stimulated ^{45}Ca uptake 能が変化する場合としない場合の両方存在することが明かとなった.

［謝辞］

PC12h細胞を提供していただいた大阪大・蛋白研　畠中　寛教授に感謝致します.

［文献］

(1) 松田成久ら (1989) 生化学, 61, 1191. (2) McGuire, J. C. and Greene, L. A. (1978) J. Bio. Chem. 254, 3362.

(3) Hatanaka, H. (1981) Brain Res. 222, 255. (4) Ichida, S. et al (1984) J. Phermacol. Exp. Ther. 228, 439.

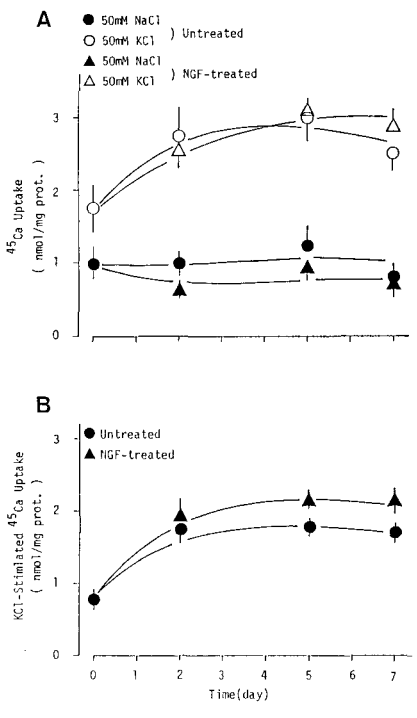


Fig. 1 NGF の効果

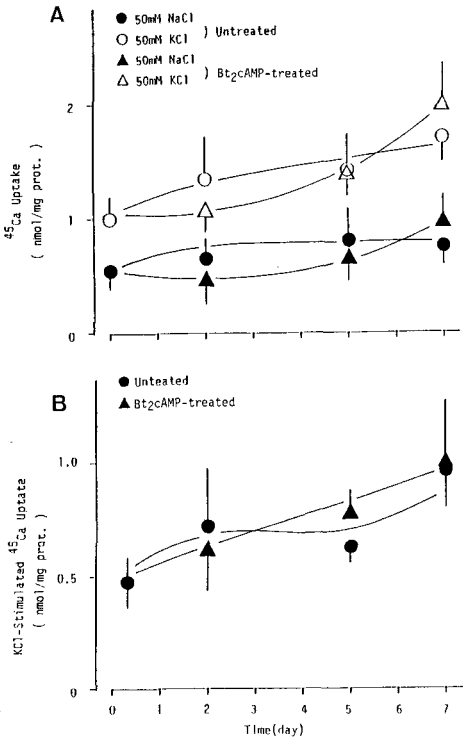


Fig. 2 Bt_2cAMP の効果

118 ^{45}Caオーバーレイ法によるラット脳カルシウム結合タンパク質の検索

堂前純子・鈴木龍雄・田中亮
（名市大・医・1生化）

〔要約〕 ラット大脳、小脳より soluble (sol), P_2, synaptosome (syn), synaptic plasma membrane (SPM), postsynaptic density-enriched (PSD-rich)画分を調製し、それぞれの画分に存在するCa結合タンパク質 (CaBP)について調べた。

1）大脳PSD-rich画分には分子量66k, 55k, 19k, 16kのタンパク質、140k領域のタンパク質群にCa結合能が認められた。一方、小脳PSD-rich画分には55k, 19k, 16kのCaBPが検出された。
2）分子量55k, 19kのCaBPはすべての画分に認められ、それぞれtubulin, calmodulinと考えられた。
3）140k CaBP群は大脳PSD-rich画分に特異的で、ここに付随するCaMキナーゼIIの内在性基質であると考えられるが、^{45}Caオーバーレイ法ではリン酸化に伴うCa結合能の変化は検出されなかった。
4）sol画分には分子量29k, 28kのCaBPが検出され、前者はcalretinin, 後者はcalbindin-D_{28k}と考えられた。これらは小脳P_2, syn, SPM画分にも少量認められた。

［はじめに］ 神経細胞において細胞内Ca^{2+}は、神経突起の形成と伸展、神経伝達物質の放出、長期増強の成立や維持等、重要な現象に深く関与していることが知られている。これら Ca^{2+}の細胞機能調節因子としての作用は、細胞内Ca結合タンパク質(CaBP)を介して発現されると考えられている。Ca^{2+}によるシナプス伝達調節機構を明らかにすることを目的として、シナプス画分に存在するCaBPの検出と同定を試みた。

［方法］ 6週齢ウィスター雄ラットの大脳皮質、小脳を用いた。組織に10容の10mM Tris-HCl(pH7.5)/5mM EGTA/150mM NaClを加えてホモジェナイズ後、100,000g, 60分遠心して得られた上清をsol画分として用いた。P_2, syn, SPM, PSD-richの各画分は既報(6)に準じて調製した。

CaBP検出は、Maruyamaらによる^{45}Caオーバーレイ法(4)を一部改変して行った。 nitrocellulose膜のかわりにPVDF膜を使用した点、転写後の膜を 0.05% glutaraldehydeを添加した Imidazole buffer中でインキュベートしてから^{45}Caと反応させた点が主な変更部分である。膜上のタンパク質と結合した^{45}Caはオートラジオグラフィーまたは RI Imaging System (AMBIS社)を用いて検出、定量した。

［結果と考察］ ^{45}Caとの反応の前に glutaraldehyde処理を行うことでCaBP検出感度は上昇した(図1)。glutaraldehyde固定によりタンパク質の膜上への保持が良好となる(5)ためと考えられた。なお、この処理により^{45}Ca結合量の低下するタンパク質は見られなかった。

大脳PSD-rich画分には、分子量66k, 55k, 19k, 16kのタンパク質と、140kのタンパク質群にCa結合能が認められた(図2)。分子量55kのタンパク質は、ラット脳より精製したtubulinとSDS-PAGE上同じ移動度を示すこと、2M urea存在下でdoubletとなることよりtubulinであると考えられた。分子量19kのタンパク質はCa^{2+}の有無により移動度が変化し、いずれも精製calmodulin (CaM)と同じ位置であること、等電点が3.8-3.9であることよりCaMと考えられた。これら55k, 19kの2種は検索したすべての画分にCaBPとして検出された。19kタンパク質は小脳PSD-rich画分で少なく、小脳PSDは大脳PSDに比べCaM量が少ないとする報告(1)と一致した。140kタンパク質群は、大脳PSD-rich画分に特異的で(図3)、ここに付随するCaMキナーゼIIの内因性基質であると考えられる(2)が、リン酸化に伴うCa結合能の変化は^{45}Caオーバーレイ法では検出できなかった。一方、小脳PSD-rich画分に認められたCaBPで明らかなものは55k, 19kの2種のみで、この他には16kタンパク質がわずかに検出された。(図2)

sol画分には分子量29k, 28kのCaBPが認められた。これらは小脳に多く大脳には少ないこと、分子量、等電点より前者はcalretinin, 後者はcalbindin-D_{28k} (3)と考えられた。これらは小脳P_2, syn, SPM画分にもわずかに認められた。他に分子量21kのタンパク質にもCa結合能が認められた。この21k CaBPは大脳、小脳のP_2, syn, SPM画分にも少量検出された。

［文献］
(1)Carlin, R. K., Grab, D. J., Cohen, R. S., and Siekevitz, P.(1980) J. Cell Biol. 86, 831-843
(2)堂前純子、鈴木龍雄、田中亮(1990) 神経化学 29,336-337
(3)Gabrielides, C., McCormack, A. L., Hunt, D. F., and Christakos, S. (1991) Biochem. 30,656-662
(4)Maruyama, K., Mikawa, T., and Ebashi, S.(1984) J. Biochem. 95,511-519
(5)Van Eldik, L. J. and Wolchok, S. R. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 124, 752-759
(6)Wu, k., Carlin, R., and Siekevitz, P.(1986) J. Neurochem. 46, 831-841

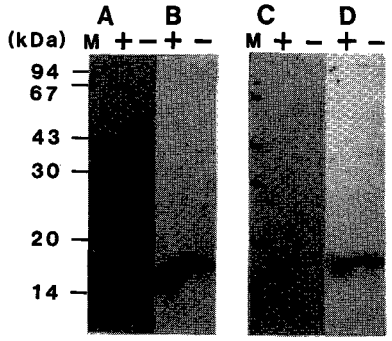


図1　CaMの^{45}Ca結合へのglutalardehyde処理の影響
(15% SDS-PAGE)
A,B: glutalardehyde処理を行ったもの
C,D: glutalardehyde処理を行わなかったもの
A,C: PVDF膜のCBB染色(^{45}Ca binding assay後に染色)
B,D: ^{45}Caのオートラジオグラフ
M : molecular marker
(上から94, 67, 43, 30, 20, 14 kDa)
+ : $CaCl_2$添加にて泳動 (タンパク質量 2ug)
− : EGTA添加にて泳動 (タンパク質量 2ug)

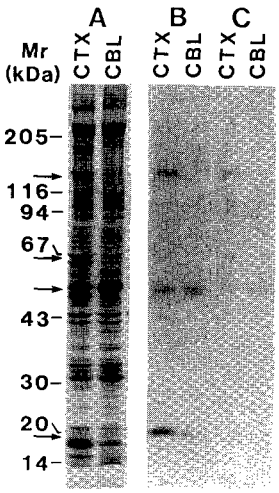


図2　PSD-rich画分のカルシウム結合タンパク質
(7-17% SDS-PAGE)
A : gelのCBB染色 (タンパク質量 20ug/lane)
B,C : ^{45}Caのオートラジオグラフ (タンパク質量 40ug/lane)
BはCa^{2+}濃度10^{-6}M、Cは10^{-2}Mで^{45}Ca結合を行った。
^{45}Caの濃度はどちらも37kBq/mlである。
CTX : 大脳皮質から調製したPSD-rich画分
CBL : 小脳から調製したPSD-rich画分

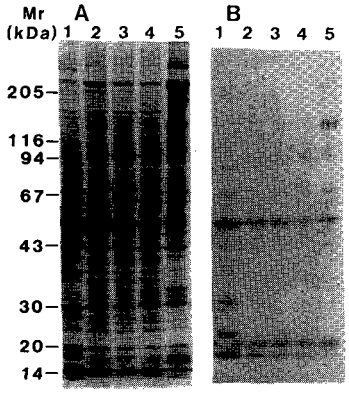


図3　大脳の各画分のカルシウム結合タンパク質
(7-17% SDS-PAGE)
A : gelのCBB染色 (タンパク質量 20ug/lane)
B : ^{45}Caのオートラジオグラフ (タンパク質量 40ug/lane)
1 : sol画分
2 : P_2画分
3 : syn画分
4 : SPM画分
5 : PSD-rich画分

119 ラット初代培養アストロサイトに対するプロスタグランジン$F_{2\alpha}$の作用

北中 純一[1]、尾上 浩隆[2]、馬場 明道[1]
([1]大阪大・薬・薬理、[2]大阪バイオサイエンス研究所・神経科学部門)

〔要約〕

ラット初代培養アストロサイトに対するプロスタグランジン$F_{2\alpha}$（$PGF_{2\alpha}$）の作用を、[^{3}H]inositolでラベルした細胞を用い検討した。$PGF_{2\alpha}$はアストロサイトにおいて濃度依存的にphosphoinositide (PI) 代謝回転を亢進した(ED_{50} = 23 nM)。PGD_2、PGE_2もアストロサイトにおいてPI代謝回転を亢進したが、最大反応は$PGF_{2\alpha}$のそれよりも小さく、さらに数オーダー高い濃度を必要とした。アストロサイトをdibutyryl cyclic AMP (dBcAMP) で処置して分化させた場合、$PGF_{2\alpha}$によるPI代謝回転は増強されたが、反応のED_{50}値は変化しなかった。ジギトニンで処置したアストロサイトにおいて、guanosine 5'-O-(3-thio)triphosphate (GTPγS)は有意にPI代謝回転を亢進し、$PGF_{2\alpha}$はこの反応をさらに増強した。以上より、ラット初代培養アストロサイトにはphospholipase C と共役した$PGF_{2\alpha}$受容体が存在することが示された。

【目的】

プロスタグランジンは脳においてその存在が示されており(1)、中枢神経系において何らかの役割を持つと考えられる。中でもPGD_2、PGE_2は睡眠-覚醒サイクルにおけるregulatorと考えられている(2)。一方$PGF_{2\alpha}$は末梢においてはその生理機能および情報伝達系との連関について詳細に検討されているが、中枢における機能は未だ明確ではない。その中でNG108-15細胞において$PGF_{2\alpha}$がPI代謝回転を亢進するという報告(3)は、中枢神経系において$PGF_{2\alpha}$受容体の存在を示唆するものといえる。今回$PGF_{2\alpha}$の中枢作用を調べる目的の一つとして、ラット初代培養アストロサイトを用いてPI代謝回転との連関について検討した(4)。

【方法】

ラット初代培養アストロサイトは、生後1-2日齢のSD系ラット大脳皮質より調製した。10%の牛胎児血清を含むMEM中でアストロサイトを8-14日培養した後、培地中に1 mM dBcAMPを加えさらに3-6日培養したものを用いた。本培養条件で得られた細胞は、90%以上がGFAP陽性であった。

[^{3}H]Inositol (1μCi/well)を含むMEM中でアストロサイトを24時間インキュベートした後培地を除去し、lithium-Krebs-Ringer液(LiKRB)で細胞を洗浄して実験に用いた。PG類はエタノールに希釈して用い、エタノールの最終濃度は0.1%とした。反応後LiKRBを除去し、氷冷メタノールを添加して反応を停止した。[^{3}H]inositol phosphatesの定量はBerridgeらの方法に従った(5)。

【結果】

DBcAMPで分化させたラット培養アストロサイトにおいて、$PGF_{2\alpha}$は3 nMからPI代謝回転を亢進し、0.3 μMで反応はプラトーに達した（図1）。この反応は$PGF_{2\alpha}$添加後20分で最大となる比較的反応時間の長いものであった。PGD_2、PGE_2もPI代謝回転を亢進したが、そのefficacyおよびpotencyは$PGF_{2\alpha}$の場合よりも小さいものであった。PGI_2はPI代謝回転を引き起こさなかった。図2に示すように、dBcAMPで処置しない未分化状態のアストロサイトにおいては、$PGF_{2\alpha}$によるPI代謝回転は認められたが、その最大反応はdBcAMP処置細胞の約50%であった。しかしdBcAMP処置の有無に関わらず、ED_{50}値はほぼ一定の値を示した。アストロサイトをジギトニンで処置して細胞膜の透過性を高めた系において、GTPγSは有意にPI代謝回転を亢進した（図3）。$PGF_{2\alpha}$はこの作用をさらに増強し

た。ジギトニン処置細胞においては、外液にCa^{2+}が存在することがPI代謝回転を引き起こすためには必須であり、Ca^{2+}によるPI代謝回転を$PGF_{2}\alpha$+GTPγSはさらに増強した。アストロサイトを1μg/ml cholera toxinあるいはpertussis toxinで24時間処置したものにおいて、$PGF_{2}\alpha$によるPI代謝回転には影響が認められず、コントロールと同程度のphospholipase C 活性が認められた。$PGF_{2}\alpha$によるPI代謝回転は、carbacholやnorepinephrineによるPI代謝回転と相加性を示した。

【考察】

ラット培養アストロサイトにおいて、$PGF_{2}\alpha$は他のPG類と比べて特異的にPI代謝回転を亢進することが分かり、本細胞に$PGF_{2}\alpha$特異的受容体の存在が示された。また、この情報伝達系にはGTP結合タンパク質が介在している可能性が示唆された。細胞をdBcAMPで処置することで$PGF_{2}\alpha$によるPI代謝回転が増強されることから、細胞の分化によって$PGF_{2}\alpha$受容体の数が増加することが考えられる。

Fig. 1.

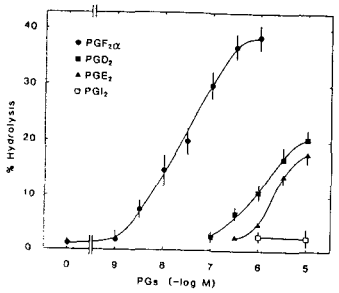


Fig. 3.

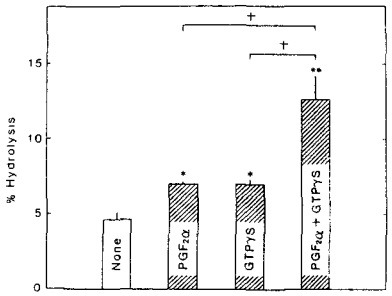


Fig. 2.

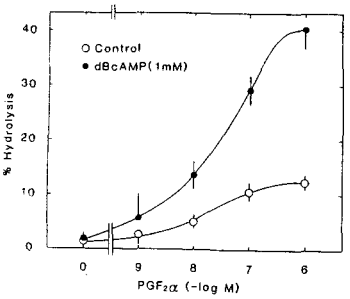


Fig. 1. Dose-response curves for prostaglandins (PGs) -evoked PI hydrolysis in rat cultured astrocytes. [^{3}H]Inositol-prelabeled cells were incubated with PGs at the indicated concentrations for 15 min. Points are means ± S. E. M. of three to eight experiments. When bars are absent, the S. E. M. is smaller than the symbol.

Fig. 2. Dose-response curves for $PGF_{2\alpha}$-evoked PI hydrolysis in non-transformed and transformed astrocytes. The cells were preincubated with (●) or without (○) 1 mM dBcAMP for three to six days before the loading of [^{3}H]inositol. Points are means ± S. E. M. of four experiments. When bars are absent, the S. E. M. is smaller than the symbol.

Fig. 3. Effects of $PGF_{2\alpha}$, GTPγS and $PGF_{2\alpha}$+GTPγS on PI hydrolysis in digitonin-permeabilized astrocytes. The transformed cells were treated with 20 μM/ml of digitonin for 5 min, followed by the incubation of the cells with 1 μM $PGF_{2\alpha}$ and/or 100 μM GTPγS in 10 μM Ca^{2+}-containing LiKRB for 15 min. Values are means ± S. E. M. of three experiments.
*P<0.05, **P<0.01, compared with none. †P<0.05, compared with $PGF_{2\alpha}$ and GTPγS.

【文献】

(1) Narumiya, S., et al. (1982) Life Sci. **31**, 2093-2103.

(2) Hayaishi, O. (1988) J. Biol. Chem. **263**, 14593-14596.

(3) Hatanaka, M., et al. (1989) J. Neurochem. **53**, 1450-1455.

(4) Kitanaka, J., et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun., in press.

(5) Berridge, M. J., et al. (1982) Biochem. J. **206**, 587-595.

120 脳ω－conotoxin受容体を免疫沈降させる単クローン抗体

茨木京子、堀川　洋、西須英雄、阿部輝雄
（新潟大学脳研究所）

〔要約〕

われわれはすでに脳から可溶化したω-conotoxin受容体(電位感受性Caチャンネル成分)を免疫沈降させる2種の単クローン抗体(SPM-1およびSPM-2)を報告した。これらの抗体はω-conotoxin受容体に結合した蛋白質を認識しているものと思われる。今回、ω-conotoxin受容体分子そのものを認識する単クローン抗体を得ることを目的として、ウシ脳膜分画のジギトニン抽出物をSPM-2-Sepharoseにかけて結合した分画を抗原としてマウスを免疫してω-conotoxin受容体を免疫沈降させる単クローン抗体を作製した。得られた抗体(2B6)はウシ脳ω-conotoxin受容体の約60%を沈降させた。また、免疫沈降の際、2B6とSPM-1およびSPM-2を同時に添加した場合、最大沈降は約70%となった。[^{3}H]propionyl-ω-conotoxinで標識した後、可溶化したω-conotoxin受容体を2B6とインキュベートして、蔗糖密度勾配遠心にかけると、ω-conotoxin受容体の沈降が有意に速まった。。

神経系において外液Ca^{2+}の細胞内への急速な流入は電位感受性Caチャンネルを通して起こる。神経系には多様なCaチャンネルが存在するが、その分子的基盤、生理的機能の差異については不明な点がきわめて多い(2)。われわれはω-conotoxin GVIA(以下GVIA)を用いて神経系の電位感受性Caチャンネル分子を追究してきた。すでに脳膜分画から可溶化したGVIA受容体を免疫沈降させる2種の単クローン抗体を報告した(3,4)。これらの抗体はいずれもGVIA受容体分子自身ではなく、それに結合した蛋白質を認識するものと思われる(3)。GVIA受容体分子自身を認識する単クローン抗体を得るために、SPM-2-Sepharose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部分精製したGVIA受容体を抗原としてマウスを免疫して、GVIA容体を免疫沈降させる単クローン抗体を得た。これらは、SPM-1あるいはSPM-2の認識する蛋白質とは異なった抗原を認識していると考えられる。

［実験方法］

低張処理したウシ脳P2分画のジギトニン抽出物をSPM-2-Sepharoseにかけ、結合分画をSDSで溶出したものをマウスに注射して免疫した。このマウスの脾臓細胞をミエローマ細胞(P3X63-Ag8.653)と融合させてハイブリドーマを作製した。すでに述べたように(1)、anti-mouse IgG-Sepharoseを用いてハイブリドーマ培養上清の可溶化GVIA受容体沈降能をアッセイすることにより単クローン抗体を確立した。また、ウシ脳膜分画よりジギトニンで可溶化した[^{3}H]propionyl GVIA([^{3}H]Pr-GVIA)標識受容体を2B6とインキュベートした後、0.1%ジギトニン存在下で5-20%(w/v)蔗糖密度勾配遠心(3)にかけて分画した。

［結果と考察］

SPM-2は神経系およびパラニューロンに局在する28 kDaの蛋白質を認識する(3)。　低張処理したウシ脳膜分画のジギトニン抽出物をSPM-2-Sepharoseにかけると、28 kDa蛋白質、36 kDa蛋白質およびGVIA受容体が結合する。この結合分画をSDSで溶出したものを抗原としてマウスを免疫し、ウシ脳から可溶化したGVIA受容体を免疫沈降させる単クローン抗体を選択した。可溶化したウシ脳GVIA受容体を有意に免疫沈降させる単クローン抗体、2B6(IgM)が得られた。

図1に示すように2B6はウシ脳より可溶化したGVIA受容体の約60%を沈降させた。すでに報告したようにGVIA受容体に結合していると考えられる、それぞれ36 kDa、28 kDaの蛋白質を認識する単クローン抗体SPM-1とSPM-2はウシ脳GVIA受容体の25-30%を沈降させる(4)。2B6、SPM-1およびSPM-2の3種の単クローン抗体を同時に加えた場合には、最大免疫沈降は約70%に増加した(図1)。したがって、2B6によって沈降するGVIA受容体はSPM-1およびSPM-2によって沈降するGVIA受容体と一部重複しているものと考えられる。また、2B6はウシ脳からジギトニンで可溶化した[^{3}H]PN200-110標識dihydropyridine(DHP)受容体を有意に沈降させないので(図1)、ウシ脳DHP感受性Caチャンネル分子とは交差しないものと思われる。

可溶化したGVIA受容体を2B6とインキュベートした後、蔗糖密度勾配遠心にかけてGVIA受容体の沈降速度が変化するかどうかを調べた。図2に示すように抗体の非存在下、あるいは対照単クローン抗体のTC-201(シビレエイ電気器官のアセチルコリンエステラーゼを認識するIgM)とインキュベートした場合と比較して2B6ではGVIA受容体の沈降が有意に速まった。また、ウシ脳膜分画のジギトニン抽出物をBolton-Hunter試薬を用いて^{125}Iで標識して2B6による免疫沈降を行い、沈降成分をSDS電気泳動後、オートラジオグラフィーで解析すると、SPM-1やSPM-2の場合とは異なり、36 kDaおよび28 kDaの蛋白質の濃いバンドは検出されなかった。これらの結果は2B6がSPM-1あるいはSPM-2とは異なったGVIA受容体関連成分を認識することを示す。2B6はGVIA受容体分子そのものを認識している可能性が強い。

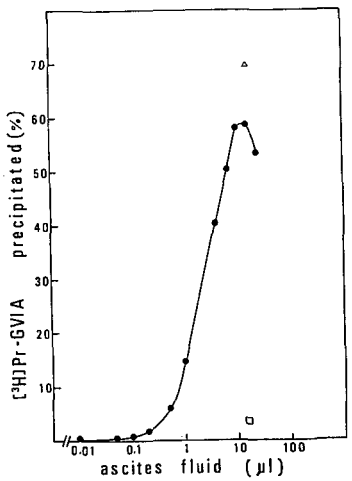


図1 ウシ脳低張処理P2分画ジギトニン抽出物中のGVIA受容体の免疫沈降
●、2B6; △、2B6+SPM-1+SPM-2
□、2B6.[^{3}H]PN200-110標識(DHP受容体)

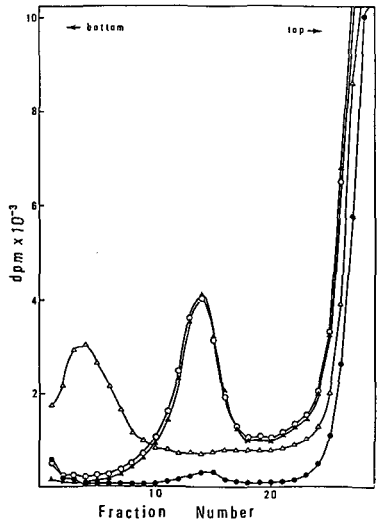


図2 [^{3}H]Pr-GVIAで標識したウシ脳低張処理P2分画ジギトニン抽出物の蔗糖密度勾配遠心
▲、抗体なし; ○、+ TC-201; △、+ 2B6
●、+ 1 μM非標識GVIA

[文献]

1. Hayakawa, N., Morita, T., Yamaguchi, T., Mitsui, H., Mori, K. J., Saisu, H. and Abe, T. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 483-490.
2. Hess, P. (1990) Annu. Rev. Neurosci. 13, 337-356.
3. 西須英雄、茨木京子、山口徹、阿部輝雄 (1990) 神経化学 29, 158-159.
4. Yamaguchi, T., Ibaraki, K., Mitsui, H., Saisu, H. and Abe, T. (1990) Neurosci. Res. Suppl 11, S120.

121 低分子量 GTP 結合蛋白質 smg p25A の調節蛋白質 GDI (GDP dissociation inhibitor : smg p25A GDI) の機能および発現について

本池俊行、佐野公彦、中村　馨、菊池　章*、貝淵弘三*、高井義美*

(神戸大・医・小児科、*第一生化)

〔要約〕 smg p25A (= rab3A 蛋白質) は神経伝達物質の分泌反応に関与していると考えられている。 今回、私共はその調節蛋白質である smg p25A GDI (GDP dissociation inhibitor) の生体内での機能を明らかにする目的で、cDNA クローニングによる一次構造の解析を行い、smg p25A に対する作用機序、他の低分子量 GTP 結合蛋白質との相互作用、ラットでの組織分布、および発達期ラット脳における発現について解析を加えた。 smg p25A GDI は447アミノ酸からなり、推定分子量は50,565であった。 smg p25A は翻訳後にそのC末端の２個のシステイン残基にゲラニルゲラニル基が付加し、C末端システインのカルボキシル基がメチル化されているが、ras p21 とのアナロジーから、この翻訳後修飾がその機能発現に必須であると考えられる。 事実、C末端側を欠く smg p25A 断片、およびC末端側の翻訳後修飾を受けていない smg p25A に対しては smg p25A GDI は作用しなかった。 smg p25A GDI は酵母細胞において分泌反応に関与している SEC4 蛋白質、およびラット肝臓より精製された rab11 蛋白質などの低分子量 GTP 結合蛋白質に対しても、smg p25A に対するのと同様にGDP/GTP 交換反応抑制作用を示した。 ラット各組織における smg p25A GDI の発現を調べると、心臓、肝臓等の smg p25A の発現していない組織も含め、すべての組織に発現が認められた。 発達期のラット脳では胎仔期、新生仔期を通じて高い発現が認められた。 培養中枢神経細胞においては smg p25A GDI は神経細胞のみならず、グリア細胞にもその発現が認められた。

(緒言)

哺乳類細胞において、smg p25A を含む rab ファミリー群の低分子量 GTP 結合蛋白質は細胞内蛋白質の輸送、分泌反応に関与していると考えられている。 現在までの研究により、私共は smg p25A が神経組織、特に神経終末に高濃度に存在するのみならず、唾液腺、膵外・内分泌腺などの regulated secretion を行う組織においてその発現が観察されていることから、smg p25A がこれらの組織において分泌反応に関与していると推定している。

また、私共は smg p25A は翻訳後にC末端の２個のシステイン残基にゲラニルゲラニル基が付加し、C末端システインのカルボキシル基がメチル化されており、このゲラニルゲラニル基によって smg p25A が膜に結合していることを明らかにしている(3)。

一方、私共は GDP 結合型の smg p25A に結合して 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、smg p25A GDI と命名している(6)。 私共は 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が、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、smg p25A 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(1)。

今回、私共は smg p25A の調節蛋白質である smg p25A GDI の機能および発現について解析を加えたので報告する。

(実験方法)

ウシ大脳より精製した smg p25A GDI の部分アミノ酸配列に基づいて作製した oligonucleotide probe を用いて、ウシ大脳 cDNA ライブラリーより smg p25A GDI cDNA を単離し、サンガー法により塩基配列を決定した(4)。 smg p25A、SEC4 蛋白質、および rab11 蛋白質の GDP/GTP 交換反応は [^{3}H]GDP, [^{35}S]GTPγS を用い、既報の方法により測定した(6)。 ラット各組織ならびに各発達段階におけるラット脳より RNA を抽出し、smg p25A GDI cDNA をプローブとしてノーザンブロット法によって smg p25A GDI mRNA を半定量した。 胎生20日ラット胎仔より分離、培養したアストロサイトから総蛋白質を抽出し、抗 smg p25A GDI 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った(5)。 生後5日ラット脳より海馬細胞を分離、培養し、抗 smg p25A GDI 抗体を用いて、ペルオキシダーゼ-DAB による免疫染色を行った。

(結果)

・ smg p25A GDI cDNA のクローニング　smg p25A GDI は447アミノ酸からなり、その推定分子量は50,565であった。 ホモロジー検索を行ったところ、smg p25A GDI と酵母の低分子量 GTP 結合蛋白質である RAS2 蛋白質を GDP 結合型から GTP 結合型へと変換させる調節蛋白質 CDC25 との間に弱いアミノ酸配列の相同性が認められた

(4)。

・ smg p25A GDI の作用に対する smg p25A のC末端修飾の影響　ウシ大脳から精製した smg p25A はC末端が翻訳後に修飾をうけているが、この smg p25A に対して、smg p25A GDI は1：1の比率で複合体を形成し、smg p25A からの GDP の解離、および GTP の結合を阻害する。 smg p25A のトリプシンによる限定分解で得られたN末端側断片は翻訳後修飾を受けたC末端を含まず、同じ反応条件下において、このN末端側断片に対して smg p25A GDI は作用しなかった。 また、大腸菌で発現させた smg p25A はC末端の翻訳後修飾を受けていないが、この smg p25A に対しても smg p25A GDI は作用しなかった(2)。

・ smg p25A GDI と他の低分子量 GTP 結合蛋白質との相互作用　smg p25A GDI の存在下において smg p25A と同様に SEC4 蛋白質、および rab11 蛋白質からの [^{3}H]GDP の解離が阻害され、両蛋白質への [^{35}S]GTPγS の結合が阻害された(7,8)。

・ ラット各組織および発達期ラット脳における smg p25A GDI の発現　ラット各組織より抽出した RNA を用いてノーザンブロット法により解析すると、smg p25A GDI mRNA は脳、肺、胸腺、心臓、肝臓、脾臓、小腸、腎臓に認められ、特に脳と脾臓に高い発現が認められた(4)。 発達期ラット脳においては、胎仔期、新生仔期を通じて smg p25A GDI mRNA の高い発現が認められ、発現の変動は認められなかった。

・ ラット中枢神経細胞における smg p25A GDI の発現　ウェスタンブロット法による解析では smg p25A GDI は smg p25A の発現していないアストロサイトにも発現が認められた。 単層グリア細胞上の海馬神経細胞において、抗 smg p25A GDI 抗体により神経細胞が染色されると共に、オリゴデンドロサイトも染色された。

（考察）

smg p25A GDI が GDP 結合型の smg p25A に作用して GDP/GTP 交換反応を抑制し、smg p25A の膜への結合を阻害することから、smg p25A GDI は smg p25A の GDP/GTP 交換反応を調節すると共に、smg p25A の細胞膜や分泌小胞と細胞質間のトランスロケーションを制御していると考えられる。 私共は smg p25A はそのC末端の翻訳後修飾によって細胞膜に結合していることを明らかにしているが、今回、この翻訳後修飾が smg p25A と smg p25A GDI との相互作用に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

一方、酵母の SEC4 蛋白質はゴルジ体から細胞膜への分泌小胞の輸送に関与している。 また、私共は rab11 蛋白質は肝臓のミクロゾーム・ゴルジ画分に存在することから、肝臓における constitutive secretion に関与していると考えている。 これらの蛋白質に対しても、smg p25A GDI が GDP/GTP 交換反応を抑制することから、smg p25A GDI は smg p25A 以外にも、一群の低分子量 GTP 結合蛋白質に作用し、その GDP/GTP 交換反応と細胞膜や分泌小胞と細胞質間のトランスロケーションの調節を行っていると考えられる。

smg p25A GDI が smg p25A を発現していないグリア細胞に発現が認められること、また、ラット胎仔期において smg p25A の発現の低い段階においても smg p25A GDI が恒常的に高い発現を示すことから、中枢神経系においても smg p25A GDI が他の低分子量 GTP 結合蛋白質との相互作用により細胞内膜輸送に関与している可能性が示唆された。

（文献）

1) Araki, S., Kikuchi, A., Hata, Y., Isomura, M., and Takai, Y. (1990) J. Biol. Chem. 265, 13007-13015

2) Araki, S., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Hata, Y., and Takai, Y. (1991) Mol. Cell. Biol. 11, 1438-1447

3) Farnsworth, C.C., Kawata, M., Yoshida, Y., Takai, Y., Gelb, M.H., and Glomset, J.A. (1991) Proc. Natl. Sci. USA in press

4) Matsui, Y., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Kondo, J., Teranishi, Y., and Takai, Y. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 4116-4122

5) Nonaka, H., Kaibuchi, K., Shimizu, K., Yamamoto, J., amd Takai, Y. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, 556-563

6) Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S., and Takai, Y. (1990) J. Biol. Chem. 265, 2333-2337

7) Sasaki, T., Kaibuchi, K., Kabcenell, A.K., Novick, P.J., and Takai, Y. (1991) Mol. Cell. Biol. 11, 2909-2912

8) Ueda, T., Takeyama, Y., Ohmori, T., Ohyanagi, H., Saitoh, Y., and Takai, Y. (1991) Biochemistry 30, 909-917

122

A substitution of glycine by valine at position 49 of Gsα subunit confers a differentiation potential to it in a cAMP-independent manner in PC12 cells.

Ahmed, MD. Kabir, and Shun Nakamura

Div. of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience, NCNP

[Abstract] From the comparison of primary structures of *ras* p21 protein and G-protein, it may be assumed that the homologous sequences among them may constitute functionally homologous domains especially in GTP-binding and hydrolyzing pocket of G-protein. Under this consideration we substituted glycine 49 by valine of Gsα protein, which residue is supposed to be equivalent to glycine 12 of p21. This substitution resulted in a distinct functional phenotype in Gsα. When transiently expressed in COS7 cells, Gsα(val) gave 3 fold higher basal level of cAMP than its wild type counterpart. Then we isolated stable transformants of PC12 cells expressing both of the normal and the mutated Gsα cDNA under the control of metallothionein promoter. When expression of Gsα(val) was induced by cadmium, PC12(Val) transformants differentiated. While PC12(Gly) transformants did not. Two independent PC12(Val) transformants resulted in low basal level of cAMP and failed to respond to cAMP responsive element. These results suggested that Gsα(val) activated adenylate cyclase in an agonist-independent manner in COS7 cells, by contrast, that the same protein transduced a differentiation signal through a cAMP-independent pathway in PC12 cells.

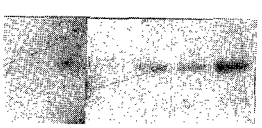
[Results and Discussions] We transiently expressed Gsα variant in COS7 cells, and measured cyclic AMP level in COS7 transfectants. COS7 cells transfected with vector alone did not show any change in the basal cAMP level. On the other hand, we observed 2 to 3 fold enhancement of cAMP level in COS7 cells transfected with Gsα(gly) and 4 to 5 fold enhancement with Gsα(val)(Table 1). Moreover, when stimulated by a β-adrenergic agonist, isoproterenol 2 to 3 fold higher cAMP accumulation was observed in Gsα(val) transfectants over its glycine counterpart. This increased cAMP level in Gsα(val) transfectants should be due to the increased activation of adenylate cyclase, because the amount of Gsα proteins expressed from plasmids was almost equal. Our results described above are in good agreement with the findings of Woon *et al.*(3).

Table 1. Activation of adenylate cyclase in COS7 transformants

Type of Transfection	Accumulated cAMP -ISP	+ISP
	(pmol/mg protein)	
pKCR	58 ± 22 (1.0)	250 ± 10 (1.0)
pKCRGsα(gly)	132 ± 40 (2.3)	490 ± 40 (2.0)
pKCRGsα(val)	255 ± 80 (4.4)	918 ± 15 (3.7)

Values are average ± SEM (n=5). Cells were treated with 1mM isobutyl methyl xanthine for 30 min and cAMP was induced with 1μM Isoproterenol (ISP) for 3 min at 37°C. Fold of relative increment of cAMP was shown in the parentheses.

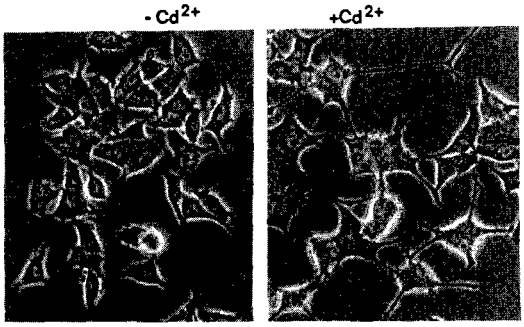
Fig. 1. Expression of Gsα gene in PC12 cells. Western blot analysis



Immunostaining was performed with a rabbit anti-Gsα antiserum developed against the C-terminal peptide sequence (RMHLRQYELL).

Next we isolated stable transformants of PC12 cells with Gsα(val), assuming that the mutated Gsα subunit may constitutively activate adenylate cyclase, and thereby transduce signal for differentiation in the cells. PC12 cells were infected with retroviral vectors that contains either Gsα(gly) or Gsα(val) genes under the control of mouse metallothionein promoter. Two independent G418 resistant clones were able to express 52 kDa Gsα protein when treated with Cd^{2+} (Fig. 1). Then these clones were subjected to a phenotypic analysis in presence of Cd^{2+}. The initiation of neurite outgrowth was observed at day 2 in Gsα(val) transformants, which neurite outgrowth was appeared to reach the maximal level at day 6 after addition of 1 mM Cd^{2+} (Fig.2).

Fig. 2. Gsα (Val) induces differentiation in PC12(Val)1 cells.



Expression of Gsα (Val) was induced by 1 μM $CdCl_2$

The basal cAMP level and cAMP accumulation induced by an agonist of adenosine receptor, N-ethylcarboxamidoadenosine were determined in PC12(Val) transformants (Table 2). These transformants responded to the agonist normally but gave lower basal level of cAMP. We further examined the activation of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene to which cAMP-response element (CRE) was linked. PC12(Val) cells were transfected with CRE-CAT and CAT activity from cell lysate was measured (Table 3). These results showed that the induced Gsα(val) did not activate CRE-CAT at all. Thus, our result suggested that a mutated form of Gsα may transduce a differentiation signal through a cAMP-independent pathway in PC12 cells.

[Materials and Methods] Site specific mutagenesis was performed by the method of Inoue *et al.* (2) using a 18 mer oligonucleotide (5'GGGTGCTGTAGAGTCTGG 3') as designed to code for valine at position 49 in the sense strand of Gsα gene. cAMP was quantitated by Amersham cAMP assay kit with cell lysates .

[References]

1. Gorman, C.M., Moffat, L.F. and Howard, B.H. (1982) *Mol. Cell. Biol.* **2**(9): 1044-1051
2. Inouye, S. and Inouye, M. (1983) *EMBO J.* **2**: 87-91.
3. Woon, C.W., Heasley, L., Osawa, S. and Johnson, G.L. (1989) *Biochemistry* **28**: 4547-4551

Table 2. Accumulation of cAMP in response to NECA in presence or absence of Cd^{2+}

	NECA			
	-*		+**	
Transformants	Cd^{2+}		Cd^{2+}	
	-	+	-	+
	cAMP (pmol/10^7cells)			
PC12	31.2 ± 4.2	31.5 ± 4.0	136	138
PC12(val)1	17.4 ± 2.5	16.7 ± 3.2	189	171
PC12(val)2	22.2 ± 3.1	24.0 ± 2.5	174	N.D.

*Average ± SEM (n=4)
**Average of two determinations
Expression of Gsα(Val) was induced by 1 μM $CdCl_2$. Accumulation of cAMP was enhanced by N-ethylcarboxamidoadenosine(NECA) in presence or absence of 1 μM $CdCl_2$.

Table 3. Activation of CRE and SRE elements in response to agonists and Cd^{2+} in PC12(Val) cells.

	CRECAT	SRECAT
	% conversion	
NECA	0.18 (9)	-
FSK	0.38 (19)	-
Cd^{2+}	0.02 (1)	0.01 (1)
NGF	-	0.14 (14)
None	0.02 (1)	0.01 (1)

PC12(Val)1 transformant was transiently transfected with eucaryotic expression plasmid bearing CAT gene under the control of CRE or SRE element. At 34 h after transfection, 1mM N-ethylcarboxamidoadenosine(NECA), 1 μM forskolin, 1 μM $CdCl_2$, and 50 ng/ml NGF were added. Cells were harvested at 48 h. Cell lysates were prepared and CAT activities were assayed by the method of Gorman *et al.* (1).

123 モルヒネ及びエタノール感受性1本鎖cAMP response element（CRE）結合蛋白質（sCRE－BP）の性質と精製

大杉　武、池本光志、田中秀和、谷浦秀夫、三木直正
（大阪大・医・第一薬理）

〔要約〕

モルヒネ及びエタノールの慢性投与により変化する1本鎖DNA結合蛋白質の精製及び性質を検討した。NG108-15神経細胞より核分画を調製し、0.5 M NaCl抽出画分を陰イオン交換カラム(Q-セファロース)、ゲルろ過カラム(セファクリル S-300)、DNAアフィニティカラムを用いて精製した。このDNA結合蛋白質は約50 KDaで、ソマトスタチン遺伝子のプロモーター領域のcAMP response element(CRE)に特異的に結合した。この蛋白質はゲルろ過によって、約110-130 KDaの分画に溶出され、二量体か三量体を形成していると推定された。2本鎖CRE結合蛋白質と異なり、熱処理(65° C、10分)でDNA結合能が失活した。この蛋白質の遺伝子発現への作用を調べる目的で、CREを含むクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)プラスミドをNG108-15細胞に導入し、CAT活性を測定した。モルヒネの長期処理によりCAT活性は減少した。以上より、この蛋白質は新しいCRE結合蛋白質で薬物耐性・依存に深く関与している可能性が示唆された。

[緒言]

モルヒネやエタノールは薬物耐性・依存を生じるが、その機構に関しては不明な点が多い。我々は既に、ソマトスタチン遺伝子のプロモーター領域のCREを含むオリゴDNAをプローブとしてゲルシフト法を行い、NG108-15細胞の核抽出液中にモルヒネ、エタノールの長期処理により変化するDNA結合蛋白質が存在することを報告した。この蛋白質はこれまでに報告されたCRE結合蛋白質とは異なり、1本鎖のCREに特異的に結合する。今回、この1本鎖CRE結合蛋白質(sCRE-BP)の精製及び性質を検討した。

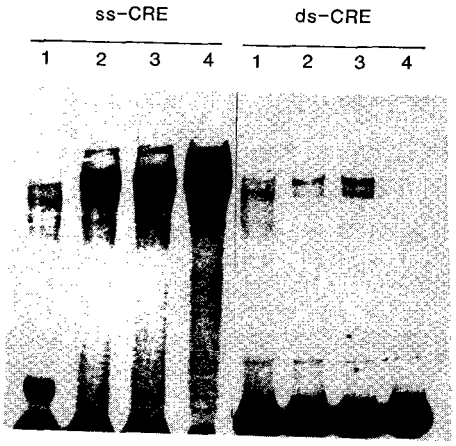
[実験方法]

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。　核抽出液: Dignamらの方法(1)に従って、核蛋白質抽出液を得た。　ゲルシフト法: ソマトスタチン遺伝子のCREを含むオリゴDNAを用いて、既報(2)に準じて行った。　sCRE-BPの精製: 核抽出画分を陰イオン交換カラム(Q-セファロース)、ゲルろ過カラム(セファクリル S-300)を用いて活性分画を得た。2本鎖CREアフィニティカラムを調製し(3)、熱処理によって1本鎖CREにした。このDNAアフィニティカラムを用いてさらに精製した。　UV-クロスリンク法: 核抽出液とオリゴDNAを反応後、紫外線(305 nm)を1時間照射して、蛋白質とDNAを共有結合させた後、SDS-PAGEにより分子サイズを測定した。　CATアッセイ: CAT遺伝子を持つプラスミドにCREを挿入し、リン酸カルシウム法を用いてNG108-15細胞に導入した。[^{14}C]クロラムフェニコールを基質としてCAT活性を測定した(4)。

[結果及び考察]

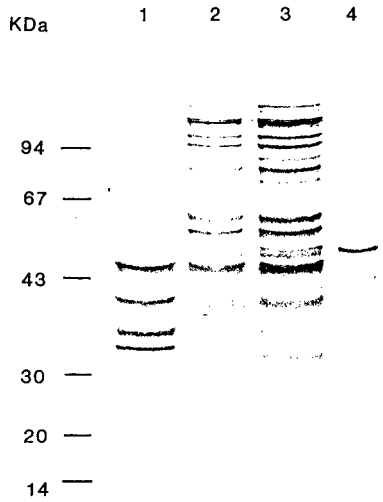
陰イオン交換及びゲルろ過カラムにおいて、1本鎖CREに結合活性を示す分画には2本鎖CRE結合蛋白質が含まれるが、1本鎖CREアフィニティカラムを用いることにより1本鎖CRE結合蛋白質(sCRE-BP)を分離した(図　1)。SDS-PAGEから、このsCRE-BPは約50 KDaと算定された(図　2)。この蛋白質はゲルろ過によって約110-130 KDaの分画に溶出され、二量体か三量体を形成していると思われる。核抽出液と1本鎖CREをインキュベート後、UV-クロスリンク

法とSDS-PAGEより、約50 KDaのsCRE-BPのバンドを検出した。モルヒネ、エタノール長期処理により、このバンドは減少した。sCRE-BPは熱処理(65° C、10分)によりDNA結合活性が減少した。sCRE-BPの転写活性に対する作用を調べる目的でCATアッセイを行った。CREを含むCATプラスミドをNG108-15細胞に導入後、モルヒネ(50 μM)あるいはフォルスコリン(10 μM)を加えて2日間培養した。対照群に比べフォルスコリン処理群ではCAT活性が増し、モルヒネ処理群では減少した(図 3)。現在、CRE結合蛋白質は数種類報告されているが、これらの蛋白質は2本鎖CREを認識すること、また、熱処理によってあまり結合活性が減少しないことから、sCRE-BPは新しいCRE結合蛋白質であると思われる。この蛋白質の機能はまだ不明であるが、モルヒネ長期処理により、DNA結合能とCAT活性が減弱することから、他のCRE結合蛋白質と隣接してDNAに結合するか、他の蛋白質とダイマー形成して、転写を活性化する因子である可能性が示唆された。



1: Crude extract
2: Q-Sepharose
3: Sephacryl S-300
4: DNA affinity column

図1. 各精製段階におけるゲルシフトアッセイ



1: Crude extract
2: Q-Sepharose
3: Sephacryl S-300
4: DNA affinity column

図2. 各精製段階におけるSDS-PAGE

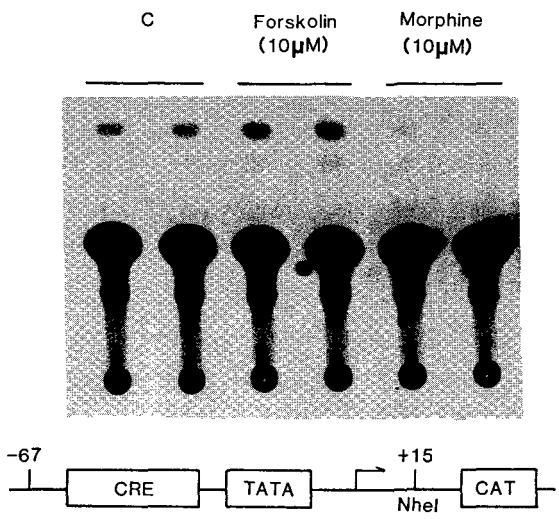


図3. CAT活性に対するモルヒネとフォルスコリンの作用

[文献]

1) Dignam, J.D. et al., (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1475-1489

2) Osugi, T. et al., (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, 25-31

3) Kadonaga, J.T. et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5889-5893

4) Yamamoto, K.K. et al., (1988) Nature 334, 494-498

5) Maekawa, T. et al., (1989) EMBO J. 8, 2023-2028

124 大脳皮質内 c-fos mRNA発現に及ぼす生理的食塩水単回および反復投与刺激の影響

浅沼幹人[1)]*, 小川紀雄[1)], 平田 洋[1,2)], 羽場久美子[1)], 周 希誠1), 田中健一1), 森 昭胤[1)]
(岡山大医・脳代謝研・機能生化[1)], 第三内科[2)])

〔要約〕
生理的食塩水(saline)皮下単回投与(1.2 ml/kg)による前頭皮質内 c-fos mRNAの発現と、それに及ぼすsaline反復前投与(1.2 ml/kg/day for 7 days)の影響について、Northern blot analysisを用いて検討した。単回刺激では投与後30分でc-fos mRNAは対照群の約5倍にまで増加したが、投与2時間後には対照レベルにまで復していた。反復前投与のみのＲＣ群は最終投与後25時間経過しているにもかかわらず、 c-fos発現量は無処置対照のＣＣ群に比して有意に増加していたが、単回投与のみのＣＳ群での増加に比して軽度であった。また反復前投与＋当日投与したＲＳ群では反復前投与のみのＲＣ群に比して有意に c-fos mRNA発現は増加しており、4群の内で最も多く発現していた。しかし、ＣＳ,ＲＳ群のそれぞれＣＣ,ＲＣ群に対するc-fos mRNAの発現増加量 (ＣＳ－ＣＣおよびＲＳ－ＲＣ)には有意差は認められなかった。したがって、saline反復前投与は単回投与後のc-fos mRNA発現量を増大させるが、これは単回投与後のc-fos mRNA発現の増加幅を増加させることによるのではなく、c-fos mRNAの基礎値を増加させることによると考えられる。

［目的］ c-fosは細胞性癌遺伝子のひとつとして同定されたものであるが、c-fosおよびその発現産物であるFos蛋白は、通常細胞の分化,増殖や正常機能に関係した情報を細胞内second messenger系から核内の種々の遺伝子に伝達するthird messenger あるいはtrigger geneとしての役割を果たしている。中枢神経細胞においても様々な刺激・ストレスによりc-fosは急速に発現することが報告されている(2-6)。c-fosは他の細胞性癌遺伝子のひとつであるc-junとともに、刺激直後から発現し(early immediate gene)、Fos蛋白はJun蛋白と複合体AP-1を形成し、核内転写制御因子として他の種々の遺伝子の転写制御をおこなっていると考えられている(7)。このc-fos遺伝子は刺激後数十分以内に急速にしかも一過性に発現するが、従来の報告では単回刺激後のc-fos発現についてのみであった(2-6)。そこで今回我々は、生理的食塩水(saline)皮下単回投与による前頭皮質内c-fos mRNAの発現と、それに及ぼすsaline反復前投与の影響について、Northern blot analysisを用いて検討した。

［方法］ 8週齢の雄性Sprague-Dawley系ラット(BW 280-290g)を用い、処置時以外は刺激を与えず静穏な環境下に置いた。saline刺激によるc-fos mRNA発現の時間経過をみるために、saline (1.2 ml/kg)をラット背部皮下に単回投与し、投与0.5, 1, 2時間後にすみやかに断頭屠殺した。一方、salineの反復前投与のc-fos mRNA発現に及ぼす影響を検討するために、ラットを以下の4群に分けた。①無前処置・無投与対照(ＣＣ)群：他群と同時に断頭屠殺 、 ②無前処置・saline単回投与(ＣＳ)群：saline (1.2 ml/kg, s.c.)単回投与1時間後に屠殺、③saline反復前投与・当日無投与(ＲＣ)群：saline (1.2 ml/kg/day, s.c. at 9:00)連日7日間投与し 、25時間後に屠殺、④saline反復前投与＋当日投与(ＲＳ)群：saline (1.2 ml/kg/day s.c. at 9:00)連日8日間投与し、1時間後に屠

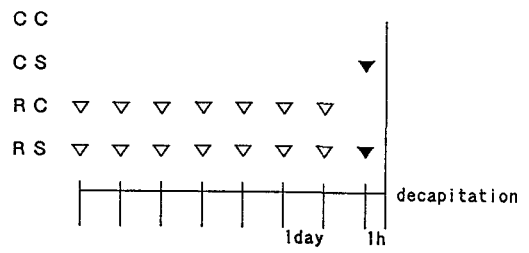


Fig. 1 Procedure of the pretreatment
▽,▼ indicate the saline (1.2 ml/kg s.c.) administration

殺。 Northern hybrdizationは既報に基づき行った(5)。すなわち屠殺後すみやかに前頭皮質を取り出し、total RNAをChromczynskiらの方法(1)により抽出した。Northern blot analysisでは、total RNA (15 μg/lane)を6.7% paraform-aldehydeで変性させ、1% agarose gelで電気泳動し、nylon membraneにblotし固定した。一方dot blot analysisでは、total RNAを段階希釈し(10 μg, 2 μg, 0.4 μg)、同様に変性させ直接membraneにblotし固定した。 これらのmembraneは、prehybridizationの後に、multiprime labeling法を用いて[^{32}P]dCTPで標識したv-fos probe (1 kb; fragment of FBJ-MSV proviral DNA)とともに24時間hybridizeさせ、washの後4日間のautoradiographyに供した。

[結果および考察] Northern blot analysisでは、saline単回投与刺激により前頭皮質 c-fos mRNAの発現が認められた (Fig. 2左)。 単回刺激では投与後30分でc-fos mRNAは対照群の約5倍にまで増加したが、投与2時間後には対照レベルにまで復していた (Fig. 2右)。このc-fos mRNAの発現は、既報の種々の刺激に対するc-fos mRNA発現と同様に刺激後30分以内の急速でしかも一過性の発現であり、saline皮下投与という軽微な刺激でもc-fos mRNAは発現されうることが明らかになった。さらにsaline反復前投与のc-fos mRNAの発現に及ぼす影響について検討した (Fig. 3)。反復前投与のみのＲＣ群は最終投与後25時間経過しているにもかかわらず、c-fos 発現量は対照のＣＣ群に比して有意に増加していた。この増加は単回投与のみのＣＳ群での増加よりは軽微であった。つまりc-fos mRNA発現量は単回投与では投与約2時間後に対照レベルまで回復するが、反復前投与を行うことにより対照群レベル以上に維持されることを示している。また反復前投与・当日投与したＲＳ群では反復前投与のみのＲＣ群に比して有意にc-fos mRNA発現は増加しており、4群の内で最も多く発現していた。しかし、ＣＳ，ＲＳ群のそれぞれＣＣ，ＲＣ群に対するc-fos mRNAの発現増加量（ＣＳ－ＣＣおよびＲＳ－ＲＣ）には有意差は認められなかった。したがって、saline反復前投与は単回投与後のc-fos mRNA発現量を増大させるが、これは単回投与後のc-fos mRNA発現の増加幅を増加させることによるのではなく、c-fos mRNAの基礎値を増加させることによると考えられる。

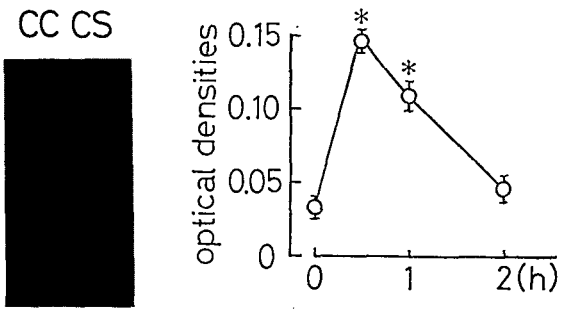


Fig. 2 Northern blot analysis and time course of c-fos mRNA induction in the rat frontal cortex. (*p<0.01 one-way ANOVA)

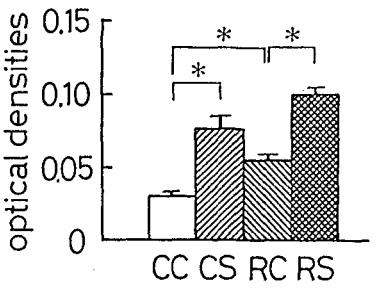


Fig. 3 Effects of repeated saline administration on c-fos mRNA. (*p<0.01 one-way ANOVA)

[文献]

1. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem., 162, 156-159
2. Morgan, J. et al. (1987) Science, 237, 192-197
3. Nakajima, T. et al. (1989) Epilepsy Res., 4, 156-159
4. Nakajima, T. et al. (1989) Brain Res., 501, 307-314
5. Onodera, H. et al. (1989) Neurosci. Lett., 98, 101-104
6. Miller, J. C. (1990) J. Neurochem., 54, 1453-1455
7. Chiu, R. et al. (1988) Cell, 54, 541-552

125 ラット脳におけるコレシストキニンのc－fos mRNA発現に及ぼす影響

三好理絵，鬼頭昭三*，野本照子
（東京女子医科大学薬理学教室，放送大学*）

〔要約〕
種々の成長因子や他の細胞刺激が、原癌遺伝子の発現を生じ、これが細胞の長期応答につながることが示唆されている（1，2）。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－8のアナログであるセルレインは、臨床神経学の分野で長期的な薬理作用をもたらすことが知られている。そこで本研究では、ラット脳における細胞性癌遺伝子c-fosの発現に及ぼすセルレインの作用をin situ hybridizationにより検討した。セルレインはbasalの状態でのc-fos mRNAを変化させなかった。しかし、海馬や大脳皮質での、中枢興奮薬ペンチレンテトラゾール（PTZ）によるc-fos mRNAの増加をセルレインは抑制した。c-fos遺伝子は、抑制性の方向へも調節を受けることが知られているため、CCK受容体の活性化は、この機序に連関することが示唆される。

〔目的〕
近年、c-fosやc-junなどの原癌遺伝子が神経系の情報伝達に関与していることが示唆されている（1，2）。中枢神経細胞においては、けいれんや長期増強などの際に原癌遺伝子の発現が活性化されることが認められている（3，4）。原癌遺伝子発現の変化は、他の遺伝子の転写を制御し、神経の可塑性や発生といった長期的な機能変化につながると考えられている。c-fosの発現は、促進性と抑制性の因子によって調節されていることが証明されている（5）が、生理的な応答に対するc-fos発現の抑制効果については報告がない。CCKは食欲制御などの神経機能に関与している脳腸管ペプチドである。臨床神経学の分野で、CCKは不随意運動の治療に用いられるが、その改善効果は血中半減期から予想されるより長く持続することが知られている。脳におけるCCK受容体の細胞内応答として、イノシトールリン脂質代謝亢進が知られており（6）、我々の以前の実験でもラット線条体で細胞内カルシウムイオン濃度上昇が認められている（7）。今回、CCKの長期的な細胞応答を知る目的で、ラット脳でのc-fos mRNA発現に対するCCKの影響を検討した。

〔方法〕
ラットc-fos遺伝子のオリゴヌクレオチドプローブを^{35}S-dCTPにより末端標識した。実験にはWistar系オスラット（体重250-350 g）を用いた。CCK－8のより安定なアナログであるセルレイン（400 μg/kg）を腹腔内投与した。一部の動物においては、セルレインを前処置した後、PTZ（50mg/kg）を腹腔内注射しけいれんを誘発させた。動物はペントバルビタール麻酔下に4％パラフォルムアルデヒドで灌流固定した。前頭断のミクロトーム切片を用いて、in situ hybridizationを行なった。

〔成績〕
c-fos mRNAの脳内分布を図1に示す。basal状態でのc-fos発現はきわめて低濃度であった。セルレイン投与30、60、90分後、c-fosの発現は変化しなかった。PTZ投与は、海馬や大脳皮質でc-fos発現を活性化することが報告されている（8）。我々の実験でも、PTZ投与60分後に梨状葉、海馬、大脳皮質でc-fos mRNAの著明な増加が見られた。海馬では、錐体細胞層と歯状回顆粒細胞層に観察された。PTZ投与の30、60、90分前に、セルレインを前処置すると海馬及び大脳皮質でのc-fos mRNAの増加が抑制された。梨状葉でのc-fos mRNAは、セルレインにより変化しなかった。セルレインによるc-fos mRNAの増加の抑制は60分前投与が最も効果が大きく、90分前投与では弱くなった。

〔考察〕
c-fosはimmediate early geneと呼ばれる一群の遺伝子に含まれ、その生成産物はJunとdimerを形成し、target遺伝子の転写を調節すると考えられている。全身投与したセルレインがc-fos mRNAを変化させたことは、このペプチドが

遺伝子発現を調節することにより長期的な応答を神経細胞に起こすことを示唆する。c-fos遺伝子はcalcium responsive elementとcAMP responsive elementを持ち、その発現は細胞内のカルシウムイオンとcAMPによって制御されることがわかっている。ＣＣＫは細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることが認められているにもかかわらず、basalの状態でのc-fos活性には変化を与えず、ＰＴＺによるc-fos mRNAの増加を抑制する方向に働くことは興味深い。c-fos遺伝子は、促進性と抑制性のtrans acting factorによる調節を受けていることが認められている。ＣＣＫ受容体の活性化は、c-fosの発現を抑制する細胞内応答に連関していると考えられる。

［文献］

1. Morgan, J.I., and Curran, T. (1989) Trend Neurosci. 12, 459-462
2. Sheng, M., and Greenberg, M.E. (1990) Neuron 4, 477-485
3. Dave, J.R., Tabakoff, B., and Hoffman, P.L. (1990) Mol. Pharmacol. 37, 367-371
4. Cole, A.J., Saffen, D.W., Baraban, J.M., and Worley, P.F. (1989) Nature 340, 474-476
5. Sassone-Corsi, P., and Verma, I.M. (1987) Nature 326, 507-510
6. Moriarty, T.M., Gillo, B., Sealfon, S., Roberts, J.L., Blitzer, R.D., and Landau, E.M. (1988) Mol. Brain Res. 4, 75-79
7. Miyoshi, R., Kito, S., and Nomoto, T. (1991) Neuropeptides 18, 115-119
8. Saffen, D.W., Cole, A.J., Worley, P.F., Christy, B.A., Ryder, K., and Baraban, J.M. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 7795-7799

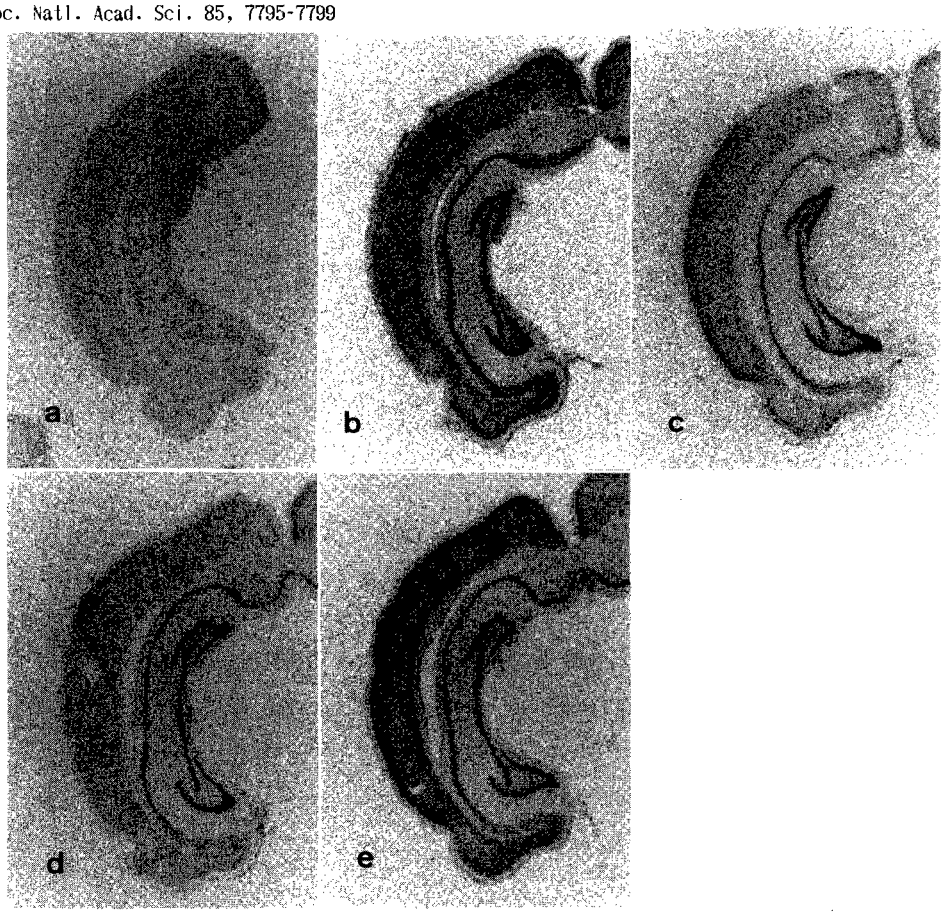


図1　ラット脳におけるc-fos mRNAの分布　ａ：コントロール（生理食塩水投与）．ｂ：ＰＴＺ投与６０分後．ｃ：ＰＴＺ３０分前にセルレイン投与．ｄ：ＰＴＺ６０分前にセルレイン投与．ｅ：ＰＴＺ９０分前にセルレイン投与．

126 カルモデュリン依存性プロテインキナーゼＩＩによるｃ－ｆｏｓ遺伝子の転写調節

大迫俊二、山内卓
（東京都神経研、遺伝学）

〔要約〕

ＰＣ１２細胞を脱分極刺激すると細胞内へのＣａ$^{2+}$流入に伴いｃ－ｆｏｓ遺伝子の転写が活性化される。Ｃａ$^{2+}$によるｃ－ｆｏｓ遺伝子転写調節における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）の役割を調べるためにマウスのｃ－ｆｏｓ遺伝子の5’転写調節領域をクロラムフェニコール・アセチルトランスフェレース（ＣＡＴ）に繋ぎレポーター遺伝子とし、キナーゼＩＩのαサブユニットｃＤＮＡあるいはその変異ｃＤＮＡ発現ベクターとともにＰＣ１２細胞にトランスフェクトしＣＡＴ活性を測定した。その結果、キナーゼＩＩのαサブユニットｃＤＮＡを発現させたものは、コントロールと同様にＣＡＴ活性に影響を与えないのに対し、プロテインキナーゼドメインのみを持ち恒常的に活性化されたα－ＩによってＣＡＴ活性の上昇が観察された。このことはＣａ$^{2+}$によるｃ－ｆｏｓ遺伝子の転写の活性化にキナーゼＩＩが関与することを示す。

神経系における遺伝子発現調節は、情報の伝達と可塑性を考える上で重要な働きをするものと考えられる。Immediate early response genes (IEGs) と呼ばれる一群の遺伝子はＤＮＡ結合タンパク質であり、外界の刺激に応答しLate response genesの転写調節を行うものと考えられる。IEGsのなかでもｃ－ｆｏｓ遺伝子の転写調節については最も解析が進んでおり複数のシス・エレメントおよびトランス因子が同定されている（1）。最近、ＰＣ１２細胞において、脱分極刺激による細胞内へのＣａ$^{2+}$流入に伴うｃ－ｆｏｓの転写活性化はＣＲＥ(cyclic AMP responsive element)とＣＲＥＢ(CRE binding protein)のリン酸化を介することが示唆され、このリン酸化はカルモデュリン依存性プロテインキナーゼによる可能性が考えられている（1－3）。我々は、これまで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について解析しており（4－7）、ｃ－ｆｏｓの転写活性化にもキナーゼＩＩが関与する可能性を考え、キナーゼＩＩのαサブユニットｃＤＮＡおよび恒常的に活性化されたキナーゼＩＩ（α－Ｉ）ｃＤＮＡ発現ベクターを用いてｃ－ｆｏｓ転写活性に及ぼす効果を検討した。

（実験方法）

マウスｃ－ｆｏｓ遺伝子の5’領域のSacI-AccI (約1.1 kb) もしくはＣＲＥのみを含むHincII-AccI (約0.2 kb) ＤＮＡフラグメントをクロラムフェニコール・アセチルトランスフェレース（ＣＡＴ）遺伝子と結合させてレポーター遺伝子（ｃ－ｆｏｓ／ＣＡＴ）とした（図1）。マウスｃ－ｆｏｓ遺伝子（ｐＭＳ１）は東北大学医学部、小野哲也先生から供与して頂いた。キナーゼＩＩのαおよびα－ＩｃＤＮＡ（4、5）をヒトのelongation factor遺伝子のプロモーターを持つｐＥＦ３２１発現ベクターに組み込み、レポーター遺伝子とともにＰＣ１２細胞にリン酸カルシウム法（8）によりにトランスフェクトし、一過性に発現するＣＡＴ活性を常法にしたがって測定した（9）。キナーゼＩＩの活性測定およびイミュノブロットは常法に従って行った（4）。

（実験結果と考察）

ＰＣ１２細胞を高カリウム刺激すると細胞内へのＣａ$^{2+}$流入に伴い、ｃ－ｆｏｓの転写活性化が起こり、この反応に必要なｃ－ｆｏｓ遺伝子のシス・エレメントはＣａＲＥ(Ca^{2+} responsive element)と呼ばれＣＲＥと同じと考えられているが（1、3）、マウスのｃ－ｆｏｓ遺伝子についてもＣａＲＥ／ＣＲＥのみを含むＨｉｎｃＩＩ－ＡｃｃＩフラグメントについても同様の結果が得られたので、Ｃａ$^{2+}$によるｃ－ｆｏｓ遺伝子の転写活性化はＣａＲＥ／ＣＲＥを介するものと考えられる。キ

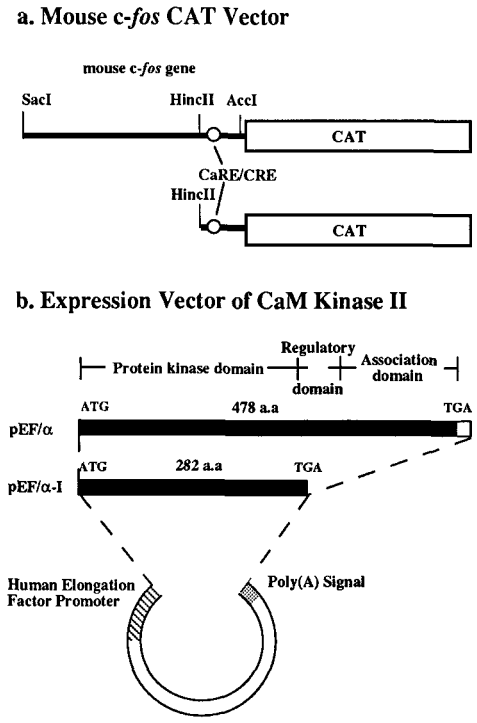


図1．ｃ－ｆｏｓ／ＣＡＴベクターと
キナーゼＩＩ発現ベクター

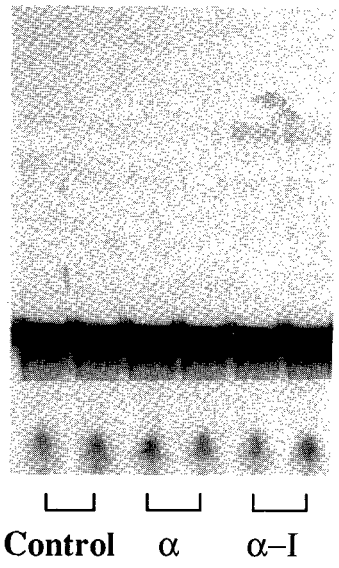


図2．α－ＩによるＣＡＴ活性の上昇

ナーゼＩＩのαサブユニットおよびα－ＩｃＤＮＡはＰＣ１２細胞において一過性に発現することがキナーゼＩＩ活性とイミュノブロットによって明らかになった。αサブユニットは活性にCa^{2+}／カルモデュリンを必要とするのに対し、α－Ｉは活性にCa^{2+}を必要とせず、恒常的に活性化されていた。そこで、Ca^{2+}によるｃ－ｆｏｓ遺伝子の転写活性化にキナーゼＩＩが関与する可能性を直接調べるために、ｃ－ｆｏｓ／ＣＡＴベクターをキナーゼＩＩのｃＤＮＡとともにＰＣ１２細胞にトランスフェクトしＣＡＴ活性を調べた。図２に示すように、αサブユニットｃＤＮＡによってはＣＡＴ活性は影響されなかったが、α－ＩｃＤＮＡによってＣＡＴ活性の増加が観察された。この結果は、Ca^{2+}によるｃ－ｆｏｓの転写活性化にキナーゼＩＩの活性化が関与することを示す。

現在、キナーゼＩＩに特異的阻害ペプチドを発現させ、Ca^{2+}によるｃ－ｆｏｓの転写活性化が抑制されるかどうかについても検討中である。また、Ca^{2+}によるｃ－ｆｏｓの転写活性化の為に必要と考えられる核への信号伝達に関するメカニズムについても検討している。

（文献）

1. Sheng, M. and Greenberg, M. E. (1990) Neuron 4, 477-485.
2. Sheng, M., Dougan, S. T., McFadden, G. and Greenberg, M. E. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 2787-2796.
3. Sheng, M., McFadden, G. and Greenberg, M. E. (1990) Neuron 4, 571-582.
4. Yamauchi, T., Ohsako, S. and Deguchi, T. (1989) J. Biol. Chem. 264, 19108-19116.
5. Ohsako, S., Watanabe, A., Sekihara, S., Ikai, A. and Yamauchi, T. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 705-712.
6. Ohsako, S., Nakazawa, H., Sekihara, S., Ikai, A. and Yamauchi, T. (1991) J. Biochem. 109, 137-143.
7. Hagiwara, T., Ohsako, S. and Yamauchi, T. (1991) J. Biol. Chem. in press.
8. Huynh, T. V., Young, R. A. and Davis, R. W. (1985) in DNA Cloning: A Practical Approach (Glover, D. M., ed) Vol. 1, pp89-121, IRL Press, Oxford.
9. Gorman, C. M., Moffat, L. F. and Howard, B. H. (1982) Mol. Cell. Biol. 2, 1044-1051.

127 カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡの構造

山内　卓、杉浦弘子、金関　憲、池内容子
（東京都神経科学総合研究所・遺伝学）

〔要約〕
Ca^{2+}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）の立体構造を明らかにするために電子顕微鏡でキナーゼⅡの構造を解析した。ラット大脳と小脳から精製したキナーゼⅡをHeuserの開発した急速凍結による雲母上でのレプリカ法で分析した。キナーゼⅡの分子は”花”の様な構造をとり中心部に１個の大きな中心顆粒を持ち、周囲に小さな周辺顆粒をもつ極めて特徴的な構造を示す。キナーゼⅡは周辺顆粒の数が10個のものと、8個のものの２グループに分けられる。キナーゼⅡとモノクローナル抗体およびカルモデュリンとの結合実験からキナーゼⅡの周辺顆粒にはプロテインキナーゼドメインと調節ドメインが存在し、中心顆粒はαまたはβサブユニットがそれぞれ10個あるいは8個集合したものであることが明かとなった。

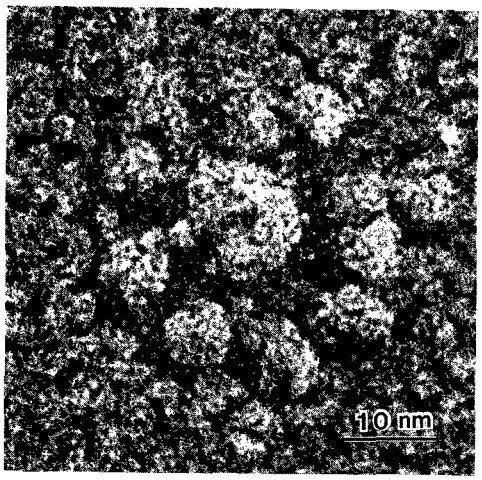
キナーゼⅡは脳神経系において高い活性を示し、特に海馬では全蛋白質の2%にもおよぶと報告されている。この酵素は神経伝達物質の生合成酵素をはじめ多くの機能蛋白質のリン酸化を触媒し、神経機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられている[1)]。ラット大脳から精製したキナーゼⅡはαおよびβサブユニットから構成されている。αおよびβサブユニットの１次構造はcDNAの構造より明かとなり、αは478アミノ酸(54kDa)、βは542アミノ酸(60kDa)からできている[2,3)]。各サブユニットはプロテインキナーゼ・ドメイン、調節ドメインおよび会合ドメインの３つの機能ドメインから構成される。cDNAの発現実験によりαおよびβサブユニットはそれぞれ単独でも酵素活性を持つことが明かとなった[4)]。しかしキナーゼⅡを構成するサブユニットの数、αとβサブユニットの比率、あるいは立体構造についてはほとんど明らかにされていない。この点を調べるため電子顕微鏡でキナーゼⅡの構造を解析した。

「実験方法」

キナーゼⅡの電子顕微鏡写真は Heuser によって開発された急速凍結・雲母法[5)]によって調製した。キナーゼⅡはラット大脳および小脳より精製した。キナーゼⅡαサブユニットのプロテインキナーゼ・ドメインを 特異的に認識するモノクローナル抗体はマウス・ミエローマ細胞で調製した[6)]。

「実験結果と考察」

ラット大脳と小脳から精製したキナーゼⅡをHeuserの開発した急速凍結による雲母上でのレプリカ法で分析した。キナーゼⅡの分子は”花”の様な構造をとり中心部に１個の大きな中心顆粒を持ち、周囲に小さな周辺顆粒をもつ極めて特徴的な構造を示す。キナーゼⅡは周辺顆粒の数が10個のものと、8個のものの２グループに分けられる。大脳キナーゼⅡの多くは10個の周辺顆粒を持ち、その典型的な電子顕微鏡像を図１に示す。分子全体の外径は8個周辺顆粒のものは約32nmであり、10個のものは34nmである。この大きさは分子量 500-600 kDa のキナーゼⅡ分子に対応する。中心顆粒の直径は10nm、周辺顆粒の直径は6-7nmである。周辺顆粒は約3-5nmの長さの細い繊維様の構造で中心顆粒とつながっている。この細い繊維は約10アミノ酸から成る伸びた１本のペプチド鎖に対応すると考えられる。周辺顆粒を10個もつ分子と8個もつ分子の存在比は大脳では3.2:1であり小脳では逆に 1:2.6 である。この比は電気泳動で分離しコマジー染色した大脳と小脳のキナーゼⅡのαおよびβサブユニットの存在比とよく一致する。一方、αサブユニットと特異的に反応するモノクローナル抗体は周辺顆粒が10個の分子とのみ反応し、8個の分子とは反応しなかった。これらの結果は、周辺顆粒10個の分子はαサブユニット10個から構成されるホモポリマーであり、8個の分子はβサブユニット8個から構成される



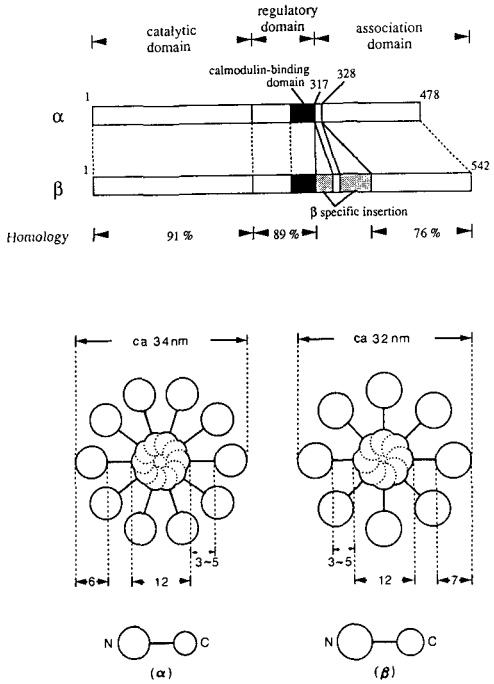


図1（上）。10個周辺顆粒を持つ大脳キナーゼII

図2（右）。キナーゼIIの構造モデル

ホモポリマーであることを示している。また、このモノクローナル抗体はαサブユニットのプロテインキナーゼ・ドメインと反応することが分かっている特異抗体であり、周辺顆粒とのみ反応し中心顆粒とは全く反応しなかった。カルモデュリンも周辺顆粒とのみ結合し、中心顆粒とは結合しなかった。これらの結果から、周辺顆粒にはプロテインキナーゼ・ドメインと調節ドメインが存在し、中心顆粒はαまたはβサブユニットがそれぞれ10個あるいは8個集合したものであることが明かとなった。10個周辺顆粒を持つαサブユニットのホモポリマーを Type α、8個周辺顆粒を持つβサブユニットのホモポリマーを Type β と名付けた。それらの構造を模式的に示すと図2のようである[7]。

これまで使用されてきた酵素の精製法ではキナーゼIIのαおよびβサブユニットが分離されないことからキナーゼIIは2種のサブユニットから成るヘテロポリマーと考えられていた。しかし、cDNAの発現実験からαおよびβサブユニットは単独でもキナーゼII活性を持つことが示され、ホモポリマー構造をとる可能性が示唆されていた。これまでにキナーゼIIのαおよびβサブユニットの構成比が個体の発達過程や脳の存在部位によって変化し、それにともなう酵素の性質と構造の変化が明かでなかったが、それはキナーゼIIのTypeαおよびTypeβの存在量の違いと説明する事ができる。αおよびβサブユニットの構成比の異なる大脳と小脳のキナーゼIIの比較、あるいはcDNAの発現実験により Type α と Type β の間に酵素学的性質の違いが見出されているので Type α と Type β の神経系における役割が注目される。

「文　献」

1. Yamauchi, T., Fujisawa, H. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 15-21
2. Bennett, M. K., 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. Heuser, J. E. (1983) J. Mol. Biol. 169, 155-195
6. Ohsako, S., et. al. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 705-712
7. Kanaseki, T., et al. (1991) J. Cell Biol. in press

128 神経特異的１４ｋＤａタンパク質はチロシンキナーゼの基質である

中条茂男、塚田和彦、古山泰雄、中村泰治、中谷一泰
（昭和大学・薬学部・生物化学）

〔要約〕

我々が見いだした神経細胞に特異的に存在する、分子量14,000のタンパク質(1)がtyrosine kinase の基質であることを明らかにし、phosphoneuroprotein 14 (PNP 14)と命名した。ラット大脳を用いてendogenous リン酸化反応を行った結果、PNP 14はin vitro、およびin vivoでリン酸化された。さらに、in vitroリン酸化反応で、EGF-受容体、および$p60^{v\text{-}src}$は牛脳から精製したPNP 14のtyrosine 残基をリン酸化したが、A-kinase、C-kinase、casein kinases 1 および2などのSer-、Thr-kinaseはリン酸化しなかった。以上の結果は、PNP 14が神経系において、tyrosine リン酸化反応を介して、その機能が制御されている可能性が考えられる。

PNP 14は、神経細胞に特異的に存在していることから、神経系において何らかの機能を発現しているものと考えられているが、これまでその機能については不明である。タンパク質リン酸化反応は神経系において、化学伝達物質の放出や受容体刺激後のsignal transduction pathway において重要な役割を演じていると考えられている。本実験では、PNP 14がリン酸化反応に関与しているかどうかを調べる目的で行った。

［方法］

PNP 14 の精製は牛大脳から前報(1)に従って行った。in vitroリン酸化反応は、ラット大脳からcytosol および particulate 画分を調製し、［γ-^{32}P］ATP存在下、30° C、20 分間 incubate して行った。in vivo リン酸化反応は、ラット第三脳室に150 μCi ［^{32}P］orthophosphate を投与し、2 時間反応を行った後、cytosolを調製した。in vivo、in vitro リン酸化反応後、免疫沈降法とSDS-PAGE を用いてリン酸化されたPNP 14を分離した。また、リン酸化アミノ酸はSDS-PAGE後、gelからPNP 14を抽出し、cellulose 薄層プレートを用いてelectrophoresis、およびchromatographyによる二次元マップにより解析した。EGF-受容体はA 431 細胞から既報(2)に従って精製した。$p60^{v\text{-}src}$ は抗$p60^{v\text{-}src}$モノクローナル抗体とProtein G-Sepharoseを用いて、SR-3Y1細胞から調製した。

［結果］

ラット大脳から調製したcytosol、およびparticulateに［γ-^{32}P］ATPを加えてin vitroでendogenousリン酸化反応を行った結果、両画分に含まれるPNP 14への^{32}Pの取り込みが認められ、PNP 14がprotein kinase の基質であることが明らかになった（図１）。さらに、in vivoでもリン酸化されるかどうかを検討したところ、in vitro同様リン酸化された（図２）。そこで、このリン酸化反応を触媒する酵素を明らかにするため、種々の精製酵素標品を用いてin vitroでリン酸化反応を行った。Ser-、Thr-kinaseとしてA-kinase、C-kinase、casein kinases 1、および2を、またtyrosine kinase としてEGF-受容体、$p60^{v\text{-}src}$を用いた。その結果、PNP 14はtyrosine kinaseによってリン酸化され（図３Ａ、４Ｂ）、そのリン酸化アミノ酸はいずれもtyrosineであった（図３Ｂ、４Ｂ）。一方、Ser-、Thr-kinaseによるリン酸化は全く認められなかった。

［考察］

PNP 14が*in vivo*でリン酸化されること、また*in vitro*、［γ-^{32}P］ATP存在下でendogenous にリン酸化されることから、PNP 14がprotein kinase の生理的基質であることを明らかにした。さらに、このリン酸化反応はin vit-

roの結果からtyrosine kinase により触媒されるものと考えられる。リン酸化酵素としては受容体型(EGF-受容体)、および非受容体型($p60^{v-src}$)tyrosine kinaseの両者によりリン酸化されることから、神経系のsignal transduction pathwayにおいて、tyrosine phosphorylationを介してPNP 14の機能が制御されている可能性が高い。

[文献]

1. Nakajo, S. et al., (1990) J. Neurochem. 55, 2031-2038.
2. Nishibe, S., et al., (1989) J. Biol. Chem. 264, 10335-10338.

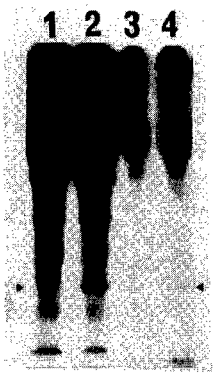


図1. PNP 14 のin vitro、endogenous phosphorylation
ラット大脳からcytosol(lanes 1、2)、particulate(lanes 3、4)を調製し、[γ-^{32}P]ATP存在下でリン酸化反応を行った後、免疫沈降した。写真はそのautoradiogram。arrow headsはPNP 14の位置を示す。
lanes 1、3: normal rabbit IgG
lanes 2、4: anti-PNP 14 rabbit IgG



図2. PNP 14 のin vivo phosphorylation
lane 1: normal rabbit IgG で免疫沈降した。
lane 2: anti-PNP 14 rabbit IgG で免疫沈降した。
arrow headはPNP 14の位置を示す。

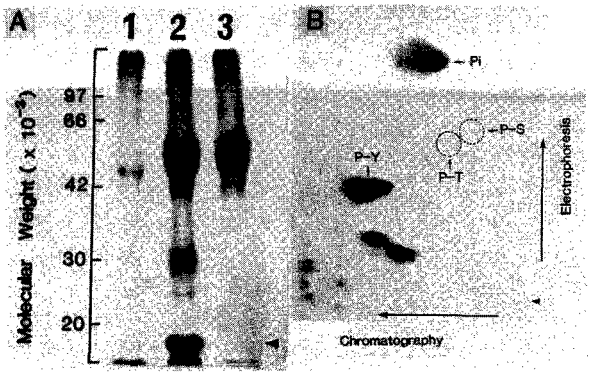


図3. $p60^{v-src}$によるPNP 14のリン酸化
A、SR-3Y1細胞抽出液から、それぞれnormal mouse serum(lane 1)、anti-$p60^{v-src}$モノクローナル抗体(lane 2)とProtein G-Sepharoseで免疫沈降させた。その複合体を酵素として、精製PNP 14のリン酸化反応を行った。
lane 3はanti-$p60^{v-src}$モノクローナル抗体とPNP 14で同様にリン酸化した。arrow headはPNP 14の位置を示す。
B、図3Alane 2からPNP 14を抽出し、リン酸化アミノ酸を分析した。Pi, P-S, P-T, P-Yはそれぞれ、無機リン酸、phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosineを、arrow headは試料のスポット位置を示す。

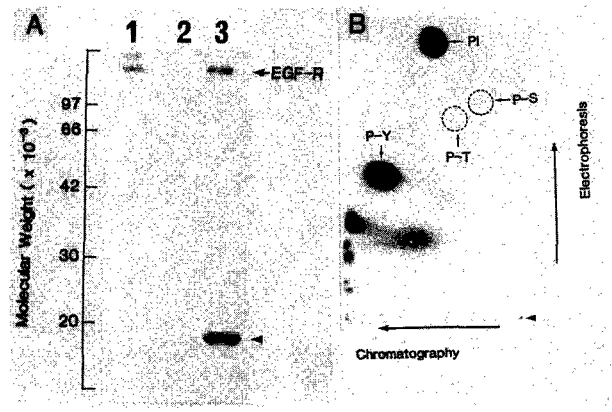


図4. EGF-受容体によるPNP 14のリン酸化
A、精製PNP 14をA 431細胞から精製したEGF-受容体によりリン酸化反応を行った。arrow headはPNP 14の位置を示す。
lane 1: EGF-受容体のみ
lane 2: PNP-14 のみ
lane 3: EGF-受容体 + PNP-14
B、図4Alane 3からPNP 14を抽出し、リン酸化アミノ酸を分析した。Pi, P-S, P-T, P-Yはそれぞれ、無機リン酸、phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosineを、arrow headは試料のスポット位置を示す。

129

イノシトール1，4，5－三燐酸受容体における多様性の抗体による解析

中出　真嗣＊、濱中　裕喜＊、藤井　重元＊、前田　信明＊、新延　道夫＊、御子柴　克彦＊，＊＊
（＊阪大　蛋白研　機能制御、＊＊東大　医科研　化学）

〔要約〕イノシトール1,4,5-三燐酸(IP3)受容体は小脳プルキンエ細胞に豊富に存在する分子量 32 万の糖蛋白質であり、広範な組織に分布している。各組織における受容体の性質の差異を、fura2を用いたCa^{2+}放出能の測定及び、小脳IP3受容体に対して得られた数種の抗体を用いての免疫学的手法により、比較検討した。モノクローナル抗体(mAb)18A10は小脳ミクロソーム画分からのIP3誘発Ca^{2+}放出は阻害するが、肝臓ミクロソーム画分からのIP3誘発Ca^{2+}放出は阻害しないことが分かった。また、各種合成ペプチドを用いた解析の結果、mAb18A10は小脳IP3受容体上のC末端部位（2736-2747のアミノ酸残基）を認識することが分かった。マウス各組織より調製した膜画分をSDS-PAGEにかけ、小脳IP3受容体に対する各種抗体を用いてWestern-Blot法を行った。N末端部位を認識する抗体mAb4C11には反応するが、mAb18A10には反応しにくい組織が肝臓を含めいくつかあることが分かった。これらの事実より、IP3受容体に多様性があり、特にC末端部位に位置するCa^{2+}チャンネル開口部の構造に、組織特異性があることが示唆された。

【緒言】

IP3は、滑面小胞体上に存在するIP3受容体を介して、小胞体内腔に貯蔵されているCa^{2+}を放出させる。このIP3によるCa^{2+}動員機構は中枢系、末梢系組織において普遍的に観察される現象であるが、各組織においてIP3受容体の性質に若干、差異が観られる。例えば、小脳のIP3受容体の場合、受容体とIP3の結合がCa^{2+}により調節をうける事(1)や、IP3との親和性が肝臓由来の受容体と比較して低い事(2,3)などが挙げられる。これらの差異が受容体自身の構造から生じるものか或いは、受容体以外の調節因子の影響に因るものなのかは明らかでない。 我々はすでにマウス小脳のIP3受容体をクローニングし(4)、その受容体蛋白質の構造と機能について詳細な解析を行なってきた(2,5)。これまでに、IP3受容体に対する抗体を用いた解析において、１）C末端部位を認識するmAb18A10が小脳ミクロソーム画分からのIP3誘発Ca^{2+}放出を阻害する事及び、２）その作用がIP3と受容体の結合を阻害するのではなく、Ca^{2+}チャンネルの開口に関与している事等を報告した(6)。今回、これまでに得られた知見を用いて、IP3受容体の各組織における構造上の差異を検討したので報告する。

【方法】

（１）Ca^{2+}放出実験　　マウス小脳、及び肝臓よりミクロソーム画分を調製し、それぞれ蛋白質濃度が250μg/ml及び、400μg/mlとなるように反応溶液中に混合した。Ca^{2+}放出量の測定はStaudermanらの方法(7)を参考にした。即ち、ATP存在下でCa^{2+}をvesicle内に取りこませ、IP3によってCa^{2+}を放出させた。Ca^{2+}放出量はfura-2を用いてモニターし、最大放出量の百分率で評価した。抗体、及びIP3 phosphataseは、必要に応じて添加した。

（２）IP3 phosphataseの部分精製　　肝臓のミクロソーム画分においてはIP3 phosphatase活性が低いため、マウス小脳よりこの酵素を部分精製して、Ca^{2+}放出実験の際に加えた。　マウス小脳のミクロソーム画分を1%TX-100で化溶化し、これをDE52、heparin-agarose(50mM-250mM NaClで溶出)の各クロマトグラフィーで分画することにより部分精製した。

（３）MAb18A10のエピトープ部位の決定　　IP3受容体のC末端領域に対するペプチドを数種合成し、これらペプチドとBSAをRichardsonらの方法(8)により架橋させた後、SDS-PAGEにかけ、Western-blot法によりmAb18A10との反応性を調べた。IP3受容体と各種ペプチドとの競合実験においてはELISA法を用いた。

（４）ポリクローナル抗体の作製　　IP3受容体を前田らの方法(2)で精製した後、さらにmAb18A10をAffi-Gel10(BIO-RAD）に結合させたイムノアフィニティーカラムにかけた。この溶出画分をウサギに免疫し、抗血清を得た。またIP3受容体のC末端領域に対する各種ペプチドとBSAの架橋物に対しても同様にして抗血清を得た。

（５）各種臓器からの膜画分の調製　　Moureyの方法(9)に従った。

【結果及び考察】

小脳及び、肝臓のミクロソーム画分からのIP3誘発Ca^{2+}放出の模様をFig.1に示す。小脳の場合、IP3により放出されたCa^{2+}は速やかにvesicle内に再取込みされるが（Fig.1-a）、肝臓の場合、放出されたCa^{2+}は一部しか取り込まれない（Fig.1-b）。肝臓のミクロソーム画分に小脳より部分精製したIP3 phosphataseを加えると、小脳の場合と類似したCa^{2+}の再取込みが起こる（Fig.1-b）。このことはphosphataseによるIP3の分解に伴って、チャンネルが閉塞した為だと考えられる。次にIP3受容体に対する種々の抗体を用いて、これらがIP3誘発Ca^{2+}放出に及ぼす作用を小脳及び、phosphataseを添加した肝臓のミクロソーム画分に対して検討した。Fig.2にmAbのIP3受容体上の認識部位を示す。mAb18A10が小脳のミクロソーム画分からのCa^{2+}放出は阻害するのに対し、肝臓からのCa^{2+}放出はほとんど阻害しないことが分かった（Fig.3）。他の抗体はCa^{2+}放出に対し影響が観られなかった。次に、mAb18A10が認識するIP3受容体上のペプチド配列を同定した。先に、

この抗体を用いてIP3受容体のC末端領域（2648-2749のアミノ酸配列）がクローニングされた事からmAb18A10のエピトープはこの範囲内に存在すると考えられる(4)。そこで、Fig.4-aに示す各種ペプチドを合成し、それぞれBSAと架橋させた後、SDS-PAGEにかけWestern-Blot法によりmAb18A10との反応性を調べた（Fig.4-b）。mAb18A10はpep6とのみ反応する事が分かった。又、ELISAによる競合実験において、pep6のみがIP3受容体とmAb18A10との結合を阻害する事が分かった（Fig.4-c）。

次に、マウスの各組織より調製した膜画分をSDS-PAGEにかけ、小脳IP3受容体に対する各種抗体を用いて、Western-Blotを行った。その結果、mAb4C11及び、mAb18A10両抗体に同程度反応する組織（小脳、大脳等）とmAb4C11には反応するがmAb18A10には反応しにくい組織（肝臓、肺、顎下腺等）があることがわかった。以上のことから、１）IP3受容体のC末端部位にはCa^{2+}チャンネル開口に重要な構造があり、２）この構造は各組織において異なることが示唆された。

【文献】(1) Danoff et.al.(1988) Biochem. J. 254, 701-705 (2) Maede et.al.(1990) EMBO J. 9, 61-67 (3) Pietri et.al.(1990) J.Biol.Chem. 265, 17478-17485 (4) Furuichi et.al.(1989) Nature 342,32-38 (5) Maeda et.al.(1991) J.Biol.Chem. 266,1109-1116 (6) Nakade et.al.(1991) Biochem.J. in press (7) Stauderman et.al.(1988) Biochem. J. 255,677-683 (8) Richardson et.al.(1985) J.Virol. 54,186-193 (9) Mourey et.al.(1990) Biochem.J. 272,383-389

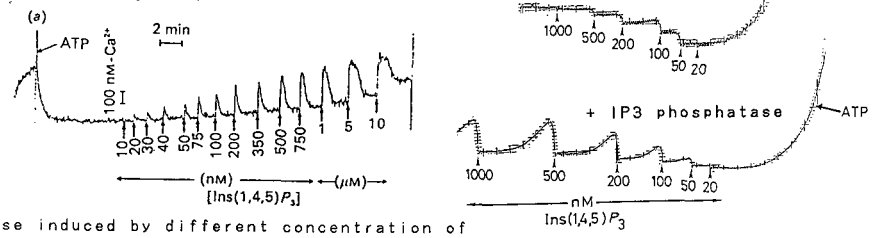


Fig.1 Ca^{2+} release induced by different concentration of IP3 from mouse cerebellar microsomes(a) and liver micosome(b).

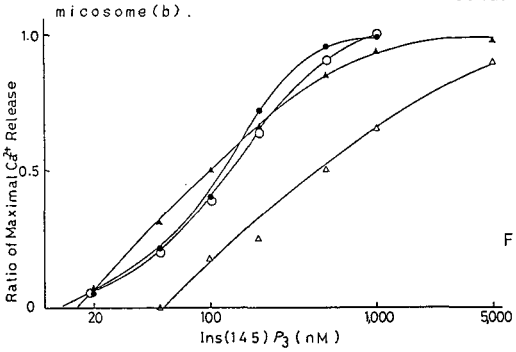
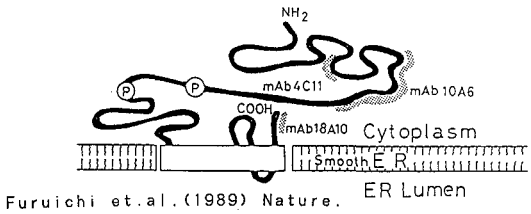
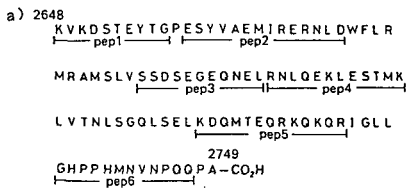


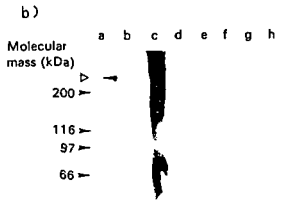
Fig.3 Dose-dependent effects of IP3 on Ca^{2+} release from cerebellar(▲,△) and liver(●,○) microsome in the presence(△,○) or absence(▲,●) of 50ug of mAb18A10/ml.



Furuichi et.al.(1989) Nature.

Fig.2 Schematic model for the topology of IP3 receptor in the membrane and epitopes for three mAbs.





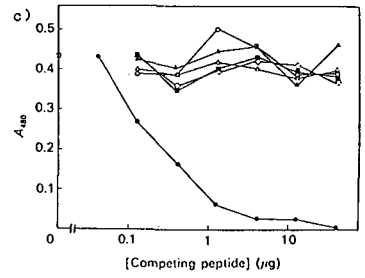


Fig.4 Epitope mapping for mAb18A10

a) Peptides used for epitope mapping

b) Immunoreactivity of mAb18A10 with the pep6-BSA conjugate
lane a, 10μg of mouse cerebellar microsomal fraction; b, BSA; c, pep6-BSA; d, pep1-BSA; e, pep2-BSA; f, pep3-BSA; g, pep4-BSA; h, pep5-BSA

c) Two-step competitive ELISA : inhibition of the binding between mAb18A10 and the purified IP3 receptor by pep6
●,pep6; ○,pep1; ■,pep2; ◇,pep3; △,pep4; ▲,pep5.

130 ジアシルグリセロールとシス型不飽和脂肪酸によるプロテインキナーゼC分子種の相乗的な活性化

篠村徹太郎、松島真司、西塚泰美
(神戸大・医・第2生化)

〔要約〕 プロテインキナーゼC(PKC)の代表的な分子種α, β, γを用いて、ジアシルグリセロール(DG)と脂肪酸による本酵素の活性化機構を検討した。DGはカルシウムとホスファチジルセリン(PS)の存在下にPKCによるH1ヒストンのリン酸化反応を亢進するが、各種不飽和脂肪酸はDGと相乗的に本酵素を活性化することが示された。Myelin basic protein (MBP)およびGrowth-associated protein 43 (GAP43)を基質として用いても同様の結果が得られた。このDGと不飽和脂肪酸によるPKCの相乗的活性化はPKCα, β, γ各分子種ともにみられ、不飽和脂肪酸がPKC分子種を介して脳組織における情報伝達に関与している可能性が示唆される。

PKCは各種の組織や細胞に広く分布するが、神経組織にもっとも大量に存在し神経情報伝達に重要な役割を果たしていると推定される。PKCは分子多様性を示し脳組織にも多くの分子種の存在報告されているが、α, β, γの各分子種は異なる酵素学的性質および脳内分布を示すことが知られている(1)。また、アラキドン酸等の不飽和脂肪酸はPKCを活性化するが、海馬における長期増強(Long-Term-Potentiation, LTP)時にアラキドン酸の増加が観察されている(2)。今回、H1ヒストン、MBP、GAP43等の各種の基質タンパク質を用いてPKCの代表的な分子種α, β, γに対するDGと不飽和脂肪酸の相乗的効果を検討した。

[実験方法]

PKC分子種α, β, γはラット大脳上清よりDE-52、トレオニンセファロース、フェニル-5PW、ヒドロキシアパタイトを用いたカラムクロマトグラフィーにより分離精製した(3)。PKC活性は、不飽和脂肪酸、カルシウム、PS、DG存在下における[γ-^{32}P]ATPよりそれぞれの基質タンパク質への放射活性の転移により測定した(3)。H1ヒストンは仔牛胸腺より精製した(3)。MBPはSigma製を用いた。GAP43はMasureらの方法(4)により牛脳から精製した。

[結果]

H1ヒストンを基質として用いPKC活性に対するアラキドン酸の効果を検討した結果、DGの存在下にアラキドン酸によりPKC分子種α, β, γのカルシウムに対する親和性の増加が観察された。図1にPKC分子種βの結果を示す。PKCは低濃度のカルシウムの存在下においても充分に活性化された。PKC活性に対するアラキドン酸の効果は濃度依存性であり、各分子種とも、約50 μMのアラキドン酸により最大活性を示した(図2)。同様の活性化はドコサヘキサエノイン酸、オレイン酸、リノレン酸、リノール酸等のシス型不飽和脂肪酸によっても認められたが、エライジン酸等のトランス型脂肪酸及びパルミチン酸、ステアリン酸等の飽和脂肪酸では認められなかった。

MBPを基質として用いた場合もアラキドン酸によりPKC分子種α, β, γのカルシウムに対する親和性の増加が観察された。γ分子種ではH1ヒストンを用いた場合とほぼ同様の結果が得られたが、α, β分子種はPSおよびDGの存在下に約20 μMのアラキドン酸により最大活性を示しPS非存在下ではアラキドン酸の効果は低かった(図3)。

PKCβ分子種を用いてGAP43をリン酸化した場合、MBPを基質として用いた場合とほぼ同様に、約20 μMのアラキドン酸により最大のリン酸化が観察された(図4)α, γ分子種においてもほぼ同様の結果が観察された。ドコサヘキサエノイン酸等の他のシス型不飽和脂肪酸もほぼ同様の効果を示した。

[考察]

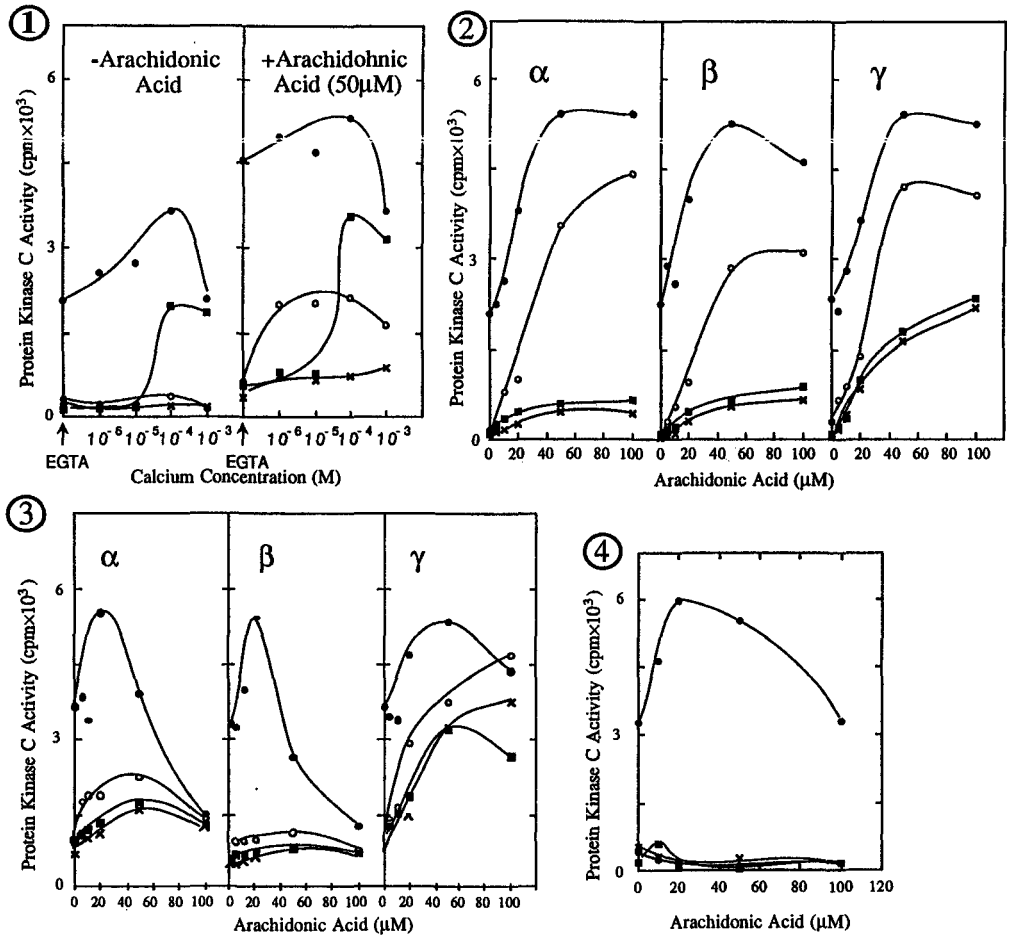
アラキドン酸等のシス型不飽和脂肪酸は、DGの存在下においてPKC分子種α, β, γを活性化した。基質としてH1ヒストンを用いた場合、PKC分子種はアラキドン酸によりDGと相乗的に活性化をうけることが示されている(5)。神経組織に存在するPKCの基質であるMBP、GAP43を用いた場合でもPKC分子種は、不飽和脂肪酸によりDGと協調的に活性化をうけたが、MBPを基質とした際にはアラキドン酸によりPKC分子種によって異なる活性化が観察された。またGAP43はLTPが確立された際にPKCによってリン酸化されると考えられている(6)。また、海馬でのLTPの際、アラキドン酸濃度が上昇し、海馬にはGAP43及びPKC分子種の両者が局在することも報告されている(2,7)。

従って、アラキドン酸等の不飽和脂肪酸がLTPにおいてPKCの活性化を通じてGAP43のリン酸化を促進し、短期記憶などの脳内のメカニズムに関与している可能性が高いと考えられる。

[文献]

1) Nishizuka, Y. (1988) *Nature* 334, 661-665
2) Lynch, M.A., Errington, M.L., and Bliss, T.V.P. (1989) *Neuroscience* 30, 693-701
3) Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ase, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1988) *J. Biochem.* 103, 759-765
4) Masure, H.R., Alexander, K.A., Wakim, B.T., and Storm, D.R., (1986) *Biochemistry* 25, 7553-7560
5) Shinomura, T., Asaoka, Y., Oka, M., Yoshida., K., and Nishizuka, Y., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 88, 5149-5153
6) Lovinger, D., M., Akers, R., F., Nelson, R., B., Barnes, C., A., McNaughton, B., L., and Routtenberg, A., (1985) *Brain Res.* 343,137-143
7) Rosenthal, A., Chan, S., Y., Henzel, W., Haskell, C., Kuang, W.-J., Chen, E., Wilcox, J., N., Ullrich, A., Goeddel, D., V., and Routtenberg, A., (1987) *EMBO J.* 6, 3641-3646

図1 H1ヒストンを基質とした際のPKC分子種βの活性
図2 H1ヒストンを基質とした際のPKC分子種α, β, γの活性
図3 MBPを基質とした際のPKC分子種α, β, γの活性
図4 GAP43を基質とした際のPKC分子種βの活性
(●), PS (8 μg/ml) 及びDG (0.8 μg/ml) 存在下; (■), PS (8 μg/ml) 存在下;
(○), DG (0.8 μg/ml) 存在下; (x), PS 及びDG 非存在下



131 １４－３－３蛋白質による蛋白質キナーゼＣの活性化

礒辺俊明、比屋根ゆり子、奥山典生、市村徹[1]、中条茂男[2]、中谷一泰[2]
（都立大・理・化、[1]新潟大・自然化学研究科、[2]昭和大・薬・生化）

〔要約〕
ウシ脳に存在する14-3-3蛋白質の分子構造を解析し、Ca^{2+}/リン脂質依存性蛋白質キナーゼ（ＰＫＣ）に対する作用について検討した。14-3-3蛋白質標品に含まれる７種類のサブユニット（α－η鎖）はそれぞれ異なったアミノ酸配列をもつ、独立の遺伝子に由来するポリペプチドと考えられた。天然の蛋白質分子中では、これらのサブユニットは２量体を形成し、一群の14-3-3蛋白質ファミリーを構成している。ζ鎖から再構成したζ$_2$型の14-3-3蛋白質は、Ca^{2+}とリン脂質により活性化されたＰＫＣをさらに約２倍活性化した。この活性化は添加した14-3-3の量に依存し、最大活性化の1/2の活性上昇（1/2Vmax）に必要な14-3-3濃度は0.77μMであった。β$_2$およびε$_2$型の蛋白質でも同様の活性化が認められた。一方、ＰＫＣ活性に対して強い阻害作用を示すＰＫＣ阻害蛋白質が14-3-3蛋白質と非常によく似たアミノ酸配列をもつことから、細胞内のＰＫＣ活性は14-3-3蛋白質ファミリーにより調節されていると推定した。

＜はじめに＞
14-3-3蛋白質（14-3-3）は、脳可溶性蛋白質の約１％を占める酸性蛋白質で、モノアミン生合成系の律速段階酵素であるチロシンおよ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化する作用[2,12]から、脳のモノアミンレベルの調節因子として働いていると推定されている[6,7]。14-3-3には少なくとも７種類の分子種（α－η鎖）が存在し、現在までにウシ[3]、ラット[11]、およびヒト[5]のη鎖、およびウシのβ、γ鎖[8]のアミノ酸配列や、それらの組織[3,4]、および細胞レベル[11]での発現様式が明らかにされている。これらの研究によれば、14-3-3は神経細胞に広く分布し、モノアミンを合成しない神経細胞にも存在している[11]。また、この蛋白質のアミノ酸配列が、内在性のＰＫＣ阻害蛋白質とよく似ている[1]ことから、14-3-3にはモノアミン合成の調節以外の生理機能があるのではないかと推定されている。本研究では、14-3-3ファミリーの分子構造と、ＰＫＣに対する作用について報告する。

＜実験方法＞
14-3-3蛋白質はウシ脳から精製し、α－η鎖は逆相系HPLCを用いる既報の方法[3,8]で分離した。アミノ酸配列は、主として分離したポリペプチド鎖を直接解析して決定した。ＰＫＣに対する活性の測定には、単離したポリペプチド鎖を水系緩衝液中で再構成し[3,8]、ホモ２量体としてから使用した。ＰＫＣは、ラット脳から Kikkawaらの方法[10]に準じて精製した。ＰＫＣ活性は、ヒストンＨ１を基質とし、［γ^{32}］ATP からの^{32}Pのとりこみをシンチレーションカウンターで計測する標準的な方法[9]で測定した。

＜結果と考察＞
14-3-3蛋白質ファミリーの分子構造
図１に、本研究で主として使用したζ鎖のアミノ酸配列を、Aitkenらにより発表されたＰＫＣ阻害蛋白質の配列[1]とともに示した。ζ鎖は、245アミノ酸残基から構成され、14-3-3蛋白質標品中に存在する他のポリペプチドと共通の構造上の特徴をもっていた。この結果は、ζ鎖から再構成したζ$_2$型の14-3-3蛋白質が、他の型の蛋白質と同様の生化学的、免疫化学的な性質を示し、またCaM/キナーゼの活性に依存してトリプトファン水酸化酵素を活性化する[8]事実に対応している。一方、ζ鎖をはじめとする14-3-3蛋白質は、いずれもＰＫＣ阻害蛋白質と非常によく似たアミノ酸配列をもっていた。また、14-3-3の分子中には、ＰＫＣ活性を阻害することが予想される"pseudo-substrate"配列が認められた。この結果は、14-3-3蛋白質が、ＰＫＣを阻害する活性をもつことを示唆するものと考えた。
ＰＫＣに対する14-3-3蛋白質の作用
図２に、ζ鎖から再構成したζ$_2$型の14-3-3蛋白質を添加したときのＰＫＣ活性の変化を示した。ヒストンＨ１への^{32}P のとりこみで測定したＰＫＣの活性は、添加した14-3-3蛋白質の量に依存して上昇し、最大ではCa^{2+}とリン脂質の存在下で測定した「活性型」ＰＫＣの活性の約２倍に達した。ＰＫＣを最大の1/2 活性化する（1/2 Vmax）ための14-3-3濃度は0.77 μMであった。14-3-3によるこの活性上昇は、Ca^{2+}とリン脂質の非存在下では観察されなかった。また、これと同様の現象が、β鎖あるいはε鎖から再構成したβ$_2$型やε$_2$ 型の14-3-3蛋白質でも認められた。
ζ$_2$蛋白質を添加して反応をおこなったＰＫＣ活性測定混合物を逆相ＨＰＬＣで分離して、リン酸化された蛋白質を同定した（図３）。^{32}Pに由来する放射活性は、ヒストンピークにのみ認められ、ζ鎖には検出

されなかった。ポリアクリルアミドゲル電気泳動－オートラジオグラフィー法でも同様の結果が得られた。また、ζ$_2$蛋白質を直接ＰＫＣと混合して反応をおこなっても、ζ鎖へのリン酸基のとりこみは認められなかった。

以上の結果から、β$_2$、ε$_2$、ζ$_2$型の14-3-3蛋白質は、いずれもＰＫＣの活性化因子であると考えた。一方、アミノ酸配列の比較から、Aitkenらによって分離されたＰＫＣ阻害蛋白質もまた14-3-3蛋白質ファミリーの一員と考えられ、したがって、細胞内のＰＫＣ活性は、細胞質に存在する一群の14-3-3蛋白質ファミリーによって調節されていると推定した。ただし、ＰＫＣ活性を阻害するＰＫＣ阻害蛋白質に対応する14-3-3蛋白質は現在まで同定されていない。

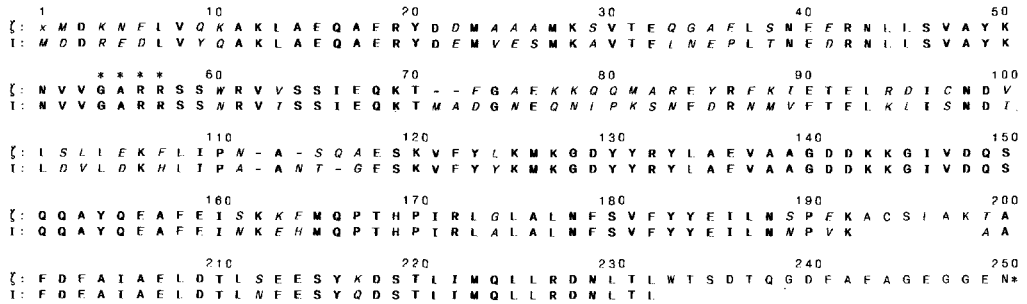


図１．14-3-3ζ鎖とＰＫＣ阻害蛋白質のアミノ酸配列

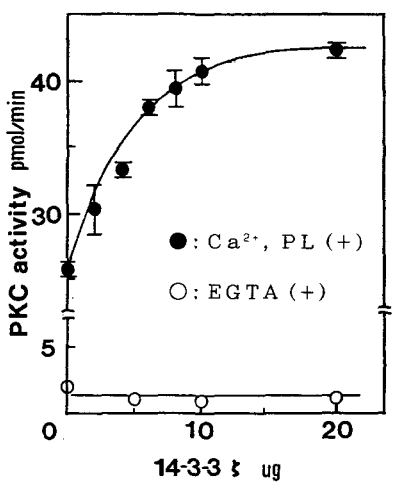


図２．14-3-3ζ$_2$蛋白質によるＰＫＣの活性化

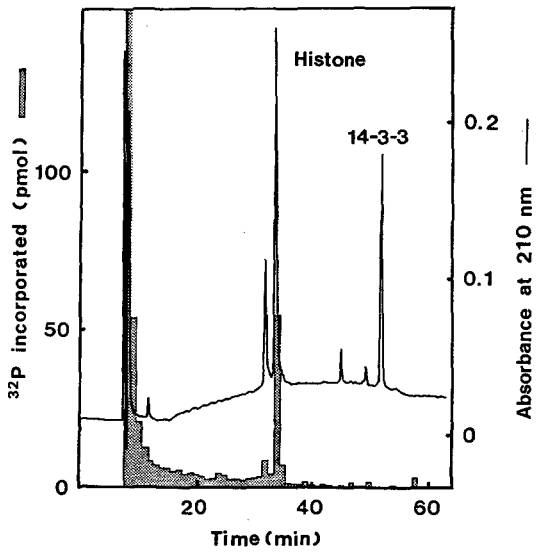


図３．逆相ＨＰＬＣによるリン酸化蛋白質の同定

文献
1) Aitken, A. et al. (1990) Nature 344, 594.
2) Ichimura, T. et al. (1987) FEBS Lett. 219, 79-82.
3) Ichimura, T. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7084-7088.
4) Ichimura, T. et al. (1991) J. Neurochem. 56, 1449-1451.
5) 市村由香ら (1990) 神経化学 29, 288-289.
6) Isobe, T. et al. (1989) Acta Hitol. Cytol. 52, 25-32.
7) 磯辺俊明ら (1990) 蛋白質 核酸 酵素 35, 597-611.
8) Isobe, T. et al. (1991) J. Mol. Biol. 217, 125-132.
9) Kikkawa, U. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257, 13341-13348.
10) Kikkawa, U. et al. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 135, 636-643.
11) Watanabe, M. et al. (1991) Mol. Brain Res. 10, 151-158.
12) Yamauchi, T. et al. (1981) J. Biol. Chem. 256, 5404-5409.

132 スタウロスポリンによるＰＣ１２細胞の分化

小嶋久子、北島理恵、玉井洋一
（北里大学・医学部・生化学）

〔要約〕

PC12 細胞に Nerve Growth Factor (NGF) を作用させると Neurite の形成に24時間以上を必要としたが、protein kinase 阻害剤である staurosporine を添加すると(20-50nM)、迅速に応答して数時間で neurite 様の突起が形成された。staurosporine により生じた PC12 細胞の形態変化と伝達物質関連酵素活性との関係を検討して次の結果を得た。NGF と staurosporine それぞれによって突起を形成した PC12細胞 のコリンアセチルトランスフェラーゼ (CAcT) とアセチルコリンエステラーゼ (AchE) 活性を測定した。NGF で分化した PC12 細胞の CAcT 活性は対照よりやや高い程度であるが、staurosporine で分化した細胞の CAcT 活性は 対照の 4-5倍に上昇した。AchE 活性は両処理とも同程度の活性を示した。この結果から staurosporine は NGF による分化とは異なる機作で PC12 細胞のアセチルコリン合成系を活性化することが示唆された。

［緒言］

ラットの pheochromocytoma から株化された PC12 細胞は、NGF により神経突起を形成するので培養系における神経細胞のモデルとしてよく使われている[1]。また、PC12 はアセチルコリン、カテコールアミンや GABA など複数の神経伝達物質合成能力があることも知られている。しかし、これら神経伝達物質の発現調節の機作は未だ明らかではない。一方、protein kinase 阻害剤である staurosporine が PC12 細胞の突起形成を誘発すること[2]や突起形成における NGF と staurosporine との相互関係[3]が報告されているが、形態変化と神経化学的性質との関係については明らかではない。我々は PC12 細胞の突起伸長誘発と伝達物質関連酵素の発現が NGF と staurosporine の間でどのような違いがあるかを検討したので報告する。

［方法］

細胞　PC12 細胞は天野武彦博士（三菱生命研）、NS-20Y 細胞 (cholinergic) と NIE-115 細胞 (adrenergic) は田中亮博士（名市大）から分与された。細胞の維持には PC12 については 10% FCS、5% horse serum (HS) を含む RPMI-1640 培地を用い、NS-20Y と NIE-115 については 10% FCS を含む DME 培地を用いた。PC12 の NGF 処理は NGF を 50 μg/ml、1% HS と N1 supplement を含む RPMI-1640 培地で行い、staurosporine（北里研、大村智博士から供与）処理は 1% HS と N1 supplementを含む RPMI-1640 に staurosporine を添加して行った。薬剤添加の培養にはコラーゲンコート皿 (Corning社)を使用した。酵素活性は 20nM の staurosporine 濃度下で培養した細胞について行った。

酵素活性測定　アセチルコリンエステラーゼ(AchE) 活性は Klingman[4]ら、コリンアセチルトランスフェラーゼ(CAcT)活性は Deguchi の方法[5]に従った。

［結果と考察］

PC12 細胞の培養液に低血清下で staurosporine を 10nM-100nM の濃度範囲で添加すると、添加後約1時間で形態変化が認められ、8時間では突起が伸長して形態的に神経細胞へと分化する（図1B）。しかし、staurosporine が 50nM 以上、

または15時間を経過すると細胞の浮き上がる率が高くなった。一方、NGF 添加による形態変化は staurosporine のそれより遅く、24時間から72時間を必要とした（図1C,D）。NGF 添加後24時間と staurosporine 添加後8時間の PC12 細胞のAchE 活性と CAcT 活性を比較した（表1）。NGF は PC12 細胞のアセチルコリン合成能を1.5倍促進するのに対し staurosporine は約4倍も促進することがわかった。AchE 活性に対しては両処理とも同じ程度の活性を示した。

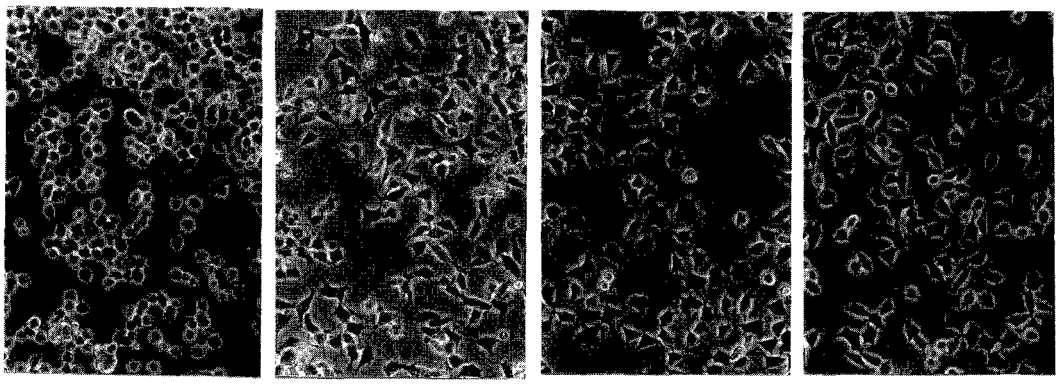


図1　PC12 細胞の NGF および staurosporine による突起形成
A, PC12; B, staurosporine-treated PC12(8hr); C, NGF-treated PC12(24hr); D, NGF-treated PC12(72hr)

表1　PC12 細胞の CAcT 活性と AchE 活性

細胞	処理	CAcT(pmol/h/mg prot.)	AchE(nmol/min/mg prot.)
PC12	(-)	362.0±8.0	11.4±1.2
PC12	NGF	557.6±28.1	14.9±0.7
PC12	staurosporine	1504.7±50.0	16.4±0.7
NS-20Y	(-)	3058.1±14.2	21.3±2.4
NIE-115	(-)	352.6±13.1	26.2±1.2

PC12 細胞の起源はカテコールアミン系の細胞であるが、複数の神経伝達物質を合成出来る株細胞である。培養の条件によりカテコールアミン系の細胞が cholinergic な性質を示すこともあるが、細胞分化と伝達物質表現型の調節については不明なことが多い。タンパク質のリン酸化を阻害する staurosporine が何故 PC12 のアセチルコリン合成を活性化するのか、cholinergic と noradrenergic の分化の方向を決める要因は何かなどについて今後検討を行いたいと考えている。

［文献］

(1) Greene,L.A. and Tischler,A.S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci.USA 73, 2424-2428

(2) Hashimoto,S. and Hagino,A.(1989) Exp. Cell Res. 184, 351-359

(3) Hashimoto,S. and Hagino,A. (1989) J. Neurochem. 53, 1675-1685

(4) Klingman,G.I., Klingman,J.D. and Poliszczuk, A. (1968) J. Neurochem. 15, 1121-1130

(5) 出口武夫 (1990) 新生化学実験講座「神経化学」、364-366

133 マウス脳発生過程における神経分化特異的核蛋白質NECDINの遺伝子発現

相沢貴子、丸山敬、近藤ひろみ*、吉川和明
（東京都精神研・分子生物、神経病理*）

〔要約〕
レチノイン酸処理によって神経分化刺激を行なったマウス胚性がん（ＥＣ）細胞に誘導される新しい核蛋白質（necdin）のマウス脳発生に伴う遺伝子発現の変化を検討した。成熟マウスではnecdin mRNAは全ての脳内部位に存在した。また、大脳の発生に伴うnecdin mRNAの変化を検討したところ、ニューロン発生時期に認められ、生後1-4日に最大になり、その後加齢に伴って減少した。合成ペプチドに対する抗体を用いた免疫組織化学によってマウスの神経発生過程でのnecdinの局在を検討したところ、10日胚の神経管内の幹細胞（マトリックス細胞）には検出されないが、分化したニューロンの核内に存在した。このことからnecdinはin vivoにおいてもニューロンの分化と共に誘導される核蛋白質であると考えられる。

中枢神経系の初期発生に関わる遺伝子とその発現についての知見は極めて少ない。マウス胚性がん(EC)細胞P19をレチノイン酸で処理するとニューロンやアストログリア（３）、さらにはミクログリア様食細胞（１）に分化する。またP19細胞はアルツハイマー病アミロイド蛋白前駆体遺伝子発現の面でもin vivoでの脳細胞の発達過程を反映したパターンを示す（５）ため、脳細胞の発生機構を研究するのに適した培養細胞モデルと考えられる。私達はレチノイン酸処理をしたP19細胞由来のサブトラクションcDNAライブラリーから神経系分化に特異的な新しいcDNAを単離した（２）。このcDNAが指令する蛋白質はアミノ酸数325個で核に局在するが、その構造は既知の蛋白質とは類似性がない。今回は、このnecdin (neurally differentiated EC cell-derived factor) と名付けた新しい核蛋白質のマウス脳発達に伴うin vivoでの遺伝子発現を検討した。

【実験方法】

［Northern法］各発達段階のddY系マウスの脳をから既報の方法（４）にしたがってRNAを抽出した。 RNA（５μg／レーン）は臭化エチジウムを添加した6%ホルムアルデヒド/1.2%アガロースゲルで泳動後、ナイロン膜に転写した。転写されたRNAの等量性と非分解度はrRNAの蛍光によって確認した。ハイブリダイゼーションはnecdinのcDNA(4BFL)のEcoRI断片をマルチプライム法で放射標識したものをプローブとして既報の条件（５）で行った。

［免疫組織化学］necdinのC末端（309-325）に対応する合成ペプチドを抗原としてウサギに免疫し、抗体C2を得た。C2はイムノブロット法によって42kDaの単一バンドを認識した（２）。免疫組織化学は組織を4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋を行った。パラフィン切片（５μm）は脱パラフィンの後にC2と反応させ、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法（Vector Labs)によって発色させた。

【成績】

成熟雄性マウス（65日齢）の脳内各部位におけるnecdin mRNAの分布を検討した（Fig.1A）。necdin mRNAは視床下部や中脳に高く、嗅球や小脳に低い傾向はあるが脳内の全ての部位に存在した。各部位でのnecdin mRNAは約1.7キロ塩基長の単一バンドを示した。necdin mRNAは比較的均一な分布を示すことから、necdin遺伝子は脳の一部に局在する細胞ではなく、どの部位にも存在する細胞に発現しているものと考えられる。次にマウス大脳（11日胚のみ頭部）の発達に伴うnecdin mRNAの変化を検討した（Fig.1B）。necdin mRNAはニューロンの発生時期（11-14日胚）には既に存在し、生後1-4日に最大になり、その後加齢に伴って減少することが判明した。このnecdin mRNA濃度変化のパターンは既に報告したラット終脳における神経ペプチド前駆体mRNA濃度の生後発達パターン（４）とは異なっている。次に免疫組織化学によってnecdinの脳内の局在を検討した（Fig.2）。necdinは神経管内の未分化幹細胞（マトリックス細胞）には検出されなかった（A）が、ニューロブラストないしニューロンに分化が進んだ細胞の核内に存在した（15日胚）（B）。この時期ではnecdin陰性の細胞核も存在したが、細胞分化がさらに進んだ時期（生後2日）では、ほとんど全ての細胞核が染色された（C）。

【考察】

私達は既にnecdinはP19細胞由来のニューロンやアストログリア前駆細胞の核内に存在することを見いだしている（２）が、本研究によってin vivoにおいてもnecdinは脳細胞の核内に存在し、神経分化と共に発現することが明らかになった。necdin mRNA濃度は加齢によって低下するが、これが細胞一個あたりのnecdin遺伝子の発現量の減少か、もしくはnecdin遺伝子を発現している細胞数が減少するのかは、細胞核内necdinの

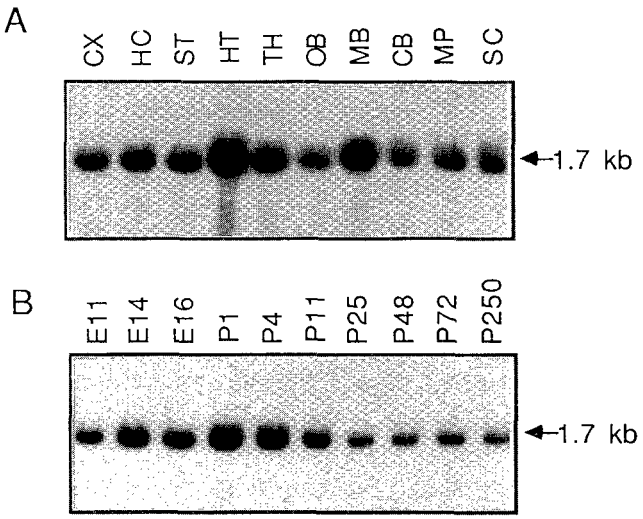


Fig.1 Northern blot analysis of necdin mRNA in mouse brain.
A: distribution of necdin mRNA in the discrete regions.
CX, cortex; HC, hippocampus; ST, striatum; HT, hypothalamus, TH, thalamus; OB, olfactory bulb; MB, midbrain; CB, cerebellum; MP, medulla/pons; SC, spinal cord.
B: necdin mRNA levels during the course of development.
E11-16, embryonal days 11-16; P1-250, postnatal days 1-250

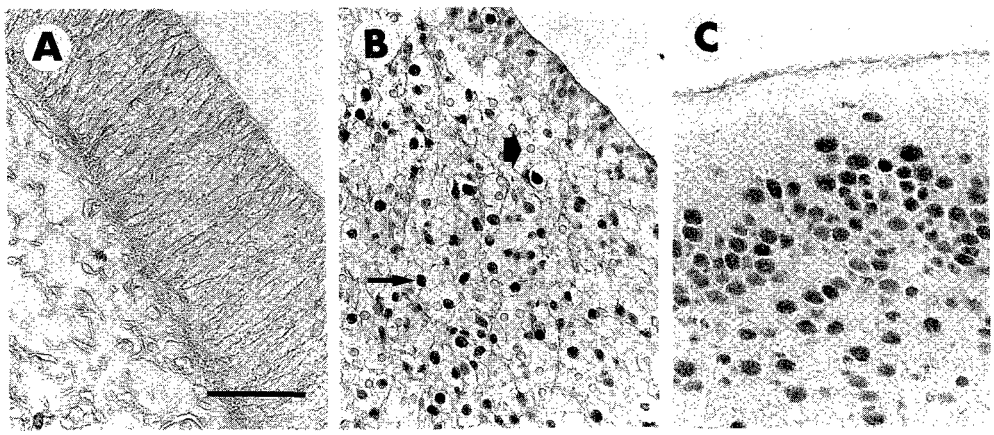


Fig.2 Localization of necdin immunoreactivity in mouse brain during the course of neuronal differentiation and development.
A: neural tube (E10) B: periventricular region (E15) Arrows indicate the nuclei showing positive (→) and negative (➧) immunoreactivities. C: Cerebral cortex (P2)
Scale bar= 50 μm for A-C.

定量的解析を含めて今後検討を要する。また、P19細胞においてもnecdin遺伝子発現の神経分化後の急増と長期培養による減少が見られる（２）ため、necdinは神経系細胞の加齢現象を反映する指標となり得る可能性もある。necdinの機能については現在不明であるが、ニューロンの分化と共に発現する核蛋白質であることから、ニューロンの分化誘導時の遺伝子発現の調節に関与している可能性があり、今後の研究課題としたい。

【文献】

1)Aizawa,T. Haga,S., and Yoshikawa,K.(1991) Dev.Brain Res.59, 89-97.
2)Maruyama,K. Usami,M., Aizawa,T., and Yoshikawa,K.(1991) Biochem.Biophys.Res.Commun. (in press)
3)Jones-Villeneuve,E., McBurney,M., Rogers,K., and Kalnins,V.(1982) J. Cell Biol., 94, 253-262.
4)Yoshikawa,K., and Aizawa, T. (1988) Mol. Brain Res., 4, 87-96.
5)Yoshikawa,K., Aizawa,T., and Maruyama,K. (1990) Biochem.Biophys.Res.Commun. 171, 204-209.
6)Yoshikawa,K., and Sabol, S. (1986) Mol.Brain Res., 1, 75-83.

134 マウス中枢神経系発生におけるレチノイン酸受容体の発現と局在

山形崇倫[1]、 山門 誠[2]、桃井 隆[2]、 桃井真里子[1]
（自治医大・小児科[1]、第一解剖[2]、国立精神神経センター第5部[3]）

〔要約〕
中枢神経系発生過程におけるレチノイン酸の生理作用を検討する目的でマウスの発生過程でのレチノイン酸受容体（RAR)の発現と局在を免疫組織化学的に検討した。10.5日胚では、脊髄前角の幼若神経細胞がわずかにRARα、β陽性であり、その後陽性細胞は著増したが、出生時にはRARαは一部の神経細胞に限局し、βは消失した。終脳では脊髄より遅れて14.5日胚に発現がみられ、その後出生時にかけて陽性細胞はα、βとも増加していた。これらの発現様式は、RARsが神経細胞の分化、成熟過程に関与している可能性を示唆した。

レチノイン酸は形態形成における位置情報を担う物質として注目されており、神経形成においても神経細胞の分化に関与する可能性が示唆されている。このレチノイン酸の生理作用は核に局在するレチノイン酸受容体（retinoic acid receptor、RAR）を介して発現することが解明されており、現在までにα、β、γのRARがマウスとヒトで明らかにされている。今回われわれは、中枢神経系におけるレチノイン酸作用を解析する目的で、マウスのRARの遺伝子より推測されるアミノ酸配列をもとにRAR蛋白に対する特異抗体を作成し、免疫組織化学的にマウス発生過程におけるRARの発現と局在を検討した。

［方法］

①イムノブロットによるレチノイン酸遺伝子の検出

レチノイン酸受容体αとβのアミノ酸配列のうち最も相同性の低いRARβのN端側20アミノ酸残基を合成し、ヘモシアニンに結合の後、ウサギに免疫し抗血清を得た。レチノイン酸受容体αの抗体はさきに作成したレチノイン酸受容体αの合成ペプチドに対する抗体を用いた。マウス大脳を0.5MNaClを含む50mMTris-HCl（pH7.5）で抽出し、各サンプル50ug蛋白量を12%SDS-ポリアクリルアミドゲル上で泳動した。泳動後、Towbinらの方法でトランスブロットし、抗体とperoxidase-Avidin-Biotin system（Vectastain）でRARα、βを検出した。

②免疫組織化学染色

マウス10.5日、11.5日、12.5日、16.5日胚、および出生時マウスを4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋した。5μm切片を脱パラフィン後、RARα、βの抗体と4°C、72時間反応後、上記のようにABC法にて検出した。peroxidaseの発色にはDABを用いた。

③P19細胞へのレチノイン酸受容体の導入と発現

SV40のベクターpSG-5にRAR遺伝子βをつなげ、pSV2Neoの遺伝子と共にP19細胞へリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションした。G-418による選択の後、耐性細胞をクローニングし、各クローンにおけるRARβの発現をNorthern法を用いて検討した。

④レチノイン酸受容体βのmRNAの検出

グアニジンイソシアネート法を用いて、各細胞のクローンからRNAを抽出し、RARβの発現をNorthern hibridization法にて検討した。

［結果］

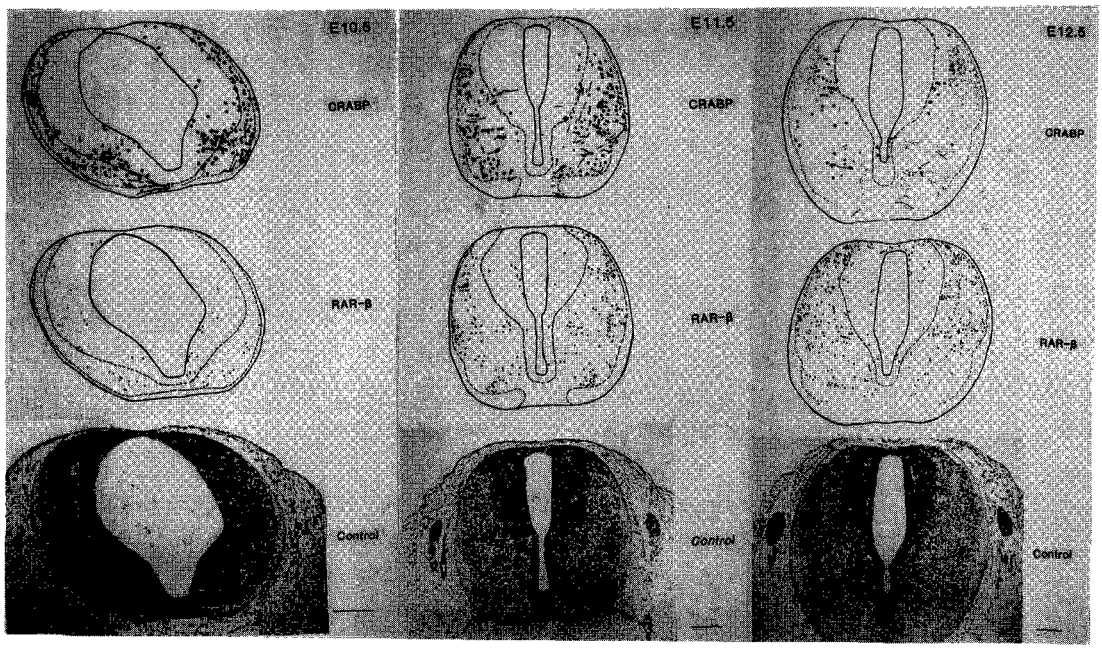
作成したRARβの合成ペプチドに対する抗体がRARβと反応することを、RARβの発現していないP19細胞にSV40ベクターにRARβ遺伝子をつなげたものをトランスフェクションし、得たクローンC4でのRARβのmRNAを確認後、作成した抗体によるイムノブロットで確認した。C4クローンではp50蛋白が検出されたが、遺伝子を導入しないP19細胞ではp50は検出されなかった。

RARβ、およびαに対する抗体を用いて、正常マウス発達過程におけるRAR蛋白の発現を検討した。図には10.5日、11.5日、12.5日胚の脊髄におけるRARβの発現を細胞内レチノイン酸結合蛋白（CRABP)の発現と対照させて示す。既に報告したようにCRABPの発現は中枢神経系内で未分化細胞が幼若神経細胞に分化する時にみられその後急速に消失する。RARβは神経細胞に分化直後の10.5日胚では殆ど検出されず、わずかに前角細胞などが陽性であるが、11.5日、12.5日と陽性細胞は部位の変化と共に増加していた。出生時には殆ど検出されなかった。終脳では14.5日胚で陽性細胞が出現し、出生時に至るまで著増を示した。RARαもβに似た発現パターンを示した。

［考察］

マウスRARβのN端のペプチドを抗原として作成した抗体はRARβ遺伝子が発現する細胞でのみp50と反応し、p50はRARβであり、作成した抗体の特異性が確認された。この抗体での検索により、RARβはCRABPより遅れて神経細胞に発現し、神経系形成と共にその発現細胞を増すと共に分布の変化がみられた。このことはRARの発現と神経系の成熟過程が深く関与することを示唆している。

図：マウス発生過程の脊髄におけるRARβ、CRABPの発現
10.5日胚（E10.5）、11.5日胚（E11.5）、12.5日胚（E12.5）を示す。CRABP、RARβは方法に示すように各抗体を用いてABC法にて陽性細胞を検出し、写真上で陽性細胞をトレースし作図したものを示す。Controlは使用部位の構造をを明らかにするために隣接切片をメチルグリン染色したものである。



135 Cytokine, dibutyryl cAMP, sodium butyrate によるアストロサイト，線維芽細胞のNGF産生調節

吉田一成，左合正周，大谷光弘，F. H. Gage*，戸谷重雄
（慶應義塾大学脳神経外科，Dept. of Neurosci., UCSD*）

〔要約〕

ラット脳由来のアストロサイト，及び皮膚由来の線維芽細胞は，*in vitro* において，NGFを産生し得る。アストロサイトに対しては，aFGF，bFGF，IL-1β，TNF-α，TGF-β1が，線維芽細胞に対しては，aFGF，bFGF，IL-1β，TNF-α，TGF-β1，PDGF，TGF-α，EGFが，NGFの産生を著明に促進した。中でもaFGFに最も強い活性が認められた。Protein kinase Cの活性化，及び抑制，細胞内Ca^{++}の増加，inositolの低下，forskolinによる内因性のcAMPの上昇は，aFGF存在下，非存在下のアストロサイト，線維芽細胞のNGFの産生には影響を及ぼさなかった。しかし，db-cAMPはaFGF存在下のアストロサイト，aFGF存在下，非存在下の線維芽細胞のNGF産生を著明に促進した。また，sodium butyrateはaFGF存在下に於いてのみ，線維芽細胞のNGF産生を促進した。これらの所見は，過剰量の細胞内cAMPとbutyl基が，異なった機序でNGF産生を調節し得ることを示唆する。アストロサイト，線維芽細胞のNGF産生を促進する種々のcytokineは，aFGFとbFGF，EGFとTGF-αの2つの組み合わせを除いて協調作用が認められた。アストロサイト，線維芽細胞は損傷が加わった際に，NGFを産生することにより，傷害された神経細胞の再生を促すものと考えられた。

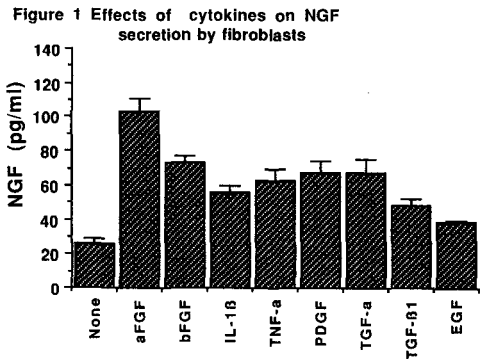
【緒言】中枢神経系に於いては，前脳基底野のコリン作動性ニューロンがNGFに感受性であり，少なくとも正常脳に於いてはそれらの標的細胞がNGFを産生していると考えられる[1-4]。一方神経系固有の間質であるアストロサイトは，その詳細は明らかにされてはいないが，様々なメカニズムにより，ニューロンが正常な機能を営むのに必要な環境を形成していると思われる。近年，NGFの微量定量が可能になり，アストロサイトが *in vitro* に於いてNGFを合成分泌することが明らかにされた[5]。我々は，脳に多量に存在するFGF，並びに活性化されたミクログリアの産物であるIL-1β，TNF-αが，アストロサイトのNGF産生を制御していることを見出し，報告した[6]。中でもaFGFに最も強い活性がみとめられたが，FGFはfibroblastのNGF産生も促進する。今回は，aFGFがほかのcytokineやdb-cAMPと協調的に，アストロサイトや線維芽細胞のNGF産生を制御していることを見出したので報告する。

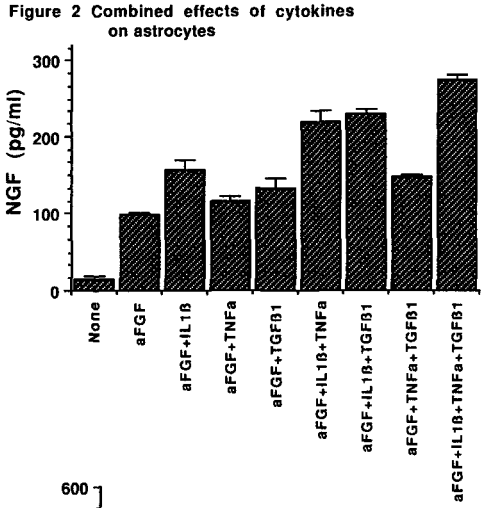
【方法】アストロサイトは，生後2日以内のラット（Fischer 344）大脳皮質もしくは海馬の初代組織片培養から，酵素処理により2回継代することにより得た。線維芽細胞は，出生前ラット胎仔の皮膚を材料とし，同じく組織片培養から2回継代したものを用いた。培地は10% FCS添加DMEを用い，アストロサイトはpoly-L-lysine処理した，線維芽細胞は無処理の25cm^2のフラスコにて培養した。NGFの定量に際しては，アストロサイトは1×10^5 cells/1ml medium/well，線維芽細胞は6×10^4 cells/1ml medium/wellの細胞密度で，24-well plateに継代し，継代後3日後に無添加，あるいは試薬を含んだ培地に交換（0.3ml/well），9-24時間培養した後に培地中に分泌されたNGFを2-site enzyme-immunoassayにより定量した。

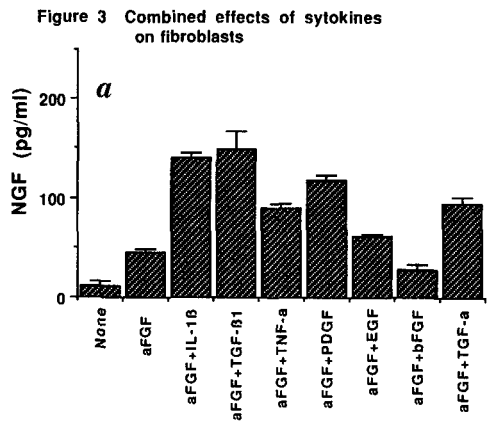
【結果並びに考察】アストロサイトに対しては，aFGF，bFGF，IL-1β，TNF-αに加えてTGF-β1に，線維芽細胞に対しては，aFGF，bFGF，IL-1β，TNF-α，TGF-β1，PDGF，TGF-α，EGFに，NGFの産生促進効果が認められた（Fig. 1）。次に，最も強い活性が認められたaFGFの存在下，非存在下で，どのような細胞内伝達機構がアストロサイト並びに，繊維芽細胞のNGF産生調節に関与しているかを観察した。PMA，sphingosineによるprotein kinase Cの活性化，及び抑制，LiClによるinositolの低下，ionomycinによるCa^{++}の上昇，並びにforskolinによる内因性のcAMPの上昇はNGFの生合成に関与していないことが判明した。しかしながら，db-cAMPはaFGF存在下のアストロサイト，aFGF存在下，非存在下の線維芽細胞のNGF産生を著明に促進した。また，sodium butyrateは，aFGF存在下のみで線維芽細胞のNGF産生を促進した。以上の結果は，NGF産生の制御機構は，アストロサイトと，線維芽細胞では多少異なっていることを示しており，過剰量のcAMPとsodium butyrateは，異なった機序で，NGFの産生を制御し得ることが判明したが，その生理的役割については不明である。アストロサイト，線維芽細胞の

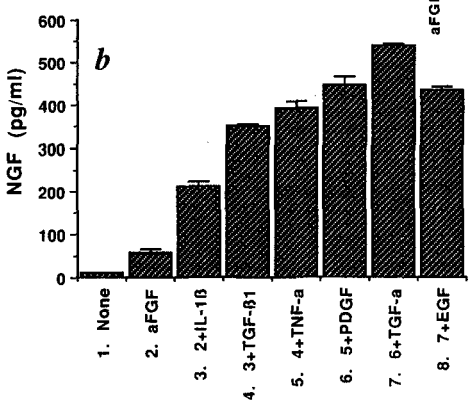
NGF産生を調節する種々のcytokineは，aFGFとbFGF，EGFとTGF-αの2つの組み合わせを除いて，協調的にNGF産生を促進することが判明した（Fig.2，3）。aFGFとbFGF，ならびにEGFとTGF-αのreceptorはそれぞれ少なくとも一部共通であると考えられていることから，これらのcytokineはreceptorの段階で，競合を起こす可能性がある。

【結語】アストロサイトならびに線維芽細胞のNGFの産生は，脳及び末梢組織に損傷が加わった際に供給される可能性がある種々のcytokineにより，協調的に促進されることが判明し，アストロサイト，線維芽細胞により産生されるNGFは，障害が起こった際の神経細胞の再生を促進する役割を担っているものと推測された。









Values represent means ± S.D. of three determinations.

【References】

1. Honegger, P. (1983) Monogr. Neurol. Sci. 9, 36-42.
2. Hatanaka, H. and Tsukui, H. (1986) Dev. Brain Res. 30, 47-56.
3. Ayer-Lelievre, C., et al. (1988) Science 240, 1339-1341.
4. Korsching, S., et al. (1985) EMBO J. 4, 1389-1393.
5. Furukawa, S., et al. (1986) Biochem. Biophys. Res. Com. 136, 57-63.
6. Yoshida, K., and Gage, F.H. (1991) Brain Res. 538, 118-126.

136 分化した神経芽腫細胞における新生期脳由来抗癌因子ＮＢＣＦに対する感受性低下：ＮＢＣＦ拮抗因子と細胞内カルシウムイオンの関与

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だけ抗癌因子NBCF（62 kDa, pI 9.1）を分泌するが、NBCFは各種腫瘍細胞、特に神経芽細胞腫に対して顕著な増殖抑制と致死作用を示す。NBCF分子のＮ端1-14アミノ酸残基を認識する抗体を添加すると、NBCFによる細胞増殖抑制活性とミトコンドリア脱水素酵素抑制活性とが部分阻害された。ヒト神経芽腫 NB1細胞は、グリア芽腫細胞由来因子で２－４日間処理すると、神経突起を伸展させると共に、NBCFへの感受性が低下するが、この感受性低下には新たな蛋白質合成を必要とすることが判明していた。 NB1細胞は未分化でも分化した状態でも、細胞質内遊離Ca^{2+}キレート剤のBAPTA･AMを投与すると、NBCF感受性が亢進した。分化した NB1細胞の分泌物質を未分化の NB1細胞に６時間添加するとNBCF感受性が低下した。これらの結果は、NBCF拮抗作用として遅効性を示すグリア芽腫細胞由来因子に対して、分化した状態で分泌されるNBCF拮抗因子は速効性があり、細胞質内遊離Ca^{2+}がNBCF拮抗と分化状態とに関与することを示唆する。

［緒言］
脳の発生過程でのプログラム細胞死は、初発要因として神経栄養（生存）因子の不足が主に考えられてきたが、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、発生過程の神経細胞の培養系での細胞死は蛋白質合成やＲＮＡ合成の阻害剤で救済される例が少なくないので、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発するキラー液性因子の関与があると考えられる。Johnsonらは神経細胞死を起こす脳由来キラー蛋白質数種を電気泳動的に分離した。我々は正常細胞よりも腫瘍細胞に選択的に増殖抑制 DNA合成抑制する活性を指標に(5)。マウス脳がプログラム死の起こる新生期と胎生末期にのみ分泌する細胞増殖抑制性の蛋白質を見出だし(1)、新生期脳由来抗癌因子NBCF(neonatal bain-derived carcino static factor ）と命名し、62kDa 、pI9.1 の蛋白質として精製し、アミノ酸配列順序を一部決定して新規の蛋白質であることを示した(4)。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(1-4)。
［方法］ ①NBCFとヒトグリア芽腫A172細胞由来因子（A172dGF)はゲル濾過・アニオン交換HPLCでの部分精製標品を用い、ヒト神経芽腫 NB1細胞またはマウス神経芽腫 NAs-1細胞に投与した。 ② NB1細胞の培養後液は、A172dFで３日間処理して分化させた NB1細胞または未分化のままの NB1細胞を８時間無血清培養した後に培養液をYM5限外濾過膜で濃縮したものを用いた。 ③NBCF抗血清はNBCF分子のＮ端1-14アミノ酸残基に相当する合成ペプチドを担体蛋白質 KLHに共有結合させてウサギに投与して取得した。 ④細胞体以上の長さの神経突起を計測し、細胞増殖はコールターカウンターで、ミトコンドリア脱水素酵素活性は MTT色素還元法で各々定量した。
［結果と考察］
①マウス神経芽腫 NAs-1細胞の細胞増殖とミトコンドリア脱水素酵素活性は、NBCFの投与で22%, 48%に各々低下するが、NBCF処理の直前にNBCF抗血清(Anti-N14 NBCF-KLH）を添加しておくとその濃度に依存してNBCF活性が部分的に阻害された（図1)。担体蛋白質KLH に対する抗血清では阻害されなかった。 ②ヒト神経芽腫 NB1細胞の増殖は、ヒトグリア芽腫A172細胞由来因子（A172dGF)を100 ug/ml で処理すると細胞当たり 0.9個だった神経突起が 2-4日で 3.0-4.1個に増加すると共に、この分化誘導に伴いNBCF感受性が低下した。A172dF処理しない未分化のままの NB1細胞はNBCF感受性が大きいが、NBCF処理の６時間前に、分化した NB1細胞の分泌物質(>5 kDa; DiffNB1dF) で添加しておくと添加濃度に依存してNBCF感受性が顕著に低下することが MTT還元能から示された（図２）。未分化の NB1細胞の分泌物質(>5 kDa; UndiffNB1dF) は DiffNB1dFと同じ添加濃度範囲では顕著なNBCF感受性低下は見られなかった。これらの結果は分化した NB1細胞のみが分泌するNBCF拮抗因子が存在し、このNBCF拮抗作用が６時間以内で発現する速効性があることを示す（図３）。 ③ NB1細胞を細胞質内遊離Ca^{2+}キレート剤BAPTA･AMで処理するとNBCF感受性が顕著に増大することが未分化および分化した状態のいずれでも見られた（図４）。Ca^{2+}チャネル遮断剤のnifedipineでは有意差がなかったが、verapamil では分化した NB1細胞のNBCF感受性を幾分亢進させた。Ca^{2+}チャネル作働薬のBay K 8644では未分化および分化した NB1細胞の両方でNBCF感受性の低下が見られた。これらの結果は細胞質内遊離Ca^{2+}濃度がNBCF感受性と逆相関することを示す。 ④A172dFによって NB1細胞の神経突起が増加すると、NBCF感受性が低下するという逆相関性が示されているが、この感受性低下は、グリア因子による新たな蛋白質合成が必要であることが判明しているので、NBCF拮抗因子としての DiffNB1dFであり、 UndiffNB1dFには含まれないことが示唆される（図３）。
［文献］(1) Matsuno, T. & Miwa, N.: Med.Sci.Res. 17, 425-426, 1989. (2) Miwa et al.: J.Cancer Res. Clin. Oncol. 110,196-202,1985. (3) Miwa et al.: J. Cell. Physiol.132, 538-544, 1987 (4) Miwa, N. et al.: Biochim.Biophys.Acta 1034, 309-317 1990 (5)Miwa, N.et al.: J.Antibiotics 36, 715-720, 1983. (6)Miwa et al. : Human Cell 3, 137-145, 1990 (7)Miwa et al. : Biotherpy 2, 311-317, 1988

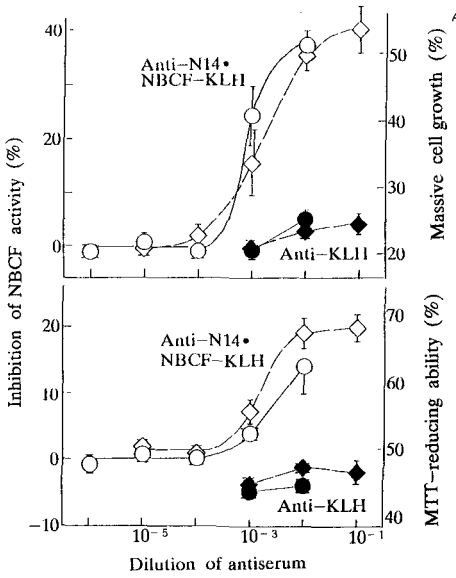


図 1

Counteraction of anti-NBCF serum to cell growth-inhibitory activity and mitochondrial deHase-inhibitory activity of NBCF.

DEAE-3SW/HPLC-purified NBCF was administered at fixed dose of 97 ng/ml to mouse neuroblastoma NAs-1 cells, inducing 79% inhibition of massive cell growth as assayed with Coulter counter after 5-day treatment and 52% inhibition of mitochondrial dehydrogenase activity as assayed by MTT reduction method after 20-hr treatment

Anti-N14•NBCF-KLH serum or anti-KLH serum was to the cells at a diversity of dilution rates immediately before NBCF treatment .

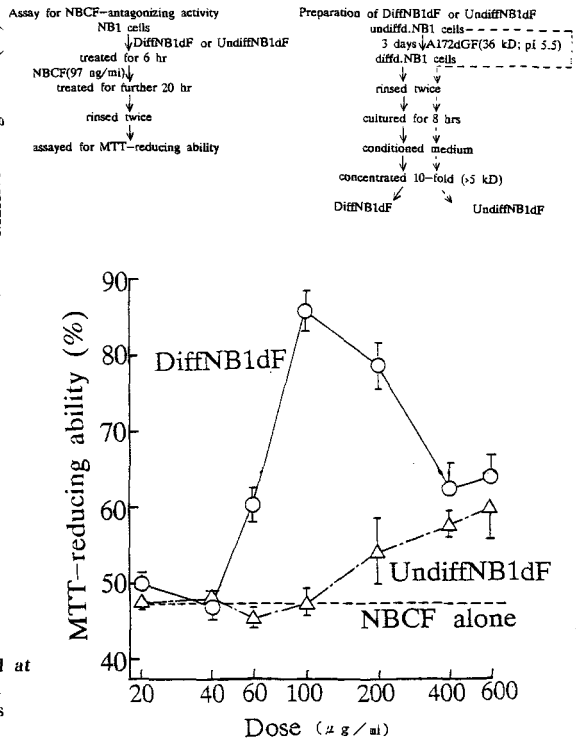


図 2

Antagonization of DiffNB1dF to NBCF activity in human neuroblastoma NB1 cells.

Various doses of DiffNB1dF or UndiffNB1dF were administered to NB1 cells, which were further treated with DEAE-3SW/HPLC-purified NBCF of 97 ng/ml. The value of control cells receiving no factors was regarded as 100% of MTT-reducing ability.

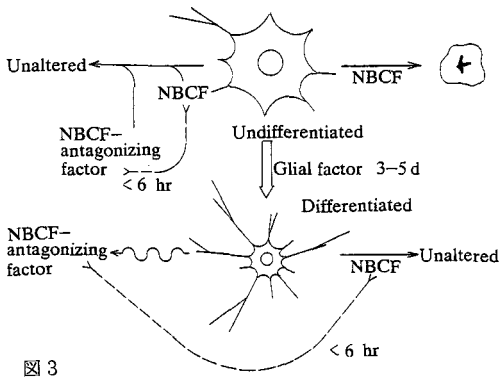


図 3

Rapid effect of NBCF-antagonizing factor and slow effect of A172-derived glial factor on protecting human neuroblastoma NB1 cells against cytocidal action of NBCF

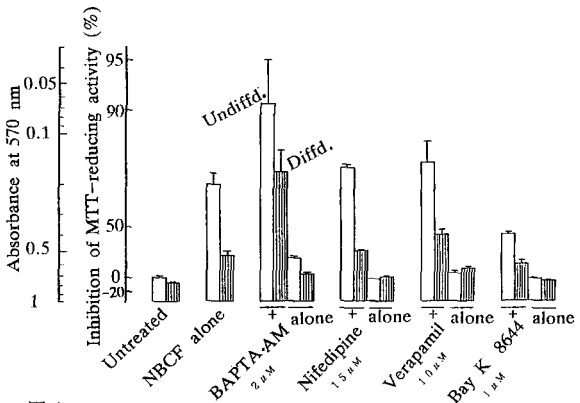


図 4

Effects of agents altering intracellular Ca^{2+} concentrations on susceptibility of human neuroblastoma NB1 cells to NBCF.

The cells were treated for 6 hr with DEAE-3SW/HPLC-purified NBCF (97 ng/ml) alone, NBCF plus a $[Ca^{2+}]_{in}$-altering agent or the agent alone when undifferentiated or differentiated by treatment with A172-derived glial factor (100 μg/ml) for 4 days. Then the cells were rinsed and assayed for MTT reducing ability.

137 形態形成期の脳に特異的に存在するプロテオグリカン

―モノクローナル抗体を用いた研究―

大平敦彦，松井ふみ子，前田信明
（愛知県コロニー・発達障害研究所・発生学部）

〔要約〕
生後１０日のラット脳から精製した可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（ＣＳＰＧ）を抗原として、抗ＣＳＰＧモノクローナル抗体を作製した。そのうちのひとつ、１Ｇ２は、コア蛋白部分の分子量が220 kDa のＣＳＰＧ（ＣＳＰＧ－２２０）と、150 kDa のＣＳＰＧ（ＣＳＰＧ－１５０）を認識した。どちらのコア蛋白質も、各種グリコシダーゼで消化した後でも１Ｇ２と反応することから、１Ｇ２エピトープはペプチド部分にあると推定された。軟骨・骨格筋・肺・肝臓・腎臓のホモジェネート中には、１Ｇ２と反応するプロテオグリカンは検出できなかった。いろいろな発達段階のラット大脳におけるＣＳＰＧ－２２０とＣＳＰＧ－１５０の量を、免疫ブロット法により調べた。その結果、ＣＳＰＧ－２２０は、形態形成期の脳には存在するが、成熟脳では検出されないことが明らかとなった。一方、ＣＳＰＧ－１５０は、成熟脳にも多く存在していた。このように、両者の発現は、脳の発達過程において個別に制御されていることが分かった。

脳の発達の様々な段階にプロテオグリカンが関与していることが、しだいに明らかになってきた（文献１の総説参照）。しかし、脳には、物理化学的性質の類似した多くの種類のプロテオグリカンが存在している(2, 3)ため、個々のプロテオグリカン分子種を有効に識別する方法を開発する必要がある。そこで、私達は、ラット脳から精製した可溶性ＣＳＰＧ混合物を抗原として、個々のＣＳＰＧコア蛋白質に特異性を持つモノクローナル抗体の作製を行っている。なお、抗原としたＣＳＰＧ混合物には、神経突起の伸展を調節する活性があることが、報告されている(4, 5)。

［材料および方法］

抗原とした可溶性ＣＳＰＧｓは、生後１０日のＳＤラット脳よりＰＢＳで抽出した後、すでに報告した方法(2) により、イオン交換、ゲルろ過、超遠心分離を組みあわせて精製した。

抗原をＣ３Ｈマウスに免疫し、そのひ臓細胞とＰ３－Ｕ１ミエローマ細胞を融合させ、ハイブリドーマを作製した。陽性クローンの一次スクリーニングはＥＬＩＳＡ法で行った。陽性クローン１Ｇ２は、ＩｇＧ$_1$ κ型の抗体を産生することが分かった。

プロテオグリカンの各種糖側鎖を除去するため、コンドロイチナーゼＡＢＣ，ニューラミニダーゼ，エンド－β－ガラクトシダーゼ，エンドグリコシダーゼＦ，Ｎ－グリコシダーゼ，および０－グリコシダーゼを用いた。

組織のホモジェネートは、湿重量１ｇの組織を、蛋白分解酵素阻害剤を含む３ ml の氷冷ＰＢＳ中で、ガラステフロンホモゲナイザーを用いて調製した。ホモジェネートの一部は、４℃で、6,000 x g, 20 分遠心することにより、ＰＢＳ可溶性画分と不溶性画分とに分離した。

ＣＳＰＧコア蛋白質は、３％濃縮ゲル－６％分離ゲルからなるＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離・分析した。一部は、トリス－グリシン緩衝液中でＰＶＤＦ膜に転写し、各種の抗体やレクチンとの反応性を調べた。

［結果と考察］

生後１０日のラット脳をＰＢＳで処理すると、主なものだけでも、５種類のＣＳＰＧｓが可溶化できる。それらのコア蛋白質の分子量は、250, 220, 150, 130, 93 kDaであった (2)。免疫ブロット法により調べた結果、モノクローナル抗体１Ｇ２は、220 kDa と150 kDa の２つのコア蛋白質を認識することが分かった。２つのコア蛋白質に共通のエピトープが存在することを確認するため、150 kDa のコア蛋白バンドに結合した抗体をＫＳＣＮで溶出し、それを 220 kDaのコア蛋

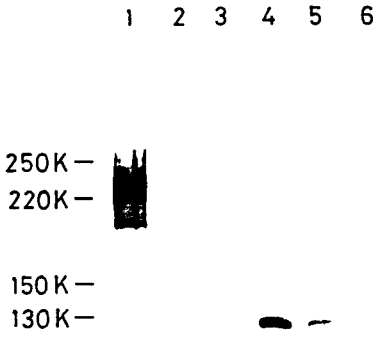


図1．　1G2抗体を用いたホモジェネートの免疫ブロット分析。　1，大脳；2，骨格筋；3，肺；4，肝臓；5，腎臓；6，骨端軟骨。

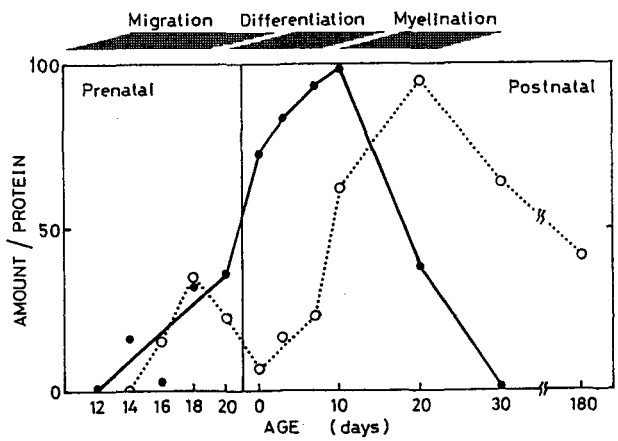


図2．　大脳の発達に伴うCSPG－220（－●－）とCSPG－150（・○・）の量的変動。　横軸，ラットの日齢；　縦軸，蛋白量を基準とした時の、それぞれのCSPGの相対量。

白質に反応させた。その結果、この抗体は、220 kDa コア蛋白バンドにも反応した。

脳のCSPGsには、コンドロイチン硫酸鎖以外に、HNK－1糖鎖や糖蛋白型オリゴ糖鎖が結合していることを、確認した。これらの糖鎖を、6種類の糖鎖切断酵素を用いて、可能な限り除去しても、なお、1G2とそれぞれのコア蛋白質との反応性には変化がみられなかった。したがって、1G2は、ペプチド構造を認識する抗体であると推定された。

生後10日のラットから大脳・骨端軟骨・骨格筋・肺・肝臓・腎臓のホモジェネートを調製し、50μgの蛋白量をSDS－PAGEで分離後、PVDF膜に転写して1G2抗体との反応性を調べた。プロテオグリカン特有の巾広いバンドは、脳にのみ検出されたことから（図1）、1G2が認識するCSPGsは、主に脳に存在する分子種であることが分かった。

胎生12日から成獣まで、いろいろな発達段階の大脳において、1G2が認識するプロテオグリカンの90％以上がPBSで可溶化された。PBS抽出物をコンドロイチナーゼABCで消化した後、免疫ブロット法によりCSPG－220とCSPG－150のコア蛋白質を1G2で染色した。染色の程度は、デンシトメーターで定量した。その結果、CSPG－220は、胎生14日に検出可能となり、生後10日あたりの脳に最も多量に存在すること、および脳がほぼ成熟した生後30日には、ほとんど検出できなくなることが分かった（図2）。一方、CSPG－150は、胎生16日に検出可能となり、胎生18日ころまで増加した。その後、一旦減少するが、出生後再び増加し、生後20日ころ最大となった。そして、成獣の脳にも充分検出できるだけ存在することも分かった。

以上の結果から、モノクローナル抗体1G2は、時間的に個別に発現制御をうけている2つの脳特異CSPGsを認識することが分かった。2つのCSPGsのコア蛋白質に、どういう共通構造が存在するかは、今後の課題である。

［文献］

1．Maeda, N., and Oohira, A. (1991) Trend. Glycosci. Glycotechnol., 3, 28-34.

2．Oohira, A., Matsui, F., Matsuda, M., Takida, H., and Kuboki, Y. (1988) J. Biol. Chem., 263, 10240-10246.

3．Herndon, M. E., and Lander, A. D. (1990) Neuron, 4, 949-961.

4．Iijima, N., Oohira, A., Mori, T., Kitabatake, K., and Kohsaka, S. (1991) J. Neurochem., 56, 706-708.

5．Oohira, A., Matsui, F., and Katoh-Semba, R. (1991) J. Neurosci., 11, 822-828.

138 脳可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカンによるＰＣ１２細胞の増殖阻害

仙波りつ子、大平敦彦＊
（愛知県コロニー・研究所・周生期、＊発生）

〔要約〕

脳可溶性画分より精製されたコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）によるPC12細胞の増殖阻害について検討した。１）PC12D細胞は、doubling time 2日で増殖するが、培養液に50 nmolウロン酸/mlのCSPG混合物を添加すると、培養6時間頃から細胞数が全く増加しなかった。この結果は、CSPGをあらかじめ基質に結合させても観察された。２）CSPGによるPC12D細胞の50%増殖阻害は約2 nmol/mlであった。３）CSPG混合物を分子量250Kのコアタンパクをもつ CSPGと、150K、130KのCSPGを含む画分に分画し、同様の実験を行なったところ、いずれのCSPG分画でも50 nmol/mlの濃度でPC12D細胞の増殖阻害が観察された。３）CSPGをコアタンパク部分と糖鎖であるCS部分に分離し、上記の実験を行なうと、コアタンパク部分に阻害活性が検出された。４）^{3}HチミジンのDNAへの取り込みを調べた。培養液交換直後に2時間、細胞をパルスラベルすると、CSPG存在下でチミジンの取り込みは60%ほど高くなっていた。その後12時間までは、対照群と変わらなかったが、以後減少していた。以上の結果より、CSPGはPC12細胞の増殖阻害はするが、チミジンの取り込みは一過性に促進させることが明らかになった。

近年、プロテオグリカン（PG）は、神経系の発達過程においてきわめて重要な作用を持つと考えられてきている。私達はこれまでに、神経細胞（PC12細胞）の分化にともない、PGの量的、質的変化が観察されることを報告した（1-6）。また、脳可溶性のコンドロイチン硫酸（CS）PGをPC12細胞の培養液に添加すると、突起形成が阻害されることも報告した（3、5、7）。今回、CSPGのPC12細胞に対する作用が、突起形成阻害だけでなく、増殖阻害にもあることが明らかになったので報告する。CSPGによるPC12細胞の増殖阻害は突起形成阻害に先行するように思われた。

［実験方法］ PC12D細胞は5%牛胎仔血清、5 μg/mlインシュリン、100 U/mlペニシリンを含むダルベッコ改変培地を用い、ポリリジンコートした培養皿に約12000 cells/cm^{2}の割合で蒔いた。24時間後、NGFおよびCSPGを含む培地にかえた。CSPGをあらかじめ基質に結合させるには、ポリリジンコートした培養皿に上記の培地に溶解したCSPGを加え、CO_2インキュベーターで一晩incubateし、使用直前に血清を含まない培地で２回洗浄した。チミジンの取り込みは、培地交換後、0、2、6、10、24、48 hで2時間パルスラベルした。ラベル後、細胞を血清を含まない培地で3回洗浄し、10% TCAで、4° C、2時間処理した。TCA処理によって、可溶性のチミジンを除去した。培養皿を水で３回洗浄し、DNAに取り込まれたチミジンを1 M NaOHで可溶化した。1 M HClで中和後、^{3}Hの放射活性を測定した。

［結果と考察］ PC12D細胞をポリリジンコートした培養皿に蒔き、24時間後に新しい培地に交換し、0、1、2日で細胞数を測定した。PC12D細胞は神経成長因子（NGF）存在、非存在にかかわらず、doubling time 2日で増殖した。一方、この系に、CSPGを加えると、細胞数は6時間ころから増加しなかった（図１）。CSPGをあらかじめ基質に結合させた後PC12D細胞を蒔いたところ、ポリリジンだけを基質とした場合と同じ数の細胞が培養皿に接着したが、その後、細胞数の増加、突起形成は観察されなかった。この結果から、CSPG存在下でPC12D細胞の細胞数の増加がみられないのは、細胞が基質に接着しないために起こるのではなく、増殖阻害によると考えられた。

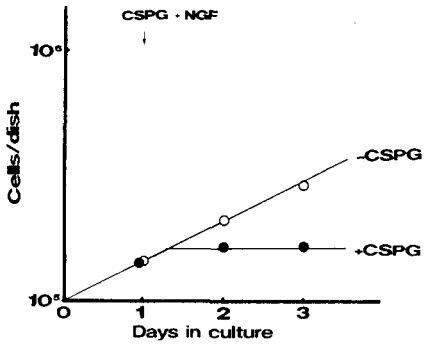


図1　脳可溶性CSPG存在下、非存在下における PC12D細胞の増殖曲線

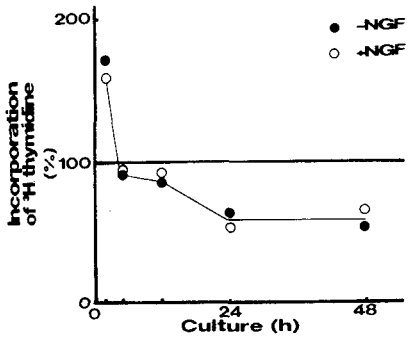


図2　PC12D細胞のDNAへのチミジンの取り込み

CSPG存在下での取り込みがコントロールの相対値として表わされている。

脳CSPGの濃度を変えて細胞増殖の阻害曲線を描くと、50%阻害は約2 nmolウロン酸/mlであった。突起形成の阻害は約5 nmol/mlであり、比較的よく一致していた。 可溶性画分から精製されたCSPGには、コアタンパクのサイズの異なる数種類のCSPGが含まれているので、次に、これらを分子量250Kのコアタンパクをもつ CSPG (CSPG-250) と、150Kおよび130Kののコアタンパクをもつ CSPGの混合物 (Low mix) に分画し、PC12D細胞の増殖に対する効果を調べた。 CSPG-250、 Low mixいずもPC12D細胞の増殖を阻害した。 しかしながら、軟骨特有のCSPG (PGH) あるいはヒアルロン酸と複合体を形成しているaggregated PGHには、PC12D細胞の増殖阻害活性は認められなかった。PGはコアタンパク部分と糖鎖部分に分けることができることから、これらを分画しPC12D細胞に作用させた。 糖鎖部分であるCSには、突起形成の場合と同様阻害活性がなかった。 一方、コアタンパク部分に関しては、 いずれのCSPGから調製されたコアタンパクにもPC12D細胞の増殖阻害活性がみられた。 この点も突起形成阻害の場合と一致していた。先にも述べたように、PC12D細胞の増殖が、 CSPGによって阻害されるされるのは細胞分裂が阻害されることによるものと考えられたので、チミジンの取り込みを調べた。培養液を交換後ただちに細胞をチミジンで 2時間ラベルした場合、チミジンのDNAへの取り込みはCSPG存在下で約160%に上昇していた (図2)。 その後、12時間までは、CSPG存在下、非存在下でチミジンの取り込みには有意な差がなかったが、24、48ではCSPG存在下でその取り込みは減少していた。細胞周期にはG1、S、G2、M期の4 phasesがあるが、細胞増殖阻害をする物質は大半がG1期に作用する。 しかしながら、 CSPGによる阻害はG1期ではなく、突起形成阻害に先立って起こるように思われる。今後この点について検討する。

[文献] 1. Katoh-Semba, R., Oohira, A., Sano, M., Watanabe, K., Kitajima, S., and Kahiwamata, S. (1989) J. Neurochem., 52, 889-895 2. Katoh-Semba, R., Oohira, A., Sano, M., Watanabe, K., Kitajima, S., and Kahiwamata, S. (1989) Biomed. Res., 10, 499-508 3. 仙波りつ子 (1990) 神経研究の進歩、34巻、612-618 4. 仙波りつ子、大平敦彦 (1990) 細胞、22巻、340-345 5. Katoh-Semba, Oohira, A., and Kashiwamata, S. (1990) J. Neurochem., 55, 1749-1757 6. 仙波りつ子、大平敦彦、柏俣重夫 (1990) 神経化学、29巻、362-363 7. Oohira, A., Matsui, F., and Katoh-Semba, R. (1991) J. Neurosci., 11, 822-827

139 Type1,Type2アストロサイト細胞系譜(Cell lineage)に伴う膜表面中性糖脂質の変化

矢崎貴仁、阿相皓晃、植村慶一
(慶應大・医・生理)

〔要約〕

胎生ラット脳より分離・培養したアストロサイトを用い、Type1,Type2細胞系譜(Cell lineage)に伴う膜表面中性糖脂質の量的変化を、HPLC及び免疫組織化学により検討した。HPLCによる分析の結果、Type2アストロサイトの場合はType1アストロサイトの場合に比べ Cerebrosides with nonhydroxy fatty acides (NFA) およびCeramide dihexoside (CDH) の値が有意に上昇し、また抗アシアロGM1および抗アシアロGM2抗体を用いた免疫染色で、Type2アストロサイトはType1アストロサイトより強い陽性反応を示した。アストロサイトがType1からType2へ変換する際、中性糖脂質の組成に変化が認められたことから、それらの細胞で発現する膜表面中性糖脂質の変化が細胞系譜に密接な関係のあることが示唆された。

哺乳類中枢神経系のグリア細胞系譜の中でオリゴデンドロサイトおよびType2アストロサイトへの分化に際しては、O-2A progenitor cell[1] が重要な役割を果たすが、in vitro では培地中の血清およびPDGF濃度を調整することによってO-2A progenitor cellからType2 アストロサイトへの分化を誘導することが可能である[2][3][4][5]。さらにType1 progenitor cell から分化するType1アストロサイトは in vitro transformation によってType2から誘導されたり、逆にType1からType2アストロサイトへの変換もあり、これらの細胞系譜は複雑で、そのメカニズムについてはまだよく解っていない。一方、グリア細胞に豊富に含まれる中性糖脂質は細胞膜表面に存在し、細胞の成長・認識・分化に重要な役割を果たしており[6][7][8]、発達過程においてはその構成が変化することが知られている[9]。そこでわれわれは、発達過程に伴うグリア細胞系譜がどのようなメカニズムで行われているのかを知る手がかりとして、培養アストロサイトを用いType1からType2へ分化を誘導したうえで、それぞれの細胞膜表面に発現される中性糖脂質の変化につき検討を行った。

〔方法〕

(1)アストロサイトの培養：アストロサイトは胎生15日目のウィスター系ラット大脳皮質よりトリプシンで単離し、10%ウシ胎児血清(FCS)を添加したDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)中で培養し単層培養系を得た。Type1アストロサイトがconfluentになったものを無血清培地(TYI-100)に交換し、24-48時間培養してType2 アストロサイトへの分化を誘導した。

(2)HPLCによる中性糖脂質の分析：Type1およびType2の、Cerebrosides with nonhydroxy fatty acids (NFA), Ceramide dihexoside (CDH), Ceramide trihexoside (CTH) について、Jungalwalaら[10]の方法を用いて測定した。また中性糖脂質中に含まれるGalactose量の測定も行った[11]。

(3) 免疫組織化学：Type1およびType2アストロサイトそれぞれについて、一次抗体として抗アシアロGM1または抗アシアロGM2ポリクローナル抗体と抗GFAPモノクローナル抗体、二次抗体にFITC標識抗ウサギIgG とローダミン標識抗マウスIgG を用いた免疫二重染色を施行し、アシアロGM1およびアシアロGM2の各種アストロサイトでの発現の有無を確認した。またType1,Type2アストロサイトの同定にモノクローナルA2B5抗体、モノクローナルRan2抗体（Dr.Raff M.C.より供与）、および抗GFAPポリクローナル抗体、細胞膜のコントロールに抗N-CAMモノクローナル抗体を用いた単染色を行った。

〔結果と考察〕

HPLCによる中性糖脂質分析では、NFAおよびCDHがType2アストロサイトにおいて有意に高値を示し、CTHはType1に比べてType2では非常に低値であった(Table1)。また中性糖脂質中のGalactose量はType1では8.26μg/mg-proteinであったのに対しType2では16.55μg/mgと有意に上昇していた。免疫組織化学的検索で、Type1アストロサイトは抗アシアロGM1抗体にごく弱い陽性を示すものがあったが、Type2アストロサイトでは強い陽性反応を示した(Fig.1.2)。

これまでに考えられている糖脂質の合成系はFig.3に示す通りであるが、今回の結果よりType1アストロサイトにおいてはCDHからCTHへの合成反応が進んでいるが、Type2アストロサイトでは逆にCDHからアシアロGM2(GA2)-アシアロGM1(GA1)への反応系が促進されている可能性が考えられた。これには合成系の酵素活性が関与していることも考えられるが、いずれにしても

今回の in vitro におけるType1からType2へのアストロサイトの分化誘導と細胞膜表面の中性糖脂質とが密接な関係にあることが示唆される。またType2アストロサイトにおいてガングリオシドの合成系反応が進みにくいとすれば、Type2アストロサイトでのガングリオシドのもつ生理活性も異なることが予想され興味深い。今後さらに薄層クロマトグラフィーを用いたイムノブロットで検討を加え、アストロサイトの細胞系譜(Cell lineage)に必要な物質の同定を進める予定である。

	Type1 rich Astrocytes cultures	Type2 rich Astrocytes cultures
NFA	258.4±26.8	441.9±72.8
CDH	49.6±11.7	331.9±38.1
CTH	32.2±12.0	N D
Glob	68.1± 4.6	249.9±52.2

Note : NFA : Cerebrosides with nonhydroxy fatty acids
CDH : Ceramide dihexoside(Ceramide-glucose-galactose)
CTH : Ceramide trihexoside(Ceramide-glucose-galactose-galactose)
Glob : Tetrahexosylceramide(GalNAc(β_1−3)(Gal(α_1−4)Gal(β_1−4)Glc(β_1−1)cer)

Table 1. Neutral Glycolipid Contents in Cultured Astrocytes
(p moles-glycolipid/mg-protein)

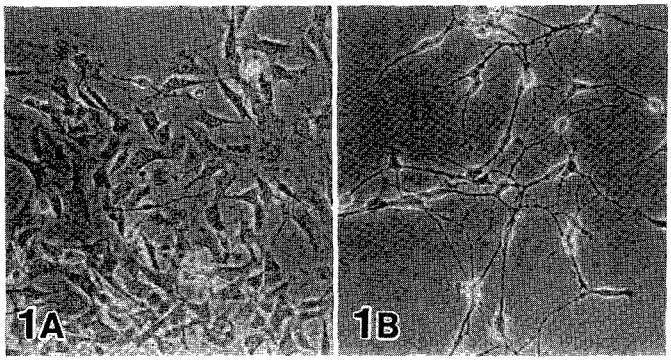


Fig. 1. Type1アストロサイトからType2アストロサイトへの分化誘導
A : Type1 B : Type2

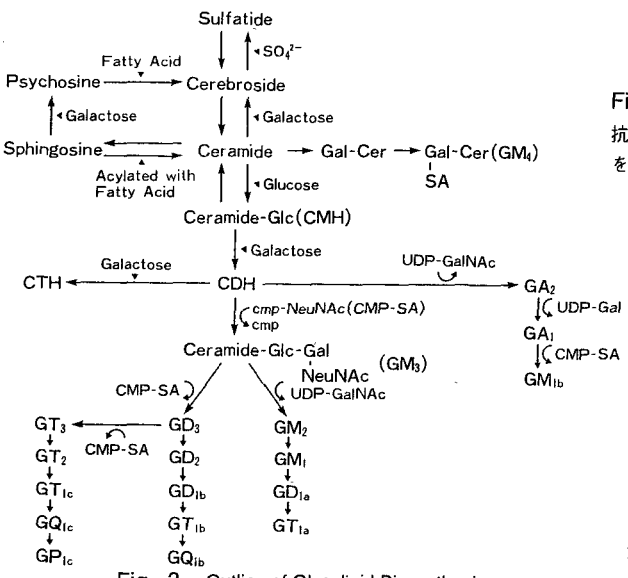


Fig. 3. Outline of Glycolipid Biosynthesis

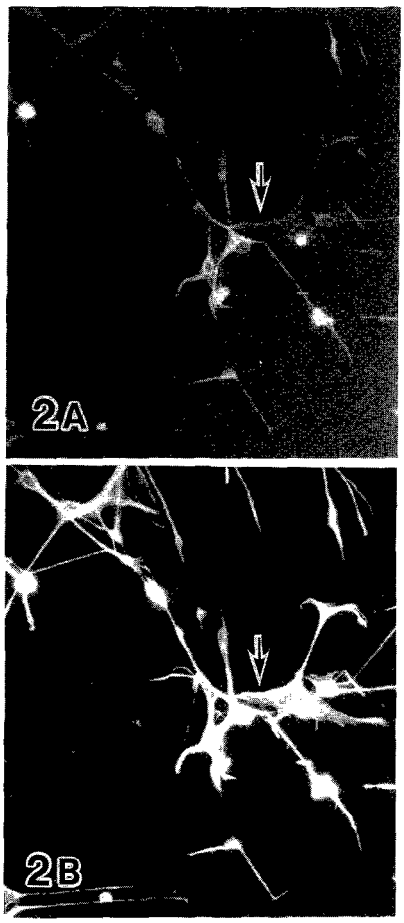


Fig. 2.
抗ヒトアシアロGM1抗体及び抗GFAPモノクローナル抗体を用いた免疫二重染色 A: アシアロGM1 B: GFAP

〔文献〕

1) Raff,M.C. et al. (1983) Nature 303, 390-396
2) Abney,E.R. et al. (1981) Dev.Biol. 83, 301-310
3) Williams,B.P. et al. (1985) Dev.Biol. 112, 126-134
4) Lillien,L.E. et al. (1988) Neuron 1, 485-494
5) Lillien,L.E. and Raff,M.C. (1990) Neuron 4, 525-534
6) Hakomori,S. (1981) Annu.Rev.Biochem. 50, 733-764
7) Ledeen,R.W.(1983)Handbook of Neurochem. 3, PlenumPress
8) Yamakawa,T. and Nagai,Y. (1978) TIBS 3, 128-131
9) Hilbig,R. and Rahmann,H.(1983/84)Dev.Neurosci. 6,260-270
10) Jungalwala,F.B. et al. (1977) J.Lipid Res. 18, 285-292
11) Neskovic,N. et al. (1972) Clinica Chemica Acta 38, 147-153

140 SV 40 ori-によるマウスO-2A lineage cell のcell line化

大谷邦彦, 錫村明生**, 丸野内棣***, 中島泉*, 高橋昭
(名古屋大 医 : 神経内科, 免疫*, 藤田保健衛生大 : 神経内科**, 応用細胞***)

〔要約〕
マウスの 初代混合グリア培養 を行い、origin-defective simian virus-40 (SV 40 ori-) DNA とpSV2neo DNA を electroporation法にて移入した。限界稀釈法によるクローニングで得られたクローンの中の 1 つは、10% ウシ血清(CS) での培養下では平坦な細胞であるが、血清の濃度を下げると、oligodendrocyte類似の形態変化を示した。このcell lineは10% CS 培養下では、全てastrocyteのマーカーであるglial fibrillary acidic protein (GFAP)およびSV-40のlarge T抗原 陽性であり、A2B5、O4 抗原およびgalactocerebroside (GalC)は陰性であった。血清の濃度の低下による形態の変化に伴い、GFAP陽性率が低下し、O4抗原、GalC陽性細胞が出現した。A2B5は陰性であった。以上のことから、このcell lineはO-2A (oligodendrocyte / type 2 astrocyte) progenitor cell と類似した性質を持ったbipotential glial cell line と考えられた。また、O-2A progenitor cell が視神経以外の中枢神経系に存在することが示唆された。

［はじめに］
O-2A progenitor cellは培養条件によりoligodendrocyteにもtype 2 astrocyte にも分化しうるbipotential cellで、ラット の視神経においてその存在が証明されている[3]。最近小脳でもその存在が示唆されている[1]が、O-2A progenitor cellの分布および分化の機構には不明な点が多く残されている。今回、マウス 全脳(視神経を除く) 初代培養てごく早期にSV 40 ori- によるtransfectionを行い、bipotential glial cell のline 化を試みた。

［対象と方法］
生後 2 - 3 日目のC3H/HeNマウスの全脳より髄膜および視神経を剥離し、既報の方法により[4] 10% CSにて培養を行った。培養7日目にelectroporation法により、SV 40 ori- DNAとpSV2neo DNAを細胞内に移入した。electroporation 48 時間後よりG418によってselectionを開始し(最終濃度400ug/ml)、transformant を単離した。このtransformantを限界稀釈法によりクローニングしcell lineを得た。これらのcell lineを種々の濃度のCS存在下で培養し、形態変化およびphenotypic markerを経時的に検索した。phenotypic markerはA2B5抗体、O4抗体、抗GalC抗体、抗GFAP抗体を用い間接蛍光抗体法により染色[4]し、全細胞中の陽性細胞の比率を算定した。

[結果]
transfectionにより得られた100以上のcell lineの内の 1 つ(OS3)は次のような性質を示した。10%CS培養下では平坦な細胞であるが、2%CSないしは0.5%CS培養下では分裂、増殖はほとんど停止し、 4 - 5 日で突起を伸展してmultipolar cellへと変化し、胞体はphase brightとなりoligodendrocyte様の形態を示した。10%CS培養下では、全ての細胞がGFAP陽性であり、large T抗源も全ての細胞で強発現を示した。しかし、O4抗原、GalC、A2B5はいずれも陰性であった。2%CSないしは0.5%CSで培養した場合、A2B5はいずれの培養条件下でも陰性であったが、GFAP陽性細胞は培養期間に比例して減少し、突起を伸展したmultipolar cellの中にO4抗原ないしはGalC陽性の細胞が出現した。O4抗原陽性細胞（全細胞の50 - 70%）のうち一部はGFAPも陽性であったが、GalC陽性細胞（全細胞の10 - 20%）のほとんどはGFAP陰性であった。これらの性質は、transfectionより1年以上を経過した現在でも安定である。

[考察]

このOS3 cell lineは、培養条件の変化に伴い、A2B5は陰性であるが、他のtype 2 astrocyteとoligodendrocyteの形態学的、免疫組織化学的な性質を持ち合わせO-2A progenitor cellのcell lineと考えられた。また、このcell lineではGFAP発現そのものは非可逆的な現象ではなく、O-2A progenitor cellに対するciliary neurotrophic factorの作用[2]の場合と同じく可逆的であった。O-2A progenitor cellの局在についても現在議論のあるところであるが、今回マウスの全脳より髄膜を剥離する際に、視神経も同時に除いていることから、マウスにおいても視神経以外の中枢神経系にprogenitor cellが存在することを示唆しているものと考えられた。今後このOS3 cell lineは、O-2A progenitor cellから、oligodendrocyte、type 2 astrocyteへの分化を研究する上で有用であると考えられる。

［文献］

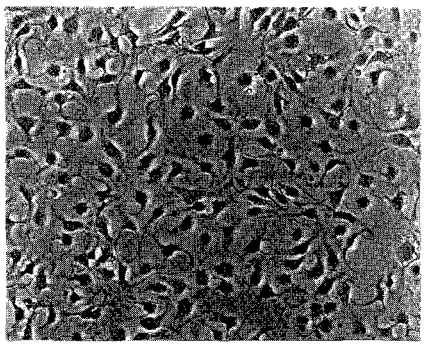
1) Levi,G., Gallo,V., and Ciotti,M.T. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 , 1504 - 1508

2) Lillien,L.E., Sendtner,M., Rohrer,H., Hughes,S.M., and Raff,M.C. (1988) Neuron 1 , 485 - 494

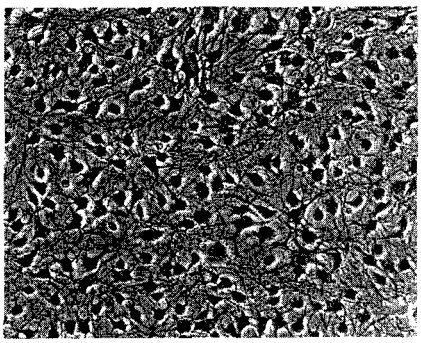
3) Raff,M.C., Miller R.H., and Noble,M.D. (1983) Nature, 303 , 390 - 396

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

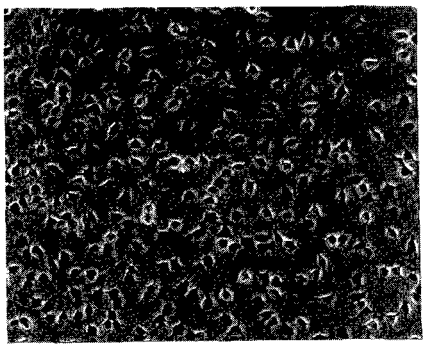
Fig. 1. Morphological transformation of OS3 cell line



A. 10% CS



B. 2% CS (short term culture)



C. 2% CS (long term culture)

141 神経細胞接着因子L1のエピトープを共有する新しいL1関連分子について

阿相皓晃、三浦正幸、小林正明、宮崎唯雄、植村慶一
（慶應大・医・生理）

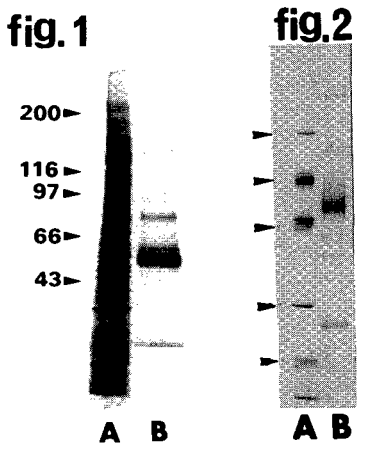
〔要約〕
神経細胞接着因子L1のエピトープを共有するL1関連分子を抗L1抗体を産生するハイブリドーマのサブクローン由来のモノクローナル抗体(2E12A3)を結合させたアフィニテイーカラムクロマトグラフィーより分離同定した。この分子は細胞接着を阻害したり、突起伸展を抑制し、小脳顆粒細胞の再凝集培養系における細胞移動を阻止するような生理活性を持つことから、L1関連分子の抑制性の機能ドメインについて詳細に検討している。

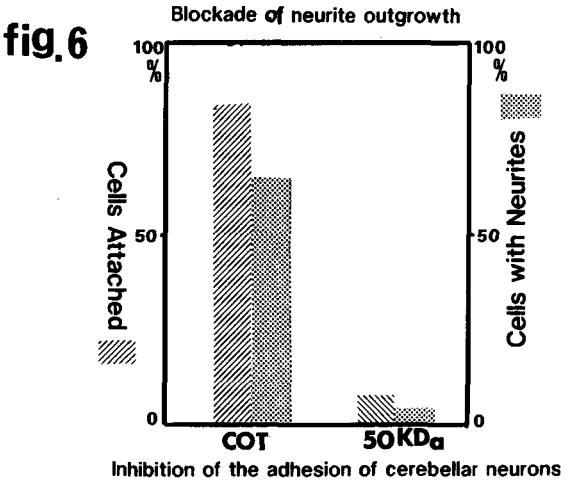
細胞接着分子群のなかでL1は膜貫通性の糖蛋白質(分子量200KDa)で、そのcDNAの構造解析からイムノグロブリンスーパーファミリーに属する分子であることが明らかにされてきている[1)2)3)]。L1の神経系における機能的役割は、細胞と細胞の認識や細胞間接着、移動、それに続く回路形成に関与していることが知られている[4)5)6)]。今回我々はこのL1分子のエピトープを共有する新しいL1関連分子を発見し、その性状について調べたので報告する。

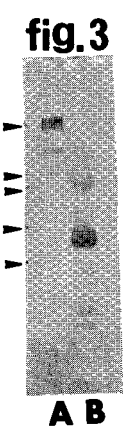
〔方法〕
マウス(2週齢前後)脳50gをプロテアーゼ・インヒビターを含む溶液でホモジナイズして膜分画を得、さらに0.5%NP40を含むトリスバッファーで可溶化した後、超遠心した上清をSepharose4Bに結合した抗L1抗体を産生するハイブリドーマのサブクローン由来のモノクローナル抗体(mAb2E12A3)のアフィニテイーカラムにかけ、洗浄後0.1%DOCを含んだジエチールアミン溶液(pH11.5)で溶出し精製した。抗体のアフィニテイーカラムで得られた分子のイムノブロッテイング解析はTowbinらの方法に従った[7)]。この分子の機能アッセイはin vitroでマイクロカルチャー系を使用したこれまでの方法に従った[5)]。さらにアフィニテイーカラムで使用した抗体による免疫組織化学的な検索には2次抗体にFITC標識ラットIgG抗体を用い共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

〔結果〕
mAb2E12A3を結合させたアフィニテイーカラムから得られたものは、分子量が約50KDaの蛋白質(GLM50と命名した。)と、その他にわずかに80KDaと28KDaの蛋白質(Fig.1,2)があった。これをL1のポリクローナル抗体を用いたイムノブロットで調べたところ、GLM50が強く染め出された(Fig.3,4)。しかしながら大腸菌で発現させたラットL1細胞内ドメインを抗原として得たL1分子のポリクローナル抗体(本大会で三浦らが発表)を用いたイムノブロットで検討したところ、この抗体は膜分画で200KDaと80KDaには反応するが、mAb2E12A3のアフィニテイーカラムより精製されたGLM50は反応しなかった(Fig.5)。さらにこのGLM50のバンドをゲルからイモビロン膜に転写してペプチド断片のアミノ酸配列をデータベースで検索したところ、これまでに報告されていない配列であることがわかった。これらの結果よりGLM50はL1のエピトープを共有する新しいL1関連分子であることが示唆された。さらに生理活性を調べるためにGLM50をスポット上にコートしたカバーグラス上に小脳顆粒細胞をのせたところ著しい接着阻害効果が認められたほか、突起伸展も著しく抑制された(Fig.6)。また顆粒細胞の細胞移動を調べるための再凝集培養系の中に直接GLM50(5μg/ml)を添加した場合も著しく突起伸展が抑制されるばかりでなく、完全に細胞移動を阻止した(Fig.7)。

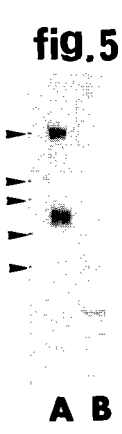
〔考察〕
細胞外マトリックス成分や細胞表面の膜糖蛋白質が細胞の発生・分化の過程で具体的にどのような役割を演じているかについてはよく解っていない。これまでに過剰の可溶性フィブロネクチンがフィブロネクチン依存性の接着性を阻害するという報告がある[9)]が、今回神経系の組織構築や形態形成において多機能を有するL1分子のエピトープを共有する分子が新しく同定され、しかもその機能的な役割が接着性・突起伸展・移動を抑制する効果を持つものであることは非常に興味深く、その活性が糖鎖部位にあるのか蛋白部位にあるのかについて検討中である。











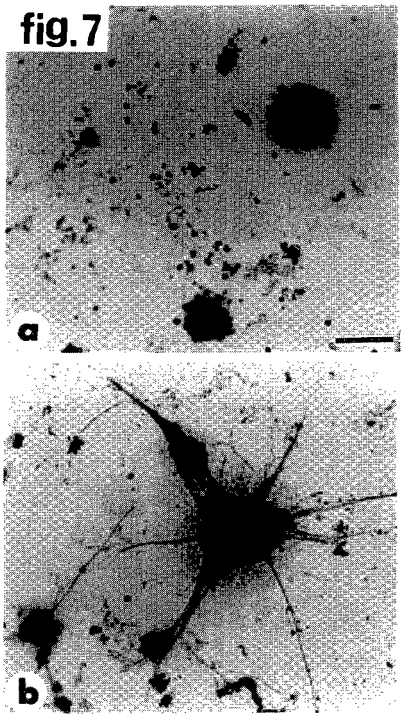


Fig.7. 小脳再凝集培養系における突起伸展抑制；
a:50KDaを添加 b:Control

〔文献〕

1) Moos,M. et al. (1988) Nature 334, 701-703

2) Miura,M. et al. (1991) FEBS lett. in press

3) Kobayashi, M. et al. (1991) submitted

4) Lindner,J. et al. (1983) Nature 305, 427-430

5) Keilhauer,G. et al. (1985) Nature 316, 728-730

6) Rathjen,F.G. et al. (1984) EMBO.J. 3, 1-10

7) Towbin,H. et al. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 76, 4350-4354

8) 阿相皓晃　他 (1990) 神経進歩 34, 620-631

9) Yamada,K. et al. (1984) J.C.B. 99, 29-36

(図)

Fig.1,2. SDS-PAGE後の銀染色像； 1A:マウス脳から得た可溶性膜分画(5.5μg), 1B:mAb2E12A3のアフィニテイーカラムより得られた蛋白質, 2A:低分子量マーカー蛋白, 2B:mAb2E12A3のアフィニテイーカラムより得られた蛋白質 (0.5% NP40未使用分画使用)

Fig.3,4. L1ポリクローナル抗体を使用したイムノブロッテイング像； 3A･4A:膜分画, 3B･4B:アフィニテイーカラム使用後

Fig.5. ラットcDNAから大腸菌で作らせたL1の細胞内ドメインを認識するポリクローナル抗体でのイムノブロッテイング像；5A: 膜分画, 5B:アフィニテイーカラム使用後

142 細胞接着分子ＳＣ１

田中英明
（群馬大学・医学部・薬理学）

〔要約〕
運動ニューロンの発生初期から神経筋接合部が形成され始める頃までの一過性に運動ニューロンの細胞表面に特異的に発現される分子量１０万の膜蛋白ＳＣ１は、５個の免疫グロブリン様ドメインを持ち、そのサブタイプはＶ・Ｖ・Ｃ２・Ｃ２・Ｃ２であった。ＳＣ１（＋）の形質転換細胞が、お互いに接着して大きな細胞凝集塊を形成する事や、精製されたＳＣ１を介して培養皿に接着する事から、ＳＣ１はＳＣ１分子同士が接着するホモフィリックな接着分子であると考えられた。また、この接着には、培養液中の血清、Ｃａ・Ｍｇイオンは影響しなかった。

脊髄運動ニューロンは、神経管の腹側中心管壁で細胞分裂を終え、神経管の両端に移動し運動ニューロンカラムを形成する。脊髄介在ニューロンは脊髄内にその軸索を伸ばすが（１）、運動ニューロンだけが選択的に軸索を脊髄の外に伸ばす（２）。このような運動ニューロンの細胞移動と凝集、軸索成長などには、細胞表面や細胞間隙に発現している分子が重要な働きをしており、運動ニューロンはこれらの分子に対し、細胞表面の糖蛋白や糖脂質を介して反応すると考えられる。

我々は、ニワトリ胚脊髄の粗膜分画を抗原としてモノクローナル抗体を産生し、免疫組織化学によるスクリーニングから、運動ニューロンの発生直後から神経筋シナプスが形成される時期までの一過性に、その細胞表面に発現される分子量約１０万の膜蛋白質を見いだし、ＳＣ１と名付けた（３）。また、ＳＣ１は全ての末梢神経系、一部の中枢神経系、網膜、脊索、表皮、腎など様々な部位にも、発生過程で異なった時期に発現されている。ＳＣ１の持つ機能を解析するために、精製したＳＣ１に対するウサギ抗血清を用いて、４日目ニワトリ全胚のｃＤＮＡ発現ライブラリーから、ＳＣ１ｃＤＮＡをクローニングし、ＳＣ１が免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子である可能性を報告した（４）。ここでは、ＳＣ１の構造と細胞接着の性質を解析した結果を報告する。

＜実験方法＞

動物細胞発現ベクターに組み込んだＳＣ１ｃＤＮＡと薬物耐性プラスミドをヒト胎児腎由来の２９３細胞に強制発現させ形質転換細胞を得た。この形質転換細胞を、低トリプシン（０、０００１％）・１ｍＭＥＤＴＡ（ＬＴＥ）処理とピペッティングにより単離細胞とし、２００万個／ｍｌの密度で静置下の細胞凝集を測定した。ＳＣ１抗原は、１０－１２日目のニワトリ全胚の膜分画からモノクローナル抗体アフィニティーカラムにより精製し、Ｌｅｍｍｏｎ等（５）の方法で培養皿に吸着させた。

＜結果と考察＞

ＳＣ１は５個の免疫グロブリン様ドメインを持ち、Ｎ－末端からＶ，Ｖ，Ｃ２、Ｃ２、Ｃ２のサブタイプに分類された。これまで神経系で知られている免疫グロブリンスーパーファミリーの中で分子量の大きいものは、全てＣ２ドメインから形成されており、ＳＣ１は特異な構造を持っていた（図１）。ホモロジー検索の結果、

ヒトメラノーマのマーカー抗原として報告されているＭＵＣ１８（６）と全体に良く似ていた。また、ＮＣＡＭやＭＡＧと弱いホモロジーが見られた。

形質転換細胞膜上に発現されたＳＣ１は、ＬＴＥ処理によっては失われず、ＳＣ１（＋）の細胞は、コントロール２９３細胞に比べ短時間に細胞凝集塊を形成した（図２Ａ、図３）。ＳＣ１に対するモノクローナル抗体のうちＭ７８０７は細胞凝集を阻害しなかったが、Ｍ７８０５は強く阻害した（図２Ｂ、図３）。これらのことから、ＳＣ１（＋）の細胞凝集はＳＣ１分子の特異的な部位を介したもので、ＳＣ１が細胞接着分子である事を示していた。また、塗布された精製ＳＣ１分子によってＳＣ１（＋）細胞が培養皿に接着する事から、ＳＣ１の細胞接着作用は、ＳＣ１分子同士によるホモフィリックな接着であると考えられた。ＳＣ１の接着は、培養液中の血清，Ｃａ・Ｍｇイオンに依存しなかった（７）。[この報告は、松井崇裕、縣　明美、戸村昌美、久保田一朗、K.C.McFarland, B. Kohr, A. Lee, H. Phillips, D. Sheltonとの共同研究である]

＜文献＞

(1) Tanaka H. et al. (1990) Development,110,565-571. (2) Tanaka H. (1991) J. Comp. Neurol., 303,329-337. (3) Tanaka H. and Obata K. (1984). Dev. Biol.106,26-37. (4) 松井崇裕、田中英明（1990）第１４回神経科学学術集会、63p (5) Lemmon V. et al. (1989) Neuron, 2, 1597-1603. (6) Lehmann J.M. et al. (1989) PNAS 86, 9891-9895. (7) Tanaka H. et al. (1991) Neuron (in press).

図　１。ＳＣ１構造のモデル

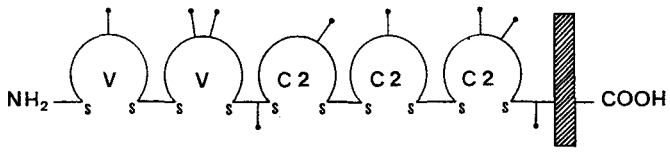


図　２。１時間培養後の細胞凝集

Ａ：ＳＣ１（＋）

Ｂ：ＳＣ１（＋）－ＭＡｂＭ７８０５

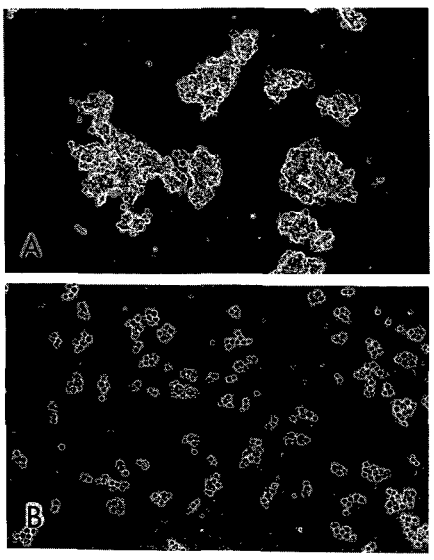
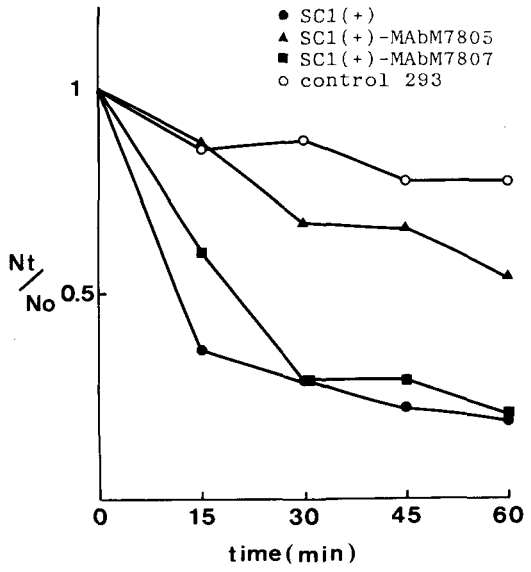


図　３。細胞凝集の時間経過

Ｎｏ：時間ｏの細胞塊数

Ｎｔ：時間ｔの細胞塊数



143

ラット神経細胞接着因子Ｌ１のｃＤＮＡクローニング：新しいアイソフォームの同定と発現

三浦正幸、小林正明、阿相皓晃、植村慶一　(慶応大・医・生理)

〔要約〕

細胞接着因子Ｌ１は、神経細胞での発現特異性が高く神経細胞同士の接着のみならず軸索束形成や神経細胞の移動など神経系の発生過程の様々な局面に関与する多機能分子である。ラット脳ｃＤＮＡライブラリーより複数のオーバーラッピングクローンを得、構造を解析した結果、ラットＬ１の全翻訳領域の構造が明かとなった。クローニングの過程でカルボキシ末端側細胞質領域に４つのアミノ酸ＲＳＬＥ配列が欠失しているクローンが得られた。このアイソフォーム（Ｌ１ｃｓ）とＬ１の発現をＰＣＲ法によって調べた結果、Ｌ１は中枢神経系で、Ｌ１ｃｓは末梢神経系で多く発現していることが明かとなった。また、細胞種によっても発現パターンは異なりＬ１のalternative splicing が機能発現を調節していることが推察された。

神経系の構築には細胞表面にある糖タンパク質、なかでも細胞接着因子が多くの重要な働きを担っている。神経系の発生は[1]neurogenesis [2]neuronal migration [3]neurite outgrowth and fasciculation [4] synapse formation and myelination [5] neuronal cell death 等の素過程に分けて考えることが出来るが、神経細胞接着因子Ｌ１は現在までに少なくとも [2][3] 及びmyelination に関与していることが明らかにされている(1-5)。L1は immunoglobulin (Ig) gene super family に属しこのＩｇドメインのホモフィリックな結合によって細胞接着を引き起こすと考えられている(6)。しかし、このドメインだけでは上記のような多機能性を説明することは出来ず、Ｌ１の特徴的なドメイン毎の機能を詳しく解析する必要があると考えラットＬ１のｃＤＮＡクローニングを行った。その結果、マウスＬ１と非常にホモロジーの高いラットＬ１ｃＤＮＡ全長を得るとともに、細胞質領域の alternative splicing によって産生されるアイソフォームが存在することを見いだしたので報告する(7)。

[方法]

１）ｃＤＮＡクローニング：以下の４種類のｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングした。adult rat brain cDNA libraries (lambda gt10, gt11), new born rat cDNA library (lambda gt11), randam primed adult rat hippocampus cDNA library (lambda gt11)。用いたプローブはマウス脳より抽出したＲＮＡに対して逆転写反応及びＰＣＲ法 (8) によって得たマウスＬ１、１－３６６、３５６４－３７８３ｂｐ(6)に対するｃＤＮＡである。

２）Southern blotting 及びNorthern blotting：Maniatis らの方法(9)に従って行った。ラット肝臓より染色体ＤＮＡを抽出した。各種臓器及び細胞から *guanidium*-CsCl 法によってＲＮＡを抽出した。プローブとしてラットＬ１カルボキシ末端をコードするｃＤＮＡ 0.8 kb を用いた。

[結果と考察]

４種類のｃＤＮＡライブラリーをスクリーニング (total $7x10^6$) し２９コの独立したクローンを得た。インサートの長いクローン４つ (pRL1:2.5 kb, pRL3:2.8 kb, pRL10:3.7 kb, pRL13: 2.8 kb)を選別し塩基配列を決定した。ラットＬ１ｃＤＮＡ翻訳領域は３７７７ｂｐからなり TAG 終止コドンに続いて１．２ｋｂの非翻訳領域が存在した。マウスＬ１とのホモロジーは非常に高く塩基配列で９５．７％、アミノ酸配列で９６．７％である。細胞外に６つのイムノグロブリンＣ２様ドメインと５つのフィブロネクチン３型リピート構造を持つ。膜貫通領域に続いて１１４アミノ酸からなる細胞質領域が存在する。この細胞質領域は特にホモロジーが高くマウス(6)、ヒト（小林ら、本大会）と完全に配列が一致した。Southern blotting によりＬ１遺伝子がゲノム中シングルコピーで存在することが明かとなった（図１）。また、Northern blotting によりＬ１は株化神経様細胞で特異的に約６．０ｋｂの転写産物として発現されていることが明かとなった（図２）。ｃＤＮＡクローニングの過程で細胞質領域にＲＳＬＥ配列の欠損したクローンが得られ alternative splicing によるＬ１のアイフォーム（Ｌ１ｃｓ： L1 cytoplasmic domain short と命名）が神経組織で発現していることが考えられた。そこでＰＣＲ法を用いてＬ１及びＬ１ｃｓの発現を解析した（図３）。脳ではＬ１が主要であるのに対し坐骨神経ではＬ１ｃｓが多く発現していた。株化細胞においてもその発現パターンは様々でありニューロンとグリア（シュワン細胞）以外にもニューロンのサブタイプでもＬ１の発現パターンは異なる可能性が示唆された。

Drosophila で単離されたＬ１類似タンパク質 neuroglian は alternative splicing によってやはり細胞質領域に違いのある２種類が発現している。short form は多くの組織で発現しているのに対し long form は中枢と末梢のニューロン、末梢の支持細胞で特異的に発現している(10)。細胞質領域のホモロジーはＬ１とneuroglian でも高くこれらの分子の機能発現に重要な働きを担っているものと考えられる。Ｌ１のカルボキシ末端側はりん酸化を受ける(11)。ＲＳＬＥ配列が欠失するとにより casein kinase II の *potential phosphorylation sites* の一つが失われる。Ｌ１の機能はりん酸化を介して調節されることが考えられＬ１、Ｌ１ｃｓが異なった機能を持つ可能性が考えられた。

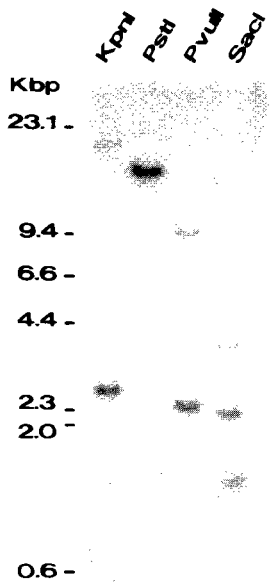


図1.Southern blotting によるラットL1遺伝子の解析。

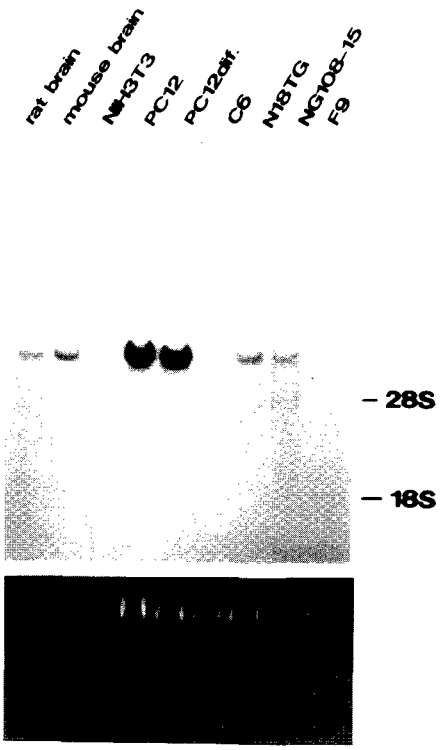
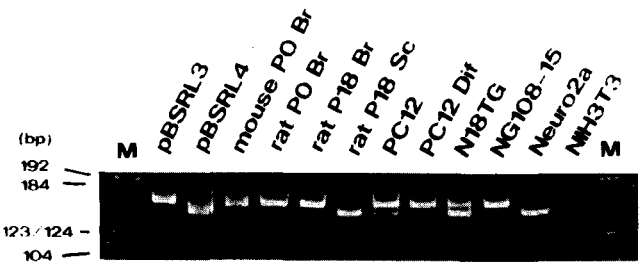


図2.Northern blotting によるL1遺伝子発現の解析。PC12difは、培地にNGF 50 ng/mlを添加して6日間培養したものである。



[文献]
1) Lindner,J. et al.(1983) Nature 305,427-430.
2) Keilhauer,G. et al.(1985) Nature 316,728-730.
3) Chang,S. et al.(1987) J.Cell Biol.104,355-362.
4) Fischer,G. et al.(1986) J.Neurosci.6,605-612.
5) Wood,P.M. et al.(1990) J.Neurosci.10,3635-3645.
6) Moos,M. et al.(1988) Nature 334,701-703.
7) Miura,M. et al.(1991) FEBS lett. in press.
8) Kawasaki,E.S.(1990) in PCR protocols. Amplification of RNA,pp21-27,Academic Press.
9) Maniatis,T. et al.(1982) in Molecuar Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
10) Hortsch,M. et al.(1990) Neuron 4,697-709.
11) Sadoul,R. et al.(1989) J.Neurochem.53,1471-1478.

図3.PCR法によるL1アイソフォームの検出。
P0, P18: postnatal day 0 or 18. Br: brain. Sc: sciatic nerve. それぞれの組織及び細胞 からtotal RNA を抽出し逆転写反応の後、PCR法によって検出した。PCRに用いたプライマーは、RSLE配列の両端、3541－3558（PL11）、3671－3687bp（PL12）(7) に相当する配列のオリゴヌクレオチドである。pBSRL3 はラットL1cDNA全長を含むプラスミドである。pBSRL4 はL1cscDNA全長を含むRSLE配列を欠損したプラスミドである。

144 ヒトドレブリン蛋白質の免疫学的解析とcDNAクローニング

戸田正博[1)2)]、白尾智明[1)]、浅田英穂[1)]、戸谷重雄[2)]、植村慶一[1)]
（慶應大・医・生理[1)]、脳神経外科[2)]）

〔要約〕

抗ドレブリンモノクローナル抗体M2F6用いたWestern blot解析により、ヒト脳（成人大脳皮質）およびヒト神経芽細胞腫由来の株化細胞SY5Yにドレブリン蛋白を検出した。SDS電気泳動上、分子量は約130kDaを示した。ヒト胎児脳cDNAライブラリーを用いて、ラットドレブリンA cDNAをプローブとしてプラークハイブリダイゼイションによりスクリーニングを行い、2種類のドレブリンcDNAを単離した。これらは制限酵素地図上高い相同性を示したが、Pst I-Sma I fragmentの大きさに相違を認めた。SY5Y細胞よりtotalRNAを抽出し、今回得られたヒトドレブリンcDNA gDhb13(約2800bp)をプローブとしてNorthern blot解析を行ったところ、2800bp付近にbroadなbandを認めた。したがってgDhb13はヒトドレブリンmRNAのほぼ全長を含んでいると思われた。

発生段階の神経組織には様々な遺伝子が時期的にも、部位的にも特異的に発現しており、神経細胞の分化、成長、シナプス結合などの過程が整然と進行している。このメカニズムを明らかにしていくためには、これらの遺伝子の発現様式および対応する遺伝子産物を同定する必要がある。ドレブリンは神経系の発生過程において特異的に発現する蛋白質で、ニワトリでは、幼若型(E1、E2)と成熟型(A)の3種の蛋白質アイソフォームよりなり[4)]、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。スプライシングパターンは発生段階に従いE1,E2,Aの順に変化する[3)]。一方抗体との交差反応性より、ラットにもドレブリン蛋白質が検出されている。ラットにおいては蛋白レベルで、発生段階に伴うドレブリンEからAへの変換が示されたが[1)]、対応する複数のmRNAの存在については明らかにされていない。そこで今回ヒトドレブリン蛋白質について免疫化学的および遺伝子工学的解析を試みた。

〔方法〕

1) Western blot解析： ヒト脳組織（成人大脳皮質）、SY5Y細胞（ヒト神経芽細胞腫）を湿重量測定後10倍量のSDS-sample bufferでホモジナイズして試料を調整した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、蛋白質をイモビロン膜に転写し、抗ドレブリンモノクローナル抗体M2F6を用いて免疫染色を行った。

2) cDNA クローニング： ヒト胎児（21週）脳cDNA-λgt11ライブラリー(Clonotec Labs,CA)より、ラットドレブリンA cDNA[2)]をプローブとして、プラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングを行った。

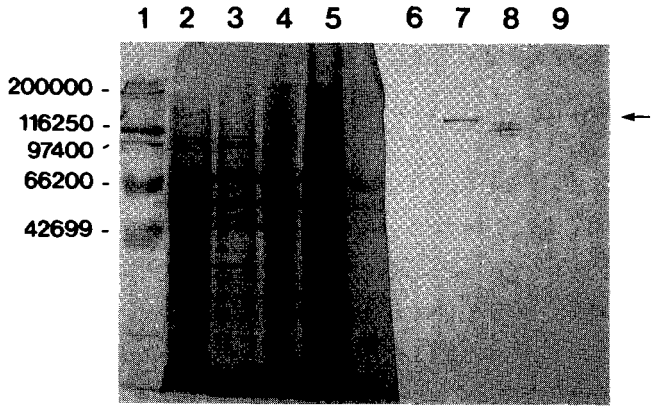
3) Northern blot解析： SY5Y細胞よりtotal RNAを抽出し、ホルムアルデヒドゲルで電気泳動後、ナイロン膜に転写した。プローブは今回得られたヒトドレブリン cDNA(gDhb 13)をランダムプライマー法で^{32}P標識した。50% formamide, 1% SDS, 1M NaCl, 10% dextran sulfate液中で42°Cにてover nightハイブリダイズさせ、2XSSC, 60°Cでwashした後、常法によりオートラジオグラフィーを行った。

〔結果および考察〕

ヒトドレブリン蛋白質の検出： Western blot解析により、ヒト脳およびSY5Y細胞にドレブリン様蛋白質を検出した(図1)。SDS電気泳動上、分子量は約130kDaを示し、ニワトリドレブリンAより大きく、一方ラットドレブリンAよりはやや小さかった。成人大脳ではヒトドレブリンA、未分化の培養細胞であるSY5Y細胞ではヒトドレブリンEを想定したが、今回のWestern blot解析上では、両者間の分子量の差は明瞭でなかった。SY5Y細胞のimmunocytochemistoryの結果より、このドレブリンimmunoreactivityはニワトリやラットドレブリンと同様に細胞膜直下に強く(浅田他、準備中)、今回検出したドレブリン様蛋白はヒトドレブリン蛋白質そのものであると考えられた。

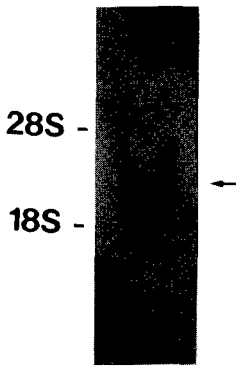
ヒトドレブリンcDNAクローンの単離： ヒト胎児脳cDNAライブラリー約500,000個のクローンから、13個の陽性クローンを得た。インサートの長い3クローン(gDhb13: 2800bp, gDhb9: 2500bp, gDhb3: 2300bp)について制限酵素地図を作成したところ、高い相同性を示したが、Pst I-Sma I fragmentの長さが約250bp異なることより、2種のcDNAに分けられた(図2)。ニワトリドレブリン蛋白質E1とE2の相違が、挿入配列(ins 1)の有無による[3)]のと同様に、得られた2種のcDNAが、ヒトドレブリンの2種の蛋白質アイソフォームをコードしている可能性が考えられ、これらは胎児脳より得られたcDNAであるため、現在ヒトドレブリン蛋白質E1,E2に対応するcDNAであると考えている。さらに、成人大脳のcDNAライブラリーを作成中であり、ヒトドレブリンA cDNAの検出を考慮中である。

ヒトドレブリンmRNAの検出： gDhb13 cDNAをプローブとしてNorthern blot解析により、SY5Y細胞のmRNAを解析したところ、2800bp付近にbroadなbandが検出された(図3)。したがって、今回得られたcDNAクローン(gDhb13)はヒトドレブリンmRNAのほぼ全長を含んでいると考えられた。



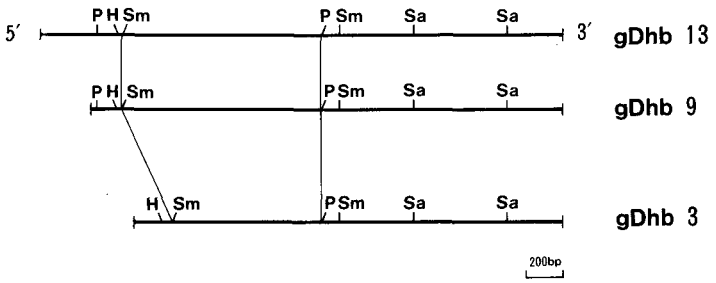
(図1) Western blot解析

1 分子量マーカー
2,6 成熟ラット大脳 (湿重量1mgより抽出)
3,7 SY5Y細胞 (ヒト神経芽細胞腫 (湿重量0.5mg)
4,8 生後1日鶏大脳 (湿重量0.5mg)
5,9 成人大脳皮質 (湿重量0.5mg)



(図3) Northern blot解析

SY5Y細胞 20μg



(図2) ヒトドレブリンcDNA 制限酵素地図

H: Hind Ⅲ
P: Pst I
Sa: Sac I
Sm: Sma I

(BamH I, Kpn I, Sph I, Xba I では切断されなかった。)

〔文献〕

1. Shirao,T., Kojima,N., Inoue,A. and Obata,K.(1990) 神経化学, 29:310-311
2. Shirao,T., Kojima,N. and Obata,K., 投稿中
3. Shirao,T., Kojima,N., Terada,S. and Obata,K.(1990) Neuroscience Res.Suppl., 13:S106-S111
4. Shirao,T. and Obata,K.(1985) J.Neurochem., 44:1210-1216

145 ラット脳mRNAの死後安定性に対する生理的食塩水による還流およびGTC液の効果

平田 洋[1,2]、小川紀雄[1]、 浅沼幹人[1]、 羽場久美子[1]、 周 希誠[1]、 森 昭胤[1]

（岡山大・医・脳代謝研究施設・機能生化学部門[1]，第3内科[2]）

〔要約〕

mRNAの死後安定性に対する生理的食塩水による還流（以下生食還流と略す）および5M guanidine thiocyanate液（以下GTC液と略す）の効果について検討を行った。雄性SDラットを用い、ネンブタール(i.p.)麻酔下に生食還流した後、脳を摘出しGTC液内で部位分けを行った群（A群）、同麻酔下に生食還流した後、脳を摘出し生理的食塩水内で部位分けを行った群（B群）、断頭屠殺後すぐに脳を摘出しGTC液内にて部位分けを行った群（C群）、断頭屠殺後生理的食塩水内にて脳の部位分けを行った群（D群）の4群に分類した。各々の群よりChomczynskiらの法によりtotal RNAを抽出し、脳内神経細胞骨格タンパク質であるβアクチンのmRNAについて検討した。いずれの群もノザーンハイブリダイゼイション法にて、βアクチンmRNAのバンドを確認することができた。ドットブロット法を用いた定量的検討では、AおよびC群が、それぞれBおよびD群よりも多量にmRNAを確認できた。またA群とC群の間では、大きな差は見られなかった。これらの結果より生食還流の有無にかかわらず、部位分けをする場合にRNA分解酵素阻害剤であるGTC液を使用することは、mRNAの死後安定性に対して優れた効果を持つことが明かとなった。

（目的）

近年、分子生物学の進歩にともない脳内におけるmRNAの測定がしばしば行われるようになってきた。しかしRNAはDNAのように安定でなく、血中や組織中にに存在するRNA分解酵素によって容易に分解されてしまう。このRNAの不安定性は、mRNAの発現の有無や量的変化を検討する上で、非常に大きな問題点となる可能性があると思われる。そこで我々は、脳内神経細胞骨格タンパク質の1つであるβアクチンのmRNAについて、生理食塩水による還流（以下生食還流と略す）およびmRNA分解酵素阻害剤である5M guanidine thiocyanate液（以下GTC液と略す）の、mRNA死後安定性に対する効果について検討した。

（方法）

Shrague-Dawley(SD)系雄性7週ラットを以下の4群に分類した。

A群：ネンブタール(I.p.)麻酔下に生食還流を行った後脳を摘出し、GTC液内にて部位分けを行った群

B群：ネンブタール(i.p.)麻酔下に生食還流を行った後脳を摘出し、生理的食塩水内にて部位分けを行った群

C群：断頭屠殺直後脳を摘出し、GTC液内にて部位分けを行った群

D群：断頭屠殺直後脳を摘出し、生理的食塩水内にて部位分けを行った群

上記4群のラットより摘出した脳から大脳皮質と線条体の2つの部位を切り出し、Chomczynskiらの方法(2)によりtotal RNAの抽出を行った。15μg相当のtotal RNAを1%agarose/formaldehyde ゲルを用いて電気泳動し、ナイロンメンブラン（Hybond N,Amersham)にブロットした。またtotal RNAを10μg，2μg，0．4μgに段階希釈しドットブロット吸引機にてナイロンメンブランにブロットした。これらのメンブランを用い、ラットβアクチンmRNA(5)に相補的な配列を持つ市販のオリゴヌクレオチドプローブの3′末端を[^{32}P]でラベルし、ハイブリダイゼーションを行い、x-ray film (Hyperfilm,MP Amersham)に感光させた。

得られたオートラジオグラムのシグナルは、optical dewnsity (O.D.) 値をコンピューター画像解析機 (RAS1000, Amersham)を用いて数量化することにより比較検討した。

(成績)

βアクチンmRNAプローブにて、大脳皮質、線条体共にFig.1に示すようにβアクチンmRNAのバンドを確認することができた。

ドットブロット法を用いた定量的検討では、Fig.2に見られるようにβアクチンmRNAプローブにて各群に結合が認められた。Table 1は、Fig.2に示されているうち10μg相当のRNAをドットブロットし得られたオートラジオグラムのシグナルのO.D.値を、コンピューター画像解析機を用いて数量化したものである。この結果、生食還流の有無にかかわらず、GTC液を用いて部位分けした群がGTC液を用いない群に比較して、高いO.D.値を示していた。また、この傾向は大脳皮質および線条体共に共通していた。

(考察)

RNAは血中や組織中に多量に含まれるRNA分解酵素によって容易に分解されてしまう。そのためmRNAを定量する際には検体が死後どのくらい経過しているか、検体が死後どの様な状態で保存されていたか、脳の部位分けがどの様な状態でなされたか等多くの事が問題となってくる。特に最近は人体での死後脳によるmRNAの検討がされているため、mRNAの死後安定性はことさら重要な問題となってきている。死後の時間的経過によるmRNAの安定性に関しては種々の報告(1),(3),(4),なされているが、保存状態や部位分け時の扱い方による安定性に関しては余り報告がなされていない。そこで我々はこのたびこれらの点について検討を行った。このたびの実験より、RNA分解酵素阻害剤であるGTC液内に脳を浸しながら部位分けを行うことは、mRNAの安定性を保持する上で非常に有用な方法とであるとの、結論に達した。また、種々のmRNAはその種類に依って安定性が異なっている可能性があるので、βアクチンmRNA以外のmRNAの死後の保存状態による安定性についても、現在検討中である。

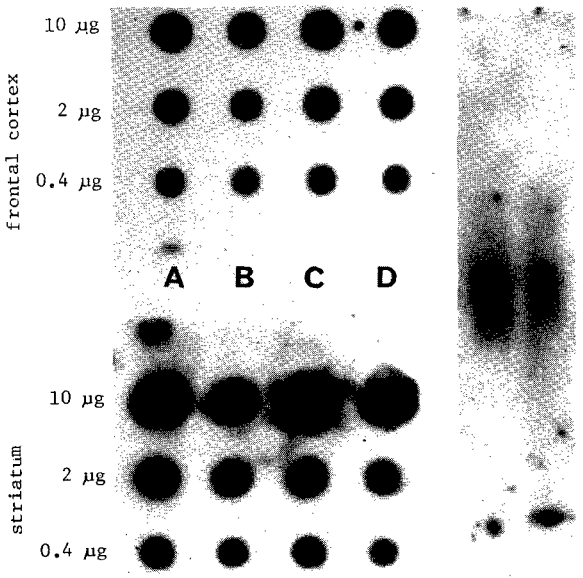


Fig. 1

Fig. 2

TABLE 1

	Optical Density	
	Frontal Cortex	Striatum
group A	0.39	0.67
group B	0.27	0.50
group C	0.35	0.61
group D	0.28	0.44

Each value is O.D. of the detected signal for dot blotting(10μg RNA).

(文献) (1)Arai H. et al.(1989) Neurosci. letters, 103:127-131.

(2)Chomczynski P.and Sacchi N.(1987) Anal. Biochem.,162:156-159.

(3)Guillemette J.G. et al.(1986) J. Neurochem.,47:987-997.

(4)Perrett C.W. et al.(1988) J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry,51:325-331.

(5)Ponte P. et al.(1984) Nuc. Acids Res.,12:1687-1692.

146 虚血耐性現象におけるOxygen Radical Stressの関与について

松本昌泰　大槻俊輔　鈴木敬一郎*　多賀谷昌史　秦　龍二　小川　智
和中明生　上田周一　半田伸夫　木村和文**　谷口直之*　鎌田武信
大阪大学　第一内科、生化学*、バイオ研核**

【要約】

Superoxide Dismutase (SOD)活性阻害剤である Diethyldithiocarbamate (DDC)を虚血負荷4日前に予め投与し、可逆的なOxygen Radical Stress (ORS)を負荷しておくことにより、砂ネズミ一過性前脳虚血5分虚血モデルにみられる海馬CA1領域における遅発性神経細胞壊死に対する保護効果が観察された。またDDC投与4日後の海馬ではストレス蛋白であるHeat Shock Protein 72 (HSP72)の発現も確認され、さらにMn-SODの明らかな誘導も認められ、以上よりHSP72を発現するのに十分なORSを負荷することによりMn-SODが誘導され、致死的な虚血負荷によるOxygen Radical を不均化することにより虚血に対する耐性が発現されていると考えられた。

【目的】

我々は砂ネズミの一過性前脳虚血モデルを用いた検討により、虚血負荷に対して選択的脆弱性を示す海馬subiculum-CA1領域がblood flow cliff領域、すなわち重度の虚血と残存血流存在部位とが境を接する領域に一致していることを明らかにしてきた(1)。さらにpyran-SODを用いた検討によりこのCA1領域では虚血中のOxygen Radical Stress (ORS)を介して遅発性神経細胞壊死が誘導され得ることを示してきた(2)。本研究では中枢神経系の神経細胞に普遍的に観察される虚血耐性現象(3,4)、すなわち予め非致死的な虚血を負荷しておくことにより神経細胞が致死的な虚血に対して耐性を獲得する現象のメカニズムを究明する一環として、SODの強力な活性阻害剤DDCの投与による可逆的なORSの前処置(5,6)が神経細胞に虚血に対する耐性を誘導し得るか否かを検討した。さらにDDC投与後のOxygen Radical消去系であるMn-SODとCuZn-SOD、およびストレス蛋白であるHSP72の誘導を検討した。

【方法】

成熟砂ネズミ60匹を対象とした。DDCによる虚血耐性の誘導；24匹を以下の3群に分類した。偽手術群(n=5);両側総頸動脈剥離のみで虚血負荷を全く加えなかったもの。DDC4日後群(n=9);虚血負荷4日前に1.0g/kgのDDCを腹腔内投与。DDC2日後群(n=4);虚血負荷2日前に1.0g/kgのDDCを腹腔内投与。 Vehicle群(n=6);虚血負荷4日前に0.2mlのsalineを腹腔内投与。DDCまたはsaline投与4日後もしくは2日後に軽エーテル麻酔下に両側総頸動脈を剥離し、麻酔覚醒時クリップにて5分間の一過性前脳虚血を加えた。虚血中は体温を37℃に維持し、虚血後も体温をモニターし再灌流30分後と60分後の体温を記録した。血流再開7日後にエーテル麻酔下に断頭し、脳を摘出し5%酢酸-95%エタノール混合液にて浸潤固定後パラフィン包埋した。その後bregmaの尾側1.4～1.6mmに位置し背側海馬を含む厚さ5μmの薄切切片を作成しHE染色に供した。海馬CA1領域の遅発性神経細胞壊死の程度をneuronal density（海馬錐体細胞層1mm長あたりの生存神経細胞数）と、以下の4段階のhistological gradingにて評価した。Grade 0:全く壊死細胞を認めない、Grade 1:数個の壊死細胞を散見するのみ、Grade 2:壊死細胞と正常細胞とが混在しているもの、Grade 3:大部分の細胞が壊死に陥っているもの。 SOD蛋白の動態；18匹を以下の4群に分類した。DDC 1.0g/kgを腹腔内投与後2日(n=4)、4日(n=5)のDDC前投与群とsaline 0.2mlを腹腔内投与後2日(n=4)、4日(n=5)のvehicle前投与群をそれぞれ断頭屠殺し、氷上にて両側海馬を摘出した。検体は20mM Tris-HCl+1mM EDTA bufferでホモジナイズし、ソニケーション0℃3分間処理後、4℃ 900gにて10分間遠心分離後うわ澄みをsampleとした。マウス抗Mn-SOD、Cu,Zn-SOD抗体を用いたサンドイッチELISA法(8),(9)でMn-SOD、Cu,Zn-SOD蛋白量を測定した。HSP72の動態；18匹を以下の4群に分類した。DDC 1.0g/kgを腹腔内投与後2日(n=4)、4日(n=4)のDDC前投与群とsaline 0.2mlを腹腔内投与

後2日(n=2)、4日(n=4)のvehicle前投与群をそれぞれ断頭屠殺し、氷上にて両側海馬を摘出した。検体は2%SDS+10%Glycerol+62.5mM Tris-HClを含んだsample bufferでホモジナイズし、加熱処理後、4℃ 10000gにて30分間遠心分離後うわ澄みをsampleとした。SDS-PAGE電気泳動後、抗HSP72抗体によるWestern Blotting法に供した(4)。

【結果】

虚血後の体温にはDDC投与群、Vehicle投与群間に有意な差を認めなかった。DDCによる虚血耐性の誘導； 偽手術群は全例grade 0 (neuronal density 182.0/mm)で壊死細胞は認めず、vehicle群では全例grade 3 (neuronal density 平均 5.8/mm)で高度の神経細胞壊死が認められた。またDDC2日前投与群ではgrade 2.8±0.5 (neuronal density 17.5±14.5/mm)でvehicle群と同様の神経細胞壊死を認めた。 しかしDDC4日前投与群の平均gradeは2.1±0.8 (neuronal density 74.4/mm)でありvehicle群に比し有意な神経細胞保護効果がみられた。SOD蛋白の動態；海馬のCu,Zn-SODの蛋白量はVehicleおよびDDC投与により増減を示さなかった。Mn-SODについては、DDC投与4日後群の蛋白量はVehicle投与4日後群の約1.6倍と有意に増加していた。 HSP72の動態；DDC投与4日後群では4例中3例に、DDC投与2日後群やVehicle投与群では認識できなかったバンドが、72kD付近に明かなバンドとして認められた。

【考察】

DDC投与によるORSをあらかじめ加えることにより、一過性前脳虚血後の海馬CA1領域における遅発性神経細胞壊死に対する明らかな保護効果が認められ、神経細胞が本来致死的な虚血侵襲に対する耐性を獲得したことが強く示唆された。またDDC投与後のSOD動態の検討により、DDCの強力な銅キレーター作用によるCu,Zn-SODの活性阻害の結果、海馬において遅発性にMn-SODの有意な代償的誘導が観察されたことから、虚血耐性の発現には、DDC投与によるMn-SODの誘導が関わる可能性が考えられる。すなわち、我々がこれまでの検討で示してきた、Cu,Zn-SODであるPyran-conjugated SOD(2)やrecombinant human SOD(6)の虚血負荷前投与の遅発性神経細胞壊死に対する有意な保護効果の発現と同様に、虚血負荷前に既に増加したMn-SODの存在が虚血負荷によるORS産生を軽減させることにより保護効果を発現したものと思われる。また、これまでの検討により、虚血耐性現象発現のためにはHSP72を発現させる程度の虚血ストレスを予め負荷することが重要であることを示してきたが(7)、DDC投与後のHSP72の誘導に関する検討により、本研究におけるDDC投与量は海馬の神経細胞にとって非致死的ではあるがHSP72を発現させるのに十分なORSになったものと考えられた。以上より、DDCの前投与による神経細胞の虚血耐性発現には、細胞にとってHSP72を発現するのに十分なORSにより、Oxygen Radicalの消去系であるMn-SODが誘導され、結果的に虚血そのものによるORS産生を介した神経細胞障害過程を軽減させる機作が関わるものと考えられ、蛋白および遺伝子レベルでの負荷応答現象が関わると推察される虚血耐性現象のメカニズムを解明する上でも示唆に富むものと思われる。

【文献】

1)Matsumoto M. et al: Brain Res. 424:231-238,1978

2)Kitagawa K. Matsumoto M. et al: Neuroscience 35:551-558,1990

3)Kitagawa K. Matsumoto M. et al: Brain Res. 528:21-24,1990

4)Kitagawa K. Matsumoto M. et al: Brain Res. in press,1991

5)Hass MA. et al: Am J Physiol 253:c66-c70,1987

6)Heikkila ER. et al: J Biol Chem 251(7):2182-2185,1976

7)Tagaya M. Matsumoto M. et al: J Cereb Blood Flow Metab 11:s636,1991

8)Kawaguchi T.et al: J Immunol. Methods 127:249-254,1990

9)Ogino K. et al: Clin Chem Acta 182:209-210,1989

147 一過性脳虚血負荷によるエンドセリン産生に関する免疫組織化学的検索

山下樹三裕、片岡泰文、丹羽正美、重松和人*、小泉修一**、C. R. Jones***、谷山紘太郎
(長崎大・医・薬理2、病理2*、九州大・薬・薬理**、Marion Merrell Dow Research Institute***)

〔要約〕
脳卒中易発症高血圧自然発症ラットに一過性の脳虚血負荷を施し、そのエンドセリン (ET) 産生に及ぼす影響を免疫組織化学的手法を用いて調べた。10 分間虚血、再開通後 7 日目の脳を灌流固定し、凍結切片を作製した。脳虚血処置により、海馬 CA1 領域に遅発性神経細胞壊死が認められた。壊死の認められた切片では、ET-1 様および ET-3 様免疫活性が海馬 pyramidal layer, molecular layer および CA4 の各領域に顕著に認められた。陽性細胞は、ほとんどが astrocytes であった。偽手術群の海馬には ET 様免疫活性はほとんど認められなかった。大脳皮質においても強い ET 様免疫活性が認められ、ET-1 と ET-3 ではその陽性細胞の分布に差異がみられた。本実験結果より、一過性の脳虚血負荷により ET 様免疫活性が顕著に発現し、脳虚血性神経細胞壊死の機構に ET が何らかの役割を果たしていることが示唆された。

エンドセリン (ET) は血管内皮細胞由来の血管収縮因子として発見された 21 個のペプチドで (5)、現在までに ET-1, ET-2 および ET-3 の 3 つの isoforms が知られている (2)。これら ET は、非血管系の末梢臓器さらには中枢神経系においてもその特異的結合部位、ET mRNA の発現および ET 様免疫活性が認められ、神経伝達物質または神経調節因子としての可能性が示唆されている (6)。一過性の脳虚血状態に陥ると、海馬等に遅発性の神経細胞壊死が惹起されること (4) や、その際にグルタミン酸などのアミノ酸含量および遊離量が増加すること (1) 等が知られている。また、著者らは ET が、neurotoxic factor として虚血性脳機能障害を誘発する可能性を提起している (3)。そこで一過性の脳虚血が ET 産生にいかなる影響を及ぼすか、免疫組織化学的手法を用いて検討した。

〔実験方法〕

雄性脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) 12 ～ 14 週齢を用い、ハロタン 1.5% の麻酔下に腹側頸部を切開し、両側総頸動脈を剝離露出し、金属性クリップで 10 分間血流を止め脳虚血を負荷した。偽手術群には両側総頸動脈の剝離露出のみ行った。再開通後 7 日目にエーテル麻酔下にて左心室よりカテーテルを通し、ヘパリン含有 phosphote buffered saline (PBS)、続いて 4% パラホルムアルデヒド含有 PBS にて灌流固定した後、脳を摘出した。摘出した脳はさらに同固定液に一晩浸し、5 ～ 20% ショ糖／PBS 液に順次沈めた後凍結し、クリオスタットにて 20 μm の連続切片を作製した。この切片を用いて抗 ET-1 抗体および抗 ET-3 抗体 (Peninsula Laboratories, INC)を一次抗体として、ABC 免疫組織染色に供した。

〔結果〕

10 分間の両側総頸動脈結紮による脳虚血負荷により、SHRSP の海馬 CA1 領域に遅発性神経細胞壊死が認められた。この切片に抗 ET-1 抗体 (500 倍希釈) を免疫組織化学的に反応させた結果、海馬領域では pyramidal layer, molecular layer および CA4 に顕著な ET-1 様免疫活性が認められた。陽性細胞はほとんどが astrocytes であった。しかし、偽手術群の海馬には ET 様免疫活性はほとんど認められなかった。一方、同希釈倍率での ET-3 様免疫活性も海馬領域でほぼ同様の部位に強い陽性反応が認められた。さらに大脳皮質においても ET-1 様および ET-3 様免疫活性が認められたが、ET-1 および ET-3 陽性細胞の分布に差異が認められた。なお、同希釈倍率の正常ウサギ血清では、これらの陽性反応は全く観察されなかった。さらに ET-1, ET-3 による吸着試験を行った抗体では、陽性反応の著明な減弱が認められた。

〔考察〕

10 分間の両側頸動脈結紮によって、SHRSP の海馬 CA1 領域に遅発性神経細胞壊死が発症することが明らかになった。同時に、海馬および大脳皮質において、ET-1 様および ET-3 様の免疫活性が顕著に発現することがわかった。これまでに虚血による遅発性神経細胞壊死にグルタミン酸などのアミノ酸の遊離増大、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が関与していることが示唆されている (1)。一方、ET によっても神経細胞障害が誘発され (3)、さらに我々は ET が海馬領域の神経細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる結果も得ている。したがって、本実験の結果は、脳虚血による遅発性神経細胞壊死の機構に、ET がなんらかの役割を果たしている可能性を示唆する。

〔参考文献〕

1. Choi, D.W. (1988) Trends Neurosci., 11, 465-469.
2. Inoue, A. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2863-2873.
3. Kataoka, Y. et al. (1989) Neuroscience Lett., 107, 75-80.
4. Kirino, T. (1982) Brain Res., 239, 57-69.
5. Yanagisawa, M. et al. (1988) Nature, 332, 411-415.
6. Yanagisawa, M. et al. (1989) Trends Pharmacol. Sci., 10, 374-378.

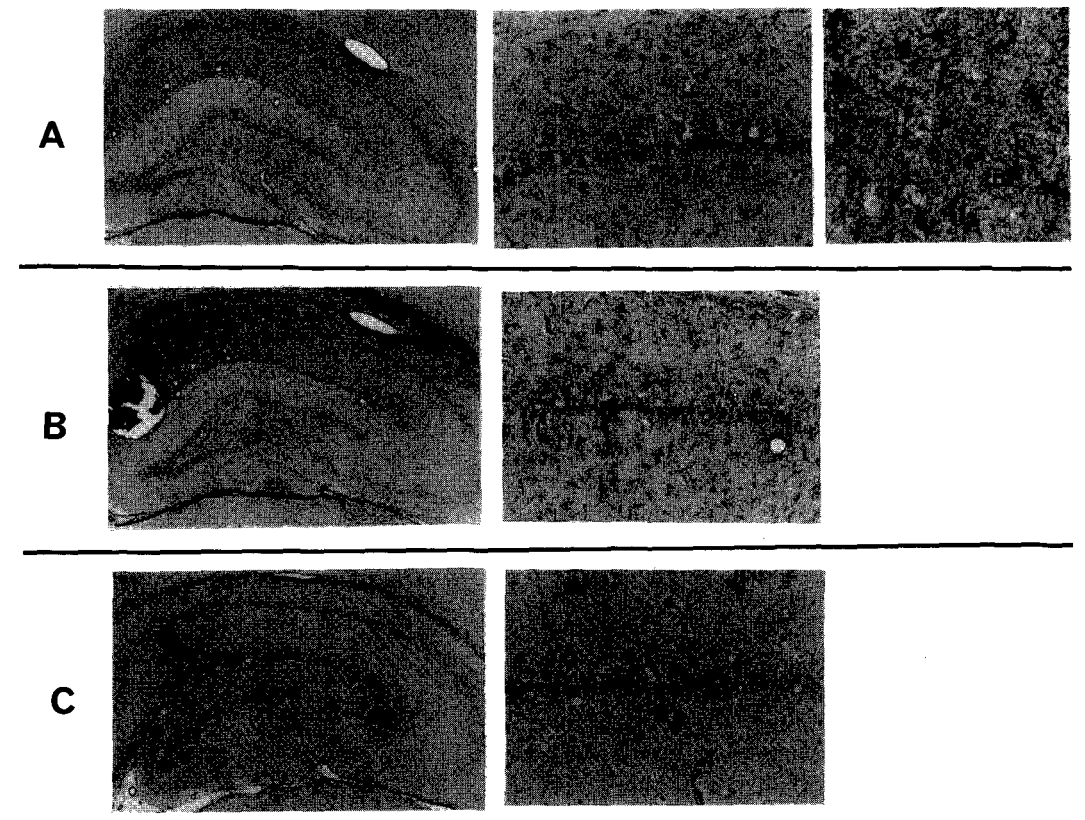


Fig. 1. Endothelin-like immunoreactivities enhanced by a transient brain ischemia in the hippocampus of SHRSP.
A: ET-1, B: ET-3, C: Sham-operated rat

148 一過性脳虚血後の海馬ＣＡ１、ＣＡ３、歯状回、大脳皮質及び線条体におけるＮＧＦレベルの経時的変化

小豆原秀貴、小野寺宏、仙波りつ子*、加藤兼房**、山崎靖人、小暮久也
東北大学神経内科
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所周生期学部（*）、生化学部（**）

〔要約〕

ラット四血管閉塞モデルを用いて、２０分の一過性脳虚血を作成後、海馬ＣＡ１、ＣＡ３、歯状回、大脳皮質及び線条体におけるＮＧＦレベルの部位別経時的変化を、虚血負荷後３０日にわたり測定した。同時に虚血負荷後の海馬における、ＧＦＡＰ陽性ｒｅａｃｔｉｖｅ ａｓｔｒｏｃｙｔｅの経時的変化も検討した。

海馬ＣＡ１では錐体細胞壊死の始まる虚血２日後に一致して一時的にＮＧＦレベルは低下したが、しかし、７日後には回復、更に３０日には上昇した。組織学的変化を認めない歯状回でも虚血２及び７日後に一時的にＮＧＦレベルの低下を認めたが３０日後には回復した。海馬ＣＡ３、大脳皮質及び線状体では、ＮＧＦレベルに有意な変化を認めなかった。以上のように組織学的変化の観察される、海馬ＣＡ１だけでなく歯状回でもＮＧＦレベルの有意な変化を認めた。

（はじめに）

ＮＧＦは中枢神経系では海馬、大脳皮質などに多く含まれ、前脳基底核コリン作動性神経細胞などに神経栄養活性を持つとされているが、一方、一過性脳虚血後の、海馬の遅発性神経細胞壊死の発生に際して、ＮＧＦの関与を示唆する報告[1]も散見される。今回我々は、虚血性脳障害時のＮＧＦの関与を検討するため、一過性脳虚血後、海馬ＣＡ１などを中心に部位別に脳内ＮＧＦレベルを虚血後３０日にわたり経時的に測定した。

（方法）

Ｗｉｓｔａｒ系雄性ラット（１２週齢、３００-３４０ｇ）を使用した。ラット四血管閉塞モデル[2]を用い、２０分の一過性脳虚血負荷後、経時的に（虚血後１、２、７及び３０日）、海馬ＣＡ１、ＣＡ３、歯状回、大脳皮質及び線条体のＮＧＦレベルをマウスＮＧＦのβ-ｓｕｂｕｎｉｔに対する酵素免疫測定法（enzyme immunoassay）[3]により測定した。同時に免疫組織化学的に海馬のＧＦＡＰ陽性ｒｅａｃｔｉｖｅ ａｓｔｒｏｃｙｔｅの経時的変化も検討した。

（結果）

（１）脳内ＮＧＦレベルの経時的変化（Table 1）

ａ） 海馬ＣＡ１では、錐体細胞壊死の始まる虚血２日後に一致して一時的にＮＧＦレベルの低下（-27%, not significant）を認めたが、しかし錐体細胞壊死の進行にもかかわらず７日後には回復、更に３０日後には上昇した（+40%, $p<0.05$）。

ｂ） 歯状回では、虚血２（-29%, $p<0.05$）および７日後（-48%, $p<0.01$）、ＮＧＦレベルの低下をみたが、３０日後には回復した。

ｃ） 海馬ＣＡ３、大脳皮質及び線条体では、ＮＧＦレベルに有意な変化を認めなかった。

（２）抗ＧＦＡＰ抗体を用いた海馬の免疫組織化学的検討（Fig. 1）

虚血後７日目まで海馬全体で、ＧＦＡＰ陽性ｒｅａｃｔｉｖｅ ａｓｔｒｏｃｙｔｅの増加、及び個々の細胞についても反応の増強を認めた（Fig. 1, B）。虚血３０日後では、ＣＡ１で依然強い反応を認めるものの、他の部位では反応は既に減弱していた（Fig. 1, C）。

（考察）

海馬ＣＡ１では錐体細胞壊死の始まる虚血２日後に一時的なＮＧＦレベルの低下を認めるものの、その後の錐体細胞壊死にもかかわらず７日では回復、３０日には上昇した。ＧＦＡＰの免疫染色では、虚血後３０日でも依然強い反応が海馬ＣＡ１のみで認められ、錐体細胞壊死後の海馬ＣＡ１での、ＮＧＦレベルの変化に対するａｓｔｒｏｃｙｔｅのなんらかの関与が示唆された。一方、組織学的変化を認めない歯状回でも虚血後２日及び７日でＮＧＦレベルの低下を認めたが、３０日後にはコントロールレベルへ回復した。本研究では歯状回のＮＧＦレベルの変化の原因は不明であるが、顆粒細胞の一過性のＮＧＦ産生障害などが示唆される。

Table 1 Time course of β-NGF levels in the various rat brain regions after transient ischemia

	Hippocampus			Cerebral cortex (n)	Striatum (n)
	CA1 (n)	CA3 (n)	D.G. (n)		
Control	1.27±0.19 (10)	1.98±0.54 (9)	1.99±0.29 (10)	0.51±0.03 (7)	0.27±0.04 (7)
Postischemia 1 day	1.26±0.14 (8)	1.58±0.16 (8)	1.97±0.22 (8)	0.46±0.03 (7)	0.23±0.02 (7)
2 days	0.96±0.10 (11)	1.10±0.17 (11)	1.42±0.34* (11)	0.50±0.04 (7)	0.25±0.03 (7)
7 days	1.34±0.15 (11)	0.97±0.18 (11)	1.03±0.13** (12)	0.55±0.03 (7)	0.26±0.04 (7)
30 days	1.78±0.16* (7)	1.11±0.24 (7)	1.81±0.19 (7)	0.52±0.03 (7)	0.23±0.02 (7)

β-NGF level is given as ng/g wet weight of tissue
Data represent mean± SEM.
Statistical significance: *p<0.05; **p<0.01
(Williams-Wilcoxon's analysis)
n; numbers of animals used.

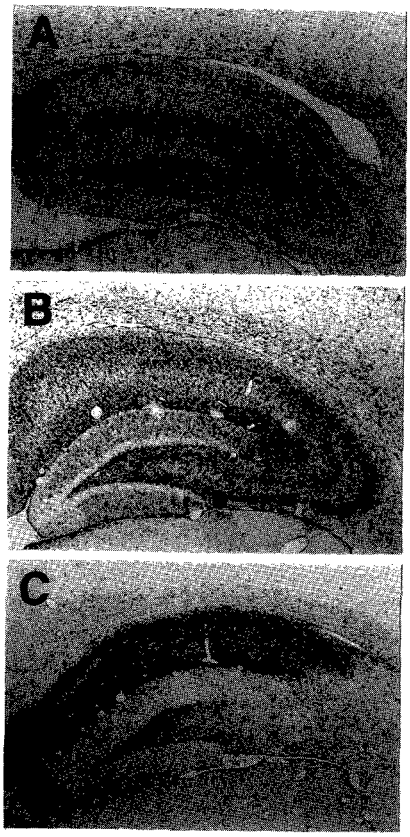


Fig. 1 Representative photomicrographs of immunohistochemical staining for GFAP of the hippocampus, 1-30 days after 20 min of transient ischemia. Seven days after ischemia, GFAP immunoreactivity of individual astrocytes became intense and the number of GFAP positive cells increased throughout the hippocampus (B). Thirty days after ischemia, numerous GFAP positive astrocytes were still evident in the CA1 subfield and small number of astrocytes were still visible in the in the dentate hilus (C).

A: Sham-operated control.
B: Seven days after ischemia.
C: Thirty days after ischemia.

(文献)
1) Buchan A. M., and Pulsinelli W. A. (1989) J. Cereb. Blood Flow Metab. 9 (suppl. 1), s749.
2) Pulsinelli W. A. et al. (1979) Stroke 10, 267-272.
3) Katoh-Semba R. et al. (1989) J. Neurochem. 52, 1559-1565.

149

加齢による脳虚血脆弱性とアミノ酸放出

大星博明、八尾博史、井林雪郎、佐渡島省三、藤島正敏、
中根博*、松本孝*、平野誠*、内村英幸*
九州大学第二内科、国立肥前療養所*

〔要約〕
我々は、成熟高血圧自然発症ラット（ＳＨＲ）に 20 分間の一過性脳虚血を負荷しても海馬病変はみられないが、老齢ＳＨＲでは同部位に虚血性障害が出現することを認めている[4]。今回、この加齢による脳虚血脆弱性を解明する目的で、海馬ＣＡ１領域における脳血流量、脳温および細胞外アミノ酸濃度の変動を、老齢ＳＨＲと成熟ＳＨＲとで比較検討した。脳虚血中、海馬の脳血流量は安静時の約２０％に下降し、脳温は１℃低下したが、二群間で有意な差はなかった。興奮性アミノ酸であるグルタミン酸およびアスパラギン酸の細胞外濃度は脳虚血後上昇し、安静時の６～８倍に増加したが、両群間に差は認められなかった。一方、脳虚血に伴うタウリンの増加は、成熟ラットの２１倍に比し、老齢ラットでは１３倍と有意に少なかった。その他のアミノ酸（アラニン、γ-アミノ酪酸、グルタミン）の変化も二群間で差は認なかった。以上より、老齢ＳＨＲの海馬の虚血性障害には興奮性アミノ酸のみでなく抑制性アミノ酸であるタウリンの虚血時動態も関与することが示唆された。

【緒言】
加齢と高血圧は久山町研究などの疫学調査から、脳梗塞および血管性痴呆の発症の重要な危険因子であることが知られている[2]。一方、加齢に高血圧が合併した時の虚血性神経細胞障害に及ぼす影響についての基礎的検討は少ないと思われる。我々はこれまでに、老齢の高血圧自然発症ラット（Spontaneously hypertensive rats: ＳＨＲ）では一過性脳虚血による脳内各部位でのモノアミン含量の変化が、成熟ＳＨＲとは異なること、またin vivo brain dialysis でみた線条体での虚血性ドパミン放出やその代謝産物(DOPAC)の変化も加齢により修飾され、それらは脳血流に依存するものではないことを報告してきた[5]。今回は、老齢および成熟ＳＨＲを用い、虚血性細胞障害との関連が注目されている興奮性および抑制性アミノ酸の放出反応を海馬において比較検討した。

【方法】
１９-２３ヶ月齢の老齢雌ＳＨＲ(n=8)および５－７ヶ月齢の成熟雌ＳＨＲ(n=6)を用いた。amobarbital (100mg/kg i.p.) 麻酔下に、20 分間の両側総頸動脈閉塞による一過性脳虚血を作製し[1]、閉塞を解くことで 80 分間血行を再開した。海馬の細胞外液中アミノ酸濃度（グルタミン酸、アスパラギン酸、タウリン、アラニン、γ－アミノ酪酸、グルタミン）および脳血流量の変動をそれぞれ in vivo brain dialysis 法と水素クリアランス法を用い測定した[3]。dialysis probe は Carnegie Medicine 社製 1 mm probe を用い、脳血流測定用白金電極とともに海馬ＣＡ１に定位的に留置した。透析液 (Ringer's solution) は、microsyringe pump (Eicom EP-60) により 4 μl/min で灌流し、10 分毎に回収した。安静時の脳血流測定および透析液の回収を行った後、脳虚血を導入した（implantation 後 90分）。回収液中のアミノ酸濃度は高性能液体クロマトグラフィー（reversed phase column, Eicompak MA-5ODS）と o-phthalaldehyde によるプレカラム誘導体化法を用い、蛍光検出器で測定した。平均動脈血圧は持続的に、血液ガスは実験の各時期に測定した。また海馬の温度を脳血流用電極先端に固定したsenserを用いて経時的に測定し、直腸温は約３７℃になるように熱ランプで調節した。

【成績】
脳虚血前の平均血圧は老齢および成熟ＳＨＲでそれぞれ 170±5 mmHg(平均±SEM)及び 162±3 と有意な差はなかった。また、脳虚血前の海馬の血流は老齢および成熟ＳＨＲの二群間に差はなくそれぞれ 45.0±2.3 ml/100g/min および 51.5±3.4 であった(Fig. 1)。脳虚血 20 分での脳血流は両群とも 10 ml/100g/min以下となり、有意差は認められなかった。閉塞血管を再開通後の脳血流は両群ともに一過性の hyperemia の後 hypoperfusion となったが、再開通後 40 分以降の脳血流は老齢群で有意に低値を示した。($p<0.05$-0.01)。興奮性アミノ酸であるグルタミン酸およびアスパラギン酸の細胞外液中濃度は両群とも脳虚血中から再開通直後にかけて６－８倍に増加し、再開通後 20 分には速やかに安静時のレベルに復したが(Fig. 2A)、両群間で有意な差はみられなかった。抑制性アミノ酸であるタウリンの細胞外濃度は、成熟ＳＨＲでは脳虚血により著明な上昇（21 倍）を示したが、老齢ＳＨＲ群での虚血性増加は約2分1（13 倍）と有意に($p<0.01$)増加の程度が少なかった(Fig. 2B)。他の抑制性アミノ酸であるアラニンおよびγ-アミノ酪酸も脳虚血により有意な上昇を示し、グルタミンは虚血中には減少を、再開通後には overshoot を示したが、これらのアミノ酸の変化は二群間で差はみられなかった。海馬の温度

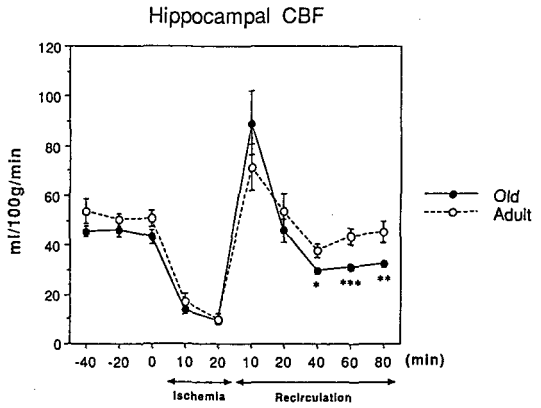


Fig. 1 Cerebral blood flow (CBF) in the hippocampus of old and adult SHR. * p<0.05, ** p<0.02, *** p<0.001 compared to adult SHR.

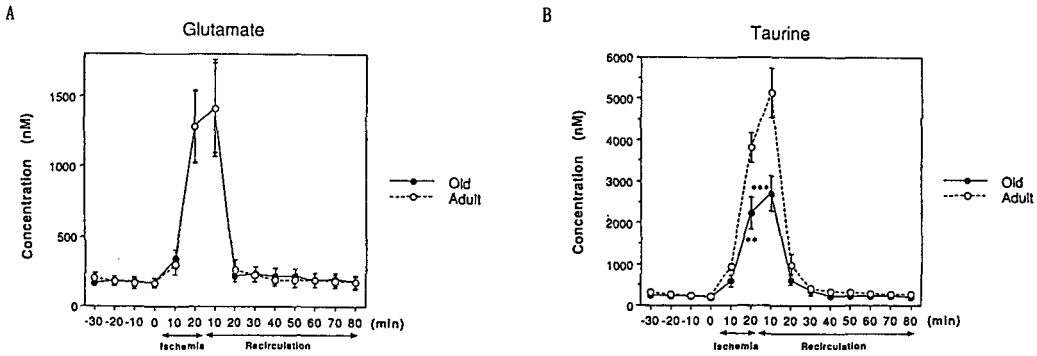


Fig. 2 Extracellular glutamate (A) and taurine (B) concentrations in the hippocampus of old and adult SHR. ** p<0.02, *** p<0.01 compared to adult SHR.

は虚血中約1℃低下し、再開通後には虚血前より約 0.5 ℃上昇したが、二群間に有意な差はなかった。

【考察】

我々はすでに、20 分間の一過性脳虚血後老齢ＳＨＲでは海馬に虚血性細胞障害を生じるが、成熟ＳＨＲでは明かな病変が出現しないことを報告している[4]。今回、この老齢ＳＨＲが有する脳虚血に対する脆弱性を解明する目的で、脳虚血によるアミノ酸放出について brain dialysis 法を用いて検討した。興奮性アミノ酸として注目されているグルタミン酸およびアスパラギン酸の放出に関しては、予想に反して成熟および老齢ＳＨＲで有意な差は認められなかった。近年 brain dialysis 法を用いた細胞外液中グルタミン酸の虚血性増加は多く報告されているが、組織障害との関連については十分明らかにされたわけではなく、かかる興奮性アミノ酸が脳虚血時に in vivo で果たす役割、特に組織障害をさらに増悪させるのか否かについては今後も検討が必要と考えられる。一方、抑制性アミノ酸として知られるタウリンの放出が、老齢ＳＨＲでは成熟ＳＨＲの約半分と有意に少ないことが認められた。この差がどのような機序によって生じるのかは今回の検討で明かではない。しかし、虚血により過興奮の状態にある神経細胞に対してタウリンは抑制的に働くと考えられ、老齢ＳＨＲでの虚血性組織障害の発生にタウリンの放出量の低下が関与している可能性が示唆された。

【文献】

[1] Fujishima, M., et al., (1975) Stroke 6:62-66. [2] Kawano, H., et al., (1990) Jpn. J. Med. 29:261-265 [3] Ooboshi, H. et al., J. Neurochem. in press. [4] Yao, H., et al., Stroke in press. [5] Yao, H., et al., (1990) Stroke 21(supple I):I-18-I-19.

150 ラット脳内におけるシトクロムP—450s21（P—450XXIAI）の分布と機能

中村和彦，岩橋和彦，久郷敏明，細川　清，市川佳幸*
（香川医科大学精神神経科，香川医科大学生化学*）

〔要約〕

Deoxycorticosterone(DOC)や11-deoxycortisolを生合成するシトクロムP-450$_{s21}$（P-450XXIAI，ステロイド21-ハイドロキシレース）をウシ副腎皮質ﾐｸﾛｿｰﾑから単一蛋白質として精製し，その抗体をウサギで作成した．ラット中枢神経内における本酵素の分布を，抗P-450$_{s21}$抗体を使用して免疫組織化学的に研究した．その結果，主に脳幹網様体，いわゆる上行性網様体賦活系のニューロンや繊維がこの抗体と免疫反応し，P-450$_{s21}$がこれらの領域に局在していることが判明した．さらに酵素化学的にP-450$_{s21}$の分布を検討するため，脳内のステロイド21-ハイドロキシレースの酵素活性を測定した．その結果特に脳幹部分の活性が高いことが分かった．以上の結果，P-450$_{s21}$がラット脳幹の上行性網様賦活系に局在する事は明かで，その生成物のＤＯＣやその代謝物のステロイド化合物が，意識の維持に関係していることが示唆された．

〔はじめに〕

高等動物のステロイドホルモンは，シトクロムP-450というヘムタンパク酵素を末端酵素とする電子伝達系（シトクロムP-450依存性モノオキシゲナーゼ系）によって生合成されるが，P-450のアイソザイムのP-450$_{s21}$依存性モノオキシゲナーゼ系は従来副腎皮質や性腺にのみ局在するといわれてきた（３）．最近になって脳内においてもいろいろな種類のステロイドが代謝されている事が判明してきたが（４），今回我々はこのP-450$_{s21}$に関して，脳内における分布並びにその酵素活性について研究した．加えてその生成物の生理的機能についても検討した．

〔方法〕

ウシ副腎皮質ミクロソームからP-450$_{s21}$を精製した．精製P-450は，SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で単一蛋白質であり，ヘム量は17.5nmoles/mg蛋白質であった（２）．このP-450$_{s21}$に対する抗体を，ウサギを用いて作製した．wistar系ラット（200g）の脳，副腎をホルマリンとCarnoy'の固定液で固定後，凍結切片にして，酵素抗体法の常法に従い，VectastainのABCkitにて，ＤＡＢ反応で免疫組織化学的に染色した（１）．一方，脳の各領域のホモジネイトについて^{3}HでラベルしたP-450$_{s21}$の基質（[1,2-^{3}H]-プロジエステロン）とNADPH-再生系を加え30分間反応させた後メチレンクロライドで酵素反応を停止させ，シリカゲルIBF Baker Flex-layer Sheetにてクロマト展開し，反応生成物である[1,2-^{3}H]-デオキシコルチコステロンを抽出した．この生成物を液体シンチレーションカウンターにて定量した（２）．なおシトクロムP-450$_{s21}$依存性モノオキシゲナーゼ活性は，免疫化学的にP-450$_{s21}$抗体によっても阻害されることが確かめられた．

〔結果〕

ラット副腎における，P-450$_{s21}$（P-450XXIAI）の免疫組織化学的検索では，皮質のみ免疫陽性反応を認めた．これは今回使用したP-450$_{s21}$の免疫抗体がP-450$_{s21}$に特異的であること，およびラットの組織における免疫組織染色に有効である事を示している（図1-A）．またP-450$_{s21}$抗体によるラット脳内の検索結果では，脳幹部の網様体の領域，すなわち“上行性網様体賦活系”に属するニューロンと上行性の繊維内に強い免疫陽性反応が観察された（図1-B）．しかし，対照の抗体で同一実験条件下に同様の操作をしたが免疫反応は陰性であることが確かめられた．しかもラットの雌雄の脳に差はなかった．更に，アイソトープラベルの基質を用いたステロイド21-ハイドロキシレース酵素活性の測定の結果ラット脳幹部分では単位タンパク質あたり，ラット副腎の約2%の活性が認められたが，その他の部位ではほとんど活性がみられなかった（図２）．以上の結果から，ラット脳内の特に脳幹部位にP-450$_{s21}$依存性モノオキシゲナーゼ系が存在している事が，形態組織的，並びに酵素化学的に判明した．

〔考察〕

シトクロムP-450$_{s21}$依存性モノオキシゲナーゼ系が,生理学的に意識の維持を司っていると言われる脳幹網様体の上行性網様体賦活系のニューロンや繊維内に存在する事から，そのP-450$_{s21}$により生合成するDeoxycorticosteroneやその代謝物がneurosteroidとして神経伝達物質の役割を持っている可能性が強いものと思われる．実際,脳内ステロイドでプレグネノロンがGABAのリセプターに結合してそのCl$^-$チャンネルを調節したり，プロゲステロンもまた，GABA系のニューロンに作用して抗けいれん作用を有する事が知られている（５）．今回我々が発見した脳内のP-450$_{s21}$依存性モノオキシゲナーゼ系によって生合成されるDeoxycorticosteroneも同様にneurosteroidとして，その局在部位からみて意識の維持，あるいは逆に睡眠の誘導等において生理的な役割を果たしていると予測される．今後もP-450のアイソザイムについてもその分布や生成物のステロイドの生理的機能について検討を続けたいと考えている．

〔謝辞〕

香川医大機器実習センターの宮武明，宮中宏両先生の援助に深謝いたします．

〔文献〕

（１）Le Goascogene C, et al:Science.237:1212-1215(1987)

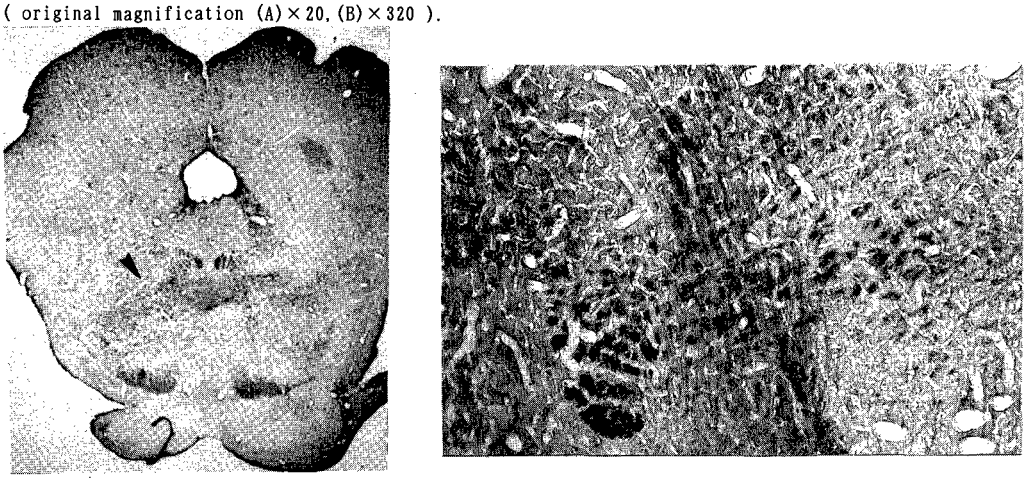
（２）Hiwatashi, A.and Ichikawa,Y.:Biochim.Biophys.Acta,664:33-48,(1981)

（３）Ichhikawa, Y. et al:FEBS Lett.167:131-136,(1984)

（４）Iwahashi, K. et al:Biochim.Biophys.Acta,1035:182-189,(1990)

（５）Majeeuska,MD et al:Brain Res.404:355-361,(1987)

図1. Photograph shows immunoperoxidase staining of a rat brain with the antibody against P-450$_{s21}$. Clealy stained cells or ascending fibers are observed mainly in the tractus reticulothalamicus (original magnification (A)×20,(B)×320).



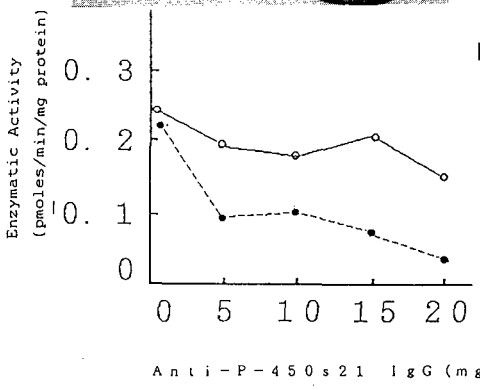


図2. Activity and immunochemical inhibition of progesterone 21-hydroxylase in homogenates of the rat brainstem and adrenocortex. The effects of adding the IgG fraction of preimmune antibody(open symbols) and the IgG against P-450$_{s21}$(solid symbols) on the activity are shown in brainstem.

151 抗hippocampal cholinergic neurostimulating peptide抗体を用いたラット中枢神経組織の免疫組織化学

林 謙一郎*、小鹿 幸生*、三竹 重久*、藤森 修**、国松 巳歳***、佐々木 實***
植木 靖之****、福島伸之****
*名市大（医）第二内科、**同、第二解剖、***同、第二生化、****住友製薬

〔要約〕

Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide（HCNP）に対する家兎ﾎﾟﾘｸﾛﾅﾙ抗体から抗原ｱﾌｨﾆﾃｨｰｶﾗﾑを用いて特異抗体を精製し、これを用いて14日齢ﾗｯﾄ中枢神経組織ﾊﾟﾗﾌｨﾝ切片の免疫染色を行った。その結果、大脳では嗅脳の一部の細胞、白質の神経線維及びその周囲の細胞、脳幹の一部の細胞及び神経線維が染色された。また小脳では白質の神経線維及びその周囲の細胞とﾌﾟﾙｷﾝｴ細胞の細胞質、脊髄では白質の神経線維とその周囲の細胞の細胞質が特異的に染色された。

［緒言］

HCNP(1)(2)(3)は小鹿等によりラット海馬から分離、精製されたﾗｯﾄ中隔核培養組織のAch産生を促進するﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞである。しかし神経組織内の生理的作用、分布はわかっていない。そこで今回我々はHCNPの特異抗体を用い14日齢ﾗｯﾄの脳及び脊髄におけるHCNPの分布を免疫組織化学的な方法で検討したので報告する。

［方法］

1.脱ｱｾﾁﾙ化HCNP(NH_2-HCNP、合成HCNP)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、合成ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞの精製はYMC-A363(S-5)ODSｶﾗﾑを用いHPLCで実施した。

2.合成HCNPと牛血清ｱﾙﾌﾞﾐﾝ をglutaraldehyde法にて結合させ、蒸留水にて透析後、凍結乾燥を行った。乾燥物を1mg/mlの濃度でPBSに溶解し、等量のFreund's complete adjuvantと emulsionにし三羽のｳｻｷﾞ（No.1,2,3）に免疫した。

3. 抗HCNP特異抗体の精製にはCNBr-Activated Sephalose 4B (Pharmacia) 1ml に合成HCNP2mgを結合させたｱﾌｨﾆﾃｨｰｶﾗﾑで常法によりｳｻｷﾞ抗血清2mlから行った。

4. 抗体価の測定にはXenobind EIA Plate(Boxy Brown)を使用した。すなわち合成HCNPをPBSで希釈し、10^{-5}Mから10^{-7}Mの濃度系列でPlateに固相化した。抗血清を加え4℃、一昼夜反応後、抗ｳｻｷﾞIgGﾍﾟﾙｵｷｼﾀﾞｰｾﾞ標識抗体を添加し、H_2O_2とO-phenylenediamineにて発色させ1N H_2SO_4にて反応を停止させ、490nmでの吸光度を抗体の力価とした。

5.Wistar系ラット新生児脳を終脳前頭断で４分割にしブアン液にて室温で24時間固定した。 固定した標本は脱水、透徹後、Paraffin Blockform (Merck) で包埋した。 組織ブロックから2～3μmの切片を作成し、slide-glassにmountした。脱水、洗浄後、5％正常山羊血清(DAKO)にてblockし、100倍希釈の精製特異抗体にて二昼夜反応後、VectorstainのABC Kitを用い染色をおこなった。尚、内因性ﾍﾟﾙｵｷｼﾀﾞｰｾﾞをblockするために3%H_2O_2加ﾒﾀﾉｰﾙと前もって反応させた。negative controlには一次抗体として非免疫のｳｻｷﾞIgGを用いた。また、十分量の合成HCNPとpreincubationした抗HCNP特異抗体を用いて吸収試験を行った。更に抗S-100抗体（ﾆﾁﾚｲ）、抗NSE抗体（DAKO）、抗Myelin basic protein抗体（DAKO）を用いた免疫染色を施行し比較検討した。

［結果及び考察］

1.ｳｻｷﾞから得られた抗HCNP抗体の力価は抗原（合成HCNP）を10 $^{-5}$Mにてplateに固相化した時に1000倍希釈のNo.1の抗血清では0.186であり、No.2,No.3の抗血清はそれよりやや低値であった。ｱﾌｨﾆﾃｨｰ精製した場合、100倍希釈のNo.1の精製抗体の力価は0.189、No.3では同一条件で0.117であった。No.2は低値であった。免疫染色には主にNo.3の精製特異抗体を用いた。尚、No.3の精製特異抗体の蛋白濃度はBradford法にて123μg/mlであった。

2.精製特異抗体を用いた免疫染色によれば大脳では図１のように白質の神経線維とその周囲の細胞の細胞質が瀰漫性に染色され、嗅脳の一部の細胞の細胞質も染色された。脳幹の一部の細胞の細胞質及び一部の神経線維、小脳でも白質の神経線維及びその周囲の細胞とﾌﾟﾙｷﾝｴ細胞の細胞質が染色された。脊髄でも図２、３のように白質の神経線維とその周囲の細胞の細胞質の一部が特異的に染色された。

3.精製特異抗体で免疫染色される組織は白質の神経線維とその周囲の細胞の細胞質が主体であるが、それらは抗S-100抗体、抗NSE抗体、及び抗Myelin basic protein抗体で染色される組織分布と異なっていた。

4.図４は脊髄での吸収試験の結果であり、反応は陰性であった。非免疫ｳｻｷﾞIgGを一次抗体の代わりに用いたcontrol試験及びHCNPとpreincubationした精製特異抗体を用いた吸収試験の何れにおいても組織は全く染色されず精製抗体の特異性が高いことが証明された。

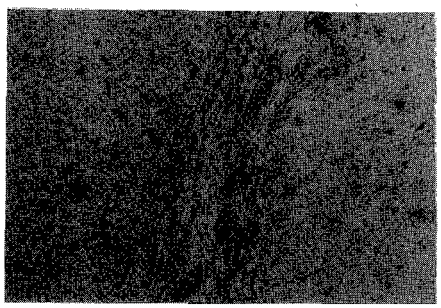


図.１　大脳　（20倍）

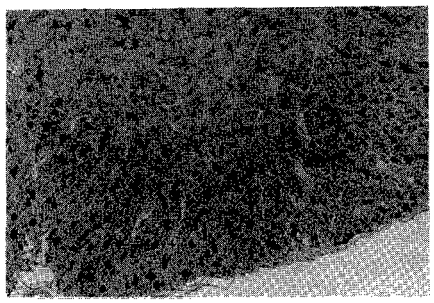


図.２　脊髄　（20倍）

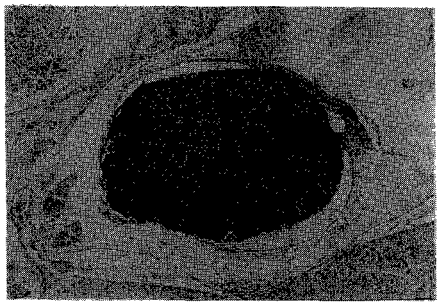


図.３　脊髄　（4倍）

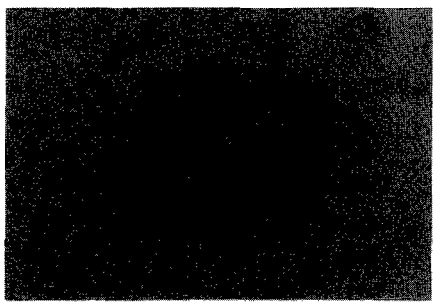


図.４　脊髄　吸収試験　（4倍）

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　28(1):374-375,1989

(3)小鹿幸生　他　神経化学　29(1):180-181,1990

152 線維芽細胞成長因子受容体に対する抗体作製とその脳内での免疫組織化学的応用およびｍＲＮＡの検出

花井一光[1]，松尾明典[2]，安原　治[1]，遠山育夫[1]，磯部正治[3]，大村　裕[4]，木村　宏[1]

(1:滋賀医大・分子神経生物学研究センター，2:京大・医・神経内科，3:富山医科薬科大学和漢薬研究所，4:日本臓器生物活性科学研究所)

〔要約〕

線維芽細胞成長因子受容体(FGF-R)に対する抗体を、合成ポリペプチドをハプテンとして、家兎に免疫し作製した。この抗体を免疫組織法に用いてラットおよびヒトの脳内における FGF-R様免疫活性物質の局在について検索した。その結果、FGF-R様免疫活性物質はラットおよびヒト脳ともグリア細胞と神経細胞の双方に認められた。また、ＰＣＲ法によって、ラット脳における FGF-R遺伝子の発現を検討した。

〔緒言〕

線維芽細胞成長因子(FGF)は、神経組織に対して生理学的に重要な作用をもち、さらに種々の神経疾患においては、病態との関わりがみられることから、注目されている。 FGFの作用を把握するためには、線維芽細胞成長因子受容体(FGF-R)の局在を明らかにする事が重要である。本研究では、 FGF-Rの細胞外ドメインに相当する合成ポリペプチドをハプテンとして抗体を作製し、免疫組織化学的にラットおよびヒト脳内における FGF-R様免疫活性物質の局在について検討した。

また、ラット脳より抽出した RNAからcDNAを逆転写し鋳型として PCRを行ない、脳内の FGF-RのmRNAの発現を検出した。

〔方法〕

FGF-Rの抗体作製:FGF-Rに特異的な細胞外ドメインの17個のアミノ酸配列(1)のポリペプチドを合成し、それをハプテンとし、 poly-L-glutamateに結合した。この結合体の構造は、 NMRにて解析した。これを家兎に免疫して抗血清を得た。抗体の特異性および力価はスポットテスト法にて検定した。すなわち、2%ゼラチン溶液に浸潤し乾燥させたニトロセルロース膜に1.0 pmolesから3.9 fmolesの合成ポリペプチドを含む溶液1 μl をスポットし、パラフォルムアルデヒドガスで固定後、FGF-R抗体と反応させ発色反応の強弱により抗体価を測定した。

FGF-Rの免疫組織化学:Wistar系雄ラット(150-250 g)を灌流固定し、脳を摘出後、クライオスタットで切片を作製した。ヒトは、剖検時に大脳皮質を切り出し、4%パラフルムアルデヒドで浸漬固定後、クライオスタットにて切片を作製した。それぞれを浮遊法にてＡＢＣ免疫組織染色に供した。

FGF-RのPCR: Wistar系雄ラット(150-250g)から摘出した大脳皮質，海馬，視床下部，小脳および肝から RNAを抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAとし、それを鋳型として、ラット FGF-Rの細胞外ドメインの一部の290 bp(2)をPCR法で増幅した。

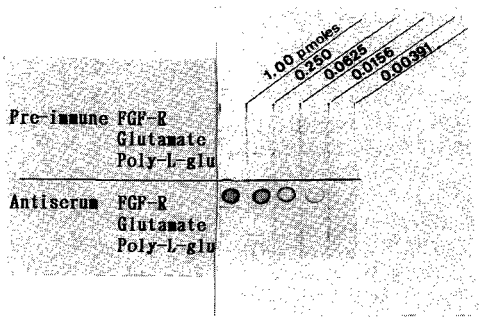
〔結果〕

得られた FGF-R抗体を１万倍希釈でスポットテストに用いた場合、15.6 fmolesのFGF-R合成ポリペプチドが十分な感度で検出されたが、担体ペプチドのpoly-L-glutamateおよび単独のl-グルタミン酸とは、1 pmolesの高濃度とも反応しなかった(Fig.1)。したがって、この抗体の担体ペプチドとの交叉率は2%以下と考えられた。

ラット脳における免疫組織化学では FGF-R様免疫活性物質はグリア細胞(Fig.2-A)、神経細胞(Fig.2-B)および一部の毛細血管に認められ、いずれも顆粒状に染色され膜抗原を思わせる像を示した 。FGF-R陽性グリアは、重染色を行った結果、オリゴデンドログリアであった。これらの陽性グリアは脳内に広く分布していた。ヒト大脳においても、 FGF-R様免疫活性陽性物質はグリア細胞(Fig.2-C)、神経細胞の一部および毛細血管に認められた 。PCR法の結果、 FGF-R遺伝子は大脳皮質，海馬，視床下部および小脳で発現しており、肝でもわずかに認められた。(Fig.3)。

〔考察〕

今回作製した FGF-R抗体は特異性および力価が高く、免疫組織化学法に応用すると光顕レベルでの陽性細胞の種類の同定および脳内の分布を詳細に検索することができた。これまで我々は酸性線維芽細胞成長因子がアストロサイトに分布していることを報告してきた(3)。今回、 FGF-R様免疫活性物質が、神経細胞とグリア細胞の双方にみられたことから、 FGFは、グリアーグリア，グリアーニューロンの相互作用に強く関わっていることが示唆された。また、PCR法により脳内の種々の部位で FGF-RのmRNAが存在することが確認された。FGF-Rには、いくつかのサブタイプの存在することが知られており(4)、今後は、サブタイプごとに特異的な抗体を作製し、それぞれの発現部位や作用の差異について検討を行うことが重要であると思われる。



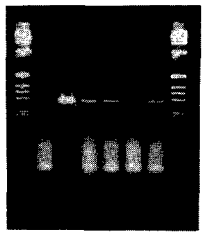


Fig. 1 The specificity of the FGF-R antiserum: Nitrocellulose membrane spotted with FGF-R polypeptide, glutamate and poly-L-glutamate.

Fig. 3 Amplification of FGF-R target sequence(290 bp) with PCR: lane 2, liver; 3, whole brain; 4, cerebral cortex; 5, hippocumpus; 6, hypothalamus; 7, cerebellum(from total *RNA except for whole brain poly(A)+ RNA*)

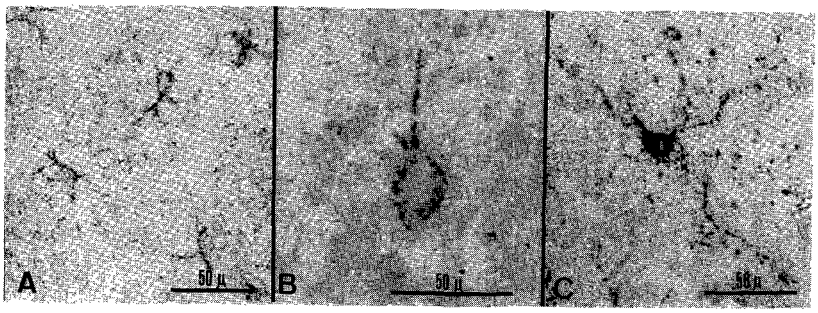


Fig. 2 FGF-R-like immunoreactivites in the rat and human brain. In the rat brain, both glial cells (A) and neuronal cells (B) stained positively for FGF-R. In the human brain, glial cells (C) and neuronal cells are stained as well as in the rat brain.

参考文献：(1)Isacchi A., Bergonzi L., Sarmietus P., (1990) Nucleic Acid Res. 18, 1906

(2)Wanaka A., Johnson E. M., Milbrandt J. (1990) Neuron, 5, 267-281

(3)Tooyama, I., Hara, Y., Yasuhara O., Oomura Y., Sasaki K., Muto T., Suzuki K., Hanai K., Kimura H. (1991) Neuroscience 40, 769-779

(4)Partanen J. et al (1990) EMBO J., 10, 1347-1354

153 自傷行為モデルラットのドーパミン神経系と受容体

I 新生仔期6－OHDA投与ラットの行動特性及びドーパミンニューロンの傷害部位

岡村 均、横山ちひろ'、田口淳一、一谷幸男、井端泰彦
（京都府立医大・第二解剖、精神'）

［要約］新生仔ラット大槽内に6-hydroxydopamine(6-OHDA)を投与し、成熟後L-DOPA負荷時に自傷行為(self-mutilation behavior:SMB)を示したラットの行動異常のメカニズムを行動薬理学的に、また、ドーパミン(DA)ニューロン系の損傷部位を抗tyrosine hydroxylase 抗体を用いて免疫組織化学的に検索した。SMB発現は前肢を口に近づける常同行動様運動に引き続いて起った。これらの行動異常は、D_1受容体拮抗薬であるSCH-23390で完全に抑制され、haloperidolでは部分的に抑制されるが、D_2受容体拮抗薬であるYM-09151-2では全く抑制されず、D_2よりもD_1受容体の強い関与が示唆された。SMB発現ラットにおいては黒質緻密帯-線条体DA系及び腹側被蓋野-側坐核嗅結節DA系が高度に傷害されていたが、Calleja野、内側前頭皮質、視床下部及び縫線核のDA系には傷害が殆どなかった。これらの結果より6-OHDA投与によって部位特異的なDAニューロン系の障害が起こることが明かとなり、特に腹側被蓋野－側坐核嗅結節DA系は非SMB群に比しSMB群でかなり傷害されていることから、この部位のDAニューロン系の傷害がSMB現象に深く関与すると想定された。

［目的］自傷行為は精神遅滞児に稀ならず認められ身体の一部を引きちぎるような激しい自傷行為(self-mutilation behavior:SMB)は典型的には Lesch-Nyhan症候群(LN)で認められるが、その神経学的本態はほとんど解明されていない。近年、死後脳検索にてLNで特異的に脳内ドーパミン(DA)含量が減少していることが報告され[1]、またBreeseらは、新生仔期に 6-hydroxydopamine(6-OHDA)を大槽内投与し脳内DAニューロン系を破壊したラットが、L-DOPA負荷時運動量の増加 (L-DOPA induced increased locomotor activity: DILA)とともに激しい自傷を示すことを発見し、自傷行為に DAニューロン系が深く関与することを明らかにした[2),3)]。一方、中枢DAニューロン系は、Dahlstrom and Fuxe (1964) によりA8～A14まで分類され、またDA受容体はD_1～D_5に分類され、それら各々が別々の機能に結びついていると考えられている。本研究はいかなる部位の中枢DAニューロン系及びその受容体が傷害されることによって、 SMBが誘発されるのかを明らかにすることを目的とするが、その第１段階として今回我々は、このラットにおける行動異常のメカニズムを行動薬理学的に検討するのみならず、DA系の傷害領域を抗tyrosine hydroxylase(TH) 血清による免疫組織化学的検索により、SMBなどの行動異常との相関性を検討した。

［方法］Wistar系ラット生後１日齢及び３日齢にdesipramine(20mg/kg)前処置後、実験群には6-OHDA(100μg/5μl vehicle:vehicleには0.1% Ascorbic acidを含む)を、対照群には6-OHDAを含まないvehicleのみを大槽内に投与した。4～6週齢で、末梢性ドーパ脱炭酸酵素阻害剤であるRo4-4602(50mg/kg i.p.)前処置後、L-DOPA(100mg/kg i.p.)を負荷し、 Animex による運動量の測定及び行動評価を行なった。SMB判定は身体の咬傷を確認することにより行なった。L-DOPA 投与後のAnimexによる運動量の計測は投与直後より10分毎90分まで行い、SMBが出現したラット群においてはその時点でDA 受容体拮抗薬を投与した。対照群においては全例(31例)L-DOPA投与後の各10分間運動量が 200countsを越えなかったので、DILAは10分間のcountsが 250countsを一度でも越えたものとした。また4～6週においてSMBが起こったラットの一部は、6～8カ月の時点でもう一度L-DOPA負荷を行い、SMBの有無を検討した。8～10週齢で、ラットを 4%パラホルムアルデヒドを主体とする固定液で灌流固定後、凍結切片を作成し、抗TH血清(1:10000希釈)によるＡＢＣ法免疫組織化学を行ない、DAB-Nickelにて可視化し、中脳(A8,A9,A10)、視床下部(A11,A12,A13,A14)のドーパミン細胞体及びその投射野(線条体、側坐核、嗅結節、内側前頭皮質、梨状葉、嗅内野、正中隆起など)を各群において比較した。

［結果］

1．行動学的検索　１）103例の新生仔期6-OHDA処置群のうちL-DOPAを負荷後、61例のラットにSMBが引き起こされ(SMB(+)群)、30例のラットにはDILAのみ認められ(SMB(-)/DILA(+)群)、2例のラットはSMBもDILAも示さなかった。SMB群はSMB出現前、DILAを伴うものが大部分(89%)であった。２）SMB(+)群のL-DOPA投与後の行動パターンは、投与直後より急激なDILAが起こり、それが減少すると共に飛び上がり運動、首を上下に振って前肢を口に近づける常同行動様運動が出現し、投与後20～120分にてSMBが出現した(Fig 1)。SMB(-)/DILA(+)群においては、投与後約１時間してDILAが起こるが、SMBのみならず常同行動様運動も起こることはまれであった。３）SCH-23390(1mg/kg)を前処置した場合にSMB出現は完全に抑制された。しかしSMBが出現した群におけるDILAは部分的にしか抑制されなかった。４）出現したSMBはSCH-23390(0.1, 0.2, 0.4, 1mg/kg)にて完全に抑制され、haloperidol(1,5,20mg/kg)にてはbitingの頻度は減少するが、完全に抑制されることは少ない。また、YM-09151-2(0.02, 0.1, 1mg/kg)投与ではSMBの状態は全く抑制されなかった。５）4～6週齢でSMBを呈したラットはすべて(9例)5～7カ月後、再びL-DOPA負荷時SMBを呈した。

2．免疫組織化学的検索　1）SMB(+)群においては、黒質緻密帯-線条体DA系及び腹側被蓋野-側坐核嗅結節DA系が高度に傷害されていたが、Calleja野、大脳皮質、視床下部及び縫線核のDA系には影響が殆どなかった（Fig 2）。2）SMB(-)/DILA(+)群においては、黒質緻密帯-線条体DA系は1）と同様高度に傷害されていたが、腹側被蓋野-側坐核嗅結節DA系は傷害がより軽度であった。

［考察］Breeseらは、desipramine前処置後、新生仔期大槽内に6-OHDAを投与したラットの脳内 DA量は激減し、ノルアドレナリン量は変動しないことを報告し[2),3)]、さらに、これらのラットのDA受容体をL-DOPAやapomorphineで刺激するとSMBを起こすことを報告した[2)]。また、このSMBはD_1受容体作動薬であるSKF-38393でも引き起こされ、D_2受容体作動薬であるLY-171555では引き起こされないことや、D_1受容体拮抗薬であるSCH-23390で抑えられることから、D_1受容体がSMBに関与すると想定した[4)]。SMBの抑制にSCH-23390が有効であり、特異的なD_2受容体拮抗薬YM-09151-2が無効であるという我々の今回の結果はBreeseの仮説をさらに支持するものである。Haloperidolが部分的にしかSMBを抑制しなかったのはこの薬のD_2受容体拮抗作用に比してD_1受容体拮抗作用が弱いことによるのではないかと考えられる。我々はさらにL-DOPA投与後SMBに至る経過を詳細に検討することにより、大部分のラットにおいてはSMB出現前に行動量の急激な増大、続いて行動量の減少を伴う常同行動の出現がおこることを見いだした。現在までの生化学的データでは新生仔期6-OHDA投与によって脳内の90%以上のDA量が失われるとされているが[3)]、脳内におけるDA系の傷害部位は明確には言及されていない。今回我々は、THの免疫組織化学を適用することにより、初めて、6-OHDAは部位選択的にDAニューロンを傷害すること、またこの傷害部位の広がりがSMB出現と対応していることを明らかにした。特に腹側被蓋野-側坐核嗅結節DA系は、非SMB群に比しSMB群でかなり傷害されていることから、この部位のDAニューロン系の傷害がSMB現象に深く関与すると想定される。現在この部位のDA及びその代謝産物の減少の程度をHPLCにて、またD_1およびD_2受容体の部位特異的な変動をオートラジオグラフィーにて検索中である。

［文献］
1）Lloyd et al. N. Engl. J. Med. 305,1106-1111(1981)
2）Breese et al. J.Pharmacol.Exp.Ther. 231,343-354(1984)
3）Smith et al. J.Pharmacol.Exp.Ther. 185,609-613(1973)
4）Breese et al. J.Pharmacol.Exp.Ther. 235,287-295(1985)

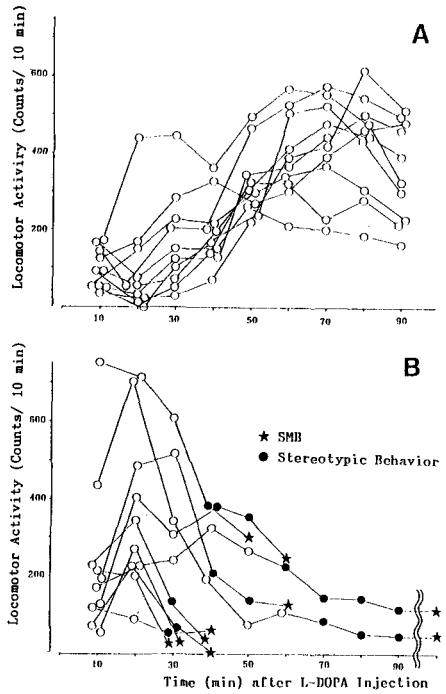


Fig 1. Time course of the activity counts of neoneatal 6-OHDA treated rats after loading of L-DOPA(100mg/kg,i.p.) pretreated with Ro4-4602(50mg/kg,i.p.) 30min before. Locomotor activity was counted by Animex by consecutive 10 min period activity scores through 90min. Panel A shows the SMB(-)/DILA(+)group(n=10), Panel B show SMB(+) group(n=10). Each line shows time course of activity counts of one rat. Animal behavior was also observed during the locomotion test. In panel B, the point showing the stereotypic behavior such as head nodding and coordinated movement of front paws toward the mouth is shown as black circle, and the point showing self-mutilation behavior(SMB) is expressed as star.

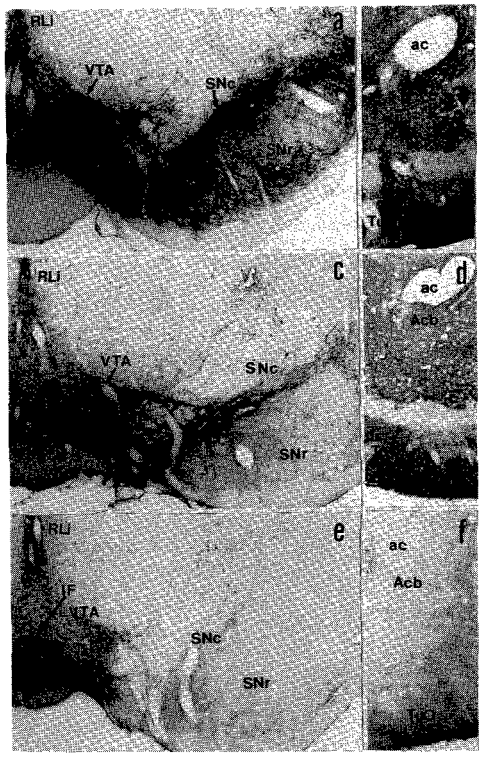


Fig 2. TH-immunoreactive neurons and terminals in the midbrain (a,c,e) and the ventral striatum (b,d,f) of control (a,b), SMB(-)/DILA(+) (c,d) and SMB(+)(e,f) rats. ac:anterior commissure Acb:nucleus accumbens IF:interfascicular nucleus RLi:rostral linear nucleus of raphe SNr:substantia nigra pars reticulata SNc:substantia nigra pars compacta TuO :tuberculum olfactorium VTA:ventral tegmental area

154 ヒト末梢神経ミエリンに存在するネオラクト系ガングリオシド

後藤希代子[1]、舟本規昭[1]、太田雪子[1]、阿部敏明[1]、長嶋和郎[2]、
[1]帝京大学、医、小児、[2]北大、医、病理

〔要約〕
ヒト末梢神経のガングリオシド組成をTLC-免疫染色により分析した結果、LM1(NAα2-3nLc$_4$Cer)よりも更に糖鎖の長いネオラクト系ガングリオシドが検出された。これらのガングリオシド(X1、X2)は運動神経、感覚神経に共通な成分であり、単離してその構造を分析すると、X1はNA-nLc$_6$Cer, X2は(NA)$_2$-nLc$_4$Cerであると考えられた。更に末梢神経ミエリンのガングリオシドを分析すると、X1, X2共にミエリンに存在してた。又、末梢神経およびそのミエリンの中性糖脂質分画にはこれらのネオラクト系ガングリオシドのアシアロ体であるnLc$_4$Cer、nLc$_6$Cerが検出された。以上ネオラクト系のガングリオシド、糖脂質が末梢神経ミエリンに存在することが示された。

ガングリオシドは細胞表面に存在する酸性糖脂質であり、神経系での様々の機能が注目されている。近年、末梢神経系の障害に関して運動性、感覚性のそれぞれの障害に対応した特定の糖鎖が自己抗原として注目され、末梢神経系のガングリオシド、糖脂質が疾病形成へ何等かの役割をしていると推定されている(1)。この為、末梢神経の表面抗原としてのガングリオシド、糖脂質の分布を詳細に調べる事が重要となってきた。筆者らは、運動神経と感覚神経を特徴ずけ、一方の神経に優位性を示す末梢神経疾患の障害機構をも説明できるような物質レベルでの違いが想定できると考え検索を行なってきた。その過程で、ヒト運動神経と感覚神経ではGD1a等のガングリオシドの脂肪酸、長鎖塩基分子種がたがいに異なる事を明らかにし、更にこれらのガングリオシドは軸索由来である事を報告した(2)。本研究では両神経のガングリオシド組成をTLC-免疫染色により分析した結果、LM1(NAα2-3nLc$_4$Cer)に加えて、更に糖鎖の長いネオラクト系ガングリオシドが検出され、これらのネオラクト系ガングリオシドは両神経のミエリンに存在することが分かったので報告する。

[方法]

1．材料　ヒト末梢神経は神経疾患でない患者の剖検例より得た。馬尾神経のうち前根と後根が一緒になる以前の部分を互に混入しないように慎重に分離し、前根:運動神経、後根:感覚神経として分析に供した。

2．中性糖脂質、ガングリオシドの分離、分析　総脂質の抽出、総ガングリオシド画分の分離、HPLCによるモノシアロ、ジシアロ、トリシアロ画分の分取は既報に従った(2, 3)。各ガングリオシド画分はTLC で展開後シアリダーゼ処理を行ない免疫染色を行なった(4)。抗体は抗 アシアロGM1抗体、及びネオラクト系糖鎖の末端２糖（Galβ1-4GlcNac-R)を認識するモノクローナル抗体H-11(5)を用いた。TLCの展開溶媒は溶媒１，C/M/0.2 % $CaCl_2$.$2H_2O$(55/45/10, by volume), 溶媒２, C/M/5N NH_4OH/0.4% $CaCl_2$.$2H_2O$(60/40/4/5, by volume)、溶媒３, C/M/H_2O (70/40/8, by volume)を使用した。中性糖脂質は、アセチル化後Iatrobeadsカラムにかけ、微量成分の分析の為、CMH(画分Ａ)と２糖以上の中性糖脂質(画分Ｂ)に分離した。

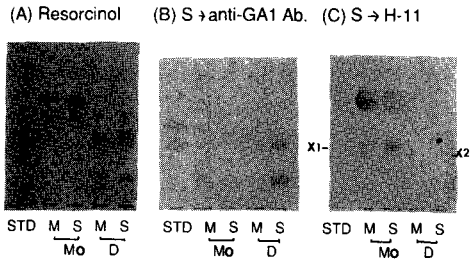
3．ミエリン画分の調製　ミエリンの分離は、Mickoらの方法(6)、Chouらの方法(7)に従いおこなった。5'-nucleotidase活性(8)、β-ガラクトシダーゼ活性(9)の測定、SDS-PAGEによる蛋白質分析及び抗P0抗体による免疫染色等によりミエリン画分の純度を検定した。

[結果]

1. 末梢神経のネオラクト系ガングリオシド

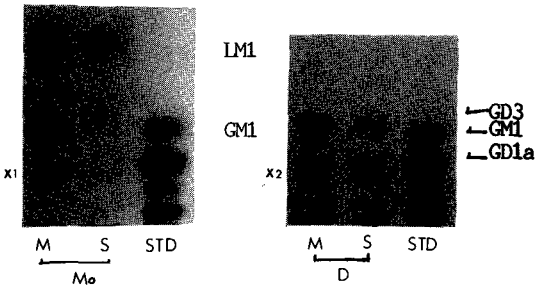
ヒト運動神経と感覚神経のモノシアロ及びジシアロガングリオシド画分をTLCで分離し、シアリダーゼ処理後に免疫染色を行い分析した(図1)。図1Bに示した様に抗 アシアロGM1抗体による染色では、末梢神経のガングリオ系ガングリオシドGM1, GD1a, GD1bに相当するバンドが検出された。H-11による染色では、LM1(NAα2-3nLc$_4$Cer)に加えモノシアロガングリオシド

Figure 1. Monosialo- and disialo gangliosides of human motor and sensory nerves.



(A) resorcinol spray, (B and C).Plates were developed with solvent system 2, and treated with sialidase, followed by immunostained with B, anti-GA1Ab; C, H-11.
M,motor nerve; S.sensory nerve; Mo,monosialo-; D,disialo-ganglioside fraction.

Figure 2. Monosialo- and disialo-ganglioside fraction of the motor and sensory nerve myelins.



M, motor nerve; S, sensory nerve; Mo,monosialo-; D,disialo-ganglioside fraction. resorcinol spray. solvent system 2.

Table1. Ganglioside composition of human peripheral myelins.

	motor nerve*	sensory nerve*
GM3 (%)*	6	6
LM1	33	37
GM1	14	2
GD3+X1	29	32
GD1a	4	1
X2	6	9
GD1b	9	9

*,% of total gangliosides

画分にX1、ジシアロガングリオシド画分にX2の２種類の陽性バンドが検出され（図1C）、両神経にはLM1以外に更に糖鎖の長いネオラクト系ガングリオシドが存在すると考えられた。これらのガングリオシドを精製し、シアリダーゼ処理を行なうとX1はnLc_6Cer、X2はnLc_4CerとTLC上で同じ移動度をしめす糖脂質を生じた事（結果未掲載）、及びX1, X2のTLCでの移動度よりX1は$NA\text{-}nLc_6Cer$, X2は$(NA)_2\text{-}nLc_4Cer$と考えられた。LM1はミエリンに局在するため(7,10)、X1, X2もミエリンに存在することが予想されるので両神経よりミエリンを分離して分析した。

２．末梢神経ミエリンのガングリオシド、中性糖脂質

ミエリンを運動、感覚神経より分離してガングリオシドのTLC分析を行なうと、LM1,GD3の他にX1,X2,GM1,GD1a,GD1b, GM3等が検出された（図２）。これらのうちで、LM1,GD3 ,GM3,X1,X2は運動、感覚両神経ミエリンに共通であった。一方、GM1,GD1aは運動神経では検出されたが、感覚神経では非常に少なく、運動神経ミエリンにはGM1含量が感覚神経のそれと比べ多かった。表１にデンシトメトリーによるガングリオシド組成比を示した。末梢神経ミエリンの中性糖脂質のうち、２糖以上の中性糖脂質画分（画分Ｂ）のTLC-免疫染色の結果からは、X1, X2のアシアロ体であるnLc_4Cer、nLc_6Cerが検出された。

[考察]

末梢神経ミエリンは中枢神経ミエリンとは構成要素が異なることが知られ、そのタンパク質も50%以上が末梢神経ミエリンに特徴的なP0タンパク質で構成されている。脂質については、中枢のそれと比べスフィンゴミエリン含量が高く、GalCerが少ない事で知られる(11)。中枢神経ミエリンの主要ガングリオシドはGM1であるが、末梢神経ミエリンはLM1が総ガングリオシドの30%以上を占めている。本研究で、運動、感覚両神経ミエリンにはより糖鎖の長いネオラクト系のガングリオシド、糖脂質が末梢神経ミエリンに存在することが示され、末梢神経ミエリン、シュワン細胞の特徴と考えられた。ネオラクト系糖鎖はI血液型抗原の前駆物質であり、様々な修飾を受け癌性、胎児性抗原に変化することが知られている。今後、末梢神経におけるネオラクト系糖鎖の抗原性等について解析を進める予定である。

[謝辞]単クローン抗体H-11、抗P0抗体を御供与頂きました東京医科歯科大学滝孝雄先生並びに慶応大学植村慶一先生にに深謝いたします。

References

(1)Steck, A.J., *et al* , Ann.Neurol. 22, 764-767 (1987). Sadiq, S.A.*et al* , Neurology 40, 1067-1072 (1990). (2) Ogawa-Goto, K., *et al* , J.Neurochem. 55, 1486-1493 (1990). (3) Ando, S.,*et al,* J.Chromatogr. 408, 285-290 (1987). (4) Hirabayashi, Y., *et al,* (1986). Biochim.Biophys.Acta, 876, 178-182 (1986). (5) Myoga, A., *et al,*,. Cancer Res., 48, 1512-1516 (1988). (6) Micko, S., and Schlaefper,W.W. J.Neurochem., 30, 1041-1049 (1978). (7) Chou, K.H.,*et al,* J.Neurochem. 44, 1898-1912 (1985).
(8) Michell, R.H.,*et al,* Biochem.Biophys.Res.Commun. 21, 333-338 (1965). (9) Wenger, D.A., *et al,* Science 188, 1310-1312 (1975).
(10) Fong, J.W., *et al,*J.Neurochem. 26, 157-162 (1976). (11)Smith,M.E., Handbook of Clinical Neurol. 7, pp23-40(1987)

155 ミクログリア由来のグリオージス誘導因子について

錫村明生*，澤田　誠**，杢野謙次+，加藤兼房++，丸野内　棣**，山本纁子*
（藤田保健衛生大・神内*，応用細胞**，名大・神内+，愛知県コロニー研・生化++）

〔要約〕
グリオージスの発症機序にアプローチする目的で，従来アストロサイトの増殖を誘導することが報告されているinterleukin-1(IL-1)，tumor necrosis factor-α(TNFα)，interferon-γ(IFNγ) およびミクログリアの上清のアストロサイトの増殖に対する効果を検討した．この結果，IL-1，TNFα，IFNγ はアストロサイトの増殖に対する効果はなく，IFNγはむしろ増殖を抑制し分化を促進した．これに対し，ミクログリアの上清はアストロサイトの増殖能を有意に増加させた．この効果は抗IL-1抗体，抗TNFα抗体，抗IL-6抗体，抗IFNγ抗体では抑制されず，既知のサイトカインとは異なるミクログリア由来の液性因子がアストロサイトの増殖に関与することが示唆された．

［目的］
中枢神経系を構成するグリア細胞のひとつであるミクログリアの本態は不明であり，細胞起源についても一定の見解が得られていない．我々はこの細胞が極めて単球系の細胞に近似する特性を有することを示してきた[1-4]．また，昨年度までの研究でミクログリアがアストロサイトの産生するサイトカイン(GM-CSF)でその機能を調節されていること[4,5]，ミクログリア自身も種々のサイトカインを産生していることが明らかになっている[2]．本年度は，ミクログリア由来のサイトカインのアストロサイトの増殖に対する効果を検討した．アストロサイトの増殖する病態はグリオージスと呼ばれ種々の神経疾患に共通に認められる組織変化であるが，その発症機序は不明である．ミクログリアの産生する interleukin－1(IL-1)[6]やtumor necrosis factor-α(TNF-α)[7]がアストロサイトを増殖させるという報告と，組織学的にもグリオージスの部位にミクログリアの出現を認めることからミクログリアがサイトカインを介してグリオージスの発症に関与している可能性が推測される．今回は，種々の因子によるin vitroでのアストロサイトの増殖能の変化を測定するアッセイ系を確立し，ミクログリア由来のサイトカインの効果について検討した．また近年，interferon-γ(IFNγ)がアストロサイトを増殖させるgliosis inducing cytokineであるという報告[8]もあり，IFNγのアストロサイトに対する効果もあわせて検討した．

［方法］
既報のごとくC3H/HeNマウス新生仔の一次混合グリア細胞培養よりミクログリアを分離し，1×10^6/mlに調整し，無刺激およびLPS，TPAや種々のサイトカイン(IL-1，TNF，IFNγ，IL-6，GM-CSF)で刺激後２日目に上清を集めた(Mi-Sup)．これらMi-Supおよび，recombinant IL-1α，β，TNFα，IFNγをアストロサイトの培養に添加し，３日目にその増殖促進効果を検討した．アストロサイトの増殖の陽性対照としてTPA(1-100ng/ml)を用いた．増殖能は刺激後の細胞数の変化，MTTアッセイ，Bromodeoxyuridine(BrdU)のとりこみ，およびS-100蛋白量の変化で測定した．

［結果と考察］
従来の報告に反し，今回検討したサイトカイン(IL-1α，β，TNFα，IFNγ)はいずれもアストロサイトの細胞数，BrdUとりこみ，S-100蛋白量を有意に変動させず，増殖促進効果は認められなかった（表１）．IFNγは細胞数の増加を抑制し，S-100 蛋白量を増加させており，アストロサイトの増殖に対してはむしろ抑制的に働き，分化を促進していると考えられた．これに対し，ミクログリアの上清は無刺激の上清でもアストロサイトの増殖を促進し，その強さは陽性対照の TPAとほぼ同程度であった．種々の刺激後のMi-Supも同様にアストロサイトに対し増殖促進的に働いたが，その効果は無刺激の上清と同程度であった（表２）．Mi-Supの増殖促進効果は抗IL-1抗体，抗IL-6抗体，抗TNFα抗体，抗IFNγ抗体では抑制されず，ミクログリア由来の既知のサイトカインとは異なる因子によるものと考えられた．現在そのMi-Sup中のアストロサイト増殖因子について詳細に検討中である．
グリオージスの部位には比較的早期にミクログリアが集積することが知られており，中枢神経系の種々の病態で認められるグリオージスの発症に今回示したミクログリア由来のアストロサイト増殖因子の関与が推測された．

表1 PROLIFERATION OF ASTROCYTES IN VITRO

stimulation		cell ($\times 10^{-5}$)	MTT (OD620 $\times 10^3$) high	MTT (OD620 $\times 10^3$) low	BrdU uptake[a] (%)	S-100 (ng/dish)
none		7.9	154	57	2.8±2.1	7.29
IL-1	1 U/ml	7.6	155	59	4.1±1.3	7.63
	10	8.5	143	58	3.4±1.3	6.90
	100	8.6	136	57	2.4±1.9	8.25
TNFα	1 U/ml	6.4	145	54	4.8±1.8	6.98
	10	6.2	150	57	5.5±2.4	8.10
	100	7.9	151	55	3.5±1.9	5.97
IFNγ	1 U/ml	8.5	154	56	3.2±3.1	6.98
	10	8.2	137 **	55 **	7.1±3.7	9.22 *
	100	8.6	114	49	4.6±1.7	14.49
TPA	1 ng/ml	7.5	160	63	9.1±0.8	12.02
	10	10.4 *	178 *	69 *	13.4±1.9 *	15.89 *
	100	16.7	204	77	18.2±2.1	22.49

a) $BrdU^+$ cell/$GFAP^+$ cell as a percentage.

Each value represents mean of the quadriplicate samples (SD was less than 10 % unless specified).

* significant increase ($p<0.01$) in a dose dependent manner.

** significant decrease ($p<0.01$) in a dose dependent manner.

表2 PROLIFERATION OF ASTROCYTES: MTT assay

stimulation		OD 620 ($\times 10^3$) high	med	low
none		277±17	150±19	54±8
Mi-Sup-	1 %	293± 2	175±20	54±3
	10	373±15*	199±15*	62±4*
	25	418± 9	210± 2	70±4
$Mi-Sup^{LPS}$	1		168±20	
	10		199± 5*	
	25		203± 2	
$Mi-Sup^{TNF}$	1	298± 3	194±24	67±2
	10	320± 8*	239±36*	103±5*
	25	357± 8	371± 5	142±9
$Mi-Sup^{IL-6}$	1		185± 7	
	10		177±18*	
	25		189±16	
$Mi-Sup^{IFN}$	1	299± 3		
	10	325± 8*		
	25	391±17		

* significant increase ($p < 0.001$)

[文献]

1. Suzumura, A. et al. (1987) J. Neuroimmunol. 15: 263.
2. Sawada, M. et al. (1989) Brain Res. 491: 394.
3. Sawada, M. et al. (1990) Brain Res. 501: 119.
4. Suzumura, A. et al. (1990) J. Neuroimmunol. 30: 111.
5. Ohno, K. et al. (1990) Bichem. Biophys. Res. Commun. 169: 719.
6. Giulian, D. et al. (1985) Science 228: 495.
7. Selmaj, K.W. et al. (1990) J. Immunol. 144: 129.
8. Yong, V.W. et al. (1991) Proc. American Acad. Neurol. April 23, Boston, MA.
9. Suzumura, A. et al. (1991) Brain Res. 545: 301.

156 Paraneoplastic cerebellar degeneration 患者血中抗体が認識する神経系 Zinc Finger 蛋白

佐藤修三,中野亮一、犬塚 貴,藤田信也,崎村建司*,三品昌美*,宮武 正
(新潟大・神経内科、神経薬理*)

〔要約〕
Paraneoplastic cerebellar degeneration(PCD)の患者血清中の抗神経抗体を検索した。患者血清中に脳蛋白中の58KDaの蛋白に対する抗体がimmunoblotにて確認された。免疫組織化学的検索では、神経細胞、特にプルキニエ細胞の核及び細胞質が染色された。ヒト小脳のcDNAライブラリーをこの患者血清にて免疫スクリーニングを行い一個の陽性クローンを得た。その塩基配列のホモロジー検索では、転写制御因子として知られている Zinc Finger 構造を有していた。この抗体による転写制御因子の障害が、神経細胞の生存維持に必須な分子の発現を抑制し、PCDにおける神経細胞変性の原因となっている可能性が示唆された。

Paraneoplastic syndromeとは悪性腫瘍の直接の浸潤などによらず、遠隔作用により、神経、神経筋接合部、筋などに障害をきたす一連の疾患群である。その発症機序は不明であるが、患者血清もしくは髄液中に、腫瘍と神経などの障害組織に共通の抗原を認識する抗体が検出されており、それらの抗体が疾患形成に関与している可能性が示唆されている。特にParaneoplastic cerebellar degeneration(PCD)においては、患者血清中の抗体が認識する抗原の検索が進んでいる[5]。今回われわれは、PCD患者の血清を用いて、これまでに報告されていない蛋白分子のcDNAクローンをえたので報告する。

【症例】患者は77歳女性、1984年に癌性腹膜炎の診断を受けたが化学療法にて寛解した。1988年6月亜急性に小脳失調症が出現、臨床経過と血清中の抗プルキニエ抗体が陽性で会ったことよりPCDと診断された。

【方法】ヒトの各組織のホモジネーを凍結乾燥し、11%のポリアクリルアミドにて電気泳動を行った後ウエスタンブロットを作製した。患者および対照血清を一次抗体として用い、avidin-biotin complex peroxidase (ABC)法にて免疫染色した。また、ヒト脳の凍結乾燥切片を用いて、免疫組織化学的検索も行った。ヒト大脳、小脳、肝よりRNAを精製し、クローン化したcDNAをプローブとして用い、ノーザンブロッティングにてその発現を検索した。 λgt11 cDNA発現ライブラリーを患者血清にて免疫スクリーニングを行った。得られたクローンをpUC118にサブクローニングし、dideoxi法にて塩基配列を決定した。

【結果】免疫ブロット法では、患者血清により、ヒト小脳のホモジネートにおいて58kdの主なバンドと、いくつかの弱く染色されるバンドがみられた（図1）。免疫組織化学的には、患者血清にて、プルキニエ細胞の核および細胞質が強く染色され、その他の神経細胞やグリア細胞も弱く染色された。ノーザンブロッティングでは、小脳にて2kbから4.5kbの複数の陽性バンドが認められた（図2）。得られた陽性クローンは、およそ300bpのインサートを持っていた。その塩基配列は、84塩基；28アミノ酸の繰り返し配列で構成されていた。遺伝子バンクとの相同性の検索では、ヒトのZinc Finger 蛋白グループの一員であるZNF7およびZNF8と高い相同性をもっていた（図3）。各ユニットのコンセンサス配列は、$CX_2CX_3FX_5LX_2HX_3HX_7$ であり、これまでに報告されているSp1やKruppelにみられるZinc Fingerモチーフ（図3）にみられるものと一致していた。

【考察】卵巣癌や乳癌を有するPCD患者血清が、プルキニエ細胞を特異的に染色したとの報告がある。インムノブロットでは、それらが認識する蛋白分子は画一的で、34kdと62kdの二種類の分子を染める血清がほとんどであった。しかし日本での類似の症例では、52kdの蛋白分子を認識する抗体を有する症例が多かった。これらの分子は、患者血清による発現ライブラリーのスクリーニングにより、cDNAクローニングが行われ、それらのアミノ酸配列が明らかにされている。34kd[1]と52kd[3]の分子構造は、既知の蛋白分子との相同性が見られず、それらの機能などは不明である。ここで報告した抗体は、免疫ブロッティングにて小脳の58kdの蛋白を認識し、ノーザンブロットでも小脳のRNAを強く反応し、さらに免疫組織化学でもプルキニエ細胞を強く染色したこと、抗体により得られたクローンの構造がZinc Fingerモチーフの繰り返し配列であったことなどより、われわれはこの蛋白を Cerebellar Zinc Finger Protein(CZF)と名づけた[4]。最近、62kdの分子構造が報告されたが、興味深いことにその配列の中に転写因子に見られるLeucine Zipper構造が一部含まれていた[2]。われわれがここに報告したZinc Finger構造は、やはり転写因子に見られる配列であるが、62kd分子とは全く異なったものであった。このように、類似のPCD 患者にて、異なった構造の転写因子が抗原として認識される抗体が発現していたことは、単なる偶然とは思われない。今後これらの分子の機能を解明することによって、単にPCDの責任抗原を明らかにするのみならず、小脳に関した変性疾患や自己免疫疾患などの病因解明にもつながると考えられる。

【文献】
1) Dropcho,E.J., Chen,Y.-T., Posner,J.B. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 84, 4552-4556, 1987.
2) Fathallah-Shaykh,H., Wolf,S., Wong,E. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 88, 3451-3454, 1991.
3) Sakai,S., Mitchell,D.J., Tsukamoto,T. et al.: Ann. Neurol. 28, 692-698, 1990.
4) Sato,S., Inuzuka,T., Nakano,R. et al: Biochem. Biophys. Res. Comm.: in press, 1991
5) Tanaka,K., Yamazaki,M., Sato,S. et al.: Neurology 36, 1169-1172, 1986.

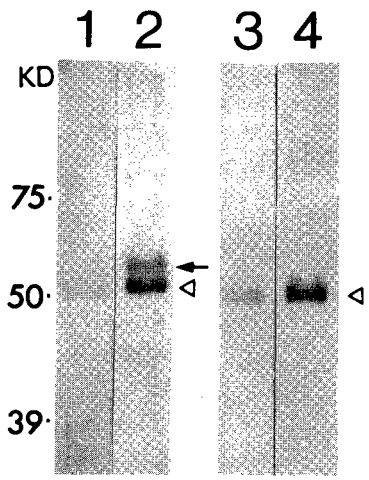


Figure 1. Immunoblot analysis of human tissues with the serum from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD). Western blots of cerebral (lane 1 and 3) and cerebellar homogenate (lane 2 and 4) were incubated with diluted serum (1:200) from a patient with PCD (lane 1 and 2) and a control (lane 3 and 4). The serum from the patient with PCD recognizes one distinct antigen (arrow) and a few higher bands, and intrinsic heavy chain of immunoglobulin (open triangle) which is also seen in blots incubated with the control serum. Molecular weights (KD) are shown on the left.

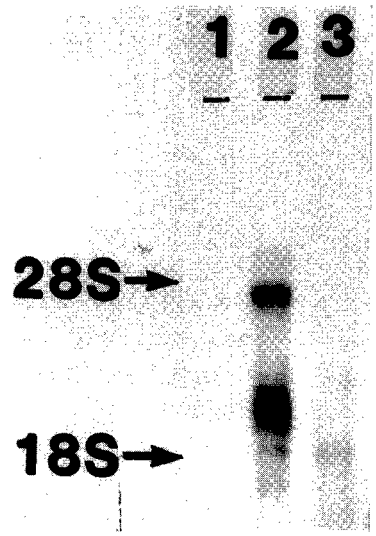


Figure 2. Northern blot analysis of CZF mRNA in human liver (lane 1), cerebellum (lane 2) and cerebrum (lane 3). Total RNA (10 ug each) was electrophoresed and hybridized with an EcoRI fragment of pCZF.

C x e C g K a F x x x s x L x x H Q r i H t G e k p y x	Consensus ZNF7
C x x C G k x F x x x x x L x x H x r x H t g e k p y x	Consensus ZNF8
C x x C x x x F x x x x x L x x H x x x H T G E K P Y x	Consensus Kruppel
C x x C g K r F x r s d h L x x H x r t H T G E x x F x	Consensus Sp1
K A F N W S S S L T K H K R I H T R E K P F K	CZF Sequence
C K E C G K A F I W S S T L T R H K R I H T G V S P Y K	
C E E C G K A F S R S S T L T K H K T I H T G E K P Y K	
C K E C G K A F K H S S A L	

Figure 3. Comparison of amino acid sequence of CZF with ZNF7, ZNF8, Sp1 and Kruppel zinc finger motifs. The sequences are given in one-letter code and aligned to show the repeated units. Amino acids matching the zinc finger consensus sequence are boxed. A consensus for the repeated motifs of ZNF7, ZNF8, Kruppel and Sp1 is displayed, uppercase letters correspond to strictly conserved amino acids, and lowercase letters to the amino acids of which more than 60% are conserved, x indicates no conservation. Amino acid sequence of CZF consists of four repeated units, two complete units and two incomplete units, and it is given in uppercase letters.

157 ヒト末梢血リンパ球のＩＬ－２産生およびＤＮＡ合成に対するムスカリン性受容体の促進的関与

矢田武，北村佳久，野村靖幸
（北大・薬・薬効）

【要約】

サイトカインと神経伝達物質を介する脳神経系と免疫系との相互連関が注目されている。今回、神経伝達物質の免疫担当細胞機能への影響の有無を解明することを目的とし、ヒト末梢血リンパ球（human peripheral blood lymphocytes, hPBL）を用い、interleukin-2（IL-2）産生と、ＤＮＡ合成への oxotremorine-M（Oxo-M; ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニスト）の影響を検討し、次の結果を得た。１）Oxo-M 100 pM～100 μM 単独では IL-2 産生を誘導しなかった。２）Oxo-M, carbachol（CCh）前処理により phytohemagglutinin（PHA）刺激による IL-2 産生は増大した。３）PHA による [^{3}H]thymidine（[^{3}H]TdR）取り込み亢進は、Oxo-M 前処理により促進された。以上の結果より、hPBL にはムスカリン性受容体が存在すること、抗原受容体刺激による IL-2 産生、ＤＮＡ合成亢進に対しムスカリン性受容体刺激は促進的に影響を及ぼすことが示唆された。

【緒言】

近年、脳・神経系が免疫系機能をコントロールすること、すなわちリンパ球における神経伝達物質受容体の存在[1]、脾臓・胸線においての迷走神経の存在と同組織内のリンパ球機能への acetylcholine（ACh）の関与[2]などが報告されており、両系が相互に連関していると考えられている。また当研究室は、Jurkat 細胞（ヒト株化 helper T 細胞）に m３型ムスカリン性受容体が発現し、その刺激によりコレラ毒素非感受性ＧＴＰ結合蛋白質を介し 1,4,5-イノシトール三リン酸（IP_3）産生と細胞内 Ca^{2+} 濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の一過性上昇が起こることを報告した[3]。そこで今回我々は、リンパ球機能に対する ACh の作用の有無を明らかにすることを目的に hPBL を用い、IL-2 産生と [^{3}H]TdR 取り込みに及ぼすムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニスト Oxo-M の影響を検討した。

【実験方法】

hPBL の調製と培養

実験にはヒト末梢血リンパ球画分（hPBL）を用いた。本研究の目的を説明し同意を得た上で健康成人より採血し、Boyum の方法[4]に準じて hPBL を調製した。なお、密度勾配遠心分離には Ficoll-Paque（Pharmacia）を用いた。遠心分離後、白濁した中間層を回収し、リン酸緩衝液（PBS）で洗浄後 RPMI-1640 培地に細胞を懸濁した。Trypan blue 染色による細胞生存率は常に 95 % 以上であった。細胞培養は 0.5 % 牛胎仔血清（FCS）を含む RPMI-1640 培地を用い、37 ℃, 10 % CO_2/90 % air の条件下で 2 x 10^6 cells/ml の細胞濃度で行った。

IL-2 の測定

上記条件下で種々の薬物刺激を施した後、培養液を回収し 500 x g, 5分間遠沈し上清を IL-2 測定用サンプルとした。測定は、ELISA キット（NEN）を用いて定量した。

[^{3}H]TdR 取り込みの測定

hPBL を [^{3}H]TdR（2 μCi/ml, 0.5 μM）と 24 時間インキュベートした。培養終了後、セルハーベスターを用いてガラスフィルター上に回収し、その放射活性を測定した。

【結果および考察】

リンパ球にムスカリン性アゴニストを単独で作用させることにより細胞膜電位が数分以内に変化すること[5]、$[Ca^{2+}]_i$ が一過性に上昇すること[3]などの報告がされており、ムスカリン性受容体の活性化がリンパ球の生理機能に関与することが示唆される。ムスカリン性アゴニストである Oxo-M 単独では IL-2 産生は認められなかったが、mitogen である PHA 24 時間添加によるT細胞活性化、IL-2 産生誘導が、10 μM Oxo-M, 24 時間の前処理により増強された。さらに、100 μM CCh 24 時間前処理でも同様の結果が得られた（図１）。IL-2 産生は PHA 刺激後約６時間より検出されるようになることが知られているが、10 μM Oxo-M, 24 時間の前処理により PHA 刺激後３～６時間で IL-2 産生が誘導された。Oxo-M の IL-2 産生増強作用は、PHA 刺激前４～６時間の前処理によっても発現し、また、100 pM Oxo-M でも発現した（図２）。PHA 刺激による [^{3}H]TdR のＤＮＡへの取り込み活性も、Oxo-M 24 時間前処理により濃度依存的に増強された（図３）。以上の結果より hPBL においてムスカリン性受容体刺激だけでは IL-2 産生（活性化Ｔリンパ球特有の反応）誘導、[^{3}H]TdR 取り込み活性の促進（リンパ球増殖反応）は認められなかったが、ムスカリン性アゴニスト前処理により抗原受容体刺激に対するＴリンパ球の応答性が増強されたことから、Ｔリンパ球に存在するムスカリン性受容体がその活性化機構を調節しているものと推定される。現在、ムスカリン性受容体刺激による二次メッセンジャーの変化、蛋白質リン酸化酵素の変動、さらにムスカリン性受容体と抗原受容体のクロストークについても検討中である。

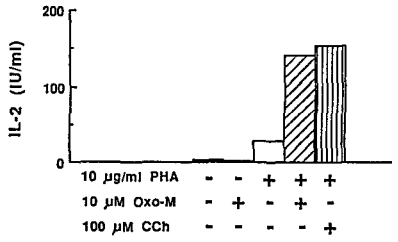


図１　IL-2 産生における Oxo-M, CCh の前処理の効果

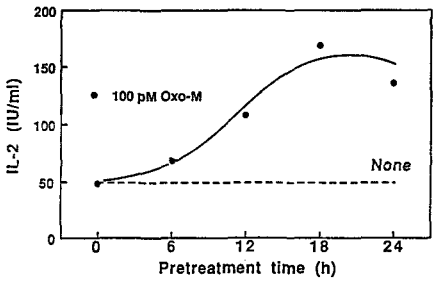


図２　IL-2 産生における Oxo-M 前処理時間の影響
（前処理の後、PHA を 24 時間添加）

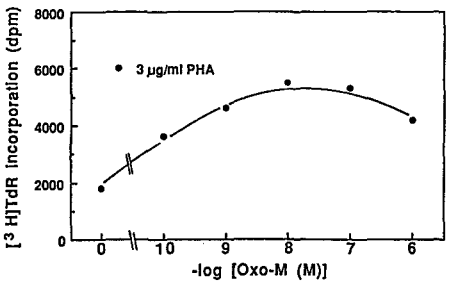


図３　[^{3}H]TdR 取り込みにおよぼす Oxo-M 前処理の影響
（前処理の後、PHA を 24 時間添加）

【参考文献】

(1) Blalock, J.E.(1989) Physiological Reviews 69, 1-32.
(2) Bulloch, K.(1985) Neural Modulation of Immunity (R. Guillemin et al,eds.), pp. 111 -pp. 141, Raven Press, New York.
(3) 金田利夫, 野村靖幸 (1990) 神経化学, 29, 58-59.
(4) Boyum, A.(1968) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 Suppl., 97, 31-50.
(5) Shapiro, H.M., Strom, T.B.(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4317-4321.

158 GABA受容体関連薬の末梢投与によるラット脳内コレシストキニン8S免疫活性の変化

横山俊英[2]、高橋真司[1]、武田克道[1]、山本敏文[1]、加藤武[1]
([1]横浜市大・総合理学・分子認識、[2]元 東工大・生命化学)

〔要約〕
脳内にはコレシストキニン8硫酸（CCK8S）がGABA性神経に共存する事から、その生理機能を明らかにする目的で$GABA_{A,B}$受容体作用薬、拮抗薬をラットに投与し、前頭前皮質、海馬、線条体、視床下部のCCK8S免疫活性（CCKLI)を測定した。$GABA_A$作用薬ムシモールは海馬、視床下部においてCCKLIを減少させ、拮抗薬のビククリンも低容量で同様な変化を示した。$GABA_B$作用薬バクロフェンは海馬、視床下部においてCCKLIを減少させ、前頭前皮質において増加傾向を示した。ホモタウリン単独ではCCKLIを変化させなかったが、バクロフェンによる海馬のCCKLIの減少を一部回復させた。これらの結果と、前頭前皮質、海馬のGABA性神経にCCK8Sが共存することから、CCK8Sの放出にGABA受容体が深く関わっていることを示唆している。

脳内にはCCK8Sが多く存在し、その薬理的効果が列挙されているものの、生理機能を解明するまでには至っていない。CCK8Sは大脳皮質、海馬、線条体などに多く存在し、記憶・学習に関わっている可能性がある。

私共は、これまで麻酔薬(1)、低酸素(2)、神経破壊(3,4)処置によるラット脳内CCKLIの変化について測定してきた。今回はCCKの生理機能を更に明らかにする目的で、CCKが共存するGABA神経との関係について検討した。以前にCl^-チャンネル阻害剤ピクロトキシンを投与すると、痙攣に伴ってCCKLIが減少することを報告した(5)。今回は痙攣を伴わない生理的条件で、GABA性神経の作用薬、拮抗薬を投与し、脳内CCKLIの変化を測定した。

方法：Wistar系雄性ラットにムシモール（0.5, 1.2 mg/kg）、ビククリン（1.5, 3, 6 mg/kg）、バクロフェン（3, 7.5, 15 mg/kg）、ホモタウリン（20, 40 mg/kg）を腹腔内投与し、４０分後に断頭し、氷上で素早く取り出し、前頭前皮質、海馬、線条体、視床下部に分け、－８０℃に凍結後CCKLIの定量に用いた。ビククリンとバクロフェンについては、経時的変化についても検討した。CCKLIはCCKアミノ末端を認識する特異抗体を用いて酵素免疫測定法により定量した(6)。

結果：$GABA_A$受容体の作用薬ムシモールは高濃度投与により、海馬、視床下部のCCKLIを20%減少させ、線条体、前頭前皮質のCCKLIは変化させなかった。拮抗薬のビククリンは3 mg/kg 投与により海馬、視床下部のCCKLIを減少させ（図１）、線条体では増加させた（図２）。一方、$GABA_B$作用薬バクロフェンは海馬において容量依存的にCCKLIを減少させ（図３）、経時的には40分で最低値に達し、徐々に回復した（図４）。大脳皮質では増加傾向を示し、線条体と視床下部では明らかな傾向を示さなかった。拮抗薬の１種であるホモタウリン単独投与ではCCKLIをほとんど変化させなかったが、海馬ではバクロフェンによって減少したCCKLIを部分的に拮抗した。

考察：今回の実験では、$GABA_A$受容体の拮抗薬ビククリンが海馬、視床下部のCCKLI を減少させた。この結果は、以前ピクロトキシンによる変化と同様であった。ピクロトキシンは痙攣を誘発したが、今回用いた低濃度のビククリンは痙攣を誘発しなかった。これらの結果から、$GABA_A$拮抗薬によるCCKLIの変化は痙攣による二次的な変化ではなく、$GABA_A$受容体を介した直接的な作用と考えられる。一方、線条体におけるCCKLIの増加は、線条体スライスを用いたin vitro の結果と同様であった。$GABA_B$受容体はGTP蛋白質とカップルしていると言われており、$GABA_A$受容体と異なった生理機能を持っているものと思われる。今回の実験では、$GABA_B$受容体の作用薬バクロフェンが海馬のCCKLIを減少させた。この結果はバクロフェンが自己受容体に作用し、CCK8Sの放出を促進させたためと考えられる。一方前頭前皮質では、バクロ

フェンの投与によりCCKLIが増加傾向を示したことが海馬の結果と異なり、今後更に検討を要する問題である。今回測定したCCKLIは脳組織内の含量であり、CCKLIの減少がCCK8Sの放出昂進とは言えず、この点についても今後の問題である。

References

1. Kushima et al., Neuropeptides, 14,225(1989)
2. Yamamoto & Kato, Develop. Brain Res., 26,285(1986)
3. Yamamoto & Kato, Neurosci. Res., 5,265(1988)
4. Takita & Kato, Neuropeptides, 13,71(1989)
5. Kato et al., Neurochem. Int., 4,493(1988)
6. Takeda et al., Neurochem. Int., 15,55(1989)

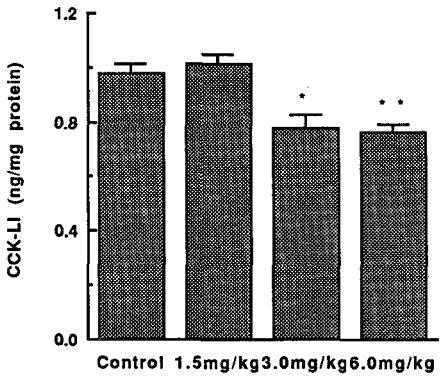


Fig.1 Effect of bicuculline on CCKLI content in hypothalamus

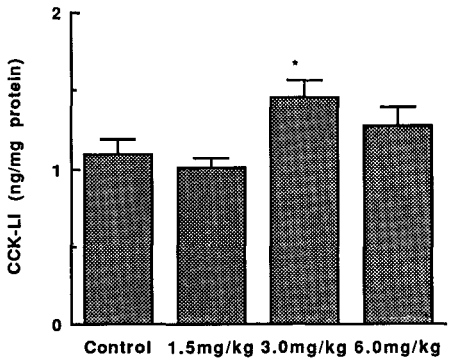


Fig. 2 Effect of bicuculline on CCKLI content in striatum

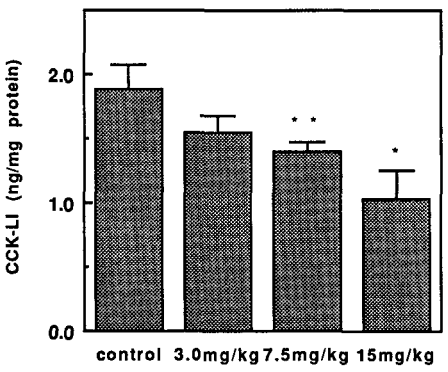


Fig. 3 Effect of baclofen on CCKLI content in hippocampus

* ; p<0.05
* * ; p<0.001

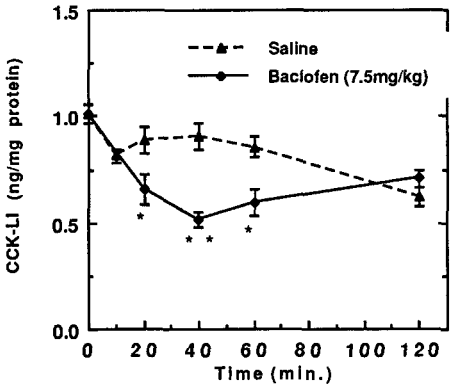


Fig. 4 Time dependent effect of baclofen on CCK-LI in hippocampus

159 Desipramine慢性投与時の側坐核におけるα$_2$-アドレナリン受容体機能の変化について
－in vivo brain dialysis 法による検討－

関谷 紫，杉田倫太郎*，澤 温**，野村総一郎***，伊藤哲一彦
(藤田保健衛生大・医・精神，トヨタ記念病院*，さわ病院**，立川病院***)

〔要約〕
三環系抗うつ薬であるdesipramine(DMI)の慢性投与がラット側坐核のα$_2$-アドレナリン受容体機能にどのような影響を及ぼすかを調べるために、DMIを14日間(20mg/kg,ip)投与したラットにα$_2$アゴニストであるclonidine(CLN)(100μg/kg,ip)を負荷し、locomotor activityの変化と側坐核のモノアミンnorepinephrine(NE)・dopamine(DA)及びモノアミン代謝産物4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol(MHPG)・normetanephrine(NMN)・3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)・homovanilic acid(HVA)・5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA)を脳内透析法を用いて経時的に測定した。対照群では、CLN投与後locomotor activityが減少するのに対して、DMI群では60分・90分にlocomotor activityの減少が有意に減弱した。DMI群ではCLN投与後90分・120分においてNE値の減少が有意に減弱した。同様にMHPG値においてもDMI群では、CLN投与後30分から150分において有意にMHPG値の減少が減弱した。NMN値においてもNE、MHPGと同様の傾向を示したが、対照群とDMI群との間に有意差を認めなかった。DA、DOPAC、HVA及び5-HIAAの経時的変動には有意差を認めなかった。以上の結果よりDMIの慢性投与は側坐核においてシナプス間隙におけるNE系に影響を及ぼしている事が示唆された。

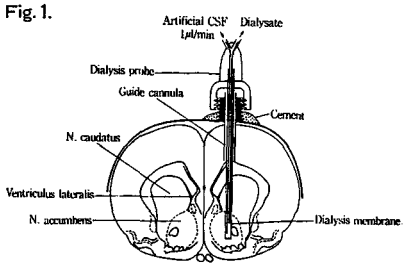
＜緒言＞脳内α$_2$-アドレナリン受容体は、三環系抗うつ薬の慢性投与により機能低下を起こすことが知られており、抗うつ作用の発現機序とも関連があるとされている。一方うつ病の病巣部位をどこに求めるかという視点はうつ病研究の流れの中で見逃される事が多かったが、我々は情動と意欲の維持に深く関与していると考えられている側坐核に着目している。以上二つの視点から、今回我々は抗うつ薬慢性投与時のα$_2$アゴニストに対する側坐核のモノアミン及びモノアミン代謝について検討するために、DMIを慢性投与したラットにCLNを負荷しlocomotor activityの変化と側坐核のモノアミン及びその代謝産物を脳内透析法を用いて経時的に測定した。

＜方法＞Wistar系雄性ラットに5週齢時よりDMI20mg/kgを1日1回午後3時に腹腔内投与を開始した。対照群には等量の生理食塩水を投与した。DMI群、対照群それぞれ5匹づつ使用した。手術は、ラット6週齢時、DMI投与7日目にpentobarbital麻酔下において脳定位固定装置に固定した後、透析プローブ装着時に側坐核の中心に透析部分が固定されるようにガイドカニューレをKönig and Klippelのアトラス(3)に基づきA=9.2mm H=+2.0mm L=1.3mmの位置に留置した。透析実験は、術後7日目DMI投与開始14日目の暗期にHutson et alの方法(2)に従い作製された脳内透析プローブを用い、Sugita et alの方法(5)に準拠して行った(Fig.1)。30分毎連続3回の透析液を採取した後、DMI群、対照群共にCLN100μg/kgを腹腔内投与した。投与後150分まで透析液を採取した。同時にAutmex(Columbus Instrumental)にてlocomotor activityの測定を行った。採取した透析液は、0.1%システイン5μlと混和後、測定まで-75℃にて保存した。透析液中のNE、MHPG、NMN、DA、DOPAC、HVA、5-HIAAは電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。投与前値を算術平均し、その値に対する投与後150分までの30分毎の値の変化率を算出して、分散分析後Student's unpaired t-testを用いて検定した。

＜結果＞対照群では、CLN投与後にlocomotor activityが減少するのに対して、DMI群では、locomotor activityの減少が減弱した。CLN投与後60分、90分においてP＜0.05にて有意差を示した(Fig.2,A)。対照群では、CLN投与後にNE値が減少するのに対して、DMI群では、NE値の減少が減弱した(Fig.2,B)。CLN投与後90分、120分においてP＜0.01にて有意差を示した。同様に対照群では、CLN投与後にMHPG値が減少するのに対して、DMI群では、MHPG値の減少が減弱した。CLN投与後30分、60分、90分、120分においてはP＜0.01、CLN投与後150分においてP＜0.05にて有意差を示した(Fig.2,C)。NMNにおいてもNE、MHPGと同様の傾向を示したが、対照群とDMI群との間に有意差を認めなかった(Fig.2,D)。DA、DOPAC、HVA及び5-HIAAの経時的変動には有意差を認めなかった。

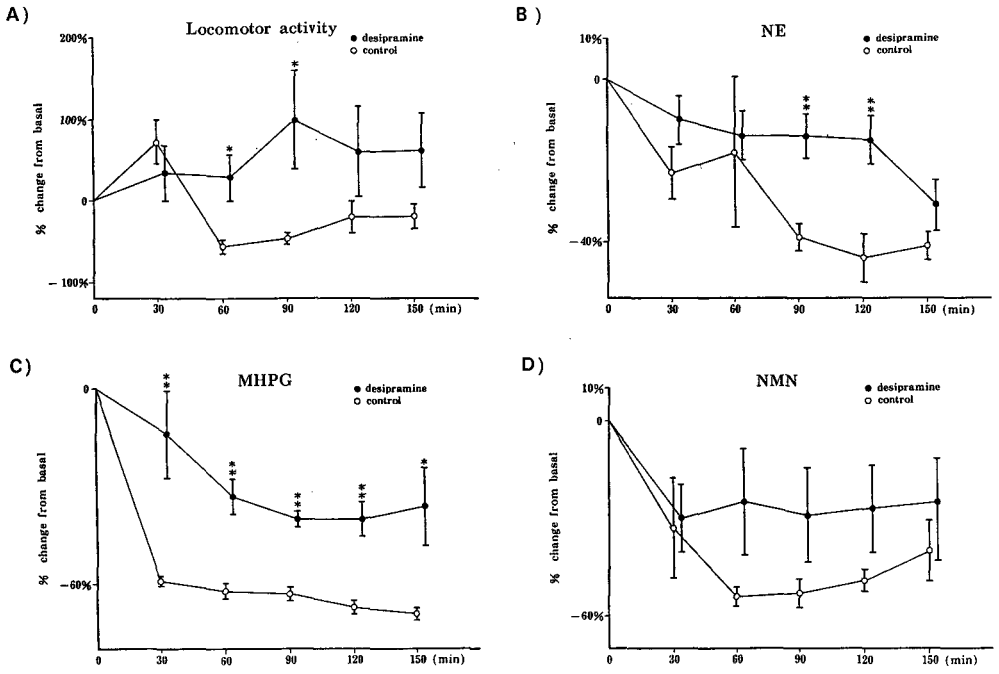
＜考察＞CLNは、前シナプスのα$_2$-アドレナリン受容体興奮作用を介し中枢のNE系を抑制するとされている(6)。またCLNによる鎮静効果は、ラットやマウスにおいて行動のパラメーターとしてよく測定されているが、前シナプスのα$_2$-アドレナリン受容体を介したものと理解されている(1)。今回我々は脳内透析法を用い同時に側坐核のモノアミンとその代謝産物の変化と行動とを測定することにより、α$_2$-アドレナリン受容体機能について検討した。DMI投与時には、CLNによるlocomotor activityの減少、NE、MHPGの減少がともに抑制された。MHPGの低下が前シナプスα$_2$受容体機能の指標となることは過去の断頭実験において示唆されているが、今回我々は脳内透析法を用い側坐核のシナプス間隙のNE系の変化と行動とを同時に測定し相関を認めた。これらのことからDMIの慢性投与は側坐核においてα$_2$アゴニストに対するNE系の変化に影響を及ぼす事が示唆された。現在のところうつ病の研究において、部位に対する考察はまだ少ないように思われる。そのなかで側坐核は、Plaznik & Kostowskiの行動実験(4)などにより海馬とともに注目されている。今後も他の薬物を使用して側坐核におけるモノアミン受容体機能について検討していきたい。

Fig. 1.



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

Fig.2.



The time course after administration of clonidine(100 μg/kg i.p.). Each value is expessed as a percentage (mean±S.E.M.) from basal level. ** p<0.01 * p<0.05

＜文献＞

1) Delini-Stula, A., Baumann, P. and Büch, O. (1979) Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 307, 115-122.

2) Hutson, P.H., Sarna, G.S., Kantamaneni, B.D. and Curzon, G. (1985) J. Neurochem., 44, 1266-1273.

3) König, J.F. and Klippel, R.A. (1963) The Rat Brain, Williams and Wilkins, Baltimore.

4) Plaznik, A. and Kostowski, W. (1987) Eur. J. Pharmacol., 135, 389-396.

5) Sugita, R., Sawa, Y., Nomura, S., Zorn, S.H. and Yamauchi, T. (1989) Neurochem. Res., 14, 267-270.

6) Svensson, T.H., Bunney, B.S. and Aghajanian, G.K. (1976) Brain Res., 92, 291-306.

160 線条体へのドパミン系薬物の注入がラット線条体ドパミン放出に及ぼす効果：脳透析法による検討

富山勝則，越川憲明，小林雅文
（日本大・歯・薬理）

〔要約〕

ラットの線条体にドパミン（DA）関連薬物を注入し，同部位の細胞外DA，DOPAC，HVAレベルをインビボマイクロダイアリシス法で測定した。D_1 antagonistのSCH23390（1μg）の注入により，onsetの早い著しいDAレベルの上昇が認められたがDOPAC，HVAレベルには変動は認められなかった。D_2 antagonistのl-sulpiride（25ng）の注入では，DA，DOPAC，HVAレベル共にonsetの遅い緩徐な上昇が認められた。Onsetの早いDA増加がD_1受容体を介した反応であるか否かについて検討する目的で D_1，D_2受容体の選択的な別なantagonist（BW737C，YM-09151-2）やagonist（SKF38393，quinpirole）を用いて実験を行ったが，いずれの薬物でも onset の早いDAレベルの上昇が認められ，この反応は少なくともDA受容体を介したものではないことが示唆された。また同様のonsetの早いDAレベルの上昇はd-amphetamine，nomifensinの注入でも認められた。さらにこれらの薬物による急激なDAレベルの上昇はnomifensinによるもののみがtetrodotoxine sensitiveであった。

中枢神経系に作用する薬物の作用メカニズムや作用部位の研究には直接薬物を脳内に注入する技法が欠かせないが，行動薬理学の分野では脳内に植え込んだガイドカニューレを通じて薬液をマイクロシリンジで目的部位に適用する方法が広く用いられている。演者らはこの方法を用いてapomorphine誘発顎運動やturning behaviourの発現，調節における線条体のdopamine D_1，D_2受容体の役割について研究を行ってきた（1-3）。しかし，その役割をさらに深く追究するためには薬物注入部位におけるdopamine放出やその代謝産物の変化について把握することが必要である。通常，マイクロダイアリシス法では灌流液中の薬物を透析膜を介して局所に適用する方法がとられるが，本実験では薬液注入用の微細なチューブを透析膜の近くに配置した直管型透析プローブを用いて，薬物を直接脳内に注入し、行動薬理学で用いられている方法と同じ条件下での検討を行った。

〔方法〕

SD系雄性ラット（約300g）を用い，ペントバルビタール（50mg/kg i.p.）麻酔下で，Paxinos & Watson（4）のアトラスに従いガイドカニューレを片側線条体（A：0.5mm，L：3.0mm from bregma；V：3.5mm from dura）に挿入固定した。手術7日後にマイクロインジェクションチューブ付き直管型プローブ（エイコム社製；MI-BDP-I）をガイドカニューレより2mm線条体内に露出させて固定し，Ringer液を0.2μl／minの流速で3時間以上灌流し，DA，DOPAC，HVAのレベルが一定になってから実験を開始した。また灌流液は20分毎に電気化学的検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC－ECD）に注入し，マイクロインジェクションチューブからの薬物の注入は0.5μlを30秒かけて行った。各物質の測定値は薬物注入前の3点の平均値の百分比として表した。

〔結果および考察〕

図1に示すように，D_1 antagonistの SCH23390（1μg）を直接線条体に注入した場合，注入直後に著明な一過性のDAレベルの上昇が認められたが，DOPAC，HVAレベルには変動は認められなかった。一方，D_2 antagonistのl-sulpi-ride（25ng）を注入した場合にはDA，DOPAC，HVAレベル共にonsetの遅い上昇が認められた。これらの両薬物を併用した場合には，DAレベルは SCH23390 単独投与と同様の結果を示しDOPACとHVAレベルはl-sulpiride 単独投与と同様の結果であった。すなわち両薬物の効果が相加的に認められた。この結果は SCH23390とl-sulpirideがそれぞれ独立した別の中枢DA系機構に対して作用することを示唆するものである。SCH23390によるDA

の放出はAjimaら（５）によっても報告されているが，この効果がSCH23390固有のものであるのか，D_1レセプターを介したものであるのかを検討するため，さらにD_1 antagonistのBW737C，D_2 antagonistのYM-09151-2，D_1／D_2 antagonistのcis-flupentixol，D_1 agonistのSKF38393，D_2 agonistのquinpiroleについても実験を行った。その結果，表１に示す通りいずれの薬物でもその効果に程度の差はあるが一致して onsetの早い一過性のＤＡレベルの上昇が認められた。またＤＡの放出促進薬のd-amphetamine，取り込み阻害薬のnomifensinについても実験を行ったが，いずれも同様の急激なＤＡレベルの上昇を示した（表１）。これらの反応が voltage-dependentであるか否かについてテトロドトキシン（TTX, 2μM）存在下で検討した結果，nomifensinによるＤＡ変化のみがTTX-sensitiveであった。従ってSCH23390に代表される onsetの早いＤＡレベルの上昇は nomifensinの場合とは異なり，voltage-dependentではないことが示された。一方，l-sulpiride投与後に認められたonsetの遅いＤＯＰＡＣ，ＨＶＡレベルの上昇は YM-09151-2投与でもおこり，またagonistの quinpiroleで逆の現象が認められることから，一般的に考えられているように，D_2 自己受容体を介した２次的な変化であることが示唆された。

〔文献〕

1) Koshikawa, N., et al. (1989) Europ. J. Pharmacol., 163, 277-236. 2) Koshikawa, N., et al. (1990) Europ. J. Pharmacol., 178, 189-194. 3) Koshikawa, N., et al. (1990) Europ. J. Pharmacol., 178, 233-237. 4) Paxinos, G. & Watson, C. (1986) The Rat Brain, Academic Press. 5) Ajima, A., et al. (1990) Brain Res. 518, 193-198.

図１　ＤＡ，ＤＯＰＡＣ，ＨＶＡレベルに及ぼすSCH23390，l-sulpirideの効果　(n=6, mean±S.E.M.)

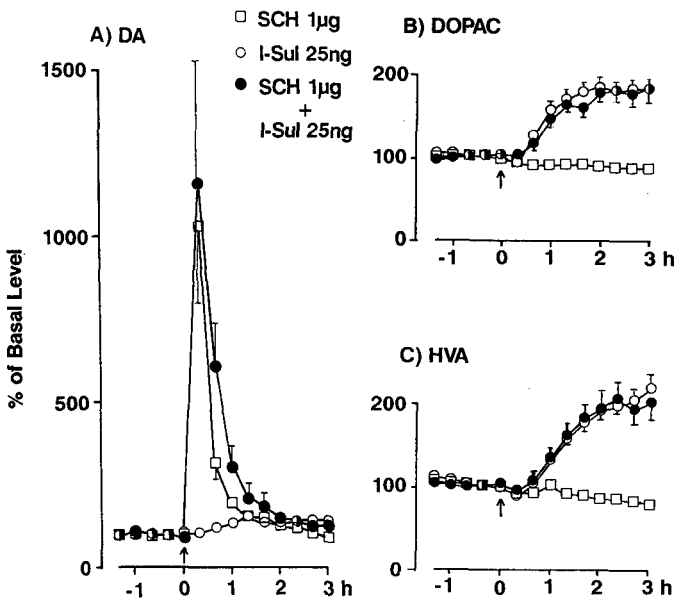


表１　線条体ＤＡレベルに及ぼす各種ＤＡ系薬物の効果（注入２０分後のＤＡレベル）

n=6

薬物	DA (% of basal level)
BW737C	0.5μg　193±20
	1.0μg　279±52
YM-09151-2	0.1μg　264±69
	1.0μg　1364±341
Flupentixol	1.5μg　644±132
	3.0μg　1164±512
SKF38393	0.5μg　214±21
	1.5μg　763±172
Quinpirole	15μg　226±39
	30μg　415±73
Nomifensin	0.05μg　285±41
	0.1μg　1058±263
d-Amphetamine	3.0μg　3790±816

161 一酸化炭素負荷により誘発される線条体dopamine, serotoninおよびそれら代謝物濃度の変化

平松正行，横山靖司，鍋島俊隆*，亀山 勉
（名城大・薬・薬品作用，*名古屋大・医・薬剤部・医療薬学）

〔要約〕脳を虚血状態にすると，神経細胞外液中の神経伝達物質が著明に増加し，この増加が低酸素状態における細胞障害の病理学的変化に関与していることが示唆されている．今回，マイクロダイアリシス法を用い，一酸化炭素負荷により誘発される低酸素時の線条体の神経伝達物質の濃度を測定した．一酸化炭素負荷の前および後における神経細胞外液中のdopamine，serotonin (5-HT)およびそれら代謝物濃度の変化を，電気化学検出器付きの高速液体クロマトグラフィー (HPLC-EC)により，15分間隔で測定した．一酸化炭素負荷直後に細胞外液中のdopamine濃度が著明に増加し，代謝物である3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)およびhomovanillic acid (HVA)の濃度は減少した．Dopamineは一酸化炭素負荷後45分以内にはベースラインレベルに戻った．5-HTの代謝物である5-hydroxyindoleacetic aicd (5-HIAA) 濃度には変化はみられなかった．非競合的N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体拮抗薬であるMK-801 (1 mg/kg)を皮下投与すると，dopamineの増加とDOPACの減少が拮抗される傾向を示した．低酸素負荷はglutamateの遊離を引き起こし，また，グルタミン酸神経は線条体ドパミン神経活動を調節していることが知られているので，この拮抗作用は，MK-801によるNMDA受容体の拮抗によるものかも知れない．

〔緒言〕

ラットやジャービルの総頸動脈や中大脳動脈の閉塞による脳虚血により，神経細胞の障害や壊死が起こり記憶が障害されることから，脳血管性痴呆の実験動物モデルとして脳虚血モデルが広く用いられている (Pulsinelli et al., 1982; Kirino et al., 1982)．我々は，マウスに一酸化炭素を負荷すると受動的回避反応において記憶障害が発現し，海馬CA$_1$領域において神経細胞の障害が見られることを報告してきた (Nabeshima et al., 1991)．一酸化炭素の負荷は脳内を低酸素状態にするが脳血流は阻害しないので，glucoseなどは補給されている点で，虚血モデルと異なることが考えられる．虚血時に脳細胞外液中の神経伝達物質濃度が著しく増加し，この細胞外伝達物質の上昇が虚血による細胞障害の発現に関与していることが示唆されているが，これが低酸素によるものか，虚血が必要なのかについては明確でない．そこで今回は，一酸化炭素負荷により脳内を低酸素にした時の脳内モノアミン及びそれらの代謝物の変化について，また，脳内モノアミンの変動が NMDA 受容体を介する変化であるかどうかを明らかにする目的で，MK-801を一酸化炭素の負荷前に処置した時の変化についても合わせて検討した．

〔方法〕

実験には，体重 260～320 gの S.D.系雄性ラットを用いた．ラットをpentobarbital-Na (50 mg/kg, i.p.)で麻酔し，線条体 (bregmaより A:1.0, L:3.0, H:4.0 mm; Paxinos & Watson, 1986)にguide cannulaを挿入し，手術の3～7日後に実験を行った．実験当日，dialysis probeをguide cannulaに沿って挿入し，歯科用ワックスで固定した．そしてインフュージョンポンプよりクレブス液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.3 mM $CaCl_2$)を2 μl/minの速度で灌流し，ベースラインが安定した後，透析液を15分毎にサンプルチューブに採取した．一酸化炭素は，α-chloralose麻酔下90秒間隔で3回（1，2回目は30秒間，3回目は10秒間，流速10 cc/min)吸入させることによって負荷した．MK-801 (1 mg/kg)は一酸化炭素を負荷する40分前に皮下投与した．採取したサンプル中のdopamine, DOPAC, HVA, 5-HT及び 5-HIAAは，HPLC-ECにより測定した．尚，サンプルチューブには予めサンプルの酸化を防止するため 0.2 Nの過塩素酸20μlを添加しておいた．データは薬物投与前の3サンプルの平均を100とした百分率で表し，平均値及びその標準誤差を示した．各時間における群間の比較には，分散分析及びDunnett検定を用いた．

〔結果〕

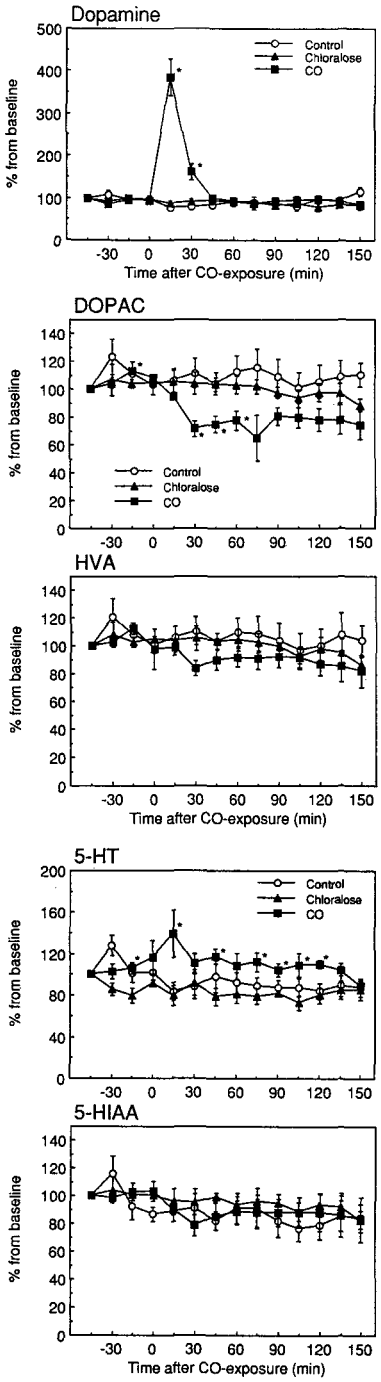
1. 一酸化炭素負荷後の脳内モノアミン及びその代謝物の変化

α-Chloralose投与群においてはdopamineの濃度は測定中ほとんど変化なかった．一酸化炭素を負荷すると，負

荷後0～15分のサンプルにおいてdopamineの濃度がα-chloralose 投与群に比べ，約400%にまで有意に上昇した．そしてその後速やかに減少し，45分以内にコントロールレベルにまで戻った．Dopamineの代謝物であるDOPACは一酸化炭素負荷15～30分後では約30%減少し，その後ほぼ一定の濃度を示した．一方，HVAにおいても同様に約20%の減少がみられた．5-HTの濃度は一酸化炭素負荷後，約150%にまで有意に上昇し，その後速やかにコントロールレベルに戻った．また，5-HTの代謝物である5-HIAAは，一酸化炭素負荷によりほとんど変化を受けなかった．

2. MK-801 投与による一酸化炭素負荷後の脳内モノアミン及びその代謝物の変化

MK-801 (1 mg/kg)を投与しても，dopamineの濃度はほとんど変化しなかった．MK-801は一酸化炭素負荷による dopamineの濃度の増加を抑制する傾向がみられた．一酸化炭素負荷によるDOPACおよびHVAの減少は，MK-801の前処置により抑制された．



〔考察〕

虚血によりglutamateが遊離され，NMDA受容体が活性化され，細胞外からCa^{2+}イオンが細胞内に流入することが知られている (Despande et al., 1987)．また，線条体には大脳皮質からグルタミン酸神経が投射しており，この神経がドパミン神経を調節していることが報告されている (Rudolphe et al., 1983)．NMDA受容体がドパミン神経上に存在し，その遊離を調節しているかどうか，NMDA受容体の非競合的拮抗薬であるMK-801を前処置して検討した．MK-801を前処置すると，一酸化炭素負荷によるdopamine遊離が抑制される傾向を示し，また，DOPACの減少はコントロールレベルに戻った．しかし，その拮抗作用は完全なものでなかった．Assuntaら (1990) は，glutamateを線条体内に注入すると，線条体のdopamineが遊離され，この遊離がMK-801で拮抗されず，非NMDA受容体の拮抗薬であるFG-9041で拮抗されたことから，グルタミン酸神経によるdopamine遊離の調節に非NMDA受容体が関与している可能性を示唆している．したがって，低酸素負荷時の線条体でのグルタミン酸神経によるドパミン神経系の調節機構について，更に詳細な検討が必要と思われる．

〔文献〕

Assunta, I. et al. (1990) Brain Res., 530:223-228.

Despande, J.K. et al. (1987) J. Cerebr. Blood Flow Metabol., 7:89-95.

Kirino, T. (1982) Brain Res., 239:57-69.

Nabeshima, T. et al. (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther., 256: 378-384.

Paxinos, G. & Watson, C. (1986) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edn. Academic Press.

Pulsinelli, W.A. et al. (1982) Annals of Neurol., 11:491-498.

Rudolphe, M.I. et al. (1983) Neurochem. International, 5: 479-486.

162 視床下部内神経性ヒスタミン遊離の日内リズムについて

望月 貴年、大和谷 厚、岡倉 薫、堀井 新*、和田 博
(大阪大・医学部・第二薬理、*耳鼻咽喉科)

〔要約〕

マイクロダイアリシス法とHPLC-蛍光法を用いて視床下部内神経性ヒスタミンの遊離を、無麻酔、非拘束条件で連続的に測定した。12:12hの明暗サイクル下で飼育したラットの視床下部前部に透析プローブを慢性的に植え込み、2-5日の回復期をおいて視床下部を灌流すると、暗期、即ち活動期のヒスタミン遊離は明期よりも有意に高く、同時に測定した行動量の推移と同期した日内リズムが観察された。また、ヒスタミン遊離の増加は暗期開始時よりも2.5時間先行することが見いだされた。

視床下部後部の結節乳頭核を起始核とするヒスタミン神経系は、脳内の広範な部位に線維を投射し、様々な生理機能を調節することが知られている[6,9]。中でも睡眠-覚醒[2,3]、神経内分泌[1]など、日内リズムと関係した脳機能の調節にヒスタミン神経系が深く関与していることが示されているが、脳内ヒスタミン含量自体には経時的に測定しても明確な日内リズムは見いだされていない[7]。我々は既に、in vivo マイクロダイアリシス法とHPLC-蛍光法を用いて、ウレタン麻酔下のラットで、ヒスタミン神経終末の密に存在する視床下部前部における内因性ヒスタミンの遊離動態を検討し、この方法で測定されるヒスタミンが神経性のものであることを示した[4]。そこで今回は、無麻酔、非拘束条件でラット視床下部前部のヒスタミンの遊離を連続して測定し、その経時的推移を検討した。

実験方法

12:12hの明暗サイクル下 (08:00 明期開始)で飼育されたWistar系雄性ラット (190-250g)をペントバルビタール麻酔下 (40mg/kg、i. p.)に脳定位固定装置に固定し、ガイドカニューラ (CMA/12プローブ用)を視床下部前部 (bregmaよりP 1.5、L 0.5、V 9.2mm)[5]に植え込んだ。術後は防音箱内の個別ケージ (CMA/125)に移し、2-5日間アクティシステム (Panlab)で行動量を記録しながら日内リズムが回復するのを確認した。その後、ラットを軽くエーテルで麻酔し、透析用プローブを視床下部前部に刺入した。プローブ刺入時間が、その後のヒスタミン遊離に及ぼす影響を消去するためにプローブを刺入し実験を開始する時間はFig.1A上部の個々のラットにおける灌流時間を表す横棒に示すように意図的に変化さた。また、この時点でケージ内の餌は全て取り除いた。そして毎分1 μlの流速で人工脳脊髄液 (140mM NaCl、3mM KCl、2.5mM $CaCl_2$、4.5mM Glucose)を灌流し、刺入後2時間より30分ずつサンプルを採取した。実験後、脳を摘出、固定し、クリオスタットで前額切片を作成してプローブの先端位置を確認した。

サンプル中のヒスタミンはHPLC-蛍光分析法により測定した[4,8]。ヒスタミン遊離の経時的推移は、30分間の平均値をANOVA、Student' t-testで統計学的に検討した。また、行動量の経時的推移も同様に検討した。

結果と考察

Fig.1Aには明暗サイクル下における視床下部前部のヒスタミン遊離量を、Fig.1Bには同時に測定した30分間の行動量をdouble-plotで示した。暗期 (20:00-08:00)におけるヒスタミン遊離の平均値は0.21±0.01 pmol/30分 (mean±S.E.M.)であり、明期 (08:00-20:00、0.12±0.01 pmol/30分)に比べ有意に遊離が増加していた ($p<0.01$)。明期前半 (08:00-14:00)のヒスタミン遊離量は低レベルで、明期後半より徐々に遊離は増加し、暗期開始の2.5時間前より明期の平均値に比べ有意に増加し、暗期には高レベルの遊離が持続し、暗期の終了とともに低下した。このように、神経性ヒスタミンの遊離には明暗サイクルと同期した日内リズムが存在することを確認した。ヒスタミン神経系は、

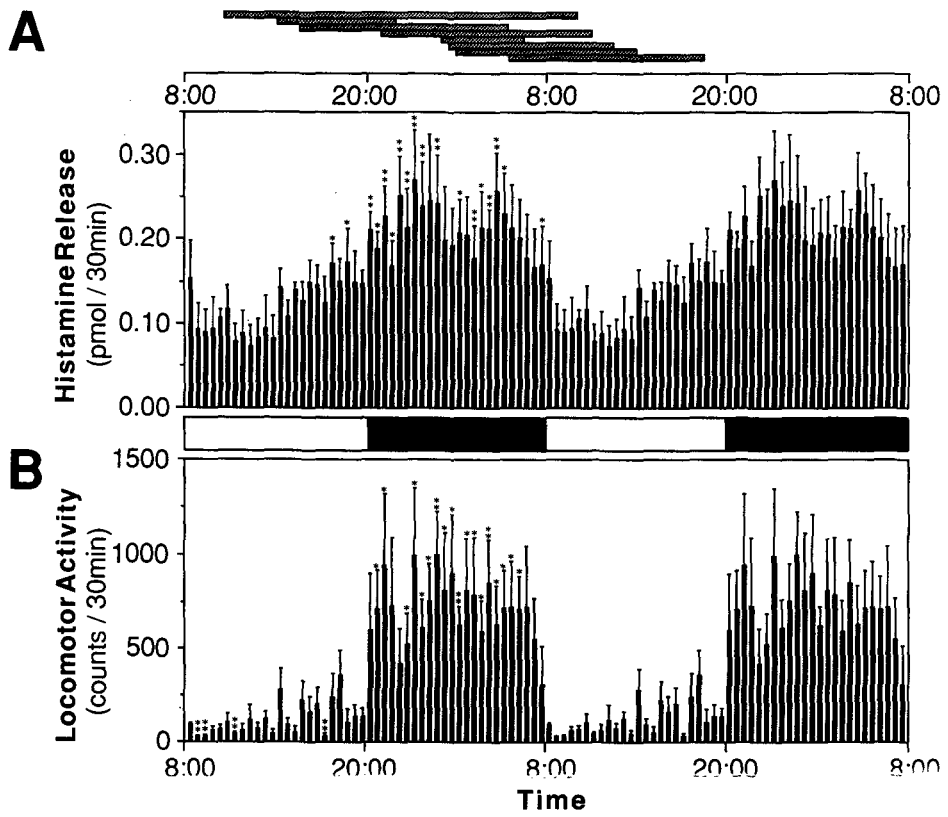


Fig. 1 Circadian variation of histamine release from the anterior hypothalamic area (A) and locomotor activity (B) of conscious and freely-moving rats.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ *vs* the average during the light period

視床下部-下垂体系の神経内分泌活動を調節することがよく知られており[1]、このような内分泌活動は日内リズムを示すことから、今回の結果はヒスタミン神経系が神経内分泌活動の日内リズムを調節する機能をもつ可能性を強く支持するものである。また、ヒスタミン神経系が睡眠-覚醒の日内リズムの調節に関係する、特に覚醒の発現に重要な役割を果たす[2, 3]という報告から考えると、ヒスタミン遊離が暗期に先行して増加するという今回の結果は大変興味深い。

References

1) Cacabelos R. (1990) *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **12**, 341-376.
2) Kiyono S. et al. (1984) *Physiol. Behav.* **34**, 615-617.
3) Lin J.S. et al. (1988) *Neuropharmacology* **27**, 111-122.
4) Mochizuki T. et al. (1991) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **343**, 190-195.
5) Paxinos G. and Watson C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd edn.*, Academic Press, Sydney.
6) Schwartz J.C. et al. (1991) *Physiol. Rev.* **71**, 1-51.
7) Tuomisto, L. (1991) in *Histaminergic Neurons: Morphology and Function.* (Watanabe T., and Wada H., eds), pp. 283-295. CRC Press, Boca Raton.
8) Yamatdani A. et al. (1985) *J. Chromatogr.* **344**, 115-123.
9) Yamatodani A. et al. (1991) in *Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 97.* (Uvnäs B., ed), pp.243-283. Springer Verlag, Berlin.

163 ヒスタミンH_3リガンドと合成酵素阻害剤のマウス自発運動量に及ぼす影響

坂井也彦，小野寺憲治*，山崎誠治，
谷内一彦，前山一隆，渡邊建彦
（東北大学・医学部・一薬理，*歯学部・薬理）

〔要約〕　われわれは、ヒスタミンH_3受容体のアゴニスト、アンタゴニストであるそれぞれα－メチルヒスタミン（α－MeHA）、チオペラミドおよびヒスタミン合成酵素の阻害剤、α－フロオロメチルヒスチジン（FMH）を肥満細胞欠損（W/W^v）マウスに投与して、自発運動量、脳内ヒスタミン含量を測定した。チオペラミドは脳内ヒスタミン量を減少させ、低用量では運動量を増加させた。α－MeHAはヒスタミン量を増加させたが、運動量には影響しなかった。FMHはヒスタミン量を低下させ、運動量を減少させた。FMHの運動量に対する効果は、ICRマウスでもみられたが、ddYマウスでは見られなかった。

【目的】

中枢にヒスタミン・ニューロン系が存在し、日内リズムや摂食行動に広く影響を与えていることが知られている（1）。1983年ArrangらによりH_3受容体の存在が提唱され（2）、その後H_3アンタゴニストであるチオペラミドと、H_3アゴニストであるα－メチルヒスタミン（α－MeHA）の開発により、この受容体のオートレセプターとしての存在が確立された（3）。われわれは今回、これらのH_3リガンドと、ヒスタミンの合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素の阻害剤、α－フルオロメチルヒスチジン（FMH）を用いて、脳内ヒスタミンを変動させたときのマウス自発運動量に及ぼす影響を調べたので報告する。

【方法】

マウス自発運動量とrearingの数は光センサー法（BTA－1、室町機械）、運動失調はrotarod法により測定した（4）。薬物はi．p．投与し、H_3リガンドは1時間後に、FMHは3時間後に運動量を測定し、直ちに屠殺し脳をとりだし、－80°Cに凍結した。ヒスタミンは、α－MeHAと分離するため新たに改変したHPLC－蛍光法で測定した。

【結果】

H_3リガンドのマウス自発運動に及ぼす影響：　H_3アンタゴニストであるチオペラミド12．5ないしは25mg／kgの用量で、肥満細胞を欠損するW／W^vマウスの自発運動量とrearingの頻度は有意に上昇し（図1）、その効果は3時間以上持続した（4）。しかし、50mg／kg以上の用量では、自発運動量は逆に低下したが、この用量では、rotarod法でマウスが落下した（4）。一方、H_3アゴニストであるα－MeHAでは6から50mg／kgのいずれの用量でも、自発運動量には有意の変化をおこさなかった（図2）。

H_3リガンドによるマウス脳内ヒスタミン含量の変化：　マウスの脳内ヒスタミン含量は、チオペラミドでは12．5mg／kg以上で減少し、α－MeHAでは12．5mg／kg以上で増加した（表1）。

FMHによるマウス自発運動量の変化：　FMH25mg／kgのi．p．投与で、W／W^vマウスの自発運動量は有意に減少し（図2）、ICRマウスにおいては12．5mg／kgの用量でも減少した（図3）。しかし、ddYマウスではFMHによる運動量の減少は観察されなかった。

【考察】

以上の結果から、チオペラミドによるマウスの運動量の増加効果は、チオペラミドによりヒスタミン神経系の末端からヒスタミン遊離が促進され、その遊離したヒスタミンがポスト側にあるH_1、H_2受容体を介して反応したものと思われる（4）。一方、ヒスタミンの生合成をFMHで阻害すると運動量の減少がみられ、中枢においてはヒスタミン・ニューロンが覚醒系に関与しているというLinらの脳波の実験結果（5）を支持する。ラットではFMH100－200mg／kgで始めて自発運動の減少が認められたが（6）、W／W^vおよびICRマウスはFMHに対して感受性が高いが、ddYマウスでは低く、FMHの使用に際しては種差を考慮しなくてはならないと思われる。一方、α－MeHAによりヒスタミンの遊離を抑制しても、運動量に関しては生合成を阻害したときほどの強い効果は観察されな

かった。このことはマウス運動量に関するヒスタミン・ニューロン系の関与の中で、H_3受容体は間接的であり、H_1、H_2受容体ほど直接的な役割を果たしていないと思われる。脳内ヒスタミン量はチオペラミド、FMHのいずれでも減少したが、前者は遊離促進のためであり、後者は合成阻害のためであり、今後、ヒスタミン・。ニューロン系の活動性の指標としては、ヒスタミン代謝物（7）やヒスチジン脱炭酸酵素の活性（8）を測定する必要があろう。

図1　チオペラミドのW／W^{v}マウス自発運動量に及ぼす影響

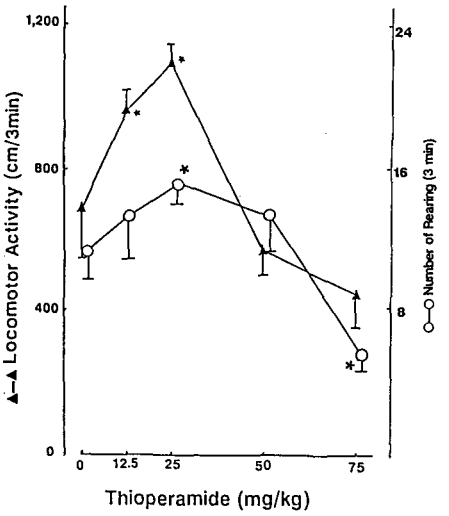


表1　チオペラミド、α－MeHAのW／W^{v}マウスの脳内ヒスタミン含量に及ぼす影響

処置 (mg/kg, i.p.)		ヒスタミン含量 (pmol/g 湿重量)	(%)
生理食塩水		351±29	100
チオペラミド	12.5	257±13*	73
	25	223±20*	63
	50	203±36*	57
	75	189±21*	53
α－MeHA	6.0	416±23	118
	12.5	712±43*	202
	25	751±76*	213
	50	831±17*	236

*P＜0.05

図2　α－MeHA、FMHのW／W^{v}マウスの自発運動量に及ぼす影響

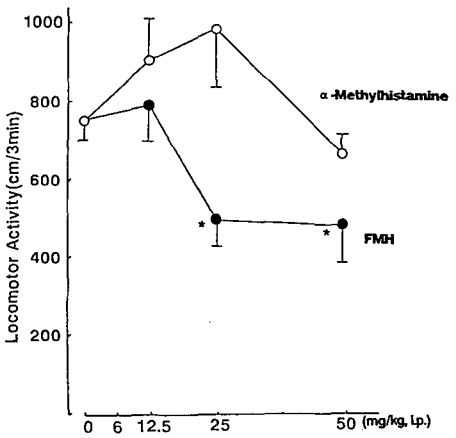
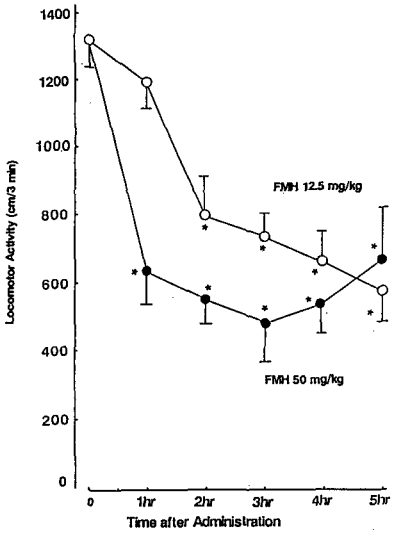


図3　FMHのICRマウスの自発運動量に及ぼす影響



【謝辞】チオペラミド、α－MeHAは住友製薬、FMHはDr.Kollonitsch, Merck Sharp & Dohmeより提供された。

【文献】(1) T.Watanabe & H.Wada, Histaminergic Neurons:Morphology and Function, CRC Press, 1991.(2) J.M. Arrang et al., Nature, 302, 832-837(1983). (3)J.M.Arrang et al., Nature, 324, 117-123(1987). (4)N.Sakai et al., Life Sci., 48, 2397-2404(1991).(5)J.S.Lin et al., Neuropharmacology, 27, 111-127(1988). (6)K.Onodera et al., Submitted to Meth. Find. Clin. Exp. Pharmacol. (1991). (7)R.Oishi et al., Life Sci., 34, 691-700(1991). (8)K.Meguro et al., Biog. Amines, in press(1991).

164 ヒト及びウシCNPのダブレットの起源

栗原 正　遠山陽子　山本純子　金松知幸
（創価大 生命科学研）

〔要約〕
最近我々は，マウス2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase（CNP）遺伝子のエクソン1の中途で二者択一のスプライシングが起きていることを示した．この二者択一スプライシングではアミノ酸20残基が異なる2つのポリペプチドが生ずると予想され，SDS-PAGEゲル上に見られる哺乳類共通のCNPダブレットをよく説明する．今回我々は，二者択一スプライシングから予想される大きい方のヒトポリペプチドに特異的な抗体を調製し，SDS-PAGEゲル上に見られるヒト及びウシCNPのダブレットを免疫ブロット法で検索した．その結果，ヒト及びウシCNPのダブレット（CNPIとCNPII）のうち大きい方のポリペプチド（CNPII）だけが今回調製した特異的な抗体で染め出された．二者択一スプライシングで予想された大きい方のポリペプチドのN末端部分の配列は今回はじめてSDS-PAGEゲルのブロット上でCNPIIに証明された．哺乳類に共通して見られるCNPダブレットはおそらくマウスで見い出されたのと同じ二者択一スプライシングで生じたと思われる．

2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase（CNP）は中枢神経系のオリゴデンドログリア細胞に特異的な酵素として知られる．CNPはSDS-PAGEゲル上で近接した2本のバンドから成るが，これらダブレット間の構造の違い及びダブレット生成の機構は不明であった．最近我々は，マウスCNP遺伝子のエクソン1の中途で二者択一のスプライシングが起きている事を示した（1）．この二者択一スプライシングではアミノ酸20残基が異なる2つのポリペプチドが生ずると予想され，SDS-PAGEの成績をよく説明する．しかし，マウスの場合例外的にSDS-PAGEで3本の近接したCNPバンドがあり（1），哺乳類に共通して見られるCNPダブレットがマウスで見い出されたのと同じ二者択一スプライシングで生じたとするには証拠不十分である．マウス（1）やラット（2）では二者択一スプライシングに対応している2本のmRNAバンドが検出されるのに対し，ヒト（3）やウシ（4）ではmRNAバンドが単一に見える事も説明が困難である．今回我々は，二者択一スプライシングから予想される大きい方のヒトポリペプチドに特異的な抗体を調製し，SDS-PAGEゲル上に見られるヒト及びウシCNPのダブレットを免疫ブロット法で検索した．

＜実験方法＞
図1のアンダーライン部分のアミノ酸からなるペプチドをExcellペプチド合成機(Milligen/Biosearch)で合成しHPLCで精製した．合成ペプチドはFujita et al.（5）に従いグルタールアルデヒド存在下にウシ血清アルブミンと攪拌し，Freundの完全アジュバンドと共にウサギに免疫した．このようにして得られた血清を抗ペプチド血清として免疫染色に用いた．抗CNP血清は既報（6）のものを用いた．ヒトミエリンは新潟大学佐藤修三先生からいただいた．ウシミエリンはNorton法で調製した．SDS-PAGEはLaemmli法で行ない，ニトロセルロース膜へのトランスファーは日本泳動製の簡略な装置を用い25mMトリス150mMグリシン20%メタノール中で行なった．免疫染色はビオチンアビジン法で行ない，2-クロロナフトールで発色させた．

Human Smaller Polypeptide	(M)SSS.....
Human Larger Polypeptide	(M)NRGFSRKSHTFLPKIFFRKMSSS.....
	Synthetic Peptide
Bovine Smaller Polypeptide	(M)SSS.....
Bovine Larger Polypeptide	(M)SRGFSRKSQTFLPKVFFRKMSSS.....

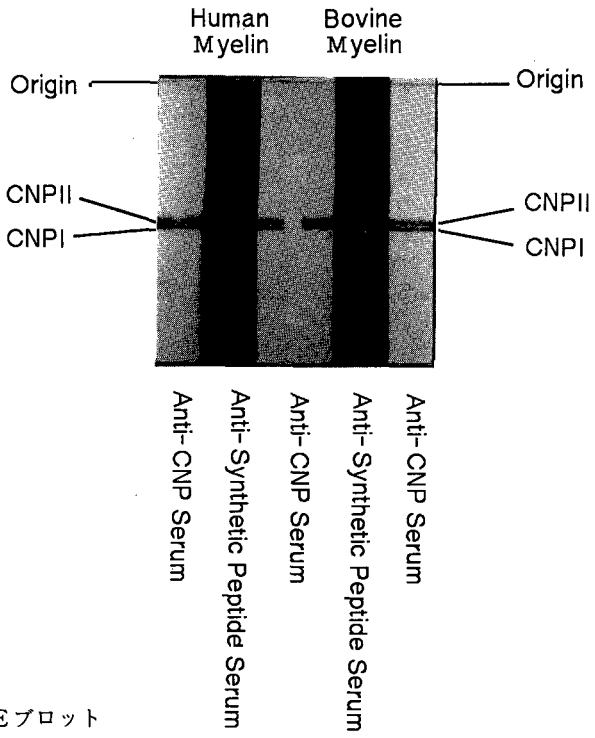
図1　二者択一スプライシングから予想される２つのＣＮＰポリペプチド（Smaller Polypeptide と Larger Polypeptide). ヒトアンダーライン部分のペプチドを化学合成した．成熟ポリペプチドでは翻訳開始メチオニン（括弧内のM）は除かれ、N末端のセリン又はアスパラギンはアセチル化されていると考えられる．ヒトの配列は遺伝子構造から、またウシの配列はｃＤＮＡから推定した．

＜実験結果及び考察＞

ヒト及びウシで，マウスで見い出されたのと同じ二者択一スプライシングが起こると仮定すると，図１に示すような２つのポリペプチド（SmallerとLarger）が生ずる．これら２つのポリペプチドは図１に示してあるN末端部分のみが異なる．そこで，予想される大きい方のポリペプチドに特異的な１９残基からなるペプチド（ヒト，アンダーライン部分）を合成し，ウサギに免疫して抗血清を調製した．図２は，ヒト及びウシミエリンのＳＤＳ-ＰＡＧＥを行ない，ニトロセルロース膜へトランスファー後短冊状に切断し，抗ＣＮＰ血清（6）と上述の抗ペプチド血清で染色した結果である．ヒトおよびウシＣＮＰのダブレット（ＣＮＰIとＣＮＰII）のうち大きい方のポリペプチド（ＣＮＰII）だけが抗ペプチド血清に反応することが判明した．図１のアンダーライン部分の配列はＣＮＰIIには存在するがＣＮＰIには存在しないことが明らかで，ヒトおよびウシＣＮＰのダブレットはマウスで見い出されたのと同じ二者択一スプライシングで生じたことを強く示唆する．

二者択一スプライシングで予想された大きい方のポリペプチドのN末端部分は今回はじめてＳＤＳ-ＰＡＧＥゲルのブロット上で証明されたわけで，マウスで見られるＣＮＰの多型についても現在同様の手法で解析中である．

以上の結果から，哺乳類に共通して見られるＣＮＰダブレットはおそらくマウスで見い出されたのと同じ二者択一スプライシングで生じたと思われる．



＜文献＞

(1) Kurihara et al. (1990) BBRC 170, 1074-1081
(2) Bernier et al. (1987) J.Neurosci. 7, 2703-2710
(3) Kurihara et al. (1988) BBRC 152, 837-842
(4) Kurihara et al. (1987) JBC 262, 3256-3261
(5) Fujita et al. (1990) J.Neurochm. 55, 1056-1059
(6) Kurihara et al. (1981) BJ 195, 153-157

図2　ヒト及びウシミエリンのＳＤＳ-ＰＡＧＥブロットの免疫染色

165 オリゴデンドロサイト分化・生存の分子機構 ～ミエリン形成不全を伴うジンピーマウスを用いた解析

鹿川哲史*、池中一裕*、御子柴克彦* **
(*大阪大・蛋白研・機能制御、
**東京大・医科研・化学)

〔要約〕
我々はミエリンプロテオリピド蛋白質（ＰＬＰ）遺伝子の発現をpolimerase chain reaction （ＰＣＲ）法を導入した高感度検出系を用いて解析し、alternative splicing 産物ＤＭ20がミエリン蛋白質ＰＬＰとは異なる神経系の分化促進因子としての機能を有することを示唆してきた。
今回、ジンピーマウス脳の発生段階におけるＰＬＰ遺伝子発現を上記の方法で、ジンピー型と正常型ＰＬＰならびにＤＭ20の４種のmRNAを区別し検出したところ、胎生１６日ジンピーマウスではジンピー型のＤＭ20－mRNAが正常とほぼ同量発現していることが明らかとなった。また、ヘテロを解析すると、Ｘ染色体不活化によって生じたジンピー型ＰＬＰを発現するオリゴデンドロサイトは細胞は生後９日に既に変性が始まっており、ジンピーマウスにおけるよりも早く変性脱落することが示された。これらの結果から、胎生期において、正常なＤＭ20の存在がオリゴデンドロサイトの分化促進に必要である可能性が考えられた。また、ヘテロの生体内における観察から、オリゴデンドロサイトの生存維持には神経細胞と接触することなど他の細胞との相互作用も重要であることが示唆された。

〔序論〕
ミエリンプロテオリピド蛋白質（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。ジンピー突然変異マウスはこのＰＬＰ遺伝子のスプライス部位に変異を持つため(1,2)ミエリン形成障害を示すマウスであるが、ミエリン形成細胞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と報告されていた。また、初代培養系で正常マウスのアストロサイトの培養上清を加えることによりジンピーマウスのオリゴデンドロサイトが延命する(5)ことから、ＰＬＰ遺伝子産物がオリゴデンドロサイトの分化、生存因子様の働きを有するのではないかと考えられていた(6)。我々は既にＰＬＰ遺伝子転写産物をＰＣＲ法を用いて高感度に検出する系を用いてマウス胎仔脳内でも胎生１６日をピークとしてＰＬＰ遺伝子が発現しており、しかもそれはＤＭ20－mRNAであることを明かにしてきた。また、培養細胞を使った実験からＤＭ20は神経系の細胞にニューロン、グリア系を問わず広く発現していることが分かった。ＤＭ20はＰＬＰ遺伝子のalternative splicing産物であるが、これらのことからミエリン蛋白質として以外の機能を持つことが強く示唆された(7)。ＰＬＰ遺伝子に突然変異を持つミュータント動物はオリゴデンドロサイトの変性脱落をはじめ、グリア系細胞に異常を示すので、ＤＭ20がグリアの分化に何らかの寄与をしていることが考えられた。今回、ジンピーマウス脳におけるＤＭ20の発現を検討したので報告する。

〔実験方法〕
１）全RNAの調製　GTC/CsClを用い超遠心法で回収した。
２）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。検出はそれぞれのmRNAに特異的な種々の領域のオリゴヌクレオチド（ＰＬＰ－ＯＮＬＹ、ＤＭ20、Ｅ４11）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（図１）。

〔結果と考察〕
ジンピーマウス胎仔脳内にも微量のＰＬＰ遺伝子産物があるかどうか検討するため、先に開発したＰＣＲ法を用いて解析した結果、胎生１６日のジンピーマウス（jp/Y）にはジンピー型のＤＭ20－mRNAが正常とほぼ同量発現していることが明らかとなり、胎生期のジンピーマウス脳内に正常なＤＭ20が存在しないことがオリゴデンドロサイトの分化異常を引き起こす直接的な原因である可能性も考えられた（図２）。
ジンピーＰＬＰおよびＤＭ20－ｍＲＮＡには第５エキソンが含まれていないため７４ベースの欠損があるが(3,4)、ＰＣＲ法を用いたのちこのジャンクション部分のオリゴヌクレオチドでハイブリダイズする事により正常およびジンピー型mRNAの区別が容易に行える（図１）。そこで、生後１８日のジンピーマウス（jp/Y）２匹と同腹のヘテロのメス（jp/X）および正常のオス（X/Y）の脳より全ＲＮＡを抽出して同様に解析した。ジンピーマウス（jp/Y）において第５エキソンが欠失したmRNAの発現は検出されたが、正常対照群と比べその量は減少していた（図３）。
ＰＬＰ遺伝子はＸ染色体上ににあるが、Ｘ染色体には不活化という現象が知られている。このためジンピーマ

ウスのヘテロ（jp/X）では、正常型ＰＬＰ遺伝子とジンピー型ＰＬＰ遺伝子を発現している２種の細胞が混じり合いキメラ状になっており、両者の相互作用を調べるには格好の系である。Bartlettらはジンピーグリア細胞初代培養系でオリゴデンドロサイトの脱落が正常アストロサイトの培養上清を加えることにより防ぐことができると報告しており(5)、ＰＬＰ遺伝子由来の液性分化生存因子の存在を示唆した。これに従うとヘテロ（jp/X）においては正常細胞由来の液性因子が存在するためジンピー型細胞の変性脱落が少なくなっていると予想される。しかし、生後１８日のヘテロ（jp/X）を解析してみると、予期に反してジンピー型ＰＬＰ遺伝子の発現は全く認められなかった（図３）。このことはヘテロ（jp/X）脳内のジンピー型細胞が、ジンピー（jp/Y）脳内におけるよりも早く変性脱落していることを示している。ヘテロにおいていつごろからジンピー型細胞が変性脱落するのか調べるためにミエリン形成開始直前の生後２日目（Ｐ２）およびミエリン形成初期の生後９日目（Ｐ９）ジンピーマウスおよびその同腹仔脳より全ＲＮＡを抽出して解析した。生後２日目ではヘテロにおいてＰＬＰ－mRNAもＤＭ20－mRNAも正常型、ジンピー型が同程度発現しており、ジンピー型細胞がまだ変性していないことを示している。しかし、生後９日になると、すでにジンピー型ＰＬＰ遺伝子発現の減少が認められ、ジンピー型細胞の脱落が起こっていることが明かとなった（図４）。これらはいずれもジンピー（jp/Y）脳内における変性脱落よりも顕著であった。ジンピー（jp/Y）ではオリゴデンドロサイトは神経軸索と接触することができるが、ヘテロ（jp/X）のジンピー型細胞は正常型細胞と軸索との接触を競合することから、仮説として、生体内でのオリゴデンドロサイトの生存には液性の分化促進因子以外に、神経軸索と接触するということも重要ではないかと考えられた。

以上の結果より中枢ミエリンを形成するオリゴデンドロサイトが分化し生存していくためには、オリゴデンドロサイト自身にプログラムされたＰＬＰ遺伝子の発現すなわちＤＭ20による直接的な分化促進因子と、神経軸策との接触など他の細胞との相互作用の両方が重要であることが示唆された。

〔文献〕

1. Nave, K.-A., Bloom, F.E., and Milner, R.J. (1987) J. Neurochem. 49, 1873-1877
2. Macklin, W.B., Gardinier, M.V., King, K.D., and Kampf, K. (1987) FEBS Letters 223, 417-421
3. Nave, K.-A., Lai, C., Bloom, F.E. and Milner, R. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 9264-9268
4. Moriguchi, A., Ikenaka, K., Furuichi, T., Okano, H., Iwasaki, Y., and Mikoshiba, K. (1987) Gene 55, 333-337
5. Bartlett, W. P. et al.(1988) Glia 1, 253-259
6. Campagnoni, A. T. and Macklin, W. B. (1988) Molecular Neurobiology 2, 41-89
7. 鹿川哲史、池中一裕、御子柴克彦 (1990) 第33回日本神経化学会

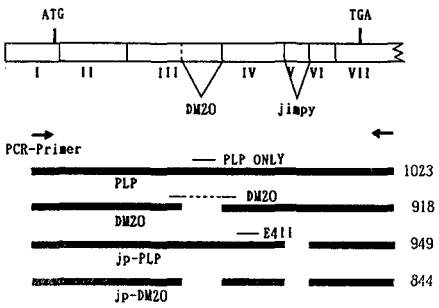


図１　ＰＬＰ転写産物の高感度検出系
図に示したプライマーを用いて転写産物を増幅した。右の数字は増幅物の長さ（塩基数）を示す。

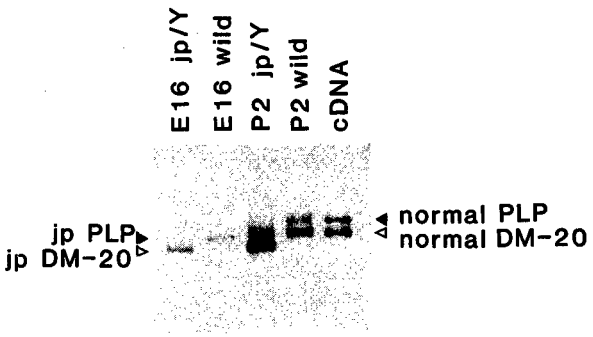


図２　胎生１６日及び生後２日目のジンピー及びその同腹マウス脳におけるＰＬＰ遺伝子の発現
プローブには全分子種を検出できるE4IIを用い、それぞれのmRNAに相当する位置を矢頭で示した。

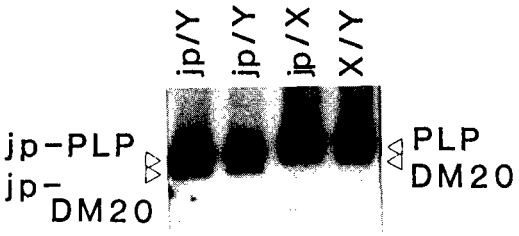


図３　生後１８日目ジンピー及びその同腹マウス脳におけるＰＬＰ遺伝子の発現

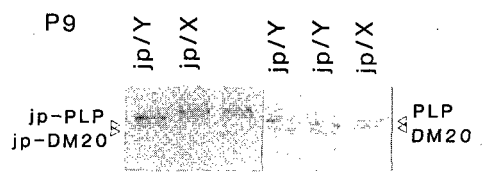


図４　生後９日目ジンピー及びその同腹マウス脳におけるＰＬＰ遺伝子の発現

166 Myelin-associated glycoprotein (MAG) の遺伝子解析

中野亮一、藤田信也、佐藤修三、犬塚　貴、崎村建司*、三品昌美*、宮武　正
（新潟大・脳研・神経内科、*神経薬理）

〔要約〕

マウスの gene library より Myelin-associated glycoprotein(MAG) 遺伝子をクローニングし、その構造解析を行った。MAG遺伝子は全長約15kbpに渡り13個のエクソンが12個のイントロンにより分断されていた。エクソン5～9はMAGの免疫グロブリン類似の5つのドメインをコードしており、1個のエクソンは1個のドメインに対応していた。また各エクソン間の境界はコドンフレームでみて1番目と2番目の塩基間にあり、これらは免疫グロブリン遺伝子と同様の特徴であるため、MAG遺伝子は免疫グロブリン遺伝子と共通の原始的な遺伝子から進化したと考えられた。MAG遺伝子のプロモーター領域にはMBPやPLP遺伝子のプロモーター領域と類似の配列が存在し、オリゴデンドロサイト特異的発現に関与している可能性が示唆された。

［はじめに］

Myelin-associated glycoprotein(MAG)は主に軸索周囲に存在する糖蛋白で、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ている。われわれはこれまでマウス[1]及びヒト[2]のMAGについてcDNAクローニングを行い、その全アミノ酸配列を決定した。マウスのcDNAについては、TGAの終止コドンをふくむ45bpが挿入されているものとされていないものがあり、挿入されているmRNAからはアミノ酸への翻訳がここで止まるため分子量の小さな small MAG(S-MAG)を生じ、挿入されていないmRNAからは翻訳が最後まで進むため分子量の大きなlarge MAG(L-MAG)を生じることがわかった。L-MAGには細胞内のC末側にsignal transductionに関わると思われるtyrosin autophosphorelation siteなどがあるが、膜貫通部と細胞外の構造は両者に共通である。この細胞外の構造は5つのドメインD1～D5よりなりこれらのドメイン内にはジスルフィド結合が1カ所存在し、免疫グロブリンのドメイン構造に類似していることから、MAGは免疫グロブリンスーパーファミリーに属することが明らかになった。我々はこれまでマウスの正常発育過程、脱髄後のremyelination、あるいは髄鞘形成不全マウスであるQuaking mouseにおいて、MAGの発現の変化を検討してきた。脳の組織修復などにおけるMAGの発現調節機構の解明などのためには、更にMAG遺伝子の構造解析が必須であり、われわれは今回マウスの遺伝子クローニングを行った。

［方法］

DBAマウスのEMBL3 gene libraryを、cDNA fragment[1]をプローブとしてスクリーニングし、得られた陽性クローン4つについて制限酵素地図を作製した後、pUC118にサブクローニングした。塩基配列はdideoxy法により決定した。

［結果］

得られた4つのクローンはMAG遺伝子の全長をカバーしていた(Fig. 1)。マウスのMAG遺伝子は全長約15kbpで、13個のエクソンが12個のイントロンで分断されていた。Coding regionはエクソン4の途中から始まっていた。エクソン5～9は細胞外に存在する免疫グロブリン類似の5つのドメインをコードしていたが、1つのドメインは1つのエクソンに対応していた。さらに各エクソン間の境界はコドンフレームでみて、1番目と2番目の塩基間にあった(Fig. 2)。この関係は膜貫通ドメインなど他のドメインにおいては崩れていた。

エクソン1の5'側上流の塩基配列ではTATA box類似の配列が存在し、その上流側にはCCAAT box結合因子であるNF-Yのbinding sequence が2カ所見られた。さらにMBPとPLPの遺伝子プロモーター領域に見られる類似配列と同様の配列が存在した(Fig. 3)。

［考案］

免疫グロブリン遺伝子とT-cell recepterやMHC抗原、Thy1抗原などの免疫グロブリンスーパーファミリーの膜蛋白遺伝子において認められる特徴的なエクソンの構造がMAGにおいても同様に認められた。このことはこれらの遺伝子が共通の原始的な遺伝子から進化したことを示唆すると考えられる。

Myelin basic protein (MBP)とproteolipid protein (PLP)の遺伝子プロモーター領域には4カ所の類似配列の存在が指摘されている[2]がこのうちMAGには2カ所の類似配列が存在していた。MAG,MBP,PLPの3者は共にオリゴデンドロサイトに特異的に発現しておりこの様な類似配列の存在は注目される。

［文献］

1)Fujita,N., Sato,S., Kurihara,T., Kuwano,R., Sakimura,K., Inuzuka,T., Takahashi,Y. and Miyatake,T. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 165, 1162-1169

2)Ikenaka,K., Furuichi,T., Iwasaki,Y., Moriguchi,A., Okano,H. and Mikoshiba,K. (1988) J. Mol. Biol. 199, 587-596

3)Sato,S., Fujita,N., Kurihara,T., Kuwano,R., Sakimura,K., Takahashi,Y. and Miyatake,T. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 1473-1480

Fig. 1:The structure of the mouse MAG gene. The 4 overlapping phage clones covering the MAG gene are shown at the bottom. EcoRI (R) and HindIII (H) sites are indicated. The squares represent exons (I to XIII) and the bent line represents the coding regions.

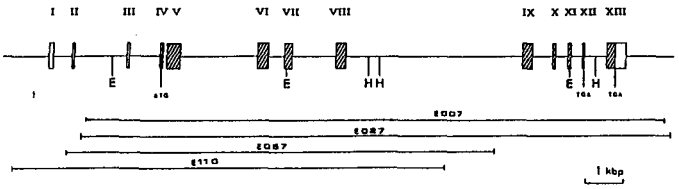
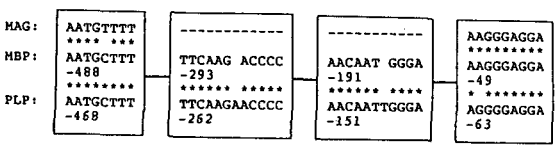


Fig. 2:Sequence around the exon-intron junctions of the MAG gene. Triplet codons of nucleotide sequence in exons are underlined. Intron sequence is given in lowercase letters. The size of each exon is indicated below the sequence, and the size of each intron confirmed by polymerase chain reactions (PCR) is shown in the right-hand column. The exons surrounded by dashed line encode the immunoglobulin-related extracellular domains of MAG. Each number of domain (D1 to D8) is denoted in the left-hand column of its encoding exon. The nucleotides which are in disagreement with the cDNA sequence are indicated by dots.

	Intron	Exon	Intron	
		I (-------ATCATCCAA)	gtgagtac----	0.9kbp
	----ctgtgcag	II CCTTCTGTGT-------AGAGACTTG (53bp)	gtaggtgt----	1.4kbp
	,----tgttctag	III GTTGAAAGGC-------GAGACTAAG (56bp)	gtgagtgg----	0.8kbp
	----atctgcag	IV CCCTAGCTCA-------ATT TCA G (73bp)	gtaatggc----	0.1kbp
D1	----atctacag	V CT TCT CGA-------ATC GTC A (369bp)	gtgagtcg----	2.0kbp
D2	----ctacacag	VI AC ACC CCC-------GTC AAG T (297bp)	gtgagcct----	0.4kbp
D3	----ggcctcag	VII AC CCC CCA-------GTC ATG T (256bp)	gtgagtct----	1.1kbp
D4	----cccccgcag	VIII AT GCA CCT-------GTG GAG T (261bp)	gtgagtgc----	4.6kbp
D5	----ttttgcag	IX TT GCC CCC-------GGA GCA C (288bp)	gtgagtga----	0.5kbp
D6	----accctcag	X AC CGA CTC-------AGA AGA AA (97bp)	gtgagtgc----	0.3kbp
D7	----ccctgcag	XI A AAG AAC -------G TAT GAG (100bp)	gtgagagg----	0.3kbp
	----ttcaatag	XII TCC AGA GA-------CCCCAGGAG (45bp)	gtaggtcc----	0.6kbp
D8	----ctccatag	XIII AGT AAG AA-------TAATGACAA (519bp)		

Fig. 3:Homologous nucleotide sequences between the 5'-flanking regions of the MAG, MBP and PLP genes.



167 Neuropeptide Y 遺伝子のグルココルチコイドによる転写調節エレメントの解析

三崎 尚之、樋口 宗史、山形 要人、三木 直正
（大阪大・医・第一薬理）

〔要約〕NG108-15 細胞において、Prepro-neuropeptide Y(NPY) 遺伝子のmRNA量がグルココルチコイドにより増加することから、NPY遺伝子上にGlucocorticoid responsive element(GRE)が存在することが示唆された。このエレメントを同定するため、ﾗｯﾄNPY遺伝子の上流域3.3kbをクローニングし、その各種deletionをChloramphenicol acetyl transferase(CAT) 遺伝子上流に結合したものをNG108-15細胞に導入し、その一過性発現を調べた結果、-2.9kbから-2.1kbの範囲にGREが存在することが示された。この領域の塩基配列を決定したところ、-2.5kb, -2.1kbの位置にGRE共通配列が、-2.1kbの位置にGRE-like配列が認められ、これらの比較的遠い上流域に存在するエレメントがグルココルチコイドの作用を仲介していると考えられた。

［はじめに］

Neuropeptide Y(NPY)は、36アミノ酸からなる神経ペプチドで、ほ乳類の神経系に広く、多量に存在する(1,2)。また、NPYはカテコラミン、ＧＡＢＡ、アセチルコリンなどと共存しており、神経伝達物質、ないし、神経調節因子としての作用があるものと考えられている。実際、NPYは末梢でカテコラミンによる血管収縮作用を増強したり、カテコラミンの放出を抑制する作用が認められ、中枢性には摂食行動、日内リズムなどに関係している。

以前、我々は、NPY遺伝子の発現は多くの因子によって調節されており、さらにそれらの間に相乗作用が認められることを報告した(3)。NPY遺伝子の正の発現調節因子のひとつとしてグルココルチコイドがあげられるが、これは、NPY遺伝子上にGlucocorticoid responsive element(GRE)が存在することを示唆している。しかし現在までに発表されたNPY遺伝子の-670bp上流域(4)には、GRE consensus sequence(5'-TGTTCT-3')は認められなかった。そのため、実際にNPY遺伝子の発現を調節するエレメントはより上流域にあるものと考えられた。

そこで今回我々は、このエレメントを同定するため、ラット ゲノム ライブラリー から得たNPY遺伝子上流域とChloramphenicol acetyl transferase(CAT)遺伝子のfusion plasmid、およびそのdeletion mutantの一過性発現を測定し、転写開始点から比較的遠い上流域に存在するGREが発現を調節しているとの結果を得たので報告する。

［材料と方法］

試薬：[α-^{32}P]-dCTP, [^{14}C]-ｸﾛﾗﾑﾌｪﾆｺｰﾙ はAmersham より、各制限酵素、DNA ｼｰｹﾝｼﾝｸﾞ ｷｯﾄ はTOYOBOより購入した。

NPY遺伝子上流のクローニング：Charon 4A に組み込まれたラット ゲノム ライブラリーをNPY cDNAの5'領域138bpをプローブとして、plaque hybridization法により、スクリーニングし、その結果得た陽性プラークからDNAを調製し、pUC-18ベクターにサブクローニングした。このDNAを用い、制限酵素地図を作成した。

プラスミドの作成：クローニングしたDNAから、NPY遺伝子上流域3.3kbを含むフラグメントを切り出し、CATベクターに挿入した(pNPY3.3CAT)。このプラスミドを制限酵素で切断することで、図１に示すような各deletionを作成した。

遺伝子導入とCATアッセイ：5%FCSを含むDulbecco変法Eagle最小倍地にて培養したNG108-15細胞(1x10^7 cells/10cm plate)に20μgのDNAを燐酸カルシウム法により導入し、48時間培養を行った。1μM ﾃﾞｷｻﾒｻｿﾞﾝ は、培養の24時間の時点で添加した。蛋白250μgを含む細胞抽出液を0.2M Tris-Cl(pH7.5)、80mM ｱｾﾁﾙCoA、3.7kBq [^{14}C]-ｸﾛﾗﾑﾌｪﾆｺｰﾙから成る反応液中で37℃、30分間インキュベートし、薄層クロマトグラムにてｱｾﾁﾙ化ｸﾛﾗﾑﾌｪﾆｺｰﾙと非ｱｾﾁﾙ化ｸﾛﾗﾑﾌｪﾆｺｰﾙを分離し、ｵｰﾄﾗｼﾞｵｸﾞﾗﾑ後、ﾃﾞﾝｼﾄﾒｰﾀにてアセチル化率を定量した。

DNAシーケンシング：pBSII-SK+ベクターを用い、ジデオキシ法により、塩基配列を決定した。

［結果と考察］

ラット ゲノムライブラリーのスクリーニングにより、２つの陽性プラークが得られたが、制限酵素により切断した際のフラグメントのパターンから、これらは同一のDNAを含んでいることが示された。また、クローニングされたこのD

NAの下流域の一部(XhoI-SphI フラグメント)の塩基配列を調べた結果、以前に報告されたラットNPY遺伝子の配列(4)と完全に一致した。このNPY遺伝子上流域のグルココルチコイドに対する反応性を調べるため、NPYとCATのfusion plasmidを作成し、NG108-15細胞に導入することでその一過性発現を調べた。CATベクターのみを導入した場合、CAT活性は、1μM ﾃﾞｷｻﾒｻｿﾞﾝの存在下、非存在下でほぼ同じであったが（相対活性：1.03）、NPY上流3.3kbを含む、pNPY3.3CATを導入した場合は、図2に示すように、ﾃﾞｷｻﾒｻｿﾞﾝ存在下でのCAT活性は、非存在下に比べ、約4倍上昇した。ほぼ同様の活性上昇がpNPY2.9CATでも認められたが、pNPY2.1CATではこの上昇はほとんどみられず、さらに短いフラグメントをもつプラスミドについても、ﾃﾞｷｻﾒｻｿﾞﾝの影響は観察されなかった（図2）。

このデータからグルココルチコイドに反応してNPY遺伝子の発現を調節するエレメントが、転写開始点より-2.9kbから-2.1kbの範囲に存在することが示された。そこでこの約0.8kbの領域の塩基配列を決定した結果、2つのGRE 共通配列(TGTTCT)が-2.5kb および -2.1kb の位置の相補鎖上に、また1つのGRE-like 配列(AGTTCT)が-2.1kbの相補鎖上に認められた。これらのエレメントを介して、グルココルチコイドはNPY遺伝子の転写活性に影響を及ぼしているものと考えられ、特に-2.1kbに存在する2つのエレメントは接近しているため、協調的に働く可能性が示された。

グルココルチコイド受容体がGREに強く結合してその作用を発揮するには、GREがﾊﾟﾘﾝﾄﾞﾛｰﾑ構造をとり、受容体が二量体の形で結合することが必要であるとされているが(5)、今回確認された3つのエレメントはどれもこの構造をとっていない。しかし、ﾊﾟﾘﾝﾄﾞﾛｰﾑ構造をとらないGREにも、受容体が単量体の形で結合し、比較的弱くではあるが、作用を示すことが知られており(5)、これは、ﾃﾞｷｻﾒｻｿﾞﾝがprepro-NPY mRNA量をあまり強く増加させない(1.6倍)という事実と一致する。

また、3つのエレメントは-2.5kb、-2.1kbと比較的遠い上流域に存在しているが、同様に転写開始点からかなり離れた領域で作用するGREがｳｻｷﾞuteroglobin 遺伝子(-2.6kb)(6)、ﾏｳｽtyrosine aminotransferase 遺伝子(-2.5kb)(7) で報告されており、転写開始点からの距離はGREの活性に影響しないと考えられる。

今回報告した3つのエレメントが実際にグルココルチコイド受容体と特異的に結合するかを確認するために、今後 DNaseI protection assay、gel shift assay などが必要である。

［文献］
(1) O'Donohue, T.L. et.al. (1985) Peptides(N.Y.) 6, 755-768
(2) Gray, T.S. et.al.(1986) Life Sci. 38, 389-401
(3) Higuchi, H. et.al.(1988) J.Biol.Chem. 263, 6288-6295
(4) Larhammar, D. et.al.(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 84, 2068-2072
(5) Chalepakis, G. et.al.(1990) DNA-Cell-Biol. 9, 355-368
(6) Cato, A.C.B. et.al.(1984) EMBO J. 3, 2771-2778
(7) Jantzen, H-M. et.al.(1987) Cell 49, 29-38

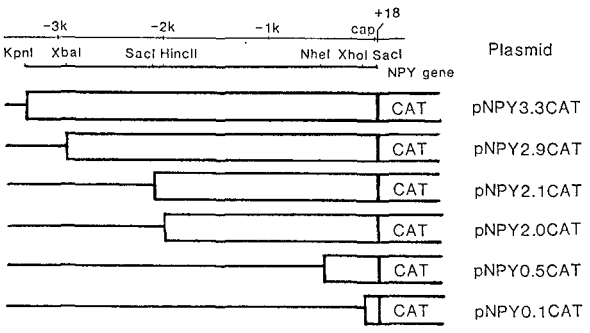


図1 CAT fusion plasmid の構造
上段はNPY遺伝子上流域の簡単な制限酵素地図を、
下段は各プラスミドの構造を示す。

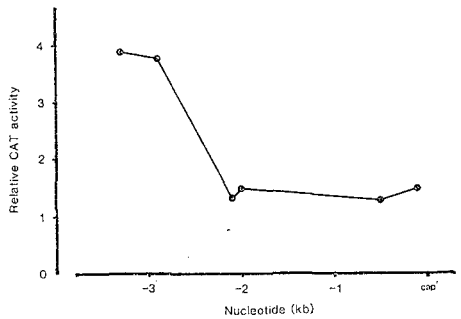


図2 NPYフラグメントのサイズとCAT相対活性
横軸はCAT fusion plasmid に含まれるNPY遺伝子のサイズを、縦軸はﾃﾞｷｻﾒｻｿﾞﾝ非存在下でのCAT活性を1としたときのﾃﾞｷｻﾒｻｿﾞﾝ存在下でのCAT活性（相対活性）を示す。

168 アゴニスト刺激によるGABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNA発現の調節

廣内雅明[1)]、大熊誠太郎[1)]、橋本　保[2)]、辻村　敦[2)]、栗山欣弥[1,2)]

（京都府立医大・薬理[1)]、老化研・神経化学・分子遺伝[2)]）

〔要約〕

初代培養神経細胞にGABA$_A$受容体のアゴニストであるムシモールを曝露したところ、GABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNAの発現低下が認められた。この作用は対照としたβ-actinのmRNAの発現には影響を及ぼさず、またGABA$_A$受容体のアンタゴニストであるピクロトキシニンを同時に添加することにより抑制された。従って、このムシモールによる作用はGABA$_A$受容体を介した反応であると考えられる。一方、GABA$_A$受容体のアンタゴニストであるピクロトキシニンあるいはCl^-チャネルの遮断薬であるピクロトキシニンを曝露した場合には、GABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNAの発現に著明な変化は認められなかった。以上のことから、GABA$_A$受容体のアゴニスト刺激が遺伝子レベルにおける自己調節能にも影響を及ぼす可能性が示唆される。

マウス大脳皮質の初代培養神経細胞にはGABA作動性神経が存在しており、GABA$_A$受容体が発現し、かつ機能していることが判明している(5)。またGABA$_A$受容体は複数のサブユニットから構成され、Cl^-チャネルを形成していることが分子レベルで明らかにされつつある。しかしながら、その遺伝子レベルにおける調節機構についてはあまり知られていないのが現状である。我々はこれまでヒトGABA$_A$受容体α_1サブユニットのcDNAクローニングを行うとともに、α_1サブユニットmRNAがマウス大脳皮質の初代培養神経細胞中に2種類発現すること、更にその発現は培養日数の経過と共に急速に増加することを明らかにした(4)。本研究では、GABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNAの発現調節を解明する目的で、初代培養神経細胞にGABA$_A$受容体のアゴニストであるムシモールを曝露し、その影響について検討した。

［方法］

神経細胞の単離は胎齢15日目のマウス胎児の新皮質をトリプシン処理することにより行い、10日間初代培養を行った神経細胞を実験に供した(6)。

mRNAの単離は細胞をSDSとプロテアーゼで処理し、オリゴdTセルロースカラムを用いて行った。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にて行った。さらにmRNAの発現を定量的に比較検討するためにリボヌクレアーゼプロテクション法を行い、GABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNAを測定した。ノーザンブロット解析の場合、α_1サブユニットcDNAをランダムプライマー法でラベルしたものをプローブとして用い、またリボヌクレアーゼプロテクション法の場合には、cDNAをin vitro転写により作製したRNAプローブを用いた。

［結果・考察］

GABA$_A$受容体のアゴニストであるムシモールを神経細胞に曝露した場合のGABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNAに対する影響を、経時的に検討した。まず最初にムシモール(10 μM)を1日間あるいは4日間曝露した場合の影響をノーザンブロット解析したところ、GABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNAの発現はその対照と比較した場合、1日間曝露したものでは著明な減少を示したが、4日間曝露したものではこのような減少が認められなかった(Fig.1)。さらに、初代培養神経細胞中には2種類のmRNAの発現が認められたが、両者は同一の挙動を示すものであった。そこでより詳細に検討するために、リボヌクレアーゼプロテクション法を用いて解析したところ、GABA$_A$受容体α_1サブユニットmRNAの発現はム

シモールに4時間曝露した時点から減少を示しはじめ、48～72時間の曝露後には約60%の減少を示した(Fig. 2)。一方、ムシモール曝露の影響の特異性を検討するため、その対照としたβ-actin mRNAの発現の変化についても検討したところ、この発現には全く変化は認められなかった。

このようにアゴニスト刺激によりGABA$_A$ 受容体α_1 サブユニットmRNA の発現が減少したので、GABA$_A$受容体のアンタゴニストであるピククリン(10 μM)を同時に曝露したところ、上記のムシモールによる減少作用は消失した。従ってこれらの変化はGABA$_A$ 受容体を介したものであると考えられる。一方、GABA$_A$ 受容体のアンタゴニストであるピククリン(10 μM)、あるいはGABA$_A$受容体に共役するCl$^-$チャネルの遮断薬であるピクロトキシニン(10 μM)を神経細胞に1日間曝露した場合には、GABA$_A$ 受容体α_1 サブユニットmRNA の発現には著明な変化を認めなかった。

以上の結果より、GABA$_A$ 受容体においては蛋白質レベルで認められるようなリン酸化反応を介した受容体活性調節機構だけでなく(2,3)、遺伝子レベルにおいてもアゴニスト刺激が自己調節能を示す可能性が考えられる。同様の現象はβ－アドレナリン受容体やムスカリン性アセチルコリン受容体の場合でも認められており(1,7)、mRNAの安定性が変化したというよりも、遺伝子からの転写制御における影響と考えられていることから、GABA$_A$ 受容体の場合にもアゴニスト刺激が転写調節機構に影響を及ぼすことが推測される。

[文献]

(1) Bouvier, M. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 16786-16792

(2) Browning, M.D. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 1315-1318

(3) Heuschneider, G. and Schwartz, R.D. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 2938-2942

(4) Hirouchi, M. et al. (1991) Neurochem. Int. in press

(5) Kuriyama, K. et al. (1987) Brain Res. 416, 7-21

(6) Ohkuma, S. et al. (1986) Int. J. Dev. Neurosci. 4, 383-395

(7) Wang, S.Z. et al. (1990) FEBS Lett. 276, 185-188

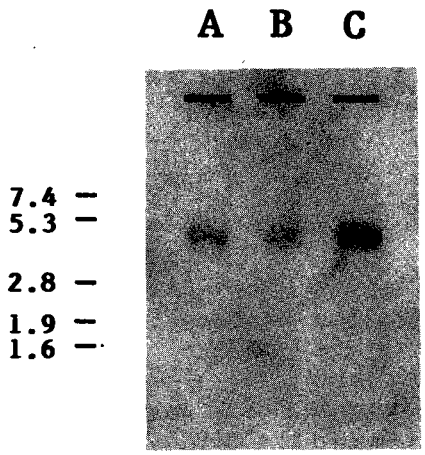


Fig. 1 Effect of Muscimol Treatment on Expression of mRNA for GABA$_A$ Receptor α_1-Subunit in Primary Cultured Neurons. A: Control, B: 1 day treatment prior to the isolation, C: 4 days treatment prior to the isolation.

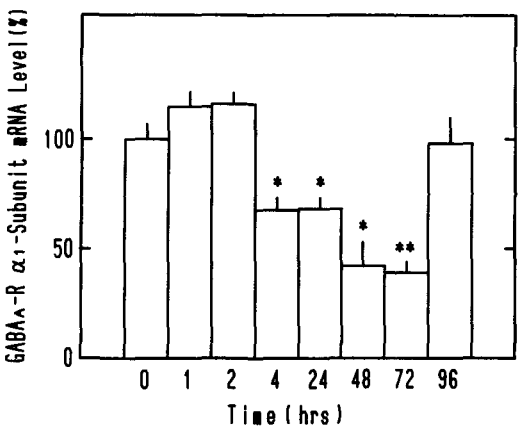


Fig. 2 Time Course of changes in GABA$_A$ Receptor α_1-Subunit mRNA Levels after Treatment with Muscimol in Primary Cultured Neurons.
*p<0.01, **p<0.001, compared with the value obtained at 0 time.

169 網膜におけるアマクリン細胞の特異抗原分子HPC-1の一次構造解析およびその組織発現様式

井上 明宏、小幡 邦彦、赤川 公朗
（生理学研究所・神経化学）

〔要約〕モノクローナル抗体HPC-1をプローブにして、陽性cDNAクローンを単離した。β-ガラクトシダーゼとcDNAの融合蛋白質に対する抗血清は、イムノブロットで同様に34-36 kDaの複数のタンパク質を認識した。推定されるアミノ酸配列の分子量は35417kDaであった。分子内のC端付近に疎水性の高い領域があるため膜貫通タンパク質と推定された。また、既知のポリペプチドとの相同性は、全体としては見いだせなかったものの、部分的に基底膜の構成タンパク質ラミニンと類似な部分があった。この抗原性は中枢神経系のニューロンに広範に分布していたが、非神経系の組織には存在しておらず、まったく新しい神経特異タンパク質と結論した。網膜の発生に伴ってHPC-1抗原は内網状層の発達とアマクリン細胞層の構築とともに発現していた。これらの結果より、膜表面分子としてのHPC-1の層構築あるいは特異形態維持などにおける何らかの機能が示唆された。

神経系の高度に分化した機能や相互作用、形態形成に対して、分子的な基盤をもってアプローチするために、細胞種やある層に特異的に反応するモノクローナル抗体はきわめて有用な情報を与えてくれる。これまで、網膜においては光受容細胞のオプシンをはじめとした、いくつかの細胞種特異的なモノクローナル抗体が作製され、同定されてきた。そのなかの一種としてわれわれは、アマクリン細胞の細胞体膜およびその樹状突起の存在する内網状層を特異的に標識するモノクローナル抗体HPC-1を得ている[3]。その特徴的な組織分布の性質から単離網膜細胞における細胞種の同定に利用されていたが[1, 2]、分子のレベルでの解析は行われていない。そこで、cDNAを単離して一次構造を解析し、遺伝子レベルでの実験を行うことが、HPC-1抗原分子の機能を研究するうえで重要と思われる。今回われわれは、cDNAのクローニングおよびその同定を行い、一次構造を解析した。また、融合タンパク質に対する抗血清やcDNAプローブを用いて組織発現の様式を調べた結果を報告する。

[方法]

（1）cDNAクローニング、および塩基配列の決定と一次構造の解析。ラット海馬のλgt11cDNAライブラリーをランダムプライミング法で作製し、モノクローナル抗体HPC-1陽性クローンを数個得た。これらはすべて同一のmRNAに由来するものであった。さらにオリゴ(dT)プライミング法でλgt10のライブラリーを作製し、cDNAをプローブにして、最も長い部分をカバーするようにクローンを選択し、塩基配列をダイデオキシ法により決定した。推定アミノ酸配列のホモロジー検索は、NBRF-PDB(Rel.27)およびSWISS-PROT(Rel.15)の各データベースを使用した。（2）抗血清。電気泳動的に単離したβ-ガラクトシダーゼとHPC-1抗原cDNAのオープンリーディングフレームとの融合タンパク質を家兎に繰り返し免疫して得た。（3）イムノブロット。ラットおよびニワトリ各組織のホモジネートあるいは膜分画を12.5 %のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、ニトロセルロース膜に転写し、HRP-抗IgG抗体により非放射性に陽性バンドを検出した。一次抗体の希釈は、HPC-1は300倍、抗血清は1000倍で行った。（4）免疫組織染色。4 %パラホルムアルデヒドで固定したラットの各組織、あるいは浸漬固定したニワトリ網膜の12 μm凍結切片を作製し、間接蛍光抗体法により検出した。（5）RNAブロット。ラットの各組織よりLiCl/urea法で抽出、精製したpoly(A)-rich RNA 4 μgをホルマリンアガロースゲルで分離し、ナイロン膜に転写した後、^{32}P-標識cDNAプローブ(2.1 kbp)によってハイブリダイゼーションを行い、2 x SSC、1 % SDS、60 °Cの条件で洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。

[結果と考察]

得られたcDNAの配列を連結すると、poly(A)部分を含み最長2222 bpとなった。RNAブロットの結果から、mRNAは2.4 kbの単一のバンドとして検出されるので（図2-B）、今回クローニングした一連のcDNAはその90 %以上はカバーしていると思われる。モノクローナル抗体HPC-1はイムノブロットにおいて35 kDaと36 kDaの複数のタンパク質バンドを認識するが、cDNAに由来する融合タンパク質に対する抗血清も網膜や海馬などにおいて同一のパターンを示した(図2-A)。また、免疫組織化学的には、HPC-1の抗原性は網膜においてアマクリン細胞層の細胞膜および内網状層に存在するが、蛍光抗体法によりモノクローナル抗体及び抗血清のラット網膜における反応性は、ともに同様なパターンを示した。これらのことから今回クローニングしたcDNAは、モノクローナル抗体HPC-1の認識する抗原分子のものであると結論した。スクリーニングの段階で約80個のクローンを解析したが、異なるポリペプチドをコードするクローンは見いだせなかった。塩基配列中にはクローニング部位から936 bpのオープンリーディングフレームが存在しており、推定されるアミノ酸配列は312残基で分子量の計算値は35417 Daであった。C末端付近には22残基のきわめて疎水性の高い領域が1箇所存在しており（図1）、細胞膜を貫通するタンパク質と推定された。この結果は、組織あるいは単離培養細胞における染色性ともよく一致するものである。N末端にはシグナル配列と思われる疎水的な領域は存在しなかったが(図1)、

推定される分子量はSDS-PAGEから決定されたものにほぼ等しいため、ほとんどの翻訳領域をカバーしていると考えられた。細胞膜でのトポロジーに関しては現在のところ明確でない。分子内には２箇所のN-glycosylation siteの候補であるAsnが存在していた。タンパク質データベース検索によると、全体として既知のポリペプチドとの相同性はなく、まったく新しいタイプのタンパク質と結論した。しかし、局所的に検討するとＮ末端側に存在する近接した28、59、29残基の配列が、基底膜の構成成分であるラミニンB1鎖のＣ末端40 kDa断片（ドメインＩ）のＣ末端領域と、それぞれ36.4 %、33.3 %、32.1 %の有意な類似性をもっていた。この領域は、ラミニン分子の神経突起伸展促進あるいは神経細胞のsurvivalに効果を有するエラスターゼ消化断片中に含まれている[4]。このことは細胞膜上に存在するHPC-1抗原分子に同様な効果がある可能性を示唆しており、現在培養細胞を用いて検討中である。HPC-1抗原の全身の組織における分布を調べるために、抗血清によるイムノブロットを行った(図２-Ａ)。この結果、網膜、海馬以外にも、大脳皮質、小脳、脊髄などの中枢神経組織での抗原性の存在が確認された。一方、肝臓、腎臓、筋肉、副腎、心臓の各臓器においては反応性は認められなかった。また、mRNAレベルにおいても同様に中枢神経系に特異的な発現が確認された(図２-Ｂ)。

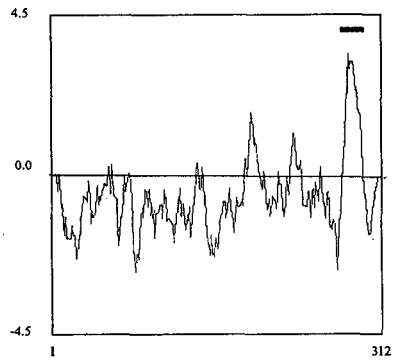
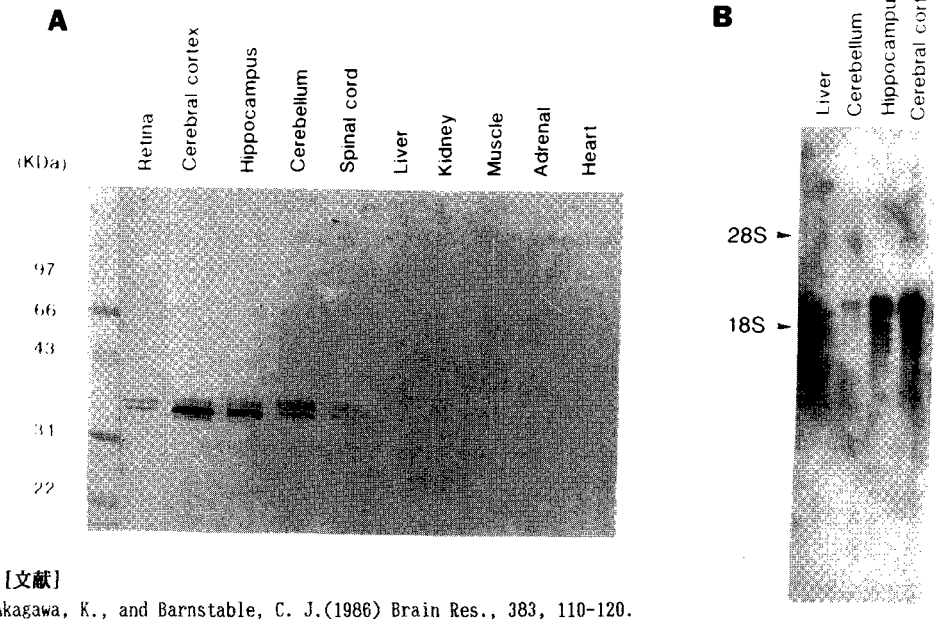


図1 HPC-1 抗原分子の疎水性・親水性プロフィール。疎水性の程度を正で表した。太線、膜貫通領域。

今回報告した抗血清は、ラットのみならずニワトリでも反応した。そこで、ニワトリ網膜の発生に伴うHPC-1分子の発現をイムノブロット及び免疫組織化学により調べた。その結果、分裂後の細胞が移動して、神経節細胞層を構成しはじめるころから抗原性が出現し、さらにアマクリン細胞が分化して、内網状層を構築していくのに伴って内網状層の染色性が増すことが示された。これらの結果と一次構造上の特徴を考え合わせると、HPC-1分子は網膜の層構造の構築あるいはその特異的な神経連絡や形態保持になんらかの影響をおよぼしている可能性が示唆された。

図2 ラット各組織のHPC-1 抗原分子の発現パターン。A. 抗血清によるイムノブロット。 B. cDNAプローブ(2.1 kbp) によるRNA ブロット。



【文献】

1. Akagawa, K., and Barnstable, C. J.(1986) Brain Res., 383, 110-120.
2. Akagawa, K., Takada, M., Hayashi, H., and Uyemura, K.(1990) Brain Res., 518, 1-5.
3. Barnstable, C.J., Hofstein, R., and Akagawa, K.(1985) Dev. Brain Res., 20, 286-290.
4. Sasaki, M., Kato, S., Kohno, K., Martin, G.R., and Yamada, Y.(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 935-939.

170 ヒト筋肉及びウシ脳組織からのαBクリスタリンの精製

篠原春夫、稲熊　裕、後藤幸代、森下理香、浅野富子、
加藤兼房　(愛知県コロニー・研・生化)

〔要約〕

1) ヒトの筋肉より既に確立しているEIA法を用いαクリスタリンのBサブユニット（αB）免疫活性を精製した。筋肉の抽出液中のαBを40%硫安で塩析し、DEAE-Sepharoseイオン交換クロマト、次いでBio-Gel A-5m のカラムより最初に溶出される高分子量αB免疫活性を集めた。これをFPLC system 中で、6-7M urea 存在下で、S-Sepharose HP、Superdex 75pg、最後に TSK SP-5pw にかけて精製した最終標品はSDS-PAGEでウシレンズαBと同じ位置に単一バンドを示した。

2) ほぼ同じ方法で、ウシ脳よりαB免疫活性を精製した。

3) 精製したヒト筋αBとウシ脳αBをAsp-NあるいはLEPで処理し、そのペプチドマップをSDS-PAGEで調べるとウシレンズαBのそれと完全に一致した。

4) ヒト筋αBをプロテアーゼ処理して得られたペプチドのアミノ酸配列はすべて遺伝子より推定されているそれと完全に一致した。

5) 精製ヒトαBをウサギに免疫して抗血清を得た。さらに、抗血清より抗原一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、ウシレンズ、ウシ脳及びヒト筋のαBと特異的に反応する抗体であった。

6) S-Sepharose HPでαBと分離精製されてくる蛋白質はアミノ酸配列分析の結果、ヒト熱ショック蛋白質HSP27である事が分かった。

眼球レンズの主構成成分の一つであるαBクリスタリン（αB）が眼球以外の種々の組織にも存在していることが報告されているが、その生理活性は不明である。αBは一種の熱ショック蛋白質であるという報告（1）がある一方で、先天性疾患のアレキサンダー病患者脳に蓄積するRosenthal fiber の主成分もαBであることが明らかになり（2）、その臨床的意義が高まっている。αBをアレキサンダー病患者の脳組織あるいはラットの心筋から分離精製したという報告は若干例あるが、今回我々は正常ヒト筋組織からαBを精製し、かつ、αBと同時精製されてくる蛋白質が熱ショック蛋白質 HSP27 であることを見いだした。

【材料および方法】

1) ヒトαB、ウシαBの精製

外科的に切除された大胸筋310g、ウシ脳組織434gを、4倍量の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) でホモジナイズした。その遠心上清を0-40%硫安塩析して、約100mlの 0.01M リン酸カリ緩衝液 (pH 8.0) で溶かした。0.01M リン酸カリ緩衝液で一夜透析した後、その遠心上清をDEAE-Sepharose カラムに負荷した。0.01-0.4M リン酸カリ直線密度勾配で溶出して、既にαBの合成ペプチドで作製した EIA（3）で特定したαB分画を集めた。これをBio-Gel A-5m にかけ、EIA により検出したαB分画を集めた。更に硫安塩析し、その沈澱を約2mlの 0.1M sodium acetate (pH 4.5), 1 mM EGTA, 1mM DTT, 7M ureaに溶かし、同液で一夜透析した。これをFPLC system 中で、6-7M urea 存在下でS-Sepharose HP により溶出した（図1）。更にαB分画をゲルろ過 Superdex 75pg、イオン交換 SP-5PW で精製した。

2) ペプチドマッピングとアミノ酸分析

精製したヒト筋αBとウシ脳αBを、エンドプロテイナーゼAsp-Nあるいはリシルエンドペプチダーゼ(LEP)により37° Cで酵素切断し、SDS-PAGE 電気泳動した。また、ヒトαBをAsp-N 及びV8プロテアーゼで処理して得た断片のアミノ酸配列の解析を行った。また、αBと同時精製されてくる蛋白質も同様にしてアミノ酸解析を行った。

3) 抗ヒトαB抗体の作製

精製したヒト筋αBをcomplete adjuvant と混合し、ウサギに皮下注射 (1 mg/rabbit) により2週間隔で免疫し、2ヶ月後より採血した。抗血清中のIgG画分を50% 硫安塩析してヒト筋αB一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て精製した。得た抗体の特異性はイムノブロットで確認した。

【結果と考察】

S-Sepharose HPで二つのpeak (peak I, II) が観察され、αBはそのpeak IIに存在した（図1）。得られたヒト筋肉のαB、ウシ脳のαBの最終標品はSDS-PAGE上で、既に報告したウシレンズαBと同じ位置で単一バンドとなった。ヒトαBの精製表を表1に示

す。またヒトαBとウシ脳αBのペプチドマッピングではSDS-PAGE上でウシレンズαBと同様の断片化が認められた。一方、ヒトαBのアミノ酸分析を行うと既に報告されたヒトαBアミノ酸配列（4）と完全に一致した（図2）。これらのことより、正常ヒト筋組織及びウシ脳組織にもかなりの濃度（ヒト筋肉の場合3.1μg/mg protein）でαBは存在して上記の方法で精製され、そのアミノ酸分析、酵素切断による断片化パターンからもレンズαBと同一蛋白質であることが強く示唆された。このαBをウサギに免疫して得られた抗体、及びこれを用いたEIAは、ウシレンズαBの抗体及びそれを用いたEIA系と殆ど同じ特異性及び検出感度を示した。

一方、FPLC(S-Sepharose HP)におけるpeak I 蛋白質（図1）をAsp-Nで酵素切断した断片をアミノ酸分析するとHSP27の配列（5）と一致したことからpeak I 蛋白質はHSP27であると思われる（図2）。HSPは熱ショックなどのストレスに対する細胞（生体）の防御機構を司るとされており、そのアミノ酸配列もαクリスタリンとのホモロジーが高い事が以前から指摘されている。今回、このHSP27が精製のある段階までαBと共存したことから、この両者間の生化学的性質の共通性があると考えられると同時に機能的関連性が強く示唆される。

【謝 辞】

本研究の中で、アミノ酸分析の御協力を頂きましたアプライドバイオシステムジャパン株式会社、東ソー株式会社に深謝致します。

【文 献】

1. Klemenz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88(1991)3652-3656.
2. Iwaki et al., Cell 57(1989)71-78.
3. Kato et al., Biochim. Biophys. Acta, 1074(1991)201-208.
4. Dubin et al., Genomics, 7(1990)594-601.
5. Hickey et al., Nucleic Acids Res., 14(1986)4127-4145.
6. Ouderaa et al., Eur. J. Biochem., 49(1974)157-168.

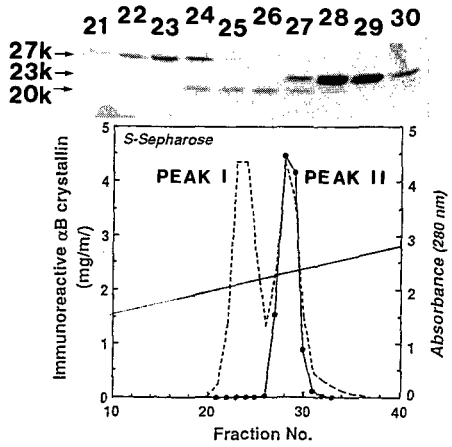


図1 FPLC(S-Sepharose)のelution patternとαBのEIA測定値。上は各分画のSDS-PAGE。

A) bovine lens α B (35-66) SDLFPASTSLSPFYLRPPSFLRAPSWIDTGLS
human lens α B (35-66) SDLFPTSTSLSPFYLRPPSFLRAPSWFDTGLS
human muscle α B SDLFPTSTSLSPFYLRPPSFLRAPSXFDTGLS

bovine lens α B (118-150) FHRKYRIPADVDPLAITSSLSSDGVLTVNGPRK
human lens α B (118-150) FHRKYRIPADVDPLTITSSLSSDGVITVNGPRK
human muscle α B FHRKYRIPADVDPLTITSXLXXDGVLTVNGPXK

bovine lens α B (164-175) EEKPAVTAAPKK
human lens α B (164-175) EEKPAVTAAPKK
human muscle α B EEKPAVTAAPKK

B) human HSP27 (21-27) DWYPHSR
peak I protein DWYPHSR

human HSP27 (30-50) DQAFGLPRLPEEWSQWLGGS
peak I protein DQAFGLPRLPEEWSQWLGGS

図2 A) ウシレンズ、ヒトレンズ、ヒト筋肉のαBのアミノ酸配列。（）内は、それぞれの最初のメチオニンを1とした際のアミノ酸の番号を示す。Xは、同定されなかったアミノ酸を示す。ウシレンズ(6)において、ヒトレンズ(4)と異なるアミノ酸は下線で示した。B) FPLC (S-Sepharose HP)で得られたpeak I protein のアミノ酸配列。既に報告されたヒトHSP27のアミノ酸配列 (5) と一致した。

表1 ヒト筋肉からのαB精製表。

Fractions	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Immunoreactive αB* Total (mg)	Specific (μg/mg protein)	Yield (%)
Crude extract	1430	11700	36.5	3.1	100
$(NH_4)_2SO_4$	199	1140	29.1	25.5	80
DEAE-Sepharose	184	134	25.6	191	70
Bio-Gel A-5m	57	76.4	23.5	308	64
S-Sepharose Hp	8	34.6	19.5	564	53
Superdex 75pg	16.2	31.0	18.3	590	50
SP-5pw	6.5	21.2	15.2	717	42

*Bovine αB_2 crystallin equivalent

171 ヒト低分子量熱ショック蛋白質ＨＳＰ２７の精製と組織分布および（ＨＳＰ２７／αＢクリスタリン）複合体の証明

加藤兼房、篠原春夫、稲熊　裕、後藤幸代
（愛知県コロニー・研・生化）

〔要約〕

1)ヒト胸筋よりαＢクリスタリンと同時精製されてきたHSP27をウサギに免疫して特異抗体を得た。これを用いてHSP27の高感度エンザイムイムノアッセイ系を作製した。

2)この測定系を使ってヒト胸筋よりHSP27の精製法を確立した。筋抽出液中のHSP27は、7 M尿素を用いるS-SepharoseカラムクロマトでαＢと分離されるまでαＢと同じ分画に回収された。最終HSP27標品は TSK SP-5pwで少なくとも２成分に分離されたが、両成分ともSDS-PAGEでは同じ位置に泳動され、また、ペプチドマップ上でも両者の違いはなかった。

3)ヒト組織でのHSP27の分布を測定してみると心筋および横紋筋と平滑筋よりなる組織に１μg/mg protein以上の高濃度で分布したが、神経組織を含む殆どの組織にも分布することが分かった。

4)ヒト胸筋、ウシ心筋、ウシ脳幹、およびラット腎粗抽出液中のαＢクリスタリンを抗αＢ抗体カラムを使って、ワンステップ精製すると、純度50%以上のαＢ標品が得られた。腎以外の組織から精製したαＢ標品中には、SDS-PAGE上でαＢと同程度の鮮明なバンドを示す26-27 kDaの蛋白質が存在した。この蛋白質は抗αＢ抗体とは反応せず、抗ヒトHSP78抗体と反応した。

5)逆に抗ヒトHSP27抗体カラムを用いて、ヒト胸筋抽出液中のHSP27を精製すると、HSP27以外にαＢクリスタリンが同時精製されてきた。 以上の結果より、少なくとも筋組織のαＢクリスタリンは、細胞内では低分子量HSP27と複合体を形成して存在することが示唆された。

我々は、ヒト骨格筋よりαＢクリスタリンを精製する際に同時精製されてきて、7M尿素存在下でαＢと分離された分子量約27kDaの蛋白質が低分子量熱ショック蛋白質(HSP27)であることを前演題で明らかにした。αＢと同様にHSP27も細胞内で分子量50万以上の集合体を形成することが知られている[1]。一方、αクリスタリン蛋白質とHSP27蛋白質間の構造上の相同性が高いことが知られている[2]。HeLa細胞を熱処理すると細胞質可溶性画分のHSP27が遠心沈降する画分に移動することが報告されている[1]。しかし、HSPの定量的解析の報告は少ない。我々はヒトHSP27の高感度EIA系を確立し、ヒト組織における分布を明らかにすると同時に、少なくとも筋細胞内では、HSP27とαＢクリスタリンが集合体を形成していることを示唆する結果を得たので報告する。

実験方法と材料

ヒトHSP27の精製：　αＢの精製と同じステップを経て、ヒト胸筋より精製した。40%硫安塩析、DEAE-SepharoseとBio Gel A-5mカラムクロマト後に7M尿素存在下でS-Sepharose HPカラムクロマトにてαＢと分離し、これをSuperdex 75pgカラムを通して高分子量混在物を除去し、最後にTSK-SP 5pwカラム(0.1 M sod. acetate buffer, pH 4.5 containing 7 M urea, 1 mM EGTA and 1 mM DTT)に吸着させ、塩濃度(NaCl)を上げて溶出した。

抗ヒトHSP27抗体の作製とエンザイムイムノアッセイ系：　ヒト胸筋より精製したHSP27をウサギに免疫して、抗血清を得た。抗血清中の特異抗体は抗原結合セファロースカラムを用いて吸着・溶出して精製した。この精製抗体を用いてポリスチレン球を固相とし、大腸菌由来のβ-D-galactosidaseを標識酵素として用いるサンドイッチEIA系を確立した。また、上記の精製抗HSP27抗体１mgを0.5 gのCNBr活性化セファロースに結合させ、ワンステップ抗原精製用に用いた。

抗体結合カラムを用いたHSP27およびαＢの精製：　各組織の20%(w/v)ホモジェネートの遠心上清10-40 mlを精製抗体（抗HSP27あるいは抗αＢペプチド[3]約１mg）結合カラム(1x1.5 cm)にかけ、0.2−0.5 ml/minの流速で流した。素通りした液を再びカラムにかけた。カラムを1 M NaClを含む10 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7でよく洗ってから、ActiSep elution medium (Sterogene) 5 mlで溶出し、抗原を含む画分を直ちにゲル沪過カラムにかけて溶出液を除去した。精製分画は濃縮後SDS-PAGEおよびWestern blotsで解析した。

結果と考察

表１にHSP27の精製を示した。尿素を用いないBio-Gelゲル沪過カラムクロマトまでのステップでは、HSP27とαＢクリスタリンは同一フラクションに溶出・分画されてきた。7 M urea存在下のS-SepharoseカラムクロマトでαＢと分離された。約500ｇの筋より16 mgのHSP27が約40%の回収率で精製された。最後のSP-5pwカラムでは、図１に示すように少なくとも２つの蛋白質ピークが溶出された。これらはSDS-PAGEで27kDaの位置に単一バンドを示した。さらにこれらをプロテアーゼAsp-Nで消化し、そのペプチドマップを比べると完全に一致した。図１の溶出profileのheterogeneityはおそらくHeLa細胞で報告されている[1]ように燐酸化の有無あるいは程度に

よると思われた。最初のピークの立ち上がりにshoulderがあるので、それぞれは溶出順にHeLa細胞のHSP27 c, b, a [1]に相当するものと思われた。なお、後述のEIA系への反応性は2種類のHSP27(bとa)間で多少異なった。ヒトのHSP27は、HeLa細胞より精製された報告[1]があるのみで、正常組織からの精製は本報告が最初である。最終標品の免疫活性が低い（約80%）のは、EIA系のスタンダードとして免疫活性の最も高いHSP27、すなわち図1の後半のピーク分画(a)、を用いているためである。最終標品は三成分の混合物であるが、SDS-PAGEでは単一バンドを示した。

精製HSP27の抗血清をウサギで得、特異抗体を精製してイムノアッセイ系を確立した。3pgの微量のHSP27が測定できた（図2）。測定系はラットおよびウシ低分子量HSPとは僅かしか交差反応しなかった。この測定系を用いて測定したヒト組織におけるHSP27の濃度分布を図3に示した。横紋筋、平滑筋組織および心筋に多く分布するが、神経系を含む他の組織にも広く分布することが分かった。

ヒト骨格筋、ウシ骨格筋、ウシ脳幹、およびラット腎のホモジェネート遠心上清を抗αB抗体結合セファロースカラムにかけて、結合したαBを溶出精製すると、ラット腎以外の組織ではαB以外に26-27kDaの蛋白質が濃縮精製されてきた、これらは抗ヒトHSP27抗体と反応することがWeatern blotsで分かった。逆に抗HSP27抗体結合カラムにヒト骨格筋抽出液を流し、カラムに結合したHSP27を溶出するとHSP27以外にαBも濃縮精製されてくることも分かった。以上の事実は細胞内ではαBはHSP27とcomplexを形成して存在していることを強く示唆するもので、非レンズ組織に存在するαBクリスタリンの生理活性を知る上で重要な手がかりとなる。

文献

1. Arrigo, A-P. and Welch, W.J. (1987) J. Biol. Chem. 262, 15359-15369.
2. Schlesinger, M.J.J. (1986) Cell Biol. 103, 321-325.
3. Kato, K., Shinohara, H., Kurobe, N., Inaguma, Y., Shimizu, K. and Ohshima, K. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1074, 201-208.

Fig. 1. Elution profile of HSP27 from SP-5pw column

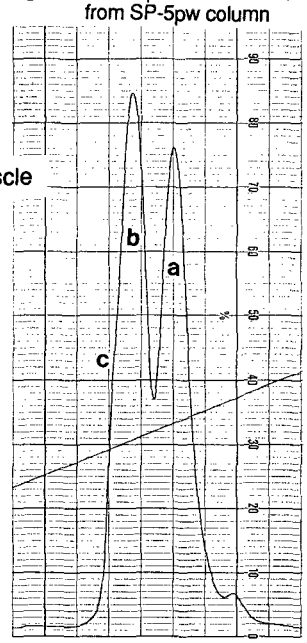


Table 1. Purification of Immunoreactive HSP27 from Human Skeletal Muscle

Fractions	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Immunoreactive HSP27 total (mg)	specific (μg/mg protein)	yield (%)
Crude extract	2060	16500	35.2	2.1	100
$(NH_4)_2SO_4$ (0-40%)	230	1780	33.3	18.7	95
DEAE-Sepharose	230	237	29.0	122	82
Bio-Gel A-5m	68	127	21.8	172	62
S Sepharose HP	19	33.6	17.0	506	48
Superdex 75pg	15.8	17.4	14.0	807	40
Sp-5pw	12.5	16.4	13.3	810	38

Frozen pectoral muscles (506g) obtained at surgical operation were used.

Fig. 2. Standard curve for the assay of HSP27

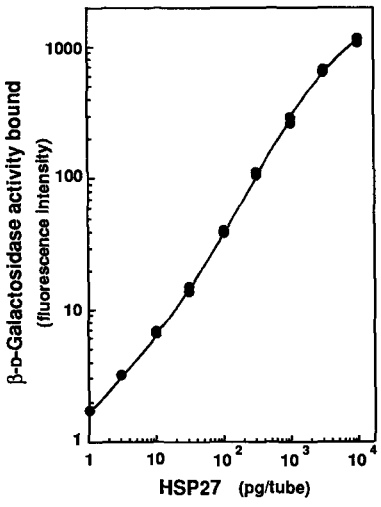
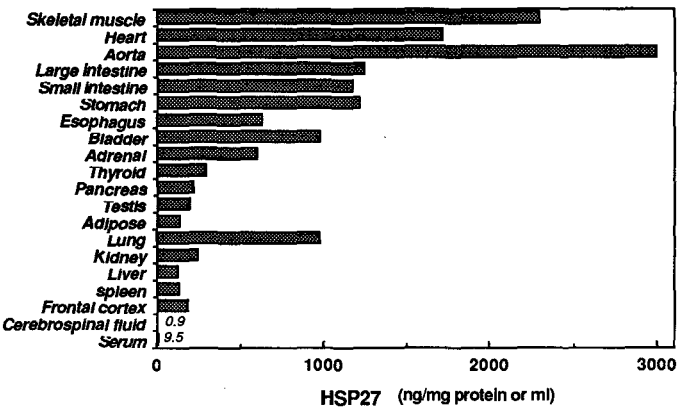


Fig. 3. Concentrations of HSP27 in various human tissues



172 熱ショックによるグリオーマ細胞中のαBクリスタリンとHSP27の動態について

稲熊 裕、篠原春夫、後藤幸代、加藤兼房
（愛知県コロニー・研・生化）

〔要約〕
1)各種培養細胞株の可溶性分画中のαBクリスタリンをイムノアッセイ法により定量したところ、グリオーマ細胞(U251, GA-1)、筋芽細胞(G8)などに存在することが分かった。
2)GA-1細胞（ラットグリオーマ）において、αBクリスタリンは増殖期に高濃度（蛋白量当り）に存在し、細胞が confluentな状態では低濃度であった。
3)GA-1細胞に熱ショック（45℃、15分間）をかけると可溶性分画中のαBクリスタリンは急速に減少した。数時間を経て回復し、その後は対照群よりも高い値となった。
4)熱ショックをかけた直後の GA-1細胞を可溶性分画と不可溶性分画とに分け、各々の分画に含まれるαBクリスタリンを定量すると、可溶性分画中のαBクリスタリンが減少するのに対し、不可溶性分画中のαBクリスタリンは増加していることがわかった。この事実は Western Blotでも確かめられた。
5)U251細胞（ヒトグリオーマ）に熱ショックをかけた場合、GA-1細胞と同様に可溶性分画中のαBクリスタリンは減少した。また、同時にヒト低分子量HSP27を測定したところ、同様に可溶性分画中のHSP27も減少することが観察された。
以上の結果より、αBクリスタリンは熱ショック（ストレス）蛋白質としての特徴をもち、その細胞内局在の状態または変化は低分子量HSP27に類似し、細胞内で連関している可能性が示唆された。

αBクリスタリンはレンズに最も豊富に存在する蛋白質であるが、レンズ以外の中枢神経系、筋肉系組織などにも存在している[1]。αBクリスタリンが低分子量熱ショック蛋白質(HSP)との間にアミノ酸配列の相同性がある[2]ことが指摘されて以来、最近は、両者は遺伝子発現の制御機構の上でも類似していることが報告された[3]。今回、我々は既に開発したαBクリスタリンのイムノアッセイ法[1]を用いて培養細胞の熱ショック処理後の経時的な変化を定量的に観察した。

実験方法と材料

細胞培養： 各培養細胞は 10%ウシ胎仔血清加ダルベッコ変法イーグル培養液を用いて 37℃、5%CO_2インキュベータで培養した。細胞は $2x10^5$個／35 mm 培養皿または $1.6x10^6$個／100 mm 培養皿をまいて、2日後に熱ショック処理した。

熱ショック処理および試料の調製： 熱ショック処理は、培養皿をパラフィルムで密閉し、一般的な条件である45℃、15分間恒温槽にて行った。細胞は、実験後速やかに培養液を除き、リン酸緩衝液(PBS)で3回洗った後培養皿ごと -80℃に使用時まで保存した。解凍時に 50 mM Tris-HCl5 mM EDTA, pH 7.5 (TE)を 0.2 - 0.5 ml (35 mm - 100 mm 培養皿）を加え、細胞を剥し、エッペンドルフチューブに集め、超音波で破砕した。12000 x g, 30分間、4℃遠心後上清（可溶性分画）と沈渣（不可溶性分画）とに分け、不可溶性分画は、150 μlのTEで一度洗ってから、各々の分画を -20℃に保存、または直ちにイムノアッセイ等に用いた。不可溶性分画はSDS-PAGEのサンプルバッファーを80 μl加え、超音波処理によって溶解し、αBクリスタリンのイムノアッセイおよび SDS-PAGE/Western blotに用いた。イムノアッセイでは不可溶性分画試料を10倍または100倍に希釈して測定した。この条件下ではSDSによるアッセイ系への影響は認められず、不可溶性分画中のαBクリスタリンを測定することができた。

ショ糖濃度勾配分画： 細胞の可溶性分画 200 μlを 10-40 %のショ糖濃度勾配(3.5 ml/tube, 120000 x g, 4℃, 16 h)にかけ、15のフラクションに分けた。各フラクションの 10 μlを用いてαBクリスタリンを測定した。

αBクリスタリンとヒトHSP27のイムノアッセイ： αBクリスタリンの測定はすでに報告した方法[1]を用いた。HSP27の測定は前演題で報告した方法[4]を用いた。αBクリスタリンの測定系は、ヒト、ウシ、ラット、マウス等のαBクリスタリンと交差測定できたが、HSP27の測定系はヒトに特異的でラットおよびウシなどの低分子量HSPとの反応性は低かった。

結果

培養細胞中のαBクリスタリン濃度は表1に示した。この結果より熱ショックの実験には主に GA-1細胞または U251細胞を用いることとした。GA-1細胞 $5x10^4$/35 mm 培養皿にまいた場合、αBクリスタリンは細胞の増殖期に最も高値を示し、細胞が cofluentな状態になると減少した（図1）。GA-1細胞に熱ショックをかけると可溶性分画中のαBクリスタリンは急速に数分の1に減少した。しかし、数時間後には元のレベルに回復し、さらに上昇して約10時間後には対照群を上回った（図2）。熱ショックを 45℃で、1, 5, 10, 15分間かけた直後の可溶性分画中のαBクリスタリンは、熱ショック直前 2540 ng/mg proteinであったものが 2360, 1530, 612, 298 ng/mg proteinと急速に下降した。この傾向は細胞数当りでも同じであった。45℃、1-15分間の熱処理後の可溶性成分をショ糖濃度勾配により分画すると、αBクリスタリンの沈降位置の著明な移動はなかったが、熱ショックの時間とともにαBクリスタリンのピークの低下がみられた。熱ショックによる可溶性分画中のαBクリスタリンの減少は G8細胞においても観察された。GA-1細

胞に熱ショックをかけた場合、可溶性分画中のαBクリスタリン（蛋白量当り）は上記のように約 1/8-1/9に減少した。ところが、同一サンプルの不可溶性分画中のαBクリスタリンは約10倍上昇していた（表2）。この結果はWestern blotでも確かめられた（図3）。U251細胞に熱ショックをかけた場合も GA-1細胞と同様に可溶性分画中のαBクリスタリンは、13.6 ± 0.6 ng/mg protein (n = 4)から熱ショック後 3.9 ± 0.3 ng/mg protein (n = 4)に減少した。また、同時に測定したHSP27も 841 ± 47 ng/mg protein (n = 4)から 369 ± 63 ng/mg protein (n = 4)に減少した。

考察

αBクリスタリンは非レンズ組織（中枢神経系、筋肉系など）にも存在し、低分子量HSPとして働いている可能性がある。U251細胞で熱ショック後のαBクリスタリンとHSP27を同時に測定したところ両者はともに可溶性分画中から減少した。αBクリスタリンとHSP27は複合体を形成している可能性があり[4]、熱ショック（ストレス）時の両者の応答には同じ機構が働いているかもしれない。

参考文献

[1] K. Kato et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta, 1074, 201-208.

[2] T.D. Ingolia and E.A. Craig (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 2360-2364.

[3] R. Klemenz et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88, 3652-3656.

[4] K. Kato et al., (1991) 第34回日本神経化学会大会論文集.

表1　confluentな状態の各種の培養細胞中のαBクリスタリン

細胞株		αBクリスタリン (ng/mg protein)
GA-1	(rat glioma)	16.4 ± 0.532
U251	(human glioma)	13.6 ± 0.568
G8	(mouse myoblast)	2.61 ± 0.286
C6	(rat glioma)	0.663 ± 0.122
NG108-15	(hybrid cell of neuroblastoma and glioma)	0.475 ± 0.179
MG178	(human glioma)	not detected
T98	(human glioma)	not detected

表2　可溶性および不可溶性分画中のαBクリスタリン

		不可溶性分画 (pg/μl)	可溶性分画 (ng/mg protein)
実験1	対照	105	2500
	熱ショック	1100	280
実験2	対照	99.5	2380
	熱ショック	1050	293

図1

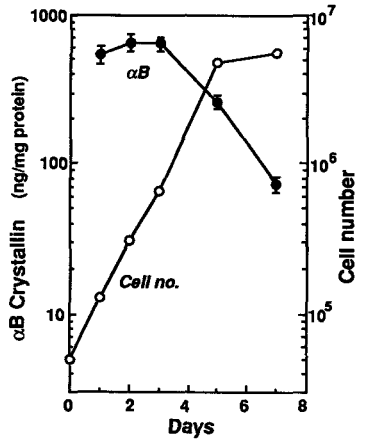


図2

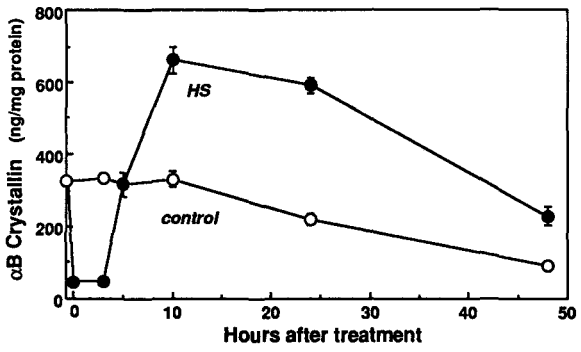
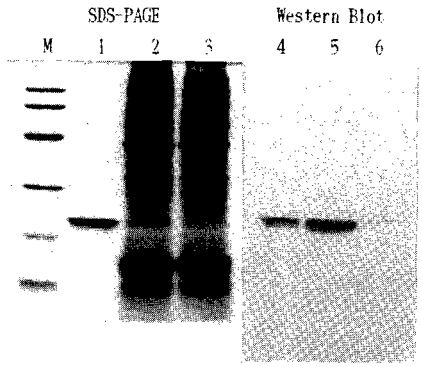


図3　Western Blotによる不可溶性分画中のαBクリスタリンの検出



M:　分子量マーカー
1:　精製ウシαBクリスタリン、1 μg
4:　精製ウシαBクリスタリン、100 ng
2 & 5:　熱ショック処理した細胞の不可溶性分画
3 & 6:　対照の細胞の不可溶性分画

173 スフィンゴ脂質活性化蛋白質前駆体の精製と性質

近藤 啓次○、佐野 輝、日根野 尚、上野 修一、柿本 泰男
愛媛大学医学部神経精神医学教室

〔要約〕
Prosaposin はスフィンゴ脂質活性化蛋白質 (saposin) の前駆体蛋白質であり、脳や筋肉に豊富に存在し、脳脊髄液に多量に分泌されている。今回我々は、monospecific な抗ウシSAP-2 抗体で作成したアフィニティークロマトグラフィーを用いてProsaposin を、ヒト母乳中より単離精製した。精製したProsaposin はグルコセレブロシダーゼに対して極めて弱い Saposin-C 活性を持っていた。Trypsin 処理によりSaposin-C 活性が著明に増加し、Western blotting においても Saposin が生じていることが確認された。

[はじめに] 糖脂質の代謝にかかわる種々の水解酵素の活性制御には活性化蛋白質が関与していることが知られている。この活性化蛋白質の一種であるグルコセレブロシダーゼ活性化蛋白質 (Saposin-C) は著者らが世界に先駆けて単離しそのアミノ酸配列を決定した酸性低分子蛋白質であり[1]、近年この蛋白質の前駆体蛋白質 (Prosaposin) の存在が核酸レベルから報告された[2]。この前駆体蛋白質はSaposin-B（スルファターゼ活性化蛋白質）、Saposin-C を始め構造的に非常に良く似た4種の活性化蛋白質をドメインとして持つ高分子蛋白質である。さらに、Prosaposin は精巣のセルトリ細胞から精細管に分泌される硫化糖蛋白質 (SGP-1) と同一蛋白質と考えられている[3]。SGP-1 は精子形成の分化過程に関与する物質として重要視されており、分泌された精細管内にて細胞膜表面に何らかのシグナルを与え制御機能を担っていると考えられる。Prosaposin が脳や筋肉組織に豊富に分布し、細胞内でリソゾームへ移行してSaposin にプロセスされる以外に、Prosaposin 自身が細胞外へ分泌されることを我々は最近証明してきた[4][5]。

[方法] ヒト母乳から Prosaposin 確認の指標として Western blotting を用い精製を行なった。まず、遠心分離により脂質層を除いた後、硫安塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過を行なった。そして、monospecific な抗ウシ Saposin-C 抗体[4]を Affi-Gel Hz (Bio-Rad) に固定化して作成したイムノアフィニティークロマトグラフィーを用いて単離精製した。ヒト胎盤より均一なグルコセレブロシダーゼを精製し[6]、この酵素に対する Prosaposin と4種の Saposin の活性化能を、4-MU-β-D-glucosideを基質として測定した[7]。Prosaposin を Trypsin を用いて切断し、産物の Western Blotting と上記酵素に対する活性化能を測定した。グルコセレブロシダーゼの活性化の測定に用いたSaposin-A, B, C, およびD はGaucher 病患者脾臓から Morimoto らの方法[8] に基づき精製した。

[結果と考察] 精製されたProsaposin は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上単一であり抗ウシ Saposin-C 抗体を用いた Western Blotting においても単一なバンドであった（図1）。 さらにN 末端からのエドマン式アミノ酸配列決定法では、cDNA から予想されるアミノ酸配列の N 末端から17番目のグリシンから始まる配列が確認された。すなわち、その部位でシグナルペプチドが切断されていることが判明した。精製標品のアミノ酸分析値は期待値とほぼ一致した。

Prosaposin はグルコセレブロシダーゼに対して若干の活性化能 (図2) を示したが、Saposin-C のそれと比較すると無視できる程度であり、生体内における Prosaposin による酵素への活性化はほとんどないといえる。Trypsin 処理により Prosaposin は切断を受け、Saposin が生じ（図3）、それに伴いグルコセレブロシダーゼに対する活性化能も増大した（図3）。cDNA から予想されるアミノ酸配列から4種の Saposin は塩基性アミノ酸に両端をはさまれた形になっており、今回の実験では、それらの部位において切断を受けたと考えられる。分泌型の Prosaposin でも in vitro において切断され、Saposin へとなりうることがわかった。リソゾーム内においても、基質特異性が Trypsin に類似するエンドペプチダーゼにより Prosaposin

が Saposin へとプロセスされると考えられる。

[文献]

1. Sano A. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 19597-19601
2. O'Brien J. S. et al. (1988) Science 241,1098-1101
3. Collard M. W. et al. (1988) Biochemistry 27, 4557-4564
4. Sano A.et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. 165, 1191-1197
5. Hineno T. et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm. 176, 668-674
6. Choy F.Y.M. (1986) Anal. Biochem.156, 515-520
7. Sano A. and Radin N. S. (1988) Biochem. J. 254, 297-300
8. Morimoto S. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3389-3393

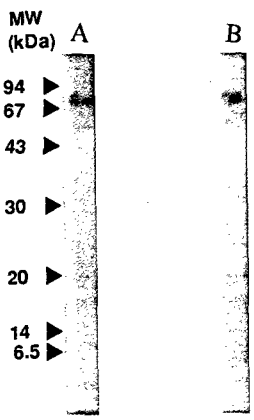


図1．最終精製 Prosaposin の蛋白染色 (A) と Western blotting (B)

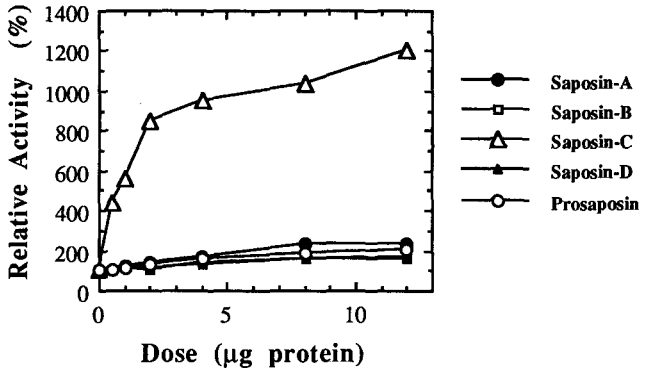


図2．グルコセレブロシダーゼに対する Prosaposin と各 Saposin の影響

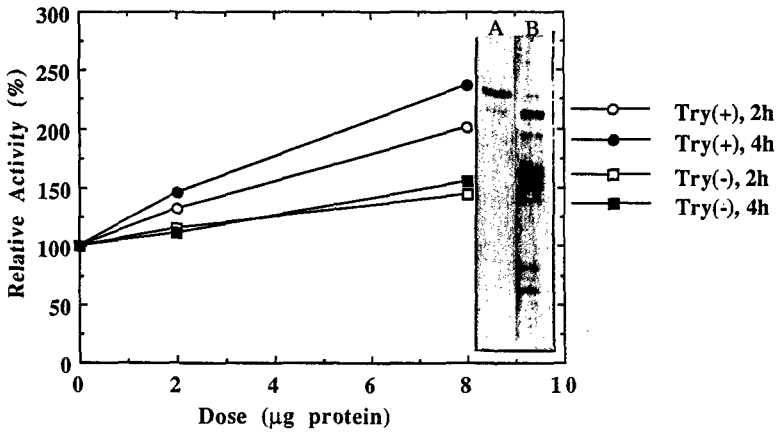


図3．Trypsin 処理後の saposin-C 活性と Western blotting
Lane A : Trypsin 処理前, Lane B: 4h Trypsin 処理の Prosaposin に対する Western blotting

174 マウス胎仔大脳皮質細胞表面のガラクトース転移酵素の性質について

宮村毅[1]、森田規之[1]、池中一裕[1]、加藤郁之進[2]、御子柴克彦[1][3]
([1]大阪大・蛋白研、[2]宝酒造、[3]東大・医科研)

〔要約〕
昨年度本大会において大脳皮質形成期のニューロブラストの移動に、細胞表面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結果を報告したが(1)、今回はマウス胎仔脳細胞表面のガラクトース転移酵素の構造と性質について検討した。我々の確立したマウス胎仔大脳皮質スライス培養法を用いたin situ ガラクトース転移反応はα-ラクトアルブミンやN-アセチルグルコサミンオリゴマーなどでは阻害されなかった。このことは、大脳皮質の細胞表面ガラクトース転移酵素が、従来知られているβ1-4 ガラクトシルトランスフェラーゼとは異なる性質のものであることを示唆している。また、ガラクトース転移産物の解析の結果、ガラクトースは、糖蛋白質のN-グリコシド型糖鎖と糖脂質糖鎖とに転移していることが示された。

【緒　言】
細胞表面のガラクトース転移酵素(GalT)は、基質糖鎖との相互作用を通じて、細胞間認識や細胞の接着、移動に深く関与していることが数多く報告されている。神経系の細胞においても、Neural crest cellやPC12 cellの細胞表面GalTの存在が示され、これらの細胞の移動や、突起伸展にGalTが関与していることが示唆されている(2,3)。また近年、脳皮質構築に異常のあるreelerミュータントマウスにおいて、脳内のGalT活性の低下が報告され(4)、それ以降我々は、大脳皮質形成期のニューロブラストの移動における細胞表面GalTの関与について検討してきた。

我々は、大脳皮質形成期のニューロブラストの移動をin vitroで再現できるマウス胎仔の大脳皮質スライス培養法を確立しており(5)、この系を用いて、1)マウス胎仔大脳皮質の細胞表面にGalTが存在すること、2)ニューロブラスト移動の早い段階への細胞表面GalTの関与が示唆されること、を昨年度本大会で報告した(1)。

今回我々は、各種薬物による内因性基質へのガラクトース転移阻害の検討、さらに内因性ガラクトース受容物質の構造の解析をおこない、大脳皮質の細胞表面GalTの性質を検討した。

【方　法】
1)スライス系でのGalT活性測定：E16(プラグ確認日をE0とする)ICRマウス胎仔脳を取り出し、既に報告した方法(1)で、スライスへの標識ガラクトースの取り込みを測定した。各種薬物は予め培養液に添加して用いた。

2)マウス胎仔脳における細胞外ガラクトース受容物質の調製：ガラクトース供与体として UDP-D-[U-^{14}C] Galactose (Amersham)をもちい、1)と同様の方法で、37℃、5時間培養した。スライスを洗浄後、超音波破砕した。破砕液よりクロロホルム／メタノールで脂質を抽出し、その抽出残さを蛋白質画分とした。脂質画分は、減圧濃縮の後、クロロホルム／メタノール抽出で脱塩をおこなった。

3)脂質画分におけるガラクトース受容物質の解析：2)で得られた脂質画分を、Silica gel 60 HPTLC (Merck)で展開し、イメージアナライザー(FUJIX)でオートラジオグラフィー解析を行った。

4)蛋白性受容物質の解析：a) GlycopeptidaseF 処理；上述の蛋白質画分をSDS, 2-Mercaptoethanolで変性させた後、0.2M TrisCl(pH8.5),1.25% NP-40,0.16% SDS,0.03M 2-Mercaptoethanolの条件下、GlycopeptidaseF 5mU で37℃、20時間反応した。反応液の10%TCA沈澱物の放射活性を液体シンチレーションで計測した。b)アルカリ処理；蛋白質画分を 0.05N NaOH,1M $NaBH_4$,45℃,20h 処理し、その TCA沈澱の放射活性を計数した。c)ガラクトシダーゼ処理；トリプシン処理した蛋白質画分約0.2mg を β-Galactosidase [Diplococcus Pneumoniae] (Boehringer Mannheim)、β-Galactosidase [Jack Bean] (生化学工業)、α-Galactosidase [Green Coffee Bean] (Sigma)で各々37℃、20時間反応させた。反応液をほう酸ナトリウムを用いた高圧濾紙電気泳動にて展開し、放射活性の遊離をイメージアナライザーで解析した。

【結果と考察】
1)マウス胎仔脳内細胞表面GalTの性質：マウス大脳皮質培養系でのガラクトースの転移は細胞表面に存在するGalTによるものであることは昨年度の本大会で示した。Neural crest cell やPC12細胞の移動、突起伸展に関与しているGalTは、ウシミルク由来のものと同じβ1-4GalT と考えられており、GlcNAcやそのオリゴマー、α-ラクトアルブミンにより、その活性は競合阻害や修飾を受ける(2,3)。しかし、マウス大脳皮質スライスへのガラクトースの転移は、N-アセチルグルコサミンモノマーやオリゴマー、グルコース、α-ラクトアルブミンのいずれの薬物によっても阻害されなかった(図1)。また、このときの培養上清の添加糖へのガラクトースの転移もみられなかった。この結果は大脳皮質の細胞表面GalTは従来から知られているβ1-4GalT とは異なる性質を有することを示唆するものである。

2）ガラクトース受容物質の解析：ラベルしたスライスのSDS-PAGEによる解析より、細胞外マトリックス蛋白質と考えられる分子にガラクトースが転移しており、また、クロロホルム・メタノール抽出画分の TLC分析により、糖脂質にも転移していることが明かとなった（図2）。ガラクトースが転移した糖脂質は、マーカーに用いたガングリオシドとは異なる移動度を示した。これらの構造に関しては、各種グリコシダーゼ消化により、検討をしているところである。蛋白質画分をN-グリコシド型糖鎖を特異的に遊離する GlycopeptidaseFで処理すると、放射活性の遊離が認められたが、アルカリ処理ではほとんど認められなかった（図3）。これは、ガラクトースがN-グリコシド型糖鎖に転移していることを示唆している。トリプシン処理した蛋白質を各種エキソガラクトシダーゼと反応させたところ、Diplococcus 由来のβ-ガラクトシダーゼで放射活性がほぼ定量的に遊離された（図4）。Jack Bean 由来のβ-ガラクトシダーゼでも高濃度では遊離がみられた。Diplococcus の酵素はβ1-4 ガラクトシドのみを、Jack Bean の酵素は β1-3と β1-4ガラクトシドを水解することから、蛋白質へのガラクトースの結合は β1-4結合であことが示唆された。しかし、先に述べたようにスライス系での GalT の活性はGlcNAcやα-ラクトアルブミンで阻害されず、また糖脂質にもガラクトースを転移するので、マウス大脳皮質細胞表面のGalTは新たな性質の β1-4GalTである可能性がある。現在、GalTの構造、ガラクトース受容分子の構造それぞれ両面から解析を行っている。

なおこの研究は、大阪大学理学部、長谷純宏先生、高知医科大学・生理、小川正晴先生との共同で行われたものである。

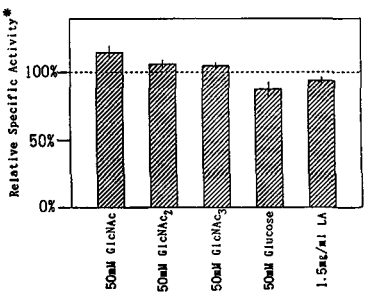


図1　各種薬物による細胞表面
GalTの活性変化
[＊培養液に何も添加しないときの活性
(0.98nmol/mg protein/3h)を100%とした]

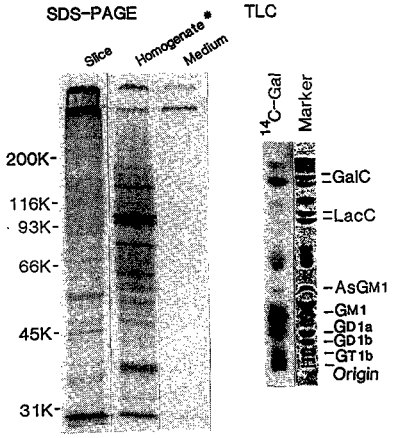


図2　ガラクトース受容分子の解析
[＊ Shurの方法(4)で 大脳皮質をホモジナイズし、反応させた]

		GlycopeptidaseF	Alkali treatment
		(Ovalbumin)	(Mucin)
Control	-	M.W. 45kDa	A490nm 0.26
	+	43kDa	0.17
		(SDS-PAGE)	(Phenol-H_2SO_4)
Slice	-	16900 c.p.m.	63700 c.p.m.
	+	12400 c.p.m.	60700 c.p.m.
	release	27%	5%

図3　ガラクトース受容蛋白質の
デグリコシレーション

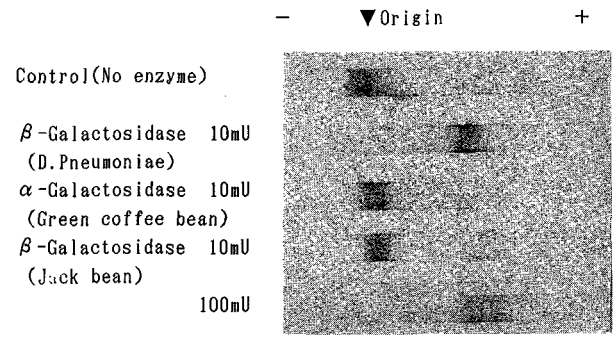


図4　ガラクトース受容蛋白質のGalactosidase消化

【文　献】

(1) 森田規之、池中一裕、御子柴克彦（1990）第３３回日本神経化学会大会論文集　174-175
(2) Runyan, R.B., Maxwell, G.D. and Shur, B.D. (1986) J. Cell Biol. **102**, 432-441
(3) Begovac, P.C. and Shur, B.D. (1990) J. Cell Biol. **110**, 461-470
(4) Shur, B.D. (1982) J. Neurochem. **39**, 201-209
(5) 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

175

ラットアストロサイトのマイクロフィラメント再構成とその組成

伊藤仁一、加藤泰治*、田中亮（名市大・医・生化I、分子医研・生体制御*）

〔要約〕

ラットアストロサイトの形態形成および細胞分化に重要な役割を果たすマイクロフィラメントの構造とその組成を再構成系において検討した。培養ラットアストロサイトを Triton X-100 処理後マイクロフィラメントを可溶化抽出し、in vitro においてアクチンフィラメントを再構成した。ローダミンーファロイジン染色により、再構成されたアクチンフィラメントは 50 mM $MgCl_2$ 存在下でパラクリスタル形成することが認められた。ＳＤＳゲル電気泳動により再構成されたアクチンフィラメントには主要バンドであるアクチン以外に 33, 36, 57 kDa タンパク質などマイクロフィラメント関連タンパク質と考えられる多数のバンドが認められた。また in vitro でのアクチンフィラメント重合は Ca^{2+}イオンにより促進され、16,500 x g、３０分間の遠心で沈降した再構成アクチンフィラメント量は Ca^{2+}イオン存在下において2倍以上に増加した。これらの知見により、アストロサイトのマイクロフィラメント重合あるいは束化が Ca^{2+}イオンにより制御されることが示唆された。

培養ラットアストロサイトは偏平で石垣状の形態を示し、細胞内マイクロフィラメントは束化し強いストレスファイバーを形成する。しかしながらグリア細胞成長因子やｃＡＭＰなどで刺激されると細胞体が収縮し多数のグリア突起が伸展し成熟型アストロサイトへと形態分化する。マイクロフィラメントは形態分化に伴って次第にストレスファイバーが崩壊し、細胞膜裏打ち構造へとその構造を変えていく[1]。

形態分化に伴うマイクロフィラメントの構造変化は細胞内 Ca^{2+}イオンに制御されており、Ca^{2+}イオン濃度の減少に強く依存する[1]。このようにマイクロフィラメントは培養ラットアストロサイトの形態分化に重要な役割を果たしている。

そこで私たちはマイクロフィラメントの構造形成の制御機構を調べるために、培養アストロサイトを Triton X-100 処理後、マイクロフィラメントを可溶化抽出し、10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl により in vitro でアクチンフィラメントを再構成した。さらにＳＤＳゲル電気泳動により再構成アクチンフィラメントの組成を調べ、in vitro におけるアクチンフィラメント重合に影響を及ぼす因子の検討を試みた。

（実験方法）

1. ラットアストロサイトの培養: 髄膜を除去した胎性１６日目のラット胎仔大脳を 0.1% トリプシンで処理し、10% FCS/DMEM 培地にて１週間の一次培養さらに１週間の二次培養を経て培養ラットアストロサイトを調製した[2]。
2. マイクロフィラメント画分の調製: 培養ラットアストロサイトをラバーポリースマンで採取した。これをTris-HCl/saline, pH 7.5,で洗浄後、0.15% Triton X-100/PHEM buffer で２分間処理し、細胞骨格画分として16,000xg, ２０分間の遠心沈澱を得た。PHEM buffer で沈澱画分を洗浄後、2mM Tris-HCl, 0.2mM Na_2ATP, 0.5mM 2-mercaptoethanol, pH 8.0 溶液で可溶化抽出し、100,000xg, １時間の遠心上清をマイクロフィラメント画分とした。
3. アクチンフィラメントの再構成: 抽出されたマイクロフィラメント画分に KCl と $MgCl_2$ をそれぞれ 0.1M および 10mM になるように添加し、

アクチンフィラメント重合を OD.350 nm の吸収にて測定した。またアクチンフィラメントを negative staining し、透過型電子顕微鏡で観察した。再構成アクチンフィラメントの組成についてはアクチンフィラメント重合後、１０万ｘｇ、１時間遠心分離し、沈澱画分を１０％ＳＤＳ－ゲル電気泳動にて分析した。

（実験結果および考察）

ラットアストロサイトより脱重合抽出されたマイクロフィラメントは骨格筋アクチン同様 0.1M KCl および 10mM $MgCl_2$ 存在下でアクチンフィラメントを再構成した（図１）。また 50 mM KCl と 50mM $MgCl_2$ によりアクチンのパラクリスタルを形成した。10% SDS-polyacrylamidegel 電気泳動により、再構成されたアクチンフィラメントには主要タンパクであるアクチンの他に 33, 36, 57 kDa タンパク質などマイクロフィラメント関連タンパクと考えられる多数のバンドが認められた（図２）。また再構成系でのアクチンフィラメントの重合は1 μM $CaCl^2$により促進された。この知見は in vivo におけるアストロサイト細胞内でのCa^{2+}イオン上昇に伴いマイクロフィラメントの束化が促進されストレスファイバーを形成するという我々が得たこれまでの知見を支持した。また再構成アクチンフィラメントにはビメンチンの存在が認められ、中間径フィラメントであるグリアフィラメントとマイクロフィラメントとの相互作用がビメンチンを介して行われていることが示唆された。

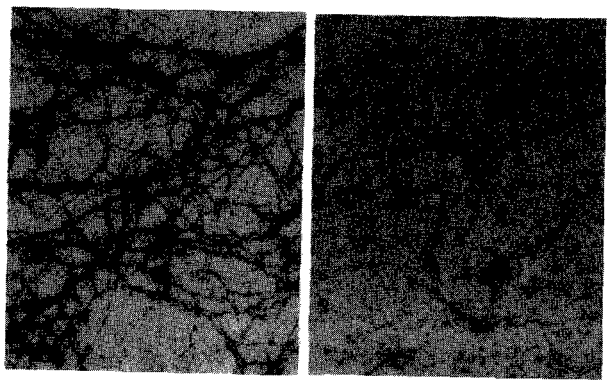


図１　再構成された培養ラットアストロサイトのアクチンフィラメント

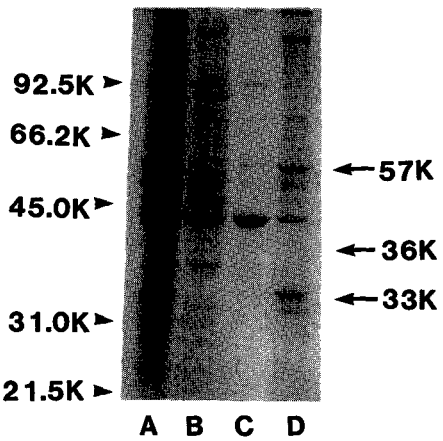


図２　再構成アクチンフィラメントの組成
A：全アストロサイト
B：Triton X-100 可溶性画分
C：再構成アクチンフィラメント
D：細胞骨格残余

（文献）

1. J. Ito et al.,: Neurochem. Int., 16, 133-140, 1990
2. J. Ito et al.,: Brain Res., 243, 309-314, 1982

176 Salsolinolによるトリプトファン水酸化酵素の阻害

太田 深雪[1]、永津 俊治[2]、直井 信[3]
[1]名古屋市大 医 精神科、[2]藤田保健衛生大 総医研、[3]名工大

要約
ヒト体内でドーパミンより生成される1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol, Sal)のトリプトファン水酸化酵素(TPH)活性に対する作用を検討した。mastocytoma P-815より調製した酵素標品を用いたところ光学異性体(R)および(S)Salは共にTPH活性を濃度に依存し阻害した。(R)および(S)のSalの阻害を反応速度論的に解析した結果、基質L-トリプトファン(Trp)に対して非競合的に阻害することが示された。また補酵素(6R)-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterine [6R(BH4)] に関してTPHは親和性の異なる2成分からなることが分かった。Salは親和性の低い成分には競合的に、親和性の高い物には不競合的に阻害した。阻害係数は10から20μMと得られ、(R)および(S)Sal間ではTPHに対する阻害活性に差が認められなかった。ヒト体内で生成されるか食物に由来するSalがインドールアミンに対する内在性または外来性の阻害剤である可能性が示唆された。

目的
Salはヒト体内でドーパミンとピルビン酸あるいはアルデヒドとの縮合によって生成されるアルカロイドである。L-DOPA療法やアルコールの摂取により生成が促進されヒト脳にも存在することから神経毒性を有すると考えられてきた。SalはC-1位の非対称性によって(R)型と(S)型の光学異性体に分類され、健常者の尿や脳脊髄液には(R)型のSalのみが検出されるのに対し、乾燥バナナやワインには(S)型の存在が報告されている(2, 4)。今回我々はSalの(R)および(S)型の光学異性体につき、神経伝達物質の代謝に対する影響をインドールアミン合成系の律速酵素であるTPHの活性への作用から検討した。

方法
TPH酵素としてmastocytoma P-815より可溶化しSephadex G-25でゲル濾過した酵素標品を用いた。TPH活性はL-アミノ酸脱炭酸酵素の阻害剤であるNSD-1015の存在下、L-Trpから生成される5-HTPの量をHPLC-FDにて定量することにより測定した(3)。
(R)および(S)Sal(終濃度1μM-1mM)のTPH活性に及ぼす影響を基質または補酵素を低濃度とした10μM L-Trp, 100μM (6R)BH_4または100μM L-Trp, 10μM (6R)BH_4の2種の条件下で検討した。
阻害の型と阻害係数Ki値は20μM(R)および(S)Salの存在下、基質または(6R)BH_4の濃度を変え活性を測定しLineweaver-Burk法により求めた。

結果
実験にもちいたTPHの反応速度論的性状を表1にまとめた。補酵素(6R)BH_4に対してTPHは親和性の異なる2成分からなっていた。一つはMichaelis定数(Km)と最大速度(Vmax)が共に小さく(高親和成分)で、他はKm, Vmax共に大であった(低親和成分)。
(R)および(S)Salは、低濃度のL-Trpと高濃度の(6R)BH_4の条件下においても(図1A)高濃度のL-Trpと低濃度の(6R)BH_4の条件下においても(図1B)Salの濃度の依存してTPH活性を阻害した。1mMではほとんど完全に酵素活性は阻害された。(R), (S)SalのIC_{50}は基質または補酵素が低濃度の条件で20-40μMと得られた。(R)及び(S)型の光学異性体による差異は認められなかった。
Lineweaver-Burk法により、阻害の型と阻害係数Ki値を求めた。(図2、図3)。(R)および(S)Salは、L-Trpに対して非競合的な阻害を示した。(6R)BH_4に対してはTPHの補酵素に対し親和性の異なる二つの成分をともに阻害した。低親和成分はSalにより競合的に高親和成分は不競合的に阻害された。Ki値を表2に示す。SalによるTPHの阻害は基質に対しても、補酵素に対しても(R)と(S)の間で有意差はなかった。

考察
(R)Salは生体内で生成されるのに対し、(S)Salは飲食物に由来することが知られている(4)。(R)及び(S)Salがin vitroの実験系において等しくTPH活性を阻害したという今回の我々の実験結果から、両光学異性体がインドールアミンの生合成系に影響を及ぼし得ることが示唆された。既にドーパミン由来のSalがドーパミン合成系の酵素、チロシン水酸化酵素(5)とモノアミン酸化酵素(1)を阻害することは知られている。しかしインドールアミンの合成系を阻害することは未だ報告がなかった。内因性と外来性のSalがセロトニン系の阻害剤となりうることは、Salの中枢神経系への作用として意義がある結果と考えられる。

文献

1. Bembenek, M. E., Abell, C. W., Chrisey, L. A., Rozwadowska, M. D., Gessner, W. and Brossi A. (1990) J. Med. Chem. 33, 147-152.
2. Dostert, P., Strolin-Benedetti, M. and Dordain, G. (1988) J. Neural Transm. 74, 61-74.
3. Naoi, M., Hosoda, S., Ota, M., Takahashi, T. and Nagatsu, T. (1990) Biochem. Pharmacol. 41, 199-203.
4. Strolin-Benedetti, M., Belloti, V., Pianezzola, E., Moro, E., Carminati, P. and Dostert, P. (1989) J. Neural Transm. 77, 47-53.
5. Weiner, C. D. and Collins, M. A. (1978) Biochem. Pharmacol. 27, 2699-2703.

表 1 Kinetic properties of TPH sample

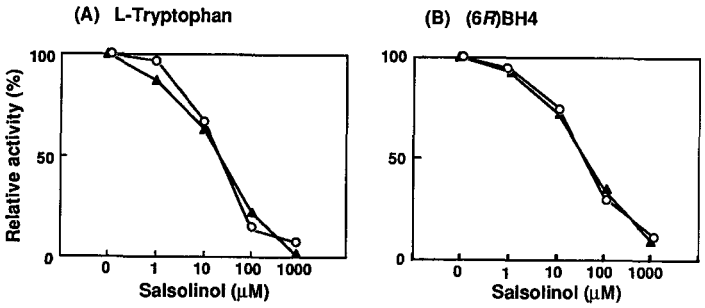
In terms of substrate, L-tryptophan	Km (μM)	Vmax (pmol/min/mg protein)
	14.8 ± 1.7	262 ± 21

In terms of cofactor, (6*R*)BH4	Km1 (μM)	Vmax1 (pmol/min/mg protein)	Km2 (μM)	Vmax2 (pmol/min/mg protein)
	5.04 ± 0.52	93.4 ± 14.2	127 ± 27	437 ± 137

表 2 Ki values of (R) and (S) salsolinol

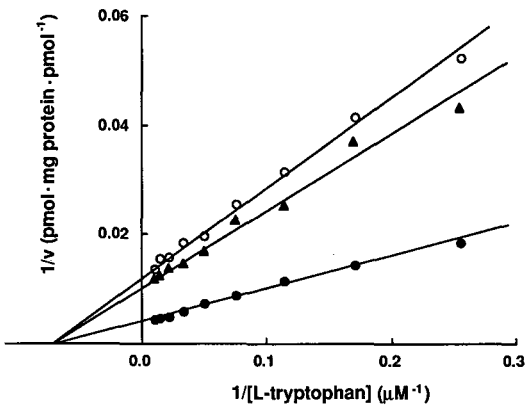
	Type of inhibition	Ki (μM) (R)Salsolinol	(S)Salsolinol
L-Tryptophan	noncompetitive	15.4 ± 5.3	19.9 ± 6.8
(6*R*)BH4	competitive	12.0 ± 4.6	19.0 ± 4.9
	uncompetitive	12.5 ± 2.4	17.4 ± 4.9

図 1



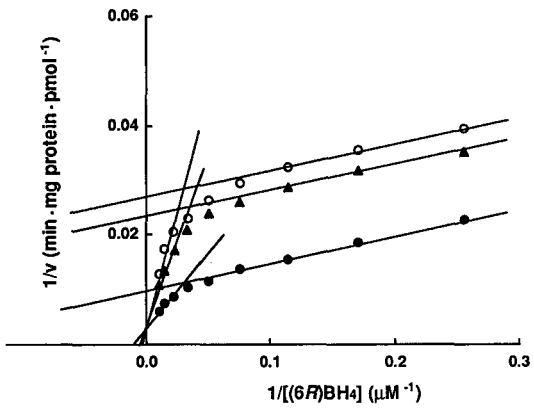
(○), (*R*) salsolinol; (▲), (*S*) salsolinol

図 2



(●), Control; (○), (*R*) salsolinol; (▲), (*S*) salsolinol

図 3



(●), Control; (○), (*R*) salsolinol; (▲), (*S*) salsolinol

177 クロマフィン細胞の開口放出に対する58kD蛋白（p65，シナプトタグミン）抗体の影響

村松　俊、今泉美佳、熊倉鴻之助、高橋正身*

（上智大学・生命研・神経化学、*三菱化成生命研）

〔要約〕

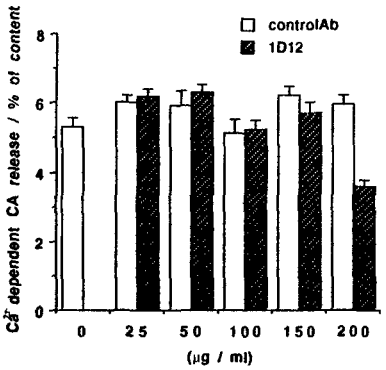
58kD蛋白（p65，シナプトタグミン）は中枢及び末梢神経細胞のシナプス小胞及び前シナプス膜に局在する糖蛋白質で、CキナーゼやCaMキナーゼIIによって速やかにリン酸化されることが知られている。我々は牛副腎髄質細胞におけるCa^{2+}やCキナーゼを介する神経伝達物質の開口放出機構への58kD蛋白の関与を調べるため、58kD蛋白に特異的なモノクローナル抗体（1D12抗体）をleaky細胞に導入し、Ca^{2+}依存性のカテコールアミン（CA）放出に対する影響を検討した。ジギトニン処理により調製したleakyクロマフィン細胞に1D12抗体を添加しCa^{2+}依存性のCA放出を調べたが放出量に大きな変化は見られず、58kD蛋白はCa^{2+}依存性のCA放出に密接な関与はしていないことが考えられた。またleakyクロマフィン細胞ではCキナーゼ活性化物質のホルボール・エステル（TPA）がCa^{2+}依存性のCA放出を増大させることが知られているので、あらかじめ1D12抗体で処理しておいたleaky細胞にTPAを添加し放出の変化を検討した。その結果TPAによるCA放出増強は有意に抑制され、TPAがCa^{2+}依存性のCA放出を増大する機構には58kD蛋白が何らかの形式で関与する可能性が示唆された。

クロム親和細胞における開口放出では神経終末と同様に顆粒と形質膜の結合及び融合に何らかの膜蛋白が、いわゆる docking and fusion protein として関与することが示唆されているがその実態は不明である。58kD蛋白（p65，シナプトタグミン）はシナプス小胞、前シナプス膜に局在することから神経終末における docking and fusion protein の候補と考えられているが[1]、最近高橋らは58kD蛋白に特異的なモノクローナル抗体1D12抗体を用いてこの蛋白がクロマフィン顆粒にも多量に局在すること、および58kD蛋白はCキナーゼやCaMキナーゼIIによってリン酸化されることを見いだした[2,3]。このことから58kD蛋白がクロマフィン細胞においても docking and fusion protein として働く可能性が考えられる。1D12抗体はクロマフィン顆粒の58kD蛋白を認識することが明かであるので、本実験ではこの抗体を用いてクロム親和細胞における開口放出への関与を検討した。58kD蛋白のCa^{2+}依存性の開口放出機構への関与を調べるために、ジギトニン処理によるleakyクロマフィン細胞に58kD蛋白に特異的なモノクローナル抗体である1D12抗体を添加し、Ca^{2+}依存性のCA放出の変化を検討した。また58kD蛋白のCキナーゼによるリン酸化とTPA添加による放出増強の関係を調べるために、1D12抗体で前処理したleaky細胞にTPAを添加し、TPAのCa^{2+}依存性CA放出の増強作用に1D12抗体がどのような影響を与えるのか検討を行った。

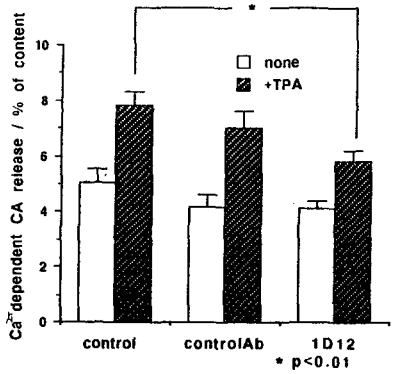
［実験方法］　クロマフィン細胞は牛副腎髄質から既報のように調製し、10％牛胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium 中で単層培養した[4]。実験には培養 4～10 日の細胞を用いた。leaky細胞の調製及びleaky細胞からのCA放出の測定には、まず培養細胞を Ca^{2+}-free Locke's液で洗浄後、ジギトニン buffer (10 μM digitonin, 140 mM Na-glutamate, 20 mM PIPES, 5 mM glucose, 5 mM EGTA, pH 6.8)に置き換え、37℃、10 分間incubation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]。

1D12抗体は高橋らによってヒヨコシナプス膜から得られたモノクローナル抗体であり、この抗体が認識する58kD蛋白はcDNA解析の結果、p65（シナプトタグミン）であることが明らかになっている[6]。本実験では1D12抗体をジギトニン buffer中に任意の濃度で添加した。TPA（sigma）はジギトニン処理の開始から7分後と、Ca-EGTA buffer 中にそれぞれ10^{-7}Mになるように添加した。control抗体としてシナプトフィジンに特異的なモノクローナル抗体を用いた。

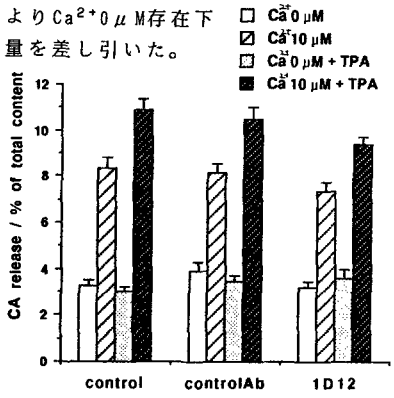
[結果および考察]　1D12抗体の濃度を25μg/mlから200μg/mlまで上げていくと200μg/mlの濃度でCa^{2+}依存性のCA放出は約30%減少するが大きく放出を抑えることはなかった（図1）。leakyクロマフィン細胞のCa^{2+}依存性のCA放出に対して1D12抗体は効果的に放出を抑制しないことから、58kD蛋白は放出機構に大きな関与をしてないことが推察された。一方、TPAによるCa^{2+}依存性のCA放出の増強は1D12抗体100μg/mlによって約40%の有為な抑制を受けた。control抗体によってもTPAの作用は抑制される傾向がみられたが有意な差は見られなかった（図2）。なお、contorl抗体、1D12抗体のいづれもCa^{2+}非依存性のCA放出には全く影響を及ぼさない（図3）。TPAはCキナーゼの活性化を介して、Ca^{2+}依存性のCA放出を増強することが知られているが、その機構は不明な点が多い。1D12抗体がTPAによるCA放出の増強に有意な抑制を示したことから、58kD蛋白のCキナーゼによるリン酸化がTPAの増強作用に関与する可能性が示唆される。これらの点は今後更にポリクローナル抗体等を用いて明確にする必要が有ろう。



（図1）Ca^{2+}依存性CA放出に対する1D12抗体の影響
各値はCa^{2+}10μM存在下の放出量よりCa^{2+}0μM存在下の放出量を差し引いた。



（図2）TPAの添加によるCa^{2+}依存性CA放出増大に対する1D12抗体の影響
Ca^{2+}依存性放出は図1と同様にして求めた。
（TPA：100nM，1D12：100μg/ml，controlAb：100μg/ml）



（図3）Ca^{2+}非依存性ならびに依存性CA放出に対する1D12抗体の影響
（TPA：100nM，1D12：100μg/ml，controlAb：100μg/ml）

[文献]
1. Sudhof, T.C. and Reinhard, J. (1991) Neuron 6, 665-677
2. Arimatsu, Y., Fujita, S., Kondo, S., Miyamoto, M., Fujimoto, Y., Kudo, J. and Takahashi, M. (1989) 7th international NCP Conference, Abstract 372
3. Takahashi, M., Arimatsu, Y., Fujita, S., Fujimoto, Y., Kondo, S., Hama, T. and Miyamoto, E. (1991) Brain Reserch, in press
4. Kumakura, K., Ohara, M., Sato, G.P. (1986) J. Neurochem. 46, 1851-1858
5. Ohara-Imaizumi, M., Takeda, K., Kawae, K., and Kumakura, K. (1990) Neurosci. Lett. 110, 167-171
6. 星野歳三、佐藤一紀、有松靖温、宮本真美、笠井陽子、高橋正身　(1990) 第13回日本分子生物学会大会要旨集 307

178　ウシ脳の新しいカルシウム結合タンパク質(neurocalcin)の精製とその性質

寺澤　求、小林良二、日高弘義
（名大・医・薬理）

［要約］
新規合成したカルモデュリンアンタゴニスト（Ｗ－７７）をリガンドとした疎水性クロマトグラフィーにより、ウシ脳細胞質画分より分子量２３－２４ｋＤａのカルシウム結合タンパク質が精製された。このタンパク質はＳＤＳ電気泳動上、あるいは等電点電気泳動上、２－３本のバンドとして認められ、これらはC_{18}逆相カラムクロマトグラフィーによって部分的に分離精製でき、分子量２３ｋＤａを示すα，β、２４ｋＤａを示すγ，δの４種のアイソプロテインの存在することがわかった。さらに、酵素消化断片より部分アミノ酸配列を決定したところ３ヶ所にＥＦ-hand構造が見られた。homology searchの結果、このタンパク質はこれまでに報告のない新しいタンパク質であり、網膜光受容体から最近発見されたカルシウム結合タンパク質であるvisininとrecoverinにそれぞれ３９．３%、４６．０%の相同性を示した。このカルシウム結合タンパク質は脳および網膜で検出されることから、我々はこれをneurocalcinと命名した。

［目的］
細胞内カルシウム濃度の上昇に伴う細胞反応には一連のカルシウム結合タンパク質が深く関与していることが知られている。これまでに我々は、当教室において創製されたカルモデュリンアンタゴニストをアフィニティーリガンドとして種々のＥＦ-hand型カルシウム結合タンパク質の精製に利用してきた(1，2)。今回、我々はウシ脳におけるカルモデュリンとは異なったカルシウム結合タンパク質を介する調節系についての検討をおこなった。新規合成したカルモデュリンアンタゴニスト（Ｗ－７７）をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより、ウシ脳のＥＧＴＡ抽出画分から分子量２３－２４ｋＤａの新しいカルシウム結合タンパク質を発見した。このタンパク質は中枢神経系の情報伝達系において重要な役割を果たしていると考えられたので、その性質を検討した。

［方法］
ウシ脳を２ｍＭ ＥＧＴＡ 存在下にホモジネートとし、その10000×g上清に１ｍＭ 塩化カルシウムを加えた標品をＷ－７７アフィニティーカラムに適用し、５ｍＭ ＥＧＴＡ による溶出を行なった。得られた画分をC_{18}逆相クロマトグラフィーによってさらに精製した。それぞれの精製標品について酵素（Ｖ８プロテアーゼまたはリジルエンドペプチダーゼ）消化断片よりプロテインシークエンサー（ＡＢＩ　４７３Ａ）を用いて部分アミノ酸配列を決定した。

［結果］
Ｗ－７７アフィニティークロマトグラフィーによってウシ脳から２３－２４ｋＤａのカルシウム結合タンパク質が精製され（図１）、さらにC_{18}逆相カラムクロマトグラフィーによって４つ（α、β、γ、δ）のアイソプロテインに分離された（図２）。決定された部分アミノ酸配列より、ウシ脳より精製されたカルシウム結合タンパク質は、３ヶ所にＥＦ-hand構造を有する新しいカルシウム結合タンパク質であり、高い相同性を示す４つのアイソプロテインであることがわかった。

［考察］

最近、網膜光受容体におけるカルシウム依存性の環状ヌクレオチド代謝の調節機構が解明されつつあるが、脳におけるそのメカニズムについては未だ充分には解明されていない。neurocalcinの生理的機能については検討中であるが、その一次構造から脳における環状ヌクレオチドの代謝調節に何らかの関わりをもつと考えられる(3-5)。neurocalcinの発見により、中枢神経系におけるカルモデュリン系以外の新しいカルシウム情報伝達系の存在が示唆された。

［文献］

1. Endo, T. et al (1981) J. Biol. Chem. 256, 12485-12489
2. Tokumitsu, H. et al (1991) Arch. Biochem. Biophys. 288, 202-207
3. Yamagata, K. et al (1990) Neuron 2, 469-476
4. Kawamura, S. et al (1991) Nature 349, 420-423
5. Dizhoor, A. M. et al (1991) Science 251, 915-918

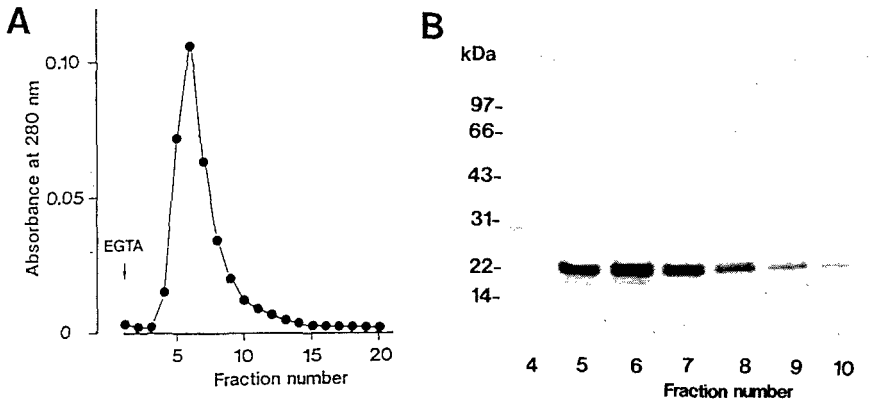


図1　W－７７アフィニティーカラムによる溶出パターン(A)とＳＤＳ－ＰＡＧＥ(B)

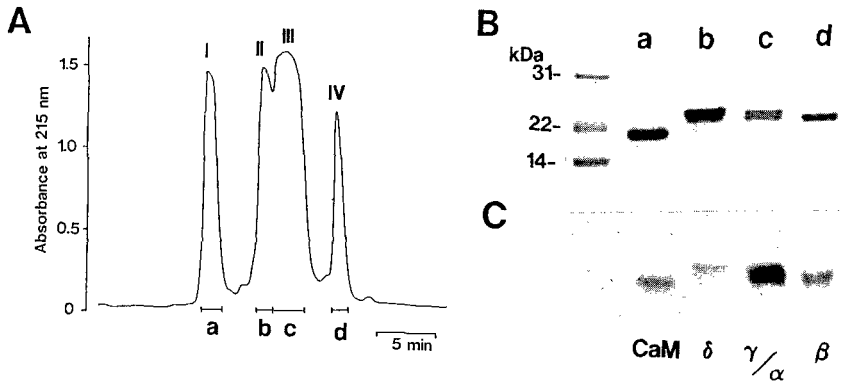


図2　neurocalcin アイソプロテインのC$_{18}$逆相カラムクロマトグラム

Ｗ－７７アフィニティークロマトグラフィーによって得られた画分について逆相ＨＰＬＣ(0.1%トリフルオル酢酸存在下、0－60% アセトニトリル）にて分離した(A)。neurocalcin はピークII－IVとして溶出された(ピークＩ：カルモデュリン)。各ピークに対応する画分(a－d)についてのＳＤＳ－ＰＡＧＥ(B)および^{45}Caオートラジオグラム(C)。

a：カルモデュリン、b：neurocalcin　δ、c：neurocalcin γ(24kDa)/α(23kDa)、d：neurocalcin β

179 培養神経芽細胞におけるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIαサブユニットcDNA導入の形態に及ぼす影響

五嶋良郎*、大迫俊二、山内卓
（東京都神経研、遺伝学、*横浜市大、医、薬理）

〔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）の機能的役割を解明することを目的としキナーゼIIαサブユニットcDNA（αcDNA）の培養神経芽細胞（Nb2a）への導入を試み、その形態に及ぼす影響について検討した。αcDNAをpEF-321の発現ベクターに挿入し、pEF-neoとともにNb2aに導入後、G-418処理により安定なクローンを得た。αcDNA導入細胞のキナーゼIIの比活性はpEF-neoのみを導入したコントロール細胞に比し２－３倍の値を示した。コントロール細胞、導入細胞ともに継代直後は、円形を呈した。しかしαcDNA導入においては、コントロール細胞が形態変化を示さない継代直後３０分時に、すでにその細胞体が扁平化し突起形成が認められた。Nb2a培養神経芽細胞におけるキナーゼIIの強制発現は、同細胞の形態変化並びに突起伸展を惹起することが示された。

キナーゼIIは脳神神経系において高い活性を示し、MAP2,チュブリンなどの細胞骨格蛋白を初め、多くの内因性物質を基質とする多機能性リン酸化酵素の一つである（３）。キナーゼIIの機能的役割の解明を目的とし今回、培養神経芽細胞の形態に焦点を絞りキナーゼIIαサブユニットのcDNA導入神経芽細胞における表現型をコントロール細胞と比較検討した。

［実験方法］

αcDNAをpEF-321の発現ベクターのEcoRIサイトに挿入し、pEF-neoとともにNb2a細胞にリン酸カルシウム法を用いて導入した（１）。導入細胞をG-418存在下に培養し、αーサブユニットを発現する安定なクローンを得た。キナーゼII活性の測定は培養細胞抽出液より得た上清をサンプルとしシンチドを基質としてCa2+存在下、非存在下に行った（４）。形態観察は、細胞を継代後、一定時間に固定し、抗キナーゼIIα抗体（２）及びFITC蛍光抗体処理後、蛍光顕微鏡およびノマルスキー微分干渉顕微鏡下に行った。突起伸展率は、細胞体径を越える長さの突起を有する細胞数の全細胞数に対する割合として評価した。

［結果及び考察］

pEF-321プロモーターを用いたαcDNA導入によりNb2a培養神経芽細胞において、キナーゼIIαサブユニットの強制発現に成功した。導入細胞のキナーゼの比活性はpEF-neoのみを導入したコントロール細胞の２－３倍であった。非導入及びpEF-neo導入細胞における内因性キナーゼIIの比活性は両者ともほぼ同程度を示した（表１）。抗キナーゼII抗体を用いた間接抗体法において、コントロール細胞は、弱いながらも主としてその細胞質に陽性反応を示した（図１，ｂ）。αcDNA導入細胞においては細胞質における反応性が著明に増大した。また核周囲及び内部に点状の陽性斑が認められた（図１，ｄ）。コントロール細胞、cDNA導入細胞は、浮遊した状態においては両者ともほぼ球形を呈した。αcDNA導入細胞はコントロール細胞が形態変化を示さない継代直後３０分時に既に全体の約５０％が扁平化し、一部に突起形成が認められた（図１、表１）。これらの差異は全く独立に得られたクローンにおいても同様に認められ、また継代後少なく

表1　αcDNA導入Nb2a細胞におけるキナーゼII活性及び突起伸展率

Clone	キナーゼII活性 Ca^{2+}	キナーゼII活性 $-Ca^{2+}$	継代後30分時の突起伸展率
	nmol/min/mg protein		%
contorl	2.13	0.13	1.6
neo	1.77	0.19	0
α-1	4.20	0.26	9.9
α-2	4.39	0.32	17.1

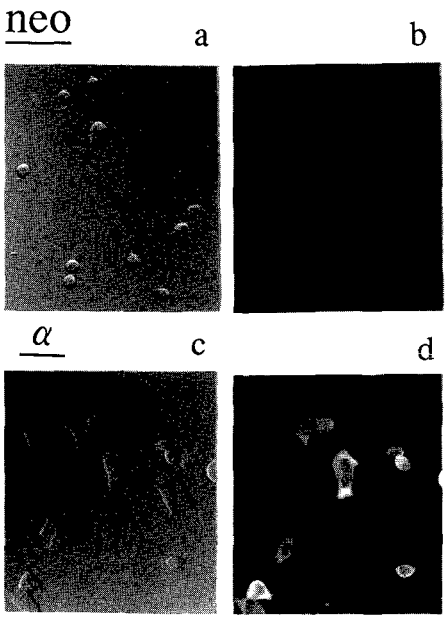


図1 キナーゼIIαcDNA導入Nb2a細胞における形態変化（継代後30分）

a，c，ノマルスキー

b，d，抗キナーゼII抗体による蛍光免疫染色

a，b及びc，dは各々同一視野

Bar = 10 μm

とも8時間は観察された。これらの結果は、Nb2a細胞におけるキナーゼIIの発現が、同細胞の形態変化ならびに突起形成に密接に関与することを示す。細胞の増殖率及び接着能に関しては、コントロール、導入細胞間に有意な差異は認められなかった。現在他の培養神経芽細胞系においても同様な知見を得つつある。

[参考文献]

1) Ohsako, S., Nakazawa, H., Sekihara, S., Ikai, A. and Yamauchi, T. (1991) J. Biochem., 109, 137 - 143

2) Ohsako, S., Watanabe, A., Sekihara, S., Ikai, A., Yamauchi, T. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun., 170, 705 - 71

3) Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1983) Eur. J. Biochem., 132, 15 - 21

4) Yamauchi, T., Ohsako, S. and Deguchi, T. (1989) J. Biol. Chem., 264, 19108 - 19116

180 ラット脳における遊離D-セリンの同定

橋本篤司*、西川徹*、林時司*、藤井紀子**、原田馨**、
岡高恵*、高橋清久*
(国立精神・神経センター*、筑波大・化学系**)

〔要約〕
N－メチル－D－アスパラギン酸（NMDA）受容体のストリキニン非感受性グリシン結合部位の内在性リガンドを検索するためラット脳TCA抽出液をペンタフルオロプロピオニック（PFP）－イソプロピルエステル化した後、D、L分離が可能なChirasil-L-Valキャピラリーカラムを用いてガスクロマトグラフ（GC）で分析を行なった。ラット脳抽出液のGCにおいて、標準D－セリン誘導体のリテンションタイムと一致するピークが検出された。このピークをElectron inpact（EI）及びPositive chemical ionization（PCI）－MSで分析したところ、標準D－セリン誘導体のEI及びPCI－MSと完全に一致し、このピークはD-セリンであることが同定された。また、ラット脳内の遊離D-セリン／総セリン比は約0.25であった。
本研究によって、ラット脳内にこれまで全く存在が知られていなかった遊離型のD－セリンが多量に存在することが初めて明かとなった。また、本会では現在検討中である遊離D－セリンの脳内分布に関しても報告する予定である。

従来、哺乳類の脳内には遊離D－アスパラギン酸が存在することは知られていた（2,3）が、その他の遊離D-アミノ酸の研究はほとんど行なわれていない。今回我々は、D－セリンがNMDA受容体ストリキニン非感受性グリシン結合部位の内在性リガンドであることを検索するためラット脳内の遊離D-アミノ酸についてGC及びGC-MSを用いて検討を行った。

［実験方法］
Wistar系雄性ラット（7週令）をネンブタールで麻酔した後、血中のアミノ酸を除くため左心室より0.9%NaClで脳を灌流した。灌流した脳に5％TCAを加えた後、ポリトロンでホモジェネイトし、その上清をTCA抽出液とした．TCA抽出液を乾固した後、イソプロパノール／2NHCl（100℃，1hr）でイソプロピルエステル化した。過剰の試薬を乾固し、ジクロロメタン及びPFP無水物を加え、100℃、20分間反応させた。過剰の試薬を乾固した後、酢酸エチルで抽出し、Chirasil-L-Valキャピラリーカラムを用いてGCで分析した。また、EI及びPCI-MSによってアミノ酸の同定を行った。

［結果］
Fig.1にラット脳TCA抽出液のPFP－イソプロピル誘導体のGCパターンを示す。保持時間11.5分に標準D－セリン誘導体と一致するピークが検出された。また、このピークのEI－MS（Fig.2.b)では、基準ピークm／z189及び特徴的なフラグメントピークであるm／z352及び380が検出された。さらに、このピークのPCI－MSでは、m／z440［M＋1］$^+$のピークが検出された。これらは標準D－セリン誘導体のMSと一致した。また、ラット脳内の遊離D-セリン／総セリン比は約0.25であった。

［考察］
以上の結果から、ラット脳内には高比率で遊離D－セリンが存在することが初めて明らかとなった。これまで、胎児期のラット脳内に多量のD－アスパラギン酸が存在し、生後1週間で数%以下に減少する報告（3）が知られているが、本研究においては、7週令のラットにおいても多量のD－セリンが検出された．
また、このD-セリンは興奮性アミノ酸受容体の内の一つであるNMDA受容体のアロステッリック調節部位に作用すること（1）が知られており、この受容体との関連性について興味が持たれる。

［文献］
1. Johnson, J.W. and Ascher, P. (1987) Nature 325, 529-531.
2. Man, E.H. et al. (1987) J. Neurochem. 48, 510-515.
3. Neidle, A. and Dunlop, D.S. (1990) Life Science 46, 1517-1522.

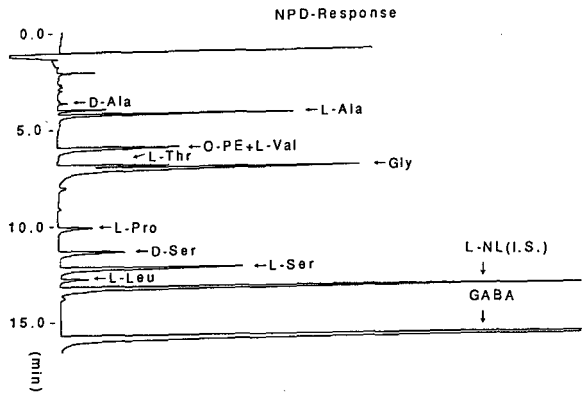


Fig.1 Gas chromatogram of N,O-PFP -isopropyl derivatives of free amino acids in rat brain extracts.

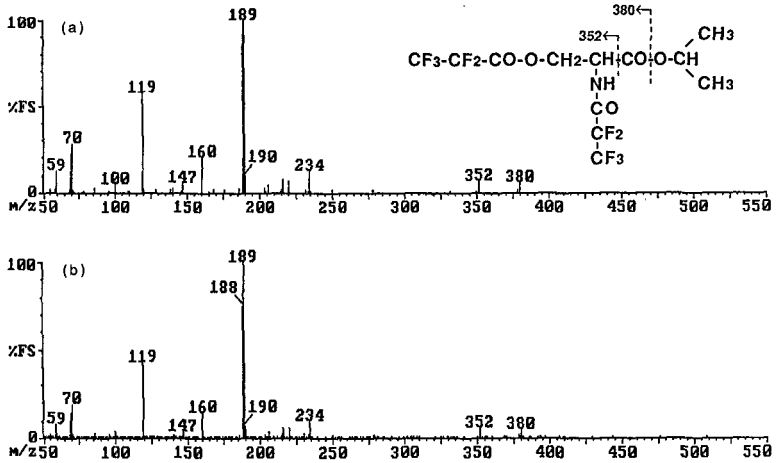


Fig. 2 Electron impact mass spectra of standard D-serine (a) and rat brain extracts (b) converted to N,O-PFP-isopropyl derivatives injected on a capillary 25 m x 0.25 mm Chirasil-L-Val.

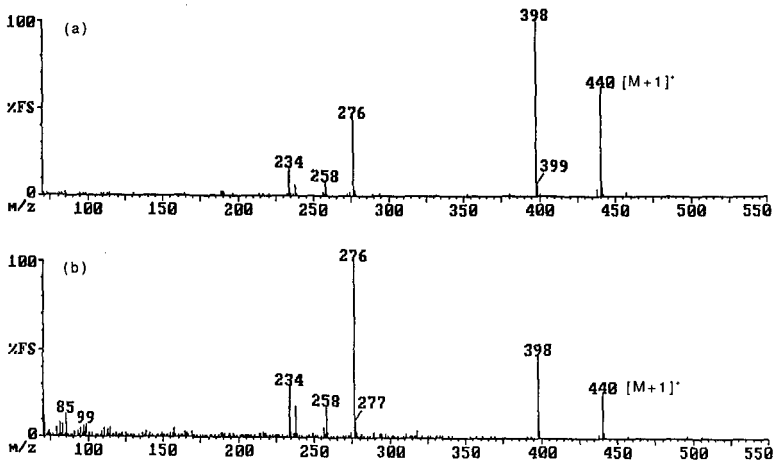


Fig. 3 Positive chemical ionization mass spectra of standard D-serine (a) and rat brain extracts (b) converted to N,O-PFP-isopropyl derivatives injected on a capillary 25m x 0.25 mm Chirasil-L-Val.

181 遊離型メチルアルギニンの定量と組織内分布

上野修一、佐野輝*、胡谷和彦、近藤啓次、柿本泰男
(愛媛大学医学部神経精神医学講座)

〔要約〕組織内遊離型メチルアルギニン(N^G-モノメチルアルギニン、N^G, N^G-ジメチルアルギニン、N^G, N'^{G}-ジメチルアルギニン)の定量法を開発し、ラット各組織、ラット脳内、およびウシ脳内の分布を調べた。ラット組織では、脾臓、筋肉、腎臓においてメチルアルギニンは高濃度であった。ラット脳内においては、小脳、嗅脳においてメチルアルギニンの濃度は高く、また、ウシ脳内の分布を見ても小脳には高濃度のメチルアルギニンが確認された。メチルアルギニンの分布は、メチルアルギニンにより競合阻害を受ける一酸化窒素合成酵素の分布とほぼ一致した。

血管内皮細胞由来血管拡張因子(Endothelium Derived Releasing Factor, ERDF)は一酸化窒素であることが確認され[1]、一酸化窒素は血管内皮細胞以外でも重要な機能を持つことが明かになりつつある。脳では興奮性アミノ酸receptor(NMDA型)が一酸化窒素を介して情報伝達をしていることがGarthwaiteらにより初めて報告[2]されて以来、活発な研究が行なわれている。この一酸化窒素の生合成は一酸化窒素合成酵素によってアルギニンを基質として作られるが、この合成反応はメチルアルギニンによって阻害されることが明かにされている[3]。我々は1970年にメチルアルギニンがヒト尿中や蛋白質の残基として存在することを報告[4]して以来、アミノ酸や蛋白質のメチル化について研究を続けており、ウシ脳の遊離メチルアルギニンの存在については本学会ですでに報告した[5]。今回我々は、組織内の三種の遊離型メチルアルギニン、すなわちN^G-モノメチルアルギニン、N^G, N^G-ジメチルアルギニン、N^G, N'^{G}-ジメチルアルギニンの分布を調べることとした。

〔方法〕組織における遊離型メチルアルギニンは非常に微量のため、従来の測定法では定量できなかった。そのため、試料を部分精製し、phenylthiocarbamyl(PTC)化を行ない、逆層HPLCを用いた分析系を新たに作成した。各組織2 gを10 mlの5 %トリクロル酢酸でホモジナイズし、遠心沈殿したその上清を陽イオン交換樹脂Amberlite CG120 (H^+ form, 100-200 mesh, 0.5 x 2.5 cm)を通過させ、1.5 mlの水、1 Mピリジンにて洗浄後、3 Mアンモニアで溶出した。溶出液を乾燥後、Amberlite CG120 (NH_4^+ form, 100-200 mesh, 0.5 x 2.5 cm)に通過させ、1.5 mlの2 Mアンモニアにて溶出、乾燥させた。その後Amberlite CG50 (NH_4^+ form, 100-200 mesh 0.5 x 2.5 cm)を通過させ、1.5 mlの2 Mアンモニアで溶出し、その乾燥標品をPTC化した。PTC化はBidlingmeyerらの方法に従った[6]。PTC化アミノ酸の分離分析には逆層HPLCを使用した。カラムはShimadzu ODS-H (0.4 x 15 cm)を用い、溶出液はA液として2.5% アセトニトリルを含む70 mM酢酸ナトリウム/pH 6.5、B液として45%アセトニトリル、15%メタノール、40%水を用いた。このHPLCでアルギニン、N^G-モノメチルアルギニン、N^G, N^G-ジメチルアルギニン、N^G, N'^{G}-ジメチルアルギニンはそれぞれ他の物質と完全に分離し、定量することが可能であった(図1)。

〔結果および考察〕ラットの組織別分布を図2Aに示す。N^G-モノメチルアルギニンは脾臓、筋肉および肝臓において高濃度存在した。N^G, N^G-ジメチルアルギニンは脾臓において他臓器と比較して高い。免疫系において一酸化窒素はマクロファージの集合抑制機能があることがわかっており、脾臓におけるN^G-モノメチルアルギニンおよびN^G, N^G-ジメチルアルギニンの存在は網内系機能と一酸化窒素の合成調節に関与することが示唆される。N^G, N'^{G}-ジメチルアルギニンは腎臓において高濃度であったが、これは細尿管中の尿に含まれるN^G, N'^{G}-ジメチルアルギニンによるものと思われた。

ラット脳ではN^G-モノメチルアルギニンとN^G, N^G-ジメチルアルギニンは嗅脳や小脳に高濃度であった（図2B）。一方、N^G, N'^G-ジメチルアルギニンはすべての脳部位でほぼ同濃度認められた。さらに詳細な脳内の分布を調べる目的でウシ脳を分析した。N^G-モノメチルアルギニンやN^G, N^G-ジメチルアルギニンは小脳皮質に多かった。また、一酸化窒素を合成することが知られる血管系は、N^G-モノメチルアルギニンやN^G, N^G-ジメチルアルギニンを多く含んでいた。N^G, N'^G-ジメチルアルギニンはすべての部位でほぼ同程度含有されていた。ラット脳において一酸化窒素合成酵素は嗅脳や小脳に活性が高いことが報告されている[7]。N^G-モノメチルアルギニンとN^G, N^G-ジメチルアルギニンの分布は一酸化窒素合成酵素活性の分布と一致しており、メチルアルギニンが脳内で本酵素を競合阻害することにより一酸化窒素の合成を調節している可能性が考えられる。しかしメチルアルギニンの濃度はアルギニンに比較して1/100以下と低濃度で、実際にこれらのメチルアルギニンが機能しているかどうか不明である。もしメチルアルギニンやアルギニンが細胞内において局在しているとすれば、一酸化窒素の合成を調節している可能性もある。三種のメチルアルギニンのうち一酸化窒素合成酵素阻害作用があることが示されているのは未だN^G-モノメチルアルギニンのみである。N^G, N^G-ジメチルアルギニンやN^G, N'^G-ジメチルアルギニンが一酸化窒素合成酵素阻害作用を持つか否か今後、研究したい。

図1：逆層HPLC (shimadzu ODS-H)

Flow rate: 0.6 ml/mim Detection: OD_{254nm}

Time (min)	A concentration (%)	temperature (℃)
0	99.9	43
10	99.9 → 97	43 → 37
40	95	
45		37 → 43
55	95	
60	85	
62	70	
63	0.1	

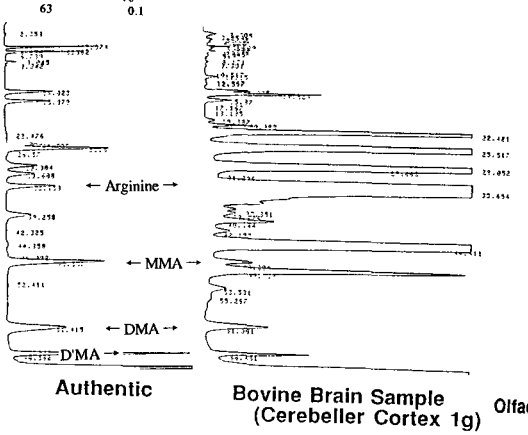
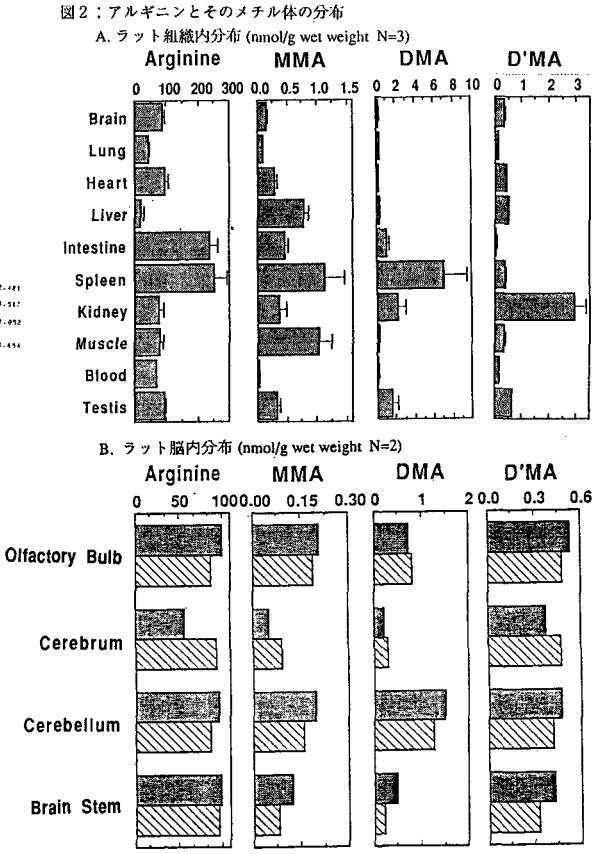


図2：アルギニンとそのメチル体の分布



〔文献〕 1）Sakuma, I., Stuehr, D. J., Gross, S. S., Nathan, C., and Levi, R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 8664-8667. 2）Garthwaite, J., Charles, S. L., and Chess-Williams, R. (1988) *Nature* 336, 385-388. 3）Satoh, H., and Inui, J. (1984) *Eur. J. Pharmacol.* 97, 321-324. 4）Kakimoto, Y., and Akazawa S. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 5751-5758. 5）胡谷和彦、柿本泰男 (1988) 神経化学 27, 416-417. 6）Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., and Tarvin, T. L. (1984) *J. Chromatogr.* 336, 93-104. 7）Bredt, D. S., Hwang, P. M., and Snyder, S. H. (1990) *Nature* 347, 768-770.

182 先天性水頭症ラットHTXの脳における神経細胞障害及びその短絡術の効果について

須田 喜久夫、新井 一、佐藤 潔

（順天堂大学 脳神経外科）

〔要約〕
先天性水頭症ラットHTX [1]における脳の発達障害をシナプスの形成障害及び行動生理学的障害として捉え、その治療時期の選択がこれらの障害を如何に修飾するかを検討するとともに、シナプスの形成障害と可塑性の連関について考案した。生後4週齢の水頭症発現HTX ラットに短絡術（晩期手術群）を施行すると、動物は救命され、性成熟期以降も生存した。これら動物の大脳皮質錐体細胞のdendritic spine をrapid Golgi 法で定量すると、spine density の著名な減少を認めたが、この所見は晩期手術群の学習障害の成立に深く関与するものと考えられた。しかし、生後1週齢の水頭症発現HTX ラットを早期に短絡術（早期手術群）で治療すると、spine densityの減少と学習障害の発現が回避されるとともに、免疫組織化学的定量法及びWestern blotting法にて大脳皮質におけるシナプス小胞蛋白SVP-38の減少が阻止されることも明かとなった。以上の結果は水頭症の進行により惹起されるシナプスの形成障害が学習障害と深く関連し、先天性水頭症の早期治療がこれらの障害を回復せしめること、即ち、シナプスの形態的、機能的な可塑性を保持するものと理解された。

〔目的〕先天性水頭症患児における精神運動発達遅延等の脳神経機能の障害の発現には、水頭症の進行に伴う神経細胞、特にそのシナプス形成の障害が大きく関与していると思われる。我々は先天性水頭症ラットHTX を用いて、その脳の発達障害をシナプスの形成障害及び行動生理学的障害として捉え、治療時期の選択がこれらの障害を如何に修飾するかを検討した。

〔対照動物及び方法〕水頭症発現(Hy(+)群）及び非発現(Hy(-)群）の先天性水頭症ラットHTX （雄）を用いた。ハロセン麻酔下に生後1週齢及び4週齢のHy(+) 群に脳室腹腔短絡術を施行し、各々の群を早期及び晩期手術群とした。又、同性・同齢のHy(-) 群にも短絡術を施行し、これをsham手術群とした。術後動物を性成熟期まで生存せしめ、Y-maze明暗弁別試験を施行した。1 session 10試行、1週 3 session、計24 session行い、実験動物の学習能を検索、3元配置による分散分析法を用いて、その結果を統計学的に検討した。試験終了後、動物を断頭、rapid Golgi 法[2]にて脳を染色、前頭・頭頂葉皮質第Ⅱ・Ⅲ層の錐体細胞を検索した。即ち、細胞体より約100 μm離れた部位より遠位20μmの間に観察されるdendritic spine の総数を数え、錐体細胞30個における平均値を各群のspine density とした。また、Hy(-) 群及びHy(+) 群、早期手術群の各々4週齢の動物を4%PFA にて灌流固定後脳を摘出、パラフィン切片（1μm）を作製、シナプス小胞蛋白(SVP-38;Obata et al [3]）に対するmonoclonal抗体(171B-5)を一次抗体に、又、二次抗体としてFITC-conjugated goat anti-mouse IgG を用いてシナプス小胞を免疫染色した（Miyazawa et al[4]）。各動物の頭頂・後頭葉皮質第Ⅰ・Ⅱ層に特定した15箇所の蛍光強度をmicrophotometer(Zeiss 社製）にて測定し、SVP-38の変化を検索した。さらに、他の実験動物群では、大脳皮質の一部を採取し、10% 容量のsample buffer にてこれをhomogenizeし、粗ミトコンドリア分画(P_2 fraction)を調整、次いで、約25μg 蛋白相当のP_2 fractionをSDS-PAGEにて電気泳動後(Laemmli[5])、Western blotting法にてニトロセルロース膜に転写した。その後、171B-5を一次抗体，二次抗体としてHRP-conjugated goat anti-mouse IgG を用いて両者を反応せしめた後、DAB にて発色し、SVP-38を検出，その動態を検討した。

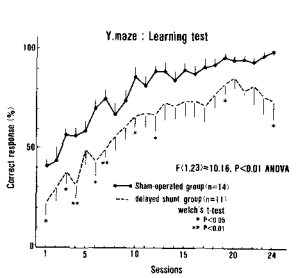
〔結果〕①明暗弁別能の評価では、晩期手術群(n=11)はsham群(n=14)に比し、その平均正反応率が顕著に低下し〔$F(1,23)=10.16$, $p<0.01$ ANOVA〕(Fig.1)、平均反応潜時も有意に延長していたが〔$F(1,23)=10.35$, $p<0.01$ ANOVA〕[6]、早期手術群(n=13)では平均正反応率(Fig.2)、平均反応潜時ともsham手術群(n=11)に比し、有意差を認めなかった（〔$F(1,23)=1.43$, N.S ANOVA, $F(1,23)=0.06$, N.S ANOVA〕。②rapid Golgi 法よる検索では、晩期手術群のspine density はsham群に比し有意に減少していたが(Student t-test; $p<0.001$)(Fig.3)[6]、早期手術群では有意差を認めなかった(Fig.4)。③SVP-38に対するmonoclonal抗体(171B-5)を用いた蛍光抗体法による定量的検討では、生後1日から3週間にかけてHy(-) 群のSVP-38の蛍光強度は直線的に増加した。一方、Hy(+) 群の蛍光強度はHy(-) 群のそれに比し、生後3週まではやや低値であったが、加齢に伴う漸増が認められた。しかし、4週齢に達すると、その蛍光強度は著明に減少した[4]。これに反し、早期手術群では4週齢に至ってもSVP-38の蛍光強度の減少は認められず、又、sham手術群との間に有意差を認めなかった(Fig.5)。④Immunoblotによる解析においても、1週齢から3週齢のHy(-) 群とHy(+) 群の大脳皮質SVP-38の蛋白量には差異を認めなかった。しかし、4週齢のHy(+) 群の蛋白量はHy(-) 群に比して、著明に減少していることが明かとなった。一方、

早期手術群のSVP-38を４週齢で検索すると、Hy(-) 群との間に明らかな差をみることはなかった(Fig.6)。

〔結論及び考案〕先天性水頭症ラットHTX の大脳外套における神経細胞の発達とsynaptogenesisをヒトと対比すると、１週齢の先天性水頭症ラットHTX はヒトの胎生24～28週に、４週齢のHTX ラットはヒトの１～２才にほぼ相当すると考えられる。４週齢のHy(+) 群では脳室は著明に拡大、下肢麻痺も出現、脳室内出血を併発し死に至る例が多い。このHy(+) 群に対し、生後４週前後に晩期短絡術を施行しても、動物は延命効果は受けるものの、水頭症により惹起された脳の組織学的障害の修復やdendritic spine の形成障害に改善は得られず、このような動物では明らかな学習障害をみることが判明した。一方、生後１週齢のHy(+) 群に早期短絡術を行うと、シナプスの形成障害及び学習障害が発来しないことが明かとなった。これらの結果は先天性水頭症に対する胎内治療も含めた早期治療の必要性を強く示唆するとともに、先天性水頭症に対する早期治療が脳のシナプスの形態的また機能的可塑性を保持するに役立つものと推察された。

〔文献〕

1. Wada M(1988);Congenital hydrocephalus in HTX rats:Incidence, pathophysiolosy and developmental impairment. Neurol Med Chir(Tokyo) 28:955-964
2. Millhouse OE(1981);The Golgi methods. In:Heimer L, Robards MJ, eds. Neuroanatomical Tract-Tracing Methods. Plenum Press, New York, pp311-344
3. Obata K, Nishiye H, Fujita S.C, Shirao T and Uchizono K(1986);Identification of a synaptic vesicle-specific 38,000-dalton protein by monoclonal antibodies. Brain Research 375:37-48
4. Miyazawa T, Nishiye H, Sato K and Shirai T;A new method of quantitatively analyzing synapses using a synaptic vesicle protein (SVP-38) monoclonal antibody: unpublished data
5. Laemmli U.K(1970);Cleavage of Structual Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature(London) 227:680-685
6. Miyazawa T, Sato K(1991);learning disability and impaiment of synaptogenesis in HTX-rats with arrested shunt-dependent hydrocephalus Child Nervous System 7: in press



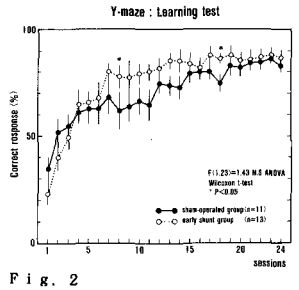


Fig. 2

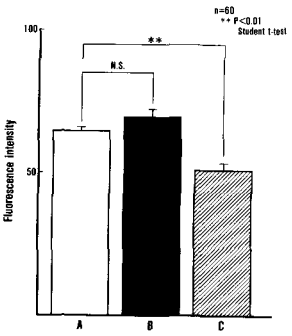


Fig. 5 生後４週齢におけるSVP-38の蛍光強度の比較
(HTX-rats 各群、 頭頂・後頭葉Ⅰ・Ⅱ層)

A ; sham手術群 (Hy(-))
B ; 早期手術群 (Hy(+))
C ; Hy(+) 群 (短絡術未施行)

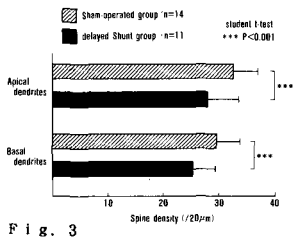


Fig. 3

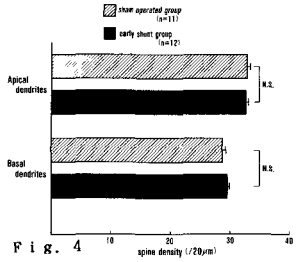


Fig. 4

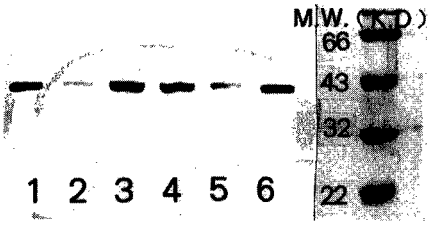


Fig. 6 抗SVP-38 monoclonal (171B-5)抗体による
HTX-rat 大脳皮質のimmunoblot
1, 4 ; 4週齢 Hy(-) 群
2, 5 ; 4週齢 Hy(+) 群
3, 6 ; 4週齢 早期手術群

183 イボテン酸によるラット海馬破壊部位における amyloid β-precursor protein及び細胞骨格蛋白の変化（破壊後長期経過）

中村　祐、武田雅俊、新川久義、播口之朗、北嶋省吾*、西村　健
（大阪大学医精神・*日生病院精神）

〔要約〕グルタミン酸受容体作動薬であるイボテン酸をラット片側海馬に注入し、100日後のamyloid β-precursor protein(ABPP)及び細胞骨格蛋白の変化を免疫組織化学的に検討した。ＨＥ染色にて破壊側の顕著な萎縮、神経細胞の脱落、グリオーシスがみられ、鍍銀染色においてはneuriteの減少が見られたが、神経原線維変化及び老人斑様構造物は見られなかった。抗ABPP抗体による染色では破壊部位の中心に顆粒状蓄積物の集積がみられ、対側では明らかな蓄積は見られなかった。また破壊部位は、抗MAP2抗体及び抗200K抗体では染色されず、抗ubiquitin抗体により強染する傾向が見られた。この実験系はABPPの蓄積の機序を解明するうえで有用であると考えられる。

アルツハイマー病の病態において細胞骨格の変化及びβ-アミロイドの蓄積は大きな特徴であり、細胞骨格及びその前駆体蛋白(amyloid β-protein precursor, ABPP)の動態を調べることはその病態を明らかにするうえで重要である。今回、我々はグルタミン酸受容体作動薬であるイボテン酸をラット片側海馬に注入し、その破壊部位におけるABPPの蓄積及び細胞骨格蛋白の変化について調べたので報告する。

方法

12週齢のウイスターラットの左側海馬にイボテン酸（1μg/1μl）を1部位に3μl、計3部位（Paxinos & Watsonの脳地図に従い、breg-3.3mm,lat2.0mm,depth3.3mm, breg-5.3mm,lat5.5mm,depth5.5mm, breg-4.3mm,lat4.5mm,depth7.5mm）に注入しその後100日間飼育し,10%formalin/PBSにて灌流した。約1日の後固定の後20%sucroseに約1日浸透し、cryostatにて15μmのfloating切片を作成し、各抗体を用い10%NGS/TBSにてvectastain kitを用い染色しDABにて発色させた。抗体は抗β-Alzheimer precursor protein A4(Boehringer, clone 22C11, 2.5μg/ml)[1,2]、抗200K neurofilament抗体(Amersham, dilution 1000x)、抗MAP2抗体(Amersham, 2.5μg/ml)、polyclocnal抗GFAP抗体(0.5μg/ml)、抗ubiquitin抗体(chemicon, dilution 100x) を使用した。一部の切片はさらにhematoxylinにて核染色を行った。また、隣接切片にてＨＥ染色、鍍銀染色(Bielshowsky変法)及びCongo Red染色を行った。

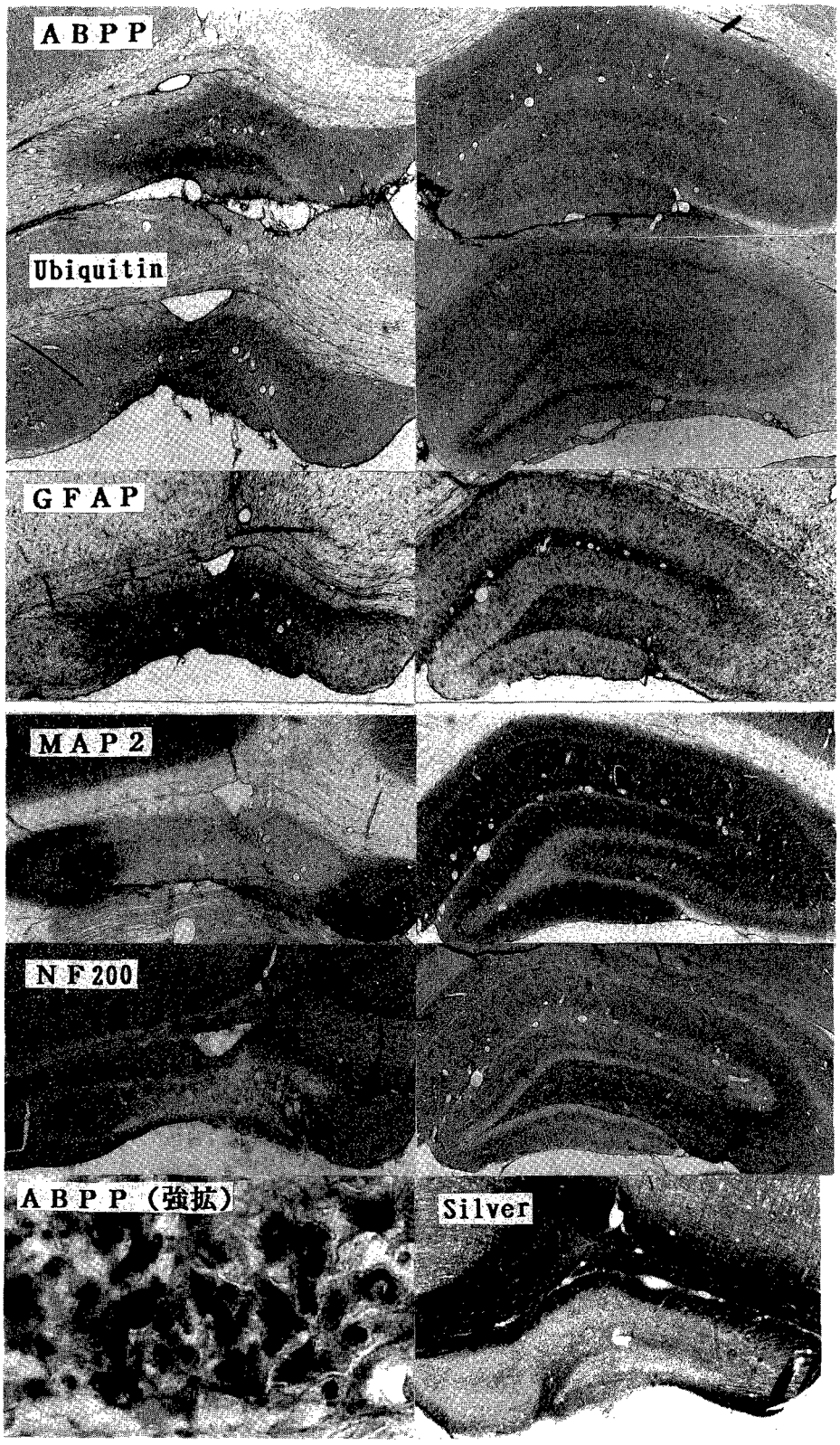
結果

ＨＥ染色にて破壊側の顕著な萎縮、神経細胞の脱落、グリオーシスがみられ、反対側では全く所見が見られなかった。鍍銀染色においては破壊部位においてneuriteの減少が見られたが、神経原線維変化及び老人斑様構造物は見られず、対側においては全く所見が見られなかった。抗amyloid β-protein precursor(ABPP)抗体による染色では破壊部位の中心に顆粒状蓄積物の集積がみられ、対側では明らかな蓄積は見られなかった。この蓄積物はCongo Redにより染色されなかった。また破壊部位は、抗MAP2抗体及び抗200K抗体では染色されず、この破壊部は抗ubiquitin抗体により強染する傾向が見られた。

考察

アミロイド線維の蓄積及び細胞骨格蛋白の変化はアルツハイマー病において大きな特徴であり、そのメカニズムを探ることは重要なことである。今回、我々はイボテン酸を海馬内に注入することにより生じた破壊部位におけるABPPの動態及び細胞骨格蛋白を免疫組織学的に検討した。ABPPを認識するために用いたモノクローナル抗体(clone 22C11)はABPPのＮ端から60－100残基を認識するものであり、ラット海馬ホモジェネイトのWestern blot上では約130-110KDaに主に２bandを認識する抗体である[1,2]。破壊部位の中心及びその周辺に直径約1-5μmの抗ABPP抗体強陽性顆粒の集積が見られる。この抗ABPP抗体陽性の蓄積物はCongo Redでは染色されず、β-amyloidを形成している可能性は低く、ABPPまたはその代謝物が蓄積しているものと考えられる。また、この部位はＨＥ染色上では高度の萎縮、神経細胞脱落、グリオーシスが見られ、鍍銀染色ではneuriteの減少が見られ、特定の構造は見られない。他の抗体による免疫組織化学では破壊部位にGFAPの高度の集積があり、高度のreactive astrocyteの増生が見られる。また神経細胞のマーカーである抗MAP2抗体及び抗200K neurofilament抗体で染色されず、この部位においては神経細胞の機能は失われていると考えられる。これらのことから破壊部位で見られたABPPの蓄積は、神経細胞由来のABPPがreactive astrocyte等により何等かの代謝を受けて蓄積したものであるか、またはreactive astrocyteから分泌され蓄積したものである可能性が示唆される。イボテン酸による破壊部位にABPPが蓄積することから、今後この実験系はABPPの蓄積の機序を解明するうえで有用であると考えられる。

1]A Wiedermann, G Konig, D Bunke, et al. Cell 57:115-126, 1989.
2]LJ Martin, SS Sisodia, EH Koo, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1461-1465, 1991.


ABPP
Ubiquitin
GFAP
MAP2
NF200
ABPP（強拡）
Silver

184 Amyloid β-precursor protein沈着の経時変化 —イボテン酸による海馬破壊部位の検討—

新川久義，中村　祐，武田雅俊，播口之朗，西村　健
大阪大学医学部　精神医学教室

〔要約〕 グルタミン酸受容体作動薬であるイボテン酸を片側海馬に直接注入した後のアミロイドβ一蛋白前駆蛋白(amyloid β-precursor protein: ABPP)の免疫反応性の経時的変化を免疫組織およびwestern blot法を用いて検討した．障害後42日では，障害部とそこに近接する神経細胞の胞体内に細かい顆粒状のABPP免疫反応性沈着物を認めた．障害後63日では，同様の変化が認められたが顆粒状沈着物はやや拡大していく傾向にあった．海馬の広範破壊は，破壊後12日目において，水溶性分画中で障害側のABPP代謝産物の増大および不溶性分画中のABPP量の増大とさらに低分子の分解産物の顕著な増大が認められた．以上の所見は，アルツハイマー病の老人班に認められるβ蛋白沈着の機構を解明する上で興味深いことである．

［緒言］ グルタミン酸受容体作動薬であるカイニン酸の脳室内投与により海馬の神経細胞は障害を受け，近傍の反応性グリア細胞内にアミロイド班の構成成分の一つと考えられるβ一蛋白の前駆体蛋白質の免疫反応性が認められることが報告されている[2]．我々は同じグルタミン酸受容体作動薬であるイボテン酸を片側海馬に直接注入した後のアミロイドβ一蛋白前駆蛋白(amyloid β-precursor protein: ABPP)抗体の免疫反応性の経時的変化を免疫組織染色およびwestern blot法を用いて検討した．

［方法］ ウィスターラット(200-250g)についてイボテン酸(Sigma)3μg（1g/ml）をステレオ下に片側海馬の中央部にマイクロシリンジを用いて緩徐に注入した．注入後3,5,7,14,25,42,63 日後に免疫組織および western blot用の処理を行った．免疫組織標本の処理は，10%formalin/PBS にて潅流・後固定（1日）し，20%sucroseに約1日浸透後，cryostatにて15μmのfloating 切片を作製した．抗体は10%NGS/TBSにて希釈し， vectastatin kit を用い染色し，DAB にて発色させた．Western blot用の標本の処理は，4倍量の0.1M Imidazole/1mM EGTA/1mM MgCl2/1% Triton X/PH7 中でホモジネート後，100,000 G で30分遠沈し，その上清を水溶性分画とした．沈渣は 10mM Bis-Tris/8M Urea/HCl/PH6.5中でホモジネート後，100,000 G で30分遠沈し，その上清を不溶性分画とした．各処理標本をSDS-PAGEに供し，イムノブロットを行った．抗体はanti-MAP2(clone 5F9, Amarsham, 2.5μg/ml)，polyclonal anti-GFAP（0.5μg/ml），anti-ABPP(clone 22C11, Boehringer Mannheim, 2.5μg/ml)[1,3] を用いた．

［結果］ イボテン酸の注入部位に一致したGFAP抗体免疫反応性グリア細胞の増生・肥厚およびMAP2抗体免疫反応性神経細胞の脱落・変性を認めた．グリアの増生は7日目にほとんど完成し，神経細胞の脱落変性はグリアの増生に先んじていた．ABPP抗体は，健常側では神経細胞の胞体を淡く染色するのみであるのに対し，障害後25日においては障害部位に一致あるいは近接した部位における残存神経細胞の胞体を比較的均質に濃く染色した(Fig.1a,d)．障害後42日では，障害部とそこに近接する神経細胞の胞体内に細かい顆粒状の沈着物として染色され，沈着物を有す細胞の核はヘマトキシリンで染色されなかった(Fig.1b,e)．障害の中心部は，顆粒状沈着物の散在のみ認め，神経細胞の構造は確認困難であった．障害後63日では，同様の変化が認められたがABPP免疫反応性顆粒状沈着物はやや拡大していく傾向にあった(Fig.1c,f)．また，この沈着物の出現時期に一致して出現部位を中心とした海馬の萎縮が顕著であった．

水溶性分画中のABPP量は全経過を通じて障害側と健常側で明瞭な差を認めなかったが，ABPPの分解産物と考えられるバンドの出現が障害側にのみ認められ，7日目まで顕著であり以後漸減する傾向にあった(Fig.2c)．不溶性分画中のABPP量は健常側に比べ障害側で明らかに増大しており，その変化は7日目まで顕著であり以後は不明瞭となった．3μgのイボテン酸を3箇所に注入した海馬の広範破壊は，破壊後14日目において，水溶性分画中で障害側のABPP代謝産物の増大および不溶性分画中に低分子の分解産物の顕著な増大が認められた(Fig.3)．不溶性分画中のGFAP量の増大および水溶性分画中のMAP2の減少は水溶性分画中ABPP分解産物の増大時期に一致していた(Fig.2b,c)．

［考察］ 以上の結果から，イボテン酸障害はABPPを分解して不溶性の分解産物を生じ，長時間を経てABPP免疫陽性顆粒を形成し，さらに時間を経てその顆粒を増大する傾向にあると考えられた．また，生じた顆粒は細胞体の構造が消失してもなおかつ残存した．Siman ら[2] は，側脳室へのカイニン酸の注入が海馬の錐体細胞を障害し，周辺の反応性星状グリア細胞内にABPP免疫反応性を生じると報告している．ABPP免疫反応性のこの様な所見は，アルツハイマー病の老人班に認められるβ蛋白の沈着と考え併せて興味深いことである．今後は時間経過に伴うABPP蓄積の機構を究明することが重要と考えられる．

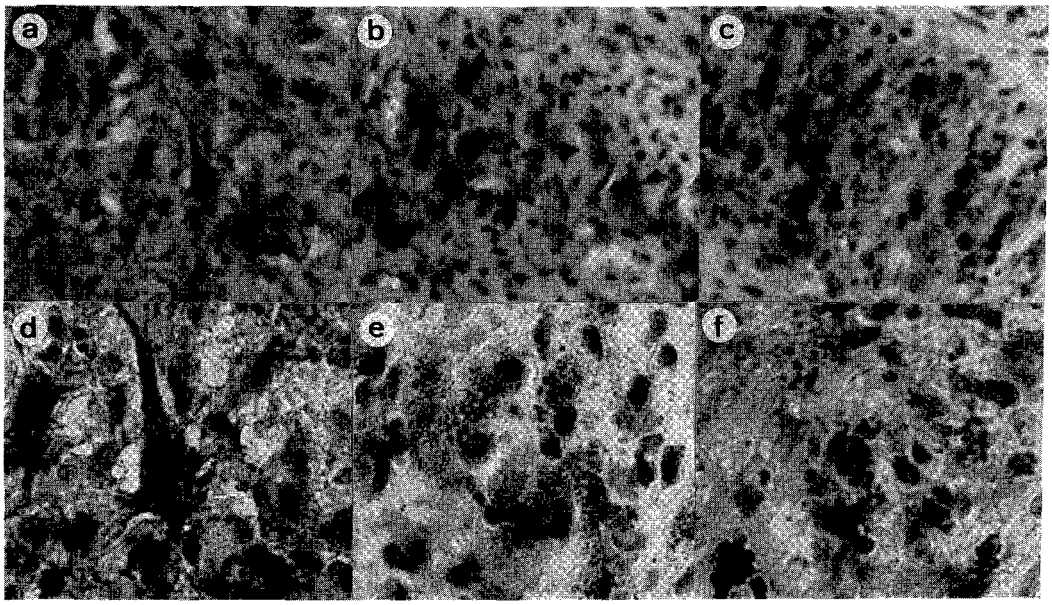


Fig.1. Immunohistochemical staining for ABPP of rat hippocampus with lesion by ibotenic acid injection. 25 days (a,d), 42 days (b,e) and 63 days after lesioning by ibotenic acid (3ug) injection. X400 (a,b,c), X1000 (d,e,f)

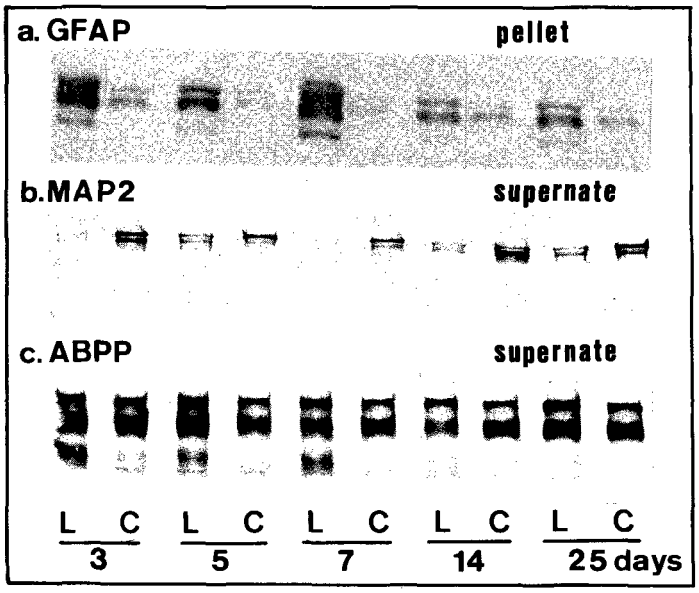


Fig.2. Western blot of GFAP, MAP2 and ABPP immunoreactivity in rat hippocampus with lesion by ibotenic acid injection. 3ug of ibotenic acid was injected into the center of lateral hippocampus. L:lesion side, C:control side.

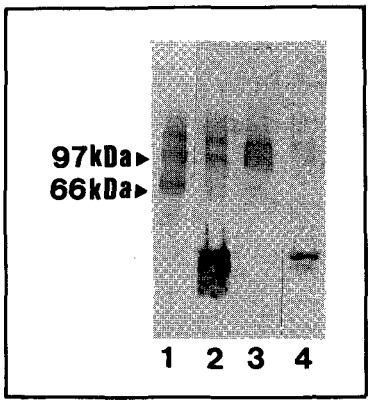


Fig.3. Western blot of ABPP immunoreactivity in rat hippocampus with intensive lesions by ibotenic acid. 3 ug of ibotenic acid was injected into the 3 part of lateral hippocampus. 14 days after injection. Lesion side (1,2), control side (3,4), soluble fraction (1,3), insoluble fraction (2,4).

[1] Martin,L.J., sisodia,S.S., Koo,E.H., et al.(1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1461-1465.
[2] Siman,R., Card,P., Nelson R.B., et al.,(1990) Neuron 3:275-285.
[3] Wiedermann,A., Konig,G., Bunke,D., et al.(1989) Cell 57:115-126.

185 海馬キンドリングラットの海馬及び扁桃核における脳湿重量及びプロテインキナーゼC活性の長期持続性変化

甲平一郎　秋山一文　大源明宏＊　伊藤　高　小野光弘　森本　清　大月三郎　曽良一郎＊＊
（岡山大・医・神経精神医学教室、十全第二病院精神科＊・アリゾナ大学医学部薬理学教室＊＊）

〔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15-16週後における脳湿重量及びプロテインキナーゼC(PKC)活性の変化を扁桃核と左右の海馬において各々可溶性分画と膜分画に分けて測定した。脳湿重量は左側海馬で有意に増加していた。PKC活性は可溶性分画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。膜分画ではキンドリングラットの扁桃核及び両側海馬において有意な変化を認めた。

[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(4)。昨年の本学会で我々は、背側海馬キンドリングラットの海馬及び扁桃核におけるPKC活性の変化について報告した(2)。今回は、キンドリング完成後の膜分画におけるPKC活性及び脳湿重量の増加が長期持続性の現象なのかを問う目的で、約4ヶ月後(15-16週間後)の脳部位別変化を検討したので報告する。

[対象と方法]
1) 背側海馬キンドリングラットの作製及び脳湿重量の測定
SD系雄性ラット（体重 260-300g）28匹（キンドリング群 N=14,対照群 N=14）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手術し、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(5)のstage 5に達した後は1-2日に1回電気刺激し、二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後キンドリングラットを最終発作から15-16週間後に断頭し、両側扁桃核と右側海馬及び左側海馬を氷上にて切り出しそれぞれの湿重量及び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なった。
2) PKCの活性の測定
PKC活性は、前報(2)と同様に測定した。2群間有意差検定には、Student's t test 及び two-way ANOVA test を用いた。

[結果]
脳湿重量は左側海馬で有意に増加していた(Fig.1)。可溶性分画に置けるPKC活性はいずれの脳部位でも有意な変化は認められなかった。膜分画におけるPKC活性は、脳湿重量あたりで表示しても(Table 1)、濾過前蛋白あたりで表示しても両側海馬及び扁桃核で有意に増加していた(Table 2)。
DE-52 カラム溶出前の蛋白濃度は、細胞質分画及び膜分画とも有意な変化はなかった。
DE-52 カラム溶出後の蛋白濃度は、膜分画において扁桃核及び両側海馬で有意に増加していたが、細胞質分画ではいずれの脳部位でも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永続性であり神経系の可塑性のモデルと考えられている。今回の実験成績はキンドリングにおけるPKCの変化を最初にとらえた前報(2)に一致し、さらにそれが永続性であることを確認したものである。このように最終発作から約4ヶ月に渡って維持される神経化学的変化は他に例をみない。扁桃核

キンドリングでは海馬 CA1 領域で mossy fiber の sprouting が生じること(6)、脱分極性の刺激によりPKCの活性化、PKCの基質であるF1蛋白のリン酸化ならびに神経伝達物質の放出が平行して引き起こされること(3)、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)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 と神経回路の再構成、神経伝達物質の放出亢進、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たしていることが示唆された。同時に左側海馬における脳湿重量の増加も、シナプスの sprouting と神経回路の再構成に関連していると思われる。

[文献]

(1) Braban, J.M. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:2538-2542. (2) Daigen, A. et al. (1991) Brain Res., 545:131-136. (3) Dekker, L.V. et al. (1989) J.Neurochem., 52:24-30. (4) Nishizuka, Y., (1988) Nature, 334:661-665. (5) Racine, R., (1972) Electroencephalogr. Cli. Neurophysiol., 32:281-294. (6) Represa, A. et al (1989) Neurosci. Lett., 99:345-350.

Fig.1 The deta represent the mean ± S.D. of 14 determinations. *p<0.04 as compared to the control (Student's t-test).

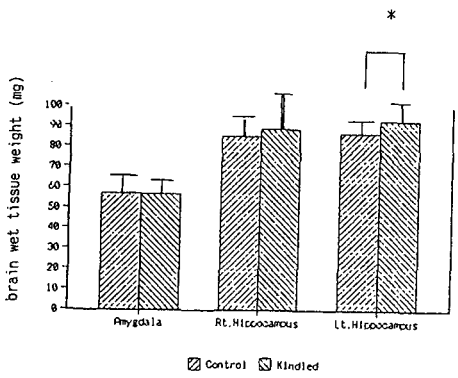


Table 1. Cytosolic and membrane-associated PKC activity in the amygdala, right hippocampus and left hippocampus. The data represent the mean ± S.D. of 14 determination. *p<0.01 as compared to the control (two-way ANOVA test).

PKC activity (nmol/min/mg weight)	amygdala	right hippocampus	left hippocampus
membrane			
control	0.211 ± 0.084	0.302 ± 0.155	0.331 ± 0.140
kindled	0.285 ± 0.115*	0.412 ± 0.170*	0.457 ± 0.180*
cytosol			
control	0.639 ± 0.263	1.030 ± 0.539	1.038 ± 0.449
kindled	0.663 ± 0.216	0.978 ± 0.388	0.996 ± 0.440

Table 2. Cytosolic and membrane-associated PKC activity in the amygdala, right hippocampus and left hippocampus. The data represent the mean ± S.D. of 14 determination. *p<0.01 as compared to the control (two-way ANOVA test)

PKC activity (nmol/min/mg protein)	amygdala	right hippocampus	left hippocampus
membrane			
control	0.355 ± 0.155	0.695 ± 0.431	0.718 ± 0.309
kindled	0.502 ± 0.213*	0.933 ± 0.415*	0.985 ± 0.384*
cytosol			
control	1.954 ± 0.713	3.631 ± 1.885	3.709 ± 1.568
kindled	2.127 ± 0.712	3.604 ± 1.498	3.652 ± 1.648

186 マイネルト基底核破壊ラットにおける大脳皮質アストログリアの反応性の検討

姉崎利治、柳沢勝彦＊＊、高橋　均＊、生田房弘＊、宮武　正＊＊
（新潟大脳研神経内科、同実験神経病理＊、東京医科歯科大神経内科＊＊）

〔要約〕大脳基底核破壊ラットにおける、大脳皮質アストログリア（ＡＳＴ）の反応を、グリア繊維性酸性蛋白（ＧＦＡＰ）をマーカーとして、免疫生化学的、免疫組織学的に検討した。マイネルト基底核（ｎｂＭ）破壊ラットにおいて、遠隔反応として破壊３日目に、前頭葉皮質にＧＦＡＰ陽性の反応性ＡＳＴが出現することが確認された。これに対し、腹側被蓋野（ＶＴＡ）破壊ラットでは、破壊後1-21日の間でＡＳＴの反応は認められなかった。また、Western Blottingにより、sham手術，ＶＴＡ破壊ラットに比してｎｂＭ破壊ラットでＧＦＡＰが有意に上昇することが定量的に確認された。ラット大脳皮質アストログリアの遠隔反応は、単に基底核破壊に基づくanterograde deafferentation によるものではなく、コリン作動性ニューロンに特異的な反応である可能性が示唆された。

〔はじめに〕　アルツハイマー病（ＡＤ）脳大脳皮質では、神経細胞が脱落すると共に、ＧＦＡＰ陽性ＡＳＴが広範に出現する（1）．また、ＡＤ脳では，大脳皮質にアセチルコリン（ＡＣｈ）を投射するｎｂＭの神経細胞が著明に脱落する。最近、ラット脳外側膝状体を破壊することによりその被投射域である後頭葉皮質でＧＦＡＰ陽性の反応性ＡＳＴが出現することが報告された（2）．ｎｂＭ及び、前頭葉皮質にドパミン（ＤＡ）を投射するＶＴＡを破壊し、前頭葉皮質におけるＡＳＴの反応をＧＦＡＰをマーカーとして免疫組織学的、免疫生化学的に検討した。

〔方法〕１．　250gのオス Wistar ratを、ハロセン麻酔下に固定し、Paxinos & Watson の図譜に従って定位脳手術的に左側の基底核に針を刺入し、ｎｂＭはイボテン酸（5μg/μl）を、ＶＴＡは 6-hydroxydopamine (6-OHDA)（2μg/μl）を 2μl注入して破壊した（3）．破壊後１、３、７、２１日目に、エーテル麻酔下に断頭し、脳を採取した。左前頭葉皮質を取り出し前半部を免疫生化学的解析に用い、後半部で免疫組織学的検討を行った。

２．　ＧＦＡＰ免疫組織化学用切片は、４％パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋しＧＦＡＰポリクローナル抗体（ＤＡＫＯ社）を用い、ＡＢＣ法で免疫染色した。

３．　破壊部位確認用切片は、ピクリン酸－４％パラホルムアルデヒド液で１時間固定後、凍結しcryostatで切片を作製し、それぞれ抗ＣＡＴモノクローナル抗体（Boechringer Mannheim Biochemica）、抗ＴＨポリクローナル抗体（CHEMICON）を用いて、ＡＢＣ法で免疫染色を行った。又、隣接する切片を用いKluver-Barrera染色も行った。

４．　組織学的検討を行ったラットと同様の手技で、ｎｂＭ，ＶＴＡを破壊し、３日後にmicrowave（東芝マイクロウェーブアプリケーター）の頭部照射後に脳を採取し、左前頭葉皮質を取り出した。0.1N $HClO_4$ にてホモジナイズ後，10000rpm,20分間冷却遠心し、その上清を試料としてＨＰＬＣにてＡＣｈ，ＤＡを測定した（4、5）．

５．　左前頭葉皮質ホモジネートを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで電気泳動後、電気的にニトロセルロース膜に移し、抗ＧＦＡＰ抗体を一次抗体、ペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgGを二次抗体として 4-chloro-1-naphtolで発色した。

〔結果〕　ｎｂＭ，ＶＴＡの破壊は、Kluver-Barrera染色で確認した。さらに、神経伝達物質の測定により、ｎｂＭ破壊側ではＡＣｈが、ＶＴＡ破壊側ではＤＡが、正常ラットに比して有意に低下していることが確認された。　ｎｂＭ破壊ラットでは、前頭葉皮質に、胞体の肥大したＧＦＡＰ陽性の反応性ＡＳＴの出現を認め、Western-blottingにおいてもsham手術，ＶＴＡ破壊ラットに比し有意の上昇を認めた。これに対し、ＶＴＡ破壊ラットでは、２１日目においてもＧＦＡＰ陽性のＡＳＴの出現は認めなかった。

〔考察〕　ｎｂＭを破壊することにより、その遠隔反応として被投射域である前頭葉皮質において、ＧＦＡＰ陽性の反応性ＡＳＴが出現することをはじめて確認した。一方、ＶＴＡを破壊したラットでは、ＧＦＡＰ陽性のＡＳＴの出現は認めなかった。したがって、ＡＳＴの遠隔反応は、単なるanterograde deafferentationによるものではなく、コリン作動性ニューロンに特異的な現象である可能性が示唆された。　ｎｂＭ破壊ラットは、アルツハイマー病大脳皮質におけるＧＦＡＰ陽性ＡＳＴの出現機序を検討するうえで有用な動物モデルと考えられた。

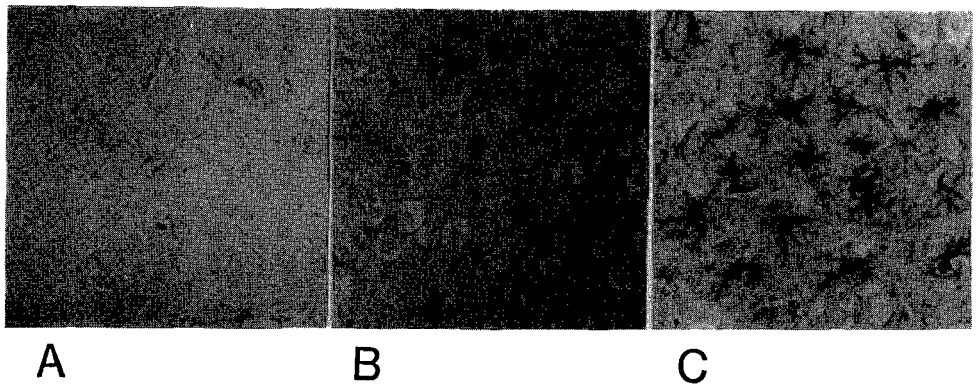


図 1　ラット前頭葉皮質における、ＧＦＡＰ免疫組織化学
Ａ：sham手術　Ｂ：ＶＴＡ破壊　Ｃ：ｎｂＭ破壊

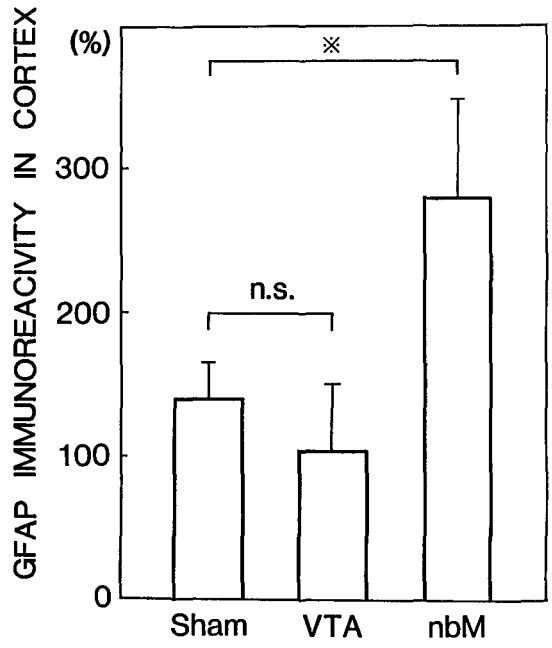


図 2　ＧＦＡＰ Western blot定量解析

〔文献〕
(1)Delacourte A. et al. (1990) Neurol.,40,33-37
(2)Hajos F., Kalman M.,Zilles K. et al. (1990) Glia,3,301-310
(3)Herve D., Trovero F., Blanc G. el al. (1990) J.Neurochem.,54,1864-1869
(4)Asano M., Miyauchi T. Kato T. et al. (1986) J.Liq.Chromato.,9,199-215
(5)Kaneda N., Asano M. & Nagatu T., (1986) J.Chromatogr.360,211-218

187 Invitro ischemiaによる脳（Na ＋K）－ATPase活性の低下

松田敏夫、馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

〔要約〕

ラット脳切片をグルコース欠乏(Glc-free)、低酸素、及びGlc・酸素欠乏(invitro ischemia)条件で処置すると膜$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性は有意に低下した(作用の強さ：invitro ischemia>Glc-free≧低酸素)。これらの処置による本酵素活性の低下は、Na^+依存性のリン酸化、K^+依存性の脱リン酸化の低下と、ウアバイン結合量の減少を伴っていた。Glc-free、低酸素の本酵素活性に対する作用は外液Ca^{2+}に依存していなかったが、invitro ischemiaの作用は外液Ca^{2+}を除くことで減弱された。Glc-free、低酸素の本酵素活性に対する作用は、細胞内Ca^{2+}のキレーターで抑制された。Invitro ischemiaの本酵素活性に対する作用はCa^{2+}チャンネル拮抗薬、グルタミン酸受容体拮抗薬により影響を受けなかったが、Mg^{2+}、Na^+-Ca^{2+}交換系阻害薬で抑制された。また、invitro ischemiaによる本酵素活性の低下はカルモジュリン、C-キナーゼ、カルパイン、ホスホリパーゼA_2の阻害薬により影響を受けなかった。腎臓切片の$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性はinvitro ischemiaで変化しなかった。

【目的】

我々は膜興奮の$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性に及ぼす影響を脳切片の系で検討し、本酵素活性が細胞内Ca^{2+}により調節されていることを認めている(1-3)。細胞内Ca^{2+}ホメオスタシスの異常として虚血障害が知られており、脳虚血時に$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性が低下しているとの報告がある。しかしながら、その低下の機構は検討されておらず、虚血時における細胞内Ca^{2+}の本酵素活性への関与は不明である。本論文においては、細胞内Ca^{2+}による本酵素活性低下の意義を追求する目的で、細胞内Ca^{2+}代謝異常を引き起こすグルコース、酸素欠乏の作用について切片の系で検討した。

【方法】

ラット脳及び腎臓切片を正常Krebs-Ringer(KR)中でプレインキュベートした後、種々の条件下で一定時間インキュベートし、その切片から膜標品を調製し酵素標品とした。酵素活性、リン酸化、脱リン酸化、ウアバイン結合は、既報の方法(1)に従って行った。切片中ATPはルシフェラーゼによる化学発光法(4)で測定した。

【結果】

ラット脳切片を1)正常KR、95%O_2-5%CO_2(O_2)、2)Glc-free KR、O_2、3)正常KR、95%N_2-5%CO_2(N_2)(低酸素)、4)Glc-free KR、N_2(invitro ischemia)の条件下でインキュベートすると、Glc-free、低酸素、invitro ischemiaの場合時間に依存した膜$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性の低下と切片中ATP含量の減少が認められた。Glc-free、低酸素単独の場合、酵素活性およびATPレベルの低下には長時間が必要であったか、両者の併用の場合(invitro ischemia)低下作用は5分から見られ、また低下の程度はそれぞれの単独より大きいことが示された。これらの処置による$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性の低下は、Na^+依存性のリン酸化、K^+依存性の脱リン酸化の低下、並びにウアバイン結合数の減少を伴った。

Glc-free、低酸素による脳切片$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性の低下はCa^{2+}-free KRにおいても認められたが、invitro ischemiaの作用は外液Ca^{2+}に依存していた(表1)。Glc-free、低酸素の本酵素活性低下作用は細胞内Ca^{2+}のキレーターであるBAPTAの前処置で消失した(表1)。Invitro ischemiaの作用は、高濃度Mg^{2+}、ベプリジル、アミロライドにより抑制された。

一方、invitro ischemiaによる脳切片($Na^+ + K^+$)-ATPase活性の低下は、ニフェジピン、ω-コノトキシン、APV、キヌレン酸、グルタミルグリシン等によって影響を受けなかった。

Invitro ischmeiaによる($Na^+ + K^+$)-ATPase活性の低下作用は、W-7、H-7、E-64、CBZ-Val-Phe、メチルプレドニゾロンで影響を受けなかったが、ジチオスレイトールの存在により有意に抑制された。

腎臓切片を、Glc-free、低酸素、invitro ischemiaの条件下でインキュベートすると、脳切片の場合と同様にATP含量の著明な減少が認められたが、切片から調製した膜標品($Na^+ + K^+$)-ATPase活性はなんら変化を示さなかった。

表1. グルコース欠乏、低酸素、虚血条件による($Na^+ + K^+$)-ATPase活性低下とCa^{2+}依存性

	($Na^+ + K^+$)-ATPase活性(μmol/mg蛋白/分)[a]	
	正常KR	Ca^{2+}を含まないKR
(A) 対　照	0.476±0.017	0.466±0.006
グルコース欠乏(30分間)	0.396±0.014**	0.358±0.012***
グルコース欠乏＋BAPTA[b]	−	0.472±0.011
(B) 対　照	0.429±0.006	0.424±0.017
低酸素(30分間)	0.347±0.008**	0.349±0.008**
低酸素＋BAPTA[b]	−	0.418±0.009
(C) 対　照	0.463±0.007	0.467±0.009
虚血条件(5分間)	0.364±0.013***	0.466±0.014

[a]平均±S.E.　[b]30μM BAPTA-AMで60分前処置　**P<0.01, ***P<0.001(対照と比較)

【考察】

Glc-free、低酸素、invitro ishcemia条件に脳切片を暴露すると、($Na^+ + K^+$)-ATPase活性の低下が認められ、この作用に細胞内Ca^{2+}の関与が示された。すなわち、Glc-free、低酸素の場合細胞内Ca^{2+}の動員が、またinvitro ischemiaにおいてはそれに加えて細胞外からのCa^{2+}の流入が関与していると思われる。また、invitro ischemiaの本酵素活性低下作用がNa^+-Ca^{2+}交換系阻害薬により抑制されたことより、細胞外からのCa^{2+}流入経路としてNa^+-Ca^{2+}交換系が考えらる。一般に虚血障害はグルタミン酸による作用と密接に関連していると考えられているが、本実験条件における($Na^+ + K^+$)-ATPase活性の低下にはグルタミン受容体の関与は認められなかった。種々の阻害薬を用いた実験から、Ca^{2+}による酵素活性低下作用の機構にカルモジュリン、C-キナーゼ、カルパイン、ホスホリパーゼA_2等が関与していないことが示唆された。細胞内Ca^{2+}がどのような機構で本酵素に作用しているかは現在不明であるが、ジチオスレイトールがこの作用を抑制したことから、この機構にSHが関与していることが考えられる。腎臓において脳の場合と同様な酵素活性の変化が見られなかったことは、本酵素アイソザイム(5,6)が虚血に対して異なる感受性をもっていることを示唆する。

【文献】

1) Matsuda, T. and Iwata, H. (1989) J. Pharmacol. Exp. Ther., 248, 729-735

2) Matsuda, T., Shimizu, I. and Iwata, H. (1990) Eur. J. Pharmacol., 183, 2350-2351

3) Matsuda, T., Shimizu, I. and Baba, A. (1991) Eur. J. Pharmacol., in press.

4) Lust, W.D., Feussner, G.K., Barbehenn, E.K. and Passonneau, J.V. (1981) Anal. Biochem., 110, 258-266

5) Sweadner, K.J. (1989) Biochim. Biochys. Acta, 988, 185-220

6) Matsuda, T., Iwata, H. and Cooper, J.R. (1984) J. Biol. Chem., 259, 3858-3863

188 中枢神経内 Acetylcholine Release に及ぼすCa拮抗薬 (Verapamil) の影響
－高血圧自然発症ラットを用いた検討－

津田　和志，西尾　一郎，増山　善明*，Menek Goldstein**
和歌山県立医科大学循環器内科，東京労災病院*，
New York University Medical Center**

〔要約〕

Ca拮抗薬の中枢性作用機序を cholinergic system との関連から検討するため、各種刺激による中枢神経内 acetylcholine (ACh) release に及ぼす verapamil の影響を観察した。Verapamil はラット線条体からの電気刺激時 (1Hz) ACh release を濃度依存性に抑制した。興奮性アミノ酸である L-glutamate も ACh release を増加せしめたが、verapamil はそれを抑制し、さらにその作用は Mg^{2+} 存在下で増強した。高血圧自然発症ラット (SHR) を用いた成績では、verapamil による電気刺激時 ACh release 抑制作用は正常血圧対照群である Wistar Kyoto ラット (WKY) に比し有意に大であった。以上よりCa拮抗薬の verapamil は電位依存性のみならず N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を介する中枢神経内 ACh release を抑制し、Mg^{2+} と共同作用を示すことが示唆された。一方、中枢内 ACh は昇圧の方向に作用することが知られているが、SHR で verapamil による ACh release 抑制作用が著明なことより、中枢内 ACh release の抑制がCa拮抗薬の降圧機序に一部関与する可能性が考えられた。

（目的）

神経終末からの神経伝達物質遊離には細胞内への Ca^{2+} 流入が必須である。既に我々は交感神経終末からの norepinephrine (NE) 遊離がCa拮抗薬により抑制されることを報告したが[5]、他の神経伝達物質遊離に及ぼすCa拮抗薬の作用機序については十分に明らかにされていない。最近、中枢神経内 cholinergic system の各種循環調節における役割が注目され、中枢内にacetylcholine (ACh) を初めとする muscarinic 受容体作動薬や choline esterase 阻害薬を投与すると血圧が著明に上昇するとの報告がなされている[2,3]。そこで本研究では各種刺激による中枢神経内 ACh release に及ぼす verapamil の影響を観察し中枢 cholinergic system と Ca 拮抗薬との関連について検討した。また高血圧自然発症ラット (SHR) を用い、高血圧におけるCa拮抗薬の中枢性作用機序の変化について検討を加えた。

（対象と方法）

体重 250-350 g の雄 Sprague-Dawley (SD) ラット、および 9-10 週齢 SHR, Wistar Kyoto ラット (WKY) を断頭後速やかに線条体を摘出し、厚さ 0.3mm の brain slice を作成した。Slice は 0.1 μM の [^{3}H] choline と 37℃ で 20分間 incubation 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。電気刺激時の [^{3}H] release 量は basal release からの増加分とし total tissue radioactivity の percent fractional release として算出した。既法のごとく本法による [^{3}H] release 量は神経終末からの ACh release 量をよく反映することが知られており[1]以後 [^{3}H] ACh release として表示することとした。Ca拮抗薬 (verapamil) の効果はこれを S_1 の14分前に灌流液中に投与し S_2/S_1 ratio ([^{3}H] release 量の比) として観察した。一方興奮性アミノ酸である L-glutamate (Glu) の影響については灌流液中に Glu 10^{-3}M を添加した際の [^{3}H] ACh release 量の変化を vehicle として生食のみ投与した際の変化を control として％変化率で表示した。数値は mean±SEM で表し、統計学的検討は分散分析法ならびに Wilcoxon rank-sum test によった。

（成績）

(1) ＳＤラットにおいて電気刺激時 [^{3}H] ACh の percent fractional release は 1.219±0.047％ (at S_1, n＝8) であった。Fig.1 は verapamil の電気刺激時 [^{3}H] ACh release への影響を示している。Verapamil は濃度依存性に電気刺激時 ACh release を抑制した。(2) 灌流液中に Mg^{2+} を含まない条件下で興奮性アミノ酸である Glu (10^{-3}M) を投与すると線条体

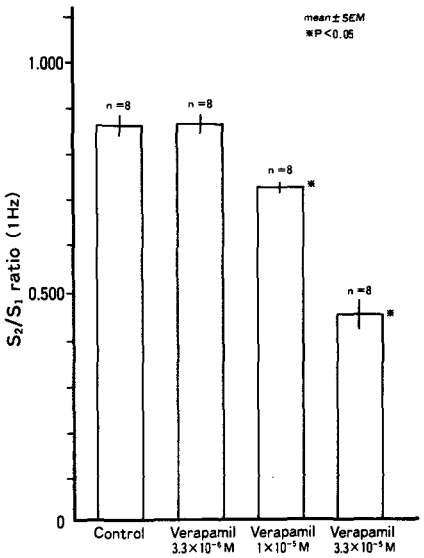


Fig.1 Effects of Verapamil on Stimulation-Evoked [^{3}H]ACh Release in Striatum of Sprague-Dawley Rats

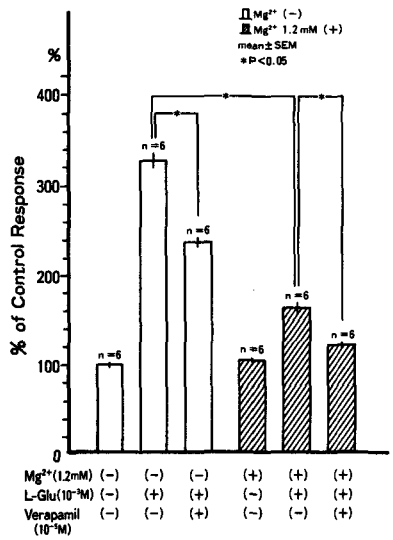


Fig.2 Effects of Verapamil on L-Glutamate-Induced [^{3}H]ACh Release in Striatum of Sprague-Dawley Rats

からの[^{3}H]ACh releaseは増加したが、その変化はverapamil (10^{-5}M)によって有意に抑制された(Fig.2)。またMg^{2+} (1.3mM)によってGlu投与による[^{3}H]ACh releaseは減少したが、verapamil存在下ではその抑制度はさらに著明となった(Fig.2)。(3)SHRの線条体において電気刺激時[^{3}H]ACh releaseのverapamilによる抑制作用は対照WKYに比し有意に大であった(ver. 10^{-5}M, SHR 64.9±1.7% of control, n=6, WKY 82.0±3.1%, n=6, P<0.05)。

(考察と結論)

以上の成績からCa拮抗薬であるverapamilは電気刺激のみならず化学刺激として投与したGluによる線条体からのACh releaseをも抑制することが示された。このことはverapamilが電位依存性のみならず、NMDA受容体に関連した細胞内へのCa^{2+}流入を抑制する可能性を示唆している。最近、中枢神経内cholinergic systemと血圧循環調節との関連が注目されている。*Brezenoff*は、中枢内にAChや*muscarinic*受容体作動薬を投与すると全身血圧が著明に上昇することを報告した[2]。同様にACh esterase inhibitorであるphysostigmine投与によっても昇圧反応が観察される[3]。Hershkowitzらは[^{3}H]quinuclidin-3-yl benzilateを用いてSHRの中枢内muscarinic受容体を検討しWKYに比しその*density*は有意に大であると報告した[4]。さらにACh合成の*inhibitor*である*hemicholinium-3*をSHRの中枢内に投与すると血圧降下に併って線条体や視床下部、脳幹部でのACh含量が低下することが明らかとなった[6]。本研究において電気刺激による線条体からのACh releaseのverapamilによる抑制はWKYに比しSHRで著明であった。その作用メカニズムの詳細については尚不明な点が多いが、verapamilが高血圧の中枢内ACh releaseを強く抑制することはその降圧作用に一部関与する可能性がある。一方、NMDA受容体は神経細胞の興奮のみならず各種の病的変化や細胞変性にも関係すると考えられている。今回verapamilがGluによるACh releaseを抑制し、Mg^{2+}と協同作用を示したことの臨床的意義についてはさらに検討を必要とするが、Ca拮抗薬の新しい中枢性作用を示唆する成績として興味深いと考えられる。

(文献)

1) Arbilla,P.B.S. and Langer,S.S.(1985) J.Neurochem.,44:331-337. 2) Brezenoff,H.E.(1982) Ann.Rev. Pharmacol.Toxicol.,22:341-381. 3) Buccafusco,J.J. and Spector,S.(1980) J.Cardiovasc.Pharmacol.,2:347-355. 4) Hershkowitz,M.,Eliash,S. and Cohen,S.(1983) Eur.J.Pharmacol.,86:229-236. 5) Tsuda,K.,Kuchii,M., Kusuyama,Y.Hano,T.,Nishio,I. and Masuyama,Y.(1984) J.Circ.J.,48:1263-1267. 6) Vargas,H.M. and Brezenoff,H.E.(1988) J.Hypertension.,6:739-745.

189 実験的ラットＩＵＧＲ胎仔脳におけるＮＳＥとアセチルコリンエステラーゼ活性の変化

植野信水[1]、前田宗徳[1]、天野　完[1]、西島正博[1]
小嶋久子[2]、北島理恵[2]、玉井洋一[2]
（[1]北里大・医・産婦人科、[2]生化学）

〔要約〕

IUGR（Intrauterin growth retardation、子宮内発育遅延）児にみられる中枢神経障害の生化学的基盤を明らかにすることを目的として実験的ラットIUGR胎仔を作成し、脳，髄液neuron specific enolase(ＮＳＥ）量、acetylcholinesterase(AChE)活性を測定した。1)IUGR児の臍帯動脈血ＮＳＥは正常発育群にくらべて有意に上昇した。2)妊娠ラットの子宮動脈結紮（結紮群）および連続的たばこ煙吸引（たばこ群）により IUGR が作成できた。3)脳内ＮＳＥ量、AChE活性は胎齢にともない緩やかに上昇し、出生直後急激に増加した。4) 結紮群、たばこ群では対照群にくらべて脳内ＮＳＥ量は有意に上昇した。5)AChE活性は両群とも有意に低下した。本実験は、IUGR児動脈血ＮＳＥ及びモデル動物脳ＮＳＥ量の変化を初めて明らかにした。

［はじめに］

周産期医療の進歩にもかかわらずIUGR（Intrauterin growth retardation、子宮内発育遅延）児では高度に中枢神経障害を残すことが臨床上問題となっているが、その生化学的背景は明らかではない。そこで中枢神経障害のindicator[1)2)3)]と考えられるneuron specific enolase （ＮＳＥ）のIUGR児臍帯動脈血中濃度を測定するとともに、実験的にラットIUGR胎仔の作成をこころみ、脳内ＮＳＥ量、acetylcholinesterase(AChE)活性の動態に関しても検討を加えた。

［方法］

ヒト胎児臍帯動脈血ＮＳＥの測定は、溶血の認められない血液採取可能であった妊娠22週から41週までの37例を対象とし、ＲＩＡキット　ＮＳＥ（γ－enolase)" 栄研 " を用いたＲＩＡ法により行なった。ラットＩＵＧＲ胎仔の作成は２種の方法により行なった。Ｗｉｓｔａｒ系妊娠ラットを用いて妊娠17日目にWigglesworth変法[4)]による片側子宮動脈の結紮を行なった（結紮群）。妊娠４日目より内容量320Lの金属製箱を用いて連続的に紙まきたばこ吸入を行なった（たばこ群）。妊娠21日目にPentobarbital 10mg/kg 麻酔下に開腹、胎盤血流量を電解質組織血流計で測定し、胎仔体重、脳・肝・胎盤湿重量を測定した。胎仔脳と髄液ＮＳＥ，脳AChE活性の測定には試料を5mM-Tris-acetate buffer (pH6.5) 5ml 中でホモジナイズし（10,000Xg,60 分間)、その上清を用いてＲＩＡ法によりＮＳＥ量またはKlingman法[5)]によりAChE活性の測定を行なった。

［結果］

１．経腟頭位分娩で臍帯動脈血ｐＨ7.20以上の正常発育群では、在胎34週以降では8.16±2.67ng/ml と33週以前の5.65±1.87ng/ml にくらべて有意に高値であった。IUGR群では 11.40±2.50ng/ml と正常発育群にくらべて有意に高値を示した。２．ラット胎仔の胎盤血流量の変化は、結紮群（40.8±15.5ml/min）、たばこ群(29.0 ±3.17ml/min) ともに対照群（48.0±15.7ml/min) にくらべて有意に減少した。３．結紮群、たばこ群はともに対照群に比べて胎仔体重、脳・肝・胎盤湿重量の有意な減少が見られた。４．正常ラット脳のＮＳＥ，AChE活性は胎齢にともない上昇した。特にAChE活性は出生後に急速に増加した（図１）。５．胎齢21日目のＮＳＥ量は、タンパク質、湿重量当たりともに対照群に比べてたばこ群、結紮群の順で有意に高値を示した（図２）。髄液中ＮＳＥ量は結紮群で有意に増加し、たばこ群ではわずかに増加していた（データ省略）。AChE活性は結紮群、たばこ群ともに有意に減少した（図３）。

図1　胎齢にともなう脳組織内NSE量,AChE 活性の変化

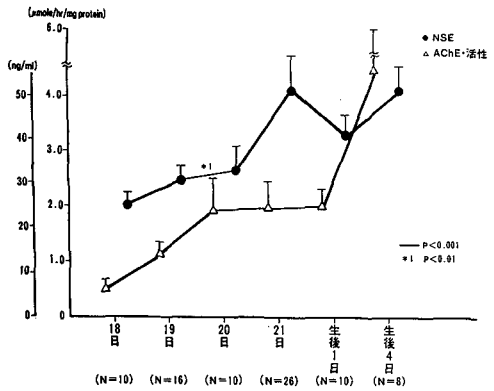


図2 ラット胎仔脳ＮＳＥ量

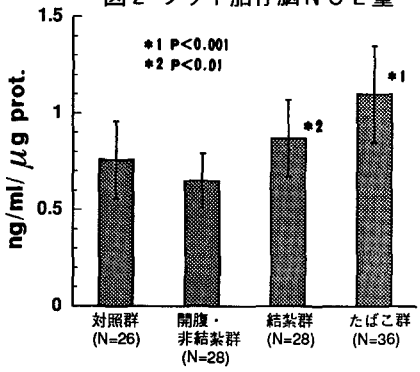
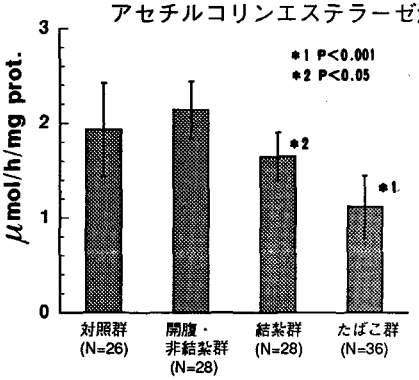


図3 ラット胎仔脳の
アセチルコリンエステラーゼ活性



［考察］

ヒトIUGR児の臍帯動脈血ＮＳＥが増量することを初めて明らかにした。ラットを用いて作成した実験的IUGR胎仔においては、脳および髄液ＮＳＥ量が増加することが分かった。以上の実験結果から臍帯動脈血ＮＳＥ量の上昇は、脳ＮＳＥ量の上昇に基ずくものであることが示唆された。またAChE活性の低下は、このような胎仔の神経機能の低下とも関係があると考えられる。　今後IUGRの胎児管理上、ＮＳＥやAChE活性などの　biochemical parameter の分析と評価が必要であろう。

［文献］

1）天野　完、中島公雄、植野信水　(1990) 周産期医学　20,1247

2）大野勉他、(1985) 新生児学誌　24,552

3）Zinsmeyer,J.　(1987) J.perinat.Med.,15,199

4）Wigglesworth,J.S.(1964) J.Path.Bact.,88,1

5）Klingman,G.I.,Klingman,J.D.and Poliszczuk,A.(1986)J.Neurochem.,15,1121

190 覚醒剤断薬4週間後の steady state における神経核レベルの神経伝達物質代謝の変化とマウス系統間の特徴的差異

盛政忠臣、金行孝雄、岡田英俊、庄盛敏廉
（岡山大・医・脳研・病態生化学）

〔要約〕

覚醒剤（メトアンフェタミン：MAP）を4週間投与した後、投与中止後4週間目の steady state において、神経核レベルの5部位（前頭葉皮質、線条体、側坐核、海馬、視床下部領域）の神経伝達物質と代謝物濃度を測定して、それらの代謝の慢性変化に検討を加えた。これらの結果を、6種類の近交系マウス系統間で比較したところ、系統間に特徴的な差異が示された。即ち、a) C57BL、NZBとELの3つの系統では、脳内広範囲にわたり、多くの神経系に変化が持続していることが示された。b)それに対して、C3H、CD-1、NZWの3つの系統では、これらの変化が少ないことが示された。c) NZWの系統では、セロトニンとアセチルコリン神経系に限局した特徴的な変化が示された。また、C3Hの系統では、ドパミン神経系の変化が他の神経系より相対的に大であることが示された。以上の結果から、覚醒剤後遺症は、脳内広範囲かつ多種類の神経系にわたる変化を伴うもので、これらの神経終末における伝達物質の放出代謝機構において何らかの慢性変化を来していることが示唆された。さらに、このような変化が特定の神経系に限局して発現している系統は、慢性変化の原因機構を解明するためのモデル動物としてさらなる検討が必要であると考えられた。

【緒言】

覚醒剤後遺症においては、精神症状が慢性化または再発性となるような、中枢神経系に長期持続的な病的機構が成立していることが重要な特徴の一つである。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寄与するのは、必ずしも覚醒剤の投与量によるのではなくて、覚醒剤に対する感受性の個体差も大きく寄与しているという、臨床的な体験がある。これらのことから、覚醒剤後遺症の発現に何らかの遺伝情報が関与している可能性を検討する方向は、示唆的であると考えられる。このような遺伝情報が関与する可能性のある問題に接近するためには、実験動物は、少なくとも近交系のマウスが有利である(1, 2)と考えられる。

筆者らは、MAP断薬後における神経伝達物質の放出代謝の慢性的な変化は、従来注目されてきたDA神経系だけでなく複数の神経系に及ぶこと、特に、近交系マウスの系統間で差異のあることを明らかにして昨年度の本学会で報告(3) した。

本研究においては、新たに、マウス系統と脳部位を追加して、覚醒剤後遺症における神経伝達物質の代謝の変化について比較検討を行った。

【実験方法】

実験動物は、6系統の近交系マウス（Crj:CD-1/IRC, C3H/HeNCrj, NZB/NCrj, NZW/NCrj, C57BL/6Sea, EL/Sea）である。12時間毎の明暗周期ならびに恒温恒湿条件下で飼育し、MAPの投与は、水溶液からの自由摂取により、4週齢に開始して4週間投与した。投与終了4週間後の12週齢時の steady state において、マイクロウエーブ処理後の凍結脳スライスから得られた前頭葉皮質（FPC）、線条体（STR）、側坐核領域（NAC）、海馬（HIP）、視床下部領域（HYP）の脳部位から、HPLC-ECD等により、モノアミン伝達物質（DA, NA, 5HT）

と代謝産物（DOPAC,HVA,3MT,NM,MHPG, 5HIAA）、アセチルコリン（ACh） とコリン（Ch）ならびにγアミノ酪酸（GABA）を測定した。

【結果】

4週間にわたるＭＡＰ総投与量は、平均値で最少 153mg/kg/系統～最大 230mg/kg/系統であり、以下に示す結果とは必ずしも一致する傾向は認められなかった。

測定された各々の物質濃度で、実験群が対照群に対して変化を示した部分を、表1に記載した。

【考察】

C57BL、ELと NZBの系統においては、DA、NA、 5HTならびに AChの、測定された全ての神経系に、しかも、測定された5つの脳部位に限定されない、慢性的な伝達物質放出代謝の異常を反映する結果が得られた。これらの結果からは、覚醒剤後遺症の発現に係わる、原発性の変化と二次性の変化を区別することは不可能と考えられた。むしろ、これらの神経終末における伝達物質の放出代謝に関与する機構において、共通した変化が生じている可能性が強く示唆された。一方、CD-1、 C3Hと NZWの系統では、この様な変化が小さいことが示された。これらの中、 C3Hの系統では、DA神経系の変化が相対的に強く示され、逆に、 NZWの系統ではDA、神経系には変化がほとんどなく、 5HTと AChの神経系に相対的に強い変化が示された。これらの系統からは、それぞれ「ドパミン精神病と非ドパミン精神病」のモデルが作成される可能性が示唆される。さらに、これらの動物からの選抜育種等により、覚醒剤後遺症の原発機構を解明するためのモデル動物が作成されることが期待される。

【文献】

(1)Fitch W and Atchley(1985)Science. 228. 1169-1175.

(2)Ingram DK and CorfmanTP(1980)Neurosci Biobehav Rev, 4, 421-435

(3)盛政忠臣、金行孝雄、岡田英俊、庄盛敏廉(1990)神経化学, 29, 146-147

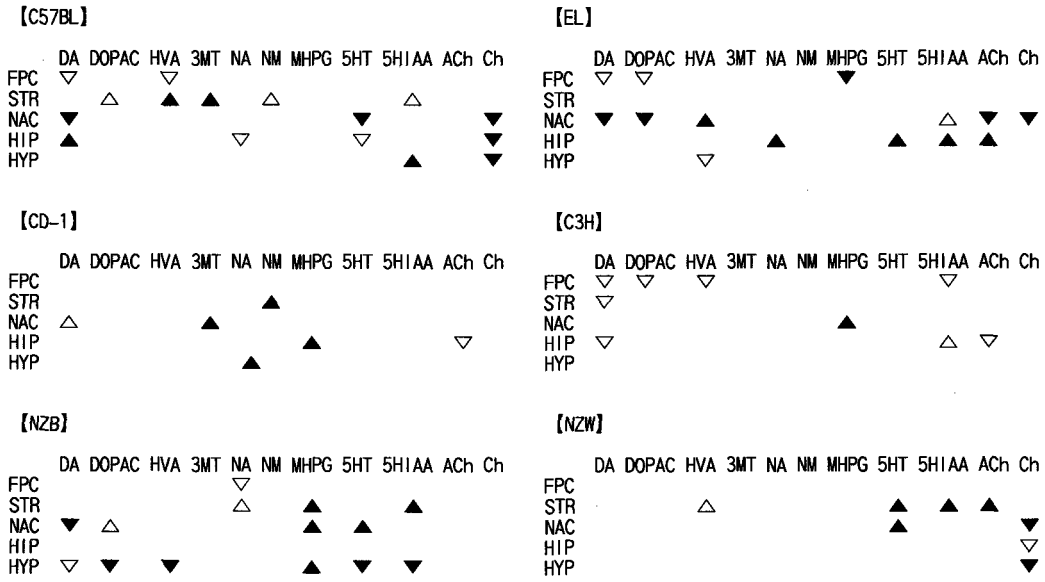


表1．覚醒剤断薬4週間後の steady state における神経核レベルの神経伝達物質と代謝物濃度の変化
▲,▼；p <0.05、△,▽；p <0.1 それぞれ、対照群に対する増加または減少を示す

191 塩基性繊維芽細胞成長因子による酸素毒性の回避

榎戸　靖、茜谷行雄、九島洋一、新延道夫§、
御子柴克彦§、畠中　寛（大阪大学・蛋白質
研究所・蛋白質生合成部門、同機能制御部門§）

〔要約〕

酸素毒性によって生じる中枢ニューロンの死と、それを防ぐ塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）の効果について、ラット中枢ニューロンの培養系を用いて検討した。胎仔期のラット（E20）脳の中隔野ニューロンをインキュベータ内気相酸素濃度を変えて培養した。その結果、昨年度本学会で報告したPC12h細胞を用いた実験と同様、酸素濃度が高くなるにつれてニューロンの生存は抑えられ、50%以上の酸素濃度では培養3日目でほとんどの細胞が死滅した。培地中に塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF）を添加しておくとこの死は濃度依存的に著しく抑えれ、ニューロンの生存が維持された。一方、神経成長因子（NGF）では効果がみられなかった。bFGFによる同様の効果は海馬および新皮質のニューロンにおいても観察された。以上の結果は、中枢ニューロンの分化および損傷時に発現し、トロフィック効果をすることが知られるbFGFが、酸素毒性によって生じる細胞障害経路の修復にも働いていることを示唆している。

ニューロンにおける酸素代謝は、加齢にともなう脳機能変化や虚血障害と深く関与していることが示唆されている。これらは主として酸素ストレスによる神経細胞死によるものと考えられる。我々はこれまでに胎仔期と生後ラット中枢ニューロンの培養系を用いることにより、ニューロンの発達にともなって生存に適した酸素濃度が上昇することを観察した[4]。また、神経細胞分化のモデル細胞であるPC12h細胞でも胎仔期のニューロンと同様50%気相酸素条件下で細胞死が生じ、これがNGFやbFGF などの神経栄養因子の添加で細胞を分化させることにより防がれることを報告した[3]。今回胎仔期（E20）のラット中枢中隔野および海馬、新皮質のニューロンを用い、高酸素培養下で生じる細胞死がbFGFの添加により著しく抑えられることを明らかにしたので報告する。

【実験方法】

胎仔ラット（E20）中枢ニューロンの培養は既に報告されている方法に従った[2,4]。切り出した脳組織をL-15培地に集め、パパイン処理によって消化した後、5%準胎仔牛血清／5%馬血清／90%DF（DME:F12=1:1）培地で分散した。これをポリエチレンイミンコートした48穴ディッシュに6～8×10^5細胞／cm^2 の密度でまき、一晩おいた後5μMのシトシンアラビノシドを含むTIP／DF 完全合成培地に変え、最長4日間培養を行った。生存細胞数の計測は、抗MAP2抗体[5]で染色される細胞を顕微鏡撮影（×25）し、1点につき3視野カウントした。生存細胞数の割合はまいた翌日の細胞をカウントした時の値を100%として表した。20%酸素で培養3日目のGFAP陽性細胞の割合は100ng／mlのbFGF添加・無添加群共に全細胞数の1～3% であった。大部分の実験に用いたbFGFはヒト組み替え型で酸化され易い2つのCys残基をSerに変えたもの（武田薬品(株)）を用いた。なお、Cys型、Ser型で効果に差はなかった。

【結果と考察】

E20ラット中隔野のニューロンを50%気相酸素濃度で2日間、添加するbFGF濃度を変えて培養した後のMAP2陽性細胞数をカウントした（図1）。bFGFによる神経細胞死の回避効果は顕著であり、濃度に依存したものであった。こ

の時の最大効果濃度は100ng／ml、ED_{50} の値は20ng／mlとなった。しかし、NGFによる生存維持効果はみられなかった。コリン作動性ニューロンの生存をウェル当りのコリンアセチル基転移酵素活性で調べたところ、bFGFによってその生存が維持されるが、NGFでは維持され難いことが分かった（図2）。bFGFには海馬および新皮質のニューロンにおいても同様に細胞死を防いだ。しかし、各々の部位で酸素毒性に対する感受性に差があることが分かった。以上の結果から、PC12h細胞での結果と同様に、培養中枢ニューロンでもbFGFが、顕著な酸素毒性による細胞死に対して回避効果を示すことが明らかになった。また、今回用いた培養系においてはアストロサイトの直接の効果は低いように思われた。bFGFはNGFと異なり、作用するニューロンへの特異性が低いことが知られており、このことが、培養系に移した時のトータルニューロンへの効果として観察された理由と思われる。NGFによる効果の場合は、NGFがコリン作動性ニューロンに対してのみ生存を維持させたとしても、他の大部分のニューロンの死によりコリン作動性ニューロンも生存し難くなったのではないかと考えられる。また、今回の結果では作用するbFGFの濃度が現在までいくつか報告されている結果に比べ高い値となった。この点については、特に強い酸化条件でのbFGFそのものの安定性を見る必要もあり、さらに検討してゆく必要があると考えられる。

【謝辞】

ヒト組み替え型bFGFを戴きました武田薬品（株）に深く感謝致します。

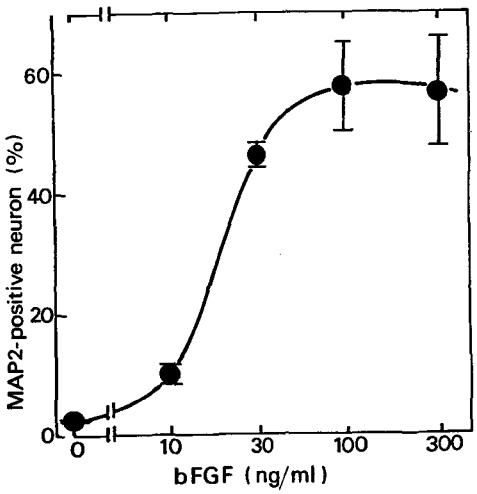


図1　50%気相酸素下で3日間培養したE20ラット中隔野ニューロンに対するbFGFの生存維持効果

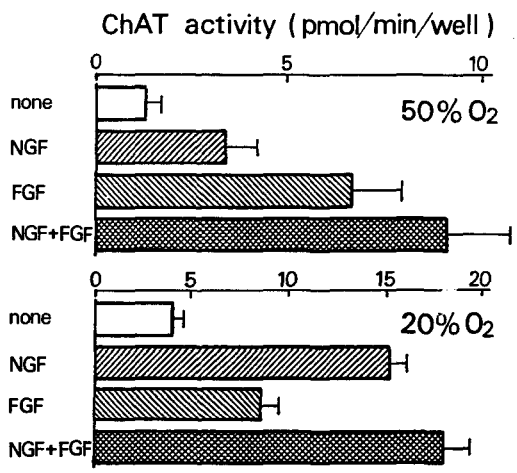


図2　20および50%気相酸素下でE20ラット中隔野ニューロンを2日間培養した後の各ウェル当たりのコリンアセチルトランスフェラーゼ活性
（加えたNGFおよびbFGFの濃度は各々100ng／ml）

【文献】

(1) 榎戸　靖、野々村健、九島洋一、畠中　寛　(1990) 神経化学、29 276-277.

(2) H.Hatanaka and H.Tsukui, Dev. Brain Res., 30 (1986) 47-56.

(3) Y.Enokido and H.Hatanaka, Brain Res., 536 (1990) 23-29 .

(4) Y.Kushima, H.Tsukui, Y.Enokido, C.Nisio and H.Hatanaka, Brain Res., 536 (1990) 16-22.

(5) M.Niinobe, N.Maeda, H.Ino and K.Mikoshiba, J.Neurochem., 51 (1988) 1132-1139.

192 Ｐｙｇｍｙマウス（ｐｇ）の神経化学的研究

杉崎哲朗、野口鉄也（東邦大・医・２生理）

〔要約〕
発育期脳に及ぼす成長ホルモン(GH)の効果発現の機序について明らかにする目的で、pygmyマウス(pg)――血中GH値及びソマトメジン値が正常であり、かつ、外因性GHに対して無反応な常染色体劣性遺伝様式をとる小人症ミュータントマウスで、先天的なソマトメジン受容体の欠落あるいは異常があると考えられているが、未だ明らかにされていない。――を用い、その神経化学的検索を行った。その結果、(1)pgマウスの大脳と小脳の湿重量が正常対照群(pg/+)のそれぞれ86.3%,85.3%と有意に減少していた。(2)pgマウスの大脳と小脳でのDNA含量ならびにRNA含量はそれぞれpg/+マウスの約83%の低値を示した。(3)pgマウスでは、大脳でのみCNPase活性がpg/+マウスの75.5%に減少していた。(4)pgマウスの一日行動総量は顕著に減少しており(pg/+マウスの31.4%)、日内変動も消失していた。以上のことから、血中ソマトメジン値が正常であるpgマウスでも小頭症を呈し、ミエリン低形成の存在することが明らかとなった。このことはpgマウスではソマトメジン受容体そのものの異常あるいはソマトメジンが受容体に結合したのちの細胞内で行われる一連の生化学的反応系に異常のあることが強く示唆された。

［目　的］
脳の発育とそれに伴う高次神経機能の発現にGHが必須であることが明らかにされてきた[1-6]。しかし、GHが血液-脳関門を通過し得ない[7]ことから、発育期の脳発育に及ぼすGHの効果がGHの二次ホルモンであるソマトメジンC(Insulin-like growth factor-1;IGF-1)の作用効果そのものである可能性が強く示唆されている。われわれは、GHを欠損するSnell下垂体性小人症マウス(dw)[1,2,6]と先天性成長ホルモン単独欠損症マウス(lit)[3-5]とは異なり、血中GHレベルおよび血中ソマトメジン値が正常で、かつ、GH抵抗性を有する小人症ミュータントマウス、pygmy (pg)マウス[8-11]を用いて中枢神経系を検索し、発育期脳におよぼすGHの効果発現の機序について検討を試みた。
［材料と方法］
動物：ジャクソン研究所より購入した雌・雄のC3H/HeNlcr-Wf-pg/+マウスを自家繁殖し、生後40日目に実験に供した。　生化学的分析：(1)RNA,DNAの定量：Schmidt & Thannhauserの方法[12]により抽出し、Mejbaumらの方法[13],Burtonらの方法[14]に従い、それぞれを比色定量した。(2)蛋白の定量：Lowryらの方法[15]によった。(3)CNPase活性の測定：Kurihara & Tsukadaの方法[16]で反応を行い、2'-AMPは高速液体クロマトグラフィー法[17]により測定した。(4)ミエリンの精製：Norton & Poduslo の方法[18]に従った。　行動量測定：既報の方法[1]に従ってAnimex Activity Meter Type S (LKB Farad)を用いて測定した。
［結　果］
体重：pgマウスの発育に伴う体重の増加は著しく抑えられており、40日齢でpg/+マウスは19.0±1.3g, pgマウスは8.3±0.5gの体重を示した。
脳重：40日齢の脳各部位の湿重量を比較すると、pgマウスでは、大脳でpg/+マウスの86.3%，小脳で85.3%であった。しかし、脳幹ではpg/+マウスと差はなっかた(表１)。
DNA,RNA,蛋白含量：pgマウス各脳部位当りのDNA含量はpg/+マウスと比較して大脳で89.5%，小脳で87.2%，また、RNA含量は大脳で82.3%，小脳で79.1%にそれぞれ有意に減少していた。しかし、脳幹では差は認められなかった。また、g湿重量当りの蛋白含量は40日齢脳各部位でpgマウスとpg/+マウスの間で有意の差はなかった(表１)。
CNPase活性：40日齢脳各部位のCNPase活性をみると、pgマウス大脳でのみその活性が75.5%に減少していた(表１)。
ミエリン分画のCNPase活性：大脳より得たミエリン分画でのCNPase活性はpg/+マウスで41.7%，pgマウスで39.3%とほぼ同率で回収され、その比活性に差は全く認められなかった。しかし、蛋白

の回収からみて、ミエリン分画がpgマウスで63.0%に減少していた(表２)。

行動量測定：Activity Meterで測定した結果、一日行動総量、暗時行動量、明時行動量いずれもpgマウスで減少しており、さらに明暗にともなう行動量の日内変動もみられなかった（図１）。

［考　察］

すでに、われわれは他の２種のGH欠損による小人症ミュータントマウス(dwマウスとlitマウス)の大脳で、グリア細胞の分裂増殖の低下、ミエリンの低形成のあること、完成したミエリンには異常がないこと、また、小脳で内顆粒層細胞数の減少していることを認め、さらに行動量の減少とその日内変動の消失していることを報告した[1-6]。今回のpgマウスを用いての実験結果は、dwマウスとlitマウスで得られとものと全く同様の結果であった。しかし、pgマウスはdwマウスとlitマウスとは異なり、血中GHレベル[10]および血中ソマトメジン値[11]が正常で、かつ、GH抵抗性を有する[10]ことが明らかにされている。さらに、pgマウスの遺伝的欠損はソマトメジン受容体そのもの、あるいは、ソマトメジン受容体に結合した後の細胞内で行われる一連の生化学的反応系にあることが考えられている[11]。したがって、今回の実験結果は、dwマウスとlitマウスにGHを投与すると脳の発育が回復すること[1 4 6]、しかし、GHは血液-脳関門を通過し得ないこと[7]、さらにIGF-1がGHの二次ホルモンであることが近年明らかにされたことなどを考え合わせると、発育期の脳発育に及ぼすGHの効果がIGF-1の作用そのものであることが強く示唆された。

［文　献］

(1)Noguchi,T.,et.al.(1982)J.Neurochem.38,257-263.(2)Noguchi,T.,et.al.(1982)J.Neurochem.39,1693-1699.(3)Noguchi,T.,et.al.(1985)Neurochem.Res.10,1097-1106.(4)Noguchi,T.,et.al.(1988)Neurochem.Res.13,249-252.(5)Morisawa,K.,et.al.(1989)Neurochem.Res.14,173-177.(6)Sugisaki,T.et.al.(1985)Neurochem.Res.10,767-778.(7)Mayberry,H.E.M.,et.al.(1971)Endocrinol.88,1309-1317.(8)King,J.W.B.(1950)J.Hered.41,249-252.(9)Rimon,D.L.&Richmond,L.(1972)J.Clin.Endocrinol.Metab.35,467-468.(10)Sinha,Y.N.,et.al.(1979)Proc.Soc.Expl.Biol.Med.162,221-223.(11)Nissley,S.P.,et.al.(1980)Horm.Metab.Res.12,158-164.(12)Schmidt,G.&Thannhauser,S.J.(1945)J.Biol.Chem.161,83-89.(13)Mejbaum,W.(1939)Z.Physiol.Chem.258,117-120.(14)Burton,K.(1956)Biochem.J.62,315-323.(15)Lowry,O.H.,et.al.(1951)J.Biol.Chem.193,265-275.(16)Kurihara,T.&Tsukada,Y.(1967)J.Neurochem.14,1167-1174.(17)Tsukada,Y.,et.al.(1980)J.Neurochem.34,1019-1022.(18)Norton,W.T.&Poduslo,S.E.(1973)J.Neurochem.38,749-758.

表１

Weights, DNA and RNA contents, RNA/DNA ratio, and CNPase activities in different parts of the CNS of 40-day-old *pg/pg* mice

Tissue	Genotype	Wet weight (mg)	Protein (mg/g wet-wt)	DNA (μg/brain part)	RNA (μg/brain part)	RNA/DNA	CNPase activity (μmol/mg protein of homogenate/min)
Cerebrum	*pg/+*	249±7 (10)	102±4 (10)	428±23 (10)	830±40 (10)	1.94	2.94±0.08 (10)
	pg/pg	215±7 (7)*	100±8 (7)	354±18 (7)*	683±49 (7)*	1.93	2.22±0.03 (7)*
Cerebellum	*pg/+*	55.6±0.9 (10)	118±8 (10)	309±25 (10)	163±19 (10)	0.528	2.84±0.19 (10)
	pg/pg	47.4±3.0 (7)*	120±9 (7)	255±26 (7)*	129±15 (7)*	0.506	2.83±0.24 (7)
Brain stem	*pg/+*	*114±5 (10)*	*107±7 (10)*	*195±10 (10)*	328±22 (10)	*1.68*	*5.54±0.26 (10)*
	pg/pg	104±8 (7)	110±9 (7)	187±20 (7)	327±19 (7)	1.75	5.39± 0.26 (7)

Values are expressed as mean ± SD, with the number of animals in parentheses.
All differences from the control, *pg/+*, were significantly by Student's *t*-test. *: p<0.001.

表２

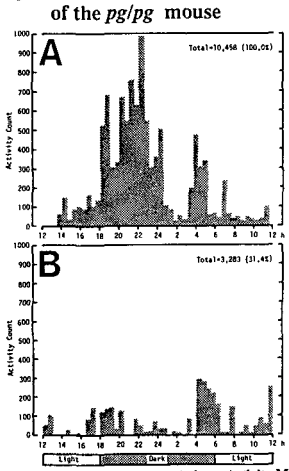
CNPase activity in purified myelin fraction of the cerebra from *pg/+* and *pg/pg* mice at 40 days of age

Genotype	Preparation	CNPase: Specific activity (μmol/mg protein/min)	CNPase: Total activity (μmol/min)	CNPase: Recovery (%)	Protein: Concentration (mg/g wet-wt)	Protein: Total content (mg)	Protein: Recovery (%)
pg/+	Homogenate	2.92±0.18 (5)	78.5	100	108	26.9	100
	Purified myelin	10.5±0.2 (5)	32.7	41.7	----	3.11	11.6
pg/pg	Homogenate	2.23±0.07 (5)	50.4	100	105	22.6	100
	Purified myelin	10.1±0.3 (5)	19.8	39.3	----	1.96	8.67

The values of CNPase specific activity are expressed as mean ± SD, with the number of animals in parentheses.

図１

Spontaneous locomotion activity of the *pg/pg* mouse



Activity was recorded by an Animex Activity Meter, Type S (LKB Farad). The sensitivity of the activity meter was adjusted to record only locomotion. Each column represents activity counts during 30-min intervals. A total 24-h count is shown in the upper right corner of each panel. (A) Control (*pg/+*), (B) *pg/pg*.

193 Gunnラット小脳における限局性黄染と関連するビリルビン結合タンパク

青野幸子[1]、仙波禮治[1]、佐藤浩[2]、慶野宏臣[1]、柏俣重夫[3]
([1]愛知県コロニー・研究所・周生期、[2]滋賀医大・生物、[3]刈谷保健所)

新生仔期に光照射を行い、小脳重量が Gunn ラットヘテロ接合体 (j/+) の約 74 % に回復した 15 日齢 Gunn ラットホモ接合体 (j/j) (光照射群) および低形成小脳をもつ無処置 j/j (無処置群) にビリルビンの displacer であるブコロームを投与し、小脳における限局性黄染 (核黄疸) を誘発した。両群ともブコローム投与後 15 時間で血清ビリルビン値は低下し、一方小脳内ビリルビン値は上昇した。ブコローム投与前の光照射群における血清ビリルビン値は無処置群の約 81 % であるのに、投与後の光照射群小脳内ビリルビン値は無処置群の約 140 % と有意に高値を示した。光照射群では全小葉の内顆粒細胞層でビリルビン黄染が認められたが、無処置群では小葉 VIII-IX のみが黄染されており、障害度の強い前葉・中葉の黄染はほとんど認められなかった。黄染の原因となるタンパクを同定するために、我々が開発した方法を用いて Gunn ラット小脳におけるビリルビン結合タンパクについて検討したところ、15・30 日齢 j/j 無処置群では j/+ に比べて 17K の分子量をもつ可溶性ビリルビン結合タンパクが減少していた。またこのタンパクは、15 日齢 j/j 無処置群小脳において障害の著しい前半部の減少が著明であった。

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。今回は、小脳顆粒細胞層におけるビリルビンの限局性黄染について若干の知見が得られたので報告する。

我々は、ビリルビンの displacer であるブコロームを用いた実験より、限局性黄染が小脳で最も起こりやすい時期は生後 15 日前後であることを既に明らかにしている (3) 。この時期におけるビリルビンの標的部位を明らかにするために、光照射によって小脳低形成が予防された j/j (4) と小脳低形成を示す j/j 間で小脳におけるビリルビンの限局性黄染に差異が認められるかどうか検討した。また我々は昨年度の本学会において、ビリルビン結合タンパクをニトロセルロース膜上で迅速かつ簡便に検出する方法について報告した (5) が、この方法を用いて Gunn ラット小脳におけるビリルビン結合タンパクについて検討した。

[材料と方法] Gunn ラット小脳におけるビリルビンの限局性黄染: j/j を光照射群および無処置群に分けた。光照射群 j/j 仔を、底に 14 本の蛍光管を備えた光照射箱の中央に置き、午前 9 時 30 分より午後 4 時 30 分まで 1 日 7 時間、生後 6 日より 10 日まで 5 日間光照射を行ない、無処置群は母獣より離して室内灯下に置いた。生後 15 日に光照射群および無処置群にブコローム (40mg/kg) を投与した。両群において、ブコローム非投与ラットをそれぞれの対照として用いた。投与後 15 時間でラット仔をエーテル麻酔し、心臓より血液を採取した。血清ビリルビン濃度および小脳内ビリルビン濃度はそれぞれ Malloy and Evelyn (6) 、Katoh ら (7) の方法を用いて測定した。一部の小脳はホルマリンで灌流固定し、組織学的検索を行なった。小脳におけるビリルビン結合タンパクの検索: 8、15、30 日齢の j/j および j/+ を用いた。断頭採取した j/j ・j/+小脳を 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、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。上清および沈澱を、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) 。SDS-電気泳動後、Towbin ら (8) の方法に従いタンパクをニトロセルロース膜上に転写した。SDS-電気泳動は Laemmli (9) の方法に準じて行い、ポリアクリルアミドの濃度は 5-20 % とした。ブロッティング後、ニトロセルロース膜をブロッキング試薬を含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH

Table 1. Effect of bucolome on cerebellar bilirubin level in photo-irradiated and non-irradiated homozygous (j/j) Gunn rats

Group	treatments		n	cerebellar weight (mg)	total plasma bilirubin level (mg/dl)	cerebellar bilirubin level (nmoles/g of wet weight)
1	irradiated	bucolome	9	118.4 ± 12.7[a]	5.3 ± 1.8[c]	66.0 ± 13.5[c,e]
2	irradiated	control	9	120.3 ± 14.4[b]	11.8 ± 2.8[d]	7.1 ± 1.8
3	non-irradiated	bucolome	8	56.6 ± 6.7	5.4 ± 1.7[c]	47.3 ± 13.2[c]
4	non-irradiated	control	10	60.7 ± 9.2	14.6 ± 1.3	6.9 ± 3.0

Results are expressed as the means ± SD.
[a] $p<0.001$, [e] $p<0.02$ compared with Group 3.
[b] $p<0.001$, [d] $p<0.02$ compared with Group 4.
[c] $p<0.001$ compared with the respective controls.

7.4) 中で 1 時間インキュベートした。ブロッキング試薬として 牛血清アルブミン フラクション V (BSA V; 85 μM) あるいは 卵白アルブミン (OVA; 85 μM) を用いた。 その後、0.2 ml の 0.1 N NaOH に溶解した 5 mg のビリルビン (Merck) を上記の緩衝液中に加え (最終濃度:170 μM) 、更に 1 時間インキュベートした。BSA V および OVA に対するビリルビンのモル比は 2 とした。蒸留水で軽く水洗後、Fouchet's reagent (10) 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。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 (11) の方法に従った。

[結果] 光照射群では j/j 小脳重は j/+ (小脳重: 161.6 ± 5.6) の約 74 % に回復しているのに対し、無処置群では約 36 % にとどまっていた (Table 1)。ブコローム投与前の血清ビリルビン値は光照射群では無処置群の約 81 % の値を示したが、小脳内ビリルビン値は両群における差は認められなかった。ブコローム投与後 15 時間の血清ビリルビン値は、両群ともそれぞれの対照に比べて有意に減少しており、ビリルビンがアルブミンより displace されていることが確認されたが、両群間の差は認められなかった (Table 1) 。小脳内ビリルビン値は両群ともに対照より増加していたが、光照射群におけるビリルビン値は無処置群に比べて有意に高値を示した (Table 1) 。ブコロームを投与した場合、両群ともにビリルビンによる限局性黄染が小脳において誘発された。光照射群の小脳では限局的黄染は全小葉の内顆粒細胞層に認められたが、低形成小脳をもつ無処置群では前葉・中葉における黄染はほとんど認められず、小葉 VIII-IX に強い黄染がみられた。

ブロッキング試薬として BSA V を用いた場合、15、30 日齢の小脳では 5 種類の膜タンパクおよび 1 種類の可溶性タンパクがビリルビン結合タンパクとして検出され、以前の報告 (5) を確認することができたが、j/j・j/+ 間の差は認められなかった。ブロッキング試薬として OVA を用いた場合、更にいくつかのタンパクが陽性反応を示し (5) 、そのうち分子量 17K の可溶性タンパクは j/+ に比べて j/j 小脳で減少していたが、8 日齢ではこのタンパクは認められなかった。低形成小脳を前半と後半にわけた場合、前半における 17K 可溶性タンパクは後半に比べて少なかった。

[考察] ブコロームによって小脳における限局性黄染が誘発された場合、無処置群の小脳内ビリルビン値は光照射群より有意に低い値を示したが、これは光照射によって低形成が予防された小脳では全小葉が黄染されるのに対し、低形成小脳では障害の著しい前葉・中葉の内顆粒細胞層の黄染がほとんど見られないことに起因すると思われる。j/+ 小脳に比べて j/j 小脳で減少していた分子量 17K の可溶性ビリルビン結合タンパクは障害の著しい j/j 小脳前半部で減少していること、黄染の認められない 8 日齢では検出されないことから、限局性黄染のおきた小脳ではビリルビンがこのタンパクに結合している可能性が示唆される。

(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. (1989) Biol. Neonate 55, 119-123. (4) Keino, H., Sato, H., Semba, R., Aono, S., Aoki, E., and Kashiwamata, S. (1985-86) Pediat. Neurosci. 12, 145-150. (5) Aono, S., Semba, R., Sato, H., and Kashiwamata, S. (1988) Bull. Japan. Neurochem. Soc. 29, 262-263. (6) Malloy, H. T. and Evelyn, K. A. (1937) J. Biol. Chem. 119, 481-490. (7) Katoh, R., Kashiwamata, S., and Niwa, F. (1975) Brain Res. 83, 81-92. (8) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354. (9) Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685. (10) Hawkinson, V., Watson, C. J., and Turner, C. R. H. (1945) J. Am. Med. Assoc. 129, 514-515. (11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.

194

SH-SY5Y細胞におけるカルバコールのサイクリックAMP産生系増強作用について

八木一中川　勇三，斉藤　康成，高田　吉弘，高山　衛
（　雪印乳業・生物科学研究所・神経化学　）

〔要約〕

SH-SY5Y細胞を用いて、フォルスコリン誘発細胞内サイクリックAMP含量に対するカルバコールの効果を調べた。カルバコールは、フォルスコリン誘発サイクリックAMP含量に対して濃度依存的な増大を引き起こした。カルバコールのサイクリックAMP含量上昇に対するED50値は、イノシトールリン脂質代謝応答に対するED50値と類似の値を示した。また、両作用はピレンゼピンにより抑制され、両作用のIC50値は、共に約2 μMを示した。カルバコールは、プロスタグランディンE$_1$やVasoactive intestinal peptide誘発サイクリックAMP含量に対しても同様な増強作用を示した。カルバコールによる増強応答は、トリフルオペラジンに感受性でカルフォスチンCに非感受性であった。以上の結果より、カルバコールによるサイクリックAMP産生系増強作用のすくなくとも一部は、カルモジュリン系を介している可能性が示唆された。

〔はじめに〕

ムスカリン性アセチルコリンレセプター刺激によって、種々の細胞内変化（フォスフォリパーゼCの活性化、アデニレートサイクレースの抑制、イオンチャンネル開閉の制御等）が引き起こされることが知られている(4)。一方、近年、異なるシグナル伝達経路のクロストークの存在が指摘され、細胞機能応答を理解する上で注目されている。しかしながら、神経系細胞を用いた詳細な解析が少なく、不明な点が多い。今回、我々は、イノシトールリン脂質代謝応答とカップルしたムスカリン性レセプターを有するヒトニューロブラストーマSH-SY5Y細胞において細胞内サイクリックAMP濃度の上昇が引き起こされることを認めたので報告する。

〔実験方法〕

SH-SY5Y細胞の培養：Dr. June Bielder により樹立された細胞株ヒトニューロブラストーマSH-SY5Y細胞は、伊野美幸博士（聖マリアンナ医大）の御好意により提供された。SH-SY5Y細胞は、10%牛胎仔血清、抗生物質を含むDMEM液を用い、5%CO_2存在下で37℃で培養した。イノシトールリン酸の測定：^{3}H-myoinositol を加え24時間ラベルしたSH-SY5Y細胞を、10 mM LiClを含むクレブスバッファー（114 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 0.75 mM $CaCl_2$, 1.2 mM Na_2HPO_4, 1.2 mM $MgCl_2$, 20 mM $NaHCO_3$, 10 mM glucose）で 30分間5%CO_2 存在下でインキュベートした後、カルバコールおよびピレンゼピンを添加し、30分間反応を行った。6%TCAによる反応停止後、細胞をホモジナイズし、12,000 X g, 20分間遠心分離後の上清を Bio-Rad AG1-X8樹脂（formate型）にてイノシトールーリン酸（IP$_1$）画分を分離し、その放射活性を測定した(1,7,8)。サイクリックAMP含量の測定：SH-SY5Y細胞を、20 mM Hepes, 100μM イソブチルメチルキサンチンを含むDMEM液でプレインキュベーション後、カルバコールおよび 10 μM フォルスコリンで10分間反応を行った。6%TCAにより反応停止後、細胞をホモジナイズし、遠心分離後の上清に存在するサイクリックAMPをRIA（ヤマサcAMPアッセイキット）にて測定した。

〔実験結果〕

SH-SY5Y細胞において、フォルスコリン（10 μM）は約50倍の細胞内サイクリックAMP含量の上昇した。カルバコールは濃度依存性にそのサイクリックAMP含量上昇を増強した（図1-A）。フォルスコリンで誘発したサイクリックAMP応答の最大増加は、約2-3倍でEC50値は約5 μMであった。一方、カルバコールのフォスフォリパーゼC活性化刺激によって生じるイノシトールリン酸蓄積のEC50値は約10 μMであった（図1-B）。図2にムスカリン性アンタゴニストであるピレンゼピン感受性を示す。フォルスコリンで誘発したサイクリックAMP上昇に対するカルバコール（100 μM）の増強作用およびカルバコール（100 μM）誘発イノシトールリン酸蓄積作用の両作用に対するピレンゼピンのIC50値は約2 μMであった。図3にプロスタグランディンE$_1$（PGE$_1$）およびVasoactive intestinal peptide (VIP) で誘発したサイクリックAMP含量に対するカルバコールの効果を示す。

カルバコール（100 μM）は、PGE$_1$（10 μM)およびVIP（1 μM)刺激作用に対しても約2－3倍の増強を示した。次に、プロテインキナーゼC阻害剤とカルモジュリン阻害剤の影響を調べた。フォルスコリンで誘発したサイクリックAMP含量上昇に対するカルバコールの増強作用は、カルフォスチンC（3 μM)前処理による影響は認められなかったが、トリフルオペラジン（100 μM)前処理により抑制された。

〔考察〕

今回、我々は、SH－SY5Y細胞においてカルバコールがフォルスコリン－，PGE$_1$－ および VIP－誘発サイクリックAMP含量上昇に対して増強作用を示すことを認めた。Meiらは、フォルスコリン－誘発サイクリックAMP含量上昇に対するカルバコールの効果を認めているが、ムスカリン性レセプターアンタゴニストで拮抗されないことを報告している(6)。我々のデーターとの相違の理由は明らかではない。また、SH－SY5Y細胞のムスカリン性レセプターのサブタイプについても矛盾が存在している。Serraらは、M1サブタイプレセプターを有していることを報告している(10)が、一方、Lambertら(5) や Cioffiら(2) は、SH－SY5Y細胞のピレンゼピン感受性からM3サブタイプレセプターであることを示唆している。我々のピレンゼピン感受性データーは、後者の報告を支持している。カルバコールによるサイクリックAMP含量上昇のメカニズムについては、イノシトールリン酸の増加による細胞内カルシウム濃度の上昇から生じるカルモジュリン依存性アデニレートサイクレース活性化のメカニズムが、トランスフェクトしたフィブロブラストやカルシノーマ細胞系で示唆されている(3, 9)。今回のSH－SY5Y細胞での我々のデーターから、類似なメカニズムが神経系細胞においても存在している可能性が示唆された。

〔文献〕
1) Berridge,M.J.,Dawson,R.M.C.,Downes,C.P.,Heslop,J.P.and Irvine,R.F.(1982) Biochem.J. 212, 473-482.
2) Cioffi,C.L.and Fisher,S.K.(1990) J.Neurochem. 54, 1725-1734.
3) Felder,C.C.,Kanterman,R.Y.,Ma,A.L.and Axelrod,J.(1989) J.Biol.Chem. 264, 20356-20362.
4) Hulme,E.C.,Birdsall,N.J.M.and Buckley,N.J.(1990) Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 30, 633-673.
5) Lambert,D.G., Ghataone,A.S.and Nahorski,S.R.(1989) Eur.J.Pharmacol. 165, 71-77.
6) Mei,L.,Roeske,W.R.and Yamamura,H.(1989) Brain Res. 504, 7-14.
7) Nakagawa,Y.and Baudry,M.(1989) Neuroscience 32, 363-369.
8) Nakagawa,Y.,Saitoh,K.,Ishihara,T.,Ishida,M.and Shinozaki,H.(1990) Eur.J.Pharmacol.184, 205-206.
9) Sapiro,R.A.,Scherer,N.M.,Habecker,B.A.,Subers,E.M.and Nathanson,N.M.(1988) J.Biol.Chem. 263, 18397-18403.
10) Serra,M.,Mei,L.,Roeske,W.R.,Lui,G.K.,Watson,M.and Yamamura,H.I.(1988) J.Neurochem. 50, 1513-1521.

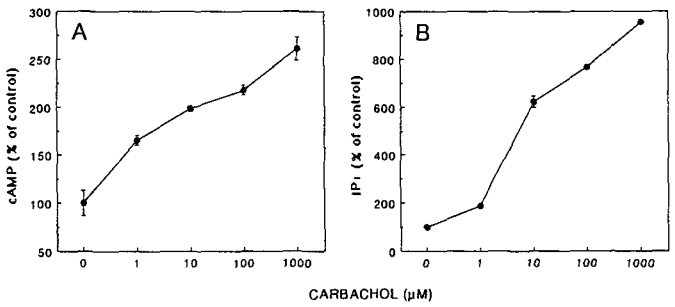


図1. カルバコール刺激で誘発されるcAMP応答(A) とPI謝応答(B) の用量－反応曲線

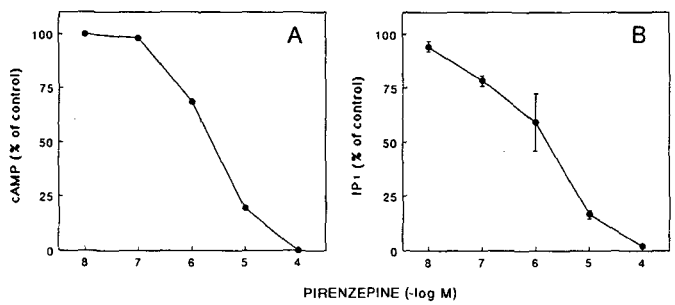


図2. ピレンゼピンによるcAMP応答（A）とPI代謝応答（B）の阻害曲線

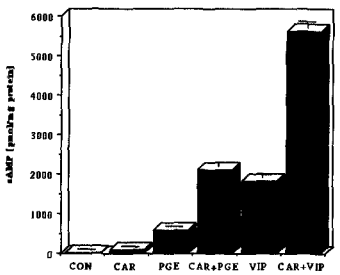


図3. ProstaglandinE1 および Vasoactive intestinal peptide 刺激で誘発されるcAMP応答に対するカルバコールの効果

195 てんかん性大脳皮質サイクリックAMP合成系のアデノシンおよびそのアナログに対する応答

服部幸雄、森脇晃義、林　泰資、堀　泰雄
（岡山大・医・第一生理）

〔要約〕

鉄塩溶液注入による慢性てんかん活動を示すラット大脳皮質の切片において、アデノシンおよびアデノシンアナログに対するサイクリックAMP合成の応答をいくつかの異なる皮質部位で比較検討した。アデノシンおよび2-chloroadenosine(2-CADO)に対するサイクリックAMP合成の応答は、鉄塩誘導てんかん性大脳皮質の第一次焦点側で変化し、その変化はアデノシン受容体を介するサイクリックAMP合成系の長期持続的な機能変化によることが示唆された。一方、R-N^6-phenylisopropyladenosineおよびN^6-cyclohexyladenosineに対するサイクリックAMP合成には、アデノシンや2-CADOに対する場合と異なり、その応答に変化はみられなかった。これらの結果は、鉄塩溶液注入により惹起されるアデノシン感受性サイクリックAMP合成系の機能変化は、アデノシン受容体のサブタイプにより異なることを示唆する。

［目的］

ラット大脳皮質への鉄塩溶液注入によって皮質脳波上に出現するてんかん性異常活動は、その出現が長期間に及び(6)、サイクリックAMP合成系の機能変化がその脳内過程に関与している可能性が考えられる。一方、アデノシンは中枢神経系において、ニューロン活動やシナプス伝達に重要な役割をもっていることが示されてきた(4)。本研究では、鉄塩誘導てんかん活動を示すラット大脳皮質の異なる部位より得られた切片を用いて、アデノシンおよびアデノシンアナログに対するサイクリックAMP合成の応答を比較検討した。

［方法］

Wistar系雄性ラット(体重180-230g)の大脳皮質左感覚運動野に5μlの0.1M塩化第一鉄溶液を注入した。対照群のラットには、5μlの生理食塩水を同じ方法で注入した。注入後、頭蓋骨に植え込まれた電極より皮質脳波を経時的に記録した。鉄塩溶液の注入により、皮質脳波上に、孤立性棘のみを示すラット、および孤立性棘に加えて棘徐波複合を示すラットが出現した。孤立性棘のみを示すラットは、その出現パタンからさらにいくつかに分類された(3)。本研究では、孤立性棘のみを示すラットのうちでその出現が注入側に優勢なラットをIS群、棘徐波複合をも示すラットをSW群とした。大脳皮質切片は、注入の30-60日後のIS群、SW群および対照群のラットから作製した。皮質脳波記録後に、摘出した大脳皮質を左右前後に四分した。この場合、注入点は左前半部皮質に含まれた。それぞれの皮質部位から作製した厚さ400μmの切片を、Krebs-Ringer bicarbonate-glucose液中で60分間インキュベートした後、アデノシン、2-chloroadenosine(2-CADO)等添加あるいは無添加の同液中でさらに10分間インキュベートした。すべてのインキュベーションは95% O_2-5% CO_2を通気しながら37°Cで行った。インキュベーション終了後の切片に氷冷7%トリクロロ酢酸を加えてホモジナイズし、ホモジネート中のサイクリックAMPを既に報告した方法(2)により精製定量した。統計学的処理には、分散分析およびStudent's t-testを用いた。

［結果］

ラット大脳皮質切片サイクリックAMP含量はアデノシンによって6-11倍に上昇した。注入点を含む左前半部皮質のアデノシンによるサイクリックAMPレベル上昇は、IS群およびSW群では対照群より大きかった。SW群では、注入側後半部皮質においても同様の増大がみられた。アデノシン無添加のサイクリックAMPの基礎レベルには、いずれの群においても変動は認められなかった。サイクリックAMP含量は、2-CADO、R-N^6-phenylisopropyladenosine(R-PIA)あるいはN^6-cyclohexyladenosine(CHA)によって5-18倍に上昇した。これらのうち、2-CADOが最も大きなサイクリックAMPレベル上昇効果を示した。2-CADOによるサイクリックAMPレベル上昇には、IS群およびSW群ともに、アデノシンによる場合と同様の注入側皮質での増大がみられた。しかし、R-PIAやCHAによる上昇にはそのような増大は認められなかった(Table 1)。2-CADOによるサイクリックAMPレベル上昇には、ホスホジエステラーゼ阻害剤のRo 20-1724

Table 1 Cyclic AMP contents in cortical slices incubated with or without adenosine analogues.

Group	and cortical area	No addition	2-CADO	R-PIA	CHA
IS	Left anterior	11.8±0.9	199.3±14.4[a]	79.1±5.7	75.2±5.4
	Right anterior	11.5±0.8	109.1±6.5	69.0±4.5	65.1±4.3
	Left posterior	11.9±0.7	111.8±7.1	68.1±4.3	63.9±4.0
	Right posterior	11.6±0.8	108.5±7.3	67.3±4.0	64.7±4.4
SW	Left anterior	11.5±1.0	202.7±13.4[a]	79.4±5.8	75.2±5.5
	Right anterior	11.4±0.7	114.5±7.0	68.2±4.4	64.7±4.1
	Left posterior	11.8±0.7	177.8±11.6[a]	76.9±5.1	72.7±5.2
	Right posterior	12.0±0.8	113.9±7.8	67.9±4.5	64.1±3.9
Control	Left anterior	11.4±0.9	114.1±6.4	66.2±4.3	65.6±4.3
	Right anterior	11.9±0.7	112.7±6.8	66.5±4.6	64.5±4.0
	Left posterior	12.0±0.5	115.8±7.1	69.0±4.1	63.1±4.2
	Right posterior	11.7±0.6	116.4±7.5	68.1±4.7	66.0±4.5

Cyclic AMP contents are expressed as pmol/mg protein. The concentration of the analogues was 0.1 mM. Each value represents the mean±SEM of 7-10 different experiments. [a]$p<0.001$ compared with the value of control rats.

およびアデノシンデアミナーゼの存在下においても、アデノシンあるいは2-CADO単独による場合と同様に注入側皮質での増大がみられた。また、これらのサイクリックAMPレベル上昇はアデノシンアンタゴニストの8-phenyltheophyllineによって強く抑制された。

[考察]

本研究の結果は、鉄塩溶液注入によって誘導されるてんかん活動をもつラット大脳皮質の注入点近傍皮質領域において、アデノシンや2-CADOに対するサイクリックAMP合成の応答が変動することを示している。この変動はホスホジエステラーゼ阻害剤およびアデノシンデアミナーゼの存在下での2-CADOに対するサイクリックAMP合成応答にもみられたことから、サイクリックAMP合成系自体の応答性が鉄塩溶液注入に伴って変化すると考えられる。また、アデノシンや2-CADOに対するサイクリックAMP合成応答はアデノシンアンタゴニストによって強く抑制されたので、これらの効果は細胞表面のアデノシン受容体を介していることが示唆される。一方、R-PIAやCHAに対するサイクリックAMP合成の応答には、2-CADOに対する応答にみられるような注入側皮質での増大は認められなかった。この理由は現在のところ明らかではないが、鉄塩溶液注入によりアデノシン受容体メカニズムに起る機能変化がそのサブタイプにより異なる可能性が考えられる。これまでに、鉄塩溶液注入によるてんかん活動の発現には大脳皮質細胞膜脂質の過酸化が関与していること(5)、脂質過酸化はアデノシンに対するサイクリックAMP合成の応答を変化させること(1)等が示唆されている。したがって、大脳皮質への鉄塩溶液注入はサイクリックAMP合成の応答に影響を及ぼし、この応答変化は大脳皮質の注入点近傍に始まり周囲皮質へ広がることが考えられる。この応答変化波及の程度が異常脳波出現パタンの相違に対応すると推測される。本研究で得られた長期間に及ぶ第一次焦点側皮質におけるサイクリックAMP合成系の応答変化は、鉄塩誘導てんかんの発達とその持続的活動の過程にかかわるものと考えられる。

[文献]

1. Baba, A., Tatsuno, T., and Iwata, H. (1984) J. Neurochem. 42, 192-197
2. Hattori, Y., Moriwaki, A., Hayashi, Y., and Hori, Y. (1990) J. Neurochem. 54, 518-525
3. Moriwaki, A., Hattori, Y., Nishida, N., and Hori, Y. (1990) Neurosci. Lett. 110, 72-76
4. Snyder, S.H. (1985) Annu. Rev. Neurosci. 8, 103-124
5. Willmore, L.J., Hiramatsu, M., Kochi, H., and Mori, A. (1983) Brain Res. 277, 393-396
6. Willmore, L.J., Sypert, G.W., Munson, J.B., and Hurd, R.W. (1978) Science 200, 1501-1503

196 新規ＡＮＰアンタゴニストＨＳ－１４２－１の株化神経細胞におけるｃＧＭＰ産生抑制作用について

土岐　真一郎、松田　譲
（協和発酵・東京研）

〔要約〕

HS-142-1は微生物の培養液より単離された初めての非ペプチド性ANPアンタゴニストである。我々は神経系におけるナトリウム利尿ペプチドの作用を明らかにするために、神経由来の株化細胞であるPC12およびNG108-15細胞を用いてナトリウム利尿ペプチドによるcGMP産生の増大に対するHS-142-1の影響について検討した。心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)はいずれの細胞においても濃度依存的にcGMP量を増加させた。C-typeナトリウム利尿ペプチド(CNP)によるcGMP応答はPC12細胞ではANP、BNPの場合と比べ1/10と弱かった。NG108-15細胞ではCNPに対する応答は認められなかった。いずれの細胞においてもHS-142-1は濃度依存的にナトリウム利尿ペプチドによるcGMP産生を抑制した。ニトロプルシッドによるcGMP産生の増大に対してHS-142-1は無効であった。以上の結果より、HS-142-1はこれら二種の細胞においても、機能的ANPレセプターの作用を抑制することが明らかとなった。従って、HS-142-1は神経系でのナトリウム利尿ペプチドの機能を探る上で有用な物質であると考えられる。

【目的】ナトリウム利尿ペプチドファミリー（心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、C-typeナトリウム利尿ペプチド(CNP)）は体液量や血圧を調節しているホルモンである。これらは脳内にも広く分布しており、その局在性から血圧調節、脳脊髄液量の調節、ホルモンの分泌などの重要な役割を担っていると考えられている。最近、我々は微生物培養液からグアニル酸シクラーゼと共役しているANPレセプターに特異的に作用する新規非ペプチド性アンタゴニストHS-142-1（図1）を単離した(1、2)。HS-142-1が神経系においてもナトリウム利尿ペプチドの作用を抑制するかどうかを明らかにするために神経細胞のモデル細胞であるPC12およびNG108-15を用いてナトリウム利尿ペプチドによるcGMP産生に対するHS-142-1の影響について検討した。

【方法】PC12細胞は7.5%馬血清および7.5%牛胎児血清をふくむDMEM中で培養して実験に供した。細胞内もしくは細胞外のcGMP産生はFiscusらの方法(3)に従い、細胞を250μMIBMX存在下、各薬剤と共に37℃、20分間インキュベートした後に測定した。NG108-15細胞は10%馬血清、100μM hypoxanthine、16μM deoxythymidine をふくむDMEMを用いて６穴プレート上で培養して実験に用いた。cGMP産生はTohdaらの方法(4)を用い、細胞を各薬剤と共に37℃、10分間反応させた後に測定した。cGMP量はラジオイムノアッセイ法を用いて定量した。

【結果】PC12細胞ではrANP、pBNPにより同程度の細胞内外の濃度依存的なcGMP産生の増加がみられた（図2-A）。pCNPによる濃度依存的なcGMP量の増加も認められたが、その増加作用はrANP、pBNPと比較して1/10と弱かった。HS-142-1はそのいずれのペプチドによるcGMP産生も同程度に抑制し、100μg/mlではほぼ完全に抑制した（図3-A）。NG108-15細胞においてもPC12細胞と同様にrANPおよびpBNPによるcGMP産生の増大が認められたが、pBNPによる増加作用はrANPに比べて弱く、pCNPによるcGMP産生の増大は認められなかった（図2-B）。HS-142-1はrANPおよびpBNPによるcGMP産生を抑制したが、PC12細胞の場合と比較してその阻害度は低く、また、100μg/mlの濃度でも完全な抑制はみられなかった（図3-B）。PC12およびNG108-15のどちらの細胞においてもニトロプルシッドによるcGMP量の増加に対して100μg/mlのHS-142-1はなんら阻害を示さなかった。

【考察】近年、三種のANPレセプター分子が遺伝子レベルで同定され、そのおのおのと各ナトリウム利尿ペプチドとのリガンドリセプター相互作用が明らかとなってきた(5)。PC12細胞とNG108-15細胞とでは、rANP、pBNP、pCNPによるcGMP産生量がそれぞれ異なることから、異種のレセプターサブタイプが二種の細胞において異なった割合で発現していることが示唆される。PC12細胞においてHS-142-1がほぼ同等にrANP、pBNP、pCNPによるcGMP産生を抑制し、ニトロプルシッドによるcGMP産生に対して全く無効であった。牛副腎皮質において既に得られているHS-142-1が選択的に膜結合型グアニル酸シクラーゼを選択的に阻害するという結果(1)を考慮すると、このことはグアニル酸シクラーゼと一体となったANPレセプターを阻害する事によってもたらされているものと考えられる。NG108-15細胞においてHS-142-1によるcGMP産生抑制がPC12細胞における場合と比較して弱かったこと、また高濃度のHS-142-1によってもcGMP産生が完全に抑えられなかったことからNG108-15細胞ではHS-142-1に非感受性の未知のANPレセプターが発現している可能性が示唆される。このことについては今後詳細なる検討が必要である。以上のことより、HS-142-1は神経系でのナトリウム利尿ペプチドの役割を解明する上で有用な化合物であると考えられる。

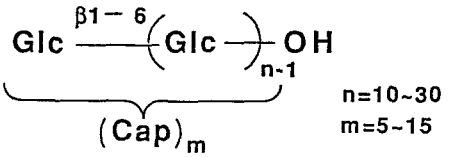


図1、HS-142-1の構造　Glc；グルコース、Cap；カプロン酸

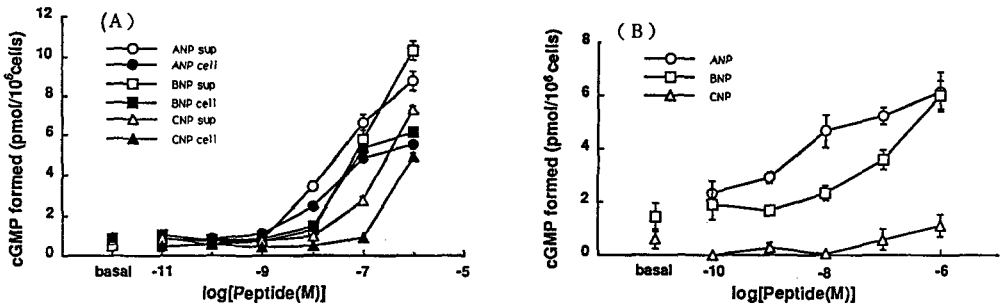


図2、ナトリウム利尿ペプチドによるcGMP産生　(A)PC12細胞を各濃度のrANP(○)、pBNP(□)、pCNP(△)とともに20分間処理した。白抜きは細胞外、黒塗は細胞内cGMP量を表す。(B)NG108-15をrANP(○)、pBNP(□)、pCNP(△)とともに10分間処理したときの細胞内外の総cGMP量。各点は三連の平均を表す。

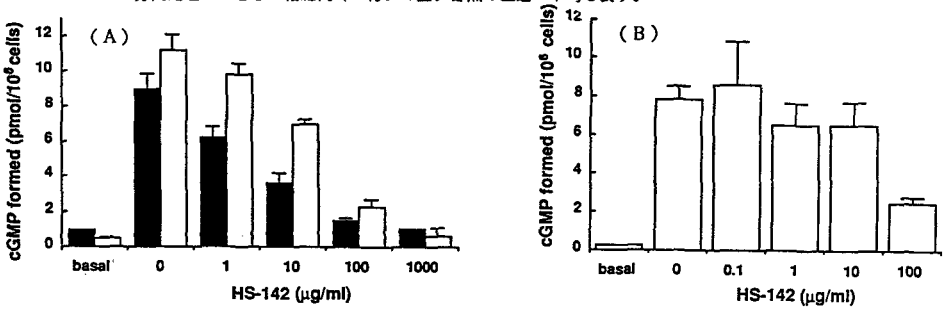


図3、rANPによるcGMP産生に対するHS-142-1の影響　rANPは10-7M添加した。(A) PC12細胞を用いた場合の細胞内cGMP量（■）および細胞外cGMP量（□）。(B)NG-108-15細胞を用いた場合の細胞内外の総cGMP量。各点は三連の平均を表す。

【参考文献】 (1) Y. Morishita et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun., 176, 949-957 (2)Y. Morishita et al. (1991) Jap. J. Pharmacol. [suppl I], 55, 123 (3)R. R. Fiscus et al. (1987) J. Neurochem., 48, 522-528 (4)M. Tohda and Y. Nomura (1990) J. Neurochem., 55, 1800-1805 (5)K. J. Koller et al. (1991) Science, 252, 120-123

197 c-erb Aα₂ mRNAのラット中枢内局在部位

鯉淵典之、山岡貞夫、鈴木光雄＊

（獨協医大・第一生理、＊群馬大・内分泌研）

〔要約〕

proto-oncogene c-erb Aα 2 mRNAのラット中枢神経系(主に視床下部及びその周辺部)における局在を in situ hybridization histochemistry (ISH)を用いて解析した。実験には雄性ラット(200-250g)を用い脳凍結切片を作成した。この切片を用いてラットc-erb Aα₂ mRNAに相補的な合成RNA (riboprobe)によりISHを施行した。このriboprobeはトリチウムで標識された核酸を用いて作成し、hybridizationの検出はオートラジオグラフィーで行った。c-erb Aα₂ mRNAは脳内に広範囲にわたって分布していた。視床下部では室傍核、腹内側核、弓状核に比較的密な分布が見られた。視床下部以外では海馬、扁桃体内側部、大脳皮質等に多く分布していた。c-erb Aα₂は甲状腺ホルモン受容体superfamilyに属しているが甲状腺ホルモンとの結合能を持たないことが知られている。そして他の甲状腺受容体と比べ中枢神経系に比較的多量に存在していることが知られている。このことから、c-erbAα₂は中枢神経系における甲状腺ホルモン作用の特殊性に関与している可能性があると思われる。

proto-oncogene c-erb Aは avian erythroblastosis virus (erv)から同定されたoncogene v-erb Aと非常に高いホモロジーをもち、生体内で現在までに数種類が同定されている(c-erb A superfamily)。そのうちのあるものは甲状腺ホルモン受容体として機能している。一方、臨床的に甲状腺機能障害で小児期の発達障害のみならず、成人期以降の発症例でも種々の精神神経学的異常が生ずることが従来より知られてきた。しかし、実験的に甲状腺ホルモンが直接脳に作用するという確証は未だに得られていない。その一方で、最近中枢神経系より数種類のc-erb Aが同定された[1]。しかし細胞内での存在量が神経ペプチド等に比べ非常に少ないため局在は未だに明らかではない。本研究では、c-erb Aα₂ mRNAに相補的なRNAプローブを用い、in situ hybridization histochemistry (ISH)により実験を進めその局在を検討した。

実験は雄性Sprague-Dawleyラット(200-250g)を用いた。このラットをネンブタール麻酔下にて断頭屠殺後脳を摘出し、脳凍結切片(厚さ：8μm)を作成した。そして、4％ホルマリンで固定後ISHに用いた。ラットc-erb Aα₂ mRNAの特異的sequenceに相補的な合成RNA (riboprobe)は³Hにて標識された核酸(³H-UTPならびに³H-ATP)を用いて作成した。このriboprobeを用いてMcCabeらの方法[2]に改変を加えた手法で50°Cで48時間ISHを施行した。そして、洗浄のため切片にRNase処理

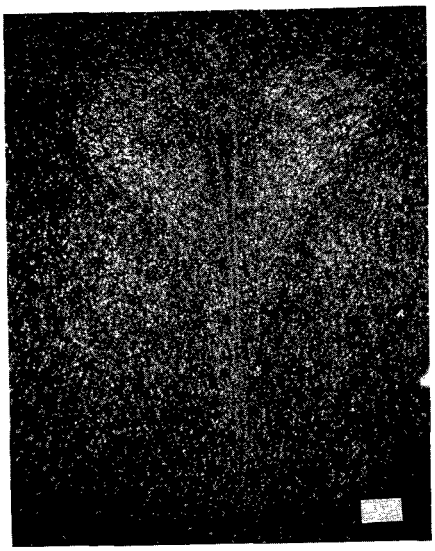


図1 暗視野コンデンサーを用いた視床下部室傍核のISHによる顕微鏡オートラジオグラフィー像。scale bar=100μm

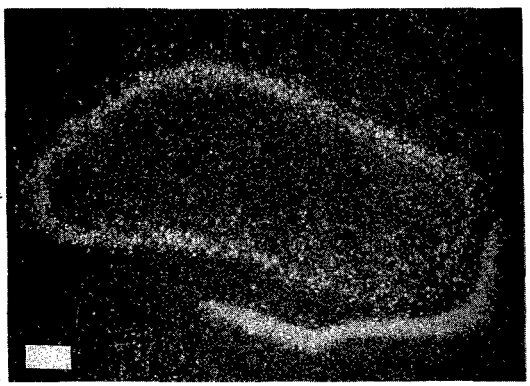


図2 海馬吻側の顕微鏡オートラジオグラフィー像。scale bar=100μm

を行ったのちオートラジオグラフィー用エマルジョン(Kodak NTB-3)を塗布し、4カ月間4°Cにて暗室内で露光し現像した。細胞同定のため、現像後0.5%クレシルバイオレットにて後染色を行い封入した。観察には明視野ならびに暗視野にて光学顕微鏡を用いた。

結果の一例を図1に示した。写真はラット視床下部室傍核で、暗視野にて撮影した。c-erb Aα$_2$ mRNAは脳内に広範囲に分布していた。視床下部では室傍核、視床下部腹内側核、弓状核等に密に存在していた。また、視床下部以外では海馬(図2)を始め、扁桃体内側核、大脳皮質深層等に多く見られた。強拡大で観察すると(図3)、明らかに細胞周囲へのオートラジオグラフィーのグレイン集積像が見られる細胞もあるが、全体的に細胞単位のグレイン数は少なかった。そのため細胞によっては標識細胞なのか、それともbackgroundなのか同定困難な細胞も多く見られた。また、神経細胞はグリアに比べより多くのグレインが集積していた。

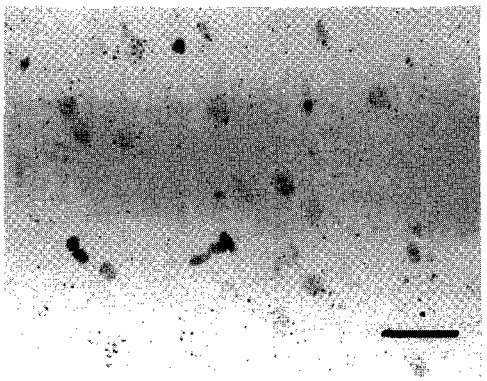


図3 海馬(CA1領域)顕微鏡オートラジオグラフィー像。高温(50°C、2日間)でISHを行うため、細胞質は変性し、核のみが後染色により染まっている。scale bar=40μm

本研究では甲状腺ホルモン受容体superfamilyの一つc-erb Aα$_2$ mRNAの脳内分布をISHを用いて明らかにした。ISHは目的とするmRNAの局在を明らかすることが出来るため、ある物質の作用を生理的機能と関連させて論じる場合有効な研究手段である。本研究では当初より細胞単位での同定を目的とした。細胞内含有量が非常に少ないため、結果として細胞単位で標識細胞を同定するまでには至らなかったものの、mRNAが小量でもISHで局在の同定は可能であることが証明できた。

c-erb Aα$_2$は甲状腺ホルモン受容体superfamilyの中では特異で、ホルモン結合活性を持つc-erb Aα$_1$と同じDNA sequenceから転写された後、alternative splicingによって、標的とするDNAのプロモーター領域の甲状腺ホルモン受容体結合部位(thyroid hormone response element、TRE)との結合能は有するものの、甲状腺ホルモンとの結合能を保有しない物質となる[3]。in vitroの実験では、他の甲状腺ホルモン受容体と拮抗してTREと結合し、甲状腺ホルモンの作用を調節することが確認されている[3]。おもしろいことに、c-erb Aα$_2$は、他の甲状腺ホルモン受容体と比べ中枢神経系において比較的多量に存在している。一方、甲状腺機能の変化に伴う種々の神経症状が知られているにもかかわらず、旧来より脳は甲状腺ホルモンの標的臓器ではないとされてきた。その理由として甲状腺ホルモンによる組織の酸素消費量の増大が見られないことがあげられている[1]。本研究で、甲状腺ホルモンに不応でしかも甲状腺ホルモン受容体のDNAへの結合に対し阻害的に作用するc-erbAα$_2$が脳内に多量にしかもdiffuseに存在することが分かったが、c-erb Aα$_2$が脳内に多く存在していることで甲状腺ホルモンの中枢神経系への作用を調節し、他の標的臓器と比べてその作用を特殊化していることも考えられる。

［謝辞］
実験に際し、協力してくださった米国ロックフェラー大学のR.B. Gibbs博士ならびにD.W. Pfaff教授に感謝致します。また、riboprobe作成にご協力くださったハーバード大学のW.W. Chin教授に感謝致します。

［文献］
1. 鈴木光雄 1989. Receptor III. 作用別レセプター論 5.甲状腺ホルモン. 日本臨床 47:620-625.
2. McCabe, J.T. and Pfaff, D.W. 1989. In situ hybridization: a methodological guide. Conn, M.P. (ed) Methods in Neurosciences vol. 1 Gene probes. Academic Press, San Diego. p98-126.
3. Koenig, R.J., Lazar. M.A., Hodin R.A., Brent G.A., Larsen P.R., Chin, W.W. and Moore D.D. 1989. Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. Nature 337:689-661.

198 rasートランスフォーマントにみられる周期的Ba内向き電流

星　直人、橋井美奈子、野田百美、野澤義則*、東田陽博
（金沢大・医・神経情報研・神経物性、*岐阜大医・生化）

〔要約〕

繰り返して細胞内Ca濃度が上昇する（Caオシレーション）時に、細胞内へCaイオンが流入する事が知られている。その過程を解析する事を目的に、Caオシレーションが高頻度で出現する、ras・トランスフォーム細胞で、2荷イオン流入を電気生理学的に調べた。50 mM Baを含む灌流液下で、マイトジェン刺激により、主にBaによる周期的な内向き電流が観察された。この電流は、-75 ～ +75 mV の広い範囲で固定膜電位を変化させても観察でき、いわゆる電位依存性Caチャンネルを介しているとは考えられなかった。この電流は、10 % FCS、ブラジキニン（100 nM）、カフェイン（10 mM）、フォルスコリン（10 μM）で刺激誘発でき、PMA（1 nM）、Ni（200 μM）、SK & F 96365（20 μM）で阻害された。又、この内向き電流は、50 mM Ca，50 mM Srを含む灌流液では生じなかった。以上の結果はこの電流が細胞内から何等かの調整を受けて、Baの流入を生じており、Caオシレーションと密接に連動している事を示唆している。

［はじめに］

ニューロトランスミッター刺激により、細胞内のCaが周期的に上昇するCaオシレーションは、多くの組織・細胞で観察されており、細胞外の情報を細胞内伝達物質であるCaに情報変換する上で重要な意味を持つ現象と考えられている(1)。Caオシレーションの維持には細胞外Caが必須で、常に細胞内CaストアにCaを補充しなければならない。Ca補充の様式として、容量性Ca流入(5)や、PI 代謝産物の関与など(3) が提唱されているがその詳細は不明である。

今回我々は、Caオシレーションが高頻度で出現する事が報告された、DT線維芽細胞株（NIH3T3のK-ras パーマネントトランスフォーマント）(2) で、Caオシレーション中にCaチャンネルを通って細胞内に流入するであろう2荷イオンの動態を、Baをイオンキャリアーとする Ba電流として記録したので報告する。

［方法］

理化学研究所の杉本博士より入手したDT細胞は、10 % FCS を含むDMEMで既報通り培養した(2)。膜電流の測定は、4 ～ 7 MΩ のパッチ電極によるwhole-cell-膜電位固定法で行った。細胞は50 mM BaCl，30 mM NaCl，10 mM CsCl，25 mM Glucose，25 mM TEA，10 mM HEPES，(PH 7.3 buffered by NaOH) を含む液で灌流した。パッチ電極は、150 mM CsCl，1 mM $MgCl_2$，10 mM EGTA，1.0 mM ATP，10 mM HEPES （PH 7.3 buffered by CsOH）液で満たした。薬物は灌流液に加えて用いた。

［結果と考察］

(1) 100 nM BK を含む50 mM Ba溶液で灌流するとまず、一過性の（図1の＊で示した）緩慢な内向き電流が生じた。ひきつづき（＃で示した）周期的に別の内向き電流が生じた。周期的に起こる内向き電流は、その後2～4時間以上観察できた（図1）。

(2) 膜電位を、+20 mVに固定してもBa内向き電流の振動が観察できた。このことから、今まで知られている電位依存性Caチャンネルを通る電流ではないと考える（図2）。Ba存在下 Na Free で内向き電流が流れる事と、Ba free ではこの電流が消失することから、主にBaがチャージキャリアーである電流である。

(3) 100 nM BK や10 % FCS で刺激した場合、図1のような緩慢な内向き電流を伴ったが、10 μM フォルスコリン、50 μM dbc AMP, 10 mM カフェイン刺激の場合緩慢な内向き電流なしに、周期的な内向き電流が誘発できた。

(4) この電流は、200 μM Ni, 1 nM PMA, 20 μM SK & F 96365 で阻害された。この薬理的性質は、別に測定されたFura-2蛍光を指標とした、Caオシレーションの動向(2) とよく一致した。

(5) 50 mM Baを50 mM Sr, 50 mM Ca にそれぞれ置換した灌流液では、周期的におこる内向き電流は消失し、又、刺激誘発することはできなかった。このことは、Sr、Ca のみが細胞内Caストアに入る事ができる(4)という報告を考えあわせると、この電流が細胞内Caストアから制御を受けている事を示唆していると思われる。

この電流は、細胞内Caを補充するためのCa流入チャンネルを介していることが期待される。Caオシレーションでの CaピークとBa電流が一致するかは、Ba条件下で Fura-2 が使用できないため不明である。現在、シングルチャンネル記録法により、そのチャンネルを同定しようと試みている。

[文献]

1. Berridge, M. J. (1990) J. Biol. Chem. 265: 9183-9186.
2. Fu, T. et al (1991) FEBS Lett. 281: 263-266.
3. Irvine, R. F. (1990) FEBS Lett. 263: 5-9.
4. Kwam, C. Y. & Putney, J. W. (1990) J. Biol. Chem. 265: 678-684.
5. Takemura, H. & Putney, J. W. (1989) Biochem. J. 258: 409-412.

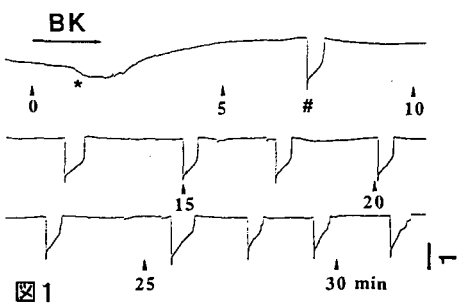


図1

[図1] 100nM BK 灌流開始後にみられる内向き電流の時間経過

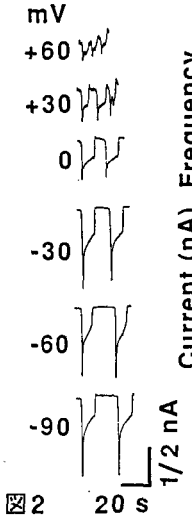


図2

[図2] 示した固定膜電位での内向きBa電流

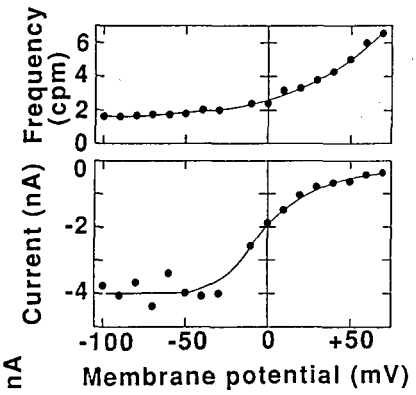


図3

[図3] 図2で示した細胞での、固定膜電位を変数とする、内向き電流の大きさと頻度の関係

199 中枢神経細胞内カルシウム動態に対するendothelinの作用

小泉修一、片岡泰文*、山下樹三裕*、丹羽正美*、渡辺繁紀、工藤佳久**
（九州大・薬・薬理、*長崎大・医・薬理２、**三菱化成生命科学研究所・脳神経薬理）

〔要約〕
中枢神経細胞内Ca^{2+}動態に及ぼすendothelis(ETs)の影響を調べた。ET-1及びET-3刺激によりラット海馬培養神経細胞、海馬切片及び線条体切片において細胞内Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]_{in}$）の上昇が認められた。海馬神経培養細胞では、ET-3、0.1～10 μM刺激により濃度依存性の$[Ca^{2+}]_{in}$上昇が認められた。海馬切片ではET-3刺激により、CA1 stratum radiatum 及び歯状回(DG)で、またET-1によりstratum radiatumで$[Ca^{2+}]_{in}$上昇が認められた。これらの部位は、N-methyl-D-aspartate (NMDA)刺激により$[Ca^{2+}]_{in}$の上昇が認められる部位とほぼ一致していた。線条体切片においては、背外側部ならびに内側部で$[Ca^{2+}]_{in}$上昇が著明であった。以上本実験結果は、ETsが脳内neuropeptideとして$[Ca^{2+}]_{in}$上昇を介してグルタミン酸と同様、神経の可塑性あるいは虚血時の神経細胞障害などに関与している可能性を示唆するものであり興味深い。

ETsは血管内皮細胞由来の強力な血管収縮物質として発見されたペプタイドであるが(6)、中枢神経系でもその特異的結合部位、ETs様免疫活性およびETmRNAの発現が認められている(7)。さらに脳組織でのIP_3産生、アストロサイトでの$[Ca^{2+}]_{in}$上昇作用(1)が報告され、ETsは血管系だけでなく脳内でもなんらかの生理機能を担っている可能性が指摘されている。本実験では神経細胞及び脳切片を用いてETs刺激による$[Ca^{2+}]_{in}$変化とその作用局在性を観察し、ETsの$[Ca^{2+}]_{in}$に与える影響を検討しその生理的役割を明らかにしようとした。

［実験方法］

海馬神経細胞の培養：既報(4)にしたがいWistar系ラット胎児（16～20日）より分画した海馬を0.25 % trypsin/0.02 % deoxyribonuclease Ⅰで処理し、poly-D-lysineでコートしたカバーグラス上に、2～6 × 10^5 cells/wellの濃度にて培養した。グリア細胞の増殖を抑えるために第５日目ないしは第７日目に10 μMのcytosine arabinofuranoside 24 時間処理を行った。実験には14～16日目の培養細胞を用いた。

脳切片の作製：実験にはWistar系雄性ラットを用いた。断頭後、すばやく摘出した脳を、十分通気した後凍らせてシャーベット状にした人工脳脊髄液(ACSF)にて洗浄した。脳がよく冷えた状態で海馬及び線条体を分画し、ロータリースライサーにて300 μmの厚さのスライス標本を作製した。

$[Ca^{2+}]_{in}$の測定：$[Ca^{2+}]_{in}$変化の測定はCa^{2+}-indicator fura-2を用いて行った。(5)。Fura-2の負荷は培養細胞ではACSFに希釈したfura-2/AM (5 μM)を加え45～60分間incubationした後、30分間以上洗浄した。脳切片はfura-2/AM (10 μM)を負荷し45分間酸素通気しながらincubationを行いその後同様に洗浄を行った。標本を顕微鏡ステージ上のchamberにセットし流速２ ml/minで灌流し、ET(１～10 μM)、NMDA(10, 100 μM)及び脱分極刺激(KCl; 30, 50 mM)を0.5～２分間負荷した。Fura-2蛍光の変化(340/360)を$[Ca^{2+}]_{in}$の上昇としてreal-timeで測定し、汎用画像解析装置（ARGUS-100）を用いデータ解析を行った。

［結果］

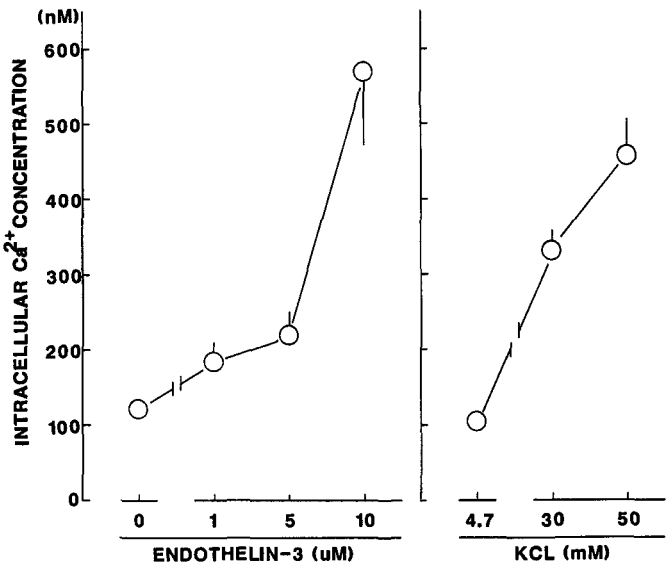
培養細胞：ET-3 (0.1～10μM), 1 min刺激を行うと濃度依存性の$[Ca^{2+}]_{in}$上昇が観察された。また、$[Ca^{2+}]_{in}$の上昇は持続的であった。脱分極刺激（KCl; 30, 50 mM）後のET-3刺激、及びET-3負荷後の再度のET-3刺激では$[Ca^{2+}]_{in}$の上昇は認められなかった。

脳切片：ET-1及びET-3 (1～10μM), 1 min刺激により、海馬及び線条体切片において濃度依存性の

$[Ca^{2+}]_{in}$上昇が認められた。特に海馬ではCA1 stratum radiatum及びDGにおいて著明であった(ET-1, 10 μM; 21.4 ± 4.2%(CA1)、及び 18.8 ± 2.1%(DG)、 ET-3, 10 μM; 30.0 ± 5.7%(CA1)、及び 35.0 ± 8.6%(DG)、 % of increase)。またCA1 stratum radiatum 及びDGにおいては、NMDA刺激によってもETsと同様に$[Ca^{2+}]_{in}$上昇が認められた。ET-3刺激後さらに再度のET-3刺激を行うと、$[Ca^{2+}]_{in}$上昇は惹起されなかったが、ET-3刺激後に、ET-1及びNMDA刺激を行うといずれの場合にも、$[Ca^{2+}]_{in}$上昇が認められた。

[考察]

海馬切片においてETs刺激によりCA1 stratum radiatumおよびDGで特に著明な$[Ca^{2+}]_{in}$上昇が認められた。これまでETsは、神経関連細胞としては、培養グリア細胞、樹立神経系株細胞系や牛副腎培養クロマフィン細胞において細胞内Ca^{2+}動態を活性化することが報告されている。今回、脳神経細胞においてもETsにより$[Ca^{2+}]_{in}$が上昇することがはじめて明らかとなった。海馬切片での$[Ca^{2+}]_{in}$上昇は少なくとも一部は神経細胞そのものにおいて生じた変化を反映したものと推測される。ETsの脳神経細胞や脳切片における作用は長時間持続すること、さらに受容体の脱感作が生じやすいことなど、末梢組織での報告とよく一致している(7)。脱分極刺激後にETs刺激による$[Ca^{2+}]_{in}$上昇が生じなくなったことは、脱分極による電位依存性Caチャンネル(VSCC)の不活性化によりETsの作用が抑制されたことによると考えられる。従ってETs刺激による$[Ca^{2+}]_{in}$上昇過程にVSCCが関与している可能性が示唆される。我々は先に、ETs誘発性細胞障害(2)や、ETsの線条体切片からのdoapmine遊離作用が、Ca拮抗薬により抑制されること(3)を報告した。これらの結果からもETsによる$[Ca^{2+}]_{in}$上昇作用におけるVSCCの関与は十分考えられる。またET-3負荷後でもET-1及びNMDA刺激による$[Ca^{2+}]_{in}$応答は観察された。従って、これらはそれぞれの特異的受容体を介してその作用を発現すると推測される。ETsが神経細胞における$[Ca^{2+}]_{in}$を上昇させること及び上昇部位が海馬CA1、DGなどNMDAによる上昇部位とよく一致していたことは、ETsがグルタミン酸と同様に神経の可塑性、あるいは神経細胞死の機構においてなんらかの役割を果たしている可能性を提起するものであり興味深い。



[参考文献]

(1) Goldman, R.S. et al.(1991) Neuroscience Lett., 123, 4-8.

(2) Kataoka, Y. et al.(1989) Neuroscience Lett.,107,75-80.

(3) Koizumi, S. et al. (1990) Japan. J. Pharmacol. Suppl., 52, 103p.

(4) Kudo, Y. et al.(1986) Br.J.Pharmacol., 89. 191-198.

(5) Kudo, Y. et al.(1988) Biomed. Res., 9, 153-156.

(6) Yanagisawa, M. et al.(1988) Nature, 332, 411-415.

(7) Yanagisawa, M. et al.(1989) Trends Pharmacol. Sci., 10, 374-378.

図1 Endothelin-3及びKCl刺激による海馬培養神経細胞内Ca^{2+}濃度の変化

200 抗うつ薬のラット脳培養神経細胞内Ｃａ２＋濃度上昇作用

清水雅美、西田　朗、早川　浩＊、山脇成人＊
（国立呉病院臨床研究部、＊広島大・神経精神）

〔要約〕

ラット前大脳皮質の初代培養単一神経細胞を用いて抗うつ薬の細胞内Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]i$）に及ぼす効果を検討した。４種の抗うつ薬（amitriptyline、desipramine、imipramine、mianserin）により用量依存性の$[Ca^{2+}]i$上昇が観察された。これらの反応は細胞外Ca^{2+}を除去した条件下において影響されなかったことから、細胞内Ca^{2+}貯蔵部位からのCa^{2+}の遊離を反映していると考えられた。Amitriptyline（1mM）による$[Ca^{2+}]i$上昇はbradykinin（10μM）またはcaffeine（20mM）の前投与により有意に抑制された。また、amitriptyline、desipramine、mianserin（各々1mM）はイノシトール1,4,5-三リン酸（IP_3）量を有意に増加させた。さらに、ホスフォリパーゼＣの阻害薬であるneomycinの前処置はamitriptylineによる$[Ca^{2+}]i$上昇を有意に抑制した。以上のことから、これらの抗うつ薬はIP_3感受性のCa^{2+}貯蔵部位およびcaffeine感受性のCa^{2+}貯蔵部位を含む細胞内Ca^{2+}貯蔵部位からCa^{2+}の遊離を引き起こすことが示唆された。

【目的】

近年、細胞機能に関連した抗うつ薬の作用が注目されており、中でも細胞内情報伝達系に対する直接作用の可能性が考えられている。最近、ラット脳スライスにおいて高濃度の抗うつ薬がイノシトール一リン酸の蓄積を促進すること(1,5)、またPI代謝系関連酵素の活性に影響すること(2,3,4)が報告され、抗うつ薬がホスファチジルイノシトールーCa^{2+}動員系に対し何等かの作用を持つ可能性が示唆されている。しかしながら、その作用機序に関しては未解決な問題も多く、また、抗うつ薬のCa^{2+}動員系に対する直接的作用に関しては未検討である。そこでわれわれは、抗うつ薬投与による細胞内Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]i$）の変化をラット前大脳皮質由来の培養単一神経細胞を用い、fura-2蛍光法により検討した。

【方法】

1.培養神経細胞の作成：胎生第18日のラット胎仔より前大脳皮質を取り出し、0.25% トリプシン、0.02% DNaseⅠで37°C、20分間処理した。得られた細胞懸濁液をあらかじめ単層培養したアストログリア細胞上に 5×10^5cells/well（直径15mm）の密度でまき、37°C、90% air:10% CO_2の条件下、7-12日間培養した。培地には、ダルベッコ改変イーグル培地 、5% 牛胎仔血清、5% 馬血清、1mM ピルビン酸ナトリウム、50 U/ml ペニシリンG、100 μg/ml ストレプトマイシンを用いた(6)。

2.培養神経細胞内Ca^{2+}濃度変化の測定：標本にfura-2/AM（5μM）を 37°C、90分間負荷し、balanced salt solution（BSS:130mM NaCl、5.4mM KCl、1.8mM $CaCl_2$、5.5mM glucose、20mM HEPES、pH7.3）で灌流を行った。 抗うつ薬は全てBSSに溶解し灌流により1分間暴露した。Ca^{2+}を含まないBSS（1mM EGTAを含む）は1分間、Ca^{2+}拮抗薬は15分間、neomycinは20分間の前処置を行った。340nm／380nm、 340nm／360nmの二波長励起蛍光変化をコンピューター画像処理により解析し、キャリブレーションカーブを用いて $[Ca^{2+}]i$に変換した(6)。

3.IP_3量の測定：ラット胎仔前大脳皮質より分離した細胞を単層培養したアストログリア細胞上に 3×10^6cells/dish（直径35mm）の密度でまき、8日間培養した。標本は2mlのBSSで3回洗浄した後、抗うつ薬は5秒間、acetylcholineは15秒間与えた。反応液を除いた後、4%過塩素酸1mlを加え反応を停止させ、氷上に20分間静置し、2000g、15分間（4°C）の遠心操作により蛋白質を沈澱させた。上清を 1.53M KOH/75mM HEPESで pH7.5に合わせ、氷上に1時間保存した。再び2000g、15分間（4°C）の遠心操作を行い、上清中のIP_3量をIP_3アッセイシステム（TRK.1000、アマシャム）により定量した。

【結果】

1.抗うつ薬投与による$[Ca^{2+}]i$変化：ラット前大脳皮質由来の培養単一神経細胞において４種の抗うつ薬の投与（1mM）により一過性の$[Ca^{2+}]i$上昇が観察された。この反応は10秒以内にpeakに達し、薬物存在下にもかかわらず30秒以内に徐々に静止レベルまで戻った。これらの反応は Fig.1に示すように用量依存性を示した。

2.$[Ca^{2+}]i$上昇に及ぼす細胞外Ca^{2+}除去の影響：４種の抗うつ薬（1mM）は、細胞外Ca^{2+}非存在下においてもCa^{2+}存在下とほぼ同程度の$[Ca^{2+}]i$上昇を引き起こした。

3.$[Ca^{2+}]i$上昇に及ぼすCa^{2+}拮抗薬の効果：Imipramine（1mM）による$[Ca^{2+}]i$上昇は、verapamil、nicardipine、diltiazem（10μM）の前処置で影響されなかった。

4.$[Ca^{2+}]i$上昇に及ぼすbradykininおよびcaffeine前処置の影響：Amitriptyline（1mM）投与の前にbradykinin（10μM）およびcaffeine（20mM）の投与を1分間行った。これら薬物の投与により、amitriptylineによる$[Ca^{2+}]i$上昇は投与前の反応に比し24±5%、35±3%（mean±SEM、n=20-23）に各々抑制された（Fig.2）。

5.抗うつ薬投与によるIP_3産生：ラット前大脳皮質培養細胞を用い、抗うつ薬投与によるIP_3量の変化を測定した。対照値、6.8±0.2 (pmol/10^6cells；mean±SEM、n=6) に比し、1mM amitriptylineの投与によりIP_3量は11.0±0.2 (n=5) に増加した。薬物によるIP_3量の増加を対照値に対して%表示した結果をTable 1に示した。 Amitriptyline、mianserin、desipramine (各々1mM) 、acetylcholine (1μM) はIP_3量の有意な増加を引き起こした。Imipramine (1mM) 投与は有意ではないが、対照値の20%の増加を示した。

6.$[Ca^{2+}]i$上昇に及ぼすneomycinの効果：5mM neomycinの前処置は amitriptyline (1mM) またはimipramine (1mM) 投与による$[Ca^{2+}]i$上昇を対照値の80%と60%に抑制し、10mM neomycinは各々37%と22%に抑制した。

【考察】

4種の抗うつ薬、 amitriptyline、imipramine、 desipramine、mianserinはラット前大脳皮質培養神経細胞において一過性の$[Ca^{2+}]i$上昇を引き起こし、この反応は10μMから1mMの濃度で用量依存性を示した。これら$[Ca^{2+}]i$上昇は細胞外Ca^{2+}非存在下において、またCa^{2+}拮抗薬の前処置によっても影響されなかったことから、抗うつ薬は細胞外からのCa^{2+}流入ではなく細胞内Ca^{2+}貯蔵部位からCa^{2+}の遊離を引き起こすことが示唆された。さらに、$[Ca^{2+}]i$上昇はbradykinin、caffeineの前処置により各々24%と35%に抑制されたことから、抗うつ薬は、IP_3感受性Ca^{2+}貯蔵部位とcaffeine感受性Ca^{2+}貯蔵部位の両部位からCa^{2+}の遊離を引き起こすことが示唆された。抗うつ薬がIP_3感受性Ca^{2+}貯蔵部位からCa^{2+}の遊離を引き起こすことは、以下のことから確認できた。 Amitriptyline、 mianserin、 desipramineは 1μM acetylcholine刺激とほぼ同程度のIP_3量の増加を引き起こし、imipramineによっても有意ではないが、対照値の20%のIP_3量増加を認めた。さらに、ホスフォリパーゼCの活性を阻害してIP_3の産生を抑制することが知られているneomycinの前処置は、抗うつ薬による$[Ca^{2+}]i$上昇を抑制した。今回、4種の抗うつ薬に認められた作用の機序に関しては、受容体を介する作用、あるいは抗うつ薬自身が有する両親媒性の性質により膜に直接作用することにより受容体以降のGTP結合タンパク質またはホスフォリパーゼCの作用の誘導、あるいは膜を通過し、細胞内Ca^{2+}貯蔵部位への直接作用などが推測され、今後さらなる検討が必要と思われた。今回認められた抗うつ薬の作用は、細胞内Ca^{2+}貯蔵部位からのCa^{2+}動員系のメカニズム解明に新たな方向性を加えるものであるが、高濃度を必要とすることから臨床効果と結び付けるのは困難と思われる。

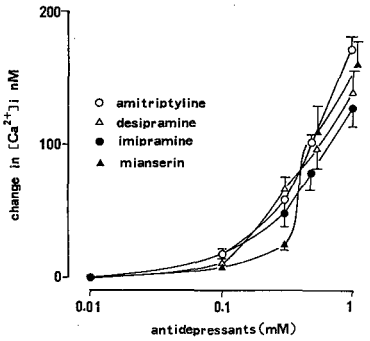


Fig. 1 Dose-response curves of antidepressant-induced [Ca2+]i increases in rat fronto-cortical cultured neurons. The results represent mean±SEM values obtained by testing 20-45 cells.

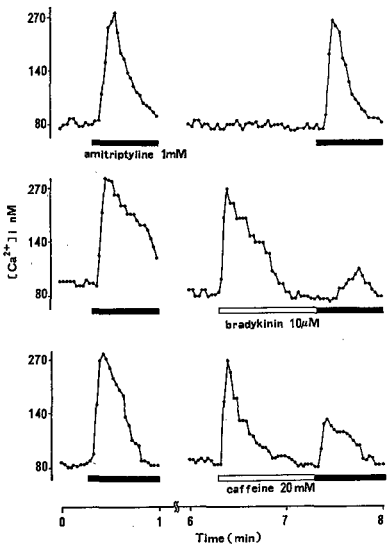


Fig. 2 Effects of bradykinin and caffeine on the amitriptyline-induced [Ca2+]i increases in rat fronto-cortical cultured neurons. Horizontal bars indicate perfusion with amitriptyline (1 mM, solid bars), bradykinin (10 μM) and caffeine (20 mM).

Table 1 Effects of antidepressants and acetylcholine on IP3 levels in rat fronto-cortical cultured cells.

Treatment		Ins(1,4,5)P_3 content (% of control)
Control		100± 3
Amitriptyline	1mM	158± 4**
Mianserin	1mM	160±19*
Desipramine	*1mM*	152±18*
Imipramine	1mM	120±14
Acetylcholine	1μM	188±24*

Data are presented as percentage of control values and represent results from 4-7 determinations in 2-3 separate experiments. * $p<0.05$; ** $p<0.01$, indicates a significant difference from control values.

【文献】

1) Dyck, L.E. and Boulton, A.A. (1989) Neurochem. Res., 14:1047-1052.
2) Husebye, E.S. and Flatmark, T. (1988) Biochem. Pharmacol., 37: 4149-4156.
3) Li, P.P., Warsh, J.J. and Stanacev, N.Z. (1988) Neurochem. Res., 13:789-795.
4) Mori, T., Takai, Y., Minakuchi, R. et al (1980) J. Biol. Chem., 255:8378-8380.
5) Osborne, N.N. (1988) Neurochem. Res., 13:105-111.
6) 清水雅美、早川 浩、加藤匡宏、山脇成人(1991)神経精神薬理 (印刷中)

201 ラット小脳CaBP23K：Ca依存性膜結合蛋白質の精製とその性質

高松 研、野口鉄也、平野修助、植村慶一*
（東邦大 医 第2生理、慶応大 医 生理*）

〔要約〕
Ca依存性膜結合蛋白質：CaBP23KをCa存在下に調整したラット小脳膜分画のEGTA溶出液より、Mono Q, Phenyl-Sepharose CL4Bを用いて精製し、最終的にCosmosil C18ARを用いた逆相HPLCにて単一に精製した。本標品の分子量は、ゲルろ過より23kDa、S DS-Polyacrylamide Gel電気泳動にてCa存在下21kDa、Ca非存在下23kDaであった。メルカプトエタノールの存否によっては電気泳動上の移動度は変化しなかった。等電点はCa存在下5.2、Ca非存在下4.9であった。蛋白1分子あたりのCa結合数は最大4個と推定された。CaBP23Kは、80° C, 5 minの熱処理によっても上記性質に変化は認められなかった。また、CaBP23Kは、Ca依存性に小脳、大脳、網膜より精製した膜分画に結合し、同様の結合が燐脂質に対しても認められた。

【はじめに】

Ca依存性膜（燐脂質）結合蛋白質には、Annexin (Lipocortin)と総称される一群のCa結合蛋白質が知られている。これらは比較的高濃度のCa存在下に可逆的に燐脂質に結合するとされ、17残基からなる共通配列を持つ70~80残基のサブドメインが4回から8回繰り返すという構造上の共通性を持っている(1)。我々はCa存在下に調整したラット小脳膜分画からのEGTA溶出液中に、^{45}Ca-AutoradiographyでCaと高親和性に結合すると思われる分子量約23kDaの蛋白が存在することを見い出した。そこで今回は、この蛋白を精製し、その性質について検討した。

【方法】

ラット小脳20gを10倍量の0.32M sucrose, 20mM Tris pH 7.4, 0.2mM PMSF, 1mM$CaCl_2$でホモゲナイズし、1,500gで20min遠心し上清を100,000gで60min遠心した。沈査を20mM Tris pH 7.4, 0.2mM PMSF, 1mM$CaCl_2$で4回洗い、粗膜分画とした。粗膜分画を20mM Tris pH 7.4, 0.2mM PMSF, 2mM EGTAで懸濁し、100,000gで60min遠心した上清をEGTA溶出液とした。EGTA溶出液の60~80%硫安分画を20mM Tris pH 7.4, 1mM $CaCl_2$対して透析した後、同緩衝液で平衡化したMono Qにかけ NaClの濃度勾配で溶出した。CaBP23Kは180mM NaClに溶出したが、この分画に500mMとなるようにNaClを加え、500mM NaCl, 20mM Tris pH 7.4, 1mM $CaCl_2$で平衡化したPhenylsepharose CL4Bにかけた。100mM NaCl, 20mM Tris pH 7.4, 1mM $CaCl_2$で洗った後、100mM NaCl, 20mM Tris pH 7.4, 2mM EGTAで溶出した。この分画をさらに0.1%TFAで平衡化したCosmosil C18にかけAcetonitrileの濃度勾配で溶出した。ゲルろ過にはSuperose 12を用い、50mM Sodium Phosphate pH 7.4, 100mM NaClを移動相とした。SDS-Polyacrylamide Gel電気泳動はLaemmliの方法に、二次元電気泳動はO'Farrelの方法に、^{45}Ca-AutoradiographyはMaruyamaの方法 (2)に、^{45}Ca-Equilibrium DialysisはPotterの方法(3)に従った。各組織の膜分画の調整は小脳の場合と同様に行なった。

【結果および考察】

ラット小脳膜分画からのEGTA溶出液中に^{45}Ca-Autoradiographyで、分子量約23kDaのバンドを見い出した。このバンドは1mM Ca存在下に調整した上清中には存在しなかったことから、Ca依存性に膜分画と結合することが示唆され、CaBP23Kとした(Fig. 1)。そこでEGTA溶出液の硫安分画を行ない60~80%分画にCaBP23Kを回収した。この分画を20mM Tris pH 7.4, 1mM $CaCl_2$対して透析した後、同緩衝液で平衡化したイオン交換カラムMono QにかNaClの濃度勾配で溶出した。CaBP23Kは約180mM NaClに溶出された。さらにこの分画をCa存在下にPhenylsepharose CL4Bに吸着させ低NaCl濃度の緩衝液で洗った後、EGTAで溶出したところCaBP23Kはこの分画中に回収された。この段階で電気泳動的に純度は約90%と推定された。

CaBP23KはSuperose12 を用いたゲルろ過で分子量23kDa、LaemmliのSDS-Polyacrylamide Gel電気泳動では、0.1mM Ca存在下に21kDa、0.1mM EGTA存在下に23kDaであった。Mercaptoethanolの存否によって移動度は変化しなかった。2次元電気泳動によって等電点は10uM Ca存在下に5.2、0.1mM EGTA存在下に4.9であった。またCaBP23Kの上記性質は、80°C, 5minの熱処理によっても変化しなかった。^{45}Ca-Autoradiographyでは、一般的にEF-hand構造を有する高親和性にCaを結合する蛋白のみが検出され、Annexinと総称される比較的親和性の低いCa結合蛋白の一群は検出されない。^{45}Ca-Equilibrium Dialysisによる検討では、Ca濃度が5uM以上のときCaBP23K 1 分子あたり4分子のCaを結合し、Caに対する親和性は比較的高いものと思われた。一方、CaBP23KはCa依存性に小脳、大脳、網膜より調整した膜分画に結合し、同様の結合がPhosphatidylserineに対しても認められた(Fig. 2)。最近、Kawamuraらによって光受容の順応蛋白として見い出されたS-modulinは、Ca依存性に視細胞円板膜に結合しPhosphodiesterase活性を調節している可能性が示唆されている。S-modulinはまたEF-hand構造を有することが示されている(4)。このCaBP23KはS-modulin特異的と思われるC末端よりの合成ペプチドに対する抗体（抗S-modulin抗体-2）と交差反応性を示すことから(Fig. 3)、細胞内でなんらかの情報調節を行なっている可能性が示唆される。

【文献】

1. Heinzmann, C.W. and Hunziker, W. (1991) TIBS 16:98-103
2. Maruyama, K. et. al. (1984) J. Biochem. 95:511-519
3. Potter, J.D. et. al. (1983) Method in Enzymology 102:135-152
4. Kawamura, S. and Murakami, M. (1991) Nature 349:420-423

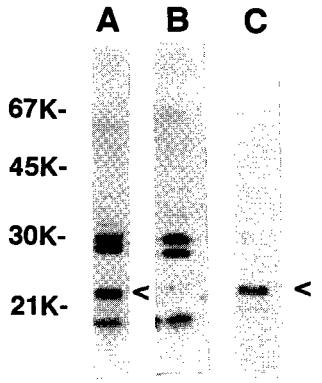


Fig. 1 ^{45}C-Autoradiography
A: 小脳の1mM EGTA加緩衝液による抽出分画
B: 小脳の1mM Ca加緩衝液による抽出分画
C: 小脳のCa存在下に調整した粗膜分画のEGTA加緩衝液による抽出分画

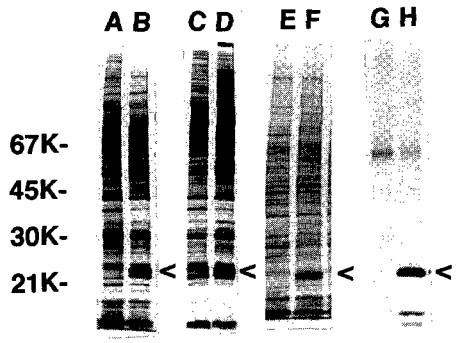


Fig. 2 Ca依存性の膜分画への結合
各々の膜分画とCaBP23Kを室温で20minインキュベートし、100,000g, 30min遠心しその上清を電気泳動した。
A, B: 小脳、C, D: 大脳、E, F: 網膜、G, H: PS-Liposome
A, C, E, G: Ca(+)、B, D, F, H: EGTA(+)

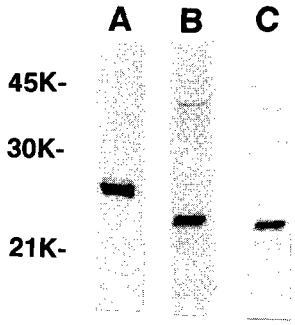


Fig. 3 抗S-modulin抗体によるImmunoblot
A: 網膜の1mM EGTA加緩衝液による抽出分画
B: 小脳の1mM EGTA加緩衝液による抽出分画
C: CaBP23K

202 百日咳毒素（ＩＡＰ）によるＡＤＰ－リボシル化反応
―ラット脳およびヒト血小板膜標品における検討―

小田垣雄二，小山　司，山下　格
（北海道大学医学部・精神医学教室）

〔要約〕
ラット脳およびヒト血小板より調整した膜標品を用いて，百日咳毒素(islet-activating protein, IAP) による［^{32}P］ADP-リボシル化反応を検討した。100μM の GTPγS 存在下において，大脳皮質のIAP による［^{32}P］ADP-リボシル化反応は$MgCl_2$ の濃度に依存して抑制されたが，このMg^{2+}の効果に対し２mMのリチウムは影響を与えなかった。各種の抗うつ薬長期投与によっても大脳皮質におけるIAP によるADP-リボシル化は変化しなかった。一方，ヒト血小板膜標品においても，ラット脳と同様，一定の蛋白濃度の範囲内ではこの反応をIAP 感受性Ｇ蛋白質量の測定に利用しうることが示された。健常成人を対象にした検討より，年令と血小板におけるIAP によるADP-リボシル化反応の間には有意な負の相関があることが明らかとなった。

【はじめに】
精神分裂病や躁うつ病などの内因性精神疾患の病態や精神科治療薬の奏効機転との関連においては，従来細胞膜表面の各種受容体に焦点を当てた研究が数多くなされてきた。最近，これらの受容体への刺激を細胞内の二次情報に変換する機構の詳細が明らかにされるのに伴い，受容体以降の情報伝達機構に着目した研究が増加している。われわれは，昨年，ラット大脳における百日咳毒素(islet-activating protein, IAP) によるADP-リボシル化反応を検討し，リチウムが*in vitro*でも長期投与によってもこの反応に影響を与えないことを報告した(3) 。今回は，各種抗うつ薬の投与による影響を検討し，さらに同様の方法をヒト血小板膜標品にも適用したのでその結果を報告する。

【対象と方法】
①ラット大脳皮質膜標品における反応には既述の方法(3) を用いた。抗うつ薬としては，imipramine, desipramine, amitriptyline, tranylcypromine, およびiprindolをそれぞれ 10mg/kg，１日１回，14日間腹腔内投与し，生理食塩水を投与した対照群と比較した。
②ヒト血小板膜標品はNelsonとSeamonの方法(2) を一部改変して調整した。IAP による［^{32}P］ADP-リボシル化反応はラット大脳において報告した方法(3) と同様の方法で施行したが，反応液中に 100μM のGTP および10mMの$MgCl_2$ が含まれている点が異なっている。今回の測定の対象としたのは，研究の趣旨をよく説明し同意の得られた24～60歳の健康成人15名（男性７名，女性８名）である。

【結果】
①ラット大脳皮質における反応
すでに報告したように，GTP の非水解性アナログである GTPγS は$MgCl_2$ の非存在下ではIAP による［^{32}P］ADP-リボシル化反応を増強するが(3)， この反応に対し$MgCl_2$ は濃度依存的な抑制効果を示した(Fig. 1)。２mMの塩化リチウムの添加によっても，この抑制効果は影響を受けなかった(Fig. 1)。各種抗うつ薬の長期投与によっても大脳皮質におけるIAP によるADP-リボシル化量には有意な変化は認められなかった(Table Ⅰ) 。
②ヒト血小板における反応
ラット大脳膜標品の場合(3) と同様，ヒト血小板においても，一定の範囲内で蛋白濃度とADP-リボシル化量の間には比例関係が成立した(Fig. 2)。15名の健常成人の値をFig. 3に示した。年令と血小板のIAP によるADP-リボシル化量との間には有意な負の相関関係を認めた($r=-0.58$, $P<0.05$) 。

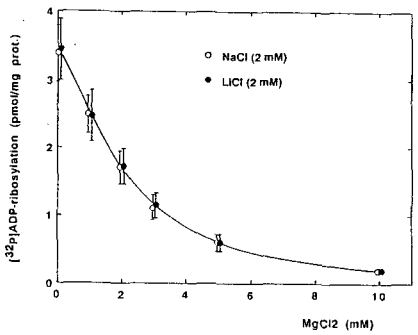


Fig.1 Inhibitory effect of $MgCl_2$ on the IAP-catalyzed [^{32}P]ADP-ribosylation in rat cerebral cortical membranes. Values represent means ± S.E.M. of six experiments.

Table I Effects of long-term treatment with antidepressants on [^{32}P]ADP-ribosylation catalyzed by IAP in rat cerebral cortical membranes.

	ADP-ribosylation (pmol/mg prot.)
Control (n=5)	2.14 ± 0.41
Imipramine (n=5)	2.18 ± 0.39
Desipramine (n=5)	2.12 ± 0.34
Amitriptyline (n=5)	1.95 ± 0.41
Tranylcypromine (n=5)	2.13 ± 0.52
Iprindol (n=5)	2.07 ± 0.41

Values are means ± S.E.M.

【考察】

昨年の報告(3) および今回の結果(Fig. 1, Table I) より，ラット大脳のGi/Go はリチウムまたは抗うつ薬によって少なくとも量的には変化を受けないことが示された。今後は受容体とG蛋白との共役機構など，機能的な側面からの検討がなお必要と思われる。

一方，ヒト血小板における検討からは，年令との間に負の相関があることが示された。血小板においては主にGi_2 が存在することが報告されている(1) ので，加令に伴うADP-リボシル化量の変化はこのG蛋白量の減少によるものであるかもしれない。血小板におけるこのような年令の影響が，そのまま脳内のG蛋白についても当てはまるか否かは現時点では不明であり，死後脳の検索の結果などを待つ必要があろう。躁うつ病などの機能性精神疾患においては血小板は最もよく用いられる対象であり，著者らは今後この方法を用いて精神疾患におけるG蛋白質の関与について検討を加えたいと考えている。今回の結果からは，その際，特に年令について厳密なマッチングが必要となることが示された。

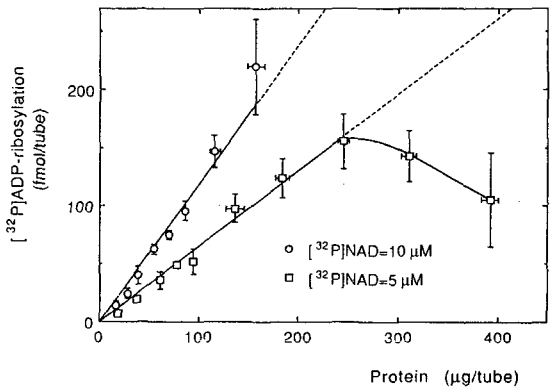


Fig.2 Relationship between the protein concentrations of platelet membranes and the amounts of [^{32}P]ADP-ribosylation catalyzed by IAP. Values represent means ± S.E.M. of 2-5 determinations.

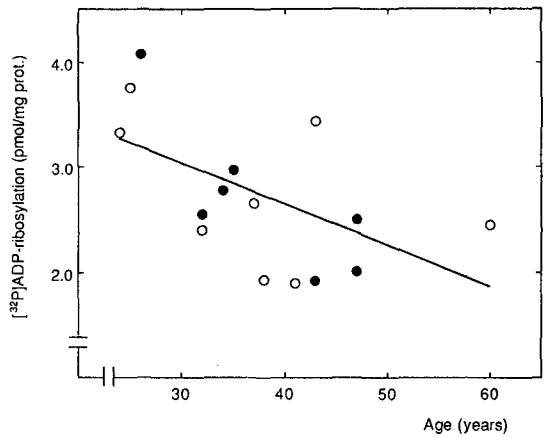


Fig.3 [^{32}P]ADP-ribosylation of platelet membranes by IAP in relation to subject age. Each point represent the value for male (●) and female (○) donors.

【文献】

1. Nagata,K.,Katada,T.,Tohkin,M.,Itoh,H.,Kaziro,Y.,Ui,M.,and Nozawa,Y. (1988) *FEBS Lett.* 237, 113-117
2. Nelson,C.A.and Seamon,K.B. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 13469-13473
3. 小田垣雄二，小山司，松原繁広，山下格 (1990) 神経化学 29, 386-387

203 ラット脳、膜画分に於ける ガングリオシド依存性タンパク燐酸化

中岡隆志、辻崇一、永井克孝*
（理研精遺伝情報、東京都臨床総合研究所*）

〔要約〕
低濃度のガングリオシドの、タンパク燐酸化に対する効果についてラット脳の膜画分を用いて検討した。分子量72000の膜タンパク（72K-protein）の燐酸化に対して、80 nMのGQ1bはタンパク燐酸化を亢進すると共に脱燐酸化をも促進した。同じ膜画分に於けるATP ase活性は、GQ1bに影響されなかった事より、GQ1bとこの72K-proteinの燐酸化システムとの関連が示唆された。

神経系組織に於けるガングリオシドの様々の作用についての知見が集積されてきている。それらの分子的機作に関しては、依然、不明であるが、そのうちのいくつかはタンパク燐酸化に対する調節を介したものと考えられている。今回我々は、報告されているよりはるかに低い濃度のガングリオシドを用いて、タンパク燐酸化に対しての調節的な作用の有無について検討した。

（材料、方法） ラット脳よりP_2及びP_3 (Gray and Whittaker,1962)に相当する膜画分を調整し、低張のバッファーに懸濁し、２度洗浄した後の沈澱画分を反応に供した。

燐酸化反応は、膜画分をNP-40 の入った反応溶液にタンパク量として 5-7 mg/mlになるように懸濁し、３０℃で３０分インキュベートした後、$\gamma-^{32}$Ｐ－ＡＴＰ（終濃度 20 μM, 0.37 MBq）を加えた。内因性に燐酸化された膜画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動し、オートラジオグラフィーにて検討した。

反応溶液： 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 20 mM NaCl, 1 mM MnCl2, 0.1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 2% ethanol and 80 nM GQ1b +/-.

膜画分のATPase活性は、活性炭沈降法にて (Reddy et al., 1978)検討した。

燐酸化アミノ酸残基の検討は、燐酸化された膜画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥにかけ、ゲル上の相当するバンドよりタンパクを回収した試料より行った。１１０℃、６規定の塩酸中で加水分解後セルロースアセテート膜上で電気泳動し、オートラジオグラフィーにて検討した。

（結果、考察） 膜画分の内因性の燐酸化反応より、２０秒の反応時間でＳＤＳ－ＰＡＧＥ上、72K-proteinの燐酸化の80 nMのGQ1bによる亢進が認められた。この亢進は0.04, 0.06%の低い濃度のNP-40の存在下で認められたが、NP-40の濃度を増加させると認められなかった。

反応時間を変えて、72K-proteinへのリンの取り込みについて検討したが、２０秒から１２０秒で最も多かった。それ以降は徐々に減少したが、GQ1bはこの72K-proteinに取り

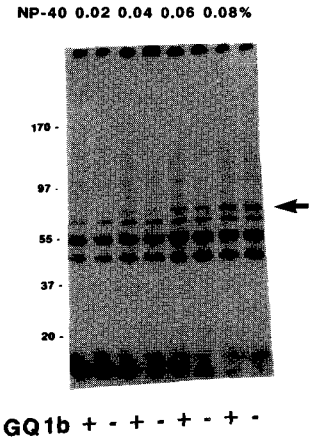
込まれたリンの減少をも促進した。

同じ膜画分のATPase活性の検討により 500-700 μgのタンパクを含んだ100 μlの反応溶液中で 40-60 μmoles/minのＡＴＰが分解され、燐酸化反応に加えた 2 nmolesのＡＴＰは５秒以内に分解されると考えられた。80 nMのGQ1bはATPase活性に影響しなかった。以上より、GQ1bは72K-proteinの燐酸化、脱燐酸化の双方を亢進すると考えられた。

２次元電気泳動上、72K-proteinに相当する酸性のスポットが認められた。NEPHGEでは72K-proteinに相当するスポットは認められなかったことより、72k-proteinは酸性のタンパクであると考えられた。また、72K-proteinの主な燐酸化アミノ酸残基は、セリン残基であった。

GQ1bについての臨界ミセル濃度は明かではないが、GT1bについては 10^{-6} Mである事より(Corti et al., 1988)、80 nMのGQ1bは単分子として存在することが予想され、このGQ1bが72K-proteinの燐酸化システムの代謝回転に関わっていると考えられた。

燐酸化した膜タンパクの
オートラジオグラフィーの一例 →



参考文献

Corti, M., Cantu, L., Sonnino, S., and Tettamanti, G. (1988) in "New Trends in Ganglioside Research: Neurochemical and Neurogenerative Aspects" (Ledeen, R.W, Hogan, E.L., Tettamanti G., Yates A.J., and Yu, R.K., eds.), pp. 79-91.

Gray, E.G., and Whittaker, V.P. (1962) J. Anat.(Lond.) 96, 79-88.

Reddy, N.B., Okiver, K.L., Festoff B.W., and Engel, W.K. (1978) Biochim. Biophys. Acta 540, 371-388.

204 摘出白鼠交感神経節の脱分極刺激依存性トランスグルタミナーゼ活性化におよぼすGM1あるいはシアル酸化合物の効果

中島雄三・安藤正人・鈴木由美子・永田　豊（藤田保健衛生大・医・生理）

[要約]脱分極性神経伝達物質のAChを添加した生理溶液中でシナプス結合を豊富に含む摘出白鼠交感神経節(SCG)をインキュベートすると、細胞質内タンパクの非流動化(退行性変化)を促進する酵素・トランスグルタミナーゼ(TG)が著明に活性化される。今回は、ベラトリジン(Ver、0.2mM)あるいはKCl(高$[K^+]_o$、50mM)脱分極条件でのTG活性変動を比較した。さらに、これら脱分極刺激依存性の SCG内TG活性に対するGM1糖脂質(5nM)あるいはシアル酸化合物(α-SC、20μM)の修飾効果を調べて、シナプス伝達過程がこれらシアル酸化合物によってどのように調節されているのかを考察した。①SCG内のTGは、神経細胞膜のNa^+流入を促進するVer刺激で著明に活性化(3.7倍)された。また、高$[K^+]_o$脱分極条件では、Verに比べてさらに著しいTG活性上昇効果(6倍)が見られた。つまり、SCGニューロン膜の脱分極性変化によって引き起こされるTGの活性化効果は、神経系の普遍的な現象であることが判明した。②ACh刺激で増大するTG活性は、GM1あるいはα-SCを添加するとさらに促進されたが、GM1の促進効果はコレラ毒素でその糖鎖を陰蔽すると完全に消失した。一方、コレステロールは AChのTG増大効果に影響をおよぼさなかったことから、シアル酸部分が有効に作用してTG活性を修飾していることが考えられた。③Ver依存性TG活性化はGM1あるいはα-SC添加によって促進されたが、高$[K^+]_o$刺激での TGの活性増大効果に対しては抑制的に作用した。また、TG酵素の活性発現に必須なCa^{2+}の SCG内への取り込み系は、Verおよび高$[K^+]_o$刺激で有意に促進(+40%)された。しかし、シアル酸化合物の添加によっては高$[K^+]_o$依存性の Ca^{2+}取り込み系のみ選択的に阻害された。従って、シアル酸化合物は異なった機序で Na^+- と K^+-channelに共役するCa^{2+}取り込み系に作用して、シナプス伝達に伴う脱分極刺激依存性のTG活性を積極的に調節している可能性が示唆された。

[序]シナプス結合を豊富に含む交感神経節(SCG) を成熟白鼠より摘出して、脱分極性神経伝達物質のアセチルコリン(ACh)と共に生理溶液中で好気的な条件下でインキュベートすると、細胞質内タンパクの非流動化(退行性変化)を促進するトランスグルタミナーゼ(TG)酵素活性は、数分以内から著明に上昇することが認められた。一方、ノルエピネフリン(NE)を添加して神経節内ニューロンを過分極状態にすると、組織内のTG活性の抑制効果がやはり短時間で示された。つまり、TG酵素はシナプス伝達という高度に機能分化した神経細胞膜の興奮と抑制過程に対応した物質代謝系と、密接に連動して活性調節されていることが示唆された(1)。 既に我々は、神経突起の伸展やグリア芽細胞の分化を誘発する脳組織由来のGM1糖脂質(GM1)、あるいは人工合成したシアル酸コレステロール(α-SC)が、SCG内タンパク合成能を抑制した時に、ACh 刺激の場合とほぼ同程度に神経節内のTG活性が増大することを報告した(2)。 従って、これらシアル酸化合物は神経細胞の分化に伴う退行性変動を促進するが、さらにシナプス伝達機能をも修飾することが推測される。そこで、SCG標本で認められたACh刺激によるTG活性の上昇と、NE依存性の酵素活性の抑制という相反した効果に対して、GM1あるいはα-SCがどのような影響を与えるのか検討した。 また、インキュベーション溶液中にベラトリジン(Ver) の添加、あるいは高$[K^+]_o$ 脱分極状態時に、SCG内 のTG活性変動が両シアル酸化合物の添加によってどのように変動するかを測定して、神経伝達過程におよぼすシアル酸化合物の修飾機序を考察した。

[実験材料と方法]成熟白鼠からのSCG標本の摘出(1)、生理溶液中でのインキュベーション条件および神経節内TG活性の測定(2)は、それぞれ既報に従い実施した。また、外液中のCa^{2+}のSCG内への取り込み系は、プレインキュベートした神経節標本をさらにトレーサー量の放射性Ca^{2+}($^{45}CaCl_2$)を含む生理溶液中に移した後、2分間に神経節内へincorporate される放射活性から測定した(1)。

[実験成績および考察]①ACh あるいはNE刺激による TG活性変動におよぼす GM1と α-SCの効果: 脱分極性剤 ACh(0.1mM)を含む生理溶液中で30分間インキュベートすると、SCG内TG活性は著明に上昇(8.7倍)したが(1)、GM1(5nM)をさらに添加すると、神経節内TG酵素は対照に比べてさらに10倍にも達する活性化が示された。しかし、コレラ毒素 B(250ng/ml)を作用させて GM1分子内の糖鎖を隠蔽すると、GM1 による活性促進効果のみが完全に消失した(表1)。また、AChと共にα-SC(20μM)を溶液中に添加してSCGをインキュベートすると、GM1存在下よりも一層著明なTG活性の上昇(12倍以上)が見られたが、 α-SCのシアル酸部分を欠くコレステロール(20μM) を含む溶液中でSCGをインキュベートすると、ACh依存性の TG活性変動は僅かであった(表1)。このように、コリン作動性神経伝達刺激で誘発されるSCG内 TG酵素の活性化は、天然および人工合成シアル酸化合物によって相加的に促進されることが判明した。しかもこの促進効果は、GM1 分子内の親水性糖鎖あるいはGM1やα-SCを構成するシアル酸部分が有効に作用した結果生ずることが明確となった。一方、SCG標本をNE 刺激によって過分極状態にすると、神経節内TG活性は有意に抑制(-28%)されたが(1)、この低下に対して GM1あるいはα-SCは全く変動を与えなかった(表1)。つまり、節後ニュ-ロン膜のコリン作動性脱分極電位変動に依存したTGの活性化には、シアル酸化合物が特異的に"positive"な調節(修飾)作用を示す可能性が示唆された。② Verおよび 高$[K^+]_o$脱分極刺激によるTGの活性化とシアル酸化合物による活性調節機序の相違: 既に我々は、ACh刺激で増大するSCG内のTG活性は、節後ニュ-ロン膜のコリン作動性ニコチン性受容体を遮断すると約1/5のレベルに迄抑制されることを見出している(1)。また、ニコチン性受容体を介した膜の興奮は、この受容体と共役した Na^+-channelの開放に伴うイオン電流の上昇に規定された変動であることも報告されている(4)。 そこで、Ver(0.2mM)を生理溶液中に添加してSCG内へのNa^+-influxを促進すると、Na^+-channel非開放時(対照)と比べてSCG内 TG活性は約3.7倍に上昇するのが認められ

た(図1)。つまり、ニコチン性受容体と連動した AChの刺激は、明かにNa^+-channel開放に依存した膜の脱分極を介してSCG内のTG酵素を活性化したことが確認された。次に、溶液中のK^+濃度を上昇(50mM)(高$[K^+]_o$)させた脱分極条件では、Ver添加による増大効果よりもさらに著明(約6倍)な酵素の活性化が示された(図1)。 従って、コリン作動性受容体をAChで刺激する脱分極条件のみならず、神経節細胞膜の Na^+-またはK^+-channelを直接活性化して生ずる脱分極性変化でも、SCG内 TG活性の上昇が引き起こされることが認められた。換言すれば、TGは神経細胞膜の興奮という脱分極状態で引き起こされる膜の特殊な機能分化の程度を推定する際に、有用な指標酵素の一つと考えられる。次に、Verまたは高$[K^+]_o$条件下でGM1を添加すると、Ver依存性のTG活性は GM1によって相加的に1.7倍に増大したが、高$[K^+]_o$ 条件で促進された酵素の活性上昇効果に対しては、GM1は有意な抑制作用(-30%)を示した。また、Verあるいは高$[K^+]_o$ 刺激で誘発されるSCG内 TG活性は、α-SCを同時に添加すると GM1の効果を上回る相加的な酵素活性上昇が認められた(図1)。TG酵素の活性発現には Ca^{2+}の存在が不可欠であることから(2)、Verおよび高$[K^+]_o$脱分極に対してこれらシアル酸化合物がSCG内への放射性Ca^{2+}の取り込み($^{45}Ca^{2+}$-influx)にどのようなす影響をおよぼすかを検討した。$^{45}Ca^{2+}$を含む生理溶液中でSCG標本をインキュベートすると、急速(2分間)な$^{45}Ca^{2+}$-influxの直線的な増加が見られるが、この溶液中へVerを添加、あるいは高$[K^+]_o$条件にすると、$^{45}Ca^{2+}$-influx は何れも増大(+約40%)した。このことは、Verあるいは高$[K^+]_o$刺激によって細胞外液からCa^{2+}流入が促進して細胞内Ca^{2+}が増大した結果、TG酵素の活性化が引き起こされた可能性が考えられる。さらにシアル酸化合物を添加すると、Ver依存性の$^{45}Ca^{2+}$-influx増大に対してGM1およびα-SCは共に無効であったが、高$[K^+]_o$刺激で促進した $^{45}Ca^{2+}$-influx量は対照レベルに迄低下するのが見られた(表2)。水溶液中では、GM1 およびα-SCを構成するシアル酸部分は陰イオンとして電離して存在する性質から、遊離のCa^{2+}と結合するキレート作用をもつ可能性が指摘されている(3)。従って、高$[K^+]_o$脱分極刺激で細胞外から細胞内へのCa^{2+}の流入が促進された時に、さらにGM1あるいはα-SCを添加すると、この$^{45}Ca^{2+}$-influxは阻止されて、その結果 TG酵素の抑制的な活性修飾が引き起こされたものと理解される。しかし、Ver脱分極刺激で同様に増加する$^{45}Ca^{2+}$-influxに対しては、シアル酸化合物が全く影響をおよぼさなかったこと、およびVer依存性のTG活性はGM1とα-SC刺激でさらに促進されることから、この場合には明かに K^+-channelと共役するCa^{2+}-influx系とは異なった機序で細胞内のCa^{2+}濃度環境が調節されている可能性が推測される。何れにしても今回の成績によって、シアル酸化合物はシナプス伝達の過程でニューロン膜が示す興奮性脱分極性現象を積極的に修飾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 # 02259106 の援助に依った)

【文献】(1)安藤ら(1991) 神経化学 30 (印刷中) (2)Ando et al. (1990) Mol. Chem. Neuropathol. 13. 33-46 (3)Rahmann (1983) Neurochem. Int. 5. 539-547 (4) Rogawski (1985) In Neurotransmitter Action in the Vertebrate Nervous System. Plenum Press, New York

図1. Vertridineあるいは高$[K^+]_o$依存性の摘出SCG内TG活性におよぼすシアル酸化合物の影響

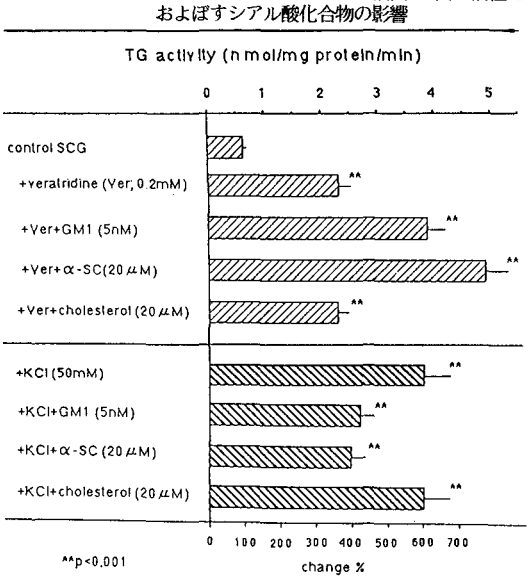


表1. シアル酸化合物によるAChあるいはNE神経伝達物質刺激依存性の摘出SCG内TG活性変動の調節

Conditions	TG activity	Change %
SCG(30 min)	618 ± 55 (8)	100
+ACh(0.1mM)+eserine(0.1mM)	5,403 ± 810 (5)[a]	874
+ACh+GM1(5nM)	6,108 ± 720 (4)[a]	988
+ACh+GM1+toxin(250ng/ml)	5,253 ± 609 (4)[a]	850
+ACh+α-SC(20μM)	7,825 ± 882 (4)[a]	1266
+ACh+cholesterol(20μM)	5,977 ± 551 (4)[a]	967
+NE(0.05mM)+pargyline(0.01mM)	447 ± 38 (5)[a]	72
+NE+GM1(5nM)	461 ± 35 (4)[a]	75
+NE+GM1+toxin(250ng/ml)	466 ± 44 (4)[a]	75
+NE+α-SC(20μM)	440 ± 40 (4)[a]	71
+NE+cholesterol(20μM)	415 ± 45 (4)[a]	67

TG activity (pmols/mg protein/h) ; [a]p<0.001

表2. Vertridineあるいは高$[K^+]_o$依存性の摘出SCG内への$^{45}Ca^{2+}$-取り込みにおよぼすシアル酸化合物の効果

Conditions	$^{45}Ca^{2+}$-uptake	Change %
SCG (2min)	1.05 ± 0.06 (8)	100
+veratridine(Ver; 0.2mM)	1.52 ± 0.07 (4)[a]	145
+ver+GM1(5nM)	1.55 ± 0.06 (4)[a]	148
+ver+α-SC(20μM)	1.57 ± 0.07 (4)[a]	150
+ver+cholesterol(20μM)	1.51 ± 0.06 (4)[a]	144
+KCl(50mM)	1.42 ± 0.05 (4)[a]	135
+KCl+GM1(5nM)	1.04 ± 0.05 (4)	99
+KCl+α-SC(20μM)	1.02 ± 0.04 (4)	97
+KCl+cholesterol(20μM)	1.40 ± 0.05 (4)[a]	133

$^{45}Ca^{2+}$-uptake (nmol/ganglion/min); [a]p<0.001

205 コリンおよびアドレナリン作動性神経伝達物質による白鼠神経節内トランスグルタミナーゼ活性調節の相反効果と $^{45}Ca^{2+}$-influx

安藤正人・鈴木由美子・中島雄三・永田　豊（藤田保健衛生大・医・生理）

【要約】コリン作動性節前末端と交感性節後ニューロンとのシナプス結合をもつ白鼠摘出上頸交感神経節(SCG)を生理溶液中でインキュベートした時、細胞内の退行・変性過程の生化学的指標となるトランスグルタミナーゼ(TG)が、EPSPを生ずるアセチルコリン(ACh)添加、およびIPSPをもたらすノルエピネフリン(NE)刺激でどのような影響を受けるのかを測定し、シナプス結合を含まない迷走神経節(NG)標本のTG活性変化と比較検討した。①SCGとNG標本をAChで刺激すると、両神経節内のTGは5分以内から急激な活性上昇が見られ、30分後で最大活性化効果が認められたが、この効果はSCG標本で著明であった。一方、NEを含む溶液中で神経節をインキュベートするとSCGで数分以内からTG活性の有意な低下が認められた。このようなSCG標本で示されたAChによるTG活性化とNEによる抑制効果は、酵素反応の速度論的解析で、伝達物質とTG酵素の基質との間の親和性と反応速度をそれぞれ相反して変動させているので、TG酵素タンパクの構造変化(修飾)に起因して引き起こされる現象と理解された。②AChによるSCG内TG活性の上昇は、アトロピンのみならずヘキサメソニウムによって強力に阻止されたことから、節後ニューロン膜のニコチン性およびムスカリン性受容体の活性化と密接に関連した変動と考えられた。また、NE刺激依存性のTG活性抑制効果は、プロプラノロールとヨヒンビン添加で完全に回復した。つまり、ACh刺激の一部はSCG内介在ニューロンのSIF (small intencely fluorescent)細胞からNEを遊離させて、節後神経細胞のβおよびα$_2$受容体を介してTGの活性が惹起されたものと解された。③生理溶液中からSCG内への$^{45}Ca^{2+}$-influxはAch添加およびNE刺激で有意に抑制された。従って、TG活性化に至適なSCG細胞内Ca^{2+}濃度は、AChとNEが外液からのCa^{2+}の流入のみならず細胞内のCa^{2+}貯蔵部位よりの放出を調節することによって、細胞の興奮と抑制状態を規定している可能性が示唆された。

【序】コリン作動性節前末端が交感性節後ニューロンとシナプス結合している上頸交感神経節(SCG)を成熟白鼠より摘出して、AChまたはNEを含む生理溶液中で好気的にインキュベートすると、SCG組織内ポリアミン合成系の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素(ODC)が、数時間の潜時を経て著明に活性化されることが認められた(1)。しかし、シナプス結合を殆ど含まない迷走神経節(NG)標本ではこれら神経伝達物質刺激によるODC活性の上昇は全く見られなかった(1)。つまり、SCG標本にAChとNEを作用させた後に示されたODC活性の増大は、神経伝達過程と密接に関連したポリアミン合成に先行したODC酵素タンパクの誘導現象と考えられた。一方、細胞質内に局在するトランスグルタミナーゼ(TG)は、異なるポリペプチド鎖グルタミン残基間にポリアミンを付加して架橋する反応を触媒する酵素である(3)。その結果、細胞内タンパクの流動性が消失するため、TG活性の変動は生体組織の退行・変性過程を検知する上で有用な指標となり得る。そこで今回は、AChあるいはNEを添加した溶液中で摘出神経節をインキュベートした時、これら神経節内のTG活性の変化を調べた。また、細胞内Ca^{2+}がTGの活性発現には必須であるので(3)、同様の条件下で放射性Ca^{2+}の神経節内への取り込み($^{45}Ca^{2+}$-influx)系を比較検討して、シナプス伝達に伴うTG活性の調節機序とその生理的意義を追求した。

【実験材料と方法】①成熟白鼠よりSCGおよびNG標本の摘出は既報(1)に従い実施した。②TG活性は、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の homogenate を酵素標品として、[^{3}H]putrescine(1110GBq/mmol)がカゼインタンパク中に取り込まれる放射活性量から求める Lorandら の方法(5)に準じて測定した。③$^{45}Ca^{2+}$-influxの測定は、予め30分間プレインキュベートした神経節標本をさらに $^{45}CaCl_2$(18.5KBq)含む生理溶液中に移して、2分間のインキュベーションの間に組織内へ取り込まれる放射活性から求めた(7)。

【実験成績および考察】①AChあるいはNEによる神経節内TG活性調節の経時変化と酵素反応機序の解析：摘出SCG標本をACh(0.1mM)とeserine(AChE抑制剤;0.1mM)を含む生理溶液中でインキュベートすると、5-30分間に急激な神経節内TG活性の上昇が見られ、対照SCG酵素活性値の約8.7倍(30分)に達したが、2時間迄刺激を続けるとこの活性値は緩かに低下した。また、NG標本をAChで刺激すると組織内TG活性の上昇効果はSCGよりも緩除な時間経過で示され、その最大活性化効果は約2.4倍(30分)で、2時間のインキュベーションに亘って持続的に認められた(図1)。一方、NE(50μM;MAO抑制剤pargylineを0.1mM含む)を生理溶液中に添加すると、SCG内TG活性は5分後から有意に抑制されて30分後には約28%の活性低下が見られ、この傾向は2時間後迄示された。しかし、NG内TG活性に対するNEの効果は殆ど認められなかった(図1)。このように、シナプスを含むSCG神経節で特異的にコリンおよびアドレナリン作動性神経刺激によって極めて短時間(30分以内)にTG活性の促進と抑制の相反した効果が認められたことから、TG活性の変動は神経伝達機構と密接に関連した現象であろうと考えられた。既に我々は、糖脂質(GM1)やシアル酸コレステロール(α-SC)を作用させた時に、神経節組織で数分以内に TG活性が上昇することを報告しており、これはシアル酸化合物がTG酵素の親和性(Km値)を増大させるのみならず、酵素の触媒能(Vmax値)の亢進に起因した現象であることを明かにしている(2)。そこで、今回のACh刺激によって誘発されたSCG内TG活性の促進とNEによる酵素活性の抑制効果の調節機序を反応速度論的に解析した。すなわち、AChは TG酵素の見かけのKm値を約1/2に低下させVmax値を著明に上昇(約7.3倍)させたが、NEはKm値の増大(約1.7倍)とVmax値の低下傾向を示した(表 2)。つまり、これら神経伝達物質で誘発される TGの活性変動は、ODC の活性化で認められた酵素タンパクの誘導ではなくてシアル酸化合物刺激効果の場合と同様に、TGタンパク分子の構造修飾が短時間に進行した結果と理解された。②AChおよびNE神経伝達刺激のよるSCG内への$^{45}Ca^{2+}$-influxの調節：SCG内のシナプス伝達過程の中で、節前神経末端から遊離された AChは節後神経細胞膜のコリン作動性受容体と結合して交感性ニュー

ロンの興奮性電位変化(EPSP)を引き起こす。この内、速い脱分極性電位変化(f-EPSP)はニコチン性受容体、遅い電位成分(s-EPSP)はムスカリン性受容体をそれぞれ介した ACh刺激に由来している。一方、f-EPSPに続いてその回復過程に見られる比較的緩徐な時間経過の抑制性過分極電位変化(s-IPSP)は、節前刺激からのAChの一部が節内介在ニューロン(SIF細胞)を刺激して、この細胞からさらに放出される NEが節後交感性ニューロン膜受容体のα_2に作用した結果誘発されることが知られている(4)。そこで、SCG内で示された神経伝達刺激に依存した短時間のTG活性調節の相反効果と、交感性神経節細胞膜の興奮性との関連性を追求した。ACh刺激により著明に促進されたTG活性はムスカリン性遮断剤のアトロピン(0.1mM)の添加で約1/3のレベル迄に抑制され、ニコチン性拮抗剤のヘキサメソニウム(0.1mM)を同時添加すると、アトロピンよりも強力な阻止効果(約1/5)が示された(表1)。一方、NE刺激で低下するTG活性は、β-遮断剤のプロプラノロール(0.01mM)をさらに添加することによって完全に回復した。同様の回復効果はα_2-ブロッカーのヨヒンビン(0.01mM)を添加しても見られたが、プラゾシン(α_1-拮抗剤、1μM)の添加では逆にTGの活性化が示された(表1)。つまり、AChによるTG活性の促進効果は明かにSCG内のシナプス伝達過程で節後交感性ニューロン膜のニコチン性と ムスカリン性受容体の活性化と密接に連動した現象と考えられた。さらに、SIF細胞から遊離する NE伝達物質も節後神経細胞のアドレナリン性(βおよびα_2)受容体を刺激してTG活性の抑制的な調節に関与している可能性が強く示唆された。既に、SCGの電位固定法から検出されるCa^{2+}内向電流は脱分極状態では増大するが、過分極時には減少することが報告されている(6)。また、TG活性の発現にはCa^{2+}の存在が必須であることから、次にSCG内への$^{45}Ca^{2+}$-influx におよぼすAChとNEの影響を比較した。インキュベーション溶液中からSCG内へ急速(2分間)に取り込まれる $^{45}Ca^{2+}$量(1.05nmol/SCG/min)は、AChの添加で有意に抑制(約30%)された。この抑制効果はアトロピンあるいはヘキサメソニウムの同時添加でほぼ完全に回復した。一方、NE刺激によっても$^{45}Ca^{2+}$-influx は著明(約36%)に低下するのが認められたが、TG活性抑制の回復効果と同様にβあるいはα_2 ブロッカーの添加でこの減少も対照のレベル迄回復された。つまり、AChやNEが節後神経細胞膜のそれぞれの受容体と共役する Ca^{2+}輸送系を抑制した結果、これら神経伝達物質が細胞膜Ca^{2+}チャンネルの開閉の制御のみならず、細胞質内Ca^{2+}貯蔵部位からのイオンの放出を調節している従来の知見(6)を支持している。以上のことから、神経伝達物質を作用させた時に生ずるSCGニューロン内のCa^{2+}濃度環境の変動に依存して、神経細胞の興奮とその回復過程でTG活性発現が合目的に調節されている可能性が強く示唆された。

【文献】(1)Ando et al.(1984)Cell.Mol.Neurobiol. 4.79-90 (2)Ando et al.(1991)J.Neurochem.(in press) (3)Gilad et al.(1985)J.Neurochem.44.1385-1390 (4)Greengard and Kebabian(1974)Fed.Proc.33.1059-1063 (5)Lorand et al.(1972)Anal.Biochem.72.248-252 (6)Rogawski (1985)In Neurotransmitter Action in the Vertebrate Nervous System. Plenum Press, New York (7)Volle et al.(1981)J.Pharmacol.Exp.Ther.219.338-343

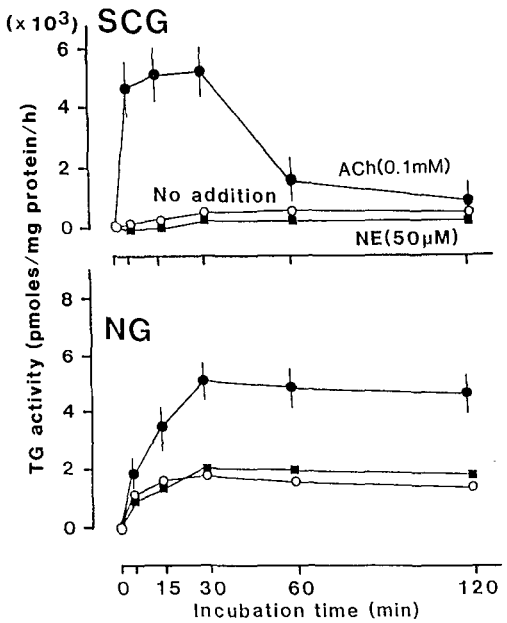


図1. AChあるいはNE刺激による摘出SCGおよびNG神経節内TG活性の経時変化

表1. AChあるいはNE神経伝達刺激依存性の摘出SCG内TG活性変動におよぼす各種遮断剤の影響

Conditions	TG activity	Change %
SCG (30 min)	618 ± 55 (8)	100
+ACh(0.1mM)+eserine(0.1mM)	5,403 ± 810 (5)[a]	874
+ACh+atropine(0.1mM)	1,956 ± 186 (4)[a]	317
+ACh+C_F (0.1mM)	1,095 ± 96 (4)[a]	177
+NE(0.05mM)	447 ± 38 (4)[a]	72
+NE+propranolol(0.01mM)	693 ± 89 (4)	112
+NE+prazosin(0.01mM)	1,131 ± 141 (4)[a]	183
+NE+yohimbine(0.01mM)	606 ± 59 (4)	98

TG activity (pmoles/mg protein/h): [a]$p<0.001$

表2. 摘出SCG内TG酵素の見かけのKm値とVmax値におよぼすAChあるいはNEの影響

Conditions	Km	Vmax
SCG	0.15	0.86
+ACh(0.1mM)	0.07	6.25
+NE(0.05mM)	0.26	0.78

Km(mM): Vmax(nmoles/mg protein/h)

206 リン脂質への[^{3}H]MK-801吸着反応

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)レセプターイオノフォア複合体上のイオンチャネルの指標に用いられる、[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)のリン脂質への吸着性について検討を行った。ホスファチジルセリン(PS)への[^{3}H]MK-801の吸着反応は、濃度依存性、反応温度部分的依存性、反応時間依存性、可逆性および飽和性を示した。Scatchard解析により、本吸着反応は反応温度30℃ではKd値133.2±4.3 μM、B_{max}値71.8±4.5 nmol/mg PSの単一成分から構成されることが明らかとなった。PSへの吸着能は[^{3}H]MK-801のみならず[^{3}H]TCPにも見受けられ、両吸着反応はともにスペルミジン(SPD)の添加により著明に増強された。この吸着増強作用は、スペルミン(SPN)やbis-(3-aminopropyl)amine(BAA)も認められた。一方、NMDAアンタゴニストおよびグリシン(Gly)アンタゴニストは、いずれもPSへの[^{3}H]MK-801の吸着を阻害しなかった。以上の結果より、[^{3}H]MK-801とPSの間には何らかの化学的相互作用が存在し、この相互作用がポリアミン類のNMDAレセプター機構増強作用の出現機序に関与する可能性が推察される。

脳シナプス膜標品への[^{3}H]MK-801結合は、膜標品をホスホリパーゼA_2やCで処理すると有意に低下する(9)ことから、NMDAチャネルの調節機構にリン脂質が関与する可能性が示唆されている。一方、[^{3}H]MK-801結合を指標としたNMDAレセプター複合体の可溶化・再構成実験では、リン脂質の添加が可溶化標品への結合を増強するが、この増強された結合は通常の膜標品への[^{3}H]MK-801結合とは異なる性質を示した(8)。したがって、本研究では各種リン脂質と[^{3}H]MK-801との相互作用について検討を加えた。

[実験方法]

結合実験は、脳シナプス膜の非存在下に種々のリン脂質を50 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.4)中で均一に懸濁し、5 nM [^{3}H]MK-801と30℃、30分間反応させた。反応停止は、Whatman GF/Bグラスフィルターを用いた吸引濾過法により行った。非特異的結合は、非放射性の10 mM MK-801を添加して測定した。

[結果]

PSは、0.01 mg/mlの濃度でも[^{3}H]MK-801に対して強い吸着能を示した。PS濃度を上昇させることにより本吸着は増加し、0.5 mg/mlでほぼ最大となった。ホスファチジルイノシトール(PI)にも[^{3}H]MK-801との吸着が認めらたが、ホスファチジルエタノールアミン(PE)やホスファチジルコリン(PC)には[^{3}H]MK-801との吸着性は認められなかった(表1)。PSと[^{3}H]MK-801の吸着反応はグルタミン酸(Glu)やGlyの添加でも変動しなかったが、この条件下にさらにSPDを添加すると吸着反応は著明に増強された。また、SPD単独の添加でも強い吸着増強作用が認められた。他のNMDAチャネルリガンドである[^{3}H]TCPを用いても、[^{3}H]MK-801の場合と同様な結果が得られた(表2)。他のポリアミンについて検索を進めたところ、SPDばかりでなくSPNやBAAが本吸着を増強することが判明した。SPDの吸着増強作用は反応温度2℃より30℃の場合に強く出現した。反応温度2℃の場合には吸着が平衡状態に到達するには約30分の反応時間を要するのに対して、反応温度を30℃に上昇させると5分以内に吸着は平衡状態に到達した。一方、平衡状態レベルは2℃と30℃で差異は見られなかった。完全な平衡状態に達した時点で大量の非放射性MK-801(10 mM)を添加すると吸着は速やかに解離した。Scatchard解析により、反応温度2℃の場合の吸着反応は、Kd=47.9±3.2 μM、B_{max}=23.4±1.1 nmol/mg PSの単一成分から構成されることが判明した。反応温度を30℃に上昇させるとKd値およびB_{max}値はともに約3倍に増加した。SPDの吸着増強作用に対して、NMDAおよびGlyアンタゴニストはいずれも全く影響を与えなかった。

[考察]

酸性リン脂質の一つであるPSは、オピエート(1)、セロトニン(10)、ベンゾジアゼピン(3)、あるいはドーパミンD_2(7)など種々のレセプター機構に関与するとの報告が多数見受けられる。さらに、PSの構成成分であるホスフ

表1. リン脂質への[^{3}H]MK-801の吸着

Lipid (mg/ml)	[^{3}H]MK-801 adsorption (dpm) None	MK-801	Lipid (mg/ml)	[^{3}H]MK-801 adsorption (dpm) None	MK-801
PS			PC		
0.01	12457.0±255.1	289.3±14.1	0.01	371.3±29.0	270.7±10.9
0.05	39931.0±388.3	331.3±17.5	0.05	406.3±13.5	361.7±42.3
0.1	56676.3±674.8	429.7±9.2	0.1	369.3±28.5	381.3±19.8
0.3	72852.0±1153.4	976.0±34.2	0.3	475.3±49.4	365.7±30.8
0.5	82359.3±1098.2	1241.3±35.4	0.5	519.7±26.5	440.7±16.0
PE			PI		
0.01	451.0±16.0	318.0±35.8	0.01	5351.3±210.8	350.3±16.3
0.05	865.3±27.7	355.7±33.3	0.05	17729.3±624.6	330.7±29.2
0.1	1502.3±28.5	410.3±14.7	0.1	24687.0±186.4	404.3±27.0
0.3	3361.7±55.6	435.3±33.4	0.3	29900.7±1238.7	541.7±11.7
0.5	4627.3±51.6	448.3±17.4	0.5	33157.0±235.6	814.7±57.7

表2. [^{3}H]MK-801の吸着に対する各アゴニストの影響

Compound	Adsorption (fmol/mg PS) [^{3}H]MK-801 None	MK-801	[^{3}H]TCP None	PCP
None	3532.4±61.6	89.5±1.8	307.1±27.0	72.8±2.1
Glu	3500.1±53.3	83.9±3.0	313.3±5.6	69.5±2.3
Glu/Gly	3533.2±19.1	104.9±2.1	370.3±97.8	73.8±3.5
Glu/Gly/SPD	7007.0±305.1	136.9±4.1	2317.6±72.6	498.9±33.3
SPD	6783.6±78.2	142.3±3.8	2486.9±129.2	510.6±19.3

ォセリンはNMDA認識部位に対してアンタゴニスト作用を有することも報告されている(4)。PSは、脳シナプス膜タンパク質1 mg中に約0.1 mg存在するので(2)、従来行われている[^{3}H]MK-801結合にシナプス膜標品内のPSへの吸着反応が少なくとも一部は関与する可能性が示唆される。しかしながら、この吸着反応はNMDAアンタゴニストやGlyアンタゴニストで全く阻害されない点が膜標品への結合とは異なる。したがって、これらのアンタゴニストに対する感受性の相違から、リン脂質への吸着反応を区別することが可能である。また、[^{3}H]MK-801の結合と吸着の両反応はポリアミンの増強作用が認められる点で類似するが、ポリアミンのNMDAレセプター複合体に対する増強作用は線条体培養細胞(6)や、ラット脳mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞(5)を用いた電気生理学的実験でも確認されており、ポリアミンの増強作用が結合実験でのみ検出されるアーチファクトであるとは考えにくい。しかしながら、[^{3}H]MK-801結合実験は反応停止方法を含めて、特にSPDの存在下では慎重な対応が望まれる。

[謝辞]

本研究の一部は、平成3年度文部省科学研究費補助金の援助のもとに行った。

[文献]

1. Abood, L.G., Salem, N., Macneil, M. and Butler, M. (1978) Biochim. Biophys. Acta., 530, 35-46.
2. Breckenridge, W.C., Gombos, G. and Morgan, I.G. (1972) Biochim. Biophys. Acta., 266, 695-707.
3. Hammond, J.R. and Martin, I.L. (1987) Eur. J. Pharmacol., 137, 49-58.
4. Klunk, W.E., McClure, R.J. and Pettegrew, J.W. (1991) J. Neurochem., 56, 1997-2003.
5. McGurk, J.F., Bennet, M.V.L. and Zukin, R.S. (1990) Neurobiol., 87, 9971-9974.
6. Sprosen, T.S. and Woodruff, G.N. (1990) Eur. J. Pharmacol., 179, 477-478.
7. Srivastava, L.K., Kazmi, S.M.I., Blume, A.J. and Mishra, R.K. (1987) Biochim. Biophys. Acta., 900, 175-182.
8. Suzuki, T., Ogita, K. and Yoneda, Y. (1991) NMDA Receptor Related Agents (eds Kameyama, T., Nabeshima, T. and Domino, E.F.), NPP Books, Ann Arbor, 15-28.
9. Yoneda, Y., Ogita, K. and Enomoto, R. (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther., 256, 1161-1172.
10. Yoshikawa, S. and Ishitani, R. (1985) Life Sci., 36, 485-492.

207 時間制限給餌後に自由摂餌させたラットの摂餌行動と脳セロトニン代謝

奥野正景、切池信夫、井上幸紀、伊藤英樹、川北幸男
（大阪市大・医・神経精神医学教室）

〔要約〕時間制限給餌後、自由摂餌を再開したときの摂餌行動ならびに脳のセロトニン代謝について検討した。Wistar系雌性ラットに1日2時間の制限給餌を7日間施行し、その後自由摂餌に戻し、2時間、1、5、14日後の脳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対照群と比較した。1日2時間の制限給餌を7日間繰り返しその後自由に摂餌させると1日当りの摂餌量が対照群の145％(1日目)～126％(5日目)と有意に増加した。自由摂餌開始後5日目まで、全ての脳部位特に、皮質、脳幹、視床下部において、TRP、5-HT、5-HIAA量は減少しており脳セロトニン代謝は低下していた。しかし、自由摂餌開始後14日目には、1日当りの摂餌量、体重および、脳TRP、5-HT、5-HIAA量全てにおいて対照群と差を認めなかった。
以上、時間制限給餌後自由摂餌に戻すと、hyperphagiaの状態となり、この間脳セロトニン代謝は低下し、摂餌行動の正常化とともに脳セロトニン代謝も正常化した。

〔**はじめに**〕摂食障害患者においてしばしば不食や摂食制限の後に、過食を生じる[4]。そこでは過食と脳セロトニン代謝異常との密接な関係が推定されている[2]。昨年の本学会では、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すと、脳セロトニン代謝が亢進することを報告した[3]。そこで本研究では過食のメカニズムを明らかにする第一歩として、時間制限給餌を繰り返しその後自由摂餌に戻した時の摂餌行動ならびに、脳セロトニン代謝への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週齢、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％、345.2 Cal/100g)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7日間にわたって施行し、8日目から22日目までは24時間自由に摂餌させた。そしてその間の摂餌量、水分摂取量及び体重の変化を測定記録した。そして自由摂餌再開直前、2時間後、1日後、5日後および14日後に断頭を行い、脳の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水分摂取をさせ、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[1]らの方法にしたがって、大脳皮質、脳幹(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％ $ZnSO_4$＋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32％、7日目で58％に減少した。しかし、自由摂餌再開1日目では対照群の145％、5日目では125％と対照群に比して有意に増加した。総摂餌量は、その後徐々に減少して14日目では103％と対照群と差を認めなかった。対照群の体重は平均3.1g/日ずつ増加したのに対して、実験群のそれは制限給餌中は平均0.9g/日ずつ減少し、自由摂餌再開後1週間は、平均6.0g/日、2週間目は2.8g/日ずつ増加し、14日目には同時期の対照群の約99％と差を認めなかった。

Fig.1に自由摂餌再開直前、2時間後、1日後、5日後、14日後の脳各部位のTRP、5-HT、5-HIAA含量の変化を同時期の対照群に対する比として示した。

自由摂餌開始前、TRP量は大脳皮質で対照群に比し有意に増加していた、5-HT量は海馬以外で対

照群と差がなく、5-HIAA量は、大脳皮質、脳幹において対照群に比し有意に増加していた。自由摂餌開始後2時間では、開始前に比しTRP量は大脳皮質を除く脳6部位において有意に減少、5-HT量は、線条体、脳幹、視床下部において低下、一方海馬においては有意に増加、5-HIAA量は大脳皮質、脳幹、視床下部、海馬で有意に低下していた。自由摂餌開始1日後、TRPと5-HT量は脳7部位において、5-HIAA量は視床をのぞき脳6部位において2時間後と差を認めなかった。自由摂餌開始5日後、TRP量は脳7部位において減少しており、大脳皮質と海馬においては対照群に比し有意差を認めた。しかし、5-HTと5-HIAA量は自由摂餌開始2時間後に比し増加しており対照群と比べて有意差を認めなかった。自由摂餌開始14日後には、TRP、5-HIAA量はすべて自由摂餌開始2時間後に比し増加しており対照群とほぼ同じ水準に達していた。

時間制限給餌によりラットは1日の総摂餌量が減少し、低体重となるが、自由摂餌を再開するとhyperphagiaを呈し、同時に脳セロトニン代謝は脳7部位、特に皮質、脳幹、視床下部において低下していた。自由摂餌再開後2週間で、摂餌行動の正常化と共に脳セロトニン代謝も正常化した。以上のことから、脳内セロトニン代謝の低下がhyperphagia状態と密接に関連していると考えられた。

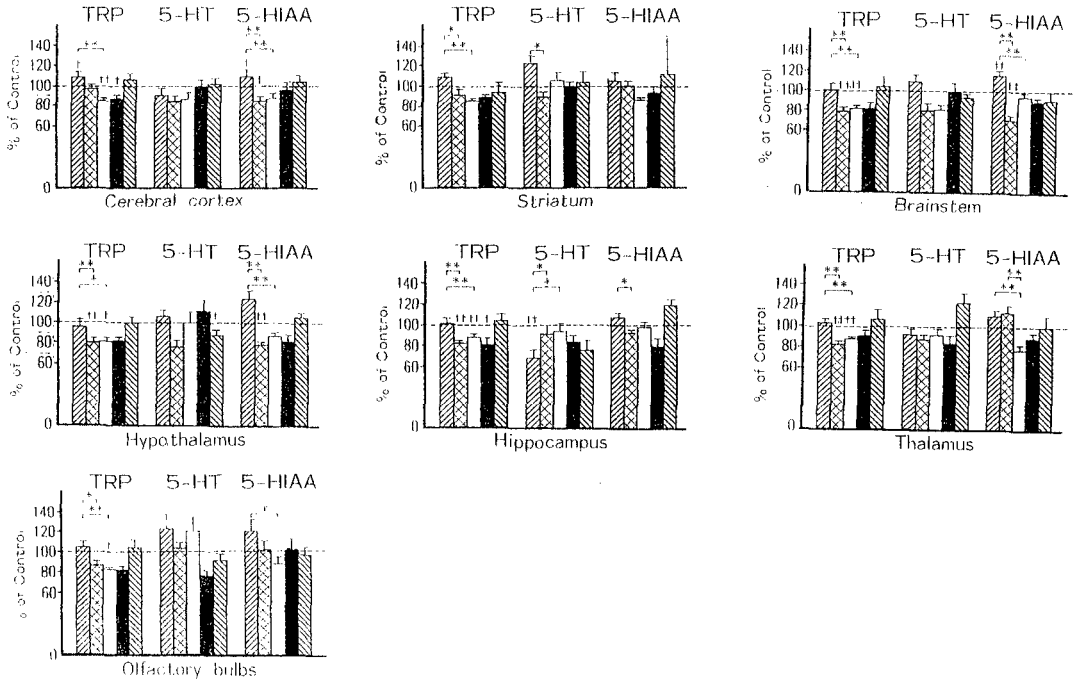


Fig.1 Effects of free feeding following 7 days scheduled feeding on the concentrations of TRP, 5-HT and 5-HIAA in different brain regions of rats, prior to (▨), after 2 hours (▩), 1 day (▥), 5 days (■) and 14 days (▧) of free feeding. Values are expressed as mean ± S.E.M.
*p<0.05 **p<0.01 : compared with each scheduled rat.
†p<0.05 ††p<0.01 : compared to controls.

〔文献〕

1) Gispen, W. H. et al. (1972) Neuroendcrinol. 9, 285-296.
2) Jimerson, D. C. et al. (1990) Biol Psychiatry. 28, 443-453.
3) 奥野正景ほか(1990) 神経化学 29, 248-249.
4) Reinhard J. T. (1990) Appetite. 14 105-109.

208 Conditioned fear stress の脳内セロトニン代謝におよぼす影響

井上　猛、小山　司、山下　格
（北海道大学医学部精神医学教室）

【要約】
電撃ストレス(EFS)とconditioned fear stress (CFS)がラット脳のセロトニン(5-HT)代謝に及ぼす影響を７脳部位で検討した。３０分間のEFSによりtryptophan(Trp)濃度は血漿では変化しなかったが、脳ではほぼ全部位で増加がみられた。5-HT含量はいずれの脳部位でも変化しなかったが、5-HIAA含量は内側前頭葉皮質、側坐核、扁桃体の３部位で増加した。CFSにより血漿コルチコステロン濃度の上昇、脱糞数の増加、freezing behaviorの出現が認められた。EFSとは異なり、CFSでは血漿中のTrp濃度は低下したが、脳各部位のTrp含量は変化しなかった。CFSにより5-HT含量はいずれの脳部位でも変化しなかったが、5-HIAA含量は内側前頭葉皮質でのみ増加がみられた。内側前頭葉皮質の5-HT作動性神経の情動ストレス時における役割の重要性が示唆された。

【目的】
ストレスは脳内のセロトニン(5-HT)の代謝に大きな影響を与え、その代謝物を増加させる(1)(2)(7)。しかし、これまでのストレス研究においては拘束、電撃、寒冷などのストレッサーが用いられ、いずれも身体的侵襲を伴うものであった。そのためストレスによる脳内の神経化学的変化が純粋に情動の変化を反映したものといえないという難点があった。 Fanselow,M.S.(3) は電撃ストレス負荷したラットをいったんホームケージにもどし、２４時間後に電撃をうけた装置に再び置くことによって、freezing behaviorが出現することを報告し、これを条件付けられた恐怖(conditioned fear)によって惹起された防御反応と考えた。同様の操作により、DOPAC含量が内側前頭葉皮質で増加すること(4)(5)、MHPG-SO_4 含量が視床下部、扁桃体、青斑核で増加すること(8)が報告されている。痛みなどの身体的侵襲を伴わないため、CFSは心理的ストレスとして考えられ、他の身体的侵襲を伴なうストレッサーと比べ、ストレスによる神経化学的変化を直接情動と関連付けられるという利点がある。CFSによりドーパミン、ノルアドレナリン代謝が変化することはすでに報告されているが、5-HT代謝が変化することはこれまでに報告されていない。本研究では、電撃ストレス(EFS)とCFSがラット脳の5-HT代謝にもたらす影響と、CFSによる行動、内分泌の変化について検討した。

【方法】
Sprague-Dawley系雄性ラットを用いた。EFSの影響をみる実験では、2.5mAのfootshockを３０分間負荷した直後に断頭し、脳と血液を採取した。対照群は同じ箱に電撃を加えずに３０分間静置した。CFSの実験では、EFSを３０分間負荷し、２４時間後に同じショック箱に電撃を加えずに３０分間置き、freezing behavior、脱糞数の観察を行った後、直ちに箱より取りだし、断頭により血液と脳を採取した。対照群は同じ箱に２４時間の間隔をおいて２回、各々３０分間静置した。内側前頭葉皮質、側坐核、線条体、室旁核、外側視床下部、扁桃体、海馬の７脳部位についてTrp、5-HT、5-HIAAの含量をHPLC-ECD により測定した。各代謝物の含量は蛋白量あたりの濃度とした。またTrpについては血漿中濃度も測定した。血漿中のコルチコステロンはRIAで測定した。 Freezing behaviorの評価はtime-sampling procedure(3)により、１０秒毎に行動を評価した。

【結果】
(1)３０分間のEFSによりTrp濃度は血漿では変化しなかったが、脳ではほぼ全部位で増加がみられた。5-HT含量はいずれの脳部位でも変化しなかったが、5-HIAA含量は内側前頭葉皮質、側坐核、扁桃体の３部位で増加した（Fig.(A))。(2)CFSにより血漿コルチコステロン濃度の上昇、脱糞数の増加、freezing behaviorの出現が認められた。(3)EFSとは異なり、CFSでは血漿中のTrp濃度は低下したが、脳各部位のTrp含量は変化しなかった。CFSにより5-HT含量はいずれの脳部位でも変化しなかったが、5-HIAA含量は内側前頭葉皮質でのみ増加がみられた(Fig.(B))。

【考察】
CFSによりfreezing behaviorの出現、脱糞数の増加、血漿コルチコステロン濃度の上昇がみられたが、これらの結果は情動の変化を反映したものであり、CFSは情動ストレスとして妥当であると思われる。電撃ストレス(1)(2)や拘束ストレス(7)で5-HT代謝が増加するという報告がある。今回の結果では、CFSにおいては電撃ストレスによる

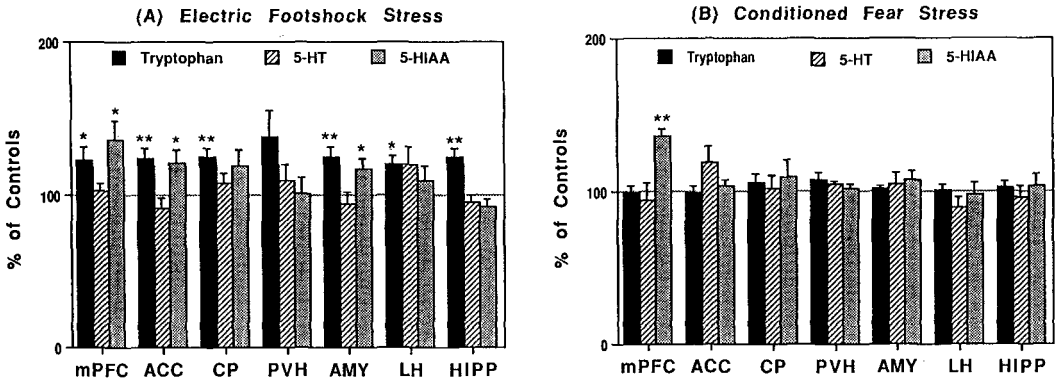


Fig. Effects of electric footshock stress (A) and conditioned fear stress (B) on tryptophan, 5-HT and 5-HIAA levels in the discrete rat brain regions. Results are means with SEM of data obtained on 7-8 rats and are expressed as percentage of respective control values. mPFC,medial prefrontal cortex; ACC ,nucleus accumbens; CP,caudate-putamen; PVH,paraventricular nucleus of the hypothalamus; AMY,amygdala ; LH,lateral hypothalamus; HIPP,hippocampus. (*:p<0.05 ; **:p<0.01)

変化とは異なり、5-HIAA含量は内側前頭葉皮質でのみ増加した。CFS により5-HT代謝の亢進がもたらされることは、これまでに報告はなく本研究がはじめての報告である。最近5-HT系抗不安薬が開発され、不安における5-HT仮説が注目されている(6)。本研究で認められた内側前頭葉皮質の5-HT代謝の亢進はこの仮説を動物実験の側面から支持するものと思われる。電撃あるいは拘束ストレスにより脳内Trp含量が増加することが報告されている。 Dunn,A. J.(2)は電撃ストレスにより脳内5-HT代謝の亢進、血漿と脳のTrp濃度の増加を報告し、ストレス時におこる5-HTの放出亢進による5-HT貯蔵の低下をTrpの全身的な利用の亢進が補充するような調節機構が存在するのではないかと指摘している。しかしKennett,G.A.ら(7)は拘束ストレスで脳内のTrpは増加するが、血漿中濃度は変化しないと報告しており、血漿における変化は一致しない。本研究でもKennett,G.A.らと同様に、電撃ストレスでは脳内Trp含量は増加したものの、血漿中濃度は変化しなかった。さらにCFSにおいては電撃ストレスによる変化とは異なり、血漿中濃度はむしろ低下し、脳内のTrp含量は変化しなかった。これらの結果の違いは、身体的侵襲の有無で説明することも可能であり、Dunn,A.J.が仮説としてあげている自律神経系による脳内Trp利用の調節とは、身体的刺激に対する反応である可能性が示唆される。

【文献】

(1)Adell,A. et al.(1988)Brain Res.,459,54-59.
(2)Dunn,A.J.(1988)Life Sci., 42,1847-1853.
(3)Fanselow,M.S.(1980)Pavlov.J.Biol.Sci.,15,177-182.
(4)Herman,J.P. et al.(1982) Life Sci.,30,2207-2214.
(5)井上 猛他(1991)神経精神薬理(in press).
(6)Kahn,R.S. et al.(1988)Biol Psychiatry,23,189-208.
(7)Kennett,G.A. et al.(1981)20,39-43.
(8)Tsuda,A. et al.(1986)Pharmacol.Biochem.Behav.,24,115-119.

209 ラット線条体へのｓｕｌｐｉｒｉｄｅ投与の摂餌行動およびドパミン代謝におよぼす影響について

井上幸紀，切池信夫，奥野正景，伊藤英樹，
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22時間の絶食後、マイクロダイアリシス法によりドパミン D_2 receptor の選択的阻害剤である sulpiride 0.05 μg/μl, 0.5 μg/μl, 2.5 μg/μl, 5 μg/μl を含む各灌流液を、プローブより線条体に１μl/min の流速で拡散投与しながら６時間自由摂餌させ、その間１時間毎の摂餌・摂水量、及び 20 分毎の線条体細胞外液中の dopamine (DA)、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DAPAC) 及び homovanillic acid (HVA) 濃度を測定した。sulpiride の投与により DOPAC 及び HVA 濃度は有意に増加したが、その増加量と濃度との間に有意な相関は認められなかった。0.05 μg/μl の sulpiride 濃度では摂餌量は増加傾向を示し、2.5 μg/μl 以上では摂餌量は抑制された。これは、sulpiride が低濃度では pre-synaptic D_2 autoreceptor に働くことにより DA 代謝回転が亢進し摂餌行動を促進し、高濃度では post-synaptic D_2 receptor を阻害したために摂餌行動が抑制されたものと考えられた。これらのことから、線条体 D_2 receptor は摂食行動に関与していることが示唆された。

＜はじめに＞　我々は昨年の本学会において、ラットに時間制限給餌を繰り返すと、摂餌行動中に線条体ドパミン代謝が亢進することを報告した。そのなかで線条体ドパミンが摂食行動において、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、そしゃくなどの行動に関与している可能性を示唆した[1]。そこで今回我々は、線条体にドパミン D_2 receptor の選択的阻害剤である sulpiride を直接投与し、これにより摂餌行動が抑制されるかどうかについて検討を加えた。

＜方法＞　実験動物、マイクロダイアリシス法における外科的処置は前報と同様である[1]。すなわち、Wistar 系雌性ラット（180～210g）に chloral hydrate 麻酔下で Paxinos and Watson の図譜[3]に従い guide cannula を（背外側）線条体（AP +0.5mm, L +3.0, V -3.5mm 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、実験開始日の13時に飼料を取り除き（摂水は可能）、21時に長さ３mmのＩ字型透析プローブを挿入した。自由行動下でリンゲル液を 0.25 μl/min の流速で10時間灌流し、その後（実験２日目の７時から）１ μl/min の流速で灌流し、９時から11時までの dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) 及び homovanillic acid (HVA) 濃度をそれぞれの基礎値として測定した。ラットを22時間絶食させた後、実験２日目の11時から17時まで、sulpiride を 0.05 μg/μl, 0.5 μg/μl, 2.5 μg/μl, 5 μg/μl 各濃度で灌流液に混入し、線条体にプローブより拡散投与しながら６時間自由摂餌させ、その間の１時間毎の摂餌・摂水量を測定した。実験終了後、ラット大脳切片を作成し、鏡頭下で正しくプローブが線条体内に挿入されていることを確認した。

sulpiride は、藤沢薬品工業（株）のドクマチール注射液（sulpiride 50 mg/ml, NaCl 4.75 mg/ml, H_2SO_4 7.18 mg/ml）をリンゲル液（147 mM NaCl, 4 mM KCl, 4.5 mM $CaCl_2$）で使用濃度まで希釈したものを用いた。

統計的解析は、DA, DOPAC, および HVA 濃度変化について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、各測定値と同時期の対照群とのあいだで Welch Test を用いて行った。各濃度における１時間毎および累積の摂餌・摂水量については対照群と各実験群の間で Welch Test を用いて行った。

＜結果及び考察＞　0.05 μg/μl, 0.5 μg/μl, 2.5 μg/μl, 5 μg/μl 各濃度で sulpiride を含むリンゲル液を線条体に灌流した時の自由摂餌６時間における１時間毎及び累積の摂餌・摂水量を Fig.1 に示した。自由摂餌開始後１時間の摂餌量は、sulpiride 0.05 μg/μl で高値の傾向を示し、これ以上の濃度では対照群との間に差を認めなかった。しかし、６時間における累積摂餌量についてみると、0.05 μg/μl では対照群に比し高値を示し、0.5 μg/μl では対照群と異ならず、2.5 μg/μl, 5 μg/μl では対照群に比し低値を示した。また、単位時間当りの摂餌量についてみると、４時間目の１時間において 0.5 μg/μl 及び 2.5

μg/μl で、6時間の1時間において 5 μg/μl で対照群に比し低値を示した。一方摂水量についてみると、自由摂餌開始後1時間では sulpiride のいずれの濃度においても差を認めなかったが、6時間目の累積摂水量では 0.05μg/μl では対照群と異ならないが、0.5 μg/μl, 2.5 μg/μl, 5 μg/μl のいずれの濃度においても対照群に比し有意に低値を示した。単位時間当りの摂水量についてみると、自由摂餌開始4時間以後において、sulpiride 0.5 μg/μl, 2.5 μg/μl, 5 μg/μl において、対照群に比し低値を示した。

Fig.2 に、sulpiride 投与後における線条体細胞外液中の DA, DOPAC 及び HVA 濃度の変化を示した。0.05 μg/μl では、DA, DOPAC 及び HVA 濃度は著明に増加し、それは基礎値の 140～230 % に達した。これらのうち DA は4時間目頃より基礎値より低下し、6時間目では基礎値の約 80 % であった。0.5 μg/μl, 2.5 μg/μl では、DA, DOPAC, HVA は基礎値の 120～200 % まで増加し、これは投与中持続した。5 μg/μl では、DA は投与1時間後に基礎値の約 125 % まで増加し、その後減少し、2時間後で基礎値の約 90 %、6時間後では基礎値の約 50 % であった。DOPAC は投与2時間後に基礎値の約 130 % に達し、その後減少し、6時間後では基礎値の約 90 % であった。HVA は4時間後に基礎値の約 160 % に達し、その後徐々に減少したが、6時間後で基礎値の約 130 % と高値であった。

以上の結果をまとめると、sulpiride を線条体に投与すると DA の合成と放出が促進され、低濃度では摂餌量の増加が、高濃度では摂餌量及び摂水量の低下が観察された。これは、sulpiride が低濃度では pre-synaptic D_2 autoreceptor に働き、DA の合成と放出が促進され[2)4)]線条体の機能が亢進し、摂餌行動が増強され、高濃度では post-synaptic D_2 receptor を阻害することにより線条体の機能が低下し、摂餌行動が抑制されるものと考えられた。

＜参考文献＞　1 井上幸紀 ら (1990) 神経化学 29, 256-257.　2 Imperato, A. et al. (1988) J. Pharmacol. Exp. Ther. 245, 247-264.　3 Paxinos, G. and Watson, C. (1986) The Rat Brain, Academic Press.　4 山田和夫 ら (1988) 精神薬療基金研究年報 第19集 199-205.

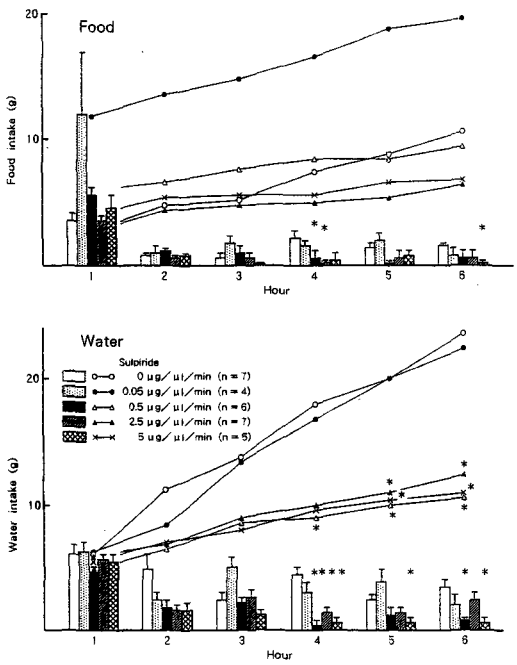


Fig. 1 Hourly and cumulative food and water intake during sulpiride perfusion into the ventrolateral striatum for 6 hours. Values are expressed as mean ± S.E.M.
＊ $p < 0.05$, ＊＊ $p < 0.01$: Compared with the control.

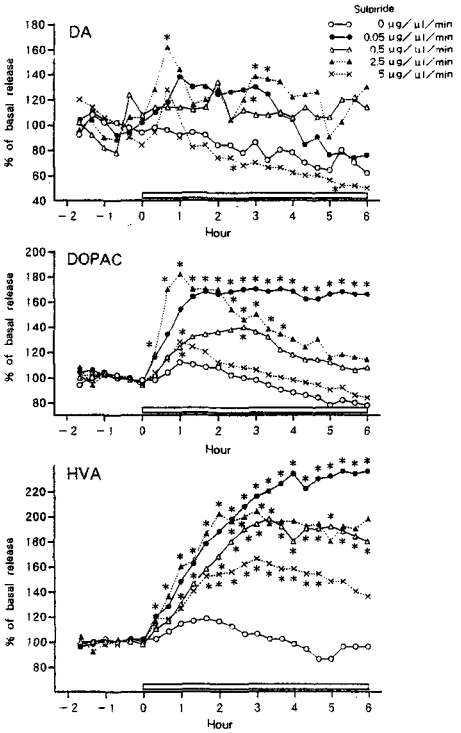


Fig. 2 Changes of striatal extracellular DA, DOPAC, and HVA concentrations during sulpiride perfusion (expressed as an open column : ▭) into the ventrolateral striatum for 6 hours. Values are expressed as mean.
＊ $p < 0.05$: Compared with the control.

210 Gunnラット脳のGlutathione S-Transferase活性について。

都築紀宏
名古屋市大・医・生化学

〔要約〕
ホモ接合体Gunnラットの大脳および小脳細胞質分画に含まれるglutathione S-transferase活性を正常Wistarラットの場合と比較した。４週齢、１１週齢Gunnラットとも全体的に３０－３５％低い酵素活性を示した。特に４週齢大脳では５０％以上の活性低下があった。これら細胞質分画の遊離アミノ酸組成を分析するとGunnラットでは アスパラギン酸(60-200%)、グリシン(50%)、リジン(200%)、及びGABA(30-50%)は増加し、グルタミン酸(30-47%)、アラニン(50%)は減少していた。神経抑制性アミノ酸が増量する傾向が見られた。Glutathione S-transferaseはバラニューロン、牛副腎髄質の細胞質分画にも強い活性が認められ、この結果は神経系にもglutathione S-transferaseが存在することを傍証した。

〔序〕 Gunnラット[1]はWistar系ラットの突然変異種で、ホモ接合体(homozygotes)では肝細胞ミクロソーム酵素 bilirubin UDP-glucuronyl transferaseが先天的に欠損しているために、非抱合型高ビリルビン血症を示し、大脳皮質や基底核に黄疸症状を呈する。Glutathione S-transferase(GST) はロイコトリエンＡなどの代謝産物に glutathione (GSH) を抱合する酵素で、我々はこの酵素の脳内分布を調べる一連の実験で、ラット脳神経終末分画に強いGST活性があることを見出した[2]。この酵素はビリルビンで強く阻害されることが知られているので[3]、今回 Gunnラット脳のGST活性について検討した。

〔材料と方法〕 Wistar系雄性Gunnラット(homozygous)は４週齢と１１週齢のものを２匹ずつ使用した。対照として同系同週齢の正常雄性ラットを用いた。ラットは断頭後、大脳（間脳を含む）、小脳（中脳、橋の一部を含む）を２個ずつ、各々８－１０倍量の氷冷 50 mM リン酸カリ緩衝液(pH 7.4) 中でテフロン-ガラスホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした。20,000xg、30分間遠心分離し、その上清を酵素液とした(4-7 mg protein/ml)。GST活性は1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)とGSHとの抱合反応をpH 6.5、340 nmにて分光測定して求めた。この pHでの反応生成物の濃度算出には差吸光係数 9.6 $mM^{-1}cm^{-1}$を用いた[4]。またこの上清の遊離アミノ酸組成の分析はスルホサリチル酸で除蛋白後、日立アミノ酸分析計835型で行なった。Gunnラットは三共株式会社安全性研究所（静岡県袋井市）から恵与された。

〔結果〕 対照ラットのGST活性は大脳、小脳とも pH 6.4-6.7に至適 pHを示したので、活性測定はpH 6.5で行なった。表I に示したように Gunnラットでは４週齢、１１週齢とも、大脳、小脳はほぼ同程度の酵素活性を示した。週齢差では１１週齢ラットのほうが両脳において80% ほど高活性であった。正常ラットでは４週齢、１１週齢とも小脳より大脳の酵素活性が平均45% 高く、また４週齢より１１週齢のほうが両脳とも平均 35% ほど高い活性を示した。即ちGunnラットでは全体的に30% ほどGST活性の低下がみられた。特に４週齢大脳では50% ほどと顕著な活性低下があった。１１週齢Gunnラットの大脳 GSTは18 μMビリルビンで約15%、45 μMで30-35 %の活性阻害を受けた。

表IIにGST酵素液として用いたGunn 及び正常ラットの脳抽出液の遊離アミノ酸組成を示す。正常ラットと比べてGunnラットでは以下の増減が見られた。アスパラギン酸は両脳において４週齢では60%、１１週齢では200% 以上増加している。グルタミン酸は４週齢、１１週齢とも小脳で47%、大脳で30% 程減少している。グリシンは１１週齢両脳で 50% の増加をしめす。アラニンは逆に１１週齢両脳で70% の減少を示した。

リジンは4週齢、11週齢とも両脳で200% 以上の増大を示した。GABAは両脳において4週齢で40-50 %、11週齢で 33% の増大が見られた。シスタチオニンは正常ラットでも大脳より小脳に10倍以上多く含まれていた。

［考察］ Gunnラットでは大脳皮質、小脳、基底核の順にビリルビンが沈着してゆくと言われている。大脳が特に低いGST活性を示したのは、この順序に起因しているかも知れない。GST活性の減少が酵素の生合成低下に因るのか、ビリルビンの結合阻害によるのかは更に解析が必要である。

AsaokaらはSprague-Dawley系Gunnラットを用いて GST活性を測定している[5]。我々の結果とは逆に、ヘテロ接合体（対照）と比べてホモ接合体では、小脳の酵素活性に増大が見られ、Vmaxの変化より酵素量の増加による活性増大と解析している。ただヘテロ接合体は正常ラットと必ずしも性質が同じとは言えない[6,7]。

Table I. Glutathione S-Transferase Activity of Brain Cytosols of Normal and Gunn Rats.

	normal	Gunn	% of normal
4-week-old			
cerebellum	63.5	41.0	64.6
cerebrum	101.0	45.5	45.0
11-week-old			
cerebellum	96.5	75.5	78.2
cerebrum	126.0	84.0	66.7

Activities in nmoles of CDNB conjugated with GSH/min/mg protein (means of 4 assays).

Table II. Free Amino Acids in Brain Extracts of Normal and Gunn Rats.

	4-week-old				11-week-old			
	cerebellum		cerebrum		cerebellum		cerebrum	
	normal	Gunn	normal	Gunn	normal	Gunn	normal	Gunn
Asp	*118.0	188.4	104.6	165.9	86.0	172.9	60.0	141.6
Thr	17.3	16.0	13.2	12.2	12.4	12.5	9.5	10.0
Ser	18.4	18.3	21.3	24.8	18.1	16.9	20.5	25.2
Glu	165.5	88.1	156.5	115.4	155.0	81.3	139.6	94.5
Gln	106.2	98.1	89.6	78.3	98.7	98.2	74.9	85.4
Gly	26.6	34.1	23.9	25.1	24.2	37.3	23.0	34.3
Ala	61.1	94.5	59.1	65.0	71.7	19.1	62.1	20.0
Val	** ---	3.3	1.9	3.2	---	---	1.7	0.8
Cys	1.3	1.1	0.5	0.7	---	1.5	0.6	0.7
Met	1.2	1.4	1.1	1.3	1.6	1.3	0.8	1.1
Ile	---	1.4	1.0	1.5	---	---	0.9	1.2
Leu	2.7	3.3	2.7	3.0	2.6	3.1	2.4	2.7
Tyr	3.1	2.3	2.2	1.9	2.0	2.5	1.5	1.4
Phe	2.8	3.3	2.3	2.7	2.7	2.4	1.9	2.1
Try	---	0.9	0.8	0.8	1.2	1.3	---	0.7
Lys	10.3	26.0	6.1	14.5	8.0	16.4	4.3	8.9
His	3.2	2.9	2.6	2.6	2.5	2.4	2.1	2.2
Arg	4.8	5.3	3.0	4.2	3.6	4.4	2.7	3.4
Cysthi	10.0	12.5	0.9	1.0	12.1	9.6	0.8	0.9
GABA	173.0	270.4	194.2	266.6	194.1	258.3	205.1	273.3
Tau	216.9	227.0	192.1	207.5	150.2	136.7	130.9	156.2

* in nmol/ml, corrected for difference in sample concentrations based on those of 4-week-old, normal cerebellum. ** ---, not detected.

Gunnラット脳アミノ酸組成： 必須アミノ酸には目立った変化はなかった。アスパラギン酸とグルタミン酸は神経系に対して興奮作用を示すが、前者は増加し、後者は減少していた。グルタミン酸は脱炭酸されると抑制性アミノ酸 GABAになるが、事実 GABAの増大も見られた。表IIの数値には中間代謝物としての値も当然含まれているが、グリシンも含めて抑制性アミノ酸が増量している傾向が見られた。

［謝辞］ 実験計画に週齢を合わせてGunnラットを恵与していただきました三共株式会社安全性研究所に謝意を記します。またアミノ酸分析に助言を頂きました医・共同研、後藤香糸子氏に感謝します。

［文献］ 1) Gunn, C.H.(1938) J. Hered. 29, 137-139. 2) 都築紀宏、後藤香糸子(1988) 神経化学 27, 188-189. 3) Vander Jagt, D.L., Wilson, S.P., Dean, V.L., & Simons, P.C.(1982) J. Biol. Chem. 257, 1997-2001. 4) Habig, W.H., Pabst, M.J., & Jakoby, W.B.(1974) J. Biol. Chem. 249, 7130-7139. 5) Asaoka, K., Sato, H., & Kashiwamata, S.(1986) Biomedical Res. 7, 103-106. 6) Schmid, R., Axelrod, J., Hammaker, L., & Swarm, R.L.(1958) J. Clin. Invest. 37, 1123-1130. 7) Robinson, S.H.(1969) Nature 222, 990-991.

211

老化促進マウス脳における神経伝達物質受容体の加齢変化

山中庸次郎，北村佳久，野村靖幸
（北大・薬・薬効）

〔要約〕

老化促進モデルマウス(SAM)の P/8系は、老化モデルおよび学習記憶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 2、12ヶ月齢の大脳皮質、海馬、小脳の各膜画分への [^{3}H]pirenzepine (M_1ムスカリン性受容体アンタゴニスト)、[^{3}H]MK-801 (N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体/チャネルブロッカー)結合を測定したところ、SAM-P/8系海馬で対照の R/1系に比較して有意に減少した。また [^{3}H]8-OH-DPAT (セロトニン$_{1A}$受容体アゴニスト)、[^{3}H]flunitrazepam (GABA/ベンゾジアゼピン受容体アゴニスト)結合も P/8系海馬で有意に減少した。これは、SAM-P/8系における加齢に伴う受動的回避反応獲得障害が学習記憶障害のみに起因するのでなく低不安も関与するという考え方を支持する。さらに SAM 12ヶ月齢の大脳皮質、海馬、小脳のシナプス膜画分および可溶性画分を調製し [^{3}H]phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu)結合を測定したところ、SAM-P/8系海馬膜画分および大脳皮質、海馬可溶性画分において有意に減少した。PKCの LTPへの関与が報告されていることより PKCの減少も SAM-P/8系の学習記憶障害に一因をなすことが示唆された。

【緒言】

中枢神経系のアセチルコリン(ACh)、グルタミン酸(Glu)は、学習記憶機能に関与し、GABA、セロトニン(5-HT)は情動行動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[1]および学習記憶障害モデル[2]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(R/1)系に比し SAM-P/8(P/8)系脳における Glu含量、50 mM KCl刺激による Glu放出の低下、NMDAによる [^{3}H]ノルアドレナリン(NA)放出活性の低下を見いだしている。一方、P/8系における加齢に伴う受動的回避反応獲得障害が学習記憶能力の低下のみに起因するのでなく低不安も関与することが示唆されている[4]。今回我々は、SAM脳におけるM_1ムスカリン性受容体、NMDA受容体/チャネル、5-HT_{1A}受容体、GABA/ベンゾジアゼピン(BDZ)受容体の加齢変化について検討した。さらに長期増強(long-term potntiation; LTP)へのPKCの関与が示唆されている[3]ことより、12ヶ月齢 SAM脳の[^{3}H]PDBu結合の変化についても検討した。

【実験方法】

1) 各種リガンドの結合実験には生後 2ヶ月ならびに12ヶ月齢の P/8系と R/1系の雄を使用した。それぞれの大脳皮質、海馬、小脳のシナプス膜画分を調製し、[^{3}H]pirenzepine (15 nM)、[^{3}H]MK-801 (15 nM)、[^{3}H]8-OH-DPAT (2 nM)、[^{3}H]-flunitrazepam (5 nM)結合実験を行なった。それぞれの非特異的結合は atropine (10 μM)、MK-801 (10 μM)、buspirone (10 μM)、diazepam (10 μM)存在下で算出した。

2) [^{3}H]PDBu結合実験には P/8および R/1系 12ヶ月齢の雄を使用した。大脳皮質、海馬、小脳のシナプス膜画分および可溶性画分を調製し、[^{3}H]PDBu (5 nM)結合実験に用いた。非特異的結合は 5 μM TPA存在下で算出した。

【結果】

[^{3}H]pirenzepineおよび [^{3}H]MK-801結合は、海馬において P/8系で R/1系に比し有意に減少した。また、[^{3}H]8-OH-DPAT、[^{3}H]flunitrazepam結合は、大脳皮質、海馬において加齢によって有意に減少し、両結合とも海馬において P/8系で R/1系に比し有意に減少した(図1,2)。各結合とも小脳においては著しい変化は認められなかった。[^{3}H]PDBu結合は海馬膜および大脳皮質、海馬の可溶性画分において有意に減少した(図3)。

【考察】

学習と記憶の機能障害が早期に観察される P/8系において1)生後 2ヶ月以降に多数の空泡性変性、2)NADPH-diaphorase陽性神経細胞(AChニューロン)の加齢に伴う萎縮と神経細胞数の減少、3)生後 8ヶ月齢で海馬錐体細胞の樹上突起、spine密度の減少が報告されている。我々は前回の本学会においてP/8系の海馬におけるグルタミン、Glu含量の増加、大脳皮質膜における [^{3}H]MK-801、および [^{3}H]pirenzeoine結合の減少を報告した。今回、NMDA受容体/チャネル、M_1ムスカリン性受容体だけでなく GABA/BDZ受容体、5-HT_{1A}受容体が減少していることは P/8系に学習記憶機能の障害に加え、情動行動にも変化が生じていることが考えられる。最近、宮本らは P/8系における受動的回避反応獲得障害が学習記憶障害だけでなく、低不安も一因を担っていることを示唆している[4]。今回の我々の実験結果は、これを支持している。また、アルツハイマー病(AD)での PKCサブタイプ別の膜画分における低下が報告されており[5]、P/8系海馬膜画分および可溶性画分における[^{3}H]PDBu結合の低下は学習記憶障害の原因を考える上で、Glu含量の増加、NMDA受容体/チャネルの変化と関連して興味深い。さらに最近 ADにおいて GAP-43の蛋白レベルでの減少が報告されている[6]。そこで SAM脳における GAP-43mRNAの変化の有無を現在検討中で、併せて報告する。
予定である。

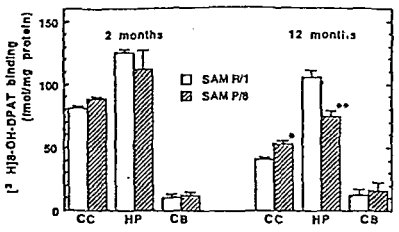


図1: 脳各部位における [^{3}H]8-OH-DPAT結合の R/1系と P/8系の比較

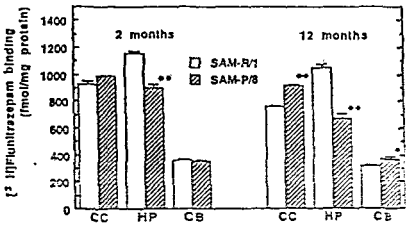


図2: 脳各部位における [^{3}H]flunitrazepam結合の R/1系と P/8系の比較

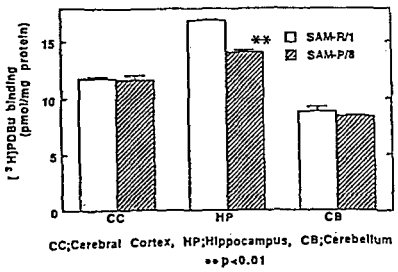


図3: 脳各部位のシナプス膜画分における [^{3}H]PDBu結合の R/1系と P/8系の比較

【謝辞】

SAMを提供頂いた 竹田俊男教授(京大胸部疾患研)に感謝致します。

【参考文献】

1. Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuti, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Ishii, M. and Yamamuro, T. (1981) Mech. Aging Dev. 17, 183-194.
2. Miyammoto, M., Kiyota, Y., Nagaoka, A., Matsuo, T., Nagawa, Y. and Takeda, T. (1986) Physiol. Behav. 38, 399-406.
3. Aker, R.F., Loviger, D.M., Colley, P.A., Linden, D.J. and Routtenberg, A. (1986) Science 231, 587-589.
4. 宮本政臣 (1991) 第8回 老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会抄録集 18-21.
5. Masliar, E., Cole, G., Shimohama, S., Hansen, L., DeTeresa, R., Terry, R.D. and Saito, T. (1990) J. Neurosci. 10(7), 2113-2124.
6. Masliar, E., Mallory, M., Hansen, L., Alford, M., Albright, T., DeTeresa, R., Terry, R., Baudier, J. and Saitoh, T. (1991) Neuron 6, 729-739.

212 El マウス脳における mRNA の翻訳活性

中西重紀，撫井弘二，山上　栄，木岡哲郎，
大西　博，川北幸男

（大阪市大・医・神経精神）

〔要約〕

生後100日目における痙攣履歴のある El(+) マウス、痙攣履歴のない El(o) マウス、発作非感受性の ddY マウス脳から polysomal poly(A)$^+$ mRNA を調製した。この mRNA をそれぞれ [^{35}S]-methionine と rabbit reticulocyte lysate の系に加え、mRNA の翻訳活性を比較した。ラベルされた翻訳産物は反応60分で最大に達し、mRNA の濃度 10μg/ml まで直線的な上昇を示した。ddY の翻訳活性は３群の間で最も高く、それに対して El(+) と El(o) は 72% と 58% と有意な低値を示した。El と ddY マウスの翻訳産物のオートラジオグラフの結果では、明らかに異なる spot は見出せなかったので、発作感受性に相関すると考えられる蛋白分子種は認められなかった。

【目的】　発作感受性の El マウス脳 mRNA は、その母系である ddY マウスより nucleotide sequence complexity が有意に少ないことを、DNA-RNA saturation hybridization 法によって報告し[1)2)]、El マウスの mRNA は ddY マウスに存在する sequence の一部が欠損している可能性を示唆した[1)2)]。こうした El マウスに特異な mRNA が、細胞質での蛋白質合成のレベルでも変化することが予想される。ここでは、El マウスの発作感受性と mRNA の翻訳レベルでの発現制御について検討したので報告する。

【方法】　実験には、生後28日目より週１回の放り上げ刺激を与え、生後75日頃より強直間代痙攣を起した生後100日目の痙攣履歴のある El(+) マウスを用いた。他に、生後一度も放り上げ刺激を与えなかった痙攣履歴のない El(o) と発作非感受性の ddY マウスを用いた。これら３群マウス脳から polysomal poly (A)$^+$ mRNA を前報[2)]に従って調製した。mRNA を [^{35}S]-methionine と rabbit reticulocyte lysate の系に加え、蛋白質を in vitro で合成し、[^{35}S]-methionine の取り込みによって mRNA の翻訳活性を比較した。その翻訳産物を一次および二次元電気泳動を行った後、autoradiograph で解析した。

【成績】　Fig.1 に ddY マウス mRNA を加えた時のラベルされた翻訳産物の経時的変化を示す。反応60分で最大値に達し、それ以降も緩徐な増加傾向を示した。反応60分における種々の mRNA 濃度の翻訳産物への影響について検討した結果を Fig.2 に示す。mRNA 10μg/ml まで直線的なラベルの増大を示したが、それ以後はやや平坦化し、20μg/ml の濃度では減少した。Poly(A)$^+$ mRNA 2.64 μg/ml を加え、反応60分間でインキュベーションした結果を Table 1 に示した。ddY の翻訳活性は３群の間で最大であったので、これを 100% として、El(+) と El(o) の活性を表わすと、それぞれ 71.8% と 58% となり、ddY に比べて有意な低値であったが、他方、El(+) と El(o) との間には有意差は見られなかったが、El(+) が El(o) よりやや高い翻訳活性を示した。El と ddY マウスの翻訳産物のオートラジオグラフの結果を Fig.3 a, b に示した。２群間で明らかに異なるラベルの存在は認められなかった。

【考察】　In vitro 蛋白質合成系における El(+)、El(o)、ddY マウスの mRNA の翻訳活性を [^{35}S]-methionine の翻訳産物への取り込みについて比較した。その結果、ddY に対して、El(+)、El(o) が有意な低値を示したことは、El マウスの mRNA が先天的に翻訳活性が低いことを示唆し、以前に報告した mRNA の sequence complexity の低いことと関連があるように思われる。また、El(+) と El(o) との間に存在する翻訳活性の差異は、週１回の放り上げ刺激によって誘発される痙攣発作によって形成された発作感受性と相関するのかも知れない。El マウスの発作では、特異的に mRNA の転写や processing の過程での３′末端の poly(A) 形成が障害され、mRNA 合成が阻害されることを示した[3)4)]が、このことは今回の結果を支持するものかも知れない。なお、今回、一次元と二次元電気泳動で、ddY、El ともに、67KD から 230KD の間にかなりの翻訳産物を認めたが、El マウスだけに特異的なスポットは見出し得なかった。従って、発作感受性に相関すると考えられる蛋白分子種の検出には成功していない。

【文献】　1) Hirayama, E., Yamagami, S., Onishi, H., Chikami, T., Mori, K. and Kawakita, Y. Jpn.

J. Pschiatr. Neurol., 40 : 361-365 (1986)
2) Mui, K., Yamagami, S., Kioka, T., Hirayama, E., Furutsuka, D., Onishi, H. and Kawakita, Y., Jpn. J. Psychiatr. Neurol., 43 : 573-574 (1989)
3) Onishi, H., Yamagami, S., Mori, K. and Kawakita, Y., Exp. Neurol., 83 : 98-107 (1984)
4) Yamagami, S., Onishi, H., Ohno, K., Mori, K. and Kawakita, Y. Exp. Neurol., 95 : 167-177 (1987)

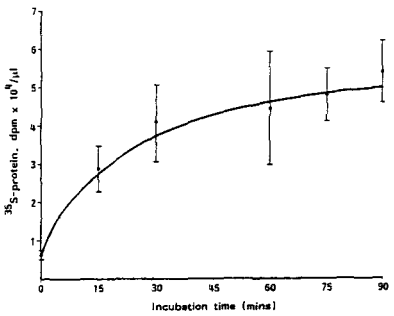


Fig. 1. Time course for ddY mRNA

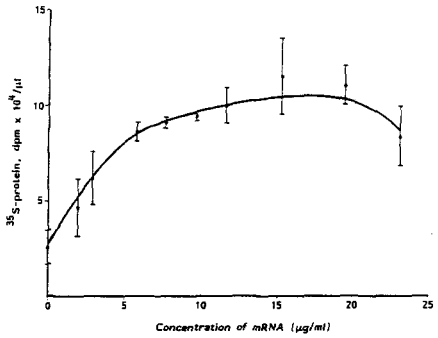


Fig. 2. Response curve for ddY mRNA concentration

Table 1. Effect of mRNA from ddY, El(+) and El(o) mouse brains on incorporation of [^{35}S]-methionine into protein in vitro.

Mice	^{35}S-protein, dpm x 10^4/µl		% control
ddY	4.45 ± 1.45	(n=15)	100
El(+)	3.19 ± 0.16	(n=15)	71.8
El(o)	2.58 ± 0.84	(n=15)	58.0

**: P<0.01, *: P<0.05

Standard assays with [^{35}S]-methionine were set up with 2.64 µg/ml mRNA. Incubation time was 60 min.

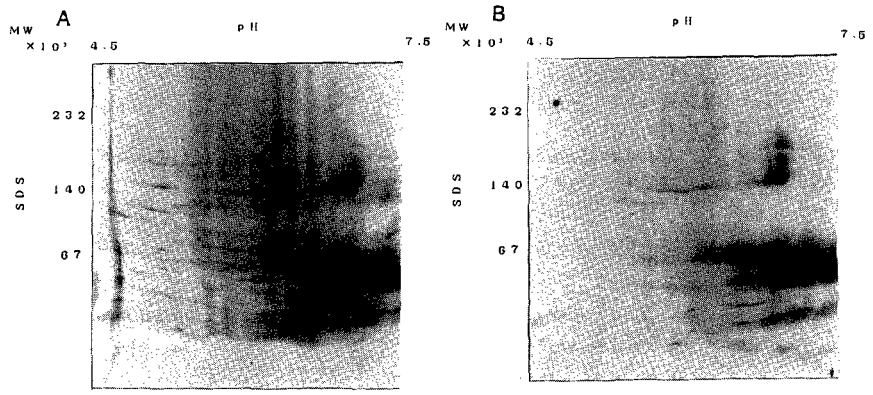


Fig.3. Autoradiogram of two-dimensional gel-electrophoresis for protein synthesis by mRNAs of El(o) and ddY mouse brains using rabbit reticulocyte lysate cell-free systems. El(o): a, ddY: b

213 Elマウス発作時における脳のc-fos mRNAの発現

勝元栄一，尾崎宣洋，山上　栄，横谷　昇，
撫井弘二，大西　博，川北幸男
（大阪市大・医・神経精神）

〔要約〕
遺伝的てんかんモデルであるElマウスとその母系であるてんかん原性を持たない ddYマウスを用いて、Elマウス固有の放り上げ刺激による発作後ならびにペメグリド投与による発作後のc-fos mRNAの誘導を調べた。痙攣履歴を有するEl(+)マウスの放り上げによる固有の痙攣後のc-fos mRNAの発現は、30分でピークに達したが、 60分後でもなお高い誘導を持続した。 他方、El(+)、放り上げ履歴のないEl(o)、ddYマウスの各々にペメグリド (16 mg/kg)を腹腔内注射し、痙攣を起こさせた場合のc-fos mRNA発現は30分でピークとなり急速に減少した。このElマウス固有の発作によるc-fos mRNA発現の延長は、週一回の発作の反復、つまり痙攣履歴によるものではないかと考えられる。 また、ElとddYマウス間において、ペメグリド投与時の痙攣後のc-fos mRNA発現の経時的、量的な相違は、遺伝的な発作感受性と関係があると思われる。

【目的】　プロトオンコジンのc-fosは、癌遺伝子のひとつであり、正常細胞の分化と増殖に関与している。メトラゾールやカイニン酸等の投与による痙攣発作[1)2)]、Kindlingによる誘発発作[3)]、実験的アルコール依存動物の断酒後の発作[4)]などによって脳のc-fos遺伝子の誘導が引き起こされるという。 c-fos mRNAの誘導が発作の結果生ずるものか、てんかん原性と相関するものかについては明確になっていない。今回、我々は、Elマウスを用いて、先天的な発作感受性とc-fos遺伝子発現との関連性を明らかにしようと試みた。

【方法】　痙攣履歴のあるEl(+)マウスを放り上げ刺激により発作を誘導した。また、El(+)、El(o)、ddYにペメグリド16mg/kgを腹腔内注射し、発作を誘導した。脳からのRNAの抽出はグアニジン・チオシアネート・フェノール・クロロホルムを用いたSingle-step method[5)]に若干の改変を加えて行った。 抽出されたtotal RNAは、アガロース・ゲル電気泳動した後、Northern blotによって、ニトロセルロース・フィルターに転移した。 また、痙攣発作15分、30分、60分後のc-fos mRNA発現をミリブロット-S（ミリポア社）を用いてSlot blottingした。Random primed DNA labeling kit, c-fos probe (Takara) と [α-^{32}P]-deoxy CTPによってcDNAをラベルした後、セファデックスG-50カラムに通して、カウントし、最初のラベルの部分を取り出し、フィルター上のRNAとハイブリダイゼーションした。48時間Autoradiogramし、c-fos mRNAの誘導を調べた。

【結果】　Autoradiogramによって得られたc-fos mRNAのバンドを、densitometerでscanし、 そのラベルの濃度の経時的変化をFig.1に示した。痙攣履歴のあるEl(+)マウスの発作間歇期ではc-fos mRNAの誘導はごく僅かであるが、放り上げ刺激によって、発作15分後で急激に増加し、30分でピークに達した。さらに60分後もかなり高いレベルの誘導が認められた。２時間後では発作間歇期のレベルになった。El(+)とEl(o)マウスの腹腔内にペメグリド16mg/kgを注射し、発作を誘発させた時のc-fos mRNAの誘導は発作30分後でピークとなり、 その後急速な減少を示した。 他方、ddYにおけるペメグリド腹腔内注射では、ピークは発作15分後に認められ、その後急速に減少した。

また、放り上げ刺激およびペメグリド投与によって発作を誘発させ後15分、30分、60分におけるc-fos mRNAの発現をスロットブロットし、Autoradiogram後densitometerによって定量したものをFig.2, 3に示した。 経時的な変化はNorthern blotによって得られた結果と同様でEl(+)の放り上げによる発作の誘導では、他の場合と異なり60分後でも高いレベルの発現を持続していた。 また、ddYにおける15分後のピークでのc-fos mRNAの誘導は他のピーク時の発現量より低いものであった。

【考察】　上の結果はElマウスの固有の放り上げ刺激による発作では、c-fos mRNAの誘導が30分後に最大となり、その後60分でも持続したことを意味する。他方、ペメグリドによる発作では、Kindlingによる発作や、単独電撃痙攣の場合と同様に、急速で、一時的な増加にとどまった。 また、ddYではElマウスと異なったc-fos mRNAの誘導パターンを呈し、発現量もElマウスに比して低かった。これらのことは、Elマウス固有の発作でのc-fos mRNAの発現の延長は週一回の発作の反復、つまり痙攣履歴によるものではないかと推測される。 他方、ElとddYマウス間におけるペメグリドによる痙攣のc-fos mRNAの経時的ならびに量的変化の相違は、遺伝的な発作感受性に関係があるのかも知れない。 既に、細胞核内におけるFos蛋白質は遺伝情報の転写制御因子と関連すると考えられているので、Elマウス脳においてc-fos mRNAに対応したFos蛋白質が合成され、 転写に影響を与える可能性が示唆され、以前に我々が報告したElマウス脳での特異な転写レベルでの変化[6)7)8)]と一致するものである。

【参考文献】　1) Morgan, J. I. et al., Science 237, 192-197 (1987)　2) LaSalle, G. L. G., Neurosci. Lett. 88: 127-130 (1988)　3) Dragunow, M. & Robertson, H. A., Nature 329: 441-442 (1987)　4) Dave, J. R. et al., Mol. Pharmacol. 37: 367-371 (1989)　5) Chomczynski, P. & Sacchi, N., Anal. Biochem. 162: 156-159 (1987)　6) Onishi, H. et al., Exp. Neurol. 83: 98-107 (1984)　7) Yamagami, S. et al., Exp. Neurol. 95: 167-177 (1987)　8) Yamagami, S. et al., Acta Neurol. Scand. 80: 327-332 (1989)

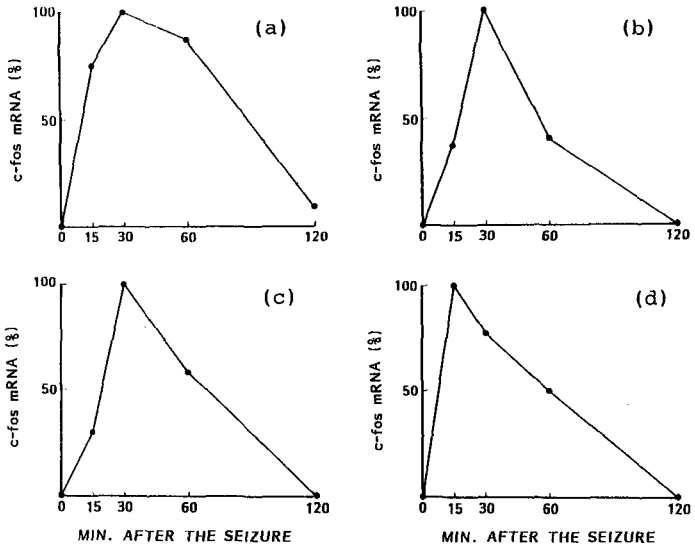


Fig. 1. Time courses of c-fos mRNA expression by Northern blot analysis (a): seizures provoked by tossed-up stimulation of El(+) mice, (b): Bemegride-induced seizures of El(+) mice, (c): those of El(o) mice, and (d): those of ddY mice.

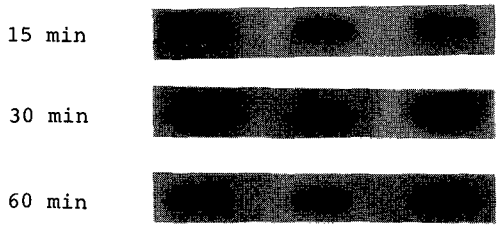


Fig. 2. Autoradiogram of the Slot blot analysis of the c-fos mRNA expression at 15, 30, and 60 min after seizures of El(+) mice.

Induced seizures	Mice	Times after seizures (min)	Relative ratio of c-fos mRNA induction 0 50 100 (%)
Tossed-up stimulation	El (+)	15 30 60	
Bemegride injection	El (+)	15 30 60	
	El (o)	15 30 60	
	ddY	15 30 60	

Fig. 3. Comparison with El(+) seizures by tossed-up, and Bemegride-induced seizures El(+), El(o), and ddY mice.

214 E1マウスの発育に伴う脳内β－エンドルフィン様免疫活性の変化

片山雅文、大西　博、小出誠司、甲斐利弘、山上　栄、川北幸男

（大阪市大、医、神経精神）

〔要約〕

オピオイドペプチドの一種であるβ－エンドルフィン（β-EP）と痙攣の関係を明らかにするために、遺伝てんかんモデルのE1マウスとその母系であるddYマウス脳のβ－エンドルフィン様免疫活性（β-EP-LI）をradioimmunoassay（RIA）で測定した。放り上げ刺激前の生後25日では脳の各部位でddYとE1の間にβ-EP-LIの差は認められなかった。E1マウスを放り上げ刺激を行ったE1(+)と刺激を行わないE1(o)とに分けた不全発作発現期の50日では、大脳皮質、中隔野、視床、視床下部、橋－延髄において、また成熟期の150日では大脳皮質、下垂体において、発作間歇期のE1(+)及びE1(o)のβ-EP-LIがddYに比べて増加した。E1(+)とE1(o)の間での差は無かった。これらの結果から脳内β-EPの増加は発作の影響によるものでなく、E1マウスの発作発現に関与しているものと考えられる。

オピオイドペプチドは多彩な生理活性を有する[5]が、β-EPを脳室内に投与した場合、ラットで辺縁発作を起こす[3]ことや、発作感受性スナネズミの発作を抑制する[1]ことなどが報告されており、痙攣との関係が推測されている。我々はこれまで、E1マウスの脳内エンケファリン系の異常を報告してきた[4)6)]。今回、プロオピオメラノコルチン（POMC）系に属するβ-EPを各発育期の脳の部位別についてRIAで測定した。

［方法］　E1マウスは放り上げ刺激の履歴の有無でE1(+)とE1(o)に分け、E1(+)では生後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認めた。実験には、刺激3日後の発作間歇期のE1(+)、E1(o)、対照群としてE1の母系のddYマウスを用い、生後25日、50日、150日で断頭した。4℃で脳を11部位に切り出し、0.1N HClの20倍容を加えPolytronで1分間ホモジナイズした後、25,000xgで遠心した。上清からSep-Pak C_{18} cartridgeを使用し50%アセトニトリル：50% 0.05%トリフルオロ酢酸でpeptide-rich fractionを溶出した。凍結乾燥後Assay Buffer（50mM sodium phosphate(pH7.4), 0.2% bovine serum albumin, 10mM EDTA）に溶解し、Amersham社から購入した[^{125}I]β-EPとその抗血清（cross-reactivity: 100% with β-EP, 1-2% with β-lipotropin, less than 1% with γ-endorphin, leucine and methionine enkephalins and dynorphin 1-6）と共に4℃、5日間インキュベートした。デキストラン炭末法により上清を分離し、γ-counterでβ-EP-LIを測定した。蛋白定量はLowry法に従った。

［結果］　ddY、E1マウスとも脳内の各部位及び下垂体にβ-EP-LIが認められた。各発育期を通して、下垂体のβ-EP-LIは脳内各部位に比べて1,000～10,000倍の高値を示し、海馬、線条体、嗅脳、小脳ではβ-EP-LIは認められなかった。生後25日ではddY、E1とも扁桃核、中隔野、視床下部、下垂体にβ-EP-LIを認めたが、マウス間で差は無かった（Table 1）。50日では、大脳皮質、中隔野、視床、視床下部、橋－延髄において、E1(o)とE1(+)はddYに比べてβ-EP-LIの増加傾向、或いは有意な増加を認めた（Table 2）。150日の成熟マウスでは50日と同じ部位にβ-EP-LIを認め、大脳皮質、下垂体でE1(o)とE1(+)のβ-EP-LIが有意に増加した（Table 3）。

［考察］　β-EP含有ニューロンは細胞体のある視床下部から扁桃核、中隔野、視床、橋－延髄などに線維終末を

送ることが知られ[2]、今回の実験においても同部位にβ-EP-LIが確認された。50日と150日のE1マウス脳ではいずれもddYに比べβ-EP増加の傾向が見られたがE1(+)とE1(o)の間に差は無く、このことから脳内β-EP-LIの増加は痙攣の影響ではないと考えられる。不全発作出現の時期に一致する50日のE1のβ-EP-LIが中隔野、視床、視床下部、橋－延髄において増加することは、これらの部位におけるβ-EPはE1の発作発現に関係することを示唆する。大脳皮質のβ-EP-LIは50日と150日のE1で増加しており、不全発作から強直間代発作へという発作の完成と関係があるかも知れない。下垂体については、通常β-EPは血液脳関門を通過しないとされており血流を介しての直接的な発作への関与は否定的だが、150日のE1での増加は脳内の変化に比べ時期的に遅れており、今後検討の余地があると思われる。これらのβ-EPの増加についてはPOMC系の機能亢進と神経線維終末での放出障害による機能低下の両方が考えられ、痙攣に対して促進的に作用するか抑制的に働くかは未だ十分明らかでない。しかし以上の結果からはE1マウス脳のPOMC系の機能異常の存在が推定され、β-EPが痙攣素因や発作発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

[文献] 1) Bajorek, J. G. et al. (1982) Peptides 3, 83-86 2) Barchas J. D. et al. (1978) Science 200, 964-973 3) Henriksen, S. J. et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5221-5225 4) 小出誠司ほか (1990) 神経化学 29, 430-431 5) Olson, G. A. et al. (1984) Peptides 5, 975-992 6) Onishi, H. et al. (1989) Neurochem. Res. 14, 31-35

Table 1. β-EP-LI of 25-day-old mice

Region	Strain (25-day-old)	
	ddY	E1
	fmol/mg protein	
Cerebral cortex	n.d.	n.d.
Hippocampus	n.d.	n.d.
Striatum	n.d.	n.d.
Amygdala	6.12±0.69	6.38±0.85
Septal area	3.88±0.33	4.00±0.80
Thalamus	n.d.	n.d.
Hypothalamus	5.52±0.36	6.73±0.74
Olfactory bulb	n.d.	n.d.
Pons-medulla	n.d.	n.d.
Cerebellum	n.d.	n.d.
	pmol/mg protein	
Pituitary	73.59±18.19	69.96±16.79

mean±SEM. n.d. : not detectable

Table 2. β-EP-LI of 50-day-old mice

Region	Strain (50-day-old)		
	ddY	E1(o)	E1(+)
	fmol/mg protein		
Cerebral cortex	1.61±0.05	3.48±0.35[b]	4.69±0.42[c]
Hippocampus	n.d.	n.d.	n.d.
Striatum	n.d.	n.d.	n.d.
Amygdala	36.63±6.68	37.64±7.83	47.81±4.83
Septal area	32.82±1.68	45.34±0.23[c]	45.93±1.97[c]
Thalamus	9.72±0.32	16.56±1.90	19.89±2.08[b]
Hypothalamus	18.24±1.47	32.65±4.67[a]	38.65±2.38[b]
Olfactory bulb	n.d.	n.d.	n.d.
Pons-medulla	10.62±0.42	18.25±1.80[a]	22.53±2.08[b]
Cerebellum	n.d.	n.d.	n.d.
	pmol/mg protein		
Pituitary	44.06±1.54	45.97±4.62	42.49±3.57

Table 3. β-EP-LI of 150-day-old mice

Region	Strain (150-day-old)		
	ddY	E1(o)	E1(+)
	fmol/mg protein		
Cerebral cortex	2.51±0.10	3.06±0.06[b]	3.04±0.04[b]
Hippocampus	n.d.	n.d.	n.d.
Striatum	n.d.	n.d.	n.d.
Amygdala	24.08±0.75	31.39±4.65	33.10±1.49
Septal area	15.05±0.86	14.84±1.29	14.07±0.74
Thalamus	6.82±0.35	10.48±1.03	10.07±1.21
Hypothalamus	13.54±0.26	10.22±0.92	21.98±4.44
Olfactory bulb	n.d.	n.d.	n.d.
Pons-medulla	26.62±4.24	38.45±0.93	44.31±5.42
Cerebellum	n.d.	n.d.	n.d.
	pmol/mg protein		
Pituitary	31.73±1.06	50.50±3.40[c]	45.01±1.84[b]

mean±SEM. [a]P<0.1, [b]P<0.05, [c]P<0.01; compared with ddY mice. n.d. : not detectable

215 ラット凍結損傷脳における神経栄養活性

蓮井　武，提中順一，佐藤好威，木村喜代史
（日本新薬㈱中央研究所）

〔要約〕脳組織の一部吸引除去や虚血による損傷脳において神経栄養因子の合成が促進されることが明らかになりつつある．本報では脳浮腫モデルの作製法の一つである凍結損傷法を用いて，脳内の新しい神経栄養因子の存在を探ることを試みた．dry ice/acetone にて冷却した銅製プローブ（直径6 mm）をラット頭蓋骨上に密着させて作製した凍結損傷により，損傷12時間後に損傷部位およびその近傍の大脳皮質可溶性画分中の神経細胞生存維持活性の増大がみられた．この活性の増大は一過性のもので，凍結損傷 24時間後以降は減少した．さらに可溶性画分の神経細胞生存維持活性は，画分中の蛋白質濃度に依存して増大し，20μg/mlで最大となり，より高濃度では，逆に生存維持効果は減少した．

これらの結果から，凍結損傷を受けた大脳皮質において神経細胞生存維持活性をもつ物質が，損傷後比較的早い時期に産生あるいは蓄積されることが示された．

【緒言】　脳内には，神経細胞の生存維持や神経突起の伸展活性をもつ神経栄養因子（ＮＴＦ）と呼ばれるいくつかの物質が存在する．近年これらの NTF が，脳に損傷を与えると，その修復のために損傷部位周辺に産生・蓄積することが明らかになりつつある．Nieto-Sampedro ら(3)は，大脳皮質の一部を吸引除去し，除去した部位に gelform を埋め込む方法を用い，gelform への浸出液および辺縁部組織に NTF が増加することを示した．その後同様な方法により，損傷部周辺には，NGF，aFGF，bFGF，CNTF，および GMF などが産生あるいは蓄積されることが明らかにされてきた．また山田ら(6)は，脳虚血によっても梗塞巣周辺に bFGF が現れることを報告している．本報では，脳浮腫モデル(4)の作製法としてよく用いられる凍結損傷法を用い，ラットの凍結損傷脳より得た可溶性画分の培養神経細胞に対する生存維持効果を検討した．

【材料と方法】　凍結損傷脳は，４週齢雄 Wistar系ラットをペントバルビタールで麻酔後頭皮を切開し，右頭蓋骨上に dry ice/acetone にて冷却した直径６mmの銅製プローブを１分間密着させて作製した．一定時間後断頭し，損傷側の大脳皮質（Cerebral Cortex）と同側の四丘体より吻側の大脳皮質・嗅球を除いた脳組織（Other Region）とに分け，さらに大脳皮質を損傷部位とその近傍（Lesion Area）およびこれらを除いた大脳皮質領域（Surrounding Area）とに分けて採取した．これらの脳組織の可溶性画分は DMEM 中でホモジェナイズした10%ホモジネートを 105,000×g 60分遠心した上清から得た．胎生16-17日齢 Wistar系ラットの大脳皮質神経細胞をトリプシン処理後，poly-L-lysine でコーテングした 24wellプレートに 1×10^5 cells/wellの密度で播種した．10% FCS，5μM cytosine arabinoside を含む DMEM で 24時間培養した後に無血清培地（DMEM）に交換し，可溶性画分はこの時点で添加した．可溶性画分の蛋白質濃度は，Bradford 法(1)に基づいて測定した．生存神経細胞数は，１細胞長以上の突起をもつ細胞を計測することにより求めた．

【結果】<u>可溶性画分中の神経細胞生存維持活性と蛋白質濃度</u>　凍結損傷12-18時間後の大脳皮質の損傷部位とその近傍から得た可溶性画分の培養神経細胞に対する生存維持効果を培地に添加した蛋白質濃度との関係から検討した．損傷群では，蛋白質濃度の増加にともない生存細胞数が増加し，20μg/mlのとき最大値を示した（Fig.1）．しかし，蛋白質濃度をさらに増加させると，逆に生存細胞数は減少した．一方，偽手術群（Sham群）では，20μg/mlの蛋白質量を培地に添加したとき，生存細胞数は無添加群よりわずかに増加する傾向が認められたが，損傷群に比べ有意（$p<0.01$）に少なかった．

<u>脳各部位間の神経細胞生存維持活性の比較</u>　凍結損傷12-18時間後，損傷半球のいくつかの部位から得られた可溶性画分の神経細胞生存維持活性を比較した．損傷群 Cerebral Cortex の可溶性画分の生存維持活性は，同群の Other Region および Sham群の Cerebral Cortex に比べ，有意ではないが高い傾向を示した（Table 1）．さらにこの損傷群 Cerebral Cortex の Lesion Area の可溶性画分は，同群の Surrounding Area や，Sham群の Lesion Area 相当域に比べ，有意に高い生存維持活性を示した（$p<0.01$）．

凍結損傷後の時間経過と神経細胞生存維持活性の変化

凍結損傷の 3, 6, 12, 18, 24 あるいは 48 時間後に摘出した大脳皮質の損傷部位およびその近傍の可溶性画分の生存維持活性を検討した（Fig. 2）. 活性は凍結損傷12時間後で最大に達し, そのときの生存細胞数は, Sham群12時間後のものより有意に多かった($p<0.05$). 生存維持活性はその後徐々に低下した.

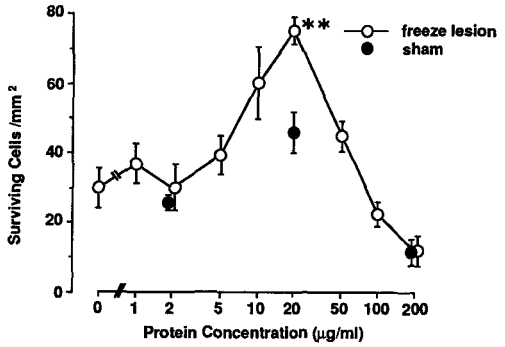


Fig. 1 Dose-response curve of neurotrophic activity in the soluble fraction obtained from "Lesion Area". Surviving neurons were counted 5 days after the addition of soluble fraction. ＊＊：$p<0.01$ vs. sham.

【考察】 凍結損傷法は, 再現性の良さなどから脳浮腫モデルの作製法としてよく用いられている(4). 本報においては, 脳損傷時における神経栄養因子の産生促進条件を検討するためにこの方法を用いた. 今回用いた冷却プローブの 1 分間接触による凍結損傷の程度は, 大脳皮質に限定されており, 水分含量も約 1 %の増加に留まっていた. 神経細胞生存維持活性が添加した蛋白質濃度に依存して増大し, 20 μg/mlで最大になることから, 可溶性画分中に生存維持活性物質の存在が期待される. しかしより高濃度では, 逆に生存維持効果の抑制を示したことから, 神経細胞の生存維持を抑制する因子の存在も示唆される. 中枢神経系にこの様に神経細胞の生存維持を抑制する物質が存在することは, Whittemore ら(5)によって既に報じられており, 我々の結果はそれを支持している. 凍結損傷後, 大脳皮質の損傷部位およびその近傍から得た可溶性画分には, 損傷群の他の部位あるいは Sham群の相当する部位に比べても高い生存維持効果が認められた. このことは, 凍結損傷により大脳皮質の損傷部位およびその近傍で神経細胞維持活性物質が産生（あるいは蓄積）促進されていることを示している. また, 損傷側大脳皮質の可溶性画分は, 損傷 12 時間後付近で活性の一過性の増大を示した. このような栄養活性の時間的変化は, 山田ら(6)の虚血 1-2 週間後に神経栄養活性が認められたという報告とは異なる. しかし, 石川ら(2)の大脳皮質吸引除去後 4 時間頃から NGF が増加し, 16 時間後に最大に達するという報告や, Nieto-Sampedroら(3)の aFGF 活性が術後 1-24 時間の間に最大に達するという報告は, 我々の結果と同様な傾向を示している. この活性の経時的変化の類似性は, 我々が検討している神経細胞維持活性物質が NGF あるいは aFGF 様物質である可能性を示唆している.

Table 1 Comparison of neurotrophic activity in some brain regions after freeze lesion

Brain regions	sham-operated	freeze-lesioned
ipsilateral hemisphere	cells/mm²	cells/mm²
Cerebral Cortex⁺	49.3 ± 3.4	54.2 ± 4.1
Other Regions	41.1 ± 3.1	50.3 ± 2.6
ipsilateral cerebral cortex		＊＊
Lesion Area	50.1 ± 4.1	68.6 ± 3.7 ＊＊
Surrounding Area	50.9 ± 6.5	51.6 ± 3.4

Values show the mean±S.E. 5 days after the addition of soluble fraction (20 μg protein/ml).
＋ : Lesion Area＋Surrounding Area, ＊＊：$p<0.01$

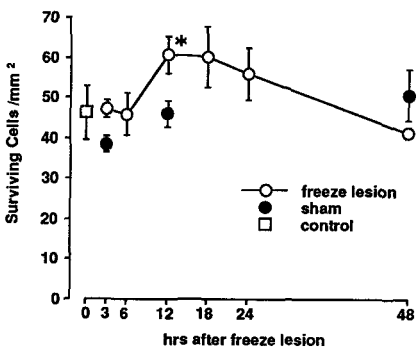


Fig. 2 Time course of induction of neurotrophic activity in the soluble fraction obtained from "Lesion Area" after freeze lesion. Surviving neurons were counted 6 days after the addition of soluble fraction (20 μg protein/ml). ＊：$p<0.05$ vs. sham.

(1) Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. **72**, 248-254 (2) 石川リカ 他 (1990) 神経化学 **29**, 438-439 (3) Nieto-Sampedro, M., et al. (1982) Science **217**, 860-861 (4) 小川武希 (1987) Neurol. Med. Chir. (Tokyo) **27**, 372-380 (5) Whittemore, S., et al. (1985) Dev. Brain Res. **20**, 169-178 (6) 山田和雄 他 (1991) 第16回日本脳卒中学会総会抄録集 p. 163

216 坐骨神経ａＦＧＦレベルの損傷による変動

石川リカ[1,2]、錦織浩治[2]、古川美子[1]、林恭三[1]、古川昭栄[1]（岐阜薬科大学分子生物[1]、キリンビール医薬開発研究所[2]）

〔要約〕

酸性線維芽細胞成長因子（ aＦＧＦ）の末梢神経系における神経栄養因子としての役割を調べるために、坐骨神経損傷後のａＦＧＦレベル変化を神経成長因子（ＮＧＦ）の場合と比較しつつ検討した。坐骨神経の切断後、ＮＧＦレベルが切断部位より末梢側で二相性に増加するのとは対照的に、ａＦＧＦレベルは末梢側でのみ著しい低下が見られた。この末梢側でのレベル低下は坐骨神経の挫滅後にも同様に見られるが、１０週後にはもとのレベルに回復していた。これらのことより、ａＦＧＦは坐骨神経内をＮＧＦのように逆行輸送されているのではないことが明らかになった。また、ａＦＧＦのｍＲＮＡレベルが坐骨神経内で極めて低いこと、坐骨神経内にその軸索を伸ばす交感神経、感覚神経、あるいは運動神経等の神経細胞体が存在する神経節におけるａＦＧＦレベルが坐骨神経内のそれと同等以上であることなどから、これらの神経細胞体でａＦＧＦが合成され、軸索内にも分布していると考えられた。

【諸言】 aＦＧＦは本来中胚葉由来細胞に増殖刺激活性を持つペプチド性因子として精製されたものであるが、近年培養神経細胞に対する突起伸長、生存維持等の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、よく知られた神経栄養因子であるＮＧＦとは異なる点が多く、末梢神経系における神経栄養因子としての作用についても不明な点が多い。そこで我々は、今回、ａＦＧＦが損傷後の神経再生にどのように関与するかを知るために 坐骨神経損傷後の動態について酵素免疫測定法を用いて測定し、ＮＧＦの場合と比較検討した。

【方法】ネンブタール麻酔下の６週齢雄 Wistar ラットの坐骨神経を一側の大腿部の後面で展開、脛骨神経と腓骨神経との分岐部から 10 mm 付近で切断または挫滅処理を行った。コントロールは、反対側の坐骨神経を切断あるいは挫滅せずに用いた。術後経時的にラットを屠殺し、切断あるいは挫滅部を中心にその中枢側及び末梢側からそれぞれ約 10 mm の部分を採取し、さら各 3 mm の断片にした。これらの坐骨神経断片及び各神経組織中のＮＧＦ及び aＦＧＦレベルを測定した。これらの因子は、組織からは凍結融解あるい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[1,3]にて定量した。測定感度はそれぞれ約 1 pg/ml、0.2 ng/ml であった。ａＦＧＦのｍＲＮＡは合成ＤＮＡプローブを用いてノザンブロット法によって行った。

【結果】実験に用いた範囲の坐骨神経内ではａＦＧＦ及びＮＧＦはどこも一様なレベルを示した。坐骨神経の切断後のＮＧＦレベルにおいて、切断部位に接した末梢側での一過性の増加とそれに引き続く末梢側全体での増加及び中枢側でのレベル低下がが認められた（図１Ａ）。これとは対照的に、ａＦＧＦでは中枢側ではレベル変化が見られずに末梢側全体で切断後３日にかけてコントロールの約 20 % までレベルが低下し、その後も低レベルにとどまった（図１Ｂ）また坐骨神経の挫滅処理を行った場合も挫滅部位から末梢にかけて同様なａＦＧＦレベルの低下が見られたが、 10 週後にはコントロールレベルまで回復した（図２）。一方坐骨神経内のａＦＧＦのｍＲＮＡレベルはａＦＧＦレベルが坐骨神経の 1/6 以下である脳レベルより低かった。また坐骨神経内にその軸索を伸ばしている交感神経、感覚神経、運動神経の神経細胞体のある組織であるＳＣＧ（上頸交感神経節）、ＤＲＧ（脊髄後根神経節）、脊髄でのａＦＧＦレベルは坐骨神経内と同等以上であった。

【考察】ＮＧＦの坐骨神経切断後のその末梢側での一時的な蓄積は、ＮＧＦが軸索内を逆行輸送されているためであり、その後の末梢でのレベル上昇はシュワン細胞や繊維芽細胞によるＮＧＦ合成を反映しており、これらのＮＧＦが軸索再生に有利に働くと考えられている[2]。ａＦＧＦレベルにおいてはこの末梢側での蓄積がないことから、少なくとも逆行輸送はされていないことが明らかである。とすれば、軸索内のａＦＧＦは神経細胞体で合成されているかＮＧＦ

のようにシュワン細胞や繊維芽細胞が神経軸索の調節を受けて合成していることが考えられる。坐骨神経内にａＦＧＦのｍＲＮＡが少ないこと、神経細胞の細胞体の存在する神経節などの組織でａＦＧＦレベルが高いこと、及び培養系でのシュワン細胞や繊維芽細胞がａＦＧＦを合成しないこと[4]も考えあわせると、前者の可能性が強く、坐骨神経内のａＦＧＦは、損傷後の神経再生時に直接の作用は持っていないと考えられた。

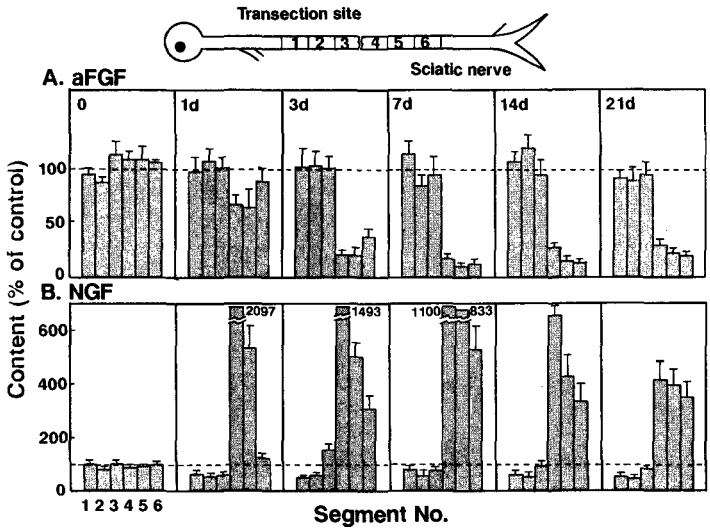


図１　坐骨神経切断後のａＦＧＦ及びＮＧＦレベルの経時的変化

坐骨神経を Segment　３，４の間で切断し、経時的に１～６の Segment (3 mm) に細断し、それらのａＦＧＦ、ＮＧＦレベルを測定した。コントロール（未処理）レベルに対する％で表示した。平均±ＳＥ（ｎ＝５）

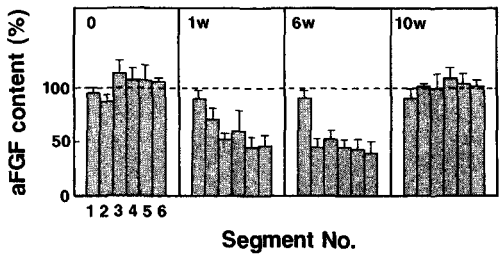


図２　坐骨神経挫滅後のａＦＧＦレベルの経時的変化

坐骨神経の Segment　２の位置に挫滅処理を行い、経時的に１～６の Segment (3 mm) に細断し、それらのａＦＧＦレベルを測定した。コントロール（未処理）レベルに対する％で表示した。　平均±ＳＥ（ｎ＝５）

【参考文献】

(1) Furukawa,S.,Kamo,I.,Akazawa,S.,Furukawa,Y.,Satoyoshi,E.,Itoh,K.,Hayashi,K. (1983) J.Neurochem. 40, 734

(2) Heumann,R.,Korsching,S.,Bandtlow,C.,Thoenen,H. (1987) J.Cell Biol. 104, 1623

(3) Ishikawa,R.,Nishikori,K.,Furukawa,S. (1991) J.Neurochem. 56, 836

(4) Ishikawa,R. et al. unpublished data

217 酸性・塩基性繊維芽細胞成長因子は神経成長因子除去によるＰＣ１２細胞の細胞変性を阻止する。

小池達郎，田中秀逸，加治和彦*
（佐賀医大・化学，都老人研・アイソトープ部*）

〔要約〕

神経成長因子（NGF）処理により分化したＰＣ１２細胞は、NGFの除去に応答して細胞変性を起こす事が知られている。この系を用いて酸性・塩基性繊維芽細胞成長因子（ａＦＧＦ／ｂＦＧＦ）の細胞死・変性に対する効果を調べた。ａＦＧＦ及びｂＦＧＦは共にNGF除去によるＰＣ１２細胞の細胞死、突起の変性を阻止した（EC_{50}は共に6-7ng/ml）。さらに、ａＦＧＦ／ｂＦＧＦは6-水酸化ドーパミン（6-OH-DA，1μM）処理による神経突起の変性に対する回復作用を保持していた。ＰＣ１２細胞をａＦＧＦ又はｂＦＧＦで処理した後、成長因子を除くとNGFの場合と同様に細胞変性が起こる事から、両者共に細胞変性に対するpriming作用を持つ事が判った。又この変性はNGF、cAMP等で阻止された。これらの結果は、ａＦＧＦ／ｂＦＧＦは細胞変性の阻止という点からNGFと同等の作用を持つことを示唆する。

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除去により神経細胞死が起こる。この神経細胞死は発生における神経細胞数調節の主要な機構とされる。培養交感神経節細胞を用いた研究から、NGF除去後の細胞死は積極的な過程から成ること(5)及び脱分極によって阻止されること(3)が判っている。一方、この神経細胞死の分子機構を調べる為には材料が多く調製できることが望ましい。この為、我々はＰＣ１２細胞に着目してその変性過程を調べた。ＰＣ１２細胞はNGF処理して分化させると、NGF除去に応答して変性するが、蛋白合成・ＲＮＡ合成阻害剤では部分的にのみ阻止される(4)蛋白合成・ＲＮＡ合成に依存しない過程は成長端や突起の変性を含んでいた。突起の変性はleupeptin等のプロテアーゼ阻害剤で阻止された(8)。この様にNGF除去によるＰＣ１２細胞の変性は複数の機構からなるものと考えた(8)。NGF除去によるＰＣ１２細胞の変性は培養交感神経節細胞の場合と同様に脱分極やｃＡＭＰ処理により完全に阻止された(5)。ＰＣ１２細胞はａＦＧＦやｂＦＧＦに応答して突起の成長や酵素活性の上昇等の性質を示すことが知られているが、同時にその作用の差異も知られている(6,7)。ここでは、NGF以外の種々の成長因子のＰＣ１２細胞の変性過程に対する効果を調べ、細胞変性という観点からNGF作用との比較を試みた。

［実験方法］

ＰＣ１２細胞の培養：ＰＣ１２細胞22aの培養は既報(2)により行った。細胞はコラーゲンコートした48well plateにまき、10%馬血清、５%牛胎児血清、50ng／ml NGFを含むＲＰＭＩ培地で１０－１４日培養して実験に供した。

細胞変性のアッセイ法：NGFの除去実験は培地中にマウス2.5SNGFに対する抗体を加え（1%）、NGFを中和することにより開始した。抗体添加後24時間後、培地中及び細胞内のＬＤＨ（Lactate dehydrogenase）活性を測定した(5)。細胞内活性は0.1%トリトンで可溶化後測定した。このcytoplasmic enzymeは通常では3-10%培地中に放出されるが細胞死に伴って20～50%放出される（放出量は採取時間による）。顕微鏡による形態的観察のほかトリパンブルー染色によって生細胞数を数えた。

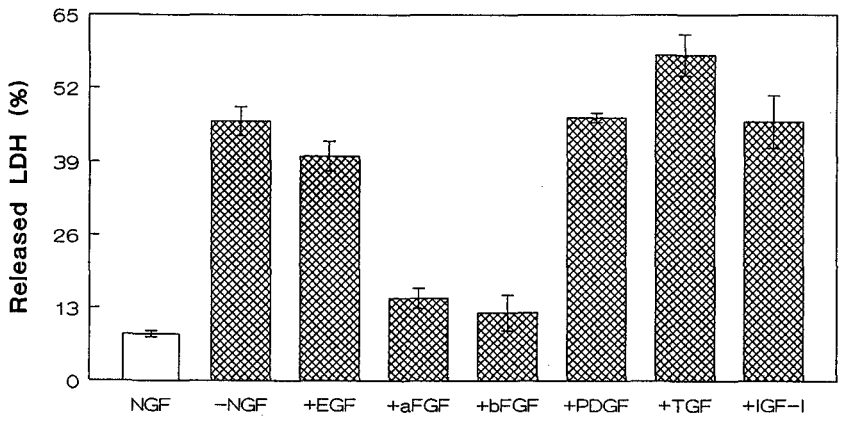


図1　NGF除去したＰＣ１２細胞の変性に対する種々の成長因子の効果
（各々20ng/ml加え、24h後ＬＤＨ活性を測定；左のカラムはNGFを含む対照）

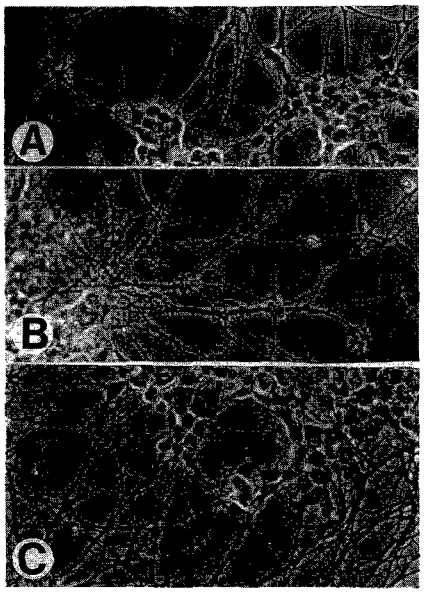


図2　位相差顕微鏡写真
(A:+NGF、B:-NGF、
C:-NGF+bFGF(20ng/ml):bar=50μm)

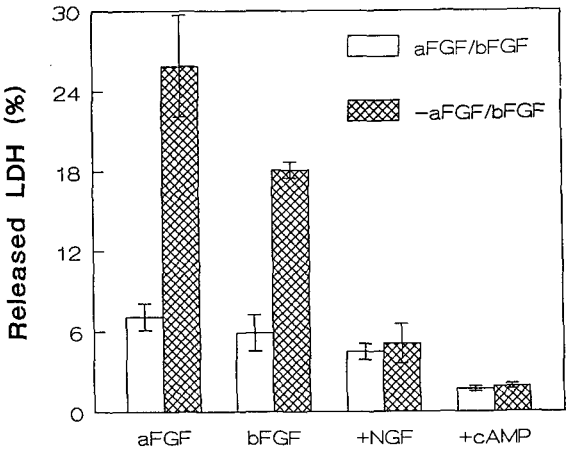


図3　ａＦＧＦ（左のカラム1組）及びｂＦＧＦ（残りの右側カラム3組）処理したＰＣ１２細胞の各々の成長因子除去による変性
（除去後24hでＬＤＨを測定した。右２組のカラムは各々NGF（50ng/ml）、CPT-cAMP　0．2mM）　によりｂＦＧＦ除去による変性が阻止される事を示す。

［結果及び考察］

ａＦＧＦ及びｂＦＧＦはNGF除去によるＰＣ１２細胞の変性を阻止する。ＰＣ１２細胞をNGF存在下10-14日培養後培地液中に抗NGF抗血清を加えてNGFを除去すると、ＰＣ１２細胞の変性が起こる。細胞内酵素（ＬＤＨ）活性の培地中への放出量を指標に細胞変性を定量化してみると、図１の左の２つのカラムに示される様に、ＬＤＨの放出はNGF除去により著しく増加する。NGF抗体を含む培地に種々の成長因子（各20ng/ml)を加え、その細胞変性に対する効果を24h後調べてみると、ａＦＧＦ／ｂＦＧＦ共に細胞変性阻止作用が見られた（図１）。ａＦＧＦ／ｂＦＧＦの濃度依存性からEC_{50}は共に6-7ng/mlであった。図２に示した様に、ｂＦＧＦの効果を位相差顕微鏡写真でみると、細胞死と共に突起のdilation等の突起の変性も阻止していることが判る。

ａＦＧＦ及びｂＦＧＦはchemical axotomyによる突起の変性の回復を促進する。我々は、充分分化したＰＣ１２細胞を6-Hydroxy Dopamine（6-OH-DA）で処理すると（1μM,2h）、突起の変性のみが起こることを報告した(1)。そこで、6-OH-DA処理後の回復過程を調べることによって、突起の変性の回復に与えるａＦＧＦ／ｂＦＧＦの効果を調べた。その結果ａＦＧＦ／ｂＦＧＦ（20ng/ml)共に回復を促進し、新たなsproutingを引き起こした。このsproutingの形態的観察からこれらの成長因子の作用はcAMPによる効果とは異なること、NGF（50ng/ml）より作用は劣ることが示唆された。

ａＦＧＦ及びｂＦＧＦにはプライミング（priming）作用がある。　これらの結果は、ａＦＧＦ／ｂＦＧＦがNGF除去によるＰＣ１２細胞の細胞死及び突起の変性を阻止する事を示しているが、これらの成長因子がその除去による細胞死を引き起こす作用（priming作用）があるかどうかを調べた。ＰＣ１２細胞を20ng/mlのａＦＧＦ／ｂＦＧＦで10日間処理した後、各々の成長因子を含まない培地で３回洗うことによりそれらを除き、24時間後細胞変性が起こるかどうかを調べた。その結果ａＦＧＦ／ｂＦＧＦ共にその除去は変性を引き起こした（図３）。図３に示した様に、ｂＦＧＦ除去によるＬＤＨ放出はNGF（50ng/ml）又はCPT-cAMP（0.2mM）添加によって阻止された。ａＦＧＦ／ｂＦＧＦが細胞変性に対するpriming作用を持つ事は、これらが細胞変性阻止という点からNGFと同等の作用を持つことを示唆している。さらに、クロマフィン前駆細胞はまずＦＧＦに応答し突起を成長し、その結果NGFに対する依存性を獲得すると考えるStempleらの仮説(7)を補強するものであり、NGFとFGFの役割を示唆すると考える。

［参考文献］

1. Chiba,T. et al.,Biomedical Res.2:618-628(1981)
2. Koike,T., Brain Res.,289:293-303(1983)
3. Koike,T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,86:6421-6425(1989)
4. Koike,T. Prog. Neuro-Psychopharmacol.in press (1991)
5. Martin,D.P. et al.,J.Cell Biol.106:829-844(1988)
6. Rydel,R.E. and Greene,L.A.,J.Neurosci.,7:3639-3653(1987)
7. Stemple,D.L. et al.,Neuron,1:517-525(1988)
8. Tanaka,S. et al.,Soc. Neurosci.Abstract, 17,in press(1991)
9. Togari,A. et al.,J.Neurosci.,5:307-316(1985)

218 神経成長因子除去によるＰＣ１２細胞の変性におけるｃ－ｆｏｓの役割

田中秀逸，高島明彦*，小池達郎
（佐賀医大・化学，三菱化成生命科学研究所*）

〔要約〕
神経成長因子（NGF）処理により分化したＰＣ１２細胞は、NGFの除去に応答して細胞変性を起こす事が知られている。この系を用いて細胞死・変性の機構を調べる為、まずプロトオンコジンの関与を調べた。NGF除去後経時的にmRNAを分離し、c-fos message量を調べると、30分後に活性化されていた。この活性化は２時間後には見られなかった。対照としてnaiveＰＣ１２細胞にＮＧＦを加えた時のc-fosの活性化と比較した。両者の時間経過、transcriptのサイズは良く似ているが、両者のintensityには大きな差があった。この結果はNGFを加えることは細胞のシグナルとなるのと同様にNGFを除くこともシグナルになることを示している。そこで、ラットc-fos及びc-jun配列に相補的なオリゴヌクレオチド(18mers)を合成し、細胞変性に対する効果を調べた。対照区においてNGF除去後15hはＬＤＨの培地への放出は15%程であるが、既に突起は変性し、変性した細胞も現れる時期である。c-fosのセンス配列はＬＤＨの放出量がやや減るものの、変性を阻止出来ない。これに対しアンチセンス配列は15h後変性をほぼ阻止し、変性全体のtime courseを遅らせた。c-junの場合にも同様な傾向がみられた。これらの結果からこの変性過程の機構にプロトオンコジンc-fosやc-junの活性化が関与していることが示された。

神経細胞の生存は標的細胞から分泌される神経栄養因子によって支持されている。従って、神経栄養因子の限定的供給の為におこる競合過程の結果、多くの神経細胞が発生の過程で死んでいくと考えられている。近年、in vivo 及びin vitroの系においてこの神経細胞死が積極的な過程からなることが示唆され(5,7,9)、その新しいカスケードの解明に注目が集まっている。神経細胞は細胞死・変性プログラムを持っており、これが種々の環境の変化例えば病的疾患において発現しているのではないか、とも考えられている。交感神経節細胞（ＳＣＧ）はその生存に神経成長因子(NGF)を必要とするが、NGFの除去により細胞死が起こり、且つこの細胞死はシクロヘキシミドやアクチノマイシンＤの添加により阻止される(5)。我々は細胞死の分子機構を調べる材料としてＰＣ１２細胞に着目した。ＰＣ１２細胞はNGF処理して分化させると、NGF除去に応答して変性するが、蛋白質合成・ＲＮＡ合成阻害剤では部分的にのみ変性が阻止される(4)。蛋白質合成・RNA合成に依存しない過程は成長端や突起の変性を含んでいた。突起の変性はleupeptin等のプロテアーゼ阻害剤で阻止された(10)。この様にNGF除去によるＰＣ１２細胞の変性は複数の機構からなるものと考えた(4,10)。NGF除去によるＰＣ１２細胞の変性は培養交感神経節細胞の場合と同様に脱分極やcAMP処理により完全に阻止された(4)。この系の有利な点を生かし、ＰＣ１２細胞を用いて、細胞死・変性のカスケードを明らかにすることを目的に、まずプロトーオンコジンc-fosの活性化の有無を検討した。

［実験方法］
ＰＣ１２細胞の培養：ＰＣ１２細胞22aの培養は既報(3)により行った。細胞はコラーゲンコートしたディッシュにまき、10%馬血清、５%牛胎児血清、50ng／ml NGFを含むRPMI培地で10-14日培養して実験に供した。
細胞変性のアッセイ法：培地中にマウス2.5S NGFに対する抗体（1%）を加えることにより、NGFを除いた。抗体添加後、培地中及び細胞内のＬＤＨ（Lactate dehydrogenase）活性を測定した(5)。細胞内活性は0.1%トリトンで可溶化後測定した。
Northern Blotによる解析：分化したＰＣ１２細胞にNGF抗体を含む培地を加えた後、経時的に全RNAを抽出し(1) oligo(dT)カラムでmRNAを部分精製し、１%アガロースフォルムアルデヒドゲルで泳動した（5μg/lane)。ゲルをblot後、^{32}P-標識 v-fos（1kb；Takara）を用いてハイブリダイズした。
オリゴヌクレオチド：ラットc-fos（2）及びc-jun（8）に対するセンス及びアンチセンス-オリゴヌクレオチド(18mers)は合成後、HPLC又はエタノール沈澱により精製し、10-15μMの濃度で培地に加えた（10%非働化血清を含むRPMI培地を使用）。5時間後抗体を加えNGFを除き、15-18時間後培地及び細胞を可溶化して、LDH活性の測定を行った。それぞれの第一構造は：TTCTCGGGTTTCAACGCG、TGCGTTGAAGCCCGAGAA、ACTGCAAAGATGGAAACG、CGTTTCCATCTT TGCAGT（5'd to 3'd）。

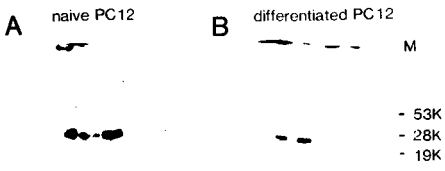


図1 ＰＣ１２細胞にNGF(50ng/ml)を加えた場合（Ａ）と分化したＰＣ１２細胞の培地からNGFを除いた場合（Ｂ）のc-fos message量の変化

［結果及び考察］

分化したＰＣ１２細胞の変性はc-fosの活性化を伴う。ＰＣ１２細胞をNGF存在下で10-14日培養後、培地中に抗NGF抗血清を加えてNGFを除去すると、ＰＣ１２細胞の変性が起こる。経時的にmRNAを分離し、c-fos message量を調べると、30分後に活性化されていた。この活性化は２時間後には見られない（図１）。対照としてnaiveＰＣ１２細胞にNGFを加えた時のc-fosの活性化を示してある。両者の時間経過、transcriptのサイズは良く似ているが両者のintensityには大きな差がある（Ａの場合は全RNAを10μgロードしている）。この結果はNGFを加えることは細胞のシグナルとなるのと同様にNGFを除くこともシグナルになることを示している。

c-fosのアンチセンス-オリゴヌクレオチドは細胞変性を遅らせる作用がある。　そこで、ラットc-fos及びc-jun配列に相補的なオリゴヌクレオチド(18mers)を合成し、細胞変性に対する効果を調べた。図２にその結果の１例を示す。コントロールにおいてNGF除去後15hはＬＤＨの培地への放出は15%程であるが、既に突起は変性し、変性した細胞も現れる時期である。c-fosのセンス配列はＬＤＨの放出量がやや減るものの、変性を阻止出来ない。これに対しアンチセンス配列は15h後変性をほぼ阻止し、変性全体のtime courseを遅らせた。４回の実験でアンチセス配列はNGF除去によるＬＤＨの放出の74.5% (±6.1,mean ± SEM;n=4)を抑えたのに対し、センス配列は13.3% (±7.1;n=4)のみにすぎなかった。図２に示したようにc-junの場合にも同様な傾向がみられた。しかし、両者を同時に加えても、より大きな抑制効果は生まれなかった。これらの結果は、NGF除去によるＰＣ１２細胞の細胞死及び突起の変性へのプロトーオンコジンc-fos及びc-junの関与を示していると考えられる。そこで、現在までの栄養因子除去による変性過程の機構を仮説として示した（図３）。図３に示した様に、カルシウムイオンによる細胞死の阻止はこのpathwayの下流で起こると考えている。

［参考文献］

1. Chomoczynski,P. and Sachii,N. Anal. Biochem.,162:156-159(1987)
2. Curran,T. et al., Oncogene,2:79-84(1987)
3. Koike,T., Biochim. Biophys. Acta,763:258-264(1983)
4. Koike,T. Prog. Neuro-Psychopharmacol.in press (1991)
5. Martin,D.P. et al.,J.Cell Biol.106:829-844(1988)
6. Morgan,J.I. and Curran,T., Ann. Rev. Neurosci.,14:421-452(1991)
7. Oppenheim,R.W. et al., Develop. Biol.138,104-113(1990)
8. Sakai,M. et al.,Cancer Res.,49:5633-5637(1989)
9. Scott,S.A. and Davies,A.M.,J.Neurobiol.,21:630-638(1990)
10. Tanaka,S. et al.,Soc. Neurosci.Abstract, 17:96.4(1991)

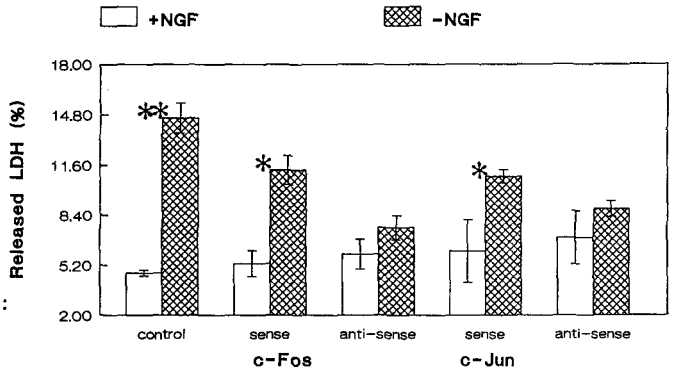


図2　ラットc-fos及びc-jun配列に対するセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果（96-wellプレートにＰＣ１２細胞を蒔き、10日培養後、NGFを除きオリゴヌクレオチドの効果を調べた。NGF除去後15hでＬＤＨを測定した。）。t-test (+NGF vs -NGF) : *, p< 0.05; **, p< 0.02

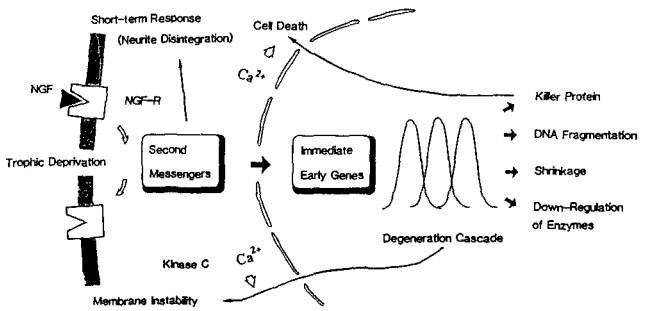


図3　NGF除去による交感神経節細胞、ＰＣ１２細胞の細胞死・変性の機構（仮説）

219 中間径線維蛋白のユビキチン化と神経変性 特にニューロフィラメントのユビキチン化について

田中稔久、武田雅俊、楯林義孝、谷向知、車谷隆宏、大河内正康　関山敦生、播口之朗、西村　健

（大阪大学医学部精神医学教室）

〔要約〕

各種の神経変性疾患脳においてユビキチン化された中間径線維からなる神経細胞質内封入体が観察されている。中間径線維蛋白のユビキチン化と神経細胞の変性過程との関係を明らかにするために、アルミニウムを注入したウサギ脳内に増生するニューロフィラメント蛋白について実験を行った。アルミニウム注入により実験的神経原線維変化を生じた脳では抗ユビキチン抗体による免疫染色で陽性の神経細胞を認めた。アルミニウム注入ウサギ脳から細胞骨格蛋白分画を精製し、ウエスタンブロット法により増生したニューロフィラメント蛋白のユビキチン化の程度を検討した。さらに精製ニューロフィラメントについてin vitroでのATP依存性分解を検討し、ニューロフィラメント蛋白はATP依存性にユビキチン経路により分解されることを示した。

[目　的]

アルツハイマー病の神経原線維変化、ピック病のピック球、パーキンソン病のレヴイ小体など神経変性疾患の神経細胞体内封入体はユビキチン化された細胞骨格蛋白からなるものと考えられる。ユビキチンはATP依存性細胞内蛋白分解に関与するといわれているが、その詳細については不明な点が多い。そこでウサギにアルミニウムを注入することにより実験的神経原線維変化を作製し、増生したニューロフィラメント蛋白をモデルとして中間径線維のユビキチン化およびユビキチン系による蛋白分解過程について検討するために以下の実験を行った。まず、アルミニウム中毒ウサギ脳組織を抗ユビキチン抗体による免疫染色法によりユビキチンの関与を示した。続いて増加したユビキチンの結合した基質蛋白を明らかにするために、脳組織から細胞骨格蛋白分画を部分精製し抗ユビキチン抗体によるウエスタンブロットを行った。さらにニューロフィラメント蛋白が実際にユビキチン系分解の基質となりうるかどうかを検討するために、in vitroにて網状赤血球中のユビキチン系蛋白分解系による精製ニューロフィラメント蛋白のATP依存性蛋白分解について検討した。

[方　法]

1)　実験的神経原線維変化の作製

エーテル麻酔下にてNew Zealand rabbit（約3kg）の後頭隆起より1cm吻側、1cm左側に直径0.5cm程度の穴を開け、大脳皮質内にHolt's Adjuvant (5.6ml 10% $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 27.9ml H_2O, 6.3ml 15.75% $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$) をゆっくり注入した。処置後10日後に一方のウサギにはネンブタール麻酔下で10% formalin 麻酔下で10%formalin/phosphate-buffered saline にて灌流固定を行い、パラフィン包埋後に4μmの切片とし免疫染色用とした。他方のウサギには同様の麻酔後に開頭し大脳・小脳分画と延髄・脊髄分画とに分けて凍結保存し蛋白検討用とした。

2）粗細胞骨格蛋白分画の精製

凍結保存した試料（ウサギ脳脊髄、牛脊髄）をそれぞれ3倍量のbuffer (0.85M Sucrose /10mM Bis-Tris (pH6.5)/2 mM EGTA /0.2M KCl /10mM $MgCl_2$ /1% Triton-X) にてホモジナイズした後、遠心し沈澱を集めはじめと等量のbuffer (10mM Bis-Tris (pH6.5)/2mM EGTA /0.2M KCl /10mM $MgCl_2$ /1% Triton-X) にてホモジナイズし、それをさらに等量のbuffer (0.85M Sucrose /10mM Bis-Tris (pH6.5)/2mM EGTA /0.2M KCl /10mM $MgCl_2$) 上にoverlayした状態で遠心し、その沈澱をbuffer(8M Urea /10mM Bis-Tris(pH6.5) /1% 2-Mercaptoethanol)に溶解した。

3)網状赤血球ライセートの作製

New Zealand rabbit（約3kg）にフェニルヒドラジン塩酸塩溶液(2.5% w/v)1mlを背側皮下に10日間連日注射し、採血後血球をWrite solutionにて染色し網状赤血球の存在（80%以上）を確認した。そして血球を遠沈にて回収しPBSにて3回洗浄後、血球容積の1.6倍量のバッファー(20mM Tris (PH7.4) /1mM DTT)を加えることによりライセートを得た。

4)ATP依存性蛋白分解

網状赤血球ライセート 200μlに基質蛋白として牛脊髄より抽出した粗細胞骨格分画をライセート バッファーに透析したものを100μL加え,さらにATP(+)にはATPがfinal 10mMになるように、protease inhibitor(+)にはp-APMSF ((p－アミジノフェニル)メタンスルホニルフルオリド塩酸塩1mg/ml、Leupeotin 1mg/ml,2mM EGTAとなるように加えtotal 500μl1として37°Cで加温してその変化をSDS-PAGEおよびウエスタンブロット法にて調べた。

[結　果]

1)アルミニウム中毒ウサギ脳組織の免疫染色

アルミニウムを注入したウサギ脳組織を抗200KDaニューロフィラメント抗体で染色すると神経細胞体内に異常蓄積したニューロフィラメントからなる実験的神経原線維変化が染まる。実験的原線維変化は縫線核・前庭神経核・舌下神経核などの脳幹部神経核や脊髄前核神経細胞などに多く、海馬・小脳プルキンエ細胞でも認められる。この実験的神経原線維変化を生じたウサギ脳を抗ユビキチン抗体で染色したものであり、脳幹部の神経核を中心とした部位においてユビキチン抗体陽性の神経細胞が多数観察された。

2）アルミニウム注入ウサギ脳の細胞骨格蛋白のユビキチン化

図1に細胞骨格蛋白分画のウエスタンブロットを示す。a,d,g,jは抗68KDaニューロフィラメント抗体、b,e,h,kは抗ユビキチン抗体、c,f,i,lは抗GFAP抗体による染色である。左(a-f)にアルミニウム注入ウサギ脳を、右(g-l)に正常ウサギ脳を示す。実験的神経原線維変化の多い部位として延髄・脊髄分画(a,b,c,g,h,i)と、大脳・小脳分画(d,e,f,j,k,l)とを区別して示した。b,e,h,kに示すように抗ユビキチン抗体により分子量60－80KDaのメインバンドとその下に2本のバ

ンドが見られる。アルミニウム注入脳においてこのバンドが増強していた。また、延髄・脊髄分画では大脳・小脳分画と比較してこのバンドより強く観察された。a,d,g,jに示すように抗68KDaニューロフィラメント抗体により68KDaニューロフィラメントとその部分分解物と考えられるバンドがアルミニウム注入脳により多く認められる。c,f,i,lに抗GFAP抗体によるGFAP（分子量50KDa）染色を示すが、抗ユビキチン抗体により68KDaニューロフィラメントに対応するバンドが染色されており、ニューロフィラメント蛋白がユビキチン化されていることが示される。

3）ATP依存性蛋白分解について

図2に網状赤血球ライセートによる粗細胞骨格蛋白分画の分解の経時的変化を示した。Aは網状赤血球ライセートのみ、Bは粗細胞骨格蛋白分画のみ、5,10,15,30,60は各々ATP存在下5,10,15,30,60分後の変化である。時間とともにニューロフィラメントが分解される。図3は60分後の変化を抗68KDaニューロフィラメント抗体にてウエスタンブロットしたものである。Aは粗細胞骨格蛋白分画のみを示し、B,CはATP(-)、D,EはATP(+)、B,Dはprotease inhibitor(-)、C,Eはprotease inhibitor(+)の分解を示す。ATP存在下での68KDaニューロフィラメントの分解が示された。

[考　察]

ユビキチンは76個のアミノ酸からなる分子量8.6KDaの低分子量蛋白であり、ATP依存性蛋白分解に関与し、マクロパイン・メガパイン（分子量700－1000KDa)などのプロテアーゼによる分解のマーキングとして基質蛋白のリジン残基に結合するといわれている。各種神経変性疾患における神経細胞体内封入体の形成へのユビキチンの関与が想定されているが、未だ明らかにされていない。今回、細胞骨格蛋白のユビキチン化についてアルミニウム中毒により増生したニューロフィラメントをもちいて実験を行った。アルミニウム中毒によりニューロフィラメント蛋白（200KDa,160KDa,68KDaのトリプレット蛋白）が増加するが、それに伴いユビキチンの増加が認められる。トリプレット蛋白の中では68KDaニューロフィラメント蛋白が主としてユビキチン化されていた。また、ユビキチン系酵素群を大量に含む網状赤血球ライセートによる精製ニューロフィラメントの分解を検討し、ニューロフィラメント蛋白はATP依存性に分解されることを明らかにした。この知見は神経変性疾患における中間径線維蛋白のユビキチン化の過程を示唆しているものと考えられる。

[文　献]

(1) Ciehanover,A.,et al.(1978) Biochem.Biophys.Res.Commun.81,1100-1105. (2) Chin,D.T.,et al.(1986) J.Biol.Chem.261,3833-3890. (3) Hershko,A.,et al.(1979) Proc.Natl.Acad.Sci.USA.76,3107-3110. (4) Klatzo,I.,et al.(1965) J.Neuropath.Exp.Neurol. 24,187-199. (5) Love,S.,et al.(1988) J.Neuropath.Exp.Neurol. 47,393-405. (6) Manetto,V.,et al.(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 85,4501-4505. (7) Perry,G.,et al.(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 84,3033-3036. (8) Rabinovitz,M.,et al.(1964) Biochim.Biophys.ACTA. 91,313-322. (9) Rechsteiner,M.(1987) Ann.Rev.Cell Biol. 3,1-30.

図1

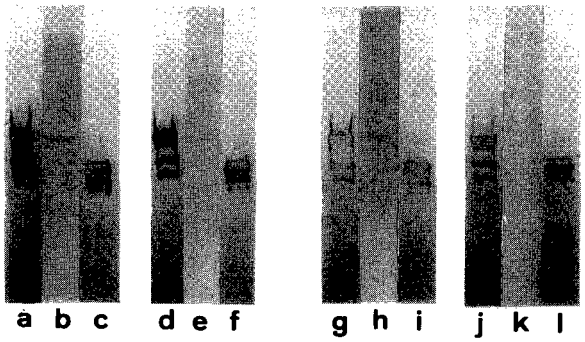


図2

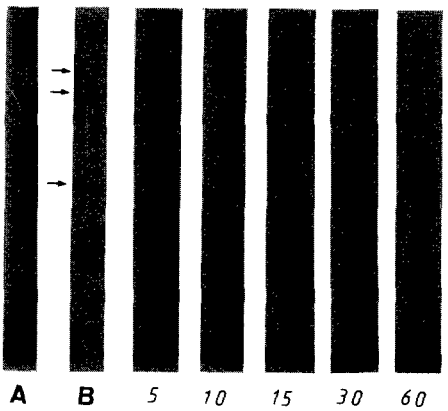
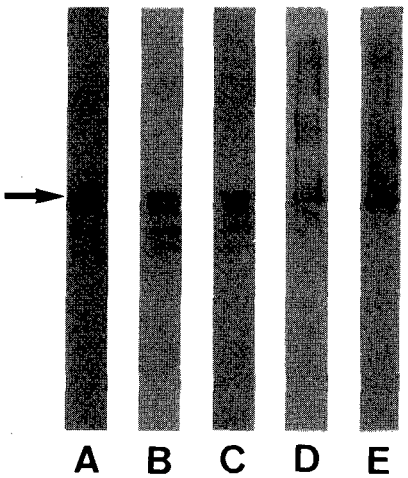


図3



220 家族性アルツハイマー病血液buffy coatの継代接種により生じるハムスター脳内病変について

谷向　知、武田雅俊、工藤　喬、新川久義、田中稔久、楯林義孝、車谷隆宏、関山敦生、大河内正康、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〕

アルツハイマー病集積発症をみた一家系について患者及びその家族の血液buffy coatをハムスターの脳内に接種した。接種１８カ月後に還流固定し、ニューロフィラメント・タウ・ユビキチンなどの細胞骨格蛋白に対する抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った結果すべてのbuffy coat接種群で脳幹神経核に各抗体陽性の神経細胞内ニューロフィラメント様線維性構造物が認められた。電顕観察により線維性構造物は、１０nmニューロフィラメント様線維の集積からなる神経細胞体内封入体として存在していた。さらに病変を呈したハムスター脳組織を継代接種し、６カ月後に還流固定した脳組織についても免疫組織化学的検討を行ったが、buffy coat接種ハムスター脳でみられたものと同様な所見が得られた。　今回得られた成績は、アルツハイマー病の病因を示唆するものと考えられる。

［目的］

アルツハイマー病の発症要因として遺伝性(1)・中毒性(6)・免疫性(4)・感染性(3)因子などの関与が想定されているが、未だ本疾患の病因は明かにされていない。我々は、アルツハイマー病の発症要因を解明する目的でアルツハイマー病集積発症をみた一家系について血液buffy coatを採集し、ハムスター脳内接種を行いその脳組織を検討し特異的な脳内病変が生じることを報告した(5)。本研究では、buffy coat接種により生じた脳内病変が継代可能かどうか検討するために、病変の認められたハムスター脳組織の継代接種実験を行った。接種６カ月後の脳組織について検討したところ興味深い知見を得られたので報告したい。

［方法］

１．Buffy coat接種

アルツハイマー病集積発症をみた一家系のアルツハイマー病患者２名、兄例の子供２名について、本研究の目的と方法を十分に説明し同意を得た上で肘静脈からヘパリン血２０mlを採血した。採集血液を３０００rev/minの遠沈によりbuffy coatを分離し、等量の生理食塩水にてホモジェナイズした。ハムスター（６週齢・メス）を７０mg/kgのペントバルビタール麻酔下で、ブレグマから２mm後方、２mm外側、２mmの深さの脳内に約50μlのbuffy coatを各群4匹ずつ接種した。

２．継代接種

Buffy coat接種１８カ月後病変を生じたハムスター脳組織を１０倍量の生理食塩水にてホモジェナイズしたものを同様の手技により脳内に接種し、６カ月後還流固定を行い免疫組織学的に検索した。

３．免疫組織化学的検索

Buffy coat接種１８カ月後あるいは継代接種６カ月後、生理食塩水および１０％ホルマリンで還流固定を行い、１週間浸潤固定した脳をパラフィン包埋し６μの切片を作成し、抗２００KD-ニューロフィラメント(monoclonal/Amersham･TRI)・抗タウ(policlonal/Chemicon)・抗ユビキチン(monoclonal/Chemicon)・抗ＧＦＡＰ(monoclonal/Labsystem)などの細胞骨格蛋白に対する抗体を第１反応としＤＡＢを発色基質としてＡＢＣ法にて染色したのちヘマトキシリンにて核染した。

４．電顕観察

１％-パラフォルムアルデヒド-１％-グルタールアルデヒドにて経心的還流固定を行いオスミウム固定後エポンに包埋した。切片をレイノルド液および酢酸ウランで染色後、電子顕微鏡（ＪＥＯＬ　ＸＣ１００）にて観察した。

［結果］

継代接種６カ月後の脳組織について、異なる２種類の抗２００ＫＤ－ニューロフィラメント抗体による免疫組織化学的検索を行った。抗２００ＫＤ-ニューロフィラメント抗体では、前庭神経核以下の脳幹神経核を中心に分布して、胞体全体が強陽性に染色される神経細胞が多数観察された。このニューロフィラメント抗体陽性細胞は、左右差は認めるものの両側性に認められた。抗タウ抗体による免疫染色ではこれらの抗２００ＫＤ-ニューロフィラメント抗体陽性の神経細胞が陽性に染色された。抗ユビキチン抗体を用いた免疫染色でも抗ニューロフィラメント抗体染色で陽性の細胞が染色された。しかし、これらの抗ニューロフィラメント抗体陽性細胞は、抗タウ-１抗体（monoclonal/Boehringer）、抗ＰＨＦ抗体（polyclonal/INC）では染色されなかった。また、抗ＧＦＡＰ抗体を用いた免疫組織化学による検索では染色性の増強は認められず、海綿状変化は乏しい所見であった。電顕観察により径１０nmのニューロフィラメント様線維の集積が観察され、免疫染色で示した線維性構造物は神経細胞

胞体内の細胞質封入体として存在しているとものと考えられた。このような継代接種により生じた脳内病変は、buffy coat接種により生じた病変と類似しており、buffy coat接種による病変が継代可能であることを示す知見と考えられた。

［考察］

Creutzfeldt-Jakob病の感染性が明らかにされて以来、アルツハイマー病の接種実験が精力的に試みられてきたが実験動物にアルツハイマー病変を惹起したとの報告は未だない。Manuelidisら(2)はアルツハイマー病患者および家族の血液buffy coatをハムスター脳内に接種し、また病変を呈した脳組織を継代接種することによりspongioform encephalopathyが生じたと報告しているが、今回我々が得た所見は海綿状変化に乏しくManuelidisらの結果とは異なるものであった。本実験で生じた病変は、脳幹神経核の神経細胞の胞体内に集積する抗２００ＫＤ-ニューロフィラメント抗体・抗タウ抗体・抗ユビキチン抗体による免疫染色陽性のニューロフィラメント様線維性構造物であった。継代接種により生じた脳病変は、接種６カ月後に既に認められた。Buffy coat接種実験では接種１２カ月後の脳では病変が認められておらず、病変を呈した脳組織の継代接種では病変が出現するまでに大幅な期間の短縮がみられる。今回我々が報告した結果は何等かの因子が継代されている可能性を示唆するものでありアルツハイマー病の発症要因を検討していくうえで興味深い所見であると考えられる。

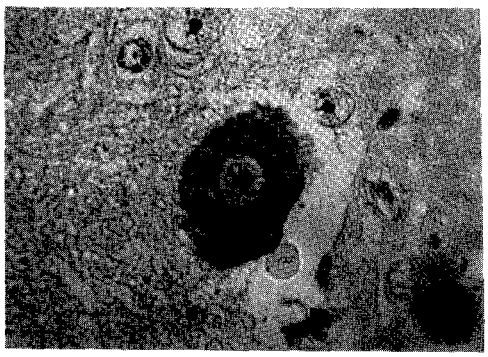


図１．
抗２００ＫＤ-ニューロフィラメント抗体による免疫染色

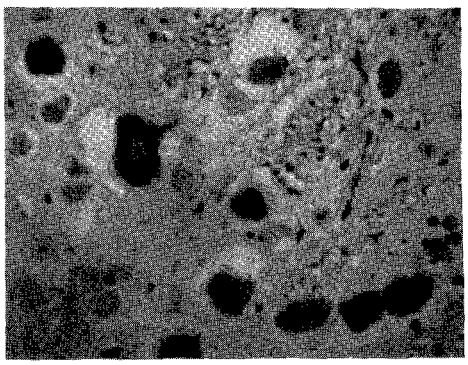


図２．
抗ユビキチン抗体による免疫染色

［文献］

1. Henderson VW, Finch CE:J Neurosurg, 70:335-353, 1989.
2. Manuelidis E, De Figueiredo JM, Kim JH, Fritch WW, Manuelidis L:Proc Natl Acad Sci USA, 85:4898-4901, 1988.
3. Prusiner SB:N Engl J Med, 310:661-663, 1984.
4. Rogers J, Luber-Narod J, Styren SD:Neurobiol Aging, 9:339-349, 1988.
5. Takeda M, Nishimura T, Kudo T, Tanimukai S, Tada K:Brain Res, 551:319-321, 1991.
6. Takeda M:Aging of the Brain. Basel, Karger, pp265-278, 1990.

221 細胞骨格蛋白刺激によるマウス脾臓リンパ球の免疫応答

田中稔久、武田雅俊、中村和子、加藤佳也*、車谷隆宏、大河内正康、関山敦生、播口之朗、西沼啓次*、西村　健

（大阪大学医学部精神医学教室、　国立療養所松籟荘*）

〔要約〕

アルツハイマー病患者血清中にはグリア線維酸性蛋白に対する高い抗体価が認められる。細胞骨格蛋白に対する自己抗体の出現のメカニズムを検討するために、マウス脾臓リンパ球を用いて、グリア線維酸性蛋白(GFAP)およびニューロフィラメント200KDa蛋白(NF200KP)によるリンパ球刺激作用について検討した。GFAPもNF200KPもマウスリンパ球に対する刺激作用を有しており、用量依存性にリンパ球の増殖反応を起こし、さらに、IgM産生量についても用量依存性に刺激することが明らかになった。この結果から、細胞骨格蛋白はリンパ球を直接刺激する作用を持つことが示唆され、アルツハイマー病患者血清中で認められる高い抗GFAP抗体価の出現も同様の機序によるものと推察された。

［目的］

我々はアルツハイマー病患者血清中にはアストログリア細胞中の主要な細胞骨格を形成するグリア線維酸性タンパク質(glial fibrillary acidic protein;GFAP) に対するIgGクラスの自己抗体が存在していることを報告した。また、昨年度の本学会で、アルツハイマー病患者の免疫反応の異常を明らかにするためにアルツハイマー病患者末梢血よりリンパ球を分離しGFAP刺激に対する反応を検討した結果、アルツハイマー病患者リンパ球はIgG産生能が高進しており、GFAP刺激に対する反応性が高いことを報告した。アルツハイマー病患者に上昇している抗GFAP抗体はIgGクラスであり、IgMクラスの抗GFAP抗体価は正常人にも認められる。従ってIgMクラス抗体は疾患特異的でない可能性があり、細胞骨格蛋白の直接刺激作用をBALB/Cマウス脾臓リンパ球を用いてリンパ球増殖反応および免疫グロブリン産生能を検討したので報告したい。

［材料と方法］

1)GFAPおよびニューロフィラメント200K(NF200KP)蛋白の精製

牛脊髄からTriton処理法により得た粗ニューロフィラメント分画を、DE-52カラムクロマトグラフィにより分画し、未吸着部分からGFAPを、0-350mMNaCl塩濃度勾配により溶出される最初のピークからNF200KPを精製した。

2)リンパ球の調整と刺激実験

BALB/Cマウス脾臓を摘出・細切後、RPMIにて洗浄後、塩化アンモニウムトリスバッファーにて赤血球を破砕した後、遠沈によりリンパ球を回収した。リンパ球を20%FCSを含むRPMI培養液中で$50x10^5$ /wellに調整し各ウェルにプレートした。1mMNaHCO$_3$ に対して透析後RPMIにて濃度を調整したGFAPあるいはNF200KPを終濃度10, 50, 100μg/mlになるように加えて培養した。positive controlとしてはlypopolysaccharides(LPS)を加えて培養したものを用いた。

3)MTT法

培養3日目のリンパ球についてMTT法により細胞増殖反応を定量した。

4)IgMの定量

anti-mouse IgMを固相化抗原としたELISAマイクロプレートに、培養7日目のリンパ球上清を10倍希釈したものを50μl加え1時間後、洗浄してperoxydase labeld anti-mouse IgMを加えた後室温にて1時間インキュベイトした。さらに洗浄後orthophenylenediamineを発色基質として492nmでの吸光度をマイクロプレートリーダにて測定した。

［結果］

アルツハイマー病患者血清中の抗GFAP抗体の存在をウェスタンブロット法にて確認した。精製GFAPを泳動・転写したニトロセルロース膜をヒト血清と反応させ、第2抗体としてanti-human IgGあるいはanti-human IgMを用いると、いずれの場合にもGFAPの分子量50KDaに相当する位置に1本のバンドが認められ、これは抗GFAPモノクロナル抗体によるバンドと一致していた。正常ヒト血清では抗GFAP IgM抗体のバンドは認められたが、IgG抗体のバンドは検出できなかった。精製NF200KPについて同様の実験を行ったところアルツハイマー病患者および正常人血清のいずれについてもIgMクラス、IgGクラスの抗NF200KP抗体の存在が示された。

続いて、GFAPおよびNF200KPよるリンパ球の刺激作用について検討した。マウスリンパ球の培養液中にGFAPを添加し、MTT法により調べた細胞増殖反応を図1に示す。GFAPによる刺激3日後のリンパ球では、添加GFAP量に比例して細胞

増殖反応が認められた。、LPS刺激したものと比較しても、GFAP刺激によりマウスリンパ球は100μg/mlまでのGFAP量について用量依存性に増殖反応が刺激されることが明かになった。同様に、マウスリンパ球をNF200KP刺激３日後にMTT法にて測定した結果を図２に示す。GFAP刺激と同様に、100μg/mlまでのNF200KP量について用量依存性に増殖反応が刺激されていた。

次にGFAP刺激後７日間培養したマウスリンパ球の培養上清中のIgM量をELISA法により定量した。添加GFAP濃度を0、10,50,100μg/mlと上げるに従って培養上清中のIgM量が上昇していた（図３）。同様に、NF200KP刺激後７日間培養したリンパ球培養上清中のIgM量についても用量依存性に上昇していた（図４）。

［考察］

アルツハイマー病患者血清中にはGFAPに対するIgG抗体価の上昇が認められるが、IgM抗体価は多くの正常人でも高い価を示す。このような細胞骨格蛋白に対する自己抗体価の上昇のメカニズムを明らかにするためにマウス脾臓から調整したリンパ球を用いて細胞骨格蛋白による刺激に対するリンパ球の反応を検討した。実験結果からは、まだ免疫感作されていないマウスＢリンパ球が、GFAPあるいはNF200KP刺激により活性化されて、増殖サイクルに移行し抗体産生細胞へと分化する過程が示唆された。これまで細胞骨格蛋白によるリンパ球刺激作用は報告されていないが、今回示したGFAPおよびNF200KPによるリンパ球刺激作用は、重合・脱重合を繰り返すような特殊な線維性蛋白であるGFAPとNF200KPの分子的特徴がＢリンパ球に対してレクチン様の刺激を与えるとの可能性が考えられる。

［文　献］

(1) Mosmann, T., (1983) J. Immunol. Methods 65, 55-63
(2) 中村和子　他、(1989) 神経化学　28, 50-51
(3) 中村和子　他、(1990) 神経化学　29, 106-107
(4) 中村和子　老年精神医学雑誌　2, 665-674
(5) Tanaka, J. et al. (1989) Acta Neurol. Scand. 80, 554-560

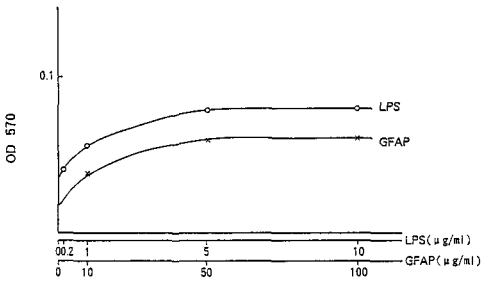


図１

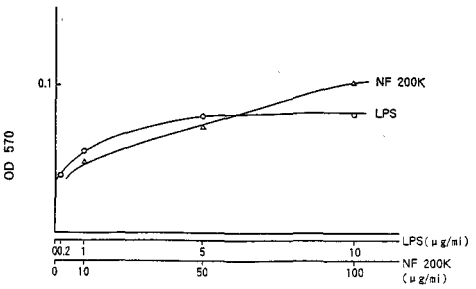


図２

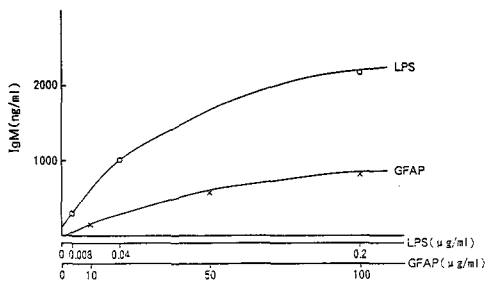


図３

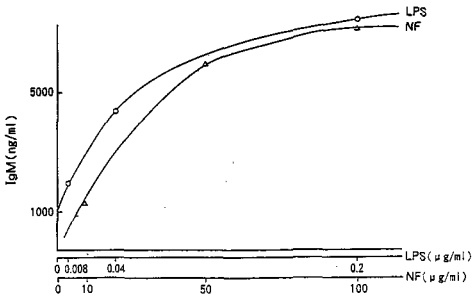


図４

222

海馬破壊がラット学習行動に及ぼす影響 ——2つの課題を用いて

松本　明・九穂　泰三・芝軒　信次・小暮　美樹・石川　紘一
（日本大・医・薬理）

［要約］　成熟ラットに Trimethyltin を投与すると、その3週間後に主として海馬の細胞に変性・壊死が発生し、脳内のアセチルコリン濃度の低下が認められた。シャットル・ボックス型の明暗弁別回避学習を行なわせたところ、TMT はその投与時期にかかわらず、正解率に影響を与えなかった。これに対して放射状迷路学習の場合には、訓練終了後にTMT を投与した動物においては、保持試験時の餌獲得率（正解率）に有意の差は認められなかったが、あらかじめTMT を投与しておいた動物に訓練を行なったところ、餌獲得率は有意に低値となり、さらに保持試験においても低値であった。以上の結果より、海馬は空間記憶の形成過程、しかもその短期記憶形成過程に関係し、そこには神経伝達機構としてコリン作働神経系が含まれている可能性が示唆された。

はじめに

海馬の損傷を伴った患者において、著しい記憶障害が認められることから（3)、この部位が動物の記憶形成に重要な働きをしているとされている。しかし、海馬がどのような機構を介して、記憶形成のどの相に影響しているかについては明らかにされていない。一般に動物の記憶を考える場合に、短期記憶・長期記憶に区別することは分りやすく、多くの研究者によって受け入れられている。この場合短期記憶はニューロン回路上の電気生理学的現象に伴う一時的な変化、一方長期記憶はニューロンの可塑性を含めた物質的基盤を伴う永続的な変化と考えることができる（1)。そこで、学習訓練の前後に海馬を破壊し、学習の獲得および保持に対する影響を比較検討することによって、記憶形成における海馬の意義について研究した。

実験方法

(1) 海馬損傷動物の作成：Wistar系成熟雄性ラットに 8 mg/kg の Trimethyltin (Sigma, St. Louis, MO) を経口投与し、投与後学習実験に用いるまでの間、恒温・恒湿に維持された12時間明暗周期の室内で3週間にわたって飼育した。この間、痙攣の発現や易興奮性、自発運動量などを観察した。なお薬物の投与は、学習実験を開始する3週間前または訓練終了1日後（保持試験の3週間前）に行なった。

(2) 学習方法：2つの異なった paradigm を用いた。①明暗弁別回避学習　U字型ゲートによって2つのコンパートメント（それぞれ 20 X 25 X 20 cm）からなるシャトル・ボックスを用いた。動物を装置に入れ、10分間自由に探索させた後、2つあるコンパートメントのうち動物のいない方の電球が点灯し（条件刺激）、呈示後5秒以内に明コンパートメントに移動した場合正解とし、移動しなかった場合には、2.0 mAの電撃を床の格子より3秒間加えた。移動が完了すると、60秒間の Intertrial interval (ITI)の後、再び一方の電球が点灯し、学習を繰り返した。訓練は連続90試行行ない、記憶保持の判定は3週間後に同じ方法を用いて30試行で行なった。　②放射状迷路学習　それぞれのアームが 48 cmの八方迷路を用いた。アームには給餌器が置かれ、1個 50 mgの餌をとることができた。学習は食餌制限を加えた動物について1日10分間ずつ行ない、8個の餌を取るようになるまで続けた。餌を得るまでに侵入したアームの数で、獲得した餌の数を割った値を餌獲得率とし、正解率と同等に考えた。この場合にも記憶保持判定は3週間後に行なった。

(3) 神経伝達物質の測定：モノアミンやアセチルコリン、およびそれらの代謝産物については、Ishikawa et al. の方法に準じて、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なった（2)。

実験結果

TMT を投与すると動物は aggressive となり、時には痙攣を起こしたが、2週間後には一般行動観察上無処置動物と区別がつかない程度に回復した。一方TMT を投与した動物の組織を観察すると、比較的海馬に限局した細胞の変性・壊死・脱落と、グリア細胞の増殖が認められた。

TMT の投与を受けていない動物に明暗弁別回避学習訓練を行なわせた場合、90試行で正解率は 85%程度に上昇した（図1A）。このような正解率を示した動物にTMT を投与し、3週間後に保持試験を行なったところ、正解率に対照群と比較して有意の差は認められなかった。一方訓練を行なう前にTMT を投与しておいた群（図1B）においても、訓練試行中および保持試験の正解率とも、対照群と比較して有意の差は認められなかった。

放射状迷路学習の場合、訓練によって餌獲得率が 90%以上になった動物にTMT を投与しても、3週間後に行なった保持試験の餌獲得率には有意の差を認めなかった（図2A）。これに対して、TMT を訓練開始前に投与

した動物においては、訓練時の餌獲得率の上昇は対照群と比較して有意に抑制され（$P < 0.01$）、また保持試験時のそれも対照群に対して、有意に低い値であった（図２Ｂ）。

神経伝達物質の定量結果で特徴的なことは、脳内のいろいろな部位で、アセチルコリン濃度が低下していたことであった（例えば線条体において、対照群で9116±605 ng/g湿重量であったものが、TMT 処置によって 8132±423 ng/gに低下した）。モノアミンについては部位によって変動があり、一定の変化が認められなかった。

考　　察

TMT を投与したところ、比較的選択的に海馬の組織学的変化や、アセチルコリンの低下が認められ、このモデルはコリン作働神経系の異常を伴った海馬損傷動物と考えることができた。

記憶は、その記銘・固定と保持および想起の過程を含み、外界からの刺激に対応する適切な行動として表現されるものと考えられている。放射状迷路学習を行ない、飼料獲得率が一定の成績以上に達した後、海馬を破壊してもその成績に著しい変化を示さなかったが、学習を行う前に破壊するとその獲得率は対照群に較べて有意に低下した。このことは、動物の海馬を破壊してもすでに形成された記憶およびその想起過程には著しい影響を与えないが、海馬が短期記憶装置として与えられた情報を記銘する過程に密接に関係することを示唆した。一方明暗弁別回避学習においては、いずれの訓練時に破壊処置を行なっても、それら獲得率に著しい差を示さなかった。このことは、海馬破壊によって障害される記憶形成には、課題特異性があることを示し、空間記憶に対しては著しい障害を招来するが、回避学習ではその影響が表現されにくいことを示している。

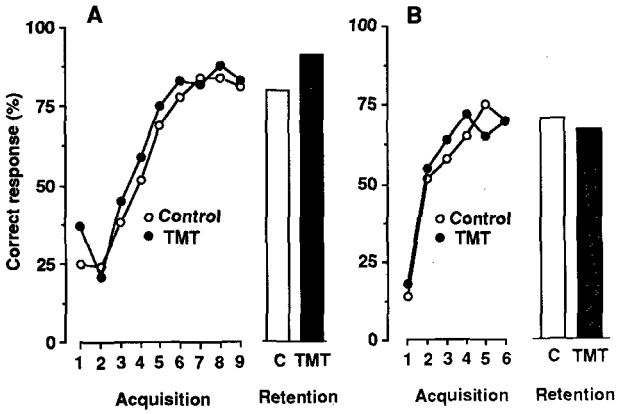


図１．明暗弁別回避学習に及ぼすTMT の作用
Ａ：訓練終了後にTMT を投与し、３週間後に保持試験を行った。Ｂ：訓練前にTMT を投与し、訓練および保持試験を行った。Acquisitionは訓練時の正解率の変化を、またRetentionは保持試験時の正解率の変化を示している。ともに統計学的に有意の差のなかったことに注目。

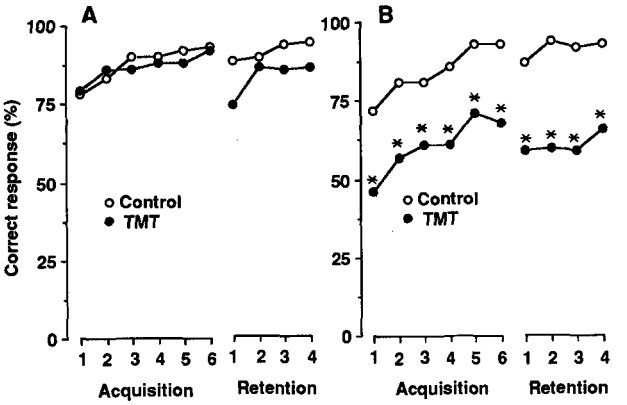


図２．放射状迷路学習に及ぼすTMT の作用
Ａ：訓練終了後にTMT を投与し、３週間後に保持試験を行った。Ｂ：訓練前にTMT を投与し、訓練および保持試験を行った。*対照群と比較して統計学的に有意の差のあることを示している（$P < 0.01$）。

文　　献

1. Abbott, L.F. (1990) Modulation of function and gated learning in a network memory. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9241-9245.
2. Ishikawa, K. and Shibanoki, S. (1985) Liquid chromatographic determination of free and conjugated 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyl glycol with wide-ranging substances related to monoamine metabolism. Anal. Biochem. 147:441-450.
3. Squire, L.R., Shimamura, A.P. and Amaral, D.G. (1989) Memory and the hippocampus. In Neural Model of Plasticity (Byrne, J.H. and Berry, W.O., eds.), pp.208-239. Academic Press, New York.

223 ラット扁桃核キンドリングにおけるプトレッシンの役割

林　泰資、服部幸雄、森脇晃義、堀　泰雄
(岡山大・医・第一生理)

〔要約〕

ラット扁桃核キンドリングの発達により脳内ポリアミン、特にプトレッシン濃度の顕著な増加が見られた。この増加は発達初期では刺激部位に限局されていたが、キンドリングの完成に伴って脳全体に広がった。そこでキンドリング発達とプトレッシンの関係を明らかにするため、ポリアミン合成阻害剤であるα-ジフルオロメチルオルニチン（DFMO）とプトレッシンの扁桃核内投与を行い、同部位刺激によるキンドリング発達に対する影響を検討した。50 nmolの DFMO はスペルミジン、スペルミン濃度にほとんど影響を与えることなく、キンドリング刺激によるプトレッシンの増加を抑制した。同量の DFMO を連日の扁桃核刺激に先だって10日間連続投与すると、キンドリングの発達が顕著に促進された。一方、200 nmolのプトレッシン投与は既にキンドリングが完成しているラットのてんかん発現には如何なる作用も示さなかったが、10日間の連続投与によりキンドリング発達を抑制した。これらの結果は、脳内プトレッシンがキンドリング形成に深く関連し、その発達を抑制していることを示唆する。

［目的］

プトレッシン、スペルミジン、スペルミン等のポリアミン濃度およびポリアミン合成律速酵素（オルニチン脱炭酸酵素；ODC）活性は、中枢神経系の興奮（5）および物理的、化学的損傷（2）などにより上昇することが知られているが、その機能的な役割については明らかにされていない。最近、われわれは実験てんかんモデルとして知られるキンドリング現象の形成に伴ってポリアミン、特にプトレッシン濃度が脳全体で著しく増加することを見いだした（3）。本研究では、このプトレッシンの増加とキンドリングの関係を調べるために、キンドリングの発達初期と完成後におけるポリアミンの濃度変化を比較検討するとともに、ODC 阻害剤であるα-ジフルオロメチルオルニチン（DFMO）とプトレッシンを扁桃核内に投与し、これらの薬物のキンドリング発達に対する効果を検討した。

［実験方法］

Wistar系雄性ラット（体重180-210g）を使用した。ペントバルビタール麻酔下で、ステンレス製の双極電極（直径200μm）、あるいはステンレス製のガイド・カニューレ（22-gauge）と双極電極を接着したユニットを左扁桃核に慢性的に植え込み、キンドリング刺激、薬物投与、および後発射記録に用いた。また、皮質脳波記録のためにステンレス電極（直径 1 mm）を前頭皮質上の頭骨中に両側性に植え込んだ。手術から 2 週間経過した後、一度キンドリング刺激（電流強度 250μA、周波数 50Hz、持続時間 1ミリ秒の二相性矩形波）を 1 秒間加え、5 秒間以上持続する後発射が出現したラットを選び、その後も一日一回の刺激を繰り返した。行動上のキンドリングの発達は Racine（6）の方法に従って 5 段階に分類した。

ポリアミン濃度の定量は Desiderio ら（1）の方法により高速液体クロマトグラフィーを用いて行った。キンドリング発達初期（stage 2 から 3）および完成後（stage 5）のラットを最終刺激から 1, 8, 24 時間後に断頭屠殺し、脳を左扁桃核とその他の大脳部位に分けポリアミン濃度を定量した。また、脳内ポリアミン濃度に対する DFMO（50 nmol）の扁桃核内投与の効果も同様の方法で検討した。

薬物の扁桃核内投与は以下の方法で行った。DFMO またはプトレッシンは人工脳脊髄液（ACSF）に溶かし、ステンレス製のインジェクション・カニューレ（27-gauge）をガイド・カニューレに挿入して連日のキンドリング刺激の 1 時間前に10日間投与した。対照群のラットには同量の ACSF を投与した。また別に、キンドリングが完成したラットに対して 200 nmol のプトレッシンを 1 回のみ投与し、そのてんかん発現に対する作用も観察した。薬物の効果は行動および脳波の変化を指標に検討した。

［結果と考察］

キンドリング刺激によるプトレッシンの増加は、キンドリング発達の初期では刺激部位である左扁桃核に限局されており、行動上、脳波上のてんかん発達にともない脳全体に広がった（Table 1）。従って、プトレッシンの増加はキンドリング発達に密接に関連していると考えられる。この左扁桃核のプトレッシンの増加はキンドリング発達初期の方が完成後より顕著であった。この結果は、キンドリング発達初期の方が完成後よりも左扁桃核の興奮性が高いことを示唆してい

る。ODC 阻害剤である DFMO はスペルミジン、スペルミン濃度にほとんど影響を与えることなく、キンドリング刺激によるプトレッシンの増加を抑制した。この DFMO を連日の刺激に先だって10日間連続投与すると行動上のキンドリングの発達が促進されるとともに、後発射が前頭皮質に出現するまでの刺激回数を減少させた。一方、プトレッシンの投与は既にキンドリングが完成しているラットに対して如何なる抗てんかん作用も示さなかったが、10日間の連続投与によりキンドリングの発達を抑制した（Fig. 1）。これらの結果はキンドリング刺激により増加する脳内プトレッシンはこのてんかんモデルの発達過程に対して抑制的な効果を持っていることを示唆している。既に報告されているように、プトレッシンはシナプスにおけるCa^{2+}代謝に関連し、神経伝達を調節している（4）。従って、今回観察されたキンドリング発達抑制効果もプトレッシンのシナプス伝達調節作用を介したものである可能性がある。

今回の研究で、キンドリング完成まで刺激回数はプトレッシン投与群と対照群で差は見られなかった。この結果は、より長期、あるいはより大量のプトレッシン投与が必要であったことを示唆している。脳内に投与されたプトレッシンの大部分はスペルミジン、スペルミンに代謝される（9）。さらにスペルミジン、スペルミンは N-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体を介する興奮性神経伝達を促進することが示されている（7）。キンドリング形成において、NMDA 受容体はその発達およびてんかん発現に密接に関係している（8）ことから、プトレッシンから代謝されたこれらのポリアミンはキンドリング発達の促進因子となり、プトレッシンの投与中止後、プトレッシンのキンドリング発達抑制効果を阻害したのかもしれない。しかしながら、スペルミジン、スペルミンとキンドリング形成についてはさらに詳しい検討が必要である。

Table 1. Changes in putrescine concentrations with the development of amygdaloid kindling.

Time after stimulation	Left amyghdala	Remaining cerebrum
Control	10.8±1.6	9.1±0.9
Prekindled		
1 h	29.2±5.2[a]	10.8±2.2
8 h	35.1±3.6[b, c]	12.2±0.8
24 h	39.1±4.1[b, d]	10.7±1.1
Kindled		
1 h	21.8±2.0[b]	13.2±0.9
8 h	26.6±3.0[b]	16.6±0.9[b]
24 h	14.5±2.3	10.7±1.1

Data were mean±SEM values from 4 to 9 different rats. The statistical significance was evaluated by two-way analysis of variance followed by t test with Bonferroni correction. [a]$p<0.05$ and [b]$p<0.05$ compared with the control group. [c]$p<0.05$ and [d]$p<0.01$ compared with the kindled group.

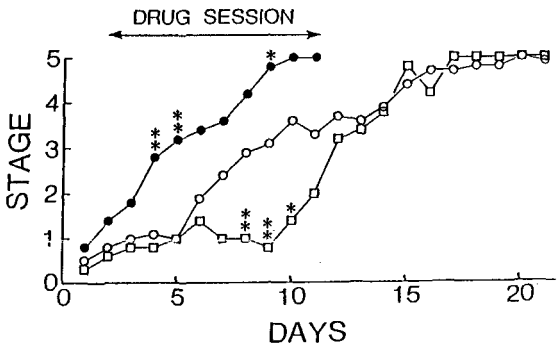


Fig. 1. Effects of intraamygdaloid injections of DFMO (50nmol) or putrescine (200nmol) on the development of behavioral kindling. Rats were injected with DFMO (●, n=5), putrescine (□, n=5) or ACSF (○, n=9) 1 h before kindling stimulation for 10 days. The statistical significance was evaluated by Kruskal-Wallis test followed by two-tailed Mann-Whitney U test. *$p<0.05$ and **$p<0.01$ compared with the ACSF group.

［文献］

1. Desiderio, M.A., Davalli, P., and Perin, A. (1987) J. Chromatogr. 419, 285-290
2. Dinel, G.A., and Cruz, N.F. (1984) J. Neurochem. 42, 1053-1061
3. Hayashi, Y., Hattori, Y., Moriwaki, A., Saeki, K., and Hori, Y. (1989) J. Neurochem. 53, 986-988
4. Iqbal, Z., and Koenig, H. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 133, 563-573
5. Pajunen, A.E.I., Hietala, O.A., Virransalo, E.L., and Piha, R.S. (1978) J. Neurochem. 30, 281-283
6. Racine, R.J. (1972) Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 32, 281-294
7. Ramson, R.W., and Stec, N.L. (1988) J. Neurochem. 51, 830-836
8. Sato, K., Morimoto, K., and Okamoto, M. (1988) Brain Res. 463, 12-20
9. Shaskan, E.G. and Snyder, S.H. (1973) J. Neurochem. 20, 1453-1460

224 受容体オートラジオグラフィ法による移植海馬ニューロン機能の解析

小野寺宏、杉本晃、小暮久也
（東北大学・神経内科）

〔要約〕
ラット海馬ＣＡ３錐体細胞をカイニン酸により選択的に破壊後、胎生１９日の胎児海馬ニューロンをhostのＣＡ３領域に移植して、経時的に受容体オートラジオグラフィ法によりgraftの機能を解析した。移植海馬ニューロンは成獣海馬錐体細胞に匹敵するアセチル コリン受容体数を発現し得た。ＣＡ１錐体細胞は本来ＣＡ３錐体細胞からの入力を受けるが、カイニン酸処理によりＣＡ３錐体細胞からの情報が遮断された状態であっても、胎児ＣＡ１ニューロンは正常ＣＡ１錐体細胞同様極めて高密度にIP3受容体を発現した。この ことから、IP3受容体の発現レベルはＣＡ３錐体細胞には影響されないと考えられた。ＣＡ１錐体細胞の表現型は他の神経細胞群との線維連絡とは無関係にそのかなりの部分が胎生19日までに決定されていると推測される。

脳移植実験は、神経細胞間結合解析のモデルとして、また臨床応用を目指して頻用されている。従来、移植神経細胞の生着および回路形成の指標として、電気生理学的、形態学的、行動薬理学的マーカーが用いられてきた。受容体オートラジオグラフィ法により神経伝達物質受容体やセカンドメッセンジャー系の分布を神経核レベルで解析することが可能となったが、本法は神経の可塑性変化を検出する上でも優れた方法である。

本研究では、ラット海馬ＣＡ３錐体細胞をカイニン酸により選択的に破壊後、胎児海馬ニューロンをhostのＣＡ３領域に移植して、経時的に受容体オートラジオグラフィ法によりgraftの機能を解析した。

［方法］ 既報の如く、ペントバルビタール麻酔下にＷｉｓｔａｒ雄ラットの両側側脳室にカイニン酸を各0.4μｇ注入して両側の海馬ＣＡ３錐体細胞を選択的に破壊した(1)。カイニン酸投与５日後に ラット胎児（胎生１９日）の海馬を顕微鏡下にＣＡ１領域と、ＣＡ３／歯状回領域に二分し、それぞれの画分をトリプシン消化してcell suspensionを作成した。 尚、胎生１９日では大部分のＣＡ１及びＣＡ３錐体細胞は分裂を終了しているが、歯状回顆粒細胞の分化は未だ不十分であるため、この時期のＣＡ３／歯状回領域から得た神経細胞の大部分はＣＡ３錐体細胞であると考えられる。3~5X10^5 cellsを左海馬ＣＡ３領域に 定位的に移植した。 移植２～１２週後に断頭屠殺し速やかに凍結切片（12μm）を作成 し、種々のトリチウムラベルのリガンドとインキュベートした。神経伝達物質受容体のマーカーとしてmuscarinic cholinergic受容体(QNB)を(2)、細胞内セカンドメッセンジャーとしてinositol 1,4,5-trisphosphate(IP3)受容体とforskolin受容体(3)を選んだ。オートラジオグラムの銀粒子密度を画像解析装置で測定後、標準線源の銀粒子密度で補正して受容体密度を定量した。隣接脳切片をCresyl violet染色およびcholinesterase組織化学にて検討した。

［結果及び考察］

移植12週後迄、ＣＡ１神経細胞移植群、ＣＡ３神経細胞移植群の何れも生着していた。 大部分の移植細胞はhostのＣＡ３領域に局在していたが、一部の細胞はＣＡ１及び歯状回門にも分布していた。

アセチルコリン受容体；ＣＡ３ graftにおけるmuscarinic receptor密度は、移植２週間後には成獣海馬ＣＡ３における受容体密度の70%に達しており、移植１２週後には成獣とほぼ等しいmuscarinic receptor密度を示した（Fig.１）。同様に、１２週後にはCA1移植群でも成獣ＣＡ１に匹敵する受容体密度に達しており、medial septal nucleusに由来するcholinergic fiberもこの時期にはgraft内に侵入して密なcholinesterase陽性線維網を形成していた(data not shown)。ＣＡ１や歯状回における受容体密度には移植側と非移植側との間で差が無かった。

細胞内セカンドメッセンジャー；IP3受容体はＣＡ１錐体細胞では極めて密に分布しているが(3),ＣＡ３錐体細胞や歯状回顆粒細胞のIP3受容体密度は極めて低い事が知られている。移植２週間後でのIP3受容体密度は、ＣＡ１移植群、ＣＡ３移植群共に低値であった。しかし、12週後にはＣＡ１移植群のIP3受容体密度は成獣ＣＡ１のレベルに匹敵する極めて高い値を示したのに対して、ＣＡ３移植群は２週間後同様低値に留まっていた（Fig.2)。 Forskolin結合部位はＣＡ１で疎、ＣＡ３／歯状回で密と、IP3受容体とは対照的な分布を示す。移植２週間後には、ＣＡ１移植群、ＣＡ３移植群何れも結合部位の密度は低く、両者の間ではほとんど差が認められなか

った。一方、移植１２週後のＣＡ３移植群の結合部位密度は著明に増加したのに対して、ＣＡ１移植群の結合部位密度は２週間後のレベルに留まっていた(Fig.3)。

上記のリガンドによる受容体解析の結果から、移植海馬錐体細胞が成獣海馬錐体細胞に匹敵するアセチルコリン受容体数を発現し得ることが明らかになった。ＣＡ３領域に移植された胎児ＣＡ３錐体細胞が本来の機能の一翼を担うことが可能である。例えば、カイニン酸による海馬ＣＡ３破壊モデルでは、歯状回顆粒細胞に由来するmossy fiberの異所性 発芽がＣＡ３領域と歯状回supragranular layerで認められるが (4) 、胎児ＣＡ３ニューロン移植により異所性発芽を抑制することが出来る(unpublished data)。

ＣＡ１錐体細胞は本来ＣＡ３錐体細胞からの入力を受けるが、カイニン酸処理によりＣＡ３錐体細胞からの情報が遮断された状態であっても、胎児ＣＡ１ニューロンのIP3受容体密度は正常ＣＡ１錐体細胞同様極めて高いものであった。このことから、IP3受容体発現レベルはＣＡ３錐体細胞に影響されないと考えられた。ＣＡ１錐体細胞の表現型は他の神経細胞群との線維連絡とは無関係にそのかなりの部分が胎生19日までに決定されていると推測される。

以上、In vitro受容体オートラジオグラフィ法が、移植神経細胞の機能を解析する方法として有用である事を示した。

本研究は、中国軍医大学神経内科、鄭健博士との共同研究である。

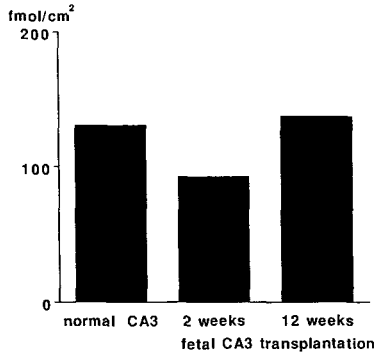
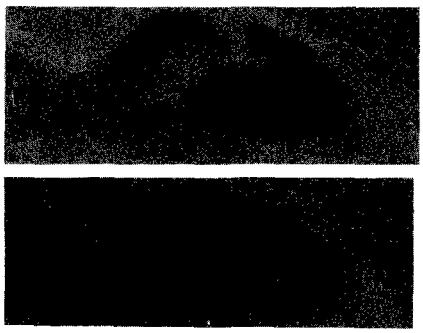


Fig.1

海馬ＣＡ３graftにおけるmuscarinic cholinergic受容体密度



C Inositol 1,4,5-trisphosphate binding

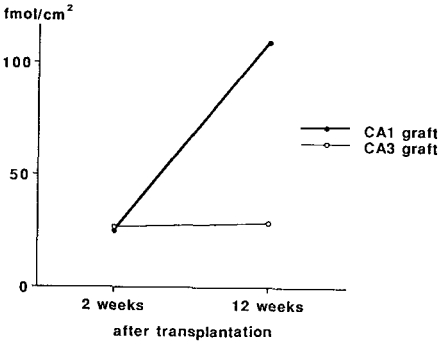


Fig. 2

移植１２週後の [³H] IP3オートラジオグラム(a, b)
(a)ＣＡ１ graft. IP3受容体に富む(矢印)
(b)ＣＡ３ graft. IP3受容体に乏しい(矢頭)
(c)IP3受容体密度の経時変化

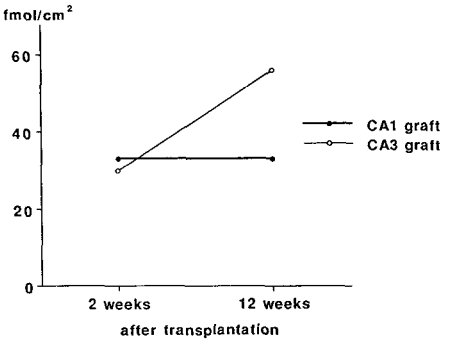


Fig.3

胎児海馬graftにおける[³H]forskolin受容体密度

［文献］

1. Onodera H. et.al.(1986) Neurosci.Lett.68,169-174.
2. Onodera H. et.al.(1987) Brain Res.415,309-322.
3. Onodera H. et.al.(1990) Neuroscience 38,125-136.
4. Tauck D.and Nadler J.(1985) J.Neurosci.5,1016-1022.

225 覚醒剤反復投与によるラット線状体のドパミンD－2受容体、G蛋白の変化

門田健、岡田瑛子、諸井佳代子*、
尾崎直子**、門田朋子*

（都精神研・神経化学、
*千葉大医、**金沢医大）

〔要約〕

Methamphetamine（MAP）をラットに14日間反復投与し、誘発される常同行動の薬物に対する感受性昂進（逆耐性）をみた。休薬のあと線状体を切り出し、細胞下分画を調製した。各分画について〔^{3}H〕YM－09151－2（YM）結合をみた。また、〔^{32}P〕NADを基質として百日咳毒素（IAP）によるADPリボシル化反応をしらべた。得られた測定値をコントロールのラットのそれと比較した。（1）コントロール、MAP投与ラットを問わず、YM結合量（単位蛋白量あたり）は、内膜に富む分画（ミクロゾーム、ゴルジ体）で高かった。（2）MAP反復投与によりゴルジ体分画のYM結合量（単位蛋白量あたり）には軽度の低下がみられた。（3）またMAP反復投与により、各分画におけるADPリボシル化は増加するようであった。

周知のように覚醒剤のメタンフェタミン（MAP）の相当量（4－10mg／kg）をラットに反復投与すると、薬物によって誘起される反応、常同行動、が強くあらわれてくるようになる。このMAPに対する行動感作（behavioral sensitization）の形成、発現、長期にわたる保持についてはドパミン系の障害をふくむ神経化学的所見が報告されている（1，2，3）。これらの背景を考慮にいれ、MAP反復投与後のドパミン信号系の変化を細胞分画法でしらべることにした。今回は線状体から調製した細胞下分画中のドパミンD－2受容体、G蛋白を検討した。

［方法］

1．線状体の細胞下分画の調製：　7週令のWister系ラットにMAP5mg／kgを腹腔内投与した。投与期間は通算16日間、正味14日間で1日1回投与し、第7、第14日は休みとした。最終投与の後、4－10週間の休薬期間をおき、断頭して線状体を実体顕微鏡下で切り出した。3－4匹分の線状体をあわせ、0.32M蔗糖液で10％ホモジェネートとし、分別遠心、蔗糖密度勾配遠心法で各種の細胞下分画を調製した（4）。

2．結合実験：　40－120μg蛋白量の細胞下分画と〔^{3}H〕YM09151－2（YM）を5℃、15－18時間インキュベートし、反応液をWhatman GF／B濾紙で吸引濾過して反応を停止した。非特異的結合は100μM S（－）－Sulpiride存在下での結合とした。

3．IAPによるADP ribosylation：　Bokochらの方法（5）にしたがい、7.5－40μgの細胞下分画を25μg／mlのIAP、1μM〔^{32}P〕NAD存在下25℃で1時間インキュベートした（反応液全量、100μl）。10％TCAで反応を停止し、沈査をSDSを含む緩衝液で溶解、SDSポリアクリルアミド電気泳動をし、次いでオートラジオグラフィーをした。

［結果と考察］

1．YMの各細胞下分画への結合をしらべたところ、ミクロゾーム（Ms）分画、ゴルジ体（Golgi）分画といった内膜系の細胞下分画への比結合量が高かった（Fig.1）。内膜系のD－2受容体の密度、リガンドに対する親和性は形質膜系（P_2；粗シナプトゾーム分画）とは同一でないという可能性も考えられる。粗シナプトゾームを純化して得られる所見と比較してみる。

2．覚醒剤反復投与による各細胞下分画のYM比結合量の変化をFig.1に示した。統計検定すると、ゴルジ体分画で有意の低下がみとめられた（$P<0.05$；Student's t-test）。

3．IAPによる40－45Kの蛋白のADPリボシル化はホモジェネート（H）、粗シナプトゾーム（P_2）、ミクロゾーム（Ms）分画のいづれでもみとめられた。各分画とも蛋白量7.5－40μg／tubeの範囲では濃度依存性があった（Fig.2）。MAPの慢性投与は、これら各分画のIAPによる40－45K蛋白のADPリボシル化を促進しているように思われた（Fig.3）。MAPの慢性投与はGo／Giに作用が及ぶかと考えられた。

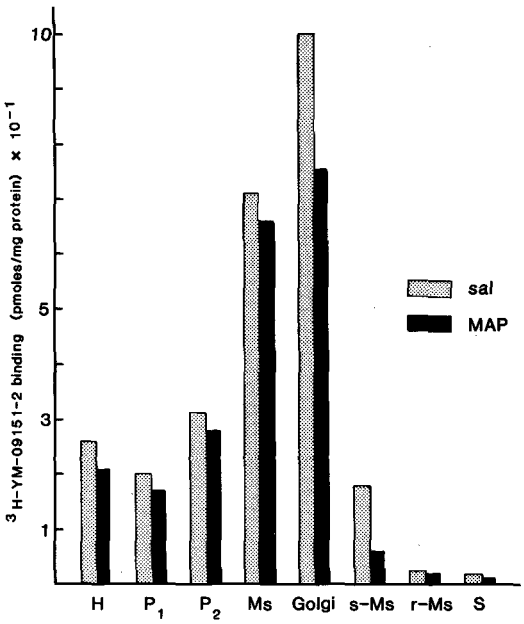


Fig.1 Binding of [^{3}H] YM-09151-2 to the subcellular fractions prepared from rat striatal tissue.
Saline, as a control treatment. MAP, treated with an intraperitoneal injection of methampbetamine at a dosis of 5mg/kg once a day for 16 days except the 7th and 14th days. H, homogenate; P_1, nuclear debris fraction; P_2, crude synaptosomal fraction; Ms, microsomal fraction; Golgi, Golgi complex fraction; s-Ms, smooth microsomal fraction; r-Ms, rough microsomal fraction; S, supernatant fraction. Values are the mean for each subcellular fraction. n=4 in all fractions.

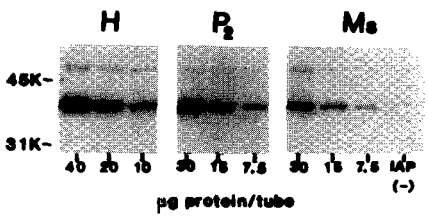


Fig.2 [^{32}P] ADP ribosylation of rat striatal subcellular fractions catalyzed by IAP. Dependence on protein concentration. H, homogenate; P_2, crude synaptosomal fraction; Ms, microsomal fraction.

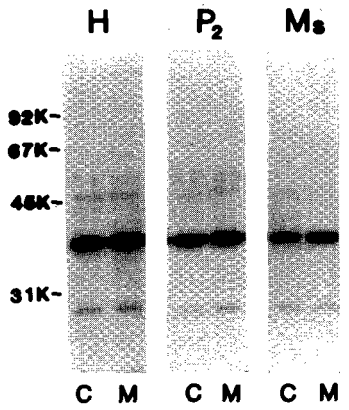


Fig.3 Enhancing effects of subchronic MAP treatment on [^{32}P] ADP ribosylation of rat striatal subcellurar fractions catalyzed by IAP. C, control; M, MAP treatment. H, homogenate; P_2, crude synaptosomal fraction; Ms, microsomal fraction. Each reaction tube contained 20 μg protein.

〔文献〕

1. 吉川武男ら（１９９０）神経化学 ２９, １４８－１４９
2. 中山誠ら（１９９０）神経化学 ２９, ２６４－２６５
3. Ujiike, H. et al. (1991) Brain Res. 540, 159－163
4. Kadota, K. et al. (1991) Japan. J. Pharmacol. 55, Suppl. I., 165p
5. Bokoch, G. M. et al. (1983) J. Bol. Chem. 258, 2072－2075

226 慢性硬膜下血腫患者の血漿および血腫の脂質分析
－血腫増大機構への血小板活性化因子（ＰＡＦ）の関与－

平島 豊、長堀 毅、西嶌 美知春、遠藤 俊郎、高久 晃、*中川 靖一
（富山医薬大・医・脳神経外科、*北里大・薬・衛生化学）

〔要約〕慢性硬膜下血腫患者の手術時に得た血腫の上清および血漿の脂質分析を行なった。ホスファチジルコリン(PC)は血腫上清に比べ血漿中で高かったが、ソゾホスファチジルコリン(lysoPC)は差がなかった。また血腫上清、血漿PC, lysoPCの脂肪酸組成は本質的に差がなかった。血腫上清のlysoPCとPCの比(lysoPC/PC)は症状の発現から手術までの日数とよい相関を示した。患者血漿中PAFは正常ボランティアに比べ14倍の濃度であった。一方血腫上清中のPAFは新鮮血腫群では血漿と同程度の濃度であるが陳旧血腫群では血漿に比べ有意に濃度が低かった。lysoPAFは両群ともに血腫上清と血漿の間で差がなかった。

［はじめに］慢性硬膜下血腫の成因と増大の機構はいまだ不明な事が多い。Virchowはその成因を炎症に求めた(12)。血腫の増大機構には再出血説(11)が広く支持されている。また被膜からの出血には局所的hyperfibrinolysisの関与(13)が示唆されている。PAFは炎症細胞の走化性因子(8)(9)であると同時に好酸球等の脱顆粒作用をも持っている(4)。また慢性硬膜下血腫被膜は好酸球の浸潤とその脱顆粒が著明で、これらが被膜からの出血に関与していると考えられている(13)。本実験では慢性硬膜下血腫の成因と増大機構の解明を目的として血腫上清および血漿のPAFをはじめとする脂質の分析を行なった。

［方法］14例の慢性硬膜下血腫患者からの16血腫と14血漿を分析に供した(表1)。また血漿PAF濃度正常値を求めるべく7例のボランティアから採血した。血腫、血液を3000rpm 10分間遠心した上清を Bligh & Dyer法(1)で抽出し、その後 Silica gel cartridge(Sep-pak^{R}cartridge, Waters)に応用し、洗浄後に10mlクロロホルム－メタノール－水(1/2/0.8, v/v/v)で溶出した。次にこの抽出液をTLCで溶媒クロロホルム－メタノール－水(65/35/6, v/v/v)を用いて展開し、PC, PAF, lysoPCに相当する部分を抽出した。lysoPAFの分離はHPLCで行った。PC , lysoPC の定量はRouser法(7)でまたPAF, lysoPAFの定量は生物学的分析法によった(6)。またPC 、lysoPCの脂肪酸分析はガスクロマトグラフィーを用いた。

［結果］慢性硬膜下血腫患者の血漿PC濃度は 3.84±0.72μmol/ml （ M±SEM, n=12)で血腫上清濃度1.05±0.24μmol/ml (M±SEM, n=14)より高かった(P＜0.05)。症状発現から手術日までの日数で新鮮血腫(14日以内)と陳旧血腫(14日以降)に分けるとPC, lysoPCともに両者の上清中に有意な差は認めなかった。しかしながら症状発現第１日目の症例(表1. Case5)の血清上清PCは高値を示した。血腫のlysoPC/PCは症状発現から手術日までの日数と良い相関を示した。(図1)。またPC, lysoPC の脂肪酸組成は血漿と血腫上清で本質的に差がなかった(表2)。PAFに関しては患者血漿濃度は2.45±1.48pmol/ml (M±SEM, n=14)で、血腫濃度は 0.54±0.20 pmol (M±SEM, n=16)で患者血漿濃度が有意に高かった(P＜0.01)。 新鮮血腫群では血漿、血腫上清とも高値を示し有意差を認めないが陳旧血腫群では血腫上清濃度が低く、血漿値が高かった(P＜0.01 図2)。

［考察］Trotterの再出血説(11)は慢性硬膜下血腫の増大機構として広く認められている。血腫と血漿の PC, lysoPCの脂肪酸組成に本質的に差の無い事から、脂質分析の結果からも血腫の起源は血液である事が考えられる。しかしながら今回の結果は血球成分を伴った出血なのか血漿成分のみの漏出なのかを明確には示し得ない。赤血球、好中球PCの脂肪酸組成は血漿のそれと(10)きわめて類似していると報告されており、血腫中のPCの一部は血球成分に由来する事も考えられる。赤血球、好中球の18:1の割合は血漿にくらべてやや高い事が知られており(2,5)、血漿中の18:1の割合が高い事と関係があるかもしれない(表2)。血腫上清PC濃度は血漿の1/3以下であり、この事は、出血によって貯留したPCが何らかの方法で希釈されている事を示している。超急性期の血腫上清(case 5) PC濃度は高いが新鮮血腫、陳旧血腫では差を認めず、この希釈は出血後すみやかに生じるものと思われる。慢性硬膜下血腫被膜に脱顆粒を伴う好酸球の浸潤が著明である事が知られており、プラスミノーゲンを多量に含む脱顆粒が局所の線溶系の亢進、ひいては出血に関与していると言われている(13)。PAFは好酸球を含む炎症細胞の走化性因子で好酸球の脱顆粒をも促進する(4,9)。新鮮血腫群では血腫上清、血漿の両者でPAF濃度が高く、全身的、局所的に被膜よりの出血の危機にさらされていると考えられる。また陳旧血腫でさえも全身的PAF濃度が高く、出血の危険性はまぬがれないと考えられる。

［文献］

1. Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

2. Dodge, J.D., and Phillips, G.B. (1967) J. Lipid Res. 8, 667-675.
3. Ito, H., Yamamoto, S., Komai, T., et. al. (1976) J. Neurosurg. 45, 26-31.
4. Kroegel, C., Yukawa, T., Dent, G., et. al. (1988) Immunology 64, 559-562.
5. Mueller, H. W., O'Flaherty, J. T., Greene, D. G., et.al. (1984) J. Lipid Res. 25, 383-388.
6. Pinkard, R. N., Farr, R. S., and Hanahan, D. J. (1979) J. Immunol. 123, 1947-1957.
7. Rouser, G., Fleischer, S., and Yamamoto, A. (1970) Lipids 5, 494-496.
8. Show, J. O., Pinckard, R. N., Kathleen , K. S., et. al. (1981) J. Immunol. 127, 1250-1255.
9. Tamura, N., Agrawal, D. K., Suliaman, F. A., et. al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 142, 638-644.
10. Taniguchi, M., and Sakagami T. (1985) Rinshokensa 29, 1291-1297 (in Japanese).
11. Trotter, W. (1914) Brit. J. Surg. 2, 271-291.
12. Virchow, R. (1857) Gesellshaft zu Wurzburg 7, 134-142.
13. Yamashita, T., Kubota, T., and Yamamoto, S. (1985) J. Neurosurg. 62, 257-260.

FIG. 1

Lyso PC/PC *versus duration of symptoms*

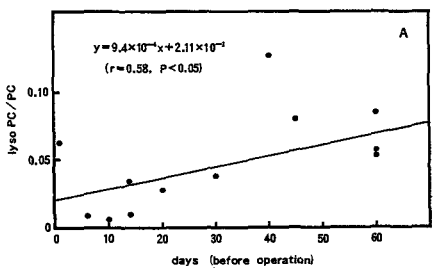


FIG.2

PAF levels in fresh hematoma group (A) and old hematoma group (B)

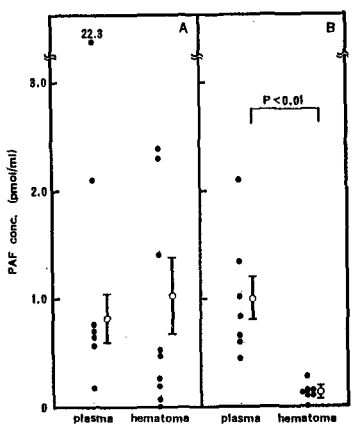


TABLE 1

Summary of the reported 14 cases with chronic subdural hematoma

Case	Age/Sex	Trauma	Symptomas	Interval of symptoms	Side(s) of hematoma
1	67/M	+	headache gait disturbance	5 days	Left
2	65/M	+	aphasia rt. hemiparesis	14 days	Left
3	55/M	+	dementia	40 days	Left
4	88/F	+	gait disturbance	60 days	Left
5	48/M	+	headache gait disturbance	1 day	Bilateral
6	69/M	+	gait disturbance	6 days	Bilateral
7	62/M	+	headache vomiting	14 days	Bilateral
8	84/M	+	vertigo headache	30 days	Left
9	80/M	+	gait disturbance	20 days	Left
10	66/M	+	headache gait disturbance	14 days	Right
11	77/M	+	gait disturbance	10 days	Left
12	86/F	+	dizziness headache	45 days	Left
13	75/F	+	gait disturbance	60 days	Right
14	78/M	+	dementia	60 days	Left

TABLE 2

The fatty acyl chain composition of PC and lyso PC in plasma and hematoma of the patients with chronic subdural hematoma

	Plasma		Hematoma	
	PC	lyso PC	PC	lyso PC
16 : 0	21.4	28.7	19.8	39.2
18 : 0	15.4	17.2	17.4	24.6
18 : 1	14.0	6.4	20.3[c]	7.0
18 : 2	20.8	47.8	16.0	29.3
20 : 3[a]	2.9	—	2.7	—
20 : 4	10.6	—	9.0	—
22 : 5[b]	1.3	—	2.2	—
22 : 6	13.6	—	12.6	—

227 脳内Oncogene Productの分布とAging

竹田 稔，塩田清二**，竹田二美代*，菅谷慶三，
塩田富紀子，中井康光**，佐藤永雄
（昭和大・医・第２，第１*生化学，第１解剖**）

〔要約〕
Oncogene Productの脳内分布と加齢に伴う変化を調べるために、生後０日、６週、３カ月、６カ月及び１年６カ月のラットを用いて抗c-fos,c-jun,SRC,v-H-ras 抗体を用いたABC 法により免疫組織化学的に検索した。各抗体との反応性は脳各部位及びAge によって大きく異なることが判明した。抗c-fos の反応性は、新皮質、梨状葉、視床、視床下部では生後０日で既に細胞核に陽性を示し、６週から１年６カ月で強い反応性が認められた。線条体、扁桃では生後０日では反応性は認められず６週以後強い反応性が維持された。抗c-jun 抗体との反応性は細胞核と線維部分で異なり、Aging によっても異なる。生後０日の海馬では核、線維共に強い反応性が認められたのに対し、６週令以後ではいずれの部位でも反応性が失われていた。線条体の反応性は細胞核では加齢と共に強くなるのに対し、線維では０日以降みられなくなる。抗src 抗体との反応性は脈絡叢の細胞で老令のもの程強いのに対し、新皮質や脳梁では６週以後では認められなかった。この結果は抗v-H-ras 抗体との反応性とも一致する。以上の観察結果より、Oncogene Productの分布とその局在は脳内各部位によってもそれぞれ異なり、さらに老化と共に増減するものもあることが分った。

＜目的＞

近年多くの癌遺伝子が同定されこれらが単に癌細胞に特異的であるのではなく、正常細胞の増殖や分化、又、情報伝達を担うタンパク質をコードし細胞の重要な機能をコントロールしている事が明らかにされつつある。今回我々は、Oncogene Product の脳内分布とAging による変化について明らかにする目的で数種の抗癌遺伝子産物抗体を用いて、免疫組織化学的に検索を試みた。

＜材料と方法＞

生後０日、６週、３カ月、６カ月及び１．５年のWistar系ラット各４匹をネンブタールで麻酔後、４％パラホルムアルデヒド／ 0.1Mリン酸緩衝液（PB,pH7.2）溶液にて左室より灌流固定した。脳を摘出後、同一固定液にて４℃、２～３時間浸漬固定した。更に20%Sucrose/PB溶液中に浸漬固定後、前頭断の連続凍結切片（20μm）を作製した。切片をPBで洗浄後、抗c-fos,c-jun/AP1,v-H-ras(Oncogene science社),src(Transformation Research 社) 抗体を用いて、４℃にて一晩incubation後、ABC 法にて免疫染色を行った。染色後の切片をゼラチン処理スライドグラス上に貼付し、乾燥後 0.4%オスミウム酸溶液で処理した後エタノール系列にて脱水、封入し光顕にて観察した。

＜結果と考察＞

種々のAge におけるラット脳各部位の各種抗Oncogene Product抗体に対するimmunoreactivityを表１に示した。同一抗体でも脳各部位によって反応性は異なり、又、同一部位でもAge によって反応性は異なる事が判明した。c-fos 産物はc-jun 産物と複合体を作りAP1 を形成して転写制御因子として作用していることが知られている。

Dragunow[1] らは成熟ラットでは Fosは、大脳皮質、海馬、扁桃、線条体、梨状葉で免疫陽性が認められることを報告している。我々の今回の結果でもほぼこれと同部位にc-fos 免疫陽性が成熟ラットで認められた。しかし、更にAging によるc-fos の発現をみると、生後０日では海馬、線条体、扁桃では殆ど認められず、梨状葉、視床、視床下部では生後０日より加齢に伴なって強い免疫反応性が認められた。c-fos の発現がノルアドレナリン[2] やメトラゾール[3] などにより、一過性に増加することが報告されているが、今回我々の得たc-fos 発現がAging や脳部位によって異なることの生理的機構と意義は不明である。c-jun 産物の脳内分布とAging との関連に関する報告は無いが、表１に示すように生後０日で新皮質、海

馬、線条体で反応性が認められ、しかも神経細胞の核のみならず線維部分にも免疫反応性が認められる。更に新皮質、線条体の細胞核で加齢により反応性が強く認められるのに対し線維部分の反応は消失する。又、海馬では、生後６週で反応性が消失する。チロシンキナーゼをコードするsrc の発現についてみると新皮質、脳梁では生後０日で細胞質に陽性反応が認められるが、生後６週以後では免疫反応性は失われる。一方脈絡叢及び脳室上衣では老令のラットに強い免疫反応性が認められた。ras 産物であるGTP 結合タンパクの免疫反応性は脈絡叢及び脳室上衣で６週令（写真Ａ）よりも１．５年（写真Ｂ）で強いのに対し、新皮質、海馬、脳梁では６週以後では弱い。

現段階では我々は免疫組織化学によるデーターしか持ち合せていないが、m-RNA レベルでの解析を検討中である。これらの癌遺伝子の発現の脳部位、及びAge で異なることが、脳各部位の機能と、分裂・増殖（再生）能力を保持しない神経細胞でどのような意義をもつのかは今後の課題である。

表1

ラット脳各部位癌遺伝子産物の免疫反応

	０日	６週	３カ月	６カ月	１年６カ月
c－ｆｏｓ（核）					
新皮質	＋	＋＋	＋	＋	＋
梨状葉	＋	＋＋＋	＋＋	＋＋	＋＋＋
線条体	－	＋＋	＋	＋	＋
海馬	－	－	＋	－	－
扁桃	－	＋＋	＋	＋	＋
視床	＋	＋＋＋	＋＋	＋＋＋	＋＋
視床下部	＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋
c－ｊｕｎ					
新皮質					
細胞核	＋	＋	＋＋	＋＋	＋＋
線維	＋＋	－	－	－	－
海馬					
細胞核	＋＋	－	－	－	－
線維	＋＋＋	－	－	－	－
線条体					
細胞核	＋	＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋
線維	＋＋	－	－	－	－
ＳＲＣ（細胞質）					
新皮質	＋	－	－	－	－
脳梁	＋＋	－	－	－	－
視床下部	－	＋＋	＋＋	＋＋	－
脈絡叢	＋	＋	＋	＋＋	＋＋＋
ｖ－Ｈ－ｒａｓ（細胞質）					
新皮質	＋	－	－	－	－
脳梁	＋＋	－	－	－	－
海馬	＋＋	－	－	－	－
脈絡叢	＋＋	＋	＋	＋＋	＋＋

文献

1) Dragunow, M., Roberton, H.A. (1988) Brain Res, 440, 252-260

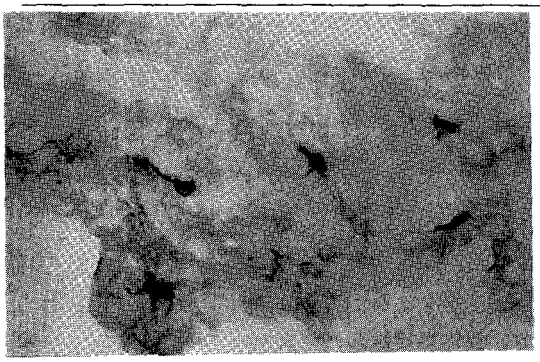
2) Kaczmarek, L., et.al. (1988) Mol, Brain Res, 3, 183-186

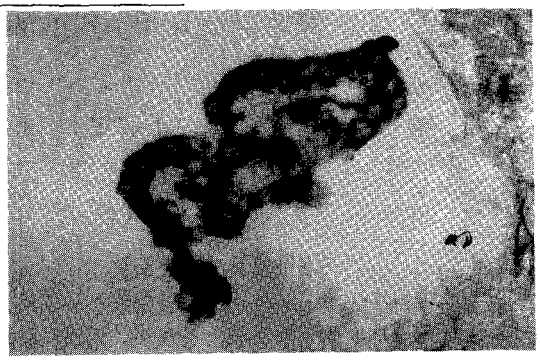
3) Morgan, J.I., et.al. (1987) Science, 237, 192-197

写真：脈絡叢の抗ras 抗体との免疫反応性

Ａ：６週令，Ｂ：１年６カ月

いずれも２００倍





228 ヒト髄膜腫の生化学的分析 －良性および悪性髄膜腫に特徴的な脂質組成－

脇谷 健司、＊中村 治、＊＊岩森 正男
東京警察病院脳神経外科、＊東京都立駒込病院脳神経外科、＊＊東京大学医学部第二生化学教室

〔要約〕
ヒト良性および悪性髄膜腫のマーカーとなり得る生化学的表現形質の変化を見出す目的で、髄膜腫手術標本の脂質組成を分析し、組織学的に良性な髄膜腫と悪性髄膜腫との比較を行った。コレステロール含有量、リン脂質含有量と組成については、良性群と悪性群の間に差はみられなかったが、遊離脂肪酸含有量は、良性髄膜腫全例において著明に増加しており、さらに遊離脂肪酸含有量の多い例ではコレステロールエステルが減少する傾向がみられた。遊離脂肪酸の合成、エステル化の差が髄膜腫の悪性度の指標になり得る可能性が示された。今後糖脂質の変化についても分析を行う予定である。

（はじめに）
細胞悪性化に伴う脂質組成の変化についてはすでに多くの研究がみられるが（２）、脳腫瘍についてその変化を観察した報告は少ない。ヒト髄膜腫については、２２番染色体に癌抑制遺伝子の存在が報告され（３）、また２２番染色体のモノソミーが糖脂質ＧＤ３の発現と関係していることが報告されている（１）。我々もヒト髄膜腫、特に悪性髄膜腫の生化学的マーカーの検出を目指して研究を進めているが、今回、良性および悪性髄膜腫の脂質組成を比較したところ両者に著明な違いを認めた。
髄膜腫は、クモ膜の表層細胞より発生し、全脳腫瘍の約２０％を占める代表的良性腫瘍である。稀に（２－１０％）、組織学的悪性所見を示しｍａｌｉｇｎａｎｔ ｍｅｎｉｎｇｉｏｍａと呼ばれるが、組織学的に悪性所見がなくとも急速な発育、周囲組織への浸潤、遠隔転移などの悪性の臨床経過をとることがあり、悪性髄膜腫の診断基準は必ずしも明確ではない。

（材料および方法）
髄膜腫組織：
分析した髄膜腫は、手術時に摘出した組織を－７０℃に凍結保存したもので、組織学的には、ｍａｌｉｇｎａｎｔ４例、ｍｅｎｉｎｇｏｔｈｅｌｉｏｍａｔｏｕｓ２例、ｆｉｂｒｏｕｓ、ｈｅｍａｎｇｉｏｐｅｒｉｃｙｔｉｃ各１例であった。
総脂質の抽出：
腫瘍組織（８９－６７５ｍｇ）は、凍結乾燥し重量を測定後、クロロホルム－メタノールを用いて総脂質を抽出した。抽出液中の総遊離コレステロール含有量は、コレスタンを内部標準とし、ガスクロマトグラフィーで定量した。Ｌｉｐｉｄ－ｂｏｕｎｄ ｐｈｏｓｐｈｏｒｕｓ含有量は、Ｂａｒｔｌｅｔｔ法で定量した。
中性脂質の定量：
コレステロール、トリアシルグリセロール、遊離脂肪酸、コレステロールエステルは、ヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸（８０：３０：１）で展開後、酢酸銅－リン酸試薬で発色後、デンシトメーターで定量した。
リン脂質の定量：
ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、ホスファチジルコリン（ＰＣ）、スフィンゴミエリン（Ｓｐｈ）についても、クロロホルム、メタノール、水（６５：３５：８）で展開後、同様の方法で定量した。

（結果）
ヒト良性および悪性髄膜腫の中性脂質：
ヒト良性および悪性髄膜腫の中性脂質としては、図１に示すようにコレステロール、遊離脂肪酸、コレステロールエステルが検出された。遊離脂肪酸は、良性髄膜腫全例に含まれているのに対し、悪性髄膜腫では、ごく僅か、もしくは全く検出されなかった。それぞれの成分の濃度を乾燥組織重量当

りで比較すると（Ｔａｂｌｅ１）、遊離脂肪酸は、悪性髄膜腫では、１．９μｍｏｌｅ以下もしくは全く含有されないのに対し、良性髄膜腫では、１０．３－２７．１μｍｏｌｅであった。さらに遊離脂肪酸濃度が低い悪性髄膜腫において、コレステロールエステル含有量が相対的に高濃度であった。相補的に遊離脂肪酸濃度が高いと、コレステロールエステル濃度が低い傾向にあった。

ヒト良性および悪性髄膜腫のリン脂質：

リン脂質濃度は、良性と悪性の間で有意の差は認められなかった。その組成もＰＥ、ＰＣ、Ｓｐｈが主要成分として検出され、それぞれの成分の濃度に差はみられなかった。

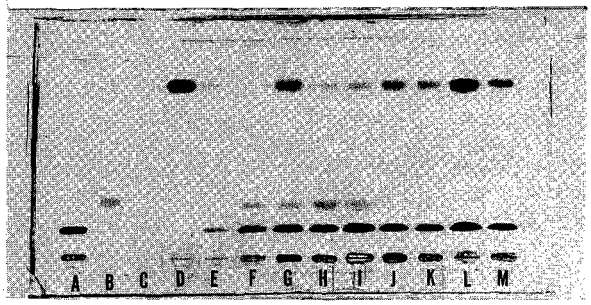


Fig. 1 Thin-layer chromatogram of crude lipids from meningiomas. A,cholesterol. B,oleic acid. C,triolein. D,cholesterol oleate. E,triolein plus cholesterol oleate. F to I,benign meningiomas. J to M,malignant meningiomas.

Table 1 Lipid compositions of human meningiomas with different malignancy. (μmole/g dry weight)

No.	Histological diagnosis	Lipid-bound phosphorus	Cholesterol	Free fatty acids	Cholesterol ester
1	Hemangiopericytic	98.5	28.3	27.1	1.0
2	Meningotheliomatois	55.8	27.3	11.9	12.6
3	Fibrous	39.1	28.2	16.5	2.7
4	Meningotheliomatous	39.2	26.6	10.3	3.3
5	Malignant	41.2	25.8	UD	9.5
6	Malignant	18.8	11.1	0.3	1.3
7	Malignant	35.2	23.8	UD	16.4
8	Malignant	81.0	29.7	1.9	12.7

UD,undetectable

（考察）

ヒト良性および悪性髄膜腫の生化学的相違点を明かにする目的で脂質組成を分析し遊離脂肪酸とコレステロールエステル含有量に違いがあることを見つけた。中枢神経系のコレステロールエステル合成酵素は、ミエリンのマーカーとして知られており、脱髄過程で生じた遊離脂肪酸を解毒すると考えられている。今回の結果も遊離脂肪酸とコレステロールエステルの濃度は相補的であり、遊離脂肪酸をエステル化して無毒化する合成経路が関与している可能性が考えられ、この酵素活性が悪性髄膜腫に比べ、良性髄膜腫では低いことが予想される。本酵素が特定の細胞膜に局在していると仮定すると良性と悪性髄膜腫をより明確に区別する生化学的指標として有用なマーカーになり得ると思われる。糖脂質および染色体についても解析を進め、両者の違いをより明確にしたいと考えている。

（文献）

（１）Ｆｒｅｄｍａｎｎ Ｐ．ｅｔ ａｌ （１９９０） Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．５５，１８３８－１８４０

（２）中村 治 他 （１９８７） 脳神経，３９，２２１－２２６

（３）Ｓｅｉｚｉｎｇｅｒ Ｂ．Ｒ．ｅｔ ａｌ （１９８７） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８４，５４１９－５４２３

229 癌患者の血清及び脳脊髄液中のペプチドC末端アミド化酵素活性

宮崎則幸1　植村富彦2　大倉久直3　野村和弘4
高山順5　渋井荘一郎4
精神研 1RI　2神経化学
国立癌センター 3内科 4脳外科 5小児科

〔要約〕
各種癌患者の血清及び脳脊髄液中のアミド化酵素（Peptidylglycine α-amidating monooxygenase）活性及び神経内分泌腫瘍や神経芽細胞腫のマーカーとされているニューロン特異性エノラーゼ（NSE）値を測定した。血清では、正常者の本酵素活性は、3．893±1．070 nmol／hr／mlであるのに対し、肺の腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌では約25%、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫等の神経原発腫瘍では、正常者より約40%高い活性値を示した。 その他の癌（肝臓癌、消化器癌、子宮癌）や非腫瘍性良性疾患では、正常者の活性とほぼ同程度であった。 脳脊髄液については、神経原発腫瘍及び癌の脳転移患者の検体を測定した結果、リンパ性白血病、横紋筋肉腫、脊索腫等の中胚葉由来の腫瘍で、本酵素活性は、正常値に比し高い値を示したのに対し、網膜芽細胞腫、悪性神経上皮腫、脳幹部神経膠腫、上咽頭癌等の外胚葉由来の腫瘍では、低値を示した。NSE濃度については、血清では肺の腺癌、網膜芽細胞腫に、また脳脊髄液については、網膜芽細胞腫に比較的高い値を示したが、血清及び脳脊髄液のいずれにおいても、アミド化酵素活性とNSE濃度レベルとの間の相関関係は見られなかった。以上の結果より、神経細胞由来の腫瘍では、血中に本酵素が遊離して来るものと考えられるが、脳脊髄液中には、腫瘍の局在性の為か、必ずしも遊離して来ないように思われる。

【緒言】 多くの生理活性ペプチドは、その前駆体蛋白よりプロセシングをうけて成熟する。ペプチドC末端アミド化酵素（Peptidyl-glycine α-amidating monooxygenase）はこのプロセシングに関与する酵素の一つで、グリシンに終わるペプチドのC末端をアミド化する。 本酵素のヒトでの組織分布は、視床下部、脳下垂体、大脳皮質の順に比活性が高く、腎臓、肝臓、膵臓、肺にはほとんどない（4）。 なお、血清中にも検出されている（2、4）。一方本酵素は、癌組織においても調べられており、Chromophobe pituitary tumorやPheochromocytomaの組織、Medullary thyroid carcinomaの組織やプラズマに本酵素の高い活性が報告されている（4）。 また、肺の小細胞癌の組織に、bombesinやphysalaemin様のC末端にアミド化構造を持つペプチドの存在が報告されている（1、3）。 以上の知見より、アミド化酵素活性が高いと推定される癌患者の血清及び脳脊髄液中の本酵素活性値と神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、及び肺の小細胞癌をはじめとする神経内分泌腫瘍の診断と治療効果のマーカーとして使用されているニューロン特異性エノラーゼ（NSE）濃度を測定し、両者に相関関係があるか否かを検討した。

【方法】 アミド化酵素活性の測定：^{125}I標識の合成D-Tyr-Val-Gly（^{125}I-D-Tyr-Val-Gly）を基質トレーサーとして、optimalな条件下、即ち、20μM硫酸銅、2mMアスコルビン酸、100μg／ml カタラーゼ、75mMトリス一塩酸緩衝液（pH7．5）、1nmol D-Tyr-Val-Glyに、血清（10μl）又は脳脊髄液（10μl）を加え3時間、37℃でincubate（反応容量50μl）し、Merck社製シリカゲルプレートによるThin-Layer-Chromatography（TLC）で基質（Rf＝0．75）と生成物（Rf＝0．49）を展開溶媒（Methanol／Dichloromethane／H_2O，80／15／5）で分離した後、プレートをラジオクロマトスキャナーにかけ、両者の放射活性を測り、基質から生成物への転換率を求めた（図1）（2）。
NSE濃度の測定： 栄研化学 社製キットを用いてラジオイムノアッセイにより測定した。 試料：検体は、国立癌センター病院の保存血清及び脳脊髄液（両者共－80℃で保存）を用いた。 試料の採取時期は、血清については、1988－1990年4月、脳脊髄液については、1990年6－9月に採取したものを用いた。

【結果】1．癌患者血清中のアミド化酵素活性
表1に示すように、正常者の活性値は3．893±1．070nmol／hr／mlであった。 肺の腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌では、いずれも標準偏差値は大きいが、正常者の活性値よりも約25%高くなっている。 以上の結果は、ボンベシンやフィサラミン様のC末端にアミド化構造を持つペプチドが、肺小細胞癌で活発に生成されていることを間接的に示唆している。 神経原発腫瘍では、検体数は少ないが、正常者の活性値よりも約40%高くなっている。 前立腺癌もやや高い傾向を示しているが、他の癌（肝臓、子宮、消化器癌）や良性疾患患者の血清では、正常者の活性とほぼ同じ値であった。
陽性率を正常者の活性値平均＋2SDで区切ると、肺の腺癌、扁平上皮癌、神経原発腫瘍である網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫で約30%が2SD以上であった。 すべてを含めた肺癌及び神経原発腫瘍で、10%の危険率で有意差があった。アミド化酵素活性とNSE値との間には、肺癌、神経原発腫瘍のいずれの場合も、相関関係は認められなたった。
2．癌患者の脳脊髄液中のアミド化酵素活性
我々は、現在正常者の脳脊髄液検体を得られぬ故、本酵素活性を測定していないので、Wand等の測定値、2．8nmol／hr／mg protein（5）を用い、原発性及び転移性脳腫瘍患者の活性値と比較した。
図2に示すように、脊索腫、リンパ性白血病、横紋筋腫、肺癌の各一例に正常者の場合より約2倍高い活性が見られた。 肺癌を除いた上記の腫瘍は、いずれも中胚葉由来である。網膜芽細胞腫、悪性神経上皮腫、脳幹部神経膠腫、上咽頭癌等の外胚葉由来の腫瘍では、アミド化酵素活性は、正常者の場合より15－50%程低かった。NSE濃度は、網膜芽細胞腫に比較的高い値が得られたが、今回の被検試料では、アミド化酵素活性とNSE値との相関関係は見られなかった。
【考察】以上の結果より、アミド化酵素活性が、ある種の脳腫瘍に特異的であるとは言えないが、リンパ性白血病、横紋筋肉腫、脊索腫等、中胚葉由来の腫瘍の脳転移患者の脳脊髄液で、本酵素活性が高い結果が得られた。これは、中胚葉由来腫瘍が

脳へ転移した場合、本酵素の存在する脳神経組織を広範囲に圧迫破壊する為、本酵素が脳脊髄液中へ浸出したのか、又は、中胚葉組織が腫瘍化した為に、その腫瘍内で本酵素活性の増大を来したのかは、今後明らかにせねばならない。一方、外胚葉由来の腫瘍や、神経原発腫瘍で、脳脊髄液中の本酵素活性が比較的低くかったことは、これらの腫瘍形成部位によっては、脳脊髄液中に酵素を浸出させるには至らないのか、又は、腫瘍内での本酵素の過剰産成がない為なのかは、今後の問題である。

【文献】(1) Lazarus, L. H. et al. (1983) Science 219, 79-81 (2) Miyazaki, N. & Uemura, T. (1991) Anal. Biochem. in press (3) Moody, T. W. et al. (1981) Science 214, 1246-1248 (4) Wand, G. S. et al. (1985) Metabolism, 34, 1044-1052 (5) Wand, G. S. et al. (1985) Neuroendocrinology 41, 482-489

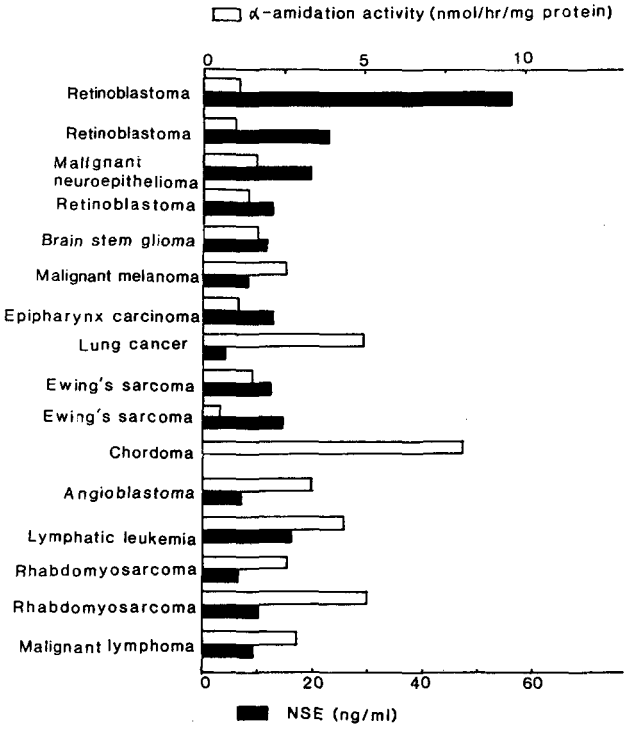
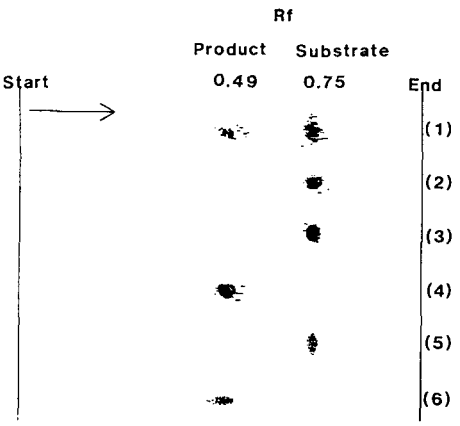


Fig.2 α-amidation activity and neuron specific enolase (NSE) level of cerebrospinal fluid from the patients with malignant tumors



TLC Solvent Methanol/Dichloromethane/Water (80/15/5)

Fig.1 Idetification of ^{125}I-D-Tyr-Val-Gly and ^{125}I-D-Tyr-Val-NH$_2$ on a TLC plate

Lane 1, fresh serum lane 2, boiled serum
lane 3, ^{125}I-D-Tyr-Val-Gly
lane 4, ^{125}I-D-Tyr-Val-NH$_2$
lane 5, D-Tyr-Val-Gly lane 6 D-Tyr-Val-NH$_2$

Table 1 Comparison of control and various disease serum α-amidation activity

	mean ± SD (pmol/hr/ml)	n	Positive rate 1SD %	Positive rate 2SD %	
Lung Cancer	4866	16	37.5	25.0	
Adeno ca.	4917	10	50.0	30.0	
Squamous cell ca.	4889	17	29.4	11.7	
Small cell ca.	4853	3	66.7	0	
Large cell ca.	4045	15	20.0	13.3	
No histology	(4695)	(61)	(31.1)	(14.8)	
(Total)	5719	6	50.0	33.3	p<0.05
Nerve Tumors	4798	2	50.0	0	
Retinoblastoma	5163	3	33.3	33.3	
Ganglion neuroma	(5400)	(11)	(45.5)	(27.3)	p<0.1
Neuroblastoma	4589	7	42.8	14.2	p<0.1
(Total)	3738	27	10.3	10.3	
Prostatic ca.	3232	11	0	0	p<0.1
Other ca.	3893	35	5.7	2.8	
Benign diseases	1070				
Healthy control					

230 Glycine prodrug milacemideのラットCSFアミノ酸におよぼす影響

仙波純一、P. N. Patsalos*
(東京医科歯科大学、精神科、*Institute of Neurology, London)

〔要約〕

グリシンのprodrugと期待されている milacemide (100, 200, 400 mg/kg) をラットに腹腔内投与し、経時的にCSFと血液を無麻酔無拘束のもとに採取し、CSFからはグリシンを含むアミノ酸を測定した。Milacemide 投与によりCSF中のグリシンは用量依存的に増加し、セリンやタウリンも高用量で軽度の増加を示した。GABA・スレオニン・グルタミンなどには変化がみられなかった。以上の結果から、milacemide は血液脳関門を通過し、脳内でグリシンに代謝されてグリシン濃度を増加させることが示された。

Milacemide (2-n-pentylaminoacetamide)は、モノアミン酸化酵素によってglycinamide、続いてグリシンに代謝されることが in vitro の実験で確認されている(1)。Glycinamide とグリシンはいずれも血液脳関門を通過しにくいので、milacemide はグリシンのprodrugと期待される。Milacemide の臨床治験では抗けいれん作用・抗ミオクローヌス作用あるいは抗痴呆作用などが推測されている。さて In vivo の実験ではMilacemide投与後にラット脳内のいくつかの部位でグリシンの濃度が増加しているという報告はあるが (2, 3)、経時的に脳脊髄液（CSF）中のグリシンを含むアミノ酸濃度の変化を検討した報告はみられない。今回の研究では、単一のラットにCSFと血液のカテーテルを同時に留置して無麻酔無拘束の状態で経時的にサンプルを採取する方法を開発し、milacemide投与後のCSF中の各種アミノ酸濃度の変化を検討した。（CSFと血液中のmilacemideとその代謝物の薬物動態は他に発表の予定である。）

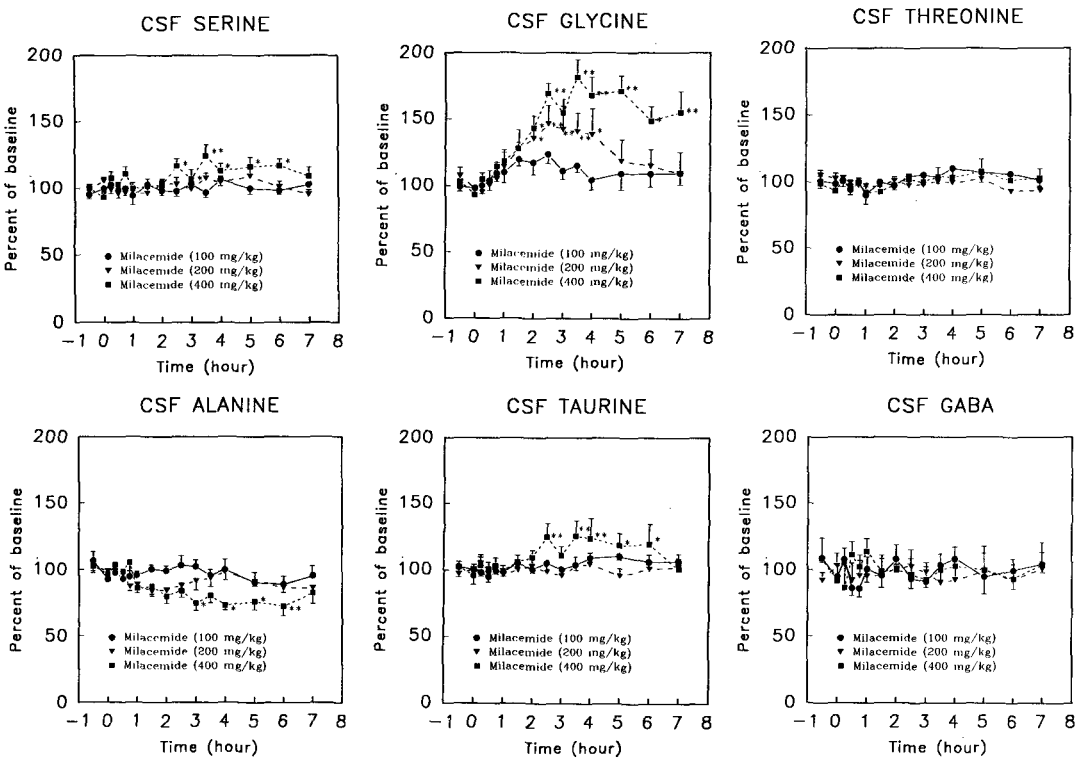
【方法】

体重250-300 g のSprague-Dawley系オスラットを用いた。Pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) で麻酔後、左頸部を切開し左頸静脈にシリコンチューブを留置した。チューブの一方は頸部から左耳介まで皮下を通し皮膚から約2 cm体外に出し、ヘパリンで内部を満たした。CSFカテーテルはSarnaら(4)の方法により、Cisterna magnaに小さなポリエチレンチューブを留置した。この手術３日後に milacemideを腹腔内にそれぞれ 100, 200, 400 mg/kg投与した。投与前基礎値として、少なくとも３回以上３０分ごとCSF(30 μl)と血液 (200 μl)を採取し、投与後は図に示すように８時間後まで行った。アミノ酸の測定はTurnell & Cooper (5)による高速液体クロマトグラフィー法を用いた。すなわち、2.5 μl のCSFに10 μl の内部標準(homoserine)と 10 μl の o-phtalaldehydeを加え、１分後にクロマトグラフに注入した。使用したシステムはGilson社製302型ポンプ、自動注入装置、Kratos社製の蛍光検出器(excitation 340 nm, emission 418 nm)からなり、カラムは Microsorb C18 (Rainin社製, 4.6 mm x 15 cm)であった。測定したアミノ酸はグルタミン・セリン・グリシン・スレオニン・タウリン・アラニン・GABAである。経時的なデータは投与量ごとに一元の分散分析を行い、有意差のある場合は、それぞれの基礎値に対して各時点でのLSDの多重比較を行った。

【結果】

CSF中のアミノ酸の値は個体ごとの変異が大きいので、投与前２回のサンプルの平均値を基礎値とし、それからの％で表示した。図に示すように、CSFのグリシンは用量依存的に増加していた。またセリンとタウリンは

400 mg/kg の高用量の時にのみ20-30% の増加がみられた。これに反して、アラニンは高用量で-25%の減少を示した。グルタミン・スレオニン・GABAなどは有意な変化を示さなかった。



【考察】

Milacemide 投与後に脳ホモジネートのアミノ酸を測定した報告(2, 3, 6)では、脳のいくつかの部位でのグリシンの増加が示されている。ＣＳＦ中のグリシンの増加はこれらの結果を支持するものである。またセリンの軽度の上昇はグリシンの代謝亢進によるものと考えられる。しかしタウリンの上昇とアラニンの減少はグリシンの代謝経路とは直接関係せず、その機序は不明である。おそらく、アミノ酸代謝はそれぞれ複雑な経路をとることなどから、グリシンの増加による二次的な変化であろうと推察される。Janssens de Varebeke (7) らは milacemide投与後、ラットの黒質でGABAの増加を観察しているが、ＣＳＦ中のGABAの増加はみられなかった。ＣＳＦのGABAは多くは線条体に由来すると思われ、黒質GABAの寄与は少ないためと考えられる。

以上の研究はＣＳＦ中のグリシンを測定したものであり、実際に神経伝達物質として働いているグリシンの変化を直接に示すものではないが、milacemide はグリシンの prodrug としての条件を満たしていることが示された。

【文献】

(1) Janssens de Varebeke, P. et al. (1988) J. Neurochem. 50, 1011-1016 (2) Chapman, A.G. and Hart, G.P. (1988) J. Neural. Transm. 72, 201-212 (3) Truong, D.D. et al. (1988) Movement Disord. 3, 77-87 (4) Sarna, G.S. et al. (1983) J. Neurochem. 40, 383-388 (5) Turnell, D.C. and Cooper, J.D.H. (1982) Clin. Chem. 28, 527-531 (6) Christophe, J. et al. (1983) J. Neurochem. 40, 383-388. (7) Janssens de Varebeke, P. et al. (1983) Biochem. Pharmacol. 32, 2751-2756

231 神経変性疾患患者脊髄のアミノ酸およびタンパク分画の検索

藤田公和・安藤正人・田丸政男・永田　豊・本多虔夫＊
（藤田保健衛生大学・医学部・生理、＊横浜市民病院）

[要約]　筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の死後摘出した頸髄標本の遊離アミノ酸含量を測定し、非神経疾患で死亡した患者の頸髄標本と比較した結果、ALS患者頸髄では対照頸髄と比較してAspとGlu含量が有意に減少していた。同じ脊髄標本よりタンパクを可溶化し、二次元アクリルアミドゲル電気泳動法を用いてタンパク分画を行ない、この神経疾患に特徴的なタンパクの検出を試みた。ALS患者脊髄標本のタンパクパターンでは、分子量約45kD付近のタンパクが酸性領域でpIの異なる数個のサブスポットに分離して出現する特徴的な分画像が得られた。したがってALSでは、脊髄内遊離アミノ酸含量の変動と関連した特異なタンパク分子が、組織内に蓄積している可能性が考えられる。またALSと類似した、より増強されたタンパクパターンが他の神経変性疾患患者の脊髄でも観察された。

[目的]　筋萎縮性側索硬化症(ALS)は主として運動ニューロンを侵す原因不明の進行性変性疾患である。既に、Nagataら[2]はALS患者脊髄前角でアセチルコリン合成酵素(ChAT)活性が有意に減少することを報告しており、この疾患は第二次運動ニューロンが選択的に破壊されていることを生化学的にも示した。一方、この神経疾患の病理組織標本では脊髄側索部に著明な神経線維変性が観察される。そのため我々はALS患者の死後摘出・凍結した頸髄横断標本を用いて、第一次運動ニューロンの神経伝達物質と推定される遊離アミノ酸含量を測定した[1]。その結果、ALS患者の頸髄内アスパラギン酸（Asp）およびグルタミン酸（Glu）含量は、非神経疾患の患者のものと比較して有意に減少する傾向が見られた。今回我々は、ALS患者と非神経疾患患者脊髄より可溶化したタンパク分画を比較して、この疾患の神経変性に特徴的なタンパクの検出を試みた。同時に、他の2種の神経変性疾患の患者脊髄についても同様の検索を行った。

[実験材料と方法] 非神経変性疾患(CONT)(3例)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)(4例)、パーキンソン病(PK)(1例)および慢性再発性ニューロパチー(NP)(1例)患者の死後3～14.5時間で脊髄(頸髄、胸髄および腰髄)を摘出し、-80° Cに凍結した。この凍結脊髄をドライアイス上で厚さ数mmに横断して、それぞれ前索、側索、後索、前角および後角の5部位に組織片を分割した。①遊離アミノ酸含量の測定：脊髄組織中の遊離アミノ酸含量の測定は、70% ethanol中で脊髄組織片を磨細して除蛋白した後、その抽出液を風乾してさらに緩衝液に融解させたものをアミノ酸自動分析機（日立835型)を用いて分離・定量した。②タンパク分画の二次元電気泳動法：各脊髄組織片(3mg-w.w.)は微小ガラス-ガラスホモジェナイザーを用いてSDS、β-mercaptoethanol、Nonidet P-40およびureaを含むgel buffer中で磨砕・可溶化した。可溶化したホモジェネートは、さらに遠心分離(1,000g X 10 min)した後、既報[7]に従って二次元電気泳動法(pI 4.5-8.5; MW 20-200 kD)でその上清タンパク分画の分離解析を実施した。

[結果と考察]　①ALS患者頸髄では非神経疾患患者標本と比較して、側索部のみならず前角（前索）、後角および後索の何れの部位でも興奮性アミノ酸であるAspとGlu含量が有意に減少した。一方Gly, TauおよびGABA含量は両者の間に大きな変動は観察されなかった(表1)。このような結果はPlaitakisら[6]、Perryら[4]の報告と一致している。しかし、ALS患者の脊髄横断面組織像では、主として脊髄側索部の著明な神経変性が観察されるが、GluおよびAsp含量の減少は脊髄側索の変性部以外でも観察された。この要因としては、最初第一次運動ニューロンの変性が生じ、その後疾患の進行に伴って他の神経線維も変性していくためと推測される。　一方、初期段階のALS患者血液中でアミノ酸含量の変動が見られたという報告[3,5]がされてはいるものの,脊髄内の遊離アミノ酸の代謝経路については未だ確定的な結論は得られていない。②そこで今回我々は、脊髄ニューロンおよび軸索の変性・脱落に伴って、脊髄内に特異な変性タンパク分解産物の蓄積の可能性について検討した(図1)。　対照脊髄の泳動所見では、頸髄、胸髄および腰髄の何れのレベルの横断切片から得られた前索、側索、後索、前角および後角の5部位間でタンパクパターンの量的および質的な差異は認められなかった(当日発表)。一方、ALS患者脊髄標本のタンパクパターンでは、分子量約45kD付近のタンパクが酸性領域でpIを異にする数個のサブスポットに分離して出現する特徴的な分画像が見られた(⌐ 領域)。さらにこの特徴的なタンパク分画の変化は、脊髄の何れのレベル(頸、胸および腰髄)の横断切片標本(5部位)でもほぼ同様に出現していることが示された。　上記のように、ALS患者脊髄組織中の遊離アミノ酸レベルは形態変化が認められる側索のみならず全ての同一横断部位でも有意に減少していることが明確となっている。従って今回の泳動所見で示されたように、ALS脊髄のタンパク分画パターンに出現した特徴的なサブスポットは、脊髄組織内で作用していると考えられるアミノ酸伝達候補物質(Glu あるいは Asp)の減少によって生じた構成タンパク質の性質の変化に基づくものかもしれない。
そこで、他の神経変性疾患のPKおよびNP患者から得られた脊髄標本のタンパク分画を同様に解析したところ、ALSで示されたと同一のタンパクスポットの挙動が両疾患標本でも見られた。さらに、興味あることにはPKとNP標本ではALS標本と比較して、これらスポットのタンパク量の著明な増大が確認された。このように、ALSのみならずPKおよびNP患者の脊髄標本でも異常な分子量を持つタンパクの出現を示す同様の泳動変化が認められたことから、これらのタンパクの性質についてさらに検討を加える必要がある。

[文献] (1)藤田ら(1990)神経化学29.214-215. (2)Nagata et al(1982)Brain Res.224.223-229. (3)Patten et al(1978)Ann Neurol,3.305-309. (4)Perry et al(1987)Neurology,37.1845-1848. (5)Plaitalis et al(1984)Ann Neurol,15.144-153. (6)Plaitakis et al(1988)Ann Neurol,24.446-449. (7)Stone and Hammerschlag (1981) Cell. Mol. Neurobiol. 1: 3-17.

表1　ALS患者および非患者頸髄内遊離アミノ酸含量(μmoles/g-wet weight)

	Asp	Glu	Gly	GABA	Tau
前角	0.93±0.09	4.32±0.28	2.57±0.53	0.60±0.07	2.50±0.22
＋	**0.39±0.21****	**2.16±0.81****	**1.55±0.56**	**0.39±0.11**	**2.61±0.14**
前索					
側索	0.87±0.21	3.36±0.19	1.66±0.50	0.25±0.06	2.39±0.05
	0.41±0.14*	***2.02±0.49****	***1.39±0.35***	***0.18±0.01***	***2.66±0.17***
後角	1.22±0.12	4.44±0.17	1.19±0.44	0.53±0.13	2.31±0.31
	0.55±0.19*	***2.49±0.60****	***1.49±0.48***	***0.43±0.07***	***2.86±0.29***
後索	1.23±0.21	3.83±0.34	1.45±0.44	0.21±0.08	2.37±0.33
	0.48±0.13**	**2.43±0.86***	**1.29±0.60**	**0.13±0.02**	**2.71±0.44**

それぞれの数値は平均値±標準偏差、上段は非ALS患者例(N=3)下段はALS患者例(N=4)の遊離アミノ酸含量を示す。　* P<0.05　** P<0.01

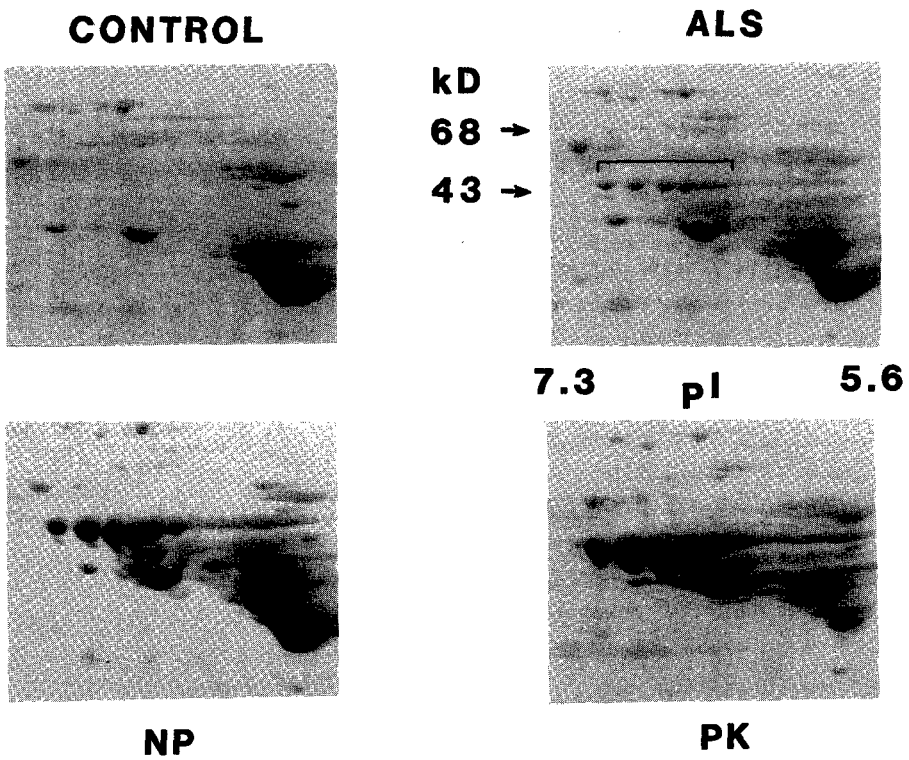


図1　非神経変性疾患(CONTROL)、ALS、パーキンソン(PK)および慢性再発性ニューロパチー(NP)患者頸髄のタンパク分画二次元電気泳動像

232 慢性分裂病死後脳におけるストリキニーネ非感受性グリシン結合部位に関する研究

石丸昌彦、車地暁生、融　道男
東京医科歯科大学医学部神経精神医学教室

〔要約〕

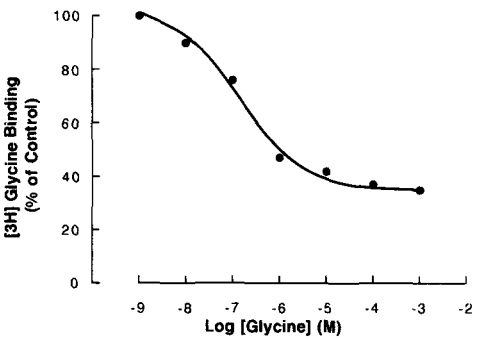
慢性分裂病死後脳の膜標品を用い、ストリキニーネ非感受性グリシン結合部位に関して、[3H]グリシンをリガンドとした受容体結合実験を行った。ストリキニーネ非感受性[3H]グリシン結合部位は、Scatchard 解析によって単一の結合部位であることが示された（Kd＝109 nM, Bmax＝222 fmol/mg prot.）。分裂病死後脳の特異的[3H]グリシン結合数（50nM）を前頭前野４部位と海馬３部位で測定したところ、海馬 CA1-3領域において対照群と比較して有意な増加が見られた。この結果から、精神分裂病の海馬において、ストリキニーネ非感受性グリシン結合部位が変化している可能性が示唆された。

N-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体の非競合的アンタゴニストである phencyclidine（PCP）が精神分裂病に酷似した症状を惹起することなどから、NMDA受容体を介した神経伝達と精神分裂病の病態との関係が注目されている。また、NMDAによる電気生理学的作用がグリシンによって強力に増強されることが報告され(2)、この作用はNMDA受容体にカップルしたストリキニーネ非感受性グリシン結合部位を介したものであると考えられている(1)。従って、ストリキニーネ非感受性グリシン結合部位は、NMDA受容体を介した神経伝達に対する重要な調節機構に与るものと考えられ、同結合部位が精神分裂病の病態に関与している可能性が示唆されるとともに、同結合部位に作用する分裂病治療薬の開発も期待されている。本実験では[3H]グリシンをリガンドとして用い、分裂病死後脳の大脳皮質及び海馬において、ストリキニーネ非感受性グリシン結合部位に対する受容体結合実験を行った。

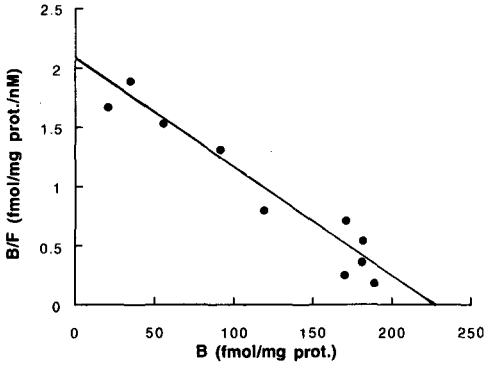
［実験方法］分裂病群は 5～12例、対照群は 7～10例で、死亡年齢・死後凍結時間について両群間に差はなかった(4)。４倍容の 0.32M の sucrose 中に－80℃で凍結保存されていた脳 homogenate を室温で融解し、約50倍容の50mM Tris/acetate buffer（pH 7.4, 4℃）中でポリトロンを用いて homogenize した後、遠心分離を行った（18,000 rpm, 30 min.）。同様の遠心分離操作を２回行った後、脳膜標品を0.2% Triton-X 100と氷冷下で10分間反応させ、さらに同上の遠心分離操作を３回行い、以下の結合実験に用いた。すなわち膜標品を 100μM strychnineを含む 50mM Tris/acetate buffer（pH 7.4, 2℃）中で、[3H]glycine（NEN, 45.0 Ci/mmol）と 2℃で20分間反応させた。結合反応は Whatman GF/B グラスフィルター上で 吸引濾過により停止させた。非特異結合は 1mM グリシン存在下の結合実験によって求めた(3)。統計学的解析には Mann-Whitney U検定を用いた。

［結果］100μM strychnine を含む 50mM Tris/acetate buffer 中での[3H]glycine 特異結合は、0.2% Triton-X 100 処理によって約60%の増加を示し、２℃において約20分で飽和に達した。また Scatchard 解析によって、同結合部位は単一の結合部位であることが示された（Kd＝109 nM, Bmax＝222 fmol/mg prot. → Fig.2）。

さらに50nM [3H]グリシンを用いた結合実験では、分裂病群は海馬CA1-3 で対照群と比較して統計学的に有意な増加を示したが、他の領域では有意な変化は見られなかった（Table 1）。



(Fig.1)



(Fig.2)

Table 1. 精神分裂病死後脳における[3H]glycine結合

	対照群	分裂病群
Prefrontal cortex		
Medial frontal cortex	43.9 ± 5.4 (n=10)	53.7 ± 3.6 (n=12)
Orbitofrontal cortex	38.9 ± 1.6 (n= 7)	44.7 ± 2.4 (n=10)
Eye-movement area	28.1 ± 2.2 (n= 7)	27.7 ± 1.6 (n=10)
Orbital cortex	87.4 ±16.7 (n= 8)	82.6 ± 7.5 (n=11)
Hippocampal region		
CA1-3	53.7 ± 1.7 (n= 9)	100.0 ±20.2*(n= 5)
subiculum	67.4 ± 4.3 (n= 9)	84.3 ±17.4 (n= 7)
posterior portion	53.6 ± 4.7 (n= 8)	58.7 ± 6.0 (n= 7)

Values are presented as mean ± SEM.

* $P<0.01$

[考察] ラット脳において、ストリキニーネ非感受性[3H]グリシン結合は単一の結合部位を示すことが報告されているが、ヒト死後脳の大脳皮質を用いた実験でも同様の結果が得られた。慢性分裂病死後脳におけるストリキニーネ非感受性[3H]グリシン結合は、海馬 CA1-3 で対照群に比べて統計学的に有意な増加を示した。他の６部位では有意な差はなかったが、Eye-mevement areaとOrbital cortexを除く４部位で分裂病群に増加の傾向が認められた。以上の結果は、ヒト脳に単一親和性のストリキニーネ非感受性グリシン結合部位が存在することを示すとともに、同結合部位が慢性分裂病において変化している可能性を示唆するものである。

[文献]

(1) Huettner,J.E. Biochemical Pharmacology(41)1991:9-16

(2) Johnson,J.W. & Ascher,P. Nature(325)1987:529-531

(3) Ogita,K. Suzuki,T. and Yoneda,Y. Neuropharmacology(28)1989:1263-1270

(4) Toru,M. et al. Acta Psychiatr. Scand.(78)1988:121-137

233 精神分裂病死後脳のグリシン及びセリン含量の測定

渡辺明子、熊代　新、車地暁生、融　道男
東京医科歯科大学神経精神医学教室

〔要約〕

精神分裂病死後脳の大脳皮質15部位において、グリシン及びセリン含量を、高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。脳ホモジェネートは、過塩素酸で除タンパクした後、アミノ酸を dabsyl 化し、その誘導体を可視分光検出器で検出した。グリシン含量は内側前頭皮質、眼窩前頭皮質および第二次視覚領野において、分裂病群がコントロール群に比べて有意に増加しており、セリン含量も同様に増加傾向が認められ、眼窩前頭皮質においては、その変化が有意であった。しかしながら、グリシンおよびセリン含量は、その他の脳部位では、分裂病群とコントロール群の間に変化は見られなかった。また今回測定したいずれの脳部位においても、グリシン含量とセリン含量の間に強い正の相関が認められた。以上の結果から、精神分裂病の前頭前野や後頭葉皮質において、グリシンとセリンの代謝に何らかの異常が存在し、この異常が精神分裂病の病態生理に関与している可能性が考えられる。

NMDA レセプターのアンタゴニストであるフェンシクルジンが精神分裂病に酷似した精神症状を引き起こすことから、精神分裂病の病態と NMDA レセプターを介した興奮性アミノ酸の神経伝達の異常との関連が注目されている。この NMDA レセプターはイオンチャンネルやポリアミン結合部位だけでなく、グリシン結合部位を含む複合体から成っていることが知られている。脳内のグリシンは、セリンが serine hydroxymethyl trasferase によって脱メチル化されることによって合成される。本研究では、精神分裂病死後脳の前頭前野（４部位）、頭頂葉（４部位）、側頭葉（５部位）および後頭葉（２部位）のグリシンおよびセリン含量を、高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。今回用いたアミノ酸分析はDabsyl Chlorideによるアミノ酸のプレカラム誘導体化による逆相クロマトグラフィー法である。この方法では、導体化が容易であり、その誘導体も極めて安定であること、しかも分析が極めて高感度で、短時間であることなどの利点がある。

【方法】

(1)脳のホモジェナイズと除蛋白：４倍容の0.32 M sucrose中で保存されていた脳ホモジェネートに 0.4 N 過塩素酸を加え除蛋白し、遠沈して得られた上清に2 M $KHCO_3$ を加え中和した。遠沈して得られた上清を最終的に湿重量の16倍ないし32倍に希釈したものをサンプルとし、分析に使用するまで -80 ℃で保存した。

(2) Dabsylation (1):20 μlのサンプルをキャップ付きのガラスチューブに入れ、50 mM Na_2HCO_3を20 μl加え、4 nmol/μl のdimetylamino-azobenzen sulphonyl chloride (DABS-Cl) acetonitrile溶液 80μlを入れ、70 ℃で 12 min 反応させ赤褐色のaminochromを生成した。反応後20% acetic acid を入れてtotal 500μlとし、そのうち20-40μlをHPLCに注入した。この最終生成物は室温で1カ月、4℃で3カ月は安定である(2)。

(3)アミノ酸分析： 試薬：standard amino acid はCiba-Geigy社製のAmino Chrom Kitを使用した。DBS-Clは Nacalai Tesque社製をアセトンで2回精製した。反応のためのガラスチューブはシリコナイズしたものを用いた。

ＨＰＬＣ： ポンプおよびデガッサーは日本分光社製のTRITOTAR VI, DG-3510を使用した。可視分光検出器は相馬光学社製のS/3250を用い，波長 436 nmの吸光度を検出した。カラムはアミノクローム用逆相 CCD column

(Ciba-Geigy社製)を使用した。カラム温度は40 ℃、流速 1 ml/minで行った。グラジェントプログラムは日本分光の分析systemに準じ、 移動相A：25 mM 酢酸緩衝液(pH 6.4) 4% N,N-dimethylformamide 、移動相B：アセトニトリルを用い、1サイクル60分で行った。

表 1. 前頭前野と後頭葉におけるグリシンおよびセリン含量

	GLYCINE (nmol/mg prot)(n)	SERINE (nmol/mg prot)(n)
PREFRONTAL CORTEX		
Medial frontal cortex	C 19.2 ± 2.2 (9) S 24.8 ± 1.5 (10)*	C 9.1 ± 1.3 (9) S 11.5 ± 0.9 (10)
Orbitofrontal cortex	C 27.6 ± 1.8 (7) S 38.2 ± 2.2 (12)**	C 10.2 ± 0.6 (6) S 14.6 ± 0.9 (12)**
Eye-movement area	C 12.7 ± 1.1 (9) S 12.6 ± 1.0 (12)	C 5.4 ± 0.5 (9) S 4.8 ± 0.4 (12)
Orbital cortex	C 19.0 ± 1.4 (7) S 18.9 ± 1.8 (6)	C 5.0 ± 0.5 (7) S 5.5 ± 0.9 (6)
OCCIPITAL CORTEX		
Primary visual area	C 13.6 ± 2.1 (7) S 18.7 ± 2.3 (11)	C 5.1 ± 0.8 (7) S 6.1 ± 0.8 (11)
Secondary visual area	C 10.3 ± 1.2 (9) S 14.3 ± 1.3 (11)*	C 3.3 ± 0.4 (9) S 4.5 ± 0.5 (10)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ C vs S C : Controls, S : Schizophrenics

【結果と考察】

内側前頭皮質、眼窩前頭皮質および第二次視覚領野において、グリシン含量は分裂病群がコントロール群において統計学的に有意に増加しており、セリン含量も同様に増加傾向がみられ、眼窩前頭皮質においては、その変化が統計学的に有意であった（表1）。しかしながら、その他の脳部位では、分裂病群のグリシンおよびセリン含量は、コントロール群に比べて変化していなかった。またいずれの脳部位でもグリシン含量とセリン含量の間に強い正の相関が認められた。

以上の結果から、精神分裂病死後脳の限局した脳部位でグリシン及びセリン含量の増大が存在することから、精神分裂病ではこの二つのアミノ酸の代謝異常が存在する可能性が考えられる。 Warizi ら(3)は精神分裂病の側頭葉においてグリシン及びセリン含量が増加し serine hydroxymethyl transferase の Km 値が増大していたが、前頭葉においてはこれらの変化は認められなかったと報告している。本研究においてもグリシンおよびセリン含量が変化していた脳部位は異なっていたが、同様の変化が認められた。グリシンは NMDA レセプターを介して興奮性アミノ酸の神経伝達を調節することが知られており、今回得られた結果は精神分裂病で想定されている興奮性アミノ酸神経伝達の異常に関与している可能性がある。

謝辞 技術的助言を頂いた日本分光工業ＬＣ応用開発課の近藤氏に感謝いたします。

【文献】

1) Chang J-Y., Martin P., Bernasconi M.R. and Braun D.G. FEBS Lett. 132 (1981) 117-120

2) Knecht Rene. and Chang J-Y. Anal. Chem. 58(1986) 2375-2379

3) Waziri R. et al. Neuroscience Lett. 120 (1990) 237-240

234 精神分裂病死後脳のコレシストキニン受容体とシグマ受容体

澁谷治男、森博史、融道男
（東京医科歯科大学、医学部、神経精神科）

〔要約〕

精神分裂病脳１２例、対照脳１０例についてコレシストキニン（CCK）受容体およびシグマ受容体を測定した。CCK受容体は^{3}H-CCK-8をリガンドとして大脳皮質および大脳辺縁系の２６部位について測定した結果、分裂病服薬群で海馬支脚と扁桃体の一部で受容体結合量の増加を、また頭頂葉感覚領野では有意な低下を認めた。このようなCCK受容体の変化は、分裂病のCCK免疫活性の変化が主に大脳辺縁系で生ずる事と関連している可能性がある。シグマ受容体は^{3}H-1,3-di-o-tolylguanidine(DTG)をリガンドとして、大脳皮質１７部位について測定した。シグマ受容体結合量は分裂病群の頭頂葉上頭頂小葉および楔前部皮質においてのみ有意な増加を認めたが、その他の脳部位では分裂病群と対照群、分裂病の服薬群と非服薬群の間に明らかな差異は検出されず、シグマ受容体の分裂病の病態への関与は乏しいと考えられる。

精神分裂病は感情や意欲の障害、思考や認知の障害、意志発動性の障害など多彩な症状を示し、今日責任脳部位を限定する事は困難なようにも見える。それ故当面は分裂病脳の生化学的分析に際しては、広範な脳部位を対象に、抗分裂薬と機能的に関連を有する脳内物質について検索を進める事が必要であろう。我々はさきに分裂病脳側頭葉皮質のCCK受容体および前頭前野皮質のシグマ受容体について報告したが（２、３）、その後、さらに分析を進めてCCK受容体について２６部位、シグマ受容体は１７部位について測定したので報告する。

［対象と方法］

精神分裂病脳は１２例で、男６例、女５例、死亡時平均年齢６０．４歳。ＤＳＭ－III,による病型分類は解体型６、緊張型１、妄想型１、分類不能型４。死亡直前に４０日間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。以下に記述する脳部位について粗膜分画を作製し受容体結合量を測定した。前頭葉皮質は内側前頭皮質（Brodmannの領野９、１０、４６）、眼球運動領野（領野８）、眼窩前頭皮質（領野４５、４７）、眼窩皮質（領野１１、１２）、前運動領野（領野６）、　運動領野（領野４）、Broca皮質（領野４４）に分けた。側頭葉皮質は外側後頭側頭回（Brodmannの領野３６、２０の一部）、中および下側頭回（領野２０、２１）、上側頭回,（領野２２、３８、４１、４２、５２）および側頭葉後部（領野３７を測定した。頭頂葉皮質は縁上回（領野４０）、角回（領野３９）、帯状回後部（領野２３、２６、２９、３０、３１）、上頭頂小葉および楔小葉前部（領野５、７、３１）、感覚領野（領野１、２、３、５、４３）に分け、後頭葉皮質は第１次視覚領野（領野１７）と第２、３次視覚領野（領野１８、１９）に分けた。大脳辺縁系については海馬は歯状回、アンモン角、海馬支脚、海馬後部の４部位に分け、扁桃体は基底外側核群と基底内側核群および中心核の３部位を測定した。梨状葉皮質は前部と後部に分けて測定した。CCK受容体結合量の測定は^{3}H-CCK-8を用い、BSA、BacitracinおよびEGTAを含む20mM,HEPES緩衝液(pH7.4）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。

シグマ受容体の測定は^{3}H-DTGをリガンドとして用いて、10^{-6}Mグルタミン酸存在下で0.05Mトリス緩衝液(pH7.4)中

で25°C90分間反応させた。デイスプレーサーには10^{-5}Mハロペリドールを用いた。統計処理はMann-Whitneyの U一検定（両側）を用いP<0.05以下を有意とした。

[結果]

^{3}H-CCK-8結合量は年齢、死後凍結までの時間、凍結保存期間との間に相関を認めない。男女間および左右半球間でも有意な差異はない。大脳皮質の^{3}H-CCK-8結合量は6.8から20.0,fmol/mg,proteinであり比較的側頭葉皮質で高い傾向を認めた。一般的には分裂病群と対照群の間に明らかな差異は認めず、頭頂葉の感覚領野でのみ分裂病服薬群で有意に低下していた。大脳辺縁系の^{3}H-CCK-8結合量は海馬で少なく扁桃体、梨状葉皮質では高い値を示した。分裂病服薬群では対照に比較して海馬支脚、扁桃体基底外側核群で有意な増加をみとめた。服薬群と非服薬群を比較すると概して測定した全脳部位で服薬群の^{3}H-CCK-8結合量が高い傾向があった。

^{3}H-DTG結合量は一般に前頭前野皮質で低く、頭頂葉、側頭葉皮質で高値を示した。上頭頂小葉および楔小葉前部皮質でのみ分裂病群で有意に高い結合量を見たが、その他の大脳皮質のシグマ受容体結合量は対照群との間に差異がなかった。分裂病群の服薬群、非服薬群を比べてもシグマ受容体結合量に明らかな差異を認めなかった。

[考察]

今回測定に用いた脳標品については既にCCK免疫活性を測定し報告した（４）。CCK-8免疫活性は分裂病脳で増加傾向があり、CCK-33免疫活性は減少傾向を示した。特に、大脳辺縁系の諸部位および眼窩前頭皮質、前運動領野、外側後頭側頭回で有意に減少していた。Farmeryらは（１）分裂病の前頭葉皮質や海馬のCCK受容体が減少していると報告しているが、我々はこれらの脳部位でCCK受容体結合量の低下は検出できなかった。むしろ服薬群の海馬支脚では結合量の増加を認め、これはCCK-33免疫活性と逆相関を示した。分裂病群の扁桃体ではCCK-33免疫活性は低く、それ故CCK-8/CCK-33の比は増加し、この比とCCK受
容体結合量は有意な正の相関関係を示した。我々はこれらの所見を分裂病脳におけるCCK作動系の機能低下を示唆するものと考えているが、真にCCK機能状態を知るためにはCCK生合成系の検討が必要である。

大脳皮質におけるｼｸﾞﾏ受容体の分布は均一ではなく、前頭葉皮質で少なく後方に行くに従い増え、側頭葉、頭頂葉で豊富であるという所見を示した。多くの抗分裂病薬がｼｸﾞﾏ受容体に高い親和性を有する事から、分裂病や抗分裂病薬の薬理作用にｼｸﾞﾏ受容体が関与している可能性がある。今回の測定では上頭頂小葉および楔前部においてのみ、軽度のしかし有意な増加を検出した。しかしながらその他の脳部位では分裂病群と対照群の間に明らかな差異がなく、また分裂病の服薬群と非服薬群を比較してもシグマ受容体結合量に差がない。シグマ受容体は直接的には分裂病の成因に関与していないと推察される。

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および実験に協力していただいた林菜海子、橋本千津子、鳥飼みちよ、国嶋千代子さんに感謝します。

[文献]

1 Farmery,S.M., Owen,P., Poulrer,M. and Crow,T.J. (1985), Life,Sci., 36, 473-477

2 澁谷治男、熊代新、森博史、融道男、(1990), 神経化学、29,422-423

3 森博史、澁谷治男、高橋良、（1989）、神経化学、28,,476-477

4 澁谷治男、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

235 精神分裂病者の血清インターロイキン-6（ＩＬ－6）濃度

新谷　太*、神庭　重信*、丸尾　直子**、中木　敏夫***、
丹生谷　正史*、鈴木　映二*、木下　徳久*、八木　剛平*

*：慶応義塾大学医学部　精神神経科学教室
**：東ソー株式会社　研究本部　生物工学研究所　第二研究室
***：慶応義塾大学医学部　薬理学教室

〔要約〕

身体疾患、特に炎症性疾患を有さない精神分裂病患者９０人と精神疾患の既往のない健常者９０人の血清ＩＬ－６の濃度をＥＬＩＳＡを用いて測定した。全対象者において同時に測定された血清ＣＲＰ値、血清ＩｇＧ値、白血球数およびその分画は正常範囲内であったにもかかわらず、８人の精神分裂病者が血清ＩＬ－６の明らかな高値を示した。これら８人の患者における病型、罹病期間、薬物投与量、家族歴、既往歴には特徴的な所見はなかった。このことは、精神分裂病患者の一部に、何んらかの免疫学的な異常が存在することを意味する。

精神分裂病の病因仮説の一つに自己免疫疾患仮説がある。こまでの報告には、精神分裂病患者血清中における抗脳抗体の存在（１）や、患者から分離した末梢血単核球のphytohemagglutinin刺激によるインターロイキン-2の産生能の有意な低下（２）を証明するものなどがある。こうした現象は自己免疫疾患でみられることが知られている。今回われわれは精神分裂病における自己免疫疾患的な要素の関与する可能性を検討するために、ある種の自己免疫疾患患者の血清中で上昇することの知られている（３）ＩＬ－６の血清中濃度を慢性期の精神分裂病患者で測定した（４）。

（対象と方法）

対象者は、DSM-III（５）に基づいて精神分裂病と診断された入院中の患者９０人（うち男性６０人）と、精神科的疾患の既往および現症のない健常成人９０人（うち男性６０人）である。患者の平均年齢は４１.９±９.９歳（男性, ４１.０±１０.２；女性, ４２.６±９.３）で、平均罹病期間は１８.２±６.９年（男性, １８.０±６.０；女性, １８.６±８.７）平均在院期間は１３.２±６.８年（男性, １２.９±７.７；女性, １３.８±５.２）であった。全患者は現在、クロルプロマジン等価量（６）で一日平均１４５４±６７３㎎で治療されており、幻覚妄想は寛解状態にある。一方、健常成人の平均年齢は４１.０±１０.２歳（男性, ４１.２+１０.３；女性, ４０.６+９.９）であった。

全対象者に研究意義を十分に説明し、同意を得た上で１０mlの採血を行なった。血液を２時間以内に遠心分離し、血清だけを採取、ＩＬ－６を測定するまで－４０°Cで保存した。また、全対象者に対して、採血の時点での末梢血白血球数と白血球分画、血清ＣＲＰ値、血清ＩｇＧ値を調べた。血清ＩＬ－６はサンドイッチ法によるＥＬＩＳＡを使って測定した。代表的な標準曲線を図１に示す。なお、各サンプルはデユプリケートで測定し、平均値をもってその値とした。このＥＬＩＳＡではＩＬ－６の測定限界は３.９pg/mlで、ＩＬ－６以外のサイトカインは検出されなかった（結果は省略）。

（結果）

両群の血清ＩＬ－６値を図２に示す。精神分裂病者群の平均値と標準偏差は、１０.４±８.２pg/ml（男性, １０.６±８.６；女性, １０.１±７.４）であったのに対して、正常者群では１０.２±２.６pg/ml（男性、１０.６±２.９；女性、９.５±１.５）であった。また、Ｋｏｌｍｏｇｏｒｏｖ－Ｓｍｉｒｎｏｖ検定を行ったところ両群の間に有意差が得られた（χ^2 = ４５．０，Ｐ＜.００１）（男性, χ^2 = ２６.１，Ｐ＜.００１；女性，Ｄ = １７．０，Ｐ＜.０１）。なお、採血の時点での末梢血の白血球数と白血球分画、血清ＣＲＰ値、血清ＩｇＧ値は全対象者で正常範囲内であり、また精神分裂病者の血清ＩＬ－６値と、その年齢、罹病期間、在院期間、一日投薬量、投薬された薬剤の種類、遺伝的素因の有無などとの間には相関関係は見られなかった。

（考察）

今回得られた実験結果から、精神分裂病者群には明らかに血清ＩＬ－６高値を示す者がいることもわかった。このことは、一部の精神分裂病者に自己免疫疾患的な発症機序が関与していることを間接的に示すものかも知れない。もちろん、この結果だけでは、精神分裂病の自己免疫疾患仮説を証明したことにはならない。しかし、精神分裂病患者でその血清ＩＬ－６値が高値を示すにもかかわらず、理学的に炎症反応異常を認めず、末梢血白血球数、血清ＣＲＰ値、血清ＩｇＧ値も正常であることは興味深い点である。このような異常な免疫反応の解離が精神分裂病で示されたことは、免疫疾患として精神疾患を考える足掛りになるのではないかと考えられる。この機序の解明は、今後の研究課題となるであろう。

血清ＩＬ－６がどの組織に由来して高値を来しているのかは不明である。ただし、グリオブラストーマやアストロサイトーマなどの神経系細胞が、インターロイキン-1の刺激によってＩＬ－６を産生すること（７）や、下垂体前葉細胞がＩＬ－６を産生する（８）との報告がなされており、血清ＩＬ－６の過剰産生が中枢神経系内で行なわれている可能性も否定できない。

今後は、さらに対象者数を増やすとともに、臨床経過とともに値が変動するかを調べるために、縦断的に調査してゆく予定である。

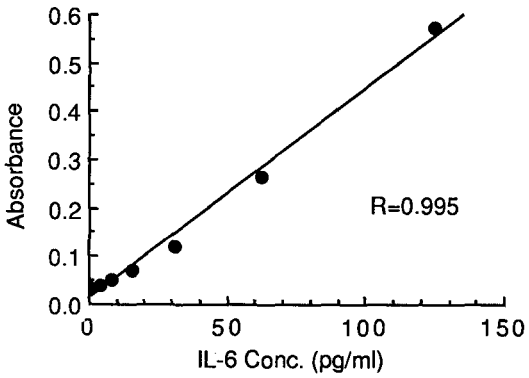


図1　ＥＬＩＳＡによるＩＬ－６の標準直線
横軸はＩＬ－６の濃度（ｐｇ／ｍｌ）。縦軸は吸光度を表している。相関係数は０．９９５。ＥＬＩＳＡに関する方法の詳細については文献（８）を参照。

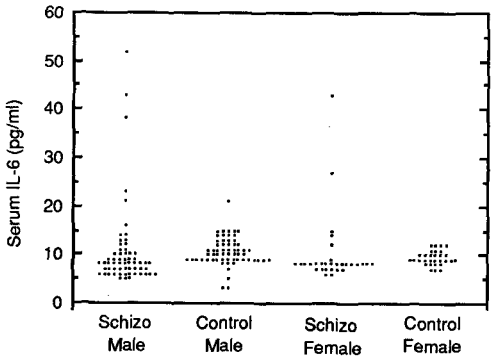


図2　全対象者の血清ＩＬ－６の濃度分布
横軸は左から精神分裂病者の男性（６０人）、健常者の男性、精神分裂病者の女性（３０人）、健常者の女性。縦軸は血清ＩＬ－６濃度（ｐｇ／ｍｌ）。

（文献）

1. R.G.Heath, K.L. McCarron, and C.E. O'Neil, (1989) Biol. Psychiat. 25 725-733.
2. R. Ganguli, B.S. Rabin, and S.H. Belle, (1989) Biol. Psychiat. 26 427-430.
3. Hirano T, Matsuda T, Turner M, et al., (1988) Eur. J. Immunol. 18, 1797-1801
4. F. Shintani, S. Kanba, T. Nakaki, et al., (1991) Life Scie. in press
5. American Psychiatric Association DSM-III, ed 3. (1980) American Psychiatric Press Washington, DC.
6. R.J. Wyatt, (1976) Psychopharmacol. Bull. 12, 5-50.
7. Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, et al., (1987) EMBO J. 6, 2939-2945
8. Spangelo BL, MacLeod RM, Isakson PC, et al., (1990) Endocrinology 126, 582-586

236 ラットにおける学習課題遂行時脳内モノアミン変動の *in vivo* dialysis法による検討

堀 耕治，入野誠郎*，田中淳一，田中早苗，野村正彦，
久保浩一*，濱口勝彦*
（埼玉医大・第一生理，神経内科*）

〔要約〕

学習行動に伴うニューロトランスミッターの変動を調べる目的で、左右弁別学習を獲得させたラットを用いて学習前と学習中のモノアミンの含有量を測定した。今回は、学習能力の低下が示唆されている[4] stroke-prone spontaneously hypertensive rat(SHR-SP)[3]およびその対照として Wistar Kyoto (WKY) を用い、in vivo microdialysis によって採取された 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)を HPLC-electrochemical detector(ECD)で測定した。測定部位は、学習・記憶に関与が深い海馬、扁桃核、視床前核を選んだ[2]。その結果、SHR-SP, WKY共に学習中に上記代謝産物の増加を認め、左右弁別学習にドパミナージック・セロトナージックニューロンの関与が示唆された。

記憶・学習にニューロトランスミッターとしてモノアミンが関与していることはよく知られている[1),3)]。今回我々は、ラットの学習課題遂行時の脳内モノアミン含有量の変動を、in vivo dialysisを用いて測定した。

＜方法＞

実験には自由摂食時の85%に体重制限した12週齢のSHR-SPとWKYを使用し、スキナー箱で左右弁別学習を行った。左右弁別学習にはmult FR30 FI60スケジュールを用いた。すなわち右ランプ点灯時（FR30試行）にはレバーへの30回目の反応に対し、また左ランプ点灯時（FI60試行）には点灯開始から60秒経過後の初発反応に対し、報酬として餌ペレットを1個呈示した。1日の訓練はFR30試行とFI60試行をランダムな順序で各20試行おこない、これを30日間継続した。学習を獲得したラットに対し、George Paxinos & Charles Watson のアトラスにより3部位（海馬・扁桃核・視床前核）にガイドカニューレを挿入した。挿入から3日後に直管型で透析膜長1mmのプローブを使用して24時間灌流した後、透析を行った（流速2μl/min）。DOPAC, HVA, 5-HIAAの測定は、ホームケージで自由行動下にある学習前と防音箱で騒音を遮断したスキナー箱内での学習中に行い、20分毎に40μlずつHPLC-ECDにて定量した。

＜結果と考察＞

Fig.1に左右弁別学習の指標である反応率（1分当りのレバー押し反応数）を示す。対照群であるWKYが15日目よりFRとFIを弁別したのに対し、SHR-SPでは弁別まで24日を要した。また、もうひとつの指標である反応潜時（ランプ点灯開始から初発反応までの時間）についても、SHR-SPで学習獲得の遅延を認めた(Fig.2)。以上のことからSHR-SPでは左右弁別学習能が低下しているということが示唆された。次に、学習前に対する学習中の DOPAC, HVA, 5-HIAAの増加率を系統間で比較した(Fig.3)。両系統ともに学習中の値が高かったことから、学習課題の遂行にはドパミナージックとセロトナージックニューロンが介在していることが示唆された。一方、2（系統）×3（部位）の分散分析の結果、HVAと5-HIAAの

増加率に系統間で有意差が認められた（それぞれ、$F(1,35)=8.75$, $p<.01$、$F(1,35)=6.18$, $p<.05$。図中の＊は分散分析後におこなったt検定の結果）。これはドパミナージックやセロトナージックシステムに系統間で相違があるためと考えられ、この点について更に検討が必要である。

＜文献＞

1) Dismurkes,R.K.& Rake A.V. Psychopharmacologia, Berl.23 17～25 (1972)

2) Mishkin,M. Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.298,85～95 (1982) 3) 野村正彦 蛋白質核酸 酵素 26.No11.1735～1740(1981) 4) 野村正彦 神経化学 23.147～149(1984)

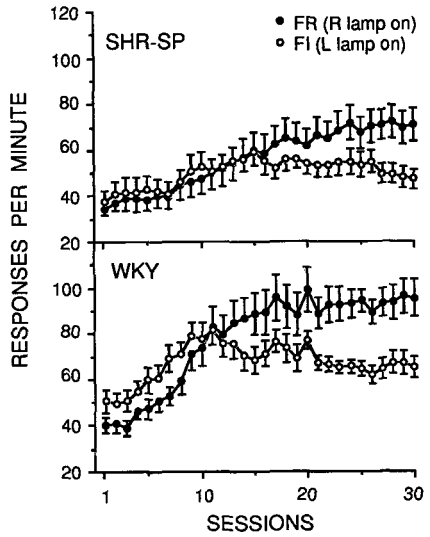


Fig. 1 Response rate for each schedule plotted against sessions.

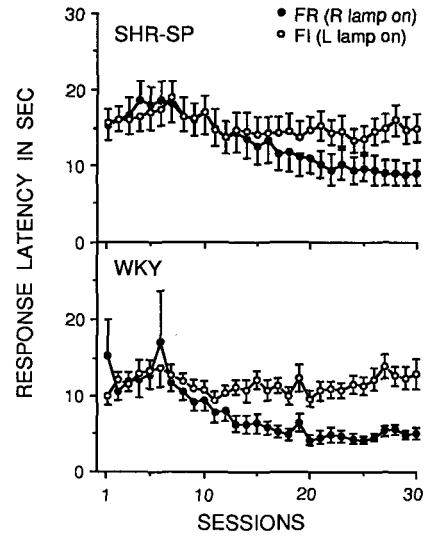


Fig. 2 Response latency for each schedule plotted against sessions.

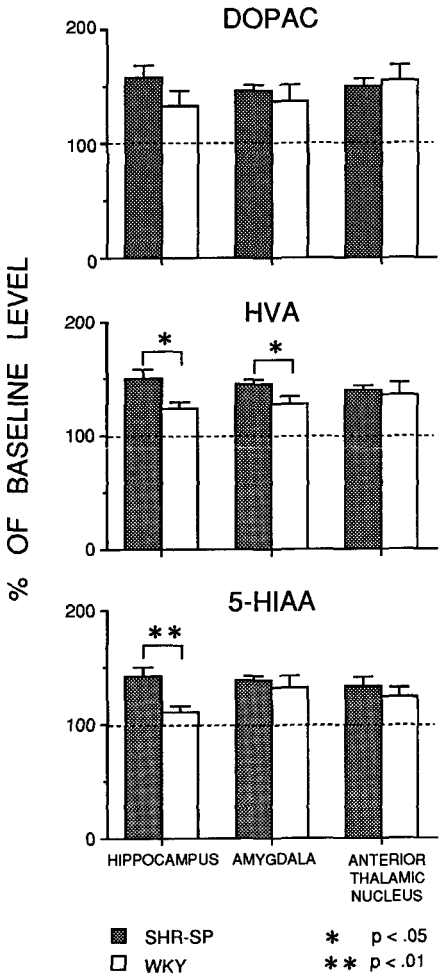


Fig. 3 Brain monoamine contents during learning sessions expressed as a percentage of baseline.

237 フェンサイクリジンのラット脳内アミノ酸への影響

米沢裕次、松本孝、堤哲之、中村薫、平野誠、本藤久雄、橋本喜次郎、内村英幸、中原辰雄*
(情動行動障害センター・国立肥前療養所、九州大学一理一化学*)

〔要約〕
フェンサイクリジン(PCP)をラットに単回投与し、脳内アミノ酸含量への経時的な影響を前頭前野、尾状核一被殻、側坐核の3部位について検討した。前頭前野では、PCP投与後15分及び30分の時点でグルタミン酸(Glu)、アスパラギン酸(Asp)およびγ-アミノ酪酸(GABA)の含量が増加傾向を示したものの有意な変化ではなかった。尾状核一被殻では、15分及び30分の時点で Asp の含量が有意に減少したのに対し、Glu,GABAの含量は変化を示さなかった。側坐核では、15分及び30分の時点でAspの含量が減少傾向を示したが、有意な変化ではなかった。PCPのNMDA受容体を介する脳内ドーパミンニューロン系への影響には部位差があるとい言われているが、上記の結果から、PCP末梢投与は、興奮性アミノ酸であるアスパラギン酸ニューロン系にも部位特異的な影響を及ぼすことが示唆された。

［目的］
PCP は、その乱用により分裂病に類似した症状を呈することや、PCP投与動物で常同行動などの異常行動を示すことなどから、分裂病の病態モデルとして注目されている。我々はこれまで、PCP投与ラットについて行動薬理的及び神経化学的な検討をしてきた。そして、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経時的変化を見ることで、PCPのドーパミン代謝亢進作用には部位特異性があることを明らかにした。線条体を含む脳部位で、ドーパミンニューロンと興奮性及び抑制性アミノ酸ニューロンとは密接な相互作用を有していると言われているが、PCP投与による脳内アミノ酸レベルへの影響を見た報告は見あたらない。そこで今回、PCP末梢投与による脳内アミノ酸レベルの経時的変化を、脳部位別に検討した。

［方法］
Wistar系雄性ラット(250-350g)を用いた。PCP(7.5mg/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。クリオスタット(-12℃)内で凍結脳より300μmの連続切片を作製し、-20℃のプレート上で前頭前野、尾状核一被殻、側坐核の3部位を切り出した。0.1Mギ酸を加えてホモジナイズし、一部を蛋白定量用に分け、遠心(17,700Xg,10min,5℃)後、その上清を更に孔径0.45μmの膜フィルターで遠心濾過した。上清の一部に5%トリクロロ酢酸及び内部標準物質としてL-ホモセリンを加え混合し、遠心した。更にその上清の一部に、1N水酸化ナトリウム溶液を一定量加えてpH調整した。こうして得られた試料中のアミノ酸をo-フタルアルデヒド-2-メルカプトエタノール誘導体にして、蛍光検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー法（溶媒グラジエント）で分離した。アミノ酸の測定は、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)、セリン、グルタミン、グリシン(Gly)、スレオニン、アラニン、タウリン(Tau)、γ-アミノ酪酸(GABA)について行った。有意差の検定には、Scheffe testを用いた。

［結果］
1）前頭前野での変化(Fig1-upper)：PCP投与後15分、30分の時点で、Asp,Glu及びGABAの含量が増加傾向を示したが、有意な変化ではなかった。また他のアミノ酸含量は変化を示さなかった。
2）側坐核での変化(Fig1-middle):PCP投与後15分及び30分の時点で、Asp含量が減少傾向を示したのに対し、 Glu, GABA及びその他のアミノ酸含量は変化を示さなかった。
3）尾状核一被殻での変化(Fig1-lower):PCP投与後15分、30分の時点で、Asp含量が有意に減少した(15分:-20%,30分:-15%)のに対し、Glu及びGABAの含量は変化を示さなかった。また他のアミノ酸含量も変化を示さなかった。

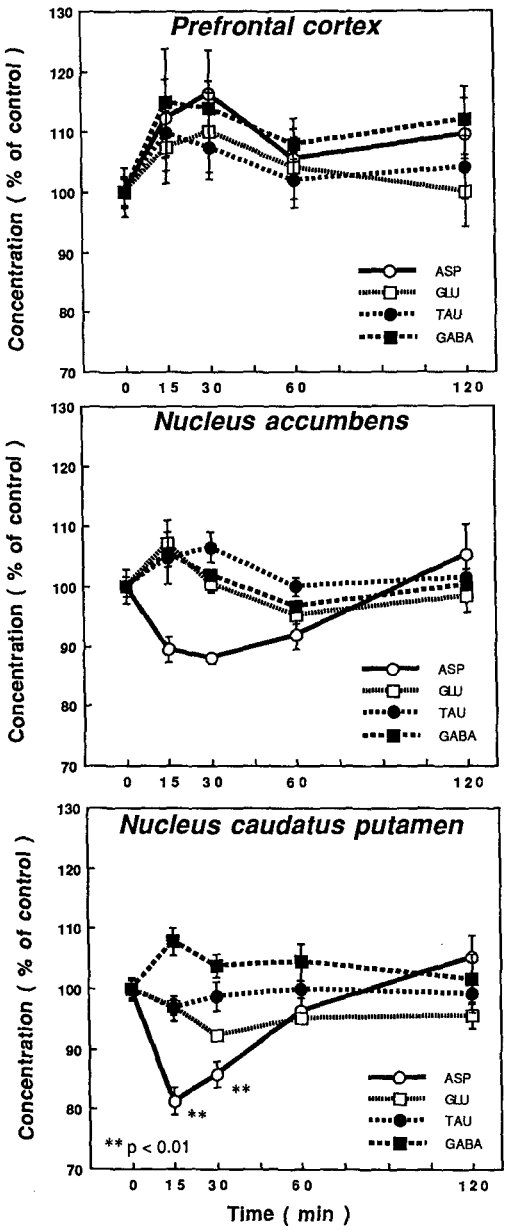


Fig.1. Time-course of the effect of PCP on amino acids levels in prefrontal cortex (upper), nucleus accumbens (middle) and nucleus caudate putamen (lower) of rat brain. Control values were ; prefrontal cortex (Asp: 5.37±0.22, Glu: 22.04±0.53, Tau:7.88±0.17, GABA:2.43±0.06), nucleus accumbens (Asp:3.65±0.10, Glu:18.16±0.30, Tau:10.23±0.08, GABA:3.07±0.09), nucleus caudate putamen(Asp:2.92±0.04, Glu:16.76±0.24, Tau:12.14±0.21, GABA:1.87±0.03 μg/mg protein, mean±S.E.M)

［考察］

PCP投与により前頭前野皮質ではAspレベルは増加傾向にあるものの有意ではなく、線条体ではPCP投与15,30分後にAspレベルは有意に低下した。側坐核では15,30分後にAspレベルは低下傾向にあるものの有意な変化ではなかった。我々は先に、PCPの脳内モノアミンに対する影響を検討し，前頭前野皮質においてドーパミン代謝の亢進が最も大きく、側坐核でも代謝亢進が認められたが、線条体では変化がないという事を明らかにした[1]。行動薬理学的には、PCP投与10-15分後に自発運動の著明な増加がみられた[2]。このようにPCPはドーパミンニューロン系のみならずAspニューロン系にも部位特異的な影響を及ぼし、かつPCPによる行動変化とAspレベルの変化が経時的に対応することは注目される。

PCPは中脳皮質辺縁系や線条体においてNMDAレセプターを介してドーパミンニューロン系に影響を及ぼすこと知られている。最近、線条体シナプトゾームを用いた実験で、ドーパミンはAspの放出を抑制し[3]、一方中脳ではAspがNMDAレセプターを介してドーパミンを放出させる[4]などAspとドーパミンの相互作用が報告されている。今回示されたPCPによるAspレベルの変化の神経化学的なメカニズムについては解釈が難しいが、脳特定部位におけるAspとドパーミンの両ニューロン系の相互作用が関与しているのかもしれない。

［文献］

1）松本孝ら(1990) 神経化学, 29, 220-221

2）T.Tsutsumi et al.(1990) NEW TRENDS IN SCHIZOPHRENIA AND MOOD DISORDERS RESEARCH,32

3）Guido Maura. et al.(1989) J. Pharmacol. Exp.Ther. 251,1142-1146

4）Howard Mount et al.(1990) J. Neurochem. 55, 268-275

238 ロイシンによるチロシン過剰毒性の軽減作用 ー血液・脳・網膜中アミノ酸濃度とモノアミン代謝ー

横越英彦・堀江健二・守田昭仁
（静岡県立大・食品栄養・栄養化学）

〔要約〕

チロシン(Tyr)過剰食(5%)をラットに投与した時の栄養生理学的変化に対し[1-4]、ロイシン(Leu)を同時に添加(5%)するとどうなるかを、主に、血液・脳(各部位)・網膜に注目し、経日的に分析した。血中アミノ酸が脳内に取り込まれる時には、血液・脳関門(Blood-Brain Barrier)を経由し、その時の制御は、お互いに拮抗するアミノ酸の割合によってなされている。そこで、血中アミノ酸比(大型中性アミノ酸濃度の総和に対する各アミノ酸の濃度の比)を計算したところ、Tyr比は、Tyr添加食群で有意に高く、Leuの同時投与により低下した。その他のアミノ酸比は、Tyr添加で低下し、Leuの添加で更に低下した。網膜・脳各部位(視床下部・大脳皮質・線条体・青斑核・海馬・脳幹・扁桃核)のTyr含量は、Tyr添加食で増加し、Leuの添加で部分的に抑制された。カテコールアミンの代謝変動も大体同様に測定され、以上、高Tyr食による代謝変動がLeuの同時投与で部分的に抑制されることがわかり、その生理学的意義について今後検討したい。

〔目的〕

高Tyr食をラットに与えると、成長の抑制とともに病理学的症状として手肢のむくみや白内障の起こることが知られている。これに対し、食餌蛋白質などを変えることにより、またある種のアミノ酸を補足することにより、この症状の消失することが明らかにされている[1-4]。Tyrは蛋白質合成の基質であると同時に、カテコールアミン(エピネフリン・ノルエピネフリン・ドーパミンなど)の合成素材でもある。脳内におけるカテコールアミンの合成は、主にその前駆物質のレベルにより調節され、また、脳内への取り込みは血液・脳関門を経ることが知られている。今回は、Tyrの過剰摂取による脳・網膜のアミノ酸及びカテコールアミンの代謝の変動に及ぼすLeuの同時添加の影響を調べることを目的とした。

〔方法〕

Wistar系雄ラット(体重60g)を3群に分け、試験食として各々5%カゼイン食、Tyr(5%)添加食、Tyr及びLeu(5%)添加食を1日、3日あるいは14日間与えた後、血液・脳・網膜を速やかに取り出した。血液は遠心後血清をえ、アミノ酸濃度・アミノ酸比を日立高速アミノ酸分析計で測定した。脳については、大脳・線条体・青斑核・視床下部・海馬・脳幹・扁桃核を分画した[5]。Tyrは分光光度計で測定し[6]、またカテコールアミンは分画した後、HPLCによる電化検出器で測定した。

〔結果及び考察〕

正常食、Tyr添加食、TyrとLeuの同時添加食を1、3、14日間投与し、各成分を測定したが、全般的にみれば、血中アミノ酸濃度の変化は、いずれの投与期間であっても顕著な差異が得られる。しかしながら、組織カテコールアミン濃度の変化については、余り大きな変動はみられないが、その中では投与期間の長いほうが、影響はでやすかった。その中でいくつかの結果を以下に列記する。

1. 各試験食を摂取したラットの体重変化は、各群に差はなく同じであった。
2. 血中アミノ酸濃度を測定し、それから各々のアミノ酸比を計算し、図1に示した。Tyrは、Tyr添加食群で有意に高く、Leuの同時投与により部分的に抑制された。その他のアミノ酸(Thr, Val, Met, Leu, Phe, Trp, His)比は、Tyr添加で低下し、Leuの添加で更に低下した。

3. 網膜及び脳各部位のTyr含量は、対照群と比べTyr添加食群で有意に高く、Leuの同時添加で部分的(約半分)に抑制された(図2)。
4. 網膜のノルエピネフリンは、Tyr添加で増加し、Leuの同時添加で抑制された。その他のカテコールアミンも、同様の傾向を示した。
5. 視床下部のカテコールアミンは、3.4-ジハイドロキシフェニール酢酸がTyr添加食で増加し、Leu添加食で抑制された。
6. 扁桃核のノルエピネフリンはTyr添加で増加し、Leu添加で減少した。青斑核では、Leu添加で減少した。
7. 図3に視床下部のドーパミン濃度を示したが、対照群に対しTyr添加で顕著に増加し、Leuの同時添加で対照群のレベルまで抑制された。

以上の結果、高Tyr食による脳内カテコールアミン代謝の変動がLeuの同時投与で抑制されること、また網膜も同じような挙動をすることがわかった。このことは、高Tyr食を摂取した時の体重低下、飼料摂取量の減少、死亡率の増加、手肢のむくみ、白内障といった症状の原因として一部関与しているかも知れない。今後、その生理学的意義について検討したい。

図1

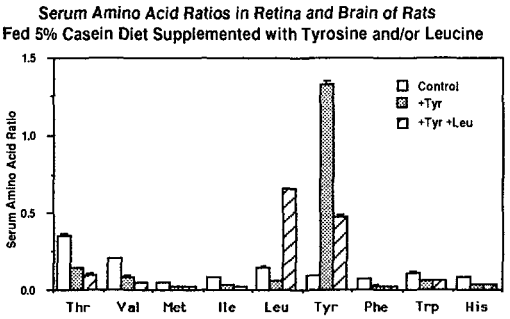


図2

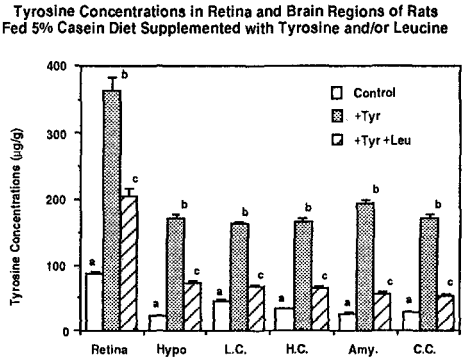
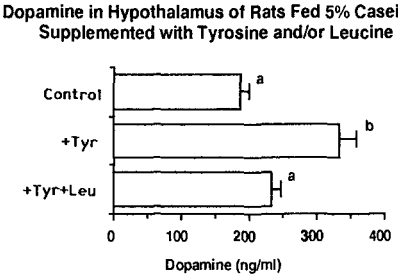


図3



［文献］

1. Harper, A. E., Becker, R. V. & Stucki, W. P. (1966) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., ***121***, 695-699.
2. Muramatsu, K., Odagiri, H., Morishita, S. & Takeuchi, H. (1971) J. Nutr., ***101***, 1117-1125.
3. Yokogoshi, H. (1985) J, Nutr. Sci. Vitaminol., ***31***, 519-531.
4. Yokogoshi, H., Ishida, K .& Iwata, T. (1987) Nutr. Rep. Inter., ***35***, 583-589.
5. Reinstein, D. K., Isaacson, R. I. & Dunn. A. J. (1979) Brain Res., ***175***, 392-397.
6. Waalkes, T. P. & Udenfriend, S. (1957) J. Lab. Clin. Med., ***50***, 733-736.

239 LHRHの海馬神経伝達物質遊離に与える影響 —in vivo dialysis実験

下山政憲、三好理絵＊、鬼頭昭三
（放送大学、東京女子医科大学薬理学教室＊）

〔要約〕
海馬は、LH-RH receptorが脳内で最も豊富に存在する場所として知られているが、その機能的意義に関する検討は殆ど行われていない(1,2)。

著者らは、海馬内に投与したLH-RHが、海馬のAChおよびglutamate放出にどの様な影響を及ぼすかをintracerebral dialysisを用いて検討した。その結果、LH-RH投与(10^{-5}M, 10^{-6}M)は、海馬からのAChの放出に影響を及ぼさなかった。一方、LH-RH投与(10^{-5}M, 10^{-6}M)は、海馬からのglutamateの放出を抑制した。これらの結果から、海馬でLH-RHはglutamate neuronに影響を及ぼし、glutamateの放出を調整している可能性が示唆された。

〔目的〕
間脳－下垂体系における LH-RHの作用と作用機序については、従来からよく知られている。しかし、その他の中枢神経系におけるLH-RHの役割については、不明な点が多い。近年、海馬にはLH-RH receptorが高い密度で存在する事が明らかにされているが、その機能については明らかでない(1,2)。我々は、海馬におけるLH-RHの機能を探る目的で、LH-RH投与が海馬の神経伝達物質の動態にどの様な影響を及ぼすかを、intracerebral dialysis法を用いて検討した。

〔方法〕
Wistar系雄性ラット(180-200g)を用いた。chloral hydrate麻酔下で、定位的にBregmaからP 2.2 mm、L 2.5 mm、硬膜から深さ3.5 mmの海馬内に透析プローブ (Carnegie Medicine) を挿入した。挿入1日後に、無麻酔下でリンゲル液を 2 μl/min の速度で灌流した。灌流液中のacetylcholine(Ach)およびglutamateはHPLC-electrochemi-cal detector (ECD)で測定した。

Achの測定はFujimori, K and Yamamoto, K(3)の方法に従って行った。なお、灌流液中には、10^{-4}M neostigmineを加えた。glutamateの測定はLaura, A. A. らの方法(4)に準じて行った。即ち、採取した灌流液に等量のo-phthaldialdehyde, 2-mercaptoethanolを含む反応液をくわえて反応させた後、HPLCにapplyし、アミノ酸と結合したSH基をECDで測定した。移動相には、0.1 sodium acetate buffer(pH 6.0.8% acetonitrile, 3% tetrahydrofuran, 0.5 mM EDTA)を用いた。LH-RHはリンゲル液中に溶解し、プローブを介して30分間海馬内に投与した。

〔成績〕
1）glutamate の海馬における基礎放出量は灌流開始2.5時間前後で安定した。従って、灌流開始2.5時間後から、15分毎に灌流液の回収をおこなった。Achの基礎放出量は灌流開始2時間前後で安定した。LH-RH投与前の4 sampleの Achの放出量（基礎放出量）は69.9±3.6 nM(n=29), glutamateのそれは921±41 nM(n=33)であった。

2）10^{-5} Mおよび10^{-6} M LH-RH投与後の海馬からのAChの放出の変化を観察したが、いづれの量ともAChの放出に有意の影響を及ぼさなかった。

3）10^{-5} Mから10^{-7} MのLH-RHを海馬内に投与し、glutamateの放出の変化を見た。10^{-5}M LH-RH投与では、投与15分後から、放出量は有意に減少し（最大37%）、この減少は1時間持続した。その後、放出量は次第に基礎値に回復した。10^{-6} M LH-RH投与でも、投与1時間後から30分間glutamateの放出の減少が見られた（最大34 %）。一方、10^{-7} MのLH-RH投与ではglutamateの放出に変化は見られなかった。

〔考察〕
海馬においてLH-RH receptorが豊富に存在するにも関わらず、その存在意義あるいは機能に関しての報告は極めて少ない。そこで、我々は海馬でのLH-RHの機能の一端を明らかにする目的で、海馬内への LH-RH投与とin vivoでの海馬からのAChあるいはglutamateの放出との関連を検討した。LH-RHの海馬内投与は海馬のACh動態に影響を及ぼさなかったが、高濃度（10^{-5} M, 10^{-6} M)のLH-RH投与では、glutamateの放出は抑制された。

glutamateは、中枢神経系において代表的な興奮性神経伝達物質である事が知られている。また、glutamateは海馬において記憶、学習等の高次機能と密接に関連している事も知られている。

今回の結果は、海馬内に投与したLH-RHがその receptorを介して、海馬のglutamate neuronに抑制的に作用した事を示唆した。海馬でLH-RHはglutamateの放出を調整することを介して、この部位の生理的機能に深く関与している可能性が推測された。今後、海馬におけるLH-RHの役割を明らかにするために、GABA, aspartate等のアミノ酸系伝達物質あるいはアミン系伝達物質の動態とLH-RHとの相互関連についても検討を加える必要があると考えた。

［文献］
1. Leblanc, P., Crumeyrolle, M., Latouche, J., Jordan, D., Fillion, G., L'Heritier, A., Kordon, C., Dussaillant, M., Rostene, W., and Haour, F. (1988) Neuroendocrinology 48, 482-488
2. Badr, M., Marchetti, B., and Pelletier, G. (1989) Dev. Brain Res. 45, 179-184
3. Fujimori, K and Yamamoto, K(1987) J. Chromatgr. 414, 167
4. Laura, A.A et al. (1984) Anal. Chem. 56, 1089

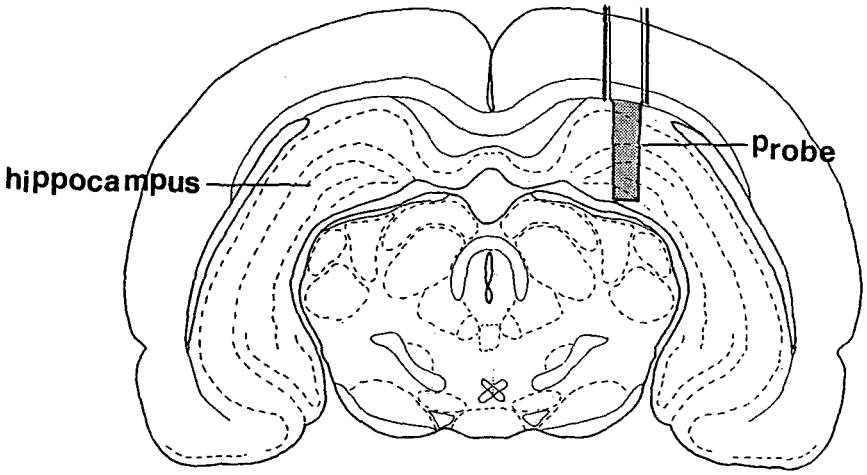


図1 Schematic drawing of a dialysis probe inserted into the hippocampus.

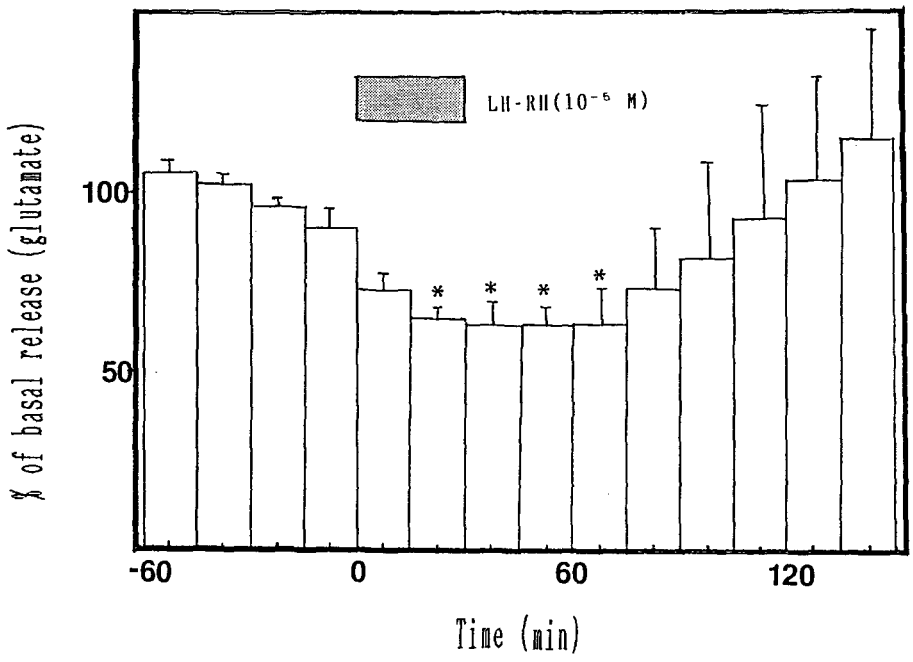


図2 Effect of local perfusion with 10-5M LH-RH on levels of glutamate in hippocampal perfusates. Values are given as percentages of basal values (N=4) P<0.05.

240

ガングリオシド治療後に発症した筋萎縮性側索硬化症様の神経障害

結城伸泰*、佐藤修三*、杉山和彦**、片桐　忠**、佐々木英夫**、宮武　正*
(新潟大学脳研究所神経内科*、山形大学医学部第3内科**)

〔要約〕

ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞ投与後に筋萎縮性側索硬化症に類似した神経症状が発現した。plasmapheresisにより症状が改善したことから、神経障害の要因として液性因子の関与が考えられた。患者血清中に[GalNAcβ1-4 Gal(3-2α NeuAc)β1-]をepitopeとして認識する高力価のIgM抗体を検出した。臨床症状の改善と並行して抗体価が低下していったことから、抗ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞ抗体が本症例の神経障害発現に関与していたことが疑われた。[GalNAcβ1-4 Gal(3-2αNeuAc)β1-]を終末構造に含むｳｼ脳抽出ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞがimmunogenとして、ALSに類似した神経障害を惹起し可能性が示唆された。

はじめに

西ヨーロッパや南アメリカを中心に、ウシ脳から抽出したｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞが各種神経疾患に対して広く用いられている[1]。しかしながら、最近の2重盲検法による研究では、ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞを投与しても電気生理学的にも臨床的にも改善が認められなかったとする結果が次々と出されている[1]。日本でも糖尿病性ﾆｭｰﾛﾊﾟﾁｰ患者に対するｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞ投与の治験が行われていたが、ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞ投与後に筋萎縮性側索硬化症(ALS)様の神経症状を呈した患者を経験し、その患者血清中にｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞに対する高力価の抗体を検出したので報告する[7]。

症　例

症　例：72歳、男性。

主　訴：四肢の筋力低下。

既往歴：61歳糖尿病を指摘され、65歳からｲﾝｽﾘﾝを使用していた。足首より末梢の冷感を訴えたが、筋力は正常で、深部腱反射はやや低下していた。表在・深部感覚とも異常なく、自律神経障害も認めなかった。

1989年11月(71歳)中旬より1ヵ月間ｳｼ脳ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞ40 mg/日筋注を受けた(総量1200 mg)。

現病歴：1990年2月　畳につまずいて転倒するようになった。

6月　上肢を挙げたり階段を降りたりするのが困難となった。

7月中旬　物につかまらないと立ち上がれず、歩行に介助が必要となり、8月山形大学第3内科へ入院した。

一般身体所見：9ヵ月間で3kg体重が減少した。

神経学的所見：意識清明。知能正常。

脳神経系；舌には萎縮はなかったがfasciculationを認めた。他の脳神経には異常なかった。

運動系；四肢にfasciculationを認めた。上肢は近位筋優位、下肢は遠位筋優位の筋萎縮・筋力低下を認めた。下顎反射・ｱｷﾚｽ腱反射は消失していたが、他の四肢深部腱反射は亢進していた。上・下肢とも病的反射が陽性であった。共同運動障害は認めなかった。

感覚系；足首より末梢の冷感を訴えたが、表在・深部感覚とも異常なかった。

自律神経系；異常なし。

入院時検査成績：骨格筋由来のLDH、CKの上昇を認めた。髄液検査では細胞数は正常で、蛋白は131 mg/dlと　上昇していた。頸部・腰部MRIでは軽度の椎間板ﾍﾙﾆｱを認めたが、圧迫の所見はなかった。運動神経伝導検査では、ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞ投与前に比して速度の遅延はなかったが、複合筋活動電位が著明に低下していた。

入院後経過：当初ALSが疑われたが、筋力は徐々に回復していった。10月　plasmasheresisを受け、その前後で筋力は著しく改善した。

方　法

薄層ｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾑ免疫染色：静岡県立大学平林義雄博士から供与を受けたｳｼ脳より抽出・精製したｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞGM1, GD1a,GD1b,GT1b,GM2(NeuAc),GM2(NeuGc),GA2,GD2,GM3を抗原として用い、以前に述べた方法に基づき[6]、患者血清中の抗ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞ抗体を検出した。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)：対象として、本患者の他に、正常対照14例、疾患対照としてALS患者15例、ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞ投与を受けた糖尿病性ﾆｭｰﾛﾊﾟﾁｰ患者3例の血清を使用した。抗原としてGM2(NeuAc) 10 pmol/wellを固相化した。1次抗体として1:2^7より連続希釈した患者血清を、2次抗体として1:2000に希釈した抗ﾋﾄIgM抗体を用いた。本研究では、492nmにおける吸光度が0.1以上を示す最大希釈濃度1:xを抗体価xとして定義した。

結　果

薄層ｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾑ免疫染色で、本患者血清IgMはGM2(NeuAc)と強く反応し、GD1a,GD1b,GT1b,GM2(NeuGc),GA2,GD2,GM3とは反応しないことが明らかにされた。ELISAにて、正常対照・疾患対照の血清とも抗GM2(NeuAc)抗体価は2^7未満であったのに対して、本患者血清抗GM2(NeuAc)抗体価は2^{15}と著しい高値を示した。また、抗GM2(NeuAc)抗体価は経過とともに徐々に低下していった。

考　察

Nagaiらがｳｻｷﾞにｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞを免疫して脳脊髄炎様症状を惹起したことを報告しているにも関わらず[4]、ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞ治療の副作用としては、これまで注射部位の不快感以外は報告されていなかった[3]。

近年、下位運動ﾆｭｰﾛﾝ疾患と抗GM1ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞ抗体との関連が注目され、免疫抑制療法により抗GM1抗体価の低下と臨床症状の改善がみられることから抗ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞ抗体の病的役割が示唆されている[2,5]。本症例でもplasmapheresisが著効したことから、神経障害の要因として液性因子の関与が考えられた。免疫染色の結果から、本患者血清中IgMは終末の糖鎖構造[GalNAcβ1-4 Gal(3-2αNeuAc)β1-]をepitopeとして認識することが考えられた。また、臨床症状の改善と並行して抗糖鎖抗体が低下したことから、抗糖鎖抗体が本症例の神経障害発現に関与していたことが示唆された。

我々は患者に注射されたｳｼ脳ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞの中にはGM2(NeuAc)が含まれることを薄層ｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾑで確認したが、[GalNAcβ1-4 Gal(3-2αNeuAc)β1-]を終末構造に含むｳｼ脳抽出ｶﾞﾝｸﾞﾘｵｼﾄﾞがimmunogenとして、ALSに類似した神経障害を惹起した可能性が考えられた。

文　献

1) Bradely WG. Critical review of gangliosides and thyrotropin-releasing hormone in peripheral neuromuscular disease. Muscle Nerve 1990;13:833-42.
2) Freddo L, Yu RK, Latov N, et al. Gangliosides GM1 and GD1b are antigens for IgM M-protein in a patient with motor neuron disease. Neurology 1986;36:454-58.
3) Horowitz SH. Therapeutic strategies in promoting peripheral nerve regeneration. Muscle Nerve 1989;12:314-22.
4) Nagai Y, Momoi T, Saito M, et al. Ganglioside syndrome, a new autoimmune neurologic disorder, experimentally induced with brain gangliosides. Neurosci Lett 1976;2:107-11.
5) Pestronk A, Cornblath DR, Ilyas AA, et al. A treatable multifocal motor neuropathy with antibodies to GM1 ganglioside. Ann Neurol 1988;24:73-78.
6) Yuki N, Yoshino H, Sato S, et al. Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following Campylobacter jejuni enteritis. Neurology 1990;40:1900-02.
7) Yuki N, Sato S, Miyatake T, et al. Motoneuron-disease-like disorder after ganglioside therapy. Lancet 1991;337:1109-10.

241 グリアの細胞体を認識するモノクローナル抗体３Ｃ４について

吉村和法、北村邦男、野村正彦
（埼玉医大・一生理）

われわれはグリアを認識する新しいマーカーとなる可能性を持つモノクローナル抗体３Ｃ４を作製した。この抗体はヒトのグリアの細胞体をGFAPとは異なる染色パターンをもって強く認識し、ウサギおよびラットのグリアとも交差した。しかしラット肝臓、腎臓、血管、心臓、骨格筋など他の組織は認識されなかった。またこの抗体を用いてヒトの３ヵ月、１５才、２０才、６１才の年齢の中枢神経組織を免疫組織化学的に検索したところ３ヵ月の乳児の脳を除いて他の脳はすべて染色された。ウエスタンブロット分析の結果よりモノクローナル抗体３Ｃ４の抗原は蛋白性物質であることがあきらかとなった。以上より中枢神経組織のグリアを認識するモノクローナル抗体３Ｃ４はグリアの細胞体を特異的に認識するので、グリア細胞を研究する上で有効な新しい道具となる可能性が高いと考えられる。

中枢神経組織は他の組織に比して高度に分化した細胞構築をおこない、記憶や学習といった高度な精神活動を営んでいるが、老齢化すると中枢神経組織は萎縮することが知られている。この萎縮という現象は脳における細胞数の減少[3]で、すなわち中枢神経組織でのニューロンの減少として知られている。一方グリア細胞は老化に伴い増加あるはそのままの傾向であることが知られている。そこでグリアはいままで単にニューロンの支持細胞としていわれているが、まだまだ未知な機能を行なっている可能性が推測される。そこで中枢神経組織のグリアのマーカーとしてアウトロサイトはＧＦＡＰ（グリア線維性酸性タンパク質）,オリゴデンドログリアはガラクトセレブロシドおよびＭＢＰ（ミエリン塩基性蛋白質）などが知られているが、我々はそれらとは別のグリア細胞に特異的と推定される新しいモノクローナル抗体３Ｃ４を得たので、この抗体のグリア特異性について検討を行なったので報告する。

（実験方法と材料）

動物：　ラットはSprague-Dawleyラット、日本白色ウサギおよび埼玉医科大学法医学教室より頂いた死後２４時間から４８時間後の剖検脳を材料とした。

抗体の作製および免疫組織化学：　モノクローナル抗体作製は以前記述した[1]ようにIMR-32(human neuroblastoma)(100ug)を超音波処理後,抗原としてBALB/cマウスに免疫し、その脾細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞と細胞融合後、そのハイブリドーマ培養上清をヒト脳の凍結切片を用いて間接蛍光抗体法[4]によって神経組織の細胞に反応するモノクローナル抗体を検索した。その結果グリアを認識するモノクローナル抗体３Ｃ４を得た。この抗体をもちいて各種の年齢のヒト、ウサギおよびラットの中枢神経組織および他の臓器の凍結切片をもちいて免疫組織化学的な検討をおこなった。ウサギ抗ＧＦＡＰ抗体およびウサギ抗ウシＳ１００抗体はダコ・ジャパンより購入した。

腫瘍細胞の培養：　IMR-32とマウスミエローマ(P3／NSI／1-Ag4－1)は大日本製薬から購入したものを以前報告[4]したように培養した。

ウエスタンブロット：　常法に従い、ラットの大脳組織の細胞核画分を除いた細胞分画をサンプルとして、ウエスタンブロット分析[4]を行なった。

（結果と考察）

グリアを認識するモノクローナル抗体３Ｃ４はヒト、ウサギおよびラットの中枢神経組織のグリアの細胞体を強く認識し、ミエリンが微かに認識された（図１Ａ）がその染色像は、抗ＧＦＡＰ（グリ

ア線維酸性蛋白質）[2]抗体のそれ（図１Ｂ）とは異なっていた。抗ＧＦＡＰ抗体と抗体３Ｃ４あるい抗Ｓ１００Ａ抗体と抗体３Ｃ４の二重蛍光抗体染色の結果（図は示していない）から抗ＧＦＡＰ抗体の認識するアストロサイトのすべてを抗体３Ｃ４は認識していないことが判明した。また上衣細胞を認識しなっかった。このことからのＧＦＡＰとは異なる抗原を認識していることが推定される。また骨格筋、肝臓、腎臓、血管、心臓などの他の組織はこの抗体によって染色されなかった（表１）。さらヒトの３ヵ月、１５才、２０才、６１才の大脳をこの抗体で染色したところ、３ヵ月の脳のみ染色されなかった（表２）。よってヒトでは３Ｃ４の抗原は３ヵ月ではまだ発現されていないこと示唆される。また抗原とした腫瘍細胞ＩＭＲ－３２の細胞体がモノクローナル抗体３Ｃ４で均一に認識されたので、神経系の発生段階でニューロブラストとグリアが共通なマーカーを持つ可能性も示唆された。さらにウエスタンブロット分析（結果は図示していない）より数本のタンパクバンドが３Ｃ４抗体によって認識された。以上免疫組織化学的および生化学的結果よりこの抗体の抗原はおそらく一部のグリアに局在し蛋白性抗原で、染色パターン、分子量および分布状態から既知のグリアのマーカーであるＧＦＡＰ、ＭＡＧ（ミエリン結合性糖蛋白質）、ＭＢＰ（ミエリン塩基性蛋白質）、Ｓ１００蛋白質、ＣＮＰ（2',3'-サイクリックヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ）、クレアチニンキナーゼ-ＢＢとは異なる抗原である可能性が推定される。今後詳細な検討をおこない、グリアの新しいマーカーとなる可能性を探りたい。

（文献）

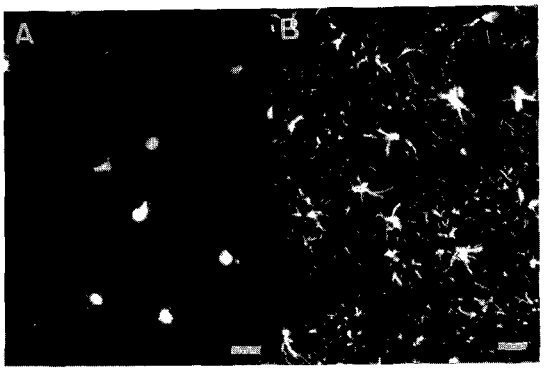
1:Akagawa, K. & Barnstable, C.J.: Brain Res. 383, 110-120(1986)

2:Lewis, S.A., Balcarek, J.M., Krek, V., Shelanski, M. & Cowan, N.J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 2743-2746(1984)

3:Terry, R.D., De Teresa, R. & hansen, L.A.: Ann. neurol. 21, 530-539(1987)

4:吉村和法：埼玉医科大学雑誌、第１７巻、15-29(1989)

図１



ラット大脳の抗体３Ｃ４による蛍光像（Ａ）と抗ＧＦＡＰ抗体による蛍光像（Ｂ）
Bar: 25um

表１

ラットの各種組織に対するモノクローナル抗体３Ｃ４の反応性

灰白質	+*
大脳	
白質	+++**
灰白質	+
小脳	
白質	+++
灰白質	+
脊髄	
白質	+++
肝臓	−
腎臓	−
心臓	−
骨格筋	−

*:ニューロンは染色されず、一部のグリアのみ染色された。
**:ほとんどすべてのグリアが染色された。

表２

各種年齢のヒト脳に対するモノクローナル抗体３Ｃ４の反応性

	３ヵ月	１５才	２０才	６１才
抗体３Ｃ４	−	+	+	+

242 V－1タンパク質の組織分布と小脳形態形成過程での発現様式

田岡万悟、礒辺俊明、奥山典生、渡辺雅彦#、近藤尚武#、桑野良三§、森井研§、宋時栄*、山国徹*、
（都立大・理、東北大・医#、新潟大遺伝子実験施設§、三菱生命研*）

〔要約〕

V-1タンパク質は小脳における神経細胞の分化と神経回路網の形成が盛んな生後早期に一過性に発現が増大する新規タンパク質である。我々はV-1mRNAの組織分布と、ラット小脳の成熟過程での発現様式を、V-1cDNAを用いたノーザンブロット法および *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。V-1mRNAには3.5kbと3.1kbの２種類の分子種が存在し、哺乳動物の脳に広く発現していた。V-1mRNAの発現は他の臓器に比べ脳に強く、小脳だけでなく中枢神経系に広く発現していた。*in situ* ハイブリダイゼーション法による解析では、V-1mRNAは小脳の形成過程においてプルキンエ細胞、顆粒細胞と、ニューロブラストの産生が盛んな"neurogenic region"である外顆粒層に発現していた。以上の結果から、V-1タンパク質は哺乳動物の神経細胞の発生と分化、形態形成の調節に関与していると推定した。

＜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、組織化学的、電気生理学的な研究の蓄積も豊富で分子レベルでの形態形成の研究に適した材料である。我々は神経系の形態形成の過程で細胞内の情報伝達に関与するタンパク質を検索することを目的として、ラット小脳に存在する121種類の可溶性タンパク質を2D-HPLC法[4]で解析した。その結果、神経細胞の分化やシナプス形成が盛んな出生後１週間以内に一過性に増加するタンパク質を２種類(V-1,V-2)検出し、分離精製した[5]。いずれも構造未知の新規タンパク質で、V-1についてはタンパク質化学的な方法とクローニングにより全一次構造を決定した[5]。V-1は117アミノ酸からなる酸性タンパク質で、細胞間相互作用による細胞の運命決定や形態形成に関与していると考えられているcdc10/SWI6モチーフ構造[1]を分子中央部に２回半繰り返し持っていた。本研究ではノーザンブロット法と *in situ* ハイブリダイゼーション法によってV-1mRNAの組織分布とその発現様式を解析した。

＜方法＞

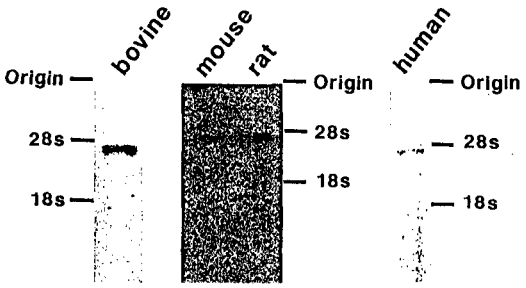
ウシ脳、マウス脳、ヒト脳、ラット各臓器および脳各部位のRNAはGTC-LiCl法[2]とAGPC法[3]で調製した。組織RNAのノーザンブロット分析はホルムアルデヒド法で行った。ランダムプライマーラベリング法で^{32}P標識したV-1cDNAコード領域を含むPstI-PstIフラグメント(132bp)をプローブとして使用した。ハイブリダイゼーションと洗浄は常法により行い、オートラジオグラフィーによってシグナルを検出した。検出されたシグナルの定量は富士写真フィルムのイメージングアナライザーシステムで行った。*in situ* ハイブリダイゼーションはランダムプライマーラベリング法によって^{35}Sで標識したV-1cDNAのコード領域をプローブとして既報の方法[7]で行った。

＜結果と考察＞

ラットV-1cDNAをプローブとしてラット脳RNAをノーザンブロット法で分析した結果、V-1mRNAには3.5kbと3.1kbの分子種が存在し、3.5kbのmRNAがより多く発現していた。また、ラットと同じサイズのmRNAがヒトやマウス、ウシの脳でも発現しており（図１）、これらの哺乳動物ではV-1の一次構造が保存されていることが示唆された。V-1mRNAは成熟ラットの心臓、肺、肝臓、副腎や筋肉などの臓器にも分布していたが脳ではこれらの臓器の2～30倍ものV-1mRNAを発現していた。脳内では大脳皮質、海馬、視床、延髄などの中枢神経系領域に広く分布していた。ラット小脳ではV-1mRNAは出生直後に既に存在していたが、その量は３日、７日と次第に増加し、生後12日には最大の発現量を示してその後徐々に減少した（図２）。以上のV-1mRNAの一過性の発現様式はタンパク質レベルでの解析[4]とほぼ一致していた。

in situ ハイブリダイゼーション法による組織化学的な解析（図３）では、V-1mRNAは生後７日では外顆粒層や内顆粒層及びプルキンエ細胞層で発現し、分子層では発現していなかった。生後14日では内顆粒層及びプルキンエ細胞層での発現量が増大していた。生後49日のラット小脳ではプルキンエ細胞での発現が保たれているのに対し顆粒細胞での発現は著しく減少していた。すなわちV-1mRNAは小脳の形成過程において特定の神経細胞と、ニューロブラストへの分化が活発に起こっている"neurogenic region"に特異的に発現していた。

以上の結果から、V-1タンパク質は哺乳動物の中枢神経系に広く分布し、細胞間の相互作用を介した神経系の発生と分化、形態形成の調節に関与していると考えた。



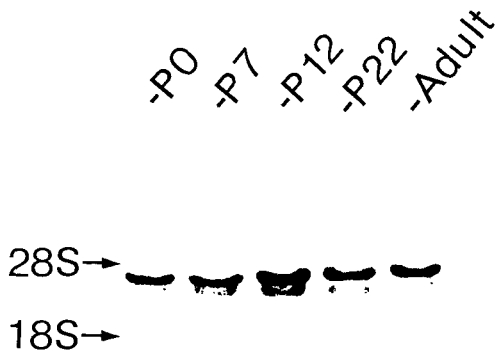


図1.
各種動物脳V-1mRNAのノーザンブロット分析
Bovine：ウシ脳ポリ(A)$^+$RNA　10μg
Mouse：マウス脳ポリ(A)$^+$RNA　5μg
Rat：ラット脳ポリ(A)$^+$RNA　5μg
Human：ヒト脳 total RNA　10μg

図2.
ラット小脳V-1mRNAのノーザンブロット分析
P0：出生直後　total RNA　20μg
P7：生後7日　total RNA　20μg
P12：生後12日　total RNA　20μg
P22：生後22日　total RNA　20μg
Adult：生後109日　total RNA　20μg

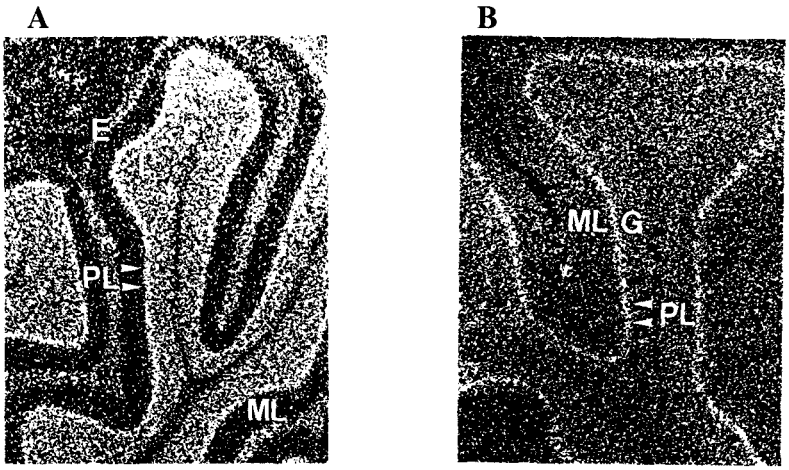


図3．ラット小脳V-1mRNAの *in situ* ハイブリダイゼーション
A：生後14日　B：生後49日
I：内顆粒層　E：外顆粒層　PL：プルキンエ細胞層　ML：分子層
G：顆粒層

1)Breeden, L. and Nasmyth, K. (1987) Nature 329, 651-654.
2)Cathala, G., Savouret, J.F., Mendez, B., West, B.L., Karin, M., Martial, J.A. and Baxter, J.D.(1983) DNA 2, 329-335.
3)Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159.
4)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.
5)田岡万悟　礒辺俊明　奥山典生　山国徹 (1989) 神経化学 28, 98-99.
6)田岡万悟、礒辺俊明、奥山典生、小沢史子、菱沼文男、山国徹 (1990) 神経化学 29, 372-373.
7)Watanabe, M., Sakimura, k., Takahashi, Y. and Kondo, H. (1990) Dev. Brain Res. 53, 89-96.

243 一部の神経核に強く発現するコンドロイチン硫酸プロテオグリカン

前田信明、松井ふみ子、大平敦彦 （愛知県コロニー研、発生）

〔要約〕

生後10日目のラット脳から調製したPBS可溶性プロテオグリカン画分を免疫原として、モノクローナル抗体(Mab 6B4)を作製した。Mab 6B4は、分子量25万のコア蛋白質をもつ分子量60-100万のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを認識した。6B4抗原の各種組織における分布を immunoblot 法により解析したところ、当抗原は脳及び脊髄のみに検出された。当抗原の成獣ラット脳における分布を免疫組織化学的に解析したところ、大脳皮質や海馬の neuropil 及び一部の非錘体細胞が弱く染色されたが、脳幹部においては、一部の神経核のみが、強く染色されるのが観察された。そこで、脳幹部を詳細に解析したところ、橋核、外側網様核、傍正中網様核、橋被蓋網様核、舌下神経周囲核等の小脳前核に、当プロテオグリカンが、多量に発現していることが明らかとなった。また、小脳のプルキンエ細胞及びゴルジ細胞にも中程度の発現がみられた。これらのことは、当プロテオグリカンが特に、小脳ー小脳前核系の機能に密接に関与していることを示唆している。

ほ乳類の脳には、細胞表層または細胞間基質成分として、多種類のプロテオグリカンが存在することが明らかにされつつある(1,2)。プロテオグリカンは、ラミニンやサイトタクチン等の基質蛋白質や神経栄養因子と結合することにより、神経機能に様々な調節作用を及ぼすと考えられている(3)。また、ある種のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンのコア蛋白質には、神経突起の伸展を促進する作用があると報告されている(4)。しかしながら、単一の脳プロテオグリカンについて、その同定や脳内分布が解析された例は、ほとんどない。そこで、本研究では、脳のプロテオグリカンに対するモノクローナル抗体を作製し、脳プロテオグリカンの同定及び脳内分布を検討した。

［実験方法］

(1)モノクローナル抗体の作製

既報（1）の方法に従って、10日目ラット脳より、PBS可溶性プロテオグリカン画分を調製し、BALB/cマウスに免疫した。 常法により、細胞融合を行ないハイブリドーマを調製した。抗体陽性細胞は、immunoblot法により選択し、限界希釈法を二度繰り返すことにより、モノクローンとした。

(2)免疫組織化学

SD系成熟雌ラットをPBSで灌流した後、4%パラホルムアルデヒド／0.1M リン酸緩衝液、pH 7.4 で灌流固定した。脳を摘出後、パラフィン包埋し、7 μmの切片を作製した。組織切片は、ビオチン化抗マウスIgMを用いたABC法により、染色した。

［結果］

(1)6B4抗原の性質

成熟ラット全脳のホモジネートをコンドロイチナーゼ ABC (CHase ABC)で処理後、5% SDS PAGE で解析したところ、分子量25万の位置に反応産物が認められた。一方、CHase ABC 未処理サンプルを同様に解析した場合には、分離ゲル上には反応産物は出現しなかった。そこで、CHase ABC 未処理サンプルを agarose PAGEで分離し、immunoblot法で解析すると、分子量60-100万の位置に反応産物が認められた(図ー１）。6B4抗原の各組織に於ける分布をimmunoblot法により調べたところ、脳および脊髄のみに認められ、その他の組織には検出されなかった。これらのことは、6B4抗原が、脳に多量に存在するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであることを、示している。

(2)6B4抗原の脳内分布

6B4抗原の脳内分布を免疫組織化学的に解析した。

(a)大脳皮質及び海馬

neuropilが弱く染色される。また、大脳皮質第4,6層の一部の非錘体細胞周囲が比較的強く染色される。このような細胞は、特に体性感覚野において顕著である。

(b)視床

視床網様核が濃染される。

(c)橋及び延髄

橋核、橋被蓋網様核、外側網様核、舌下神経周囲核等の小脳への苔状線維起始核が濃染される。一方、登上線維起始核である下オリーブ核は、染色されない（図－2A）。

(d)小脳

プルキンエ細胞及びゴルジ細胞の周囲及び小脳核が染色される（図－2B）。

[考察]

6B4抗原は、一部の神経細胞のみに強く発現していることが、明らかとなった。脳幹部においては、小脳前核に特に強い発現がみられ、小脳－小脳前核系の形成維持に当プロテオグリカンが関与していることが考えられる。

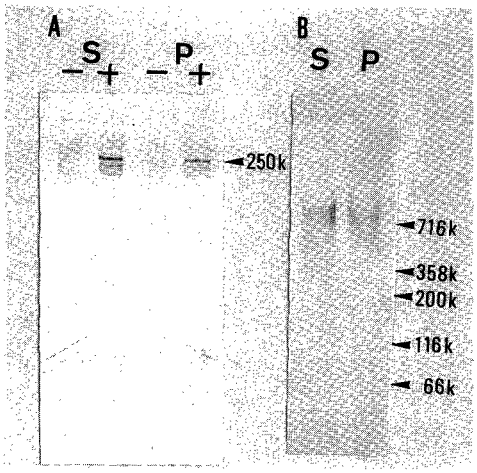
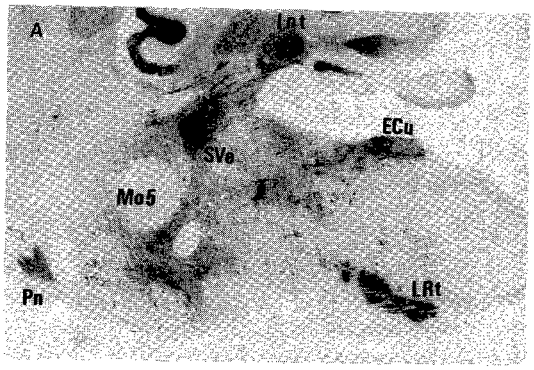


Fig.1 Immunoblot analysis of the adult rat whole brain. Particulate(P) and soluble(S) fractions were prepared from the adult rat brain. The each fraction was treated with (+) or without (-) CHase ABC and analyzed by immunoblotting using Mab 6B4 after the electrophoresis with 5% SDS PAGE (A) or agarose PAGE (B) system.



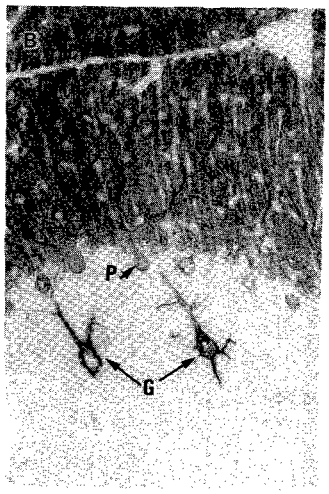


Fig.2 Immunohistochemical analysis of the adult rat brain. (A) Pn: pontine nuclei, Mo5: motor trigeminal nucleus, SVe: superior vestibular nucleus, Int: interposed cerebellar nuclei, ECu: external cuneate nucleus, LRt, lateral reticular nucleus.
(B) P: Purkinje cell, G: Golgi cell.

[文献]

(1) Oohira et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 10240-10246.
(2) Herndon and Lander (1990) Neuron 4, 949-961.
(3) Maeda and Oohira (1991) Trend. Glycosci. Glycotechnol. 3, 28-35.
(4) Iijima et al. (1991) J. Neurochem. 56, 706-708.

244 選択的海馬サーキット障害後に見られる神経細胞機能の可塑性：カルシニューリン免疫組織染色からのアプローチ

山崎靖人、小野寺宏、足立一男＊、小豆原秀貴、松尾嘉之、小暮久也
（東北大学・医・神経内科、＊カナダ・シンファー研究所）

〔要約〕

カルシニューリン（ホスファターゼ2B）のAサブユニット、Bサブユニットに対する特異的モノクローナル抗体を作製し、選択的海馬サーキット障害後の免疫染色性の変化について検討した。選択的海馬CA1神経細胞障害として一過性前脳虚血モデルを用い、また選択的海馬CA3神経細胞障害モデルとして脳室内カイニン酸投与モデルを用いた。コントロール動物において、CA1,CA3 の dendritic fields、および歯状回に両サブユニットの高い免疫反応性が認められた。CA1,またはCA3 神経細胞の選択的障害により、CA1,CA3 の dendritic fields の免疫反応性は著しく低下した。興味深いことに、CA1,CA3 神経細胞障害後に CA3 stratum lucidum の免疫反応性が上昇した。特に、CA3 錐体細胞破壊後の CA3 stratum lucidum の免疫反応性の変化においてA,Bサブユニット間で差が認められた。このことから、カルシニューリン免疫反応は神経細胞機能を検出する為に有用なマーカーである事が明らかになった。特に、錐体細胞障害後の歯状回顆粒細胞の可塑性を良く反映するものと考えられる。

目的

精妙に構築された海馬サーキットは、虚血などのダメージにより容易に破綻を来たすが、新たに機能を補おうと再構築が試みられることが知られている。我々は、今回可逆的リン酸化反応を制御するのに重要な脱リン酸化酵素の一つであり、脳内に豊富なカルモジュリン依存性のカルシニューリン(1)に対する抗体を用いて、選択的海馬サーキット障害後の可塑性の可能性について検討した。

方法

1) CA1障害モデル：pulsinelli Brierley の方法に従い Wistar ットに20分間の前脳虚血を負荷した。再開通3時間後より30日まで経時的に観察した。
2) CA3障害モデル：脳室内にカイニン酸（0.4μg/μl/body）を投与した。投与後7日から100日まで観察した。
3) 免疫組織染色：パラフォルムアルデヒド固定パラフィン切片で、ABC（avidin-biotin peroxidase complex）法を用いた。一部は、金コロイド銀増感法を用い、銀粒子密度染色性（optical density)をコンピューター画像解析装置にて測定し比較した（CA3障害モデル）。

結果および考察

正常動物において、両カルシニューリン・サブユニット免疫反応性の海馬内分布は既報と類似していた(2)。Aサブユニット(Cal-A)は、CA1 subfieldのdendritic fieldとCA3の stratum lucidum に高い Immunoreactivity (IR)が見られた。一方、Bサブユニット(Cal-B)は、Cal-Aと異なり海馬全域に IR が見られ、特にCA1, CA3の dendritic fields および dentate gyrus stratum moleculare に強い反応が認められた。

前脳虚血負荷2～4日後にCA1に選択的神経細胞死が認められ、またカイニン酸投与2日後には投与側のCA3に選択的神経細胞死が認められた。細胞死に伴ってCA1またはCA3 subfieldにおいてCal-A, Cal-Bいずれも IR が著しく低下した。CA3 stratum lucidum において、CA1細胞死に先行する虚血負荷6-24時間後に一過性の IR 低下が認められ、逆に細胞死の現われる4日目以降著しい IR の増強が見られた。この IR の

亢進はCA1 障害30日後まで持続した（図1）。CA3細胞障害モデル死では、7日目より100日まで障害側のCa1-A染色性は対側に比べ著明に増感したのに対して、CA1-B IRは対側に比べ7日目から30日まで一過性に低下し、その後著しく上昇した（図2）。

タンパク質リン酸化の可逆的調節は、正常細胞機能維持および障害されたシグナル伝達系の再構築に必須である。今回の結果は、海馬障害後タンパク質脱リン酸化機構が著しく変化したことを示唆している。また、我々は既に、虚血負荷モデルにおいて、[^{3}H] phorbor ester 結合、およびadenosine A1 receptor 結合が形態変化の認められないCA3 subfieldにおいて亢進すること（3, 4）から、障害負荷後のシグナル伝達系の変化、すなわち可逆性の可能性を報告している。今回の結果でも同様に形態変化の見られないCA3 stratum lucidum において免疫染色性の変化が認められ、障害後の歯状回顆粒細胞の可塑性を示唆するものと考えられる。

以上のことから、脳障害後に変化する神経細胞機能やシナプスの可塑性を解析する上で、カルシニューリン免疫染色が良いマーカーとなりうると思われる。

(1) Yang S.D., Tallant E.A. and Cheung W.Y. (1982) Biochem. Biophys.Res. Common. 106, 1419-1425.
(2) Matsui H., Itano T., Etoh S., Tokuda M., Wang J.H. and Hatase O. (1989) In Calcium Protein Signalling pp.369-375, Pleum Publishing Corporation.
(3) Onodera H., Araki T. and Kogure K. (1989) Brain Res. 481, 1-7.
(4) Onodera H. and Kogure K. (1989) Brain Res. 458, 212-217.

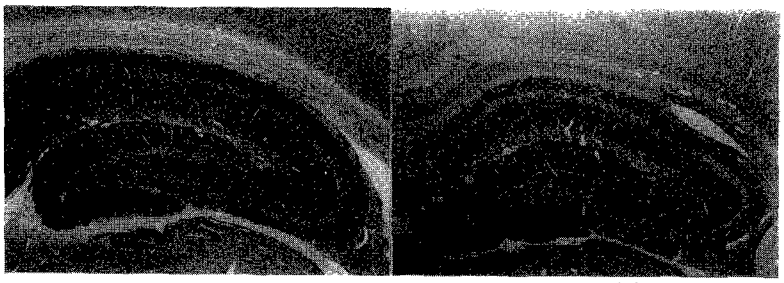


図1
前脳虚血負荷によるCA1錐体細胞破壊後の免疫組織染色（B subunit）
左図：コントロール
右図：虚血負荷後4日

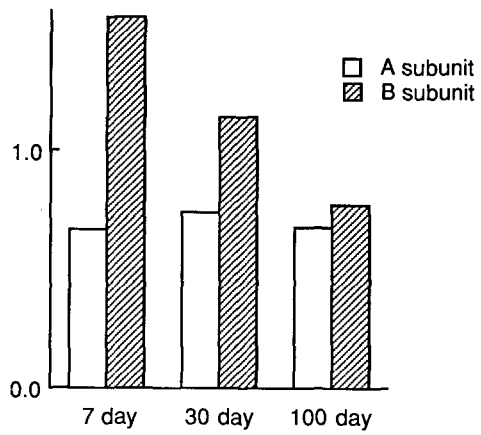


図2
カイニン酸脳室内注入による一側CA3錐体細胞破壊後のStratum lucidum における免疫染色性の経時変化
非処置側の吸光度との相対比（CA3破壊側／CA3健常側）を示す

245 神経細胞特異タンパク質１４ｋＤａの脳組織および細胞内分布と成長分化における含量変化について

柴山敏子、岡橋育子、*浜登希子、小俣久美子、中条茂男、**落合英彦、**中井康光、***佐藤和恵、中谷一泰、中村泰治

（昭和大、薬、生物化学、***分析センター、**医、第一解剖、*三菱化成生命研、脳神経科学）

〔要約〕

１４ｋＤａタンパク質（ＰＮＰ１４）は、脳サイトゾールより単離された分子量１４７００の酸性タンパク質である。前回我々は本タンパク質が他の臓器に比べ脳に著しく多いこと、脳の成長分化と共に脳における含量が増加することを報告した。今回は、その存在部位を間接蛍光抗体法を用いて、小脳、大脳、脊髄において検索すると同時に、生化学的にも更に詳しく分画して調べた。その結果、本タンパク質は、いずれの切片においてもシナプスに局在し、軸索やグリア細胞には存在しない事を見出した。また培養神経細胞を同様に観察したところグリア細胞は免疫反応陰性で神経細胞は陽性であった。ＰＮＰ１４は、シナプス小胞にはみられずシナプス膜とシナプス上清に多いことが判明した。ラットの加齢にともなう脳内ＰＮＰ１４の含量変化について生後１４日目以降を観察したところ、生後２８日目にその量は最大になり以後はその量を維持した。従って、ＰＮＰ１４は神経細胞の基幹的なタンパク質とおもわれる。

［目的］ＰＮＰ１４の神経組織における存在部位については、すでに電子顕微鏡を使って小脳のプルキニエ細胞の周囲の神経終末や大脳淡蒼球に多いことが明らかになっている（１）。今回はもっと広い組織範囲を観察する為と、電子顕微鏡による結果を確認する目的で間接蛍光抗体法を用いた。本タンパク質は脳のどの部位にも存在していたので、特に小脳、大脳、脊髄について観察した。またラット脳中隔野の神経細胞を培養し如何なる性質の神経細胞に多いかを観察した。またシナプス小胞に存在するのかどうかをシナプス小胞を単離して調べた。さらに本タンパク質の量については、生後１４日以降に量的変化がおきるかどうかについても調べた。

［方法］ラットを４％パラホルムアルデヒド／０．０５％グルタルアルデヒドで灌流固定後組織を採取し、凍結切片をつくり間接蛍光抗体法により染色し蛍光顕微鏡および共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡で観察した。ラット神経細胞の培養は生後１４日目のラット脳中隔野を採取し、１週間培養し染色した。またラット脳の各分画はＪａｈｎらの方法（２）にしたがって調製し、ＳＤＳ／ＰＡＧＥ後アフィニテイー精製した抗体を用いてイムノブロットを行なった。

［結果］小脳におけるＰＮＰ１４の分布を間接蛍光抗体法で観察すると、分子層は全体に白く、顆粒層には点々と白い塊がみられた。この像はシナプス小胞構成タンパク質シナプトフィシン（ｐ３８）の分布とよく一致していた（Ｆｉｇ．１）ので、ＰＮＰ１４はシナプス前膜に存在すると思われる。しかしグリア細胞のマーカーとなるＧＦＡＰ抗体で染色した時の像とは全く異なった像を示した。脊髄では、運動ニューロンの周囲およびその他のシナプス存在部位に本タンパク質の存在が見られた。大脳では、軸索が免疫反応陰性であった。培養神経細胞をｐ３８抗体とＰＮＰ１４抗体とで２重染色したところ、全く同じ染色像を示し、コリン作動性ニューロンおよびＧＡＢＡニューロンの細胞質、神経突起も免疫反応陽性であったが、グリア細胞は免疫反応陰性であった（Ｆｉｇ．２）。

Ｆｉｇ．３にみられるようにＰＮＰ１４は、シナプス膜（Ｐ２、ＬＰ１）シナプス可溶性画分（ＬＳ２）に存在するが，シナプス小胞（ＳＧ２）には全く存在しなかった。一方、シナプス小胞構成タンパク質のひとつであるｐ３８は、ＬＳ２になくＳＧ２に非常に多く存在した。ホモジネートから遠心により順に得た各分画におけるＰＮＰ１４の相対的な存在量をイムノブロットより計算すると、表に示したように本タンパク質は膜分画（Ｐ２、Ｐ３、ＬＰ１、ＬＰ２）より可溶性画分（Ｓ２、Ｓ３、ＬＳ１、ＬＳ２）に多かった。これも、ｐ３８とは異なった結果であった。

ラットの成長分化にともなってＰＮＰ１４は、可溶性画分においても膜画分においても増加し、可溶性画分では生後２１日で最大値に達したが、膜画分では生後２１日でも増加を続け、生後２８日で最大となった（Ｆｉｇ．４）。

［考察］以上の結果からＰＮＰ１４は、神経細胞に特異的に存在し成熟脳組織ではシナプスに濃縮されていること、さらにシナプス小胞には存在せずシナプス膜、シナプス可溶性画分に存在していることが明らかになった。また膜画分におけるＰＮＰ１４の含量変化が、生後シナプスが過剰に作られたのち減少するという知見と一致するので、本タンパク質がシナプスの形成に関係していることを示唆けている。今後はＰＮＰ１４がシナプスにおける小胞輸送や分泌機能に関わるタンパク質であるのかどうかを検討する必要がある。

［文献］(1)Nakajo, S., et el. J. Neurochem.(1991) 55, 2031-2038.

(2)Jahn, R., et al.Pro. Natl. Acad. Sci.(1985) 82, 4137-4141.

［謝辞］本研究を遂行するに当って、ｐ３８の抗体を贈与してくださった生理学研究所の小幡邦彦博士に深く感謝いたします。

Fig.1、ラット小脳におけるＰＮＰ１４の存在部位
Ａ、Ｃは蛍光抗体染色像
Ｂ、Ｄはそれぞれの位相差像

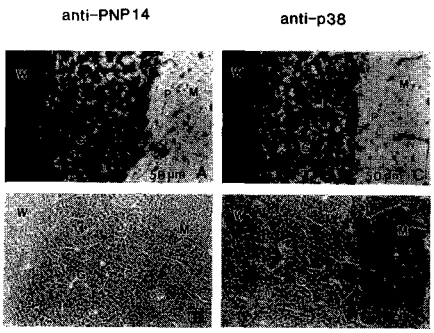


Fig.2、培養神経細胞におけるＰＮＰ１４の存在部位

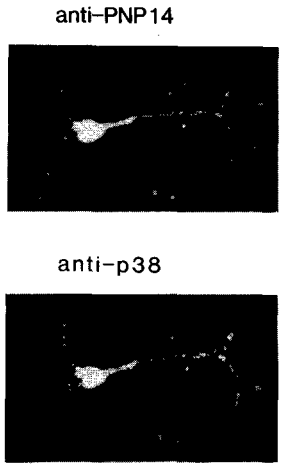
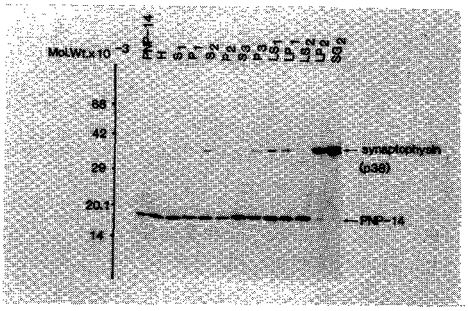


Fig.3、脳ホモジネートの各分画におけるＰＮＰ１４の分布

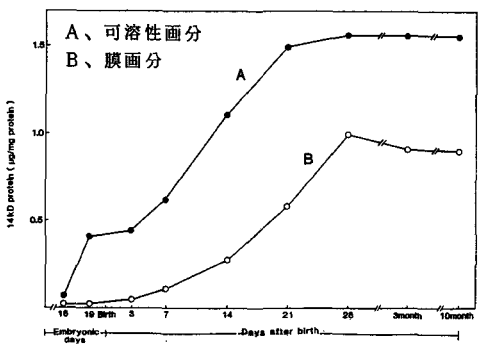


TOTAL RECOVERIES AND RELATIVE ENRICHMENTS OF PNP 14 AND P38 IN SUBCELLULAR FRACTIONS

	Total recovery, %		Relative enrichment	
	p38*	PNP 14	p38*	PNP 14
Homogenate	*100*	*100*	*1.00*	*1.00*
P_1	17.9	23.0	0.69	0.94
S_1	68.0	73.0	1.00	1.07
P_2	22.2	9.7	0.95	0.39
S_2	36.3	37.0	0.72	1.24
P_3	35.1	9.7	1.28	0.57
S_3	1.1	12.1	0.06	1.12
LP_1	14.8	14.8	1.07	1.13
LS_1	7.4	14.1	0.62	1.04
LP_2	7.5	0.07	5.68	0.04
LS_2	0.1	8.6	0.02	1.15
SG_2	2.58	0	8.08	0
SG_4	1.05	0.02	4.68	0.07

* Data from Jahn et al.

Fig.4、ＰＮＰ１４の成長分化における含量の変化



246 ラット中枢神経系におけるサブスタンスP結合蛋白質の免疫組織化学

野村哲也、稲垣　忍、仲田義啓*、髙木　宏
（大阪市立大学・医・第一解剖、広島大学・医・薬効解析*）

〔要約〕ラット脳からサブスタンスP（SP）結合蛋白質を精製し，兎に免疫し抗体を作成した．この抗体を用いてラット中枢神経系内におけるSP結合蛋白質の分布を免疫組織化学的に検討した．SP結合蛋白質は脳内に広く特異的に分布した．例えば，脳幹の運動核などのニューロンの細胞表面に一致して免疫反応産物が観察され，さらに細胞質にも虎斑状に反応産物が観察された．

［はじめに］

哺乳類のtachykinin family のうちSP，substance K（SPK），neuropeptide gamma はpreprotachykinin A (PPTA) gene に由来し，neuromedin K（NMK）はPPTB gene に由来する(1)．一方，tachykinin 受容体にはSP，SK，NMKの3つにそれぞれ最も親和性の高いサブタイプが分子生物学的にも薬理学的にも同定されている(2-6)．私達はSP結合蛋白質をラット脳から精製しこれに対する抗体を用いて免疫組織化学的に同蛋白質の中枢神経系における分布・局在について検討した。

［方法］

ラット脳をジキトニンで可溶化後，ゲル濾過，レクチンカラム，affinityカラムを用いて精製した（仲田ら）．このSP結合蛋白は分子量76Kであった．精製したSP結合蛋白質をアジュバンドと共に家兎に免疫し抗体を作成した．ラットをペントバルビタール(50mg/kg)で麻酔しホルムアルデヒド含有固定液で灌流固定後，30％庶糖液に浸漬し，30μm厚の凍結切片を作製した．切片をSP結合蛋白質抗体と免疫反応後，ABC法で反応，DABで発色した．隣接切片はチオニンで対比染色を行った．

［結果］

SP結合蛋白質は中枢神経系内に豊富に幅広く局在していた．SP結合蛋白質はニューロンに一致して認められ、主に細胞表層の細胞膜付近に局在したが，細胞質内にも虎斑様に観察された（図1）．しかしながら、細胞核は陰性であった．免疫反応は中枢神経系内では動眼神経核，滑車神経核，三叉神経運動核(Mo5)，外転神経核，顔面神経核(7)，舌下神経核などの運動ニューロンに最も強く認められた（図2）．運動ニューロン以外では内側中隔野、マイネルト基底核、視床前核背側部、内側膝状体内側部(MGM)，n. optic tract (OT)，上丘深層(InG)，赤核(R)，黒質緻密質外側部(SNL)，脚橋被蓋核、橋・延髄網様体(PnO,PnC, Gi)，三叉神経中脳路核(Me5)，前庭神経外側核(LVe)及び上核(SuVe)，蝸牛神経核(VCo),三叉神経脊髄路核(Sp5)，raphe magnus (RMg),薄束核や楔状束核（散在性に分布）、迷走神経背側核などに免疫反応強陽性のニューロンが観察された（図2）。また、淡蒼球、視床下部外側核，内側膝状体内側部，黒質緻密質(SNC)，網様体被蓋橋核,小脳核や外側毛体核、外側及び内側上オリーブ核などの聴覚関連神経核に中等度の免疫陽性ニューロンが観察された。

［考察］

本研究で使用した抗体は主に細胞体膜や細胞質のSP結合蛋白質を認識した．内側中隔野，視床前核背側部、視床下部外側核，網様体，三叉神経脊髄路核，舌下神経核，迷走神経背側核などに分布するニューロンはSP結合蛋白質免疫陽性を示し，またRI標識リガンドを用いたオートラジオグラフィ（ARG）の結果と一致した(6)．一方，外眼筋を支配する運動核や，三叉神経運動核や顔面神経核等の運動核，前庭神経核や蝸牛神経核，赤核や小脳核などではSP結合蛋白質の免疫反応が陽性を示したのに対し，RI標識リガンドによるARGの結果ではSP結合部位が観察されていない(6,7)．反対に，線条体，上丘表層，孤束核などではARGによってSP結合部位の存在が報告されているのに，免疫反応をあまり検出できなかった．しかしながら，黒質緻密質のようにSPリガンドを用いたARG実験では殆ど結合部位が観察されていないのに(6,7)，in situ hybridization 法ではSP受容体が報告されている(8)部位も存在するので実験方法によってもSP受容体分布の違いがあるようである．即ち，本研究でのSP結合蛋白質の分布は以前のRIリガンドを用いたARGの結果と一致する部位もあったが一致しない部位も多く観察された．

本ＳＰ結合蛋白質抗体はblotting実験で76Kの蛋白質を認識し，Molecular Biology によって推測されるＳＰ受容体の分子量よりもかなり大きく，１つには糖鎖を含めたＳＰ結合蛋白質を認識している可能性が考えられた.

［参考文献］

1. Nakanishi,S. (1987) Physiol. Rev., 67, 227-241.
2. Sigemoto, R. et al. (1990) J. Biol. Chem., 265, 623-628.
3. Sasai, Y. & Nakanishi S. (1989) Biochem.Biophy.Res.Comm., 165, 695-702.
4. Yokota, Y. et al. (1989) J. Bio. Chem., 264-17649-17652.
5. Hershey, A.D. and Krause, J.E. (1990) Science, 247, 958-962.
6. Saffroy, M. et al. (1988) Peptides, 9, 227-241.
7. Quirion, R. et al. (1983) Nature, 303, 714-716.
8. Sigemoto R. et al. (1990) 第１４回神経科学学術集会，1P57.



図１
前庭神経外側核におけるＳＰ結合蛋白質免疫陽性ニューロンの局在を示す光学顕微鏡写真.
ＳＰ結合蛋白質は主に細胞膜に一致して認められ（矢印），さらに細胞質にも認められた.

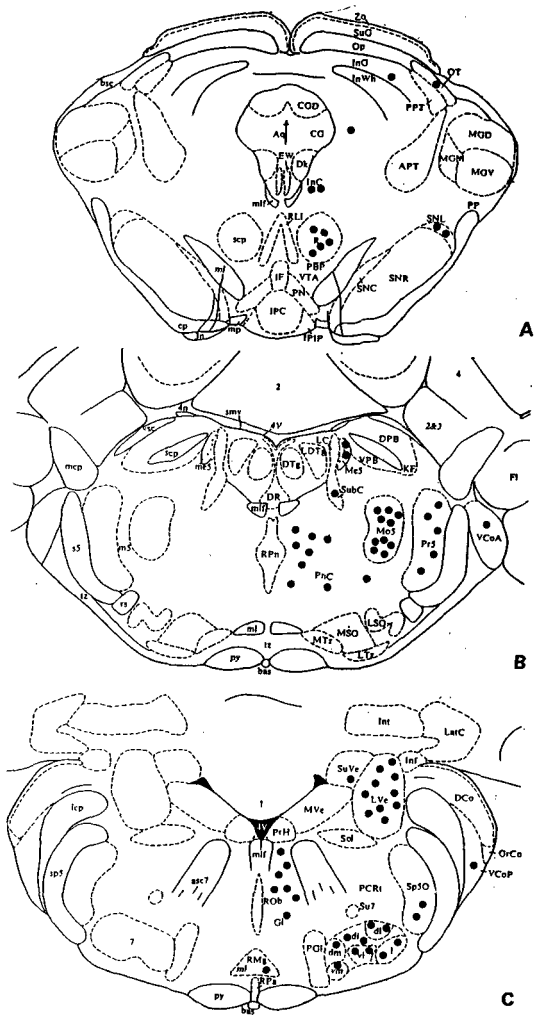


図２
ラット脳幹の前頭断切片を吻側から尾側へ並べＳＰ結合蛋白質の分布を示した．黒丸は免疫反応強陽性ニューロンの分布を示す.

247 ヒトS100蛋白α,β鎖遺伝子の構造と染色体局在

森井　研、高橋康夫*、蓑島伸生**、福山隆一**、清水信義**、桑野良三
（新潟大・遺伝子実験施設、脳研・神経薬理*、慶大・医・分子生物**）

〔要約〕
中枢神経系の形成、発達へのS-100蛋白の関与を知る目的で、ヒトS-100 α, β鎖遺伝子のクローニングと染色体へのマッピングを行った。α, β鎖遺伝子共に、三つのエクソンが二つのイントロンで分断されていた。翻訳領域はイントロン2で二等分され、Ca^{2+}結合部位である二つのEF handはエクソンⅡ、Ⅲから各々コードされていた。ソーティングした染色体を用いたスポットブロットハイブリダイゼーションにより、α, β鎖遺伝子は各々、第1、第21染色体にマッピングされた。

Moore[5]により脳特異蛋白として発見されたS-100蛋白は、α, βの2つのサブユニットからなるダイマーである。α, βサブユニット共に、EF handとして知られる二つのCa^{2+}結合部位を有し、細胞周期、細胞分化、細胞骨格と膜の相互作用への関与が想像されている[2]。中枢神経系においてアストログリアに局在するβ鎖が、神経突起伸長作用を示すこと[2]、β鎖が第21染色体上のダウン症候群の責任領域の近傍に遺伝子座を有しダウン症候群で増加していることから[1]、β鎖の脳の発達、神経回路の形成への重要な役割が考えられている。一方、α鎖はニューロンにも存在するが、その機能は明らかではない。中枢神経系の形成や発達にS-100蛋白がどのように関与しているかを分子レベルで解明する目的で、ヒトS-100蛋白α, βサブユニット遺伝子のクローニングと遺伝子の染色体上の局在部位の決定を行った。

［方法］
1．遺伝子クローニング。　EMBL3ヒト白血球遺伝子ライブラリー(Clontech)を、既にクローニングしたヒトα, β鎖cDNA[6]をプローブに用いたプラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。β鎖では陽性プラークが得られたが、α鎖では得られなかったため以下のように遺伝子ライブラリーを作成した。ヒト胎盤高分子DNAをEcoRⅠで消化し、α鎖cDNAをプローブとしたサザンブロット解析で単一なバンドを呈した6 kbp付近のフラグメントをアガロースゲルから切り出してλgt10のEcoRⅠ部位に挿入した。このライブラリーをα鎖cDNAでスクリーニングし陽性プラークを得た。制限酵素分析、サザンブロット解析により制限酵素地図を作成した。各制限酵素断片をpUC118にサブクローニングし、Sanger法で塩基配列を決定した。
2．サザンブロット解析。　ヒト胎盤高分子DNAを制限酵素処理ののち電気泳動、フィルターに転写後、ヒトα, β鎖cDNAを各々プローブとしてハイブリダイゼーションを行った。
3．染色体マッピング。　GM130B細胞の分裂中期染色体をセルソーターでフィルター上にソーティングし、各染色体に特異的なDNAマーカーを用いたスポットブロットハイブリダイゼーションにより各画分に含まれる染色体を同定した[4]。次いでこれらのスポットブロットとヒトα, β鎖cDNAをハイブリダイズさせた。

［結果、考察］
ヒト遺伝子ライブラリーから各々6 kbp, 14 kbpのα, β鎖遺伝子が得られた（Fig. 1）。α, β鎖遺伝子は共に三つのエクソンと二つのイントロンで構成されており、エクソン－イントロン接合部はGT-AG則に従っていた。エクソンⅠは5'非翻訳領域のみからなっていた。エクソンⅡは13塩基(α)または1塩基(β)の5'非翻訳領域と、141塩基(α)または138塩基(β)の翻訳領域をコードしていた。エクソンⅢは141塩基(α)または138塩基(β)の翻訳領域及び3'非翻訳領域全体をコードしていた。すなわち、α, β鎖共にその翻訳領域はイントロン2によって真中で分断されてエクソンⅡ, Ⅲに均等に分配され、二カ所のCa^{2+}結合部位（EF hand）

はエクソンⅡ、エクソンⅢに分かれてコードされていた。これらの結果より、ヒトα，β鎖遺伝子が、他の EF hand タイプの蛋白と同様に一つの Ca^{2+} 結合部位をコードする祖先遺伝子の何回かの遺伝子増幅と遺伝子欠損により進化してきた事が示唆される。

ヒトα，β鎖遺伝子の 転写制御機構を検討するために5'上流領域を比較すると、それらの塩基配列は類似しており、更にラットβ鎖遺伝子[3]の 5'上流領域と非常に高い相同性を示した。ヒトβ鎖遺伝子上流領域には、ラットβ鎖遺伝子の TATA box 様配列及び CCAAT box 様配列に対応する塩基配列が認められた。以上から、ヒトα，β鎖遺伝子の転写開始点及びプロモーターがこの相同性の高い領域に存在することが示唆される。

ヒト α，β鎖 cDNA プローブを用いてヒト遺伝子 DNA をサザンブロット解析した結果、ハイブリダイゼーションのパターンはα，β鎖遺伝子の制限酵素地図と一致し、各々の遺伝子が haploid あたり単一コピー存在することが示された。

更に、染色体をソーティングし、スポットブロットハイブリダイゼーションを行ったが、ヒトα，β鎖 cDNA は各々 a_1 分画、q 分画とハイブリダイズし、ヒトα，β鎖遺伝子は各々、第1染色体、第21染色体に有ることが示された（Fig. 2）。これらの結果から、ヒト-マウスハイブリドーマを用いたヒトβ鎖遺伝子の染色体マッピング[1]の status が provisional から confirmed となり、α鎖遺伝子が新たに第1染色体に provisional としてマッピングされた。

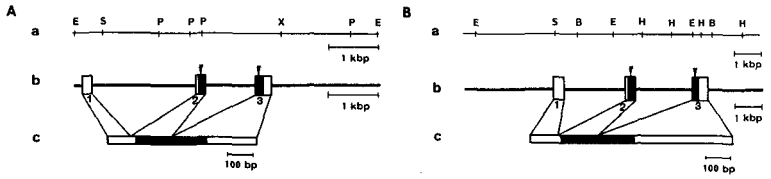


Fig. 1. Schematic presentation of human α subunit gene (A) and human β subunit gene (B). (a) Restriction map of genomic clone. B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; S, SmaI; X, XbaI. (b) Diagram of the gene. Exons, indicated by the boxes, are numbered. The solid boxes indicate the coding region and the open boxes indicate the noncoding region. The arrowheads identify the Ca^{2+}-binding domains. (c) Structure of the cloned cDNA.

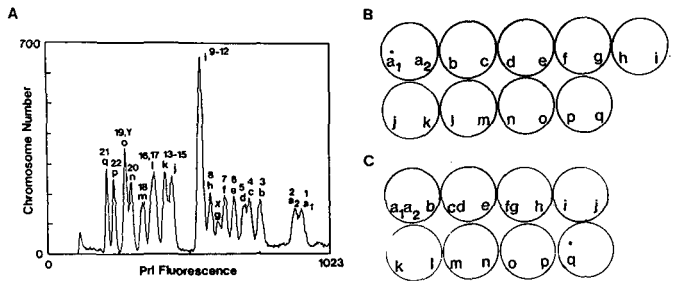


Fig. 2. Localization of the human α and β subunit genes on the flow-sorted chromosomes from the human B-lymphoblast line GM00130B. (A) Propidium iodide-stained flow-karyotype. (B) Hybridization of the entire length of human α subunit cDNA probe to spots containing sorted chromosomes. (C) Hybridization of the 3' noncoding region of human β subunit cDNA probe to spots containing sorted chromosomes. In this case, fractions a_1 and a_2 were collected as a mixture.

［文献］

(1) Allore, R. et al. (1988) Science. 239, 1311-1313 (2) Kligman, D. et al. (1988) Trends Biochem. Sci. 13, 437-443 (3) Maeda, T. et al. (1991) Mol. Brain. Res. 10, 193-202

(4) Minoshima, S. et al. (1990) Cytometry. 11, 539-546 (5) Moore, B. W.(1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 739-747 (6) Morii, K. et al. (1989) 神経化学. 28, 132-133

248 N_2O 鎮痛の発現機序におけるSubstance Pおよび Noradrenaline系神経の関与

石川敏三,重冨美智男,田和聖子,山本智久,前川剛志*,坂部武史
(山口大医・麻酔－蘇生、総合診療部*)

〔要約〕
N_2O 鎮痛の発現機序における中枢神経系内substance P (SP)およびnoradrenaline(NA) 系神経の関与について検討した。N_2O (75 %) 吸入により以下のことが明かとなった。1．鎮痛実験(%MPE) : tail-flick潜時は60%上昇した後、徐々に減弱した。Clonidine: CLO 前投与では60-80 %に維持 (耐性を拮抗) され、青斑核破壊後では30%に低下した。Naloxone投与は N_2O 鎮痛を変化させなかった。2．NA系神経伝達 : 青斑核のNA (HPLC-ECD) 濃度は低下し、[^{3}H]-CLO結合部位(in vitro autoradiography)は増加した。また、脊髄後角の [^{3}H]-CLO結合部位は増加した。3．SP系神経伝達 : 脊髄後角のSP含量(RIA) は増加し、[^{125}I]-Bolton Hunter SP 結合部位は減少した。以上から、N_2O 鎮痛はopioid神経系を介する機構より、下行性抑制系のNA系神経シナプス伝達の賦活と、一次知覚伝導における α_2 受容体を介する抑制およびSP系神経シナプス伝達の抑制作用の関与がより有力であることが示唆された。

【はじめに】笑気 (N_2O) が、強力な鎮痛作用を有することは古くから知られているが、その鎮痛作用機序については一定の見解がない。従来より、N_2O 鎮痛は脊髄一次知覚伝導への直接的抑制作用、あるいは脊髄上位下行性抑制系の賦活作用による可能性が電気生理学的方法から示され(1,2) 、またこれらはnaloxoneで部分的に拮抗されることから(6) 、内因性opioid神経の関与が有力とされた。しかし、麻薬性拮抗剤に影響されないとする報告もあり(4) 、少くとも局所脳、脊髄における選択的神経系のシナプス伝達の果す役割については不明のままである。一次知覚伝導において、脊髄後角のsubstance P(SP) は重要な侵害情報の伝達物質として知られているが、最近脊髄後角あるいは脳幹青斑核のnoradrenaline(NA) 系神経(とくに α_2 受容体) が、opioid系神経との相互作用により下行性抑制系の調節に重要に関与している可能性が示唆されている(3) 。そこで、本研究は N_2O 鎮痛の発現機序について、脊髄後角および脊髄上位脳幹におけるNAおよびSP系神経の関与について神経化学的に検討した。

【方法】Wistarラット(250-350g)を用い飼料と水は自由に与え、明暗サイクル(7:00-19:00)で飼育した。ラットを対照群 (覚醒状態) 、N_2O-alone (N_2O-A)群、N_2O-clonidine:CLO (N_2O-C)群、N_2O-LC lesion (N_2O-L)群、N_2O-naloxone:NAL(N_2O-N)群に分けた。ラットをプラスチック製箱の中に入れ、N_2 75%+ O_2 25% (対照群) あるいは N_2O 75%+ O_2 25% (N_2O 各群) を吸入させ、経時的にtail-flick(TF)法による鎮痛効果を2時間測定した後、断頭した。冷温下で脳および脊髄 C_{1-3} を取り出し、分析まで凍結保存した。TF法では、各群測定時3-5 回行い (対照時: 5-7 秒、cut off 10秒) 、%MPEで鎮痛効果の指標とした(%MPE＝ (処置後－対照時／(10 －対照時) ×100)。脊髄後角部、青斑核を0.1Mクエン酸緩衝液(pH3.0) を用い均質化した後、冷却遠心分離し、上澄をHPLC-ECD (750mV, ODS 5μ, 0.15Mクエン酸緩衝液) に注入しNAを定量分析した。α_2 受容体結合(in vitro autoradiography)は、凍結組織標本 (20 μ) をKrebs リン酸緩衝液(25 ℃) でpreincubation し(30 分間) 、次に1.0nM [^{3}H]-CLOを含む0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH7.6, 25℃, 10mM $MgCl_2$ 含) に60分間つけ行った (非特異的結合 : 10 $^{-9}$M phentolamineを含む) 。Ultrofilm に30日間感光させ、得られたautoradiogram から画像解析装置を用い定量的特異的結合を算出した。SP含量は脊髄(C_{1-3}) 後角部を取り出し、radioimmuno assay で測定した。またSP受容体結合は、同様な組織切片を室温で15分間のpreincubation を行った後、ペプチド酵素阻害剤と500pM [^{125}I]-BH-SPを含む50mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.4) で90分間結合させた。その後Ultrofilm に24時間感光し、以後の画像解析は前述同様とした。薬物 : CLO は N_2O 吸入30分前に150 μg/kg, ip 投与、NAL は5mg/kg, iv を N_2O 吸入と同時に投与(morphine の鎮痛効果を拮抗する用量) 。青斑核破壊群で実験1週間前に脳定位下、両側青斑核をlesion generatorで破壊し、光顕的に傷害を確かめた。

【結果】1．鎮痛効果(%MPE) : 対照群では測定中変化なかったが、N_2O-A 群では吸入30分で最高値60%に達した後、減少した (耐性

発現）。N_2O-C 群では吸入後60-80 %を維持し（耐性の拮抗）、N_2O-L 群では吸入30分で30%と有意に抑制された。一方、N_2O-N 群では N_2O-A 群と差がなく N_2O による鎮痛効果は拮抗されなかった（図1-a, -b）。2. NA系神経伝達：N_2O-A 群では、青斑核でNA濃度の減少と［^{3}H］-CLO結合部位の増加、また脊髄後角(laminae I-II）で結合部位の増加がみられた（図2）。3. SP系神経伝達：N_2O-A 群では脊髄後角のSP含量は120 %増加し、また［^{125}I］-BH-SP結合部位は20%減少した（図3）。

【考察】本研究から N_2O 鎮痛は吸入30分後に最大となり、以後徐々に減少し、急性耐性が発現することが明らかになった。また N_2O の鎮痛効果は青斑核破壊により減弱し、α_2 受容体刺激(CLO投与）で N_2O 鎮痛の耐性が拮抗された。また N_2O 鎮痛はNALで拮抗されなかった。このことから N_2O 鎮痛の発現機序はmorphineとは異なり、脊髄上位痛覚伝達調節系におけるNA系神経の賦活作用（下行性抑制）の関与が有力と考えられる。N_2O 吸入で青斑核のNA濃度が減少し、α_2 受容体結合の亢進がみられたことは、LC由来NAニューロンが活性化されたことを示すものと考えられる。一方、一次知覚ニューロンについては、α_2 受容体が侵害刺激伝達に重要に関与するSP神経終末のシナプス前、あるいは後角ニューロンに局在し、興奮性伝達をシナプス前抑制している可能性がある(3)。したがって本研究で N_2O 吸入により脊髄後角のSP放出量の減少と後角ニューロンSP(NK1) 受容体結合の減少がみられたことは、N_2O が一次知覚伝導をSP系神経や脊髄上位のNAに作用して抑制し、鎮痛効果を発現した可能性を示唆する。しかし、下行性抑制系で青斑核に入力し連鎖する中脳周囲灰白質、傍巨大細胞網様核はオピオイドとα_2 受容体が共存しており、これらの相互作用の鎮痛効果への関与については不明である。本研究で N_2O 吸入後、時間と共に鎮痛効果が減弱しCLO が拮抗することを示したが、このことはmorphineの耐性発現をCLO が拮抗するとした報告と符号するものと考えられ、今後これら受容体の相互作用についての検討も必要である。以上のことから、N_2O 鎮痛の発現にはopioid神経系を介する機構より、NA系神経の下行性抑制の賦活作用と一次知覚伝導におけるα_2 受容体を介する抑制作用とSP系神経シナプス伝達の抑制作用の関与がより有力であることが示唆された。

【文献】1)Kitahata LM, Taub A and Sato T;J Pharmacol Exp Ther(1971)176,101、2)Komatsu T,Shingu K,Tomemori N, et al;Acta Anesth Scand(1981)25,519, 3)倉石泰: 薬学雑誌(1990)110,711 、4)Lavine JD, Gordon NC, and Field HL;Pain(1982)13,165 、5)Theye RA and Michenfelder JD;Anesthesiology (1968)29,1119 、6)Zuniga J, Joseph S, Knigge K;Eur JPharmacol(1987)142,51

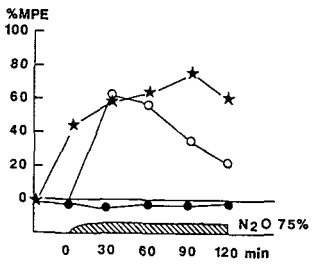


Fig.1-a Time course of analgesic maximal possible effect (MPE) of N_2O (75%).
●N_2 exposure, ○N_2O exposure, ▲Combination of N_2O and clonidine.

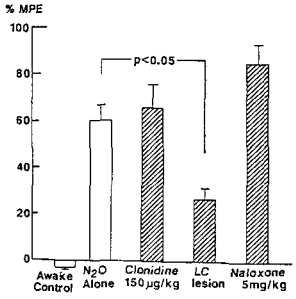


Fig.1-b Modification of N_2O analgesia.
Analgesic maximal possible effect (MPE) at 30min after start of N_2O exposure.

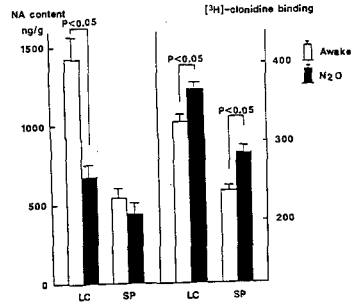


Fig.2 Effect of N_2O (75%) on noradrenaline concentration and [^{3}H]-clonidine binding sites in the locus coeruleus (LC) and dorsal horn (laminae I-II) of spinal cord.

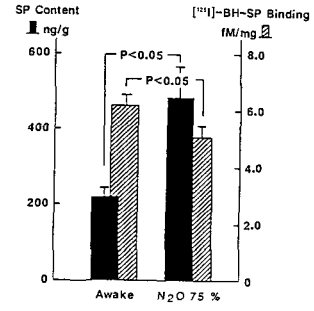


Fig.3 Effect of N_2O (75%) on substance P content and [^{125}I]-Bolton Hunter SP binding sites in the dorsal horn (laminae I-II) of spinal cord.

249 脳虚血による CA1 遅延細胞死に先行する clathrin の変化 (II)

吉見建二*、岩田宜芳*、工藤香、武田雅俊、中村祐、西村健
*三共(株)中枢神経研究室、 大阪大学医学部精神神経科

〔要約〕

clathrin 様免疫反応性が脳虚血後の海馬 CA1 細胞層において上昇している事を昨年の本学会において発表した[6,7]。海馬 CA1 細胞は脳虚血に特に脆弱であり、細胞壊死が約3日の遅延期間をおいて現われる[4]事から、脳虚血再開通後の二次的な変化を研究するのに適している。clathrin は細胞内小胞輸送に関わるコート小胞のコート構成分子であるが、その免疫反応性の上昇は CA1 ニューロンに特異的であり、これが脳虚血による細胞死のメカニズムに関わっている可能性がある。今回は使用した抗体の抗原との反応性について検討し、染色性の上昇が clathrin の過剰な重合による可能性を示唆する知見を得たので報告する。

(方法)

免疫組織化学:スナネズミ(10 週齢、♂)をハロセン麻酔下に総頸動脈を 5-15 分間結紮、再開通し一過性前脳脳虚血を施した[4]。一定時間後に灌流固定し、海馬凍結切片をモノクローナル抗 clathrin 抗体(CHC5.9)[2]により免疫染色した。MCID 画像処理装置(Imaging Research Inc.)により海馬各部位の染色の Optic Density (OD)を測定した。

重合による免疫反応性の変化:clathrin はアルカリ性において可溶性となり、弱酸性において重合しコートの格子構造を形成する事が知られている[3,5]。重合による抗体の反応性の変化を検討するために、ウシ脳よりコート小胞を精製[1]し、あるいはスナネズミ脳より粗コート小胞分画を得、これらを pH6.5 または pH8.0 のバッファーにて希釈した液をニトロセルロース紙にドットブロットし、抗 clathrin 抗体により染色し、重合・脱重合による免疫反応性の相違を検討した。

海馬の細胞質、膜分画の clathrin 含量:一方、遅延細胞死に先行する脳虚血 2 日後に断頭、海馬ホモジネートを作成、100 x10^3g 遠心分離により細胞質、膜分画を得て、SDS-PAGE およびウエスタンブロットにより clathrin 含量を偽手術動物と比較した。

(成績)

脳虚血再開通後の海馬切片の各部位の Optic Density を測定し、染色の実験毎、切片毎のばらつきを補正するためデータを各海馬切片全体の Optic Density に対する%で表した(表1)。脳虚血 12 時間－2 日後の CA1 錐体細胞層において染色性の有意な上昇を認め昨年の目視による結果を定量的に確認できた。

スナネズミコート小胞、またはアルカリにより脱重合した clathrin のドットブロットにより、使用した抗 clathrin 抗体は、可溶化した calthin よりも重合したコートにより強く反応する事が明らかになった(図1)。

海馬ホモジネートにおいて 5 分間脳虚血 2 日後では顕著な変化を認めるに致らなかったが、脳虚血を 15 分間とすると細胞質の clathin の減少が認められた(表2)。

（考察）

脳虚血後の海馬 CA1 における clathin 様免疫反応性の上昇を定量的データとし、統計的に有意である事が示された。重合しコートを形成した clathrin のほうが脱重合し可溶性となったものより免疫反応性が強い事から、この変化は clathrin がより重合したためである可能性が示された。海馬ホモジネートの細胞質分画の clathin が 15 分間脳虚血後顕著に減少した事はこの可能性をうらずけるものである。calthin が過剰に重合しているとすると receptor-mediated endocytosis あるいは ゴルジ体からの小胞輸送などの細胞内小胞輸送が障害されていると考えられる。脳虚血後のニューロンの二次的な変化として小胞輸送の障害についても検討する必要があると思われる。

（引用文献） (1) Altisiei & Branton (1983) Cell 32 921-929. (2) Bruder.G..Wiedenmann.B.(1986) Exp.Cell Res.164.449-462 (3) Goud et al.(1985) J.Cell.Biol.100 521-527. (4) Kirino.T.(1982) Brain Res. 239.57-69. (5) Ungewickell.E. et al. (1981) Cold Spring Harbor Symp.XLVI 723-731. (6)吉見、他(1990)神経化学 456-457. (7) Yoshimi.K. et al. Brain Res. in press.

表１：脳虚血後 CA1 錐体細胞層の染色強度の変化。海馬全体の Optic density を 100 とし、CA1 錐体細胞層の Optic density を表した。

survival time	sham	1hr	3hr	6hr	12hr	1day	2days
mean density ± S.E.M. (n)	99.6 ±0.9 (10)	89.8 ±2.4 (6)	103.8 ±4.1 (6)	108.5 ±6.2 (4)	123.5* ±0.0 (2)	124.3** ±7.1 (3)	115.4* ±5.3 (5)

*:p<0.05, **:p<0.01, Dunnet's test

図 1

脱重合(PH8.0) 重合(PH6.5)による CHC5.9 抗体の反応性

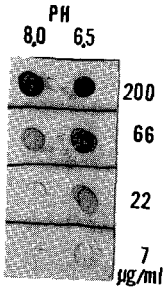


表２：脳虚血 2 日後の海馬サンプル SDS-PAGE 上の clathrin バンドの強さ。

サンプルを 7.5% polyacrylamide gel により展開し、クマシーブルーにて染色の後各レーンをスキャンし、clathrin バンドのレーン全体の OD 値に対する%で示した。

処置	個体数	細胞質分画	膜分画
偽手術	(n=4)	0.27 ± 0.01	3.45 ± 0.31
5分間脳虚血	(n=4)	0.30 ± 0.03	3.70 ± 0.35
偽手術	(n=4)	0.12 ± 0.02	1.63 ± 0.24
15分間脳虚血	(n=4)	0.03 ± 0.03 *	1.75 ± 0.22

250 高血圧自然発症ラット(SHR)を用いた脳虚血モデルの慢性期における脳内アセチルコリン系各種パラメーターの変化

○羽場久美子[1]，小川紀雄[1]，水川公直[2]，田中健一[1]，浅沼幹人[1]，平田　洋[1,3]，森　昭胤[1]
岡山大学医学部・脳研・機能生化[1]，第一解剖[2]，第三内科[3]

〔要約〕
高血圧自然発症ラット(SHR)を用いて脳虚血モデルを作製し，血流再開通後の脳内アセチルコリン系の種々のパラメーターの変化を慢性期に重点をおいて検討した．虚血2週間後に前頭皮質および海馬で組織的に病変が観察されたが，海馬は前頭皮質に比べ軽微であった．しかし，対照のWKYラットでは虚血8週間後でも，虚血による組織の病変は光学顕微鏡的には全く観察されなかった．前頭皮質においてムスカリン性アセチルコリンレセプター(mACh-R)サブタイプの1つであるM1レセプター(M1-R)への特異的結合(Bmax)は2週間以降，有意な低下が持続したが，海馬ではM1-RのBmaxは4週間後に初めて，sham-operate群に比べ有意な低下が観察され，以後低値を持続した．WKYラットについてはどの部位においても虚血によるM1-Rの変化は認められなかった．choline esterase(ChE)活性は前頭皮質で2-4週間で虚血により低下，8週間後には回復したが，海馬では虚血8週間後に初めて低値を示した．choline acetyltransferase(CAT)活性はいずれの部位でも変化が見られなかった．以前我々が砂ネズミを用いた一過性脳虚血モデルで報告したような海馬におけるmACh-Rの超遅発性の変化，さらにはChE活性の超遅発性の変化がSHRでも同様に観察された．慢性高血圧状態を示すSHRを用いた脳虚血モデルはヒトの脳梗塞の病態モデルとして有用であることが示唆された．

〔緒言〕
高血圧症は脳血管障害の基礎疾患として重要であるが，高血圧自然発症ラット(SHR)を用い両側総頸動脈を閉塞しその後の組織学的変化(8,10)やエネルギー代謝の変化(1,6)についての検討は行われているものの生化学的検討は充分にされているとはいえない．今回我々は高血圧症患者に頻発する脳血管障害の後遺症を生化学的見地から明らかにする目的で，SHRを用いて脳虚血モデルを作製し，ムスカリン性アセチルコリンレセプター(mACh-R)サブタイプの1つで脳に特異的に存在するM1レセプターサブタイプ(M1-R)，アセチルコリン(ACh)合成酵素であるcholine acetyltransferase(CAT)活性およびACh分解酵素のcholine esterase(ChE)活性の変化を慢性期に着目して検討した．

〔方法〕
20-24週齢の雄性SHRを用いた．まずketamine麻酔下(100 mg/kg, i.m.)頸部正中切開にてSHRの両側総頸動脈を露出し絹糸をかけた．翌日ether麻酔下に再びこれを露出し，覚醒後すばやく動脈瘤クリップで閉塞した．3時間後クリップを除去して血流を再開通させた(ischemia群)．再開通後2,3,4そして8週間後に動物を屠殺し，Glowinskiらの方法(3)によって前頭皮質，海馬，線条体を摘出した．sham-operate群は両側総頸動脈閉塞以外はischemia群と全て同じ条件下で実験を行った．組織学的検索は常法に従って行い，M1-R結合はLathinらの方法(7)を一部改変して行い，リガンドとしては[^{3}H]-pirenzepine，非特異的結合として1μM-atropineを用いた．CAT活性はFonnum(2)の変法であるHabaらの方法(4)にて測定した．またChE活性は和光純薬のコリンエステラーゼテストワコーを，蛋白定量はBio-radのprotein assayキットを使用した．各測定値はone-way ANOVAもしくはU-testにより検定し5%以下を有意の差とした．また，WKYラット(20-24週齢，雄性)を用いて同様にsham-operate群およびischemia群を作製し，8週間後に屠殺，組織学的検討，レセプター結合実験および酵素活性測定に供した．

〔結果〕
SHRでは，虚血2週間後に大脳皮質および海馬で組織的に病変が観察されたが，海馬は大脳皮質に比べ軽微であった．しかし，WKYラットでは虚血8週間後でも，虚血による組織の病変は光学顕微鏡的には全く観察されなかった．前頭皮質においてM1-Rへの特異的結合(Bmax)は2週間以降，有意な低下が持続し，一方，海馬ではM1-RのBmaxは2，3週間で

減少傾向がみられるものの，4週間後に初めて，sham-operate群に比べ有意な低下が観察され，以後低値を持続した(図1)．線条体では虚血による変化は認められなかった．WKYラットについては全ての脳部位で虚血によるM1-Rの変化は認められなかった(図1)．またKd値はSHR，WKYラットのいずれの群においても変化は見られなかった．

前頭皮質でChE活性は虚血後2-4週間にわたり低下し続けその後回復したが，海馬では虚血8週間後に初めてsham-operate群に比べ有意に低下した(図2)．線条体でのChE活性の虚血による変化およびWKYラットでの虚血による変化は観察されなかった(図2)．一方，CAT活性は虚血によりほとんど変化しなかった．

[考察]

脳虚血発作後，多くの神経細胞が死滅しその結果種々の脳血管障害後遺症を発症する．なかでも脳血性痴呆は重要である．脳血管障害は高血圧症に伴い頻発する．SHRは正常な血圧(平均血圧110mmHg)を有するラットに比べ，12週以降平均血圧170mmHgが持続し，その両側総頸動脈を結紮することにより，脳にヒトの脳血管障害の場合と極めてよく似た組織の病変が認められる(8,9)．SHRを用いた脳虚血モデルの脳の組織学的観察(8,10)やエネルギー代謝の変化(1,6)はよく検討されているが，生化学的背景についてはほとんど報告されていない．今回我々は，その生化学的背景を明らかにする目的で脳の知的機能に関係の深いACh系神経機構を中心に前頭皮質，海馬，線条体について慢性期に着目して検討を行った．

その結果，図1,2に示すように以前我々が砂ネズミを用いた一過性脳虚血モデルで報告した(5)ような海馬におけるmACh-Rの超遅発性の変化がSHRでも同様に観察され，このことは海馬における生化学的変化が，前頭皮質に比べてはるかに緩徐に発生しうることを示しており，高血圧症を伴った患者の脳虚血発症後の治療を行う上で，留意すべき点であると考えられる．また今回得られた知見からSHRを用いた脳虚血モデルをヒトの脳梗塞の病態モデルとして病態の解明や治療薬の開発に応用すべきであると思われる．

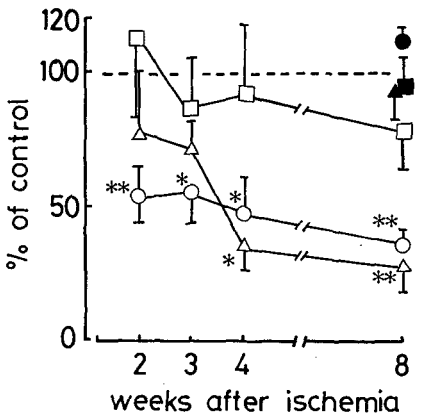


図1　脳虚血後のM1-Rの経時的変化

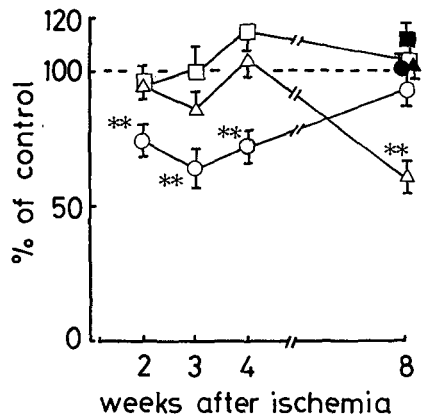


図2　脳虚血後のChE活性の経時的変化

○－○：前脳皮質，△－△：海馬，□－□：線条体　(●，▲，■：WKYラット)

Values are Mean±SEM, *p<0.05, **p<0.01 vs. sham-operated control (by U-test)

[文献]

(1)Fujishima, M. et al.(1977)J. Neurol. Sci., 33, 1-11. (2)Funnum, F.(1974)J. Neurochem. 24, 407-409. (3)Glowinski, K. et al.(1966) J. Neurochem. 13, 655-669. (4)Haba, K. et al.(1989)Neurochem. Res. 13, 951-955. (5)Haba, K. et al.(1991) Brain Res., 54, 116-122. (6)Kiyohara, Y. et al.(1985)Stroke, 16, 835-840. (7)Luthin, R.G. et al.(1984)J. Pharm. Exp. Therapeu. 228, 68-655. (8)Ogata, J. et al.(1976)Stroke, 7, 54-60. (9)Ogata, J. et al.(1977)Acta Neuropathol., 40, 171-177. (10)Sadoshima, S. et al.(1988)Brain Res., 454, 238-243.

251 一過性前脳虚血に伴う海馬ＮＴ－３転写産物の減少

武田 篤，小野寺宏，山崎靖人，小暮久也
（東北大学医学部脳疾患研究施設，神経内科）

〔要約〕ラット一過性前脳虚血後の海馬におけるNeurotrophin-3 (NT-3) [2] 転写産物の変動をNorthern blotting法及びS1-nuclease protection法により検討した。NT-3転写産物は虚血後速やかに減少，３時間以内に検出限界以下となり，少なくとも一週間のあいだ検出限界以下にとどまった。NT-3の主要な産生細胞である海馬歯状回の顆粒細胞層は虚血侵襲に対して耐性であり形態学的にもよく保たれることが知られており，また，NT-3転写産物の減少がきわめて早期にはじまることから，こうした変化が顆粒細胞死を反映したものとは考えにくい。すなわち，一過性虚血は神経栄養因子産生の機能的変化をひきおこし，これを契機として，二次的に，海馬神経回路網の機能的変化を生ずる可能性が示唆された。

【緒言】Neurotrophin-3 (NT-3) [2] は，Nerve growth factor (NGF) やBrain-derived neurotrophic factor (BDNF) と共に NGF family を構成する神経栄養因子の一つであり，中枢神経系においては，主に海馬（CA1内側部，CA2，歯状回顆粒細胞層）に限局して存在する。末梢知覚神経に対して神経栄養因子として働くことが確認されているものの，中枢におけるNT-3の標的細胞についてはまだよくわかっていない。一方，一過性前脳虚血後に生ずる様々な遅発性の組織変化には，神経栄養因子の関与も推定されているが，詳細は明らかでない。そこで，今回我々は，ラット一過性前脳虚血モデルを用いて，海馬に於けるNT-3転写産物の変動について検討した。

【方法】Pulsinelliらの方法[4]により，260 —300gの雄Wistarラットに一過性前脳虚血を加えた。すなわち，ネンブタール麻酔下，両側椎骨動脈を電気凝固し，翌日，ハロセン麻酔下両側頸動脈を露出，ハロセンを中止後，動脈瘤クリップにて20分間結紮した。血流再開後，0.5，1.5，3，12，24 時間，2，3，5，7日後に断頭して，速やかに脳を摘出，大脳皮質と海馬に分けて液体窒素下に凍結した。コントロールのラットには頸動脈結紮以外，同様の処置を加えた。それぞれのtime pointで2 —3 匹の動物を用いた。total RNA はグアニジン／塩化セシウム法にて分離した。Northern blotting 法，S1-nuclease protection法は常法に従った。NT-3 cDNA はPolymerase chain reaction により，ラット脳cDNAから増幅，Plasmid にクローン化してprobe として用いた。他に，v-fos(宝酒造)，Human β-actin (和光純薬)，Human c-jun[1] のDNA 断片をそれぞれprobe として用いた。

【結果と考察】Northern blotting 法によると，大脳皮質のc-fos，c-jun転写産物は血流再開後，それぞれ，0.5 時間，1.5 時間をピークとして一過性に上昇した（図A，B）。一方，β-actinのmRNAレベルには著明な変化を認めなかった（図C）。これらは以前に我々が報告した結果[3] と矛盾しなかった。海馬 RNAサンプルもc-fos(図D)，c-jun (data not shown)，β-actin (図F）については，同様の結果を示したが，NT-3転写産物は虚血後速やかに減少し，３時間以内に検出限界以下となり，少なくとも７日間検出限界以下にとどまった（図E）。結果の再現性を確認するために，虚血実験を再施行し，抽出しなおした海馬 RNAサンプルについて，S1-nuclease protection法により，NT-3 mRNA を検出したが，同様に３時間以内に検出限界以下まで減少した(data not shown)。大脳皮質RNA では転写産物が検出されず，probe はNT-3に特異的にハイブリダイズしていると考えられた(data not shown)。NT-3の主要な産生部位である歯状回顆粒細胞層は虚血に対して比較的耐性であり，20分虚血では組織学的にも殆ど変化がみられないことが知られている。従って，NT-3の減少が単に神経細胞壊死を反映したものとは考えにくい。今回の結果は，虚血を契機として，神経栄養因子を含めた中枢神経系の遺伝子発現が機能的に変化し，それが一定期間持続することを示している。これらは二次的に，海馬神経回路網の機能的な変化につながる可能性もあり，極めて興味深い結果であると思われた。

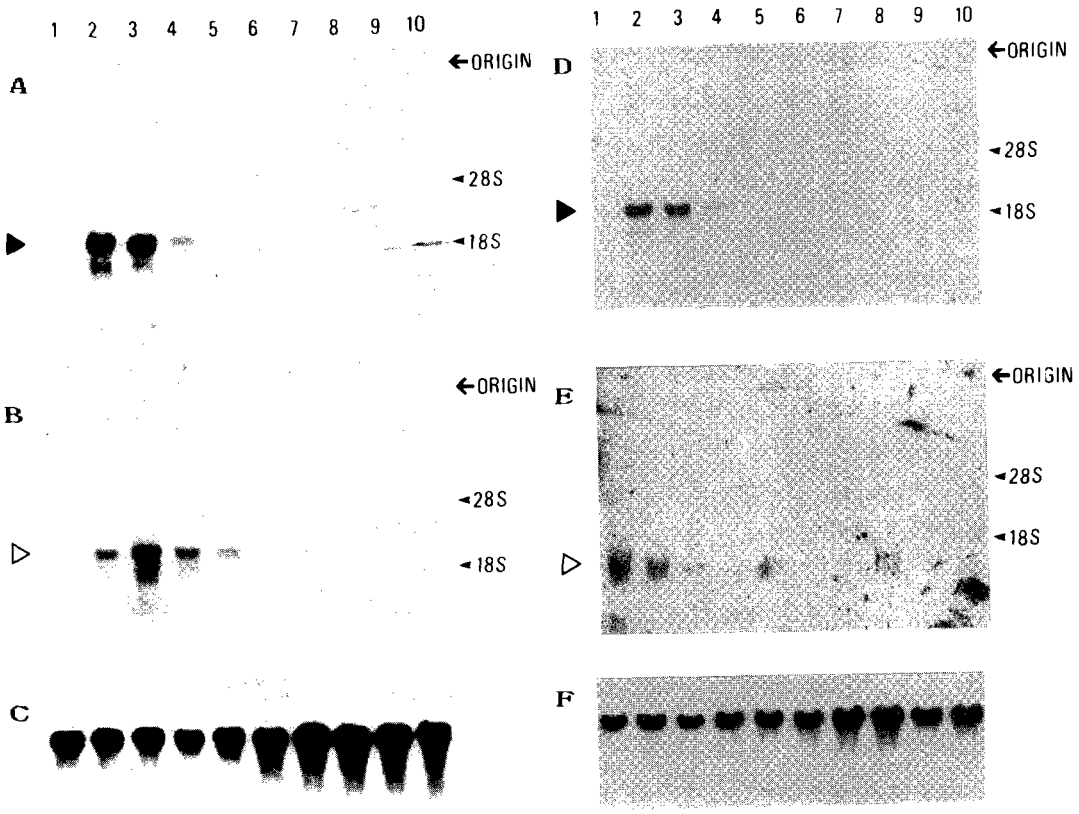


図　大脳皮質(A-C) 及び海馬(D-F) RNA サンプルによるNorthern blotting.
A-Cでは10ug/lane, D-F では20ug/lane のtotal RNA をアガロースゲルにて電気泳動後，ナイロンメンブレン(Hybond N $^{+}$) にブロットし，それぞれ，v-fos(A,D)，β-actin(C,F)，c-jun(B)，NT-3(E) probeとハイブリダイズした。lane1;コントロール，lane2;虚血後 0.5時間，lane3;同 1.5時間，lane4;同 3時間，lane5;同12時間，lane6;同24時間，lane7;同 2日，lane8;同 3日，lane9;同 5日，lane10; 同 7日。

【謝辞】
Human c-jun plasmid (ph-cJ-1) を供与頂いたDr. Peter Angel 及び御指導頂きました東北大学医学部応用生理学教室，柴原茂樹先生，東北大学抗酸菌病研究所細胞生物学部門，帯刀益夫先生に感謝致します。

【参考文献】

1 Angel, P., Allegretto, E.A., Okino, S.T., Hattori, K., Boyle, W.J., Hunter, T. and Karin, M. (1988) *Nature* **332**, 166-171

2 Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M. and Yancopoulos, G.D. (1990) *Science* **247**, 1446-1451

3 Onodera, H., Kogure, K., Ono, Y., Igarashi, K., Kiyota, Y. and Nagaoka, A. (1989) *Neurosci. Lett.* **98**, 101-104

4 Pulsinelli, W.A. and Brierley, J.B. (1979) *Stroke* **10**, 267-272

252 ラット黒質刺激による線条体脳血流の変化とドーパミン系神経伝達物質との関連
—レーザードップラー血流計とマイクロダイアリシス法による測定—

和田博夫，飯島節，折茂肇，井藤英喜[1]，佐藤昭夫[2]
（東京大・老年病，都老人医療センター[1]，都老人総合研究所[2]）

〔要約〕

ウレタン麻酔したウィスター系雄性ラットの左黒質には刺激用電極針、左または右の線条体にはレーザードップラー血流計のプローブを挿入し、黒質電気刺激（100uA,50Hz,10sec）による線条体脳血流の変化を連続的に記録した。刺激による血圧変化を消去する目的で脊髄ラットとした後の電気刺激では、刺激と同側の線条体脳血流は有意な増加反応を示したが、反対側では無反応であった。ドーパミン拮抗薬であるハロペリドール静注後の刺激による脳血流増加率は有意に抑制されたが、アセチルコリンのムスカリン性拮抗薬であるスコポラミン静注後の刺激による脳血流増加率は有意な変化を示さなかった。一方黒質刺激前後での線条体細胞外液をマイクロダイヤリシス法で潅流採取し、潅流液中に含まれるドーパミン系神経伝達物質（DA,DOPAC,HVA）をニューロケムを用いて測定したところDAのみが黒質刺激によって増加した。以上の事実より、黒質刺激によって線条体に放出されるDAは線条体の血管に対して拡張性に作用していると考えられた。

〔目的〕脳血流の神経性調節として種々の神経伝達物質や神経修飾物質が血管拡張性または血管収縮性に作用していると考えられているが不明な点も多い[1]。我々は線条体の脳血流調節に対するドーパミン系およびアセチルコリン系の神経伝達物質の関与を明らかにする目的で脊髄ラットの一側黒質を電気刺激した際の線条体脳血流の変化をレーザードップラー血流計[2]で連続的に測定し、薬理的効果をも含めて検討した。また黒質刺激によって線条体に放出されるドーパミン（DA）とその代謝物質（DOPAC，HVA）をニューロケム（ESA社）で測定し結果を検討したので報告する。

〔方法〕ウレタン麻酔した体重約300gのウィスター系雄性ラットを定位的に固定し、room air 下にrespiratorを装着し直腸温を37°C前後に保った。右大腿動脈から血圧と心拍数をモニターし、また右大腿静脈を確保して補液および薬物投与路とした。頭蓋骨切開後、左黒質には電気刺激針を挿入し、左または右の線条体にはレーザードップラー血流計を挿入した。刺激による血圧変化を消去する目的で脊髄をTh_{1-2}間で切断して脊髄ラットとした後、左黒質に電気刺激（100uA,50Hz.10sec）を加え左または右の線条体における脳血流の変化を連続記録した。DAの拮抗薬であるハロペリドールまたはアセチルコリンのムスカリン性拮抗薬であるスコポラミンを静注（5mg/kg,i.v.）した後の一側黒質刺激に対する刺激と同側線条体の脳血流増加率の変化を検討した。一方黒質を電気刺激（100uA,50Hz,5min）した時の線条体の細胞外液をマイクロダイヤリシス法[3]で潅流採取し、潅流液中のDA，DOPAC，HVAをニューロケム[4]で測定し結果を検討した。

〔成績〕（1）脊髄ラットの一側黒質電気刺激により、血圧は変化せず、同側線条体脳血流は増加反応を示した。反対側線条体の脳血流は無反応であった。（図1参照）

（2）ハロペリドールの前投与により、刺激に対する脳血流増加率は有意に抑制された。（図2，4参照）

（3）スコポラミンの前投与により、脳血流増加率は有意な変化を示さなかった。（図3，4参照）

（4）マイクロダイヤリシス法によって採取した線条体細胞外液中のDAは黒質電気刺激によって有意に増加したが、DOPAC，HVAは不変であった。（図5参照）

〔考察〕ラット線条体脳血流の神経性調節因子の主なものはDAであり、黒質電気刺激によって線条体に放出されるDAは線条体血管に対して拡張性に作用していると考えられた。

〔文献〕

(1) Biesold,D.,Inanami,O.,Sato,A.and Sato,Y.(1989)Neurosci.Lett.98,39-44.

(2) Habel,R.L.,Heizer,M.L.,Marmarou,A.andEllis,E.F.(1989)Am.J.Physiol.256, H1247-H1254.

(3) Ungerstedt,U.and Hallatrom,A.(1987)Life Sci.41,861-864.

(4) Matson,W.R.,Bouckomsd,A.,Svendsen,C.,Flint Beal,M. and Bird,E.D.(1987)Life Sci., 41,905-908.

図1

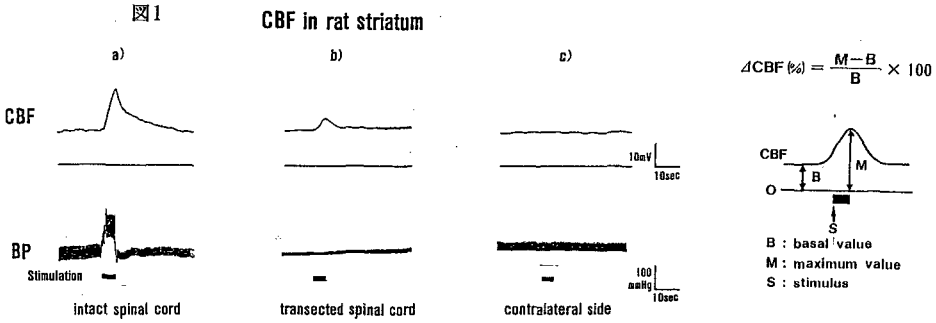


図2

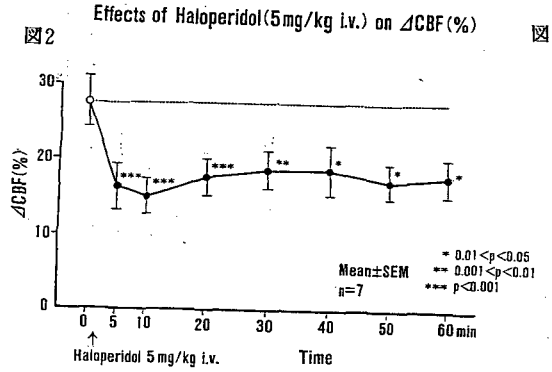


図3

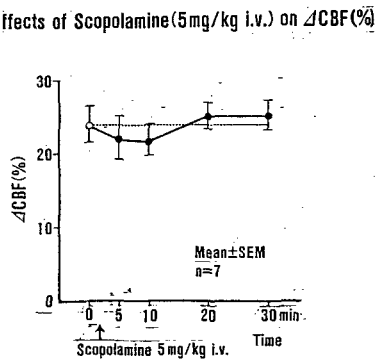


図4

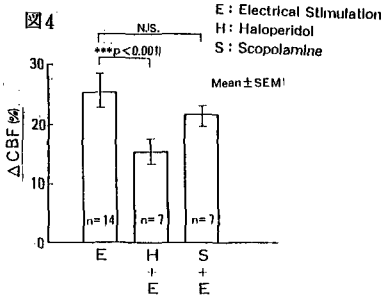
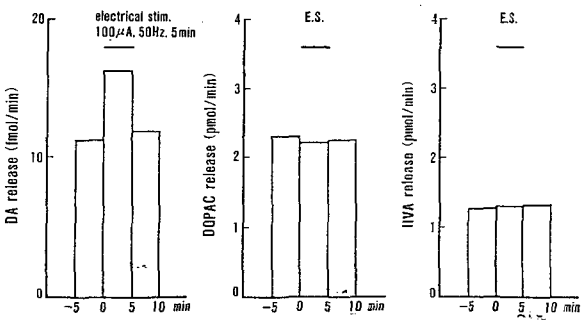


図5



253 脳微小血管内皮細胞による組織型plasminogen activatorの産生について

森本　正[1]，石崎泰樹[2]，吉本智信[1]，杉原英光[3]，佐々木富男[1]，高倉公朋[1]，室田誠逸[2]
（東京大学脳神経外科[1]，東京医科歯科大学顎研機能[2]，日本化薬総合研究所[3]）

〔要約〕

ブタ脳微小血管，ブタ大動脈より内皮細胞を培養し，その培養上清中のtissue-type plasminogen activator(tPA)活性およびtPA抗原量をzymographyおよびWestern blotにより測定した．Fibrinogenを基質としたzymographyによって培養上清中に複数のplasminogen activator(PA)活性が確認され，このうち分子量59000の活性が大動脈内皮細胞に比べて脳微小血管内皮細胞で強く発現されることがわかった．この活性は抗tPA抗体による活性の中和および免疫沈降法によってtPA活性を表すことが確認された．またWestern blotの結果，培養上清中のtPA抗原量も脳微小血管内皮細胞の方が多く，その分子量からtPAの大部分はPA inhibitorとの複合体の形で存在すると推定された．

［目的］血管内皮細胞はprostacyclin, thrombomodulin, heparan sulfate, plasminogen activator(PA)などを産生することにより抗凝固活性において重要な役割を果たしている．PAにはtissue-type PA(tPA)とurokinase-type PA(uPA)があり，前者はfibrinとの親和性が高く，血管内での線溶に関与し，後者は血管新生に関与していると考えられている．ともに内皮細胞によって産生されるが，その産生パターンには種や血管の部位による差がみられる(1,5)．脳微小血管内皮細胞ではthrombomodulinが乏しいなど他部位の内皮細胞に比べて特徴的な所見が報告されている(3)．今回我々は脳微小血管内皮細胞のtPA活性を大動脈と比較し，その差を明らかにすることを目的とした．

［方法］ブタ脳微小血管，ブタ大動脈より内皮細胞を培養し(6)，その培養上清中のtPA活性およびtPA抗原量をzymographyおよびWestern blotにより測定した．ZymographyはSDS-10% polyacrylamide gelにfibrinogenを組み込むことによって行い(2,4)，tPA活性の同定は抗tPA抗体を用いた活性の中和および免疫沈降法によって行った．

［結果］Fibrinogenを基質としたzymographyによって脳微小血管および大動脈内皮細胞の培養上清中に複数のPA活性が確認された．このうち分子量59000のPA活性は大動脈内皮細胞に比べて脳微小血管内皮細胞で強く発現されることがわかった（Fig．1）．培養上清を抗tPA抗体による免疫沈降法で処理した後zymographyを行うと分子量59000のPA活性は用量依存性に抑制された．またgelに抗tPA抗体を加えてzymographyを行うとこの活性は消失した．これらの結果から分子量59000の活性はtPAによるものと同定され，このtPA活性が脳微小血管内皮細胞でより強く発現されていることがわかった．抗tPA抗体を用いたWestern blotの結果，内皮細胞培養上清中のtPA抗原の量も大動脈内皮細胞に比べて脳微小血管内皮細胞の方が多いことがわかった（Fig．2）．Western blotでみられたbandsの分子量は106000，119000であり，59000付近にはbandはみられなかった．この結果はtPAの大部分はPA inhibitorなど蛋白との複合体の形で存在することを示唆するものと解釈された．

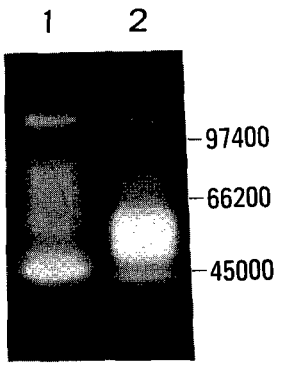


Fig. 1 Visualization of fibrinogenolytic activity on SDS-fibrinogen gel.
Lane 1: aortic endothelial cells
Lane 2: brain microvessel endothelial cells

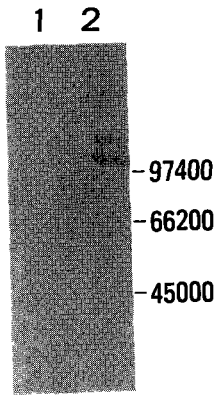


Fig. 2 Western blot analysis.
Lane 1: aortic endothelial cells
Lane 2: brain microvessel endothelial cells

［結論］脳微小血管内皮細胞は大動脈内皮細胞に比べて多くのtPAを産生しており，tPA活性もより強く発現していることがわかった．脳微小血管内皮細胞にはthrombomodulinが少ないことが報告されており(3)，tPA活性の高いことは脳微小循環における抗凝固活性を確保する意味があるものと考えられた．

［文献］

1. Bartha, K., Wojta, J., Wagner, O.F., and Binder, B.R. (1988) Am. J. Physiol. 254, R885-R890
2. Herron, G.S., Banda, M.J., Clark, E.J., Gavrilovic, J., and Werb, Z. (1986) J. Biol. Chem. 261, 2814-2818
3. Maruyama, I., Bell, C.E., and Majerus, P.W. (1985) J. Cell Biol. 101, 363-371
4. Menashi, S., Hornebeck, W., Robert, L., Caen, J., and Legrand, Y. (1989) Exp. Cell Res. 183, 294-302
5. Wojta, J., Hoover R.L., and Daniel, T.O. (1989) J. Biol. Chem. 264, 2846-2852
6. Yoshimoto, S., Ishizaki Y., Kurihara, H., Sasaki, T., Yoshizumi, M., Yanagisawa, M., Yazaki, Y., Masaki, T., Takakura, K., and Murota, S. (1990) Brain Res. 508, 283-285

254 一過性前脳虚血および虚血耐性現象発現時における Mn－SOD、およびCu，Zn－SODの動態

大槻俊輔　松本昌泰　鈴木敬一郎*　多賀谷昌史　秦　龍二　小川　智　和中明生
上田周一　半田伸夫　木村和文**　谷口直之*　鎌田武信
大阪大学　第一内科、生化学*、バイオ研核**

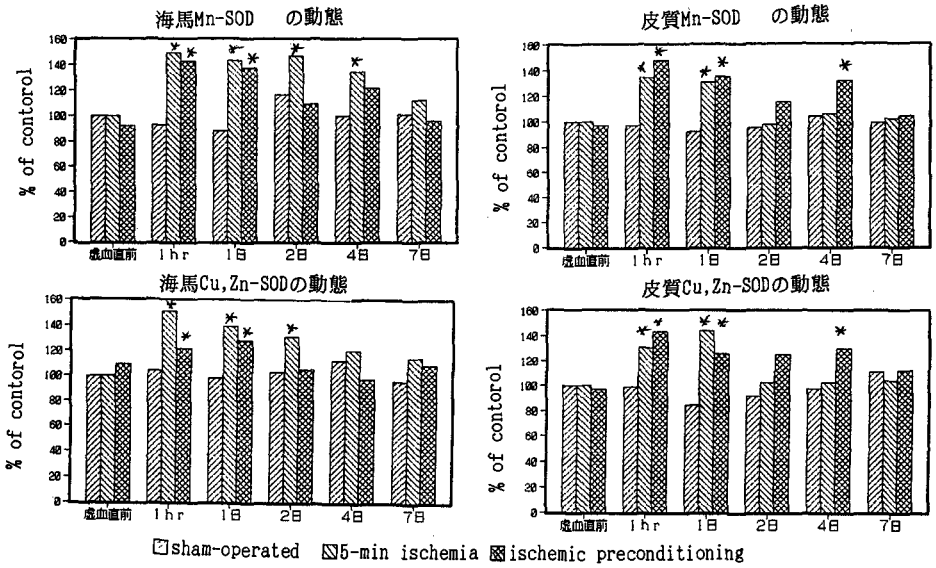
【要約】
砂ネズミ一過性前脳虚血モデルを用いて虚血負荷前後の海馬および皮質におけるMn-SOD、Cu,Zn-SODをELISA法で測定した。虚血負荷前のMn-SOD、Cu,Zn-SODには部位差がみられ、ともに虚血に対して脆弱である海馬では、比較的耐性のある皮質よりも低値を示した。虚血侵襲に対して海馬と皮質では、ともにSODの誘導が観察されたが、皮質のSODは虚血後早期一時的に軽度に誘導されるのみであるのに対して、海馬ではより強度に遷延したSODの誘導がみられた。この事実は虚血性神経細胞障害のメカニズムにおけるOxygen Radical Stress (ORS)の関与を強く示唆するものと思われた。また非致死的な虚血をあらかじめ負荷すること(ischemic preconditioning)によって、次の致死的な虚血に対する耐性が誘導される（虚血耐性現象）が、このとき虚血後のSOD誘導の程度は虚血性細胞壊死が見られるときよりも軽度であり、虚血耐性現象におけるORSの関与が示唆された。

【目的】 砂ネズミでは5分間の一過性前脳虚血後、数日を経て海馬CA1領域に限局した神経細胞壊死が出現することが報告されている(1)。この現象は遅発性神経細胞壊死と呼ばれ、虚血侵襲に対して極めて障害を受けやすい海馬CA1領域神経細胞の選択的脆弱性を端的に表わしている。我々は砂ネズミの一過性前脳虚血モデルを用いた検討により、海馬subiculum-CA1領域は重度の虚血と残存血流存在部位とが境を接するblood flow cliff領域と一致し(2)、この部位で産生されたfree radicalが虚血性神経細胞障害のtriggerとなる可能性を明らかにしてきた(3)。今回同モデルにおいて虚血侵襲に対して極めて脆弱な海馬と比較的耐性のある皮質各々のMn-及びCu,Zn-Superoxide Dismutase(SOD)を測定し、虚血によるOxygen Radical Stress (ORS)に対する神経細胞の応答現象の究明を試みた。さらに非致死的虚血負荷をあらかじめ加えることにより虚血耐性現象(4,5)を発現させた状態での一過性前脳虚血5分負荷前後のSODの動態についても検討し、虚血耐性現象における ORSの関与を検索した。

【方法】 成熟砂ネズミ83匹を対象とし、以下の4群に分類した。コントロール群(n=7)；無処置。偽手術群(n=24)；両側総頸動脈剥離のみで虚血負荷を加えなかったもの。5分虚血負荷群(n=24)；海馬CA1細胞にとって致死的な5分間の一過性前脳虚血を加えたもの。ischemic preconditioning群(n=28)；非致死的な2分虚血を72時間前と48時間前にあらかじめ加えておいてから、海馬にとって致死的な5分間の一過性前脳虚血を加えたもの。虚血は軽エーテル麻酔下に両側総頸動脈を剥離露出し、麻酔覚醒時クリップにて2分間あるいは5分間両側総頸動脈を閉塞させることにより作成した。虚血中は体温を37℃に維持した。各群とも、5分虚血あるいは偽手術負荷の1時間後、1日後、2日後、4日後、7日後(それぞれn=4)、さらにischemic precondition群では5分虚血直前(n=4)を加えた各時点で、チオペンタール深麻酔下に4℃生食で経心的に脳を灌流した後断頭屠殺し、氷上にて両側の海馬と皮質を摘出した。検体は20mM Tris-HCl+1mM EDTA Bufferでホモジナイズし、0℃ 3分間のsonication処理後、4℃ 900gで10分間遠心分離してうわ澄みをsampleとした。 sampleはマウス抗Mn-SOD、Cu,Zn-SOD抗体を用いたサンドイッチELISA法にてMn及びCu,Zn-SODを各々測定した(6,7)。

【結果】 コントロール群でのMn-SODおよびCu,Zn-SOD蛋白量(ng/mg蛋白)はそれぞれ、海馬では6.94±0.54、0.466±0.036、皮質では12.08±0.94、0.617±0.052 (mean±S.D.)であり、Mn-およびCu,Zn-SOD蛋白量は海馬より皮質でより高値であった($p<0.01$,Mann-Whitney U-test)。 偽手術群では海馬および皮質ともに虚血によるSOD蛋白量の有意な変化は認めなかった。 5分虚血負荷群においては、海馬のMn-SODは虚血後1時間から4日後まで、Cu,Zn-SODは虚血直後から2日後まで有意

に上昇し、以降下降傾向を示した。一方、皮質ではMn-SOD, Cu,Zn-SODはともに1時間後、 1日後に軽度ではあるが有意な上昇を認め、２日後よりコントロール値に復していた。ischemic preconditioning群で5分虚血直前の時点においては海馬および皮質のMn-SOD、Cu,Zn-SODはともに偽手術群に比し有意な変化を示さなかった。また5分虚血後では海馬および皮質ともに虚血1時間後と1日後にMn-SOD, Cu,Zn-SODの有意な上昇を認め、2日後に一旦下降傾向を示すが、4日後に再び軽度の上昇を示し、7日後にはコントロール値近くまで復した。(* p<0.05, vs control; Multiple comparison of Dunnet)



【考察】砂ネズミ一過性前脳虚血モデルを用い、虚血負荷に伴うMn-SOD 、Cu,Zn-SOD の動態を検討した。虚血負荷に対して脆弱である海馬では、虚血に対して比較的耐性のある皮質よりもMn-SOD、Cu,Zn-SODはともに有意な低値を示し、一過性前脳虚血時に発生するOxygen Radical消去系の多少が選択的脆弱性と関与している可能性がある。また虚血侵襲に対して脆弱な海馬と比較的耐性のある皮質とでは、ともに虚血後SODの誘導が観察されたが、その動態は両部位では大きく異なることが明らかとなった。すなわち皮質では5分虚血により虚血後1日以内の早期にだけSODが誘導されたが、海馬では5分虚血負荷後4日まで強度かつ遷延したSOD誘導が認められ、神経細胞が壊死に陥るほどの強度の虚血侵襲に対しては、SODが強く遷延して誘導されることを示唆するものと考えられる。このSOD動態はCu,Zn-SOD messenger RNAの動態(8)とも良く一致しており、虚血に伴うORSがSOD誘導のtriggerとなっているものと思われる。一方、ischemic preconditioning自体はSODを誘導しなかったが、海馬における虚血後のSOD動態は致死的な虚血負荷が加わっているにも関わらず皮質における5分虚血後のSOD動態と同様に、過度のSOD誘導がみられなかった。以上より、虚血負荷後に海馬で観察された強度かつ遷延したSODの誘導が単に遅発性神経細胞壊死と密接な関連を有するものと考えられた。この遷延するSODの誘導が単に虚血中あるいは後の細胞障害の程度を反映するのみであるのか、より積極的に細胞障害過程そのものに関わるものかどうかについては今後さらに究明されるべき重要な課題と思われた。

【文献】

1)Kirino T.: Brain Res. 239:57-69,1982
2)Matsumoto M. et al: Brain Res. 424:231-238,1978
3)Kitagawa K. et al: Neuroscience 35:551-558,1990
4)Kitagawa K. et al: Brain Res. 528:21-24,1990
5)Kitagawa K. et al: Brain Res. in press,1991
6)Kawaguchi T. et al: J Immunol Methods 127:249-254,1990
7)Ogino K. et al: Clin Chem Acta 182:209-210,1989
8)Uyama O. et al: J Cereb Blood Flow Metab 11:s635,1991

255 興奮性アミノ酸レセプター結合の脳虚血による変化

鈴木竹雄[1)]、荻田喜代一[1)]、田中祥裕[2)]、米田幸雄[1)]
（1）摂南大・薬・薬理、2）住友製薬研究所）

〔要約〕

一過性脳虚血を負荷したスナネズミ脳内における興奮性アミノ酸(EAA)レセプター結合の一斉分析を行った。活性化状態のN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)チャネルの生化学的指標である[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合は、反応時間16時間ではいずれの脳内部位も虚血負荷による変化は認められなかった。一方、反応時間30分間の本結合は虚血負荷群の海馬でのみ著明に減少した。また、NMDA認識部位を反映する[^{3}H]グルタミン酸(Glu)結合と[^{3}H]D,L-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentenoate(CGP 39653)結合、およびグリシン(Gly)認識部位を反映する[^{3}H]5,7-dichlorokynurenate(DCKA)結合と[^{3}H]Gly結合はいずれも虚血負荷後の海馬において有意に減少したが、[^{3}H]スペルミジン(SPD)結合や他のサブタイプを反映する[^{3}H]DL-α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate(AMPA)結合や[^{3}H]カイニン酸(KA)結合には変化が見られなかった。以上の結果より、スナネズミ海馬において一過性脳虚血負荷は、NMDAレセプターイオノフォア複合体の機能低下を惹起する可能性が示唆される。

NMDAレセプターイオノフォア複合体は、学習や記憶といった可塑性形成に関与するばかりでなく、脳虚血後の遅発性神経細胞壊死にも関与するという両面を併せ持つことが知られている(5)。近年、脳虚血負荷によりEAAレセプターが減少するということが報告されている(2)が、EAAレセプターの生化学的検出法に数多くの方法論的問題点があるため、統一的見解が得られないのが現状である(8)。したがって本研究では、一過性脳虚血手術後の海馬と大脳皮質におけるEAAレセプター結合の一斉分析を行い、脳虚血負荷によるEAAレセプターの変化について解析した。

〔方法〕

雄性スナネズミ(体重約60g)をエーテル麻酔下頸動脈を露出させた。クリップで両側総頸動脈の血流を完全に遮断し、3分、5分あるいは10分後に血流を回復させた。対照群は、クリップ操作のみを行わなかった。術後2週間あるいは4週間の海馬および大脳皮質を40倍量の蛋白分解酵素阻害剤を含む50 mMトリス酢酸でホモジナイズした後、3回洗浄を行った膜標品を凍結保存した。実験当日に室温融解後、膜標品は、0.08% Triton X-100で前処理したのち実験に供した。[^{3}H]MK-801結合(4)、[^{3}H]Glu結合(7)、[^{3}H]Gly結合(3)および[^{3}H]SPD結合(9)の測定は、それぞれ既報の方法に準じて行った。また、[^{3}H]DCKA結合、[^{3}H]CGP 39653結合、[^{3}H]AMPA結合および[^{3}H]KA結合は、いずれも膜標品と放射性リガンドを2℃で反応させて測定した。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〕

海馬CA1野におけるニッスル染色陽性部位面積は、3分間の虚血負荷により対照群の場合の約1/3に低下し、この減少は負荷時間を5分あるいは10分に延長しても増大しなかった(図1)。したがって、以下の実験には虚血負荷5分間の動物を用いた。虚血負荷2週間および4週間後の大脳皮質および海馬における[^{3}H]MK-801結合を完全に平衡状態に到達する反応時間16時間で測定したところ、Glu(10^{-5} M)/Gly(10^{-5} M)存在下あるいはGlu/Gly/SPD(10^{-3} M)存在下のいずれの条件下においても対照群と虚血負荷群の間で有意な変化は認められなかった。次に反応時間30分における[^{3}H]MK-801結合を測定したところ、大脳皮質では結合量に大きな変化は見られなかったのに対して、海馬では虚血負荷群の結合量が対照群の場合の約1/2に減少していた(図2)。反応速度論的解析により、虚血負荷による海馬の[^{3}H]MK-801結合の減少は、見かけの結合速度定数(Kobs)の低下に起因することが判明した(表1)。また、NMDA認識部位を反映する[^{3}H]Glu結合と[^{3}H]CGP 39653結合、およびGly認識部位を反映する[^{3}H]Gly結合と[^{3}H]DCKA結合は、虚血負荷後の海馬において有意に減少したが、[^{3}H]SPD結合や他のサブタイプを反映する[^{3}H]-AMPA結合および[^{3}H]KA結合には著変は見られなかった。

図1. 細胞の染色性

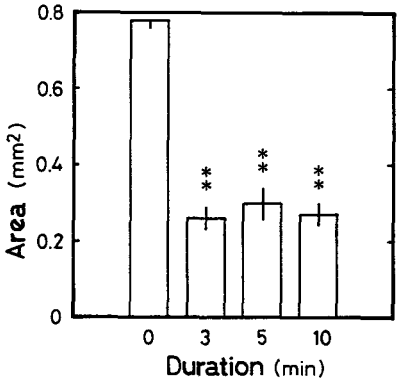
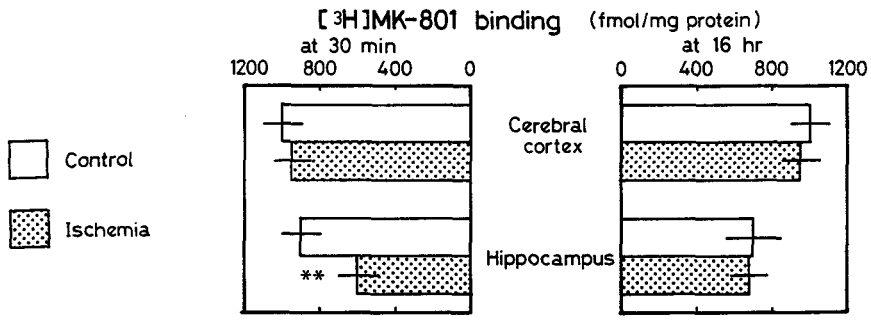


表1. 反応速度論的解析

	Kobs ($min^{-1} \times 10^3$)	
	Cerebral cortex	Hippocampus
Control	78.2±13.0	101.2±5.4
Ischemia	130.0±27.9	37.8±11.0**

図2. [³H]MK-801結合に対する脳虚血の影響



[考察]

海馬は脳虚血による損傷を最も受け易い部位であるが、その損傷がnon-NMDAレセプターには出現せず、NMDAレセプター複合体に対して選択的であることが示唆された。このことは、老齢ラット脳内におけるNMDAレセプターの減少に類似している(6)。このNMDAレセプターとnon-NMDAレセプターの相違は、レセプターの局在に起因するのかもしれない。事実、non-NMDAレセプターは神経細胞のみならずグリア細胞にも存在するのに対して、NMDAレセプターは神経細胞のみに存在することが知られている(1)。[³H]MK-801結合の虚血負荷による変化が平衡状態の結合量ではなく、結合速度の減少に起因することから、虚血負荷によりNMDAレセプターイオノフォア複合体の密度よりむしろ、機能的傷害が惹起される可能性が推察される。今後、このNMDAレセプターイオノフォア複合体の一過性脳虚血負荷による機能傷害について詳細な解析を進めたい。

[謝辞]

本研究の一部は、平成3年度厚生省精神・神経疾患研究委託費の援助のもとに行った。

[文献]

1. Barres, B.A. (1989) Nature, 339, 343-344.
2. Leach, M.J., Hollox, K.J., O'Donnell, R.A. and Miller, A.A. (1988) Eur. J. Pharmacol., 152, 189-192.
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. Rothman, S.M. and Olney, J.W. (1986) Ann. Neurol., 19, 105-111.
6. 田丸政男、米田幸雄、荻田喜代一、清水遵、永田豊 (1990) 神経化学、29, 468-469.
7. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Brain Res., 499, 305-314.
8. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Anal. Biochem., 177, 250-255.
9. Yoneda, Y., Ogita, K., Suzuki, T. and Enomoto, R. (1990) Eur. J. Pharmacol., 183, 1664-1665.

256 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) とカルシニューリン (CaN) の脳虚血後における変化

森岡基浩[1)]、福永浩司[2)]、永廣信治[1)]、生塩之敬[1)]、宮本英七[2)]
(熊本大学・医・[1)]脳神経外科、[2)]第一薬理)

〔要約〕

遅発性神経細胞壊死を呈する一過性脳虚血後のラット脳海馬において、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) とカルシニューリン (CaN) (Ca^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインフォスファターゼ) の経時的部位変化について検索した。CaMキナーゼIIは虚血後早期より免疫反応性、活性ともに調べた海馬全領域で減少し、3日後より遅発性神経細胞壊死を呈したCA1以外の領域で回復がみられた。細胞内Ca^{2+}の上昇を反映すると考えられるCaMキナーゼII Ca^{2+}/CaM非依存性活性の上昇が虚血後3日まで観察された。一方、CaNの免疫反応性は虚血後早期にはよく保存されており CA1 領域でのみ形態学的変化とともに減少がみられた。以上のことより、Ca^{2+}/CaM依存性蛋白質燐酸化、脱燐酸化酵素の一過性虚血後の変化には明らかな差があり、神経細胞内ではその反応の平衡に差の生じることが示唆された。

【目　的】

一過性脳虚血後の海馬CA1領域にみられる遅発性神経細胞壊死には、虚血後の神経細胞内Ca^{2+}濃度の上昇が重要な役割を果たしていると考えられている(1)。CaMキナーゼIIおよびCaNはともにCa^{2+}/CaMにより活性化され、海馬領域に強い局在性を示す。両酵素はとくに神経細胞に豊富に存在し、様々な機能に重要な役割を果たしていると考えられており、多くの共通した基質を持っている。両酵素の一過性脳虚血後の海馬における経時的部位変化を検索した。

【方　法】

雄成熟ウィスターラット (200～260 gm) を用い、Pulsinelliらの方法 (3) により20分間前脳虚血を作成した。両酵素に対する抗体を用い、虚血後6、12時間、1、1.5、2、3、7日に潅流固定後、海馬の免疫染色を行なった。また虚血後12時間、1.5、3、7日に断頭後直ちに凍結させた脳内海馬CA1、CA3、歯状回、頭頂葉の組織をクリオスタット内で顕微鏡下に採取し、CaMキナーゼII活性の測定、イムノブロットによる両酵素の検索を行なった。CaMキナーゼII活性の測定は福永らの方法 (2) にてCa^{2+}/CaM非依存性活性 (EGTA存在下活性)、全活性 (Ca^{2+}/CaM存在下活性) をそれぞれ測定した。

【結　果】

本法による一過性前脳虚血後7日の海馬領域における組織学的検討ではCA1領域には全例に神経細胞壊死が認められ、その他の領域には明らかな変化は認められなかった。CaMキナーゼII免疫反応性は虚血後6時間後においてCA1、CA3錐体細胞層、歯状回顆粒細胞層で減少が認められたが、CA1を除く他の部位では徐々に回復し3日後には対照とほぼ同じ状態にまで回復した (図1)。CaMキナーゼII全活性の変化は虚血後12時間で35％まで減少し、CA1を除く他の部位では3日後には60％、7日後には80％まで回復した。細胞内Ca^{2+}の上昇を反映すると考えられるCa^{2+}/CaM非依存性活性の上昇が虚血後3日まで観察された。CaNは正常脳ではとくにCA1領域に豊富に存在し、虚

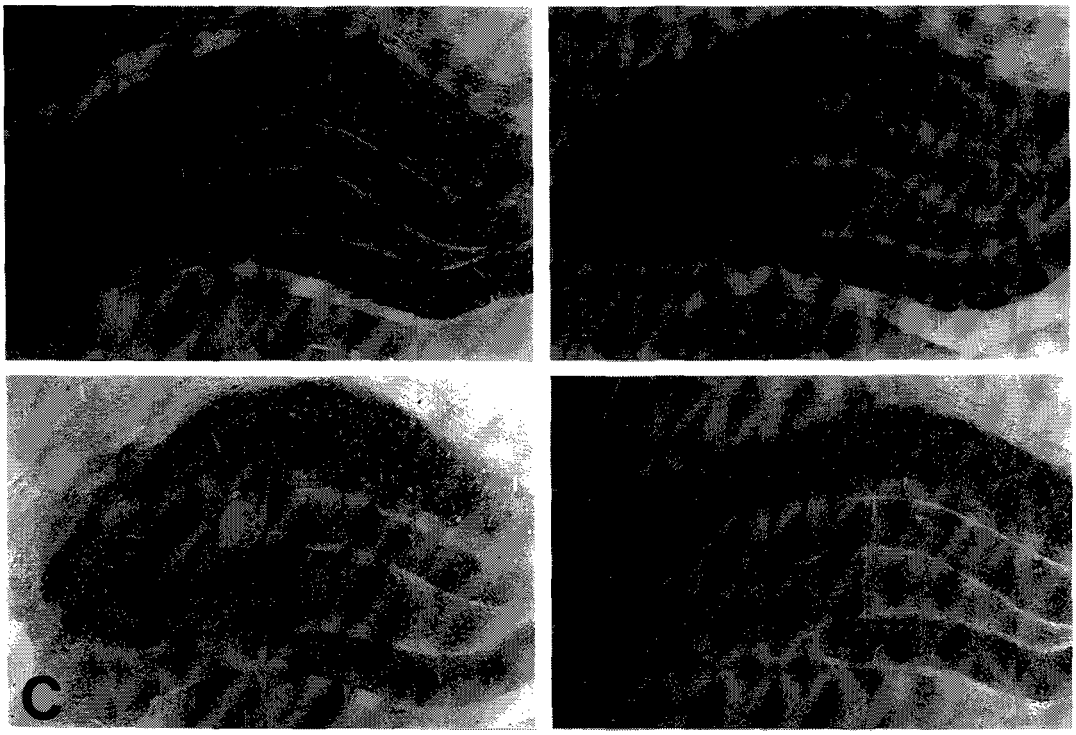


図1　抗 CaM キナーゼⅡ抗体 (A、B) および抗 CaN 抗体 (C、D) による海馬免疫染色 (A、C：対照、B、D：虚血後 9 時間)。CaM キナーゼⅡ免疫反応性は CA1、CA3 錐体細胞層、歯状回 (DG) 顆粒細胞層で著明に減少しているが、CaN の免疫反応性には変化が見られない。

血後 24 時間まで全領域で免疫染色性は保たれていたが、CA1 領域において遅発性神経細胞壊死とともに免疫染色性が消失した (図1)。イムノブロットでは、両酵素とも免疫組織化学的知見と一致した結果が得られ、両酵素のより低分子量を示す分解産物は認められなかった。

【考　察】

CaM キナーゼⅡは虚血後 6 時間後に全領域で免疫反応性、12 時間後には全活性に低下がみられた。したがって CaM キナーゼⅡの減少は一過性虚血後の海馬神経細胞すべてに共通してみられる現象であり酵素量の減少を反映するものと考えられたがイムノブロット上では分解産物と考えられるフラグメントは認められなかった。また Ca^{2+}/CaM 非依存性活性の上昇は細胞内 Ca^{2+} の上昇を反映すると考えられることより、虚血後細胞内 Ca^{2+} の上昇が 3 日目まで持続することが生化学的に示唆された。両酵素の動態を比較すると、CaM キナーゼⅡが虚血後早期より全領域で減少するのに対し、CaN はよく保存されている。一過性脳虚血後神経細胞内では、Ca^{2+}/CaM 依存性蛋白質燐酸化、脱燐酸化反応が変化し、その平衡に差の生じることが示唆された。

【文　献】

1) Choi, D.W. (1990) J. Neurosci. **10**, 2493-2501

2) Fukunaga, K., Rich, D.P., and Soderling, T.R. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 21830-21836

3) Pulsinelli, W.A., and Brierly, J.B. (1979) Stroke **10**, 267-272

人名索引（ABC順）

［数字は講演番号を示す］

(A)

安部明夫……90
阿部輝雄……120
阿部敏明……154
足立一男……244
相沢貴子……133
赤川公朗……169
茜谷行雄……191
秋元孝文……105,117
秋山一文……72,185
秋山實利……13
秋澤俊史……13
天野完……189
安藤正人……204,205,231
安藤進……83
姉崎利治……186
青木公子……71
青野幸子……193
新井一……182
荒木敏之……70
有賀純……12
浅田英穂……144
浅野富子……75,170
浅沼幹人……124,145,250
芦沢健……77
阿相皓晃……108,139,141 143

(B)

馬場明道……119,187

(C)

C. R. Jones……147
千葉賢三……106
周希誠……124,145

(D)

大源明宏……185
提中順一……215
堂前純子……118
土井澄江……136

(E)

E.M.Johnson Jr.……36
江頭亨……81
遠藤俊郎……52,226
遠藤真澄……99
榎戸靖……191
榎本理世……2,60
江崎行芳……37

(F)

Fred H. Gage……135
藤井紀子……180
藤井重元……129
藤森観之助……67
藤森修……151
藤本貞毅……38
藤本禎子……9,92
藤澤仁……93
藤島正敏……149
藤田公和……231
藤田興……27
藤田昌宏……6
藤田信也……156,166
藤原豊……72,79
福永浩司……17,256
福島伸之……151
福山隆一……247
舟本規昭……154
古川昭栄……31,73,216
古川美子……216
古家園子……115
古山泰雄……128

(G)

Gallyas Ferenc Jr.……98
五嶋良郎……179
後藤希代子……154
後藤幸代……170,171,172

(H)

H.I.Yamamura……72,79
H. Thoenen……116
羽場久美子……124,145,250
芳賀和子……88
芳賀達也……88
浜登希子……245
浜田淳……110
浜岸安太郎……79
濱口勝彦……236
濱中裕喜……129
濱之上誠……96
韓達……69
韓大健……58,60
花井一光……152
半田伸夫……146,254
原田馨……180
針ケ谷和花子……42
播口之朗……40,183,184 219,220,221
長谷川成人……37
長谷川真一……53
橋井美奈子……103,198
橋本篤……180
橋本恵理……77
橋本喜次郎……237
橋本重夫……41
橋本保……168
橋本恒一……4
橋本吉秀……73

秦　龍二……146,254
畠中　寛……35,191
畠瀬　修……50
林　泰資……223
服部成介……8
服部幸雄……195,223
早川　浩……200
早川　徹……32,113
林　謙一郎……151
林　恭三……31,216
林　時司……180
林　泰資……195
林　要喜知……31,100
日高弘義……178
東田陽博……84,103,198
樋口宗史……167
引地　充……72,79
日根野　尚……173
平井俊策……47
平井裕子……13
平松　緑……11
平松正行……161
平野　誠……149,237
平野修助……24,201
平島　豊……52,226
平田　洋……124,145,250
廣内雅明……168
比屋根ゆり子……131
本多健治……89
本多虔夫……231
本藤久雄……237
堀　耕治……236
堀　泰雄……195,223
堀江健二……238
堀井　新……162
堀川　洋……120
星　直人……198
細川宏一……41
細川　清……150

(I)

茨木京子……120
井端泰彦……153
井林雪郎……149
市田成志……105,117
市川佳幸……150
市村　徹……131
一瀬　宏……94
一谷幸男……153
伊賀耕三……19,20
五十嵐道弘……85
井原康夫……37
飯島　昇……25
飯島　節……252
池田官司……77
池中一裕……174
池亀　守……27
池本光志……123
池中一裕……165
池内俊彦……35
池内容子……127
生田房弘……186
今泉和則……107
今泉美佳……177
今泉　玲……14
稲垣　忍……246
稲熊　裕……170,171,172
井上明宏……169
井上和秀……67,87
井上幸紀……207,209
井上順雄……23
井上　猛……66,208
犬塚　貴……45,156,166
入江恒正……111
入野誠郎……236
石川紘一……222
石川リカ……216
石川敏三……248
石丸昌彦……232
石崎泰樹……101,253
磯部正治……152
礒部俊明……131,242
板野俊文……50
伊藤英樹……207,209
井藤英喜……252
伊藤　高……185
伊藤　尚……26
伊藤仁一……175
伊藤青萩……136
伊藤哲一彦……159
岩橋和彦……150
岩森正男……228
岩永　操……34
岩田　弘……107
岩田邦男……110
岩田宜芳……249
岩坪　威……37

(J)

J. Milbrandt……36
Jacobowitz David M.……16
Joan Heller Brown……90

(K)

Kabir MD Ahmed……122
門田　健……74,76,225
門田朋子……26, 74,225
門脇　大……11
鹿川哲史……165
加賀谷有行……65
甲斐利弘……214
貝淵弘三……121
加治和彦……217
柿本泰男……173,181
鎌田裕樹……77
鎌田武信……146,254
亀下　勇……93
亀谷富由樹……42
亀山　勉……161
神谷大雄……89

金関　憲……127
神庭重信……235
金子元久……80
金松知幸……24,164
金行孝雄……190
菅野智行……80
唐沢　健……52
假屋哲彦……51
笠井陽子……9,92
柏原健一……79
柏俣重夫……193
片桐　忠……240
片村能也……77
片岡喜由……19,20,21,22
片岡泰文……147,199
片山雅文……214
加藤英政……36
加藤郁之進……174
加藤兼房……48,75,148 155,170,171 172
加藤泰治……175
加藤　武……62,158
加藤佳也……221
勝元栄一……213
桂　昌司……4
勝谷友宏……41
川原正博……39
川井ゆか……104
川北幸男……207,209,212 213,214
川島誠一……26
川島拓司……31
慶野宏臣……193
Kenimer G. James……87
菊池　章……121
木村　宏……152
木村　淳……38
木村和文……146,254
木村喜代史……215
木村定雄……76
木村康宏……103
金野郁雄……11
木下　章……32,113
木岡哲郎……212
切池信夫……207,209
岸野晶祥……111
岸野浩行……105,117
北畠克顕……25
北川照男……97
北島理恵……132,189
北島哲子……34
北嶋省吾……183
北村邦男……241
北村佳久……157,211
北中純一……119
鬼頭昭三……125,239
木山博資……70
清澤和弘……48
小林和夫……39
小林正明……108,141,143
小林雅文……160
小林良二……178
小暮久也……148,224,244 251
小暮美樹……222
甲平一郎……185
甲村英二……32,113
河野健一……15
高坂新一……25,96
鯉淵典之……197
小出誠司……214
小池達郎……217,218
小泉修一……147,199
小嶋久子……132,189
小島正已……35
小宮義璋……85
近藤尚武……242
近藤ひろみ……133
近藤啓次……173,181
近藤俊三……9
河野俊郎……81
越川憲明……160
腰本裕之……110
越村邦夫……86
胡谷和彦……181
小山　司……55,63,66 202,208
久保博彦……19
久保浩一……236
九穂泰三……222
工藤　喬……220,249
工藤佳久……18,199
久郷敏明……150
熊谷千尋……28,84
熊倉鴻之助……177
熊代　新……233
国松巳歳……151
栗原　正……164
栗山欣弥……4,69,168
黒田洋一郎……39
黒岩幸雄……71
車地暁生……114,232,233
車谷隆宏……40,219,220 221
九島洋一……191
桑野良三……242,247
葛谷博磁……27

(L)

李　憲……86
劉　健康……11

(M)

M. Hofer……116
M. Meyer……116
馬　麗娟……101
前田宗徳……189
前田信明……129,137,243

前川剛志……248
前山一隆……163
丸野内棣……140,155
丸山敬……42,133
丸山和佳子……53
増子博文……80
桝内務……80
増山善明……188
松田敏夫……187
松田譲……56,59,196
松口直成……68
松井ふみ子……137,243
松井英男……23
松本明……222
松本啓……65
松本真知子……64
松本昌泰……146,254
松本孝……149,237
松本智明……82
松尾明典……152
松尾嘉之……244
松岡一郎……116
松島真司……130
松山晃文……107
Menek Goldstein……188
三木直正……29,123,167
三木哲郎……41
御子柴克彦……12,129,165 174,191
三国雅彦……65
三森康世……44
蓑島伸生……247
三崎尚之……167
三品昌美……156,166
三竹重久……151
三ツ汐洋……51
三浦正明……108
三浦正幸……141,143
三羽信比古……136
三輪聡一……86
三宅博久……91
宮本亜紀……82
宮本英七……17
宮本豊……25
宮村毅……174
宮武正……45,156,166 186,240
宮崎則幸……229
宮崎唯雄……141
三好理絵……125,239
溝口克弘……68
水川公直……250
水谷宏……69
望月貴年……162
毛利哲郎……54,106
杢野謙次……48,155
桃井真里子……134
桃井隆……104,134
森昭胤……11,124,145 250
森啓……49
森博史……234
森惟明……91
森俊夫……25
森井研……242,247
盛政忠臣……190
森本清……185
森本正……253
森岡基浩……256
森下理香……75,170
守田昭仁……238
森田育男……101
森田規之……174
森脇晃義……195,223
諸井佳代子……74,76,225
諸治隆嗣……62,102
本橋伸高……51
本池俊行……121
撫井弘二……212,213
村上信之……48
村上哲英……50
村木彰……55
村松俊……177
村本和也……39
村岡新一郎……65
室田誠逸……101,253
室屋賢康……8
薙井武……215

(N)

鍋島あけみ……77
鍋島俊隆……161
永廣信治……256
長堀毅……226
永井克孝……203
長尾則男……136
長嶋和郎……154
永田豊……204,205,231
永津俊治……53,94,176
中出真嗣……129
中川敏幸……12
中川靖一……226
中原辰雄……237
中井康光……227,245
中嶋一行……96
中島光業……31,100
中条茂男……128,131,245
中村文裕……63
中村肇……121
中村順司……5
中村薫……237
中村和彦……150
中村和子……221
中村治……228
中村重信……44,90
中村俊……8
Nakamura Shun……122
中村豊郎……136

中村泰治……128
中谷一泰……245
中村洋一……19,20,21,22
中村祐……183,249
中根博……149
中西亜紀……212
中野稔……47
中野亮一……156,166
中岡隆志……203
中崎聡理……105,117
中島泉……140
中島雄三……204,205
仲田義啓……13,246
中谷一泰……128,131
中山孝……115
中安博司……69
中沢憲一……67
中沢真理子……26
中沢洋一……68
中村祐……184
直井信……53,176
成宮周……5
根木哲郎……50
新川久義……183,184,220
新延道夫……129,191
西田朗……200
西島正博……189
西嶌美知春……226
西川徹……180
錦織浩治……216
西村健……40,41,183,184,219,221,249
西沼啓次……221
西尾廣昭……13
西尾一郎……188
西塚泰美……130
丹羽正美……147,199
丹羽雅之……15
丹羽利充……53
野田百美……198
野口鉄也……192,201
野路久仁子……18
野本照子……125
野村和弘……229
野村耕章……52
野村正彦……236,241
野村総一郎……159
野村哲也……246
野村靖幸……5,10,14,28,78,84,157,211
野崎正勝……15
野沢美香……56,59
野沢義則……198

(O)

小幡邦彦……169
落合英彦……245
小田垣雄二……66,202
尾形直則……21,22
小川紀雄……124,145,250
小川智……146,254
小河原緑……49
荻田喜代一……1,2,3,58,60,61,206,255
小倉明彦……9,18,26,
大原たかね……82
大庭幸子……11
大熊誠太郎……168
大倉久直……229
大海忍……26
大森哲郎……55,63,66
大貫哲男……79
大迫俊二……126,179
大須伸佳……80
太田雪子……154
大月三郎……72,79,185
大槻俊輔……146,254
岡田泰士……50
子鹿幸生……33,111
小鹿幸生……151
岡高恵……180
岡田瑛子……225
岡田英俊……190
岡田尚志郎……95
岡橋育子……245
岡倉薫……162
岡村均……153
岡野栄之……12
沖俊一……79
大河内正康……40,219,220,221
奥野正景……207,209
奥山典生……131,242
尾前二三雄……73
小俣久美子……245
大西博……212,213,214
小野光弘……185
小野寺宏……148,224,244,251
小野寺憲治……163
尾上浩隆……119
大星博明……149
大平敦彦……137,138,243
大村裕……152
折茂肇……252
大杉武……123
太田深雪……53,176
大谷邦彦……140
大谷光弘……135
大辻常男……52
尾崎直子……74,225
尾崎宜洋……213
小澤寛樹……77

(P)

P. N. Patsalos……230

(S)

佐渡島 省 三 ……149
左 合 正 周 ……135
西 須 英 雄 ……120
斎 藤 秀 哉 …… 64
斎 藤 繁 …… 85
斉 藤 利 和 …… 77
斉 藤 康 成 ……194
斎 藤 和 子 …… 65
斎 藤 茂 治 …… 25
斎 藤 祐見子 …… 26
坂 部 武 史 ……248
坂 口 健 夫 …… 32
坂 井 也 彦 ……163
榊 佳 之 …… 41
坂 本 秀 生 …… 27
坂 本 貴 志 …… 91
崎 村 建 司 ……156,166
崎 山 武 志 …… 97
佐久間 聡 子 …… 84
櫻 井 宏 明 …… 57
佐 野 輝 ……173,181
佐 野 公 彦 ……121
佐 野 護 …… 34
佐々木 英 夫 ……240
佐々木 實 ……151
佐々木 富 男 ……253
佐 藤 昭 夫 ……252
佐 藤 浩 ……193
佐 藤 和 恵 ……245
佐 藤 潔 ……182
佐 藤 康 二 …… 6
佐 藤 真 …… 70
佐 藤 修 三 …… 45,156,166
240
佐 藤 永 雄 ……227
佐 藤 好 威 ……215
佐 藤 一 紀 …… 9
澤 温 ……159
澤 田 誠 ……109,155
瀬 川 富 朗 …… 13
関 周 司 …… 95
関 谷 紫 ……159
関 山 敦 生 …… 40,219,220
221
仙 波 純 一 ……230
仙 波 りつ子 ……138,148
仙 波 禮 治 ……193
芝 軒 信 次 ……222
柴 山 敏 子 ……245
渋 井 荘一郎 ……229
澁 谷 治 男 ……234
重 松 和 人 ……147
重 冨 美智男 ……248
清 水 雅 美 ……200
清 水 信 義 ……247
清 水 知 己 …… 68
下 濱 俊 …… 38
下 条 雅 人 …… 96
下 山 政 憲 ……239
篠 原 春 夫 ……170,171,172
篠 村 徹太郎 ……130
新 谷 太 ……235
塩 江 邦 彦 …… 51
塩 坂 貞 夫 ……107
塩 田 富紀子 ……227
塩 田 清 二 ……227
白 尾 智 明 ……144
庄 盛 敏 廉 …… 95,190
小豆原 秀 貴 ……148,244
宋 時 栄 ……242
曽 良 一 郎 …… 79,185
外 松 明 美 …… 47
須 田 喜久夫 ……182
須 藤 慎 治 …… 81
菅 谷 慶 三 ……227
杉 原 英 光 ……253
杉 本 晃 ……224
杉 崎 哲 朗 ……192
杉 田 倫太郎 ……159
杉 浦 弘 子 ……127
杉 山 英 子 …… 46
杉 山 和 彦 ……240
鈴 木 敬一郎 ……146,254
鈴 木 光 雄 ……197
鈴 木 史 郎 …… 74
鈴 木 竹 雄 …… 3,58,206
255
鈴 木 龍 雄 …… 18,118
鈴 木 由美子 ……204,205
錫 村 明 生 ……140,155

(T)

T. F. Deuel …… 36
田 平 武 ……98,99
多 田 國 利 ……220
多賀谷 昌 史 ……146,254
田 口 淳 一 ……153
田 口 隆 久 ……112
平 英 一 …… 29
高 田 吉 弘 ……194
高 寺 恒 雄 …… 54
高 木 宏 ……246
高 橋 昭 ……48,53,140
高 橋 均 ……186
Takahashi Keikichi …… 98
高 橋 清 久 …… 65,180
高 橋 正 身 …… 9,92,177
高 橋 信 明 …… 35
高 橋 真 司 ……158
高 橋 勤 …… 53
高 橋 康 夫 ……247
高 畑 直 彦 …… 77
高 井 義 美 ……121
高 久 晃 …… 52,226
高 倉 公 朋 ……253
高 松 研 ……201
高 野 行 夫 …… 89

高島明彦 …… 87,218
高辻功一 …… 6
高山順 ……229
高山衛 ……194
武田篤 ……251
竹田二美代 ……227
武田克道 ……158
武田雅俊 …… 40, 41,183
184,219,220
221,249
竹田稔 ……227
武市昌士 …… 30
武富保 …… 46
Takeuchi Alice Mayumi … 98
瀧尾拡士 …… 49
玉井洋一 ……132,189
田丸政男 ……231
田辺敬貴 …… 41
田中英明 ……142
田中秀和 ……123
田中祥裕 ……255
田中淳一 ……236
田中健一 ……124,250
田中喜久子 …… 42
田中真 …… 47
田中正敏 …… 68
田中亮 ……18,33,118
175
田中佐知子 …… 71
田中早苗 ……236
田中秀逸 ……217,218
田中稔久 … 40,219,220
221
田中康一 …… 83
谷口直之 ……146,254
谷口隆之 …… 38
谷向知 … 40,219,220
谷浦秀夫 …… 29,123
谷山紘太郎 ……147
田岡万悟 ……242
田代謙一郎 …… 30
楯林義孝 ……40,41,219
220
田和聖子 ……248
寺澤求 ……178
戸田正博 ……144
富樫広子 …… 64
東田道久 … 5,10,14,28
78,84
遠山正彌 … 6,32,36,70
遠山陽子 ……164
土岐眞一郎 ……56,59,196
徳武哲 …… 43
富田博秋 ……72,79
富田幸子 ……104
富山勝則 ……160
遠山育夫 ……152
融道男 …114,232,233
234
戸谷重雄 ……135,144
津田和志 ……188
津田正明 …… 7,57
津田正彦 …… 97
辻崇一 ……203
辻村敦 ……168
塚田和彦 ……128
塚田泰且 ……106
塚田裕三 …… 24
鶴見介登 …… 15
筒井研 …… 95
筒井公子 …… 95
堤哲之 ……237
津崎尚子 …… 96
都築紀宏 ……210

(U)

内村英幸 ……149,237
上田周一 ……146,254
植木靖之 …… 33,151
植村富彦 ……229
植野信水 ……189
上野修一 ……173,181
漆原尚巳 …… 10
宇佐美美穂子 …… 42
生塩之敬 ……256
植村慶一 …108,139,141
143,144,201

(W)

和田博夫 ……252
和田博 ……162
和田哲幸 ……105,117
脇谷健司 ……228
和中明生 ……32,36,146
254
王平 …… 63
渡辺明子 ……233
渡辺雅彦 ……242
渡辺繁紀 ……199
渡辺建彦 ……163
綿野智一 …… 67
Winsky Lois …… 16

(Y)

矢田武 ……157
八木-中川勇 ……194
山田和雄 …… 32,113
山上栄 …212,213,214
山形要人 ……167
山形崇倫 ……134
山口知子 …… 16
山門誠 ……134
山国徹 ……242
山本秀子 …… 62,102
山本纊子 ……155
山本純子 ……164
山本正彦 …… 33
山本智浩 ……112
山本智久 ……248
山本敏文 … 62,102,158

山元俊憲……71
山中庸次郎……211
山岡貞夫……197
山崎靖人……148,244,251
山下格……55,63,66
202,208
山下樹三裕……147,199
大和谷厚……162
山内卓……126,127,179
山脇成人……200
山崎誠治……163
柳沢勝彦……186
谷内一彦……163
八尾博史……149
安田武司……48
安原治……152
矢崎貴仁……139
横越英彦……238
横尾秀康……68
横谷昇……213
横山ちひろ……153
横山靖司……161
横山俊英……158
米田幸雄……1,2,3,58,60
61,206,255
米沢裕次……237
吉田明……92
吉田英治……48
吉田一成……135
吉田武美……71
吉川和明……100,133
吉見建二……249
吉本智信……253
吉村和法……241
吉岡充弘……64
湯浅龍彦……45
湯川素子……44
結城伸泰……240

(Z)

朱和……4

NEN Research Products

DUPONT

in situ ハイブリダイゼーション システム

Du PontのInsituハイブリダイゼーションシステムは
合成オリゴヌクレオチドプローブを用いて細胞内の特定のmRNA分子を
固定するためのシステムです。

特に初心者向けにデザインされており、手法の
習得にも適しています。

システム内容

［組み合わせにより6通りのシステムを用意しています］

^{35}S標識オキシトシンプローブ，ラット脳コントロールスライド
ALP標識バソプレッシンプローブ，10×PBS溶液，20×SSC溶液，BCIP溶液
アルカリフォスファターゼバッファー，ハイブリダイゼーションバッファー，NBT溶液
パラホルムアルデヒド，コプリンジャー，スライドボックス，スライドメイラー
乾燥剤，プラスチックピンセット

詳しくは下記までお問合せください。

輸入販売元

第一化学薬品株式会社

アイソトープ課/〒104 東京都中央区新川一丁目22番11号 TEL.03(3552)1531代

DOJINDO Reagents
Information

お気軽にどうぞ…
ユーザー専用フリーダイヤル
0120
シャクのゴヨーハ
489-548

Reagents for Cell Biology

膜蛋白質可溶化剤:
n-Octyl-β-D-glucoside
n-Heptyl-β-D-thioglucoside
n-Octyl-β-D-thioglucoside
MEGA-8, MEGA-9, MEGA-10
deoxy-BIGCHAP
CHAPS, CHAPSO
Detergent Starter Kit (Detergentの各500mg包装)

細胞内カルシウムの超高感度蛍光プローブ:
Fura 2, Fura 2-AM, Quin 2, Quin 2-AM
Indo1, Indo1-AM, Fluo 3, Fluo 3-AM
Rhod 2, Rhod 2-AM, 5-F-BAPTA, 5-F-BAPTA-AM

細胞内pHの超高感度蛍光プローブ:
BCECF, BCECF-AM, Quene1, Quene1-AM

細胞内Cl^-の超高感度蛍光プローブ:
SPQ, MQAE*

細胞内粘度の超高感度蛍光プローブ:
Azido-FDA, PC_3P, tma-DPH

細胞内カルシウムの選択的キレート剤:
BAPTA, BAPTA-AM

細胞膜を透過する重金属キレート剤:
TPEN

細胞内セカンドメッセンジャー:
Ins(1,4,5)P_3, Ins(1,3,4,5)P_4

各種Caged化合物:
Caged ATP, Caged GDP, Caged GTP
Caged cAMP, Caged cGMP
Caged ATP Dimethoxy
Caged GDP Dimethoxy
Caged GTP Dimethoxy
Caged cAMP Dimethoxy
Caged cGMP Dimethoxy
Caged Ca (Nitr 5, Nitr 7)
Caged Fluorescein,* Caged Fluorescein Osu*
Caged Fluorescein sulfo Osu*
Caged Proton,* Caged Proton Dimethoxy*
Caged Glycine,* Caged Glycine Dimethoxy*

リポソーム安定化剤:
Chol-AECM-Mannan, Chol-AECM-Pullulan
DDPC

ラジオイムノアッセイ用二価性キレート試薬:
Aminobenzyl-EDTA,
Isothiocyano benzyl-EDTA

酵素標識抗体用水溶性架橋試薬:
Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS

●新版Dojindoカタログ無料配布中です。ご請求ください。

*:近日発売予定

DOJINDO 試薬製造元
株式会社 同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原2025-5 〒861-22
(熊本テクノ・リサーチパーク)
Tel.096-286-1515(代表) Fax.096-286-1525
ドージン・イースト(東京)
Tel.03-3578-9651(代表) Fax.03-3578-9650

ドータイト試薬発売元
和光純薬工業株式会社
本社　大阪市中央区道修町3丁目1番2号 〒541
Tel.06-203-3741(大代表)
東京支店 東京都中央区日本橋本町4丁目5番13号 〒103
Tel.03-32708571(大代表)
出張所　福岡・広島・名古屋・横浜・大宮・筑波・仙台・札幌

アミノ酸受容体研究試薬

品揃えを充実!! 異性体・類似体も豊富に。

興奮性アミノ酸受容体(グルタメートリセプター)作働・拮抗薬

リセプターサブタイプ	アゴニスト	アンタゴニスト
イオンチャンネル型		
NMDA	NMDA, cis-ACPD(ADCP) 1-Amino-1, 3-cyclopentanedicarboxylic acid Ibotenic Acid, Asp	D-AP5, D-AP7 ACBC 1-Aminocyclobutanecarboxylic acid ,HA-966 3-Amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone
non-NMDA	(S)-AMPA, (R,S)-AMPA α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid cis-2, 4-Methanoglutamate Kainic Acid Domoic Acid	GAMS γ-D-Glutamylaminomethyl sulphonic acid ,BPDC 1-(4-Bromobenzoyl)piperazine-2, 3-dicarboxylic acid CNQX 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dion ,JSTX Joro Spider Toxin
代謝調節型		
	trans-ACPD(ADCP) Ibotenic Acid Quisqualic Acid	DL-AP3, D-AP4

グルタメートリセプター ブロッカー

2, 4-Dihydroxyphenylacetylasparagine, Argiotoxin, JSTX

上記の他光学異性体、構造類似体を多数在庫しています。
ご照会ください。

抑制性アミノ酸受容体(GABAリセプター)作働・拮抗薬

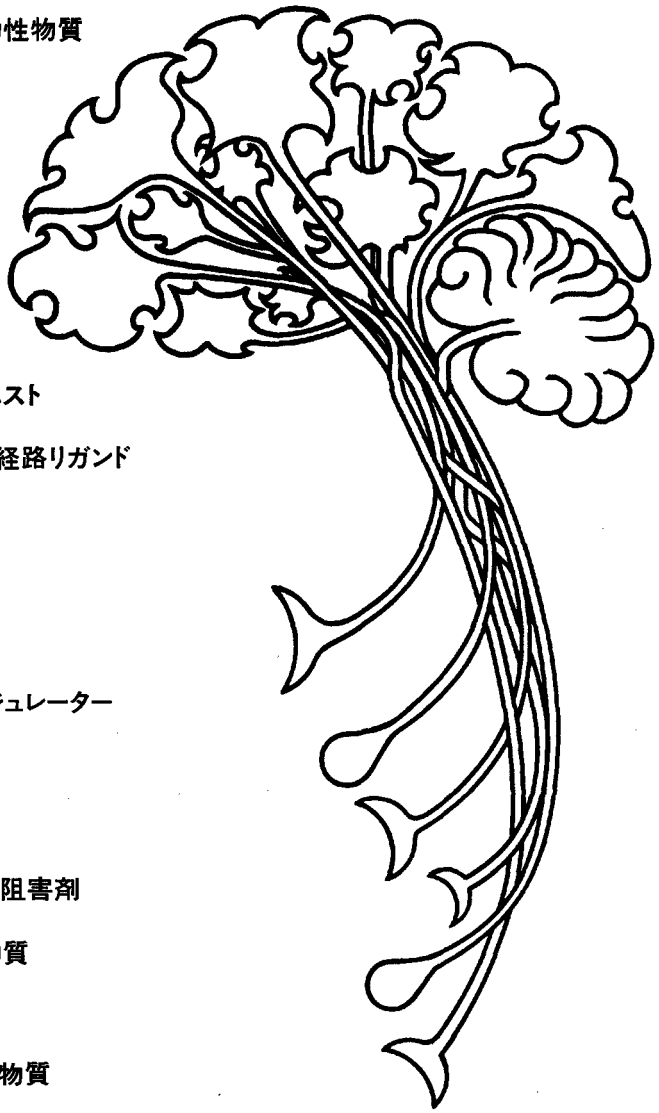
リセプターサブタイプ	アゴニスト	アンタゴニスト	リガンド
$GABA_A$	ZAPA (Z)-3-[(Aminoiminomethyl)-thio]-prop-2-enoic acid TACA trans-4-Aminocrotonic acid ,GABA Muscimol	Bicuculline	
$GABA_B$	3-Aminopropylphosphinic acid Baclofen	Phaclofen Saclofen 2-Hydroxysaclofen	4-Amino-3-benzo(b)furan-2-yl-butanoic acid 4-Amino-3-(5-methoxybenzo(b)-furan-2-y)-butanoic acid
$GABA_C$			CACA cis-4-Aminocrotonic acid

和光純薬工業株式会社

本　社　大阪市中央区道修町3丁目1番2号
〒541 電話 大阪(06)203-3741(大代表)
東京支店　東京都中央区日本橋本町4丁目5番13号
〒103 電話 東京(03)3270-8571(大代表)
出張所　福岡・広島・名古屋・横浜・大宮・筑波・仙台・札幌

RBI 脳神経研究用試薬

- アデノシン誘導体/プリン作動性物質
- アドレナリン作動性物質
- ベンゾジアゼピン誘導体
- コリン作動性物質
- ドーパミン作動性物質
- 酵素阻害剤
- カルモジュリン・アンタゴニスト
- サイクリック・ヌクレオチド経路リガンド
- 興奮性アミノ酸
- GABA作動性物質
- ヒスタミン作動性物質
- イオンチャンネル・モジュレーター
- 神経毒
- 神経ペプチド
- タンパク質キナーゼ阻害剤
- セロトニン作動性物質
- キサンチン誘導体
- 薬理学対照標準物質



※1991年RBI社カタログをご請求下さい。

フナコシのライフサイエンス研究用試薬と機器

日本総代理店

フナコシ

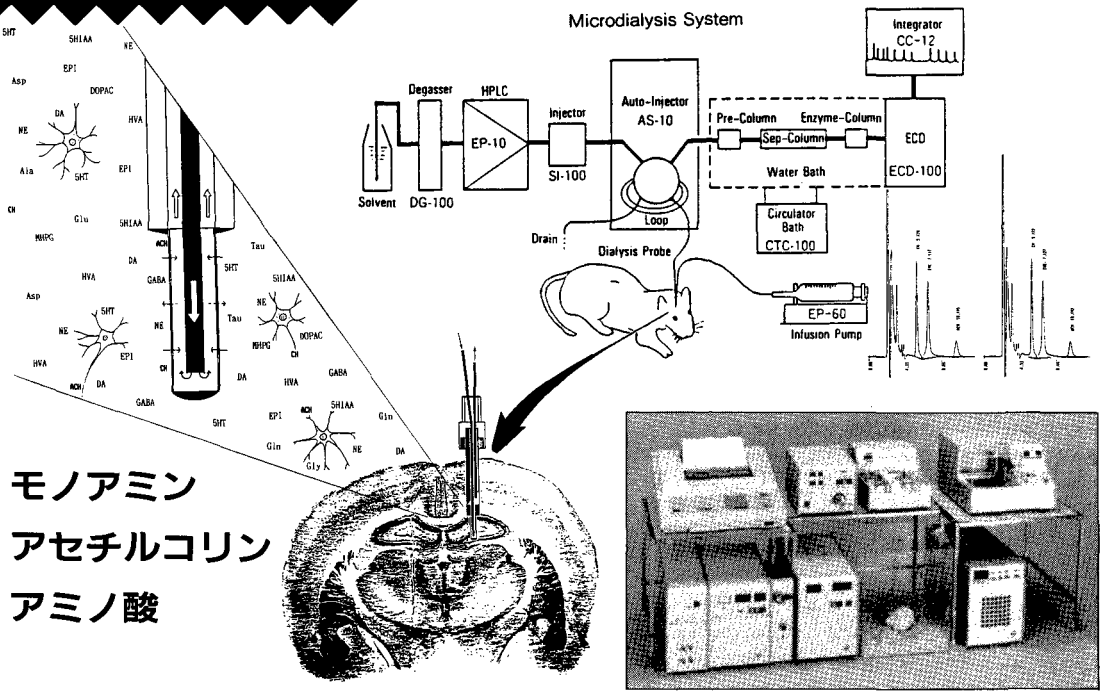
フナコシ株式会社

〒113 東京都文京区本郷2-9-7 ユピテル・ユニビルディング

営業業務部・研究試薬部・研究機器部☎03-5684-1616(代表)・研究開発部技術情報課☎03-5684-1620(代表)

IN VIVO Microdialysis

エイコム マイクロダイアリシスシステム

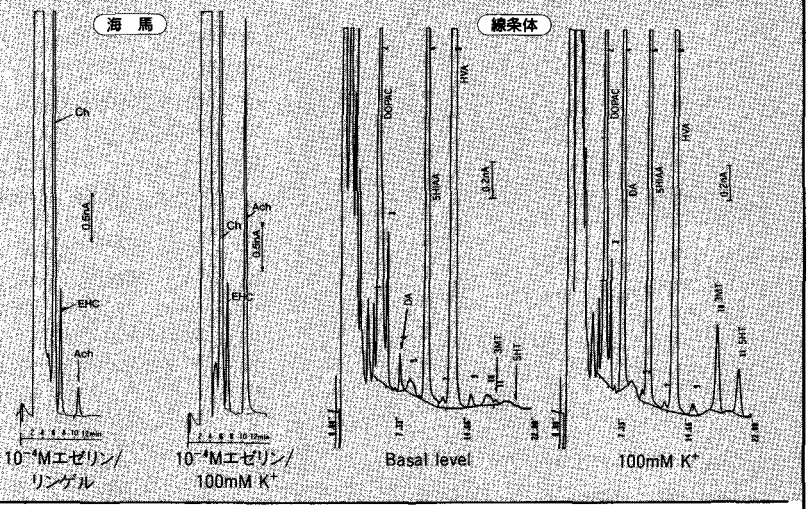


モノアミン
アセチルコリン
アミノ酸

- **IN VIVOの状態で測定できます。**
- **オートインジェクタを用いることにより連続的に、サンプルロスも無く測定できます。**
- **マイクロダイアリシス用フラコレ、オートサンプラも用意されています。**
- **HPLC-ECDは超高感度で安定性の高いエイコムの分析システムです。**
- **プローベは直管型、U字型双方が用意されています。また、特注品も製作できます。**

エイコム電気化学検出システムは感度、安定性にすぐれています。マイクロダイアリシスシステムに限らず高感度分析にご採用をお待ちします。

- HPLC-ECDの分析、マイクロダイアリシスシステムについての技術情報を"エイコム情報"として用意しております。ご一報をお待ちします。



10^{-4}Mエゼリン/リンゲル　　10^{-4}Mエゼリン/100mM K^+

EiCOM 株式会社 エイコム

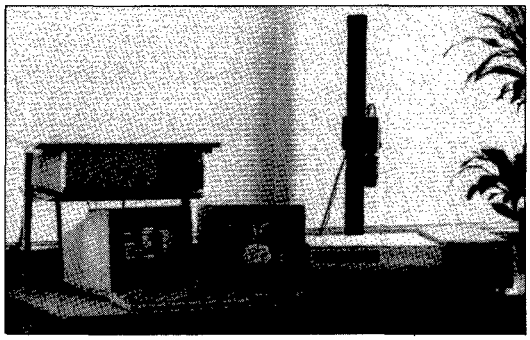
本　　社：〒612 京都市伏見区北端町24-1
TEL(075)622-2112(代)　FAX(075)622-2114
東京営業所：TEL(03)3493-4554　FAX(03)3494-8267
札幌営業所：TEL(011)813-3268　FAX(011)813-6001

あなたの力強いパートナーに!!

カナダ・イメージングリサーチ社製
Image Analyzer MCID

本システムは、脳神経科学分野における画像診断の基礎研究法として、極めて適切な方法となったオートラジオグラフィー法による脳組織代謝・循環の定量測定とレセプターバインディング分析、また電気泳動ゲルによるタンパク分子量分析、細胞内カルシウムイオン濃度等を、定量的に計測するために開発されたシステムです。

32ビットコンピュータをメインとし基本装置は最新のOS/2を採用していますので、広範囲なマルチタスクが実行できます。高解度CCDカメラは画面を256階調に分解し、高性能イルミネータ上のサンプル濃度形態を正確に計測いたします。



一台のMCIDからおおくの用途が広がります。

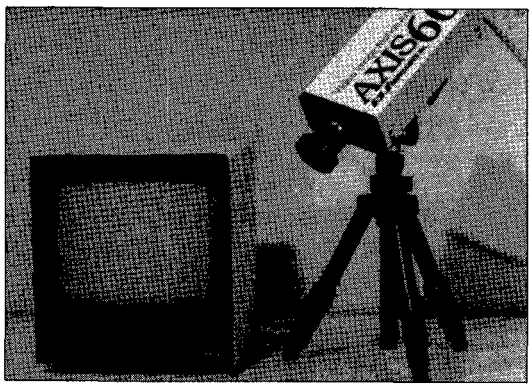
◆ARG濃度定量測定
- 全身ARG濃度測定・レセプタ結合定量測定
- 脳代謝定量濃度測定・脳蛋白合成率測定
- 脳循環定量濃度測定・脳血管透過性測定

◆データのイメージ表示
- 2Dグラフィックカラー表示

◆生化学的濃度定量測定
- 電気泳動ゲル分析・蛋白分子量分析
- 細胞内カルシウムイオン濃度分析

◆生物学的形態測定
- 手動、自動形態測定・自動濃度測定
- グレイン、細胞、血球等の自動カウント
- キャピラリー(組織血管)形態測定

実験動物行動解析装置
Video Image Motion Analyzer AXIS



AXIS60／AXIS30

今までの実験はすべて人間による観察に依存していた為、客観性に欠け、定量的なデータも少なかった。

本システムは、CCDカメラからの画像信号を処理し撮影領域内の目標物体だけを抽出し、得られた座標データをもとに、目標物体の行動を解析し、角解析値、軌跡を出力する小動物用の運動解析装置です。

実験動物の運動軌跡を記録し、距離、速度、方向、変換角度、その他各実験に合わせた測定項目が用意されていますので、客観的な定量かデータが確実に得られます。
迷路を使用する学習・記憶実験等には最適な研究機器です。

◆解析ソフトウェア【TARGET】
- 8方向放射状迷路
- モーリス水迷路
- BIEL型水迷路
- 角型オープンフィールド

◆AXIS 60/30用オプション
- 実験用迷路各種
- 8方向放射状迷路用餌獲得センサー

◆AXIS 30用オプション
- 暗視野用赤外線カメラ
- ビデオ解析用外部同期ユニット
- ビデオ解析用タイムラプス・カセットビデオレコーダ
- ビデオ解析用タイムベースコレクタ

上記製品についてのお問い合わせは……

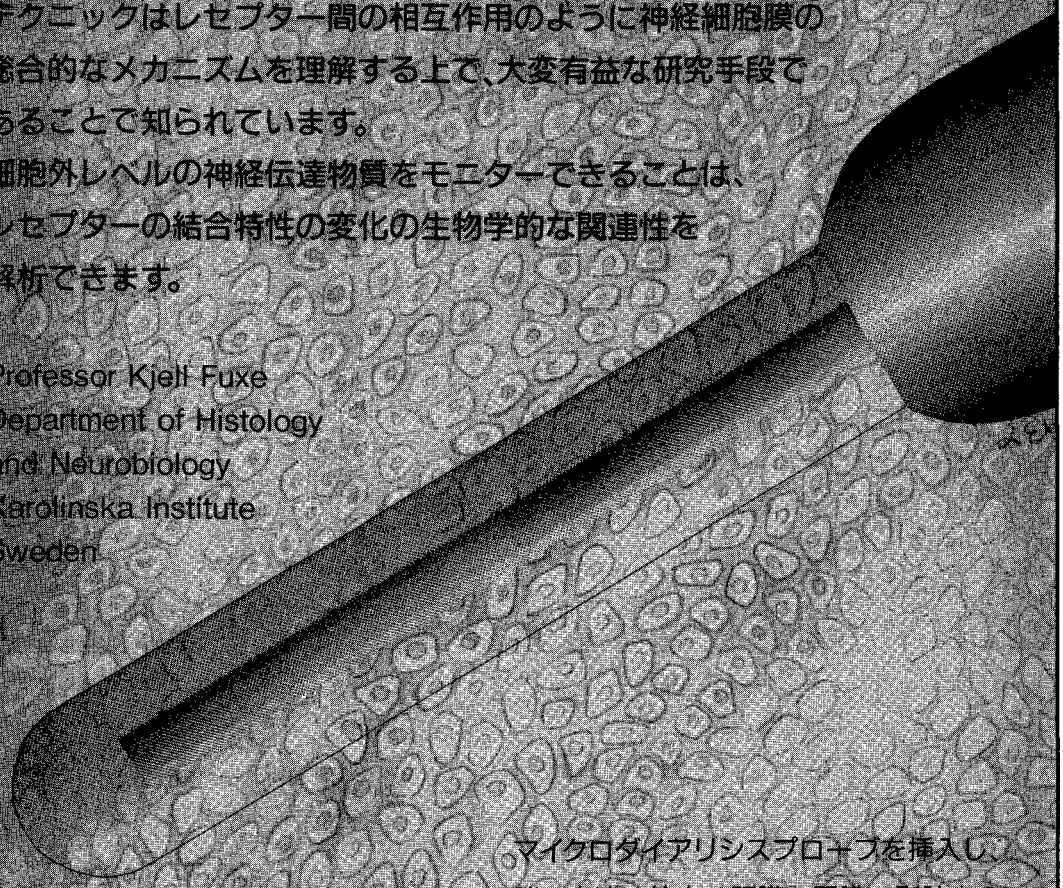
NEUROSCIENCE, INC.
株式会社 ニューロサイエンス

本　　社：〒110 東京都台東区台東3-15-1 平和生命ビル
TEL.(03)5688-1061　FAX.(03)5688-1065
大阪支店：〒532 大阪市淀川区西宮原1—8—38—1106号
TEL.(06) 393-0750　FAX.(06) 393-0759

マイクロダイアリシス

テクニックはレセプター間の相互作用のように神経細胞膜の
総合的なメカニズムを理解する上で、大変有益な研究手段で
あることで知られています。
細胞外レベルの神経伝達物質をモニターできることは、
レセプターの結合特性の変化の生物学的な関連性を
解析できます。

Professor Kjell Fuxe
Department of Histology
and Neurobiology
Karolinska Institute
Sweden



マイクロダイアリシスプローブを挿入し、
脳、血液、筋肉、肝臓、腎臓、脂肪中の
各神経伝達物質、代謝物、栄養素、薬物、
毒物をモニターします。

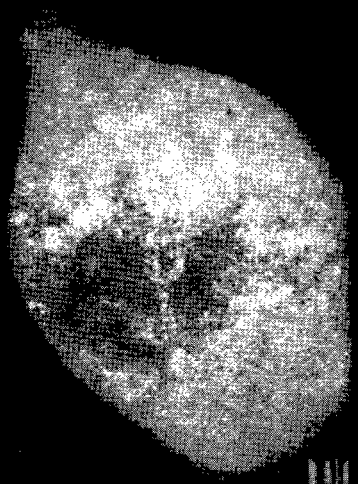
※細胞間の情報の探索方法について詳細な資料を必要な方は、BASにお問い合わせください。

BAS
ビー・エー・エス株式会社

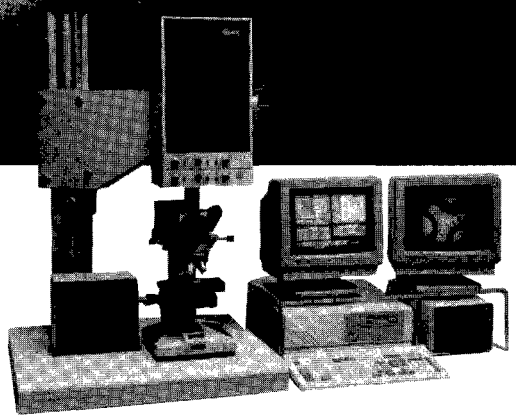
〒131 東京都墨田区押上1－36－4 TEL.(03)3624-0367(代)
FAX.(03)3624-0940
〒532 大阪市淀川区西中島5-7-14 TEL.(06)308-1867
FAX.(06)308-6890

細胞観察のイノベーション

英国MRCとBio-Rad社が生み出した次世代顕微鏡



ウシガエル交感神経節細胞Fluor-3/AMによりCa^{++}測光
（写真提供：佐賀医科大 久場健司先生）



共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡

MRC-500J/600

レーザーによる共焦点光学方式により光断層像（光CTスキャン像）が得られます。この像は従来の蛍光顕微鏡では決して得られない、おどろくほど鮮明な画像です。現在すでに日本の多くの研究者に、バイオラッド レーザー顕微鏡は使用されています。

●メーカーを問わず三眼落射蛍光顕微鏡、倒立蛍光顕微鏡にとり付けられます。 ●FITC、ローダミン、テキサスレッドなど従来の蛍光法に対応します。 ●アルゴン・イオンレーザー（488nm、514nm）搭載。 ●スキャンニングシステムには全反射広帯域光学系を採用し、紫外～近赤外のレーザーにも対応できます。 ●蛍光・反射・透過・位相差・ノマルスキー各画像が得られます。 ●連続断層法、透過/蛍光画像合体、輝度ヒストグラム、擬似カラーによる輝度表示など各種ソフトウェアを搭載。

BIO-RAD
マイクロサイエンス部

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

本　　社　〒104 東京都中央区勝どき5-3-6 住友生命勝どきビル　☎(03)3534-7601
大阪営業所　〒532 大阪市淀川区新北野1-14-11 大阪新北野第一生命ビル　☎(06)308-6268
筑波営業所　〒305 つくば市吾妻1-15-1 筑波司法会館　☎(0298)52-0837
名古屋営業所　〒465 名古屋市名東区一社3-121-1 MIDORIビル　☎(052)702-2358
福岡営業所　〒812 福岡市博多区博多駅東2-17-5 モリメンビル　☎(092)475-4856

神経化学　第30巻　第1号

平成3年9月20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　(株)林　工房