ISSN：0037－3796

神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第35回　日本神経化学会大会論文集

Vol. 31 (No. 1), 1992

日本神経化学会

神経化学

第35回日本神経化学会大会論文集

PROCEEDINGS OF THE 35th ANNUAL MEETING OF

THE JAPANESE NEUROCHEMICAL SOCIETY

於　名古屋

10月20日(火), 10月21日(水), 10月22日(木)

Vol. 31 (No.1), 1992

日 本 神 経 化 学 会

編集委員（ABC順）

藤本征五	（名市大・医・薬理）
濱中淑彦	（名市大・医・精神科）
林　恭三	（岐阜薬大）
日高弘義	（名大・医・薬理）
亀山　勉	（名城大・薬）
柏俣重夫	（刈谷保健所）
加藤兼房	（愛知県コロニー）
加藤泰治	（名市大・医・分子医研）
松田友宏	（名市大・医・薬理）
鍋島俊隆	（名大・医・薬剤）
直井　信	（名工大・保健体育）
永田　豊	（藤田保健衛生大・医・生理）
永津俊治	（藤田保健衛生大・総医研）
西野仁雄	（名市大・医・生理Ⅱ）
小鹿幸生	（名市大・医・内科Ⅱ）
鈴木龍雄	（名市大・医・生化学Ⅰ）
高橋　昭	（名大・医・神経内科）
武富　保	（信州大・医・心脈管病研）
田中　亮（代表）	（名市大・医・生化学Ⅰ）

目　　次

1．カルモジュリンキナーゼⅡのシナプス後肥厚部-細胞骨格系へのトランスロケーション…… 32
鈴木龍雄、野路久仁子、田中　亮
（名古屋市大・医・第一生化）

2．培養海馬神経細胞におけるグルタミン酸刺激に伴うCaMキナーゼIIの活性化反応 …… 34
福永浩司、宮本英七
（熊本大・医・第一薬理）

3．グルタミン酸受容体cDNAを用いた細胞内発現と蛋白質燐酸化反応 …… 36
山本秀幸[*1,2]、宮本英七[*2]、T. R. Soderling[*1]
（[*1]オレゴン医大、[*2]熊本大・医・第一薬理）

4．カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII αおよびβタンパク質量の発達過程における変化…… 38
杉浦弘子、山内　卓
（都神経研・遺伝学）

5．ラット大脳CaM-キナーゼIVのA-キナーゼによるリン酸化と活性調節 …… 40
亀下　勇、藤澤　仁
（旭川医大・第一生化）

6．大腸菌で発現した不活性なカルモデュリン依存性プロテインキナーゼIVを活性化する因子の組織分布…… 42
奥野幸子、藤澤　仁
（旭川医大、第一生化）

7．カルレチニンの非神経細胞P_2膜タンパクリン酸化への影響 …… 44
山口知子、Lois Winsky*, David M. Jacobowitz*
（東京女医大・生化、*NIMH）

8．海馬LTP発現によるCキナーゼの変化…… 46
鈴木龍雄、野路久仁子、田中　亮、小倉明彦*、中村京子*、工藤佳久*
（名古屋市大・医・第一生化、*三菱化成生命研・脳神経薬理）

9．抗ホスファチジルセリン抗体を用いた活性化プロテインキナーゼCの可視化の試み …… 48
宮澤淳夫、吉岡　享
（早稲田大・人間科学）

10. PC12細胞におけるホスホリパーゼDの活性化機構…… 50
加納宏行、野沢義則
(岐阜大・医・生化)

11. K－252aによるNGF受容体チロシンキナーゼの特異的阻害 …… 52
橋本裕子、室屋賢康、服部成介、中村　俊
(国立精神神経センター神経研・診断研究部)

12. ラット培養アストロサイトにおけるグルタミン酸によるアデニル酸シクラーゼの抑制…… 54
佐賀　寛、橋本　均、馬場明道
(大阪大・薬・薬理)

13. ウシ網膜2次ニューロンに存在するグルタミン酸受容体と連関するGTP結合蛋白質の検索 56
吉川知志、津田基之
(姫路工大・理・生命科学)

14. 低分子量G蛋白質、smg／rab3A p25、の標的蛋白質の同定と精製…… 58
和田　謙、貝淵弘三、白瀧博通、山口　務、堀内久徳、高井義美
(神戸大・医・第一生化)

15. 肝臓に存在する94K　MEKA様蛋白質は大脳G蛋白質βγサブユニットと相互作用する 60
郭　哲輝、相場　仁*、三木直正
(大阪大・医・第一薬理、*札幌医大・生化)

16. ウシ脳コート小胞で見られるADP－リボシル化反応 …… 62
諸井佳代子、門田　健*、木村定雄
(千葉大・医・高次研・高次神経、*都精神研・神経化学)

17. 神経系における新しいカルシウム結合蛋白neurocalcin …… 64
中野明夫、寺沢 求、渡辺正人、岡崎勝男、日高弘義
(名古屋大・医・薬理)

18. シナプトカナリン（脳N型Caチャネル結合蛋白質）の構造と多様性 …… 66
森田貴雄*1,2、森　寿*2、崎村建司*2、三品昌美*2、関根陽子*1、堀川　洋*1、
西須英雄*1、阿部輝雄*1
(新潟大・脳研・*1神経化学、*2神経薬理)

19. In situ DNA-Protein Binding法による脳内転写調節因子のDNA結合活性の同定 …… 68
王　小兵、大杉　武、池本光志、田中秀和、三木直正
(大阪大・医・第一薬理)

20. NPY 遺伝子の神経成長因子レスポンスエレメントの同定と結合蛋白質の誘導 …… 70
樋口宗史、中野浩一、三木直正
(大阪大・医・第一薬理)

21. マウス脳の cAMP response element (CRE) 結合蛋白質に対するモルヒネの作用 …… 72
大杉　武、池本光志、田中秀和、王　小兵、三木直正
(大阪大・医・第一薬理)

22. ムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬による mRNA の発現と c-fos mRNA の誘導抑制 74
深間内文彦、D. -M. Chuang*
(東京医歯大・難研プロジェクト、*NIH)

23. DNA 合成器でビチオン標識されたプローブを用いた高解像度非放射性 in situ ハイブリダイゼーション法について …… 76
花井一光、渡部芳徳、安原　治、遠山育夫、木村　宏
(滋賀医大・分子神経生物研)

24. ラット脳部位の ESR － CT イメージング …… 78
平松　緑、及川和夫、野田博行、丹羽龍史[*1]、小中隆盛、森　昭胤[*2]、
尾形健明[*3]、鎌田　仁
(山形県テクノポリス財団、[*1]メクト、[*2]岡山大・医・分子細胞医学研・神経情報、
[*3]山形大・工・物質工学)

25. アルツハイマー病血液バッフィコートのハムスター脳への接種実験 …… 80
谷向　知、武田雅俊、工藤　喬、楯林義孝、大河内正康、金山　巌、播口之朗、西村　健
(大阪大・医・精神医)

26. アルツハイマー病患者および健常者の血小板におけるアミロイドβ蛋白前駆体のプロセシング …… 82
大河内正康、武田雅俊、中村　佑、車谷隆宏、関山敦生　金山　巌、西村　健
(大阪大・医・精神医)

27. 培養細胞系でのアルツハイマー病アミロイド前駆体タンパク質の代謝の検討 …… 84
丸山　敬[*1]、熊谷善弘[*1,2]、山尾・針ヶ谷和花子[*3]、宇佐美美穂子[*1]
([*1]都精神研・分子生物、[*2]三共・活性研、[*3]都臨床研・遺伝情報)

28. APP 遺伝子を導入したグリオーマ細胞におけるアミロイドジェニックフラグメントの生成 86
林要喜知、柏木久美子、吉川和明*
(森永乳業・生科研、*都神経研・分子神経生物)

29. 抗 HIPPOCAMPAL CHOLINERGIC NEUROSTIMULATING PEPTIDE (HCNP) 抗体による高齢者ヒト剖検脳への免疫染色の試み…… 88
三竹重久、小鹿幸生、林謙一郎、大塚康史、山本正彦、藤森　修*
(名古屋市大・医・第二内科、*第二解剖)

30. 成長抑制因子 (GIF) の生理活性部位 …… 90
内田洋子、辻　省次*1、井原康夫*2
(都老人研・神経病理、*1新潟大・脳研・神経内科、*2東京大・脳研・病理)

31. アルツハイマー病脳におけるプロテインキナーゼCアイソザイム量の変動 —エンザイムイムノアッセイ法による定量的検討— …… 92
下濱　俊、松島秀行、山岡由美子、木村　淳、亀山正邦*1、萩原正敏*2、
日高弘義*2、谷口隆之*3、
(京都大・医・神経内科、*1住友病院、*2名古屋大・医・薬理、*3京薬大・生物)

32. PHF 内におけるユビキチン標的タンパク質の同定 …… 94
森島真帆、長谷川成人、瀧尾擴士*1、鈴木政美*2、千谷晃一*2、井原康夫
(東京大・医・脳研病理、*1理化学研・生体分子解析室、*2藤田保衛大・総医研・医高分子)

33. アルツハイマー病脳におけるトロンビンの沈着について …… 96
秋山治彦、Patrick. L. McGeer*
(都精神研・神経病理、*Kinsmen Lab., UBC, Vancouver)

34. Pick 細管と神経原線維変化の比較 …… 98
徳武　哲 (都精神研・分子生物)

35. 断片化アミロイド前駆体蛋白の蓄積 —イボテン酸によるラット海馬破壊部位において— … 100
中村　祐*1,2、武田雅俊*1、新川久義*1、亀谷富由樹*3、播口之朗*1、
北嶋省吾*2、西村　健*1
(*1大阪大・医・精神、*2日生病院・精神、*3都精神研)

36. イボテン酸による海馬障害部位での β-アミロイド前駆タンパク質の動態 …… 102
新川久義、中村　祐*1、武田雅俊、亀谷富由樹*2、播口之朗、西村　健
(大阪大・医・精神、*1日生病院・精神、*2都精神研)

37. ヒト、マウス及びラット脳には遊離型 D-セリンが存在する …… 104
橋本篤司*1,2、西川　徹*2、土井永史*3、金子嗣郎*4、金野柳一*5、丹羽　章*5、
安村美博*5、熊代　新*2、岡　高恵*2、高橋清久*2
(*1新技術事業団さきがけ研究21、*2国立精神神経センター、*3都立府中病院、
*4都立松沢病院、*5独協医大)

38. 哺乳動物におけるスペルミジンから2－オキソ－1－ピロリジンプロピオン酸の生成について…… 106
川瀬秀明、長谷川武史*、橋本泰道、多賀千明、原田博之、佐藤伸介、
上村　宏、能登　直、中嶋照夫
（京都府医大・精神医、*同位元素）

39. Isoquinoline類の脳内モノアミン代謝に対する影響　－ in vitro microdialysis法による検討－…… 108
丸山和佳子、高橋　勤*1、太田深雪*2、長谷川真一、高橋　昭、永津俊治*3、直井　信*4
（名古屋大・医・神経内科、*1江南女子短大、*2名古屋市大・精神科、
*3藤田保衛大・総医研、*4名古屋工業大）

40. 肥満細胞欠損ラット（Ws／Ws）における脳内ヒスタミン含量とヒスチジン脱炭酸酵素活性…… 110
前山一隆、尾上　均*、杉本是明、櫻井映子、春日井　努*、北村幸彦*、渡辺建彦
（東北大・医・第一薬理、*大阪大・医・病理）

41. 自傷行為モデルラットのドーパミン神経系と受容体．II 新生仔期6-OHDA投与ラットのドーパミンD2受容体の変動：［^{3}H］YM-09151-2を用いたレセプターオートラジオグラフィー…… 112
岡村　均、横山ちひろ*、井端泰彦
（京都府立医大・第二解剖、*精神科）

42. Thiamineおよびそのリン酸エステルのdopamine系およびserotonin系に対する影響…… 114
張　玉祥、山下拓史、中村重信、川崎　尚*
（広島大・医・第三内科、*第一生化）

43. 種々のストレスに対するヒトグリオーマ細胞中のαBクリスタリンとHSP28の応答…… 116
加藤兼房、後藤幸代、長谷川かおり、稲熊　裕
（愛知県コロニー・発障研・生化）

44. ラット低分子量ストレス蛋白質HSP27のEIA系の確立と骨格筋からの精製…… 118
後藤幸代、篠原春夫、稲熊　裕、長谷川かおり、加藤兼房
（愛知県コロニー・発障研・生化）

45. 低分子量ストレス蛋白質のラット個体レベルでの応答：　熱ショックによる中枢神経系および末梢組織での誘導…… 120
稲熊　裕、長谷川かおり、後藤幸代、加藤兼房
（愛知県コロニー・発障研・生化）

46. シトクロムP—450db 1の脳内活性…… 122
岩橋和彦、松尾義則[*1]、常岡　豊[*1]、中村和彦、臼杵豊之、
久郷敏明、早原敏之、洲脇　寛、細川　清[*2]
（香川医大・精神科、[*1]生化、[*2]付属病院）

47. 霊長類におけるチロシン水酸化酵素の多型性…… 124
一瀬　宏、大江瑞恵、藤田啓介、永津俊治
（藤田保衛大・総医研・神経化学）

48. ラット小脳の形成過程で発現調節されるタンパク質因子の解析：V－2タンパク質のcDNAクローニングと分布…… 126
松岡邦枝、田岡万悟[*]、奥山典生、篠田友孝、山国　徹[*]、宋　時栄[*]、礒辺俊明
（都立大・理・化、[*]三菱化成生命研）

49. 眼球摘出ラット視交叉上核におけるc-fos蛋白の日内変動…… 128
山岡貞夫、渡辺和人、鯉淵典之
（獨協医大・第一生理）

50. ヒト2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-phosphodiesterase遺伝子の構造と染色体局在…… 130
桃生勝己、栗原　正[*1]、高橋康夫[*2,3]、市川富夫[*2]、熊西敏郎[*2]、林　茂信[*3]、
蓑島伸生[*4]、清水信義[*4]
（秋田大・医、[*1]創価大・生命研、[*2]新潟大・脳研、
[*3]国立犀潟病院、[*4]慶応大・医）

51. 視床下部と胎盤性成長ホルモン分泌促進因子遺伝子の5'上流領域の塩基配列決定
－　RAGE法を用いて　－…… 132
溝渕睦彦、L. A. Frohman[*]
（愛媛大・医・神経精神医、[*]シンシナティ大・内分泌）

52. Nested RACE法によるラット睾丸Isoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferase cDNAの配列決定…… 134
溝渕睦彦、村尾孝児[*]、武田良平、柿本泰男
（愛媛大・医・神経精神医、[*]香川医大、第一内科）

53. ヒト脳Dipeptidyl aminopeptidase like proteinのcDNAクローニングと1アミノ酸置換による酵素活性の回復…… 136
横谷　昇[*1,2]、Robert J. Wenthold[*2]、和田圭司[*2,3]
（[*1]大阪市大・医・神経精神科、[*2]NIDCD, NIH、
[*3]国立精神神経センター・神経研・疾病研究第四部）

54. 神経切断手術後短時間以内で一過性に変動する白鼠上頚交感神経節内トランスグルタミナーゼ活性の調節因子…… 138
安藤正人、國井修一、立杢延族、柴山健三、永田　豊
(藤田保衛大・医・生理)

55. アネキシンVの神経栄養作用と神経保護作用 …… 140
武井延之、大澤圭子、中尾裕史*、今井嘉紀、高坂新一
(国立精神神経センター神経研・代謝、*興和総合科学研)

56. ラットGAP－43 cDNA－トランスジェニックカーブの作成と単離網膜神経節細胞の軸索成長…… 142
新保　清、朝倉幹雄*
(聖マリアンナ医大・第一生理・*神経精神科・難病治療研センター)

57. 培養大脳皮質ニューロン間のシナプス形成におけるガングリオシドの役割：エンドグリコセラミダーゼ処理の影響…… 144
村本和世*1,2、川原正博*1、小林和夫*1、伊東　信*3、山形達也*3、黒田洋一郎*1
(*1都神経研・神経生化、*2東京大・医・薬理、*3三菱化成生命研・複合糖質)

58. 神経細胞の突起形成にともなうドレブリン蛋白の細胞内局在とF-アクチンの変化…… 146
浅田英穂、白尾智明、戸田正博*、池田圭朗*、植村慶一
(慶応大・医・生理、*脳外科)

59. IDENTIFICATION OF RAT DREBRIN EMBRYONIC ISOFORM BY POLYMERASE CHAIN REACTION AND ITS GENOMIC ANALYSIS…… 148
Peter Kaub, Tomoaki Shirao, Akihiro Inoue*, Yasuo Takeda, Keiichi Uyemura,
(Dept. Physiol., Keio Univ. Sch. Med. *National Ins. Basic Biol.)

60. 神経細胞形質膜蛋白質HPC－1の機能解析…… 150
赤川公朗、山口和彦*1、中山　孝*2、井上明宏
(生理研・神経化学、*1生体システム、*2機能協関)

61. 初代培養前脳基底野ニューロンにおけるNGFレセプターの発現調節…… 152
小島正己、山田雅司、池内俊彦、畠中　寛
(大阪大・蛋白質研・生合成)

62. trk cDNAの神経細胞内導入による機能的NGF受容体の構築…… 154
松島　宏、衛藤義勝、前川喜平、E. Bogenmann*
(慈恵医大・小児科、*Childrens Hospital of LA)

63. NB－OK 1細胞におけるNaFの神経突起成長調節作用 …… 156
八木-中川勇三、大金信夫、斉藤康成、藤沢悦子、鬼頭直美、中村　博
(雪印・生物科学研・神経化学グループ)

64. ミクログリア産生プラスミノーゲンの作用　－ニューロン上のプラスミノーゲン結合蛋白の検出－…… 158
中嶋一行、永田晃一、濱之上　誠、竹本なぎさ、高坂新一
(国立精神神経センター神経研・代謝)

65. マウスミクログリアでのIL－2受容体発現による増殖と活性化…… 160
澤田　誠、錫村明生、丸野内棣
(藤田保衛大・総医研・応用細胞、神経内科)

66. 神経突起伸展因子受容体（NOFR）のcDNAクローニング …… 162
平　英一、高羽夏樹、谷浦秀夫、郭　哲輝、三木直正
(大阪大・医・第一薬理)

67. ヒトグリア細胞増殖抑制因子、グリオスタチンの構造解析と神経栄養因子活性…… 164
Yaman Eksioglu、浅井清文、平野淳史*、磯部一郎、中西圭子、加藤泰治
(名古屋市大・医・分子医研・生体制御、*小野薬品)

68. マウス脳の各発育段階および小脳ミュータントにおける代謝型及びnon-NMDA型グルタミン酸受容体の脳内分布…… 166
梁　淑姫、宮脇敦史、古市貞一、御子柴克彦
(東京大・医科研・化学研究部)

69. AMPA type non-NMDAグルタメイト受容体（GluR1-4）遺伝子発現の多様性…… 168
佐藤康二、木山博資*、遠山正彌*
(大阪大・医・バイオ研神経解剖、*第二解剖)

70. NMDA脳室内投与による転写制御因子のDNA結合能の変動 …… 170
荻田喜代一、米田幸雄
(摂南大・薬・薬理)

71. MMDA受容体複合体を構成するポリアミン結合部位のグアニンヌクレオチドによる調節‥ 172
山本敏文、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、*都精神研・精神薬理)

72. 小脳顆粒細胞におけるグルタミン酸レセプターを介したTRE結合活性の誘導とSNPによる抑制…… 174
津田正明（岡山大・薬・微生物）

73. NG108−15細胞におけるNMDA受容体の存在とその性質についての検討…… 176
大熊誠太郎、桂　昌司、陳　大志、栗山欣弥
（京都府立医大・薬理）

74. ラット脳内興奮性アミノ酸レセプター結合の発生学的研究…… 178
榎本理世、荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

75. ラット脳内興奮性アミノ酸レセプター結合に対するストレス負荷の影響…… 180
韓　大健、荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

76. イメージングプレートによる受容体の画像化　−^{11}C, ^{3}H標識薬剤による多重標識オートラジオグラフィー− …… 182
谷内一彦、柳　鐘薫、岩田　錬*、井戸達雄*、渡辺建彦
（東北大・医・第一薬理、*東北大サイクロトロンRIセンター）

77. in situ hybridization法を用いたウシおよびラットヒスタミンH_1レセプターmRNAの局在の検討 184
阿部能之、荻野　敏、堀尾嘉幸*1、木山博資*2、遠山正彌*2、松永　享*1、福井裕行*1
（大阪大・医・耳鼻咽喉科、*1第二薬理、*2第二解剖）

78. モルモット・ヒスタミンH_1レセプター遺伝子の単離…… 186
堀尾嘉幸、伊藤誠二*、福井裕行
（大阪大・医・第二薬理、*大阪バイオサイエンス研）

79. $GABA_B$受容体に特異的なモノクローナル抗体の作製とその性質…… 188
中安博司、水谷　宏、栗山欣弥、寺居和宏*、花井一光*、木村　宏*
（京都府立医大・薬理、*滋賀医大・分子神経）

80. 精製$GABA_A$受容体複合体に対する抗体の特異性…… 190
田口淳一、岡村　均、井端泰彦、栗山欣弥*
（京都府立医大・第二解剖、*薬理）

81. 微小管付随タンパク質（MAP）1の精製とその性質…… 192
藤井敏弘、渡辺正知、近藤慶之、新井孝夫*1
（信州大・機能高分子、*1東京理科大・応用生物）

82. オリゴデンドロサイトとシュワン細胞に局在するゲルゾリン様蛋白質…… 194
田中潤也、祖父江憲治
（大阪大・医・バイオメディカル教育研究センター・神経生化）

83. ラットアストロサイト由来グリアフィラメントとマイクロフィラメントの相互作用…… 196
伊藤仁一、増田真理、田中　亮
（名古屋市大・医・第一生化）

84. IDPN による軸索内輸送阻害とニューロフィラメント蛋白リン酸化状態の変化 …… 198
田代朋子、今井礼子、小宮義璋
（群馬大・医・分子病態）

85. ラット坐骨神経内を軸索輸送する P 物質様免疫活性の性質：新しく開発した EIA 法による測定…… 200
加藤　武、猪股裕二、武田克道
（横浜市大大学院総合理学・分子認識）

86. PC12D 細胞の神経突起誘導と細胞骨格 …… 202
岩永　操、佐野　護
（愛知県コロニー研・形態）

87. アルミニウムによる培養大脳皮質細胞の形態的・機能的変化：タウ蛋白の蓄積及びシナプス形成異常…… 204
川原正博、市川眞澄*、村本和世、小林和夫、黒田洋一郎
（都神経研・神経生化、*解剖発生）

88. 抗 PHF モノクローナル抗体 M 4，C 5 はタウの胎児型リン酸化を認識する …… 206
渡辺　淳*1,2、長谷川成人*1、瀧尾攘士*3、新井孝夫*2、鈴木政美*4、
千谷晃一*4、井原康夫*1
（*1東京大・脳研・病理、*2東京理大・応用生物、*3理化学研・生体分子解析、
*4藤田保衛大・総医研）

89. タウプロテインキナーゼ II によるニューロフィラメント蛋白のリン酸化…… 208
久永真市、石黒幸一*、内田庸子*、奥村英一、岡野孝幸、岸本健雄
（東京工大・生命理工、*三菱生命研）

90. カルシウム依存性開口放出機構へのミオシン軽鎖キナーゼの関与について…… 210
熊倉鴻之助、今泉美佳、櫻井　隆*1、中村清二*1、中西　聡*2、松田　譲*2、野々村禎昭*1
（上智大・生命研・神経化学、*1東京大・医・第一薬理、*2協和発酵・東京研）

91. ATP 刺激によるドーパミン放出過程における myosin light chain の関与 …… 212
小泉修一、井上和秀、綿野智一、藤森観之助、熊倉鴻之助*、高仲　正
（国立衛生試験所・薬理、*上智大・生命研・神経科学）

92. YM-09151-2 によるラット線条体の膜電位非依存性 Dopamine 遊離 …… 214
富山勝則、越川憲明、小林雅文
（日本大・歯・薬理）

93. MK-801は amantadine によるドパミン放出を抑制する …… 216
山下拓史、張　玉祥、丸山博文、中村重信
（広島大・医・第三内科）

94. 虚血性脳神経細胞死とエンドセリン受容体 …… 218
山下樹三裕、丹羽正美、片岡泰文、重松和人*1、姫野明彦*2、堤　圭介*3、谷山紘太郎
（長崎大・医・薬理二、*1病理二、*2精神神経科、*3脳外科）

95. 高酸素負荷による培養中枢ニューロンの死は蛋白質合成を必要とする …… 220
榎戸　靖、茜谷行雄、畠中　寛
（大阪大・蛋白質研・生合成）

96. ラット海馬神経細胞初代無血清培養系によるグルタミン酸神経細胞毒性の評価系の確立 … 222
大野和茂、山口時男
（山之内製薬・筑波研）

97. 虚血性脳浮腫および脳梗塞発症機構における一酸化窒素（NO）産生の関与 …… 224
長藤寿昭、松居　徹、浅野孝雄
（埼玉医大・総合医療センター・脳外科）

98. 砂ネズミ脳虚血における IP_3 受容体およびプロテインキナーゼ C 活性の変化について …… 226
永田栄一郎、福内靖男、田中耕太郎、美原　盤*、白井俊孝、野川　茂、野崎博之
（慶応大・神経内科、*美原記念病院）

99. 脳虚血後の PKC 活性の変化とそれに及ぼす ceruletide の影響 …… 228
勝浦五郎、新宅治幸、永業正美、松下　享
（塩野義製薬・研）

100. グルタミン酸受容体の虚血後機能変化 …… 230
三谷　章、柳瀬尚人、片岡喜由
（愛媛大・医・第一生理）

101. 非致死的脳虚血の前処置による虚血耐性獲得のメカニズム…… 232
加藤宏之、中田直樹、劉　暁宏、村瀬健史、陳　婷、劉　勇、小暮久也
（東北大・医・神経内科）

102. 虚血性グルタミン酸放出機構…… 234
三谷　章、安藤　泰、章　龍、片岡喜由
（愛媛大・医・第一生理）

103. 低脳温と虚血性アミノ酸放出反応－ in vivo brain dialysis による検討－…… 236
大星博明、井林雪郎、高野健太郎、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・第二内科、*国立肥前療養所）

104. 海馬 CA 1 野および小脳皮質における IN　VITRO 虚血性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇…… 238
柳瀬尚人、三谷　章、片岡喜由（愛媛大・医・第一生理）

105. 無グルコース処理による培養ニューロンの ATP 含量と Na ポンプ活性の変化…… 240
井上順雄、阿部田　聡*、松井英男
（杏林大・医・第一生化、*第一内科）

106. インスリン/IGF-I によるアストロサイト $(Na^{+}+K^{+})$-ATPase 活性の増加…… 242
村田陽介、松田敏夫、馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

107. トランスジェニックマウスを用いたミエリンプロテオリピド蛋白質遺伝子産物のグリア分化因子としての機能…… 244
鹿川哲史*1、池中一裕*1、栗山茂樹*1,2、岡野栄之*3、有賀　純*3、
中尾純治*1、御子柴克彦*3
（*1大阪大・蛋白研、*2奈良医大・第三内科、*3東京大・医科研）

108. PLP 遺伝子産物のオリゴデンドロサイト分化促進因子としての機能解析…… 246
中尾純治、池中一裕、鹿川哲史、Seung U. Kim*1、御子柴克彦*2
（大阪大・蛋白研、*1British Columbia 大・神経内科、*2東京大・医科研）

109. Transforming Growth Factor βによるミクログリアの機能抑制…… 248
錫村明生、澤田　誠*、丸野内棣*、山本纉子
（藤田保衛大・神経内科、*総医研・応用細胞）

110. 胚性癌細胞株 P19の in vitro 神経分化モデルにおける Pleiotrophin の発現とその意義…… 250
加藤英政、和中明生、松本和政、遠山正彌
（大阪大・医・第二解剖）

111. ヘパリン結合性神経突起伸長因子（Pleiotrophin, MK）の神経系発生過程における蛋白発現…… 252
松本和政、和中明生、加藤英政、高辻功一[*1]、村松　喬[*2]、遠山正彌
（大阪大・医・第二解剖、[*1]大阪府立看護短大、[*2]鹿児島大・医・第二生化）

112. ラット神経成長抑制因子（GIF）のcDNAクローニングと遺伝子発現の検討…… 254
小林　央、辻　省次[*1]、内田洋子[*2]、井原康夫[*3]、中嶋一行[*4]、高坂新一[*4]、宮武　正
（東京医歯大・神経内科、[*1]新潟大・脳研・神経内科、[*2]都老人研・臨床病理、
[*3]東京大・脳研・脳病理、[*4]国立精神神経センター・代謝研究）

113. ヒト神経成長抑制因子のcDNAクローン化とその発現…… 256
辻　省次、小林　央[*1]、宮武　正[*1]、内田洋子[*2]、井原康夫[*3]
（新潟大・脳研・神経内科、[*1]東京医歯大・神経内科、[*2]都老人研・臨床病理、
[*3]東京大・医・脳研・病理）

114. ラット及びヒトHCNP前駆体遺伝子の構造…… 258
東藤直樹、東條伸一郎、植木靖之、安喰英夫、小鹿幸生[*]
（住友製薬・研・遺伝子科学、[*]名古屋市大・医・第二内科）

115. HIPPOCAMPAL CHOLINERGIC NEUROSTIMULATING PEPTIDE（HCNP）の生物学的活性領域…… 260
小鹿幸生、林謙一郎、植木靖之[*]、小菅なぎさ[*]、入江恒正[*]、山本正彦
（名古屋市大・医・第二内科、[*]住友製薬・研）

116. Pygmyマウス（pg）を用いての脳発育に及ぼすインシュリン様成長因子－1の作用機構に関する研究…… 262
杉崎哲朗、山田　孝、佐藤　勇[*]、野口鉄也
（東邦大・医・第二生理、[*]総研）

117. ラット凍結損傷脳における神経栄養活性…… 264
佐藤好威、莚井　武、木村喜代史
（日本新薬・生物研）

118. アンギオテンシンII脳室投与の視床下部モノアミンニューロンに及ぼす影響　－正常血圧並びに高血圧自然発症ラットの比較－…… 266
塚島　彰、松本　孝、平野　誠、中原辰雄[*1]、堤　哲之、中村　薫、中根　博、
内村英幸、藤島正敏[*2]
（国立肥前療養所、九州大・[*1]理・化学、[*2]医・第二内科）

119. 筋ジストロフィーマウス（mdx）の咬筋及び三叉神経終末内のbFGF様免疫反応…… 268
松田正司、阪中雅広（愛媛大・医・第二解剖）

120. ドーパミン神経毒 MPP^+ による PC12細胞の細胞死の機序 …… 270
板野泰弘、北村佳久、野村靖幸
(北海道大・薬・薬効)

121. メタンフェタミン逆耐性ラットにおける [^{125}I] RTI 55の脳内分布の変化 ーオートラジオグラフィー法を用いた検討ー…… 272
沼地陽太郎、吉田寿美子、伊藤千裕、猪ノ坂孝雄、松岡洋夫、佐藤光源
(東北大・医・精神医)

122. メタンフェタミン、コカイン反復投与による^{3}H-WIN35,428のラット脳内集積の変化 …… 274
吉田寿美子、沼知陽太郎、猪ノ坂孝雄、伊藤千裕、松岡洋夫、佐藤光源
(東北大・医・精神医)

123. メタンフェタミン逆耐性形成ラットに対するフェンサイクリジンの交差逆耐性現象； 脳内アミノ酸ニューロン系の関与…… 276
米沢裕次、堤 哲之、中村 薫、本藤久雄、橋本喜次郎、松本 孝、平野 誠、
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)

124. 脱長期増強へのアデノシン受容体の関与について…… 278
藤井 聡、脇坂 晟、関野祐子*1、黒田洋一郎*1、伊藤憲一*2、宮川博義*2、加藤宏司*2
(杏林大・医・第二生化、*1都神経研・神経生化、*2山形大・医・第二生理)

125. キンドリングラット海馬における遺伝子発現の長期変化…… 280
児島伸彦、小幡邦彦 (生理研・神経化)

126. 自然発症てんかんラット (SER) の加齢に伴う脳内脂質過酸化および superoxide dismutase 様活性の変化 …… 282
伊藤武彦、片山泰人、枝松 礼、油布克巳*、森 昭胤
(岡山大・医・分子細胞医学研・神経情報、*麻酔・蘇生)

127. E 1マウス脳 mRNA の翻訳活性における poly (A) 鎖の相関 …… 284
撫井弘二、黒田陽子、中西亜紀、木岡哲郎、大西 博、山上 栄
(大阪市大・医・神経精神)

128. キンドリングモデルにおけるてんかん準備性の獲得：海馬の神経化学的及び形態学的変化 286
板野俊文、宮本 修、藤澤睦夫*1、長尾省吾*1、山本良隆*2、臼杵豊之*2、
洲脇 寛*2、岡田泰士*3、根木哲郎*4、村上哲英*3、畠瀬 修
(香川医大・生理、*1脳外科、*2精神神経科、*3生物、*4保健体育)

129. 摂食による記憶促進…… 288
大村　裕*、佐々木和男、李　愛軍、森田真次、今井秀樹、花井一光
(日本臓器製薬、*生物活性科学研)

130. アラキドン酸による脳ミトコンドリア複合体Iの阻害…… 290
森井博史*、竹内裕子、渡辺恭良
(大阪バイオサイエンス研・神経科学、*新技術事業団さきがけ研究「細胞と情報」)

131. NMDA受容体を介する神経毒性の温度による影響…… 292
高寺恒雄、毛利哲郎
(北陸大・薬・創薬研)

132. Hypoxia/reoxygenationによるAstrocyteよりのサイトカインの誘導…… 294
前田裕輔、松本昌泰、小川　智、大槻俊輔、半田伸夫、木下タロウ*、鎌田武信
(大阪大・第一内科、*微生物病研・免疫不全疾患)

133. 一過性脳虚血によるモノアミン、アミノ酸放出反応におよぼすカルシウム拮抗薬の影響… 296
中根　博、八尾博史、大星博明、井林雪郎、佐渡島省三、藤島正敏、松本　孝*、
中村　薫*、堤　哲之*、平野　誠*、内村英幸*
(九州大・医・第二内科、*国立肥前療養所)

134. グルタミン酸による脊髄培養神経細胞障害に対するステロイドホルモンの保護作用…… 298
尾形直則*1,2、中村洋一*1、辻　浩司*1,2、片岡喜由*1
(愛媛大・医・*1第一生理、*2整形外科)

135. 神経成長因子除去によるPC12細胞の細胞死・細胞変性に対する種々の脱分極剤の効果… 300
小池達郎、田中秀逸
(佐賀医大・化学)

136. 致死的および非致死的虚血後の脳内神経成長因子レベルの変化…… 302
村瀬健史*1,4、加藤宏之*1、仙波りつ子*2、加藤兼房*3、劉　暁宏*1、中田直樹*1、
劉　勇*1、陳　婷*1、小暮久也*1
(*1東北大・医・神経内科、愛知県コロニー・*2周生期、
*3生化、*4明治製菓・薬品総合研・新薬研)

137. 虚血性脳損傷の進展における脳内Na^+, K^+-ATPase活性低下の関与…… 304
長藤寿昭、小出　徹*、高頭廸明
(中外製薬・探索研、*現医薬ライセンス部)

138. 繰り返し非致死的虚血負荷時の細胞外アミノ酸量の変化について －microdialysis 法を用いた検討－ …… 306
中田直樹[*1]、加藤宏之[*1]、劉　暁宏[*1]、村瀬健史[*1,2]、劉　勇[*1]、陳　婷[*1]、小暮久也[*1]
([*1]東北大・医・神経内科、[*2]明治製菓・薬品総合研究所・新薬研)

139. ラット脳虚血負荷に伴う神経細胞障害に対する塩酸ビンコナート（OM －853）の防御作用 …… 308
飯野年昭、桂　昌司、橋本恒一、栗山欣弥
(京都府立医大・薬理)

140. 一過性脳虚血後の NMDA 受容体 mRNA 発現の変化 …… 310
杉本　晃、武田　篤、小野寺　宏、小暮久也
(東北大・医・脳疾患研・神経内科)

141. ラット脳断頭虚血によるホスホリパーゼ D 活性低下 …… 312
西田　朗、江本克也[*1]、清水雅美、魚住　徹[*1]、早川　浩[*2]、山脇成人[*2]
(国立呉病院・臨床研、広島大・[*1]脳外、[*2]神経精神科)

142. 一過性脳虚血後の海馬 CA 1 及び歯状回における GAP －4 3 発現の経時的変化 …… 314
小豆原秀貴、小野寺　宏、山崎靖人、杉本　晃、小暮久也
(東北大・神経内科)

143. 一過性脳虚血砂ネズミにおける脳内アセチルコリン系神経機構の変化に対するアセチルコリンエステラーゼ阻害薬の保護作用 …… 316
田中健一[*1]、小川紀雄[*1]、浅沼幹人[*1]、平田　洋[*1,2]、近藤洋一[*1,2]、
周　希誠[*1]、森　昭胤[*1]
(岡山大・医・[*1]分子細胞医学研・神経情報学、[*2]第三内科)

144. 低酸素性培養神経細胞傷害にたいするプロスタグランディン E_1 の保護作用とその作用機序 … 318
大槻秀夫、山田和雄、湯口貴導、種子田　護、早川　徹
(大阪大・医・脳外科)

145. 脳虚血ラットにおける血管作動性物質の脳内変動の免疫組織化学的研究 …… 320
水島秀勝、佐々木　健、嶋津基彦、田所康之、岩田隆信、松本　清、塩田清二[*1]、
中井康光[*1]、竹田　稔[*2]
(昭和大・医・脳外科、[*1]第一解剖、[*2]第一生化)

146. ラット一過性前脳虚血後の海馬 HB － GAM 発現量増大 …… 322
武田　篤、杉本　晃、小野寺　宏、小暮久也
(東北大・医・脳疾患研・神経内科)

147. 局所脳虚血・再灌流における c-Fos 発現の経時的変化…… 324
嶋津基彦、水島秀勝、佐々木健、岩田隆信、松本　清、塩田清二[*1]、
中井康光[*1]、竹田　稔[*2]
（昭和大・医・脳外科、[*1]第一解剖、[*2]第一生化）

148. 脳虚血による CA 1 遅延細胞死に先行する clathrin の変化（III）…… 326
吉見建二、松田啓一、岩田宣芳
（三共・活性物質研）

149. 低酸素・低グルコース処置による神経膜 Cl イオン依存グルタミン酸輸送の増加…… 328
小山　豊、石橋　正、馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

150. 慢性脳血流低下モデル動物における脳内モノアミン量の変動…… 330
車谷隆宏、武田雅俊、谷向　知、新川久義、服部英幸、田中稔久、楯林義孝、
大河内正康、関山敦生、西村　健
（大阪大・医・精神医）

151. 慢性低灌流負荷による虚血耐性現象の誘導…… 332
大槻俊輔、松本昌泰、田口明彦、秦　龍二、小川　智、上田周一、半田伸夫、鎌田武信
（大阪大・医・第一内科）

152. 持続的な cAMP レベル上昇はラット上頸神経節細胞の NGF 除去に伴う細胞死を阻止する　334
田中秀逸、小池達郎
（佐賀医大・化学）

153. グルココルチコイドの海馬神経細胞に与える影響　－ in vivo 及び in vitro 実験－…… 336
鬼頭昭三、三好理絵*、木村暁子、林　一治、丸山雪子
（放送大、*東京女医大・薬理）

154. ヒトアストロサイトーマ（U-87MG）細胞のサブスタンス P 結合に対する糖鎖合成阻害剤
tunicamycin の影響…… 338
仲田義啓、西尾廣昭
（広島大・医・総合薬・薬効解析）

155. 細胞外 ATP 刺激による PC12細胞の DNA 合成 …… 340
高島明彦、野口かおり、井上和秀*
（三菱化成生命研、*国立衛生試験所）

156. ヒトのドレブリンE cDNAクローニング …… 342
戸田正博[*1,2]、白尾智明[*1]、浅田英穂[*1]、蓑島伸生[*3]、清水信義[*3]、
戸谷重雄[*2]、植村慶一[*1]
(慶応大・医・[*1]生理、[*2]脳外科、[*3]分子生物)

157. 培養生後2日ラット中隔神経のChAT活性に対する脱分極の誘導効果 ー NGFの作用との差異についてー…… 344
浜田 淳、腰本裕之、砥出勝雄、岩田邦男
(日本たばこ医薬研)

158. ラミニン, VIP, S-ラミニンにおける構造類似性と神経突起伸展活性について …… 346
田代謙一郎[*1,3]、山下法文[*2]、穴井元昭[*3]、田代信維[*2]、
([*1]若久病院、九州大・[*2]医・精神神経科、[*3]九州大医療短大・生化)

159. スタウロスポリンの培養神経細胞への効果 (II) …… 348
小嶋久子、北島理恵、中村和生、玉井洋一
(北里大・医・生化)

160. マウス神経芽腫細胞における外来性スフィンゴシルホスホコリンの神経突起伸展効果…… 350
杉山英子、武富 保 (信州大・医・心脈管研・脂質生化)

161. NGFにより分化したPC12細胞の免疫細胞化学的研究 …… 352
池亀 守、坂本秀生、藤田 興、葛谷博磁
(藤田保衛大・総医研・分子生物)

162. グリア細胞膜小胞低浸透圧処理標品によるグルタミン酸輸送…… 354
中村洋一、片岡喜由 (愛媛大・医・第一生理)

163. 脳可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカンによるPC 1 2細胞の増殖および突起形成阻害：細胞環境の影響…… 356
仙波りつ子、大平敦彦 (愛知県コロニー研・周生期)

164. NG108−15細胞へのGAP −43の移入は神経突起形成とアセチルコリン放出を促進する… 358
熊谷千尋、東田道久、野村靖幸
(北海道大・薬・薬効)

165. 感覚領野損傷後の視床逆行性変性に対する外因性線維芽細胞成長因子 (FGF) の作用機序 360
湯口貴導、山田和雄、甲村英二、大槻秀夫、坂口健夫、早川 徹
(大阪大・医・脳外科)

166. bFGFによるヒト神経芽細胞腫CHP100細胞における低親和性NGFレセプターの発現調節 362
泰地睦夫、Kazuo Taiji*、Karen L. Deyerle*、Mark Bothwell*
(住友製薬・研、*ワシントン大・医)

167. 動物細胞で産生させた組換え型ヒトNT－3の性状 364
岩根　理、渡辺辰也、新谷麻江、改正善彦、松本純枝、佐々田玲子、五十嵐貢一
(武田薬品・生物研)

168. アミノアルキルエステル誘導体によるマウスアストログリア細胞のNGF合成誘導 366
石川リカ、秋元功司、榊原和征、宮本昌志、錦織浩治、*古川昭栄
(キリンビール医薬開発研、*岐阜薬大・分子生物)

169. ヒトグリア細胞増殖抑制因子、グリオスタチンの精製とモノクローナル抗体の作製 368
平野敬善、浅井清文、金子修至*、磯部一郎、中西圭子、Yaman Eksioglu、加藤泰治
(名古屋市大・医・分子医研・生体制御、*小野薬品)

170. 神経成長因子によるPC12h細胞の突起誘導過程に対する細胞外K252aの阻害効果 370
千葉賢三、塚田泰且、山崎眞津美、毛利哲郎
(北陸大・薬・創薬研)

171. リン脂質による神経成長因子（NGF）の産生誘導 372
清水博喜、松永　学、上野正孝、加藤弘之、荒川義弘、山西嘉晴
(エーザイ・筑波研)

172. ラット培養神経細胞を用いたNMDA誘発神経細胞死に対するbFGFの救援効果 374
加藤　晃、永業正美
(塩野義製薬・研)

173. 培養ラット中枢ニューロンに及ぼすインターロイキン－2の生存維持作用 376
古川美子、粟辻啓文、中島光業*、古川昭栄、林　恭三
(岐阜薬大・分子生物、*森永乳業・生科研)

174. 海馬部位特異的なNGF mRNA，NGFレベルのカイニン酸応答性 378
橋本吉秀、尾前二三雄*1、古川昭栄*2、林　恭三*2
(三井製薬生科研、*1三井東圧LS研、*2岐阜薬大・分子生物)

175. ヒトリンパ球におけるm3ムスカリン性受容体刺激のIL-2産生増強 380
北村佳久、矢田　武、野村靖幸
(北海道大・薬・薬効)

176. 神経線維腫（NF 1）由来のヌクレオシド、ジヌクレオチドによる神経芽腫細胞の増殖促進…… 382
堀田妙子、浅井清文、中西圭子、磯部一郎、Yaman Eksioglu、武田直仁*、加藤泰治
（名古屋市大・医・分子医研・生体制御、*名城大・薬・薬剤）

177. 興奮性アミノ酸神経毒性を抑制する筋由来因子の作用機構の解析…… 384
山本智浩、田口隆久
（大阪大・基礎工学・生物工学）

178. 活性化アストロサイトの中隔野コリン作動性ニューロンに対する作用について…… 386
左合正周、吉田一成、若本寛起、大谷光弘、戸谷重雄
（慶応大・医・脳外科）

179. 神経成長因子（NGF）遺伝子発現調節の分子機構…… 388
尾前二三雄、勝俣東子、古川美子*、古川昭栄*
（三井東圧化学ライフサイエンス研、*岐阜薬大・分子生物）

180. てんかん性Ｅ１マウス脳のキノリン酸合成酵素の性質 …… 390
浅井広志、鬼頭純三*1、高橋史郎*2、溝渕　稔*2、黒田智子*2、中野紀和男
（名古屋大・農・生化学制御、*1医・実験動物センター、*2塩野義製薬・研）

181. Elマウスの痙攣による脳内β-エンドルフィンの経時的変化 …… 392
片山雅文、大西　博、甲斐利弘、山上　栄
（大阪市大・医・神経精神）

182. 自然発症てんかんラットのてんかん様発作発現と脳内アミノ酸およびモノアミン遊離の週齢変化…… 394
神田知之、黒川昌子、中村譲治、石井昭男、笹　征史*
（協和発酵・医薬研、*広島大・医・薬理）

183. Ｅ１マウスに於けるアロプリノールの抗けいれん作用と部位特異的SOD酵素活性誘導… 396
村島善也、多田博史*1、笠茂公弘*2、篠崎たき子、中本百合江、諸岡啓一*3、鈴木二郎*4
（都精神研、*1国立療養所千石荘病院、*2日本大・医・精神神経、*3東邦大・医・第一小児、*4精神神経）

184. 発育期におけるＥ１マウス脳のオピオイドκレセプターの変化 …… 398
甲斐利弘、大西　博、片山雅文、小出誠司、山上　栄
（大阪市大・医・神経精神）

185. 扁桃核キンドリングラット脳における kainate 受容体 mRNA の増加：in situ hybridization study …… 400
引地　充、富田博秋、小野光弘、藤原　豊、秋山一文
（岡山大・神経精神）

186. 脳内アセチルコリン系神経機構のラット系統差に関する生化学的検討…… 402
近藤洋一[*1,2]、小川紀雄[*1]、平田　洋[*1,2]、浅沼幹人[*1]、田中健一[*1]、森　昭胤[*1]
（岡山大・医・分子細胞医学研・[*1]神経情報学、[*2]第三内科）

187. ff-lesion ラットにおける HCNP の空間学習記憶障害改善作用…… 404
岸野晶祥、泰地睦夫、小鹿幸生[*]、入江恒正
（住友製薬・研、[*]名古屋市大・医・第二内科）

188. 学習記憶およびコリン作動性神経に対する中隔への抗 NGF 抗体持続注入の影響…… 406
新田淳美、古川美子[*]、林　恭三[*]、鍋島俊隆
（名古屋大・医・医療薬学・薬剤部、[*]岐阜薬科大・分子生物）

189. 前脳基底部破壊ラットの学習能に対する加齢の影響．行動学的、神経化学的および組織学的解析…… 408
中村静雄、大野知親
（サントリー生物医研・薬効薬理）

190. オペラント学習における海馬破壊の影響　－カイニン酸とコルヒチンの相違－…… 410
松本　明、九穂泰三、石川紘一
（日本大・医・薬理）

191. 弁別学習の遂行に伴うラット扁桃核モノアミン含量の上昇　－ in vivo dialysis 法による検討－…… 412
堀　耕治、田中淳一、野村正彦、入野誠郎[*]、久保浩一[*]、濱口勝彦[*]
（埼玉医大・第一生理、[*]神経内科）

192. 弁別学習遂行時のラット扁桃核モノアミン量の推移：老化に伴う変化…… 414
田中淳一、堀　耕治、野村正彦
（埼玉医大・第一生理）

193. ペプチドを用いたミエリン PO 蛋白細胞接着活性部位の検討…… 416
矢崎貴仁、三浦正幸、阿相皓晃、古武よし子、北村邦男[*]、植村慶一
（慶応大・医・生理、[*]埼玉医大・第一生理）

194. 胎生期に発現するミエリン塩基性蛋白質の新しいアイソフォームの発見…… 418
仲嶋一範[*1,2]、池中一裕[*1]、鹿川哲史[*1]、有賀　純[*2]、中尾純治[*1]、中平健祐[*1]、
塩田千代[*1]、Seung U. Kim[*3]、御子柴克彦[*2]
([*1]大阪大・蛋白研、[*2]東京大・医科研、[*3]British Columbia 大・神経内科)

195. ヒト末梢神経ミエリンの糖脂質抗原の解析…… 420
後藤希代子、森田御園、窪田和興、太田雪子、江嵜英美、阿部敏明、長嶋和郎*
(帝京大・医・小児科、*北海道大・医・病理)

196. 末梢神経 PO 蛋白質糖鎖の 2 アミノピリジル化誘導体の構造解析…… 422
北村邦男、田中早苗、坂本　安、渋谷匡子、吉村和法、野村正彦、植村慶一*
(埼玉医大・第一生理、*慶応大・医・生理)

197. ミエリン形成前のヒト胎児脳に特徴的な糖脂質…… 424
岩森正男[*1]、平山桂子[*1,4]、百枝加奈子[*1,4]、脇谷健司[*2]、中村　治[*3]、
花岡一雄[*4]、高倉公朋[*5]
([*1]東京大・医・生化、[*2]東京警察病院・脳外科、[*3]都立駒込病院・脳外科、
東京大・医・[*4]麻酔科、[*5]脳外科)

198. IgM λ型 M 蛋白血症を伴う慢性多発ニューロパチーにおける PO 蛋白糖鎖に対する反応性の検討…… 426
細川　武、北村邦男*、野村恭一、金子　厚、野村正彦*、濱口勝彦
(埼玉医大・神経内科、*第一生理)

199. 視床下部室傍核における c-erbA α2 mRNA 量の甲状腺機能低下に伴う変化…… 428
鯉淵典之、山岡貞夫 (獨協医大・第一生理)

200. ラット脳における最初期遺伝子 mRNA 発現に及ぼすエストロジェンの影響と老化による変化…… 430
三好理絵、鬼頭昭三*、村木　篁、藤井恵美子
(東京女医大・薬理、*放送大)

201. Mapping Pattern of Immediate Early Genes Expression during Ethanol Withdrawal in Rat Brain. …… 432
Izuru Matsumoto, Fei LE, Brian C. Shanley and Peter A. Wilce.
(Dept. Biochem., Univ. Queensland, Australia)

202. ハロペリドールとスルピリド投与によるマウス脳における c-fos mRNA の発現の比較 …… 434
勝元栄一、尾崎宣洋、山上　栄、撫井弘二、大西　博
(大阪市大・医・神経精神)

203. 転写制御因子 AP-1 の DNA 結合能 …… 436
荻田喜代一、米田幸雄（摂南大・薬・薬理）

204. 骨格筋でのグルコース利用を促進する視床下部の作用機構…… 438
岡野吉晴*、箕越靖彦、阿部啓之、嶋津　孝
（愛媛大・医・生化第一、*麻酔科）

205. フェレットにおける制癌剤誘起性嘔吐と延髄最後野のセロトニン濃度…… 440
遠藤　泰、南　勝、浜上尚也
（東日本学園大・薬・薬理）

206. 時間制限給餌後に閉所条件を加えた時のラット摂餌行動と脳セロトニン代謝…… 442
奥野正景、切池信夫、井上幸紀、伊藤英樹、藤嵜泰利、山上　栄
（大阪市大・医・神経精神医）

207. 脳局所グルコース利用率に対するシアン化ナトリウムの線条体投与の影響…… 444
上條由美、*木内祐二、安原　一、*小口勝司
（昭和大・医・*第一薬理、第二薬理）

208. 培養ミクログリアのスーパーオキシド産生能…… 446
田中　真、外松明美、平井俊策
（群馬大・医・神経内科）

209. アルツハイマー病・病態モデル　－　海馬におけるプロテインキナーゼC（β）の細胞内局在に与えるレセルピン投与の効果について　－…… 448
小町裕志、柳澤勝彦、白崎康文*、宮武　正
（東京医歯大・神経内科、*第一製薬・中央研）

210. ダウン症脳におけるアミロイドβ／A4前駆体タンパクとそれに由来する成分の解析 … 450
亀谷富由樹、田中喜久子、石井　毅*
（都精神研・分子生物、*超微形態）

211. cDNA の人工改変によるアルツハイマーアミロイド前駆体タンパクのプロセシングの検討 452
宇佐美美穂子、山尾-針ヶ谷和花子、丸山　敬
（都精神研・分子生物）

212. アルツハイマー病・病態モデル．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反応性の検討（第2報）…… 454
姉崎利治、高橋　均*1、生田房弘*1、宮武　正*2、辻　省次、柳澤勝彦*2
（新潟大・脳研・神経内科、*1実験神経病理、*2東京医歯大・神経内科）

213. アルツハイマー病海馬及び海馬障害ラットにおけるカルシニューリン免疫活性…… 456
小野寺宏、山崎靖人、小暮久也
(東北大・神経内科)

214. β－アミロイド蛋白 (22-35) による神経細胞毒性…… 458
高寺恒雄、毛利哲郎 (北陸大・薬・創薬研)

215. アルツハイマー病患者の大脳皮質におけるαBクリスタリンと低分子量熱ショック蛋白質 HSP 2 8 …… 460
篠原春夫、稲熊　裕[*1]、後藤幸代[*1]、稲垣俊明[*2]、加藤兼房[*1]
(三重大・医・解剖、[*1]愛知県コロニー研・生化、[*2]名古屋市厚生院・内科)

216. Methamphetamine 大量投与による dopamine および serotonin 神経毒性に対する NMDA 受容体拮抗薬の抑制作用…… 462
大森哲朗、小山　司、村木　彰[*]、山下　格
(北海道大・医・精神医、[*]小樽市立第二病院)

217. シナプトタグミン及びωコノトキシン受容体と複合体を形成する35kDa タンパク質の分子構造…… 464
吉田　明、笠井陽子、近藤俊三、伊藤朋子、高橋正身
(三菱化成生命研)

218. NB－OK 1 細胞におけるムスカリン性レセプターを介した細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度調節機構の解析…… 466
斉藤康成、大金信夫、藤沢悦子、鬼頭直美、中村　博、八木-中川勇三
(雪印乳業・生物科学研・神経化学グループ)

219. ヒト白血病 Jurkat 細胞におけるβ－アドレナリン受容体の Ca^{2+} 動員の調節機構 …… 468
竹村晴夫、八田愼一、山田恵子[*]、大鹿英世
(札幌医大・薬理、[*]生化第二)

220. ラット脳特異カルシウム結合蛋白質 P23K の cDNA クローニング：中枢神経系に存在する新しい EF-hand 蛋白質ファミリーの同定 …… 470
小林正明、高松　研、斉藤茂治、野口鉄也
(東邦大・医・第二生理)

221. コリンアセチルトランスフェラーゼ cDNA を導入した NG108-15細胞でのアセチールコリンの合成と分泌…… 472
木村康宏、小田恵夫[*1]、出口武夫[*2]、東田陽博
(金沢大・医・神経物性、[*1]病理、[*2]BML 基礎研究 3 部)

222. アセチルコリン放出のリン脂質による修飾…… 474
田中康一、宗田靖二*、安藤　進
(都老人研・生体膜、*日本商事医薬研)

223. ラット線条体ドパミンオートレセプターを介するドパミン放出調節機構に及ぼす K^+ チャンネルの役割…… 476
田中隆彦、吉田真美、横尾秀康、溝口克弘、田中正敏、*H. C. Fibiger
(久留米大・医・薬理、*British Columbia 大・精神)

224. ラット海馬におけるオピオイド受容体を介したセロトニン遊離調節機構…… 478
松本真知子、吉岡充弘、富樫広子、齋藤秀哉
(北海道大・医・薬理第一)

225. FDRV 法による単一神経細胞 PC12からの ATP 刺激誘発ドーパミン放出の測定…… 480
井上和秀、Michael R. Duchen*
(国立衛生試験所・薬理、*Dept. Physiol., Univ. College London)

226. ラット海馬セロトニン遊離に及ぼす α_2受容体作動薬 UK14,304の影響 —— in vivo microdialysis 法による検討 …… 482
沼澤理絵*、吉岡充弘、松本真知子、富樫広子、劔物　修*、齋藤秀哉
(北海道大・医・薬理第一、*麻酔)

227. 匂い受容体の嗅上皮上での分布…… 484
腰本裕之、加藤一夫、吉原良浩、森　憲作
(大阪バイオサイエンス研・神経科学)

228. 各種麻酔薬の鎮痛効果と中枢神経系 α_2受容体変動について…… 486
重冨美智男、石川敏三、田和聖子、仲西　修、坂部武史
(山口大・医・麻酔・蘇生)

229. NMDA レセプター複合体上のグリシンドメインの多様性 …… 488
鈴木竹雄、荻田喜代一、米田幸雄
(摂南大・薬・薬理)

230. グルタチオンの内因性 NMDA レセプターアゴニストとしての可能性…… 490
榎本理世、荻田喜代一、米田幸雄
(摂南大・薬・薬理)

231. [^{3}H] MK −801結合に対するCaの調節メカニズム…… 492
韓　大健、荻田喜代一、米田幸雄
(摂南大・薬・薬理)

232. Dopamine Receptors in the Ventrolateral Striatum and Feeding Behavior…… 494
Koki Inoue[*1,2]、Nobuo Kiriike[*1]、Masakage Okuno[*1]、Hideki Ito[*1]、
Yasutoshi Fujisaki[*1]、Sakae Yamagami[*1]
([*1]Dept. Neuropsychiatry, Osaka City Univ., Med. Sch.、[*2]Kande Hospital)

233. ヒト5 − HT_{1B}および5 − HT_{1D}受容体遺伝子のクローニングとその発現…… 496
望月大介、辻田隆一、山田慎二、嵯峨井　均
(旭化成・合成医薬研)

234. 視床下部バゾプレッシンニューロン神経核（視索上核）におけるムスカリン様レセプター
M_3サブタイプの機能…… 498
森眞由美、神谷稔夫、津島宏美、松田友宏
(名古屋市大・医・薬理)

235. 脳内グルココルチコイドレセプターへの [^{3}H] TA結合…… 500
米田幸雄、荻田喜代一
(摂南大・薬・薬理)

236. メタンフェタミンのセロトニン系へのneurotoxicな作用に対する非競合的NMDA受容体
アンタゴニストの効果…… 502
楯林義寛、黒木俊秀、衛藤和子、松本　孝*、堤　哲之*、中村　薫*、
平野　誠*、内村英幸*
(九州大・医・神経精神科、*国立肥前療養所・臨床研)

237. アルコール依存症ヒト死後脳におけるGTP結合蛋白質の変化…… 504
片村能也、小澤寛樹、橋本恵理、八田愼一[*1]、高畑直彦、P. Riederer[*2]、齋藤利和
(札幌医大・神経精神医、[*1]薬理、[*2]Dept. Psychiatry, Wurzburg Univ.)

238. G蛋白質との連関を介した細胞骨格成分蛋白質Tubulinによる情報伝達系の調節…… 506
八田愼一、小沢寛樹*、芹沢　健*、齋藤利和*、大鹿英世
(札幌医大・薬理、*神経精神医)

239. ヒト死後脳における加齢に伴うGTP結合蛋白質の変化…… 508
橋本恵理、小澤寛樹、片村能也、齋藤利和、八田慎一[*1]、P. Riederer[*2]、高畑直彦
(札幌医大・神経精神医、[*1]薬理、[*2]Wurzburg大・精神医)

240. G蛋白質γサブユニットの多様性とその生理活性…… 510
森下理香、加藤兼房、浅野富子
(愛知県コロニー研・生化)

241. ウシ副腎クロマフィン細胞における百日咳毒素による分泌促進作用…… 512
大島岳夫、二宮光義、郷　保正
(塩野義製薬・研)

242. 笑気鎮痛の耐性発現と細胞内情報伝達系変化…… 514
田和聖子、石川敏三、重冨美智男、仲西　修、坂部武史
(山口大・医・麻酔・蘇生)

243. C 6グリオーマ細胞におけるホルボールエステルのタウリン流出促進作用…… 516
中村博彦、黄　縄好*、高倉公明*
(都立駒込病院・脳外科、*東京大)

244. 神経特異的リン酸化タンパク質 (PNP 14) の情報伝達複合体…… 518
中条茂男、塚田和彦、中谷一泰
(昭和大・薬・生物化学)

245. 線条体内 c-fos mRNA 発現に対するアセチルコリン系作用薬の影響…… 520
周　希誠[*1]、小川紀雄[*1]、浅沼幹人[*1]、平田　洋[*1,2]、森　昭胤[*1]
(岡山大・医・[*1]分子細胞医学研・神経情報学、[*2]第三内科)

246. ムスカリン受容体刺激による zif268遺伝子発現について：PC12d における PKC 依存性経路…… 522
海老原達彦、伊藤和光、David W. Saffen
(東京大・医・脳研・生化)

247. 5 HT_2 受容体アゴニスト刺激による 5 HT_2 受容体結合数、イノシトールリン脂質代謝と mRNA の変化 …… 524
穐吉條太郎、D. -M. Chuang*
(大分医大・精神神経科、*Mol. Neurobiol., Biol. Psychiat. NIMH)

248. cAMP 依存性プロテインキナーゼの糖脂質による活性化反応…… 526
荒金　太[*1,2]、福永浩司[*1]、阿部幸子[*3]、荒木恵子[*3]、佐武　明[*3]、宮崎康二[*2]、岡村　均[*2]、宮本英七[*1]
(熊本大・医・[*1]第一薬理、[*2]産婦人科、[*3]新潟大・脳研)

249. イノシトール燐脂質代謝における Ethopropazine および三環系薬物の効果 …… 528
大金信夫、斉藤康成、藤沢悦子、鬼頭直美、中村　博、八木一中川勇三
(雪印・生物科学研・神経化学グループ)

250. 塩酸ビンコナート (OM −853) のラット脳内イノシトールリン脂質代謝系に及ぼす影響 … 530
桂　昌司、飯野年昭、栗山欣弥
(京都府立医大・薬理)

251. 新規 M_1アゴニスト YM796の神経化学的性質 …… 532
日高和幸、秋保　啓、中村ゆき江、山口時男
(山之内製薬・中央研)

252. 神経伝達物質およびシアル酸化合物刺激依存性の白鼠交感神経節内トランスグルタミナーゼ活性発現の細胞局在性 …… 534
安藤正人、國井修一、立杢延族、永田　豊
(藤田保衛大・医・生理)

253. ラット脳におけるプロサポシンの分布 …… 536
近藤啓次、佐野　輝、柿本泰男、松田正司*、阪中雅広*
(愛媛大・医・神経精神医、*第二解剖)

254. desipramine 連続投与によるマウス脳内 tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase 免疫反応性の減少　−半定量的免疫組織化学的検討− …… 538
國見由佳理、山岡功一、小森　薫、内藤　宏、山岡久也、伊藤哲彦、笠原　嘉、永津郁子*
(藤田保衛大・医・精神医、*第二解剖)

255. An Immunohistochemical Study of Copper-Zinc Superoxide Dismutase in Rat Hippocampus after Transient Cerebral Ischemia …… 540
Xiao-Hong Liu, Hiroyuki Kato, Naoki Nakata, Kenshi Murase, Yong Liu,Ting Chen, Kyuya Kogure
(Dept. Neurol., Institute of Brain Diseases, Tohoku Univ., Sch. Med.)

256. 一側の後脊髄動脈枝焼灼手術後の脊髄内遊離アミノ酸含量とトランスグルタミナーゼ活性の変動 …… 542
藤田公和、安藤正人、安達一真*、永田　豊
(藤田保衛大・医・生理、*脳神経外科)

257. オクラトキシン A 投与によるマウス胎仔脳の脂質過酸化の亢進とストレス蛋白様ポリペプチドの誘導 …… 544
田丸政男、平田ゆかり*1、松谷天星丸*2、永田　豊*3
(鈴鹿医療科学技術大・医用情報、藤田保衛大・医・*1法医、*3生理、*2川村学園大)

258. スナネズミ前頭皮質における monoamine oxidase の酵素化学的特性 …… 546
森岡大地、上田結子、泉　順吉、稲垣昌博、橋本みゆき、木内祐二、小口勝司
（昭和大・医・第一薬理）

259. Isoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferase の組織分布と成長、加齢に伴う変化…… 548
溝渕睦彦、村尾孝児*、武田良平、柿本泰男
（愛媛大・医・神経精神医、*香川医大・第一内科）

260. ラット脳の膜リン酸化タンパク質72kDa …… 550
中岡隆志、浜本敏郎、辻　崇一
（理研・国際フロンテイア・糖遺伝情報）

261. 脳血管攣縮における髄液 PAF 濃度、PAF-acetylhydrolase の意義 …… 552
平島　豊、遠藤俊郎、加藤僚子、大森友明、高久　晃
（富山医薬大・医・脳外科）

262. トリプトファン水酸化酵素の急激な失活の機構について…… 554
長谷川宏幸、大黒一哉、市山　新*
（西東京科大・バイオサイエンス、*浜松医大・生化第一）

263. 新しいグリア性プロテオグリカン，１Ｇ２－PG　－大脳の発達に伴う発現部位の変化－ 556
大平敦彦、松井ふみ子、前田信明*
（愛知県コロニー・発障研・周生期、*基礎生物学研・感覚情報処理）

264. in vitro におけるグリアフィラメント様構造の再構成と特性 …… 558
伊藤仁一、増田真理、田中　亮
（名古屋市大・医・第一生化）

265. アストロサイト由来マイクロフィラメントの in vitro 再構成におけるα－シアロシルコレステロールの影響…… 560
増田真理、伊藤仁一、田中　亮
（名古屋市大・医・第一生化）

266. 抗キネシン抗体による運動ニューロン疾患脊髄の検討…… 562
豊島　至、小松眞史、正　宗研、D. C. Anthony*1、C. H. Martenson*1、M. P. Sheetz*2
（秋田大・医・第一内科、Duke 大・医・*1病理、*2細胞生物）

267. 非神経細胞に誘導発現されたドレブリン蛋白による突起形成及び細胞骨格の変化…… 564
池田圭朗*、白尾智明、浅田英穂、Peter Kaub、戸谷重雄*、植村慶一
（慶応大・医・生理、*脳外科）

268. Methamphetamine・Phencyclidine 急性投与のラット脳皮質 CCK mRNA レベルに及ぼす効果…… 566
吉川武男、国嶋千代子[*1]、山田和男[*2]、渋谷治男[*2]、融　道男[*2]
(生理研・神経化学、[*1]東邦大・理、[*2]東京医歯大・精神)

269. 神経興奮性ペプチド achatin-I の作用…… 568
竹内　宏、金　嘉慧、劉　国君、ディビナ・サントス、荒木陽子、安田好美[*]、南方宏之[*]、野本享資[*]
(岐阜大・医・第一生理、[*](財) サントリー生有研)

270. 下垂体前葉細胞からの LHRH 刺激性 LH 放出機構の加齢変化…… 570
宮本　篤、木村永一、大鹿英世
(札幌医大・薬理)

271. カエル下垂体後葉における神経ペプチドの共存…… 572
竹田二美代、竹田稔、塩田清二[*]、中井康光[*]
(昭和大・医・第一生化、[*]第一解剖)

272. 軟体動物ペプチドの Achatina 神経細胞に対する作用…… 574
劉　国君、ディビナ・サントス、荒木陽子、竹内　宏
(岐阜大・医・第一生理)

273. [1 $^{-13}$C] D-glucose 投与による脳内アミノ酸代謝の機能的意義の検討…… 576
金松知幸、高原ひろみ、平野修助、塚田裕三
(創価大・生命科学研)

274. ヒトスフィンゴミエリナーゼ及びニーマンピック病の分子生物学的検討…… 578
井田博幸、衛藤義勝 (東京慈恵会医大・小児科)

275. パーキンソン病患者脳内における N-メチルドーパミンの検出…… 580
梶田光春、丹羽利充[*1]、武田直仁[*2]、吉住秀夫[*2]、立松　晃[*2]、永津俊治[*3]
(名古屋大・小児科、[*1]分院内科、[*2]名城大・薬、[*3]藤田保衛大)

276. 鉛ニューロパチーの脊髄におけるエネルギー代謝特性…… 582
加藤尚彦、赤林　朗、横山和仁[*]、荒記俊一[*]
(横浜市大・医・第一生化、[*]東京大・医・公衆衛生)

277. 慢性分裂病死後脳におけるストリキニン非感受性グリシン結合部位に関する研究 (第二報) 584
石丸昌彦、車地暁生[*]、融　道男[*]
(東京医歯大・難治疾患研・プロジェクト研究室、[*]医・神経精神医)

278. ストレス適応と脳内セロトニン動態の関連…… 586
武田弘志[*1]、増田幹生[*1]、松宮輝彦[*1,2]、渋谷　健[*1]
([*1]東京医大・薬理、[*2]東海大・医・薬理)

279. Methamphetamine 逆耐性ラット側坐核からの dopamine 遊離に及ぼす dynorphin の影響 …… 588
横尾秀康、山田茂人[*]、吉田真美、田中隆彦、溝口克弘、江本浩幸、古賀千尋、
石井秀夫、田中正敏
(久留米大・医・薬理、[*]脳研)

280. アンフェタミン惹起初代培養神経細胞 [^{3}H] TCP INTACT CELL BINDING の増強…… 590
山本秀子、山本敏文[*]、鷺　直樹、楊　献紅、諸治隆嗣
(都精神研・精神薬理、[*]横浜市大・総合理・分子認識)

281. ハロペリドールによるラット線条体スライスからの電気刺激誘発 dopamine 遊離増強作用の継時変化…… 592
山田茂人、横尾秀康[*]、西山浩二、西　彰五郎
(久留米大・医・脳研、[*]薬理)

282. 抗うつ薬の作用機序に関わるヒトβ1アドレナリン受容体遺伝子の分子クローニングおよびその構造解析…… 594
足立　淳、松井宏晃、伊野美幸、長谷川　浩、朝倉幹雄、長谷川和夫
(聖マリアンナ医大・神経精神科)

283. [^{3}H] prazosin 結合部位の結合特性　－電気けいれんショックおよびイミプラミンの反復処置の効果－…… 596
早川　浩、清水雅美[*]、西田　朗[*]、本橋伸高、山脇成人
(広島大・精神科、[*]国立呉病院・臨床研)

284. 高血圧自然発症ラットおよびヒト尿中の内因性 MAO 活性阻害物質、イサチンについて …… 598
浜上尚也、遠藤　泰、南　勝
(東日本学園大・薬・薬理)

285. 近交系4元雑種からの攻撃性モデルマウスの作成と神経伝達物質代謝の変化…… 600
盛政忠臣、金行孝雄、河本泰生[*]、庄盛敏廉
(岡山大・医・神経内科、[*]農)

1 カルモジュリンキナーゼIIのシナプス後肥厚部－細胞骨格系へのトランスロケーション

鈴木龍雄，野路久仁子，田中亮
名市大医・第1生化学

〔要約〕
ラット前脳をとりだしてから一定時間（0分，5分，30分，60分，300分）氷上に置き、シナプス後肥厚部(postsynaptic density, PSD)を調製した。断頭直後に調製したPSD画分中のCaM Kinase II αサブユニット(mPSDp, major PSD protein)の含量は、わずか2.7%であったのに対し、5分，30分，60分，300分後に調製をスタートしたPSD画分中ではそれぞれ7.8，8.6，9.4，11.0%であった。PSD画分中へのtubulin含量の増大は60分のPSD画分で僅かに観察されたが、300分の画分でより顕著に観察された。PSD画分中のCaM Kinase IIの活性をSyntide-2を基質として測定すると、α-subunitタンパク質(mPSDp)含有量の変化とほぼ平行して増加した。一方、同じ画分を用いてCキナーゼ活性を測定したところ、顕著な変動は観察されなかった。0分と60分のPSD画分中のCa^{2+}/CaM依存性キナーゼ基質の種類に差はみられなかったが、CaM Kinase II αサブユニットの自己リン酸化量に対する内在性基質タンパク質のリン酸化量の比は0分のPSD画分で高かった。CaM Kinase II αサブユニット含量の増加は膜画分でもみられ、同時に可溶性画分での減少が観察された。以上の結果は、正常な脳活動が停止後、僅か数分間の間にシナプス後部細胞質からCaM Kinase IIがPSD画分へトランスロケートすることを示唆している。

〔はじめに〕
mPSDp (major Postsynaptic Density protein)は、単離されたpostsynaptic density (PSD)に豊富に存在するタンパク質で、Siekevitzらの方法によるPSDでは画分中の全タンパク質の10-20% (3)、Cotmanらの方法によるPSDでは約50%を占め(1, 4)、細胞骨格タンパク質としての機能が示唆されている。一方、1983年、84年に、このタンパク質がCaM Kinase IIのαサブユニットであることが3つのグループによって明らかにされた(6-8)。PSD結合型CaM Kinase IIは、soluble CaM Kinase IIと同様な性質を示すが比活性は低い(9)。大脳と小脳中のα，βサブユニット比も、soluble CaM Kinase IIとPSD結合型CaM Kinase IIで同じである。PSD結合型も、自己リン酸化されてCa^{2+}非依存性活性を生ずる(9, 10)。本報告では、正常な脳活動が中断されたのち、僅か数分の間に起こるCaM Kinase IIの変化について報告する。

〔方法〕
PSD画分の調製： Wistar rat(6週齢)を断頭後、直ちに前脳をとり出し、氷上に一定時間(0, 5, 30, 60, 300分)静置したのち液体窒素にて急速冷凍し、-80℃に保存した。前脳を解凍後、Wuらの方法(11)に従って2種の前脳(0分の前脳と他の前脳)から同時にPSD画分を調製した。
キナーゼ活性の測定： 5 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EGTA, 5 μM[γ-^{32}P]ATPを含む50 mM HEPES buffer (pH7.4)中で、Ca^{2+}-Calmodulin, Ca^{2+}-phosphatidyl-L-serine存在下、非依存下で、MBP_{4-14}, syntide-2ないし、内在性タンパク質を基質としてリン酸化反応を行った。
その他：SDS-PAGE後のタンパク含量は、染色されたゲルから溶出したクマシーブリリアントブルーの吸光測光によった(5)。

〔結果〕
CaM Kinase II αサブユニットはanti-CaM Kinase II抗体を用いたWestern blot法で同定した。断頭後、一定時間0℃に放置した前脳から調製したPSD画分中のCaM Kinase II αサブユニットタンパク質(mPSDp)の含量(クマシー染色法)を図1にプロットした。0, 5, 30, 60, 300分後の標品中の含量は、それぞれ2.7, 7.8, 8.6, 9.4, 11%であった。0分値に対して、5分，30分，60分，300分値はそれぞれ2.9, 3.2, 3.5, 4.1倍になっていた。syntide-2を用いたCa^{2+}/CaM依存性活性は0分値に対して、2.5, 3.7,

3.7, 4.0倍になっていた(図2)。それぞれのPSD画分で、Ca^{2+}非依存性活性の割合は6.2, 3.5, 2.4, 3.4, 3.0%であった。PSD中のCキナーゼ活性にはそれぞれの標品で大きな変動はみられなかった。PSD画分のtubulin の蓄積(2)は60分標品で観察されはじめ、300分後には著明に増大していた。Western blot 法では、膜画分(60分標品)中のαサブユニット含量の増大、および可溶性画分での減少が観察された。

[結論と考察]

断頭後の時間経過に伴い、PSD画分の成分としてのCaM Kinase II αサブユニット(mPSDp)含量が急速に増大し、CaM Kinase活性の増大とほぼ一致した。これと同時に、可溶性画分ではこのタンパク質の減少が観察された。このことは、断頭による正常脳活動の停止後、僅か数分間でシナプス後部細胞質のCaM Kinase IIがPSD－細胞骨格系へトランスロケートすることを示唆している。同様の変化が脳虚血や脳のスライス作製時にも起きている可能性が考えられた。

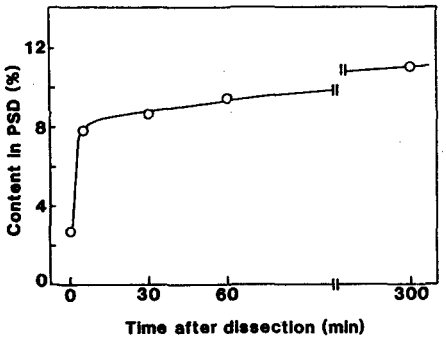


図1　断頭後、一定時間0℃に放置した後調製したPSD画分中のCaM Kinase II αサブユニットタンパク質(mPSDp)の含量

下段の数値は断頭後PSD調製を始めるまでの時間。

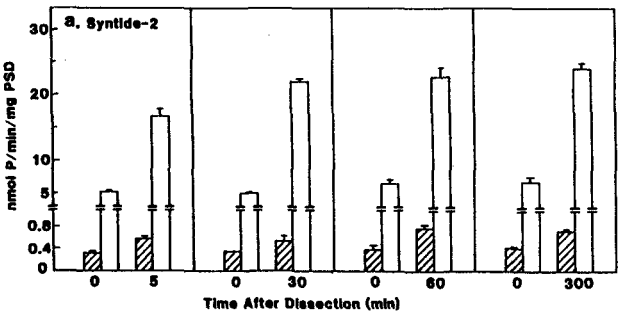


図2　上記PSD画分のCa^{2+}/calmodulin依存性protein kinase活性

オープンカラム, Ca^{2+}/CaM存在下の活性
斜線カラム, Ca^{2+}/CaM非存在下の活性

下段の数値は断頭後PSD調製を始めるまでの時間。

(1) Banker, G., Churchill, L., and Cotman, C. W. (1974) J. Cell Biol., 63, 456-465. (2) Carlin, R. ., Grab, D. J., and Siekevitz, P. (1982) J. Neurochem., 38, 94-100. (3) Cohen, R. S., Blomberg, F., Berzins, K., and Siekevitz, P. (1977) J. Cell Biol., 74, 181-203. (4) Cotman, C. W., Banker, G., Churchill, L., and Talor, D. (1974) J. Cell Biol., 63, 441-455. (5) Fenner, C., Traut, R. R., Mason, D. T., and Wikman-Coffelt, J. (1975) Anal. Biochem., 63, 595-602. (6) Goldenring, J. R., McGuire, Jr. T. S., and DeLorenzo, R. J. (1984) J. Neurochem., 42, 1077-1084. (7) Kelly, P. T., McGuiness, T. L., and Greengard, P. (1984) Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 81, 945-949. (8) Kennedy, M. B., Bennet, M. K., and Erondu, N. E. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7357-7361. (9) Rich, D. P., Colbran, R. J., Schworer, C. M., and Soderling, T. R. (1989) J. Neurochem., 53, 807-816. (10) Suzuki, T., Fujii, T., and Tanaka, R. (1987) J. Neurochem., 48, 1716-1724. (11) Wu, K., Carlin, R., and Siekevitz, P. (1986) J. Neurochem., 46, 831-841.

2　培養海馬神経細胞におけるグルタミン酸刺激に伴うCaMキナーゼIIの活性化反応

福永浩司、宮本英七
(熊本大学・医・第一薬理)

〔要約〕

培養海馬神経細胞を用いて、グルタミン酸刺激に伴う Ca^{2+}／カルモデュリン (CaM) 依存性プロテインキナーゼII (CaMキナーゼII) の活性化機構について調べた。 1) 無刺激の細胞では、CaMキナーゼIIの Ca^{2+} 非依存型活性は全活性の4～5％であった。10 μMのグルタミン酸刺激により、Ca^{2+} 非依存型活性は15秒以内に11～12％に上昇し、この活性は少なくとも30分間持続した。 2) グルタミン酸による活性化反応は細胞外 Mg^{2+} イオン存在下で抑制され、NMDA受容体の特異的阻害剤であるAP5、CPPにより完全に阻害された。 3) 細胞をあらかじめ放射性無機燐酸でラベルし、in situでのCaMキナーゼIIの自己燐酸化反応と標的蛋白質であるmicrotubule-associated protein 2 (MAP2) の燐酸化反応について検討した。グルタミン酸刺激に伴いCaMキナーゼIIのα、βサブユニットとMAP2への燐酸の取り込みは1分間刺激で各々約180％、130％と有意に上昇し、この上昇は少なくとも15分間持続した。 4) CaMキナーゼII、MAP2の燐酸化反応の上昇は、NMDA受容体阻害剤であるAP5前処理によって完全に阻害された。以上の結果は、海馬神経細胞においてNMDA受容体刺激はCaMキナーゼIIを活性化し、つづいてMAP2の燐酸化反応を引き起こすことを示した。このことは、CaMキナーゼIIの海馬シナプス伝達長期増強 (LTP) における重要な役割を示唆している。

【目　的】

CaMキナーゼIIは神経細胞に高濃度存在し、神経伝達物質の生合成、放出および細胞骨格蛋白質の機能を調節している。本酵素はin vitroにおいて、Ca^{2+}／CaMによる活性化に伴い、酵素のN末端より286／287番目 (α／βサブユニット) のスレオニンが自己燐酸化され、Ca^{2+} 非依存型に変化する (1-3)。私達はこれまで小脳顆粒細胞の初代培養系を用いて、この Ca^{2+} 非依存型活性を測定することにより、細胞外刺激に伴うCaMキナーゼIIの活性化機構について解析してきた (4-6)。最近、電気生理学的研究によりCaMキナーゼIIのLTPの誘導、維持機構への関与が示唆されている (7,8)。今回、私達はLTP発現におけるCaMキナーゼIIの作用機構を明らかにする目的で、海馬神経細胞の初代培養系を用いて、CaMキナーゼIIの活性化機構、およびその標的蛋白質であるMAP2の燐酸化反応について解析した。

【実験方法】

海馬神経細胞の初代培養は生後1日目ラットよりMattsonとKaterの方法 (9) により行なった。8～9日間培養後、種々のグルタミン酸受容体アゴニストにより細胞を刺激した。刺激後細胞は液体窒素にて凍結し、プロテアーゼおよびプロテインホスファターゼ阻害剤を含む緩衝液にてホモジナイズ後、細胞抽出液を得た。細胞抽出液中のCaMキナーゼIIの Ca^{2+} 非依存型活性 (EGTA存在下) および全活性 (Ca^{2+}／CaM存在下) はsyntide 2を基質として測定した。結果は Ca^{2+} 非依存型活性の全活性に対する割合 (％) で表わした。in situでのCaMキナーゼIIの自己燐酸化反応、MAP2の燐酸化反応について検討した。細胞を ^{32}P-燐酸でラベルし、刺激後、ホモジナイズし、細胞抽出液を得た。抽出液より、CaMキナーゼIIとMAP2の特異抗体にて免疫沈降し、SDS-PAGE後、燐酸化の程度をバイオイメージアナライザーにて測定した。

【結果と考察】

Krebs-Ringer HEPES (KRH) 溶液中 (コントロール) での海馬神経細胞において、CaMキナーゼIIの全活性の4～5％が Ca^{2+} 非依存型の活性であった。KRHより Ca^{2+} を除くと、本活性は1～2％に減少した。再び、Ca^{2+} を含むKRHに交換すると活性は30秒以内にコントロールレベル (5％) まで回復した (図1)。細胞を Mg^{2+} 非存在下、10 μMグルタミン酸で刺激すると、Ca^{2+} 非依存型活性は15秒以内に11～12％に上昇した。この活性の上昇は、インキュベート溶液中にグルタミン酸が存在する条件で少なくとも30分間持続した。NMDA受容体の特異的阻害剤であるAP5は100 μMの濃度でグルタミン酸の刺激効果を完全に抑制した (図1)。

種々のグルタミン酸アゴニストの効果について検討した。100 μM NMDAではグルタミン酸と同程度の刺激効果が

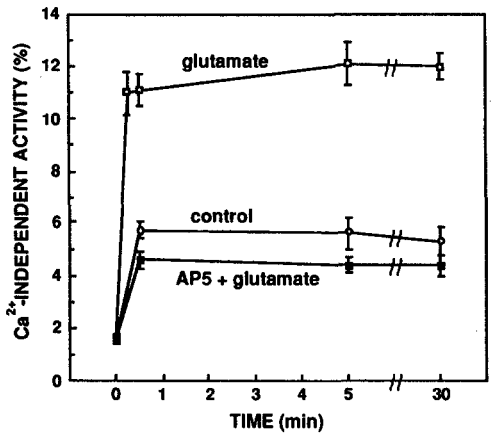


図1 CaM キナーゼIIの Ca^{2+} 非依存型活性に対するグルタミン酸の刺激効果

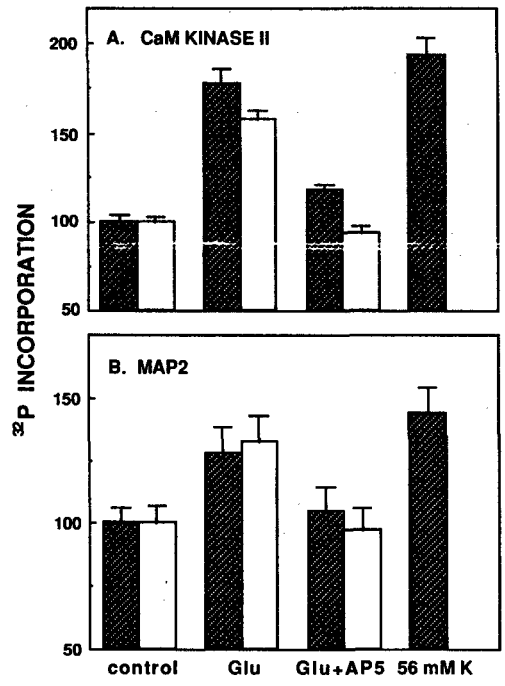


図2 CaM キナーゼII、MAP2 の in situ での燐酸化に対するグルタミン酸、脱分極の刺激効果
(■ ; 1 分間刺激, □ ; 15 分間刺激)

見られた。100 μM のカイニン酸 AMPA によっても有意な Ca^{2+} 非依存型活性の上昇が見られたが、NMDA の効果が細胞外 Mg^{2+} 存在下でほぼ完全に抑制されるのに対して、カイニン酸、AMPA の効果は Mg^{2+} によりほとんど影響されなかった。代謝型グルタミン酸受容体のアゴニストであるキスカル酸、trans-ACPD によっては各々、10 μM、300 μM の濃度でほとんど活性化が見られなかった。次に、グルタミン酸の効果に対する種々の拮抗薬の効果について検討した。10 μM のグルタミン酸の効果は NMDA 受容体の阻害剤である AP5 により完全に抑制され、カイニン酸／AMPA 受容体、代謝型グルタミン酸受容体の拮抗薬である CNQX、AP3 によっては阻害されなかった。さらに電位依存型 Ca^{2+} チャネル阻害剤であるニフェジピンも効果を示さなかった。以上の結果は、グルタミン酸は主に NMDA 受容体を介して CaM キナーゼIIを活性化し、Ca^{2+} 非依存型活性を発現することを示している。

次に in situ での CaM キナーゼIIの自己燐酸化反応と標的蛋白質である MAP2 の燐酸化反応について調べた。培養海馬神経細胞の CaM キナーゼIIは 50、58、60 kDa の α、β'、βのサブユニットからなり、グルタミン酸刺激により、酵素の自己燐酸化は刺激前を 100 %とすると、刺激後 1 分で 177±9 %に増加し、15 分後でもこの上昇は持続していた。脱分極刺激によっても、同様の自己燐酸化の亢進が見られた (図2A)。一方、MAP2 の燐酸化反応はグルタミン酸、高 K^+ の 1 分間刺激により、各々 128±11 %、144±10 %に増加した。グルタミン酸刺激に伴う MAP2 の燐酸化反応の上昇は CaM キナーゼIIの自己燐酸化反応と同様に 100 μM の AP5 の前処理により完全に抑制された (図2B)。in situ における CaM キナーゼIIの自己燐酸化反応は、Ca^{2+} 非依存型活性の発現とよく相関した。この活性の発現は、小脳顆粒細胞において明らかにしたように(4–6)、酵素の 286／287 番目 (α／βサブユニット) のスレオニンの自己燐酸化反応によるものと考えられる。さらに、MAP2 が神経細胞の細胞体、樹状突起に主に発現していることを考え合わせると、NMDA 受容体刺激に伴い活性化された CaM キナーゼIIは、後シナプス部位において MAP2 を燐酸化すると考えられる。このことは、シナプス可塑性発現における CaM キナーゼIIの役割を解明するうえで重要な知見であろう。

【文献】

1) Miller, S.G., Patton, B.L., & Kennedy, M.B. (1988) Neuron **1**, 593-604
2) Schworer, C.M., Colbran, R.J., Keefer, J.R., & Soderling, T.R. (1988) J. Biol. Chem. **263**, 13486-13489
3) Thiel, G., Czernik, A.J., Gorelick, F., Nairn, A.C., & Greengard, P. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 6337-6341
4) Fukunaga, K., Rich, D.P., & Soderling, T.R. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 21830-21836
5) Fukunaga, K., & Soderling, T.R. (1990) Mol. Cell. Neurosci. **1**, 133-138
6) 福永浩司, 宮本英七, Soderling, T.R. (1990) 神経化学 **29**, 338- 339
7) Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Mauk, M.D., Kelly, P.T., Nicoll, R.A. & Waxham, M.N. (1989) **340**, 554-557
8) Malinow, R., Schulman, H., & Tsien, R.W. (1989) Science **245**, 862-866
9) Mattson, M.P., & Kater, S.B. (1989) Brain Res. **490**, 110-125

3　グルタミン酸受容体 cDNA を用いた細胞内発現と蛋白質燐酸化反応

山本秀幸[1),2)]、宮本英七[2)]、T.R. Soderling[1)]
([1)]オレゴン医科大学、[2)]熊本大学・医・第一薬理)

〔要約〕

Ca^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡ (CaM キナーゼⅡ) は、シナプス後肥厚部位の主要蛋白質であり、グルタミン酸受容体存在部位に豊富に存在している(1)(2)。最近クローニングされた AMPA／カイニン酸受容体チャネル (GluR1-6) には、細胞質内領域に種々のプロテインキナーゼにより燐酸化され得るアミノ酸配列が認められる。今回、CaM キナーゼⅡのシナプス後肥厚部位での生理的機能を解明する目的で GluR1 をバキュロウイルス－昆虫細胞系に発現させ、蛋白質燐酸化反応について検討した。イムノブロット法により、102kDa と 91kDa のバンドが観察された。102kDa バンドは、ツニカマイシン処理により N-グリコシル化されていることが示唆された。両バンドは細胞上清分画と膜分画の両方に認められた。細胞上清分画から免疫沈殿法により GluR1 を単離し、燐酸化反応について検討した。GluR1 は CaM キナーゼⅡにより強く燐酸化を受け、プロテインキナーゼC (PKC) により、軽度に燐酸化された。cAMP 依存性プロテインキナーゼ (Aキナーゼ) では燐酸化反応は認められなかった。CaM キナーゼⅡと PKC は GluR1 のセリン残基を主に燐酸化したが、燐酸化部位に違いが認められた。これらの結果は GluR1 の機能が主に、CaM キナーゼⅡにより調節されていることを示唆している。

【目　的】

グルタミン酸受容体は記憶や学習の基礎となるシナプス伝達の可塑性や脳虚血に伴う神経細胞死などの種々の病態への関与が示唆されている。電気生理学的研究によりAMPA／カイニン酸型グルタミン酸受容体チャネルのAーキナーゼによる調節機構の存在が示唆された (3)(4)。またCaM キナーゼⅡがシナプス後肥厚部位に豊富に存在すること、クローニングされたAMPA型グルタミン酸受容体 (GluR1-4) がCaM キナーゼⅡによりリン酸化を受け得るアミノ酸配列を有すること、CaM キナーゼⅡが海馬の長期増強に関与すること(5)などが報告されている。今回、CaM キナーゼⅡによるグルタミン酸受容体の調節機構を明らかにする目的で、グルタミン酸受容体をバキュロウイルス－昆虫細胞系に発現させ、蛋白質燐酸化反応について検討した。

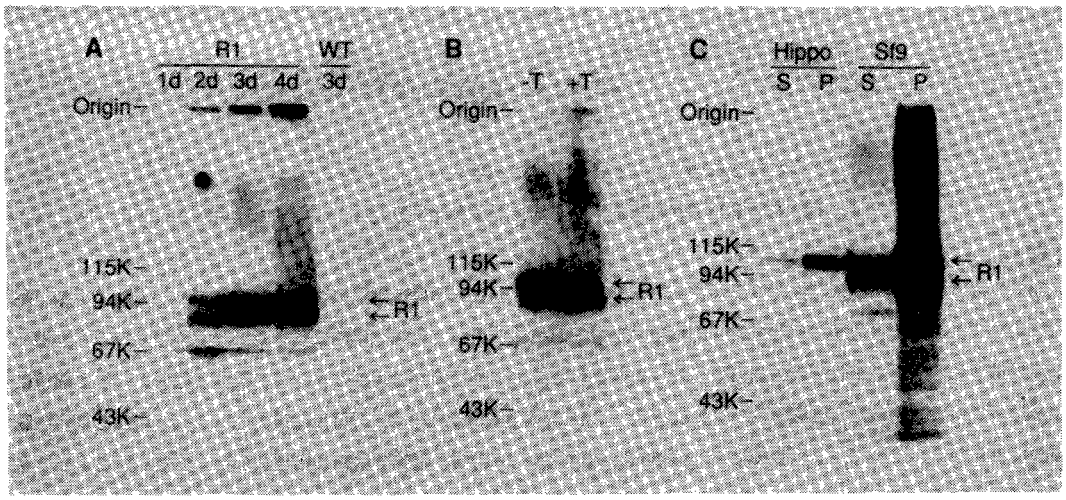
【方　法】

マウス脳CaM キナーゼⅡのαサブユニットとGluR1(6)は Brickey らの方法(7)により、バキュロウイルス－昆虫細胞系に発現させた。GluR1の C 末端部位に対する抗体は、BSA と結合させた合成ペプチドを兎に免疫して作製されたもの(8)を用いた。蛋白質リン酸化反応(9)、免疫ブロット(9)、免疫沈殿法(10)は、既報の方法に従った。免疫染色は Nilaver らの方法(11)にしたがった。

【結果及び考察】

GluR1の発現；GluR1cDNA を含んだバキュロウイルスを昆虫細胞 (Sf9 細胞) に感染させた後、細胞ホモジネートを電気泳動後にGluR1 に対する抗体を用いてイムノブロットを行なった (図1.A)。感染後、2日目に 102kDa と、92kDaの２本のバンド(R1)が観察された。GluR1の発現は、3日目に最大に達した。野生型のバキュロウイルスを感染させた細胞ではGluR1の発現は認められなかった。感染後、１日目に10μg/mlのツニカマイシンを加え２日後にGluR1のイムノブロットを行なった（図１Ｂ）。ツニカマイシン処理により、102kDa のバンドは消失した。このことより102kDa のバンドは92kDaの N-グリコシル型であることが示唆された。細胞ホモジネートを遠心後、細胞上清分画と膜分画中のGluR1の存在を検討した（図１Ｃ）。両分画に、102kDaと92kDaの両バンドが認められた。ラット海馬の細胞上清分画にはほとんどグルタミン酸受容体は認められず、膜分画に多量に存在した。海馬では102kDa のバンドのみ認められた。発現されたGluR1の存在部位を免疫組織学的に検討した。トリトン X-100 非存在下に、免疫染色を行なうと、細胞は軽度に染色され、トリトンX-100 処理により、染色性は増強された。抗体が受容体の細胞外を認識することより、一部の受容体は細胞膜に組み込まれていることが示唆された。CaM キナーゼⅡを発現したSf9細胞ではトリトンX-100非存在下の免疫染色性は認められなかった。

GluR1のリン酸化反応；細胞上清分画より免疫沈殿法によりGluR1を単離し、種々のプロテインキナーゼによるリン酸化反応を検討した(図2)。GluR1は 10 nM のCaM キナーゼⅡによりリン酸化を受け、100 nM の PKC で軽度にリン酸化された。Aキナーゼではリン酸化反応は認められなかった。CaM キナーゼⅡとPKCによるGluR1の燐酸化部位をリン酸化アミノ酸分析と二次元ペプチドマップ法により検討した。100 nM の両酵素で、30 分間リン酸化したGluR1では、主にセリン残基がリン酸化された。リン酸化GluR1をトリプシン処理後に二次元ペプチドマップを行なうと両



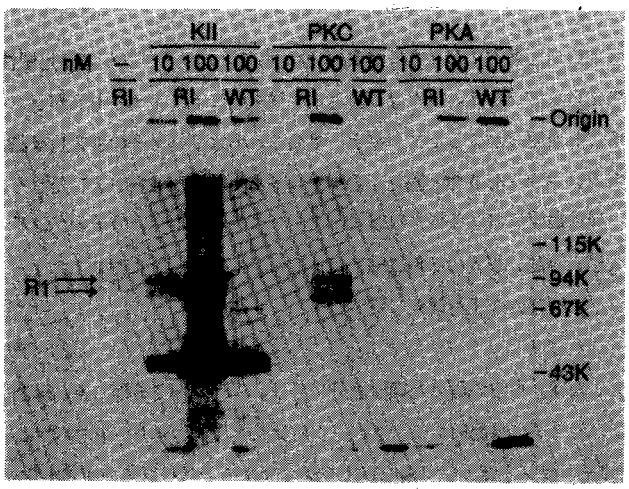


図1 GluR1 の Sf9 細胞における発現

A. 野生型バキュロウイルス (WT) 感染3日後では、GluR1 の発現は見られない。67kDa のバンドは培養液中の BSA を示す。

B. 感染後1日目に DMSO のみ(-T)、ツニカマイシン (+T) を加えた。

C. 感染後の Sf9 細胞 (Sf9)、ラット海馬 (Hippo) をホモジナイズ後、細胞上清分画 (S) と膜分画 (P) を得た。同量 (13μg) の蛋白質を電気泳動に用いた。

図2 GluR1 のリン酸化反応

A. GluR1cDNA を含むバキュロウイルス (R1) と野生型バキュロウイルス (WT) 感染後の細胞上清分画を用いて免疫沈殿を行なった。免疫沈殿物を10nM、100nM のCaM キナーゼⅡ(KII)、Cキナーゼ (PKC)、A-キナーゼ (PKA) で3分間リン酸化した。

酵素で異なったリン酸化ペプチドが認められた。これらの結果よりGluR1がCaM キナーゼⅡの良好な基質であり、受容体機能が受容体自身のリン酸化反応により調節されていることが示唆された。またCaM キナーゼⅡとPKCでGluR1の異なるセリン残基がリン酸化される事が明らかになった。報告されているGluR1のアミノ酸配列には、細胞質内領域にそれぞれのキナーゼでリン酸化されるセリン残基が想定されており、今後、これらのセリン残基を欠失したGluR1を細胞内で発現させ、野生型GluR1との比較によりリン酸化の影響を電気生理学的に検討していく予定である。

【文　献】

1)Kennedy, M.B., Bennett, M.K. and Erondu, N.G. Proc. Natl. Acad. Acad. Sci. USA 80, 7357-7361 (1983).

2)Kelly, P.T., McGuiness, T.L. and Greengard, P. Proc. Natl. Acad. Acad. Sci. USA 81, 945-949 (1984).

3)Wang, L-Y., Salter, M.W. and MacDonald, J.F. Science 253, 1132-1135 (1991).

4)Greengard, P., Jen,J., Nairn, A.C. and Stevens, C.F. Science 253, 1135-1138 (1991).

5)Malinow, R., Schulman, H. and Tsien, R.W. Science 245, 862-866 (1989).

6)Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S.W. and Heinemann S. Nature 342, 643-648 (1989).

7)Brickey, D.A., Colbran, R.J., Fong, Y.L. and Soderling, T.R. Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 578-584 (1990)

8)Wenthold, R.J., Hunter, C., Wada, K. and Dechesne, C.J. FEBS Lett. 276, 147-150 (1990).

9)Yamamoto, H., Fukunaga, K., Lee, K. and Soderling, T,R. J. Neurochem. 58, 1110-1117 (1992).

10)Yamamoto, H., Maeda, N., Niinobe, M., Miyamoto, E. and Mikoshiba, K. J. Neurochem. 53, 917-923 (1989).

11)Nilaver, G. and KoZlowski, G.P. in Techniques in Immunocytochemistry , p199, Academic Press, New York. (1989).

4 カルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅡαおよびβタンパク質量の発達過程における変化

杉浦弘子、山内　卓
（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）の発達過程における変化をラット大脳、小脳、脳幹についてαおよびβ分子に対して特異的なモノクローン抗体を用いて免疫化学的に調べた。αおよびβタンパク質の濃度は加令にともないそれぞれの脳領域で著しく変化した。出生直後のαおよびβタンパク質濃度は低く、脳の部位による違いは余りなかった。酵素タンパク質は生後10-14日に急速に増大し、20-30日後に最大となった。増加の割合は脳の部位で異なり、大脳では出生直後に比べ30-50倍、小脳では10-20倍、脳幹では約10倍増加した。また、αおよびβタンパク質の発現は大脳および脳幹ではキナーゼⅡ活性とほぼ相関していた。

キナーゼⅡは脳におけるプロテインキナーゼとしては最も豊富に存在する酵素の1つであり[1]、シナプス伝達や可塑性など神経機能調節に重要な役割を果たしていると考えられている[2]。我々は、最近電子顕微鏡によりキナーゼⅡがαおよびβサブユニットのホモポリマーの混合体であることを明らかにした[3]。キナーゼⅡのαおよびβ分子の存在比は脳の部位や週令で異なることが報告されているが、我々はキナーゼⅡの大脳と小脳における酵素学的な性質およびそれぞれの基質タンパク質の違いを見出した[4]。しかし、発達過程における様々な領域のキナーゼⅡαおよびβ分子のタンパク質の定量は行われていない。今回、我々は脳を大脳、小脳、脳幹の部位に分け可溶性画分と顆粒画分においてキナーゼⅡαおよびβタンパク質を免疫化学的に測定し、その経時的変化を観察した。

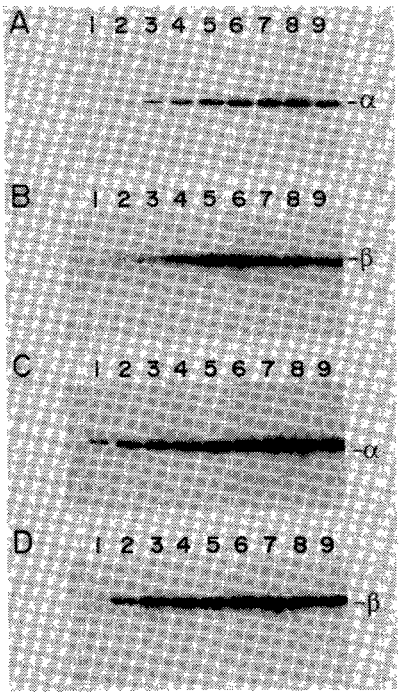
「実験方法」

ラット大脳、小脳、脳幹を採取し、ホモジナイズした後、可溶性画分と顆粒画分に分け、SDS-PAGEで分離した。泳動後タンパク質をニトロセルロース膜に写し、αおよびβ分子に特異的なモノクローン抗体[5]と反応させた。2次抗体に^{125}Ⅰ-ラベル抗マウスIgGを使用してαとβ分子をオートラジオグラフで検出し、ラジオアクティブバンドを切り出し、^{125}Ⅰのカウントを測定し定量した。この条件で5-200ngのαまたはβ分子が定量できる。キナーゼⅡ活性はシンチド2のCa^{2+}依存性リン酸化によって測定した。

「実験結果と考察」

ラット大脳、小脳、脳幹のホモジネイトについて、αおよびβ分子に対して特異的なモノクローン抗体を用いてイムノブロッティングを行ったところ、αタンパク質とβタンパク質はそれぞれ50KDaおよび60KDaの位置に1本のバンドのみ認められた。αタンパク質量は大脳、脳幹、小脳の順であり、βタンパク質量は大脳、小脳、脳幹の順であった。

次にこれらの脳を可溶性画分と顆粒画分に分けてαおよびβタンパク質量を定量したところ、いずれの部位においてもαおよびβタンパク質共に加令にともない増加した。すなわち、大脳では、生後1日にはキナーゼⅡ濃度は可溶性画分および顆粒画分共に低いが、30日令でその濃度は最大になりそれ以後やや減少傾向を示した。図1にイムノブロッティングによる大脳のαおよびβタンパク質の加令に伴う変化を示した。αタンパク質は30-60倍上昇し、最大濃度は可溶性画分および顆粒画分共に約6μg/mgであった（表1）。これは大脳全タンパク質量の約0.6%に相当する。またβタンパク質は可溶性画分および顆粒画分共にαタンパク質より早く（10-14日）上昇傾向を示し、30日で最大となる。αとβタンパク質の比は出生直後には1:1であるのが生後20-30日では3-5:1となる。生後1.5年経過した大脳αタンパク質は可溶性画分および顆粒画分共に30日の値に比べ少し低下した。



Brain region	Fraction	α protein			β protein		
		day 1	day 30	Increase	day 1	day 30	Increase
		μg/mg protein		*-fold*	*μg/mg protein*		*-fold*
Forebrain	soluble	0.099	6.01	61	0.078	1.81	23
	particulate	0.196	6.20	32	0.181	1.70	9
Cerebellum	soluble	0.012[a)]	0.062[b)]	5	0.063[c)]	0.160	3
	particulate	0.025[d)]	0.168	7	0.054	0.495	9
Brainstem	soluble	0.155	1.03	7	0.071	0.153	2
	particulate	0.248	2.33	9	0.081	0.291	4

a), b), c), and d); data of day 20, 60, 5, and 10, respectively.

表1　αとβタンパク質の発達過程における増加率.

図1（左）　大脳のαおよびβタンパク質の加令に伴う変化.
A、B　可溶性画分；　C、D　顆粒画分；
1-9、それぞれ1、5、7、10、14、20、30、60、90日.

小脳では発達過程においてαタンパク質よりβタンパク質の方が多く存在し、どちらも可溶性画分より顆粒画分に多かった。顆粒画分は20日頃からβタンパク質が増加し、30日で最大となり（0.5μg/mg）、増加率は約10倍であった。αおよびβタンパク質は小脳顆粒画分のタンパク質のそれぞれ0.02%および0.05%に相当する。しかし、大脳と比較してその量は非常に少ない。また、脳幹では顆粒画分に多く存在し、大脳や小脳よりやや早くタンパク質量の増加を示した。顆粒画分はαおよびβタンパク質共に20日で最大となった。αおよびβタンパク質量はそれぞれ0.2および0.03%であった。このことは脳幹のキナーゼIIは大脳に比べて増加率が低く、早い時期に最大に達することを示している。

一方、精製キナーゼIIの比活性をもとにしてキナーゼIIの濃度を計算すると、30日の大脳では可溶性タンパク質の約0.7%となった。この値は免疫化学的に求めたαとβタンパク質を加えた値とおよそ相関することが解った。脳幹でも活性とタンパク質量はよく相関していたが、小脳では酵素の比活性から求めた酵素タンパク質量は免疫化学的に求めたものより多く、キナーゼII以外にシンチド2のリン酸化活性が存在することを示した。

以上のようにキナーゼIIは発達過程においてタンパク質量が生後10-14日に急速に増大し、20-30日で最大に達するが増加の割合は脳の部位で著しく異なることが明かとなった。キナーゼIIの脳における機能を明らかにするためにはそれぞれの部位における発現の調節およびキナーゼII基質タンパク質を明らかにすることが重要であると考えられる。

「文献」

1. Yamauchi, T., Fujisawa, H. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 15-21
2. Colbran, R. J., Schworer, C. M., Hashimoto, Y., Fong, Y. -L., Rich, D. P., Smith, M., Soderling, T. R. (1989) Biochem. J. 258, 313-325
3. Kanaseki, T., Ikeuchi, Y., Sugiura, H., Yamauchi, T. (1991) J. Cell Biol. 115, 1049-1060
4. Yamauchi, T., Sekihara, S., Ohsako, S. (1991) Brain Res. 541, 198-205
5. Ichikawa, T., Sekihara, S., Ohsako, S., Hirata, Y., Yamauchi, T. (1992) J. Chem. Neuroanat. in press

5 ラット大脳CaM-キナーゼIVのA-キナーゼによるリン酸化と活性調節

亀下 勇、藤澤 仁
（旭川医大・第一生化学）

〔要約〕

CaM-キナーゼIVは、A-キナーゼによりリン酸化され、酵素1分子あたり約1モルのリン酸が取り込まれた。このときリン酸化に伴いCaM-キナーゼ活性はリン酸化前の約40%にまで低下した。A-キナーゼによるリン酸化部位を含むペプチドにはホスホセリンが検出されそのアミノ酸配列はAVVASSRLGSASSSHTNIQESNKであった。このペプチドはCaM結合部位の一部を含んでおり、この中のセリン残基のリン酸化により酵素活性が抑制されることが示唆された。

CaM-キナーゼIVは特に脳組織に豊富にみられる酵素で、広い基質特異性を示す多機能性プロテインキナーゼのひとつである（1）。小脳ならびに大脳のCaM-キナーゼIVは自己リン酸化により顕著な活性の増大がみられることが報告されているが（2、3）、その他詳しい活性調節機構についてはほとんど知られていない。今回、CaM-キナーゼIVのA-キナーゼによるリン酸化反応について検討したところ、自己リン酸化反応の場合とは逆にA-キナーゼによるリン酸化により酵素活性の抑制がおこることを見いだしたので以下に報告する。

［実験方法］

CaM-キナーゼIVはラット大脳より（1）、またA-キナーゼは牛心筋より（4）精製した。CaM-キナーゼIV活性はCa^{2+}／CaM存在下にsyntide-2へ取り込まれるリン酸の量を調べる事により測定した。A-キナーゼによりリン酸化されたCaM-キナーゼIVの活性測定は1.4μMプロテインキナーゼインヒビター（Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-His-Asp）添加によりA-キナーゼ活性を完全に阻害した条件下で行った（5）。^{32}P-ATPとA-キナーゼで酵素をリン酸化した後、リシルエンドペプチダーゼ処理し、逆相HPLCにより放射活性を持つペプチドを単離することによりリン酸化ペプチドを調製した。アミノ酸配列分析は気相プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステム社477A型）を用いて行った。

［結果］

CaM-キナーゼIVをA-キナーゼによりリン酸化すると、反応開始60分後には酵素あたり0.5－1モルのリン酸の取り込みが見られた。自己リン酸化酵素の場合リン酸化に伴いSDSゲル上で高分子量側へのバンドのシフトが見られたのに対し、A-キナーゼによるリン酸化酵素ではSDSゲル上での移動度の変化がみられないことから、それぞれのリン酸化部位が異なることが示唆された（図1）。CaM-キナーゼIVは自己リン酸化により酵素が約10倍活性化されたが（3）、A-キナーゼによるリン酸化では酵素活性の低下が見られ、60分後には約40%にまで低下した（図2）。しかし、この時酵素のリン酸化に伴うCa^{2+}／CaM非依存性活性の変化は観察されなかった。A-キナーゼによりリン酸化された酵素は至適pHや，ATP、syntide-2に対するKmは変化していなかったが、CaMに対するKaは約3倍に増大していた。また，A-キナーゼによりリン酸化されたCaM-キナーゼIVは，Ca^{2+}／CaMの添加により自己リン酸化反応が起こり，また自己リン酸化を受けた酵素もさらにA-キナーゼの添加により新たにリン酸化を受けることから、それぞれのリン酸化反応は独立に起こることが示された。A-キナーゼによりリン酸化を受ける部位を明かにする目的で^{32}P-ATPで標識した酵素をリシルエンドペプチダーゼで処理し、逆相HPLCで分離したところ放射活性を持つ主要ピークがひとつ検出された。このペプチドのホスホアミノ酸分析を行ったところホスホセリンのみが検出され、アミノ酸配列分析からリン酸化ペプチドはAVVASSRLGSASSSHTNIQESNKであることが明かになった（図3）。

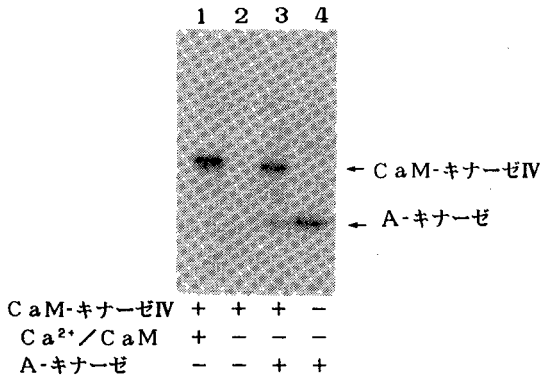


図1　CaM-キナーゼIVの自己リン酸化とA-キナーゼによるリン酸化。CaM-キナーゼIVを図中に示した条件下に［^{32}P］ATPでリン酸化し、SDSPAGEの後オートラジオグラフィーを行った。

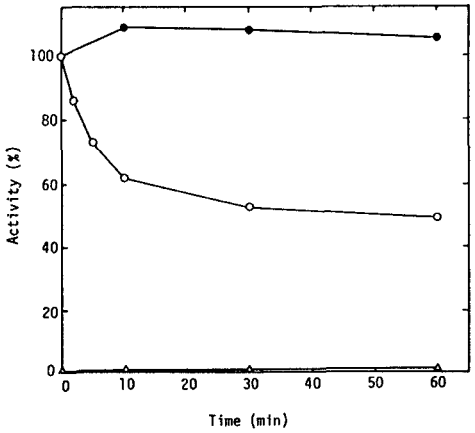


図2　A-キナーゼによるリン酸化に伴うCaM-キナーゼIVの活性変化。CaM-キナーゼIVをプロテインキナーゼインヒビター存在下（●）あるいは非存在下（○、△）にATP、A-キナーゼとインキュベートし、時間経過とともにCa^{2+}／CaM依存性（○、●）ならびに非依存性活性（△）を測定した。

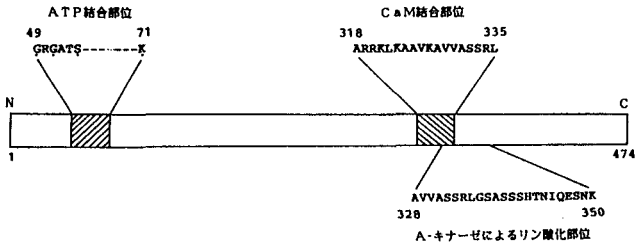


図3　CaM-キナーゼIVのA-キナーゼによるリン酸化部位。数字はMeansらの報告したアミノ酸配列（6）に対応する。

［考察］

CaM-キナーゼIVは自己リン酸化により顕著な活性化がみられるのに対し（2、3）、A-キナーゼによるリン酸化では活性の抑制が見られた（図2）。A-キナーゼによりリン酸化されたCaM-キナーゼIVはCaMに対する親和性が低下していたが、これはリン酸化部位がCaM結合部位あるいはその近傍にあるためと考えられた（図3）。多機能性プロテインキナーゼが2つの異なるセカンドメッセンジャー（Ca^{2+}とcAMP）により逆の活性調節を受けるという例はこれまで知られておらず興味深い活性調節機構である。

［文献］

(1) Miyano, O., Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1992) J. Biol. Chem 267, 1198-1203
(2) Frangakis, M. V., Ohmstede, C. A., and Sahyoun, N. (1991) J. Biol. Chem. 266, 11309-11316
(3) 亀下、藤澤 (1991) 神経化学 30、212-213
(4) Okuno, S., and Fujisawa, H. (1990) Biochmim. Biophys. Acta 1038, 204-208
(5) Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 180, 191-196
(6) Means, A. R. et al. (1991) Mol. Cell. Biol. 11, 3960-3971

6 大腸菌で発現した不活性なカルモデュリン依存性プロティンキナーゼⅣを活性化する因子の組織分布

奥野幸子、藤澤　仁
（旭川医大、第一生化）

〔要約〕

ラット小脳のカルモデュリン依存性プロティンキナーゼⅣ（キナーゼⅣ）のｃＤＮＡを導入した大腸菌は活性が全く検出されない不活性なキナーゼⅣを産生するが、この不活性なキナーゼⅣをＡＴＰ、マグネシウム、カルシウム、カルモデュリン依存性に活性化する物質がラットの脳内に存在する。ラットを用いてこのキナーゼⅣを活性化する因子の組織分布を調べた結果、脳にほぼ特異的に分布し、末梢組織には殆ど検出されないことが明らかになった。また脳内分布を調べると大脳に最も多く、脳幹、小脳の順に高い値を示した。キナーゼⅣも脳にほぼ特異的に分布するが、脳内では小脳に最も多く、キナーゼⅣと活性化因子の両者間で分布に違いがみられた。ラット脳幹を用いてキナーゼⅣの活性化因子の細胞内分布を調べた結果、可溶性のマーカー酵素である乳酸脱水素酵素（ＬＤＨ）と同様の分布を示した。キナーゼⅣの活性化因子は脳の可溶性画分に特異的に分布し、キナーゼⅣの活性発現に直接関与していることが考えられた。

カルモデュリン依存性プロティンキナーゼⅣ（キナーゼⅣ）は、脳にほぼ特異的に、かつ高含量で分布するカルシウム／カルモデュリン依存性の多機能性プロティンキナーゼであり（１）、キナーゼⅡとともにカルシウムイオンによる神経機能の調節に主要な役割を担っていることが推定される。本酵素のｃＤＮＡを導入した大腸菌が産生するキナーゼⅣは活性が全く検出されない不活性なキナーゼⅣであるが、我々はこの不活性酵素を活性化する物質がラットの脳内に存在することを見出した（４）。今回このキナーゼⅣの活性化因子の組織分布と細胞内分布を調べたので報告する。

〔方法〕

ラット小脳のｃＤＮＡライブラリーよりキナーゼⅣの全コーディング領域を含むクローンを得た（３）。これをｐＥＴ発現ベクターに組み込んで大腸菌に導入し、不活性なキナーゼⅣを調製した。ラットの各組織を 0.1% トリトン X-100 を含む緩衝液でホモゲナイズし、100,000 Ｘｇ，60 分の遠心上清画分を調製し、そのキナーゼⅣ活性化能を調べた。不活性なキナーゼⅣと各組織の遠心上清画分を、ＡＴＰ、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、カルモデュリン存在下に３０℃でインキュベーションした後、ベプチドγ（１）を基質にして、出現したキナーゼⅣ活性を測定した。細胞内分布はラット脳幹を既報（２）に従って分画した標品を用いて調べた。

〔結果および考察〕

ラット小脳キナーゼⅣのｃＤＮＡを導入した大腸菌から調製したキナーゼⅣの不活性酵素をＳＤＳゲル電気泳動で調べるとラット小脳のキナーゼⅣのαサブユニットの蛋白バンドと一致したが、キナーゼⅣの活性は全く検出されなかった。この不活性酵素をラット脳の粗抽出液とインキュベーションすると活性が出現し、至適条件下では脳から精製した酵素とほぼ同等の比活性を示した。活性化には、ＡＴＰ、マグネシウム、カルシウム、カルモデュリンを要求し、インキュベーション時間に依存してキナーゼⅣ活性が出現した。また脳の粗抽出液を１００℃で５分間処理すると活性化能は失われた。図１はラットの各組織に含まれる単位蛋白量当たりのキナーゼⅣ活性化能を示しているが、脳にほぼ限局して分布していることが明らかになった。脳を大きく大脳、脳幹、小脳に分けると、大脳＞脳幹＞小脳の順に高い含量を示した。キナーゼⅣの活性も脳にほぼ特異的に分布するが（１）（図１）、小脳＞大脳＞脳幹の順に多く、活性化因子の脳内分布とは異なっている。表１は活性化因子の細胞内分布を調べた結果である。代表的な可溶性酵素である乳酸脱水素酵素（ＬＤＨ）の分布とほぼ等しく、神経細胞体および神経終末部の可溶性画分に存在していると考えられる。このように不活性なキナーゼⅣを活性化する因子は脳の可溶性画分に特異的に分布し、末梢組織には殆ど存在していな

いことが明らかになった。脳におけるキナーゼIVの活性発現の調節に密接に関与していることが考えられ、興味深い。

図1　キナーゼIV活性化因子およびキナーゼIV活性のラットの組織分布

単位蛋白量当たりの活性が最も高い組織（キナーゼIV活性化因子は大脳、キナーゼIV活性は小脳）をそれぞれ１００%として百分率で示した。

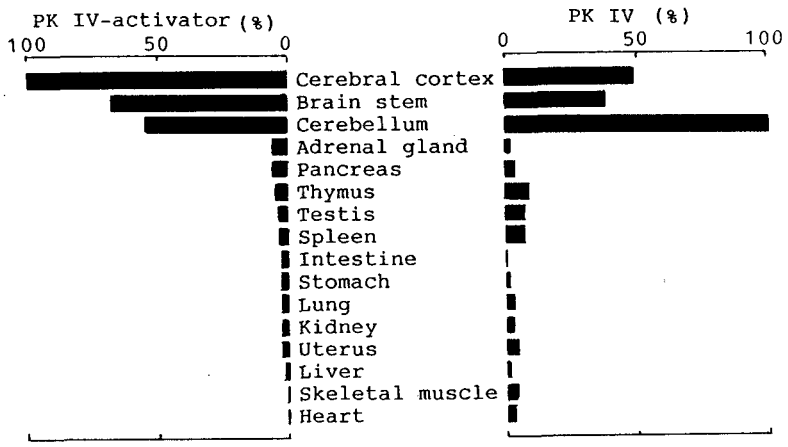


表1　キナーゼIV活性化因子の細胞内分布

Fraction	Protein (%)	PK IV-activator (Relative specific activity)	LDH
Nuclear	25	0.23	0.13
Crude mitochondrial	44	0.57	0.71
hypoosmotic sup	(8)	(3.28)	(2.86)
hypoosmotic pellet	(38)	(0.08)	(0.17)
Microsomal	6	0.37	0.30
Isotonic soluble	25	2.65	2.50

〔文献〕

1. Miyano, O., Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1992) J. Biol. Chem. 267, 1198-1203
2. Okuno, S., Yamauchi, T., and Fujisawa, H. (1984) Biogenic Amines 1, 291-295
3. Okuno, S., and Fujisawa, H. (1991) Neurosci. Res. Suppl. 16, S45
4. 奥野幸子、藤澤　仁 (1992) 第65回日本生化学会大会

7 カルレチニンの非神経細胞P_2膜タンパクリン酸化への影響

山口知子、Lois Winsky * and David M.Jacobowitz*
（東女医大・生化学、*NIMH）

〔要約〕

カルレチニン（ＣＲ）はカルビンヂン（ＣＢ）と相同分子種であるが、ＣＢは腸管におけるカルシウム運搬タンパクとして知られ、かつ中枢神経ニューロンにも分布している脳腸管ペプチドの一つである。一方、ＣＲは感覚ニューロンに目立って局在し、中枢神経内に広く分布しているが、非神経組織での局在は今のところ腸管のガングリオンの周辺にしか認められていない。この近年、単離精製されたカルシウム結合タンパクであるＣＲはカルモジュリンのSuperfamilyであることがクローニングで同定されている。われわれはＣＲが中枢神経シナプトソーム膜画分の３９kDaタンパクのリン酸化を特異的に阻害することを報告してきたが[1]非神経組織の末梢器官（肺、心、肝、脾、腎、睾丸）のP_2膜画分でも３９kDaタンパクのリン酸化を阻害することが明かとなった。ニューロンでのみ発現していると思われているＣＲが末梢器官の膜タンパクリン酸化に対しても同様の効果を持っていることは、普遍的にP_2膜画分存在するの３９kDaタンパクが中枢神経細胞でのみＣＲによる調節を受け何らか生理機能を担っていることを示唆している。

［はじめに］

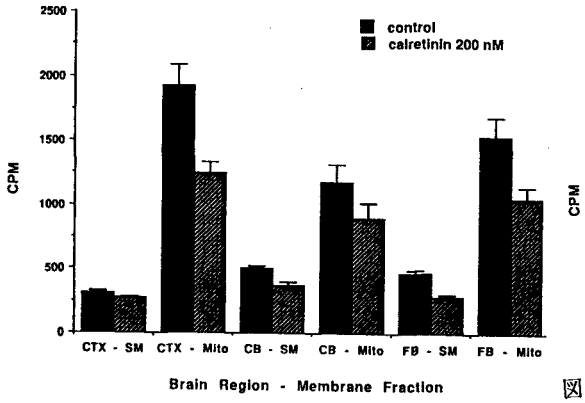
近年、中枢神経に発現している新しく分離されたカルシウム結合タンパクのカルレチニン（ＣＲ）[2-3]は現在のところ種々のニューロンにおける局在に興味がもたれ、免疫組織化学および in situ hybridization でCNSにおけるマッピングが詳しく報告されている。[4~6]近縁分子種であるカルビンジン（ＣＢ）とはニューロンにおける局在が異なっており[2]このことはこれらカルシウム結合タンパクの中枢神経内における機能の差異を示唆していると思われる。さらに、われわれが昨年報告したようにＣＲはＣＢと異なり、シナプトソーム膜３９kDaタンパクのリン酸化を特異的に阻害し、その効果は脳ホモジネートのP_2膜画分の３９kDaタンパクのリン酸化に対しても阻害効果が顕著に認められたことから、今回は非神経組織におけるP_2膜画分を調製してリン酸化に対する効果を検討した。更に脳の種々の部位から調製したP_2およびシナプトソーム膜画分のリン酸化に対する効果も合わせて検討した。

［実験方法］

カルレチニン（ＣＲ）はWinskyら[2]の方法によってモルモット脳可溶画分から抽出し精製した。ラットの各組織からのP_2膜画分は、１０％等張ホモジネート(v/w)(0.32M Sucrose,20mMHepes,pH7.4,2mM EDTA,0.5mM EGTA,0.5mM DTT) を700 x gで１０分遠心した上清を10,000 x gで４０分遠心し、その沈渣P_2を低張緩衝液中（20mMHepes,pH7.4,2mM,5mM EGTA,0.5mM DTT)で４℃一時間処理したのち膜画分を10,000 x g ２０分遠心して集めた。上清のS_2は更に105,000 x g で６０分遠心し、沈渣（P_3）を同様に低張処理して膜分画を集め、上清（S_3）を可溶画分とした。各膜各分のリン酸化は既報[1]に従って実施したが、リン酸化反応は３０℃、３分とし、ＣＲは２００ｎＭで阻害効果を検討した。

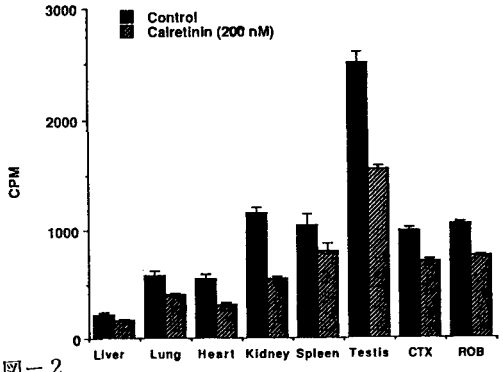
［結果・考察］

ラット脳の大脳、小脳及び脳幹から部位別に調製したシナプトソーム膜画分およびミトコンドリア膜画分（P_2を再分画してシナプトソームを不連続密度勾配で調製する際得られた沈渣を集め、低張処理して遠心分離した画分）を用いて^{32}Pでリン酸化し、SDS-PAGEで同一タンパク量（100μg/lane）、オートラジオグラムによって３９kDaタンパクのリン酸化されたバンドをカウントした。



脳部位別３９kDa膜タンパクリン酸化に対するカルレチニンの影響。
リン酸化した各膜タンパク１００μg/laneをSDS-PAGE(10%)で分離しオートラジオグラムで同定した３９kDa膜タンパクバンドの放射活性をカウントした。
SM:シナプトソーム膜　Mit:ミトコンドリア膜、CTX:大脳皮質
CB:小脳、FB:脳幹。Triplicate assay by two experiments.Mean+s.d.

図－２



臓器別３９kDa膜タンパクリン酸化に対するカルレチニンの影響。
リン酸化した各P_2膜タンパク１００μg/laneをSDS-PAGE(10%)で分離しオートラジオグラムで同定した３９kDa膜タンパクバンドの放射活性をカウントした。
.CTX:大脳皮質、ROB:大脳を除いた脳組織。
Triplicate assay by two experiments.Mean+s.d

３９kDaタンパクのリン酸化はいずれの部位でもシナプトソーム膜画分よりミトコンドリア画分に多く認められ、かつＣＲによる阻害効果もより明瞭に認められた。次いで、各末梢臓器から調製したP_2膜画分を低張処理して集めた膜画分で３９kDaタンパクのリン酸化に対するＣＲの効果を検討した。総タンパク量に対する３９kDaのリン酸化の程度は臓器によって異なるが、睾丸で３９kDaのリン酸化タンパクの存在とＣＲによる阻害効果が顕著に認められた。又、同時に調製した大脳（CTX）とその他の脳の部位（ROB）から調製したP_2膜画分による実験結果も合わせてグラフに示した。肝では３９kDaタンパクのリン酸化は膜タンパク量当たり最も小さく、ＣＲの阻害効果としては心、腎、睾丸において約５０％の阻害が認められ、脳のP_2膜画分を他臓器のそれとで比較するとＣＲによる３９kDaタンパクのリン酸化の阻害効果は他の末梢臓器と比べて中程度で約３０％の阻害が認められた。３９kDaタンパクのリン酸化はP_3膜画分や可溶画分では認められないことから、３９kDaタンパクがP_2膜画分の大部分を占めるミトコンドリア膜に局在するタンパクである可能性があり、このタンパクの同定とリン酸化の生理的意義の解明は重要な課題であると思われる。一方、ニューロンでのみ発現していると思われているＣＲの末梢組織での膜タンパクのリン酸化調節因子としてのin vitroでの効果は同族分子種のカルビンヂン（ＣＢ）では認められず、カルシウム結合タンパクであるカルレチニンの特異的効果と考えられる。

［文　献］

(1) Yamaguchi,T.,Winsky,L. and Jacobowitz,D.M.(1991) Neurosci.Lett.131,79-82.
(2) Rogers,J.H.(1989) J.Cell Biol.,105,1343-1353.
(3) Winsky,L.,Nakata,H.,Martin,B.M. and Jacobowitz,D.M.(1989)Proc.Natl.Acad. Sci.USA,86,10139-10143
(4) Rogers,J.H.,Kahn,M. and Ellis,J.C.(1989) in Pochet,R.,Lawson,D.E.M. and Heizman,C.W.(Eds.),Calcium Binding Proteins in Normal and Transfected Cells, Plenumn Press,N.Y.,pp.195-203.
(5) Jacobowitz,D.M. and Winsky L.(1991) J.Comp.Neurol.,304,198-218.
(6) Arai,R.,Winsky,L.,Arai,M. and Jacobowitz,D.M.(1991) ibid,310,21-44.

8 海馬LTP発現によるCキナーゼの変化

鈴木龍雄[1]，野路久仁子[1]，田中亮[1]，小倉明彦[2]，中村京子[2]，工藤佳久[2]
[1] 名市大・医・第一生化　[2] 三菱化成生命研・脳神経薬理

〔要約〕
ラット海馬にlong-term potentiation (LTP)を惹起した後、海馬を取り出し、可溶性画分と膜画分のプロテインキナーゼ活性を測定した。in vitroで行った内在性基質のリン酸化では、LTPの可溶性画分で80kと10-18kタンパク質のCa^{2+}非存在下でのリン酸化が昂進していた。これらのリン酸化はCキナーゼ(PKC)特異的インヒビター，PKC_{19-36}によって完全に抑制された。免疫沈降法により、80kタンパク質はmyristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)であることが明かとなった。MBP_{4-14}(PKCの選択的基質)を基質とした場合にも、LTPの可溶性画分でCa^{2+}非依存性のキナーゼ活性の昂進がみられた。可溶性画分と膜画分で抗PKC抗体を用いてimmunoblotting を行ったところ、LTPの膜画分でβ-PKCの分解が昂進していた。以上の結果、LTP発現時には、シナプス膜上でβ-PKCの限定分解が盛んに行われてcatalytic fragmentが細胞質中へ遊離され、そこで細胞内Ca^{2+}濃度の高低に関わらず持続的にPKC基質のリン酸化を行っている可能性が考えられた。

[はじめに]

長期増強(long-term potentiation, LTP)は高等動物における記憶・学習のモデルとなる電気生理現象で、そのメカニズムの究明が続けられている。LTPには神経細胞内Ca^{2+}の濃度上昇が必須で、それにひきつづくCa^{2+}依存性の信号伝達系、特にProtein Kinase C (PKC)とCa^{2+}/Calmodulin-dependent protein Kinase II (CaMKII)の果たす役割が注目されている。また、LTPの中期においては，これらのKinaseがひきつづいてactiveな状態にあることが示唆されている(4, 5)。また、Ca^{2+}依存性タンパク質分解酵素のcalpainがLTP発現に関与しているとの報告もある(1, 2, 6)。本報告では，ラット海馬のLTP発現時に観察されたCa^{2+}-independentでPKCタイプのリン酸化活性の昂進と、Western blot法によるPKC分子の変化を報告する。

[方法]

LTPの作製： Wistar rat(雄, 200-250g)をウレタン麻酔し、海馬CA3 pyramidal cell layerに刺激電極、対側のCA1 pyramidal cell layerに記録電極を挿入し、テスト刺激(0.1 ms, 0.1 Hz)に対する反応が安定した後テタヌス刺激(50 Hz, 1-4 s)を与えた。テタヌス刺激60分後、ラットの頭部を10秒間液体窒素に浸したあと海馬をとり出し-80℃に保存した。

キナーゼ活性の測定： 記録電極挿入側の海馬を解凍後、1 mM PMSF, 10 μM leupeptin, 10 μM pepstatin A, 10 nM caryculin Aを含む Tris-HCl (20 mM, pH7.4)中でホモゲナイズし、遠心により上清と沈澱を得た。活性測定は、5 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EGTA, 5 μM [γ-^{32}p]ATPを含む50 mM HEPES buffer (pH7.4)中で、Ca^{2+}-calmodulin, Ca^{2+}-phosphatidyl serine存在下、非依存下で、MBP_{4-14} (24 μM), syntide-2 (20 μM)ないし、内在性タンパク質を基質として行った。

その他： Western blotはAmersham ECL kitの方法に基づいて、TypeI, typeII, typeIII PKCに対するモノクローナル抗体(生化学工業)を用いて行った。免疫沈降はanti-MARCKS抗体(Dr.Nairn, A., The Rockefeller Univ.より供与)を用いてHaskinsらの方法(3)に基づいて行った。

[結果]

(1)キナーゼ活性の変化： テタヌス刺激後60分経過の時点で、population spike amplitudeが刺激前の2倍以上に増大した標本を'large' LTPとし、増大したが2倍に達しなかった標本を'small' LTPとして分類した。Ca^{2+}非依存下で行った内在性基質に対するリン酸化反応では、'large' LTPの上清画分で、分子量80kと10-18kタンパクのリン酸化が昂進していた。分子量80kタンパク質は免疫沈降法の結果、

MARCKSであることが明らかになった(図１)。PKCに対する特異的基質（MBP_{4-14})に対するリン酸化活性は'large' LTPで昂進しており(図2a, b, オープンカラム), PKCに対するinhibitor, PKC_{19-36} (1 μM, 10 μM, 図2a, b斜線）で抑制された。PKC_{19-36} 1 μM存在下で行ったSyntide-2に対するリン酸化活性は、LTPの前後で大きな変化は見られなかった。

(2)PKC分子の変化: 上清および沈澱画分のPKC分子の変化をWestern blottingで調べたところ、'large' LTPの沈澱画分で、分子量36Kのβ-PKC分解産物の量が増大していた。α-PKCにはこの変化は見られなかった。海馬γ-PKCは上清、沈澱ともに含量が低値であった。β-PKC特異的な分解は、単離したpostsynaptic density画分においても観察された。

[結論]

ラット海馬のLTP誘導後、海馬の上清画分において、Ca^{2+}非依存性のPKC型キナーゼ活性の昂進と、膜画分におけるβ-PKC特異的な分解の昂進が見られた。以上の結果は、テタヌス刺激によってβ-PKCが膜上で特異的に限定分解を受け、細胞質にCa^{2+}による制御を受けないPKC触媒ドメインが放出されたことを示唆する。このプロセスがLTP発現において特有の現象ではないかと考えられた。

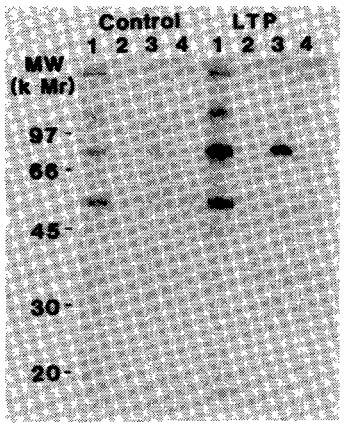


図１

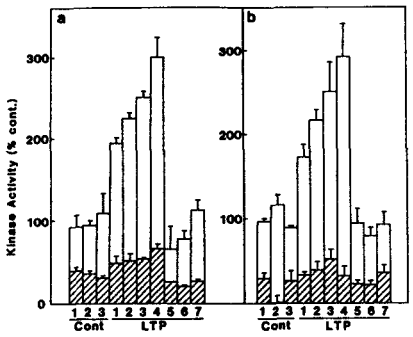


図２

図１ 80kタンパク質の免疫沈降

海馬上清を用いて[γ-^{32}P]ATP存在下にリン酸化反応を行い，抗MARCKS抗体を用いて免疫沈降した。lane 1, 上清のリン酸化パターン. lanes 2～4, 免疫沈降後のcontrolとLTPの上清画分. lane 2, normal IgG使用, lane 3, anti-MARCKS抗体使用. lane 4, 抗体未使用.

図２ 海馬上清のキナーゼ活性

MBP_{4-14}を基質とし, Ca^{2+}非存在下に活性を測定した。LTP1-4, 'large' LTP; LTP5-7, 'small' LTP. オープンカラム: PKC_{19-36}非存在下での活性. 斜線カラム: PKC_{19-36}存在下(a, 1 μM; b, 10 μM)での活性.

(1)del Cerro, S., Larson, J., Oliver, M. W., and Lynch, G. (1990) Brain Res., 530, 91-95. (2)Denny, J. B., Polan-Curtain, J., Ghuman, A., Wayner, M. J., and Armstrong, D. L. (1990) Brain Res., 534, 317-320. (3)Haskins, K., Hannum, C., White, J., Roehm, N., Kubo, R., Kappler, J., and Marrack, P. (1984) J. Exp. Med. 16, 452-471. (4)Klann, E., Chen, S., and Sweatt, J. D.(1991) J. Biol. Chem., 266, 24253-24256. (5)Malinow, R. Madison, D. V., and Tsien, R. W. (1988) Nature, 335, 820-824. (6)Oliver, M. W., Baudry, M., and Lynch, G.

9 抗ホスファチジルセリン抗体を用いた活性化プロテインキナーゼCの可視化の試み

宮澤淳夫，吉岡　享

（早稲田大学・人間科学部）

〔要約〕プロテインキナーゼC（PKC）は活性化に伴い細胞質中をtranslocateし，細胞膜のホスファチジルセリン（PS）に結合すると言われている．この性質を利用して生後の発生段階にあるラット小脳皮質におけるPKCの活性化部位を明らかにすることを試みた．まず，我々はPSとPKC（γtype;γPKC）に対するモノクローン抗体を準備し，ラット小脳の発生を追ってそれぞれ免疫染色を行なった．ここでγPKCを用いたのはこの分子種が小脳の中心的な細胞であるプルキンエ細胞に特に多く発現しているからである[1,2]．その結果，抗PKC染色は小脳の発生を通して常にプルキンエ細胞に見られたが，抗PS染色は発生に伴いその局在部位が変化し，特に生後14日目から21日目のプルキンエ細胞では免疫染色がほとんど見られなくなった．次に，小脳皮質におけるPKC活性を小脳の発生を追って調べた結果，生後7日目から21日目にかけて順次PKC活性は増加していくが，アダルトでは生後14日目以下のレベルに減少した．また，小脳を高濃度Phorlbol 12-Myristate 13-Asetate（PMA）で処理しPKCをdown regulationさせると，PMA未処理の小脳では抗PS染色が見られなかった部位も，抗PS抗体により強く染色されるようになった．これらのことから，PKC活性の高い生後14日目から21日目のプルキンエ細胞では，PKCがtranslocateしPSと結合しているために抗PS抗体がPSを認識できず，その結果免疫染色が見られなくなってしまったと考えられる．従って抗PS抗体による免疫染色が低下している部位がPKCの活性化部位である．

プロテインキナーゼやホスホリパーゼなど脂質を共役因子とする酵素の活性を研究するとき，脂質とタンパク質の相互作用を調べることは重要なことである．近年，我々は様々なリン脂質に対するモノクローン抗体を作製し[3,4]，細胞内情報伝達系の解析に用いてきた．特にラット小脳の発生を追って抗リン脂質抗体を用いて免疫染色を行なった結果，小脳の発生段階によりその局在パターンが異なることが分かった[5]．これは組織染色の前に行なうアルデヒドを用いた固定操作ではリン脂質分子自体が直接固定されないことから，抗リン脂質抗体による免疫染色によって示されたリン脂質の局在は，リン脂質とタンパク質との相互作用の強さを反映したものであると考えられる．そこで本研究では，PSとPKC（γtype;γPKC）のモノクローン抗体を用いて免疫組織化学的にそれらの局在部位を明らかにし，発生段階にあるラット小脳におけるPSとγPKCの相互作用について調べることにした．その結果，抗PS抗体による免疫染色を行なうことにより，in vivoでのPKCの活性化部位を明らかにすることができたので報告する．

［方法］

免疫組織化学：生後の日令が分かっているラットをネンブタール（30mg/kg, i.p.）で麻酔し，3％パラホルムアルデヒドと1％グルタールアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液で灌流固定した．小脳を取り出し，マイクロスライサーを用いて50μmの厚さの切片にし，抗PS抗体（PS4A7）[4]と反応させABC法で染色した．またγPKCの染色は，ラットを麻酔後，4％パラホルムアルデヒドを含む0．1Mリン酸緩衝液で灌流固定し，クリオスタットを用いて13μmの切片を作り，抗γPKC抗体（CKI97－5）[2]と反応させABC法で染色した．

PKC活性の測定：ラットを麻酔し，小脳を取り出して人工脳脊髄液中に浸し，マイクロスライサーで200μmの切片にした．実体顕微鏡下で小脳切片から分子層を切り集め，液体窒素中で凍結させた．この分子層におけるPKC活性を測定した[2]．

ELISA法を用いた抗体結合の抑制効果の検討：［小脳の細胞質タンパク質の調整］ラットを麻酔後，生理食塩水を灌流し，小脳を取り出してブロック状に細切し液体窒素で凍結させた．これをホモジェナイズし，100,000gで1時間遠心しその上清を回収した．［ELISA］マイクロタイター・ウエルにPS（10μMエタノール溶液）を50μl入れ，室温で蒸発させた．BSA溶液でブロッキングを行なった後，小脳の細胞質タンパク質を反応させた．ウエルを洗浄後，抗PS抗体と反応させ，最終的にフェニレンジアミンで発色させた．

［結果と考察］

抗PSモノクローン抗体による小脳の染色像を図1に示した．抗PS染色は小脳の発生にともなって変化した．生後7日目にはプルキンエ細胞全体が強く染色されたが，生後14日目になるとプルキンエ細胞の樹状突起に比べて細胞体の染色が弱くなった．生後21日目になると，さらにその染色が弱くなり，プルキンエ細胞の樹状突起がわずかに染色されたが，細胞体には染色が見られなくなった．アダルトではプルキンエ細胞の樹状突起が再び強く染色されるようなったが，細胞体や顆粒細胞に染色は見られなかった．また，それぞれの発生段階にある小脳切片から脂質の抽出を行った結果，PSの量に変化は見られなかった．

図2には抗γPKCモノクローン抗体による染色像を示した．このγPKCは小脳ではプルキンエ細胞に特異的に存在し，その染色パターンは小脳の発生を通じて均一でプルキンエ細胞の樹状突起，細胞体および軸索全体に免疫染色が見られた．さらに小脳の分子層でのPKCの活性を小脳の発生を追って調べた結果を図3に示した．PKC活性は生後7日目，14日目，21日目と1週ごとに増加したが，アダルトではその活性が生後14日目のものよりも低下していた．このPKC活性の変化のパターンは，PSの免疫染色の変化のパターンと完全に相反するものである．

PKCの活性化の条件は，細胞質中のPKCがtranslocateし膜のPSと結合することである．したがって，PKCの活性の高い生後14日目，21日目の段階で抗PS染色が弱くなるのはPKCが細胞膜のPSと結合したために抗PS抗体はPSと結合できなくなり染色性が低下したものと推測される．

そこで，ＰＫＣを始めとする細胞質中に含まれるＰＳ結合タンパク質が，ＰＳと抗ＰＳ抗体の結合を阻害できるかどうかＥＬＩＳＡで調べた．実験には，生後７日目と２１日目の小脳の細胞質タンパク質を調整して用いた．これは図３に示したように生後７日目と２１日目ではそのＰＫＣ活性に大きな差があることから，組織中に含まれるＰＫＣ量にも差があると考えられるからである．その結果，図４に示したようにＰＫＣの存在量が多いと思われる生後２１日目の小脳の細胞質タンパク質により生後７日目のものよりも強く阻害がかかることが分かった．

さらに，ＰＳと抗ＰＳ抗体との結合を阻害しているものがＰＫＣであることを確かめるために，アダルトラットをＰＭＡ（２００ｎＭ）を含む生理食塩水で１０分間灌流した後に固定し，抗ＰＳ抗体と抗γＰＫＣ抗体で免疫染色を行なった．その結果，γＰＫＣの染色が全体的にかなり減少している（図５Ｂ）のと対照的に，ＰＳの染色がプルキンエ細胞の細胞体や樹状突起，さらに顆粒細胞にも見られるようになった（図５Ａ）．これらの部位は，ＰＭＡ未処理の小脳では染色がほとんど見られなかった部位である．

以上のことから，ＰＳと抗ＰＳ抗体の結合を阻害していたのはＰＫＣであることが確かめられた．つまり，抗ＰＳ抗体による免疫染色性の減少は，ＰＳとＰＫＣの相互作用の強さを反映したものである．従って，抗ＰＳ抗体を用いた免疫染色を行なうことにより組織内のＰＫＣの活性化部位を可視化できることが分かった．

［謝辞］
ＰＫＣのモノクローン抗体を御供与いただいた神戸大学・医学部　西塚泰美教授，並びにＰＳのモノクローン抗体を御供与いただいた東京大学・薬学部　井上圭三教授に感謝致します．

［文献］

(1) Huang, F. L., Yoshida, Y., Nakabayashi, H., Young, W. S. III, and Huang, K.-P. (1988) J. Neurosci. 8, 4734-4744.
(2) Hashimoto, T., Ase, K., Sawamura, S., Kikkawa, U., Saito, N., Tanaka, C., and Nishizuka, Y. (1988) J. Neurosci. 8, 1678-1683.
(3) Miyazawa, A., Umeda, M., Horikoshi, T., Yanagisawa, K., Yoshioka, T., and Inoue, K. (1988) Molec. Immunol. 25, 1025-1031.
(4) Umeda, M., Igarashi, K., Nam, K. S., and Inoue, K. (1989) J. Immunol. 143, 2273-2279.
(5) Ito, E., Miyazawa, A., Takagi, H., Yoshioka, T., Horikoshi, T., Yanagisawa, K., Nakamura, T., Kudo, Y., Umeda, M., Inoue, K., and Mikoshiba, K. (1991) Neurosci. Res. 11, 179-188.

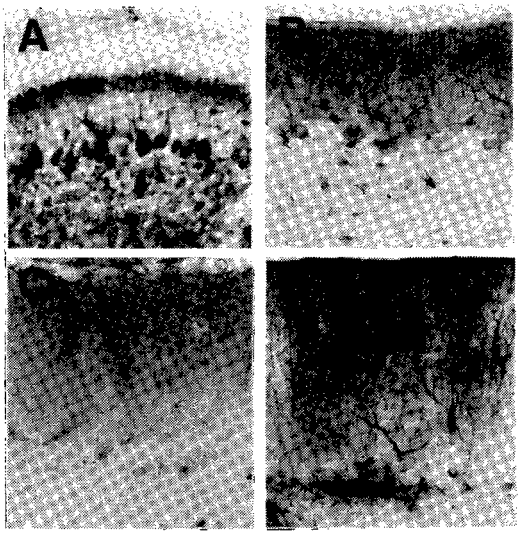


図１：抗ＰＳ抗体による小脳皮質の染色像．
Ａ：生後7日目，Ｂ：14日目，Ｃ：21日目，Ｄ：Adult．

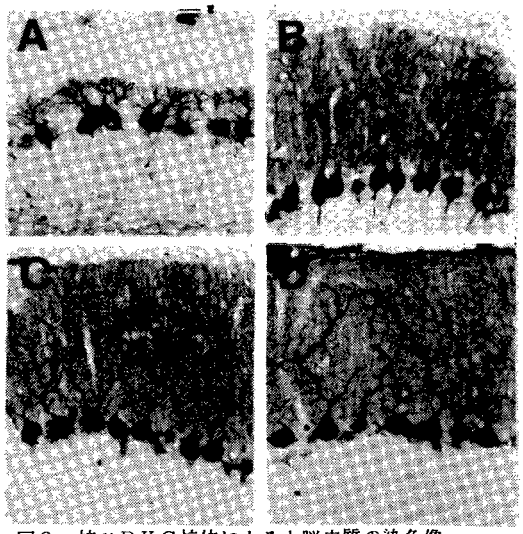


図２：抗γＰＫＣ抗体による小脳皮質の染色像．
Ａ：生後7日目，Ｂ：14日目，Ｃ：21日目，Ｄ：Adult．

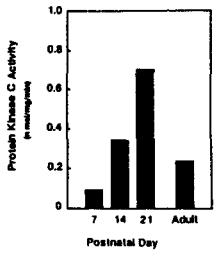


図３：小脳皮質のＰＫＣ活性．

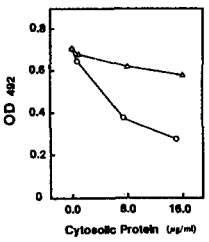


図４：細胞質タンパク質によるＰＳと抗ＰＳ抗体の結合阻害．
（△：生後7日目，○：生後21日目）

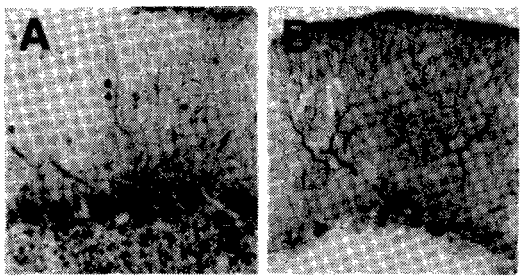


図５：ＰＭＡ処理小脳皮質における抗ＰＳ抗体（Ａ）と抗γＰＫＣ抗体（Ｂ）による染色像．

10 PC12細胞におけるホスホリパーゼDの活性化機構

加納宏行、野沢義則
（岐阜大・医・生化）

〔要約〕

PC12細胞をカルバコール（CCh)あるいは phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)で刺激すると、ホスホリパーゼD(PLD) が活性化された。プロテインキナーゼC (PKC)の阻害剤スタウロスポリンは、PMA による PLD活性化を抑制したが CChによるそれを抑制しなかった。膜透過性 PC12 細胞においては、CCh および guanosine-5'-*O*-(3-thiotriphosphate) (GTPγS)が PLDを活性したが、それらは guanosine-5'-*O*-(2-thiodiphosphate) (GDPβS)により抑制された。また、他のヌクレオチドはPLD を活性化しなかった。 CChによる PLD活性化は、百日咳毒素(PT)処理したPC12細胞でも同様にみられた。また、膜透過性PC12細胞における GTPγS によるPLD の活性化には、Ca^{2+}、Mg^{2+}、およびATP の三者が必要であった。以上のことからムスカリン受容体を介する PLDの活性化には PKCは関与せず、PT非感受性GTP 結合タンパク質（Gタンパク質）を介することが示され、また、GタンパクによるPLD 活性制御にCa^{2+}、Mg^{2+}、およびATP 依存性の何らかの因子が関与する可能性が示唆された。

［目的］

新しい情報変換酵素としてPLD が注目されている。PC12細胞においても、CCh やブラジキニン刺激によるPLD の活性化が報告されているが（1、2）、その活性化機構は明らかでない。これまでの報告から、PLD の活性化機構は細胞の種類により異なることも知られている。そこで、PC12細胞におけるPLD 活性化機構をCCh 刺激の際を中心に検討した。

［方法］

PC12細胞（杉本喜憲博士、理研・筑波ライフサイエンスセンターより分与）は、既報に従って培養した（3）。PLD 活性は、[^{3}H]パルミチン酸(10 μCi/ml)で3時間標識した PC12 細胞を 0.5% エタノール存在下で刺激した際に生成される [^{3}H]ホスファチジルエタノール ([^{3}H]PEt)を TLCで分離、定量することにより行なった。膜透過性細胞は、細胞を 15 μM ジギトニンで 25 ℃、6 分間処理することにより調製した。PTによる ADPリボシル化反応は既報に従って行なった（3）。

［結果］

PC12細胞を CChで刺激すると、濃度依存的に [^{3}H]PEt が産生された。EC_{50}は 2 x 10 $^{-5}$ Mで、 1 x 10 $^{-3}$ Mで [^{3}H]PEt 産生は最大に達し、100 μM アトロピンで完全に抑制された。また、PMA (100 nM)で刺激しても [^{3}H]PEt が産生された。CCh (1 mM)による [^{3}H]PEt 産生は約1分でプラトーに達したのに対し、PMA の場合には 30 - 60分で達した。PLD 活性化に対するPKC の関与を調べるために PKCの阻害剤スタウロスポリンの効果を検討したところ、スタウロスポリン (~5 μM)は PMAによる [^{3}H]PEt 産生を抑制したのに対し、CCh によるそれを抑制しなかった。そこで、Gタンパク質の関与について検討した。膜透過性 PC12 細胞を CChで刺激すると [^{3}H]PEt が産生されたが、これは GDPβS (1 mM)により濃度依存性に抑制された。また、膜透過性細胞では GTPγS (100 μM)によっても [^{3}H]PEt が産生されたが、これも GDPβS (1 mM)で抑制され、他のヌクレオチド (GTP, UTP, CTP)は [^{3}H]PEt を産生しなかった。PT (10-200 ng/ml) で細胞を１５時間処理した後 CChで刺激したところ、未処理細胞と比較して [^{3}H]PEt 産生に影響はなかった。この時、PT処理したPC12細胞膜画分のPT基質は完全にADP-リボシル化されていた。以上の結果から、CCh による PLDの活性化は PKCに非依存性で、PT非感受性Gタンパク質を介していることが示された。

ついで、Gタンパク質による PLD活性調節機構についてさらに検討した。膜透過性 PC12 細胞において、1 mM ATP と 2 mM Mg^{2+}存在下に、Ca^{2+}は濃度依存性に [^{3}H]PEt を産生し、 GTPγS はそれを増強したが、Ca^{2+}が存在しないと GTPγS も無効であった (Fig.1)。 200 nM Ca^{2+}存在下にてMg^{2+}と ATPの影響を検討したところ、Mg^{2+}単独でもある程度の [^{3} H]PEt 産生を認めたものの GTPγS による増強はみられず、Mg^{2+}と ATPの共存下でのみ GTPγS の効果がみられた (Fig.2)。この ATPの効果は ADP以外の他のヌクレオチド (AMP, AMP-PCP, UTP, CTP) ではみられなかった。また、無傷PC12細胞を同じ条件 (1 mM ATP, 1 or 2 mM Mg^{2+}, 200 nM Ca^{2+}, 139 mM potassium glutamate, 20 mM Pipes, pH 6.9) でインキュベートしても [^{3} H]PEt の産生はみられなかった。

[考察]

PC12細胞では、CCh によるPLD の活性化はPKC に非依存性で、PT非感受性Gタンパク質を介していることが示された。また、PMA を用いた実験より、PKC もPLD を活性化することが示された。一方、PC12細胞をCCh 刺激した際、PKC が活性化されることが報告されている（4）。これらの結果から、ひとつの可能性として、PKC のサブタイプとしてPLD 活性化に関与するサブタイプと関与しないサブタイプが存在することが考えられる。つまり、PMA はいずれのサブタイプも活性化し、その結果PLD を活性化するが、CCh はPLD 活性化に関与しないPKC サブタイプだけを活性化するという可能性である。

膜透過性細胞を用いた実験より、GタンパクPLD の活性化にはCa^{2+}、Mg^{2+}、およびATP の三者の存在が必須であることが示された。ATP がMg^{2+}共存下で有効なこと、リン酸供与体となりえない他のヌクレオチドがATP の代用にならないこと、無傷細胞ではATP がPLD を活性化しない、つまり、ATP の作用が受容体を介したものでないことより、ATP がMg^{2+}とともに何らかのリン酸化反応に関与している可能性が示唆される。ADP は細胞内でATP に変換されて作用しているのかもしれない。したがってGタンパク質は、Ca^{2+}および何らかのリン酸化反応を介して、あるいは、それらと協同的にPLD を活性化している可能性が示唆された。

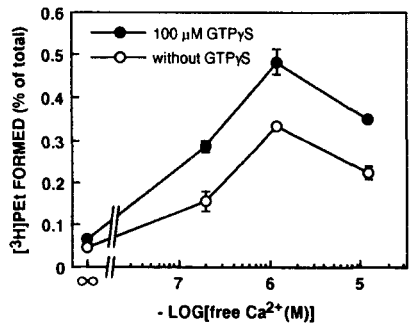


Fig. 1. Ca^{2+}-dependent [^{3}H]PEt formation in the presence or absence of GTPγS in permeabilized PC12 cells. Permeabilized cells were incubated for 30 min at 25°C without (○) or with (●) 100 μM GTPγS in glutamate buffer* containing 0.5% ethanol, 1 mM ATP, 2 mM $Mg^{2+}$and the indicated concentrations of Ca^{2+}.

*Glutamate buffer: 139 mM potassium glutamate and 20 mM Pipes, pH 6.9

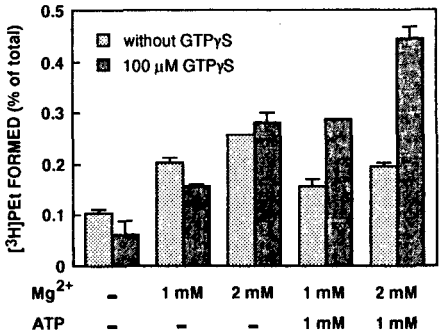


Fig. 2. Effects of $Mg^{2+}$and ATP on [^{3}H]PEt formation in the presence or absence of GTPγS in permeabilized PC12 cells. Permeabilized cells were incubated for 30 min at 25°C without (□) or with (■) 100 μM GTPγS in glutamate buffer* containing 0.5% ethanol, and 200 nM Ca^{2+} in the presence of the indicated concentrations of Mg^{2+} and/or ATP.

[文献]

1. Horwitz, J. (1991) *J. Neurochem.* **56**, 509-517

2. Purkiss, J., Murrin, R. A., Owen, P. J., and Boarder, M. R. (1991) *J. Neurochem.* **57**, 1084-1087

3. Kanoh, H., Kanaho, Y., and Nozawa, Y. (1992) *J. Neurochem.* in press

4. Messing, R. O., Stevens, A. M., Kiyasu, E., and Sneade, A. B. (1989) *J. Neurosci.* **9**, 507-512

11　K-252aによるNGF受容体チロシンキナーゼの特異的阻害

橋本裕子、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]　神経成長因子(NGF)によって開始されるシグナル伝達経路におけるチロシンキナーゼの役割を明らかにする目的で、チロシンキナーゼの阻害剤であるherbimycin AをPC12細胞に投与した。herbimycin AはNGFによる神経突起の伸長を抑制したが、ジブチリルcAMP(Bt_2cAMP)の作用は阻害しなかった。我々は昨年の本大会でNGFおよび上皮増殖因子(EGF)が*ras*p21の活性化を引き起こすことを報告したが、herbimycin AはNGFによる、genisteinはNGFおよびEGFによる*ras*p21の活性化をそれぞれ阻害した。この事実はNGFおよびEGFによる*ras*p21の活性化にはチロシンキナーゼが関与していることを示唆している。一方、PC12細胞のNGFによる神経分化を特異的に抑制することが知られているプロティンキナーゼ阻害剤K-252aはNGFによる*ras*p21の活性化は阻害したが、EGFによる活性化は阻害しなかった。ついで、我々は抗*trk*抗体を用いてNGFが*trk*の産物である分子量140KDaの糖タンパク質($gp140^{trk}$)の自己リン酸化を引き起こすことを明らかにした。興味深いことにK-252aはNGFによる$gp140^{trk}$の自己リン酸化を特異的に阻害した。この結果はK-252aは少なくとも*trk*のチロシンキナーゼを阻害することでPC12細胞に対するNGF特異的な分化抑制作用を引き起こすことを示している。

[目的]　我々は昨年度本大会において、ラット褐色細胞腫由来ＰＣ１２細胞において神経成長因子（ＮＧＦ）および上皮細胞成長因子（ＥＧＦ）がｒａｓ遺伝子産物ｐ２１を活性化すること、さらにプロテインキナーゼ阻害剤Ｋ－２５２ａがＮＧＦによるｒａｓｐ２１の活性化を阻害することを報告した（１、２）。ＮＧＦレセプターを構成する因子であるｔｒｋ遺伝子産物がチロシンキナーゼであることが明らかにされ、ＮＧＦレセプターに起因するキナーゼカスケードの解析はＮＧＦシグナル伝達系を明らかにする上できわめて重要な課題である。そこでＮＧＦ作用に対するチロシンキナーゼ阻害剤の効果を調べるとともにＫ－２５２ａの作用点を明らかにすることを試みた。

[方法] 細胞培養：ＰＣ１２細胞は１０％ウシ胎児血清および５％ウマ血清を含むＤＭＥＭ中で、５％CO_2，３７℃の条件下で培養した。ＮＧＦによる突起伸長は５０ｎｇ／ｍｌのＮＧＦ存在下に２日間培養を行なった後判定した。チロシンリン酸化タンパク質の解析：ＰＣ１２細胞をＮＧＦ（５０ｎｇ／ｍｌ）またはＥＧＦ（２５ｎｇ／ｍｌ）で種々の時間刺激した後、細胞をＰＢＳで洗浄し１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００を含む緩衝液でタンパク質を抽出した。Ｋ－２５２ａ（５０ｎＭ）処理は成長因子添加１５分前より行なった。成長因子レセプターを分析する際は試料を小麦胚芽アグルチニン（ＷＧＡ）アガロースに吸着する画分を用いた。試料をＳＤＳゲル電気泳動により展開した後、抗ホスホチロシン抗体（ＰＹ２０）を用いたウェスタンブロットにより解析した。抗ｔｒｋ抗体：ｔｒｋ遺伝子産物のＣ末端１１残基に相当するオリゴペプチドに対するウサギ抗血清を作成し、抗血清をペプチドを用いたアフィニティカラムで精製した標品を用いた。

[結果・考察]　ＮＧＦによるＰＣ１２細胞の分化誘導に対するチロシンキナーゼ阻害剤の効果を調べたところｈｅｒｂｉｍｙｃｉｎ　Ａ（０．５μｇ／ｍｌ）が突起伸長を完全に抑制することが判明した。このときBt_2cAMPによる突起伸長には効果を示さなかった。またＮＧＦによるｒａｓｐ２１の活性化におよぼす影響を調べたところ、ｈｅｒｂｉｍｙｃｉｎ　Ａおよびｇｅｎｉｓｔｅｉｎが完全に抑制することが明らかとなり、ｒａｓｐ２１の活性化にチロシンキナーゼ活性が関与することが示唆された（図１）。

Ｋ－２５２ａはＰＣ１２細胞においてＮＧＦ作用のみを抑制しＥＧＦの効果は阻害しないことが示されている。そこでＫ－２５２ａの作用点を明らかにすることを試みた。ＰＣ１２細胞中で活性型ｒａｓ遺伝子の発現により突起伸長が誘導されることが示されているが、Ｋ－２５２ａはこの系には効果を示さなかった。昨年我々が報告した、ＮＧＦによるｒａｓｐ２１の活性化がＫ－２５２ａにより抑制されるという知見と併せて考えると、Ｋ－２５２ａの作用点はＮＧＦレセプターからｒａｓｐ２１までの間に限局される。そこで、ＮＧＦレセプターおよびＥＧＦレセプターの自己チロシンリン酸化に対するＫ－２５２ａの効果を調べた。

ＰＣ１２細胞をＮＧＦおよびＥＧＦで刺激後、抽出液のＷＧＡ吸着画分をホスホチロシン抗体を用いたウェスタンブロットにより解析したところ、１４０ｋＤａおよび１９０ｋＤａの糖タンパク質のチロシンリン酸化がみられ、それぞ

れＮＧＦレセプターおよびＥＧＦレセプターと考えられた。１４０ｋＤａのチロシンリン酸化糖タンパク質は抗ｔｒｋ抗体により特異的に免疫沈降されたことからｔｒｋ遺伝子産物（ｇｐ１４０^{trk}）であることが確認された（図２ａ）。ついでＫ－２５２ａにより細胞を前処理したところｇｐ１４０^{trk}のチロシンリン酸化が完全に抑制されたのに対し、ＥＧＦレセプターに対しては効果を示さなかった（図２ｂ）。したがって、ＮＧＦ作用の特異的阻害剤であるＫ－２５２ａの作用点はＮＧＦレセプターの構成因子であるｇｐ１４０^{trk}そのものであると考えられた。現在ＮＧＦシグナル伝達系を構成すると考えられる因子のチロシンリン酸化について解析中である。

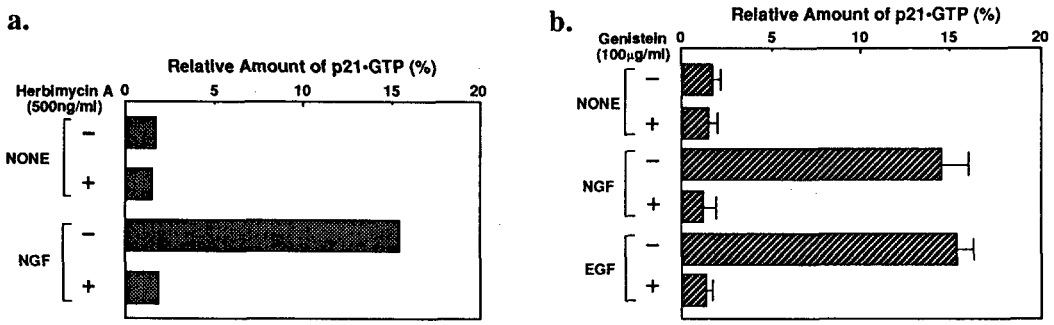


図１．NGF, EGFによる*ras* p21の活性化に対するチロシンキナーゼ阻害剤の効果。
［方法］の項で述べたように、*ras* p21に結合したヌクレオチド量をチロシンキナーゼ阻害剤の有無で計測した。
a. herbimycin A (0.5 μg/ml)の効果。
b. genistein (100 μg/ml)の効果。

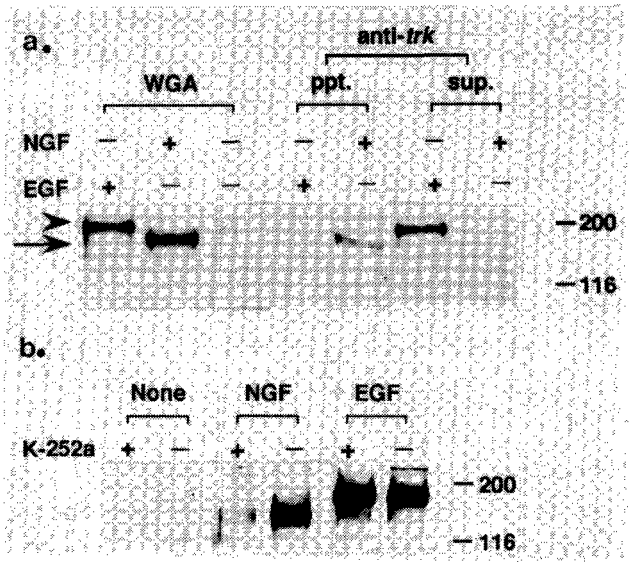


図２．(a) PC12細胞をNGFまたはEGFで５分間刺激後、WGAを用いて糖タンパク質分画を調製し、ついでそれぞれの糖タンパク質分画をを抗*trk*抗体によって免疫沈降した。免疫沈降物およびその上清を電気泳動した後、抗ホスホチロシン抗体によるウェスタンブロッティングによってチロシンリン酸化タンパク質を観察した。➤はEGF受容体を➔はgp140^{trk}を示している。
(b) PC12細胞をK-252aにより１５分間前処理し、NGF、EGFを添加してから５分後のチロシンリン酸化タンパク質を解析した。

［文献］
1.室屋賢康、服部成介、中村俊. (1991) 神経化学 30, 42-43.
2. K. Muroya, S. Hattori & S. Nakamura. (1992) *Oncogene* 7, 277-281.

12 ラット培養アストロサイトにおけるグルタミン酸によるアデニル酸シクラーゼの抑制

佐賀 寛，橋本 均，馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

〔要約〕

ラット大脳皮質初代培養アストロサイトにおいて、βアドレナリン受容体刺激およびフォルスコリンによるアデニル酸シクラーゼ活性化によるcAMP産生をグルタミン酸は抑制した。これらの作用は、アストロサイトを百日咳毒素(IAP)で前処置することによって有意に減弱された。グルタミン酸受容体アゴニストのうち、キスカル酸，1-Aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylate(tACPD)はcAMP産生抑制作用を示し、これらの作用はホスファチジルイノシトール(PI)代謝回転亢進の作用と関連していなかった。以上より、アストロサイトにはIAP感受性G蛋白を介して直接アデニル酸シクラーゼを抑制する、tACPDに感受性のグルタミン酸受容体が存在していることが示唆された。

【目的】

グルタミン酸は中枢神経系の主要な神経伝達物質であり、記憶や学習といった脳の高次機能や、脳障害時の神経細胞壊死に関与していると考えられているが、これらの機構の詳細についてはまだ不明な点も多い。グルタミン酸の受容体は、イオンチャンネル型の受容体とPI代謝回転に共役した代謝調節型受容体があることが明らかとなっているが(1)、cAMP情報伝達系については脳スライスでcAMP量を上昇させることが知られているが、受容体の関与は明確でない(2)。

グルタミン酸受容体はグリア細胞のひとつであるアストロサイトにも存在することが示されており(3,4)、グルタミン酸のターゲット細胞としてアストロサイトの生理的役割の重要性が注目されている。そこで今回我々は、グルタミン酸の培養アストロサイトcAMP産生系に対する作用を検討した。

【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10-20日培養後、二次培養して10-20日たってconfluentになった細胞を実験に用いた。本培養条件で得られた細胞は、90%以上がGFAP陽性であった。反応は、培地を除去しKrebs-Ringer(KR)液で20分プレインキュベート後、3-イソブチル-1-メチルキサンチン(IBMX)1mMを含むKR液で5分間、更に薬物を添加し10分間処置した。反応の停止は氷冷トリクロロ酢酸(TCA)の添加で行ない、上清をエーテル抽出によってTCAを除去したのちラジオイムノアッセイによってcAMPを定量した。

【結果】

グルタミン酸処置によって培養アストロサイトcAMP量は、脳切片で報告されているような増加(2)を示さず、むしろ抑制傾向を示した。βアドレナリン受容体のアゴニストであるイソプロテレノール(Iso)10μMの刺激によるcAMPの産生を、グルタミン酸は濃度依存的に抑制した(図１)。この抑制のIC_{50}値は約7μMであり、Isoによる cAMP産生のEC_{50}値には変化を起こさずefficacyのみを減少させるものであった。反応時間15分までの各時間でグルタミン酸による抑制の割合は一定であった。フォルスコリンでのアデニル酸シクラーゼの直接の活性化によるcAMPの産生に対してもグルタミン酸は抑制作用を示した。アストロサイトをあらかじめIAP100ng/mlで培地中6時間前処置すると、グルタミン酸によるcAMPの産生の抑制作用が部分的ではあるが回復した(図２)。IBMXを含まないKR液中で反応を行なってもグルタミン酸は同様の抑制を示した。

グルタミン酸受容体の選択的アゴニストのうち、NMDA,カイニン酸,AMPAでは著明な作用は見られなかったが、キスカル酸,tACPDは抑制作用を示した。抑制作用を示す３つの薬物のうち最もpotencyの高いものはグルタミン酸であり、キスカル酸とtACPDは同程度であった(図１)。すなわちcAMP産生系のグルタミン酸受容体アゴニストの感受性は、PI代謝回転を活性化するそれらの感受性(4)とは異なるものである。またPI代謝回転は外液Ca^{2+}イオンに依存性(4)であるが、グルタミン酸によるcAMP産生の抑制作用は外液Ca^{2+}除去の条件下でも正常時と同様に起こった。Phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA,100nM)との同時添加によりIsoのcAMP産生が増強された。

図１．イソプロテレノールによるcAMP産生に対するグルタミン酸アナログの抑制作用

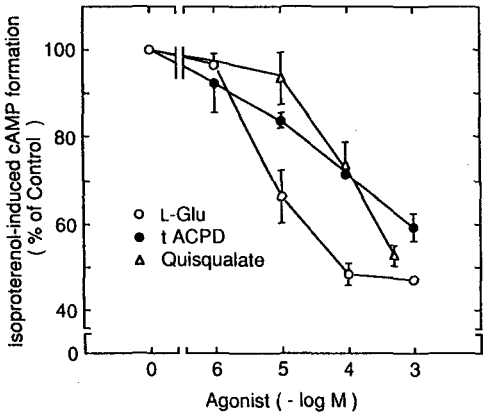
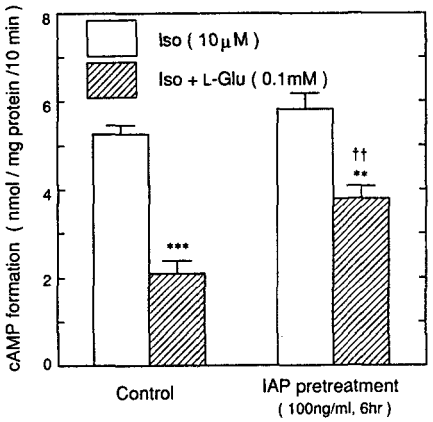


図２．グルタミン酸による抑制に対する百日咳毒素(IAP)前処置の効果



** p<0.01, *** p<0.001 Isoとの比較

++ p<0.01 Controlとの比較

【考察】

ラット培養アストロサイトにおいて、グルタミン酸がcAMP産生系を抑制することが明らかとなり、IAP感受性G蛋白がこの現象に関与していることが示唆された。同様な作用はtACPDでも認められたが、次に示すような成績からPI代謝回転-PKC系の活性化による二次的な作用であるとは考えにくい。1) グルタミン酸受容体アゴニストのcAMP産生系に対する作用強度がPI代謝系に対するそれと異なっていた。2)グルタミン酸受容体アゴニストのcAMP産生系とPI代謝系に対する作用が外液Ca^{2+}依存性並びにPMA感受性の点で異なっていた。従ってグルタミン酸によるcAMP産生抑制作用は、tACPD感受性グルタミン酸受容体を介したアデニル酸シクラーゼの抑制によるものであると考えられる。最近代謝調節型のグルタミン酸受容体にアデニル酸シクラーゼと抑制的にカップルしたタイプのものがあることが報告されており(5)、我々の結果はアストロサイトにもこのタイプの受容体が存在しているということを示唆するものである。

【文献】

1)Barnes,J. and Henly,J.M., (1992) Prog.Neurobiol., 39, 113-133

2)Baba,A.,et al. (1988) J.Pharmacol.Exp.Ther., 245, 299-304

3)Backus,K.H.,et al.(1989) J.Neurosci.Res., 22, 274-282

4)Milani,D., et al. (1989) Glia, 2, 161-169

5)Tanabe,Y., et al. (1992) Neuron, 8, 169-179

13 ウシ網膜2次ニューロンに存在するグルタミン酸受容体と連関するGTP結合蛋白質の検索

吉川知志、津田基之
(姫路工大・理・生命科学)

〔要約〕

桿体外節を除去したウシ剥離網膜膜画分を百日咳毒素と放射標識NADによりADPリボシル化を行った後、SDS-PAGE、オートラジオグラフィーを行ったところ、39～40KDaに放射標識されたバンドが見られた。Mg^{2+} 存在下にL-グルタミン酸またはそのアナログであるAPB（2-アミノ-4-ホスホノ酪酸）を加えることにより、このADPリボシル化が部分的に抑制された。また、膜標品に対するGTPγSの結合量が、APBを共存させることにより増加した。これらの結果は、GTP結合蛋白質と連関するグルタミン酸受容体が網膜膜画分に存在すること、および受容体と連関しているGTP結合蛋白質は百日咳毒素感受性であることを示唆している。

〔目的〕

視細胞の光応答は化学シナプスを介して第2次ニューロンである水平細胞や双極細胞に伝達される。現在、視細胞の神経伝達物質としてはL-グルタミン酸が第1候補に挙げられている。網膜にL-グルタミン酸を投与すると水平細胞および双極細胞は応答するが、水平細胞およびオフ型双極細胞のそれは脱分極性であるのに対しオン型双極細胞は過分極性の応答を示すことから、両者の応答における分子機構は異なっていると考えられている[1)]。特に、後者におけるグルタミン酸の作用はcGMP作動性のイオンチャネルを介することが示されており、GTP結合蛋白質、ホスホジエステラーゼを介する視細胞の光応答に類似の機構が存在する可能性がある[2)]。そこで我々は、ウシ網膜2次ニューロンに存在するGTP結合蛋白質を検索し、それらのグルタミン酸受容体との連関の可能性について検討した。

〔方法〕

1．網膜膜標品の調整

暗所保存しておいたウシ剥離網膜を39%ショ糖を含む緩衝液中で激しく撹拌した後、22,000 x gで25分間遠心分離を2回繰り返し上清中に含まれる桿体外節を除去し、得られた膜画分を1 mM EDTA、1 mM DTT、50 μM 4-amidino-PMSFを含む10 mM MOPS溶液（pH 7.4）で2回洗浄し、膜標品とした。

2．百日咳毒素によるADPリボシル化

膜標品を放射標識した2 μM NADを含むTris緩衝液（pH 7.5）中に懸濁し、終濃度1~5 μg/mlの百日咳毒素を添加して30℃でインキュベートした。等量のsample bufferを加えて反応を停止した後、10%ポリアクリルアミドゲルにてSDS-PAGEを行い、放射標識されたバンドをオートラジオグラフィーによって検出した。また、バンドに取り込まれた放射活性をFuji Image analyzer BAS2000を用いて定量した。反応溶液に1~5 mMの各種グルタミン酸受容体リガンドを添加し、その効果を比較した。

3．GTPγS結合量の測定

膜標品を0.1 mM EDTA、0.2 mM $MgSO_4$を含む20 mM MOPS溶液（pH 7.4）中に懸濁し、放射標識した

0.1~1 μM ＧＴＰγＳを添加して３０℃でインキュベートした。１００倍量の氷冷Tris緩衝液（pH 8.0）を加えて反応を停止した後、ニトロセルロースフィルターを用いて吸引濾過し、フィルター上の放射活性を測定した。反応溶液に1~5 mMの各種グルタミン酸受容体リガンドを添加し、その効果を比較した。

〔結果および考察〕

百日咳毒素によるＡＤＰリボシル化に対して、L-グルタミン酸およびそのアナログであるＡＰＢ（２－アミノ－４－ホスホノ酪酸）はこれを部分的に抑制した（図１）。これは受容体刺激を介して共役するＧ蛋白質が活性化され、百日咳毒素の基質とならなくなったものと考えられる。この抑制効果の発現には1 mMという高濃度のリガンドが必要であった。より強い抑制効果を示したＡＰＢは、オン型双極細胞タイプのグルタミン酸受容体に特異性が高いという報告があり[3]、ＡＤＰリボシル化に対する抑制効果もこのタイプの受容体と共役するＧ蛋白質への直接の活性化作用によるものと考えられる。さらに、ＡＰＢは膜標品に対するＧＴＰγＳの結合を促進した（図２）。L-グルタミン酸は非常に弱い活性化効果しか示さなかった。また、L-アスパラギン酸およびカイニン酸は無効であった。このＡＰＢの促進効果は約２５％程度であったが、これは膜標品には多種のＧ蛋白質が存在しており、その一部のみが活性化される為と考えられる。

これらの結果より、ＧＴＰ結合蛋白質と連関するグルタミン酸受容体が網膜膜画分に存在すること、および受容体と連関しているＧＴＰ結合蛋白質は百日咳毒素感受性である可能性が示された。現在は、このＧ蛋白質の同定ならびに単離精製を試みている。

図１

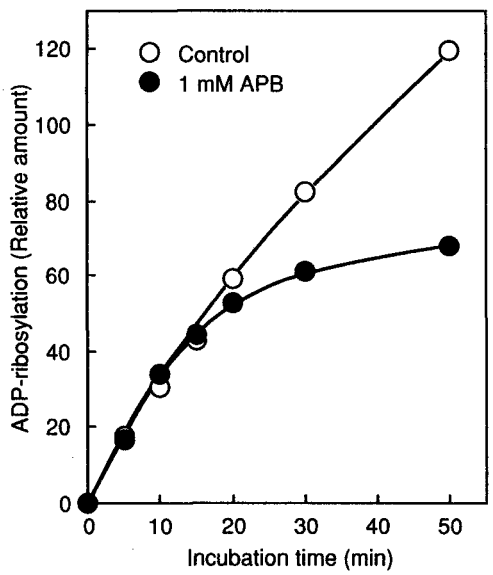
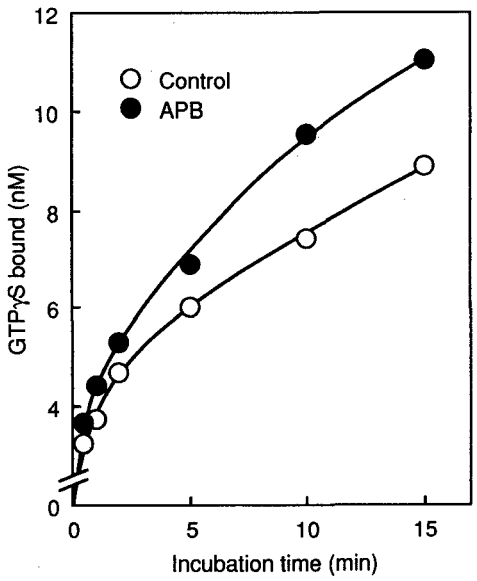


図２



〔文献〕

1）Kaneko, A. and Shimazaki, H. (1976) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 40, 537-546

2）Nawy, S. and Jahr, C. E. (1990) *Nature* 346, 269-271

3）Slaughter, M. M. and Miller, R. F. (1981) *Science* 211, 182-185

14 低分子量G蛋白質、smg/rab3A p25、の標的蛋白質の同定と精製

［著者］ 和田謙、貝淵弘三、白瀧博通、山口務、堀内久徳、高井義美
［所属］ （神戸大・医・第一生化）

［要約］

smg/rab3A p25がシナプスからの神経伝達物質の放出を制御していることが明らかになりつつある。そこで、今回、私共はsmg p25Aの作用機構を明らかにする目的でsmg p25Aの標的蛋白質の同定を試みた。^{125}Iで標識したGTPγS結合型smg p25Aをウシ大脳膜と架橋させたところ、smg p25Aと特異的に架橋される蛋白質が同定された。この蛋白質を各種のカラムクロマトグラフィーとショ糖密度勾配遠心法により高度に精製した。この蛋白質はGTPγS結合型smg p25Aとは結合したが、GDP結合型smg p25Aとはほとんど結合しなかった。したがって、この蛋白質はsmg p25Aの標的蛋白質であると考えられた。

［緒言］

最近、神経伝達物質の放出などの分泌反応の制御に低分子量G蛋白質が関与していることが明らかになっている(1,4)。私共が見出したsmg p25Aは、シナプス内でシナプス小胞や前シナプス膜に局在することから、神経伝達物質の放出反応の制御に関与していると考えられる(3)。一方、smg p25AにはGDP結合型の不活性型とGTP結合型の活性型が存在し、GDP/GTP交換反応抑制蛋白質(smg p25 GDI)によって活性制御を受けている。通常、smg p25AはGDP結合型でsmg p25 GDIと複合体を形成して細胞質に存在しているが、何らかの刺激でsmg p25AがsmgからGDIから解離すると、smg p25AがGTP結合型に転換される。そして、GTP結合型のsmg p25Aが標的蛋白質に結合して生理活性を示すと考えられる。そこで、私共は神経伝達物質の放出反応におけるsmg p25Aの作用機構を明らかにする目的で、今回、smg p25Aの標的蛋白質をウシ大脳より高度に精製してその性状を解析した。

［実験方法］

ウシ大脳膜を１％コール酸で可溶化しその１０万×ｇ上清をコール酸可溶性画分とした。大腸菌で発現させたsmg p25Aを精製し、GTPγS結合型に変換後^{125}I-Bolton Hunter reagentにて標識し(2)、disuccinimidyl suberate (DSS)存在下で各フラクションと３０℃、３０分間インキュベートさせ、SDS-PAGE後 autoradiographyを行なった。rab11 p24は大腸菌で発現させて精製した。

［結果］

smg p25A標的蛋白質の精製

ウシ大脳膜コール酸可溶性画分を^{125}I-標識smg p25AとDSSで化学架橋させたところ、分子量１１万付近にbandが出現した。このbandは、大量の非標識GTPγS結合型smg p25Aを共存させると消失し、smg p25Aとの特異的結合によるものであった。ウシ大脳膜コール酸可溶性画分を、HiLoad 26/10 Q Sepharose HPでカラムクロマトグラフィーを行なったところ、図１に示すようにsmg p25Aと結合する蛋白質は１つのピークとして同定された。このピークをMono Q HR 10/10、 hydroxyapatite、ショ糖密度勾配遠心法にて精製を進めたところ１１万の特異band出現のピークと一致してSDS-PAGE上で分子量約８．５万の蛋白質が同定された。smg p25Aの分子量は約２．４万であることからこの分子量約８．５万の蛋白質がsmg p25Aと特異的に結合する標的蛋白質と考えられた。以後、このピークをsmg p25A標的蛋白質と呼び以下のようにその性状の解析を行なった。

smg p25A標的蛋白質の性状

図２Ａに示すように、１１万のbandはDSS存在下でのみ出現した。結合阻害実験を行なったところ、図２Ｂに示すように非標識GTPγS結合型smg p25Aによって用量依存性に結合が阻害され、IC_{50}は8nMであった。非標識GDP結合型smg p25Aでは阻害は弱く、IC_{50}は70nMであった。一方、同じrabファミリーに属する低分子量G蛋白質rab11 p24では全く阻害されなかった。なお、smg p25A標的蛋白質にはGDP/GTP交換反応調節活性は認められなかった。

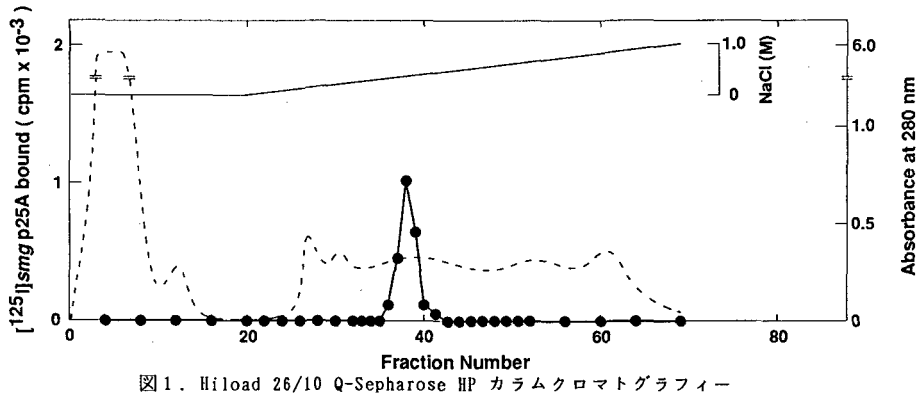


図1．Hiload 26/10 Q-Sepharose HP カラムクロマトグラフィー

●—● ： 11万bandの放射活性

····· ： OD_{280}

— ： NaCl濃度

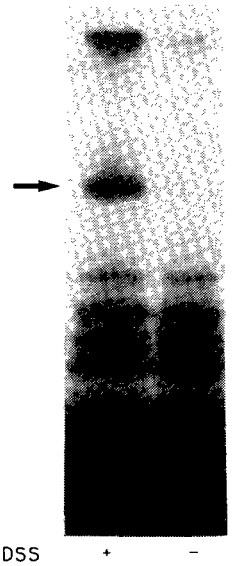


図2 A．smg p25Aとsmg p25A標的蛋白質のクロスリンク

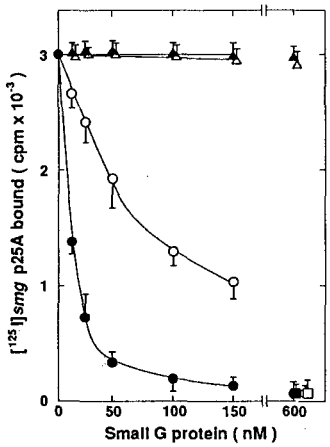


図2 B．非標識低分子量G蛋白質による結合阻害

●：非標識GTPγS結合型smg p25A

○：非標識GDP結合型smg p25A

▲：非標識GTPγS結合型rab11 p24

△：非標識GDP結合型rab11 p24

[考察]

今回、私共はウシ大脳膜より分子量約8．5万のsmg p25A標的蛋白質を高度に精製した。この蛋白質は、（1）GTP結合型smg p25Aと特異的に結合しGDP結合型smg p25Aとはほとんど結合しなかった。（2）rab11 p24とは全く結合しなかった。（3）GDP/GTP交換反応調節活性がなかった。これらの実験結果から、私共はこの分子量約8．5万の蛋白質がsmg p25Aと特異的に結合し、シナプスからの神経伝達物質の放出反応を制御しているsmg p25A標的蛋白質であると考えている。

[文献]

1. Balch, W. B. (1990) Trends Biochem. Sci. 15, 473-477

2. Bolton, A. E., and Hunter, W. M. (1973) Biochem. J. 133, 529-539

3. Mizoguchi, A., Kim, S., Ueda, T., Kikuchi, A., Yorifuji, H., Hirokawa, N., and Takai, Y. (1990) J. Biol. Chem. 265, 11872-11879

4. Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., and Kawata, M. (1992) Int. Rev. Cytol. 133, 187-230

15 肝臓に存在する９４K ＭＥＫＡ様蛋白質は大脳Ｇ蛋白質βγサブユニットと相互作用する

郭　哲輝、相馬　仁*、三木直正

（阪大・医・第一薬理、札幌医大・生化*）

〔要約〕

MEKA蛋白質がトランスデューシン（Ｔ）βγサブユニットと複合体を形成することから網膜以外の組織におけるMEKA様蛋白質の存在を検討した。ウシ肝臓cDNAライブラリーより単離したcDNAクローンの塩基配列は、網膜MEKA cDNA のそれと一致していた。更に、total RNA を用いたPCR の実験からも肝臓や大脳皮質にMEKA様mRNAが存在することが明らかとなった。抗MEKA血清を用いたwestern blotより肝臓、大脳皮質可溶性画分にもMEKA様蛋白質が発現していることが明らかとなった。肝臓から３種類のMEKA様蛋白質を精製し、これら蛋白質と脳Ｇｏα、Ｇｏβγとの再構成実験を行った。ＧｏαへのGTP 結合はＧｏβγにより促進されるが、94 K MEKA 蛋白質はこの促進効果を阻害した。これらの結果は、肝臓にもMEKA様蛋白質が存在すること、そのなかの94K MEKA蛋白質は脳Ｇ蛋白質βγサブユニットと相互作用することを示唆する。

プラスーマイナス法で種々の網膜特異的cDNAクローンを単離してきた(1) が，その中のMEKA cDNA は分子量約32 KDaの酸性可溶性蛋白質をコードしている(2) 。 MEKA蛋白質は、cyclic nucleotide-dependent protein kinaseの基質となり得るリン酸化蛋白質(2,3) で、光刺激により脱リン酸化される(4) 。本蛋白質の精製からＴβγと複合体を形成していること(3,5,6) などを明らかにした。Ｇ蛋白質が多くのファミリーより構成されていること、MEKA蛋白質がＴβγと結合することなどから網膜以外の組織におけるMEKA、或はMEKA様蛋白質の存在を検討した。

［方法］

1) cDNAクローニング ： ウシ肝臓λgt10 cDNA ライブラリーより網膜MEKA cDNA をプローブとし、ハイブリダイズするクローンの単離と塩基配列を決定した。

2) MEKA mRNA の検出 ： 網膜 MEKA cDNAに対応する合成プライマーを作製し、ウシ網膜、肝臓、大脳皮質の total RNA とのPCR を行った。合成されたDNA 及びその制限酵素処理したDNA 断片をアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

3) ウシ肝臓可溶性画分に存在するMEKA様蛋白質の精製 ： 種々のカラムクロマトグラフィーを行い３種類のMEKA様蛋白質を部分精製した。PVDFフィルターにブロットしたMEKA様蛋白質を、抗ウシ網膜MEKA血清と反応させ検出した。

4) Ｇｏα、Ｇｏβγ及びMEKA様蛋白質の再構成実験 ： ウシ脳より精製したＧｏα、ＧｏβγＩ或はＧｏβγII(7) を用い、[^{35}S] GTP-γＳ結合に対する精製MEKA様蛋白質の効果を調べた。反応組成は、25mM Hepes (pH 7.6), 100mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 1mM chaps, 0.1mg/ml ovalbumin, 20nM ＧｏαとＧｏβγ、100 nM [^{35}S] GTP 及び50nM MEKA 様蛋白質よりなり、30℃で結合実験を行った。

［結果及び考察］

網膜MEKA cDNA をプローブとし、肝臓 cDNA ライブラリーより単離したcDNAの塩基配列は、網膜のそれと一致してした。網膜、肝臓、大脳皮質 total RNA を用いたPCR の実験からもMEKA様mRNAの存在を確認した。肝臓可溶性蛋白質をDEAE-cellulofine クロマトグラフィーで分画し、そのwestern blot（図 １）の解析から肝臓には抗MEKAと反応する35 KDa（２種類よりなる）及び94 KDaの MEKA 様蛋白質が存在することが明らかとなった。また、大脳皮質可溶性画分にもMEKA様蛋白質が存在した。

肝臓に存在する３種類のMEKA様蛋白質を種々のカラムクロマトグラフィーで精製し、これら蛋白質の生理活性を脳より精製したＧｏαとＧｏβγＩ或はＧｏβγIIを用いて検討した（図 ２）。ＧｏαへのGTP 結合（○－○）は、Ｇｏβγにより促進（●－●）されるが、94 K MEKA 蛋白質の存在下（▲－▲）では著明に阻害された。この阻害は、用量依存性を示し、Ｇｏβγと等モル比で最大効果を示した。一方、94 K MEKA はＧｏαへのGTP 結合に影響を与えなかった（△－△）。他方、２種類の35 K MEKA は、これら再構成系には影響しなかった。以上の結果から、網膜以外の肝臓などの組織にもMEKA様蛋白質が存在すること、本蛋白質のＧ蛋白質βγ

サブユニットとの相互作用により“情報－変換機構”が調節されている可能性が考えられる。

［謝辞］
本研究の一部は札幌医科大　秋野豊明教授ら、京大理学部　深田吉孝博士らとの共同研究である。また、東大脳研　芳賀達也教授のご協力に謝意を表します。

［文献］

1. C.-H. Kuo, et al. (1986), Mol. Brain Res., 1, 251-260.
2. C.-H. Kuo, et al. (1989), Mol. Brain Res., 6, 1-10.
3. C.-H. Kuo, et al. (1989), Biochem. Biophys. Res. Comm., 50, 139-141.
4. R.H. Lee, et al. (1984), Biochemistry, 23, 1972-1977.
5. R.H. Lee, et al., (1987), Biochemistry, 28, 3983-3990.
6. J.A.Reig, et al., (1990), J. Biol. Chem., 265, 5816-5824.
7. H.Sohma, et al.(1992), Biochem.Biophys. Res. Comm., 184,175-182.

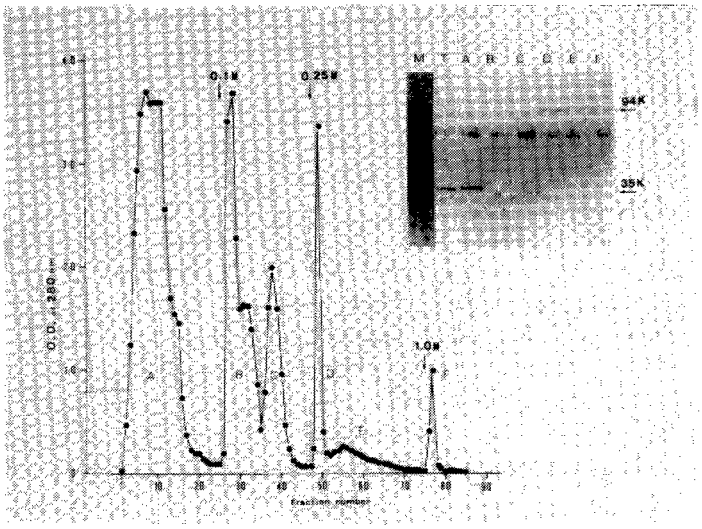


図　1　ウシ肝臓可溶性蛋白質のDEAE-cellulofine カラムクロマトグラフィーとwestern blot
ウシ肝臓を30mM Tris-HCl (pH 7.7), 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTA 0.1mM DTT, 0.2mM PMSF でホモゲナイズしその可溶性蛋白質(T)をDEAEカラムで溶出、分画（A－F）した。分画中のMEKA様蛋白質は、抗MEKAを用いたwestern blotで検出した。

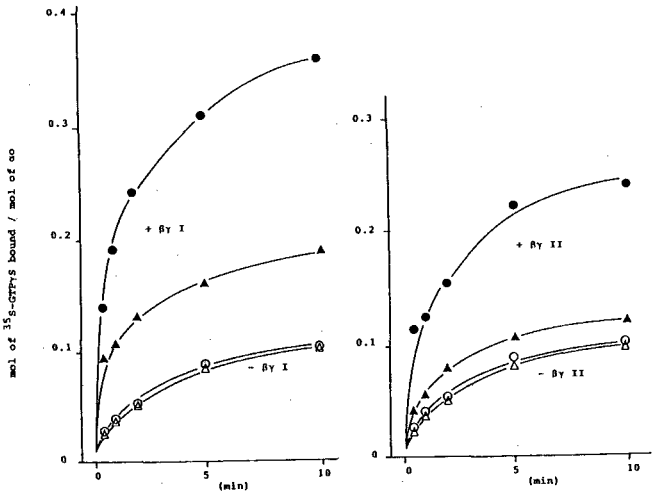


図　2　肝臓94K MEKA様蛋白質と脳Ｇｏα、ＧｏβγＩ、ＧｏβγIIとの再構成実験
脳より精製したＧｏα、ＧｏβγＩ、ＧｏβγIIを用いαサブユニットへの［^{35}S］GTP 結合を30℃下で行ない測定した。
○－○：　Ｇｏα，　△－△：　Ｇｏα＋94K MEKA
●－●：　Ｇｏα＋ＧｏβγＩ（ＧｏβγII）
▲－▲：　Ｇｏα＋ＧｏβγＩ（ＧｏβγII）＋94K MEKA

16 ウシ脳コート小胞で見られるＡＤＰ－リボシル化反応

諸井佳代子、門田健＊、木村定雄
（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についてＡＤＰ－リボシル化反応の有無、および性質について検討を加えた。(1)コート小胞を(^{32}P)ＮＡＤとインキュベート後、10％ＴＣＡで沈澱させたものをＳＤＳ－ポリアクリルアミド電気泳動したところ、150k-180kDa（クラスリン重鎖）、92k-105kDa（アセンブリ蛋白）、52k-54kDa（αチュブリン）の蛋白bandが強く標識され、さらに32k-36kDa（クラスリン軽鎖）のbandも標識された。(2)これらの標識は反応液中のコート小胞の量およびインキュベーション時間の増加に応じて増加した。(3)この反応はイソニコチン酸ヒドラジド、3-アミノベンツアミドによって阻害された。(4)標識後、蛇毒phosphodiesteraseによる消化を行ったところ、コート小胞でみられた標識は消失した。これらの結果はコート小胞の構成ポリペプタイドが内在性にＡＤＰ－リボシル化されることを示している。

ＡＤＰ－リボシル化反応にはmono-およびpoly-ＡＤＰリボシル化反応が存在する。mono-ＡＤＰ－リボシル化反応は主として細胞膜または細胞質でみられ、細胞質膜における情報伝達系の調節機構として働いている。ＧＴＰ結合蛋白質（Ｇ蛋白質）がコレラ毒素や百日咳毒素によりＡＤＰ－リボシル化され、受容体－効果器間の伝達が修飾されていることは良く知られている。poly-ＡＤＰ－リボシル化反応は細胞核において主として見られ、核内のクロマチン構造蛋白質（ヒストン等）のＡＤＰ－リボシル化によってＤＮＡの転写、複製、修復の調節がされている（1）。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、この小胞の機能としては、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受容体介在endocytosisが示されている(2)。このendocytosisにＧ蛋白質が関与することが示され（3）、また分離精製されたコート小胞に三量体および低分子のＧ蛋白質が存在することが示されている（4、5）。今回このコート小胞の構成ポリペプタイドが内因性にＡＤＰ－リボシル化される結果を得たのでその特性について報告する。

［実験方法］

コート小胞標品：ウシ大脳皮質から、前回と同様(4) 30-50%の連続蔗糖密度勾配さらに5-30%の連続蔗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で調べ95-98％と算出された。蛋白量はLowry法で測定した。さらにコート小胞を0.5M トリス塩酸緩衝液（pH, 8.0)で処理し外側のコートと内側のコア（脱コート小胞）に分離した。コート小胞の主成分であるクラスリン重鎖は Sepharose CL-4Bと Ultrogel AcA 34によるゲル濾過でコート分画より精製された。

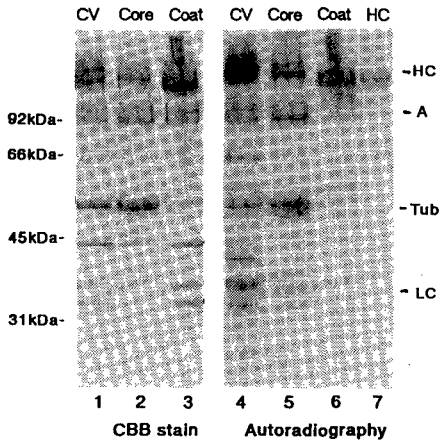
ＡＤＰ－リボシル化反応：80-100μg 蛋白量のコート小胞標品を10mM チミジン、1mM ＤＴＴ、1mM ＥＤＴＡ、2.5mM $MgCl_2$を含む100mM トリス塩酸緩衝液（pH, 7.5)中、25μM (^{32}P)ＮＡＤ(4μCi)と３７℃，６０分インキュベートした。反応は10％ＴＣＡを加えて停止し、沈査をＳＤＳを含む緩衝液で溶解し、ＳＤＳ－ポリアクリルアミド電気泳動、ついでオートラジオグラフィーを行った。標識bandの放射活性はフジイメージアナライザーで定量し、その値はphoto stimulated luminescence (PSL)で表した。阻害剤等の薬物は(^{32}P)ＮＡＤと同時にインキュベーション液に加えて反応を行った。蛇毒phosphodiesteraseによる消化の場合、上記に従いコート小胞を(^{32}P)ＮＡＤと反応させた後、反応を10％ＴＣＡで停止させた。沈査を10％ＴＣＡで４回、さらにエタノールで洗浄後、希アルカリ液で溶かし塩酸で中和後、100mM トリス塩酸緩衝液（pH, 8.9）中、酵素(3U/tube)と３７℃、２時間反応させた。反応はＴＣＡを加えて停止、沈査をもちいて電気泳動、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)ＮＡＤ存在下、コート小胞の150k-180kDa、92k-105kDa、70kDa、52k-54kDaの蛋白bandが強く標識された。また32k-36kDaのbandも標識された（Fig.1, lane 4)。150k-180kDa及び32k-36kDaのbandはコートの構成蛋白成分であるクラスリンの重鎖(HC)および軽鎖(LC)に、92k-105kDaのbandはコート小胞の形成に関与するアセンブリ蛋白（アダプチン:A）と、52k-54kDaのbandはチュブリン(Tub)のそれと一致した（Fig.1, lane

1 and 4)。コート小胞を0.5M トリス塩酸緩衝液で処置することで得られるコート画分でも150k-180kDa、92k-105kDaのbandが標識されたが、32k-36kDaの標識は弱かった（Fig. 1, lane 6)。精製クラスリン重鎖でも標識が見られた（Fig. 1, lane 7)。さらに図２に示すように、これらのbandの標識は反応液中のコート小胞量に依存して増加した。またインキュベーション時間の増加とともにクラスリン重鎖(HC)の標識は増加したが、チュブリン(Tub)やクラスリン軽鎖(LC)の標識は３０分で飽和に達した。0°Cでのインキュベーションでは標識bandは観察されなかった。これらのbandの標識は10mM のイソニコチン酸ヒドラジドや3-アミノベンズアミドで強く阻害されたが、ＮＡＤやＡＤＰ－リボースによる阻害は弱かった。蛇毒phosphodiesteraseによる消化によりコート小胞で見られた(^{32}P)標識体は、コート小胞、コア分画、コート分画のいずれを用いた場合でも消失した（Fig. 3)。これらの結果はコート小胞を構成しているポリペプタイドが(^{32}P)ＮＡＤ存在下、内在性にＡＤＰ-リボシル化されたことを示している。注目されるのは150k-180kDaの蛋白（クラスリン重鎖）に対する転移反応が初めて検出されたことである。今回の結果からはコート小胞の構成ポリペプタイドのＡＤＰ－リボシル化反応が内在の酵素によるものか未だ不明である。ＡＤＰ－リボシル化によってクラスリン重鎖、さらにコート小胞が修飾される機能的意義についてはさらに検討されねばならない。

Fig. 1. ADP-ribosylation of coated vesicles with [^{32}P]NAD.



CV; coated vesicles, Core; decoated vesicles, Coat; coat fraction, HC; clathrin heavy chain, A; adaptins, Tub; tubulin, LC; clathrin light chain

Fig.3. Effect of snake venom phosphodiesterase on prelabeled polypeptides

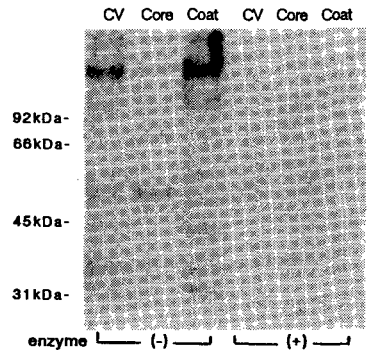
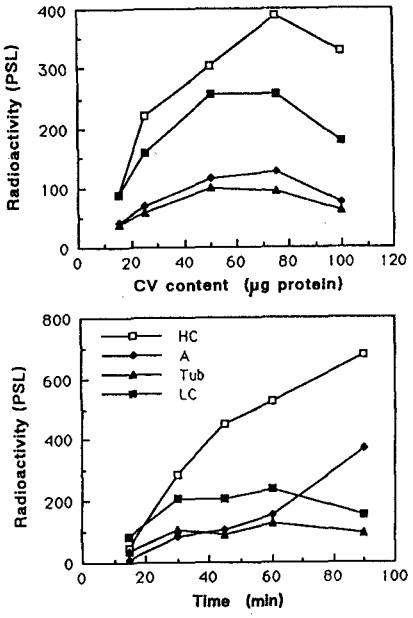


Fig.2. Effect of CV content and incubation time on ADP-ribosylation



［文献］

(1)Ueda, K. & Hayaishi, O. (1985) Ann. Rev. Biochem. 54, 73-100

(2)Goldstein J.L. et al. (1979) Nature, 279, 679-685

(3)Mayorga, L.S. et al. (1989) Science, 244, 1475-1477

(4)Moroi K. et al. (1991) Japan. J. Pharmacol. 55, 399-402,

(5)Lenherd J.M. et al. (1991). Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, 197-203

17 神経系における新しいカルシウム結合蛋白neurocalcin

中野明夫、寺沢求、渡辺正人、岡崎勝男、日高弘義
(名古屋大・医・薬理)

[要約]
Neurocalcinは分子量23 kDaおよび24 kDaの3カ所にEF-hand構造を持つ新しいカルシウム結合蛋白であり、アミノ酸配列上visininおよびrecoverinと高い相同性を持っている。我々はneurocalcin抗体を作製し、immunoblotよりneurocalcinは脳と網膜に存在することを発見した。このことはneurocalcinは神経特異的カルシウム結合蛋白であることを示唆している。免疫組織化学ではneurocalcinは網膜アマクリン細胞とガングリオン細胞に存在し、視細胞層は全く染まらず、visininやrecoverinの存在様式とは明らかに異なっていた。今回の結果よりneurocalcinは神経系のカルシウム伝達系において重要な働きをしていることが示唆された。

[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蛋白が深く関与していることが知られている。Walshらはカルシウム依存的疎水性クロマトグラフィーを使いウシ脳より21 kDaカルシウム結合蛋白を精製したと報告している(1)が、我々は新しく合成したW-77をリガンドとしたカルシウム依存的疎水性クロマトグラフィーにより、ウシ脳より23 kDaおよび24 kDaのカルシウム結合蛋白(neurocalcin)を精製した。アミノ酸配列上neurocalcinはvisinin、recoverinと高い相同性を持っている(2)。今回neurocalcin抗体を作製し臓器分布の検討を行った(3)。またneurocalcin isoproteinのクローニング(4)についても併せ報告する。

[方法]
精製したneurocalcin 0.5 mgをウサギに2週間間隔、計4回皮下注し抗体を得た。2 mM EGTA存在下にウシ各臓器をホモジネートし、その20,000 x g上清を電気泳動し(30-40μg/lane)、immunoblotを行った。Neurocalcin抗体は2,000倍希釈にて使用した。免疫組織化学はベクター社のABCキットを用い小脳、網膜について行った。またneurocalcinの部分アミノ酸配列をもとにして合成したプローブを用いウシ脳のcDNAライブラリーをスクリーニングし、得られたクローンの塩基配列を決定した。

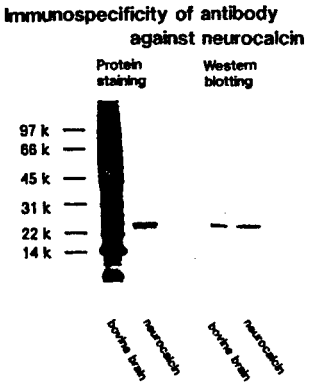
[結果]
Immunoblotによるとneurocalcinは大脳、小脳、延髄、脊髄、網膜に存在し、心臓、肺、肝臓、脾臓、小腸、膵臓、精巣にはimmunoreactive 23-24 kDa bandは見られなかった。小脳の免疫組織染色を行うと分子層および顆粒層は中等度染まるのに対し、プルキンエ細胞層は殆ど染まらなかった。網膜においては視細胞層は全く染まらず、アマクリン細胞とガングリオン細胞のみが強く染色された。Neurocalcinには少なくとも5つのisoproteinがあり、その1つのクローニングを行い全アミノ酸配列の決定を行った。 Neurocalcinには3カ所のEF-hand構造があり、その1番目と2番目はcalmodulinの2番目と3番目のEF-hand構造とそれぞれ非常に似ていた。

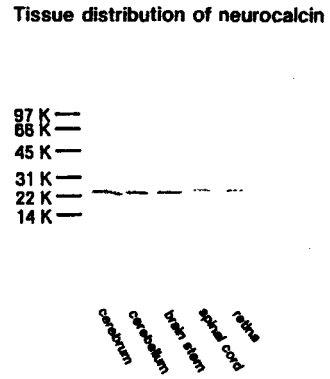
[考察]

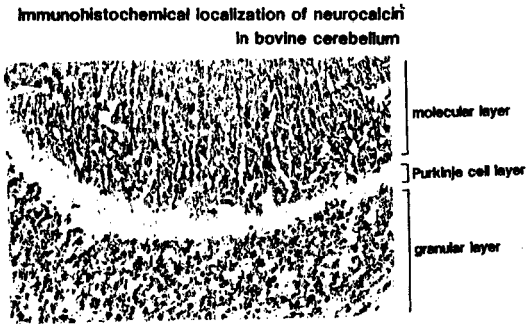
EF-hand構造を持つカルシウム結合蛋白の多くは2ないし4カ所のカルシウム結合ループを持っており、3カ所のカルシウム結合ループを持つものとしてpalvalbumin、visinin、recoverinなどがある。 NeurocalcinはEF-hand構造を3カ所に持つ新しいカルシウム結合蛋白であり、しかもvisinin、recoverinと高い相同性をもっている。Visininは24 kDaのretinal cone特異的カルシウム結合蛋白である。Recoverinは26 kDaのretinal coneおよびrod特異的カルシウム結合蛋白であり、guanylate cyclaseを活性化する。アミノ酸配列上相同な蛋白は同じ様な機能を持っていることがあり、neurocalcinも神経系において重要な働きをしている可能性が示唆された。

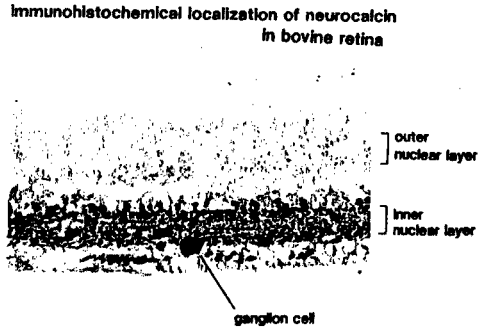
［文献］

1. Walsh, M.P. et al. (1984) Biochem. J. 224, 117-127
2. Terasawa, M. et al. (1992) J. Biol. Chem. In Press
3. Nakano, A. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. In Press
4. Okazaki, K. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 185, 147-153









18 シナプトカナリン（脳N型Caチャネル結合蛋白質）の構造と多様性

森田貴雄[1,2]、森　寿[2]、崎村建司[2]、三品昌美[2]、関根陽子[1]、堀川　洋[1]、西須英雄[1]、阿部輝雄[1]
（新潟大学脳研究所　神経化学[1]、神経薬理学[2]）

〔要約〕

すでに報告したように、可溶化した脳ω-conotoxin GVIA受容体（N型Caチャネル成分）を免疫沈降させる単クローン抗体SPM-1は36 kDaの膜蛋白質を認識する。この36 kDa蛋白質は尿素存在下でのSDS電気泳動で互いに近接した二つの主要な成分と二つの微量成分に分離された。これらの4成分はいずれもSPM-1と反応し、isoformであると考えられた。このグループの蛋白質をシナプトカナリン（synaptocanalin）と名付けた。精製した36 kDa 蛋白質のN末端からのアミノ酸配列に対するオリゴヌクレチド混合物を用いて、ウシ前脳のcDNA libraryをスクリーニングし、isoformの一つをコードするcDNAクローンを得た。この蛋白質（synaptocanalin I）は288残基から成り、C末端に疎水度の高い24残基のコアがあり、膜貫通ドメインと考えられた。SPM-1によるイムノブロットの結果と一致して、そのmRNAは調べた組織のうち、神経系にのみ検出された。

シナプス前末端の興奮によって電位感受性Caチャネルが開口し、細胞外液より流入したCa^{2+}によって神経伝達物質の放出が起こる。Caチャネルを選択的に阻害する毒素であるω-conotoxin GVIA（GVIA）は中枢および末梢の一部のシナプスにおける神経伝達物質放出を不可逆的に阻害する（1）。したがって、これらのシナプスにおいてはGVIA感受性（N型）Caチャネルが神経伝達物質放出に直接関与しているものと考えられる。われわれは2種の単クローン抗体（SPM-1、SPM-2）が可溶化した脳GVIA受容体の一部を免疫沈降すること、SPM-1、SPM-2はそれぞれ36 kDa、28 kDaのGVIA受容体（N型Caチャネル）結合蛋白質を認識すること、これらの蛋白質が神経系およびパラニューロンに局在すること等をすでに報告した（3）。今回、36 kDa蛋白質に幾つかのisoformが存在することを見いだすとともに、この蛋白質に対するcDNAのクローニングを行い、isoformの一つをコードするcDNAクローンを得た。

［実験方法］

ウシ大脳皮質より調製した低張処理P2分画のジギトニン抽出物をSPM-1-Sepharoseにかけ、SDSで溶出することにより、36 kDa蛋白質を得た（3）。SDS電気泳動後、36 kDaバンドをPVDF膜上にブロットし、蛋白質シークエンサーにかけて、N末端からのアミノ酸配列を決定した。この部分配列に対するオリゴヌクレオチド混合物の^{32}P標識物を用いて、ウシ脳のcDNA libraryをスクリーニングして全長をコードする一つのcDNAクローンを得た。また、各組織からpoly(A)$^+$ RNAを調製し、このクローンのinsertをプローブとして用いたノーザンブロットによってmRNAの組織分布を検討した。

［結果と考察］

36 kDaバンド全体をシークエンサーにかけた結果、M-K-D-R-T-Q-E-L-R-S/T-A-K-Dの配列が得られた。N末端から10残基目はS（serine）とT（threonine）がほぼ同量検出された。これはおそらくisoformの存在によるものと考えられたので、尿素存在下でのSDS電気泳動によってisoformの分離を試みた。図1に示すように、36 kDa蛋白質はSPM-1と反応する二つの主要な成分（36a、36b）と二つの微量成分（36aの上および36aと36bの中間）に分離された。36a、36b成分のN末端からのアミノ酸配列はそれぞれ、M-K-D-R-T-Q-

E-L-R-T-A-K-D-S、M-K-D-R-T-Q-E-L-R-S-A-K-D-Sであった。これらの結果は36 kDa蛋白質にいくつかのisoformが存在することを示す。これらの36 kDa蛋白質が脳において主としてシナプスに存在し、Caチャネルに結合していることから、これらの蛋白質をシナプトカナリン(synaptocanalin)と命名した。

N末端の5残基(MKDRT)に対応する合成オリゴヌクレオチド混合物を^{32}Pで標識したものをプローブとして用い、ウシ脳cDNA libraryをスクリーニングし、36bのN末端配列を含んだ一つのクローン (plasmid pCR42)を得た。pCR42のinsert (1.2 kb)中に36b成分のN末端配列から始まる288アミノ酸残基の open reading frameが含まれていた。この蛋白質(synaptocanalin 1)の分子量は33,274と計算された。この蛋白質は親水性部分に富んでいるが、C末端に24残基の疎水性ドメインが存在していた。シナプトカナリンは脳可溶性分画には検出されず、膜蛋白質であると考えられる(3)。したがって、このC末端部位が唯一の膜貫通部位と推測された。この蛋白質のアミノ酸配列は上皮の形態形成に関与すると考えられる間充織の蛋白質であるエピモルフィン (epimorphin)(2)と62%のホモロジーを有していた。^{32}Pで標識したpCR42のinsertをプローブにしたノーザン解析では、小脳、大脳に4.5 kbの濃いバンドおよび2.4 kbの薄いバンドが存在したが、他の組織では全く検出されなかった(図2)。

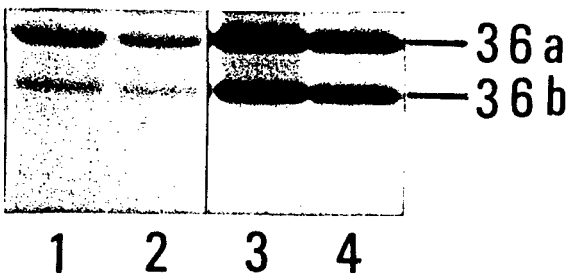


図1 シナプトカナリンのisoformの分離
PC12細胞ジギトニン抽出物をSPM-1- (lane 1,3)、SPM-2-Sepharose(lane 2,4)にかけ、SDSで溶出し5 M 尿素存在下でSDS電気泳動。lane 1,2:ブロットのAmidoblack染色；lane 3,4: SPM-1との反応。

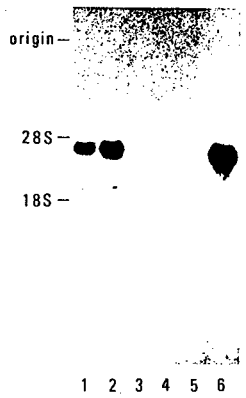


図2 シナプトカナリンmRNAのノーザン解析
lane 1-6、ラット大脳皮質、小脳、腎臓精巣、肝臓、ウシ小脳。

本研究は次田　皓博士 (東京理科大学生命科学研究所)および小谷昌司博士(新潟大学理学部)との共同研究であることを付記します。

[文献]

(1) Gray, W. R., Olivera, B. M. and Cruz, L. J. (1988) Ann. Rev. Biochem. 57, 665-700.

(2) Hirai, Y., Takebe, K., Takashina, M., Kobayashi, S. and Tekeichi, M. (1992) Cell 69, 471-481.

(3) Saisu, H., Ibaraki, K., Yamaguchi, T., Sekine, Y. and Abe, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 59-66.

19 In situ DNA-Protein Binding法による脳内転写調節因子のＤＮＡ結合活性の同定

王小兵、大杉　武、池本　光志、田中　秀和、三木直正

（大阪大・医・第一薬理）

［要約］
我々は新しい方法――in situ DNA-Protein Binding (in situ DPB) 法を開発した。この方法はラベルしたオリゴヌクレオチドをプローブにして、組織薄切片上で、DNA結合蛋白質の局在、特にそのDNA結合活性を同定することが出来る。in situ DPB法を用いて、正常マウス脳内AP-1結合蛋白質の特異的な分布及びそのDNA結合活性を初めて検出した。さらに、覚醒剤投与によるAP-1結合蛋質のDNA結合活性の特徴的な変化を見出した。

［緒言］
転写調節因子はgene上流のプロモータ領域にある特異的な配列を認識する蛋白質である。これらの蛋白質はDNAに結合すると、geneの転写活性に大きい影響を与えることが知られている。従来、転写調節因子のDNA結合活性を研究するにはゲルシフト法がよく使われるが、この方法は組織から核蛋白を抽出してin vitroで調べるので　脳のようなheterogenousの組織においては各部位の転写調節因子の分布及びそのＤＮＡ結合活性を調べるには大変難しい。そこで、我々は組織薄切片上で、DNA結合蛋質の局在、特にそのDNA結合活性を同定出来るin situ DNA-Protein Binding　(in situ DPB) という新しい方法を開発した。

［方法］
1、プローブ
　metallothionein gene上流のTPA レスポンスエレメントであるAP-1 配列(1)を含むオリゴヌクレオチドを合成し、相補鎖のDNAとアニーリングしてから、^{35}S－dCTPで3’末端をラベルし、プローブとした。
2、in situ DNA-Protein Binding
　マウス脳を摘出し、ドライアイス中で凍結してから　クリオスタットで凍結切片を作製した。乾燥した切片を３％パラホルムアルデヒドで３０分間固定する。HEPES bufferで充分に洗浄してから、０．２％DNaseで処理した。３０分後、２０ｍＭのEDTAを含むHEPESで充分に洗浄してから、ラベルしたプローブをかけ、３０℃、１時間を反応させた後、HEPES bufferでfreeのプローブを洗浄し、乾燥する。乾燥した切片にｘ線フィルムをかけ、オートラジオグラフィーを行い、DATAをMCIA (Micro Computor Imagine Analyzer) によって画像処理を行った。
3、ゲルシフト法：ラベルしたAP-1プローブを用いて、既報に準じて行った(2)。
4、薬物投与：急性投与：メタンフェタミン（５ｍｇ／ｋｇ）をマウスに皮下注射し、３時間後に脳を摘出し、実験に使った。慢性投与：　メタンフェタミン２ｍｇ／ｋｇを３日間間隔で　６回注射する。最後注射の一ヶ月後、脳を摘出して実験に使った。

［結果及び考察］
　ラベルした二本鎖DNAプローブを脳切片にかけると、特徴的な結合が観察された。この結合はプロテアーゼで前処理することによって消失したが、DNase とRNaseの前処理に影響されなかったことから、DNAプローブと切片上の蛋白質との結合であることを示唆した。さらに、この結合はパラホルムアルデヒドの前固定によって　濃度依存的に消失するので、蛋白質の高次構造はDNAプローブの結合に重要であることが示された。この結合の特異性を調べたところ、１００倍のcold AP-1 プローブの存在下では　AP-1結合は抑制されたが異なる転写調節因子であるSp1(3)の結合は抑制されなかった（図１Ａ）。一方、ミュータントのAP-1プローブは抑制作用を示さなかった。AP-1結合蛋白質の重要な構成蛋白質であるc-Jnuに対する抗体(Oncogene Sci)で切片を前処理すると、AP-1結合は強く抑制されたがSp1結合は影響されなかった(図１Ｂ)。これらの結果はゲルシフトの結果（１Ｃ）と一致する。　以上のデータで示したようにAP-1プローブで同定された結合は特異的にAP-1プローブを認識するDNA結合蛋白質であることが明らかになった。
　脳内AP-1結合蛋白質は特徴的な局在を示し、嗅球、歯状回、小脳皮質には多く、線条体、海馬、視床下部,皮質第IV層細胞層、梨状葉にも見られる（図２のa-e）。　さらに　AP1と Sp1の分布をくらべてみると、

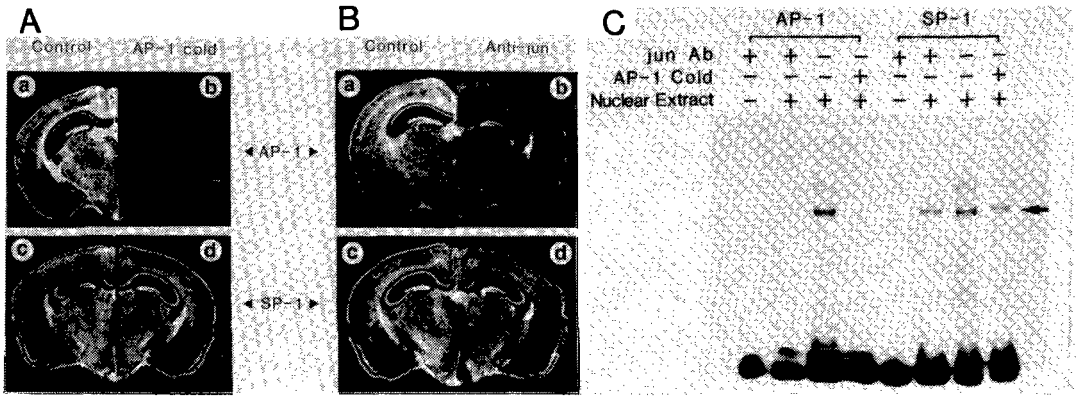


図１．AP-1プローブの結合特異性．A：AP-1(a,b)及びSp1(c,d)プローブ結合に対するcoldのAP-1プローブの抑制効果(b,d)．B：AP-1(a,b)及びSp1(c,d)プローブ結合に対する抗Jun抗体による抑制効果．C：ゲルシフト法によるAP-1及びSp1結合蛋白質の結合特異性の解析．

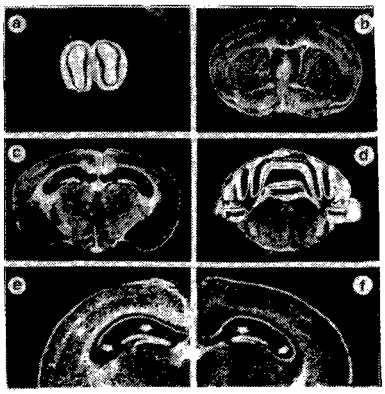


図２。マウス脳内におけるAP-1(a-e)及びSp1(f)結合蛋白の分布。



図３．メタンフェタミンによるAP-1結合蛋白質の変化．a,c:対照群．b:急性投与．d:慢性投与．

図２のe，fに矢印で示したように　海馬ではAP-1結合蛋白質はＣＡ１野にだけみられ、Sp1結合蛋白質はＣＡ１－ＣＡ３全野にみられる。歯状回ではAP-1 プローブの結合はSp1の結合より多く，皮質においてはAP-1の結合は第４細胞層に多く存在することに対して、Sp1結合蛋白質は均一にに存在することがわかった。以上のようにin situ DPB法によって脳内の転写調節因子はそれぞれ違うパタンーで分布することを初めて明らかにした。

次に、in situ DPB法を用いて、　覚醒剤投与によるマウス脳内AP-1結合蛋白質の変化を調べた。メタンフェタミン注射後、移所運動は著明に増加し、注射３時間後、皮質帯状回、第IV層細胞層、梨状葉、歯状回、視床下部,手綱核、内側扁桃体核などの部位ににおいて、AP-1結合蛋白質のDNA結合活性は著明に上昇することが観察された（図３b）。メタンフェタミンを反復投与すると、反応の増強、いわゆる逆耐性現象がみられる。 この逆耐性反応は投与後１カ月においても、持続することは移所運動の実験で明らかになった。この時の脳内AP-1結合蛋白質は図３dで示したように、AP-1結合蛋白質の変化は持続していることが見られた。覚醒剤やコカインなどの中枢神経系作用薬による行動の変化はよく知られるが、そのメカニズムは不明である。以上の結果は、これらの薬物による耐性及び依存状態における遺伝子の発現変化を示唆し、そのメカニズムの遺伝子レベルでの解明に役立つ。

［文献］

1. Lee, W. et al. (1987) Nature 325, 368-372
2. Osugi, T. et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, 25-31
3. Kodonaga, J. T. et al. (1988) Science 242, 1566-1568

20 ＮＰＹ遺伝子の神経成長因子レスポンスエレメントの同定と結合蛋白質の誘導

樋口宗史、中野浩一、三木直正
（阪大医・第一薬理）

〔要約〕

PC12 細胞の Nerve Growth Factor (NGF) による分化に伴い、ラット Neuropeptide Y (NPY) 遺伝子発現は１００倍増加する。Nuclear Run-on assay でこの遺伝子の転写活性を調べると８倍の増加が認められた。つまり、相当部分が転写活性の増加に依存していた。NGF 反応性に関与する cis-element を同定するために、種々の長さの NPY遺伝子5' 上流を含む CAT レポーター遺伝子を PC12 細胞にトランスフェクションし、CAT アッセイを行った。Cap site 近傍の 48 bp が NGF-Response Element と同定された。Gel shift assay により、NGF 処理で結合活性の増加する少なくとも２つの核蛋白質がこの element に結合することが示された。

〔目的〕

PC12 細胞は高親和性 NGF 受容体（trk ）を介する反応により、交感神経様細胞に分化する。NGF 処理後、trk の tyrosine リン酸化、活性型 Ras-GTP の増加や種々の serine/threonine kinase 群や GAP の活性増加が２０分以内に生じ、続いて蛋白合成を介さない転写制御因子群 immediate-early genes の発現誘導が引き起こされる(1-3) 。さらに続いて late genes としての神経特異遺伝子群が発現誘導され交感神経に分化する。しかし、これらの神経分化に関わる神経特異遺伝子の発現がどのような機序により起こるかは不明である。Neuropeptide Y (NPY) は交感神経の cotransmitter であり、PC12 細胞の NGF による交感神経様細胞への分化に伴ってその遺伝子発現が著しく増加する事が知られている(4-7) 。今回、私達は NGF による NPY 遺伝子転写活性増加に関与する cis-element を同定し、その転写調節因子を解析したので報告する。

〔実験方法〕

CAT レポーター遺伝子の作製： ラット NPY 遺伝子をクローニングし、制限酵素切断後種々の長さの上流域をプロモーターの無い pUCATSV1 CAT ベクターに挿入した（図１）。さらに細部の CAT レポーター遺伝子は PCR により合成したプロモーター断片をベクターに挿入して作製した。

遺伝子導入と CAT アッセイ： PC12 細胞を 5% FCS と 10% HS を含む DMEM で培養した。 5-25 μｇの DNA を燐酸カルシウム＋グリセロール法で導入し、さらに NGF とともに 48 時間培養した。CAT アッセイは既報に従い行った(8) 。

ゲルシフトアッセイ： NGF-RE を構成する２つのオリゴヌクレオチドを合成した。PC12 細胞より Dignam らの方法(9) に従い、核抽出液を調整した。5' 末端ラベルしたオリゴヌクレオチドと蛋白質の結合反応は 12 mM Hepes-KOH(pH7.9), 60 mM KCl, 12% glycerol 存在下に 30 ℃, 30 分間で行い、4% アクリルアミドゲルで低イオン強度下に分離し、オートラジオグラフィーを行った。

〔結果〕

（１）未分化 PC12 細胞における CAT レポーター遺伝子を用いて測定した NPY 及び Enkephalin A 遺伝子転写活性は pRSVCAT のそれに対しそれぞれ 0.3%, 7.3% であったが、NGF 処理による PC12 細胞の分化に伴いそれぞれ８倍、４倍に転写活性が増加した。この結果は Nuclear run-on アッセイのそれとよく一致していた。（２）NGF 反応の ED50 値は 1x10-10 M であり、高親和性受容体を介していた。（３）図１に示したように種々の pUCAT-NPY の CATベクターを用いて、NGF-Response Element を Cap site の近傍 98 bp に同定した。PCR で作製したさらに詳細な CAT ベクターにより、最終的に 48 bp を５倍の転写活性増加を持つ NGF-RE を決定した。このエレメントは系統的によく保存されていた。（４）この NGF-RE をコードする上流、下流のオリゴヌクレオチドを合成し、gel shift アッセイを行った。PC12 細胞には少なくとも２つの特異的に結合する核蛋白質が存在し、NGF により結合が誘導される事が示された（図２）。

［考察］

交感神経分化に関与する lata genes である神経特異遺伝子群が NGF の高親和性受容体を介して発現誘導をうけ、その遺伝子産物が分化を引き起こすと考えられている。しかし、どの様な機序で NGF が late genes の転写を活性化するか、また分化に関与する核転写調節因子が何かは不明である。私達は NPY 遺伝子を用いて、NGF に反応する cis-element の同定と NGF で結合活性の誘導される核蛋白質が存在することを見いだした。これらの転写因子の性質及び転写活性化の機序、かつ交感神経の分化にどのように関与するのかを、今後検討したい。

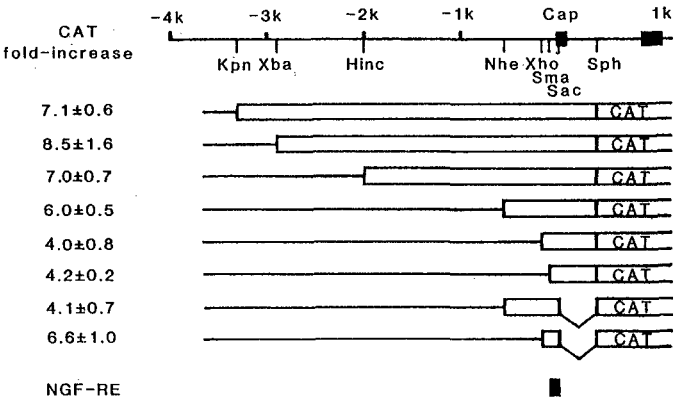


図1 CAT fusion plasmid の構造と CAT アッセイの結果

左に各種 NPY-CATレポーター遺伝子の NGF による転写誘導の結果を示す。右に NPY-CAT レポーター遺伝子の構造を示す。

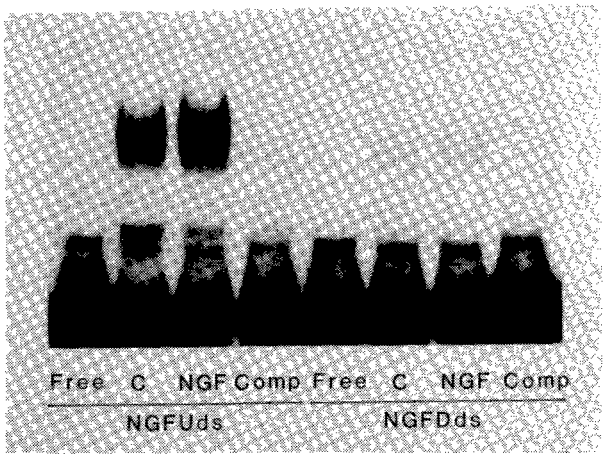


図2 NGF-Response Elementによるゲルシフトアッセイ

PC12 細胞を NGF 50 ng/ml で処理した。NGFUds, NGFDds はそれぞれ NGF-RE の上流、下流 30 bp を5'端ラベルして用いた。競合には 100 倍量のコールドのオリゴを用いた。

［文献］

1. Li, B.-Q. et al. (1992) Science 256, 1456-1459.
2. Wood, K.W. et al. (1992) Cell 68, 1041-1050.
3. Milbrandt, J. (1987) Science 238, 797-799.
4. Higuchi, H. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 6288-6295.
5. Sabol,S.L. and Higuchi,H. (1990) Mol. Endocrinol. 4, 384-392.
6. Higuchi, H, et al. (1990) Mol. Pharmacol. 38, 614-623.
7. Higuchi, H. et al. (1991) J. Neurochem. 57, 1840-1847.
8. Misaki, N. et al. (1992) Neurochem. Int. in press.
9. Dignam, J.D. et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1475-1489.

21 マウス脳のｃＡＭＰ　ｒｅｓｐｏｎｓｅ　ｅｌｅｍｅｎｔ　（ＣＲＥ）　結合蛋白質に対するモルヒネの作用

〔所属〕
大杉　武、池本光志、田中秀和、王小兵、三木直正
（大阪大・医・第一薬理）

〔要約〕

マウスにモルヒネを慢性投与すると、モルヒネの鎮痛効果の減弱することが知られている。モルヒネを慢性投与したマウス脳における核蛋白質の変化を検討するため、ソマトスタチン遺伝子のプロモーター領域のcAMP response element (CRE) の1 本鎖及び2 本鎖オリゴDNAを合成し、プローブとしてゲルシフトアッセイを行った。1 本鎖CRE 結合蛋白質はモルヒネ慢性投与により、小脳においてDNA 結合活性が減少した。脳の他の部位にも結合活性はあるが、モルヒネの効果は見られなかった。2 本鎖CRE 結合蛋白質は小脳に高い結合活性が見られたが、モルヒネによって影響を受けなかった。

以上のことから、モルヒネ慢性投与により変化する1 本鎖CRE 結合蛋白質が小脳に存在し、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]

マウスやラットにおいて、モルヒネを連続投与すると、薬物耐性・依存を生じることが古くから知られているが、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アッセイを行ない、NG108-15細胞の核抽出液中にモルヒネ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 結合蛋白質がマウス脳の粗核抽出液にも存在し、モルヒネの慢性投与によりこの蛋白質のDNA結合活性が大きく変化する結果を得たので報告する。

[実験方法]

薬物投与:　Kanetoらの方法(1) に従い、体重20-25gのdd系雄性マウスに初日10mg/kg から20、40、80、100mg/kgまで連日増量し、その後、100mg/kgを維持量としてさらに3 日間、1 日2 回ずつ皮下投与した。

核抽出液:　マウスを断頭屠殺し、脳を摘出後、小脳、海馬、大脳皮質に分割した。それぞれの脳部位を0.25 M Sucrose、10 mM KCl、1.5 mM MgCl2、0.5 mM DTT、10 mM Hepes (pH 7.5) 溶液中でホモゲナイズし、低速遠心(500 xg、10 min)後、粗核分画を得た。次に、 Dignam らの方法(2) に従って、核抽出液を得た。

ゲルシフトアッセイ:　ソマトスタチン遺伝子のCRE を含む36mer のオリゴDNA を用いて、既報 (3)に準じて行った。

[結果及び考察]

ゲルシフト法を用いて、1 本鎖CRE 結合蛋白質 (図1)と2 本鎖CRE 結合蛋白質 (図2)の脳内分布を検討した。2 本鎖CRE 結合蛋白質は大脳皮質、海馬、に比べ、小脳において顕著に結合活性が高かった。これに対して、1 本鎖CRE 結合蛋白質の結合活性は脳の各部位に見られた。次に、モルヒネ慢性投与を行ったマウス脳を用いて、結合活性の変化を調べた。対照群に比べ、モルヒネ投与群のマウス小脳において、1 本鎖CRE 結合蛋白質の結合活性が著しく減少した。しかし、他の部位では有意な差が見られなかった。同じ核抽出液を用いて、2 本鎖CRE 結合蛋白質の結合活性を調べたが、モルヒネ投与によって影響を受けなかった。モルヒネ慢性投与による1 本鎖CRE 結合蛋白質への効果は小脳でのみ見られることから、非特異的作用ではないと思われる。モルヒネによる1 本鎖CRE 結合蛋白質の結合活性の減少が蛋白質の量的変化か、DNA に対する親和性の低下によるのかは明らかで

ない。モルヒネを慢性投与後、1 週間休薬したマウスにおいては、1 本鎖CRE 結合蛋白質の結合活性は減少していた。NG108-15細胞では、休薬後36時間で結合活性が回復することから、回復の機構はマウスでは異なる可能性がある。ゲルシフトアッセイにおいて、マウス脳の1 本鎖CRE 結合蛋白質の移動度はNG108-15細胞の蛋白質より遅かった。分子サイズが異なるか、他の因子によって修飾を受けているのかもしれない。マウスにモルヒネを慢性投与すると、モルヒネの鎮痛作用に対する耐性とともに、モルヒネ投与による自発運動量が増加することが知られている。小脳における1 本鎖CRE 結合蛋白質の変化が運動量の増加による2 次的変化かどうかを現在検討している。2 本鎖CRE 結合蛋白質はCREBなど転写因子として知られているが、1 本鎖CRE 結合蛋白質の生理機能は不明である。1 本鎖CRE 結合蛋白質が熱感受性であり、脳での局在が2 本鎖CRE 結合蛋白質と異なることから、両者は異なる蛋白質であると考えられる。2 本鎖CRE 結合蛋白質が小脳に多く、1 本鎖CRE 結合蛋白質がモルヒネによって、小脳において変化することの生理的意義については、オピオイド受容体との関連など興味のあるところである。1 本鎖CRE 結合蛋白質の結合活性がモルヒネによって変化し、CREBなどの転写因子のDNA 結合を調節している可能性が考えられる。

[文献]

1) Kaneto, H. et al., (1973) Japan. J. Pharmacol., 23, 701-723
2) Dignam, J.D. et al., (1983) Nucleic Acids Res., 11, 1475-1489
3) Osugi, T. et al., (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun., 174, 25-31

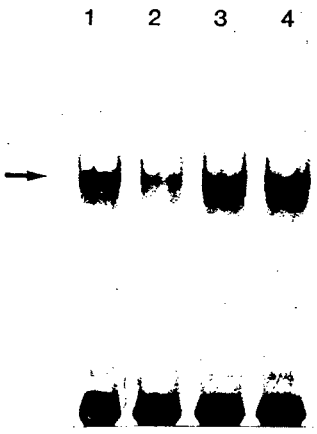


図 1. 1 本鎖CRE 結合蛋白質の脳内分布とモルヒネの作用
1,2 : 小脳
3,4 : 大脳皮質
1,3 : 対照群
2,4 : モルヒネ投与群

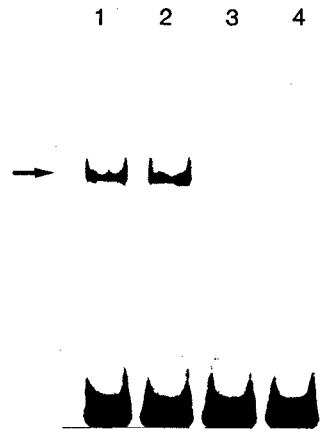


図 2. 2 本鎖CRE 結合蛋白質の脳内分布とモルヒネの作用
1,2 : 小脳
3,4 : 大脳皮質
1,3 : 対照群
2,4 : モルヒネ投与群

22 ムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬によるmRNAの発現とc-fos mRNAの誘導抑制

深間内 文彦、D.-M. Chuang[*]
（東医歯大 難研プロジェクト，[*]ＮＩＨ）

〔要約〕 ラット小脳顆粒細胞の初代培養系を用い、ムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)拮抗薬に対するmRNAの制御機構を検討した。アトロピンはm2- およびm3-mAChR mRNAを増加させたがその時間経過は異なっていた。m2-mAChRに選択的な拮抗薬であるAF-DX116はm2-mAChR mRNAを有意に増加させ、作働薬であるカルバコールによるm2-mAChR mRNAの減少、cAMPの増加、c-fos mRNAの誘導を阻害した。一方、m3-mAChRの選択的拮抗薬である4-DAMPはm3-mAChR mRNAを増加させ、カルバコールによるm3-mAChR mRNAのdown-regulationをブロックした。細胞内cAMPレベルを増加させる8-Br-cAMPやforskolinはm2-mAChR mRNAを選択的に減少させた。以上の結果はm2-mAChR mRNAの制御にcAMPが関与し、一部、CREを介してc-fos mRNAが誘導されていることを示唆する。

[目的]

ムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)は現在まで5種類のサブタイプ（m1-m5)がクローニングされており、それぞれにカップルするエフェクターシステムも異なっている。m2- およびm3-mAChRを発現している幼若ラット小脳顆粒細胞の初代培養系を用い、mAChRの作働薬であるカルバコールがイノシトールリン脂質代謝の脱感作を生じ、mAChR mRNAのレベルを減少させることを先に報告した(1)。今回は、m2-およびm3-mAChRに選択的に作用する拮抗薬を用いてm2- およびm3-mAChR mRNAの調節機構を検討した。

[方法]

細胞培養: 生後8日目のSprague-Dawley ラット小脳顆粒細胞の初代培養を行った。細胞をトリプシンで処理後、10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 50μg/ml gentamicin, 25mM KCl を含むBMEM培地を用い、6%CO_2, 37℃の条件下で培養した。グリアの増殖を抑制するため24時間後に β-cytosine arabinoside (10μM)を加えた。培養8日目に薬物を添加し各々の実験に応じ反応を停止した。mRNAの検出: 反応培地を除去後、Chirgwinらの方法(2)に従いRNAを抽出しノーザンブロット法によりmRNAを検出した。受容体結合実験: 培養細胞をPhysiological Saline Solution (PSS)で洗浄後、0.5nM [^{3}H]QNBを含むPSS 中で37℃、75分間インキュベートし、反応停止後、細胞蛋白を可溶化し放射活性を測定した。cAMPの測定: 反応停止後、0.1M HClを加え、懸濁液を12,000 ×g, 5分間遠心し上清を中和後、[^{3}H]cAMP binding assay kit により定量した。核run-offアッセイ: Greenbergらの方法(3)に準じ核を単離し^{32}P-UTPを取り込ませたあとRNAを抽出し、フィルター上のcDNAを含んだpSP64および含まないpSP64とハイブリダイゼーションを行った。

[結果および考察]

非選択的ムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬であるアトロピンは時間依存的にm2- および m3-mAChR mRNAならびにQNB結合を増加させた(Fig.1)。核run-offアッセイによると8時間アトロピンを作用させるとm3-mAChR遺伝子の転写活性は約2.3倍増加することがわかった. AF-DX116(1μM)はm2-mAChR mRNAを、4-DAMP(1μM)はm3-mAChR mRNAをそれぞれ特異的に増加させた(Fig.2)。さらにAF-DX116はカルバコールによるm2-mAChR mRNAの減少、cAMPの増加、c-fos mRNAの増加をブロックし、4-DAMPはカルバコールによるm3-mAChR mRNAの減少(8時間)、cAMPの増加(2時間)、c-fos mRNAの誘導を阻害した(Fig.3)。細胞内のcAMPレベルを増加させる8-Br-cAMP(300μM)やforskolin(10μM)の 処置ではm2-mAChRmRNAが選択的に時間依存性に減少した (Fig.4)。カルバコールによるm2-mAChR mRNA のdown-regulationは細胞内cAMPレベルの増加と並行し

ており、逆にAF-DX116によるm2-mAChR mRNAのup-regulationはcAMPレベルの減少と相関していた。さらに、8-Br-cAMPやforskolinが選択的にm2-mAChR mRNAを低下させることやコルヒチンによるm2-mAChR mRNAの増加に伴いcAMPのレベルが低下すること(4,5)などからm2-mAChR mRNAの調節にcAMPが深く関与していることが示唆された。さらにカルバコールによるm2-mAChR mRNAのdown-regulationにおけるcAMPの増加はc-fos mRNAの増加を伴うことから一部、CREを介してc-fos mRNAが誘導されていることも考えられる。

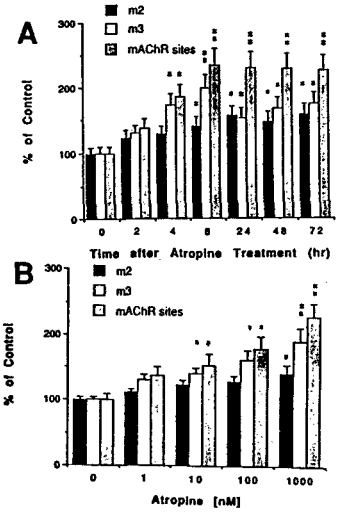


Fig. 1. Atropine-induced up-regulation of mAChR mRNA and binding sites. Cells were treated with 1 μM atropine for the indicated time periods (A) or exposed to the indicated concentrations of atropine for 8 hr (B). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, when compared with their untreated control group (Student's t-test).

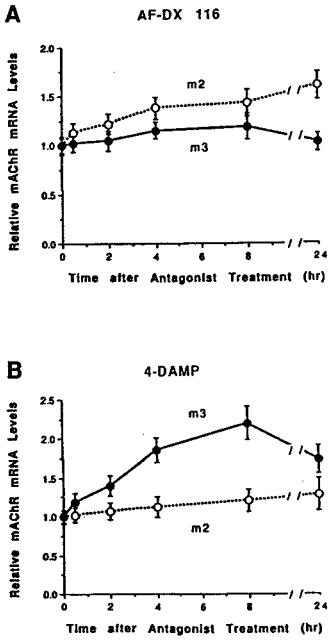


Fig. 2. Time-course of up-regulation of m_2- and m_3-mAChR mRNAs by subtype-specific antagonists. Cells were treated 1 μM AF-DX 116 (A) or 1 μM 4-DAMP (B) for the indicated time periods.

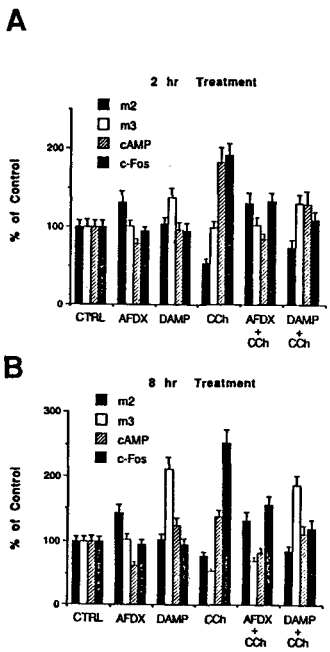
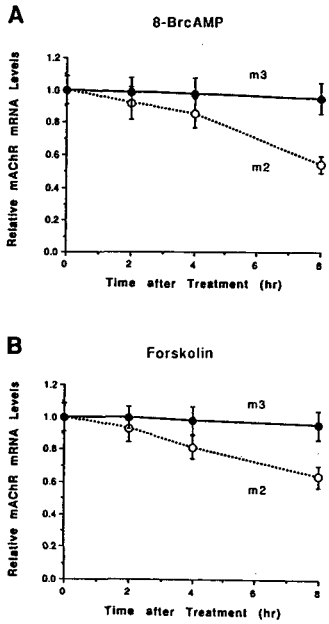


Fig. 3. Effects of mAChR subtype-specific antagonists on mRNA levels and cAMP contents. Cells were treated with the indicated drugs for either 2 hr (A) or 8 hr (B).



(←) **Fig. 4. Effects of 8-Br-cAMP and forskolin on m_2- and m_3-mAChR mRNA levels.** Cells were treated with either 300 μM 8-Br-cAMP (A) or 10 μM forskolin (B) for the indicated time periods.

[文献]

1) Fukamauchi,F.,C.Hough and D.-M.Chuang (1991) J.Neurochem.56,716-719.

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

3) Greenberg,M.E. and E.B.Ziff (1984) Nature 311, 433-438.

4) Fukamauchi,F.,C.Hough and D.-M.Chuang (1991) Mol.Cell.Neurosci.2,123-129.

5) Fukamauchi,F.,C.Hough and D.-M.Chuang (1991) Mol.Cell.Neurosci.2,315-319.

23 DNA合成器でビオチン標識されたプローブを用いた高解像度非放射性in situ ハイブリダイゼーション法について

花井一光、渡部　芳徳、安原　治、遠山育夫、木村　宏
（滋賀医大分子神経生物学研究センター）

〔要約〕
非放射性in situ ハイブリダイゼーション法を行う上で、最適なプローブの標識条件を探る目的で、DNA合成器とビオチン化フォスフォアミド試薬を用い（1）、合成過程中、自動的に標識物質を直接オリゴヌクレオチドに結合させ、ビオチン数と組み込み位置を変えた種々のバソプレシンアンチセンスプローブ（2）を作成した。これらのプローブを視索上核と室傍核におけるバソプレシンmRNAの発現を対象として反応させ、抗ビオチン抗体を使いABC免疫組織法により可視化した。また、染色結果は発色反応の強弱を画像解析装置を用いて判定評価した。さらに、この方法を応用することでバソプレシンmRNAの発現を電子顕微鏡レベルで観察することが可能になった。

〔緒言〕
標識プローブ核酸の作成法として、DNA合成器でオリゴヌクレオチドを調製しその3' 末端に標識物質を酵素化学的に結合させる方法が広く利用されてきた。この方法の問題は、①標識物質の結合比率を制御しにくい、②プローブ配列中に標識物質を混在させることが困難である、③非放射性物質の標識効率が悪い、等である。本研究は、既成DNA合成器とビオチン化フォスフォアミド試薬を使用して、オリゴヌクレオチドの合成過程中に標識物質を自動的に結合させることにより、プローブを論理的かつ自由にデザインし、非放射性In situ ハイブリダイゼーション法の検出感度と解像度の向上をはかった。

〔方法〕
組織固定：Wistar系雄性ﾗｯﾄ(200-300g)を一液（4%ﾊﾟﾗﾎﾙﾑｱﾙﾃﾞﾋﾄﾞ、0.2%ﾋﾟｸﾘﾝ酸、0.35%ｸﾞﾙﾀｰﾙｱﾙﾃﾞﾋﾄﾞ(GA)、0.02%ｼﾞｴﾁﾙﾋﾟﾛｶｰﾎﾞﾈｰﾄを含む0.1M燐酸緩衝液(PH=7.4)）で灌流固定し、脳を摘出後一液よりGAを除いた液で後固定を二日間行った。その後、クライオスタットにて連続切片を作成した。　ビオチン標識オリゴヌクレオチドの作成：ビオチン化バソプレシンアンチセンスプローブ(Table I)はDNA合成器(Applied Biosystems, Inc, CA, U.S.A.)を使用し、ビオチン化試薬(Biotin-ON, Clonteck, CA, U.S.A.)を用いて合成した。ビオチン化試薬はアセトニトリルに溶解し合成器の反応時間を300 secに設定して合成した。　酵素化学的ビオチン標識：DNA合成器により作成したオリゴヌクレオチドをTerminal deoxynucleotidyl tranferase によりビオチン化dATPを3' 末端に標識した。　オリゴヌクレオチドの精製と解析：脱塩後、逆層高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製解析した。In situ ハイブリダイゼーション：切片はハイブリダイゼーション前にコラゲナーゼとパパイン処理を行い、その後30 ng/mlのプローブを含むハイブリダイゼーションバッファー(4*SSC, 0.6MNaCl, 0.06M citrate, PH=7.0)に37℃で二日間反応させた。反応後、抗ビオチン抗体を使いABC免疫組織法により可視化した。画像解析と統計処理：CCDカメラ(XCD-007, SONY, Tokyo, Japan)より取り込んだ画像を画像解析装置(Nexus7000, Nexus Co., Osaka, Japan)により光学濃度(OD)に変換し、非パラメトリック法で統計処理した。

〔結果と考察〕
酵素化学的に標識したプローブはいろいろな長さにビオチン化されたオリゴヌクレオチドの混合物であり、反応時間に応じてビオチン化がすすんだ。また、3' 末端のヌクレオチドがCよりもAの方がビオチン化され易かった(Figure 1)。一方、DNA合成器で標識したプローブは単一のピークを持っていた。また、ビオチンの標識数

に応じてリテンション時間が長くなった。

ラット脳における染色結果は、ビオチンが2個と5個の間ではODが著明に増加(50%)した(P<0.001)、一方ビオチンが5個と10個の間ではODは20%ほど増加したにすぎなかった(n.s.)(TABLE II, Figure 2)。また同一ビオチン数の条件では3'末端と5'末端の標識の差はほとんどなっかた。3'末端にビオチンを20個標識したプローブとプローブ配列中に標識物質を5個混在させたプローブでは染色されなかった。染色の結果から5'末端に5個のビオチンを標識したプローブが安定した結果を得るには最適であることがわかった。

TABLE I
X=Biotin-ON Phosphoramidite

VAS-B1 5'-CAGCTGCGTGGCGTTGCTCTGCTCCCGAGCAGCXX-3'
VAS-B2 5'-CAGCTGCGTGGCGTTGCTCTGCTCCCGAGCAGCXXXXX-3'
VAS-B3 5'-CAGCTGCGTGGCGTTGCTCTGCTCCCGAGCAGCXXXXXXXXXX-3'
VAS-B4 5'-CAGCTGCGTGGCGTTGCTCTGCTCCCGAGCAGCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'
VAS-B5 5'-XXXXXCAGCTGCGTGGCGTTGCTCTGCTCCCGAGCAGC-3'
VAS-B6 5'-XXXXXXXXXXCAGCTGCGTGGCGTTGCTCTGCTCCCGAGCAGC-3'
VAS-B7 5'-CAGCXGCGTGXCGTXGCTCTGCXCCCGAGCAGCGCGXG-3'

TABLE II Kolmogorov-Smirnov test between all pairs of the groups

group	2R	5R	5L	
5R	405.59**			** significant at p<0.001
5L	407.00**	3.963§		§ nonsignificant (P>0.05)
10L	441.76**	14.79§	3.275§	

Group number means number of biotins conjugated to the probe and R, L means that serial sections were from the right, left side of the brain, respectively. The numbers are the chi square values of the Kolmogorow-Smirnov test for the corresponding combinations of the pixel density data.

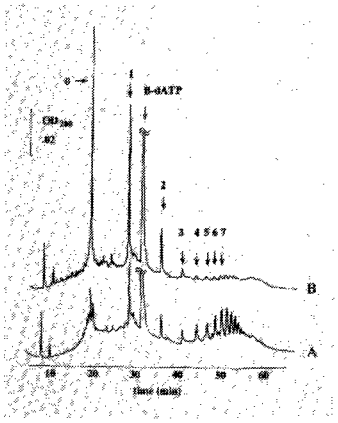


Figure 1 Reverse phase HPLC chromatogram of biotin labeling mixture by TdT. The effect of the 3' terminal nucleotide on the template independent elongation by TdT. The terminal nucleotide was A(A) and C(B). Other portion of the sequence was the same.

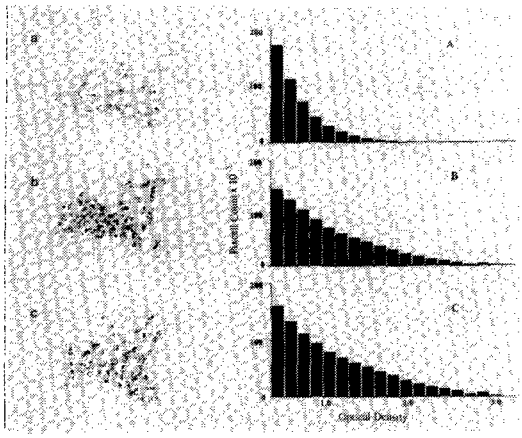


Figure 2 a-c) Vasopressin mRNA visualized by various probes in rat supraoptic nerve nucleus. Oligonucleotide probes conjugated at 3' end with 2 biotins (a), 5 biotins (b) and 10 biotins (c). **A-C)** Distribution of the pixels which shows the specified labeling intensities (OD) in the sections from the supraoptic nerve nucleus visualized with 3 different biotin probes. Probes conjugated with 2 biotins (A), 5 biotins (B) and 10 biotins (C) at 3' end were used.

References

(1) Misiura K., Durrant I., Evans M.R. and Gait M.J. (1990) Nuc. Acids Res. 18: 4345-4360
(2) Richard I and Dietmr R. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 2006-2010
(3) Young III W. S., Mezey E and Siedel R.E. (1986) Mol. Brain Res. 1: 231-241

24 ラット脳部位のESR-CTイメ-ジング

平松 緑、 及川和夫、 野田博行、 丹羽龍史[1]、 小中隆盛、 森 昭胤[2]、 尾形健明[3]、 鎌田 仁
(山形県テクノポリス財団、[1]メクト株式会社、[2]岡山大、医、分子細胞医学研、神経情報、
[3]山形大、工、物質工学科)

[要約]
イメージング試薬をラット頚動脈より注入し、生きたままでラット脳部位のイメージング試薬の分布をESR-CTにより画像として捕えることができた。また、L-バンドESRによるイメージング試薬のシグナルの波形により脳実質内に取り込まれるか否かが判定できた。

最近、 種々の疾患や老化にフリーラジカルが関与していることが明らかにされている。今までは、主としてX-バンドESR法によりこれらの情報が得られてきたが、それはin vitroの実験によるものであった。最近、L-バンドESR-CTシステムの開発(1)により、 予め投与したイメージング試薬、 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine-1-oxyl (carbamoyl-PROXYL)の画像が生きたままのラットの頭部で捕えられている(2)。しかし、 carbamoyl-PROXYLは脳関門を通過しにくいので、脳実質内の画像は捕えられていない。今回は、脳関門を通過しやすいイメージング試薬を選択し、高速ESR-CTシステムを用いて検索した結果、 in situでラット脳部位の画像が捕えられたので報告する。

[実験方法]
1. 実験動物 ： 200～250gのWistarラット雄を使用した。
2. イメージング試薬 ： Carbamoyl-PROXYL、16-DOXYL-stearic acid (16-DS)、 5-DOXYL-stearic acid (5-DS)、maleimido-2,2,6,6-tetramethyl piperidine-1-oxyl (maleimido-TEMPO)、 nordiazepam-TEMPO(3)、nordiazepam-16-DOXYL-stearylpropyl(4)、 nordiazepam-PROXYL-propyl(5)、及びhaloperidol-TEMPO (6)を使用した。これらはジメチルスルホキサイド(DMSO)に溶解した。
3. ESR-CTイメージング ： ラットをペントバルビタール麻酔し、頚動脈を露出した。ついで生理食塩水を満たしたポリエチレンチューブを頚動脈に挿入し、耳穴が共振器の中央にくるようにラット頭部をループギャップ共振器に固定後、頭部におけるESR信号強度が一定に達した時点で、イメージング試薬(0.4M)を0.1mlゆっくりと注入したのち測定を開始した。
高速ESR-CTシステムは、 L-バンドESR装置 (JEOL)、三次元磁場勾配用コイル 及びコンピューターを用いて構築した。 ESR-CTの測定条件は、 次のとおりである： field、 39± 6mT ; response、 rapid ; magnetic fields modulation、 0.2mT ; sweep time、 2.4sec ; magnetic gradient、 1mT/cm ; angle、 0° ～160° of 20° intervals。

[実験結果]
DMSO溶液中のcarbamoyl-PROXYL、16-DS、 5-DS、 maleimide-TEMPO、 nordiazepam-TEMPO、nordiazepam-16-DOXYL-stearylpropyl、nordiazepam-PROXYL-propyl 及びhaloperidol-TEMPO においては、対称形の3本線のシグナルが検出された。Carbamoyl-PROXYL、nordiazepam-PROXYL-propyl 及びhaloperidol-TEMPO 投与後のラット頭部においては、 DMSO溶液の場合と同様に3本の対称形シグナルが検出された。しかし、16-DS、5-DS、 maleimide-TEMPO、 nordiazepam -TEMPO及びnordaizepam-16-DOXYL-stearylpropyl においては非対称形の 3本線が観察された。その際ラット頭部のL-バンドESRスペクトルによるcarbamoyl-PROXYL、maleimido-TEMPO、 nordiazepam-TEMPO、nordiazepam-PROXYL-propyl 及びhaloperidol-TEMPOの半減期は、それぞれ7.8分、 5分、 5分、 26分及び2分であり、5-DS及び16-DSは、 15分間安定であった。
次にラット頭部の上から見た二次元投影画像(上に口、下に首)を左に示し、 脳の位置におけるスライス幅1.5mmの冠状断のCT画像を右に示した。また、上段(ａ)にラット脳表面及び脳内のcarbamoyl-PROXYL(頚動脈よりcarbamoyl-PROXYLを注入後脳を取り出し、脳表面にcarbamoyl-PROXYLをさらしたもの)を，中断(ｂ)及び下段(ｃ)に頚動脈より注入したmaleimido-TEMPO及びcarbamoyl-PROXYLを示した(図. 1)。 Carbamoyl-PROXYLについては、ESR-CTシステムによると脳部位には分布が認められず、脳下部の血管に分布が認め

られた（図１）。Maleimido-TEMPO（図1-b）、16-DS及び5-DSは、脳部位に多く分布していることが認められた。しかし、haloperidol-TEMPOを用いた場合は脳部位における分布が認められなかった（図省略）。

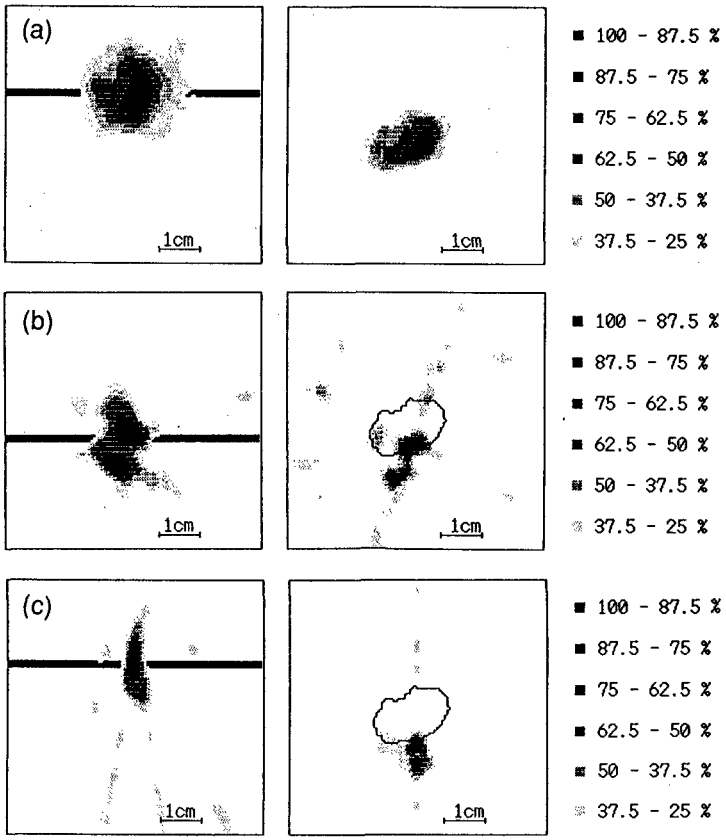


図１．ラット頭部のＥＳＲ－ＣＴ像。ラット頭部の上から見た二次元画像（上に口、下に首）を左に示し、脳の位置におけるスライス幅1.5mmの冠状断のCT画像を右に示した。上段（ａ）にラット脳表面及び脳内のcarbamoyl-PROXYL（頚動脈よりcarbamoyl-PROXYLを注入後脳を摘出し、脳表面にcarbamoyl-PROXYLをさらしたもの）を、中断（ｂ）及び下段（ｃ）に頚動脈より注入したmaleimido-TEMPO及びcarbamoyl-PROXYLを示した。

[考察]

先にIshidaら(2)は、carbamoyl-PROXYLを腹腔内に注入後のラット頭部のESR-CT画像を報告している。彼らは、脳部位にcarbamoyl-PROXYLの分布を認めていないことより、carbamoyl-PROXYLは脳関門を通過し難いことを示唆している。今回われわれは頚動脈よりcarbamoyl-PROXYLを注入したが、同様な実験成績であった。今回は高速磁場掃引法を取り入れたので、ESR-CTのデーターを取り込むのに従来は40分かかっていたのが、12分に短縮された。従って半減期が2分と非常に短いhaloperidol-TEMPOのESR-CTが可能となった。しかし、3本の対称なL-バンドESRスペクトルが得られたことから、haloperidol-TEMPOは脳内では結合していないと考えられたが、ESR-CT画像により脳部位に入っていないことが確かめられた。これは、carbamoyl-PROXYLの場合と同様であった。しかし、5-DS、16-DS、maleimide-TEMPOについては非対称形の3本線のシグナルが得られたことから、これらは脳内に結合していることが想定されたが、今回のESR-CT画像により脳部位に直接入っていることが観察された。

今回初めて生きたラット脳部位のESR-CT画像を捕えることができた。生体内の酸化還元状態を生きたままの状態で無侵襲に捕えられたことは、今までのMRI、PETに加え、さらに新しい情報が提供されるものと期待される。

[文献]

1) Ishida, S., Kumashiro, H., Tsuchihashi, N., Ogata, T., Ono, M., Kamada, H. and Yoshida, E. Phys. Med. Biol. 34:1317-1323, 1989. 2) Ishida, S., Matsumoto, S., Yokoyama, H., Mori, N., Kumashiro, H., Tsuchihashi, N. and Ogata, T. Magnetic Resonance Imaging 10: 109-114, 1992. 3) Mori, A. unpublished data. 4～6), Niwa, R. unpublished data.

25 アルツハイマー病血液バッフィコートのハムスター脳への接種実験

谷向　知，武田雅俊，工藤　喬，楯林義孝，大河内正康，金山　厳，播口之朗，西村　健

大阪大学医学部精神医学教室

〔要約〕

アルツハイマー病の病因を究明する目的で，家族性・非家族性アルツハイマー病患者および健常者から採取した血液バッフィコートをハムスターの脳内に接種した．接種１８カ月後に脳組織を細胞骨格蛋白である２００ｋニューロフィラメント，タウ，ユビキチンなどの抗体を用いて免疫組織染色学的検討を行った．さらに前回本学会で報告した継代接種により病変のみられたハムスター脳を第３世代として接種した．家族性・非家族性アルツハイマー病患者のバッフィコート接種ハムスター脳では，抗２００ｋニューロフィラメント抗体で染色される線維増生を胞体内に蓄積する神経細胞を認めた．

この線維はタウ・ユビキチンの抗体でも染色された．しかし健常者のバッフィコートを接種した群では病変は認められなかった．第３世代接種群では接種３カ月で線維の蓄積を認めたが，この線維は抗体の使い分けによりこれまでのものと異なりリン酸化を受けていないという所見であった．今回の結果は，バッフィコート接種によりハムスター脳内に惹起される病変がアルツハイマー病で惹起されてるものであり，病因を示唆するものと考えられる．

［はじめに］

アルツハイマー病は中枢においてアミロイドβ蛋白で構成される老人斑，paired helical firamentsで構成される神経原線維変化を特徴とする神経病理学所見を伴う進行性の痴呆を呈する変性疾患である．家族性アルツハイマー病患者の中でアミロイドβ前駆体蛋白遺伝子に点突然変異を持つものがいることが報告され(2)，遺伝的要因が本疾患の発症に関与しているとし精力的に研究が行われているが突然変異の認められない家族性・非家族性アルツハイマー病がはるかに多い．また，ボクサー脳症などの外傷でみられるような神経原線維変化，アミロイド蛋白の沈着を伴う痴呆がみられること(1)，さらには，中毒(3)・感染(3)・免疫異常(4)などの関与がアルツハイマー病の発症要因として検討されてきたが，未だ不明な点が多く結論がでるに至っていない．

我々は，点突然変異（ＡＰＰ^{717}Val→Ile）を有する家族性アルツハイマー病患者を経験し，その血液から採取したバッフィコートをハムスター脳内に接種することにより，①接種１８カ月後のハムスター脳組織において脳幹神経核の神経細胞胞体内に嗜銀性の線維性構造物の集積を認めること，②この線維は抗２００ｋニューロフィラメント抗体・抗タウ抗体・抗ユビキチン抗体で染色されること，③病変が認められた脳組織をハムスターに継代接種して６カ月後の免疫染色においてバッフィコート接種時と同様の性状を持つ線維性構造物をもつ病変を認めること，などを報告した(6,7,)．今回は①病変の認められたハムスター脳をさらに第３世代として接種し，３カ月後に行った神経病理学的検索，②新たに追加した点突然変異を有しない家族性・非家族性アルツハイマー病患者および健常対照者のバッフィコートを接種した１８カ月後のハムスター脳組織について検討したので報告したい．

［方法］

１．　バッフィコートの採取と接種

兄弟発症を認めた点突然変異を認めない家族性アルツハイマー病患者，物忘れで発症した５８才男性の非家族性アルツハイマー患者，および家族歴の有しない現在まで特別の既往歴の認めない４２才男性および５３才女性にインフォームドコンセントを得た上で肘静脈からヘパリン血２０ｍｌを採取した．採取した血液を滅菌スピッツに移し，1,500G, 20分の遠心により分離したバッフィコートを等倍量の生理食塩水でホモジェナイズし，50mg/kgペントバルビタール麻酔下のゴールデンハムスター（メス，６週齢）をステレオで固定し，ブレグマから２㎜左側，２㎜後方，２㎜の深さの大脳皮質に５０μｌずつ接種した．

第３世代接種には前回報告した継代接種群で病変の認められたハムスター脳を１０倍量の生理食塩水でホモジェナイズしたものをバッフィコート接種時と同じ要領で接種した．

２．　バッフィコート接種群の検索

バッフィコート接種１８カ月後のハムスターを50mg/kgのペントバルビタール麻酔下，生理食塩水ののち10%ホルマリンで経心的灌流固定を行った．固定後の脳を切り出し１週間の浸漬固定ののち，６μｍの冠状断パラフィン切片を作成した．この切片を用いて，ＤＡＢを発色基質としてＡＢＣ法にて免疫染色した．第１抗体としては，抗２００ｋニューロフィラメント抗体（monoclonal/Sigma, Amersham)・抗タウ抗体(policlonal/Chemicon)・抗ユビキチン抗体(monoclonal/Chemicon)・抗タウ-1抗体(monoclonal/Boehringer)を用いた．

3．　第3世代接種群の検索

第3世代接種3カ月後のハムスターを同様の手技により灌流固定して作成した脳切片を用いて，ＡＢＣ法にて免疫染色した．第1抗体にはリン酸化・脱リン酸化200kの両方を認識する抗体(monoclonal/Sigma)，脱リン酸化200kのみを認識する抗体(monoclonal/SMI)，リン酸化200kのみを認識する抗体(monoclonal/Amersham)の3種類の抗２００ｋニューロフィラメントを用いた．

［結果および考察］

バッフィコート接種群の脳組織を免疫組織化学を用いて神経病理学的に検討した．抗200kニューロフィラメント抗体を用いた免疫染色では家族性・非家族性アルツハイマー病患者の両方の接種群からも陽性に染色される線維を胞体内に集積する神経細胞を認めた．この神経細胞胞体内に集積した線維は，抗タウ抗体では染色されたが抗タウ-1抗体では染色されずこの線維を構成をしているタウがリン酸化されていることが示唆された．抗ユビキチン抗体による免疫染色では異常線維の増生がみられた胞体全体が染色された．この病変は両側性の病変で，三叉神経核，顔面神経核，前庭神経核，舌下神経核などの脳幹神経核の神経細胞で認められた．しかし，接種部位付近を含め大脳皮質・海馬・脊髄などではみられなかった．また，健常者のバッフィコート接種群の脳組織からは線維集積を認める神経細胞の所見はみられなかった．

この線維集積を認める病変が，点突然変異の有無に関わらず家族性・非家族性アルツハイマー病患者から採取した血液バッフィコートを接種したハムスター脳でのみ認められたことは，この病変がアルツハイマー病特有に惹起されるものであり，アルツハイマー病の病因を示唆するものであると考える．

第3世代接種群では，リン酸化200kのみ認識する抗体では染色を認めなかったが，他の2種類の200kの抗体を用いた免疫染色では陽性に染色される線維の集積した神経細胞を認めた．このことから継代接種群と異なり第3世代接種で，この時期にはリン酸化を受けていない200kニューロフィラメントが増生していることが示唆された．

アルツハイマー病脳においてニューロフィラメント蛋白などの細胞骨格蛋白のリン酸化の異常が示唆されているが，この一連の接種でみられる病変が早い時期にはリン酸化を受けていないニューロフィラメントが増生し，長期になるとリン酸化を受けているというのは興味深い所見であり，アルツハイマー病における細胞骨格蛋白のリン酸化の異常の検討にも有用なモデルであると考える．

Volunteer	Sex	Age	200k(Sigma)	200k(Amersham)	200k(SMI)	tau	tau-1	ubiquitin
1. FAD (with mutation)	M	55	+	+	n.d.	+	−	+
2. FAD (brother of 1)	M	52	+	+	n.d.	+	−	+
3. Doughter of 1	F	24	+	+	n.d.	+	−	+
4. Second passage of 1	−	(6months)	+	+	n.d.	+	−	+
5. Third passage of 1	−	(3months)	+	−	+	n.d.	−	+
6. FAD (no mutation)	M	48	+	+	+	n.d.	−	+
7. FAD (brother of 5)	M	45	+	+	+	n.d.	−	+
8. Sporadic AD	M	63	+	+	+	n.d.	−	+
9. Sporadic SDAT	F	72	+	+	±	n.d.	−	+
10.Healthy control	F	54	−	−	−	n.d.	−	−
11.Healthy control	M	42	−	−	−	n.d.	−	−

+: positive,　−: negative,　n.d.=not done

［文献］

1. Allsop D et al.　Am J Patho 136,255-260,1990.
2. Goate A et al.　Nature 349,704-706,1991.
3. Prusiner SB　N Engl J Med 310,661-663,1984.
4. Rogers J et al.　Neurobiol Aging 9,339-349,1991.
5. Takeda M　Aging of the Brain.Basel,Karger pp265-278,1990.
6. Takeda M et al.　Dementia 2,57-63,1991.
7. 谷向　知ほか　神経化学 30,466-467,1991

26 アルツハイマー病患者および健常者の血小板におけるアミロイドβ蛋白前駆体のプロセシング

大河内正康、武田雅俊、中村佑、車谷隆宏、関山敦生、金山嚴、西村健

（大阪大学医学部精神医学教室）

〔要約〕アルツハイマー病患者および健常者から血小板分画を調整し、トロンビン(Th)刺激によるアミロイドβ蛋白前駆体(APP)およびその部分分解産物の血小板からの放出について検討した。APPの同定と定量はウエスタンブロット法により検討した。血小板のα顆粒放出の指標として血小板第4因子(PF4)を用いた。血小板をトロンビン刺激した後の上清中に約130Kおよび約100Kのバンドを認めそれらは各々KPIドメインを持った全長型APPとKPIドメインを持った分泌型APPであった。また血小板のα顆粒中にKPIドメインを持った全長型APPが含まれており、分泌型APPはそれとは異なった何らかの機構により血小板から放出されている可能性が示唆された。これらの点でアルツハイマー病患者と健常者のあいだに特に差異は認められなかった。また全長型APPが血小板から顆粒放出により分泌された後そのままインキュベートしておくと再び血小板内に再取り込みされていると考えられるデータを得た。この再取り込みは分泌型APPではみられなかった。

［目的］

アルツハイマー病患者脳の特徴的な病理学的所見として老人斑や神経原線維変化が知られている。老人斑の中心部に沈着するアミロイドβ蛋白の配列が明らかにされ、アミロイドβ蛋白はより大きな前駆体蛋白として生合成されることが示されて以来、APPのプロセッシングについての研究が精力的に行なわれている。APP遺伝子を過剰に発現させたCOS細胞を用いた実験などから、APPのプロセシングには正常細胞内でも複数の経路が存在しており、アルツハイマー病などの病的過程においてはAPPのプロセシングに変化が生じていることが示唆されている。アルツハイマー病患者細胞内におけるプロセシングの異常を検討することはアルツハイマー病脳の病理学的過程の解明にとって重要であると考えられる。我々はAPPのプロセシングの異常を検討するために、生物学的材料として、大量のAPPを含むことが知られており（1,2）、かつ、患者からの入手が比較的容易な血小板に注目した。本研究では、アルツハイマー病患者および健常者から調整した血小板からのAPPおよびその部分分解産物の放出について検討した。

［方法］

実験の主旨及び内容を十分に説明し同意を得たアルツハイマー病患者及び健常人から採取した静脈血を、Mustardらの方法に従い（6）、ACD anticoaglunt で抗凝固処理した後他の血液成分より分離し Tyrode buffer を加えて血小板分画とした。8mlの静脈血から得た十分に洗浄した血小板分画を200μl の Tyrode buffer (pH 7.4)に懸濁し、 Th を添加した後、1200g、10分の 遠沈によりPlatelet Lysate (PL)分画とPlatelet Releasate (PR)分画とに分離した。PR分画は分離後凍結及び融解を２回繰り返したものを遠沈しその上清を使用した。血小板刺激によるα顆粒放出の指標としてα顆粒の構成成分である PF4の放出量をELISA法により測定した。各分画中に含まれるAPPの部分分解産物の同定と定量はウエスタンブロット法により検討した。１次抗体として、22C11(Boehringer)、R37、R98（東京都老人研、亀谷先生より供与）、GID（T.Saitohより供与）をもちいた。

［結果］

１） アルツハイマー病患者５例及び健常人５例についてTyrode buffer中に存在するwashed platelet (platelet from about 8cc of blood/ 200μl of Tyrode buffer ,pH 7.4)にTh濃度10U/mlで刺激後5分経過したところで1200g、 10分遠沈し上清をPR分画とし22C11を１次抗体として用いてウエスタンブロットによりそのAPPの分泌を検討した。その結果メインバンドとして約130K及び約100Kの2本のバンドを認めた（図１）。同じPR分画についてGID、R98を１次抗体としてウエスタンブロットを行なったところ同じバンドを認めた。ところがR37抗体で同様にウエスタンブロットを行なったところ130Kのバンドのみ認めた。（図２）これらの実験ではアルツハイマー病患者と健常人のあいだで明確な差異は認められなかった。

２） アルツハイマー病患者２例及び健常人２例について血小板に加えるTh濃度を0,0.1,1,5,10,50U/mlと段階的に変化させた後PR分画をウエスタンブロットで検討したところ130K及び100Kの２本のバンドは各々の最大放出量を示すTh濃度に差異がみられた。130Kバンドは Th濃度5～10U/ml でデンシトメーターでの測定値はプラトーに達した。一方100KバンドはTh濃度10U/mlまでは130Kのバンドの測定値よりも低くTh濃度0.1U/ml の刺激ではその放出をウエスタンブロット上で認めなかった。またTh濃度を10U/ml～50U/ml に変化させると100Kバンドの測定値は大幅に増加した。同時にPL分画を検討したところ100Kバンドのみを認め、そのバンドはTh濃度の増加とともに減少した（図３）。

PF4をα顆粒放出のコントロールとして測定したところPF4値はELISA上で血小板を単離する過程で少量放出されておりまた血小板をTh刺激した場合約10U/mlの刺激でその測定値はプラトーに達した。（図４）これらの実験ではアルツハイマー病患者と正常人のあいだで明確な差異は認められなかった。

３） 健常人２例について血小板をThで刺激した後37℃でインキュベートした状態で放置し1、15、30、45分、1、2時間後にPR分画内のAPPの量及びパターンをウエスタンブロットで検討した。Th濃度1U/mlの刺激でも50U/mlの刺激でも同様にAPPの最大放出は1分後にみられた。Th濃度1U/mlの刺激で主に認められる130KバンドはPRと血小板とを共にインキュベートすると時間の経過と共に減少した。（図５）50U/mlの刺激後PRと血小板を共にインキュベートしたところ130Kバンドは減少したが100Kバンドは減少しなかった。

次にTh濃度1U/mlで刺激し1分後PRとPLとを遠沈により分離しその後37℃でインキュベートし時間の経過と共に130kのバンドの減少がみられるかどうか検討した。その結果刺激後すぐにPRとPLを分離した状態では130Kバンドの減少は認められなかった。同様にTh濃度50U/mlの刺激後でも、PR分画を分離しておくと130Kおよび100Kバンドの

減少は認められなかった。

[考察]

130Kバンドは22C11（APPのN端60から100残基を認識するモノクローナル抗体）、R98（KPI37から49残基に対するポリクローナル抗体）(4)、GID（APPのN端176から185残基を認識するポリクローナル抗体）、R37（APPのC端681から695に対するポリクローナル抗体）(3)のいずれでも同様に認識されることからAPP770又はAPP751の全長型であると考えられる。また100Kバンドは22C11、R98、GIDで認識されるがR37でバンドが認識されないこととその分子量からAPP770又はAPP751の分泌型(APP truncated form)であると考えられる。これらのデータ及び現在までの知見を総合すると血小板をTh刺激することによりKPIドメインを持ったAPPが放出されると考えられる。

血小板中のAPPはα顆粒中に存在するといわれている（7）。本実験の結果はTh刺激後、顆粒放出の指標としたPF4の分泌と全長型APPの分泌が同期しているにもかかわらずPF4の分泌と分泌型APPの分泌は一致しないことを示している。130Kバンドも100KバンドもTh刺激後1分で最大に達しており全長型APPが分泌された後に分解されて分泌型に変化している可能性は否定される。APP分泌型の放出は単なるα顆粒放出過程以外のものが関与していると考えられる。

これまでにfibroblastを用いたProtease Nexin (PN)に関する実験ではPNがfibroblastから放出された後プロテアーゼとセルピンドメインでバインドした後fibroblast中に再取り込みされその後プロテアーゼとともに分解されることが報告されている（5）。近年そのPNファミリーの1つであるPN 2がAPPのKPIドメインを持ったものの分泌型であることがわかった（7）。本実験の結果からKPIドメインにプロテアーゼ等の物質が何もバインドしていない全長型のAPPが放出された後暫くインキュベートするだけで再び血小板内にとりこまれる可能性が示唆された。このデータは全長型APPからのβ蛋白の形成が血小板内に再取り込みされたAPPの分解により起こる可能性を示唆している。

[文献]

1) Bush et al. J. Biol. Chem.26,15977-15983(1990)
2) Cole et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 170,288-299(1990)
3) Ishii et al. Neuropath Appl Neurobiol, 15,135-147 (1989)
4) Kennedy et al. Neurodegeneration, 1,59-64
5) Low et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.2340-2344 (1981)
6) Mustard et al. Method in Enzymology. 169,3-14(1989)
7) Van Nostrand. Science. 745-748(1990)

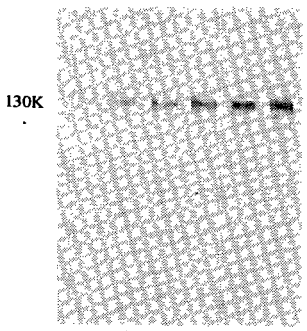


図5

Th濃度1U/ml刺激後PLおよびPR分画を分離せずに各時間インキュベートした。その後遠沈しPR分画について検討した（22C11）
1：2h, 2：1h, 3：45min, 4：30min, 5：15min, 6：1min後

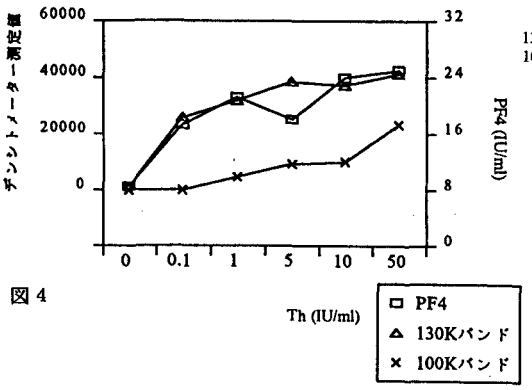


図4

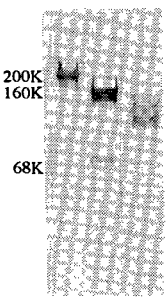


図1

1：NF200K、2：NF160K,68K
3：Th刺激後のPR分画

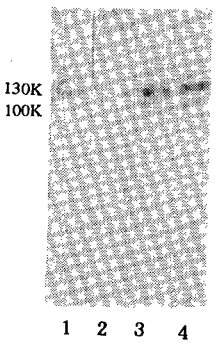


図2

Th刺激後のPR分画のウエスタンブロット
1：R98, 2：R37, 3：22C11, 4：GID

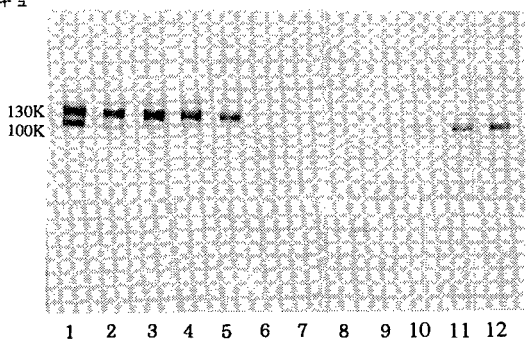


図3

Th各濃度でのPR分画及びPL分画のウエスタンブロット
PR分画、1：50, 2：10, 3：5, 4：1, 5：0.1, 6：0U/ml
PL分画、7：50, 8：10, 9：5, 10：1, 11：0.1, 12：0U/ml

27 培養細胞系でのアルツハイマー病アミロイド前駆体タンパク質の代謝の検討

○丸山 敬[1]、熊谷 善弘[1,2]、山尾－針ヶ谷 和花子[3]、宇佐美 美穂子[1]
([1]東京都精神研・分子生物、[2]三共（株）・活性研、[3]東京都臨床研・遺伝情報)

〔要約〕

アルツハイマー病の老人斑の主成分であるβ/A4タンパク質は前駆体（APP）の異常代謝によって蓄積すると考えられる。そこで、このAPPの代謝を培養細胞で遺伝子導入により過剰に発現させて検討した。サル腎臓の線維芽細胞由来のＣＯＳ細胞での一過性の発現実験では、Eschらの報告と同様に短いC末断片を残して分泌されていた。切断部位を改変した変異APPも野性型と同様に分泌されたため、APPの分泌機構は、アミノ酸配列のみでなく、APPの立体構造も認識していると考えられた。また家族性アルツハイマー病で発見された変異（Val717-Ile, Phe, Gly）もこの発現系では代謝に影響を及ぼさなかった。より病態に近いグリア系など神経系の培養細胞での安定発現系での検討が必要であるが、APPの異常が直接その代謝異常（β/A4タンパク質の生成）に関連するものではないことを示唆する。

＜序文＞

アルツハイマー病の痴呆の原因として、老人斑の主成分であるβ/A4タンパク質（β/A4）の蓄積による神経変性が考えられている。このアミノ酸４２個のβ/A4は、アミノ酸695個の前駆体（APP）に由来することが判明した。APPは正常組織にも存在するが、その大部分はβ/A4の配列を中断する部位で切断され、N末側は分泌されているため、β/A4フラグメントは生成され得ない(1)。アルツハイマー病状態では、この本来の正常な代謝に問題が生じ、β/A4が蓄積されると考えられる。

APPには、神経細胞に比較的特異的なAPP695と、各種の組織に分布するAPP751/770がある。APP751/770はAPP695にタンパク質分解酵素の阻害配列が挿入されており、そのN末側の分泌型は、細胞増殖に関連する細胞外因子として独立に研究されてきたNexinIIであることが判明した。APP695の生理機能については不明である。

APPはタンパク質としての発現が比較的低いために、また、β/A4タンパク質の蓄積が患者もしくは高等類人猿に限定されるために、タンパク質化学的な研究が困難である。そこで、培養細胞へ遺伝子導入によりAPPを過剰に発現させて、その代謝の検討を試みた。

＜方法＞

ＣＯＳ細胞での一過性の発現は既報に従ってDEAE-dextran/chloroquine法で行い、72時間後に発現を検討した。安定形質転換細胞は、ニューロブラストーマ由来の培養細胞NB-1とIMR-32にエレクトローポレーション法によって作成を試みた。

＜結果と考察＞

１。ＣＯＳ細胞での一過性発現による検討

（ａ）APP695とAPP770の代謝の差

APP695は神経系細胞に比較的特異的に存在し、蛋白質分解酵素阻害活性を持ったAPP751/770は各種の組織に普遍的に存在する。アルツハイマー病では、このAPP751/770の割合が増加しているとの報告があり(5)、また、トランスジェニック・マウスの実験ではAPP751を導入したマウスのみに老人斑様の構造が確認された(4)。

ＣＯＳ細胞での一過性発現では、APP695とAPP770には差がみられず、Eschらの報告と同様にLeu688から始まるＣ末断片を残して分泌されていた。Protease K処理やimmunoprecipitationの結果から、合成されたAPPは直ちに細胞表面に輸送されると考えられた。その切断が細胞表面で行われているのか、輸送途中に行われるのかは不明である。

（ｂ）Val717変異の効果

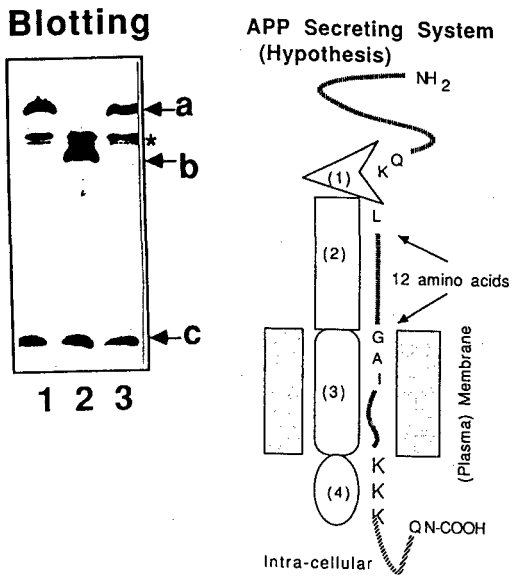
家族性アルツハイマー病の一部の家系でVal717がIle、Phe、Glyに変異していることが発見され、APPの異常代謝の直接の原因として注目されている。これらの変異を持ったAPPを発現させたが、野性型APPと同様に代謝された。しかし、アルツハイマー病の発病が数年の経過を経て発症することを考えると、本実験では検出されえない極く僅かの差が重要な可能性はある(3)。

（ｃ）secretaseの特徴

APPをAsn-Lys-Leu688で切断して分泌する酵素は未だ同定されていないがsecretaseと命名されている。このsecretaseを解析するために、この切断部位をAlaになどで置換した変異APPを発現させたが、野性型と同様に代謝された。この切断部位を欠落したものすら正常に代謝された。このことからsecretaseは単純にそのアミノ酸配列を認識するのではなく、立体構造、おそらく細胞膜からの距離も認識していると考えられた(2)。

２。安定形質転換細胞でのAPPの代謝の検討

ＣＯＳ細胞では線維芽細胞であり、また神経組織にのみ特有なAPPの代謝系が存在する可能性もある。そこで、ニューロブラストーマ由来の培養細胞（NB-1、IMR-32）にAPPのcDNAを導入して恒常的に発現する培養細胞の作成を試みた。いくつかのクローンが得られたが、やはり、ＣＯＳ細胞と同様にsecretaseで切断されて分泌されていた。現在、変異APPを発現する形質転換細胞の作成中である。



(1) Esch, F.S. et al. (1990) Science 248, 1122-1124
(2) Maruyama, K. et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 1670-1676
(3) Maruyama, K. et al. (1991) Neurosci. Lett. 132, 97-100
(4) Quon, D. et al. (1991) Nature 352, 239-241
(5) Tanaka, S. et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 165, 1406-1414

図説明：　右図はsecretaseの構造の仮説である。secretaseは可溶性の蛋白質分解酵素ではなく、膜（おそらく細胞表面膜）に組み込まれた複合体と思われる。その機能部位として、少なくとも、蛋白質切断活性を持つ部位（１）、膜からの距離もしくは立体構造を認識する部位（２）、膜の内側と外側を連結する部位（３）、APPの細胞質側を認識する部位が存在すると考えられる。左図は、ＣＯＳ細胞で発現したAPPをＣ末抗体でimmunoblottingにより検出した。１，野性型APP695；２，Ｎ末側の一部が欠損したAPP695；３，secretaseの本来の切断部位を２０個程度欠損させたAPP695。ａ，ｂは完全長さのAPP（ｂは欠損しているために分子量が小さくなっている）、ｃは膜に残るＣ末断片。変異にかかわらず、同じＣ末断片が生成されている。＊は非特異的バンド（遺伝子を導入していないコントロール細胞でも検出される）。

＜謝辞＞

本研究の一部は、サンド老化および老年医学研究基金、総合健康推進財団、文部省科研費の援助のもとに行われた。

28 ＡＰＰ遺伝子を導入したグリオーマ細胞におけるアミロイドジェニックフラグメントの生成

林要喜知[1]、柏木久美子[1]、吉川和明[2]
（1;森永乳業･生科研、2;東京都神経研･分子神経生物）

〔要約〕ヒトグリオーマ細胞(Bu17)にアルツハイマーアミロイド蛋白質前駆体(APP)のcDNA(APP695,APP770)を導入し、APP過剰発現細胞を得た。導入遺伝子により合成された外来性APPは、内在性APP量の約5-20倍に達したが、細胞内、外での代謝には何等変化が認められなかった。しかし、クロロキンやロイペプチンなどのライソゾームの酵素阻害剤(lysosomotrophic drug)処理により、分子量が8～29KDaからなるAPPフラグメントの著しい蓄積が観察された。このうち16kDa以上のものはβ/A4を含むアミロイド形成能をもつフラグメントと考えられる。免疫染色によりライソゾーム様細胞内小器官にフラグメントの局在が観察された。この蓄積物の形成には、APP695,APP770の両蛋白質において有意な差異がなかった。以上の結果より、ライソゾーム加水分解酵素活性の低下が、細胞内APPの代謝を阻害し、アミロイド形成能をもつフラグメントの産生につながると考えられる。

（目的）　アルツハイマー病は、神経原線維変化や老人斑形成など、いくつかの神経病理学的特徴を持つことが知られている。老人斑は、アミロイド蛋白質前駆体(APP)の異常プロッシングにより形成されると考えられているが、現在のところ適当な細胞モデルがない。近年、神経系の構成細胞では、分泌経路とは異なる細胞内ライソゾーム／エンドゾーム系のAPP代謝経路が存在し[1]、またカテプシンBやDが老人斑に結合することも明らかにされている[2]。これらのことからライソゾームにおけるAPPの代謝がβタンパク質の形成とどのように関わるか興味が持たれる。我々も、この点をさらに詳細に検討するため、全長型のヒトAPP695およびAPP770cDNAを導入したAPP過剰発現細胞を作成し、ライソゾーム加水分解酵素阻害剤の効果を検討した。

（実験方法）　グリオーマ細胞の培養とトランスフェクション：　グリオーマ(Bu17)の培養は、10%FCSを含むDMEM培養液中、5%CO_2/air下で培養を行った。額田らが改良したベクターpKHS[3]にAPP695やAPP770のcDNAsを組み込み、リン酸カルシウム法にてこれらを細胞へ導入した[4]。G418(400μg/ml)存在下で培養した後、クローニングシリンダーにてトランスフェクタントの各クローンを単離した。 免疫蛍光染色とイムノブロット：　培養細胞の蛍光染色は、APPのC末(25アミノ酸残基)に対するウサギ抗体(AC-1)とFITC結合抗ウサギ抗体を用いて既報[5]のように行った。イムノブロットは、細胞抽出液を用いてトリス・トライシンSDS-PAGE[6]を行い、イモビロンに転写した後、AC-1とペルオキシダーゼ結合抗ウサギ抗体(Bio Rad)を用いて行った。

（結果と考察）　外来性APPを過剰発現するトランスフェクタントを免疫染色法により選び、それらの細胞抽出を用いてイムノブロットを行った（図1）。外来性APP695発現細胞では、106～125と145KDaのAPPバンドが、APP770では110と130KDaのAPP分子が合成されていた。しかし、これらの細胞ではAPPの分解フラグメントはほとんど認められず、また細胞変性もなかった。次に、ライソゾーム阻害剤や種々のプロテアーゼ阻害剤を用いてAPP代謝に及ぼす効果を検討した（図2）。 Leupeptin、E64、antipainおよびchloroquine処理は、AC1抗体に反応するフラグメント(8-29 KDa)の著しい蓄積を引き起こした。しかし、pepstatin A、aprotinin、actinonin、arphamenine A、B、soybean trypsin inhibitor、diprotinおよび塩化アンモニウム処理では、同様なフラグメント蓄積がほとんど認められなかった。これらの蓄積は、阻害剤の容量に依存的であり、阻害剤除去後もしばらく蓄積物が代謝されずに残っていた。阻害剤のない条件下では、APPは主として小胞体やゴルジ装置に存在していたが、阻害剤を加えた場合、主としてライソゾーム様細胞小器官に存在した（図３）。おそらく、ライソゾーム／エンドゾームで分解されるAPPが阻害剤により不完全な分解をうけたため、その中間代謝産物であるフラグメントが蓄積したと考えられる。阻害剤なしではこのようなフラグメントが蓄積されないことから、通常の細胞では、APPの発現が数倍上昇しても完全に代謝する能力があるものと考えられる。また、蓄積物の代謝が速やかに起こらないことから、何か凝集物の様なものを構成し始めている可能性がある。また、16kDa以上のフラグメントはβ/A4蛋白質を含むと考えられ、特に16kDaフラグメントはアミロイド様線維を形成する[7]。したがって、これらがトランスフェクタントに対して細胞内から毒性効果を示すか、あるいはニューロンの細胞膜に作用して外部から細胞毒性を発揮するかを現在検討している。なお、ごく最近Haassら[8]により腎細胞を用いて同様な結果が報告されており、細胞特異性についても検討したい。

(文献) (1)Haass,C.,Hung,A.Y.,and Selkoe,D.J.(1991)J.Neurosci.,11,3783-3793. (2)Cataldo,A.M.,Paskevich, P.A.,kominami,E.,and Nixon,R.A.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA.88,10998-11002. (3)Nukada,T.,Mishina,M.,and Numa,S.(1987)FEBS Lett.,211,5-9. (4)Chen,C.,and Okayama,H.(1987)Mol.Cell.Biol.,7,2745-2752. (5)Hayashi, Y.,Haimovich,B.,Reszka,A.,Boettigh,D.and Horwitz,A.F(1990)J.Cell.Biol.110,175-184. (6) Schaegger.H.,and von Jason,G.(1987)Analytical.Biochem.,166,368-379. (7)Maruyama,K., Terakado,K., Usami,M., and Yoshikawa ,K.(1990) Nature,347,566-569. (8)Haass,C.,Kou,E.H.,Mellon,A.,Hung,A.Y.,and Selkoe,D.J.(1992)Nature,357, 500-503.

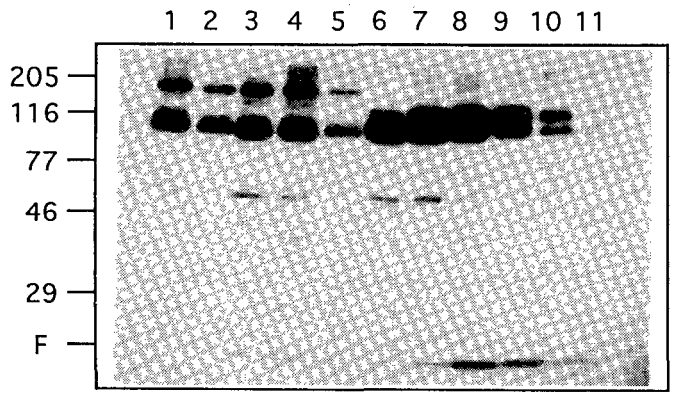


図1. Bu17トランスフェクタントで発現された外来性APPの免疫ブロット。細胞抽出液(10μg/lane)をSDS-PAGE(10%)で分離し、イモビロン上にブロット後、抗AC1抗体およびペルオキシダーゼ抗ウサギ抗体で反応するタンパク質を検出した。レーン1-5: 外来性APP695を発現している異なるクローン。レーン6-10: 外来性APP770を発現している異なるクローン。レーン11: 非トランスフェクタント(Bu17細胞)。

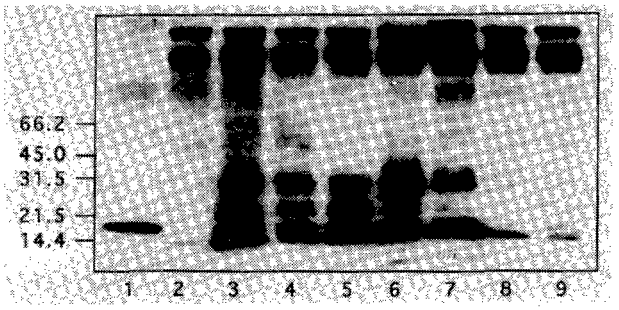


図2. APP分解に及ぼす各プロテアーゼ阻害剤の効果。 APP695を発現するトランスフェクタントを各阻害剤で24時間処理し、細胞抽出液をTris-Tricine SDS-PAGE(16%)で分解後、イモビロンにブロットし、図1のように反応するタンパク質を検出した。レーン1:APPのC末100残基からなるペプチド。レーン2-9:各種阻害剤で処理したトランスフェクタントのパターン。レーン2, 未処理; レーン3,leupeptin(100μg/ml); レーン4,antipain(100μg/ml); レーン5,E64(6μM); レーン6,chloroquine(100μM); レーン7,NH_4Cl(50mM); レーン8,bestatin(250μg/ml); レーン9,chymostatin(100μg/ml)。APP770発現細胞でもほぼ同様の結果が得られた。

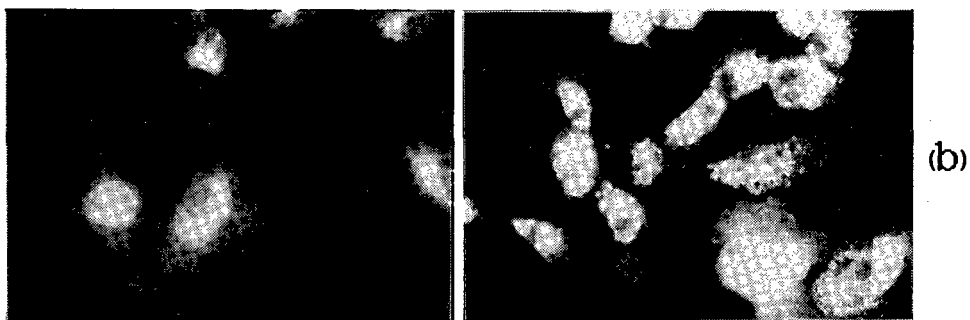


図3. AC1抗体を用いたトランスフェクタント(APP770)の免疫染色。 未処理胞(a)あるいはchloroquine処理細胞(b)を、3.2%ホルムアルデヒドで固定後、AC1抗体で免疫染色し、FITC抗ウサギ抗体で標識した。

29 抗 HIPPOCAMPAL CHOLINERGIC NEUROSTIMULATING PEPTIDE (HCNP) 抗体による高齢者ヒト剖検脳への免疫染色の試み

三竹重久* 小鹿幸生* 林謙一郎* 大塚康史* 山本正彦* 藤森修**
*名市大（医）第二内科 **名市大（医）第二解剖

〔要約〕
ラット培養中隔核のアセチルコリン産生を促進する海馬組織中の polypeptide [Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (HCNP)] を合成した。この HCNP を家兎に免疫し、抗 HCNP 抗体を affinity 精製した。高齢者ヒト剖検脳を抗 HCNP 抗体を使用し免疫組織化学的に検討、同時にウエスタンーブロット (WB) 法を行った。その結果、HCNP 抗体は光顕的および電顕的に平野小体 (HB)、アルツハイマー神経原線維変化 (ANT) を認識しており、特に HB で顕著であった。一方、海馬組織抽出液中の抗 HCNP 抗体認識成分を WB 法で検討した所、抗体は前駆体蛋白の他に2つの成分と反応したことから、HB および ANT 中の抗体結合成分が3つのどの成分と対応するのか不明であり今後の検討が必要と考えられた。

〔はじめに〕
我々は先に海馬ー中隔核系を用い、中隔核培養組織の Cholinergic development を促進する因子群が海馬組織内に存在し[1]、その一つは、Acetyl-Ala-Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leu-OH 構造を有る新規ペプチドであることを示し、Hippocampal Cholinergic Neurostimulating peptide (HCNP) と命名した[2]。また合成 HCNP で家兎を免疫し、抗体を affinity 精製した。この抗体は免疫組織化学的に2週齢 Wistar 系 rat の脳白質を主に認識することを報告した[3]。今回高齢者ヒト剖検脳に免疫組織化学的検討を加え抗 HCNP 抗体は、老齢者および痴呆患者に認められる HB[4][5] およびアルツハイマー ANT[6] を認識することを認めたので報告する。

〔対象および方法〕
1)名古屋市厚生院における高齢者6剖検例の脳および脊髄を対象とした。症例1～6は、それぞれ85、91、87、86、81歳の女性、87歳の男性であった。その後臨床病理学的に症例1、2、4、6は、アルツハイマー型老年痴呆 (SDAT)、症例3、5は正常成人と診断された。症例1～3で、光顕的に前頭葉、頭頂葉、側頭葉(海馬を含め)、後頭、大脳基底核、中脳、橋、延髄、小脳、脊髄を系統的に調べた。症例4、5で免疫電顕、症例6で WB 法を行った。
2)抗体の作製：合成 HCNP を BSA に結合し家兎を免疫、抗血清を得た。得られた家兎ポリクローナル抗 HCNP 抗体を NBr-Activated Sephalose 4B (Pharmacia) により affinity 精製した[3]。
3) WB 法：SDAT で死亡した87歳のヒト前頭葉と海馬組織を0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) 溶液中で超音波破壊し遠心にて画分を得た。この可溶性画分の蛋白量を Bradford法[7] で測定後、一定蛋白量 (20μg) を分取、凍結乾燥後10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む Solubilization buffer に再溶解し、12% SDS-Polyacrylamide gel electro-phoresis (PAGE) を実施後、Immobilon-P[SQ] (Millipore) に転写した。免疫染色は、抗 HCNP 抗体で一昼夜反応後 avidin-biotin - peroxidase complex (ABC) 法にて行った。
4)光顕的免疫組織化学：10% ホルマリン固定のパラフィン切片を作製し、ABC 法にて行った。対照試験として HCNP による吸収試験および一次抗体のかわりに非免疫 Rabbit 血清を使用した染色も実施した。
5)電顕的免疫組織化学：海馬を剖検時摘出し、4% パラホルムアルデヒドおよびザンボニー固定液中に浸漬し LR-White に包埋した。その後 Postembedding 法にてコロイド金免疫染色、電子染色を施し観察した。

〔結果〕
1) WB 法：海馬で10、23、40KDaの部に抗HCNP 抗体陽性バンドを認め、前頭葉で14、20KDa に薄いバンドを認めた(図1)。
2)光顕所見：抗 HCNP 抗体による陽性部位は、海馬に限局し、他の部位では陰性であった。陽性成分は海馬中 Sommer's sector およびその附近に限局し、ロッド状または顆粒状に染色されていた。顆粒状成分は時に ANT 内に認められた。重染色およびミラー切片法により検討したところ、ロッド状成分は HE 染色上エオジン好性であり、その分布を含め HB に一致したが、ANT と共に認める顆粒状成分は、明らかなエオジン好性を示さなかった（図2）。対照試験は、いずれも陰性であった。
3)電顕所見：金粒子は、HB、ANT の2つの構造物中に認められた。
<1> HB：円形、ロッド状の外観を呈し、超微形態上規則的な縞状および格子状構造を認めた（図3）。
<2> ANT：異常線維束内の線維の一部に約80nm 周期、膨大部約24nm、狭窄部約10nm の螺旋状線維を認め paired helical filament (PHF) と一致した。

［考察］

抗 HCNP抗体は光顕的および電顕的に、HB および ANT を認識していた。ANT と HB は同一細胞内に入りまじって出現することが知られており[8]、ANT に認められた抗 HCNP抗体陽性成分が HB を認識した可能性を考慮しなくてはならない。しかし、今回の検討では、ANT 内の陽性成分に HB の所見を欠いていたことから、本抗体は HB と同様に ANT 自体を認識したものと考えられた。

HCNP をコードする DNA とその塩基配列および抗 HCNP抗体の認識部位は、それぞれ東藤他、小鹿他により本誌に発表される予定である。HCNP は187個のアミノ酸からなる分子量約21KDa の前駆体蛋白の N 末端11個のアミノ酸から成るペプチドである。この21KDa 前駆体蛋白は、牛脳由来の phosphatidylethanolamine binding protein[9] と84%の相同性を示し、この前駆体蛋白は SDS-PAGE で23KDa 近傍に移動することが知られている。また、本実験に使用された抗 HCNP抗体は、ラット、ヒト、ウシそれぞれの HCNP において種を越え保存された HCNP の C 末端近傍領域を認識する。WB 法による検討から、前頭葉組織には少ないが、海馬の組織抽出液中には、HCNP の前駆体蛋白と考えられる23KDa 成分の他に2つの異なった成分が存在していた。この事から、抗 HCNP抗体により染色された HB および ANT には、抗 HCNP抗体が認識する3つの成分のいずれかが多く含まれるものと考えられるが、どの成分の蓄積かは不明で今後検討したい。また、何故、抗 HCNP抗体がヒト海馬組織とは明らかな反応を示さず異常構造物のみを認識したのかも今後の課題と考えられた。

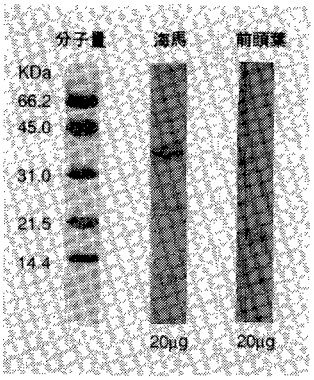


図1、 ウエスタンーブロット法（87 歳、アルツハイマー型老年痴呆例)の所見

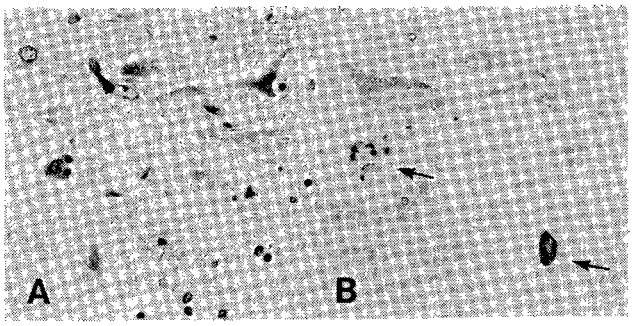


図2、HE 染色(A)と免疫染色(抗HCNP抗体)(B)のミラー標本
平野小体とアルツハイマー神経原線維変化に陽性成分(矢印)を認めた。

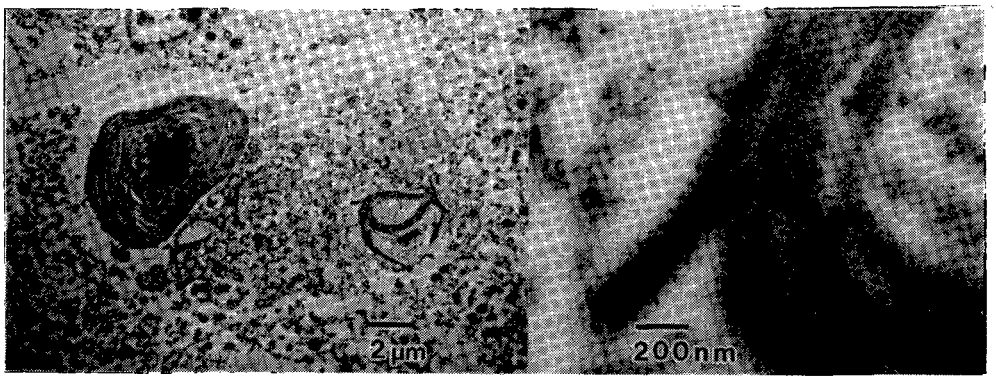


図3、 平野小体の免疫電顕所見

［文献］

1) Ojika,K. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81:2567-2571,1984 2) Ojika,K. et al., Brain research, 572:164-171,1992 3) 林謙一郎 他 神経化学 30(1):328-329,1991 4) Ogata,j. et al., Acta Neuropath, 21:61-67,1972 5) Gibson,P.H. et al., J.Neurol.Sci, 33:199-206,1977 6) Alzheimer A,Allg Z Psychiatr, 64:146-156,1970 7) Bradford M.M., Biochem, 72:248-254,1976 8) 平野朝雄 神経病理を学ぶ人のために p81,1976 9) Schoentgen,F. et al., Eur.J.Biochem, 166:333-338,1987

30 成長抑制因子(GIF)の生理活性部位

内田洋子[1]、辻省次[2]、井原康夫[3]
（都老人研神経病理[1]、新潟大脳研神経内科[2]、東大脳研病理[3]）

〔要約〕
アルツハイマー病脳で減少している成長抑制因子（GIF）は、銅と亜鉛を含むメタロチオネイン様の蛋白である。正常老人脳、および、ヒトGIFcDNAを組み込んだ大腸菌からGIFを精製し、その生理活性部位を検討した。ヒト脳由来のGIFから金属を除いても、金属を亜鉛だけに変えても抑制活性は減少しなかったが、金属（－）培地中で大腸菌に合成させたGIFには抑制活性は無かった。ヒト脳由来GIFのトリプシン消化物のうち、成長抑制活性があるのはCAKペプチドであることがわかったが、化学合成したCAKペプチドには活性が無かった。

アルツハイマー病脳では神経栄養因子活性が高くなっているが、これは、成長抑制因子（GIF）が正常老人脳と比べて減少しているためである（1、2）。GIFは銅と亜鉛を含むメタロチオネイン様の蛋白で、中枢神経系のアストロサイトに分布していることがわかっている（3）。今回は、GIFの活性発現に金属が必要かどうか、GIFの生理活性部位について検討した。

〔方法〕
ヒト脳由来のGIFの調製：既報（3）に従い、正常老人の大脳皮質から精製した。GIFは、GIF53-54を認識するペプチド抗体を使ったdot immunobindingによって検出した。
recombinant GIFの調製：GIFの翻訳領域を含むcDNA（4）を発現ベクターに組み込み、大腸菌に導入してGIFを発現させた。大腸菌のlysateから、既報（3）に従い、GIF抗体に反応する蛋白を精製した。精製標品の分子量は、イムノブロット上で、脳由来のGIFと同じ7kDaであった。
ヒト脳由来のGIFからのmetal-free GIFとZn-GIFの調製：脳由来GIFを0.1N HClで処理後、ゲル濾過してmetal-free GIFを得た。metal-free GIFにメルカプトエタノール存在下で10倍量（モル比）の$ZnCl_2$を加え、ゲル濾過してZn4-GIFを得た。GIFに結合する金属の有無は原子吸光分析によって調べた。
成長抑制活性の測定：新生ラットより大脳皮質を取り出し、trypsin-DNase 1でdissociateして細胞を得た。Gelatin-polyornithine coatしたmicroplateに1.75×10^4個／wellの細胞をまき、無血清培地にアルツハイマー病脳抽出液を加えて5日間培養した。培養後、細胞を固定し、ELISAでMAP2レベルを定量した。成長抑制活性は、アルツハイマー病脳抽出液中の栄養因子活性を何%阻害するかで示した。

〔結果と考察〕
（1）GIF活性と金属
脳由来のGIFから銅と亜鉛を除いても、結合する金属を亜鉛だけ(Zn4-GIF)に変えても、GIFの成長抑制活性は減少しなかった（図1）。しかし、recombinant GIF(rGIF)では、metal-free rGIFには抑制活性がなく、亜鉛を含むGIF(Zn6-rGIF)には抑制活性が見られた（Zn6-rGIFのspecific activityは脳由来GIFのそれの約1/10）（図2）。これらの結果は、GIFの活性発現に銅と亜鉛が必要というのではないことを示唆している。むしろ、金属の結合したGIFは、金属の結合していないGIFとその高次構

造が異なっており、GIFの活性発現には金属が結合した状態の高次構造が必要であることを示唆している。

（2）GIFの抑制活性部位

脳由来のGIFを固定化トリプシンで消化し（室温、１８時間）、各ペプチド断片の成長抑制活性を調べたところ、CAK(GIF45-47)に抑制活性が認められた（GIFの最大抑制活性を100%とすると、CAKの活性は34-58%）。しかし、化学合成したCAKペプチドには、GIFに見られるような強い抑制活性は認められなかった。GIFから切り出されたCAKペプチドのC18カラムからの溶出位置は、合成CAKの溶出位置と異なっていた。GIFのトリプシン消化実験から、GIFの活性部位がCAKにあるらしいことがわかった。しかし、合成CAKペプチドには抑制活性が無いことと、メタロチオネインにもCAK配列があること（CAKの位置が異なり、.....SCAK....であるため、トリプシン消化で切り出されない）から、CAKが抑制活性を持つためには別の要素が必要であることが示唆された。

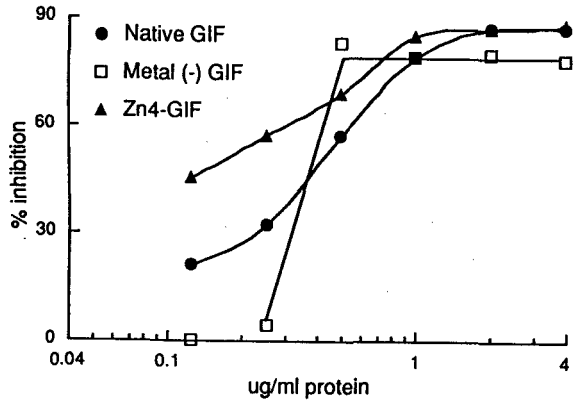


図1　ヒト脳由来GIFより調製したmetal free GIFとZn-GIFの成長抑制活性

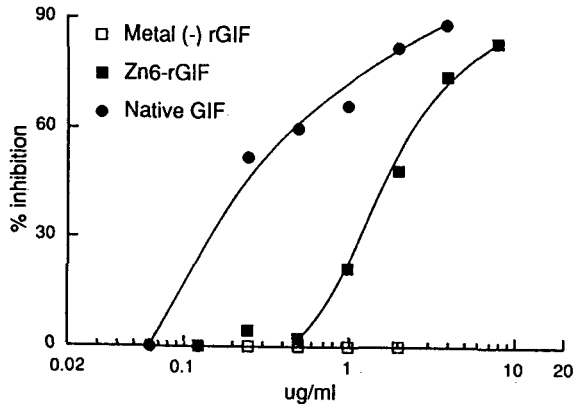


図2　Metal free recombinant GIFとZnを含むrecombinant GIFの成長抑制活性

〔謝辞〕

原子吸光分析を行なっていただいたバリアンインスツルメンツリミテッドの斉藤好一さんに感謝する。本研究の一部は文部省科学研究費重点領域（1）（０２２４０１０４）のもとに行なった。

〔文献〕

(1) Uchida Y et al: Biochem Biophys Res Commun, 150: 1263-1267 (1988)

(2) Uchida Y & Tomonaga M: Brain Res, 481: 190-193 (1989)

(3) Uchida Y et al: Neuron, 7: 337-347 (1991)　　(4) Tuji S et al, in press

31 アルツハイマー病脳におけるプロテインキナーゼCアイソザイム量の変動 ーエンザイムイムノアッセイ法による定量的検討ー

下濱　俊、松島秀行、山岡由美子、木村　淳、亀山正邦*、
萩原正敏**、日高弘義**、谷口隆之***
（京都大·医·神経内科、住友病院*、名古屋大·医·薬理**、京薬大·生物***）

〔要約〕

ヒト脳における プロテインキナーゼC（PKC）アイソザイム（α,β,γ）量をサンドイッチタイプのエンザイムイムノアッセイ法により定量的に測定し、アルツハイマー病脳での変化について検討した。ヒト脳において各PKCアイソザイムは細胞質分画と膜分画のいづれにも存在し、膜分画の方に多く存在した。アイソザイムの中では量的には β>α>γ の順で存在していた。12例の対照群と8例のアルツハイマー病群の剖検脳側頭葉を用いた検討では、アルツハイマー病群ではいづれのアイソザイム量も減少する傾向が認められ、PKC-β量が膜分画においてのみ有意に減少していた。ホルボールエステル結合数も膜分画においてのみ有意に減少していた。これらの結果よりヒト脳では アイソザイム としては β type が最も多く存在し、膜分画での PKC-β の減少がアルツハイマー病の病態生理に関与していることが示唆された。

[目的]

PKC はリン脂質依存性Ca^{2+}感受性セリン／スレオニンタンパクリン酸化酵素である（1）。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、ジグリセリド（DG）とイノシトールリン酸が産生される（2）。DGはリン脂質とCa^{2+}の存在化にPKCを活性化し、活性化したPKCは標的タンパクをリン酸化することにより細胞の活動、成長、分化等の調節で重要な機能を発現していると考えられている（3）。これまでにアルツハイマー病における PKC の変動については、ホルボールエステル結合およびヒストンH III のリン酸化を指標に検索され、アルツハイマー病脳の顆粒性分画でPKCレベルおよび活性の有意な減少が指摘された（4）。さらに PKC アイソザイムの全アミノ酸配列が明かにされたことより、各アイソザイムに特異的な 10 数個のアミノ酸配列のペプチドを合成し、これを抗原として作製した抗体による検索がなされ、アルツハイマー病脳では、特に PKC-βII の変化が著しいことが示された（5,6）。しかし、その後これらの結果と異なる報告もなされており（7,8）、アルツハイマー病の病態生理における PKC の関与については依然として不明である。その一つの原因は、ウェスタンブロット法や免疫組織染色法による PKC の検索は、いわば定性的な検索と考えられ、正確な量比関係を求めることが困難であるからと思われる。そこで、私達は、サンドイッチタイプのエンザイムイムノアッセイ法を用いて、ヒト脳での 各PKC アイソザイムの定量化について検討するとともに、アルツハイマー病脳での変化について検索した。

[対象]

対照群は12例（平均年齢81歳）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（平均年齢79歳）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。検索部位は側頭葉とした。

[方法]

1) PKC アイソザイムの定量法

精製 PKC を抗原として作製された3種類のモノクローナル抗体 MC-1a, -2a, -3a は、ヒドロキシアパタイトカラムにて分画した PKC アイソザイム（γ, β, α）の N 末端をおのおの特異的に認識することがウェスタンブロットの結果より明かにされている。また、PKC のC末端のポリペプチドを合成して作製したポリクローナル抗体は、全てのアイソザイムのC末端を認識することが示された（9）。そこで、0.5 μg の各モノクローナル抗体を 96 穴マイクロプレートに4° Cで固相化後、5 % BSA でブロッキング後、このプレートにサンプルを入れ、サンプル中の PKC を吸着させる。よく洗浄した後ペルオキシダーゼで標識したポリクローナル抗体によってサンドイッチし、o-フェニレンジアミンの酸化反応による発色を吸光光度計（492 nm）で測定することにより定量した（9）。単位は抽出蛋白質 1 mg 当りの PKC 量で比較した。

2) サンプル調整法

組織を9倍量の buffer (1% BSA, 0.1 M NaCl, 20 mM EDTA, 1 mM $MgCl_2$, 0.001 % leupeptine, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) で homogenize した後、100,000 x g で 60 分間遠沈し、その上清を細胞質分画とした。その沈渣を0.5 % 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate を含む抽出 buffer で resuspend した後 homogenize し、再び 100,000 x g で 60 分間遠沈し、その上清を膜分画とした。

3) ^{3}H-PDBu結合実験

組織を9倍量の buffer (0.32 M sucrose, 5 mM HEPES (pH 8.0), 5 mM benzamidine, 2 mM dithiothreitol, 3 mM EGTA, 0.5 mM MgSO4, 0.5 mM ZnSO4, 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 0.1 mg/ml leupeptine, 0.05 mg/ml pepstatin, 0.1 mg/ml aprotinine)で homogenize した後、1,000 x g で 10 分間遠沈し、その沈渣をresuspend した後 homogenize し核分画とした。上清を100,000 x g で 60 分間遠沈し、その上清を細胞質分画とした。その沈渣を resuspend した後 homogenize し膜分画とした。^{3}H-PDBu 結合実験は、10 mM magnesium acetate, 1.4 mM $CaCl_2$, 0.4 mM EGTA, 50 mM KCl, 4 mg/ml BSA, 100 μg/ml phosphatidyl serine およびリガンドとして^{3}H-PDBu を含む 50 mM Tris-HCl buffer に上記の各分画のサンプルを加え、4° C で一時間反応させることにより行った。特異的結合部位は、1 μM の cold PDBu の非存在下および存在下の結合部位数の差で求めた。最大結合数（Bmax）および解離定数（kd）は、Scatchard 解析により求めた。

[結果]

1) ヒト脳における PKC アイソザイム量およびアルツハイマー病脳における変化

ヒト側頭葉組織における全 PKC 量のうち、おおよそ β type が約 42 %、γ type が 30 %、α type が 28 % を占めた。いづれのアイソザイムもその約 90 % は、膜分画に存在していた。アルツハイマー病脳における PKC アイソザイム量は、正常脳に比べ、β type が膜分画において有意に減少していた。細胞質分画の γ type 量もアルツハイマー病脳において減少の傾向が認められたが、有意ではなかった（表 1）。

2) アルツハイマー病脳における ^{3}H-PDBu 結合能の変化

ヒト脳の各分画組織において特異的 ^{3}H-PDBu 結合部位は単一であることが Scatchard plot 解析より判明した。^{3}H-PDBu 結合能は、アルツハイマー病脳において、正常脳に比べ膜分画においてのみその最大結合量が有意に減少していた。その他の分画での最大結合量およびいづれの分画でも解離定数は、アルツハイマー病脳において有意な変動は認められなかった。

表 1　ヒト脳における PKC アイソザイム量およびアルツハイマー病脳における変動

	細胞質分画		膜分画	
	対照群	アルツハイマー病群	対照群	アルツハイマー病群
α type	116 ± 24	101 ± 25	1403 ± 89	1169 ± 68
β type	268 ± 54	227 ± 31	1848 ± 149	1214 ± 109*
γ type	114 ± 18	64 ± 11	1236 ± 87	1150 ± 225

* $p<0.05$　　単位は　ng of rabbit brain PKC isozymes/mg protein

[考察]

脳は PKC の豊富な組織であると考えられているが、今回のエンザイムイムノアッセイ法による定量的検討により、ヒト脳における PKC アイソザイムの組織内分布が明らかとなった。まず、アイソザイムのうちでは、β type が最も豊富に存在すること、さらにいづれのアイソザイムも細胞内では膜分画に約 90 % 存在していることが示唆された。

アルツハイマー病脳側頭葉において、β type の PKC アイソザイム量が、対照群に比べ、膜分画において有意に減少していることがエンザイムイムノアッセイ法による定量的検討により示された。また、有意ではなかったが、γ type の PKC アイソザイム量が細胞質分画において減少する傾向を認めた。私たちは、以前に各アイソザイムに特異的な合成ペプチドを抗原として作製した抗体による定性的なウェスタンブロット解析を施行し、アルツハイマー病脳前頭葉組織の顆粒性分画で、やはりβ type のうち βII type が有意に減少していることを示している。しかし、その際細胞質分画では β type アイソザイムの有意な増加を認めており（5）、今回のエンザイムイムノアッセイ法による定量的検討と異なる点である。^{3}H-PDBu 結合部位は、私たちのエンザイムイムノアッセイ法やウェスタンブロット解析と異なり、80 kDa の PKC 分子のみでなく、プロテアーゼによるその分解産物も認識している可能性がある。今回の検討では、アルツハイマー病脳のやはり膜分画においてのみ ^{3}H-PDBu 結合部位数が有意に減少していることが示されたが、これは主に β type アイソザイムの変動を反映している可能性が示唆される。β type はヒト脳において最も豊富な PKC アイソザイムであり、膜分画の PKC は活性化状態にあることが示唆されており、アルツハイマー病脳側頭葉組織膜分画での β type PKC のダウンレギュレーションは、直接アルツハイマー病における神経機能の障害に関係しているものと推測される。

今回、私たちは、ヒト剖検脳でも PKC アイソザイム（α,β,γ）量をサンドイッチタイプのエンザイムイムノアッセイ法により定量的に測定することが可能であることを示した。この方法は簡便な PKCアイソザイムの定量法であり、今後、アルツハイマー病患者の末梢組織を用いて、生前にその病態生理の解析および痴呆性患者の診断法として応用できる可能性があると考えられる（10）。

文献

1. Takai Y., Kishimoto A., Inoue M. and Nishizuka Y. (1977) J Biol Chem 252, 7603-7609
2. Berridge MJ. and Irvine RF. (1984) Nature 312, 315-320
3. Nishizuka Y. (1988) Nature 334, 661-665
4. Cole G., Dobkins KR., Hansen LA., Terry RD. and Saitoh T. (1988) Brain Res 452, 165-174
5. Masliah E., Cole G., Shimohama S., Hansen L., DeTeresa R., Terry RD. and Saitoh T. (1990) J Neurosci 10, 2113-2124
6. Masliah E., Cole G., Hansen LA., Mallory M., Albright T., Terry RD. and Saitoh T. (1991) J Neurosci 11, 2759-2767
7. Horsburgh K., Dewar D., Graham DI. and McCulloch J. (1991) J Neurochem 56, 1121-1129
8. Clark EA., Leach KL., Trojanowski JQ. and Lee VMY. (1991) Lab Invest 64, 35-44
9. Hagiwara M., Hachiya T., Watanabe M., Usuda N., Iida F., Tamai T. and Hidaka H. (1990) Cancer Res 50, 5515-5519
10. 松島秀行、下濱　俊、木村　淳 (1992) 第 33 回日本神経学会総会抄録集, pp135

32 ＰＨＦ内におけるユビキチン標的タンパク質の同定

森島真帆[1]、長谷川成人[1]、瀧尾擴士[2]、鈴木政美[3]、千谷晃一[3]、井原康夫[1]
（東京大学医学部脳研病理[1]、理化学研究所生体分子解析室[2]、藤田保健衛生大学総医研医高分子[3]）

〔要約〕
アルツハイマー病脳に蓄積するPHFは、その主要構成成分としてタウとユビキチンが同定されている。最近、ユビキチンを含まないタウのみからなるSDS可溶性のPHFが見出され、PHFの形成、蓄積におけるユビキチンの意味について興味が持たれている。本研究では、PHFを精製してAPI消化物のペプチドマップを作製し、得られたペプチドのアミノ酸配列分析、質量分析を行うことにより、PHF内に於いてユビキチンが結合する標的タンパク質を検索した。そして、PHF内ではユビキチンがタウにイソペプチド結合していることをタンパク化学的に証明した。またPHF内でのタウのユビキチン化は、モノユビキチンとマルチユビキチンの両方の形で行われていることも明らかにした。

アルツハイマー病の脳では変性脱落していく神経細胞の細胞内に神経原線維変化と呼ばれる異常な線維状構造物が進行性に蓄積する。神経原線維変化はpaired helical filaments（PHF）から成っており、その主要構成成分として微小管結合タンパク質の一種タウ及びユビキチンが同定されている（1,2）。ユビキチンはATP依存性のタンパク質分解系に関与する因子であり、C末端のGlyが標的タンパク質中のLysにイソペプチド結合し、それがシグナルとして働いてタンパク質の分解が行われることが知られている。しかしPHF内でのユビキチンの存在形態、標的タンパク質、及びタンパク質分解系の関与などについてはまだ明らかにされていない。そこで本研究ではPHFに含まれるユビキチンの意味を知るために、またPHF蓄積のメカニズムを考えるために、PHFに於けるユビキチンの標的タンパク質を検索、同定した。

〔方法〕

1）PHFの精製；アルツハイマー病脳のサルコシル不溶性画分よりグアニジン塩酸でPHFを可溶化した。これをTSK-G3000によるゲル濾過法で分画した後、PHFタウ（A68）を含まない高分子量画分をセミマイクロボア逆相HPLC（RP-300、ABI）を用いて精製した。

2）イムノブロット法による検出；1）により得られた各分画を抗ヒトタウ抗体、抗PHF抗体、抗ユビキチン抗体（DF2）（2）を用いてイムノブロット法により解析した。

3）ペプチドマップの作製；イムノブロットでスメアを呈するPHF、PHFタウ、ユビキチンをLys-Xで特異的に切断する酵素、*Achromobacter lyticus* protease I（API）でそれぞれ消化し、これをセミマイクロボア逆相 HPLC（Select B、Merck）で分離してペプチドマップを作製し、比較した。ここではユビキチンのAPI消化ペプチドを、N末端側からU1、U2、…、U8と呼ぶことにする。

4）アミノ酸配列の決定と質量分析；得られたペプチドはプロテインシークエンサー（473A、ABI）を用いてアミノ酸配列を決定し、またイオンスプレー質量分析機（API III、PE-SCIEX）を用いて質量分析を行った。

〔結果と考察〕

アルツハイマー病脳のサルコシル不溶性画分をグアニジン塩酸で抽出し、ゲル濾過の後、逆相HPLCで分画した。この方法によりSDS-PAGEでPHFに特徴的なスメアパターンを呈する画分を得ることができた。この画分をイムノブロット法により調べた結果、抗タウ抗体のみが反応するスメア画分と抗タウ抗体と抗ユビキチン抗体の両方が反応するスメア画分が存在することが明らかになった。そこでそれぞれの画分をAPIで消化し、ペプチドマップを作製した。精製したPHFタウとユビキチンについても同様にAPIペプチドマップを作製して比較することにより、スメアPHF画分内のユビキチン化ペプチドを探索した。

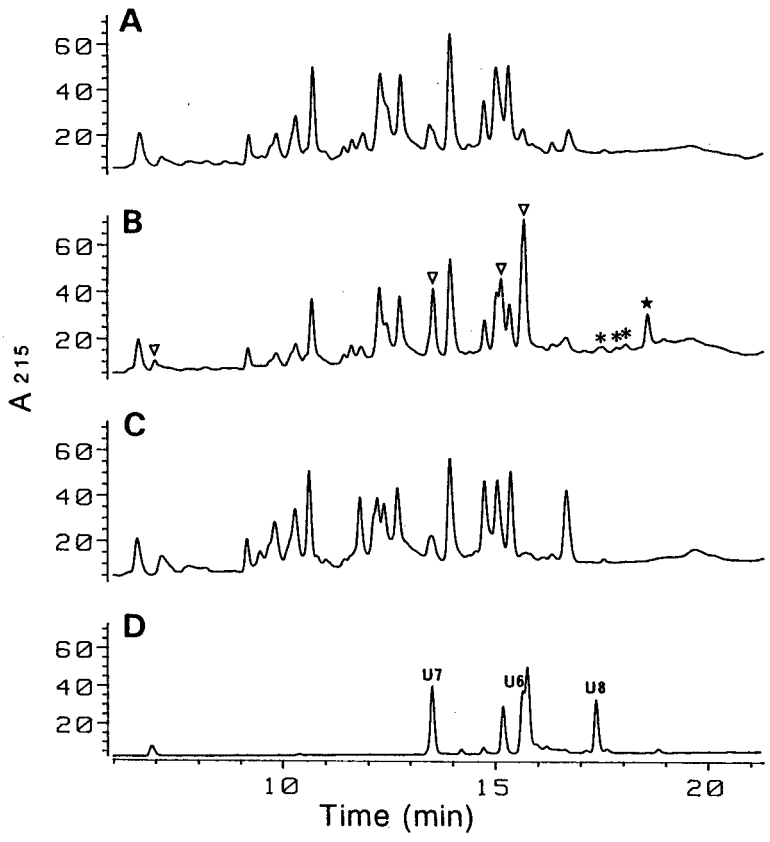
タウとユビキチンを含むスメア画分のAPIペプチドマップは、基本的にPHFタウのペプチドマップとユビキチンのマップを合わせたものに類似していた（図1）。詳細に検討するために、タウとユビキチンの両方を含むスメア画分のペプチドマップ（図1B）をタウのみのスメア画分のマップ（図1A）と比較したところ、前者にのみ特徴的な複数のピークが存

在することがわかった。その内の4ピーク（▽）はユビキチン由来のAPIペプチドのピークと一致したが、ユビキチンの最C末端ペプチドU8に相当するピークはスメアPHF画分からは検出されず、代わりにユビキチンともタウとも異なる新たな4つのピーク（＊★）が観察された。そこで、これらのピークのアミノ酸配列の決定及び質量分析を行った。

＊で示したピークのアミノ酸配列分析を行った結果、それぞれのピークからU8のアミノ酸配列と同時にタウのアミノ酸配列が検出された。また質量分析でも、タウのAPIペプチドにU8がイソペプチド結合したY字型ペプチドに相当する質量が確認された。これらの結果から、PHF内ではユビキチンがタウに結合していることがタンパク化学的に示された。

一方、★ピークからはユビキチンの最C末端U8とU6の2つのアミノ酸配列を読みとることができた。また質量分析ではU6+U7+U8の質量に相当するシグナルが観測された。従って、このピークにはマルチユビキチンのAPIフラグメントが含まれると解釈される。ただし、スメアPHFのAPI消化物中からU6あるいはU7単独のペプチドが得られるので、PHF内にはマルチユビキチンとモノユビキチンの両方が存在していると考えられる。

以上の結果は、PHF内ではユビキチンがモノユビキチンとマルチユビキチンの両方の形でPHFタウに結合していることを示唆する。N末端からC末端までの全長を含むPHFタウ（A68）にはユビキチンが結合していない（3）ことから、タウが異常なリン酸化を受けPHFとして蓄積した後に、ユビキチンがPHF内のタウに結合すると考えられる。PHFタウはそのN末端がプロセッシングされることによりユビキチン化を受けるようになり、これがタンパク質分解のシグナルとして働いてさらにPHFタウのプロセッシングが進行するのであろうと推測される。これらの結果は、他の変性疾患での細胞内異常封入体におけるユビキチン結合の意味を考える上でも重要と思われる。



〔文献〕
(1) Nukina, N. & Ihara, Y. (1986) J.Biochem. 99, 1541-1544
(2) Mori, H. et al (1987) Science 235, 1641-1644
(3) Lee, V. M.-Y. et al (1991) Science 251, 675-678

図1　APIペプチドマップ

A；タウを含むスメアPHF、B；タウとユビキチンを含むスメアPHF、C；PHFタウ、D；ユビキチン

33 アルツハイマー病脳におけるトロンビンの沈着について

秋山治彦、 Patrick.L. McGeer*
(東京都精神研・神経病理、*Kinsmen Lab., UBC, Vancouver)

〔要約〕

アルツハイマー病(AD)剖検脳におけるトロンビンの局在を免疫組織化学的に検討した。正常対照者ではトロンビンは血管壁および血管内残存血漿にのみ認められたが、AD脳ではさらに、老人斑アミロイド、一部のびまん性アミロイド沈着、細胞外神経原線維変化に一致して沈着していた。これらの染色は抗トロンビン抗体をプロトロンビンで吸収しても消失せず、AD脳においてプロトロンビンの活性化(トロンビンの生成)が生じていることが示唆された。トロンビンは凝固系カスケードにおける中心的なプロテアーゼとしてフィブリンの生成やプロテインCの活性化を引き起こすほか、単球・Mφ系細胞の遊走・活性化、神経細胞やアストロサイトの分化調節、アストロサイトの分裂促進などの作用をもっており、その活性化はADの病態にも大きな影響を及ぼしていると思われる。

【目的】

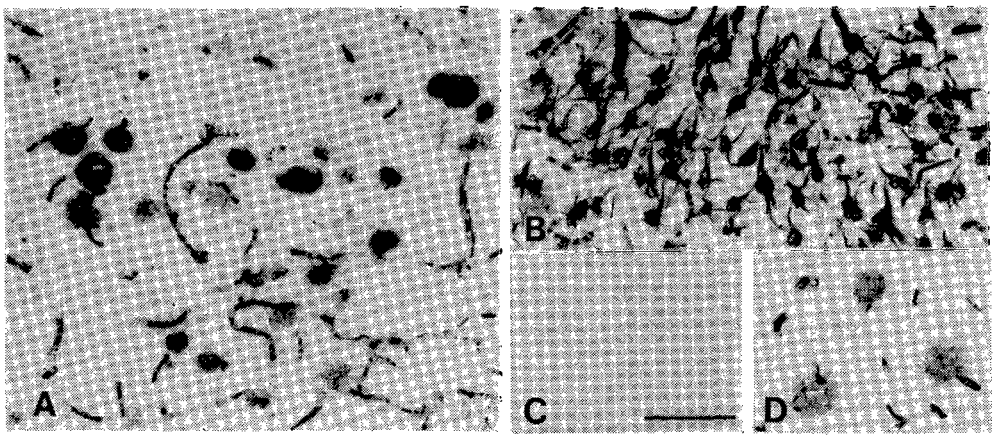
アルツハイマー病(AD)の病因として、βアミロイド蛋白(BAP)の脳への沈着が注目されているが、日常の神経病理学的検索では痴呆のない高齢者にも大量のBAP沈着を認めることがしばしばあり、本症における神経細胞の変性にはさらに別の病理機転も関与していると考えられる。AD脳では老人斑を中心にミクログリアの強い反応が認められ、さらに、少数ではあるがTリンパ球の浸潤も観察される。反応性ミクログリアは多くの点で組織マクロファージ(Mφ)と共通の表現型を示し、脳における単球系貪食細胞として機能していると思われる。また、AD脳において、アミロイド沈着や細胞外神経原線維変化などの病的産物に一致して補体系が活性化され、補体膜攻撃複合体による神経細胞の障害が生じている可能性もある。一般に末梢組織における炎症反応では早期から血液凝固・線溶系の活性化が生じ、補体系を含む液性および細胞性免疫系要素とともに重要な役割を果たしている。本研究の目的は、アルツハイマー病変において、凝固系カスケードの中核をなすプロトロンビンからトロンビンへの活性化が生じているかどうかを検討することである。

【方法】

アルツハイマー病と正常対照者の剖検脳から可及的速やかに(死後3-8時間以内)厚さ5mm程の小ブロックを切り出し、4%パラフォルムアルデヒドによる浸漬固定を4℃にて24-48時間行った。固定後、一定期間しょ糖液に浸漬した脳ブロックを、凍結ミクロトームにて10-30μmに薄切し、浮遊法を用いて、免疫組織化学染色を行った。一次抗体としてウサギ抗ヒト・トロンビン抗体(American Diagnostica Inc., USA)、抗ヒトC4dモノクローナル抗体(Quidel, USA)を使用し、ABC法にて発色させた。抗トロンビン抗体による染色の特異性検定には精製トロンビン(Protogen AG, スイス)およびプロトロンビン(Enzyme Res. Lab., USA)による吸収試験を行った。

【結果】

トロンビン免疫活性は正常対照者脳では血管壁および血管内残存血漿にのみ認められたが、AD脳ではさらに、老人斑を中心とするアミロイド沈着[図A]や細胞外神経原線維変化[図B]にも一致して局在していた。老人斑を形成していない、いわゆるびまん性アミロイド沈着については、その一部に沈着が認められた。これらの染



図．アルツハイマー病脳側頭葉皮質のトロンビン免疫染色。A．血管壁、血管内残存血漿と老人斑アミロイドが陽性に染色される。 B．内嗅領第II層の細胞外神経原線維変化。 C．トロンビンによる吸収抗体を用いた染色。 D．プロトロンビンによる吸収抗体を用いた染色。(Bar=100μm)

色は抗トロンビン抗体を精製トロンビンで吸収することで消失した[図C]。一方、同様の吸収試験を精製プロトロンビンを用いて行っても老人斑等の染色は消失せず[図D]、AD脳においてプロトロンビンの活性化（トロンビンの生成）が生じていることが示唆された。

【考察】

トロンビンは凝固系カスケードにおける中心的なプロテアーゼとしての機能のほか、細胞膜レセプターを介する単球・Mφ系細胞の遊走・活性化、神経細胞やアストロサイトの突起伸長阻害、アストロサイトの分裂促進などの作用をもつことが知られている。近年、神経系細胞によるプロトロンビンmRNAの発現が報告されており[2]、トロンビンが脳におけるプロテアーゼネキシンI(PN-I)の標的プロテアーゼの一つではないかとの指摘がある。プロトロンビンからトロンビンの生成には、組織因子(TF)あるいは反応性ミクログリアが発現しているMac-1(補体レセプター:CR3)による外因系の活性化[1]と、接触相に始まる内因系の活性化の両方の可能性が考えられる。AD脳において組織因子が周囲のマトリックスに比べ老人斑で強く染色されたとの報告があり[3]、また、外因系の他の要素もMφにより産生されることが知られているので、これらの系の活性化には血液脳関門の破綻は必ずしも必要ではない。さらに、KPIを含むβアミロイド前駆蛋白の分泌型(PN-II)は、強い内因系凝固因子阻害活性を有しており、中枢神経系の生理的および病的な状態においてトロンビンの生成や、トロンビンとそのインヒビター(PN-Iなど)とのバランスが多くの重要な役割を果たしている可能性がある。AD脳では老人斑周囲の異常神経突起の形成や神経細胞の変性にトロンビンが直接に、あるいは炎症性変化・免疫系反応の活性化を通じて何らかの関与をしていることが強く示唆される。

【文献】

1. Altieri, D.C., Morrissey, J.H., Edgington, T.S. (1988) Proc. Natl. Aad. Sci. USA 85, 7462-7466

2. Dihanich, M., Kaser, M., Reinhard, E., Cunningham, D., Monard, D. (1991) Neuron 6, 575-581

3. McComb, R.D., Miller, K.A., Carson, S.D. (1991) Am. J. Pathol. 139, 491-494

34 Ｐｉｃｋ細管と神経原線維変化の比較

徳武 哲
（都精神研・分子生物）

〔要約〕
Pick病の剖検脳よりPick小体(Pick body) を精製し、それを壊して遊離してきたPick細管(Pick Fibrils)の微細構造をネガティブ染色法を用いて電子顕微鏡により観察し、神経原線維変化の微細構造と比較した。さらに各種の細胞骨格タンパク質に対する抗体を用いて、Pick小体およびPick Fibrilsの免疫学的性質を調べ、病理学的意義および生成機構について考察を試みた。

［はじめに］
Pick病はAlzheimer 病と同様に進行性の痴呆を主な症状とし、臨床的には両者は区別し難いこともあるが、剖検脳の病理学的検索により、神経細胞内に特異的なPick小体が見られることによりAlzheimer 病と区別される。Pick小体には細管構造が観察され、その形態はAlzheimer 病の神経細胞に見られる神経原線維変化(Neurofibrillary Tangles:NFT)のstraight tubulesと似ており (4,6,7,8)、また、免疫学的にも類似しているという報告があり(2,5,12)、病理学的に関連があるのでないかと考えられている。本実験では、NFT とPick Fibrilsとの形態と免疫学的性質をさらに詳細に検討し、病理学的意義および生成機構について考察を試みた。

［実験法］
1．実験材料．　本実験に用いたPick病の剖検脳は、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海馬を中心に沢山見いだされたが、老人斑や神経原線維変化は見られなかった (3)。
2．Pick小体の精製．　Pick小体の精製は昨年の本学会で報告した方法を少し変更して行った(11)。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, 75μm の stainless meshを通し、濾液を遠心し沈殿画分を集めた (P-1)。この画分にさらに1.5Mの蔗糖を含んだ溶液50mlを加え、前と同じようにhomogenizeしてから沈殿画分を集めた (P-2)。この画分に8M尿素溶液20mlを加え一夜放置し、さらに径が75, 20μm のnylon meshを通して濾液を集めて遠心し、沈殿画分を集めた (P-3)。この後の collagenase 処理は行った場合と行わなかった場合について結果を比較した。
3．Pick Fibrilsの精製．　P-3 画分を Poytronを用いて激しくhomogenizeし、遠心して得られた上清画分 (S-4)をPick Fibrils画分とした。
4．NFT の精製．　NFT はすでに報告した方法により精製した (9)。

［結　果］
1．微細形態の比較．　Pick小体の超薄切片を電顕で観察した場合も、また、単離したPick Fibrilsを観察した場合も、straight fibrilsが多く見られると報告されている (6,7)。本実験でもstraight fibrilsが多く見られた(Fig.1a)。Straight fibrilsの径は約10nmでNFT のstraight tubulesと同じであり、形態的に似ていた。しかし、NFT の長さが数μm あるのに対し、Pick Fibrilsの長さは数百nmにすぎなかった。また、NFT が多くの線維が平行な束になっているのに対し、Pick FibrilsはPick小体の中にrandomに配列している場合が多い。しかし、時には平行に配列している場合も見られる (3,7)。
Straight fibrilsだけでなく、helical fibrils も時々見られた(Fig.1b)。Helical fibrils はNFT の Paired Helical Filaments(PHF,Fig.1d)に似ているように見えるが (1)、詳細な点では違っていた。

すなわち、helical fibrils の径は15－30nmでPHF の10－20nmに比べ少し大きかった。また、helix のpitch もPHF の２倍の160nm あり、規則性があまり厳密ではなかった。

PHF は100,000X以上で観察すると、４本の平行したsubunit 構造が観察され、それがリボン状に捩じれているように見えるが (13,14)、collagenase 処理をしないで調製したPick Fibrilsではsubunit 構造は見られなかった。しかし、collagenase 処理をした場合は、PHF に似た４本の subunit構造が観察される場合があった (Fig.1c)(10)。

２．免疫学的性質．　Pick病脳のパラフィン切片と、微小管タンパク質やニューロフィラメントタンパク質等の細胞骨格タンパク質に対する抗体を用い、免疫組織学的方法により、Pick小体の免疫学的性質を調べると、微小管タンパク質(MAPs)のtau 因子に対する抗体が最も強く反応した(Fig.2a)。ニューロフィラメンタンパク質に対する抗体は、Pick小体の周りの細胞質と強く反応した (Fig.2b)(10)。

これらの抗体を、遊離したPick Fibrilsと反応させ、金コロイドでラベルした二次抗体を用いて免疫電顕法で調べたところ、反応は弱かったがtau 因子に対する抗体だけが反応した(Fig.1a)。

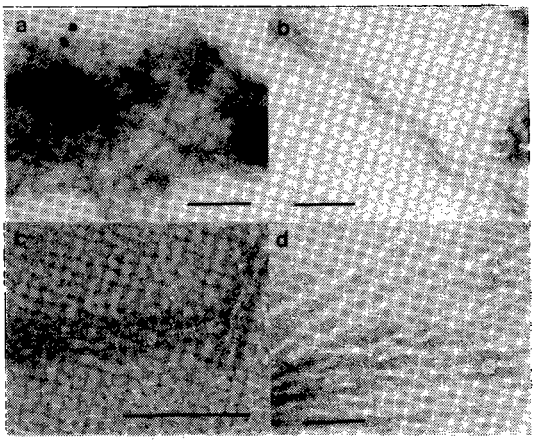


Fig. 1. Electron micrographs of Pick fibrils and PHF. **a.** cluster of straight fibrils. **b.** helical fibrils. **c.** straight fibrils obtained after collagenase digestion. **d.** PHF. Specimens were stained by 1% uranyl acetate. Bars show 100 nm.

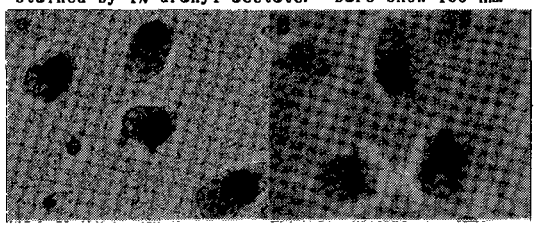


Fig. 2. Pick bodies stained by rabbit antibodies to tau factor (a) and NF-M (b). Peroxidase conjugated anti-rabbit goat serum was used as second antibody.

[考　察]

Pick病とAlzheimer 病の主な症状は共に進行性の痴呆である。Pick小体とNFT は共に神経細胞内に見られる病変組織であるが、光学顕微鏡を用いて観察した形態的特徴は明確に異なっている。また、NFT では変性線維が沢山含まれているのに対して、Pick小体では変性線維はあまり多く含まれていないにもかかわらず、その微細形態や免疫学的性質に類似性が見られるのは　興味深いことである。PHF も、またPick Fibrilsもtau 因子が主成分である可能性が強い。NFT においてPHF が沢山蓄積していることは、細胞骨格タンパク質の中で、tau 因子が特異的に修飾や分解を受けるために、変性線維ができる可能性を示している。しかし、Pick小体においては、Pick Fibrils は量的にはあまり多くなく、その周囲にニューロフィラメントの蓄積が見られることは、基本的な原因は細胞骨格全体の機能や代謝に異常であり、tau 因子が特に不溶性の線維を作り易いという性質の為にその存在が顕著に見られるという可能性も考えられる。

尚、本実験は当研究所超微形態学研究室の小柳新策先生との共同研究である。

[文　献]

(1)Katoh, S. & Nakamura, H., Acta Neuropathol., 81, 125-129 (1990)
(2)Murayama, S., Mori, H., Ihara, Y. & Tomonaga, M., Ann. Neurol., 27, 394-405 (1990)
(3)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 8(1979)
(4)Perry, G., Mulvihill, P., Manetto, V., et al., J. Neurosci., 7, 3736-3738 (1987)
(5)Rasool, C.G., & Selkoe, D.J., New Eng. J. Med., 312, 700-705 (1985)
(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)Tabaton, M., Mandybur, T.I., Perry, G. et al., Ann. Neurol., 26, 771-778 (1989)
(9)Tokutake, S. & Ishii, T., Neuropathol., Suppl. 3, 79-86 (1986)
(10)徳武哲、山本明広、神経化学、29, 424-425 (1990)
(11)徳武哲、神経化学、30, 112-113 (1991)
(12)Ulrich, J., Haugh, M., Anderton, B.H. et al., Acta Neuropathol., 73, 240-246 (1987)
(13)Wischik, C.M., Crowther, R.A., Stewart, M. et al., J. Cell Biol., 100, 1905-1912 (1985)
(14)Wisniewski, H.M., Merz, P.A. & Iqbal, K., J. Neuropathol. Exp. Neurol., 43, 643-656 (1984)

35 断片化アミロイド前駆体蛋白の蓄積 -イボテン酸によるラット海馬破壊部位において-

中村 祐[1,2]、武田雅俊[1]、新川久義[1]、亀谷富由樹[3]、播口之朗[1]、北嶋省吾[2]、西村 健[1]
(大阪大学医精神[1]・日生病院精神[2]・東京都精神医学総合研[3])

〔要約〕イボテン酸をラット片側海馬に注入し、100日後に破壊部に蓄積しているβ-アミロイド前駆体蛋白（ＡＰＰ）をＡＰＰの種々の部位に対する抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。破壊部位に神経細胞体様に顆粒状に蓄積しているＡＰＰの大部分は免疫組織化学的検討では、全長のＡＰＰではなく、Ｎ末側及びβ／A4の部分を含くみ、Ｃ末が分解を受けているものであると考えられる。また、Ｎ末側の抗体で認識されないがＣ末の抗体により認識されるＡＰＰ断片も存在すると考えられ、ＡＰＰの蓄積は種々のフラグメントより形成されていることが考えられる。これらことから、この実験系はＡＰＰの分解・蓄積及びβーアミロイド形成のメカニズムを探る上で簡便でかつ有用なモデルであると考えられる。

アルツハイマー病脳においてＡＰＰ陽性の老人斑が見られ、病態と関連が深いことが報告されている。我々はイボテン酸を大量に海馬実質内に注入することにより広範囲にかつ非可逆的に破壊し、その破壊部位においてＡＰＰが蓄積することを報告してきた[3]。今回、ＡＰＰがどの様な形で蓄積しているのかをＡＰＰに対する種々の抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。

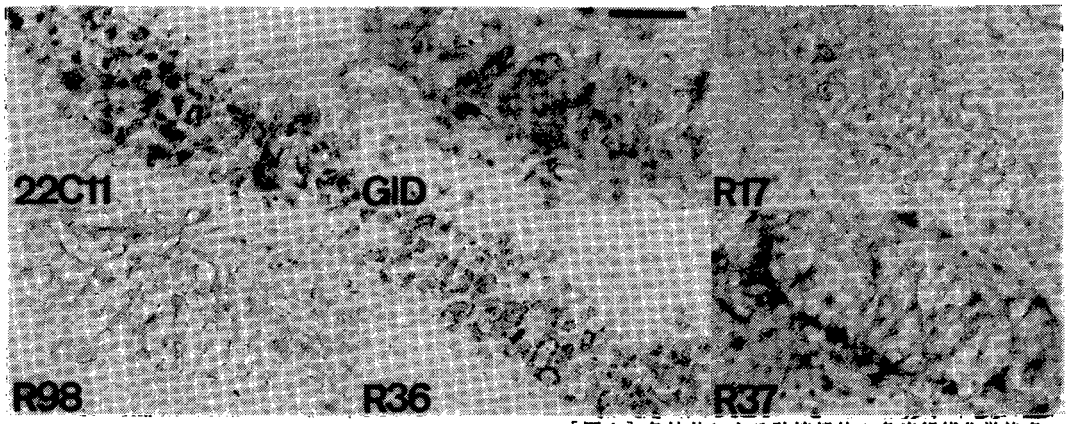
［方法］
12週齢のウイスターラットの左側海馬にイボテン酸（1μg/1μl）を１部位に3μl、２－３部位に注入しその後100日間飼育し、10%formalin/PBSにて潅流した[3]。約１日の後固定ののち20%sucroseに約１日浸透し,cryostatにて15μmのfloating切片を作成し、各抗体（下記）を用い10%NGS/TBSにてVectastain kitを用い染色しDABにて発色させた。二重染色はモノクロナル抗体22C11及びポリクロナル抗体R37／R17を用い、先にVectastain kitを用いDABにて発色させた後、２番目の抗体を反応させフルオレスセイン標識２次抗体にて染色した。

［抗体及び希釈］

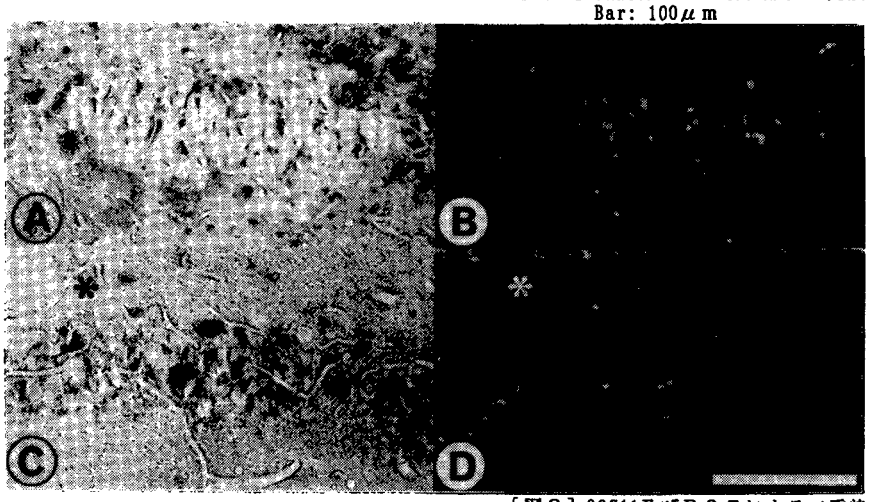
名称	種類	抗原/epitope	希釈	
22C11	mono	60-100	2.5μg/ml	(Boehringer Manheim)[4]
ＧＩＤ	poly	175-186	1000x	(Dr.T.Saitohより提供)
Ｒ９８	poly	KPI37-49	300x	[2]
Ｒ３６	poly	527-540	1000x	[1,2]
Ｒ１７	poly	β1-24	2000x／400x	[1,2]
Ｒ３７	poly	681-695	1000x	[1,2]

［結果・考察］
22C11、ＧＩＤ及びＲ３６抗体では破壊部に直径１-１０μmの顆粒状のＡＰＰの蓄積がみられるが、その染色patternとＣ末を認識するＲ３７のpatternに明らかな相違が見られた（図１）。22C11、ＧＩＤ及びＲ３６は主にＡＰＰの蓄積を神経細胞体様に染色するのに対して、Ｒ３７はそれ以外の部分を強く染色しているように観察された。β1-24を認識するＲ１７では極一部が顆粒状に染色され（Ｒ１７は神経細胞体を染色せず、アルツハイマー病脳において老人斑を染色する希釈2000xで用いた）、またＫＰＩを認識するＲ９８では一部の反応性アストロサイトが染色されるように観察された。これらの結果よりＡＰＰは全てが全長の形で蓄積しているとは考えられず、一部分解をうけた形のＡＰＰが蓄積しているものと考えられた。
このことを確認するためにＮ末側を認識するモノクロナル抗体22C11とＣ末を認識するポリクロナル抗体Ｒ３７にて二重染色を行った（図２）。先ずＲ３７で染色し、次に22C11にて染色した所、神経細胞体様のＡＰＰ蓄積はＣ末に対する抗体Ｒ３７では染色されず、Ｎ末側の抗体22C11により染色された。この結果から少なくともこの神経細胞体様に蓄積しているＡＰＰはＣ末端が失われていると考えられた。その逆の順にに染色した場合、Ｎ末側抗体22C11に認識されないが、Ｃ末に対する抗体Ｒ３７により認識されるＡＰＰの断片が存在することを示していると考えられる。次にβ1-24を認識する抗体Ｒ１７が高濃度（400x：この場合Ｒ１７は神経細胞体を認識）でＡＰＰを認識することを用いて22C11と２重染色を行った（図３）。高濃度Ｒ１７ではほとんどのＡＰＰの蓄積を染色しているように観察された。Ｒ１７で染色の後22C11で認識される部位はほとんど観察されなかった。これは発色したDABにより２番目の一次抗体の反応を妨害するためであると考えられ、蓄積しているＡＰＰのほとんどがＲ１７と22C11に認識される形で蓄積していると考えられる。逆の染色も同様のことを示していると考えられた。
破壊部位に蓄積しているＡＰＰの大部分は全長のＡＰＰではなく、Ｒ１７で認識されるβ／A4の部分を含むが、Ｃ末が分解を受けているものであると考えられる。また、Ｎ末側の抗体で認識されないがＣ末の抗体により認識される部分も存在すると考えられ、ＡＰＰの蓄積は種々のフラグメントより形成されていると考えられる。これらことから、この実験系はＡＰＰの分解・蓄積及びβーアミロイド形成のメカニズムを探る上で有用なモデルであると考えられる。

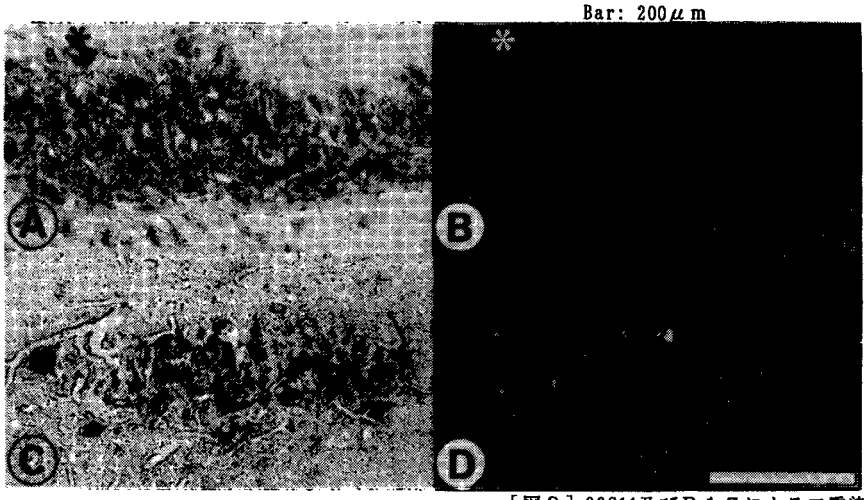
［参考文献］
1]Ishii T, Kametani F, Sato M(1989) Neuropath Appl Neurobiol 15, 135-147
2]Kennedy H, Kametani F, Allosp, D(1992) Neurodegeneration 1, 59-64
3]Nakamura Y, Takeda M, Niigawa H, et al.(1992) Neurosci Lett 136, 95-98
4]Wiedermann A, Konig G, Bunke D, et al.(1989) Cell 57, 115-126



［図１］各抗体による破壊部位の免疫組織化学染色
Bar: 100μm



［図２］22C11及びＲ３７による二重染色
Ａ：Ｒ３７－DAB→Ｂ：22C11－Fluorescein
Ｃ：22C11－Fluorescein→Ｄ：Ｒ３７－DAB
Bar: 200μm



［図３］22C11及びＲ１７による二重染色
Ａ：Ｒ１７－DAB→Ｂ：22C11－Fluorescein
Ｃ：22C11－Fluorescein→Ｄ：Ｒ１７－DAB

36 イボテン酸による海馬障害部位でのβ-アミロイド前駆タンパク質の動態

新川久義[1]，中村　祐[2]，武田雅俊[1]，亀谷富由樹[3]，播口之朗[1]，西村　健[1]
（大阪大学医精神[1]・日生病院精神[2]・東京都精神医学総合研[3]）

［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て２週間後のβアミロイド前駆体蛋白（amyloid β-precursor protein: ＡＰＰ）の動態をＡＰＰに対する種々の抗体を用いたwestern blotで検討した．その結果，イボテン酸障害は水溶性分画における全長型，分泌型ＡＰＰおよび分解産物のバンドを幾分増大し，不溶性分画における全長型ＡＰＰのバンドを幾分，分泌型ＡＰＰと分解産物のバンドを明瞭に増大した．以上の結果から，海馬のイボテン酸障害は全長型，分泌型ＡＰＰおよびその分解産物を増大し，分泌あるいは分解されたＡＰＰは不溶性に移行することが示唆された．このＡＰＰの不溶化が免疫染色で確認されてきた錐体細胞層における異常なＡＰＰ免疫陽性顆粒の形成メカニズムと関連している可能性が考えられた．

［緒言］　アルツハイマー病の老人斑の構成成分であるβアミロイドは数種の前駆体蛋白（ＡＰＰ）より形成されているが，生理的なプロセシングではβアミロイドの内側部で切断され，そのＮ末側が分泌型ＡＰＰとなり，βアミロイドを形成する事はない[1]．Siman[5]らはグルタミン酸受容体作動薬であるカイニン酸を脳室内投与することにより海馬の神経細胞は障害を受け，近傍の反応性星状グリア細胞内にＡＰＰの免疫反応性が認められることを報告している．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比較的大量に直接海馬に注入して長期経過後に障害周辺部の反応性星状グリア細胞内のＡＰＰ免疫反応性出現以外に，障害部の強い萎縮にともなって，海馬錐体細胞層に一致した部位にＡＰＰ免疫強陽性顆粒が蓄積する事を報告してきた[4]．今回は同様の方法で海馬を障害して２週間後の時点におけるＡＰＰ蓄積の動態をＡＰＰに対する種々の抗体を用いたwestern blot法により検討した．

［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２～３部位にマイクロシリンジを用いて緩徐に注入した．注入２週間後に断頭し，取り出した両側海馬を４倍量の0.1M Imidazole/1mM EGTA/1mM $MgCl_2$/20nM p-AMSF/1% Triton X/HCl/PH7.0 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 12.5%のSDS-PAGEに供し，イムノブロットを行った．抗体はＧＩＤ（ＡＰＰ175-186，1000X），Ｒ９８（ＫＰＩ37-49，300X），Ｒ３６（ＡＰＰ527-540，100X），Ｒ１７（β1-24，400X）およびＲ３７（ＡＰＰ681-695，100X）のポリクロナル抗体を用いた．

［結果］　水溶性分画のwestern blotでは18Kd付近に太いバンドが認められ，これは全ての抗体で同程度に染色されることから正体不明の非特異的反応と考えられる．水溶性および不溶性分画の105～125付近に２つのバンドが認められ，上方のバンドはＮ末側（ＧＩＤ，Ｒ９８，Ｒ３６），β蛋白（Ｒ１７），Ｃ末側の抗体（Ｒ３７）で染色されていることから全長型のＡＰＰと考えられる．また，下方のバンドはＮ末側の抗体（ＧＩＤ，Ｒ９８，Ｒ３６）およびβ蛋白（Ｒ１７）抗体で染色されるが，Ｃ末側の抗体（Ｒ３７）で染色されず，分泌型のＡＰＰと考えられる[2]．水溶性分画においてイボテン酸による海馬障害は，Ｒ１７のバンドに大きな変化を与えず，ＧＩＤ，Ｒ３７，Ｒ３６，Ｒ９８の全長型，分泌型ＡＰＰおよび分解産物のバンドを幾分増大した．不溶性分画において海馬障害はＲ３７，Ｒ１７のＡＰＰ分解産物のバンドを幾分増大する傾向を示し，Ｒ９８，ＧＩＤ，Ｒ３６の全長型，分泌型ＡＰＰと分解産物のバンドを明瞭に増大した．

［考察］　以上の結果から，海馬のイボテン酸障害は２週間後の時点で，全長型，分泌型ＡＰＰおよび分解産物を増大し，分泌あるいは分解されたＡＰＰは不溶性に移行していくことが示唆された．ＡＰＰ自身が分泌型および分解産物になることによって不溶化傾向を有するのか，中間径線維あるいは不溶化した微小管と結びつくことによって不溶化分画に検出されるのか[3]はまだ明らかでないが，このＡＰＰの不溶化が免疫染色で確認された錐体細胞層におけるＡＰＰ免疫溶性顆粒の形成メカニズムと関連している可能性が考えられる．このことは老人斑に認められるβアミロイド形成と関連して興味深いことである．

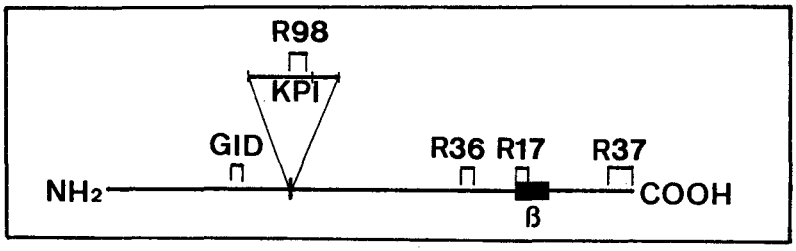


Fig.1 βアミロイド前駆体蛋白に対する抗体認識部位.

GID (APP175-186)
R98 (KPI 37-49)
R36 (APP527-540)
R17 (β1-24)
R37 (APP681-695)

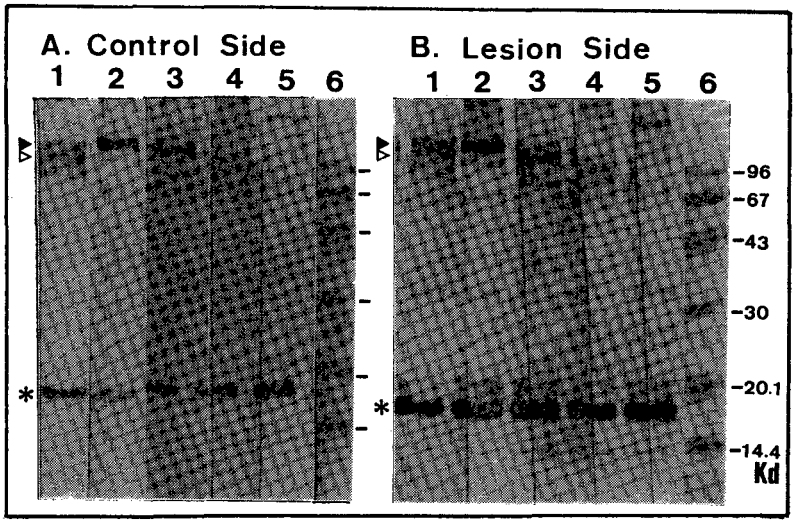


Fig.2 海馬障害の水溶性分画中APP動態に及ぼす影響.

lane 1: GID抗体
lane 2: R37抗体
lane 3: R36抗体
lane 4: R17抗体
lane 5: R98抗体
lane 6: Molecular Marker
▶: Full-length APP
▷: Secreted APP
*: Nonspecific Reaction

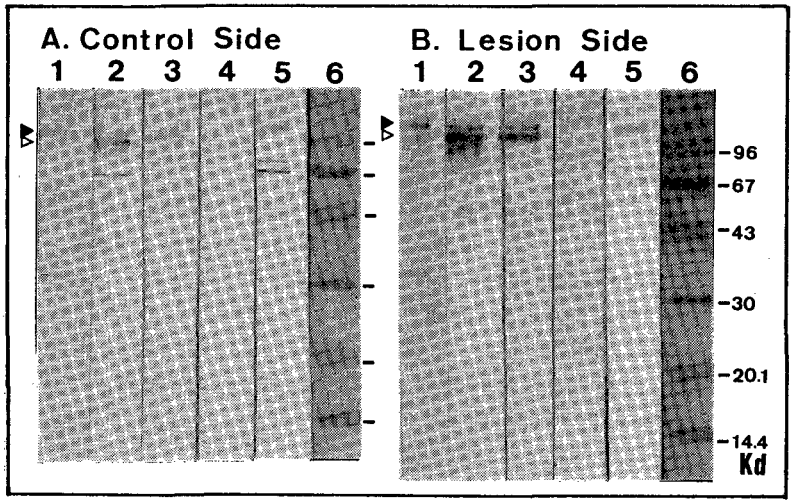


Fig.3 海馬障害の不溶性分画中APP動態に及ぼす影響.

lane 1: R98抗体
lane 2: GID抗体
lane 3: R36抗体
lane 4: R17抗体
lane 5: R37抗体
lane 6: Molecular Marker
▶: Full-length APP
▷: Secreted APP

[参考文献]
1)Each F S, Keim P S, Beattie E C, et al. (1990) Science 248:1122-1124
2)Kennedy H, Kametani F, Allosp d. (1992) Neurodegeneration 1,59-64
3)Lawrence M, Refolo, Ian S, et al. (1991) J Neurosci 11,3888-3897
4)Nakamura Y, Takeda M, Niigawa H, et al. (1992) Neurosci Lett 136,95-98
5)Siman R, Card P, Nelson R B, et al. (1989) Neuron 3,275-285

37 ヒト、マウス及びラット脳には遊離型D-セリンが存在する

橋本篤司[1、2]、西川徹[2]、土井永史[3]、金子嗣郎[4]、金野柳一[5]、丹羽章[5]、安村美博[5]、熊代新[2]、岡高恵[2]、高橋清久[2]
(新技術事業団さきがけ研究２１[1]、国立精神・神経センター[2]、東京都立府中病院[3]、東京都立松沢病院[4]、独協医大[5])

〔要約〕
前大会において我々はガスクロマトグラフ-マススペクトル（ＧＣ-ＭＳ）法を用いて初めてラット脳内に遊離型Ｄ-セリンが多量存在することを報告した。今回o-phthaldialdehyde(OPA)およびBoc-L-cysteine(Boc-L-Cys)を用いた高速液体クロマトグラフ（ＨＰＬＣ）法を確立し、ＧＣ-ＭＳの結果の追試を行なった。その結果、ＨＰＬＣ法においても脳内Ｄ-セリンが多量存在することが確認された。さらに、ヒト死後脳及びマウス脳のＤ-セリン含量を測定したところそれぞれ0.09μmol/g(21.3%)及び0.31μmol/g(28.8%)であり、ヒトにも多量のＤ-セリンが存在することが明かとなった。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には、Ｄ-セリンやＤ-アラニンなどのＤ-アミノ酸が選択的に作用して種々の機能を発揮することがすでに知られていることから(2)、哺乳類脳内に存在するＤ-セリンとＮＭＤＡ受容体機能や精神神経疾患との関連に興味が持たれる。

哺乳類のアミノ酸、特に蛋白質中に組み込まれるアミノ酸は全てＬ-体であると考えられている。しかし、Ｄ-アミノ酸オキシダーゼが系統発生学的に脳内に保存されていること(3)、遊離型Ｄ-アスパラギン酸が少量脳内に存在すること(4)、最近我々がＧＣ-ＭＳ法によって、ラット脳内における多量の遊離型Ｄ-セリンの存在を証明したこと(1)：などの所見は、Ｄ-体のアミノ酸が哺乳類においても機能している可能性を示唆している。そこで我々は、Ｄ-アミノ酸の中枢における機能を解明して行くためにより簡便で分離能の良いＨＰＬＣ法を確立した。さらに、この方法を用いて遊離型Ｄ-セリンがヒト死後脳及びマウス脳にも存在することを見いだしたので、ここに報告する。

［実験方法］
Wistar系雄性ラット及びｄｄＹ系雄性マウス（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で灌流した脳及び精神神経疾患に罹患していない死亡時年齢55-84歳の死後脳（都立松沢病院より供与）を用いて実験を行なった。ヒト死後脳、ラット及びマウス脳に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。アミノ酸の分析は、ＴＣＡ抽出液をOPAおよびBoc-L-Cysで誘導化した後、逆相ＨＰＬＣカラム（Nova-Pak C18,Waters)を用いてAcetonitrile:Acetate buffer:Tetrahydrofuran (7:90:3→47:50:3, 120min)のリニアグラジエントで行なった。

［結果］
今回、ＨＰＬＣ法を確立することによってＧＣ-ＭＳ法では長時間要した誘導化時間が大幅に短縮され数分でできるようになり、さらに中枢において重要な役割を果たしていると考えられるD,L-グルタミン酸、D,L-アスパラギン酸、D,L-グルタミン、D,L-アスパラギン、D,L-セリン、グリシン、タウリンなど多くのアミノ酸を４５ｍｉｎ以内に分離できるようになった。Fig.1にラット脳ＴＣＡ抽出液のOPA／Boc-L-Cys誘導体のＨＰＬＣパターンを示す。保持時間29.0分に標準Ｄ-セリン誘導体と一致するピークが検出され、Ｄ-セリン

含量と総セリンに対する比はそれぞれ0.28μmol/g及び27.2%であった(Table1)。この値はGC-MS法で定量した値と良く一致した。また、ヒト死後脳及びマウス脳を用いてD-セリン含量を測定したところ、それぞれ0.09μmol/g(21.3%)及び0.31μmol/g(28.8%)であった。

[考察]

以上の結果から、より簡便で分離能の良いHPLC法を確立することによってGC-MS法で見いだされたラット脳内D-セリンの存在を確認できた。さらに、ラット脳内に存在した遊離型D-セリンがヒト及びマウス脳内にも存在することが明かとなった。D-セリンはNMDA型興奮性アミノ酸受容体のアロステリック調節部位に対する選択的リガンドであることがすでに知られていることから、内在性D-セリンの神経伝達物質としての可能性やNMDA受容体機能の異常が示唆されているアルツハイマー病、てんかん、精神分裂病などの精神神経疾患との関連性について、今後検討していく必要があると思われる。

[文献]
(1) Hashimoto, A. et al. (1992) FEBS Lett. 296, 33-36.
(2) Kleckner, N.W. and Dingledine, R. (1988) Science 241, 835-837.
(3) Neims, A.H. et al. (1966) J. Neurochem. 13, 163-168.
(4) Neidle, A. and Dunlop, D.S. (1990) Life Science 46, 1517-1522.

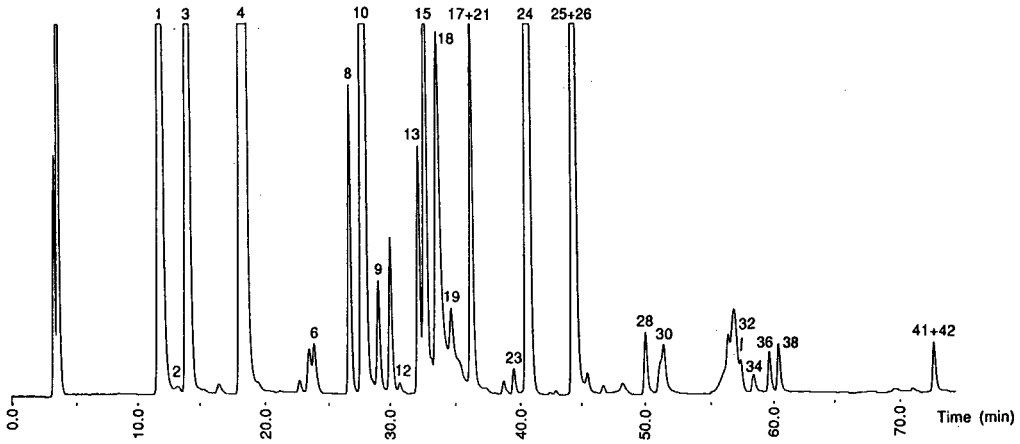


Fig.1 Chromatogram of Boc-L-Cys/OPA derivatives of free amino acids in the brain. 1;L-Asp, 3;L-HCA 4;L-Glu, 8;L-Ser, 9;D-Ser, 10;L-Gln, 13;L-Thr, 15;Gly, 18;O-PE, 24;Tau,

Table 1 Concentration of free D-serine and the ratio (%) of free D-serine to total serine in human, mouse and rat brain. Rat and mouse brains consist of telencephalon, midbrain, diencephalon and human postmortem brain sample contains frontal cortex (Broadmann's cytoarchitectonic field of 10). Values (μmol/g wet weight) represent means with S.E.M. of six to eight of samples.

Species	Human brain (n=6)	Mouse brain (n=8)	Rat brain (n=6)
D-Serine	0.09±0.01	0.31±0.01	0.28±0.01
L-Serine	0.33±0.04	0.77±0.01	0.77±0.01
D/D+L(%)	21.3±2.1	28.8±0.3	27.2±0.2

38 哺乳動物におけるスペルミジンから 2-オキソ-1-ピロリジンプロピオン酸の生成について

〔演者〕
〔所属〕
川瀬秀明*, 長谷川武史**, 橋本泰道*, 多賀千明*,
原田博之*, 佐藤伸介*, 上村宏*, 能登直*, 中嶋照夫*
(京都府医大 *精神医学, **同位元素)

〔要約〕
スペルミジン-^{14}C のラット腹腔及び脳室内, N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オン-d_2及びイソプトレアニン-d_2の腹腔内投与により, N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オン系代謝の検討を行った. スペルミジン-^{14}Cの尿中未同定代謝産物を検索した結果, 標識 2-オキソ-1-ピロリジンプロピオン酸が同定された. 尿中では, この標識体はγ-アミノ酪酸に次ぐ, 放射活性を示したが, 脳室内投与での全脳抽出物中では, その活性は低い値を示した. また, N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンとイソプトレアニンの本投与法での尿中のGC/MS分析では両者の相互変換は認められなかった. 以上の2-オキソ-1-ピロリジンプロピオン酸及びスペルミジン酸の分布等の検索と安定同位体を用いた代謝実験の結果より, 中枢神経系でのスペルミジンの酸化的脱アミノ反応はアミノプロピール基側が優勢で, 末梢系臓器とは異なることが証明された.

細胞の増殖や成長に関与すると考えられていポリアミン類は, 生体内では, プトレスチン, スペルミジンやスペルミン等との相互変換を通した平衡にあって, その生理的条件に見合った濃度が保たれ, 比較的代謝を受けにくいアミン類である. しかし, 末端酸化を受け特異なアミノ酸類に代謝されることも知られている. その中でもスペルミジンは他の二者と異なり, 非対称な構造を有するので, その代謝ないし代謝産物の生理作用に興味がもたれる. 本研究では前回発表(2)したスペルミジンの代謝産物のN-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンについて, スペルミジン-^{14}C等を用いて代謝に検討を加えた. その結果, 新たに2-オキソ-1-ピロリジンプロピオン酸を同定したので, その分布について検討した.

<方法>

I 標品及び安定同位体標識体の調製 多目的の合成中間体N-プロピオニトリル-ピロリジノ-2-オンは前回の方法(2)に従って, アクリロニトリルと2-ピロリドンより合成した. 2-オキソ-1-ピロリジンプロピオン酸はこのニトリル誘導体を6N HClに溶かし, 80 °Cで6 時間加熱することにより得た. 精製はII, IIIで用いたカラムクロマトグラフィーとイソプロピールアルコール-イソプロピールエーテル混合溶媒を用いた再結晶化によった(mp. 107.9～109.7). スペルミジン酸は上記で得た酸を再び6N HClに溶かし, 140 °Cで14 時間加熱した. 得た酸水解混合物から, ピリジン-酢酸緩衝液(pH 3.7)下のアンバーライトIR 120を用いたカラムクロマトグラフィーにより, 原料とγ-アミノ酪酸を除き, 目的のアミノ酸の粗結晶を得た. N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オン-d_2は上記ニトリル誘導体メタノール-d_1に溶かし, 酸化白金, 酢酸-d_4を触媒として, 重水素加圧下3 時間で還元した. 以下の精製は前回の方法(2)に従った. イソプトレアニン-d_2も上記で得た標識アミンを前回の方法(2)に従って酸水解し, 精製した.

II 実験にはウィスター系雄性ラット (体重 180 g) を使用した. スペルミジン-^{14}Cをラット腹腔及び脳室内に, N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オン-及びイソプトレアニン-d_2をラット腹腔内に投与した. 塩酸酸性下で24時間尿を集め, 脳室内投与の場合はラットを断頭し全脳を採取した. 臓器より, 中, 塩基性成分を抽出する場合, 過塩素酸溶液でホモジネートし, 過塩素酸を除去して抽出物を得た. 酸性成分の場合, 水でホモジネートし, 減圧乾固後, 5倍量の5 %の濃アンモニア水を含むエタノール溶液で3回, 再抽出し, 減圧乾固により, 試料を得た. それぞれを以下の分析に供した.

III ラット尿及び脳抽出物は 1.1x10.5 cm のDowex 50x2(100～200 mesh, H^+型)のカラムにかけ, Nakajima等の方法(3)に従い各 100 mlの水, 1M ピリジン, 2N アンモニア水, 3N アンモニアを含む 50 %エタノール溶液を用いて, ゛酸性分画゛ ゛中性分画゛ ゛塩基性分画゛及び゛ポリアミン分画゛を溶出させた.

IV ゛酸性分画゛は減圧乾固後, アンモニア弱アルカリ下で, 1.1x5.3 cm Dowex 1x4(100～200 mesh, OH^-型)のカラムに通した. カラムを水 50 ml で洗浄後, 50 mlの 1M 酢酸で溶出する分画を集め, 減圧乾固した. 更に, この分画を展開溶媒ジクロロメタン：メタノール：酢酸(8:2:0.02 V/V)を用いてシリカゲルTLCにて精製し, 再結晶や水解反応に供した.

V ゛中性分画゛の分析は，得られた゛中性分画゛に50 mgの合成スペルミジン酸を加え，Iの同アミノ酸精製と同じ方法で分析した．同アミノ酸の出現はDubinの発色法(1)，放射活性の測定は液体シンチレーションカウンターによった．
VI *GC/MS*分析の条件；分析形－PFP誘導体(4)，機種－GCMS 6020（島津制作所），カラム－キャピラリーカラムCBP-1(25m x 0.25mm i.d.)，カラム温度－210～240 ゜C(progaming rate 8 ゜C/min)

＜結果＞

I 未同定代謝産物の同定 尿中のスペルミジン代謝産物にDowex 50x2(H^+型)のカラムに吸着しない゛酸性分画゛に相当量の放射活性を認めた．この標識体はDowex 1x4(OH^-型)のカラムに吸着し，1M の酢酸にて流出した．この分画を乾固して，シリカゲル*TLC*で展開したところ，*Rf*が0.56の位置に放射活性が集中した．この位置をかきとり，メタノールにて抽出し，140 ゜Cで14 時間加熱による酸水解反応にかけたところ，アンバーライトIR 120 H^+型カラムに吸着し，スペルミジン酸と挙動をともにした．これらの結果より，標識体の構造を2-オキソ-1-ピロリジンプロピオン酸と推定した．そこで2-オキソ-1-ピロリジンプロピオン酸を合成し，この標識体と共晶を試みたところ，2度の再結で放射活性度は一定になり，標識体と標品は挙動をともにした．

これらの結果から，*TLC*で精製された標識体は2-オキソ-1-ピロリジンプロピオン酸と同定した．この標識体は回収放射能の0.840 %であった．なお，この酸の全脳抽出物からの回収は微量であった．

II 尿゛中性分画゛及び゛塩基性分画゛の分析 主な放射性代謝産物はγ-アミノ酪酸とスペルミジン酸であった．それぞれ，回収放射能は3.05及び0.840 %であった．以下詳細はTableに示した．

＜考察＞

N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンが同定されて以来，この代謝産物が開環して，イソプトレアニンが生成すると考えられていた(5)．しかし，この開環にはATP 1分子の消費程度のエネルギーが必要と考えられので，側鎖のアミン酸化反応に比べれば，熱力学的にピロリドン環の生体内での滞在時間は長いと考えられる．従って，生化学的にも2-オキソ-1-ピロリジンプロピオン酸の尿中排泄は妥当と考えられる．また，N-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンとイソプトレアニンを腹腔内に投与した結果，尿中の*GC/MS*分析では両者の相互変換は認められなかった．少なくとも，血中滞在中にN-アミノプロピール-ピロリジノ-2-オンからのイソプトレアニン，ついでスペルミジン酸への連続的な変換は考えがたい．ただし，イソプトレアニン及びプトレアニンからのスペルミジン酸への変換は有り得る．

Table

Distributions of spermidine metabolites in 24-h urine of the rat injected intraperitoneally and 2-oxo-1-pyrrolidinepropionic acid in extract of the rat injected intracerebroventricularly with spermidine-^{14}C.

Putreanine	0.187 %
Isoputreanine	0.094 %
N-Aminopropyl-pyrrolidine	0.571 %
2-Oxo-1-pyrrolidinepropionic acid	0.840 %
γ-Amino-butyric acid	3.080 %
Spermidic acid	0.159 %
2-Oxo-1-pyrrolidinepropionic acid (brain)	<0.010 %

Spermidine metabolites were purified by ion-exchange chromatography Amberlite CG 120 (100-200 mesh, NH_4^+ or H^+). Radioactivity was counted by a liquid scintillation counter.

2-オキソ-1-ピロリジンプロピオン酸への放射活性の集積と前回発表したアミン類の分析結果と合わせ考察すると中枢神経系と末梢臓器との末端アミノ基の酸化位置の差がより鮮明になった．これらの結果は中枢神経系においてアシル化を考慮しても，スペルミジンのプロピール基側とブチル基側とではアミノ基には分子レベルでの作用に生化学的な差異があることを示唆している．

＜文献＞

1. Dubin, D.T. (1960) J.Biol.Chem. 235, 783-786
2. 上村宏，川瀬秀明，長谷川武史，橋本泰道，能登直，中嶋照夫 (1990) 神経化学 Vol. 29 128-129
3. Nakajima,T., Noto,T., & Kato,N.(1980) Physiol.Chem. 12 401-410
4. Noto,T., Hasegawa,T., Kamimura,H., Nakao,J., Hashimoto, H. & Nakajima,T(1987) Anal.Biochem. 160,371-375.
5. Seiler,N. & Kodgen,B. (1983) Int.J.Biochem. 15, 907-915

39 Isoquinoline類の脳内モノアミン代謝に対する影響 -in vivo microdialysis法による検討-

丸山和佳子[1)]、高橋勤[2)]、太田深雪[3)]、長谷川真一[1)]、高橋昭[1)]、永津俊治[4)]、直井信[5)]
[1)]名古屋大神経内科、[2)]江南女子短大、[3)]名市大精神科、[4)]藤田保健衛生大総医研、[5)]名古屋工業大

[要約]

自然界およびヒト脳内に存在することが知られているisoquinoline類であるtetrahydroisoquinoline (TIQ)、dihydroxy-tetrahydroisoquinoline (DHTIQ)及びその誘導体の脳内神経伝達物質に対する影響をラット線条体in vivo microdialysis法により検討した。DHTIQ類の潅流によってドーパミン(DA)、セロトニン(5-HT)などのモノアミンの細胞外濃度が増加した。特に1-(R)methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline [(R)salsolinol, (R)Sal)]ではDAを遥に上回る5-HTの増加が引き起こされることが証明された。他のDHTIQ類ではDAに対する作用が5-HTに対する作用より強かった。一方TIQ類ではこのような神経伝達物質の増加は見られなかった。3,4,-Hydroxylphenylacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)等のモノアミンの代謝物はDHTIQ、TIQ類の両者の潅流により低下し、monoamin oxidase (MAO)阻害が示唆された。DHTIQ類特に(R)Salはl-DOPA療法やアルコール摂取により増加することが知られており、ここで示された神経伝達物質の放出作用はこれら疾患の精神神経症状と関わりをもつ可能性があると考えられた。

[実験方法]

DHTIQ類としては(R)Sal, (R)Sal, N-methyl-(R)Sal [NM(R)Sal], 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (Norsal), N-methyl-Norsal (NMNorsal), TIQ類としては1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (TIQ), N-methyl-TIQ (NMTIQ), N-methyl-isoquinolinium ion (NMIQ$^+$), 1-methyl-TIQ(1-MeTIQ)を用い検討した。

Stereotaxic atlas of Paxions and Watsonに従い成熟雄Wistar ratに定位脳手術を行い、線条体にプローブを留置した。24時間後2μl/minの流速でKrebs-Ringer溶液の潅流を行い、20分間隔でサンプリングを行った。更に開始1時間後より2時間にわたり1mMのisoquinolineを溶解したKrebs-Ringer溶液を潅流し、潅流液中のモノアミン及びその代謝物を経時的に測定した。測定には高速クロマトグラフィー電気化学検出器-多次元分析装置(ESA, NEUROCHEM)を用いた[1)]。

更に神経伝達物質の放出が神経活動に関係しているかどうかを明らかとするためナトリウムチャンネル阻害剤tetrodotoxin(TTX)を添加し同様な実験を行った。更に脳黒質及び線条体で同時潅流を行い、黒質でisoquinolineの潅流を行ったときの線条体でのモノアミンレベルの変化を検討した。

[結果および考察]

図1に実験に用いたisoquinoline類の化学構造式を示す。

図2に(R)Sal潅流前、潅流後120分後の潅流液[クロマトグラム(A)、(B)]、(B)から(A)の差をとったクロマトグラム(C)を示す。(R)Salの潅流によりDA(peak6)、5-HT(peak8)の増加が見られ(C)では陽性peakとなっている。その他にも(C)では多くの陽性peakが見られ、(R)Salは神経伝達物質の放出作用があることが示唆された。このような放出作用は全てのDHTIQ類で共通にみられたが、TIQ類では認められなかった。表1に潅流後120分後の潅流液中のDAおよび5-HT濃度を示す。DA濃度増加の程度はDHTIQ間で大きな差はなかったが、5-HTの増加は(R)Salでのみ強くNM(R)Sal及びNorsalとは約500倍の差が認められた。NMNorsalでは5-HTは増加しなかった。(R)Salは強力かつ選択的な5-HT放出物質であることが示された。

一方図2で示された様にDOPAC (peak2)、HVA (peak5)、5-HIAA (peak3)といったモノアミン代謝物は(R)Sal潅流によって減少し、(C)では陰性peakとなっている。表2にイソキノリン潅流120分後代謝物濃度の潅流前値に対する比率を示す。DHTIQ、TIQ類両者ともにこれら代謝物を低下させ、MAO活性阻害が示唆された。

TTX添加によって(R)Salの作用は影響を受けず、また黒質への(R)Salの潅流によっては線条体のモノアミン濃度には変化が見られなかった。即ち(R)Salの作用は神経活動を伴わないと考えられた。

(R)Salを含むDHTIQ類は脳内でDAとケト酸あるいはアルデヒドとの縮合によって生成される。またそのN-メチル体[NM(R)Sal, NMNorsal]はDA神経毒である1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)と化学構造が類似していることより、内因性DA神経毒の候補物質であると考えられ、DA$^+$と5-HT$^+$の生成の律速酵素を阻害した。今回示されたDHTIQ類のDA放出作用やMAO阻害はMPTPの酸化体である強力なDA神経毒MPP$^+$やamphetamineの作用と類似しており、DHTIQ類はDA神経毒性や薬物投与時における精神症状発現作用をもつ可能性があると考えられた。一方5-HTは鬱病等精神病や睡眠に関与する神経伝達物質であり、(R)Salに特異的にみられた5-HT放出作用は何らかの精神神経症と状関連をもつ可能性があ

る。今回実験に使用したDHTIQ類の濃度は1 mMと高濃度ではあるが、microdialysis法による投与時には透析膜の透過性、組織における拡散があり、細胞内濃度は遥に低いと考えられる。更にDHTIQ類はDA由来のアルカロイドでありDA取り込み機構により細胞内に蓄積される。DHTIQ類はL-DOPA療法やアルコール摂取により生成が促進され、これらのモノアミン放出作用は臨床症状と関係をもつことが示唆された。今後更なる検討が必要である。

[文献]

1) W. Maruyama, D. Nakahara, M. Ota, T. Takahashi, A. Takahashi, T. Nagatsu, and M. Naoi. (1992) N-Methylation of dopamine-derived 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, (R)salsolinol, in rat brains: In vivo microdialysis study. J. Neurochem. 59, 395-400.

2) M. Minami, T. Takahashi, W. Maruyama, A. Takahashi, P. Dostert, T. Nagatsu, and M. Naoi. (1992) Inhibition of Tyrosine hydroxylase by R and S enantiomers of salsolinol, 1-methyl-6,7-didihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. J. Neurochem. 58, 2097-2101.

3) M. Ota, P. Dostert, T. Hamanaka, T. Nagatsu, and M. Naoi. (1992) Inhibition of tryptophan hydroxylase by (R)-and (S)-1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines (salsolinols). Neuropharmacol. 31, 337-341.

図1. Chemical structures of (R)Sal, NM(R)Sal, Norsal, NMNorsal, (S)Sal, 1-MeTIQ, TIQ, NMTIQ, and NMIQ+.

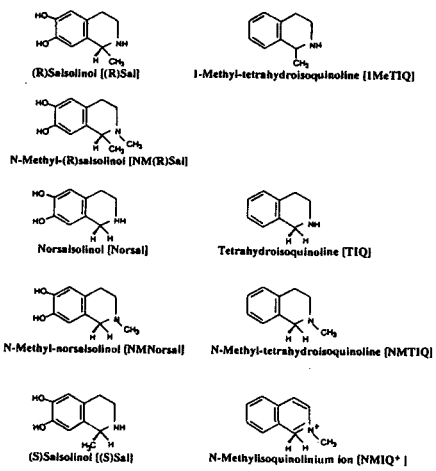
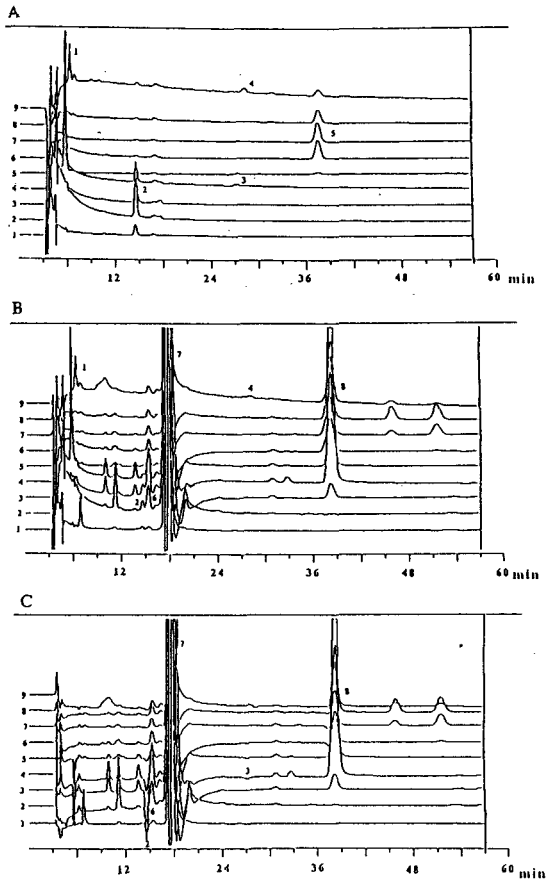


図. 2. Chromatograms of the dialysate of the rat striatum.



A; Before perfusion, B; after 120 min perfusion of 1 mM (R)Sal,
C; subtraction of A from B.
Peak 1; L-tyrosine, peak 2; DOPAC, peak 3; 5-HIAA,
peak 4; L-tryptophan, peak 5; HVA, peak 6; DA, peak 7; (R)Sal,
peak 8; 5-HT, arrow; NM(R)Sal.

表1. The effects of dihydroxytetrahydroisoquinolines on extracellular levels of dopamine and serotonin

	Concentration (nM)	
	DA	5-HT
(R)Sal	303.7 ± 96.5	2531 ± 121
(S)Sal	21.5 ± 0.99	3692 ± 11
NM(R)Sal	84.0 ± 44.6	5.2 ± 5.2
Norsal	50.3 ± 12.8	4.3 ± 2.8
NMNorsal	102.9 ± 21.9	N.D.
Basal level in the striatal dialysate before perfusion	4.2 ± 3.6	N.D.

N.D.; not detected.

40 肥満細胞欠損ラット（Ws/Ws）における脳内ヒスタミン含量とヒスチジン脱炭酸酵素活性

〔著者〕前山一隆、尾上均*、杉本是明、櫻井映子、春日井努*、
〔所属〕北村幸彦*、渡辺建彦（東北大・医・一薬理、大阪大・医・病理*）

〔要約〕
Ws/Ws ラットは c-kit 遺伝子の欠失により骨髄幹細胞から肥満細胞への分化が進行しない結果、肥満細胞を欠損している。本ラットの各組織におけるヒスタミン含量ならびにその合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）活性を測定した。ヒスタミンは Ws/Ws ラットの脳ならびに腺胃において正常型ラットの約60 %存在しており、非肥満細胞性ヒスタミンとして作用していると考えられる。特に中枢において、ヒスタミン、HDC 活性とも視床下部に高く両ラットの比較より、肥満細胞性ヒスタミンの関与は大脳皮質ならびに小脳にみられた。Ws/Ws ラットは肥満細胞性ヒスタミンの影響を除去できる点で、ヒスタミン・ニューロンの研究に有用であることが確かめられた。

［目的］ヒスタミンはその貯蔵形式により肥満細胞性ヒスタミンと非肥満細胞性ヒスタミンに大別される。特に脳においては非肥満細胞性ヒスタミンはヒスタミン・ニューロンとして自発行動(4)、睡眠覚醒(1)、けいれん抑制(8)、摂食(5)等に関与していることが明かとなってきた。われわれはすでに肥満細胞欠損マウス（W/W^v）における脳内ヒスタミンが神経由来であるとともにその代謝回転を測定し、半減期が約1時間であることを報告した(2)。最近、丹羽らが発見した白色黒眼、貧血を特徴とする変異ラット（Ws/Ws）は c-kit 受容体に突然変異がみられ、骨髄幹細胞から肥満細胞への分化が起こらないため肥満細胞を欠損することが明かとなった(3,6)。ヒスタミン・ニューロンの研究において肥満細胞の関与がしばしば問題となるが、本ラットはこの点で有用であると考えられる。そこで肥満細胞欠損ラット（Ws/Ws）とその野生型（+/+）ラットの脳内ヒスタミンならびにヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）活性を比較した。

［方法］

1）ヒスタミン含量の測定：肥満細胞欠損ラット（Ws/Ws）、野生型（+/+）を断頭後、脳、胃、脾臓、腎臓、肺、心臓、皮膚の各組織を摘出し、6 倍量の 3% 過塩素酸にてホモジェナイズし、10,000 x g、20 分間遠心後、その上清を HPLC-蛍光法にて測定した(7)。

2）HDC 活性の測定：組織を0.01 mM ピリドキサールリン酸、0.2 mM ジチオスライトール、1% ポリエチレングリコールを含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液（pH 6.8）でホモジェナイズし、10,000 x g、20 分間遠心後、上清を透析する。透析後、基質である 0.25 mM L-ヒスチジンを添加し 37 ˚C、4 時間インキュベートした後、生成したヒスタミンを HPLC-蛍光法にて測定した。

［結果］

1）Ws/Ws と +/+ ラットの各組織におけるヒスタミン含量を表1に示した。Ws/Wsラットの皮膚、心臓、肺は +/+ ラットの 0.3、2.8、4.0 % であり、これらの組織では殆どが肥満細胞性ヒスタミンである。一方、Ws/Ws ラットの全脳と腺胃は +/+ ラットの 62.5、65.5 % であり、非肥満細胞性ヒスタミンの占める割合が大きい。

2）脳内ヒスタミンの分布を表2に示した。Ws/Ws ラットの大脳皮質ならびに小脳においてヒスタミン含量は有意の減少が認められた。視床下部、視床、中脳、線条体においては両者間に差は認められなかった。

3）Ws/Ws、+/+ ラット脳の各部位における HDC 活性を表3に示した。両者に有意差は認められなかった。

［考察］肥満細胞欠損ラット（Ws/Ws）は c-kit 受容体の突然変異により、骨髄細胞から肥満細胞への分化が抑制されることが知られている(6)。我々はこれまで肥満細胞欠損マウス（W/W^v）を用いて、非肥満細胞性ヒスタミンの存

在とその代謝回転を報告した。 即ち W/W^{v} マウスの脳、胃におけるヒスタミンは野生型 (+/+) の 44.7 %, 46.3 % であり、Ws/Ws ラットにおいても同様の結果を得た。 皮膚における肥満細胞数とヒスタミン含量の減少は一致することから、Ws/Ws ラットに存在するヒスタミンは非肥満細胞性ヒスタミンであり、 +/+ ラットとのヒスタミン含量の比は各組織における非肥満細胞性ヒスタミンの存在比を表わしている。 一方、ヒスタミン合成酵素である HDC 活性は Ws/Ws、 +/+ 間で有意差が認められない点は、脳における HDC 活性のほとんどすべてが非肥満細胞に由来することを意味する。 脳分画から得た結果より、 Ws/Ws ラットの脳内ヒスタミン含量は視床下部が最も高く、ヒスタミン・ニューロンの細胞体が視床下部乳頭体に存在するというこれまでの報告と一致する。 脳内ヒスタミンにおける肥満細胞の影響は、Ws/Ws と +/+ ラットとの比較より、大脳皮質、小脳に大きいことが示された。 以上の結果より、Ws/Ws ラットは肥満細胞の影響を除けるという点でヒスタミン・ニューロンの研究に有用であることが確かめられた。 さらに本ラットを用いてヒスタミン合成阻害薬ならびに H_3 拮抗薬の作用を検討したい。

［謝辞］本ラットを提供していただいた近藤恭司博士、丹羽愛樹博士（八木記念パーク・実験動物研究所）に感謝致します。

表1．ラットにおける非肥満細胞性ヒスタミンの占める割合

	Ws/Ws	+/+	%
全脳	0.31	0.49	62.8
腺胃	275	420	65.5
脾臓	2.69	13.0	20.7
腎臓	0.58	3.86	15.0
肺	0.87	21.6	4.0
心臓	0.58	20.9	2.8
皮膚	0.48	186	0.3

Ws/Ws ラットの各臓器におけるヒスタミン値（nmoles/g湿重量）ならびに野生型(+/+)におけるヒスタミン値に対する割合

表2． 脳内ヒスタミンの分布

	Ws/Ws	+/+
大脳皮質	0.239 ± 0.018*	0.332 ± 0.034
海馬	0.189 ± 0.043	0.337 ± 0.070
線条体	0.312 ± 0.041	0.292 ± 0.029
視床下部	2.487 ± 0.544	2.465 ± 0.603
視床	0.985 ± 0.171	1.058 ± 0.211
中脳	0.513 ± 0.082	0.479 ± 0.078
橋延髄	0.098 ± 0.022	0.139 ± 0.020
小脳	0.049 ± 0.007**	0.115 ± 0.017

数値は 5 匹の平均 ± S.E.M. （nmoles/g 湿重量）を示す。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ （ +/+ ラットとの比較）

表3． 脳各部位における HDC 活性の比較

	Ws/Ws	+/+
前脳	0.094 ± 0.015	0.073 ± 0.015
中脳	0.972 ± 0.320	0.523 ± 0.206
後脳	0.100 ± 0.065	0.088 ± 0.032

数値は 5 匹の平均 ± S.E.M. （pmoles/min/mg 蛋白）
前脳（大脳皮質、海馬、線条体）、中脳（視床、視床下部、中脳）、後脳（橋延髄、小脳）

［文献］

(1)Kiyono, S., Seo, M.L., Shibagaki, M.et al. (1985) Physiol. Behav. 34, 615-617
(2)Maeyama, K., Watanabe, T., Yamatodani, A. et al. (1983) J. Neurochem. 41, 128-134
(3)Niwa, Y., Kasugai, T., Ohno, K. et al. (1991) Blood 78, 1936-1941
(4)Sakai, N., Onodera, K., Maeyama, K. et al. (1991) Life Sci. 48, 2397-2404
(5)Sakata, T., Fukagawa, K., Ookuma, K. et al. (1990) Brain Res. 537, 303-306
(6)Tsujimura, T., Hirota, S., Nomura, S. et al. (1991) Blood 78, 1942-1946
(7)Yamatodani, A., Fukuda, H., Wada, H. et al. (1985) J. Chromatogr. 344, 115-123
(8)Yokoyama,H., Onodera, K., Maeyama, K. et al. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. in press

41 自傷行為モデルラットのドーパミン神経系と受容体
II 新生仔期6-OHDA投与ラットのドーパミンD2受容体の変動：[³H]YM-09151-2を用いたレセプターオートラジオグラフィー

岡村 均、横山ちひろ*、井端 泰彦
（京都府立医大・第二解剖、精神*）

［要約］出生後早期に 6-hydroxydopamine（6-OHDA）にてドーパミンニューロンを破壊したラットのうちL-DOPA負荷時自傷行為（self-mutilation behavior:SMB）が出現したラットのドーパミンD2受容体密度を[³H]YM-09151-2をリガンドとする定量的 in vitro オートラジオグラフィーの手法にて検索した。SMBラットでは6-OHDA処置後だがSMBが出現しない群（非SMB群）、6-OHDAを含まないvehicleのみの対照群に比して、広範なドーパミンニューロン系の破壊を来しているにもかかわらず、線条体・側坐核・嗅結節におけるD2受容体密度の有意な変動は認められなかった。この事実は、D2受容体作動薬及び拮抗薬単独ではSMBの発現抑制を引き起こしえないという行動薬理学的所見と関連すると考えられる。中脳、黒質緻密部、腹側被蓋野においては、SMB群では対照群に比し有意に減少していたが、SMB群と非SMB群の間では有意な差はなかった。この部位でのD2受容体の減少程度は、ドーパミンニューロンの破壊の程度とよく相関しており、ドーパミンニューロン自身の自己受容体の消失を表わす所見と考えられる。

［目的］新生仔期 6-hydroxydopamine（6-OHDA）を投与したラットは、成熟後L-DOPA負荷時に、ドーパミン過感受性行動と考えられる自傷行為（self-mutilation behavior: SMB）、急速な運動量の増大（fast dopa-induced increased locomotor activity:fast DILA）、常同行動（stereotypy behavior）を示す[1]。これらの現象はドーパミンD1受容体作動薬SKF38393で惹起され、D1受容体拮抗薬SCH23390で抑制されること、D2受容体作動薬及び拮抗薬はこれらの行動の発現や抑制に効果がないことから、D2よりもD1受容体が主に関与した現象であると言われてきた[2]。しかし、D2作動薬であるquinpiroleがD1作動薬SKF38393のSMB惹起作用を亢進するという所見[2]は、D2受容体も間接的ながらもSMBに関与するといえる。我々は前回ドーパミンニューロン破壊部位の免疫組織化学的検索より、腹側被蓋野－腹側線条体（側坐核－嗅結節）系の破壊がSMB発現の有無に重要であることを明らかにした[1]。今回我々は選択的ドーパミンD2受容体拮抗薬である[³H]YM-09151-2[3]を用いた定量的in vitroレセプターオートラジオグラフィーを確立し、大脳基底核の各部位にて、SMBに伴うD2受容体の変化について検索した。

［方法］Wistar系ラット生後１日齢及び３日齢に desipramine（20㎎/㎏）前処置後、実験群には6-OHDA（100㎍/5㎕）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（50㎎/㎏ i.p.）を負荷し、行動評価を行ない、6-OHDA処置ラットをSMB群と非SMB群に分けた。SMB判定は身体の咬傷を確認することにより行なった。10～15週齢で[³H]YM-09151-2を用いたin vitroレセプターオートラジオグラフィーを行なった。オートラジオグラフィーの条件を決定するに先立ち、section-wipe methodにより [³H]YM-09151-2 bindingの種々の生化学的検討を行ない、飽和実験をScatchard解析し、Kd = 0.98nM、Bmax = 66fmol/SECTIONを求めた。実際のオートラジオグラフィーはKuharとUnnerstallの手法に準じた[4]。0.1Mリン酸緩衝液（PBS）で灌流・脱血後、大脳基底核を含む連続16㎛厚の凍結切片を作成し、120mM NaCl、5mM KCl、2mM $CaCl_2$、1mM $MgCl_2$ を含む 50mM Tris-HCl bufferにて22℃ 5分preincubation後、0.5nM [³H]YM-09151-2を22℃ 2時間反応を行なった。nonspecific bindingは10μM (+)-butaclamol存在下で決定した。反応後、洗浄は5分 2回 氷冷buffer中で行ない、冷風下で乾燥後、[³H]acrylic standard bars（Amersham）とともに、[³H]Hyperfilmに4℃ 4週間露出した。得られた画像は、MICD（Imaging Research 社、Canada）により解析を行なった。なお、ドーパミンニューロンの損傷程度を検索する為、一部の凍結切片は抗tyrosine hydroxylase（TH）血清による免疫組織化学を行なった。

［結果］

1.[³H]YM-09151-2の正常ラット大脳基底核における分布

大脳基底核の中で、線条体、側坐核、嗅結節はいずれも非常に高い[³H]YM-09151-2の結合活性を示すが、各部位の平均を取ると線条体が側坐核、嗅結節のものに比して結合密度が高い傾向がある（Fig.1, Table 1）。また線条体内のsub-divisionをとると、腹外側部（CPVL）が最も結合密度が高く、続いて室周囲部（CPPV）及び背外側部（CPDL）、内側部（CPM）の順に密度が低くなる傾向が認められた。中脳被蓋においては、黒質緻密部（SNc）から黒質網様部内側底部にかけて存在するドーパミンニューロンの分布に一致して高い結合密度が認められたが、線条体からの線維が終末している黒質網様部（SNR）には弱い値しか認められなかった。また赤核後下方のA8の部位も弱く、腹側被蓋野（VTA）はそれらよりやや高い値を示す程度であった。

2.[³H]YM-09151-2結合密度の新生仔期6-OHDA投与による変動

[³H]YM-09151-2の大脳基底核各領域における結合密度を、対照群、非SMB群、SMB群の３群間で比較した。解析にあたり用いた前額断切片は各脳領域の中央部である（線条体 Bregma(B) +0.2、側坐核B +1.7、嗅結節 B +1.7、黒質・腹側被蓋野・脚間核 B -5.6）。線条体においては対照群、非SMB群、SMB群の順に結合密度の平均値は上昇するが、各群間に有意の変動は認められなかった（ただし背外側部CPDLにおいてはSMB群では対照群に比し増加傾向を示す($0.05<P<0.1$)）（Table 1）。側坐核、嗅結節にては、結合密度は３群間でほとんど変動しなかった。ドーパミン細胞体の見られる中脳においては、SNCでは対照群に比し、非SMB群、SMB群でともに有意に低下したが、非SMB群とSMB群の間には有意な差はなかった。VTAの受容体密度はSMB群でのみ対照群より有意に低下していたが、対照群と非SMB群との差は有意ではなかった。これらラットのTH免疫組織化学の検索の結果、中脳ドーパミンニューロンは対照群、非SMB群、SMB群の順に減少していた。

［考察］新生仔期6-OHDA大槽内処置ラットでは大脳基底核のドーパミン含量が減少する。非SMB群、SMB群では対照群に比して各々、線条体では29%、4%、側坐核では40%、9%、嗅結節では70%、21%であり、特にSMB群で各部位でドーパミン含量が激減するのが特徴である（Yokoyama and Okamura, 未発表）。しかるに、今回の実験で明らかになったことは、D2受容体の分布密度は、線条体・側坐核・嗅結節ともに、対照群、非SMB群、SMB群の３群間で変化がなかったこと

である。これは成熟ラットの黒質－線条体系破壊後に認められる、線条体でのD2受容体数の増加現象[5]と明らかに異なるものであり、SMBラットが、常同行動、SMBの現象においてはD2受容体作動薬に過感受性を示さないという行動薬理学的知見とよく一致する。

中脳ドーパミンニューロン群は自己受容体としてD2受容体を持つと言われるが、今回の実験での対照群では、[^{3}H]YM-09151-2の結合部位はドーパミンニューロンの分布とよく一致していた。非SMB群、SMB群における中脳での結合密度の減少は、ドーパミンニューロン破壊の程度とよく相関しており、破壊が広範に認められるSMB(+)群では[1]、腹側被蓋野でも[^{3}H]YM-09151-2の結合密度は低下していた。中脳の自己受容体の減少は当然、線条体・側坐核・嗅結節の自己受容体の減少も伴うはずである。現在までのところこれらの部位でのドーパミン終末が持つD2受容体数が、全ドーパミンD2受容体数に占める割合は明らかでないが、もしこれが大きければ、対照群と6-OHDA処置群で[^{3}H]YM-09151-2が変わらないという今回の所見は、postsynaptic cell上の [^{3}H]YM-09151-2の結合密度は上昇している可能性もある。これを明らかにする一助として、線条体などの細胞体に存在する、D2S、D2L、D3、D4などの mRNAの変動をin situ hybridizationの手法などで検討することは有用であると考えられる。

我々はSMB発現は、腹側被蓋野－腹側線条体系のドーパミンニューロン群の障害の有無と相関することをTH免疫組織化学法で示してきた[1]。今回の検討では、細胞体のある腹側被蓋野のD2受容体密度はSMB群で対照群に比して減少するものの、非SMB群とは有意な差は認めなかったこと、又、側坐核・嗅結節では３群間で殆ど変動がなかったことから、腹側被蓋野－腹側線条体系のドーパミンニューロン系に関与するD2受容体密度はSMB発現と相関はないと考えられる。

［文献］

1) 岡村 均，横山ちひろ ら，神経化学 30, 332-333 (1991)
2) Breese et al, J. Pharmacol. Exp. Ther. 235, 287-295 (1985)
3) Terai, M. et al, Kuropean J. Pharmacol. 173, 177-182 (1989)
4) Kuhar and Unnerstall. In Method in Neurotransmitter Receptor Analysis (Ed. H. Yamamura et al.), Raven Press, New York, 1990, pp177-218.
5) Neve et al, Brain Res. 302, 9-18 (1984)

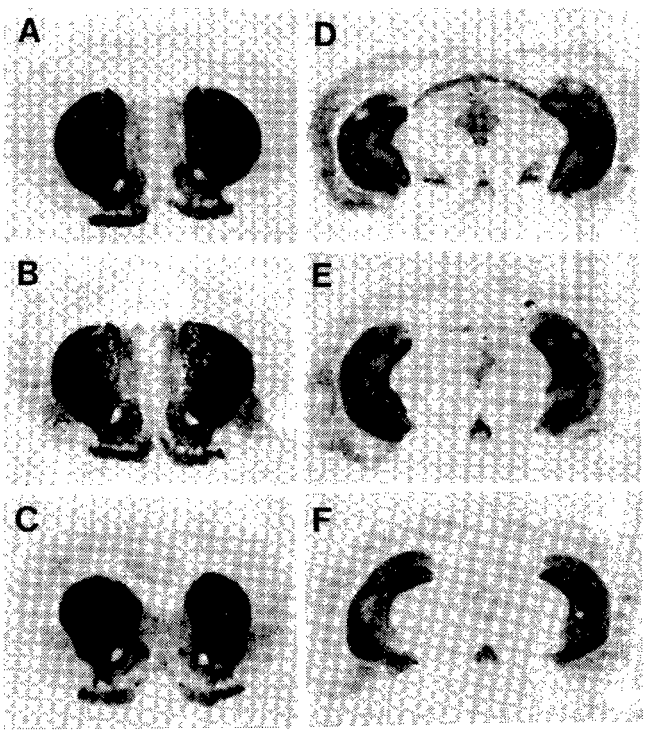
Table 1 CONTROL群、SMB(-)群、SMB(+)群における[^{3}H]YM-09151-2の結合密度の大脳基底核における変動

	CONTROL	SMB(-)	SMB(+)
CPDL	99.4±9.5	123.4±7.4	148.4±14.4
CPM	69.2±7.2	78.0±2.8	98.8±9.7
CPVL	144.5±21.8	163.0±6.4	183.1±12.3
CPPV	101.7±8.2	106.9±10.0	133.2±7.8
AcbC	100.9±8.1	92.4±4.9	106.0±12.2
AcbS	122.2±5.5	100.4±9.4	99.7±11.3
TuO	104.4±7.8	97.0±5.5	84.4±5.0
Icj	76.7±5.1	84.3±7.2	77.0±3.2
SNC	37.6±3.6	13.7±1.6	8.2±0.6
SNR	9.8±1.8	6.7±0.7	9.2±2.0
VTA	20.9±3.0	14.1±2.1	7.9±1.3
IPR	46.4±3.8	41.1±3.4	44.8±2.0

(Mean±SEM,fmol/mg tissue)　　＊P<0.05

CPDL:線条体背外側部
CPM:線条体内側部
CPVL:線条体腹外側部
CPPV:線条体室周囲部
AcbC:側坐核中心部
AcbS:側坐核外殻部
TuO:嗅結節
Icj:Calleja野
SNC:黒質緻密部
SNR:黒質網様部
VTA:腹側被蓋野
IPR:脚間核吻側部

Fig. 1 線条体・側坐核・嗅結節（A－C）と中脳（D－F）における[^{3}H]YM-09151-2結合のオートラジオグラフィー像。A,D:対照群、B,E:SMB(-)群、C,F:SMB(+)群



42 Thiamineおよびそのリン酸エステルのdopamine系およびserotonin系に対する影響

張　玉祥, 山下拓史, 中村重信, 川崎　尚*
(広島大・医・第三内科, 第一生化学*)

〔要約〕
thiamineとそのリン酸エステルであるthiamine monophosphate(TMP), thiamine diphosphate(TDP), thiamine triphosphate(TTP)が, 線条体におけるdopamine(DA)および, serotonin(5-HT)の放出, 代謝に与える影響をin vivo microdialysis法を用いて検討した. thiamine, TMP, TDP, TTPをRinger液で10mMに溶解し, 生理的に近い条件に調整した各溶液を20分間灌流することにより脳内投与を行なった. thiamineとTMPの投与により, モノアミンおよび代謝産物は有意な変化を示さなかった. TDPおよびTTPの投与によりDAおよび5-HT濃度は有意に($p<0.05$)上昇した. また, HVA, 5-HIAA濃度は有意に低下した. TDPおよびTTP投与によるDA, 5-HT濃度上昇の機序としては, シナプス前膜におけるDA, 5-HTの再取り込み阻害作用によると考えられる.

〔目的〕
thiamineが欠乏すると, 神経系においては*polyneuropathy*や*Wernicke-Korsakoff*症候群などの神経障害をきたすことはよく知られている. thiamineには補酵素としての作用の他に, 神経伝達機構と関連した作用が想定されている. そこで今回われわれは, in vivo microdialysis法を用いて, ラットの線条体にthiamineおよびそのリン酸エステルを直接投与し, dopamine系およびserotonin系に対する影響を検討した.

〔方法〕
実験にはウイスター系雄性ラット(体重250-300g)を使用した. 抱水クロラール麻酔下(360mg/kg, i.p.)で, ラットの頭部を脳定位固定器(SR-5)に固定した. 脳内微小透析用probeを挿入するためのguide cannulaを, 先端が線条体中心部に位置するように, Bregmaから正中より左側方3.0mm, 脳表より深さ3.5mmに埋め込んだ. guide cannulaの上部を歯科用セメントで頭蓋に固定し, 手術後1週間以上の回復期間をおいて実験した. cut-off分子量50kDaの再生セルロース製の透析膜を持った内径200 μmの直管式の透析probe (BDP-I-8-03)をguide cannulaの先端より3mm突出した状態で線条体に挿入した. 無麻酔, 無拘束の条件下で, probeにRinger液を1 μl/minの速度で灌流した. 線条体透析液中のdopamine (DA), serotonin(5-HT), homovanillic acid(HVA), 5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA)は逆相カラム(MA-ODS, 5 μm, 4.6X100mm)で分離し電気化学検出器(ECD-100)で検出, 定量した. 移動相は, 0.1Mクエン酸ー0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH3.9), 15% methanol, 150mg/l 1-octanesulfonate, 3mg/l EDTAを用いた. DA, 5-HT, HVA, 5-HIAAは, 標準品(Sigma)により各ピークを同定し, 面積を濃度とした. 線条体灌流液をautoinjector(AS-10)を用いて22分毎に回収し, HPLCに直接注入し, 各濃度を連続的に測定した. 薬物投与はprobeを挿入後, 約2時間リンゲル液を灌流し, 各ピークが安定した後に行なった. thiamine, TMP, TDP, TTPをRinger液で10mMに溶解し, pH 6.0になるように調整した. probeに各溶液を20分間灌流し, 透析膜から滲出させることにより脳内に投与した. 結果における統計学的有意差の検定は, 薬物投与前と投与後の各時間のDA, 5-HT, HVA, 5-HIAA濃度について分散分析による多重比較を行ない, 危険率5%未満の場合に有意と判定した.

〔結果〕
1) thiamine投与ではDA, 5-HT, HVA, 5-HIAA濃度は投与後154分まで有意な変化はみられなかった.
2) TMP投与ではDA, 5-HT, HVA, 5-HIAA濃度は投与後154分まで有意な変化はみられなかった.
3) TDPの投与では, 投与直後からDA濃度は上昇し, 44分後には有意に上昇した. その後も基礎値より上昇したまま推移し, 徐々に低下した. HVA濃度は投与直後から低下し, DAが最高値を示した44分後には有意に低下し, その後は基礎値とほぼ同じレベルで推移した. 5-HT濃度はDAと同様に投与直後から上昇し, 44分後には有意に上昇した. その後は徐々に低下した. 5-HIAA濃度はHVAと同様に投与直後から低下し, 44分後には有意に低下し, その後は基礎値とほぼ同じレベルで推移した(図1).
4) TTPの投与では, 投与直後からDA濃度は上昇し, 44分後には有意に上昇した. その後も基礎値より上昇したまま推移し, 徐々に低下した. HVA濃度は投与直後から低下し, DAが最高値を示した44分後には有意に低下し, その後は基礎値とほぼ同じレベルで推移した. 5-HT濃度はDAと同様に投与直後から上昇し, 44分後には有意に上昇した. その後は徐々に低下した. 5-HIAA濃度はHVAと同様に投与直後から低下し, 44分後には有意に低下し, その後は基礎値とほぼ同じレベルで推移した(図2).

〔考察〕
脳内に様々な形で分布しているthiamineの役割には, 補酵素としての作用の他に, 神経伝達機構に何らかの関連があるとの仮説がCooperらにより報告された(1). これを支持する研究が行なわれ, 電気刺激によってAchの遊離と平行してthiamineとTMPが細胞膜より遊離されること(2)や, 電気刺激によりAchが遊離した時の細胞膜活動電位はthiamine

添加で上昇すること(3)などが報告されている. thiamine欠乏ラットを用いた実験からthiamineとモノアミンとの関連が示唆されている. Iwataら(4, 5)はthiamine欠乏ラットにおいて脳内ノルアドレナリンおよびアドレナリン含量の増加と脳内モノアミン酸化酵素(MAO)活性と末梢血中カテコラミン量の低下を報告している. 5-HTについては, thiamine欠乏ラットで小脳, 延髄, 中脳, 視床の5-HTニューロンの消失, 5-HTの取り込み低下と5-HTの代謝回転の増加などが報告されている(6). 今回われわれの実験では, 無麻酔で, 無拘束の条件下で実験を行なった. 線条体へのthiamine, TMP, TDP, TTPの実際の投与量については, 回収率を測定したところ10%以下であり, 局所における希釈の影響も考えると, 実際の線条体細胞外液における各濃度は1mM以下と考えられた. thiamineおよびTMPの投与ではDA, 5-HT, HVA, 5-HIAA濃度に有意な変化はみられなかった. TDPとTTPの投与ではDAおよび5-HT濃度が上昇し, HVA, 5-HIAA濃度が低下することが明らかとなった. DAおよび5-HTはシナプス前膜から放出された後, ほとんどすべてが再取り込みされて神経細胞内に戻る(7). その大部分はDA, 5-HTとして再利用され, 一部分は代謝されて細胞外に放出される. 線条体細胞外液のHVA, 5-HIAAのうち細胞外で生成されるものは僅かであり, ほとんどは神経細胞内での代謝を経て生成される(8). TDP, TTP投与によるDAおよび5-HT濃度上昇の機序としては, 同時にHVA, 5-HIAA濃度が低下したことから, モノアミンの再取り込み阻害, あるいはMAO, カテコール-O-メチル転移酵素(COMT)などの代謝酵素阻害によると考えられる. しかし, TDP, TTP投与直後からDAおよび5-HT濃度に変化がみられたこと, thiamineのリン酸エステルはそのままの形では細胞膜を通過することが困難であり, 神経細胞内でモノアミン代謝に影響を及ぼすとは考えにくいことから, DA, 5-HT濃度上昇の機序としては, シナプス前膜における再取り込み阻害作用による可能性が考えられた. 今回われわれは, thiamineのリン酸エステルであるTDPとTTPがDA系および5-HT系に対し促進的に作用することを明らかにした. このことはthiamine欠乏が神経系へ及ぼす影響を説明する論拠のひとつになると考えられた.

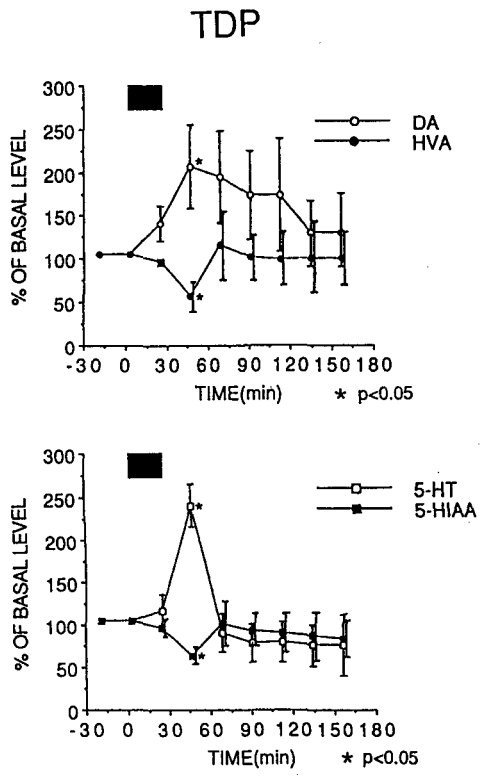


図1. TDPのDA系, 5-HT系に対する影響

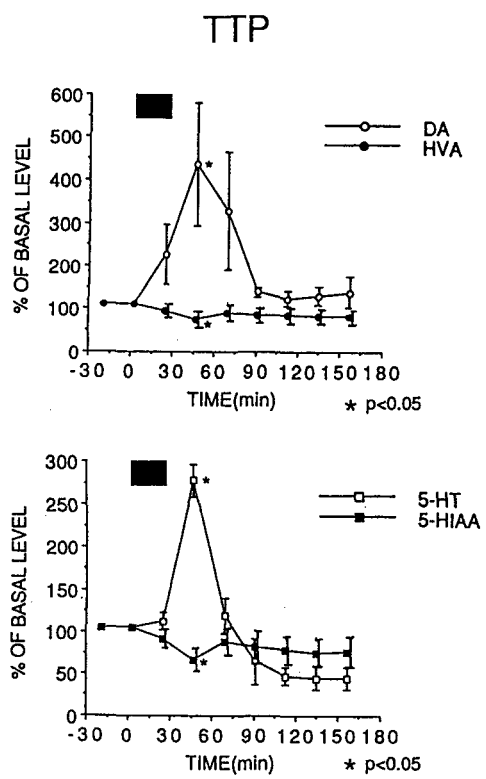


図2. TTPのDA系, 5-HT系に対する影響

文献

1. Cooper, J. R. and Pincus, J. H. (1979) Neurochem. Res. 4, 222-239
2. Eader, I. and Dunaut, Y. (1980) J. Neurochem. 35, 1287-1296
3. Goldberg, D. J. and Cooper, J.R. (1975) Neurobiol. 6, 435-452
4. Iwata, H., Nishikawa, T. and Baba, A. (1970) European. J. Pharmacol. 12, 253-256
5. Iwata, H. (1976) Nutr. Sci. Vitaminol. 22, 25-27
6. Plaitakis, A., Van Woert, M. H., Hwang, E. C. and Berl, S. (1978) J. Neurochem. 31, 1087-1089
7. DeMet, E. M., Vosmer, G. and Halaris, A. E. (1981) J. Neurochem. 36, 917-923
8. Westerink, B. H. and Spaan, S. J. (1982) J. Neurochem. 38, 342-347

43 種々のストレスに対するヒトグリオーマ細胞中のαBクリスタリンとHSP28の応答

加藤兼房、後藤幸代、長谷川かおり、稲熊　裕
（愛知県コロニー・発障研・生化）

〔要約〕
低分子量ストレス蛋白質であるαBクリスタリンとHSP28の応答が顕著に現れるヒト グリオーマ U118 MG 細胞を使って、熱および化学的ストレスに対する両蛋白質の変動、発現を解析して以下の結果を得た。
1)HSP28とαBはともに、45℃/15分間の熱ショック(Hs)を与えると、Hs直後には細胞質から膜分画への移動が起こり、可溶性分画の両蛋白質が急激に減少し、つづいて数時間後からは可溶性分画の両蛋白質濃度は増加し、Hs後 18-20時間で HSP28 は2-3倍に、αBは100倍近くになった。可溶性分画の両蛋白質の Hs直後の減少および20時間後の増加は温度(43℃-46℃)依存的であった。
2)亜砒酸ナトリウム(As, 25-200 μM)、エタノール(1-5%)などで1時間(37℃)処理すると、Hsと同様に HSP28とαBが誘導された。しかし、cAMP, TPA, カフェイン、カドミウム、亜鉛、ニコチンなどでは誘導されなかった。Asによる誘導は濃度(25-200 μM)依存的であったが、Hsの場合と異なりストレス処理直後の膜分画への移動は起こらなかった。
3)Hs(45℃/15 min)と、As(50 μM)あるいは エタノール(2 %)処理を同時に行うと 両蛋白質、とくにαBの誘導は相乗的に現れた。
4)培地に glycerolを10 % (約 1 M) 加えると Hs による両蛋白質の誘導は完全に阻止された。しかし、Asによる応答は影響されなかった。sorbitol (1 M), mannitol (1 M) および重水(50%)も同様に Hsによる誘導を抑える傾向を示した。
5)Hs および As 処理後の HSP28とαBの増量は、それぞれの mRNA の増量が先行していることを Northern blotting にて確認した。このように、HsとAs は同じように HSP28とαBを誘導するが、その機序の違いを示唆する現象を明らかにすることができた。

ストレス蛋白質あるいは熱ショック蛋白質(HSP)はその遺伝子の promotor 部分に特有の塩基配列(HSE, heat shock element)を持ち、この部分に HSF(heat shock factor)が結合すると遺伝子が活性化され、mRNAの、次いでHSPの合成が促進される。HSFは DNA-binding protein の一つで、熱や化学的なストレスによって活性化されたものが HSE に結合するとされている(1)。αBとHSP28 の一次構造の類似性が高いこと、αBの遺伝子にも HSE が存在すること(2)などから、αBも HSPの一員ではないかと推測されていた。事実、われわれはラットグリオーマ細胞(GA-1)中のαBがHsに応答して、Hs 中では細胞質から膜分画（核）へ移動し、つづいてαBが誘導されてくることを観察し、αBが低分子量 HSP の一つであることを示した(3)。また、ヒト骨格筋よりαBとHSP28 が同時精製され、細胞内では両蛋白質が複合体を形成していることを示唆する結果を報告した(4)。今回は、ヒト グリオーマ細胞 (U118 MG) を用い、種々のストレスに対するαBとHSP28 の応答を解析した結果を報告する。

【方法と材料】

細胞培養とストレス処置　ATCCより入手したヒトglioblastoma 細胞株、U118 MG は37℃、95% air/5% CO2 下で 10% FCS 添加 DMEM 液中で培養した。大部分の実験は35-mm皿を用い、confluent状態に達した細胞で行った。熱ショックは各皿をパラフィルムでシールして目的の温度に調節した恒温槽に15分間漬けた。As などの化学物質は、37℃で1時間作用させた後、新しい培地に換えた。ストレス反応抑制のために用いたglyverolなどの添加培地は、ストレス投与45分前に換え、ストレス投与終了後通常の培地にもどした。培養皿中の細胞は PBS で3回洗った後、皿ごと凍結保存した(-20℃)。凍結皿に0.3 mlの PBS を加え、細胞を物理的に剥して超音波処理し、日立RP80-AT2 ローターで 60000 rpm/20 minの遠心上清を分析した。膜分画は遠心沈査をPBSを加えて集め、再度超音波処理と遠心後に得た沈査を2%SDSに溶解して、SDS-PAGE・Western blotに用いた。

αBとHSP28の測定　既に報告してるEIA法(4,5)にて測定した。

Western および Northen blots　Western blotは、すべてアフィニテイー精製した抗αB（C末ペプチド）および抗ヒトHSP28 抗体 IgG を用いた。Northan blotに用いたαBの cDNA probe は Prof. H. Bloemendalより供与された。また、ヒトHSP28の cDNA probe は市販のものを用いた。

【結果】

図1に Hs(45℃/15分)処理後の可溶性分画のαBとHSP28 の経時的変化を示した。U118 MG細胞のαBは 約 2 ng/mg proteinと僅かしか存在しないが、Hs によって誘導され十数時間後には100倍近い値になった。HSP28も Hs 直後の減少（膜分画への移動）につづき合成が促進され 2-3倍の値に達した。これらの結果は Western blotでも確認できた。これらの応答（直後の減少とその後の誘導）は温度(43-46℃)依存的であった。各種の化学的ストレスを投与した後20時間後のαBとHSP28 の濃度を測ってみると。As 処理に対する応答が最も大きかった。As による両蛋白質の誘導は濃度 (25-200μM) 依存的であった。エタノール、L-azetidine-2-carboxylic

acidにも僅かであるが両蛋白質が誘導された。しかし、cAMP, TPA, caffeine, nicotine などに反応しなかった。図2に 100μMの As で処理後の経時的変化を示した。Hsの場合(図1)と類似の応答が観察された。しかし、Hsの場合と異なりストレス直後の減少は認められなかった。HsとAs を同時に投与すると、両蛋白質の応答は相乗的で、とくにαBの誘導で顕著であった（図3）。Hsとエタノール同時処理、Asとエタノール同時処理でも同じ様な傾向を示した。これらの蛋白質の増量はそれぞれの mRNA の発現の増加が先行していることを、Northern blotting で確かめた。chick embryo cellを用いた系で、 glycerolまたは重水(D_2O)が培地に混在するとHs後に起こる HSP70の誘導が抑制されることが報告されている(6)。U118 MG細胞のαBとHSP28 のストレス応答への glycerolの影響を調べた結果を図4に示した。10% glycerolの存在下で45℃/15分の Hsによる両蛋白質の応答は完全に阻止された。しかし、Asによる応答は全く影響を受けなかった。このような抑制作用は1 M のsorbitolやmannitol添加でも認められた。D_2O や polyhydroxyl alcoholである glycerolなどは蛋白質の変性を防御する作用があり、細胞内蛋白質の変性が Hs応答の triggerの一つであることを示唆している。HSFの活性化機構として、熱による直接活性化と、燐酸化による活性化が示唆されている(1)。glycerolなどは熱ストレスによる HSFの直接活性化をブロックしているかも知れない。

【考察】

HSPファミリーに属するαBとHSP28の各種ストレスに対する応答および glycerolなどによるその修飾は U118 MG 細胞では同じように現れ、二つの HSP の独自性は認められなかった。ラットに in vivo で Hs を投与した際には神経組織での両蛋白質の応答は全く異なっていた(8)。この違いの理由は今のところ分からない。一方、HsとAs の二種類のストレスに対しては、明かに異なる反応が観察された。ストレス投与早期に現れる膜分画への移動が Hsでは観察されたが、As では認められないこと。glycerolは Hsによって起こる一連の反応を完全に阻止するが、As によって引き起こされる反応を止めることができないことである。αBおよび HSP28 がストレスに対して増加することの生物学的意義およびαBと HSP28 の生物活性の解明が待たれる。

【文献】

(1) Nature 335, 372-375, 1988. (2) Nucl. Acids. Res., 14, 4127-4145, 1986.
(3) Biochem. Biophys. Res. Commun. 182, 844-850, 1992. (4) J. Biol. Chem. 267, 7718-7725, 1992.
(5) Biochim. Biophys. Acta. 1074, 201-208, 1991. (6) J. Cell. Physiol. 139, 219-228, 1989.

Fig. 1. Two small HSPs after a heat treatment (45°C/15 min)

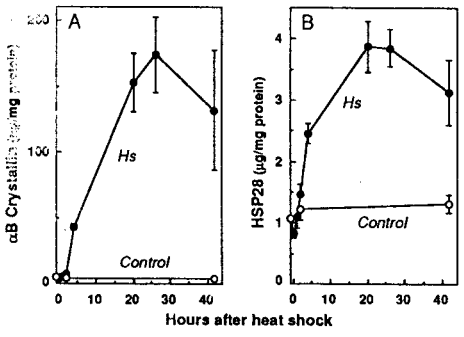


Fig. 2. Two small HSPs after an arsenite treatment (100 μM/1 h)

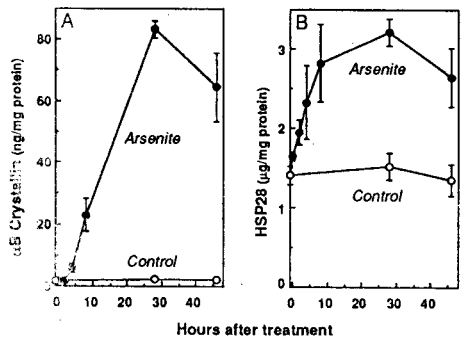


Fig. 3. Synergistic effect of heat and arsenite stresses

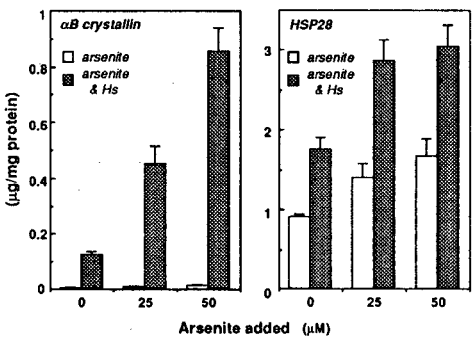
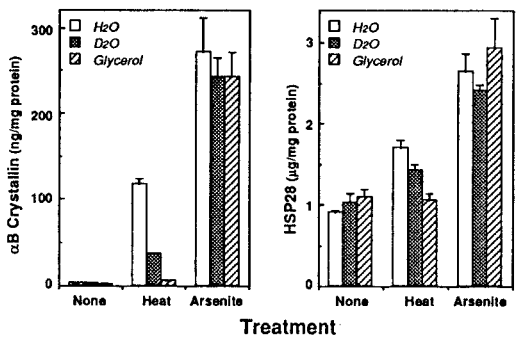


Fig. 4. Inhibition of heat shock response by glyrerol and D_2O



44 ラット低分子量ストレス蛋白質ＨＳＰ２７のＥＩＡ系の確立と骨格筋からの精製

後藤幸代、篠原春夫、稲熊　裕、長谷川かおり、加藤兼房
（愛知県コロニー・発障研・生化）

〔要約〕
1)遺伝子より推測されているラットHSP27のC末端の12ペプチド（ＰＥＡＧＫＳＥＱＳＧＡＫ）を合成し、ヘモシアニンとの結合物をウサギに免疫し抗血清を得た。ラット骨格筋より部分精製したHSP27標品を不溶化したセファロースカラムを用いて、抗血清中の特異抗体を精製した。精製抗体はラットHSP27と特異的に反応し、ヒトHSP28やαＢクリスタリンとは交叉反応しなかった。この抗体を用いてβ-D-ガラクトシダーゼを標識酵素として使うサンドイッチ型ＥＩＡ系を作製したところ10 pg 以上のラットHSP27が特異的に測定できた。
2)ラット骨格筋中のHSP27は、ヒト骨格筋のHSP28に比べて少なく精製が困難であったが、上記の測定系を用いるとカラムからの溶出位置を正確に知ることができた。骨格筋抽出液中のHSP27免疫活性を、硫安分画、次いで DEAE-Sepharose, Bio-Gel A-5m カラムクロマト、さらに 7 M 尿素存在下で、 S Sepharose, Superdex 75pg, TSK SP-5PW カラムクロマトを行い精製した。500 gの骨格筋より1.5 mg 前後のHSP27を精製することができた。最終標品は SDS-PAGE でヒトHSP28より低分子量領域に単一バンドを示した。

われわれはヒト骨格筋よりαＢクリスタリン（以下αＢ）と低分子量ストレス蛋白質 HSP28 が同時精製されてくること(1)、αＢが低分子量ストレス蛋白質の一つであること(2)、細胞内ではαＢとHSP28が >500 kDa の複合体を形成していること(1)、ヒトグリオーマ細胞株中の両蛋白質は各種ストレスに応答すること(3)、などをイムノアッセイ法を使って明らかにしてきた。また、αＢはレンズ以外に心筋や骨格筋、腎、および脳などに局在(4)するのに対し、HSP28 はすべての組織に分布していることも報告してきた(1)。しかし、これら２種類のストレス蛋白質の生理機能を明らかにするためには、動物を使った in vivo の実験が必要である。αＢの一次構造は動物種間でほとんど違いがないことから、すでに確立しているイムノアッセイ系がラットαＢの測定(3)に利用できたが、ヒトHSP28に対する抗体はラットHSP27とは全く交叉反応しないのでラットHSP27の特異抗体を作製することが必要だった。ラット骨格筋のHSP27はヒト筋肉のHSP28に比べて量的に少なく、完全精製にはラットHSP27の検出系が必要であった。それでcDNAより推測されているラットHSP27のC末端の12ペプチド(5)を合成し、このペプチドに対する特異抗体を得て、ラットHSP27のイムノアッセイ系を確立することができた。この測定系を用いてラット骨格筋より、SDS-PAGEで単一バンドを示すHSP27を精製したので報告する。

【方法と材料】

C末端ペプチドに対する特異抗体の作製　合成した12ペプチド（ＰＥＡＧＫＳＥＱＳＧＡＫ）はグルタールアルデヒド(7 mM)を用いてヘモシアニンと結合させた。ペプチド0.5 mg を含む結合物を完全アジュバントとともにウサギ皮下に注射した。これを２週間隔で繰り返し、９週後より採血した。部分精製(約50%純度)したラットHSP27(約 5 mg)をCNBr活性化セファロース(2 g)に結合させ、これをつめたカラムを使って、すでに報告(4)している手順通りに、抗体を精製した。抗血清200 mlより約 5 mgの精製抗体IgGが得られた。

イムノアッセイ系の作製　抗体IgGをペプシンで消化して得た$F(ab')_2$ フラグメントを用いて、大腸菌由来のβ-D-ガラクトシダーゼで標識したFab'フラグメントと、$F(ab')_2$を吸着させたポリスチレン球（直径3.2 mm）を調製した。

HSP27の精製　ラット骨格筋よりヒトHSP28の精製法(1)に準じて精製した。凍結筋 500 gを４倍量(2000 ml)の50 mM 燐酸ナトリウム、5mM EDTA (pH 7) 中でホモジナイズ、遠心上清を硫安分画(0-40%)し、沈澱を300 mlの10 mM 燐酸カリウム、pH 8.0 とホモジナイズし、これを同じ緩衝液に透析した。透析した分画は100,000 x g/1 h 遠心し、上清をDEAE Sepharoseカラム(5 x 25 cm)にかけた。HSP27は燐酸カリウム緩衝液の濃度(10-400 mM)を上げて溶出した。HSP27画分を集め、50 %硫安で沈澱、濃縮してからBio-Gel A-5mカラム(2.6 x 60 cm)にかけ低分子量の混在物を除いた。HSP27画分を集め、7 M尿素などを含む酢酸緩衝液(0.1 M, pH 4.5)に透析した。これをFPLCシステム中でセットしたHiLoad S-Sepharose HPカラム(1.6 x 10 cm)にかけ、上記の尿素/酢酸緩衝液に加えたNaCl濃度勾配で溶出した。HSP27画分を集め、濃縮後上記の尿素/酢酸緩衝液で平衡化したHiLoad Superdex 75pgカラム(2.6 x 60 cm)にかけ、高分子量の混在物を除去した。HSP27画分を集め、TSK SP-5PW カラム(0.8 x 7.5 cm) にかけ、尿素/酢酸緩衝液中のNaCl濃度を上げてHSP27を溶出して最終標品を得た。

【結果】

精製抗体の特異性　ラットヒラメ筋抽出液をSDS-PAGEし、ニトロセルロース膜に転写後、抗原結合カラムで精製した抗体を使って免

変染色すると、HSP27に相当する位置の蛋白質だけが染色された。また、ヒトHSP28とは反応しなかった。同じようにヒトHSP28のC末端12ペプチド（PEAAKSDETAAK）で作製した抗体はヒトHSP28に特異的で、ラットHSP27とは全く反応しなかった。

<u>イムノアッセイ系の測定感度と特異性</u>　HSP27は抽出液中ではαBなどとともに分子量 >500 kDaの複合体を形成していることを利用して、上記のペプチド抗体を使ってサンドイッチEIA系を作製してみた。図1に示すように10 pg/tubeのラットHSP27が検出測定できることが分かった。この測定系はαBクリスタリンやヒトHSP28とは交叉反応しなかった。

<u>ラットHSP27の精製</u>　上記のイムノアッセイ系を使って、HSP27の存在するフラクションを正確に知ることができるようになり、ラット骨格筋よりHSP27を表1に示すように精製することができた。図2にDEAE Sepharose と Bio-Gel A-5m カラムクロマトでの溶出パターンを示した。図3AはS Sepharoseカラムからの蛋白質(A280)の溶出パターンを示すが、HSP27は最初のピークに、また二番目、三番目のピークには、ヒトの骨格筋からの精製の時に観察されたように、20-kDa 蛋白質およびαBクリスタリンが溶出された。TSK SP-5PW から溶出（図3B）された最終標品はSDS-PAGEで、ヒトHSP28のすぐ下の27 kDaの位置に単一バンドを示した。しかし、その溶出パターンから分かるように、ヒトHSP28と同じように、ラットHSP27も燐酸化を受けた成分が混在することが示唆された。約 500 g の筋肉より約1.5 mgの精製蛋白質が得られた。

【考察】

C末端12ペプチドで作製した抗体は HSP27との特異性および親和性は高かった。しかし、収量(約 5 mg/200 ml血清)は少なかった。これはnative proteinを不溶化したカラムに結合し、高塩濃度(1 M NaCl)(4)の洗いにもはずれてこない抗体を溶出精製したためと思われる。HSP27は通常の溶液中では >500 kDaの複合体として存在していることから、C末端ペプチドに対する抗体だけで作製したサンドイッチ型EIA 系で測定することができた。ラットHSP27の精製は未だ報告されていない。赤筋が少ないためかラット骨格筋中のHSP27は少なく、測定系により精製過程をイムノアッセイ系でモニタリングすることによりはじめて完全精製できたと考えている。

【文献】

(1) J. Biol. Chem., 267, 7718-7725, 1992.　(2) Biochem. Biophys. Res. Commun., 182, 844-850, 1992.　(3) 本論文集

(4) Biochim. Biophys. Acta, 1074, 201-208, 1991.　(5) Eur. J. Biochem., 179, 209-213, 1989.

Fig. 1. ***Standard curve for EIA of rat HSP28***

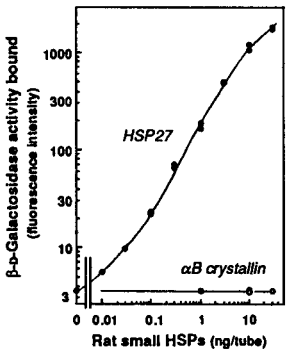


Table 1. Purification of Immunoreactive HSP27 from Rat Skeletal Muscle

Fractions	Total volume	Total protein	Immunoreactive HSP27 total	specific	yield
	(ml)	(mg)	(mg)	(μg/mg protein)	(%)
Crude extract	1690	14800	10.6	0.72	100
$(NH_4)_2SO_4$ (0-40%)	274	1980	9.3	4.70	88
DEAE-Sepharose	430	271	6.7	24.7	63
Bio-Gel A-5m	51	56.1	4.2	74.9	40
S Sepharose HP	11.5	8.1	2.7	333	25
Superdex 75pg	12.0	2.4	2.2	917	21
TSK SP-5PW	3.7	1.7	-	-	16

Frozen skeletal muscles (about 500 g) were used.

Fig. 2. ***Elution profiles of HSP27 from DEAE-Sepharose and Bio-Gel A-5m columns***

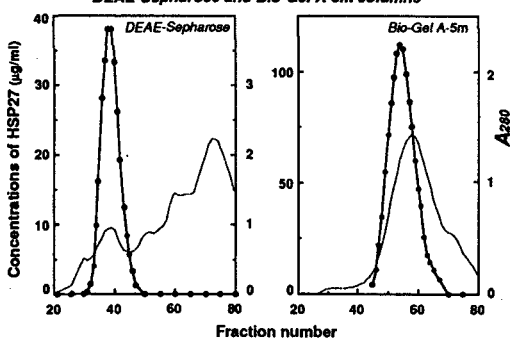
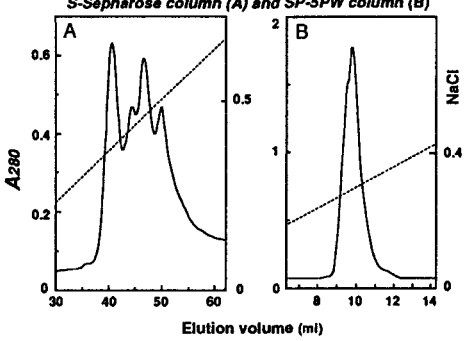


Fig. 3. ***Elution profiles of proteins from S-Sepharose column (A) and SP-5PW column (B)***



45 低分子量ストレス蛋白質のラット個体レベルでの応答：熱ショックによる中枢神経系および末梢組織での誘導

稲熊 裕、長谷川かおり、後藤幸代、加藤兼房
（愛知県コロニー・発障研・生化）

〔要約〕
ラットを42℃および25℃(±0.1℃)の water bath に15分間温浴させ、18時間後に屠殺し、中枢神経組織（大脳皮質、海馬、視床下部、小脳、延髄、頸髄）および末梢組織における低分子量ストレス蛋白質、HSP27とαBクリスタリン（以下αB）、の濃度を最近確立したEIA法にて測定して以下の結果を得た。

1)中枢神経組織のαBとHSP27はおもにグリア細胞に存在し、αBは100 ng/mg protein 以下の低濃度であるのに対し、HSP27は 50-400 ng/mg protein と延髄、頸髄に比較的多く存在した。42℃の熱ショック(HS)を与えると、18 時間後には中枢神経系ではすべての組織でHSP27が増量し、とくに小脳では数倍高い値を示した。これらの結果は組織抽出液のWestern blotでも確かめられた。しかし、αBの濃度は HS によって変化しなかった。なお、25℃水浴ラットと無処置ラットの各組織での濃度は、αBおよびHSP27ともに差を認めなかった。

2)一方、末梢組織、とくにαBとHSP27が高濃度で存在する筋組織（舌、横隔膜、大腿直筋、ヒラメ筋）では HS による応答がほとんど見られず、心筋でHSP27が2倍近くに増量するだけで、αBの増加は認められなかった。

3)その他の末梢組織で、とくにHSP27の多い組織（肺、副腎、脾、脂肪組織）では、HSP27が約2倍に増加していた。しかし、膀胱、軟骨（胸骨剣状突起）や胃では対照（25℃）ラットと有意の差を認めなかった。HS によるαBの増加はわずかに肺で観察された。

αBが低分子量ストレス蛋白質の一つで、熱ストレスや種々の化学ストレスに反応して、HSP28とともに合成が誘導されることをヒトグリオーマ細胞株を用いて明らかにしてきた(1)。しかし、実際にストレスを動物に与えた時に、これら2種類の低分子量ストレス蛋白質が誘導されるかどうかを定量的に解析した報告は未だ無い。一方、我々はアルツハイマー病患者大脳皮質、とくに側頭葉では両蛋白質濃度が高いことを報告している(2)。また、胎生9日目頃に熱ストレスを与えると、高率に脳奇形を持ったマウスが生まれてくることから、この発症機構にストレス蛋白質の関与を示唆する報告(3)もある。それで我々は成獣ラットに熱ストレスを与えた時の両蛋白質の応答を18 時間後のラットの中枢神経組織および末梢組織を摘出して解析した。

【方法と材料】

<u>αBおよび HSP27の測定</u>　αBは種特異性が低く、動物間でその一次構造に3-4のアミノ酸置換がある程度で、既に報告しているウシαBのEIA系(4)で測定することができた。しかし、HSP28/27は種特異性があるため、ラットHSP27のC末端ペプチドを抗原としてウサギで作製した抗体を用いたEIA系(5)にて測定した。

<u>熱ストレスと組織抽出液の作製</u>　体重200 g 前後の雄ウイスターラットをアクリル製の円筒に入れ、恒温漕 42(±0.1)℃ または 25℃で、15分間　水平位置で半身以上を水没させた。18 時間後にラットをエーテル麻酔下で瀉血、断頭して各組織を摘出し、-30℃で保存した。凍結組織は10倍量の50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.5中でホモジナイズし、超遠心上清中のαBと HSP27を測定した。

【結果】

<u>神経組織におけるαB（図1A）と HSP27（図1B）の応答</u>

図1に42℃/15 min 処理後18時間の熱ストレス群 (n=5) と対照群 (n=5) の中枢神経組織における両蛋白質濃度を平均±標準誤差で示した。αB、HSP27ともに大脳皮質では低く、延髄や頸髄では高い傾向を示した。これらの部位のαBは HS群と対照群で差は認められなかった。しかし、HSP27の濃度は、調べた神経組織の全部位で、HS群で顕著に増加し、とくに小脳では対照群(29.0 ± 4.1 ng/mg protein)に対して、HS群では(217 ± 18 ng/mg protein)と約7倍高い濃度であった。

<u>筋組織におけるαB（図2A）と HSP27（図2B）の応答</u>

αBとHSP27 は心筋と骨格筋、とくに遅筋である1型筋線維に多く存在する。筋組織の両蛋白質のHSに対する応答は少なく、舌、横隔膜、大腿直筋（2型線維を多く含む）、ヒラメ筋（1型線維を多く含む）の濃度は対照群との差は認められない。わずかに心筋でHSP27が2倍近くに増加していた。

その他の末梢組織におけるαB（図3A）と HSP27（図3B）の応答

HSP27は平滑筋組織や肺、副腎、膀胱、軟骨組織、脂肪組織にもかなりの濃度で分布している。これらの組織のHSP27は膀胱、軟骨組織、胃を除いて、HS に応答して2倍近い高値を示した。αBは僅かに肺でHSへの応答が観察された。

【考察】

培養細胞系では各種ストレスに対して2種類の低分子量ストレス蛋白質は必ず同時に応答し、一方だけが誘導されることはなかった(1)。しかし、in vivoで熱ストレスを与えた場合はαBとHSP27の応答が全く違うことが分かった。αBは、少なくとも42℃/15分間のストレスにはほとんど反応しないのに対し、HSP27が応答している組織・臓器は多かった。HSP27の応答の程度は組織によって違いがあり、筋組織のHSに対する反応はほとんど認められなかったが、中枢神経系はもっとも大きく応答した。熱ストレス、損傷、虚血などによって中枢神経組織のHSP70 とそのmRNAの発現が増加することが報告(6-8)されている。我々は、HSP27も同じように熱ストレスに応答することをはじめて明らかにしたが、このようなHSP70やHSP27の増加の生理的意義およびそれぞれのHSPの生理活性については不明である。なお、HSP27の発現が促進している細胞種については免疫組織化学的に解析中である。

【文献】

(1) Kato, K. et al. 本論文集. (2) Shinohara, H. et al. 本論文集. (3) Webster, S.W. et al. Teratology, 31, 73-82, 1985. (4) Kato, K. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1074, 201-208, 1991. (5) Goto, et al. 本論文集. (6) Cosgrove, J. W. & Brown, I.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 569-573, 1983. (7) Brown, I. R. et al. Neuron, 2, 1559-1564, 1989. (8) Vass, K. et al. Acta Neuropathol., 77, 128-135, 1988.

Fig. 1. Changes in concentrations of αB crystallin (A) and HSP27 (B) in rat CNS after heat shock

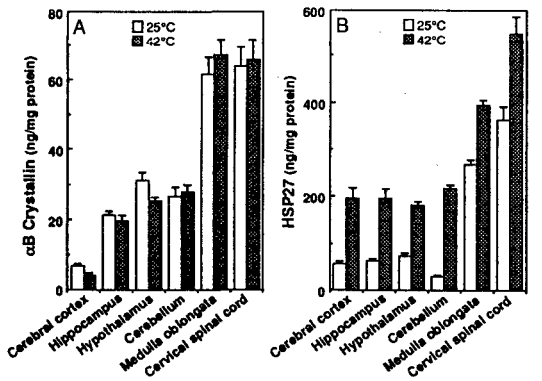


Fig.2. Concentrations of αB crystallin (A) and HSP27 (B) in rat muscle tissues after heat shock

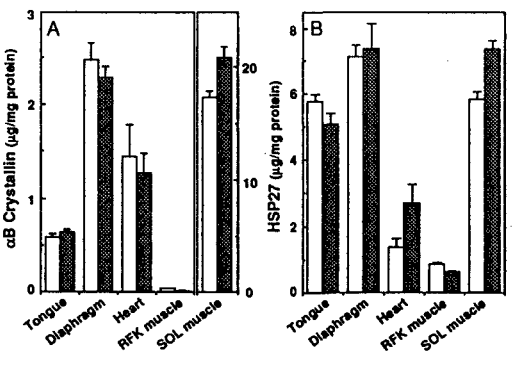
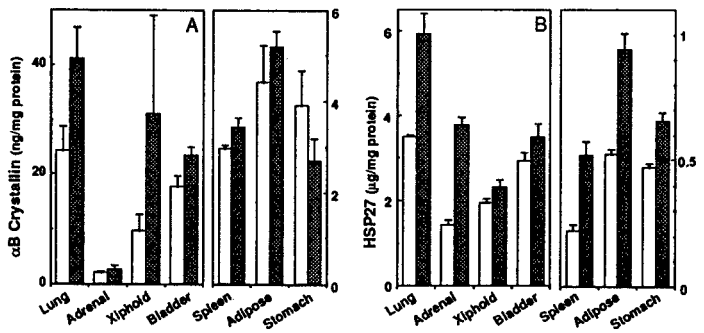


Fig. 3. Concentrations of αB crystallin (A) and HSP27 (B) in rat peripheral tissues after heat shock



46　シトクロムP－４５０ｄｂ１の脳内活性

岩橋和彦，松尾義則*，常岡豊*，中村和彦，臼杵豊之，
久郷敏明，早原敏之，洲脇寛，細川清**
香川医大　医　精神科，*同　生化学，**同　附属病院

[要約]

ミクロソーム型P-450db1はデブリソキン，ブフラロールの他，パーキンソンニズムをおこす原因物質のMPTPも代謝する酵素で，主に肝臓に存在することが知られていたが　最近になって　本酵素はハロペリドールやイミプラミンなどの向精神薬なども代謝する可能性が報告されてきた．そこで我々は　このシトクロムP-450db1の脳内での存在，組織分布，および臓器特異性を明かにするため　ウシの肝，脳，腎，副腎，の各ミクロソーム分画におけるP-450db1の酵素活性をHPLCにて調べた．　その結果，デブリソキン-4-水酸化酵素活性が脳内の　特に大脳皮質に　肝のおよそ数パーセントほど見られたほか，小脳，中脳，延髄，腎，副腎，にもブフラロール-1'-水酸化酵素活性が見られた．　このことから，向精神薬も肝以外の，脳内などでも代謝されている可能性が　あり，脳内の本酵素活性と　向精神薬の脳内での代謝および副作用を含めた　薬理作用との関係についてさらなる検討が必要と思われる．

[目的]

P-450db1はIIDsubfamilyに属するシトクロムP-450の分子種の一つで，MPTPの他デブリソキン，ブフラロール，スパルテインや，三環抗うつ剤などの中枢神経系に作用する薬物を含む２５種以上の薬物を代謝する事が知られている[1]．　またパーキンソン病の患者において有意に本酵素の薬物代謝能が低い事，本酵素の活性の弱さ　あるいは欠損率には人種差があり　欧米人で１０％，東洋人で１％の人が酵素欠損またはpoor metabolizerであるといわれている[1]．
今回我々は　これまで肝臓に存在しているといわれてきた本酵素が　向精神薬など脳神経系に作用する薬物を代謝するという事から　本酵素が脳内にも分布する可能性があると考え，その脳内分布や臓器特異性を調べるとともに　基質となる薬物による副作用と脳内における酵素の薬物代謝能との因果関係について検討した．

[方法]

クローニングして得られたウシP-450db1IIDcDNAをビオチン化ラベルし，in situ hybridization法にて組織分布をしらべた[2]．

ウシの肝，脳（大脳皮質，小脳，中脳，延髄），腎，副腎の各ミクロソーム分画を精製し，基質としてデブリソキンあるいはブフラロールを入れ，NADPH-generating system を加えて　それぞれ　デブリソキン-4-水酸化酵素活性，ブフラロール-1'-水酸化酵素活性をHPLCを用いて測定

した[2]．

[結果]

in situ hybridization の解析結果から　シトクロムP-450IIDと相同性があると考えられる遺伝子産物が肝臓以外で脳，腎，副腎にて検出された．これをもとにその部位での酵素活性を調べた（下の図）．

デブリソキン-4-水酸化酵素活性は　大脳皮質にて肝の数パーセントほど検出された．脳のその他の部位や腎，副腎では活性は検出されなかった．　一方，ブフラロール-1'-水酸化酵素活性は　腎，副腎に　肝の数パーセントほど検出されたが，脳の各部位（大脳皮質，小脳，中脳，延髄）にもごくわずかながら検出された．中でも　大脳皮質に最も強い活性がみられた．図のデータは　3回の活性測定値の平均である．ウシ肝ミクロソーム分画の同活性を100%として　他の組織のものと比較した．

[考察]

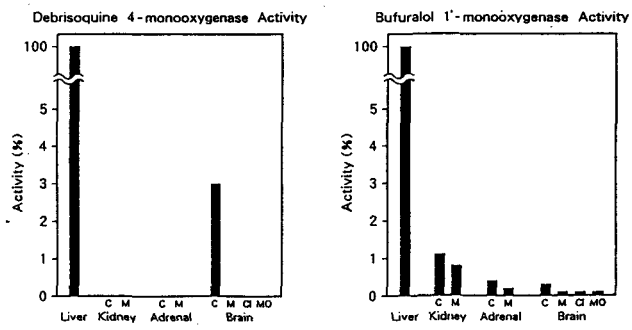
以上の実験結果から，脳内には　P-450IIDのsubfamilyが発現しているもののデブリソキン-4-水酸化酵素活性は大脳皮質にしか見つからず，ブフラロール-1'-水酸化酵素反応についても脳内各部位により活性の強さに差があり，　大脳皮質が脳内で最も活性が強いことがわかった．肝のみでなく脳についても，P-450db1の薬物代謝能に個人差があると考えられることから　肝に加えて脳内でのP-450db1の活性の弱さが　パーキンソンニズムや　他の薬物による脳神経系への副作用の発生に関与している可能性がある．

今後は，脳，肝，腎，副腎のP-450db1の薬物代謝活性の臓器特異性や個人差を調べながら，neurotoxicな物質や薬物によって引き起こされるパーキンソンニズムや小脳失調等の神経症状の病巣部位と　特に脳内での本酵素活性の強さとの関係についてさらなる検討を重ねていくつもりである．

[文献]

1)Fonne-Pfister R. and Meyer U.A. (1988) Biochem. Pharmacol. 37: 3829- 3835
2)Kronbach T. et al. (1987) Analy. Biochem. 162: 24-32
3)Rigby P.W.J. et al. (1977) J. Mol. Biol. 113: 237-251

DEBRISOQUINE 4-MONOOXYGENASE AND BUFURALOL 1'-MONOOXYGENASE ACTIVITIES IN MICROSOMES OF VARIOUS TISSUES FROM BOVINE



47 霊長類におけるチロシン水酸化酵素の多型性

一瀬宏、大江瑞恵、藤田啓介、永津俊治
（藤田保健衛生大学・総医研・神経化学）

〔要約〕 チロシン水酸化酵素の4種の多型性（type 1 - type 4）を、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) により高感度に検出する方法を確立した。この方法を用いることにより、ヒトのチロシン水酸化酵素の4種の多型性は、腫瘍細胞である褐色細胞腫ばかりでなく副腎や脳にも存在することが明かとなった。また、サルではヒトのtype 1とtype 2に相当する多型は存在したがtype 3, type 4 に相当するものは検出できなかった。これらの結果は、進化の過程において、まず2種類の多型が獲得された後に、4種の多型が獲得されていったことを示していると考えられる。

［目的］

チロシン水酸化酵素は、カテコールアミン生合成の律速酵素として脳および副腎でのカテコールアミンの合成量を調節している。チロシン水酸化酵素の活性調節機構として、リン酸化が重要であると考えられている。さらに、ヒトではラットやマウスに存在しない4種の多型性が褐色細胞腫からのcDNAクローニングの過程で発見され（1-4）、多型性による活性調節の可能性が示唆されている。チロシン水酸化酵素の多型性は、ラットなどと共通の構造を持つtype 1の３０番目と３１番目のアミノ酸の間に、4アミノ酸 (type 2)、２７アミノ酸 (type 3)、あるいは３１（４＋２７）アミノ酸 (type 4) が挿入されることにより形成される。それぞれのtypeは酵素学的な性質が少しづつ異なっており、最も比活性の高いものはtype 1でtype 2, type 3, type 4の順に小さくなる（5）。また、type 2ではtype 1ではみられない新たなリン酸化部位が生じることが示唆されている（1）。また、褐色細胞腫から見つけられた4種のtypeのすべてが、副腎や脳の正常な組織においても発現しているかどうか問題となっていた。

一方、ラット・マウスで見られないチロシン水酸化酵素の多型性をヒトが進化の過程でどのように獲得していったのかを知ることは、多型性の生理的意義を知る上でも興味深い。

そこで、我々はチロシン水酸化酵素の4種の多型をreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)により高感度に検出する方法を開発し、ヒトおよびサルの各組織で測定を行った。

［方法］

ヤクニホンザル(*Macaca fuscata yakui*)の副腎および脳は、京都大学霊鳥類研究所の林基治博士のご厚意により提供された。

オリゴヌクレオチドプライマーの合成は、ABIのmodel 392により行った。PCRは、Perkin-Elmer Cetus社のGeneAmp PCR System 9600により行った。組織からのＲＮＡの調製は、チオシアン酸グアニジン溶液で抽出した後、塩化セシウムを用いた超遠心法により行った。合成プライマーのシークエンスは下記のとおりである。HS-4: 5'-TGTCTGAGCTGGACGC-3'; HA-3: 5'-CTCCTCAAAGGCCACAGCCTCCA-3'; HA-2: 5'-TGCAGTTCCAGGCCACGGAGAGC-3'; HA-4: 5'-GGCCACGGAGAGCCTGTGAGGCT-3'.

各動物の臓器からの全RNA 1μgをランダムヘキサヌクレオチドと逆転写酵素によりcDNAとした後、それぞれのプライマー対によりチロシン水酸化酵素のcDNAを増幅した。PCRによる増幅は、アニール及び伸長：60℃ 1 min、変性：94℃ 30 secの2ステップのサイクルを30回繰り返すことにより行った。

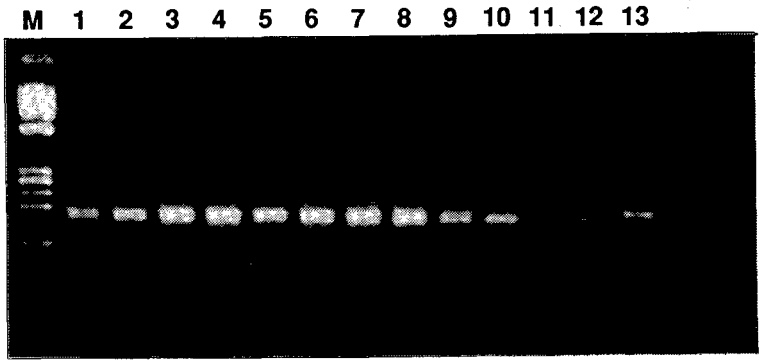


図１、プライマーHS-4およびHA-3によるチロシン水酸化酵素type 1, type 2の多型性の検出
1、ヒト黒質；２、ヒト副腎；３、ニホンザル副腎；４、ニホンザル黒質；５、ニホンザル青斑核；６、カニクイザル橋延髄；７、カニクイザル黒質；８、マーモセット副腎；９、マーモセット中脳；１０、ラット全脳；１１、ニホンザル肝臓；１２、type 1 cDNA；１３、type 2 cDNA

［結果および考察］

チロシン水酸化酵素のtype 1, type 2は、HS-4とHA-3のプライマー対により検出した。図１に示したように、ヒトおよびサルではtype 1とtype 2に相当すると考えられる２本のバンドが検出されたが、ラットでは、１本のバンドのみが検出された。また、type 3, type 4の検出はHS-4とHA-2あるいはHA-4により行った。ヒトの副腎、さらに脳(黒質)でもtype 1, type 2ばかりでなくtype 3, type 4も検出された。しかし、サルの組織においては、type 3, type 4は検出されなかった。

これらの結果より正常細胞や腫瘍細胞に関わらずヒトではチロシン水酸化酵素の４種すべてが組織で発現していることが明かとなった。また、サルの組織においては、type 1, type 2は検出されたがtype 3, type 4は検出されなかった。これはヒトが進化の過程で、まず２種の多型を獲得した後にさらに４種の多型を獲得していったことを示唆しているものと考えられる。

［文献］

(1) Grima, B., Lamouroux, A., Boni, C., Julien, J.-F., Javoy-Agid, F., & Mallet, J. (1987) Nature, 326, 707-711.
(2) Kaneda, N., Kobayashi, K., Ichinose, H., Kishi, F., Nakazawa, A., Kurosawa, Y., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., 146, 971-975.
(3) Kobayashi, K., Kaneda, N., Ichinose, H., Kishi, F., Nakazawa, A., Kurosawa, Y., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1987) Nucleic Acids Res., 15, 6733.
(4) Kobayashi, K., Kaneda, N., Ichinose, H., Kishi, F., Nakazawa, A., Kurosawa, Y., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1988) J. Biochem., 103, 907-912.
(5) Kobayashi, K., Kiuchi, K., Ishii, A., Kaneda, N., Kurosawa, Y., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1988) FEBS Letters, 238, 431-434.

48 ラット小脳の形成過程で発現調節されるタンパク質因子の解析：V-2タンパク質のcDNAクローニングと分布

松岡邦枝、田岡万悟*、奥山典生、篠田友孝、山国　徹*、宋　時栄*、磯辺俊明
（都立大・理・化、三菱化成生命研*）

〔要約〕

V-2タンパク質は、ラット小脳の形態形成の初期過程で一過的にその発現が増大する“Developmentally-regulated” タンパク質の一つである。ラット小脳から分離精製した V-2は、分子量約30kDa の糖を含まない酸性タンパク質であった。精製した V-2の部分アミノ酸配列を基礎として、PCR/cDNAクローニング法でラット脳cDNAライブラリーより単離したV-2 cDNAの塩基配列を決定した。 V-2はアミノ酸残基数 247、分子量28,600のポリペプチドと推定された。 V-2は生化学的な性質が異なる二つの構造領域から構成されていた。N末端側 2/3の領域はほぼ中性で、これまでに知られていない Leuの繰り返し構造が認められた。C末端側 1/3の領域は、 HMG-1や Nucleolinなどの核内因子や、ニューロフィラメントタンパク質にみられる酸性アミノ酸のクラスター構造をもっていた。V-2 mRNAは脳の各領域に広く分布し、中でも小脳に多く発現していた。小脳の成熟過程での発現様式とその独特の構造から、 V-2タンパク質は小脳をはじめとする神経系の形成に関連する新規の分子であると推定した。

＜はじめに＞　我々は脳の神経細胞の分化や神経回路の形成過程に直接関与するタンパク質を検索することを目的として、ラット小脳タンパク質の生後変化を２次元高速液体クロマトグラフィー(2D-HPLC) システムで定量的に追跡してきた(2,4)。この方法で検出した、生後７日に小脳内での含量が最大となる V-1タンパク質はその一次構造と組織化学的な解析から、cdc10/SWI6ファミリーの一員であり、脳の発生と分化、あるいは形態形成に関わる細胞間相互作用の調節に関与していると推定されている(5,6)。本大会では、生後３日目に存在量が最大になる V-2タンパク質の、cDNAクローニングによる構造解析、及びノーザンブロット分析の結果について報告する。

＜材料と方法＞　出生後0、3、7、12、21、180日のラット小脳 100mg中の可溶性タンパク質を 2D-HPLCシステムに導入して得られたタンパク質地図を比較し、各ポリペプチドピークの加齢に伴う変化を解析した。ラット小脳抽出液から 2D-HPLC法と、逆相HPLCによる再クロマトグラフィーにより V-2タンパク質を精製した。精製した V-2の部分一次構造を決定し、得られたアミノ酸配列を元に PCR法で翻訳領域のcDNAフラグメント（199bp） を合成し、これをプローブとして、ラット脳 cDNA-λgt10ライブラリーをスクリーニングした。単離した陽性クローンのcDNAの塩基配列は dideoxy法により決定した。同様のプローブを用いて、ラット脳内の各領域（嗅球、皮質、海馬、視床、線条体、小脳、脳橋、延髄）poly(A)RNAのノーザンブロット分析を行った。

＜結果と考察＞　2D-HPLC法によって、 V-2は V-1が分離される0.1M溶出画分のタンパク質地図上に検出された（図１）。V-2は神経細胞の分化とシナプス形成が活発に行われている生後３日に存在量が一過的に最大となる相特異的なタンパク質であり、小脳の分化成熟過程への関連が注目された。

精製した V-2は、N末端がブロックされた、糖を含まない酸性タンパク質であった。ラット脳cDNAライブラリー（2×10^6クローン）より、７個の陽性クローンを単離した。全翻訳領域を含むクローンについて、塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した。そのcDNAの制限酵素地図を図２に示した。このクローンは１kbのcDNAを含み、 93bの5'非翻訳領域、741bの翻訳領域、183bの3'非翻訳領域から構成されていた。翻訳領域にコードされるアミノ酸残基は 247で、分子量28,600、等電点 3.8のポリペプチドと推定された。分泌タンパク質や膜内在性のタンパク質に特有なリーダー配列及び疎水性アミノ酸のクラスター構造は存在しなかった。また、同様の方法で分離同定した V-1タンパク質に認められた“cell-cycle motif”は存在しなかった。SWISS PROTデータベースで検索したところ V-2は独特な構造を持つ新規タンパク質であった。 V-2はアミノ酸配列の特徴から大きく二つの領域に分けられた。N末端側 2/3は、構成アミノ酸の17％を Leuが占める、Leucine-richな領域であり、一連の転写制御因子にみられるLeucine-Zipper構造(3) や酵母アデニル酸シクラーゼ細胞外ドメインの Leucine-rich repeat構造とは異なる Leuの繰り返し構造が認められた。C末端側 1/3の領域はその約70％が酸性アミノ酸から構成される酸性クラスター構造をとっていた。酸性アミノ酸のクラスターを持つタンパク質には HMG-1や Nucleolin等の核内因子や、ニューロフィラメントタンパク質、T細胞の分化誘導因子の前駆体Prothymosin αなどが知られている(1)。

V-2cDNAをプローブとしたノーザンブロット分析の結果を図３に示した。V-2 mRNAには 2.4kbと 1.4kbの２つの分子種が存在し、1.4kbのmRNAがより多く発現していた。V-2 mRNAは中枢神経系領域に広く分布していたが、中でも小脳に多く存在していた。

小脳成熟過程での相特異的な発現様式とその独特な構造から、V-2タンパク質は小脳をはじめとする神経系の形成に関与する新しい分子であると推定した。

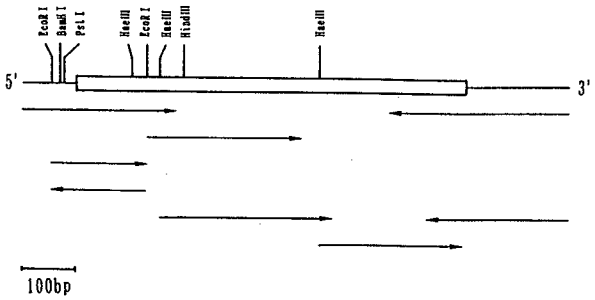


図２　V-2 cDNAの制限酵素地図

矢印は塩基配列を決定した方向と部位を、□は翻訳領域を示す

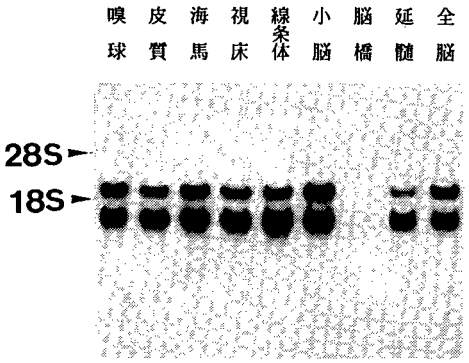


図３　脳内各組織poly(A) RNAのノーザンブロット分析

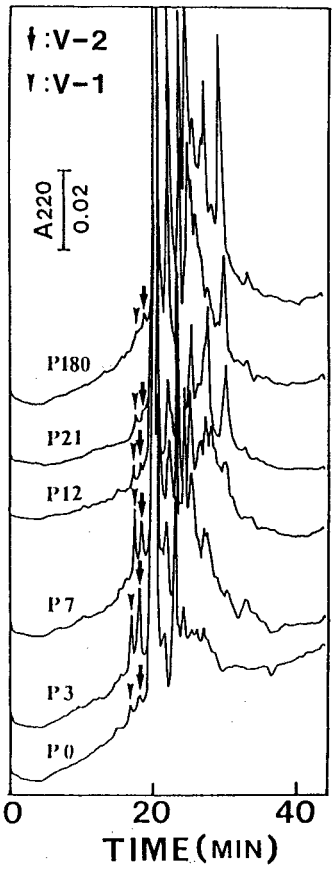


図１　ラット小脳のタンパク質地図（0.1M画分）の生後変化

図中の矢印はそれぞれV-2、V-1のピークを示す

＜文献＞

(1) Earnshaw W. C. (1987) J. Cell Biol., 105, 1479-1482

(2) Isobe T., Uchida K., Taoka M., Shinkai F., Manabe T. and Okuyama T. (1991) J. Chromatogr. 588, 115-123

(3) Landshulz W.H., Johnson P.F. and McKnight S.L. (1988) Science, 240, 1759-1764

(4) 田岡万悟、磯辺俊明、奥山典生、山国　徹 (1989) 神経化学　28, 98-99

(5) 田岡万悟、磯辺俊明、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 (1991) 神経化学 30, 510-511

(6) Taoka M, Yamakuni T, Song S.-Y., Yamakawa Y., Seta K., Okuyama T., and Isobe T (1992) Eur. J. Biochem., in press

49 眼球摘出ラット視交叉上核における c-fos 蛋白の日内変動

山岡貞夫、渡辺和人、鯉淵典之
（獨協医大・第一生理）

〔要約〕
長期間 free-running 状態におかれた動物の内因性リズムの解析を行うため、眼球を摘出したラットを用いて視交叉上核における c-fos 蛋白 (Fos) の変動を免疫組織化学的に検索した。実験には成熟雄性ラットを用い、エーテル麻酔下にて両側眼球を摘出した。手術から２カ月後に locomotor activity を指標として各ラットの概日リズムを調べた。そして活動期、又は非活動期のほぼ中央の時間でラットを屠殺し、脳凍結切片を作成し、Fos 対するポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学を行った。Fos 陽性細胞は視床下部内に広く分布していた。細胞は核のみが染色されていた。視交叉上核においては Fos 陽性細胞数に明らかな変動が見られた。それぞれのラットにおいて一切片当たりの視交叉上核内の Fos 陽性細胞数を計測したところ、非活動期には活動期の約３倍の陽性細胞数が確認された。以上の事から視神経を離断し長期間 free-running 状態におかれたラットでは、視交叉上核の Fos 免疫活性が行動の概日リズムと同期して変動していることが明らかになった。

【緒言】 ゲッ歯類においては、視交叉上核に概日リズムのペースメーカーが存在する事が知られている。この部位で発生したリズムが他の部位に伝わり、行動、ホルモン分泌等の表現形としてのリズムを形成するためには、なんらかの signal transducer の存在が示唆される。一方、現在まで、視交叉上核においていくつかの物質が概日リズムと同期して変動することが確認されている[1]。その中の一つに proto-oncogene c-fos がある。c-fos は中枢神経系に広い範囲に存在し、種々の刺激に反応して発現し、標的となる遺伝子の転写を調節していることが知られている[2]。視交叉上核において、c-fos の周期的発現が報告されているが、これは光刺激に反応して発現しているものと考えられている[3]。しかし光刺激を与える時期によっては c-fos の発現が見られない時間帯があり、c-fos の発現に内因性リズムがなんらかの関与をしていることが示唆される。本研究では、内因性リズムが視交叉上核の c-fos 発現にどの様に関与しているかを調べるため、両側の眼球を摘除したラットを用いて、視覚情報を完全に離断した状態で c-fos 蛋白 (Fos) の日内変動を検索した。

【方法】 実験は３か月齢の雄性 Wistar ラットを用いて行った。まず、エーテル麻酔下にて視神経を離断し、両側眼球を摘出した。手術から２カ月後に Automex や Infrared Sensor を用いてそれぞれのラットの locomotor activity を５日間連続して測定した。この間、ストレスによる Fos 発現を避けるため、ラットには一切手を触れず、ケージも全く同じ場所に固定しておいた。測定した locomotor activity より chronogram を作成し、power spectrum を計算し、各ラットの行動の概日周期を算出した。circadian time (CT) は活動期の開始点を 12.00 と定めた。これに基づき８匹のラットは活動期の中央の時間、９匹のラットは非活動期の中央の時間にネンブタール麻酔下にて４％ホルマリンを用いて灌流固定した。麻酔の際もストレスによる Fos 活性変化の影響を避けるため、麻酔薬注射後５分以内に麻酔のかからなかったラットは実験から除外した。固定後脳を取りだし厚さ 30 μm の凍結切片を作成した。その後、Oncogene Science 社から購入した Fos に対するポリクローナル抗体を用いて、Koibuchi 等の方法[4]により免疫組織化学を行った。その後、各ラットごとに一切片の視交叉上核当りに含まれる Fos 陽性細胞数を計測した。又、対照として、同一切片上に含まれる視索上核における Fos 陽性細胞数を計測した。

【結果】 locomotor activity を調べた chronogram の一例を図１に示した。locomotor activity を計測した結果、本実験で用いた全ラットの行動リズムは周期 24.26±0.12 時間、頂点位相 -308.87±6.09° の free-running 状態を示していた。ラット屠殺の CT は活動期 18.17±0.79、非活動期 5.84±0.73 であった。Fos 陽性細胞は視床下部内に広範囲にわたって分布していた。視交叉上核周囲では、視床下部前核、外側核、室傍核、視索上核等に陽性細胞が観察された。細胞は、核のみが染色されており、細胞質には免疫活性はなかった。図２で示したように、視交叉上核における Fos 免疫活性を活動期と非活動期で比較してみると、明らかに異なっていることが分かった。すなわち、非活動期に多く、活動期に少なくなっていた。細胞数計測の結果を表１に示した。視交叉上核においては、非活動期は活動期に比べ、約３倍の Fos 陽性細胞数を示した。一方、視索上核においては、そのような違いは見られなかった。

【考察】 本実験では眼球を摘出した成熟オスラットにおいて、視交叉上核の Fos 免疫活性が行動の概日リズムと同期して変化していることが明らかになった。このことから、このラットでは、視交叉上核において、Fos は内因性ペースメーカーの変動と共に動いている可能性が示唆された。ラットが 24 時間の明暗周期のもとで飼育された場合、視交叉上核の Fos 免疫活性は明期に高く暗期に低いことが報告されている[3]。ラットは

暗期が活動期に当るため、行動のリズムと Fos 免疫活性との相関という点では今までの結果と同様である。しかし、現在まで、この Fos 活性の変化は光刺激と同期していると考えられてきた。そして短期間の恒暗条件や恒明条件下で飼育されたラットでは Fos 免疫活性に変化はない、とされてきた。しかし、恒暗状件下で飼育されているラットにおいても、光刺激を与える時間によって Fos 活性の上昇が見られない時間帯があり、内因性リズムが Fos の発現になんらかの影響を与えていることが示唆されている。内因性リズムとある物質の活性変化との相関を調べる場合には、視覚の情報を遮断した状態で、長期間 free-running 状態におかれた動物を用いて実験を進める必要がある。本研究では、ラットの眼球を摘出した上で、2カ月間の free-run 状態の後、Fos 変化の検出を行った。そして Fos 発現と内因性リズムとが相関していることを確認した。このことは、視交叉上核において、Fos は内因性ペースメーカーからの signal を transduce している可能性を示している。おそらく、現在知られている光刺激による Fos の発現も、内因性ペースメーカーが、先ず entrain され、この変化を Fos が signal transducer として伝達しているのではないかと考えられる。

【謝辞】 本研究の一部は 1992 年度文部省科学研究費 (04670099) によって行われた。

【文献】

1. 本間研一、他. 1989. 生体リズムの研究. 北海道大学図書刊行会.
2. J. I. Morgan & T. Curran. 1989. Trends in Neuroscience 12:459-462.
3. D. J. Earnest et al. 1990. Exp. Neurol. 109:353-361.
4. N. Koibuchi et al. 1991. Endocrinology 129:3208-3216.

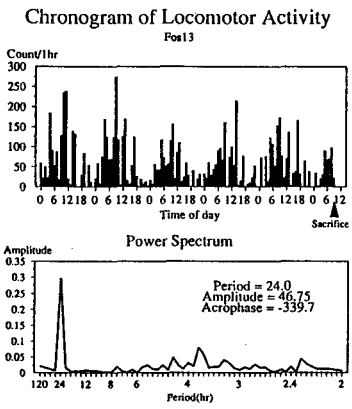


図1 活動の概日リズムを示す chronogram 及び power spectrumの一例。

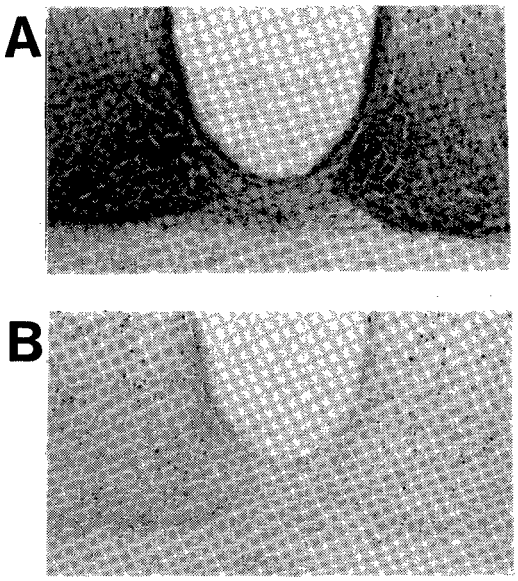


図2 視交叉上核の Fos 免疫活性。A: 非活動期、B: 活動期。scale bar=100 μm。

表1 視交叉上核 Fos 陽性細胞数の日内変動

時期	動物数	circadian time	視交叉上核(細胞/切片)	視索上核(細胞/切片)
活動期	8	18.17±0.79	56.53±13.57	45.79±4.02
非活動期	9	5.84±0.73	157.38±23.02*	45.67±7.20

時期はラットを屠殺した時の locomotor activity を示す。circadian time は活動期の開始点を 12.0 と定めた。有意差の検定には Student の t 検定を用いた。*: P<0.01 vs 活動期。

50 ヒト 2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase 遺伝子の構造と染色体局在

桃生勝己[1], 栗原　正[2], 高橋康夫[3,4], 市川富夫[3], 熊西敏郎[3], 林　茂信[4], 蓑島伸生[5], 清水信義[5]
([1]秋田大・医, [2]創価大・生命研, [3]新潟大・脳研, [4]国立犀潟病院, [5]慶応大・医)

〔要約〕

ヒト 2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNP) 遺伝子の構造と染色体局在を明らかにした．ヒトCNP 遺伝子は長さおよそ 8.5 kbp，マウスと同様に 3 個のイントロンで分断された 4 個のエクソン（エクソン 0, 1, 2, 3）から成る．遺伝子 DNA から調製したエクソン 0 プローブとエクソン 1 の 5' 端プローブの両者が，見かけ上単一に見えるノーザンブロット上の mRNA バンドに反応し，マウスで見いだされたのと同じ二者択一スプライシングで 2 種の mRNA が生じていることが示唆された．5'フランキング領域にはオリゴデンドログリア特異的と見られる配列が見いだされた．セルソーターで分画したヒト染色体のスポットブロットのハイブリダイゼイションにより，ヒト CNP 遺伝子は染色体 17 番にあることが判明した．

非常に高い 2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNP) 活性が脳および脊髄に存在し，脳の CNP タンパクと CNP mRNA はオリゴデンドログリア細胞に特異的に発現していることが示されている（文献 1, 2, 3）．CNP mRNAの発現はミエリン形成時にピークに達し，その後次第に減少していく（文献 4）．CNP タンパクは 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およびダブレット生成の機構は不明であった．我々は，マウス CNP 遺伝子をクローニングしてその構造を明らかにするとともに，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（文献 5, 6）．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，マウスやラットでは二者択一スプライシングに対応して mRNA バンドが 2 本検出されるのに対し，ヒトやウシでは mRNA バンドが単一に見えるなど，なおはっきりしない点が残っている．今回我々は，ヒトCNP 遺伝子の構造と染色体局在を明らかにしたのでここに報告する．

＜実験方法＞

Clontech Laboratories から購入した EMBL-3 ヒト遺伝子ライブラリーをヒト CNP の cDNA 断片 300 bp および 1500 bp（文献 7）でスクリーニングした．このスクリーニングで得た 4 個のオーバーラップした独立クローン（インサートの大きさはいずれも 15 kbp 前後）から CNP 遺伝子全域をカバーする 4 個の断片をサブクローニングした．染色体局在は，セルソーターで分画したヒト染色体のスポットブロットのハイブリダイゼイションで決定した（文献 8, 9）．プローブはヒト CNP cDNA の 3'非翻訳領域を用いた．

＜実験結果および考察＞

ヒト CNP 遺伝子は長さおよそ 8.5 kbp，マウスと同様に（文献 5, 6）3 個のイントロンで分断された 4 個のエクソン（エクソン 0, 1, 2, 3）から成ることが明らかになった．図 1 にヒト CNP 遺伝子の 5' 端領域の構造を示す．遺伝子 DNA から調製したエクソン 0 プローブとエクソン 1 の 5' 端プローブ（エクソン 1a プローブ，図 1 参照）の両者が，見かけ上単一に見えるノーザンブロット上の mRNA バンドに反応した．両プローブが反応した位置は互いにわずかにずれているように見えた．ヒトにおいても，マウスで見いだされたのと同じ二者択一スプライシングで，図 1 に示すように 2 種の mRNA が生じていることが示唆された．ヒトやウシの CNP mRNA はマウスやラットの CNP mRNA よりかなり大きく，そのために 2 種の mRNA がゲル上で分離しにくいのであろう．最近我々は，二者択一スプライシングから予想される大きいほうのポリペプチドに特異的な抗体を合成ペプチドに対する抗体として作製し，SDS-PAGE ゲル上の CNP ダブレットを免疫ブロット法で検索した（文献 10, 11）．その結果は，哺乳類共通の CNP ダブレットがマウスで見いだされたのと同じ二者択一スプライシングで生じることを示唆した．ヒト CNP 遺伝子の 5'フランキング領域については，現在までに TATGTAA（図 1）の上流約 600 bp までの塩基配列を決定し，オリゴデンドログリア特異的と見られる配列を見いだしている．

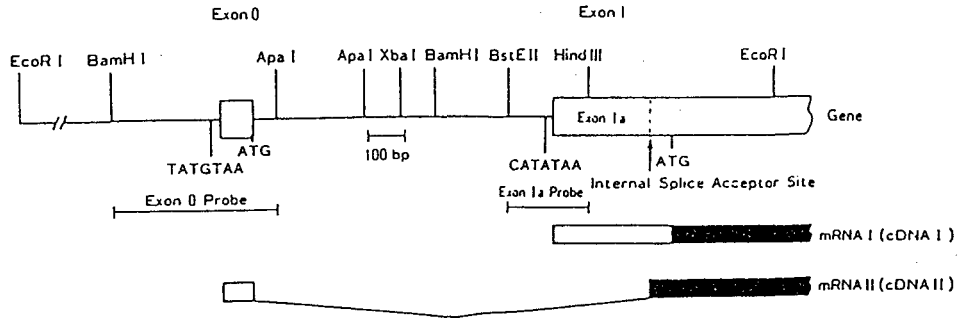


図1　ヒトCNP遺伝子の5'端領域．遺伝子上のボックスはエクソン部分を示す．mRNAの黒塗り部分は翻訳領域を示す．エクソン1の内部スプライスアクセプターサイト（矢印）より5'側をエクソン1aと呼ぶことにする．遺伝子DNAの *Bam* HI-*Apa* I 断片，*Bst* EII-*Hin* dIII 断片をそれぞれエクソン0およびエクソン1aの配列を検出するためのプローブとしてノーザンハイブリダイゼイションに用いた．転写開始点（エクソン0およびエクソン1の5'端）はプライマー伸長で推定した．

2つの異なった条件下で分画したヒト染色体のスポットブロットをヒトCNP cDNAでハイブリダイズさせると，染色体16, 17番を含む"画分I"と染色体Y, 17番を含む"画分L"が反応し，ヒトCNP遺伝子は染色体17番にあることが判明した（図2）．最近，Glial Fibrillary Acidic Protein（GFAP）遺伝子がヒト染色体17番にあることが報告された（文献12, 13）．マウスではおそらく染色体11番の近接した位置にCNP遺伝子とGFAP遺伝子があり（文献14），この位置関係がヒト17番染色体でも保存されている可能性が強い．

＜文献＞

1. Y. Nishizawa et al. (1985) Neurochem. Res. 10, 1107-1118
2. B.D. Trapp et al. (1988) J. Neurochem. 51, 859-868
3. T. Kurihara et al. (1992) Adv. Second Messengers Phosphoprotein Res. 25, 101-110
4. T. Kurihara et al. (1989) Mol. Brain Res. 5, 247-250
5. K. Monoh et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 165, 1213-1220
6. T. Kurihara et al. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 1074-1081
7. T. Kurihara et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 152, 837-842
8. K. Sakai et al. (1989) Genomics 5, 309-315
9. S. Minoshima et al. (1990) Cytometry 11, 539-546
10. 栗原ら (1991) 神経化学 30, 354-355
11. T. Kurihara et al. (1992) Neurosci. Lett. 138, 49-52
12. E. Bongcam-Rudloff et al. (1991) Cancer Res. 51, 1553-1560
13. T. Kumanishi et al. (1992) Acta Neuropathol. 83, 569-578
14. L. Bernier et al. (1988) J. Neurosci. Res. 22, 497-504

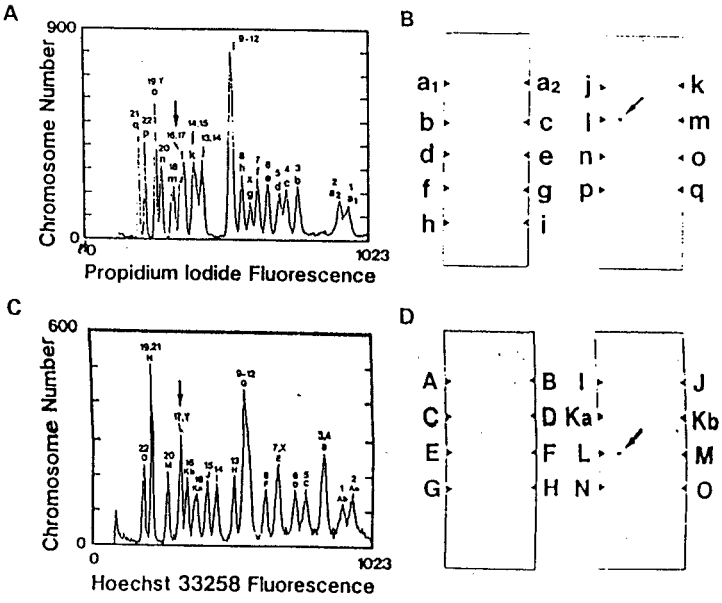


図2　セルソーターによるヒト染色体の分画（A, C）と分画したヒト染色体のスポットブロットハイブリダイゼイション（B, D）．矢印は陽性シグナルを示す．

51 視床下部と胎盤性成長ホルモン分泌促進因子遺伝子の5'上流領域の塩基配列決定 -RAGE法を用いて-

溝渕睦彦、 L. A. Frohman*
(愛媛大学医学部神経精神医学教室、 *シンシナティ大学内分泌教室)

〔要約〕
成長ホルモン分泌促進因子(GRH)は、マウスの視床下部と胎盤に多量に存在する。その遺伝子は5個のエクソンから構成され、視床下部と胎盤では、第1エクソンのみ異なっている。今回われわれは、それぞれの第1エクソンの位置と遺伝子制御部分である5'上流領域の構造解析を行なった。視床下部性GRH第1エクソンの位置は、第2エクソンから3.8 kb上流に存在し、胎盤性GRH第1エクソンは視床下部の第1エクソンよりさらに12-8 kb上流にあった。RAGE (Rapid Amplification of Genomic DNA Ends) 法を用いてそれぞれの遺伝子制御領域を比較した結果、 胎盤ではTATAやCAATボックスは存在せず、両部位には類似性は認められなかった。

[はじめに]
GRHは、視床下部に局在し下垂体前葉の成長ホルモンの合成、分泌を促進させるペプチドである。 多くの視床下部性ペプチドは、視床下部以外の組織にも存在し、GRHは胎盤に多量含まれている[1]。 ヒト、ラットとマウスの視床下部GRHの cDNAや genomic DNAは、5つのエクソンから成り全体で約10 kb の単一コピー遺伝子である[2-4]。われわれは、胎盤のGRH cDNAが第1エクソンのみ視床下部と異なる事を明かにした[5]。 今回、視床下部と胎盤の第1エクソンの位置と遺伝子制御部分である5'上流領域の構造解析をPCRを用いて行なった。

[方法]
動物は25週齢C57BL/6Jマウスを用い、視床下部と胎盤からのtotal RNAはChomczynskiらの方法[6]で抽出した。cDNAはこれらのRNAから逆転写酵素を用いて得た。 エクソン特異的プローブは、それぞれのcDNAからPCRを用いて作成した。 C57BL/6Jマウス genomic DNAを18種類の制限酵素で切断後、サザンブロットを行なった。サザンブロットやプローブラベリング法は既報の方法[7]を用いた。 RAGE法に関しては、genomic DNAとPlasmid DNA(Bluescript KS)をそれぞれ同一一種類の制限酵素で切断後、ligationしたものをPCRの鋳型とした(図2)。PCR増幅は、一回目、二回目とも30サイクル行ない、二回目は一回目の増幅産物の0.1%を鋳型として用いた。 増幅した二本鎖DNAは、ゲル精製後、一方のプライマーのみでasymmeric PCRを行ないdirect sequencing し配列決定した。

[結果と考察]
視床下部と胎盤の第一エクソンの相対的な位置を調べるために、18種類の制限酵素でgenomic DNAを切断後サザンブロットを行なった。 視床下部第一エクソン、胎盤第一エクソンと共通の第二エクソンの三種類のプローブで検出した。BglIIとSphIの結果から、 視床下部第一エクソンが第二エクソンの近傍に存在する。この事を確かめるために、 視床下部第一エクソンと第二エクソンの間をPCRで増幅しサザンブロットを行なった。 視床下部第一エクソンプローブと第二エクソンプローブは、3.9 kbのバンドとハイブリッドしたが、胎盤第一エクソンプローブとはハイブリッドしなかった。そこで、表1のBamHI(12 kb)とKpnI(12-3.9=8.1 kb)の結果もあわせると図1の配列となる。次に、RAGE法（図2）に従ってそれぞれの第一エクソンの上流部を増幅し、サザンブロットしたものが図3である。視床下部(872 nt)と胎盤(846 nt)の5'上流の塩基配列を決め、 胎盤ではTATAやCAATボックスは存在せず、両部位には類似性は認められなかった。

[文献]
1. Baird, A., Wehrenberg, W. B. et al. (1985) Endocrinology 117, 1598-1601
2. Mayo, K. E., Vale, W. et al. (1983) Nature 306, 86-88
3. Mayo, K. E., Cerelli, G. M. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 63-67
4. Frohman, M. A., Downs, T. R. et al. (1989) Mol. Endocrinol. 3, 1529-1536
5. Mizobuchi, M., Frohman, M. A. et al. (1991) Mol. Endocrinol. 5, 476-484
6. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159
7. Mizobuchi, M. and Frohman, L. A. (1992) Biotechniques 12, 350-353

Probe	Placental First Exon kb	Hypothalamic First Exon kb	Second Exon kb
Restriction Enzyme			
*Bgl*II	5.6	8.5	8.5
*Sst*I	~20.0	3.0	6.0
*Eco*RI	15.0	6.5	~23.0
*Eco*RV	~20.0	7.0	~26.0
*Sph*I	8.1	8.8	8.8
*Bam*HI	12.0	12.0	5.5
*Hpa*I	~20.0	~20.0	6.8
*Kpn*I	5.8	12.0	2.5

表1. サザンブロットの結果の一部

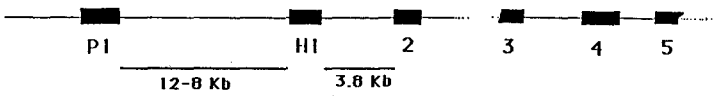


図1. マウスGRHのエクソンの位置と距離
P1, H1はそれぞれ胎盤、視床下部の第一エクソンを表している
kb; kilobase

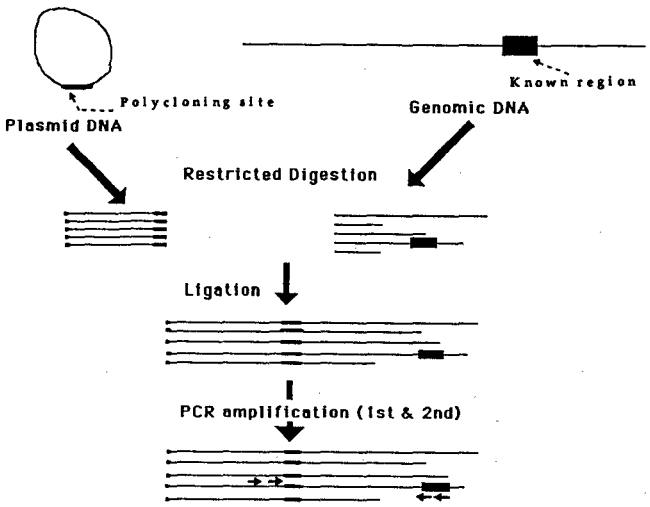


図2. RAGE法の説明図

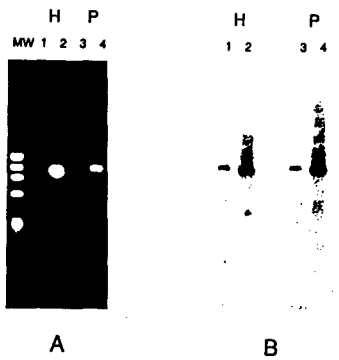


図3. RAGE法を用いて増幅された5'上流領域
Ethidium Bromide染色(A)とサザンブロット(B)
H; hypothalamus, P; placenta
1st amplification (lane1&3)と2nd amplification (2&4)

52 Nested RACE法によるラット睾丸 Isoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferase cDNAの配列決定

溝渕睦彦、 村尾孝児*、 武田良平、 柿本泰男
(愛媛大学医学部神経精神医学教室、*香川医大第一内科)

〔要約〕

ラット脳 Isoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferase cDNA 配列をもとに、PCR (Polymerase Chain Reaction)を用いDNAプローブを作成し、ノーザンブロットを行なった。長さの異なる4種類のRNA (1.1, 1.7, 2.5と4.0 kb) が検出され、脳では2.5 kb、睾丸では1.1 kbが主な転写産物であった。1.1 kbに相当するcDNA配列を、睾丸のmRNAからNested RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)法で配列決定した。推定される睾丸の蛋白は、脳のN末端31個のアミノ酸を欠いていると考えられる。

[はじめに]

蛋白のカルボキシメチル化酵素は、1) グルタミン酸残基のγ-カルボキシル基のメチル化、 2) L-イソアスパラギン酸、アスパラギン酸残基のβ-カルボキシル基のメチル化、 3) C末端システインのメチル化の3種類に分類される[1]。2) のメチル化酵素(PIMT)は、広く哺乳動物に存在し、組織別には脳、睾丸と赤血球に分布している。このPIMTは、ウシ脳[2]とヒト赤血球[3,4]から単離精製され、アミノ酸配列が決められているが、cDNAは脳でのみ報告されている[5,6]。今回われわれは、このcDNAをもとにPCRをもちいてプローブを作成し、ノーザンブロットを行なうとともに、睾丸での主な転写産物である1.1 kbに相当するcDNAの構造を新たに決定した。

[方法]

動物は25週齢Wistar系ラットを用い、各組織からのtotal RNAはChomczynskiらの方法[7]で抽出後、一部polyA RNAを調製した。cDNAはこれらのRNAから逆転写酵素を用いて得た。プローブに用いたcDNA部位(124 bp)は、報告されている配列[5]をもとに、核酸や低分子のメチル化酵素と共通なドメイン部分[2]を避けて選んだ。ノーザンブロットやプローブラベリング法は既報の方法[8]を用いた。既知の配列をもとに未知の5', 3'末端の増幅は、PCRによりNested RACE 法[9,10]にしたがった。増幅した二本鎖DNAは、ゲル精製後、一方のプライマーのみでasymmeric PCRを行ないdirect sequencing し配列決定した。

[結果と考察]

既報のcDNA配列[5]をもとに、脳、肝臓と睾丸のcDNA からPCRで124 bp DNA断片を増幅し、脳と睾丸から124 bp断片が単一に得られた。このDNAをプローブに用いて、脳、肝臓と睾丸をノーザンブロットした結果が図1である。脳と睾丸ではTotal RNA, polyA RNAともに4.0, 2.5, 1.7と1.1 kbの4種類のmRNAが存在し、肝臓では検出されなかった。脳は2.5 kb, 睾丸では1.1 kbが、主な転写産物であった。 脳と睾丸から増幅した124 bp断片が、報告されている配列[5]と同一であることを確認した後、プライマーを合成し未知の部分を増幅解析した。3'末端のDNAは、睾丸のpolyA RNAから(dT)17 プライマーで逆転写し、Nestedプライマーと既知の部分のプライマーで二度PCR増幅して得た。5'末端は、既知の部分のプライマーで逆転写し、terminal deoxynucleotidyl transferaseを用いて末端にpolyAを付加した。その他の増幅は、3'末端で用いた方法と同じである。得られたDNAの5'末端とcDNAの全配列は、図2-a)と図3に示している。この新しく決定した睾丸のcDNAは、報告されている脳のcDNAの5'末端が94 nt、3'末端が594 nt 短いものであった。そこで、脳に存在し睾丸にないcDNA部分を、脳のmRNAからPCRで増幅し、プローブを作成しノーザンブロットを行なった。図2-b)は、脳と睾丸に共通な部分のプローブと脳の5'末端に特異的なプローブで、睾丸のRNAをそれぞれノーザンブロットした結果である。睾丸の主な転写産物である1.1 kbのmRNAは、脳の5'末端部分を持っていない。以上の結果から、睾丸のPIMT蛋白は、脳のN末端の31個のアミノ酸を欠いた酵素蛋白であることが類推された。

[文献]

1. Barten, D. M. and O'Dea, R. F. (1990) Life Sience 47, 181-194
2. Henzel, W. J., Stults, J. T. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 15905-15911
3. Ingrosso, D., Fowler, A. V. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 20131-20139

4. Ingrosso, D., Kagan, R. M. et al (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 175, 351-358
5. Sato, M., Yoshida, T. et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 342-347
6. MacLaren, D. C., Kagan, R. M. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 185, 277-283
7. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159
8. Mizobuchi, M. and Frohman, L. A. (1992) Biotechniques 12, 350-353
9. Frohman, M. A. and Martin, G. R. (1989) Technique 1, 165-170
10. Mizobuchi, M., Frohman, M. A. et al. (1991) Mol. Endocrinol. 5, 476-484

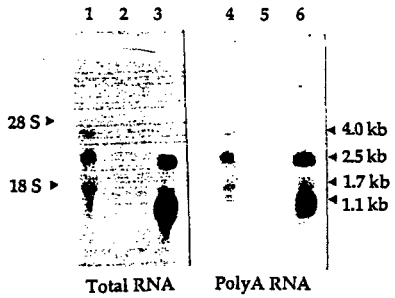


図1．脳 (lane 1, 4)、肝臓 (2, 5)と睾丸 (3, 6) の
ノーザンブロット分析
Total RNA (10 μg) とpolyA RNA (5 μg)を用いた。

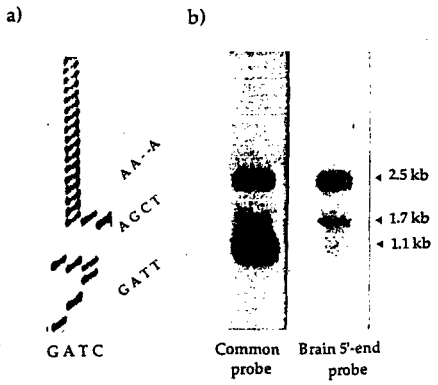


図2．Nested RACE法を用いて決めた睾丸PIMT cDNAの
5'-末端部塩基配列 (a)、共通部分と脳5'-末端部の
プローブを用いての睾丸mRNAのノーザンブロット(b)

```
agctaatcca caacctcogc aagaatggaa tcatcaagac agataaagta tttgaggtgA  60
TGCTGGCTAC AGACOGCTCC CACTATGCAA AATCTAACCC TTACATGGAT TCTCCCACAGT 120
CAATAGGTTT CCAGGCAACA ATCAGCGCTC CTCACATGCA TGCATATGCA CTAGAGCTCC 180
TGTTTGACCA GCTGCACGAA GGCGCTAAAG CCCCTGACGT AGGGTCTGGA AGTGGAATCC 240
TCACCGCGTG TTTTGCACGG ATGGTTGGAC ACAGTGGGAA AGTCATTGGA ATTGATCACA 300
TTAAAGAACT AGTGGACGAC TCAATTAACTA ATGTCAAAAA GGATGACCCC ATGCTCCTGT 360
CCTCTGGGCG AGTACGGCTG GTTGTGGGCG ATGGAAGAAT GGGGTTTGCT GAAGAAGCCC 420
CTTACGATGC CATTCACGTC GGAGCTGCAG CCCCAGTTGT GCCCCAGGCA TTAATAGACC 480
AGTTAAAGCC TGGTGGAAGA TTGATATTGC CAGTCGGTCC TGCAGGAGGA AACCAAATGT 540
TGGAGCAGTA TGACAAGCTA CAAGATGGCA GTGTCAAAAT GAAGCCTCTG ATGGGGGTGA 600
TATACGTGCC TTTAACAGAT AAAGAAAAGC AGTGGTCCAG GTGGAAGtga ttttctcttc 660
tgctctttct tcctccacac attcaaggga cgagctgtga gagcaacctg tagcttggcc 720
gtctgtaaca ctgcagtgga ttgctcatct cggtcctcaa agcattgaga gccaacagca 780
tcaccgcttg ttttggactt tgttacactc ttattttcag catgaaaatg tgtggttttt 840
gtagggtttc ctaattcaaa acggtgcaga gccagactga tagaggaggg ctggagagtg 900
ttaactttgt gttgtttaac atgcccacat ttcactttac aaatattaaa agaaagggtt 960
ctctaacogg
```

図3．睾丸の1.1 kb 転写産物に相当するcDNAの全塩基配列
ボックスはそれぞれinitiation codon と termination codon、下線部はpolyA signalを示す。

53 ヒト脳 Dipeptidyl aminopeptidase like protein の cDNA クローニングと1アミノ酸置換による酵素活性の回復

横谷 昇[1,2]、Robert J. Wenthold[2]、和田 圭司[2,3]
(大阪市大神経精神科[1]、NIDCD, NIH[2]、国立精神神経センター神経研究所疾病研究第四部[3])

〔要約〕

ウシ脳 Dipeptidyl aminopeptidase like protein (BDPPX)の cDNA クローンをプローブとしてヒト脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、Dipeptidyl aminopeptidase like protein(HDPPX)の cDNA クローンを得た。HDPPX cDNA クローンは３５８０塩基対からなり、８０３アミノ酸をコードしていた。アミノ酸配列をラット肝 Dipeptidyl aminopeptidase IV型(RDPPIV)と比較すると５３％のアミノ酸配列相同性を示し、ドットプロット解析で有意な直線を描いた。しかし、HDPPX では RDPPIVの活性中心であるセリンがアスパラギン酸に変わっていた。HDPPX を発現ベクターに挿入しトランスフェクション法により COS-7 細胞で発現させたところ DPPIV 活性はめられなかったが、アスパラギン酸をセリンに置換させたところ DPPIV 活性が認められた。組織特異性について、PCR を用いて調べたところ HDPPX はほぼ脳特異的に発現していた。又、染色体マップの結果より遺伝子は第７染色体上にあることが分かった。

[緒言]

生体内には種々のペプチデースが存在し、生理的活性のあるペプチドの活性化および代謝等をおこなっている。しかし、中にはペプチドの切断をおこなうのみならず、他の生理機能を持つものもあると考えられている。たとえば Aminopeptidase N がコロナウイルスのレセプター[1,2]として働いているとか、Dipeptidyl aminopeptidase IV(DPPIV)がT cell の分化誘導に関与している[3]とかいう報告がある。Wada ら[4]はウシ脳よりタンパクを精製し、cDNA クローンを得て解析したところ、ラット肝 DPPIV[5]と高い相同性を有することが分かり、これを Dipeptidyl aminopeptidase like protein (DPPX)と命名した。今回我々はヒト脳 DPPX の cDNA クローニングをおこない、さらにその酵素活性、組織特異性、遺伝子座について解析したので報告する。

[方法]

ヒト脳 cDNA ライブラリー（Stratagene, CA）から、ウシ DPPX cDNA クローンをプローブとして、プラークハイブリダイゼーション法でスクリーニングし、cDNA クローンを得て、単離後、塩基配列を決定した。つぎに、cDNA クローンの翻訳領域を真核細胞発現ベクター pcDNAI （Invitrogen, CA）に挿入したプラスミドを作製し、COS-7 細胞にトランスフェクション後、膜分画を調整して DPPIV の合成基質(Gly-Pro-p-nitroanilide)と反応させた。ついで、６５０番目のアスパラギン酸をセリンに置換したプラスミドを作製し同様に酵素活性を調べた。又、この cDNA クローンに特異的なプライマーを作製し、ヒトの各種臓器 mRNAより調整した cDNAを鋳型として PCR をおこない、さらに cDNA クローンをプローブに用いてサザンブロットハイブリダイゼーションをおこなった。同様に３' 非翻訳領域に特異的なプライマーを用いて、マウスXハムスターハイブリッド細胞群（BIOS Corp., CT）の DNA を鋳型として PCR で染色体マップをおこなった。

[結果と考案]

得たヒト脳 DPPX cDNA クローンは、３５８０塩基対よりなり、８０３アミノ酸をコードしていた。アミノ酸配列をラット肝 DPPIV と比較すると５３％のアミノ酸配列相同性を示

した。又、ドットプロット解析をラット肝 DPPIV との間でおこなうと、有意に長い直線を描いた（図１）。これらの事より DPPX と DPPIV は同一遺伝子であったものが進化の過程で分化したと考えられる。しかし、両方のアミノ酸配列を整合して並べたところ DPPIV の活性中心であるセリン[8]に対応するアミノ酸がアスパラギン酸（６５０番目）に変わっていた。DPPX をトランスフェクション法により COS-7 細胞で発現させたところ DPPIV 活性は認められなかったが、６５０番目のアスパラギン酸をセリンに変異させたところDPPIV 活性が認められた（表１）。又、組織特異性については、ほぼ脳のみで発現が認められた。染色体マップの結果、DPPX 遺伝子は第７染色体上にある事が分かった。DPPX の生理的な機能については何もわからないが脳特異的である事や、膜結合型 peptidase のなかに多機能を持つタンパクがある事より、本来多機能タンパクとして働いていたものが一アミノ酸が変わるこてで peptidase の活性を失い他の機能のみ残っているのではないかと考えられる。

[文献]

1. Delmas, B.et.,al. Nature 357, 417-420 (1992)
2. Yeager, C.L.,et.al. Nature 357, 420-422 (1992)
3. Hegen, M.,et.al. J.Immunol. 144, 2908-2914 (1990)
4. Wada, K.,et.al. Proc. Natl.Acad.Sci.USA 89,197-201 (1992)
5. Ogata, S.,et.al. J.Biol.Chem. 264, 3596-3601 (1989)
6. Ogata. S.,et.al. Biochemistry 31, 2582-2587 (1992)

図１　ドットプロット解析

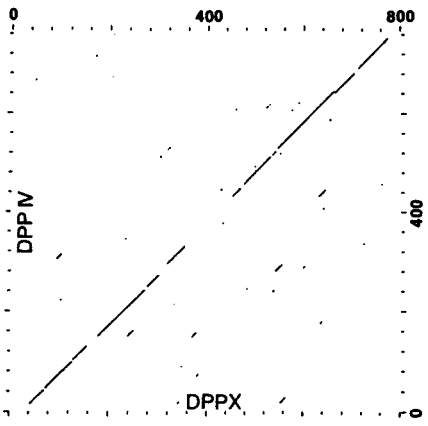


表１　DPPIV の酵素活性測定

	nmol product/min/mg protein
DPPX(Lys^{650}→Trp) (Asp^{650}→Ser)	13.426±1.250
DPPX(Lys^{650}→Trp)	9.534±1.263
DPPX	6.181±1.423
without cDNA	6.446±1.558

54 神経切断手術後短時間以内で一過性に変動する白鼠上頸交感神経節内トランスグルタミナーゼ活性の調節因子

安藤正人・國井修一・立岑廷族・柴山健三・永田　豊　（藤田保健衛生大・医・生理）

[要約]白鼠上頸交感神経節(SCG)の節前神経切断(denervation)手術1週間後の神経節内transglutaminase (TG)活性値は非手術SCGの約80%に保たれていたが、節後神経を切断したaxotomized SCG内 TG活性値は1/8以下に低下したことから、TG活性の発現部位は節後交感性ニューロン内に限局していることが明かとなっている(1)。 今回は、denervationおよびaxotomy手術後の短時間(24時間) 以内でSCG内TG活性がどのように変動するのか測定した。また、神経切断手術後の短時間以内で摘出した SCG標本を生理溶液中で細胞の分化や増殖を誘発する種々の薬剤と共にさらにインキュベートした後、節内のTG活性を測定して、手術刺激に依存して短時間で変動するSCG内 TG活性発現の調節因子を考察した。①Denervated SCG内 TG活性は、術後30分から24時間以上に亘って、非手術SCG内対照値の1/4の低いレベルで留まっていた。一方、axotomy を施したSCG内TGは術後30分から有意な活性上昇が認められ、1-4時間後に最大値(1.5倍)に達する増大効果が示されたが、この一過性の上昇は24時間後には消失した。②Denervated SCG(3時間後)を摘出して生理溶液中で30分間インキュベートする時、protein kinase C(PKC)を活性化するphorbol ester (TPA;1μM)を添加しても、手術後短時間で著明に減少したSCG内 TG活性は影響を受けなかったが、PKC inhibitorのtrifluoperazine (TFP;10μg/ml)の添加によって術後SCGの対照値を上回るSCG内 TG活性の上昇効果が示された。すなわち、denervation 刺激によってシナプスを介して神経節内のPKC-Ca^{2+}情報伝達系の亢進状態が引き起こされた結果、逆にTG活性の抑制状態が生じた可能性が推定された。 ③術後3時間目に摘出したaxotomized SCGを交感性ニューロンの生存や分化に必須な NGF(0.25μg/ml)と共にインキュベートすると、手術刺激で上昇したSCG内TG活性は有意に低下した。従って、軸索の切断によってSCGの標的器官から逆行性に速い軸索輸送で供給されているNGF が供給されないことが引き金となって、細胞変性(細胞死)プログラムが合目的に発現されて、SCG内TG活性の増大現象が示されたことが強く示唆された。

[序]既に我々は、節前神経末端と交感性節後ニューロンがシナプス結合している白鼠上頸交感神経節(SCG) の節前神経の切断(denervation)手術後1週間を経過した節内transglutaminase(TG)活性値は、非手術intact SCGの約80%に保たれていたが、節後神経を切断したaxotomized SCG内TG活性値は1/8以下に低下していたことから、細胞質内でCa^{2+}に依存して可溶性タンパク鎖の架橋反応(退行性変化)を触媒するTG活性の発現部位は節後交感性ニューロン内に限局していることを報告した(1)。一方 Giladらにより、白鼠SCGの節後神経線維を挫滅すると極めて短時間(30分)に神経節内TG活性の一過性の上昇ピークが示されることが明かにされている。この時、膜電位依存性のCa^{2+}-channelを特異的に抑制するverapamilをin vivo投与すると、この活性増大が消失することが示されている。つまり、節後線維の損傷刺激が引き金となって、節後ニューロン膜のCa^{2+}透過性が増大した結果、TGが細胞質内の至適なCa^{2+}濃度に依存して活性化されるが、verapamilで Ca^{2+}の細胞内へのinfluxを抑制すると、このTG活性化が阻止されることが推定されている(3)。また我々は、非手術SCG標本を細胞内のCa^{2+}に依存して変動するprotein kinase C (PKC)の活性調節剤(phorbol ester;TPAおよびtrifluoperazine;TFP)、あるいはシアル酸化合物(GM1-ganglioside;GM1やsialyl cholesterol;SC)などで刺激すると、30分以内に節内のTG活性が合目的に変動することを認め、PKC-Ca^{2+} 情報伝達系が TG酵素の活性発現調節と密接に関連していることを見い出している(2)。今回は、denervationおよびaxotomy手術後24時間以内でSCG内TG活性がどのような影響を受けるのかを詳細に検討した。さらに、術後短時間(3時間目) で摘出した標本を前述の細胞の分化や増殖を誘発する種々の因子、あるいは交感性ニューロンの生存と分化に必須な神経成長因子(NGF) を添加した生理溶液中でインキュベートした後、SCG内TG活性を測定して、手術刺激に依存して短時間で変動するSCG内TG活性の調節因子を追求・考察した。

[実験材料および方法]Wistar系成熟白鼠を麻酔下で、無菌的に一側のSCG の節前線維を denervationし、反対側SCGの節後線維をaxotomyした(5)。術後30分から24時間迄の間に摘出したSCG内TG活性、ならびに種々の条件下でさらにインキュベート(2)した術後神経節内TG活性は、何れもLorandらの方法(4)に従って測定した。

[実験成績および考察]①神経切断手術後24時間以内のSCG内TG活性の経時変化：術後30分から24時間経過したSCGを経時的に摘出して、組織内TG活性の変動を調べた。その結果は図1 の如くで、denervated SCGでは術後の30分から4時間以上に亘って急激なTG活性の低下(非手術intact SCGの1/4値)が認められ、この効果は術後24時間迄持続して見られた。一方、axotomized SCG内 TG活性は術後30分から有意な上昇が認められ、1-4時間後には最大値(1.5倍) に達する活性増大効果が示されたが、この一過性の上昇は24時間後には消失した(図1)。 前述したように、TG活性発現部位は節後交感性ニューロン内に限局することを確認している(1) ことから、今回のように術後30分から4時間迄の極めて短時間では形態的変性像は殆ど生じていないと考えられるSCG標本で、denervation によってTG活性の著明な低下が示され、axotomyでは逆に有意なSCG内TG活性の上昇という相反効果が認められた成績は、 SCG内ニューロンの急激な生理化学的変化に起因する現象である可能性が推定される。②低下したdenervated SCG内TG活性におよぼすPKC modulatorの効果：我々は、12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate(TPA)添加によって摘出SCG内PKCが活性化される時、組織内TG活性は抑制されるが、TFP刺激でPKC活性を抑制すると逆にSCG内TG活性化の促進効果が示されることを報告した。つまり、細胞の増殖 promotorとしてのCa^{2+}-PKC情報伝達系が機能的に亢進する条件下では、細胞の退行変性の指標酵素のTGは不活化される機構が作動している可能性が示唆された(2)。一方、組織化学的検索によって、denervation直後からSCG節後ニューロン内PKC subtypeのβ型に対する免疫反応性が増大することが示されている(6)。そこで、TPA(1μM) あるいはTFP(10μg/ml)を添加した生理溶液中で、denervation 後3時間目の摘出SCGをインキュベーション(30分間)した後、組織内TG活性を測定し

た。すると、不活化されたdenervated SCG内TG活性にはTPA添加によっては無効であったが、TFP刺激によりTG活性は増大する効果が認められた(図2)。一方、神経突起の伸展を促進しタンパク合成を抑制するGM1あるいはSC内のシアル酸残基も、PKCによるintact SCG内TG活性の修飾作用を抑制する可能性が指摘されている(2)。しかし、denervated SCG内のTG活性に対してはこれらシアル酸化合物の添加は全く影響をおよぼさなかった(図2) ことから、TPAが直接PKC活性を抑制した結果生ずるTG活性抑制機序とは異なって、GM1やSCは間接的にPKCの活性を調節している可能性が考えられる。何れにしても、denervation 刺激がシナプスを介して節後神経節内のPKC-Ca^{2+}情報伝達系の亢進状態を引き起こした結果、逆にTG活性の抑制状態が短時間で生じた可能性が推測された。③上昇したaxotomized SCG内TG活性におよぼすNGFの効果: 我々は既に、axotomy処置後 2-4時間目で、交感性ニューロンの生存と分化に必須なNGF含量は、非手術SCGの 約1/3レベルに迄急速に減少することを認めている。このことは、SCGはその標的器官(瞳孔筋や顎下腺)から逆行性の速い軸索輸送系(0.167mm/min) によって、NGFの供給を受けて神経節内に蓄積していることを示している(5)。 一方、田中らは、PC 12細胞をNGF非存在下で培養した時、protooncogene の c-fos やc-jun などの発現量も30分後の培養早期から上昇することを報告している(7)。そこで、axotomized SCG(3時間目)をNGF(0.25μg/ml) と共にインキュベートして、組織内TG活性を測定したところ、axotomy 組織内で有意に上昇していたTG活性は NGFの添加で明かに抑制されて、intact SCGの活性値迄ほぼ回復することが認められた(図3)。 しかし、GM1やSCの添加刺激によっては逆にTG活性増大の促進効果が示された(図3)。今回の検討から、軸索の切断によってNGFの逆行性の供給が阻止されて SCG内 NGFレベルの低下状態が生じ、これが引き金となって交感性ニューロン内で細胞変性(細胞死)プログラムが合目的に発現された結果、SCG内 TG活性の上昇が引き起こされた可能性が強く推察された。

[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)の援助に依った。

【文献】(1)安藤ら(1992)神経化学31(印刷中) (2)Ando et al. (1991)J. Neurochem. 57:1848-1854 (3)Gilad et al. (1985)J. Neurochem. 44:1385-1390 (4)Lorand et al. (1972) Anal. Biochem. 72:248-252 (5)Nagata et al. (1987)J. Neurochem. 49:296-302 (6)Roivainen (1991)Neurosci. Res. 11:292-296 (7)田中ら(1991)神経化学30:462-463.

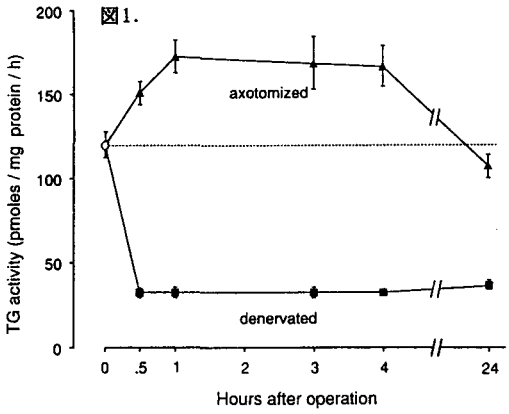
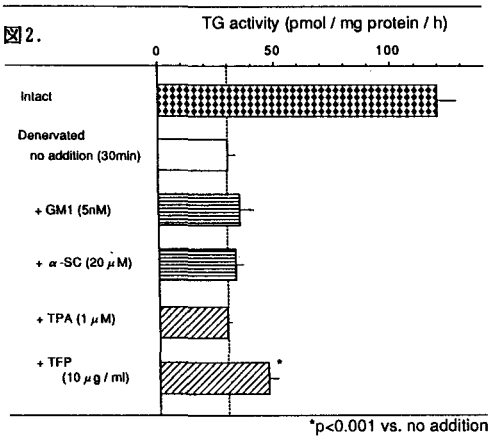
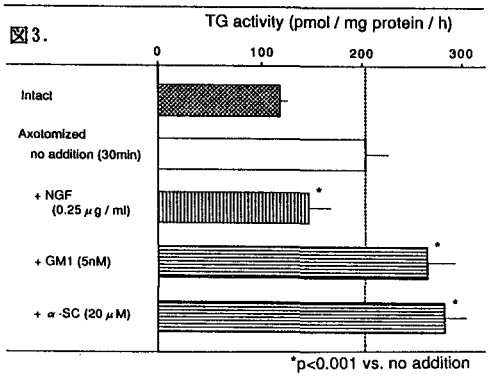


図1. 神経切断後、24 時間以内で変動する SCG 内TG活性の経時変化

図2. Denervation 後、3時間目で摘出した SCG内 TG活性におよぼす シアル酸化合物あるいは PKC 活性モデュレーターの添加効果

図3. Axotomy後、3時間目で摘出したSCG内 TG活性におよぼす NGFあるいは シアル酸化合物の添加効果





55 アネキシンVの神経栄養作用と神経保護作用

武井延之、大澤圭子、中尾裕史＊、今井嘉紀、高坂新一

国立精神・神経センター、神経研究所、代謝、　＊興和総合科学研究所

［要約］

アネキシンVの神経栄養作用と神経保護作用について検討した。アネキシンVは初代培養したラット胎仔大脳皮質神経細胞の生存を維持し、その作用は用量依存的であった。培養細胞を用い、^{125}I標識したアネキシンVとの結合実験を行なったところ、特異的結合が観察され、リセプター様物質の存在が示唆された。

さらにアネキシンVはグルタミン酸による大脳皮質神経細胞の細胞死を抑えた。同様の効果はカルシウムイオノフォアによる神経毒性に対しても発揮されたことから、アネキシンVはカルシウム過流入による神経細胞死を、何らかのメカニズムで抑制する作用をもつと考えられた。

［はじめに］

アネキシンは一群のカルシウム・リン脂質結合蛋白質からなるファミリーであり、リポコルチン、カルパクチンなどともよばれ、さまざまな性質や作用が知られている。アネキシンV（カルフォビンディンI）は抗血液凝固作用をもつ蛋白質として胎盤より精製されたものであるが、その生理的作用については不明な点が多い。アネキシンVは中枢神経内にもひろく分布しており、アストロサイト、ミクログリア、ファイブロブラストといった非神経細胞では発現しているものの、神経細胞には存在しない（1）。そこで神経細胞に対する作用を調べる目的でアネキシンVを神経細胞の培養系に添加し、生存維持作用を観察した。

さらにグルタミン酸及びカルシウムイオノフォアの神経毒性に対する保護作用もあわせて検討した。

［方法］

アネキシンVおよび抗体：ヒト（2）およびラットアネキシンVは酵母に発現させた組み替え体を用いた。抗体はウエスタンブロット用には抗ヒトアネキシンVモノクローナル抗体(A46)（2）を、活性阻害用には同・ポリクローナル抗体を用いた。

神経細胞生存維持作用の検定：大脳皮質神経細胞はE17のラット胎仔より調製し、５Ｘ１０^{4}個／ｃｍ^{2}で播種し、1%FBS/ITSP/MEM培地（3）で５－６日間培養し、アネキシンVは２日目から添加した。神経毒性を調べる系では、細胞密度を１０^{5}個／ｃｍ^{2}で培養し、グルタミン酸は７日後に、イオノマイシンは４日後にそれぞれアネキシンVと同時に添加した。生存細胞数の算定は位相差顕微鏡下に計数した。

結合実験：結合実験は大脳皮質神経細胞を５Ｘ１０^{5}で播種し10%FBS/MEM培地で２４時間培養した後、^{125}I標識したアネキシンVを用いて、氷上で９０分反応させて行ない、スキャッチャード解析を行なった。

［結果と考察］

アネキシンVは培養下の大脳皮質神経細胞に対し生存維持作用を持ち、その効果は用量依存的であることが明らかとなった（図１）。抗MAP2抗体を用いた免疫細胞化学的染色の結果から、この培養系ではほとんどの細胞がMAP2陽性であり、アネキシンVは神経細胞に直接作用していることが示唆された。そこでアネキシンVの神経細胞に対する結合実験を行なったところ特異的結合が認められ、スキャッチャード解析の結果Kd値がおよそ１０nMと算定された（図２）。さらにアネキシンVは神経細胞内に取り込まれることも判明した。これらのことからアネキシンVは大脳皮質神経細胞にたいする神経栄養因子である可能性が考えられた。

つぎにグルタミン酸の神経毒性にたいするアネキシンVの神経保護効果を調べるために、まずグルタミン酸の作用について検討した。　この培養条件下ではグルタミン酸１mMに２４時間暴露することにより、生存神経細胞数は約５０％に減少した。この毒性はNMDAアンタゴニストであるMK801を共存させることによってほぼ完全にブロックされた。また同様に細胞内カルシウムキレーターであるBAPTA・AMによっても阻害された。すなわちリセプター刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇による神経細胞死であると

考えられた。 このような条件下でアネキシンVは用量依存的に神経細胞死を抑制した（図3）。 この神経細胞死抑制効果はアネキシンVをあらかじめ神経細胞とインキュベートしておき、細胞を培地で洗った場合にも観察され、しかもインキュベートした時間が長いほど効果が強いことから、神経細胞内に取り込まれたアネキシンVがカルシウム過流入による細胞死を何らかのメカニズムで抑制していると考えられた。 同様の結果はカルシウムイオノフォアであるイオノマイシンの神経毒性に対しても観察された。

アネキシンVは神経細胞には内在的に存在しないカルシウム・リン脂質結合蛋白質であり、神経細胞に取り込まれたものがカルシウムをキレートするという可能性もあるが、カルシウムに対する親和性は比較的低いこと、モル比などから、単なるカルシウム緩衝作用ではなく、神経栄養因子としての働きをを介した作用であると考えられた。

[文献]

（1）武井延之、他 （1991）生化学 63、836

（2）Iwasaki, A.,et al. (1987) J. Biochem. 102 1261-1273

（3）Takei, N., et al., (1991) J. Neurochem. 57 1178-1184

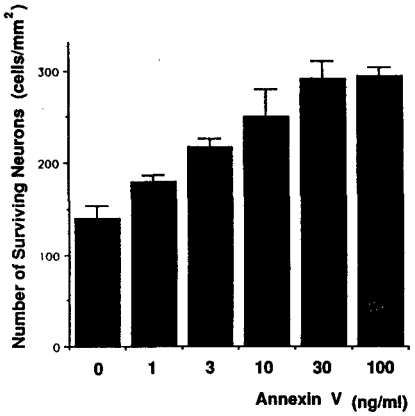


図1 アネキシンVの大脳皮質神経細胞の生存維持に対する作用

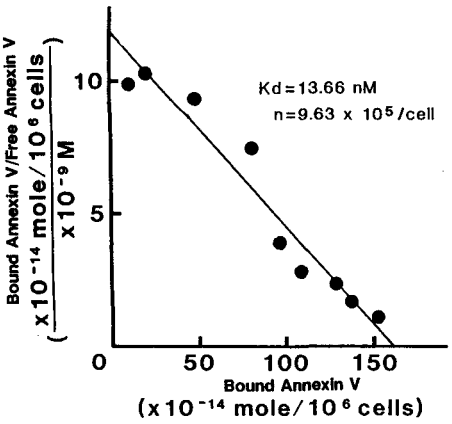


図2 アネキシンVの神経細胞への特異的結合

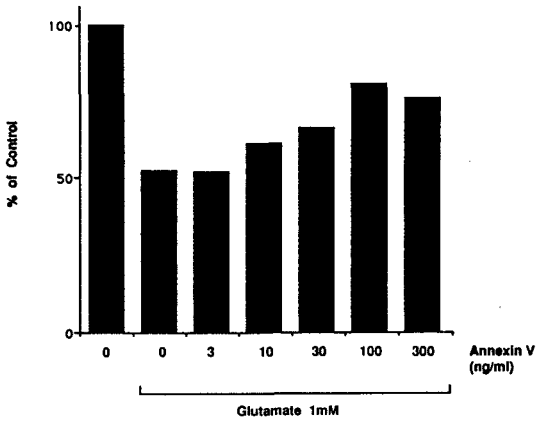


図3 グルタミン酸の細胞毒性に対するアネキシンVの拮抗作用

56 ラット GAP-43 cDNA-トランスジェニックカープの作成と単離網膜神経節細胞の軸索成長

新保　清、朝倉幹雄[1]
（聖マリアンナ医科大学　第一生理学教室、
神経精神科学教室・難病治療研究センター[1]）

〔要約〕
Rous sarcoma virus long terminal repeart プロモーターとラット GAP-43 cDNA の結合遺伝子 LTR-GAP43 を作成し、人工受精後 1~4 時間のコイ受精卵の胚盤にマイクロインジェクションした。処理卵 60 個中 19 個が孵化し、13 個体が孵化後 1 年まで成長した。このうち 2 個体から LTR-GAP43 が検出され、トランスジェニック雌カープから排卵誘導して成熟卵を採取した。紫外線照射し不活化した精子で媒精した卵を、約 40 分間冷水に浸け第二極体の放出を抑制し、単為発生的に 126 匹の f1 を得た。胸鰭の生検から 3 カ月以上生存した f1 52 匹中 22 匹で LTR-GAP43 を検出した。トランスジェニック f1 の剥離網膜のノーザン解析の結果からラット GAP-43 の発現が、また単離網膜神経節細胞の培養から軸索成長速度の増大が観察された。

緒言

プロテインカイネース C の基質蛋白質である Growth-associated protein-43（GAP-43）は成長錐に存在し(12)、神経突起の成長を促進する(2, 15)と考えられている。GAP-43 は大脳皮質視覚野(7, 8)、間脳(9)、網膜(3, 6)等の視覚路で、その発現が様々な発生段階で調べられている。構造及びその発生分化が比較的良く調べられている網膜、特に長い軸索を有し視神経を形成する神経節細胞の発生、再生過程での GAP-43 の効果を調べることは、神経細胞の分化、再生のメカニズムを考える上で有効である。我々はラット GAP-43 cDNA-トランスジェニックカープを作成し、その視覚路の形成及び網膜神経節細胞の培養下での軸索成長を観察し、比較検討した。

材料および方法

プラスミド pRc/RSV にラット GAP-43 cDNA(4)を挿入し LTR-GAP43 を作成した(14)。外来遺伝子の導入は人工受精後 1~4 時間のコイ受精卵の胚盤に 100 μM Tris, 10 μM EDTA 溶液に溶解した約 10^7 コピーの LTR-GAP43 フラグメントをマイクロインジェクションして行なった。処理卵は 20 °C の静水に 7 日置き孵化させ、稚魚は季節に合わせて 10~16 時間の光照射、10~28 °C、KH 2~4、GH 2~5、pH 7.0~7.5 の水槽内で飼育した。導入遺伝子は胸鰭の生検組織を LTR-GAP43 をプローブとしてサザン及びドットブロット解析し検出した。成熟した雌のトランスジェニックカープに下垂体末 5mg/kg を筋注し、排卵誘導して成熟卵を採取し(1)、3000 erg の紫外線照射で不活化したコイ精子で媒精した。卵は媒精 15 min 後、4 °C の氷水に 40 min 浸して第二極体の放出を阻止し(5)、20 °C の水槽に移し孵化させた。得られた f1 は 3 カ月を待って実験に用いた。網膜の光応答は暗順応したコイから網膜を剥離し、ガラス微小電極を細胞内に刺入して双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、神経節細胞の細胞内応答を記録した。組織学的には Golgi 染色、また horseradish peroxidase を用いて双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、神経節細胞を細胞内染色して観察した(11)。ラット GAP-43 cDNA の発現はノーザン法及び combined reverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）法(10)を用い ^{32}P ラベルしたラット GAP-43 cDNA をプローブとし、ハイブリダイゼーションした量及び結合条件から解析した。網膜神経節細胞は 3~15 units/ml のパパインで処理し、機械的に単離した後、L-15 培地を満たしたプライマリアで培養し、軸索成長速度を測定した(13)。

結果

LTR-GAP43 を注入した卵 60 個のうち約 32 % 19 個が孵化した。このうち 5 個体が孵化後 3 週以内に、1 個体が孵化 3 カ月後に死亡したが、孵化卵の約 68 %に当たる残り 13個体が 1 年以上生存した。胸鰭の生検組織のサザン及びドットブロット解析の結果、13 個体中 2 個体 Pg2、Pg7 から LTR-GAP43 が検出された。Pg2、Pg7 それぞれ 7 コピー、10 コピーの外来遺伝子が導入された。トランスジェニック雌カープ Pg7 から採取した約 2000 個の成熟卵のうち、126 個が単為発生し、孵化した。このうち 52 匹が 3 カ月以上生存した。解析した f1 52 匹中 22 匹から LTR-GAP43 が検出され、ノーザン及び RT-PCR 解析から 22 匹全てでラット GAP-43 の発現が観察された。単離網膜神経節細胞の軸索が細胞体の直径の 3 倍以上伸長した割合はトランスジェニックカープ群、ノントランスジェニックカープ群それぞれ培養 48 時間後で 51.3 % (n=80 cells)、14.6 % (n=212)、培養 120 時間後で 84.3 % (n=51)、15.1 % (n=152) であった。培養 48 時間後に対する 120 時間後の神経節細胞の生存率を計算するとトランスジェニックカープ群で 63.8 %、ノントランスジェニックカープ群で 71.7 %であった。剥離網膜標本の電気的、形態的観察では神経細胞の分化異常、神経細胞間の結合様式の変化等を示唆する結果は認められなかった。

考察

Rous sarcoma virus long terminal repeart (RSV-LTR) プロモーターを用いラット GAP-43 cDNA のコイへの導入、遺伝、発現に成功した。培養網膜神経節細胞の観察から GAP-43 は軸索の成長に関与していることが示唆された。神経の分化、生存率の向上に関しては本実験では顕著な影響は認められなかった。外来遺伝子の挿入された染色体上の位置、挿入部位前後の DNA 配列、ラット GAP-43 の発現時期、コイ GAP-43 とラット GAP-43 の効果の違い等を含め、GAP-43 の作用機序に関し免疫組織化学的実験を加え現在検討している。

御援助頂きました東海大学 DNA 生物学教室　勝木元也先生、木村　穣先生、筑波大学生物科学教室　斎藤建彦先生、酒井秀人先生、東京都水産試験場の職員の皆様に感謝致します。

文献

1) Bhowmick, R. M., Kowtaz, G. V., Jana, R. R. and Gupta, S. D. (1977) Aquaculture 12, 149-155
2) Costello, B., Meymandi, A. and Freeman, J. A. (1990) J. Neurosci. 10, 1398-1406
3) Doster, S. K., Lozano, A. M., Aguayo, A. J. and Willard, M. B. (1991) Neuron 6, 635-647
4) Karns, L. R., Shi-Chung Ng, Freeman, J. A. and Fishman M. C. (1987) Science 236, 597-600
5) Makino, S. and Ojima, Y. (1943) Cytologia 13, 55-60
6) McIntosh, H. and Blazvnski, C. (1991) Brain Res. 554, 321-324
7) McIntosh, H., Daw, N. and Parkinson, D. (1990) Visual Neurosci. 4, 585-593
8) McIntosh, H. and Parkinson, D. (1990) Brain Res. 518, 324-328
9) Moya, K. L., Benowitz, L. I. and Schneider, G. E. (1990) Brain Res. 527, 259-265
10) Rappolee, D. A., Mark, D., Banda, M. J. and Werb, Z. (1988) Science 241, 708-712
11) Saito, T., Kujiraoka, T., Yonaha, T. and Chino, Y. (1985) J. Comp. Neurol. 236, 141-160
12) 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
13) Tachibana, M. (1983) J. Physiol. 345, 329-351
14) Zhang, P., Hayat, M., Joyce, C., Gonzalez-Villasenor, L. I., Lin, C. M., Dunham, R. A., Chen, T. T. and Powers, D. A. (1990) Mol. Reproduc. Develop. 25, 3-13
15) Zuber, M. X., Goodman, D. W., Karns, L. R. and Fishman, M. C. (1989) Science 244, 1193-1195

57 培養大脳皮質ニューロン間のシナプス形成におけるガングリオシドの役割：エンドグリコセラミダーゼ処理の影響

村本和世[1,2]、川原正博[1]、小林和夫[1]、伊東信[3]、山形達也[3]、黒田洋一郎[1]
[1]東京都神経科学総合研究所・神経生化学、[2]東京大学・医学部・薬理、[3]三菱化成生命科学研究所・複合糖質

〔要約〕
ラット（胎令18日－19日）脳から大脳皮質を取り出し、パパインによる酵素処理で細胞を単離・培養した。この初代培養系にfura-2を負荷して細胞内Ca^{2+}濃度多点同時解析システムでモニターすると、ニューロン内の同期するCa^{2+}濃度変動を指標にシナプス形成の解析ができることは既に報告されている。培養２日目より、エンドグリコセラミダーゼ（EGCase）[1]とアクチベーター[2]を培養液中に添加し、培養７－８日目まで添加し続けておくと、ニューロン間で同期してみられる細胞内Ca^{2+}濃度変動の振動数が無添加コントロールに比べ酵素濃度依存的に減少した。この振動数は、電顕によって実際に観察した場合のシナプス数と正の相関を示すことがわかっており[3]、従ってEGCaseにより、ガングリオシドの糖鎖部分を除くことによって、培養大脳皮質ニューロン間のシナプス形成が抑制されたことが示唆された。

細胞膜の外表面には、糖蛋白質や糖脂質という形で多数の糖鎖が存在している。これらの糖鎖群は細胞間相互作用などの機能の面から最近特に注目される様になってきた。その中でもスフィンゴ糖脂質ガングリオシドは脳に多く存在し、シナプス部位に局在が見られるという報告[4]も在り、シナプス部位でなんらかの生理機能を果たしている可能性が高い。また我々は既にecto-protein kinase[5]の阻害剤と考えられるK-252b[6]が培養大脳皮質ニューロン間のシナプス形成を阻害することを報告[7,8]しているが、neuroblastomaの膜表面に存在するある種のecto-protein kinaseがガングリオシドGQ_{1b}によって調節されているという報告[9]も在り、その関連に興味がもたれる。さらに長期記憶のメカニズムとされるシナプス結合の変化を含むシナプスの可塑性[10]研究の上からも重要と考えられるシナプス形成・保持のメカニズムにおいてガングリオシド自身が果たす役割も注目される。従来ガングリオシドの機能を探る手法として最も多く使われたものは、実験系に外からガングリオシドを添加するというタイプのものであったが、その場合必ず内在性のガングリオシドとの関連が問題となった。この問題を解決するためには、あらかじめ内在性ガングリオシドを除いておく手段が考えられる。最近、ガングリオシドを含む糖脂質から糖鎖部分を切り離す酵素、エンドグリコセラミダーゼ（EGCase）が伊東らによって発見された[1]。EGCaseは糖脂質のセラミドとグルコースで結合している糖鎖との間のグリコシド結合を特異的に加水分解する活性を持つ酵素で、単糖がセラミドに結合したセレブロシド、及び糖蛋白質糖鎖やリン脂質には作用しない。また、EGCaseは活性の発現にTriton X-100のような界面活性剤を必要としたが、最近EGCaseの活性化タンパク質（アクチベーター）が発見され、これを加えることによって生理的条件下で細胞の生存率を下げることなく細胞表面糖脂質糖鎖を特異的に除去することが可能となった[2]。この酵素により、あらかじめ細胞表面に存在するガングリオシドの糖鎖部分を除くことで、ガングリオシド分子の持つ役割・機能がよりはっきりすると考えられる。今回は、まずEGCaseによって培養ニューロンを処理した場合のシナプス形成に対する影響などについて報告する。

［実験方法］
ラット大脳皮質ニューロンの培養は既報[7]の様に、Banker & Cowan法[11]を若干改変して行った。18－19日令のラット胎子脳から大脳皮質を取り出し、パパイン消化した後poly-L-lysineでコーティングしたカバーグラスを底に貼り付けたflexipermプレートを用いて培養した。培養２日目から培養液中にEGCaseをアクチベーターと共に加えた。培養３日目と７日目には培養液を半量ずつ交換し、この時酵素とアクチベーターも半分量加え、添加した酵素活性が一定になるようにした。培養７－８日目に培養細胞にfura-2を負荷した後、既に報告された方法[12]により螢光ビデオモニター装置[13]による細胞内Ca^{2+}濃度変動の観察を行った。またこの培養神経細胞を4%paraformaldehydeにより固定し、抗ＭＡＰ２(microtubule-associated protein 2)抗体(monoclonal)及び抗ニューロフィラメント抗体を用いて螢光二重染色を行い、形態的な変化について検討を加えた。

［実験結果及び考察］
既に本学会においても報告している様に、ラット大脳皮質細胞を培養しおよそ培養開始後１週間たつと視野内のほぼ全てのニューロンが同期した細胞内Ca^{2+}の自発的な変動を示す様になる。同時に行った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細胞内Ca^{2+}濃度変動の振動数とが強い相関を示すことが明らかになっている($r=0.90$)[3]。従って一定条件下で細胞内Ca^{2+}濃度変動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且つ定量的にアッセイすることが可能となる。

大脳皮質培養細胞に培養２日目よりEGCase 20mU/ml、アクチベーター蛋白10uMを添加し、上述の機能アッセイを培養７日目に行った結果、振動数の著しい減少が見られ、EGCase添加群では対照の１４％にまで低下した（図１）。更にこの振動数の低下は、酵素濃度に依存していた（図２）。この時抗ＭＡＰ２抗体及び抗ニューロフィラメント抗体による免疫細胞染色を行い細胞の形態変化を観察したが、光学顕微鏡レベルでの変化は認められず、酵素添加によるシナプス形成の抑制は細胞や突起の変化によるものではないと思われる（写真省略）。今回、EGCase処理によって細胞膜表面のガングリオシドに由来する糖鎖を除くことにより、培養ニューロン間のシナプス形成は抑制されることが明らかになり、ガングリオシド分子の糖鎖部分がシナプス形成に必要である可能性が示唆された。しかしながら、現在のところガングリオシドとシナプス形成との因果関係を証明するにはまだ実験が不十分であり、今後は、１）酵素処理を行った後に特定のガングリオシド種を加えるなどして、ガングリオシド自体の関与を明確にするとともに有効なガングリオシド分子種を検索する、２）ガングリオシドの代謝を変える薬物を用いてその作用を比較するなどして更に検討を加えていく必要がある。

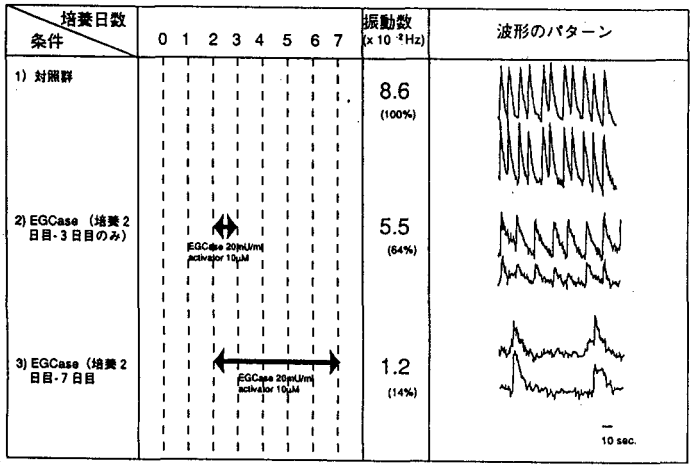


図１　EGCase添加期間による細胞内Ca^{2+}濃度変化の振動数への影響。EGCaseの添加期間と培養７日目に見られた細胞内Ca^{2+}濃度変動のパターン及びその振動数を示した。

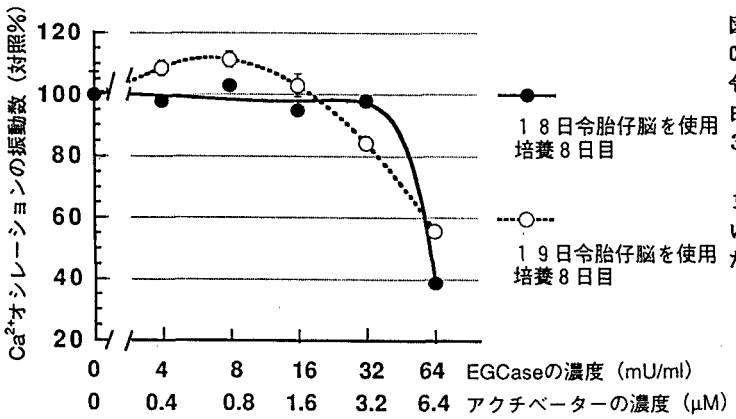


図２　EGCase添加濃度による細胞内Ca^{2+}濃度変化の振動数への影響。胎令１９日目のラットを用いたもの（白丸）については、１濃度に対して３－５実験の平均値で示してある。Barは標準誤差を示している。胎令１８日目のラットを用いたものについては、１例だけの実験結果を示した。

［文献］
１）Ito,M. and Yamagata,T.(1989)J.Biol.Chem.264:9510. 2)Ito,M.et.al.(1991)J.Biol.Chem.266:7919. 3)黒田洋一郎、他(1990)神経化学 29:196. 4)Hansson,H.A.et.al.(1977)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:3782. 5)Ehrlich,Y.et.al.(1986)Nature 320:67. 6)Nagashima,K.et.al.(1991)FEBS Lett.292:119. 7)Muramoto,et.al.(1988)Proc.Japan Acad.Ser.B 64:319. 8)Kuroda,Y.et.al.(1992)Neurosci.Lett.135:255. 9)Tsuji,S.et.al.(1988)J.Biochem.104:498. 10)Kuroda,Y.(1989)Neurochem.Intern.14:309. 11)Banker,G.A. and Cowan,W.M.(1977)Brain Res.126:397. 12)Ogura,A.et.al.(1987)Neurosci.Lett.78:69. 13)Kudo,Y. and Ogura,A.(1986)Brit.J.Pharmacol.89:191.

58 神経細胞の突起形成にともなうドレブリン蛋白の細胞内局在とF-アクチンの変化

浅田英穂[1)]、白尾智明[1)]、戸田正博[2)]、池田圭朗[2)]、植村慶一[1)]
（慶應大・医・生理[1)]、脳神経外科[2)]）

〔要約〕

ヒト神経芽細胞腫（SH-SY5Y細胞）を用いて、未分化およびレチノール酸（ＲＡ）により神経突起を伸展した際の、アクチン結合蛋白であるドレブリンの細胞内局在と細胞骨格蛋白F-アクチンの変化を検討した。未分化SH-SY5Y細胞では、ドレブリンは細胞質内に斑点状に存在し、ストレスファイバー（ＳＦ）上においても連続性を持たずに点状にのみ存在した。神経突起を伸展したSH-SY5Y細胞では、細胞体および突起の細胞膜近傍に局在が変化し、F-アクチンと共在した。これは、初代培養系における小脳神経細胞のドレブリンの局在と類似した。ドレブリンと共在する膜近傍のF-アクチンはアクチンの脱重合薬サイトカラシンDに対して、ＳＦを形成するF-アクチンよりも安定性が高かった。また、蛋白リン酸化酵素阻害薬k-252aによりSH-SY5Y細胞は突起を伸展し、その際のドレブリンの細胞内局在は、ＲＡの場合と同様に膜近傍にF-アクチンと共在した。したがって、ＲＡによるドレブリンの膜近傍への局在の変化には蛋白リン酸化酵素活性の阻害が関与すると推測された。

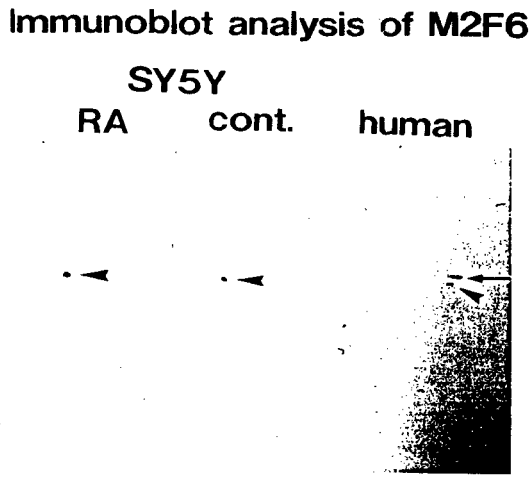
神経発生関連蛋白ドレブリンは、神経組織の発生過程で時期特異的に出現するアクチン結合蛋白である[1)]。ドレブリンにはニワトリではE1、E2（幼若型）、A（成熟型）の３種類[1)]、ラットではEおよびAの２種類の蛋白質アイソフォームがあり[2)]、神経細胞の分化成熟に平行してE1からE2、Aに変化する[1)]。我々は、ドレブリンを一過性に発現させた繊維芽細胞は樹状突起様の突起を伸展することを最近報告したが[3)]、ドレブリンはアクチンを介して神経細胞の形態形成に関与していることが推測されている。今回、ドレブリンの機能を解析することを目的として、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いて、レチノール酸(RA)を添加し突起を伸展した神経細胞とドレブリンの細胞内局在の変化の相関について解析した。また、細胞骨格蛋白であるF-アクチンに注目し、ドレブリンとF-アクチンの細胞内の局在の相違、およびF-アクチンの可逆的脱重合剤であるサイトカラシンDに対するF-アクチンの安定性について検討した。さらに蛋白リン酸化酵素阻害薬k-252aを用いることにより、RAによって突起を伸展したSH-SY5Y細胞におけるドレブリンの細胞内局在の変化の機序について考察を加えた。

〔実験方法〕

未分化SH-SY5Y細胞の培地中(F-12:DMEM =1:1の混合培地)に10^{-5}M RA(sigma)を２週間添加し、分化型SH-SY5Y細胞を得た。未分化および分化型SH-SY5Y細胞を常法により[1)]二次元電気泳動後、ニューロフィラメント(NF)抗体およびドレブリン抗体(MAb M2F6)を用いてウエスタンブロットを行った。免疫細胞化学染色は、poly-L-lysineでコーティングしたカバースリップ上で細胞を培養した後、10%ホルマリンで固定、ドレブリン抗体(MAb M2F6)およびNBD-phallacidineを用いて二重染色した後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。F-アクチンの安定性についての解析はサイトカラシンD(50ng/ml,5μg/ml)を培地中に1時間添加した。蛋白リン酸化酵素阻害薬の影響についてはK252a (20nM)を添加した後、同様に二重染色法により解析した。

〔結果および考察〕

SH-SY5Y細胞はRA添加２週間により神経突起を伸展し、ウエスタンブロット法による解析では、68K NFが増加した。未分化SH-SY5Y細胞には分子量約116KのドレブリンEのみが存在し、分化誘導後もアイソフォームはEのままであり発現量の明かな変化を認めなかった(図１-a,b)。一方、成人大脳組織にはドレブリンA(約125K)およびドレブリンEが存在した(図１-c)。共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫細胞化学染色では、未分化SH-SY5Y細胞においてドレブリンは細胞質内に斑点状に存在し、ストレスファイバー(SF)上においても連続性を持たずに点状に存在した(図２)。一方、分化後は細胞膜近傍にドレブリンの局在が変化し、F-アクチンと共在した(図３)。これは初代培養法を用いた小脳神経細胞におけるドレブリンの細胞内局在に類似していた。低濃度サイトカラシンD(50ng/ml)に対しては、未分化細胞ではSFが消失し、ドレブリンが共在するF-アクチンのみがcytoplasmic poolとして残った。しかし分化型細胞では、F-アクチンには変化がみられなかった。したがって、ドレブリンが連続的に結合している膜近傍のF-アクチンは、ドレブリンが点状にのみ結合するSFのF-アクチンよりも脱重合に対して安定性が高いことが明かとなった。高濃度サイトカラシンD(5μg/ml)に対しては、いずれもretraction processを形成し、ドレブリンとF-アクチンが共在するcytoplasmic poolが細胞質あるいは突起上に残存し、両者は実際に細胞内で結合していると想定された。さらに、蛋白リン酸化酵素阻害薬 k252a (20nM)添加によってSH-SY5Y細胞は突起を伸展したがRAによる突起伸展作用とは相乗効果を示さず、また k252a 投与後のドレブリンとF-アクチンの細胞内局在は膜近傍に共在しRAの場合と類似していた。RAによるSH-SY5Y細胞の突起伸展の機序は主としてprotein kinase C活性の低下によるものと考えられているが、RAとk252a添加後のドレブリンの局在が同じ染色パターンを示したことから、RAによるドレブリンの細胞内局在の変化には蛋白リン酸化酵素活性の阻害が関与している可能性が示唆された。

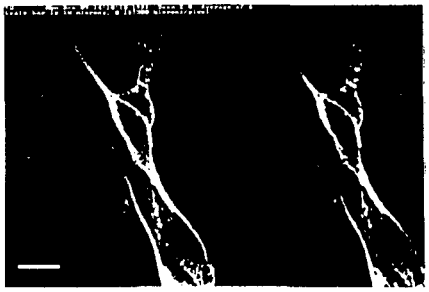


図－1
RA添加SH-SY5Y細胞のドレブリンの変化。RA添加2週後(a)および未分化SH-SY5Y細胞(b)、成人大脳組織(c)の二次元電気泳動後、MAb M2F6を用いたイムノブロット解析。矢印はドレブリンE、矢頭はドレブリンAを示す。

図－2　未分化SH-SY5Y細胞のMAb M2F6（γ_1）およびNBD-phallacidin（左）の二重免疫細胞化学染色。Scale bar,10 μ m.



図－3　分化SH-SY5Y細胞のMAb M2F6（γ_1）およびNBD-phallacidin（左）の二重免疫細胞化学染色。Scale bar,10 μ m.



〔文献〕
1）Shirao,T. and Obata,K.(1985) J.Neurochem. 44 : 1210-1216
2）Shirao,T.,Kojima,N.,Nabeta,Y. and Obata,K.(1989) Proc. Japan Acad. 65 Ser.B : 169-172
3）Shirao,T.,kojima,N. and Obata,K.(1992) NeuroReport 3 : 109-112

59 IDENTIFICATION OF RAT DREBRIN EMBRYONIC ISOFORM BY POLYMERASE CHAIN REACTION AND ITS GENOMIC ANALYSIS

Peter Kaub*, Tomoaki Shirao*, Akihiro Inoue**, Yasuo Takeda*, Keiichi Uyemura*.
*Department of Physiology, Keio University School of Medicine, 35, Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160, and **National Institute for Basic Biology, Okazaki, 444.

ABSTRACT Reverse polymerase chain reaction (PCR) of 1 week rat brain total RNA, and normal PCR of a neonatal rat lambda gt-11 cDNA library, generated a rat drebrin isoform, approximately 140bp smaller than an adult isoform generated under the same conditions, from adult lambda gt-11 cDNA library, or previously constructed vectors, containing rat drebrin A cDNA. All PCR products reacted with a rat drebrin A ^{32}P labelled probe, when subjected to Southern blot analysis. This finding correlates well with the exon difference found between chicken drebrins A and E2, and is the first evidence, that mRNA for a drebrin embryonic isoform(drebrin E) is generated in the rat. Screening of a rat genomic library, by Southern blotting, with rat drebrin A restriction fragments, identified two clones with rat genomic sequence 5', and one clone with sequence 3', of the rat drebrin gene. Further analysis of these clones may identify other transcriptionally important regions in the developmental regulation of the drebrin gene.

INTRODUCTION Drebrins are novel actin-binding proteins in the brain[1]. Three isoforms- two embryonic isoforms(E1 and E2) and an adult isoform (A), are generated by alternative splicing from a single gene, in the chicken brain[2]. cDNA from rat drebrin A, induces neurite-like processes when transfected into non-neuronal cells[1]. Immunoblot analysis of rat drebrin proteins, with monoclonal antibody against chicken drebrins, demonstrated the appearance of two isoforms of rat drebrin protein, at different stages of development[3]. As the nucleotide sequence of rat drebrin A has already been characterized[1], reverse PCR(reverse transcription of RNA's to cDNA, followed by PCR amplication) offers a convenient method to analyse transcriptional regulation of the rat drebrin gene. Analysis of the rat genome, in regions near the drebrin gene, may offer further clues to other transcriptionally important events in the developmental regulation of the drebrin gene.

METHODS One week old JLA-Wistar rats were sacrificed by decapitation and total RNA from isolated brain tissues, was obtained by guanidinium thiocyanate/lithium chloride precipitation[5]. Approximately 3µg of total RNA was used per reverse PCR reaction. RNA samples were reverse transcribed to cDNA with RAV-2 reverse transcriptase. Approximately $3x10^9$ pfu of adult and neonatal lambda gt-11 cDNA libraries(Clontech) were incubated at 70°C/5min;0°C/5min. Apart from cycle number, PCR protocol was identical for both reverse transcribed(35 cycles) and lambda cDNA(30cycles) samples using 50 pmol of each rat drebrin specific primer[RD3 and RD6- rat drebrin A nucleotides 882-901 and 1904-1923, respectively[1]]according to standard procedures. Restriction fragments of rat drebrin A cDNA vector (Drh102)[1], labelled with ^{32}P-dATP by primer extension of random hexamer, were used for Southern Blotting of a lambda CHARON4A genomic rat library(Clontech) or PCR generated fragments by established procedures[5].

RESULTS AND DISCUSSION Neonatal rat lambda-gt11 cDNA(strongly) and 1 week rat reverse transcribed RNA(weakly) generated PCR products of approximately 800bp(Fig. 1A). This was approximately 140bp smaller than the PCR product generated from both adult rat lambda-gt11 cDNA, and rat drebrin A cDNA containing vector, Drh102. 1 week rat reverse transcribed RNA also generated PCR products of approximately 500bp and 400bp, however only the 800bp fragment and the 1041bp adult fragment were positive by Southern blotting with rat drebrin A restriction fragment Dr102ND, suggesting that the 500 and 400bp fragments are not related to drebrin. PvuII digestion of both the 800 and 1041bp PCR products, maintained the 140 bp size difference, suggesting that the rat drebrin exon lies within this PvuII region.

Lambda Charon4A rat genomic library was initially screened with the labelled Dr102ND restriction fragment by Southern blotting. Forty three positive clones were identified by this procedure and subsequently screened with 5' and 3' restriction fragments of rat drebrin(see Fig. 2), to characterize genomic regions containing the rat drebrin gene. Two clones(lambda D12 and D40) that were strongly reactive with both 5' and 3' restriction fragments, were found(see summary of restriction fragment analysis in Table 1). One clone (lambda D2) reactive with 3' restriction fragments(Dr102P3;E3 and EE), but not restriction fragments 5' of the rat drebrin 3' EcoRI site, was found(Table 1).

Drebrin has been demonstrated to be developmentally regulated in the process of neuronal growth[1,2,3]. To date, the only difference found between different isoforms of drebrin, is the transcriptional regulation of the exon region. We have demonstrated that PCR is a rapid and convenient method for the analysis of exon regulation in rat drebrin function. Analysis of genomic sequences containing rat drebrin sequence, may identify other important regions, related to drebrin developmental regulation. Further analysis of the exon region, and other transcriptionally regulated regions, of rat drebrin, in the rat genome, may help elicit functionally important domains of drebrins, in the mechanisms of neuronal migration, and dendritic growth and plasticity.

FIG. 1 Generation of Rat Drebrin A and E Isoform PCR Fragments

Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blotting(B) of rat drebrin PCR products.**RD3,6**-samples amplified by PCR with rat drebrin primers RD3 and RD6; **lambda E/H**-lambda EcoRI/HindIII molecular weight markers; **PBR H**-PBR HaeIII molecular weight markers; **neo**-lambda gt-11 neonatal rat; **adult**-lambda gt-11 adult rat; **1wk**-one week reverse transcribed rat total RNA; positive controls **Drh102**-rat drebrin A cDNA containing vector; and **Drh102N/D**-NotI/DraI rat drebrin A fragment of Drh102. Southern blotting was carried out with labelled Dr102ND restriction fragment(see Fig. 2).E-drebrin E PCR fragment; A-drebrin A PCR fragment.

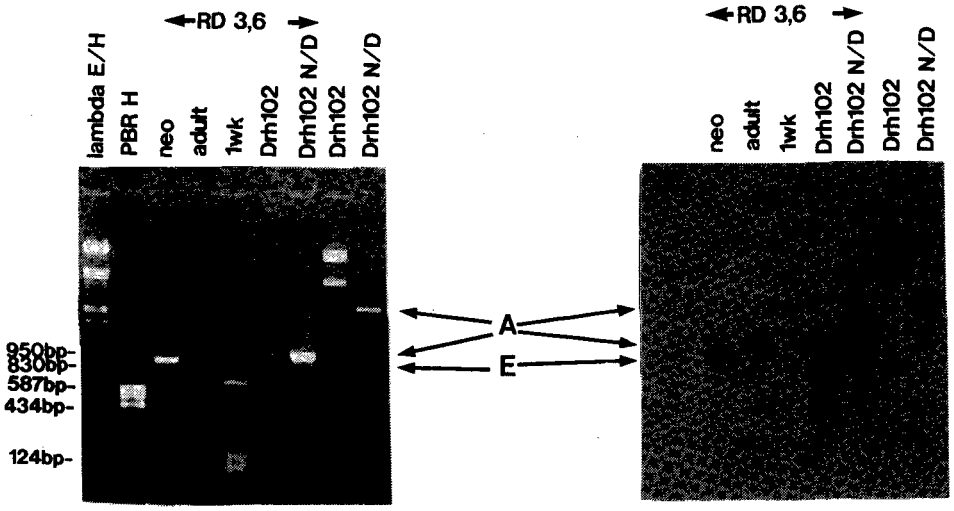


FIG.2-Restriction Map of Rat Drebrin A

Restriction fragments used in lambda rat genomic DNA library screening are represented. RD3 and RD6 rat specific PCR primer locations are also shown. ATG, stop and E represent putative start and stop codons, and exon regions, respectively. Rat drebrin A PCR product from primers RD3 and RD6 aswell as its PvuII fragment are represented by Dr102-3/6 and Dr102PP, respectively.

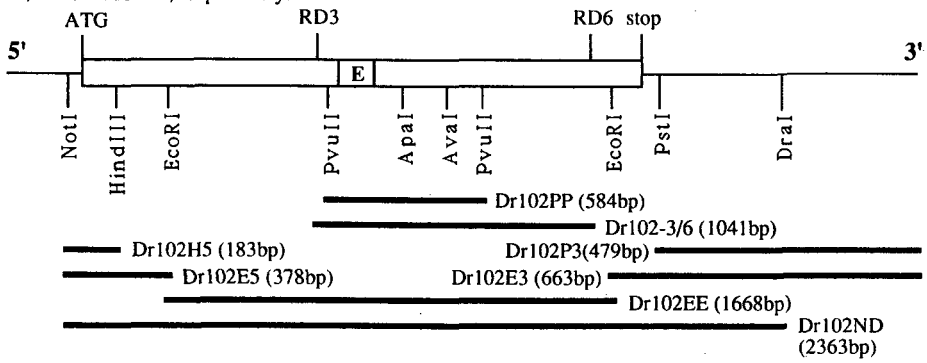


TABLE 1: Restriction Mapping of Lambda Rat Genomic Clones

Lambda rat genomic DNA clones were screened with rat drebrin A restriction fragments (see Fig.2) by Southern blot analysis and scored as either: strongly reactive(++); reactive(+); or not reactive(-).

	Dr102ND	Dr102H5	Dr102E5	Dr102EE	Dr102E3	Dr102P3
lambda D2	++	-	-	+	++	++
lambda D12	++	++	++	++	+	++
lambdaD40	++	++	++	+		++

REFERENCES

1. Shirao,T., Kojima,N. and Obata,K.(1992)NeuroReport 3:109-112.
2. Shirao,T., Kojima,N., Terada,S. and Obata,K.(1990) Neuroscience Res.Suppl., 13:S106-S111.
3. Shirao,T., Kojima,N., Nabeta, Y. and Obata,K.(1989) Proc. Japan Acad., 65, Ser. B, No. 7:169-172.
4. Cathala, G. et. al. (1983) DNA 2:329-335.
5. Sambrook, J., Maniatis, E. and Fritsch, T. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Edn.

60　神経細胞形質膜蛋白質ＨＰＣ－１の機能解析

〔著者〕赤川公朗１　山口和彦２　中山孝３　井上明宏１
〔所属〕（生理学研究所　１神経化学　２生体システム　３機能協関）

〔要約〕

神経系特異蛋白質ＨＰＣ－１のｍＲＮＡは成熟ラットの大脳皮質、海馬、扁桃体、小脳、網膜等に強く発現している。我々はＨＰＣ－１が未分化上皮細胞の形態分化促進因子であるエピモルフィンとアミノ酸配列上、強いホモロジーを有する事を見出した。このＨＰＣ－１の機能を調べる為、ＨＰＣ－１ｍＲＮＡに対するアンチセンスオリゴヌクレチドによる合成阻害実験を試みた。その結果、ＨＰＣ－１の合成阻害が培養脊髄後根神経節細胞の突起形成に影響を与える事が示唆された。またニワトリ胚の培養網膜神経節細胞の軸索内にＨＰＣ－１抗体を投与すると同様の効果が得られた。従って、ＨＰＣ－１分子は成熟した神経細胞に於ける形態形成に関係する細胞内因子と推測された。

ＨＰＣ－１蛋白質は成熟した神経細胞に特異的に発現する形質膜蛋白質である。我々はＨＰＣ－１の構造を推定し、そのカルボキシ末端に強い疎水性領域を有する蛋白質であり、アミノ末端にはシグナルペプチドが存在しない事を既に報告した（１）。ＨＰＣ－１は分子の大部分が形質膜の細胞質側にあると考えられる。最近、我々はこのＨＰＣ－１分子が未分化上皮組織の形態形成促進因子であるエピモルフィン（２）とホモロジーを有する事を見出し（図１）、両者が新しい蛋白質のファミリーの一員であることが示唆された。そこでＨＰＣ－１も同様に細胞の形態形成因子ではないかと期待された。この予想を確かめる為、培養神経細胞でのＨＰＣ－１分子の機能阻害或いは合成阻害実験を行ないその生理的機能の解析を行なった。

［実験方法］

In situ hybridization　ｍＲＮＡの局在を調べる為、Hashimoto等の方法（３）によりラット脳凍結切片上でDigoxigenin-Alkaliphosphatase発色法を行なった。ＨＰＣ－１ｃＤＮＡの１．９ Kbp-ECoRI-SphIフラグメントをテンプレートとして作製したDIG-labelled riboprobeを用いた。

アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果　既報に従い（４）成熟ラットの脊髄後根神経節を摘出した後、コラゲナーゼ処理して軽くピペッチングを行ない、細胞を遠心分離した後、ＤＭＥＭ－Ｎ１supplement中の細胞懸濁液を得た。これをポリＬリジン処理した培養皿上に播種した。ＨＰＣ－１ｍＲＮＡの開始コドン近傍に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳ）１０ｕＭを加えてCO_2インキュベーターで培養した後、形態変化を観察した。線維伸長の度合いは画像処理装置により定量化した。

抗体効果の検討　Bonhoeffer等の方法（５）に従い、受精後７日目ニワトリ胚の網膜を摘出しチョッパーで小片に切った後、ポリエチレンイミン処理した培養皿の上でdefined mediumを用いて一晩器官培養を行なった。精製抗体を先端より少量ずつ圧放出しながら、顕微鏡下で伸長してきた神経節細胞軸索をマイクロピペットで切断することにより、軸索断端より抗体を軸索内に投与した。抗体が細胞内に流入したか否かは抗体に蛍光ラベルしたＢＳＡを混ぜておき、実験後、蛍光顕微鏡で細胞を観察することにより調べた。抗体投与後、２－４時間に亘り断端近傍をタイムラプスビデオで連続記録した後、再生して観察を行ない、適宜ビデオプリンターで記録した。抗体はＨＰＣ－１抗血清をプロテインＡカラムで精製した後、凍結乾燥した標品を用いた。またＨＰＣ－１モノクロン抗体でも同様の効果を検討した。

［結果及び考察］

In situ hybridization により神経組織に於けるＨＰＣ－１ｍＲＮＡの発現を調べると、大脳皮質、海馬、扁桃体、小脳、網膜等に強いシグナルを認めた。しかしそれ以外の脳幹部等では一般に弱く、部位により発

現量に差があった。次に成熟ラットより得た培養脊髄後根神経節細胞を用いてＨＰＣ－１mＲＮＡに対するＡＳの効果を検討した（図２）。この系では通常、持続的にＨＰＣ－１が発現されている。これにＡＳを添加したmediumで培養すると多数の細い分岐を有するneuriteの形成が促進された。この効果は培養数時間後から現れはじめ３６時間後に顕著となった。ＮＧＦの有無に拘らずこの効果は認められたのでＮＧＦとＡＳの効果は異なるものと思われた。また培養網膜神経節細胞の軸索断端内に精製ポリクロン抗体を投与し、タイムラプスビデオで観察すると、投与後１０数分で断端附近より発芽様現象が生じた。この現象は数時間に亘り観察された。更に高濃度の抗体が細胞内に流入した場合、微小管阻害剤であるノコダゾールと同様の効果を認め、抗体が細胞骨格系に何等かの影響を与えていると考えられた。モノクロン抗体は無効であった。これらの結果は神経細胞形質膜蛋白質であるＨＰＣ－１が成熟した神経細胞内で抑制的に突起形成能を制御していることを示唆した。

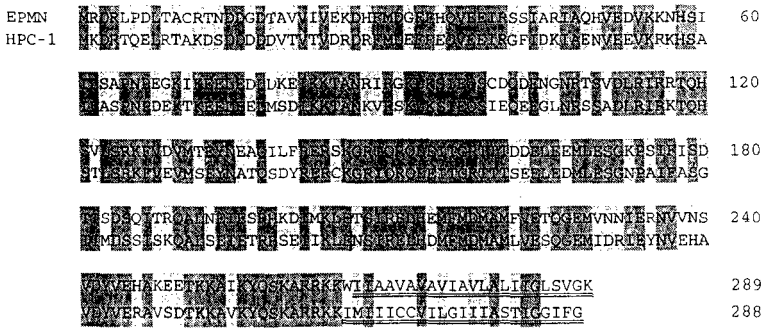


図１　ＨＰＣ－１と上皮組織形態形成促進因子エピモルフィンとのホモロジー。アミノ酸配列上６３％同一である。濃い部分は同一、薄い部分は保守的置換を示す。

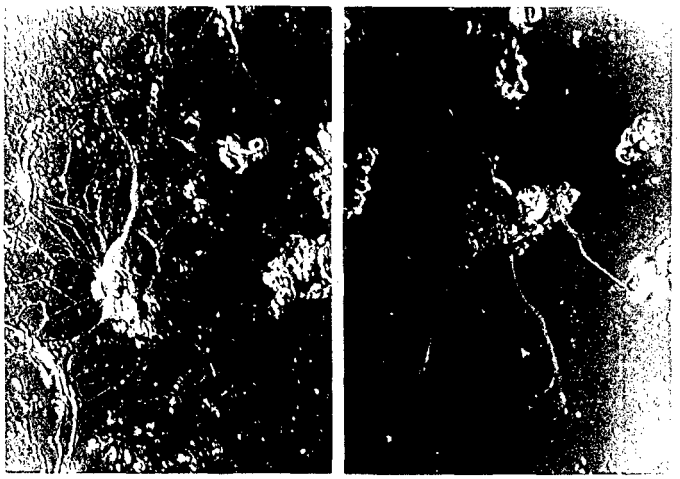


図２　アンチセンスオリゴヌクレオチドの培養脊髄後根神経節細胞に及ぼす影響。培養４８時間。左ＡＳ　右コントロール。
ＡＳがneurite様の細い突起形成を促す。ＮＧＦは添加していない。

文献

(1)Inoue A., Obata K. & Akagawa K.　J.Biol.Chem. 267, (1992) 10613-10619

(2)Hirai Y., Takebe K., Takashina M. et al., Cell 69, (1992) 471-481

(3)Hashimoto T. & Obata K.　Neurosci.Res. 12, (1991) 514-527

(4)Yamaguchi K.　Brain Res. 529, (1990) 286-293

(5)Bonhoefer F. & Huf J.　Nature 288, (1980) 162-164

61 初代培養前脳基底野ニューロンにおけるNGFレセプターの発現調節

小島正己、山田雅司、池内俊彦、畠中寛
（大阪大学蛋白質研究所・生合成）

〔要約〕

中枢神経系においては、NGFの生理作用は主として前脳基底野コリン作動性ニューロンに対して行われる。そこで、高親和性NGFレセプター（HNGFR）を形成する二つの成分遺伝子*trk*Aおよび$p75^{LNGFR}$mRNAの発現を、胎生17日から生後6週齢ラット前脳基底野の組織で、RT-PCR法を用いて調べた。その結果、*trk*A mRNAは、胎生17日では検出感度以下であり、生後にその発現が見られたのに対し、$p75^{LNGFR}$mRNAは胎生期からすでにその発現が認められた。次に、NGFにコリン作動性ニューロンの分化促進作用がみられる胎生17日ラットの初代培養前脳基底野ニューロンを用いて、NGFによる*trk*Aの発現調節の可能性を、NGFの添加36時間後に調べたところ、NGF無添加群に比べて、NGF添加群の方に*trk*Aの発現上昇が見られた。また、NGFによる分化促進作用が胎生17日と同様にみられる生後3日齢ラットの初代培養前脳基底野ニューロンを用いて、NGFによる$p75^{LNGFR}$の発現調節の可能性を調べたところ、NGFの添加後翌日から、$p75^{LNGFR}$mRNAの発現上昇が見られた。

ニューロンの分化、生存維持に重要な役割を持つ神経成長因子（NGF）は、中枢神経系では前脳基底野コリン作動性ニューロンに主に作用することが知られている[1]。一方、NGFの作用を細胞内に伝えるNGFレセプターには、低親和性レセプター（LNGFR）と高親和性レセプター（HNGFR）の2種類が存在し、最近、*trk*Aプロトオンコジーン産物がHNGFRを構成し、それと共に、HNGFRの機能発現に$p75^{LNGFR}$も必要であると考えられている[2]。ニューロンは“いつ”“どのような状況で”神経栄養因子に依存するのであろうか。この疑問に答えるためには、NGFレセプターの発現調節についての研究が重要となる。NGF添加により交感神経細胞様に分化するPC12hおよびPC12h-R細胞における$p75^{LNGFR}$の発現調節については既に報告した[3]。本研究では、NGFの添加によってコリン作動性ニューロンの分化促進作用がみられる胎生17日および生後3日齢ラットの初代培養前脳基底野ニューロンを用いて、NGFによる*trk*Aおよび$p75^{LNGFR}$mRNAの発現調節の可能性を調べた。

【実験方法】

胎生17日および生後3日齢ラット前脳基底野ニューロンの培養は既報に従った[1]。細胞はpolyethyleneimineコートしたプレートにまき、翌日NGFを添加した。培養細胞および前脳基底野組織からの全RNAの抽出後、*trk*Aおよび$p75^{LNGFR}$mRNAの検出および定量をRT(ReverseTranscription)-PCR法により行った。PCRプライマーは、*trk*A、*trk*B、$p75^{LNGFR}$およびβ-actinのmRNA由来のPCR産物が、それぞれ441、486、553、383bpになるように設定した。^{32}P-dCTP存在下でのPCR反応産物を5%アクリルアミドゲル上で電気泳動し、各PCR産物の定量をFUJIXBio-imaging Analyzer（フジフィルム社）を用いて行った[4]。

【結果と考察】

胎生17日、生後3日齢、2週齢、6週齢ラット前脳基底野組織から全RNAを抽出し、RT-PCR法（PCRサイクル数50サイクル）によって生成されたPCR反応産物を電気泳動し、エチジウムブロマイド染色で*trk*A、*trk*B、$p75^{LNGFR}$のmRNAの存在を調べた（図1）。その結果、*trk*Aは、胎生期において検出されず、生後にはじめて検出されたのに対し、LNGFRは胎生期からすでにその発現が認められた。また、*trk*Bの発現も観察された。前脳基底野コリン作動性ニューロンの海馬領域への投射は胎生17日頃から始まり、およそ生後2週齢で完了すること[5]、胎生17日から生後3日齢までのラット前脳基底野コリン作動性ニューロンのNGFによる分化の促進が特に初代培養系を用いて示されていることから[1]、この

*trk*Aの発現上昇にはコリン作動性ニューロンに対するNGFの作用が関係している可能性が考えられる。そこで、NGF添加によってコリン作動性ニューロンの分化が促進される胎生17日齢ラットの前脳基底野ニューロン初代培養を用いて、NGFを添加36時間後の*trk*Aの発現をRT-PCR法によって調べた（図2）。その結果、NGF無添加群に比べて、NGF添加群の方に*trk*Aの発現が見られた。つまり、NGFによって分化が促進される前脳基底野コリン作動性ニューロンの*trk*Aの発現はNGFによってup-regulationされる可能性が示唆された。このことから、前脳基底野コリン作動性ニューロンの成熟過程（投射過程）に合わせたこのような*trk*Aの発現上昇が起こることによって、海馬から与えられるNGFに依存するニューロンになるのではないかと考えられる。また、すでに胎生17日から前脳基底野での発現がみられている$p75^{LNGFR}$のmRNA発現も*trk*Aと同様にNGFによって調節されているかどうかを、生後3日齢ラット前脳基底野ニューロン初代培養を用いてRT-PCR法によって調べた（図3）。その結果、NGF添加後翌日から$p75^{LNGFR}$mRNAの発現上昇が見られた。レセプタータイプのチロシンキナーゼである*trk*Aと異なり、そのような構造を持たない$p75^{LNGFR}$はその生理的役割がまだ不明であるが、NGFによってup-regulationされていることから、NGFレセプターとしての役割を果たしている可能性が示唆される[2,4]。

【文献】

(1)Hatanaka, H., Tukui, H., and Nihonmatsu, I. *Dev. Brain Res.*, **39**, (1988) 85-95
(2)小島正己、池内俊彦、畠中寛　実験医学　**10**, (1992) 印刷中
(3)高橋信明、小島正己、池内俊彦、畠中寛　神経化学　**30**, (1991) 96-97
(4)Kojima, M., Takahashi, N., Ikeuchi, T. and Hatanaka, H. *Mol. Brain Res.* (1992) in press.
(5)Milner, T. A., Loy, R. and Amaral, D. G. *Dev. Brain Res.* **8**, (1983) 343-371

図1

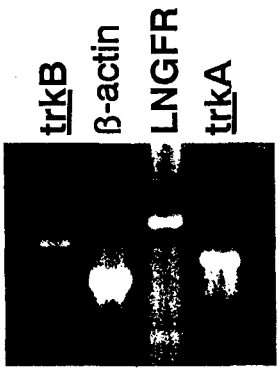


図2

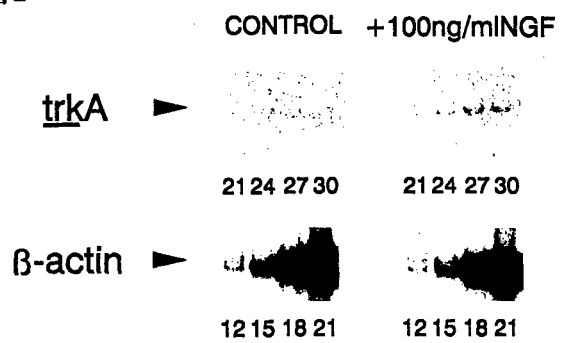


図3

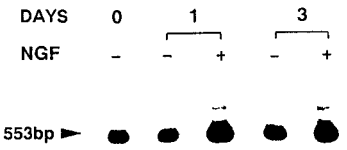


図1 生後2週齢ラット前脳基底野における*trk*A、*trk*B、$p75^{LNGFR}$、*β*-actin mRNAの発現

図2 初代培養ラット前脳基底野ニューロンにおける*trk*A mRNAの発現に対するNGFの効果 胎生17日齢ラットの初代培養前脳基底野ニューロンに100ng/mlのNGFを添加し、36時間後に全RNAを抽出した。RT-PCR反応の後、PCR反応産物を電気泳動し、FUJIX Bio-imaging Analyzerで解析した。レーン下の数字は、PCRのサイクル数である。

図3 初代培養ラット前脳基底野ニューロンにおける$p75^{LNGFR}$mRNAの発現に対するNGFの効果 生後3日齢ラットの初代培養前脳基底野ニューロンに100ng/mlのNGFを添加し、0、1、3日後に全RNAを抽出した。RT-PCRを行ないPCR産物の電気泳動後の553bpバンドを示す。

62 trk cDNAの神経細胞内導入による機能的NGF受容体の構築

松島宏，衛藤義勝，前川喜平，E.Bogenmann *
（慈恵医大・小児科，Childrens Hospital of LA* ）

〔要約〕
proto-oncogene trk のコードする蛋白(gp140^{trk}) が神経細胞内において、それ単独で神経成長因子(NGF)に対する機能的・高親和性受容体として作用するか否かを検討した。proto-oncogene trk cDNA の発現ベクターを内因性の低親和性 NGF受容体(L-NGFR; gp75 ^{LNGFR}) および trkのいずれも発現しないヒト神経芽細胞腫由来の細胞 HTLA230へトランスフェクションした。得られた stable transfectantクローン株は trk mRNA を発現しまた抗ヒトTRK 抗体を用いた FACS 解析において60% の細胞で細胞表面上にTRK の発現を認めた。transfectant の NGF短時間処置は immediate early response としての c-fos, c-jun, jun-B, jun-D の一過性の発現を引き起こした。しかし、この反応は蛋白キナーゼ阻害剤 K-252a の存在下では完全に抑制された。またtransfectant の NGF長期間処置では late response としての細胞増殖抑制を伴う神経突起の伸長が観察された。さらに、この形態学的分化は neurofilament(NF-L), MAP-2, ret proto-oncogene, GAP-43, smg p25A の mRNA の upregulationと、N-myc の downregulation とを伴うものであった。
以上の結果は、proto-oncogene trk が神経細胞内において、それ単独で NGFの機能的受容体として作用しうることを示唆するものである。

［目的］
NGF は末梢および中枢神経系における特定の神経細胞の分化・成長・維持に関与する neurotrophic factorの prototype をなすもので、その作用は細胞表面上に存在する特異的受容体(NGF receptor:NGFR) と結合することにより伝達される。さらに NGFR には Kd 値の異なる 2種類の受容体、すなわち低親和性と高親和性の受容体の存在が知られており、NGF の生物学的活性は全て後者を介して伝達されると考えられている。これまで我々は p75^{LNGFR} cDNAの神経細胞内へのトランスフェクションが適切な細胞内および細胞外環境下では細胞表面上に機能的・高親和性 NGFR を構築することを報告してきた（2）。
しかし最近になって、全く別の膜貫通性蛋白 gp140^{trk} が NGFの直接の受容体であり、NGF と gp140^{trk} との結合が NGF情報伝達の第一ステップであることが報告されるにおよび、神経細胞において、gp75^{LNGFR} と gp140^{trk} の両者どのように関与して機能的 NGF/NGFR カスケードを構築するのかが最大の疑問となってきた（1）。そこで本研究では神経細胞内に発現されたproto-oncogene trk がgp75^{LNGFR} の関与なしで、すなわちそれ単独で機能的 NGFR として作用するか否かを検討する目的で以下の実験を行った。

［方法］
ヒト神経芽細胞腫より樹立された細胞株 HTLA 230 （3）は N-myc 遺伝子の増幅・過剰発現を示し、またこの細胞株はgp75^{LNGFR} および gp140^{trk} のいずれも発現していない（4）。2.7-kb ヒトproto-oncogene trk cDNAをネオマイシン耐性遺伝子と同一コンストラクト上に有する真核細胞発現ベクターをHTLA 230細胞内へトランスフェクションし、G418(1mg/ml)の存在下で培養。2～3週間のセレクションの後、G418耐性コロニーの中から、trk 発現コロニーを Northern 解析によって選択し、クローニングを行った。以降の実験には得られたクローン中，trk mRNA 発現の高度な2～3のクローンにつき解析を行った。なお stable transfectant の NGF応答性の検討に際しては、適切な細胞外環境が必要であることから、細胞をラット平滑筋細胞($R_{22}C1$-F) によって産性された生物学的マトリックス上で維持し、実験を行った（2）。

[結果]

Northernブロットにおいて、Mock transfectant では trk mRNA は全く検出されなかったが、stable transfectant では内因性 trkに比してやや大きなサイズの trk mRNAが認められた。これは用いた発現ベクターのコンストラクトに由来するものであり、このとは逆に発現した trk mRNA がトランスフェクションに伴う内因性 trk の活性化によるものではないことを意味する。また抗ヒトtrk 抗体を用いた間接蛍光抗体法(FACS)では transfectant の約60% の細胞で、細胞表面上にTRK の発現が認められた。

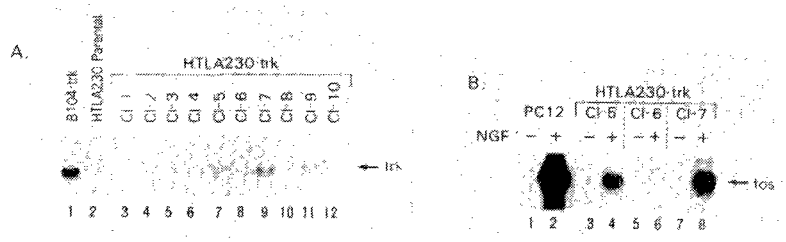
次いで、発現した TRKが機能的であるか否かを検討するため、stable transfectant の NGF処置に伴う変化を観察した。NGF 投与後40分で stable transfectant は c-fos, c-jun, jun-B, jun-D 等の immediate early gene の一過性の発現を示した。さらに late responseについて検討する目的からstable transfectant を R_{22} Cl-F matrix 上で、NGF(100ng/ml) 存在下に7-10間培養したところ、transfectantは細胞増殖の抑制を伴う形態学的分化を示した。また、この間、経時的に行ったRNA の抽出・Northern ブロットにおいて、transfectantでは形態学的分化に伴い NF-L, MAP-2, rct proto-oncogene, GAP-43, smg p25Aの mRNA の発現誘導を認めた。なお Mock transfectantでは NGF 処置に伴う early response, late response は全く見られなかった。さらに、NGF 処置に伴い、transfectantでみられた N-myc の過剰発現は downregulation されており、これらのことは NGF 処置が、単に形態学的のみならず分子レベルにおける transfectant の分化誘導をも引き起こしたことを意味する。

[考察]

本研究において 我々は内因性の$gp75^{LNGFR}$ および $gp140^{trk}$ のいずれも発現していない神経芽細胞腫株HTLA 230 内へヒト proto-oncogene trk をトランスフェクションし、stable transfectant を樹立した。得られたtransfectantは細胞表面上に $gp140^{trk}$ を発現し、NGF 処置に引き続いて、機能的 NGF/NGFR カスケードの構築を示唆する immediate early response および late response を示し、結果として悪性腫瘍細胞は形態学的／分子レベルでの分化へと誘導された。このことは神経系細胞において、トランスフェクションされた proto-oncogene trkが、それ単独で、すなわち$gp75^{LNGFR}$ の関与なしで機能的 NGFR として作用しうることを意味する。さらに得られた神経芽細胞腫 transfectant が NGF処置に引き続いて細胞増殖の抑制を伴う真の分化へと導かれたことは NGF/NGFR カスケードが腫瘍抑制活性を有することをも示唆する。

[文献]

(1)Bothwell, M. (1991) Cell 65, 915-918.
(2)Matsushima, H., and Bogenmann, E. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 5015-5020.
(3)Matsushima, H., and Bogenmann, E. (1992) Int. J. Cancer 51, 250-258.
(4)Matsushima, H., and Bogenmann, E. (1992) Methods in Neurosci. in press.



Northern blot analysis of trk(A) and c-fos(B) transcripts in HTLA 230 transfectans

63 NB－OK１細胞におけるNaFの神経突起成長調節作用

八木－中川勇三，大金信夫，斉藤康成，藤沢悦子，鬼頭直美，中村博
（雪印・生物科学研究所・神経化学グループ）

〔要約〕ニューロブラストーマNB－OK１細胞を用いて、フォルスコリン－誘発神経突起成長に対するNaFの効果を調べた。NaFは、フォルスコリン－誘発神経突起成長に対して濃度依存性の抑制を引き起こした（IC_{50}値 ＝ 7 mM）。サイクリックAMP含量，イノシトールリン酸蓄積およびアラキドン酸遊離に対して、NaFは顕著な変化を引き起こさなかったが、一方、細胞内Ca濃度に対しては上昇作用を示した。NaFによる神経突起成長抑制作用は、Mn^{2+}に感受性を示し、nifedipine，ω-conotoxin およびNi^{2+}に非感受性であった。以上の結果より、NaFによる神経突起成長抑制作用の少なくとも一部は、L-，N-，T- 型以外のMn^{2+}感受性カルシウムチャネルを介している可能性が示唆された。

〔はじめに〕

神経突起成長（neurite outgrowth）に対して、ある種のペプチド性ホルモンや神経伝達物質が調節作用を示すことが近年報告され、神経可塑性の観点から注目されている（6）。しかし、その調節作用の詳細なメカニズムについては不明な点が多い。我々はすでに、フォルスコリンで誘発される神経突起成長がG－タンパク質とカップルしたレセプターを介して調節される現象を神経系細胞NB－OK１で見つけている（１２）。そこで今回は、G－タンパク質の直接的活性化剤としてFイオンが指摘されているので（１）、神経突起成長に関連するシグナル伝達経路を理解する意味からもNaF効果の検討を行った。

〔実験方法〕

NB－OK１細胞の培養：ヒトニューロブラストーマNB－OK１細胞は、矢内原昇教授（静岡県立大）の御好意により提供された。NB－OK１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，37°C で培養した。形態変化の観察：実験にはプラスチックディシュ(Falcon 3002) を用い、グルタルアルデヒド(2%)固定後、顕微鏡下で観察された細胞形態変化をポラロイドカメラで撮影した。神経突起形成率および反応条件は、既報（１２）の方法に準じて行った。サイクリックAMP含量の測定：細胞を、20 mM Hepes，0.1 mM IBMXを含むDMEM液でプレインキュベーション後、既報（１２，１３）の条件に準じて行った。イノシトールリン酸の測定：^{3}H-myo-inositol (1 μCi/ml)を加え20時間ラベルしたNB－OK１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、NaFを加え45分間反応させた。６%TCAによる反応停止後、既報（９，１１，１２）の条件に準じて行った。アラキドン酸遊離の測定：^{3}H-arachidonic acid(0.1 μCi/ml)を加え20時間ラベルしたNB－OK１細胞を、20 mM Hepes を含むDMEM液で４回洗浄した後、Dumuisらの方法（２）に準じて行った。細胞内Ca濃度の測定：ポリリジンコーティング上で培養した細胞をFura-2/AM(20 μM) でラベルした後、バッファー(130 mM NaCl，5.4 mM KCl，1.8 mM $CaCl_2$，5.5 mM glucose，20 mM Hepes-NaOH;pH 7.3) に置換し、既報（１２）の条件に準じて行った。

〔実験結果〕

NB－OK１細胞において、NaFは濃度依存性のフォルスコリン(10 μM)-誘発神経突起成長抑制を引き起こし、そのIC_{50}値は約 7 mMを示した（図１）。フォルスコリンは、アデニレートサイクレースに対する直接的活性化剤として知られ（１４）、その結果増大したサイクリックAMPが神経突起成長に関与するメカニズムが考えられているので（１０）、サイクリックAMPに対する影響を調べた。図２Aに示すように、NaF(10 mM) は、basal 値およびフォルスコリン(10 μM)-誘発された値に対しても影響を示さなかった。次に、フォスフォリパーゼCおよびA_2 に対する影響を調べる目的で、NaF(10 mM) 刺激によるイノシトールリン酸蓄積およびアラキドン酸遊離をみた。図２B－２Cに示すようにそれぞれのアッセイ系のポジィティブコントロールである carbachol(100 μM) または melittin (1 μg/ml)による明確な刺激効果が認められたが、一方、NaF(10 mM) は顕著な変化を引き起こさなかった。G－タンパク質がある種のCaチャンネルとカップルしている場合があるので（４，５）、細胞内Ca濃度に対する影響を調べた。図３に示すように、NaF(10 mM) は顕著な$[Ca^{2+}]_i$上昇作用を示した。またその作用は、Ca-free/1mM EGTA条件下で検出することはできなかった。そこで次に、神経突起成長に対する各種カルシウムチャンネル阻害剤の影響を調べた（図４）。フォルスコリン－誘発神経突起成長に対するNaF(10 mM) の抑制効果は、10 μM nifedipine(L型),

1 μMω-conotoxin（N型）および1 mM $NiCl_2$（T型）前処理による影響を受けなかったが、一方、$MnCl_2$ (1 mM)前処理によってNaFによる神経突起抑制効果が顕著に阻害された。

〔考察〕

Gタンパク質活性化の目的でGTPアナログ効果を調べるには、細胞をサポニンやストレプトリジンO処理でGTPアナログを透過させる必要性がある。しかし、神経突起成長現象を解析するには無傷の細胞状態で解析すること望まれる。今回我々は、フォルスコリン一誘発神経突起成長に対してNaFが抑制効果を示すことをヒト神経系細胞で認めた。直接的G－タンパク質活性化剤による神経突起成長調節作用についての報告はなく今回が最初の報告である。Fイオンの G－タンパク質活性化の本体はAlF_4^-である可能性が示唆されているが（1）、今回の神経突起成長抑制作用に関しては$AlCl_3$添加してもNaFの効力に差が認められなかった。AlF_4^-生成に必要な微量アルミニウムが、NB－OK1細胞に内在しているのかもしれない。NaFによるアデニレートサイクレース，フォスフォリパーゼCおよびフォスフォリパーゼA_2の活性化については、異なる細胞・組織標品で報告されているが（3，7，8，15）、NB－OK1細胞においてはいずれの酵素にも顕著な変化を引き起こさなかった。しかし、NaF刺激によって$[Ca^{2+}]i$の上昇が認められた。この$[Ca^{2+}]i$上昇効果は外液Caを除いた条件下では認められず、細胞外のCaイオンに依存したものであった。一方、細胞内カルシウムが神経突起成長に対して調節作用を発現する重要な因子であることが示唆されている（6，12）。特に、イノシトールリン脂質代謝応答とカップルしたレセプター刺激の場合は、TMB－8感受性を示す細胞内貯蔵部位からのカルシウム動員が重要な役割を示すことが明らかとなっている（12）。今回の実験でのNaFによる神経突起成長抑制効果がMn^{2+}に感受性を示し、nifedipine, ω-conotoxin およびNi^{2+}に非感受性であったことから、NaFの神経突起成長抑制作用メカニズムの少なくとも一部は、L型，N型，T型以外のMn^{2+}感受性を示すカルシウムチャンネルを介している可能性が示唆された。

〔文献〕

1) Bigay,J.,Deterre,P.,Pfister,C.,and Chabre,M.(1985) FEBS Lett.191,181-185.
2) Dumuis,A.,Pin,J.P.,Oomagari,K.,Sebben,M.and Bockaert,J.(1990) Nature 347,182-184.
3) Guillon,G.,Mouillac,B.and Marine-Noelle,B.(1986) FEBS Lett.204,183-188.
4) Hescheler,J.,Rosenthal,W.,Trautwein,W.and Schultz,G.(1987) Nature 325,445-447.
5) Holz IV,G.G.,Rane,S.G.and Dunlap,K.(1986) Nature 319,670-672.
6) Kater,S.B.and Guthrie,P.B.(1990) Cold Spring Habor Symposia on Quantitative Biology LV,359-370.
7) Litosch,I.(1987) Biochem.J.244,35-40.
8) Marc,S.,Leiber,D.and Harbon,S.(1988) Biochem.J.255,705-713.
9) Nakagawa,Y.and Baudry,M.(1989) Neuroscience 32,363-369.
10) Nakagawa,Y.and Ishihara,T.(1988) Brain Res.439,11-18.
11) Nakagawa,Y.,Saitoh,K.,Ishihara,T.,Ishida,M.and Shinozaki,H.(1990) Eur.J.Pharmacol.184,205-206.
12) Nakagawa-Yagi,Y.,Saito,Y.,Takada,Y.and Nakamura,H.(1992) Biochem.Biophys.Res.Comm.182,45-54.
13) Nakagawa-Yagi,Y.,Saito,Y.,Takada,Y.and Takayama,M.(1991) Biochem.Biophys.Res.Comm.178,116-123.
14) Seamon,K.B.and Daly,L.W.(1986) Adv.Cyclic Nucl.Protein Phosphorylat.Res.29,1-150.
15) Strnad,C.F.,Parente,J.E.and Wong,K.(1986) FEBS Lett.206,20-24.

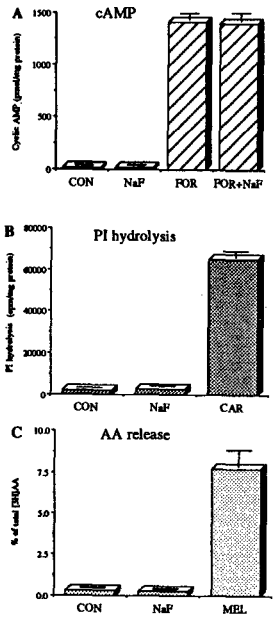


図2．サイクリックAMP含量(A)，イノシトールリン酸蓄積(B)，アラキドン酸遊離(C) に対するNaF効果

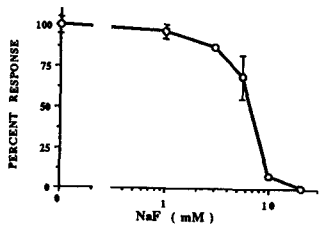


図1．フォルスコリンで誘発される神経突起成長に対するNaF効果の濃度依存性曲線

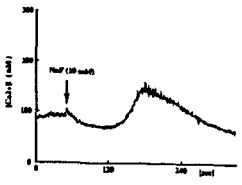


図3．細胞内Ca濃度に対するNaF効果

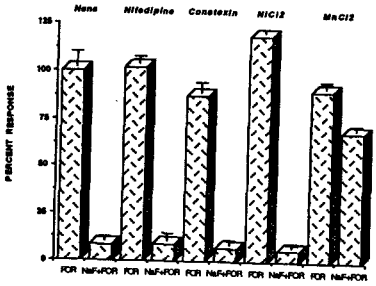


図4．NaFによるフォルスコリン一誘発神経突起成長に対する各種カルシウムチャンネル阻害剤の効果

64 ミクログリア産生プラスミノーゲンの作用

－ニューロン上のプラスミノーゲン結合蛋白の検出－

中嶋一行，永田晃一，濱之上誠，竹本なぎさ，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(Mic-CM)にプラスミノーゲンの存在を認めた。ウロキナーゼ存在下のザイモグラフィーおよびラットプラスミノーゲン抗血清を使用したウェスタンブロット法において、分子量約90kDaにプラスミノーゲンのバンドを検出した。このMic-CM中のプラスミノーゲンは^{35}S-メチオニンによるラベルとその後の免疫沈降法により、ミクログリアで生合成された後分泌されることが示された。次にミクログリア由来プラスミノーゲンのニューロンへの作用を想定して、精製プラスミノーゲンを培養ニューロンへ添加しその効果をみた。その結果、大脳皮質ニューロンでは突起の伸長が、また中脳ニューロンではドーパミンの取り込みが促進することが明らかとなった。このような作用はニューロンの膜上に存在するプラスミノーゲンレセプターを介していると推定されたため、リガンドブロット法を使用して、結合タンパクの探索を行った。胎生16日のラット脳より分離した大脳皮質ニューロンおよび脳のホモジネートにはプラスミノーゲンを結合するタンパクが検出された。以上の結果は、ニューロン膜上にはプラスミノーゲンの特異的レセプターが存在する可能性を強く示唆している。

昨年我々はMic-CMにウロキナーゼ(UK)型プラスミノーゲンアクチベーター(uPA)の存在を認めそれが分泌性であることを報告した[4]。この結果はuPAの特異的基質であるプラスミノーゲンもuPA同様分泌される可能性を推測させるものであった。そこでザイモグラフィーおよびウェスタンブロット法によりMic-CMを分析したところ、分子量約90kDaにザイモーゲンが存在することを認めた。我々は以前よりミクログリアのニューロンの生育に対する役割に注目しており、ミクログリア由来の神経栄養因子を探索してきた[2]。今回同定したプラスミノーゲンのニューロンへの作用を検討したところ、ラット大脳皮質ニューロンに対しては突起伸展作用を、中脳ニューロンに対してはドーパミン取り込み活性を促進させた[1]。これらプラスミノーゲンの作用はニューロン上のレセプターを介している可能性が考えられたことから、今回はこの点について生化学的に検討した結果を報告する。

［方法］

ミクログリアの分離とMic-CMの調整法[2-4]は既に報告した。Mic-CMは血清の影響を除去するために無血清のDMEMを使用して得ている。大脳皮質ニューロンおよび中脳ニューロンは胎生16日のラットより分離し、10%FCSを含む培地を用いて高密度(10^6 cells/cm^2)に培養した。プラスミノーゲン検出用のザイモグラフィーには２%カゼイン、１U/mlのUKを含む１%アガロースゲルを使用した。ラットプラスミノーゲンはラット血漿よりLysine-SepharoseおよびSephadex G-150を使用して精製した。またこの標品をウサギに免疫することによりプラスミノーゲンの抗血清を得た。プラスミノーゲンレセプターの検索は、ビオチン化プラスミノーゲンおよびストレプトアビジン-HRPを使用したリガンドブロット法により行った。

［結果および考察］

昨年報告したようにミクログリアの分泌するセリン型プロテアーゼのひとつとしてuPAを同定したが、その特異的基質であるプラスミノーゲンも探索の結果Mic-CM中に検出された（図１）。培養時間と共にその分泌量が増加した。このプラスミノーゲンはミクログリア自身で合成された後細胞外に分泌されることは^{35}S-メチオニンによるラベルとその後のラットプラスミノーゲン抗血清を使用した免疫沈降法により確認した。

ミクログリア由来のプラスミノーゲンの役割を検討するために培養ニューロンに精製プラスミノーゲンを添加しその作用を観察した。その結果、ラット大脳皮質ニューロン（アグリゲートカルチャー）に対しては突起の伸

長を促進させることが認められた（図2）。この効果はプラスミンの阻害剤であるα_2-アンチプラスミンおよびP-nitrophenylguanidinobenzoateで抑制された。また既に報告したように中脳ニューロンに対してはドーパミンの取り込み活性を促進させる作用を示した[1]。これらの現象はプラスミノーゲンがニューロン上の特異的な結合蛋白に結合し、細胞内へシグナルを伝達することを推測させた。そこでその存在を明らかにする目的で胎生16日のラット脳より分離、培養したニューロンを用いてプラスミノーゲン結合蛋白の探索を行った。図3にはニューロンホモジネートを用いてリガンドブロットを行った結果を示した。多くの蛋白バンドが存在するのにも関わらず（レーン1）ビオチン化プラスミノーゲンは特定の蛋白と強く結合した（レーン2）。この結合はリジンのアナログである6-amino caproic acid (6ACA)の共存により検出されなくなること（レーン3）から、プラスミノーゲンと結合蛋白の結合はリジン結合を介していると推測された。この結果は、プラスミノーゲンはニューロンの特定の蛋白に結合することを示しており、特異的レセプターの存在を強く示唆している。現在、細胞膜に局在する結合蛋白の分離精製を進めている。

［文献］

1. Nagata K, Takei N, Nakajima K and Kohsaka S. Jpn. J. Pharmacol. 58(S1) 146 (1992)
2. Nakajima K, Hamanoue M, Shimojo M, Takei N and Kohsaka S. Biomed. Res. 10(S3), 411-423 (1989)
3. Nakajima K, Shimojo M, Hamanoue M, Ishiura S, Sugita H. and Kohsaka S: J. Neurochem. 58, 1401-1408 (1992)
4. Nakajima K, Tsuzaki N, Shimojo M, Hamanoue M and Kohsaka S: Brain Res. 577, 285-292 (1992)

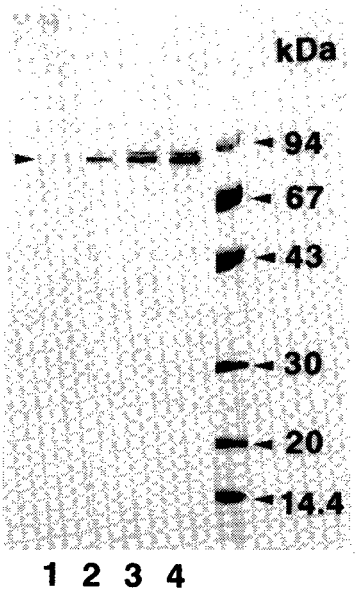


図1 Mic-CM中のプラスミノーゲンの検出。ミクログリア(4×10^5)を6 well プレートに播種した。
1. 0h
2. 12h
3. 24h
4. 48h

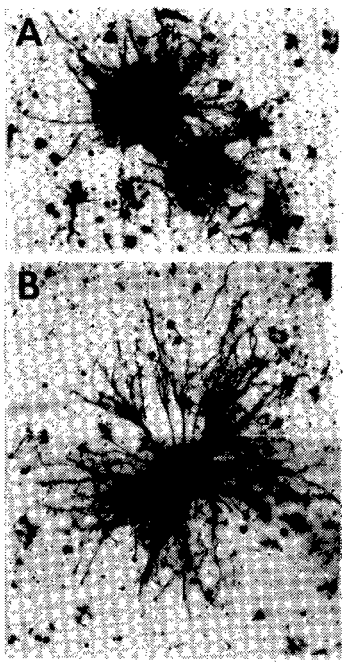


図2 ラット皮質ニューロンに対するプラスミノーゲンの作用
A. コントロール
B. 0.1 μMラットプラスミノーゲン添加

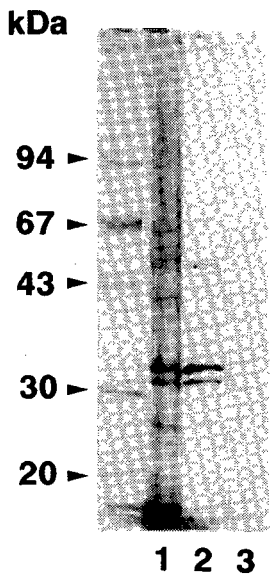


図3 リガンドブロットによるプラスミノーゲン結合タンパクの検出
1. タンパク染色
2. ビオチン化プラスミノーゲンの結合
3. 0.1M 6ACA存在下のビオチン化プラスミノーゲンの結合

65 マウスミクログリアでのＩＬ－２受容体発現による増殖と活性化

澤田誠、 錫村明生、 丸野内棣
藤田保健衛生大総医研応用細胞、 神経内科

中枢神経系は免疫系から独立していると考えられているが、相互に影響している可能性もある。T細胞因子であるインターロイキン２(IL-2)を導入したトランスジェニックマウスで脳内に大きな影響が見られることが報告されていることから、今回我々はマウス培養グリア細胞でIL-2受容体の発現を調べた。マウス脳混合グリア培養より分離精製した３種類のグリア細胞のいずれに於いてもIL-2受容体の発現はみられなかったが、ミクログリアをリポポリ多糖で活性化することによりIL-2受容体のmRNAを誘導することができた。この誘導によりミクログリアはIL-2に応答して増殖及び活性化されることがわかった。ミクログリアの増殖は0.2-200ミリユニットのマウスリコンビナントIL-2においてみられ、これはBrdUの取り込みによって確認できた。また、この増殖は抗IL-2受容体抗体によって抑制された。IL-2の作用はM-CSFやGM-CSFとは異なった機構を介したもので、IL-2特異的な応答であることが考えられる。以上の結果は脳内で活性化されたミクログリアがT細胞によりIL-2を介して制御される可能性を示しており、中枢神経系と免疫系の相互作用を考える上で重要な現象であると思われる。

[目的]

ミクログリアは中枢神経系のサイトカインネットワークにおいて中心的な役割を果たす細胞の一つで、いろいろなサイトカインを産生するほか、他の細胞が産生するサイトカインによってその活性を調節される(4,7-10,13)。このネットワークは免疫系とは独立して働いているが、その機能も免疫系の細胞の増殖や活性化を調節することとは異なった役割を持っていると考えられる。しかし免疫系で産生されるサイトカインによりミクログリアやアストロサイトが活性化されるという相互調節の機構も存在するらしい。このうちインターロイキン２(IL-2)はT細胞により産生され、T細胞自身の増殖を促進する因子として発見された(5)が、神経系に対しても作用を有するらしく、オリゴデンドロサイトの増殖を促進したり(4)、IL-2遺伝子を導入したトランスジェニックマウスで脳に変性が生じたり(3)することが報告されている。そこで今回我々はIL-2の神経系に対する役割を調べるためにマウス脳より調製した培養グリア細胞を用いてIL-2受容体の発現やその作用について検討した。

[方法]

ミクログリア、アストロサイト、およびオリゴデンドロサイトは新生マウス脳より調製した混合グリア培養から既報の方法で分離した(8,9,12)。各種薬物やサイトカインによる細胞の刺激は、培地交換後にそれぞれを添加して規定の時間培養して行った。IL-2によるミクログリアの増殖の測定については100ng/mlのリポポリ多糖で12時間処理したミクログリアを培地交換後マウスリコンビナントIL-2を加えさらに３日間培養後に、MTT法(9)およびBrdU法により行った。同様に処理したミクログリアについて酸性ホスファターゼ活性とNBT還元能についても定量した。各処理を行ったミクログリアより酸性グアニジン－フェノール法(2)によりRNAを抽出してRT-PCRによりマウスIL-2受容体α鎖のmRNA発現を検索した。

[結果]

３種類の精製グリア細胞においてはマウスIL-2受容体α鎖のmRNAは検出できなかったが、リポポリ多糖で刺激したミクログリアでは発現がみられた。IL-2は無刺激のミクログリアやアストロサイトには影響を及ぼさないがリポポリ多糖で刺激したミクログリアでは増殖の促進、酸性ホスファターゼ活性の上昇、および活性酸素ラジカル産生の増大がみられた。IL-2の増殖促進効果は0.2ミリユニットから用量依存的に増大し(Fig.1)、またこれはT細胞でIL-2の作用を阻害することがわかっている抗IL-2受容体β鎖モノクローン抗体で阻害された(Fig.2)。この抗体はM-CSFによるミクログリアの増殖には影響しなかった。IL-2依存性の増殖ではミクログリアはアメーバ状の形態を保持したまま増殖し、M-CSFやGM-CSFの増殖でみられる特徴的な形態変化(rod-shape,13)とは異なっていた。

[考察]

IL-2は元来T細胞増殖因子として発見されたが、最近では単球系の細胞に作用してサイトカイン産生の増大などの活

性化を引き起こすことが報告されている(6)。ミクログリアは単球ーマクロファージ系の細胞の一つであるが、これまではIL-2による活性化やIL-2受容体の発現については知られていなかった。今回我々は活性化ミクログリアがIL-2受容体のα、βtanをともに発現してIL-2によるシグナルを受容し、増殖能や機能を調節されることを示した。これはミクログリアが単球系の性質を持つことを支持するものである。しかしミクログリアは単球ーマクロファージとは以下の点で異なることも明らかとなった。①静止状態のミクログリアはIL-2受容体を発現していない。②単球ではIL-2は増殖を促進しない。③ミクログリアではIL-2はサイトカイン産生を増大しない。このうち②については、M-CSFが欠損しているop/opマウスにおいて単球ーマクロファージの数が激減しているのに対しミクログリアは正常数を保持していると言う事実(1)と考え合わせると興味深い。即ち、ミクログリアは単球ーマクロファージとは異なりM-CSFに依存しない増殖促進機構を持つ可能性があるということである。またミクログリアがIL-2依存的に増殖する場合、既報のCSF類による増殖(10)とは異なる細胞内メカニズムを介している可能性もある。両細胞の起源や発生、生体内での役割を考える上で重要な点であろう。

今回の成績は免疫系による神経系細胞の調節という点に於いても重要と思われる。ミクログリアは神経系にウイルスなどの異物が侵入したり神経細胞やその他の細胞が変性を起こしたりすると活性化されその部位に集まることが知られているが、このときに活性化T細胞がその部位に存在するか、IL-2濃度が上昇していればミクログリアが増殖し効率よく炎症反応などの局所免疫反応を行うことができることになる。しかもこの場合ミクログリアはアメーバ状の形態となり、活性化状態にあると考えられる。さらにミクログリアはCD4抗原を発現している(11)ことから、活性化T細胞とミクログリアの相互作用によってHIVなどの脳内感染のメカニズムをある程度説明できるかも知れない。

[文献]

1 Cechini MG et al. (1992) Calcified Tissue Int. 50:A36.
2 Chimczynski P and Sacchi N (1987) Analyt Biochem 162:156.
3 垣生園子　神経進歩　(1991) 35:44.
4 Merrill JE (1987) Immunol Today 8:146.
5 Morgan DA et al. (1976) Science 193:1007.
6 Musso T et al. (1992) J Immunol 148:795.
7 Ohno K et al. (1990) BBRC 169:719.
8 Sawada M et al. (1989) Brain Res 491:394.
9 Sawada M et al. (1990) Brain Res 509:119.
10 Sawada M et al. (1992) Brain Res in press.
11 澤田誠　他　(1992) 生化学大会号、印刷中.
12 Suzumura A et al. (1984) Brain Res 324:379.
13 Suzumura A et al. (1990) J Neuroimmunol 30:111.

Fig. 1

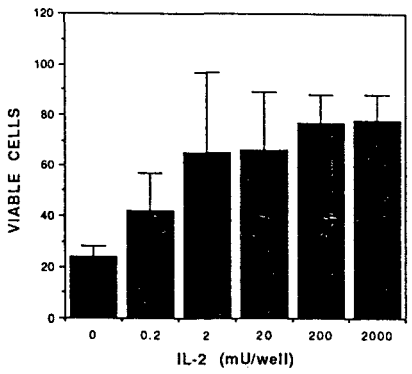
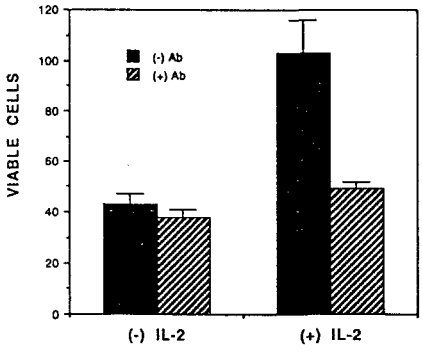


Fig. 2



66 神経突起伸展因子受容体（ＮＯＦＲ）のｃＤＮＡクローニング

○平英一、高羽夏樹、谷浦秀夫、郭　哲輝、三木直正　（大阪大・医・第一薬理）

〔要約〕

私達はすでに神経突起伸展因子（NOF）に対する受容体(NOFR)を、ニワトリ砂嚢平滑筋から精製している。NOFR は約82kDaの糖タンパク質であり、砂嚢の他に網膜視神経、毛様体神経節や小脳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、複数の陽性クローンを得、その塩基配列を決定した。その結果、既知の塩基配列とはホモロジーは見られなかった。アミノ酸配列では高いものでSC1と30%程度のホモロジーしか見られなかった。アミノ酸配列の解析からNOFRはイムノグロブリンスーパーファミリーに属する新しい膜タンパク質であると思われる。

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）を精製している(1)。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わかっている。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、小脳、毛様体神経節などにも分布することが明らかになった(4)。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砂嚢平滑筋のλgt11 cDNA ライブラリーからクローニングを行った。

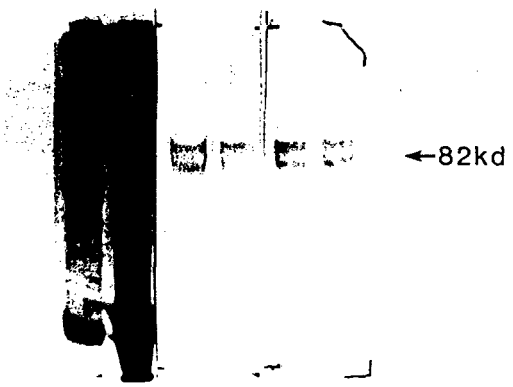
［方法］

1. 精製された NOFR に対して作られた抗体を用いて、ニワトリ砂嚢平滑筋のλgt11 cDNA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一部を用いて同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(5)に従った。
4. ノーザンブロット解析により、mRNAのサイズを決定した。また組織分布を調べた。

［結果と考察］

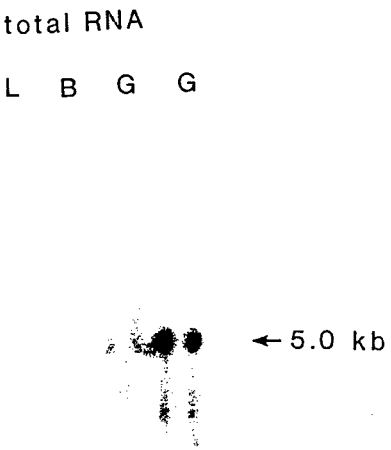
抗 NOFR 血清を用いて、ニワトリ砂嚢平滑筋λgt11 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、複数の陽性クローンを得た。得られたクローンが目的とする蛋白質であるかどうかを同定するためにエピトープ選択法を行った。ニトロセルロース膜上のIPTGで誘導された融合蛋白質と抗NOFR血清を反応させ、特異的に吸着している抗体だけを酸性溶液で溶出した。この抗体を用いてイムノブロットを行うと砂嚢筋の82kDa蛋白質と反応した（図１）。しかし、非免疫血清で行っても反応は見られなかった。このことから得られたクローンは NOFR をコードしていると思われる。ノーザンブロット解析よりmRNAは約5.0kbと思われる。また孵化後のニワトリにおいては、NOFR は脳、肝臓などでは発現していないことがわかった（図２）。塩基レベルでは他の既知のタンパク質とはホモロジーは見られなかった。

決定した塩基配列から推定されるアミノ酸配列では約50残基ごとにシステイン残基がみられる部分が存在した。これはイムノグロブリンに特徴的であり、NOFRはイムノグロブリンスーパーファミリーに属すると思われる。アミノ酸レベルではやはりイムノグロブリンスーパーファミリーに属するNCAM、SC1などの接着分子と約20%から30%程度の低いホモロジーが見られた。NOFR は細胞外マトリクス物質であるNOFに対するリセプターとして見つかっており、ヘテロフィリックな結合をする。これは他のイムノグロブリンスーパーファミリーに属する接着分子がホモフィリックな結合をするのとは異なり、特徴的である。



（図１）ニワトリ砂嚢平滑筋のイムノブロット

m　マーカー
a　ＣＢＢ染色
b　エピトープ選択抗体によるイムノブロット
c　抗ＮＯＦＲ血清によるイムノブロット



（図２）ノーザンブロット解析

L　肝臓
B　脳
G　砂嚢
G　砂嚢 polyA

(1) Hayashi Y. and Miki,N. (1985) J.Biol.Chem. 260 14269
(2) Taniura H., Hayashi Y. and Miki N. (1988) J.Neurochem. 50 1527
(3) Taniura H., Kuo C-H., Hayashi Y. and Miki N. (1991) J.Cell Biol. 112 313
(4) Kato S. et al (1992) Neuroscience Letter 140 78
(5) Weinberger C. et al (1985) Science 228 724

67 ヒトグリア細胞増殖抑制因子、グリオスタチンの構造解析と神経栄養因子活性

Yaman Eksioglu[1]、浅井清文[1]、平野淳史[2]、磯部一郎[1]、中西圭子[1]、加藤泰治[1]
(名古屋市立大学医学部・分子医学研究所生体制御部門[1]、小野薬品[2])

〔要約〕

Von Recklinghausen氏病患者より得られた神経線維腫中に存在するヒトグリア細胞増殖抑制因子、グリオスタチン(Gliostatin)の構造を明らかにするために、精製したグリオスタチンをトリプシンで消化し得られたペプチドのアミノ酸配列を調べた。その結果、N末端と12個のトリプティックペプチドのアミノ酸配列は、血小板由来血管内皮細胞増殖因子（Platelet-derived endothelial cell growth factor: PD-ECGF）のアミノ酸配列と全て一致した。ヒト胎盤より精製したPD-ECGFと、神経線維腫より得られたグリオスタチンを用いて、グリア細胞増殖抑制因子活性、血管内皮細胞増殖促進活性を測定したところ、どちらもほぼ同じ活性を示した。さらに、ラット胎児大脳皮質ニューロンの培養系にグリオスタチンおよびPD-ECGFを添加したところ生存維持活性と突起伸展活性を示した。

［はじめに］

神経線維腫中に存在するヒトグリア細胞増殖抑制因子、グリオスタチン(Gliostatin)は、グリア細胞、及びグリオーマ細胞の増殖を抑制し、神経芽腫細胞の増殖には影響を与えない蛋白性の因子である[2,3]。我々は、このグリオスタチンを5ステップのカラムクロマトグラフィーにて比活性で約800倍まで精製し、またこの活性を抑制するモノクローナル抗体を作成し、分子量約50Kの蛋白質であることを明らかにした。この精製グリオスタチンを使用し、部分アミノ酸配列の決定を試みた。また、新たにグリオスタチンのラット皮質ニューロンに対する神経栄養因子活性を見いだしたので報告する。

［方法］

1、アミノ酸配列決定法：グリオスタチンを神経線維腫より精製し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法にて分離後、PVDF膜に転写した。ポンソー3Rにて染色しバンドを確認後切り取り、一部はそのままN末端のアミノ酸配列決定に使用し、残りは、トリプシンにてin situ digestionを行なった。酵素消化物を逆相カラム（μRPC C2/C18、SMART system）にて分離し、自動アミノ酸シークエンサーにて配列決定を行なった。

2、胎盤からのグリオスタチン精製法：胎盤を20mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）中でホモジェネートし、塩析にて28%～45%の画分を得た後、DEAE-Sephacel、Phenyl-Sepharose、hydroxylapatite、Mono-Qを使用し精製した[1]。

3、生物活性測定法：グリア細胞増殖抑制活性は、第33回本学会にて報告したように、ラットアストロサイトーマ細胞C6を用いて[^{3}H]-チミジンの取り込みによって測定した。血管内皮細胞増殖促進活性は、ウシ大動脈血管内皮を用い[^{3}H]-チミジンの取り込みによって測定した[1]。

4、神経栄養因子活性測定法：ラット胎児（E16）より大脳皮質を分離しパパインにて細胞を分散した後、ポリリジンでコートした48well dishにまいた。24時間後各種濃度のグリオスタチンまたはPD-ECGFを添加しさらに7日間培養し、神経突起を伸ばしている細胞を数えるとともに、ニューロフィラメント量を酵素抗体法にて定量した。

［結果と考察］

1、神経線維腫より精製したグリオスタチンのN末端と12個のペプチドの配列が決定でき、ホモロジー検索の結果、PD-ECGFのアミノ酸配列と一致した。（N末端と12個のペプチドで全配列の約20%を占めている。）

2、胎盤より精製したPD-ECGFは、神経線維腫より精製したグリオスタチンとSDS-PAGE上同じ位置に泳動され、western blotでもグリオスタチンに対するモノクローナル抗体で同様に染色された。生物学的活性を測定したところ、グリア細胞増殖抑制活性は、神経線維腫から精製したものと胎盤より精製したものでほぼ同じ濃度-反応曲線を示し、ID_{50}=1.3nMであった（図1）。血管内皮細胞増殖促進活性でもほぼ同じ濃度-反応曲線を示し、EC_{50}=1.0nMであった（図2）。これら活性は、抗グリオスタチンモノクローナル抗体で阻害された。以上の結果より、グリオスタチンとPD-ECGFは同一であると考えられた。

3、グリオスタチン/PD-ECGFをラット胎児大脳皮質ニューロン培養系に添加したところ濃度依存的に突起を伸展している生存細胞数が上昇した（図3a）。さらに、ニューロフィラメント量を定量したところ神経線維腫から精製したものと胎盤より精製したものでほぼ同じ濃度-反応曲線を示し、EC_{50}=0.3nMであった（図3b）。ただし、この神経栄養因子活性はグリア細胞を介して作用している可能性は否定できない。

4、このようにグリオスタチン/PD-ECGFは、グリア細胞の増殖を抑制するとともに血管内皮細胞の増殖を促進し、さらに神経細胞の生存維持と突起伸展を促進している可能性が高く、生理的な状態では、脳成熟段階での血液脳関門形成に重要な役割をしているのではないかと推定している。また、脳損傷を受けた時も反応性グリオーシスの制御、神経細胞の再生、脳血管の再生等に作用している可能性がある。

［参考文献］

1. Asai, K., Nakanishi, K., Isobe, I., Eksioglu, Y., Hirano, A., Hama, K., Miyamoto, T., Kato, T. J. Biol. Chem. (in press).
2. Asai, K., Hirano, T., Kaneko, S., Moriyama, A., Nakanishi, K., Isobe, I., Yaman, Y. Z., Kato, T. J. Neurochem. 59 (1992) 307-317.
3. Asai, K., Hotta, T., Nakanishi, K., Ito, J., Tanaka, R., Otsuka, T., Matsui N., Kato, T. Brain Res.556 (1991) 344-348.

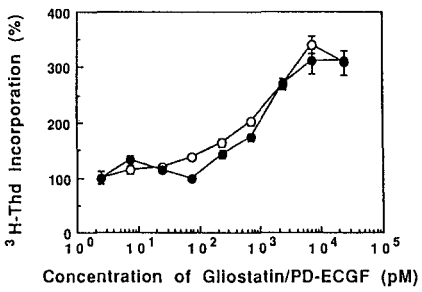


図1、グリオスタチン/PD-ECGFによる血管内皮細胞増殖活性
-○-神経線維腫より精製したグリオスタチン
-●-胎盤より精製したPD-ECGF

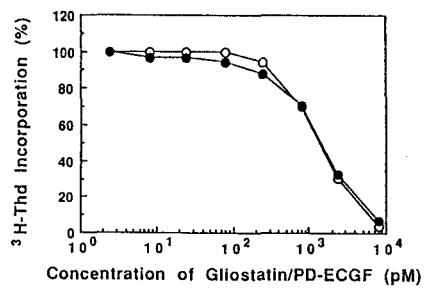
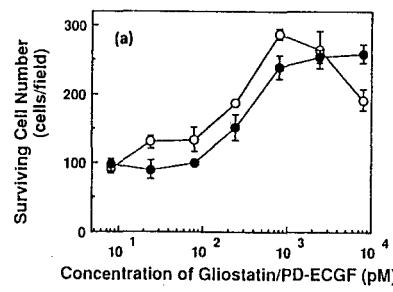


図2、グリオスタチン/PD-ECGFによるグリア細胞増殖抑制活性
-○-神経線維腫より精製したグリオスタチン
-●-胎盤より精製したPD-ECGF



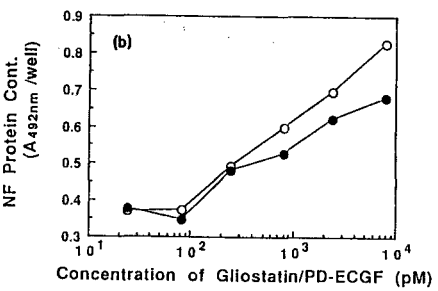


図3、グリオスタチン/PD-ECGFによる神経栄養因子活性
(a) 細胞数
(b) ニューロフィラメント量
-○-神経線維腫より精製したグリオスタチン
-●-胎盤より精製したPD-ECGF

68 マウス脳の各発育段階および小脳ミュータントにおける代謝型及びnon-NMDA型グルタミン酸受容体の脳内分布

梁淑姫、宮脇敦史、古市貞一、御子柴克彦
（東京大学医科学研究所・化学研究部）

［要約］
グルタミン酸は哺乳動物中枢神経系において生理的及び病的機能に重要な役割を果たしていると考えられている。我々は代謝型（mGluR1）及びnon-NMDA型（GluR1）のグルタミン酸受容体に対する抗体を作製し、マウス脳における局在を解析した。正常マウスにおいて代謝型は嗅糸球層、視床、海馬、小脳分子層、またnon-NMDA型は嗅糸球層、中隔核、海馬、歯状回、小脳分子層で強い発現が観察された。小脳分子層における両受容体の発現はBergmannグリア細胞に示唆されたが、生後初期にはPurkinje細胞においても発現が観察された。また海馬では発達に伴って両受容体の特徴的な発現パターンが観察され、異なる入力線維群とのシナプス形成を考える上で興味深い。

［はじめに］
グルタミン酸は中枢における興奮性の神経伝達物質のひとつであり、シナプスの可塑性において中心的役割をはたし、また種々の病態にも関与している。多くの薬理学的研究の結果グルタミン酸受容体はイオンチャネル型と代謝型に二分され、前者はさらにNMDA型、non-NMDA型に分類される(1,2)。これまでに *in situ* hybridization やリガンドの結合部位の解析によってその局在が検討されてきた。抗体を用いた研究はnon-NMDA型に関して三報あるが(3,4,5)、Purkinje細胞における局在に関しては意見が分かれている。今回我々はnon-NMDA型（AMPAタイプGluR1）及び代謝型受容体（mGluR1）に対するポリクローナル抗体を作製し、各種小脳ミュータント及び発達過程における局在について解析した。

［材料及び方法］
・抗体の作製
抗原としてGluR1 (6)のC末端14アミノ酸、mGluR1 (7)のC末端15アミノ酸に相当する合成ペプチドを用いた。これらをBSAに結合して家兎に免疫した。精製して得られたIgGを、GluR1に対応するものをA1、mGluR1に対するものをM1と名付けた。
・免疫組織化学
生後（PND）0, 3, 7, 12, 21日および成熟正常マウス（ICR）そして各種小脳ミュータント（*wv, sg, pcd, Lc*）の脳の18 μmの凍結切片を作製し、Bouin液で固定した後A1あるいはM1で反応後、biotin-抗ウサギIgG抗体、avidin-HRPと反応させDAB/H_2O_2で染色した。また隣接切片を4%パラホルムアルデヒド固定し、抗IP_3受容体モノクローナル抗体4C11, 18A10 (8,9,10)と反応させた。

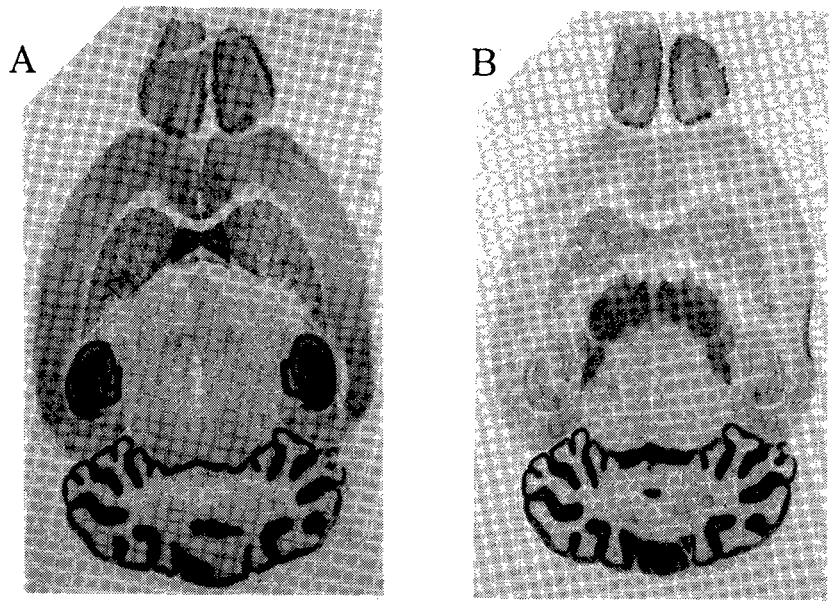
［結果及び考察］
・Western blot 解析
両抗体は小脳のsynaptosome画分、synaptic plasma membrane画分及び、post synaptic density画分中の蛋白質に特異的に反応したが、その分子量はアミノ酸配列から推定されるよりやや大であった。そこで、N-glycosidase Fにより処理したsynaptosome画分を用いたところ、推定分子量にほぼ対応する96kD（A1）及び131kD（M1）の蛋白質と反応した。このようにしてIgGの抗原特異性は示されたため、これをマウス脳の免疫組織化学的解析に用いた。
・免疫組織化学
（1） 正常成熟マウス脳での発現。成熟ICRマウス脳においてA1は嗅糸球層、中隔核、海馬、歯状回、小脳分子層等と強く反応し、線状体、側坐核、手綱核、扁桃核、大脳皮質等と中程度に反応した。またM1は嗅糸球層、視床、海馬、小脳分子層等と強く反応し、中程度の反応は線状体、淡蒼球、側坐核、乳頭体、下オリーブ核、大脳皮質等に認められた。A1とM1のいずれも小脳分子層において強い抗体反応があるが、Purkinje細胞層には反応が観察されない。これは、受容体がシナプス近傍に分布しているために明瞭な樹状突起構造として観察されないのかもしれない。海馬においては領域特異的な反応を示し、A1はCA1と歯状回領域と強く、CA2-CA3領域とはやや弱く反応する。またM1はCA1領域及び歯状回のhilusとは強く反応するものの、CA2-CA3領域との反応はかなり弱い。

（2）マウス脳の発達に伴う変化。グルタミン酸を介した神経伝達系の確立を追うために生後の脳の発達過程におけるグルタミン酸受容体の発現様式を調べた。PND 0 において両抗体の反応は微弱ながらも成熟マウス脳で反応の認められる部位に観察された。両抗体の反応は微弱ながらも出生時において、成熟マウス脳で反応の認められる部位に認め得た。その反応性は、ほぼ直線的に増加していた。しかしPND 0 における A1 と視床との反応は、発達と共にほぼ消失した。海馬では、異なる入力をうける樹状突起部位で、発達に伴って発現領域が拡がった。このことは海馬のシナプス形成を考える上で興味深い。また小脳においては、Bergmann グリア細胞と思われる部分の他に、4C11と18A10での染色像との比較から、Purkinje 細胞樹状突起であると推定される放射状に伸展する突起に発現が観察された。特に PND 3, 7 においては、Purkinje 細胞体に反応する像も認められた。

（3）ミュータントマウスを用いた解析。小脳における GluR1及び mGluR1の発現部位を更に検討するために、各種小脳ミュータントを用いて抗体反応を調べた。顆粒細胞がない為に平行線維入力を欠く *wv* ミュータント、及び棘突起形成を欠き樹状突起も貧弱な *sg* ミュータントでは、正常マウスに比べると劣るものの、小脳分子層に両抗体との反応性を認めた。一方、Purkinje 細胞を欠損する *Lc* 及び *pcd* ミュータントでは極めて微弱な発現が観察された。これらの発現量の著減は、ミュータントにおける Bergmann グリア自体の絶対数の減少や、Purkinje 細胞の変性脱落による環境要因で Bergmann グリアでの発現が抑制されることが原因と考えられる。

［文献］

(1) Kuba, K., and Kumamoto, E. (1990) Progress. Neurobiol. 34 (3), 185-270. (2) MacDonald, J.W., and Johnston, M.V. (1990) Br. Res. Rev. 15, 41-70. (3) Rogers, S.W., et al.(1991) J. Neurosci. II (9), 2713-2724. (4) Blackstone, C.D., et al. (1992) J. Neurochem. 58 (3), 1118-1126. (5) Petrallia, S.W., and Wenthold, R.J. (1992) J.Comp.Neuro. 318, 329-354. (6) Sakimura, K., et al. (1990) FEBS 272 (1,2), 73-80. (7) Masu, M., et al. (1991) Nature 349, 760-76. (8) Maeda, N., et al. (1988) J. Neurochem. 51 (6), 1724-1730. (9) Maeda, N., et al. (1989) Develop. Biol. 133, 67-76. (10) Nakanishi, S., et al. (1991) J. Neurosci. 11 (7), 2075-2086.



1 mm

マウス中枢神経系におけるグルタミン酸受容体の局在（6か月令ICRマウス）
A: GluR1の存在部位　　B: mGluR1の存在部位

69 AMPAtype non-NMDAグルタメイト受容体(GluR1-4)遺伝子発現の多様性

佐藤 康二*、木山 博資、遠山 正彌
(大阪大医・バイオ研神経解剖*、第二解剖)

[要約]
AMPA type non-NMDAグルタメイト受容体(GluR1-4)mRNAに相補的なoligoDNAprobeを作製し、ラット脳において、in situ hybridization法を用い、各受容体mRNAの発現を検討した。その結果、脳内の幅広い領域でGluR1-4mRNAの豊富な発現が観察された。さらに、これらの発現を各領域ごとに検討すると、その発現パターンには多様性がみられた。GluR2mRNA、GluR4mRNAは脳内のほとんどの領域で観察されたが、GluR1mRNA,GluR3mRNAにおいては、それぞれ発現の検出ができない領域が見られた。これらの事から,AMPAtype受容体サブタイプの構成は、脳内の領域ごとに異なり、高い多様性を有することが示唆された。

non-NMDAグルタメイト受容体は脳内において、主にfast excitatory neurotransmissionに関与するイオンチャンネル型受容体であり、現在、その遺伝子構造が次々と明かになっている(1)。さらに卵母細胞における発現系により、各受容体の組み合わせによりさまざまな応答が見られることが知られており(1)、 in vivoに於いての各受容体の組み合わせに関心がもたれている。今回我々は、AMPAtypeとされるGluR1-4についてそのmRNA発現分布をラット脳内で比較検討した。

[実験方法]
150gの雄性wistar系ラットをDiethyletherで麻酔後断頭し、取り出した脳を、ドライアイスで凍結した。クライオスタットにて15-20μmの新鮮凍結切片を作製し、シランコートしたスライドクラスに張り付けた。45merよりなるoligoDNAprobeを^{35}S-dATPにて、3'-end標識し、ハイブリダイゼーションバッファーに加え、42℃にて一晩反応した。55℃の1xSSCにて20分×3回の洗浄後、エタノール系列にて脱水乾燥した。ハイダイゼーションシグナルの可視化には、乳剤オートラジオグラフィーを用い、6週間の露光を行った。それぞれのタイプのmRNAに対する特異的プローブのデザインは、文献1に基つき行った。

[成績]
A) 概観
GluR1-4mRNAは脳内に幅広く発現していたが、その発現様式には差異が見られた。GluR2mRNAの発現は最も強く、しかもほとんどすべての領域の神経細胞にその発現が認められた。GluR4mRNAもほとんどすべて領域で発現が認められたが、発現の強さは相対的に低かった。それに対してGluR1mRNA及びGluR3mRNAについては、発現の検出ができない領域も認められた。
B) 分布(図1-3)
四種のサブタイプの分布を比較し、いくつかのグループに分類した。第一にGluR1-4mRNAが揃って豊富に発現している領域で、海馬錐体細胞、嗅球僧帽細胞、大脳皮質(II,III,V,VI層)などがその例である。第二は、GluR2-4mRNAは豊富に発現しているかGluR1mRNAの発現が極端に少ない領域で、動眼神経核、三叉神経運動核などの運動系脳神経核や、聴覚、前庭系のいくつかの領域に見られた。第三は、GluR1,2,4mRNAの発現は豊富だが、GluR3mRNAの発現の少ない領域で、Calleja島、視床下核等に見られた。その他、視床腹側核群、内側膝状体等では、GluR3,4mRNAの発現が強い傾向が、また視床下部の多くの領域ではGluR1,2mRNAの発現が強い傾向が見られた。また小脳ベルグマングリアにおいては、GluR2,3mRNAは検出されず、GluR1,4mRNAのみの発現が認められた。
C) 共存
海馬錐体細胞や嗅球僧帽細胞などで例外なくすべての細胞がGluR1-4mRNAを発現しており少なくてもこれらの細胞では四者は共存すると考えられた。

[考察]
各サブユニットの生理学的検策により、GluR2がCaイオンの透過性に重要であることが言われている(3)。すなわち、GluR2を含む組み合わせではCaイオンに対して透過性がないが、GluR2を含まない組み合わせでは、Caイオンに対する透過性が出現するのである。今回の我々の検討では、ベルグマングリアにおいてGluR2mRNAの発現が認められず、Ca透過型のイオンチャネルの存在か示唆された。実際、最近その事実が生理学的に確認された(2).一方、それ以外の領域に於いては、GluR2mRNAの検出できない部位は確認できなかった。したがって、神経細胞に於いては、GluR2を基本としGluR1,3,4とのさまざまな組み合わせにより、多様なCaイオン非透過型のイオンチャネルが形成されているものと考えられた。

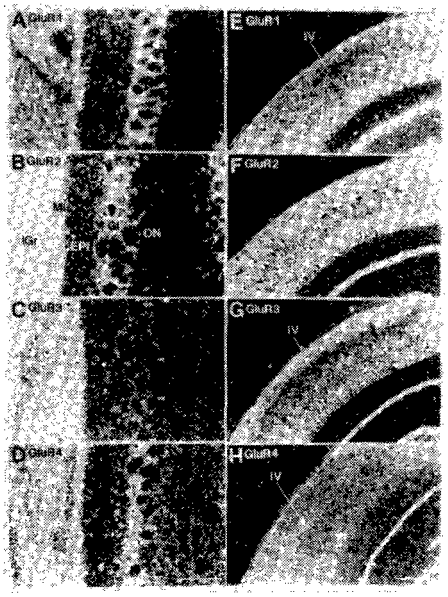


図１．嗅球及び大脳皮質に於けるGluR1-4mRNAの発現

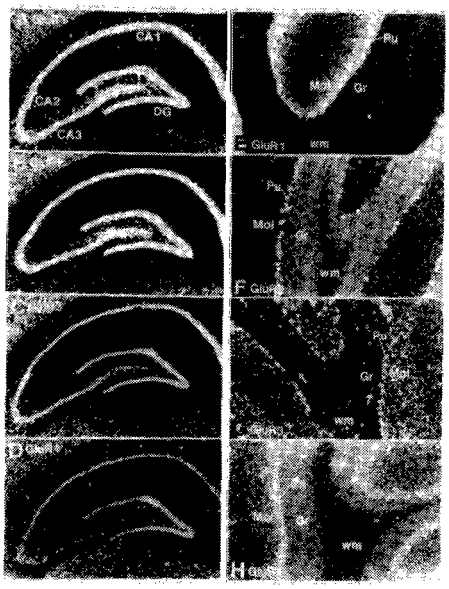


図２．海馬及び小脳に於けるGluR1-4mRNAの発現

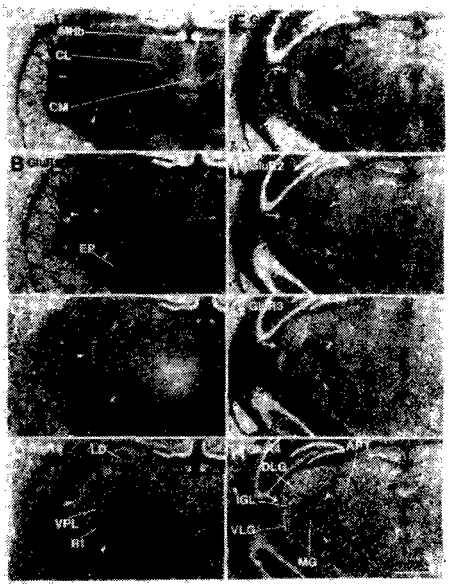


図３．視床及び内側膝状体レベルに於けるGluR1-4mRNAの発現

Abbreviations

IV,VI,layer IV,VI of the cerebral cortex; APT, anterior pretectal nucleus; CA1-3,fields CA1-3 of Ammon's horn; CL,centrolateral thalamic nucleus; CM,central medial thalamic nucleus; DG,dentate gyrus; DLG,doral lateral geniculate nucleus; EP,entopeduncular nucleus; EPL,external plexiform layer of the olfactory bulb; Gl, glomerular layer of the olfactory bulb; Gr, granular cell layer; IGL,intergeniculate leaf; IGr,internal granular layer of the olfactory bulb; LD,laterodorsal thalamic nucleus; MG, medial geniculate nucleus; MHb,medial habenular nucleus; Mi,mitral cell layer of the olfactory bulb; Mol,molecular layer; ON,olfactory nerve layer; Pu,Purkinje cell layer; Rt,reticular

［文献］

1. Keinanen,K., Wisden,W., Sommer,B., Werner,P., Herb,A., Verdoorn,T.A., Sakmann,B., and Seeburg,P.H. (1990) Science 249,556-560.
2. Muller,T., Moller,T., Berger,T., Schnitzer,J., and Kettenmann,H. (1992) Science 256,1563-1566.
3. Verdoorn,T.A., Burnashev,N., Monyer,H., Seeburg,P.H. and Sakmann,B. (1991) Science 252,1715-1718.

70 NMDA脳室内投与による転写制御因子のDNA結合能の変動

荻田喜代一、米田幸雄（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕

マウス脳の細胞抽出液を用いて、転写制御因子Activator protein 1 (AP-1)、Activator protein 2 (AP-2)、Activator protein 3 (AP-3)、SP-1、Nuclear factor κB (NF-κB)、OCT-1、cAMP resposive element結合蛋白質 (CREB)、Nuclear factor 1 (NF-1/CTF) およびGlucocorticoid responsive element結合蛋白質 (GREB) の各シスエレメントへの結合能をゲルシフトアッセイにより検討するとともに、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)の脳室内投与による各転写制御因子DNA結合能の変動を検索した。本実験条件下では、NF-1/CTFを除くすべての因子が検出された。NMDA脳室内投与によりAP-1およびCREB結合能が著明に増強されたが、AP-2、AP-3、SP-1、OCT-1およびGREB結合能には著しい変化は認められなかった。また、NF-κB結合能はNMDA投与により減少傾向が観察された。NMDA投与によるAP-1結合能の増強は投与後1~2時間で最大となった。NMDAチャネルブロッカーである(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)の前投与は、NMDA投与によるAP-1およびCREB結合能増強に対して完全な抑制効果を発揮した。以上の結果より、NMDA脳室内投与は転写制御因子AP-1およびCREBを選択的に誘導する可能性が示唆される。

興奮性アミノ酸レセプターのサブタイプの一つであるNMDAレセプターは、学習・記憶などの中枢神経系の可塑性形成や脳虚血、低酸素あるいは低血糖などによる遅発性神経細胞壊死に関与することが明らかとなっている(5)。これらはすべて長期的な細胞の機能変動現象であり、その出現にはレセプター活性化に伴う長期的な生化学的反応性変化の関与が考えられる。事実、NMDAレセプター活性化は、チロシンキナーゼ、プロテインキナーゼCあるいはCa^{2+}カルモデュリン依存性プロテインキナーゼなどの活性化を誘発するばかりでなく、プロトオンコジーンであるc-fosおよびzif/268 mRNAなどを誘導すること(4)が示されている。すなわち、NMDAレセプター活性化により細胞内流入したCa^{2+}は、リン酸化カスケード反応を活性化したのち、核内転写制御因子を変動させることが推察される。したがって本研究では、NMDAレセプター活性化に伴う核内転写制御因子の変動を検索する目的で、各種シスエレメントを含むプローブDNAを用いたゲルシフトアッセイにより各種転写制御因子のDNA結合能に対するNMDA脳室内投与の影響を検討した。

〔実験方法〕

薬物投与：Std-ddy雄性マウス(20-30 g)にNMDAあるいは生理食塩水をHaley and McCormickの方法(1)により脳室内投与(2 μl)した。またMK-801は、NMDAあるいは生理食塩水の脳室内投与の15分前に腹腔内投与した。

細胞抽出液の調製：マウス全脳からSonnenbergらの方法(3)により調製した細胞抽出液を5 mM $MgCl_2$、50 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM DTT、10% グリセロールおよび蛋白質分解酵素阻害剤(APMSF、leupeptin、antipain、benzamidine)を含む10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)(DB I)で透析した。

ゲルシフトアッセイ：DB I中で細胞抽出液(10 μg蛋白質)と1 μg poly(dI-dC)を室温で10分間前処理したのち、5'-エンドラベリング法で標識した各種2本鎖[^{32}P]DNAプローブ(図1)(50-100 pg、5,000-10,000 cpm)を添加した。結合反応は室温で30分間行い、DNA-蛋白質複合体と遊離プローブをポリアクリルアミドゲル(6%)電気泳動法(100 mV定電圧、2℃、1.5時間)により分離した。泳動後にゲルを乾燥し、ゲル中の放射能をオートラジオグラフィー法により検出した。

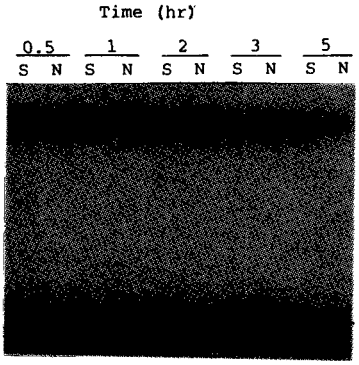
〔実験結果〕

未処置動物の脳細胞抽出液中には、NF-1/CTFを除くすべての因子結合能が検出できた。中でも、AP-1およびCREB結合能が比較的高いことが判明した。生理食塩水の脳室内投与はAP-1結合能を投与30分後で増加させたが、以後結合能の減少傾向が見られた(図2)。この生理食塩水投与による変化はCREB結合にも観察されたが、他のDNAプローブへの結合では著明ではなかった。0.01 μg以下のNMDA脳室内投与では顕著な痙攣発作は認められないが、0.05-1.0 μg投与で用量依存的な痙攣発作が観察された。NMDA(0.5 μg)の脳室内投与は、AP-1およびCREB結合能を対照群に比べて著明に増強した。AP-1結合増強効果は投与1-2時間後で最大となり、以後減少傾向が見られた(図2)。それに対して、NF-κB結合能は

図1. 各因子のシスエレメントを含むプローブのDNA配列

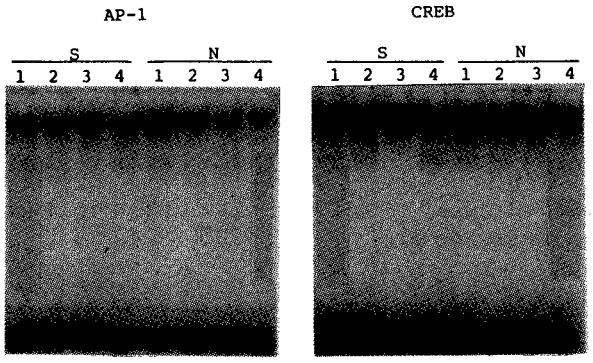
AP-1	5'-CTAGTGATGAGTCAGCCGGATC-3'
AP-2	5'-GATCGAACTGACCGCCCGCGGCCCGT-3'
AP-3	5'-CTAGTGGGACTTTCCACAGATC-3'
SP-1	5'-GATCGATCGGGGCGGGGCGATC-3'
NF-κB	5'-GATCGAGGGGACTTTCCCTAGC-3'
OCT-1	5'-GATCGAATGCAAATCACTAGCT-3'
CREB	5'-GATTGGCTGACGTCAGAGAGCT-3'
NF-1/CTF	5'-ATTTTGGCTTGAAGCCAATATG-3'
GREB	5'-GATCAGAACACAGTGTTCTCTA-3'

図2. NMDA投与によるAP-1結合能の増加



S: Saline(2 μl)　N: NMDA(0.5 μg)

図3. NMDA投与によるAP-1およびCREB結合増強作用に対するMK-801前投与の効果



MK-801(mg/kg i.p.)

Lane 1:	0
Lane 2:	0.5
Lane 3:	1
Lane 4:	5

NMDA投与による減少傾向が観察された。また、その他の結合能にはNMDA投与で著しい変化は認められなかった。NMDAチャネルブロッカーであるMK-801の単独投与はいずれの結合能にも著変を与えなかったが、MK-801前投与は対照群のAP-1およびCREB結合能に変化を与えることなく、NMDA投与群の結合増強作用を完全に消失させた(図3)。

〔考察〕

本研究成績から、NMDAレセプターの活性化により核内転写制御因子であるAP-1およびCREBが選択的に誘導される可能性が示唆される。NMDA投与によるAP-1およびCREB結合能の増強現象がMK-801の前投与で完全に消失した事実は、この現象がNMDAレセプターの活性化を介する反応であることを推察させるものである。しかしながら、AP-1およびc-fos mRNAがペンチレンテトラゾールやピクロトキシンなどの痙攣薬の投与やあるいは電撃痙攣により誘導され、その誘導が各種抗痙攣薬により抑制されることなどが知られており(2,3)、本研究で見られた増強現象がNMDA投与による痙攣に起因する可能性は現在のところ否定できない。したがって、各種痙攣薬の効果および抗痙攣薬の拮抗作用などの検討が今後の課題であろう。

〔謝辞〕

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(04671421)の援助のもとに行った。

〔文献〕

1. Haley, T.J. and McCormick, W.G. (1957) Br. J. Pharmacol. 12, 12-15.
2. Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L. and Curran, T. (1987) Science 237, 192-197.
3. Sonnenberg, J.L., Mitchelmore, C., Macgregor-Leon, P.F., Hempstead, J., Morgan, J.I. and Curran, T. (1989) J. Neurosci. Res. 24, 72-80.
4. Szekely, A.M., Costa, E. and Grayson, D.R. (1990) Mol. Pharmacol. 38, 624-633.
5. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1991) Neurosci. Res. 10, 1-33.

71 ＮＭＤＡ受容体複合体を構成するポリアミン結合部位のグアニンヌクレオチドによる調節

山本敏文、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、東京都精神医学総合研究所・精神薬理*）

〔要約〕
N-methyl-D-aspartate(NMDA)/PCP受容体イオンチャンネル複合体のポリアミンによる機能調節について、[3H] 1-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine(TCP)をリガンドとしてラット大脳皮質膜標品を用いて調べた。ポリアミン（スペルミン、スペルミジン）は[3H]TCP結合を洗浄膜標品の基礎結合活性の約10倍から12倍増加させ、同じ条件でみたグルタミン酸による最大効果（約8倍）より強かった。ポリアミンによる[3H]TCP結合の増強効果のEC_{50}値は、スペルミン及びスペルミジンで各々1.5μMと32μMであり高濃度で逆に抑制を受ける二相性の用量－反応曲線を示した。プトレッシンは単独での[3H]TCP結合増加作用はなく、スペルミンやスペルミジンで活性化された結合を抑制した。グアニンヌクレオチド、GTP、GDP及びその非水解アナログであるGppNHp、GTPγSそしてGDPβSは、いずれも用量依存的にスペルミン、スペルミジンによる[3H]TCP結合の増加を抑制した。IC_{50}値はおよそ5-10μMと強く、GDP及びGDPβSがGTPアナログよりも強い抑制効果を示した。10μMスペルミンによる[3H]TCP結合増加に対するGTPγS(100μM)の影響をScatchard解析した結果、グアニンヌクレオチドによる抑制は非拮抗阻害であった。これらの結果はポリアミン、特にスペルミンがNMDA/PCP受容体複合体の機能調節において、グルタミン酸やグリシンよりも強いefficacyと、ほぼ同等のaffinityを持ち、さらにはグアニンヌクレオチドのGTP及びGDPの両者に親和性のあるGTP/GDP結合部位を介する負のアロステリック調節を受けていることを強く示唆している。

N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体複合体は、NMDA認識部位のほかにグリシン結合部位や、イオンチャンネル内部に位置していると考えられている幻覚薬フェンサイクリジン(PCP)結合部位、Mg結合部位など、いくつかの異なるアゴニスト、アンタゴニストの結合部位から構成されている(3)。NMDA受容体イオンチャンネル複合体の機能を知る方法として、イオンチャンネル内に位置している PCP結合部位への放射性標識したPCP誘導体、[3H] 1-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine(TCP)の結合を見る方法が用いられている。近年、同様なPCP結合部位のリガンドとして[3H]TCPとともに用いられてきた[3H]MK801結合がポリアミン類により増強されることが報告されてきた(5)。さらに我々はこれまで、低濃度Mgがグルタミン酸と同様な機構で[3H]TCP結合を増強することを報告してきており(2)、ポリカチオンであるポリアミンの結合部位との関連について興味が持たれていた。しかしながら、低濃度Mgの増強作用を明瞭に観察することが困難であったのと同様に、ポリアミン類の作用についても、比較的高濃度で効果を示すなどその生理的意義について十分には解明されていなかった。今回我々は、低濃度Mgによる[3H]TCP結合の増強作用を明らかにする目的で確立したシナプトソーム膜の調製法を用い、内因性物質の影響を極力抑えることでポリアミンによる高親和性の[3H]TCP結合の増強作用を調べることが出来た。さらにはポリアミン結合部位がグアニンヌクレオチドにより調節されている可能性についても検討を加えた。

【実験方法】
Wistar系雄性ラット（250-300g）の大脳皮質粗シナプトソーム膜を 50 mM Tris-HCl buffer/ 10 mM EDTA(pH 7.6) で繰り返し洗浄、途中、37℃、10分間のincubation、-80℃での急速凍結と融解を行い調製し、最後に 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6)に懸濁して-80℃に保存した。実験当日、5 mM Tris-HEPES buffer(pH 7.6) で2回さらに洗浄し同一bufferに0.2mg protein/mlとなるように調製した。[3H]TCP結合実験は、膜標品（10μg protein/tube）と 5 nM [3H]TCP(1509.6 GBq/m mol)を 5 mM Tris-HEPES buffer(pH 7.6) 中で25℃2時間反応させた。反応はInotech セルハーベスター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、30μMのPCPの存在下で行った。

【結果】
大脳皮質膜標品に対する[3H]TCP結合はグルタミン酸、グリシン及びスペルミンにより用量依存的に増加した。[3H]TCP結合の最大効果はいずれも10μMで達成されスペルミジンでは100μMであった（Fig.1）。これらのアゴニストの作用はスペルミン、スペルミジンが強く、結合増強効果はグルタミン酸とグリシンの同時添加で見られる効果に匹敵していた。また、グルタミン酸、グリシンそしてスペルミンのEC_{50}値は順に0.2μM、0.5μM、0.9μMであった。スペルミン、スペルミジン共に高濃度では逆に結合は抑制された。スペルミンによる[3H]TCP結合の強力な増強作用は、同時に添加されたGTP, GDP, GTPγS, GDPβSにより抑制された（Fig.2）。このヌクレオチドの作用はグアニンに特異的であり、ATP, ITP, CTPにはほと

んど認められなかった（Table.I）。また、guanosine、cyclicGMPにも阻害作用がなく、わずかにGMPが弱い作用を示した。GTP及びGDPによる[3H]TCP結合に対するスペルミン作用の阻害機構はScatchard解析の結果Kd値に有為な変化がなくBmaxのみ低下していることから非拮抗的な阻害であることが示された。

【考察】

今回の実験結果は、スペルミンがNMDA/PCP受容体イオンチャンネル複合体のアゴニストとして、グルタミン酸と同様の機構で作用していることが確認出来た。特に、我々の比較的緩和な、しかも効果的な調製法による洗浄膜標品を用いることでグルタミン酸やグリシンの作用用量に近い10μM以下のEC_{50}値が得られたことは、細胞外膜表面にポリアミン結合部位が存在している可能性を示唆している。さらには、本研究ではじめてグアニンヌクレオチドがポリアミン作用を調節していることが明かとなった。Baronらは[3H]glutamate及び[3H]CPP結合がGTPやGDPなどで競合的に阻害されることからグアニンヌクレオチドがNMDA受容体のアンタゴニストであることを報告したが(1)、SacaanらはGTPγSがグルタミン酸による[3H]TCP結合促進を逆に増強することを報告している(6)。我々もグルタミン酸により促進された[3H]TCP結合はGppNHpで有意に変化がないことを報告している(2)。[3H]glutamate及び[3H]CPP結合のKd値がスペルミンにより変化する(4)ことが知られており、この両者の矛盾は膜標品に残存するポリアミン類による影響の差と推測される。しかしながら従来知られているGTP結合タンパクとは異なり、GDPが一番強い作用を持ちGTPとともに同じ効果を示していることから、GTP結合タンパク質（Gタンパク質）とは異なる新規のGTP/GDP結合タンパク質が関与しているものと推察される。

【文献】

(1) Baron,B.M., Dudley,M.W., McCarty,D.R., Miller,F.P., Reynolds,I.J. and Schmidt,C.J., J. Pharmacol. Exp. Ther., 250, 162-169 (1989)

(2) Hori,T., Yamamoto,T., Hatta,K. and Moroji,T., Synapse, 8, 13-21 (1991)

(3) Kemp,J.A., Foster,A.C. and Wong,E.H.F., TINS, 10, 294-298 (1987)

(4) Pullan,L.M. and Powel,R.J., Eur. J. Pharmacol., 207, 173-174 (1991)

(5) Ransom,R.W. and Stec,N.L., J. Neurochem., 51, 830-836 (1988)

(6) Sacaan,A.I., Snell,L.D. and Johnson,K.M., Abst. Soc. Neurosci., 14, 235 (1988)

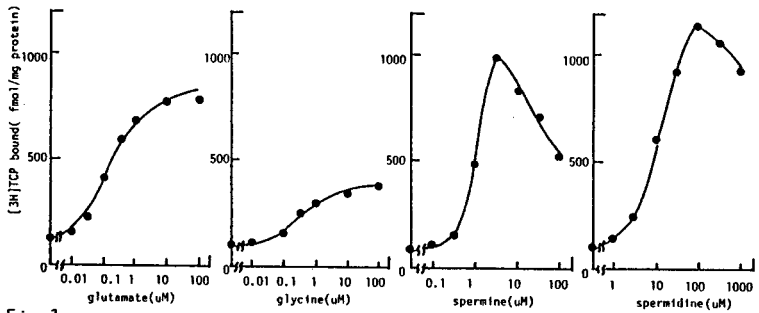


Fig.1.
Stimulation of the [3H]TCP binding by glutamate, glycine, spermine and spermidine to the well-washed rat cortical membranes.

Table 1.
Effect of guanine nucleotides on spermine-induced [3H]TCP binding.

Nucleotide (100 uM)	[3H]TCP bound (% control)
GTP	18
GTPγS	32
GppNHp	20
GDP	9
GDPβS	5
GMP	95
guanosine	98
cyclic GMP	94

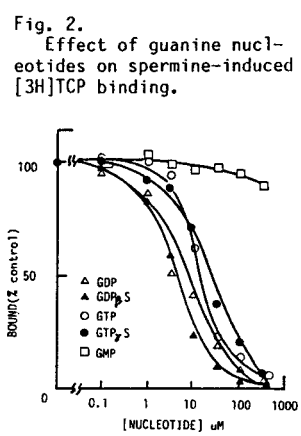


Fig. 2.
Effect of guanine nucleotides on spermine-induced [3H]TCP binding.

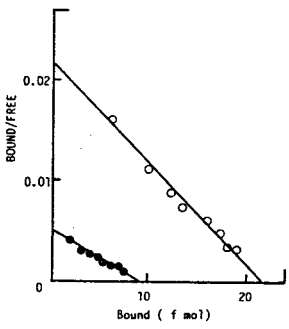


Fig. 3.
Scatchard analysis of the spermine-induced [3H]TCP binding in the absence(○) or presence(●) of 50 uM GTPγS.

72 小脳顆粒細胞におけるグルタミン酸レセプターを介したTRE結合活性の誘導とSNPによる抑制

津田　正明
（岡山大・薬・微生物）

【要約】　すでにマウス小脳顆粒細胞において、NMDA (N-methyl-D-aspartate)およびカイニン酸投与でTRE(TPA-responsive element)とCRE(cyclic-AMP responsive element)の両方に親和性を持つDNA-結合活性が誘導されることを報告している(1)。このTRE-結合活性の誘導は、細胞内へのCa^{2+}流入とよい相関性を示した。また、細胞内Ca^{2+}キレーターであるBAPTA[1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid]を加えると、TRE-結合活性の上昇は認められなかった。このTRE-結合活性は、CREにむしろ強い結合活性を持っているにも拘らず、CRE上に形成されるDNA結合性複合体中にはc-Fos関連タンパク質が含まれていた。さらに、一酸化窒素(NO)生成薬剤として知られるSNP(Sodium nitroprruside)を加えた所、NMDAおよびカイニン酸で誘導されるTRE-結合活性の誘導は抑えられた。この時、SNPによるNMDAレセプターを介したCa^{2+}流入は抑制されたが、カイニン酸レセプターによる流入は抑制されなかった。従って、NOは後シナプス細胞において、NMDAレセプターからのCa^{2+}流入を特異的に抑えると同時に、カイニン酸レセプターを介した細胞内情報伝達をも抑える可能性が考えられる。

【目的】　シナプスの可塑性のモデル系として知られる長期増強や薬剤投与等によるけいれんを誘発したラット脳神経細胞中において、c-fosやzif/268などの最初期遺伝子(immediate early gene; IEG)の発現誘導の起こることが知られている(2,3)。この事実は、シナプス伝達によって核内の転写制御系にも変化の起こることを示している。これらIEG遺伝子は転写制御因子をコードしており、その発現誘導は何らかの遺伝子発現の制御に関わっているものと考えられる。しかし、その関わり方は明らかではなく、ましてや高次神経機能発現に果たす遺伝子発現レベルの役割は全くわかっていないと言ってよい。このシナプス伝達に対する神経細胞の遺伝的応答性は、出生後の神経ネットワーク形成時の神経細胞に顕著に表れる。そこで、出生後一週目のマウス小脳の顆粒細胞の初代培養系を用いて、グルタミン酸入力によって引き起こされる核内転写制御系の変化を主にゲルシフトアッセイを用いて検討した。同時に、レトログレードメッセンジャーとして注目されている一酸化窒素(NO)の与える影響を、NO生成薬剤を用いることによって検討した。

【方法】　出生後一週目のマウス小脳より、顆粒細胞の初代培養系を調製した。培養液中には25mM KClと10 μM cytosine arabinosideが含まれており、この条件下では90 %以上の細胞が顆粒細胞となる。培養後7日目に培地を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時間後にNMDAあるいはカイニン酸を100 μMで加えた。2時間後に細胞を集め、核抽出液を調製した(1)。ゲルシフトアッセイは、^{32}Pで末端標識したTREまたはCREをプローブに用いて行った(1)。細胞内へのCa^{2+}の取り込みは、10 μCi $^{45}CaCl_2$をLocke's溶液に加え、アゴニストを加えた後10分間の取り込み値を測定した。取り込み後、細胞は0.5N NaOHで処理し、シンチゾールを加えた後、放射活性を測定した。Sodium nitroprusside(SNP)は、アゴニスト投与3分前に加えた。

【結果】　すでに、NMDA,カイニン酸刺激によるTRE-結合活性の誘導は、それぞれのレセプターを介して特異的に引き起こされていることを報告した。また、これは細胞外Ca^{2+}の存在に依存して認められた。そこで、実際にNMDA,カイニン酸刺激による細胞内へのCa^{2+}取り込み変化を調べた所、両者の場合共に上昇が見られた。そして、そのアゴニスト濃度依存性は全くTRE-結合活性の上昇と一致していた。細胞内Ca^{2+}キレーターであるBAPTAを加えた所、TRE-結合活性の上昇は抑えられた。このTRE-結合活性の上昇は、TPA(12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate)投与によっても認められる。また、プロテインキナーゼCの特異的阻害剤であるカルフォスチンC(1 μM)添加によって、NMDAによるTRE-結合活性の上昇は抑えられた。

このTRE-結合活性は、TREよりもCREに対して高い結合親和性をもつ。そこで、CRE上に形成される複合体中にc-Fosが含まれるかどうかをスーパーゲルシフトアッセイ法によって調べた。その結果、抗c-Fos抗体(4)をDNA結合反応液中に加えると、ゲル上のバンドのスーパーシフトが認められた(図1)。これは、その複合体中にc-Fos関連蛋白質が含まれることを示している。

NMDA,カイニン酸によるTRE-結合活性の上昇は、100 μM SNP存在下で完全に抑制された(図2)。c-fosの誘導も抑制された。しかし、この際、NMDAレセプターを介したCa^{2+}流入は抑えられたが、カイニン酸レセプターを介したCa^{2+}流入は全く抑えられなかった(図3)。これらCa^{2+}流入は、それぞれのレセプター特異的に引き起こされていることはアンタゴニスト投与実験で確かめられた。このSNP効果は可逆的であり、NMDAレセプターに対するSNP効果はヘモグロビン処理で抑制された。TPA投与でもTRE-結合活性の上昇は認められるが、これはSNPの抑制をそれ程受けなかった(図2)。

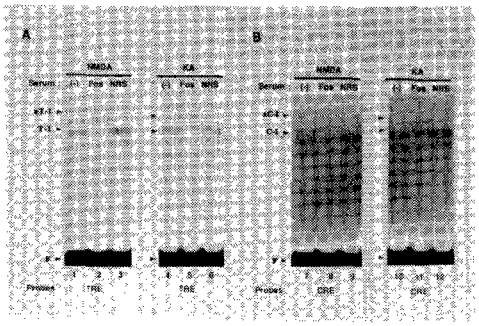


図 1. スーパーゲルシフトアッセイ
NMDAあるいはカイニン酸(KA)刺激を加えた細胞の核抽出液を用いて、抗c-Fos抗体または正常ラビット血清を加えてDNA結合反応を行った。抗c-Fos抗体を加えた場合、バンドのスーパーシフトがCREプローブの場合にも認められた。

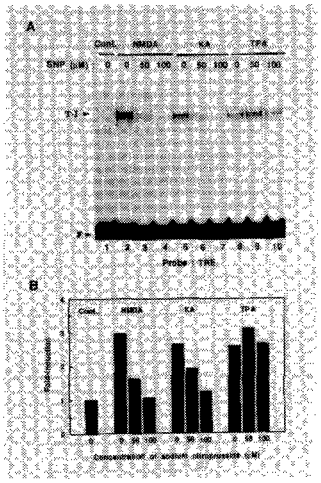


図 2. TRE結合活性に対するSNPの効果（上図）
(A) NMDA, カイニン酸(KA), TPA 投与3分前に50, 100μM でSNPを加え、刺激後2時間で核抽出液を調製した。
(B) バンドのデンシトメーター解析後、コントロールに対する活性の相対的倍率を示した。

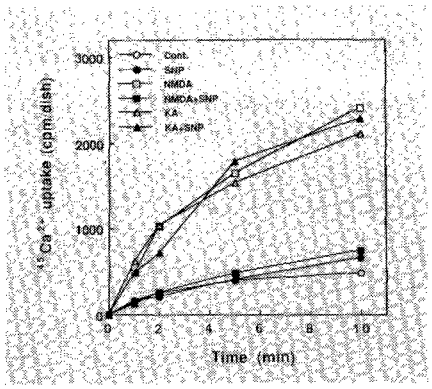


図 3. Ca^{2+}取り込みに対するSNPの効果（左図）
10 μCi $^{45}CaCl_2$投与後即座にNMDA, カイニン酸(KA)を加え、10分間の$^{45}Ca^{2+}$の細胞内取り込みを測定した。100 μM SNPを加える場合は、アゴニスト投与3分前に添加した。NMDAレセプターからのCa^{2+}取り込みが特異的に抑えられている。

【考察】 NMDA, カイニン酸レセプターを介したCa^{2+}の細胞内流入が、TRE-結合活性の誘導の引金となっていることが確かめられた。これには、Ca^{2+}によるプロテインキナーゼCの活性化が関与しているらしい。また、この誘導される結合活性はc-Fos関連蛋白質を有するにも拘らず、CREに対して高い親和性を持つ。このような親和性を示すDNA結合活性の実際例は未だ知られていない。現在、マウス脳内局部におけるDNA結合活性を測定できる方法を開発し、けいれん薬投与マウスの海馬や小脳に誘導されるTRE-結合活性の検討を行っている。すでに、一酸化窒素がNMDAレセプターからのCa^{2+}流入を制御する可能性が報告されている(5)。本研究においても、SNPが特異的にNMDAレセプターからのCa^{2+}流入を抑制した。これとは別に、SNPがカイニン酸刺激によるTRE-結合活性の誘導を抑えることを見いだした。この場合、細胞内へのCa^{2+}流入は起こっており、SNPがカイニン酸刺激によって引き起こされた情報伝達を抑制する可能性が考えられる。現在、これが一酸化窒素によるものかどうかをより詳細に検討中である。

【文献】

1. Sakurai, H., Kurusu, R., Sano, K., Tsuchiya, T. and Tsuda, M. (1992) J. Neurochem. in press.
2. Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L. and Curran, T. (1987) Science 237, 192-197.
3. Cole, A. J., Saffen, D. W., Baraban, J. M. and Worley, P. F. (1989) Nature 340, 474-476.
4. Nishina, H., Sato, H., Suzuki, T., Sato, M. and Iba, H. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3619-3623.
5. Manzoni, O., Prezeau, L., Marin, P., Deshager, S., Bockaert, J. and Fagni, L. (1992) Neuron 8, 653-662.

73 NG108-15細胞におけるNMDA受容体の存在とその性質についての検討

大熊誠太郎、桂　昌司、陳　大志、栗山欣弥
（京都府立医大・薬理）

〔要約〕

Neuroblastoma × glioma hybrid cells NG108-15 (NG細胞) における NMDA受容体の存在の有無とその薬理学的特性について、[$^{45}Ca^{2+}$]influxおよび[^{3}H]MK-801結合の観点から検討を行った。グルタミン酸(Glu)は濃度依存的に[$^{45}Ca^{2+}$]influxを増大させ、100μMで[$^{45}Ca^{2+}$]influxは最大に達し、それ以上の濃度では逆に低下を示した。またglycine (1mM) の存在下では、[$^{45}Ca^{2+}$]influxは有意な増加を示した。Glu誘発性[$^{45}Ca^{2+}$]influxは、MK-801、ketamine、AP-5、CPP の存在下では有意に阻害され、また7-CKもGlu誘発性[$^{45}Ca^{2+}$]influxを抑制した。Mg^{2+}およびZn^{2+}は濃度依存的に [$^{45}Ca^{2+}$]influxを抑制した。一方、spermineはGluの存在の有無にかかわらず、[$^{45}Ca^{2+}$]influxを増大させた。NG細胞膜への [^{3}H]MK-801結合は、ketamine、AP-5、CPPにより濃度依存的に抑制され、Mg^{2+}、Zn^{2+}によっても抑制されたが、spermineは[^{3}H]MK-801結合を促進した。以上の結果から、NG細胞には機能的なNMDA受容体が存在することが明らかとなった。

［目的］

グルタミン酸(Glu)受容体のサブタイプの1つであるNMDA受容体は、脳虚血に伴う神経細胞死に関与していることが明らかにされつつあり[5]、また記憶に関係する神経機能変化の1つである長期増強作用にも、 NMDA受容体の関与の可能性が指摘されている[4]。しかしながら、これらのNMDA受容体の生理的あるいは病態生理学的役割とその機序に関しては不明の点が少なくない。従来より、これらの点を解明するために、脳切片、大脳皮質および海馬などから調製された初代培養神経細胞などが実験に供されているが、本研究では神経化学的研究に最もよく応用されている株化細胞の 1つであるneuroblastoma × glioma hybrid NG108-15細胞(NG細胞)にNMDA受容体が存在しているか否かを薬理学的に検索した。

［方法］

NG細胞（大阪大学医学部薬理学教室三木直正教授より提供を受けた）を5% FCS含有 Dulbecco's modified Eagle minimum essential medium (0.1mM hypoxanthine, 16μM thymidine, 1mM aminopterine含有)中で培養し、4-6日後confluenceに達した状態で実験に供した。

[^{45}Ca]influxは、氷冷したCa^{2+}-free Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB:pH 7.4)で細胞を3回洗浄したのち、Ca^{2+}-free KRB中で、37℃、60分間のpreincubationを行い、ついで3μCi [^{45}Ca]Cl_2 を添加することで反応を開始した。反応開始後2分間のincubationを行った後、[$^{45}Ca^{2+}$]を含むKRBを吸引除去し、氷冷したKRBで5回洗浄した。次いで0.5N NaOH存在下で細胞を培養皿より剥離し、シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。NetのGlu誘発性[$^{45}Ca^{2+}$]influxは、Glu存在下で得られた[$^{45}Ca^{2+}$]influxよりGlu非存在下の[$^{45}Ca^{2+}$]influxを差し引くことで得た。

[^{3}H]MK-801結合の測定には、NG細胞より得たP_2分画を50mM Tris-citrate buffer (pH 7.4)で5回洗浄後、24時間凍結し、次いで解凍後前述のbufferで5回洗浄したものを用いた。P_2画分を6.5nM [^{3}H]MK-801の存在下で30℃、60分間のincubationを行った後、Whatman GF/Bフィルターで吸引濾過し、濾紙に残留する放射活性を測定した。なお、非特異的結合は100μM MK-801の存在下でincubationを行うことにより得た。

［結果・考察］

Gluは、濃度依存的な [$^{45}Ca^{2+}$]influxの増大をもたらし、100μMでその作用は最大に達したが、それ以上の濃度では抑制を示した。この高濃度のGluによるinfluxの低下はGluの毒性によるものと考えられる。一方、glycineの添加によっても[$^{45}Ca^{2+}$]influxは有意な増加を示したが、その増加の程度はGluの場合に比して弱かった(Table 1)。NMDA受容体複合体を形成するCa^{2+}チャネルの阻害薬であるMK-801およびketamineは濃度依存的にGlu誘発性 [$^{45}Ca^{2+}$]influxを阻害し

た(Fig. 1)。またGlu結合部位の阻害薬である2-amino-5-phosphopentanoic acid (AP-5)および(±)-3-(2-carboxypiperazine-4-yl)-1-propylphosphonic acid (CPP)、glycine結合部位阻害薬である7-chlorokynurenic acid (7-CK)はいずれもGlu誘発性[$^{45}Ca^{2+}$]influxを有意に抑制した(Table 2)。これらの結果は、神経細胞などで認められた作用に類似した作用であると考えられる[1-3]。しかし、7-CKの抑制作用はAP-5およびCPPに比して弱く、glycineの作用とも考え併せると、内在性glycineの作用の関与の可能性を示唆するものと考えられる。ポリアミンの1つであるspermineの添加は、Gluの存在の有無にかかわらず、[$^{45}Ca^{2+}$]influxの増加をもたらし、Glu存在下での[$^{45}Ca^{2+}$]influxの増加は相加的であった。また、Mg^{2+}およびZn^{2+}は、いずれもGlu誘発性[$^{45}Ca^{2+}$]influxを濃度依存的に抑制した。

[^{3}H]MK-801のNG細胞P_2分画への結合は、ketamine、AP-5、Cppのいずれによっても濃度依存的に阻害され(Fig. 2)、Mg_{2+}およびCa^{2+}も[^{3}H]MK-801結合を濃度依存的に阻害した。また[^{3}H]MK-801結合に、spermineにより増強されるのが観察された。これらの[^{3}H]MK-801結合に対する諸種薬物の作用は、[$^{45}Ca^{2+}$]influxの場合と同様の傾向を示したが、結合実験の場合には阻害作用の程度が[$^{45}Ca^{2+}$]influxの場合に比して弱いことが認められた。この差異の原因については現在のところは不明である。

以上の結果より、NG細胞にはCa^{2+}チャネルと機能的に共軛するNMDA受容体が存在することは明らかと考えられ、この細胞はNMDA受容体の機能的役割の解明に有用な実験系であると考えられる。

[文献]

1) Davies, J. and Watkins, J. C. (1982) Brain Res. 235, 378-386.

2) Davies, J., et al. (1986) Brain Res. 383, 169-173.

3) Kemp, J. A., et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 6547-6550.

4) Klann, E., et al. (1991) J. Biol. Chem. 266, 24253-24256.

5) Meldrum, B. and Garthwaite, J. (1990) Trends Pharmacol. Sci. 11, 379-387.

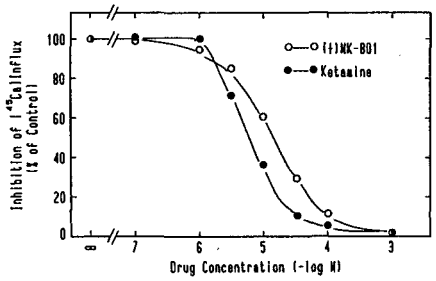


Fig.1 Effects of (+)MK-801 and ketamine on glutamate-induced [^{45}Ca]influx into NG108-15 cells

Table 1 Effects of glutamate and glycine on [^{45}Ca]influx into NG108-15 cells

Agent	[^{45}Ca]Influx (cpm/mg protein)
None (Basal)	5,482 ± 532
Glutamate (50 μM)	39,317 ± 1,123*
Glycine (1 mM)	19,994 ± 761*
Glutamate (50 μM) + Glycine (1 mM)	39,742 ± 1,025

Each value represents the mean ± S.E. obtained from 4 separate experiments.
*$p<0.01$, compared with the basal value.

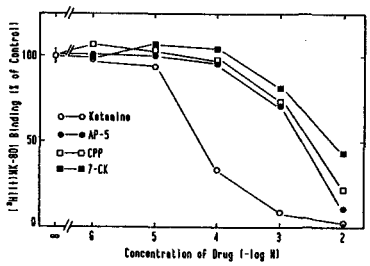


Fig.2 Effect of various antagonists on [^{3}H](+)MK-801 binding to crude synaptic membrane prepared from NG108-15 cells

Table 2 Effects of antagonists for NMDA and glycine receptors on glutamate-induced [^{45}Ca]influx into NG108-15 cells

Agent (mM)	[^{45}Ca]Influx (% of control)
Control	100.0 ± 9.1
AP-5 (0.1 mM)	105.7 ± 5.7
(1.0 mM)	17.0 ± 0.9 **
CPP (0.1 mM)	76.7 ± 4.3
(1.0 mM)	25.0 ± 1.4 **
7-CK (1.0 mM)	73.0 ± 0.9 *

*$p<0.05$, **$p<0.01$, compared with control (Aspin-Welch's test).
AP-5:2-Amino-5-phosphonopentanoic acid.
CPP:(±)-3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)-1-propyl-phosphonic acid.
7-CK:7-Chlorokynurenic acid.

74 ラット脳内興奮性アミノ酸レセプター結合の発生学的研究

榎本理世、荻田喜代一、米田幸雄
〈摂南大・薬・薬理〉

〔要約〕

ラット脳内の各種イオノトロピック型興奮性アミノ酸(EAA)レセプター結合の生後変化について検討した。N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプターチャネルへの[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclo-hepten-5,10-imine(MK-801)結合は、大脳皮質膜標品ではアゴニスト類添加条件下に各生後段階で検出されたが、本結合は生後7日(P7)では成熟ラット(adult)の場合の約80%まで増加した。NMDA認識部位への[^{3}H]グルタミン酸(Glu)結合もほぼ同様の増加を示したが、NMDAアンタゴニストの[^{3}H]D,L-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentenoate(CGP 39653)結合には[^{3}H]Glu結合よりも遅れて増加する傾向が見られた。また、グリシン(Gly)認識部位への[^{3}H]Gly結合はP7でadultレベルと同様の結合が検出されたが、Glyアンタゴニストの[^{3}H]5,7-dichrolo-kynurenic acid(DCKA)結合は生後14日(P14)でもadultの場合の1/2程度しか検出されなかった。一方、non-NMDAレセプターへの[^{3}H]α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA)結合はP14ではadultの場合の30%前後であったが、[^{3}H]カイニン酸(KA)結合は生後3日(P3)目ですでにほぼadultレベルであった。以上の結果より、EAAレセプターの各サブタイプやNMDAレセプターの各ドメインは、それぞれ異なった生後発達を示す可能性が示唆される。

NMDAレセプターは、成熟脳では記憶や学習などの可塑性形成プロセスに関与するが(9)、発生段階の脳においてもシナプス形成過程に大きな影響を及ぼすとの見解(4)が示されている。ニューロンは個体発生のごく初期に分化・発生し、成熟後はほとんど分裂増殖をしない特殊な性質をもつことは周知の事実である。ニューロンの発生は大部分が出生前に起こるが、脳内部位によってはその発生時期が異なる。例えば、生命維持に関係する脳幹部に近いニューロンほど胎生早期に発生し、皮質に近く高次神経活動に関与するニューロンの発生は比較的胎生後期に観察されるが、また小脳などでは例外的に出生後にニューロンの発生が認められる。今回、我々はレセプター結合実験法を用いて、発達段階の脳内可塑性形成プロセスに占めるNMDAレセプターの機能的位置を追究する目的で、生後の各発達段階におけるラット脳内EAAレセプター結合の変動を検討した。

〔実験方法〕

P3、P5、P7およびP14の各ラット大脳皮質を、3種類の蛋白分解酵素阻害薬を含む40倍量の5 mMトリス酢酸緩衝液(pH 7.4)でホモジナイズした。これを50 mMトリス酢酸緩衝液(pH 7.4)への懸濁とその後の遠心分離操作により充分に洗浄したのち、0.32 M蔗糖水溶液に懸濁して-80℃で凍結保存した(2)。懸濁液を結合実験当日、室温で融解後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(10)。本膜標品を50 mMトリス酢酸緩衝液中で、EAAレセプターを標識する各種放射性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急速吸引濾過法により停止した(1)。

〔実験結果〕

Glu、Glyおよびスペルミジン添加条件下で測定した平衡状態の[^{3}H]MK-801結合はP3の時点では136.0±2.5 fmol/mg proteinであった。本結合は、P5、P7およびP14と生後日数の経過とともに増加し、それぞれP3の場合の1.5倍、2.6倍および6倍となった(図1)。また、NMDA認識部位への[^{3}H]Glu結合はP3時ではadultの1/4以下であったが、P5、P7およびP14と生後日数の増加に伴い結合が増大し、P14ではP3の場合の3倍以上の結合が観察された。また、[^{3}H]CGP 39653結合はP3からP14の生後範囲はほぼ直線的に増加し、P14ではP3の場合の約7倍に増加した(図2)。さらに、Gly認識部位への[^{3}H]Gly結合はP3ではadultの場合の約1/2程度であったが、P5、P7およびP14ではP3の場合のそれぞれ1.4倍、2倍および4.7倍の結合が認められた。これに対して、[^{3}H]DCKA結合はP3ではadultの場合の20%以下であったが、[^{3}H]Gly結合の場合と同様にP5、P7およびP14と結合は増加してそれぞれP3の場合の1.3倍、2.2倍および3.5倍となった(図3)。一方、non-NMDAレセプターへの[^{3}H]AMPA結合はP3時にadultの場合の

約30%の結合が観察されたが、P14までは他のレセプター結合の場合ほど著しい増加は見られなかった。すなわち、P5、P7およびP14の[^{3}H]AMPA結合は、P3の場合と比べてそれぞれ1.4倍、1.8倍および1.8倍であった。[^{3}H]KA結合はP3の時点でほぼadultの場合と同様のレベルが認められたが、P5、P7、P14と生後日数の経過につれて結合は増加し、adultの1.5から2倍の結合が検出された(図4)。

図1. イオンチャネル部位

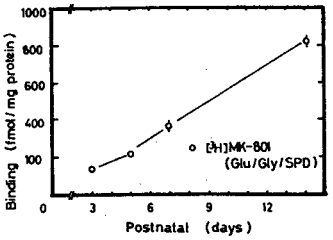


図3. Gly認識部位

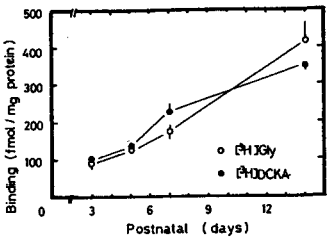


図2. NMDA認識部位

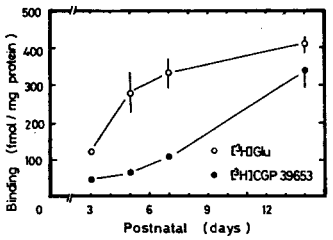
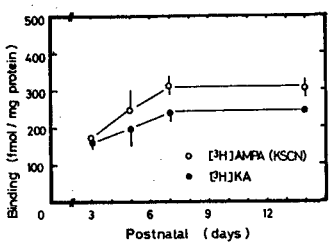


図4. non-NMDAレセプター



〔考察〕

以上の結果は、NMDAレセプターおよびnon-NMDAレセプターはともに、P3の時点ですでにリガンド結合能を有するが、その生後発達に伴う変化は各サブタイプや各ドメインによってそれぞれ異なることを示唆するものである。NMDA認識部位(6,7)やGly認識部位(8,11)には、アゴニスト選択型とアンタゴニスト選択型の多様性が観察されるが、本研究では両認識部位はともにアンタゴニスト選択型の成熟がアゴニスト選択型に比べて遅い傾向にあることが明らかとなった。この事実は、ニューロンの発達初期段階にすでに各選択型への分化が始まっている可能性を支持するものと思われる。一方、KAレセプター結合がP1の時点ですでにadultレベルであるとのオートラジオグラフィー法を用いた研究結果(3,5)と、本研究成績はよく一致する。さらに、特定のリガンド結合が生後の特定時期にはadultの場合よりも高い事実は、神経系の発達初期段階においてこれらのリガンドで標識される部位が、成熟動物の場合とは異なる特殊な機能的役割を担っている可能性を示唆するのかもしれない。

〔謝辞〕

本研究の一部は、平成4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. Enomoto, R., Ogita, K., Han, D. and Yoneda, Y. (1991) J. Neurochem., 59, 473-481.
2. 榎本理世, 荻田喜代一, 米田幸雄 (1990) 神経化学, 29, 212-213.
3. Insel T.R., Miller L.P. and Gelhard R.E. (1990) Neurosci., 35, 31-43.
4. LoTurco J.J., Blanton M.G. and Kriegstein A.R. (1991) J. Neurosci., 11, 792-799.
5. Miller L.P., Johnson A.E., Gelhard R.E. and Insel I.P. (1990) Neurosci., 35, 45-51.
6. Ogita K., Kouda T., Suzuki T., Ohkawara A., Enomoto R., Nabeshima T. and Yoneda Y. (1991) Neurochem. Int., 18, 55-62.
7. 荻田喜代一, 米田幸雄 (1991) 神経化学, 30, 28-29.
8. 鈴木竹雄, 荻田喜代一, 米田幸雄 (1991) 神経化学, 30, 32-33.
9. 米田幸雄, 榎本理世 (1991) 脳と精神の医学, 2, 795-804.
10. Yoneda, Y., Ogita, K. and Enomoto, R. (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther., 256, 1161-1172.
11. Yoneda, Y. and Suzuki T. (1992) Drug News & Perspectives, 5, 28-38.

75 ラット脳内興奮性アミノ酸レセプター結合に対するストレス負荷の影響

韓大健、荻田喜代一、米田幸雄
（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
拘束水浸ストレス負荷に伴うラット脳内興奮性アミノ酸(EAA)レセプター結合の変化について検討を行った。[^{3}H](+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合は、ストレス1回負荷直後ではいずれの脳内部位においても著明な変化を示さなかったが、負荷120時間後では小脳と視床下部において本結合の有意な増加が認められた。さらに、ストレス1日1回5日間連続負荷の場合も、連続負荷直後の[^{3}H]MK-801結合にはいずれの脳内部位においても著変は見出せなかったが、連続負荷終了後24時間の時点では同両脳内部位において[^{3}H]MK-801結合の有意な増加が観察された。しかしながら、同一のストレス負荷条件下でも[^{3}H]α-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA)結合や[^{3}H]Kainic acid(KA)結合には有意な変化は認められなかった。したがって、拘束水浸ストレス負荷により選択的に脳内N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプターのリガンド結合能が増大する可能性が示唆される。

〔緒言〕
ストレス負荷は脳内特定部位において、選択的なγ-アミノ酪酸(GABA)代謝変化を誘発するのみならず(9)、GABAレセプター結合にも強い影響を与えることが知られている(7)。この時に同時に、脳内グルタミン酸(Glu)濃度の著明な変動が招来されるが(9)、EAAレセプターについては、ストレス負荷によりNMDAチャネルへの[^{3}H]N-[1-(2-Thienyl)cyclohexyl]piperidine(TCP)結合には変化はみられないが、non-NMDAレセプターへの[^{3}H]AMPA結合は海馬の一部の領域で増加ことが認められる(8)。一方、ステロイドホルモン類の血中濃度はストレス負荷に伴い急激に上昇するが(3)、ステロイドホルモンレセプターの中でもグルココルチコイドレセプターは、ホルモンレセプターとしての機能以外に細胞核内で転写制御因子として特定の遺伝子の発現を調節することが明らかにされている(4)。さらに、NMDAレセプターの活性化はc-fosやzif/268などの特定のプロトオンコジーンの発現促進を通じて、Activator protein 1(AP-1)などの転写制御因子の誘導を行うが(1)、このAP-1のDNA結合能はグルココルチコイドレセプターの作用により大きく変動するので、NMDAレセプター活性化に伴う種々の細胞機能変化は、結局グルココルチコイドレセプターの活性変動により調節される可能性が高いと類推される。したがって本研究では、脳内Glu代謝変化の著明に観察される拘束水浸ストレスを用いて、脳内イオノトロピック型EAAレセプター結合の変動の有無について検索を進めた。

〔実験方法〕
7週齢のWistar系雄性ラット(200-250 g)を、自由摂食、摂水下において12時間ごとの明暗リズム条件下で飼育した。拘束水浸ストレスは、12-16時間絶食させたラットを金属製拘束ケージを用いて、25℃の水浴中で鎖骨下まで3時間浸すことにより負荷した(8)。動物実験は常にAM7時から12時までの間に行った。ストレスは1日1回もしくは5日間5回連続の2通りで負荷し、動物をストレス負荷直後(0時間後)、24時間後および120時間後にそれぞれ断頭致死させたのち脳を採取した。脳は橋－延髄、小脳、線条体、中脳、視床下部、海馬および大脳皮質の計7部位に分画した(5)。各脳内部位は、40倍量のホモジナイズ用緩衝液〔1 mM EDTA、0.01% Bacitracinおよび0.1 mM Phenylmethyl-sulfonyl fluorideを含む5 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)〕でホモジナイズしたのち、各ホモジネートを50,000g、30分間、遠心分離した。得られた沈渣を同量の洗浄用緩衝液〔50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)〕に懸濁後、再び同条件で遠心分離を行った。この遠心分離と懸濁による洗浄操作を3回行ったのち、沈渣を重量の8倍量の0.32 Mショ糖水溶液に懸濁して-80℃で凍結保存した。実験当日凍結標品を室温融解させたのち、洗浄用緩衝液でさらに2回洗浄操作を行った(未処理膜標品)。あるいは、凍結懸濁液を実験当日に0.08% Triton X-100で前処理した膜標品(トリトン処理膜標品)を結合実験に用いた(2)。[^{3}H]MK-801結合実験は、未処理膜標品を5 nM [^{3}H]MK-801と50 mM Tris-acetate buffer(pH 7.4)中で、30℃、30分間反応させて行った(6)。[^{3}H]AMPAおよび[^{3}H]KA結合実験は、トリトン処理膜標品を10 nM [^{3}H]AMPAもしくは10 nM [^{3}H]KAと50 mM Tris-

表1. [³H]MK-801結合に対するストレス負荷の影響

	[³H]MK-801 binding (fmol/mg protein)	
	小脳	海馬
Control	11.9±1.0	186.1±13.2
1回ストレス		
負荷直後	12.9±0.6	173.3±19.7
24時間後	12.7±1.5	165.9±10.8
120時間後	17.1±2.0*	191.9±18.7
1日1回5日間連続ストレス		
負荷直後	11.2±1.3	200.7±12.8
24時間後	16.7±2.0*	199.0± 6.7
120時間後	14.6±1.1	178.2±17.5

表2. ラット自発運動量に対するストレス負荷の影響

	Rearing(counts/60 min)		Ambulation(counts/60 min)	
ストレス負荷	対照群	ストレス負荷	対照群	ストレス負荷
96時間前	114.5±18.0	94.6±15.6	343.0±46.4	315.5±42.0
72時間前	120.2±20.4	89.2±21.2	347.8±54.8	381.0±50.7
48時間前	108.8±16.9	72.8±15.3	362.2±85.1	313.3±62.8
24時間前	120.3±34.7	72.0±25.9	326.3±71.5	277.8±33.7
当日	139.0±42.0	72.0±25.9	327.3±70.5	581.0±47.5*
24時間後	149.0±39.2	59.5±18.0**	453.7±110.3	298.7±21.6
48時間後	159.8±21.1	92.8± 9.2*	487.2±90.1	398.0±47.4
72時間後	189.6±51.5	68.5±11.3*	473.5±59.6	278.8±13.8*
96時間後	221.3±45.8	108.2±8.8*	467.6±76.3	437.7±35.8
120時間後	251.0±38.7	107.3±16.9**	460.3±65.6	460.7±44.2

acetate buffer(pH 7.4)中で2℃、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急速吸引濾過法により行い、洗浄後の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。また、ラットの自発運動量はAM9時からAM12時までの間にアニメックス装置を使用して測定し、10分間毎の合計60分間のAmbulationおよびRearingの回数を計測した。

[結果]

ストレス1回負荷直後および負荷24時間後の条件下では、いずれの脳内部位でも[³H]MK-801結合には著変は見出せなかったが、負荷120時間後においては小脳および視床下部で[³H]MK-801結合の有意な増加が見られた。ストレス1日1回5日間連続負荷の場合には、負荷直後ではいずれの脳内部位においても[³H]MK-801結合には著明な変化は現れなかったが、連続負荷24時間後には小脳と視床下部において[³H]MK-801結合の有意な増加が認められた(表1)。一方、同条件下においていずれの脳内部位でも[³H]AMPA結合および[³H]KA結合に著明な変化は認められなかった。ストレス負荷のラット自発運動量に対する影響を検討したところ、Ambulationについては対照群とストレス負荷群の間にはストレス負荷当日を除いて顕著な差は認められなかったが、Rearingについては対照群が計測日数の経過と共に運動量を増加させたのに対して、ストレス負荷群には著明な運動量の増加は観察されなかった(表2)。

[考察]

本研究結果は、拘束水浸ストレスの負荷がEAAレセプターのなかでも特に、NMDAレセプター結合に大きく影響を与える可能性を支持するものである。小脳および視床下部において観察される[³H]MK-801結合の選択的増加が、結合部位の増加あるいは親和力の変化に起因するものかについての解析のみならず、血中グルココルチコイド濃度変化と[³H]MK-801結合増加との関連性についても早急に解決されなければならない。また、単回負荷群と連続負荷群との間の[³H]MK-801結合変化に関する相違点についても慎重な検討が必要である。

[謝辞]

本研究の一部は、平成4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. Cole, a. J., Saffen, D. W., Baraban, J. M., and Worley P. F. (1989) Nature, 340, 474-476.
2. Enomoto, R., Ogita, K., Han D. and Yoneda, Y. (1992) J. Neurochem., 59, 473-481.
3. Fujieda, K. and Hiroshige, T. (1978) Acta Endocrinol., 89, 10-19.
4. Fuller, P.J. (1991) FASEB J. , 5, 3092-3099.
5. Glowinski J. and Iverso L.L. (1966) J. Neurochem., 13, 655-669.
6. 韓大健、榎本理世、荻田喜代一、米田幸雄 (1991) 神経化学, 30, 146-147.
7. Skerritt, J. H., Trisdikoon P., and Johnston G. A. R. (1981) Brain Res., 215, 398-403.
8. Tocco, G., Shors, T.J., Baudry, M. and Thompson, R.F. (1991) Brain Res., 559, 168-171.
9. Yoneda, Y., Kanmori, K., Ida S. and Kuriyama K. (1983) J. Neurochem., 40, 350-356.

76 イメージングプレートによる受容体の画像化

— ^{11}C、^{3}H標識薬剤による多重標識オートラジオグラフィー —

谷内一彦、柳鍾薫、岩田錬※、
井戸達雄※、渡辺建彦
（東北大学・医・第一薬理、東北大学サイクロトロンＲＩセンター※）

〔要約〕最近開発されたイメージングプレートシステム（ＩＰＳ）を用いて、^{3}H、^{11}C標識リガンドによる受容体オートラジオグラフィーをおこない、フィルムによる方法と比較した。[^{3}H]ピリラミン、[^{3}H](R)-α-メチルヒスタミン、[^{11}C]Ｎ－メチルスピペロンを用い、ヒスタミンH_1、H_2、ドパミンD_2受容体をインビボあるいはインビトロで画像化した。またこれらの核種の半減期の差を利用して同一切片の多重標識オートラジオグラフィーをおこない、ドパミンD_2受容体とヒスタミンH_2受容体の分布の違いを可視化した。フィルム法では不便な点の多い^{3}H標識リガンドや^{11}C標識リガンドでもＩＰＳによりオートラジオグラフィーがおこなえるので、多くの新しい研究が可能になると考えられる。

はじめに　従来の受容体マクロオートラジオグラフィーは通常、^{3}H、^{125}Ｉ標識リガンドの結合実験を行い、それらに感受性のあるフィルムにより画像化をおこなう。この受容体オートラジオグラフィーの方法はすでに確立しているが(2)、実際にこれをおこなう際、以下のような不都合な点がある。１）^{3}H標識リガンドに対して感受性が低く、感光時間がかかる。２）^{3}H標識リガンドによる定量的オートラジオグラフィーを行う際、dynamic rangeが狭く、定量が難しい。３）ポジトロン（特に^{11}C）標識リガンドによる受容体オートラジオグラフィーはフィルム法では感度が低くおこなえない。我々はこのような欠点の少ない高感度・高分解能イメージイングプレートシステム（富士写真フィルムBAS3000）を使用し、^{11}C、^{3}H標識リガンドによるインビボ、インビトロでの受容体オートラジオグラフィー法をおこなっている。

方法　ａ）^{11}C標識リガンド（[^{11}C]N-Methylspiperone, [^{11}C]SCH23390, [^{11}C]YM09151-2）は我々の開発したオンライン合成システムを使用して、$^{11}CO_2$ガスより実験ごとに作成した(1)。^{3}H標識リガンドは[^{3}H](R)-α-Methylhistamine（ヒスタミンH_2受容体アゴニスト）、[^{3}H]Pyrilamine（H_1アゴニスト）を使用した。ｂ）^{11}C標識リガンド、[^{11}C]N-MethylspiperoneによるインビボでのD_2受容体測定は、Wistar rat (230-260g)に250-350 μCi (200-300 pmol)を尾静脈より投与40分後屠殺し、20μmの切片を作製して保護膜のあるイメージングプレート(UR-IP)に２時間接触させた。ｃ）^{11}C標識リガンド（[^{11}C]N-Methylspiperone, [^{11}C]SCH23390, [^{11}C]YM09151-2）によるインビトロでの受容体測定では、リガンド 0.4-4nMを含む溶液(20mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 0.0001 % ascorbic acid, pH 7.4)の中で20μmの切片を30分室温でインキュベーションし、UR-IPに2時間接触させた。ｄ）[^{3}H]PyrilamineによるインビボでのヒスタミンH_1受容体測定では、Hartley guinea pig (260 g)に10μCi, 360 pmolの[^{3}H]Pyrilamineを股静脈より投与し、60分後に屠殺して20μmの切片を作製し、保護膜のないイメージングプレート(TR-IP)と2週間接触させた。この量では、フィルムでは十分な画像は得られないため、別に80μCi(2900pmol)投与し同様にインビボでの受容体測定をおこなった。ｅ）インビトロでのヒスタミンH_2受容体測定では、50 mM Na-K buffer (pH 7.4)の中で、1 nMの[^{3}H](R)-α-Methylhistamineとインキュベーション後、洗浄したあとTR-IPと5-7日間接触させた。一部はその後Hyperfilmと４カ月間接触させた。ｆ）半減期の差を利用して、^{11}C（半減期20.38分）と^{3}H（12.26年）の2核種による多重標識受容体オートラジオグラフィーをおこなった。Bufferに^{11}C, ^{3}H標識リガンドを同時に溶解し、切片を40分室温でインキュベートし、はじめに２時間UR-IPと接触させ^{11}Cの画像を得、３日後^{11}Cの十分な減衰を待ってTR-IPと5-7日接触させて^{3}Hの画像を得た。

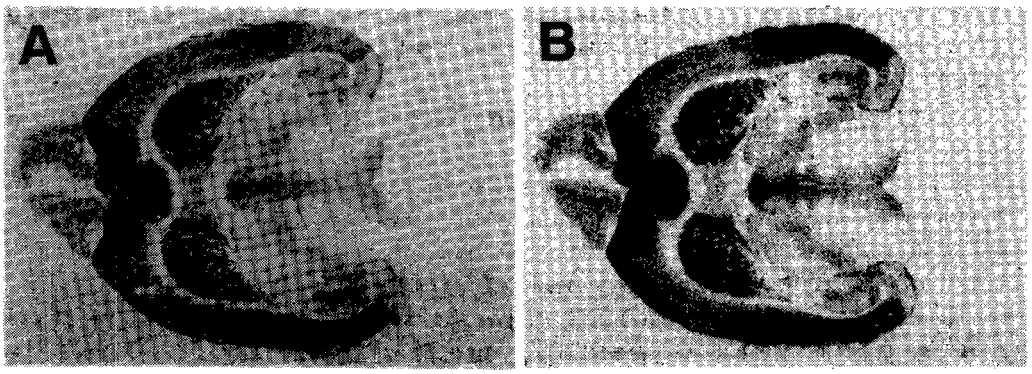


図１　フィルム（Ａ）とイメージングプレート（Ｂ）によるヒスタミンH_2受容体の画像化：[^{3}H]α－メチルヒスタミンのラット脳（水平断）でのインビトロ結合

結果　ａ）図１に示す如く、フィルムとイメージングプレート(TR-IP)によって得られた同一切片のヒスタミンH_2受容体の画像を示す。IPS (BAS3000)は50μm程度の分解能があるのに対し、フィルムは20μmで多少IPのほうが画質が荒い。し

かし露光時間は、IPが5日間であるのに対し、フィルムでは1-2カ月では十分な黒化度が得られず、4カ月接触させた。b）図２Ａに[^{11}C]N-MethylspiperoneによるインビボでのドパミンD_2受容体（線条体）、5-HT_2受容体（前頭葉）の画像化を示す。この時の投与したリガンドの受容体占拠率はB_{max}５％以下で、ほぼＰＥＴ（ポジトロンエミッションコンピュータトモグラフィー）での測定条件に近似している(3,4,5)。フィルムでは５０倍程度投与しないと黒化しないが、その量では受容体がblockされている。脳切片を用いたインビトロでの[^{11}C]N-Methylspiperoneの結合も、IPにより[^{3}H]標識薬剤と同様に画像化できた（図２Ｂ）。c）[^{3}H]PyrilamineによるヒスタミンH_1受容体のインビボでの測定(6)では、tracer dose（薬剤の受容体占拠率が５％以下と考えている）での画像化にはIPが必須で（図２Ｃ）、フィルム法では（図２Ｄ）８倍の放射能を投与し９０日程度の露光をしてもコントラストが低かった。d）半減期の差を利用した同一切片多重標識受容体オートラジオグラフィーを図３に示す。ドパミンD_2受容体とヒスタミンH_1受容体の分布の違いを同一切片にて可視化することができる。

図２

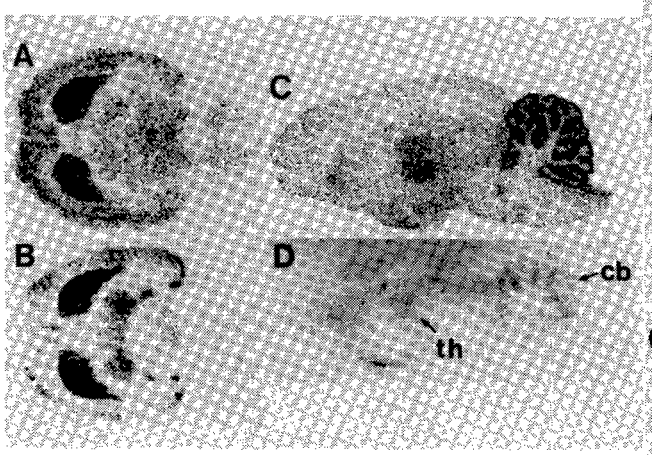


図３

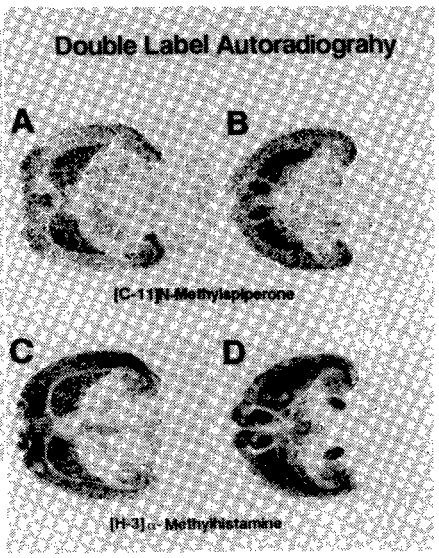


図２　^{11}Ｃ－、^{3}Ｈ－標識リガンドによるインビボ・インビトロ受容体オートラジオグラフィー：Ａ）[^{11}C]N-メチルスピペロンのインビボでの結合測定（UR-IP）。Ｂ）[^{11}C]N-メチルスピペロンのインビトロでの結合（UR-IP）。[^{11}C]SCH23390（ドパミンD_1受容体アンタゴニスト），[^{11}C]YM09151-2（ドパミンD_2受容体アンタゴニスト）でも同様にUR-IPにより画像が得られる。Ｃ）[^{3}H]ピリラミンのインビボでの結合測定（TR-IP）。Ｄ）フィルム法での[^{3}H]ピリラミンの結合測定。cb;cerebellum,　th;thalamus

図３　[^{11}C]N-メチルスピペロンと[^{3}H](R)-α-メチルヒスタミンの多重標識オートラジオグラフィー：ＡとＣが頭側の同一断面で、ＢとＤが尾側の同一断面である。大脳皮質、黒質、ventral pallidum、olfactory nucleusなどで異なる分布をする。　Ａ，ＢはUR-IPにて、Ｃ，ＤはTR-IPにて画像化した。

考察　^{3}Ｈや^{11}Ｃのような核種は、通常のフィルムを用いたオートラジオグラフィーでは、それぞれの核種の性質（^{3}Ｈではエネルギーが低い、^{11}Ｃでは半減期が短すぎるなど）により、十分な画像が得られなかったり、定量に苦労することが多い。我々は最近注目を集めているヒスタミンH_1受容体のオートラジオグラフィーによる研究を進めるために、新しく開発された^{3}Ｈなどに感受性のあるＩＰＳを用い、その優位性を検証した。いままでフィルム法では不可能であったtracerdoseでのインビボ受容体測定、ポジトロン放出核種での受容体オートラジオグラフィーなどがＩＰＳでは可能で、さらに^{3}Ｈ標識リガンドによるインビトロ受容体オートラジオグラフィーでもその定量性、迅速性において優れていた。現在定量的オートラジオグラフィーのためのスタンダードを作っている。ＩＰＳを用いることによりＰＥＴ用トレーサー(3,4,5)の迅速な評価が可能であり、また薬剤や発現させた遺伝子クローンの^{3}Ｈ－リガンドによる迅速なスクリーニングなども可能になると考えられる。

謝辞　BAS3000システムを使わせて頂いた富士写真フィルム、[^{3}H]αメチルヒスタミンを供与して頂いたミドリ十字に深く感謝いたします。

文献(1)Iwata R, Pascari M, Yuasa M, Yanai K, Takahashi T, Ido T. Appl. Radiat. Isot. in press
(2)Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ (eds). 1985, Neurotransmitter Receptor Binding, Raven Press
(3)Yanai K, Watanabe T, Yokoyama H, et al. Neurosci. Lett. 137:145-148, 1992
(4)Yanai K, Watanabe T, Meguro K, et al. NeuroReport 3:433-436, 1992
(5)Yanai K, Watanabe T, Yokoyama H, et al. J. Neurochem. 59: 128-136, 1992
(6)Yanai K, Yagi N, Watanabe T, et al. J. Neurochem. 55:408-420, 1990

77 in situ hybridization法を用いたウシおよびラットヒスタミンH_1レセプター mRNAの局在の検討

阿部能之[1]、荻野敏[1]、堀尾嘉幸[2]、木山博資[3]、遠山正弥[3]、松永亨[1]、福井裕行[2]
（大阪大学医学部耳鼻咽喉科教室[1]、第２薬理学教室[2]、第２解剖学教室[3]）

〔要約〕
ヒスタミンH_1レセプターのウシ副腎、ラット脳における発現とその局在をin situ hybridization法を用いて検討した。ウシ副腎に対してはウシヒスタミンH_1レセプターcDNAの45個の塩基配列に相補的なオリゴプローベを２種類作成し、これを ^{35}S 標識して使用した。ラット脳に対してはアルカリフォスファターゼ標識した２種類のオリゴプローベを使用した。その結果、ウシ副腎では髄質に強いシグナルがみられ、髄質内でも特に皮質に近い部位に強く発現していた。ラット脳においても、ヒスタミンH_1レセプターmRNAが局在して発現していることが明らかになった。今後さらに詳細な分布を明らかにすると共に、レセプターmRNAの発現している細胞の同定をおこなう予定である。

［目的］

ヒスタミンは中枢、末梢神経系において神経伝達物質として、またアレルギーや炎症反応において化学伝達物質として重要な役割を果たしている。このヒスタミンの作用は受容体を介して伝達されるが、その受容体には現在３種類の亜型（H_1,H_2およびH_3）が知られている。最近、我々はウシ副腎髄質よりH_1レセプターcDNAのクローニングに成功し、そのシークエンスを明かにした(3)。また、このcDNAフラグメントを用いてラットゲノムライブラリーよりプラークハイブリダイゼーション法を用いてラットH_1レセプター遺伝子のクローニングにも成功した。そこで今回、in situ hybridizationの手法を用い、組織学的にウシ副腎、ラット脳におけるH_1レセプターmRNAの発現とその局在について検討したので報告する。

［方法］

実験には合成オリゴDNAをプローブとして用いた。ウシにおいてはクローニングされたcDNAの中から、第３細胞内ループに位置する284－298、及び344－358番目の各15個のアミノ酸をコードする塩基配列（図１）に相補的なDNAプローブを２種類合成（図２）し、ターミナルトランスフェラーゼを用いて3'末端を[α-^{35}S]dATPでラベルし、この２種のプローブを混合してin situ hybridizationによる検出に使用した。ラットにおいてもウシにおいてプローブに用いたアミノ酸配列に相当する部分（277-284、及び337-351番目の各15個のアミノ酸配列）をえらび、この塩基配列に相補的なcDNAの図２に示す部分にアルカリフォスファターゼ標識した合成プローブを作成し、２種類のプローブを混合して実験に使用した。ウシ副腎は新鮮組織をドライアイスにて素早く凍結し、ラット脳は４％パラフォルムアルデヒド含有0.1Mリン酸緩衝液で還流固定後凍結した。クライオスタットで20μmの切片を製作し、シランコートしたスライドグラスに張り付け、－80 ℃ で保存した。切片は４％パラフォルムアルデヒドにて固定し、アセチル化などのプレハイブリダイゼーション反応後、エタノール系列にて乾燥し、ハイブリダイゼーションを行なった。４×SSC（１×SSC：0.15M NaCl, 0.015M Sodium Citrate）に50％脱イオン化ホルムアミド、Denhardt's液、Salmon testis DNA, 10％デキストランサルフェートを加えたハイブリダイゼーション液に、ウシは１スライドあたり0.5-1.0×10^6 dpm、ラットは1-10 fmol/μl 量のプローブを加え、湿箱中に置いた切片にかけ、37 ℃ で約16時間インキュベーションを行なった。45 ℃ の水槽を用い、１×SSCで20－30分毎に溶液を換えながら1.5時間洗浄した。ウシはエタノール系列で脱水後１週間X－rayフィルムラジオオートグラフィー後現像し（マクロラジオオートラフィー）、Kodak社の乳剤をかけ４週間露出し、ミクロラジオオートグラフィーをおこなった。ラットはバッファーを0.1M Tris-HCl(pH 7.5) に変えた後、発色基質（0.33mg/ml nitro blue tetrazolium/0.17mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoylphosphate）を加えた0.1M NaCl, 50mM $MgCl_2$を含む0.1M Tris-HCl(pH 9.2)と約20時間反応、発色させ、H_2Oで洗浄し反応を停止した。コントロールとしては、ウシ、ラット共に100倍

の非標識プローブを標識プローブと共にハイブリダイゼーション液に加えインキュベートする競合試験をおこなった。

[成績]

ウシ副腎においては、シグナルは髄質に強く発現していた。髄質内におけるその発現のしかたは一様ではなく、髄質の皮質に近い部位に強く発現していた。ラット脳においてはTynglate cortex, hippocampus, piriform cortexなどに局在してシグナルが観察された。

[考察]

副腎においては髄質のクロム親和性細胞に対しヒスタミンがカテコールアミンやエンケファリンを分泌させる作用のある事が知られている(3)。今回副腎髄質に強くシグナルが発現していたことはこの事実をうらずけるものであった。今後さらに副腎髄質のアドレナリン及びノルアドレナリン含有細胞それぞれにおける発現の差についても検討したい。ラット脳においてはヒスタミンを神経伝達物質とする神経系(2)が証明されており、ヒスタミンは脳内において睡眠覚醒、日内ヒズム、摂食、飲水、前庭機能などの機能に関与している事が知られている(4)。今回の検討によって、ヒスタミンH_1レセプターのmRNAも脳内にある局在をもって分布していることが明らかになった。現在、全脳におけるその局在を明らかにすべく、検討中である。

図1

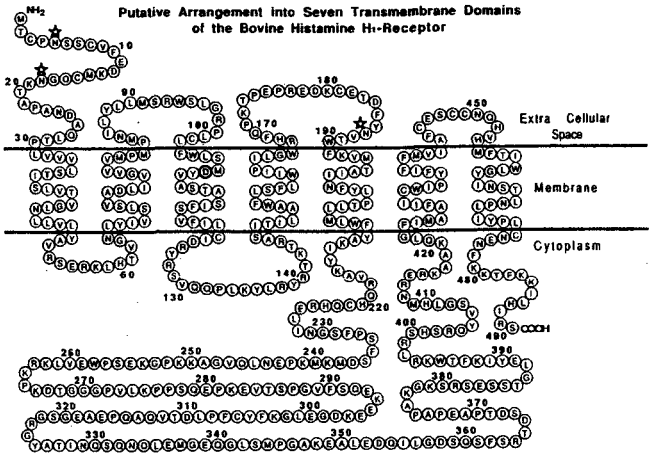


図2

Sequences of oligo-probes for in situ hybridization

Bovine

Probe 1 : 5' >TTCTCCATCCTTCTCTTCCTTCTCTTGGCTGAAGACACCTGGAGA< 3'

Probe 2 : 5' >CCGGGAGAAGGACTGGCTGTCACCTAGGATCTGATCCTCTAAGGC< 3'

Rat

Probe 1 : 5' >GGGACGTGTTTCCCTTTCCCCCTCTTGGCTGAAGACAGTTGGAGA< 3'

Probe 2 : 5' >CCGGGAGAAGGACTGTTGATCCACCAAGGTCTGATCCTCTGATGT< 3'

[文献]

(1) Noble, E. P., Bommer, M., Liebisch, D., and Herz, A. (1988) Biochem. Pharmacol. 37, 221-228

(2) Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., Tohyama, M., and Wada H. (1984) Brain Res. 295, 13-25

(3) Yamashita, M., Fukui, H., Sugama, K., Horio, Y., Ito, S., Mizuguchi H., and Wada, H. (1991) Proc. Natl. Acad. Aci. U. S. A. 88, 11515-11519

(4) Yamatodani, A., and Watanabe, T. (1991) in Histaminergic Neurons: Morphology and Function. (Watanabe, T., and Wada H., eds), pp. 231-238. CRC Press, Boca Raton.

78 モルモット・ヒスタミンH₁レセプター遺伝子の単離

堀尾嘉幸、伊藤誠二＊、福井裕行
（大阪大学医学部第二薬理、＊大阪バイオサイエンス研）

〔要約〕

PCR(polymerase chain reaction)で増幅しクローン化したモルモット脳ヒスタミンH₁レセプターcDNAフラグメントをプローブとしてモルモット遺伝子DNA ライブラリーよりモルモットヒスタミンH₁レセプター遺伝子をクローン化した。モルモットH₁レセプター遺伝子はイントロンを持っていなかった。モルモットH₁レセプター蛋白質はウシH₁レセプターよりも３個少ない４８８個のアミノ酸より構成されており、やはり７個の膜貫通領域を持っていることが推定された。ウシH₁レセプター、ラットH₁レセプターとのホモロジーは膜貫通領域で８０－１００%、全体では６７－６９%であった。細胞内第３ループに相当する領域は２４１個のアミノ酸よりなり、ウシ（２１２個）、ラット（１９７）個より更に長いものであることが判明した。ヒスタミンと相互作用をすると考えられている第Ⅲ膜貫通領域のアスパラギン酸、第Ⅴ膜貫通領域のスレオニンとアスパラギンはいずれもモルモット、ウシ、ラットで保存されていた。また S-S結合を形成していると考えられる第Ⅰおよび第３細胞外ループのシステインも３者で保存されていた。

ヒスタミンはオータコイド、神経伝達物質として中枢神経系をはじめとして末梢臓器にも広く分布し、その作用は現在のところヒスタミンH₁レセプターを介するものとして平滑筋の収縮、毛細血管透過性の亢進、副腎髄質からのカテコールアミンの遊離、H_2 レセプターを介するものとして胃酸の分泌、そしてH_3 レセプターを介するものとして中枢神経における神経終末よりのヒスタミン遊離の抑制が知られている。ヒスタミンレセプターの情報伝達機構に関してはこれまでの研究により、H₁レセプターではホスホリパーゼCの活性化とそれに続くイノシトール 1,4,5,-三リン酸の蓄積、細胞内 Ca^{2+} の増加であり、H_2 レセプターではcAMPの増加である。H_3 レセプターに関してはまだ不明のままである。H₁レセプターとH_2 レセプターはいずれもGタンパク質を介する情報伝達機構が考えられ、その構造は分子内に７個の膜貫通領域を有する７回膜貫通型レセプター（１）と想定されていたが、１９９１年に我々によってウシH₁レセプター（２),Gantz らによって犬H_2 レセプター（３）がクローニングされ、そのことが実証された。モルモット臓器はラットなどの齧歯類に比べヒスタミンに対する感受性が著しく高く、これまでヒスタミンH₁レセプターの研究によく使われてきた。そこでこのヒスタミンの動物種による感受性の差が何に起因するか、また動物種によるヒスタミンH₁レセプターの構造の相違点と共通点、H₁遺伝子のイントロンの有無、さらにはヒスタミンH₁レセプターのサブクラスがないかどうかを検討するためにモルモットゲノムＤＮＡライブラリーよりモルモットヒスタミンH₁遺伝子の単離を試みた。

【方法】

モルモット臓器（大脳、小脳、肺、心臓、小腸）よりGuanidine Thiocyanate-CsTFA 法によってtotal RNA を抽出後、poly U paperを使ってpoly(A) RNA を分離した。各々のpoly(A)RNA用いてcDNAを合成した後、このpoly(A)RNA-cDNA をテンプレートとしてPCR (polymerase chain reaction) をおこなった。PCR のプライマーとしてウシヒスタミンH₁レセプターの第２および第４膜貫通領域に相当するそれぞれ21コのヌクレオチドにEcoRI 又はPstI制限酵素切断配列を設けたものを用いた。PCR 反応後、反応産物を EcoRI とPstIで切断し、２%アガロースで目的のバンドを分離しpUC 119 にサブクローニング後、その塩基配列を決定した。この結果、大脳のRNA よりモルモットH₁レセプターと思われる約

300 bpのフラグメント一種類が分離された。そこで、このフラグメントをプローブとしてEMBL-3をベクターとしたモルモットゲノムDNA ライブラリー約５０万個をスクリーニングしたところ６個の陽性クローンを単離した。このうちの一つについてさらに分析したところ BglII で切断される 4.8 kb のDNA にH₁ 構造遺伝子が存在することが確認された。そこでこのDNA フラグメントをpUC 119 にサブクローニングし、制限酵素地図を作成した。DNA シークエンスはDNA 断片をM13 ファージにさらにサブクローニングした後DNA シークエンサー (ABI)を用いて決定した。

【結果と考察】

単離した4.8 kbの BglII フラグメントは約1.4 kbの5'遺伝子上流領域を含むモルモットH₁ レセプター遺伝子をコードしており、H₁ レセプター遺伝子内にはイントロンが存在しなかった。モルモットH₁ レセプター蛋白質はウシレセプターよりも３つ少ない488 個のアミノ酸から構成されており、分子量55,600でフォトアフィニティーラベル実験で想定されていた分子量 (56-57k) (4) に近似していた。またhydropathy analysis より、７個の膜貫通領域を持っていることが想定された。ウシH₁ レセプターとのホモロジーは膜貫通領域では最もホモロジーの低い第IV膜貫通領域で80%、最も高い第III および第Ⅴ膜貫通領域では100%であった。またラットとの比較では最も低いホモロジーは第IV膜貫通領域 (80%) で最も高い領域は第III と第Ⅴ膜貫通領域(100%)であった。一方全領域でのアミノ酸のホモロジーは牛H₁ レセプターと67% 、ラットH₁ レセプターとは69% であった。同様の比較法で牛、ラット間のホモロジーは80% で、モルモットH₁ レセプターの構造は牛、ラットのものとやや異るという結果を得た。また第Ⅴ及び第VI膜貫通領域ではさまれた細胞内にあると思われる第３細胞内ループはＧ蛋白質と相互作用する領域と考えられているが、241 個のアミノ酸から構成されており212 個のアミノ酸よりなるウシH₁ レセプター、197 個のアミノ酸よりなるラットH₁ レセプターよりも更に長いものであることが見いだされた。ヒスタミンのアミノ基の結合するsiteと考えられている第III膜貫通領域のアスパラギン酸とヒスタミンのイミダゾール環に作用すると考えられている第Ⅴ膜貫通領域のスレオニン及びアスパラギンはいずれも牛、ラット、モルモットで共通に保存されていた。NH_2-端にある 2個のN-glycosylation を受ける可能性のあるアスパラギンはウシ、ラットと同様に存在したがウシ、ラットで認められた第２細胞外ループのN-glycosylation site はモルモットには存在しなかった。また第１、第３細胞外ループに１つずつシステインが存在しこの２つのシステインはウシ、ラット、モルモットの３つに共通しており、この２つのシステインがS-S 結合を行ってレセプターの立体構造の形成に役立っているものと考えられた。一方ヒスタミンH₁ レセプターはＣキナーゼによって不活性化されることが報告されていたが（５)、第３細胞内ループにはＣキナーゼによってリン酸化を受ける配列 R-X-X-S-X-R-X (X: 任意のアミノ酸）に非常に近似した配列であるR-L-R-S-H-S-R-Q が認められ、この８個のアミノ酸はウシ、ラットでも全く同じであった。モルモットH₁ レセプター遺伝子の5'上流領域ではTATA box、NF-Y site, AP-2 siteが認められたが、CRE, TRE, GCbox は認められなかった。

【文献】

（１）堀尾嘉幸、福井裕行、和田博(1992)化学と生物、30, 102-111

（２）Yamashita, M., Fukui, H., Sugama, K., Horio, Y., Ito, S., Mizuguchi, H. and Wada, H. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 11515-11519

（３）Gantz, I., Schaffer, M., Delvalle, J., Logsdon, C., Campbell, V., Uhlew, M. and Yamada, T. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 429-433

（４）Ruat, M., Bouthenet, M. L., Schwartz, J. C. and Ganellin, C. R. (1990) J. Neurochem. 55, 378-385

（５）Volpi, M. and Berlin, R. D. (1988) J. Cell Biol. 107, 1533-1539

79 GABA$_B$ 受容体に特異的なモノクローナル抗体の作製とその性質

中安博司、水谷宏、栗山欣弥、*寺居和宏、*花井一光、*木村宏
（京都府立医大・薬理、 *滋賀医大・分子神経）

〔要約〕

ウシ大脳皮質のシナプス膜から調製したGABA$_B$ 受容体標品でマウスを免疫し、この受容体に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。 この抗体（IgM）は、シナプス膜画分の蛋白質のうち分子量8万のものを特異的に認識した。 またこの抗体によりシナプス膜の可溶化上清からGABA$_B$ 受容体を選択的に免疫沈降させうることが結合実験で証明された。 この性質を利用して、抗体結合ビーズを作製し、イミュノアフィニティクロマトグラフィーを行ったところ、GABA$_B$ 受容体をほぼ単一にまで精製することが出来、高いGABA結合能を示す標品を得ることが出来た。 免疫組織化学で、このモノクローナル抗体がシナプス膜を染めることも示された。 これらの結果より、この抗体により特異的に認識される分子量8万のシナプス膜蛋白質がGABA$_B$ 受容体そのものであると考えられる。

【方法】

シナプス膜画分をウシ大脳皮質より調製し、これを界面活性剤CHAPSによりGABA結合活性を保ったままで可溶化した。 免疫原としてのGABA$_B$受容体は、すでにわれわれが報告した如く（1）、GABA$_B$受容体の特異的アゴニストであるバクロフェンをリガンドとして用いるアフィニティクロマトグラフィーにより調製した。 部分精製標品（10－20μg）を繰り返しマウスに投与し、ここから得られたリンパ球とミエローマ細胞との融合を行った（2）。 スクリーニングは、同じ部分精製標品を用いて作ったミニウエスタンブロットにより行った。 分子量は8万位であろうと予想されていたので、この付近を認識する抗体を産生するハイブリドーマを選択していった。 得られたポジティブクローンは、96穴プレートでの限界希釈によるクローニング操作を二度繰りかえして単一クローンにした。 このハイブリドーマ（GB－1）をマウス腹腔内で増殖させて、得られた腹水を実験に使用した。

【結果と考察】

シナプス膜蛋白質のウエスタンブロットを用いて、得られたモノクローナル抗体の特異性を検討した。 シナプス膜画分中には、多種類の蛋白質がみられたが、この抗体により分子量8万の蛋白質のみが特異的に認識されることが判明した（図1）。 この分子量8万の蛋白質は、大脳皮質、小脳、延髄、脊髄などのシナプス膜画分に広く認められた。

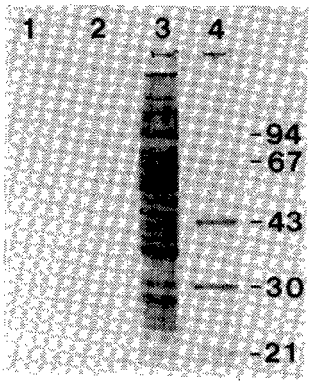
ブロットの処理において、この一次抗体抜きのものでは、当然ながらバンドは認められなかった。 またこの抗体は、バクロフェン・アフィニティクロマトグラフィーの溶出液中の主成分である分子量8万の蛋白質とも強く反応した。

次に、これが実際にGABA$_B$ 受容体に対する特異抗体であるかどうかを調べるために、シナプス膜蛋白質の可溶化標品について、吸収実験を行った。 抗体結合ビーズと可溶化液をゆるやかに振とうしながら反応させると、大部分のGABA$_B$ 受容体の結合活性はビーズに吸着されたが（図2）、全体の蛋白質組成はこの操作の前後で全く変化しなかった。 つまり、GABA$_B$ 受容体は極めて特異的にこの抗体結合ビーズに吸着されたことが明かとなった。

ビーズをよく洗った後、強い酸性条件下（0．1M クエン酸、pH2．5）でGABA$_B$ 受容体を溶出させることが出来た。 この様な過酷な条件下では、一部のGABA$_B$ 受容体が失活してGABA結合能を失ってしまうが、全体の操作を氷の中で素早く行うことにより、高い結合活性を残した状態でGABA$_B$ 受容体標品が得られた。 この標品は、SDS－PAGEで分子量8万の単一のバンドのみを示した。 単純計算では、可溶化上清から約8，200倍の精製となるが、部分失活を考慮すると、実際の精製度は、もっと高いものになると思われる。

このモノクローナル抗体は、GABA$_B$ 受容体の結合活性を直接的に阻害することも分かった。 シナプス膜を希釈した腹水と予めインキュベートしておき、その後に［^{3}H］GABAとの結合を調べると、抗体による強い阻害が認められた。 現在のところ、この抗体がどの様な仕組みで結合阻害をするのかは明かではないが、このモノクローナル抗体は、GABA$_B$ 受容体に対して、見かけ上高分子のアンタゴニストとして機能しているように思われる。 実際、抗体とシナプス膜とのプレインキュベーションにより、GABAの添加によるGABAB受容体共役性のc－AMP生成量の減少が消失した。 これらの結果は、このモノクローナル抗体により特異的に認識される分子量8万の蛋白質が単なるGABA結合蛋白質ということだけではなく、実際にGABA$_B$ 受容体そのものであることを示している。

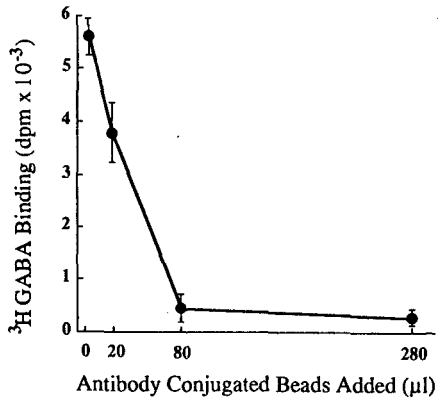
このモノクローナル抗体がIgMであることもあって、受容体の電顕レベルでの免疫組織化学的な研究にはおおきな制限があることが判明した。 しかしながら、光顕レベルでの研究により、このGABA$_B$ 受容体がシナプス膜に存在することが明らかになった。 これらの結果を総合すると、このモノクローナル抗体が分子量8万のGABA$_B$ 受容体に特異的なものであることが確認できたと考えられる。



（図1）　モノクローナル抗体の特異性

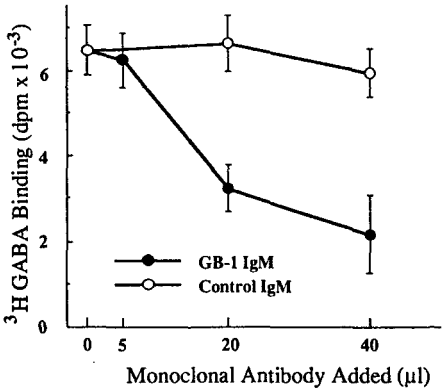
ウシ大脳皮質のシナプス膜蛋白質のウエスタンブロットを作製し、モノクローナル抗体と反応させ、アルカリフォスファターゼ結合の抗ＩｇＭ二次抗体で発色させた。

1．一次抗体（ＧＢ－１）抜きのコントロール
2．ＧＢ－１抗体によるイミュノブロット
3．１と２に対応するブロットの蛋白質染色
4．分子量マーカー



（図2）　モノクローナル抗体による結合活性の吸収

ＣＮＢｒ活性化セファロースと腹水から調製した精製ＩｇＭを反応させ、抗体結合ビーズを作製した。　これとシナプス膜の可溶化標品を一晩ゆるやかに振とうした。　遠心でビーズを沈澱させ、上清中のＧＡＢＡ$_B$ 受容体の活性を測定した。　抗体結合ビーズの量を増やしていくと、ほぼ全部の結合活性を吸収できるが、このときの上清中の蛋白質組成には、吸収操作の前後で全く変化がみられない。　また、これに伴い上清中の分子量８万の蛋白質も、特異的に減少している事も判明した。



（図3）　モノクローナル抗体による結合活性の直接阻害

腹水中には高濃度の抗体が含まれているが、これとともにほぼ同量のアルブミンも含まれており、以下の結合阻害実験には不都合である。　このために、抗ＩｇＭ抗体カラムを用いて腹水からＩｇＭ抗体をほぼ単一に精製した。　市販の非特異的マウスＩｇＭも同様に精製した。　これらの特異ＩｇＭ（ ● ）、または非特異ＩｇＭ（ ○ ）とシナプス膜を一晩インキュベートし、［^{3}H］ＧＡＢＡの結合活性を測定した。　非特異抗体は殆ど阻害しないのに対し、ＧＢ－１抗体では明らかな結合活性の阻害効果がみられた。

【文献】

1. Ohmori, Y. and Kuriyama, K. Biochem. Biophys. Res. Commun. 172, 22-27 (1990).

2. Nakayasu, H., Mizutani, H. Hanai, K., Kimura, H. and Kuriyama, K. Biochem. Biophys. Res Commun. 182, 722-726 (1992).

80 精製$GABA_A$受容体複合体に対する抗体の特異性

田口淳一＊，岡村　均＊，井端泰彦＊，
栗山欣弥＊＊
（京都府立医大・第二解剖＊，薬理＊＊）

〔要約〕
ウシ大脳皮質粗シナプス膜画分からベンゾジアゼピン アフィニティー カラムクロマトグラフィーによって精製したγ－アミノ酪酸（GABA）$_A$受容体複合体標品に対する家兎抗血清の特異性を検討した。ラット脳細胞下画分のイムノブロッティングにより，抗血清は精製実験における$GABA_A$受容体複合体サブユニット分子量に近似した分子量59K－63Kのバンドを認識し，シナプス膜画分のみならずあらゆる細胞下画分に免疫陽性反応が認められた。粗シナプス膜のノニデットP－40可溶化画分における結合実験で，抗血清は$GABA_A$受容体複合体を免疫沈降させた。本抗血清によるラット脳の免疫組織化学的検索の結果は，GABA抗体やL－グルタミン酸脱炭酸酵素抗体によって得られる結果とほぼ一致した免疫陽性反応の分布を示した。以上のことより，本抗血清は$GABA_A$受容体複合体を特異的に認識する抗体を有していると考えられた。

【目 的】

脳内に存在するγ－アミノ酪酸（GABA）受容体の一つである$GABA_A$受容体は，リガンド依存性チャンネルを形成し，またベンゾジアゼピン受容体と複合体を形成する$GABA_A$受容体複合体として機能することが諸種の研究によって明らかにされている（1，2）。これまで我々は，ベンゾジアゼピン アフィニティー カラムクロマトグフィーによる$GABA_A$受容体複合体の精製を行うと共に（3），この精製$GABA_A$受容体複合体標品に対する抗血清を家兎で得ることに成功している（4）。今回はこの抗血清の特異性について生化学的，薬理学的，免疫組織化学的に詳細な検討を行った。

【方 法】

ウシ大脳皮質粗シナプス膜画分をノニデットP－40で可溶化後，ベンゾジアゼピン アフィニティーカラムを用いて約3800倍に精製した$GABA_A$受容体複合体標品をアジュバントと混合し，家兎を免疫することにより得られた抗血清を用いて以下の実験を行った。 1．イムノブロッティング： Whittakerらの方法（5）に従ってラット脳より得られた細胞下画分についてウェスタンブロッティングを行い，抗血清（5000倍希釈）を用いたアビジン－ビオチン化酵素複合体（ABC）法による免疫染色を施行し，3，3'-ジアミノベンジジン－Ni（DAB－Ni）による発色を観察した。 2．免疫沈降実験： ラット脳粗シナプス膜のノニデットP－40可溶化画分を抗血清及びプロテインAとインキュベート後，遠心分離して得られた上清について［^{3}H］ムシモール及び［^{3}H］フルニトラゼパムを用いた結合実験を行い，上清中に残存する結合活性を測定した。 3．免疫組織化学： ペントバルビタール麻酔下でパラホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド組織固定液で灌流したラット脳より凍結切片（厚さ40μm）を作成し，抗血清（5000倍希釈）を用いたABC法による免疫染色を行い，光顕的にDAB－Niによる発色を観察した。

【結 果】

P_1，P_2，P_3画分についてイムノブロッティングを行うと，いずれの画分でも分子量59K－63Kのバンドに免疫陽性反応が観察された。さらにP_2画分の低張処理後庶糖密度勾配遠心を行うことによって得られた画分のいずれにも，同様のバンドが観察された（Fig. 1）。また，大脳皮質，小脳，中脳，延髄・橋，線条体（淡蒼球を含む），海馬，視床下部及び嗅球の膜画分を用いた場合にも，全領域にわたって同一範囲の分子量を持ったバンドの存在が観察された。一方，粗シナプス膜画分のノニデットP－40可溶化画分を用いて［^{3}H］ムシモール及び［^{3}H］フルニトラゼパム結合の抗血清による阻害実験を行ったが，有意な結合阻害は認められなかった。しかしながら，可溶化画分においてプロテインA存在下での抗血清による沈降実験を行ったところ，可溶化画分に残存する［^{3}H］ムシモール及び［^{3}H］フルニトラゼパムに対する結合能は，非免疫血清の場合と比較して有意な低下を示した。ラット脳切片を用いて免疫組織化学的検索を行うと，大きく3つに分類される免疫染色パターンが観察された（Fig. 2）。すなわち，小脳顆粒層，

嗅球外網状層及び網膜内網状層において網様形態が密に観察される染色パターン，黒質網様部，淡蒼球，嗅結節カリヤ野において粗な線維を伴った明白な細胞体様形態を示す染色パターンが認められた。一方，これら部位と比較して弱い染色パターンが尾状核－被殻，大脳皮質及び海馬において観察されると共に，視床下部（視束上核，室傍核，視床下部前核）や視床においては，弱いが細胞体様形態を示す染色パターンが観察された。

【考 察】

イムノブロッティングによって観察されたバンドの分子量（５９Ｋ－６３Ｋ）が，アフィニティーカラムを用いた精製実験におけるサブユニット分子量（５３Ｋ，５７Ｋ）と比較的近似していること，免疫沈降実験において［^{3}Ｈ］ムシモール及び［^{3}Ｈ］フルニトラゼパム結合蛋白の抗血清による沈降が観察されたこと，また免疫組織化学的検索によって明らかにされた脳内の染色部位がこれまでにＧＡＢＡ抗体（６）やＬ－グルタミン酸脱炭酸酵素抗体（７）を用いて行われた免疫組織化学の結果とほぼ一致することから，本抗血清が脳内に存在するＧＡＢＡ$_{A}$受容体複合体を特異的に認識する抗体を有してると考えられる。また，結合阻害実験において抗血清は［^{3}Ｈ］ムシモール及び［^{3}Ｈ］フルニトラゼパム結合を有意に阻害しないにもかかわらず，ＧＡＢＡ$_{A}$受容体複合体の免疫沈降を惹起したことは，本抗体が複合体蛋白を認識するが，結合部位を認識しないことを意味していると考えられる。一方，Ｐ$_{2}$（シナプトゾーム）画分以外にＰ$_{3}$（ミクロゾーム）画分やＰ$_{4}$（リボゾーム）画分にも免疫陽性反応が確認されたことに加え，低張処理Ｐ$_{2}$画分の庶糖密度勾配遠心によって得られるいずれの画分（Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ）にも同様に免疫陽性反応が認められたことより，本抗体がシナプス膜に存在するＧＡＢＡ$_{A}$受容体複合体のみならず，細胞内状態のＧＡＢＡ$_{A}$受容体複合体またはその前駆体を認識する性質を有していることが推測される。

【文 献】

(1) Taguchi, J. and Kuriyama, K. (1987) Neuropharmacol. 26, 1745-1750.

(2) Pritchett, D. B. et al. (1989) Nature 338, 582-585.

(3) Kuriyama, K. and Taguchi, J. (1987) Neurochem. Int. 10, 253-263.

(4) Taguchi, J. et al. (1989) Brain Res. 483, 395-401.

(5) Whittaker, V. P. et al. (1964) Biochem. J. 90, 293-303.

(6) Ottersen, O. P. and Storm-Mathisen, J. (1984) J. Comp. Neurol. 229, 374-392.

(7) Perez, M. M. et al. (1981) Neurosci. 6, 875-895.

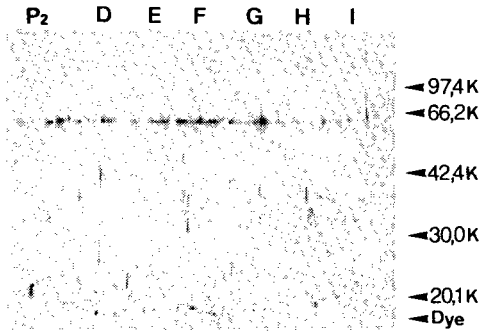


Fig.1 Immunoblotting in subcellular fractions from rat brain.
D, E, F, G, H and I indicate the fractions used and named by Whittaker et al.(5).

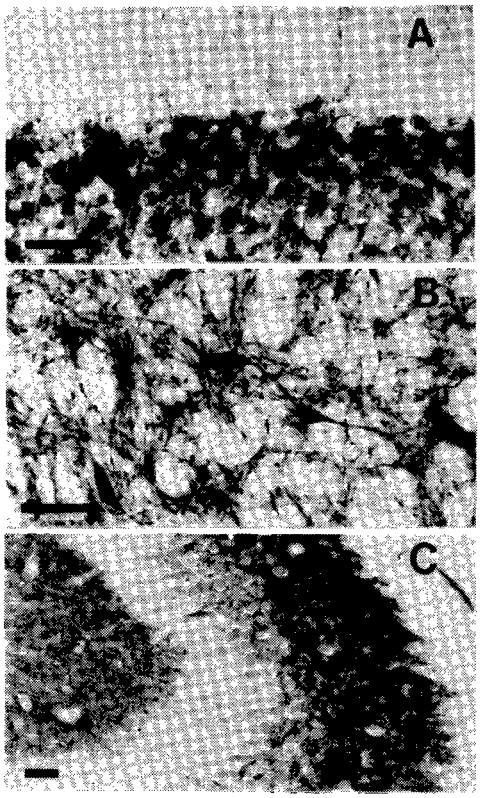


Fig.2 Immunohistochemistry in cerebellum (A), substantia nigra (B) and hippocampus (C) of rat brain.
Bars indicate 50 μm.

81 微小管付随タンパク質(MAP)1の精製とその性質

藤井敏弘, 渡辺正知, 近藤慶之, 新井孝夫*
(信州大　機能高分子, 東京理科大　応用生物*)

〔要約〕

哺乳類の脳由来の微小管付随タンパク質（以下ＭＡＰ）1はＭＡＰ１Ａ，１Ｂ，１Ｃの３成分の総称として呼ばれている。ＭＡＰ１Ｃが逆行性のモータータンパク質であることを除き、ＭＡＰ１Ａ，１Ｂについては形態学的研究が中心でその機能はほとんど知られていない。脳の発達にともないＭＡＰ１Ａ，１Ｂ含量は変動した。新生児脳においてはＭＡＰ１Ｂが主成分であるのに対して、成熟脳ではＭＡＰ１Ｂ量が減少しておりそれを補うかのようにＭＡＰ１Ａが発現していた（図１）。この変化は生後１０～２０日の間で観察された。これらのタンパク質が神経系の形成と密接に関係していることが推測された。我々はＭＡＰ１Ａ，１Ｂの簡便な分離方法を開発した（ＰＬＡＡ法）。鯉の脳からＭＡＰｓを分離するためにＰＬＡＡ法を適用したところ、分子量４００ｋＤａ以上のＭＡＰ１様タンパクと約２７０ｋＤａのＭＡＰ２様タンパク質が分離できた。この方法で分離されたラット脳ＭＡＰ１Ａ，１Ｂ両者ともチューブリンばかりかＦ－アクチンとも結合した。ＭＡＰ２，タウのＦ－アクチンとの結合とは異なりこの結合はCa^{2+}／カルモデュリンでは調節を受けなかった。また、チューブリンとの結合とは異なる結合部位を含んでいるようであった。また、ＰＬＡＡ画分にはＭＡＰ１を基質とする内因性キナーゼ活性が含まれていた。

［目的］

脳・神経系に多量に含まれる微小管とその付随タンパク質は軸索，樹状突起の形成と維持に深く関与するものと考えられている（１，２）。ＭＡＰ１は１Ａ，１Ｂ，１Ｃの３種のサブクラスから構成され、ＭＡＰ２，タウと比べ非常に不安定なことから、ＭＡＰ１Ｃを除きタンパク化学的な研究やその機能についてはほとんど進んでいない。我々はｔａｘｏｌとポリ－Ｌ－アスパラギン酸（ＰＬＡＡ）を組合せＭＡＰ１の新しい分離法を開発した（３）。この方法を基にして、鯉の脳からＭＡＰ１，２様タンパク質の分離，ＭＡＰ１Ａ，１Ｂの他の細胞骨格との相互作用，脳の発達に伴う変動，リン酸化について検討した。

［方法］

ＭＡＰ１はラットと鯉の脳からＰＬＡＡとｔａｘｏｌを組合せたＰＬＡＡ法にて分離した（３）。チューブリンはラット脳微小管タンパク質からＰ－ｃｅｌｌｕｌｏｓｅのクロマトグラフィーにより、アクチンはウサギ骨格筋より単離した。ＭＡＰ１の同定はＳＤＳ－ＰＡＧＥ，イムノブロットで、脳の発達（生後１日～４週齢）に伴うＭＡＰｓの変化は間接ＥＬＩＳＡ法などで分析した。

［結果及び考察］

ＭＡＰ１の精製上の問題はこのタンパク質が非常に分解されやすいこととＭＡＰ２の混入がさけられない点である。ＴａｘｏｌとＰＬＡＡを組合せた本法では分解がある程度おさえられ、さらにＭＡＰ２の混入が１～２％であった。ラット脳１８ｇからＭＡＰ１が約３５０μｇ，熱処理していないＭＡＰ２が約８００μｇ得られた。ＭＡＰ１はＳＤＳ－ＰＡＧＥ（５％／６Ｍ　尿素）上３本のバンドに分離し、高分子量の２本が１Ａ，低分子量の１本が１Ｂであることがタンパク染色とイムノブロットにて判明した。また、３１＆３２ｋＤａのｌｉｇｈｔｃｈａｉｎと思われるポリペプチドを含んでいた。鯉の脳微小管からもＭＡＰ１様タンパクがこの方法で抽出され、興味深いことには分子量４００ｋＤａ以上のポリペプチドを含んでいた（図２）。このタンパク質はラットＭＡＰ１Ａ，１Ｂの抗体とはほとんど交差しなかった。一方、ＭＡＰ２様のタンパクも含まれており分子量はラットＭＡＰ２とほぼ同じであるが熱処理には不安定であった。

ラットＭＡＰ１Ａ，１ＢはＭＡＰ２同様にチューブリンのみならずアクチンとも結合した（図３）。キモトリプシンで限定分解したＭＡＰ１を用いたところ、２００，１３３ｋＤａフラグメントは両者と４０，３８ｋＤａフラグメントはチューブリン，６０ｋＤａフラグメントはアクチンのみと結合することから両者間のＭＡＰ１分子上の結合部位は異なることが示唆された。ＭＡＰ２においてはカルモデュリンによりCa^{2+}濃度に依存しアクチンと結合することが知られているが、ＭＡＰ１－アクチン間の結合はカルモデュリンにより影響を受けなかった。

脳微小管標品中にはA－キナーゼが含まれていることが古くから知られており、ＭＡＰ２はそのよい基質となる。ＭＡＰ２はカルモデュリンキナーゼⅡ，キナーゼＣなどのリン酸化酵素の基質となり、このリン酸化によりチューブリンとの結合性が調節される。ＭＡＰ１はカゼインキナーゼによりリン酸化されることが報告されているが（４）この生理的な意義については知られていない。ＰＬＡＡ抽出画分にはＭＡＰ１を基質とするキナーゼ活性が含まれていた。現在このキナーゼについて検討中である。

［謝辞］
実験に協力していただいた中村晶，渡辺靖之，井上良信君に感謝いたします。

［文献］

1. Schoenfeld, T.A. et al. (1989) J. Neurosci. 9, 1712-1730
2. 藤井敏弘，新井孝夫 (1990) 生体の科学 41, 219-224
3. Fujii, T. et al. (1990) Anal. Biochem. 184, 268-273
4. Diaz-Nido, J. et al. (1988) J. Cell Biol. 106, 2057-2065

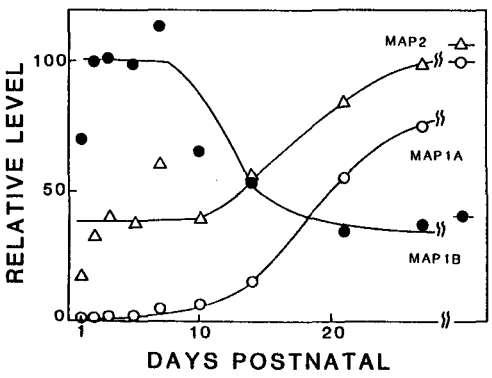


図１　Change in the relative amount of MAP1A, MAP1B and MAP2 during rat brain development

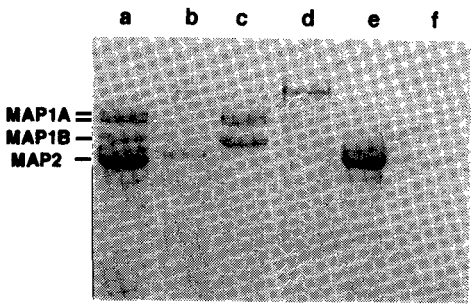


図２　Preparation of microtubules and extraction of MAP1 and MAP2 fractions from rat and carp brain
a, Rat microtubule proteins
b, Carp microtubule proteins
c, Rat PLAA-MAP1
d, Carp PLAA-MAP1
e, Rat MAP2
f, Carp MAP2

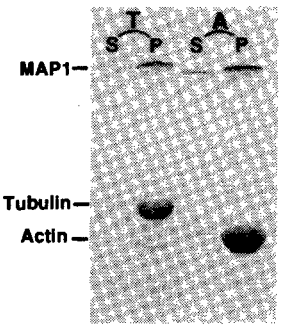


図３　Sedimentation analysis of interaction of MAP1 with tubulin and F-actin

MAP1 was incubated with either tubulin (T) or F-actin (A), and then mixtures were centrifuged at 100,000g for 30 min. The supernatants (S) and pellets (P) were separated and analyzed by SDS-PAGE.

82 オリゴデンドロサイトとシュワン細胞に局在するゲルゾリン様蛋白質

田中潤也・祖父江憲治
大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター神経生化学

〔要約〕
血漿ゲルゾリン(brevin)のC末フラグメントに対する特異抗体を用いて、中枢及び末梢神経におけるゲルゾリン様蛋白質含有細胞を免疫組織化学的に検索した。その結果、中枢神経においてはオリゴデンドロサイトが、末梢神経ではシュワン細胞が免疫反応陽性であり、幼若ラットでは髄鞘そのものにもゲルゾリン様蛋白質が存在していた。また、これらの細胞にはアクチンとトロポミオシンも存在していた。更に、ラットの脳発達に伴うゲルゾリン様蛋白質の発現変化をみると、髄鞘形成の活発な時期に一致して発現が著しく増大し、生後1カ月以降は漸減していくことを見い出した。これらの知見は、ゲルゾリン様蛋白質も含めたアクチン系細胞骨格が髄鞘形成の初期、特にオリゴデンドロサイトやシュワン細胞がそのlamellipodia(leading edge)を伸展し神経軸索を取り巻いていく過程に深く関与していることを示している。

緒言

ゲルゾリンは、アクチンフィラメントをCa^{2+} 依存性に切断する蛋白質としてウサギ肺のマクロファージから分離精製されたものである。中枢神経系においては、1980年代初頭よりマクロファージゲルゾリン類似の約88kDaのモノマーアクチン結合蛋白質の存在することが示されていた[1]。神経系に存在するこの蛋白質は、神経細胞に存在するとした報告[2]やオリゴデンドロサイト[3]あるいは網膜の種々の細胞にも存在するという報告[4]があり、その神経系における役割については充分な解析がなされていなかった。今回、我々はゲルゾリンのCa^{2+} 感受性ドメインであるC末フラグメントに対する特異抗体を作成し、これを用いてラット中枢神経及び末梢神経におけるゲルゾリン様蛋白質含有細胞を検索したところ、オリゴデンドロサイト・シュワン細胞に特異的に局在していることを見い出し、この蛋白質とミエリン形成との関連について検討を行った。

方法

[1]抗体
抗ゲルゾリンC末フラグメント抗体の作成：DE-52とブルーセファロースカラムを用いて精製した、ヒト血漿ゲルゾリン(brevin)をウサギに免疫して抗血清を得た。この抗血清から、brevinのC末フラグメントを結合させたセファロースCL-4Bアフィニティカラムを用いて、C末フラグメント特異的な抗体を分離精製した。ミエリン塩基性蛋白質(MBP)、グリア線維酸性蛋白質(GFAP)、高分子量型トロポミオシン(TM)、ニューロフィラメント68kDa蛋白質(Nf68)に対する各抗体は市販のものを使用した。
[2]immunoblotting
抗体の特異性、ゲルゾリン様蛋白質の中枢神経系における部位別の分布、生後1日から6カ月までのラット脳発達に伴うゲルゾリン様蛋白質の発現量変化は、immunoblotting法により検討した。
[3]免疫組織化学
ラット前脳・橋（生後3日から6カ月まで）・坐骨神経を4%パラフォルム・0.2%ピクリン酸・(+/-)0.1%グルタールアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)によって灌流固定または浸漬固定し、マイクロスライサーまたはクリオスタットを用いて10-30μmの切片を作成した。抗原の検出には、光学顕微鏡レベルではABC-DAB法と蛍光抗体法、電子顕微鏡レベルではイムノゴールド法を用いた。

結果

ゲルゾリンC末フラグメントに対する抗体は、脳の各部位で約90kDaの蛋白質とのみ免疫学的交叉性を示した。ラット中枢神経に対する免疫組織化学的検索の結果、ゲルゾリン様蛋白質含有細胞は少数の突起を有し主に白質に分布するNf68を含まない非神経細胞であった(Fig.1A)。幼若ラットでは、細胞体以外に髄鞘も免疫反応陽性である。GFAPとゲルゾリン様蛋白質の分布を２重染色法によって比較したところ、ゲルゾリン様蛋白質陽性細胞はアストロサイトではなくオリゴデンドロサイトであることを確認した(Fig.1BC)。電顕レベルでは、ミエリン膜上にゴールド粒子が結合し、ゲルゾリン様蛋白質が細胞質に存在しているだけではないことが明らかになった。(Fig.1D)。ゲルゾリン様蛋白質とTMに対する抗体を用いて２重染色法を行い、ゲルゾリン様蛋白質陽性細胞にはTMも存在していた(Fig.1EF)。同様にアクチンの存在も認めた。末梢神経におけるゲルゾリン様蛋白質の検索結果を、Figure 2に示した。軸索を取り囲むようにゲルゾリン様蛋白質陽性のシュワン細胞が認められる。つぎに、中枢神経の発達に伴うゲルゾリン様蛋白質とMBPの発現変化を前脳と脳幹に分けて調べた(Fig.3)。ゲルゾリン様蛋白質は生後1日目から既にわずかに存在しているが、脳幹では生後8日目、前脳では生後10日目頃から急激に発現量が増大する。発現量のピークは、脳幹では生後21日目、前脳では28日目であり、その後漸減していく。一方、髄鞘形成を反映すると考えられるMBPの発現量は、脳幹で10日目、前脳では13日目頃から検出されるようになり、そのまま6カ月に至るまで概ね一定の割合で漸増していく。免疫組織化学的検索では、脳幹では生後8日目、前脳では生後15日目からゲルゾリン様蛋白質陽性のオリゴデンドロサイトを確認することが出来た。

考察

髄鞘は中枢ではオリゴデンドロサイト、末梢ではシュワン細胞によって形成される。前者は、数本ないし数十本の軸索を取り囲んで髄鞘を形成するのに対し、後者は一本の軸索のみを対象にしている。このような違いはあるが、両細胞は一種のlamellipodiaを伸展して軸索を何重にも巻いていくという極めて特異な細胞運動を示すという点で共通している。lamellipodiaの運動は、アクチン系細胞骨格が中心となって出現すると考えられるが、オリゴデンドロサイトやシュワン細胞の細胞骨格については充分な研究は殆どなされてこなかったため、その特異な運動形式を説明できるような物質的基盤は明かではない。この点に関して、今回我々はアクチンフィラメント切断蛋白質であるゲルゾリンが、アクチン・トロポミオシンと共に髄鞘形成細胞に局在することを見い出し、これらの細胞のlamellipodia伸展にアクチンフィラメントのゾル化ーゲル化が関与していることが予想できる。実際、オリゴデンドロサイト中にはローダミンーファロイジン陽性のアクチンフィラメントが存在しているにも関わらず[5]、通常の電子顕微鏡観察ではオリゴデンドロサイト中にアクチンフィラメントは殆ど観察されない。これは、豊富に存在するゲルゾリン様蛋白質によってアクチンフィラメントが断片化されているためであると考えられる。

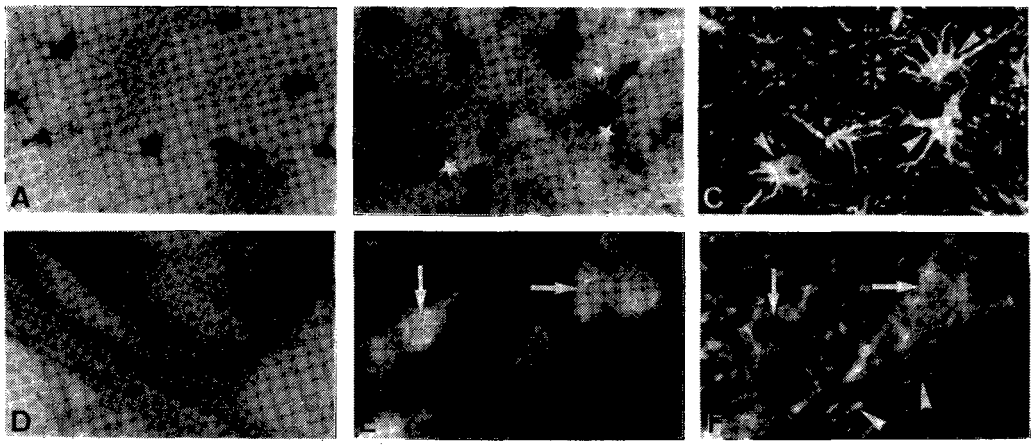


Figure 1. A)抗ゲルゾリン抗体による生後21日のラット脳基底核の染色像。オリゴデンドロサイトの細胞体と髄鞘が免疫反応陽性である。B)C)ラット橋を抗ゲルゾリン抗体(B；ABC-DAB法)と抗GFAP抗体(C;蛍光抗体法)で２重染色したもの。写真B上に星印で、写真C 上の矢尻で示したアストロサイトの位置を表示した。ゲルゾリン様蛋白質を含む細胞はアストロサイトではないことがわかる。D)イムノゴールド法による免疫電顕像。径5nmのゴールド粒子がミエリン膜に結合している。E)F)基底核の細胞群に対し、抗ゲルゾリン抗体(E)、抗TM 抗体(F) による２重蛍光抗体染色を行ったもの。ゲルゾリン陽性細胞はTMも含んでいる(矢印)。なお、軸索も抗TM抗体により染色される(矢尻)。

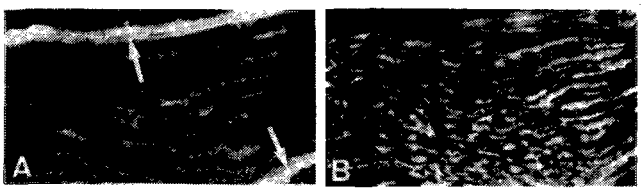


Figure 2. ラット（生後64日）坐骨神経より分岐した末梢神経を抗ゲルゾリン抗体(A)と抗Nf68抗体(B)で２重染色したもの。シュワン細胞のごく薄い細胞質にゲルゾリン様蛋白質が存在し、軸索と直接接触するミエリン部分には存在しない。なお、神経周膜(矢印)もゲルゾリン様蛋白質を含んでいる。

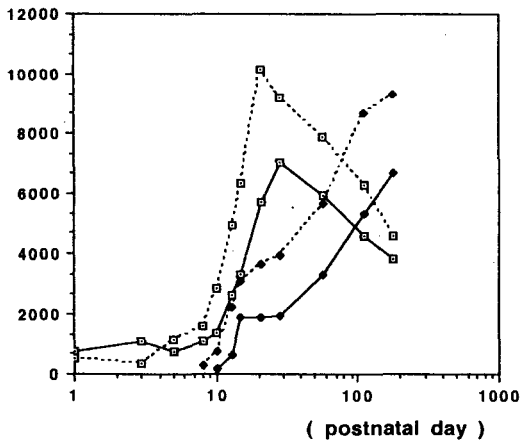


Figure 3. ラットの脳発達に伴うゲルゾリン様蛋白質とMBPの発現量の変化。Immunoblotting で検出した蛋白質を、デンシトメーターにより半定量しグラフに表示した。実線は前脳、破線は脳幹におけるゲルゾリン様蛋白質（白四角）、MBP（黒四角）の変化を表している。脳幹の髄鞘形成が前脳に先行することを反映して、両蛋白質の発現量の変化は脳幹で先行してみられる。

参考文献

[1] Nishida et al. (1981) J.Biochem. 89,1655-1658.
[2] Petrucci et al. (1983) J.Neurochem.40,1507-1516.
[3] Legrand et al. (1986) Dev.Brain Res.30,231-235.
[4] Legrand et al. (1991) Cell Tiss.Res.264,335-338.
[5] Selmaj et al. (1991) J.Immunol. 147,1522-1529.

83 ラットアストロサイト由来グリアフィラメントとマイクロフィラメントの相互作用

伊藤仁一、増田真理、田中亮
（名市大・医・生化Ⅰ）

〔要約〕培養ラットアストロサイトよりグリアフィラメント画分とマイクロフィラメント画分を調製し、フィラメント形成時におけるこれら２種のフィラメント画分の相互作用を検討した。グリアフィラメント画分はα-シアロシルコレステロール（α-ＳＣ）存在下において重合が著しく抑制されたが、マイクロフィラメント画分を添加することによりその重合は回復した。in vitro の系で再構成されたマイクロフィラメント様構造を再脱重合した画分も同様にグリアフィラメントの重合を促進した。α-ＳＣ存在下でのマイクロフィラメントのグリアフィラメント重合促進作用は KCl, $MgCl_2$ 存在下においてのみ認められ、negative staining による電顕観察においても約１０ｎｍの繊維構造が認められた。これらの知見はマイクロフィラメント画分のグリアフィラメント重合促進作用がα-ＳＣによるグリアフィラメント画分の変性による非特異的な会合を促進した結果ではないことを示した。マイクロフィラメント画分によるグリアフィラメント重合促進作用はα-ＳＣ濃度が１５μＭのときに最も強く、グリアフィラメント画分が低濃度の時ほど顕著であった。

グリア細胞成長因子で刺激されたラットアストロサイトは２４時間以降徐々に形態分化し、細胞体が収縮しグリア突起が伸展するようになる。このとき細胞内グリアフィラメントは束化し太いフィラメント構造を形成し、またマイクロフィラメントは、コントロール細胞において形成されるストレスファイバーが崩壊し、細胞膜裏打ち構造へと構造変化することが観察される[1]。α-ＳＣで刺激されて形態変化したアストロサイトにおいても、グリアフィラメントとマイクロフィラメントは同様の構造変化が観察されることから[2]、これらの細胞骨格の構造変化はアストロサイトの形態分化に共通した現象であることが示唆される。そこで本研究では、アストロサイトの形態分化におけるこれら細胞骨格の役割を理解するために、ラットアストロサイトよりグリアフィラメント画分とマイクロフィラメント画分を調製し、in vitro 再構成系におけるこれらフィラメントの相互作用を検討した。

（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日目のラット胎児大脳を 0.1% トリプシンで処理し、これを 20% FCS/DMEM 培地にて１週間の一次培養を行った。さらに 10% FCS/DMEM で１週間の二次培養を経て、アストロサイトを調製し実験に供した[3]。
2. グリアフィラメント構成タンパク画分の調製: 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、16,000 x g, 20 min の遠心沈殿を細胞骨格画分として得た。これを 2mM Tris-HCl, 0.2mM Na_2ATP, 0.5mM 2-mercaptoethanol, phalloidin (30 μg/ml)を用いて抽出し、グリアフィラメント画分とした。
3. マイクロフィラメント構成タンパク画分の調製: 伊藤らの方法に従って行った[4]。
4. グリアフィラメント様構造およびマイクロフィラメント様構造の in vitro 再構成: グリアフィラメント画分については 0.15 M NaCl, 10mM $MgCl_2$ で重合し、またマイクロフィラメントについては 0.1 M KCl, 10

mM $MgCl_2$ で重合した。フィラメントの重合は O.D. 350 nm の吸収にて測定した。また再構成されたフィラメント構造を酢酸ウランで negative staining し、透過型電子顕微鏡にて観察した。

（実験結果および考察）

α-SC非存在下においてグリアフィラメント画分とマイクロフィラメント画分を混合して共重合しても、見かけ上の相互作用は認められなかった。しかしながら、α-シアロシルコレステロール（α-SC）存在下において重合が著しく抑制された状態にあるグリアフィラメントにマイクロフィラメント画分を添加することによりその重合は回復した（Fig.1）。in vitro の系で再構成されたマイクロフィラメント様構造がα-SC存在下において低イオン強度で再脱重合された画分も同様にグリアフィラメントの重合を促進した。これらの知見はマイクロフィラメント構成タンパク質がグリアフィラメントの重合促進作用をもつことを示唆した。α-SC存在下でのマイクロフィラメントのグリアフィラメント重合促進作用は KCl, $MgCl_2$ 共存下においてのみ認められ、negative staining による電顕観察においても約10nmの繊維構造がマイクロフィラメントにより重合促進されることが認められた（Fig.2）。これらのことはマイクロフィラメント画分の重合促進作用がα-SCによるグリアフィラメント画分の変性による非特異的な会合を促進しているものではないことを示した。またアストロサイト細胞内においてグリアフィラメントとマイクロフィラメントとが結合するのみならず、マイクロフィラメント（あるいは脱重合状態のマイクロフィラメント構成タンパク質）がグリアフィラメントの重合あるいは束化を制御していることを示唆した。

（文献）

1)J. Ito et al.,: Neurochem. Int., 16, 133-140, 1990
2)T. Kato et al.,: Brain Res., 438, 277-285, 1988
3)J. Ito et al., Brain Res., 243, 309-314, 1982
4)伊藤ら: 神経化学, 30, 376-377, 1991

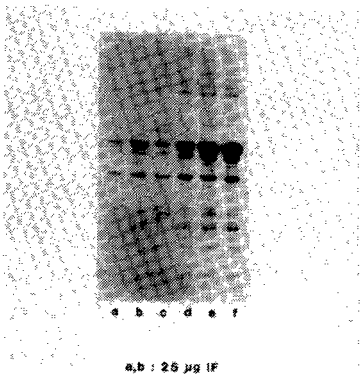


Fig. 1 Effects of microfilament components on polymerization of intermediate filaments

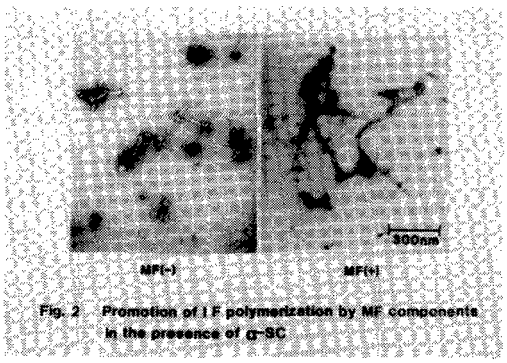


Fig. 2 Promotion of IF polymerization by MF components in the presence of α-SC

84 IDPNによる軸索内輸送阻害とニューロフィラメント蛋白リン酸化状態の変化

田代朋子・今井礼子・小宮義璋
（群馬大学医学部分子病態）

〔要約〕

β，β'-iminodipropionitrile (IDPN) 腹腔内投与により、数日のうちに、ニューロフィラメント(NF)蛋白の軸索内輸送が阻害され、近位部軸索に大量のNF貯留が生じる。我々は、坐骨神経運動繊維の系を用い、IDPNによる軸索内輸送阻害の経過と、NF蛋白のリン酸化状態の変化との対応を調べ、NF輸送およびNF－微小管相互作用にリン酸化がどのように関与するかを検討した。

1. IDPN(1.5g/kg) により、NF蛋白のみならずチューブリン輸送も部分的に阻害される。輸送停止したチューブリンは低温不溶性の安定重合型である。また、既に軸索内を移動中のNF蛋白、チューブリンもその場で停止することから、軸索の全長にわたって一斉に輸送停止が起こると考えられる。
2. NFの200k(NF-H)、160k(NF-M)サブユニットに対する抗体を用いて定量したところ、IDPN投与12時間後から、前根の最も脊髄に近い部分でNF蛋白の貯留が観察された。更に、NF-H、NF-Mのリン酸化状態を識別する抗体により、12時間～ 1日後には前根部で一過性にリン酸化程度の低下が検出された。

IDPN はNF蛋白の軸索内輸送を選択的に阻害する神経毒である(1,3,10)。形態的には、近位部軸索に大量のNF貯留による腫大を生じるとともに、軸索全長にわたってNFと微小管の解離が起こり、NFは軸索周辺部に密集し、微小管と膜顆粒は中心部に分布するようになる(1,7,10)。このようなIDPN中毒神経は軸索内におけるNFと微小管の相互作用や遅い軸索内輸送の機構を研究する上で重要なモデルと考えられる。

NFの３種のサブユニット蛋白のうち、分子量の大きいNF-HとNF-MはそのCOOH末端側に10-30 箇所に及ぶ多重リン酸化をうけることが知られているが、リン酸化がNF蛋白の構造及び代謝調節にどのように関わるかについては不明な点が多い (6)。今回我々は、ラット坐骨神経運動繊維の系を用い、軸索内輸送とNF蛋白のリン酸化状態の双方について、IDPN投与後の時間経過を観察し、その関連を検討した。

＜方法＞ 軸索内輸送実験：７週齢の時点で、脊髄前角 L_3-L_5に L-[^{35}S]メチオニン 50μCi(0.2μlx2) を注入し、直後あるいは一定期間後にIDPN 1.5g/1kg 体重を腹腔内投与した。RI標識３週間後に坐骨神経及び前根を摘出して 6mmの連続切片にした。切片を凍結破砕後、1% Triton を含む抽出液でホモジェナイズし、可溶性分画と不溶性分画に分別した。両分画中の標識蛋白を SDSゲル電気泳動で分離した後、FUJIX BAS 2000によりチューブリン、アクチン、NF蛋白の各バンドに含まれる放射活性を測定した。

NF蛋白リン酸化状態の比較：軸索内輸送実験と週齢を揃えるため、予め一定期間前にIDPNを投与して10週齢の時点でL_4前根を摘出し、後根神経節の位置まで 4コの6mm 切片を得た。各切片に含まれる蛋白を SDS電気泳動後、膜転写して次の各モノクローナル抗体で検出、定量した（抗体の特異性については文献 4を参照）。(1)リン酸化状態によらない抗NF-H抗体(N52) 及び抗NF-M抗体(NN18)、(2) 高度にリン酸化されたNF-H、NF-Mに対する抗体(SMI 31)、 (3)脱リン酸化NF-Hに対する抗体(SMI 32)。

＜結果と考察＞ 図 1B にみるように、RI標識と同時にIDPNを投与した場合、NF蛋白の輸送がほぼ完全に停止するとともに、チューブリンの一部も輸送阻害をうける。我々はこれまで、軸索チューブリンには、重合－脱重合平衡にあるダイナミック型と、低温やCa^{2+}などの微小管脱重合条件下でも可溶化されない安

定重合型の二種の存在様式が区別されることを示してきたが(8)、IDPN により著しく速度低下するのは安定重合型のみである。この結果は、安定重合型チューブリンとNFの相互作用を示すとともに、以下に述べるようにこの相互作用がNF蛋白のリン酸化により調節される可能性を示唆する。また、RI標識 1 週間後（図 1C)、 2週間後にIDPNを投与した場合にもその場で輸送が停止することから、軸索の全長にわたって、一斉に輸送が停止すると考えられる。

抗NF-H抗体 (N52)を用いると、IDPN投与12時間後には、前根の細胞体に最も近い切片 1にNF蛋白の貯留が始まっていることがわかる（図 2）。抗NF-M抗体(NN18)でも、少し貯留がみられる。一方、高リン酸化型NF-H、NF-Mを認識する抗体(SMI 31)に対する反応性は、12時間～ 1日後に低下した後、2 日以降は回復に向う。SMI 31/N 52 の反応性の比を指標とすると、正常では切片 2、3 で進行するリン酸化がIDPN投与後、一過性に低下することが判明した。

これまで、IDPN投与によりNFリン酸化が亢進すると報告されているが(2,9)、何れも投与後3-7 日以降の結果である。a) 形態的なNF貯留が24時間後には検出される(10)、b)IDPNによる神経症状は約36時間後に観察されるようになる、c)投与間隔を 4日にすればNF輸送は完全に停止したままであるが、 7日間隔以上では完全に停止しない(5) などの知見から、NFの輸送阻害は24時間以内に起こり、4-7 日の間に回復に向うと考えられる。今回検出されたNF-Hリン酸化の一過性低下はこのような時間経過とよく一致しており、リン酸化の抑制が輸送停止ならびにNF－微小管相互作用に関与する可能性を強く示唆する。

＜文献＞(1)Chou,S.M. & Hartmann,H.A.(1964)Acta Neuropathol.,3, 428 (2)Gold,B.G. & Austin,D.R. (1991) Brain Res.,563, 151 (3)Griffin,J.W. et al.(1978) Science,202, 633 (4)Harris,J. et al. (1991)J.Neurosci.Res.,30, 47 (5)小宮義璋(1987) 神経化学, 26, 271 (6) Nixon,R.A. & Sihag,R.K. (1991)TINS,14, 501 (7)Papasozomenos,S.C.et al. (1981) J.Cell Biol.,91, 866 (8) Tashiro,T. & Komiya,Y.(1989) J.Neurosci.,9, 760 (9) Watson, D.F. et al.(1989) J. Neurochem.,53, 1818 (10) Yokoyama, et al.(1980) Biomed. Res,1, 537

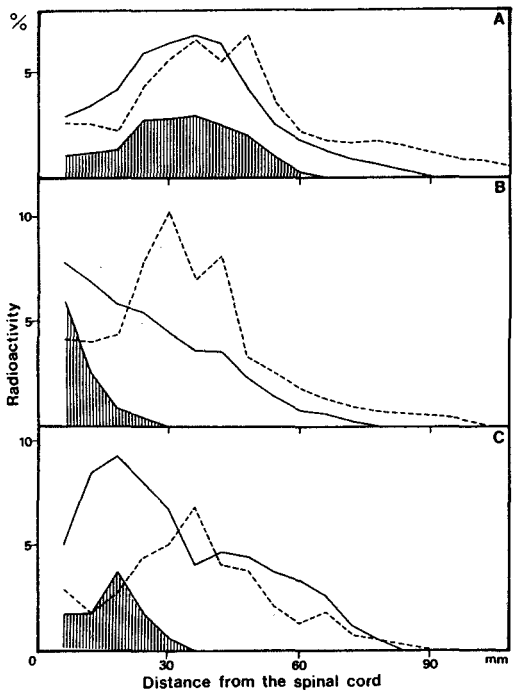


図.1 IDPNによる遅い軸索内輸送の阻害： IDPNを投与しない場合(A)、RI 標識と同時(B) または1 週間後(C) にIDPN (1.5g/kg)を腹腔内投与した場合の各々について、標識 3週間後の前根および坐骨神経における標識NF-H（縦線部)、安定重合型チューブリン（実線)、ダイナミック型チューブリン（破線）の分布を示す。

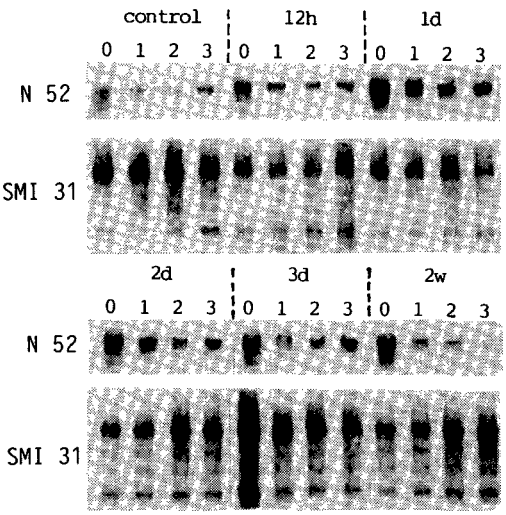


図.2 IDPNによるNF-Hの貯留とリン酸化状態の変化。前根の8mm 切片を脊髄に近い部分より 1→4 とし、抗NF-H抗体(N 52)および高リン酸化型NF-HとNF-Mを認識する抗体(SMI 31)を用いて、Western Blotを行った。IDPN投与後12時間～ 3日と 2週間後の変化を示す。

85 ラット坐骨神経内を軸索輸送するP物質様免疫活性の性質：新しく開発したEIA法による測定

加藤武、猪股裕二、武田克道
（横浜市大大学院 総合理学 分子認識）

〔要約〕
タキキニン類のカルボキシ末端をほとんど認識しないサブスタンスP（P物質）特異的抗血清を用いて酵素免疫検定(EIA)法を確立した。この方法はニューロキニンA（サブスタンスK）と0.3％交叉した。そこでこの方法を用いてラット坐骨神経内を軸索輸送するP物質の性質について検討した。坐骨神経を機械的破壊2日後に取り出し、順行性P物質様免疫活性を逆層カラムHPLCにて分離後EIA法により定量したところ、P物質以外に保持時間の長い物質が10％ほど存在することが明かとなった。
これらの結果から、P物質前駆体のプロセシングのほとんどが細胞体から神経終末へ輸送される間のかなり早い時期においてP物質への変換が行われ、一部の物質は神経終末においてプロセシングされる可能性を示唆した。

脳および末梢に色々な神経ペプチドが単離されている。ほとんどの神経ペプチドはmRNAから翻訳された前駆体蛋白質のプロセシングによって生合成される。最近このプロセシングに関与する酵素が明かとなってきた。二塩基性アミノ酸残基対(Lys-Arg, Arg-Arg)を特異的に開裂させる酵素としてKex2が酵母から単離され(1)、その後関連酵素としてPC1, PC2, Furin などが見つかり、大きな話題を呼んでいる。一方神経ペプチドにはカルボキシ末端のアミド化された物質が多く存在し、その生合成にpeptidylglycine α-monooxygenase (PAM)が関与している。一般に、神経ペプチド前駆体蛋白質のプロセシングは、軸索内輸送中に行われると考えられているものの、あまり報告はない。私どもはこれまで坐骨神経を使って神経ペプチド（P物質、コレシストキニン）および関連酵素の軸索内輸送について報告してきた(2,3)。特にPAMが順行性に輸送されることを明らかにした(5)。

しかし、神経ペプチドが細胞体および軸索内でどこまでプロセシングされるか、などについては不明な点が多い。本研究ではP物質様免疫活性(SPLI)の簡便な測定法を開発し、その方法を用いてラット坐骨神経内のP物質前駆体のプロセシングがどのように調節されるかを検討する目的で、坐骨神経内SPLIを逆層カラムHPLC分離後測定した。

[方法] ラットをエーテル麻酔下で両側の坐骨神経2 mmを圧搾破壊した。手術2日後断頭し、素早く坐骨神経を取り出し、2M酢酸、0.2％メルカプトエタノールで抽出し、その上清を凍結乾燥後試料とした。逆層カラムHPLC分離は0.1％トリフルオロ酢酸存在下5から90％ CH_3CN のリニアグラジエントにより溶出した。標準物質の溶出位置は280 nmの吸光度とEIA法で決めた。SPLIの測定方法は図1に示した。P物質の抗体は以前報告したように $SP_{5\text{-}11}$ のカルボキシ末端にBSAを結合させた抗原を用いてウサギより作製した(4)。

[結果] 図2に示すようにP物質の検出感度は数pgであった。ラジオイムノアッセイで測定した正常なラット坐骨神経3 mmあたりのSPLIは10 pgであり(3)、今回開発したSPLIのEIA法はラット坐骨神経のSPLIを測定するに充分な感度である。他のタキキニンとの交叉性ではニューロキニンA (NKA)は0.3％であった（図2）。この方法を使いてラット坐骨神経内を順行性に輸送しているSPLIを逆層カラムHPLCで分離後EIAで測定したところ、図3に示すように25％ CH_3CN で溶出するSPLIが80％ほど存在し、P物質と同じ溶出位置であった。その他45％ CH_3CN で溶出するSPLIが10％ほど存在した。

[考察] 今回開発したSPLIのEIA法はP物質に特異的であり、同一遺伝子に存在するNKAを分別でき、P物質が一次知覚神経の伝達に機能しているか否かを研究するためには大変有用な方法である。検出感度も従来のラジオイムノアッセイ法とほぼ同じであり、簡便な測定法が開発できた。NKAの関連ペプチドとしてニューロペプチドK、ニューロペプチドγなどが存在しており、今回検出したSPLIがP物質関連ペプチドであるか否かを更に検討し、P物質前駆体のプロセシングの解明に役立てる。

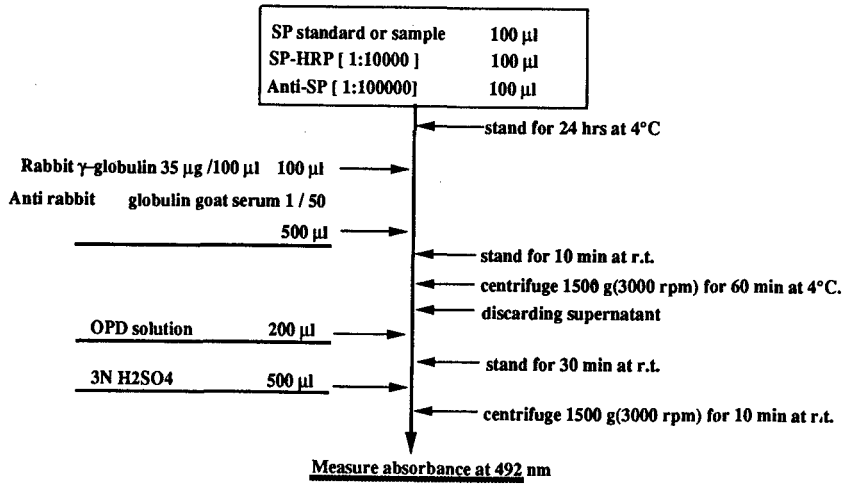


Fig. 1 Enzyme immunoassay procedure for Substance P like immunoreactivity

[文献]

1. Brenner C. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 922-926.
2. Kato T. et al. (1986) Neurosci. Res. 3, 247-252.
3. Kato T. et al. (1987) Neurosci. Res. 4, 241-248.
4. Koshiya K. et al. (1984) Brain Res. 324, 261-270.
5. Tozawa K. et al. (1990) J. Neurochem. 55, 745-749.

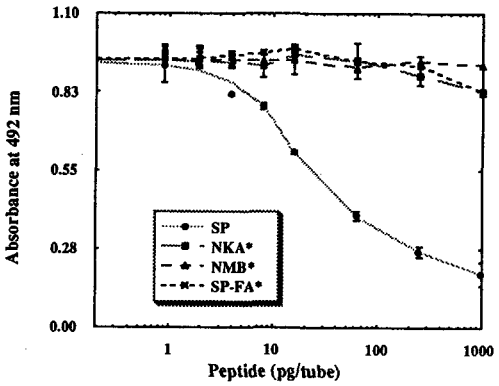


Fig. 2 Standard curve for the substance P enzyme immunoassay

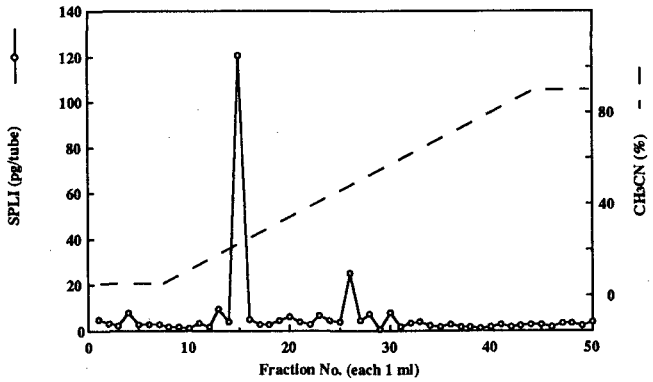


Fig 3 HPLC column chromatography of SPLI in rat sciatic nerves

86 PC12D細胞の神経突起誘導と細胞骨格

岩永 操、佐野 護
（愛知県コロニー研、形態学部）

〔要約〕 PC12D 細胞は、RNA 合成阻害剤存在下でもNGFあるいは dbcAMP処理後数時間で神経突起が誘導される。rhodamine-phalloidinでアクチンを染色し観察すると、NGF,dbcAMP添加30秒から数分後に細胞周囲ラッフルが形成されるが、その部分にアクチンの顕著な束が形成される。10分位の間に、アクチンの蛍光は細胞周囲の4,5 点に凝集する。その点を先端にして、2時間後には突起の形成が認められた。NGF またはdbcAMPによって誘導されるアクチンの凝集は、それぞれ異なった蛋白燐酸化酵素阻害剤K-252a, H-89により特異的に阻害された。従って、このアクチンに見られる変化は蛋白質リン酸化を介して生じる突起形成の初期反応である可能性が示唆された。 colchicine, cytochalasin Bは、これらの変化を完全には抑制しなかったが、NGF, dbcAMP いずれの場合もcytochalasin B 存在下の突起は発達が悪かった。一方colchicine存在下の突起は大きなfilopodia の様相を呈した。colchicineとcytochalasin Bを同時添加するとアクチン線維の束の形成も突起の形成も完全に阻害された。

PC12D 細胞 (1) は, NGF 或いは cAMP上昇薬で処理すると数時間で突起を伸ばす。 この突起誘導は RNA合成阻害剤によって抑制されない。 NGF、dbcAMP による突起伸張はそれぞれ異なった蛋白質燐酸化酵素阻害剤で特異的に阻止された (2, 3)。 微小管蛋白の燐酸化が突起伸張の制御にかかわる可能性を想定し、微小管結合蛋白の燐酸化活性をin vitroで調べた結果, cAMP, NGF で数分処理された細胞には、それぞれ別の酵素が活性化される事実を認めた。それらの活性の変化と神経突起誘導との関連を示す報告を行なってて来た(3-5)。 しかし、キナーゼの活性化 は数分後、突起形成は数時間後の現象であり、両者の関連を示す直接的証拠はない。今回、NGF, dbcAMPなどの処理後数分で PC12D細胞に見られるアクチン線維の変化に注目し、蛋白質燐酸化阻害剤の影響、細胞骨格脱重合剤の効果などを調べる事により、突起形成の初期反応として解析を行なった。

［実験方法］①細胞培養 形態観察に用いる細胞は poly-Lysine coat したcoverslip 上に培養した。 ②蛍光染色 PC12D 細胞を3.7% paraformaldehyde in PBSで５分固定、0.1% TritonX-100で 3分処理、アクチンの染色にはrhodamine-phalloidin (1/20 in PBS)で37度、30分処理。 tubulin の染色には、monoclonal抗tubulin 抗体を用い、biotinylated 2次抗体、次にstreptavidin-FITCを用いて行なった。

［結果と考察］ NGF, dbcAMP処理、30秒-4分で細胞周囲に形成されるラッフルに強いアクチンの蛍光が観察され、10分以後、細胞周囲の数点にそれが凝集し、やがて突起の形成とともにそのgrowth coneへと移行した。この連続的な変化から、 PC12D細胞ではアクチンの局在の変化が突起形成の初期反応である可能性が示唆された（図１）。

NGF による突起の形成を特異的に阻害する事が知られているK-252aは、NGF によるアクチンの初期変化もやはり特異的に阻害した。一方、cAMPによる突起形成は、A-キナーゼの特異的阻害剤H-89により阻害されるが、dbcAMPによって誘導されるアクチンの初期変化もH-89の添加によって抑制された。突起形成と同様にNGF, cAMP で誘導されるアクチンの局在の変化がそれぞれ、特異的なキナ－ゼ阻害剤によって抑制された事実は、このアクチンの局在の変化が蛋白質リン酸化を介して起こる突起形成の初期反応である可能性を示している。アクチンの脱重合剤cyto-

chalasin Bを添加すると、アクチンは壊れているが、ラッフルの形成も突起の形成も阻害されない（図２Ｂ）。また微小管の脱重合剤colchicineを添加しても、同様にラッフルも突起も形成される（図２Ｃ）。 cytochalasin Bを添加すると、NGF, dbcAMP とも長い突起の誘導は見られなかった。またcolchicineを添加した場合、突起は大きな filopodiaの形状がみとめられた。しかし両阻害剤を同時に加えると、これらの変化は完全に阻害された。以上の結果は、neurite は微小管、filopodia はアクチン線維に支持されているとの仮説に適合する。両細胞骨格は完全な神経突起の形成には不可欠であるが、突起誘導の初期過程には必ずしも必要でない可能性が考えられる。

図１、NGF 添加後 PC12D細胞のアクチンの局在の変化。

(A)処理前、(B)4分後 (C)2時間後 (D)5時間後の蛍光顕微鏡写真

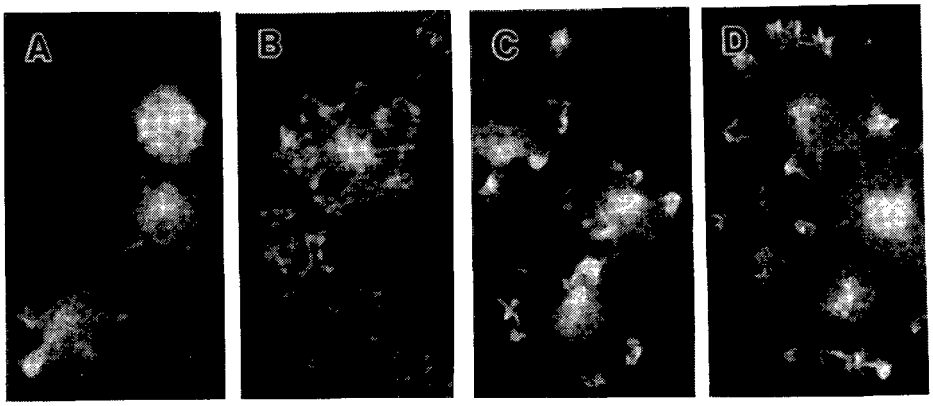
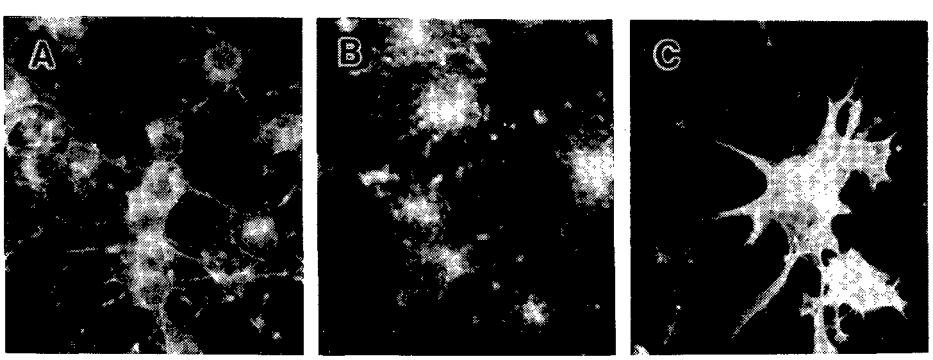


図２、細胞骨格脱重合剤を添加下での突起誘導。

(A)無添加 (B)40μM cytochalasin B, (C)100μM colchicine存在下、NGF を添加し24時間後の細胞のアクチンの蛍光顕微鏡写真。。



[文献]

(1) Katoh-Semaba,R., et al.(1987) J. Neurosci. Res., 17, 36.

(2) Chijiwa,T.et al.(1990) J. Biol. Chem., 265, 5267.

(3) Sano,M.et al. (1990) J. Neurochem., 55, 427

(4) Sano,M., Kitajima,S. (1992) J. Neurochem., 58, 837

(5) Sano,M.(1992) J. Neurochem.,59, in press

87 アルミニウムによる培養大脳皮質細胞の形態的・機能的変化：タウ蛋白の蓄積及びシナプス形成異常

川原正博、市川眞澄*、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、*解剖発生

〔要約〕アルミニウムのラット大脳皮質培養細胞に対する作用を免疫組織化学及び電顕による形態観察、また、細胞内Ca^{2+}の自発振動の振動数を測定することによるシナプス形成のアッセイを用いて検討した。その結果、アルミニウムの長期投与によって細胞はaggregationを起こし、タウ蛋白が異常に蓄積していることが判明した。GFAPによって染まるprocessもコントロールよりも太く、グリア細胞にも異常が生じていることが示唆された。電顕観察によってもニューロンの細胞体に異常が観察された。また、アルミニウムが弱酸性条件下でハイドロキシポリマーの形態をとることを^{27}Al-NMRを用いて確認し、モノマーとの作用の差を検討した。モノマーとポリマーのアルミニウムを一時投与(100 μM、37℃、1時間)した8日後のシナプス形成アッセイの結果、モノマーはコントロールと比べて差は見られなかったが、ポリマーでは有意な減少が見られ、シナプス形成が阻害されていることが示唆された。

アルミニウムは飲料水、食料、粉塵、医薬品などにも多く含まれており、その摂取量は20~40mg／日にも達すると推定されている。アルミニウムとアルツハイマー病との関わりについては、アルミニウムの脳内投与による神経原線維の形態変化や、老人斑中への蓄積、透析痴呆などを根拠として古くから指摘されて来た。更に、飲料水中のアルミニウム濃度とアルツハイマー病の発症率とが相関するという疫学調査が、イギリスで行われたのをはじめとして、カナダ、フランスなど各国で同様の結果が報告されてきている[3]。

しかしながら、アルミニウムの神経毒性については矛盾する報告も多く、はっきりとした結論は出ていない。この原因は、一つには、アルミニウムが水溶液中で様々な化学形態を取る結果、その作用に差が生じる為であることが考えられる。アルミニウムは通常はモノマー（Al^{3+}）の形態を取るが、pHの変化などにより重合してハイドロキシポリマーの形態をとりうる。このようなハイドロキシポリマーは膜透過性が高まることが考えられ、実際に、酸性雨のため酸性となった湖水中でアルミニウムがハイドロキシポリマーの形態を取り、魚類、植物根などにモノマー（Al^{3+}）よりも強い毒性を及ぼすことが既に知られている[1]。

演者らは昨年の本学会において、実験条件のコントロールが容易なラット大脳皮質神経細胞の初代培養系を用いてアルミニウムの神経毒性について報告した。今回、更に長期に培養を行った結果について報告すると共に、弱酸性水溶液中で13量体のハイドロキシポリマー（Al_{13}:$Al_{13}O_4(OH)_{24}(H_2O)_{12}$）が形成されることを、$^{27}Al$-NMRを用いて確認し、アルミニウムの化学形態による神経毒性の差についても検討を行った。アッセイ法としては細胞内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を用いた。更に、タウ蛋白などの免疫組織化学、電顕による形態変化を観察した。

［実験方法］

胎齢18日のラット大脳皮質の培養を既法に基づいて行った[4]。Al_{13}はParkerらの方法に従ってpHを徐々に5.0に上昇させることにより形成させ、^{27}Al-NMR(JEOL,GEX-400)により確認した。また、細胞内Ca^{2+}の同時多点解析システムによってfura-2による蛍光強度の時間変化を同時多点解析を行った[4]。培養神経細胞は4% paraformaldehydeにより固定し、免疫組織化学を行い、HRP-DAB法、あるいは蛍光法により観察した。更に電顕用にparaformaldehydeとglutaraldehydeを用いて包埋固定を行った。

［実験結果及び考察］

アルミニウムモノマーの長期継続投与ー免疫組織化学

既に、アルミニウム100 μMの2~3週間にわたる投与によって、リン酸化neurofilamentの異常な蓄積が見られることを報告したが、今回更に長期にわたる培養を行った結果、培養31～50日後には、アルミニウムを投与した細胞はaggregationを起こし、細胞塊同士が太いprocessで結合されているのが観察された。タウ蛋白に対する免疫組織化学によって、細胞体やprocessがコントロールに比して強く染まっているのが観察された（図１）。また、aggregateしていない細胞についても同様の現象が観察された。この太いprocessはリン酸化neurofilament抗体によっても強く染まることが判明した。更に、GFAP抗体によって染色されるprocessが太く異常な形態を取り、グリア細胞にも異常が生じていることが示唆された。上記の様にaggregationを起こした細胞を電顕により観察した結果、ニューロンの細胞体に電子密度の高い異常構造物の蓄積などが観察された。

アルミニウムモノマーとポリマーとの短期投与

既に、報告している様に、視野のほぼ全てのニューロンは同期した細胞内Ca^{2+}の自発振動を起こし、その振動数と電

顕により観察されたシナプス数とが強い相関を示すこと(r=0.90)が明らかになっている[2]。

Al_{13}の安定性、性状を^{27}Al-NMRを用いて検討した所、BSS液(pH6.5)中でその形態を保ち、安定に存在することを確認した。そこで、モノマー(Al^{3+})及びポリマー(Al_{13})を培養2日目に一時投与(100μM、37℃、1時間)し、その後、培養10日目に細胞内Ca^{2+}の同時多点解析を行った。その結果、細胞内Ca^{2+}の振動数は、Al^{3+}の場合、この条件下ではコントロールとほとんど差はない(相対振動数：95%)のに対して、Al_{13}を投与した場合には、振動数が有意に減少している（相対振動数：78%）ことが判明した(図2)。従って、これらの結果から、Al_{13}は培養神経細胞間のシナプス形成にモノマーに比べてより強い影響を及ぼしていることが示唆された。長期培養を行い、形態変化を免疫組織化学により観察した結果、一時投与によっても培養1ヵ月後にはタウの蓄積が観察され、しかもAl_{13}を投与した場合により顕著であった。

リン酸化されたタウ蛋白がアルツハイマー病のNFTの主要構成成分であることや、アルミニウムによってタウの脱リン酸化が阻害される[6]ことを考えると、アルミニウムによるタウの蓄積は、アルツハイマー病との関連を示唆する興味深い知見である。また、最近、Terryらはアルツハイマー病患者脳内でシナプスが減少し、その減少と痴呆の程度とが相関していることを報告し[5]、シナプスの減少とアルツハイマー病との関連が注目されている。

アルミニウムの神経系への作用とアルツハイマー病との関連は、もちろんこれらの事実から直接証明出来た訳では無い。しかしながら、上記のような類似点を考慮にいれると関連の可能性を一概に否定はできず、更により詳しい研究を進めることが必要であると考えている。更に、アルミニウムがハイドロキシポリマーの形態をとることにより毒性が増大し得ることが明らかになった。この種のハイドロキシポリマーは環境中に容易に生じ得ると考えられるが、その作用についての知見は少ない。今後更に検討していきたい。

タウ抗体を恵与頂きました、東京大学医学部脳研 井原康夫先生、^{27}Al-NMRの測定をして頂きました㈱日本電子、および御紹介頂きました東京医科歯科大学医学部 宮武正先生に深謝致します。

1)Hunter,D,Ross,DS,Science,251,1056-1058(1991).2)黒田洋一朗、他、神経化学,29,196-197(1990).3)McLachlan,DR,et al.,Can Med. Assoc J.,145,793-804(1991).4)Muramoto-K,et al.,Proc.Japan Acad.,Ser.B 64,319-322(1988).5)Terry-RD, et al.,Ann Neurol.,30,572-580(1991).6)Yamamoto-H,et al.,J.Neurochem.,55,683-690(1990).

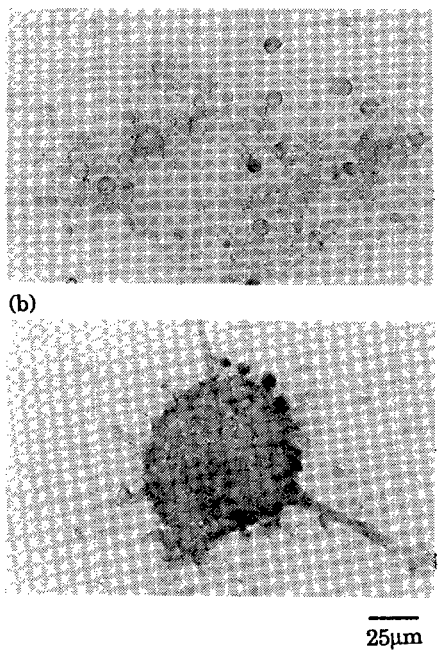


図1．タウ蛋白による免疫組織化学
(a)コントロール(b)Al100μM投与
培養48日後に固定し、HRP-DABにより発色させた。

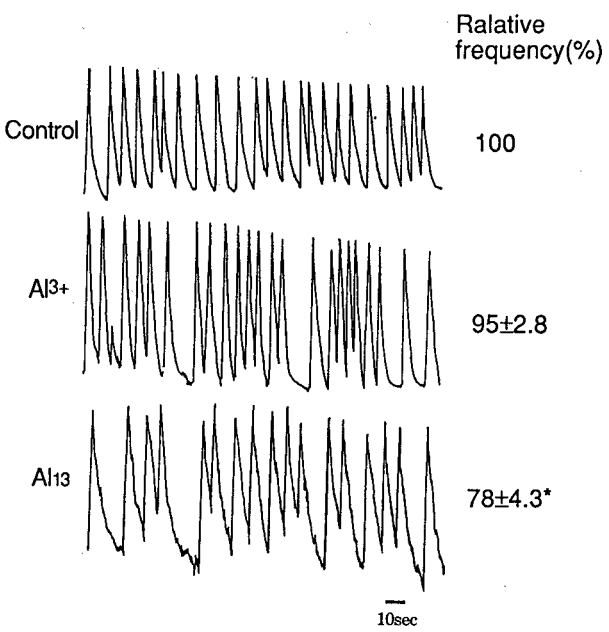


図2．細胞内Ca^{2+}の自発振動の振動数に対する影響
螢光強度の時間変化及びその相対振動数(mean±SEM)を表す。 *P<0.005

88 抗ＰＨＦモノクローナル抗体Ｍ４，Ｃ５はタウの胎児型リン酸化を認識する

渡辺　淳[1・2]，長谷川成人[1]，瀧尾擴士[3]，新井孝夫[2]，鈴木政美[4]，千谷晃一[4]，井原康夫[1]
（東京大学脳研病理[1]，東京理科大学応用生物[2]，理化学研究所生体分子解析[3]，藤田保健衛生大学総医研[4]）

〔要約〕
アルツハイマー病脳のサルコシル不溶性画分（サルコシルPHF）を抗原として得られたモノクローナル抗体M4およびC5は、正常のヒトタウとはほとんど反応せず、PHFと胎児型タウを特異的に認識した。C5の反応性は、PHFおよび新生ラットタウをアルカリフォスファターゼ処理することにより消失した。また、M4の反応性は、37℃でのアルカリフォスファターゼ処理では何の変化も見られなかったが、67℃という高温下でアルカリフォスファターゼ処理することにより消失した。したがって、これら二つの抗PHF抗体は、タウの胎児型のリン酸化を認識しているものと考えられた。エピトープマッピングを行った結果、M4とC5の認識部位は、タウの微小管結合ドメインのそれぞれN末端とC末端側にあることが判明した。

［目的］
アルツハイマー病（以下AD）の病理学的特徴の一つは、paired helical filaments（以下PHF）と呼ばれる異常線維が神経細胞内に進行性に蓄積することである。このPHFの主な構成成分は、微小管結合蛋白の一種であるタウであることが免疫化学的、蛋白化学的に同定されている(1,2)。PHFを構成しているタウが、異常にリン酸化されていることはかねてより指摘されているが、その異常性については、まだ不明な点が多い。本研究では、モノクローナル抗体を用いて、PHFのタウのどの部位がどのように正常タウと異なるかを免疫化学的、蛋白化学的に同定することを試みた。

［方法］
モノクローナル抗体の作製；AD脳のサルコシル不溶性画分を調製し(3)、BALB/cマウスに免疫した。マウスから脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞P3と電気融合法によりハイブリドーマを調製し、トリス生食にて単離したtangle（TS-tangle）を特異的に染色するクローンを選択した。

PHF-タウと新生ラットタウの調製；PHF-タウはAD脳のサルコシル不溶性画分をグアニジン塩酸で可溶化し、TSK-G3000SWXLによるゲルろ過で分画した後、逆相HPLC（RP-300,ABI）を用いて精製した(4)。新生ラットタウは生後一日令のラット脳の可溶性画分から、硫安分画（33-50%）、熱処理、ホスホセルロースカラムを用いて精製し、PHF-タウと同様に、ゲルろ過、逆相HPLCで精製した。

アルカリフォスファターゼ処理；PHF-タウおよび新生ラットタウを、プロテアーゼ阻害剤を含む50mMトリス塩酸緩衝液（pH8.3）中で懸濁し、アルカリフォスファターゼ（E.coli, type III R, Sigma）を10u/ml加え、37℃で2時間または67℃で2時間処理した(5)。

エピトープマッピング；PHF-タウおよび新生ラットタウをトリプシン、キモトリプシン、またはCNBr処理し、種々の抗体を用いてイムノブロット法とELISA法により反応するペプチドを検索した。検出された最も小さなフラグメントは、N末端アミノ酸配列分析を行うと共に、アルカリフォスファターゼ処理（37℃または67℃）前後で、Lys-Xで特異的に切断する酵素、Achromobactor protease I（API）で消化し、それぞれのペプチドマップを比較した。

［結果および考察］
モノクローナル抗体M4,C5の認識するタンパクを調べるため、AD脳の抽出物をSDS-電気泳動し、イムノブロットで検索したところ、これらの抗体はサルコシル不溶性として回収されるPHFタウと思われるバンドに加え、レーン全体をdiffuseに染色した。また、正常脳抽出物およびAD脳の可溶性の画分とはほとんど反応しないことが分かった。一方、種々の発達段階のラット脳のホモジネートを用いてイムノブロットしたところ、胎児期から幼若期のラット脳のみに見られる50kDのバンドと反応することが明らかとなった。この50kDのバンドは、微小管画分に回収されること、熱安定性を示すこと、抗タウ抗体と反応することから、胎児型のタウであることが分かった。よって、これらの抗体はタウの胎児型の特殊なイソフォームを認識しているか、何らかの胎児型の修飾を認識するものと思われた。PHFを構成するタウはリン酸化されていることから、タウを脱リン酸化して、これらの抗体の反応性が変化するかどうかを調べることにした。その結果、新生ラットタウを37℃においてアルカリフォスファ

ターゼ処理をすると、C5の反応性は消失したが、M4の反応性は変化がなかった。しかし、67℃という高温下でアルカリフォスファターゼ処理を行った結果、M4の反応性が完全に消失することが示された。したがって、二つの抗PHF抗体は、タウの別々の胎児型のリン酸化を認識する抗体であることが判明した。

次に、M4のエピトープを同定するため、新生ラットタウをキモトリプシンで部分分解し、既にエピトープが同定されているタウの抗体とその反応性を比較した。その結果、M4はモノクローナル抗体5E2と全く同じ染色パターンを示し、5E2部位の近傍を認識することが示された。また、M4と反応する最も小さな約9kDのフラグメントは、N末端シークエンス分析から、SSPGSPG…から始まるペプチドであることが分かった。CNBrフラグメントとの反応性をELISA法で調べた結果、M4はPDLKN…で始まるペプチドとは反応せず、5E2部位を含むペプチドと反応した。以上のことから、M4のエピトープは、ヒトのタウで最も長いイソフォームを基準とすると、198-250番の範囲内にあることが判明した。

M4の反応性は37℃でのアルカリフォスファターゼ処理では消失せず、67℃での処理で消失することから、これらの処理で変化した部分がエピトープである可能性が考えられる。そこで、このM4と反応するペプチドを37℃と67℃でアルカリフォスファターゼ処理し、API消化して、逆相HPLCにより展開し、ペプチドマップを作製した。その結果、67℃の処理で消失するピークが一つだけ観察された。そのピークはシークエンスおよび質量分析をした結果、VAVVRTPPKに一つのリン酸基が結合しているペプチドであることが判明した。このリン酸基は67℃の処理によってのみ水解されることから、M4はこのペプチドにあるリン酸化を認識していることが強く示唆された。

C5については、サルコシルPHFのトリプシンフラグメント（約15kD）を同様の手法で分析した結果、384-406番の範囲内にあるリン酸化を認識していることが強く示唆された。

二つの抗PHF抗体の性質を調べることで、PHFを構成しているタウに胎児型のリン酸化があり、それらはタウの微小管結合ドメインの両側に存在することが判明した。このことは、神経原線維変化やcurly fiberが死に行く神経細胞の再生の試みの結果の残骸であるとするIharaのsprouting仮説を強く支持するものである(6)。これらの抗体は、PHFタウに働くキナーゼの検索、あるいはタウの不溶化、およびPHFの形成機構の解明に役立つものと思われる。

［文献］

(1)Ihara, Y. et al. (1986) J. Biochem. (Tokyo) 99, 1807-1810.

(2)Kondo, J. et al. (1988) Neuron 1, 827-834.

(3)Nukina, N. and Ihara, Y. (1985) J. Biochem. (Tokyo) 98, 1715-1718.

(4)Hasegawa, M. et al (1992) J. Biol. Chem. in press.

(5)Goedert, M. et al. (1992) Neuron 8, 159-168.

(6)Ihara, Y. (1988) Brain Res. 459, 138-144.


```
        10         20         30         40         50         60         70         80         90        100
MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLV[DEGAPGKQAAAQPHTEIPEG

       110        120        130        140        150        160        170        180        190        200
TTAEE]AGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSP
                                                                                                      ===
       210        220        230        240        250        260        270        280        290        300
GSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKN[VKSKIGSTENLKHQPGGG]KVQIINKKLDLSN[VQSKCGSKDNIKHV
                 ----------5E2
==========================================M4

       310        320        330        340        350        360        370        380        390        400
PGGG]SVQIVYKPVDLSK[VTSKCGSLGNIHHKPGGG]QVEVKSEKLDFKDR[VQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS
                                                                                                ==========
       410        420        430        440
GDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL

======C5
```

図　ヒトタウのアミノ酸配列（N末端側58アミノ酸挿入、C末端側31アミノ酸挿入をもつタイプ）
〔 〕成人型挿入配列　□ 微小管結合領域　--- 5E2のエピトープ
=== 今回同定した抗体M4, C5のエピトープ

89 タウプロティンキナーゼIIによるニューロフィラメント蛋白のリン酸化

久永真市，石黒幸一＊，内田庸子＊，奥村英一，岡野孝幸，岸本健雄
（東工大・生命理工，三菱生命研＊）

〔要約〕
我々は最近ｃｄｃ２キナーゼがニューロフィラメント（ＮＦ）のＨサブユニット（ＮＦ－Ｈ）のＣ末尾部をリン酸化することを報告した。しかし、ｃｄｃ２キナーゼは本来細胞周期を促進する因子であり、分化し、分裂を行なわない神経細胞では存在しているかどうかも判明していない。我々はタウとＮＦ蛋白のリン酸化部位が似ていることに注目をして、タウプロティンキナーゼがＮＦ蛋白をリン酸化するか、又ｃｄｃ２様の酵素であるかどうかを検討してみた。タウプロティンキナーゼIIは、ｃｄｃ２キナーゼと同様に脱リン酸化型のＮＦ－ＨをＮＦ蛋白の中では最もよい基質として認識し、電気泳動上の移動度をリン酸化型へと変換した。ＮＦ－Ｈはタウプロティンキナーゼ IIによるリン酸化で微小管結合能を失った。タウプロティンキナーゼIIは抗ＰＳＴＡＩＲ抗体とは反応しなかったが、$p13^{suc1}$とは結合した。これらの結果から、タウプロティンキナーゼIIはｃｄｃ２様のＮＦ－Ｈキナーゼとして神経細胞内でも機能している可能性が示唆された。

〔目的〕
ニューロフィラメント（ＮＦ）は神経細胞に特異的な中間径線維であり、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上の分子量が200K（ＮＦ－Ｈ）、150K（ＮＦ－Ｍ）、70K（ＮＦ－Ｌ）の３つのポリペプチドから構成されている。ＮＦ蛋白は神経細胞内において最もリン酸化されている蛋白の一つである。このリン酸化はＮＦ－Ｈ、ＮＦ－ＭのＣ末尾部に多く存在するＫＳＰの繰り返し配列上にあり、それらのリン酸化程度の違いにより、ＮＦの神経細胞内での局在が異なることが知られている。リン酸化型ＮＦは軸索に存在し、脱リン酸化型は細胞体・樹状突起に存在している。また、ＮＦ蛋白のＣ末尾部はＮＦ間及び他の細胞内オルガネラ等との相互作用をしている部位であり、その相互作用はリン酸化によって制御されていると考えられている。このようにリン酸化はＮＦの機能上非常に重要であるのにもかかわらず、リン酸化を担っているキナーゼについては全くわかっていない。我々は、最近、細胞周期の調節において最も重要な役割を果たしているｃｄｃ２キナーゼがＮＦ－ＨのＣ末尾部をリン酸化することを見つけ報告した[1]。しかし、ｃｄｃ２キナーゼは本来細胞周期を促進する因子であり、分化し、分裂をしなくなった神経細胞に存在しているかは解っていない。我々は脳のキナーゼでｃｄｃ２様のものを検索したところ、タウプロティンキナーゼIIがＮＦ蛋白のリン酸化に関して、ｃｄｃ２キナーゼとよく似た性質を示すことを見つけたので報告する。

〔方法〕
ＮＦ蛋白はウシ脊髄の粗抽出液をSepharose4 Bのゲルロ過にかけることにより分離した[2]。ＮＦ蛋白の脱リン酸化はアルカリフォスファターゼによって行った[3]。タウプロティンキナーゼはウシ脳より石黒らの方法により精製した[4]。ｃｄｃ２キナーゼはヒトデ卵母細胞からsuc1によるアフィニティーカラムを用いて精製した[5]。微小管はブタ脳から重合・脱重合を繰り返して精製した。

ＮＦのｃｄｃ２キナーゼ及びタウプロティンキナーゼによるリン酸化は（$\gamma^{32}P$）ＡＴＰ存在下で25～30℃、10～120分加温し、ＳＤＳ－ＰＡＰＥ後オートラジオグラフ又は、リン酸化の程度を液体シンチレーションカウンターで計測することにより行った。

〔成績〕
アルカリフォスファターゼで脱リン酸化したＮＦをタウプロティンキナーゼI，IIでリン酸化したところ、タウプロティンキナーゼIはＮＦ－Ｈ、ＮＦ－Ｍ、ＮＦ－Ｌを同程度にリン酸化したのに対して、タウプロティンキナーゼIIはＮＦ－Ｈを最も強くリン酸化した。このリン酸化のパターンはｃｄｃ２キナーゼによるものと類似していた。タウプロティンキナーゼIIはリン酸化により、ＮＦ－Ｈの電気泳動上の移動度を回復させた（図１Ａ）。ＮＦ－Ｈへのリンの取り込み量は、ｃｄｃ２キナーゼとタウプロティンキナーゼIIでほとんど同じであった（図１Ｂ）。ＮＦ－Ｈ Ｃ末尾部のリン酸化部位と考えられている２種の合成ペプチドを用いて、基質になるかどうかを調べたところ、ＫＳＰＸＫという配列をもつペプチドはよくリン酸化されたのに対し、ＫＳＰＸＸはリン酸化

されなかった。タウプロティンキナーゼIIもｃｄｃ２キナーゼと同様ＮＦ－Ｈ Ｃ末尾部の微小管結合部位の近傍をリン酸化していた。脱リン酸化ＮＦ－Ｈは微小管と結合して、遠心によりチューブリンとともに沈澱に回収されるが、タウプロティンキナーゼで再リン酸化したＮＦ－Ｈは微小管に結合せず、上清に残るようになった（図２）。タウプロティンキナーゼIIがｃｄｃ２に関連した酵素であるかどうかをｃｄｃ２に共通のアミノ酸配列であるＰＳＴＡＩＲに対する抗体、及びｃｄｃ２に特異的に結合する酵母のp13^{suc1}蛋白に対する反応性を調べることにより確認した。タウプロティンキナーゼIIは抗ＰＳＴＡＩＲ抗体には反応しなかったが、p13^{suc1}－Sepharoseには結合した。

〔考察〕

タウプロティンキナーゼIIはＮＦ蛋白のリン酸化に関して、ｃｄｃ２キナーゼと非常によく似た基質特異性を示した。抗ＰＳＴＡＩＲ抗体には反応しなかったが、p13^{suc1}蛋白とは結合した。最近、ＰＳＴＡＩＲ配列をもたないｃｄｃ２関連キナーゼも報告されていることを考えると、タウプロティンキナーゼIIは神経細胞において発現されているｃｄｃ２関連キナーゼの一つではないかと考えられる。タウプロティンキナーゼＩＩが唯一のＮＦ－Ｈ特異的キナーゼであるか、単に神経細胞の中でのＳＰ配列を認識する酵素群の一つであるのかはまだ明らかではない。しかし、（１）タウプロティンキナーゼIIが結合しているタウ蛋白は神経細胞内では軸索に多く、ＮＦ蛋白と同じ局在を示すこと、（２）タウプロティンキナーゼIIの最もよい基質である脱リン酸化型のＮＦ－Ｈは微小管と結合することができ、両者は軸索内においても非常に近いところに存在しうることなどから、軸索内でもＮＦ－Ｈキナーゼとして機能している可能性は高いと考えられる。

〔参考文献〕

(1)Hisanaga, S., Kusubata, M., Okumura, E., and Kishimoto, T. (1991) J. Biol. Chem. 266, 21798-21803
(2)Hisanaga, S., and Hirokawa, N. (1988) J. Mol. Biol. 202, 297-305
(3)Hisanaga, S., and Hirokawa, N. (1989) J. Neurosci. 9, 959-966
(4)Ishiguro, K., Takamatsu, M., Tomizawa, K., Omori, A., Takahashi, M., Arioka, M., Uchida, T., and Imahori, K. (1992) J. Biol. Chem. 267, 10897-10901
(5)Kusubata, M., et. al., (1992) J. Biol. Chem. in press

図１

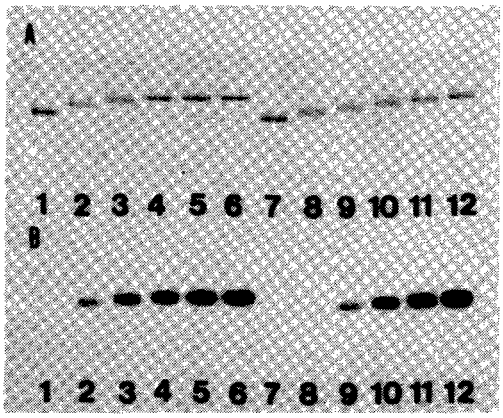


図２

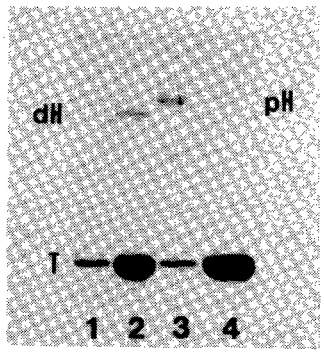


図１　脱リン酸化ＮＦ－Ｈのcdc２キナーゼとタウプロティンキナーゼIIによるリン酸化の時間経過。ＡはＣＢＢによる蛋白染色；Ｂはオートラジオグラフ。リン酸化反応は35℃で行い、各レーンの反応時間は次の通りである。１と７，０分；２と８，10分；３と９，30分；４と10，60分；５と11，120分；６と12，240分。

図２　ＮＦ－Ｈのタウプロティンキナーゼ IIによるリン酸化と微小管との結合。脱リン酸化ＮＦ－Ｈ（レーン１と２）とタウプロティンキナーゼIIで再リン酸化したＮＦ－Ｈ（レーン３と４）を微小管と加温した後、13,600×ｇ，10分遠心した上清（レーン１と３）と沈澱（レーン２と４）のＳＤＳ－ＰＡＧＥ。dH，pH，Ｔは脱リン酸化ＮＨ－Ｈ，再リン酸化ＮＦ－Ｈ，チューブリンをそれぞれ示す。

90 カルシウム依存性開口放出機構へのミオシン軽鎖キナーゼの関与について

熊倉鴻之助、今泉美佳、櫻井　隆*、中村清二*、中西　聡**、松田　譲**、野々村禎昭*

上智大・生命研・神経化学、*東京大・医学部・第一薬理、**協和発酵・東京研究所

〔要約〕

カルシウム依存性開口放出機構にミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)が関与する可能性を究明する目的で、牛副腎クロマフィン細胞からのカルシウム依存性カテコールアミン（CA）放出に対するMLCKの特異的阻害薬、Wortmannin、の作用を検討した。Wortmanninで前処理をしたクロマフィン細胞では、アセチルコリンおよび高カリウム刺激によるCA放出はいずれも顕著に阻害され、この時のWortmanninのIC_{50}は1 μMであった。Wortmannin処理後にジギトニン処理によって得られたleaky細胞からカルシウムにより引き起こされる開口放出も、Wortmanninの濃度に依存して阻害された。また、この阻害作用におけるWortmaninininのIC_{50}も1μMと、インタクト細胞でのIC_{50}値と一致した。この結果からWortmanninのCA放出阻害作用は、細胞内カルシウムが開口放出を引き起こす反応過程を阻害した結果であることが示され、クロマフィン細胞ではカルシウム依存性開口放出の分子機構にMLCKが重要な関与をしていることが強く示唆された。

副腎髄質細胞におけるカルシウム依存性開口放出機構には、その細胞外カルシウム依存性が筋肉の刺激収縮連関のそれと似ていることなどから、収縮系蛋白やその調節因子の関与が以前より考えられている。これまでに、牛副腎髄質からMLCKが部分精製され(1)、クロマフィン細胞では外因性MLCKによるミオシン軽鎖のリン酸化(2)が報告されているが、MLCKあるいはミオシン軽鎖のリン酸化がカルシウム依存性開口放出機構に関与するかどうかについては、未だに不明な点が多い。一方、WortmanninにはMLCKに対して特異性の高い阻害作用があることが最近明らかになり(3)、Ig-Eによるヒスタミン放出に対する阻害作用が報告された(4)。本研究では、クロマフィン細胞における開口放出に対するWortmaninnの阻害作用を測定解析して、カルシウムが開口放出をもたらす細胞内反応過程にMLCKが関与する可能性を検討した。

［実験方法］

クロマフィン細胞は、既報(5)に従い、牛副腎髄質から調製し、10 % 牛胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium 中で単層培養した。実験には培養 4～10 日の細胞を用いた。インタクト細胞からのCA放出の測定はLocke's溶液中で行った。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、任意の遊離Ca^{2+}を含むジギトニン 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して放出測定を行なった。Wortmannin処理は、それぞれ放出測定に先立って３０分間行い、さらにWortmannin存在下で放出を測定した。Buffer中に分泌されたCAと細胞含有 CA は 0.4 M 過塩素酸で抽出し、HPLC 法により定量を行なった。

［結果及び考察］

Wortmannin 1μM で 30 min 前処理をしたクロマフィン細胞では、アセチルコリン(ACh)刺激、および高カリウム刺激によるCA放出は、いずれも有意に抑制された（Fig.1）。高カリウム刺激によるCA放出についてこの阻害作用の濃度依存性を見ると、阻害作用は 0.3 μM 以上の濃度で有意に認められ、Wortmanninの濃度に依存していた。Wortmannin 1μMでは５０％阻害が、また10 μMではほぼ完全な阻害が観察された（Fig.2）。この範囲の濃度のWortmanninは、自発性放出には何等影響を与えなかった。また、３０分間の前処理によっても細胞内CA含量は全く影響を受けなかった。

Wortmanninの阻害様式を明確にするために、予めWortmannin処理を加えた細胞からジギトニンによってleaky細胞を調製し、そのleaky細胞からのCa^{2+}依存性開口放出に対する影響を調べると、インタクト細胞の高カリウム刺激の場合に得られた用量反応曲線（Fig.2）と近似した濃度依存性を示す阻害作用が観察され、Wortmannin 1 μMで５０％阻害が、10μMでほぼ完全な阻害が得られた。（Fig.3）。従って、クロマフィン細胞におけるWortmanninのカテコールアミン放出阻害作用は、細胞内遊離Ca^{2+}が開口放出をもたらす反応過程を阻害した結果であると言え、細胞外Ca^{2+}の流入機構にはなんら影響を与えないと考えられる。事実、細胞内Ca^{2+}の変動を蛍光顕微鏡で測定すると、Wortmannin 30 μM

で処理をした細胞のACh刺激に対するCa^{2+}応答は無処理細胞と変わらなかった。

Wortmannin のカテコールアミン放出阻害作用は、細胞の処理時間に依存しており、１５分処理では阻害作用が見られず、２０分では最大阻害の約５０％が観察され、最大阻害作用の発現に要する処理時間は およそ３０分であった。このように阻害作用の発現に時間を要する性質は、精製MLCKに対する阻害作用の性質(3)と良く一致する。また、MLCKの活性阻害ペプチド(6)をleaky細胞にロードするとCa^{2+}依存性CA放出の顕著な抑制が観察されることから、Ca^{2+}依存性開口放出のWortmanninによる阻害はMLCKの阻害が原因であると推察される。

従来クロマフィン細胞では、開口放出機構へのMLCKの関与を明確に示す報告は無く、その役割については議論の余地があるところであった。その原因の一つは、本研究で用いたWortmanninのようにMLCKに対して高い特異性を持つ阻害物質が得られていなかった点にある。MLCKに対して極めて特異性の高いWortmanninを用いた本研究の結果は、クロマフィン細胞のCa^{2+}依存性開口放出には、MLCKまたはミオシン軽鎖のリン酸化が重要な役割を持っていることを強く示唆する。開口放出機構にミオシン軽鎖のリン酸化が関与する分子機構は未だ不明であるが、今後はCa^{2+}依存性開口放出機構におけるMLCKの関与をさらに明確にすると共に、既知の開口放出調節因子との関係を明らかにしていきたい。

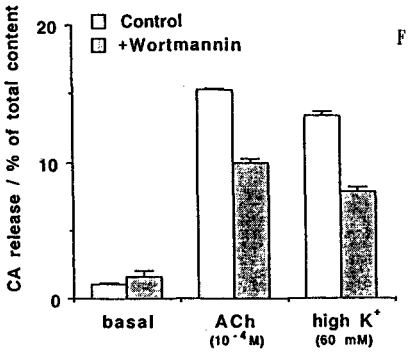


Fig.1 ACh刺激および高カリウム刺激によるCA放出に対するWortmanninの阻害作用

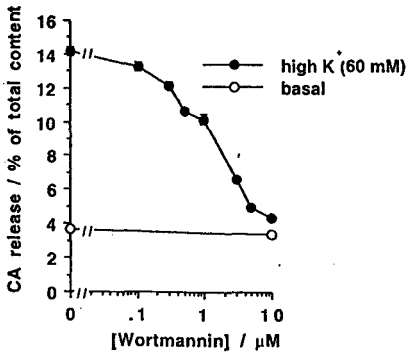


Fig.2 高カリウム刺激によるCA放出に対するWortmanninの阻害作用

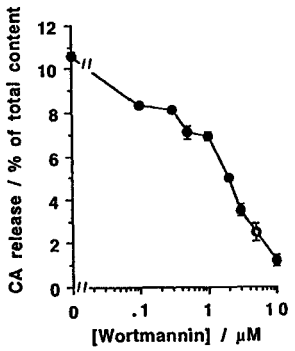


Fig.3 Leaky細胞からのCa^{2+}10μMによるCA放出に対するWortmanninの阻害作用

［文献］

1. Kanda, K., Sobue, K, & Kakiuchi, S. (1985) J. Biochem. 97, 961-964.
2. Lee, S.A., Holz, R.W., & Hatahaway, D.R. (1987) Bioscience Reports, 7, 323-332.
3. Nakanishi, S., Kakita, S., Takahashi, I., Kawahara, K., Tsukuda, E., Sano, T., Yamada, K., Kase, H., Matsuda, Y., Hashimoto, Y., & Nonomura, Y. (1992) J. Biol. Chem. 267, 2157-2163.
4. Kitani, S., Teshima, R., Morita, Y., Ito, K., Matsuda, Y., & Nonomura, Y. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 183, 48-54.
5. Ohara-Imaizumi, M., Kameyama, K., Kawae, N., Takeda, K., Muramatsu, S., & Kumakura, K. (1992) J. Neurochem. 58, 2275-2284.
6. Wysolmerski, R.B. & Lagnoff, D. (1991) Am. J. Physiol. 261, C32-40.

91 ATP刺激によるドーパミン放出過程におけるmyosin light chainの関与

小泉修一、井上和秀、綿野智一、藤森観之助、熊倉鴻之助*、高仲　正
（国立衛生試験所・薬理部、*上智大・生命研・神経科学）

〔要約〕
PC12細胞を用いて、ATP受容体刺激により惹起されるドーパミン（DA）放出過程におけるmyosin light chain（MLC）の関与を検討した。ATP（100μM）刺激によるPC12細胞からのDA放出は、MLC kinase（MLCK）の選択的拮抗薬、wortmannin（WT; 0.1～10μM）の1時間前処置により、濃度依存的に抑制され10μMではほぼ完全に消失した。IC_{50}は0.3μMであった。一方、ATP刺激による細胞内Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]_{in}$）の上昇は、WT（10μM）の前処置により全く影響を受けなかった。すなわちWTは、ATP刺激による細胞内へのCa^{2+}流入に影響を与えることなしに、DA放出を抑制した。本実験結果より、①$[Ca^{2+}]_{in}$上昇以降のDA開口放出過程にMLCのリン酸化が深く関与していること、②WTはMLCKを阻害することによりDAの開口放出を抑制することが示唆された。

［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細胞を用いて研究を進め、以下のような知見を得た。ATPはP2受容体を刺激し、受容体作働性のCa^{2+}流入を惹起し、その結果DA放出を引き起こす（1-6）。この時同時に生じた脱分極により活性化された電位依存性Ca channel（VGC）はDA放出には全く関与していない(1)。外液Ca^{2+}を除去するとDA放出は生じない（5,6)。このように、ATP刺激によるDA放出はP2受容体作働性ion channelからの外液Ca^{2+}の細胞内流入により惹起されるが、その後、DAの開口放出に至る詳しい機序は全く不明である。Myosinはactinとともに筋収縮に関与している蛋白であるが、筋以外の細胞においても細胞骨格を形成し、伝達物質の開口放出に重要な役割を果たしていることが報告されている（9）。本実験は、MLCK活性を特異的に阻害するWTを用いることにより、ATP刺激によるPC12細胞からのDA放出機序の一端を明らかにすることを目的とした。

［実験方法］　PC12細胞の培養法、DA放出量の定量法（5-7）及び$[Ca^{2+}]_{in}$測定法（8）は既報に従った。WTはATP刺激の30分及び1時間前より暗所にて目的濃度をPC12細胞に添加した。その後WTを含むATP(100μM)溶液にてDA放出実験及び$[Ca^{2+}]_{in}$測定実験を行った。WTは協和発酵工業（株）より提供していただいた。

［結果］　Fig.1に、ATP（100μM）刺激により惹起されたDA放出に対するWT(0.1～10μM)の影響を示した(○; 30分、●; 1時間の前処置)。PC12細胞からのDA基礎遊離量はA:1.57±0.07 % of total content(n=4)、ATP（100μM）刺激によるDA遊離量はB:15.23±0.32 % of total content (n=4)であった。Fig.1の値はB－A値を100(control)とした % of control値を示している。ATP刺激によるDAの放出は、添加したWTの濃度に依存して抑制され、1時間の前処置で3μM; 6.18±9.48、10μM; -1.45±4.35 % of controlとほぼ完全に抑制された。このときIC_{50}値は0.3μMであった。またWTを30分間前処置した場合にも、ATPによるDA遊離は濃度依的に抑制された。しかしその効力は1時間前処置した場合の約50 %であった（3μM;50.76±2.17）。Fig.2に、ATP（100μM）刺激による$[Ca^{2+}]_{in}$の上昇に対するWT（10μM）1時間前処置の影響を示した(○; control、●; WT)。WT（10μM）は、ATP刺激によるDA放出を完全に抑制する濃度であるが、$[Ca^{2+}]_{in}$の変動にはほとんど影響を与えなかった。

［考察］　ATP受容体刺激は、受容体作働性非選択的カチオンチャネルからCa^{2+}の細胞内流入を誘

発し、DA放出を引き起こす。しかし、$[Ca^{2+}]_{in}$上昇からDA開口放出に至る過程は未だに不明である。MLCKの選択的拮抗薬であるWTが、ATPにより惹起される$[Ca^{2+}]_{in}$上昇に影響を与えずにDA遊離を完全に抑制したことから、WTの作用部位は$[Ca^{2+}]_{in}$上昇以降のDA開口放出過程であると推測される。同様の結果が、クロム親和細胞（11）、ラットのbasophilic leukemia、ヒトのbasophils（12）で得られている。PC12細胞には2種類のMLC（17k及び20kDa)が存在し、calmodulin依存性リン酸化酵素でリン酸化を受ける。このうち20 kDa MLCは、MLCKによりリン酸化を受ける（10）。従って、PC12細胞におけるWTの標的はMLCKであり、これが特異的に阻害されたことによりATP誘発性のDA放出が抑制されたものと考えられる。以上、ATP刺激による$[Ca^{2+}]_{in}$上昇からDA開口放出に至る過程に、MLCのリン酸化が必須であることが明らかとなった。

[文献] 1. Inoue K., et al., Neurosci. Lett., 106, 294-299, 1989. 2. Nakazawa K., et al., J. Physiol. (Lond.), 428, 257-272, 1990. 3. Nakazawa K., et al., Br. J. Pharmacol., 102, 581-584, 1991. 4. Nakazawa K., et al., J. Physiol. (Lond.), 434, 647-660, 1991. 5. Inoue K., et al., Br. J. Pharmacol., 102, 581-584, 1991. 6. Inoue K., et al., Br. J. Pharmacol., 102, 851-854, 1991. 7. Inoue K. and Kenimer J.G., J. Biol. Chem., 263, 8157-8161, 1988. 8. Grynkiewicz G., et al., J. Biol. Chem., 260, 3440-3450, 1985. 9. Hartshorne D.J. et al., News in Physiol. Sci., 7, 59-64, 1992. 10. Englert D.F., and Perlman R.L. Biochemica. et Biophysica. Acta., 802, 77-82, 1984. 11. Ohara-Imaizumi M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, in press. 12. Kitani S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 183, 48-54., 1992.

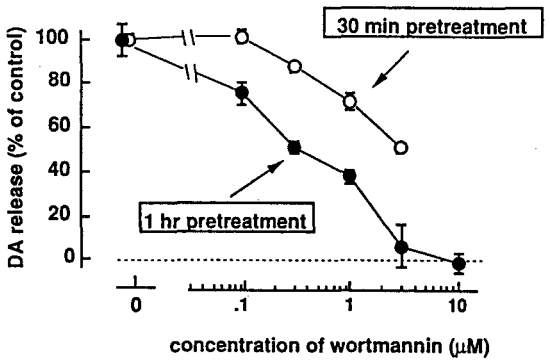


Fig. 1 Concentration and time dependency of inhibition by wortmannin of ATP-evoked dopamine release. (○; 30 min, ●; 1 hr pretreatment.)

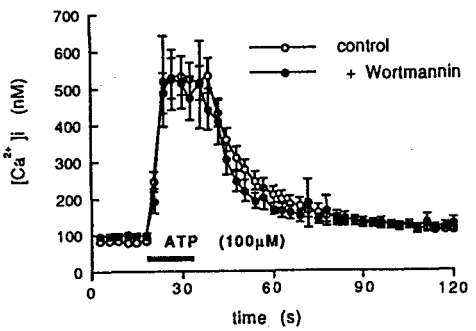


Fig. 2 Effect of wortmannin on ATP-evoked intracellular Ca^{2+} increase in PC12 cells.

92 YM-09151-2によるラット線条体の膜電位非依存性Dopamine遊離

富山勝則，越川憲明，小林雅文
（日本大・歯・薬理）

〔要約〕
脳微小透析法を用いてYM-09151-2（YM）をラットの線条体に注入した際の細胞外dopamine（DA）動態について検討した。前回の第３４回神経化学会において，YMを直接脳内に注入した場合発現するDAのオンセットの早い一過性の著明な増加（rapid increase）はオンセットの遅い増加とは異なり，tetrodotoxinに非感受性であることを報告したが，今回はこのYMによるDAのrapid increaseがどのようなメカニズムで発現するかについてさらに検討を加えた。

YMにより生じるDAのrapid increaseはl-sulpiride（75ng／0.5μl），またはnomifensine（10μM）の前処置によって影響を受けなかった。またCa^{2+} free Ringer液灌流下でもYMによるDAのrapid increaseは影響を受けなかったが，オンセットの遅いDAならびにDOPAC，HVAの増加は抑制された。以上の結果より，線条体へのYMの注入により生じるDAの遊離機構にはオンセットの速いものと遅いものの２つがあり，前者はCa^{2+}非依存性であり，D_2レセプターを介さず，かつnomifensine様の再取り込み機構の阻害によるものではないことが示された。また後者はD_2オートレセプターを介した変化であることが示唆された。

演者らは第３４回神経化学会において，透析膜のすぐ近くに薬液注入用のマイクロインジェクションチューブを配置したプローブを用いて各種DA系薬物を直接線条体内に注入すると，SCH 23390やYM-09151-2（YM）などはオンセットの速い著しい線条体DA遊離の増加（rapid increase）を惹き起こすことを報告した（1）。今回は選択的D_2アンタゴニストであるYMとl-sulpiride（l-Sul）がDA遊離に対して異なった効果を示すことに着目し，それらの差について，特にYMによって起こるDAのrapid increase発現機構についてさらに検討を行った。

〔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（2）のアトラスに従いガイドカニューレを左側線条体（A：9.0mm，L：3.0mm，V：7.0mm from interaural line）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-4-02；透析膜長 2mm，分子量 50,000）をガイドカニューレに装着固定した。Ringer液（NaCl 147.0mM，KCl 4.0mM，$CaCl_2$ 2.3mM，pH 6.0）を2μl／minの流速で３時間以上灌流し，回収されるDA，DOPAC，HVAの量が安定した後，灌流液の交換または薬物の注入を行った。灌流液としては上記Ringer液以外にCa^{2+}free Ringer液（NaCl 147.0mM，KCl 4.0mM，$MgCl_2$ 2.3mM，pH 6.0），人工脳脊髄液（glucose 5.0mM，NaCl 125.0mM，$NaHCO_3$ 27.0mM，KCl 2.5mM，NaH_2PO_4 0.5mM，Na_2HPO_4 1.2mM，Na_2SO_4 0.5mM，$MgCl_2$ 1.0mM，$CaCl_2$ 1.0mM，pH 7.4）を用いた。回収した灌流液は２０分毎にオートインジェクターを用いてＨＰＬＣに注入し，電気化学検出器によりDA，DOPAC，HVAを定量した。Ringer液で灌流し安定した時点の３回分の各物質の平均値を１００％として各時点の値を表した。有意差の検定にはMann-WhitneyのU-testを用い，YM注入直前の値に対して検定を行い，有意水準は$p<0.05$とした。また例数は各６匹とした。

〔結果および考察〕
図１（Ａ）に示すように，YM（1μg／0.5μl）注入後に認められる線条体の著明なDAのrapid increaseは２時間前にl-Sul（75ng／0.5μl）を投与し，D_2レセプターを遮断しておいた場合にも同様に認められた。この結果はYMによるDAのrapid increaseがD_2レセプターを介した結果でないことを示している。このDAのrapid increaseはDAの再取り込み阻害によっても発現する可能性があるので，nomifensine前処置の効果についても検討した。その結果，図１（Ｂ）に

示すように，nomifensine （10μM）の灌流はそれ自体DAレベルを900%増加させるが，その時点でさらにYMを投与すると著明なDAのrapid increaseが認められた。この結果はYMによるDAのrapid increaseがnomifensineとは異なる機構によること，さらにYM自体がDA取り込み機構によってDA神経内に取り込まれ，小胞内のDAを置換し放出させる可能性をも否定するものである。図2（A）に示すように，YMによるDAのrapid increaseはCa^{2+} free Ringer液の灌流下でも発現することが認められた。この結果は，前回報告したようにYMのこの作用がTTX非感受性であったことと考え合わせると，YMはamphetamine類のようなamine releaserとしての作用か，あるいはMPP^{+}のような神経毒性を示すことが推察される。一方，オンセットの遅いDAならびにDOPAC，HVAの増加はCa^{2+}に依存性であり，TTXにも感受性であったので，D_2オートレセプターが遮断された結果によって生じたものと考えられる。Ringer液の灌流はCa濃度が細胞外液の濃度（1.1μM）よりも高いのでDA遊離を既に高めてしまっており，そのことによって薬物のDA遊離に対する効果が変わってしまう可能性が指摘されている（3）。そこでCa濃度がより生理的な濃度に近いとされる人工脳脊髄液灌流下でYMを投与したが，やはり同様のDAのrapid increaseが認められた（図2B）。以上のことから，YMによるTTX非感受性のDAのrapid increaseはCa非依存性であり，さらにD_2レセプターやDAの再取り込み機構を介したものではないことが示された。

〔文献〕

（1）富山勝則 他 (1991) 神経化学, 30, 346-347. （2）Paxinos, G. & Watson, C. (1986) The Rat Brain, Academic Press. （3）Westerink, B.H.C., et al.(1988) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.,337, 373-378.

図1 YM-09151-2による線条体DA遊離に対するl-sulpiride（A），nomifensine（B）前処置の効果

YM：YM-09151-2（1μg／0.5μl），l-Sul：l-sulpiride（75ng／0.5μl）

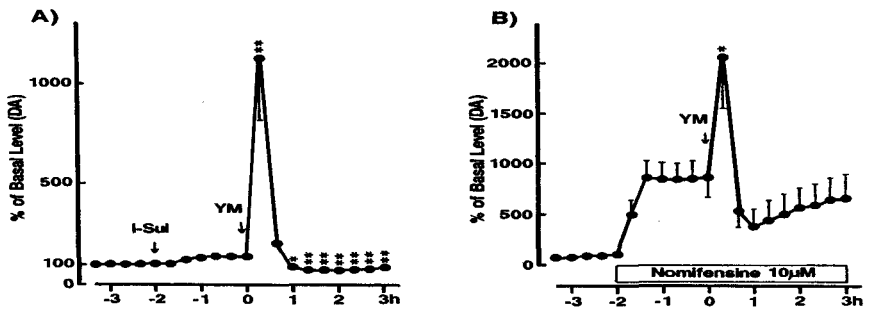
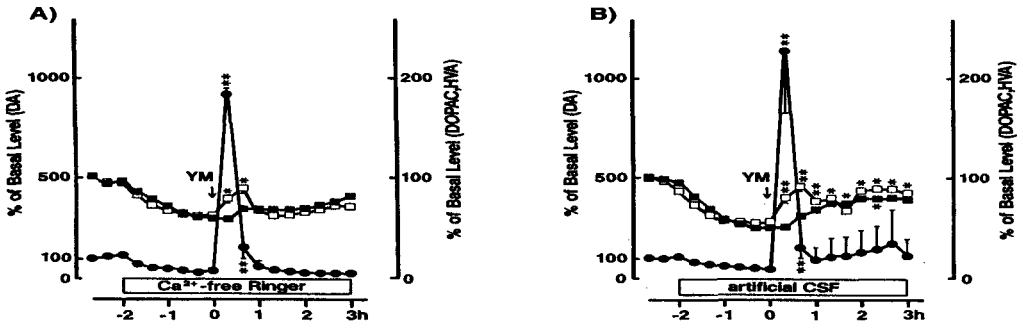


図2 YM-09151-2による線条体DA（●），DOPAC（□），HVA（■）遊離に対するCa^{2+}free Ringer液（A），人工脳脊髄液（B）灌流の効果



93 MK-801はamantadineによるドパミン放出を抑制する

山下拓史, 張　玉祥, 丸山博文, 中村重信
(広島大・医・第三内科)

〔要約〕
抗パーキンソン病薬であるamantadineを腹腔内および線条体に投与し, 線条体細胞外液のdopamine(DA)濃度を上昇させることを確認した. グルタミン酸(Glu)はDA神経終末からDA放出を促進することが知られているが, N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体antagonistであるMK-801はDA系の代謝を促進することが報告されている. MK-801の腹腔内および線条体投与では, 線条体DAや代謝産物DOPAC, HVA濃度は変化しなかった. しかし, MK-801とamantadineの同時投与によりDAの放出は抑制された. NMDA受容体を介する前シナプス性のDA放出調節機構やamantadineのNMDA受容体のPCP(phencyclidine) siteとの親和性が報告されており, このことから, amantadine投与によるDAの放出は, 間接的あるいは直接的にNMDA受容体を介する可能性が示唆された.

〔はじめに〕
線条体には, 前頭葉皮質からのグルタミン酸(Glu)ニューロンと黒質からのドパミン(DA)ニューロンの投射を受け(1), 両者の神経終末は相互に調節作用を持っているが, その機序には一定の知見は得られていない. Gluあるいはそのagonistは線条体でN-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体を介してDAの放出を促進するが, NMDA非競合性antagonistの(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo［a, d］cyclohepten-5, 10-imine maleate(MK-801)もDA系の代謝を促進することが報告されている(2). 今回われわれは, MK-801とDA放出作用を持つ抗パーキンソン病薬amantadineの線条体DA系に対する作用, およびNMDA受容体とDA系の相互作用を明らかにするために, in vivo microdialysisを用いて検討した.

〔方法〕
実験にはウイスター系雄性ラット(体重250-300g)を使用した. 抱水クロラール麻酔下(360mg/kg, i.p.)で, ラットの頭部を脳定位固定器(SR-5)に固定した. 脳内微小透析用probeを挿入するためのguide cannulaを, 先端が線条体中心部に位置するように, Bregmaから正中より左側方3.0mm, 脳表より深さ3.5mmに埋め込んだ. guide cannulaの上部を歯科用セメントで頭蓋に固定し, 手術後1週間以上の回復期間をおいて実験した. cut-off分子量50kDaの再生セルロース製の透析膜を持った内径200 μmの直管式の透析probe (BDP-I-8-03)をguide cannulaの先端より3mm突出した状態で線条体に挿入した. 無麻酔, 無拘束の条件下で, probeにRinger液を1 μl/minの速度で灌流した. 線条体透析液中のDA, dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC), homovanillic acid(HVA)は逆相カラム(MA-ODS, 5 μm, 4.6×100mm)で分離し, 電気化学検出器(ECD-100)で検出, 定量した. 移動相は, 0.1Mクエン酸－0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH3.9), 15% methanol, 150mg/l 1-octanesulfonate, 3mg/l EDTAを用いた. DA, DOPAC, HVAは, 標準品(Sigma)により各ピークを同定し, 面積を濃度とした. 線条体灌流液をautoinjector(AS-10)を用いて22分毎に回収し, HPLCに直接注入し, 各濃度を連続的に測定した. 薬物投与はprobeを挿入後, 約2時間リンゲル液を灌流し, 各ピークが安定した後に行なった. 薬物投与は1) amantadine(100mg/kg)腹腔内(i.p.)投与および1mMに調整したRinger液を10分間灌流することによる脳内(i.c.)投与. 2) MK-801(0.00039mg/kg)i.p. 投与および0.1mMに調整したRinger液を10分間灌流することによるi.c. 投与. 3) MK-801(0.00039mg/kg)i.p. 投与20分後にamantadine(100mg/kg)i.p. 投与. MK-801(0.00156mg/kg)i.p. 投与20分後にamantadine(100mg/kg)i.p. 投与. 4) MK-801を0.1mMに調整したRinger液を10分間灌流しi.c. 投与後, amantadineを1mMに調整したRinger液を10分間灌流しi.c. 投与を行なった. 結果における統計学的有意差の検定は, 薬物投与前と投与後の各時間のDA, DOPAC, HVA濃度について分散分析による多重比較を行ない, 危険率5%未満の場合に有意と判定した.

〔結果〕
1) amantadine(100mg/kg) i.p. 投与により線条体細胞外液のDA濃度は有意に上昇した(表1).
amantadine(1mM) i.c. 投与により線条体細胞外液のDA濃度は有意に上昇した(図1, 表1).
2) MK-801(0.00039mg/kg) i.p. 投与により線条体細胞外液のDA濃度に変化はみられなかった(表1).
MK-801(0.1mM) i.c. 投与により線条体細胞外液のDA濃度に変化はみられなかった(表1).
3) MK-801(0.00039mg/kg) i.p. 投与後20分してamantadine(100mg/kg) i.p. 投与したところ線条体細胞外液のDA濃度に変化はみられなかった(表1).
MK-801(0.00156mg/kg) i.p. 投与後20分してamantadine(100mg/kg) i.p. 投与したところ線条体細胞外液のDA濃度に変化はみられなかった(表1).
4) MK-801(0.1mM) i.c. 投与を10分間行なった後amantadine(1mM) i.c. 投与を10分間行なったところ線条体細胞外液のDA濃度に変化はみられなかった(図2, 表1).

〔考察〕

抗パーキンソン病薬のamantadineのカテコラミン系に対する作用は，神経終末のカテコラミン放出作用(3), tyrosine hydroxylase活性促進作用(4), dopamine β-hydroxylase活性抑制作用(5), 再取り込み阻害作用(6)などが報告されているが，一定の知見は得られていない．今回われわれは腹腔内および線条体投与を行ない，線条体細胞外液のDA濃度を上昇させることを明かにした．一方，in vivo(7)とin vitro(8)の研究によりGluはDA神経終末でDAの放出を促進することが知られている．GluのDA系に対する作用は，DA神経終末への直接作用，多シナプスを介しての作用，あるいはAchを介しての作用が想定されており，その機序は明らかではない．われわれの結果ではMK-801の腹腔内および線条体投与はamantadineによるDAの放出を抑制した．MK-801はD_1, D_2受容体，シナプス前膜のDA uptake site, NE, Ach, 5-HT, GABA受容体との親和性が低いこと(9, 10)から，選択的にNMDA受容体を介してamantadineによるDA放出作用を抑制したと考えられた．また，神経終末から放出されたDAは，Glu神経終末にあるD_2受容体を刺激してGluを放出させ(11)，DA神経終末のNMDA受容体を刺激し，DAの放出をさらに増加させるといった一連のcascadeが考えられる．amantadineによるDA放出が減弱した機序としては，このNMDA受容体をMK-801が阻害し，引き続いて起こるDA放出を抑制した可能性があると考えられる．また，amantadineはNMDA antagonistとしての作用(12, 13)や，NMDA受容体抑制部位のPCP(phencyclidine) siteと軽度の親和性(14)があることが報告されており，amantadineが直接NMDA受容体を刺激しDA系に促進的にはたらく可能性もあるが，今回の結果では，MK-801腹腔内および線条体投与では線条体DAには影響はなかった．われわれは，amantadine投与によるDAの放出が 間接的あるいは直接的にNMDA受容体を介することを明らかにした．

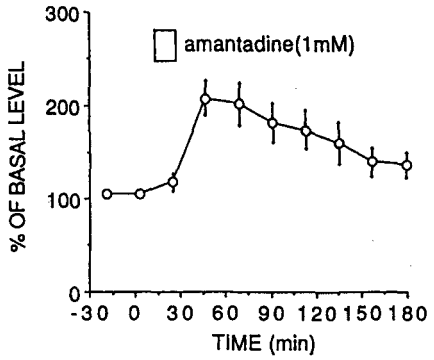


図1. amantadine脳内投与による線条体DA濃度の変化

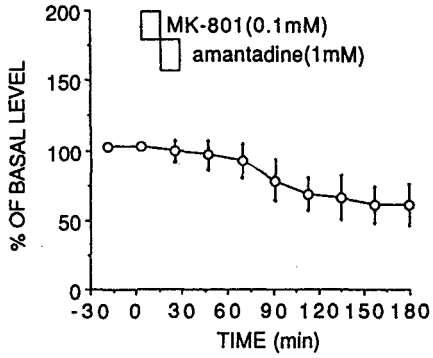


図2. MK-801脳内投与によるamantadineのDA放出作用の抑制

	DA	DOPAC	HVA
Amantadine(100mg/kg) i. p.	↑	↑	↑
Amantadine(1mM) i. c.	↑	→	↑
MK-801(0.00039mg/kg) i. p.	→	→	→
MK-801(0.1mM) i. c.	→	→	→
MK-801(0.00039mg/kg) i. p. + Amantadine(100mg/kg) i. p.	→	→	→
MK-801(0.00156mg/kg) i. p. + Amantadine(100mg/kg) i. p.	→	→	→
MK-801(0.1mM) i. c. + Amantadine(1mM) i. c.	→	→	→

表1. amantadineおよびMK-801の線条体DA, DOPAC, HVA濃度に及ぼす影響

文献

1. Freund, T., Powell, J. and Smith, A. (1984) Neuroscience.13, 1189-1215
2. Tadimeti, S., Helen, S., Kim, J. L., Louis, L. M. and Paul, L.W. (1990) J. Neurochem. 54, 1157-1162
3. Thornburg, J. E. and Moore, K. E. (1973) Res. Comm. Chem. Path. Pharm. 5, 81-85
4. Stromberg, U., Svensson, T. H. and Waldeck, B. (1970) J. Pharm. Pharmacol. 22, 959-961
5. Scatton, B., Cheramy, A., Besson, M. J. and Glowinski, J. (1970) Europ. J. Pharmacol. 13, 131-135
6. Stromberg, U. and Svensson, T. H. (1971) Acta. Pharmacol. (1971) 30, 161-165
7. Roberts, P. J. and Anderson, S. D. (1979) Neurochem. 32, 1539-1545
8. Chesselet, M. F. (1984) Neuroscience. 12, 347-375
9. Vignon, J., Pinet, V., Cerruti, C., Kamenka, J. M. and Chicheportiche, R. (1988) Eur. J. Pharmacol. 148, 427-436
10. Clineschmidt, B. V., Williams, M., Witoslawski, J. J., Bunting, P. R., Risley, E. A. and Totaro, J. A. (1982) Drug Dev. Res. 2, 147-163
11. Deria, J., Dwoskin, L. and Zahniser, N. (1988) Synapse. 2, 450-456
12. Olney, J. W., Price, M. T., Labruyere, J. (1987) Eur. J. Pharmacol. 142, 319-320
13. Kornhuber, J., Bormann, J., Retz, W. (1989) Eur. J. Pharmacol. 166, 589-590
14. Jang-Ho, J. Cha, Leons, S. and Dure, I. V. (1991) Neuroscience Letters. 132, 55-58

94 虚血性脳神経細胞死とエンドセリン受容体

山下樹三裕[1]、丹羽正美[1]、片岡泰文[1]、重松和人[2]、姫野明彦[3]、堤　圭介[4]、谷山紘太郎[1]
長崎大・医・[1]薬理２、[2]病理２、[3]精神神経科、[4]脳神経外科

〔要約〕
虚血性神経細胞障害へのエンドセリン（ET）の関与を調べる目的で、一過性前脳虚血による ET 受容体の変動を定量的受容体オートラジオグラフ法を用いて検討した。一過性前脳虚血動物は、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）を用いて両側総頸動脈を 10 分間結紮することにより作製した。血流再開後 7 日目の海馬には、CA1 錐体細胞に遅発性神経細胞壊死が認められ、CA1 pyramidal cell layer および lacunosum moleculare layer において ^{125}I-ET-1 および ^{125}I-ET-3 特異的結合部位の、著明な増加が認められた。これら増加した結合部位はグリア細胞上に位置することが示唆された。虚血後血流再開 2 日目の海馬では、ET 結合特性に偽手術群との差は認められなかった。虚血性神経細胞死発症時の ET 量の増加を示した先の報告と今回の結果より、脳虚血病変にエンドセリンが重要な役割を果たしているものと考えられる。

脳内エンドセリン（ET）の生理的、病態生理的意義が注目されている。ET-1 および ET-3は、その特異的受容体を介して、細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度を上昇させる（3, 5）。一方、虚血性神経細胞死の機序に興奮性アミノ酸類またはペプチド類による細胞内 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, 2）。我々は、これまでに一過性前脳虚血による海馬 CA1 pyramidal layer, lacunosum moleculare layer および CA4 領域に ET-1および ET-3 の産生が著明に増加することを見い出し、脳虚血病変に ET が関与することを示唆した（6）。そこで、今回は一過性前脳虚血による ET 受容体の変動を、定量的受容体オートラジオグラフ法を用いて検索し、あわせて、emulsion オートラジオグラフ法で結合部位の細胞局在も検討した。

〔方法〕
14 週齢の雄性脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）に、1.5%ハロタン麻酔下、10 分間両側総頸動脈の結紮により、一過性の脳虚血を負荷した後、経時的に断頭し、摘出脳の連続脳薄切片を作製した。対照として、偽手術群を同様に作製した。これら切片を、15 分間室温で preincubation した後、^{125}I-ET-1 および ^{125}I-ET-3をリガンドとして、48 時間 4℃で incubation した。非特異的結合は、1.0 μM 非放射性 ET-1 または ET-3 存在下で得た。また、受容体の特性を調べるため、1.0 pM－1.0 μM 非放射性 ET-1 または ET-3 を 53.6 pM ^{125}I-ET-1含有 incubation buffer に添加した。結合部位濃度は標識後 Hyperfilm-^{3}H に ^{125}I-standard とともに感光させ、オートラジオグラムを作成した後、computerized microdensitometer で黒化度を測定し、standard と比較することにより定量した（4）。得られたデータは LIGAND computer program により解析した。また、ET 結合部位の細胞局在を調べるため、emulsion オートラジオグラフ法も展開した。

〔結果〕
偽手術群の海馬では、比較的高濃度の ^{125}I-ET-1 および ^{125}I-ET-3 結合部位が lacunosum moleculare layer に認められた。oriens layer および stratum radiatum では、低濃度

の ET 結合部位が認められたが、pyramidal cell layer では ET 結合部位はほとんど認められなかった。また ^{125}I-ET-1 結合部位と ^{125}I-ET-3 結合部位との分布の差は認められなかった。虚血後血流再開 2 日目の海馬の ET 受容体結合は偽手術群のそれと比較して有意な変化は認められなかった。しかし虚血後血流再開 7 日目の海馬では oriens layer から lacunosum molecular layer にわたって著明な ET 結合量の増加が認められ、特に、pyramidal cell layer において、最も高濃度の ^{125}I-ET-1 および ^{125}I-ET-3 結合量が認められた (Fig. 1)。LIGAND による Scatchard 解析の結果、ET 結合量の増加は、いずれも著明な Bmax の増加であり、Kd 値には変化はなかった。また emulsion オートラジオグラムによる光顕観察から、これら増加した結合部位は、グリア細胞上に位置することが示唆された。

〔考察〕

SHRSP の両側総頸動脈を 10 分間結紮することで、結流再開後 4 日目から 7 日目で海馬 CA1 錐体細胞の神経細胞壊死が認められる。一過性の脳虚血後 2 日目の海馬では ET 量および ET 結合部位は偽手術群のそれと有意な差は認められないが、7 日目では双方とも著明に増加した。ET の増加は主にアストログリア細胞で認められたが、ET 結合部位の増加は、アストログリアとともにマイクログリアによるものと思われ、グリア＝グリア細胞間およびグリア＝神経細胞間における ET 情報の伝達が、脳虚血病変に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。以上より、脳虚血による神経細胞脱落時に、ET 産生が増加するだけでなく、ET 受容体量も著明に増加していることが判明し、虚血性神経細胞障害の過程に、ET が重要な役割を果たしていることが示唆された。

〔文献〕

1. Choi, D.W. (1988) Trends Neurosci., 11, 465-469.
2. Kataoka, Y. et al. (1989) Neurosci. Lett., 107, 75-80.
3. Nishimura, T. et al. (1991) Br. J. Pharmacol., 103, 1242-1250.
4. Niwa, M. et al. (1992) Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol., 225, 281-289.
5. Reiser, G. and Donie, F. (1990) Eur. J. Neurosci., 2, 769-775.
6. Yamashita, K. et al. (1992) Cell. Mol. Neurobiol. (in press)

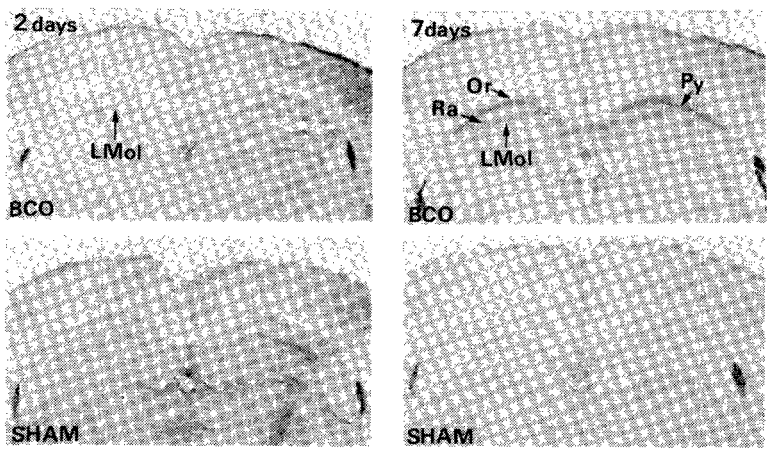


図1 ^{125}I-ET-1 特異結合のオートラジオグラム
上段左：一過性前脳虚血後 2 日目、上段右：一過性前脳虚血後 7 日目、
下段：それぞれの偽手術脳

95 高酸素負荷による培養中枢ニューロンの死は蛋白質合成を必要とする

榎戸　靖、茜谷行雄、畠中　寛
（大阪大学蛋白質研究所・生合成）

〔要約〕

高濃度の酸素気相下に培養されたラット胎仔中枢ニューロンの死は蛋白質およびRNA合成阻害剤によって抑制されることを見いだした。ラット（E20）脳の海馬ニューロンを50%気相酸素濃度に設定したインキュベータ内で培養すると、培養2〜3日後にはほとんどのニューロンが死滅することを既に報告した。今回、この現象がapoptosisによる細胞死の形態をとっているかを調べるため蛋白質合成阻害剤であるcycloheximideあるいはRNA合成阻害剤であるactinomycinDを添加し、その効果を調べた。その結果、これら阻害剤は共にニューロン死を顕著に防いだ。同様の効果は、培地中に高濃度のカリウムを添加しニューロンに脱分極刺激を与えた場合や、CPT-cAMPを加えた場合にも観察された。以上の結果は、高酸素負荷による培養中枢ニューロンの死が、細胞内に備わる何らかの自殺メカニズムを介して引き起こされていることを示唆している。

細胞内の酸素代謝にともなって生じる酸素ストレスが、老化や疾患の原因となる遍在的な細胞障害を引き起こすことが知られている。特に、エネルギー代謝が酸素とグルコースに唯一依存している脳では、ニューロン活動に必要なイオンチャネルの駆動のために多くの酸素が消費されている。このことは、非分裂細胞として脳機能の中心を担い続けるニューロンは、その機能を果たす一方で、絶えず酸素ストレスに曝されていることを意味している。脳は虚血侵襲などの脳血管障害によっても酸素ストレスを受け、容易に変性・脱落する事が知られている。すなわち、ニューロンの持つ酸素ストレスへの防御機構の解明は、それらの非分裂細胞としての長期生存能力のみならず、酸素ストレスに起因する多くの神経疾患や脳血管障害の予防およびその治療を考える上でも特に重要な問題であると考えられている。これまで我々は高酸素負荷によって誘導されるPC12h細胞や中枢ニューロンの死がNGFやbFGFなどの神経栄養因子によって防がれることを報告してきた[1,3,4]。本研究では、酸素によって誘導される中枢ニューロン死の機構を知る手がかりとして、蛋白質およびRNA合成阻害剤による生存維持作用を検討した。

【実験方法】

胎仔ラット中枢ニューロンの初代培養は既報に従って行った[2]。胎仔ラット脳より切り出した海馬部位をL-15培地中に集め、パパイン処理によって消化した後、5%準胎仔牛血清、5%馬血清を含むDF培地（DME:F12=1:1）で分散した。翌日5μMのAraCを含むTIP/DF培地に換え、気相酸素濃度を20および50%に設定したインキュベータ内で最長4日間培養を行った。生存細胞数の計測は抗MAP2抗体（新延、御子柴先生より供与）による免疫組織化学的染色とニグロシンによる死細胞の染色を用いてカウントした。

【結果と考察】

E20海馬ニューロンを50%気相酸素濃度で培養したところ、培養1日目あたりから細胞は死滅し始め、3日目にはほとんどの細胞は死滅した。この時、培地中に蛋白質合成阻害剤であるcycloheximideを1〜3μMの濃度で加えたところ、培養3日目でも開始時の約80%の細胞が生存していた。生存細胞は蛋白質合成の阻害によって細胞の肥大や突起伸長が著しく抑えられていた。これらは培地からcycloheximideを除き、通常培養下に移すことによって再び回復した（図1）。同様に、0.1μg/mlのactinomycinDの添加によっても細胞の生存が維持されたが、1μg/ml以上では細胞毒性が観察された。次に、E20胎仔ニューロンを10〜40mMの高カリウムを含む培地で培養することにより、ニューロンへの脱分極刺激が細胞の生存に与える影響を調べた。その結果、20mM以上の高カリウム刺激は、ニューロンの生存を顕著に促進した。特に、この条件では、50%気相酸素濃度においても通常培養時と同様の突起伸長も観察された。これらの結果

から、酸素毒性による培養中枢ニューロンの死は、末梢系のニューロンでNGF除去後にみられる細胞内自殺メカニズムを介したニューロン死に極めて類似したものであることが示された[5,6]。今後細胞死を誘導する細胞内シグナル伝達経路の解析や酸素によるニューロン死の形態がapoptosisでみられる細胞死機構と同様のものであるかについてさらに検討していきたい。

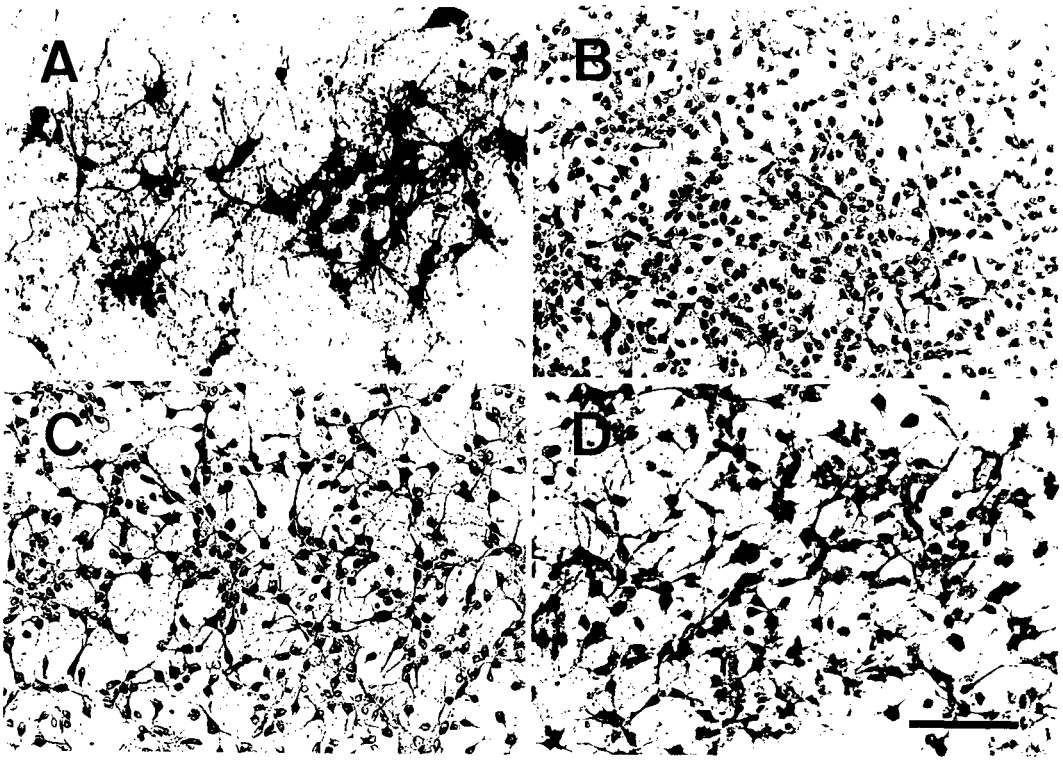


図1　高酸素負荷によるラットE20培養中枢ニューロンの死に対する蛋白質およびRNA合成阻害剤の抑制効果

(A)50%気相酸素下で2日間培養したときの無添加群、(B)1μM cycloheximide 添加群、(C)0.1μg/ml actinomycine D添加群、(D)(A)と同様に培養した後、cycloheximideを除き、20%気相酸素下で2日間培養をおこなったもの。

【文献】

(1)榎戸　靖、茜谷行雄、九島洋一、新延道夫、御子柴克彦、畠中　寛、(1991) 神経化学　30 408-409.

(2)Hatanaka, H and Tsukui, H., (1986) *Dev.Brain Res.*, 30 47-56.

(3)Enokido, Y. and H. Hatanaka, H., (1990) *Brain Res.*, 536 23-29.

(4)Enokido, Y., Akaneya, Y., Niinobe, M., Mikoshiba, K. and Hatanaka, H., (1992) *Brain Res.* in press.

(5)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.

(6)Koike, T., Martin, D.P. and Johnson, Jr., E.M., (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 86 6421-6425.

96 ラット海馬神経細胞初代無血清培養系による グルタミン酸神経細胞毒性の評価系の確立

大野和茂、山口時男
（山之内製薬株式会社　筑波研究所）

〔要約〕
グルタミン酸の神経細胞毒性の機序解明、また保護作用を有する薬剤の評価を行なう目的でラット海馬神経細胞初代無血清培養系を利用したグルタミン酸神経細胞毒性の評価系確立を試みた。グルタミン酸刺激条件、グルタミン酸受容体サブタイプの選択的アゴニストＮＭＤＡ、ＡＭＰＡ、Ｋａｉｎａｔｅの神経細胞毒性、ウワバイン等の薬剤による神経細胞死との比較について検討した。グルタミン酸神経細胞毒性の評価系としては、グルタミン酸刺激条件は、培養６日目以降の細胞を使用し、グルタミン酸濃度１００～１０００μＭ、曝露時間５～３０分間、細胞死を判定する時間は１８～２４時間後が適当と考えられた。選択的なアゴニストの毒性は、グルタミン酸＞ＮＭＤＡ＞Ｋａｉｎａｔｅ＞ＡＭＰＡの順であった。また、感受性はそれぞれのアゴニスト共に培養初期では認められなかった。グルタミン酸の毒性はＮＭＤＡレセプターのアンタゴニストであるＭＫ８０１により阻害されたためＮＭＤＡレセプターを介するものと考えられた。ウワバインによる細胞毒性と細胞死の時間経過を比較したところグルタミン酸による細胞死の方が速く、１８～２４時間でプラトーに達することが示された。以上よりラット海馬神経細胞初代無血清培養系を用いたグルタミン酸神経細胞毒性の評価系を確立した。この系は、無血清培養系であることから機序解明、薬物の評価系として有用と思われる。

【目的】
初代神経細胞培養系を用いた遅発性神経細胞壊死に関与すると考えられるグルタミン酸の神経細胞毒性について評価する実験系の開発を試みた。現在まで神経細胞培養系でグルタミン酸の神経細胞毒性を調べている報告はある（１、２、３、４）。しかしながら、血清培地の使用、トリパンブルーでの視覚的な細胞死の判定等、改良すべき点が残されている。血清培地を使用する場合、特に初代培養系では血清のロットの違いにより細胞の性質が左右される。また、薬物を評価する際、血清中の未知の因子の影響も考慮しなければならず、培養条件の違いにより実験室間でデータが若干異なっている。さらにトリパンブルーでの細胞死の判定は、観察する視野によってデータがばらつき定量性について問題が残る。今回我々は、これらの問題点を除くため無血清培養条件での安定した初代神経細胞培養系の確立、及びその培養系を用いてのグルタミン酸の神経細胞毒性の感度よい評価系の確立を試み、検討を行なった。

【方法】
①無血清条件におけるラット海馬神経細胞初代培養系
胎生１８日のラットより全脳を取り出し、実体顕微鏡下で海馬を摘出した。　細胞を分散させるためにパパインとDNase Ⅰ により消化し、レンズフィルターを用い細胞塊を除き、１０％血清を含むＤＭＥＭにて細胞浮遊液にした。分離した神経細胞を poly-l-lysine coating 48 well plate 上に 4×10^5 / cm^2 の密度で播種し、２４時間後、無血清培地（ＤＭＥＭ、インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸、ＢＳＡ）に交換した。培地交換は２、３、７回／週について検討した。
②神経細胞毒性
上記の培養細胞を用いてグルタミン酸曝露実験を行なった。検討項目は、1)培養日数によるグルタミン酸感受性、2)グルタミン酸曝露時間、3)濃度、4)細胞死の時間経過、である。グルタミン酸曝露時にはグルタミン酸、必要に応じて各種薬剤を同時に含む無血清培地に交換し、一定時間曝露した後、３回洗浄し、新しい無血清培地と交換した。数時間培養後、培養上清を回収し、上清中のＬＤＨ活性を測定することにより細胞死の判定を行なった。
ＮＭＤＡ、ＡＭＰＡ、Ｋａｉｎａｔｅの毒性については培養６日目に添加することにより用量依存性を検討した。また、ウワバインの細胞毒性は、１ｍＭ培地に加え時間経過を検討した。

【結果】
１）無血清条件におけるラット海馬神経細胞初代培養系
この培養系では培養６日目以降で培地交換による細胞死が認められた。その細胞死は培地交換の回数が少ない場合に顕著に見られた。培養６日目に培地交換する際、グルタミン酸レセプターのサブタイプであるＮＭＤＡレセプターのアンタゴニストＭＫ８０１を２０μＭ添加することにより、培地交換による細胞死が抑制された。
培地交換が３、５回／週の場合、培地交換による細胞死は低いレベルに抑えられ、１ｍＭのグルタミン酸刺激で十分な細胞死が見られたため、グルタミン酸曝露実験には培地交換３回／週で培養した細胞を以下の実験で使用した。
２）神経細胞毒性
①培養日数によるグルタミン酸感受性の変化：培養３、６、９、１２日目の細胞についてグルタミン酸１ｍＭ、５分間曝露し、２４時間後細胞死を判定した。３日目では細胞死が見られなかったが、６日目以上で細胞死が認められた（Ｆｉｇ．１）。以下の実験では培養６日目の細胞を使用した。②グルタミン酸曝露時間：グルタミン酸１ｍＭで１０秒から２４時間曝露し２４時間後細胞死を判定した。１０秒でも若干の細胞死が認められ、１時間で最大の反応が見られた。１時間と２４時間曝露はほぼ同一の反応であった。③グルタミン酸濃度：グルタミン酸１０～１０００μＭ、５分間曝露し２４時間後細胞死を判定した。３０μＭから認められ、３００μＭ以上で最大の反応が見られた（

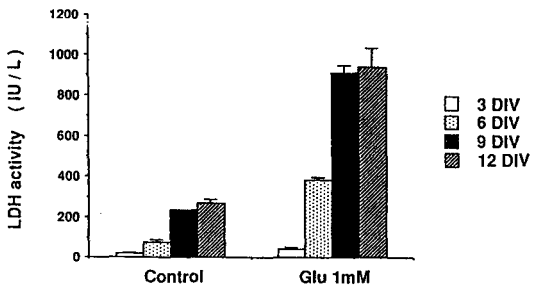
Ｆｉｇ．２）。④グルタミン酸神経細胞死の時間経過：グルタミン酸５０、１０００μＭそして５、３０分間曝露し１．５～４８時間後に細胞死を判定した。どの条件においてもグルタミン酸による細胞死の反応は１８～２４時間でプラトーに達することが示され、２４～４８時間の間では顕著な細胞死は認められなかった（Ｆｉｇ．３）。⑤グルタミン酸神経細胞毒性に対する薬剤の拮抗作用：グルタミン酸５００μＭおよびＭＫ８０１　２０μＭ共存下で５分間曝露し２４時間後細胞死を判定した。ＭＫ８０１はグルタミン酸による神経細胞毒性を阻害した。⑥グルタミン酸受容体アゴニストの毒性：ＮＭＤＡ、ＡＭＰＡ、Ｋａｉｎａｔｅの神経細胞毒性の用量依存性について検討した。毒性はグルタミン酸＞ＮＭＤＡ＞Ｋａｉｎａｔｅ＞ＡＭＰＡの順であった。ＡＭＰＡの毒性は非常に弱いものであった（Ｆｉｇ．４）。⑦ウワバインの毒性：培地に１ｍＭウワバイン添加し、培地中ＬＤＨ活性の変化を２４時間まで測定したところ、２４時間ではプラトーに達せず、直線的な上昇が認められた。

【考察】

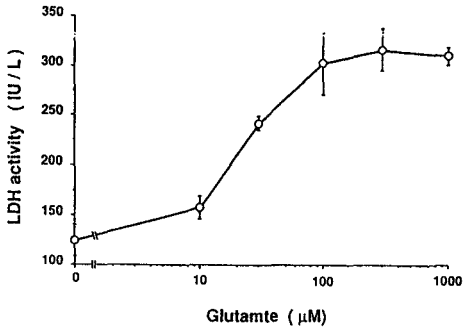
グルタミン酸の神経細胞毒性を阻害する薬物の評価系としてグルタミン酸刺激条件は、培養６日目以降の細胞を使用し、グルタミン酸濃度１００～１０００μＭ、曝露時間５～３０分間、上清中のＬＤＨを測定する時間は１８～２４時間後が適当と考えられる。以前に報告されたＰｅｔｅｒｓｏｎら（３）の無血清培地によるグルタミン酸神経細胞毒性の評価系と比較し、我々の系ではグルタミン酸感受性が若干早期に認められる。この違いは我々の系の方が細胞密度が約４０倍高いため、細胞の成熟が速くなった可能性、もしくは我々の系は細胞死の判定を上清中のＬＤＨ活性の測定で行なっているため、細胞死の測定の感度が高いことによる可能性が考えられる。培養細胞に対するグルタミン酸の作用は上記の結果より、細胞死の過程の初期の段階にのみ必要であり、主にＮＭＤＡ受容体を介した反応であることが示唆された。またウワバインと比較し速い反応であると考えられた。今回確立したグルタミン酸の神経細毒性の評価系は神経細胞死を阻害する薬剤の評価系として、又、神経細胞死の機序解明の系として有用であると思われる。

【参考文献】

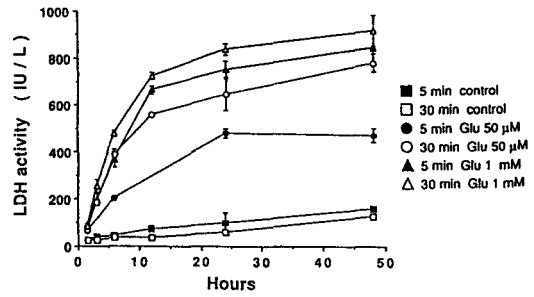
1.Choi, D.W., et al. (1987) J. Neurosci., 7, 357-368
2.Dubinsky, J.M., et al. (1990) J. Neurosci., 11, 2545-2551
3.Peterson, C., et al. (1989) Dev. Brain Res., 48, 189-195
4.Ogura, A., et al. (1988) Exp. Brain Res., 73, 447-458



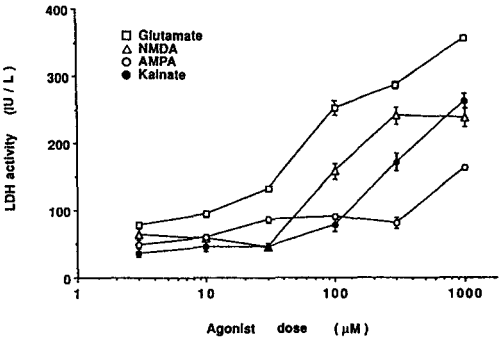
Ｆｉｇ．１　培養日数によるグルタミン酸感受性の変化



Ｆｉｇ．２　グルタミン酸濃度の検討



Ｆｉｇ．３　グルタミン酸細胞毒性の時間経過



Ｆｉｇ．４　グルタミン酸受容体アゴニストの細胞毒性

97 虚血性脳浮腫および脳梗塞発症機構における一酸化窒素（NO）産生の関与

長藤寿昭、 松居 徹、 浅野孝雄
（埼玉医科大学 総合医療センター 脳神経外科）

〔要約〕

一酸化窒素（NO）合成酵素阻害剤の一つであるN^{ω}-nitro-L-arginine（NNA）の、左中大脳動脈（MCA）を永久閉塞したラットにおける虚血性脳浮腫および脳梗塞の進展に対する効果を検討した。梗塞大脳半球側の水分およびナトリウム含量は、虚血48時間後に有意に増大し、一方、カリウム含量は減少した。虚血3日後には四肢の協調運動障害と右後脚の痛みに対するthresholdの上昇、および、前頭葉、後頭葉と新線条体領野に梗塞巣域を認めた。NNA（1 mg / kg）を虚血後から（5分、3、6および24時間後）にラットに腹腔内投与したところ、梗塞大脳半球側の水分およびナトリウム含量の増大は有意に軽減された。さらに、右後脚の痛みに対するthresholdの上昇を有意に改善し、この時、脳梗塞巣の面積も劇的に縮小させた。以上の結果から、虚血性脳浮腫および脳梗塞の進展機序にNOが何らかの形で関与することが示唆された。

NO合成酵素の基質であるL-arginineのいくつかの誘導体は、海馬や小脳におけるNMDA受容体刺激によるcGMPの増大やNO合成酵素の活性化を抑制するため、脳内における情報伝達機構に深く関与していると考えられている[1]。一方、病態生理的観点からは、培養大脳皮質神経細胞[2]や海馬スライス[5]でNOが興奮性アミノ酸であるグルタミン酸による神経細胞壊死に密接な関係を有すこと、また、マウスMCA閉塞モデルを用いてNOが脳梗塞形成機序に関与することが最近示された[6]。しかしながら、虚血性脳浮腫発現機構におけるNOの関与の有無は明かにされていない。そこで、ラットMCA閉塞モデルを用いて、虚血性脳浮腫および脳梗塞形成機構におけるNOの関与を明かにする目的で今回の検討を行なった。

[実験方法] 雄性SD系ラット（297 - 385 g）をハロセン麻酔下、左レンズ核線条体動脈近位のMCAを電気焼灼し、脳虚血モデルを作成した[4]。偽手術は、MCAを電気焼灼する以外をすべて同様に行なった。右側頭筋（36.9 ± 0.2 °C）および直腸（37.2 ± 0.3 °C）の温度は、一定に保った。NNA（Sigma）あるいは生理食塩水は、MCA閉塞5分前（虚血前投与群）あるいは5分後（虚血後投与群）に腹腔内投与し、以下両群ともMCA閉塞3, 6そして24時間後に同様に投与した。虚血48時間後における左大脳半球内水分含量は、[（湿重量－乾燥重量）／（湿重量）] x 100 % で求め、ナトリウムとカリウム含量は原子吸光光度計を用いて定量し、mEq / kg 乾燥重量で表示した[4]。MCA閉塞3日後、treadmill testにより四肢の協調運動を、またrandall seritt testにより右後脚の痛みに対するthresholdを調べた。引き続き、脳を灌流固定し、取りだした脳をパラフィン包埋し、冠状断連続切片をヘマトキシリン－エオシンで染色した。脳梗塞巣の面積は、光学顕微鏡での観察像をイメージアナライザーに取り込み定量した。

[実験結果] 正常無処置ラットにおける左大脳半球内水分含量、ナトリウム、およびカリウム含量は、それぞれ79.22 ± 0.08 %, 353.6 ± 3.9 mEq / kg, 695.1 ± 8.5 mEq / kg（それぞれ6例）であった。Table 1に示した様に、梗塞大脳半球側の水分およびナトリウム含量はMCA閉塞48時間後に有意に増大した。一方、カリウム含量は有意に減少したが、その変化率はナトリウムのそれと比較して小さかった。虚血3日後における行動実験の結果、四肢の協調運動障害と右後脚の痛みに対するthresholdの有意な上昇が観察された。また病理検索の結果、前頭葉、後頭葉そして新線条体領野に広範な梗塞巣域を認めた（Fig. 1）。NNA（1 mg / kg）を虚血前から、あるいは虚血後からにラットに腹腔内投与したところ、梗塞大脳半球側の水分およびナトリウム含量の増大は有意に軽減された（Table 1）。さらに、虚血後からのNNAの投与により右後脚の痛みに対するthresholdの上昇を有意に改善し、脳梗塞巣の面積も劇的に縮小させた（Fig. 1）。

[考察] 今回の実験は、NO生成の抑制はラットMCA閉塞による脳浮腫および脳梗塞を軽減することを初めて示したものである。NNAの詳細な作用点は今回の検討のみからは不明であるが、本化合物が培養した大脳皮質神経細胞[2]と海馬スライス[5]でグルタミン酸による神経細胞死に拮抗することから、少なくとも神経細胞レベルでの作用が示唆される。脳虚血中、細胞外へ放出された高濃度のグルタミン酸は、主にNMDAレセプターを介して虚血性脳損傷の初期事象に関連するCa^{2+}の流入を引き起こす。脳内のNO合成酵素は、細胞の可溶

性分画に存在しCa^{2+}依存性であるので、脳虚血時に本酵素が活性化されることが想像される。NOとO^{2-}とは容易に反応し、比較的安定な$ONOO^-$を生じる。また、$ONOO^-$は分解してさらに細胞毒性の高いOH^-やH_2O_2を産み出す[1]。このような活性酸素種は虚血性脳損傷の進展に深く関与するので、今回のNNAによる改善作用は、上述の活性酸素種を梗塞周囲で減少させることによるのかも知れない。事実、NNAをラットに腹腔内投与すると脳内のNO合成酵素は不可逆的に抑制されること[3]、またSODが砂ネズミ海馬CA1の神経細胞壊死を阻止するという実験事実は、この仮説を支持する。今後NO合成酵素阻害剤の虚血脳における脳循環およびNO合成酵素活性に対する作用の検討が必要とされる。

Table 1. Effect of NNA on the brain water and electrolytes contents after the rat MCA occlusion.

Treatments		H_2O (%)	Na (mEq/kg)	K (mEq/kg)
Sham operation		80.71 ± 0.34 (6)	463.5 ± 25.9 (6)	633.5 ± 8.7 (6)
MCA occlusion				
+ pre-treatment	Saline	81.91 ± 0.19 (7) **	571.5 ± 16.5 (6) **	576.3 ± 4.9 (6) **
	NNA	80.95 ± 0.24 (7) # #	486.3 ± 25.0 (6) # #	624.8 ± 11.0 (6) # #
+ post-treatment	Saline	82.20 ± 0.24 (7) **	616.9 ± 17.8 (6) **	589.2 ± 24.2 (6)
	NNA	81.42 ± 0.23 (7) #	543.1 ± 27.9 (6) *, #	631.8 ± 15.3 (6)

The left hemispheric water, sodium and potassium contents were examined at 48 h following focal ischemia in rats. Either a saline (1 ml/kg) or NNA (1 mg/kg) was intraperitoneally administered to the animals as follows: Pre-treatment. 5 min before, 3 h, 6 h and 24 h after the induction of cerebral ischemia. Post-treatment. 5 min, 3 h, 6 h and 24 h after the induction of cerebral ischemia. Each value represents the mean ± S.E.M. of the number of animals shown in parentheses. *, P < 0.05 v.s. sham operation; **, P < 0.01 v.s. sham operation; #, P < 0.05 v.s. MCAo + saline; ##, P < 0.01 v.s. MCAo + saline (Dancan test).

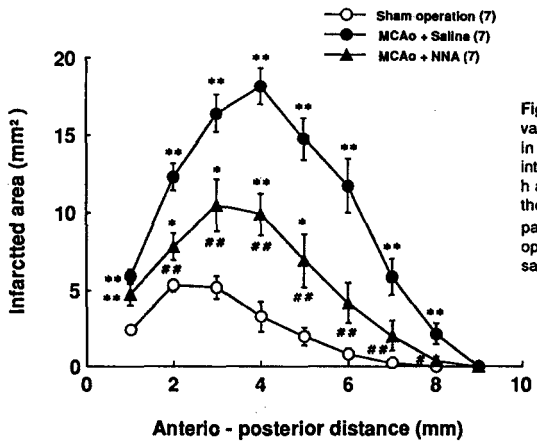


Fig. 1. Ameliorative effects of NNA on the cerebral infarct size at various coronal sections obtained at 72 h following MCA occlusion in rats. Either a saline (1 ml/kg) or NNA (1 mg/kg) was intraperitoneally administered to the animals 5 min, 3 h, 6 h and 24 h after the induction of cerebral ischemia. Each point represents the mean ± S.E.M. of the number of animals shown in the parentheses. *P < 0.05 v.s. sham operation; **P < 0.01 v.s. sham operation; #P < 0.05 v.s. MCAo + saline; ##P < 0.01 v.s. MCAo + saline (Dancan test).

[引用文献]

1. Bredt, D.S. and Snyder, S.H., Neuron, 8 (1992) 3 - 11.
2. Dawson, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88 (1991) 6368 - 6371.
3. Dwyer, M.A., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 176 (1991) 1136 - 1141.
4. Gotoh, O. et al., Stroke, 16 (1985) 101 - 109.
5. Izumi, Y. et al., Neurosci. Lett., 135 (1992) 227 - 230.
6. Nowicki, J.P., et al., Eur. J. Pharmacol., 204 (1991) 339 - 340.

98 砂ネズミ脳虚血におけるＩＰ$_3$受容体およびプロテインキナーゼＣ活性の変化について

永田栄一郎、福内靖男、田中耕太郎、美原盤＊、
白井俊孝、野川茂、野崎博之
（慶應義塾大学神経内科、美原記念病院＊）

〔要約〕

砂ネズミ一側総頸動脈結紮モデルにおいて局所脳血流および脳組織イノシトール1,4,5三リン酸（IP$_3$）受容体結合能とフォルボールエステル結合能を測定し、脳内セカンドメッセンジャー系活性変化について検討した。ハロセン浅麻酔下に右総頸動脈を結紮，1時間後にStroke indexを判定，6点以上の動物を以下の実験に使用し、結紮6時間後覚醒状態で，^{14}C-iodoantipyrine(IAP)法で局所脳血流(lCBF)を測定した。その後、脳を摘出し、フレオン22により急速凍結した．クリオスタットで連続脳切片を作製し，各切片を^{3}H-inositol 1,4,5,trisphosphate(IP$_3$)または^{3}H-phorbol 12,13,-dibutyrate(PDBu)でラベルしてオートラジオグラムを作製した。画像解析装置によりlCBF、IP$_3$およびPDBu結合量を各脳局所で測定した．IP$_3$結合量は結紮側で対側と比較し海馬CA1でのみ有意に低値($p<0.01$)を示した。他の領域では明かな有意差を認めなかった。一方、PDBu結合量は結紮側で対側と比較し淡蒼球被殻、視床外側核で有意に低値($p<0.05$-0.01)を示した。しかし、海馬CA1およびCA3で対側と比較し有意に高値($P<0.05$)を示した。lCBFは結紮側のすべての大脳半球領域で対側と比較し有意に($p<0.05$)低下していた。以上より、虚血時のIP$_3$受容体結合能とPKC活性の変化は一様でなく、虚血に対するイノシトールリン脂質系セカンドメッセンジャーの反応は系により、また脳内の領域によって、かなり異なることが示唆された。

【目的】

セカンドメッセンジャー系として近年，イノシトールリン脂質よりフォスフォリパーゼＣの作用によって産生されるイノシトール1,4,5三リン酸（IP$_3$）とジアシルグリセロール（DG）が重要な役割を果たすことが明かとなってきた(1)．IP$_3$は細胞内Ca^{2+}貯蔵部（滑面小胞体）の受容体に特異的に結合することによって、同部位よりCa^{2+}を動員し，細胞内Ca^{2+}依存性の系を動かす．一方，DGはプロテインキナーゼＣ(PKC)を活性化させる．我々は，同一脳において局所脳血流(lCBF)とPKC活性およびIP$_3$受容体結合能の測定を可能とするオートラジオグラフ法を用いて(2)，上記脳組織セカンドメッセンジャー系活性の変化を砂ネズミ一側総頸動脈結紮モデル（6時間虚血）を用い，各脳局所において検討した．

【方法】

IP$_3$受容体結合能実験には体重70-90ｇの砂ネズミ27匹を用いた．結紮群では，ハロセン浅麻酔下に右総頸動脈を結紮，その1時間後にStroke index(3)を判定し，6点以上の動物6匹を以後の実験に使用した．ペントバルビタール（20mg/kg）腹腔内投与による浅麻酔下に片側大腿動静脈にポリエチレンチューブ（PE10）を挿入した。右総頸動脈結紮6時間後覚醒状態にて，^{14}C-iodoantipyrine法により局所脳血流量(lCBF)を測定，その後断頭し脳を摘出してフレオン22により急速凍結した．-20° Cのクリオスタットで厚さ20μmの連続脳切片を作製し、ゼラチンスライドに固定した。IP$_3$受容体結合能測定用の切片は，室温下、buffer(20 mM Tris-HCl pH 7.7, 20mM NaCl, 100mM KCl, 1mM EDTA)中で5分間インキュベートした。次に、上記bufferに牛血漿アルブミン及び4 nMの ^{3}H-IP$_3$(specific activity=17.0 Ci/mmol; NEN Reseach Products/Du Pont) を加えた組成の溶液中において、4° Cで10分間インキュベートした。また、非特異的結合量測定のため、上記bufferにさらに4 μMの未標識IP$_3$を加えた溶液中で同様にインキュベートした。その後、4° Cのbuffer中で2分間の洗浄を2回繰り返し、最後に4° Cの精製水で洗浄し、直ちに冷風にて乾燥した。

PDBu結合実験では体重70-90ｇの砂ネズミ20匹を用いた．Stroke index(3)で6点以上の動物8匹を用いて行い、上記と同様の方法によりlCBFを測定、PDBu結合量測定用切片を33° Cのbuffer(50 mM Tris-HCl pH 7.7, 100 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$)中で60分間インキュベートし、2.5 nMの^{3}H-phorbol 12,13,-dibutyrate(PDBu)(specific activity=15.8 Ci/mmol; NEN Reseach Products/Du Pont)でラベルした．非特異的結合量測定のため、上記のbufferにさらに2.5μMの未標識PDBuを加えた溶液中で同様にインキュベートした(4)。

これらの実験で得た標本は、^{3}H標準線源とともにUltrofilmに1-4週間感光し、オートラジオグラムを作製した。IP$_3$及びPDBuの特異的結合量は、それぞれ総結合量より非特異的結合量を差し引いて求め画像処理装置により画像表示した。

【結果】

1)生理学的パラメーター

実験中、平均動脈血圧、PaO_2、$PaCO_2$及び動脈血pHは正常範囲であった。

2)lCBF

Table 1, 2.のように総頸動脈では結紮側において対側と比較し、脳局所各領域で有意に脳血流の低下を認めた。

3)IP$_3$特異的結合量

IP_3特異的結合量は、Table 1.に示すように結紮側では対側と比較し海馬CA1で有意に低値を示したが、他の領域では明かな有意差は認められなかった。

4)PDBu特異的結合量

Table 2.のごとく結紮側では、対側と比較して淡蒼球被殻、視床外側核において有意に低値を示した。しかし、海馬CA1およびCA3において、対側と比較し有意に高値を示した。

Table 1. Local cerebral blood flow (lCBF) and specific binding of ^{3}H-inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)

		lCBF (ml/100g/min)	IP_3 (fmol/mg)
Frontal cortex			
	R	6.3±9.8 **	30.2±9.4
	L	53.7±33.8	32.5±9.6
Frontoparietal cortex (motor area)	R	2.0±3.4 **	35.9±5.8
	L	88.3±33.9	35.4±7.0
Frontoparietal cortex (somatosensory area)	R	1.2±2.9 **	32.3±6.7
	L	86.8±38.7	31.7±5.5
Caudate-putamen			
	R	6.0±9.3 **	40.0±13.8
	L	64.3±35.8	38.2±11.2
Accumbens nucleus			
	R	10.3±16.2**	29.3±9.3
	L	41.0±32.3	28.7±9.3
Globus pallidus			
	R	8.7±13.4**	40.8±9.4
	L	55.2±27.1	43.5±7.5
Temporal cortex (auditory area)	R	0.7±1.2 **	36.7±10.5
	L	66.2±38.9	35.8±10.1
Hippocampus(CA1 region)			
	R	3.7±6.0 **	40.8±13.1**
	L	56.7±37.0	65.1±8.0
Hippocampus(CA3 region)			
	R	1.7±2.9 **	28.0±9.8
	L	56.7±34.1	31.0±9.6
Dentate gyrus			
	R	8.2±10.3**	32.2±10.7
	L	66.8±39.7	34.0±11.9
Thalamus(medial nuclei)			
	R	62.7±36.8	31.1±12.2
	L	96.3±50.6	31.8±12.3
Thalamus(lateral nuclei)			
	R	5.3±8.6 **	26.5±9.7
	L	78.2±38.8	27.2±10.4
Substantia nigra (molecular layer)	R	24.2±26.2**	31.4±21.5
	L	86.3±47.7	32.1±14.2
Cerebellar cortex			
	R	122.7±42.7	91.1±32.4
	L	125.0±41.6	88.3±32.3

Values are the mean±SD. R: occluded side, L: non-occluded side.
Significant differences from the non-occluded side:*p<0.05;**p<0.01.

Table 2. Local cerebral blood flow (lCBF) and specific binding of ^{3}H-phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu)

		lCBF (ml/100g/min)	PDBu (fmol/mg)
Frontal cortex			
	R	4.3±5.8 **	886.8±115.9
	L	64.5±26.0	946.3±121.5
Frontoparietal cortex (motor area)	R	3.8±3.4 **	799.5±124.3
	L	77.6±30.5	882.6±161.3
Frontoparietal cortex (somatosensory area)	R	2.8±4.2 **	830.9±133.1
	L	85.1±30.4	844.7±199.5
Caudate-putamen			
	R	4.5±7.4 **	812.3±136.5
	L	60.9±24.3	865.0±131.0
Accumbens nucleus			
	R	13.6±22.6**	1038.9±228.2
	L	28.8±28.9	1073.5±223.9
Globus pallidus			
	R	4.5±8.2 **	643.8±162.3*
	L	45.4±18.7	711.3±141.5
Temporal cortex (auditory area)	R	0.7±14.4**	882.0±274.6
	L	52.5±23.0	895.8±301.0
Hippocampus(CA1 region)			
	R	3.4±6.0 **	1158.4±254.5
	L	53.6±24.4	1089.6±230.6*
Hippocampus(CA3 region)			
	R	3.6±4.1 **	1214.9±212.8
	L	52.3±24.3	1084.5±192.0**
Dentate gyrus			
	R	5.9±4.7 **	973.3±103.9
	L	65.3±28.5	996.0±145.4
Thalamus(medial nuclei)			
	R	64.6±37.3	711.3±119.3
	L	75.4±40.8	712.2±137.6
Thalamus(lateral nuclei)			
	R	5.1±8.0 **	603.1±170.7*
	L	75.8±34.9	707.7±144.5
Substantia nigra (molecular layer)	R	27.0±16.5**	1004.8±332.0
	L	60.9±15.7	973.4±290.2
Cerebellar cortex			
	R	81.9±31.4	1059.8±265.7
	L	82.5±31.4	1020.9±238.7

Values are the means±SD. R: occluded side, L: non-occluded side.
Significant differences from the non-occluded side:*p<0.05;**p<0.01.

【考察】

今回我々は、脳虚血におけるイノシトールリン脂質系の変化につき砂ネズミ一側総頸動脈結紮モデルを用い検討した。IP_3受容体結合能は、結紮側海馬CA1においてのみ有意に低下を示し、同部位の滑面小胞体におけるCa^{2+}動態に大きな擾乱が生じている可能性が示唆された。一方、PDBu結合量が結紮側海馬CA1及びCA3領域で有意に高値を示したことは、同部位でPKCが細胞膜に移動し活性化されていることを示唆している(5)。虚血に対し脆弱性を示す海馬で特に、これらの変化が認められたことは、イノシトールリン脂質系が虚血性細胞障害に密接に関係している可能性を示唆している。

【文献】

(1)Berridge, M.J.(1987) Annu. Rev. Biochem., 56:159-193.
(2)Takashima, S. et al.(1990) Autonomic Nervous System, 27:38-45.
(3)McGraw, C.P.(1977) Arch. Neurol., 34:334-336.
(4)Tanaka, K. et al.(1991) J. Cereb. Blood Flow Metab., 11:283-291.
(5)Abdel-Latif, A.A.(1986) Pharmacol Rev., 38:227-272.

99 脳虚血後のPKC活性の変化とそれに及ぼすceruletideの影響

勝浦 五郎、新宅 治幸、永業 正美、松下 享
（塩野義製薬株式会社・研究所）

〔要約〕

脳虚血後の海馬PKC活性の変化とそれに及ぼすcholecystokinin octapeptide (CCK-8)のアナログであるceruletideの影響についてスナネズミを用いて検討した。3分間虚血直後のparticulate PKC活性は有意に増加したが、cytosolic PKC活性には変化が認められなかった。ところが、脳虚血30分、60分ならびに1日後の海馬のcytosolic PKC活性は有意に低下したが、particulate PKC活性は有意な変化を示さなかった。さらに、虚血時間を5分間にするとcytosolicならびにparticulate PKC活性は有意に低下した。また、3分間虚血60分後の前頭葉および線条体の両PKC活性には変化が認められなかったが、5分間虚血後の前頭葉のcytosolic PKC活性および線条体のcytosolicならびにparticulate PKC活性は有意に低下した。PKC inhibitorであるstaurosporineを2分間虚血の直前に側脳室内へ注入すると軽度の海馬細胞傷害は有意に増強され、PKC活性も有意に減少した。一方、神経細胞傷害保護作用をもつceruletideによって虚血後の海馬のcytosolic PKC活性の低下が抑制された。以上の結果から、脳虚血後のPKC活性の低下は神経細胞傷害の重要な過程であると考えられる。

〔はじめに〕

脳虚血後の神経細胞傷害に過剰放出された興奮性アミノ酸、特にglutamateが重要な役割を果たしていることは、種々の実験系から明らかであり、glutamate receptor刺激後の細胞内Ca^{2+}濃度の異常な上昇がcrucial triggerになっていると考えられている。我々はすでに、培養神経細胞を用いてCCK-8ならびにその関連ペプチドがglutamateによる細胞内Ca^{2+}濃度上昇を抑制することによって神経細胞死を著明に防御することを明らかにした(1、2)。さらに、スナネズミを用いた脳虚血モデルでの海馬錐体細胞傷害もceruletideによって有意に抑制された(3)。脳虚血後の細胞傷害の過程にはglutamateの過剰放出以外に、ATPの減少あるいはミトコンドリアの活動の変化などが複雑に絡み合っていると考えられる。そこで、in vivoでの虚血後の脳内のintracellular eventsの変化から神経細胞傷害誘発のpathophysiological stepsを明らかにするために、今回は細胞活動にとって重要な調節作用をつかさどるPKC活性の変化を調べた。さらに、神経細胞傷害保護作用をもつCCK-8のアナログであるceruletideの脳虚血後のPKC活性の変化に及ぼす影響についても検討した。

〔実験方法〕

37°Cのhot plate上でスナネズミ(体重70-80g)の総頸動脈をhalothane麻酔下でocclusionすることによって脳虚血をおこなった。PKC活性測定のため、intact、虚血直後、30分後、60分後、1日後、4日後に動物を断頭後、氷上でだちに脳部位を取り出し、50mM Tris buffer (containing 5mM EDTA、10mM EGTA、10mM benzamidine、0.3% β-mercaptoethanol、50μg/ml phenylmethylsulphonyl fluoride)でホモジナイトした。ホモジナイト液を1,000 x gで遠沈し、そのsupernatantをさらに100,000 x gで遠沈後、そのsupernatantをcytosolic fractionとし、そのpelletを0.1% Triton-Xを含む先のTris bufferで可溶化し、さらに100,000 x gで遠沈して、そのsupernatantをparticulate fractionとした。PKC活性はAmershamのPKC enzyme assay kitで測定した。タンパク量はBradfordの方法で測定した。海馬の錐体細胞傷害の程度はEigyo, Mらの方法(3)にしたがって虚血4日後に判定した。

〔実験結果と考察〕

Sham ope.群の海馬のcytosolicならびにparticulate PKC活性はそれぞれintact群のそれらと明らかな差は認められなかった。3分間虚血直後のcytosolic PKC活性は変化しなかったが、particulate PKC活性はsham ope.群のそれと比較して有意に増加した (Fig. 1)。しかし、虚血後30分、60分ならびに1日後のcytosolic PKC活性はsham ope.群と比較して有意に減少したが、particulate PKC活性は変化を示さなかった (Fig. 1)。ところが、4日後にはこれらの

変化は認められなくなった。また、ほとんど細胞傷害を引き起こさない1分間虚血あるいは軽度の細胞傷害をおこす2分間虚血60分後の海馬のcytosolic PKC活性はsham ope.群のそれとまったく差は認められなかった。しかし、5分間虚血によりcytosolicならびにparticulate PKC活性がsham ope.群と比較して有意に減少した。このようにcytosolic PKC活性の減少と神経細胞傷害の程度とに非常に高い相関が認められた。3分間虚血60分後では前頭葉ならびに線条体のPKC活性はsham ope.群のそれと差は認められなかった。ところが、5分間虚血により前頭葉のparticulate PKC活性には変化が認められなかったもののcytosolic PKC活性は有意に減少した。また、線条体でも5分間虚血によってcytosolicならびにparticulate PKC活性が著明に減少した。PKC inhibitorであるstaurosporine (10μg)を2分間虚血の直前に側脳室内へ投与すると、海馬の錐体細胞傷害の程度は対照群のおおよそ3倍に増加し、PKC活性も有意に減少した。Ceruletide (100μg/kg)を3分間虚血の30分前に皮下投与しても虚血30分後の海馬のcytosolic PKC活性は依然有意に減少していた。しかし、60分後のcytosolic PKC活性の減少はceruletide (30、100μg/kg)により有意に回復した (Fig. 2)。

これらの実験結果から、軽度の虚血では海馬のcytosolic PKC活性が減少し、さらに強い虚血によってcytosolic PKC活性の低下のみならずparticulate PKC活性が減少することが認められた。さらに、このcytosolic PKC活性の減少と錐体細胞傷害の程度とがよく一致したことから、虚血後のPKC活性の低下は神経細胞傷害の1つの重要な過程であると考えられる。我々は先にceruletideの末梢投与によって虚血による海馬の錐体細胞傷害が有意に抑制されることを見いだしており(3)、本実験でも虚血傷害を抑制する用量のceruletideによって虚血による海馬のPKC活性の減少が著明に抑制された。一方、2分間虚血でstaurosporine投与によりcytosolic PKC活性の有意な減少をともない、神経細胞傷害が有意に増強された。このように、cytosolic PKC活性の減少、さらにひき続いておこるparticulate PKC活性の減少がion channelなどの細胞調節機能に異常をきたし、細胞傷害を引き起こす原因になっていると考えられる。しかし、PKC活性の減少のメカニズムについては本実験結果から明らかではないが、虚血によりPKCが脱リン酸化されるためか、あるいは内因性PKC抑制物質が増加した可能性が考えられる (4、5)。

Fig. 1. Changes of PKC activity in the hippocampus following cerebral ischemia

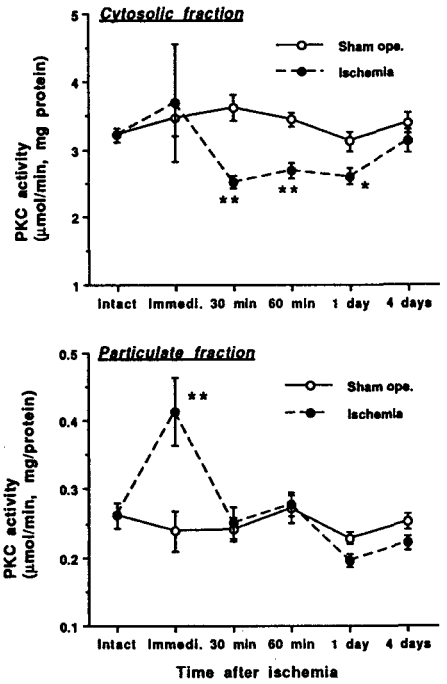
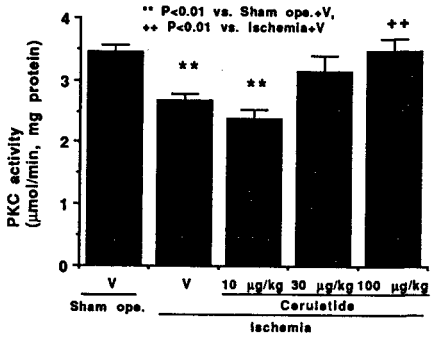


Fig. 2. Effect of ceruletide on PKC activity in the hippocampus following cerebral ischemia



[文献]

(1) Katsuura, G., Shinohara, S., Shintaku, H., Eigyo, M. and Matsushita, A. (1991) Neurosci. Lett., 132, 159-162. (2) Shinohara, S., Katsuura, G., Eigyo, M., Shintaku, H., Ibii, N. and Matsushita, A. (1992) Brain Res., in press. (3) Eigyo, M., Katsuura, G., Shintaku, H., Shinohara, S., Katoh, A., Shiomi, T. and Matsushita, A. (1992) Eur. J. Pharmacol., 214, 149-158. (4) Borner, Ch., Filipuzzi, I., Eartmann, M., Eppenberger, U. and Fabbro, D. (1989) J. Biol. Chem. 264, 13902-13909. (5) Kochhar, A., Saitoh, T. and Zivin, J. (1989) J. Neurochem. 53, 946-952.

100 グルタミン酸受容体の虚血後機能変化

三谷　章，柳瀬　尚人，片岡　喜由
(愛媛大学医学部　第一生理)

〔要約〕
一過性の脳虚血後数日の時間経過の後発生する遅延性神経細胞死は、一過性の脳虚血により虚血神経細胞において発現したなんらかの機能的変化が神経細胞をゆっくりと死に至らしめると考えられる。本研究では、５分間の一過性脳虚血によりスナネズミ海馬ＣＡ１野のグルタミン酸受容体に機能変化が起こり、虚血後カルシウムイオンの流入を招き易い状態になっていることが明かとなった。

[はじめに]

一過性の脳虚血後発生する遅延性神経細胞死にカルシウムイオンが重要な役割を果たしていると考えられている(4)。虚血時に細胞内において濃度上昇したカルシウムイオンに応答して種々のタンパク質燐酸化酵素や燐脂質加水分解酵素が活性化され、グルタミン酸受容体が機能変化を起こす。血流再開後、細胞内カルシウムイオン濃度は速やかに虚血前値に復するが、機能変化を起こしたグルタミン酸受容体が生理的レベルで放出されるグルタミン酸に対して過剰に反応し、細胞内にカルシウムイオンの蓄積を導き、神経細胞をゆっくりと死に至らしめると仮説される。本研究では、５分間の一過性脳虚血により２－４日の時間経過の後、遅延性神経細胞死が発生することが知られている(1)スナネズミ海馬ＣＡ１細胞の虚血後グルタミン酸受容体の機能的変化を検討した。また、２分間の一過性脳虚血により２日の時間経過の後、虚血耐性を獲得することが知られている(2,3)同動物の海馬ＣＡ１細胞の虚血後グルタミン酸受容体の機能的変化も比較検討した。

[方法]

５分間の一過性脳虚血負荷３－１２時間後あるいは２分間の一過性脳虚血負荷２日後のスナネズミの海馬スライスに細胞内カルシウムイオン蛍光指示薬rhod-2をloadingし、細胞内カルシウムイオンイメージングシステムを使って、グルタミン酸受容体サブタイプのアゴニストであるカイニン酸、ＡＭＰＡ（α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate）あるいはＮＭＤＡ（N-methyl-D-aspartate）を添加し誘発される細胞内カルシウムイオン濃度上昇を計測した。さらに、虚血耐性獲得を確認するために、細胞内カルシウムイオン濃度測定後のスライスを抗ＨＳＰ７０（heat shock protein 72kD）を使って免疫組織学的に観察した。

[結果]

５分間脳虚血負荷後のＣＡ１野においては、虚血を負荷していないＣＡ１野と比較して、グルタミン酸受容体アゴニストのうちNMDAにより誘発される細胞内カルシウムイオン濃度上昇が著明に増大した。また、虚血耐性を獲得しているスライスの海馬ＣＡ１野においては、NMDAにより誘発される細胞内カルシウムイオン濃度上昇は抑制される傾向が認められた（図１）。

[考察]

海馬ＣＡ１野においては、５分間の一過性脳虚血によりグルタミン酸受容体のうち特にNMDA型受容体の機能的変化が起こり、虚血後カルシウムイオンの流入を招き易い状態になっていることが明かとなった。また、虚血耐性を獲得した海馬ＣＡ１野においては、おそらくNMDA型受容体の機能変化によりカルシウムイオンの流入が起こりにくい一種のdesensitizationが生じていると考えられる。このような一過性脳虚血によるグルタミン酸受容体の感受性の変化が遅延性神経細胞死発現の中枢的役割を担っている可能性が考えられる。

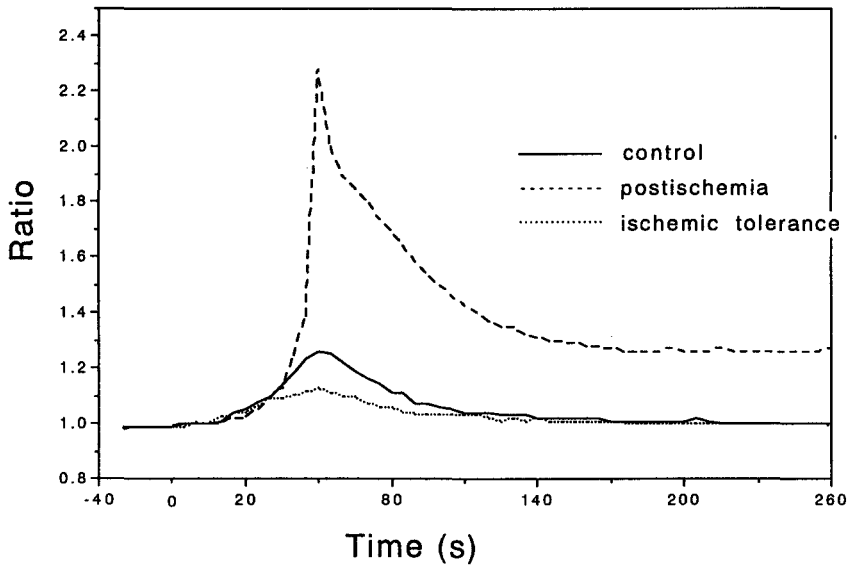
[文献]

(1) Kirino, T.(1982) Brain Res.,237,57-69.

(2) Kirino, T. et al.(1991) J Cereb Blood Flow Metab,11,299-307.

(3) Kitagawa, K. et al.(1990) Brain Res.,528,21-24.

(4) Siesjö, B.K. and Bengtsson, F.(1989) J Cereb Blood Flow Metab,9,127-140.



(図1) 虚血後海馬ＣＡ１野において、NMDA（50μＭ）２分間投与によって誘発される細胞内カルシウムイオン濃度上昇の時間経過の代表例。 実線は虚血を負荷していないスライス（control）から得られたデータ、波線は実験３－１２時間前に５分間の脳虚血を負荷したスライス（postischemia）から得られたデータ、そして点線は実験２日前に２分間脳虚血を負荷し虚血耐性を獲得させたスライス（ischemic tolerance）から得られたデータ。縦軸の蛍光比は（各時点での蛍光強度）／（測定直前の蛍光強度）で表している。横軸は、NMDA投与開始時刻からの時間経過（秒）。

101 非致死的脳虚血の前処置による虚血耐性獲得のメカニズム

加藤宏之、中田直樹、劉暁宏、村瀬健史、陳淳、劉勇、小暮久也
（東北大学医学部神経内科）

〔要約〕

非致死的脳虚血の前処置による虚血耐性獲得のメカニズムを砂ネズミの前脳虚血モデルを用いて検討した。偽手術あるいは２分間の脳虚血の３ないし４日後に、３分間の脳虚血を負荷した。本モデルでは前者では海馬ＣＡ１神経細胞が脱落するが、後者では障害されない。microdialysis法およびHPLCで測定した２回目の脳虚血中に細胞外に放出される神経伝達物質glutamate, glycine, GABAの量は２分間虚血の前処置の有無によらず一定であった。NMDA受容体阻害剤のMK-801を２分間虚血時に投与しておくと虚血耐性は獲得されなかった。2'分間虚血の３日後にheat shock protein-70(HSP70)は免疫組織化学的に種々の程度に海馬ＣＡ１領域に染色された。３分間虚血の２日後には、２分間虚血前処置群ではHSP70は強く誘導されたが、偽手術群では誘導されなかった。以上より、虚血耐性の獲得は、1).虚血中の興奮性アミノ酸放出量の制御によるのではない。2).NMDA受容体の活性化が関与する。3).２回目の虚血中および虚血後に強く誘導されるHSP70の関与が示唆される。

【目的】

神経細胞に与えられた種々の有害なストレスはストレス応答を介して引き続いて起こるストレス侵襲に対する抵抗性を獲得させる。脳虚血もその例外ではなく、非致死的な脳虚血の前処置は、その１ないし７日後に負荷された致死的な脳虚血侵襲に対する抵抗性を獲得させる(1-3)。この、虚血耐性の機構の解明は脳を虚血侵襲から保護する方法の開発に大いに役立つと考えられるが、いまなおその機構は十分に理解されるには至っていない。そこでわれわれは、虚血耐性発現における、興奮性アミノ酸、NMDA受容体、および、heat shock protein-70 (HSP 70)の役割を検討するために以下の実験を行った。

【方法】

雄性砂ネズミを用い、halothane麻酔下に両側総頸動脈を２分間閉塞するか偽手術を行い、３ないし４日後に再度３分間両側総頸動脈を閉塞した。実験１：microdialysis法およびＨＰＬＣを用いて、４日後に負荷された２回目の虚血中および再灌流直後（計10分間）に海馬ＣＡ１領域の細胞外に放出されたglutamate,glycine,γ-amino butyric acid (GABA) 量を測定した(4)。実験２：MK-801(3mg/kg, i.p.)を２分間虚血の１時間前に投与した。３日後に３分間虚血を負荷し、その７日後に脳を灌流固定した。パラフィン切片をCresyl violet染色して光顕下に海馬ＣＡ１領域の錐体細胞密度を測定した。対照群には生食を投与した。虚血中および虚血後の動物の体温は両群で同じになるよう、MK-801投与群では外部からの保温を行った。実験３：２分間虚血あるいは偽手術の３日後、および、３分間虚血の２日後に脳を灌流固定して凍結切片を作成し、HSP70に対するmonoclonal抗体(Amersham)およびABC kit(Vector)を用いて、免疫組織化学染色を行った(5)。

【結果】

実験１：２回目の虚血負荷前の基礎値(μM)は、偽手術群(n=5)ではglutamate 14.8±2.96(SEM), glycine 12.3±1.74, GABA 0.21±0.07、２分虚血負荷群(n=5)ではglutamate 17.6±3.03, glycine 13.6±1.06, GABA 0.14±0.04であった(ns)。基礎値に比しての増加率(%)は、偽手術負荷群ではglutamate 346±66, glycine 182±17,

GABA 1515±697、２分間虚血負荷群では glutamate 330±48, glycine 148±14, GABA 1295±474、と両群間に有意差はなかった。実験２：海馬ＣＡ１領域の錐体細胞密度(/mm)は、生食投与群で206±52(SD;n=13)、MK-801投与群で86±42(n=8)と後者で有意に少なかった(p<0.01)。実験３：HSP-70の染色性は、２分間虚血の３日後(n=5)ではＣＡ１領域では中等度からほとんど見られない位までばらついた。２分間虚血の３日後に３分間虚血を負荷した群(n=5)では全例に強くＣＡ１領域のHSP70の染色がみられたが、偽手術負荷群の３日後に３分間虚血を負荷した群(n=5)ではＣＡ１にはHSP70は染色されなかった（図１）。

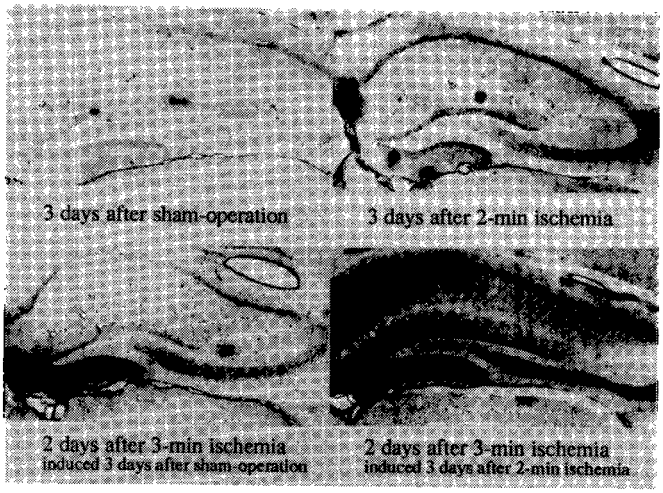
【考察】

砂ネズミにおける２分間の前脳虚血は形態学的に神経細胞障害を起こさない（非致死的）。この２分間虚血で前処置した３ないし４日後に、約80%の海馬ＣＡ１神経細胞を脱落させる３分間虚血を負荷しても、ほとんどの神経細胞は死なない（虚血耐性）(1)。この虚血耐性の獲得のメカニズムは現在十分には明らかではないが、本実験の結果より示唆される結論としては以下の通りである。1).虚血耐性の獲得は２回目の虚血中および虚血直後に放出される興奮性アミノ酸や抑制性アミノ酸の量を調整することによって発現しているのではない。2).MK-801の前処置で虚血耐性の獲得が抑制されるので、NMDA受容体の活性化を介した反応系の関与が考えられる。3).虚血耐性を獲得した脳ではHSP70の合成が見られ、特に、２回目の虚血後にHSP70が強く発現したのと対照的に、神経細胞脱落がみられる偽手術＋３分間虚血群の海馬ではHSP70の合成は認められなかった。このことより、虚血時にHSP70が存在していること、および、２回目の虚血後にすみやかにHSP70が合成されるよう条件付けされることが虚血耐性発現に重要であると考えられる。

【文献】

1) Kato H. et al. (1991) Brain Res. 553:238-245.
2) Kirino T. et al. (1991) J. Cereb. Blood Flow Metab. 11:299-307.
3) Kitagawa K. et al. (1990) Brain Res. 528:21-24.
4) Nakata N. et al. (1992) Neurosci. Lett. 138:86-88.
5) Vass K. et al. (1988) Acta Neuropathol. 77:128-135.

図１　砂ネズミ海馬におけるheat shock protein-70の免疫組織化学的染色



102 虚血性グルタミン酸放出機構

三谷 章, 安藤 泰, 章 龍, 片岡 喜由
（愛媛大学医学部 第一生理）

〔要約〕

一過性脳虚血によって発生する細胞外グルタミン酸濃度上昇の機構をスナネズミ海馬ＣＡ１野においてマイクロダイアリシス法を用いて検討した結果、①５分間脳虚血中グリア細胞からのグルタミン酸の放出はほとんど生じていない、②５分間脳虚血初期においては神経終末からのグルタミン酸の放出が主である、③５分間脳虚血後期においては海馬ＣＡ１野錐体細胞からの放出が生じている、ことを示す結果が得られた。

脳虚血中、大量のグルタミン酸が虚血脳領域において放出されている。従来このグルタミン酸は、神経終末から放出されていると一般に考えられている。しかしながら、最近のシナプトゾームを用いた研究(1,3)や、培養グリア細胞を用いた研究(2,4)によりグルタミン酸の放出は神経終末ばかりでなくシナプス後細胞膜およびグリア細胞からも起こりうる可能性が示唆されている。本研究では、虚血時に放出されるグルタミン酸の起源を明らかにするために以下の実験を行った。

〔方法〕（実験１）グリア細胞からの放出成分を選択的に観察するため、実験１０－１４日前に一側性５分間脳虚血を負荷して、一側性に遅延性神経細胞死を発生させておいたスナネズミの両側（反対側はコントロール）海馬ＣＡ１野に膜長0.5mmのマイクロダイアリシスプローブを装着し、再度５分間脳虚血負荷により放出されるグルタミン酸を150秒毎に回収し、酵素サイクリング法にて測定した。実験終了後、動物を経心臓的に潅流固定し、プローブの位置および遅延性神経細胞死発生の確認、さらに抗ＧＦＡＰによる免疫組織染色を行った。

（実験２）スナネズミ大脳皮質の灰白質あるいは白質に膜長0.5mmのマイクロダイアリシスプローブを装着し、５分間脳虚血中放出されるグルタミン酸を実験１と同様に測定した。

（実験３）海馬ＣＡ１野の主要グルタミン酸作動性入力路である同側海馬ＣＡ３野からのSchaffer側枝と反対側海馬ＣＡ３野からの交連性線維を遮断するため、実験３－７日前にカイニン酸をスナネズミの脳室内に両側性に注入し両側の海馬ＣＡ３野錐体細胞を選択的に破壊した。このような処置を施したスナネズミの海馬ＣＡ１野にマイクロダイアリシスプローブを装着し、５分間脳虚血負荷により放出されるグルタミン酸を実験１と同様に測定した。

〔結果〕（実験１）遅延性神経細胞死が発生した海馬ＣＡ１野では、シナプス後細胞成分はほとんど脱落し、神経終末はtarget cellを失い変性し、グリア細胞が増殖していることが確認された。神経細胞死が発生していない反対側の海馬ＣＡ１野においては、虚血中通常この動物で認められる虚血前値の１５－２０倍高濃度の細胞外グルタミン酸放出が観察された。これに対し、遅延性神経細胞死が発生していた海馬ＣＡ１野においては虚血性グルタミン酸放出はほとんど観察されなかった（図１）。

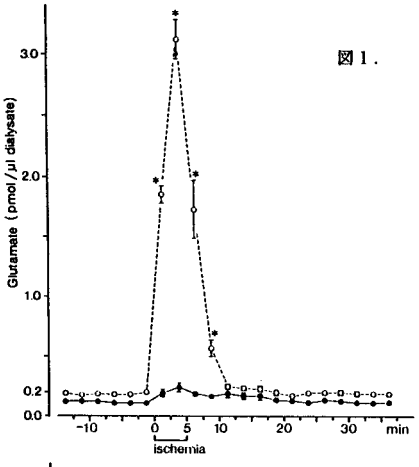
（実験２）灰白質においては、５分間脳虚血によりこの動物の海馬ＣＡ１野で放出されるグルタミン酸よりも高濃度の細胞外グルタミン酸放出が観察された。これに対し、白質では虚血性グルタミン酸放出はほとんど観察されなかった（図２）。

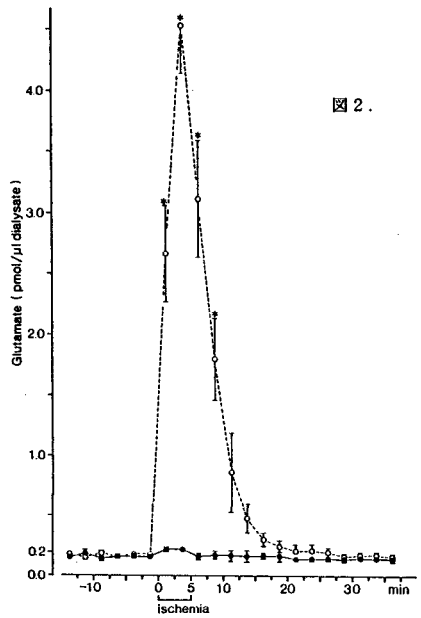
（実験３）通常この動物の海馬ＣＡ１野においては、５分間脳虚血の初期２．５分間においてすでに有意なグルタミン酸放出の増大が観察されるが、グルタミン酸入力路が遮断された海馬ＣＡ１野においては５分間脳虚血の初期２．５分間にほとんど虚血性グルタミン酸の放出は観察されず、虚血後期２．５分間においてのみ急激なグルタミン酸放出が観察された（図３）。

〔考察〕（実験１）遅延性神経細胞死が発生している海馬においてグルタミン酸が放出されれば、それはほとんどグリア細胞から由来するものと考えられる。しかしながら、そのことを示唆するグルタミン酸放出は５分間の脳虚血中観察されず、グリア細胞は５分間の一過性脳虚血により生じるグルタミン酸放出にはあまり関与していないと考えられる。（実験２）グリア細胞と神経線維が存在している白質において虚血性グルタミン酸放出は５分間の脳虚血中観察されなかった。これに対し、海馬ＣＡ１野よりも多くの神経細胞が存在する灰白質においては、海馬ＣＡ１野よりも高濃度のグルタミン酸放出が観察された。これらの結果は、グリア細胞は一過性の脳虚血により生じるグルタミン酸放出にはあまり関与していないこと、５分間脳虚血中には神経細胞からも放出が起こっていることを示唆している。（実験３）グルタミン酸入力路が遮断された海馬ＣＡ１野において虚血初期に欠損したグルタミン酸放出成分は神経終末からの放出であり、また虚血後期に観察された急激なグルタミン酸放出成分はシナプス後神経細胞すなわち海馬ＣＡ１野神経細胞自身から放出された可能性が高い。以上の結果より、スナネズミ海馬ＣＡ１野においては、一過性脳虚血中放出されるグルタミン酸はその初期においては神経終末から放出され、後期においてはシナプス後細胞膜から放出されているのではないかと考えられる。

〔文献〕

1) Kauppinen,R.A. et al.(1988) Neuroscience 27,175-182.
2) Ogata,T. et al.(1992) J. Neurochem. 58,1957-1959.
3) Sanchez-Prieto, J and Gonzalez (1988) J. Neurochem. 50,1322-1324.
4) Szatkowski, M. et al.(1990) Nature 348,443-446.





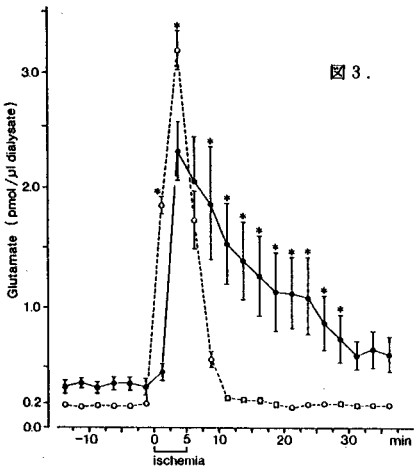


図１．マイクロダイアリシスにより観察されたスナネズミ海馬ＣＡ１野での虚血性細胞外グルタミン酸レベルの経時的変化．●—●は海馬ＣＡ１錐体細胞が脱落した海馬ＣＡ１野での虚血性細胞外グルタミン酸レベルの変化を示す．○−○はその反対側海馬ＣＡ１野すなわちＣＡ１錐体細胞が生存している海馬ＣＡ１野での虚血性細胞外グルタミン酸レベルの変化を示す．データは平均値±ＳＥＭで表している（ともにｎ＝１０）．＊印は海馬ＣＡ１錐体細胞が脱落した海馬ＣＡ１野でのグルタミン酸レベルと比較して有意に高いことを示す（$p<0.01$, two-way analysis of variance）．縦軸は２．５分毎に回収された回収液中のグルタミン酸レベル（pmol/ul）．横軸は虚血開始時刻からの時間（分）．

図２．マイクロダイアリシスにより観察されたスナネズミ大脳皮質白質（●—●）および灰白質（○−○）での虚血性細胞外グルタミン酸レベルの経時的変化．データは平均値±ＳＥＭで表している（ともにｎ＝６）．＊印は白質でのグルタミン酸レベルと比較して有意に高いことを示す（$p<0.01$, two-way analysis of variance）．縦軸は２．５分毎に回収された回収液中のグルタミン酸レベル（pmol/ul）．横軸は虚血開始時刻からの時間（分）．

図３．マイクロダイアリシスにより観察されたスナネズミ海馬ＣＡ１野での虚血性細胞外グルタミン酸レベルの経時的変化．●—●は両側海馬ＣＡ３錐体細胞が脱落した海馬ＣＡ１野での虚血性細胞外グルタミン酸レベル．○−○はコントロール（図１の○−○に相当）．データは平均値±ＳＥＭで表している（ｎ＝４および１０）．＊印は互いに他方のグルタミン酸レベルに比べて有意に高いことを示す（$p<0.01$, two-way analysis of variance）．縦軸は２．５分毎に回収された回収液中のグルタミン酸レベル（pmol/ul）．横軸は虚血開始時刻からの時間（分）．

103 低脳温と虚血性アミノ酸放出反応

- in vivo brain dialysis による検討 -

大星博明、井林雪郎、高野健太郎、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〕
低脳温による脳虚血保護効果の機序を明らかにする目的で、低脳温状態での海馬における脳血流量およびアミノ酸濃度の変動を、脳虚血前後で老齢高血圧自然発症ラット(ＳＨＲ)を用いて検討した。脳温を30°C、33°Cおよび36°Cに維持した3群に20分間の一過性脳虚血を負荷し、in vivo brain dialysis を用いて海馬ＣＡ１領域の細胞外アミノ酸濃度を測定した。脳虚血中の海馬の脳血流量は各脳温群で有意な差はみられなかった。脳を軽度の低温 (33°Cおよび30°C) に20分間維持すると細胞外アミノ酸濃度は約20%の低下を示した。興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の細胞外濃度は脳虚血中に安静時の１０倍に増加したが、低脳温群では２～４倍に抑制された。また、抑制性アミノ酸であるタウリンは、36°C群では16倍に増加したが、低脳温群での増加は４～１０倍と有意に抑さえられた。抑制性アミノ酸とされるアラニンの虚血性増加も低脳温群で有意に抑さえられた。老齢ＳＨＲの海馬における虚血性アミノ酸放出の低下は、興奮性アミノ酸のみでなく抑制性アミノ酸にも認められ、低脳温による虚血保護効果におけるアミノ酸神経伝達物質の役割の解釈には慎重を要することが示唆された。

【緒言】
脳虚血中に放出される多量のグルタミン酸が、虚血性神経細胞障害を増悪させることが報告されている (glutamate theory)。さらに低体温による脳保護効果においても、興奮性アミノ酸の放出抑制が重要な役割を果たす可能性が示唆されている。昨年度の本学会で、我々は老齢高血圧自然発症ラットを用いて海馬での虚血性アミノ酸放出と加齢による脆弱性の検討を行い、抑制性アミノ酸、特にタウリンの関与を報告した [1]。そこで今回は、脳虚血中の興奮性アミノ酸および抑制性アミノ酸の放出反応に及ぼす低脳温の影響を老齢ＳＨＲの海馬において検討した。

【方法】
１８～２５ヶ月齢の老齢雌ＳＨＲを用いた。Amobarbital (100mg/kg i.p.) 麻酔下で、20 分間の両側総頚動脈閉塞による一過性脳虚血を作製し [2]、閉塞を解くことで 60 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、グリシン、タウリン、アラニン) 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、脳血流測定用の白金電極とともに海馬ＣＡ１に定位的に留置した。透析液 (Ringer 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、脳温を変更した。脳温の設定には我々の開発したラット用脳温度コントローラーを用い [4]、30°C (n=4)、33°C (n=5) および36°C (n=7) に設定し、20分後に脳虚血を導入した。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。海馬の温度のモニターは脳血流測定用電極先端に張り付けた微小熱電対を用いて経時的に測定し、直腸温は約37°Cになるように温熱毛布で調節した。

【成績】
脳虚血前の海馬の血流量は 34～43 ml/100g/min で各脳温度群の間に差は認められなかった。脳温を変えることによる血流量の変化も明らかでなかった。脳虚血 20 分での脳血流量は 3 群とも 12 ml/100g/min 以下となり、群間に差はなかった。閉塞した総頚動脈を再開通すると脳血流量は 3 群ともに一過性に増加したのち低下した。興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の細胞外液中濃度は36°C群で脳虚血中から再開通直後にかけて約１０倍に増加したが、低脳温群では２～４倍にすぎず、再開通20分以降では有意に低下した (Fig.1)。一方、抑制性アミノ酸であるタウリンの細胞外濃度は、36°C群では脳虚血により著明な上昇 (16

倍) を示したが、低脳温群では低温開始後より有意な低下がみられ、虚血性増加も４～１０倍程度に抑制された (Fig.2)。他の興奮性アミノ酸とされるアスパラギン酸およびグリシンならびに抑制性アミノ酸とされるアラニンも、低脳温に設定後より約20%の濃度の低下がみられ、脳虚血導入後の上昇が有意に抑制された。

Fig. 1

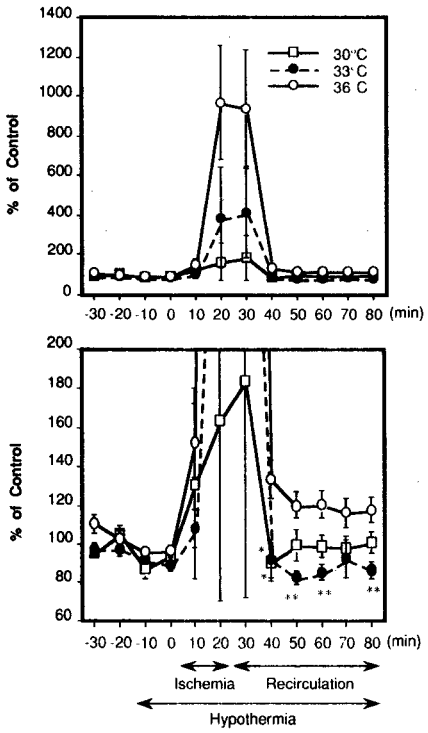
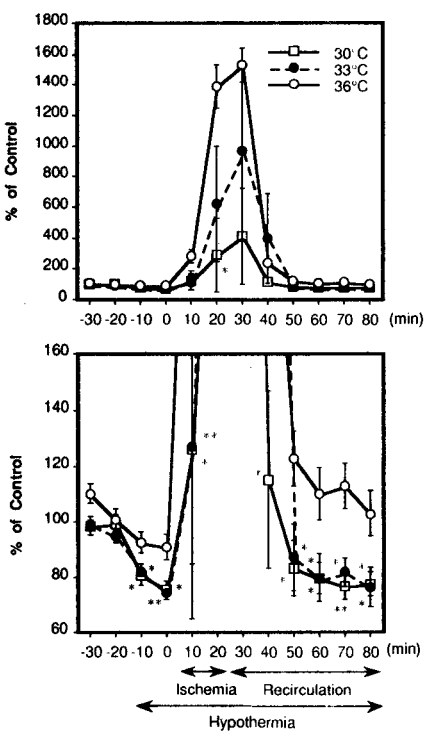


Fig. 2



Values are mean ± SEM ＊ p<0.05, ＊＊ p<0.01 compared to 36°C

【考察】

今回の検討では、低脳温にすることにより神経伝達物質の放出が有意に抑制される可能性が示された。さらに脳虚血によって生じる著明な放出反応は、興奮性アミノ酸だけでなく、抑制性アミノ酸も低脳温状態にすることにより低下することが示された。Globusらは、虚血性神経細胞障害におけるグルタミン酸の放出反応のみでは組織障害を説明しにくいことから、興奮性アミノ酸と抑制性アミノ酸の放出量のバランスが重要であると報告している [5]。我々も、老齢ＳＨＲで20 分間の一過性脳虚血の負荷に対する脆弱性 [6]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も関与する可能性を報告してきた [1]。今回、低脳温にすることにより、一過性脳虚血に伴うアミノ酸放出が抑制性アミノ酸でも低下したことから、低脳温による虚血保護効果に対しグルタミン酸の放出反応のみを問題にすることには慎重であるべきと考えられた。

【文献】

[1] 大星博明、他、 (1991) 神経化学 30:324-325. [2] Fujishima, M., et al., (1975) Stroke 6:62-66.
[3] Ooboshi, H. et al., (1992) J. Neurochem. 58:298-303 [4] 高野健太郎、他、(1991) 脳循環代謝 3:102.
[5] Globus, M.Y-T. et al., (1991) Neuro. Sci. Lett. 127:39-42. [6] Yao, H., et al., (1991) Stroke 22:1414-1418.

104 海馬ＣＡ１野および小脳皮質における IN VITRO 虚血性細胞内Ca^{2+}濃度上昇

柳瀬　尚人，三谷　章，片岡　喜由
愛媛大学医学部　第一生理

〔要約〕

虚血性選択的神経細胞死にCa^{2+}が重要な役割を果たしていると考えられている［1］。我々は，細胞内Ca^{2+}イメージングシステムを用いたスライス実験にて、虚血に対して特に脆弱な領域である海馬ＣＡ１野および小脳分子層に虚血性選択的細胞内Ca^{2+}濃度上昇が発生することを観察した。この細胞内Ca^{2+}の濃度上昇の機序を明らかにすることは、虚血性神経細胞死を防御するためにも重要な問題であり、この濃度上昇を示すCa^{2+}の起源についても検討した。その結果、海馬ＣＡ１野では虚血性選択的細胞内Ca^{2+}濃度上昇成分には、細胞外からの流入成分と細胞内からの放出成分があり、さらに、細胞内からの放出成分には Ca^{2+}－ｉｎｄｕｃｅｄ Ca^{2+} ｒｅｌｅａｓｅ タイプのものが含まれることが明らかになった。これに対し、小脳皮質では細胞外からの流入成分の比率は少なく、虚血性選択的細胞内Ca^{2+}濃度上昇成分は、その大部分が細胞内貯蔵部からの放出成分であると考えられた。

〔目的〕

虚血中に神経細胞内で濃度上昇するCa^{2+}が各種の蛋白分解酵素や脂質分解酵素を活性化し、一連の細胞構築破壊性の反応を起こし神経細胞を死に至らしめると考えられている。この虚血に対する脆弱性にCa^{2+}の濃度上昇が関与しているとするならば、虚血に対して脆弱な脳領域において虚血性選択的細胞内Ca^{2+}濃度上昇が観察されるはずである。本研究では、虚血に対して脆弱であることが知られている海馬ＣＡ１野および小脳Ｐｕｒｋｉｎｊｅ細胞を含む海馬および小脳スライスを用いて、その虚血性細胞内Ca^{2+}濃度上昇過程を細胞内Ca^{2+}イメージングシステムを使って観察した。

〔方法〕

Ca^{2+}蛍光指示薬ｒｈｏｄ－２をあらかじめ細胞内にｌｏａｄｉｎｇしておいたスナネズミ海馬および小脳スライスに灌流用人工脳脊髄液からO_2とｇｌｃｏｓｅを除去することによりｉｎ ｖｉｔｒｏの系での虚血条件（ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｉｓｃｈｅｍｉａ）を負荷し、細胞内Ca^{2+}イメージングシステムを使って細胞内Ca^{2+}レベルの変動を観察した。また、Ca^{2+}上昇成分のうち細胞内貯蔵成分を分離して観察するために、灌流液中のCa^{2+}を除去して同様の実験を行った。さらに、海馬スライスについては、細胞内貯蔵部からの放出のうちCa^{2+}－ｉｎｄｕｃｅｄ Ca^{2+} ｒｅｌｅａｓｅタイプの放出を抑制するｄａｎｔｒｏｌｅｎｅを灌流液中に添加して同様の実験を行った。

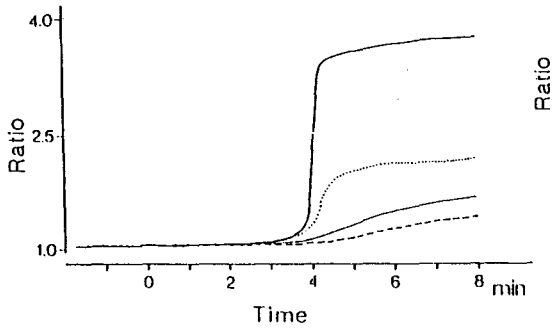
〔成績〕

海馬スライスでは、ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｉｓｃｈｅｍｉａ負荷数分経過して、急峻で大量の細胞内Ca^{2+}濃度上昇が観察された。細胞外液中のCa^{2+}を除去した場合には、上昇度の緩やかな細胞内Ca^{2+}濃度上昇が観察され、この上昇成分はｄａｎｔｒｏｌｅｎｅ投与によりさらに抑制された。一方、小脳スライスでも、ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｉｓｃｈｅｍｉａ負荷数分経過して、大量の細胞内Ca^{2+}濃度上昇が観察された。しかし、その上昇速度は海馬ＣＡ１野で認められる虚血性Ca^{2+}濃度上昇と比較して緩徐であり、細胞外液中のCa^{2+}を除去した場合には、海馬ＣＡ１野で認められるような濃度上昇の著明な抑制は観察されなかった。

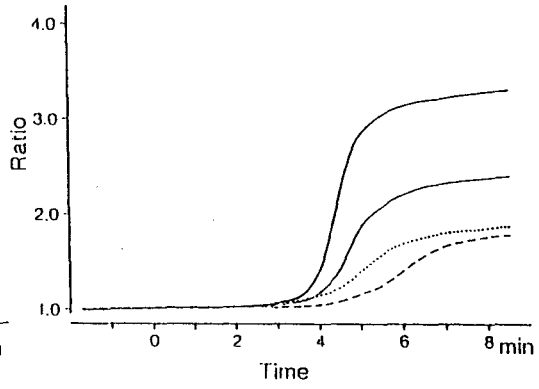
〔考察〕

虚血に対して脆弱であることが知られている海馬ＣＡ１錐体細胞および小脳Ｐｕｒｋｉｎｊｅ細胞において、虚血性選択的細胞内Ca^{2+}濃度上昇が観察されたことは、虚血性選択的神経細胞死にCa^{2+}が重要な役割を果たしているという考えを支持している。虚血時、海馬ＣＡ１野において上昇する細胞内Ca^{2+}には細胞外からの流入成分と細胞内貯蔵部からの放出成分があり、さらに放出成分には Ca^{2+}－ｉｎｄｕｃｅｄ Ca^{2+} ｒｅｌｅａｓｅタイプのものが含まれることが明かとなった。一方、小脳Ｐｕｒｋｉｎｊｅ細胞は海馬ＣＡ１

体細胞と比較して、ＮＭＤＡ型グルタミン酸受容体の分布が極めて低く［2］、逆にＩＰ$_3$受容体の分布が非常に高いことが知られている［3］。小脳Ｐｕｒｋｉｎｊｅ細胞において観察された緩徐なCa^{2+}濃度上昇は、その大部分が細胞内貯蔵部からの放出成分を表していると考えられる。



（図１） in vitro ischemic medium灌流下の海馬スライスにおけるCa^{2+}蛍光強度の経時的変化。太実線は放線状層、細実線は上昇層、破線はＣＡ３、点線は歯状回をそれぞれ表している。in vitro ischemia負荷約４分後に放線状層では急速なCa^{2+}蛍光強度の上昇を認め、約30秒後にはほぼプラトーに達する。縦軸の蛍光比は（各時点での蛍光強度）／（測定直前の蛍光強度）で表している。横軸は in vitro ischemia開始時刻からの時間経過（分）。



（図２） in vitro ischemic medium灌流下の小脳スライスにおけるCa^{2+}蛍光強度の経時的変化。太実線は分子層、細実線はPurkinje細胞層、破線は顆粒層、点線は髄体をそれぞれ表している。in vitro ischemia負荷約４分後に比較的急速なCa^{2+}蛍光強度の上昇を認め、約 100秒後にはほぼプラトーに達する。縦軸の蛍光比は（各時点での蛍光強度）／（測定直前の蛍光強度）で表している。横軸は in vitro ischemia開始時刻からの時間経過（分）。

〔文献〕

1 Siesjö,B.K.and Bengtsson,F.(1989)J.Cereb.Blood Flow Metab.,9,127-140.

2 Kataoka,K.,Mitani,A.,Andou,Y.,Enomoto,R.,Ogata,K. and Yoneda,Y.(in press)Neurochem.Int.

3 Nakanishi,S.,Maeda,N.and Mikoshiba,K.(1991)J.Neurosci.,11,2075-2086.

105 無グルコース処理による培養ニューロンのＡＴＰ含量とＮａポンプ活性の変化

井上 順雄，阿部田 聡*，松井 英男
（杏林大・医・第一生化，第一内科*）

〔要約〕
ラット大脳の初代培養ニューロンを無グルコース処理すると，時間と共に細胞内ATP含量が減少するが，70%程度の減少では全体のNaポンプ活性に変化はなかった．しかしこの時，全体のNaポンプ活性のうち脳型Naポンプの活性は約60%であり，これはグルコース存在下において脳型活性が全体の約1/3 であるのと異なっていた．ATP量がさらに減少すると全体のNaポンプ活性は低下したが，脳型活性が全体の約60%であることは変わらなかった．これらの結果は，細胞内エネルギーレベルが低下したときに脳型Naポンプが重要な機能を果たすことを示す．そして，ある程度エネルギーレベルが低下しても，脳型Naポンプの活性化によってNaポンプ活性を維持できることも示された．

Naポンプ（Na,K-ATPase ）はニューロンにおいて多量のエネルギーを消費してNa^+とK^+の能動輸送を行い，細胞が正常に機能するために必須な細胞内外のイオン濃度勾配を維持する．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て，成熟したニューロンには，すべての組織に存在する普遍型Naポンプ（α１型）の他に，脳などの組織だけに存在する脳型Naポンプ（α２型とα３型）が存在すること（１－３），さらに，脳型Naポンプは神経興奮後のイオン環境の修復に重要であること（４，５）を示した．一方，細胞内エネルギーレベルが低下しNaポンプ機能が傷害される様な条件下では，グルタミン酸の興奮毒性が強まることが報告されている（６）．そこで今回，我々は，Naポンプアイソフォームがニューロンの生存を維持するためにどの様に機能するか検討するために，無グルコース処理下における細胞内ATP含量とNaポンプ活性を測定した．また，グルタミン酸刺激の影響も検討した．

【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11～15日間培養した（１－５）．無グルコース（Glc）処理のためには，標準(+Glc)反応液［130mM NaCl, 2mM KCl, 0.8mM $MgCl_2$, 1.8mM $CaCl_2$, 5mM グルコース，0～1 mM ウアバイン，25mM Hepes-Imidazole緩衝液（pH 7.3)］から，グルコースを除いた（-Glc）反応液で，または，グルコースを除き5mM デオキシグルコースを添加した(+dGlc)反応液で，細胞を37℃で，30分,60分または90分間処理した．グルタミン酸刺激の影響を見るためには，処理の最後の12分間,100μMグルタミン酸を添加した．ATPは細胞から0.9M $HClO_4$で抽出し，$KHCO_3$で中和後，ルシフェリンールシフェラーゼを用いて定量した．Naポンプ活性測定は,細胞の処理後反応液に^{42}KClを添加し，12分間に細胞内に流入する^{42}Kを測った（2-4）．Naポンプ活性は，1mMウアバイン添加で阻害されるK^+ 流入量から求めた．さらに，Naポンプの活性を，脳型（ジギタリス高感受性型）と普遍型（低感受性型）のアイソフォームの活性に分けた．

【実験結果と考察】

表１に示すように，グルタミン酸刺激のない条件下では，グルコースを除去した条件下（以下,Glc非存在下）で細胞を30分間処理すると，細胞内ATP含量はグルコースが存在する条件下（以下，Glc存在下)の約70%に減少したが，全体のNaポンプ活性は変化しなかった．しかしこの時,脳型Naポンプ活性は約1.9倍上昇するのに対して，普遍型Naポンプ活性は約70%に低下した．その結果，全体の活性の約60%が脳型活性であり，残りの40%が普遍型活性となった．これは，Glc存在下で，全体のNaポンプ活性の約1/3 が脳型活性であり，残りの2/3が普遍型活性であるのと異なっていた．一方，グルコー

ス除去効果を顕著にするために，グルコースを除去しデオキシグルコースを添加した条件下（以下，dGlc存在下）で細胞を30分間処理した後では，ATP量は約20%に減少した．この時，全体のNaポンプ活性は約80%に低下し，全体の活性の約60%がGlc非存在下と同様に，脳型活性であった．無グルコース処理時間が30分以上になると，Glc非存在下でもdGlc存在下でも，細胞内ATP量は時間と共に減少した（図1）．この時，脳型活性と普遍型活性の比は変わらずどちらも同程度に低下して，全体のNaポンプ活性が低下した（図2）．以上の結果は，細胞内ATP量が減少した時には，脳型Naポンプが普遍型Naポンプよりも機能的に重要になることを示す．さらに，ATP量がある程度まで減少しても，脳型活性の上昇によって全体の活性を一定に維持できることも明らかになった．これは，神経興奮後のイオン環境の修復時だけでなく，細胞内エネルギーレベルが低下した時にも，脳型Naポンプが重要な機能を果たしていることを示している．

処理条件	ATP量 (nmol/mg protein)	Naポンプ活性 (K^+取り込み活性：nmol/min/mg protein) 全活性	脳型活性	普遍型活性
<グルタミン酸無刺激>				
Glc存在下	29.1 ± 2.0 (7)	37.8 ± 1.3 (16)	13.0 ± 0.9 (16)	24.8 ± 0.8 (16)
Glc非存在下	20.2 ± 1.8* (7)	41.9 ± 1.6 (11)	24.7 ± 1.1* (11)	17.2 ± 1.0* (11)
dGlc存在下	5.0 ± 0.3* (7)	31.4 ± 1.3* (9)	20.0 ± 0.9* (9)	11.4 ± 0.7* (9)
<グルタミン酸刺激>				
Glc存在下	24.1 ± 1.6 (7)	58.2 ± 1.9 (16)	42.6 ± 1.9 (16)	15.6 ± 0.6 (16)
Glc非存在下	10.4 ± 1.2* (7)	23.7 ± 1.7* (11)	15.4 ± 1.5* (11)	8.3 ± 0.4* (11)
dGlc存在下	2.6 ± 0.2* (7)	13.9 ± 1.4* (9)	9.7 ± 1.3* (9)	4.2 ± 0.6* (9)

表1．無グルコース処理(30分)後の培養ニューロン（11～15日間）のATP含量とNaポンプ活性．
平均値±SEM (n)．グルタミン酸刺激したものは無刺激と比較してすべて有意．
*p<0.01，Glc存在下に比較して有意．

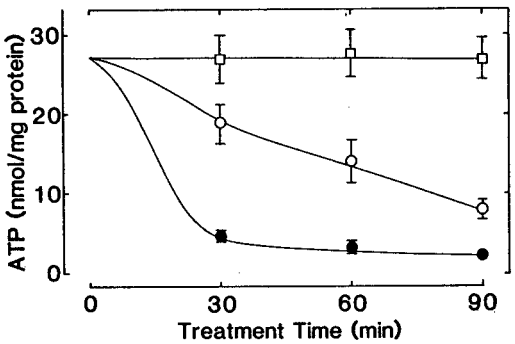


図1．無グルコース処理による培養ニューロンのATP含量変化．
□,Glc存在下： ○,Glc非存在下： ●,dGlc存在下

一方，細胞をグルタミン酸で刺激すると，Glc存在下では，脳型活性が顕著に上昇することで全体のNaポンプ活性を上昇させる(表1)（4，5）．しかし，無グルコース処理下では，グルタミン酸刺激によって Naポンプ活性は上昇しなかった．この相違の原因は，グルタミン酸刺激によるATP量の減少の割合が，Glc存在下ではわずかであるのに対して，無グルコース処理下では約50 %にも達することによると考えられる．この結果は，無グルコース条件下における細胞のグルタミン酸刺激は，細胞内エネルギーを急速に減少，枯渇させ，Naポンプの機能障害を起こし，細胞の生存を傷害する可能性を示している．

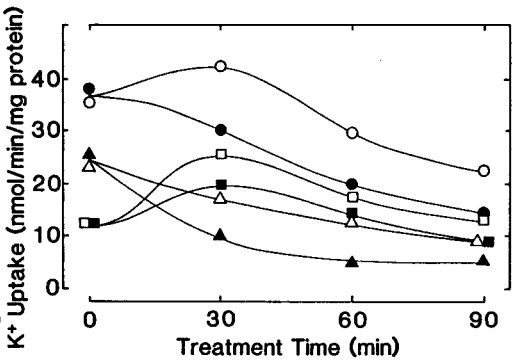


図2．無グルコース処理による培養ニューロンのNaポンプ活性変化．
Glc非存在下： ○,全活性； □,脳型活性； △,普遍型活性
dGlc存在下： ●,全活性； ■,脳型活性； ▲,普遍型活性

【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.

6. Novelli, A., Reilly, J.A., Lysko, P.G., and Henneberry, R.C. (1988) Brain Res. 451, 205-212.

106 インスリン／IGF－Iによるアストロサイト $(Na^+ + K^+)$－ATPase活性の増加

村田陽介，松田敏夫，馬場明道
（大阪大学・薬学部・薬理）

〔要約〕
ラット培養アストロサイトにおいてインスリン、IGF-Iは用量依存的に$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性を増加させた。この増加作用には8時間以上の処置時間が必要であり、またその作用は蛋白合成阻害薬であるシクロヘキシミドにより抑制された。インスリンの作用は、[^{3}H]チミジン取り込みの促進作用と関連しており、またチロシンキナーゼ阻害薬により抑制されることから、IGF-I受容体の活性化を介して発現していることが考えられる。これらの成績は、アストロサイトの増殖に$(Na^+ + K^+)$-ATPaseが何らかの役割を演じていることを示唆する。

Na^+とK^+の能動輸送を行っている$(Na^+ + K^+)$-ATPaseは、あらゆるタイプの細胞に存在しており、細胞内のイオン環境を維持することで細胞機能の調節に関与している。本酵素にはアイソザイム（α1、α2、α3）の存在が知られており、それぞれのアイソザイムは異なる調節機構を有していると考えられている(1,2)。例えば、脂肪細胞、骨格筋等のα2アイソザイムの活性はインスリンにより選択的に活性化される。一方、本酵素は細胞の増殖、分化において何らかの役割を演じていると考えられている。しかしながら、従来の研究ではRb^+の取り込みやウアバインの作用を検討しているのみで$(Na^+ + K^+)$-ATPase自身に対する作用の詳細は不明である。我々は、細胞増殖における$(Na^+ + K^+)$-ATPaseアイソザイムの関与を追求する目的で、α1およびα2アイソザイムから成るラット培養アストロサイト$(Na^+ + K^+)$-ATPase(3)に対するインスリン、インスリン様成長因子(IGF)等の増殖因子の作用について検討した。

〔方法〕
細胞の単離は、生後1-2日齢のS.D.系ラット大脳よりFrangakisとKimelberg(4)の方法に従って行った。10%の牛胎児血清を含むイーグルMEM培地で2-3週間培養後さらに二次培養を行いコンフルエントな細胞（通常14-20日）を実験に用いた。薬物処置は血清を含まない(SF-MEM)中で一定時間（多くは48時間）行った。$(Na^+ + K^+)$-ATPaseの部分精製は蔗糖密度勾配超遠心法により行った。$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性は既報の方法(5)に従って、また[^{3}H]チミジンの取り込みはBallottiら(6)の方法により測定した。

〔結果〕
SF-MEM中でアストロサイトをインスリンとインキュベートした後、細胞をホモジナイズしその$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性の変化について検討した。インスリン処置により細胞数、蛋白量の増加が見られるが、インスリン処置による$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性の増加はウェル当たり、蛋白当たり、DNA当たりいずれの場合でも見られた（表1）。インスリンの作用は用量依存的で、この作用には8時間以上の処置時間が必要であった。また、インスリンの$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性増加作用は細胞ホモジネートだけでなく部分精製標品でも見られた。IGF-I処置はインスリンの場合と同様に活性の増加を示したが、この場合の活性化作用はインスリンより低濃度で見られた（10^{-9}M）。インスリンにより[^{3}H]チミジン取り込みが促進され、この時のインスリンの用量は$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性増加作用の場合と一致していた。

インスリン処置の$(Na^+ + K^+)$-ATPase活性に対する作用を部分精製酵素標品で反応速度論的に解析すると、インスリンが基質ATPに対する親和性に影響を与えていないことが示された。インスリンによる$(Na^+ + K^+)$-ATPaseの活性化作用は、シクロヘキシミドにより拮抗された（図1）。また、インスリン処置細胞の$(Na^+ + K^+)$-ATPaseのウアバイン阻害

表1. インスリンのアストロサイト($Na^+ + K^+$)-ATPase活性に対する作用(12例の平均±S.E.)

	蛋白量	DNA量	($Na^+ + K^+$)-ATPase活性		
	μg/well	μg/well	nmol/h/well	μmol/h/mg蛋白	μmol/h/mg DNA
コントロール	100±3	3.91±0.16	282±19	2.90±0.28	75.9± 8.1
インスリン(1μM、48時間)	136±4	4.76±0.25	603±39	4.55±0.42	135.2±16.2

図1. シクロヘキシミドの作用

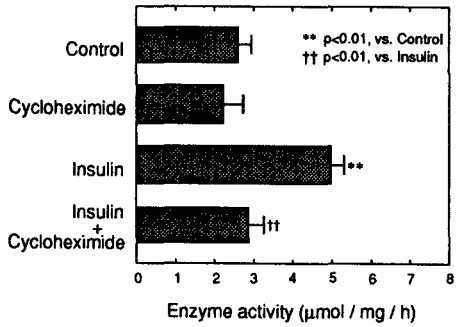
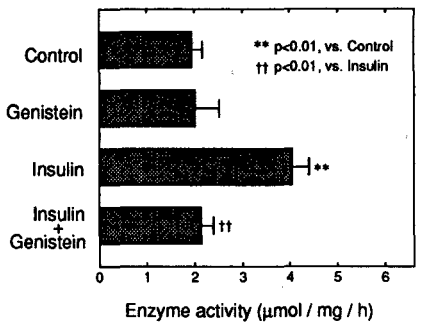


図2. ゲニステインの作用



の感受性について検討したが、未処置細胞の反応速度論的解析のそれと有意な差は認められなかった。インスリンによる($Na^+ + K^+$)-ATPaseの活性化作用は、チロシンキナーゼ阻害薬であるゲニステインにより抑制された(図2)。

〔考察〕

成長因子であるインスリン、IGF-IがアストロサイトのNa⁺ + K⁺-ATPase活性を増加させることを見いだした。この増加は蛋白量当たりだけでなくDNA量当たりでも見られ、細胞数の増加以上に($Na^+ + K^+$)-ATPase活性が増加することが示された。既に色々な系でインスリンがRb^+取り込みを促進することが報告されているが、これらの作用は分単位で起こる早い反応であり、本実験で認められた作用発現の遅い反応とは異なっていると考えられる。ラット培養アストロサイトにIGF-I受容体が存在し、この受容体が増殖に関与していることが示されている(6)。本研究で明らかにしたインスリン、IGF-Iによるアストロサイト($Na^+ + K^+$)-ATPase活性増加作用は、いずれも[^{3}H]チミジン取り込みの促進に要する用量で見られた。また、そのインスリンの作用は、チロシンキナーゼ阻害薬であるゲニステインで抑制された。これらの成績は、IGF-I受容体の活性化により($Na^+ + K^+$)-ATPaseが誘導されることを示唆する。酵素誘導の可能性は、インスリンの作用が蛋白合成阻害薬であるシクロヘキシミドで抑制されること、また反応速度論的解析でインスリンがATPに対する親和性に影響を与えないこと等の成績により支持される。これらの成績は、アストロサイトの増殖に本酵素が関与している可能性を示唆する。なお、アストロサイトにα1、α2のアイソザイムが存在していることが報告されているが(3)、ウアバイン感受性の解析から脂肪細胞で報告されているようなインスリンによるアイソザイムの選択的活性化はないと考えられた。

〔文献〕

1) Sweadner, K.J., Biochim. Biophys. Acta 988, 185-220 (1989). 2) Matsuda, T., Yakugaku Zasshi 110, 235-245 (1990). 3) McGrail, K.M. Phillips, J.M. & Sweadner, K.J., J. Neurosci. 11, 381-391 (1991). 4) Frangakis, M.V. & Kimelberg, H.K., Neurochem. Res. 9, 1689-1698 (1984). 5) Matsuda, T., Iwata, H. & Cooper, J.R., J. Biol. Chem. 259, 3858-3863 (1984). 6) Ballotti, R., Nielsen, P.C., Pringle, N., Kowalski, A., Richardson, W.D., Van Obberghen, E. & Gammeltoft, S., EMBO J. 6, 3633-3639 (1987). 7) Han, V.K.M., Lauder, J.M. & D'Ercole, A.J., J. Neurosci. 7, 501-511 (1987).

107 トランスジェニックマウスを用いたミエリンプロテオリピド蛋白質遺伝子産物のグリア分化因子としての機能

鹿川哲史[1]、池中一裕[1]、栗山茂樹[1,2]、岡野栄之[3]、有賀純[3]、中尾純治[1]、御子柴克彦[3]
([1]大阪大・蛋白研、[2]奈良医大・三内、[3]東大・医科研)

〔要約〕

我々はグリア細胞の発生時期に一致して、胎生マウス脳にミエリンプロテオリピド蛋白質（ＰＬＰ）遺伝子のオルタナティブスプライス産物ＤＭ２０が発現していること報告してきた。今回、ＤＭ２０の機能を明らかにするためにＰＬＰ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、胎生マウス脳にＤＭ２０を過剰に発現させることに成功した。このトランスジェニックホモ接合体マウスにはミエリン形成不全が観察され、ＰＬＰ遺伝子内に突然変異を有するジンピーマウスと全く同様の表現型を示した。ＲＮＡレベルの解析から、ＤＭ２０が過剰に発現することでオリゴデンドロサイトの分化が促進されていることが推察され、ＤＭ２０がグリア細胞の分化及び生存維持因子として機能していることが強く示唆された。

【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特異的に産生され、その主要な構造蛋白質の一つと考えられてきた（1）。しかし、このＰＬＰ遺伝子に突然変異を持つジンピーマウスは、ミエリン形成以前から中枢神経系グリア細胞の分化異常を示す（2）。この現象は従来考えられているようにＰＬＰ遺伝子が成熟後のミエリン形成細胞オリゴデンドロサイトに特異的に発現しているとすると説明できない。我々はＰＬＰ遺伝子産物がグリア分化因子としての機能してを有し、未熟なグリア細胞や他の細胞に発現している可能性を考え研究を進めた。最近、我々は Polymerase Chain Reaction（ＰＣＲ）法を導入した高感度な検出系を開発し、グリア細胞の発生時期以前の胎生１１日のマウス胎仔脳に既にＰＬＰ遺伝子が選択的スプライス産物ＤＭ－２０の形で発現していることを明らかにした（3、4）。この発現はグリア細胞の発生時期に相当する胎生１４日から１６日に増大していた（図1）。また幼弱期のジンピーマウスでは、異常なジンピー型ＤＭ－２０のみが発現しており、正常なＤＭ－２０の欠落がグリア細胞の分化異常を引き起こしたことが考えられた（5）。以上のことからＤＭ－２０がグリア細胞の分化促進因子として機能していることが示唆されたので、今回我々はＤＭ－２０を過剰に発現させるためＰＬＰ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、更に詳細な検討を行った。この導入遺伝子のホモ接合体マウス（plp/plp）はＰＬＰ遺伝子に変異を持つジンピーマウスと全く同様の表現型を示した。

【方法と結果】

１）ＰＬＰ遺伝子のクローニングとトランスジェニックマウスの作製

C57BL/6マウスＤＮＡを用いてコスミドライブラリーを作製し、三回のスクリーニングを行いＰＬＰ遺伝子全長を含む４つの陽性クローンを得た。このうちの約４５kbのクローンＰＬＰ－４e’をラムダターミナーゼ消化し、直鎖状としたＤＮＡをマウス受精卵にマイクロインジェクションした。生まれた６５匹のマウスのＤＮＡを解析したところ２コピーの導入ＰＬＰ遺伝子を持つトランスジェニックマウスを得ることに成功した。

２）導入ＰＬＰ遺伝子の組織特異的発現

導入ＰＬＰ遺伝子発現の組織特異性はジンピーマウスとの交配によって作製したマウス（jp/Y,plp/-）のmRNAをＰＣＲによって増幅し、各エキソン特異的なオリゴヌクレオチドでハイブリダイズして解析した。このマウス（jp/Y,plp/-）の内因性のＰＬＰ遺伝子産物はすべて第５エキソンが欠如したジンピー型であるのに対し、導入遺伝子産物は正常型であるため区別して検出することができた。ＰＬＰ遺伝子発現の最も盛んな生後１８日目のマウス（jp/Y,plp/-）の各種組織からＲＮＡを調製し解析したところ、導入遺伝子発現の組織特異性はほぼ保たれており、脳にＰＬＰ及びＤＭ－２０が、末梢神経の存在する心臓などにはＤＭ－２０のみがそれぞれ内因性のジンピー型mRNAとほぼ等量発現していた（図2）。

３）トランスジェニックマウスの成長過程におけるＰＬＰ遺伝子発現

マウスを継代し作製した導入ＰＬＰ遺伝子ホモ接合体マウス（plp/plp）は企図振戦、硬直性痙攣などジンピーマウスのと全く同様の表現型を示し、約１ヶ月で死に至った。また、ヘテロ接合体マウス（plp/-）も２ヶ月から７ヶ月までに下肢の硬直などの症状を発症し、数カ月から１０ヶ月で死に至った。そこでこれらのマウスの脳におけるＰＬＰ遺伝子発現の経時変化をＲＮＡレベルで解析した。胎生１２日から生後１８日まで、ＰＬＰ遺伝子のコピー数にほぼ比例して、ホモ接合体（plp/plp）は同腹の正常マウス（-/-）に比べ数倍の、ヘテロ接合体においても2、3倍程度の発現がみられた。胎生１２日目のホモ接合体マウス（plp/plp）は既に胎生１６日目の正常マウス（-/-）と同程度のＤＭ－２０が産生されており、胎生１６日目では本来生後でしか見られないＰＬＰの産生が検出された（図3）。ＤＭ２０の早期における過剰発現で、オリゴデンドロサイトの分化が数日早まったことが考えられた。

４）免疫組織化学的観察

各時期のパラフィン切片を作製し、抗ＰＬＰ抗体及び抗ＭＢＰ抗体などを用いて免疫組織化学的観察を行い、ホモ接合体

マウス（plp/plp）表現型はジンピーマウス同様、ミエリン形成不全に由来することが明らかになった。またヘテロ接合体（plp/-）では生後１８日頃は一旦形成されていたミエリンが発症時期には脱落することも明らかになった（図４）。

【考察】

トランスジェニックマウスの手法を用いて、胎生期のマウスにＤＭ－２０を過剰量発現させると、正常よりも数日早い胎生１６日目に既にＰＬＰmRNAが検出された。ＰＬＰmRNAはミエリン形成に同調して産生される分子である（図１）ので、導入ＰＬＰ遺伝子ホモ接合体マウス（plp/plp）で見られたミエリン形成不全は、早期にＰＬＰ遺伝子が過剰に発現した結果オリゴデンドロサイトの分化に異常が生じたためではないかと推察することができる。近年、ジンピーマウスのオリゴデンドロサイトの変性脱落は正常マウスのアストロサイトから放出される液性因子によって回復し、正常なオリゴデンドロサイトに分化したと報告された（６）。以上の事実とＤＭ２０が未熟なグリア細胞やアストロサイトなど成熟オリゴデンドロサイト以外でも産生されているという我々の解析結果と合わせて考えると、ＤＭ２０は他の蛋白質との相互作用を経て或いはＤＭ２０自身が修飾されて放出され、細胞外からオリゴデンドロサイトなどグリア細胞の分化機構や生存維持に関与していることが考えられる。以上の結果から、胎生期に産生されているＤＭ－２０あるいはその修飾された分子がグリア細胞の分化促進因子及び生存維持因子として機能していることが強く示唆された。

【参考文献】

1. Campagnoni A. T. and Macklin W. B. (1988) *Mol. Neurobiol.* 2, 41-89.
2. Knapp P. E., Skoff R. P. and Redstone D. W. (1986) *J. Neurosci.* 6, 2813-2822.
3. 鹿川哲史、池中一裕、御子柴克彦 (1990) 第33回日本神経化学会
4. Kazuhiro I., Kagawa T. and Mikoshiba K. (1992) *J. Neurochem.* 58, 2248-2253.
5. 鹿川哲史、池中一裕、御子柴克彦 (1991) 第34回日本神経化学会
6. Bartlett A. T. and Macklin W. B. (1988) *Glia* 1, 253-259.

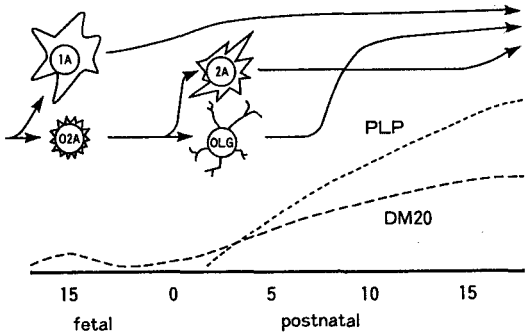


図1　正常マウスの発育過程におけるＰＬＰ遺伝子発現

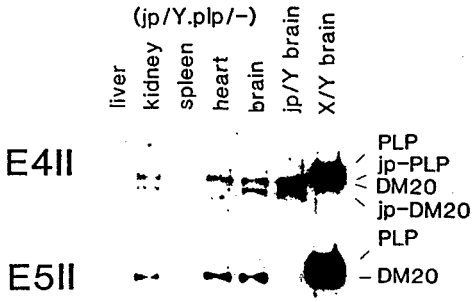


図2　トランスジェニックマウス（jp/Y, plp/-）における
ＰＬＰ遺伝子発現
E4II及びE5IIはそれぞれエキソン４、エキソン５
に対応するオリゴヌクレオチドプローブで
ハイブリダイズした。

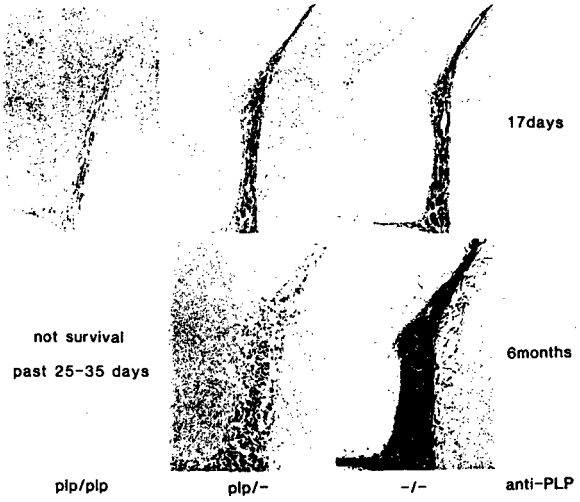


図4　トランスジェニックマウス小脳におけるＰＬＰ蛋白質の産生

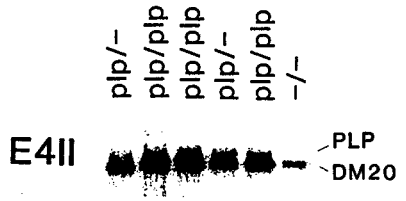


図3　胎生１６日トランスジェニックマウスにおける
ＰＬＰ遺伝子発現

108 PLP遺伝子産物のオリゴデンドロサイト分化促進因子としての機能解析

中尾純治[1]、池中一裕[1]、鹿川哲史[1]、Seung U. Kim[2]、御子柴克彦[3]
(阪大蛋白研[1]、British Columbia大神経内科[2]、東大医科研[3])

〔要約〕
ミエリンプロテオリピド蛋白質および、その選択的スプライス産物であるDM-20は、同じ局在を示し、双方共にミエリン膜の層構造の形成に関与している蛋白質と考えられていた。しかし、胎生期脳内にDM-20が選択的に生産されていること、またPLP遺伝子に突然変異を持つジンピーマウスはミエリン形成以前の胎生期にグリア細胞系の異常を示すこと、および正常なマウスのアストロサイトの培養上清で培養するとジンピーマウスのオリゴデンドロサイトが延命することから、PLP遺伝子産物(特にDM-20)がオリゴデンドロサイトの分化促進因子として機能していることが考えられた。今回、この可能性を追求するため、DM-20mRNAが多量に産生されているG26細胞の培養上清が、初代脳細胞培養系においてオリゴデンドロサイト分化を促進する作用を有するか否かを検討した。その結果G26 細胞の培養上清は、オリゴデンドロサイトの分化を著しく促進する因子を含むことが明らかとなった。さらにこのG26細胞培養上清を濃縮、透析した試料を用いて解析したところ、オリゴデンドロサイト分化促進作用に対して用量依存性を示した。しかし、PLP遺伝子を発現していないNIH3T3細胞の培養上清にはオリゴデンドロサイト分化促進作用はなかった。このことから、DM-20もしくはその修飾産物がオリゴデンドロサイト分化促進因子として機能していることが推定された。

〔序論〕

ミエリンプロテオリピド蛋白質 (PLP) は、中枢神経系のミエリンに局在し、ミエリン膜の層構造の形成に関与している蛋白質である。PLP遺伝子の選択的スプライス産物であるDM-20も、35アミノ酸の欠失以外はPLPと同一の一次構造であり、ミエリン画分に回収されることから、PLPと同様の局在や機能を有する蛋白質であると考えられていた。しかし、DM-20が、グリア細胞の発生時期以前に、胎生16日をピークとして産生されていること(1)、およびPLP遺伝子に突然変異を持つジンピーマウスは、ミエリン形成以前の胎生期にオリゴデンドロサイトの分化異常を示すことからDM-20にはミエリン形成以外の作用もあることが示唆された。ジンピーマウスにおいても胎生期に異常なDM-20が産生されていること(2)から、胎生期のジンピーマウスでは正常なDM-20の欠落がグリア細胞の分化異常を起こしていると考えられた。また、ジンピーマウスのオリゴデンドロサイトが正常なマウスのアストロサイトの培養上清で延命することが報告されており(3)、アストロサイトの初代培養細胞にDM-20が発現していること(4)を考え合わせるとDM-20がオリゴデンドロサイトの分化促進因子として機能していることが強く示唆された。われわれはDM-20mRNAは、アストロサイトだけではなく、神経系の培養細胞に広く検出されているが、とりわけoligodendrogliona系の株化細胞であるG26細胞に強く発現していることを示した(図1)。PLP遺伝子産物がオリゴデンドロサイト分化促進因子としての機能を持つ可能性を追求する目的のため、G26細胞の培養上清の初代脳細胞培養系に対する作用を検討した。

〔実験方法〕

1)細胞培養上清　G26細胞もしくはNIH3T3細胞を、N4 (5) で2日間培養した上清を使用した。

2)初代脳細胞培養　ICR系マウスの胎生17日の大脳皮質からトリプシン処理により細胞を分散させ、ポリエチルイミン処理したカバーグラス上、3×10^5の密度で培養を開始した。10%牛胎児血清を含むDMEM:Ham's F12=1:1で3日間培養したのち、Bottenstein らの*defined medium* (5) 、N4:03=1:2 もしくはconditioned medium:03=1:2でさらに4日間培養した。

3)免疫染色　オリゴデンドロサイトの染色は、一次抗体として、抗ガラクトセレブロシドモノクローン抗体を、二次抗体としてFITC-抗マウス抗体を用い、生染色した後、ﾊﾟﾗﾎﾙﾑｱﾙﾃﾞﾋﾄﾞで固定し蛍光顕微鏡下で陽性細胞数を数えた。

〔結果と考察〕

DM-20がオリゴデンドロサイトの分化促進因子として機能するかどうかを検討するために、DM-20遺伝子が多量に産生されているG26 細胞培養上清の、初代脳神経培養系におけるオリゴデンドロサイトの分化に与える影響について検討した。図2に示したようにG26 細胞の未精製の培養上清は、初代脳細胞培養系においてオリゴデンドロサイトの分化を著しく促進する効果を持つことが明らかになった。

次に、G26細胞の培養上清を約5倍濃縮し、さらに透析をした試料をもちいて、オリゴデンドロサイト分化促進作用の用量依存性を検討した。同時に、NIH3T3細胞の培養上清に関してもG26細胞の培養上清と同様の処理をおこない比較検討した。図3に示したように濃縮および透析をおこなったG26細胞培養上清は、用量依存的にオリゴデンドロサイトの分化を促進することが明かとなった。しかし、DM-20が産生されていないNIH3T3細胞(図1)の培養上清から得られた試料にはこのような効果はなかった。

以上のことから、DM-20が多量に産生されているG26細胞の培養上清はオリゴデンドロサイトの分化を促進する活性を有し、さらにこの培養上清を濃縮・透析した試料を用いた実験からは、用量依存的に効果を発現することがわかった。DM-20を産生していないNIH3T3細胞にはこのような効果は全くなかったことからDM-20もしくはその修飾産物がオリゴデンドロサイト分化促進因子として機能していることが推定された。このことは、ジンピーマウスを用いた我々の以前の解析結果を支持するものと思われる。今後、この因子の作用は、オリゴデンドロサイトの前駆細胞(O-2A progenitor cell)の増殖や分化を促進することによるものか、もしくはオリゴデンドロサイトそのものの増殖を促進することによるものか、検討していく予定である。

〔文献〕

(1)Ikenaka,K.,Kagawa.,T. and Mikoshiba,K. (1992) J. Neurochem. 58 ,2248-2252.
(2)鹿川哲史、池中一裕、御子柴克彦 (1991) 第34回日本神経化学会
(3)Bartlett,W.P. et al.(1988) Glia 1,253-259
(4)鹿川哲史、池中一裕、御子柴克彦 (1990) 第33回日本神経化学会
(5)Bottenstein,J.E.,Hunter,S.F. and Siedel M.(1988) J. Neurosci. Res. 20 291-303

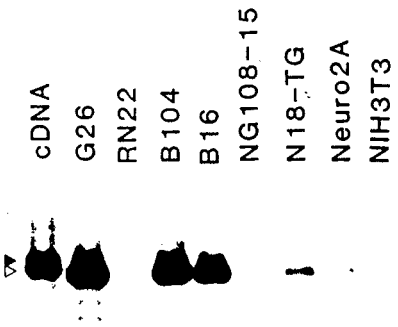


図1 各種培養細胞におけるPLPおよびDM-20遺伝子の発現
各種培養細胞から抽出した0.2μgの全RNA を逆転写酵素と反応させた後、Taq polymeraseをもちいて、45回PCRをおこなった。つぎに^{32}Pでラベルしたオリゴヌクレオチドプローブを用いてハイブリダイゼーションさせオートラジオグラフィーを行った。PLP(▲)およびDM2(△)クローンから増幅したバンドをcDNA のラインに示した。

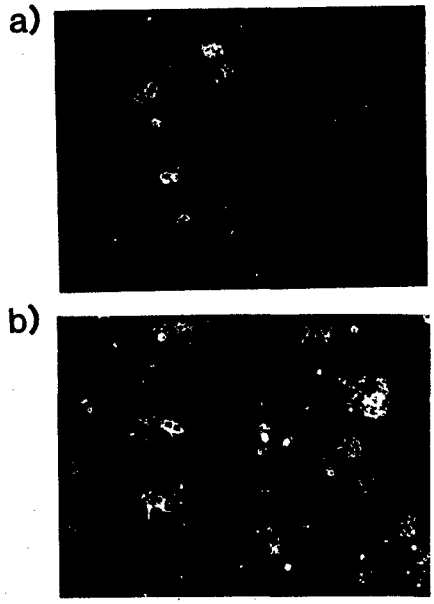


図2 G26細胞培養上清のオリゴデンドロサイト分化促進作用
胎生17日のマウス大脳皮質から得た細胞を3×10^{5}の密度で培養を開始し、10%牛胎児血清を含むDMEM:Ham's F12 =1:1で3日間培養したのち、Bottensteinらのdefined medium(DM)に変更しさらに4日間培養した。オリゴデンドロサイトを免疫染色して蛍光顕微鏡で観察した。DMにG26細胞培養上清を加えた場合(b)と加えなかった場合(a)と比較検討した。

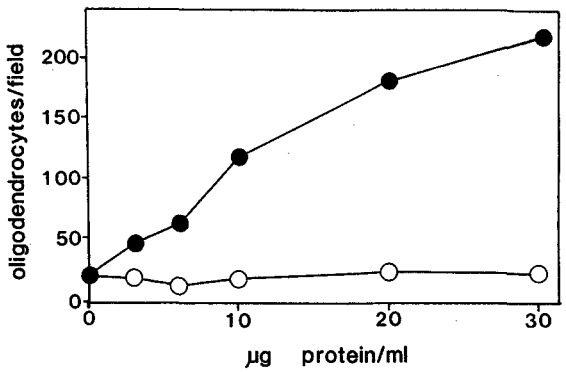


図3 G26細胞培養上清中に含まれるオリゴデンドロサイト分化促進因子の用量依存性
培養は図2の場合と同様におこなったが、細胞培養上清そのもののかわりにG26細胞(●)あるいはNIH3T3細胞(○)の培養上清を濃縮、透析した試料を用いてその用量依存性を解析した。免疫染色後、G26細胞,NIH3T3ともに各濃度について2回の培養におこない、それぞれ5視野(200×)ずつ陽性細胞を数え、平均値を計算した。

109 Transforming Growth Factor βによるミクログリアの機能抑制

錫村明生，澤田　誠*，丸野内　棣*，山本纁子
（藤田保健衛生大・神内，同総医研応用細胞*）

〔要約〕
アストロサイト，ミクログリアより産生されるtransforming growth factor β（TGFβ）の中枢神経系での機能を検索する目的でTGFβのミクログリアに対する効果を検討した．この結果，TGFβは容量依存性にミクログリアの活性化，増殖能およびサイトカイン産生を抑制した．中枢神経系では種々のサイトカインが産生され独自のサイトカインネットワークを形成しているが，TGFβ はこのネットワークにおける負の調節因子として重要な働きをしていることが示唆された．

〔目的〕
中枢神経系のグリア細胞が免疫系と同様の種々のサイトカインを産生することが明らかになっている．アストロサイトはIL-1，IL-6，TNF-α，GM-CSF，M-CSF，G-CSF，TGF-βを産生し，ミクログリアはIL-1，IL-6，TNF-α，TGFβを産生し，これらが autocrine またはparacrineに各グリア細胞の機能を調節している．これらのうち，TGF-βの中枢神経系での機能は不明であり，今回in vitroでのTGF-βのミクログリアに対する効果を検討した．

〔方法〕
既報[1]のごとくC3H/HeNマウスよりミクログリアを分離し，無刺激，活性化を促進する刺激下(LPS 0.1μg/ml)，増殖を促進する刺激下(GM-CSF，M-CSF)で培養し，TGF-βの効果を以下の項目について検討した．
(1) 増殖能の変化：無刺激およびGM-CSF 100 U/ml，M-CSF(10% L cell conditioned medium)存在下で培養し，それぞれにTGFβを0.002-2ng/mlの濃度で加え，３日後に細胞の増殖をMTT Assayにて測定した．
(2) 酸フォスファターゼ活性，O_2^-産生能：無刺激および LPS（0.1μg/ml）で刺激したミクログリアにTGFβを0.002-2ng/mlの濃度で加え，３日間培養後に既報の方法[2]で酸フォスファターゼ活性およびO_2^-産生を測定した．
(3) サイトカイン産生能：ミクログリア(5×10^5/ml)を無刺激およびLPS(0.1μg/ml)刺激下で培養し，それぞれに TGFβ 0.1-100ng/ml を加え３日間培養した．３日目に上清を集め，残った細胞をPBSで３回洗浄し，total RNAを抽出した．上清中のサイトカイン活性は，IL-1をD-10細胞，IL-6をMH-60細胞によるbioassayで測定し，TNF活性は L-929 細胞に対する細胞障害性により測定した．サイトカインのmRNAは既報[3]のreverse PCRにより測定した．

〔結果〕
(1) 増殖能に対する効果：ミクログリアは無刺激では増殖せず，TGFβを添加しても変化は認められなかった．GM-CSFまたはM-CSF存在下でのミクログリアの増殖はTGFβにより容量依存性に抑制された（図１）．
(2) 活性化に対する効果：TGFβは容量依存性に無刺激およびLPS刺激ミクログリアの酸フォスファターゼ活性，O_2^-産生を抑制した（図２）．
(2) サイトカイン産生に対する効果：TGFβはミクログリアのIL-1，IL-6，TNF産生を容量依存性に抑制し（図３），これはmRNAの量的変化でも確認された．

〔考察〕
TGF-βは単独ではミクログリアの増殖能に変化を与えなかったが，M-CSF，GM-CSFによるミクログリア の増殖を抑制した．同様に，活性化に対しても，TGF-βはLPSによる酸フォスファターゼ活性，O_2^-産生の上昇を抑制した．更にTGF-βはミクログリアのIL-1，IL-6，TNF-αの活性及びmRNAの発現を抑制し，サイトカイン産生に対しても負の調節をしていることが明らかになった．
昨年までの研究で，アストロサイトが種々のサイトカインを産生し，サイトカインを介してミクログリアの活性化，増殖を促進していることを明らかにしてきた．すなわち，TNF-αはミクログリアを活性化し，GM-CSFやM

-CSFは増殖を促進する．また一方，ミクログリア由来のIL-1などのサイトカインがアストロサイトを増殖させグリオージスを引き起こす因子として注目されている．これらの知見は中枢神経系における複雑なサイトカインネットワークの存在を示唆しており，今回，アストロサイト由来のTGF-βがこれらのサイトカインと拮抗する負の調節因子としてサイトカインネットワークにおいて重要な働きをしていることが示唆された．

REFFERENCES

1) Suzumura, A. et al., J. Neuroimmunol. 15:263, 1987.
2) Suzumura, A. et al., Brain Research 545:301, 1991.
3) Sawda, M. et al. Brain Research in press.

Fig. 1 Effects of TGF-beta on proliferation

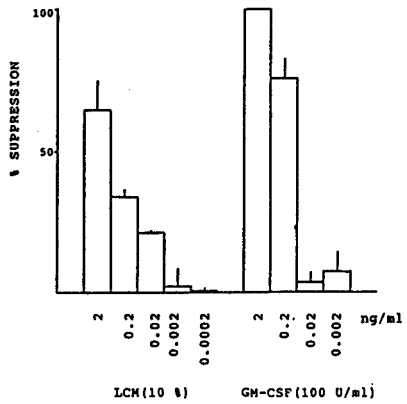


Fig. 2 Effects of TGF-beta on activation of microglia

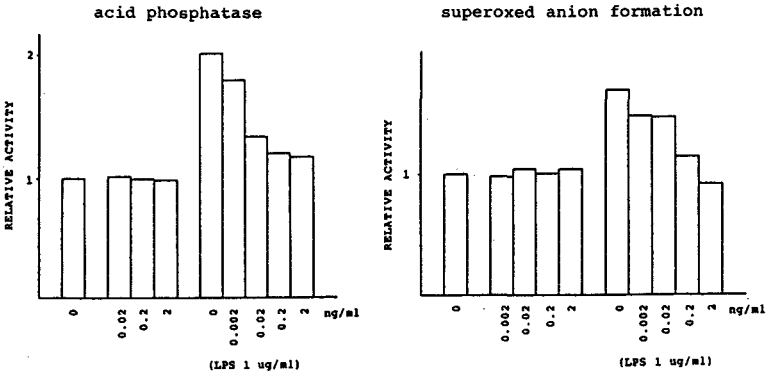
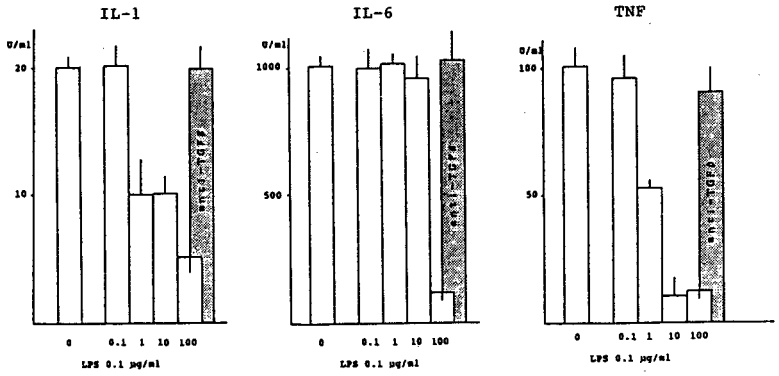


Fig. 3 Effects of TGF-beta on cytokine production by microglia



110 胚性癌細胞株Ｐ１９のｉｎ　ｖｉｔｒｏ神経分化モデルにおけるＰｌｅｉｏｔｒｏｐｈｉｎの発現とその意義

加藤英政、和中明生、松本和政、遠山正彌
（大阪大・医・第２解剖）

〔要約〕
Pleiotrophin(PTN)は分子量約18Kdのヘパリン結合性成長因子で培養神経細胞に対する突起伸長作用を有する事が明らかとされている。その遺伝子発現、及び蛋白発現は発生過程の中枢神経において制御された様式を取り、特に生後1-2週のラット脳においてピークとなりその後急速に減少する（本学会松本らの抄録参照）。今回我々はin vitroで再現性よく神経系細胞に分化させ得る胚性癌細胞株、Ｐ１９を用いて、この系においてPTNmRNAは未分化な状態ではノザン解析で検出不可能なレベルであるが、分化刺激後細胞が突起を伸ばし始める時期に一致してPTNmRNAの発現が認められ、神経のネットワークが著明になる時期にピークが存在した。その後も発現は若干低下するものの持続して観察された。続いて行ったnon-RIオリゴヌクレオタイドプローブによるin situ hybridizationと抗PTN抗体を用いた免疫組織化学では分化刺激後のPTNmRNA及びPTN蛋白は主に突起を有する神経細胞様細胞に局在している事が明らかとなった。この事実はPTNが神経細胞で産生され分泌された後に神経細胞の突起伸長を促すというオートクライン或いはパラクライン様のメカニズムでPTNが作用している事を示唆する。このことを証明する目的で我々は分化刺激を行った後、培養液中にPTNのアンチセンスオリゴヌクレオタイドを加え、突起伸長を抗MAP2抗体染色を用いて観察した。コントロールとして用いたセンスオリゴヌクレオタイドの系に比し明らかにアンチセンスオリゴヌクレオタイドを加えた群では突起伸長が抑えられていた。現在さらに数を増やして半定量的な評価を進めている。

（目的）
PTNは神経突起伸長作用を有する事が知られているが、その他の生理作用及びメカニズムについては詳細は明らかとはなっていない。問題となるのは実際の神経組織においてどの細胞種（神経細胞、グリア細胞）がこの因子を産生し、どの細胞種がその作用を受けるかという点である。神経突起伸長作用に限って云うならば受け手の側は神経細胞となるが、PTNがグリア細胞で産生されるか或いは神経細胞で産生されるかによりその作用メカニズムは大きく異なる。この点を解明するためには組織レベルよりも個々の細胞の同定が容易な培養系がより適していると考えられる。今回我々は単一の化学刺激（高濃度レチノイン酸）で再現性よく、しかも少なくとも神経細胞とグリア細胞の混合培養系に分化させ得る胚性癌細胞株、Ｐ１９を用い分化の各時期におけるPTNの遺伝子及び蛋白発現を細胞レベルで検討した。また作用メカニズムの解明の目的でアンチセンスオリゴヌクレオタイドによる発現抑制実験を行った。

（方法）
1)細胞培養
Ｐ１９細胞（東大生化学濱田博士より供与）の培養条件は基本的にはRudnickiとMcBurney等の方法に準じた(1)。培養液は10%FCSを添加したα-MEMを用い、２日おきにtrypsin-EDTAで処理後継代した。分化刺激はまずtrypsin-EDTAで処理後分散した細胞をbacteriological-gradeのディッシュで１μMのレチノイン酸（ＲＡ）を含む培養液を用いて２日間浮遊培養する事により細胞集塊を形成させ、その後tissue culture-gradeのディッシュ或いはチェンバースライドに移し通常の培養液を用いて培養し、経時的に観察した。
2)ノザン解析
未分化Ｐ１９細胞、分化刺激開始後２日、４日、６日、８日の細胞からＡＧＰＣ法を用いてｔｏｔａｌＲＮＡを調整した。8%ホルマリンを含む0.8%アガロースゲルで各時点のｔｏｔａｌＲＮＡ２５μｇを展開後、ニトロセルロース膜にＲＮＡを転写した。プローブはラットPTNcDNA (1.4Kb)をランダムプライマー法により^{32}Ｐラベルし用いた。転写後の膜を４２°Ｃでプローブ（１０^{6}ｃｐｍ／ｍｌ）とハイブリダイズさせた後、洗浄、フィルムオートラジオグラフィーを行った。
3)non-RI in situ hybridization
チェンバースライドで培養した分化刺激前後各時点の細胞を3%パラホルムアルデハイドで固定後、proteinase K処理を行った。この後脱水しハイブリダイゼーションに供した。non-RI in situ hybridizationは木山等の方法に準じた。プローブはラットPTNcDNAのcoding regionの5'末端に相補的な30merのオリゴヌクレオタイドにalkaliphospatase標識し精製後使用した。
4)PTN、MAP2の免疫組織化学的検出
ラビット抗PTN抗体は成熟PTN蛋白のＮ末端の14個のアミノ酸よりなる合成ペプタイドを家兎に免疫する事により作成した（詳細は本学会松本らの抄録を参照）。抗MAP2抗体はラビット抗ブタMAP2抗体(Peninsula laboratories)を使用した。non-RI in situ hybridization の場合と同様に細胞を固定後、１次抗体と反応させ洗浄後FITC-抗ラビットIgGと反応、蛍光顕微鏡下で観察した。
5)アンチセンスオリゴヌクレオタイドによる発現抑制実験
アンチセンス法の効果を評価しやすくする目的で、ほぼ大きさの揃った小細胞集塊をhanging-drop法(1)を用いて作成、分化刺激を行いこの後96穴プレートに細胞集塊を移し以下のオリゴヌクレオタイドを3μMの濃度で含む培養液で培養した。オリゴヌクレオタイドはnucleaseに対して安定とされるphosphorothioate oligonucleotide(S-オリゴ)をD

ＮＡ合成機で合成した（田辺製薬応用生化研の協力による）。アンチセンスS-オリゴはPTN蛋白の翻訳開始部位を含む17merの配列に対するもので、対照実験用として同配列のセンスS-オリゴも同時に合成した。

（結果と考察）

Ｐ１９細胞は２日間１μＭ ＲＡ存在下で培養する事により、再現性よく神経様細胞とグリア様細胞の混合培養系を達成しうる（図１）。未分化な状態では線維芽細胞様の形態を取り、盛んに増殖するが刺激開始後２日では明瞭な突起形成は認められぬものの明らかな細胞形態の変化（小型で球状の細胞の出現）が観察される。刺激開始後４日頃には明瞭な突起が観察され、ネットワークを形成し始める像が認められる。また同時に細胞集塊の下層にはグリア様の形態を取る細胞が存在する（図１）。この神経突起のネットワークは刺激開始後６－８日には完成し（図１）、この時期以降はグリア様細胞の増殖が持続し、最終的にはconfluentな状態となって神経細胞は死滅する。

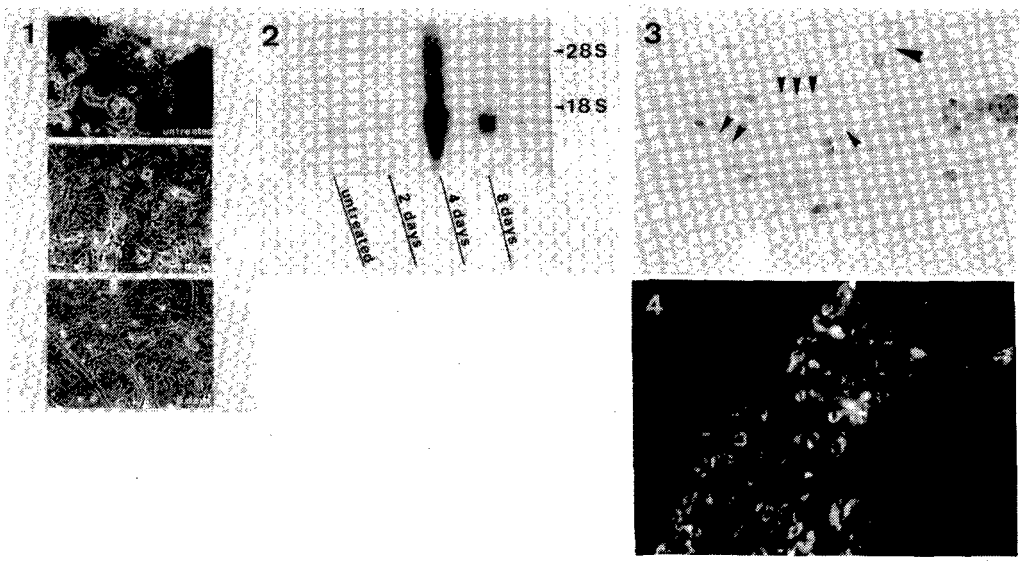
この系においてPTNmRNAの発現を検討したところ、未分化な状態では検出感度以下であるのに対し、刺激開始後２日頃より若干の発現が認められ、突起伸長の盛んな４日目ではmRNAの強い発現が観察された（図２）。この事実はPTNが神経突起伸長作用を有する事、およびin vivoにおいて神経突起伸長の最も盛んな生後１－２週にPTNの遺伝子、蛋白が著増する事とよく一致すると考えられた。刺激開始後８日目ではmRNAの発現は減少しているが、この時期のグリア様細胞の増殖により相対的に減少している可能性も考えられた。

本実験系においてどの細胞種がPTNを産生しているかを遺伝子、蛋白発現の両面から検討したところ、PTNmRNA（図３）PTN蛋白（図４）共に突起を有する神経細胞様細胞に局在する事が明らかとなった。また先のノザン解析で減少傾向の認められた８日目の標本でもPTNmRNAの強い発現が観察された事は相対的な減少を示唆している。以上の結果は神経細胞が突起を伸ばす際に、自らがPTNを産生分泌する事によりネットワーク形成を促進するというようなオートクライン或いはパラクライン様メカニズムの存在を示唆している。

このようなメカニズムが存在するか否かをアンチセンスオリゴヌクレオタイドを用いて検討したところ、センスオリゴヌクレオタイドを添加した細胞ではオリゴヌクレオタイドを加えない場合とほぼ同等のMAP2陽性の突起形成が観察されたのに対し、アンチセンスオリゴを添加した群ではMAP2陽性の突起形成は明らかに抑制されていた。しかしながら本実験はあくまで定性的な評価であり、現在突起の長さを計測する事による半定量的評価を検討中である。

以上の実験結果からPTNはオートクライン的に働く可能性が考えられるが、一方分泌された本因子がグリア細胞の表面に結合し、突起伸長に好適な基質を形成する可能性もあり今後本因子の受容体の解析が生理作用のメカニズムの解明に必要不可欠である。

（付図説明） 図１：上より分化刺激前、刺激終了後４日、刺激終了後８日のP19細胞の位相差像を示す。４日目で突起形成が盛んであり、８日目ではほぼネットワーク形成が完了している像が認められる。 図２：PTN mRNA発現の時間経過。刺激終了後４日にピークが認められる。 図３：PTN mRNAの細胞レベルの発現。刺激終了後８日目の培養細胞でnon-RI in situ hybridizationにより検出。mRNA陽性細胞のほとんどはarrowheadsで示すような突起を有する神経様細胞である。 図４：８日目の培養細胞におけるPTN蛋白発現。細胞集塊の上部に位置する神経様細胞に強い陽性反応を認める。



1)Rudnicki, M.A. & McBurney, M.W. Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. in Teratocarcinomas and embryonic stem cells. a practical approach. (ed. E.J. Robertson) IRL press.

2)Kiyama, et al. Recent progress in the use of the technique of non-radioactive in situ hybridization histochemistry: new tools for molecular biology. Neurosci. Res. 9 (1990) 1-21.

111 ヘパリン結合性神経突起伸長因子（Pleiotrophin, MK）の神経系発生過程における蛋白発現

松本和政、和中明生、加藤英政、*高辻功一、**村松　喬、遠山正弥

（大阪大・医・第二解剖、*大阪府立看護短大、**鹿児島大・医・第二生化学）

〔要約〕

Pleiotrophin(PTN)(1,2)とMK(3)は共にﾍﾊﾟﾘﾝに対して親和性を有し、培養神経細胞に対し突起伸長作用を持つﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ性成長因子である。両者はｱﾐﾉ酸ﾚﾍﾞﾙで約50%の相同性を有し、かつｼｽﾃｲﾝ残基の位置が保存されていることより新たな遺伝子ﾌｧﾐﾘｰを形成すると考えられている。今回我々はこれらの因子に特異的なﾎﾟﾘｸﾛｰﾅﾙ抗体を作成し、発生過程の神経系における蛋白の局在を免疫組織化学的手法を用いて検討した。以前に行った遺伝子発現の個体発生のﾊﾟﾀｰﾝと蛋白発現のﾊﾟﾀｰﾝはよく相関した。PTN,MKの蛋白局在は非常に似通っており、発生過程神経系において主に細胞外の細かな点状の反応として認められた。またPTNは線維束にも陽性反応が観察された。更に詳細に検討する目的で免疫電顕法を用いて微細構造ﾚﾍﾞﾙにおける蛋白局在を検討したところ、PTNはそのﾋﾟｰｸ時には細胞膜に主にその局在が認められ、また線維束においては軸索内にも陽性反応が認められた。 以上の結果はPTN/MKﾌｧﾐﾘｰは神経系の個体発生において制御された発現様式を取り、MKは主に発生初期に、PTNは発生中期に作用すること、またPTN/MKが細胞外基質に付随して神経細胞の移動や突起進展に対して”良好な環境”を作り出している可能性を示唆するものと考えられた。

（目的）

PTN/MKは共に培養神経細胞に対して突起伸長作用を有するﾍﾊﾟﾘﾝ結合性成長因子である。我々はPTN/MKの遺伝子発現をin situ hybridization法で発生過程の神経系で検討し、両者が個体発生上特異な発現ﾊﾟﾀｰﾝをとることを報告した。すなわちMKは胎生初期から中期に強い発現を認め、特に上衣層にmRNAの局在が観察された(4)。一方PTNmRNAは胎生後期に発現が上昇し、生後1-2週に極めて強い発現が前脳を中心に広範囲に観察され、その後この発現は減少し成熟脳では一部の神経細胞群に弱い発現を認めるのみとなる(5)。このように発生時期に応じて遺伝子発現が制御されていることはこれらの成長因子が神経の個体発生に重要な役割を担っていることを示唆している。その生理的意義を理解する上で蛋白発現を検討することが必要不可欠と考えられる。今回我々はPTN,MK 各々に対する特異的抗体を作成し組織ﾚﾍﾞﾙでの蛋白発現、局在を解析することを目的とした。

（方法）

1)抗体作成

PTNに対する抗体は成熟ﾗｯﾄPTN蛋白のN末14個のｱﾐﾉ酸よりなるﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞを合成、ｼｽﾃｲﾝｱﾐﾄﾞ基を介してMBS esterにより牛血清ｱﾙﾌﾞﾐﾝに結合させ、精製後家兎に免疫した。抗体の特異性は血清分離後、ﾄﾞｯﾄﾌﾞﾛｯﾄにてﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞとの反応性を確認し、その後生後一週ﾗｯﾄ脳のﾎﾓｼﾞﾈｰﾄを用いたｳｴｽﾀﾝﾌﾞﾛｯﾄにより、検定した。本抗体はｳｴｽﾀﾝﾌﾞﾛｯﾄにて約18Kdの位置に単一のﾊﾞﾝﾄﾞを認識することが明らかとなった。また同一の系にてﾘｺﾝﾋﾞﾅﾝﾄbFGF、aFGFとは交差反応を認めなかった。この後AH-Sepharoseに同ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞを結合させたｱﾌｨﾆﾃｨｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨｰにより抗体を精製し以下の免疫組織化学法に使用した。MKに対する抗体はﾏｳｽL細胞において産生させたﾘｺﾝﾋﾞﾅﾝﾄMKを免疫源とし、家兎においてﾎﾟﾘｸﾛｰﾅﾙ抗体を作成した。特異性の検定は上記の方法で行った。この後抗体をｱﾌｨﾆﾃｨｰ精製、以下の実験に使用した。両抗体の交差反応は発生過程の神経系における時間経過が全く異なる事より殆ど無視しうると考えられた（結果の項参照）。

2)免疫組織化学

胎生10、14、17日のﾗｯﾄ胎仔は浸漬固定により、生直後、生後7,10,14日、成熟ﾗｯﾄは潅流固定により固定後、凍結切片（厚さ約14-20μm）を作成、ＡＢＣ法で抗原を可視化した。また一部のﾗｯﾄは固定後抗原を可視化した後に、エポン樹脂に包埋し超薄切片を作成、電顕観察を行った。

（結果）

1)MK蛋白発現の個体発生

MKは胎生10日より中枢神経(CNS)内に広範囲に、特に終脳胞に強い発現を認めた。免疫陽性産物は非常に細かい点状の反応として認められ、細胞質内よりもむしろ細胞膜或いは細胞間隙に局在する事を示唆する像が得られた。この為細胞体自体は陰性反応として認められた（図１）。胎生14日でも同様の傾向ではあるが、CNS内に存在する線維束にも陽性反応が観察された。この免疫反応は胎生17日には強度が減弱し、生直後には前脳部では殆ど反応が認められなくなった。しかしながらこの時期においても小脳皮質（特に分子層）及び脈絡叢には蛋白発現が強く認められた。このﾊﾟﾀｰﾝは同時に行ったin situ hybridization 法でも認められ本抗体の特異性が確認された。以降生後7,14日では、小脳皮質の反応は減弱し脈絡叢のみ強度の反応が持続した。

2)PTN蛋白発現の個体発生

PTNは胎生期においては上記のMKとほぼ同様の免疫染色ﾊﾟﾀｰﾝを取るが、その強度はMKに比して弱く、終脳の脳室上衣層に発現が限局していた。胎生17日以降は発現強度は増強し、脳室上衣層に加え脳実質内に広範囲に、とりわけ生直後からは前脳を中心に反応性増加が著明であった。特に以前にin situ hybridization で非常に強い発現が観察された生後7,14日の脳切片ではほぼCNS内全域に陽性反応が観察された（図２）。このようなPTNの胎生期、生後発達の発現ﾊﾟﾀｰﾝは先に述べたMKのそれとは好対照であり、両抗体の交差反応は無い事を裏付ける。強拡大の観察では、MKの場合と同様に免疫陽性反応はfine granular patternをとり、細胞輪郭を淵どる様な像が観察された（図３）。またこの時期には脳梁や前交連などの線維束にも強い反応が観察された（図４）。成熟ﾗｯﾄ脳ではPTN蛋白の発現は弱く、大脳皮質や梨状葉の神経細胞と線維束に免疫染色が認められるのみであった。興味深いことにこの時期では生後1-2週にみられたような細胞膜、細胞間隙における局在よりもむしろ細胞質局在が主であった。

3)PTN蛋白の微細構造レベルでの局在

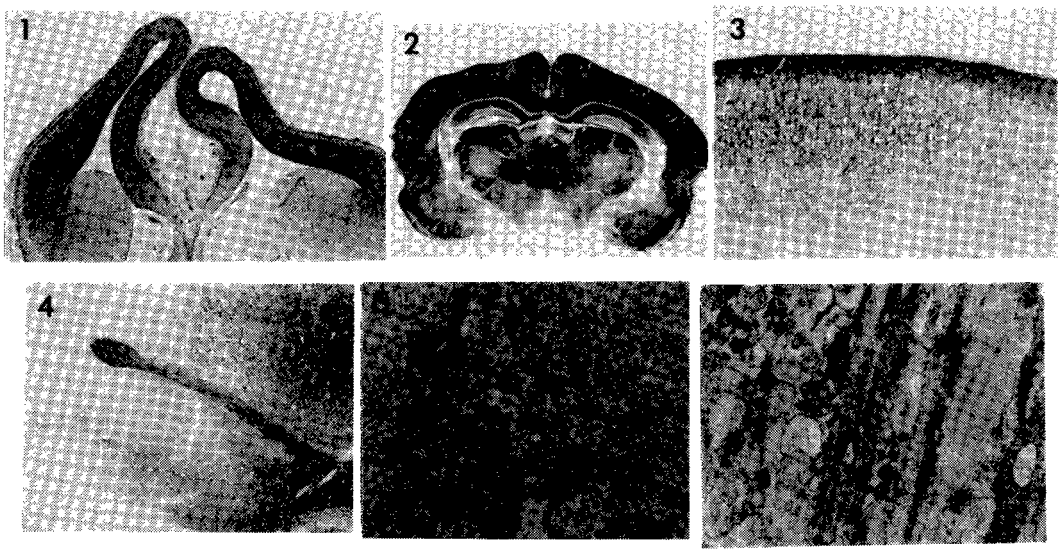
以上述べてきたようにPTN/MKﾌｧﾐﾘｰは光顕ﾚﾍﾞﾙでは少なくとも細胞外基質に付随した局在様式を取ると考えられたので実際にどの細胞種（神経細胞、ｸﾞﾘｱ細胞）によりこれら成長因子が産生されているかを同定する事は困難である。またPTNに関しては以前のin situ hybridizationの結果からは細胞種のｽｲｯﾁ（ｸﾞﾘｱから神経）の可能性も考えられたので、細胞種の同定は重要と考えられた。そこで続いて我々は微細構造ﾚﾍﾞﾙでのPTN蛋白局在を検討した。標本は生後7日の大脳皮質、脳梁、成熟ﾗｯﾄの大脳皮質、脳梁の４点を選択し検討した。図５は生後7日の大脳皮質を示すが、これよりPTN蛋白は主に細胞膜に広範に局在している事が確認された。また神経細胞体内にも僅かではあるが、ｺﾞﾙｼﾞ装置周辺などに免疫陽性産物を認め、本因子が主に神経細胞により産生されていることが明らかとなった。この時期の脳梁では免疫反応は軸索内に認められ（図７）、このことからも本因子が神経細胞において産生され、かつ軸索内輸送を受けている可能性が考えられた。成熟ﾗｯﾄ大脳皮質ではPTNは発現が少なく、主に樹状突起内に局在している像が観察された。また脳梁では軸索内の微小管に付随して局在していた。

（考察）

今回の結果より、PTN/MKﾌｧﾐﾘｰはその遺伝子発現とよく相関し、神経組織の個体発生において独特の制御された発現様式を取る事が明らかとなった。おおまかにはMKは胎生初期から後期、PTNは胎生後期から生後２週に強い発現が認められin vitroにおいてはほぼ同様の神経突起伸長作用を有し、実際の免疫陽性反応の組織局在の様式も酷似しているもののin vivoにおいてはなんらかの役割分担がある可能性が考えられる。

MKはPTNとは異なり生後には発現が減少するが唯一小脳皮質では生後1-2週も発現が持続しており、この時期では小脳でPTNとMKが共同して作用している可能性がある。小脳はCNS内でも生後にも細胞分裂とそれにつずく細胞の移動が盛んに行われるという特殊性を持ち、このことがMKの持続発現と関与しているかも知れない。

PTNに関しては細胞膜に付随した局在を取る事及び神経細胞における産生が明らかとなった。PTN、MKともに分泌型の蛋白でありﾍﾊﾟﾘﾝに親和性を有することより、能動的に神経細胞より分泌され、FGFの場合と同様に細胞外基質（ﾍﾊﾟﾗﾝ硫酸ﾌﾟﾛﾃｵｸﾞﾘｶﾝなど）に結合することにより安定化するﾒｶﾆｽﾞﾑの存在が考えられた。Rauvala等の指摘したように(2)、PTNのＮ末、Ｃ末に存在するﾘｼﾞﾝｸﾗｽﾀｰが神経突起伸長の為の基質になるとすれば、上記の細胞外局在は生理的に意味があると考えられる。このようなｵｰﾄｸﾗｲﾝﾒｶﾆｽﾞﾑは我々が同時に行ったP19細胞のin vitro神経分化モデルにおいてもこれを支持する結果が得られている（本学会、加藤ら）。 また軸索内の蛋白局在はこれら因子の軸索内輸送を示唆しており、現在我々はこの問題を線維束切断実験により検討中である。



1)Li, Y.S. et al. Science 250 (1990) 1690-1694.
2)Merenmies, J. & Rauvala, H. J. Biol. Chem. 265 (1990) 16721-16724.
3)Tomomura, M. et al. J. Biol. Chem. 265 (1990) 10765-10770.
4)Kadomatsu,K. et al. J. Cell Biol. 110 (1990) 607-616.
5)加藤英政、和中明生、遠山正彌ら　神経化学 30 (1991) 98-99.

112 ラット神経成長抑制因子（ＧＩＦ）のｃＤＮＡクローニングと遺伝子発現の検討

小林　央[1)]，辻　省次[2)]，内田　洋子[3)]，井原　康夫[4)]，中嶋一行[5)]，高坂　新一[5)]，宮武　正[1)]
1)東京医科歯科大神経内科，2)新潟大脳研神経内科，3)都老人研臨床病理，4)東大脳研脳病理，5)国立精神神経センター代謝研究部

〔要約〕
アルツハイマー病(AD)の病態の一つとして、GIFがAD脳において低下していることが示唆されている[7)8)9)10)]。GIFの生理学的機能及び分化、老化との関連を検討するため、ラットGIF cDNAをクローン化し、その発現について検討した。既にクローン化したヒトGIF cDNAの配列を元にRT-PCR法を用いマウスGIF cDNAを得た。これをプローブとし、ラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングし376bpのラットGIF cDNAをクローン化した。翻訳領域は198bpからなり、ヒトGIF cDNAとのホモロジーはアミノ酸翻訳領域で85%相同であった。ノーザンブロットではラットGIFは脳においてのみ特異的に発現を認め、ラット脳の発育過程でGIFの発現の増加を認めた。GIFはヒトとラットの間で極めて保存性が高く、中枢神経系に特異的に発現し、脳の発育に密接な関連をもつ蛋白であると考えられる。

【目的】
アルツハイマー病（AD)は、初老期から老年期にかけて痴呆をきたす原因不明の変性疾患である。病理学的には、ニューロンの変性脱落に加えて、アルツハイマー神経原繊維変化(NFT)と老人斑(SP)の出現を特徴とする[5)]。AD脳において、SP、NFTの出現、そしてニューロンの変性脱落に至る病態はいまだに解明されていない。
内田らは幼若ラットの皮質神経の初代培養細胞に、AD脳と正常対照脳の抽出液を加えると、AD脳のほうがラット大脳皮質ニューロンの生存を促進し、細胞体から出る突起の数を増やすことを見いだし、見かけ上、AD脳の神経栄養因子活性が高いことを示した。さらにそれが成長抑制因子(growth inhibitory factor; GIF)がAD脳で低下しているために起きていることを明らかにした[8)9)]。内田らはヒトGIFを単離し、68個のアミノ酸からなる蛋白で、そのアミノ酸配列はヒトメタルチオネインII (MT-II)と70%相同であることを明かにし、免疫組織学的にGIFが大脳皮質のアストロサイトに特異的に発現していることを示した[10)]。
また最近我々は、ヒトGIF cDNAをクローニングし、mRNAのレベルにおいて、GIFが脳に特異的に発現し、AD脳においてその発現が低下していることを報告した[7)]。
しかし、現在までGIFは他の動物種では報告がなく、その生物学的意義も明かでない。そこで本研究では、GIFの生理学的機能及び分化、老化との関連を検討するため、ラットGIF cDNAをクローン化し、その発現について検討した。
【方法】
1)cDNAプローブ: ヒトGIF cDNAの配列を元に、GIFのアミノ末端及びカルボキシ末端に特異的なオリゴヌクレオチドを作製し、cross-species homologyを利用し、逆転写酵素-polymerase chain reaction法(RT-PCR)により、マウスGIF cDNAの一部をクローニングし、plasmid vectorにサブクローニングした(pBSMGIF)。シークエンシングによりGIFに特異的な挿入配列を確認した。
2)cDNAクローニング: pBSMGIFをプローブとし、東大医学部生化学岡山博人先生より供与していただいたラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。
3)Northern blotting: ラットの各組織より、Chirgwinらの方法によりtotal RNAを抽出し、total RNA 10μgを0.66Mのformaldehydeを含む1.5%のアガロースゲルに泳動し、ナイロン膜に移した後、^{32}Pでラベルしたc DNAプローブと、ハイブリダイゼーションを行った。最終的にナイロン膜を0.1X SSC, 0.1% SDSで65℃, 30分間洗い、オートラジオグラフィーした[4)]。それぞれのバンドの相対的放射線量をFujiバイオイメージアナライザーBAS2000で測定した[1)]。
4)cDNA probe: GIFではホモロジーのあるメタルチオネイン遺伝子[3)]とのハイブリダイズを避けるためにラットGIF cDNAの3'非翻訳領域をPCR法[6)]を用いて増幅し^{32}Pでラベルしc DNAプローブを作製した。β-Actin genomic DNAをコントロールとして用いた[2)]。
【結果】
1)cDNAクローニング: ラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングし、24個のクローンを得た。インサートの最も長いクローン(pcDRGIF2)を選別し塩基配列を決定した。
2)ラットGIF塩基配列: pcDRGIF2 cDNAは376bpであり、翻訳領域は198bpからなり、poly A tailの上流22bpにpoly A signalを認めた。ヒトGIFとのホモロジーは非常に高く塩基配列で85%、アミノ酸配列で84%の相同を認めた。
3)組織での発現: Northern blottingによりラットGIFは大脳、小脳に特異的に約400ntの転写産物として発現し、肝臓、腎臓、脾臓、肺、心臓、腸では発現を認めなかった(図1)。
4)脳の発育過程での発現: 胎生期及び生後のラット脳の発育において、ラットGIF mRNAの発現をNorthern blottingにより検討したところ、発育過程においてGIFの発現の増加を認めた。特に生後10日より17日の間で、急激な増加を認め、脳の発育にGIFが密接な関連を持つことが示唆された。また生後26カ月の加齢ラットにおいても明かなGIFの発現の低下は認められなかった(図2)。
5)細胞での発現: ラットの培養細胞系において、GIFの発現を調べるために、ラットの種々の細胞系よりRNAを抽出しNorthern blottingにより検討した。その結果アストロサイトの初代培養系において、高い発現を認めた(図3)。

【考察】

ラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングし、poly A tailを除き376bpのラットGIF cDNAをクローン化した。Northern blottingにより約400ntの転写産物を認め、全長のラットGIF cDNAと考えられた。ラットGIF cDNAとヒトGIF cDNAとのホモロジーはアミノ酸翻訳領域で85%相同であり、GIFはヒトとラットの間で極めて保存性が高いと考えられた。Northern blottingではラットGIFは脳においてのみ特異的に発現を認め、GIFは中枢神経系に特異的に発現している蛋白である。ラット脳の発育において、ラットGIF mRNAの発現の増加を認め、特に生後10日より17日の間で、急激な増加を認めた。脳の発育にGIFが密接な関連を持つことが示唆された。またラットの初代培養系において、GIFはアストロサイトに高い発現を認めた。

以上よりGIFは種において、きわめて保存性が高く、生物学的に重要な蛋白であると考えられる。またラットGIF cDNAは、GIFの生理学的機能やADとの関連を検討するうえで、重要な役割を果たすと考えられる。

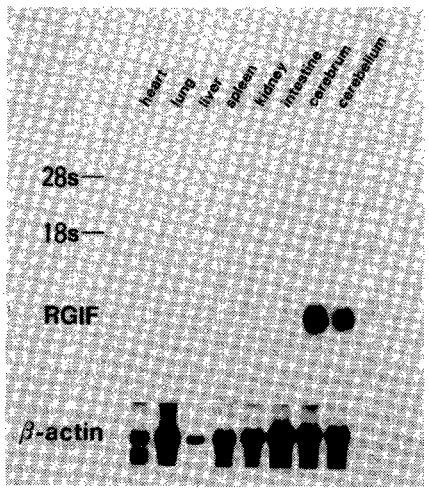


図1. Northern blottingによるGIFの組織発現

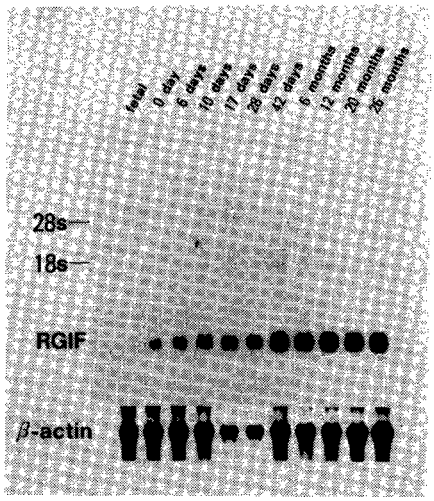


図2. ラット脳の発育過程におけるGIFの発現

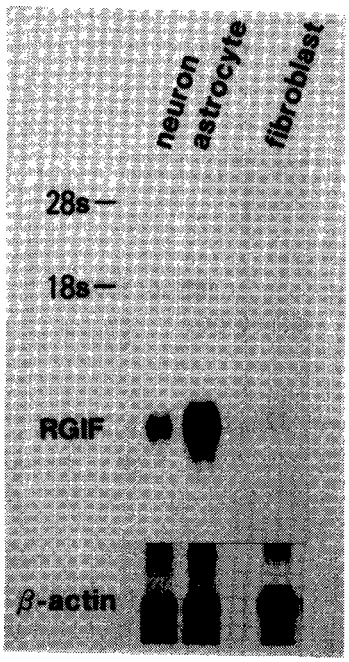


図3. ラット培養細胞系におけるGIFの発現

【文献】

1) Amemiya, Y. et al. (1988) Nature 336:89-90.
2) Hamada, H. et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:6465-6469.
3) Karin, M. et al. (1982) Nature 299:797-802.
4) Kobayashi, H. et al. (1990) J. Mol. Neurosci. 2:29-34.
5) Mann, D.M.A. et al. (1988) Neuropathol. Appl. Neurol. 14, 177-195.
6) Saiki, R.K. et al. (1985) Science 230:1350-1354.
7) Tsuji, S. et al. in preparation.
8) Uchida, Y. et al. (1988) Biochem. Biophs. Res. Commun., 150: 1263-1267.
9) Uchida, Y. et al. (1989) Brain Res. 481: 190-193.
10) Uchida, Y. et al. (1991) Neuron 7:337-347.

113 ヒト神経成長抑制因子のｃＤＮＡクローン化とその発現

辻　省次[1]，小林　央[2]，宮武　正[2]，内田　洋子[3]，井原　康夫[4]
（1．新潟大学脳研究所神経内科，2．東京医科歯科大学神経内科，
3．東京都老人研・臨床病理，4．東京大学医学部脳研病理）

〔要約〕

アルツハイマー病脳において神経成長抑制因子(growth inhibitory factor, 以下GIF)の発現が低下することが知られているが，アルツハイマー病においてこのGIFの発現が低下するメカニズムを明らかにすることを目的として，まずヒトGIFのcDNAのクローン化を行った．得られたcDNAは全長396塩基対で，poly A tail，polyadenylation signalを有しており，唯一のopen reading frameを認め，68アミノ酸からなるタンパクをコードすることが示された．塩基配列の解析からメタロチオネインと高い相同性を有することが示された．大腸菌において発現したタンパクが確かにgrowth inhibitory activityを持つことがbioassayにより確認された．ノーザン解析から，GIF mRNAは中枢神経系に特異的に発現していることが示され，さらにアルツハイマー病においてGIF mRNAの発現が低下しており，transcriptionのレベルでGIFの発現が低下していることが示された．

【目的】内田らによりアルツハイマー病脳抽出液の中には見かけ上神経成長因子活性が高いが，実はこれは正常脳に多く存在する神経成長抑制因子(growth inhibitory factor, 以下GIF)がアルツハイマー病脳においてその発現が低下していることが示されている[1-3]．そこで，アルツハイマー病脳においてこのGIFの発現が低下するメカニズムを明らかにすることがアルツハイマー病の病態生理のメカニズムを解明する上で重要であると考え，その第一歩としてヒトGIF cDNAのクローン化を行い，GIF発現のtissue distributionを明らかにし，さらにアルツハイマー病脳におけるGIF mRNAの発現の変化を検討した．

【方法】

1．ヒトGIF cDNAのクローン化

アミノ酸配列からGIFがメタロチオネインと高い相同性を示すことが判明していたので，ヒトGIFに特徴的な配列をアミノ末端側と，カルボキシ末端側から選んだ上で，メタロチオネインのcodon usage frequencyを考慮してユニークなoligonucleotide primerを作成した．このprimerを用いて，ヒト脳cDNA libraryから調製したtotal DNAをtemplateとしてpolymerase chain reaction (PCR)を行い，PCR産物をサブクローン化し塩基配列の解析を行い，ヒトGIFをコードするcDNAであるかどうかの確認を行ったうえで，このcDNAをプローブとしてヒト脳cDNA library[4]のスクリーニングを行った．

2．塩基配列の解析

dideoxynucleotide chain terminator methodにより塩基配列の解析を行った．

3．ヒトGIF cDNAの発現

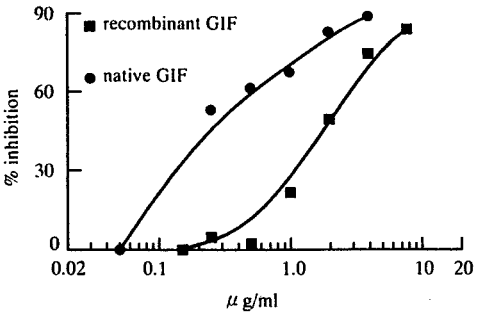
GIF cDNAの5'および3'非翻訳領域の一部を改変し，発現ベクターpKK223-2の*Nco*I，*Hind*III siteに組み込み，1mM IPTG存在化にGIF合成を行い，既報の方法に従い，GIFの精製を行った上でラット脳初代培養系を用いてgrowth inhibitory activityの測定を行った．

4．ノーザン解析

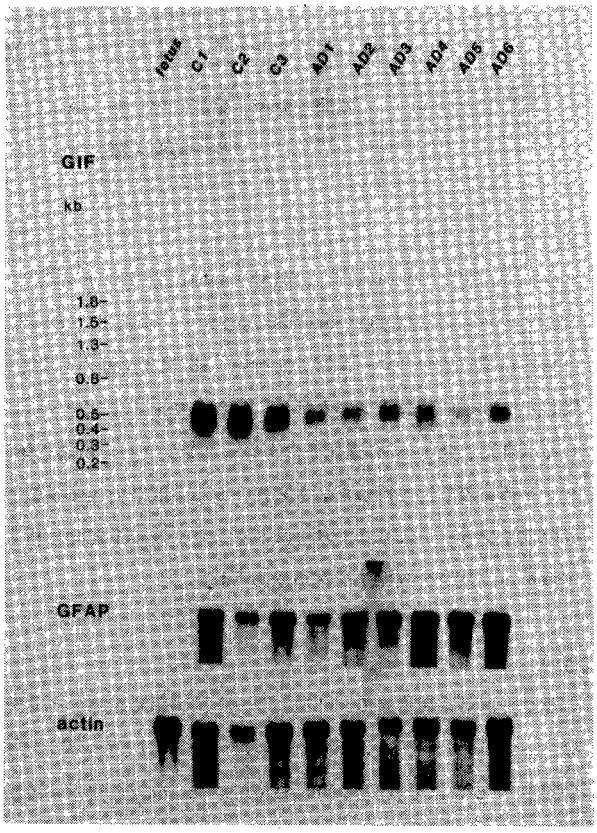
ヒト剖検脳よりChirgwinらの方法によりtotal RNAを抽出し20 μgのtotal RNAを2.2Mのformaldehydeを含む1.2%アガロースゲルにて電気泳動し，ニトロセルロース膜に転写後ヒトGIF cDNA 3'非翻訳領域（PCRにて調製）をプローブとしてhybridizationを行った．

【結果及び考察】

得られたcDNAは全長396塩基対で，poly A tail，polyadenylation signalを有しており，唯一のopen reading frameを認め，68アミノ酸からなるタンパクをコードすることが示された．塩基配列からメタロチオネインと高い相同性を有し，MTIIと比較して塩基配列で54%のidentity，アミノ酸配列で63%のidentityを示し，アミノ末端およびカルボキシ末端の近傍にそれぞれ3塩基，



図－1　大腸菌で発現したGIF活性.



図－2　正常脳およびアルツハイマー病脳のNorthern解析

１８塩基の挿入が認められた．さらに興味あることに，システインの含量が29mol%と高く，メタロチオネインと比較してすべてのシステインが保存されており，システインの近傍にリジンが多く存在するなどメタロチオネインとしての基本構造を有していることが示され，メタロチオネインと密接な関連のあるタンパクであることが示唆された[5-9]．大腸菌において発現したタンパクが確かにgrowth inhibitory activityを持つことがbioassayにより確認された（図－１）．ノーザン解析から，GIF mRNAは中枢神経系に特異的に発現していることが示され，さらにアルツハイマー病においてGIF mRNAの発現が低下しており，transcriptionのレベルで　GIFの発現が低下していることが示された（図－２）．

以上の結果より，ヒトGIFは中枢に特異的に発現しており，構造上メタロチオネインと極めて類似の構造を有する新たなタンパクであり，アルツハイマー病においてはmRNAのレベルで発現が低下することが示され，その生理学的機能の解明および転写調節のメカニズムの解明が重要と考えられた．

【文献】

1. Uchida, Y., Ihara, Y. and Tomonaga, M. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. **150**, 1263-1267
2. Uchida, Y. and Tomonaga, M. (1989) Brain Res. **481**, 190-193
3. Uchida, Y. Tokio, K., Titani, K., Ihara, Y. and Tomonaga, M. (1991) Neuron **7**, 337-347
4. Kobayashi, H., Sakimura, K., Kuwano, R., Sato, S., Ikuta, F., Takahashi, Y., Miyatake, T. and Tsuji, S. (1990) J. Mol. Neurosci. **2**, 29-34
5. Karin, M. and Richards, R.I. (1982) Nature **299**, 797-802
6. Schmidt, C.J., Jubier, M.F. and Hamer, D.H. (1985) J. Biol. Chem. **260**, 7731-7737
7. Heguy., A., West, A., Richards, R.I. and Karin, M. (1986) Mol. Cell. Biol. **6**, 2149-2157
8. Varshney, U., Jahroudi, N., Foster, R. and Gedamu, L. (1986) Mol. Cell. Biol. **6**, 26-37
9. Foster, R., Jahroudi, N., Varshney, U. and Gedamu, L. (1988) J. Biol. Chem. **263**, 11528-11535

114 ラット及びヒトHCNP前駆体遺伝子の構造

東藤 直樹、東條 伸一郎、植木 靖之、安喰 英夫、小鹿 幸生*
(住友製薬・研・遺伝子科学、名古屋市大・医・第2内科*)

〔要約〕
ラット脳中隔野組織 (rat medial septal nucleus) に対するアセチルコリン合成促進活性が見いだされた hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) の前駆体タンパク質をコードするラット海馬組織由来cDNA遺伝子のクローニングを行い、187アミノ酸よりなる21kDaのタンパク質をコードするcDNAクローンを単離した。HCNP前駆体タンパク質は、ウシ・フォスファチジルエタノールアミン結合タンパク質と高い相同性を示した。また、染色体DNA遺伝子のクローニングを行い、染色体DNAの遺伝子構造を明らかにするとともに、プロモーター領域の解析を行った。さらに、ラットHCNP前駆体遺伝子に対応するヒト型HCNP前駆体遺伝子を胎盤由来のcDNAライブラリーよりスクリーニングした。ラットHCNPに相応するヒト型アミノ酸配列にもラットHCNPと同様のアセチルコリン合成促進活性が認められた。

〔目的〕
ラット海馬組織由来のHCNPは、ラット脳中隔野組織のアセチルコリン合成を誘導する(1)。HCNPはacetyl-Ala-Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leuの11アミノ酸よりなる新規のペプチドであることが明らかにされている(2)。またHCNPは、fimbria-fornix lesion ratに対する脳室内へのカニュレーションによって、水迷路学習に対する有為な効果が認められる等（本大会発表）、新規のペプチド性神経疾患治療剤として期待されている。現在のところ、HCNPの中枢神経細胞に対する作用機序については明らかではない。また、HCNP前駆体タンパク質をコードする遺伝子の発現機構および前駆体タンパク質のプロセッシング機構も不明である。そこでわれわれは、ラットHCNP前駆体タンパク質をコードするcDNAより前駆体タンパク質のアミノ酸配列の推定を行うとともに、HCNP前駆体遺伝子の組織特異的発現性の検討、染色体DNAの遺伝子構造の解析、前駆体遺伝子の発現機構の解析を開始した。さらに、ラットHCNP前駆体タンパク質に対応するヒトHNCP前駆体タンパク質をコードする遺伝子の単離を行い、ラットHCNPに相応するヒト型のHCNPがラットHCNPと同様の生理活性を有するかの検討を開始した。

〔方法と結果〕
今回われわれは、HCNPの前駆体遺伝子の構造を明らかにする目的で、10-12日齢の幼若ラット海馬組織より調製されたcDNAライブラリーより、3種のウサギ抗HCNPポリクローナル抗体を用いてcDNA遺伝子の選別を試みた。何れのポリクローナル抗体とも反応性を示す3種のクローンが単離され、塩基配列の決定の結果、何れのクローンもHCNPのアミノ酸配列と一致する open reading frame (ORF) を有することが明らかとなった。しかしながら、これらのクローンにはHCNP前駆体遺伝子の翻訳開始コドンに対応する塩基配列は含まれていなかった。そこで、上記クローンcDNAのうち、R4 cDNAをプローブとして、再度幼若ラット海馬cDNAライブラリーをスクリーニングし、翻訳開始コドンと推定されるATG配列より約25bp上流域を含むクローンA0-10-1を選別した。このクロー

ンcDNAには、21kDa(187aa)のタンパク質をコードし得るORFが存在し、HCNPに相当する領域は ORFのN末端に位置することが明らかとなった。データベース検索の結果、ORFはウシ・フォスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 (NBRF-PIR database accession number S00056) と極めて高い相同性 (84.4%) を示した。ラットHCNP前駆体遺伝子の各種末梢組織における発現を検討した結果、検討した何れの組織においても不偏的な発現が認められた。特に、skeletal muscle、pancreas、testisにおいて顕著な発現が認められた。また、前駆体遺伝子はラット脳内の各部位においても不偏的に発現し、その発現量に差は認められなかった。

次に、HCNP前駆体タンパク質の染色体遺伝子の構造及びプロモーター領域の解析を行うため、cDNAをプローブとしてラット染色体DNAライブラリーより目的のクローンの選別を行った。その結果、cDNAに対応する染色体DNAクローン RL1-1が選別され、サザンブロッティングによってその遺伝子構造が明らかにされた。HCNP前駆体タンパク質の染色体遺伝子は、少なくとも4つのエクソン、3つのイントロンから構築され、5.7kbのDNA断片内にマッピングされた。さらに、翻訳開始コドンを含む5'上流域のDNA断片を用いて S1マッピングを行った結果、翻訳開始コドンの上流45bp付近で転写が開始されることが明らかとなった。また、この転写開始点の上流にはTATA配列は見いだせなかったものの、25bp上流にはAP-1結合領域、さらに、75bp上流にはCCAAT box配列が認められた。

ラットHCNP前駆体遺伝子に対応するヒト型cDNA遺伝子を単離するため、ラットcDNAをプローブとしてヒト胎盤由来cDNAライブラリーより目的のクローンを選別した。その結果、187aaからなる ORFを有するクローン pl-3が単離され、推定されるアミノ酸配列より、ヒト型タンパク質は、ラット型HCNP前駆体タンパク質とウシ・フォスファチジルエタノールアミン結合タンパク質と各々83.3%、94.1%の相同性を示すことが明らかとなった。

ラットHCNPのアミノ酸配列に対応する推定されたヒトのアミノ酸配列にもとづいてペプチドを合成し、ラット脳中隔野組織のアセチルコリン合成促進作用を検討したところ、ヒト型のペプチド (11アミノ酸) にもラットHCNPと同様の生理活性が見いだされた。

〔考察〕

フォスファチジルエタノールアミン結合タンパク質がHCNPの前駆体タンパク質と考えられる。HCNPは、このタンパク質のN末端に位置し、海馬組織に存在するプロセッシング酵素によって前駆体タンパク質より産生されると推察される。HCNPとフォスファチジルエタノールアミン結合タンパク質の神経細胞における関わりに興味がもたれる。

〔文献〕

1. Ojika,K. and Appel,S.H. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 2567-2571.

2. Ojika,K. et.al. (1992) Brain Res., 572, 164-171.

115 HIPPOCAMPAL CHOLINERGIC NEUROSTIMULATING PEPTIDE (HCNP)の生物学的活性領域

小鹿幸生*、林謙一郎*、植木靖之**、小菅なぎさ**、入江恒正**、山本正彦*
*名市大(医) 第2内科　**住友製薬(株) 研究所

〔要約〕10-12日齢ラット海馬より精製された HCNPは Ac-Ala-Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leu-OH 構造を有し、ラット培養中隔核 choline acetyltransferase (ChAT) を特異的に増加(誘導)して acetylcholine (Ach)の産生能を促進する。このペプチドの有する生物学的活性領域について検討した。HCNPの断片ペプチドによる生物学的活性、抗HCNP 抗血清による HCNP活性の中和と抗血清の抗原認識部位の検討、更にラット型とヒト型 HCNPの構造比較と各々の生物学的活性の比較などから、HCNPの生物学的活性領域はペプチドのC末端近傍に存在するものと考えられた。

【緒言】 ラット海馬組織から精製・構造決定された[1]~[3]HCNPは、ラット培養中隔核のChAT活性を特異的に増加(誘導)し、Ach産生を促進することが示唆された[4]。また、HCNPとアセチル基を除いた free-HCNP の作用を比較すると、いづれも同様の生物学的作用を示すが、free-HCNPはより低濃度で作用を発現することを報告した[5]~[8]。今回このペプチドのAch産生促進作用を示す活性領域について検討したので報告する。

【方法】 (1)ペプチドの合成は、Beckman社製 system 990 synthesizerを用い、Boc法で実施した。保護基の除去にはフッ化水素を用い、合成ペプチドの精製は YMC-SH-363-5 ODSカラムを用い HPLCで実施した。

(2)HCNPに対する抗体は、free-HCNPを glutaraldehyde 法で BSA に結合、Freund's complete adjuvant に emulsified 後家兎の皮下に注射して抗血清を作製した。

(3)抗体価の測定および抗体の抗原認識部位の検討には Xenobind EIA plate (Boxy Brown)を使用した。free-HCNP(1-11) およびその断片ペプチドを合成、これらペプチドを PBSで希釈し、10^{-5}M~10^{-9}Mの濃度系列を作り、その各々 50μlづつを plateに固相化した。1000倍希釈の 抗free-HCNP抗血清を加え4℃一昼夜反応後、抗ウサギ IgG ペルオキシダーゼ標識抗体を添加、H_2O_2 と O-phenylenediamine で発色させ1N H_2SO_4 にて反応を停止、490nm で吸光度を測定した。

(4)free-HCNP の生物学的活性を抗体により中和する目的で、free-HCNP 10μg/50μl PBS と抗 free-HCNP 抗血清または対照血清各々15μl と混合、4℃で一昼夜反応した。反応後この free-HCNPと血清混合液を培養液で希釈し free-HCNP の最後濃度が 20pg/ml medium および 80pg/ml mediumとなる様に培養系に添加した。また、抗血清のみを添加した群を対照とした。

(5)中隔核の組織培養および Ach 産生能の測定法は従来の方法に従い[9][10]、胎齢16日目のラット中隔核を顕鏡下に摘出、細片化し culture dishに植付け、0.7~1％のFBS を含む培養液で培養した。検討資料は培養開始と同時に添加し、培養6日目に [^{3}H]-cholineを添加して Achの産生能を測定した。Ach産生能は培養組織一片が30分の incubation 時間内に産生した[^{3}H]-Ach 量で表示した。

【結果および考察】 HCNPの各種断片ペプチド (2-7, 4-8, 6-11) を合成し 0, 20, 50, 100 300 pg/ml medium の濃度で中隔核培養系に添加したところ、6-11断片ペプチド添加群の培養組織 Ach産生量は、それぞれ 2.1±0.8, 3.5±0.5, 5.5±1.0, 5.7±0.9, 6.7±1.7 fmol/specimen/30min とペプチドの濃度に依存して Ach産生能の増加が認められた。しかし、他の断片ペプチドには明らかな促進作用は認められなかった (表1)。

表1：断片ペプチドの活性の有無

	(rat HCNP 断片)	(活性の有無)
2-7	H-Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-OH	無
4-8	H-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-NH_2	無
6-11	H-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leu-OH	有

図(1)に抗 free-HCNP 抗血清による free-HCNP の生物学的活性の中和実験の結果を示す。中隔核培養系に抗血清のみを添加した対照培養組織の Ach 産生能は 7.2±0.7 fmol/specimen/30minであった。free-HCNP に抗血清を添加した群では free-HCNP に対照血清を添加した群に比し培養組織の Ach 産

表(2)抗free-HCNP 抗血清の抗原認識 (EIA 法)

	free-HCNP と断片ペプチド (10^{-5}M)	吸光度 490 nm
1	1-11	0.192
2	2-11	0.186
3	3-11	0.182
4	4-11	0.182
5	5-11	0.169
6	2-10	0.077
7	3-9	0.000
8	2-7	0.000
9	3-7	0.000
10	4-7	0.000

生能が有意に (P<0.01) 抑制され、free-HCNP 20pg/ml mediumに抗血清を添加した群では、Ach産生能は対照群と同等で有った。このことは抗血清が free-HCNPの Ach産生促進活性を中和した事を示唆するものと考えられる。また、各種の HCNP断片ペプチドを合成し、この断片ペプチドと抗血清中に含まれる抗体との反応性を EIA 法で検討すると、HCNPのC末端近傍の Proと Leuの両者を含むペプチドとは反応を示したが、含まないペプチドとは明らかな反応を示さなかったことから、抗血清中に含まれる抗体はHCNPのC末端近傍を主に認識しているものと考えられる(表2)。

ラット海馬から精製された HCNPのアミノ酸配列から HCNPをコードするcDNAがラット海馬およびヒト胎盤からクローニングされ本誌に発表される予定である。このヒトcDNAの塩基配列から予測されるヒト型 HCNP のアミノ酸配列を図2に示す。ヒト型 HCNPを合成しラット中隔核培養系に添加したところ、ヒト型 HCNPもAch産生能を濃度依存生に増加させた(図3)。ラット型およびヒト型 HCNP の構造を比較するとHCNPのC末端近傍のアミノ酸配列は種を越え保存されており、両型のHCNPがラット中隔核のコリン作動性神経に類似した作用を示したことは、この保存された領域が活性領域として重要な働きを演じていると考えられる。

ラット型 HCNP : Ac-Ala-Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leu-OH
ヒ　ト型 HCNP :　Pro-Val-Asp-Leu-Ser-Lys-Trp-Ser-Gly-Pro-Leu-OH

図2 : ラット型およびヒト型 HCNP の構造比較

以上 HCNP(6-11)断片ペプチドが生物学的活性を示し、HCNPのC末端近傍を主に認識する抗体がHCNPの生物学的活性を中和したこと、更にラット型とヒト型の HCNPには種を越え保存されたアミノ酸配列がC末端近傍に有り、両型のペプチドが生物学的活性を示したことから、HCNP の活性領域はペプチドのC末端近傍に限局している可能性が示唆された。今後更に小さな HCNP断片ペプチドを用い、最小アミノ酸配列を明らかにしたい。

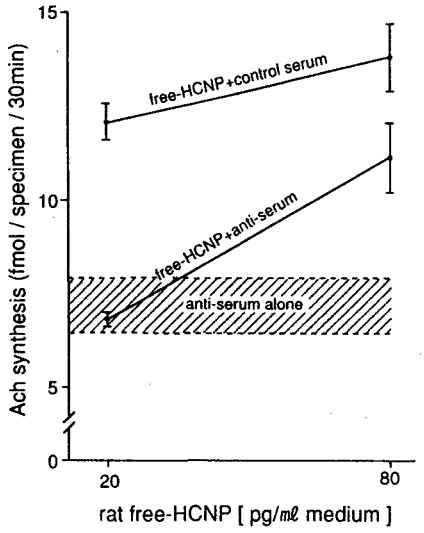


図1 : 抗血清によるHCNP活性の中和

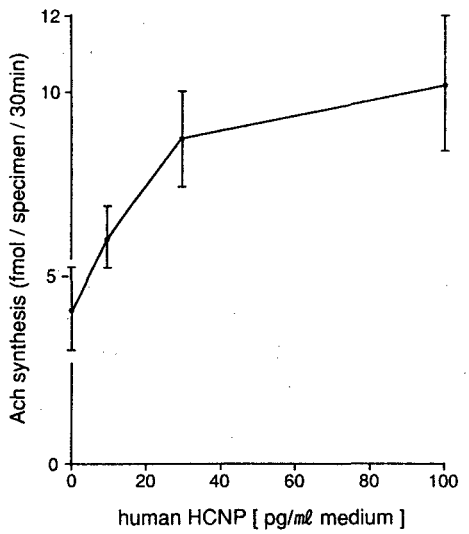


図3 : ヒト型HCNPのラット培養中隔核Ach産生促進

[文献]

1.小鹿幸生 他、神経化学、28:374-375, 1989. 2.小鹿幸生 他、神経化学、29:180-181,1990. 3.Ojika,K. et al, Brain Research 572:164-171, 1992. 4.小鹿幸生 他、神経化学、30:92-93, 1991. 5.Ojika,K. et al, Proc.Natl.Acad. Sci.USA. 81:2567-2571, 1984.

116 Pygmyマウス(*pg*)を用いての脳発育に及ぼすインシュリン様成長因子－1の作用機構に関する研究

杉崎哲朗、山田　孝、*佐藤　勇、野口鉄也（東邦大・医・第二生理、*総研）

［要　約］

脳発育におよぼす成長ホルモン(GH)の二次ホルモンとしてのインシュリン様成長因子-1 (IGF-1) の作用機構について明かにする目的で、血中GHおよびIGF-1レベルが正常であるにもかかわらず、脳の発育異常（小頭症、ミエリン低形成）と行動異常（自発活動量の減少とその日内変動の消失）を示す小人症マウス、Pygmyマウス(*pg*)を用いて脳内のIGF-1ならびにIGF-1受容体の構造を蛋白質レベルで検討した。その結果、（1）脳各部位（大脳、脳幹、小脳）、肝臓、腎臓におけるIGF-1濃度は、血中レベルと同様に*pg*マウスと正常マウス(+/?)に差はなかった。（2）*pg*マウス血中のIGF結合蛋白(BP) に異常は認められなかった。（3）脳各部位、肝臓、腎臓それぞれから調整したミクロソームへの[^{125}I] IGF-1 の特異的結合は、*pg*マウスと+/?マウスに差はなかった。（4）[^{125}I] IGF-1 のアフィニティー架橋実験の結果、いずれも130kDaの蛋白質が標識され、*pg*マウス脳各部位でのIGF-1受容体のα-サブユニット構造が正常であることが示唆された。以上の結果から、*pg*マウスではIGF-1受容体のβ-サブユニットあるいはβ-サブユニットのチロシン残基のリン酸化によってスタートする細胞内情報伝達機構に異常のあることが考えられた。

［目　的］

GHが脳の発育とその高次神経機能の発現に重要な役割をしていることが明かにされてきた[1-6]。しかし、GHが血液－脳関門を通過しえない[7]ことから、GHの二次ホルモンであるIGF-1が脳の発育に直接関与していることが示唆されている。他方、IGF-1受容体はインスリン受容体およびいくつかの細胞増殖因子の受容体と同じように細胞にチロシンキナーゼ活性を持つ受容体であり、この活性がリガンドの情報伝達に必要であると考えられている。しかし、このチロシンキナーゼ活性が活性化された後の情報伝達機序についてはいまだ明かにされていない。われわれは、血中のGHならびにIGF-1が正常であるにもかかわらず、小人症を呈し、かつ、小頭症で大脳にミエリン低形成をもつ突然変異マウスPygmy(*pg*)[8-12]を用いて、脳内IGF-1受容体について検索し、GHの脳発育に関与する二次ホルモンとしてのIGF-1の作用機序について検討を試みた。

［材料と方法］

(1)実験動物および材料：ジャクソン研究所より購入後、自家繁殖しているヘテロ接合体(C3H/HeNIcr-Wf-pg/+)の雌・雄マウスの交配から得られる*pg*マウスおよび同腹の正常マウス(+/?)を実験に用いた。40日齢のマウスから採血後、脳、肝臓、腎臓を摘出し、脳はさらに大脳、脳幹、小脳の3部位に分けた。(2)IGF-1の定量：酸・エタノール処理した血清[13]およびSaraらの方法[14]で各組織より抽出したIGF-1をNichols社製SM-C RIAキットを用いて測定した。(3)IGF結合蛋白(BP)の解析：血清中のIGFBPをZaphらの方法[15]にて検索した。(4)ミクロソームの調整：脳各部位は植村らの方法[16]に、肝臓、腎臓はHogeboomらの方法[17]に従いそれぞれのミクロソームを調整した。(5)[^{125}I] IGF-1 の結合実験：Saraらの方法[18]に従い、各ミクロソームへの[^{125}I] IGF-1 の特異的結合を調べた。(6)[^{125}I] IGF-1 のアフィニティー架橋実験：Shemerらの方法[19]に従い、IGF-1受容体のα-サブユニットを比較検討した。

［結　果］

IGF-1の定量：*pg*マウスの脳各部位、肝臓、腎臓、および、血清中のIGF-1値はいずれも+/?マウスと全く差は認められなかった(Table 1.)。

血清中のIGFBP：IGFBP-3, IGFBP-2, およびIGFBP-1いずれも*pg*マウスと+/?マウスとの間に全く差は認められなかった。

[^{125}I] IGF-1 の特異的結合：ミクロソームの回収は*pg*マウスと+/?マウスとほぼ同率で、脳各部位は9から13mg/g tissue、肝臓は32mg/g tissue、腎臓は23mg/g tissueであった。このミクロソームへの[^{125}I] IGF-1 の特異的結合は、いずれの組織においても*pg*マウスと+/?マウスとの間に有意な差は認められなかった (Table 2.)。

[^{125}I] IGF-1 のアフィニティー架橋実験：*pg*マウスと+/?マウスともに脳各部位、肝臓、腎臓いずれの組織でもα-サブユニットとされている130kDaの蛋白質が認められたが、その他の組織中IGFBP、とくに20kDa は+/?マウスには認められたが、*pg*マウスには存在しなかった。

［考　察］

すでに、われわれはIGF-1免疫反応物質が神経細胞に存在し、しかも血中GH依存性をもたないことを明かにし、IGF-1が神経細胞で合成され、既知の脳内ホルモンと同様に神経機能を調節している可能性を報告した[20]。今回のRIAによるIGF-1測定結果およびIGFBPの検索結果から、*pg*マウスならびに+/?マウスの脳各部位にIGF-1の存在が定量的に認められ、IGF-1がエンドクリン機構あるいはオートクリン／パラクリン機構、あるいはその両機構によって、脳の発育とそれに伴う高次神経機能の発現に関与していることが強く示唆された。一方、IGF-1受容体へのリガンドの特異的結合は、*pg*マウスの脳各部位で+/?マウスと全く差が認められず、しかし、[^{125}I] IGF-1 のアフィニティー架橋実験で130kDaのα-サブユニットには差が認められなかったが、その他の組織中 IGFBP に異常が示唆されている。このことから、*pg*マウスの脳各部位のIGF-1受容体α-サブユニット構造には異常の存在する可能性は考えにくいが、*pg*マウスの遺伝的欠損が受容体β-サブユニットあるいはその他のIGFBPによる細胞内情報伝達系にあることが示唆された。現在、IGF-1受容体のリン酸化実験、IGF-1受容体のチロシンキナーゼ活性の測定を行なってIGF-1受容体β-サブユニットについて検索をすすめており、あわせて、IGF-1受容体のリン酸化に伴い、この受容体と結合し、それ自身もリン酸化されると考えられるいくつかの細胞内機能性蛋白についても検討中である。

［文　献］

(1)Noguchi, T., et.al. (1982) J. Neruochem. 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. (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)杉崎哲朗、野口鉄也 (1991) 神経化学 30, 410-411. (13)Daughaday, W.H., et.al. (1980) J. Clin. Endocrinol. Metab. 51, 781-788. (14)Sara, V.R., et.al. (1982) Acta Physiol. Scand. 115, 467-470. (15)Zapf, J., et.al. (1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3813-3817. (16)植村慶一、他 (1963) 神経進歩 7, 763-771. (17)Hogeboom, G.H., et.al. (1948) J. Biol. Chem. 172, 619-635. (18)Sara, V.R., et.al. (1983) J. Clin. Invest. 721, 1084-1094. (19)Shemer, J., et.al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 7693-7699. (20)Noguchi, T., et.al. (1987) Neuroendocrinol. 46, 277-282.

Table 1. IGF-1 concentration in various tissues of 40-day-old pygmy mouse.

Genotype	Cerebrum (ng/g wet-wt)	Brain stem (ng/g wet-wt)	Cerebellum (ng/g wet-wt)	Liver (ng/g wet-wt)	Kidney (ng/g wet-wt)	Serum (ng/ml)
+/? (n=6)	18.4 ± 1.1	11.1 ± 1.8	7.44 ± 1.96	147.5 ± 22.7	123.5 ± 16.6	307.8 ± 64.2
pg/pg (n=6)	19.7 ± 1.1 (107%)	11.8 ± 0.4 (107%)	6.81 ± 1.15 (91.5%)	129.7 ± 36.1 (87.9%)	138.5 ± 14.7 (112%)	259.7 ± 68.0 (84.4%)

Table 2. Specific binding of ^{125}I-labeled IGF-1 to microsomes prepared from various tissues of 40-day-old pygmy mouse.

Genotype	%: compared to those of the respective normal controles				
	Cerebrum	Brain satem	Cerebellum	Liver	Kidney
+/?	100	100	100	100	100
pg/pg	90	95	101	107	129

117 ラット凍結損傷脳における神経栄養活性

佐藤好威、蓮井　武、木村喜代史
（日本新薬（株）生物研究所）

〔要約〕昨年度の本大会で、大脳皮質の凍結損傷部位およびその近傍の組織可溶性画分中に培養神経細胞の生存・維持に関わる物質が一過性に誘導されることを報告した。本年は、凍結損傷により誘導される神経栄養活性物質の性質の検討と分離・同定を試みた。可溶性画分中に誘導された栄養活性物質は、非透析性で、熱処理や trypsin 分解によって失活することからタンパク質性の物質であろうと推定された。DE-52 による活性物質の溶出パターンは、少なくとも三種類の栄養因子が可溶性画分に含まれていることを示した。Peak I の栄養活性はタンパク濃度に依存したが、Peak II の活性は 200 倍希釈付近に最大活性をもつベル状の titration curve を描き、両 Peak 中の因子の神経細胞に対する作用機序の相異が示唆される。Pass through 画分の活性物質の分子量は、Superose 12 による溶出位置から、13KDa 前後と推定された。また抗 bFGF 抗体による可溶性画分中の栄養活性の中和反応は、著明な活性の低下をもたらした。

以上の結果より、凍結損傷部位およびその近傍の組織に誘導される神経栄養活性物質は、少なくとも三種類あり、そのうちの一つは、bFGF あるいはその構造類似体であろうと推定された。

【緒言】近年、脳組織の一部吸引除去（3）や中大脳動脈閉塞（5）などによる脳損傷が、その損傷部位近傍に神経栄養因子の誘導・集積をもたらすことが報じられてきている。我々も、血管原性脳浮腫を伴う外傷モデル作製法として良く知られている凍結損傷法を用いて、新しい栄養因子の探索を行って来た。昨年の大会で、凍結損傷部位およびその近傍の組織に神経栄養活性の一過性の増大があることを報告した（2）。今回はこの活性物質の性質の検討と分離同定を試みたので報告する。

【材料と方法】 脳の凍結損傷と可溶性画分の分画：脳の凍結損傷は、4 週齢の wistar 系雄ラットを用いて既報の方法で作製した(2)。可溶性画分は、栄養活性が一過性に増大する損傷12-16時間後に大脳皮質から注意深く摘出された損傷部位およびその近傍の組織を、DMEM中でホモジナイズ後、105,000 x g、60 分間遠心した上清画分より得た。栄養活性物質の部分精製：30-65% 飽和硫安によって分画された可溶性画分の沈澱を、少量の tris-phosphate 緩衝液（1mM $MgSO_4$ を含む 10 mM tris phosphate, pH 7.5 ）に懸濁し、同緩衝液にて一晩透析した。透析後、この懸濁液を上記緩衝液で予め平衡化した DE-52 陰イオン交換カラム（1.8 x 25 cm)より、NaClの直線的濃度勾配（0～0.75M)で溶出した。得られた栄養活性の高い画分をプールし、セントリコン 3 で濃縮した後、FPLC を用いて Superose 12 HR 10/10 によって上記緩衝液でゲルろ過した。可溶性画分の trypsin 処理と抗 a- 及び b-FGF 抗体による中和反応：透析後の可溶性画分（20 μg protein/ml）と trypsin (44.2 units/ml)を37°Cで反応させた後、aprotinin (30.3 μg /ml)を加えて反応を停止させることにより trypsin 処理可溶性画分を作製した。抗 a-及びb-FGF 抗体による栄養活性の中和は、透析後ろ過滅菌した可溶性画分と種々の濃度で DMEM に懸濁した抗体とを混合し、0°C、90分間インキュベートする事により行った。この反応液を抗体処理可溶性画分として用いた。神経栄養活性の測定：神経細胞の培養と神経栄養活性の評価は既報の方法で行った(2)。

【結果】 可溶性画分中の栄養活性物質の性質：可溶性画分中の神経栄養活性物質は，硫安分画や透析では、栄養活性になんの変化もなかったが、熱および trypsin 処理で完全に活性を失なった。

栄養活性物質の DE-52 カラムクロマトグラム：栄養活性は溶出緩衝液のみを培地に加えた時の神経細胞の生存数に対する各溶出画分を加えたときの生存細胞数の相対比として表してある(Fig.1)。活性は pass through 画分と塩濃度が 0.14M (Peak I)と 0.22M (Peak II) の画分に認められた。また図には示していないが Frac.43～45には、神経細胞の生存を著しく抑制する物質の存在も認められた。

Peak I と Peak II の titration：Peak I および II のそれぞれ Frac.53 と 59 の画分を用い、希釈による栄養活性の変化を検討した（Fig.2）。Peak I (Frac.53)では、20倍から200倍希釈にかけ活性は増大するが、より高倍希釈では低下した。一方、Peak II(Frac.59)では、100倍希釈まで高い活性を維持するが、150 倍希釈以上になると著明に活性が低下した。

Pass through 画分及び Peak II の活性物質の分子量の推定：Pass through 画分およびPeak II の濃縮液をSuperose 12 で別々にゲルろ過した。Pass through 画分では、分子量12～14KDa 付近に活性の高いピークが見られた。一方、Peak II 画分では分子量40～70KDa の画分にわずかながら活性が認められた。

栄養活性の抗 bFGF 抗体による中和反応：可溶性画分中の栄養活性の抗 a- 及び b-FGF 抗体による中和反応を試みた。表中（Table 1）Control は可溶性画分を加えず、抗体のみを培地に加えたときの生存細胞数の変化を示しているが、いずれの抗体を加えても著明な活性の低下は認められなかった。一方、可溶性画分のみを培地に加えると生存細胞数は増加するが、抗 bFGF 抗体によって予め中和した可溶性画分を加えたときには細胞数は著しく減少した。しかしながら、抗 aFGF 抗体によって処理された可溶性画分は栄養活性に著明な影響をもたらさなかった。

【考察】 凍結損傷12時間後付近で損傷部位およびその近傍の組織可溶性画分中に誘導（あるいは集積）される栄養活性物質は、熱に不安定なタンパク質性の物質であることが示された。これらの可溶性画分中の栄養活性物質は、DE-52 陰イオン交換カラムクロマトグラム上で三つの活性画分に分離した。この条件下（10mM tris-phosphate, pH 7.5）で陰イオン交換体に結合しなかった pass through 画分は、等電点 7.5 以上の塩基性タンパク質であると考えられた。更に、この pass through 画分に含まれる主な活性物質の分子量は、Superose 12 の溶出パターンから 12～14KDa と推定された。現在、熱に不安定な塩基性タンパク質で、分子量が 13KDa 前後の神経栄養因子として良く知られている物質は bFGF のみであり（4）、しかもこの因子は、神経細胞の損傷修復に関与していることも既に報じられている（1）。そこで、bFGF の抗体を用いて可溶性画分中の活性の中和反応を行ったところ、栄養活性が抗 bFGF 抗体によって著しく抑制され、且つその抑制率は可溶性画分の全活性中の80％以上であるという結果を得た。これらの結果は、凍結損傷部位およびその近傍の組織可溶性画分に見られる神経栄養活性物質の主要な一つが、bFGF あるいはその構造類似体であることを示唆している。
一方、陰イオン交換体に吸着し、塩濃度の増加に伴って溶出される二つの活性ピークについては、希釈による活性の変化を検討した。Peak I（Frac.53）は200培希釈付近で最大活性を持つベル状の titration curve を描いたが、Peak II（Frac. 59）では100倍希釈まで高い活性をもつが、より高倍希釈では著明な活性の低下を示すシグモイド状の濃度依存性を示した。これらの結果は、両画分中の活性物質の神経細胞に対する作用の相違を示唆する。Peak II のゲルろ過の結果は分子量 40～70KDa 付近の画分に僅かながら活性の存在を示していることから、この画分中の栄養活性物質は比較的高分子量のものであることが推察される。しかし、溶出後の活性の回収率が極めて悪く、ゲルろ過過程での失活も予想され、さらに精細な検討が必要と思われる。

【参考文献】

(1)Anderson,K.J., et al (1988) Brain Res.460,253-259
(2)筵井武、他 (1991) 神経化学 30, 456-457
(3)Nieto-Sampedro,M., et al (1982) Science 217,860-861
(4)日本組織学会編 (1984)細胞成長因子 朝倉書店
(5)山田和雄，他 (1991) 第16回日本脳卒中学会抄録集 p163

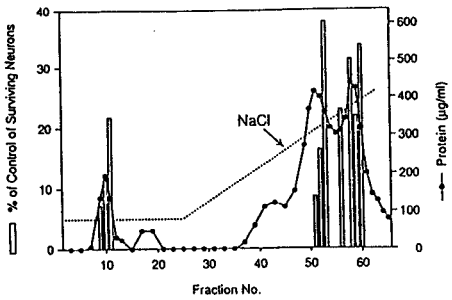


Fig. 1. Chromatogram of the neurotrophic activity in the soluble fraction of cerebral cortex from freeze-lesioned brain on DE-52 ion exchange column.

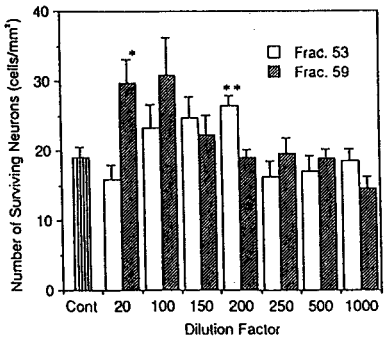


Fig. 2. Titration of neurotrophic activity in Frac.53 and Frac.59 of DE-52 chromatography.
Each fraction, Frac.53 or 59 on DE-52 coluan chromatogram, was serially diluted with the same buffer as the elutate. These diluted samlpes were added into each medium. The value is the mean ± S.D. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$,

Table 1. Effects of anti a- or b-FGF antibody on the neurotrophic activity in the soluble fraction of cerebral cortex from freeze-lesioned brain.

Antibody	Surviving Neurons (cells/mm²)	
	Control	Freeze-lesioned
no antibody	30.7 ± 2.1	53.3 ± 2.2
Anti-aFGF	29.6 ± 2.9	48.7 ± 3.9
Anti-bFGF	28.5 ± 2.4	33.2 ± 2.1*

The soluble fraction (20μg protein /ml)from freeze-lesioned cerebral cortex was incubated with anti a- or b-FGF antibody (10μg /ml) at 0°C for 90 min. These treated fractions were added into each medium. In control, the antibody alone was added. Each value is the mean ± S.D. * : $p < 0.01$ vs.no antibody

118 アンギオテンシンII脳室投与の視床下部モノアミンニューロンに及ぼす影響 －正常血圧並びに高血圧自然発症ラットの比較－

塚島彰、松本孝、平野誠、中原辰雄*、堤哲之、中村薫
中根博、内村英幸、藤島正敏**
国立肥前療養所、九州大・理・化学*、九州大・医・第二内科**

〔要約〕

20-24週齢高血圧自然発症ラット（SHR）及び対照のWistar Kyotoラット（WKY）を用い、各群の側脳室に生理食塩水または、アンギオテンシンII（AngII）100ngを投与し1時間後の視床下部神経核のノルアドレナリン(NE)関連物質の組織含量を検討した。AngII投与によりWKY群の視床下部室周囲核でMHPG、NEが減少、視交叉上核でNEが減少したがSHRでは変化が見られなかった。WKYに比較してSHRで視床下部室周囲核のMHPG，NEが減少、視交叉上核のNEが減少していた。これらの結果からWKYではAngIIによる血圧の上昇に室周囲核及び視交叉上核のNEニューロンが関与しているがSHRでは別のﾒｶﾆｽﾞﾑが働いていることが示唆された。

＜緒言＞　アンギオテンシンII（AngII）を脳室内に投与すると飲水行動や昇圧反応を引き起こすが、この作用は視床下部のカテコールアミンとりわけノルアドレナリン(NE)の関与が考えられている。高血圧自然発症ラットではAngIIによる昇圧反応が亢進しているが、この作用機序におけるNEニューロンの関与については十分分かっていない。今回、我々は、正常血圧ラットと高血圧自然発症ラットの視床下部におけるNEニューロンに対するAngIIの影響を検討した。

＜方法＞　20-24週齢の雄WKY、SHRを用いた。抱水クロラール麻酔下に右側脳室にカテーテルを挿入し、1日後股動脈にカテーテルを挿入した。その翌日、股動脈カテーテルで血圧をモニターし脳室カテーテルよりAngII 100ng又は生理食塩水を投与しAngII投与群の昇圧を確認した。AngII及び生理食塩水投与 1時間後に断頭し速やかに脳を取り出し、-80℃で凍結後、クライオスタット（-12℃）内で300μmの連続切片を作製した。各切片よりPaxinos & Watsonのアトラスに従って実体顕微鏡下に視床下部の各部位（視床下部前核、視交叉上核、室傍核、背内側核、室周囲核、後核）をマイクロナイフで切り出した[1]。NEとその代謝産物、3-methoxy-4-hydroxy phenylethylene glycol（MHPG）はHPLC-ECDにより定量し蛋白量当りのモノアミン含量を算出した。

＜結果及び考察＞　平均血圧は、WKYで101±1.5mmHg，SHRで148±3.7mmHgでSHRで有意に高値であった。AngII 投与による昇圧は平均血圧で、WKYで29±1.1mmHg，SHRで45±3.7mmHgであり、SHRの血圧上昇はWKYよりも有意に大きかった。WKYではAngII投与により室周囲核でMHPG、NEが減少、視交叉上核でNEが減少した。SHRではWKYに比較して室周囲核のNE、MHPGと視交叉上核のNEが有意に低下していた。尚視交叉上核のMHPGは検出感度以下で測定できなかった。視床下部の上述した部位以外ではNE、MHPGのレベルに有意差を認めなかった。またSHRではAngIIを投与しても各部位のNE、MHPGの変化は認められなかった。尚、各神経核のNE、MHPGの含量はWKY-生理食塩水投与群で室周囲核で各々27.44±1.55,27.68±2.01,視交叉上核で12.00±0.63,室傍核で29.02±7.22,8.19±0.90,前核で7.24±0.24,3.80±0.85,後核で10.17±1.28,5.20±0.22,背内側核で37.54±9.84,11.82±2.05pg/μg protein(mean±SEM)であった。AngIIの脳室内投与によりWKYの室周囲核のNE、MHPG及び視交叉上核のNEが減少していたことから、WKYではAngIIによる血圧の上昇にこれらの部位のNEニューロンが関与すると考えられる。正常血圧ラットでAngII脳内投与による血圧の上昇には視交叉上核を含む第三脳室前腹側部（AV3V）のNEニューロンが重要な役割を果し

ているといわれている[4][5]。我々の結果ではAV3Vのやや後方にある室周囲核におけるNEニューロンもAngⅡによる昇圧に重要であると考えられた。脳室にAngⅡを投与し視床下部前部でマイクロダイアリシスを行い同部のNEの放出が増加する、また視床下部全体のNEの代謝回転が上昇するとの報告があるが、今回の結果との相違はダイアリシスと組織レベル或は組織の切り出し方の違いによると考えられる[2][3]。SHRではWKYにAngⅡを投与してNE,MHPGレベルの変化が見られたのと同じ室周囲核及び視交叉上核でNE系に同様の変化が認められたのは興味深い。しかしながらSHRではAngⅡ投与によってNE、MHPGの変化は認められなかった。SHRでは、これらの神経核でのNEニューロンの活動がもともと低下しており、AngⅡによる血圧の上昇にNEニューロンは関与していない可能性がある。正常血圧のWKYとSHRではAngⅡの作用機序が異なっており、WKYではAngⅡによる血圧の上昇に視床下部室周囲核及び視交叉上核のNEニューロンが関与するが、SHRでは別の神経系が関与していることが示唆される。AngⅡによる血圧の上昇には、今回検討した部位よりさらに吻側のAV3VのNEニューロンが関与していると言われている[5]。またこの部位はSHRの血圧上昇に関与している可能性があるので現在検討中である。

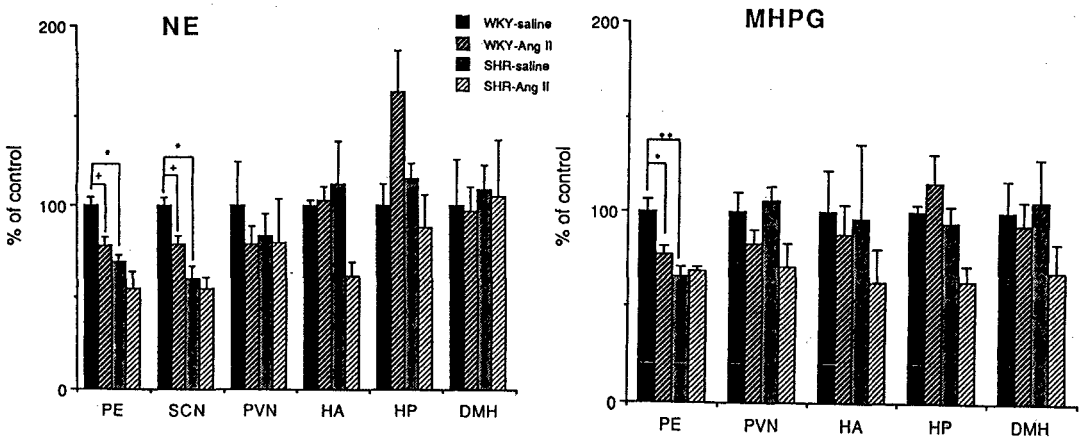


Fig.1 WKY及びSHRの視床下部神経核におけるNEとMHPGに及ぼすAngiotensinⅡの影響(n=5-8)
* p < 0.05, ** p < 0.01 (Scheffe's test), + p < 0.05 (Student's t-test)
略語 PE:室周囲核、SCN:視交叉上核、PVN:室傍核、HA:前核、HP:後核、DMH:背内側核

＜文献＞
(1)内村英幸 他.蛋白質核酸酵素 26:1192,1981
(2)Fatimunnisa,Q.et al Brain Res.563:137,1991
(3)Sumnurs,C.et al Am.J.Physiol 224:13.R244,1983
(4)Bellin,SI.et al Brain Res 403:105,1987
(5)Bellin,SI.et al Brain Res 456:9,1988

119 筋ジストロフィーマウス(mdx)の咬筋及び三叉神経終末内のbFGF様免疫反応

松田 正司、阪中 雅広
愛媛大学医学部第二解剖

〔要約〕生後28日の筋ジストロフィー（mdx）マウスの咬筋及び三叉神経終末内の塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）の局在を免疫組織化学的手法を用いて観察した。イムノブロットにより我々の抗bFGF血清は、分子量18kDaの精製bFGFと特異的に反応し、咬筋のホモジネート中においても分子量18kDaの蛋白を認識することが確認された。bFGF免疫反応を有する細胞を電子顕微鏡下で観察すると、幼若な再生筋細胞内で特に強い反応が認められ、筋細胞の成熟につれ反応が減弱することが判明した。又、変性線維は従来bFGF陽性であると報告されていたが、電子顕微鏡による観察では変性したミトコンドリアのクリステにDABの非特異的吸着が認められるのみで、免疫反応産物は同定されなかった。bFGF含有運動神経終末は、bFGF強陽性を示す初期の再生筋細胞とは神経筋接合部を形成せず、bFGF反応性をほとんど示さない成熟筋細胞とのみ神経筋接合部を形成した。以上のことより、再生初期の筋細胞は自ら産生したbFGFの影響下で分化、増殖し、その成熟に伴って、何らかの抑制機構が働くことによりbFGF産生能が低下するものと考えられた。また、本研究により、筋細胞の再生あるいは発生初期には、神経由来のbFGFは関与しないことが示唆された。

（目的）

mdxマウスは筋細胞膜の裏打ちタンパクであるジストロフィンが欠損する為筋変性を来すX染色体異常動物である（6, 9）同マウスの筋変性は比較的緩徐であり、4週齢の筋では変性像に混在する再生像も観察することが可能である。

塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）は、間葉系細胞及び神経細胞の増殖、分化を促進することが従来より知られているが、このbFGFは、mdxマウスの筋においても細胞外マトリックスあるいは筋細胞内で増加し、筋細胞変性の抑制、再生の促進に関与することが示唆されている。しかしながら、同マウス筋組織において、bFGFの細胞内局在部位についての報告はほとんど見られない。また最近我々は、咬筋を支配する三叉神経運動根にも強いbFGF免疫反応を検出しており（10）神経線維由来のbFGFがmdxマウスの筋再生に関与する可能性を示唆している。

本研究ではbFGFに対する特異抗体（10, 12）を用いて変性、再生筋細胞の混在するとされる（3）生後28日のmdx咬筋内筋線維、神経筋接合部において、bFGFの局在を微細構造レベルで検索した。

（材料と方法）

イムノブロット　精製されたbFGF、acidicFGF（aFGF）及びmdxマウス咬筋のホモジネートをSDS－ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し、イムノブロットを行った。免疫組織化学　生後28日のmdxマウスを麻酔下で潅流固定し、咬筋を厚さ60μmに薄切し、bFGF抗血清を用いて免疫染色を行った。呈色にはコバルトーグルコースオキシダーゼージアミノベンチジン増感法を（15）を用い、通常の電顕包埋法により処理した。コントロール切片には、牛bFGFにて吸収した抗血清を用いた。

（結果）

イムノブロット　今回用いたbFGFに対する抗血清は分子量18kDaのbFGFを認識したが、acidic FGFとは交叉反応を示さなかった。咬筋のホモジネート中でも分子量18kDaタンパクを認識した（Fig 1）。

免疫組織化学　光学顕微鏡で観察すると、bFGF陽性反応は小型細胞の中に認められ、大型の細胞には観察されなかった（Fig 2a）。この反応は吸収血清を用いたコントロール切片では消失した（Fig 2b）。

電子顕微鏡で観察すると強いbFGF陽性反応を示したものは、筋原線維を小量しか含まない幼若な筋細胞で、各々の細胞同士が癒合している像が認められた（Fig 3a）。反応は筋原線維以外の細胞質に認められたが、しばしば核の正染色質にも存在した（Fig 3a）。細胞が大きく筋原線維が豊富になるにつれ免疫反応は認め難くなるが、注意深く観察すると細胞周辺に小量の免疫反応産物が見られた（Fig 3b）。成熟筋細胞はもはや免疫反応を示さなかったが、しばしばbFGF陽性神経終末と神経筋接合部を形成した。変性筋線維は、電子顕微鏡で観察するとミトコンドリアのクリステに非特異なDAB沈着を有するのみでbFGF陰性であることが分かった。

（考察）

Andersonら（1991）(4)は変性筋線維にもbFGF陽性反応が認められるとしているが、今回の我々の実験結果では、変性線維にはbFGFの特異反応は認められなかった。おそらくAndersonらの光学顕微鏡のみを用いた研究ではbFGF特異反応とミトコンドリアのクリステ内の非特異的DAB沈着の区別がつかなかったものと思われる。また、Andersonらは小型のbFGF陽性細胞を一部変性細胞としているが、我々の研究では、変性筋細胞は正常細胞同様大型であり、Andersonは再生筋細胞を変性筋細胞と認識していた可能性が強い。

DiMarioらは、mdxマウスの筋の細胞外マトリックスにbFGF免疫反応がコントロールマウスと比較して、より強く検出されることを報告した。しかし、我々の研究では、反応は筋内膜の線維芽細胞にわずかにbFGF陽性構造が認められるのみで、大部分のbFGF反応は幼若筋細胞と神経終末に見られた。DiMarioらの用いた抗体は我々の抗体と異なり、細胞外マトリックスのヘパリン結合bFGF（5, 13, 14）を良く認識するものと考えられる。

再生筋細胞の大きさに逆比例してbFGF免疫反応の強さが変化し、しかも変性筋線維にはbFGF特異反応がみられないことから

筋の再生初期においてbFGFがAutoregulatory agentとして作用する可能性が、本形態的研究で示唆された。また三叉神経運動根は、bFGFを欠く成熟した筋細胞とは神経筋接合部を形成するが、強いbFGF免疫反応を示す再生初期の筋細胞とは神経筋接合部を形成しないことから、筋の再生初期過程には神経由来のbFGFは必須でないものと思われる。

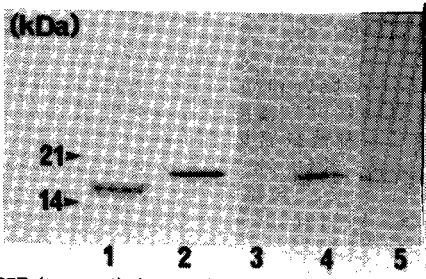


図1．aFGF（レーン1,3）とbFGF（レーン2,4）を電気泳動し、蛋白染色（1,2）と、bFGF抗血清によるイムノブロットを施行した（3,4）。この抗血清はbFGFのみを認識する（レーン3,4）。mdxマウス咬筋のホモジネートをイムノブロットで検索したところ、bFGFと同じ分子量（18kDa）の所にメインバンドが見られた（5）。

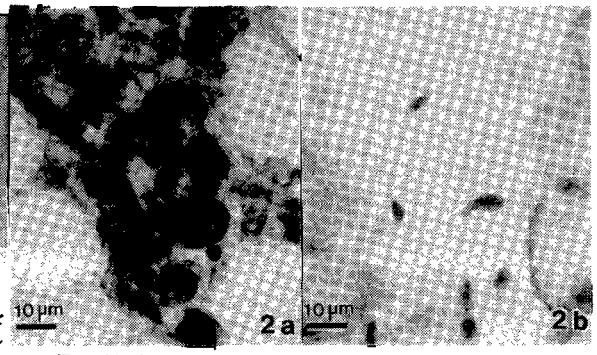


図2．(a) 小型筋細胞はbFGF陽性であるが、大型細胞には陽性反応が見られない。(b) 吸収血清を用いたコントロール切片では、bFGF免疫反応は消失する。



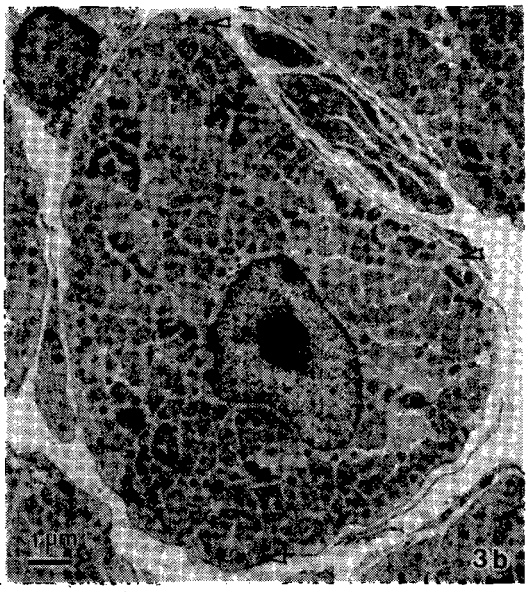


図3．(a) 電子顕微鏡で小数の筋原線維（矢印）を有する小型のbFGF陽性細胞を観察すると、免疫反応物が細胞質及び核内に観察される（矢頭）。(b) 筋細胞内のmyofilamentが増加し、成熟してゆくにつれて、bFGF免疫反応物は減少し、細胞体周辺にのみ小量観察されるようになる（矢頭）。

References

1. Allen RE, Dodson MV, Luiten LS (1984) Exp Cell Res 152: 154-160.
2. Allen RE, Boxhorn LK (1989) J Cell Physiol 138: 311-315.
3. Anderson JE, Ovalle WK, Bressler BH (1987) Anat Rec 219: 243-257.
4. Anderson JE, Liu L, Kardami E (1991) Dev Biol 147: 96-109.
5. Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, Svahn CM, Folkman J, Vlodavsky I (1989) Biochem 28: 1737-1743.
6. Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, Salvilanti G, DiMauro S, Sunkel LM, Hoffman EP, Rowland LP (1988) Cell 54: 447-452.
7. DiMario J, Buffinger N, Yamada S, Strohman RC (1989) Science 244: 688-690.
8. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L (1986) Cell Differ 19: 1-17.
9. Koenig M., Monaco AP, Kunkel LM. (1988) Cell 53: 219-228.
10. Matsuda S, Desaki J, Okumura N, Shiosaka S, Imaoka S, Sakanaka M (1992) Brain Res 577: 92-100.
11. Novikoff AB, Goldfischer S (1969) J Histochem Cytochem 17: 675-680.
12. Okumura N, TakimotoK, Okada M, Nakagawa H (1989) J Biochem 106: 904-909.
13. Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB (1991) Science 252: 1705-1707.
14. Ruoslahti E (1989) J Biol Chem 264: 13369-13372.
15. Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K (1987) J Histochem Cytochem 35: 207-212.

120 ドーパミン神経毒MPP⁺によるPC12細胞の細胞死の機序

板野泰弘，北村佳久，野村靖幸
（北大・薬・薬効）

【要約】
Parkinsonismを引き起こす1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine（MPTP）の活性本体である1-methyl-4-phenylpyridinium ion（MPP⁺）はPC12細胞の細胞死を引き起こすことが知られる。PC12細胞を交感神経細胞様に分化させる神経成長因子（NGF）およびdibutyryl cAMPおよび持続的な[Ca^{2+}]i上昇を引き起こす50 mM KCl処理によって、MPP⁺によるPC12細胞の細胞死が抑制されることが認められた。一方、細胞死の一形態であるapoptosis（programmed cell death）にはdeath gene、killer protein、endonucleaseの関与が示唆されているが、蛋白質合成阻害薬およびdeoxyribonuclease（DNase）阻害薬は共にMPP⁺によるPC12細胞の細胞死を抑制した。以上の結果から、MPP⁺によって引き起こされるPC12細胞の細胞死は、細胞死に直結すると考えられる蛋白質の合成と内在性DNaseの活性化を必要とするapoptosis様の細胞死であることが示唆された。

【緒言】
MPP⁺はParkinsonismを引き起こすことで知られるMPTPの活性本体であり、Parkinson病の特徴である黒質－線条体系ドーパミン（DA）ニューロンの選択的変性を引き起こす[1]。その機序として、脳内でMPTPより生じたMPP⁺がDAニューロンの終末よりDA取り込み機構によって取り込まれ、細胞内に多量に存在する神経メラニンと結合することによって蓄積し、最終的に細胞死を引き起こすと考えられているが詳細には解明されていない[1]。一方、PC12細胞はDAを生合成すること[2]、DA取り込み機構を有すること[3]からDAニューロンの有用なモデルと考えられる。そこでDAニューロンの変性機序の解明ならびに変性防御を目的に、PC12細胞におけるMPP⁺誘発細胞死のメカニズムとその防御について検討した。

【実験方法】
PC12D細胞を用い、24穴collagen-coated dishに細胞をまき2日後に実験に供した。血清を含まないDMEM培地で2回洗った後、MPP⁺などの薬物を含んだ同培地を加え、37 ℃、90% air-10% CO_2の条件下で24時間インキュベートした。培養上清および細胞内の乳酸脱水素酵素（LDH）活性を測定し、全活性に対する培養上清中の活性の程度を細胞死の指標とした。生存細胞率は3-(4,5-dimethyltiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide（MTT）が生細胞中のミトコンドリアに存在する酵素によって特定波長に吸収極大を持つformazanに変化する原理を用いて測定（MTT assay）した。

【結果】
培養条件下のPC12細胞から血清を除去すると24時間後には約20%が細胞死すること、この際にMPP⁺は濃度依存的に細胞死を引き起こし、1 mM MPP⁺では約30%が細胞死することが認められた（図1）。NGF、dibutyryl cAMP、50 mM KCl、蛋白質合成阻害薬cycloheximide（CHX）およびDNase阻害薬aurintricarboxylic acid（ATA）はいずれもMPP⁺によるPC12細胞の細胞死を抑制した（図2，3）。一方、phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）（0.1 μM）およびinterleukin-6（IL-6）（100 ng/ml）はMPP⁺による細胞死を抑制しなかった。

【考察】
一般に[Ca^{2+}]iの上昇は細胞死につながると考えられているが、高濃度K^+による持続的な[Ca^{2+}]i上昇によってMPP⁺誘発細胞死が抑制されたことは、小池らのCa^{2+}セットポイント仮説[4]を支持すると考えられる。またPC12細胞を分化させるNGFおよびdibutyryl cAMPは[Ca^{2+}]i上昇を引き起こさないことから、Ca^{2+}の関与しない経路で生存維持作用を示すと考えられる。細胞死は形態学的にapoptosisとnecrosisに分類される。MPP⁺による細胞死の機序としてミトコンドリアの電子伝達系の阻害によるATP生成障害説[5]が有力視されているが、その細胞死がapoptosisなのかnecrosisなのか判然としない。apoptosisによる細胞死は転写阻害薬や蛋白質合成阻害薬で抑制できることからdeath geneおよびkiller proteinの存在が示唆されている[6]。今回MPP⁺によるPC12細胞の細胞死がCHXで抑制されたことからMPP⁺がapoptosis様の細胞死を引き起こすことが示唆された。同様に、apoptosisによる細胞死にはDNAの断片化が伴い、DNase阻害薬（ATA,Zn^{2+}）が細胞死を抑制することが示されている[6]が、ATAがMPP⁺による細胞死を抑制したこともapoptosis様の細胞死であることを示唆する。MPP⁺によるDNAの断片化については現在検討中である。

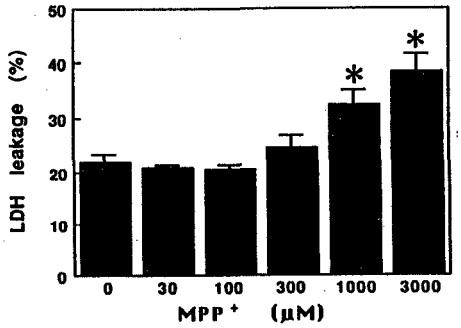


図１　ＰＣ１２細胞のＭＰＰ⁺による細胞死
*: p<0.05

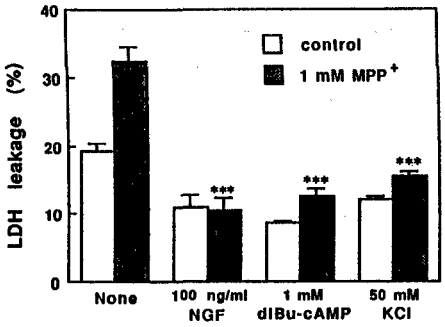


図２　ＭＰＰ⁺誘発細胞死に対する各種薬物の影響
***: p<0.001（ＭＰＰ⁺単独処理に対する危険率）

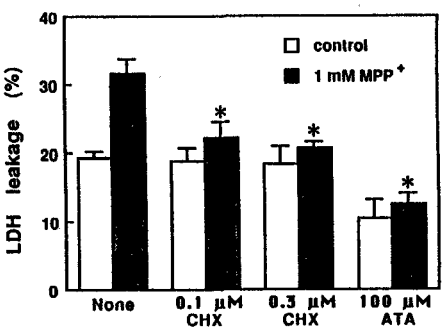


図３　ＭＰＰ⁺誘発細胞死に対する各種薬物の影響
***: p<0.001（ＭＰＰ⁺単独処理に対する危険率）
CHX: cycloheximide, ATA: aurintricarboxylic acid

参考文献］
1) Fuller, R.W. (1990) in current Aspects of the Neuroscience: I (N.N. Osborne, eds.), Macmillian Press, London, pp. 183-201
2) Hatanaka, H. (1981) Brain Res. 222, 225-233
3) Takahashi, T., Naoi, N., and Nagatsu, T. (1987) Neurochem. Int. 11, 89-93
4) Koike, T., and Tanaka, S. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci.USA 88, 3892-3896
5) Vyas, I., Heillila, R.E., and Nicklas, W.J. (1986) J. Neurochem. 46, 1501-1507
6) Martin, D.P., Schmidt, R.E., DiStefano, P.S., Lowry, O.H., Carter, J.G., and Johnson, E.M.Jr. (1988) J. Cell Biol. 106, 829-844
7) Mcconkey. D.J., Hartzell, P., Nicotera, P., and Orrenius, S. (1989) FASEB J. 3, 1843-1849

121 メタンフェタミン逆耐性ラットにおける[I]RTI 55の脳内分布の変化
－オートラジオグラフィー法を用いた検討－

沼知陽太郎、吉田寿美子、伊藤千裕、猪ノ坂孝雄、松岡洋夫、佐藤光源
（東北大学医学部精神医学教室）

〔要約〕 動物に覚醒アミンを反復投与したさいに観察される逆耐性現象は、覚醒剤精神病における症状再発脆弱性の研究モデルとされ、その基盤には、脳ドパミン（DA）系の持続性機能変化が想定されている。さきに我々は、MAP逆耐性ラットにアイソトープ標識メタンフェタミン（MAP）を投与し、線条体、側坐核、小脳で放射活性が有意に増加していることを観察し 、逆耐性現象に伴うDA系の持続性機能変化が、DA系神経終末部位におけるDA取り込み機構の変化に基づくものと推論した。今回我々は、定常状態の逆耐性形成動物における脳DA取り込み機構の変化の検索と、さらにその画像化をめざして、MAPの慢性投与動物に、アイソトープ標識コカイン誘導体である[I]RTI 55を投与して、ラジオイメージアナライザーを用いた画像解析を試みた。その結果、DA神経終末に富んだ脳部位だけでなく、小脳、橋でも、逆耐性形成群に有意な放射活性の増加がみとめられた。以上から、逆耐性形成時には、DA取り込み機構の変化のみならず、さらに広範な部位の細胞膜に異常が生じている可能性が示された。

［はじめに］

MAP やアンフェタミン等の覚醒アミンの長期乱用によって、精神分裂病の急性期にみられる幻覚妄想状態にきわめて類似した精神病像が出現し、覚醒アミンの長期断薬後にも、再発準備性が長期にわたって持続することが知られている。動物に覚醒アミンを反復投与したさいに観察される逆耐性現象は、こうした再発脆弱性の動物モデルとされている。逆耐性現象の機序として、線条体、側坐核における MAPへの反応性DA遊離の増加が報告されている 。MAPやアンフェタミンは、DA神経終末上のDA取り込み部位に作用し、細胞内に取り込まれてDAを放出するという交換拡散モデルが提唱されている 。さらに、MAP逆耐性動物ではコカイン再投与でも敏感に異常行動を起こし（交叉逆耐性）、それがシナプス間隙内DA過剰状態に起因することが知られている。コカインはDA取り込みを特異的に遮断してDA過剰状態を生ずるので、覚醒アミン長期投与で生じる脳DA系の持続性機能変化は、DA系神経終末部位におけるDA取り込み機構の変化によるものと我々は推論した。Clarkeらによって開発されたコカイン誘導体 のうち、RTI 55（3β-(4-iodophenyl)-tropane-2-carboxylic acid methyl ester）は、DA取り込み部位に対する親和性が最も強いとされており 、Bojaらは、ノルエピネフリン、セロトニン取り込み部位に対する親和性は少なく、DA取り込み部位に対する特異性が最も高いと推測している 。今回我々は、定常状態の MAP逆耐性形成ラットにおける脳DA取り込み機構の変化の検索と、さらにその画像化を目的として、MAPの慢性投与動物に、アイソトープ標識コカイン誘導体である[I]RTI 55を投与して、ラジオイメージアナライザーを用いた画像解析を試みた。その結果に若干の考察を加えて報告する。

［方法］

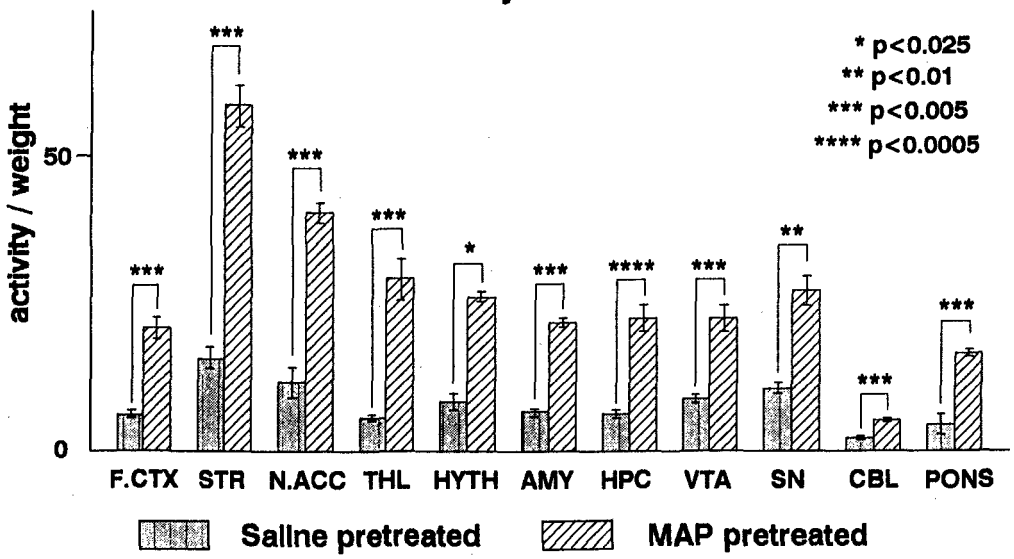
実験には７週令のSplague-Dawley系雄性ラット（190-200g）を用い、これを２群に分けて、１２時間の明暗周期下で飼育した。１群には MAP hydrochloride 4mg/kg を１日１回、明期に２１日間連続腹腔内投与した（MAP群，n=3）。もう１群には、正常対照群として相当量の生理食塩水を１日１回明期に２１日間連続腹腔内投与した（SALINE群，n=3）。MAP群では、初回および最終投与日に MAP投与後３０分における異常行動を CreeseとIversenによる常同行動評価法にもとづいて評価した 。７日間の断薬期間をおいて、[I]RTI-55（New England Nuclear 社）を、両群のラットに腹腔内投与した。投与後１８０分で断頭、脳を採取して、クリオスタットで厚さ15μm の冠状断連続切片を作成した。[I]RTI-55は、１頭当り 34.2μCi の割合で投与した。関心領域（前頭葉、線条体、側坐核、視床、視床下部、海馬、扁桃核、腹側被蓋野、黒質、小脳、橋）を含む切片について、ラジオイメージアナライザー（Fuji BAS-2000）を用いて画像解析し、さらに単位重量当りの放射活性も算出した。

［結果と考察］

CreeseとIversen [3]の常同行動評価法で評定した結果、投与開始日に比べ（平均スコア 2点）、２１日後には明らかに異常行動が増加し（平均スコア 4.5点）、逆耐性が獲得されていた。図１に示すように、MAP 群では、上記脳内部位の（単位重量当りの）放射活性は、SALINE群に比べて有意に増加していた。

逆耐性現象の基盤には、脳DA系の持続性機能変化が想定されている。さきに我々は、 MAP逆耐性ラットにアイソトープ標識MAP を投与し、線条体・側坐核・小脳で放射活性が有意に増加していることを報告し[7]、 逆耐性現象に伴うDA系の持続性機能変化が、DA系神経終末部位におけるDA取り込み機構の変化に基づくものと推論した。今回我々は、定常状態の逆耐性形成動物における脳DA取り込み機構の変化の検索と、さらにその画像化をめざして、 MAP逆耐性ラットに[^{125}I]RTI 55を投与して、ラジオイメージアナライザーを用いた画像解析を試みた。上述のように、コカインはDA取り込み部位に結合して、DA取り込みを遮断するものであり、RTI 55はDA取り込み部位への親和性、特異性が非常に高いリガンドである。しかし、今回観察されたRTI 55の脳内分布の変化は、線条体、側坐核等のDA神経終末や、黒質、腹側被蓋野等のDA神経起始核だけではなく、小脳、橋にも及んでいた。今回の実験ではRTI 55を投与してから１８０分後に断頭しており、この時間帯では、コカイン再投与時の異常行動はほぼ消失しているとされている。以上から、今回観察された変化は、 MAP逆耐性形成に伴うコカインのincorporation siteの持続性の変化を反映するものである可能性が示唆される。今後は逆耐性形成に伴って生じる長期持続性の神経細胞膜の変化について，DA再とりこみ部位を含む広範な脳部位の変化を明らかにすることが必要と思われる。

図1 Accumulation of [^{125} I] RTI 55 in rat brain regions steady state



［参考文献］

(1) Boja, J.W. et al. (1991) Eur. J. Pharmacol. 194, 133-134.

(2) Clarke, R.L. et al. (1973) J. Med. Chem. 16, 1260.

(3) Creese, I., Iversen, S.D. (1973) Brain Research 55, 369-382.

(4) Fischer, J.F., et al. (1979) J.Pharmacol.Exp.Ther. 208, 203-209.

(5) Innis, R. et al. (1991) Eur. J. Pharmacol. 200, 369-370.

(6) Kazahaya, Y., et al. (1989) Biol. Psychiatry 25, 903-912.

(7) 沼知陽太郎 他 (1990) 神経化学 29, 150-151.

122 メタンフェタミン、コカイン反復投与による^{3}H-WIN35,428のラット脳内集積の変化

吉田寿美子、沼知陽太郎、猪ノ坂孝雄、伊藤千裕、松岡洋夫、佐藤光源
（東北大学医学部精神医学教室）

〔要約〕 コカイン誘導体である H-WIN35,428を用いて、メタンフェタミン（ＭＡＰ）およびコカイン逆耐性形成ラットにおける脳内集積の変化を検討した。その結果、ＭＡＰ逆耐性動物では側坐核／嗅結節と小脳において、コカイン逆耐性動物では線条体と側坐核／嗅結節において、ＤＡＲの有意な減少を認めた。WIN35,428 はドパミン（ＤＡ）再取り込み部位を特異的に遮断することにより薬理作用を発揮するとされていることから、ＭＡＰとコカインによる逆耐性動物では、共通して側坐核／嗅結節のＤＡ再取り込み部位の持続的な減少が起こっているものと考察した。また、ＭＡＰとコカインによる逆耐性動物では、線条体と小脳にみられた変化が一致しなかったことから、ＭＡＰとコカインの反復投与による逆耐性形成時の脳内変化は同一ではないことを指摘した。

［はじめに］

ＭＡＰやアンフェタミン等の覚醒アミンの長期乱用でひきおこされる覚醒剤精神病は精神分裂病に酷似した臨床像と臨床経過を示し、断薬後も長期にわたって再発準備性が持続する。症状再発の引き金となるのは覚醒アミンやストレス等であり、臨床薬理学的成績および慢性覚醒アミン投与動物による実験成績では脳ドパミン系の過大反応が中心的な役割を演じるとされている。この過大反応の起こる神経機構について逆耐性現象を指標に活発な研究が行われているが、未だに明確にされていない。さきに我々はＭＡＰ逆耐性動物における脳内 ^{3}H-標識ＭＡＰ集積の変化を検討して著しい増加を報告し、逆耐性形成時にはその膜内とりこみ機構に持続的な障害が起こるものと推論した。行動薬理学的には逆耐性現象はＭＡＰだけでなくコカインでもみられ、両者には交差逆耐性がみられることが知られており、コカインが特異的にＤＡとりこみを遮断することから、コカインもしくはＤＡとりこみ機構の変化が起こっている可能性がある。そこで今回は、ＭＡＰ及びコカイン逆耐性形成ラットにおけるコカイン誘導体である H-WIN35,428（図１）の脳内集積の変化を検討した。

［方法と対象］

ＮＥＮ社製の H-WIN35,428を用いた。

1)ＭＡＰ及びコカイン逆耐性ラットの作成：７週令のＳＤ系雄性ラットを用い、これを３群に分けて、１２時間の明暗周期下で飼育した。ＭＡＰ群にはＭＡＰ４ mg/kg、コカイン群にはコカイン２０ mg/kg、対照のＳＡＬＩＮＥ群には同容量の生理食塩水を１日１回明期に２１日間連続腹腔内投与した。ＭＡＰ群及びコカイン群では、初回と投与２１日目に、ＭＡＰ投与後３０分における異常行動をCreeseとIversen の常同行動評価法にもとづいて評価した。

2) H-WIN35,428のラットにおける脳内集積の測定：７日間の断薬期間をおいて、３群のラットに H-WIN35,428(2x10 cpm/head) を腹腔内投与し、１５分後に断頭して脳を採取した。直視下で線条体、嗅結節／側坐核、小脳の３部位を採取し、各脳部位についてＬＳＣ法にて放射活性を測定し、differential absorption ratio (ＤＡＲ)を算出した。

［結果］

CreeseとIversen の常同行動評価法で評定した評価スコアは、ＭＡＰ群及びコカイン群では投与開始日の平均スコアが２±０、２±０であったのに対し、最終投与日における平均スコアは４±０、４±０と有意に増加しており、逆耐性現象が形成されていた。

ＤＡＲは、ＭＡＰ群ではＳＡＬＩＮＥ群に比べ、嗅結節／側坐核、小脳において有意の減少を認め、線条体においては両群間に差を認めなかった（図２）。コカイン群ではＳＡＬＩＮＥ群に比べて線条体と嗅結節／側坐核において有意の減少を認め、小脳においては両群間に差を認めなかった。（図３）

［考察］

コカイン誘導体のWIN35,428 は、6-OHDAを片側黒質に注入したラットでコカインと同様にＤＡ再とりこみ遮断作用に基づくrotational behavior を誘発し、尾状核のＰ２ fraction に対してコカインと同様にＤＡの合成と放出の

促進作用を示すこと[1]が報告されており、いずれの作用もコカインより強力であることされている。また、WIN35,428はコカインとその結合部位を共有し、後者ＤＡ再取り込み部位と密接に関連することが知られている[2]。今回の実験成績は、この H標識物質のＤＡＲが、ＭＡＰ群では嗅結節／側坐核と小脳で、コカイン群では線条体と嗅結節／側坐核で有意に減少することを示している。今回ＤＡＲを測定した時点は、コカイン再注射により再現する異常行動がピークに達する注射後１５分のものであり、この異常行動が再現した時点における従来のほぼ一致した成績は、線条体と側坐核における遊離ＤＡ量の過剰な増加である[3]。しかし、この遊離ＤＡの過剰増加と今回明らかにされたWIN35,428 のＤＡＲ減少との関連については、いまだ推論の域をでない。少なくともつぎの二つの可能性をめぐって今後の研究が必要であろう。① H-WIN35,428 がＤＡ再取り込み部位を標識するのであれば、異常行動の再現する時点で同部位が減少しており、逆耐性現象形成前には行動上無効であった量のコカインで容易に占拠されて遊離ＤＡ量の増加と異常行動の再現をきたす可能性がある。② H-WIN35,428 がコカインの膜内取り込み部位を共有し、ＤＡ再取り込み部位はその一部をなすのであれば、ＤＡ再取り込み部位以外の膜の変化が遊離ＤＡ過剰増加の神経機構として関与している可能性がある。ＭＡＰ群ではアルファノルアドレナリン受容体の他に最近ＤＡＤ 受容体の存在が明らかにされた小脳でＤＡＲが変化していたが、これが上記①、②のいずれによるものか不明である。

逆耐性現象が共通してみられたＭＡＰ、コカイン両群で共通して嗅結節／側坐核におけるＤＡＲ減少がみられたことは、同部位が線条体よりも逆耐性形成に密接に関係することを示しており、また、両群におけるＤＡＲ変化部位が一致しなかったことは逆耐性現象に伴って障害される脳部位が必ずしも一様でないことを示している。今回検討した脳部位以外の脳部位についての検索が必要である。

［参考文献］

1)Bagchi, S.P., et al. (1983) Neuropharmacology, 22, 1289－1295

2)Heikkila, R.E. et al. (1979) J. Pharmacol. Ther, 211, 189－194

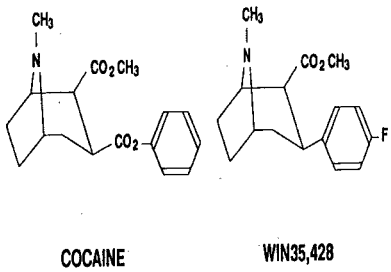
3)沼知陽太郎, 吉田寿美子, 他 (1990) 神経化学 29, 150-151

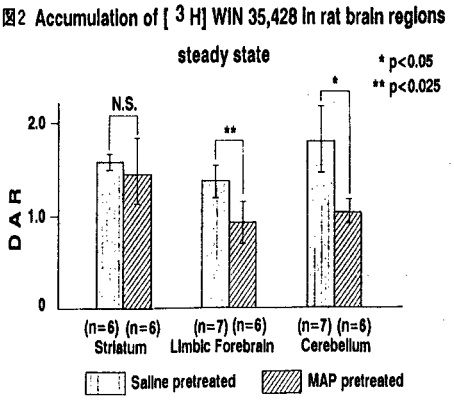
4)Pogun, S., et al. (1991) J. Pharmacol. 198, 203－205

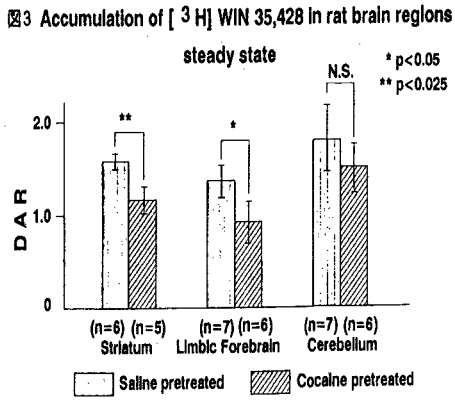
5)佐藤光源 (1988) 代謝 25, 63－71

6)Sato, M., et al. (1992) Schizoph. Bull. 18, 115-122

図1







123 メタンフェタミン逆耐性形成ラットに対するフェンサイクリジンの交差逆耐性現象；脳内アミノ酸ニューロン系の関与

米沢裕次、堤哲之、中村薫、本藤久雄、橋本喜次郎、松本孝、平野誠、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〕

メタンフェタミン(MAP)逆耐性現象を形成したラットに、フェンサイクリジン(PCP)を投与することにより、行動学的にはspontaneous activityとhead weaving に増強が見られ、MAPとPCPの間に交差逆耐性の存在することが示唆された。このMAP-PCP交差逆耐性現象について、脳内モノアミン及びアミノ酸の変化を脳部位別に検討した結果、MAP逆耐性現象を形成したラットでは、PCP 投与により前頭前野皮質及び前部帯状回皮質においてアスパラギン酸(Asp) 含量が有意に減少することが示された。以上の結果から、MAP-PCP交差逆耐性現象には、脳内Asp の変化が関与している可能性が考えられる。

〔目的〕

従来より分裂病の病態モデルとして、MAPによる逆耐性現象が注目され広く研究されており脳内ドーパミン(DA)系の変化が報告されている。今回我々は、MAP逆耐性現象を形成した動物にPCPを投与することで、分裂病の臨床像により近似したモデルが得られるのではないかと考え、このモデルについて行動薬理学的、神経化学的研究を行った。

〔方法〕

実験には Wistar 系雄性ラット(200-300g)を用いた。各ラットを注射60分前からアクリルケージに移し馴化させた後、MAP(5mg/kg) または生食を14日間腹腔内投与し、7日間の断薬後、PCP(7.5mg/kg)または生食を投与した。active counter を用いて自発運動量の変化を5分毎に60分間測定し、またラットの行動をビデオ録画して、常同行動についてNabeshimaら[1]の評価尺度を用いて行動分析を行った。そして60分間の行動観察後、既報に準じて[2][3]脳を部位別に切り出し、脳内モノアミンとその代謝産物、及びアミノ酸の測定を行った。

〔結果及び考察〕

行動学的には、MAP-PCP群ではsaline-PCP(SAL-PCP)群に比べ、10-15分、15-20分の時点でspontaneous activityが、また10-13分、20-23分の時点でhead weavingが有意に増強していた.(Fig.1.) このことから、MAPとPCPの間には交差逆耐性の存在することが示唆された。MAP-PCP交差逆耐性の存在については意見が分かれているが、今回の結果はNabeshimaら[4]やGreenbergら[5]の肯定的見解を支持するものと考えられる。脳内モノアミンとその代謝産物の変化については、SAL-SAL群に比べ、SAL-PCP群及びMAP-PCP群で 、前頭前野皮質、側坐核において、3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)の増加が見られたが、SAL-PCP群とMAP-PCP群との間では有意な差が認められなかった。MAP-PCP交差逆耐性現象の神経化学的背景には、DA系の変化の関与が予測されるが、今回の実験からはそれを支持する結果は得られなかった。これは、PCPの投与量や、投与から断頭までの時間の問題による可能性も考えれる。一方脳内アミノ酸の変化については、前頭前野皮質及び前部帯状回皮質において、SAL-PCP群に比べ、MAP-PCP群でAsp含量の有意な減少が見られた.(Fig.2) 我々は、既に別の研究でPCP単回投与による脳内アミノ酸への経時的影響を検討して、PCP投与後15,30分というより早い時点で、前部帯状回皮質においてAsp含量が有意に減少するという結果を得ている。その結果と今回の結果とを考慮すると、MAP逆耐性を形成したラットでは、PCP投与によるAsp含量の減少という所見がより著明に反映されて出現すると言える。MAP逆耐性現象も含む今回の動物モデルでは、Aspが何らかの重要な意義を持っているのかも知れない。MAPあるいはアンフェタミン慢性投与後の脳内アミノ酸への影響を見た報告はこれまでに余りされていないが、その中にはMAP逆耐性現象における脳内のGABAやAspの変化の関与を示唆するものもある.[6] 今回認められたAsp含量の変化が、ニューロン活動の変化を反映したものか否かについては解釈の難しいところであり、今後脳内透析法などの別な手技を用いた検討が必要であろう。

〔文献〕
1)Nabeshima,T. et al.(1987) Eur.J.Pharmacol.,135,23-33.
2)松本孝ら.(1990) 神経化学,29,220-221.
3)米澤裕次ら.(1991) 神経化学,30,500-501.
4)Nabeshima,T. et al.(1989) Res.Commun.Substances Abuse,10,62-76.
5)Greenberg,B.D. et al.(1985) Phrmacolo.Biochem.Behav.,23,99-105.
6)橋本恒一ら.(1985) 神経化学,24,103-105.

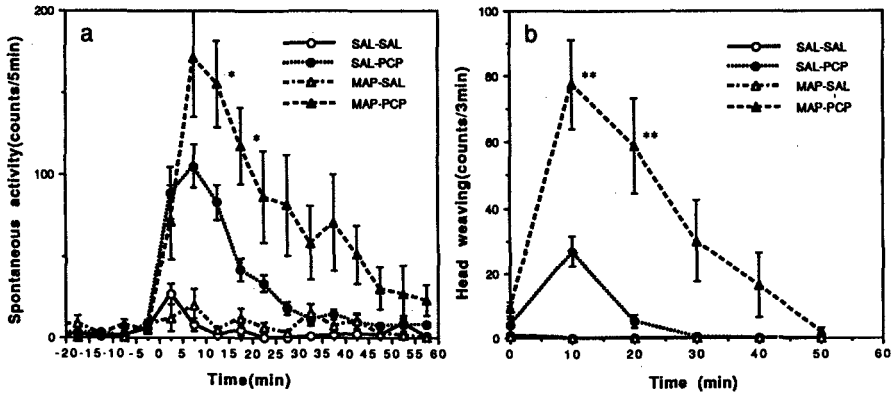


Fig. 1. Effect of PCP on the spontaneous activity(a) and head weaving(b) of the rat repeatedly treated with MAP. Each point represents mean ± S.E.M. of 6-8 rats.
*p<0.05, **p<0.01 vs SAL-PCP group by Student's t-test

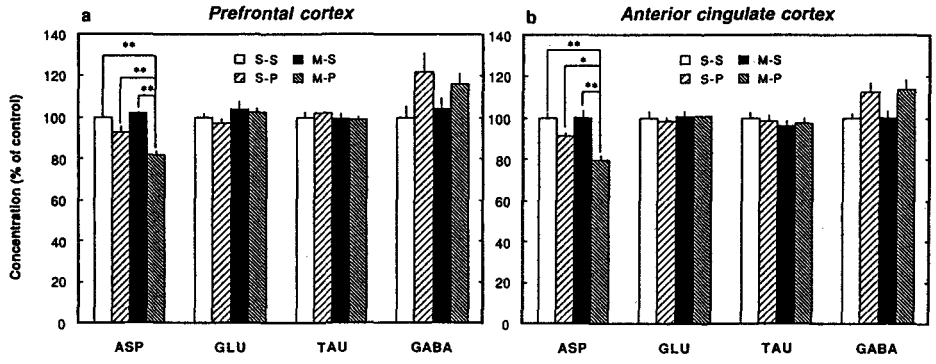


Fig. 2. Effect of PCP on the levels of 4 amino acids in the prefrontal cortex(a) and anterior cingulate cortex(b) of the rat repeatedly treated with MAP. Each bar represents mean ± S.E.M. of 6-8 rats
*p<0.05, **p<0.01 vs SAL-SAL or SAL-PCP group by Scheffe's test

124 脱長期増強へのアデノシン受容体の関与について

藤井聡、 脇坂 晟、 関野祐子*、 黒田洋一郎*、 伊藤憲一**、 宮川博義**、 加藤宏司**
杏林大学医学部・第2生化学、 東京都神経研・神経生化学*、 山形大学医学部・第2生理学**

〔要約〕
海馬シナプスでおこしたシナプスの伝達効率の増大（長期増強（long-term potentiation, ＬＴＰ））を、入力刺激でもとに戻す（脱長期増強）際のアデノシン受容体の関与を検討した。モルモット海馬スライスで、ＣＡ１ニューロンに 100Hz, 100発のテタヌス刺激を与えてＬＴＰを誘導した20分後に、1Hz,1000発の入力刺激（消去刺激）を与えるとＬＴＰをもとに戻すことができる。消去刺激を与える際にアデノシンA_1受容体アンタゴニスト、8-cyclopen-tyltheophylline (1 μM)を潅流液中に加えると、Population spike および Field EPSP の脱長期増強が抑制された。一方、消去刺激時にアデノシンA_2受容体アンタゴニスト、CP-66713 (10 μM) を与えた場合では、前者の脱長期増強が抑制され、後者は増大し、この結果、EPSP-population spike dissociation (E-S dissociation) の程度が拡大した。これらの結果より、入力刺激にともない海馬シナプス終末から放出されるATPの代謝産物であるアデノシンは、A_1受容体を介して脱長期増強を促進し、A_2受容体を介して脱長期増強を抑制すると結論した。

海馬は記憶との関連で、脳の可塑性の格好のモデルとして精力的に研究されているが、その注目される性質にＬＴＰが挙げられる。ＬＴＰは、海馬の興奮性入力線維束に短時間、高頻度刺激を与えると、その経路のシナプス伝達効率が著しく亢進しその状態が長期間持続する現象である[1]。ＬＴＰが人工液中に取り出した脳スライスにおいても誘導が可能である現在、ＬＴＰに関しては多くの研究がなされその実態を裏付ける知見が得られている。しかし、もしＬＴＰのみがシナプスの可塑性の主体であれば、海馬内のニューロンはＬＴＰによりシナプスの伝達効率は飽和してしまう。そこで、可塑性を維持するためにはＬＴＰをもとに戻す何等かの仕組みが必要と考えられる。このＬＴＰをもとに戻す現象（脱長期増強）に関する報告は少なく[2,3,4]、近年、筆者らはその詳細を検討し報告した[5]。モルモット海馬ＣＡ１ニューロンで、100 Hz, 100発のテタヌス刺激でおこしたＬＴＰに対する脱長期増強の効果は、与える消去刺激の発数(200, 500 ないし 1000発)、周波数(1, 2, 5 ないし 10 Hz)および消去刺激を与える時間(20, 100分後)に応じて変化し、テタヌス刺激 20 分後に 1 Hz, 1000 発の消去刺激を与えると、Field EPSP および Population spikeの変化分は 68.5 ± 35.2% ないし 80.1 ± 21.6% (mean ± S.D.) 減少した(n=6)。1 Hz, 1000発の消去刺激のみ与えた場合 (Control) は平均 4.3% ないし 7.1% の減少率であり(n=6)、脱長期増強はこれと比較すると有意に大きな変化であった。消去刺激が高い周波数、少ない刺激発数、あるいは100分経過後の場合では、ＬＴＰの消去率は有意に小さかった。脱長期増強は、消去刺激時にNMDA受容体の拮抗阻害剤、 2-amino-5-phosphonovalerate (APV, 50μM)を与えると阻止された。ＡＴＰおよびその代謝産物は刺激によりシナプス終末からシナプス間隙に放出され、その量は刺激頻度に依存する[6]。これらの分解産物であるアデノシンはシナプス前膜のA_1受容体を介して、神経伝達物質の放出を阻害しシナプス伝達を抑制する[7,8]。一方、アデノシンはA_2受容体を介してcyclic AMPを増加させシナプス伝達を増強している[9]。アデノシンのA_1およびA_2受容体への親和性は前者で高く後者で低いため、神経活動の程度に応じて放出されたアデノシンは、その濃度に応じてシナプス伝達に対すして異なった効果を現す可能性が示唆されている[12]。我々は、脱長期増強が消去刺激の周波数および発数に依存して変化しているため、この現象にアデノシン受容体が関与する可能性があると考え、海馬ＣＡ１ニューロンで脱長期増強へのアデノシンA_1およびA_2受容体アンタゴニストの効果を検討したので報告する。

［実験方法］
モルモット海馬スライス（厚さ500 μm）で、ＣＡ１錐体細胞への入力線維束であるSchaffer collateral を刺激し、ＣＡ１放線層より導出したField EPSPの初期の傾き(S-EPSP)および錐体細胞層より導出したPopulation spikeの振幅(A-PS)を計測し、その変化をシナプス伝達効率の変化とした。刺激ー応答曲線上(SRC)でPopulation spikeの振幅が最大値の40-60%になるよう刺激の強さを固定し、２０秒おきのテスト刺激を与え、少なくとも３０分間応答を観察した後、100Hz, 100発のテタヌス刺激を与えＬＴＰを誘導した20分後に消去刺激(1Hz, 200ないし1000発)を与えた。脱長期増強に対するアデノシン受容体アンタゴニストの作用を検討するために、消去刺激を与える5-7分前から消去刺激終了時まで、A_1受容体アンタゴニスト、8-cyclopentyltheophylline (8-CPT, 1 μM)およびA_2受容体アンタゴニスト、CP-66713[11](10 μM)を潅流した。

［実験結果と考察］
テタヌス刺激でＬＴＰが誘導され、２０分後のS-EPSPは平均 48.9% 、A-PSは平均 61.7% 増大した(n=79)。また、テタヌス刺激１００分後のS-EPSPおよびA-PSの増大は平均 42.3% および 56.9% で、この時点でもＬＴＰは保たれていた(n=10)。 図１は脱長期増強の１例で、テタヌス刺激２０分後に1 Hz, 1000発の消去刺激を与えると増大したS-EPSPおよびA-PSはコントロールレベルに戻り、脱長期増強がおこることがわかる。前述したように、この変化は消去刺激をのみ与えた場合よりも明らかに大きい変化で、長期抑圧（ＬＴＤ）とは明らかに異なる。
消去刺激時に8-CPTを潅流すると、テタヌス刺激で増大したS-EPSPおよびA-PSの変化は 9.0 ± 28.8% および 13.4 ± 25.7% (n=7, mean ± S.D.)で、標準溶液潅流時と比較すると有意(two-tailed Student's t-test, P<0.01)に小さく、脱長期増強が抑制された。図２はその１例である。8-CPT潅流下に消去刺激のみを与えたControl例(n=7)では、S-EPSPは平均32.2% 増大しA-PSは14.5% 減少した。

一方、消去刺激時に CP-66713 (10 μM)を潅流すると(n=8)、テタヌス刺激で増大した S-EPSPは 101.7 ± 12.5% 減少し、標準溶液潅流時と比較して消去が有意 (P<0.05) に増大したが、A-PSの減少率は 19.1 ± 21.7% に過ぎず標準溶液潅流時と比較して消去は有意 (P<0.01)に小さかった。図３にその１例を示す。CP-66713 潅流下でのControl例(n=8)では、S-EPSPは平均24.0%、A-PSは平均28.9% 増大した。

これらの結果は、アデノシンがA_1およびA_2受容体を介して脱長期増強の誘導に関与し、脱長期増強の程度を変化させている可能性を示す。消去刺激時にA_1アンタゴニストが存在すると脱長期増強が抑制されることから、アデノシンはA_1受容体を介して脱長期増強を増大させると考えられる。また、A_2受容体アンタゴニストの潅流下に消去刺激を与えるとEPSPの脱長期増強が増大し、かつE-S dissociationが拡大することから、脱長期増強においてA_2受容体は EPSP における消去を抑制しかつ E-S dissociation を縮小させる作用を持つと考えられる。現在、アデノシン受容体の脱長期増強に対する作用機序の詳細は不明であるが、脱長期増強が APV の潅流で阻害されることからグルタミン酸受容体、とくにNMDA受容体とこれらのアデノシン受容体との作用の関連が示唆される。

最近われわれは、海馬ＣＡ１ニューロンで、A_2受容体アンタゴニスト、CP-66713 (10 μM)のＬＴＰに対する効果を検討し、この存在下でEPSP のＬＴＰ誘導が阻害される一方、Population spike のＬＴＰは阻害されず、 E-S dissociation が拡大して 誘導すると報告した[12]。これらの実験結果から、神経活動の活発なシナプスでアデノシンが放出され、その濃度が上昇するとA_2受容体に作用して、ＬＴＰを増強しつつ脱長期増強を抑制する。一方、神経活動の不活発なシナプスでは低濃度に留まるため、A_1受容体に作用してＬＴＰを抑制しつつ脱長期増強を促進する可能性があると考えられた。神経活動に依存して増減するアデノシンが、これら親和性の異なる２種類の受容体の作用を介してシナプスの伝達効率を変え、ニューロン回路網の可塑性に深く関与していると結論した。

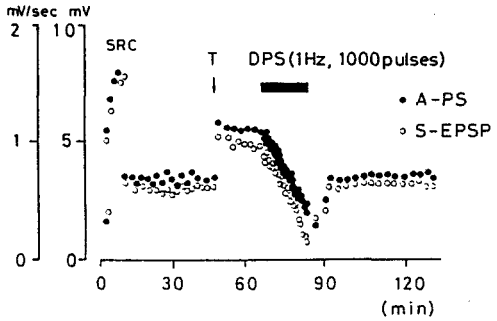


図１　脱長期増強の１例。テタヌス刺激（T，100 Hz，100発）により増大したPopulation spike の amplitude (A-PS)，Field EPSP の slope (S-EPSP) は、消去刺激（ＤＰＳ，１Hz，1000 発）でもとのレベルに戻っている。　ＳＲＣ：刺激ー応答曲線縦軸は各パラメーターの値、横軸は時間経過を表す。

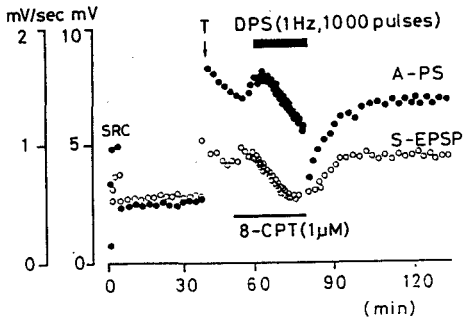


図２　脱長期増強におけるアデノシンA_1受容体アンタゴニス(8-CPT)の効果。

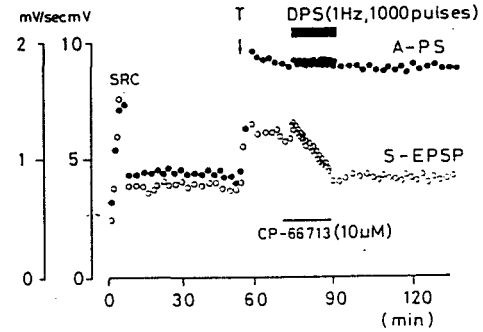


図３　脱長期増強におけるアデノシンA_2受容体アンタゴニスト(CP-66713)の効果。

REFERENCE

(1) Bliss, T.V.P. and Lømo, T. (1973) J. Physiol. 232, 331-356.
(2) Hesse, G.W. and Teyler, T.J. (1976) Nature 264, 562-564.
(3) Barrienuevo, G.W. et. al. (1980) Life Sci. 27, 2385-2391.
(4) Staubli, U. and Lynch, G. (1990) Brain Research 513, 413-425.
(5) Fujii.S. et. al. (1991) Brain Research 555, 112-122.
(6) White,T.D. (1978) J. Neurochem. 30, 329-336.
(7) Kuroda,Y. et. al. (1976) Brain Research 109, 196-201.
(8) Schubert, P. and Hitzdorf, U. (1979) Brain Research 172, 186-190.
(9) Kuroda, Y. In Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives (Daly, J., Phillis, J., Shimizu, M. and Ui, M. eds.) pp245-256, Raven Press., New York.
(10)Kuroda, Y. (1991) In Roles of Adenosine and Adenine Nucleotide In the Biological System (Imai, S. and Nakazawa, M. eds.) pp605-615. Elsevier Science Publishers, BV., New York.
(11)Sarges, R., et. al. (1990) In Purines In Cell Signalling, pp417-418, Springer-Verlag, New York.
(12)Sekino, Y. et. al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm. 181(3), 1010-1014.

125 キンドリングラット海馬における遺伝子発現の長期変化

児島 伸彦, 小幡 邦彦
(生理学研究所・神経化学)

〔要約〕
キンドリングにおける長期けいれん準備状態の分子基盤を知る目的で、キンドリング最終刺激から2週間以上経過したラットと正常ラットとの海馬の転写産物の質的あるいは量的差異を検索した。まず*in vitro* translationによってそれぞれのpoly(A)$^+$RNAの翻訳産物を二次元電気泳動法によって解析した結果、キンドリング海馬で増加しているものが数種類存在することがわかった。そこでキンドリング海馬のcDNAから正常海馬のpoly(A)$^+$RNAとの共通成分をサブトラクション法によって除去し、残ったcDNAでライブラリーを作成した。このライブラリーよりキンドリング海馬で発現の増加するcDNAクローンを5個単離した。これらの塩基配列から4個はチトクロム酸化酵素サブユニットIIの、1個は同サブユニットIIIのcDNAであることがわかった。Northernブロット解析の結果、キンドリング海馬でサブユニットIIのmRNAは2.3倍増加していた。これらのことよりキンドリング脳内では長期にわたって遺伝子発現が変化していることが明らかとなった。またチトクロム酸化酵素mRNAの増加はキンドリング動物の長期にわたるけいれん準備状態の維持機構に関与している可能性がある。

脳の可塑的変化、とりわけ長期にわたって持続する変化は、記憶の保持、学習といった脳の高次機能の基礎をなすものであるが、その物質的基盤はほとんどわかっていない。一方、このような長期持続的な可塑的変化の一つのモデルにキンドリング効果があげられる。脳の特定部位に後発射 (after discharge) を引き起こす刺激強度で高頻度刺激を連日与えると、動物は当初行動上変化をきたさないこの刺激によってけいれん発作を引き起こすようになる。この反応はほとんど不可逆的であり、長期間刺激を休止した後でも再度刺激をすることによって動物は直ちにけいれん発作を引き起こす。これまでにキンドリング刺激後、c-*fos*をはじめ各種ペプチド、神経成長因子などの遺伝子発現の増加が報告されている (1,2) が、これらの変化の多くは一過性であり、キンドリングのけいれん準備状態の維持よりはその形成に関与するかあるいはけいれんの二次的効果であると考えられ、キンドリングけいれん準備状態の長期維持の機構を説明するものではない。現在その分子メカニズムに関しては不明であるが、キンドリング刺激標的部位において細胞の興奮性が長期にわたって増大しており (3) 、てんかん発作発生に対する感受性を高める方向で、それに関わる様々な分子の遺伝子発現上の再編が起こる可能性が考えられるので、我々はそのような分子を系統的に検索する手段として、キンドリングと正常海馬のpoly(A)$^+$RNAからそれぞれ*in vitro* translationを行い、それらの産物を二次元電気泳動法によって解析した。さらにキンドリング形成後の海馬cDNAから正常海馬との共通分子のサブトラクションを行ってキンドリングで増加するcDNAを単離した。

〔実験方法〕
キンドリング動物の作成：生後7週のWistar系ラット (♂) の内側中隔に電極を刺入し、一週間の回復を待って一日2回のキンドリング刺激 (60Hz,1秒、300-400μA) を連日行った。ラットはこの刺激に対して徐々に反応するようになり平均20回目でstage5の全身けいれん発作を引き起こした。その後2回 (計3回) 連続してキンドリングけいれんを起こしたものをキンドリング動物と定義し、最終けいれん後2週間以上経過したラットを実験に供した。

in vitro translation産物の解析：poly(A)$^+$RNAを[^{35}S]メチオニン存在下でウサギ網状赤血球ライゼートの系で翻訳させ、二次元電気泳動法によって分離した。解析はイメージアナライザー (FUJIX, BAS2000) によって行った。

サブトラクションcDNAライブラリーの作成：サブトラクションの原理はPalazzoloらの方法 (4) に準じた。すなわち、まずキンドリングラット海馬のpoly(A)$^+$RNAに対するcDNAを作製した。このcDNAに対して20倍量の正常ラット海馬poly(A)$^+$RNAを加えて両者をハイブリッド形成させ、その後ハイブリッド形成しないcDNAをハイドロキシアパタイトカラムにより分離した。この操作を二回繰り返して残った一本鎖cDNAを二本鎖化しファージベクター

λZAPIIに挿入しcDNAライブラリーを作成した。このライブラリーからキンドリングおよび正常ラット海馬の[^{32}P]total cDNAプローブによってdifferentialスクリーニングを行い、キンドリング海馬cDNAプローブの方に強く反応するクローンを単離した。

RNaseプロテクション解析：プラスミドpGEM-11Zにサブクローニングして作成したcDNAクローンに対する[^{32}P]アンチセンスcRNAをtotal RNAとハイブリッド形成した後RNaseAおよびRNaseT1処理を行い、残ったRNA断片をアクリルアミドゲルにて分離しオートラジオグラムによって検出した。定量は上記イメージアナライザーによった。

〔結果と考察〕

まずキンドリングの長期にわたるけいれん準備状態時に遺伝子発現上の変化があるか否かを、キンドリングラット海馬poly(A)$^+$RNAの*in vitro* translationによる翻訳産物を正常のそれと比較した（図1）。両者の電気泳動パターンに大きな差異はないが、再現的にキンドリング海馬で増加しているようなスポットが数種類検出された。この結果より、キンドリングの長期にわたるけいれん準備状態時に遺伝子発現上の変化があることが示された。

次にそのような分子に対するcDNAクローンを単離、同定するためにキンドリングラット海馬のcDNAからハイブリッドサブトラクション法によって正常ラットのmRNAと共通配列をもつものを除去して、残ったcDNAのライブラリーを作成し、これよりdifferentialハイブリッド形成法およびRNaseプロテクション解析によって正常と比べキンドリング海馬で増加しているようなクローンを選別した。その結果候補となるcDNAクローンが5個得られた。これらのクローンの塩基配列を決定したところ、4個はチトクロム酸化酵素サブユニットIIのcDNAであり、1個は同サブユニットIIIのcDNAであることがわかった。RNaseプロテクション解析およびNorthernブロット解析によってこれらのmRNAの発現量はキンドリングラット海馬で正常に比べ2.3倍増加していることが確認された（図2）。これらのmRNA増加に伴ってチトクロム酸化酵素の存在量ならびに酵素活性がキンドリングラット海馬で実際に増加しているか否かの確認は今後の課題であるが、チトクロム酸化酵素はニューロンの活動と密接に関連していることは周知のとおりであり（5）、その発現がキンドリング動物海馬で長期的に増加することは、本酵素がキンドリング動物の刺激標的部位のニューロンの興奮性を長期にわたって増大させている機構に関与する可能性を示唆するものである。

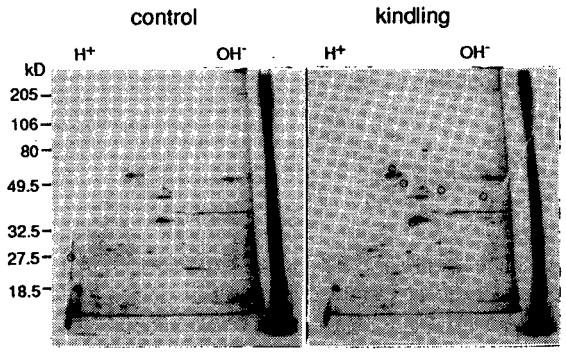


図1 ラット海馬poly(A)$^+$RNAからのin vitro translationによる翻訳産物の二次元電気泳動パターン．増加しているスポットを丸で囲った。

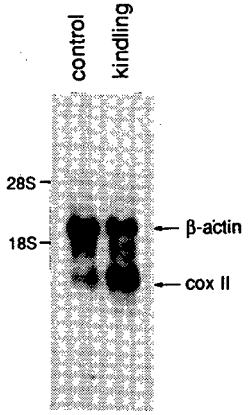


図2 ラット海馬poly(A)$^+$RNAのNorthernブロット解析．プローブにはチトクロム酸化酵素サブユニットIIのcDNAを用いた。また内標としてβ-actin cDNAプローブを同時にハイブリッド形成した。

文献

(1) 秋山 一文, 佐藤 光源 (1990) 蛋白質 核酸 酵素 35, 1206-1213.
(2) Ernfors, P. *et al.* (1991) Neuron 7, 165-176.
(3) 森本 清, Goddard, G.V. (1987) 神経精神薬理 9, 461-491.
(4) Palazzolo, M.J. *et al.* (1989) Neuron 3, 527-539.
(5) Wong-Riley, M.T.T. (1989) Trends Neurosci. 12, 94-101.

126 自然発症てんかんラット(SER)の加齢に伴う脳内脂質過酸化およびsuperoxide dismutase様活性の変化

伊藤武彦[1)]、片山泰人[1)]、枝松　礼[1)]、油布克巳[2)]、森　昭胤[1)]
岡山大学医学部 分子細胞医学研究施設 神経情報学部門[1)], 麻酔・蘇生学教室[2)]

〔要約〕

振戦をしめすtremor rat (TRM)およびzitter rat (ZI)のdouble mutantとしてSerikawaらによって開発された自然発症てんかんラット(Spontaneously epileptic rat, SER zi/zi, tm/tm)は脳幹や小脳を中心とした空胞形成と中脳腹側被蓋核の変性を伴う。われわれはすでにTRMについては活性酸素種の関与を示唆する結果を得ているが、SERはdouble mutantであることから、SERの病態においても活性酸素種の関与が考えられた。そこで今回はSERの脳内thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)、carbon centered radical (・C)およびsuperoxide dismutase(SOD)様活性を測定した。その結果、各部位で加齢に伴うTBARSの増加，および小脳と橋延髄におけるミトコンドリア分画のSOD様活性の亢進が認められた。しかし、各部位ともに・Cは16週齢で著明に減少し、また、橋延髄では細胞質上清のSOD様活性が減少していた。これらの結果から、SERの脳内では脂質過酸化が亢進しており、代償性に一部の抗酸化系が活性化されるが、多くが死亡する20週齢に近づくと防御系が破綻することが示唆された。このことからSERにおいても活性酸素種の関与が考えられた。

目的　SERの病態について活性酸素種の関与を明らかにするために、脳内の脂質過酸化の指標として過酸化脂質中間体ラジカルである・CとTBARSとを測定した。また、抗酸化系の活性の指標としてSOD様活性を測定した。

材料と方法　**動物**　実験には京都大学医学部動物実験施設より入手したSERを用いた。動物は、空調された飼育室において12時間明暗法にて飼育し、水と餌は不断給餌法により与えた。4週齢、12週齢、16週齢に達したものを実験に供した。
試料の作成　動物は断頭にて屠殺した。直ちに脳を摘出し、氷上にて大脳半球、小脳、橋・延髄に部位分けした。各部位に0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.8)を加えてホモゲナイズし、radical及びTBARSの測定用の試料とした。また同じホモジネートをDanh(1)らの方法によりミトコンドリア分画および細胞質上清分画に分画し分析開始まで-80℃に保存した。
測定　(1) Carbon centered radical　試験管に試料を200μlとり、トラッピング剤5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide(DMPO)を20μl加え撹拌し、添加3分後よりESR spectrometer (JES-FE1XG)にて・Cのspin adduct (DMPO-・C)を分析した。内部標準物質には酸化マンガンを使用した。スピン数の計算は、既知スピン数の2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxylpiperidine-1-oxyl(TEMPOL)の信号強度との比により行った。ESR spectrometerによる測定条件は次のとおりである。Magnetic field, 335±5mT; power, 8.0mW; response, 0.3s; modulation, 0.2mT; 温度, 室温; amplitude, 6.3x1000; sweep time, 30s。
(2) TBARS　Ohkawaらの方法(5)に従って測定した。
(3) SOD様活性　Hiramatsuらの方法(3)にしたがって測定した。
(4)タンパク定量　BCA protein assay reagent (Pierce)を用いて行った。
統計学的有意差の検定はunpaired t-testによっておこなった。

結果　(1) Carbon centered radical　16週齢のSERでは各部位で4週齢または12週齢に比べて有意に減少していた(Fig. 1)。
(2) TBARS　16週齢のSERでは各部位で4週齢または12週齢に比べて有意に増加していた(Fig. 2)。
(3) SOD様活性　ミトコンドリア分画中のSOD活性は、大脳半球で12週齢では増加し、16週齢では4週齢と比べて有意差がないレベルまで減少した。小脳では週齢を重ねるにしたがって増加が見られた。橋延髄では12週齢のSERにくらべて16週齢では増加していた(Fig. 3)。一方、細胞質上清分画では橋延髄のみにおいて4週齢に比べて16週齢のSERにおいてSOD様活性の減少が見られた(Fig. 4)。

考察　SERは、振戦を示すmutantであるTRMおよびZIのdouble mutantであり、Serikawaらによって開発された(6)。このラットは自発的に痙攣発作および欠神様発作を繰り返し、20週齢に至るまでにほとんどが死亡する。SERでは組織学的検索により脳幹網様体を中心とした空胞形成と、中脳腹側被蓋核の神経細胞および神経線維の変性とを伴うことが明らかにされている。われわれは既にTRMについてTBARSやfree radicalの測定によって活性酸素種の関与を示唆する結果を得ている(2)。また、脳内の脂質構成についての分析により不飽和脂肪酸含量の変化を見いだしている(4)。したがって、double mutantであるSERにお

いても、同様に活性酸素種の関与する病態が考えられた。今回は、測定した各部位で加齢に伴うTBARSの増加が認められ、小脳と橋延髄ではミトコンドリア分画のSOD様活性が増加していた。このことはSERの脳内で脂質過酸物が蓄積していることを示唆している。また、ミトコンドリア分画のSOD様活性の上昇は細胞に加わったoxidative stressに対する代償性の反応であることが考えられる。しかし、各部位ともに・Cが16週齢で著明に減少しており、また、橋延髄では細胞質上清のSOD様活性が減少していた。従って、多くのSERが死にいたる20週齢に近づくと膜の過酸化反応はむしろ低下していることが考えられる。脂肪の過酸化は細胞膜上の不飽和脂肪酸において起こることが知られているが、16週齢のSERではこの不飽和脂肪酸が減少しているのかも知れない。橋延髄の細胞質上清分画でSOD様活性が低下しているのは、最も組織学的変化が著しいこの部位で細胞のviabilityが低下していることを示唆している。これらの結果からSERでは加齢にともない代償性に一部の抗酸化系が活性化されるが、多くが死亡する20週齢に近づくと脳幹部で防御系が破綻する可能性が示唆された。今後はSERの脳内で活性酸素が生じるメカニズムについて検討が必要である。

文献 (1) Danh, H.C., Benedetti, M.S. and Dostert, P. (1983) J. Neurochem. 40, 1003-1007

(2)枝松　礼, 片山泰人, 伊藤武彦, 油布克巳, 森　昭胤 (1991) 日本実験動物学会総会講演要旨集, 148

(3) Hiramatsu, M., Kohno, M., Edamatsu, R., Mitsuta, K. and Mori, A. (1992) J. Neurochem. 58, 1160-1164

(4)片山泰人, 枝松　礼, 伊藤武彦, 油布克巳, 森　昭胤, 野田泰子, 高山美佐子 (1992) 日本実験動物学会総会講演要旨集, 106

(5)Ohkawa, H., Ohishi, N and Yagi, K. (1979) Anal. Biochem. 95, 351-358

(6) Serikawa, T. and Yamada, J. (1986) J. Hered. 77, 441-444

Fig. 1

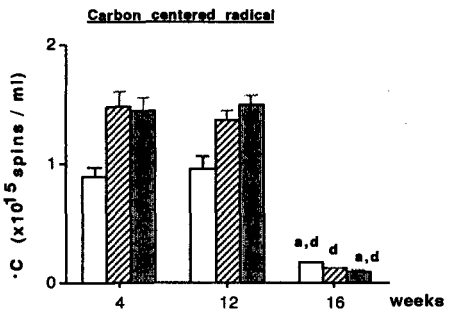


Fig. 2

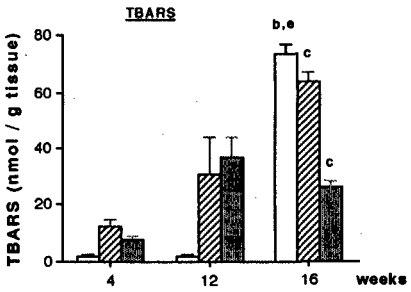


Fig. 3

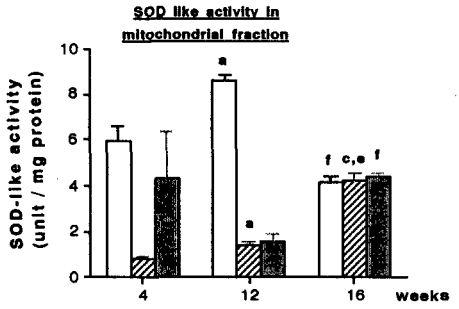
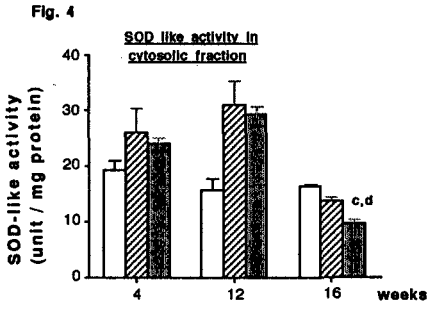


Fig. 4





Each value represents mean±SEM of 4 to 6 rats. a) $p<0.05$, b) $p<0.005$, c) $p<0.001$ vs 4 weeks. d) $p<0.05$, e) $p<0.005$, f) $p<0.001$ vs 12 weeks.

127 El マウス脳mRNAの翻訳活性におけるpoly(A)鎖の相関

塩井弘二、黒田陽子、中西亜紀、木岡哲郎、大西博、山上栄

（大阪市大・医・神経精神）

〔要約〕 遺伝性てんかんモデルであるElマウスのmRNAの翻訳活性低下に対するpoly(A)鎖の関与について、in vitroの系を用いて検討を加えた。rabbit reticulocyte lysateにpoly(A)を添加した時のmRNAの翻訳活性をみると、poly(A)$^+$-mRNAを用いた場合、痙攣履歴のあるEl(s)と履歴のないEl(ns)での[^{35}S]-methionineの蛋白質への取り込みは、poly(A)濃度が1μg/ml以下では促進され、それ以後、高濃度になるに従い阻害が顕著となった。他方、発作非感受性のddYでは、poly(A)の濃度増加にともなって取り込みは抑制された。poly(A) mRNAの場合、3群マウスとも低濃度のpoly(A)では促進し、高濃度になるに従い抑制された。翻訳産物のオートラジオグラフの結果では、両El群とddYとの間で各バンドの量的差異が認められた。これらのことから、ElマウスのmRNAの先天的な翻訳活性の低下には、不完全なpoly(A)鎖が関与していることが示唆された。

【目的】

mRNAの3'末端に存在するpoly(A)鎖の役割は、いまだ十分に明らかにされていないが、poly(A) binding protein (PABP)と結合することで、mRNAの安定性や翻訳活性に影響を与えることが報告されている[1)2)]。我々は、遺伝性てんかんモデルのElマウス脳では、mRNAのtranscriptionやpoly(A)添加に障害があり、翻訳活性も発作非感受性のddYマウスに比し58%と有意に低いことを既に報告した[3)4)5)]。そこで本研究では、Elマウス脳mRNAの翻訳活性低下に対するmRNAのpoly(A)鎖の関与について、rabbit reticulocyte lysateを用いたin vitroの系で検討を加えた。

【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日頃より強直痙攣を起こした生後100日目の痙攣履歴のあるEl(s)と、生後放り上げ刺激を与えなかった履歴のないEl(ns)、発作非感受性のddYマウスを用いた。マウス脳から前報[5)]に従いpolysomal RNAを調製後、oligo(dT) celluloseカラムでpoly(A)$^+$mRNAとpoly(A)$^-$RNAを回収した。poly(A)$^+$-mRNAは終濃度2.5μg/ml、poly(A) RNAは100μg/mlとし、[^{35}S]-methionineを含むrabbit reticulocyte lysateに各種濃度のpoly(A)とともに加え、in vitroで蛋白質を合成し、[^{35}S]-methionineの取り込みによって、翻訳活性を比較した。その翻訳産物は、SDS-PAGEを行った後、オートラジオグラフで解析した。またpoly(G), poly(U), poly(C)を添加した時の翻訳活性についても比較した。

【結果】

ddYのpoly(A)$^+$mRNAにpoly(A), poly(G), poly(C), poly(U)を添加した時の[^{35}S]-methionineの蛋白質への取り込みの結果をFig. 1に示す。poly(G)添加は取り込みを促進したが、poly(C), poly(U), poly(A)の添加は、この順に抑制が強くみられた。poly(A)の濃度を増加させると、poly(A)$^+$mRNAの場合では、Fig. 2に示すように、ddYでは濃度の増加に伴って取り込みが持続的に抑制され、1μg/ml以上で平坦化したのに対して、両El群では、1μg/mlまでは取り込みが促進し、それ以上では抑制がみられた。poly(A) mRNAの場合では、3群とも低濃度のpoly(A)添加で取り込みは促進し、高濃度になると抑制が認められた。翻訳産物のSDS-PAGEの結果をFig. 3に示す。poly(A)$^+$mRNA、poly(A) mRNAのいずれの場合も20KDから67KDの間に数本のmajor bandを認め、poly(A)濃度の変化により、取り込み量に応じた量的変化を認めた。

【考察】

El(s)、El(ns)およびddYマウスのpoly(A)$^+$mRNAにpoly(A)を添加し、in vitroの系で[^{35}S]-methionineの蛋白質への取り込みを比較した。その結果、ddYではpoly(A)濃度に対し持続的な抑制がみられたのに対し、両El群では二相性を示した。この変化は、本実験や他の報告でのpoly(A) mRNAにみられるパターンと同様であった。我々は、既にElマウス脳ではmRNAのtranscriptionやpoly(A)添加に障害があり、翻訳活性がddYより低いことを示した。mRNAのpoly(A)鎖がPABPと結合することでmRNAの翻訳活性に影響を与えるという最近の知見[2)]を考え合わせると、今回の結果は、Elマウスのpoly(A)$^+$mRNAでは不完全なpoly(A)鎖のため、PABPへのpoly(A)の結合に対して、低濃度のpoly(A)を加えると、補足的に作用することにより翻訳開始において促進的に作用するのに対して、高濃度では競合的な阻害が生ずることにより蛋白質合成が抑制されると推測される。これらのことから、ElマウスのmRNAの先天的な翻訳活性の低下には、不完全なpoly(A)鎖が関与していることが示唆され、発作感受性と何らかの関連があるのかもしれない。SDS電気泳動の結果では、質的なバンドの差異を見い出し得なかったので、Elマウスの不完全なpoly(A)鎖はある種のmRNAに限られたものではないことが推測される。

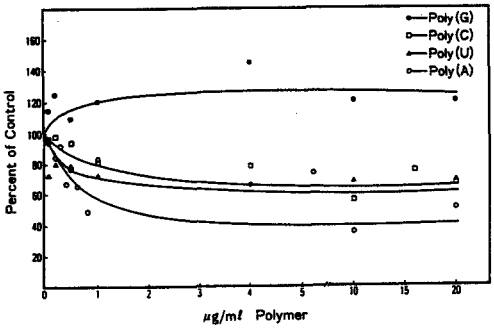


Fig. 1 Inhibition of Protein Synthesis by Ribopolymer

Translation in rabbit reticulocyte lysate containing [^{35}S]-methionine was incubated for 1 h at 30℃ in the presence of ddY poly(A)'mRNA (final concentration of 3μg/ml) with poly(A), poly(G), poly(U), poly(C) in the indicated concentrations.

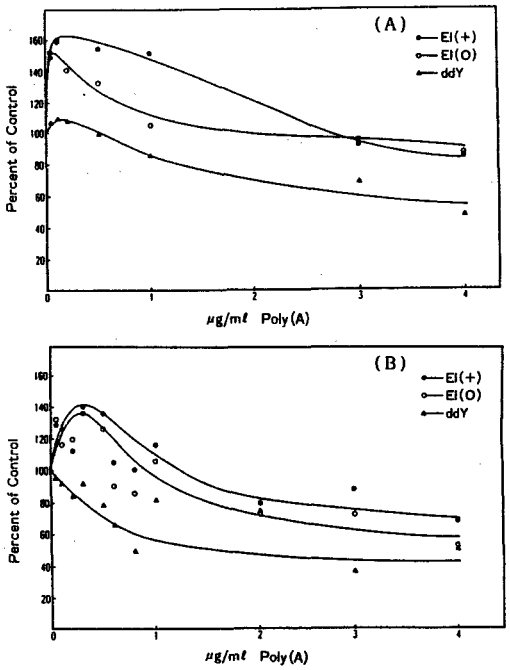


Fig. 2 Effect of poly(A) on the translation of poly(A)$^-$ or poly(A)'mRNA. A: Poly(A)$^-$RNA with poly(A). B: Poly(A)'mRNA with poly(A).

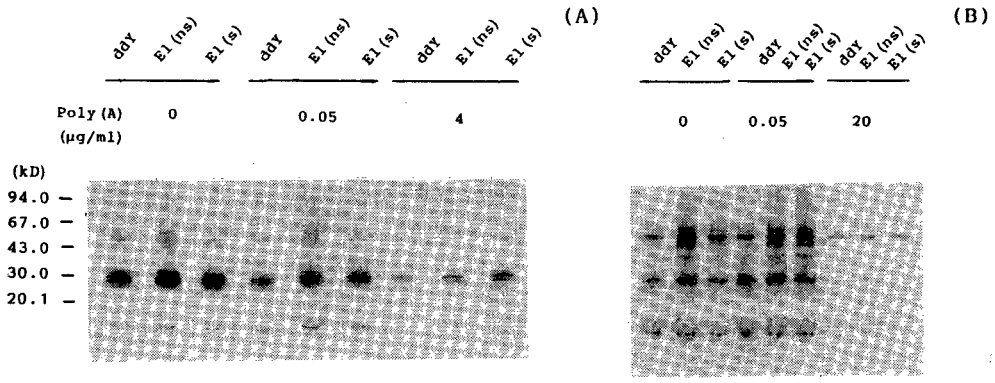


Fig. 3 Autoradiographic pattern of translation products by SDS-PAGE. A: Protein synthesized by poly(A)$^-$RNA. B: That by poly(A)'mRNA.

【文献】

1)Munroe, D. and Jacobson, A. (1990) Mol. Cell. Biol., 10, 3441-3455.

2)Sachs, A. B. and Davis, R. W. (1989) Cell, 58, 857-867.

3)Onishi, H. et al. (1984) Exp. Neurol., 83, 93-107.

4)Yamagami, S. et al. (1987) Exp. Neurol., 95, 167-177.

5)Mui, K. et al. (1991) J. Neurochem., 57(suppl), 71.

128 キンドリングモデルにおけるてんかん準備性の獲得：海馬の神経化学的及び形態学的変化

板野俊文，宮本　修，藤澤睦夫[1]，長尾省吾[1]，山本良隆[2]，臼杵豊之[2]，洲脇　寛[2]，岡田泰士[3]，根木哲郎[4]，村上哲英[3]，畠瀬　修（香川医大・生理，脳神経外科[1]，精神神経[2]，生物[3]，保健体育学[4]）

扁桃体キンドリングモデルを用いて、てんかん準備性と海馬における神経伝達物質及び形態学的変化について解析した。てんかん準備性のステージに伴い，海馬ＣＡ２－３の錐体細胞外におけるグルタミン酸とＧＡＢＡの濃度は明かな上昇を示した。一方この変化に同調して顕微鏡下での微小形態学的変化もおこり、てんかん様の強いけいれん発作を伴うＣ５のステージではこの変化は更に顕著となった。この形態変化は最終刺激後も持続するのに対して、細胞外の神経伝達物質の濃度は元のレベルまで回復する。てんかん準備性と神経伝達物質および形態変化の関係について考察を加えた。

［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。生化学的解析により興奮性のアミノ酸であるグルタミン酸の関与が指摘されており[2,3]、最近その初期過程においては長期増強（ＬＴＰ）も関与していることが示されているされているが[4]、これらの仮説では一時的な効果は説明できても、半永久的にてんかん準備性が獲得される機序については説明が出来ない。今回はこの不明な部分を解明する目的でキンドリングモデルを作成し、神経化学的な検討と形態学的な検討を行った。

［方法］

1.キンドリングモデルの作成：ddN系のオスのマウスの扁桃体に双極性慢性電極を刺入し，脳内微小透析法用のガイドカニューレは海馬CA2-3領域にに埋め，歯科用セメントで固定した。手術後回復を待って刺激は 100～ 200μA で60Hzの双極性矩型波を用いて１日に２回行った。てんかんの強度を表すステージ判定はRacineの方法により、C1：顔、顔面の運動、C2：首振り、C3：前肢の強直、C4：立ち上がり、C5：プラス全身強直性けいれん及び転倒をもって行った[5]。

2.脳内微小透析法：プローブはカーネギー社製のCMA-12を用い、マイクロインフュージョンポンプを用いて3μl/minにて灌流した。透析液はオルトフタルアルデヒド(OPA)試薬（54mg,OPAと40μlの2-メルカプトエタノールを8mlの0.1Mの炭酸ナトリウム緩衝液と2mlのメタノールに溶かしたもの）と等量反応後、ODSカラム装着の高速液体クロマト法で解析した。検出はECDで行い700mVの電圧を付加した。溶離液は0.1M酢酸ナトリウム,0.1M酒石酸，0.5mMEDTAを基本にした緩衝液でアセトニトリルのの濃度とpHが、各分析で異なり、グルタミン酸(Glu)とアスパラギン酸(Asp)の解析では8%と6.0、GABAでは22%と5.4であった[3]。

3.形態学的解析：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，クレジールバイオレットで染色を行った。形態の解析はイメージ　アナリシスＩＢＳＡを用いて各部位の神経細胞の面積計算を行った。

［結果と考察］

図１にキンドリングの各ステージにおける海馬錐体細胞外の神経伝達物質の濃度変化を示す。刺激前を１としてその比で表しているが、GluとGABAがステージ依存性に増加するのに対して、Aspはフルキンドリング獲得後減少した。一方最終刺激終了後、７日後ではGABAとAspは元のレベルに回復したのに対し、Gluはゆるやかな減少傾向を示したが、コントロールよりも高いレベルを維持していた。図２には各ステージ毎の海馬の各部位における面積の変動を示している。CA3では有意な変化を認めなかったが、CA2ではステージに依存して明かな面積の増加を検出した。一方他の部分ではすべてコントロールに比較して有意に面積は減少していた。しかしこの変化は肉眼的なものではなく、顕微鏡的でありコンピューター解析により初めて有意差解析が出来た。また単位あたりの

細胞密度を解析したところ、CA2では面積増加が原因の有意な密度減少が、DGでは細胞数減少に伴う有意な密度減少が認められたが、他の部位では有意差はなかった。最終刺激１ヶ月後に固定し形態的解析を行ったところ、C5でのサンプルと同様の形態変化が認められ、コントロールへの回復は見られなかった。

ヒト側頭葉てんかんにおける海馬細胞の角化現象は既に報告されていたが、この現象がてんかんにおいて原因なのか、結果なのかは大きく論の分かれる所である[6]。今回の我々の結果は、形態変化は原因であることを示唆いる。何故ならC3のステージではまだ強いてんかん様の発作は出現していないが、形態変化は起こる。さらに形態変化の増加にともなってけいれんの強度も増加しているからである。ではこの形態変化は何によって引き起こされたのか？その候補者はGluであろう。脳の一過性虚血による遅延性神経細胞死はGluの放出増加によることは既によく知られている[7]。またGluが神経成長円錐に作用し、軸索の伸展に関与していることもまた報告されている[8]。

以上を総合し、てんかん準備性の獲得は次のような過程を経過すると考えられる。

1.連続刺激にともない細胞外Glu濃度の増加が起こる。比較的早期・短期反応としてセカンドメッセンジャーを介する反応が誘導される。

2.メタボトロピックなGlu受容体を介してLTPがおこる（やや長期的な生化学反応のサイクルが各刺激ごとに誘導）。

3.Gluは錐体細胞に働いて形態変化を起こすと同時に、新しい促通性のシナプス形成を促す（長期反応の誘導）。

4.LTPと促通効果はますます増強される。

5.けいれん発作を伴う強いてんかん準備性を獲得する。

一方神経伝達物質が刺激を中止した後に減少するのに比較して、形態的変化を伴うシナプスの促通作用は半永久的に保持され、てんかん準備性として保持される。

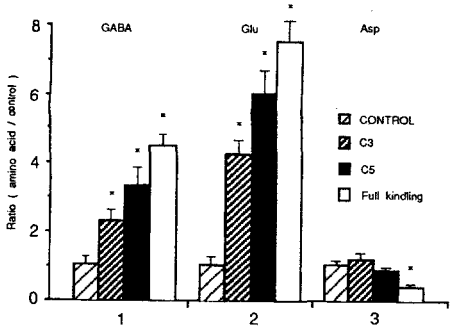


Fig.1 キンドリングに伴う海馬細胞外液中の神経伝達物質の変化
コントロールを１として各濃度を比で表している。*コントロールに対してP>0.001で有意に変化

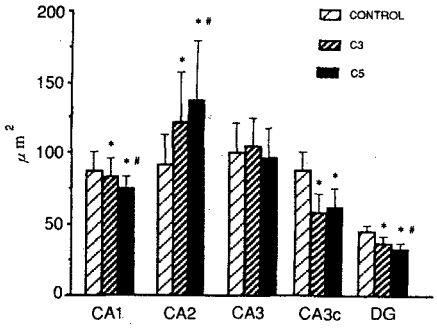


Fig.2 キンドリングに伴う海馬神経細胞の面積変化
*コントロールに対してP>0.001、
#C3のステージに対してP>0.001で有意に変化

［文献］

1) Goddard, G.V., McIntyre, P.C. and Leach, C.K., Exp. Neurol., 25(1969)295-330.

2) Janjua, N.A., Itano, T., Kugoh, T., Hosokawa, Matsui, H., Nakano, M. and Hatase O., Epilepsy Res. 11(1992)37-44

3) Minamoto, Y., Itano, T., Tokuda, M., Matsui, H., Janjua, N.A., Hosokawa, K., Okada, T., Murakami, T.H., Negi, T. and Hatase, O., Brain Res.,573(1992) 345-348

4) Sato, K., Morimoto, K. and Okamoto, M., Brain Res.,463(1988) 12-20

5) Racine, R.J., Electroencephal. Clin. Neurophysiol.,32(1972) 281-294

6) Sutula, T.P., Epilepsy Res.,10(1991) 62-70

7) Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. and Diemer, N.H., J. Neurochem., 43(1984) 1369-1374

8) Lipton, S.A. and Kater, S.B., Trends in Neurosciences, 12(1989)265-270

129 摂食による記憶促進

大村裕*、佐々木和男、李愛軍、森田真次、今井秀樹、花井一光

(日本臓器製薬株式会社·生物活性科学研究所*)

〔要約〕
酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)は脳室壁の上衣細胞によって産生される。摂食やグルコース腹腔内投与によりCSF中に増加したグルコース(Gluc)に上衣細胞が反応してaFGFを放出する。放出aFGFは2時間後海馬ニューロンが取り込んでいる。aFGFと記憶との関係を明らかにするため、Gluc投与後の受動回避学習とモリスの水迷路学習をテストすると、投与2時間後だけが有意に学習記憶を促進した。これら促進は、Gluc投与30分前に抗aFGF抗体の側脳室投与で無効になった。神経生理学的にaFGFは量-反応的にシナプス電位の長期増強の促進を起こした。しかし、神経化学的に海馬内の転写因子zif/268のRNAおよびmRNAを増加させなかった。以上のことから摂食が、生体のホメオスタシス保持に必要であるだけでなく、それにより放出されたaFGFが脳に学習記憶の促進準備状態を作っていることになる。このことは、生理学的に重要な課題であろう。

1. 中枢性摂食調節作用

酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)は脳室壁の上衣細胞によって産生される。摂食あるいはGluc腹腔内投与により、脳脊髄液中に増加したグルコース(2mMから4mMへ)に上衣細胞が反応して、aFGFを放出する(Hanaiら、1989)。すなわちaFGFの脳脊髄液中濃度は、0.7 pmolから摂食やGluc投与(300 mg/kg)2時間で0.7 nmolへ増加する。上衣細胞はしたがって脳内グルコセンサーである(Oomuraら、1992)。上衣細胞はマンニトールおよびD-leucineには反応しない。摂食抑制に対するaFGFの脳室内投与の最少有効濃度は約3 pmolであり、生理学的範囲内である(Oomuraら、1991)。

aFGFのN端$_{1-15}$は脳室内投与で摂食抑制作用をもつが、最少有効濃度は0.26 nmolで、全構造1-140のものに対し86倍量必要である。aFGF N端$_{1-11}$およびC端$_{114-140}$は無効である。これら全ては細胞分裂促進作用が消失している(Sasakiら、1991)。さて、N_{1-15}および$C_{114-140}$が共存すればN_{1-15}単独より摂食抑制に有効ではないかと考え、N_{1-15} 50 nmol + $C_{114-140}$ 50 nmolを第三脳室内に投与したが、N_{1-15}単独と同様であった。aFGFの2次元構造から、N_{1-29}があればaFGF全構造に比較し得るのではないか、またこれは3次元構造上残りの30-140部に対して架橋などのないことから、N_{1-29}を0.03-12 nmol脳室内投与したが、それぞれ7-15%の抑制であり、量-反応的とはいえなかった。もちろん100℃に加熱したものは完全に無効であった。またN_{1-29}に細胞分裂作用は消失している。N_{1-9}はβシートとランダムコイルからなるので、これを取り除いたN_{9-29}を、1-15 nmol投与で検討したところ7 nmolで13%の摂食量抑制であった。またこれも細胞分裂作用は消失している。

N_{1-29}およびN_{9-29}がN_{1-15}に対して有効性が低いのは、16番目にあるcysteineのためではないか、すなわち立体構造上この部で反転してN_{1-15}までの活性部位を覆ってしまうためではないかと考えて、cysteineをalanineに変換した[Ala^{16}] N_{1-29}を合成して実験を行った。0.03-0.14 nmol脳室内投与で、夜間および1日量とも量-反応的に摂食抑制を誘起した。しかし、10-20%の範囲内の抑制であり、全構造のものと比較して、23倍量を必要とした。

2. シナプス可塑性および記憶促進作用

受動回避学習: 暗箱の前にマウスを置くと、暗い場所を好むでの内部に入る。その時暗箱の床の金網に電撃をかけるとマウスはあわてて外に逃げ出す(獲得試行)。24時間後にもう一回同じことを行う(保持試行)。マウスが前日のことを記憶しておれば、暗箱に入るまでの時間が延長しているはずである(情動的記憶)。Glucを腹腔内に投与してこの受動的回避学習をマウスで行うと、aFGFが脳内に移行し、海馬ニューロンが取り込んでいる2時間目だけ有効で(Oomuraら、1991)、24時間後にも有意にその効果が持続した。しかし、抗aFGF抗体をGluc腹腔内投与の30分前に、両側脳室内に注入すると、有意に学習効果

を阻害した。また、対照群として正常IgGの脳室内投与では学習効果は有意に持続した(Oomuraら、1992)。

Morissの水迷路学習: マウスをプールで何回か泳がせて、水中に隠して見えないようにした足場を見いださせる水迷路学習いわば空間的学習記憶実験をGlucを腹腔内投与2時間目とそうでないものとで行ってみる。プールを4区画に分けてマウスを水中に1区画ごとに10分おきに入れて、足場発見までの時間(4回)を測定し平均する。Gluc投与2時間後の群は有意に速く足場を見いだした。しかし、Gluc投与30分前に抗aFGF抗体を投与すると、この効果は阻害された。

脳虚血と記憶学習: 5分間の脳虚血によるCA1領域のニューロン変性を起こしているスナネズミでは、受動回避学習およびMorris水迷路学習は強く阻害を受けた(虚血後5日目のテスト)。

3. aFGFによる記憶促進の原因

遺伝子の変化: zif/268はシナプス活動で長期増強を起こす蛋白として考えられている(Caleら、1989)。実際にzif/268が海馬内で増加したかどうか、摘出海馬についてノーザンブロットで測定を行った。ラット脳RNAを材料にzif/268のcDNAを作成し、PCR法で増幅し、^{32}P標識後プローブとしてzif/268 RNAを測定した。Gluc腹腔内投与後1,2および3時間目の海馬内zif/268 RNA、およびGluc投与後1,2および3時間目に受動回避学習(獲得試行)を1回行って24時間後の海馬内zif/268 RNAは有意に増減しなかった。またGluc投与30分後の海馬内zif/268 mRNAを測定したが有意の変化はなかった。

長期増強: 記憶の神経生理学的指標は、シナプス電位の長期増強(LTP)である。海馬を含むラット脳切片(前額断面)を作成し、Schaffer側枝に電気刺激を加えてシナプス電位を記録する。テタヌス刺激として100Hzで7発刺激を加えた後5分間隔で1発刺激を加えてシナプス電位の振幅の変化を測定した。aFGF灌流により、シナプス電位振幅の長期増強の促進が30分にわたり量-反応的に起こった。

4. 摂食の意義と脳内における学習記憶の準備状態

摂食によって学習記憶を修飾する内在性活性物質として中枢性にはaFGFのほか、オピオイドがある。いわゆる報酬期に中枢オピオイド系が活動して摂食中枢ニューロンの活動を変化させるが、オピオイドが海馬に作用すると仮定すれば記憶を修飾する。記憶定着に対してオピオイドは促進あるいは抑制とまだデータは一定ではない。

末梢性には摂食によって分泌されるCCK-8とVIPが記憶修飾作用をもつ。摂食によって受動性回避学習が促進されるのはCCK-8で、VIPは抑制的に作用する。これらの効果は迷走神経を横隔膜下で切断すると無効になる。すなわち門脈にある求心性迷走神経の終末がCCK-8やVIPにより活動変化し、この変化が海馬まで到着するためである。

摂食により上昇したGlucに反応して、上衣細胞から放出されたaFGFが2時間後には海馬ニューロンに取り込まれて、学習・記憶の促進効果を及ぼしている。摂食により、言い換えると、脳は学習の効率化の準備状態を形成している。この意味で摂食の生理学的意義は極めて重要である。

文献

1) Cole AJ., Saffen DW., Baraban JM. and Worly RF. (1989) Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. Nature 340:474-476

2) Hanai K., Oomura Y., Kai Y., Nishikawa K., Shimizu N., Morita H. and Plata-Salaman CR. (1989) Central action of acidic fibroblast growth factor in feeding regulation. Am J Physiol 256: R217-R223

3) Oomura Y., Sasaki K. and Hanai K. (1991) Chemical and neuronal regulation of food intake. Progress in Obesity Research 1990, eds.Y. Oomura, S. Tarui, S. Inoue and T. Shimazu. John Libbey, London pp.3-12

4) Oomura Y., Sasaki K., Suzuki K., Muto T., Li A., Ogita Z., Hanai K., Tooyama I., Kimura H. and Yanaihara N. (1992) New brain glucosensor and its physiological significance. Am J Clin Nutri. 55: 278S-282S

5) Sasaki K., Oomura Y., Suzuki K., Muto T., Hanai K., Tooyama I., Kimura H. and Yanaihara N. (1991) Effects of acidic fibroblast growth factor on memory in rodents. Abst. Soc. Neurosci, 17: 1100

130 アラキドン酸による脳ミトコンドリア複合体Iの阻害

森井　博史*、竹内　裕子、渡辺　恭良
（大阪バイオサイエンス研究所神経科学部門、*新技術事業団さきがけ研究「細胞と情報」）

〔要約〕
ラット脳よりミトコンドリアを調製後、超音波処理によりミトコンドリア亜粒子を作製し、電子伝達系構成成分に対するアラキドン酸の効果を酵素活性の直接測定により探索した。その結果、アラキドン酸は複合体I（NADH-CoQ oxidoreductase）のみを110 nmol/mg protein のIC_{50}値で不可逆的に阻害し、他の酵素群にはほとんど影響を与えなかった。さらにLineweaver-Burk プロットによる解析により、アラキドン酸はCoQに対してはnoncompetitive、NADHに対してはuncompetitiveな阻害様式を示した。このようにアラキドン酸のミトコンドリアにおける不可逆的作用部位が複合体Iであることが明確に示され、このような阻害が脳虚血から細胞死にいたる過程の1つに含まれていると考えられる。

［はじめに］

脳虚血時に細胞膜のホスホリパーゼが活性化され、脂肪酸が遊離されることが知られている（1）が、特にアラキドン酸(AA)が生理的状態の50倍にも増加し、それに伴いAAカスケード物質であるプロスタグランジン（PG）類やロイコトリエン（LT）類が増加することが報告されている。また、このときミトコンドリアの機能低下がおこることもよく知られており、この両者の関連が指摘されている（2、3）。最近、筆者らは詳細な検討を行い、ミトコンドリア呼吸活性がPG類やLT類のAAカスケード物質ではなく、AAそれ自身により直接阻害されることを見いだした（4）。この作用は、可逆的な脱共役作用と不可逆的な電子伝達系の阻害とに分けられる。後者の不可逆的阻害が、虚血から細胞壊死に至る機構に含まれているのではないかと考えられる。そこで、本研究においてAAの作用機序を明確にするためにミトコンドリアの電子伝達系を構成している各酵素群の活性を直接測定し、それに対するAAの影響を調べた。

［材料と方法］

ラット脳よりミトコンドリアをClark & Nicklasの方法にしたがって調製した。ただし、アラキドン酸の影響を正確に調べるために牛血清アルブミンは加えなかった。さらに、この標品を氷中でバス型ソニケーターを用い、2分間、超音波処理することによりミトコンドリア亜粒子を得た。

呼吸活性は、クラーク型酸素電極を用い、反応液中の溶存酸素量を測定することにより求めた。

電子伝達系の各酵素群の活性はミトコンドリア亜粒子を用い、測定した（6）。複合体I活性はCoQ_1を用いNADHの酸化を、複合体II活性はCoQ_2H_2を用い2,6-dichloroindophenolの還元を分光学的に測定することより求めた。複合体IIIあるいは複合体IVはシトクロームcの還元あるいは酸化を分光学的に測定することにより測定した。複合体Vは遊離リン酸量をFiske & Subbarawの方法を用いて測定した。グルタミン酸脱水素酵素とリンゴ酸脱水素酵素の活性はNADHの酸化から決定した。

［結果］

ミトコンドリアの電子伝達系の電子の流れは、図1に示すように呼吸基質の違いから複合体IからのNAD呼吸と複合体IIからのFAD呼吸とに大別される。既に報告しているように（4）ミトコンドリアの呼吸活性は、アラキドン酸の添加により顕著に減少した（表1）。さらに、state 4ではNAD呼吸とFAD呼吸との間にはほとんど差が見られないが、uncoupled stateにおいては顕著な差が見られ、アラキドン酸のIC_{50}値はNAD呼吸では約3倍低い値を示した。

さらに詳しい検討を加えるために電子伝達系各構成酵素群の活性を直接測定し、アラキドン酸の影響を調べた。表2に示すように、50μM アラキドン酸は電子伝達系酵素群のうち、複合体I（NADH-CoQ oxidoreductase）活性のみを64%阻害した。それに対して、その他の構成成分である複合体II-V、グルタミン酸脱水素酵素やリンゴ酸脱水素酵素の活性はほとんど影響されなかった。このような阻害は、遊離脂肪酸を結合することが知られている牛血清アルブミンを添加しても回復せず、不可逆的なものであった。また、アラキドン酸の作用の強さは使用する蛋白質濃度に依存し、そのIC50値は110 nmol/mg proteinであった。阻害形式を詳細に検討するためLineweaver-Burk plot による解析を試みると、アラキドン酸の阻害形式はCoQに対してはnoncompetitive、NADHに対してはuncompetitiveな阻害を示した。

［考察］

ミトコンドリア電子伝達系酵素群の活性の直接測定から、アラキドン酸によりFAD呼吸の最初の段階である複合体Ⅱ（succinate-CoQ oxidoreductase）はほとんど影響されず、アラキドン酸の作用部位がNAD呼吸の最初の段階である複合体Ⅰ（NADH-CoQ oxidoreductase）であることが明確に示された。ところが、呼吸活性の測定ではNAD呼吸とFAD呼吸の差はあまり明確にはみられなかった。このことは、直接酵素活性を測定する場合とは異なり、呼吸活性では様々な現象の総和として観察しているためと考えられる。また、阻害の強さが使用している蛋白質濃度に依存しており、そのことも酵素活性測定と呼吸活性測定での不一致の結果が得られる要因であると考えられ、このことからアラキドン酸の作用部位がミトコンドリア内膜中にあるのかそれともミトコンドリア亜粒子の内側にあると想像される。複合体Ⅰは多数の蛋白質の集合体であるため、アラキドン酸がどの蛋白質と結合して作用しているかなどは現在のところ不明である。しかしながら、NADHあるいはCoQに対するアラキドン酸の阻害形式から推測すると、CoQの複合体Ⅰへの結合やCoQへのプロトンの受渡しの部分ではなく、NADHの結合に加えてNADHからのプロトンの移動が阻害されていると考えられる。

（参考文献）

(1) Bazan, N.G.(1970) Biochim. Biophys. Acta, 218, 1-10

(2) Clark, J.R. and Nicklas, W.J.(1970) J. Biol. Chem., 245, 4724-4731.

(3) Hillered, L. & Chan, P.H.(1988) J. Neurosci. Res., 19, 94-100.

(4) Takeuchi, Y., Morii, H., Tamura, M., Hayaishi, O., & Watanabe, Y.(1991) Arch. Biochem. Biophys., 289, 33-38.

(5) Morii, H., Takeuchi, Y., & Watanabe, Y.(1991) Biochem. Biophys. Res. Commun., 178, 1120-1126.

(6) "Methods in Enzymology"(Fleischer, S. & Packer, L. eds.) (1978) Academic Press, New York.

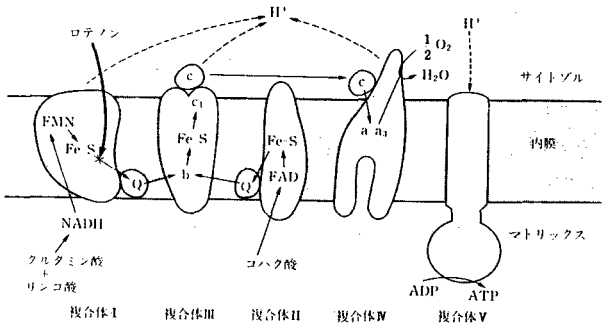


図1. ミトコンドリア呼吸鎖

表1　ラット脳ミトコンドリア呼吸活性に対するアラキドン酸の影響

	state 4 (ED50)	uncoupled state (IC50)
NAD呼吸	19.8 μM	26.1 μM
FAD呼吸	15.5	78.6

表2　ラット脳ミトコンドリア電子伝達系に対するアラキドン酸の影響

	対照実験 (nmol/min/mg protein)	50 μM AA (nmol/min/mg protein)
複合体Ⅰ (NADH-CoQ oxidoreductase)	390	140
複合体Ⅱ (sucinate-CoQ oxidoreductase)	220	200
複合体Ⅲ (CoQH2-cytochrome c oxidoreductase)	580	570
複合体Ⅳ (cytochrome c oxidase)	480	440
複合体Ⅴ (ATPase)	1000	980
glutamate dehydrogenase	1300	1400
succinate dehydrogenase	4300	4000

131 NMDA受容体を介する神経毒性の温度による影響

高寺恒雄、毛利哲郎
（北陸大・薬・創薬研）

〔要約〕
ラット胎児（17-19 日齢）の大脳皮質培養細胞を用いてNMDA受容体を介する細胞毒性とそのNMDA処理時の温度との関係について検討した。細胞を20℃で30-90 分間放置後，同温度で500 μM NMDA、15分間処理すると、37 ℃，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 ）の遊離の増加が見られた。それに対し、37℃で30-90 分放置後37℃でNMDA処理すると細胞毒性は全く見られなかった。NMDAの添加による細胞内カルシウムイオンの増加も、37℃で抑制された。このようにNMDA受容体を介する細胞毒性およびカルシウムイオンの流入は処理時の温度を20℃から37℃に上げると著しく減少することが示された。

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、それが脳細胞死の引き金となる。NMDA受容体にはグルタミン酸およびグリシンの認識部位の他、Mg^{2+} 、Zn^{2+} 、ポリアミン、プロトンの調節部位やアルコールなどの作用部位の存在がわかってきた(1) 。これまで、NMDAによる神経細胞死もエタノールやプロトンによって影響を受けることを報告してきた（2,3 ）。今回は、NMDAによる細胞毒性とカルシウムイオンの流入に対する温度の影響を検討した。

［実験方法］ ラット大脳初代培養細胞は、ラット17-19 日齢の胎仔から既報(2) のように調製し、10%準胎仔血清を含むDulbecco's Modified Medium(DMEM) 中で培養した。培養8-12日目の細胞を実験に用いた。 20 ℃では生理的Mg^{2+}存在下においてもNMDAによる著しい毒性が観察されたので、すべての実験はMg^{2+}存在下で行った。 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 7.4) 中、 20 ℃または37 ℃で0-90分間 preincubationしたのち、500 μM NMDA を添加し、20℃および37℃で15分間 incubation した。10 mM Hepes buffered DMEM で洗い同mediumを加え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。細胞内カルシウムイオン濃度の測定はIndo-1を細胞にとりこませて、蛍光解析装置（ACAS 570）によって行った。

［結果］ 細胞を前もって 20 ℃に30-90 分間置いたのち、同温度（20℃）で500 μM NMDA処理を15分間行なうと、37 ℃、18時間後の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された。それに対し、細胞を37℃ に30-90 分間置いた後、同温度（37℃）で同様にNMDA処理を15分間すると、NMDAによる細胞毒性は全く見られなかった（図１,2）。温度を32℃にした場合も毒性はほとんど見られなかった。このような温度の効果は各温度(20,32,37 ℃）で90分間放置後、20 ℃に戻し、さらに90分間放置すると、NMDA処理(20 ℃、15分間）による細胞毒性が再び同程度に見られた（図3)。 また、NMDA処理後18時間放置時の温度を20℃にしても同様な結果が得られ、細胞毒性はNMDA処理時までの温度に影響された。一方、NMDAによる細胞内カルシウム濃度の上昇も37℃，90分間放置した場合、20℃での放置に比べ著しく抑制された（図4)。

［考察］ NMDA 受容体を介する細胞毒性はNMDA処理時の温度を20℃から37℃に上げると著しく減少し、同時にカルシウ

ムイオンの流入も抑制されることが示された。この細胞毒性に対する温度の効果はNMDA処理時の温度だけに依存すること、また温度効果が可逆的であることから、NMDA受容体レベルでの作用である可能性がある。ラットの虚血負荷時の脳温を37℃から33℃に低下させると、神経細胞死がかなり抑制されることが報告されており(4)、この効果は細胞外グルタミン酸レベルの減少で説明されている。我々の結果は、この温度範囲ではNMDA受容体を介する神経毒性に対してある程度の抵抗性を持っていることを示唆した。

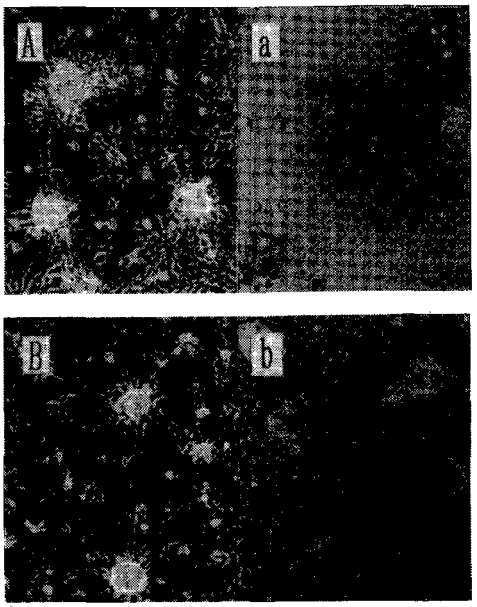


図 1 NMDA神経細胞毒性の温度による影響

A, a: NMDA 20 ℃ B, b: NMDA 37 ℃
A, B: 位相差像 a, b: トリパンブルー染色

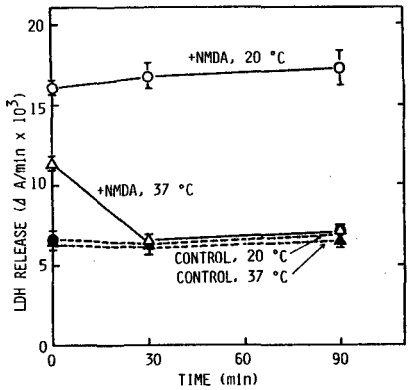


図 2 NMDA細胞毒性に対する温度効果の preincubation 時間との関係

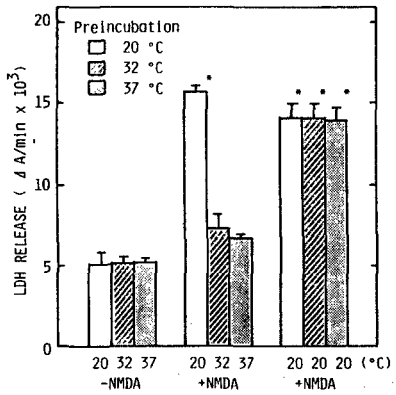


図 3 NMDA細胞毒性に対する温度効果の可逆性

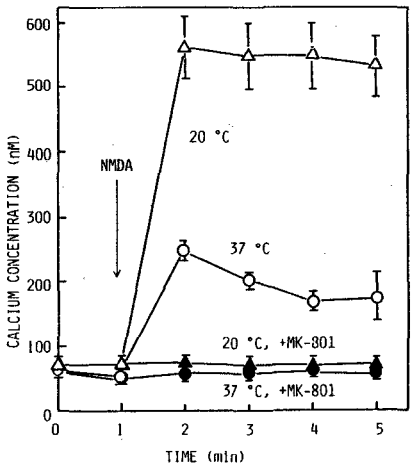


図 4 NMDAによる細胞内遊離カルシウム増加に対する温度の影響

[文献] 1. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1991) Neurosci. Res. 10, 1-33

2. Takadera, T., Suzuki, R. and Mohri, T. (1990) Brain Research, 537, 109-114

3. Takadera, T., Shimada, Y. and Mohri, T. (1992) Brain Research, 572, 12, 6-131

4. Mitani, A. and Kataoka, K. (1991) Neuroscience, 42, 661-670

132 Hypoxia/reoxygenationによるAstrocyteよりのサイトカインの誘導

○前田裕輔、松本昌泰、小川智、大槻俊輔、半田伸夫、木下タロウ*、鎌田武信
（大阪大学・第一内科、 *同微生物病研究所・免疫不全疾患）

〔要約〕 アストログリア(astrocyte, 以下AST)が、脳における虚血・再潅流の病態生理にどの様に関与しているかを理解するため、neonatal ratよりASTを分離・培養、低酸素環境に暴露した後、Reoxygenation(REOX)し、どの様なサイトカインが産生されるか検討した。抗ラットIL-1抗体を用いたELISA, LM細胞を用いたアッセイによればREOX後、36時間までIL-1及びTNFは検出されなかった。これに対し、MH-60細胞を用いたbioassayによれば、REOX後のAST培養上清には明らかなIL-6活性が存在し、REOX後8-16時間後に(342pg/ml/10^6cells)、そのtrans-criptはREOX後8時間で最大となった。また、REOX後にIL-6活性を誘導するためには16時間以上の低酸素暴露が必要であった。化学的蛍光法によって測定されたOxygen derived free radicals (OFR)は、REOX後30分で最大となりradical scavengeである N-acetyl cysteine (NAC)はOFRを減少させるとともに、IL-6の誘導も抑制した。

〔目的〕

我々は、砂ネズミを用いた実験的脳虚血モデルにより、脳という臓器レベルでのストレス応答現象がみられ、虚血・再潅流中に発生するORFが、その引き金となることを示してきた(3)。また、これらの現象を細胞レベルで検討するため、大規模な嫌気チャンバーを用い組織培養レベルでの虚血モデルを確立し、血管内皮細胞を用いその虚血応答を分子レベルで検討してきた(6,7)。

アストログリア(AST)は、Microgliaと並んで、脳におけるサイトカイン産生細胞であり、さまざまな化学的刺激に応答、TNF, IL-6などのサイトカインを産生する事が知られている。本研究は、虚血・再灌流の場においてASTがどのようなサイトカインを産生し得るかを検討し、脳での虚血・再灌流の病態における神経・グリア関係を理解せんとしたものである。

〔方法及び結果〕

1)細胞培養と低酸素環境の達成。Neonatal rat大脳半球よりMacArthyらの方法に準じてASTを分離、2代目まで継代培養し以下の実験に供した。この時点で培養細胞は98%以上がGFAP陽性のASTとなった。低酸素環境の達成にはCOY社製嫌気チャンバーを用い、チャンバー内に2%程度の水素を導入、パナジウム触媒によって迷入する酸素と反応、除去する事によって達成した。これによってチャンバー内気相の酸素濃度は数ppm以下、液相の酸素分圧は約14 torrとなった。また、trypan blue染色、LDH放出によって評価された細胞のViabilityは、低酸素暴露後48時間、またREOX後48時間まで正常に保たれていた。

2)Hypoxia /reoxygenationによってASTより産生される各種サイトカインの測定。ASTを24穴プレートに植え、confluentとなった後、一定時間低酸素環境に暴露ののち、予め37℃, 5% CO_2, Room Airでincubateしたで2回洗浄した後、MEM中に産生される各種サイトカイン(IL-1α, IL-1β, TNF, IL-6)を測定した。IL-1α, IL-1βの測定は各々に特異的な抗体を用いたELISAによって測定した。TNF, IL-6はそれぞれLM細胞を用いたcytotoxicity assay, MH-60細胞を用いたproliferation assayによって測定した。即ち、96穴プレートに約10^4個のLM細胞またはMH-60細胞を植え、REOX後のAST培養上清を加え48時間incubateした後、さらにdimethyl thiazol diphenyl tetrazolium (MTT 0.5mg/ml)と6時間incubateし2-propanol, HClで細胞を溶解、細胞中に取り込まれたMTT量をOD540にて評価した。REOXされたAST培養上清中のIL-1α, IL-1βはどちらも感度以下(<2 U/ml, <20 U/ml)であった。また、TNF活性も検出されなかった(<0.1 U/ml)。これに対しREOX後のAST培養上清には明かなIL-6活性が存在し、その活性量はREOX後8-16時間後に最大となり以後減少した。またIL-6活性のピークは32時間低酸素暴露された細胞群でもっとも顕著であり、低酸素暴露が8時間以下、また正常酸素分圧下でMediumのみ交えた細胞群ではその活性は見いだされなかった。また、低酸素暴露のみでもIL-6の誘導を認めたが、その誘導は不十分であった(Fig.1)。

3)U373細胞におけるIL-6活性の誘導。これらREOXによるASTよりのIL-6の誘導がCulture中に迷入した他の細胞に起因する可能性を除外するため、ヒトASTのcell lineであるU373細胞で同様の検討を行った。REOXはU373細胞においてもIL-6を誘導、REOXによってAST自身がIL-6を産生する可能性を支持した。

4)REOXによるAST よりのIL-6誘導のメカニズムに関する検討。REOXによるAST よりのIL-6誘導のメカニズムを検討するため、REOX直後に発生するOFRを測定した。ORF の測定は10^5個のASTをREOX直後にlucigenin (400 ug/ml) とincubateし、ORF に由来する蛍光の発生をアロカ社製ルミノメーター BLR-301によって測定した。ASTより発生するOFRは、REOX後約10分から著増し、30分後に最大となり以後漸減した。Free Radical ScavengerであるN-acetyl cysteine (NAC 20mM) をREOX 5分前に加えると、OFRのピークがほぼ1/3に抑制され、IL-6の産生もREOX16時間後で約1/4に減少した(Fig.2)。また、ASTを過酸化水素(H_2O_2)と5分間反応さ

せると、正常酸素下でも反応後8-16時間をピークとしてH_2O_2の濃度依存性にIL-6の誘導が見られた。以上より、REOXによるOFRの発生がきっかけとなってASTよりのIL-6の誘導が起こることが示された。

5)Transcriptionalレベルでの検討。REOXによるAST よりのIL-6の誘導がTranscriptional レベルで起こっていることを確認するため、Reverse transcriptase(RT) を用いたPCR 法によってIL-6のTranscriptを半定量的に測定した。REOX後のAST よりAGPC法によってRNAを抽出、RTと反応させた後Minamiらの報告(5)に従ってラットIL-6用primerを作成、PCRにて増幅した後2% agarose gelにて電気泳動し、ethidium bromideにて染色した。IL-6のTranscript量はREOX直後より漸増し、REOX後8時間で最大となった。またREOX 5分前に加えられたNAC はIL-6 Transcript量を明らかに低下させた。正常酸素下のASTから得られたmRNA中には同様の増幅度でIL-6 Transcriptは検出されず、REOXによるIL-6の誘導がTranscriptionalレベルで発生していることが明らかとなった。

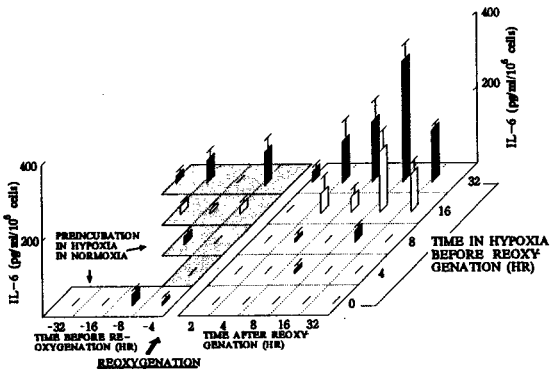


Fig 1: REOXによるASTよりのIL-6の誘導。ASTを一定時間低酸素環境に暴露した後REOXし、培養上清中に産生されるIL-6活性をMH-60細胞を用いたBioassayにて測定した。図中左は低酸素、または正常酸素分圧下でのAST培養上清中のIL-6濃度(Base line)を表す(n=8, Mean±S.D.)。

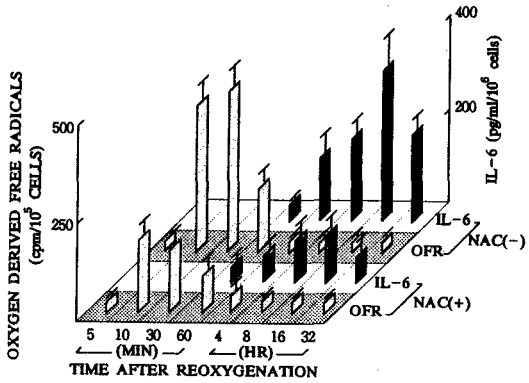


Fig 2: REOXによって発生するOFRとIL-6産生との関連。ASTを32時間低酸素暴露した後、REOXし、ASTcultureより発生するOFRをルミノメーターで測定、また同時にREOXされたASTより産生されたIL-6を測定した。さらにREOX 5分前にNAC 50 mMを加え、同様にOFR, IL-6活性量を測定した(n=8, Mean ± S.D.)。

〔考察〕

我々はヒト末梢血由来マクロファージ(Mφ)を用い、REOXによってMφよりIL-1の産生が起こることを見いだし、Mφに由来するIL-1が血管内皮に作用しELAM等のadhesionmoleculeを誘導すると供に血管機能を修飾、これらが虚血・再潅流に伴う血管傷害に関与している可能性を示してきた(4)。一方、これらの現象は、傷害された組織でのTissue remodelingの第一段階であるとも考えられる。脳においてもMφと由来を同じくするMicrogliaが存在し、同様の反応が惹起されると考えられるが、脳虚血・再灌流に際してOFRの発生、血管機能の修飾など神経細胞にとって極めてきびしい環境が発生する中、何らかの神経保護機転が作用しているはずである。

IL-6はその造血系細胞への作用のみならず、強い神経保護作用をもつサイトカインである。Hamaらは成熟ラットより得られた培養神経細胞を用いた実験系でコリン作動性neuronやカテコールアミン作動性neuronに対し、IL-6には明かな生命維持作用のあること、その作用は神経細胞に対する直接作用であることを報告している(1,2)。以上よりASTは脳における虚血・再灌流の場において、IL-6の産生を通じ、神経保護機転として作用していることが考えられ、かかる病態生理下でのNeuron-glia関連を理解する上で極めて興味深い。

〔文献〕

1. Hama T. et al: *Neurosci Lett* 104:340-344,1989
2. Hama T. et al: *Neuroscience* 40:445-449,1991
3. Kitagawa K. Matsumoto M. et al: *Brain Res* 528:21-24,1990
4. Koga S. Ogawa S. et al: *J Clin Invest* 1992, in press
5. Minami M. et al: *Biochem Biophys Res Commun* 176:593-598,1991
6. Ogawa S. et al: *J Clin Invest* 85:1090-1098,1990
7. Ogawa S. et al: *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88:9897-9901,1991

133 一過性脳虚血によるモノアミン、アミノ酸放出反応におよぼすカルシウム拮抗薬の影響

中根博、八尾博史、大星博明、井林雪郎、佐渡島省三、藤島正敏、松本孝*、
中村薫*、堤哲之*、平野誠*、内村英幸*
（九州大・医・第二内科、*国立肥前療養所）

〔要約〕

高血圧自然発症ラット（ＳＨＲ）に、L-タイプの電位依存性カルシウムチャンネルブロッカー（PN200-110）を全身投与し脳虚血中のモノアミンおよびアミノ酸の放出反応におよぼす影響をin vivo brain dialysisを用い検討した。脳虚血早期にドパミン濃度は両群とも著増したが有意差はみられなかった。しかし虚血20-40分、再開通後最初の20分間にPN200-110群でvehicle群に比べ有意な低下がみられた。一方グルタミン酸の放出反応には影響を与えなかった。以上の結果は、脳虚血中のドパミン放出がL-タイプの電位依存性カルシウムチャンネルよりのカルシウム流入に一部依存し、グルタミン酸の放出は非依存性であることを示し、両者の放出機序は異なることが示唆された。

〔緒言〕

これまでに脳虚血時に大量のドパミンや各種アミノ酸が細胞外へ放出されることが報告されているが、その詳しいメカニズムについては十分な解明はなされていない。われわれは、ω-Conotoxinがドパミン放出反応を抑制することを示し、N-タイプ電位依存性カルシウムチャンネルの神経伝達物質放出への関与を報告した（2）。そこで今回は日常臨床で汎用されているL-タイプのカルシウムチャンネルブロッカーである、ジヒドロピリジン系のカルシウム拮抗薬の脳虚血時におけるドパミン、アミノ酸放出反応におよぼす影響について検討した。

〔方法〕

5-9か月齢の雄ＳＨＲ（体重350-450ｇ）を用いた。Amobarbital (100mg/kg, i.p.)麻酔下に、両側総頚動脈閉塞による一過性脳虚血を1時間、その後閉塞を解くことで2時間の血行再開通を行なった。局所脳血流量は、水素クリアランス法を用いて測定し、同時にin vivo brain dialysis法を用いて細胞外ドパミン、グルタミン酸濃度をHPLCで測定した(2,5)。定位脳固定装置を用いて線条体に脳血流用白金電極とdialysis probeを留置し4μl/minで潅流し、20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なった後、L-タイプ電位依存性カルシウム拮抗薬、PN200-110を0.25mg/kg (n=4)、2.5mg/kg (n=5)、またはvehicle (n=6)を皮下投与し、20分後脳虚血を導入した。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。直腸温は約37℃に熱ランプで調節し、線条体の温度も脳血流用電極先端に固定したセンサーで経時的に測定した。

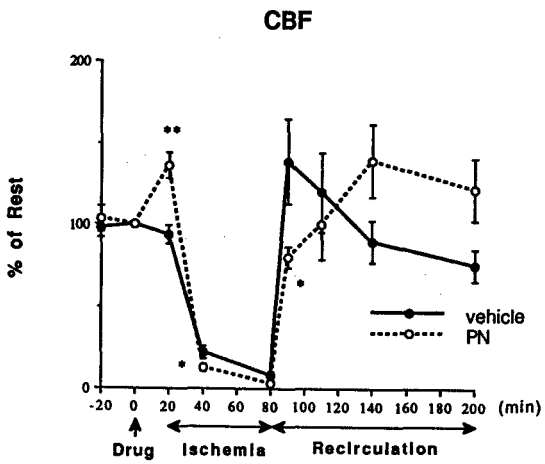
〔結果〕

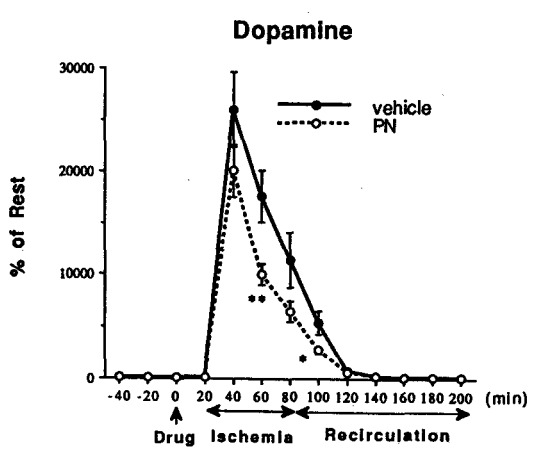
PN200-110 0.25mg/kg投与群と2.5mg/kg投与群で各種パラメーターに差はなく両群をまとめて検討した。PN200-110投与により平均血圧は187±4mmHg(平均±SEM)から102±10mmHgと有意に低下し、脳血流量は有意に上昇した。脳虚血により両群とも脳血流量は安静時の20％以下の強い虚血レベルとなった。血行再開通によりvehicle群は一過性のhyperemiaの後、hypoperfusionの経過をとったが、PN200-110群ではhyperemiaはみられず再開通1時間後まで脳血流量は増加した（Fig.1)。ドパミンは虚血前vehicle群10.0±3.7pM、PN200-110群5.1±0.6pMであった。脳虚血後最初の20分間にvehicle群で260倍、PN200-110群で200倍と著増し両群に有意差はみられなかったが、その後の虚血20-40分でそれぞれ167倍、101倍、再開通後最初の20分間で54倍、27倍とPN200-110群で有意な低下がみられた（Fig.2)。一方グルタミン酸は虚血前vehicle群0.55±0.16μM、PN200-110群0.36±0.04μMで1時間虚血によりいずれも32倍まで上昇した。虚血後最初の20分間ではそれぞれ3倍、11倍とむしろPN200-110投与群で上昇しており、グルタミン酸放出に対する抑制効果はみられなかった（Fig.3)。

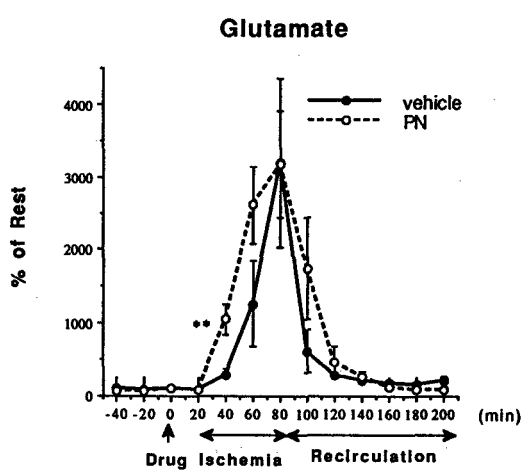
〔考察〕

今回の結果から、L-タイプのカルシウム拮抗薬は脳虚血によるドパミン放出反応のうち、虚血後期の細胞外液中のドパミン濃度を低下させることがわかった。これまでの報告で、L-タイプのカルシウムチャンネルは、3種の電位依存性チャンネルのうち最も遅く開放し持続時間は最も長いといわれている（1）。またコカインによるドパミンの放出反応をL-タイプのカルシウム拮抗薬が抑えるとされている（3）。以上のことからL-タイプのカルシウム拮抗薬は虚血後少し遅れて作用が発現し、Lチャンネルを介したカルシウムの流入をおさえてドパミン濃度を低下さ

せているものと考えられた。しかしその効果はNチャンネルに比べ弱いものと思われた。一方グルタミン酸については、虚血時の放出はvesicular poolからよりもcytosolic poolからの放出が主体で、カルシウム非依存性であるとの報告が多い（4）。われわれの結果も従来の報告を支持するものであった。脳血流量については、PN200-110投与により血行再開通直後の一過性のhyperemiaがみられず時間経過と共に上昇したことから、PN200-110は脳血管に対し何らかの保護作用を持つ可能性が示唆された。今回の結果より脳虚血中のドパミンとグルタミン酸放出機序に対するカルシウムチャンネルの関与は異なるものと考えられた。







〔文献〕(1) Kasai, H. (1990) 実験医学 8: 1753-1757. (2) Ooboshi, H. et al., (1992) J. Neurochem. 58: 298-303. (3) Pani, L. et al., (1991) Neuroscience 91: 85-88. (4) Rubio, I. et al., (1991) J. Neurochem. 57: 1159-1164. (5) Yao, H. et al., (1988) Experimentia 44: 506-508.

134 グルタミン酸による脊髄培養神経細胞障害に対するステロイドホルモンの保護作用

尾形 直則[1)2)] 中村 洋一[1)] 辻 浩司[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〕

脊髄神経細胞へのグルタミン酸毒性に対するステロイドホルモンの保護作用を検討した。ラット脊髄由来初代培養神経細胞をグルタミン酸入り塩溶液に 15 分間暴露し、その後 24 時間中に変性した細胞より培地中に漏出した lactate dehydrogenase (LDH) の活性を細胞障害の指標とする実験系を用いた。脊髄神経細胞は暴露されるグルタミン酸の濃度に依存して漏出する LDH を増大するが、暴露後の培地に 10 μM のデキサメサゾンを添加することにより、この増大分の約 50% を抑制することができた。暴露するグルタミン酸の濃度が 100 μM の時、このデキサメサゾンの神経保護作用は濃度依存性であった (Half effective concentration = 0.1 μM)。しかしデキサメサゾンの濃度を 100 μM まで上げても LDH 放出の増大は完全には抑制されず、なお増大分の約 20% が残存した。デキサメサゾンはまた、グルタミン酸暴露の 1 時間後に投与されても神経保護作用を示した。その他のステロイドホルモンについても同じ実験系で神経保護作用を調べた結果、アルドステロン、プロゲステロン、テストステロンはデキサメサゾンとほぼ同様な効果が確認されたが、ステロイドホルモンの前駆体であるコレステロールは効果がみられなかった。脊髄損傷に対するステロイドホルモンの作用機序に、このグルタミン酸毒性に対しての神経細胞への直接の保護作用が関与している可能性が考えられる。

脊髄が外傷などにより障害を受けたとき、軸索の断裂などの急性のダメージに引き続いて、虚血や損傷された組織から遊離された物質などにより二次的な神経細胞変性が起こると考えられている。最近の研究で、虚血に陥った神経組織では細胞外液中の興奮性アミノ酸濃度が上昇すること(4,5)、また培養神経細胞を興奮性アミノ酸に暴露すると細胞死が引き起こされること(2)などが報告され、虚血によって細胞外液中に放出された興奮性アミノ酸の神経細胞に対する毒性が、遅発性神経細胞死の最初の引き金になっているのではないかと考えられるようになった。我々は in vitro での脊髄損傷モデルとして培養脊髄神経細胞をグルタミン酸に暴露し、それによって変性を起こした神経細胞より漏出する LDH を細胞障害の指標とする実験系を用い神経保護作用を持つ薬物の検索を行っている。今回使用したステロイドホルモンは臨床的には脊髄損傷の際、経静脈的に投与されることがあり実験的にもその有効性が示されている(3)が、その作用機序は主に損傷を受けた組織の浮腫の改善による血行の再開であると考えられており、神経細胞そのものに対する作用についての研究はあまりなされていない。我々は本研究においてステロイドホルモンには直接神経細胞を保護する作用があることを示し、その作用様式を検討した。

［実験方法］

Cell Preparation : 妊娠 14 日ラット胎仔の脊髄を、0.25 % トリプシンにて 37 ℃ 15 分間処理し、解離した細胞をポリエチレンイミンでコートした 11 x 11 mm のプラスチックカバースリップ上に培養した。最初の 24 時間は 10 % Horse Serum／5 % FCS／DMEM、その後はグリア細胞の増殖を抑えるため無血清培地 (DMEM＋添加物(1)) にて 11 日間培養した。この操作で得られた細胞の約 70 % が抗-microtubule associated protein 2 抗体に陽性であった。

グルタミン酸暴露 : 神経細胞を Hepes-buffered Krebs Ringer solution (HKR)で 37℃ 1 時間 preincubate 後、15 分間グルタミン酸（通常は 100 μM ）入りHKRに暴露した。その後 medium を無血清培地に置き換え、グルタミン酸を取り除いた。薬物を投与するときはこの無血清培地に添加した。そしてその後の 24 時間中に細胞より培地中に漏出した LDH の活性を測定した。

LDH 活性の測定 : LDH 活性の測定は Kho and Choi の方法(2)に従って行った。80 μM NADH, 80 mM K-phosphate (pH 7.5) の条件下で、800 μM pyruvate を加えた前後での、340 nm の吸光度変化速度の差を LDH 活性とした。カバースリップ上の細胞は 50 mM NaOH, 0.5 mg/ml sodium dodecylsulfate により溶解後、蛋白量を測定し、細胞蛋白量あたりの LDH 活性を神経細胞障害程度の指標とした。グルタミン酸暴露を行わなかった場合でも神経細胞から少量の LDH 漏出が認められ、Fig.2, Fig.3 では

各々の結果よりこの background を引いた値を用い、100 μM グルタミン酸暴露のみの対照実験に対する割合で示した。

［結果及び考察］

神経細胞を種々の濃度のグルタミン酸に暴露してみたところ、暴露するグルタミン酸の濃度に依存して神経細胞より LDH が放出されることがわかった (Fig.1)。10 μM のデキサメサゾン存在下ではこの LDH 放出量が約半分に抑制されるが、その際 Half effective concentration (EC_{50}) は約 100 μM でほとんど変化しなかった。この結果よりデキサメサゾンはグルタミン酸による毒性を非拮抗的に抑制すると考えられる。 Fig.2 は暴露するグルタミン酸濃度が 100 μM の場合、デキサメサゾンは濃度依存性に神経保護作用を示すことを示している (EC_{50}=0.1 μM)。しかしデキサメサゾンの濃度を 100 μM まで上げても LDH 放出の増大は完全には抑制されず、なお増大分の約 20% が残存する。我々は同じこの実験系でグルタミン酸レセプターアンタゴニストである MK801 がグルタミン酸神経毒性をほぼ 100 % 抑制することを確認している。このことからデキサメサゾンの作用機序は MK801 のように Ca^{2+} channel を block することによるのではない可能性が高いと考えられる。さらにデキサメサゾンの投与時期がグルタミン酸暴露後、どの程度まで遅れても有効であるのかを調べるために Fig.3 のようにグルタミン酸を除去してからデキサメサゾンを投与するまでの時間を変化させてみたところ、投与の遅れが 1 時間以内までは明かな有効性が認められた。グルココルチコイド以外のステロイドホルモンについても同じ実験系で神経保護作用を調べた結果、アルドステロン、プロゲステロン、テストステロンはデキサメサゾンとほぼ同様な効果が確認されたが、ステロイドホルモンの前駆体であるコレステロールにはグルタミン酸に対する効果はみられなかった。

以上のように我々はステロイドホルモンには直接神経細胞に作用してグルタミン酸の毒性からそれを保護する効果があることを示したが、グルタミン酸暴露後の投与においても有効であることはその作用機序を考える上で興味深い。

Fig 1

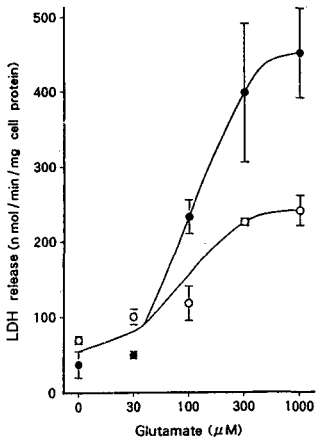


Fig 2

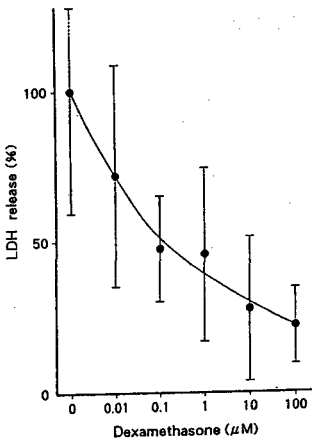


Fig 3

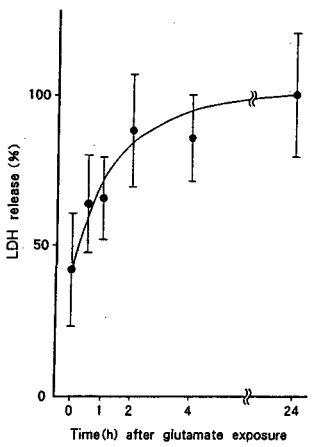


Fig. 1: Glutamate neurotoxicity on cultured spinal cord neurons and neuroprotective effect of 10 μM dexamethasone. LDH (mean ± SD., n = 4) in culture media were measured 24 h after a 15 min-exposure to various concentrations of glutamate (closed circles). The effect of 10 μM dexamethasone was examined by adding to the post-exposure medium (open circles).

Fig. 2: Dose-dependent neuroprotective effect of dexamethasone on glutamate neurotoxicity in the cultured spinal cord neurons. Various concentrations of dexamethasone were added to the media after the glutamate (100 μM) exposure. (mean ± SD., n = 4)

Fig. 3: Reductions of neuroprotective effect with increasing in time interval between glutamate washout and dexamethasone addition. Glutamate (100 μM) was added to the medium for 15 min, and dexamethasone (10 μM) was added 0, 0.5, 1, 2 and 4 h after glutamate washout. *LDH in media* were measured 24 h after the glutamate exposure. (mean ± SD., n = 4)

［参考文献］ (1) Ogata T., Nakamura Y., Shibata T. and Kataoka K. (1992) J. Neurochem. **58**, 1957-1959. (2) Koe J.Y. and Choi D.W. (1987) J. Neurosci. Meth. **20**, 83-90. (3) Kuchner E.F., Mercer I.D., Pappius H.M. and Hansebout R.R. (1976) in *Dynamics of Brain Edema* (Pappius, H.M. and Feindel, W., eds) Berlin, Springer-Verlag, pp 315-322. (4) Mitani A., Imon H., Iga K., Kubo H. and Kataoka K. (1990) Brain Res. Bull. **25**, 319-324. (5) Simpson Jr.R.K., Robertson C.S. and Goodman J.C. (1990) Neurochem. Res. **15**, 635-639.

135 神経成長因子除去によるＰＣ１２細胞の細胞死・細胞変性に対する種々の脱分極剤の効果

小池達郎，田中秀逸
（佐賀医大・化学）

〔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・細胞死を起こす。この系及び上頸神経節細胞を用いて種々の脱分極剤（高K^+培地、ベラトリジン、ウワバイン、モネンシン等）の細胞変性・細胞死に対する効果を調べた。高K^+培地（35mM以上）はNGF除去によるＰＣ１２細胞の細胞死を完全に阻止し、突起にも変性は見られなかった（EC_{50}＝17mM）。高K^+の効果は低Ca^{2+}培地又はNifedipine処理によって失われた。ベラトリジンは細胞内酵素（LDH）活性の放出を部分的（70％）に抑えた。その効果は2μM TTX、又は低Ca^{2+}培地中で失われた。ベラトリジン存在下で生存した細胞の突起は変性していた。突起の殆ど無い状態では、ベラトリジンの効果は更に改善された。ベラトリジンは交感神経節細胞の細胞死も抑えたが突起の変性を促進した。他の脱分極剤ウワバイン、モネンシン等は細胞死を阻止することも突起の変性を抑えることもなかった。これらは細胞死及び突起の変性を阻止する脱分極剤の効果としてCa^{2+}の重要な役割を示唆すると考える。

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(6)及び脱分極によって阻止されること(2)が判っている。一方、我々はＰＣ１２細胞をNGF処理して分化させると、NGF除去に応答して変性し、細胞死が起こる事を見いだした(4,7)。さらに、NGF除去によるＰＣ１２細胞の変性は突起の変性と細胞死が異なる機構により起こるものと考えたが、細胞死に関しては培養交感神経節細胞の場合と良く似ていることを報告した(4,7)。同様に、両者の細胞死が脱分極やｃＡＭＰ処理により完全に阻止されることも共通であった(4,7)。しかし、Tengと Greene(8)はＰＣ１２細胞の突起変性は脱分極により阻止されないとして、阻止される亜株を単離しその特性づけを行っている。その為、ＰＣ１２細胞のＮＧＦ除去による変性に対する種々の脱分極剤の効果を詳細に検討し、交感神経節細胞の場合と比較した。

［実験方法］

ＰＣ１２細胞の培養：ＰＣ１２細胞22aの培養は既報(1)により行った。細胞はコラーゲン塗布した24ウェルプレートにまき、7％馬血清、５％牛胎児血清、50ng／ml NGFを含むＲＰＭＩ培地で12-14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48時間後、培地中及び細胞内のLDH（Lactate Dehydrogenase）活性を測定した(4)。細胞内のLDH活性は細胞を0.1％トリトンで可溶化後測定した。NGF存在下では約5％のLDH活性が培地中に放出されるが、細胞死に伴って20～50％に増加する（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。

低Ca^{2+}又は高K^+培地の調製：細胞外液のCa^{2+}濃度が10-50μＭの低Ca^{2+}を含む培地又は高K^+培地の調製は既報(2)によった。

［結果及び考察］

高K^+培地はＮＧＦ除去によるＰＣ１２細胞の突起変性と細胞死を阻止する。

ＰＣ１２細胞をNGF存在下12-14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

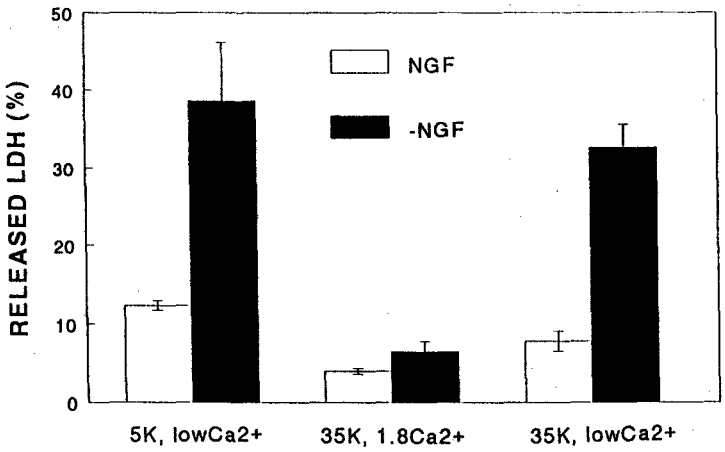


図1 高K^+培地（35mM）によるＰＣ１２細胞死の阻止と高K^+効果の低Ca^{2+}培地中での消失。分化したＰＣ１２細胞の培地からにNGFの抗体を加えてNGFを除いた後48時間後LDH活性を測定した。 細胞外液イオン濃度：5K, lowCa2+:5mMK+, lowCa2+, 35K, 1.8Ca2+:35mMK+,1.8mMCa2+, 35K, lowCa2+:35mMK+, lowCa2+. 高K^+培地（35mM）はＰＣ１２細胞死を阻止する（中）が、その効果は低Ca^{2+}培地中で失われる（右）。低Ca^{2+}培地中ではNGF存在下でLDHの放出がやや増加するがNGFの除去に応答して細胞死を起こす(左)。

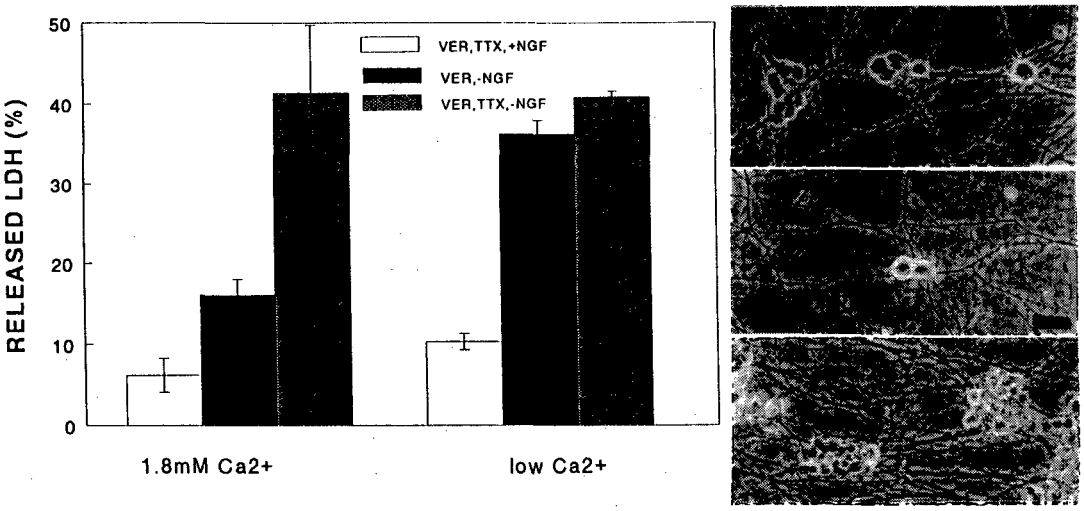


図2（左）正常（1.8mM）及び低Ca^{2+}培地でのベラトリジンの細胞死阻止効果。薬物処理後48時間後にLDHを測定した。ベラトリジン（35μM）はLDHの放出を約70%抑えるが、その効果は2μMのTTXで完全に抑えられる。低Ca^{2+}培地では効果は消失する（ver=veratridine、TTX=tetrodotoxin）。
図3（右）ベラトリジン（35μM）処理した細胞の48時間後の位相差顕微鏡写真（上:veratridine+NGF、中:veratridine-NGF、下：-NGF：bar=50mμ）。

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、ＬＤＨの放出はNGF除去により対照値5.3%（±0.7；mean±SD、n=3）から44.6%（±3.8）に著しく増加する。トリパンブルーで死細胞は50.8%（±8.3、n=2292）に上った。NGF抗体を含む培地にアクチノマイシンＤ（0.3μM）を加え、その細胞変性に対する効果を調べてみると、LDHの放出は89%（±6）阻止された。完全に阻止されないのは突起の変性はDNA依存RNA合成に非依存的であるからである(4,7)。一方、高K^+培地（35mM以上）はLDHの放出を完全に阻止している（図1）。又、位相差顕微鏡観察から突起も突起束を形成しており、変性は見られない。。細胞外液K^+の濃度依存性からＥC_{50}は17mMであった。これは交感神経節の場合（21mM）と一致する。低Ｃa^{2+}培地中ではNGF存在下でLDHの放出がやや増加するが、細胞死は正常に起こる（図1）。しかし、高K^+培地による細胞死の阻止効果は低Ｃa^{2+}培地中（図1）又はNifedipine処理（5μM）によって失われた。以上のことから、高K^+培地によってＮＧＦ除去によるＰＣ１２細胞の突起変性も細胞死も阻止され、その効果はLタイプＣa^{2+}チャンネルによる細胞外Ｃa^{2+}の流入によると考えられる。

ベラトリジンは細胞死を阻止するが突起の変性を引き起こす。

ベラトリジンはNa^+チャンネルを活性化して細胞を脱分極させることが知られている。ベラトリジンは35μMで細胞死に伴うLDHの放出を約70%抑える（図2）。この効果は2μMのテトロドトキシン（TTX）で完全に抑えられるのでNa^+チャンネルを介して起こるものと考えた。さらに低Ca^{2+}培地中ではベラトリジンの効果は失われた（図2）が、Nifedipineでは阻害されなかった。LDHの放出を完全には抑えないのはベラトリジン存在下で突起が変性するからである（図3）。ベラトリジン処理した突起は細くなっており、K^+の流出によるRVD（Regulatory Volume Decrease）ではないかと考えた。即ち、Na^+チャンネルの活性化に伴いNa^+イオン（及びCa^{2+}）の流入が起こるが同時にK^+の流出が起こると予想される。突起では容積が細胞体に比較して小さい為にK^+の流出によってRVDが起こる。このRVDはNGF存在下では部分的に阻止される。細胞外液のK^+濃度を上げるとRVDは阻止された。更に、分化した細胞をポリオルニチン塗布したプレートに蒔き、突起の殆どない状態で実験を行うと、ベラトリジンは85-90%LDHの放出を阻止した。一部の細胞（10-15%）が死ぬのは細胞内Ｃa^{2+}濃度が十分に上昇しない為と思われる（3）が更に検討を要す。しかし他の脱分極剤ウワバイン、モネンシン等は調べた濃度範囲で細胞死を抑えることも突起の変性を抑えることもなかった。これらの結果は細胞死を阻止する脱分極剤の効果としてCa^{2+}の重要な役割を示したものとなった。ベラトリジンは交感神経節細胞の細胞死も抑えたが樹状突起の変性を促進した。これらの事から我々の用いているＰＣ１２細胞は脱分極によって細胞死も突起の変性も阻止される事が判ったが、種々のＰＣ１２サブクローン間でのNGF除去に対する応答性の差異は細胞内でのCa^{2+}の役割を更に生化学的に調べる為に有用であると考えられる。

［参考文献］

1. Koike,T., Brain Res., 289: 293-303 (1983)
2. Koike,T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,86: 6421-6425 (1989)
3. Koike,T. and Tanaka,S.,ibid, 88: 3892-3896 (1991)
4. Koike,T. Prog. NeuroPsychopharmacol.& Biol-Psychiatry 16: 95-106 (1992)
5. Koike,T. and Tanaka,S. Soc.Neurosci.Abstr.,18:in press (1992).
6. Martin,D.P. et al.,J.Cell Biol., 106: 829-844 (1988)
7. Tanaka,S. et al.,Soc. Neurosci.Abstr., 17: 228 (1991)
8. Teng,K.K. and Greene,L.A.Soc Neurosci.Abstr., 17: 1495 (1991)

136 致死的および非致死的虚血後の脳内神経成長因子レベルの変化

村瀬健史[1,4]，加藤宏之[1]，仙波りつ子[2]，加藤兼房[3]，劉 暁宏[1]，中田直樹[1]，劉 勇[1]，陳 婷[1]，小暮久也[1]
(東北大学医学部神経内科[1]，愛知県身障害者コロニー・発達障害研究所・周生期[2]，生化学[3]，明治製菓・薬品総合研究所・新薬研究所[4])

〔要約〕
虚血耐性現象発現に神経成長因子（NGF）の産生が関与しているのか否かを明らかにする目的で，砂ネズミに致死的（5分間）あるいは非致死的（2分間）な脳虚血を施し，海馬CA1，中隔，大脳皮質および線条体におけるNGF含量を経時的に測定した．また，cresyl violet 染色および抗グリア線維性酸性蛋白（GFAP）抗体に対する免疫染色も行った．5分間虚血群では，4日および7日後に海馬CA1で錐体細胞が完全に壊死したにもかかわらず，NGF含量は約30%の増加傾向を示した．この時，GFAP陽性細胞が観察された．さらに，中隔では虚血4日および7日後にNGF含量は有意に減少していた．大脳皮質および線条体では著変は認められなかった．一方，2分間虚血群でも，4日および7日後に海馬CA1でNGF含量は約30%の増加傾向を示した．その他の部位では著変は認められなかった．以上の結果より，虚血耐性現象の発現にNGFの産生は深くかかわってはいないものと考えられた．

【緒言】
脳に損傷が加わると，その修復を担う神経栄養因子が損傷部位周辺に産生されることが明らかとなりつつある(1,5)．一方，予め非致死的な虚血を施すと次の虚血侵襲に対して神経細胞は抵抗性を有することが知られている（虚血耐性現象）(2,4)．今回，我々はこの虚血耐性現象にNGFの産生が関与しているのか否かを，砂ネズミの一過性前脳虚血モデルを用いて検討した．

【材料と方法】
虚血モデル　12週齢の雄性砂ネズミを使用した．ハロタン麻酔下に両側総頸動脈を剥離し，覚醒後に杉田式クリップにて2分間あるいは5分間の一過性前脳虚血を施した．血流再開通後6時間，4日および7日後に断頭により脳を摘出し，粉末ドライアイスにて急速凍結した．NGF測定　-15 ℃下で脳を海馬CA1，中隔，大脳皮質および線条体に分割し測定用試料とした．NGF含量はマウスβ-NGFに対する高感度サンドイッチタイプ酵素免疫測定法(3)により測定した．組織化学的評価　cresyl violet 染色にて神経細胞障害を，また，GFAP免疫染色にてアストロサイトの反応性を観察した．

【結果】
NGF測定 (Table 1)　海馬CA1では4日および7日後に両群とも増加傾向（+30%，$p<0.10$）を示した．中隔では6時間後に両群とも一過性に有意に増加（+25%，$p<0.05$），その後2分間虚血群では対照群レベルに回復，また，5分間虚血群では4日後（−25%，$p<0.05$）および7日後（−40%，$p<0.01$）有意に減少した．大脳皮質および線条体では明らかな変化は認められなかった．組織化学的評価 (Fig. 1)　5分間虚血群では4日後より海馬CA1で選択的な神経細胞死が確認され，海馬全体にGFAP陽性細胞が観察された．一方，2分間虚血群では明らかな形態学的変化は認められなかったが，海馬CA1の stratum radiatum および stratum lacunosum-moleculare にGFAP陽性細胞が観察された．

【考察】
これまでの研究により，致死的虚血の1日から7日前に非致死的虚血（2分間）を予め施すことにより虚血耐性現象が獲得されることが明らかとなっている(2,4)．今回，海馬CA1において2分間虚血後NGF含量は約

30%の増加傾向を示したものの，この増加傾向は5分間虚血後にも同様に認められた．従って，このNGF含量の変化が直接虚血耐性現象を説明するものとは考えられない．また，海馬CA1の錐体細胞死にもかかわらずNGF含量が減少しなかったのは，虚血侵襲後アストロサイト由来のNGFが産生された可能性が考えられた．さらに，アストロサイト由来のNGFはシナプス結合をしていない中隔－海馬系コリン作動性ニューロンへは受容されず，その結果，中隔のNGF含量は海馬CA1の錐体細胞死とともに減少したものと考えられた．興味あることに中隔において両群とも虚血6時間後に一過性の増加を示したが，原因については現在のところ不明である．さらに，非致死的な虚血に対してもアストロサイトの反応性が亢進したことから，短時間の虚血侵襲に対してグリア細胞が神経細胞の保護，修復に関与している可能性も考えられた．

【文献】

1. Finklestein, S.P., Apostolides, P.J., Caday, C.G., Prosser, J., Philips, M.F. and Klagsbrun, M. (1983) Brain Res. 460, 253-259
2. Kato, H., Liu, Y., Araki, T. and Kogure, K. (1991) Brain Res. 55, 238-242
3. Katoh-Semba, R., Semba, R., Kashiwamata, S. and Kato, K. (1989) J. Neurochem. 52, 1559-1565
4. Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tagaya, M., Hata, R., Ueda, H., Niinobe, M., Handa, N., Fukunaga, R., Kimura, K., Mikoshiba, K. and Kamada, T. (1990) Brain Res. 528, 21-24
5. Lorez, H., Keller, F., Ruess, G. and Otten, U. (1989) Neurosci. Lett. 98, 339-344

Table 1　Time course of β-NGF levels in the various brain regions after 2 min and 5 min ischemia in the gerbils

	Hippocampal CA1	Septum	Cerebral cortex	Striatum
Sham-operated	0.18±0.05	0.26±0.09	0.16±0.04	0.05±0.02
5 min ischemia				
6 hours	0.21±0.13	0.33±0.15 *	0.13±0.02	0.05±0.01
4 days	0.25±0.08	0.20±0.05 *	0.19±0.03	0.06±0.01
7 days	0.23±0.08	0.15±0.02 **	0.19±0.04	0.07±0.01
2 min ischemia				
6 hours	0.21±0.07	0.32±0.11 *	0.17±0.03	0.06±0.01
4 days	0.22±0.06	0.21±0.04	0.18±0.04	0.06±0.02
7 days	0.23±0.07	0.28±0.08	0.17±0.03	0.06±0.01

β-NGF levels are given as ng/g wet weight of tissue. Data represent mean±SD
Statistical significance was determined by Mann-Whitney U-test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$

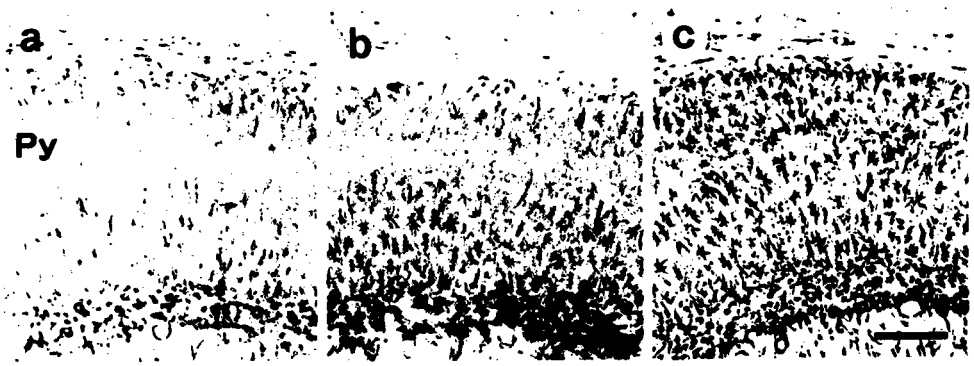


Fig. 1 Representative photomicrographs of immunohistochemical staining for GFAP of hippocampal CA1
A: Sham-operated, B: 7 days after 2 min ischemia, C: 7 days after 5 min ischemia

137 虚血性脳損傷の進展における脳内 Na^+,K^+-ATPase 活性低下の関与

長藤寿昭[1)]、小出 徹[2)]、高頭迪明[1)]
（中外製薬（株）探索研究所[1)]、現 医薬ライセンス部[2)]）

〔要約〕

一過性脳虚血後の機能障害および、神経細胞壊死の進展機構における脳内Na^+,K^+-ATPaseの関与を明らかにする目的で、砂ネズミの片側総頸動脈閉塞モデルを用いて検討した。10分間の閉塞に続く血流再開により、虚血側大脳皮質と海馬のNa^+,K^+-ATPase活性は、有意に減少した。[^{3}H]ウアバイン結合実験の結果から、これは酵素数(Bmax値)の減少によるものと判明した。次に、正常無処置ラットのシナプトゾーム内Na^+,K^+-ATPaseを特異的に活性化し、脳虚血後の機能障害および、神経細胞壊死を改善するBY-1949(3 - 30 mg/kg)を、虚血開始30分前と血流再開直後の二回経口投与すると、Na^+,K^+-ATPase活性の低下とBmax値の低下は用量依存的に改善された。以上の結果から、血流再開急性期に於ける脳内Na^+,K^+-ATPaseの特異的活性低下は、少なくとも亜急性期の行動変化あるいは神経細胞死に対して、重要な役割を担っていることが示唆された。

神経細胞膜に存在し、膜興奮後のNa^+とK^+の細胞内外の濃度勾配を回復させ、Na^+/Ca^{2+}exchangeや神経伝達物質の再取り込み機構も間接的に制御するNa^+,K^+-ATPaseの、脳虚血後、神経細胞が壊死に至り始める時期以降の活性変動は不明である[3)]。また、Na^+,K^+-ATPaseと脳虚血後の神経細胞壊死の因果関係に関しても報告は少ない[1)]。そこでシナプトゾームのNa^+,K^+-ATPaseを特異的に活性化することが明かにされているBY-1949[3)]を用いて今回の検討を行なった。

[実験方法] 1) 脳虚血モデル作成：軽エーテル麻酔下、雄性砂ネズミ（体重80-110 g)の左側総頸動脈を露出させ、10分間クリップで閉塞した。動物は虚血中、虚血性神経症状を呈したもののみ実験に供した。また術中、直腸から体温をモニターし、37 ± 0.3 °Cに保った[2)]。2) Na^+,K^+-ATPase活性測定：術側大脳半球の大脳皮質、海馬から調製した租ミトコンドリア画分を用いて測定した[2,3)]。3) [^{3}H]ウアバイン結合実験：術側大脳半球の大脳皮質から調製した租ミトコンドリア画分を用いて行なった[2)]。4) その他：3-methoxy-11-methylbenz [b,f] [1,4] oxazepine-8-carboxylic acid (BY-1949)は、中外製薬(株)で合成した。

[実験成績] 10分間の片側総頸動脈閉塞後の血流再開(15, 30, 60 分)により、梗塞側の大脳皮質と海馬のNa^+,K^+-ATPase活性は、有意に減少した。両部位に於けるこれらの減少は、共に血流再開15分後に最大に達したが、1日後には、虚血前の活性まで回復した(Fig. 1-A)。一方、Mg^{2+}-ATPaseは、両部位とも少なくとも、血流再開7日後まで有意な変動を示さなかった(Fig. 1-B)。血流再開15分後での[^{3}H]ウアバインの大脳皮質への結合実験から、このNa^+,K^+-ATPaseの活性低下は、酵素数(Bmax値)の減少によるものであることが明らかとなった(TABLE I)。そこで、シナプトゾーム分画のNa^+,K^+-ATPaseを特異的に活性化することが明らかにされているBY-1949(3, 10, 30 mg/kg)[3)]を、虚血開始30分前と血流再開直後の二回経口投与すると、血流再開15, 30, 60分後に於けるNa^+,K^+-ATPase活性の低下は、Mg^{2+}-ATPaseには変化を及ぼさずに、用量依存的に改善された(TABLE II)。また、血流再開15分後での[^{3}H]ウアバイン結合実験に於けるBmax値の低下も、BY-1949(30 mg/kg)の投与により、Kd値には変化を及ぼさずに有意に軽減された(TABLE I)。

[考察] 血流再開後の[^{3}H]ウアバイン結合のBmax値の減少を伴ったNa^+,K^+-ATPase活性の特異的な低下は、本酵素数の減少を示唆している。複数のNa^+,K^+-ATPaseのisoformの存在を示唆する他の結合実験結果を考慮すると、今回の実験条件は神経分画のNa^+,K^+-ATPaseを検出していると考えられる[3)]。しかしながら、Na^+,K^+-ATPaseの活性低下は、神経細胞の壊死が始まる血流再開1日後には回復している。これは、マクロファージの神経細胞への侵入を伴ったグリオーシスの結果、見かけ上の活性回復と解釈される[4)]。事実[^{3}H]ウアバイン結合実験に於けるBmax値の低下は血流再開7日まで観察された。また、低濃度ウアバインを脳室内投与すると、嗅球、線条体および海馬でグルタミン酸濃度の上昇と神経細胞死が認められるため、Na^+,K^+-ATPase活性低下が少なくとも部分的に神経細胞壊死発現機構に関与するとの仮説が提出されている[1)]。一過性脳虚血後の機能障害および神経細胞壊死を改善することが知られているBY-1949[2,3)]がNa^+,K^+-ATPase活性低下を有意に軽減するという今回の実験成績は、この仮説を薬理学的に支持するものと考えられる。

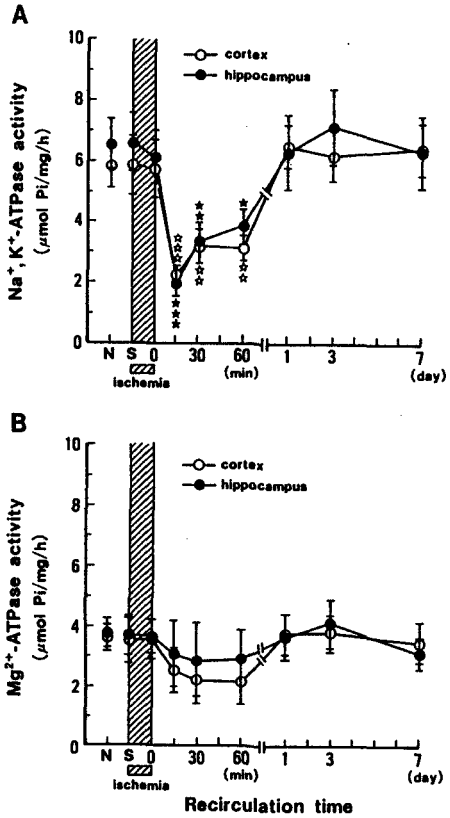


Fig. 1. Time courses of the changes in brain (A) Na^+,K^+-ATPase and (B) Mg^{2+}-ATPase activities following cerebral ischemia in gerbils. Each value represents the mean ± S.E.M. of 8 to 13 animals. N, naive animals; S, sham-operated animals. $^{**}P < 0.01$ (ischemia vs. sham, cerebral cortex). $^{***}P < 0.001$ (ischemia vs. sham, cerebral cortex). $^{*}P < 0.05$ (ischemia vs. sham, hippocampus). $^{**}P < 0.01$ (ischemia vs. sham, hippocampus). $^{***}P < 0.001$ (ischemia vs. sham, hippocampus).

TABLE I

Scatchard analysis of [^{3}H]ouabain binding following cerebral ischemia in gerbils

[^{3}H]Ouabain binding to the CSM of the cerebral cortex was examined at 15 min following cerebral ischemia in gerbils. Either vehicle or BY-1949 (30 mg/kg) was administered twice, at 30 min prior to clipping and immediately after recirculation. Each value represents the mean ± S.E.M. of the number of animals shown in parentheses.

Treatment	K_d *(nM)*	B_{max} *(pmol/mg protein)*
Naive (3)	21.14 ± 0.23	139.97 ± 1.26
Sham (5)	19.57 ± 0.92	146.79 ± 4.02
15 min recirculation		
+ none (5)	19.42 ± 0.86	101.59 ± 5.45[a]
+ vehicle (5)	19.32 ± 0.71	106.10 ± 5.65[b]
+ BY-1949 (5)	19.41 ± 0.61	125.88 ± 1.61[c,d]

[a] $P < 0.001$ (sham vs. none).
[b] $P < 0.001$ (sham vs. vehicle).
[c] $P < 0.05$ (none vs. BY-1949).
[d] $P < 0.05$ (vehicle vs. BY-1949).

[引用文献]

1. Lees,G.J., Brain Res., 16 (1991) 283 - 300.
2. Nagafuji, T. et al., Brain Res., 571 (1992) 265 - 271.
3. Nagafuji, T. et al., J. Neurochem., 58 (1992) 362 - 368.
4. Perry, V.H. et al., Trends Neurosci., 11 (1988) 273 - 277.
5. Sweadner, K.J., Biochim. Biophys. Acta, 988 (1989)185 - 220.

TABLE II

Effects of BY-1949 and vinpocetine on the Na^+, K^+-ATPase activity following cerebral ischemia in gerbils

The Na^+,K^+-ATPase is expressed as μmol P_i/mg protein/h. Either vehicle, BY-1949, or vinpocetine was administered orally twice, 30 min prior to clipping, and immediately after recirculation. Each value represents the mean ± S.E.M. of the number of animals shown in parentheses. The pre-ischemic values obtained from sham-operated animals were 5.863 ± 0.964 (n = 8) and 6.593 ± 0.969 (n = 8) in the cerebral cortex and hippocampus, respectively.

Treatment	*Brain regions*	*Time after recirculation (min)*		
		15	*30*	*60*
Vehicle	Cerebral cortex	1.578 ± 0.132 (9)	2.503 ± 0.217 (8)	2.881 ± 0.198 (7)
	Hippocampus	1.468 ± 0.129 (9)	2.536 ± 0.229 (7)	2.860 ± 0.219 (7)
BY-1949				
3 mg/kg	Cerebral cortex	2.117 ± 0.237 (7)	2.954 ± 0.141 (8)	2.881 ± 0.141 (8)
	Hippocampus	2.219 ± 0.268 (7)[a]	2.953 ± 0.149 (8)	2.897 ± 0.218 (7)
10 mg/kg	Cerebral cortex	2.209 ± 0.221 (7)[d]	3.277 ± 0.160 (8)[d]	3.433 ± 0.233 (9)
	Hippocampus	2.158 ± 0.214 (7)[a]	3.297 ± 0.170 (8)[a]	3.356 ± 0.228 (9)
30 mg/kg	Cerebral cortex	2.866 ± 0.251 (7)[f]	3.512 ± 0.163 (8)[e]	3.676 ± 0.269 (9)[d]
	Hippocampus	2.688 ± 0.173 (7)[c]	3.469 ± 0.178 (8)[b]	3.684 ± 0.311 (9)
Vinpocetine				
20 mg/kg	Cerebral cortex	1.814 ± 0.149 (7)	2.551 ± 0.216 (7)	2.535 ± 0.133 (7)
	Hippocampus	1.693 ± 0.201 (7)	2.613 ± 0.157 (7)	2.468 ± 0.176 (7)

[a] $P < 0.05$; [b] $P < 0.01$; [c] $P < 0.001$ (vehicle vs. drug-treatment, hippocampus).
[d] $P < 0.05$; [e] $P < 0.01$; [f] $P < 0.001$ (vehicle vs. drug-treatment, cerebral cortex).

138 繰り返し非致死的虚血負荷時の細胞外アミノ酸量の変化について ——microdialysis法を用いた検討——

中田 直樹[1)]、加藤 宏之[1)]、劉 暁宏[1)]、村瀬 健史[1,2)]、劉 勇[1)]、陳 婷[1)]、小暮 久也[1)]
1)東北大学 医学部 神経内科、 2)明治製菓 薬品総合研究所 新薬研究所

〔要約〕

非致死的脳虚血である砂ネズミ2分間虚血負荷を1時間間隔で3回繰り返し、各虚血時の海馬ＣＡ1領域における細胞外glutamate(GLU),glutamine(GLN),glycine(GLY),taurine(TAU),GABA量の変化について測定し、併せてその際のexcitotoxic index(EI)の変化についても検討した。虚血時の細胞外GLU,GLY,TAU,GABA放出量は回数依存的に減少した。しかし、細胞外GLN量は増加した。EIは各虚血時も同程度であり有意な差はみられなかった。以上のことより、2分間虚血を繰り返し負荷した場合、各虚血時の細胞外アミノ酸放出量は減少し、興奮性アミノ酸量と抑制性アミノ酸量の比は変化せず、細胞障害の累積効果にはこれらアミノ酸放出量は重要な関与をしていないことが示された。

【緒 言】

砂ネズミ海馬ＣＡ1錐体細胞は5分間の脳虚血後72時間で著しく減少することが報告されている[6)]。最近、加藤らによりＣＡ1錐体細胞に形態学的に何ら影響を与えない2分間の虚血でも1時間間隔で繰り返し虚血負荷を行うと著しい細胞障害が認められることが報告された[5)]。虚血後の海馬ＣＡ1錐体細胞の障害にはGLU神経系（特にNMDA受容体）の関与が指摘されている[3,7)]。事実、NMDA拮抗薬であるMK-801,CPPなどの前投与により細胞障害が抑制されることが報告されている。また、虚血負荷時に細胞外GLU,GLY,GABAなどのアミノ酸が一過性に増加することも報告されている[1)]。今回、我々は砂ネズミに1時間間隔で3回の2分間の虚血負荷を行い、各虚血後の細胞外アミノ酸量をmicrodialysis法を用いて測定し、併せてGlobusら[4)]によって報告されたEI[(GLU conc.xGLY conc.)/GABA conc.]を求め、累積的神経細胞障害における興奮性アミノ酸の役割について検討した。

【実験方法】

脳虚血負荷：実験には砂ネズミ(60-80g:n=5-6)を用いた。1.5%halothane麻酔下(70%N_2O+30%O_2)で両側総頸動脈を露出し、軽麻酔下(0.5-0.75%halothane in 70%N_2O+30%O_2)で杉田式クリップにて閉塞した。

Microdialysis用probeの植え込み：1.5%halothane麻酔下(70%N_2O+30%O_2)に脳定位固定装置(David Koff)に固定し、Thiessen and Yahrらの脳図譜に従い[8)]、microdialysis用probe(1-mm dialysis membrane, 0.22-mm o.d., mol. wt. cut-off=50000, Eicom)を海馬領域にむけてbregmaからP 1.0 mm, L 2.0 mm, duraより1.7 mmの深さに植え込んだ。軽麻酔下(0.5-0.75%halothane in 70%N_2O+30%O_2)で1時間以上維持した後、10分間隔で透析液の回収を行った。透析液はsalineを用い、1μl/minの流速で流した。

アミノ酸測定：Benvenisteらの方法に従い[1)]，回収した透析液にO-phthaldialdehydeおよび2-mercaptoethanolを含む反応液に2分間反応させた後ECD付きHPLCで測定した。

【結果および考察】

細胞外アミノ酸量：結果は虚血前の量を100%として変化量を%で表示した(Figs. 1A-1E)。GLU量は1回目の虚血では284%まで増加したが,2回および3回目ではそれぞれ179%,163%であった。GLN量は初回では変化しなかったが、2回および3回目ではわずかに増加した。GLY量は初回および2回目の虚血では有意に増加したが、3回目の虚血後では有意に増加しなかった。TAU量も回数依存的に減少し、1回、2回および3回目それぞれ235%,172%および159%であった。GABA量は虚血負荷によってもっとも増加するが、GLU,TAUと同様に回数依存的に減少した。EIは各回とも同程度であり有意な差は認められなかった(Fig.2)。

虚血時細胞外GLU量が増加することはすでに報告されている[1)]。また、虚血に対してもっとも脆弱な細胞である海馬ＣＡ1錐体細胞にはNMDA受容体が豊富に存在していること[2)]、およびMK-801,CPPなどNMDA受容体拮抗薬の前投与により虚血後の細胞障害が軽減すること[3,7)]より、GLUは細胞障害を誘発する物質の一つと考えられている。2分間という非致死的な虚血でも1時間間隔で3回繰り返すことにより細胞障害が誘発される。しかし、今回の実験結果からは細胞外GLU放出量は虚血を繰り返すと減少した。これらの結果は２つの原因が関与しているものと思われる。一つは神経細胞が虚血により障害を受けGLU合成量が減少し、放出量が減少する。さらにアミノ酸の消去機構はグリア細胞に対する取り込みであるが、グリア細胞は虚血に対し比較的強いためアミノ酸の取り込み機構は

残存し、結果的に細胞外アミノ酸量が減少したものと思われる。さらに、NMDA受容体を修飾するGLY量も、また抑制性アミノ酸であるGABA量も減少し、EIは各回とも変化しなかった。本結果から2分間の虚血を1時間間隔で行った際みられる累積的障害には少なくとも虚血後の細胞外アミノ酸放出量の変化は重要な関与をしていないことが示された。

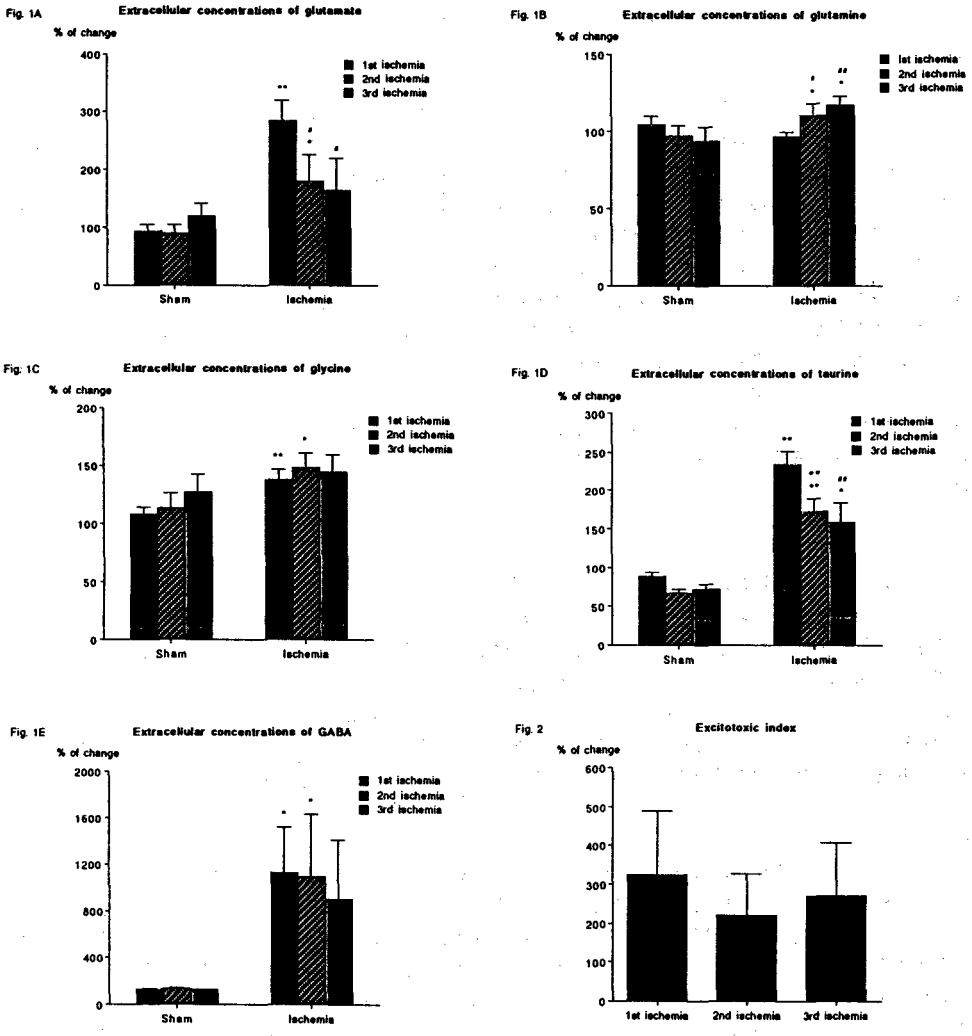


Fig. 1 各虚血時のおける海馬の細胞外アミノ酸量の変化(1A:GLU, 1B:GLN, 1C:GLY, 1D:TAU, 1E:GABA, n=5-6)
Fig. 2 各虚血時におけるExcitotoxic indexの変化(n=5-6)

【参考文献】

1) Benveniste H. et al. (1984) J. Neurochem. 43, 1369-1374.
2) Bowery N. G. et al. (1988) Br. J. Pharmacol. 93, 944-954.
3) Choi D. W. (1990) Cerebrovasc. Brain Metab. Rev. 2, 105-147.
4) Globus M. Y. -T. et al. (1991) J. Cereb. Blood Flow Metab. 11(suppl. 2), S10.
5) Kato H. et al.(1989) Brain Res. 479, 366-370.
6) Kirino T. (1982) Brain Res. 239, 57-69.
7) Meldrum B. (1990) Cerebrovasc. Brain Metab. Rev. 2, 27-57.
8) Thiessen D. and Yahr P. (1977) University of Taxas Press, Texas.

139 ラット脳虚血負荷に伴う神経細胞障害に対する塩酸ビンコナート（OM－853）の防御作用

飯野年昭、桂　昌司、橋本恒一、栗山欣弥
（京都府立医大・薬理学教室）

〔要約〕

新規indolonaphthyridine誘導体であるvinconate hydrochloride(OM-853)の脳虚血負荷に伴うラット脳内神経細胞障害に対する防御作用について、神経活性アミノ酸の細胞外放出に対する作用を中心に検討した。10分間の脳虚血負荷5日後に、海馬CA1錐体細胞に明らかな壊死像が観察され、同一条件下において、海馬の神経活性アミノ酸含量にも有意な低下が認められた。これらの変化は、OM-853(50 mg/kg)の虚血10分前処置により有意に防止された。10分間の脳虚血負荷により、海馬において、神経活性アミノ酸（グルタミン酸、アスパラギン酸、GABA、グリシンおよびタウリン）の細胞外放出量が顕著に増加した。これらの増加に対して、OM-853（50～200 mg/kg)の虚血10分前処置は、興奮性アミノ酸（グルタミン酸およびアスパラギン酸）の細胞外放出量を有意に減少したが、GABA、グリシンおよびタウリンの放出量に対しては有意な影響を与えなかった。なお、OM-853はこれら神経活性アミノ酸の基礎放出量に対しては影響を与えなかった。この虚血に伴う興奮性アミノ酸の過剰放出に対するOM-853の抑制作用は、ムスカリン受容体アンタゴニストであるスコポラミンによって拮抗された。また、ラット脳粗シナプス膜標品を用いた結合実験において、OM-853(10^{-10}～10^{-4} M)の添加は、[^{3}H](+)MK-801結合に対し影響を与えなかった。以上の成績より、OM-853 の脳虚血保護作用には、少なくとも、虚血に伴う興奮性アミノ酸の過剰放出をムスカリン受容体の刺激を介して抑制することが関与していると考えられる。

〔目的〕

新規indolonaphthyridine誘導体である (±)methyl-3-ethyl-2,3,3a,4-tetra-hydoro-1H-indolo [3,2,1-de] [1,5] naphthyridine-6-carboxylate monohydrochloride, vinconate hydrochloride (OM-853)は、ラットにおいて脳内モノアミン神経系を賦活すること[4,5]、老人においては、精神運動反応、認知機能、注意力、集中力などを改善することが報告されており、脳代謝改善薬としての臨床利用が期待される薬剤である。さらに最近、ラット、砂ネズミを用いた実験的脳虚血モデルにおいて、OM-853 は、虚血による神経細胞障害を防御することも報告されている[1,2]。また、脳虚血による神経細胞障害の発症には、虚血に伴って過剰に放出される興奮性アミノ酸の関与が示唆されている[3,6]。そこで、OM-853の脳虚血障害に対する防御作用について、脳内神経活性アミノ酸の動態に対する作用を中心に検討した。

〔実験方法〕

実験には体重200～300gのWistar系雄性ラット用い、4血管閉塞法[7]により10分間の前脳虚血を施した。海馬の組織化学的検討および神経活性アミノ酸の含量変化の検討には、虚血5日後の動物を用いた。NMDA受容体に対する作用は常法に従い[10]、ラット脳粗シナプス膜標品に対する[^{3}H](+)MK-801結合を指標として検討した。海馬での虚血負荷に伴う神経活性アミノ酸の細胞外放出に対する作用は、マイクロダイアリシス法を用いて検討した。動物は軽ハロセン麻酔下、体温コントロール装置を用いて体温を37±0.5℃に維持し、海馬(A:-3.0 mm, L: 2.0 mm, V: 4.0 mm)にマイクロダイアリシスプローブ を刺入後、リンガー液で灌流(流速 2μl/min)し、灌流開始2時間後より10分間隔で透析液を採取した。OM-853は蒸留水に溶解し、in vitro添加の場合を除いて、虚血負荷10分前に腹腔内投与した。スコポラミン併用群においては、OM-853投与10分前より灌流液中にスコポラミン(10^{-5} M)を添加した。神経活性アミノ酸は、高速液体クロマトグラフで分離後、ポストラベル蛍光法で測定した。神経活性アミノ酸の細胞外放出量は、虚血負荷前の基礎放出量に対する増加の割合として示した。実験成績は、分散分析後、2群間においては、Cochran-Cox's t-testを用い、多群間においては、Scheffe's testを用いて、統計学的有意差を検定した。

〔実験結果〕

脳虚血負荷5日後において、海馬CA1錐体細胞に明らかな壊死像が観察された。また、同一条件下において、海馬の神経活性アミノ酸含量にも有意な低下が認められた。これらの変化は、OM-853の虚血10分前処置により有意に防止され、OM-853による遅発性神経細胞死の防止作用が確認された。ラット脳粗シナプス膜標品を用いた結合実験において、OM-

853(10^{-10}～10^{-4} M)の添加は、[^{3}H](+)MK-801結合に対し影響を与えなかった。神経活性アミノ酸の基礎放出量（pmol/min)はそれぞれ、グルタミン酸 2.35±1.25、アスパラギン酸 0.53±0.05、GABA 0.23±0.03、タウリン 7.19±0.61、グリシン 2.58±0.01であった。10分間の脳虚血負荷に伴い、海馬における神経活性アミノ酸の放出量は顕著に増加し、それぞれ基礎放出量に対してグルタミン酸は1001±272%、アスパラギン酸は681±150%、GABAは1196±367%、グリシンは462±80%、タウリンは1008±136%増加した。これらの神経活性アミノ酸放出量の増加に対して、OM-853(50～200 mg/kg)の虚血負荷10分前の腹腔内投与は、グルタミン酸およびアスパラギン酸放出量を有意に減少させた(Fig. 1)。一方、GABA、グリシン、タウリンの放出に対しては、OM-853の投与は有意な影響を与えなかった。虚血に伴う興奮性アミノ酸の過剰放出に対するOM-853の抑制作用は、ムスカリン受容体アンタゴニストであるスコポラミンによって拮抗された(Fig.2)。なお、これらの神経活性アミノ酸の基礎放出量に対しては、OM-853は影響を与えなかった。

[考察]

海馬は脳虚血に対して最も脆弱な部位の一つであることが知られており、虚血による神経細胞障害には、グルタミン酸等の興奮性アミノ酸の過剰放出が関与していることが示されている[8]。グルタミン酸阻害剤およびNMDA受容体阻害剤等が虚血による神経細胞障害を防御するという報告もなされている[9]。また、すでに組織学的検討において、OM-853は虚血に伴う脳内神経細胞障害を防御すること[1,2]が報告されている。そこで、今回OM-853の神経活性アミノ酸の脳内動態に対する作用を中心に検討した。一過性脳虚血負荷に伴い、海馬においてみられたグルタミン酸およびアスパラギン酸の過剰な放出は、OM-853（50～200 mg/kg）を虚血10分前に腹腔内投与することにより有意に抑制され、この作用はムスカリン受容体アンタゴニストであるスコポラミンによって拮抗されることが明らかとなった。

神経終末には、その神経終末から放出される神経伝達物質に対して親和性を有するプレシナプスレセプター（オートレセプター）、および異なる神経伝達物質に対して親和性を有するプレシナプスレセプター（ヘテロレセプター）が存在し、神経終末からの神経伝達物質の放出を調節していることが知られている。さらに、ラットの種々の脳領域において、グルタミン酸作動性神経終末にはグルタミン酸放出を抑制的に調節している種々のヘテロレセプターが存在することが報告されており、海馬においてはムスカリン受容体の関与が報告されている[6]。また、OM-853 はムスカリン受容体に対して親和性を有することも報告されている[5]。一方、OM-853はNMDA受容体チャネルには、直接的に影響を及ぼさなかった。従って 、OM-853は、ラット海馬において、ムスカリン受容体の活性化を介して虚血に伴う興奮性アミノ酸の過剰放出を抑制したと考えられ、この作用がOM-853 による脳虚血障害の防御作用の一因になっていると考えられる。

[文献]

(1) Araki, T. and Kogure, K. (1989)Mol. Chem. Neuropathol. 11, 33-43 (2)Araki, T., Nishioka, K., Yuki, S. and Kogure, K. (1989)Acta Neurol. Scand. 81, 173-176 (3)Benveniste, H., Jorgensen, M. B., Sandoerg, M., Christensen, T., Hagbery, H. and Diemer, N. H. (1989) J. Cereb. Blood Flow Metab. 9, 629-639 (4)Koda, H., Hashimoto, T., Katsura, M. and Kuriyama, K. (1989)Japan. J. Pharmacol. 49, 413-421 (5)Koda, H., Hashimoto, T. and Kuriyama, K. (1989)Eur. J. Pharmacol. 162, 501-508 (6)Mario, M. and Maurigio, R. (1989)J. Pharmacol. Exp. Ther. 248, 1255-1260 (7)Pulsinelli, W. A. and Brierley, J. B. (1979)Stroke 10, 267-272 (8)Rothman, S. M. and Olney, J. W. (1987)Trends Neurosci. 10, 299-302 (9)Swan, J. H. and Meldrum, B. S. (1990)J. Cereb. Blood Flow Metab. 10, 343-351 (10) Yoneda, Y. and Ogita, K. (1989) Brain Res. 499, 305-314

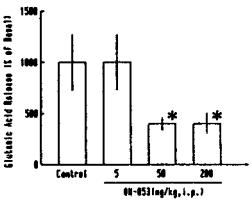


Fig. 1 Effect of OM-853 on the ischemia-induced release of excitatory amino acids. *p<0.05, compared with the control value.

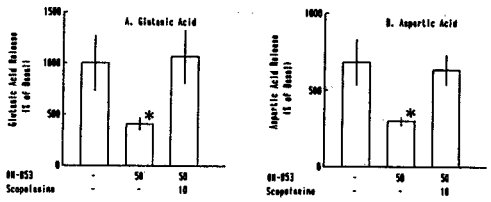


Fig. 2 Effect of scopolamine on OM-853 induced suppression of ischemia-induced release of excitatory amino acids. *p<0.05, compared with the control value(without OM-853 and scopolamine).

140 一過性脳虚血後のＮＭＤＡ受容体ｍＲＮＡ発現の変化

杉本　晃、武田　篤、小野寺宏、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４血管閉塞モデルを用いて一過性前脳虚血後の海馬におけるＮＭＤＡ受容体（ＮＭＤＡＲ１）ｍＲＮＡ発現の変化をノーザンブロット及びin situ hybridizationにより検討した。正常動物ではＣＡ１－４領域の錐体細胞、歯状回顆粒細胞にＮＭＤＡＲ１ｍＲＮＡが発現していた。脳虚血２日後、ＣＡ１錐体細胞の脱落に伴い顕著なＮＭＤＡＲ１ｍＲＮＡの減少が認められたが、ＣＡ３及び歯状回ではその発現レベルには変化がなかった。一方、in vitro 受容体オートラジオグラフィーでは、虚血後ＣＡ１のみならず海馬回全体でcompetitive-ＮＭＤＡ受容体密度が減少するなど、ＮＭＤＡＲ１のｍＲＮＡ発現レベルとの相違が認められた。

［緒言］受容体アンタゴニストを用いた多くの研究より中枢神経系におけるＮＭＤＡ受容体は学習・記憶の過程に重要な働きを担っているが、虚血やてんかん発作による神経細胞障害にもこのＮＭＤＡ受容体が関わっているとされている。一方、Moriyoshiら(2)は最近ＮＭＤＡ受容体（ＮＭＤＡＲ１）ｃＤＮＡのクローニングに成功した。そこで今回我々は、ラット４血管閉塞モデルを用いた一過性前脳虚血後のＮＭＤＡ受容体のｍＲＮＡの変化をin situ hybridization、ノーザンブロットを用いて検討した。

［方法］Pulsinelli and Brierleyの方法(4)により体重320-380gのWistar系雄性ラットに２０分間の一過性前脳虚血を加えた。血流再開３時間、１２時間、１日、２日、４日、７日後に断頭して、速やかに脳を摘出し、凍結切片をin situ hybridizationに使用した。ノーザンブロットには海馬回をＣＡ１領域とＣＡ３及び歯状回領域に２分してＲＮＡを抽出し実験に供した。in situ hybridizationはYokouchiらの方法(5)によった。プローブにはＮＭＤＡＲ１ｃＤＮＡの５’端約１kbのEco RI断片（リボプローブ）を使用した。

［結果と考察］対照動物においては既報と同様、in situ hybridizationではＮＭＤＡＲ１ｍＲＮＡはＣＡ１－４錐体細胞と歯状回顆粒細胞に密に分布していた。２０分間の前脳虚血負荷２日後よりＣＡ１錐体細胞壊死が認められたが、それに伴いＣＡ１領域のＮＭＤＡＲ１ｍＲＮＡ発現レベルが著明に減少した。ノーザンブロットにおいてもＣＡ１領域では虚血２日以降ＮＭＤＡＲ１ｍＲＮＡ発現レベルが著明に減少していた。また、in situ hybridization、ノーザンブロットいずれでもＣＡ３や歯状回では有意なＮＭＤＡＲ１ｍＲＮＡ発現レベルの変化は認められなかった。

既に我々は、competitive-ＮＭＤＡ受容体拮抗薬であるＣＰＰを用いて脳虚血後のＮＭＤＡ受容体密度の変化をin vitro 受容体オートラジオグラフィーにより検討しているが(3)、ＣＡ１のみならず海馬回全体でＣＰＰ結合の減少を観察した。このことからＣＡ１領域でのＮＭＤＡＲ１ｍＲＮＡとcompetitive-ＮＭＤＡ受容体の虚血後の変化はほぼ一致するものの、他の領域では必ずしもＮＭＤＡＲ１ｍＲＮＡレベルとＮＭＤＡ受容体密度が相関しないことが明らかとなった。ＣＡ３及び歯状回領域ではＮＭＤＡＲ１の転写は正常であるが受容体蛋白の分解の促進、コンフォメーションの変化等により受容体の結合能が低下している可能性がある。最近ＮＭＤＡ受容体のサブタイプがいくつかクローニングされており(1)、ＣＰＰがＮＭＤＡＲ１以外のＮＭＤＡ受容体の虚血後の変化を反映しているかもしれない。

［文献］(1) Meguro,H., Mori,H., Araki,K., Kushiya,E., Kutsuwada,T., Yamazaki,M., Kumanishi,T., Arakawa,M., Sakimura,K. and Mishina,M. (1992) Nature 357, 70-74 (2) Moriyoshi,K., Masu,M., Ishii,T., Shigemoto,R., Mizuno,N. and Nakanishi,S. (1991) Nature 354, 31-37 (3) Onodera,H., Araki,T. and Kogure,K. (1989) J.Cerb.Blood Flow Metab. 9, 623-628 (4) Pulsinelli,W.A. and Brierley,J.B. (1979) Stroke 10, 267-272 (5) Yokouchi,Y., Sasaki,H. and Kuroiwa,A. (1991) Nature 353, 443-445

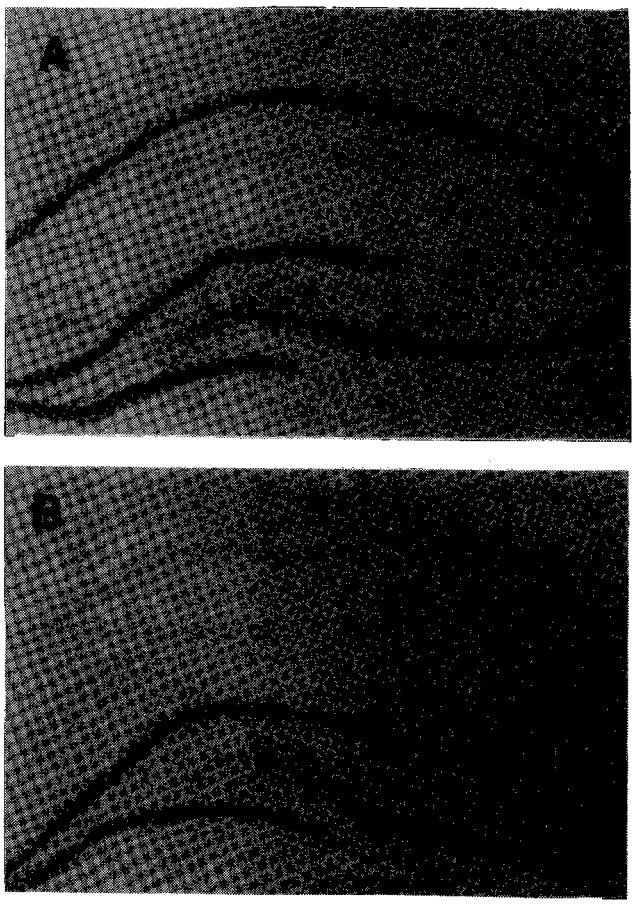


図1

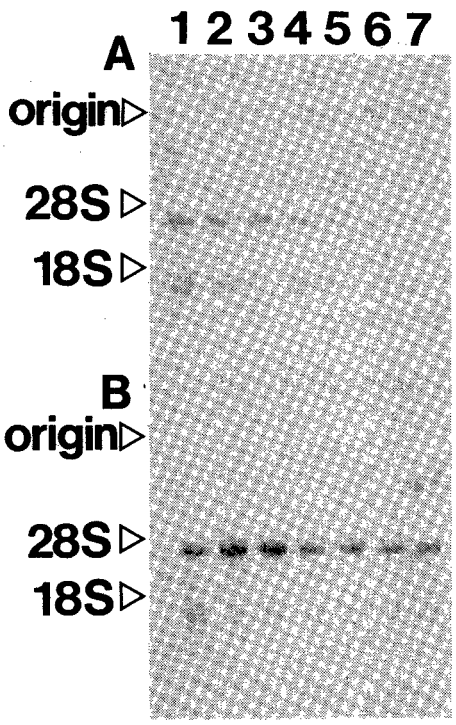


図2

図1　虚血後のラット海馬におけるNMDAR1mRNA局在の変化
A：sham-ope　B：虚血－再灌流2日後

図2　虚血後のラット海馬におけるNMDAR1mRNA量の変化
A：CA1領域　B：CA3、4、歯状回領域
lane1:sham-ope、lane2:虚血－再灌流3時間後、lane3:同12時間後、lane4:同1日後、
lane5:同2日後、lane6:同4日後、lane7:同7日後

[謝辞]
Rat NMDAR1 plasmidをご供与頂きました中西重忠先生及びご指導頂きました東北大学応用生理学教室、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。

141 ラット脳断頭虚血によるホスホリパーゼD活性低下

西田　朗*・江本克也**・清水雅美*
魚住　徹**・早川　浩***・山脇成人***
(*国立呉病院臨床研究部・広島大・**脳外・***神経精神)

〔要約〕
ラット脳膜画分でのホスホリパーゼD（ＰＬＤ）活性とホスホリパーゼC（ＰＬＣ）活性への断頭虚血の影響を比較検討した。その結果、断頭虚血３０分後、ＰＬＤ活性は著名に低下したが、ＰＬＣ活性は変化しなかった。イムノブロットにより断頭虚血によるＰＬＣβ_1量の変化の有無を検討したが、虚血はＰＬＣβ_1量に影響しなかった。

［目的］
種々の細胞外情報（神経伝達物質、ホルモンなど）が細胞膜上の受容体を経て細胞膜リン脂質の分解とそれによるセカンドメッセンジャーの産生を引き起こす。最近、多くの動物細胞で、受容体刺激後にホスファチジルコリン（ＰＣ）をホスホリパーゼD（ＰＬＤ）が分解し、ホスファチジン酸（ＰＡ）とコリンを産生する系の存在が明らかになり注目を集めている（1）。ＰＡはジアシルグリセロール（ＤＧ）に代謝され、ＰＡ自体またはＤＧがセカンドメッセンジャーとして機能する。一方、コリンはアセチルコリン合成の基質に成りうることが示されている。ＰＬＤ系の他に、リン脂質連関細胞内情報伝達系には、ホスホリパーゼC（ＰＬＣ）によりホスファチジルイノシトール４、５-二リン酸（PIP_2）が分解されイノシトール１、４、５-三リン酸（IP_3）とＤＧの産生される系の存在が既に知られている。このIP_3は細胞内カルシウム貯蔵部位からカルシウム遊離を引き起こし、ＤＧはプロテインキナーゼCを活性化する。
近年、脳虚血初期の病態への細胞内カルシウムの上昇の関与が注目を集めてきている（6）。細胞内カルシウムの上昇はカルシウム依存性プロテアーゼやホスホリパーゼ、プロテインキナーゼCを活性化し不可逆的な２次的脳損傷を引き起こし、神経細胞死に至ると考えられてきている。脳虚血の最初期でのＰＬＣ活性化の報告はあるが、虚血の進行過程でのホスホリパーゼ活性の変化は明らかではない。そこで本研究では、ラット脳の膜画分でのＰＬＤ活性とＰＬＣ活性への断頭虚血の影響を比較検討した。その結果、断頭虚血３０分後、ＰＬＤ活性は著名に低下したが、ＰＬＣ活性は変化しなかった。また、イムノブロットによりＰＬＣβ_1量の変化を検討したところ断頭虚血ではその量に変化は見られなかった。

［方法］
1)断頭虚血モデルと膜標品の作成
Wistar系雄性ラット(体重約250g)を使用した。control群では断頭後直ちに海馬を取り出し、10倍量のhomogenizing buffer (0.5 mM EDTA/1 mM dithiothreitol/0.1 mM phenylmethylsulfonylfloride/0.32 M sucrose/40 mM Hepes-NaOH pH 7.2)でhomogenizeした後、10、500gで60分間遠心し、その沈渣を上記のhomogenizing bufferで再懸濁したものを膜画分とした。ischemia群では全脳を取り出した後、37℃、30分間Krebs-HEPES buffer (127 mM NaCl/1.6 mM KCl/1.24 mM KH_2PO_4/1.3 mM $MgSO_4$/2.4 mM $CaCl_2$/26 mM $NaHCO_3$/glucose (-)/10 mM HEPES-NaOH、30分間95%N_2+5%CO_2ガスで脱気処置)中に静置した後、上記の方法で海馬の膜画分を得た。
2)ＰＬＤ活性測定法
ＰＬＤ活性測定は、既報どうりに行なった（２）。反応液は0.1% TritonX-100、5 mM *p*-nitrophenylphosphate、40 mM HEPES-NaOH、pH7.2、30 μM [^{3}H]phosphatidylcholineと膜標品(20 μg)から成り、37℃、15分間反応させた。反応後に生じたコリンの放射活性を測定した。
3)ＰＬＣ活性測定
ＰＬＣ活性測定は、既報を一部改変して行なった（３）。反応液は0.1% sodium deoxycholate、80 mM KCl、2 mM EGTA、1.6 mM $CaCl_2$、20 mM Tris-maleate、pH6.5、0.04 mM phosphatidylethanolamine、0.2 mM [^{3}H]phosphatidylinositol4、5-二リン酸と膜標品(0.5 μg)から成り、37℃、5分間反応させた。反応後に生じたイノシトールリン酸の放射活性を測定した。

4)イムノブロット

通常のSDS-PAGE後、ニトロセルロースメンブレンにブロットした。一次抗体はRheeらの抗体を使用し（4）、ダコＬＳＡＢキットを使用して発色させた。

［成績］

1)脳虚血の ホスホリパーゼ活性への影響

ラット脳海馬で、断頭虚血直後(control群)と３０分後(ischemia群)で比較したところ、ＰＬＤ活性は有意に(n=8、p<0.01)低下したが、ＰＬＣ活性は全く変化しなかった(Fig.1)。

2)脳虚血の ＰＬＣβ_1量への影響

イムノブロットの結果、ラット脳海馬膜画分でのＰＬＣβ_1量には、断頭虚血による変化は見られなかった(Fig. 2)。

［考察］

今回の研究から、リン脂質に連関した情報伝達酵素でもＰＬＤとＰＬＣではその虚血に対する脆弱性に大きな差のあることが明かとなった。ＰＬＣ活性に変化がないという結果はラット全脳での既報の結果とよく一致した（5）。本研究でのＰＬＤ活性の選択的低下は、脳虚血後の細胞内カルシウムの上昇によりカルシウム依存性プロテアーゼが活性化されタンパク質分解が起こった可能性がある。今後、タンパク質分解酵素阻害剤の処置が虚血によるＰＬＤ活性低下に作用するかどうか検討したい。ＰＬＤは ＰＬＣと比較すると、その比活性は約１０００分の１しかなく、ラット脳には極めて小量しか存在しないと推定された。動物細胞でのＰＬＤの完全精製はいまだに報告されていなが、今回の研究で示されたＰＬＤの虚血脆弱性はＰＬＤ精製を行う際には注意しなければならないかもしれない。イムノブロットでのＰＬＣβ_1量の無変化という結果は、ＰＬＣ活性に変化がなかったことと相応した。今後はＰＬＣの他のサブタイプの検討も必要と思われた。ＰＬＤに対する抗体はいまだに作成されておらず、イムノブロットはおこなえなかったが、ＰＬＤ活性低下の所見から、虚血によるＰＬＤ量の変化の有無の検討は大変興味深い。

［文献］

1) 金保ら(1991) 蛋白質核酸酵素(臨増)36、608-614
2) Nishida, A. et al, Brain Res. in press
3) Nishida, A. et al (1988), Neurosci. Lett. 90. 354-357
4) Park、DJ. et al (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 5453-5456
5) 下濱ら(1991) 神経化学 34、102-103
6) Siesjo, BK.(1989) J. Cereb. Blood Flow Metabolism 9. 127-140

Fig. 1

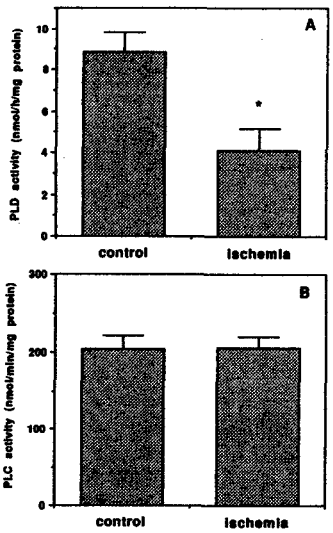


Fig. 1 Effect of ischemia on phospholipase D activity and phospholipase C activity.
A: phospholipase D
B: phospholipase C

Fig. 2

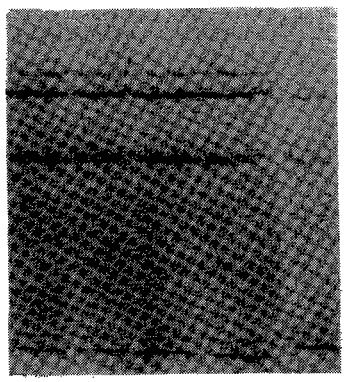


Fig. 2 Immunoblot analysis of PLCß$_1$ of hippocampal membranes from control and ischemic rats.
lane 1,2 : control
lane 3,4 : ischemia
lane 5 : 1st Ab(-)

142 一過性脳虚血後の海馬ＣＡ１及び歯状回における ＧＡＰ-４３発現の経時的変化

小豆原秀貴、小野寺宏、山崎靖人、杉本晃、小暮久也

東北大学神経内科

〔要約〕

虚血障害後の海馬でのlesioned-induced sprouting及びreactive synaptogenesis を調べるため、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、海馬でのGAP-43の経時的変化を、虚血後１００日にわたりimmunohistochemistry及びimmunoblottingにて検討した。 immunohistochemistyryでは、染色性は虚血７２時間後海馬CA1・stratum radiatum 及びstratum oriensで減少、CA1・stratum lacunosum moleculare で増加した。その後は海馬CA1・stratum lacunosum moleculareでも減少した。dentate gyrusでは、虚血7-１４日以後、特に、outer moleular layerで徐々に減少するものと思われた。虚血負荷後の海馬では、比較的早期よりreactive synaptogenesisに関与する機構が働いていると考えられた。

（はじめに）

海馬は脳虚血に対してもっとも脆弱な中枢神経系組織の一つであるが、一方、虚血後の海馬では、lesioned-induced sproutingあるいはreactive synaptogenesisが認められている[1]。神経特異蛋白growth associated protein 43 (GAP-43) は神経組織の発達及び再生に際し、軸索の成長に密接関連して発現されることが知られている[2,3]。当研究ではGAP-43の発現変化を検索することにより、虚血障害後の海馬におけるreactive synaptogenesisを検討した。これらの情報は虚血障害の治療を考える上で有益な情報と思われる。

（方法）

Wistar系雄性ラット（９-１１週齢、２９０-３２０g）を使用した。ラット四血管閉塞モデル[4]を用い、２０分の一過性脳虚血負荷後、経時的に（虚血後、３０分-１００日)海馬におけるGAP-43の発現変化を、immunohistochemistry及びimmunoblottingにて検討した。

（結果）

（１）immunohistochemistry (Fig. 1)

control animal (Fig. 1, A)では、海馬の層状構造に一致した染色が得られた。即ち、CA1では、stratum radiatum (sr)、stratum oriens (so)及びstratum lacunosum moleculare (slm)の一部に、dentate gyrus (DG)では、inner molecular layer (iml)に強い染色が得られた。脳虚血負荷２４-７２時間後、 CA1では錐体細胞障害の発生時期に一致して、so及びsrでの染色性の低下を認める一方、slmでは徐々に染色は強くなった(Fig. 1, B)。７２時間後をpeakにslmの染色は徐々に減弱した(Fig. 1, C)。 DGの、染色性は、虚血７-１４日以後、outer molecular layer (oml)で徐々に減弱するものと思われた(Fig. 1, A-C)。

（２）immunoblotting (Fig. 2)

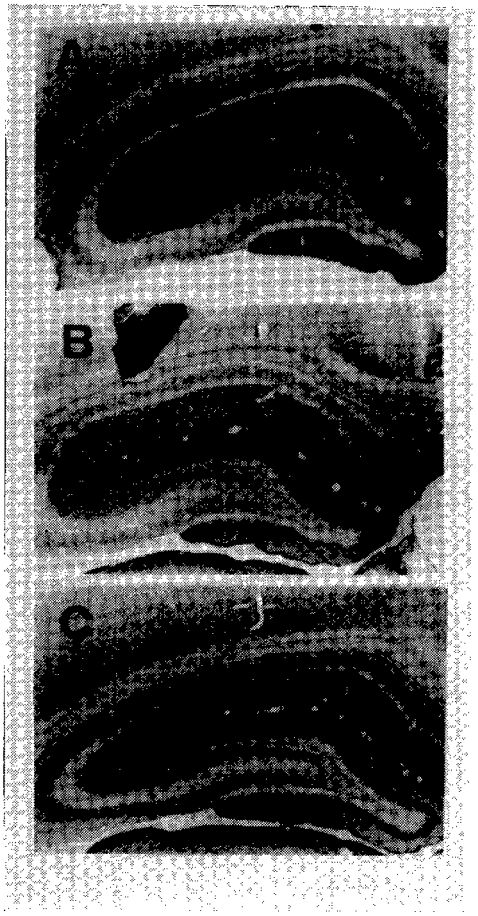
CA1のGAP-43 immunoreactive productの発現は虚血２４時間後より著明に減少、７２時間後わずかに回復した(Fig. 2, A)。DGでは、虚血７-１４日以後わずかに減少するものと思われた(Fig. 2, B)。

（考察）

perforant pathの切断により、その投射領域である海馬CA1・slmでのGAP-43の発現減少と、CA1・so及びsrで発現増加が報告されており[5]、perforant path障害に伴うreactive synaptogenesisを反映したものと考えられる。当研究ではこれとは逆のpattern（so及びsrで減少、slmで増加）が観察され、当モデルのCA1錐体細胞障害の病因を考える上で、興味深い。虚血１００日後のDGでmossy fiber sproutingが報告されているが、当研究のGAP-43の解析からは明らかに出来なかった。

（文献）

1) Benowitz, L. I. and Routtenberg, A., (1987) TINS 10 (12), 527-532.
2) Benowitz, L. I. et al., (1990) Mol. Brain Res. 8, 17-23.
3) Onodera, H. et al., (1990) Neuroscience 38 (1), 125-136.
4) Pulsinelli, W. A. et al., (1979) Stroke 10, 267-272.
5) Skene, J. H. P., (1989) Ann. Rev. Neurosci. 12, 127-156.



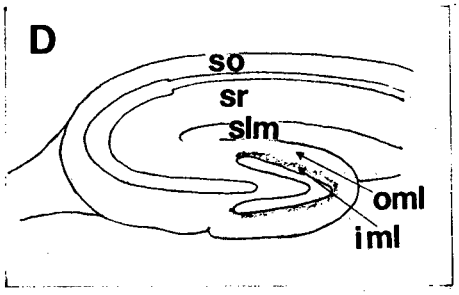


Fig. 1 Time course of GAP-43 change in hippocampus after ischemia and schematic illustration of the hippocampus.

A; sham operated control
B; 72h after ischemia
C; 30 days after ischemia
D; schematic illustration of the laminar organization of the hippocampus
so, stratum oriens;
sr, stratum radiatum;
slm, stratum lacunosum moleculare;
oml, outer molecular layer of DG;
iml, inner molecular layer of DG.

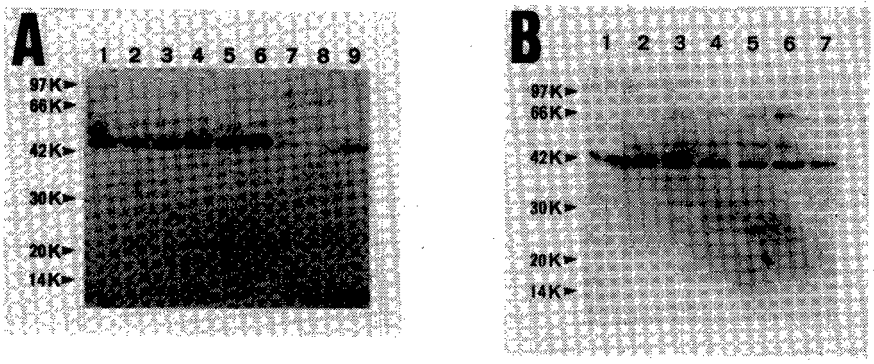


Fig. 2 Immunoblot time course of GAP-43 expression after ischemia.

A, CA1 subfield; lane 1, sham operated control; lane 2, 30 min after ischemia; lane 3, 90 min after ischemia; lane 4, 3h after ischemia; lane 5, 6h after ischemia; lane 6, 12h after ischemia; lane 7, 24h after ischemia; lane 8, 48h after ischemia; lane 9, 72h after ischemia.

B, dentate gyrus; lane 1, sham operated control; lane 2, 24h after ischemia; lane 3, 48 after ischemia; lane 4, 72h after ischemia; lane 5, 7 days after ischemia; lane 6, 14 days after ischemia; lane 7, 30 days after ischemia.

143 一過性脳虚血砂ネズミにおける脳内アセチルコリン系神経機構の変化に対するアセチルコリンエステラーゼ阻害薬の保護作用

○田中健一[1]、小川紀雄[1]、浅沼幹人[1]、平田 洋[1,2]、近藤洋一[1,2]、周 希誠[1]、森 昭胤[1]
岡山大学医学部、分子細胞研・神経情報学部門[1]、第三内科[2]

〔要約〕

痴呆患者脳においては、一般に脳内アセチルコリン(ACh) 系神経機構の機能低下が最も特徴的であることから、ACh 系の機能を高める治療薬の開発が試みられている。痴呆の原因疾患の中でも脳血管障害の占める割合は大きいことから、これらの治療薬が、脳血管障害を防いだり、脳血管障害をきっかけとする脳機能の変化を阻止することで少なくとも脳血管性痴呆を予防し得る可能性がある。そこで、砂ネズミの一過性脳虚血モデルを用いて、脳内ACh 系神経機構の虚血による影響に対するアセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害薬 (ENA-713)の効果を脳の2部位で生化学的変化を指標にして検討した。虚血再開通後4日目において、顕著に減少したACh 濃度はENA-713(0.2 mg/kg, i.p.)を予め投与しておくことにより、海馬において有意に回復した。同様に、虚血再開通後14日目において、海馬におけるムスカリンレセプター(mACh-R)結合能の低下を有意に改善した。よって、ENA-713 は一過性脳虚血後の神経細胞障害による脳内ACh 系神経機構の生化学的変化に対する保護作用を示したことから、脳血管性痴呆の予防・治療薬としての有用性が示唆された。

〔はじめに〕

老年期痴呆の患者脳では、脳内アセチルコリン(ACh) 系神経機構の低下が生化学的特徴とされており、知的機能低下との関連が注目されている。そこで、ACh 系の機能を高めることにより、痴呆の症状を改善する試みがなされている。新規のフェニルカルバメイト誘導体である、(S)-N-Ethyl-3-[(1-dimethyl-amino)ethyl]-N-methyl-phenylcarbamate hydrogen tartrate(ENA-713)はアセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害作用を有し、同じ作用を有するフィゾスチグミンと比べ、より高い中枢選択性を示す。すでに、ENA-713 は痴呆の病態モデルの1つである前脳基底部破壊ラットにおいて、記憶・学習改善作用を有することが報告されており(1) 、治療薬としての可能性が示唆されている。わが国では、脳梗塞の多発などの脳血管障害によって生じる脳血管性痴呆の占める割合も高いことから、脳血管障害に対する効果を有することは、少なくとも脳血管性痴呆に対する治療薬、あるいは予防薬として有用といえる。そこで、脳血管障害の代表的な病態モデルである一過性脳虚血砂ネズミを用いて、脳血管障害に対するENA-713 の効果を脳虚血後の脳内ACh 系神経機構の生化学的指標(ACh 濃度、mACh-R結合能、ACh 合成酵素活性、ACh 分解酵素活性)を用いて検討した。

〔実験方法〕

成熟砂ネズミ(体重60-80g、雄性)を用い、エーテル麻酔下、両側総頸動脈を露出し、覚醒後、動脈瘤クリップで閉塞した。5分後クリップを除去して再開通させた(虚血群)。ENA-713 は生理食塩水に溶解し、0.2 mg/kg を結紮2時間前に腹腔内投与した。偽手術群は、両側総頸動脈閉塞を除いて、虚血群とすべて同じ条件で行なった。また、対照群には生理食塩水を投与したものを用いた。ACh 濃度は、再開通後、4・14日目にマイクロウェーブ(4.8kw,1.1s)にて屠殺し、脳組織（前頭皮質、海馬）をすみやかに取り出し、高速液体クロマトグラフィーにて定量した (3)。ムスカリンレセプター(mACh-R)結合とAChE活性およびコリントランスフェラーゼ (CAT)活性の測定には4・14日目に断頭屠殺して、測定に供した。mACh-R結合の測定は粗膜画分を用い、[^{3}H]-QNBによるラジオレセプターアッセイを行なった (4)。CAT 活性はHabaらの方法にて測定した (5)。また、AChE活性は和光純薬のAChE測定キットを、蛋白定量はBio-rad の測定キットを使用した。各測定値は、one-way ANOVA 法によって検定し、5％以下を有意差とした。

〔結果〕

虚血対照群における虚血再開通後4日目のACh 濃度は、海馬で偽手術対照群と比べて顕著に減少したが、ENA-713 を予め投与することにより、偽手術対照群と同じレベルを維持した (Table 1)。また、このような変化は前頭皮質では認

Table 1. Effect of ENA-713 on ischemia-induced changes in ACh (ng/mg protein) in two brain regions

	Sham-operated group		Ischemic group	
	saline	ENA-713	saline	ENA-713
Frontal cortex				
4days	1.65 ± 0.13	1.37 ± 0.10	1.54 ± 0.15	1.67 ± 0.05
14days	1.55 ± 0.16	2.41 ± 0.21$^{*,+}$	1.58 ± 0.15	1.65 ± 0.12
Hippocampus				
4days	1.56 ± 0.09	1.21 ± 0.14^{++}	0.36 ± 0.06**	1.58 ± 0.05^{++}
14days	1.47 ± 0.08	2.15 ± 0.14$^{*,+}$	1.55 ± 0.18	2.22 ± 0.25

Values are mean ± S.E.M. from 4-10 gerbils. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs sham-operated controls. $^{+}$ $p<0.05$, $^{++}$ $p<0.01$ vs ischemic controls.

Table 2. Effect of ENA-713 on ischemia-induced changes in mACh-R density (Bmax) (pmol/mg protein) in two brain regions

	Sham-operated group		Ischemic group	
	saline	ENA-713	saline	ENA-713
Frontal cortex				
4days	1.54 ± 0.16	1.45 ± 0.12	1.48 ± 0.04	1.48 ± 0.05
14days	1.55 ± 0.08	1.48 ± 0.12	1.45 ± 0.09	1.42 ± 0.09
Hippocampus				
4days	1.35 ± 0.06	1.33 ± 0.09	1.24 ± 0.07	1.23 ± 0.05
14days	1.53 ± 0.14	1.37 ± 0.09^{++}	0.68 ± 0.04**	1.26 ± 0.07^{++}

Values are mean ± S.E.M. from 4-10 gerbils. ** $p<0.01$ vs sham-operated controls. $^{++}$ $p<0.01$ vs ischemic controls.

められなかった。これに対し、虚血再開通後14日目には、前頭皮質、海馬ともに、虚血対照群と偽手術対照群の間に有意な差はなかったが、偽手術群にENA-713 を投与することにより、どちらの部位においてもACh 濃度が有意に増加した。

海馬における虚血再開通後14日目のmACh-R結合の結合能(Bmax)は虚血対照群で偽手術対照群に比べ、顕著に減少したが、ENA-713 を予め投与することにより、虚血によるBmaxの低下が完全に阻止され、mACh-Rの障害に対する保護効果が認められた (Table 2)。この変化は前頭皮質ではみられなかった。また、虚血再開通後４日目においては前頭皮質、海馬ともに、虚血による影響は認められなかった。なお、虚血再開通後４・14日目のmACh-RのKd値と14日目のACh 系の合成酵素であるCAT 、分解酵素であるAChEの活性は、それぞれ、いずれの群においても変化は認められなかった。

［考察］

老年期痴呆の薬物による治療の可能性が検討されているが、まだ有効な医薬品は開発されていない。我々は、AChE阻害作用を有するENA-713 を用いて、脳血管性痴呆の原因疾患である脳血管障害に対する効果を一過性脳虚血砂ネズミを用いて検討したが、脳の神経細胞は虚血に対する抵抗性が部位によって異なるので、ACh 系神経を多く含む前頭皮質と海馬を用いた。既に我々は、海馬におけるACh 濃度とmACh-R結合の変化に時間的ずれがあることを報告したが (2)、虚血による影響が、ACh 濃度では虚血再開通後４日目に、mACh-R結合では14日目に最も顕著であることから、４・14日目に着目しACh 系の４つの指標について測定した。

海馬において、AChE阻害作用を有するENA-713 を予め投与することにより、虚血再開通後、４日目においてシナプス前部の指標であるACh 濃度の減少を顕著に改善した。また、後部の指標であるmACh-RのBmaxについては、虚血再開通後14日目におけるBmaxの低下を正常なレベルに維持した。よって、ENA-713 が虚血によるACh 系シナプスをめぐる前・後の神経細胞傷害に対する保護作用を有する可能性が示された。これに対し、14日目の時点では、ACh 濃度と同じくシナプス前部の指標であるCAT ・AChE活性にENA-713 は効果を示さなかった。これらの成績は、ACh 濃度が虚血再開通後、比較的早期に変化するのに対し、mACh-RのBmaxが晩発性に変化することを考慮すると、虚血による神経細胞傷害の時間的ずれと傷害に対する各指標の感受性に差のあるものと思われる。以上より、虚血によるACh 系の変化に対する薬物の効果を評価するにはこれらの指標を総合的に評価するとともに、傷害に対する感受性が高いシナプスレセプターの変化に特に注目する必要がある。以上より、ENA-713 は脳血管障害に起因する脳内ACh 系神経機構の傷害を総合的に防護する作用があり、脳血管性痴呆に応用し得る可能性が示唆された。

［参考文献］

(1) 植木昭紀, ほか (1991) 神経精神薬理, 13, 381
(2) Haba, H. et al. (1991) Brain Res., 540, 116
(3) Haba, H. et al. (1990) Neurochem. Res., 15, 487
(4) Ogawa, N. et al. (1983) Brain Res., 263, 348
(5) Haba, H. et al. (1988) Neurochem. Res., 13, 951

144 低酸素性培養神経細胞傷害にたいするプロスタグランディンE₁の保護作用とその作用機序

大槻 秀夫、山田 和雄、湯口 貴導、種子田 護、早川 徹
（大阪大学 医学部 脳神経外科）

〔要約〕18日令ラット培養大脳海馬細胞に、10^{-5} - 10^{-9} M のプロスタグランディン E₁（PGE₁）を培養液に加え、24時間低酸素環境で培養した。低酸素負荷終了24時間後、培養液中と付着細胞内のLDH活性を測定した。PGE₁濃度 10^{-6}、10^{-7}、 10^{-8}、10^{-9}M で無添加群とくらべ培養液中のLDH活性が低く、PGE₁に低酸素性細胞傷害に対する保護作用がみられた。同時におこなったトリパンブルー染色でもPGE₁投与群でviable cellsが多くみられた。継代培養グリアに低酸素負荷をかけたが細胞傷害はみられなかった。ラット初代培養大脳皮質細胞にPGE₁$10^{-7}$M添加し、3、9時間後に核蛋白を抽出、ウェスタンブロットすると、それぞれc-fos、myc蛋白発現が増加していた。本実験系ではグリアに傷害作用は及んでいないこと、PGE₁投与によりc-fos、myc蛋白の増加がみられたことにより、核蛋白を介するPGE₁のニューロン保護作用が示唆された。

（目的）PGE₁は神経突起伸展作用を有しており（1）、またc-fos, c-myc mRNA発現も報告されている（2,3）。虚血性神経細胞傷害時でのPGE₁投与効果とその作用機序を、胎生18日齢ウィスターラット培養大脳細胞を用い検討した。

（方法）海馬細胞を10%血清加MEM培地で24時間培養後、無血清培地で72時間培養し、コントロール群（低酸素負荷なし）と、低酸素負荷群（低酸素負荷24時間）に分け、負荷前後にそれぞれ10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}MのPGE₁を添加した。低酸素負荷終了後24時間で培養液を分離、遊離したLDH活性を定量した。細胞成分は凍結後培養液で融解、溶出した細胞質内LDH活性を同様に定量した。神経細胞にたいする作用は細胞死により培養液に遊離したLDH量の全細胞に含まれるLDH量に対する比率を用い、PGE₁の効果をone-way ANOVA と Fisher's protected least square difference (PLSD) test により多群間検定をした。同様の実験を2代継代培養グリアにもおこない、低酸素負荷のグリアへの影響を検討した。また低酸素負荷、PGE₁投与の効果をトリパンブルー染色（0.4%、5分間）と200kDaニューロフィラメント免疫染色により形態的に観察した。PGE₁（10^{-7}M）投与3、9時間後の培養大脳皮質細胞でのc-fos, myc 蛋白発現をウェスタンブロットで検討した。抗体はpolyclonal rabbit anti-human c-fos抗体（Oncogene Science社）と、mouse monoclonal antibody to myc proteins（Cambridge Research Biochemicals 社）とを用いた。

（結果）位相差顕微鏡での観察では低酸素負荷により、PGE₁投与の有無にかかわらず神経突起への細胞傷害がみられた。LDH活性は、コントロール群は変化しなかったが、低酸素負荷群では、PGE₁濃度10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}（$p<0.01$）、10^{-9}M（$p<0.05$）で無添加とくらべ保護作用がみられた(Fig.1, A,B)。トリパンブルー染色でもPGE₁投与群では青染される細胞数が少なく保護作用が観察されたが、免疫染色でのニューロフィラメントへの傷害は両群とも同じだった。継代グリアでは、形態的観察やLDH assayで細胞傷害はみられなかった（Fig.1, C,D）。ウェスタンブロットでの検討の結果、PGE₁投与群では、無添加群とくらべc-fos、myc蛋白の発現が増加していた。

（考察）本実験系では培養液の酸素分圧は20torrまで低下するが（4）、グリアには傷害作用は及んでおらず、ニューロンに低酸素傷害が加わったとみられた。ラット培養海馬細胞への低酸素性神経細胞傷害に対するPGE1の保護作用をLDH assayにより定量した結果、10^{-6}から10^{-9}Mで有意であった。形態的には、位相差顕微鏡や200kDaニューロフィラメント免疫染色では低酸素負荷による神経細胞傷害がPGE1投与の有無にかかわらずみられたが、トリパンブルー染色ではPGE1投与群でviable cellsが多くみられ、LDH assayの結果と一致し、PGE1投与により低酸素に対する耐性が増加したと考えられた。PGE1投与により培養細胞にc-fos, myc蛋白の増加がみられたこと、グリアには低酸素傷害が及んでいないことにより、本実験で示された耐性増加は核蛋白発現を介するニューロンにたいする作用と考えられた。

（文献）

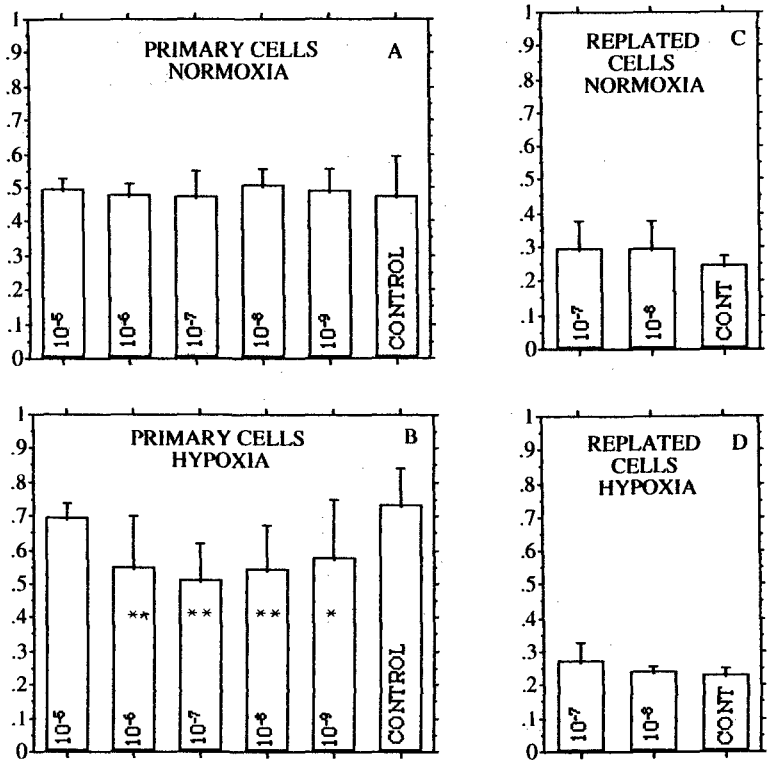
(1) Nirenberg M. et al. (1983) Science 222 : 794-799

(2) Yamashita T. et al. (1986) J Biol Chem 261 : 16878-16882

(3) Tsuda, T. et al. (1986) FEBS Lett 208 : 39-42.

(4) Kinoshita A. et al. (1989) Expl Cell Biol 57 : 310-314

Fig.1



PGE1 concentration dependence of the release of LDH in hippocampal cultures. Cultures were grown for 6 days. Values are analyzed by LDH activity in the medium in percent of total LDH activity (cells plus medium). (A): primary cultures were grown in normal conditions (n=8). (B): primary cultures were exposed to 24 hr hypoxia (n=8) (C) : replated cultures were kept in normal conditions (n=4). (D) : replated cultures were exposed to 24 hr hypoxia (n=4). Values are the means ± SD. Significant differences between PGE1-treated and control groups. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$; one-factor ANOVA, followed by Fisher's PLSD test.

145 脳虚血ラットにおける血管作動性物質の脳内変動の免疫組織化学的研究

水島秀勝，佐々木　健，嶋津基彦，田所康之，岩田隆信，松本　清．
塩田清二＊，中井康光＊，竹田　稔＊＊．
昭和大学医学部脳神経外科，第一解剖＊，第一生化学＊＊

〔要約〕
脳梗塞に準じて、ラットを用いて不完全虚血後に再灌流し、実験的に脳梗塞を作成した。この際の血管作動性物質の脳内における経時的変化を免疫組織化学的に観察し、またコンピューターを用いた画像解析装置にて、これを半定量化し、合わせて血中濃度も測定した。その結果、虚血再灌流後の各種の血管作動性物質の免疫染色性とその血中濃度は、それぞれ、異なる変動を示した。また多くの血管作動性物質において、虚血再灌流後６時間から１２時間において、無変動期を持つことが判明した。

［目的］
脳虚血性疾患の超急性期の治療は、ＭＲＩ(Magnetic Resonence Imaging)，ＣＴ(Computed Tomography)，ＳＰＥＣＴ(Single Photon Emission Computed Tomography)及びＰＥＴ(Positron Emission Tomography)等の血流動態を指標とする検査により決められているのが現状であり、また治療時期に関しても各施設まちまちである。そこで、これらの特殊な器械を使わず、しかも、発生から何時間までに治療を開始すべきかを調べるために、実験的脳梗塞ラットを田村の方法（１）に準じて作成し、主に血管収縮性物質［ＴＨ(tyrosine hydroxylase)，ＮＰＹ(neuropeptide Y)］及び血管拡張性物質［ＶＩＰ(vasoactive intestinal polypeptide)，ＳＰ(substance P)，ＣＧＲＰ(calcitonin gene-related peptide)］の脳内にしおける経時的変動を免疫組織化学的に観察した。さらにコンピュターを用いた画像解析装置を用いて、これら血管作動性物質の脳内変動を半定量的に計測し、合わせて同時期に於ける血中濃度の変化を調べた。

［方法］
約１００匹のＷｉｓｔａｒ系成熟ラットをペントバルビタールで麻酔し、気管内挿管後、田村の方法に準じてＧＯＦ全身麻酔下で開頭した。顕微鏡下に、右中大脳動脈を剖出し、脳動脈瘤用杉田クリップを用いて、その起始部を１時間閉塞し、一時的脳虚血を作成した。この際、血流ドップラーを用いて局所の血流低下率を計測した。その後クリップを除去して再灌流し１，３，６，１２時間，３，７日後に、それぞれ灌流固定し脳を摘出した。その後Ｂｒｅｇｍａから－１．８０ｍｍ～－３．８０ｍｍまでの２０ｐｍ厚さの連続凍結切片を作成し、ＰＡＰ法により免疫染色を行った。そし扁桃体における免疫陽性構造／線維／細胞体の変動を、光顕的に観察し、その後、オリンパス高速カラー画像システムＳＰ－５００を用いて半定量的に解析を行った。合わせてカテコールアミン［adrenaline(A)，noradrenaline(NA)，dopamine(DA)］，　ＶＩＰ，ＳＰ，ＣＧＲＰの血中濃度を、ＲＩＡ法にて測定した。

［結果］
ラット術側脳表におけるクリップ前後の血流低下率は、血流モニターを使用し測定した結果、約７０％に保持され不完全虚血ラットとして適切と思われた。
術側のＴＨ免疫陽性線維は，健側に比べ虚血再灌流後１２時間までは変化を示さないが（無変動期），２４時間で著減し，３日でrebound し、７日で元の値に回復した。術側ＮＰＹ免疫陽性線維は、健側に比べ虚血再灌流後６時間までは変化を示さないが、１２時間以降減少を示した。血管拡張性物質のＳＰ，ＣＧＲＰでも同様に、、６時間までは変化を示さないが、１２時間で減少し、１～３日で徐々に元の値に回復した。一方、血中

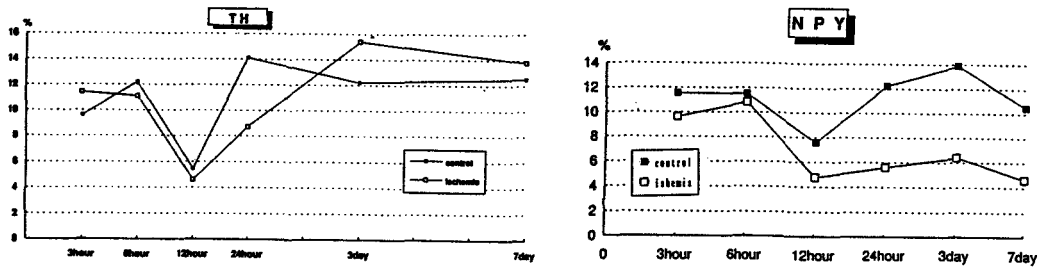
濃度測定結果では、まずA,NAは１２時間で血中濃度値が2倍に上昇したが、DAは変化が見られなかった。
一方、拡張性物質であるＳＰは、１２時間以降減少をしたが、ＣＧＲＰは、６時間，１２時間と著明に血中濃度の上昇を認めた。また、ＶＩＰは、６時間から２４時間まで減少を示した。
以上より、虚血再灌流後の血管作動性物質の免疫染色性とその血中濃度は、各物質において、異なる変動を示した。また多くの血管作動性物質において、虚血再灌流後６時間から１２時間において、無変動期を持つことが判明した。

［考察］

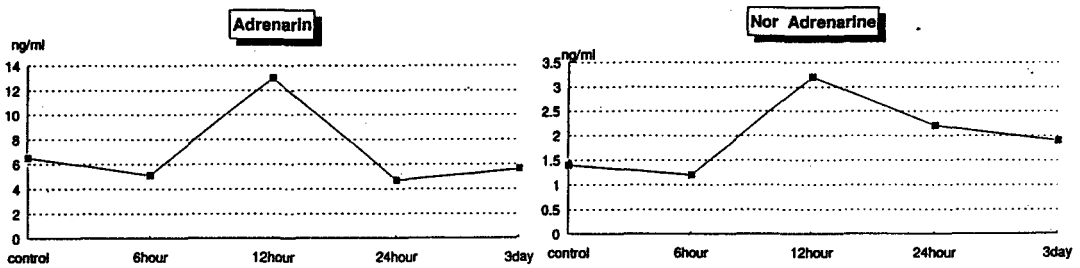
近年、脳虚血性疾患の超急性期の治療が盛んに行われるようになっきた。多くの脳外科医は、中川らの報告（２、３）に見られるように、６時間をＧｏｌｄｅｎ　ｈｏｕｒと考えて治療を行っている。今回の我々の実験では、血管作動性物質に注目した結果、多くの物質が、虚血後に無変動期を持つことが判明した。そして、その無変動期が、Ｇｏｌｄｅｎ　ｈｏｕｒとほぼ一致したことは、大変興味深い点である。今回、我々は辺縁系の扁桃体について実験観察を行ったが、虚血により同様の変化が脳の他の領域（大脳皮質、海馬など）で起きている可能性があり、より詳細に脳内各部位を検索する必要があると思われる。さらに、血管作動性物質の血中濃度測定の一層の改善により、脳梗塞患者の診断や予後判定をより適格にできるようになるのではないかと考えている。

［参考文献］

１．Tamura A.et al:J cereb Blood Flow Metab 1:61-69,1981
２．中川　翼：Neurosurg 7:51-62,1988
３．中川　翼：脳虚血とバイパス手術－全国調査より見た日本の現状，1987



％：単位面積当たりの免疫陽性構造の面積比



146 ラット一過性前脳虚血後の海馬HB-GAM発現量増大

武田 篤、杉本 晃、小野寺宏、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では、種々の神経栄養因子発現量の変動が報告されており[1]、その病態下での役割が注目されている。今回我々は、ヘパリン結合性を指標に、新生仔ラット脳から抽出された新しい神経栄養因子HB-GAM(Heparin-binding growth-associated molecule)の虚血後発現変化をNorthern blotting, In situ hybridization及びImmunohistochemistry法にて検討した。成熟ラット海馬では、主にCA1錐体細胞層にHB-GAM mRNAの発現がみられたが、虚血後２日間、その発現は減少した。しかし虚血後４日目になると、CA1領域を中心とした強い発現量の増大がみられた。この虚血後の発現増加は大部分、抗GFAP抗体陽性の細胞に限局していた。次に、抗HB-GAM抗体を用いた免疫組織化学法により、このmRNA増加が蛋白レベルでの発現変化に結びついていることを確認した。HB-GAMは虚血侵襲後の中枢神経系の修復過程において一定の役割を担っていることが示唆された。

【はじめに】 Heparin-binding growth-associated molecule (HBGAM)は、Raubalaら[2]により、新生仔ラット脳から抽出された神経栄養因子であるが、その一次構造の解析から、牛子宮より、線維芽細胞のmitogenとして抽出されたPleiotrophinと同一物質であることが知られている[3][4]。HB-GAM/Pleiotrophinは、特に新生仔脳において発現が増加し、成熟とともに減少することから、神経突起の伸長、神経細胞の成熟等に重要な役割を担っていると推定されている。一方、損傷を受けた中枢神経系においては、神経栄養活性が増加することが知られており、神経系の修復、再生に関与していると考えられている。今回我々は、ラット一過性前脳虚血モデルを用いて、虚血侵襲後の成熟脳における、HB-GAM/Pleiotrophinの発現変化を検討した。

【方法】Pulsinelliらの方法[5]により、320-380gの雄Wistarラットに20分間の一過性前脳虚血を加えた。血流再開後3,12時間、1,2,4,7日後、速やかに海馬CA1領域を分離し、total RNAを抽出した。また、12時間、1,4,7日後に速やかに脳を摘出、凍結切片を作製した。ラットHB-GAMの全長を含むプラスミド（clone p18-6）を鋳型として、T3またはT7 RNA polymeraseによりリボプローブを作製、Northen blottingおよびIn situ hybridization法に使用した。後者にはDigoxigenin-11-UTP (Boehringer Mannheim)でラベルした非RIプローブを用いた。Northen blotting, In situ hybridizationは常法に従った。In situ hybridization法にて陽性所見が得られた組織切片の一部には、続いて抗GFAP抗体を用いた免疫組織化学法により二重染色を加え、陽性細胞の同定を試みた。また、抗HB-GAM抗体[2]により免疫組織化学法を施行，蛋白レベルでの発現変動を検討した。

【結果と考察】CA1領域RNAを用いたNorthen blottingによると、HB-GAM mRNAは，虚血後2日間は徐々に減少したものの、虚血後4日目には著明に増加、7日目までこの傾向は続いた（Fig.1）。In situ hybridization法の結果もこれとよく一致した。対照切片海馬では主にCA1錐体細胞に限局した発現が見られたが（Fig.2B）、これは虚血後徐々に減少した（Fig.2CD）。しかし、虚血後4,7日目になると、CA1領域を中心に海馬回全体にHB-GAM mRNAを強く発現する細胞の著増をみた（Fig.2EF）。抗GFAP抗体を用いた二重染色によりこれらは、大部分Astrocyteであることが示唆された（data not shown）。抗HB-GAM抗体による免疫組織化学で、蛋白レベルでの発現増加も確認された（data not shown）。以上の結果は、虚血侵襲後、HB-GAMの発現が損傷部を中心としたReactive astrocyteにおいて増加することを示していると考えられた。また，この結果は脳損傷後に増加するいわゆる損傷修復活性の一部をHB-GAMが担っていることを示唆する。

Fig.1

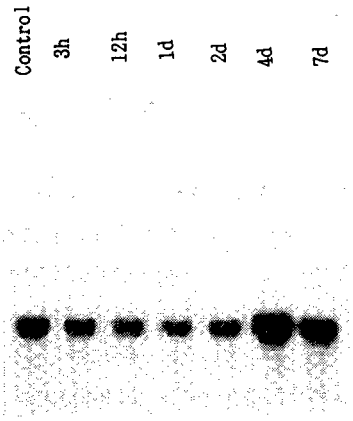


Fig.2

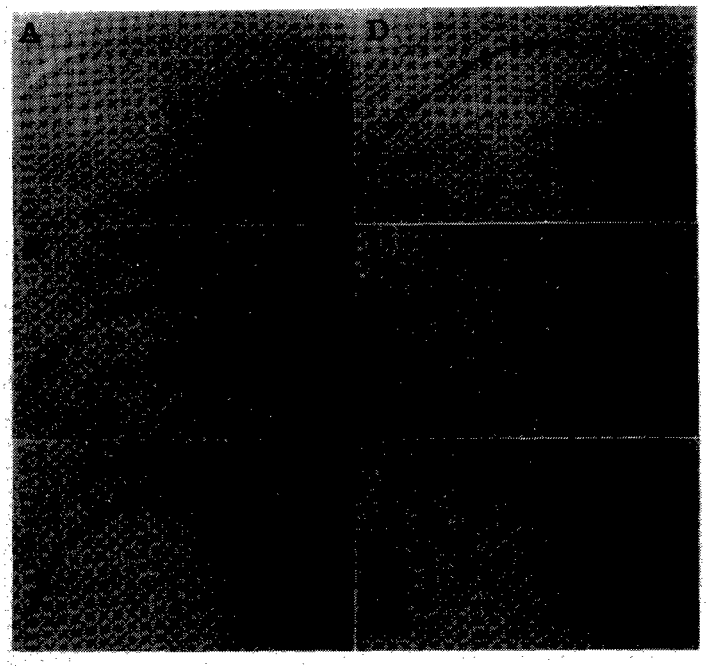


Fig.1 海馬CA1 RNAによるNorthen blotting
血流再開後、3, 12時間、1, 2, 4, 7日後のCA1領域より抽出したtotal RNA (10 ug)を1.1% agarose gel により電気泳動、Hybond N+ membraneにtransferした。probe はα-^{32}P-CTPによりラベルしたRibo probe を用いた。

Fig.2 In situ Hybridization
A, B : sham-operated control, C : 血流再開後12時間, D : 同1日, E : 同4日, F : 同7日
Northen blottingと同様のtemplateを用いて、Digoxigenin-11-UTPによりラベルしたprobeを使用。
A, Sense probe. B-F, Anti-sense probe

【文献】1) Takeda A., Onodera H., Yamasaki Y., Furukawa K., Kogure K., Obinata M. and Shibahara S. Brain Res. 569, 177-180 (1992)
2) Rauvala H. EMBO J 8, 2933-2941 (1989)
3) Merenmies J. and Rauvala H. J. Biol. Chem. 265, 16721-16724 (1990)
4) Li Y-S., Milner P.G., Chauhan A.K., Watson M.A., Hoffman R.M., Kodner C.M., Milbrandt J. and Deuel T.F. Science 250, 1690-1694 (1990)
5) Pulsinelli W.A. and Brierley J.B. Stroke 10, 267-272 (1979)

【謝辞】 HB-GAM plasmid clone, および抗HB-GAM抗体を供与頂いた, DR. Rauvala, またご指導頂いた帯刀, 黒岩両先生（東北大学抗酸菌病研究所細胞生物）, 柴原先生（東北大学医学部応用生理）に感謝致します。

147 局所脳虚血・再灌流におけるc-Fos発現の経時的変化

嶋津基彦*1, 水島秀勝*1, 佐々木健*1, 岩田隆信*1,
松本 清*1, 塩田清二*2, 中井康光*2, 竹田 稔*3
(昭和大・医・脳神経外科*1, 第一解剖*2, 第一生化*3)

〔要約〕

痛み刺激・痙攣・神経伝達物質・外傷や虚血などの様々な刺激に応答する細胞の反応（細胞内情報伝達）として、核内遺伝子産物であるc-Fosが、早期に一過性に発現することが知られている。今回、ラット局所脳虚血および虚血－再灌流モデルにおけるc-Fos発現の経時的変化を、免疫組織化学的に検索した。光顕所見において、c-Fos様免疫陽性反応は虚血側大脳皮質に有意に強く認められた。レーザー血流計を用いて局所脳血流量を測定し、実験的脳虚血の程度を評価した結果、虚血側帯状皮質に70-80%の血流低下が見られた。同部位の染色強度の経時的変化をコンピューター画像解析装置にて定量化した結果、c-Fos様免疫陽性反応は60分で最高値となった。また虚血－再灌流モデルにおいて、免疫陽性反応は、より強く認められ、30分虚血後再灌流6時間で最高値となった。このことから、虚血脳における血流変動、特に血行再開により、細胞内シグナル伝達系が著明に活性化されることが示唆された。

[目的]

成熟した神経細胞は一般に分化・増殖能を有さないと考えられていたが、実際には、様々な外界の刺激は細胞内へ伝達され、*c-fos*などの遺伝子の転写制御を介して物質合成の変容を起こすことが明らかにされつつある。また近年、臨床の場において、閉塞性脳血管障害の患者に対して、虚血中心部の周囲で機能的には障害されているが細胞死には至っていない部位(虚血半陰影部ischemic penumbra)の細胞の機能回復を目的として、急性期血栓溶解療法やEC-IC bypassが行われるようになり、急性期の虚血脳の病態や、血行再開の効果の解明が必要とされつつある。今回、実験的ラット局所脳虚血モデルを作成し、虚血脳における急性期のc-FOS発現を免疫組織化学的に観察し、形態計測学的に経時的変化を追跡した。

[材料と方法]

Wistar系・成熟雄ラット（第7-8 週齢、250-350g）を気管内挿管し、全身麻酔(GOF)を行い、顕微鏡下に右中大脳動脈を杉田式脳動脈瘤クリップにて遮断した。虚血時間を10・20・30・60・120・180分とした局所脳虚血モデル（各n=3）、また虚血負荷30分後にクリップを除去して3・6・12時間の血行再開を行った脳虚血－再灌流モデル(各n=3）を作成した。半導体レーザー式組織血流計(Biomedical science 社:LBF-3)を用いて局所脳血流量を測定し、脳虚血の程度を評価した。左室より4%PFA+0.4%GAにて灌流固定を行い、脳を摘出後、4%PFA(pH7.2)に4°C overnight浸漬固定した。さらに20% sucrose/0.1M PBに浸漬固定した後、凍結切片(20 μm)を作成し、c-Fos抗体(Oncogene science 社）を用いて4°C にてovernight incubation後、ABC法にて免疫染色を行った。切片をスライドガラス上に貼付し、0.4%オスミウム酸溶液で処理した後、アルコール系列にて脱水・封入し、光顕的に観察した。また、虚血側帯状皮質におけるc-Fos様免疫陽性反応を経時的に観察し、コンピューター画像解析装置(Olympus-Avio:SP-500)にて、その染色強度を定量化した。

[結果]

1. 虚血側の局所脳血流量を測定した結果、中大脳動脈遮断直後より、同側の帯状皮質に70-80%の血流低下が見られた。
2. 免疫染色の結果、c-Fos様免疫陽性反応は虚血側に有意に強く発現し、主に皮質Ⅱ－Ⅵ層の小型の神経細胞の核内に認められた。脳虚血モデルにおいて、c-Fos様免疫陽性反応は、虚血負荷10－30分では梨状皮質・頭頂皮質(area 1,2)に強く認め、帯状皮質には弱かったが、虚血負荷60分では梨状皮質・頭頂皮質に加え、帯状皮質にも強い免疫陽性反応を認めた(Fig. 1a,b)。さらに120-180分以降において、頭頂皮質(area 1,2)における免疫陽性反応は著明に低下していたが、

帯状皮質における反応は経時的に徐々に減少した。梨状皮質における反応は、虚血時間に関与せず、常に免疫陽性反応を認める傾向が見られた。またこれらのc-Fos様免疫陽性反応は、Ketamine(NMDA receptor antagonist)により阻害された。帯状皮質における経時的な染色強度の変化を画像解析装置にて定量化した結果、c-Fos様免疫陽性反応は60分で最高値となった(Table 1)。

3. 虚血－再灌流モデルでは、虚血側梨状皮質・頭頂皮質・帯状皮質に免疫陽性反応が見られた。帯状皮質における染色強度を定量化した結果、c-Fos様免疫陽性反応は30分虚血後再灌流6時間で著明な増加を認めた(Table 2)。

[考察]

局所脳血流量の測定結果から、虚血側帯状皮質は、血圧や側副血行・虚血の時間的因子などの影響を受けやすい不安定な領域[1]と考えられ、いわゆる虚血半陰影部に近い状態と思われた。虚血脳におけるc-Fos発現は、血流支配領域を超える部位にも認め、軟膜の破壊といった軽度の侵襲でも見られることから[2]、spreading depressionが関与しているといわれている[3]。今回、局所脳血流量の測定結果と免疫組織化学的・形態計測学的結果から、脳の微小血流変化によりc-Fosの発現が変動することが考えられ、脳の老化や可塑性に関与していることが示唆された。また、虚血脳に血行を再開することによりc-Fos発現の著明な活性化を認めることから、今後*c-fos*の誘導に引き続き、細胞内シグナル伝達系を介して合成される蛋白の同定や、その性状・特徴を理解することが必要と考えられ、現在それらについて研究中である。

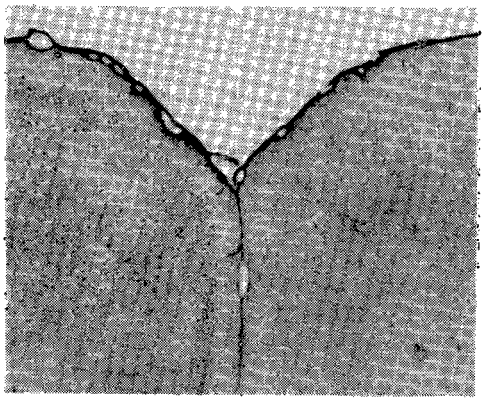


Fig. 1a: 30min-ischemia, cingulate cortex

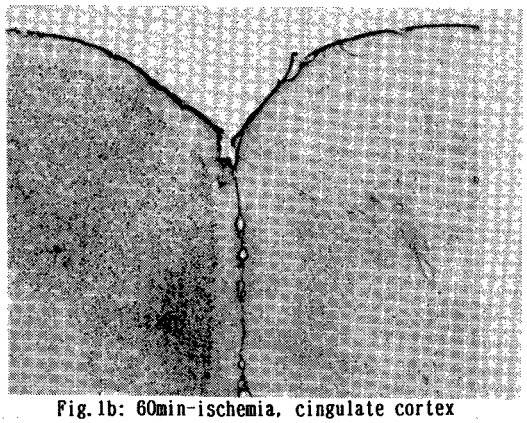
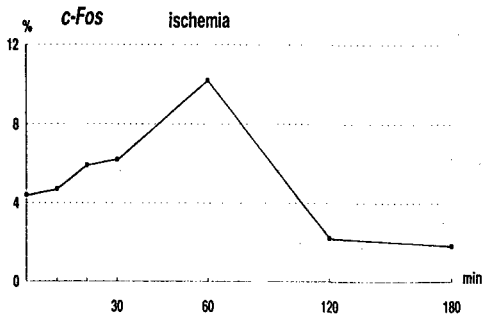
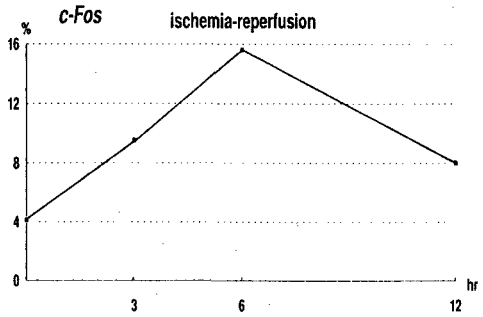


Fig. 1b: 60min-ischemia, cingulate cortex



(Table 1)



(Table 2)

[文献]

1) Warren, R., et al., (1991) Neurosurgions, 10, 18-27.

2) D.G., Herrara, H.A., Robertson (1989) Brain Res., 503, 205-213.

3) Marranes, R., et al., (1988) Brain Res., 457, 226-240.

148 脳虚血によるCA1遅延細胞死に先行するclathrinの変化（III）

○吉見 建二、松田 啓一、岩田 宜芳
三共（株）活性物質研究所

〔要約〕 一過性脳虚血後のスナネズミ海馬の免疫組織化学において、壊死しつつあるCA1ニューロンのクラスリン免疫染色が増強している事を報告してきた。今回、脳虚血1日後の海馬CA1を切出しSDS-PAGEに供し、ウエスタンブロットおよびゲルスキャンによりクラスリン含量の変化を検討したところ、脳虚血によるクラスリン含量の変化が見られなかった。一方、従来用いてきたchc5.9とは別のモノクローナル抗クラスリン抗体X-22による免疫組織化学では脳虚血による免疫染色の変化は見られなかった。以上の結果から脳虚血後の海馬CA1ではchc5.9抗体のエピトープ付近が露出するようなクラスリン分子の構造変化が起こっている事が示唆された。

［緒言］一過性脳虚血後の海馬CA1ニューロンは、再開通後、約3-4日の遅延時間を経過してから壊死する[2]。この遅延細胞死が始まるまでの間にCA1ニューロンで進行する変化を明らかにする事が、このメカニズムを明らかにする上で重要と考えられる。脳虚血後のスナネズミ海馬組織切片のCA1錐体細胞層においてクラスリン免疫反応性の上昇が見られる事をすでに報告した[6,7,8]。クラスリン免疫反応性の変化は細胞死に先立ちCA1に特異的に見られる事、遅延細胞死を抑制するpentobarbital投与によって抑制される事[9]から、細胞死のメカニズムに密接に結びついていると考えられる。

クラスリンはコート小胞の殻の主成分で、受容体エンドサイトーシスや細胞内小胞輸送に働く[1,10]。小胞を形成する際には遊離しているクラスリンが膜に多数結合し、網状の構造をつくり、膜を包んでエンドサイトーシスを引き起すと考えられている[1,10]。これまで脳虚血によるクラスリン免疫染色の増強がクラスリン合成が増加したためなのか、それ以外の原因なのか明らかにされてない。今回は脳虚血後の海馬の特にCA1だけを切出し、そのクラスリン含量をウエスタンブロットおよびゲルスキャンにより検討した。また、他の抗クラスリン抗体による免疫組織化学を試み、従来の結果と比較したので報告する。

［方法］スナネズミ（雄、10週齢）をハロセン麻酔下に総頸動脈を露出し、動脈瘤クリップにて5分間閉塞、再開通し、一日後にpentobarbital麻酔下に断頭、直ちに脳を取り出し、氷冷PBS中で両側海馬を取り出し、海馬中央部を5-6枚に輪切りにして、実体顕微鏡下にCA1を切出し凍結した。凍結したサンプルにpH6.5 buffer（0.1 M MES/1mM EGTA/0.5mM $MgCl_2$）を80μl加えてソニケートし、蛋白定量のため15μl分取した後、そのままLaemliのsample buffer 40μlによりSDS化し、5分間boilした。蛋白定量はBradford法によりBSAをスタンダードとして行った。6％ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により分離、ニトロセルロース紙に転写し、モノクローナル抗クラスリン抗体chc5.9（マウスIgM Progen社）にて免疫染色した。またはクマシーブルーにてゲルを染色後、各バンドの濃度をMCID画像解析装置（イメージングリサーチ社）の一次元ゲル解析プログラムにて測定した。

一部のスナネズミは心臓よりPBSおよび10％緩衝ホルマリンにて灌流固定した後、厚さ40μmの凍結切片を作成し、浮遊切片を2種類のモノクローナル抗クラスリン重鎖抗体、chc5.9抗体又はX-22抗体（マウスIgG、Dr.F.M.Brodskyより供与）により18時間インキュベートした後、ABC法により染色した。

［成績］ウエスタンブロットにおいてはSDS化、泳動分離をしているので免疫反応の強さは分子の重合状態等に影響されずに抗原の量を反映すると考えられるが、脳虚血動物は偽手術動物と顕著な差を認めなかった（図1）。そこで先報[3,5]に従い、より定量性の良いゲルスキャンによる定量を試みた。精製クラスリンと移動度が一致しウエスタンブロットにおいてchc5.9抗体が認識するバンドをクラスリンバンドとし、分離された蛋白中のクラスリンバンド濃度の比を求めた。このバンドはよく分離している明瞭なバンドなので別の蛋白の混入の可能性は低いと思われる。2枚のゲルから得られた値の平均値を各動物の値とした。クラスリンバンドの比率は脳虚血動物が3.05+-0.11％（mean +- S.E.M.）（n=7）、偽手術動物が3.02+-0.09％（n=8）であり、組織切片での免疫染色の増強を説明できる差は無いと判断された（図2）。免疫組織化学では、chc5.9抗体では従来の報告と同様脳虚血による免疫染色の増強が見られたが、X-22抗体では変化が認められなかった（図3）。

［考察］chc5.9抗体による免疫組織化学ではCA1ニューロンにおいて脳虚血1日後、染色が顕著に増強していた[6,7,8]（図3）。しかし、海馬CA1におけるクラスリン含量はウエスタンブロット（図1）およびゲルスキャン（図2）による検討では変化してなかった。また、X-22抗体による免疫組織化学ではchc5.9のような変化は認められなかった。これらの結果は組織切片において見られたchc5.9免疫染色の増強は、CA1ニューロン内のクラスリン分子の増加によるのでない事を示している。

使用した chc5.9 抗体はウエスタンブロット上でクラスリンバンドと特異的に反応し、また精製クラスリンによる吸収試験によって染色は消失する[6]ので、切片上の免疫染色の増強がクラスリン以外の分子の非特異染色に由来するとは考えにくい。X-22 抗体はクラスリン分子のアミノ酸残基 1109-1406 の間にエピトープがある事が調べられている[4]抗体で、この染色もクラスリン分子以外に由来するとは考えにくい。ニューロフィラメントやτ蛋白では燐酸化型と非燐酸化型を認識する抗体で免疫染色のパタンが異なる事が知られており、chc5.9 と x-22 の染色の差はエピトープの差によると考えられる。偽手術動物の染色はどちらも白質を除く部分が一面に染色されており、クラスリンの広い分布を反映していると思われるが、歯状回などで染色パタンに細かい違いがみられる。クラスリン分子が細胞によって動態が異なり、露出しやすいエピトープが異なるのかもしれない。

今後 chc5.9 抗体のエピトープを同定し、免疫反応性の変化の原因となる生化学的変化を検討する必要がある。現在までの知見では chc5.9 抗体は遊離状態よりも重合した状態のクラスリンとより強く反応し[8]、また脳虚血後の海馬において可溶性のクラスリンが減少しているという報告[3,5]があるので、脳虚血後 CA1 においてクラスリンが過剰に重合した状態になり、そのために切片における免疫反応性が増強されている可能性がある。これによって細胞内膜循環に障害が生じる事が CA1 遅延細胞死に寄与しているのかもしれない。

[謝辞] X-22 抗体はカリフォルニア大学サンフランシスコ校の Dr.F.M.Brodsky 先生の御好意により戴きました。

[文献]

(1) Brodsky FM, Science 242(1988)1396-1402 , (2) Kirino,T, Brain Research,239(1982)57-69 , (3) Kuwaki T et al., Stroke 20(1989)78-83 , (4) Nathke IS et al., Cell 68(1992)899-910 , (5) 山下正 他、神経化学 24(1985)3 , (6) Yoshimi K et al., Brain Research, 560(1991) 149-158 , (7) 吉見建二 他、神経化学 29(1990)456-457 , (8) 吉見建二 他、神経化学 30(1991) 524-525 , (9) 吉見建二 他、第 65 回日本薬理学会総会(1992)0-270 , (10) 吉村哲郎、前沢重礼、蛋白質核酸酵素 34 (1989) 1815-1825

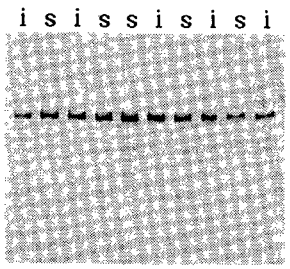


図1：CA1 ホモジネートの抗クラスリン抗体(chc5.9)によるウエスタンブロット。
i：脳虚血1日後， s：偽手術1日後。
脳虚血による変化は特に認められない。

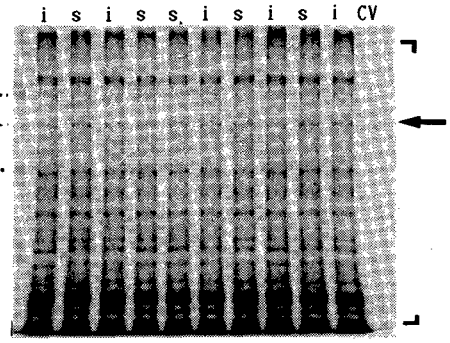


図2： CA1 ホモジネート SDS-PAGE。
i：脳虚血1日後， s：偽手術1日後，
CV：精製牛脳コート小胞。→がクラスリンのバンド。良く分離された「」の範囲をスキャンした。ゲルスキャンによるクラスリンバンドの比率は脳虚血動物が 3.05+-0.11 % (mean +- S.E.M.) (n=7)、偽手術動物が 3.02+-0.09 % (n=8)

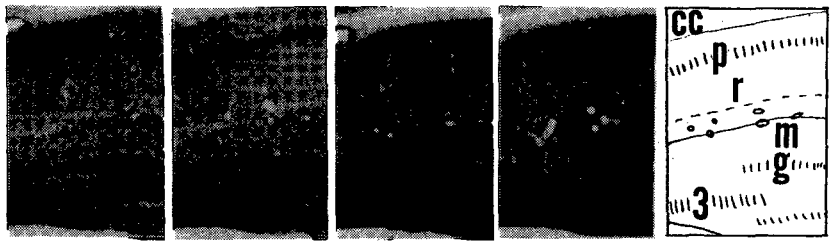


図3： 2 種類のモノクローナル抗クラスリン抗体によるスナネズミ海馬免疫組織化学
A,C：偽手術、B,D：脳虚血 1 日後。 A,B：chc5.9 抗体、C,D：X-22 抗体による染色。
cc:脳梁、p:CA1 錐体細胞層、r: CA1 樹状突起層、m:歯状回分子層、g:歯状回ヵ粒細胞層、3:CA3
chc5.9 では脳虚血後 p の染色増強が明らかだが、X-22 では脳虚血による変化が見られない。

149 低酸素・低グルコース処置による神経膜Cl イオン依存グルタミン酸輸送の増加

小山　豊・石橋　正・馬場明道
（大阪大・薬・薬理）

〔要約〕
脳のエネルギー代謝機能低下時における神経膜Cl^-依存グルタミン酸(Glu)輸送活性の変化について、ラット脳切片を用い低酸素・低グルコース処置の効果を検討した。20分間の低酸素・低グルコース液での切片の処置は、調製された神経膜小胞へのCl^-依存^{3}H-Glu取り込みを増加させた。一方、この処置はNa^+依存^{3}H-Glu取り込みには影響しなかった。低酸素・低グルコース液での処置は、^{3}H-Glu取り込みのVmax値を増加させたが、そのKm値は変化させなかった。2.4-Dinitrophenol、carbonylcyanide-m-chlorophenyl hydrazoneおよびNaCNでの切片の処置もCl^-依存^{3}H-Glu取り込みを増加させた。低酸素・低グルコース処置による^{3}H-Glu取り込みの増加は、それに続く通常濃度の酸素・グルコース液によるインキュベートで消失した。これらの結果は、脳虚血などの病態時に神経膜Cl^-依存Glu輸送活性が上昇することを示唆する。

アノキシアや脳虚血などの脳代謝低下で生じる神経細胞死が、グルタミン酸(Glu)の神経伝達の異常で生じることが知られている。これらの脳障害の際には、神経あるいはグリア細胞のNa^+依存Glu取り込み能が低下する。Na^+依存取り込みはGluによる神経伝達の終了を担うものであり、この取り込み低下が、脳障害時の細胞外Glu濃度増加の原因である。一方、Cl^-依存Glu輸送系は神経膜にも存在するがその神経伝達における役割は不明である。我々は、すでにラット脳切片の脱分極剤での処置が、再封神経膜小胞へのCl^-依存Glu取り込みを可逆的に増加させることを認め、本Glu輸送活性が、神経の興奮によって調節されることを示唆している(2)。今回は、脳代謝低下時におけるCl^-依存Glu輸送の活性について、ラット大脳切片を低酸素・低グルコース液中でインキュベートし、その切片より調製した神経膜小胞を用い、^{3}H-Glu取り込みを指標に検討した。

【実験方法】 SD系雄性ラット大脳切片(250μm)を調製し、O_2:CO_2混合ガス(95:5%)で通気したKrebs-Ringer液(KR)で35℃、30分間プレインキュベートした。脳切片を、N_2:CO_2混合ガス(95:5%)で通気したグルコース不含KRで引き続き、示した時間インキュベートした。ATP産生阻害剤による処置は、O_2:CO_2混合ガス通気KR中で行った。氷冷0.32Mショ糖溶液で切片の処置を止め、ホモジナイズ後、既報の方法(2)で粗神経膜標品を得た。神経膜標品を150mM NH_4Clおよび5mM L-Gluを含むHEPES-Tris緩衝液中で再封し、小胞外のL-Gluを洗浄した後に用いた。^{3}H-Glu取り込みは、膜小胞を20 mM HEPES-Tris緩衝液 (pH 7.4)、100 nM ^{3}H-Gluと共に37℃で、特に示した場合を除き2分間インキュベートし、メンブレンフィルター（孔径0.45μm）により小胞を分離、洗浄後、フィルター上の放射活性を測定した。150 mMのNH_4Cl、またはNaCl存在下での^{3}H-Glu取り込みをそれぞれCl^-依存、およびNa^+依存Glu取り込みとした。

【結　果】 L-Gluを負荷しない神経膜小胞への^{3}H-Glu取り込みは認められなかったが、L-Gluを負荷した膜小胞へのCl^-依存^{3}H-Glu取り込みは、時間に依存し、20分で平衡となった（図1）。脳切片を20分間低酸素・低グルコースKR液で処置した場合、^{3}H-Glu取り込みはそれぞれの時間で約2倍の増加を示した。Na^+依存性あるいは、Cl^-依存Glu輸送の阻害剤である2-amino-4-phosphonobutyrate (100μM)存在下での^{3}H-Glu取り込みは、20分間の低酸素・低グルコース

処置で変化しなかった（対照に比べてそれぞれ21.0±2.1%および -2.3±0.1%の増加）。両逆数プロットによる解析の結果、低酸素・低グルコース処置は、膜小胞への^{3}H-Glu取り込みのKm値には影響せず、そのVmax値を有意に増加させることが示された（表1）。ATPの産生を阻害する2,4-dinitrophenol (0.5mM)、carbonylcyanide-m-chlorophenyl hydrazone (CCCP, 5μM)および シアン化ナトリウム(2mM)での切片の処置も、膜小胞へのCl$^-$依存^{3}H-Glu取り込みを増加させた（表2）。低酸素・低グルコース処置による^{3}H-Glu取り込みの増加は可逆的であった。すなわち、低酸素・低グルコースKRで処置した切片を、続いて通常のO_2通気KR液で10分間インキュベートすると、Cl$^-$依存^{3}H-Glu取り込みの増加は認められなくなった（対照;2.17±0.30、低酸素・低グルコースKR(10分間);4.17±0.47、低酸素・低グルコース後通常KR;2.06±0.15pmole/mg protein/2min、平均±SEM,n=6）。

【考　察】 再封膜小胞は、取り込まれた物質が代謝変化を受けないこと、あるいは小胞内外のイオン濃度などを実験的に操作できるなどの理由により、膜輸送の研究において用いられる標品である(3)。今回、種々の実験的条件を荷したラット大脳切片より膜小胞を調製し、Glu輸送の変化を検討した結果、低酸素・低グルコース液での処置がCl$^-$依存^{3}H-Glu取り込みを特異的に増加させることを見いだした。そして、この増加は可逆的であり、輸送体数の変化にもとづくものであることが示された。また、ATP産生阻害剤による処置も、同様にCl$^-$依存Glu取り込みを増加させた。これらの結果より、神経膜Cl$^-$依存Glu輸送が脳虚血等の病態時に、その活性が増加することが考えられる。神経膜Cl$^-$依存Glu輸送系は、末梢組織細胞のGlu-システィン交換輸送系との類似性を有し、内因性抗酸化物質であるグルタチオンの細胞内濃度維持に重要であることが示されている(1,4)。虚血等のエネルギー代謝低下時には、脳内のグルタチオン量が低下する(5)。従って、このCl$^-$依存Glu輸送系の活性上昇は、脳代謝低下時の神経細胞に対する酸化的ストレスの防御機構を示すのかも知れない。

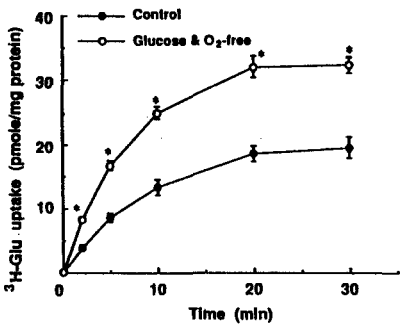


図1．L-Glu負荷再封神経膜小胞へのCl$^-$依存^{3}H-Glu取り込み
ラット脳切片は、通常の（●）、あるいはグルコース・O_2除去KR液（○）中で20分間インキュベートされた。結果は6例の平均±SEM。***p<0.001 各時間の通常KRに対して。

表1．低酸素・低グルコース処置による^{3}H-Glu取り込みのKinetic constantsの変化

	Km (μM)	Vmax (pmole/mg protein/min)
Control	1.26 ± 0.06	19.8 ± 2.8
Glucose & O_2 -free	1.01 ± 0.01	28.6 ± 2.1*

結果は4例の平均±SEM。*P<0.05 Controlに対して。

表2．低酸素・低グルコースおよびATP産生阻害薬処置の作用

	^{3}H-Glutamate uptake (pmole/mg protein/2 min)
Control	2.61 ± 0.43 (8)
Glucose & O_2-free	5.14 ± 0.31 (8)***
500 μM Dintrophenol	4.73 ± 0.37 (4)**
5 μM CCCP	4.64 ± 0.30 (4)**
2 mM NaCN	4.51 ± 0.58 (4)*

脳切片は、上記条件で30分間インキュベートされた。括弧内は例数を示す。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 Controlに対して。

【文　献】

1)Cho Y. and Bannai S. (1990) J.Neurochem., 55, 2091-2097.

2)Iwata H., Koyama Y. and Baba A. (1989) J.Neurochem., 52, 354-359.

3)Kanner I.B. (1983) Biochim.Biophys.Acta, 726, 293-316.

4)Murphy T.H., Miyamoto M., Sastre A., Schnaar R.L. and Coyle J.T. (1989) Neuron, 2, 1547-1558.

5)Rehncrona S., Folbergrova J., Smith D.S. and Siesjo B.K. (1980) J.Neurochem., 34, 477-486.

150 慢性脳血流低下モデル動物における脳内モノアミン量の変動

車谷隆宏、武田雅俊、谷向　知、新川久義、服部英幸、田中稔久、楯林義孝、大河内正康、関山敦生、西村　健　　（大阪大学医学部精神医学教室）

〔要約〕慢性脳血流低下モデル動物として、両側頸動脈にコイル状クリップを装着して８週間経過した砂ネズミを作製し、ステップ・ダウン式回避反応による学習能の計測、並びにＨＰＬＣを用いた各脳内モノアミンの測定を行なった。このモデル動物のステップ・ダウン式回避反応による学習能は、正常対照群と比較して時間経過に対する学習程度の上昇が劣り、さらに充分な時間の後にも正常対照群の示す学習程度にまで至らなかった。次にこのモデル動物の各脳内モノアミン定量の結果、ドパミンのみが前部大脳皮質・後部大脳皮質で約５０％の低下を示した。しかし、その代謝産物である３，４－ジヒドロキシフェニル酢酸、ホモバニリン酸には有意な変動は見られなかった。また、ノルエピネフリンおよびセロトニンは、有意な変動を示さなかった。

はじめに）

アルツハイマー病脳および血管性痴呆脳では、Xenon吸入法やＳＰＥＣＴなどにより局所脳血流量が低下していることが明かにされている。しかし、臨床データにより脳血流量と痴呆症状との相関は示されているものの、脳血流量の低下が直接に痴呆を発現するかどうかについては未だ明らかにされていない。我々はこの問題に対して、慢性脳血流低下動物モデルを用いて検討を加えてきた。成熟モンゴル砂ネズミの両側総頸動脈にコイル状クリップを装着し、８週間以上飼育したものを慢性脳血流低下動物モデルとして使用した。このモデル動物では、大脳皮質における局所脳血流量が正常対照群と比較して約７５％に低下していること、また、ステップ・ダウン方式による回避反応課題における学習獲得能が低下していることを報告してきた。また、クリップ装着８週後の神経病理学的検索では、神経細胞の脱落はほとんど認められず、特徴的な所見は、細胞骨格蛋白の変化、アストログリア細胞の反応性増殖、白質の希薄化であった[2)]。

今回の実験では、クリップ装着８週間後のモデル動物について、学習能の変化と脳内モノアミン代謝の変化について検討した。

実験方法）

成熟モンゴル砂ネズミ（体重６０－８０ｇ）の両側総頸動脈に、直径０．１ｍｍのステンレス・ワイヤを内径０．２－０．３ｍｍ、１ピッチ０．５ｍｍ、全長２．５ｍｍに作成したコイル状クリップを装着して８週間飼育したものを実験群、同じコイルを総頸動脈に触れる操作だけを行なったものを対照群とし、これらについてＯＵＣＥＭ－８６を用いたステップダウン方式による回避反応の学習課題について計測を行なった。１回５分のセッションを、第１日目と第２日目を獲得試験、次に１日を空け、第４日目を保持試験として、合計３セッション行なった。

次に、この学習実験の後、これらの動物の頭部にマイクロウェーブを照射して脳を迅速に固定し、前部・後部大脳皮質、海馬、視床の各部を速やかに切り出し、脳内モノアミンの定量を行った。各脳組織に５倍量の０．２Ｎ過塩素酸を加え、さらに内部標準として１００ｎｇイソプロテレノールを加え、これをポリトロンを用いてホモジェナイズした後、８０００ｇ、２５分の遠心により分離して得た上清をＨＰＬＣの試料とした。ＭＡ－５０ＤＳを用い電気化学的検出装置により各試料中の、ドパミン（ＤＡ）、３，４－ジヒドロキシフェニル酢酸（ＤＯＰＡＣ），ホモバニリン酸（ＨＶＡ）、ノルエピネフリン（ＮＥ）、セロトニン（５ＨＴ）、５－ヒドロキシ酢酸（５ＨＩＡＡ）の量をＨＰＬＣにより定量した。

結果）

１．学習実験

図１にＯＵＣＥＭ－８６による計測の結果を示す。横軸に各セッションの時間経過を，縦軸に非電撃ショック領域滞留時間の割合をとった。慢性脳血流低下動物では、対照動物と比較して、非電撃ショック領域滞留時間の増加が悪く、更に第二日目のセッションにおいても完全な学習には達していなかった。学習の保持についても対照群と比較して実験群に成績の低下傾向が認められた。

２．モノアミン定量

図２に各モノアミンの変動を示す。慢性脳血流低下動物では、前部大脳皮質と後部大脳皮質におけるＤＡ量は５０％を超える有意な低下が認められた。しかしながら、ＤＡの代謝産物については有為な変化は認めなかった。ＮＥと５ＨＴその代謝産物である５ＨＩＡＡについても、対照群と実験群で、モノアミンの総量に有意な変動は見られなかった。

考察）

一般に、一時間を超える長時間の完全虚血では、ドパミン、セロトニン、ノルエピネフリンはいずれも減少するということでほぼ一致を見ている。これは神経細胞の壊死脱落によるものと考えられる。一方、短期の完全虚血に引き続いて血行再開を行なった実験では、これらモノアミンの変動についての報告は一致を見ない。Ｃｖｅｊｉｃらは、１５分間両側完全虚血後、血流を再開して７日後まで観察し、いずれも上下の変動を繰り返しながら、ドパミン、ノルエピネフリンは一旦上昇した後減少に転じて留まり、一方セロトニンは一旦減少したものが次第に虚血以前のレベルに近付いて行くという結果を報告している[3]。この他の多くの実験でも、虚血後のドパミン総量とセロトニン総量の動きが解離することが報告されており、各ニューロンの低血流状態下での挙動の違い、ないしは虚血に対するドパミン、セロトニン両合成・代謝系の反応に違いがあることが示唆されている。本実験の結果は、慢性的な血流低下状態に対しても両ニューロン系の反応に差が存在することを示唆するものと思われる。これらの動きの違いが、虚血状態に対する各ニューロンの耐性の違いを示すものか、あるいは各合成・代謝系の虚血により受ける影響の違いを示すものなのかは今後の検討課題であると考える。

文献）

1)T.KUDO et al.,Stroke 1990;21:1205-9
2)H.HATTORI et al.,Acta Neuropathol in press 1992
3)V.CVEJIC et al.,Acta Neuropathol 1980;51:71-7

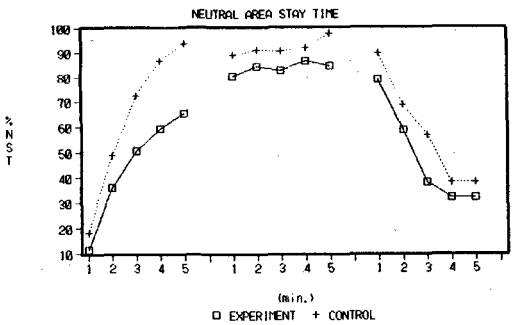
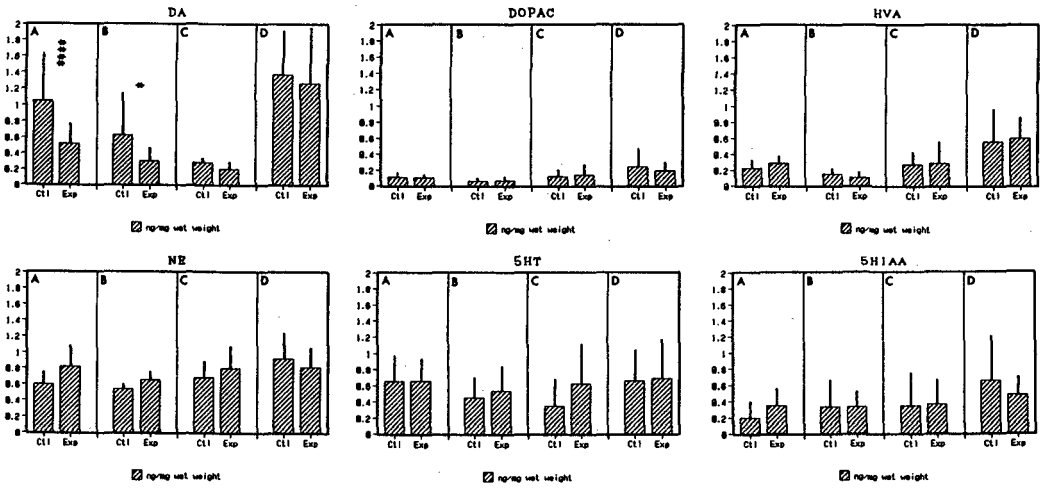


図１（左）：慢性脳血流低下のステップダウン方式回避反応学習への影響。

図２（下）：慢性脳血流低下の脳内モノアミンへの影響。平均±標準偏差で示す。****ｐ＜０．０１；　*ｐ＜０．０５。各グラフで、A:anterior cortex, B:posterior cortex, C:hippocampus, D:thalamus。



151 慢性低灌流負荷による虚血耐性現象の誘導

大槻俊輔、松本昌泰、田口明彦、秦龍二、
小川智、上田周一、半田伸夫、鎌田武信
（大阪大学第一内科）

〔要約〕
予め非致死的な虚血を負荷する事により神経細胞が本来致死的な虚血に対して耐性を獲得する現象（虚血耐性現象）が知られている。本研究では、砂ネズミにおいて無症候性の片側総頸動脈閉塞が神経細胞に虚血に対する耐性を誘導するのか否か検討した。予め右総頸動脈を結紮閉塞し無症候である砂ネズミを選別後、1，30日目に左総頸動脈を5分間閉塞し一過性前脳虚血を負荷し、再灌流7日後に海馬CA1-4領域の虚血性神経細胞障害を評価した。無症候性右総頸動脈閉塞は海馬神経細胞に対して非致死的であったが、結紮1日後の右海馬では虚血に対する脆弱性を増加させ、結紮30日後では本来致死的である虚血に対する耐性を誘導した。また熱ショック蛋白72(hsp72)の誘導がこの耐性現象の誘導とよく相関した。重度ではあるが短時間の非致死的な脳虚血のみならず、片側総頸動脈閉塞による軽度ではあるが長時間の低灌流負荷も神経細胞に虚血に対する耐性現象を発現させた。

【目的】我々は既に砂ネズミの一過性前脳虚血モデルを用いた検討により、予め重度であるが短時間の非致死的な虚血を負荷する事により神経細胞が本来致死的である虚血に対して耐性を獲得することを報告してきた(3,4,5)。今回、予め片側の総頸動脈を閉塞し、軽度の低灌流状態を長時間負荷することにより(1)、神経細胞が次なる致死的な虚血に対する耐性を獲得するのか否か検討した。

【方法】既報に従い(2,7)、予め一過性の右総頸動脈clippingを行ない、stroke-resistant（片側総頸動脈を結紮しても脳虚血症状をきたさないもの）と選別した成熟雄性砂ネズミ24匹を対象とした。『実験１』軽エーテル麻酔下に右総頸動脈を二重結紮し、麻酔覚醒後神経学的に無症候である事を確認した。結紮1,30日後(各n=6)に軽エーテル麻酔下に左総頸動脈を剥離、麻酔覚醒後5分間クリップすることにより一過性前脳虚血を負荷した。虚血中は体温を37°Cに維持し、虚血後も体温をモニターし再灌流後30分の体温を記録した。偽手術として左総頸動脈を剥離した(各n=4)。再灌流7日後断頭し脳を摘出、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、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(3)。海馬CA1-4領域の神経細胞障害を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)、grade2(壊死細胞と正常細胞とが混在している)、grade 3(ほとんどの神経細胞が壊死に陥っている)のgrade分類を用いて評価した(5)。『実験２』右総頸動脈結紮1,30日後(各n=2)、断頭し左右別々に海馬を摘出し62.5 mM Tris-HCl (pH=6.8) +1% SDS +5% 2-mercaptoethanol +10% glycerolでhomogenizeし、1.0μg蛋白量をLaemmli法の電気泳動に供し(7)、ニトロセルロース膜にimmunoblottingを行ない(10)、熱ショック蛋白72 (hsp72)に対するモノクローナル抗体(Amersham社)を用いてhsp72の発現の有無を検討した(4)。

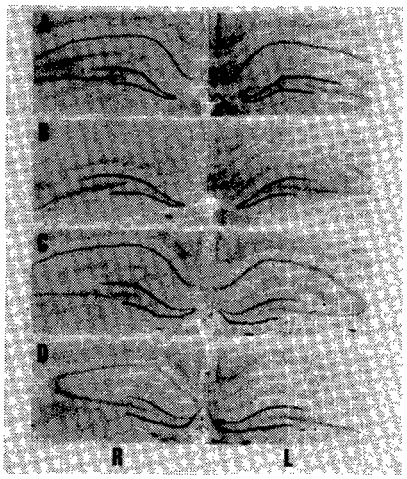
【成績】『実験１』虚血を加えた動物はすべて神経症状（昏睡、眼瞼下垂等）を示したが、虚血後の体温は結紮後1日および30日負荷群との間では有意な差を認めなかった。組織学的検討の結果を表１にまとめた。右総頸動脈結紮1,30日後に偽手術施行群では両側海馬に壊死細胞を認めなかった（各々図１AC）。結紮1日後に5分虚血を負荷した群では、全例両側海馬CA1-2領域の神経細胞はほとんど壊死に陥っており、更に右CA3-4領域にも軽度の神経細胞壊死を認めた（図１B）。結紮30日後に5分虚血を負荷した群では左海馬CA1-2領域神経細胞はほとんど壊死に陥っていたが、右海馬では有意に多くの神経細胞が残存していた（図１D）。『実験２』結紮1日後の海馬および結紮30日後の左海馬組織では見られなかったhsp72蛋白の誘導が、結紮30日後の右海馬組織でのみ明らかなhsp72蛋白の誘導が認められた。（図２）

【考察】成熟砂ネズミは後交通動脈の欠損のため両側総頸動脈を閉塞することにより再現性良く前脳虚血を作成できる(8)。片側の総頸動脈を閉塞すると前交通動脈の発達の程度により無症候から重度の脳半球虚血症状まで示すが(2,7)、今回、無症候性のものを予め選別し、次に一過性前脳虚血を負荷し神経細胞の虚血に対する細胞応答を観察した。無症

候性右総頸動脈閉塞は海馬神経細胞に対して非致死的であるが、結紮1日後の右海馬で虚血に対する脆弱性を増加させ、結紮30日後に本来致死的である虚血に対する耐性を誘導した。hsp72の誘導がこの耐性現象の誘導とよく相関した。無症候性頸動脈閉塞症は軽度であるが長時間の低灌流状態を生じ(1)、神経細胞にとって非致死的であるがhsp72を発現させるのに十分なストレスとなり、神経細胞に虚血に対する脆弱性や耐性を誘導し得ることを見いだした。以上の結果は神経細胞は少なくとも蛋白および遺伝子レベルでの細胞応答を行い低灌流状態に対して適応しているものと考えられた。

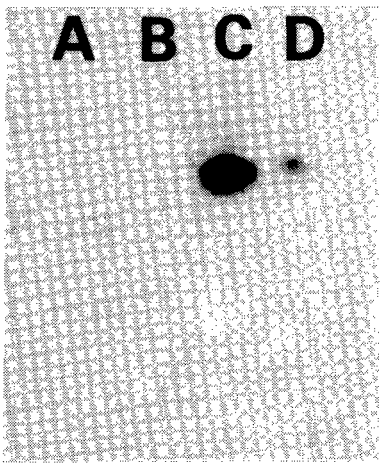
		海馬領域			
実験群		CA1	CA2	CA3	CA4
偽手術	右	0.3±0.4	0.5±0.9	0	0
(1日間隔)	左	0	0	0	0
5分虚血	右	3.0	3.0	1.2±1.2*	1.3±1.4*
(1日間隔)	左	3.0	3.0	0	0
偽手術	右	0	0	0	0
(30日間隔)	左	0	0	0.5±0.9	0.3±0.1
5分虚血	右	0.5±0.8*#	1.0±1.0*#	0.2±0.4	0
(30日間隔)	左	2.5±0.8	2.5±0.5	0.3±0.5	0.2±0.4

【表1】Grade分類による組織学的評価 (mean±SD)
*p<0.05; vs結紮後1日群(Kruskal-Wallis検定かつBonferroni多群比較), #p<0.05;vs 左側(non-parametric Wilcoxon検定)。



【図1】海馬HE染色組織像 A;結紮後1日偽手術群、B;結紮後1日5分虚血群、C;結紮後30日偽手術群、D;結紮後30日5分虚血群、 R;右海馬、L;左海馬。

【図2】海馬組織の熱ショック蛋白(hsp72)のimmunoblotting A;結紮後1日右海馬、B;結紮後1日左海馬、C;結紮後30日右海馬、D;結紮後30日左海馬。



【文献】

(1)Bothe H. W. et al. (1986) Stroke 17,1160-1163
(2)Kitagawa K. et al. (1989) Brain Res 479,263-269
(3)Kitagawa K. et al. (1990) Brain Res 528,21-24
(4)Kitagawa K. et al. (1991) Brain Res 561,203-211
(5)Kitagawa K. et al.(1991) J Cerebr Blood Flow Metab 11,449-452
(6)Lamemmli U. K. (1970) Nature 227,3218-3222
(7)Matsumoto M. et al. (1988) Stroke 19,490-497
(8)Matsuyama T. et al. (1983) J Cerebr Blood Flow Metab 3, 381-385
(9)Towbin H. et al. (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76,4350-4354

152 持続的なｃＡＭＰレベル上昇はラット上頸神経節細胞のＮＧＦ除去に伴う細胞死を阻止する

田中秀逸，小池達郎
（佐賀医大・化学）

〔要約〕栄養因子除去後の神経細胞死を抑える cAMP の作用機構について調べた。培養したラットの上頸神経節（SCG）細胞は NGF 除去後36時間でその９割以上が細胞死を起こすが、CPT-cAMP や Caffeine，IBMX 等のメチルキサンチンを培地に加えることでこの細胞死は完全に阻止された。NGF 除去後の SCG 細胞を10時間 Caffeine で処理したところ、細胞の cAMP レベルは NGF 除去後の細胞のそれの273％であった。一過性に cAMP レベルを高める作用を持つ Noradorenaline や Isoproterenol は神経細胞死を阻止できなかった。また、cAMP レベルを modulate することが知られている神経ペプチド VIP は単独では細胞死を遅らせる効果しか持たないが低濃度 IBMX との共存により完全に細胞死を阻止した。また、NGF を除き15hr経過した後では Cycloheximide を加えても約半分の神経細胞が死ぬが、CPT-cAMP やメチルキサンチンは NGF 除去後18hrに加えても細胞死を半分に抑えた。これらの結果は、持続的な cAMP レベルの上昇が post-translational に細胞死を阻止することを示している。

発生過程におこる神経細胞死は神経栄養因子の限定的供給による競合過程の結果であると考える根拠が蓄積されている。特に最近種々の系においてこの細胞死が積極的な過程からなることが示唆され、そのカスケードの解明に大きな注目が集まっている。交感神経節細胞の初代培養系はこの細胞死の研究において利点がある。ラットの上頸神経節から得られた神経細胞はその生存のために NGF を必要とする。培養液から NGF を除くと細胞は２～３日で死に細胞内酵素の放出で定量化できる[5]。この NGF 除去による細胞死は、Cycloheximide や Actinomycin Dを培地に加えることや[5]、高 K^+ 培地等の脱分極刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度を高めることで阻止されることが判っている[3,4]。また、細胞の cAMP レベルを高めることでも NGF 除去による細胞死が阻止される[6]。その作用機構について検討した。

［実験方法］

上頸神経節（SCG）細胞の培養：生後１～２日のラットから SCG を単離し、コラーゲナーゼ処理後、コラーゲンコートした48 well plate (AK 放出のアッセイ用，0.3神経節／well)または12 well plate (cAMP レベルアッセイ用，0.75神経節／well)にまいた。10％牛胎児血清、50ng／ml NGF を含む EMEM 培地で１週間培養後実験に用いた。non-neuronal cells はフルオロデオキシウリジンを培地に加えることにより除いた。

細胞死のアッセイ法：実験は培地中に0.5%のマウス NGF に対する抗体（guinea-pig）を加え、NGF を中和することにより開始した。抗体添加後12時間では何の変化も見出せないが、24時間後には細胞に変性が見られた。36～48時間後顕微鏡観察した後、培地中及び細胞内のアデニレートキナーゼ（AK）活性をそれぞれ測定した。AK は通常では３～６％培地中に放出されるが細胞死に伴って30～50%放出される。図中値は Mean±SEM (n=3) で示した。

cAMP レベルのアッセイ法：cAMP は６％ TCA で処理した細胞から freeze／thaw を５回繰り返すことにより抽出し、ラジオイミノアッセイキット（Amersham）を用いて定量した。図中値は Mean±SEM (n=4) で示した。

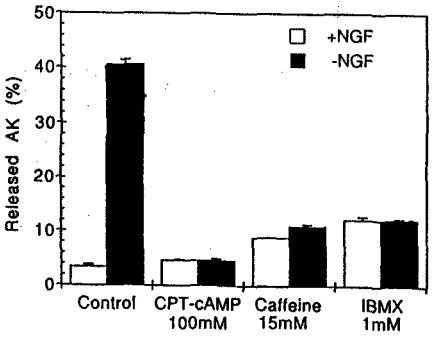


図１．NGF 除去後の神経細胞死を抑制する CPT-cAMP およびメチルキサンチンの効果．
縦軸は NGF 除去36hr後の AK 放出量を示す。

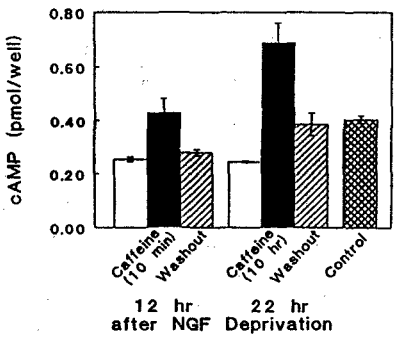


図２．NGF 除去後の神経細胞の cAMP レベルを高める Caffeine の効果．
NGF を除き12hr後 Caffeine を加え10minまたは10hr培養し cAMP レベルを測定した。Washout は Caffeine を除き更に１hr培養した細胞の、Control は NGF 存在下の細胞の cAMP レベルを示す。

［結果及び考察］

７日間培養した SCG 細胞は、培地に抗 NGF 抗体を加え NGF を除くと24時間で細胞体の萎縮を起こし、36時間でその９割以上が細胞死を起こした。この時培地に cAMP のアナログである CPT-cAMP (0.1mM) を加えておくと細胞死が完全に抑えられた（図１）。更に、ヌクレオチド依存性のホスフォジエステレース活性を阻害することが知られているメチルキサンチン類 Caffeine (20mM, 図１), IBMX (3-iso-butyl-1-methylxanthine, 1mM, 図１)及び Theophylline (10mM) によっても細胞死が完全に阻止された（我々の培養系は約10%の Non-neuronal Cells を含んでいる。メチルキサンチン類は Non-neuronal Cellに Toxic な為、見かけ上 NGF 存在下でも AK 放出が10～15%起こる。図２，４）。そこで、細胞の cAMP レベルへの Caffeine の効果を調べた。細胞の cAMP レベルは NGF 除去に伴って減少し対照の63%になる（図２）。NGF 除去後の SCG 細胞を10時間 Caffeine (20mM) で処理したところ細胞の cAMP レベルは、NGF 除去後の細胞のそれの273%であった（図２）。これに対し、一過性に cAMP レベルを高める作用を持つ Noradrenaline (10-100μM)や Isoproterenol (10-100μM, 図３）は神経細胞死を阻止できなかった。神経ペプチドのひとつである VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) は、cAMP レベルを modulate することが知られている[1,2]。NGF 除去後の細胞を VIP (0.1-10μM)で処理すると濃度依存的に細胞死の Time Course を変化させ、３μMでは約６時間細胞死を遅らせた。更に、VIP (1-10μM)はそれ自身では細胞死に影響を持たない低濃度の IBMX (0.2mM) との共存により完全に細胞死を抑えた（図３）。これは、VIP による cAMP レベルの増加は数時間しか持続しないが、IBMX が cAMP の分解を阻害することにより VIP の効果が増強された為と思われる[1]。NGF 除去に伴う細胞死は蛋白質合成阻害剤 Cycloheximide や mRNA 合成阻害剤 Actinomycin D により抑えられることが知られている[1]。しかし、NGF を除き15hr経過した後では Cycloheximide (2μM) を加えても約半分の神経細胞が死んでしまう（この時間を Cycloheximide の Committment Time と呼ぶ[5]）。ところが、CPT-cAMP やメチルキサンチンは NGF 除去後20hrに加えても細胞死を半分に抑えた（図４）。更に NGF 除去後の細胞死を蛋白質合成阻害剤 Cycloheximide を加え阻害しておいた細胞は Cycloheximide を除いても新たに CPT-cAMP を加えて置けば細胞死を起こさない (AK 放出；3.5±0.16%, n=3)が、逆に、CPT-cAMP で細胞死を阻害しておいた SCG 細胞は CPT-cAMP を除けば Cycloheximide があっても細胞死を起こした(AK 放出; 24.5±1.19%, n=3)。これらの結果は、持続的な cAMP レベルの上昇が post-translational に細胞死を抑えることを示している。SCG 細胞が NGF が無くとも生存可能になるには、NGF 存在下での cAMP レベルより高い濃度が必要なのかどうかは現在のところ不明であり、その点についても検討中である。

［参考文献］

1. Beretta, C. and Zurn, A.Z. Develop. Biol. 148, 87-94 (1991)
2. Ip, N.Y., Baldwine, C. and Zigmond, R.E. J. Neurosci. 5, 1947-1954 (1985)
3. Koike, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6421-6425 (1989)
4. Koike, T. and Tanaka, S. Proc. Natl. Acad. Sci USA 88, 3892-3896 (1991)
5. Martin, D. et al., J. Cell Biol. 106, 829-844 (1988)
6. Rydel, R.E. and Greene, L.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1257-1261 (1988)

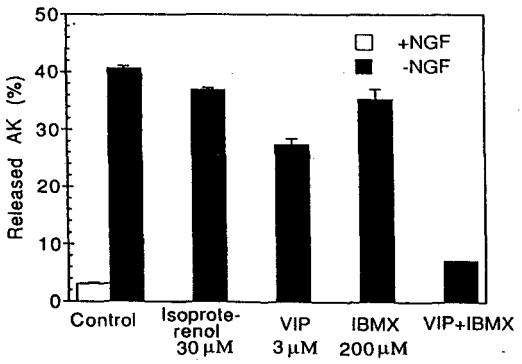


図３．NGF 除去後の神経細胞死に対する Isoproterenol, VIP の効果。
縦軸は NGF 除去36hr後の AK 放出量を示す。

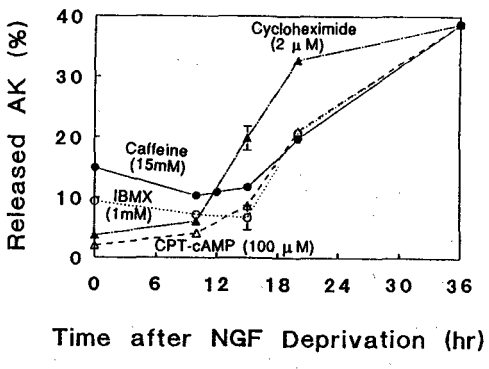


図４．Cycloheximide, CPT-cAMP, メチルキサンチンの細胞死阻止効果の Committment Time.
NGF を除きそれぞれの時間（横軸）経過後培地に薬剤を加え合計 36hr 培養し AK 放出量を調べた。

153 グルココルチコイドの海馬神経細胞に与える影響 —in vivo 及び in vitro 実験

鬼頭昭三、三好理絵*、木村暁子、林 一治、丸山雪子
(放送大学・東京女子医科大学薬理学教室*)

〔要約〕
glucocorticoid は、加齢に伴ってその血中濃度が上昇を示す数少ないホルモンの一つである。一方、海馬は脳内で glucocorticoid 及び mineral corticoid に対する受容体が最も濃密に存在する場所であるが、その機能的意味についてはいまだ明らかにされていない。

著者らは、ラット海馬培養神経細胞に10^{-5} Mの kainate を加え、そこに更に10^{-9} ～10^{-4} M の dexamethasone を加えた後、細胞内の LDH を計ることによって、dexamethasone が用量依存的に kainate による海馬神経細胞に対する毒性を増強することを認めた。

このメカニズムに対する研究の一環としてin vivo microdialysis 実験により dexamethasone の海馬神経伝達物質遊離に対する影響を検討した。その結果 dexamethasone が海馬神経細胞からの glutamate の放出を促進し acetylcholine (Ach), GABAのそれを抑制するという結果を得た。

［目的］
近年海馬は、視床下部よりも上位にあって内分泌系の脳における最高中枢として働いていると考えられている。一方、海馬には glucocorticoid や mineral corticoid の receptor が脳内で最も豊富に存在するが、全身投与された glucocorticoid が脳に対してどのように働くのか、glucocorticoid が脳内伝達物質に対してどのような影響を及ぼすかについて知られている事は少ない。この点を検討するのが、本研究の目的である。

［方法］
in vitro の実験では、ラット胎児由来の海馬神経細胞を10% FBS を含むDMEM 培地内で培養した。８日から１０日の海馬神経細胞に10^{-5} M の kainate を加えた後 overnightし、その後10^{-9}～10^{-4} M の濃度の dexamethasone を加えて更に overnight した後、実験に供した。Triton x-100 で処理後遠心し、上清の LDH を Sigma Diagnostic Kit 500 を用いて測定した。

in vivo の実験では、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 P2.2mm, L2.5mm,硬膜から深さ3.5mm 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2μl/min の速度で灌流した。灌流液中の Ach は HPLC-electrochemical detector(ECD) で測定し、アミノ酸は、蛍光法で測定した。

［成績］
１）培養神経細胞の percent survival を算出した結果 kainate 10^{-5} M 単独に比して dexamethasone の追加により、その用量依存的に percent survival が低下することを認めた。

２）glutamate の海馬における基礎放出は、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行った。Achの基礎放出量は灌流開始２時間前後で安定した。dexamethasone 投与前の4 sample の Achの放出量（基礎放出量）は、69.9±3.6nM(n=29)、glutamate のそれは921±41 nM(n=33)であった。

３）microdialysis 実験では、2mg および10mg の dexamethasone を腹腔内に投与することにより、投与４５分後から glutamate の放出は増加し（最大220%）、GABA の放出は減少した（最大25%）。Ach の放出にも減少傾向がみられた。

［考 察］

海馬においては、glucocorticoid receptor が脳内で最も豊富に存在するにもかかわらず、その存在意義，あるいは、機能に関しての報告は少ない。著者らの実験では、glucocorticoid は、海馬の神経細胞に対する興奮性アミノ酸の毒性を増強する作用があることを認めている。このことは glucocorticoid が臨床的に大量に投与され blood brain barrier を自由に通過することから注目に値する。このメカニズムは不明であるが、著者らの in vivo microdialysis 実験における dexamethasone が海馬からの glutamate の放出を増強し、GABA のそれを抑制するという結果と関係があることが推定された。海馬においては、mineral corticoid と glucocorticoid が、相互拮抗的に働いて海馬の神経機能を調整しているという仮説が提唱されているので、今後更に mineral corticoid の海馬神経細胞に対する作用を検討すると共に、GABA, glutamate 以外のアミノ酸の放出についても検討する必要があると考えた。

［文献］ 1. Robert M. Sapolsky, Desta R. Packan and Wylie W. Vale (1988) Brain Res. 453, 367-371

2. Fujimori, K and Yamamoto, K (1987) J. Chromatgr. 414, 167

3. Laura, A. A et al. (1984) Anal. Chem. 56. 1089

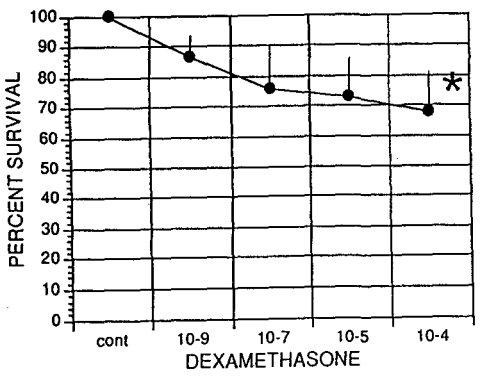


図1 Percent survival of cultured neurons of the rat hippocampus in relation with dexamethasone. Cont means kainate alone of which % survival is 85% of medium alone.

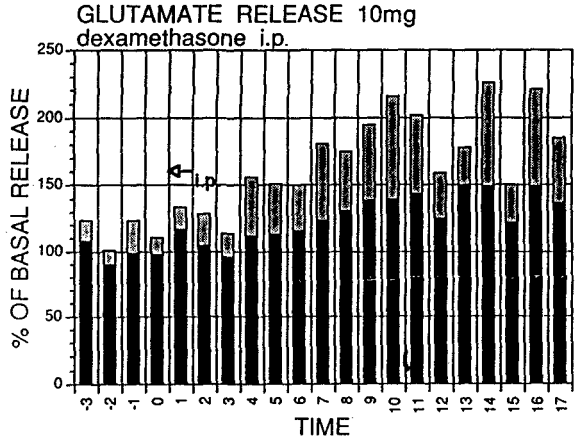


図2 Effect of intraperitoneal injection of dexamethasone on levels of glutamate in hippocampal perfusates. values are given as percentages of basal values (N=10). The shadowed part shows sd.

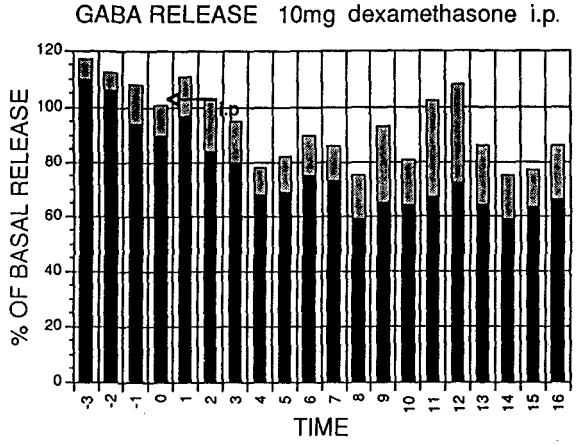


図3 Effect of intraperitoneal injection of dexamethasone on levels of GABA in hippocampal perfusates. Values are given as percentages of basal values (N=10). The shadowed part shows sd.

154 ヒトアストロサイトーマ(U-87MG)細胞のサブスタンスP結合に対する糖鎖合成阻害剤tunicamycinの影響

仲田義啓、西尾廣昭
（広島大・医・総合薬学科・薬効解析）

〔要約〕

神経ペプチドのサブスタンスP(SP)受容体結合活性に対する糖鎖分子の寄与について検討する目的で、ヒト脳グリア細胞由来のアストロサイトーマ細胞（U-87MG）を糖鎖合成阻害剤 tunicamycin(TM)で処理した後、SP受容体結合量を測定した。0.5μg/mlのTMで細胞を24時間処置後、細胞を破壊して得られた全膜画分では、SP結合は最大結合量Bmaxおよび解離定数Kdともに増加した。更に、TM処置細胞全膜画分を蔗糖密度勾配法にて分画すると、light membrane fractionでのSP結合量がおもに増加していた。しかし、TM処置した細胞を破壊しないintactの状態で結合実験を行うと、TMのSP結合量増加効果は認められなかった。以上の結果より、TMにより細胞内にSPに対して親和性のある蛋白質が発現する可能性が示唆された。

神経伝達物質の受容体は一般に糖鎖構造を有すると推定されているが、受容体における糖鎖の生理的意義は十分に明らかにされていない。しかし、培養細胞を用いた場合、糖鎖合成阻害剤で処置し、細胞上の受容体とリガンドとの結合の性質、例えば、オピオイド受容体はTM処置により結合量のみが減少し、ヒスタミンH_1受容体の場合は親和性のみが低下することが報告されている(1,2)。一方、我々はSP受容体結合部位はN-acetylglucosamine残基にα-fucoseが存在しない2本鎖複合型糖鎖を有する可能性を示唆し、糖鎖構造が親和性に影響する可能性を報告した(6)。今回はアストロサイトーマ細胞(U-87MG)を糖鎖合成阻害剤tunicamycin(TM)で処理し、SP受容体結合に対する効果について検討した。

[実験方法]

1. 細胞膜標本の調製

細胞を集めPBSを加えて110 xgで5分間遠心し、得られた細胞に50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)を加えてポリトロンにて懸濁した。20,000xgで10分間遠心し得られた沈渣をさらに、2回洗浄し膜標本として用いた。蔗糖密度勾配法による細胞膜の分画は、Nakahataらの方法(3)に準じて行った。

2. ^{3}H-Mannose, ^{3}H-Leucineの取り込み実験

Mitsuhashiらの方法(2)に従っておこなった。すなわち、細胞に0.5μg/mlのTMを加え8時間培養し、^{3}H-Mannoseあるいは^{3}H-Leucineを加え更に16時間培養し、細胞に取り込まれる放射能量を測定した。

3. ^{3}H-SP結合実験

Nakataらの方法(4)に従って行った。

4. Intact細胞の^{3}H-SP結合実験

細胞をKrebs/HEPES buffer [140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 11 mM D-glucose in 15 mMHEPES-Tris buffer (pH 7.4)]で洗浄後、結合実験に用いた。

[実験結果および考察]

U-87MG細胞を0.5μg/ml、24時間のTM処置した場合、^{3}H-Mannoseの取り込み量は未処置のときに比べ有意に減少していたが、^{3}H-Leucineの取り込みには影響がなかったことから、今回用いたTM処置により蛋白合成には影響せず、糖鎖合成のみを阻害することが示唆された(表 1)。この条件下で、膜画分におけるSP結合量を検討した結果、TM処置によりSP結合量が約30％増加し、しかも未処置膜では存在していたSP結合に対するレクチンのconcana-

valin A (Con A)に対する感受性も消失していた（図 1)。そこで、TM処置によるSP結合量の増加現象をScatchard plotにて解析した結果、0.2～5 nMの^{3}H-SPの濃度範囲では最大結合量Bmaxおよび解離定数Kdとも増加した(図 2)。更に、蔗糖密度勾配法にて膜を分画した場合、light membrane fractionでのSP結合量が主に増加することが明かとなった(図 3)。

HeLa細胞にTMを処置するとheat shock protein(HSP)の一種であるglucose regulate protein 78 (GRP 78)を特異的に発現させるとの報告があり(7)、一方、SPはGRP 78と高い親和性を有することが知られている(5)。従って、U-87MG細胞においてもTM処置により細胞内に誘導されたHSPのために結合量が増加し、細胞上のSP受容体の糖鎖合成が阻害されために解離定数が増加することが示唆された。

以上の結果より、TMにより細胞内に 1) SPに対して親和性のあるheat shock protein (s)が発現する可能性、2) SP受容体蛋白質あるいはその前駆体の蓄積等の可能性が考えられる。

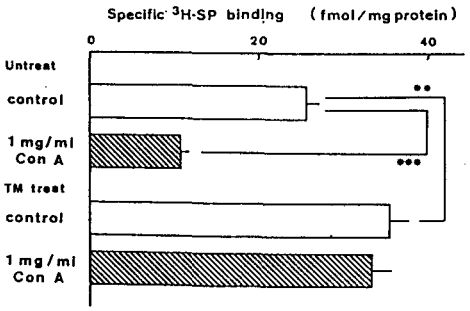


図 1 SP特異的結合に対するTMの効果

表 1 U-87MG細胞への^{3}H-Mannose, ^{3}H-Leucineの取り込み対するTMの効果

Radiolabeled precursor	Radioactivity incorporated (×10³ dpm/mg protein) 0.5 μg/ml tunicamycin −	+	Percentage inhibition by tunicamycin
³H-Mannose	8.31± 0.86	4.94± 0.56**	46.4± 1.7***
³H-Leucine	26.85± 1.73	21.01± 2.20	14.7± 6.8

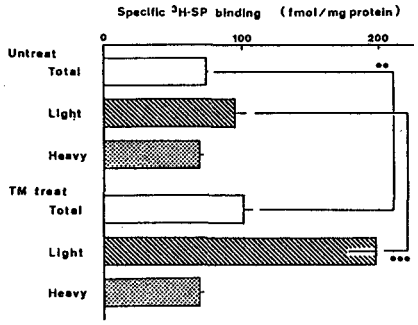


図 3 蔗糖密度勾配法によるSP結合量の分布

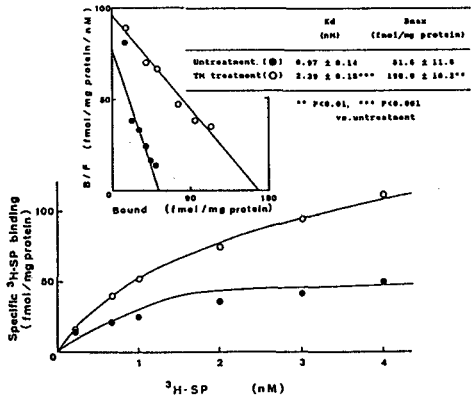


図 2 TM効果のScatchard plotによる解析

[謝辞] 実験に協力頂きました黒柳直義氏（現、中外製薬中央研）及び放射線影響研究所秋山實利部長、平井裕子副主任研究員に感謝いたします。

[文献]

1) MacLawhon, R. W. et al., (1983) J. Neurochem. 43, 1283-1296
2) Mitsuhashi, M. and Payan, D. G., (1988) Mol. Pharmacol. 35, 311-318
3) Nakahata, M. et al., (1989) Res. Commu. Chem. Pathol. Pharmacol. 64, 179-192
4) Nakata, Y. et al, (1988) J. Neurochem. 50, 522-527
5) Oblas, B. et al, (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 166, 978-983
6) Takamatsu, H. et al., (1991) J. Neurochem. 56,1452-1454
7) Watowich, S. S. and Morimoto, R. I. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 393-405

155 細胞外ATP刺激によるPC12細胞のDNA合成

高島明彦*[1]、野口かおり[1]、井上和秀[2]
([1]三菱化成生命研、[2]国立衛生試験所)

〔要約〕
PC12細胞の刺激によるDNA合成を^{3}H-thymidine のacid insoluble fractionへの取り込みにより調べた。carbamylcholine, high K^+, caffeine刺激ではDNAの合成は引き起こされなかった、ATP刺激では濃度依存的にDNAの合成が引き起こされた。ATP, ADP, AMP, Adenosineに対する応答及び、P2- antagonistスラミンの効果からこのDNA合成はP_2-purinoceptorを介して引き起こされると考えられた。このATP刺激によるDNA合成は蛋白合成阻害剤シクロヘキシミドによって阻害されなかったが、RNA合成阻害剤アクチノマイシンDによって阻害された。

ATPは神経終末小胞体あるいはクロマフィン顆粒に高濃度に存在し細胞外の刺激に応じて伝達物質と共に放出される。アデニンヌクレオチドに対してP1(adenosine, AMP), P2(ATP, ADP)という2つのレセプターが知られており、PC12細胞にはこの両方のレセプターが存在している。PC12細胞をATPにより刺激すると、P2レセプターを介して強い脱分極を起こし、Ca^{2+}の細胞内流入に引き続きノルエピネフリンの放出が引き起こされることが井上らによって報告されている(1)。我々は今回ATP刺激によるDNA合成についてPC12細胞を用いて検討した。

方法

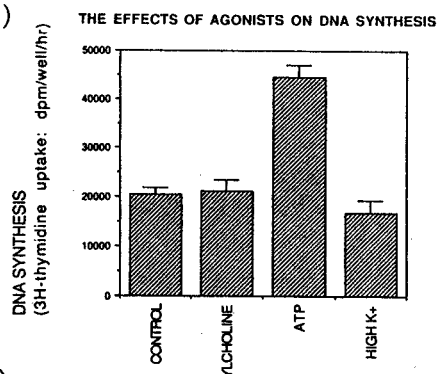
PC12細胞は7%馬血清、7%牛胎児血清を含むDMEMを用いて37 C, 10 % CO_2中で継代的に培養されている。2 x 10^5 cells/wellになるように細胞を6-well plate にまき2日後に実験に用いた。分化した細胞を用いるときにはNGF(20ng/ml)を含む無血清培地中で4日間培養した細胞を用いた。細胞はATPで刺激後に^{3}H-thymidine(2.5 uCi/ml)を1時間取り込ませPBSで洗浄後、TCAを加えた後集められた。ここで得られたTCA溶液中に含まれるacid insoluble fractionはWhattman GFCフィルターに回収され液シンで測定された。

結果及び考察

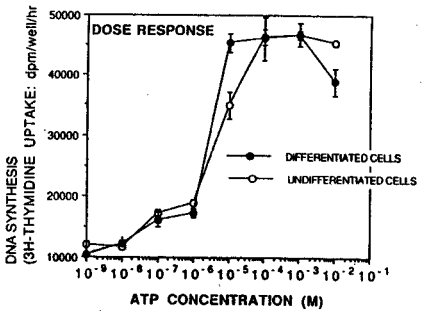
PC12細胞は1 mMカルバミルコリン、10 mMカフェイン、50 mM KCl、0.1 mM ATPによってそれぞれ刺激を行い、刺激によって取り込まれる^{3}H-thymidineの量を定量しこれをDNA合成量とした。1 mMカルバミルコリン、10 mMカフェイン、50 mM KCl刺激では対照と有意な差は観られなかった。しかし0.1 mM ATP刺激では対照の2 - 3倍のDNA合成を示した（図1）。このことは、NGFによって分化したPC12細胞でもみられた。NGF処理は無血清培地で行っており、未分化の細胞による影響は少ないと考えられる。このATP刺激によるDNA合成は10^{-6} Mから始まり10^{-5} M (NGF treated cells)及び10^{-4} M (undifferentiated cells)で最大取り込みを示した。このDNA合成は井上らが示したPC12細胞のATP刺激によるノルエピネフリン放出よりも低い

ATP濃度で引き起こされており、ノルエピネフリン放出が引き起こされない濃度条件でもATPによりDNA合成が引き起こされることが示唆された（図２）。0.1 mM ATPで細胞を刺激するとDNA合成はすぐに引き起こされ２時間後に最大となる。0.1 mM ATPで10分間細胞を刺激し細胞外液のATPを洗い流した後でもDNA合成は１時間後から始まり７時間後に最大となった(図３)。このことはATP 刺激を止めて２時間後までATP-induced currentが記録されたこと(2)と考え合わせるとATP刺激は細胞内に長期的な変化をもたらす可能性があると考えられた。ATP刺激によるDNA合成がどのレセプターによって引き起こされるかを明かにするため、ATP analoguesによるDNA合成を調べた。ATP, ADPではDNA合成が引き起こされるがAMP, Adenosineでは引き起こされなかった（図４）。更に、スラミン(300 uM)によってDNA合成は阻害された。これらのことは、ATP刺激によるDNA合成はノルエピネフリン放出を引き起こすのと同様にP_2-purinoceptorを介して引き起こされることを示した。このDNA合成はDNA複製阻害剤アフィディコリンによって抑制を受けず、ATP刺激による DNA polymerase活性も有意な変化を示さなかった。又、細胞の増殖もATP刺激によってむしろ増殖速度は減少した。これらの結果はATP刺激はアセチルコリン刺激がm_2, m_4レセプターを介してグリア細胞やニューロブラストーマに細胞増殖を活性化するようなDNA合成を起こす(3)meitogenとして作用しないことを示唆した。このDNA合成は蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミド10 ng/mlの濃度でも阻害を受けなかった、しかしRNA合成阻害剤アクチノマイシンDでは0.1 ng/ml以下の濃度で完全に阻害された。

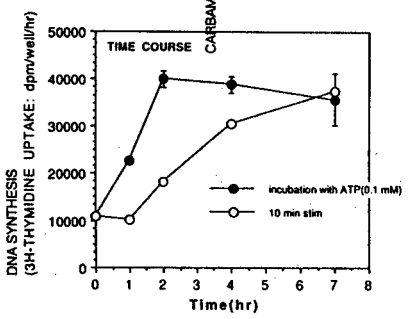
（図１）



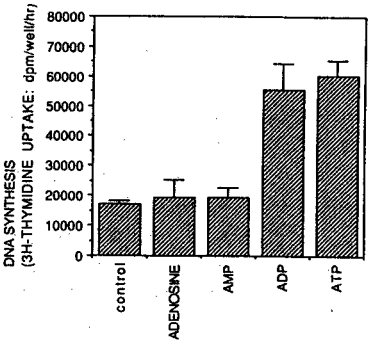
（図２）



(図３)



（図４）



文献

（１） Inoue et al.,Neurosci. Lett. 89, 106 294 - 299

（２） Evans et al.,Nature 92', 357, 503-505

（３） Ashkenazi et al, Nature 92', 340 146 -150

156 ヒトのドレブリンE cDNA クローニング

戸田正博[1)2)]、白尾智明[1)]、浅田英穂[1)]、蓑島伸生[3)]、清水信義[3)]、戸谷重雄[2)]、植村慶一[1)]
（慶應大・医・[1)]生理、[2)]脳神経外科、[3)]分子生物）

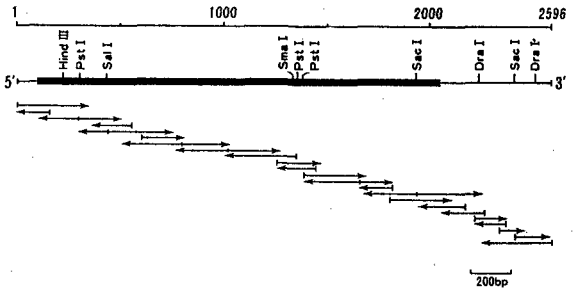
〔要約〕
ヒト胎児脳cDNAライブラリーをラットドレブリンA cDNAをプローブとしてスクリーニングし、ヒトドレブリンE cDNAを単離し、全塩基配列を決定した。全長は2596bpで、649残基のアミノ酸をコードするopen reading frameが存在した。挿入配列ins 2を除く翻訳領域についでラットドレブリンA cDNAと比較して、アミノ酸配列で88.4%の類似性を認めた。
ヒトドレブリンE cDNA導入L cellでは、細胞内でドレブリンは束状に発現しており、ラットドレブリンA cDNA導入L cellと同様に、ドレブリンがストレスファイバー上にアクチンと共在することが示唆された。
ソーテイングした染色体を用いた解析では、ドレブリン遺伝子はヒト第5染色体にマップされた。

［はじめに］
ドレブリンは神経系の発生過程において特徴的な発現パターンを呈する蛋白質で、神経細胞の移動や神経突起伸展との関連が示唆されている。ニワトリドレブリンのcDNA及び遺伝子のクローニングの結果より、ドレブリンmRNA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に対応して3種類あり、alternative splicingにより1種類の遺伝子から生じることがわかっている[2)3)]。またラット線維芽細胞L cellにラットドレブリンA cDNAを導入すると、分岐の多い樹状突起様の細胞突起を形成するという興味深い結果を得ており[1)]、さらに最近ではドレブリンはその神経細胞様突起に、また細胞質内では束状にアクチンと共在していることが示された（池田ら、本大会）。既に我々はヒト脳におけるドレブリン蛋白の存在を報告しているが[4)]、今回ヒトドレブリンcDNA clonigを行ない、得られたcDNAをL cellに導入しドレブリンの発現を試みた。さらにヒトドレブリンcDNAをプローブとして、染色体マッピングを行なった。

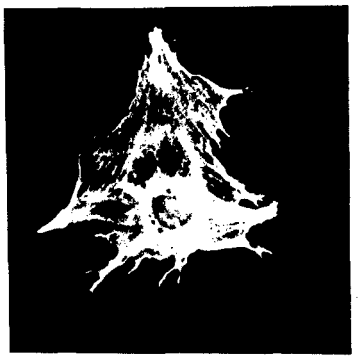
〔方法〕
cDNA cloning：ヒト胎児脳cDNA-λgt11ライブラリー(Clontec Labs,CA)より、ラットドレブリンA cDNAをプローブとして、スクリーニングを行った。インサートの長い4クローンについて制限酵素地図を作製し、pUC119にサブクローニングした。塩基配列はdideoxy法により決定した。
transfection：βアクチンプロモーターを有するpMIW-HEPのEcoRV siteおよびmetallothionein-I プロモーターを有するpMTID13SのHind III siteにそれぞれヒトドレブリンE cDNAを挿入した。この発現ベクターをneomycin resistant gene を有するpSTB-neo と共に、リン酸カルシウム共沈法に従いラット線維芽細胞L cell にco-transfectした。抗ドレブリンモノクローナル抗体M2F6を用いた免疫染色により、ドレブリン発現の確認を行なった。
chromosomal mapping：正常核型46,XYを示すGM130B細胞より、ポリアミン-ジギトニン法で染色体を調整し、ヨウ化プロピジウムまたはヘキスト33258で蛍光染色した。FACS440による解析により、10万染色体の蛍光強度の頻度分布曲線をフローカリオタイプとした。フローカリオタイプの各画分から、1種類当たり5万本の染色体をメンブレンフィルターにソーテイングし、今回得られたヒトドレブリンcDNAをプローブとしてハイブリダイズさせた。

〔結果および考察〕
cDNA cloning: 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。さらに最長のクローンであるgDhb13の全長および5'のterminal regionをプローブとして、ヒト胎児脳cDNAライブラリーを再度スクリーニングした。約1500,000個のクローンから独立した2クローンgDbh13-2,13-3を得て、分子量およびrestriction siteはgDbh13に一致しており、同一のcDNAと考え全塩基配列を決定した（図1）。全長は2596bpで、649残基のアミノ酸をコードするopen reading frameが存在した。ドレブリンEとAとの違いは挿入配列ins 2(138bp)の有無によるが、ニワトリおよびラットドレブリンAとの比較により、今回得られたcDNAはins 2を含まず（図2）、E typeと考えられた。またins 2を除く翻訳領域についてラットドレブリンAと比較すると、塩基配列から推察されるアミノ酸配列で88.4%の類似性を認めた。現在さらにヒトドレブリンA cDNAのクローニングをめざし、プローブとしてins 2の上下流に相当するそれぞれ20bpの合成ヌクレオチドを作製し、ヒト成人脳cDNAライブラリーをスクリーニング中である。
transfection: ヒトドレブリンE cDNA導入L cellでは、細胞内でドレブリンは束状に発現しており（図3）、ラットドレブリンA cDNA導入L cellと同様に、ストレスファイバー上にアクチンと共在することが示唆された。

chromosomal mapping: ソーテイングした染色体を用いた解析では、ドレブリン遺伝子はヒト第5染色体にマップされた（図4）。興味深いことに第5染色体長腕q23-qter領域には各種増殖因子がマップされており、さらにin situ ハイブリダイゼーションによる領域マッピングを計画している。



（図1）Restriction map and sequence strategy for the human drebrin E clone



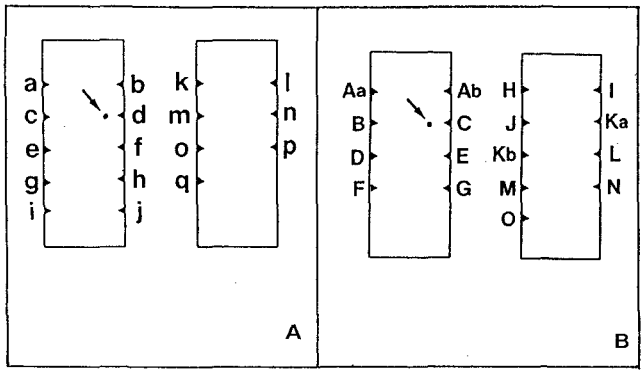
（図3）Transient expression of human drebrin E in L cells

```
Chick   241 : SMEAEEARQR LKEQSIFGEQ QEEDDRQQLR KSESEVEEAA AIIAQRPDNP REFFKQQERV
              * *****  * ** ***** *   *    *   ********** ********** **** *****
Rat     241 : SLEAEEAKRR LKDQSIFGDQ RDEEEESQMK KSESEVEEAA AIIAQRPDNP REFFRQQERV
               ********** ** ******  ******  ** ********** ********** **** *****
Human   241 : TLEAEEAKRR LKEQSIFGDH RDEEEETHMK KSESEVEEAA AIIAQRPDNP REFFKQQERV

Chick   301 : AS---GSGDA ISPGSHRTGR LHCPFIKTAD SGPPSSSSSS SSPPRTPFPY ITCHRTPNLS
              **   ** **  **  ** **   *****  * *** ****** ********** **********
Rat     301 : ASASGGSCDA PSPFNHRPGR PYCPFIKASD SGPSSSSSSS SSPPRTPFPY ITCHRTPNLS
              **** ****  *********
Human   301 : ASASAGSCDV PSPFNHRPG- ---------- ---------- ---------- ----------

Chick   358 : SFFPCSQSDY RKVSA----A GCSPCESSPA STPLGEQRTR APAEET---P ATPKDSPSP-
              * *** *      *        **  ** * *** **  * * * *   *   *  * * *
Rat     361 : SSLPCSHLDS HRRMAPTPIP TRSPSDSSTA STPITEQIER ALDEVTSSQP PPPPPPPPPA
                    ***** ********** ********** ***  ***** ********** ** ********
Human   320 : ----SHLDS HRRMAPTPIP TRSPSDSSTA STPVAEQIER ALDEVTSSQP PPLPPPPPPA
```

（図2）Comparison of amino acid sequences between human drebrin E, chick drebrin A and rat drebrin A



（図4）Drebrin gene mapping to human chromosome 5; Spot blot hybridization using flow-sorted chromosomes stained with propidium iodide(A)or Hoechst 33258(B).

〔文献〕

1. Shirao,T., Kojima,N. and Obata,K.(1992)NeuroReport 3:109-112
2. Shirao,T., Kojima,N., Terada,S. and Obata,K.(1990) Neuroscience Res.Suppl., 13:S106-S111
3. Shirao,T. and Obata,K.(1985) J.Neurochem., 44:1210-1216
4. 戸田正博、白尾智明、浅田英穂、戸谷重雄、植村慶一(1991)神経化学, 30:314-315

157 培養生後２日ラット中隔神経のＣｈＡＴ活性に対する脱分極の誘導効果－ＮＧＦの作用との差異について

浜田　淳、腰本裕之、砥出勝雄、岩田邦男
（日本たばこ医薬研究所）

〔要約〕

Nerve growth factor(NGF)は、より未分化な中隔ｺﾘﾝ作動性神経に対しては分化誘導作用を、より成熟した神経に対しては生存維持作用を発現することが知られている。我々は、昨年度本学会において、High K^+処理による脱分極が培養生後10日ﾗｯﾄ中隔神経の生存を維持することを報告した(1)。今回、我々は脱分極のｺﾘﾝ作動性神経に対する作用が、NGFと同様に、より未熟な神経に対しては分化誘導的に働くか否かを検討するために、胎生17日及び生後2日の培養中隔神経を用いて、脱分極によるｺﾘﾝｱｾﾁﾙﾄﾗﾝｽﾌｪﾗｰｾﾞ(ChAT)活性に対する作用を検討した。生後2日の培養中隔神経においてはNGF同様ChAT活性を誘導したが、胎生17日の神経においては誘導効果を示さなかったのに対し、より成熟した生後16日の神経においては、生後10日のものと同様、神経生存維持効果を示した。培養生後2日中隔神経系において、NGF及びHigh K^+処理時のｱｾﾁﾙｺﾘﾝｴｽﾃﾗｰｾﾞ(AChE)染色陽性細胞数を計測し、AChE染色陽性細胞１個当りのChAT活性(cellular ChAT)を算出したところ、NGF処理においては著明なcellular ChAT活性の上昇が見られたのに対し、High K^+においては、上昇が見られなかった。

このことから、脱分極の培養ﾗｯﾄ中隔神経に対する作用は、NGF同様、神経の成熟度により、分化誘導から生存維持へと変化するが、その誘導作用はNGFによるものと異なることが示唆された。

（目的）

神経の初期発生過程において、神経の分化や生存に神経栄養因子が大きく貢献していることが、様々な報告からなされている。神経の脱分極が同様の過程で分化や生存に大きく関与していることも、組織培養系を用いたﾓﾃﾞﾙ系で示されている(2)。一方、神経栄養因子として広く知られているNGFは、中枢神経系においては、特に中隔ｺﾘﾝ作動性神経に対して作用し、初期発生過程において胎生期より生後5日までは分化誘導作用を発現するが、生後8日以降では生存維持作用に変化する事が知られている(3)。我々は昨年度本学会において、培養生後10日ﾗｯﾄ中隔神経がHigh K^+処理による脱分極により培養中隔神経の生存が維持される事を報告した。

今回、我々は脱分極の培養中隔神経に対する作用が、より未熟な発生過程では、NGFと同様、分化誘導的に作用するか否かを検討するために、NGFが分化誘導作用を示す胎生17日及び生後2日の培養中隔神経を用いて、ChAT活性に対する作用を検討した。また、NGFの作用が完全に生存維持作用に変換し終わっている、生後16日の培養中隔神経に対する脱分極の作用も併せて検討した。

（方法）

<u>生後ﾗｯﾄ中隔神経の培養</u>

畠中等の方法(4)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、50Units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。胎生ﾗｯﾄ中隔神経の培養においては、0.1% ﾄﾘﾌﾟｼﾝ消化により、細胞を分散した。用いた胎生及び生後ﾗｯﾄの日齢はそれぞれ、ﾌﾟﾗｸﾞ確認日及び出生日を１日目として数えた。ChAT活性測定は畠中等の方法(5)、AChE染色法はHefti等の方法(6)にしたがって行った。

<u>High K^+培地調製法</u>

$NaHCO_3$-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35mM K^+培地とした。35mM以下のHigh K^+培地は、35mM K^+培地を、通常のDF/TIP培地(5mM K^+)で希釈することにより、調製した。

（結果及び考察）

NGFが生存維持作用を示す生後10日(P10)及び16日(P16)の培養中隔神経においては、NGF非存在下での経時的ChAT活性減少が、50ng/mlのNGF添加（図１Ａ）及び25mM K^+（図１Ｂ）を含むHigh K^+培地培養下で、抑制された。また、High K^+培地にNGFを共存させても生後10日及び16日ともに相加および相乗効果は見られなかった（図１Ｃ）。このことから、より成熟した生後16日ﾗｯﾄにおいてもHigh K^+処理による脱分極は、NGF同様、培養中隔神経の生存を維持する事が明かとなった。

一方、NGFが分化誘導作用を示すより未熟な培養中隔神経においては、High K^+脱分極処理により、NGFの作用とは異なるprofileを示した。すなわち、生後2日(P2)においては、High K^+脱分極処理により培養中隔神経の経時

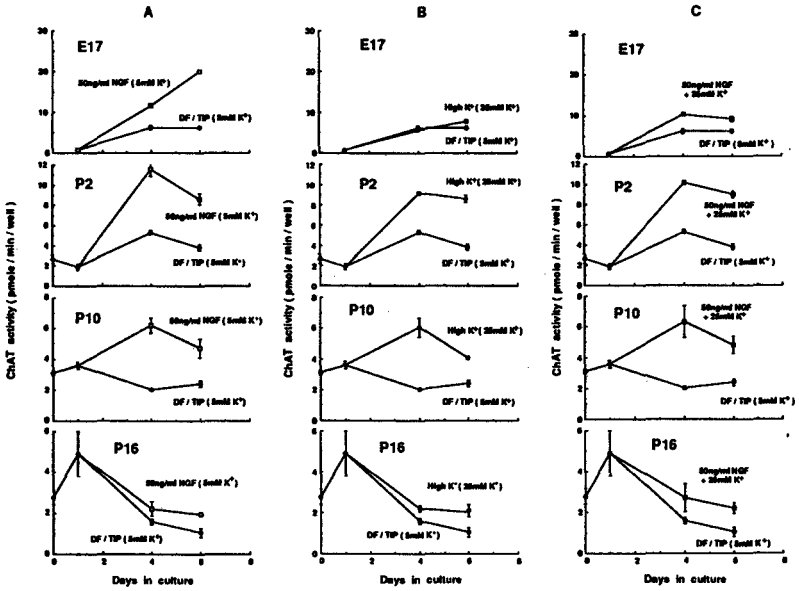


図1： 培養胎性及び生後ラット中隔神経のChAT活性に対するNGF(A), High K^+(B)及び共存効果(C)

的なChAT活性の上昇が見られたが、培養胎生17日(E17)中隔神経においてはChAT活性の上昇は見られなかった（図1B）。また、High K^+培地にNGFを共存させた場合、培養生後2日中隔神経においては相加相乗効果は見られなかったが、胎生17日中隔神経においては、High K^+脱分極がNGFのChAT誘導作用を抑制する結果を得た（図1C）。

培養生後2日中隔神経系において、High K^+脱分極処理によるChAT上昇が、生存維持効果によるものでなく、ChAT誘導作用であることを確認するために、NGFを含まない正常培地(5mM K^+)で7日間培養後、NGFまたはHigh K^+存在下でさらに5日間培養し、ChAT活性の変化を測定した。正常培地による7日間の前培養を行っても、その後のHigh K^+処理により、NGF同様、顕著にChAT活性が上昇する事から、High K^+処理による脱分極が培養生後2日中隔ｺﾘﾝ作動性神経の分化を誘導することが明かとなった。

また本結果は、High K^+処理による脱分極の、培養生後2日中隔神経に対する分化誘導作用が、NGF同様ｺﾘﾝ作動性神経1個当たりのChAT活性上昇を介した作用であることを示唆した。そこで、培養生後2日および10日中隔神経を用いて、NGFおよびHigh K^+存在下培養6日後のAChE染色陽性細胞数を測定し、AChE陽性細胞1個当たりのChAT活性を算出した。培養生後10日中隔神経においては、NGFおよびHigh K^+処理によりAChE染色陽性細胞数は無処理に比して増加するが、AChE陽性細胞1個当たりのChAT活性(Cellular ChAT活性)はいずれの処理群においても不変であった。一方、培養生後2日中隔神経の場合、NGF処理時にはAChE陽性細胞数の増加は観察されず、Cellular ChAT活性が顕著に増加したのに対し、High K^+処理時には、予想に反して、NGF共存下非共存下いずれの場合も、AChE陽性細胞数の顕著な増加がみられ、Cellular ChAT活性は無処理群と変化がなかった。本結果は、生後2日中隔神経に対するHigh K^+脱分極による分化誘導作用が、NGFのようなｺﾘﾝ作動性神経1個当たりのChAT活性を増加させる作用ではなく、神経1個当たりのChAT活性は不変のまま、cholinergic marker を発現していない神経にmarker発現を促す作用であることを示唆した。

以上の結果より、High K^+による脱分極は生後10日以降の培養ﾗｯﾄ中隔神経においては、NGFと同様ｺﾘﾝ作動性神経に対する生存維持作用を示すが、胎生17日ではChAT活性に影響を与えず、生後2日の神経に対してはAChE陽性細胞数を増加させることによりｳｪﾙ内総ChAT活性を上昇させることが明かとなった。一方、NGFは胎生17日及び生後2日ともにｳｪﾙ内総ChAT活性を上昇させ、生後2日においてはAChE陽性細胞1個当たりのChAT活性を上昇させた。このことから、培養中隔ｺﾘﾝ作動性神経に対するHigh K^+脱分極の作用はその成熟度によって異なり、より未成熟な中隔神経においてはNGFと異なった作用を示すことが示唆された。

（文献）

(1)Hamada A. et.al. 神経化学, 30,(1991), 246-247
(2)Koike T. et.al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 86,(1989), 6421-6425
(3)Hatanaka H. et.al. Dev.Brain Res. 39, (1988), 85-95
(4)Hatanaka H. et.al. Neurosci.Letters, 79,(1987), 85-90
(5)Hatanaka H. et.al. 組織培養研究, 6,(1988), 23-29
(6)Hefti F. et. al. Neurosci., 14, (1985), 55-68

158 ラミニン，ＶＩＰ，Ｓ－ラミニンにおける構造類似性と神経突起伸展活性について

田代謙一郎[1,3]、山下法文[2]、穴井元昭[3]、田代信維[2]

[1] 若久病院、[2] 九州大学医学部・精神神経科、[3] 九州大学医療短大・生化学

［要約］

ラミニンＡ鎖Ｇドメイン近くのペプチドPA22-2の活性中心はIKVAV(Ile-Lys-Val-Ala-Val)であり、細胞接着・伸展、細胞移動、神経突起伸展などの種々の細胞生理作用を持つ［１］。このアミノ酸配列は疎水性アミノ酸と１個の塩基性アミノ酸からなる。我々は生物活性とくに神経突起伸展活性を示す共通構造を検索中だが、今回この構造に類似するVIP(Vasoactive Intestinal Polypeptide)と神経終末末端に存在するS-ラミニンのそれぞれのペプチドLMA-9, LMA-10を合成し、その生物活性を細胞接着、神経突起伸展、ヘパリン結合活性で調べてみた。その結果、VIP のLMA-9(VKKYLNS) にはこれらの活性は存在しないが、S-ラミニンのLMA-10(TIKLLN)には細胞接着活性と神経突起伸展活性があった。また、LMA-10はラミニン及びIKVAV で誘導される神経突起伸展活性を阻害せず、突起伸展活性は異なる受容体を介している可能性を示唆した。以上のように、神経突起伸展活性を示す基質にはIKVAV に類似するような共通構造の存在が考えられる。

［目的］

ラミニンは分子量約900Kの糖蛋白質で、細胞接着・移動・増殖・分化、食作用などの細胞生理作用を持つほか、癌細胞転移の促進と神経突起伸展作用を持っている。ラミニンＡ鎖のＧドメイン近くには、演者らの発見したペプチド，PA22-2(SRARKQAASIKVAVSADR)の配列があり、ここに神経突起伸展や細胞接着などの生物活性が存在する［１］。PA22-2の活性中心はIKVAV であり、この配列は４個の疎水性アミノ酸と１個の塩基性アミノ酸からなる。一方、最近発見された神経終末末端に存在するラミニン類似の糖蛋白質、S-ラミニンはラミニンのB1鎖と約40%の相同性があり、神経細胞に対し接着活性を有し、その活性部位はLRE(Leu-Arg-Glu)であると報告されている［２］。このS-ラミニンのアミノ酸残基187-225 の部分のカルボキシル基末端側からの配列はラミニンのPA22-2の配列の前後に約４０%の相同性がある（表１）。また、中枢神経系にも存在することから、神経細胞への関与が考えられているVIP にもPA22-2の配列と３７%の相同性があり（表１）、演者らは神経突起伸展活性の研究過程で、この活性を示す基質には何らかの共通構造が存在するのではないかと考えるに至った。これらを検証するために、ラミニン、VIP 、S-ラミニンのペプチドを合成し、その生物活性を特に細胞接着、神経突起伸展、ヘパリン結合活性について調べてみた。

［方法］

１）細胞接着活性：PC12細胞を、7.5%牛胎児血清、7.5%馬血清を含むDMEMで培養した。

VIP	HSDAVPTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN (LMA-9)
Laminin A chain	PLKTLEENLSRNLSEIKLLISRARKQAASIKVAVSADR (LMA-8, LMA-1)
S-Laminin(from C.end)	DGLTHLRTLNVRLNTIKLLNQIRSSYPDPIPIAPDLVRY (LMA-10)

表１　ラミニンＡ鎖、VIP 、S-ラミニンのアミノ酸配列とペプチド

ペプチドを96穴培養皿に加えてコーティングした後、1.5% BSAを含むEMEM培養液で非特異結合をブロッキングしておいて、PC12細胞を加えて37°Cで１時間インキュベートした。PBS で洗浄して非接着細胞を除き、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%トライトン X-100で抽出して570nm 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 でプライミングした後、ペプチドをコーティングした24穴培養皿に入れ

て、37°Cの5% CO_2存在下に非血清培養液で培養して、神経突起形成を２日目に撮影した。

３）ヘパリン結合活性：合成ペプチドをコーティングした後、0.2% BSAでブロッキングした96穴培養皿に ^{3}H-ヘパリン(50,000 dpm/well)を加えて37°Cで２時間インキュベートした。0.05% トライトン X-100を含む洗浄液で３回洗浄した後、1% SDS/ 0.5N NaOH を加えて60°Cで30分間インキュベートした。その後、結合した ^{3}H-ヘパリンに10mlの液体シンチレーション液を加えて放射活性を測定した。

４）ペプチドのコーティング効果：合成ペプチドを96穴培養皿に入れて乾燥させた後、蒸留水で１度洗浄して非接着ペプチドを除き、74μl の蒸留水、37μl のクエン酸バッファー、89μl 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、570nm の吸光度を測定した。

［結果］

ラミニンの配列としてLMA-1-1(CSIKVAVS)，LMA-1-2(SIKVAVS)，LMA-8(IKLLIS)とVIP の配列LMA-9(VKKYLNS)及びS-ラミニンの配列LMA-10(TIKLLN)について細胞接着、神経突起伸展、ヘパリン結合活性及びコーティング効果について調べた。その結果、表２のように、細胞接着活性については、LMA-1-1 及びLMA-1-2 は活性を示すが、LMA-8 とLMA-9 には活性がなく、LMA-10にわずかに活性がみられた。神経突起伸展活性に関してはLMA-1-1，LMA-10 に活性がみられるが、LMA-1-2，LMA-8，LMA-9 には活性が見られなかった。一方、ペプチドによる活性阻害ではラミニン、 IKVAVの接着活性・神経突起伸展活性をLMA-9，LMA-10 は阻害しないが、LMA-8 は両基質の突起伸展活性を阻害した。ヘパリン結合活性ではLMA-1-1，LMA-1-2には結合活性があるが、LMA-8，LMA-9，LMA-10には活性がなかった。コーティング効果を調べると、LMA-1-1 はコーティングされやすく、LMA-1-2，LMA-10 はわずかにコーティングされるが、LMA-8，LMA-9はほとんどコーティングされないことがわかった。

［考察］

S-ラミニンは神経終末末端に存在し、その細胞接着活性部位はLRE であることが報告されているが［２］、TIKLLNに対する報告はない。今回の実験で、LMA-10(TIKLLN)は接着活性を示し、しかも神経突起伸展活性を示すことがわかった。一方、VIP については細胞接着及び神経突起伸展活性について活性を示さず、VKKYLNS の配列は関連性が少ないと思われる。しかし、コーティング効果を考えると、LMA-1-2，LMA-8，LMA-9，LMA-10 はコーティングされにくく、このことが活性同定を困難にしている可能性がある。そのため、現在ペプチドを効率よくコーティングする方法を検討中である。また、LMA-10はS-ラミニンのカルボキシル基末端側からの配列である為、今後はアミド基末端側からの配列のペプチド(NLLKIT-NH_2)を合成して活性の有無を調べ、活性の共通構造をさらに解析していく予定である。

Peptide	Sequence	Attachment P	Attachment I	Neurite Out. P	Neurite Out. I	Heparin-Binding	Coating
LMA-1-1	CSIKVAVS-NH_2	++	n.d.	+	n.d.	++	++
LMA-1-2	SIKVAVS-NH_2	+	n.d.	-	n.d.	++	±
LMA-8	IKLLIS-NH_2	-	±	-	+	-	-
LMA-9	VKKYLNS-NH_2	-	-	-	-	-	-
LMA-10	TIKLLN-NH_2	±	-	+	-	-	±

P:promotion, I:inhibition, n.d.:not detected

表２　ペプチドとその生物活性

［文献］

1.Tashiro K, Sephel GC, Weeks B, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, and Yamada Y.
J.Biol.Chem. 264:16174-16182 (1989)

2.Hunter DD, Porter BE, Bulock JW, Adams SP, Merlie JP, and Sanes JR.
Cell 59:905-913 (1989)

159 スタウロスポリンの培養神経細胞への効果（II）

小嶋久子、北島理恵、中村和生、玉井洋一
（北里大学・医学部・生化学）

〔要約〕

Protein kinase 阻害剤である staurosporine により培養細胞の形態分化や機能分化を誘発することが知られている。先に、我々はPC12細胞にstaurosporineを添加してコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)活性が上昇することを見いだし報告した。staurosporineの神経系培養細胞におけるアセチルコリン合成系の活性化についてさらに詳細な情報を得るために、マウスneuroblastoma細胞 NS-20Y などに対するstaurosporineの作用を検討した。その結果、staurosporineによりNS-20Y(cholinergic)でもneurite様の突起伸展などの形態変化が起こり、ChAT活性が上昇した。staurosporine作用時にactinomycin-Dを共存させるとChATの活性化は抑えられたが、突起伸展にはあまり影響がなかった。adrenergicな細胞であるN1E-115に同様の処理を行うと、やはり突起網の伸展などの顕著な形態変化が起こるとともに、ChAT活性の上昇が認められた。以上の結果はstaurosporineによる神経系細胞のアセチルコリン合成の活性化作用を示すとともに、staurosporineの作用を及ぼす経路が突起形成と伝達物質合成酵素の活性化とでは異なることを示唆している。

〔緒言〕

protein kinase 阻害剤である staurosporine が培養細胞の形態分化や機能分化を引き起こすことが知られている。神経系の細胞では、PC12細胞で突起形成の誘発や、NGFによる突起形成時のstaurosporineとの相互作用が報告され[2][3]、ヒトneuroblastomaSH-SY5Yでもstaurosporineの突起網形成との関係が報告されている[4]。

先に我々は、PC12細胞にstaurosporineを作用させて、突起を形成した細胞のアセチルコリンエステラーゼ活性とChAT活性を測定した。その結果、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させることが示唆された[5]。本報告では、神経細胞の形態および機能分化と伝達物質表現型の調節の関係について知る事を目的として、cholinergic細胞であるNS-20Y、adrenergic細胞のN1E-115、主要伝達物質が不明の Neuro 2aに及ぼすstaurosporineの効果についてアセチルコリン合成系に絞って検討を行った。

〔方法〕

細胞　細胞はマウス neuroblastoma N1E-115、NS-20YおよびNeuro 2a。1mM staurosporineのDMSO溶液を1% FCS、N1 supplement を含む培地に添加してstaurosporine培地とし、前培養は行わずに通常培地と交換した時を0-timeとした。

酵素活性測定　ChAT活性は出口の方法[1]に従った。

〔結果と考察〕

(1) 3種のneuroblastoma にstaurosporineを1、5、10、20nM濃度になるよう添加して経時的に形態観察を行った。staurosporineの入らないDMSOのみを添加した培地の48時間培養では、いづれの細胞も形態変化を示さなかった。staurosporine 5nM以上で添加後1時間ですでに形態変化が認められ、７時間ではっきりとした突起の伸展が観察された。1nMでは添加後5時間以上経過してから形態変化が認められた。20時間経過では10nMおよび20nM濃度でいづれの細胞についても細胞生存率が20%以下で、48時間で生存率は3%以下であった。staurosporine存在下では添加量に関係なく細胞の増殖は停止した。このようなstaurosporineのneuroblastomaの形態変化に及ぼす影響は、昨年度報告したPC12細胞の場合と同様であった。またstaurosporine作用時にactinomycin-D(1.5nM)を共存させても変化は認められなかった。次ぎにstaurosporineを1-10nM

濃度で20時間処理した後に、細胞をstaurosporineの入らない通常培地に切り替えると、1nMと5nM処理のNeuro 2aとNS-20Yでは、24hr後に細胞の形態が少し元に復し増殖が始まったが、10nM以上では細胞は回復しなかった。N1E-115細胞は10nM濃度で24時間処理した細胞も、通常培地の培養に戻すと生存細胞はそのまま保たれ、突起の伸展状態もstaurosporine存在下と変わらなかった。

(2) 我々は既にPC12細胞がstausrosporineに迅速に応答して、数時間でneurite様の突起が形成され、それに伴ってアセチルコリン合成も活性化されることを報告した[5]。そこで、cholinergic細胞であるNS-20Y細胞とadrenergic細胞であるN1E-115にstaurosporineを作用させた時のアセチルコリン合成能について比較した（表１）。NS-20Yではstaurosporine濃度10nMと20nMを比較すると、20nMの時の最大活性化は10nMの時の2倍以上であった。とくに20nMでは活性の上昇は添加後早い時期からみられたが、添加後7時間で活性が元に戻る傾向を示した。adrenergic細胞であるN1E-115細胞でも少し活性が上昇する傾向にあるが、NS-20Yほど顕著ではなかった。

表１　staurosporine処理細胞のChAT活性(pmol/h/mg protein)

Time(min)	NS-20Y		N1E-115	PC12
	10nM	20nM	20nM	20nM
0	3131±78	3058±142	352.6±13.1	362.0±8.0
30	2902±57	7776±1752	461.0±42.1	394.0±106.1
60	3201±80	8419±925	479.9±38.5	673.4±61.2
180	4554±405	n.d.[a]	n.d.	1499 ±270
420	3512±91	4326±109	350.9±10.8	1037 ±22

測定回数 n=6、[a]not determined（現在検討中）、

表２　Actinomycin-DのChAT活性(pmol/h/mg protein)への影響

薬剤添加(7hr)	NS-20Y	N1E-115
1 control	3749±621	380±43
2 staurosporine(10nM)	3829±1009	598±124
3 actinomycin-D(1.5nM)	3432±490	447±52
4 2+3	4611±569	427±71

表2にstaurosporineにactinomycin-Dを共存させた時のChAT活性を示した。NS-20YとN1E-115の両方においてstaurosporineによる活性化を抑制する傾向が見られた。staurosporineによる突起形成にはactinomycin-Dの影響が殆ど見られなかったが、ChAT活性の上昇はactinomycin-Dで抑制されることから、形態分化と酵素活性の誘導とは異なる機作であることが示唆された。以上のように、staurosporineはPC12細胞のみでなく、cholinergic細胞のNS-20Yでもアセチルコリン合成系を活性化することが示された。

［文献］

(1) 出口武夫 (1990) 新生化学実験講座 「神経化学」、364-366 (2)Hashimoto,S. & Hagino,A.,(1989) Exp.Cell Res. 184, 351-359 (3) Hashimoto,S. & Hagino,A. (1989) J.Neurochem. 53, 1675-1685 (4)Jalava,A., et al., (1992) FEBS Lett. 300, 114-118 (5)小鳩ら (1991) 神経化学 30, 290-291

160 マウス神経芽腫細胞における外来性スフィンゴシルホスホコリンの神経突起伸展効果

杉山英子，武富 保
（信大·医·心脈管研·脂質生化学）

〔要約〕Kaller法でsphingomyelin(以下SM)より調製したsphingosylphosphocholine(以下SPC) analogues及びSMを培地に添加すると3種のマウス神経芽細胞腫の細胞株、NS-20Y, Neuro2a, N1E-115の神経突起伸展が促進された。この効果の強さには細胞と培養条件によって差が見られたが、sphingosylphosphocholine＞N-acetyl SPC(NAcSPC)＞N-stearoyl SPC≒SMという傾向であった。一方、細胞障害を起こさない濃度の sphinganineによっては、NS-20Y, Neuro2a で神経突起伸展が抑制された。このSPCの効果は可逆的であり、伸展した突起の維持にもSPCが効果的であることが示唆された。[3-^{3}H]SPCを用いた代謝標識実験により、外来的に細胞に与えたSPCは細胞に取り込まれてSMの生合成に利用されうることが、明らかにされている。以上の結果から、SMの代謝回転が神経突起の形成や維持に何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

リゾスフィンゴ脂質はスフィンゴ脂質の前駆構造を有し、近年 sphingosineとともにprotein kinase C活性を阻害するといわれ，細胞機能における 内因性調節因子ではないかと注目されている[1]。すでに演者らは、3種類のマウス神経芽細胞腫の細胞株に対して、SPCとNAcSPCを培地に添加すると神経突起伸展が促進されたこと、そして、SPCを与えた細胞ではSM、ganglioside GM3、cholesterol の相対的な増加が認められたことを報告した[1]。本研究ではこのSPC による神経突起伸展効果について形態的により詳細な検討を加えた。

［材料と方法］

1．脂質：細胞に与えたスフィンゴ脂質(SPC、NAcSPC、N-stearoyl SPC、SM、sphinganine)はすべて当教室で調製されたものである。このうち、SPCはブタ脊髄由来のSMよりKaller法で調製されたものである。

2．細胞培養：マウス神経芽細胞腫の細胞株、NS-20Y、Neuro2a、N1E-115は名市大医学部田中亮、加藤泰治両教授に分与されたものである。通常の培養には、10% Fetal bovine serum (FBS)、penicillin (100 Unit/ml)、streptomycin (100 μg/ml)含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用い、37℃、5%CO_2下で行った。

3．神経突起伸展の分析：主な実験条件としては、まず細胞をpetri dish(i.d. 35mm)に0.8-1×10^4cells/cm^2の密度で播種し、各脂質を加えた1,5,10%のFBS含有DMEM2ml(対照には相当量のPBSを加えた)中で24時間培養後、培養液を除き 2.5% glutaraldehyde溶液で固定した。これをGiemsa 液で染色し、光学顕微鏡(明視野フィルター使用)下で1 cell body以上の長さの突起を伸ばしている細胞を数えた。また、SPCの効果が可逆的なものであるかどうかを調べるためには、上記のようにSPC含有培地に播種した後、４時間培養した細胞群の培地をSPCを含む培地と含まない培地とに交換した。さらにこれらの細胞群を24時間培養後に再び同様に培地を交換し、さらに24時間培養を継続した。こうして細胞を播種してから、4、24、48時間に細胞を固定、染色して突起を伸展している細胞数を求めた。

［結果と考察］

表1に示すように、3種類の細胞に共通して、既に報告したSPC、NAcSPCの他に、N-stearoyl SPC、SMにも突起伸展を促進する効果が認められた。それぞれの効果の強さは培養条件や細胞の種によって違いはあるものの、SPCの効果が最も強いと考えられた。しかしながら sphinganineの効果はこれらとは異なり、NS-20Y、Neuro2a 細胞では 突起伸展を抑制した(表2)。 この突起伸展効果は、SPCで細胞を処理した後培地からSPCを取り去ると、突起を伸展した細胞の割合がSPCを継続的に与えた細胞群よりも明らかに低かったことから、この効果は可逆的なものだと考えられる(図1)。

一般に、神経細胞の突起の伸展と細胞増殖の抑制とは密接な関連があると言われているが、本研究では、十分に突起伸展効果のある濃度のSPCやSMには細胞の増殖を抑制する効果は特に認められなかった。最近、Desai&Spiegel[2]は細胞障害にならない濃度のSPCはastrocytoma や glioma cell lineを含む数種類の培養 potent mitogenとしての生理活性を示したことを報告している。本研究におけるSPC analoguesやSMの効果

は単に細胞増殖の阻害によるものではないと考えられた。

細胞内Ca^{2+}濃度の上昇が神経突起伸展と密接に関係することを示唆する報告は多い。最近、sphingosineとSPCに細胞内Ca^{2+}濃度を上昇させるという報告がある[3]。しかし、SPCとsphinganineの対照的な効果を考えると、細胞内Ca^{2+}濃度の上昇だけではSPC analoguesやSMの効果を説明することができないと思われる。我々の実験では、これらの細胞に外来的に与えたSPCは細胞に取り込まれて、sphingosineとphosphocholineとに分解された後で速やかにceramideにアシル化され、phosphocholineのtransportによってSMに合成されていくことが推定されている[5]。メカニズムの詳細はまだ不明だが、現在までに報告されているsphingosineやSPCの生理活性を考慮すると、SPC analogues やSMの効果は一つの要因だけが関与するものではないと思われた。実験結果ではSPCの効果が際立ったが、生理的には、神経突起伸展の促進、伸展した突起の維持などの神経機能においてSMの代謝回転が重要なのではないかと考えられる。

Table I Neurite-promoting effect of synthetic SPC analogues and naturally occurring SM

Group	Concentrations(μM)	Neurite-bearing cells (%)
NS-20Y[a]		
Control		13.4±2.1 (n=16)
SPC	2.5	23.6±3.2 (n=12)[c]
NAcSPC	2.5	20.4±1.0 (n=4)[c]
N-stearoyl SPC	7.5	20.7±1.3 (n=4)[c]
	50	17.7±1.5 (n=4)[d]
SM	5	17.5±2.2 (n=4)[d]
	50	21.9±2.3 (n=4)[c]
Neuro2a[b]		
Control		16.8±3.2 (n=16)
SPC	25	36.2±5.5 (n=12)[c]
	50	48.2±4.4 (n=8)[c]
NAcSPC	25	33.4±3.2 (n=4)[c]
N-stearoyl SPC	25	20.3±1.6 (n=8)[d]
	100	21.2±2.2 (n=8)[d]
SM	25	23.5±2.2 (n=8)[c]
	100	21.6±2.0 (n=8)[c]
N1E-115[b]		
Control		19.3±4.0 (n=20)
SPC	25	52.6±3.2 (n=8)[c]
NAcSPC	25	44.5±3.3 (n=4)[c]
N-stearoyl SPC	25	29.2±3.0 (n=8)[c]
SM	25	29.9±3.0 (n=8)[c]

Data are mean ± S.D. percentages of neurite-bearing cells.
[a] Experiments were performed in the medium containing 1%FBS.
[b] Experiments were performed in the medium containing 5%FBS.
[c] $P < 0.001$ (vs control) by Student's *t* test.
[d] $P < 0.01$ (vs control)

Table II Effect of sphinganine on cell morphology

Group	Conc.(μM)	Serum(%)	Neurite-bearing cells (%)
NS-20Y			
Control		1	13.8±2.1 (n=16)
Sphinganine	0.1	1	10.9±1.5 (n=4)[c]
	0.5	1	6.4±1.0 (n=4)[a]
	1.0	1	5.4±1.0 (n=4)[a]
Control		10	2.6±0.5 (n=8)
Sphinganine	1.0	10	1.9±0.5 (n=4)[c]
	2.5	10	1.8±0.3 (n=4)[c]
	5.0	10	2.4±0.2 (n=4)
Neuro2a			
Control		5	16.8±3.2 (n=16)
Sphinganine	1.0	5	18.4±0.9 (n=8)
	2.5	5	10.4±1.2 (n=4)[b]
	5.0	5	X
Control		10	15.3±3.8 (n=12)
Sphinganine	2.5	10	14.0±0.1 (n=4)
	5.0	10	9.8±2.1 (n=4)[b]
	7.5	10	X

Data are mean ± S.D. percentages of neurite-bearing cells.
[a] $P < 0.001$ (vs control) by Student's *t* test.
[b] $P < 0.01$ (vs control) [c] $P < 0.05$ (vs control)
X, cytotoxic

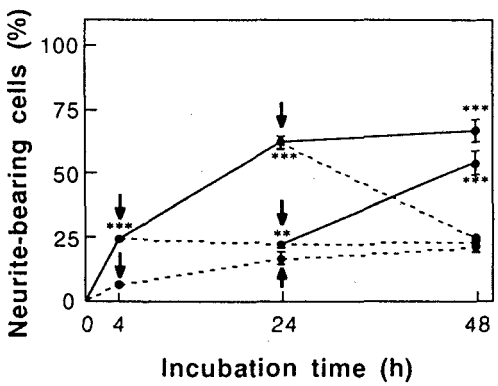


Fig. 1,
Reversible effect of exogenous SPC on neurite outgrowth in Neuro2a cells. Cells were seeded at a density of 0.8 x10^4 cells/cm^2 in DMEM containing 5% FCS, then cultured with (solid lines) or without SPC (broken lines) for the indicated periods. Arrows indicated the time when cells received fresh medium with or without SPC. After the culture, cells were fixed, and stained. *** P< 0.001, ** P< 0.01 as compared to control (without SPC) by Student's *t* test.

文献 1. Bell, R. M., Loomis, C. R., & Hannun, Y. A.(1988) Cold Spring Harb. Quant. Biol. 53 Pt 1, 103-110
2. Desai, N. & Spiegel, S.(1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 361-366
3. Ghosh, T. K., Bian, J., & Gill, D. L. (1990) Science 248, 1653-1656
4. Sugiyama, E., Uemura, K. Hara, A. & Taketomi, T. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 169, 673-679 5. 杉山英子 (1992) 信州医学雑誌 40, 45-59

161 ＮＧＦにより分化したＰＣ１２細胞の免疫細胞化学的研究

池亀守、 坂本秀生、 藤田興、 葛谷博磁
（藤田保健衛生大学・総医研・分子生物）

〔要約〕 ＮＧＦおよびＥＧＦのいずれによってもリン酸化が促進される、ＰＣ１２細胞の30kDaタンパク質を抗原として作製された単クローン抗体の間接免疫蛍光染色により、ＮＧＦにより分化したＰＣ１２細胞は対照に比べて非常に強く染色された。しかしＥＧＦを作用させたＰＣ１２細胞では、その染色強度の差はＮＧＦの場合程大きくはなかった。この抗体はラット末梢神経組織をも認識する事から、この抗体が認識する抗原は、神経細胞分化と何等かの関係があるかもしれない。

【目的】 ラット褐色細胞腫由来のＰＣ１２細胞は、ＮＧＦによる神経細胞分化のモデル系として用いられている。この際いくつかのタンパク質のリン酸化が変化し、そのうち30kDa核タンパク質のリン酸化の増加が報告されている[1,2]。著者らは、このタンパク質をBalb/Cマウスに免疫、細胞融合後、単クローン抗体を作製し、この抗体が末梢神経組織および副腎髄質を認識する事を、ラットの組織を用いて認めた[3]。この30kDa核タンパク質は、ＰＣ１２細胞に対して弱い増殖因子であるＥＧＦによってもリン酸化が促進される[2]。分化因子および分裂因子のいずれによってもリン酸化が促進される抗原を認識すると思われる抗体が、分化した細胞および分裂中の細胞を、どの様に認識するかを知るために行った。

【方法】 １、ＰＣ１２細胞の培養 ＰＣ１２細胞（RCB009）は、理研ジーンバンクより入手した。高グルコースDulbecco's modified eagle medium(DMEM,Gibuco430-2100EA）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た。抗生物質（GibucoSquare600-5070PG）は、ストレプトマイシン100μg/mlおよびペニシリン100単位/ml濃度に添加し、ＣＯ₂濃度5%、飽和水蒸気中で培養した。一般的には１週間でほぼ一面に増殖するような密度に継代し、途中１回以上培養液を交換した。ＮＧＦは50ng/mlを、ＥＧＦは11ng/mlを２日毎に培養液の交換とともに、新たに添加した。

２、単クローン抗体の作製 ＰＣ１２細胞から、Chandlerら[4]の方法により粗核画分を採り、0.3%ノニデントP-40/0.2%デオキシコール酸により洗浄した。ついで0.25N塩酸でヒストンを除去後、0.5N塩酸で超音波抽出した。この画分をPanyimおよびChalkley[5]の方法により、酸性尿素ポリアクリルアミドゲル（15%）電気泳動を行った。クーマシーブルーで染色後、目的の部分を切り採り、Balb/Cマウスに免疫した。抗体産生後、脾細胞をミエローマNS-1細胞と融合させ、抗体産生細胞をクローン化した。この細胞を大量培養し、培養液より硫安沈澱、DEAE-セルロースクロマトグラフィーによりIgGを分離し抗体とした。

３、間接免疫蛍光染色 ＰＣ１２細胞は、低速（約100xg）で10分間遠心分離して採取後、直ちにOCTCompound（TISSUE-TEK,Miles）中に凍結し、4−6μmに薄切した。薄切後、切片をドライヤーで30分以上乾燥させ、Zamboni液で4℃で１時間固定した。冷生理的食塩水で５分間、３回洗浄後、抗体を37℃で１時間反応させた。冷生理的食塩水で、５分間、３回洗浄後、ヤギ抗マウスIgG-FITCを、37℃で１時間反応させた。冷生理的食塩水で５分間、３回洗浄後、50%無蛍光グリセリン／生理的食塩水で封入し蛍光染色を観察した。

４、ＰＣ１２細胞の細胞分画 核はMuramatsuら[6]の方法により分離した。その概略は、細胞を低張処理後、0.3%ノニデントP-40/0.2%デオキシコール酸で処理後ホモジナイズし、遠心ペレットを0.88M庶糖に重層、遠心し、そのペレットを核とした。リボソームは、細胞を低張処理後ホモジナイズし、遠心分離によりミトコンドリヤを除去した上清にデオキシコール酸を1%濃度に加え、庶糖密度勾配遠心分離法（0.25M,0.5M,2.0M;100,000xg,4時間）により得た[7]。

【結果】 ＰＣ１２細胞にＮＧＦ（50ng/ml）およびＥＧＦ（11ng/ml）を２日、４日および６日間作用させ、先に述べた抗体を用いて染色した結果を図１、Bから図１、Gに示す。図１、Aは何も作用させない対照のＰＣ１２細胞である。いずれの場合も細胞質側の核周囲部が染色され、ＮＧＦ作用後２日目（Ｂ）でも、対照（Ａ）と比べて僅かに強く、４日目（Ｃ）では非常に強く染色された。６日目（Ｄ）では４日目と大体同じ程度であった。しかしＥＧＦを作用させた場合は、いずれについても（図１、Ｅ〜Ｇ）ＮＧＦの場合程、対照に比べ染色性に大きな差は

認められなかった。

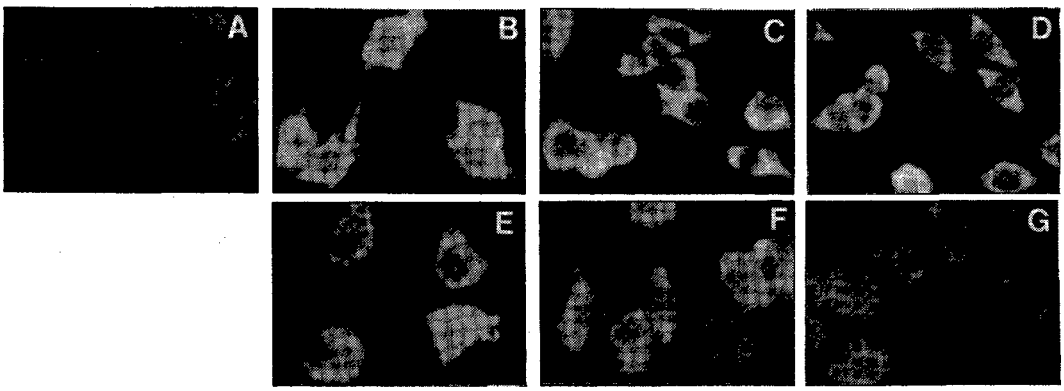
免疫に用いた核画分（図２、Ａ）、Muramatsuらの方法により得た核画分（図２、Ｂ）、リボソーム（図２、Ｃ）および0.3%ノニデントP-40/0.2%デオキシコール酸による洗液（図２、Ｄ）の、酸性尿素ポリアクリルアミド電気泳動図を示す。矢印で示した部分が目的のタンパク質で、いずれの画分にも認められた。

【考察】 以上の結果は、使用した単クローン抗体が、抗原のリン酸化部位を認識する事を示すのかもしれない。そうであれば、この抗原タンパク質はＥＧＦによってもリン酸化される[2]と考えられる事から、ＮＧＦとＥＧＦとではリン酸化部位が異なるものと考えられる。しかしＮＧＦによるリン酸化の時間的経過（ＮＧＦ作用後、細胞を処理しγ-^{32}P-ATPを加えてリン酸化、ＡＲＧで観察）、６時間後ですでに最大に達している[2]。この研究での染色性は、２日目でも僅かに増加が認められたにすぎない（図１、Ｂ）。

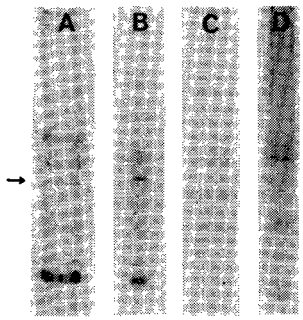
この研究で用いた抗体は、ＰＣ１２細胞の核画分の30kDaタンパク質を抗原として作製された。しかし図１の様に、リボソームと推察される核周囲部が染色された。この単クローン抗体は、核画分に狭雑するリボソームタンパク質を抗原としたのかもしれない。従って、この抗原タンパク質の細胞内分布を調べた（図２）。リボソーム（図２、Ｃ）にも認められたが、Muramatsuら[6]のノニデントP-40/デオキシコール酸により洗浄する方法により、注意深く分離された核（図２、Ｂ）にも認められた。しかし界面活性剤処理により、核画分の目的の30kDaタンパク質の量は明らかに減少する。結果は示されていないが、核の30kDaタンパク質はEDTA処理により完全に可溶化される事から、ＤＮＡと結合している可能性が考えられる。

この研究に用いた単クローン抗体が認識する抗原の、細胞内局在および抗体により認識される部位等について、免疫染色性と生化学的知見との間に矛盾がある。最近、ＰＣ１２細胞の核のみを認識する融合細胞をクローン化した。また多クローン抗体も末梢神経組織および副腎髄質を特異的に認識する。この抗体によりＰＣ１２細胞を染色すると、染色部位の異なる様々な細胞が認められる。これらの抗体を用いてさらに検討を行いたい。

【図１】 ＮＧＦおよびＥＧＦを作用させたＰＣ１２細胞の間接免疫蛍光染色。Ａ、対照、Ｂ、ＮＧＦ-２日、Ｃ、ＮＧＦ-４日、Ｄ、ＮＧＦ-６日、Ｅ、ＥＧＦ-２日、Ｆ、ＥＧＦ-４日、Ｇ、ＥＧＦ-６日



【図２】 酸性尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動図。→で示した部分が30kDaタンパク質。抗原として用いた核、Ｂ、界面活性剤で洗浄後、分離した核[6]、Ｃ、リボソーム、Ｄ、界面活性剤洗液



文献 1) Yu, M. W., Tolson, N. W., andGuroff, G. (1980) J. Biol. Chem 255. 10481-10492. 2) Nakanishi, N. and Guroff, G. (1985). J. Biol. Chem. 260. 7791-7799. 3)池亀守、藤田興、坂本秀生、葛谷博磁(1991) 生化学 63, 973. 4) Chandler, C. E., Parsons, L. M., Hosang, M., and Shooter, M. (1984) J. Bio l. Chem. 259. 6882-6889. 5) Panyim, S., and Chalkley, R. (1969) Arch. Biochim. Biophys. 130. 316-337. 6) Muramatsu M., Hayashi, Y., Onishi, T., Sakai, M., Takai, K. and Kashiyama, K (1974) Exp. Cell Res. 88. 345-351. 7) Wettstein, F. O., Staehelin, T., Noll, H. (1963) Nature 197, 43

162 グリア細胞膜小胞低浸透圧処理標品による グルタミン酸輸送

中村洋一、片岡喜由
（愛媛大・医・生理）

〔要約〕

ラット海馬ホモジネートから調製したグリア細胞膜小胞分画をさらに低浸透圧処理し、内部環境を変化させた標品を用い、グルタミン酸輸送機構を検討した。内部に KCl を負荷した場合、もとの分画の約10倍の初速度を持つ、外部Na^+依存性のグルタミン酸取り込み活性がみられた。NaCl や ChoCl を負荷した場合、あるいはカチオンを負荷しなかった場合はほとんどその活性はみられなかった。KCl 負荷した標品の外部Na^+依存性グルタミン酸取り込み反応について、各種イオノホアの効果を調べた。 K^+ に対する選択性が高い1価カチオン酸性イオノホアであるナイジェリシンはグルタミン酸取り込み活性を著明に阻害した。K^+ 特異的な中性イオノホアであるバリノマイシンは逆に取り込みを促進した。この分画のグルタミン酸輸送には膜内部にK^+、外部にNa^+が必要で、その活性は膜電位によって制御されることが示唆される。

〔はじめに〕

興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸のスカベンジングは神経終末それ自身以外にも、その周囲のグリア細胞が行うとされている。神経終末は古くからシナプトソームとして生化学的に分離され、シナプス小胞やシナプス成分の単離の材料としても汎用されているが、グリアの生化学的標品はほとんど知られていない。我々は昨年度本学会で、脳ホモジネートからパーコール分画法を用いグリア成分を豊富にふくむ細胞膜小胞 (Glial Plasmalemmal Vesicles; GPV) が得られること(1)、またそれはシナプトソームより高いグルタミン酸取り込み活性を示すこと(2) を報告した。今回海馬由来のこの分画をさらに低浸透圧処理し、小胞内部イオンを任意に変化させ、グルタミン酸取り込み反応に及ぼす効果について検索した。

〔方法〕

ラット海馬の等張ショ糖液によるホモジネートを 20, 10, 6, 2%のパーコール密度勾配遠心により分画し、2-6%と10-20%の界面から GPV とシナプトソームをそれぞれ分離した。GPV 分画に10倍量の水を加え氷冷下30分間撹拌後、小胞内に負荷すべき塩を加え遠心し、沈澱を低浸透圧処理標品とした。

グルタミン酸取り込み反応は通常 1 μM [^{3}H]-glutamic acid, 140 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM Hepes-Tris (pH 7.4, 25℃) の反応液に0.1 mg/ml の標品を加えることにより開始し、各時間後にミリポアフィルターで濾過することにより停止した。ミリポアフィルターは直ちに 2 ml の氷冷 0.9% NaCl にて4回洗浄し、フィルターに残る放射活性を液体シンチレーション法により計測し、グルタミン酸取り込み量を測定した。

イオノホアは10 mM の濃度にDMSOで溶解し、終濃度 10 μM で反応液に予め添加して用いた。

〔結果及び考察〕

150mMKClを負荷した標品は外液Na^+が存在する場合のみグルタミン酸をり込んだ。取り込み初速度は非常に大きく、もとのGPV の10倍程度であった。しかし小胞内体積が小さい為か数秒後には定常状態に達し、取り込み量はもとのGPV の半分に満たなかった (Fig.1)。KCl の代わりにNaCl やChoCl を負荷した場合にはその活性はほとんどみられず、カチオンを負荷しない標品も同様であった。(Fig.1)

[^{3}H]-グルタミン酸を 5 秒間取り込ませた後、非放射性のグルタミン酸を加えると直ちに内部の[^{3}H]-グルタミン酸と交

換し、5秒後には新しい定常状態に達した。取り込まれたグルタミン酸は外液のグルタミン酸と擬迅速平衡にあると考えられる。定常状態の取り込み量は外液のNa^+濃度と内液のK^+濃度に依存して増加し、逆に内液Na^+濃度と外液のK^+濃度に依存して減少した。これらの結果は、このグルタミン酸取り込み反応が、Na^+の外から内への、K^+の内から外への両輸送と共役していることを強く示唆している。さらにこのことを検証するために各種のイオノホアの効果を調べた (Fig.2)。1価カチオン酸性イオノホアはH^+と各種カチオンとの交換輸送を仲介するが、そのうちK^+に対する選択性が比較的高いとされるナイジェリシンはグルタミン酸の取り込みを著明に阻害した。Na^+選択性の高いモネンシンは阻害傾向がみられたが顕著ではなかった。ナイジェリシンに比し作用に時間がかかるのかもしれない。一方K^+特異的な中性イオノホアであるバリノマイシンはグルタミン酸取り込みを約40%増加させた。Ca^{2+}イオノホアである A23187やイオノマイシンは効果がなかった。バリノマイシン存在下では、内から外へのK^+濃度勾配により、小胞内負の膜電位が形成される。バリノマイシンによりK^+の濃度勾配が解消されるにもかかわらずグルタミン酸取り込みが増加したことは、この取り込み反応が膜電位依存的で、内部が負であることにより加速されることを示唆している。

Fig.1: Glu Uptake by Hypotonic-treat GPV

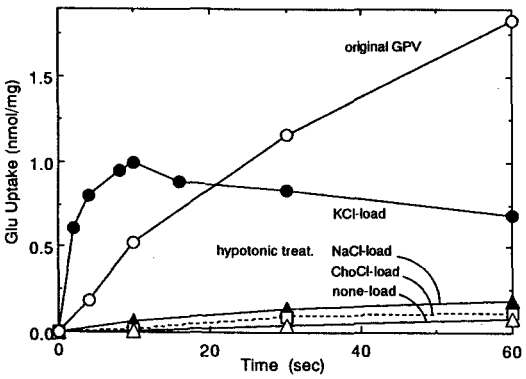


Fig. 2: Effects of Ionophores on Glu Uptake Time Courese

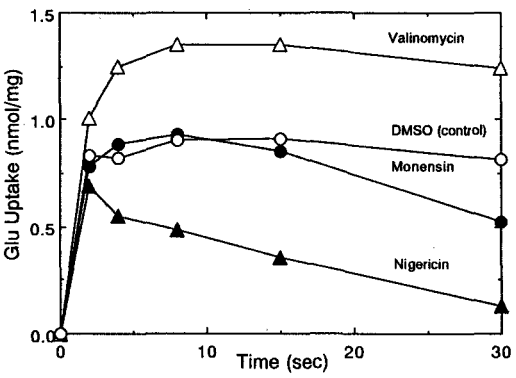


Fig. 1: Glutamate uptake by hypotonic-treated GPV. Time courses of glutamate uptake by original GPV (○) and hypotonic treated GPV preloaded with 150 mM KCl (●), NaCl (▲), or Choline-Cl (□) are shown.

Fig. 2: Effects of ionophores on glutamate uptake time course by KCl-preloaded GPV. Uptake reaction was started by addition of hypotonic-treated GPV preloaded with 150 mM KCl into the reaction mixture containing 10μM nigericin (▲), monensin (●), valinomycin (△), or their solvent, DMSO, (○).

［文献］

(1) 久保博彦、伊賀耕三、中村洋一、片岡喜由 (1991) Bull. Jpn. Neurochem. Soc. 30, 64-65.

(2) 伊賀耕三、中村洋一、片岡喜由 (1991) Bull. Jpn. Neurochem. Soc. 30, 66-67.

163 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細胞の増殖および突起形成阻害：細胞環境の影響

仙波りつ子、大平敦彦
（愛知県コロニー・研究所・周生期）

〔要約〕

私達は、脳可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）がPC12D細胞の突起形成のみならず、細胞増殖を阻害することを明らかにした。生体系の細胞間には、プロテオグリカンをはじめとして、いろいろな物質が存在する。これらの物質は単独で作用することもあるが、しばしば、お互いに相互作用をおよぼしながら作用することがある。そこで、今回、細胞環境の変化がPC12D細胞におよぼす影響、およびCSPGの阻害作用に及ぼす影響について検討した。１）CSPGの阻害作用は、培養皿をポリリジン（PL）でコートしたときのみ観察された。２）PLとコラーゲン、ラミニン（LN）、フィブロネクチン（FN）、セルタックを基質にしたとき、LNとFNにPC12D細胞の突起形成促進が培養24時間後に観察された。３）上記の培養系にCSPG混合物（CSPG-Mix）を添加したとき、LNを基質にした系では、CSPGの阻害作用が消失した。CSPG-Mix阻害の50%消失を引き起こすLNの濃度は、細胞増殖阻害に関して2.2 μg/ml、突起形成阻害に関して1.5 μg/mlであり、LNによる50%突起形成促進の濃度0.5 μg/mlと比較的一致していた。４）ラット、ヒト、EHSサルコーマ、PYSテラトカルシノーマ由来のいずれのLNにも同様の効果がみられた。５）LN/CSPG-Mixの濃度比（μg/nmol ウロン酸）が10以上になるように混合したのち基質とすると、CSPGのPC12D細胞に対する阻害の消失が観察された。以上の結果は、PC12D細胞の増殖と突起形成の制御に、LN/CSPGの濃度比が重要な因子になっていることを示している。

私達は、これまでに脳可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）がPC12D細胞の増殖や突起形成を阻害することを報告した（1-4）。この阻害は、プロテオグリカンのコアタンパク部分でおき、糖鎖部分であるコンドロイチン硫酸部分にはその作用のないことが明らかとなった。細胞間はプロテオグリカン以外にも様々な物質が共存する状態にある。そこで、PC12D細胞の増殖および突起形成に対するいくつかの細胞間物質の影響を調べると同時に、これらの環境下でのCSPGの作用についても調べた。

［実験方法］PC12D細胞は5%牛胎仔血清、５μg/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て培養した。培養皿をコラーゲン type I、IV［Col. I（177 μg/ml）、Col. IV（17 μg/ml）］、ラミニン［LN（15 μg/ml）］、フィブロネクチン［FN（10 μg/ml）］およびセルタック（10 μg/ml）を単独でコートするか、あるいはポリリジン（PL）コート上にこれらの物質をさらにコートしたのち、約12,000細胞/cm²の割合で細胞を蒔いた。24時間後、神経成長因子およびCSPGを含む培地にかえた。通常、培地交換後、48時間後に全体の細胞数、細胞体の直径の２倍以上の突起を有する細胞の数を測定した。

［結果および考察］Col. I、Col. IV、LN、FN、セルタックを基質としてPC12D細胞を神経成長因子（NGF）存在下で48時間培養し、全細胞数と突起を有する細胞を測定した。表１に示すように、全細胞数はdoubling time 約２日で増殖した。突起を持つ細胞はプラスチックディッシュ（PD）の場合に比べやや多かったが、PLを基質とした場合とほとんど同じであり、これらの物質による突起形成速度の促進は認められなかった。一方、PLと上記の物質を基質とした場合、細胞増殖には何ら変化がみられなかったが、24時間後の突起形成はLNまたはFN処理した系において促進していた。一方、50 nmolウロン酸/mlのCSPGの混合物（CSPG-Mix）を添加すると、PLを基質とした系では、細胞増殖や突起形成が阻害されたが、PDの系ではこれらの阻害が観察されなかった。さらに、ここに用いた５種類の細胞間物質等を基質として単独に用いた場合にも、CSPG-Mixの影響は全く見られなかった。PC12D細胞の増殖、突起形成の阻害は、基質結合性のCSPGによって起こることがすでに明らかにされているので、以上の結果は、CSPGがPLと結合した

本研究の一部は文部省科学研究費（No.04670509）および厚生省精神・神経疾患研究委託費（3公-1）の援助を受けた。

Table 1. Effects of various extracellular components on proliferation of and neurite outgrowth from PC12D cells and their inhibitions by CSPGs.

Substratum	Proliferation (fold) -CSPG	Proliferation (fold) +CSPG	Neurite-bearing cells (%) -CSPG	Neurite-bearing cells (%) +CSPG
PD	1.76	2.11	50.1	46.0
Col. I	2.17	2.29	63.4	59.0
Col. IV	2.51	2.41	60.6	60.8
LN	2.17	2.48	62.4	58.7
FN	1.73	2.19	54.8	45.9
Cell tak	1.86	1.68	55.8	47.2
PL	1.74	1.03	55.4	0.9
PL + Col. I	1.80	1.04	52.7	2.9
PL + Col. IV	1.90	1.15	53.7	2.4
PL + LN	1.79	1.40	59.8	54.4
PL + FN	1.97	1.17	61.5	12.1
PL + Cell tak	1.96	1.05	57.2	1.0

Proliferation was represented by the ratio of cell number at 48 h per that at 0 h.

状態ではじめて阻害作用を発揮することができることを示している。一方、PLとこれらの物質を基質とした場合には、Col. I、IV、FNおよびセルタックを基質とした系では、CSPGによる細胞増殖や突起形成阻害がPLの場合と同様に観察された。しかしながら、LNを基質とした系では、PC12D細胞の増殖および突起形成が再びみられるようになった。CSPG阻害の50%消失を引き起こすLNの濃度は、細胞増殖に関して2.2 μg/mlであり、突起形成に関しては1.5 μg/mlであった。この濃度はLNによる50%突起形成促進の濃度（0.5 μg/ml）と比較的よく一致していた。これらの実験にはEHSサルコーマ由来のLNを用いたが、ラット、ヒト、PYSテラトカルシノーマ由来のLNにも同様の結果が得られた。また、分子量250 Kのコアプロテインをもつ CSPG および150 K、130 K、93 Kのコアプロテインをもつ CSPGの混合物、さらには、これらのコアプロテイン部分による PC12D細胞の増殖、突起形成阻害もLN存在下ではみられなくなった。CSPGを培養液に添加する代わりに、PL→LN→CSPGの順で培養皿を前処理した場合にも同様の結果が観察された。先にも述べたように、CSPGによる阻害は、PLに結合した状態で起こる。LN 前処理によってPC12D細胞の増殖、突起形成阻害が消失するのは、 CSPGの培養皿への結合量の低下によって起きている可能性がある。そこで、CSPG（50 nmol/ml）→LN（20 μg/ml）の順で、あるいは、LN（20 μg）とCSPG-Mix（50 nmol)をあらかじめ混合後、培養皿をコートした。この条件下では、CSPGの阻害は明らかに観察された。しかしながら、LN/CSPG-Mixを50 μg/5 nmolおよび100 μg/5 nmolの割合で混合したとき、 CSPGのPC12D細胞に対する阻害は、CSPG単独阻害のそれぞれ約 80 %、15 %になった。以上の結果は、PC12D細胞の増殖および突起形成が細胞間物質であるLNとCSPGの量比によって制御されていることを示している。神経系の発生過程において、 barrier structureと称される神経細胞の軸索の伸長を阻害する構造がいくつかの部位に発現することが知られている（5）。この構造には、ちょうど軸索が伸びる時期にプロテオグリカンが発現し、軸索のbarrier structure への侵入を阻害することにより軸索の伸びる方向をガイドしていると考えられている。今回の結果は、LNがPC12D細胞の突起形成を促進するのに対し、CSPGは突起形成を阻害し、しかもLN/CSPGの濃度比が重要であることを示している。PC12細胞はモデル系ではあるが、今回の結果は、barrier structure におけるプロテオグリカンの作用を反映するものと思われる。

［文献］ 1. 仙波りつ子（1990）神経研究の進歩、34巻、612-618. 2. 仙波りつ子、大平敦彦（1990） 細胞、22巻、340-345. 3. Oohira, A., Matsui, F., and Katoh-Semba, R. (1991) J. Neurosci., 11, 822-827. 4. Katoh-Semba, R. and Oohira, A. (1992) Neurotrophic Factors, in press. 5. Snow, D.M., Steindler, D.A., and Silver, J (1990) Dev. Biol., 138, 359-376.

164 NG108−15細胞へのGAP−43の移入は神経突起形成とアセチルコリン放出を促進する

熊谷千尋、東田道久、野村靖幸
(北大・薬学部・薬効学)

【要約】
神経分化に及ぼす GAP-43 の機能的意義を明らかにするために、NG108-15 細胞に GAP-43 cDNA をトランスフェクトし、この移入細胞“NG-G11”における神経突起形成およびアセチルコリン (ACh) 放出について検討した。NG-G11 は diBu-cAMP 処理により対照群より強く突起を伸展した。NG-G11 においては diBu-cAMP の 72 時間処理によって伸展した突起および脱分極誘発性 ACh 放出量が薬物除去後も維持されたが、対照群ではこれらが著しく減少した。また、TPA + diBu-cAMP による 24 時間処理後、両薬物を除去すると NG-G11 でのみ突起伸展と ACh 放出の促進が引き起こされた。以上の結果より、GAP-43 が神経突起形成および ACh 放出に関与してい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蛋白質であり (1)、神経突起伸展にともない発現量が増加することが示されている (2)。以前、我々は NG108-15 細胞において、Cキナーゼの活性減少が突起伸展を増強すること (3)、伸展した突起の維持と GAP-43 の発現量保持に相関性があること、Cキナーゼの活性減少が GAP-43 の発現保持に関与すること (4) を報告した。また、神経突起形成を促進する薬物処理により NG108-15 細胞がコリン作動性に分化すること (5) と、GAP-43 が神経伝達物質の放出に関与するという報告 (6) より、神経分化における GAP-43 の多様な役割に興味がもたれる。そこで今回、cDNA を移入した NG108-15 細胞を用いて GAP-43 の作用をより直接的に検討したところ、GAP-43 が神経突起の維持ならびに伸展、ACh 放出に促進的に作用することを見いだしたので報告する。

【実験方法】
細胞培養：いずれの細胞も 2% 牛胎児血清 (FCS) 含有 DMEM-HAT 培地で培養した。
GAP-43 cDNA の移入：真核細胞発現ベクター pSG5 にラット GAP-43 cDNA 全長を挿入し、neomycin 耐性遺伝子を持つ pRc/CMV とともに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。
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。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。
ACh 放出量の測定：35 mm dish 中で培養した細胞に 37 kBq/dish [^{3}H]choline chloride を添加して 37 ℃ で 3 時間取り込ませた後、HEPES 緩衝液にて洗浄した。50 mM KCl と 20 μM hemicholinium-3 を含む HEPES 緩衝液中で 37 ℃、15 分間の反応後上清中の放射活性を測定し、一定細胞数当たりの放出量を算出した。

【結果】
GAP-43 を移入した NG-G11 と、非移入 NG108-15 はいずれも 1 mM diBu-cAMP の 72 時間処理により突起を伸展したが、その後培地中から薬物を除去すると、NG-G11 では突起が維持されたのに対し、NG108-15 では突起の退縮が認められた (Fig. 1A)。薬物除去後 24 時間での GAP-43 mRNA をデンシトメーターにより定量したところ、NG-G11 は cDNA の移入により diBu-cAMP 除去後も対照群の 2 倍の発現量を保持していた (Fig. 1B)。TPA + diBu-cAMP による 24 時間処理後薬物を除去し培養を続けたところ、除去後 48 時間で NG-G11 でのみ著しい突起伸展が認められ (Fig. 2A)、NG108-15 では薬物処理により誘導された GAP-43 mRNAが薬物除去後は正常時のレベルにまで減少したのに対し、NG-G11 では対照群の 2 倍の発現量を保持していた (Fig. 2B)。50 mM KCl 刺激による ACh 放出量を測定したところ、両細胞において認められた 1 mM diBu-cAMP 72 時間処理による放出増大作用が、薬物除去 24 時間後 NG108-15 では約 60% 減少したのに対し、NG-G11 では約 30% 減弱したのみであった (Fig. 3A)。また、TPA + diBu-cAMP 24 時間処理後、薬物を除去したところ除去後 48 時間で NG-G11 では ACh 放出量が約 2 倍に増強されたが、NG108-15 では有意な変化は認められなかった (Fig. 3B)。

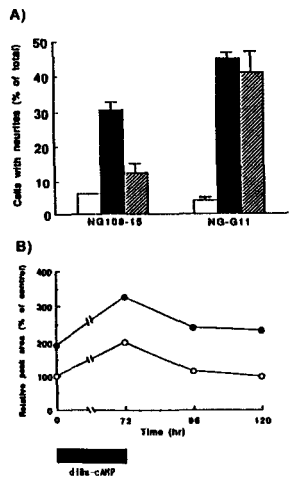


Fig. 1 Influence of the removal of diBu-cAMP on neurite maintenance and GAP-43 mRNA expression

NG-G11 and NG108-15 cells were treated with 1 mM diBu-cAMP for 72 hrand further cultured in the absence of the drug for 24 hr. The percentage of neurite-possessing cells were determined (A) 72 hr after treatment with the drug (closed columns), 24 hr after removal of drug (hatched columns), and 72 hr after non-treatment (open columns). The cell numbers with neurites more than 100 μm were counted in the same area (675 × 450 μm). RNA was isolated from treated cells and analyzed GAP-43 mRNA induction by Northern blot method (B). The resulting autoradiograms in NG108-15 (open circle) and NG-G11 (closed circle) were quantitatively analyzed. A closed bar shows the period of treatment with 1 mM diBu-cAMP.

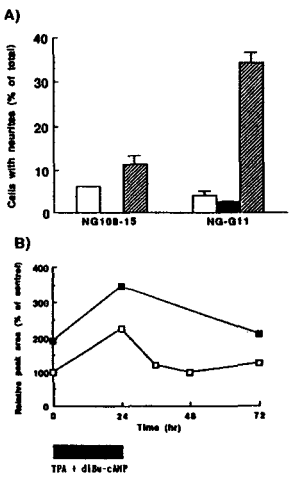


Fig. 2 Influence of brief treatment with TPA plus diBu-cAMP on neurite extension and GAP-43 mRNA expression

NG-G11 and NG108-15 cells were treated with 100 nM TPA plus 1 mM diBu-cAMP for 24 hr and further cultured in the absence of the drugs for48 hr. The percentage of neurite-possessing cells were determined (A) 24 hr after treatment with the drugs (closed columns), 48 hr after removal of the drugs (hatched columns), and 72 hr after non-treatment (open columns). The cell numbers with neurites more than 100 μm were counted in the same area (675 × 450 μm). RNA was isolated from treated cells and analyzed GAP-43 mRNA induction by Northern blot method (B). The resulting autoradiograms in NG108-15 (open square) and NG-G11 (closed square) were quantitatively analyzed. A closed bar shows the period of treatment with 100 nM TPA plus 1 mM diBu-cAMP.

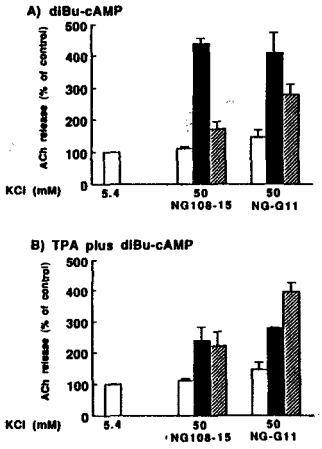


Fig. 3 Influence of the removal of TPA and/or diBu-cAMP on [^{3}H]ACh release in NG-G11 and NG108-15 cells

A) Both clones were treated with 1 mM diBu-cAMP for 72 hr and further cultured in the absence of the drug for 24 hr. 50 mM K$^+$-evoked [^{3}H]ACh release was measured 72 hr after treatment with the drug (closed columns), 24 hr after removal of the drug (hatched columns), and 72 hr after non-treatment (open columns). 5.4 mM K$^+$-evoked release were almost equal in control of both cells, and the release is shown as % of the control in the ordinate. B) Both clones were treated with 100 nM TPA plus 1 mM diBu-cAMP for 24 hr and further cultured in the absence of the drugs for48 hr. 50 mM K$^+$-evoked [^{3}H]ACh release was measured 24 hr after treatment with drug (closed columns), 48 hr after removal of the drugs (shaded columns), and 72 hr after non-treatment (open columns). 5.4 mM K$^+$-evoked release were almost equal in control of both cells, and the release is shown as % of the control in the ordinate.

【考察】

NG-G11 においてのみ、伸展した突起が薬物除去後も維持され、この時の GAP-43 mRNA のレベルは NG108-15 の正常時レベルの 2 倍以上に保持されていた。NG108-15 を TPA + diBu-cAMP で長時間処理した場合にも、伸展突起の維持と GAP-43 mRNA 発現の維持が観察されたことから (4)、あるレベル以上に発現している GAP-43 が神経突起の維持に関与することが示唆された。NG-G11 では TPA + diBu-cAMP の短時間刺激で突起の伸展が起こったことより、GAP-43 が神経突起伸展にも関与することが推定される。しかし NG-G11 において恒常的に GAP-43 mRNA が発現しているにも関わらず、薬物処理無しに突起が伸展することはなかったことから、GAP-43 そのものは突起伸展の引き金となる作用は有しておらず、Cキナーゼと Aキナーゼが関与する何らかの突起伸展活性化経路と協調する形で作用するものと考えられる。また、NG108-15 はコリン作動性の神経細胞へ分化することが知られている (5)が、GAP-43 は ACh 放出を促進した。ACh 放出促進における GAP-43 の作用機序として、exocytosis の活性化、choline acetyltransferase 活性化、choline 取り込み促進などが考えられるが、GAP-43 のリン酸化の有無の影響を含めたその詳細については、現在検討中である。GAP-43 が神経細胞としての形態形成に関与するだけでなく神経伝達物質としての ACh 放出を促進することは、神経機能における GAP-43 の生理的役割の重要性を示唆している。

【参考文献】

1) 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
2) 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
3) Tohda, M., Kumagai, C., and Nomura, Y. (1991) Neurochem. Int. 19, 255-260
4) Kumagai, C., Tohda, M., and Nomura, Y. (1992) J. Neurochem. 59, 41-47
5) Hamprecht, B. (1977) Int. Rev. Cytol. 49, 99-170
6) Dekker, L.V., De Graan, P.N.E., Pijnappel, P., Oestreicher, A.B., and Gispen, W.H. (1991) J. Neurochem. 56, 1146-1153

165 感覚領野損傷後の視床逆行性変性に対する外因性線維芽細胞成長因子(FGF)の作用機序

湯口貴導　山田和雄　甲村英二　大槻秀夫　坂口健夫　早川　徹
（大阪大.医.脳外）

ラットの体性感覚領野損傷モデルにおける同側視床の逆行性変性が、線維芽細胞成長因子(FGF)の損傷部への局所投与により、ある程度防止し得ることを報告してきた。今回FGFの作用部位を検討する目的で、FGF receptor蛋白の動態、並びに遺伝子発現を解析した。FGF receptor蛋白はWestern blottingで２つのbandとして確認され、損傷側皮質で高分子側の増加、band幅の増大を認めた。また、FGF receptor のmRNAも損傷側の皮質全体で増加していた。一方視床ではreceptor蛋白、mRNAともに損傷側と対側で明らかな差を認めなかった。またFGFの局所投与によっても、FGF receptor蛋白並びに、mRNAの発現には差を認めなかった。つぎに、FGFの細胞分裂作用に注目し、BudR標識率を調べると、損傷周辺のみならず、損傷側大脳半球全体にFGF局所投与群で明かにBudR陽性細胞が増加していた。この陽性細胞はGFAPとの二重染色により一部はglia系細胞であることが確認された。また、皮質損傷による影響をc-fos蛋白の発現により検討したところ、損傷側皮質全体にc-fos蛋白の発現を認めた。しかし視床では発現されず、FGF投与による差も認められなかった。c-fos発現細胞はニューロフィラメントとの二重染色により神経細胞である事が明かになった。以上より局所投与したFGFが視床に直接作用している可能性は低く、皮質および皮質下白質で神経細胞のみならずglia系細胞などに作用し、周辺の環境を修飾することにより視床の萎縮を防止していると考えられた。

目的　体性感覚領野を切除すると同側視床に緩徐な変性萎縮が認められ、これは軸索損傷による逆行性変性であると考えられている。これまで損傷部位にFGFを局所投与することにより、この変性をある程度防止し得ることを報告してきた[1]。今回、FGFの作用部位、並びに作用機序を探る事を目的とし、FGF receptor蛋白動態とその遺伝子発現、fos蛋白の発現、さらにFGFの細胞分裂作用をBudRの取り込みにより検討した。

方法　Wistar系雌ラット(100g)の左体性感覚領野(bregmaから前方2mm、後方4mm、外側7mm)を深さ約1mmで切除し、ablationモデルを作成した。bFGF１μgを溶解液(0.2%牛血清アルブミン加生食)で100μlとし、スポンゼルに吸収させ皮質切除部位全体を被いFGF群とした。溶解液のみを投与した群をcontrol群とした。術後1、2、3、7日後に深麻酔下に脳を取り出し、損傷側皮質、対側皮質、同側視床、対側視床、並びに海馬の各部位をサンプリングした。これを抗FGF receptor抗体(Promega社)を用いたWestern blotting法にて解析した。さらに別のラットで術後2、6、12、24、48時間後に深麻酔下にラットを潅流固定した後、6μm厚の冠状断パラフィン切片を作成し、in situ hybridization法にてFGF receptor mRNAの発現を調べた[2]。つぎにFGFの細胞分裂作用を調べるために、術後1、3日後に深麻酔下に大腿静脈ラインを確保し、分裂細胞のDNAに組み込まれるBudRを200mg/kg静注した。2時間後に70%アルコールで潅流固定し、厚さ6μmの冠状断切片を作成した。免疫組織染色法にて、BudR取り込み細胞を確認し、全有核細胞に対する割合を標識率とした。また抗GFAP抗体による二重染色を行いBudR標識細胞の種類を検討した。さらに、脳損傷後に発現されるc-fos蛋白に注目し、抗c-fos蛋白ポリクローナル抗体(Oncogene Science社)を用い免疫組織染色を行い、FGF投与による影響を検討し、抗GFAP抗体、並びに抗ニューロフィラメント抗体(200kD)にて二重染色を行いfos蛋白陽性細胞の種類を検討した。

結果　<u>損傷脳でのFGF receptor蛋白のWestern Blotting</u>：FGF receptor蛋白は９０kDと５０kD前後の２つのbandとして確認された。分子量から考えて２量体ではないかと考えられる。　術後１日目より損傷側皮質では、対側に比べ高分子　の receptor蛋白の増加、並びにband幅の増大を認めた。
視床でもreceptor蛋白の存在は確認されたが、両側で差を認めなかった。
また、FGF群とcontrol群でも明らかな差を認めなかった。図１.

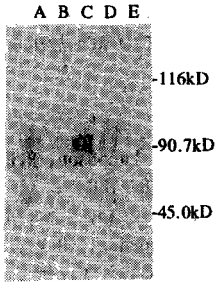


図１.FGF receptor蛋白の発現(FGF群、1day)　A:損傷側視床、B:対側視床、C:損傷側皮質、D:対側皮質、E:海馬

損傷脳でのFGF receptor mRNAの発現：FGF receptor mRNAの発現は術後１２時間頃より損傷周囲、並びに損傷側皮質全体に増加しており、これは術後４８時間まで次第に増加する傾向が認められた。しかし視床では損傷側と対側で発現に差を認めなかった。FGF群ではcontrol群に比べ多少損傷側皮質での発現が低い傾向が認められたが有意ではなかった。海馬の神経細胞では常に高度の発現を認めた。図２

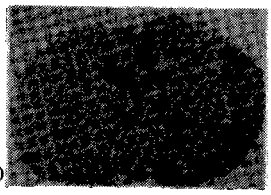
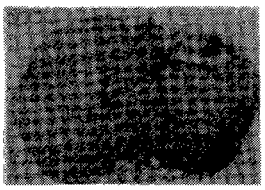


図２.Macroautoradiography
FGF群
(12時間後)



control群
(12時間後)

FGFの細胞分裂作用：術後１日目ではFGF群とcontrol群でともに、BudRの標識率は低く、標識細胞の分布範囲も損傷周囲に限られていた。術後３日目にFGF群では、損傷部周囲の標識率が 18.9％とcontrol群の6％に比して有意に高率であった。また同側皮質でも18.3％(control群:2.3％)と高率であった。対側皮質では標識細胞は認められなかった。一方脳梁では、損傷側の標識率が 16.6％であったのに対し対側でも10.8％と両側性に高率であった。さらに内包でも、損傷側で8.3％(対側0.5％)と高い標識率が認められた。FGF群でのBudR標識細胞の分布は損傷部位周辺から同側皮質、内包にまで広がり、さらに脳梁では対側にまで広がっていた。これにより局所投与したFGFがbulk flowにより伝播され作用している可能性が示唆された。図３

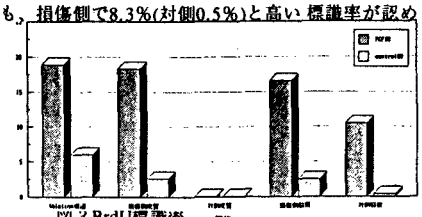
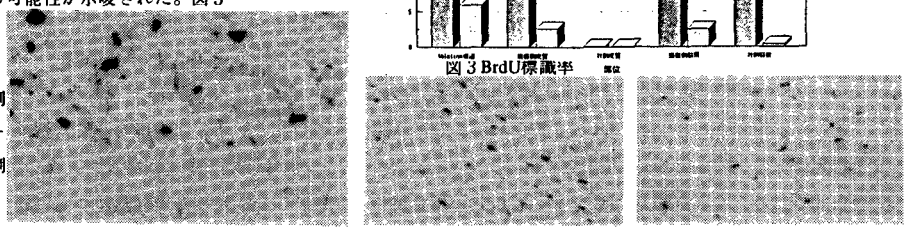


図３ BrdU標識率



損傷側
正中
対側

図４ BrdU免疫組織染色　帯状回　同側脳梁　対側脳梁

損傷脳でのc-fos蛋白の発現：損傷後２時間より損傷側皮質全体にc-fos蛋白の発現を認めた。この発現は皮質にほぼ限られており視床、内包、脳梁などでは認められなかった。また損傷側皮質での発現は術後 24時間目まで持続し、36時間後より低下する傾向を認めた。c-fos蛋白の発現にはFGF群とcontrol群で差を認めなかった。

考察　皮質感覚領野切除後に同側視床に逆行性変性萎縮が起こることが知られており、切除部位に神経栄養因子の１つであるFGFを局所投与することにより視床の萎縮がある程度防止される事を報告してきた。FGFがいかなる部位で作用し、どのような影響を及ぼし、結果として視床神経細胞の萎縮を防止するのかを検討するためには、まず皮質損傷そのものによる影響を確認し、その上でそれらが外因性FGFによりいかに修飾されるかを検討する必要がある。作用部位を調べる目的でFGF receptorに注目すると、損傷により損傷側皮質全体に遺伝子発現、並びに蛋白の増加を認めるにもかかわらず、視床では損傷側でも新たな遺伝子発現も蛋白の増加も認めなかった。このことは損傷により FGFを受け入れる状態にあるのは皮質である事を示唆している。FGFを投与することによりreceptor蛋白で明かな変化を認めなかったが、mRNAが多少control群に比べ低下する印象を受けた。一方FGFの細胞分裂促進作用をBudRの取り込みで確認してみるとFGF群で有意に高率であり、さらにそれらの一部がGFAP陽性細胞であったことから考えて、FGFがreceptorに結合し神経細胞並びに損傷軸索周囲に存在するglia系細胞に作用し、これらが視床神経細胞に保護作用を及ぼしている可能性が考えられた。

Acknowledge: FGF receptor mRNAのin situ hybridization法に関し、ご指導、ご協力をいただいた大阪大学 第二解剖学教室 和中明生博士、遠山正彌教授に感謝致します。

参考文献

(1)Kohmura,E. Yuguchi,T. Yamada,K. Hayakawa,T.(1990) Advances in Neurotrauma Res. 2:58-63

(2)Wanaka,A. Eugene,M. Johnson,Jr. Jeffrey,M. (1990)Neuron 5:267-281

166 ｂＦＧＦによるヒト神経芽細胞腫ＣＨＰ１００細胞における低親和性ＮＧＦレセプターの発現調節

泰地睦夫、Kazuko Taiji[*]、Karen L. Deyerle[*]、Mark Bothwell[*]
（住友製薬研究所、[*]ワシントン大・医学部）

〔要約〕

ヒト神経芽細胞腫・ＣＨＰ１００細胞における低親和性ＮＧＦレセプター（$p75^{NGFR}$）の発現に対する、ヒト組み換え型塩基性線維芽細胞成長因子（ｂＦＧＦ）の作用を検討した。ｂＦＧＦは、ＣＨＰ１００細胞に対して$p75^{NGFR}$の発現を蛋白質レベル（ELISA法）及びｍＲＮＡレベル（Northern blot法）で増加することを明らかにした。さらに、$p75^{NGFR}$プロモーター（5'側 6.7kbのDNA断片）の活性を、chloramphenicol acetyltransferase（CAT）をリポーターとした構築ＤＮＡを用いて検討した。この構築ＤＮＡを導入したＣＨＰ１００細胞において、ｂＦＧＦはＣＡＴ活性を上昇させた。これらの知見は、ｂＦＧＦがＣＨＰ１００細胞において$p75^{NGFR}$の発現を増加していることを示している。

【緒言】

神経系の分化の過程における神経栄養因子・成長因子の役割を明らかにする為に、低親和性ＮＧＦレセプター（$p75^{NGFR}$）、ＦＧＦレセプター遺伝子のニワトリ胚における発現がin situ hybridization法により検討された(1)。その結果、胎生期の末梢神経系ニューロンの分化において、ＦＧＦがＮＧＦよりもより早い時期に機能していることが示唆された。我々は、ｂＦＧＦがヒト神経芽細胞腫ＣＨＰ１００細胞に対して、神経突起伸展等の形態学的変化を起こすことを見い出した(2)。一方、ＮＧＦはこの様な作用を示さなかった。そこで、本研究において我々は、ＣＨＰ１００細胞における$p75^{NGFR}$の発現およびｂＦＧＦ、ＮＧＦの役割について検討した。

【方法】

①培養：ＣＨＰ１００細胞は、10%牛胎児血清（Hazelton）を含むDMEM培地（GIBCO）で培養した。

②ELISA法：$p75^{NGFR}$蛋白量の測定は、Dohertyらの方法(3)に従った。ＣＨＰ１００細胞（6,000 cells/well）をゼラチンでコーティングした96-well plateにまいて培養した後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、5μg/ml抗ヒト$p75^{NGFR}$モノクローナル抗体（ME20.4 :Boehringer-Mannheim）を一次抗体として用いて検出した。

③Northern blot analysis：ＣＨＰ１００細胞より常法(4)に従ってcytoplasmic RNAを調製し、1%アガロース／6%ホルムアルデヒド・ジェルで電気泳動した。ＲＮＡをGeneScreen membrane（NEN）にblotした後、^{32}Pラベルした$p75^{NGFR}$ cDNA（SphI-Hind III 0.9kb fragment）をプローブとしてmessageを検出した。また、オートラジオグラフィーの結果を、Image Analyzer V1（Toyobo）にて解析した。

④DNA構築とCATアッセイ：ヒト$p75^{NGFR}$ genomic clone（λ7A2：Fig. 3A）の転写開始部位より5'側6.7kbのDNA断片をCAT geneにつないだ pRBLCAT（Fig. 3B）を構築し、neomycin 耐性geneと共にcalcium phosphate法によりＣＨＰ１００細胞に導入した後、G418耐性の組み換え体を得た（詳細は文献(5)を参照）。CATアッセイは、Gormanらの方法(6)に従った。

【結果及び考察】

ｂＦＧＦ存在下において２日間培養したＣＨＰ１００細胞における$p75^{NGFR}$蛋白の発現量を、ELISA法により検討した結果、ｂＦＧＦは濃度依存的に$p75^{NGFR}$量を増加することを明らかにした（Fig. 1）。さらに、Northern blot法による分析を行い、$p75^{NGFR}$のmRNA量が２日または４日間のｂＦＧＦ（10ng/ml）の処理により増加することを見い出した（Fig. 2）。ＣＨＰ１００細胞における$p75^{NGFR}$のプロモーター活性をCATを指標として調べた結果、ｂＦＧＦ（10ng/ml）はCAT活性を上昇することがわかった（Fig. 3C）。ＮＧＦ（100ng/ml）は,mRNA量及びプ

ロモーター活性に対して効果を示さず、ｂＦＧＦ（10ng/ml）共存下にさらにＮＧＦを加えても、ｂＦＧＦの作用に影響を与えなかった（Fig. 2, 3C）。

これらの知見は、ＣＨＰ１００細胞において、ｂＦＧＦがｐ７５^{NGFR}の遺伝子発現を増強することを示している。最近、Tyr kinase domainを持つｔｒｋレセプターが、低親和性ＮＧＦレセプター（ｐ７５^{NGFR}）に加えてＮＧＦレセプターの機能を担っていることが明らかにされつつある。さらに、BDNF, NT-3, NT-4, NT-5などのneurotrophinのレセプターとしても、それぞれtrk, trk B, trk Cに加えてｐ７５^{NGFR}の関与が示唆されている（7）。従って、今回我々の得た知見は、ｂＦＧＦがＣＨＰ１００細胞に作用してｐ７５^{NGFR}の発現を増加した後に、ＮＧＦまたは他のNeurotrophinsが作用する可能性を示している（5）。

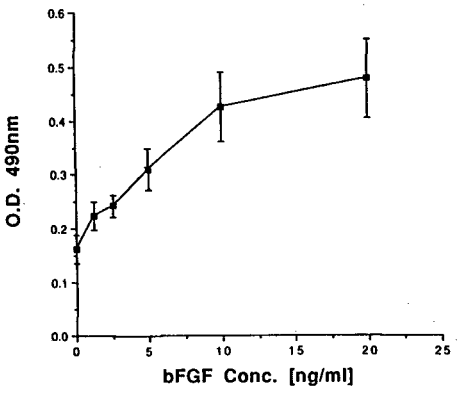


Fig. 1 Assesment of bFGF-enhanced p75^{NGFR} expression by ELISA.

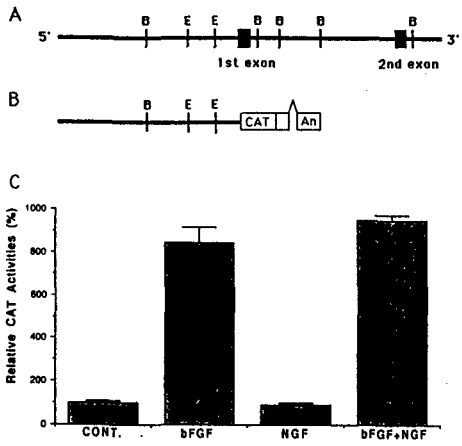


Fig. 3 A: λ7A2 genomic DNA, B:p75^{NGFR} promoter-CAT DNA(pRBLCAT), C:Effects of bFGF and NGF on relative CAT activities in CHP100 stable transformants. (the means±S.D.)

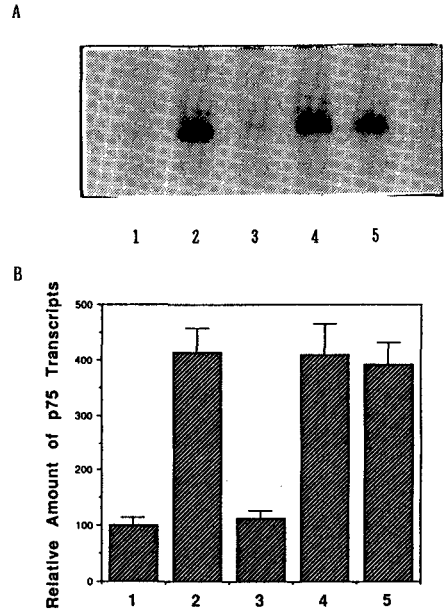


Fig. 2 A: Northern blot analysis of p75^{NGFR} transcripts in CHP100 cells. 20μg cytoplasmic RNA was loaded in each lanes. B: Relative amounts of p75^{NGFR} transcripts determined for 3 separate cultures, with error bars representing standard errors of the means.

【文献】

(1)Heuer et al. (1990) Neuron 5, 283-296.
(2)Taiji et al. (1990) Soc. Neurosci. Abstract 16, 992.
(3)Doherty et al. (1988) Neurosci. Lett. 92, 222-227.
(4)Sambrook et al. (1989)Molecular cloning p.7.12-7.15.
(5)Taiji et al. (1992) Mol. Cell. Biol. 12, 2193-2202.
(6)Gorman et al. (1982) Mol. Cell. Biol. 2, 1044-1051.
(7)Bothwell (1991) Cell, 65, 915-918.

167 動物細胞で産生させた組換え型ヒトＮＴ－３の性状

岩根理，渡辺辰也，新谷麻江，改正善彦，松本純枝，佐々田玲子，五十嵐貫一
（武田薬品・生物研究所）

〔要約〕

ヒト神経成長因子（ＮＧＦ）のプレプロ領域とヒトニューロトロフィン－３（ＮＴ－３）[1]の成熟領域からなるキメラ分子をコードするｃＤＮＡを用いて、ヒトＮＴ－３を高効率に産生するＣＨＯ細胞株を樹立した。ヒトＮＴ－３は培養上清１Ｌ当たり５００μｇ以上産生され、３段階のカラムクロマトグラフィーにより分子量の異なる２分子種に分離精製された。１種はｃＤＮＡの塩基配列から予想される完全な成熟型ＮＴ－３であり、他種はアミノ末端の５残基を欠失したものであった。これらの分子種はニワトリ８日胚脊髄後根神経節細胞に対し、同等の神経栄養活性を示し、また、ＰＣ１２細胞に対し形態変化を誘導した。さらに、ＮＴ－３がヒト末梢血リンパ球に対し、軟寒天培地中でのコロニー形成を促進する活性を有することが見いだされた。

神経栄養因子は神経系におけるニューロンの分化，生存維持あるいは再生をつかさどる蛋白性因子である。ＮＧＦファミリーに属する神経栄養因子の１種ＮＴ－３[1]の諸性質を明らかにするため、この因子を効率よく産生するＣＨＯ細胞株を樹立し、その培養上清より精製した組換え型ＮＴ－３の性状を検討した。

材料と方法

ヒトＮＧＦのプレプロ領域とヒトＮＴ－３の成熟領域からなるキメラ蛋白質をコードする融合遺伝子をＳＶ４０プロモーターの支配下に組み込んだプラスミドを構築してＣＨＯ細胞に導入し、メトトレキセート存在下で遺伝子増幅することによりＮＴ－３高産生株を樹立した。

組換え型ヒトＮＴ－３の精製は、最も産生量の多いＣＨＯ　Ｎ２－１株の培養上清からイオン交換カラムクロマトグラフィー，ゲルろ過，逆相ＨＰＬＣを用いて行った。

精製標品の蛋白化学的性質は、Ｎ末端アミノ酸配列およびＣ末端アミノ酸の決定，　アミノ酸組成分析およびｐＩについて検討した。

精製ＮＴ－３の生物活性は、i）ニワトリ８日胚脊髄後根神経節ニューロンに対する神経栄養活性，　ii）ＰＣ１２細胞に対する神経突起誘導活性およびiii）ヒト末梢血由来リンパ球に対するコロニー形成刺激活性についてＮＧＦと比較検討した。

結果と考察

組換え型ＮＴ－３は逆相ＨＰＬＣにより２つのピーク（ＩおよびＩＩ）に分離精製された（図１）。ピークＩおよびピークＩＩの標品はＳＤＳ－ＰＡＧＥでいずれも単一のバンドを示したが、ピークＩＩの蛋白質はピークＩ蛋白質より移動度が大きかった。またｃＤＮＡ配列より予想される成熟型ＮＴ－３のＮ末端ペプチドに対するモノクローナル抗体は、ウエスタンブロッティングにおいてピークＩ蛋白質と反応したがピークＩＩ蛋白質とは反応しなかった。

ピークＩおよびピークＩＩ蛋白質のＮ末端アミノ酸配列の検討から、ピークＩ蛋白質のＮ末端はｃＤＮＡ配列から予想される成熟型ＮＴ－３のＮ末端と一致したが、ピークＩＩ蛋白質Ｎ末端の５残基を欠失していることがわかった。Ｃ末端アミノ酸は、ｃＤＮＡ配列からの予想通り両分子種ともスレオニンであった。これらの結果はアミノ酸組成分析と一致した。

２Ｌの培養上清から４００μｇの成熟型および３１０μｇの５残基欠失型ＮＴ－３が精製された（表１）。精製された両分子種はニワトリ８日胚脊髄後根神経節細胞に対し同等の神経栄養活性を示した（表１）。また、その活性は約１００ｎｇ／ｍｌで最大値を示し、EC_{50}は約１５ｎｇ／ｍｌであることが分かった。　この値はＮＧＦの活性の約１／１００であった。組換え型ヒトＮＴ－３はＰＣ－１２細胞に対して神経突起の伸展を誘導しなかったが、形態変化を誘導した。さらに、ＮＴ－３にはＮＧＦ[2]と同等のＣＳＦ活性が認められた。

文献

1.　Kaisho, Y.　et　al. (1990) FEBS Lett. 266: 187-191

2.　Matsuda, Y. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6508-6512

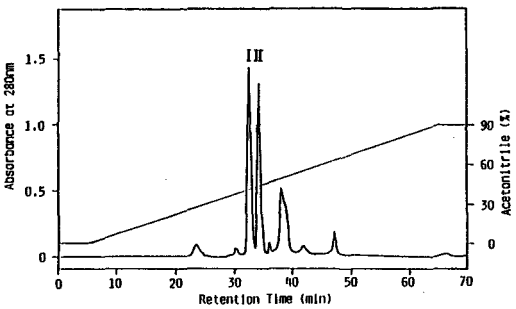


図１　逆相ＨＰＬＣによるＮＴ－３分子種の分離

Fraction	Total protein* (mg)	Total activity* (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Conditioned medium	3860	13800	3.6	100
S-Sepharose eluate	3.8	9600	2525	69.6
Sephacryl S-100 eluate	1.4	6300	4500	45.7
Reverse phase HPLC peak I	0.4	3728	9320	27.0
peak II	0.31	2532	8168	18.3

表１　組換え型ＮＴ－３精製のまとめ

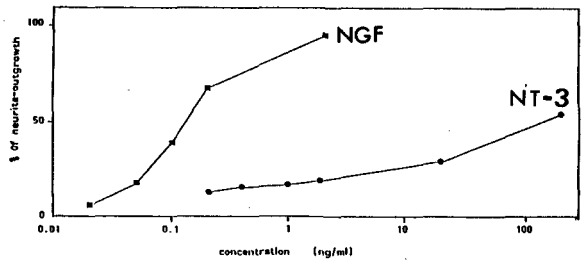


図３　ニワトリ８日胚ＤＲＧニューロンに対する神経栄養活性

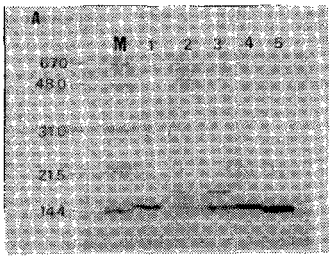


図２　精製各段階におけるＮＴ－３のＳＤＳ－ＰＡＧＥ

Ｍ：　分子量マーカー
１：　大腸菌で産生させた成熟型ＮＴ－３
２：　Ｓ－セファロース溶出画分
３：　セファクリル　Ｓ－１００　溶出画分
４：　逆相ＨＰＬＣピーク　Ｉ
５：　逆相ＨＰＬＣピーク　II

168 アミノアルキルエステル誘導体によるマウスアストログリア細胞のＮＧＦ合成誘導

石川リカ[1]、秋元功司[1]、榊原和征[1]、宮本昌志[1]、錦織浩治[1]、古川昭栄[2]（キリンビール医薬開発研究所[1]、岐阜薬科大学分子生物[2]）

〔要約〕
マウス培養アストログリア細胞はＮＧＦを合成分泌することが知られている。我々は、各種アミノアルキルエステル誘導体のアストログリア細胞のＮＧＦ合成分泌に及ぼす効果について検討した。アミノアルキルエステル誘導体のなかで、dimethyl- あるいは diethylaminoalkyloxycarbonyl 基に示される共通骨格を有する数種の化合物に、アストログリア細胞におけるＮＧＦ合成分泌の促進作用が認められた。なかでも 2-(N,N-dimethylamino)ethyl crotonate は最も低濃度（0.001-0.1 mg/ml)でその効果を示し、0.1mg/mlの濃度で24時間にコントロールの約 3.5倍のＮＧＦが培養液中に検出された。さらに、この化合物をラットに繰り返し腹腔内投与を行った結果、0.05-1.5 mg/kgの投与で、脳内の嗅球、梨状葉皮質、基底核、線条体、小脳半球および橋・延髄においてＮＧＦレベルの有意な増加が見られた。

【緒言】
培養系のマウスアストログリア細胞が増殖時に顕著にＮＧＦを合成、分泌すること[1]、さらにこのアストログリア細胞によるＮＧＦ合成がカテコール骨格を有する化合物によって増強されること[2]が報告されている。またカテコール骨格を有する化合物よりは作用が弱いものの、カルバミルコリン、メタコリンにもＮＧＦ合成増強作用が認められている[2]。そこで我々はコリンアナログである種々のアミノアルキルエステル誘導体のＮＧＦ合成増強作用を検討し、さらに最も強力なアストログリア細胞のＮＧＦ合成増強作用が認められた化合物をラットへ投与した場合のＮＧＦレベルの変動について検討した。

【方法】
アストログリア細胞の培養
マウスアストログリア細胞の培養は古川らの方法[1]により行った。すなわち、生後数日のマウス大脳から髄膜を取り除き、トリプシン処理の後に血清入り培地で培養し、初代培養アストログリア細胞を得た。実験には、培養した二次アストログリア細胞、または数代継代し増殖度の高い細胞集団としたアストログリア細胞を用いた。細胞は96穴マルチウエルプレートにて10 %牛胎児血清を含むDulbecco's MEM(FCS-DMEM)で飽和密度に達するまで培養した後、血清の代わりに0.5 % BSA を含むDMEM(BSA- DMEM) に置き換え、 7～10日間培養した。この間に細胞は完全に増殖停止しＮＧＦ合成も抑制される。このとき培地中に種々の化合物を添加し、24時間後に培地を回収しそのＮＧＦ含量をＥＩＡ[3]を用いて測定した。
脳内ＮＧＦレベルに及ぼす化合物の効果
化合物は生理食塩水に溶解し、6 ～ 7週齢雄Wistar系ラットに腹腔内投与した。薬物投与量は0.05～ 1.5 mg/Kgで、半日毎に計5 回投与した。最後の投与から 5時間後に脳を摘出し、ソニケーションによる抽出の後[3]、ＮＧＦレベルを測定した。

【結果および考察】
静止期のマウスアストログリア細胞のＮＧＦ合成分泌は表１に示した構造を有する数種のアミノアルキルエステル誘導体（0.001-3.0 mg/ml)によって増加した。特に 2-(N,N-dimethylamino)ethyl crotonate（ 化合物 a）は広い濃度範囲（0.001-0.1 mg/ml)でその効果を示した（図１Ａ）。この化合物aによるマウスアストログリア細胞のＮＧＦ分泌は時間とともに増加した。類似のエステルである propionate （b）および cinnamate（c）は、より高濃度（0.3-3 mg/ml ）で同様にＮＧＦ分泌を増加させた。また dimethylaminoalkyl ester のなかでも cyclopropanecarboxylate （f）、N,N-dimethylcarbamate（g）および3-(N,N-dimethylamino)propyl acetate （h）は、高濃度の限られた濃度

範囲でのみ約10倍ものＮＧＦ分泌促進作用が見られた（図１Ｃ）。一方、表１に示したＮＧＦ分泌増強作用を示す化合物の共通構造を有するものの中でも、大きな置換基を持つ 2-(N,N-dimethylamino)ethyl 4'-methoxycarbonylbenzoate（j）および2'-naphthalenecarboxylate （k）、あるいは表１に示したそれぞれのエステルの４級アンモニウム塩では効果はなかった。

培養系のアストログリア細胞におけるＮＧＦ分泌促進活性の最も強かった化合物aを用いて、ラットの脳内ＮＧＦレベルに与える影響について検討した。この化合物をラットに 5回繰り返し腹腔内投与した後、脳内ＮＧＦレベルを測定した結果、コントロール群に比べこの化合物を投与した群では、0.05-1.5 mg/kgの投与で嗅球、梨状葉皮質、基底核、小脳半球、および橋・延髄でＮＧＦレベルの有意な増加が見られた。また大脳皮質前部、海馬においてもＮＧＦレベルの増加傾向が見られた。アストログリア細胞の培養系を用いたＮＧＦ合成促進活性物質の探索によりそのＮＧＦ合成促進活性が認められたアミノアルキルエステル誘導体、化合物aの投与によりラット脳内ＮＧＦレベルの有意な増加が認められ、薬剤による脳内ＮＧＦ合成が制御できる可能性が示された。

【参考文献】

(1) Furukawa,S.,Furukawa,Y.,Satoyoshi,E.,Hayashi,K (1987) Biochem.Biophys.Res.Commun.,142, 395-402.

(2) Furukawa,S.,Furukawa,Y.,Satoyoshi,E.,Hayashi,K (1987) Biochem.Biophys.Res.Commun.,147, 1048-1054.

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

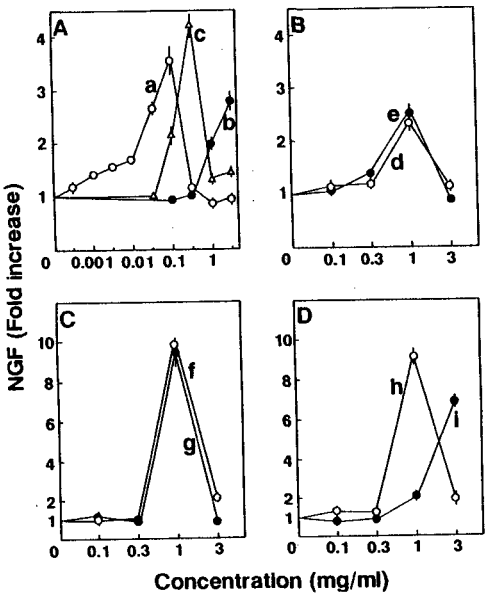


図１　アミノアルキルエステル誘導体によるアストログリア細胞のＮＧＦ合成分泌促進作用

図中の化合物ａ－ｉの構造は表１に示されたものである。

表１　種々のアミノアルキルエステル誘導体の化学構造

$(CH_3)_{n_1}CH_3$
$(CH_3)_{n_2}CH_2\text{-}N\text{-}(CH_2)_{n_3}\text{-}O\text{-}CO\text{-}R\cdot HCl$

	n_1	n_2	R	
2-(N,N-dimethylamino) ethyl crotonate	0	2	$-CH=CHCH_3$	a
2-(N,N-dimethylamino) ethyl propionate	0	2	$-(CH_2)_2CH_3$	b
2-(N,N-dimethylamino) ethyl cinnamate	0	2	$-CH=CHC_6H_5$	c
2-(N,N-dimethylamino) ethyl 4'-chloro-phenoxyacetate	0	2	$-CH_2\text{-}O\text{-}C_6H_4\text{-}p\text{-}Cl$	d
2-(N,N-dimethylamino) ethyl pentafluorobenzoate	0	2	$-C_6F_5$	e
2-(N,N-dimethylamino) ethyl cyclopropanecarboxylate	0	2	$-CH(CH_2)_2$	f
2-(N,N-dimethylamino) ethyl N,N-dimethylcarbamate	0	2	$-N(CH_3)_2$	g
2-(N,N-dimethylamino) propyl acetate	0	3	$-CH_3$	h
2-(N,N-di ethylamino) ethyl acetate	1	2	$-CH_3$	i
2-(N,N-dimethylamino) ethyl 4'-methoxy-carbonylbenzoate	0	2	$-C_6H_4OCOCH_3$	j
2-(N,N-dimethylamino) ethyl 2'-naphthalene-carboxylate	0	2	$-C_{10}H_7$	k
carbamylcholine chloride			$(CH_3)_3NCH_2CH_2OCONH_2\cdot HCl$	

169 ヒトグリア細胞増殖抑制因子、グリオスタチンの精製とモノクローナル抗体の作製

平野敬善[1]、浅井清文[1]、金子修至[2]、磯部一郎[1]、中西圭子[1]、
Yaman Eksioglu[1]、加藤泰治[1]
(名古屋市立大学医学部•分子医学研究所生体制御部門[1]、小野薬品[2])

〔要約〕

Von Recklinghausen氏病患者より得られた神経線維腫中に存在するヒトグリア細胞増殖抑制因子、グリオスタチン(Gliostatin)の精製を進め、比活性にて約800倍で電気泳動上単一なグリオスタチンを単離（蛋白質収率0.016%、活性収率12.5%）した。また、部分精製画分を用いてモノクローナル抗体を調製し、Western blotを行なった結果、グリオスタチンは分子量約50Kの蛋白であることが同定された。しかし、ゲル濾過上の推定分子量は約100Kであり、グリオスタチンは生体内では2量体として存在していると考えられた。また、グリオスタチンは、熱処理（100℃、10分）、酸処理（pH2.3、16時間）、パパイン処理（37℃、5時間）で失活し、1mMのDTT添加によりその活性が保持された。モノクローナル抗体を使用し免疫化学的交叉性をWestern blotにて検討したところ、Interleukin 1、2、3、4、5、6、TGFα、TGFβ1、TNFα、IFNα、G-CSFとは交叉しなかった。

［はじめに］

我々は、第33回本学会にて神経線維腫よりヒトグリア細胞増殖抑制因子、グリオスタチン(Gliostatin)の部分精製を行なったことを報告した[(1)]。今回、このグリオスタチンの精製をさらに進めるとともに、この部分精製画分を用いてモノクローナル抗体の作製を行ない、グリオスタチンを同定し、さらに、既知のサイトカインとの異同を検討したので報告する。

［実験方法］

1、生物活性測定法：第33回本学会にて報告したように、ラットアストロサイトーマ細胞C6を用いて[^{3}H]-チミジンの取り込みを測定した[(2)]。

2、精製法：神経線維腫の腫瘍塊を20mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）中にてホモジェネートし、遠心分離後、上清を、プルートヨパール、陰イオン交換カラム（DEAE-Sephacel）、疎水クロマトカラム（プチルトヨパール）、ハイドロキシルアパタイトカラム、最終ステップに陰イオン交換カラム（Mono-Q：SMART-System）を用いてグリオスタチンの部分精製を行なった。

3、モノクローナル抗体の作製法：ハイドロキシルアパタイトカラムのステップで得られた部分精製グリオスタチンを、定法に従いBalb/cマウスに免疫し、脾細胞をとりだしマウスミエローマ細胞SP2/O-Ag14とハイブリドーマを作製した。スクリーニングは、ハイブリドーマ培養上清と部分精製グリオスタチンを混合し、この溶液をC6細胞を用いたグリオスタチン活性測定系に添加し、グリオスタチン活性が抑制されるか否かを測定することにより行なった。中和活性と免疫沈降活性の両方を検出するために、1）グリオスタチンとハイブリドーマ培養上清を混合し、インキュベート後遠心分離した上清をグリオスタチン活性測定系に添加する方法（中和活性測定法）、2）グリオスタチンとハイブリドーマ培養上清を混合し、さらにイムソービンを添加し、インキュベート後遠心分離した上清をグリオスタチン活性測定系に添加する方法（免疫沈降活性測定法）、の2つの方法を用いた。約1500ウエルをスクリーニングし、22の陽性クローンを得ることができた。このうち8クローンをサブクローニングし、マウス腹水よりアフィニティー精製し、モノクローナル抗体を得た[(3)]。

4、アフィニティーカラムの作製法：作製したモノクローナル抗体（16D8）をHiTrap NHS-activatedカラム（ファルマシア）に固定化し、部分精製グリオスタチンを添加後、クエン酸緩衝液（pH3.0）にて溶出した。

［結果と考察］

1、グリオスタチンは、熱処理（100℃、10分）、酸処理（pH2.3、16時間）、パパイン処理（37℃、5時間）で失活し、1mMのDTT添加によりその活性が保持された。

2、グリオスタチンは、5ステップのカラムクロマトグラフィーにより、比活性で約800倍まで精製できた。最終ステップの陰イオン交換カラム（Mono-Q）によるクロマトグラムと各画分のクマシーブルー染色、Western blotの結果を図1に示す。0.15M～0.2M NaClで溶出される画分に活性と免疫学的交叉性が一致してグリオスタチンが回収された。

3、作製した8クローンのモノクローナル抗体のサブクラスを調べたところIgG_1が5クローン、IgG_{2a}、IgG_3、IgMがそれぞれ1クローンずつであった。

4、IgGの7クローンを用いて中和活性と免疫沈降活性を調べたところ、クローンにより差はあるもののどの抗体もグリオスタチン阻害活性を示した。

5、IgGの7クローンを用いてWestern blotを行なったところ、どの抗体も約50Kの分子を認識していた。

6、アフィニティーカラムを作製し、グリオスタチンの精製を試みたところ、図2に示すようにクエン酸緩衝液（pH3.0）にてグリオスタチンの溶出がみられ、活性も回収できた。

7、この抗体を用いて、他のサイトカインとの免疫化学的交叉性をWestern blotにて検討した。Interleukin 1、2、3、4、5、6、TGFα、TGFβ1、TNFα、IFNα、G-CSFについて、検討したが交叉するものはなかった。

8、グリオスタチンは、ゲル濾過では分子量約100Kと推定されたが、Western blotを行なった結果、分子量約50Kの蛋白であることが判明した。このことより、グリオスタチンは生体内では2量体として存在していると考えられた。

9、ヒトグリオブラストーマ（GB-1、T98G）、ヒトアストロサイトーマ（NAC-1、NAC-2）、ラットシュワノーマ（354A）、ラットグリオブラスト、ラットアストロサイトーマ（C6）は、グリオスタチンにより[^{3}H]-チミジンの取り込みが低下した。一方、ヒトニューロブラストーマ（GOTO、TGW、NAGAI）、マウスニューロブラストーマ（NAs-1）では[^{3}H]-チミジンの取り込みは影響を受けなかった。

［参考文献］

1. 浅井清文、加藤泰治、堀田妙子、田中　亮、大塚隆信、松井宣夫. 神経化学 29 (1990) 272-278.
2. Asai, K., Hirano, T., Kaneko, S., Moriyama, A., Nakanishi, K., Isobe, I., Yaman, Y. Z., Kato, T. J. Neurochem. 59 (1992) 307-317.
3. Asai, K., Hotta, T., Nakanishi, K., Ito, J., Tanaka, R., Otsuka, T., Matsui N., Kato, T. Brain Res. 556 (1991) 344-348.

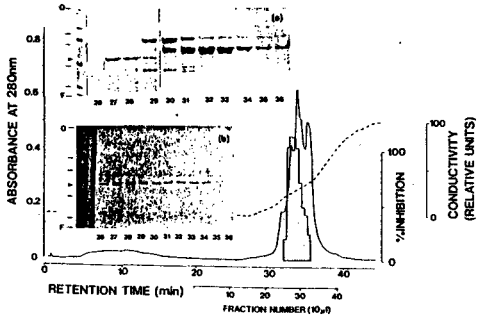


図1、Mono-Qによる分離
(a) クマシーブルー染色
(b) Western blot

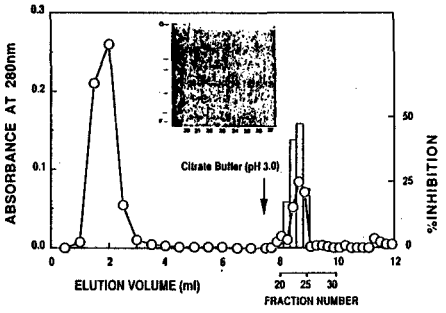


図2、アフィニティーカラムによる
溶出パターンとWestern blot

170 神経成長因子によるPC12h細胞の突起誘導過程に対する細胞外K252aの阻害効果

千葉賢三、塚田泰且、山崎眞津美、毛利哲郎
（北陸大・薬・創薬研）

〔要約〕

PC12h細胞は、神経成長因子(NGF)共存下、60 min インキュベーション後、NGFを含まないメディウムでの培養 1～2 日目で最大の突起保有率が見られる。この突起誘導は100～200 nM K252aを NGF処理前 15 min に添加し、NGFと共存させて更に、60min インキュベーションすることにより著しく阻害されたが、K252a 15 min 処理後メディウムで洗浄することによりその後の NGF処理による突起伸展には K252a による阻害が見られなかった。またK252aアナログで、細胞内への透過性がほとんど認められない K252bを用いて同様の実験を行った結果、200 nM K252b共存下でのNGF処理では突起保有率の抑制がみられたが、15 min 前処理のみでは全く阻害されなかった。そこで、K252aおよび K252bの細胞内蓄積量を測定した結果、K252a(200 nM)は、前処理を含めた 75 min インキュベーション後のK252a 量(100 %)に対して、15 min インキュベーション後、洗浄して更にメディウムで 60 min インキュベーションした場合でも、約 84 % が残存していた。しかし、K252b(200 nM)では 75 min のインキュベーションでも K252aに比較し、20 %の蓄積量であり、洗浄後のインキュベーション(60 min)で更に 7 %にまで減少した。洗浄操作によって残存する K252aは細胞膜および細胞内部に存在することが考えられるが、突起誘導に対する阻害が洗浄によってほぼ完全に消失することから、K252aは細胞外から作用することが強く示唆された。

我々は、昨年の本年会において、PC12h細胞を NGFで短時間処理後培養を継続することにより、突起誘導とその維持作用を比較的簡便に区別できることを報告した。K252aは NGFによる PC12系細胞の突起誘導の特異的な阻害剤として知られているが[1]、その作用機作についてはまだよく解明されていない。すでに Nagashima 等[2]は、K252aおよび K252b(細胞膜の透過性が非常に低い K252aアナログ)を用いてその PC12細胞への蓄積量を比較し、K252aの作用点が細胞外であることを示唆している。そこで今回、我々のアッセイ系でのK252aおよび K252bの種々処理条件における、それら阻害剤の細胞内蓄積量と突起誘導の阻害効果との関係を調べ K252aの作用点についてさらに検討した。

〔方法〕

PC12h細胞は、10 % CO_2存在下、90 % DMEM、5 % 準胎仔牛血清、5 % 熱非働化馬血清を含む培養液を用い、コラーゲンコートした 35 mm ディッシュに 2～3 × 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培地にプロケステロン、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(K252aまたはK252b)を加える場合は、15 min前処理後同様に NGFと 60 minインキュベートした。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。突起保有率の測定：2 枚のディッシュについて各 5 視野ずつランダムに選び、顕微鏡下、一定面積内にある全細胞数(～200 cells)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。細胞内の K252aまたはK252bの定量：Nagashima 等の方法を一部改変し、以下のように行った。それぞれの阻害剤を、NGFを用いずに突起保有率の測定と同様に処理し、HCl酸性の冷 $CHCl_3$/MeOH(9:1) 2 ml/ディッシュで抽出後、有機溶媒を 50 mM HEPES buffer 2 mlに置換して、蛍光法(λ_{ex}= 290 nm, λ_{em}= 374 nm)で濃度を定量した。

[結果および考察]

NGF処理(100 ng/ml, 60 min)による PC12h細胞の突起伸展は 2日目で最大となり、前処理(15 min)および NGF処理時に K252aを添加した場合は 100 nMで 43 %、200 nMで 78 %の突起保有率の阻害を示し、200 nM K252bは 45 %の阻害を呈した。しかし、両阻害剤ともに NGF添加前の前処理のみ行った場合は、突起保有率の阻害は全く認められなかった(Fig.1)。このことから、両阻害剤が前処理後の洗浄操作で阻害濃度以下に減少したものと考えられた。しかし、すでに Nagashima 等によって、K252aは K252bと異なり、十分な洗浄操作によっても細胞内に蓄積されることが報告されている[2]。そこで、今回の処理条件下での両阻害剤の細胞内蓄積量を測定した。200 nM K252aを前処理を含め 75 min PC12h細胞とｲﾝｷｭﾍﾞｰｼｮﾝした場合ﾃﾞｨｯｼｭ当り 36.1 nMの K252aが確認された。同濃度の K252aで前処理後、培地で洗浄し、更に 60 min 培地でｲﾝｷｭﾍﾞｰｼｮﾝした後においてもほとんど蓄積量の減少は認められず、75 min ｲﾝｷｭﾍﾞｰｼｮﾝ した場合の約 84 %残存することが確認された。200 nM K252bを用いて同様の実験を行った場合は 75 min ｲﾝｷｭﾍﾞｰｼｮﾝで K252aの約 20 %、前処理後、培地で 60 min ｲﾝｷｭﾍﾞｰｼｮﾝすると更に 7 %にまで減少した(Fig.2)。従って、K252aは、洗浄操作で容易に遊離、消失することの出来ない細胞膜あるいは細胞内に蓄積するものと考えられる。最近、K252aは PC12細胞において NGF高親和性受容体のﾁﾛｼﾝﾘﾝ酸化を特異的に阻害することが報告され[3]、突起誘導との関連で注目されているが、細胞内に蓄積された K252aに NGF阻害作用が認められないことから、現在、ﾁﾛｼﾝﾘﾝ酸化との関連についても検討中である。

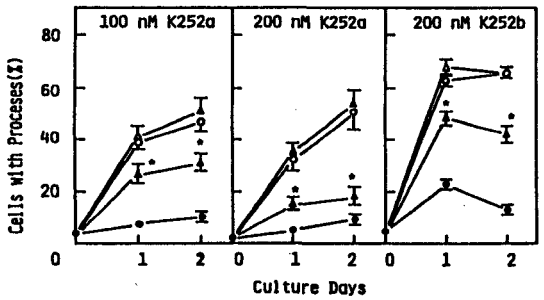


Fig. 1 Effects of K252a and K252b on the NGF-induced neurite outgrowth in PC12h cells. (●), untreated; (○), treated with 100 ng/ml NGF for 60 min; (▲), pretreated with inhibitor for 15 min and treated with NGF/inhibitor for 60 min; (△), preatreated with inhibitor for 15 min and treated with NGF. * P<0.01 versus NGF treatment alone.

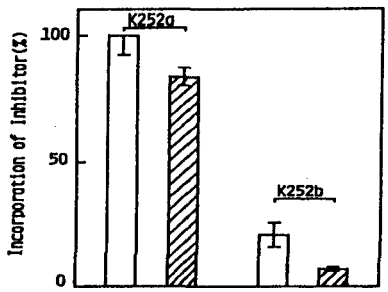


Fig. 2 Retention of inhibitors in PC12h cells after washing. □, incubated with inhibitor for 75 min. ▨, incubated with inhibitor for 15 min, washed out and incubated for 60 min in culture medium.

以上のことから K252a処理の場合は前処理後の洗浄によって細胞での蓄積量に大きな減少が認められないにもかかわらず、完全に突起誘導の抑制活性を消失することが示され、その作用部位が細胞膜外表面近傍であることが強く示唆された。

[引用文献]

1) Koizumi, S., Contreras, M. L., Matsuda, Y., Hama, T., Lazarovici, P. and Guroff, G. (1988) J. Neurochem. 8 715-721

2) Nagashima, K., Nakanishi, S. and Matsuda, Y. (1991) FEBS LETTERS 293, 119-123

3) Berg, M.M., Sternberg, D. W., Parada, L. F. and Chao, M. V. (1992) J. Biol. Chem. 267, 13-16

171　リン脂質による神経成長因子（ＮＧＦ）の産生誘導

清水博喜、松永学、上野正孝、加藤弘之、荒川義弘、山西嘉晴

（エーザイ・筑波研究所）

〔要約〕

マウス繊維芽細胞由来 L-M 細胞を用いて、リン脂質による NGF 産生誘導作用について検討した。その結果、phosphatidic acid (PA) で最も強い作用が認められ、10 μg/ml の添加により培地中の NGF が約６倍上昇した。sphingomyelin (SM) および phosphatidylserine (PS) は 100 μg/ml で、約３～５倍上昇した。一方、phosphatidylcholine (PC)、phosphatidylethanolamine (PE) および phosphatidylinositol (PI) は、ほとんど効果がなかった。また、NGFmRNA についても、PA により８時間後で約３～４倍上昇した。これらの結果は、神経障害時においてマクロファージ（Mφ）などから供給されるリン脂質が、NGF 産生誘導を介することによって神経再生を促進している可能性を示唆している。

［はじめに］リン脂質は 軸索やミエリンの構成成分として重要であるだけでなく、細胞内情報伝達系のモジュレーターとしても多岐にわたり機能していることが知られてきている。また、末梢神経障害時における減少なども報告され、その病態との関連が注目されている。我々は、リン脂質が神経細胞に対し神経突起伸展作用を有することを報告した(1)。リン脂質は坐骨神経損傷時には 傷害部位で Mφ などからリポ蛋白として供給され、神経の再生を促進していると考えられるが(2)、同様に傷害部位で誘導される NGF も神経再生を促進することが知られている。今回、我々はリン脂質の NGF 産生誘導作用について検討した。

［方法］培養：マウス繊維芽細胞由来 L-M 細胞は古川らの方法(3)に準じ、0.5% bactopeptone、100U/ml penicillinを含む Medium199 中で、5%CO_2、37℃の条件下で培養した。

薬物作用評価：L-M 細胞を96穴プレートに、2×10^5 cells/ml の細胞密度で播種してから３日培養後、培地を 0.5%ウシ血清アルブミンを含む Medium199 に換え、試料を添加した。24時間培養後、培養上清を回収し、NGF を測定した。

リン脂質溶液の調製：各種リン脂質は、リポソームの調製法に準じて懸濁した。即ち、リン脂質のクロロホルム溶液を滅菌ガラスチューブに入れ、窒素ガス気流下および真空ポンプで溶媒を完全に除去し、これに培地を加え、マイクロプローブ・ソニケーターで無菌的に超音波処理した。

Northern blot 法：試料で一定時間刺激した L-M 細胞を回収し、内部標準として369baseの NGF-senseRNA を加え、AGPC 法(4)にて総 RNA を抽出した。ホルムアミドを含む1.2%アガロースゲルで電気泳動した後、Immobilon-N (Millipore) に転写後、^{32}P標識 NGF-cRNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった。

NGF定量：抗マウスNGF単クローン抗体 (Boehringer-Mannheim) を用いて、4-methyl-umbelliferyl β-D-galactosideを基質とした酵素免疫測定法(5)にて定量した。検出限界は 0.3pg/assay であった。

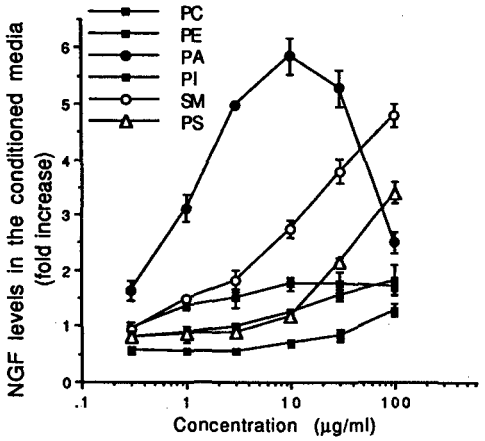


図1　L-M 細胞による NGF 産生に対するリン脂質の効果
PC, PE, PI:豚肝臓　PA:鶏卵　SM, PS:ウシ脳

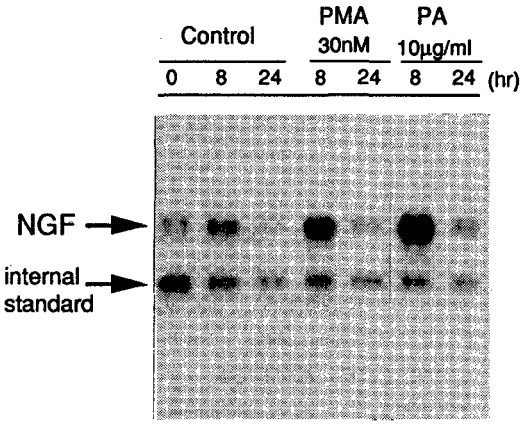


図2　PA 添加後の L-M 細胞中の NGFmRNA の変化

［結果］天然物由来の各種リン脂質による NGF 産生量の変化を図1に示した。PA が最も強く 10 μg/ml で約6倍上昇させた。また、SM、PSは、100 μg/ml で約3～5倍上昇させた。一方、PC、PE および PI は、ほとんど変化しなかった。また、NGFmRNA レベルについても、PA により8時間後で約3～4倍上昇した（図2）。

［考察］今回検討したリン脂質の中で、特に PA は、10 μg/ml と比較的低濃度で NGF、NGFmRNA ともに 強く誘導した。更に、PA の合成品について調べた結果、 dioleoyl PA、dilinoleoyl PA、1-palmitoyl-2-oleoyl PA などの不飽和脂肪酸を含むもので強い NGF 産生誘導作用が見られた。これは、鶏卵由来の PA の活性が不純物によるものではないことを示している。最近、PA に c-fos などのプロトオンコジーン発現や、DNA 合成促進などの増殖促進作用が報告(6)されており、PAによる NGF 産生誘導機構について興味深いところである。また、末梢神経障害の実験モデル等においては、末梢神経の総リン脂質が減少しており(7)、末梢神経障害治療剤であるメコバラミンは、培養細胞でリン脂質の生合成を上げることが知られている(8)。今回、PA などのリン脂質が、NGF 産生誘導作用を有することがわかった。 以上のことから、リン脂質は直接的な突起伸展作用(1)の他に、NGF 産生誘導作用によって 神経障害時の再生に 促進的に働いている可能性が示唆された。

［謝辞］NGF 標品をいただいた愛知県コロニー研の仙波りつ子先生に深く感謝いたします。

［文献］(1)Arakawa, Y., Isahara, K., and Tachibana, S. (1991) *J. Neurochem.* 56, 1864-1872 (2)Ignatius, M. J., Shooter, E. M., Pitas, R. E., and Mahley, R. W. (1987) *Science* 236, 959-961 (3)Furukawa, Y., Furukawa, S., and Satoyoshi, E. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 6039-6047 (4)Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156-159 (5)Katoh-Semba, R., Semba, R., Kashiwamata, S., and Kato, K., (1989) *J. Neurochem.* 52, 1559-1565 (6)Moolenaar, W. H., Kruijer, W., Tilly, B. C., Verlaan, I., Bierman, A. J., and De Lart, S. W. (1986) *Nature* 323, 171-173 (7)古和　久幸：(1979) 糖尿病性神経障害（文光堂刊）1-10 (8)中沢恒幸、水野鎮二、菅野剛史（1972）ビタミン 46、319-323

172 ラット培養神経細胞を用いたNMDA誘発神経細胞死に対するbFGFの救援効果

加藤 晃，永業正美
（塩野義製薬・研究所）

〔要約〕
N-methyl-D-aspartate (NMDA, 10～1000 μM)を，ラット培養神経細胞に10分間処置すると，その18時間後にlactate dehydrogenase (LDH) の遊離が増加し神経細胞死が惹起された．(+)-MK-801 (50～500 nM) は，NMDA (500 μM)と同時に添加すると，LDH の遊離を抑制したが，NMDA処置後に添加すると，(+)-MK-801 (500 nM) のみLDH の遊離を部分的に抑制し，作用が減弱した．一方，basic fibroblast growth factor (bFGF, 0.05～5 nM) は，NMDAと同時に添加しても，LDH の遊離には影響しなかったが，NMDA処置後添加すると，LDH の上昇を抑制した（救援効果）．また，epidermal growth factor (EGF, 1 および5 nM) も，NMDA処置後に添加すると，LDH の増加を部分的に抑制したものの，nerve growth factor (NGF, 0.1 ～10 nM)およびdibutyryl-c-AMP (d-cAMP, 0.05 ～5 mM) はLDH の遊離にほとんど影響しなかった．以上のことより，bFGFは，(+)-MK-801と異なり，NMDAによる神経細胞死に対して救援効果を示した．またこの作用は，用いた他の神経栄養因子よりも強力であった．

〔緒言〕塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) は，当初線維芽細胞に対する増殖因子として発見された (3)．しかし近年，PC-12 細胞に対し神経突起の伸展を促進し(5)，さらに，培養神経細胞に対しても生存維持を促進するなど(1)，神経栄養因子様活性を持つことが明らかになった．また，bFGFは，血清除去によるPC-12 細胞の神経細胞死を抑制し(4)，bFGF を含む培地であらかじめ培養した線条体培養細胞は，興奮性アミノ酸による神経細胞死に対する抵抗性が増大する(2) など，bFGFが神経細胞死に対する保護効果を有することも報告されている．

一方，アルツハイマー病を初めとする神経変性疾患での神経細胞死の原因として，グルタミン酸の過剰遊離による興奮毒性が考えられている．その中でも，N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型受容体を介した細胞毒性が，グルタミン酸による興奮毒性に重要な役割を果たしていることが示唆され，神経変性疾患の治療薬として，NMDA受容体の拮抗薬の有用性が示されてきた．しかし，これらの拮抗薬は，当然グルタミン酸の過剰遊離が引き起こされる時に必要であり，神経細胞死に対して予防的にしか作用できない可能性が考えられる．そこで，神経細胞死に対する新たな治療薬として，既に障害を受けた神経細胞に対して，救援効果を示すような薬物の開発が期待され，bFGFを初めとする神経栄養因子がこれに相当するのではないかと考えられた．

そこで今回は，ラット培養神経細胞を用いて，bFGFのNMDA誘発神経細胞死に対する救援効果を，NMDA拮抗薬の(+)-MK-801，および，bFGFと同様に神経栄養因子活性を有する神経成長因子 (NGF)，上皮細胞成長因子 (EGF)およびdibutyryl-cAMP (d-cAMP) と比較検討した．

〔方法〕胎生17～18日のラット胎児より脳を取り出し，小脳を取り除いた．脳を細切後，0.05 % trypsin で分散し，6 wellプレートに1 ×10^6 cells/wellの密度で細胞をまいた．培地には，10 %熱非動化ウシ胎児血清（分散後1～9日）または10 %熱非動化ウマ血清（分散後10日以後），グルタミン (2 mM)，グルコース(total 11 mM)，炭酸水素ナトリウム (24 mM)およびHEPES (10 mM) を含む，イーグルMEM 培地を用いた．培養は，37℃，5 % 炭酸ガス条件下で行い，非神経細胞を除くために，培養5日目より3日間，10 μM cytosine arabinosideを培地に添加した．なお，実験には培養10日目以後の細胞を用いた．NMDAの添加は，インキュベーションバッファー (IB, HEPES 25 mM, NaCl 120 mM, KCl 5.4 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM, glucose 15 mM)中で行った．初め培養細胞をIBで3回洗浄し，NMDAを添加して，室温で10分間インキュベーションした．その後，IBで一回洗浄し，LDH 測定まで血清を含まないイーグルMEM で培養した．LDH の測定は，NMDA添加の18時間後にWroblewski-La Due 法により行った．さらに，bFGFおよび(+)-MK-801は，NMDAと同時，または，NMDAの処置後LDH の測定まで培地に添加した．また，NGF, EGFおよびd-cAMPは，NMDAの処置後LDH 測定まで培地に添加した．

〔結果〕NMDA (10～1000 μM)を10分間処置すると，その18時間後に用量依存的にLDH の遊離が増加し，神経細胞死が惹起された．(+)-MK-801 (50～500 nM) をNMDAと同時に添加すると，NMDA (500 μM)によるLDH の遊離の増加は，すべての用量で有意に抑制された．しかし，(+)-MK-801をNMDA処置後LDH の測定まで添加すると，(+)-MK-801 (50～100 nM) はLDH の上昇を抑制できず，(+)-MK-801 (500 nM) でも，部分的にしか抑制しなかった〔図1(A)〕．一方，bFGF (0.05～5 nM) は，NMDAと同時に添加すると，NMDA (500 μM)によるLDH の遊離の増加には影響しなかったが，NMDA処置後LDH の測定まで添加すると，NMDA (500 μM)によるLDH の上昇を抑制した〔図1(B)〕．また，EGF (1および5 nM) も，NMDA処置後に添加すると，LDH の増加を部分的に抑制したものの〔図2(A)〕，NGF (0.1～10 nM)およびd-cAMP (0.05～5 mM) は，NMDA (500 μM)によるLDH の増加にほとんど影響しなかった〔図2(B)および(C)〕．

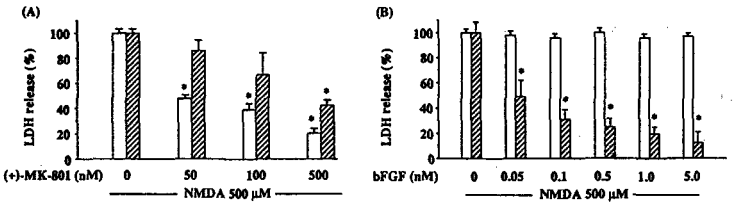


図1. NMDA誘発神経細胞死に対する(+)-MK-801 (A)およびbFGF (B)の効果

□：NMDAと同時に添加，▨：NMDAの添加後LDH測定まで添加，NMDA 500 μM=100 %

*P < 0.01 vs corresponding 0 nM treated group (Sheffe's test)

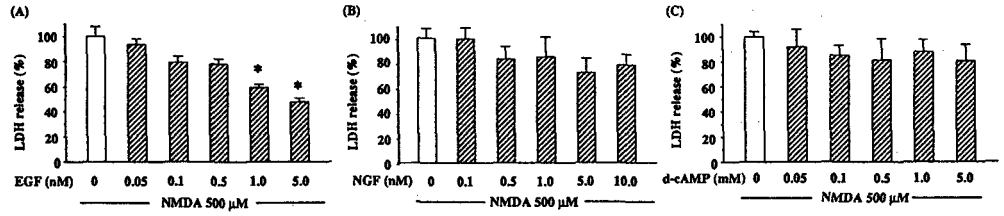


図2. NMDA誘発神経細胞死に対するEGF(A), NGF(B)およびdibutyryl-cAMP(C)の救援効果

NMDA 500 μM=100 %, *P < 0.01 vs 0 nM-treated group (Sheffe's test)

〔考察〕NMDAによる神経細胞死に対して，(+)-MK-801は，NMDAと同時に添加すると50 nM から神経細胞死を抑制するが，NMDA処置後に添加した場合には，500 nMを用いなければ抑制効果が認められず，(+)-MK-801の神経細胞死に対する救援効果は，保護効果に比べ発現しにくいことが明らかになった．一方，bFGFは，(+)-MK-801とは異なり，NMDAと同時に添加した場合には，神経細胞死に対して何ら効果を示さなかったが，NMDA処置後に添加した場合には，神経細胞死を抑制し，NMDA誘発神経細胞死に対して救援効果を示すことが明らかとなった．また，EGF は救援効果を示すもののその作用は弱く，NGF およびd-cAMPはほとんど作用を示さなかったことより，今回用いた神経栄養因子の中では，bFGFの救援効果が最も強力であることも示された．

〔文献〕

(1) Abe, K., Takayanagi, M. and Saito, H. (1991) Japan. J. Pharmacol. 56, 113-116.
(2) Freese, A., Finklestein, S.P. and DiFiglis, M. (1992) Brain Res. 575, 351-355.
(3) Gospodarowicz, D. (1974) Nature 249, 123-127.
(4) Rukenstein, A., Rydel, R.E. and Greene, L.A. (1991) J. Neurosci. 11, 2552-2563.
(5) Rydel, R.E. and Greene, L.A. (1987) J. Neurosci. 7, 3639-3653.

173 培養ラット中枢ニューロンに及ぼすインターロイキン-2の生存維持作用

古川美子、粟辻啓文、中島光業*、古川昭栄、林紘三
(岐阜薬科大学・分子生物、*森永乳業・生科研)

〔要約〕
ラット胎児脳の海馬からニューロンを培養し、インターロイキン（ＩＬ）－２の作用を調べた結果、ＩＬ－２が濃度依存的に生存維持作用を示すことが明らかになった。すなわちＩＬ－２非存在下においては培養開始２日後には生存ニューロンがみられなくなるのに対し、200 U/ml存在下ではほとんどが生存していた。ＩＬ－２の生存維持作用は抗ＩＬ－２モノクローナル抗体の添加により完全に阻害された。今回用いた培養系におけるglial fibrillary acidic protein(ＧＦＡＰ）陽性アストロサイトの混入率は0.65%以下であった。ＩＬ－２は、海馬ニューロンのみならず、線条体、大脳皮質、中隔のニューロンに対しても顕著な生存維持作用を示した。またＩＬ－２は線条体ニューロンのコリンアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）活性には影響を及ぼさなかった。これらの結果から、ＩＬ－２は広範な種類のニューロンに対し生存維持作用をもつが、必ずしも分化誘導作用を伴わないと考えられた。

ＩＬ－１にアストロサイト増殖促進作用および神経成長因子（ＮＧＦ）合成促進作用があること、ＩＬ－３にコリン作動性ニューロンの生存および突起伸展を促す作用のあること、ＩＬ－６にコリン作動性ニューロン、ドパミン作動性ニューロンの生存を維持する作用のあることなどが明らかにされ、リンホカインが免疫系のみならず中枢神経系の調節因子としても重要な役割を担っていることが示されつつある。さらに近年になって、Ｔ細胞の増殖・分化を促進するなど免疫反応調節機構で重要な役割を担っているＩＬ－２が脳にも存在し、特に海馬に多く、次いで線条体、わずかに大脳皮質にも認められること、またＩＬ－２の結合部位が海馬に存在することが報告され（１）、ＩＬ－２がコリン系のニューロンに対してなんらかの作用を担っている可能性が示唆されるようになった。これまでにＩＬ－２がオリゴデンドロサイトの増殖および成熟を促すと報告されている（２）が、中枢ニューロンに対する作用は全く不明である。そこで今回、ＩＬ－２が中枢ニューロンに作用するかどうかを知る目的で、ラット胎児脳のいくつかの部位からニューロンを培養し、生存維持に及ぼす作用、ＣＡＴ活性に及ぼす作用を検討した。

[実験方法]

ラット（胎生18日）中枢ニューロンの培養は既法に従った（３）。すなわち、切り出した脳の組織を0.25%トリプシン、0.01%ＤNase Ⅰで消化した後、５%準胎児牛血清、５%馬血清を含むＤＦ（DME:F12=1:1）の培地に懸濁し、poly-DL-ornithine でコートしたプレートに植え込み、24時間後 0.5%ウシ血清アルブミンを含むTIP/DP培地に置き換え試料を添加した。生存維持活性の測定は、24穴プレートに4×10^4 cells/cm^2 の密度で植え込み、 trypan blue dye exclusion法で生存ニューロン数を測定することにより行った。アストロサイトの同定はＧＦＡＰに対する抗体、ニューロンの同定は抗microtubule-associated protein２抗体による免疫組織染色法で行った。ＣＡＴ活性の測定は、線条体ニューロンを48穴プレートに1×10^6 cells/cm^2 の密度で植え込み、試料存在下６日間培養した後、Hatanakaらの方法（４）に従って行った。組換え型マウスＩＬ－２はGenzyme 社、抗ＩＬ－２モノクローナル抗体はPharMingen社より購入した。

[結果と考察]

ＩＬ－２およびその結合部位が海馬に多いことから、まず海馬ニューロンの生存に及ぼすＩＬ－２の作用を検討した。その結果を図１に示す。4×10^4 cells/cm^2 の密度で培養すると、ＩＬ－２無添加の場合には２日後にほぼすべてのニューロンが死滅するのに対し、100 U/mlのＩＬ－２では約90%、200 U/mlではほぼ 100%のニューロンが生存していた。次に、100 U/mlのＩＬ－２を添加し、培養１、２、３日目の生存ニューロン数を経時的に調べたところ、ＩＬ－２存在下

では3日後でも約60%のニューロンが生存していた（図2）。ＩＬ－２の生存維持作用は抗ＩＬ－２モノクローナル抗体で完全に抑制されることから、ＩＬ－２分子そのものが作用していると考えられた。また、①今回用いた培養ニューロンにおけるアストロサイトの混入率は0.65%以下であること、②アストロサイト増殖因子である腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）α、アストロサイトのＮＧＦ合成を促進するＩＬ－４やＩＬ－５は生存維持作用を示さないことから、ＩＬ－２の作用はアストロサイトを介したものではないと考えられた。次に海馬以外のコリン作動性部位のニューロンに及ぼす作用についても検討したところ、ＩＬ－２は線条体、中隔、大脳皮質のニューロンに対しても生存維持作用を示した。また、ＩＬ－２は線条体ニューロンのＣＡＴ活性になんら影響を与えなかった（表1）ことから、ＩＬ－２は線条体コリン作動性ニューロンの生存は維持するが分化は促進しないと考えられた。ＩＬ－２に応答するニューロンの同定を行う必要があるが、調べたかぎりほぼすべてのニューロンの生存が維持されることから、ＩＬ－２は広範なニューロンに対し強力な生存維持作用をもつ神経栄養因子であると考えられる。

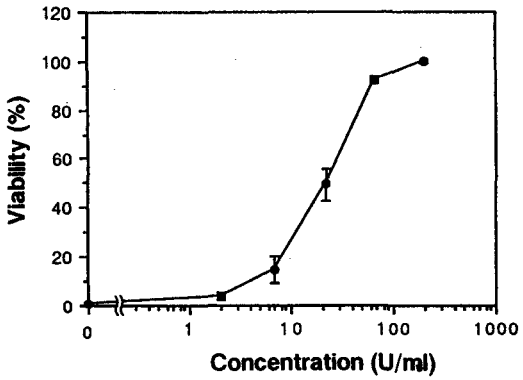


図1 Effect of IL-2 on neuronal survival in primary cultures derived from rat fetal hippocampus. At culture day 2, surviving cells excluding trypan blue dye were scored in an area of 3.1 x 10 ^{2}cm^{2} per well (2 cm^{2}).

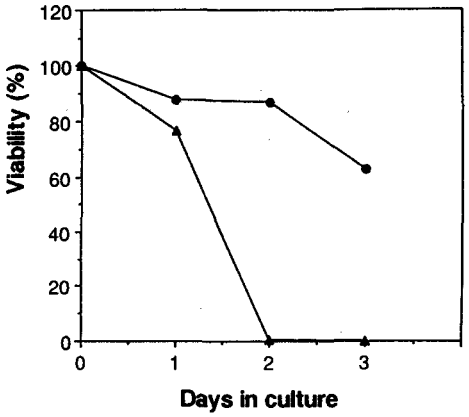


図2 Time course of the survival of rat hippocampal neurons in the absence (▲) or presence of 100 U/ml of IL-2 (●).

表1 Effect of IL-2 on CAhT activity of striatal neurons cultured from an 18-day-old rat embryo.

	Total CAhT activity (pmoles/min/well)	Total protein (μg/well)	Specific CAhT activity (pmoles/min/mg protein)
None	0.500 ± 0.12	27.8 ± 1.8	18.0 ± 4.31
+ 2 U/ml IL-2	0.476 ± 0.10	27.0 ± 3.4	17.6 ± 3.70
+ 20 U/ml IL-2	0.512 ± 0.10	29.6 ± 1.8	17.3 ± 3.37
+ 200 U/ml IL-2	0.664 ± 0.15	32.4 ± 2.2	20.5 ± 4.62

[文献]

1)Araujo, D. M., Lapchak, P. A., Collier, B. & Quirion, R. (1989) *Brain Res.* 498, 257-266.

2)Benveniste, E. N. & Merrill, J. E. (1986) *Nature* 321, 610-613.

3)Nakajima, M., Kashiwagi, K., Hayashi, Y., Saito, M., Kawashima, T., Furukawa, S. & Kobayashi, K. (1991) *Neurosci. Lett.* 133, 49-52.

4)Hatanaka, H. & Tsukui, H. (1986) *Dev. Brain Res.* 30, 47-56.

174 海馬部位特異的なＮＧＦｍＲＮＡ，ＮＧＦレベルのカイニン酸応答性

橋本吉秀[1]、尾前二三雄[2]、古川昭栄[3]、林恭三[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〕

カイニン酸を腹腔内投与したラットの海馬を、ＣＡ１領域を主に含む背側と歯状回を主に含む腹側に２分し、各々ＮＧＦｍＲＮＡ及びＮＧＦレベルの経時的変化を検討した。ＮＧＦｍＲＮＡは、投与２時間後より腹側特異的に発現増加が認められた。一方、ＮＧＦレベルは、投与２時間後には両側で減少したが、４時間後には腹側で増加、１～３日後に背側で回復、１～２週間後には、両側で増加傾向が認められた。腹側において、一旦低下したＮＧＦレベルがすみやかに増加に転じた事は、歯状回顆粒細胞でのＮＧＦｍＲＮＡ発現増加に対応したものと考えられた。また、１～２週間後の両側でのＮＧＦレベル増加は、反応性アストログリア由来のＮＧＦ産生に対応したものと推察された。興奮性アミノ酸による海馬神経細胞障害の部位特異性は、内在性ＮＧＦレベルの減少に対する神経細胞の防御的ＮＧＦ産生機能の有無に一部起因している可能性が示唆された。

【緒言】

ｎｏｎ－ＮＭＤＡ型グルタミン酸受容体アゴニストであるカイニン酸（ＫＡ）をラットに全身投与すると、海馬では主にＣＡ１領域の錐体細胞が変性壊死し、ＣＡ２領域の錐対細胞や、歯状回の顆粒細胞は抵抗性であることが知られている[1]。一方、ＫＡをラットに脳室内投与すると、歯状回顆粒細胞のＮＧＦｍＲＮＡが発現増加すること[2]及び神経細胞変性壊死後の海馬背側において反応性アストログリアによるＮＧＦ産生が昂進すること[3]が知られている。

我々は、興奮性アミノ酸による神経細胞障害と、内在性ＮＧＦとの関連を明らかにする目的で、ＫＡ全身投与後のラット脳内ＮＧＦｍＲＮＡの発現増加とＮＧＦ蛋白レベルの一過性低下という解離現象を見い出し、昨年の本学会において報告した[4]。今回、ＫＡ投与後のＮＧＦｍＲＮＡ，ＮＧＦレベルの経時的変化を海馬部位別に検討し、興奮性アミノ酸によって惹起される部位特異的な内在性ＮＧＦの変動を認めたので報告する。

【実験方法】

雄性Ｗｉｓｔａｒラット（６週齢）を用い、ＫＡ（１２ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内投与した。ＫＡ投与後、経時的に海馬を取り出し、ＣＡ１領域を主に含む背側と歯状回を主に含む腹側に２分し凍結保存した。ＮＧＦｍＲＮＡは、組織より総ＲＮＡをＡＧＰＣ法により抽出し、マウスＮＧＦｃＲＮＡプローブを用いてノーザンブロット分析を行った。ＮＧＦレベルは、組織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】

ＫＡ投与後８時間までのＮＧＦｍＲＮＡの経時的変化は、背側では大きな変化は認められなかったが、腹側では２時間後より、強い発現増加が認められた（図１）。ＫＡ投与後２週間までのＮＧＦレベルの経時的変化は、背側では２時間後に減少、１～３日後に回復、１～２週間後には増加傾向が認められた。一方、腹側では２時間後に減少、４時間後には増加に転じ、１～２週間後まで増加傾向が持続していた（図２）。

【考察】

ＫＡ投与直後に海馬背側、腹側いずれでもＮＧＦレベル減少が認められたが、ＫＡによる最も重篤な錐体細胞障害が知られるＣＡ１を含む背側では、ＮＧＦｍＲＮＡの大きな変化は認められず、ＮＧＦレベルの回復は、腹側より遅延して認められた。一方、ＫＡの神経細胞障害に対して抵抗性の高い歯状回顆粒細胞を含む腹側では、ＮＧＦレベル減少と同時期にＮＧＦｍＲＮＡの発現増加と、引続きすみやかなＮＧＦレベルの回復、増加現象が認められた。

腹側でみられたＮＧＦｍＲＮＡの発現増加は、ＫＡ脳室内投与後のｉｎ ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションの結果歯状回顆粒細胞がＮＧＦｍＲＮＡを発現増加したという報告[2]と一致する。昨年我々が報告した海馬におけるＫＡ投与１～３時間後のＮＧＦレベル一過性低下現象は、ＫＡによりまず海馬全域でＮＧＦレベル低下が起き、直後に腹側でＮＧＦレベル増加が生じることに起因していることが明かとなった。一方、ＫＡ投与１～２週間後にかけてＮＧＦレベル増加が海馬全域で認められたのは、興奮性アミノ酸による神経細胞障害後のグリオーシスのなかで反応性アストログリアのＮＧＦ産生が昂進するという機構[3]が二義的に関与したものではないかと推察される。興奮性アミノ酸による海馬神経細胞障害の部位特異性は、内在性ＮＧＦレベルの減少に対する神経細胞の防御的なＮＧＦ産生機能の有無に一部起因している可能性が示唆された。

【参考文献】

(1) Sperk, G., et al. (1983) Neurosci. 10, 1301-1315.

(2) Gall, C., et al. (1991) Mol. Brain Res. 9, 113-123.

(3) Bakhit, C., et al. (1991) Brain Res. 560, 76-83.

(4) 橋本吉秀 他 (1991) 神経化学 30, 172-173.

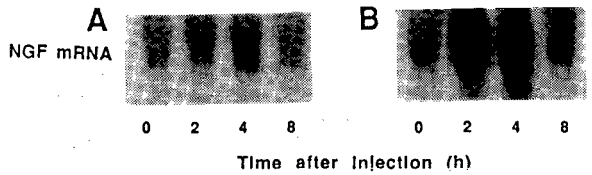


Fig. 1 Time-course of NGF mRNA in dorsal (A) and ventral (B) hippocampus after KA administration. KA (12 mg/kg body weight) was i.p. injected into 6-week-old rats then animals were sacrificed at the indicated times. Northern blot analysis was performed as described in the text. Twenty μg of total RNA was used per lane.

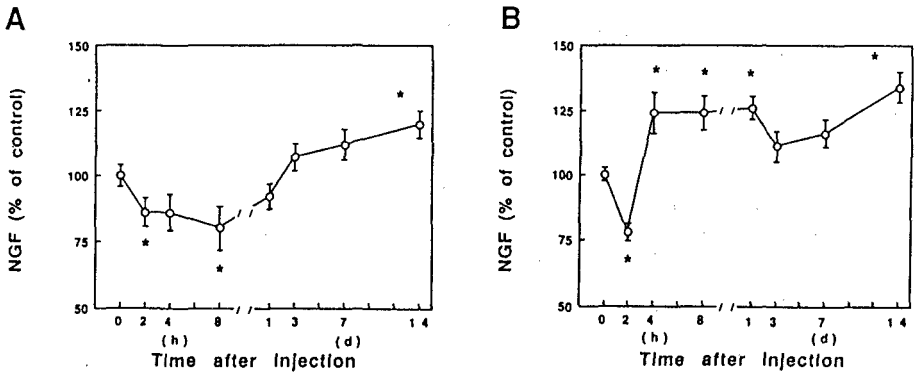


Fig. 2 Time-course of NGF level in dorsal (A) and ventral (B) hippocampus after KA administration. KA (12 mg/kg body weight) was i.p. injected into 6-week-old rats then animals were sacrificed at the indicated times. The values of NGF protein, expressed as a percentage of the original values, are the mean ± SE (n = 5). Significance (Student's t-test): *, $P<0.05$.

175 ヒトリンパ球におけるm3ムスカリン性受容体刺激のIL-2産生増強

北村佳久、矢田武、野村靖幸（北大・薬・薬効）

〔要約〕
免疫細胞機能における神経伝達物質受容体の存在とその機能的意義を解明するため、ヒト末梢血リンパ球（hPBL）およびヒト株化ヘルパーT細胞（Jurkat細胞）を用いて検討し、次の結果を得た。1）hPBLにおいてオキソトレモリンM（Oxo-M, ムスカリン性アゴニスト）前処置によって、フィトヘマグルチニン（PHA、レクチン）によるインターロイキン2（IL-2)産生が時間的に早まり、産生量も増大すること、2）このOxo-Mによる産生増大より先行してc-*fos* mRNA発現およびIL-2 mRNA発現量が増大すること、3）ノーザンブロット解析よりhPBLおよびJurkat細胞に発現しているムスカリン性アセチルコリン（mACh）受容体は、m3サブタイプであること、4）Oxo-M刺激によりhPBLは脱分極されるが、フローサイトメトリー解析によりCD4陽性細胞で著しいことが示された。以上の結果から、hPBLのうちCD4陽性リンパ球においてm3型mACh受容体は、抗原刺激によるIL-2産生を増強することが示唆された。

【緒言】
近年、サイトカインや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示唆されている[1]。我々は、これまで免疫担当細胞における神経伝達物質受容体の役割を解明するため、Jurkat細胞およびhPBLを用いてムスカリン性アセチルコリン（mACh）受容体応答機構を検討してきた[2,3]。サイトカインは、免疫担当細胞間の情報伝達物質として知られている。このうちIL-2は、Tリンパ球の増殖に関与しているだけでなく、ナチュラルキラー(NK)細胞、マクロファージ、Bリンパ球の活性化にも関与することが明らかになってきた。また、Tリンパ球の活性化は、1）増殖因子であるIL-2の産生、2）IL-2受容体の発現、3）さらにIL-2によるDNA合成の促進（細胞増殖）を引き起こす。今回、Tリンパ球のIL-2産生に対する神経伝達物質のアセチルコリン（ACh）刺激による影響について検討した。

【実験方法】
①ヒト末梢血リンパ球の調製：ヒト末梢血リンパ球（hPBL）は、研究の主旨を説明し、同意を得たうえで健康成人の肘静脈より採血し、Ficoll-Paque法により調製した。PBSで細胞を洗浄後、5 % FCSを含むRPMI-1640培地を用いて37℃、10 % CO_2/90 % airの条件下で 2 × 10^6 cells/mlの細胞密度にて細胞培養を行った。トリパンブルー染色による細胞生存率は、常に 98 %以上であった。また、20 mlの採血により2~3 × 10^7個のhPBLが得られた。
②産生IL-2の定量：hPBLを各種薬物で刺激した後、培養液を回収し、500×g、5分間遠心し上清をIL-2測定用サンプルとした。定量には、IL-2 ELISAキット(NEN)を用いた。
③ノーザンブロット解析：ヒトmAChi受容体プローブ（m1~m5）は、[α-^{32}P]ddATP を用い、3'末端標識キットにより標識した。c-*fos* プローブは、ヒトc-*fos* cDNA 2.1 Kb中のEcoR I-Stu I断片(0.9 Kb)あるいは、v-*fos* 中のPst I-Sac I断片(0.6 Kb)を用いた。プローブ[γ-^{32}P]dCTP を用いてマルチプライム標識キットにより標識した。
④フローサイトメトリーによる細胞膜電位の測定：細胞膜電位感受性色素は 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_6$)を使用した。phyco-erythrin (PE)標識マウス抗ヒトCD4モノクローナル抗体もしくはPE標識マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体を細胞懸濁液に添加し、4 ℃遮光条件下、30分間反応させた。洗浄後、1×10^6 cells/mlの細胞密度に再懸濁した。次に50nM $DiOC_6$ (DMSO溶液）を加え、4℃、遮光条件下、15分間反応させた。フローサイトメーターは、EPICS-CS (Coulter 社)を使用した。細胞にレーザー光を照射して、前方散乱光と90°散乱光から死細胞や非リンパ球集団を選別して測定対象外とし、リンパ球集団のみを蛍光強度の測定対象とした。$DiOC_6$ は、488 nmのレーザー光により励起され530~570nmの緑色蛍光を発し、PEは488 nmのレーザー光により励起され578 nm付近の燈色蛍光を発する。リンパ球に488 nmのレーザー光を照射し各細胞の $DiOC_6$、PEの蛍光強度を測定した。

【結果および考察】
①ヒト末梢血リンパ球のIL-2産生に対するmACh受容体による促進的調節機構： hPBLのIL-2産生に対する各種薬物の効果を検討した。PHA (10μg/ml) 単独刺激およびT細胞抗原受容体 (TCR) /CD3複合体に対する抗体（抗CD3抗体）で刺激したところIL-2産生が認められた。また、TPA (10 nM) 前処理によりPHA、抗CD3抗体によるIL-2産生は増大した。TPA、Ca^{2+}イオノフォアのイオノマイシン (0.5μM) の単独刺激では、IL-2産生は引き起こされなかったが、両者の添加により著しいIL-2産生が認められた。免疫抑制薬のFK506 (10 nM) およびサイクロスポリンA (CsA、100 nM) の2時間前処理によりTPA、イオノマイシン両者によるIL-2産生は完全に阻止されたが、PHA単独およびTPA前処理後のPHA刺激によるIL-2産生は60%程度しか抑制されなかった。
次に、hPBLのIL-2産生への各種AChi受容体アゴニストの作用を検討した。mAChおよびニコチン性受容体アゴニストは、それぞれ単独で刺激してもIL-2産生を引き起こさなかった。PHAによるIL-2産生は、1μM ACh (100μM フィゾスチグミン存在下)、1μM Oxo-Mの3時間前処理により増大した。また、ニコチン性受容体アゴニストである1μM ニコチンの前処理では著しい変化は認められなかった。この増大は、mAChi受容体アンタゴニストのアトロピン (100 nM) の2時間前処理により減弱した。また、この増大はPHAとアゴニストの同時添加では認められず、1~24時間のmAChi受容体アゴニスト前処理が必要であった。Oxo-M前処理後のPHAによるIL-2産生増大作用は、TPA前処理後のPHAによるIL-2産生増大作用と同様、FK506による抑制作用が弱く認められた。一方、Oxo-M前処理後TPAあるいはイオノマイシンで刺激してもIL-2は産生されなかった。PHA単独刺激では10μg/ml以上の濃度でIL-2産生が認められたが、Oxo-M (10 nM) 24時間前処理によりPHA 3μg/ml以上の濃度でIL-2産生が認められた。さらに、PHA単独では刺激後12~24時間で徐々にIL-2産生が引き起こされたが、Oxo-M前処理によりPHA刺激後3~6時間でIL-2産生が引き起こされ、12時間後には著しい増加が認められた（図1）。

PHA単独2時間刺激ではIL-2 mRNAの発現は認められなかったが、Oxo-M（10μM）2時間前処理後、PHA刺激を行ったところIL-2 mRNAの発現が認められた。PHA単独の12時間刺激ではIL-2 mRNA発現が認められ、さらにOxo-M前処理によりその発現は増大した（図2）。

②ヒト末梢血Tリンパ球に発現しているmACh受容体サブタイプの同定：hPBLにおけるmACh受容体の存在とそのサブタイプを検討するためにノーザンブロット解析を行った。hPBLは、Jurkat細胞と同様にm3受容体mRNAを強く発現していた。また、hPBLではm1受容体mRNAも弱いながら発現していた（図3）。

各種神経細胞においてmACh受容体刺激により最初期遺伝子であるc-*fos* mRNAが発現することが報告されている。またリンパ球においても、活性化するとc-*fos* mRNA発現が認められる。そこでhPBLにおいてmACh受容体刺激によるc-*fos* mRNA発現について検討を行った。PHA（10μg/ml）でhPBLを30分間刺激したところc-*fos* mRNA発現が認められた。hPBLを10μM Oxo-Mで30分間刺激したところPHA刺激と同程度のc-*fos* mRNA発現が認められた。さらに、mACh受容体を発現しているリンパ球のサブセットについて検討を行った。一方、Tリンパ球は、胸腺内において骨髄由来のTリンパ球前駆細胞（$CD4^-/CD8^-$）から$CD4^+/CD8^-$あるいは$CD4^-/CD8^+$に分化成熟される。一般に、CD4分子はTリンパ球サブセットのうちhelper/inducer T細胞（$T_{h/i}$）に発現しており、CD8分子はsuppressor/cytotoxic T細胞（$T_{s/c}$）において発現していると考えられている。また、mACh受容体刺激によりTリンパ球の細胞膜電位が変化することが報告されている。そこでPE標識したTリンパ球サブセット特異的抗体（抗CD4あるいは抗CD8抗体）と細胞膜電位感受性色素$DiOC_6$との二重染色を行い、フローサイトメトリーにより解析した。$CD4^+$Tリンパ球の$DiOC_6$蛍光強度は、Oxo-M（10 nM）の2分間処理により著しく減少した。$CD8^+$Tリンパ球ではOxo-M処理による$DiOC_6$蛍光強度の減少は小さかった。

以上の結果から、hPBLのうちCD4陽性リンパ球においてm3ムスカリン性受容体刺激により、抗原刺激によるIL-2産生が増強されることが示唆された。

【参考文献】

1) G.F. Solomon (1987) J. Neurosci. Res. 18, 1-9.
2) 金田利夫、野村靖幸（1990）神経化学 29, 58-59.
3) 矢田武、北村佳久、野村靖幸 （1990）神経化学 30, 340-341.
4) G.R. Crabtree (1989) Science 243, 355-361.

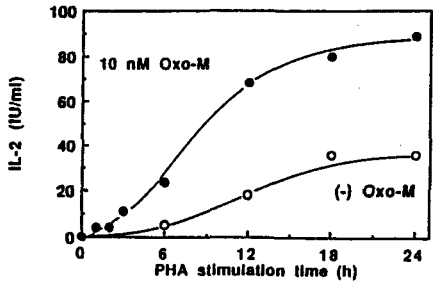


図1：ヒト末梢血リンパ球におけるPHAのIL-2産生に対するOxo-Mの作用
Oxo-M（10 nM）を24時間前処置した後、PHA（10μg/ml）で各時間刺激した。

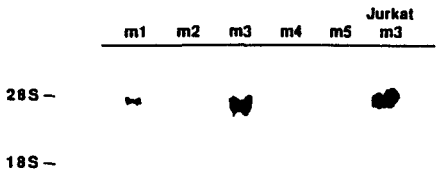


図3：ヒト末梢血リンパ球のmACh受容体サブタイプのノーザンブロット解析

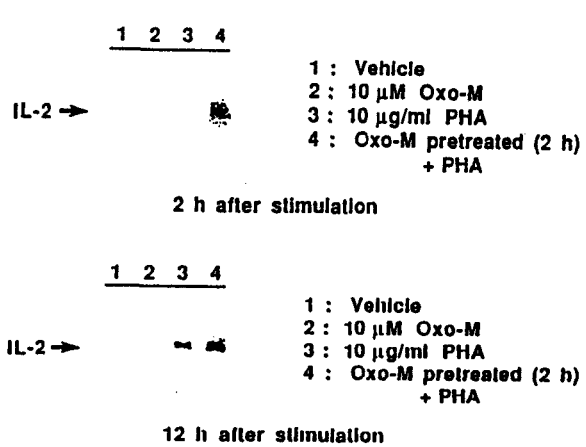


図2：ヒト末梢血リンパ球のIL-2 mRNA発現に対するOxo-Mの作用

176 神経線維腫(NF1)由来のヌクレオシド、ジヌクレオチドによる神経芽腫細胞の増殖促進

堀田妙子、浅井清文、中西圭子、磯部一郎、Yaman Eksioglu、武田直仁*、加藤泰治
(名市大・医学部・分子医研・生体制御、*名城大・薬学部・薬剤学)

〔要約〕

異常に増殖したシュワン細胞からなる神経線維腫タイプ1(von Recklinghausen neurofibromatosis, NF1)の抽出液中にヒト神経芽腫細胞に対し強い細胞増殖促進作用を示す神経芽腫細胞増殖因子Neuroblastoma-Growth Factor (NBGF)があることを見い出した。ゲル濾過(Bio-Gel P-10)、逆相系 HPLC を用いて、NF 1 からヒト神経芽腫細胞(GOTO)の細胞増殖作用を示す二画分(NBGF1, NBGF 2)を高度に精製した。NBGF 1 は GC/MS の結果から、ピリミジンヌクレオチドであるウリジンと化学構造が全く一致した。標準ピリミジンおよびプリンヌクレオシドの中ではアデノシンが最も強い活性を示した。NBGF2 は LC/MS の結果と、リボヌクレアーゼT2(5'-ヌクレオチダーゼ),ヌクレアーゼP1(3'-ヌクレオチダーゼ)を用いた特異的酵素切断法により adenylyl(3'-5')cytidine-3'-phosphate(ApCp)と同定された。これらの結果から、ヒト神経芽腫細胞は、プリン、ピリミジンヌクレオチドの生合成において *de novo* 経路が機能不全に陥っていることが示唆された。

[目的]

近年未分化なニューロンの増殖、分化を促進し成熟したニューロンの生存維持、機能亢進を促進するタンパク性の因子が多く報告されている。これらの因子は神経栄養因子(neurotrophic factor, NTF)と呼ばれ、脳の発育過程や神経機能修復起点で重要な働きをすると考えられている。神経成長因子(nerve growth factor , NGF)、毛様体神経栄養因子(ciliary neurotrophic factor,CNTF)、そしてグリア成長因子(glia matulation factor,GMF)などの NTF は、生体内でアストロサイトによって産生されることもわかってきた。

我々は、主に末梢性グリア細胞からなるNF1には、多種の NTF [1X2]やグリア細胞増殖抑制因子(gliostatin)[3] が存在することを示し、この NF1 がニューロンとグリアの相互作用を研究していく上で、貴重な材料源であることを明らかにした。今回は、この NF1 抽出液中に存在し、ヒト神経芽腫細胞に作用して、増殖を促進する NBGFs を単離し、その構造を明らかにすることができたので報告する。

[方法]

1、NBGF の生物活性の測定法: NBGF の生物活性は、ヒト神経芽腫細胞(GOTO)におけるＤＮＡ合成の増加を指標として行なった。GOTO 細胞は 10%牛胎児血清を含む RPMI 1640(GIBCO)で培養し、96 ウエルプラスチックプレートに 100 μlの細胞懸濁液 1x10^{4}個／ウエルを播種した。37℃、16時間インキュベート後、試料(1-10 μl)を加え、同時に 740Ｂq／ウエルの [^{3}H] -チミジンを加えさらに１６時間培養した。セルハーベスターで細胞をフィルターに集め乾燥後、細胞に取り込まれた [^{3}H] -チミジンを液シンで測定した。

2、精製法: NF1 の腫瘍塊(25ｇ)を20ｍＭトリス塩酸緩衝液(pH 7.4, 10μM ロイペプチン、10μM ペプスタチン、1mM PMSF含有)でホモジナイズする。遠心後、上清を100℃、10min加熱し、ひき続き pH 3.4とし、超遠心(100,000ｇ、1.5 hr)で沈殿物を除去する。上清をBio-Gel P-10(2.4ｘ120 cm、8 ml 分画、溶離液：0.1M 酢酸)で分離し、各フラクションの生物活性を測定した。活性は2成分(NBGF1, NBGF2)に分れた。NBGF1 はＣ18逆相HPLC(ODS-5, 4.6x250mm)を用い, 流速：1ml/min, 0.1% TFA に 0→50%アセトニトリルのリニアグラジエントで行なった。さらに活性フラクションは、再クロマトを行なって単一なピーク(精製NBGF1)とし GC/MS で分析した。NBGF2は、分取用Ｃ18逆相カラム（LOP-ODS,10x200mm)を用い, 流速：3ml/min, 0.1%TFA に 0→100% アセトニトリルのリニアグラジエントで分離した。主活性フラクションを NBGF1 と同様に ODS-5 で精製し、活性画分を再クロマトし単一のピーク(精製NBGF2)とし LC/MS で分析した。

3、GC/MS,LC/MSの条件: GC/MSの試料は、TMS誘導体にし、島津9020-DFで分析した。カラムは、NB-1シリカキャピラリ(30mx0.25mm)を使用しインジェクション温度は、270℃、カラム温度は、100℃-300℃の5℃/minの昇温をかけた。LC/MSは、日本電子 JMS-HX110を使用し FAB インターフェースを介し島津 SPD-6ADに接続した。分離カラムは Develosil ODS-5 (250 x 0.5 mm i.d.)、抗カラムは、Develosil ODS-5 (150 x 2 mm i.d.)を使用し、流速 100μl/ml で、溶離液は、精製時の ODS カラムの場合と同じものを使用した。

4、精製 NBGF2 の酵素分解

精製NBGF2 (1.1μg) は、10 mM 酢酸ナトリウム（pH5.3)に溶解し30 munitsのヌクレアーゼP1(NaseP1)を加え37℃、16時間反応させる。さらに凍結乾燥後、20mM TEAB(pH 8.2)に溶解し10 munits のアルカリフォスファターゼ(AP)を加え、30℃, 1 時間 反応させる。リボヌクレアーゼ T2 (RNase T2)処理は、10mM 酢酸ナトリウム（pH 4.7) 中、 1μg NBGF2 に対し30 munits の RNase T2 を加え、37℃、16 時間反応させる。C18逆相カラムで分離し、標準物質の溶出時間と 254/220 の UV 比からフラグメントを同定した。

（結果と考察）

NBGFs は、NF1の抽出液からゲル濾過にてNBGF1とNBGF2の2成分に分れた(Fig.1)。NBGF1は、ODS-カラムでアセトニトリル濃度 1.5% で溶出された。この精製 NBGF1 の GC/MS のスペクトルは、標準ウリジンと全く一致した。NBGF2 は、LOP-ODS,ODS-5 のカラムクロマトにてアセトニトリル濃度 4.5% で強い活性を示すメインピーク(精製NBGF2)として溶出した。精製 NBGF2 は、LC/MS の結果からMH⁺イオンがM/Z=653 と測定された。さらにフラグメントイオンとして M/Z=112(Cyt), 136(Ade), 348(AMP), 404(CDP), 542 が確認された(Fig. 2)。この結果から、アデノシンーシチジンジヌクレオチド（AppC, CppA, ApCp, pCpA, pApC, CpAp),又は、この重合体が想定された。この構造決定を行うために酵素による限定分解を行った(Fig.3)。Nase P1処理によりシチヂンジヌクレオチド（ppC, pCp, Cpp) と pC, Ado が溶出時間 と 254/220 の比から確認された。さらにこの反応生成物を AP で処理すると、Cydと Adoが 1:1 で回収された。次に RNase で処理すると Cpと Ap が溶出し、さらにAP 処理により Cydと Adoが 1:1 の割合で溶出した。精製 NBGF2 を直接 AP で処理すると標準 ApC とHPLC の溶出時間は、全く一致した。以上の結果から、NBGF2 は、Adenylyl(3'-5')Cytidine-3'-monophosphate(ApCp)と推定された。逆相 HPLC では、ApCp のほかに活性の強い画分が溶出したが、同定には至らなかった。ApCp の増殖活性のメカニズムは、不明だが核酸の中でアデノシンが最も強い活性を示すことから(Fig.4)、酵素的にアデノシンが分解され神経芽腫細胞に作用し増殖を促進すると考えられる。今回の研究でヒト神経芽腫細胞は、プリン、ピリミジンヌクレオチドの生合成において *de novo* 経路が何らかの機能不全に陥っていることが示唆された。

(References)

(1) Asai K., et. al., (1991), Brain Res., 556,344-348. (2) Hotta T., et. al.,(1992), J. Neurochem., in press.

(3) Asai K., (1992), J. Neurochem., 59, 307-317.

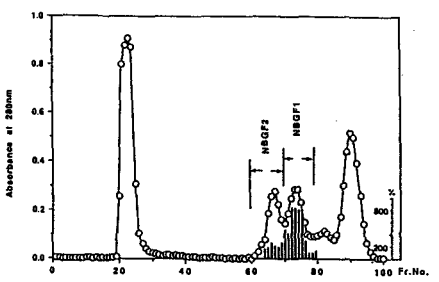


Fig.1 ゲル濾過(Bio-Gel P-10)

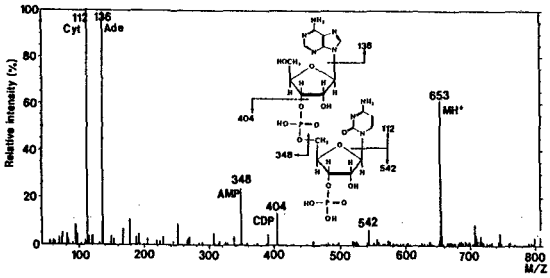


Fig.2 精製NBGF2のマススペクトル

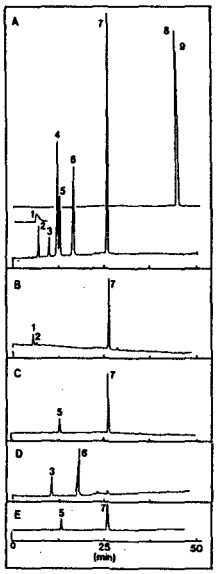


Fig.3 精製NBGF2と酵素分解物の逆相クロマトによる分離

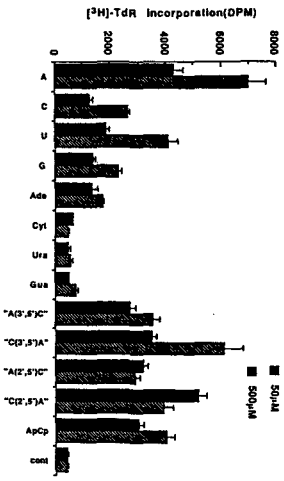


Fig.4 標準ヌクレオチドの神経芽腫細胞に対する生物活性

177 興奮性アミノ酸神経毒性を抑制する筋由来因子の作用機構の解析

山本智浩、田口隆久
（大阪大学基礎工学部生物工学科）

〔要約〕

昨年度報告したように、ニワトリ胚終脳神経細胞の初代培養系においても興奮性アミノ酸神経毒性が観察され、さらにこの毒性がニワトリ脚筋由来の因子により抑制される。我々の培養系におけるこの毒性の発現機序を詳しく調べたところ、グルタミン酸の他にアスパラギン酸も同様な毒性を示し、またカイニン酸はさらに強い毒性を示した。一方、ＮＭＤＡは、５ｍＭまでの範囲で毒性を示さなかった。さらに、このカイニン酸の毒性は、そのアンタゴニストであるＣＮＱＸでほぼ抑制された。これらの事実は我々の系における毒性発現がｎｏｎ－ＮＭＤＡタイプのグルタミン酸受容体を介していることを示している。しかし、グルタミン酸の毒性はＣＮＱＸでも全部抑制されることはなく、シスチンの共存により初めて１００％抑制が達成される。このことは、シスチンとグルタミン酸の対向輸送系もこの毒性に関与していることを示している。興味深いことに、我々の見いだした因子は、グルタミン酸の毒性を完全に抑制する。

脳の神経細胞は他の器官の細胞と異なり、個体の寿命と同期間生存するという著しい特性を示す。この性質の実現のための機構の解明は基礎と臨床医学の両面から関心を集めている。すでに報告したように（１，２）我々の用いているニワトリ胚終脳神経細胞の培養系においても、培養条件を工夫することにより顕著な興奮性アミノ酸神経毒性が観察された。さらに興味深いことに、この毒性は筋由来の因子により完全に抑制されることが示された。今回は、さらにこの毒性発現の機構と筋由来因子の関連性を解析したので報告する。

【方法】　ニワトリ胚（stage 25）より終脳を実体顕微鏡下で切り出し、トリプシン処理で細胞を解離し、25,000 /cm^2 の密度で培養した。培養液は２倍希釈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物を用いた。薬物や因子は、培養開始３時間後に加えた。この時点での細胞数を１００％と定義し、以後各時刻に同一培養ウェルに残存する細胞数を計測した。筋由来因子は、８日令のヒヨコ脚筋をプロテアーゼ阻害剤を含む４倍量のＨＥＰＥＳ緩衝液中でホモゲナイズし、遠心後の上清として得られる筋抽出液をゲルろ過にかけて高分子量成分を除いた物として調製した。

【結果】　興奮性アミノ酸の神経毒性の発現機構として第一に考えられるのが、グルタミン酸受容体の関与である（３）。この点について確認するために、アスパラギン酸、カイニン酸、ＮＭＤＡの神経毒性を調べた。図１に示したようにアスパラギン酸はグルタミン酸よりは弱いが毒性を示し、カイニン酸は強い毒性を示した。これらの毒性に対し、筋由来の因子は完全な抑制効果を示した。これに対し、ＮＭＤＡは５ｍＭまでの範囲では毒性を示さなかった。グリシン存在下で実験してもこの結果は変わらなかった。これらの結果は、我々の培養系でみられる神経毒性がｎｏｎ－ＮＭＤＡタイプのグルタミン酸受容体を介したものであることを示唆している。このことを確認するためにＣＮＱＸをカイニン酸と同時に添加したところ、毒性の抑制が観察されたが、グルタミン酸と同時にＡＰＶを添加した実験においてはなんら抑制が観察されなかった（図示せず）。

さらに興味深いことには、図２に示したようにグルタミン酸毒性に対するＣＮＱＸの効果は７０％程度の抑制に留まった。このことは、グルタミン酸毒性の発現機構がｎｏｎ－ＮＭＤＡタイプのグルタミン酸受容体を介したもの以外にもあることを示している。興奮性アミノ酸の毒性発現機構には受容体を介したもの以外にシスチンとグルタミン酸の対向輸送体を介したものもあることが提案されている（４）。図２に示したように、シスチンとＣＮＱＸの両者を培養系に添加した際にはほぼ完全にグルタミン酸の毒性を抑制した。これと同様の抑制は筋由来の因子のみの添加によっても達成できる。また、カイニン酸を用いた実験においては、シスチンはほとんど抑制効果を示さなかった。これらの結果は、我々の系で観察されるグルタミン酸毒性が２つの経路を介して発現していることを示している。

【考察】　上述の結果からｎｏｎ－ＮＭＤＡタイプのグルタミン酸受容体の毒性発現への関与が明らかになった。アスパラギン酸とＮＭＤＡの効果は、アスパラギン酸がＮＭＤＡタイプの受容体のアゴニストであるという通説と矛盾するが、ＡＰＶを用いた結果から、ＮＭＤＡタイプの受容体の関与はないものと考えている。図２で得られた結果からカイニン酸感受性神経細胞の比率を見積もることは原理的には可能だが、まだ結果の精度が十分ではない。今後は、２つの毒性発現経路の細胞内での解明が重要になる。細胞内カルシウムイオンと還元状態のモニターの準備を進めている。このような２つの経路を同時に抑制する筋由来因子の同定がもっとも興味のあるテーマである。現在、それをめざした実験を行っているが、ペプチドである可能性は減ってきている。

【文献】（１）山本、田口（1991）神経化学　30 250-251
（２）Yamamoto,T. and Taguchi,T. (1992) Neurosci.Lett. 139 205-208
（３）Koh,J. et al. (1990) J.Neurosci. 10 693-705
（４）Murphy,T.H. et al. (1989) Neuron 2 1547-1558

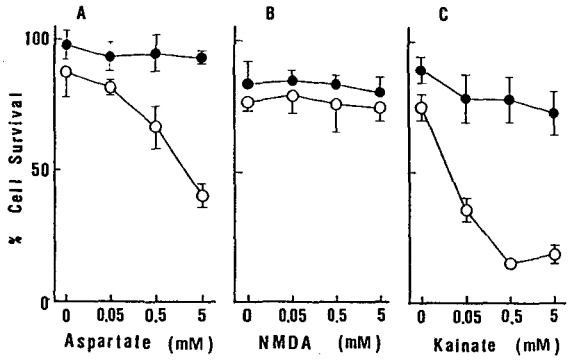


図１　グルタミン酸関連物質の神経毒性。アスパラギン酸、ＮＭＤＡ、カイニン酸の終脳神経細胞の生存への影響を示している。白丸は筋由来因子なし、黒丸はありの結果である。細胞数は５日間の培養後計測した。

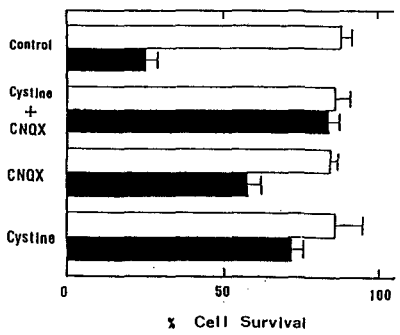


図２　グルタミン酸毒性に対するシスチンとＣＮＱＸの効果。０．０１ｍＭのＣＮＱＸと１ｍＭシスチンの３ｍＭグルタミン酸の毒性に対する効果を調べた。白抜きバーはグルタミン酸なし、黒塗りバーはありの結果を示している。細胞数は５日間の培養後に計測した。

178 活性化アストロサイトの中隔野コリン作動性ニューロンに対する作用について

左合正周、吉田一成、若本寛起、大谷光弘、戸谷重雄
（慶應義塾大学医学部脳神経外科）

〔要約〕
中枢神経系においてアストロサイトが担っている役割に関しては未だ不明の点が多いが、in vitroにおいて脳損傷の際に誘導されると考えられる種々のサイトカインがアストロサイトに作用しＮＧＦ産生を増強することより、脳損傷時に神経機能の維持、回復に重要な役割を担っていると推測される。今回我々は、ニューロンとアストロサイトのco-culture系において活性化されたミクログリアが産生するＩＬ-１β、ＴＮＦαがコリン作動性ニューロンに対しtrophic activityを有することを明かにした。これは、アストロサイトを介する間接作用であり、ＩＬ-１β、ＴＮＦαがアストロサイトのＮＧＦなどのtrophic factor産生を促進したためと考えられた。また、ＮＧＦ deprived cholinergic neuronにおいてＩＬ-１β、ＴＮＦαがアストロサイトを介して神経の変性を防ぎ、分化を促進することが明かとなった。

＜はじめに＞
中枢神経系においては前脳基底野のコリン作動性ニューロンがＮＧＦ感受性であり、正常脳ではその標的となる神経細胞がＮＧＦを産生し、ＮＧＦは軸索内を逆行性輸送されると考えられている[1]。ラットの海馬ー中隔間の神経細胞路を切断すると中隔の神経細胞が壊死に陥るが、切断前後にＮＧＦを脳室内投与しておくと神経細胞死が抑制されることから、外因性ＮＧＦ投与が神経損傷の治療となる可能性が示される[2]。また、我々はこれまでに、in vitroの実験系において脳内に存在するＦＧＦ、ミクログリアの産物であるＩＬ-１β、ＴＮＦαがアストロサイトのＮＧＦ産生を促進することを明かにしたが、これらのサイトカインが、脳損傷修復に関し、重要な役割を担っていると考えらる[3,4]。今回は、中隔野から海馬に投射するコリン作動性ニューロン（Septohippocampal neuron）のin vitroモデルを作成し、このモデルにおいてＩＬ-１β、ＴＮＦαがアストロサイトを介し、障害された神経機能の回復を促進すると考えられたので報告する。

＜方法＞
ラット新生仔海馬の初代組織片培養から、酵素処理により継代したアストロサイトを10％ＦＣＳ添加ＤＭＥを用い、poly-L-lysine処理した24-well plateにて培養した。confluentに達したアストロサイトの上に、胎生16-17日目のラット中隔野ニューロンを0.5×10^{6}/ml/wellの細胞密度で培養した。この時点で培地は1％ＢＳＡ添加Ｎ２に交換した。この培養系を用い、以下の実験を行った。コリン作動性ニューロンの機能の指標としてcholine acetyltransferase(ChAT)活性の測定を行った。
１）この系においてＩＬ-１β、ＴＮＦα、ＴＧＦ-β１、およびその組合せを添加しＣｈＡＴ活性を測定した。
２）ＮＧＦ存在下で培養後、ＮＧＦを除去し、代わりにＩＬ-１β、ＴＮＦαを添加しＣｈＡＴ活性を測定した。

＜結果＞
１）ＩＬ-１β、ＴＮＦαの両者を加えて添加したものはＮＧＦ添加とほぼ同様のレベルまでＣｈＡＴ活性の増強がみられた（図１）。ＩＬ-１β、ＴＮＦαの作用は飽和量のＮＧＦと相加効果はなく、抗ＮＧＦ中和抗体により抑制されることから、アストロサイトにより産生されるＮＧＦを介する間接作用であることが示唆された。
２）ＮＧＦ存在下で培養した後、ＮＧＦ除去したものはＣｈＡＴ活性は低下したが、ＩＬ-１β、ＴＮＦαを添加したものはさらに増強が認められ、ＮＧＦ除去によるコリン作動性ニューロンの変性を防ぎ、分化を促進することが明かとなった（図２）。

＜考察＞
我々は、in vitroにおいてａおよびｂＦＧＦ、ＩＬ-１β、ＴＮＦα、ＴＧＦ-β１、ＥＧＦなどのサイトカインがアストロサイトのＮＧＦ産生を促進し、さらにａＦＧＦ、ＩＬ-１β、ＴＮＦα、ＴＧＦ-βＩが強調的に作用することを明かにしてきた[3,4]。これらのサイトカインにより活性化されたアストロサイトにより産生されるＮＧＦは脳に損傷が加わ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している。今回の研究の結果、アストロサイトとコリン作動性ニューロンのco-culture系においてＩＬ-１β、ＴＮＦαを組合せ添加することにより、ＮＧＦ添加とほぼ同様にＣｈＡＴ活性を増強することが明かとなった。ニューロンのみの選択的培養系においては、ＩＬ-１β、ＴＮＦαを添加してもＣｈＡＴ活性の増強は認められなかった。さらに、ＮＧＦ

存在下に培養後、ＮＧＦを除去することにより神経細胞障害モデルを作成し、ＩＬ-１β、ＴＮＦαを添加したところ、非添加ではＣｈＡＴ活性が低下したのに対し、添加したものではさらに増強が認められ、神経細胞の変性を防ぎ、分化を促進したと考えられた。これは、ＩＬ-１β、ＴＮＦαがアストロサイトによるＮＧＦなどのneurotrophic factorの産生が促進された結果と考えられた。

＜結論＞

ＩＬ-１β、ＴＮＦαはＮＧＦの供給を断たれたコリン作動性ニューロンに対し、アストロサイトを介してtrophic activityを有し、障害された神経機能の回復を促進する可能性が示唆された。

図１

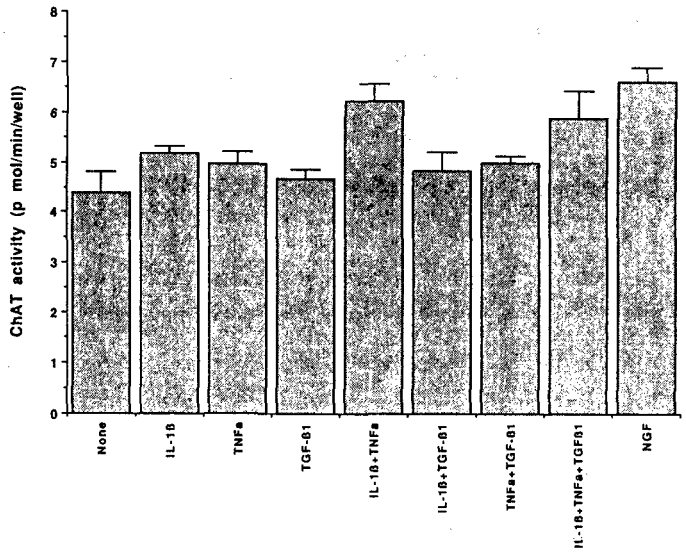
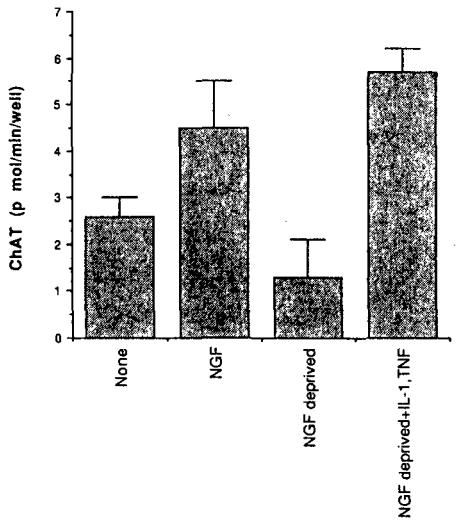


図２



1)Korsching, S. et al. (1985) EMBO J 4, 1389-1393
2)Williams,L.R. et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83, 9231-9235
3)Yoshida, K and Gage, F.H. (1991) Brain Res 538, 118-126
4)Yoshida, K and Gage, F.H. (1992) Brain Res 569, 14-25

179 神経成長因子（NGF）遺伝子発現調節の分子機構

○尾前二三雄１　勝俣東子１　古川美子２　古川昭栄２
１；三井東圧化学ライフサイエンス研　　２；岐阜薬大分子生物

〔要約〕
神経成長因子（NGF）遺伝子発現調節の分子機構解明を目的として培養マウスアストログリア細胞でtransient expression assayを行い、マウスNGF遺伝子の5`-非翻訳領域の解析を行った。その結果、マウスNGF遺伝子の5`-非翻訳領域はプロモーター活性を持つこと、またその活性はc-fos, c-jun遺伝子を同時に発現させたときに活性化されること、さらにその活性化はAP-1結合部位が存在するときにより顕著であることが明らかになった。この結果は、既に我々が確認している、カテコール化合物によりc-fos、c-jun mRNAが誘導されることとあわせて考えた場合、「カテコール化合物はまず細胞内でFos、Jun蛋白合成を誘導し、これらがAP-1を形成してNGF遺伝子の1stイントロンに存在するAP-1結合部位に結合することによって、NGF遺伝子の発現を誘導する。」という仮説を強く支持するものと考えられる。

【目的】
我々は、これまで培養マウスアストログリア細胞に於てカテコール化合物がNGF合成を促進すること、フォルボールエステルが単独で弱いNGF合成促進効果を持ち、カテコール化合物と共存させることによって著しい合成促進効果を持つことを示してきた。カテコール化合物によるNGF合成誘導は、カテコール化合物が何らかの形でNGF遺伝子の発現をコントロールしているからであると考えられる。一方、フォルボールエステルがNGF合成促進に関与していることから、NGF合成誘導には、プロテインキナーゼCを介した細胞内情報伝達経路が関与していることが示唆される。これまでの解析で、カテコール化合物によるNGF mRNAの誘導にはそれに先立つ細胞内の蛋白合成が必須であること、さらに、NGF mRNAの誘導に先立ち、c-fos、c-jun mRNAが誘導されることを明らかにした。これらの事実から、我々は以下の仮説を提示した。「カテコール化合物はまず細胞内でFos、Jun蛋白合成を誘導する。次に、これらの蛋白質がAP-1を形成してNGF遺伝子の1stイントロンに存在するAP-1結合部位に結合することによって、NGF遺伝子の発現を誘導する。」本研究は、マウスNGF遺伝子の5`-非翻訳領域の解析を行うことにより、上記の仮説を実証することを目的とした。

【方法】
マウスアストログリア細胞の培養は古川らの方法(1)に従った。DNA transfectionは、Lipofectin Reagent(BRL)を用いて行なった。分泌型alkaline phosphatase(SAP) geneは、ヒトplacental alkaline phosphatase cDNA(2)のtransmembrane domainの直前にtermination codonを導入することにより作成した。Alkaline phosphatase活性は、発光基質AMPPD(TROPIX)を用いLuminous CT-9000(中央化学)で測定した。マウスNGF遺伝子5`-非翻訳領域は、Selbyらにより示された塩基配列(3)を元に合成したプローブを用いて、マウス遺伝子ライブラリー(Clontech ML1009d)よりクローニングした。c-fos, c-jun cDNA expression plasmid、及びNGFpromoter deletion mutantは図-1, 2に示すように作成した。

【結果】
NGF遺伝子の5`-非翻訳領域の解析を行なうために、まず、レポーター遺伝子として分泌型alkaline phosphatase(SAP)を用いる系を作成した。培養液中に分泌されたSAPの活性は、発光基質AMPPDを用いることにより高感度に測定することができた。
次に、図-1, 2に示すようにNGF遺伝子5`-非翻訳領域のdeletion mutantを作成し、マウスアストログリア細胞でtransient expression assayを行なった。プロモーター活性はSAP活性(μU/ml)で示してある。mRNA start siteより上流-4700 bpまでを含む領域は明らかなプロモーター活性を示していた(図-2、pdl-4700-SAP)。さらに、この上流領域を除いていくと、プロモーター活性が増加し、特に上流-119 bpから-788 bpの間で顕著な増加が見られた(図-2)。これらのことから、NGF遺伝子プロモーターの上流-119 bpから-788 bpの間には、サイレンサーの存在が示唆される。
NGF遺伝子の1stイントロンにはAP-1結合部位が存在する(図-2)。上流-1881 bpまでを含む領域では、AP-1結合部位の存在によりプロモーター活性に変化は見られなかった(図-2)。これに対して、上流-788 bpと、-275 bpを含む領域の場合は、AP-1結合部位の存在によりプロモーター活性がそれぞれ2-3倍増加していた(図-2)。この結果から、AP-1結合部位は、-788 bpより上流がない場合NGF遺伝子発現を増加させる働きを持っていることがわかった。
さらに、c-fos, c-junの発現が、NGF遺伝子のプロモーター活性にどのような影響を与えるかを調べるため、図-1に示すような発現プラスミドを作成して、NGFプロモーターを含むプラスミドと共にco-transfectionし、上流-1881 bp、-788 bp、-275 bpを含む領域についてそれぞれ、AP-1結合部位がある場合とない場合とを比較した。その結果、c-fos, c-junのco-transfectionによるプロモーター活性の増加は、AP-1結合部位がない場合はNGFプロモーター単独の場合と比べて2-3倍であったが、AP-1結合部位が存在すると7-13倍の増加が見られた(図-3)。一方、c-fos, c-junそれぞれ単独では、AP-1結合部位の有無にかかわらず、プロモーター活性の増加は見られなかった。

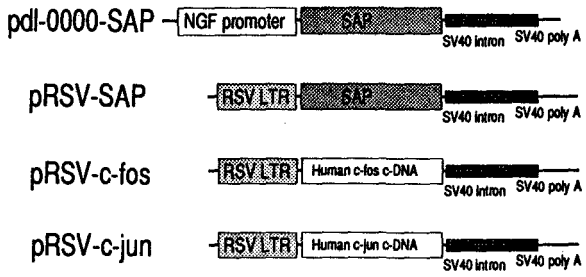


Fig-1 Structures of SAP, c-fos, and c-jun Expression Plasmids

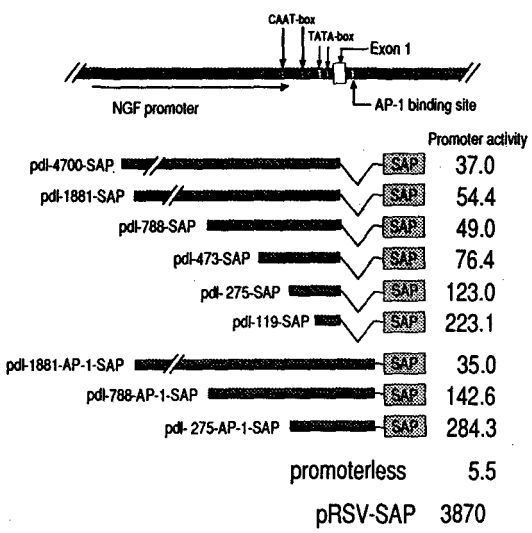


Fig-2 Deletion Analysis of NGF Promoter Region

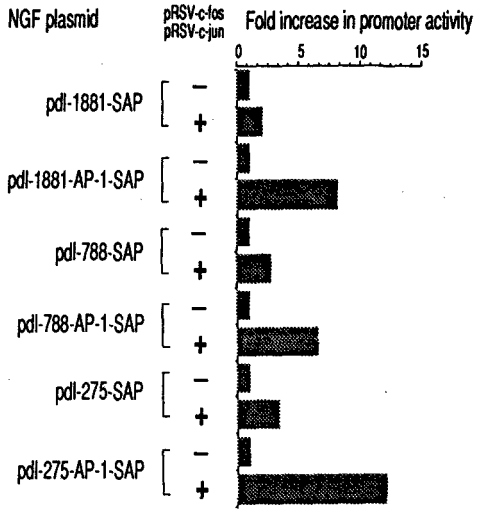


Fig-3 NGF Promoter Activation by pRSV-c-fos and pRSV-c-jun co-transfection

【考察】

NGF遺伝子プロモーターの上流領域には、サイレンサーが存在すると思われる。また、NGFプロモーターは、c-fos, c-junのco-transfectionにより活性化されるが、その活性化はAP-1結合部位の存在によりさらに増加する。このように、NGF遺伝子は正、負、両方のコントロールを受けていると考えられる。

我々は、既にカテコール化合物によりc-fos, c-jun mRNAが誘導されることを確認している。これらの知見と本研究の結果から、細胞内でカテコール化合物により合成を誘導されたFos、Jun蛋白がAP-1を形成し、NGF遺伝子の1stイントロンに存在するAP-1結合部位に結合することによってNGFプロモーターを活性化するという機構がNGF遺伝子発現の誘導に大きく関与している可能性が示唆された。

【参考文献】

(1)Furukawa, S., Furukawa, Y., Satoyoshi, E. and Hayashi, K.(1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 1048-1054

(2)Millan, J. L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 3112-3115

(3)Selby, M. J., Edwards, R., Sharp, F. and Rutter, W. J. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 3057-3064

180 てんかん性Ｅ１マウス脳のキノリン酸合成酵素の性質

浅井広志*，鬼頭純三**，高橋史郎***，溝渕稔***，黒田智子***，中野紀和男*

(* 名大農・生化学制御，**名大医・実験動物センター，*** 塩野義製薬研究所)

〔要約〕

てんかん症がどのような機構で起こるかはまだほとんどわかっていない。われわれは点頭てんかんの代表的モデル動物とされるＥｌマウスを用い、その脳での神経毒として知られるキノリン酸の代謝を調べた。その結果、Ｅｌマウス大脳皮質のキノリン酸合成酵素の活性は対照のｄｄＹマウスにくらべ著しく高いことがわかった。Ｅｌマウスの大脳皮質と海馬、小脳、および脳幹での本酵素活性には相違がなかった。基質である３－ヒドロキシアントラニル酸にたいするＫｍには両マウス間で差は見られなかった。キノリン酸分解酵素の活性は合成酵素活性の１万分の１程度しかなく、マウス種間の差もないことなどが見出された。また実際に大脳皮質のキノリン酸濃度を測定したところ、ＥｌマウスではｄｄＹマウスの約２倍以上の高値を示した。

〔序〕

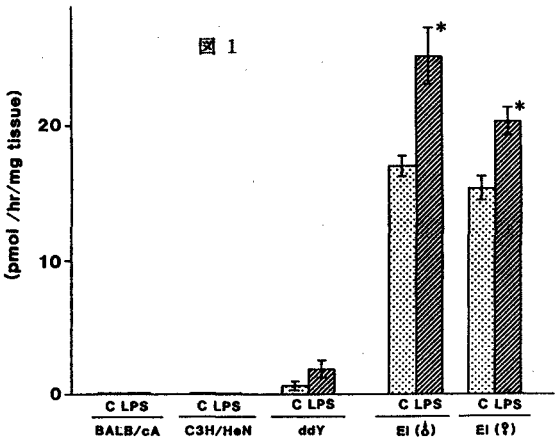
てんかん症はまず原初変化とも呼ぶべき最初の反応が起こり、それが次々とさまざまな神経機能を変化させ、最終的に発作に至るものと考えられる。一方、てんかん症が遺伝子の異常によって起こることは、遺伝的にてんかんを起こしやすいモデル動物がいることから推定できる。しかしこれらの動物の遺伝子異常の内容についてもまだまったく不明である。われわれは本研究において、点頭てんかんのモデル動物とされるＥｌマウスを用い、神経毒（Excitotoxin）として知られる（文献１）キノリン酸の代謝を調べた。

〔実験〕

近交系Ｅｌマウス、および対照のｄｄＹマウスは本学医学部動物実験施設で繁殖したのを用いた。キノリン酸合成酵素として脳各部の３－ヒドロキシアントラニル酸３、４－ジオキシゲナーゼ（3-HAOxase, EC 1.13.11.6）活性を、分解酵素としてキノリン酸フォスフォリボシルトランスフェラーゼ（QPRTase, EC 2.4.2.19）を測定した。大脳皮質キノリン酸濃度はＧＣ－ＭＳ法を使って定量した。

〔結果〕

図１に約６週齢マウスの大脳皮質中 3-HAOxase を測定した結果を示す。図から明らかなように、Ｅｌマウスでは対照のｄｄＹマウスの約１７倍の高値を示した。しかし性差はほとんど見られなかった。



つぎに体内の免疫系が活性化されたときの本酵素の活性変化を調べるため、グラム陰性菌内毒素（ＬＰＳ）を投与した。その結果本酵素活性は未投与群に比べて明らかに上昇した。一方基質である３－ヒドロキシアントラニル酸にたいするＫｍを測定したところ、Ｅｌマウスで約２．６μＭでラットで求めた値（文献１）と差はなかった。またＥｌマウスの大脳皮質と脳幹、小脳、海馬の間で本酵素活性の差は見られなかった（データ省略）。ＢＡＬＢ／Ｃマウス、Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスでは本酵素の活性はほとんど検出できなかった（図１）。Ｅｌマウス大脳皮質での本酵素活性は加齢と共にゆっくり上昇し、７ケ月齢では６週齢の１．８倍になった。ｄｄＹマウスでもやや増加したがＥｌマウスとの差は依然として大きかった（データ省略）。

つぎに末梢組織の例として脾臓の 3-HAOXase の活性を調べたところ、Ｅｌマウスでは脳の約２０倍も高かった。ｄｄＹマウスでは脳での本酵素の活性が著しく低かったのに対し、脾臓ではＥｌマウスとほとんど変わらない高い活性を示した（データ省略）。

QPRTase 活性はＥｌ、ｄｄＹマウスとも 3-HAOxase 活性の約１万分の１と著しく低く、両群で差はみられなかった（図２）。

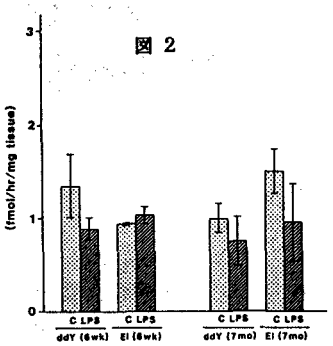


図２

そこで脳での実際のキノリン酸濃度を測定した。その結果を表１に示す。表から明らかなように、Ｅｌマウス大脳皮質のキノリン酸濃度は対照のｄｄＹマウスの約２倍の高値を示した。

（考察）

以上の結果からてんかんモデルのＥｌマウスでは脳での神経毒であるキノリン酸合成酵素の活性が対照のｄｄＹマウスに比べて明らかに高いことがわかった。これに対し分解酵素である QPRTase 活性は合成酵素に比べて著しく低く、両群で差が見られなかった。これらの事実から脳のキノリン酸の生成量は合成酵素の活性によって決まるものと考えられる。そこで実際にキノリン酸量を測ってみると、たしかにＥｌマウス脳ではｄｄＹマウスの約２倍と高かった。これらの事実からてんかんモデルのＥｌマウスの脳ではキノリン酸の生成量が大きいものと判断される。両群のマウスのキノリン酸合成酵素活性の差にくらべて実際のキノリン酸量が低いのは、実際の脳では基質である３－ヒドロキシアントラニル酸の濃度が酵素のＫｍ（約２．６μM）値に比べて低く、それによってもキノリン酸の生成量が影響を受けるのではないかとも考えられる。事実われわれはすでに、末梢にトリプトファンを投与すると脳内のキノリン酸濃度が明らかに増加すること、すなわち脳内では基質飽和ではないことを認めている（データ省略）。

正常のｄｄＹマウスの脳でのキノリン酸合成酵素の活性がＥｌマウスと比べて著しく低いのに対し、末梢組織である脾臓ではＥｌマウスと変わらないほど高いことは興味深い。というのはこの酵素は本来トリプトファンからＮＡＤが作られる重要な経路に位置する。しかし脳ではキノリン酸が神経毒になりうるため、その生成が抑えられていなければならないはずである。これが正常マウスでは本酵素の活性が低いことの理由であると考えられる。しかるにＥｌマウスでは遺伝的な欠陥のために本酵素の活性が高くなってしまったのではないかと考えられる。これが当マウスのけいれん準備状態に関連しているとも考えられる。

第１表　大脳皮質キノリン酸濃度
(pmol/g)

ＤＤＹ	１６．５±０．５＊
Ｅｌ	３４．１±３．７＊＊

＊Ｍｅａｎ＋ＳＥＭ，＊＊ｐ＜０．０１

（参考文献）

1) Okuno, E. et al. J. Nuerochem. 49: 771-780 (1987).
2) Heyes, M. P. et al. Brain Research 491: 173-179 (1989).
3) Nakano, K. et al. Brain Research 572: 1-4 (1992).

181 Ｅ１マウスの痙攣による脳内β－エンドルフィンの経時的変化

片山雅文、大西　博、甲斐利弘、山上　栄
（大阪市大、医、神経精神）

〔要約〕
痙攣とβ－エンドルフィン（β-EP）の関係を明らかにするため、遺伝てんかんモデルのE1マウスの痙攣前後のβ－エンドルフィン様免疫活性（β-EP-LI）をradioimmunoassay（RIA）で測定し、その経時的変化を検討した。週１回の放り上げにより痙攣履歴を重ねたE1(+)のβ-EP-LIは、扁桃核、中隔野、視床、橋－延髄および下垂体において痙攣１分後に減少し、180分後には痙攣前のレベルに回復した。視床下部では、E1(+)では痙攣後１分で減少せず痙攣60分後には痙攣前より増加し、180分後でも増加していた。痙攣履歴のないE1(o)の視床下部では放り上げ刺激60分後にβ-EP-LIは減少したが他の部位では差がなかった。これらよりE1マウスの脳内β-EPは痙攣により線維終末より速やかに放出され、視床下部の細胞体でのβ-EPの合成は痙攣後に過剰となり、代謝が亢進していることが示唆された。E1マウス脳のエンドルフィン系は痙攣により変化し、その病態に関与するものと推測された。

オピオイドペプチドは疼痛、情動、ストレスなど多様な生理反応に関与するが[6]、痙攣との関係もよく知られている。我々は昨年の本学会においてオピオイドペプチドの一種であるβ-EPが、遺伝性てんかんモデルであるE1マウスの発作間歇期の脳で母系のddYマウスに比べ増加していることを報告した[7]。今回、E1マウスの痙攣前後における脳内β-EPをRIAで測定し、その経時的変化に検討を加えた。

［方法］　実験動物は、生後28日から１週毎に40回の放り上げ刺激を加え、75日以後強直間代痙攣を起こすE1(+)マウスと、放り上げ刺激を加えず痙攣履歴の無いE1(o)マウスで、共に生後150日のものを用いた。E1(+)は放り上げ刺激を加える直前（痙攣前＝0分）、20回の放り上げ刺激で強直間代痙攣に至らず不全発作を示す鳴声（twich）を発した時点（abortive seizure）、40回の放り上げで強直間代痙攣を起こした時点から1分、10分、60分、180分後の各時間で断頭した。E1(o)は平常時（0分）と40回の放り上げ刺激を加えて60分後に断頭した。脳を摘出し４℃で扁桃核、中隔野、視床、視床下部、橋－延髄を切り出し、またトルコ鞍部から下垂体を摘出した。各標本に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、上清からSep-Pak C_{18} cartridgeを用いてアセトニトリル：0.05%トリフルオロ酢酸（1:1, v/v）混液でペプチド画分を溶出した。凍結乾燥後、assay buffer（50mM sodium phosphate (pH 7.4), 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（交差反応性はβ-EP-(1-27)は4%、β-lipotropinは1～2%、leucine enkephalinは0.6%、methionine enkephalin、dynorphin-(1-8)、dynorphin-(1-17)、substance Pは0.1%以下）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。

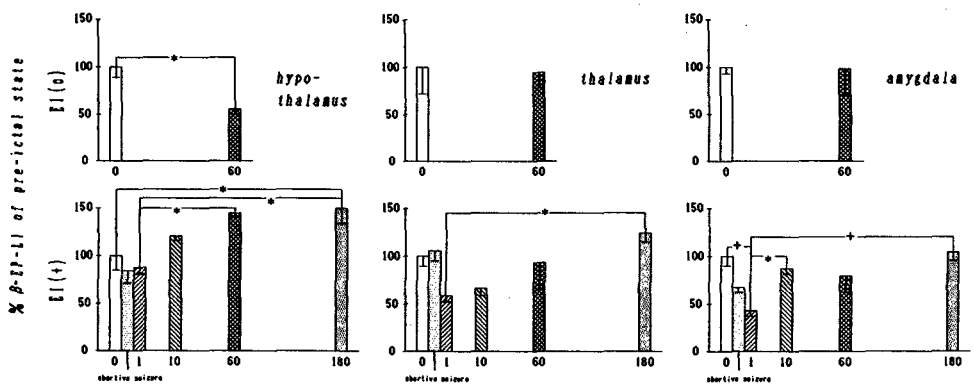
［結果］　E1(+)、E1(o)のβ-EP-LI（mol/g protein）は共に、痙攣前（＝0分）のβ-EP-LI値に対する比率で%表示した（Fig. 1）。E1(+)のβ-EP-LIは、視床下部では痙攣10分以後徐々に増加し、180分後には痙攣前よりも有意に高値となった。視床では痙攣1分後に減少傾向となり、以後180分まで徐々に痙攣前のレベルまで増加した。扁桃核でも痙攣1分後に有意に減少し10分後に増加、180分後には痙攣前のレベルまで達した。中隔野では痙攣1分後に有意に減少し10分後には増加、60分後にはさらに増加し痙攣前よりも有意に高値となり、180分後には痙攣前のレベルに達した。橋－延髄では発作1～60分後まで有意に減少し、以後180分で増加傾向を示した。下垂体でも痙攣1分後には有意に減少し、10分以後には痙攣前のレベルまで増加した。E1(o)のβ-EP-LIは、視床下部では放り上げ刺激60分後で有意に減少したが、他の部位では変化がなかった。

［考察］　E1(o)の結果は単純な物理的刺激である放り上げ刺激のみの影響を示し、E1(+)では放り上げに加え痙攣の影響を示すと考えられる。E1(o)のβ-EP-LIは放り上げ刺激で視床下部でのみ減少しており、foot-shockにより視床下部のβ-EP含量が減少するという報告[7]に類似するが、この部位のβ-EPは放り上げのような物理的刺激と関係が深いことが推察される。脳のβ-EP含有ニューロンは視床下部の細胞体から扁桃核、中隔野、視床、橋－延髄などに線維終末を送ることが知られるが[1]、E1(+)ではその線維終末部のβ-EP-LIは痙攣1分後に減少しその後増加しており、視床下部

のEl(+)のβ-EP-Llは痙攣直後も減少せずむしろ60～180分後では増加していた。これはβ-EPの線維終末からの急激な放出と細胞体からの補充を示すと考えられる。60分後には中隔野のβ-EP-Llは痙攣前のレベルを上回り、橋－延髄では1分後とほとんど変化がなく、細胞体からの供給は各線維終末間で時間差があるようである。痙攣180分後には線維終末部のβ-EPは痙攣前レベルにほぼ落ち着くように思われる。El(+)の視床下部におけるβ-EPの合成亢進はEl(o)の結果とは対照的であり、マウスに対する放り上げよりはその痙攣による影響と考えられるが、単回の電撃痙攣では視床下部のβ-EP含量が減少傾向であったとの報告[5]もあり、電撃痙攣とElの痙攣の差異を反映しているのかも知れない。以上のように、El(+)マウスでは下垂体や脳のβ-EPは痙攣毎に放出と産生を繰り返しており、β-EP系の代謝が亢進していると推測される。電撃痙攣の反復[2)5)]やキンドリングモデル[4)]において、痙攣の有無で脳内β-EP量に差がなくβ-EPと痙攣との関連を疑問視する報告がある。我々も発作間歇期のEl(+)とEl(o)の間で脳内β-EP量は脳の各部位で差がないことを報告したが[3)]、今回の成績からは痙攣を反復したものと痙攣履歴のないものとでは、β-EP含有ニューロン全体の機能が異なる可能性が示唆される。Elマウス脳のエンドルフィン系は痙攣により影響を受け変化し、Elの痙攣の病態に関与するものと考えられる。

［文献］ 1) Barchas, J. D. et al. (1978) Science 200, 964-973 2) Hong, J. S. et al. (1979) Brain Res. 177, 273-278 3) 片山雅文ほか (1991) 神経化学 30, 454-455 4) Kato, N. et al. (1983) Life Sci. 32, 2415-2422 5) Lason, W. et al. (1987) Brain Res. 403, 301-307 6) Olson, G. A. et al. (1984) Peptides 5, 975-992 7) Rossier, J. et al. (1977) Nature 270, 618-620

【Fig. 1】 Alteration of β-EP-Ll (mol/g protein) after convulsion of El mouse. *:P<0.05, +:P<0.01



182

自然発症てんかんラットのてんかん様発作発現と脳内アミノ酸およびモノアミン遊離の週齢変化

神田知之、黒川昌子、中村譲治、石井昭男、
笹　征史＊
（協和発酵・医薬研、＊広島大・医・薬理）

〔要約〕
自然発症てんかんラット（Spontaneously epileptic rat: SER)の強直性けいれんと脳内アミノ酸およびモノアミン遊離量との週齢変化について脳微量透析法を用いて検討を行った。強直性けいれんをほとんど発現しない8週齢SERに比べ、発現頻度の高い18週齢SERでは、海馬興奮性アミノ酸遊離量は高値を示した。一方、線条体モノアミン遊離量については18週齢のSERにおいて8週齢SERよりもドーパミンおよびその代謝産物遊離量が低値を示した。以上の結果よりSERにおいてはけいれん準備性の獲得（加齢）に従い興奮性神経伝達の亢進と抑制性神経伝達の減弱が起きていると考えられた。この様な神経伝達物質の異常によってSERの強直性けいれんが発現する可能性が示唆された。

緒　言

SERは、振戦を示すtremorラットとzitterラットより見いだされた二重突然変異動物である（1）。SERは加齢とともに強直性けいれん、欠神様発作を一個体で発生し、これらの発作に対する各種抗てんかん薬の効果が臨床におけるヒトの強直－間代性発作および欠神発作における成績と一致するため有用なてんかんモデル動物であると考えられている（2）。てんかんの発作発現機序には脳内の神経伝達物質の異常が考えられており、SERの神経伝達物質の検討は、てんかん発症機序の解明に重要な知見を与えると考えられる。本研究においてはけいれん発作発現に促進的に働くと考えられている興奮性アミノ酸と抑制的に働くと考えられているモノアミン遊離量について脳微量透析法を用いて検討した。

実　験　方　法

実験には京都大学医学部付属動物実験施設から譲渡された雌雄SERを個別ケージで飼育したものを用いた。また正常動物としては雄性Wistar系ラット（日本チャールスリバー供給）を用いた。8および18週齢時に動物をchloral hydrate (300 mg/kg i.p.)もしくはsodium pentobarbital (40 mg/kg i.p.)麻酔下で脳定位固定装置に固定した後、Paxinos & Watson（3）のアトラスに従い透析プローブ（エイコム社製；BDP-I）を片側線条体（A:0.5 mm, L:2.5mm from bregma; V: 6.8mm from dura）および片側海馬（P: 5.8mm, L: 4.5mm, V: 6.5mm)に挿入固定した。翌日Ringer液を2μl/minの流速で2時間以上還流してから実験に使用した。透析液はアミノ酸遊離量測定の場合は１０分毎に９回、モノアミン遊離量測定の場合は２０分毎に５回採取した。透析液は各々、HPLC-FLD及びHPLC-ECDによって分離定量した。

結　果

8週齢SERは触刺激を加えない場合には全く、加えた場合でも殆ど強直性けいれんを発現しなかった。18週齢の場合は触刺激を加えない場合でも、刺激によっても強直性けいれんを発現した。8週齢SERの海馬脳内アミノ酸遊離量と比べ18週齢SERにおいてはグルタミン酸およびアスパラギン酸の遊離量が有意に高値を示した（Table 1）。グリシンおよびタウリン遊離量には差が認められなかった（Table 1）。Wistar系ラットの場合は週齢間で興奮性アミノ酸遊離量に差は認められなかった（Table 1）。線条体モノアミン遊離量についてはSERの場合は8週齢に比

べ18週齢においてドーパミン遊離量の減少傾向が、またその代謝産物DOPACおよびHVA遊離量には有意な減少が認められた（Table 2）。セロトニン代謝産物5-HIAA遊離量は週齢間で差は認められなかった（Table 2）。Wistar系ラットの場合はドーパミン遊離量が18週齢で上昇した他は差が認められなかった（Table 2）。

考　察

SERにおいては加齢すなわちけいれん準備性の進展に伴い興奮性神経伝達物質（興奮性アミノ酸）の遊離量が増加していることが明かとなった。また、けいれん発現に対して抑制性の神経伝達物質であるドーパミン遊離量が減少傾向を示すこと、その代謝産物遊離量が減少していることが明らかにされた。これらの結果よりSERでは興奮性神経伝達の異常な亢進と抑制性神経伝達の減弱が同時に起こり、強直性けいれんを発現している可能性が示唆された。このような神経伝達物質遊離量の加齢にともなう変化がどのような機作によって起きているかは不明であり今後の検討が必要である。

Table 1 Age related changes of glutamate, aspartate, glycine and taurine release in the hippocampus of SER and Wistar rats.

		glutamate	aspartate	glycine	taurine
SER	8W	3.8 ± 0.6	2.3 ± 0.4	67.9 ± 11.6	12.0 ± 3.6
SER	18W	5.2 ± 0.6[a]	3.6 ± 0.5[a]	62.0 ± 6.8	9.3 ± 1.9
Wistar	8W	2.2 ± 0.7	1.1 ± 0.5	30.9 ± 4.3	8.6 ± 0.7
Wistar	18W	2.7 ± 0.3	1.4 ± 0.2	52.5 ± 9.5[a]	11.2 ± 2.1

(pmol/10min)

The means of basal release were calculated every ten minutes. Data show means and S.E. obtained from 6-8 animals. [a]:P<0.01 as compared with basal release of 8-weeks old rats.

Table 2 Age related changes of dopamine, DOPAC, HVA and 5-HIAA release in the striatum of SER and Wistar rats.

	dopamine	DOPAC	HVA	5-HIAA
	(fmol/20min)	(pmol/20min)	(pmol/20min)	(pmol/20min)
SER 8W	99.8 ± 21.1	35.2 ± 2.0	42.5 ± 4.4	8.3 ± 0.6
SER 18W	57.5 ± 12.0	21.6 ± 2.4[b]	16.4 ± 2.6[b]	9.2 ± 1.7
Wistar 8W	34.1 ± 4.4	26.3 ± 1.7	13.9 ± 4.5	8.1 ± 1.5
Wistar 18W	55.2 ± 4.3[a]	29.2 ± 1.9	15.9 ± 1.7	7.9 ± 1.4

The means of basal release were calculated every 20 minutes. Data show means and S.E. obtained from 5-9 animals. [a]:P<0.01, [b]:P<0.001 as compared with basal release of 8-weeks old rats.

文　献

1. Serikawa, T., Ohno, Y., Yamada, J. and Takaori, S. (1987) Lab. Anim. 21:68-71

2. Sasa, M., Ohno, Y., Ujihara, H., Fujita, M., Yoshimura, S., Takaori, S., Serikawa, T. and Yamada, J. (1988) Epilepsia 29:505-513

3. Paxinos, G. and Watson, C. (1982) The rat brain in stereotaxic coodinates, 2nd eds. Academic Press, New York.

183 EIマウスに於けるアロプリノールの抗けいれん作用と部位特異的SOD酵素活性誘導

村島善也，多田博史*，笠茂公弘**，篠崎たき子，中本百合江，諸岡啓一***，鈴木二郎****
（東京都精神研，国立療養所千石荘病院*，日大・医・精神神経**，東邦大・医・第一小児***，精神神経****）

〔要約〕
アロプリノールは一部の小児難治性てんかんに対して有効であり、特に、二次性全般化発作に優れた効果を発揮する。その作用機序についてアロプリノールはO_2^-産生を伴なうキサンチンオキシダーゼの阻害剤であることから、フリーラジカルとその消去酵素であるSOD(superoxide dismutase)の関与が示唆されている。そこで遺伝性の二次性全般化てんかんモデルであるEIマウスのけいれんに対するアロプリノールの効果とその作用機序について検討した。

アロプリノール抗けいれん作用のED_{50}は7.5mg/kgであった。75mg/kg投与により6時間後で発作は誘発されなくなり、この効果は24時間後まで続き、48時間後再び発作閾値は回復した。ddYのSOD活性は50-70mUで部位による差は殆どなかった。EI(+)のSOD活性は海馬では20mUと著しく低下しており、他の部位では60-80mUとむしろ高めであった。海馬ではアロプリノール投与後6時間で約5倍の100mUに上昇し、48時間後には50mUに戻ったが、他の部位では大きな経時的変動は無かった。以上の結果より、EIマウスにおけるアロプリノールの抗けいれん作用が明らかにされた。またその作用発現には海馬におけるフリーラジカルとその消去酵素であるSOD活性の酵素誘導が関与することが示唆された。

アロプリノールはキサンチンを尿酸に代謝するキサンチンオキシダーゼの阻害剤であるため、臨床的には高尿酸血症を伴う痛風の治療薬として用いられているが、De-Marco,P.ら[1]やTada,H.ら[2]は局在関連性、二次性全般化発作に対して有効と報告した。一方EIマウスは優れた遺伝性てんかんモデルであり、局在関連性部分てんかんで、二次性全般化発作をおこす。その脳内発作活動の起始には頭頂皮質が、また伝播全般化機構には海馬が重要で、焦点複合体を形成している。そこでこのEIマウスを用いて、アロプリノールのもつ抗けいれん作用について明かにし、さらにその作用機序についてフリーラジカル消去酵素であるSuperoxide dismutase(SOD)の経時的変化をたどることより酵素的に明らかにしようとした。

〔方法〕

ED_{50}の決定：生後3週齢より週一回の放り上げ刺激を与え、その発作閾値はきわめて低く、かつ安定しており、全例クラシから取りだし金網の上に於て10秒以内に発作を起こすようになったEIマウス（EI(+)）27匹を用いた。経口投与にて与えたアロプリノール量は 0.94、1.88、3.75、 7.5、15.0、30.0、60.0、そして 150mg/kg の計8点で、それぞれ3匹ずつ（7.5mg/kgのみ6匹）、投与後6時間で発作誘発刺激を行ない痙攣誘発閾値を決定した。

抗けいれん効果の時間経過の決定：ED_{50}の10倍量で、EI(+)18匹を用いた。75mg/kgアロプリノール経口投与後1、3、6、12、24、48時間後の6点で18匹のうちからそれぞれ3匹ずつ取り出してきて発作誘発刺激を行ない、けいれん誘発閾値を決定した。

脳内領野試料の作製：EI(+)28匹を用いた。75mg/kgのアロプリノール経口投与後発作がコントロールされた6時間後（10匹）と再び発作閾値が回復し、金網の上に乗せただけで発作を起こすようになった48時間後（9匹）に、頸椎脱臼後断頭し、コールドルーム中にて氷上で脳をとりだした。ステンレス製の脳刃のみぞで2mm間隔で嗅脳側から尾側へと前頭断切片を得、これより前頭皮質（FCx）、頭頂皮質（PCx）、海馬（Hipp）、線条体（C/P）の4部位について、8-20mgの試料を得、8-12%のホモジネートとした。対照としては無処置の30週齢EIマウス9匹と、その母系であるddYマウスを当研究所にて近交系とした30週齢10匹を用いた。

SOD活性の測定法：SODの発見者であるFridovichらの方法[3]を改良し、脳内領野10μg湿重量で測定可能な系を確立した。測定原理はフェリシトクロームc酸化型（その際の550nmの吸光度：A_1）が還元型となると550nmの特異吸光(A_2)を示すことを利用している。キサンチンナトリウムを基質としてキサンチンオキシダーゼを働かせると1:1でO_2^-を生じる。このフリーラジカルがフェリシトクロームcに対して還元剤として働き550nmの吸光度が一定速度(V)で上昇していく。このときSODを含んだ試料が加えられるとO_2^-が消去されるためVは低下してくる。SOD活性は、A_2-A_1=0.21 absorbance unitの条件下で V=0.025 absorbance units/min がV=0.0125 absorbance units/min に低下するときを1Unit(U)と定義している。今回のデータでは1μg湿重量あたりのSOD活性を1/1000 U / 1μg湿重量＝1m Unit /μg wet weightとして表示している。

〔結果〕

アロプリノールの抗けいれん効果のED_{50}：アロプリノール抗痙攣作用のED_{50}は7.5mg/kgであった。

アロプリノールの抗けいれん効果の時間経過：ED_{50}の10倍量の75mg/kg投与により投与後、3時間後では発作いき値は明かに上昇し、6時間後には3匹とも発作を起こさなくなった。この著しい抗けいれん効果は24時間後まで続き、48時間後再び発作閾値は回復していた。

ddYマウスの脳内領野でのＳＯＤ活性（図１）はFCxで幾分低いものの、他の部位では70-90mUnitと特に部位による著しい差はなかった。アロプリノール投与前のＥＩマウスＳＯＤ活性（図１）は対照のddYマウスに比較しFCx，PCx，C/Pいずれの部位でも有意に高かった。しかしHippでは全く異なり、対照のddYの1/5と低値をボした。75mg/kg のアロプリノール投与後（表１）６時間のＥＩマウスのＳＯＤ活性は投与前と比較しFCx，PCx,C/Pといずれの部位でもやや低下していた。ところがHippでは逆に、投与前と比較し、５倍以上にはねあがっていた。そして投与後４８時間（表１）ではFCx，PCx，C/Pでは、６時間後の値より有意に上昇しており、ほぼアロプリノール投与前のＥＩマウスのＳＯＤ活性レベルに回復していた。海馬では逆に６時間後の値から有意に低下していたが、やはり他の部位とは異なり、アロプリノール投与前のＥＩマウスのＳＯＤ活性レベルの４倍以上高い値を保っていた。

［考察］

EIマウスの発作発射に付いて、海馬は特に二次性全般化に、最も重要な働きをする[4]。そしていったん異常可塑性が成立すればてんかん原性の核となるてんかん焦点複合体[5]を構成する。アロプリノールのＳＯＤ酵素活性誘導能は、決して稀なものではなく腫瘍細胞等ある病的状態が確立した系では、その侵襲に応じてフリーラジカルを除去する方向へＳＯＤ酵素活性誘導されていく[6]ことが知られており、アロプリノールによるＳＯＤ活性の変化が海馬に著しくみられた現象の説明となるであろう。特にいったんアロプリノールによって高くＳＯＤ活性が誘導されると４８時間後でも抗けいれん作用こそ無くなるものの、投与前より高い値に留まることも理解できる。

アロプリノールの抗てんかん薬としての効果については二次性全般化に著効という以外に、有効と言う治験報告の内容に一貫性が無いのは治験の対象が難治てんかんということで、必ずしも同一のてんかん成立機序を持つものではないからであろう。アロプリノールによって著効となるのは、海馬に異常可塑性が形成されていて、ＳＯＤ酵素活性誘導が過剰に存在するフリーラジカルを除去できた症例に限られるものと考えられる。

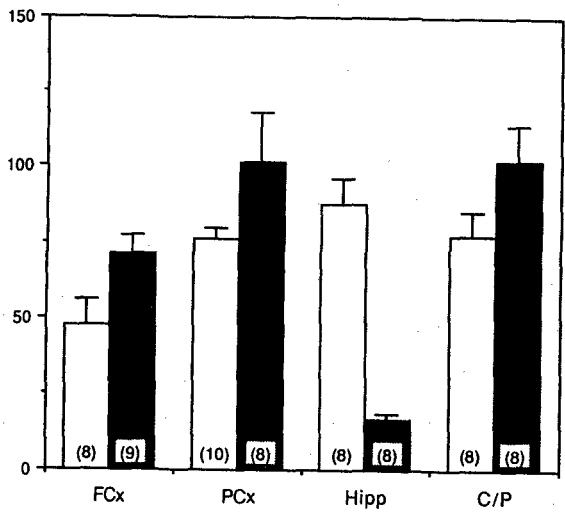


図１。ｄｄＹマウスとＥＩマウスにおける前頭皮質、頭頂皮質、海馬、線条体のＳＯＤ活性

縦軸は湿重量μgあたりのＳＯＤ活性（mUnit/μg wet weight）を示す。Unitの定義については本文中の「方法」の項参照。（）の中の数字は用いたマウスの匹数を示す。open barはddY マウスを closed barはＥＩマウスを示し、T on bar はS.E.M.を表す。

表１。ＥＩマウスの前頭皮質、頭頂皮質、海馬、線条体におけるアロプリノール投与前後のＳＯＤ活性の変化

単位は mUnit/μg wet weight.（mean±SEM(number of animals)）を示す。ＥＩマウスに75mg/kgアロプリノールを経口投与する前（Allopurinol(-)，Control)）、投与後、発作が起きなくなった６時間後（Allopurinol(+),6hr.）、再び発作が起こるようになった４８時間後（Allopurinol(+)，48hr.）の3点でＥＩマウスのＳＯＤ活性を測定した。

	Allopurinol (-)	Allopurinol (+)	
	control	6hr	48hr
FCx	71.1±6.1(9)	58.6±4.8(10)	98.7±13.2(8)
PCx	101±17(8)	57.8±5.4(9)	85.8±4.6(9)
Hipp	17.1±1.4(8)	98.2±2.7(10)	74.7±2.3(10)
C/P	91.1±5.3(9)	30.7±7.0(8)	102±12(8)

［文献］

1.De-Marco,P. and Zagoni,P.(1988) Neuropsy. biol. 19(1), 51-3.

2.Tada,H. et al.(1991) Epilepsia, 32(2), 279-283.

3.Ono,M. et al.(1992) BBRC, 182(3), 1100-7.

4.Ishida,N. et al.(1987) Jpn.J. Neurol. Psychiat. 41,498-9.

5.Suzuki,J. (1989) Art and Science of Epilepsy.(Suzuki, ed.) 27-33.

6.Hass,M.A. et al. (1989) J.Clin.Invest. 83(4), 1241-6.

184 発育期におけるE1マウス脳のオピオイドκレセプターの変化

甲斐利弘、大西　博、片山雅文、小出誠司、山上　栄
（大阪市大・医・神経精神）

〔要約〕

E1マウスの痙攣と脳内ダイノルフィン系の関係を明らかにするために、脳からP$_2$ fractionを調製し、オピオイドκレセプターのアゴニストである［^{3}H］etylketocyclazocine（［^{3}H］EKC）をリガンドとして結合実験を行った。100nM D-Ala^2-MePhe-Gly-ol^5（DAGO）と100nMのD-Ala^2-D-Leu^5 enkephalin（DADLE）で、それぞれμとδ結合部位をblockした時の発作間歇期の成熟E1マウスの大脳の最大結合数（Bmax）は母系のddYマウスに比べて有意に高値を示したが、解離定数（Kd）には差がなかった。次に、［^{3}H］EKC（0.8nM）結合を脳の８部位別について調べた。放り上げ刺激前の生後25日ですでに、E1の海馬と扁桃核において、［^{3}H］EKC結合がddYに比べて有意に増加した。不全発作発現期の生後50日では、［^{3}H］EKC結合はE1の海馬、扁桃核、大脳皮質で有意に増加し、さらに痙攣発作発現後の生後150日の発作間歇期の成熟E1についても、海馬、扁桃核、大脳皮質、線条体において、［^{3}H］EKC結合はddYに比べて有意に増加した。以上の結果は、E1マウスの痙攣発作に、海馬、扁桃核、大脳皮質、線条体のオピオイドκレセプターが密接に関係していることを示唆する。

電撃痙攣[5]やカイニン酸の投与[6]により脳内ダイノルフィン様免疫活性が変化することが報告されており、ダイノルフィン系が痙攣に関係していることが推測されている。我々はこれまで、発作間歇期のE1マウス脳のエンケファリン系の機能低下について報告し[4,7,8]、痙攣に対してエンケファリン系は抑制に作用することを示唆した。今回、E1マウスの各発育時期と脳の８部位別について、内因性のダイノルフィンが結合するκレセプターの解析を行った。

［方法］　実験動物としてE1とその母系のddYマウスを用いた。E1には生後28日目から週１回の割合で、40回の放り上げ刺激を行った。50日前後で刺激時に不全発作、75日以後に強直間代痙攣を示した。結合実験には、放り上げ刺激後３日目の発作間歇期のE1と対照群としてddYマウスを用い、生後25日、50日、150日で断頭した。Sidmanのアトラスに従い、脳を８部位に切り出し、P$_2$ fractionを調製し37℃で40分間preincubateした後、−80℃で保存した。得られたP$_2$ fractionに0.8nM［^{3}H］EKCと、μとδ結合部位をblockするために、それぞれ100nM DAGOと100nM DADLEを加え、24℃で60分間incubateした。全結合量と10μM naloxone存在下の非特異結合量の差を特異結合量とした。Saturation curveはsimplex法で解析し、BmaxとKdを算出した。

［結果］　成熟期のddYマウスと発作間歇期の成熟E1マウスの大脳について、BmaxはddYで149±1.89 fmol/mg protein、E1で148±2.83 fmol/mg protein、KdはddYで0.888±0.108 nM、E1で0.821±0.172 nMとBmax、Kdは両群で差がなかった。μとδ結合部位をblockした時のBmaxはddYで22.6±1.46 fmol/mg protein、E1で37.8±1.42 fmol/mg protein、KdはddYで1.51±0.291 nM、E1で2.34±0.568 nMとE1のBmaxはddYに比べて有意に高値を示した。0.8nM［^{3}H］EKC結合（100nM DAGOと100nM DADLE存在下）を脳の８部位について調べると、生後25日の海馬と扁桃核で(Table 1)、生後50日の海馬、扁桃核、大脳皮質で(Table 2)、生後150日の海馬、扁桃核、大脳皮質、線条体で(Table 3)、E1の［^{3}H］EKC結合がddYに比べて有意に増加した。成熟E1の大脳のBmaxの増加は、海馬、扁桃核、大脳皮質、線条体のκレセプターの増加を反映していると考えられる。

［考察］　我々は既に、EIマウス脳のオピオイドδレセプター密度がddYに比べて増加していることを報告したが[8]、今回、［^{3}H］EKCをリガンドとした結合実験において、EIのκレセプターも同様に増加していた。放り上げ刺激前の25日で既に、EIの海馬と扁桃核のκレセプターが増加し、不全発作期の50日と痙攣発現後の150日でも増加していることは、これらの部位のκレセプターがEIの痙攣素因と密接に関係しているを示唆する。50日のEIの大脳皮質と150日のEIの大脳皮質と線条体のκレセプターの増加は、発作発現の時期に一致しており、EIの痙攣発現機構に関係するのかも知れない。しかし電撃痙攣の結果、オピオイドレセプターが増加するという報告があり[9]、さらに痙攣履歴のないEI(o)との比較が必要であろう。種々の実験てんかんモデル[5)6)9)]以外に、遺伝てんかんモデルの発作感受性スナネズミ脳で[6]ダイノルフィンが変動することが報告されている。これまで我々は、EIマウス脳のメチオニンエンケファリンの減少[7]がδレセプターのup-regulationを生じる[8]ことを示した。今回のEIのκレセプターの増加から、κレセプターに主に結合する内因性のダイノルフィンの合成阻害や放出減少が推測される。オピオイド系は痙攣に対して促進的か抑制的か一定の結論に達していないが[1]、κアゴニストが抗痙攣作用を示すことより[10)11)]、EIマウスの痙攣発作にダイノルフィン系の機能低下が関係し、ダイノルフィン系は痙攣に対して抑制的に作用するのではないかと考えられる。

［文献］　1）Frenk, H. (1983) Brain Res. Rev. 6, 197-210　2）Holaday, J. W. et al. (1982) Life Sci. 31, 2359-2362　3）Hong, J. S. et al. (1985) Neuropeptides 5, 557-560　4）小出誠司ら (1990) 神経化学 29, 430-431　5）Lason, W. et al. (1983) Neuropeptides 3, 399-404　6）Lee, R. J. et al. (1987) Brain Res. 401, 353-358　7）大西 博ら (1990) 神経化学 29, 376-377　8）Onishi, H. et al. (1989) Neurochem. Res. 14, 31-35　9）Prewlocki, R. et al. (1983) Reg. Peptides 6, 385-392　10）Tortella, F. C. et al. (1986) J. Pharmacol. Exp. Ther. 237, 49-53　11）VonVoigtlander, P. F. et al. (1987) J. Pharmacol. Exp. Ther. 243, 542-547

Table 1.
［^{3}H］EKC binding (fmol/mg protein) in discrete brain regions of 25-day-old ddY and EI strain mice

Region	Strain ddY	Strain EI
Cerebral cortex	16.29±1.52	16.96±1.55
Hippocampus	5.70±0.25	7.43±0.28 *
Septal area	26.29±0.59	26.52±1.55
Striatum	22.96±3.14	23.58±3.21
Amygdala	13.68±1.22	20.12±0.72 *
Thalamus plus Hypothalamus	19.28±1.97	19.18±1.90
Pons-medulla	16.89±1.63	16.63±1.38
Cerebellum	2.05±0.38	3.24±0.37 *

mean±SEM. * P<0.05 compared to ddY

Table 2.
［^{3}H］EKC binding (fmol/mg protein) in discrete brain regions of 50-day-old ddY and EI strain mice

Region	Strain ddY	Strain EI
Cerebral cortex	14.21±0.21	15.40±0.23 *
Hippocampus	5.69±0.48	8.07±0.42 *
Septal areea	31.40±1.25	32.62±0.33
Striatum	24.10±2.01	29.88±2.56 *
Amygdala	16.31±0.53	26.44±0.94 *
Thalamus plus Hypothalamus	22.65±0.48	22.75±0.32
Pons-medulla	20.19±1.19	19.59±1.15
Cerebellum	2.45±0.18	2.42±0.22

mean±SEM. * P<0.05 compared to ddY

Table 3.
［^{3}H］EKC binding (fmol/mg protein) in discrete brain regions of 150-day-old adult ddY and EI strain mice

Region	Strain ddY	Strain EI
Cerebral cortex	11.12±1.13	17.08±1.11 *
Hippocampus	4.41±0.45	8.27±0.54 *
Septal areea	15.65±2.32	21.48±0.38 *
Striatum	14.70±0.96	19.92±0.82 *
Amygdala	13.72±0.76	20.44±0.94 *
Thalamus plus Hypothalamus	16.52±1.50	18.33±1.04
Pons-medulla	10.07±0.56	11.21±0.25
Cerebellum	1.94±0.47	2.69±0.39

mean±SEM. * P<0.05 compared to ddY

185 扁桃核キンドリングラット脳におけるｋａｉｎａｔｅ受容体ｍＲＮＡの増加 : ｉｎ ｓｉｔｕ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｓｔｕｄｙ

引地 充、 富田 博秋、 小野 光弘、 藤原 豊、 秋山 一文
（岡山大・神経精神）

〔要約〕 扁桃核キンドリングにおけるイオノトロピック興奮性アミノ酸(EAA)受容体の永続的な変化を捉えるために、合成オリゴヌクレオチドプローブを用いたin situ hybridizationを行った。プローブはクローニングされたEAA受容体の各サブタイプ； NMDA受容体(NMDAR1)、AMPA受容体(GluR-2)、Kainate受容体(KA-1)のmRNAに相補的な３種を使用した。

最終刺激より２８日後に断頭した扁桃核キンドリング完成ラット脳において、KA-1プローブで検出したkainate受容体mRNAが、コントロール群に比して両側海馬CA3で有意に増加していた($p<0.02$)。NMDAR1、GluR-2の発現には変化は認められなかった。

この結果は、扁桃核キンドリング後に海馬CA3において[^{3}H]kainateの結合増加を認めた結合実験の報告と一致しており、海馬におけるkainate受容体を介した興奮性の神経伝達の増強が示唆される。

＜方法＞

体重250ｇのＳＤ系雄性ラットを用いた。ペントバルビタール麻酔下にて、左側扁桃核に３極の慢性深部電極を植え込んだ（n=6）。手術から１週間後電気刺激を開始した。刺激は60Hzの正弦波を200μAで１日１回１秒間通電した。二次性全般発作が連続５回認められるようになった後、sham operationを施した対照ラット（n=6）とともに最終発作から２８日後に断頭した。

摘出した新鮮脳を素早く粉末ドライアイスで凍結し-80℃で保存した。クリオスタットで10μmの厚さの組織切片を作成し、予めゲラチンコートしたスライドグラスにのせ、自然乾燥させた後、-20℃で保存した。

報告されているNMDAR1、GluR-2、KA-1のcDNAに相補的な４５塩基のオリゴヌクレオチドプローブを以下のように合成した。NMDAR1: 5'-ATAGTTGGCAAACTTCCGGTCCCCATCCTCATTGAATTCCACACG-3'(1009-1053)、GluR-2: 5'-TTCACTACTTTGTGTTTCTCTTCCATCTTCAAATTCCTCAGTGTG-3'(1654-1698)、KA-1: 5'-CTTGT[illegible]TTGAACCGTAGGATCTCAGCGAACTCCTTGAGCATGTC-3'(1291-1335) これらは受容体タンパクのN末端部(NMDAR1,KA-1)、第一細胞内ループ(GluR-2)に当たる部位であり、コンピューターによるhomology reserchで既知の受容体遺伝子との配列類似性が低いことが確認されている部位である。

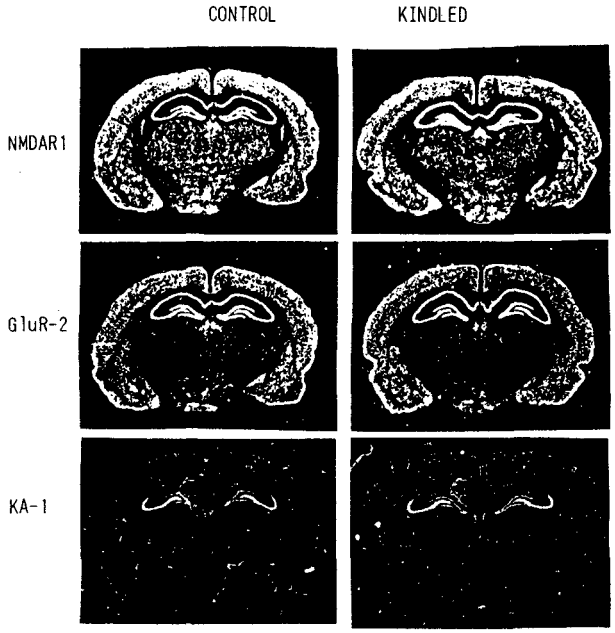
プローブはterminal deoxynucleotidyl transferaseにより３' 末端を［^{35}Ｓ］で標識した。上記プローブを以下の組成からなるhybridization buffer (1×SSC, 50% formamide, Denhardt's solution, salmon sperm DNA, 100mM DTT, 10% dextran sulfate) と１切片当たり1×10^6 dpm/ 100 μl となるようにし、これを上記組織切片と37℃で18時間ハイブリダイズさせた。その後、55℃, 1×SSCで15分×4回、室温、1×SSCで1時間洗浄した。スライドグラスを乾燥させた後、トリチウム感受性フィルムをのせ３週間感光させ現像した。Autoradiogramはcomputing-densitometerを用いて定量化し、測定は両側の海馬CA1、CA3、歯状回、扁桃核領域(AM)、梨状様皮質(PC)で行った。hybridizationの特異性の確認のため、同濃度の標識プローブを連続切片に30倍濃度の非標識プローブ存在下でhybridizeさせ、同一フィルムに感光させてhybridization signalが抑制されることを確認した。統計学的検定にはｔ検定を用いた。

＜結果＞

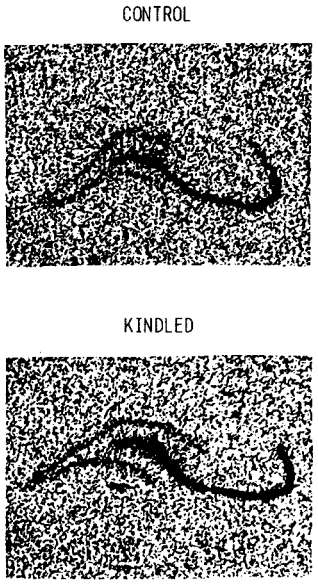
（表）Optical density of the hybridization signals of EAA receptor mRNAs after amygdala-kindling. The values are optic density ± S.D.(n=6) ＊ P<0.02

Region		NMDAR1 Control	NMDAR1 Kindled	GluR-2 Control	GluR-2 Kindled	KA-1 Control	KA-1 Kindled
CA1	L	1.584±0.076	1.632±0.133	1.914±0.101	1.878±0.143	no significant accumulation	
	R	1.576±0.063	1.675±0.161	1.925±0.103	1.906±0.133	no significant accumulation	
CA3	L	1.848±0.106	1.868±0.137	1.858±0.172	1.924±0.213	1.747±0.139	1.917±0.030 ＊
	R	1.842±0.108	1.837±0.129	1.866±0.157	1.896±0.200	1.728±0.115	1.879±0.044 ＊
DG	L	1.879±0.086	1.877±0.259	2.106±0.114	2.182±0.104	1.305±0.024	1.349±0.071
	R	1.842±0.088	1.901±0.276	2.149±0.105	2.139±0.135	1.296±0.028	1.318±0.054
AH	L	1.016±0.113	0.985±0.061	0.997±0.055	0.986±0.077	no significant accumulation	
	R	1.014±0.057	0.988±0.037	1.014±0.035	1.003±0.086	no significant accumulation	
PC	L	1.626±0.209	1.662±0.154	1.675±0.070	1.705±0.174	no significant accumulation	
	R	1.608±0.145	1.628±0.156	1.666±0.075	1.685±0.170	no significant accumulation	

(図１) Negative images of thehybridization patterns for NMDAR1, GluR-2 and KA-1



(図２) Representative pictures of hippocampal KA-1 mRNA expression



＜考察＞

NMDAR1、GluR-2は組織内に広く分布しており、海馬において特に強く発現されていた（表、図１）。これに対してKA-1は海馬CA3に限局的に強く発現され、歯状回にわずかな分布を認めるのみであった（表、図１）。これらの分布パターンは、異なるプローブを用いて検索された各々の分布の報告と良く一致している[2),(3),(6)]。

キンドリング完成ラットの両側海馬CA3において、KA-1の発現はコントロール群と比較して有意に増加していた（表、図２）。KA-1はWernerらによってクローニングされたnon-NMDA イオノトロピックEAA受容体遺伝子であり、その電気生理学的にkainateに対する特異的反応、[^{3}H]kainateの脳内分布と遺伝子分布の類似性より、kainate高親和性受容体サブユニットとみなされている[6)]。

今回の実験結果と一致する報告として、Represaらは、扁桃核キンドリング完成後のCA3における[^{3}H]kainate結合の増加を報告している[4)]。CA3は、反復する電気刺激や痙攣惹起化合物投与に対し脆弱な部位であり[1)]、歯状回顆粒細胞からの苔状繊維による興奮性調節を受けるとされている。Represaらはオートラジオグラフィーの知見に基づき、CA3での[^{3}H]kainateの増加はこの苔状繊維終末に存在する前シナプス性kainate受容体が、苔状繊維の異常なsprouting[5)]に伴い増加したものと解釈しているが[4)]、本実験においては歯状回顆粒細胞でのKA-1mRNA発現レベルは不変であり、この解釈とは一致しない。しかし、いずれにしてもキンドリングによる海馬CA3でのkainate受容体の増加は、海馬の興奮性増大をもたらすような新たな神経回路の構成を示唆するものであり、キンドリング成立に深く関与するものであろう。今後細胞レベルでのさらなる検討をする予定である。

＜文献＞

(1)Ben-Ari, Y. et al., Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fiber sprouting in the hippocampus. Trends Neurosci., 13(1990) 312-318
(2)Keinanen, K. et al., A family of AMPA-selective glutamate receptors. Science, 249(1990) 556-560
(3)Moriyoshi, K. et al., Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. Nature, 354(1991) 31-37
(4)Represa, A. et al., Hippocampal plasticity in the kindling model of epilepsy in rats. Neurosci. Lett., 99(1989) 345-350
(5)Sutula, T. et al., Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. Science, 239(1989) 1147-1150
(6)Werner, P. et al., Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. Nature, 351(1991) 742-744

186 脳内アセチルコリン系神経機構のラット系統差に関する生化学的検討

近藤洋一[1,2]*，小川紀雄[1]，平田 洋[1,2]，浅沼幹人[1]，田中健一[1]，森 昭胤[1]
（岡山大医・分子細胞医学研・神経情報学部門[1]，第三内科[2]）

〔要約〕
Sprague-Dawley(SD)系ラット、Fischer系ラット、Wistar系ラット(Wistar Kyoto)、高血圧自然発症ラット(SHR)について前頭皮質、線条体、海馬の各部位のアセチルコリン(ACh)濃度、ムスカリン性M1レセプター(M1-R)結合およびそのmRNAを測定、ラットの系統によるアセチルコリン系神経機構の差異を検討した。SD系ラット、Fischer系ラット脳内ACh濃度は線条体で高く、SHRでは前頭皮質で他系に比して高い傾向が認められた。M1-R結合はSD系ラットでは線条体、海馬に比して前頭皮質で多く、Wistar系ラットおよびSHRは海馬、前頭皮質で多かった。Fischer系ラットのM1-R結合は前頭皮質に比して線条体で多く、他系と比較すると前頭皮質では有意に少なく、逆に線条体では有意に多かった。これはFischer系ラットのACh濃度が前頭皮質と線状体で差がみられないことに相反していた。これらの成績はラットの系統および脳内部位によりシナプス伝達機構に差異が存在することを示しており、脳内アセチルコリン系神経機構を評価する際には、ラットの系統による特性に注意するとともにACh濃度とM1-R結合の両者をそれぞれ測定する必要がある。

［目的］脳内アセチルコリン(ACh)系は知的機能、意欲、覚醒などの重要な役割を担っており、実験動物を用いて様々な研究がなされている。しかし、ACh、その合成酵素、あるいはレセプター結合などの脳内分布は実験動物の系統によって異なっていると思われ、一律には論じられないと考えられる。そこで我々は実験動物として繁用されるSprague-Dawley(SD)系ラット、Fischer系ラット、Wistar系ラット(Wistar Kyoto)、さらに高血圧自然発症ラット(SHR)を用い、脳内前頭皮質、線条体、海馬において、脳内ACh系の指標であるACh濃度、ムスカリン性M1レセプター(M1-R)結合、およびそのmRNAを測定し比較検討した。

［方法］ 12週齢の雄性SD系ラット、Fischer系ラット、Wistar系ラットおよびSHRを用いた。ACh濃度の測定のためにはラットをマイクロウェーブ照射屠殺、M1-R測定には断頭屠殺し、とり出した脳組織から前頭皮質、線条体、海馬の3部位を摘出した(1)。ACh濃度はマイクロウェーブ照射脳から既報に従って、高速液体クロマトグラフィー法にて測定した(2,3)。M1-R結合は[^{3}H]pirenzepineを用いたradiolabeled receptor assay(4)により測定した。また、M1-R mRNAはM1-R cDNAに相補的な[^{32}P]標識oligonucleotide probeを用いたNorthern blot analysis(5)で検討した。Fig.1には、各系統の脳内ACh濃度およびM1-R結合(Bmax)について、前頭皮質、線条体および海馬の総和に対する一部位の割合をグラフ表示した。

［結果および考察］ SD系ラット、Fischer系ラットの脳内ACh濃度は、線条体＞前頭皮質＞海馬の順に多く、SHRの前頭皮質では他系統に比して高い傾向が認められた(Fig.1 upper panel)。M1-R結合(Bmax)は各系統ごとに特徴ある脳内分布を呈した(Fig.1 lower panel)。すなわち、SD系ラットでは前頭皮質＞線条体＝海馬の順であったが、Wistar系ラットおよびSHRでは海馬＝前頭皮質＞線条体の順であり、特に海馬でのM1-R結合は他系統に比して高かった。Fischer系ラットでのM1-R結合は線条体＞前頭皮質＝海馬の順で、前頭皮質では他系統と比較して有意に少なく、逆に線条体では有意に多いという分布を示していた。これはFischer系ラットのACh濃度では前頭皮質と線条体との間に差がないことに相反していた。これはシナプス前部の指標であるACh濃度とシナプス後部のM1-R結合が平行していないことを示しており、アセ

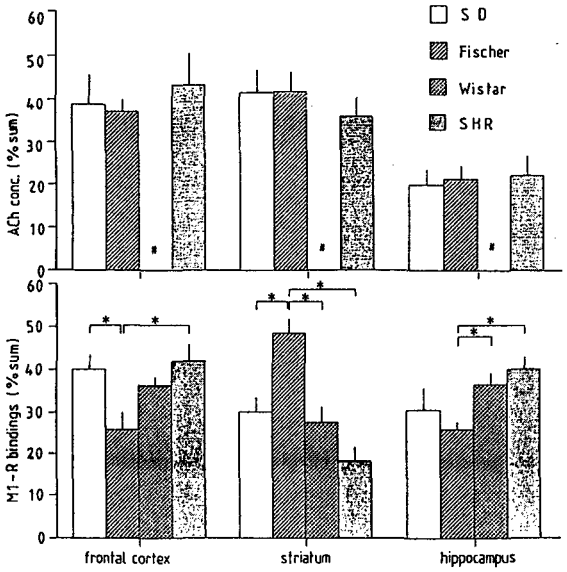


Fig.1 ACh concentrations (upper pannel) and M1-R bindings (lower pannel) in frontal cortex, striatum, and hippocampus of SD rats, Fischer rats, Wistar rats, and SHR. Values are mean +S.E.M. of %sum of ACh concentrations and Bmax for M1-R bindings. (n=6) *p<0.05 compared with 2 groups. # not yet assayed

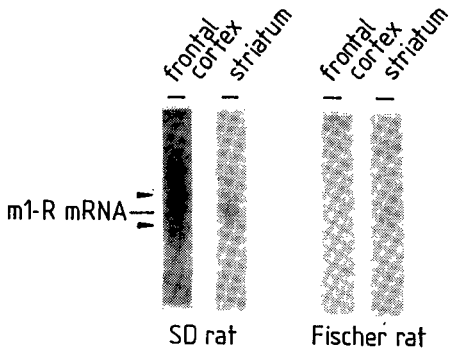


Fig.2 Representative Northern blot analysis of M1-R mRNA in frontal cortex and striatum of SD rats and Fischer rats. The arrows indicate the positions of 28S and 18S ribosomal RNAs.

チルコリン系神経機構を評価する上で両者の測定が不可欠であると考えられた。さらに、M1-R mRNAの脳内分布について検討した結果では、SD系ラットでは前頭皮質＞線条体であるのに対し、Fischer系ラットでは線条体＞前頭皮質であり(Fig.2)、これはM1-R結合の分布と同様の傾向であった。Fischer系ラットの前頭皮質M1-R結合が他部位に比して相対的に少ないということは、前頭皮質におけるM1-R結合の変化をみる時に、老齢モデルとして繁用されているFischer系ラットではその変化が過小評価される可能性があると思われる。このようにACh濃度とM1-R結合の脳内部位別分布にはラットの系統によってそれぞれ特徴があることがわかった。アセチルコリン系神経機構を評価する際にラットの系統の違いを考慮することはもちろんであるが、今回の比較実験から、アセチルコリン系神経機構の各ステップを総合的に、少なくともシナプス前部と後部の両指標について平行して測定する必要があると考えられる。

【文献】 1. Glowinski, J. and L. L. Iversen (1966) J. Neurochem., 13:655-669.
2. Fujimori, K. and K. Yamamoto (1987) J. Chromatogr., 414:167-173.
3. Haba, K. et al. (1991) Brain Res., 540:116-122.
4. Luthin, G. R. and B. B. Wolfe (1984) J. Pharmacol. Exp. Ther., 228:648-655.
5. Asanuma, M. et al, (1992) J. Neurol. Sci., in press.

187 ff－lesionラットにおけるHCNPの空間学習記憶障害改善作用

岸野晶祥、泰地睦夫、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 Neurostimulating Peptide)について、学習記憶に対する効果を検討するため、中隔野－海馬投射線維切断(ff-lesion)により空間学習障害をおこさせたラットを用い Morris の water maze test をおこなった。lesion 後２週間、HCNP を脳室内に頻回投与した後、連続５日間の water maze test および probe test を試行した結果、HCNP が vehicle 投与群に対して、有意に空間学習記憶障害を改善することがわかった。

（緒言） アルツハイマー病のモデルのひとつである ff-lesion ラットでは fimbria-fornix を切断することにより、海馬から逆行性に運ばれていた神経栄養因子が途絶え、内側中隔野および対角帯垂直部ニューロンの変性脱落がおこる。また、学習記憶機能においても、顕著な空間学習記憶障害がおこることが知られている。F. Heftiらは、NGF を脳室内投与することにより、コリナージックニューロンの変性脱落が防げること[1]、また radial maze における空間学習記憶障害も改善されることを報告している[2]。

我々が幼若ラット海馬組織より単離精製した HCNP は、Ala-Ala-Asp-Ile-Ser-Gln-Trp-Ala-Gly-Pro-Leu という配列を持つペプチドで、ラット胎児中隔野培養組織系でコリナージックニューロンの ACh 合成を促進する作用を持つことが報告されている[3]。また、ff-lesion においても中隔野コリナージックニューロンの脱落、萎縮保護作用が認められており、神経栄養因子的な作用が示唆されている[4]。今回は、HCNP の学習記憶に対する作用を検索するため、water maze test における ff-lesion ラットへの影響を行動薬理的に検討した。

（方法） 体重200g、雄性SDラットを購入後１週間の飼育後、実験に用いた。

a．ff-lesion ：抱水クロラールにて麻酔したラットの片側頭蓋骨に穴を設け、幅 0.7mmのマイクロナイフ をマニピュレーターにて刺入、部分的に ff を切断した。次にステンレスパイプを脳室内に挿入し、歯科用セメントで固定した。手術後、10mg/ml gentamycine を含む PBS に溶かした合成 HCNP 5ug をマイクロシリンジにて投与した。control群は、溶媒のみを投与した。投与は、術日と以後１～２日おきに計５回おこなった。また、normal群として同週齢の無処置ラットを用意した。

b．water maze test：Morris の water maze を用い手術後13～14日、HCNP 投与終了後４日より連続５日間の test をおこなった。日毎に異なるスタート点からスタートさせ、水面下1cmのプラットホームにたどりつくまでの時間(goal latency)、泳いだ距離(swimming path)をトラッカーシステム、イメージアナライザー（ニューロサイエンス社）で測定した。これを１日に４回繰り返した。

c．probe test：water maze test 終了後、同日に probe test を行った。プラットホームを取り除き、ラットを２分間自由に泳がせ、ゴールがあった地点（半径 5cm）を通った回数(goalpoint pass)、その中心から半径 15cm の同心円を横切った回数(cross count)、半径30cm の同心円内を泳いだ割合(path%)をもとめた。(fig.1)

d．histology：実験終了後、ff部を含む coronal 切片を作製、AChE 活性染色を行い、片側ffが lesion されていることを確認した。

（結果） fig.2 および 3 に示すとおり、water maze test の結果、control 群は normal 群に対して、有意な goal latency 、swimming path の延長を示していた。 そして probe test においても path%、cross count で有意に成績の低下がみられ、ff-lesion により顕著な空間学習記憶障害がおこることを示していた。これに対し、HCNP 投与群では、control 群に対して、goal latency、swimming path ともに有意な減少を示していた。probe test でも path%、cross count で 有意に成績が上昇、normal 群と同等のレベルに達しており、明らかにプラットホームの位置をよく記憶していた。以上より、HCNP はこの系における学習記憶障害を顕著に改善することがわかった。

（考察） 今回の結果より ff-lesion により顕著な空間学習記憶障害が起こること、そして、 HCNP 投与によりこれらの障害が改善されることがわかった。この実験では、１日に同じスタート位置から４回トライアルを繰り返しているが、各日の１回目、つまりスタート位置が変わる毎の goal latency を比較しても、control に対し有意に HCNP は、減少を示していた。(fig.4) また、maze test 終了後の probe test でも HCNP は改善作用を示していた。これらは、HCNP は、ゴールの位置を試行を通じて不変の手がかりをもとに記憶する reference memory の形成に特に作用することを示唆する。

F.H.Gage らは、今回と同様な連続５～６日の water maze test により、老齢ラットや NBM-lesion ラットの大脳皮質、海馬のコリナージックレベルの低下にともなう学習障害に対し NGF が改善作用を示すことを報告している[5][6]。また、F.Hefti らは、radial maze を用いて、NGF が ff-lesion ラットに対しても学習障害を改善する事を報告しており[2]、 その機序として、lesion を免れたニューロンの activity が上昇し、海馬での presynaptic なコリナージックレベルが上昇したためと考えている[7]。今回の実験では HCNP がどのようなメカニズムで学習記憶障害を改善するのかは不明であるが、今回の HCNP の作用で、特に注目すべきことは、その効

果の持続時間である。今回、maze test は HCNP 投与終了後４～８日に行ったにもかかわらず、学習は悪化することなく向上を続けていた。また、HCNP 投与終了８日後におこなった probe test でも顕著な記憶保持の改善を示していた。これらは、HCNP の効果が短期間で消滅するものではなく、ある程度の長期的効果であることを意味する。このような長期的な作用はニューロンネットワークの biological あるいは、morphological な長期的な変化によると考えられ、ff-lesion に対する HCNP の神経細胞保護作用[4]を考え合わせると、その作用は神経栄養因子的な機序による可能性が示唆される。

（謝辞）この実験を行うにあたり、御助力いただいた住友製薬･研究所 中島隆氏に深く感謝いたします。

（参考）

1) Montero, N. and Hefti, F. 1988, J. Neurosci., 8(8), 2986-2999
2) Will, B. and Hefti, F. 1985, Behavioral Brain Res., 17, 17-24
3) Ojika, K., Kojima, S., Ueki, Y., Fukushima, N., Hayashi, K. and Yamamoto, M. 1992 Brain Res., 572, 164-171
4) 岸野晶祥、小鹿幸生、入江恒正 1991, 神経化学, 30, 248-249
5) Fischer, W., Bjorklund, A., Chen, K. and Gage, F. H. 1991, J. Neurosci., 11(7), 1889-1906
6) Mandel, R. J., Gage, F. H. and Thal, L. J. 1989, Exp. Neurology, 104, 208-217
7) Lapchak, P. A. and Hefti, F. 1991, Neurosci., 42, 3, 639-649

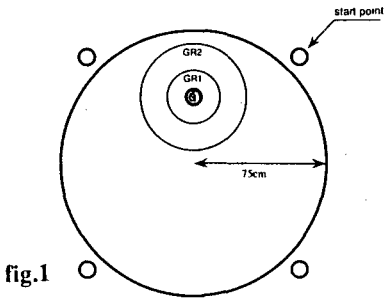


fig.1

fig.2

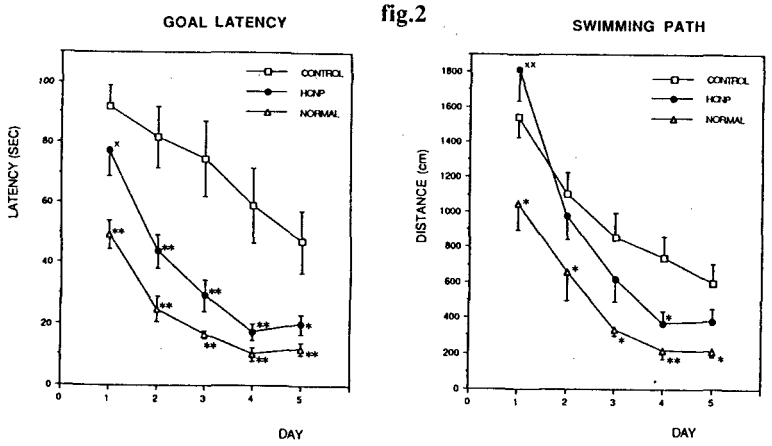


fig.3

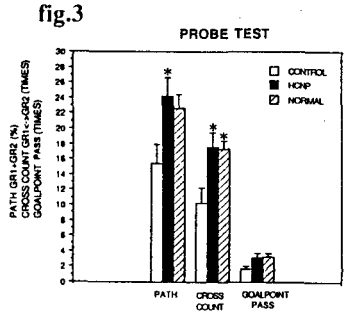
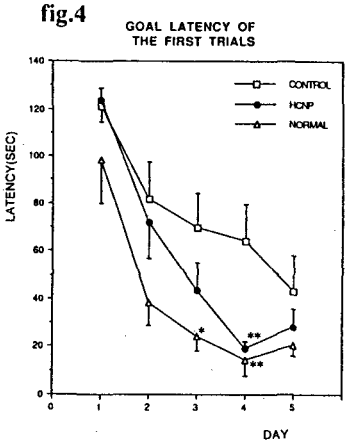


fig.4



CONTROL n=10
HCNP n=10
NORMAL n=6

All data show the mean±SE.
**,p<0.01 *,p<0.05 significant difference from control
XX,p<0.01 X,p<0.05 significant difference from normal
Duncan's t-test

188 学習記憶およびコリン作動性神経に対する中隔への抗NGF抗体持続注入の影響

新田　淳美、古川　美子*、林　恭三*、鍋島　俊隆
（名古屋大医　医療薬学・薬剤部、岐阜薬科大　分子生物*）

〔要約〕成熟ラットの中隔に抗神経成長因子（NGF）抗体を２週間持続注入を行った時の学習記憶およびコリン作動性神経に対する影響を検討した。抗NGF抗体を成熟ラット中隔に持続的に２週間総量１０および１００μg注入を行った直後では、学習記憶、アセチルコリン合成酵素(ChAT)活性およびコリンエステラーゼ(ChE)活性が有意に減少した。しかし、その２週間後には、学習記憶能力およびChAT活性の減少は観察されなかった。本研究の結果は、アルツハイマー型老年期痴呆症の原因の１つにNGFが関与している可能性を示唆していると考えられる。

［緒言］NGFは、中枢ではコリン作動性神経の生存機能維持に働くことが知られている。そのため、アルツハイマー型老年期痴呆症の原因として脳内NGFの減少や機能変化が仮定されている。現在、抗NGF抗体によりNGFを涸渇させた場合の神経系への影響については、培養細胞や幼若ラットに対する場合を中心に検討され、成熟ラットでの検討はほとんどなされていない。しかし、NGFとアルツハイマー型老年期痴呆症との関連を解明するためには、抗NGF抗体による成熟ラットの神経機能への影響を検討することが不可欠である。すでに我々は、抗NGF抗体の活性画分を脳室内に持続的に注入することにより、学習記憶障害および神経細胞の萎縮が起こることを報告している（1）。本研究では、抗NGF抗体を成熟ラットの中隔に持続注入し学習記憶および海馬のコリン作動性神経系への影響を検討した。

［実験方法］マウス顎下腺より精製したNGFをウサギに免疫することによって得た抗血清をProtein Aカラムで精製したIg G画分を実験に用いた。また、対照群には、NGFの免疫を行なっていないウサギ血清から同様に抗体を精製し用いた。８週齢の成熟ラットの中隔に、浸透圧ミニポンプを用いて抗NGF抗体を２週間持続的に注入した。総注入量は10および100μgとした。学習記憶実験には、受動的回避反応試験法を用いた。コリン作動性神経系の機能変化について、海馬のChAT活性の測定およびコリンエステラーゼ染色を行ない検討した。

［実験結果］受動的回避反応試験では、抗NGF抗体注入群で明室での滞在時間が有意に減少し（図１）、２週間の抗体注入直後では注入側の海馬のChAT活性は有意に減少した（図２）が、非注入側の海馬および抗体注入終了２週間後に断頭した場合には、抗体注入による影響は観察されなかった。また、海馬のChE活性も、抗体注入側で減少した（図３）。

［考察］アルツハイマー型老年期痴呆症の直接的な原因はNGFの減少であることは現在証明されていない。本研究では、過剰量の抗NGF抗体をNGF作用部位の中隔に持続注入した場合に学習記憶障害ならびに中隔からのコリン作動性神経の投射部位である海馬のChAT活性やChE活性が減少した。これらの結果は、アルツハイマー型老年期痴呆症の原因の1つにNGFが関与している可能性を示唆していると考えられる。しかし、注入後の時間経過によって、ChAT活性の減少が回復するメカニズム等については現在不明である。

［参考文献］

(1) Nabeshima, T., Ogawa, S., Ishimaru, H., Kameyama, T., Fukuta, T., Takeuchi, R. and Hayashi, K. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 175, 215-219

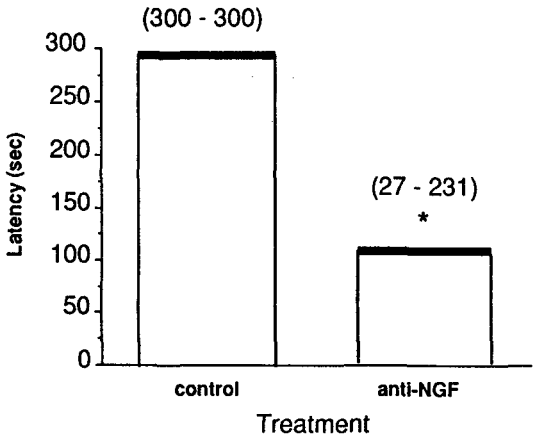


図1　受動的回避反応試験に対するラット中隔への抗NGF抗体持続注入の影響
2週間の持続的注入直後に試験を行い、図には、中央値を棒グラフで4分位値をカッコ中に示した。

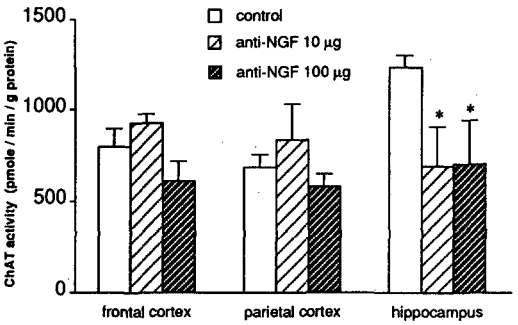


図2　海馬ChAT活性に対するラット中隔への抗NGF抗体持続注入の影響
2週間の持続的注入直後に断頭を行いChAT活性を測定した。

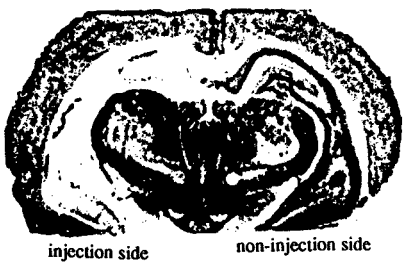


図3　ChE染色に対するラット中隔への抗NGF抗体持続注入の影響

189 前脳基底部破壊ラットの学習能に対する加齢の影響 行動学的、神経化学的および組織学的解析

中村　静雄、大野　知親
サントリー（株）生物医学研究所　薬効薬理研究室

〔要約〕　老齢ラット（26ヶ月齢）は若齢ラット（3ヶ月齢）に比べてモリス式水迷路学習課題において障害がみられ、前脳基底部（BF）を3ヶ月齢時に破壊した老齢ラット（aged BF rats, 26ヵ月齢）は正常の老齢ラットよりも障害は大きかった。老齢ラットの前頭葉皮質（FC）におけるChAT活性は若齢ラットのそれとほぼ同じであったが、aged BF ratsでは有意な減少が認められた。組織学的にもaged BF ratsではFCのAChE染色性は低下していたのに対して老齢ラットでは変化は認められなかった。また、FCの[^{3}H] vesamicol結合能は老齢ラットでは若齢ラットに比べて有意に低下していたが、aged BF ratsのそれは老齢ラットに比べて増加していた。さらに、脳内モノアミン含量は老齢ラットでは殆ど変化はみられないのに対し、aged BF ratsではすべてのモノアミン含量が顕著に減少していた。従って、老齢ラットの学習障害はモノアミン神経系の機能低下によるものではなく、コリン神経系におけるsynapse vesiculeへのアセチルコリン輸送能の低下によるものと考えられ、また、aged BF ratsの学習障害はコリンおよびモノアミン神経系両者の障害に基づくものと推察された。

（目的）アルツハイマー病患者や老齢動物における記憶障害発生機序の一つとして脳内コリン神経系の障害が報告されているが、非コリン神経系の変性も関与すると考えられている。また、BF破壊ラットはアルツハイマー病でみられる脳内コリン系の機能低下との類似性から痴呆モデルとして用いられ、数多くの行動学的・神経化学的検討がなされている。しかしながら、BF破壊ラットの学習障害と脳内神経系の加齢変化に伴う関連性についての研究は少ない。即ち、破壊3ヵ月後にChAT活性は回復するが12ヶ月後に再び低下すること（3）、破壊9ヵ月後において学習障害は回復しているにもかかわらずChAT活性の低下は持続していること（1）、また、ChAT活性の回復と学習障害の回復とは相関していること（6）などが報告されている。このように、BF破壊ラットの学習障害の加齢変化に対するコリン系ならびにモノアミン系の変性の関与については定説がない。そこで我々は老齢ラット（26ヶ月齢）と若齢（3ヶ月齢）時にBF破壊し、老化させたラット（26ヶ月齢）について行動学的、神経化学的および組織学的な比較検討を行った。

（方法）動物は雄性F344 ratsを使用した。若齢ラット（3ヶ月齢）をペントバルビタール麻酔下に脳定位固定装置に固定し、前脳基底部（A: 1.0, L: 2.6, H: 7.9 mm）にAF64A（1 μl, 1 nmol/μl）を両側性に注入した。ラットはその後23ヶ月飼育し、実験に供した（aged BF rats)。5日間の水迷路学習終了後、脳を氷冷下に摘出し、前頭葉皮質（FC）を左右に分割した。右側FCは10 vol. のTris-salt buffer（50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl2, 1 mM MgCl2, pH 7.6）を加えてsonicationし、[^{3}H] vesamicol結合能およびChAT活性を測定した。また、左側のFCはモノアミン含量を定量した。

（結果）(i) 学習行動：モリス式水迷路学習において、若齢ラットのプラットホームへの逃避時間は訓練とともに短縮した。これに対して老齢ラットならびにaged BF ratsでは顕著な学習障害が認められた。

(ii) 神経化学：a. ChAT活性：aged BF ratsでは顕著なChAT活性の低下がみられたが、老齢ラットでは若齢ラットと比べても差は認められなかった。b. AChE染色：老齢ラットでは若齢ラットと比べて変化はなく、aged BF ratsでは染色性は低下していた。c. [^{3}H] vesamicol結合能：老齢ラット（Kd(nmole); 15.8±0.69, Bmax(fmol/mg protein); 696.9±15.3）では若齢ラット（17.4±0.53, 865.9±49.2）に比べて有意に減少していたのに対し、aged BF rats（18.0±0.50, 794.9±24.7）ではその程度は軽く、老齢ラットのVmaxに比べると増加傾向が認められた。d. モノアミン含量：老齢ラットでは若齢ラットに比べてFCのNEが増加し、HVAが減少していたが、総じて、FC、海馬（HP）、線条体（ST）のNE, DA,5HTおよびそれらの代謝物含量は殆ど変化していなかった。aged BF ratsではすべてのモノアミン含量および代謝物は有意に減少していた。

（考察）老齢ラットおよびaged BF rats はともにモリス式水迷路学習において若齢ラットに比べて有意な獲得障害が認められたが、その程度は aged BF rats の方が顕著であった。これらのラットの脳内コリン系およびモノアミン系の変化には差異が認められた。即ち、コリン系では aged BF rats の FC での ChAT 活性およびcholinergic fiberに対するAChE染色性は若齢ラットや正常の老齢ラットに比べて有意に減少していた。BF rats のChAT 活性の低下は破壊２０週間後まで徐々に回復してくるが（６）、aged BF rats では ChAT 活性の低下が再発する。一方、老齢ラットではChAT 活性およびAChE 染色性には変化はみられなかったが、もう一つのコリン系の指標としてのvesicular acetylcholine transporter のリガンド（７）である、[^{3}H] vesamicol 結合能のみが老齢ラットでは若齢ラットに比べて有意に減少していた。しかしながら、aged BF rats の[^{3}H] vesamicol 結合能は若齢ラットに比べると低下傾向にあったが老齢ラットに比べると増加していた。この結果はMarien ら（５）の成績、即ち、キノリン酸によるBF 破壊では低下することと相反している。他方、Ruberg ら（８）はアルツハイマー病患者ではFCの[^{3}H] vesamicol 結合能は増加し、パーキンソン病患者では ChAT 活性は低下しているにもかかわらず、[^{3}H] vesamicol 結合能は変化しないことを報告している。このことからaged BF rats の老齢ラットと比較した場合の[^{3}H] vesamicol.結合能の増加はコリン系の機能障害に対する代償反応とも考えられる。次にモノアミン含量に関しては、aged BF rats では顕著な減少がみられるが、このモノアミン含量の低下は加齢に伴い直線的に回復する（未発表データ）。これに対して、老齢ラットではほとんどモノアミンの低下は認められなかった。Gallagher ら（２）は老齢ラットにおいて学習障害が認められるものとそうでないものの間で脳内モノアミン含量は殆ど差がなく、学習障害ラットにおいて BF,FC およびSTにおいて ChAT 活性の低下がみられたと報告している。一方、Luine ら（４）は特定の脳部位（BF, HP, ST）におけるモノアミン神経系の機能の低下が老齢ラットの学習障害に関与していることを報告している。しかしながら、今回の我々の実験では老齢ラットのHPならびに ST ではモノアミン含量の低下は殆ど認められなかった。従って、老齢ラットの空間学習障害には脳内モノアミン神経系の関与は少なく、コリン神経系におけるシナプス小胞レベルでの ACh の輸送能の低下が関与していることが考えられた。また、aged BF rats の空間学習障害は老齢ラットの場合とは異なりコリン系およびモノアミン系両者の機能低下によるものと考えられ、aged BF rats はアルツハイマー病を対象とした薬物の動物評価モデルとして有用であろうと考えられた。

（文献）

1. Bartus,R.T.,Flicker,C.,Dean,D.L.,Pontecorvo,M.,Figueiredo,J.C.and Fisher,S.K.,Pharmacol.Biochem.Behav.,23(1985)125-135.
2. Gallagher,M.,Burwell,R.D.,Kodsi,M.H.,Mckinney,M.,Southerland,S.,Vell-Rountree,L. and Lewis,M.H., Neurobiology of Aging,11(1990)507-514.
3. Hohmann,C.F.,Wenk,G.L.,Lowenstein,P.,Brown,M.E.and Coyle,J.T.,Neurosci.Lett.,82(1987)253-259.
4. Luine,V.,Bowling,D.and Hearns,M., Brain Res.,537(1990)271-278.
5. Marien,M.R.,Parsons,S.M.and Alter,C.A., Proc.Natn.Acad.Sci.,84(1987)876-880.
6. Nakamura,S.and Ishihara,T., Behav. Brain Res.,39(1990)113-122.
7. Parsons,S.M.,Bahr,B.A.,Gratz,L.M.,Kaufman,R.,Kornreich,W.D.,Nilsson,L and Rogers,G.A., Ann. N.Y.Acad.Sci., 493(1987)220-233.
8. Ruberg,M.,Mayo,W.,Brice,A.,Duyckaerts,C.,Hauw,J.J.,Simon,H.,LeMoal,M.and Agid,Y.,Neuroscience,35(1990)327-333.

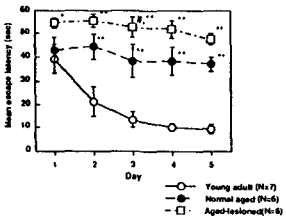


Fig.1 Learning ability of water maze performance in young adult rats, normal aged rats and aged BF-lesioned rats

*, ** p < 0.05, p < 0.01 vs young adult rats
# p < 0.05 vs normal aged rats

Table 1. ChAT activity in the frontal cortex of young adult rats, normal aged rats and aged BF-lesioned rats

	N	ChAT activity nmole/mg protein/hr
Young adult	6	16.2 ± 1.5
Normal aged	5	16.7 ± 1.4
Aged-lesioned	5	*10.1 ± 1.8* * #

Each values represents the mean ± S.E.M.
* p < 0.05 vs young adult rats
# p < 0.05 vs normal aged rats

Table 3. Monoamine contents in the frontal cortex of young adlut, normal aged rats and of rats with 23-months postlesion of the basal forebrain by AF64A

	Content (ng/g tissue weight)		
	Young(6)	Normal aged(5)	Aged-lesioned(5)
NE	119.8 ± 9.9	156.1 ± 10.6 *	102.0 ± 6.7 ##
DA	71.9 ± 5.7	79.6 ± 5.1	50.4 ± 5.1 * #
DOPAC	73.0 ± 5.9	68.3 ± 6.5	46.2 ± 6.6 *
HVA	25.6 ± 1.0	18.4 ± 2.1 *	11.7 ± 2.9 **
5-HT	243.0 ± 16.0	273.1 ± 7.9	152.9 ± 9.9 ** ##
5-HIAA	329.5 ± 25.0	325.0 ± 15.3	205.1 ± 14.2 ** ##

Each values represents the mean ± S.E.M..
*, ** p < 0.05, p < 0.01 vs young adult rats
#, ## p < 0.05, p < 0.01 vs normal aged rats

190 オペラント学習における海馬破壊の影響－カイニン酸とコルヒチンの相違

松本　明・九穂　泰三・石川　紘一

（日本大学医学部薬理学教室）

【要約】 海馬にカイニン酸（KA）を局所投与すると錐体細胞層が、一方コルヒチン（Co）を投与すると顆粒細胞層がそれぞれ選択的に変成し、KA と Co の同時投与は両細胞層の変成を惹起した。このようにして作成した海馬障害動物について、光を条件刺激としたレバー押し学習（オペラント学習）におよぼす影響を調べた。KAとCoを一側性に投与して海馬破壊を行なった動物では、学習成績の上昇および intertrial interval（ITI）中のレバー押し数は対照群と比較して有意の差を示さなかった。これに対し両側性に破壊すると、ITI中のレバー押し数が著しく増加するため学習成績は見掛け上高値を示したが、その後レバー押し回数の減少に伴って低下し、第5 session 以降対照群より低値であった。一方KA群の学習成績は、対照群とほぼ同様に上昇したが、Co群では有意に低値を示した。しかし両者の ITI 中のレバー押し数は、対照群と同程度であった。以上の成績は、海馬は短期記憶を形成する神経機構に関係し、顆粒細胞の破壊が錐体細胞のそれに比べて著しい障害を起こす事を示している。

はじめに

動物の記憶は一般に、短期記憶と長期記憶に区別して理解されてきた（1）。海馬の損傷は、主として短期記憶の形成過程に影響をおよぼす事から（2）、様々な学習課題が試みられ、空間記憶に基づく記憶形成の神経機構と密接に関係すると考えられている。我々の研究においても海馬破壊の影響は、八方迷路の様々な空間認知を必要とする課題においては、よく表現されたが、shuttle box 等の明暗弁別回避学習では影響されないと言う結果を得ている。一方電気生理学的知見としてLTPが短期記憶の形成過程に関係する可能性が示され（3）、海馬を構築する神経細胞と記憶学習の神経機構および学習課題との相互関係に興味が持たれている。その様な事を考慮し、比較的選択的に海馬錐体細胞あるいは顆粒細胞に細胞毒性を示す薬物を投与する事によって海馬障害動物の作成を試みた。また学習課題として、海馬損傷の影響が表われにくかった課題として、オペラント学習を選択し、それら損傷による影響が、記憶形成に伴う学習成績にどの様に表現されるかを検討した。

実験方法

1）海馬損傷動物の作成：Wistar系雄性ラットにペントバルビタール 30 mg/kg を腹腔内投与して麻酔した後、ラット脳固定装置を用いて海馬にカイニン酸（KA：0.2 mg/ml）、コルヒチン（Co：4.0 mg/ml）あるいは両者を 0.5 μl ずつ投与した。薬物の投与部位は、脳図表に従って Bregma より① P＝3.3, L＝±1.8, V＝3.5 ② P＝5.5, L＝±3.1, V＝3.5 ③ P＝5.8, L＝±4.8, V＝7.2であった。動物は恒温・恒湿に維持された12時間明暗周期の動物舎で飼育し、学習実験は薬物投与の3週間後に開始した。学習訓練を開始する1週間前から、すべての動物に飼料制限（80%）を加えた。また海馬破壊を行なう前の1週間にわたってスキナーボックス（520×345×345 mm）を用い、fixed ratio スケジュール（FR=1）に従ってレバー押し訓練を行なった。30回/10分以上の成績を示したもののみを以下の実験に用いた。

2）動物を装置に入れ3分間自由に探索させた後、室内に電球（24 V, 0.1 A）が点灯し、5秒以内にレバーを押すことによって餌（50 mg）が得られた。条件刺激の呈示が完了して45秒の intertrial interval（ITI）の後、再び電球が点灯し、学習が繰り返された。訓練は1日40試行とし、15日間続けられた。総試行数に対する餌獲得数を正解率として計算し、ITI中のレバー押し数は、動物の一般行動の指標として測定した。学習成績は、3日間の平均を1 session として標示し、対照群との統計学的検定には t-test を用いた。

3）実験終了後、Hematoxylin-Eosinにて染色し海馬破壊領域を確認し、破壊範囲が約 80% 以下のものを除外した。

実験結果

動物の海馬に KA および Co を投与すると軽度の興奮を示すものがあり、hyperreactvity が観察されたが、2週間後には、対照群の一般症状と区別がつかない程度に回復した。KA 投与群においても同様の症状が観察されたが、Co 群には一般行動上著しい変化がなかった。一方組織学的観察においては KA-Co 投与群では、海馬全域がほぼ完

全に脱落し、subiculumの一部が残存するのみであった。また KA 投与群では、錐体細胞層が脱落し、Co 群では顆粒細胞層のみが脱落していた。

光を条件刺激としたレバー押し学習を行なうと、生理的食塩を投与した対照群の正解率は、第1 sessionでは約12% であり、第5 sessionで約 90% となり、その後この正解率を維持した（図1A）。また KA-Co の両薬物を一側性に投与しても、正解率の推移には著しい差は認められなかった。同様に ITI 期間中のレバー押し数にも著しい相違が認められなかった（図1B）。しかし両側性に破壊すると、ITI 中のレバー押し数が著しく増加し、正解率も見掛け上高値を示したが、ITI 中のレバー押し数が対照群のそれに近ずくに従って低下した。KA 単独投与群の正解率は、第1 session において有意に高かったが、それ以後の値には、差が認められなかった。一方 Co 投与群では第2 session 以後有意に低い成績であった（図2A）。ITI 数は、KA 群の第1 session のみが有意に高かった（図2B）。

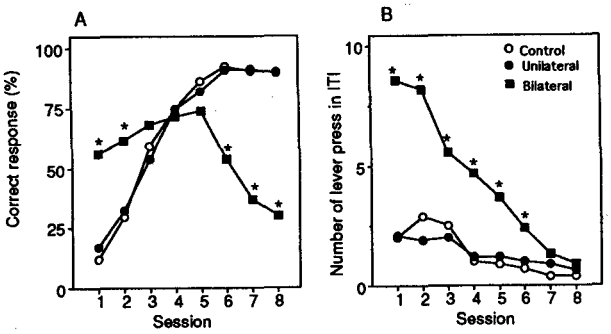


図1．一側性または両側性海馬破壊がオペラント学習（A）およびレバー押し回数（B）に及ぼす作用

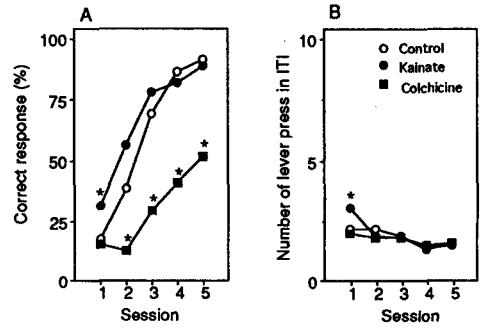


図2．カイニン酸またはコルヒチンによる海馬破壊がオペラント学習（A）およびレバー押し回数（B）に及ぼす作用

考　察

海馬は記憶の形成、特に短期記憶の記銘過程に密接に関係すると考えられている。オペラント学習において、一側性に海馬を破壊しても、正解率には何ら著しい影響を与えなかったが、両側性に破壊すると第1～5 session まで高い正解率を示した。この事は ITI 数が異常に高いため、見掛け上正解を得る確率が高くなったものと考えられる。一方一般行動には異常が認められず、また学習装置内では、通常の動物には観察されないレバー押しが増加するという行動は、海馬破壊前に記憶されたFR-1学習が想起されたものと考えられる。対照群や一側破壊群においては、この様な行動が認められない事から、海馬は想起の過程にも制御機構として働く可能性を示唆した。さらに ITI 中のレバー押し数は漸次減少した事から、海馬が破壊されても消去はできるものと考えられる。Co を投与して顆粒細胞層を破壊すると著しい学習障害を起したが、KAを投与して錐体細胞層を破壊しても、対照群と比較して著しい相違を示さなかった。しかしこれまでの研究(4)において、trimethyltin を投与し海馬錐体細胞層(特に CA1)を破壊した動物の学習成績は、KA投与動物のそれとよく一致した事から、錐体細胞層破壊の影響は、shuttle box 学習や operant 学習では表現されにくく、八方迷路学習などの空間記憶に反映されやすいと考えられる。

文　献

(1) Abbott, L.F. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9241-9245
(2) Squire, L.R., Shimamura, A.P. and Amaral, D.G. (1989) Neural Model of Plasticity (Byrne, J.H. and Berry, W.O., eds.), pp.208-239, Academic Press, New York.
(3) Lynch, G., Kessler, M., Arai, A and Larson, J. (1990) Prog. Brain Res. 83:233-250.
(4) 松本　明・九穂泰三・芝軒信次・小暮美樹・石川紘一（1991）神経化学 30:470-471.

191 弁別学習の遂行に伴うラット扁桃核モノアミン含量の上昇 — in vivo dialysis 法による検討 —

堀 耕治，田中淳一，野村正彦，入野誠郎*，久保浩一*，濱口勝彦*
(埼玉医科大学・第一生理，神経内科*)

〔要約〕

学習との関連が示唆されている扁桃核[2),3)]において，神経伝達物質の学習特異的な変動を検討する試みの一環として，学習課題遂行時における脳内モノアミン含量を in vivo dialysis 法により測定した．その結果，左右弁別訓練を獲得したラットでは学習課題遂行時に 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)，homovanillic acid (HVA)，5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) の有意な上昇が観察されたのに対し，非弁別訓練をおこなったラットではそのような上昇は見られなかった．このことから，今回用いた弁別課題の遂行には扁桃核のドーパミン・セロトニン両作動系が関与していることが示唆された．

ラットの扁桃核において，弁別学習課題遂行時の DOPAC，HVA，5-HIAA の細胞外レベルが上昇することをすでに報告したが[1)]，この上昇が弁別学習に固有のものなのか，それとも報酬型の学習に伴う餌の摂取や運動量の増加等の要因によるものなのかについては明確な結論を下せなかった．今回われわれは，弁別を伴わない訓練をおこなう統制群との比較により，この点について検討を加えた．

［方法］

自由摂食時の 85% に体重統制した Fischer 344 系ラットを被験体として用いた（訓練開始時12週齢）．弁別訓練（mult）群（n=7）には左右2個のランプを前面パネルに配置したスキナー箱を用いて mult FR30 FI60 s スケジュールの訓練をおこなった．すなわち右ランプ点灯時（FR 試行）には反応レバーへの30回目の反応に対し，また左ランプ点灯時（FI 試行）には点灯開始から 60 s 経過後の初発反応に対し，報酬として餌ペレットを与えた．一方，非弁別訓練（mix）群（n=6）には FR 試行と FI 試行とを弁別する手がかり刺激の存在しない mix FR30 FI60 s スケジュールの訓練をおこなった（左右のランプが常に点灯）．他の点では mult 群と同様である．1日の訓練は，両群とも FR 試行と FI 試行をランダムな順序で各20試行おこなった．30日間の訓練後，Paxinos & Watson のアトラスにより扁桃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 1 mm のプローブを使用して24時間灌流した後，スキナー箱内で3時間にわたって試料を採取した（流速 2 μl/min）．3時間の内，最初と最後の1時間は前面パネルを金属製遮蔽板で覆い反応レバーや餌皿への接近を不可能にした状態で，また中間の1時間では遮蔽板を取り除いて学習課題遂行状態でそれぞれ透析をおこなった．20分間の透析液を1試料とし，HPLC-ECDにより試料中の DOPAC，HVA，5-HIAA を測定した．基底値は最初の1時間，すなわち学習前3試料の平均とした．

［結果と考察］

学習成績の指標として試行開始から初発反応出現までの反応潜時をとった．Fig. 1 に訓練過程での反応潜時の推移を示す．mult 群では訓練後半から FR 試行と FI 試行の間で潜時の分化が見られるのに対し，mix 群ではそのような分化は観察されなかった．mult 群で左右のランプを手がかりとする弁別行動が獲得されたことが分かる．Fig. 2 は学習中および学習後の DOPAC，HVA，5-HIAA の基底レベルに対する百分率を示す．mult 群では学習課題遂行時にいずれのモノアミンについても基底値からの有意な上昇があったのに対し，mix 群ではそのような上昇は観察されなかった．

このことから，弁別課題の遂行によって扁桃核の細胞外モノアミンレベルが上昇すること，またこの上昇は餌の摂取や運動量の増加によるものではなく弁別学習に固有のものであることが示唆され，扁桃核におけるドーパミン・セロトニン両作動系の弁別学習への関与が推定された．

［文献］

1）堀 耕治ら（1991）神経化学 30, 498-499.　2）Richardson, J.S.（1973）Acta Neurobiol. Exp. 33, 623-648.
3）Sarter, M. & Markowitsch, H.J.（1985）Behav. Neurosci. 99, 342-380.

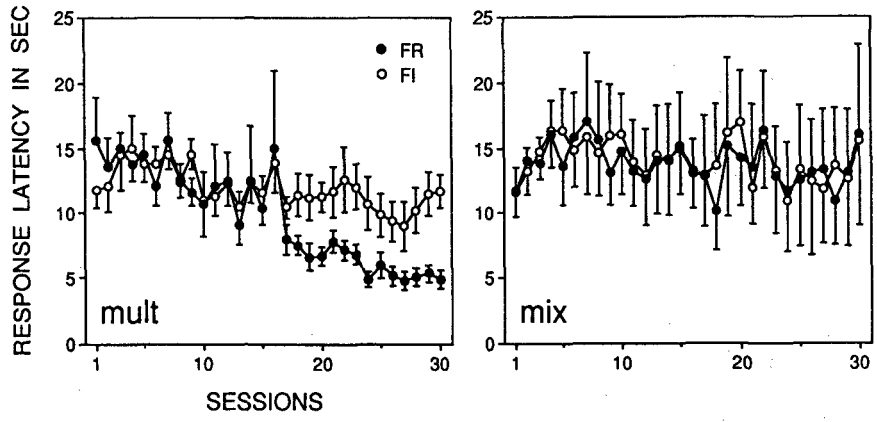


Fig. 1 Response latencies plotted against sessions. Each point represents the mean ± SEM.

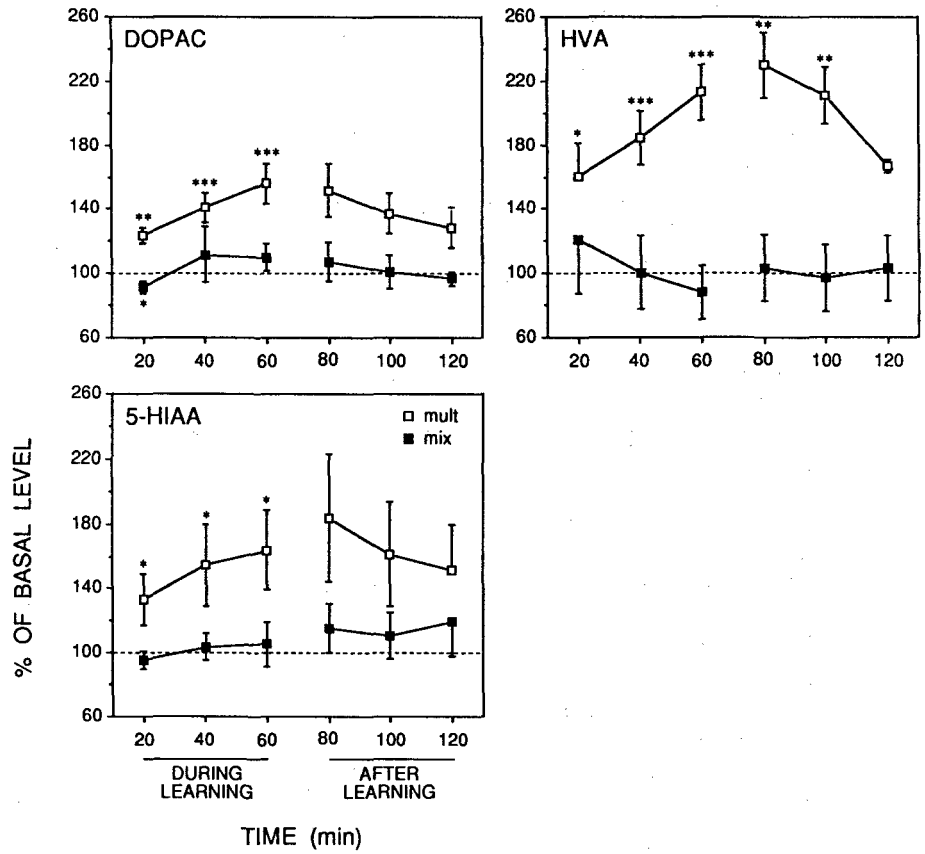


Fig. 2 Monoamine concentration during and after the learning session. Each pont represents the mean ± SEM.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs basal level.

192 弁別学習遂行時のラット扁桃核モノアミン量の推移：老化に伴う変化

田中淳一，堀耕治，野村正彦
（埼玉医大・第一生理）

〔要約〕

老化に伴う学習能力の変化と脳内モノアミン代謝との関連性を検討するため、老若２群のラットにオペラント型明暗弁別学習を行ない、学習課題遂行時における扁桃核のモノアミン量の変化をin vivo microdialysis法により測定した。ランプ点灯を正刺激とする原学習においては老齢群も若齢群と同程度の学習成績を示したが、ランプ消灯を正刺激とする逆転学習における老齢群の成績は若齢群のそれを下回った。逆転学習遂行時に若齢群でdopamine (DA),3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA)の有意な上昇が観察されたのに対し、老齢群ではこのような上昇は見られなかった。これらの結果は、老化が引起こす刺激一強化関係の変化に対する行動の可塑性の低下に扁桃核のドーパミン作動系やセロトニン作動系の加齢変化が関与していることを示唆している。

弁別学習行動時の脳内モノアミン量の推移を調べることにより、学習・記憶におけるモノアミンの役割をより明確にすることが可能である。我々は、すでに学習遂行時にラット脳内の特定部位の細胞外モノアミン量が増加することを報告した (1,2).今回は、老化に伴う学習能力の変化と学習遂行時の脳内モノアミン代謝との間に関連性を見出すことを試みた。すなわち、老若２群間で有意な学習成績の差が認められる弁別学習遂行時のモノアミン量の変動を測定、検討した。脳内測定部位には、学習に関与することが知られている扁桃核 (3,4) を選んだ。

〔方法〕

若齢群として実験開始時３か月齢、老齢群として２４か月齢のFischer344系雄ラットを用いた（各群９匹）。実験期間中の体重は自由摂食時の85%を維持するよう給餌統制した。学習実験には前面パネルの反応レバー直上に３個のランプを配置したオペラント箱を用いた。反応形成の予備訓練に続き、ランプの点灯／消灯を弁別刺激とするmult VI EXTスケジュールによる継時弁別訓練を行なった。正刺激 (S+) 呈示下での反応はVI 15 secスケジュールで間欠的に餌強化し、負刺激(S-)呈示下での反応は無強化とした。１日の実験セッションは40試行からなり、半数の試行ではS+を、残り半数の試行ではS-を呈示した。最初の30セッションでは点灯をS+、消灯をS-とする原学習訓練を行ない、続いて消灯をS+、点灯をS-とする逆転学習訓練を行なった。

逆転学習訓練が30セッション経過した時点で扁桃核にガイドカニューレを刺入した。刺入から３日後に直管型で透析膜長1mmのプローブを使用して24時間灌流後、ラットをオペラント箱に入れた状態で透析を行なった。20分間の透析液を１試料とし、連続９試料採取した。このうち中間の３試料は逆転学習下で採取し、前後各３試料は遮蔽板によってラットをオペラント箱前面パネルから隔てた状態で採取した。透析液中のモノアミン量は、電気化学検出器を備えた高速液体クロマトグラフィで測定した。

〔結果と考察〕

セッション当たりのレバー押し総反応数は、老齢群に比し若齢群の方が高い値を示した。図１は、弁別成績の指標である正反応率（総反応数に占めるR+の百分率）の推移を表している。原学習訓練 (ORIGINAL)においては反応水準の違いはあれ、老齢群も若齢群と同程度の成績を示したのに対し、逆転学習訓練 (REVERSAL)での老齢群の成績は一貫して若齢群のそれを下回った。

逆転学習前の扁桃核モノアミン量を測定した結果、5-HIAA量は若齢群に比し老齢群の方が有意に高い値を示したが、その他のモノアミン量には群間差は認められなかった。若齢群の場合、逆転学習遂行時のモノアミン量はその前後に比較して一般に高い値を示したが、老齢群では顕著な変化を認めなかった。図２は、学習に伴うモノアミン量の変化（学習前３試料の平均値に対する学習時３試料の平均値の百分率）を表している。若齢群では、DA、DOPACおよび5-HIAAに学習に伴う有意な増加を認めたが、老齢群ではベースラインからの有意な変化はなかった。

以上の結果から、加齢に伴って刺激一強化関係の変化に対する行動の可塑性が低下すること、またこの過程に扁桃核におけるドーパミン作動系やセロトニン作動系の加齢変化が関与していることが推察された。

〔文献〕

1. 堀耕治ら (1991) 神経化学 30, 498-499.
2. Irino, S. et al. (1991) Jap. J. Physiol. 41, S204.
3. Richardson, J.S. (1973) Acta Neurobiol. Exp. 33, 623-648.
4. Sarter, M. & Markowitsch, H.J. (1985) Behav. Neurosci. 99, 342-380.

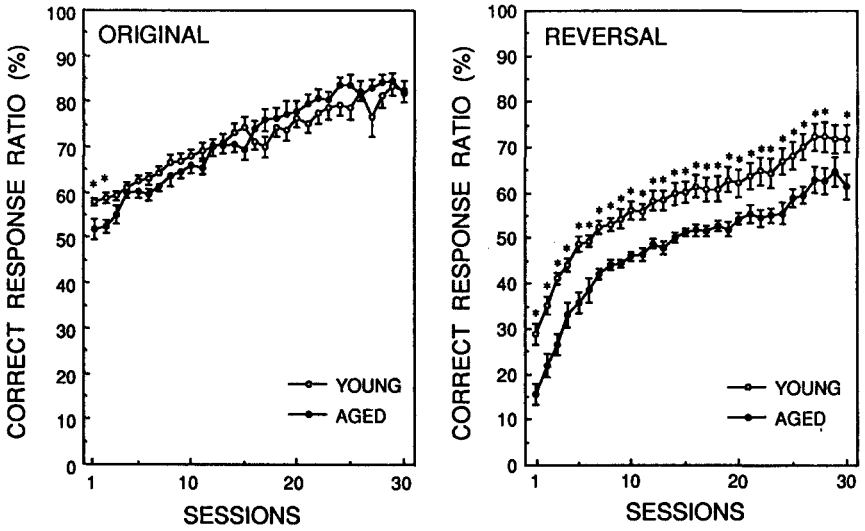


図1　正反応率の推移

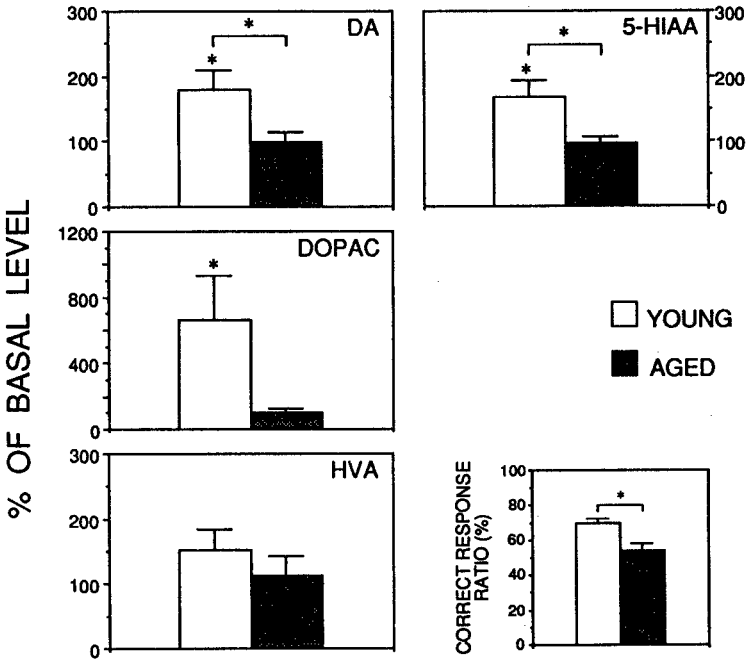


図2　学習課題遂行時におけるモノアミン含量の増加率と透析時の学習成績

193 ペプチドを用いたミエリンＰ０蛋白細胞接着活性部位の検討

矢崎貴仁、三浦正幸、阿相皓晃、古武よし子、北村邦男*、植村慶一

（慶應大・医・生理、*埼玉医大・Ｉ生理）

〔要約〕

Ｐ０蛋白は哺乳動物では末梢ミエリンに局在する膜糖蛋白であり、その構造解析より免疫グロブリンスーパーファミリーに属することが示されている。既に我々はＰ０ｃＤＮＡをＣ６細胞に強制発現させる系を確立し報告した。今回はＰ０発現Ｃ６細胞の細胞接着の解析系を確立し、以下の実験結果を得た。１）Ｐ０蛋白による細胞接着はホモフィリックなものである。２）その細胞接着はＬ１などの他の接着蛋白による細胞接着に比較してかなり強力なものである。３）Ｐ０蛋白の４種の部分合成ペプチドの添加による接着阻害実験では糖鎖結合部位を含むペプチド３（９０－９６残基）は５０％程度のかなり強い阻害効果を示した。４）ウシＰ０蛋白より精製した糖ペプチド（９１－９５残基）の添加では８５％に及ぶ著名な接着阻害が見られた。５）Ｃ６細胞膜表面に発現されたＰ０蛋白は糖鎖を含んでいることが確認された。これらの結果は糖鎖およびその近傍のペプチド部分がＰ０蛋白による細胞接着に重要な役割を果たしていることを示唆している。

［はじめに］

神経組織にはＬＩ、ＮＣＡＭ，ＭＡＧ、Ｐ０などの特徴的な免疫グロブリンスーパーファミリー蛋白群が存在し、それらが細胞接着蛋白群として、神経組織の形態形成および再生に重要な役割を果していると考えられている(2)。末梢神経系では、Ｐ０とＭＡＧはミエリン形成性シュワン細胞に発現するのに対し、ＬＩとＮＣＡＭはミエリン非形成性シュワン細胞に発現している(8)。Ｐ０はミエリン形成の初期に発現し、コンパクトミエリンの形成と維持に細胞接着蛋白として貢献している。Ｐ０ｃＤＮＡをトランスフェクトして、培養細胞に発現させ、その機能解析を行なった報告が最近出されている(1,3)。我々は既にＰ０蛋白を含まないＣ６細胞へＰ０蛋白を発現させ、発現されたＰ０蛋白が後根神経節細胞に対して神経突起伸展作用を示すことを報告した(9)。しかし、これらの蛋白群の細胞接着の活性ドメインに関する研究はまだ極めて少ない。本研究ではＰ０発現細胞の細胞接着解析系を確立し、Ｐ０蛋白の接着活性ドメインの同定を試みた。

［実験方法］

１．プラスミドの作成とｃＤＮＡのトランスフェクション：βアクチンプロモーターをもつ pBact-STneoB を発現ベクターとして用い、P0cDNA を正方向に挿入した pBACTP0 と逆方向に挿入した pBACTP0'の２種のベクターを作成した。Ｃ６細胞へのトランスフェクションはリン酸カルシウム法により、 pBACTP0 と pBACTP0'をそれぞれ発現する安定クローンＣ６Ｐ０とＣ６Ｐ０’を得た(9)。Ｃ６Ｐ０細胞におけるＰ０蛋白の発現はＰ０抗体による免疫組織染色と Western Blot によって確認した(9)。

２．ペプチド合成とＰ０糖ペプチドの調整：ラットＰ０蛋白の４３－５０、８３－９０、９０－９６、１００－１０７の部位にそれぞれ相当する４種の合成ペプチド（それぞれペプチド１，２，３，４）をＡＢＩ４３０Ａペプチド合成機でＦｍｏｃ法で合成し、ＯＤＳカラムを用いた高速液クロで精製し、ＡＢＩ４７３Ａプロテインシーケンサーでアミノ酸配列を確認した(4)。Ｐ０糖ペプチド画分（ＧＰ）は精製ウシＰ０蛋白よりゲルロカカラムを用いた既報の方法によって精製した(5)。

３．ホモフィリックな細胞接着の検定：Ｃ６Ｐ０細胞とＣ６Ｐ０’細胞をそれぞれＤｉＩとＤｉＯ色素で染色し、１：１に混合して４５分培養した後、細胞塊を固定して観察した(6)。

４．細胞凝集と阻害実験：単層培養した細胞をＥＤＴＡ存在下で１５分培養した後、デスパースし、１ｘ１０^{5}細胞／mlに調整した。細胞浮遊液を complete medium (10% fetal calf serum を含む Dulbecco's modified Eagle's medium) 中 37° Cで培養し、１５分おきに液中の細胞と細胞塊の数（Ｎ）を Hemocytometer で測定した。凝集の程度はＴ時間と０時間におけるＮの比：Ｎｔ／Ｎｏで示した(6)。阻害実験には 50-500 μg/ml の合成ペプチドまたは糖ペプチドを細胞浮遊液を作成する前に添加してその効果を測定した。

５．発現したＰ０蛋白の糖鎖の分析：Ｃ６Ｐ０細胞よりＳＤＳ溶液で蛋白を抽出した後、ＳＤＳＰＡＧＥによってＰ０蛋白を分離、精製し、プロテアーゼ分解、グリコペプチダーゼ処理、糖鎖の分離、２アミノピリジル化を行ない、蛍光検出によるＯＤＳ系高速液クロで分析した(7)。

［実験結果と考察］

１．Ｐ０蛋白によるホモフィリックな細胞接着：ＤｉＩラベルしたＣ６Ｐ０’細胞とＤｉＯラベルしたＣ６Ｐ０細胞を等量に混合して細胞凝集培養を行なった結果、ＤｉＩ－Ｃ６Ｐ０’細胞の細胞凝集は少なく弱かったがＤｉＯ－Ｃ６Ｐ０細胞は大きなホ

モフィリックな細胞塊を形成した（図は当日供覧）。

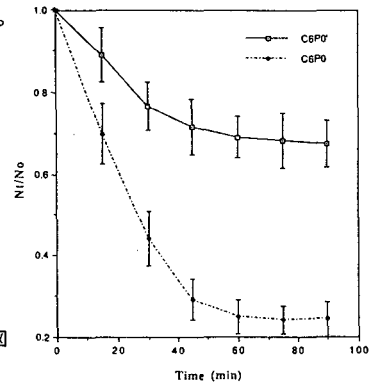
2．C6細胞のP0蛋白の発現と細胞接着の関係：C6P0細胞とC6P0'細胞の細胞凝集の時間経過を第1図に示した。全粒子（単細胞＋細胞塊）数はコントロールのC6P0'細胞では60分で68%に減少したが、C6P0細胞では24%まで減少し、P0発現細胞で著名な細胞接着が認められた。第2図に45分後の細胞接着の状態を示した。これらの結果はP0蛋白依存性の細胞接着が存在し、それは既に報告したL1蛋白依存性の細胞接着(6)に比較して、極めて強いものであることを示している。

3．合成P0ペプチドによる細胞接着の抑制の時間経過：第3図に 500 μg/ml の各種ペプチドを添加した場合の細胞接着の抑制を示した。ペプチド2，4は活性を示さなかったが、ペプチド3は顕著な抑制効果を示し、ペプチド1は弱い活性を示した。ペプチド3は唯一の糖鎖結合部位であるAsn(93) を含んでいるので、糖ペプチドを調整しその効果を検定した。

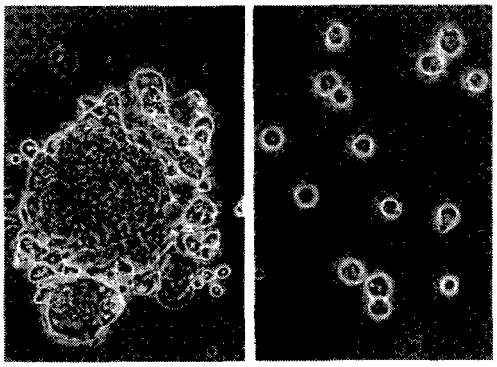
4．合成ペプチドおよび糖ペプチド添加濃度と細胞接着の抑制の関係：第4図にペプチドの添加濃度と細胞接着の抑制の程度を示した。糖ペプチドは濃度依存性に50－80%の最も強い抑制を示し、ペプチド3はその1／2程度、ペプチド1は20%以下、ペプチド2は10%以下の抑制であった。

5．C6P0細胞の発現したP0蛋白の糖鎖分析：native P0蛋白に類似の糖鎖の存在が認められた。

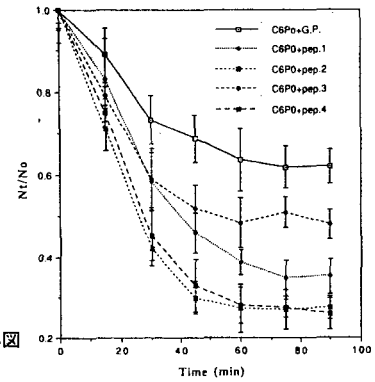
以上の結果よりP0蛋白による細胞接着には糖鎖とその近傍のペプチド部分が関与する可能性が強く示唆された。P0蛋白の糖鎖には Microheterogeneity が知られており、その中の活性ドメインとペプチド部分の関係については今後さらに詳細な検討が必要であろう。



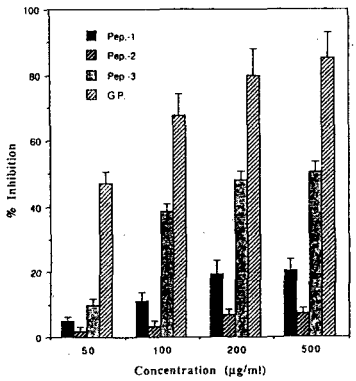
第1図



第2図　C6P0　C6P0'



第3図



第4図

［文献］

1)D'Ulso,D.,Brophy,P.J.,Staugaitis,S.M.,Frey,A.B.,Stempak,J.G.and Colman,D.R.(1990) Neuron 2,449-460
2)Edelman,G.M and Crossin,K.L.(1991)Ann.Rev.Biochem.60,155-190
3)Filbin,M.T.,Walsh,F.S.,Trapp,B.D.,Pizzey,J.A. and Tennekoon,G.I.(1990)Nature 344,871-872
4)Hewick,R.M.,Hunkapiller,M.W., Hood,L.E. and Dreyer,W.J.(1981) J.Biol.Chem.256,7990-7997
5)Kitamura,K.,Suzuki,A.,Suzuki,M. and Uyemura,K.(1979) FEBS Lett.100,67-70
6)Miura,M.,Asou,H.,Kobayashi,M. and Uyemura,K.(1992) J.Biol. Chem.267,10752-10758
7)Tomita,N.,Awaya,M.,Kurono,M.,Endo,S.,Arata,Y. and Takahashi,N.(1988) Anal. Biochem.171,73-90
8)Trapp,B.D.,Itoyama,Y.,Sternberger,N.H.,Quarles,R.H. and Webster H,deF.(1981)J.CellBiol.90,1-6
9)Yazaki,T., Miura,M.,Asou,H.,Toya,S. and Uyemura,K.(1991) Biomed.Res.12,332-230

194 胎生期に発現するミエリン塩基性蛋白質の新しいアイソフォームの発見

仲嶋一範[1,2]，池中一裕[1]，鹿川哲史[1]，有賀純[2]，中尾純治[1]，中平健祐[1]，塩田千代[1]，Seung U. Kim[3]，御子柴克彦[2]

(阪大蛋白研[1]、東大医科研[2]、British Columbia大神経内科[3])

〔要約〕

ミエリン塩基性蛋白質(MBP)はミエリンの主要な構成成分の一つである。マウス脳ではミエリンは生後形成されるが、我々は胎生12日(E12)から既にMBP遺伝子は発現しており、しかもその胎生期のアイソフォームの多くはこれまでに報告のない新しいものであることを見い出した。これらは第5エクソンにコードされる領域を欠失しており、その発現量は胎生期にピークがありミエリン形成期にはむしろ著減する特異なパターンを示した。ジンピーマウスでの解析及びFACSを用いた細胞種の検討から、これらのアイソフォームはオリゴデンドロサイト(ODC)の前駆細胞で産生されていることが示唆された。また、MBPはこれまで5種の主なアイソフォームが知られているが、mRNAレベルで少なくとも18種存在し、これらはdevelopmental profileにより少なくとも3群に分類できることも今回見い出した。

マウスMBP遺伝子は7つの主なエクソンから成り、alternative splicingにより21.5 kd、18.5 kd、17 kd-1、17 kd-2、14 kdの5種類の蛋白質をコードするmRNAが産生されることが知られている(Fig.3)(1、2、3)。これらはいずれも生後18日(P18)頃に最も盛んなミエリン形成に重要と考えられ、これまでその発現はおもに生後について調べられてきた。今回、我々が最近開発したレトロウイルスを用いたプロモーター活性測定系(4)により、胎生期の脳初代培養細胞の一部で既にMBPプロモーターが活性化されていることを見い出し、それをPCR法により確認、更にそのcDNAをクローニングしたので報告する。

【方 法】

1) レトロウイルスを用いた脳初代培養系におけるプロモーター活性の検出：E13のICRマウスの大脳の細胞を培養し、2日後MBP1.3/pIP200ウイルス(4)及びSV/pIP211ウイルスを感染させた。後者は、核移行シグナルを付加したlacZ遺伝子の上流にSV40プロモーターを挿入したもので、感染効率や感染後の細胞増殖を補正するコントロールとして使用した。感染翌日(E16相当)、既に報告した方法(4)に従いプロモーター活性をX-Gal染色により検出した。

2) RT-PCR法：各ステージの全RNAをGTC法で調製し逆転写によりcDNAを得た後、第1エクソン及び第7エクソン内に作製したプライマー間で20-30回PCRを行った。検出は、5%PAGEで分離後ナイロンフィルターに転写し、^{32}Pで標識した各種オリゴヌクレオチドでhybridizeすることにより行った。FACSで分離した細胞については、SDS及びProteinase Kで処理後、同様にRT-PCRを行った。

3) cDNAクローニング：E16のマウス脳全RNAから逆転写後、第1エクソン及び第7エクソン内に作製した各々2種類のプライマーを用いてnested PCR法によって増幅した。プラスミドに挿入後、目的の断片を持ったクローンをdot-blot法によってスクリーニングし塩基配列を決定した。

4) FACSによる細胞分離：P9のマウス大脳の細胞を、抗Galactocerebroside(GalC)抗体及びFITCラベル二次抗体と反応後、死細胞の核をpropidium iodide(PI)で染色した。PI陰性で、かつFITC陽性または陰性の分画を、各々GalC陽性または陰性細胞として回収した。

【結果と考察】

レトロウイルスを用いたプロモーター活性測定系により、少なくともE16相当からMBPプロモーターが活性化された細胞が存在することが示唆された(Fig.1)。そこでMBP-mRNAが胎生期の脳内に存在していることを確認するため、各ステージの脳からRNAを調製しRT-PCR法を行った。第2エクソン(C7 probe)、第1エクソン一第3エクソン結合部(C12 probe)に特異的なプローブでhybridizeすることにより、確かに胎生期しかもE12から、従来から知られている5種のMBPの全てがmRNAとして既に産生されていることがわかった(Fig.2A、2B; band c,h,e,g,j)。しかも興味深いことに、このうち17 kd-2をコードするものは他の4種と異なりむしろ胎生期(E15-18)にピークを持つことが明らかになった(band g)。同様な挙動を示すアイソフォームが他に3種(band d,i,k)検出されたため、これらのクローニングを試みた。塩基配列を決定したところエクソン1-2-3-4-6-7、エクソン1-3-4-7の構造を持つアイソフォーム(Fig.3)を見い出し、これらは各々band d、band kに相当することがわかった。第4エクソン一第6エクソン結合部(C46 probe)、第4エクソン一第7エクソン結合部(C47 probe)に特異的なprobeでrehybridizeした結果をFig.2C及び2Dに示す。band iは、エクソン1-2-3-4-7の構造(Fig.3)を持つものと考えられた。他にP8にピークを持つアイソフォーム(band d'、band f)も検出され、別の一群を形成するものと考えられた。これらの結果をFig.4にまとめた。

次にE15-18にピークを持つTypeIIのアイソフォームと、この時期におこる未分化ODCの分化・増殖との関係の有無を調べるため、P18でもほとんどのODCが未分化であることが知られているジンピーマウスで同様の実験を行った(Fig.5)。P18では正常マウスではTypeIIアイソフォームは著減するが、ジンピー(jp/Y)ではかなり残っていることがわかり、TypeIIは未分化ODCと関係があることが示唆された。

次に、TypeIIアイソフォームがODCの細胞系譜の細胞そのもので産生されているかを調べるためODCのマーカーであるGalC陽性及び陰性の細胞をFACSで分離し、同様に解析した(Fig.6A、6B)。その結果、TypeI、TypeIIアイソフォームのいずれもGalC陽性の細胞で主に産生されていることがわかった。以上より、TypeIIは未分化ODCそのもので産生されていることが示唆された。

【文 献】

(1) de Ferra, F. et al. (1985) Cell 43, 721-727 (2) Newman, S. et al. (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 84, 886-890 (3) Mikoshiba, K. et al. (1991) Annu. Rev. Neurosci. 14, 201-217 (4) Ikenaka, K. et al. (1992) The New Biologist 4, 53-60

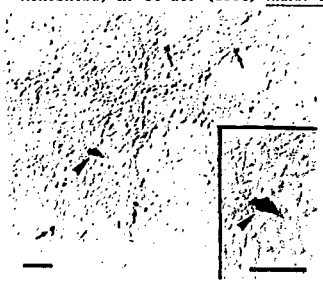


Fig.1 レトロウイルスを用いた胎生期脳の初代培養系(E16相当)におけるMBPプロモーター活性の検出：矢頭はMBP 1.3/pIP200由来の、また矢印はSV/pIP211由来のβ-galの存在を示す。bar: 50 μm

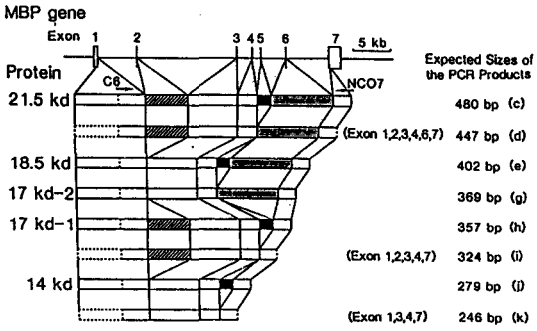


Fig.3 MBPのRNAのalternative splicing："エクソン1、5"とは各々1b、5bのことである。エクソン0、1aの有無は今回の実験では不明であり、エクソン5aを含むアイソフォームはE16からはクローニングされなかったためここでは示していない。C6、NCO7はPCRに用いたプライマーの位置を示す。

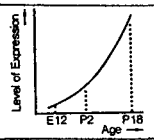
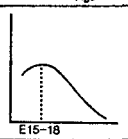
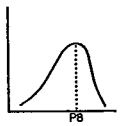
Type	Developmental Profile	Protein	Band	Exon Structure
I		21.5 kd	c	1-2-3-4-5-6-7
		18.5 kd	e	1-3-4-5-6-7
		17 kd-1	h	1-2-3-4-5-7
		14 kd	j	1-3-4-5-7
II		?	d	1-2-3-4-6-7
		17 kd-2	g	1-3-4-6-7
		?	i	1-2-3-4-7
		?	k	1-3-4-7
III		?	d'	?(hybridize to exon 4-exon 7 junction specific probe)
		?	f	?(hybridize to exon 1-exon 3 junction specific probe and exon 4-exon 7 junction specific probe)

Fig.4 脳MBPのdevelopmental profileによる分類

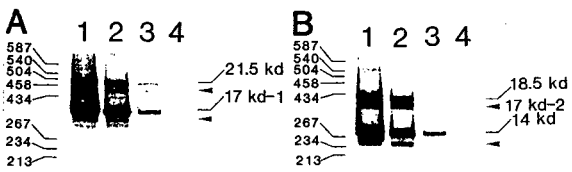


Fig.6 GalC陽性及び陰性細胞での解析：A、Bは各々C7、C12 probeで検出した結果を示す。lane1:P9全脳RNA、lane2:GalC陽性細胞、lane3:GalC陰性細胞、lane4:negative control

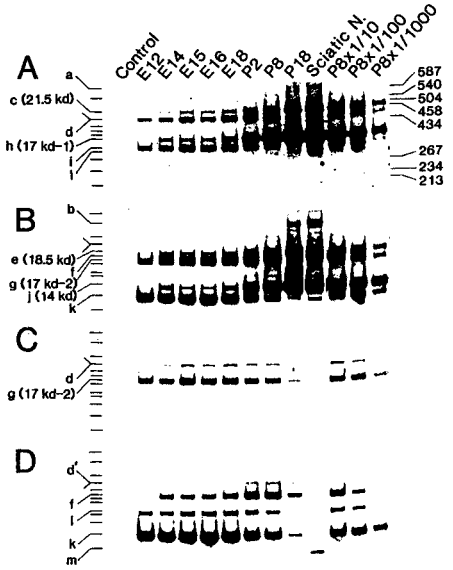


Fig.2 MBPmRNAのdevelopmental profileの解析：AはC7 probe、BはC12 probe、CはC46 probe、DはC47 probeによる解析結果を示す。すべて同じフィルターをrehybridizeしたもので、左に全bandの位置を示した。坐骨神経で、脳のTypeIIと同様の位置にbandがみられるが、C46、C47の結果からこれらは脳のものとは異なることが示唆される。合計少なくとも18種のアイソフォームが検出された。PCR: 30回。

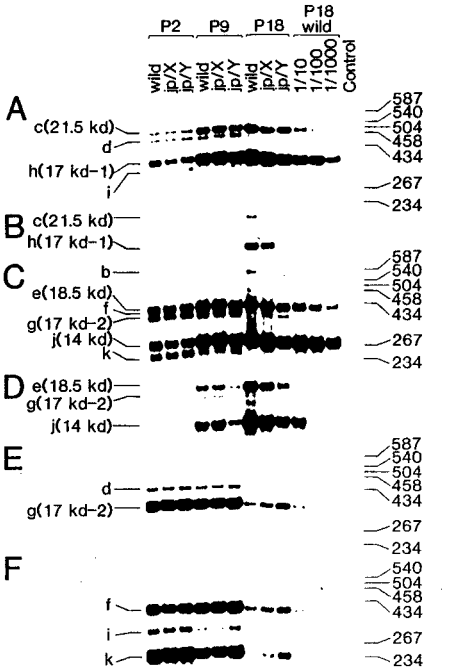


Fig.5 ジンピー及びそのlittermatesでの解析：A、BはC7 probe、C、DはC12 probe、EはC46 probe、FはC47 probeでの解析結果を示す。B、DはPCR20回、それ以外は30回行った。

195 ヒト末梢神経ミエリンの糖脂質抗原の解析

後藤希代子[1]、森田御園[1]、窪田和興[1]、太田雪子[1]、江嵜英美[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〕
ヒト運動、感覚神経およびそのミエリンの中性糖脂質組成をTLC, TLC-免疫染色により分析した。運動、感覚神経共にCMH以外にCDH, CTH, globoside (Gb_4Cer)、paragloboside (nLc_4Cer)に対応する糖脂質が検出され、両神経のミエリンにはCDH, CTH,、nLc_4Cer、nLc_6Cerが検出された。中性糖脂質パターンについて運動、感覚神経の間で顕著な差異は観察されなかった。更に慢性多発性根神経炎の患者血清中IgM抗体と結合する複数の未同定糖脂質が末梢神経に存在することが分かった。それら糖脂質抗原のうちの一つはアシアロGM1(Gg_4Cer)である可能性が、ウサギ抗Gg_4Cer抗体を用いてのTLC-免疫染色により示された。

近年、神経系の複合糖質に対する自己抗体が各種の末梢神経障害において病態に深く関与している事が分かり、様々な糖鎖が自己抗原として同定されている。これらの免疫性神経疾患の障害機序解明には抗原となるヒト末梢神経の糖脂質組成の解析が重要であるが、これまで十分な構造解析は殆どされていなかった。我々はヒト運動神経と感覚神経を特徴ずけ、特異的障害機構にも対応するような物質レベルでの違いを検索し、ヒト運動神経と感覚神経のガングリオシドはセラミド部分が特徴的に異なることを報告した(1)。又、両神経ミエリンのガングリオシド組成が異なり運動神経ではGM1含量が感覚神経よりも多いことも見いだした(2)。本研究では両神経ミエリンの中性糖脂質の構造解析を行ない、GalCer以外の糖鎖の長い中性糖脂質としてCDH, CTH, globoside (Gb_4Cer)、paragloboside (nLc_4Cer)に対応する糖脂質が検出される事を見いだした。更にヒト末梢神経の中性糖脂質画分中には慢性多発性根神経炎の患者血清中抗体と結合する微量糖脂質を見いだし、そのうちの一つはアシアロGM1(Gg_4Cer)と共通エピトープを持つと考えられたので報告する。

[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。慢性多発性根神経炎（Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy, CIDP)の患者血清は横浜市立大学医学部木村清次先生より恵与された

2．ミエリン画分の調製　末梢神経のミエリンの分離は、Mickoらの方法(3)に従いおこなった。5'-nucleotidase活性、β-ガラクトシダーゼ活性の測定、SDS-PAGEによる蛋白質分析によりミエリン画分の純度を検定した(2)。

3．中性糖脂質の分離、分析　総脂質の抽出、陰イオン交換カラムによる中性脂質と酸性脂質の分離は既報により行なった(1、2)。中性脂質画分は、アセチル化後Iatrobeadsカラムにかけ、画分A (dichloroethane/acetone 9/1, v/v)と画分B(dichloroethane/acetone 1/1, v/v)に分離した。各糖脂質の分析をTLC及びTLC-免疫染色により行なった(4)。抗体は抗アシアロGM1抗体、抗Forssman抗体(生化学工業)，及びネオラクト系糖鎖の末端2糖（Galβ1-4GlcNAc-R)を認識するH-11(5)を用いた。TLCの展開溶媒は，溶媒1、C/M/H_2O(70/40/8, by volume)、溶媒2，2-PrOH/15N NH_4OH /methylacetate/H_2O(75/10/5/15, by volume)(6)、溶媒3、C/M/0.2 % $CaCl_2 \cdot 2H_2O$(55/45/10, by volume)を使用した。

[結果]

1．末梢神経及びミエリンの中性糖脂質

末梢神経には総脂質の10%以上のGalCerが含まれているため、画分Aと画分Bに分離して微量成分の分析を行なった。98%以上のGalCerを画分Aに、2糖以上の中性糖脂質を画分Bに得た。画分Bについて、神経線維全体とミエリンのＴＬＣパターンの比較を図1に示した。運動、感覚神経線維共にCMH以外にCDH, CTH, globoside (Gb_4Cer)、paragloboside (nLc_4Cer)に対応する糖脂質が検出された(lane 1,2)。各々のミエリン画分では，nLc_4Cerが主成分となりGb_4Cerは殆ど検出できなかった(lane 3，4)。TLC-immunostainingによりnLc_4Cerに加えてnLc_6Cerが検出され、又CTH画分にはGb_3Cerが含まれることが分かったが、抗Forssman抗体と反応する糖脂質は得られなかった(結果未掲載)。運動、感覚神経の間で中性糖脂質パターンの顕著な差異は見られなかった。

2．CIDP患者血清及び抗アシアロGM1抗体によるTLC-免疫染色

末梢神経より精製した中性及び酸性糖脂質を用いて、CIDP患者血清によるTLC-免疫染色を行ない糖脂質抗原の検索を行なった。

Figure 1

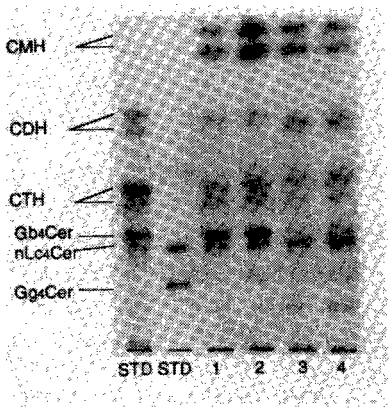


Figure 1. TLC pattern of neutral glycosphingolipids(fraction B) in human PNS.
STD(left), standard glycosphingolipids from erythrocytes; STD(right), nLc_4Cer and Gg_4Cer; lane 1, motor nerve; lane 2, sensory nerve; lane 3, myelin from motor nerve; lane 4, myelin from sensory nerve. solvent system 1

Figure 2. Immunostaining with serum IgM from a patient with CIDP.
lane 1, standard gangliosides from bovine brain; lane 2, acidic *glycolipids purified from the human* motor nerve; lane 3, sulfated glucuronyl-nLc_4Cer; lane 4, fraction B of the motor nerve; lane 5, standard glycosphingolipids from erythrocytes; panel A, orcinol; panel B, Immunostaining with serum IgM from a patient with CIDP. solvent system 3

Figure 3. Immunostaining with serum IgM from a patient with CIDP.
STD, standard glycosphingolipids from erythrocytes and Gg_4Cer; lane 1, motor nerve; lane 2, sensory nerve; lane 3, myelin from motor nerve; lane 4, myelin from sensory nerve. panel A, orcinol; panel B, Immunostaining with serum IgM from a patient with CIDP. solvent system 2

Figure 2

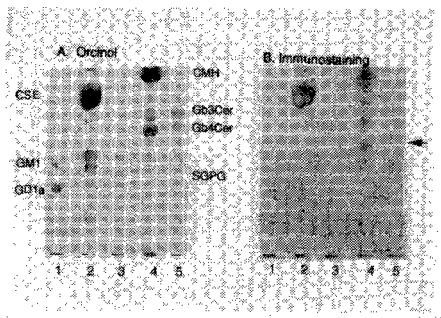


Figure 3

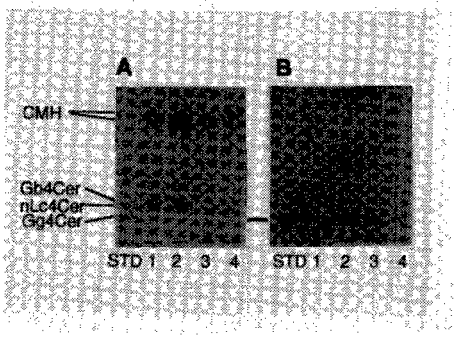


図2に示した様に患者血清IgMは、標準品として用いた赤血球膜の中性糖脂質(lane 5)、大脳ガングリオシド(lane 1)、末梢神経より精製したガングリオシド(lane 2)、*sulfated glucuronyl-nLc₄Cer*(lane 3)とは反応しなかったが、末梢神経に多量に存在するsulfatideと結合した(lane 2)。更に末梢神経の中性糖脂質画分中に複数の陽性バンドが観察された(lane 4)。LacCer,Gb_3Cerを含む赤血球膜の中性糖脂質画分には陽性バンドが観察されないことより、LacCer,Gb_3Cer以外の糖脂質が末梢神経には含まれているものと考えられた。これらの未同定糖脂質のうち移動度の最も小さいもの（矢印、以下N1と略す）は非常に微量でオルシノール染色では殆ど検出できないが、免疫染色では強く染色され抗原性の強いことが推測された。N1はGg_4Cerと移動度が近く、更にこの患者血清IgMは標準Gg_4Cerと結合した(結果未掲載)。これらより末梢神経及びミエリンの画分BにGg_4Cerが含まれている可能性を確かめるため、ウサギ抗Gg_4Cer抗体を用いてTLC-免疫染色により分析した。その結果、運動、感覚神経及び両神経ミエリン共に陽性バンドが検出され（図3）、ヒト末梢神経とミエリンにはGg_4Cerまたはそのエピトープを持つ糖脂質が存在すると考えられた。

[考察]

我々は末梢神経ミエリンのガングリオシド組成について運動神経ではGM1含量が感覚神経よりも高いことを報告しているが(2)、本研究でそのアシアロ体であるGg_4Cerは両神経にほぼ同程度存在する可能性が示された。N1等のCIDP患者血清と結合する糖脂質の構造は現在解析中である。最近、polyneuropathyの患者血清中にはGM1の糖鎖に対する自己抗体が存在し、自己抗体の特異性、crossreactivityなどは症例によって異なる事が知られている(7)。今回示したような抗原糖脂質の分布の解析と合わせて考えることにより、免疫性神経疾患の障害機序解明が進むものと期待される。

[謝辞]CIDP患者血清を御提供くださいました横浜市立大学医学部木村清次先生、単クローン抗体H-11を御供与頂きました東京医科歯科大学滝孝雄先生に深謝いたします。

References(1) Ogawa-Goto, K., *et al* ,J.Neurochem. 55, 1486-1493 (1990). (2) Ogawa-Goto, K., *et al* ,J.Neurochem. in press (3) Micko, S., and Schlaefper,W.W. J.Neurochem., 30, 1041-1049 (1978).(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) Ogawa K et al J.Chromatogr.Biomed.Appl. 426:188-193 (1988).(7). Sadiq, S.A.*et al* , Neurology 40, 1067-1072 (1990).

196 末梢神経P0蛋白質糖鎖の2アミノピリジル化誘導体の構造解析

北村邦男、田中早苗、坂本安、渋谷匡子、吉村和法、野村正彦、植村慶一*
(埼玉医大・一生理、慶大・医・生理*)

〔要約〕末梢神経ミエリン構成蛋白質の約50%を占めるP0糖蛋白質の糖鎖には糖蛋白質としては極めて珍しい硫酸化グルクロン酸を含む糖鎖が存在し、HNK-1抗体やニューロパチー患者血清との反応性が注目されている。今回、P0蛋白質糖鎖の2アミノピリジル(PA)化誘導体の作製法の検討、glycosidases並びに^{1}H-NMRを用いたPA化糖鎖の性質の検討の結果, 以下の点が明らかとなった。①糖ペプチドよりオリゴ糖を得る方法としては、ヒドラジン分解法はGP5が分解してしまうため適当な方法ではなく、glycopeptidase Aが効果的であった。② endo型酵素の内、endoglycosidase F と endoglycosidase H はGP4及びGP5に対して作用するが、endoglycosidase D は両者に対して全く作用しなかった。又、endo-β-galactosidaseはGP5及び脱硫酸化したGP5には作用するがGP4には作用せず、この酵素がグルクロン酸含有糖鎖の識別に有効であることが示された。③脱硫酸化前後のGP4とGP5に対するexoglycosidasesの作用を検討した結果、GP4とGP5に共通して存在する硫酸の結合位置はGlcNAc-5 であると考えられた。④^{1}H-NMRの結果、anomeric proton 領域にGP5特異的な2組のシグナルが観察され、これらのシグナルは脱硫酸化によって著名に高磁場側へシフトすることから硫酸化グルクロン酸及び硫酸化GlcNAc-5由来のものと考えられた。

ウシ末梢神経ミエリンの主要構成蛋白質であるP0 糖蛋白質 は 1 つのAsn結合型の糖鎖結合部をもっているが、その糖鎖には少なくとも 5 つの不均一性があり(GP1～GP5)、それらの推定構造を以前報告した(1,2)。その内のGP5はその非還元末端に硫酸化グルクロン酸をもつ珍しい構造をしていることを明らかにし、GP5がHNK-1抗体と反応することを報告した(3)。類似の構造は末梢神経に存在する硫酸化グルクロン酸含有糖脂質 (SGGLs)にもあることが報告されているが(4)、糖蛋白質としては始めてのものであった。HNK-1抗体は、この硫酸化糖脂質や神経組織のイムノグロブリンスーパーファミリーに属するMAGやN-CAM等の細胞接着蛋白質にも反応することから、これらに共通の構造としての硫酸化グルクロン酸が注目されている。一方、ある種のニューロパチー患者のMたん白が MAG の糖鎖やSGGLs の糖鎖をエピトープとすることが知られ疾患との関連が注目されている(4)。今回、P0蛋白質以外の糖蛋白質糖鎖の分析が可能となるよう2アミノピリジル化した糖鎖の作製法の検討と、得られた2アミノピリジル化糖鎖の1H-NMR分析を行なったので報告する。

[実験方法]

糖ペプチドの精製：ウシ末梢神経ミエリンより精製したP0糖蛋白質を *Streptomyces griseus protease* (Sigma Type XIV)で消化し、塩およびペプチドをAsahi-GS310（溶出液；0.05%トリフルオロ酢酸）を用いたHPLCにて除去し、糖ペプチド画分を得た(1)。

Glycopeptidase A 消化及び2アミノピリジル化：糖ペプチドはTakahashi らの方法(5)にてglycopeptidase Aによる17時間消化後、Yamamoto らの方法にて2アミノピリジル(PA)化した(6)。未反応の試薬はAsahi-GS310を用いたHPLCにて除去した。

2アミノピリジル化オリゴ糖のHPLC：PA化オリゴ糖はWakosil 5NH$_2$ (4.6x250mm)を用いた

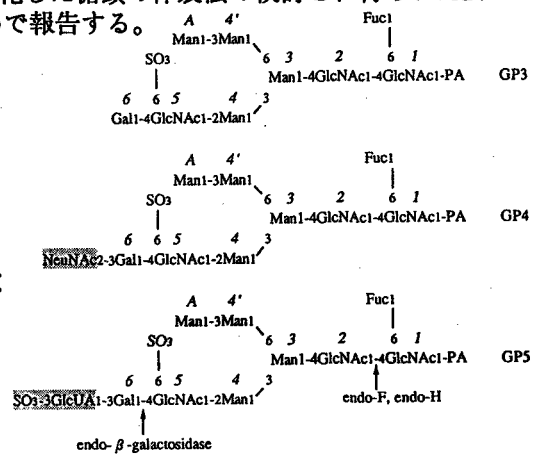


図1。本実験で扱った糖鎖の推定構造とendo型glycosidaseの作用部位
図中の斜体英数字は図2中の英数字に対応する。

HPLC及びShimpak-ODS (4.6x150mm)を用いたHPLCにて精製した。
ソルボリシスによる脱硫酸化：糖ペプチドを2%ピリジン溶液として凍結乾燥し、DMSO-10% MetOH中にて100℃２時間ソルボリシスした。Asahi-GS310にてDMSOを除去した後、脱硫酸化糖ペプチドについて上記のglycopeptidase消化及び2アミノピリジル化を行なった。
glycosidase 消化：endoglycosidase F,H,Dはそれぞれ*Flavobacterium meningosepticum* (glycopeptidase F free),*Streptomyces griseus*, *Streptococcus pneumoniae* 由来の、endo-β-galactosidaseは*Escherichia freundii* 由来の、N-acetylglucosaminidaseは*Streptococcus pneumoniae* 由来のものを使用した。
400MHz ^{1}H-NMR：HPLCにて精製したPA化オリゴ糖は重水とともに充分凍結乾燥した後550 ulの重水中に溶かし、JEOL FT-NMR EX400にて24℃及び60℃の測定をした。

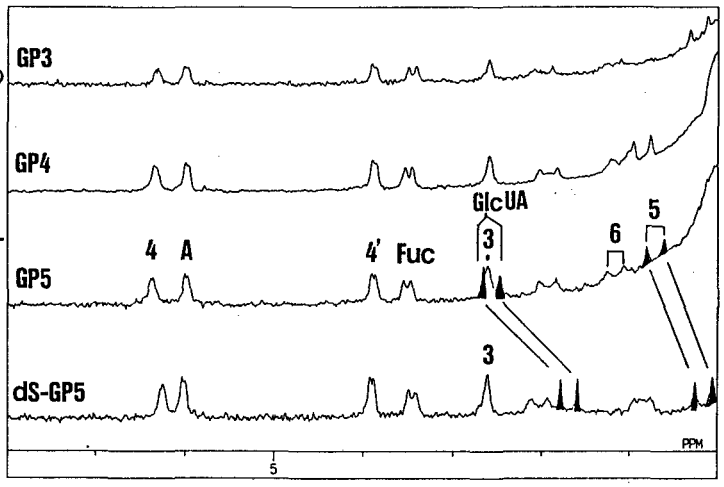


図2。400MHz FT-NMRによるPA化オリゴ糖のアノメリックプロトン領域 (4.5-5.3ppm) のNMRスペクトル
試料は0.55mlの重水中にて60℃で測定。内部標準物質としてアセトン (2.213ppm) を使用。GP5に特異的なシグナルを黒く塗りつぶし、脱硫酸化による高磁場へのシフトを図中に記した。シグナル上の英数字は図１に記載したものに対応する。
dS-GP5; ソルボリシスによって脱硫酸化した糖ペプチドよりのPA化オリゴ糖。

[結果と考察]

糖ペプチドよりの糖鎖の切り出し：精製P0蛋白質より得た糖ペプチドより、ヒドラジン分解法とglycopeptidase A消化法にて得たオリゴ糖の2アミノピリジル化誘導体についてHPLCにてそれらのパターンを比較した。その結果、ヒドラジン分解法ではGP5のピークが極端に減少しており、P0蛋白質糖鎖の切り出し法としては適当でないことが明らかとなった。
glycosidase消化：PA化GP4及びGP5に対してのendoglycosidase H,D,F の作用を検討した結果、endo-Dは両者に対して全く作用しないが、endo-Fとendo-Hは両者に対してほぼ同様に作用し、endo-Hの方が作用が強かった。endo-β-galactosidaseはGP4には作用せずGP5及び脱硫酸化したGP5にのみ作用した。その結果得られたPA化糖はHPLCの溶出位置及びFAB-MSによってasialo-agalacto-GP4と同一であることが明らかとなった。従って、endo-β-galactosidaseは±SO_4-GlcUA-Gal-GlcNAc構造に対して作用することが判明するとともに、この酵素がグルクロン酸含有糖鎖の識別に有効であることが示された。脱硫酸化前後のGP5のendo-β-galactosidase消化によって得られたPA化糖に対するN-acetylglucosaminidaseの作用を調べた結果、脱硫酸化したものにのみ作用した。又、脱硫酸化前後のasialo-agalacto-GP4に対するN-acetylglucosaminidaseの作用を調べた結果、やはり脱硫酸化したものにのみ作用した。従って、galactoseが結合しているGlcNAc-5 は硫酸が結合しているものと考えられた（図1参照）。
400MHz ^{1}H-NMR: GP3,GP4,GP5 及び脱硫酸化GP5のPA化物についての^{1}H-NMR解析を行なった結果、anomeric proton 領域にGP5に特異的な２組のシグナルが観察された。これらのシグナルは脱硫酸化によって著明に高磁場側へシフトすることから硫酸化グルクロン酸及び硫酸化GlcNAc-5由来のものと考えられた (図2)。
以上のような結果の蓄積と種々のPA化糖の作製により、他の微量に存在す硫酸化グルクロン酸含有糖蛋白糖鎖の解析が可能となったと考えられる。又、今後HNK-1のより詳細なエピトープ構造解析を進める予定である。

[文献] (1) 北村ら(1990)神経化学,29,298-299 (2) Uyemura,K. and Kitamura,K. (1991) Comp. Biochem. Physiol.,98C,63-72 (3) 北村ら(1991) 生化学, 63, 665 (4) Ariga,T. et al. (1987) J.Biol.Chem.,262,848-853 (5) Takahashi,N. et al. (1987) Biochemistry, 26, 1137 (6) Yamamoto,S. et al. (1989) J.Biochem. (Tokyo), 105, 547

197 ミエリン形成前のヒト胎児脳に特徴的な糖脂質

岩森正男[1]、平山桂子[1,4]、百枝加奈子[1,4]、脇谷健司[2]、中村治[3]、花岡一雄[4]、高倉公朋[5]

1 東京大学医学部生化学、2東京警察病院脳外科、3 都立駒込病院脳外科、4 東京大学医学部麻酔科、5 東京大学医学部脳神経外科

〔要約〕

ヒト胎児脳糖脂質について解析を行った。胎児年齢は不明であるが、ミエリンの構成成分であるα－ヒドロキシ脂肪酸含有セレブロシドとスルファチドの含量は極めて少なく、またそのガングリオシド画分にはGD1aが多量に検出されることからシナプス形成期に相当すると判断された。糖脂質組成の特徴は中性糖脂質画分に見られ、４－５糖を含む中性糖脂質が主要成分として検出された。この成分は成人脳には全く検出されず、また胎児脳ではCMH について含量の高い成分となっていた。ラクト系列Ⅰ型あるいはガングリオ系列糖鎖でないことは免疫染色で確認できた。

脳の糖脂質は脳組織の構築に極めて重要な役割を果たしている。セレブロシドとスルファチドはミエリンの主要構成成分になっており、またシナプトソームにはガングリオシドが多量に含有され、神経伝達に密接に関わっていることが知られている。さらに、ガングリオシドについては1979年以来、培養神経芽細胞腫の培養培地に添加することによって神経突起の伸長と形態変化が誘導されることが記載され(4)、類似の研究が現在に至るまで活発に展開されている(6). しかし、ガングリオシドが生体内で実際にどのような働きを行っているかは不明であり、推測の域を出ていないのが現状である。一方、発達に伴うガングリオシドの変化には大きな特徴があり、細胞遊走期にはGD3、軸索発芽期にはGQ1bやGP、シナプス形成期にはGD1aやGT1b、ミエリン形成期にはGM1 やGM4 が出現する(5)。糖脂質糖鎖発現のこのような明確なプログラムはそれぞれの時期における神経細胞の分化や形態形成を反映したものであり、それらの解析に極めて有用なマーカーとなっている。ヒト胎児脳の分析の機会があり、その糖脂質組成を解析したところ極めて興味ある知見が得られたので報告する。

方法

材料　胎児脳組織は東京大学医科学研究所移植部より妊娠中絶時、両親の同意を得て病理標本として保存してある組織（推定、胎生５－７か月）３例を用いた。大脳の一部(約1g) を分析に供した。また、精製糖脂質は医学部生化学教室で調製したものを用いた。

糖脂質の分析　脳組織の一部はそのまま水と混合し凍結乾燥した。その重量を測定後、クロロホルムーメタノール混液で総脂質を抽出し、常法に従って総コレステロール量と総リン脂質量を測定後、DEAE-Sephadex カラムで中性脂質と酸性脂質に分画した(1)。それぞれの画分からの糖脂質の分離は、アセチル化もしくはアルカリ処理によって行った。各成分の定量は中性糖脂質についてはオルシノール試薬、ガングリオシドについてはレゾルシノール試薬で発色後、TLC デンシトメーターを利用し、それぞれの発色波長での測定を行った(2)。また、特異的抗体による免疫染色は既報の方法を用いて行った(3)。

成績・考察

ヒト胎児脳の脂質組成　分析に供した３例の総コレステロール量は82.09、45.47、56.41 μmole/g 乾燥重量、総リン脂質量は134.06、74.25、59.22 μmole/g乾燥重量といずれも成人脳における含量よりも少ないが、ガングリオシド含量は、それぞれ4.14、4.60、6.68 μmole/g乾燥重量と成人脳に匹敵する程の濃度であった。また、図１に示すように、そ

れぞれの脳組織のガングリオシド組成はすでにａならびにｂ経路の成分を高濃度に含有していた(GM1 7.3%、GD1a 60.6、GD1b 6.1、GT1b 22.3%)。

しかし、ミエリン膜の成分であるスルファチドはガングリオシドの1/1000程度の含量であった。さらに中性糖脂質の組成はCMH が極端に少なく、糖鎖４－５の糖脂質の濃度が高くなっていた（図２）。最も極性の大きな糖脂質の移動度はGg_4Cerと同じであるが、抗Gg_4Cer抗体ならびに抗$IV^3GalNAc$-Gb_4Cer抗体で染色されなかった。また３ケ月齢ヒト胎児脳に検出されるLc_4Cerも全く検出されず、ヒト胎児期脳においても糖鎖構造の発達に伴う変化が起こっていることが分かる。さらに、Gb_4Cerの下に位置する糖脂質もヒト赤血球からの標準試料と一致しないことからGb_4Cerである可能性は低く、極性の大きな糖脂質の代謝中間体であると予想された。その含有量は40-143 ug/g乾燥重量であり、試料３から約88 μg の最も極性の大きな糖脂質が単離できた。NMR ならびにFABMS などの機器分析と酵素処理による構造解析を進めている。

また、CMH 成分としては、Gal とGlc が混在しており、αヒドロキシ脂肪酸は全く検出されず、ミエリン膜成分としてのCMH は含有されていないことが分かった。また、ミエリン塩基性蛋白質も検出されなかった。したがって、分析に供した脳組織はまだミエリン形成が行われておらず、そのガングリオシド組成の特徴から、シナプス形成期に相当すると判断された。この特徴的な糖脂質組成は胎児期脳における糖脂質発現のプログラムの様式を解析する上で非常に重要な情報を提供するように思われる。特に、細胞遊走期のGD3 とその直後のラクト系列糖鎖の発現、さらにシナプス形成期におけるガングリオシドａ経路とｂ経路の活性化、そしてミエリン形成期のGM4やGM1 の合成へと続く一連の糖脂質の代謝変化はそれぞれの代謝中間体も含めた合成経路のスイッチが系統的に入力されていることを物語っており、今回観察された糖脂質はその一翼を担っていると予想される。また、神経組織構築の際の細胞種の変化を解析するためのマーカー分子になる可能性もある。

図１　ヒト胎児脳の酸性糖脂質（オルシノール）

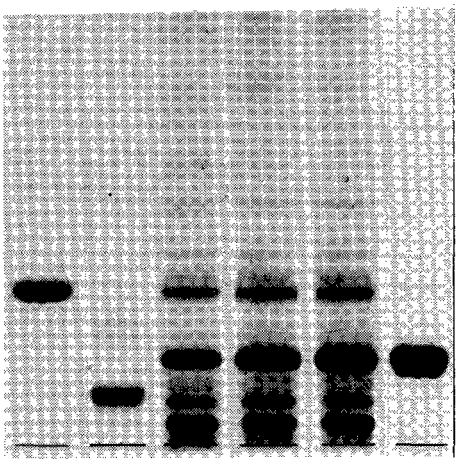
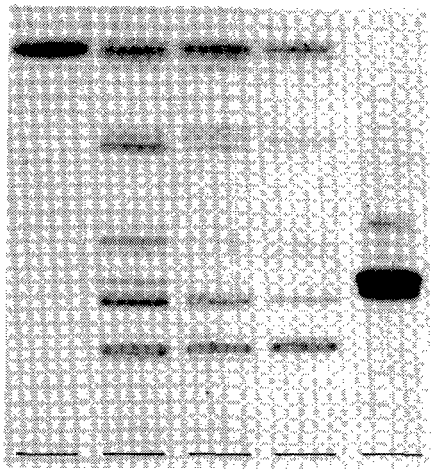


図２　ヒト胎児脳の中性糖脂質



(1,2,3はそれぞれ異なる症例である。)

文献

1 Iwamori,M., Kiguchi,K., Kanno,J., Kitagawa,M., and Nagai,Y. (1986) Biochemistry 25, 889-896

2 Iwamori,M., and Nagai,Y. (1979) J.Neurochem. 32, 767-777

3 Iwamori,M., Noguchi,M., Yamamoto,M., Yago,M., Nozawa,S. and Nagai,Y. (1988) FEBS Lett. 233, 134-138

4 Morgan,J.I. and Seifert,W. (1979) J.Supramol.Struct. 10, 111-124

5 Rahmann,H.(1985)Funkt.Biol.Med. 4, 249-261

6 Skaper,S.D., Leon,A. and Toffano,G. (1989) Mol.Neurobiol. 3, 173-199

198 IgMλ型M蛋白血症を伴う慢性多発ニューロパチーにおけるPO蛋白糖鎖に対する反応性の検討

細川 武・北村邦男＊・野村恭一・金子 厚・野村正彦＊・濱口勝彦
（埼玉医大・神経内科、第一生理＊）

〔要約〕PO蛋白の糖鎖構造は、少なくとも5つの構造よりなり、糖鎖の一つであるGP5に硫酸化グルクロン酸が含まれ、この糖鎖がHNK－1抗体と反応する事が判明している。またmyelin-associated glycoprotein（MAG）にも同様の反応がみられる。

今回IgMλ型M蛋白血症に抗PO蛋白抗体および抗MAG抗体活性を認めた慢性多発ニューロパチー（IgM－CP）症例の血清IgMのGP4および5に対する反応性を検討し、抗PO蛋白抗体活性を有する慢性多発ニューロパチー（CP）の反応と比較した。GP5に対する反応は、a）ABTSを用いた反応では、IgM－CPおよびCPにおいて高値を示し、b）DABを用い、硫酸ナトリウムあるいはグルクロン酸と血清IgMを混和させた反応では、IgM－CP、CP両者とも抑制はみられなかった。GP4に対するABTSを用いた反応では、CPにおいて高値を示し、IgM－CPにおいては上昇はみられなかった。以上から、IgM－CPにおいて血清IgMがGP5に限定して反応した事は、PO蛋白およびMAGがHNK－1抗体に反応する事、GP5もHNK－1抗体に反応する事から、我々が以前報告し今回検討したIgM－CP症例血清が、抗PO蛋白および抗MAG抗体活性を有する事が説明可能になった。またIgM－CP患者血清にみられた両抗体の共通のepitopeは、硫酸化グルクロン酸が推定された。今回の硫酸ナトリウムあるいはグルクロン酸と血清IgMとの反応では、抑制がみられなかったが、反応させる量または反応時間を変えてさらに検討を加える必要がある。

近年PO蛋白の糖鎖構造が明かになり、少なくとも5つの構造よりなる事、糖鎖の一つであるGP5に硫酸化グルクロン酸が含まれる事が判明した（1）。さらにPO蛋白がHNK－1抗体との反応性を有し、かつGP5がHNK－1抗体に反応することが明かになった（2、3）。またmyelin-associated glycoprotein（MAG）もHNK－1と反応する事が報告されている。

すでに我々は、IgMλ型M蛋白血症に抗PO蛋白抗体および抗MAG抗体活性を認めた慢性多発ニューロパチー症例を報告し、両抗体活性がPO蛋白とMAGの共通の部分に由来する事を推定した（4，5）。今回我々は、HNK－1抗体がMAGおよびPO蛋白糖鎖GP5に反応した事に注目し、前述患者血清のGP4およびGP5（図1）に対する反応性の相違の有無について検討した。

〔実験方法および対象〕

1）PO蛋白糖鎖の精製：既報の方法（6）に従い、ウシ末梢神経ミエリンの希酸抽出後の不溶性画分をStreptomyces griseus protease (Sigma Type XIV) で消化し、塩およびペプチドをAsahi-GS310を用いたHPLCにて除去し糖ペプチド画分を得た。更にShodexDEAE-825カラムを用いたHPLCにて、水から0.3M食塩までの濃度勾配溶出によりGP1－GP5を精製した。

2）GP4およびGP5と樹脂との結合：ホルミル・セルロファイン（生化学工業にGP4およびGP5を1 nmole /μl resinの濃度でカップリングさせて用いた。

3）IgMの精製：CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) に精製抗ヒトIgMμ鎖特異的抗体（Cappel）をカップリングさせたカラムを作製し、血清よりIgMを抽出し、さらに一元平板拡散法により定量した。

4）抗PO蛋白糖鎖抗体活性：

a）Engvallらの方法に準じたELISA法により測定した。2）で作製したGP4および5を抗原とし、一次抗体として患者IgM 12.5μg (13.6 pmole)、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgM抗体（Cappel）1:1000を反応させ、ABTSにて発色させ405nmでの吸光度（以下OD）を測定した。

b）また2）で作製したGP5を抗原とし、①血清IgMのみ、②血清IgM＋硫酸ナトリウム(1360 pmole)、③血清IgM＋グルクロン酸(1360 pmole)と反応させ、ついでペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgM抗体と反応後、DABで発色させた。さらに反応を陽性（＋）、疑陽性（±）、陰性（－）とした。

〔対象〕抗ＰＯ蛋白抗体活性を有するIgMλ型M蛋白血症を伴った慢性多発ニューロパチー症例（IgM－ＣＰ）、抗ＰＯ蛋白抗体を有しM蛋白血症を伴わない慢性多発ニューロパチー症例（ＣＰ）、対照（Control）、各１例づつにつき検討をおこなった。

〔結果および考案〕

１）ＧＰ５に対する反応:

ａ）ＡＢＴＳにて発色させた結果: IgM－ＣＰにおいては、ＯＤ1.47（対照樹脂数補正ＯＤ1.14）、ＣＰ1.00（補正ＯＤ0.97）、対照0.78と、IgM－ＣＰおよびＣＰにおいて高値を示した（図２）。

ｂ）ＤＡＢにて発色させた結果: IgM－ＣＰにおいては、①血清IgM、②血清IgM＋硫酸ナトリウム、③血清IgM＋グルクロン酸とも陽性（＋）で、前述の濃度の硫酸ナトリウムあるいはグルクロン酸では反応の抑制はみられなかった。ＣＰおよび対照においては、①血清IgM、②血清IgM＋硫酸ナトリウム、③血清IgM＋グルクロン酸との反応は、ＣＰは疑陽性（±）、対照は陰性（－）であった。

２）ＧＰ４に対するＡＢＴＳを用いた反応: IgM－ＣＰにおいては、ＯＤ0.48（補正ＯＤ0.44）、ＣＰ0.91（補正ＯＤ0.97）、対照0.49と、ＣＰにおいて高値を示し、IgM－ＣＰにおいては上昇はみられなかった（図２）。

IgM－ＣＰにおいて血清IgMがＧＰ５に限定して反応した事は、１）ＧＰ５がＨＮＫ－１抗体に反応する事（３）、２）ＰＯ蛋白およびＭＡＧが両者ともＨＮＫ－１抗体に反応する事から、IgM－ＣＰ患者血清が抗ＰＯ蛋白抗体および抗ＭＡＧ抗体活性を有する事が説明可能となった。さらにこの事からIgM－ＣＰ患者にみられた両抗体の共通のepitopeとして、ＧＰ５に存在する硫酸化グルクロン酸が推定された。しかしIgMにその100倍量の硫酸ナトリウムまたはグルクロン酸を混和させてもＧＰ５に対する反応が抑制されなかったことは、反応させる量または反応時間が不充分であった可能性があり、さらに検討を加える必要がある。

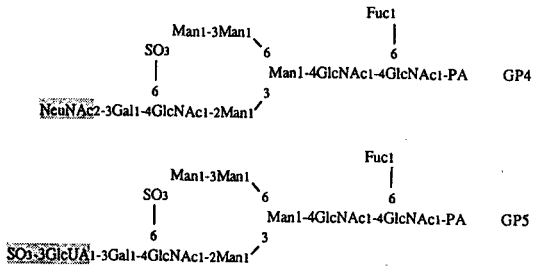


図１．ＰＯ蛋白糖鎖ＧＰ４および５

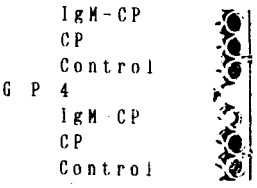


図２．ＰＯ蛋白糖鎖ＧＰ５および４に対する反応性
IgM-CP: IgMλ型M蛋白血症を伴った慢性多発ニューロパチー
CP　: 抗ＰＯ蛋白抗体活性を有する慢性多発ニューロパチー
カッコ内はcontrolの樹脂数に補正した際のＯＤを示す。

〔文献〕

（１）北村邦男、坂本　安、田中早苗、吉村和法、野村正彦、植村慶一（1990）神経化学 29, 298-299.（２）Uyemura,K. and Kitamura,K. (1991) Comp. Biochem. Physiol. 98C, 63-72.（３）北村邦男、坂本　安、吉村和法、田中早苗、渋谷匡子、野村正彦、植村慶一（1991）生化学 63, 665.（４）野村恭一、濱口勝彦、細川　武、斎藤豊和、小川恵弘（1988）臨床神経 28, 426-432.（５）細川　武、野村恭一、濱口勝彦、坂本　安、植村慶一（1987）神経化学 26, 571-573.（６）Kitamura,K., Suzuki,M. and Uyemura,K. (1979) FEBS Lett. 100, 67-70.

199 視床下部室傍核における c-erbAα2 mRNA 量の甲状腺機能低下に伴う変化

鯉淵典之、山岡貞夫
（獨協医大・第一生理）

〔要約〕
ラット視床下部室傍核小細胞区域において、甲状腺機能低下に伴う c-erb Aα2 mRNA 量の変化を in situ hybridization histochemistry (ISH) を用いて解析した。実験には成熟雄性ラットを用い、ネンブタール麻酔下にて手術的甲状腺摘除、又は偽手術を行った。甲状腺摘除後、一部のラットには 2 μg/ラット の甲状腺ホルモンを連日投与した。手術から2週間後にラットを屠殺し凍結切片作製後、c-erb Aα2 mRNA に相補的なトリチウム標識 RNA probe によりISHを施行し、エマルジョンオートラジオグラフィーを行った。そして、現像後、細胞あたりのオートラジオグラフィーグレイン数を計測した。甲状腺摘除によって視床下部室傍核小細胞区域におけるグレイン数は偽手術群に比べ著明に増加した。しかし、甲状腺摘除後、甲状腺ホルモンを補充したラットでは変化は見られなかった。以上のことから c-erb Aα2 mRNA 量は甲状腺機能低下によって増加することが分かった。

【緒言】 核蛋白 c-erb Aα2 は甲状腺ホルモン受容体ファミリーの一つとして知られている。これは c-erb Aα 遺伝子の転写産物が alternative splicing を受け、生じた2つの mRNA より作られる蛋白 (c-erb Aα1 及び α2) の一つである[1]。この2つの蛋白は、両者共に標的遺伝子のプロモーター領域にある thyroid hormone response element (TRE) と結合能を持つ点では共通しているが、c-erb Aα2 は甲状腺ホルモンとの結合能を欠き、甲状腺ホルモン作用を競合的に阻害する。そして、c-erb Aα2 は中枢神経系に多く発現している事が報告されている[1]。我々は、in situ hybridization histochemistry (ISH) を用いて、c-erb Aα2 mRNA の中枢神経系における分布を既に報告した[2]。今回は、甲状腺機能低下に伴う c-erb Aα2 mRNA 量の脳内の特定の部位における変化を検討した。測定部位は、視床下部室傍核小細胞区域 (parvocellular region of the paraventricular nucleus, pPVN) とした。pPVN には、甲状腺ホルモンに感受性を有する thyrotropin-releasing hormone (TRH) を含有する神経細胞が局在している。TRH 合成が甲状腺ホルモンにより直接調節されていることは既に報告されている[3]。又、我々も、この細胞における proto-oncogene c-fos の発現が甲状腺ホルモンにより調節されている事を報告した[4]。今回、我々は、pPVN において甲状腺ホルモンが c-erb Aα2 発現を調節している事を示唆する結果を得られた。

【方法】 実験は雄性 Sprague-Dawley ラット (200-250g) を用い、まず、ネンブタール麻酔下にて手術的に甲状腺を摘除 (n=10)、又は偽手術 (n=4) を行った。手術後、甲状腺摘除群のうち6匹に 2 μg/ラット の甲状腺ホルモン(T_4)を毎日皮下投与した。手術2週間後に断頭屠殺により脳を摘出し、凍結切片 (厚さ 8μm) を作成した。切片は、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 RNA probe は、トリチウム標識されたUTPならびにATPを用いて作成した。対照として、c-erb Aα2 mRNA の一部と相同の sequence をもった sense probe を同時に作製した。これらの probe を用いて 50°C で 48時間 ISH を施行し、切片に RNase 処理をした後、オートラジオグラフィー用エマルジョン (Kodak NTB-3) を塗布した。そして、4カ月間 4°C にて暗室内で露光した後に現像し、0.5 % クレシルバイオレットにて後染色を行った。封入後、各ラットから pPVN を含む切片をそれぞれ2切片ずつ選び同区域内の全ての細胞のグレイン数を計測した。

【結果及び考察】 ISH 後のオートラジオグラフィーの例を図1に示した。低倍率で観察すると、明らかに pPVN へのグレインの集積が認められた。しかし、高倍率では各細胞当りのグレイン数は少なく、標識されている細胞を全て同定するのは困難であった。また、グレインは細胞質のみならず核の上にも集積している事が観察された。細胞によっては核内にのみグレインが集積しているものも見られた。そのため、我々の用いた probe は c-erb Aα2 mRNA だけではなく、heteronuclear RNA (hn RNA) とも hybridize していることが予想された。 c-erb Aα 遺伝子から転写された hn RNA からは、alternative splicing によって c-erb Aα2 のみならず c-erb Aα1 も作られる[1]。前者は甲状腺ホルモンとの結合活性を持たないが、後者は結合活性を有する。従って、核内のグレインから得られる情報は細胞質とは異なっている事が考えられた。そこで、核内のグレインと細胞質のグレインを分離して計測した。その結果、細胞質のグレインのみが甲状腺摘除によって有意に増加していた (表1)。その増加は甲状腺ホルモンを補充することによって抑えられた。核内のグレインはそのような変化を示さなかった。以上の事から、成熟雄性ラット pPVN において、 c-erb Aα2 mRNA は甲状腺機能低下に伴い増加することが分かった。この結果は、pPVN において c-erb Aα2 の発現が甲状腺ホルモンによって down-regulate されている事を反映しているのかも知れない。現在までのところ、pPVN において甲状腺ホルモンに感受性を有する事が知られている細胞は TRH 含有ニューロンのみである。従って、TRH

含有ニューロンにおける甲状腺機能変化に伴う TRH、c-fos 等の遺伝子の発現変化[3,4]に c-erbAα2 発現量の変化がなんらかの関与をしている可能性があると思われる。

一般的に、細胞のホルモンに対する感受性はホルモン濃度の減少に従い増加する。本実験では、甲状腺機能低下に伴い c-erb Aα2 mRNA 量が増加したが、c-erb Aα2 は甲状腺ホルモン作用を競合的に阻害する機能を有する。この結果は、甲状腺機能低下に伴い甲状腺ホルモンの感受性が低下するかの様である。又、心筋、腎、下垂体等においても、甲状腺機能低下に伴い c-erb Aα2 mRNA 量が増加する事が報告されている。しかし、これらの臓器では、甲状腺ホルモン受容体である c-erb Aα1 mRNA も同時に増加する事が報告されている[5]。TRE との親和性は c-erb Aα1 が c-erb Aα2 よりも数倍高く、両者が同時に増加すると c-erb Aα1 発現の絶対量の増加を反映して甲状腺ホルモンに対する感受性が高まることになる。本実験では、c-erb Aα1 の発現については検討しなかったが、中枢神経系においても、他臓器と同様に c-erb Aα1 の発現が同時に増加したとすれば、甲状腺ホルモンの感受性が高まることになる。しかし、脳は甲状腺ホルモンに対し比較的応答しにくいことが知られている。以上のことから、中枢神経系において、甲状腺機能低下に従い c-erb Aα1 及びα2 遺伝子の発現量が同時に増加する。c-erb Aα1 発現増加の結果、甲状腺ホルモンに対する感受性は上がる。しかし、他の臓器に比べて多く発現した c-erb Aα2 のため、甲状腺機能低下に伴う変化は、他臓器よりも減弱される、と考えられた。今後、本実験と同様の条件下で c-erb Aα1 についても発現量の変化を調べ、この仮説について検証を進めたい。

【謝辞】 本研究は米国ロックフェラー大学の R.B. Gibbs 博士、D.W. Pfaff 教授、及びハーバード大学 W.W. Chin 教授との共同研究で行われた。

【文献】

1. W.W. Chin. 1991. In, M.G. Parker (ed), Nuclear Hormone Receptors. Academic Press. pp79-102.
2. 鯉淵典之, 他. 1991. 神経化学 30:420-421.
3. T.P. Segerson et al. 1987. Science 238:78-80.
4. N. Koibuchi et al. 1991. Endocrinology 129:3208-3216.
5. R.A. Hodin et al. 1990. J. Clin. Invest. 85:101-105.

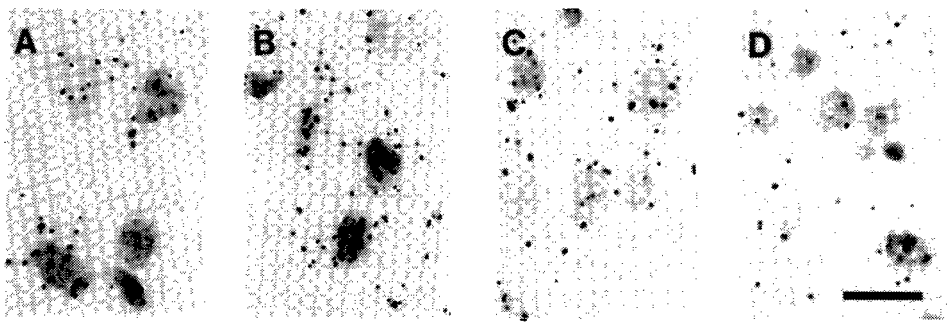


図1 c-erb Aα2 mRNA の in situ hybridization を施行した切片の顕微鏡オートラジオグラフィー。切片はクレシルバイオレットにて後染色されているが、高温 (50°C) で hybridize したため、核のみが染色されている。A: 偽手術、B: 甲状腺摘除、C: 甲状腺摘除+ T_4 補充、D: sense probe を用いて hybridization を行った切片。scale bar length = 20 μm

表1 甲状腺摘除に伴うオートラジオグラフィーグレイン数の変化

処置	動物数	計測細胞数	細胞質内グレイン(grain/cell)	核内グレイン(grain/cell)
偽手術	4	1263	3.28±0.09	4.17±0.15
甲状腺摘除	4	1346	5.28±0.12*	3.65±0.10
甲状腺摘除+T_4補充	6	1844	2.95±0.07	3.83±0.01

有意差の検定には Scheffe test を用いた。*: P<0.01 vs 偽手術群 & T_4 補充群

200 ラット脳における最初期遺伝子ｍＲＮＡ発現に及ぼすエストロジェンの影響と老化による変化

三好理絵，鬼頭昭三＊，村木篁，藤井恵美子
（東京女子医科大学薬理学教室，放送大学＊）

〔要約〕
エストロジェンは哺乳類脳に広く結合部位を有し、内分泌機能や性行動、情動行動に関与する。子宮においてエストロジェンは、細胞増殖をもたらすと共に c-fos などの細胞性原癌遺伝子を活性化する。本研究ではラット脳における二種の最初期遺伝子 c-fos と zif/268 のｍＲＮＡ発現に対するエストロジェンの作用を in situ hybridization により検討した。卵巣摘出した成熟ラットに estradiol を皮下注射すると、投与後３０分から９０分にかけて海馬、上丘、脚間核で c-fos と zif/268 のｍＲＮＡが共に増加した。一方、１０ケ月齢の middle-aged の動物では estradiol による遺伝子の応答が低下していた。以上の結果は、エストロジェンの中枢作用発現に最初期遺伝子の誘発増加が関与している可能性を示唆しており、老化に伴いその作用が低下することが考えられた。

〔目的〕
エストロジェンは、視床下部や大脳辺縁系など中枢神経系に広く作用し、内分泌機能や性行動に関与することが知られている（１）。また、エストロジェンは性特異的に、あるいは脳の部位特異的に神経伝達機構に影響を与え、アセチルコリン系やカテコールアミン系、ＧＡＢＡ系、興奮性アミノ酸系を修飾する。エストロジェンを含むステロイドの作用機序については、従来から研究が進んでおり、細胞質内の受容体と結合してＲＮＡと蛋白の合成を高めることが認められている。子宮においてエストロジェンは、細胞の成長、増殖をもたらすが、種々の成長因子と同様に、このホルモンが子宮で原癌遺伝子 c-fos や c-myc のｍＲＮＡを発現させることが報告されている（２，３）。中枢神経系においてはこれらの遺伝子は神経細胞の化学的あるいは電気的刺激により一過性に速やかに誘発されるため、最初期遺伝子と呼ばれており、神経活動と関係があると考えられている。そこで、本研究ではラット脳において二種の最初期遺伝子 c-fos と zif/268 のｍＲＮＡ発現に及ぼすエストロジェンの作用を調べた。更に、老化に伴う変化についても検討した。

〔方法〕
ラット c-fos と zif/268 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２ケ月齢と１０ケ月齢の Fischer 344 系のメスラットを用いた。エーテル麻酔下に卵巣を摘出し、その２週間後に実験を行なった。ゴマ油に懸濁したβ-estradiol 3-benzoate を 375 μg/kg の濃度で皮下注射し、３０、６０、９０分後に、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〕
basal 状態での c-fos 及び zif/268 遺伝子の発現は脳全体できわめて低濃度であった。２ケ月齢の動物において estradiol 投与後、 c-fos と zif/268 のｍＲＮＡ発現は同じような時間経過及び分布で観察された。図１に zif/268 mRNA の脳内オートラジオグラフィー像を示す。estradiol 投与により海馬で最も著明な増加が見られ、３０分から９０分後にかけて錐体細胞層と歯状回分子層に認められた。大脳皮質でも若干の増加が見られた。中脳では、上丘と脚間核で観察された。 これらの部位では、海馬での増加よりやや遅れて６０分から９０分にかけて発現していた。一方、１０ケ月齢の middle-aged の動物では、c-fosと zif/268 mRNA 共に estradiol による増加は見られなかった。

〔考察〕
卵巣摘出した成熟ラットにおいて、estradiol 投与により c-fos と zif/268 の二種の最初期遺伝子が脳で発現することを認めた。これらの遺伝子発現は３０分から９０分という速い時間で起こっているため、estradiol が受容体と反応した後の直接の作用と考えられる。estradiol は子宮で c-fos と c-myc 遺伝子を活性化することが報告されているが、この場合も３０分から６０分と速い反応である。子宮ではエストロジェンを投与した後、ホルモンが受容

体と複合体を形成するのが３０分から６０分であり、ホルモン－受容体複合体が直接 c-fos や c-myc 遺伝子に作用すると考えられている。脳でも同様の機序で最初期遺伝子が活性化されるものと思われる。脳の部位としては、海馬と中脳が estradiol に反応した。近年、エストロジェン受容体が海馬に豊富に含まれることが見いだされており（4）また、この部位は形態や発生、可塑性などの面で性差のあることが知られている（5）。estradiol による最初期遺伝子の発現が、海馬機能に何らかの役割を果していると考えられる。更に、今回の実験において middle-aged の動物では estradiol に対する反応性が成熟動物に比して低下していることがわかった。ラットではこの時期になると性周期が乱れ始め、ゴナドトロピンの放出動態が変化することが認められている。また、８から１０ケ月齢以上では視床下部－下垂体系のエストロジェン結合数が減少することも知られている（6、7）。本実験で見いだされた estradiol による遺伝子応答の低下が、神経内分泌系の老化に関わっていることが示唆される。

［文献］

1. Maggi, A. and Perez, J. (1985) Life Sci., 37, 893-906.
2. Weisz, A. and Bresciani, F. (1988) Mol. Endo., 2, 816-824.
3. Kirkland, J.L., Murthy, L. and Stancel, G.M. (1992) Endocrinology, 130, 3223-3230.
4. Loy, R., Gerlach, J.L. and McEwen, B.S. (1988) Dev. Brain Res., 39, 245-251.
5. Teyler, T.J., Vardaris, R.M., Lewis, D. and Rawitch, A.B. (1980) Science, 209, 1017-1019.
6. Brown, T.J., MacLusky, N.J., Shanabrough, M. and Naftolin, F. (1990) Endocrinology, 126, 2965-2972.
7. Rubin, B.S., Fox, T.O. and Bridges, R.S. (1986) Brain Res., 383, 60-67.

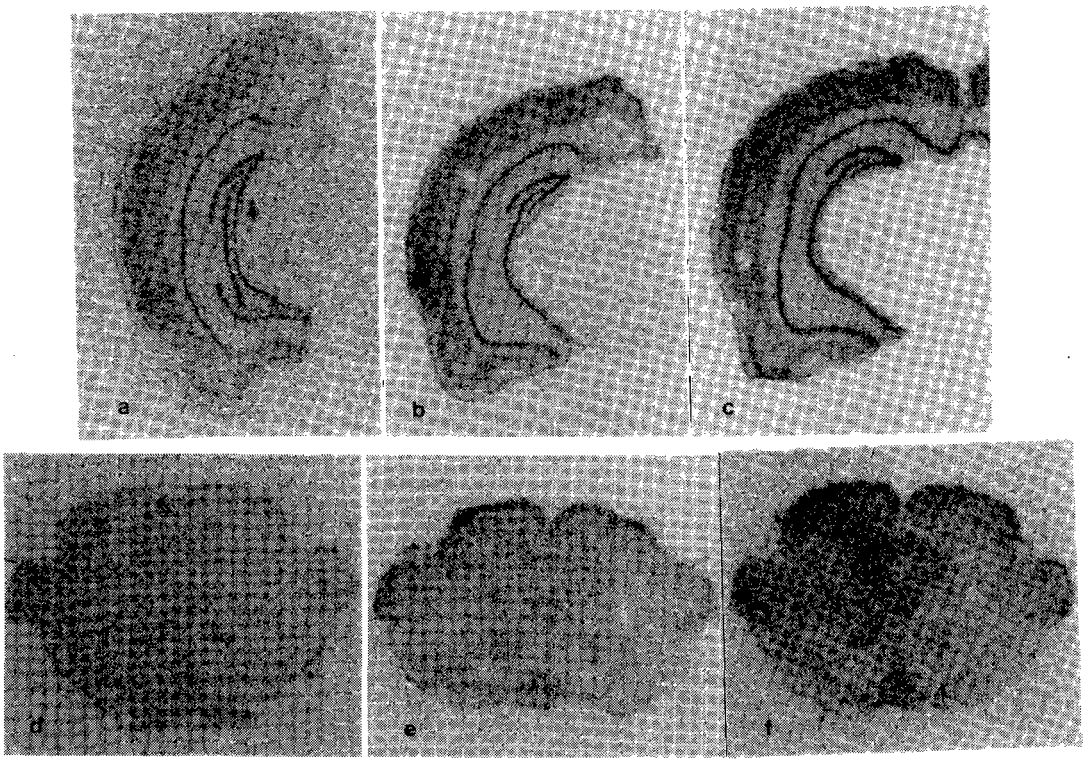


図１　ラット脳における zif/268 mRNA の分布。a～c は海馬領域を、d～f は中脳を示す。a，d：コントロール（sesame oil 投与）。b，e：estradiol 投与６０分後。c，f：estradiol 投与９０分後。

201 Mapping Pattern of Immediate Early Genes Expression during Ethanol Withdrawal in Rat Brain

Izuru MATSUMOTO, Fei LE, Brian C. SHANLEY and Peter A. WILCE,
Alcohol Research Unit, Department of Biochemistry, The University of Queensland, St Lucia, Qld. Australia. 4072.

Summary The pattern of induction of several immediate early genes (IEG)s in the brain of animals undergoing ethanol withdrawal was investigated at the level of both mRNA and protein. Animals were made dependent by chronic administration of ethanol as vapour. All animals showed severe signs of withdrawal between 8 and 15 hours after removal from ethanol vapour. A large, transient, increase in the expression of whole brain *c-fos, c-jun and zif/268* (Krox-24) mRNA was observed at 12 hours after withdrawal. The expression of IEG protein peaked at 15 hours (FOS) or 17 hours (C-JUN, KROX-24) after withdrawal. Discrete regional variation in expression of each IEG protein was revealed with extensive expression in cerebral cortex, hippocampus, olfactory bulb, inferior colliculus, cerebellar cortex and brain stem nuclei. The pattern of IEG expression during ethanol withdrawal was similar to that produced by a subconvulsant dose of NMDA. The underlying mechanism responsible for the neuronal hyperexcitability and putative function of IEG expression during ethanol withdrawal will be discussed.

Introduction

Immediate early genes (IEG)s have been characterised by a rapid induction of expression by a range of extracellular stimuli acting via changes in transmembrane ion flux or receptor activation and second messenger systems. It is therefore possible to employ expression of these genes as an *in vivo* pharmacological marker to map the activated state of neuronal cells after stimulation by a variety of agents. Further, since IEG proteins interact with DNA regulatory elements which control the transcription of other target genes (late response genes), IEG expression has been proposed to couple short-term stimuli to long-term changes including synaptic plasticity. We have demonstrated that acute ethanol administration at relatively low concentrations (blood alcohol conc.= 50mg/dl), selectively inhibits NMDA-induced *c-fos* expression in rat CNS (1). Kainate and caffeine-induced *c-fos* were insensitive to ethanol administration even at higher doses (2). These data indicated NMDA receptor-gated ion-channels in brain may be one of the sites of ethanol action *in vivo*. Changes in both inhibitory and excitatory neurotransmitter system have been suggested to occur in the ethanol-dependent brain resulting in abnormal neuronal hyperexcitability. However, the underlying biochemical basis of these changes is not fully understood (3). In the work described in this paper, we have investigated the brain receptor network underlying ethanol dependence using the IEG expression induced by ethanol withdrawal as a pharmacological marker.

Materials and Methods

Adult male Wistar rats weighting 200 $\pm$ 10g were chronically exposed to ethanol by an inhalation technique for a period of 14-21 days (4). Studies on the withdrawal phenomenon were carried out between 0 and 24 hours after cessation of ethanol. In some experiments, the non-competitive NMDA receptor antagonist, MK801 (7.5mg/kg) was administered intraperitoneally at 4, 8 and 11 hours into the withdrawal period. For Northern analysis, total RNA was prepared by the guanidinium thiocyanate method from whole brain, separated by formaldehyde/agarose gel, transferred to Hybond N (Amersham) and hybridised with ^{32}P-cDNA probes labelled by the random primer method. Immunohistochemistry was performed using polyclonal antibodies and according to the protocol described by Hsu *et.al.*(5).

Results and Discussion

After 10 days of exposure to ethanol vapour during which time the ethanol concentration was increased gradually, animals consistently had a blood ethanol concentration of 200-250 mg/dl. Animals became dependent by maintaining this blood concentration for at least 5 days. Chronic ethanol exposure did not induce IEG expression. Approximately 8 hours after removal from ethanol vapour animals displayed signs of withdrawal such as tremor, piloerection, tail-flick and wet-dog shakes. These signs became more significant at 12 hours after withdrawal when a small proportion of animals exhibited spontaneous or audiogenic seizures. Signs of withdrawal disappeared at 17 hours after removal of ethanol. A prominent, transient induction of *c-fos, c-jun* and mRNA expression was observed at 12 hours after withdrawal (Fig. 1). Induction of *c-fos* m-RNA was prevented by prior treatment with MK801. The peak expression of *c-fos* product (FOS) was present at 15 hours after withdrawal, whereas *c-jun* and *zif/268* products (C-JUN and KROX-24 respectively) peaked at 17-24 hours. C-JUN and KROX-24 were distributed in all layer of the cerebral cortex (especially in the frontal and occipital lobe), hippocampus (particularly in the dentate gyrus, CA1-3), inferior colliculus, cerebellar cortex, olfactory bulb and various nuclei of the brain stem. The pattern of FOS expression was similar to that of the other IEGs, however the signal was much weaker in all region with no labelling in the hippocampus (Fig. 2 and 3). This pattern of IEG expression during withdrawal was similar to that induced by NMDA administration (125mg/kg). Taken together, these data suggest that the NMDA receptor may play a key role in the activated neuronal state during ethanol withdrawal. Furthermore, the IEG proteins may have, by virtue of their regulation of putative late response gene expression, an important role in long-term neuronal plasticity and/or cell repair after over excitation induced by withdrawal.

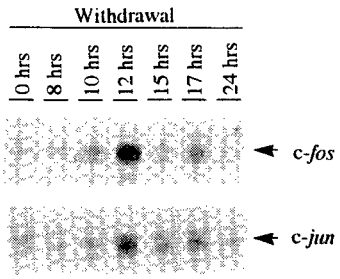


Figure 1 Expression of *c-fos* and *c-jun* m-RNA during ethanol withdrawal
Northern analysis using 20ug of whole brain total RNA extracted at times after ethanol withdrawal. Blots were probed with ^{32}P labelled cDNA probes.

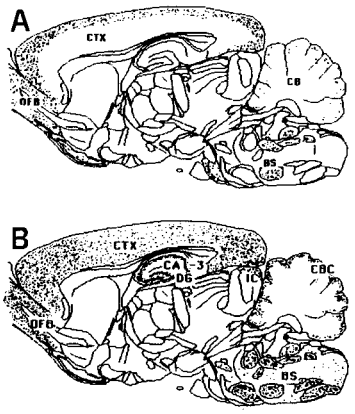


Figure 2 Expression of FOS, C-JUN and KROX-24 during ethanol withdrawal.
Diagram shows a composite picture of FOS immunoreactivity 15 hours after withdrawal (A) and C-JUN and KROX-24 (B) immunoreactivity 17 hours after withdrawal.

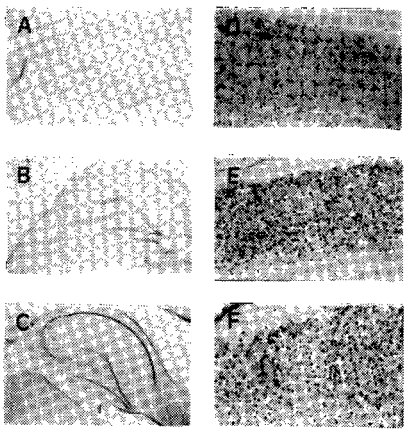


Figure 3 Immunohistochemistry showing immunoreactivity in hippocampus and cerebral cortex
Hippocampus: A, FOS; B, C-JUN; C, KROX-24
Cerebral cortex: D, FOS; E, C-JUN; F, KROX-24

References.

1. Wilce. P.A., Le F., Matsumoto, I. and Shanley, B.C (1992) *Alcohol and Alcoholism Suppl 1* (in press)
2. Le F., Wilce P.A., Hume D.A. and Shanley B.C. (1992) *J. Neurochem.* 59 (in press)
3 Buck J.K. and Flauris A.R.:(1991) *Alcoholism Clin Exptl. Res.* 15 460-470
4. Hillmann M., Wilce P.A. and Shanley B.C. (1988) *Neurochem .Int.l* 13 69-73.
5. Hsu S.M. and Raine L. (1981) *J. Histochem. Cytochem* 29:577-580

202 ハロペリドールとスルピリド投与によるマウス脳におけるc－fos mRNAの発現の比較

勝元栄一、尾崎宣洋、山上　栄、撫井弘二、大西　博

（大阪市大・医・神経精神）

〔要約〕

我々はddYマウスにハロペリドールとスルピリドとをそれぞれ投与し、ドーパミン受容体遮断により生ずると予想されるc-fos mRNA発現の誘導について検討した。ハロペリドール4～8mg/kg体重をマウス腹腔内に投与すると用量依存的にc-fos mRNA発現の誘導が増加した。また、4mg/kgのハロペリドール投与での経時的変化では、投与30分後にピークとなり、その後は減少した。それに対し、スルピリド投与においては20～100mg/kgではc-fos mRNAの誘導を認めず、200mg/kgという殆どのマウスが致死する大量投与でのみ誘導を認め、この発現は致死的刺激による反応の結果と考えられる。また、生理的食塩水投与30分後でも、僅かに誘導を認めた。c-fos mRNA発現の誘導がハロペリドール投与で認められ、スルピリド投与で認められなかったことは、スルピリドの持つドーパミンD_2受容体の選択的遮断作用よりD_1受容体遮断に関与している可能性が示唆された。

【目的】　c-fosはプロトオンコジンのひとつであり、その産物が核内に蓄積する癌遺伝子で、細胞の分化と増殖の制御に関与している。c-fos mRNA発現は、種々の刺激による痙攣発作[1),4),6),8)]、コカインの投与[7)]、大脳皮質に対する損傷[2)]など多様な細胞外刺激によって誘導されることが認められている。Miller[5)]は抗精神病薬のハロペリドール（以下HP）の投与によってc-fos mRNA発現の誘導されることを報告している。今回、我々もドーパミン（以下DA）受容体遮断薬であるHPとDA D_2-receptorの選択的遮断薬であるスルピリド（以下SP）をddYマウスの腹腔内に投与し、脳におけるc-fos mRNA発現の誘導を比較した。

【方法】　HPとSPおよび生理食塩水（以下、生食）をマイクロシリンジを用いてddYマウスの腹腔内に注射した。RNAの抽出はguanidium thiocyanate-phenol-chloroform法[3)]で行った。得られたtotal RNAを20μgずつ、アガロース・ゲルで電気泳動した後、Northern blotによってニトロセルロース・フィルターに移した。Random primed DNA labeling kit(Takara)によってc-fos cDNAを[α-^{32}P]-deoxy CTPにて標識し、セファデックスG-50カラムに通したものをフィルター上のRNAとハイブリダイゼーションし,-80℃で48時間autoradiographyし、c-fos mRNAの誘導を調べた。

【結果】　HP投与30分後におけるc-fos mRNA発現をFig. 1に示した。2mg/kg体重以下の投与では殆ど誘導を認められなかったが、4および8mg/kg投与では用量依存的にc-fos mRNA発現の著明な上昇を認めた。また、Fig. 2にはHPを4mg/kg投与した場合のc-fos mRNAの発現誘導の経時的な変化を示した。投与15分後より誘導を認め30分後でピークに達し、その後60、120、180、360分後では対照と同様僅かしか誘導を認めなかった。また、Lane 8の生食20μl投与30分後では若干の発現を認めた。Fig. 3ではLane 2,3,4,5,6ではSPを20,40,60,100,200mg/kg投与し、30分後のc-fos mRNAの誘導を示したものであるが、200mg/kgの場合に限って発現を認めた。なお、この投与量ではマウスは2,3分後に痙攣を起こして致死することが多かった。さらに、Lane 7,8,9では100mg/kgのSPの投与15,60,120分後のものであるが、c-fos mRNAの誘導は認められなかった。

【考察】　DA受容体遮断薬であるHPとSPをマウスの腹腔内投与した時の脳におけるc-fos mRNA発現の誘導を観察したが、HPでは用量依存的に誘導が認められ、30分後にピークとなる一過性の誘導であるといえるが、他方、SPでは200mg/kg投与の場合を除いて誘導は認められなかった。200mg/kg注射ではマウスは痙攣発作を起こして死亡することが多く、これは致死量に近い投与という強烈な刺激によるものと考えられた。SPはDA D_2 receptorを選択的に阻害し、HPはD_2のみならずD_1 receptorも遮断することより今回の実験におけるc-fos mRNAの誘導はD_1受容体遮断に関与している可能性が考えられた。また、生食の注射でもc-fos mRNAの僅かな誘導を認めたが、これは注射という刺激によるものと考えるのが妥当と思える。ただ、SPは脳内移行性が悪いことを考慮すると120分以降でも検討を加える必要があると考えられる。また、HPはD_1受容体遮断作用があるとはいえさほど強くなく、D_1拮抗薬の、例えばSCH 23390による検討も今後必要である。

【参考文献】
1) Dragunow M, Robertson HA. Nature, 1987 ; 329 : 441-442.
2) Dragunow M, Robertson HA. Brain Res, 1988 ; 455 : 295-299.
3) 勝元栄一　ら、神経化学、1991 ; 30 :452-453.
4) Le Gal la Salle G. Neurosci. Lett, 1988 ;88 : 127-130.
5) Miller JC. J. Neurochem, 1990 ; 54 : 1453-1455.
6) Morgan JI, Cohen DR, Hempsted JL, et. al. Science, 1987 ; 237 :192-197.
7) Young ST, Porrino LJ, Iadarola MJ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991 ; 88 : 1291-1295.
8) Zawia NH, Bondy SC. Mol. Brain Res, 1990 ; 7: 243-247.

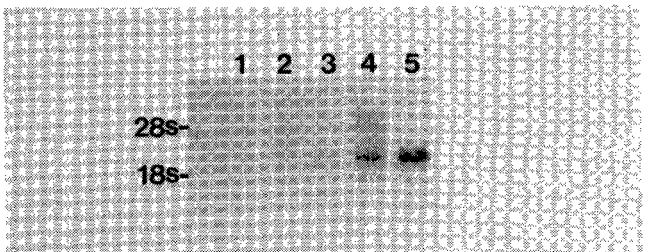


Fig. 1 Induction of c-fos mRNA expression after intraperitoneal injection of various amount of HP (1 : non-administration, 2 : 1, 3 : 2, 4 : 4, and 5 : 8 mg/kg body weight). Mice were decapitated at 30 min after injection.

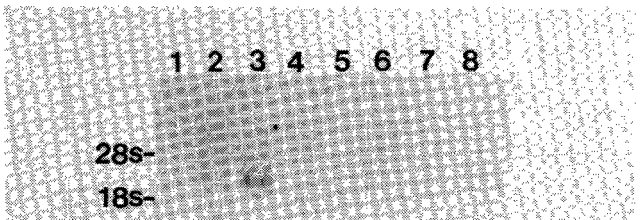


Fig. 2 Time course of c-fos mRNA induction after injection of 4 mg of HP (1 : non-administration, 2 : 15, 3 : 30, 4 : 60, 5 : 120, 6 : 180, and 7 : 360 min after injection of HP, and 8 : 30 min after injection of 20 $\mu\ell$ saline)

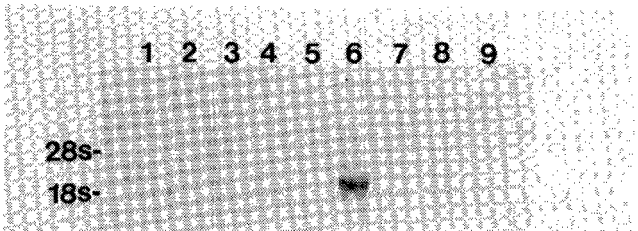


Fig. 3 Induction of c-fos mRNA expression after 30 min of injection in various amount of SP (1 : 20$\mu\ell$ saline, 2 : 20, 3 : 40, 4 : 60, 5 : 100, and 6 : 200 mg/kg of SP), and time course of c-fos mRNA induction after injection of 100 mg/kg of SP (7 : 15, 8 : 60, and 9 : 120 min).

203 転写制御因子ＡＰ－１のＤＮＡ結合能

荻田喜代一、米田幸雄（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕

マウス脳の細胞抽出液中を用いて、転写制御因子Activator protein 1 (AP-1) のシスエレメントへの結合の性質をゲルシフトアッセイにより検討した。AP-1、Activator protein 2 (AP-2) 、Activator protein 3 (AP-3) 、SP-1、Nuclear factor κB (NF-κB) 、OCT-1、cAMP resposive element結合蛋白質 (CREB) 、Nuclear factor 1 (NF-1/CTF) およびGlucocorticoid responsive element結合蛋白質 (GREB) の中で、AP-1およびCREB結合のみがNaClの添加により著明に増強された。AP-1結合は、低濃度(5 mM以下)$MgCl_2$存在下にNaCl、CH_3COONa、KClおよびCH_3COOK添加で増強された。さらに、AP-1結合は$MgCl_2$の添加によっても増強されたが、これらの増強作用には反応温度依存性が認められた。高濃度(10 mM以上)$MgCl_2$存在下において、AP-1はKCl濃度に関係することなく単一のバンドとして検出され、このバンドにはKClの結合増強効果は認められなかった。一方$MgCl_2$無添加の場合には、KCl存在下に移動度の異なる2本のバンドが検出された。以上の結果より、マウス脳AP-1のDNA結合能は反応温度や種々の無機イオンにより強い影響を受ける可能性が示唆される。

真核細胞における遺伝子の転写調節は、特定のDNAエレメント(プロモーターおよびエンハンサー領域)に転写制御因子が結合することにより行われる。転写制御因子の一つであるAP-1は、メタロチオネイン遺伝子のエンハンサー領域に結合して転写の活性化を誘発する因子として分離され、そのコンセンサス配列はTGANTC/AAである(3)。このAP-1は、発癌プロモーターである12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA)が転写を促進する遺伝子群に、共通して存在する特定のエレメント(TPA responsive element(TRE))に結合する転写制御因子と同一である(1)。また、プロトオンコジーンc-fosおよびc-junの翻訳産物(それぞれFosおよびJun)のヘテロダイマーが、AP-1のシスエレメントに強力に結合することが明らかとなっている。さらに、AP-1のシスエレメントに対してJunのホモダイマーも弱い結合能を持つことやFos関連蛋白質(Fos-related antigens(FRAs))およびJun関連蛋白質(JunB、JunD)なども複合体を形成してシスエレメントに結合する性質を持つことなどが示されている(2)。このように、多様なAP-1群が種々の内在性物質によりその結合能の調節を受けて複雑な転写制御を行っていると推察される。したがって本研究では、脳内AP-1結合能の調節因子を検索する一端として、AP-1結合の性質をゲルシフトアッセイにより検討した。

〔実験方法〕

細胞抽出液の調製：Std-ddy雄性マウス全脳および肝臓からSonnenbergらの方法(4)により調製した細胞抽出液を1 mM EDTA、1 mM DTT、10% グリセロールおよび蛋白質分解酵素阻害剤(APMSF、leupeptin、antipain、benzamidine)を含む10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)(DB Ⅱ)で透析した。

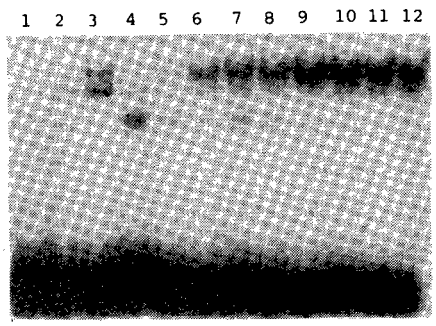
DNAプローブの調製：各シスエレメントを含む2本鎖オリゴヌクレオチドを$ATP[\gamma\text{-}^{32}P]$(222 TBq/mmol, NEN/DuPont社)とT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いた5'-エンドラベリング法により標識した。標識オリゴヌクレオチドはNENSORB 20カラム(NEN/DuPont社)で精製を行った。

ゲルシフトアッセイ：DB Ⅱ中で細胞抽出液(10 μg蛋白質)および1 μg poly(dI-dC)を室温あるいは氷中で10分間前処理したのち、標識DNAプローブ(50-100 pg、5,000-10,000 cpm)を添加して結合反応を開始した。反応は室温あるいは氷中で30分間行い、DNA-蛋白質複合体と遊離プローブをポリアクリルアミドゲル(6%)電気泳動法(100 mV定電圧、2℃、1.5時間)により分離した。泳動後にゲルを乾燥し、ゲル中の放射能をオートラジオグラフィー法により検出した。

〔実験結果〕

50 mM NaCl添加時あるいは非添加時に各種DNAプローブに対する結合を室温下で測定したところ、AP-1およびCREB結合がNaCl添加時に著明に増強されたが、その他のプローブに対する結合はNaCl添加による影響を受けなかった。5 mM以下の$MgCl_2$の添加条件下におけるAP-1結合は、NaClばかりでなくCH_3COONa、KClおよびCH_3COOKにより濃度依存的に増強された。この結合増強作用はNa塩よりもK塩の方が強力であった。また、これらの結合増強反応は反応温度2℃の場合に

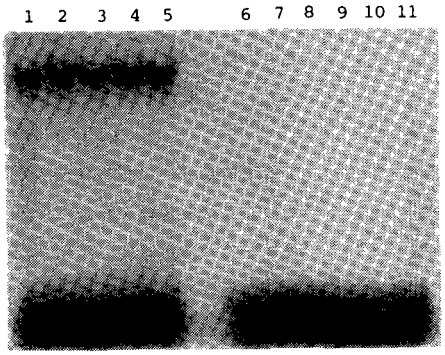
図1. KClおよび$MgCl_2$の影響



Lanes 1- 3: No addition of $MgCl_2$
Lanes 4- 6: 2 mM $MgCl_2$
Lanes 7- 9: 5 mM $MgCl_2$
Lanes 10-12: 10 mM $MgCl_2$

Lanes 1,4,7,10: No addition of KCl
Lanes 2,5,8,11: 50 mM KCl
Lanes 3,6,9,12: 100 mM KCl

図2. 脳および肝臓細胞抽出液中のAP-1結合能



Lanes 1- 5: Brain
Lanes 6-10: Liver
Lane 11: No protein

は認められなかった。KClの増強作用に対する$MgCl_2$の効果を検討した結果、10 mM $MgCl_2$存在下ではKClの結合増強作用は見られないこと、およびいずれのKCl濃度でも1本のバンドのみ検出されることが判明した。一方、5 mM以下の$MgCl_2$添加時には移動度の異なる数本のバンドが見られた(図1)。次いで、肝臓細胞抽出液中のAP-1結合能を5 mM $MgCl_2$および50 mM KCl添加条件下で検索したところ、著明なバンドは検出されなかった(図2)。また、肝臓細胞抽出液を添加すると、脳AP-1結合能が濃度依存的に阻害されることが判明した。

〔考察〕

本研究において、核内転写制御因子AP-1のDNA結合能はMg^{2+}、K^+およびNa^+などの無機イオンにより調節を受けることが明らかとなった。さらに、反応液中のイオン濃度変化が単に結合量の変化のみならず、移動度の異なる蛋白質の出現という質的な変化も誘発することは極めて興味深い。この現象は、FRAsやJun関連蛋白質などのようなAP-1の多様性(2)や種々のAP-1活性化機序に起因する可能性が推察される。また本研究から、肝臓抽出液中にAP-1結合阻害因子が存在する可能性が示された。しかしながら、ゲルシフトアッセイによる解析結果のみでは、この結合阻害因子の存在が単なるアーチファクトである可能性も無視できないので、ウエスタンブロットアッセイなどをはじめ多方面からの解析が望まれる。一方、ゲルシフトアッセイは転写制御因子の簡便な解析法として、中枢神経系の可塑性、神経系の発生・分化あるいは遅発性神経細胞壊死などの神経機能変動や神経障害の発現機序を遺伝子発現レベルで解析するために有用であるが、本研究で明らかなように反応条件により異なる結果が得られる点に留意することが必要である。

〔謝辞〕

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(04671421)の援助のもとに行った。

〔文献〕

1. Bohman, D., Bos, T.J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K. and Tjian, R. (1987) Science 238, 1386-1392.
2. Curran, T. and Franza, Jr., B.R. (1988) Cell 55, 395-397.
3. Lee, W., Mitchel, P. and Tjian, R. (1987) Cell 49, 741-752.
4. Sonnenberg, J.L., Mitchelmore, C., Macgregor-Leon, P.F., Hempstead, J., Morgan, J.I. and Curran, T. (1989) J. Neurosci. Res. 24, 72-80.

204 骨格筋でのグルコース利用を促進する視床下部の作用機構

岡野　吉晴*、箕越　靖彦、阿部　啓之、嶋津　孝

（愛媛大　・　医　・生化学第一，麻酔*）

〔要約〕

骨格筋を始めとする末梢組織へのグルコースの取り込みを促進する視床下部腹内側核（ＶＭＨ）の刺激効果が筋収縮に基づくのでなく、交感神経を介した作用であることを立証するため、筋弛緩剤投与下にラットのＶＭＨを電気刺激し、グルコースの利用速度の変化を 2-deoxyglucose 法によって検討した。３種の骨格筋、心筋ならびに褐色脂肪への糖の取り込み速度は著明に増大し、この効果は交感神経節後ニューロン遮断剤の投与によって消失した。さらに、β_3- agonist の注入は用量依存的に骨格筋へのグルコース取り込み速度を増大させることが判明し、β_3 受容体の関与が示唆される。

グルコースは脊椎動物の重要なエネルギー源であり、骨格筋を始めとする各組織へのグルコースの取り込み速度は細胞膜に存在するグルコース輸送体によって律速的に調節されている。例えば、グルコース利用を促進するインスリンの作用はグルコース輸送体の細胞内プールから細胞膜への移行を促し、輸送体の数を増加させることによる。私どもはインスリンの作用とは別に、視床下部腹内側核（ＶＭＨ）を刺激すると、骨格筋や心筋、褐色脂肪組織で特異的にグルコースの取り込み速度が増加することを見出し、既に報告した（３）。しかし、ＶＭＨ刺激では筋収縮が亢進しその結果、グルコースの利用が増大する可能性を除外できない。また、ＶＭＨの刺激効果が骨格筋などを支配する交感神経を介して発現するのかどうかについても明確でなかった。今回、これらの疑問を解くため筋弛緩剤投与、あるいは交感神経節後ニューロンの特異的遮断剤投与によってＶＭＨの作用がどのように修飾されるかを追究し、併せてβ_3-agonist の作用について検討した。

［方法］

ラットのＶＭＨに予め刺激電極を挿入しておき、体重回復後、ネンブタール麻酔下に、頸静脈カテーテルから筋弛緩剤　pancuronium bromide(0.4mg/kg)を投与し、人工呼吸下で実験を行なった。電気刺激は6V,50Hz,持続時間　0.1～0.3m sec の矩形波パルスを、1分毎に30秒間ずつ与えた。一部のラットではＶＭＨ刺激前日に guanethidine(200mg/kg i.p.)を投与しておいた。刺激開始15分後に血糖値が安定するのを待って、^{3}H標識の 2-deoxyglucose（2-[^{3}H]-ＤＧ，50 μCi/rat)、並びに^{14}C-sucrose (10μCi/rat)を頸静脈から投与し、経時的に採血するとともに15分後に断頭屠殺して、各種組織を採取した。とくに骨格筋としては、大腿四頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋、長趾伸筋を選び、前２者の骨格筋については赤筋部と白筋部に分けて採取した。各組織の glucose 利用速度（rate constant）は、組織中に取り込まれた ^{3}H及び^{14}Cの放射活性と2-[^{3}H]-ＤＧの血中消失速度から、Sokoloff の方法を用いて算出した(2)。また、β_3-agonist の効果を調べる実験では、種々の dose の BRL35135A をラットの下大静脈より持続注入した。

［結果並びに考察］

筋収縮は骨格筋への糖の取り込みを促す強力な刺激となるので、ＶＭＨ刺激実験では、全例のラットに麻酔後、筋弛緩剤の投与を行なった。このような条件下でもＶＭＨの刺激によって血糖値は刺激前値130mg/dl から230mg/dl まで上昇した。血糖値が定常状態に達した後、骨格筋の糖の取り込み速度定数を測定すると、非刺激対象群と比較して、赤筋・白筋とも1.5～2倍の増加がみられ（図１）、この値は筋弛緩剤を投与しない場合と大差なか

った。また、褐色脂肪、心筋でもそれぞれ15倍、2倍と著しく増大したが、これらの増加は guanethidine 前処置による chemical sympathectomy によって完全に消失した(図1)。しかし、白色脂肪や横隔膜への glucose の取り込み速度はＶＭＨ刺激によっても増加しなかった。さらに、インシュリン値はＶＭＨ刺激や guanethidine 処置によっても増加せず、したがって、ＶＭＨの作用はインスリンを介したものではなく、交感神経の働きによると考えられる。

ＶＭＨの刺激効果が褐色脂肪、骨格筋、心筋に選択的であるという上述の組織特異性はβ_3－アドレナリン受容体ｍＲＮＡの発現部位と符号している（１）。そこでβ_3-agonist をラットの下大静脈より持続注入しながら、骨格筋への糖の取り込み速度の変化を同様の方法で調べた（図２）。その結果、各骨格筋への取り込み速度はβ_3-agonist の用量に依存して増大し、至適用量は５－２５μg/kg/h であった。以上の結果から、骨格筋における糖の輸送がインスリンの作用とは別に、β_3-受容体を介する交感神経伝達因子によって調節されていることが明らかになった。

図1 各臓器への糖の取り込み速度

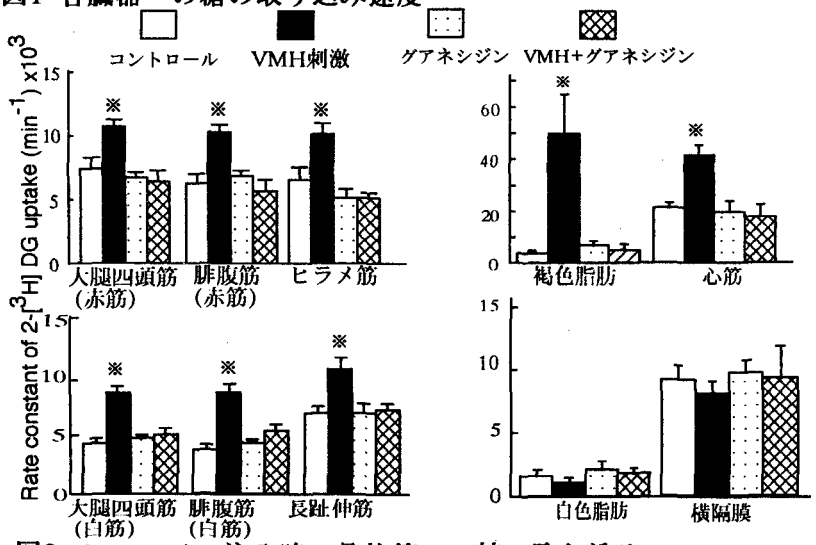
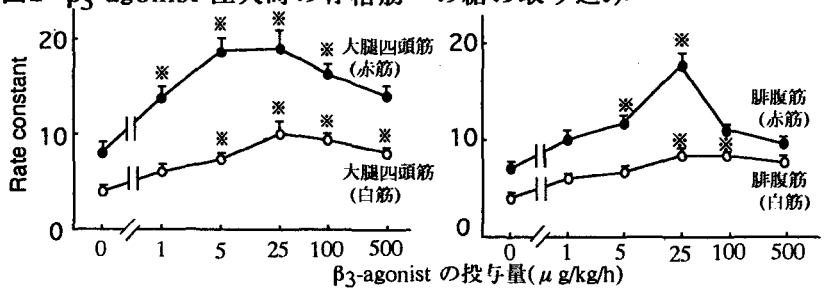


図2 β_3-agonist 注入時の骨格筋への糖の取り込み



[参考文献]

1.Emorine, L. J. et al. (1989) Science 245, 1118-1121
2.Sokoloff, L. et al. (1977) J. Neurochem. 28, 897-916
3.Sudo, M. et al. (1991) Am. J. Physiol. 261, E298-303

205 フェレットにおける制癌剤誘起性嘔吐と延髄最後野のセロトニン濃度

遠藤　泰、南　勝、浜上尚也
（東日本学園大学薬学部薬理学教室）

〔要約〕
延髄第四脳室底obex部位に位置する最後野は嘔吐反射の重要な神経構成部位である。制癌剤誘起性嘔吐の発現機序を明らかにするために嘔吐のモデル動物フェレットの延髄最後野および腸管のセロトニン（5-HT）濃度を測定した。薬物投与後６時間にわたって嘔吐反応を注意深く記録した。フェレットは催吐薬の用量に依存して嘔吐を惹起した。100%嘔吐を惹起する用量は cisplatinが10mg/kg(i.p.)、cyclophosphamideは200mg/kg(i.p.)、硫酸銅では40mg/kg(p.o.) であった。5-HT$_3$受容体拮抗薬のondansetron あるいはあらかじめ腹部迷走神経を切離することによって、嘔吐の回数は有意に減少した。Cisplatin ならびに硫酸銅投与群の回腸部位の5-HT濃度は対照群と比較して２～３倍に上昇していた。同時に測定した、AADC活性は有意に上昇し、MAO活性は有意に低下していた。催吐薬投与群の最後野の5-HT濃度は対照群に比較し有意に上昇していた。Ondansetron 前投与あるいは腹部迷走神経切離により最後野の5-HT濃度は対照群とほぼ同値であった。以上の結果より、最後野の5-HT濃度上昇が制癌剤ならびに硫酸銅によって誘起される嘔吐の誘因になっているものと考えられた。

［緒　言］
Cisplatin 誘起性嘔吐の際に小腸の病理学的障害[1]および小腸粘膜の5-HTの上昇を伴う[2]。全身の90%以上の5-HTは小腸に存在する。腸管の5-HT上昇は小腸に広く分布する迷走神経の5-HT$_3$受容体を興奮させる。5-HT上昇の情報は5-HT$_3$受容体の求心性線維を経て最後野の嘔吐中枢に至り嘔吐反応を引き起こすものと考えられている[3]。5-HT$_3$受容体拮抗薬が制癌剤誘起性嘔吐に対して有効であることは知られている[4]。フェレットを用いた結合実験において最後野に5-HT$_3$受容体が高濃度に存在することが見出されている[3]。しかしながら、制癌剤などの催吐薬投与時の最後野の5-HT濃度変化に関する報告はいまだみられない。制癌剤誘起性嘔吐の発現機序を明らかにするためにフェレットを用いて小腸ならびに最後野の5-HT濃度を測定した。同時に5-HT上昇に関わる合成系ならびに代謝系の酵素活性を測定した。さらに5-HT$_3$拮抗薬の作用点を探るべく薬物誘起性嘔吐と組織の5-HT含量におよぼす腹部迷走神経切離の影響も検討した。

［方　法］
１．行動実験：フェレットはMarshall社（NY, USA)より輸入された体重 0.8～1.5 kgの雄を使用した。Stablesらの方法を改良し６時間にわたって嘔吐の回数、嘔吐発現時間および持続時間を注意深く観察記録した[5]。催吐薬として cisplatin、cyclophosphamideならびに硫酸銅を用いた。5-HT$_3$拮抗薬ondansetron (0.1～1.0mg/kg)はcisplatin またはcyclophosphamide投与30分前に腹腔内に投与した。腹部迷走神経切離術後数日を経て嘔吐の実験に供した。
２．生化学的研究：フェレットに催吐薬を投与し、１日目の最大嘔吐反応のみられた時間である２日目投与３時間後に延髄最後野、胃粘膜ならびに回腸粘膜を素早く摘出し液体窒素にて凍結し、測定までの間 -80℃にて保存した。カテコールアミンならびにインドールアミン濃度はHPLC-ECD法にて測定した。AADC活性は Nagatsuらの方法に準拠し[7]、MAO活性は Kraml らの方法にしたがって測定した[6]。Lowryらの方法[8]により測定した蛋白量によってこれらの値を補正した。

［結　果］
１．行動観察：Ondansetron は制癌剤の cisplatin、cyclophosphamide ならびに硫酸銅による嘔吐を有意にし

かも用量依存的に抑制した。腹部迷走神経切離によりこれらの嘔吐は有意に減少した。

2．生化学的研究：Cisplatin 投与群の回腸部位の5-HT濃度は有意に上昇していた。DA濃度は有意な差異を示さなかった。図Aに示すようにcisplatin 、cyclophosphamideならびに硫酸銅投与群の最後野の5-HT濃度は対照群と比較して2～3倍に上昇していた。図Bにみるようにondansetron 前投与あるいは腹部迷走神経切離群ではcisplatin を投与しても最後野の5-HT濃度は上昇せず、control 値にとどまった。Cisplatin、cyclophosphamideならびに硫酸銅投与による嘔吐の際に回腸部位のAADC活性は、対照群と比較し有意に上昇したが、一方 MAO活性は有意に低下していた。

［考　案］

制癌剤によって消化管粘膜のエンテロクロマフィン細胞から放出された 5-HT は迷走神経の5-HT_3 受容体を刺激し、迷走神経の求心性線維の脱分極は嘔吐中枢を興奮させ嘔吐反応が起こるものと考えられている[3]。腸管から嘔吐中枢への求心性迷走神経を腹部で切離することによりcisplatin 誘起性嘔吐の回数は5分の1まで抑制された。延髄最後野は化学受容器引金帯（ＣＴＺ）と嘔吐中枢を含む。我々は今回、はじめて制癌剤の投与後、フェレット最後野の5-HT濃度が有意に増加することを明らかにした。硫酸銅でも同様の結果を得た。さらに最後野の5-HT濃度はondansetron 前投与によっても嘔吐の減少に平行し低下した。これらの結果より、最後野の上昇した5-HTが制癌剤誘起性嘔吐のひき金となっているものと示唆された。

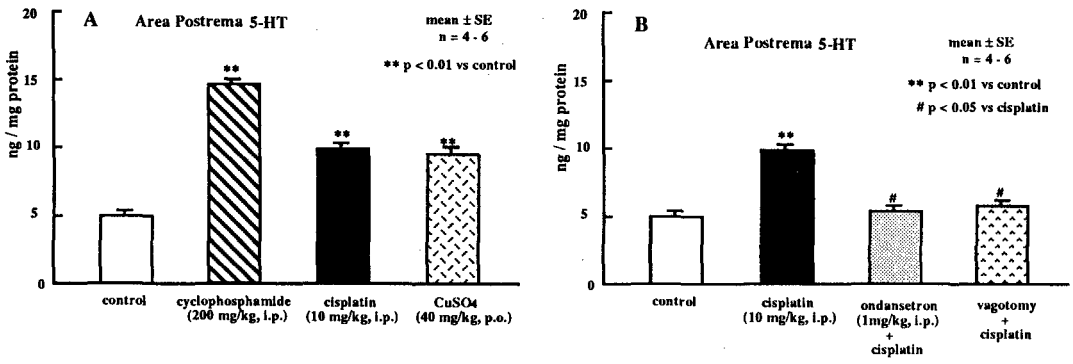


Fig. Effects of emetics (A) and pretreatment of ondansetron or vagotomy (B) in 5-HT concentrations in area postrema

［文　献］

1) Endo,T., Minami,M., Monma,Y. et al. (1990) J.Toxic. Sci. 15, 235-244.
2) Endo,T., Minami,M., Monma,Y. et al. (1990) Biogenic Amines 7, 525-533.
3) Higgins,G.A., Kilpatric,G.J., Bunce,K.T. et al. (1989) Br.J.Pharmac. 97, 247-255.
4) Kilpatrick,G.J., Jones,B.J. and Tyers,M.B. (1987) Nature 330, 746-748.
5) Kraml,M. (1965) Biochem.Pharmacol. 14, 1683-1685.
6) Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L. et al. (1951) J.Biol. Chem. 193, 265-275.
7) Nagatsu,T., Yamamoto,T. and Kato,T. (1979) Anal.Biochem. 100, 160-165.
8) Smith,W.M., Alphin,R.S., Jackson,C.B. et al. (1988) J.Pharm.Pharmacol. 41, 101-105.
9) Stables,R., Andrews,P.L.R., Bailey,H.E. et al.(1987) Cancer Treat.Rev. 14, 333-336.

206 時間制限給餌後に閉所条件を加えた時のラット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、藤嵜泰利、山上　栄
（大阪市大・医・神経精神医学教室）

〔要約〕
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、同時に狭いケージに移すという閉所条件を加え、24時間後の摂餌量と脳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た。そして、これらの結果と閉所条件のみ加えたもの、時間制限給餌のみのものおよび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摂餌量は24時間で対照群の151%まで増加した。同時に閉所条件にしたときは、対照群の177%まで増加した。これは他の3群に比し有意に増加した。一方時間制限給餌を加えないで、閉所条件のみでは摂餌量は対照群と差がなかった。時間制限給餌のみでは脳TRP、5-HT、5-HIAA量は低下傾向を示したが、5-HIAA/5-HT比に示される脳セロトニン代謝回転は変化しなかった。閉所条件のみでは脳各部位における脳セロトニン代謝回転は低下傾向を示した。時間制限給餌後に閉所条件にした群においては脳セロトニン量は減少し、脳セロトニン代謝回転は著明に亢進した。
以上のことから、時間制限給餌後に閉所条件を加えた時の摂餌量の増加は、脳セロトニンと密接に関連しているものと考えられる。

〔はじめに〕
我々は、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し、自由摂餌を再開するとhyperphagia状態となり、その時脳セロトニン代謝が低下することを報告してきた[2)3)]。そして、これに閉所条件を加えるとラットはさらにhyperphagiaとなることを観察した。そこで本研究では、この時の脳セロトニン代謝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ケージ（215x320x130mm）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%, 345.2Cal/100g）を用いた。ラットを4群に分け、うち2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た。そして、8日目の11時から24時間自由に摂餌させた(FR群)。他の1群には自由摂餌にすると同時に100x150x100mmのステンレスグリッドのケージに移し閉所条件を加えた(FR+SR群)。残り2群は全実験期間中、自由に摂餌、水分摂取させ、うち1群にのみ上記の閉所条件を8日目の11時より加えた(SR群)。残りの1群を対照群とした(C群)。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。 24時間後、9日目の11時に断頭を行い、脳のTRP、5-HT、5-HIAA量を測定した。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、線条体、脳幹（橋＋延髄）、視床、視床下部、海馬、嗅球の7部位に分割した。各脳組織は内部標準物質 Nw-metyl-5-hydroxytryptamine (NM-5-HT) を含む 10% ZnSO4 + 0.02% Ascorbic Acid を0.5-2ml 加えてホモジナイズ後、－80℃ にて保存。試料は測定直前に解凍し、 20000xg、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時間の制限給餌を7日間繰り返した後、自由摂餌を再開すると24時間における総摂餌量は、対照群の151%と有意に増加した。同時に閉所条件にすると1日の総摂餌量は対照群の177%と他の3群に比し有意に増加した。しかし、閉所条件のみでは対照群の114%と差がなかった。
Fig.1に脳各部位のTRP、5-HT、5-HIAA量の変化を同時期の対照群に対する100%比として示した。
FR+SR群において、脳TRP、5-HT量は全部位において低下していた。5-HIAA量は嗅球でのみ低下していた。そして、5-HIAA/5-HT比は脳幹、線条体、海馬をのぞく他の部位で増加しており、視床においては、他の3群に比し、皮質、

視床下部においてはSR群、FR群に比し、海馬においてはFR群に比し有意に増加していた。

FR群においては、TRP、5-HTそして5-HIAA量は脳各部位において、低下傾向を示したが、5-HIAA/5-HT比で示される脳代謝回転は有意な変化を認めなかった。

SR群においては、TRP量は全脳部位において減少傾向を示し、5-HT量は線条体、海馬、嗅球において減少傾向を示し、5-HIAA量は線条体と視床下部をのぞく他の全ての部位において減少していた。そして、5-HT/5-HIAA比は線条体と嗅球をのぞく他の部位において減少していた。

時間制限給餌後に閉所条件にすると、ラットの1日の摂餌量は、自由摂餌に戻しただけの群や時間制限給餌を加えず閉所条件にしただけの群に比し有意に増加した。同時に脳各部位において5-HT量は低下しており、また脳セロトニン代謝回転は線条体、脳幹以外の全部位において亢進していた。これらのことから、時間制限給餌後に閉所条件にて飼育すると脳セロトニン代謝回転が亢進し、脳セロトニン量が低下し、これが、摂餌量の増加と関係しているものと考えられた。

〔文献〕

1) Gispen, W. H. et al. (1972) Neuroendcrinol. 9, 285-296.
2) 奥野正景ほか (1990) 神経化学 29, 248-249.
3) 奥野正景ほか (1991) 神経化学 30, 440-441.

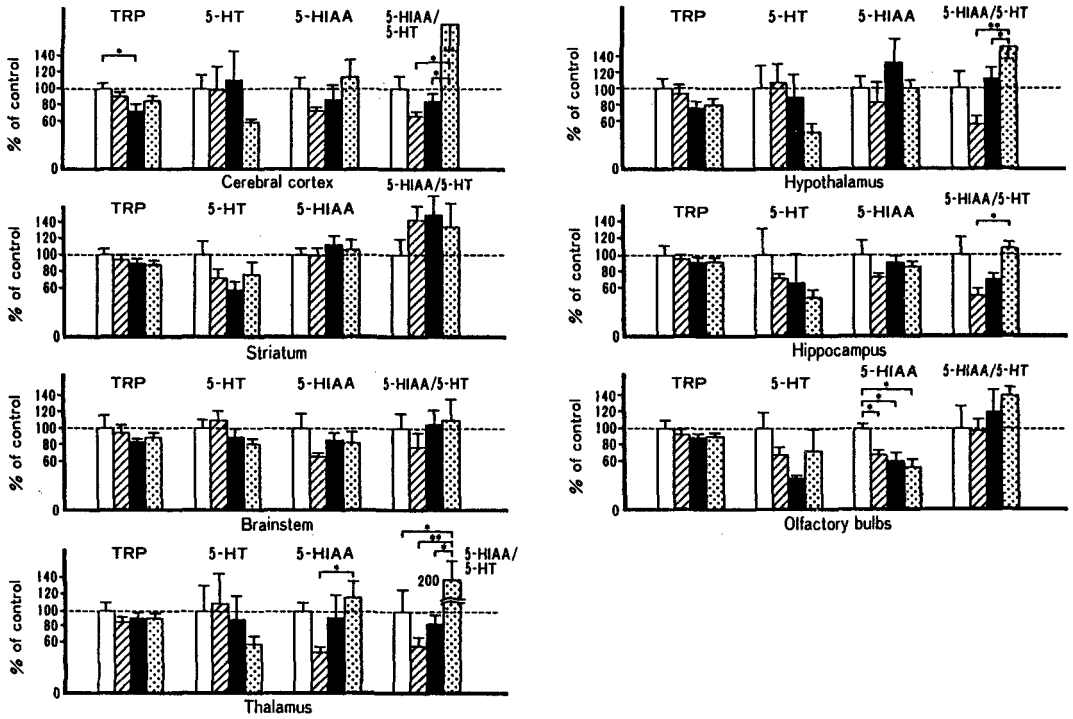


Fig. 1 Effects of space restriction following 7 days scheduled feeding on the concentratios of TRP, 5-HT and 5-HIAA, and the 5-HIAA/5-HT ratio in different brain regions of rats.
(Control □ , Space restriction ▨ , Food restriction ■ , Space restriction following food restriction ⁙)
Values are expressed as mean ± S.E.M. ** $p<0.01$ * $p<0.05$

207 脳局所グルコース利用率に対するシアン化ナトリウムの線条体投与の影響

上條　由美、*木内　祐二、安原　一、*小口　勝司
（昭和大学・医・*第一薬理、第二薬理）

〔要約〕
シアン化ナトリウムの中枢神経系に及ぼす影響を検討するために、ラット線条体内に挿入した脳内微小透析用プローブに2 mM, 10 mMシアン化ナトリウムを６０ min持続的に灌流し、脳局所グルコース利用率（ＬＣＧＵ）を脳内各部位について測定し検討を行なった。プローブ挿入側の脳内各部位のＬＣＧＵは、2 mMシアン化ナトリウム群では、control群と比べ有意な差は認められなかったが、10 mMシアン化ナトリウム群では、28部位中22部位で有意な低下が認められた。プローブ非挿入側の脳内各部位のＬＣＧＵも、10 mMシアン化ナトリウム群でのみ、28部位中13部位で有意な低下が認められた。以上の結果より、シアン化ナトリウム脳局所投与時には、脳内各部位で非選択的にＬＣＧＵが低下し、この低下によって示されるエネルギー代謝の抑制の持続が神経細胞障害の進展の基盤になっている可能性が示唆された。

＜目的＞
チトクロームオキシダーゼ阻害作用をもつシアン化ナトリウムは、細胞内のＡＴＰ産生を阻害し細胞を急速にenergy failure状態に陥らせる[3]。シアン化ナトリウムに対する感受性は組織により異なり、特に中枢神経系は感受性が高く強い機能障害が起こることが知られている。しかし、脳虚血後の神経細胞障害[1, 2]と同様にシアン化ナトリウムによるenergy failureがいかなる過程を経て神経細胞障害に至るかについては、まだ充分に検討されておらず、また脳内でのシアン化ナトリウムに対する感受性の部位差についても知られていない。そこで我々は、末梢作用による二次的な影響を避けるために脳内微小透析法を用いてシアン化ナトリウムを線条体内に直接投与し、急性期における神経細胞活性の指標として脳局所グルコース利用率（ＬＣＧＵ）を脳内各部位について測定し比較検討を行なった。

＜方法＞
手術：ＳＤ系雄性ラット（250−350 g）をpentobarbital (40 mg/kg, i.p.)で麻酔し、大腿動脈及び静脈にカニューレを留置した後、脳固定器に固定し、ガイドカニューレを右線条体直上（Bregmaより前方0.5、右側2.5、脳硬膜表面より4.0 mm）に挿入し、歯科用セメントで固定した。手術24時間後、膜長2 mmのＩ字型微小透析プローブ（BDP-I-8-02、EICOM）を挿入した。
ＬＣＧＵ測定：無麻酔無拘束で、透析プローブ内に saline (control)あるいは2 mM, 10 mMのシアン化ナトリウムを2 μl/minで60分間灌流した。灌流開始15分後、［^{14}C］デオキシグルコース（［^{14}C］ＤＧ）（100 μCi/kg）を静脈内投与した。投与後経時的に採血し、血漿中［^{14}C］ＤＧ及びグルコース濃度を測定した。45分後に断頭し、-20°Cの凍結下で、20 μmの前頭断脳切片を作成した。切片標本を、Ｘ線フィルムに21日間感光させ、デンシトメーターにより前頭各部位の黒化度を測定した。得られた脳組織の［^{14}C］量及び血漿中のグルコース濃度と［^{14}C］ＤＧ濃度から、Sokoloffらの式[4]に従いＬＣＧＵ値を計算した。有意差の検定は、ANOVAとTukeyの検定を用いた。

＜結果及び考察＞
Table 1にcontrol群、2 mM, 10 mMシアン化ナトリウム群の、プローブ挿入側での脳内各部位のＬＣＧＵを示した。control群では下丘、脚間核、内側膝状核のＬＣＧＵは高く、脳梁、中扁桃核、淡蒼球のＬＣＧＵは低かった。2 mMシアン化ナトリウム群の脳内各部位のＬＣＧＵはcontrol群と比べ有意な差は認められなかったが、10 mMシアン化ナトリウム群では、測定した全部位で約40-60%にＬＣＧＵが低下し、28部位中22部位でcontrol群に比べ有意差が認められた。一方、プローブ非挿入側でも、2 mMシアン化ナトリウム群では、いずれの部位でもcontrol群と比べ有意な差は認められなかったが、10 mMシアン化ナトリウム群では、全部位で40-70%にＬＣＧＵが低下し、28部位中13部位で有意差が認められた。また2 mM, 10 mMシアン化ナトリウム群とも、プローブ挿入側のＬＣＧＵは非挿入側に比べ一部で低値を示す傾向が認められたが、いずれも有意なものではなかった。以上の結果より、10 mMシアン化ナトリウムの線条体内局所投与の急性期には脳内各部位のＬＣＧＵが、control群に比べプローブ挿入側、非挿入側とも広範囲に低下していることが明らかになった。ＬＣＧＵは、局所脳活動の程度を反映するため、シアン化ナトリウム投与時には、脳内各部位で非選択的に細胞活動の低下が生じていることが示唆された。グルコース取り込み能は、

細胞内外のNa^+濃度勾配に依存するため、energy failureと細胞内アシドーシスによりNa^+濃度勾配が低下し、二次的にグルコース取り込み能が抑制された可能性が考えられる。また、energy failureに伴い、細胞内Ca^{2+}濃度が増加し、ホスホリパーゼを活性化することで、細胞膜の脂質環境の変化が生じ、グルコース担体の機能が低下した可能性も考えられる。このような、ＬＣＧＵの低下によって示唆されるエネルギー代謝の抑制の持続が神経細胞障害の進展の基盤となっている可能性も考えられる。

この研究に指導、協力をしてくださいました、カンサス大学のDr. F.E. Samson、Dr. S.R. Nelson、Dr. T.Pazdemikに深く感謝致します。

TABLE 1. Effect of perfusion with sodium cyanide on regional brain glucose use rate in a probe side.

	control (n=5)	CN 2mM (n=6)	CN 10mM (n=7)
Frontal cortex	55±13	49± 6	27± 7
Parietal cortex	57± 6	61±10	32± 9
Corpus callosum	23± 5	20± 3	9± 2*
Ventral striatum	68±11	58± 6	36± 9
Dorsolat. caudate	66±12	64± 8	32± 7
Globus pallidus	32± 3	32± 5	15± 3*
Ventral pallidum	55± 9	45± 9	23± 5
Nuc. accumbens	42± 4	47± 7	23± 7*
Bed nuc. stria terminalis	53±10	37± 5	27± 7
Hypothalamus	43± 4	46± 8	23± 6*
Ventral thalamic nuc.	70±11	64±10	30± 9*
Subthalamic nuc.	55± 7	63± 8	27± 8*
Lateral habenular nuc.	73± 9	73±13	36± 8*
Choroid plexus	33± 4	34± 6	16± 3*
Basolat. amygdaloid nuc.	55± 7	59± 6	25± 5*
Central amygdaloid nuc.	30± 2	35± 7	12± 1*
Hippocampus (CA3)	42± 6	47± 9	22± 6*
(Dentate gyrus)	37± 5	37± 8	19± 5*
(CA1-ventral)	45± 7	40± 5	20± 6*
(CA1-dorsal)	39± 4	35± 4	19± 6*
Dorsal lat. geniculate nuc.	63± 8	58± 8	29±10*
Medial geniculate nuc.	78±12	72±10	35± 8*
Anterior pretectal area	71±11	69± 9	35± 9*
Substantia nigra	39± 6	39± 6	21± 5*
Intrapeduncular nucleus	81±13	68± 8	40±11*
Superior colliculus	51± 7	64± 7	27± 7*
Inferior colliculus	115±11	124±11	72±14*
Lateral lemniscus	75±11	79±13	39±10*

values are means ± S.E. (μmol/100g/min), *p<0.05 compared with control

＜参考文献＞

(1) Bhardwaj, A., Brannan, T., Martincz-Tica, J. and Weinberger, J., (1990) J. Neural Transm., 80, 195-201.

(2) Hara, H., Kato, H. and Kogure,K., (1990) Brain Res., 510, 335-338.

(3) Isom,G.E., Burrows, G. and Way, J. L., (1982) Toxicology, 65 , 250-256.

(4) Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Roisers, M. H., Patlack, K. D., Pettigrew, O., Sakurada, O. and Shinohara, M., (1977) J. Neurochem., 28,897-916.

208 培養ミクログリアのスーパーオキシド産生能

田中　真，外松明美，平井俊策
（群馬大学神経内科）

〔要約〕

ラット新生仔脳の培養によって得たミクログリアのスーパーオキシド産生能をMCLA（ウミホタルルシフェリン誘導体；2-methyl-6-(p-methoxy-phenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one）依存性化学発光測定法を用いて定量的に評価するとともに、それにおよぼすアルミニウムの影響を検討した。Phorbol myristat acetate (PMA)あるいはopsonized zymosan(OZ)の刺激によって、ミクログリアはスーパーオキシドを発生したが、N-formylmethionylleucylphenylalanine (FMLP)刺激には反応しなかった。アルミニウムとして、塩化アルミニウム($AlCl_3$)、珪酸アルミニウム、酸化アルミニウムおよびアルミニウム(金属)を用いたが、これらは単独でミクログリアを刺激することはなかったしかし、$AlCl_3$存在下にPMA刺激を行うとスーパーオキシドの産生は高度に増強された。ミクログリアとアルミニウムイオンの共存によって生体内においても同様の現象が生じる可能性が示唆された。

ミクログリアは中枢神経系におけるマクロファージであり、生体防御に重要であると考えられる。一方、中枢神経系の退行変性疾患の主要病変部位、例えばアルツハイマー病の老人斑や神経原線維変化およびパーキンソン病の黒質に多数のミクログリアが出現することが知られているが、その役割は明らかにされていない。私たちは、ミクログリアが出現することの意義を解明する手始めとして、培養ミクログリアが、血液や他の組織マクロファージと同様に活性酸素を発生するか否か、またアルツハイマー病で蓄積されるアルミニウムがミクログリアにどのような影響を与えるかについて検討を加えた。

<u>実験方法</u>

ウイスターラット新生仔脳を初代培養し、14日後に振盪によってmicroglia-enriched fraction得た。さらにこれを接着にて純化したpurified microglia fractionを分離した(1)。非特異的エステラーゼ染色と蛍光標識IgGのFc-receptorへの結合から、purified microglia fractionの純度は99%以上であることを確認した。また同一の初代培養系からastroglia fractionも分離した。化学発光の測定は、MCLAを発光試薬として用い、Aloka社製 Luminescence Reader BLR-301で検出した。反応はphenol redを含まないHanks' balanced salt solution (HBSS) 中で、反応系容量1 ml、37℃で行った。刺激剤にPMA, FMLP、OZ、$AlCl_3$、珪酸アルミニウム、酸化アルミニウムおよび金属アルミニウムを用いた。アルミニウム類のうち$AlCl_3$はHBSSに溶解し、他は懸濁液とした。それぞれ50 μMおよび200 μg/ml となるように化学発光測定系に加えた。スーパーオキシドの定量は、ヒポキサンチン-キサンチン酸化酵素で発生させたスーパーオキシドをチトクロームC法で定量し、既知量のスーパーオキシド発生系を用いてMCLA依存性化学発光測定法にて発光強度との相関を用いておこなった。

<u>結　果</u>

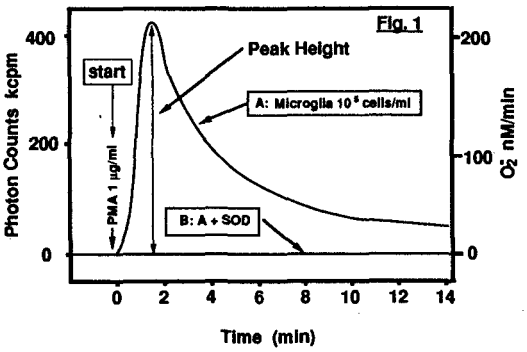
Purified microglia fractionは、PMAによって刺激され、高度の化学発光が検出された。これはスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)によって完全に抑制されることからスーパーオキシドに由来することが確認された(Fig.1)。PMA刺激における細胞密度と発光量との関係をFig.2に示した。また、OZ刺激でも同様の結果が得られたが、purified microglia fractionにFMLPを種々の濃度で添加しても発光は観察されなかった。一方、astroglia fractionは、いずれの刺激剤によってもスーパーオキシド

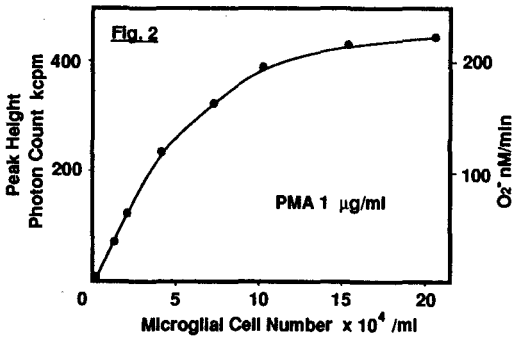
を産生しなかった。Microglia-enriched fractionはpurified microglia fractionと同程度以上のスーパーオキシド産生能を示した（図略）。今回検討したアルミニウムを含む種々の化合物は単独では化学発光を生じるための刺激剤とはならなかったが、$AlCl_3$存在下にPMA刺激を行うと発光が高度に増強され、$AlCl_3$添加および無添加の系でのスーパーオキシド発生量の差は10分間の反応時間において約0.5nmolであった(Fig.3)。

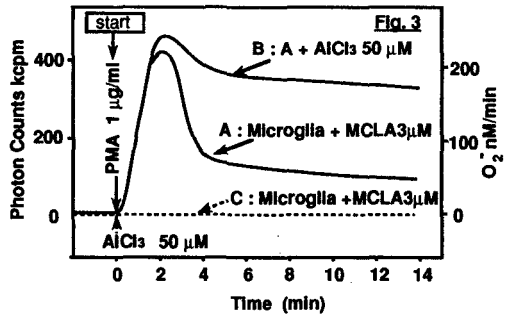
考　察

本検討で検出されたMCLA依存性化学発光は、SODによって完全に抑制され、アストロサイトでは観察されなかったことから、培養ミクログリアが産生するスーパーオキシドに由来するものであると考えられる。FMLPはヒトの好中球やマクロファージの刺激剤となるが、ラットでは好中球と同様にミクログリアにおいても種差により受容体が欠如するためにスーパーオキシドが生じなかったと思われる。本検討でミクログリアのスーパーオキシド産生能を評価するために用いたMCLA依存性化学発光測定法は従来の方法(2)に比し、より簡便かつ定量性の高い方法であると思われた(3)。

アルミニウムと活性酸素の関連については、アルミノ珪酸が白血球を刺激し活性酸素を発生させることが知られている(4)。また、アルミニウムイオンは、おそらく生体膜の構造を修飾することによって、フリーラジカルによる生体膜障害を促進するといわれている(5)。今回得られた結果のようにアルミニウムイオンがPMA刺激によるミクログリアのスーパーオキシド産生能を増強するという現象はこれまで報告されていないが、アルミニウムの蓄積と多数のミクログリアの出現をみる退行変性疾患において病変形成過程に関与する可能性が示唆された。







文　献

1)Suzumura, A. et al., Brain Res., 324(1984)379-383.
2)Colton, C.A. et al., FEBS Lett., 223(1987)284-288.
3)Nishida, A. et al., Clin.Chim.Acta, 179(1989)177-182.
4)Evans, P.H. et al., Free Rad. Res. Comms., 5(1989)317-321.
5)Quinlan, G.J. et al., Biochim. Biophys. Acta, 962(1988)196-200.

209 アルツハイマー病・病態モデル--海馬におけるプロテインキナーゼC（β）の細胞内局在に与えるレセルピン投与の効果について-

小町裕志，柳澤勝彦，白崎康文*，宮武　正
（東京医科歯科大学神経内科，第一製薬中央研究所*）

〔要約〕　プロテインキナーゼC（PKC）は脳に高濃度に存在し，記憶形成との関連で注目されている．一方，アルツハイマー病（AD）脳の海馬膜分画においてPKC（β）の免疫反応性の低下が報告されている．今回，PKCの細胞内局在に与えるモノアミンの効果をin vivoで検討した．雄ラットにレセルピンを腹腔内投与し，前頭葉・海馬・小脳を摘出し，細胞質分画・膜分画を採取した．電気泳動し，抗PKC（β）モノクローナル抗体を用いたWestern blottingを行った．レセルピン投与後の海馬膜分画で，PKC（β）の有意な免疫反応性の低下を認めた．AD脳における青斑核神経細胞の脱落を考え合わせると，AD脳におけるPKC異常はモノアミン系投射路の障害による可能性が考えられた．

［序論］　Akersらは，ラット脳を用いたlong-term potentiationにおいて，PKCの細胞質分画から膜分画への局在変化を示し，記憶形成におけるPKC細胞内局在の重要性を指摘した．[1] 一方，アルツハイマー病脳において，海馬におけるPKC（β）の免疫反応性が，膜分画で減少していることが報告され，[2] 記憶障害との関連で注目されている．最近，in vitroの実験系で，adrenergic receptorを介した，PKCの細胞内局在の変化が報告された．[3] 今回，モノアミンのPKCの細胞内局在に与える役割をin vivoで明らかにすることを目的に実験を行なった．

［方法］　250gの雄wistar ratを用い，初回，レセルピン5mg/kgを，さらに3日間2mg/kg腹腔内投与し4日目に，前頭葉，海馬，小脳を摘出し，氷冷下に0.32M蔗糖溶液でホモジナイズし，100,000g，60分遠心分離し，膜分画と細胞質分画とを得た．これらについて抗PKC（β）モノクローナル抗体（生化学工業）を用いて，Western blottingを施行した．蛋白量15-45μgで定量可能であったため，蛋白量20μgを用い，デンシトメータにより定量し，対照群及びレセルピン投与群について平均値を算出，t検定を行い比較検討した．

［結果］　海馬のwhole homogenateでは対照およびレセルピン投与ラットにおいてPKC（β）免疫反応性の明らかな差は認められなかった．一方，細胞亜分画の解析では，レセルピン投与ラット海馬において，PKC（β）の細胞質分画での増加，膜分画での減少が認められた．（図1）　定量的なWestern blottingの解析より，海馬の膜分画において，対照群に比してレセルピン投与群では統計学的に有意な減少を認めた．一方，前頭葉，小脳においては有意な変化を認められなかった．（図2）

［考察］　海馬におけるPKCの細胞内局在の変化は，Akersらによるlong-term potentiationの実験結果などから，脳における学習や記憶の成立に重要な役割を果たしていると考えられている．一方，アルツハイマー病脳でのPKCの細胞内局在の変化については，海馬の膜分画で有意に減少し，また前頭葉では，膜分画での有意な減少に加え，細胞質分画での有意な増加が報告されている．[4] アルツハイマー病脳におけるPKCの細胞内局在の変化のメカニズムは不明である．アルツハイマー病脳では，青斑核における神経細胞の高度な脱落が報告されており，[5] 今回の実験結果と考え合わせると，脳内モノアミンの減少が，海馬においてPKCの細胞内局在に変化をもたらしている可能性が考えられる．アルツハイマー病脳で認められる老人斑や神経原線維変化とPKC異常との関連は不明であり，今回の実験モデルは，これらの解明に有用であると考えられる．

［結論］　レセルピン投与ラットの膜分画において，ＰＫＣ（β）の免疫反応性の有意な低下を認めた．アルツハイマー病でのＰＫＣの細胞内局在の変化は，青斑核・腹側被蓋野からのモノアミン系投射の障害による可能性が考えられた．

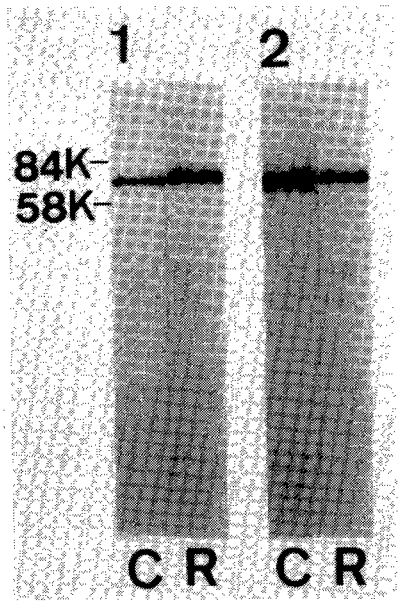


図1　ＰＫＣ（β）Western blot
1：細胞質分画，2：膜分画
C：対照ラット，R：レセルピン投与ラット

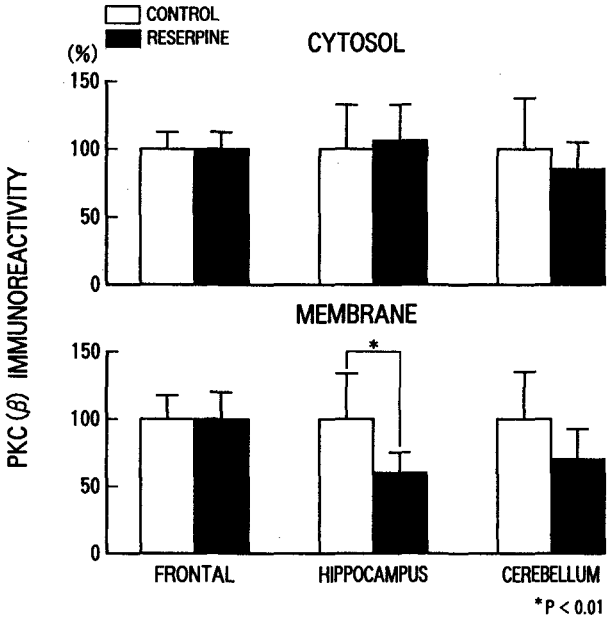


図2　Western blotの定量的解析
海馬膜分画においてＰＫＣ（β）免疫反応性の有意な減少を認めた．

［文献］

1) Akers RF et al.: Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long -term potentiation. Science 231:587,1986
2) Masliah E et al.: Differential involvement of protein kinase C isozymes in Alzheimer's disease. J Neurosci.10:2113,1990
3) Kalberg CJ et al.: Adrenergic and calcium-mediated subcellular redistribution of protein kinase C in primary neuronal cultures. BBRC 166:22,1990
4) Cole G et al.: Decreased levels of protein kinase C in Alzheimer brain. Brain Res.452,165,1988
5) Mann DMA.: A comparison of changes in the nucleus basalis and locus caeruleus in Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psych.47:201,1984

210 ダウン症脳におけるアミロイドβ／A4前駆体タンパクとそれに由来する成分の解析

亀谷富由樹[1]、田中喜久子[1]、石井毅[2]（東京都精神医学総合研究所、[1]分子生物、[2]超微形態）

〔要約〕
ダウン症患者脳よりアミロイド前駆体タンパク（APP）およびそれに由来する成分を系統的に分離精製、化学分析を行い、脳中ではどのようなAPPの分解代謝が起こっているのか検討した。ダウン症脳をリン酸緩衝液可溶画分（PB）、リン酸・トライトン緩衝液可溶画分（PB/T）、SDS溶液可溶画分（SDS）に分画した。PB画分からは分子量93-123KDaの分泌型APP、PB/T画分からは分子量15KDaのC末端断片および105-130KDaの膜結合型APP、さらにSDS画分から分子量90-125KDaの膜結合型APPが得られた。分泌型APPのうち93-97KDaの成分はAPP各部に体する抗体との反応性からAPP-695由来し、さらにβ/A4領域全てを欠いていると考えられ、この成分の切断部位が従来報告されてきた部位と異なっている可能性が示唆された。現在、PB/T画分のAPPおよびその断片について詳細な解析を行っている。

＜目的＞

脳アミロイドとして沈着するβ/A4は、その前駆体タンパク（APP）の代謝異常によって生じると考えられてるが、その生成機序は不明のままである。本研究では、ダウン症患者脳よりAPPおよびそれに由来する成分を系統的に分離精製、化学分析を行い、脳中ではどのようなAPPの分解代謝が起こっているのか検討することを目的とした。

＜方法＞

ダウン症脳を9倍量の10mMリン酸/0.2M NaCl/緩衝液でホモゲナイズし、47,000 xgの遠心をして得たPB画分、沈殿を10mMリン酸/0.2M NaCl/0.5% Triton X-100緩衝液でホモゲナイズし、47,000 xgの遠心をして得たPB/T画分、その後の沈殿をさらにSDS/DTT溶液でホモゲナイズし、47,000 xgの遠心をして得たSDS画分に分画した。それぞれの画分について、Affigel-heparin、イオン交換クロマトグラフィー等によるAPPの部分精製を行った。PB画分からはAffigel-heparinアフィニティー、MA7Qイオン交換クロマトグラフィーによって分泌型APPを分離精製をした。膜結合型およびC末端断片については精製中である。

APPの分析には、図1に示したAPPの各部分に対する抗体(1, 2)、抗T97抗体（APP-695 18-38残基）、抗R98抗体（APP-770 325-337）、抗R36抗体（APP-695 527-540）、抗Z31抗体（APP-695 577-596、群大、医山口保晴博士より供与していただいた）、抗R17抗体（β/A4 1-24）、抗R37抗体（APP-695 681-695）を用いてイムノブロットによる解析を行った。また、精製した分泌型APPはN末端アミノ酸配列分析を行った。

＜結果と考察＞

PB画分から93-123KDaの分泌型APPを精製した。精製した分泌型APPのN末端アミノ酸配列は図4に示したようになり、予想されているAPPの一次構造の18残基からの配列と一致した。123KDaおよび105-112KDaは抗T97、抗R98、抗R36抗体と反応し、93-97KDaは抗T97、抗R36抗体と反応し、抗R98抗体とは反応しなかった。また抗Z31、抗R17抗体は123、105-112KDaの成分と反応し、抗R37抗体はどの成分とも反応しなかった（図3、表1）。これらのAPPの各部に対する抗体の反応性から、93-97KDaの成分はAPP-695に由来する分泌型APPであることが推定された。

PB/Tのヘパリン非結合画分からは、分子量15KDaのC末端断片、またヘパリン結合画分からは105-130KDaの膜結合型APPが得られた。SDS画分からは、トライトンでは抽出できなかったと考えられる90-125KDaの膜結合型APPが得られた。15KDaのC末端断片は抗37抗体と反応し、また105-130KDaの膜結合型APPは抗R17抗体を除く全ての抗体と反応した。これらの成分については、現在更に精製を進めている。

分泌型APPではβ/A4領域の中でプロセシング起り、β/A4の一部（1-16残基）を含むN末端断片分泌型APPとして分泌されることが知られている(3)。アミロイド原性をもつβ/A4を含む断片が生じるには、通常のプロセシング部位での切断が起きないことが必要になる。したがって、精製した分泌型APPのC末端部にβ/A4の一部が含まれているかどうか、β/A4を含む断片が存在しているのかどうかが重要な問題となる。精製した分泌型APPのうち、APP-695由来の93-97KDaが抗Z31、抗R17抗体と反応しなかったことは、通常のプロセシングとは異なる切断が起き、膜上にアミロイド原性のある断片を生じる可能性を示唆している。この点に関しては、93-97KDaのC末端分析およびPB/T画分に得られているC末端断片の解析が必要であると考えられる。

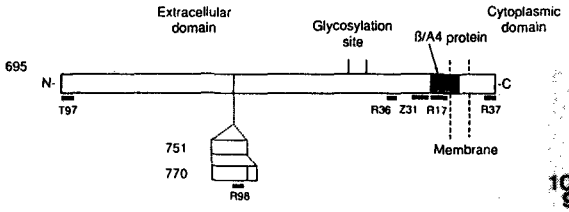


図1. APPの模式図。各合成ペプチドの位置を示した。

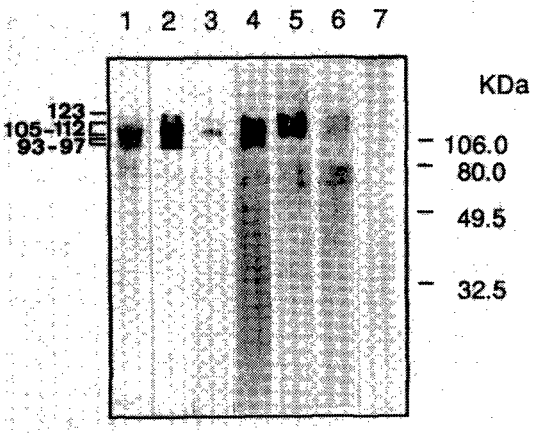


図3. ダウン症脳PB画分より精製した分泌型APPのSDS電気泳動とイムノブロット。レーン1、CBB染色。レーン2、抗T97抗体、レーン3、抗R98抗体、レーン4、抗R36抗体、レーン5、抗R17抗体、レーン6、抗Z31抗体、レーン7、抗R37抗体によるイムノブロット。

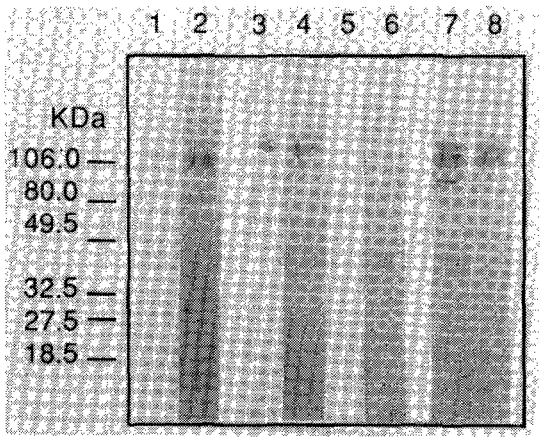


図2. ダウン症脳および正常脳から得られた各画分のイムノブロットによる分析。レーン1、ダウン症脳PB分画、レーン2、正常脳PB分画、レーン3、ダウン症脳PB/Tヘパリン結合分画、レーン4、正常脳PB/Tヘパリン結合分画、レーン5,ダウン症脳PB/Tヘパリン非結合分画、レーン6、正常脳PB/Tヘパリン非結合分画、レーン7、ダウン症脳SDS分画、レーン8、正常脳SDS分画。各画分をSDS電気泳動後、レーン1-2は抗T97抗体を、レーン3-8は抗R37抗体を用いてイムノブロットをおこなった。

	20	40
Predicted APP	LEVPTDGNAGLLAEPQIAMFCGR	
105-112 KDa	xEVPtDGnAGLLAxp	
93-97 KDa	xEVPxDgnAGll	

図4. ダウン症脳から精製した分泌型APPのN末端アミノ酸配列の分析。小文字は検出されたPTHアミノ酸のレベルが低かったアミノ酸残基を、xは同定出来なかったアミノ酸残基を示す。

＜文献＞

1. Ishii T., Kametani F., Haga S. and Sato M. (1989) Neuropathol. Appl. Neurobiol. 15, 135-147.
2. KennedyH., Kametani F. and Allsop D. (1992) Neurodegeneration 1, 59-64.
3. Esch F.S., Keim P.S., BeattieE.C., Blacher R.W., Culwell A.R., Oltersdorf T., McClure D. and Ward P.J. (1990) Science 248, 1122-1124.

211 cDNAの人工改変によるアルツハイマー アミロイド前駆体タンパクのプロセシングの検討

宇佐美美穂子　山尾一針ヶ谷和花子　丸山敬
（東京都精神研・分子生物）

〔要約〕COS-1細胞にAPP$_{695}$cDNAを導入して発現させると、APPはc末端抗体によって110-130KDと14KDの分子量のタンパク質として検出される。このうち大部分は細胞表面に局在していた。110-130KDの分子量のタンパクはAPPの全長、14KDはプロセシング後細胞膜に残ったc末端断片と考えられる。また細胞内にC末端が切断されたN末端部分の存在は見いだされないことからプロセシングは細胞表面で主として生じることが示唆される。APPのプロセシングは膜へのアンカー領域である疎水性アミノ酸残基の連続部分(Gly^{700}-Leu^{723})およびその直後にある正電荷を持つリジン(Lys^{724}-Lys^{726})を人工的に他のアミノ酸に変化させることにより一部又は著しく抑制された。

アルツハイマー病において脳に沈着するβ/A4アミロイドの前駆体タンパク(APP)は正常な代謝ではβ/A4アミロイドタンパクの中間付近で切断をうけるため、アミロイドを形成しないことはすでによく知られている。私達はアミノ酸の改変により、正常なプロセシングにはAPPの膜貫通領域が何らかの役割を果たしている可能性を示唆する知見を得ている（Maruyama,K.et al. 1991）。そこで、APPの膜貫通領域付近を変化させプロセシングに対する影響を検討した。

［方法］　APPcDNAの人工改変はKunnkel方法(Kunkel,T.A. 1985)を用い、5種類の変異型APPを作製した。COS-1細胞への導入はDEAE-dextran法を用いた。

［結果］

COS-1細胞に野性型APP$_{695}$cDNAを導入し一過性に発現させた後、S^{35}メチオニンを用いてその代謝を観察した。APPの短期間の代謝についてはすでにPC12細胞等で報告がある。PC12細胞においてはAPPは分子量の小さい未熟型として生合成され、15-30分にかけて糖鎖付加や硫酸化により分子量が増加した成熟型となると報告されている（Caporaso,G.L. et al. 1992）。しかしCOS-1細胞においてはAPPの分子量は0分より4時間まで変化が見られない(Fig. 1 A)ことより、きわめて短時間に成熟型になると考えられる。14KDのc末端断片は約30分後から変化がみられ4時間後には減少した(Fig.1 B)。培養液中への分泌は30分-1時間後から検出され早期からプロセシングが生じていることが判明した(Fig.1 C)。またproteinase K(PK)で細胞を処理した後immunoprecipitationを行うと、細胞表面に存在すると考えられるAPPはN末端側を消化されたc末断片となる。intactな細胞でのchase1時間後の全長型とc末端断片との比は40:1であるのに対しPK処理細胞では6:1となりすでにこの時点でかなりのAPPが細胞表面に存在していることが示された。

次に膜からの距離によりプロセシングの位置が決定されるとするならば、APPは厳密に膜に固定されることが必要と考えられる。一方、近年膜タンパク質の膜への固定は疎水性アミノ酸配列とその直後の正電荷アミノ酸によってなされると報告されている（Kuroiwa,T. et al. 1991）。そこでcDNAの人工改変によりAPP膜貫通領域付近のアミノ酸を変化させた変異型APPをCOS-1細胞にて発現させプロセシングを検討した。

（1）膜貫通直後の3個のリジン残基を他のアミノ酸に変化させた三種類の変異型による検討。

a. リジン残基のうち始めの2個をバリンに変化させたVVK変異型は野性型とほぼ同様な様式で発現、分泌された(Fig.2 A , Fig.3)。PK処理によって110-130KDがほぼ消失し、14KDのペプチドが増加した(Fig. 2 b)。また、N末端抗体に反応するものも見られなかった。

b. リジン残基3個をロイシン2個とイソロイシン1個に変化させたLLI変異型は発現は変わらないが分泌が野性型の約20%までに低下した(Fig. 2 A, Fig. 3)。

c. リジン残基3個をすべてグルタミン酸に変化させたEEE変異型は正常に発現されたが、全く分泌されなかった(Fig. 2 A, Fig. 3)。またPK処理によりc末端、N末端のいずれの抗体にも反応するタンパクは消失した(Fig. 2 A,B)ことにより、この変異型は膜に貫通しておらず、細胞内にも存在していないと考えられる。

（2）APPの膜貫通領域開始から6アミノ酸（Gly^{700}-Leu^{705}）をリジンに変化させたK変異型は発現された後N_{out}/C_{in}で膜に取り込まれる(Fig. 2 A, B)が、分泌されなかった(Fig. 3)。

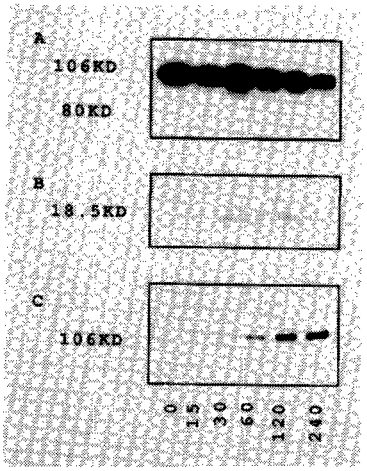


Fig.1 Autoradiograms of APP_{695} immunoprecipitated from cell lysates and conditioned media of [S^{35}] -methionine labeled COS-1 cells. The full length form (A), the 14KD peptide (B) and the secreted form (C) of APP_{695} .

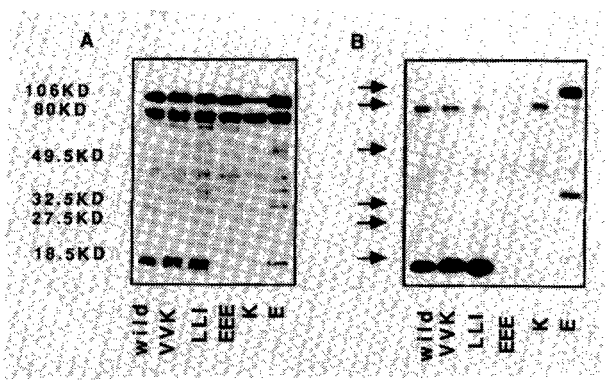


Fig.2 Immunobloting of the intact and proteainase K-treated APPs expressed in COS-1 cells.

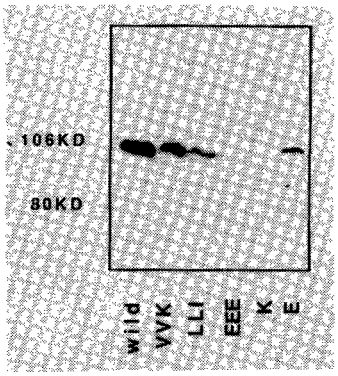


Fig.3 Secreted forms of APP in conditioned medium of COS-1 cells transfected with wild and mutant APPs.

(3) 膜貫通領域中間付近の6アミノ酸 (Val^{710}-Val^{715}) を負電荷を持つグルタミン酸に変化させたE変異型は発現されわずかに分泌されるが(Fig. 2, 3)、野性型に比べて全長のまま細胞内に存在しているものが多く見られた(Fig. 2 B)。

[考察]

以上のようにAPPの膜貫通領域付近のアミノ酸を変化させると、正常な分泌の制限や阻止が生じることが判明した。膜タンパク質の膜透過停止に関する最近の知見によれば、変異したアミノ酸がいずれも膜への停止にかかわっていると考えられることからAPPが正常にプロセシングされるためには、APPが膜に厳密に挿入されることが必要であることが強く示唆された。しかし、どのような機構でプロセシングが影響されるのか等、詳細は解析中である。

[参考文献]

1.Maruyama,K., Kametani,F., Usami,M., Yamao-Harigaya,W., and Tanaka,K. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun.179, 1670-1676

2.Kunkel,T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488-492

3.Caporaso,G.L., Gandy,S.E., Buxbaum,J.D., and Greengard,P. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2252-2256

4.Kuroiwa,T., Sakaguchi,M., Mihara,K., and Omura,T. (1991) J. Biol. Chem. 266, 9251-9253

212 アルツハイマー病・病態モデル　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反応性の検討（第2報）

姉崎　利治*、高橋　均**、生田　房弘**、宮武　正*、
辻　省次*、柳澤　勝彦*
（新潟大脳研神経内科*、同実験神経病理**、
東京医科歯科大学神経内科*）

〔要約〕マイネルト基底核破壊により、遠隔反応として前頭葉皮質に出現する反応性アストログリアと、カイニン酸による cortical injuryにともない病巣周囲に出現する反応性アストログリアに関し、ＧＦＡＰおよびにアミロイド前駆体蛋白（ＡＰＰ）をマーカーとして免疫組織学的に検討した。両実験モデルには共通してＧＦＡＰ陽性の反応性アストログリアの出現を認めた。一方ＡＰＰ免疫反応性については、cortical injuryにともなう反応性アストログリアにおいてのみ認められた。以上より反応性アストログリアは病巣の性格により多様な反応様式をとることが推察された。

【目的】

アルツハイマー病大脳皮質において広汎なＧＦＡＰ陽性アストログリアの出現を認めるが、その発現メカニズムは不明である。昨年我々は、マイネルト基底核（ｎｂＭ）破壊により、その被投射域である前頭葉皮質に、遠隔反応としてＧＦＡＰ陽性アストログリアが出現することを報告した[1]。

本年は反応性アストログリアの特性を明らかにすることを目的に、カイニン酸を用いたcortical injuryラットを加え、ＧＦＡＰおよびにＡＰＰをマーカーとしてアストログリアの反応性を免疫組織学的に比較検討した。

【方法】

１．病巣作成

200-250gの雄 Wistar ラットを、ハロセン麻酔下に固定し、Paxinos & Watsonの図譜に従って、ｎｂＭをイボテン酸 1μgを、定位脳手術的に注入して破壊した。Cortical injuryは、前頭部頭蓋骨に直径 2mmの穴を開け、カイニン酸（7.5mg/ml）をオキシセル綿（約3mm³）にしみこませ、硬膜上に置き作成した。手術、1,3,7,21日後に灌流固定し、脳を採取した。

２．組織学的検討

ピクリン酸－４％パラホルムアルデヒド液で灌流固定後、急速凍結し、クリオスタットにて凍結切片を作成した。

抗体は、抗ＧＦＡＰポリクローナル抗体（DAKO社）、
抗ＡＰＰ(666-695)ポリクローナル抗体（東大脳研病理井原康夫教授供与）[2]、
抗Choline-acetyltransferase抗体(Boehringer Mannheim社)をもちい、
ＡＢＣ法にて免疫染色を行い、diaminobenzidineにて発色した。

【結果】

１．ｎｂＭの破壊は、Kluver-Barrera染色、および Choline-acetyltransferase 免疫染色により確認した。

２．低濃度カイニン酸による cortical injuryにより、皮質神経細胞の壊死による大脳皮質層構造の乱れを認めた。

３．cortical injuryにともない出現する反応性アストログリアは、ＧＦＡＰおよびＡＰＰ両者に対する免疫反応性が陽性であることがミラー切片法で確認された[3,4](Fig.1)。

４．ｎｂＭ破壊により前頭葉皮質に出現する、遠隔反応性アストログリアは、観察期間のいずれの時点においても、ＡＰＰ免疫反応性は認められなかった。(Fig.2)

【考察】

１．ｎｂＭ破壊により、遠隔反応として前頭葉皮質にＧＦＡＰ陽性アストログリアが出現することを確認した。本実験モデルは、アルツハイマー病大脳皮質におけるアストログリアの反応メカニズムを解明する上で有用なモデルと考えられた。

２．ｎｂＭ破壊モデルと cortical injuryモデルにおける反応性アストログリアはＡＰＰ免疫反応性の点から相違が認められた。反応性アストログリアは、病巣の性格により多様な反応様式をとることが推察された[5]。

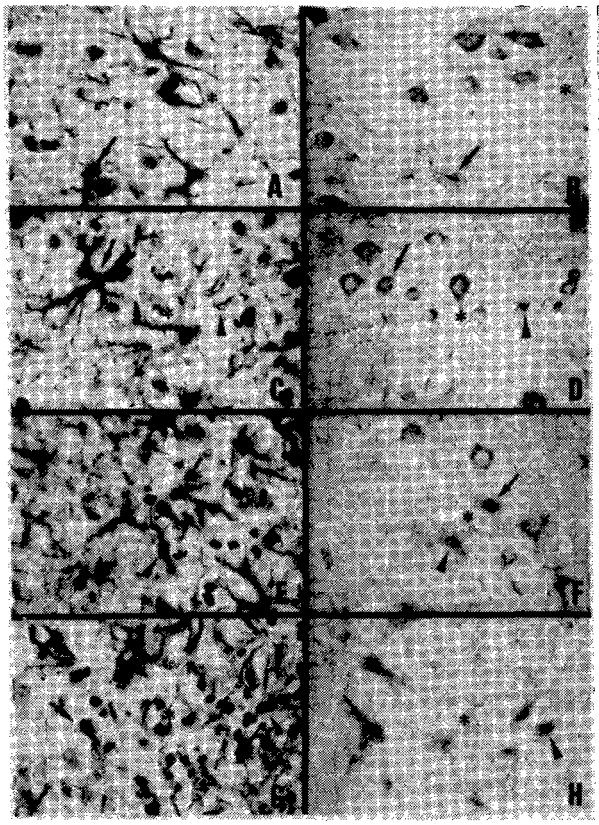


Fig.1 cortical injuryラット前頭葉皮質
A, C, E, G; GFAP免疫染色
1、3、7、21日
B, D, F, H; APP免疫染色
1、3、7、21日

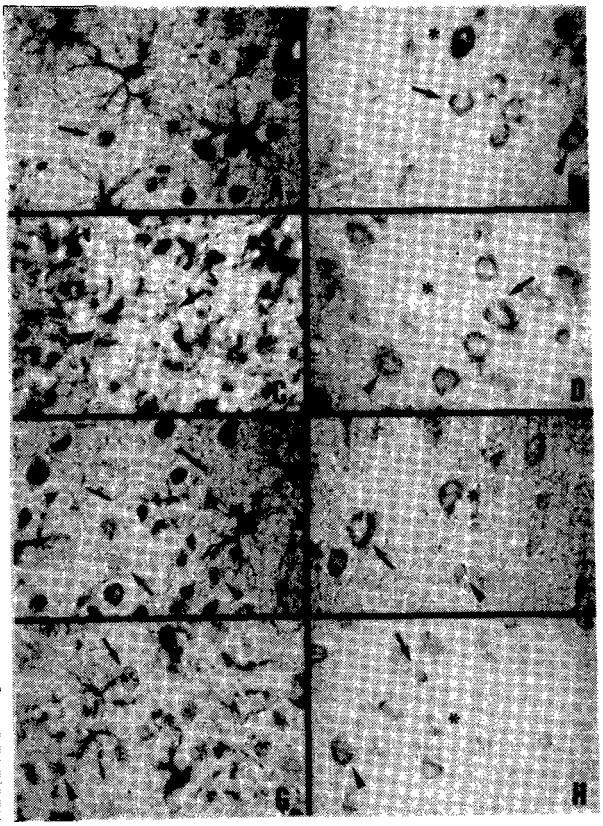


Fig.2 nbM破壊ラット前頭葉皮質
A, C, E, G; GFAP免疫染色
1、3、7、21日
B, D, F, H; APP免疫染色
1、3、7、21日

□文献□

1. Anezaki, T., Yanagisawa, K., Takahashi, H., et al. Remote astrocytic response of prefrontal cortex is caused by the lesions in the nucleus basalis of Meynert, but not in the ventral tegmental area. Brain Research, 574(1992)63-69.
2. Takio, K., Hasegawa, M., Titani, K. and Ihara, Y. Identification of B protein precursor in neuborn rat brain. Biochem. Biophys. Res. Comm. 160(1989)1296-1301.
3. Kawarabayashi, T., Shoji M., Haragaya Y., Yamaguchi H., and Hirai S. Expression of APP in the early stage of brain damage, Brain Research, 563(1991)334-338.
4. Otsuka, N., Tomonaga, M. and Ikeda, K. Rapid appearance of B-amyloid protein immunoreactivity in damaged axons and reactive glial cells in rat brain following needle stab injury. Brain Research, 568 (1991)335-338.
5. Gehrmann, j., Schoen, S.W., and Kreutzberg, G.W. Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the dentate gyrus. Acta Neuropathol, 82(1991) 442-455.

213 アルツハイマー病海馬及び海馬障害ラットにおけるカルシニューリン免疫活性

小野寺宏，山崎靖人，小暮久也
（東北大学神経内科）

〔要約〕
カルシニューリン(protein phosphatase 2B)の各サブユニットに対するモノクローナル抗体を用いて，アルツハイマー病海馬における免疫染色性を正常海馬と比較検討した．更に，選択的に海馬CA1錐体細胞を障害したラットを１年後に屠殺してカルシニューリン免疫染色をおこなった．正常人海馬では，カルシニューリンα，β各サブユニット共，神経細胞somaが比較的よく染色された．歯状回顆粒細胞とCA1-3領域の錐体細胞は同様の染色強度を示した．アルツハイマー病ではα，βいずれのサブユニットでも顆粒細胞,CA1錐体細胞で著明にimmunoreactivity(IR)が増強していたが，特にCA1錐体細胞ではapical dendritesの染色性増強が著明であった．老人班周囲のdystrophic neuritesにもIRが認められた．生存神経細胞内のtangleではカルシニューリン IRが認められるが，細胞外tangleは染色されなかった．ラット海馬でも虚血性CA1障害後，僅かに残存する錐体細胞は著明なIRの増強を示した．アルツハイマー病及びラットの海馬CA1領域いずれでも，残存する錐体細胞でカルシニューリン染色性が増強しており，死滅した神経細胞の機能を生き残った神経細胞が代償している像とも解釈される．dystrophic neuritesに集積するカルシニューリンIRはアルツハイマー病における脱燐酸化機構の変調を反映すると考えられる．

［目的］ アルツハイマー病では，燐酸化タウ因子が不溶性のpaired helical filament中に存在するなど、蛋白質の燐酸化と脱燐酸化反応を触媒する酵素系の異常が重要な役割を演じていると考えられる．カルシニューリン(protein phosphatase 2B)はカルシウム／カルモジュリン依存性脱燐酸化酵素であり，中枢神経系，とくに神経細胞に極めて高濃度に分布している．我々は，昨年度の本学会で，虚血性脳障害後急性期におけるカルシニューリンの変化を報告している(1)．アルツハイマー病でも著明な海馬障害が認められることがよく知られているが，なかでもCA1錐体細胞の変性脱落が著しい．今回，カルシニューリン各サブユニットに特異的なモノクローナル抗体を用いてアルツハイマー病患者海馬におけるカルシニューリン immunoreactivity(IR)の変化を検討した．さらに，ラット一過性脳虚血による選択的海馬CA1ニューロン障害モデルにおけるCA1領域の病変と免疫組織化学的に比較検討した．
［方法］アルツハイマー病患者（６５才女，７１才男）及び，非痴呆老人脳より海馬を切り出し，ホルマリン固定後，パラフィン切片を作成した．ラットに２０分間の一過性脳虚血（４血管閉塞モデル）を負荷して選択的に海馬CA1錐体細胞を破壊し(2)，１年後に灌流固定後パラフィン切片を作成した．カルシニューリンα，β各サブユニットに対するモノクローナル抗体(それぞれVD3,VA1)を使用しABC法にて免疫組織化学的に検討した(1,3)．更に，隣接切片を鍍銀染色して神経原線維変化と老人班の局在を観察した．
［結果と考察］ アルツハイマー病海馬； 海馬回の神経細胞密度の減少はCA1領域で目立ち，神経原線維変化，老人班も同領域等で認められた．歯状回顆粒細胞密度の減少はCA1錐体細胞の脱落に比較して軽度にとどまっていた．アルツハイマー病海馬では，歯状回顆粒細胞，CA1/CA3領域の錐体細胞のIRが対照老人に比して増強していた．ＣＡ１領域では，生存する錐体細胞は両カルシニューリンサブユニット共soma及びapical dendriteでの染色性が著明に増強していた．生存CA1錐体細胞内のtangleにはIRが認められたが，細胞外tangle（死細胞）は染色されなかった．plaque周囲のdystrophic neuritesにも弱いIRが認められた．
ラット海馬障害モデル； 虚血性CA1障害１年後には著明なCA1領域の萎縮を認めた．わずかに残存するCA1錐体細胞ではsomaとapical dendritesにおいて著明なIRの増強が認められた．CA3領域では，stratum lucidum (mossy fiber)のIRが増強していた．尚，アルツハイマー病海馬及びラット海馬いずれにおいても，α及びβサブユニット共よく似た挙動を示した．
アルツハイマー病及びラットいずれも残存するCA1錐体細胞のカルシニューリンIRは著明に増強していた．既に，アルツハイマー病海馬及びラット虚血モデルにおいて，残存する錐体細胞のCalcium/calmodulin-dependent protein kinase IIのIRが増強することが知られている．神経細胞に密に分布するこれらの燐酸化及び脱燐酸化酵素の変化は，生存する神経細胞が失われた神経細胞の機能を代償している像とも解釈出来るかもしれない．dystrophic neuritesに集積するカルシニューリンはアルツハイマー病における脱燐酸化機構の変調を反映すると考えられる．

［文献］
1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 (1991) 神経化学 30,514-515.
2 Onodera H., and Kogure K. (1989) Brain Research 458,212-217.
3 Yamasaki Y. et al Neuroscience (in press)
本発表は山形大学第三内科加藤丈夫博士との共同研究である

図1 カルシニューリン免疫組織化学（モノクローナル抗体；VA1）
(a)対照老人海馬CA1領域，(b)アルツハイマー病海馬CA1領域.
アルツハイマー病では神経細胞の染色性（特に樹状突起）が著明に増強している.

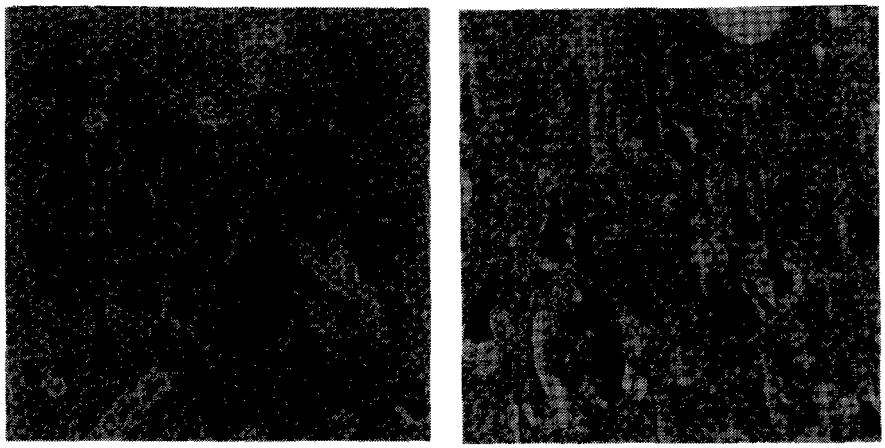
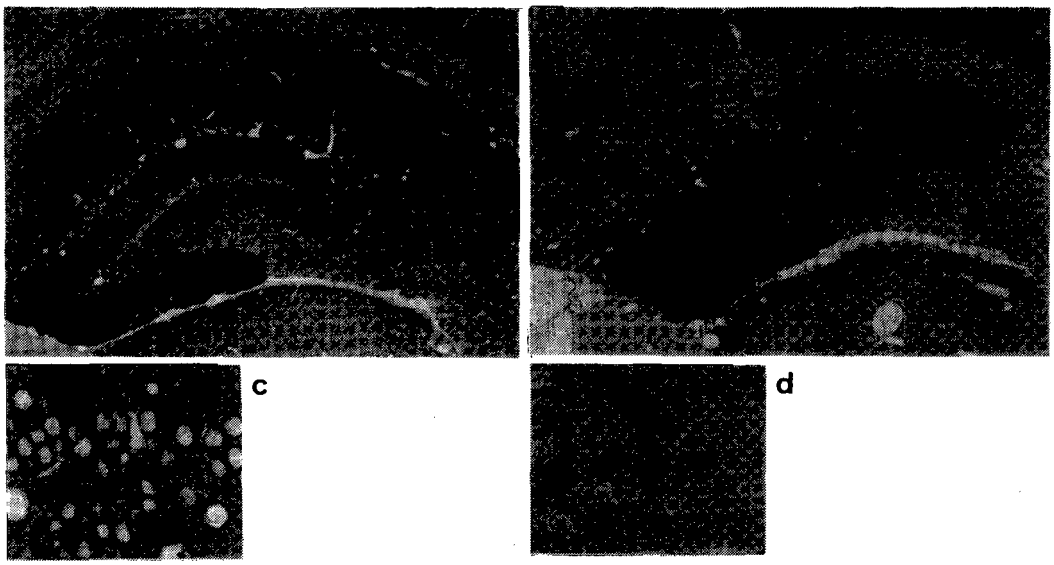


図2 カルシニューリン免疫組織化学（モノクローナル抗体；VA1）
(a) 正常海馬，(b)虚血後海馬，(c)正常CA1，(d)虚血後残存CA1錐体細胞の染色性が著明に増強している.



214

β- アミロイド蛋白（22-35）による神経細胞毒性

高寺恒雄、毛利哲郎
（北陸大・薬・創薬研）

〔要約〕
ラット胎仔（17-19 日齢）の海馬初代培養細胞を用いてβ- アミロイド蛋白（22-35)(β22-35)による細胞毒性について調べた。培養6 日目に血清を除きさらに5 日間培養した細胞にβアミロイド蛋白(22-35) を10-40 μg/ml添加すると、3-4 日後には未添加に比べ著しい細胞毒性が見られた。この毒性はトリパンブルー染色される細胞数及び乳酸脱水素酵素(LDH)の遊離の増大によっても確認された。この細胞毒性は血清、ジブチリルcAMP +フォルスコリンあるいはインスリンの添加によって完全に抑制された。以上のように、無血清の条件下ではアミロイド蛋白の著しい毒性が発現し、その毒性は細胞内情報伝達系と密接に関わっている可能性がある。

現在、β- アミロイド蛋白の沈着の機序の解明がアルツハイマー病の病因解明の重要なアプローチと考えられている。最近、β- アミロイド蛋白そのものが未分化の神経細胞にはtrophic に働き、分化した細胞に対しては神経毒性を持つこと(1) 、あるいはβ- アミロイド蛋白そのものは神経毒性を示さないが、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸による神経毒性を増強する(2) という報告がされた。このように、実験系によって結果が異なっている上、まだ著しい細胞毒性が見られないように思われる。今回、β22-35 (β蛋白のN 末端からアミノ酸残基22-35 のペプチド) の海馬培養細胞に対する影響を培養条件を変えて調べた。

[実験方法] ラット海馬初代培養細胞はラット17-19 日齢の胎仔から調製し、10%準胎仔血清を含むDulbecco's Modified Medium (DMEM) を用いてポリリジンコートした24 well のマルチウエルプレート上に培養した。 培養6 日目にDMEMだけの mediumに交換し、さらに5 日間培養した後、細胞にβ22-35 単独、あるいは透析済血清、ジブチリルcAMP+フォルスコリン、インスリンと同時に添加する。3-4 日間培養したのち、細胞毒性を位相差像、トリパンブルー染色あるいは細胞外に遊離したLDH 活性を測定することによって確認した。

[結果] 培養6 日目に血清を除き5 日間DMEMのみで培養した細胞にβ22-35 （図１）を40μg/mlとなるよう添加すると、3-4 日後に著しい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（図2)、さらに細胞外に遊離したLDH 活性測定によっても確認された。このβ22-35 の細胞毒性は濃度依存的（10-40 μg/ml）であった（図3 ）。血清（透析済）、ジブチリルcAMP+ フォルスコリン、インスリンはβ22-35 による細胞毒性を完全に阻害した（図４）。一方、 NGF、サブスタンス P、グルタミン酸受容体アンタゴニストのMK-801(NMDA 受容体）、CNQX(non-NMDA 受容体）には阻害作用は認められなかった。また、グリア細胞には影響がなかった。

[考察] 細胞を無血清にするとβ- アミロイド蛋白(22-35) の著しい細胞毒性が観察でき、また血清、ジブチリルcAMP, インスリンでその毒性を抑制できることが示された。Yankner (1) らは培養4 日目の海馬培養細胞に対し、β1-42、β25-35 などに細胞毒性のあることを報告しているが、我々は、この条件ではβ22-35 、β25-35 による明らかな毒性は見い出せなかった。又、Koh(2)らはラット大脳皮質培養細胞を用いて、β1-42 自身は神経毒性を示さず、グルタミン酸(NMDA､non-NMDA受容体) による神経毒性を増強することを報告しているが、我々のβ22-35 はラット大脳皮質

培養細胞、海馬細胞いずれの細胞においてもNMDA受容体を介する毒性を増強しなかった。このように、β- アミロイド蛋白の神経細胞に対する作用の報告は一定していない。我々の実験条件下での結果がアルツハイマー病でのβ- アミロイド蛋白の作用を反映しているかどうか十分検討する必要があるが、この細胞毒性が何らかの細胞内情報伝達系と密接に関わっている可能性がある。

終わりにβ- アミロイド蛋白(22-35) を提供して下さった北陸大学薬学部生物薬品化学教室に感謝します。

図 1　β1-42、β22-35

```
1         10         20         30         40
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
                     EDVGSNKGAIIGLM
```

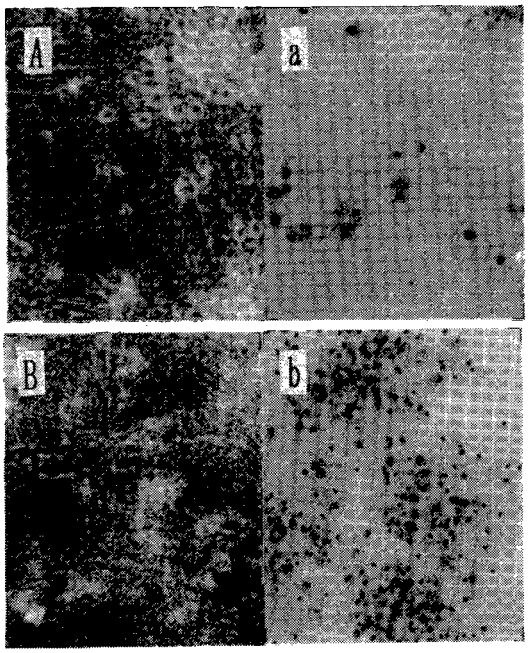


図 2　β22-35 による細胞毒性

A, B:位相差像　a, b:トリパンブルー染色
A, a:Control　B, b:β22-35 (40 μg/ml)

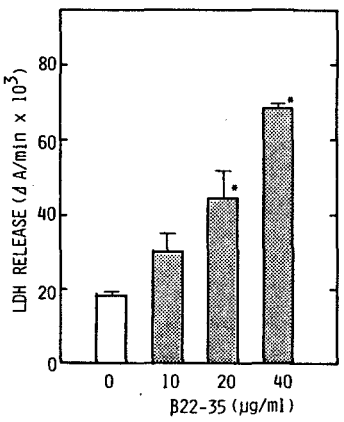


図 3　β22-35 による細胞毒性の濃度依存性

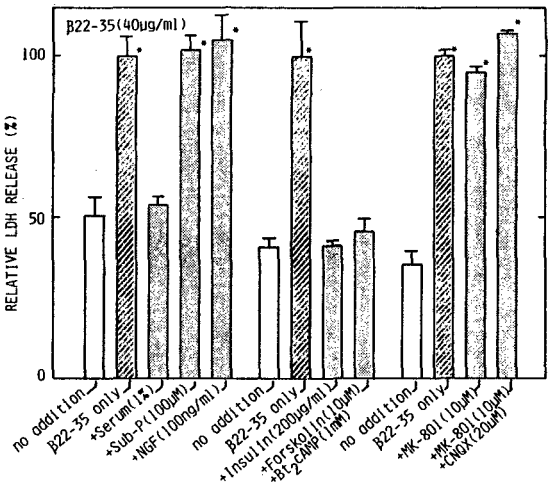


図 4　β22-35 による細胞毒性に対する保護作用

[文献]

1. Yankner, B.A., Duffy, L.K., Kirschner, D.A. (1990) Science 250, 279-282

2. Koh, J-Y., Yang, L.L., Cotman, C.W. (1990) Brain Research 533, 315-320

215 アルツハイマー病患者の大脳皮質におけるαBクリスタリンと低分子量熱ショック蛋白質HSP28

篠原春夫、稲熊　裕、後藤幸代、稲垣俊明、加藤兼房（三重大・医・解剖、愛知県コロニー・研・生化、名古屋市厚生院・内科）

〔要約〕

1)アルツハイマー病（AD）患者及びコントロール症例の大脳皮質におけるαBクリスタリン（αB）と低分子量熱ショック蛋白質(HSP28)の含量を酵素免疫測定法により測定し、また脳切片を同抗体にて免疫染色した。
2)αB含量は、AD患者の側頭葉で有意に高かったが、その他の前頭葉、頭頂葉、後頭葉では特に差はなかった。一方、HSP28含量はAD患者の側頭葉、前頭葉、頭頂葉で有意に高かったが、後頭葉では差がなかった。
3)AD患者脳組織の遠心上清を電気泳動し、そのイムノブロットを抗αB抗体、及び抗HSP28抗体で染色するとヒト筋肉から精製したαBとHSP28と同じ位置のバンドが染色された。
4)免疫組織化学的には、星状膠細胞がαBで染色され特にAD患者の海馬に多く観察された。また、変性しつつあると思われる神経細胞がHSP28抗体で染色され、特にAD患者の海馬、前頭葉に多く存在した。

熱ショック蛋白質（HSP）は熱および様々なストレスによって細胞中に誘導される一連の蛋白質である。最近、高分子量の熱ショック蛋白質（HSP72）がAD患者の脳に多いという報告がなされたが(1)、AD患者の脳における低分子量HSPに関する報告は殆どない。

αBは脊椎動物の眼球レンズの主要構成蛋白質であるが、筋や腎臓などの様々な非レンズ組織にも存在することが明らかとなった(2)。またαBは先天性疾患であるアレキサンダー病患者の脳組織中にも異常蓄積するが(3)、その生理的意義は不明である。その一方で、熱ショックにより細胞中に誘導されることから一種のHSPであると考えられるようになってきた(4)。

HSP28は哺乳類や鳥類では唯一の低分子量HSPであるが(5)、最近我々はヒト筋肉中ではHSP28がαBと複合体を形成している事を報告した(6)。今回はアルツハイマー病患者の脳組織におけるαBとHSP28について検討した。

【材料及び方法】

1)サンプリング

AD患者及びage-matchしたコントロールの剖検症例から、以下に示す部位から脳組織約1gずつを得て−80℃で保存した。即ち、1)前頭葉の上前頭回、2)側頭葉の海馬旁回、3)頭頂葉の上頭頂小葉、4)後頭葉の鳥距溝部位である（前頭葉は11例、その他の部位は各々5例）。猶、AD患者（74-93才）とコントロール例（74-98才）の診断は病理組織所見により行った。脳組織を10倍量の50mM Tris-HCl,5 mM EDTA (pH 7.5)中、0℃でホモジナイズ後、4℃で遠心（20,000 x g）し、その遠心上清を−80℃で保存した。

2)αBとHSPの酵素免疫測定とイムノブロッティング

αBとHSP28の含量は既に報告した方法（6）により測定した。蛋白定量は Bio-Rad protein assay kitを用いた。蛋白として約50μgを含む脳組織ホモジネートの遠心上清を SDS-PAGE にかけ、ニトロセルロース膜に転写した。それをαBのC末端ペプチドに対する抗体及び HSP28 抗体（6）で 0.05 μg/mlでインキュベートしperoxidaseラベルした抗ウサギ IgG で反応後 diaminobenzidine と H_2O_2 で可視化した。

3)免疫組織化学

4例のAD患者と2例のage-matchしたコントロールの側頭葉と前頭葉を10%ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。海馬と前頭葉の切片を作製して、抗ヒトαB抗体及び HSP28 抗体を用いて免疫染色した。

【結果と考察】

αBとHSP28のAD患者及びコントロールの脳組織中の濃度を図1に示した。側頭葉のαB濃度はAD患者で有意（$p<0.01$）に高かったが、その他の脳部位ではコントロールと殆ど差はなかった。HSP28 の量は側頭葉、前頭葉、頭頂葉で有意（$p<0.01$）に高かったが、後頭葉では差がなかった。AD患者の脳組織を遠心した上清中の免疫反応性αBとHSP28 はそれぞれヒト骨格筋から精製したαB及びHSP28と電気泳動上同じ位置に観察された。この事

は用いた抗体の特異性とＡＤ患者の大脳皮質にαＢと HSP28 が存在する事を示している。免疫組織化学的には星状膠細胞とアミロイド小体がαＢ抗体で染色され、特にＡＤ患者の海馬に多く観察された。変性しつつあると思われる神経細胞がHSP28抗体で染色され、ＡＤ患者の脳に多く観察された。またHSP28に対する免疫染色性が老人班の中にも観察された（図２）。以上の結果より、αＢとHSP28がアルツハイマー病患者の脳中に多く発現していることが明らかとなったが、ＡＤの病態経過の上での stressful condition によりαＢとHSP28が誘導されたのではないかと考えている。αＢが星状膠細胞、HSP28が変性しつつあると思われる神経細胞及び老人班に認められた事は、αＢとHSP28の誘導機序を考える上で興味ある所見と思われる。

【参考文献】

(1)Hamos et al., Neurology, 41(1991)345-350. (2)Iwaki et al., J. Histochem. Cytochem., 38(1990)31-39; Kato et al., Biochem. Biophys. Acta, 1074(1991)201-208. (3)Iwaki et al., Cell, 57(1989)71-78. (4)Klemenz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,88(1991)3652-3656;Inaguma et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 182(1992)844-850. (5)Kelly and Schlesinger, Cell, 15(78)1277-1286; Kim et al., Mol. Cell. Biol., 4(1984)468-474; Arrigo and Welsch, J. Biol. Chem., 262(15359-15369. (6)Kato et al., J. Biol. Chem., 267(1992)7718-7725.

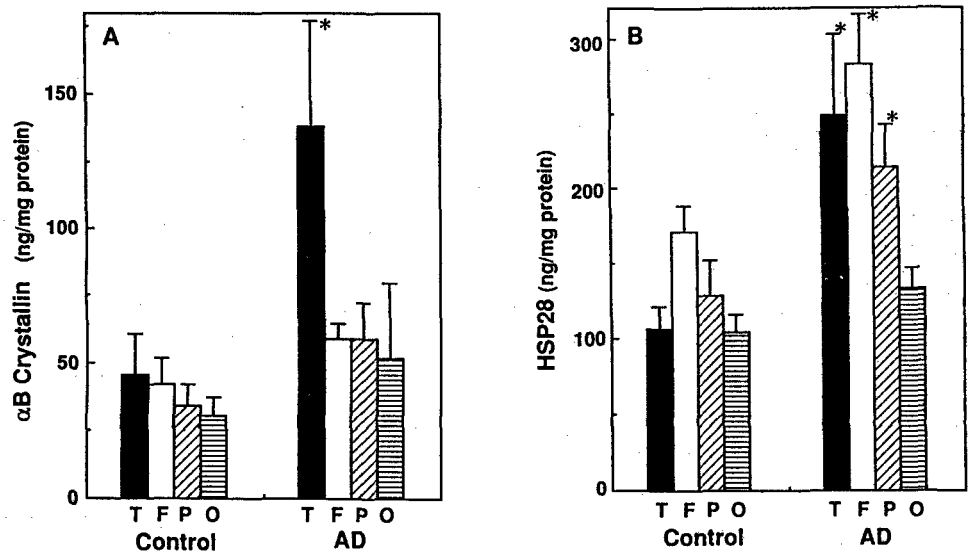


図１、ＡＤ及びコントロール症例の脳組織中のαＢ（Ａ）とHSP28（Ｂ）の量。Ｔ．側頭葉；Ｆ．前頭葉；Ｐ．頭頂葉；Ｏ、後頭葉。

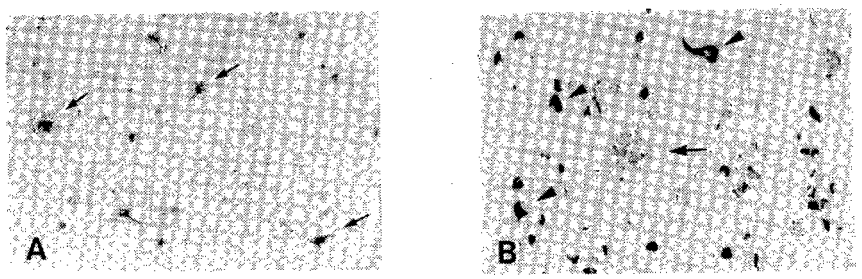


図２、ＡＤ患者の海馬を抗αＢ抗体（Ａ）、抗HSP28抗体（Ｂ）で免疫染色したもの。αＢ陽性星状膠細胞（矢印）が多く認められる。また、変性しつつあると思われる細胞（矢頭）や老人班（矢印）がHSP28陽性を示している。

216 Methamphetamine 大量投与によるdopamineおよびserotonin神経毒性に対するNMDA受容体拮抗薬の抑制作用

大森哲郎、小山　司、村木　彰*、山下　格
北海道大学医学部・精神医学教室
*小樽市立第二病院

〔要約〕

Methamphetamine (MAP)をラットに大量投与(7.5mg/kg, 2時間間隔4回皮下注射)し、5日後に断頭して、HPLC-ECDによって脳内モノアミンを測定した。DA, DOPAC, HVAは、線条体において、対照の約50%に減少した。5-HTおよび5-HIAAは、検討したすべての脳部位すなわち内側前頭葉皮質、側坐核、線条体、前視床下部、扁桃体および海馬において対照の約50%ないしそれ以下に減少した。これらのMAPによるDA、5-HTおよびそれらの代謝産物の減少を、NMDA受容体の競合的拮抗薬SDZ EAA 494および非競合的拮抗薬MK-801が、用量依存的に抑制した。以上から DAや5-HT神経に対するMAPのtoxicな作用に、NMDA受容体が関与していることが示唆された。

【はじめに】

Methamphetamine (MAP)を大量投与すると、tyrosine hydroxylase (TH)やtryptophan hydroxylase(TRH)の活性が低下し、dopamine(DA)やserotonin(5-HT)の脳内含量が減少することが知られている。これらの変化は半永続的であり、DAや5-HT神経終末に対するMAPのtoxicな作用と理解されている。最近Sonsallaら(1)はN-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体の競合的ならびに非競合的拮抗薬が、MAPによる線条体TH活性低下とDA濃度減少を抑制すると報告した。つづいてJohnsonら(2)は、NMDAの非競合的拮抗薬MK-801が、MAPによる線条体TRH活性低下を抑制することを示した。これらの報告は線条体のDAおよび5-HT神経終末に対する大量MAPのtoxicな作用には、NMDA受容体がなんらかの関与を有することを示唆している。

我々は、上記の報告を確認するとともに、他の脳部位すなわち内側前頭葉皮質、側坐核、線条体、前視床下部、扁桃体および海馬においてもMAPの大量投与が5-HTおよびその代謝産物5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)濃度を減少させ、NMDA受容体の競合的拮抗薬SDZ EAA 494および非競合的拮抗薬MK-801が、この減少を用量依存性に抑制することを見いだした。

【対象と方法】

200-250gのWistar-King系雄性ラットを使用した。MAPは7.5mg/kgを2時間おきに4回皮下投与した。対照群には、生食1ml/kgを投与した。MK-801は、第1および3回目のMAP投与の30分前に、0.25あるいは1.0mg/kgを腹腔内投与した。SDZ EAA 494は、第1、2および3回目のMAP投与の30分前に、5.0あるいは20.0mg/kgを腹腔内投与した。処置後5日目に断頭し、内側前頭葉皮質，側坐核，線条体，前視床下部，扁桃体および海馬の6脳部位について、noradrenarine (NA), DA, 3.4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), 5-HTおよび5-HIAAの含量をHPLC-ECDにより定量した．各物質の含量は蛋白量あたりの濃度とした．統計は、ANOVAおよび Student-Newman-Keulsを用いた。

【結果】

MAPは、線条体においてDA, DOPACおよびHVA濃度を対照の50%程度に減少させたが、他の5箇所の脳部位では有意な変化をもたらさなかった。これに対し、5-HTおよび5-HIAAは、測定したすべての脳部位で、対照の50%程度ないしそれ以下に減少していた。NAは、すべての脳部位で変化を示さなかった。

これらのMAPによるDAや5-HTおよびそれらの代謝産物の減少は、MK-801やSDZ EAA 494の前処置によって、用量依存的に抑制された(Fig 1& 2)。

【考察】

MAP大量投与によるDA、DOPACおよびHVA含量の減少は線条体に限定され、他の脳部位では認められなかった。この部位選択性は、これまでの報告とよく一致しているが(3)、その理由は現在のところ不明である。今回の結果から、線条体DA系におけるMAPのtoxicな効果には、NMDA受容体刺激が関与していると推定できる。これに関して注目されるのは，線条体DA神経終末上にはNMDA受容体が存在する点である(4)。前頭葉皮質や視床下部では報告がないが、側坐核(5)や扁桃体(6)では、NMDA受容体はDA神経終末上には存在しないと報告されている。したがって神経終末上のNMDA受容体がDA系に対するMAPのtoxicな作用に関与している可能性があるかもしれない。

MAP大量投与は、5-HTおよび5-HIAA含量を、今回検討した6箇所すべての脳部位において減少させた。5-HTの低下が広範に見いだされたことは、これまでの報告(3)とよく一致する。この作用は、5-HT合成阻害薬では抑制されず、DA合成阻害薬で抑制されるので、DA放出が必要条件と推定されている(3)。しかしDA分布が極めて粗な海馬などでも、この作用は強く認められるので、他の要因の関与が考えられていた。極く最近、線条体のみでなく大脳皮質と海馬における5-HT系に対するMAPのtoxicな作用も、MK-801が抑制するという所見が報告された(7)。我々の今回の結果は、さらに広範な脳部位で、その所見を確認したものと言える。これらから、5-HT系に対するMAPのtoxicな作用に、NMDA受容体が関与することが示唆される。

【文献】

1) Sonsalla PK et al (1991) J Pharmacol Exp Ther 256:506-512 2) Johnson M et al (1989) Eur J Pharmacol 165:315-318 3) Seiden LS and Ricaurte GA(1987) in Psychopharmacology The Third Generation of Progress,Ed HY Meltzer Raven Press pp359-366 4) Clow DW and Jhamandas K (1989) J Pharmacol Exp Ther 248:722-728 5) Jones S et al (1987) Neuropharmacol 26:173-179 6) Ohmori T et al (1992) Brain Res (in press) 7) Green AR et al (1992) Neuropharmacol 31:315-321

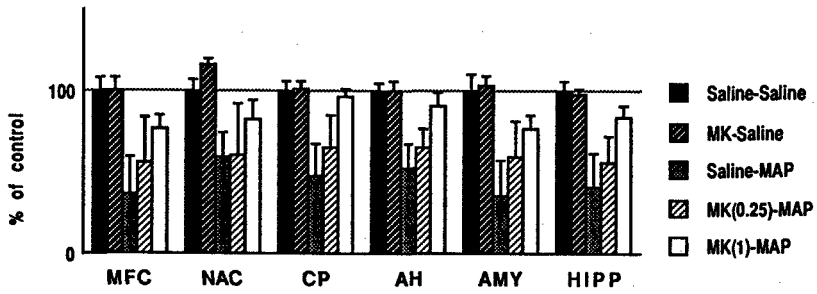


Fig 1. MK-801 prevented MAP-induced decreases in 5-HT contents in various brain regions.

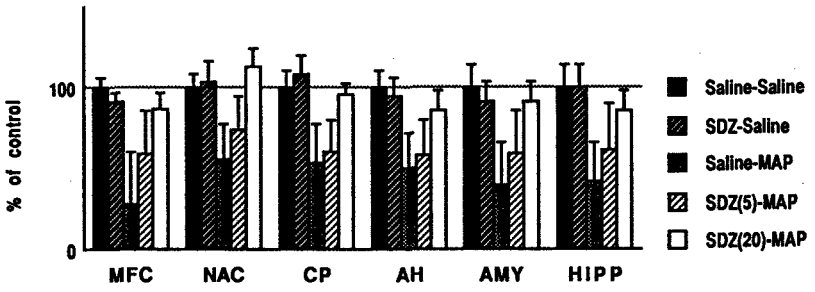


Fig 2. SDZ EAA 494 prevented MAP-induced decreases in 5-HT contents in various brain regions.

217 シナプトタグミン及びωコノトキシン受容体と複合体を形成する３５ｋＤａタンパク質の分子構造

吉田　明、笠井陽子、近藤俊三、伊藤朋子、高橋正身
（三菱化成生命科学研究所）

〔要約〕脳のωコノトキシン受容体及びシナプトタグミンを免疫沈降し、脳と副腎に発現している３５ｋＤａの膜タンパク質（ｐ３５）を認識する抗体を作成した。この抗ｐ３５抗体をプローブとしてラット脳ｃＤＮＡライブラリーから陽性ｃＤＮＡクローンを単離し、タンパク質の一次構造を決定した。ｐ３５はＣ末端領域に膜貫通部位と推定される疎水性の高い領域があり、また４ヶ所にタンパク質間の相互作用に関わると考えられるheptad motifを持っていた。以上の結果から、このｐ３５がωコノトキシン感受性Ｃａチャンネルやシナプトタグミンと関連して、神経伝達物質の神経終末からの放出に働いている可能性が示唆された。また最近、上皮－間充織間の相互作用に関わるエピモルフィンの一次構造が報告され、それがｐ３５とアミノ酸配列で６３％のアミノ酸が同一であることが明かとなった。エピモルフィンは上皮の形態形成に関わっており、このｐ３５も神経系の発生やシナプス形成になんらかの役割を担っている可能性も示唆された。

神経シナプスでの情報伝達の制御機構を理解するためには、シナプス部位における神経伝達物質放出の分子機構について研究を行う事が必要である。神経伝達物質はシナプス小胞内に蓄えられ、開口分泌により前シナプス部位より放出される。この分泌には前シナプス膜に存在するωコノトキシン感受性Ｃａチャンネルを介する細胞外からのＣａ流入が必要である事が知られているが、その機構についてはほとんど分かっていない。シナプスによる伝達は、活動電位がシナプス終末に到達して１から２ミリ秒で終了し、その時間内では開口放出を起こすのに必要なＣａ濃度の上昇はＣａチャンネルの極近傍だけに限られる。そのためこのような速い伝達物質の放出に関わるシナプス小胞は予めＣａチャンネルの近くにつなぎ止められていなければならず、そのような結合に関わるタンパク質を見つけることは重要な問題であると考えられる。

最近、我々は神経のシナプス小胞と前シナプス膜に存在しているシナプトタグミン（ｐ６５）が、Ｎ型Ｃａチャンネルと考えられるωコノトキシン受容体と一部結合していることを見いだした(2,3)。さらに一連のωコノトキシン感受性Ｃａチャンネルやその結合タンパク質に対する抗体の作成の中でωコノトキシン受容体及びシナプトタグミンと複合体を形成している３５ｋＤａタンパク質（ｐ３５）に対する抗体を得た。この様な複合体形成はシナプス小胞をアクティブゾーンにつなぎ止めるのに関わっている可能性が考えられる。今回この抗体を用いてラットｃＤＮＡライブラリーからｃＤＮＡクローンを単離しその一次構造の解析を行った(4)。

［方法］部分アミノ酸配列の決定：抗ｐ３５抗体で作製した抗体カラムを用いてｐ３５をラット脳より部分精製し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後シリコナイズドグラスフィルターに転写し、クマシーブルーで染色後目的バンドを切り出しＮ末端アミノ酸配列の決定を行った。内部の配列決定のためのフラグメントの回収は、電気泳動後ＰＶＤＦ膜に転写し、エンドプロテアーゼＬｙｓ－Ｃで消化した後アミノ酸配列の決定を行った。ｃＤＮＡクローニング：ラット大脳皮質のｃＤＮＡライブラリー（クローンテック社）から３種のモノクローナル抗体をプローブとしスクリーニングを行いｃＤＮＡクローンλ35-2を得た。このインサートをpBluescripⅡKS(-)にサブクローニングした(pBN35)。塩基配列の決定と一次構造の解析：塩基配列の決定は、pBN35からキロシーケンス用デレーションキットを用いてデレーションミュータントを作製し、ダイデオキシ法により決定した。推定アミノ酸のホモロジー検索は、PIR(ver.31)およびSWISS-PROT(ver.21)を使用した。ＲＮＡブロット：ラット大脳、小脳及びＰＣ１２細胞よりグアニジンチオシアネート／フェノール／クロロフォルム法を用いて調製したＲＮＡから、oligo(dT)遠心カラムを用いてpoly(A)-rich RNAを精製し、フォルムアミドアガロースゲルにより分離後ナイロン膜に転写し、^{32}P標識ＤＮＡプローブ(pBN35) によりハイブリダイゼーションを行い、1xSSC, 0.1% SDS, 0.1% PPi, 68℃の条件で洗浄し、富士バイオイメージアナライザーで解析を行った。

［結果と考察］

抗ｐ３５抗体３種類を用いてラット大脳皮質のｃＤＮＡライブラリーをイムノスクリーニングした結果、2.05kbのインサートを持つ陽性クローンがえられた。このクローンの塩基配列中には２８５個のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレームが存在した。ノーザンブロット解析の結果、この遺伝子はラット大脳、小脳及びＰＣ１２細胞において2.2kbのmRNAを発現していた。ｐ３５を６Ｄ２抗体カラムにより精製し、そのＮ末端のアミノ酸配列を分析すると、ｃＤＮＡから予想されるアミノ酸配列に対し、Ｎ末端側に３個のアミノ酸を付け加え、他は一致した配列が検出された。この結果からｐ３５の推定されるアミノ酸配列は２８８残基で予想される分子量は３３，０６７Ｄａであり、ｐ３５の電気泳動上の見かけの分子量とよく一致した。Ｃ末端領域は疎水性に富んだ部分が１カ所存在し、膜貫

通部位であると推定された。この配列をデータバンクで検索したところ特にホモロジーの高いものは見いだされなかった。弱いホモロジーを持つものとしては、ラミニンA鎖のドメインIの部分が存在した。この部分はαヘリックス構造をとったとき疎水的な領域が片面に並ぶ規則的な繰り返し構造を持ついわゆるheptad repeat motifを持ち、p35に於いてもこの構造が4カ所存在した。そのうちの典型的な部位(229-246)についてヘリカルホイール解析を行ったところ、片面に親水性の残基が、反対面に疎水性の残基が並ぶ両親媒性ヘリックスをとることが明らかになった（図1）。同様の構造がシナプトタグミンにも見いだされており、この様な部位を介してシナプトタグミンやCaチャンネルと複合体を形成しているのかも知れない。

今年になって、上皮－間充織間の相互作用に関わっているエピモルフィンというタンパク質の一次構造が報告された(1)。驚くことにこのタンパク質のアミノ酸配列がp35と63%同一であった（図2）。エピモルフィンは間充織に発現しており、また、p35は神経と副腎以外には見いだされていないことから、p35に非常によく似た一群のタンパク質がそれぞれ異なる組織に発現していることがうかがわれる。この非常によく似たエピモルフィンが形態形成に関わっている事から、p35も神経系の発生やシナプス形成に何らかの関わりをもっている可能性も示唆された。

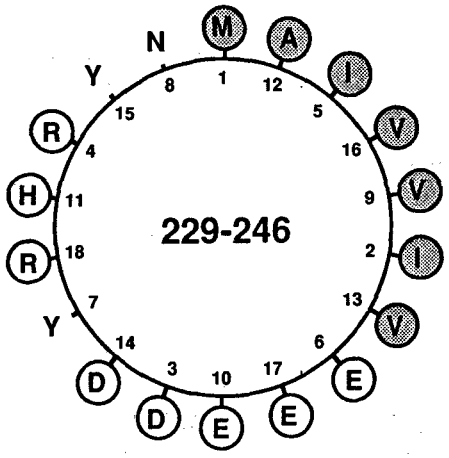


図1．両親媒性ヘリックスの模式図。229番目から246番目のアミノ酸がαヘリックスをとったときのアミノ酸残基の並びを軸方向からみた様子を示している。白丸が親水性のアミノ酸、網掛け丸が疎水性のアミノ酸を示している。

［謝辞］アミノ酸配列の決定にご協力頂きました大森 彬 先生（三菱生命研）、遺伝子クローニングに御協力いただきました桑原玲子氏（三菱生命研）に深く感謝します。

```
  1' MKDRTQELRTAKDSDDDDDVTVTVDRDRFMDEFFEQVEEIRGFIDKIAENVEEVKRKHSA  p35
     *·** ··* · ···**·*···*·*··*·***·**·******· *··**··**·**··**
  1" MRDRLPDLTACRTNDDGDTAVVIVEKDHFMDGFFHQVEEIRSSIARIAQHVEDVKKNHSI  EPM

 61' ILASPNPDEKTKEELEELMSDIKKTANKVRSKLKSIEQSIEQEEGLNRSSADLRIRKTQH  p35
     **···***··*·*****·* ·*******·**·******** ·*·*· **·*·*****·***
 61" ILSAPNPEGKIKEELEDLDKEIKKTANRIRGKLKSIEQSCDQDENGNRTSVDLRIRRTQH  EPM

121' STLSRKFVEVMSEYNATQSDYRERCKGRIQRQLEITGRTTTSEELEDMLESGNPAIFASG  p35
     *·******·**·***··* ·***·*****************···***·*****·*·** *·
121" SVLSRKFVDVMTEYNEAQILFRERSKGRIQRQLEITGRTTTDDELEEMLESGKPSIFISD  EPM

181' IIMDSSISKQALSEIETRHSEIIKLENSIRELHDMFMDMAMLVESQGEMIDRIEYNVEHA  p35
     ** ** *···***·***·**··*·***·*******·********·**·****···** ** ··
181" IISDSQITRQALNEIESRHKDIMKLETSIRELHEMFMDMAMFVETQGEMVNNIERNVVNS  EPM

241' VDYVERAVSDTKKAVKYQSKARRKKIMIIICCVILGIIIASTIGGIFG  p35
     ******·* ··*****·********** ·*     * · ··* ·**
241" VDYVEHAKEETKKAIKYQSKARRKKWIIAAVAVAVIAVLALIIGLSVGK EPM
```

図2．p35とエピモルフィン(EPM)の推定アミノ酸配列。両タンパク質で同一のアミノ酸を＊、性質のよく似たアミノ酸を・で示した。

［文献］

1. Hirai, Y., Takebe, K., Takashina, M., Kobayashi, S., and Takeichi, M. (1992) Cell 69, 471-481

2. Leveque, C., Hoshino, T., David, P., Shoji-Kasai, Y., Leys, K., Omori, A., Lang, B., El Far, O., Sato, K., Martin-Moutot, N., Newson-Davis, J., Takahashi, M., and Seagar, M. J. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3625-3629.

3. Takahashi, M., Arimatsu, Y., Fujita, S., Fujimoto, Y., Kondo, S., Hama, T., and Miyamoto, E. (1991) Brain Res. 551, 279-292.

4. Yoshida, A., Oho, C., Omori, A., Kuwahara, R., Ito, T., and Takahashi, M. submitted

218 ＮＢ－ＯＫ１細胞におけるムスカリン性レセプターを介した細胞内遊離性Ca^{2+}濃度調節機構の解析

斉藤康成，大金信夫，藤沢悦子，鬼頭直美，中村博，八木－中川勇三
（雪印乳業・生物科学研究所・神経化学グループ）

〔要約〕
ヒトニューロブラストーマＮＢ－ＯＫ１細胞においてカルバコールは一過性の細胞内遊離Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]i$）の上昇と持続性の$[Ca^{2+}]i$上昇の２相性の応答を引き起こした。これらのカルバコールで誘発される$[Ca^{2+}]i$上昇作用はpirenzepine により完全に抑制された。外液Ca^{2+} free 条件下では一過性の応答のみが観察され、ＴＭＢ－８による前処理は両方の応答を消失させた。各種Ca^{2+}チャンネルブロッカー(nifedipine, ω-conotoxin, $NiCl_2$)の効果を調べたところ、$NiCl_2$ のみが$[Ca^{2+}]i$の上昇を抑制した。以上の結果より、ＮＢ－ＯＫ１細胞におけるカルバコール刺激により観察される２相性の$[Ca^{2+}]i$の上昇は両者ともM_1レセプターを介したイノシトールリン脂質代謝の結果生じるイノシトール－３－リン酸(IP_3) による細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}の放出が関与しており、持続性の応答はＴ型のCa^{2+}チャンネルを介した外液Ca^{2+}の細胞内への流入によって起こることが示唆された。

〔はじめに〕
ムスカリン性レセプターを介した細胞内遊離Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]i$）の調節機構については種々のニューロブラストーマ（3，5）およびムスカリン性レセプター遺伝子でトランスフェクトした細胞（2）等で調べられているが、M_1レセプターを介した応答でのその詳細なメカニズムについては不明な点が多い。そこで今回、M_1サブタイプの結合特性（7）および機能的応答（6）を示すヒトニューロブラストーマＮＢ－ＯＫ１細胞を用いて持続性$[Ca^{2+}]i$応答の特性を中心に検討を行った。

〔実験方法〕
ＮＢ－ＯＫ１細胞の培養：ヒトニューロブラストーマＮＢ－ＯＫ１細胞は、矢内原昇教授（静岡県立大）の御好意により提供された。ＮＢ－ＯＫ１細胞は、10%牛胎仔血清，抗生物質を含むＤＭＥＭ培養液を用い、５%CO_2 存在下，37°Cで培養した。$[Ca^{2+}]i$の測定：ポリ－Ｄ－リジンコーティングしたカバーガラス上で培養した細胞をFura-2/AM(20μM)でラベルした後、バッファー(130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 5.5 glucose, 20 mM Hepes-NaOH; pH 7.3)に置換し、既報（６）の条件に準じて行った。薬物はすべてバッファー中に最終濃度で添加した。

〔実験結果〕
ＮＢ－ＯＫ１細胞にカルバコール(100μM)を作用させると、急激な一過性の$[Ca^{2+}]i$の上昇とそれに続くアゴニスト存在中持続的に起こる$[Ca^{2+}]i$の上昇の２相性の応答が観察された（図１）。両応答ともM_1レセプター選択的アンタゴニストであるpirenzepine(10μM)により完全に抑制され、M_2レセプター選択的アンタゴニストであるAF-DX116(10 μM)により約50% が抑制された。バッファーからCa^{2+}を除き、さらにＥＧＴＡ(1mM) を添加すると、持続性の応答は消失し一過性の応答のみが観察された（図２）。細胞内Ca^{2+}放出阻害剤であるＴＭＢ－８(100μM)（４）をバッファー中に添加し、15～30分間前処理をすると外液Ca^{2+}の存否にかかわらず両応答とも全く観察されず、またアゴニスト存在中にＴＭＢ－８を添加すると持続性の応答が急激に抑制され、$[Ca^{2+}]i$はBasal 値に戻った。持続性の$[Ca^{2+}]i$上昇が外液Ca^{2+}を除くことで消失することから次に、Ca^{2+}チャンネルブロッカーであるω-conotoxin(500nM) およびnifedipine(10 μM)、$NiCl_2$(1mM)の影響を調べた。その結果、$NiCl_2$ のみが持続性の応答を顕著に抑制した（図４）。また、$NiCl_2$ をカルバコール添加前にバッファー中に入れておくと外液Ca^{2+}を除いた場合と同様の一過性の$[Ca^{2+}]i$上昇のみが観察された（図３，５）。

〔考察〕

カルバコールはＮＢ－ＯＫ１細胞において２相性の$[Ca^{2+}]_i$上昇を引き起こした。両応答ともM_1選択的アンタゴニストpirenzepine に対して、M_2選択的アンタゴニストであるAF-DX116に対するよりも感受性が高いため、M_1レセプターを介した応答であると考えられる（６）。一過性の応答は外液Ca^{2+}に依存しないことよりM_1レセプターを介したイノシトールリン脂質代謝の結果生じるIP_3 による細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}の放出によると考えられる（６）。一方、持続性の応答は外液Ca^{2+}に依存しており、また今回使用したCa^{2+}チャンネルブロッカーのうちNi^{2+}にのみ感受性があった。このカルバコール誘発持続性応答のNi^{2+}感受性に関してはLambert らのニューロブラストーマSH-SY5Y 細胞での解析（５）と一致したものであった。SH-SY5Y 細胞はM_3サブタイプの特性を示すので、今回M_1サブタイプ特性を示すＮＢ－ＯＫ１細胞での我々の結果を考え合わせると一般性のある現象かもしれない。さらに、ＮＢ－ＯＫ１細胞はカルバコール刺激により脱分極することが報告されている（１）ため、この持続性の応答は電位依存性のＴ型のCa^{2+}チャンネルを介した外液からのCa^{2+}の細胞内への流入によって引き起こされている可能性が示唆される。また、ＴＭＢ－８は両応答とも完全に抑制するため、持続性の応答にも細胞内Ca^{2+}ストアから放出されたCa^{2+}が関与していることが推測されたが、さらに詳細な検討が必要であろう。

〔参考文献〕

1) Boddeke,H.W.G.M.(1990) Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. *supple.* 341,R80.
2) Felder,C.C., Poulter,M.O. and Wess,J.(1992) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 89,509-513.
3) Heikkila,J., Jansson,C. and Akerman,K.E.O.(1991) Eur.J.Pharmacol. 208,9-15.
4) Hunt,J.M., Silinsky,E.M., Hirsh,J.K., Ahn,D. and Solsona,C.(1990) Eur.J.Pharmacol. 178,259-266.
5) Lambert,D.G., Whitham,E.M., Baird,J.G. and Nahorski,S.R.(1990) Mol.Brain Res.8,263-266.
6) Nakagawa-Yagi,Y., Saito,Y., Takada,Y. and Nakamura,H.(1992) Biochem.Biophys.Res.Comm. 182,45-54.
7) Waelbroeck,M., Camus,J., Tastenoy,M. and Christophe,J.(1988) *FEBS Lett.* 226,287-290.

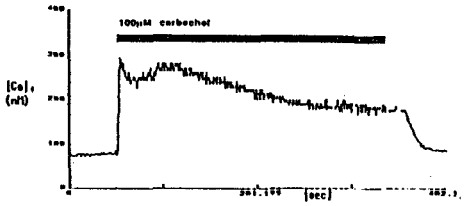


図１．　ヒトニューロブラストーマＮＢ－ＯＫ１細胞
$[Ca^{2+}]_i$に及ぼすカルバコール(100μM)の影響

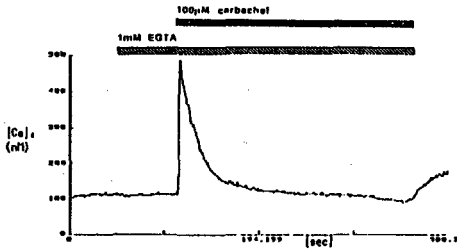


図２．　カルバコール誘発$[Ca^{2+}]_i$上昇に対する外液Ca^{2+}除去の影響

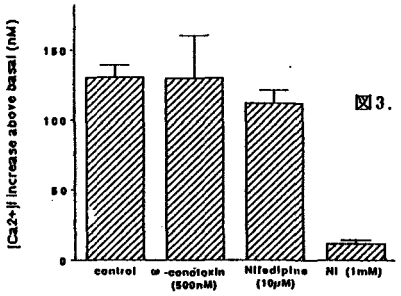


図３．　Ca^{2+}チャンネルブロッカーのカルバコール(100μM)による
持続性$[Ca^{2+}]_i$上昇への影響
各Ca^{2+}チャンネルブロッカーはカルバコール導入２分前に灌流液に添加
カルバコール導入４分後の$[Ca^{2+}]_i$を示す。

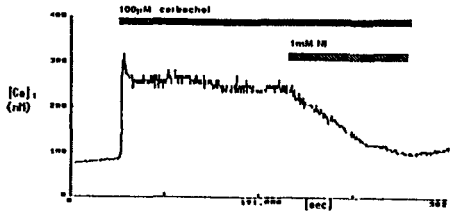


図４．　カルバコール誘発$[Ca^{2+}]_i$上昇に対するNi^{2+}の影響
Ni^{2+}(1mM) はカルバコール導入３分後に添加した。

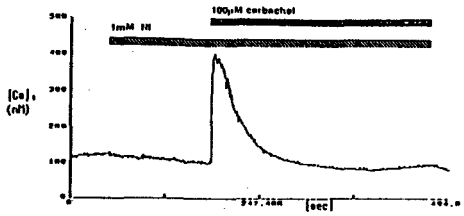


図５．　カルバコール誘発$[Ca^{2+}]_i$上昇に対するNi^{2+}前処理の影響
Ni^{2+}(1mM) はカルバコール導入２分前に添加した。

219 ヒト白血病Jurkat細胞におけるβ－アドレナリン受容体のCa^{2+}動員の調節機構

竹村晴夫、○八田慎一、山田恵子*、大鹿英世
（札幌医大・薬理、生化2*）

〔要約〕
ヒト白血病T細胞（Jurkat）におけるβ－アドレナリン受容体のCa^{2+}動員の調節機構を検討した。イソプロテレノール（ISP）の添加により、細胞内Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]_i$）は上昇し、その後減少したが、なお高いレベルを維持した。このことはプロスタグランジンE_1（PGE_1）や8-(4-chlorophenylthio)-cyclic AMP（CPT-cAMP）によっても模倣された。細胞外液Ca^{2+}除去下で、ISPによる$[Ca^{2+}]_i$の持続した高いレベルは消失した。ISPによる$[Ca^{2+}]_i$の上昇はプロプラノロールの前処置により阻害された。Immunoblot法により、この細胞にはGTP結合性蛋白質（G蛋白質）のサブタイプであるGs、Gi及びGqの存在が認められた。サポニンで膜の透過性を高めた細胞において、cAMPの添加により非ミトコンドリア性細胞内貯蔵部位からCa^{2+}の遊離が認められた。cAMP生成を増加する薬物による$[Ca^{2+}]_i$の上昇はプロテインキナーゼ阻害薬であるH-8の処置に影響を受けなかった。以上のことから、Jurkat細胞において、β－アドレナリン受容体の興奮によりG蛋白質を介して上昇したcAMPが直接細胞内貯蔵部位からCa^{2+}を遊離するものと思われる。

〔目　的〕
Tリンパ球は免疫応答において重要な役割を担っており、その細胞表面にある抗原受容体の興奮が細胞内情報伝達系、特に、Ca^{2+}を介して、リンフォカインの産生等を引き起こすことが知られている。このCa^{2+}の動員にイノシトールリン酸が関与することは良く知られているが、最近、Jurkat細胞において、cAMPを増加させるPGE_2やforskolinは$[Ca^{2+}]_i$を上昇することが報告された（1,2）。このCa^{2+}動員にイノシトールリン酸は関与しないと考えられているが、動員機構については良く分かっていない。一方、リンパ系細胞にはβ－アドレナリン受容体が存在することが報告されている（3,4）が、細胞機能への役割については知られていない。そこで、Jurkat細胞を用い、β－アドレナリン受容体のCa^{2+}動員を詳細に検討した。

〔方　法〕
細胞培養：Jurkat細胞の培養は10%ウシ胎児血清、ペニシリン（50 U/ml）、ストレプトマイシン（50 μg/ml）、グルタミン（300 μg/ml）を含むRPMI-1640培地にて行なった。
$[Ca^{2+}]_i$の測定：前報（5）に準じ、Fura-2/AM（2 μM）を室温中で30分間負荷させた後、細胞をKrebs-Ringer-Hepes溶液（KRH）で洗浄し、さらに、同溶液にてキュベット中に再浮遊させ蛍光を測定した。
Ca^{2+}遊離の測定：前報（6）に準じ、50 μg/ml サポニン、ATP再合成系、ミトコンドリア阻害薬を含む細胞内用溶液にてJurkat細胞をキュベット中に再浮遊させ蛍光を測定した。
cAMPの測定：前報（7）に準じ、薬物刺激1分後の細胞浮遊液中のcAMPを測定した。
イノシトールリン酸の測定：前報に（5）に準じ、[^{3}H]myo-inositol（5 μCi/ml）を48時間負荷した後KRHにて洗浄し、10 mM LiCl存在下で、薬物刺激1分後のイノシトールリン酸をDowexカラムにて分離し、[^{3}H]をカウントした。
Western blotting：各G蛋白質（Gs,Gi,Go,Gqのαサブユニット）に対するポリクロナール抗体（RM/1,AS/7,GC/2,QL）を用いて行ない、検出システムとしてenhanced chemiluminascence法を用いた。

〔結　果〕
図1に示されるように、ISP（10 μM）の添加により、$[Ca^{2+}]_i$は上昇し、その後減少したが、なお高いレベルを維持した。このことはcAMPを上昇させる10 μM PGE_1や細胞膜の透過性を高めた1 mM CPT-cAMPにおいても認められた。これらの薬物による$[Ca^{2+}]_i$の持続レベルは1 μM nimodipineで抑制を受けなかった。しかし、これらの薬物による$[Ca^{2+}]_i$の上昇の程度はイノシトール1,4,5三リン酸（IP_3）を増加させる抗CD3抗体OKT-3による上昇の程度に比べ小さかった（図1）。ISPによる$[Ca^{2+}]_i$の上昇はプロプラノロール（10

μM）の前処置により阻止された。細胞外液Ca^{2+}除去下で、ISPによる$[Ca^{2+}]_i$の持続した高いレベルは消失した（図２）。同条件下で、ISPにより上昇した$[Ca^{2+}]_i$が静止レベルに回復した後、OKT-3を添加しても$[Ca^{2+}]_i$増加はOKT-3単独によるものと同じであった。また、ISPによる$[Ca^{2+}]_i$の上昇はOKT-3の前処置でも変化しなかった。サポニンで膜の透過性を高めた細胞において、10 μM IP_3または1 mM cAMPの添加は非ミトコンドリア性細胞内貯蔵部から、Ca^{2+}を遊離した。ISPはcAMP生成を上昇させたが、IP_3生成に全く影響を及ぼさなかった。Immunoblot法により、この細胞にはG蛋白質のサブタイプであるGs、Gi及びGqの存在が認められた。cAMP生成を増加する薬物による$[Ca^{2+}]_i$の上昇はプロテインキナーゼ阻害薬であるH-8の処置に影響を受けなかった。

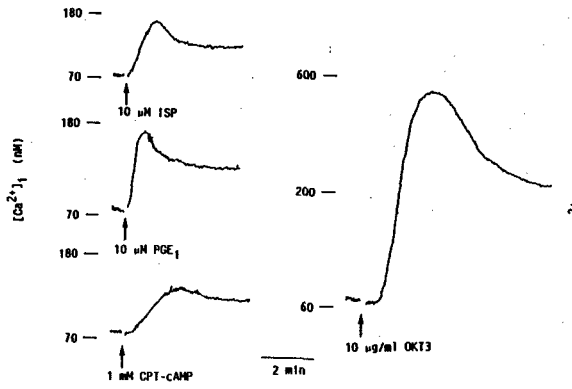


図１　Jurkat細胞の$[Ca^{2+}]_i$に対するcAMP及びIP_3生成を増加させる薬物の効果

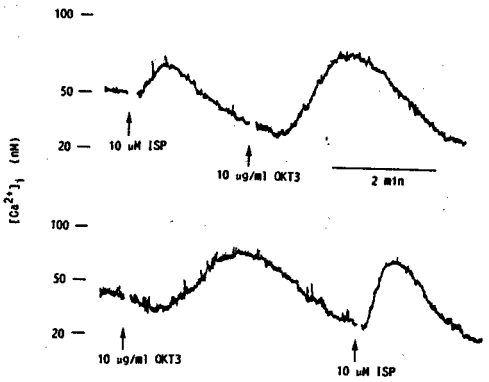


図２　細胞外液Ca^{2+}非存在下での$[Ca^{2+}]_i$に対するISP及びOKT-3の効果

【考　察】

ヒト白血病Jurkat細胞において、PGE_2やforskolinと同じように（1,2）、β－アドレナリン受容体はcAMPを介してCa^{2+}動員を調節していることが示された。図１及び図２から、このCa^{2+}の動員は細胞内貯蔵部からの遊離ばかりか細胞外液からの流入に起因すると考えられるが、H-8で阻害されなかったことから、恐らく、プロテインキナーゼＡの活性化によるものではないと思われる。細胞外液Ca^{2+}非存在下で、ISP及びOKT-3による$[Ca^{2+}]_i$はお互いの前処置で影響を受けなかった（図２）ことから、cAMPに感受する細胞内Ca^{2+}貯蔵部位はIP_3に感受する部位と異なることが示唆される。さらに、細胞膜の透過性を高めたJurkat細胞でのCa^{2+}遊離の結果から、cAMPは直接貯蔵部位からCa^{2+}を遊離するものと思われる。心筋細胞では、β－アドレナリン受容体がプロテインキナーゼＡを介してCa^{2+}チャネルを活性化することが考えられている（8）が、Jurkat細胞ではH-8やnimodipineによりcAMPによる$[Ca^{2+}]_i$の持続レベルは影響を受けなかったので、cAMPによるCa^{2+}の流入は膜電位依存性Ca^{2+}チャネルを介さないと考えられる。我々は細胞内貯蔵部位のCa^{2+}が減少するとCa^{2+}流入を引き起こすことを報告した（6,9）が、この流入はJurkat細胞でも確認された（10）ので、cAMPも同じ機構によりCa^{2+}流入を調節するものと思われる。

【文　献】

(1) Kelly, L.L. et al. (1990) J. Biol. Chem. 265, 17657-17664.
(2) Tokumitsu,Y. et al. (1991) FEBS Lett. 288, 81-85.
(3) Pochet, R. and Delespesse, G. (1983) Biochem. Pharmacol. 32, 1651-1655.
(4) Fuchs, B.A. et al. (1988) Cell. Immunol. 114, 231-245.
(5) Takemura, H. et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 180, 1518-1526.
(6) Takemura, H. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 12266-12271.
(7) Takemura, H. et al. (1992) Biochem. Pharmacol. In press.
(8) Trautwein, W. and Hescheler, J. (1990) Annu. Rev. Physiol. 52, 257-274.
(9) Takemura, H. and Putney, J.W.,Jr. (1989) Biochem. J. 258, 409-412.
(10) Ng, J. et al. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1053, 97-105.

220 ラット脳特異カルシウム結合蛋白質 P23K の cDNA クローニング：中枢神経系に存在する新しい EF-hand 蛋白質ファミリーの同定

小林 正明、 高松 研、 斉藤 茂治、 野口 鉄也
（東邦大学・医学部・第２生理）

〔要約〕

脳特異カルシウム結合蛋白質 P23K の部分アミノ酸配 列に基づき混合プライマーを作成し、ラット脳全 RNA を用いて PCR を行い、P23K 特異的なプローブを調整 した。このプローブを用いてラット脳由 cDNA ライブラリーから、ラット P23K の cDNA を単離し、全塩基配列を決定した。得られた cDNA は、588 bp の蛋白質翻訳領域を持ち、195 残基のアミノ酸からなる、推定分子量 22,574 daalton 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、ラット P23K 蛋白質は、3 個の EF-hand 構造を持ち、既に報告されている網膜特異的光情報伝達調節蛋白質群および、ラット脳由来 21 KDa カルシウム結合蛋白質（21-KDa CaBP） との間に高い相同性を認めた。また、得られた cDNA （約 1.6 Kbp) をプローブとして Northern Blot 解析を行ったところ、ラット脳及び少ないながら網膜にも約 3 K, 2 K, 1.4 K, 1 K b のバンドが認められたことから、中枢神経-網膜 系において新しいカルシウム結合蛋 白質ファミリーの存在が示唆された。

〔 緒言 〕

ラット大脳から見いだされたカルシウム結合蛋白質 P23K は、免疫組織学的に大脳皮質錐体細胞と小脳顆粒細胞に存在する神経特異蛋白質である[1]。また精製した P23K はカルシウム依存性に細胞膜と結合・解離する性質を 持ち、酵素消化断片から得られた部分アミノ酸配列上、網 膜の明暗順応において情報伝達の調節を行っている一連 のカルシウム結 合蛋白質（recoverin[2], S-modulin[3], visinin[4], 23 K Da protein[5] ） と相同性のあることが示されている[6]。これらの成績は神 経特異カルシウム結合蛋白質ファミリーの存在を示唆するものである．今回、我々は、ラット脳由来 P23k の全 cDNA クローニングを行い、中枢神経-網膜 系に存在する同種蛋 白質との構造比較を行うとともに、大腸菌での発現系を用い、P23K のカルシウム結合能を検討した。

〔 実験方法 〕

1) cDNA クローニング：ラット p23K 部分アミノ酸配列情報を基に、混合プライマーを 作成し（図-1）、ラット脳全 RNA を用いてポロメラーゼ連鎖反応（PCR）を行い、184 bp の cDNA を得、プローブとして用いた。ラット脳由来 cDNA ライブラリー（Clontech Labs.USA）をスクリーニングし、約 1.6 Kbp のクローンを得、dideoxy 法を用いて塩基配列を決定した。 2) Northern blotting ： Maniatis らの方法[7]に従って行った。各種組織から guanidium-CsCl 法により RNA を抽出し、プローブとして ^{32}P 標識した1.6 Kbp の cDNA クローンを用いた。

3) 大腸菌発現実験および ^{45}Ca blot 法：上記 cDNA の塩基配列 211 番（アミノ酸 13番）から 1211 番（3' - non coding）を Pst I で切り出し、大腸菌発現ベクター pMALc（New England Biolabs inc.）に挿入し、マルトース結合蛋白質との融合蛋白質を作成した後、アミロースカラムを用いて精製した。融合蛋白質からの P23K の遊離には Factor Xa を用いた[8]。カルシウム結合実験は Maruyama らの方法[9]に従って ^{45}Ca blot を行った。

```
      Y  A  N  F  F  P
5'- ATT TAT GCT AAT TTT TTT CC -3'
    C  C  C  C  C  C
    A     A
          G
   M  Y  D  L  D  G  D
3'- TAC ATA CTA AAC CTA CCT CT - 5'
       G  GG    G  C
                  A
                  G
```

図-1 アミノ酸配列と混合プライマー

〔結果と考察〕

1562 bp のラット P23K cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。蛋白質翻訳領域は 588 bp の塩基対から成り、195 残基のポリペプチドをコードしていた．P23K の予想アミノ酸配列は、既に報告されている網膜特異的カルシウム結合蛋白質である recoverin, S-modulin, visinin, 23K-Da protein と高い相同性を示した（図-2）。 これらの蛋白質は光情報伝達系において、情報伝達効率を制御し明暗順応を調節していると考えられており、中枢神経系における情報伝達調節因子としての P23K の機能が示唆される．

さらに、最近報告された脳特異的カルシウム結合蛋白質 21-KDa CaBP[10] との間に最も高い相同性を認めたことから、中枢神経及び網膜系に新しいカルシウム結合蛋白質ファミリーの存在することが考えられる。 Northern blot による解析（図-3）では、脳及び少ないながら網膜にも約 3K, 2K, 1.4K, 1K b の mRNA が検出されたことから、このファミリーに属する蛋白質は少なくとも 4 種以上存在すると考えられる。また P23K は、ファミリーに属する他の蛋白質と同様に 3 個の EF- hand 様のアミノ酸配列を持つことが示されたため、大腸菌発現蛋白質を用いたカルシウム結合実験を行った。発現・精製した大腸菌由来マルトース結合蛋白質（MBP）と P23K の融合蛋白質は、25 μM のカルシウム濃度でカルシウム結合性を示した（図-4,lane 1,3）。また Factor Xa により MBPと P23K を分断すると、カルシウムの結合は P23K に特異的であった（図-4、lane-2,4）ことから、P23K のEF-hand 様の配列がカルシウム結合領域であると推定された。今後、P23K の生理機能の解析を進めるとともにカルシウム結合能及びカルシウム依存性膜結合能に関して、詳細な検討を行う必要があると考えられる。

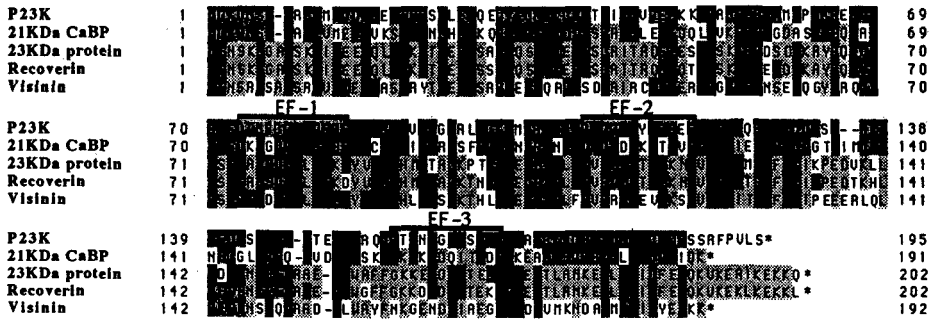


図- 2 カルシウム結合蛋白質ファミリーの相同性比較
P23Kとの相同性は ■ で、それ以外の相同性は ▒ で示した。（S-modilin を除く。）

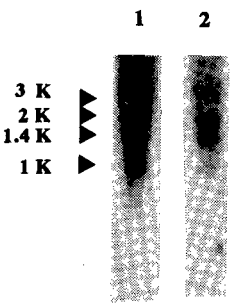


図- 3 Northern blot による P23K 遺伝子発現の解析
lane 1 : ラット脳 lane 2 : ラット網膜

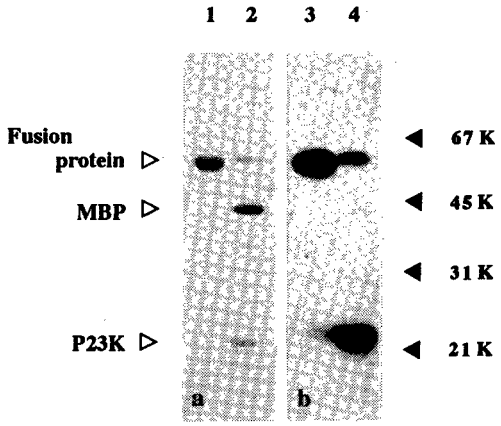


図- 4 大腸菌発現 P23K の ^{45}Ca blot.
A: Coomassie Blue 染色パターン
B: ^{45}Ca blot パターン
lane-1, 3 : MBP との融合蛋白質
lane-2, 4 : Factor Xa による切断後

[文献]
1) Takamatsu, K. et al. (1992) Brain Res. 571, 350-353
2) Dizhoor, A.M. et al. (1991) Science 251, 915-918
3) Kawamura, S. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. in press.
4) Yamagat, K. et al. (1990) Neuron 2, 469-476
5) McGinnis, J.F. et al. (1992) FEBS lett. 302, 172-176
6) Takamatsu, K. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 183, 245-251
7) Maniatis, T. et al. (1982) in Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. Press
8) Nagia, K. et al. (1984) Nature 309, 810-812
9) Maruyama. et al. (1984) J. Biochem. 95, 511-519
10) Kuno, T. et al. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 184, 1219-1225

221 コリンアセチルトランスフェラーゼ cDNAを導入した NG108-15細胞でのアセチールコリンの合成と分泌

木村康宏[1]、小田恵夫[2]、出口武夫[3]、東田陽博[1]
（金沢大・医・神経物性[1]、病理[2]、BML基礎研究3部[3]）

〔要約〕

アセチールコリンを合成する酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）をコードするラット遺伝子（ChAT cDNA）をニューロブラストーマxグリオーマ雑種細胞 NG108-15 細胞に発現させた。ChAT cDNA でトランスフェクトしたNG108-15細胞の ChAT 活性は、401 ± 5 pmol／分／タンパク質（平均値 ± S.E.M., n = 5）であり、コントロールのそれより約3倍高かった。トランスフェクトした NG108-15 細胞をラット培養横紋筋の上に培養すると、筋線維よりシナプス反応が得られた。シナプス反応が得られる筋の数、シナプス頻度はコントロール NG108-15 よりも多かった。この結果はラットChAT cDNA よりつくられた ChAT により合成されたアセチールコリンが分泌に使われたことを示している。

アセチールコリン（ACh）を伝達物質とするコリン作動性ニューロンは、筋収縮、分泌、学習、記憶過程で重要な働きをする。ACh はコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT; EC 2, 3, 1.6）により作られる。ChAT 遺伝子をコードする cDNA がクローニングされている（1−4）。それらの遺伝子を卵母細胞等で異所性に発現させ、AChをつくることは確認された（2, 4, 5）。しかし、その ACh が分泌に使われるか否か調査されたことはない。そこで我々は、Achを内在し、分泌することが知られているニューロブラストーマxグリオーマ雑種 NG108-15 細胞（6）に、ラットの ChAT cDNAをトランスフェクトし、ACh 合成能力と合成された ACh の分泌を観察したので報告する。

［方法］

NG108-15 細胞は、既報のとうり培養した（6）。DNA のトランスフェクションは、市販のリポフェクチン（BRL）により指示通り行った。ChAT 活性は、^{14}C-アセチール CoA を基質として Fonnum の方法に基づき、Ishii 等が報告したとおり測定した（4）。アセチールコリンの分泌は横紋筋のニコチン性アセチールコリン受容体刺激によるシナプス電位を指標として行う NG108-15 細胞と培養ラット筋線維との同時培養法によった（6）。

［結果］

ラットの ChAT 遺伝子を正方向に組み込んだプラスミド pcDL1 cDNA（10 μg）を 25μg リポフェクチンと混和の後、60 mm 径のDあたり、0.5 x 10^6個の NG108-15 細胞にふりかけた。2日後の ChAT 活性は、401 ± 5 pmol／分／mg タンパク質（平均値 ± S.E.M., n = 5）であった。コントロール細胞の持つ平均の値は、151 ± 13 pmol／分／mg タンパク質（n = 4）であったから、約 2.7 倍 ChAT 活性が上昇していた（図1）。これはすでに Ishii 等により報告された結果（4）とほぼ同様である。

ChAT cDNA をトランスフェクションした NG108-15 細胞をすでに完全に分化している筋細胞に重層し、1〜3日後に、筋細胞に微小ガラス電極を刺入し、ACh によるシナプス電位であるミニュチュア終板電位 MEPP を記録した。図2に示すように、筋線維からは MEPPs の活発な活動が観察された。プラジキニンによる ACh 遊離のファシリテーシ

ョンも、コントロール細胞と同様に生じた。そのようなシナプス電位をもつ筋線維の数、即ち、機能的に同定したシナプス結合数は、図３に示すように、同時培養１日目で 76 % であった。トランスフェクションしない NG108-15 細胞によるシナプス結合数（第一日目は、24 %）より増加していた。平均の MEPPs 数も第一日目でコントロールが 4.4 ± MEPPs ／分であるのに対し、ChAT 導入 NG108-15 細胞では、 10.8 ± 0.5 MEPPs ／分と有意に増加していた（$P < 0.01$）。

［考察］

本研究は、異所性（NG108-15）に cDNA より発現させた ChAT タンパク質分子によりつくられた ACh が、遊離に使われることを示す最初の報告である。前回の報告（4）では、$CaPO_4$ 法により、同細胞に発現させたが今回は、リポフェクチン法により、高率に発現することを再度確認した。NG108-15 細胞はそれ自身 ChAT を有しており、分泌行う為ラットの ChAT cDNA 由来の ACh 活性は、内在性の合成や分泌活性に上乗せした形で観察された。ChAT 活性を持たないニューロブラストーマ N1E-115 細胞が、ChAT cDNA トランスフェクションにより、ACh を合成するようになることはすでに調べられており（4）、現在それらの細胞からの分泌について調査を続行している。

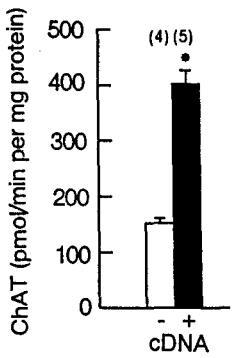
［文献］

1. Ito et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4081-4085.
2. Berrard et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9280-9284.
3. Brice et al. (1989) J. Neurosci. Res. 23, 266-273.
4. Ishii et al. (1990) Mol. Brain Res. 7, 151-159.
5. McCaman et al. (1988) Mol. Brain Res. 3, 107-114.
6. Higashida (1988) J. Physiol. 379, 209-222.

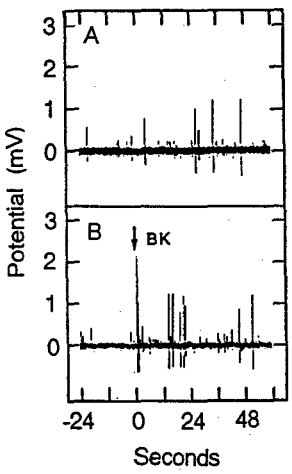
［図１］ cDNA トランスフェクションした、あるいはしない NG108-15 細胞の ChAT 活性

［図２］ ChAT cDNA をトランスフェクトした NG108-15 細胞と同時培養した筋線維から記録した MEPPs.
A．刺激しない状態　B．ブラジキニン添加による MEPPs 頻度上昇

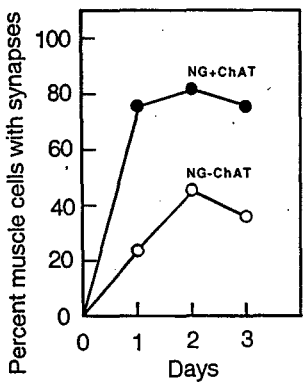
［図３］ ChAT cDNA をトランスフェクトした NG108-15 細胞と、しないコントロール細胞との同時培養による、シナプス結合を有する筋線維数の経日変化



［図１］



［図２］



［図３］

222 アセチルコリン放出のリン脂質による修飾

田中康一、宗田靖二*、安藤　進
（東京都老人総合研究所・生体膜、*日本商事医薬研究所）

〔要約〕

中枢神経終末（シナプス）からのアセチルコリン（ACh）放出に対する外因性リン脂質の効果を、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。α位がステアリン酸でβ位に不飽和度の異なる脂肪酸を結合した合成ホスファチジルコリン（PC）及びホスファチジルセリンの効果をみたところ、不飽和度の高いリン脂質の放出促進効果が大きい傾向が認められた。さらに、ラット肝より単離したPCは、放出低下を示す老齢シナプスからのACh放出を有意に増加させた。

演者らは、老化過程における中枢神経終末（シナプス）機能の変化を、神経化学的に明らかにしようとしている。老齢マウスでは、脳神経シナプスの静止膜電位が減少し、シナプス興奮性が低下している可能性のあること指摘した(2)。、シナプス膜脂質のなかの、ホスファチジルコリン（PC）の存在比が加齢とともに減少し、コレステロール量が増加することを見い出したが、その膜脂質変化と膜酵素であるNa^+, K^+-ATPase活性の加齢変化との間に強い正の相関が認められた(2)。これらのことから、シナプス膜脂質の変化がシナプス機能に影響を与えていることが考えられる。一方、高カリウム刺激によるシナプスからのアセチルコリン放出が老齢マウスで成熟期の20%にまで低下することも明らかにしている(3)。そこで本研究では、シナプス膜脂質変化とシナプス機能の関わりをより明確にする目的で、リン脂質の個々の分子種をシナプス膜に取り込ませたときのアセチルコリン放出変化について検討した。

（実験方法）

シナプトソームの調製：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(1)によりシナプトソームを調製した。

シナプトソームへのリン脂質の取込み：ホスファチジルコリンあるいはホスファチジルセリンを懸濁したKrebs-Ringer液にシナプトソームを加え、37℃でインキュベートした。30分ないし60分後に５倍量の氷冷したKrebs-Ringer液を加え反応を停止した。遠心後、シナプトソームを再びKrebs-Ringer液に懸濁し試料とした。

アセチルコリン放出量の測定：シナプトソーム懸濁液（100μl）に137mM KClを含むKrebs-Ringer液を50μl加え反応液のカリウム濃度を50mMに調整した。37℃で5分間インキュベートした後、直ちに氷冷し反応を停止した。内部標準物質のエチルホモコリンを既知量加えた後に遠心し、その上清を高速液体クロマトグラフに導入した。放出されたアセチルコリン量の高感度定量は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ィー（HPLC-ECDシステム、BAS社製）で行った。

（結果と考察）

リン脂質の分子種の違いによってACh放出効果が異なるのかを検討した。α位がステアリン酸でβ位に不飽和度の異なる脂肪酸鎖を結合したPCおよびPSのACh放出に対する効果を図１に示す。PCおよびPSとも22:6の脂肪酸を結合した分子種が最も放出促進効果が高く、不飽和度が低いほど効果が弱い傾向が認められた。極性基の違いによる差異は認められなかった。

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AChは、24か月齢以降の老齢マウスで認められる(2)。そこで、3か月齢と27か月齢のマウスから調製したシナプトソームを用いてラット肝より単離したPCのアセチルコリン放出への影響を調べた。図２に示すように、老齢シナプトソームからのACh放出は、若齢に比べ有意に低下しているのが本実験に於いても認められた。ラット肝より抽出単離したPCを取込ませるとACh放出が増加した。この増加は若齢及び老齢シナプトソームで共に認められたが、特に、老齢シナプトソ

ームでは濃度依存的にACh放出が増加した。このことは、外因性に加えたPCがシナプス機能を修飾することを示すものと考えられる。

脱分極刺激によるAChの放出は、開口放出（エキソサイトーシス）によって行われることが報告されている(4)。開口放出はシナプス小胞とシナプス形質膜との融合の過程を経て行われるので、シナプス膜流動性に依存していることが考えられる。膜流動性はいくつかの因子で調節されているが、外因性に加えたリン脂質がコレステロール／リン脂質比、あるいは、膜脂質の不飽和度を変化させることにより膜流動性を増加させ、その結果ACh放出を増加させた可能性が考えられる。一方、外因性のリン脂質が、膜電位依存性のカルシウムチャンネルの調節に関わり、AChの開口放出のトリガーとなるカルシウムイオンの流入を変化させる可能性も考えられる。ACh放出低下を示す老齢シナプトソームにPCを作用させた場合、若齢の放出レベルまで回復したことは中枢神経機能の加齢による低下の改善という点からこれらの結果は意義深いものと思われる。

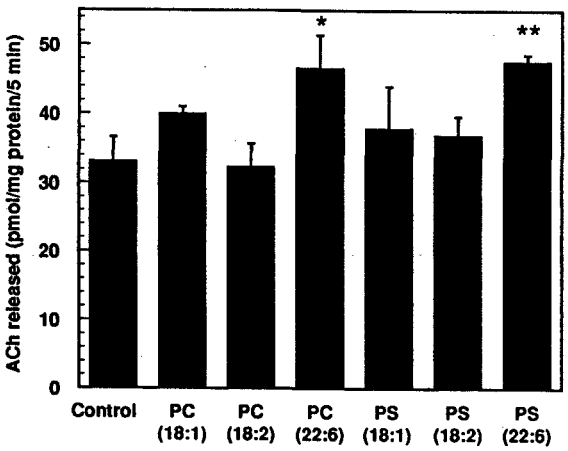


図1　ACh放出に対する外因性リン脂質の効果

10μMのリン脂質を含むKrebs-Ringer液中でシナプトソームを60分間インキュベートした。（）内はβ位の脂肪酸を示す。α位は全てステアリン酸である。PC、ホスファチジルコリン；PS、ホスファチジルセリン

* P<0.05, ** P<0.01 vs Control
(Student t-test, n=5)

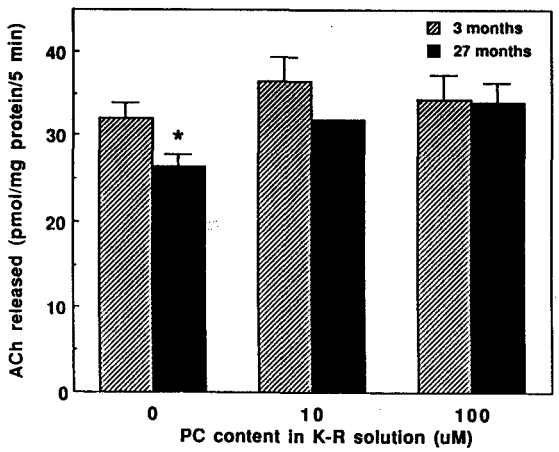


図2　老齢及び若齢シナプトソームからのACh放出へのラット肝PCの効果

* P<0.05 (3 months vs 27 months, n=3)
(但し、27か月齢、10uM PC処理群はn=2)

（参考文献）
1) Booth, R.F.G and Clark, J.B. (1978) Biochem.J. 176, 365-370
2) Tanaka, Y. and Ando, S. (1990) Brain Res., 506, 46-52
3) 田中康一、　安藤　進 (1991) 神経化学 31, 192-193
4) Otero, D.M., Wilbekia, F. and Meyer, E.M. (1985) Brain Res., 359, 208-214

223 ラット線条体ドパミンオートレセプターを介するドパミン放出調節機構に及ぼすK⁺チャンネルの役割

田中隆彦・吉田真美・横尾秀康・溝口克弘・田中正敏・H.C.Fibiger*
（久留米大・医・薬理、＊British Columbia大・精神）

〔要約〕 脳内透析法を用いて線条体でのdopamine（DA）オートレセプターを介するDA放出調節機構におけるK⁺チャンネルの役割を検討した。DA D2 レセプター拮抗薬のsulpiride（SLP,10^{-5}M）を透析膜を通じて線条体に局所投与すると、DA放出は有意に増加した。K⁺チャンネルブロッカーのquinine(QIN,10^{-5},10^{-4},10^{-3}M)を同様に線条体に局所投与すると、用量依存的にDA放出が増加した。QIN（10^{-4},10^{-3}M)を線条体に投与しながら、SLP（10^{-5}M）を同部位に投与すると、SLP によるDA放出の増加は生じなかった。これらの結果はSLP は内因性DAが線条体DAオートレセプターを活性化するのを抑制することで、また、QIN は線条体DAオートレセプターが活性化し、K⁺チャンネルが開口するのを阻止することでそれぞれDA放出を増加させたことを示唆している。

線条体のDAの合成・放出はシナプス前オートレセプターにより調節されている。このオートレセプターと薬理学的に類似のレセプターは黒質の細胞体や樹状突起にも存在し、K⁺チャンネルを活性化することで、DAの発火頻度を抑制的に調節していることが、Lacey らにより報告されている（４）。しかし、線条体DA神経終末のDAオートレセプターによるDA放出調節に対するK⁺チャンネルの役割については十分解明されていないので、今回、脳内透析法を用いて検討した。

（対象と方法）

Wistar系雄性ラット(250-300g)の両側線条体（A:+0.7 mm from bregma, V:-4.75 from dura）にhorizontal probeを植え込み、手術２日後にRinger液(147 mM NaCl, 1.3 mM $CaCl_2$, 3.0 mM KCl, 1.0 mM $NaHPO_4$, 1.0 mM $MgCl_2$)を５μl/ minで潅流し、10分間隔で透析液をautomatic injecterを用いて、HPLC-ECDに注入し、DAを定量した。SLP(10^{-5}M)、QIN(10^{-5}、10^{-4}、10^{-3}M) はそれぞれRinger液中に溶かし、透析開始1-2 時間後に透析液中のDAレベルが安定してからSLP は単独で１時間、またはQIN2時間投与後にQIN 潅流下にさらにSLP を１時間投与した。

（結果）

SLP を透析膜を介して線条体に１時間投与すると時間とともにDAは有意に増加し、その最大放出量は基礎放出量の201%であった（図1)。図２に示したようにQIN を線条体に投与すると、いずれの濃度においても線条体からのDA放出量は有意に増加した。特にQIN 投与40分後までは、用量依存的にDA放出は増加した。QIN 投与後のDA放出量の経時的変化はQIN の濃度により異なっていたが、いずれの濃度においてもQIN 投与90分後にはDA値は安定した値を示すようになった。このため、QIN 単独投与の最終３サンプルの平均値を新基準値として、QIN 存在下にSLP をRinger液中に追加した後のDA値の変化を図３に示した。1mM と100 μM の QINはSLP によるDA放出の増加を完全に抑制したが、10μM のQIN ではSLP によるDA放出の増加は抑制されなかった（図3)。

（考察）

選択的DA D2 レセプター拮抗薬のSLP を線条体に投与すると同部位よりのDA放出は増加した。これは、 SLPが線条体神経終末のDA D2 レセプターの作用を阻止したために線条体からのDA放出が増加したものと考えられる（６）。QIN は最近、強力なATP 依存性のK⁺チャンネルブロッカーであることが報告された（２）。ATP 依存性K⁺チャンネルは脳内では、海馬や黒質に豊富に分布し、GABA、serotonin 、DA神経活動に影響している可能性が指摘されている（５）。DA D2レセプターとK⁺チャンネルの関係を調べたIn vitroの実験はいくつかあるが（1,3)、In vivo におけるDAオートレセプターとK⁺チャンネルの関係についてはこれが初めての報告である。QIN のDA放出増強の機序としては、内因性DAがシナプス前DA D2 レセプターを活性化し、G 蛋白を介するシナプス前DA抑制機序の最終段階としてK⁺チャンネルが開口する（７）のをQIN が阻止することで、DA放出が増加したものと思われる。QIN によってSLP のDA放出増強効果が阻止されたのは、十分量のQIN により、シナプス前のK⁺チャンネルが閉鎖されている

と、SLP によるシナプス前DAオートレセプターブロックを介したDA放出増加が生じないことを示唆している。透析膜を介して実際に脳内に達する薬物濃度は一般に投与薬物の1-10% と言われており、今回用いたQIN の濃度は必ずしも高濃度と言えないが、1mM QIN と10,100μM QIN ではDA放出増加作用のパターンに相違があった。1mM QIN では投与第一サンプルでDA放出は最高濃度に達し、以後漸減していったことは、急速にdepolarization inactive の状態が生じたためと推定される。以上のこととから、線条体におけるシナプス前DA D2 レセプターのDA放出調節には、K^+チャンネルの活性化が関与している可能性が示唆された。

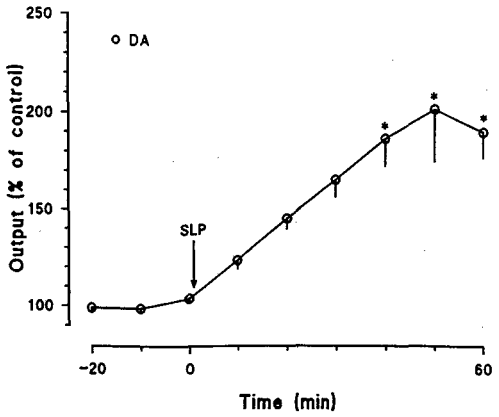


Fig.1 Effect of (-)-sulpiride (10^{-5}M,SLP) on DA release in the striatum. * p<0.05 (n=5)

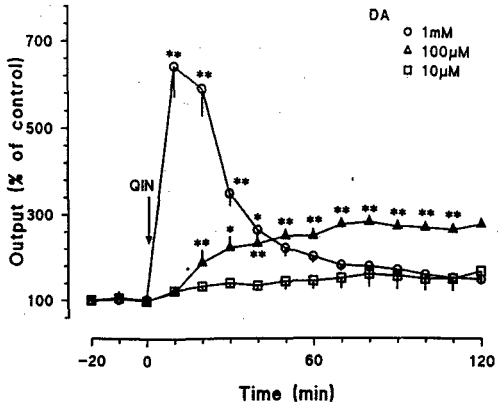


Fig.2 Effect of quinine(10^{-5},10^{-4},10^{-3}M, QIN) on DA release in the striatum.
* p<0.05, **<0.01 (n=4-8)

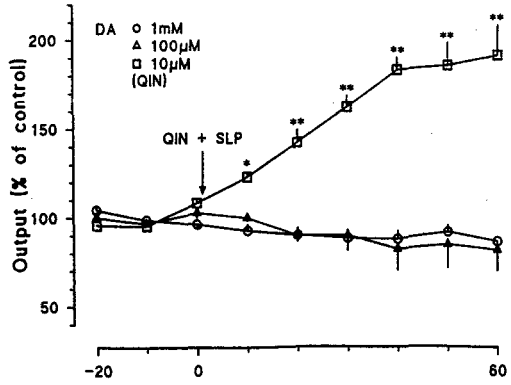


Fig.3 Effect of quinine (10^{-5},10^{-4}, 10^{-3}M,QIN) on(-)-sulpiride (10^{-6}M,SLP)-induced increases in DA release in the striatum. * p<0.05, ** p<0.01 (n=4-5)

(文献)

1 Cass,W.A. and Zahniser,N.R.(1991) J.Neurochem. 57,147-152.

2 Fatherazi,S. and Cook,D.L.(1991) J.Membrane Biol. 120,105-114.

3 Freedman,J.E. and Weight,F.F. (1989) Eur.J.Pharmacol. 164,341-346.

4 Lacey,M.G. et al.(1987) J.Physiol. 392,397-416.

5 Mourre,C. et al.(1989) Brain Res. 486,159-164

6 Westerink,B.H.C. and De Vries J.B.(1989) Neurosci.Lett. 99,197-202.

7 Zoltay,G. and Cooper,J.R.(1990) J.Neurochem. 55,1008-1012.

224 ラット海馬におけるオピオイド受容体を介したセロトニン遊離調節機構

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オピオイド受容体を介した5-HT遊離調節機構を追究する目的で、カリウム(K^+)刺激による脱分極性5-HT遊離におよぼすmorphineの影響を検討した。*in vivo* microdialysis 法を用いて測定した無麻酔無拘束ラット海馬の細胞外液中5-HT濃度はK^+(60mMおよび120mM) 刺激により濃度依存性に上昇した。5-HTの主代謝産物である5-hydroxyindole-3-acetic acid(5-HIAA)濃度はK^+刺激により変化しなかった。K^+(120mM)刺激により増加した5-HT遊離量はmorphine (10^{-7}M - 10^{-5} M) により濃度依存性に抑制された。morphine (10^{-5}M)により減少した5-HT遊離量はμ-オピオイド受容体拮抗薬であるnaltrexone (0.03 -3mg/kg,i.p.)前投与により用量依存的に抑制された。naltrexone自身は細胞外液中5-HT濃度およびK^+刺激により遊離した5-HT濃度に影響を与えなかった。δ-オピオイド受容体作動薬である[D-Pen^2, D-Pen^5]-enkephalin (DPDPE ,10^{-6}M -10^{-5}M) およびκ-オピオイド受容体作動薬であるU-69593(10^{-5}M)はK^+刺激により増加した5-HT遊離量を変化させなかった。以上の結果より、*in vivo*においてラット海馬の5-HT作動性神経終末にはμ-オピオイド受容体を介した5-HT遊離調節機構が存在することが示唆された。

「目的」
中枢神経系の5-HT作動性神経終末には自己受容体の他、α_2-アドレナリン受容体、ムスカリン受容体、オピオイド受容体など数種のヘテロレセプターの存在が報告されている。脳スライスを用いた*in vitro*の実験は、これらのヘテロレセプターが神経終末からの5-HT遊離調節を修飾している可能性を示唆している。しかしながら*in vivo*においてはオピオイド受容体を介した5-HT遊離調節機構についての報告はほとんどない。一方、morphineやenkephalinが中枢神経系5-HTの代謝回転に影響を与えること[1,2]、morphineによる耐性や鎮痛効果に5-HT作動性神経が関与していること[3]などの報告からオピオイド受容体が神経終末からの5-HT遊離調節に機能的な役割を果たしている可能性が考えられる。解剖学的にはラット海馬には縫線核から5-HT作動性神経が投射し、その神経終末が密に存在していることが知られており、また少なくともμ, δ, κの３種類のオピオイド受容体サブタイプの存在が明らかにされている。今回の実験の目的はオピオイド受容体を介した5-HT遊離調節機構を解明するため、*in vivo* microdialysis法を用い、無麻酔無拘束ラット海馬の5-HT遊離におよぼすmorphineの影響を検討した。

「方法」
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(rostal-caudal, -5.8mm; lateral, -4.8mm; ventral; -7.0mm from bregma and dura surface)にguide cannulaeを慢性的に埋め込み、術後２日目に無麻酔無拘束条件下で実験を行なった。Ringer溶液を流速2μl/minで180分間灌流した後、0.05N CH_3COOH 10μlを予め加えたチューブに透析液を20分間隔で180分間採取した。透析液中の5-HTならびに5-HIAA濃度はHPLC-ECDにて測定した。透析液採取開始60分後および120分後にRinger溶液に溶解したKCl(K^+, 60mMおよび120mM)を10分間灌流し、K^+刺激を2回行なった。μ-オピオイド受容体作動薬であるmorphine(10^{-7}-10^{-5}M)、およびδ-、κ-オピオイド受容体作動薬であるDPDPE(10^{-6}M-10^{-5}M)ならびにU-69593(10^{-5}M))は2回目のK^+刺激の際にK^+／Ringer溶液に溶解し10分間灌流した。μ-オピオイド受容体の拮抗薬であるnaltrexone(0.03-3mg/kg)、δ-およびκ-オピオイド受容体拮抗薬であるnaltrindole(3mg/kg)、nor-binaltorphimine(nor-BNI)(3mg/kg)は2回目のK^+刺激20分前に腹腔内に投与し、上記と同様の実験を行なった。実験終了後ラット脳を摘出し、プローベの位置を組織学的に確認した。

「結果と考察」

無麻酔無拘束ラット海馬の5-HTならびに5-HIAA濃度の基礎値の平均は各々18.0 fmol/sample、4.6 pmol/sampleであった。1回目のK^+刺激前値を100%とした百分率変化では、K^+（60mMおよび120mM)刺激により5-HT濃度は各々162%および333%まで濃度依存性に上昇し、1回目の刺激（S_1）に対する2回目の刺激（S_2）の比（S_2/S_1）は各々1.24および1.05であった。5-HIAA濃度はK^+刺激により変動しなかった(Fig. 1)。K^+(120mM)刺激により増加した5-HT遊離量はmorphine(10^{-7}-10^{-5}M)により濃度依存性に抑制された。DPDPE(10^{-5}M)およびU- 69593(10^{-5}M)はK^+刺激による5-HT遊離量には影響を与えなかった(Table 1)。これらのオピオイド受容体作動薬は細胞外液中の5−HT濃度には影響を与えなかった。morphine(10^{-5}M)によるK^+(120mM)刺激時の5-HT遊離量の抑制はnaltrexone(0.03-3mg/kg, i.p.)前投与により用量依存的に拮抗された(Table 2)。naltrexone自身は5-HTおよびK^+刺激により遊離した5-HT濃度には影響しなかった。一方naltrindole(3mg/kg, i.p.)およびnor-BNI(3mg/kg, i.p,.)はK^+刺激による5-HT遊離量に変化を与えなかった。

以上の結果より、*in vivo*においてラット海馬の5-HT作動性神経終末にはμ−オピオイド受容体を介する機能的な5-HT遊離調節機構が存在することが示唆された。

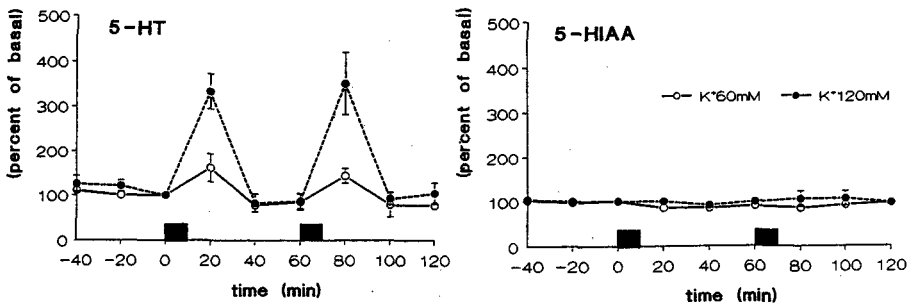


Fig.1 Effects of low(60mM, open circles) and high(120mM, solid circles) KCl on extracellular 5-HT and 5-HIAA concentrations in the hippocampus of freely moving rats. Each point represents the mean ±SEM.

Table1 : Effects of opioid receptor agonists - morphine(μ-), DPDPE(δ-) and U-60593(κ-) - on the K^+-evoked release of 5-HT from the hippocampus in freely moving rats.

	control	morphine			DPDPE	U 69593
log [M]		-7	-6	-5	-5	-5
n	4	6	6	5	6	4
S2/S1	1.05±0.17	0.80±0.09	0.46±0.12*	0.09±0.08*	1.07±0.22	1.04±0.20

mean ± SEM
*p<0.05 vs control.
The quotient S2/S1, the ratio of fractional release of 5-HT between the second and the first period of K^+ (120mM) stimulation. The opioid agonists were administered simultaneously with the second stimulation of K^+ (S2).

Table2 : Effect of μ-opioid receptor antagonist, naltrexone, on the morphine-induced inhibition of 5-HTrelease from the hippocampus in freely moving rats.

	control	morphine 10^{-5}M				
		naltrexone (mg/kg, i.p.)				
		0	0.03	0.3	1	3
n	4	5	3	6	4	5
S2/S1	1.05±0.17	0.09±0.08	0.30±0.18	0.66±0.23*	0.76±0.23*	0.67±0.08*

mean ± SEM. * p<0.05 vs morphine (10^{-5}M) without naltrexone treated rats.
Naltrexone at various doses were administered intraperitoneally 20 min before the second stimulation of K^+ (120 mM) co-perfused with morphine (10^{-5}M).

「文献」

1) Forchetti, C.M. et al.(1982) *J. Neurochem.* 38, 1336-1341
2) Yarbrough, G.G. et al.(1973) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185, 328-335
3) Messig, R.B. and Lytle, L.D.(1977) *Pain* 4, 1-21

225 ＦＤＲＶ法による単一神経細胞ＰＣ１２からのＡＴＰ刺激誘発ドーパミン放出の測定

井上和秀、Ｍｉｃｈａｅｌ Ｒ. Ｄｕｃｈｅｎ*
（国立衛生試験所・薬理部, Department of Physiology, University College London*）

〔要約〕

ＡＴＰ刺激によるドーパミン（DA）放出と細胞内Ｃａ濃度変化の関係を、Fast Differential Ramp Voltammetry (FDRV) 法とindo-1法により、単一ＰＣ１２細胞で検討した。その結果、ＡＴＰ刺激により細胞内Ｃａ濃度は一過性に上昇し、刺激後速やかにもとのレベルにまで復した。ＤＡ放出はそれに数秒ほど遅れて始まり、その後同じ様な経過をたどって増加し、やがて急速に減少した。このことから、ＡＴＰ刺激により細胞内Ｃａ上昇とＤＡ放出が単一の細胞で共に一過性に生じていることが明白となった。

［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、外液ＡＴＰがP_{2Y}様受容体を刺激し，カチオンチャネルを活性化し、Ｃａ流入を惹起すること（1-4）、同様に外液ＡＴＰがP_{2Y}様受容体を刺激し，外液Ｃａ依存性にカテコールアミン（ＣＡ）放出を引き起こすこと（1, 5, 6）をそれぞれ独立の系で明らかにしてきた。しかしながら、ＡＴＰ刺激が細胞内Ｃａ上昇とＣＡ放出を単一の細胞で連続して惹起することはいまだ証明されていない。このことを証明するには単一神経細胞からの神経伝達物質放出をも測定しうるような超高感度のアッセイ系が必要となる。我々はその様な手法として最近開発された Fast Differential Ramp Voltammetry (FDRV) 法に着目し、これを応用し、ＡＴＰ刺激に応答したＤＡ放出を単一ＰＣ１２細胞にて測定し、同時にindo-1の蛍光強度から細胞内Ｃａ濃度の測定を行い、両者の反応の時間経過を追うことを試みた。

［方法］ ＰＣ１２の培養と調製、ならびにパッチ法でのＣＡ放出測定は既報（1,7）に従った。細胞懸濁液での細胞内Ｃａ濃度測定は既報(5)に従い、単一のＰＣ１２細胞を用いたＦＤＲＶ法および細胞内Ｃａ濃度測定は既報（8, 9）に準じて行った。電気生理的検討は既報（1,2）に従った。

［結果および考察］ ＰＣ１２においてＡＴＰは既報どおり（1,2）内向き電流を惹起した。この電流は主としてＮａおよびＣａイオンの非選択性のカチオンチャネルを介した流入であることは既に証明した（2）が、電流値はＡＴＰの濃度依存性に大きくなり、その濃度作用曲線はFig.1（黒丸）となった。また、ＣＡ放出作用も外液ＡＴＰ濃度に依存して大となり、その濃度作用曲線はFig.1（白丸および白四角）となった。すなわち、両者はきわめてよく一致した。一方、細胞内Ｃａ濃度をＰＣ１２細胞懸濁液で測定した場合、Fig.1と同様な濃度依存性でＡＴＰは細胞内Ｃａ濃度を上昇した。Ｃａ濃度上昇作用およびＣＡ放出作用は外液Ｃａ依存性であった。これらのことから、ＰＣ１２ではＡＴＰ刺激によりカチオンチャネルが活性化され、Ｃａ流入を惹起し細胞内Ｃａを上昇させ、その結果ＣＡ放出が惹起されることが示唆される。ついで、このことを明確にするためにＦＤＲＶ法およびindo-1によるＣａ蛍光法により、単一ＰＣ１２細胞での細胞内Ｃａ濃度変化とＤＡ放出を測定した。その結果、Fig.2のように、ＡＴＰ（100μM）刺激により細胞内Ｃａ濃度は一過性に上昇し、刺激後速やかにもとのレベルにまで復した。一方、ＤＡ放出はそれに数秒ほど遅れて始まり、その後同じ様な経過をたどって増加および減少した。このことから、ＡＴＰ刺激により細胞内Ｃａ上昇とＤＡ放出が単一の細胞で共に一過性に生じていることが明白となった。

ＦＤＲＶ法は被検物質の定性と定量を同時に行える（8）優れた超高感度測定法であり、単一の細胞を実験対象に出

来るので、今後様々な目的に応用されるものと思われる。

[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.P.E.R.Tatham et al., Pflugers Arch. 419, 409-414, 1991. 9.G.Grynkiewicz et al., J.Biol.Chem., 260, 3440-3450, 1985.

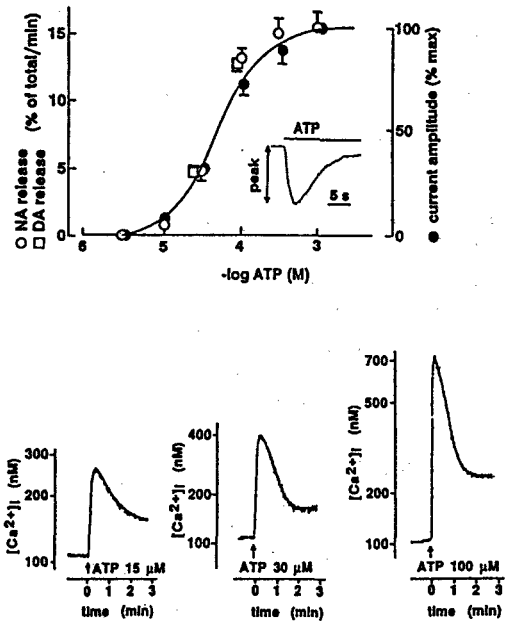


Fig.1 Effects of ATP on currents, internal Ca concentration and catecholamine release in PC12 cells.

Upper: Concentration-response curves of ATP-evoked inward currents (black circle), and catecholamine release. Inset is a typical of ATP-evoked inward current. Lower: Concentration dependent increase of internal Ca by ATP.

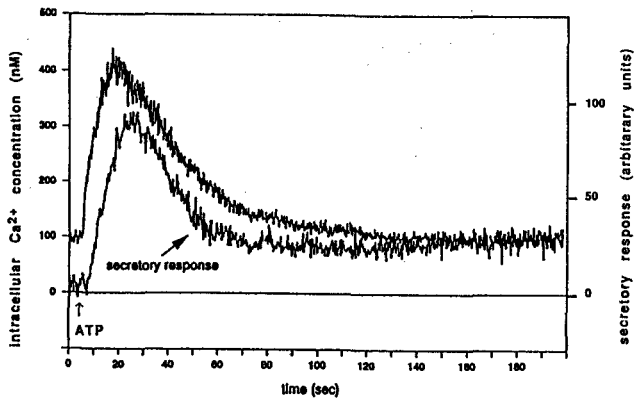


Fig.2 An increase of internal Ca and dopamine release from a PC12 cell.
Indo-1 AM was loaded 30 min before application of ATP (100uM).

226

ラット海馬セロトニン遊離に及ぼすα_2受容体作動薬 UK14,304の影響 --- *in vivo* microdialysis 法による検討

沼澤理絵**、吉岡充弘*、松本真知子*、富樫広子*、釽物修**、齋藤秀哉*
(*北海道大学医学部薬理学第一講座、**同麻酔学講座)

(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及ぼすα_2受容体作動薬UK14,304 (10^{-7}M～10^{-5}M) 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5-HT遊離量はカリウム (K^+,120mM) 刺激により342%まで上昇した。5-HTの主代謝産物である5-HIAAはカリウム刺激で変動しなかった。UK14,304 (10^{-7}M～10^{-5}M)はカリウム刺激による脱分極性5-HT遊離増加を濃度依存性に抑制した。またUK14,304 (10^{-5}M)によって38%まで抑制された脱分極性5-HT遊離増加はα_2受容体拮抗薬であるidazoxan (5mg/kg i.p.) により88%まで回復した。以上の結果より *in vivo* においてラット海馬の5-HT作動性神経終末にはα_2受容体を介した遊離調節機構が存在することが示唆された。

(目的)

中枢神経系において5-HTは神経伝達物質として重要な位置にあり、その放出調節機構が詳細に検討されてきている。ラットの海馬には縫線核から5-HT作動性神経が、青斑核からノルエピネフリン (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。脳スライスを用いた*in vitro*の実験では、海馬の5-HT作動性神経終末においてα_2アドレナリン受容体を介した放出調節機構が存在する可能性が報告されている[1,2]。しかしながら*in vivo*でα_2アドレナリン受容体作動薬を用いて5-HT放出調節機構を検討した報告は数少ない。今回の実験は*in vivo* microdialysis 法を用い、α_2アドレナリン受容体作動薬であるUK14,304が無麻酔無拘束ラット海馬の5-HT放出に及ぼす影響について検討した。さらにα_2アドレナリン受容体拮抗薬であるidazoxanにより、UK14,304の作用が拮抗されるか否かも検討した。

(方法)

実験動物は8-12週令のWistar系雄性ラットを用いた。ketamine (100 mg/kg i.p.)麻酔下で脳定位固定装置を用いて海馬にガイドカニューレ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3mmの微小透析プローベをガイドカニューレより挿入した(Probe tip : rostal-caudal -5.8mm, lateral -4.8mm, ventral -7.0mm, from bregma and dura surface)。Ringer溶液を流速2μl/minで180分灌流したのち20分間隔で透析液を採取し、ただちにHPLC-ECDにて透析液中の5-HTならびに5-HTの主代謝産物である5-HIAAを測定した[3]。サンプリング開始より60分後 (S1) と120分後 (S2) の2回にわたり、カリウム(K^+,120mM)をRinger溶液に溶解して10分間灌流した。2回目のカリウム刺激の際UK14,304 (10^{-7}M～10^{-5}M) をK^++Ringer溶液に加え、遊離した5-HTならびに5-HIAAの変化を1回目K^+刺激との比(S2/S1)で比較した。idazoxan (5mg/kg)はUK14,304 (10^{-5}M)投与群において2回目カリウム刺激の20分前に腹腔内投与した。実験終了後にプローベの位置を確認した。

(結果および考察)

カリウム (120mM) 刺激前値を100%とした百分率変化では1回目のカリウム刺激後の5-HT遊離量は342%まで上昇した。5-HTについて2回目刺激後の変化と1回目刺激後の変化の比(S2/S1)はコントロール群で0.98であるのに対し、UK14,304 (10^{-5}M) 投与群、UK14,304 (10^{-6}M) 投与群ではそれぞれ0.37(n=6), 0.59(n=5)と有意に低下した。UK14,304 (10^{-7}M)投与群(n=3)では0.74と

コントロール群に比較して低下傾向にあったが有意差は見られなかった。idazoxan (5mg/kg i.p) +UK14,304 (10^{-5}M) 投与群(n=6)においてS2/S1は0.87とUK14,304 (10^{-5}M) のみを投与した群に比較して有意に高値を示し、コントロール群値に近づいた。5-HIAA遊離量はすべての群で2回のカリウム刺激ならびにUK14,304により変化を受けなかった。

以上、本実験では無麻酔無拘束ラットの海馬において灌流液中に加えたUK14,304がカリウムによる脱分極性5-HT遊離を濃度依存性に抑制し、この5-HT遊離抑制はidazoxanで拮抗された。このことより、*in vivo* においてラット海馬の5-HT作動性神経終末における α_2受容体を介した神経伝達物質遊離調節機構の存在が示唆された。

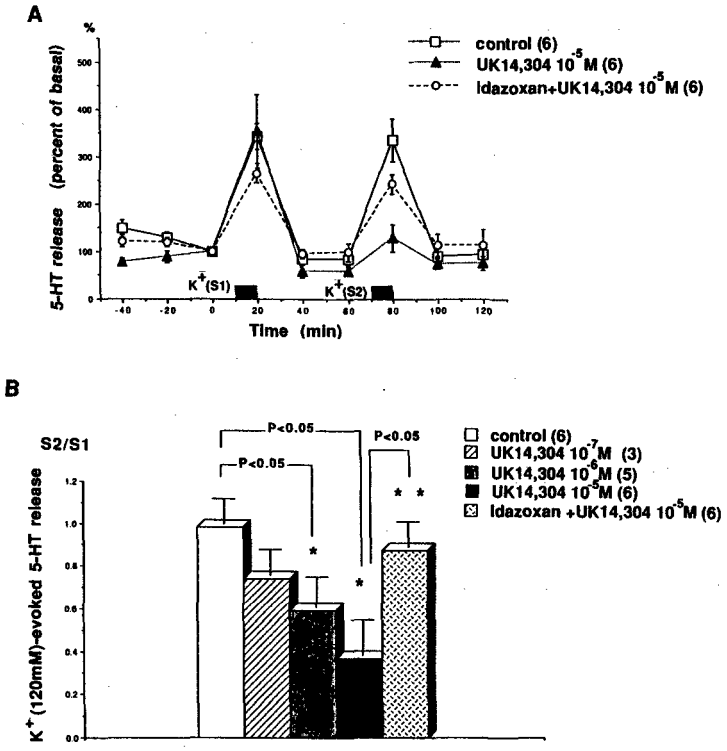


Fig.1 Effect of α_2-adrenoceptor agonist, UK14,304, on the K^+-evoked 5-HT release in the hippocampus of freely moving rats.

A: Time course observation. K^+(120mM) was added twice to the perfusion for 10min. At the second perfusion with K^++Ringer solution, UK14,304 (10^{-5}M) was added with (n=6) or without (n=6) idazoxan (5mg/kg, i.p.) pretreatment. Each point represents the means±SEM.

B: The quotient S2/S1, the ratio of fractional release of 5-HT between the second and the first period of K^+(120mM) stimulation. Each column represents the means±SEM.

*P<0.05 vs control rats. **P<0.05 vs UK14,304(10^{-5}M) treatment rats.

（文献）.

1) Frankhuyzen, A. L. and Mulder, A. H. (1980) Eur. J. Pharmacol. 63,179-182

2) Maura, G., Gemignai,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.

227 匂い受容体の嗅上皮上での分布

腰本裕之、加藤一夫、吉原良浩、森　憲作
（大阪バイオサイエンス研究所・神経科学部門）

〔要約〕
嗅上皮の嗅細胞上には匂い分子と結合する受容体が存在し、両者の結合により匂いの情報伝達が開始すると考えられている。今回我々はラットの匂い受容体タンパク質の一部アミノ酸配列に相当するペプチドを合成し、これを抗原としてウサギを免疫し、抗体を作製した。この抗体を用いてラットの嗅上皮を免疫組織化学的に検討したところ、一部の嗅細胞の樹状突起の先端から嗅粘膜中に投射する繊毛が特異的に染まることを見いだした。また抗原陽性の繊毛をもつ嗅細胞は、特定の部位にクラスターを形成せずに嗅上皮に広く分布していることがわかった。

（目的）
嗅上皮上で匂い受容体により受容された嗅情報は、嗅細胞の軸索を介して嗅球の糸球体とよばれる領域に集められ、ここで Mitral cellなどの細胞に連絡される(2,5)。この際、特定の匂い受容体からの情報は嗅球の特定領域に集められ、処理されることが一部の匂い物質で確かめられている(6)。最近Axelらによってラットの匂い受容体cDNAのクローニングが報告された。彼らは匂い受容体は少なくとも数百種類存在し、非常に大きなマルチジーンファミリーを形成していることを示唆した(1)。しかし個々の匂い受容体タンパク質がどのような立体構造の匂い分子に反応するか、またその存在様式はどのようになっているか、などの点はまだ不明である。そこで我々はAxelらの結果をもとに匂い受容体の部分アミノ酸配列に相当する合成ペプチドを合成し、それに対する抗体を作製し、ラット嗅上皮の免疫組織化学染色により　匂い受容体タンパク質の存在様式、分布について調べた(4)。

（方法）
抗体の作製
匂い受容体のＩ３ cDNA(Fig.1b)の2番目の細胞内領域の一部分(ＲＹＶＡＩＣＦＰＬＨＶＴＳＩＭＳ; OR-1)をペプチドシンセサイザー(Applied; 43SA)を用いて合成し、逆相 HPLC(Applied; 151)で精製後、glutaraldehyde 存在下で BSA と結合させ、ウサギに免疫した。得られた抗血清から Protein A-Sepharose 4B カラム(Pharmacia)によりIgG画分を調製し、次に OR-1ペプチドを固定化した Sepharose 4B カラムで精製し、 OR-1ペプチドに特異的な抗体を得た。
免疫組織化学
SD系ラット (SLC)をネンブタール麻酔下で4 % Paraformaldehydeにて灌流固定後0.5 M EDTAで脱灰、30 % Sucrose処理したあと Cryostatで凍結切片を作製した。切片を0.1 % TritonX-100で処理し、2 % BSAを含むPhosphate Buffer(pH7.4)で希釈した精製抗体(2μg/ml)でインキュベート後、FITC抗ウサギIgG抗体(Cappel)を100倍希釈にて反応させ、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。また TritonX-100無処理の切片では抗体による反応性が認められなかったことから、この抗体は細胞内のエピトープを認識していると推測される。

（結果と考察）
得られた抗体を用いてラット嗅上皮の切片を染色した結果、一部の嗅細胞の樹状突起の先端から嗅粘液中に伸

びている繊毛に免疫活性が局在していた。この結果は、匂い受容体に共役しているG蛋白であるG_{olf}が嗅粘液中の繊毛に局在しているとの報告(3)と一致している。この抗体で染色される嗅細胞繊毛は嗅上皮中に広く、まばらに分布しており、限局した部位における存在は観察されなかった。また呼吸上皮中には免疫活性は認められなかった。

モル比で100倍量の合成ペプチド存在下で吸収試験をしたところ、切片上の免疫活性が消失した。このことからこの抗体が匂い受容体タンパク質を特異的に認識していることが確認された。

現在、この抗体の認識する匂い受容体タンパク質が発生のどの時期に発現するかを検討しているが、　空気呼吸が始まっていない胎生期19日目の嗅上皮にすでにこの抗体で染色される繊毛が観察された。この時期の匂い受容体タンパク質が機能をもつか否かはまだ不明である。

（文献）

(1) Buck L, and Axel R. (1991) Cell, 65, 170-187

(2) Graziadei P.P.C., Handbook of sensory physiology; vol.4,Berlin-Heidelberg-New York, Springer (1991) 27-58

(3) Jones D.T, Reed R.R. (1989) Science, 244, 790-795

(4) Koshimoto H., Katoh K., Yoshihara Y., and Mori K. (1992) NeuroReport, 3 in press

(5) Lancet D. (1986) Annu.Rev.Neuroscei., 9, 329-355

(6) Mori K.,et al. (1992) J.Neurophysiol., 67, 786-789

図1

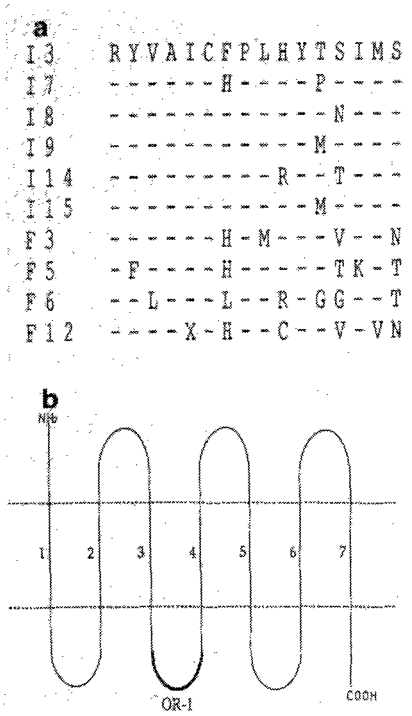
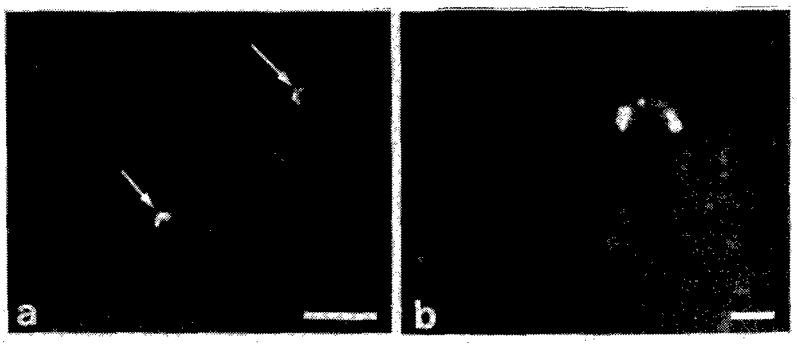


図1（a）匂い受容体タンパク質の2番目細胞内領域の一部のアミノ酸配列(1)。抗原に用いた合成ペプチドOR-1はI3のアミノ酸配列（最上列）を基にした。(b) OR-1の匂受容体タンパク質中での位置を模式的に示した。細胞膜貫通領域は1から7で、合成ペプチドOR-1の位置を太線で示した。

図2　ラット嗅上皮の抗OR-1抗体による免疫組織化学染色の共焦点レーザー顕微鏡による観察像。(a)低倍率像。抗体陽性の繊毛は矢印で示した。スケールバーの大きさは4 μm。(b)高倍率像。嗅粘液中へ伸びている抗体陽性の繊毛が観察された。スケールバーの大きさは2 μm。

図2



228 各種麻酔薬の鎮痛効果と中枢神経系α_2受容体変動について

重冨美智男、石川敏三、田和聖子、仲西　修、坂部武史
（山口大学医学部　麻酔・蘇生学教室）

〔要約〕

ラットを用い、各種麻酔薬の鎮痛効果と中枢神経系NAシナプス伝達に及ぼす影響との関連について検討した。N2O(75%)では鎮痛効果（tail-flick法 :%MPE）は最高60% となったが、halothane (HAL:1.3%)およびpentobarbital (PB:30mg/kg)では変化しなかった。また、α_2 agonist, clonidine(CLO:150 μg/kg)併用では、N2O でMPE は80% と増強し、HAL およびPBではそれぞれ75% 、90% と増加した。一方、N2O では対照に比べNA濃度（HPLC-ECD）が青斑核(LC)で減少し、 ^{3}H-CLO 結合（in vitro autoradiography）はLCと脊髄後角(SC)で増加したが、 HALではNA濃度が大脳皮質で減少したのみで、PBもこれらに影響しなかった。以上より、鎮痛効果の強いN2O は青斑核および脊髄後角のα_2受容体活性を亢進させ、その鎮痛効果はCLO 併用で増強されること、また鎮痛作用の弱いHAL およびPBはα_2受容体を変化させないことが分かった。

【はじめに】

麻酔薬は各種侵害刺激に対する生体の反応を抑制することを目的に用いられるが、その鎮痛効果発現の機序については未だ不明な点が多い。最近の研究から、脊髄後角および脳幹・青斑核ニューロンに局在するnoradrenaline (NA)神経系、α_2受容体が侵害刺激伝達の調節（下行性抑制系）に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている[1]。しかし、さまざまな麻酔薬の鎮痛効果発現と中枢神経系NAシナプス伝達に及ぼす影響との関連についてはほとんど知られていない。また、麻酔薬とα_2 agonist, clonidine(CLO)との併用は外科的手術に必要な麻酔薬必要量を減少させることがヒト、動物で明らかにされ注目されるが[2]、まだその詳細な機序については知られていない。そこで、本研究では鎮痛効果の異なる各種麻酔薬（ N2O、halothane(HAL)、pentobarbital(PB) ）について、鎮痛効果とNAシナプス伝達に及ぼす影響との関連を明らかにし、さらにCLO 投与（併用）が各麻酔時にどのように鎮痛効果を修飾するかについて検討した。

【方法】

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Wistar系雄ラット(250-350g)を用い、プラスチック製箱の中に入れ安静させたのち、Control 群、Control-CLO(Control-C)群、N2O-alone(N2O-A)群、N2O-CLO(N2O-C) 群、HAL-alone(HAL-A)群、HAL-CLO(HAL-C)群、PB-alone(PB-A)群、PB-CLO(PB-C)群に分けた。これらのうち、CLO 併用群では、CLO （ 150μg/kg , ip ）を麻酔開始30分前に投与した。鎮痛効果はtail-flick(%MPE で評価）法により、対照時の測定後、麻酔開始後15、30、60、90、120 分で測定した。また、Control, N2O-A, HAL-A およびPB-Aの各群では、覚醒状態（Control)あるいは麻酔開始後２時間で、鎮痛効果の測定終了後断頭し、冷温下で脳及び脊髄C1-3を取り出し、分析まで凍結保存した。NA濃度測定では、脊髄後角（SC）、孤束核、青斑核（LC）、視床下部、海馬、大脳皮質に分画し（約20mg）、0.1M citric acid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 5 μ, 0.15M citric acid) に注入し、定量分析した。α_2受容体結合はin vitro autoradiographyで行なった。凍結標本（20μ）をKrebs-phosphate 緩衝液（25℃）で30分間preincubation し、次にligandの 1.0 nM [^{3}H]-CLOを含む 0.1M Tris-HCl緩衝液（pH7.6, 25 ℃, 10mM $MgCl_2$ 含）に60分間浸積し結合させた（非特異的結合は10^{-5}M phentolamineを含む）。 ^{3}H-Hyperfilm に30日間感光させ、得られたautoradiogram から，コンピュータと接続された画像解析装置を用い特異的結合に換算した。統計は、一元配置分散分析法を用い、５％以下の危険率を有意とした。

【結果】

鎮痛効果(%MPE) : Control 群では MPEは変化しなかったが、Control-C 群ではMPE は最高40% となった。N2O-A 群では吸入30分で最高値 60%に達した後、120 分では40% であった。 N2O-C群では MPEは約80% を維持し、N2O の鎮痛効果を増強した。 HAL-A群、PB-A群では MPEは変化なく鎮痛効果は得られなかったが、 HAL-C群ではMPE は最高75% 、PB-C群でも90% と CLO併用により著明な鎮痛効果を示した（図１）。NAシナプス伝達：Control 群に比べ、N2O-A 群ではLCの NA 濃度は50% に減少し、 ^{3}H-CLO 結合はLC(15%) とSC(20%) で増加した

が、HAL-A群ではNA濃度が大脳皮質で40% 減少したのみで、PBもこれらに影響しなかった（図2）。

【考察】

最近の研究から、中枢神経系内α_2受容体は青斑核および脊髄後角ニューロンに高密度に分布し、鎮痛や鎮静作用の発現に重要に関与することが示唆されている[1)2)]。したがって、麻酔薬の作用機序あるいはα_2受容体agonist 併用による臨床応用を考える上で注目される。本研究は、鎮痛効果の異なる各種麻酔薬について、中枢神経系内α_2受容体変動に及ぼす影響との関連について検討したものである。HAL やPBでは鎮痛効果は弱く、また脊髄、脳局所におけるNAシナプス伝達の変動は明らかでなかった。しかし、強力な鎮痛効果を有するN2O では、侵害刺激情報の伝達やその調節に関与する青斑核および脊髄後角でα_2受容体活性が亢進することが分かった。青斑核でNA濃度の半減とα_2受容体活性の亢進が起きたことは、同宿するμ受容体やGi蛋白質との相互作用を考慮する必要があるが、N2O が青斑核由来NA神経系活動を亢進させ、線維連絡する脊髄後角に対し下行性抑制として働く可能性が考えられる。一方、脊髄後角についてはα_2受容体は膠様質でsubstance P (SP) 神経終末のシナプス前細胞に局在することが知られており、またN2O 吸入時には脊髄後角substance P の放出抑制が起きることが報告されている[5)]。したがって、N2O は脊髄における侵害刺激情報の伝達に関与するSPの放出をα_2受容体の活性化を介し、シナプス前抑制する可能性がある。われわれは、すでに N2Oの鎮痛効果はnaloxaneで拮抗されず、α_2受容体拮抗薬idazoxane および青斑核損傷で抑制されることを明らかにしたが（未発表）、今回の結果を考え合わせると、N2O の鎮痛効果はα_2受容体の刺激作用を介する可能性がある。

本研究からN2O の鎮痛効果はCLO の併用で約2倍に増強されること、またHAL あるいはPB単独では鎮痛効果はみられないが、CLO との併用で著しい鎮痛効果が発現することが明らかとなった。おそらく脊髄後角などにおけるα_2受容体をCLO が刺激したためと考えられる。従来の報告で、clonidine など選択的α_2受容体agonist は、中枢神経系内交感神経系に作用し、降圧、鎮静作用のほか、強力な鎮痛作用を有することが明らかにされ，その併用により HALの最少肺胞気濃度(MAC) を 42%低下させること[3)]や、isoflurane麻酔時の人為低血圧のためのnitroprusside 必要量を減少させること[4)]などが示されており、本結果に符合するものと考えられる。また、その鎮痛効果はCLO 単独よりも増強されることが分かったが、その可能性として、これらの麻酔薬は鎮静作用が強く、CLO 併用で相乗効果が起きたことが考えられるが、直接の機序については明らかでない。以上より、麻酔薬の鎮痛効果発現には、青斑核および脊髄後角におけるα_2受容体の活性化が関与すること、またα_2受容体agonist CLO は麻酔薬との併用により、鎮痛効果をさまざまに修飾することが分かり、合理的麻酔（疼痛）管理の面で有用であることが示唆された。

【文献】 1) Yaksh T: Pharm Biochem Behav; (1985) 22:845 2) Scheinin M and MacDonald E: Acta Vet Scand; (1989) 85:11 3) Bloor BC and Flacke WE; Anesth Analg (1982) 61:741 4) Bloor BC, Finander LS, Flacke WE et al; Anesth Analg (1986) 65:469 5) Ishikawa T: J Neurosurg Anesth (1989) 1:316

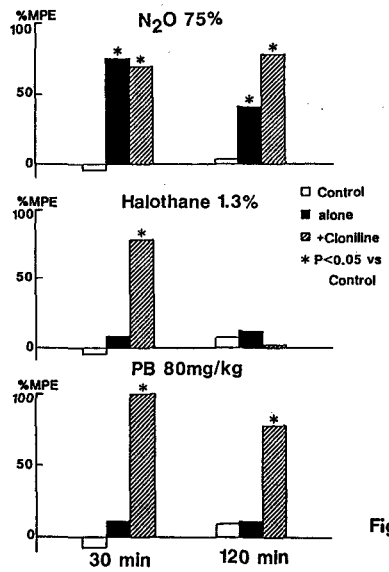


Fig. 1. Analgesic effects of combined use of clonidine with various anesthetics.

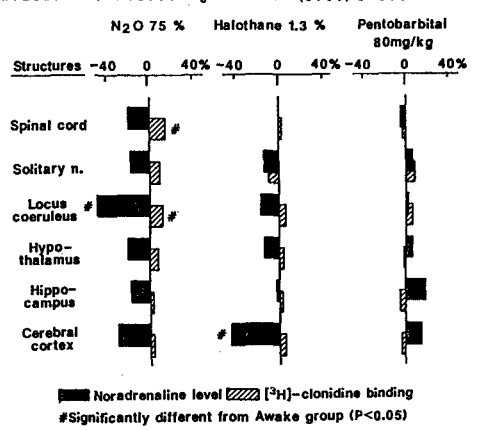


Fig. 2. Effects of anesthetics on NA content and ^{3}H-clonidine binding in rat central nerveous system.

229

NMDAレセプター複合体上のグリシンドメインの多様性

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を用いて、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グリシン(Gly)ドメインの性質をアンタゴニストである[^{3}H]5,7-dichlorokynurenic acid(DCKA)結合とアゴニストである[^{3}H]Gly結合の比較検討により解析した。[^{3}H]DCKA結合は内因性polyamine(PA)であるspermidine(SPD)やspermine(SPN)の添加により10^{-6} M以上の濃度範囲で濃度依存的に阻害されたが、アゴニストである[^{3}H]Gly結合はこれらのPA類の添加によっても著変を受けなかった。これとは対照的に、PAアンタゴニストと考えられるifenprodil(IFP)や(±)-α-(4-chlorophenyl)-4-[(4-fluorophenyl)methyl]-1-piperidine ethanol(SL 82.0715)はともに[^{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。またSPDの[^{3}H]DCKA結合阻害曲線は、10^{-5} M以上のIFPの添加により右側に移動した。シナプス膜標品をphospholipase(PLase) A_2やCで前処理すると、[^{3}H]Gly結合には著変は見られなかったが[^{3}H]DCKA結合は強力に阻害された。p-chromomercuriphenylsulfonic acid(PCMBS)の前処理でも同様な現象が観察されたが、N-ethylmaleimide(NEM)はいずれの結合にも影響を与えなかった。以上の結果より、GlyドメインにはPA感受性の異なる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。

NMDAレセプターイオノフォア複合体上のGlyドメインは、NMDAチャネル開放に絶対的必要性を示すが、そのリガンド結合実験による標識には、アゴニストである[^{3}H]Glyが繁用されている(7,10)。事実、[^{3}H]Gly結合はストリキニーネに対しても感受性を持たず、またその他の薬理学的特徴も電気生理学的研究成績と良く一致する。しかしながら、近年NMDAレセプター複合体の多様性が明らかになるにつれて、複合体を構成する各ドメインのリガンド親和性変化に関する興味が持たれている。Glyドメインについては、キヌレン酸誘導体であるDCKAが強力でかつ選択的なアンタゴニスト作用を持ち、その放射性化合物がGlyドメインの生化学的標識に有用であることが報告されている(1)。したがって本研究では、アンタゴニストである[^{3}H]DCKAとアゴニストである[^{3}H]Glyを用いて、脳シナプス膜標品への両結合の薬理学的および生化学的な性質を比較検討した。

〔方法〕
ラット全脳から粗シナプス膜標品を調製したのち、本標品を40倍量の50 mM Tris-acetate buffer(pH7.4)を用いて3回の洗浄操作を行った。最終的に得られた沈渣は0.32 M sucrose溶液に懸濁して-80°Cで凍結保存した。膜標品は使用時に室温融解後、0.08% Triton X-100で2°C、10分間の前処理を行った。前処理後、前述の洗浄操作をさらに2回行った標品を実験に供した。結合実験は、シナプス膜標品(150-200μg蛋白)を10 nM [^{3}H]Glyあるいは[^{3}H]DCKAと2°C、10分間反応させて行った。反応はWhatman GF/Bグラスフィルターを用いた急速吸引濾過法で停止した。

〔結果〕
[^{3}H]Gly結合あるいは[^{3}H]DCKA結合に対する種々の化合物の阻害力を50%阻害濃度(IC_{50}値)で比較したところ、両結合に対する各化合物の阻害能の間には高い正の相関性が認められた(図1)。NMDAチャネルへの[^{3}H]5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合は、10^{-5} M グルタミン酸(Glu)添加により著明に増強されたが、このGlu単独添加条件下の本結合は用いたほとんどすべての化合物により濃度依存的に阻害された。その化合物の中では、4-trans-2-carboxy-5,7-dichloro-4-phenylaminocarbonylamino-1,2,3,4-tetra-hydroquinoline(L-689.560)が最も阻害作用が強力であり、10^{-7} Mの添加により[^{3}H]MK-801結合は完全に消失した。しかしながら、10^{-5} M Glyをさらに添加すると、これら化合物の阻害作用は著明に減弱されていずれの阻害曲線も右側へ移動した。IC_{50}値で比較すると、[^{3}H]MK-801結合に対する各化合物の阻害能は、[^{3}H]Gly結合や[^{3}H]DCKA結合の場合とほぼ同様であった。一方、NMDAドメインへの[^{3}H]Glu結合、[^{3}H](±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid(CPP)結合および[^{3}H]DL-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentenoic acid(CGP 39653)結合に対して、L-689.560、DCKAおよびDCQX以外の化合物は比較的強い阻害作用を発揮した。約100種類の種々の化合物について[^{3}H]Gly結合および[^{3}H]DCKA結合に対する影響を一斉スクリーニングしたところ、PA類の中でも特にSPD、SPNおよびbis-(3-amino)propyl-

図1. [³H]Gly結合と[³H]DCKA結合の相関性

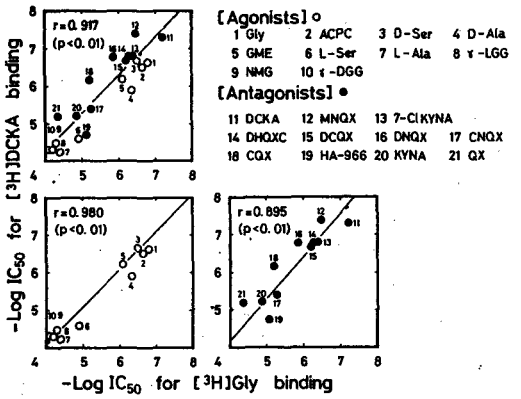
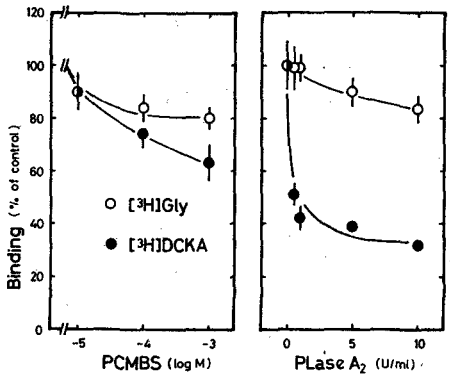


図2. [³H]Gly結合と[³H]DCKA結合の比較



amine(BAA)が、[³H]Gly結合には著変を与えずに[³H]DCKA結合を強く阻害することが判明した。一方、PAアゴニストとしての可能性を示唆されるIFPやSL 82.0715などは、逆に[³H]DCKA結合を有意に増強したが[³H]Gly結合には著変を与えなかった。SPDおよびIFPの[³H]DCKA結合に対する作用をScatchard plotにより解析したところ、SPDはKd値を約8倍、Bmax値を約3倍にいずれも有意に増加させるのに対して、IFPはKd値には影響を与えずにBmax値のみを約1.5倍に有意に上昇させることが判明した。また、[³H]DCKA結合に対するSPDの濃度依存的な阻害曲線は、10^{-6} M以上のIFPの添加により右側に移動した。Triton X-100で処理した膜標品を、さらにtrypsin、PLase A_2とC、あるいはPCMBSで前処理(30℃, 30分)すると、いずれの前処理も[³H]Gly結合には大きな影響を与えずに[³H]DCKA結合を強力に阻害することが明らかとなった(図2)。

[考察]

Glyドメインに対する親和性および特異性の両面から判断して、L-689,560やDCKAがGlyアンタゴニストとして有用性が高い化合物であることが示唆される。また、GlyアゴニストはNMDAアゴニストに比べて神経毒性や痙攣惹起作用が弱いこと(8)や、あるいは競合的(3)および非競合的(2,4)NMDAアンタゴニストが実験動物に精神分裂病様症状を引き起こすことなどを考え合わせると、Glyドメインに作用するリガンド類がNMDAアゴニストやアンタゴニストの場合に比べて、副作用の少ない薬物として有用である可能性は充分に考えられる。一方、[³H]Gly結合と[³H]DCKA結合の薬理学的および生化学的な特性が異なって出現したことから、GlyドメインにはNMDAドメインの場合の様に(5)リガンド選択性の相違に起因する多様性が存在する可能性が推察される(6)。したがって、アゴニストとアンタゴニストの両者の放射性リガンドを用いて同一のレセプターの標識を行うことは、特異的な新規化合物の探索や治療薬を開発する際に極めて重要な手段であると思われる。

[謝辞]

本研究の一部は、学校法人大阪工大摂南大学中央研究所特定研究II(92-2-801)の援助のもとに行われた。

[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. Koek, W., Woods, J.H., Mattson, M.V., Jacobson, A.E. and Mudar, P.J. (1987) Neuropharmacol., 26, 1261-1265.
3. Koek, W., Woods, J.H. and Ornstein, P. (1986a) Life Sci., 39, 973-978.
4. Koek, W., Woods, J.H. and Winger, D. (1986b) J. Pharmacol. Exp. Ther., 245, 969-974.
5. Monaghan, D.T., Olverman, H.J. Nguyen, L. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 9836-9840
6. Ogita, K., Suzuki, T. and Yoneda, Y. (1989) Neuropharmacol., 28, 1263-1270.
7. Wroblewski, J.T. and Danysz, W. (1989) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 29, 441-447.
8. 米田幸雄、荻田喜代一、鈴木竹雄 (1988) 神経化学、27(1), 406-407.
9. Yoneda, Y., Ogita, K. and Suzuki, T. (1990) J. Neurochem., 55, 237-244.

230 グルタチオンの内因性NMDAレセプター アゴニストとしての可能性

樫本理世、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(EAA)結合に対するグルタチオンの影響を検討した。酸化型(GSSG)および還元型グルタチオン(GSH)はともに、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプター複合体上のNMDA認識部位への[^{3}H]グルタミン酸(Glu)結合を10^{-6} M以上の濃度範囲で濃度依存的に阻害した。しかしながら、両グルタチオンはグリシン(Gly)認識部位への[^{3}H]Gly結合に対しては影響を与えなかった。NMDAチャネル部位への[^{3}H](+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合は、アゴニスト類非添加条件下にグルタチオンによって有意に増強されたが、この結合増強作用はGlu脱水素酵素(GDH)の前処理によってもほとんど影響を受けなかった。一方、グルタチオンはnon-NMDAレセプターへの[^{3}H]α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA)結合や[^{3}H]カイニン酸(KA)結合に対しても阻害作用を発揮したが、その阻害強度はいずれも[^{3}H]Glu結合の場合に比べて20倍以上弱いことが判明した。以上の結果より、グルタチオンがEAAレセプターの中でも特にNMDAレセプターの内因性アゴニストとしての特異的機能を有する可能性が示唆される。

グルタチオンは生体内に広く分布し、種々の物質代謝やアミノ酸輸送あるいは生体防御機構への関与など様々な生理的役割を演じることが古くから知られている。しかしながら、脳内にも比較的高濃度のグルタチオンが存在するにもかかわらず、その中枢神経系における特異的役割についてはほとんど解明されていないのが現状である。筆者らは、グルタチオンが脳シナプス膜へのNa^+依存性および非依存性[^{3}H]Glu結合を強力に阻害すること(1)、および脳シナプス膜標品中に高親和性、温度感受性、飽和性、構造選択性および立体特異性を示す[^{3}H]GSH結合活性が認められること(2,3,4)を既に報告した。また、最近の脳切片を用いた研究では、高濃度K^+刺激によりCa^{2+}依存性にグルタチオンの放出が観察されることが明らかにされている(9)。これらの実験的事実はいずれも、グルタチオンの脳内シナプス伝達メカニズムへの関与の可能性を支持する成績である。本研究では、この可能性を追究する目的で、レセプター結合実験法を用いてイオノトロピック型EAAレセプター機構におけるグルタチオンの作用の解析を試みた。

〔実験方法〕

ラット全脳より調製したシナプス膜標品を、遠心分離操作により十分に洗浄したのち、0.32 M蔗糖水溶液に懸濁状態で-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分間前処理したのち、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(8)。本膜標品を50 mMトリス酢酸緩衝液(pH 7.4)中で、EAA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急速吸引濾過法により停止した。

〔実験結果〕

GSHおよびGSSGはいずれもNMDA認識部位への[^{3}H]Glu結合を10^{-6} M以上の濃度で濃度依存的に阻害した(GSH; IC_{50}=1.98±0.22 μM, GSSG; IC_{50}=1.62±0.28 μM)が、Gly認識部位への[^{3}H]Gly結合に対しては10^{-4} M以上の高濃度でGSSGのみに弱い阻害作用が観察された(図1)。さらに、GSHおよびGSSGはアゴニスト非添加時の[^{3}H]MK-801結合を10^{-6} M以上の濃度で濃度依存的に増強した。実験に用いたGSHおよびGSSGを液体高速クロマトグラフで分析したところ、両標品ともに約1%のGluを含有することが判明した。したがって次に、グルタチオンの増強作用を確認するために、GSHの[^{3}H]MK-801結合増強作用に対するGDH前処理の影響について検討した。Gluは10^{-7} M以上の濃度で[^{3}H]MK-801結合を著明に増強したが、GDH前処理はこの増強曲線を有意に右に移動させた。これに対して、GSHの結合増強作用はGDH前処理によっても有意な影響を受けなかった(図2)。また、GSHおよびGSSGはnon-NMDAレセプターへの[^{3}H]KA結合に対して、同程度の弱い結合阻害作用を発揮した。さらに、チオシアン酸イオン(SCN^-)の添加の有無にかかわらず、non-NMDAレセプターへの[^{3}H]AMPA結合はGSHおよびGSSGによってほとんど著明な影響

を受けなかった。これらnon-NMDAレセプターへの結合に対するグルタチオンの阻害強度は、いずれもIC_{50}値で比較すると20倍以上[^{3}H]Glu結合の場合に比べて軽度であった。

図1. グルタチオンの影響

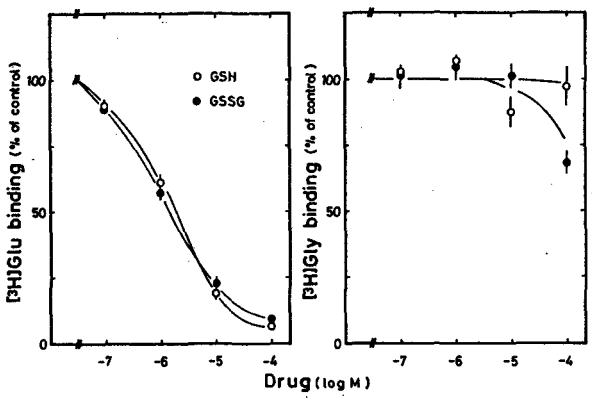
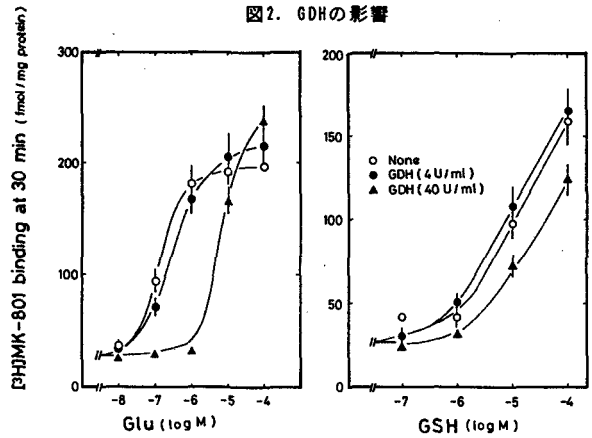


図2. GDHの影響



〔考察〕

本研究で得られた結果は、グルタチオンが脳内EAAレセプターの中でも特にNMDAレセプターの内因性アゴニストとして作用する可能性を示唆するものである。しかしながら、グルタチオンがNMDAによって誘発される細胞内Ca^{2+}濃度上昇を有意に抑制するが、高K^+もしくはKA刺激によるCa^{2+}濃度上昇には影響を与えないとの報告(5)も見受けられる。さらに、dithiothreitol (DTT)などSH基をもつ化合物によるNMDAレセプターの活性調節に関する文献(5, 6, 7)も複数報告されている。以上の成績はいずれも、その作用メカニズムは異なるもののグルタチオンが、NMDAレセプターにより介在されるトランスメンブランコントロールに選択的に関与する可能性を支持するものである。グルタチオンを構成するアミノ酸類(Glu、Glyおよびシステイン)が、いずれもNMDAレセプター介在性情報伝達に重要な生理的意義を有することを考慮するまでもなく、グルタチオンが脳内において特定の機能的役割を演じる可能性は高いものと推察される。

〔謝辞〕

本研究の一部は、平成4年度文部省科学研究費補助金(04671382)の援助のもとに行った。

〔文献〕

1. Ogita, K., Kitago, T., Nakamuta, H., Fukuda, Y., Koida, M., Ogawa, Y. and Yoneda, Y. (1986) Life Sci., 39, 2411-2418.
2. 荻田喜代一, 鈴木竹雄, 米田幸雄 (1988) 神経化学, 27, 191-192.
3. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1987) Neurosci. Res., 4, 486-496.
4. Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Brain Res., 463, 37-46.
5. Reynolds, I.J., Rush, E.A. and Aizenman, E. (1990) Br. J. Pharmacol., 101, 178-182.
6. Sucher, N.J. and Lipton, S.A. (1991) J. Neurosci. Res., 30, 582-591.
7. Yoneda, Y. and Ogita, K. (1990) Phermacol. (Life Sci. Adv.), 9, 167-182.
8. Yoneda, Y., Ogita, K. and Enomoto, R. (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther., 256, 1161-1172.
9. Zangerle, L., Cuenod, M., Winterhalter, K.H. and Do, K.Q. (1992) J. Neurochem., 59, 181-189.

231

[^{3}H] MK－801結合に対するCaの調節メカニズム

韓大健、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への[^{3}H] (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo-[a,d]cyclohepten-5,10-imine(MK-801)結合に対するCaの増強作用について検索を進めた。細胞骨格阻害薬およびカルシウムチャネル阻害薬は単独添加条件下においては[^{3}H]MK-801結合を有意に弱く阻害したが、Caの結合増強能には著変を与えなかった。また、イミプラミンをはじめとする各種中枢作用薬は、単独では[^{3}H]MK-801結合を強く阻害したが、Caの増強作用には大きな影響を与えなかった。これに対して、ホスホリパーゼA_2(PA_2)阻害作用を持つQuinacrineは単独では[^{3}H]MK-801結合を著明に阻害したが、Caの結合増強能を著しく増大させた。以上の結果より、Caの[^{3}H]MK-801結合増強作用の出現メカニズムに細胞膜のリン脂質が関与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つの異なる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と考えられる。すなわち、1)イオンチャネル部位、2)NMDA認識部位、3)Glycine(Gly)認識部位、および4)ポリアミン部位の各ドメインが複合体を形成して機能する。本複合体の活性化は、NaやKの細胞膜透過性を亢進させるばかりでなく、Caの著明な透過性亢進を惹起するが、このNMDAチャネルの開放は生理的濃度のMgおよびZnにより、それぞれ独自に遮断されることが電気生理学的研究から明らかにされている(1)。一方生化学的研究では、同チャネルへの[^{3}H]MK-801結合がこれらの2価カチオンにより影響されることが報告されている(5)。我々は、これら2価カチオンの作用が[^{3}H]MK-801結合の結合初速度変化に起因することを解明し(3)、Caの添加条件下ではGlyの[^{3}H]MK-801結合増強作用が観察されないことを見出した(2)。しかしながら、その詳細な作用メカニズムについては充分解析されていないのが現状である。したがって、本研究ではNMDAチャネル透過性を持つCaに焦点を絞り、Caの[^{3}H]MK-801結合増強作用の出現メカニズム解明の目的で、その作用点がCaと関連する種々の阻害薬添加の影響について検討を進めた。

［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分間の遠心分離と懸濁による洗浄操作を3回行ったのち、0.32 M庶糖水溶液に懸濁して-80℃で凍結保存した。実験当日にさらに上記緩衝液で2回洗浄した膜標品(トリトン未処理膜標品)、あるいは凍結懸濁液を実験当日に0.08% Triton X-100で前処理した膜標品(トリトン処理膜標品)を結合実験に用いた(6)(7)。結合実験は、いずれかの膜標品を5 nM [^{3}H]MK-801と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急速吸引濾過法により行い、洗浄後の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］

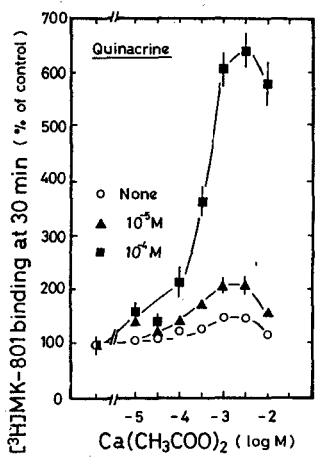
トリトン処理膜標品への[^{3}H]MK-801結合は、10^{-5} M L-Glutamic acid添加条件下においてGlyアンタゴニストである7-Chlorokynurenic acid(7-CIKYNA)や6,7-dichloroquinoxaline-2,3-dione(DCQX)の添加により濃度依存的に阻害された。Gly 10^{-5} Mの添加は7-CIKYNAやDCQXの結合阻害曲線を右に移動させたが、Caはいずれの阻害曲線にも著明な影響を与えなかった(表1)。また、Gly部位のアゴニスト(Gly、D-Serine、D-Alanineおよび1-Amino-cyclopropane carboxylic acid)およびアンタゴニスト(5,7-Dichlorokynurenic acid、7-CIKYNA、DCQXおよび1-Hydroxy-3-aminopyrrolidone-2)はいずれも濃度依存的に[^{3}H]Gly結合を阻害したが、Caはこれらの阻害曲線に対しても有意な変化をもたらさなかった。次に、Caの[^{3}H]MK-801結合増強作用が著明に検出される未処理膜標品を用いて、種々のCa関連機能蛋白の阻害薬添加の影響について検討を加えた。細胞骨格阻害薬であるCytochalasin B、PodophyllotoxinおよびColchicineやあるいはカルシウムチャネル阻害薬のNifedipine、DiltiazemおよびVerapamilを添加しても、Caの結合増強曲線に著変は認められなかった。これに対して、中枢抑制薬であるChlorpromazineやTrifluoperazineは、いずれも10^{-5} Mの濃度においてCa無添加条件下の[^{3}H]MK-801結合を強く阻

表1. [³H]MK-801結合に対するGlyアンタゴニストおよび2価カチオンの影響

Drug	7-CIKYNA		DCQX	
	$IC_{50}(\mu M)$	Hill coefficient	$IC_{50}(\mu M)$	Hill coefficient
None	1.42±0.49	0.78±0.09	1.20±0.22	1.15±0.15
Gly	45.6±10.9**	0.82±0.25	——	——
Ca	0.96±0.12	0.95±0.13	2.09±0.66	0.97±0.24
Mg	1.44±0.44	1.15±0.15	1.75±0.58	0.86±0.10

** p<0.01, significantly different from control value obtained in the absence of added drug

図1. Caの[³H]MK-801結合増強曲線に対するQuinacrineの影響



害したが、Caの結合増強作用に対する強い影響は認められなかった。また、抗うつ薬であるImipramine、DesipramineおよびAmitryptylineはいずれも10^{-4} MにおいてCa無添加時の[³H]MK-801結合を強く阻害したが、Caの[³H]MK-801結合増強曲線には大きな影響を与えなかった。一方、PA_2阻害作用を持つp-Bromophenacylbromide (PBPB)、Quinacrine、ManoalideおよびNordihydroguaiaretic acid (NDGA)について同様の検索を進めたところ、PBPBは単独では[³H]MK-801結合を有意に阻害するが、Caの結合増強作用能には著変を与えないことが明らかとなった。Quinacrine単独添加条件下においても本結合は強く阻害されたが、QuinacrineはCaの結合増強作用を著しく増大させた(図1)。Manoalideはいずれの条件下においても[³H]MK-801結合に対し著変を与えなかったのに対して、NDGAはCa無添加時の本結合を有意に増強したがCaの結合増強作用は逆に減弱させた。

[考察]

7-CIKYNAやDCQXの[³H]MK-801結合阻害曲線およびGlyアゴニストやアンタゴニストの[³H]Gly結合阻害曲線がCaにより影響を受けないことから推察して、Caの[³H]MK-801結合増強作用はGly部位に対する直接作用に起因する現象ではないと考えられる。ともにPA_2阻害作用をもつQuinacrineとNDGAの効果の相違は、Caの[³H]MK-801結合増強作用出現には細胞膜のリン脂質代謝変化が関与する可能性を示唆するものである。事実、細胞膜リン脂質の代謝産物であるアラキドン酸が、NMDA誘発性電流変化をさらに増加させるという報告も見受けられる(4)。Caの[³H]MK-801結合増作用の生理的意義の解析とともに、その作用機序解明のために今後のさらなる解析が望まれる。

[謝辞]

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(04671382)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. Enomoto, R., Ogita, K., Han D. and Yoneda, Y. (1992) J. Neurochem., 59, 473-481.
3. 韓大健、榎本理世、荻田喜代一、米田幸雄 (1991) 神経化学, 30, 146-147.
4. Miller B., Monique S., Trayneils S. F. and Attwell D. (1992) Nature 355, 722-725.
5. Reynold, I.J. and Miller, R.J. (1988) Eur. J. Pharmacol., 151, 103-112.
6. Ogita, K., Suzuki, T., Han D. and Yoneda Y. (1991) Neurochm. (Life Sci. Adv.) 10, 125-136.
7. Yoneda, Y., Suzuki, T., Ogita, K. and Han D. (1992) J. Neurochem. (in press)

232 Dopamine Receptors in the Ventrolateral Striatum and Feeding Behavior

Koki Inoue[1·2], Nobuo Kiriike[1], Masakage Okuno[1], Hideki Ito[1], Yasutoshi Fujisaki[1] and Sakae Yamagami[1]
1)Department of Neuropsychialry, Osaka City University Medical School, 2)Kande Hospital

〔要約〕 To clarify the role of dopamine receptors in the ventrolateral striatum in feeding behavior, we perfused the ventrolateral striatum of rats with (-)sulpiride (a D_2 receptor antagonist), bromocriptine (a D_2 receptor agonist), SCH 23390 (a D_1 receptor antagonist), and CY 208-243 (a D_1 receptor agonist) using a microdialysis technique during a 6-hour free-feeding period after a 22-hour food deprivation. Perfusion with sulpiride at high concentrations (more than 2.5 $\mu g/\mu l$) suppressed the food and water intake, and that with bromocriptine increased food intake in a dose dependent manner. These results suggest that D_2 receptors in the ventrolateral striatum are involved in feeding behavior. On the other hand, neither SCH 23390 nor CY 208-243 perfusion altered food intake, although both somewhat decreased water intake. These results suggest that D_1 receptors in the ventrolateral striatum play little role in feeding behavior. We conclude that the D_2 receptors in the ventrolateral striatum are more closely involved in the feeding behavior of rats than are the D_1 receptors.

<Introduction> It has been shown that dopamine (DA) turnover in the ventrolateral striatum is increased during feeding behavior[2]. To clarify the role of D_1 and D_2 DA receptors in feeding behavior, we perfused the ventrolateral striatum of rats with (-)sulpiride (a D_2 receptor antagonist), bromocriptine (a D_2 receptor agonist), SCH 23390 (a D_1 receptor antagonist) and CY 208-243 (a D_1 receptor agonist) using a microdialysis technique during free feeding after food deprivation, and observed feeding behavior during this period.

<Materials and Method> Animals and microdialysis Female Wistar rats (180-210 g) were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg i.p.), and a dialysis guide cannula was implanted in the left ventrolateral striatum (AP +0.5 mm, L +3.0 mm, V -3.5 mm from the bregma and dural surface) of each animal according to the atlas by Paxinos and Watson[3]. The cannula was secured to the skull with a screw and dental cement. A wire stylet was placed in the guide to keep it free of debris. A 10-day period was allowed for the rats to recover from surgery.

Drug treatment The following drugs were used: (-)sulpiride (Sigma Chemical Co., U.S.A.), bromocriptine (Sandoz Pharma, Ltd., Switzerland), SCH 23390 (Research Biochem, Inc., U.S.A.) and CY 208-243 (Sandoz Pharma, Ltd., Switzerland). Bromocriptine and CY 208-243 were dissolved in water using dimethyl sulfoxide or tartaric acid. These drugs were diluted with Ringer's solution (149 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 1.5 mM $CaCl_2$).

Drug perfusion On the day of the experiment, a dialysis probe with a 3-mm long cellulose tip was inserted into the guide cannula. Ringer's solution was continuously perfused at the flow rate of 1 μl/min. After the extracellular concentrations of DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) had become stable, a total of six 20-min baseline samples, collected every 20 minutes between 0900h and 1100h, were obtained following 20 hours of food deprivation. Thereafter, Ringer's solution containing each drug or Ringer's solution alone as a control was perfused through a microdialysis probe into the ventrolateral striatum for 6 hours (between 1100h and 1700h); the rats were allowed access to food during the 6-hour period. The food and water intake was measured hourly. At the end of the experiments, the brain was removed and frozen. Examination of the cannula track was carried out on razor blade-cut fine sections. The track was confined to have been correctly localized in each case, e.g., to terminate within the confines of the ventrolateral striatum.

Statistical analyses Food and water intake were analyzed with Welch test by comparing control value and experimental value for the same period. Due to the large variation of basal release between rats, the concentrations of DA, DOPAC and HVA were normalized as percentages of the mean value for the 6 samples obtained prior to the feeding trial. One-way analysis of variance with Scheffe test was used to compare the values obtained just before with those after the feeding trials, and Welch test for comparison of the control value with the experimental value.

<Result> Effects of drugs on food and water intake Cumulative food and water intake during perfusion with sulpiride, bromocriptine, SCH 23390 and CY 208-243 is shown in Figures 1, 2, 3 and 4, respectively. Food intake was increased during perfusion with sulpiride at 0.05 $\mu g/\mu l$, whereas the food and water intake were decreased at higher concentrations (more than 2.5 $\mu g/\mu l$). During perfusion of bromocriptine, food intake increased, but not significantly, in a dose dependent manner, while water intake did not change. During perfusion with SCH 23390 neither food nor water intake changed significantly, although water intake was slightly decreased at concentrations exceeding 32.4×10^{-2} ng/μl. During perfusion with CY 208-243, food intake did not change, but water intake decreased to less than 80% of the control value.

Effects of drugs on the concentrations of DA, DOPAC and HVA During perfusion with sulpiride, the concentrations of DOPAC and HVA showed significant but NON-dose-dependent increase. The concentration of DOPAC, but not those of DA and HVA, was significantly dereased compared with the control during perfusion with SCH 23390. During perfusion with bromocriptine and CY 208-243, there was no change of the concentration of DA, DOPAC or HVA compared with the controlat any dose.

<Discussion> In this study, perfusion with sulpiride (a D_2 receptor antagonist) at 0.05 $\mu g/\mu l$ was found to increase food intake, whereas food and water intake were decreased at higher doses of sulpiride. This finding suggests that sulpiride at low dose facilitates feeding behavior by blocking pre-synaptic D_2 autoreceptors, while at higher doses it inhibits feeding behavior by blocking post-synaptic D_2 receptors. Perfusion with bromocriptine (a D_2 receptor agonist) increased food intake in a dose-dependent manner. This result suggests that D_2 receptors in the ventrolateral striatum are involved in feeding behavior. On the other hand, neither SCH 23390 (a D_1 receptor antagonist) nor CY 208-243 (a D_1 receptor agonist) perfusion altered the food intake, but both somewhat decreased the water intake. These results suggest that the D_1 receptors in the ventrolateral striatum play little role in feeding behavior. Perfusion with sulpiride significantly increased the concentrations of DOPAC and HVA. Neither bromocriptine nor CY 208-243 perfusion altered the extracellular concentrations of DA, DOPAC and HVA, but SCH 23390 perfusion decreased the concentration of DOPAC. Since water intake was decreased by perfusion with these drugs, these drugs can therefor be considered to have effects on feeding behavior. DA D_1 and D_2 receptor agonists and antagonists have been reported to have inconsistent effects on the release of neurotransmitters in extracellular fluid[1]. The effects of these drugs on DA release require further investigation.

<Reference> 1)Ajima,A et al.(1990) Brain Res.518,193-198. 2)Inoue.K et al.(1990) Bulletin of the Japanese Neurochemical Society. 29(1),256-257. 3)Paxinos,G and Watson.C (1986) The Rat Brain, Academic Press.

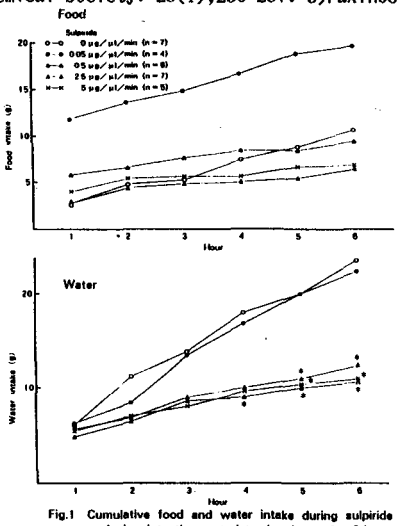


Fig.1 Cumulative food and water intake during sulpiride perfusion into the ventrolateral striatum for 6 hours. Values are expressed as mean.
* $p < 0.05$: Compared with the control.

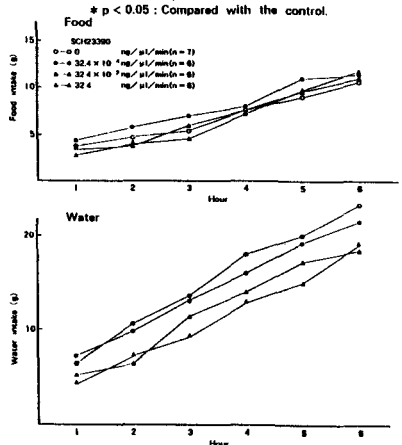


Fig. 3 Cumulative food and water intake during SCH 23390 perfusion into the ventrolateral striatum for 6 hours. Values are expressed as mean.

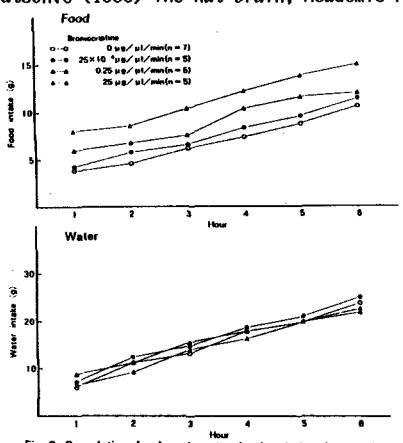


Fig. 2 Cumulative food and water intake during bromocriptine perfusion into the ventrolateral striatum for 6 hours. Values are expressed as mean.

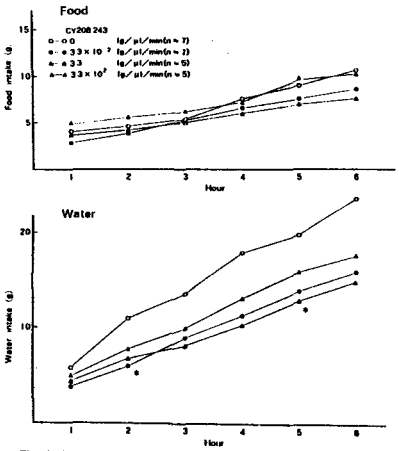


Fig. 4 Cumulative food and water intake during CY208-243 perfusion into the ventrolateral striatum for 6 hours. Values are expressed as mean.
* $p < 0.05$: Compared with the control.

233 ヒト5-HT_{1B}および5-HT_{1D}受容体遺伝子のクローニングとその発現

望月大介、辻田隆一、山田慎二、嵯峨井均
(旭化成・合成医薬研)

〔要約〕

新規ヒト5-HT_1受容体遺伝子のクローニングを試みたところ、既に報告のある5-HT_{1D}受容体遺伝子と報告のない新規遺伝子(HGCR1)のクローニングに成功した。さらに、5-HT_{1D}受容体遺伝子の偽遺伝子も得られた。これら遺伝子をＣＯＳ－７細胞に導入させることにより、^{3}H-5-HT特異的結合が認められた。これら発現細胞による結合実験成績よりHGCR1はヒト5-HT_{1B}受容体遺伝子と思われた。

＜緒言＞

現在、5-HT受容体はその薬理学的および生化学的特徴から5-HT_1, 5-HT_2, 5-HT_3および5-HT_4に分類され、5-HT_1受容体はさらに1A, 1B, 1Cおよび1Dに細分類される。これら5-HT_1受容体ファミリーのなかで5-HT_{1A}と5-HT_{1C}受容体は薬理学的に種の相違が認められていないが、5-HT_{1B}と5-HT_{1D}受容体は種特異性が報告されている(1)。すなわち、5-HT_{1B}受容体はマウス、ラットに存在するがモルモットやヒトには存在しない。逆に、5-HT_{1D}受容体はモルモット、ヒトには存在するが、マウスやラットには存在しないと言われている (5) 。さらには、これらとは別の5-HT_1受容体の存在を示唆する報告があり (2,3) 、5-HT_1受容体ファミリーの分類はいまだに不透明な部分が多い。

我々は、ＰＣＲ法にてヒト5-HT_{1A}受容体遺伝子のクローニングとその発現について報告した (4) 。今回は、5-HT_{1A}受容体遺伝子の塩基配列を参考にして新たなヒト5-HT_1受容体ファミリーの遺伝子を探索したところ、新規受容体遺伝子(HGCR1)と5-HT_{1D}受容体遺伝子、さらには5-HT_{1D}受容体偽遺伝子のクローニングに成功した。また、これら遺伝子産物の薬理学的性質について検討した。

＜実験方法＞

ＰＣＲ法：ヒト5-HT_{1A}受容体の第３および第６膜貫通ドメインを構成するアミノ酸配列をコードする塩基配列を一部変化させた２本のＤＮＡ(5'-GCGCTGGACIGGTACTGGGCCATCACCGAC-3'および 5'-GAAGAAGGGCAGCCAGCACACGATGAAGGC-3')を合成し、ヒト染色体ＤＮＡを鋳型として遺伝子増幅を行った。

クローニング法：ＰＣＲ産物をプローブとしてヒト染色体ＤＮＡのサザン・ブロティングを行い得られたポジティブ領域のライブラリーを作成しスクリーニングした。

発現系：pcDL-SRα296ベクターに目的遺伝子を組み込みＤＥＡＥ－デキストラン法によりＣＯＳ－７細胞に導入した。

結合実験：リガンドとして^{3}H-5-HTを用いて行った。

＜結果および考察＞

ＰＣＲにより得られた増幅産物を1.2%アガロースゲルで電気泳動を行うと、３つのバンド (550bps, 690bpsおよび730bps)が認められた。これらの塩基配列を確認したところ690bpsおよび730bpsのバンドは既に報告のある5-HT_{1D}および5-HT_{1A}受容体遺伝子のそれと一致していた。550bpsのバンドは5-HT_{1D}受容体の塩基配列と類似していたが明らかに異なっており、むしろラットで報告されている5-HT_{1B}受容体遺伝子と類似していた。この550bpsのＤＮＡをプローブとしてサザン・ブロッティングを行ったところHindIII 3.0kbpsにハイブリダイズした。そこでヒト染色体ＤＮＡのHindIII 3.0kbpsのライブラリーを作成しコロニーハイブリダイゼーション法により約５万個の形質転換体を調べた結果４個のポジティブクローンを得た。これらクローンの塩基配列を調べたところ390個のアミノ酸をコードする新規遺伝子(HGCR1)であることが確認された。次に5-HT_{1D}受容体遺伝子全長をクローニングする目的で690bpsのＤＮＡ断片をプローブとしてサザン・ブロッティングを行ったところ２つのポジティブバンドが認められ、そのおのおののクローニングを試みた結果一つは5-HT_{1D}受容体遺伝子でもう一つはその偽遺伝子であった。

今回クローニングした遺伝子産物の薬理学的性質を調べるために HGCR1と5-HT_{1D}受容体遺伝子をＣＯＳ－７細胞で発現させた。 HGCR1および 5-HT_{1D}受容体遺伝子を発現させた細胞は、いずれも^{3}H-5-HT特異的結合を認めた。また、各種薬剤による結合阻害実験は両者でよく類似していたが、rauwolscine結合能は5-HT_{1D}＞HGCR1であり、(-)propranolol結合能はHGCR1＞5-HT_{1D}であった。これらのことからHGCR1はヒト5-HT_{1B}受容体遺伝子と思われた。しかしながら、結合阻害データーは組織のものと比較して矛盾点があり、さらに検討が必要と思われる。また、セカンド・メッセンジャー系について検討中であり、これについてもあわせて報告する予定である。

＜謝辞＞

pcDL-SRα296ベクターを供与いただいた武部豊先生（国立予防衛生研・エイズ研究センター）に深謝します。

```
                                                                TM-I
HGCR1  MEEPGAQCAPPPPAGSETWVPQANLSSAPSQNCSAKDYIYQDSISLPWKVLLVMLLALITLATTLSNAFVIATVY   75
1D                MSPLNQSAEGLPQEASNRSLNATETSEAWDPRTLQALKISLAVVLSVITLATVLSNAFVLTTIL   64
1A                  MDVLSPGQGNNTTSPPAPFETGGNTTGISDVTVSYQVITSLLLGTLIFCAVLGNACVVAAIA   62
                               *                                *       * ** *
                          TM-II                                      TM-III
HGCR1  RTRKLHTPANYLIASLAVTDLLVSILVMPISTMYTVTGRWTLGQVVCDFWLSSDITCCTASILHLCVIALDRYWA   150
1D     LTRKLHTPANYLIGSLATTDLLVSILVMPISIAYTITHTWNFGQILCDIWLSSDITCCTASILHLCVIALDRYWA   139
1A     LERSLQNVANYLIGSLAVTDLMVSVLVLPMAALYQVLNKWTLGQVTCDLFIALDVLCCTSSILHLCAIALDRYWA   137
         * *   ***** *** *** ** ** *    *     *  **  **     *  *** ****** ********
                          TM-IV                                      TM-V
HGCR1  ITDAVEYSAKRTPKRAAVMIALVWVFSISISLPP-FFWRQAKAEEEVSECVVNTDHILYTVYSTVGAFYFPTLLL   224
1D     ITDALEYSKRRTAGHAATMIAIVWAISICISIPP-LFWRQAKAQEEMSDCLVNTSQISYTIYSTCGAFYIPSVLL   213
1A     ITDPIDYVNKRTPRRAAALISLTWLIGFLISIPPMLGWRTPEDRSDPDACTISKDHG-YTIYSTFGAFYIPLLLM   211
       ***   *   **   **  *   *     ** **   **          *        ** *** **** *  *

HGCR1  IALYGRIYVEARSRILKQTPNRTGKRLTRAQLITDSPGSTSSVTSINSRVPDVPSESGSPVYVNQV---------   290
1D     IILYGRIYRAARNRILNPPSLYGKRFTTAHLITGSAGSSLCSLNSSLHEGHSHSAGSPLFFNHV----------   277
1A     LVLYGRIFRAARFRIRKTVKKVEKTGADTRHGASPAPQPKKSVNGESGSRNWRLGVESKAGGALCANGAVRQGDD   286
         *****   ** **                          *

                                                                        TM-VI
HGCR1  ----------------------------------KVRVSDALLEKKKLMAARERKATKTLGIILGAFIVCWLPF   330
1D     ----------------------------------KIKLADSALERKRISAARERKATKILGIILGAFIICWLPF   317
1A     GAALEVIEVHRVGNSKEHLPLPSEAGPTPCAPASFERKNERNAEAKRKMALARERKTVKTLGIIMGTFILCWLPF   361
                                                    *****  * **** * ** *****

                    TM-VII
HGCR1  FIISLVMPICKDACWFHLAIFDFFTWLGYLNSLINPIIYTMSNEDFKQAFHKLIRFKCTS        390
1D     FVVSLVLPICRDSCWIHPALFDFFTWLGYLNSLINPIIYTVFNEEFRQAFQKIVPFRKAS        377
1A     FIVALVLPFCESSCHMPTLLGAIINWLGYSNSLLNPVIYAYFNKDFQNAFKKIIKCKFCRQ       422
       *   ** * *              **** *** ** **   *  *  ** *
```

Fig. 1 *Alignment of the amino acid sequences of the human HGCR1, 5-HT_{1D} receptorand 5-HT_{1A} receptor. Putative transmembrane domains are overlined and identical amino acids in all receptors are indicated by asterisks.*

＜文献＞

1. Hoyer,D. and Middlemiss,D.N. (1989) Trends Pharmacol. Sci. 10,130-132
2. Leonhardt,S.,Herrick-Davis,K. and Titeler,M. (1989) J. Neurochem. 53,465-471
3. Mahle,C.D.,Nowak,H.P.,Mattson,R.J.,Hurt,S.D. and Yocca,F.D. (1991) Eur. J. Pharmacol. 205,323-324
4. 望月大介、藤井快枝、嵯峨井均 (1990) 神経化学 29,112-113
5. Waeber,C.,Schoeffter,P.,Palacios,J.M. and Hoyer,D. (1989) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 337,595-601

234 視床下部バゾプレッシンニューロン神経核（視索上核）におけるムスカリン様レセプターM_3サブタイプの機能

森眞由美、神谷稔夫、津島宏美、松田友宏
（名古屋市大・医・薬理）

〔要約〕

視床下部バゾプレッシンニューロン神経核（視索上核）におけるコリン作動性の抗利尿作用に関与するムスカリン様レセプターのサブタイプを明らかにする目的で、種々のサブタイプに選択性を有するムスカリン様アンタゴニストの同神経核への微量注入による前処置の影響を検討した。水負荷・エタノール麻酔ラットの視索上核にアトロピン（非選択性）、ピレンゼピン（M_1）、4−DAMP(M_3)を前処置すると、ムスカリン様アゴニスト、オキソトレモリン1 nmolの微量注入による抗利尿作用は用量依存的に抑制された。アトロピン、4−DAMP、ピレンゼピンの前処置はオキソトレモリンによる抗利尿作用をほぼ完全に抑制したが、AF-DX-116（M_2）、メトクトラミン（M_2)はほとんど抑制しなかった。これらの抑制作用のID50値は、アトロピン＜4−DAMP＜ピレンゼピンの順であった。以上の結果により、視索上核においてオキソトレモリンによる抗利尿作用に介在しているムスカリン様レセプターサブタイプはM_1でも、M_2でもなく、少なくとも一部はM_3であることが示唆された。

視床下部視索上核、supraoptic nucleus（SON）はバゾプレッシン（抗利尿ホルモン）を合成・遊離するニューロンの細胞体が存在する神経核であり、免疫組織化学的にコリン作動性神経終末の局在が認められている。我々はこの神経核に種々のコリン作動性アゴニストとアンタゴニストを直接微量注入することにより、ムスカリン様レセプターを介してバゾプレッシンの遊離が促進され、抗利尿作用が発現することを明らかにしてきた[1,2]。今回はこのコリン作動性の抗利尿作用に介在するムスカリン様レセプターのサブタイプを明らかにする目的で、ムスカリン様アゴニスト、オキソトレモリンによる抗利尿作用に対する各種ムスカリン様アンタゴニスト：アトロピン(非選択性)、ピレンゼピン(M_1)、AF-DX-116(M_2)、メトクトラミン(M_2)、4-DAMP(M_3)の同神経核への前処置による抑制作用を比較・検討した。

［実験方法］

尿流出量の測定：ウイスター雄ラット（300−350g)を用い、5 ml/100 g b.w.の水を経口負荷し、45分後に同量の12%エタノールを経口投与して麻酔させた。尿流出量は薬物注入後10分間毎の滴数を注入前10分間の滴数に対する%として表した。実験中、外頸静脈カニューレから3%エタノール含有ロック液を持続注入した（0.1 ml/min)。薬物の投与法：ラットを脳定位固定装置にセットし、Königら[3]のアトラスに従って視索上核に挿入したカニューレ(外径200μm)を介して薬物の微量注入を行った。薬物は生理食塩水に溶解し、1 μlを3分間で注入した。ムスカリン様アンタゴニストの抑制作用を調べる実験では、同一神経核にアゴニスト、アンタゴニスト、アゴニストの順に注入し、2回目のアゴニストの作用を1回目の作用に対する%として表した。アンタゴニストは2回目のアゴニスト注入の 20分前に注入した。統計処理はt検定で行った（*:$P<0.05$）。 AF-DX-116は日本ベーリンガーインゲルハイム(株)社より提供された。

［実験結果］

(1)オキソトレモリンの抗利尿作用に対するムスカリン様アンタゴニストの抑制作用：アトロピン、4-DAMP、あるいはピレンゼピンの前処置はオキソトレモリンの抗利尿作用を用量依存的に抑制し、アトロピン 0.01 nmol、4-DAMP 0.1 nmol、ピレンゼピン1 nmolでほぼ完全に抑制した（Fig. 1,2,4)。 AF-DX-116は0.001~0.1 nmolで有意な抑制は見られなかった（Fig. 3)。(2)各種ムスカリン様アンタゴニストの抑制作用の用量作用曲線（Fig. 5)

：アトロピン、4-DAMP、ピレンゼピンのID50値はそれぞれ約0.002、0.04、0.4 nmolであった。AF-DX-116、メトクトラミン(1~10 nmol)は抗利尿作用を有意に抑制しなかった。(3)各種ムスカリン様アンタゴニストを単独に視索上核に注入した時、いずれも尿流出量に影響はなかった。

[考察]

オキソトレモリンの抗利尿作用に対する各種ムスカリン様アンタゴニストの抑制作用のID50値は、アトロピン＜4-DAMP＜ピレンゼピンであった。AF-DX-116やメトクトラミンには有意な抑制作用がないこと、ピレンゼピンによる抑制作用はID50値がアトロピンに比べて著しく高濃度であること、4-DAMPによりほぼ完全な抑制作用が認められることから、視索上核において抗利尿作用に介在しているムスカリン様レセプターのサブタイプはM_1でもM_2でもなく、少なくとも一部はM_3であることが示唆される。最近のcDNAクローニングより、ムスカリン様レセプターをコードするDNAにm_1, m_2, m_3, m_4, m_5の5種があり[1]、m_1, m_2, m_3がM_1, M_2, M_3サブタイプに対応するようである。m_4, m_5に対応するM_4, M_5サブタイプに高い選択性があるムスカリン様アゴニストもアンタゴニストもまだない。従来の研究によれば、主としてM_1は中枢神経系、自律神経節に、M_2は心筋に、M_3は平滑筋と末梢分泌腺に局在することが知られている[2]。本研究結果は、中枢神経のバゾプレッシン分泌機能を有する視床下部・下垂体神経分泌系においてもM_3サブタイプが介在し、ニューロンによる内分泌の調節に関与している可能性を示している。

[文献]

1)Bonner,T.I.(1989) Trends Neurosci, 12,148-151. 2)König,J.F.R. and Klippel,R.A.(1963) The Rat Brain, A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem. Williams and Wilkins Co., Baltimore. 3)Lefkowitz,R.J., Hoffman,B.B. and Taylor,P.(1990) In "The Pharmacological Basis of Therapeutics" (Editors; Gilman,A.G., Rall,T.W., Nies,A.S. and Taylor,P) 8th Edition, p.84-121. 4) Mori,M., Tsushima,H. and Matsuda,T.(1984) Japan.J.Pharmacol.,35,27-36. 5)Mori,M., Tsushima,H. and Matsuda,T.(1989) Japan.J.Pharmacol.,49,357-364.

Fig.1-4:Effects of preinjection of muscarinic antagonists on antidiuretic effect induced by injection of oxotremorine into the supraoptic nucleus (*P<0.05 vs. control)

Fig.1 Effects of atropine

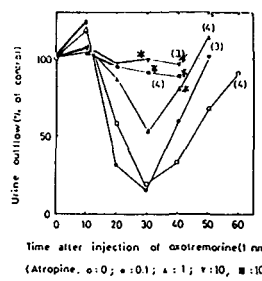


Fig.2 Effects of pirenzepine

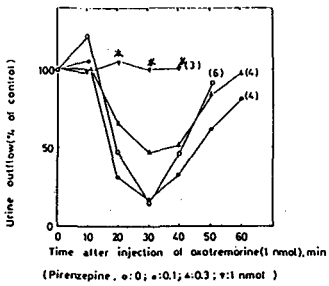


Fig.3 Effects of AF-DX-116

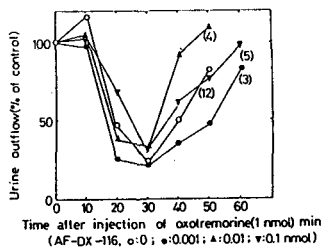


Fig.4 Effects of 4-DAMP

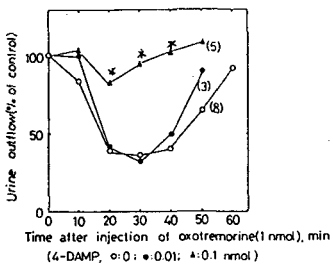
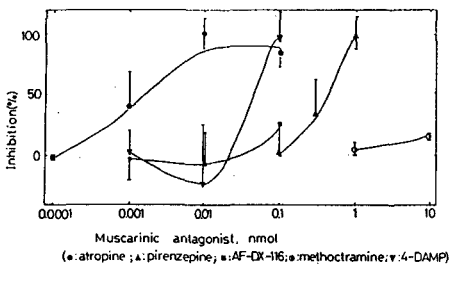


Fig.5 Dose-inhibition curves for various muscarinic antagonists



235

脳内グルココルチコイドレセプターへの［^{3}H］ＴＡ結合

米田幸雄、荻田喜代一（摂南大・薬・薬理）

〔要約〕
脳内グルココルチコイドレセプター(GR)の性質を検討する目的で、ラット脳の細胞質中の[^{3}H]triamcinolone acetonide(TA)結合および[^{3}H]TA-蛋白質複合体の細胞核内移行の性質を解析した。細胞質画分への[^{3}H]TA結合は、反応温度2℃の場合には反応時間約5時間で平衡状態に到達したが、反応温度30℃での結合は反応時間10分間で最大となった。結合の解離速度は反応温度に依存しており、2℃の場合には極めて遅いことが判明した。[^{3}H]TA結合は、各種グルココルチコイドやミネラルコルチコイドにより濃度依存的に阻害され、その結合阻害作用の強度はTA、dexamethasone、deoxycorticosterone、progesterone、prednisolone、hydrocortisone、およびcorticosteroneの順であった。[^{3}H]-TA-蛋白質複合体のラット脳細胞核画分への移行は同複合体の30℃での前処理で誘発されたが、複合体の2℃の前処理では著明な細胞核内移行は認められなかった。以上の結果より、脳内細胞質画分のGRはグルココルチコイドと複合体を形成したのちに温度依存性に活性化され、その活性型複合体のみが細胞核内に移行する能力を持つ可能性が示唆される。

N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプターは、中枢神経系の可塑性形成などの神経機能変動および脳虚血などによる遅発性神経細胞壊死、あるいはパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患の発症に深く関連するが、これらの細胞膜レセプター介在性メカニズムの解明が進むにつれて、遺伝子発現レベルでの分子細胞学的解析が重要視されている。たとえば、中枢神経系の長期増強現象とc-fosやzif/268(erg-1)などのプロトオンコジーンの誘導が関連性を持つこと(1)や、痙攣発作出現によりc-fosが誘導されること(3)などから、可塑性形成プロセスや神経変性疾患発症などに細胞核内転写制御因子の変動が関与する可能性が推察されている。一方、GRの作用発現にはホルモン-レセプター複合体が標的遺伝子のグルココルチコイド感応配列(GRE)に結合してその転写反応を促進するばかりでなく、核内転写制御因子AP-1などによる転写促進効果を調節するメカニズムの存在も明らかとなっている(2)。したがって、脳内GRは特定遺伝子の転写活性の正または負の制御により、種々の長期的神経精神機能の調節メカニズムに関与すると考えられる。本研究では、脳内GRのNMDAレセプター介在性細胞内シグナル伝達メカニズムへの関与を明らかにする目的で、まずラット脳細胞質画分への[^{3}H]TA結合および[^{3}H]TA-蛋白質複合体の脳P_1画分への移行の性質を検討した。

〔実験方法〕

[^{3}H]TA結合実験：ウイスター系雄性ラット脳を10 mM Na_2MoO_4および10 mM thioglycerol(TG)を含む50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)でホモジナイズしたのち、100,000g、30分間の遠心分離により得られた上清を細胞質画分とした。[^{3}H]TA結合は通常、細胞質画分と5 nM [^{3}H]TAを2℃で16時間反応させて行い、反応停止は0.5% polyethylene-imine処理したWhatman GF/Bグラスフィルターによる吸引濾過法により行った。各種ステロイドは、すべてdimethyl sulfoxide(DMSO)に溶解した。DMSOの最終濃度は、結合に影響を与えない2%以下とした。[^{3}H]TA-蛋白質複合体の核移行実験：脳細胞質画分は、10 mM TGを含む50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)を用いて調製した。また脳P_1画分は、ラット脳を0.32 M sucrose-10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)でホモジナイズしたのち、1,000g、10分間の遠心分離により調製した。[^{3}H]TA-蛋白質複合体の作成は、細胞質画分と250 nM [^{3}H]TAを5 mM Na_2MoO_4添加条件下で2℃、16時間反応させたのち、5%活性炭により遊離[^{3}H]TAを除いて行った。核移行実験は、0.32 M sucrose-10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)中で、P_1画分と[^{3}H]TA-蛋白質複合体を30℃で30分間反応させたのち、遠心分離法により反応を停止して行った。

〔実験結果〕

細胞質画分への[^{3}H]TA結合をグラスフィルターを用いた吸引濾過法により測定したところ、再現性のよい70%以上の特異的結合が検出された。本結合は反応温度2℃の場合には反応時間に比例して増加し、反応開始後約5時間で結合は平衡状態に到達した。その平衡状態の結合は少なくとも反応開始48時間後まで持続した。一方、反応温度30℃の場合の結合は反応開始後10分間で最大となり、以後反応時間の経過とともに減少した(図1)。次いで、結合が充分平衡状態に到達する反応時間16時間の時点で非放射性0.1 mM TAを添加して[^{3}H]TA結合の解離速度を検討した。反応温度2℃の場合には非放射性TA添加1時間後で有意な解離は認められず、添加2時間後でも約20%の解離しか観察されなかった。反応温度

図1. 結合反応に対する反応温度の影響

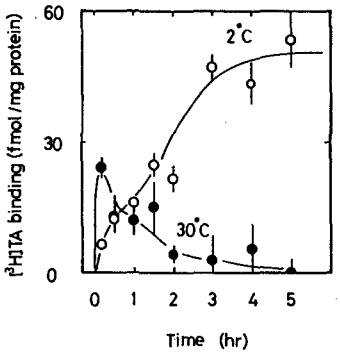


図2. 解離反応に対する反応温度の影響

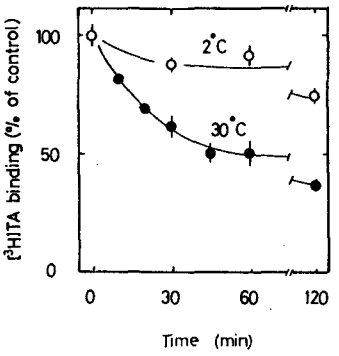


表1. 各種ステロイドによる[³H]TA結合の阻害

Steroids	IC_{50} (nM)
TA	14.6± 2.7
Dexamethasone	45.9± 4.0
Deoxycorticosterone	90.8± 20.0
Progesterone	124 ± 17
Prednisolone	146 ± 13
Hydrocortisone	437 ±108
Corticosterone	2789 ±927
Testosterone	>10000
Pregnenolone	>10000
Androsterone	>10000
β-Estradiol	>10000
Cortisone	>10000

30℃では2℃の場合に比べて解離速度は速く、非放射性TA添加後2時間で約60%の解離が認められた(図2)。用いたステロイドの中では、TAが最も強力に[³H]TA結合を阻害し、次いでdexamethasone、deoxycorticosterone、progesterone、prednisolone、hydrocortisone、およびcorticosteroneの順に弱い阻害作用を発揮した。一方、testosterone、pregnenolone、androsterone、β-estradiol、およびcortisoneの結合阻害作用は極めて弱いことが判明した(表1)。30℃あるいは2℃で前処理した[³H]TA-蛋白質複合体のそれぞれについてP_1画分への移行能を検討したところ、30℃で前処理した場合の方が2℃の場合に比べてより著明な細胞核移行活性が見られた。

〔考察〕

脳細胞質画分への[³H]TA結合に対する各種ステロイドの阻害作用は、progesteroneを除いてGRの薬理学的性質を反映するものである。progesteroneの前駆物質であるpregnenoloneが結合をほとんど阻害しないことから推察して、ステロイド環の3位の置換基が本結合に対する親和力を決定する因子の一つであると思われる。[³H]TA結合の薬理学的性質に加えて、[³H]TA-蛋白質複合体の細胞核内移行能の発現は、本研究で見られた[³H]TA結合蛋白質がGRであることを示すものである。ホルモン-GR複合体の機能発現機序は、少なくとも4段階のステップから構成されると考えられる。すなわち、1)複合体の形成、2)複合体の活性化、3)活性型複合体の細胞核内移行、および4)核内DNAへの結合である。本研究における核内移行能測定実験は、ステップ3)および4)の両者を反映すると思われるので、今後同複合体のDNA結合能の検討がGRによる転写制御メカニズムの追究には必要であろう。

〔謝辞〕

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(04671382)の援助のもとに行った。また、著者らは非会員の韓達、柏井香澄および成田幸子の三氏の実験遂行上の協力に深く感謝を表す。

〔文献〕

1. Cole, A.J., Saffen, D.W., Baraban, J.M. and Worley, P.F. (1989) Nature 340, 474-476.
2. Diamond, M., Miner, J.N., Yoshinaga, S.K. and Yamamoto, K. (1990) Science 249, 1266-1272.
3. Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L. and Curran, T. (1987) Science 237, 192-197.

236 メタンフェタミンのセロトニン系へのneurotoxicな作用に対する非競合的NMDA受容体アンタゴニストの効果

楯林義寛*、黒木俊秀*、衛藤和子*、松本孝**、堤哲之**、中村薫**、平野誠**、内村英幸**

（九州大・医・神経精神科*、国立肥前療養所　臨床研究部**）

〔要約〕

比較的高用量(15mg/kg, i.p.)のメタンフェタミン(MAP)の反復投与が中枢神経系の広範な部位のセロトニン(5-HT)ニューロン系に与えるneurotoxicな作用に対して、N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体アンタゴニスト(PCP 2.5mg/kg、またはMK-801　2.5mg/kg)前処置が及ぼす影響を脳内部位別に検討した。MAPを7日間連日反復投与した最終投与7日後に尾状核－被殻において5-HT含量、およびトリプトファン水酸化酵素(TPH)活性の有意の低下(各-30、-26%)が認められた。この低下はPCP、またはMK-801の前処置により拮抗されていた。同様に側坐核および前頭皮質においてもMAPの反復投与後に5-HT含量が有意に低下(約-30%)したが、MK-801の前処置によりこの低下は阻止されていた。以上の結果から、線条体のみならず、辺縁系、皮質系においても5-HTニューロンに対するMAPのneurotoxicな作用は興奮性アミノ酸神経系が一部関与していることが示唆された。

［目的］

これまでアンフェタミン類の大量投与は、中枢のモノアミン・ニューロン系にneurotoxicな影響を及ぼすことが知られており、覚醒剤中毒における遷延持続性の精神病状態との関連から注目される。我々[1]は、これまで、15mg/kgという比較的高用量のMAPをラットに7日間反復投与し、最終投与の2週間後においても、皮質および辺縁系を中心とした部位において5-HT系が低下していることを認め、5-HT系に対してMAPのneurotoxicな作用が持続的に及んでいる可能性を示唆した。これらのMAPのneurotoxicな作用は種々の中枢受容体の作働薬によって影響を受けることが指摘されており、それらの所見からneurotoxicityの形成機序にD_1受容体が関与している可能性などが報告されている[2]。一方、近年、種々の病態における神経細胞の変性には、興奮性アミノ酸受容体が関与することが注目を集めており、なかでも、NMDA型受容体はドーパミン(DA)受容体とも機能的連関を有することも指摘されている。従って、MAPの中枢神経系への作用にはDA系とNMDA受容体の相互作用が介在している可能性も考えられる。そこで今回の研究では、MAPのモノアミン系に対するneurotoxicな作用に対して、NMDA受容体の非競合性アンタゴニストであるフェンサイクリジン(PCP)、およびMK-801がどのような影響を及ぼすか、を検討した。

［方法］

実験動物は８週齢のWistar系雄性ラットを用い、1日1回、7日間連日MAP(15mg/kg)を投与し、最終投与の7日後に断頭した。NMDA受容体アンタゴニストは、MAP投与30分前にPCP(2.5mg/kg)またはMK-801(2.5mg/kg)を毎回前処置した。NMDA受容体アンタゴニストの単独投与の影響を検討するために、PCPまたはMK-801をラットに投与し、30分後に生食水を投与する処置を、同様に行った。対照群として、生食水のみを投与したラットを用いた。断頭したラットの脳を速やかに摘出し、凍結保存後、作成した連続切片より脳内の諸部位を切り出した。各組織中のDA、5-HTおよび各代謝産物(DOPAC、HVA、5-HIAA)を既報[3]のHPLC-ECD法により同時測定した。また尾状核-被殻においてはトリプトファン水酸化酵素(TPH)活性をHasegawa　らの方法[4]に準じて測定した。

［結果］

Fig.1に、MAP(15mg/kg)の7日間反復投与の最終投与より7日後の定常状態における脳内部位別5-HT、5-HIAAの変化とそれに対するMK-801(2.5mg/kg, i.p.)前処置の効果を示す。MAP反復投与により、尾状核-被殻、側坐核、前頭皮質のすべての部位で対照群に比して5-HTレベルが有意に低下(-30～-33%)した。また尾状核-被殻においてはTPH活性も低下(-26%)が見られた(Table 1)。これに対して、MK-801を前処置したラットでは、MAP反復投与によっても5-HTレベルおよびTPH活性の低下は認められず、尾状核-被殻と前頭皮質ではMAP反復投与のみのラットと比して5-HTレベルに有意差を認めた。すなわち、MAPの反復投与による5-HTレベルおよびTPH活性の低下はMK-801の前処置により有意に拮抗されていた。尾状核-被殻におけるMAPの作用に対するPCPの効果もMK-801の場合と同様であった。一方、側坐核と前頭皮質では、MK-801の場合と異なり、PCPを前処置してもなおMAP投与後の5-HTレベルの低下(-24～-30%)が認められた。すなわち、側坐核と前頭皮質では、5-HTレベルの低下に対するPCPの阻止効果は認められなかった。MK-801、またはPCPのみを7日間反復投与したラットでは、最終投与の7日後では、5-HT、5-HIAAレベルとも有意の変化はなかった。次に、MAPの反復投与後7日間を経た各部位のDAとその代謝産物の定常レベルは、いずれも対照群と比して特に変化は認められなかった。MK-801、PCP単独の反復投与を行ったラットでも同様であった。毎回NMDA受容体アンタゴニストの前処置後にMAPの反復投与を行ったラットも最終投与後7日後ではDA関連物質の定常レベルに有意の変化は見出せなかった。

［考察］

これまで、MAPが5-HT系の種々の生化学的な指標を持続的に低下させることから、MAPのneurotoxicな作用は、DA系よりも5-HT系に感受性が強いことを示唆する報告は、われわれの既報を含めていくつかある[1)5)6)]。今回の実験においても、15mg/kgという比較的高用量のMAP反復投与後に5-HTレベルの低下が認められるにもかかわらず、DAレベルには有意の変化が認められず、5-HT系に対するMAPのneurotocityが確認された。以上のような5-HT系へのneurotoxicityが生じる機序については、まだ十分解明されていない。従来より、MAPの大量投与後、その代謝産物より6-hydroxydopamineや5,6

-dihydroxytryptamineのようなモノアミン・ニューロンのneurotoxinが内在性に生成されるとする仮説がある[7]。近年は、5-HT再取り込み機構やDA系がneurotoxicityの形成に介在する可能性を示唆する報告[8)9)]もなされている。最近では、興奮性アミノ酸の関与する可能性を検討した研究もなされてきている。今回、われわれは、ラットにMAP(15mg/kg)を7日間連日投与し、最終投与後7日後に尾状核-被殻(線条体)でみられる5-HTレベルとTPH活性の低下が、MK-801の前処置により拮抗されることを認めたが、この所見は、Johnsonらの報告[10)]と一致している。さらに、側坐核、前頭皮質などの辺縁系、皮質系の部位におけるMAPによる5-HTレベルの減少もMK-801が阻止することも観察された。以上の結果は、線条体のみならず、辺縁系、皮質系においても、MAPのneurotoxicityの形成機序にはNMDA受容体を介して興奮性アミノ酸が関与している可能性を示している。尾状核-被殻では、PCP前処置によりMK-801の場合と同様にMAPの5-HT、およびTPH活性低下作用が阻止されていたが、側坐核、前頭皮質では、PCPにMK-801のような拮抗作用が認められなかった。NMDA受容体の特異的PCP結合部位には、MK-801のほうがPCP自体よりも特異性が強く、一方、PCPはNMDA受容体以外にもσ受容体やDA再取り込み部位などにも高い親和性を有することが指摘されている。PCPは線条体DA系よりも辺縁系や皮質系のDA系の機能を選択的に促進することが報告[11)12)]されており、MK-801のDA系にに対する影響とは部位選択性に相違があることも指摘されている[13)]。従って、MK-801と異なり、側坐核や前頭皮質では、PCPの効果が認められなかった理由として、PCPのDA系に対する影響に部位選択性があることとの関連が考えられる。

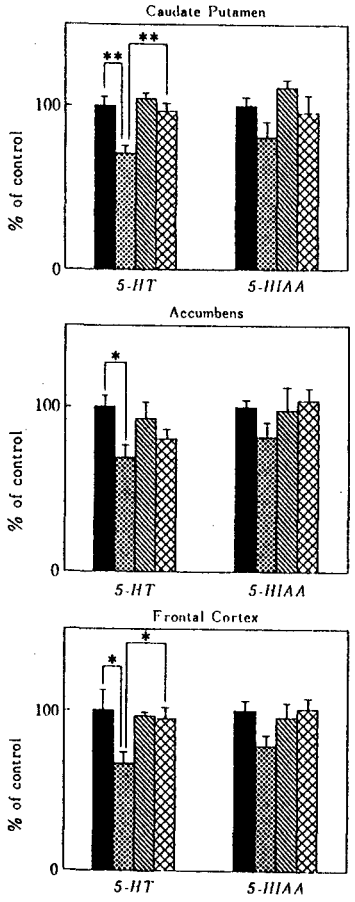


Fig 1. Effects of MK-801 (2.5mg/kg, i.p.) on neurochemical changes in 5-HT neuron systems in the descrete regions of the rat brain with repeated MAP (15mg/kg, i.p.) treatment followed by 7 drug-free days. The data are expressed as percentage of the control group (S+S) values, mean±S.E.M. *p<0.05, **p<0.01 by Scheffe's test following an one-way analysis of variance.

Table 1. Effects of the non-competitive NMDA receptor antagonists on methamphetamine-induced changes in TPH activity in the nucleus caudate putamen

Treatment	Tryptophan hydroxylase activity (μmol 5-hydroxytryptophan/g protein/hour)	
Saline+Saline	1.34±0.17	(100%)
Saline+MAP	0.99±0.13	(74%) *
MK-801+Saline	1.41±0.17	(105%)
MK-801+MAP	1.22±0.09	(91%) +
PCP+Saline	1.30±0.13	(98%)
PCP+MAP	1.24±0.20	(93%)

Each values represents the mean±S.E.M.
*p<0.05 compared to the saline control group of rats and +p<0.05 compared to the saline+MAP group of rats by Dunnett's t-test, respectively.

[文献]
1)楯林義寛ら(1989) 神経化学, 28, 478-479. 2)Sonsalla, P. et al. (1986) J. Pharmacol. Exp. Ther., 238, 932-937. 3)Kuroki, T. et al. (1992) Neuropeptides, 21, 167-173. 4)Hasegawa, H. et al. (1984) J. Biochem., 95, 1951-1758. 5)Hotchikiss, A. and Gibb, J. (1980) J. Pharmacol. Exp. Ther., 214, 257-262. 6)Ricaurte, G. et al. (1980) Brain Res., 193, 153-163. 7)Seiden, L. and Vosmer, G. (1984) Pharmacol. Biochem. Behav., 21, 29-31. 8)Schmidt, C. and Gibb, J. (1985) Neurochem. Res., 10, 637-648. 9)Schmidt, C. et al. (1985) Pharmacol. Exp. Ther., 233, 539-544. 10)Johnson, M. et al. (1991) Excitatory Amino Acids. New York: Raven Press, 717-712. 11)Deutch, A. et al. (1987) Eur. J. Pharmacol., 134, 257-264. 12)松本孝ら(1990) 神経化学, 29, 220-221. 13)Rao, T. et al. (1990) J. Neurochem., 54, 1157-1162.

237 アルコール依存症ヒト死後脳におけるGTP結合蛋白質の変化

片村能也、 小澤寛樹、 橋本恵理、八田慎一*、高畑直彦、P. Riederer**、齋藤利和
札幌医科大学神経精神医学講座、*薬理学講座 **Dept. of Psychiatry, Wurzburg University

〔要約〕
アルコール依存症者の死後脳におけるGTP結合蛋白質（G蛋白質）の機能及び量を光親和型 GTP analog(azidoanilido GTP, AAGTP)ならびにImmunoblottingを用いて検討した。促進性G蛋白質（Gsα）および、抑制性G蛋白質（Gi/oα）に対するAAGTPの基礎結合量は対照群、アルコール依存症者間で有意な差は認められなかった。しかし、アルコール依存症者群では、500mMのエタノール存在下におけるAAGTPの結合量はGsα及びGi/oα双方において有意に低下を示した。Polyclonal antibodyによるImmunoblottingではアルコール依存症者おいて、側頭葉皮質領域で、高分子量促進性G蛋白質（GsIIα）が有意に低下した。以上から、アルコール依存症者では大脳皮質において選択的にGsαの量の低下が、また、G蛋白質のエタノールに対する感受性の低下が示唆された。

〔目的〕マウス大脳皮質および人血球成分においてエタノールが受容体ーアデニル酸シクラーゼ（AC）共役系、特にGs蛋白質に直接作用を及ぼすことが報告されている（1）。そこで今回、ヒト中枢組織での変化を検討するため、アルコール依存症者の死後脳におけるG蛋白質の機能および、量を検索した。

〔方法〕アルコール依存症者（5名）、及び、年齢、死後からの経過時間をmatchさせた対照者（9名）の前頭葉、頭頂葉、側頭葉、後頭葉の大脳皮質膜標本を調製した。^{32}P-AAGTP結合実験：AAGTPは、Pfeufferの方法により作製し、AAGTP結合実験は、Ozawaらの方法（3）に準じて行なった。粗膜標本50μgをエタノール（500mM）存在下、及び非存在下で、0.1μM ^{32}PーAAGTP、および1mM $MgCl_2$ を含む2mMHepes(pH 7.4)緩衝中で、23℃、5分間、インキュベーションした後、同上の緩衝液で2回、洗浄と遠心を繰り返し、非結合AAGTPを取り除いた。次に紫外線を5分間照射後、4mMDTT(dithiothreitol)にて反応を停止させた。結果の解析はSDS-PAGE、および、オートラジオグラフィーによって行なった。 Immunoblot法によるG蛋白質（Gsα, Giα, Goα, Gqα, beta subunit)の同定：試料5μgをSDS-PAGEで分離した後、ニトロセルロース膜へ転写し、非特異的蛋白質結合のブロッキングは、転写膜を1時間、3%BSAを含む10mM Tris緩衝液でインキュベーションして行なった。その後、室温で転写膜を5000倍に希釈した一次抗体（抗G蛋白質抗：RM/1, AS/7, GC/2, QL, SW/1）と0.1%BSAを含む10mM Tris緩衝液でインキュベートし、転写膜を洗浄後、5000倍に希釈した二次抗体[Anti Rabbit Ig F(ab)'2]で、1時間、インキュベーションし、洗浄後、ECL(Enhanced Chemiluminescence)用発色液で、転写膜を1分間インキュベートし、フィルムに感光させた後、デンシトメーターにより、各G蛋白質バンドに相当する部位の定量を行なった。

〔結果及び考察〕Immunoblottingの結果、アルコール依存症者の側頭葉皮質においてはGsIIαのImmunoreactivityが対照群に比して30%の有意な低下がみられ、Gsでも同様の傾向が認められた。他の領域の各G蛋白質α subunit、beta subunitのImmunoreactivityは、対照群と有意な差は認められなかった（Fig 1）。一方、側頭葉皮質および頭頂葉皮質においてAAGTPのGsα、Gi/oαへの結合量は、エタノールの非存在下（基礎結合量）では対照群、アルコール依存症者間で有意に差は認められなかった。しかしながら、対照群においてエタノールの添加（500 mM)によりAAGTPのGsα、Gi/oαへの結合量は、約１５０%まで増強された。アルコール依存症者群ではエタノールの添加よるAAGTPの増強効果は認められなかった（Fig 2および3）。以上のことより、アルコール依存症者群では、大脳皮質領域の一部において選択的にGsα subunitの量が低下していると考えられた。また、G蛋白質量の変化が認められなかった頭頂葉皮質においても、G蛋白質に対するエタノールの作用の減弱が示唆された。これらの結果は我々が、濃厚な遺伝的負因がみられるアルコール依存症者の血小板膜標本においてGpp(NH)p刺激性AC活性の低下、Gs蛋白質のエタノールに対する感受性の低下、および、Gs蛋白質量の低下を報告した所見（2）と同様な傾向を示すものであり、アルコール依存症者では末梢及び中枢組織においてG蛋白質の機能的、量的変化が生じている可能性が示唆された。

(文献)
(1) Hoffman,P.L., and Tabakoff,B.; FASEB J. Vol.4, 2612-2622 (1990)
(2) Katamura, Y., et al. ; Clinical Neuropharmacol., Vol.15,Suppl.1, 647B (1992)
(3) Ozawa,H. and Rasenick, M.M.; J. Neurochem. 56, 330-338 (1991)

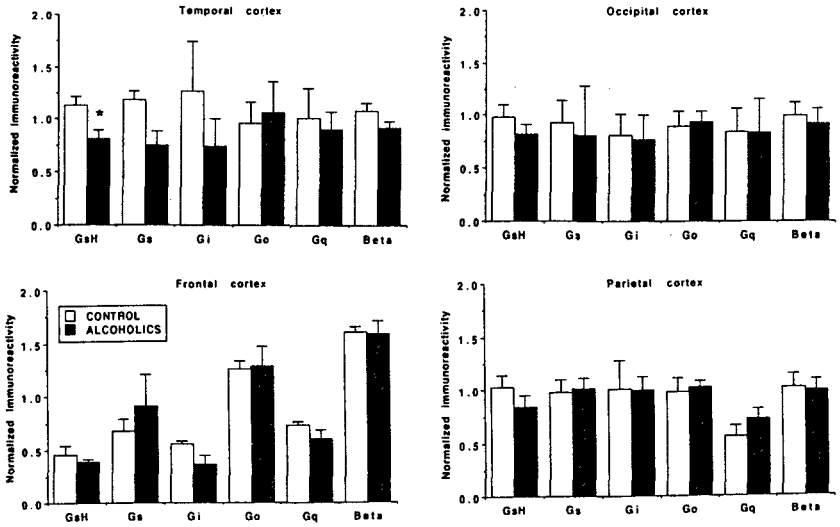


Fig.1.G-protein subunit immunoreactivities for GsHα, Gsα, Giα, Goα, Gqα, Gβ in frontal, temporal, parietal, occipital cortex.
*Significantly different from control (P < 0.05).

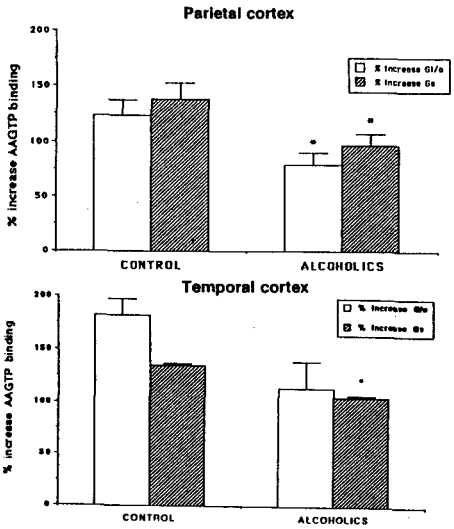


Fig.2.AAGTP binding to Gsα and Gi/oα,in human cortex membranes from controls and alcoholics
* Significantly different from control (p< 0.05).

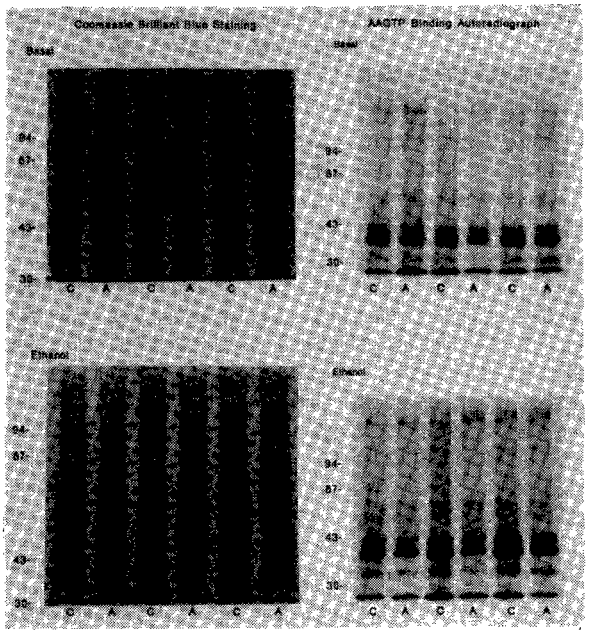


Fig.3.AAGTP labeling in parietal cortex membranes.
C; Control , A; Alcoholic.

238 G蛋白質との連関を介した細胞骨格成分蛋白質 Tubulin による情報伝達系の調節

八田慎一、小沢寛樹*、 芦沢 健*、 齋藤利和*、大鹿英世
（札幌医科大学、薬理・ *神経精神医学）

〔要約〕 Tubulin とG蛋白質との連関による細胞情報伝達系の調節について、ラット大脳皮質および線条体膜標品を用いて検討した。光親和型非水解性 GTP類似体である AAGTPの結合した Tubulin (Tu-[^{32}P]AAGTP) をラット脳より調製し、 Photoaffinity Labeling によって検討した結果、Tubulin に結合していたグアニンヌクレオチド ([^{32}P]AAGTP) は膜標品中のGiα およびGsα へ転移された。GppNHp結合型 Tubulin (Tu-GppNHp) を用いて、Tubulin によるアデニル酸シクラーゼ (AC) 活性およびDopamine D_2受容体親和性の調節を検討した結果、Tubulin からのグアニンヌクレオチドの転移によるGi 機能の活性化を反映して、AC活性の抑制と [^{3}H]spiperone 結合の Dopamine による置換曲線の右方移動が示された。これらの結果は、Tubulin はG蛋白質との連関によるグアニンヌクレオチドの転移を介して細胞情報伝達系の調節に関与していることを示唆している。

【目的】 細胞骨格成分蛋白質の一つであるTubulin が、G蛋白質 (Gi) と会合し、その際、グアニンヌクレオチド (GN) の転移反応を介してアデニル酸シクラーゼ (AC) 活性の抑制を生じることが報告されている[3]。このことは、細胞骨格成分蛋白質が細胞への情報伝達の制御にも関与している可能性を示している。さらに、細胞骨格成分蛋白質 (MAPs、τ) の機能変化とアルツハイマー型老年痴呆との関連性も示唆されており、Tubulin 機能の変化が、老化や疾病に伴って観察される細胞応答の変化に関与している可能性が考えられる。 しかしながら、Tubulin による細胞情報伝達系の調節についてはまだ不明な点が残されている。今回、我々はラット脳から調製したTubulin と大脳皮質膜、線条体膜標品を用い、 Tubulin－G蛋白質連関を介したAC活性および受容体親和性の調節について検討した。

【方法】 実験にはWistar系雄性ラットを用いた。大脳皮質、線条体の粗膜分画の調製および AC 活性の測定は Hatta et al.[2]の方法によって行った。Tubulin の調製はRasenick and Wang [3]の方法によって行い、Tubulin (Tu) をGppNHpあるいは光親和型非水解性 GTP類似体であるP^3-(4-azidoanilido)-P^1-5'-GTP (AAGTP) で重合させることで、GppNHp結合型 (Tu-GppNHp) および AAGTP結合型 (Tu-AAGTP) Tubulin を得た。[^{3}H]spiperone による Dopamine D_2 受容体結合実験は Chatterjee et al.[1]の方法に従って行った。G蛋白質へのGN結合の測定は[^{32}P]AAGTPあるいはTu-[^{32}P]AAGTP を用いたPhotoaffinity Labeling[2]を行い、結果はSDS/PAGEおよび Autoradiography によって解析した。

【結果】 大脳皮質および線条体膜標品での[^{32}P]AAGTPによる Photoaffinity Labeling の結果、Gs-H、Gs、Gi、G_{32} へのGNの結合が確認された (Fig.1)。 次に、Tubulin とG蛋白質との連関について検討した。 Tu-[^{32}P]AAGTPと大脳皮質膜標品とのインキュベーションによって、Giα に[^{32}P]AAGTPの結合を示す放射活性が認められ、Giα への[^{32}P]AAGTPの結合は添加した Tu-[^{32}P]AAGTPの量に応じて増加した (Fig.2-b、c)。同様の実験を線条体膜標品を用いて行った結果、Giα およびGsα に[^{32}P]AAGTPの結合が認められた (Fig.2-g、h)。さらに、予め UV photolysisを行い Tubulinへの[^{32}P]AAGTPの結合を不可逆的にした Tu-[^{32}P]AAGTPや、GppNHpを負荷した膜標品を用いた場合には Giαあるいは Gsα への[^{32}P]AAGTPの結合は認められなかった (Fig.2-d、e、i、j)。 次に Tu-GppNHpによるAC活性の調節について大脳皮質膜標品を用いて検討した。中枢神経系ACで特徴的なことは、膜標品に GppNHp やGTPγSのような非水解性 GTP類似体を比較的低濃度 (～ 3×10^{-6} M)、一定の条件下で作用させた際、AC活性が持続的に抑制されることである。Fig.3 に示したように10^{-7}～2 $\times10^{-6}$ MのGppNHpの処置によってAC活性は最大で約34% の抑制を生じた。同様の実験をTu-GppNHp を用いて行った結果、AC活性の抑制の程度はやや低かったが (約 29%)、GppNHpを用いた場合と同様に、Tu-GppNHp によってAC活性の持続的な抑制が生じた (Fig.3)。 次に、Tu-GppNHp によるDopamine D_2受容体親和性の調節について、線条体膜標品を用い、[^{3}H]spiperone 特異的結合の Dopamine による置換曲線から検討した。 Fig.4 に示したように、Dopamineによる[^{3}H]spiperone 結合の置換曲線は 10^{-6} M の Tu-GppNHpによって右方に移動し、この右方移動の程度は 10^{-6} M のGppNHpを単独で加えた場合とほぼ同程度であった。

【考察】 Tu-[^{32}P]AAGTP と大脳皮質あるいは線条体膜標品とのインキュベーションによって、Tubulin に結合していた[^{32}P]AAGTPは膜標品中のGiα あるいはGsα へと結合し、Tubulin からG蛋白質へのGNの転移が示めされた (Fig.2)。 このGNの転移反応は、Tubulin とG蛋白質との直接的な会合を介して生じていることが示唆されている[3,4]。大脳皮質では、Rasenick and Wang [3]の報告と一致して、GNはTubulin から主としてGiα へ転移された (Fig.2)。 一方、線条体ではGiαとGsαへのGNの転移が認められた (Fig.2)。GN ([^{32}P]AAGTP)

自体のG蛋白質への結合では大脳皮質と線条体との間で大きな差異はみられない（Fig. 1） ことから、このことは、Tubulin とGs との会合親和性が大脳皮質と線条体との間で異なっていることを推測させる。 Tubulin とGiとの連関を介したGiαへのGNの転移の結果、Gi 機能は活性化される。実際、GppNHpを単独に加えた場合と同様に、Tu-GppNHp によるAC活性の抑制がみられた（Fig. 3）。 さらに、GNの転移によって活性化されたGi とD$_2$ 受容体との共役を反映して、[^{3}H]spiperone 特異的結合のDopamineによる置換曲線は右方移動した（Fig. 4）。これらの結果は、Gi との連関によるGNの転移を介して、Tubulin がAC活性や受容体親和性の調節に関与していることを示唆している。Tubulin が細胞情報伝達系の制御に関与していることの生理的意義についてはまだ不明な点が多い。しかしながら、老化などに伴って、Tubulin が構成成分である細胞骨格系の機能変化と、神経伝達物質に対する細胞応答の変化の生じることから、両者の変化に関連性のある可能性が考えられる。今後、これらの点について検討を加える。

【文献】 1) Chatterjee T.K., Scott C.E., Vazquez D.M., and Bhatnagar R.K. (1988) Mol. Pharmacol. 33, 402-413. 2) Hatta S., Marcus M.M., and Rasenick M.M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5439-5443. 3) Rasenick M.M. and Wang N. (1988) J. Neurochem. 51, 300-311. 4) Wang N., Yan K., and Rasenick M.M. (1990) J. Biol. Chem. 265, 1239-1242.

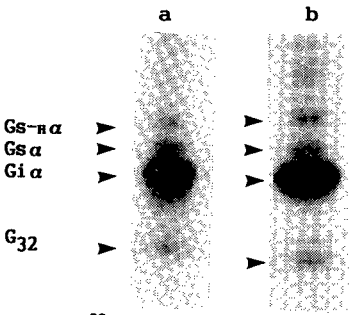


Fig. 1 [^{32}P]AAGTP photoaffinity labeling of rat cerebral cortical (a) and striatal (b) membrane. Membranes were incubated with 10^{-7} M [^{32}P]AAGTP for 3 min at 23 C, and then washed by centrifugation. The washed membranes were subjected to UV photolysis. The labeling of [^{32}P]AAGTP was analyzed by SDS/PAGE and autoradiography.

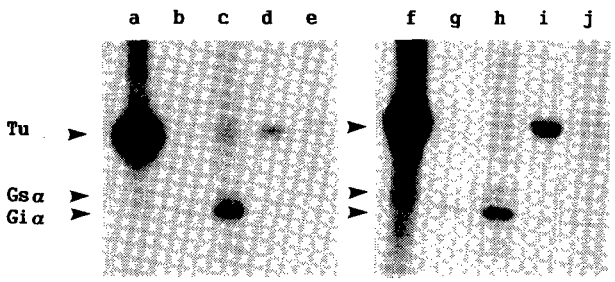


Fig. 2 Transfer of nucleotide from tubulin (Tu) to G proteins. Rat cerebral cortical (lane b-e) or striatal (lane g-j) membranes were incubated with 2 μg (lane b and g) or 10 μg (lane c-e and h-j) of Tu-[^{32}P]AAGTP for 3 min at 23 C and those membranes were washed and resuspended for photoaffinity labeling. Tu-[^{32}P]AAGTP was irradiated for 5 min prior to incubation with membranes (lane d and i). Membranes were incubated with 10^{-4} M GppNHp for 3 min at 23 C prior to incubation with Tu-[^{32}P]AAGTP (lane e and j). After UV irradiation, quenching and washing, 30 μg of membranes were subjected to SDS/PAGE and autoradiography. Ten μg of Tu-[^{32}P]AAGTP was UV irradiated and subjected to SDS/PAGE in lane a and f.

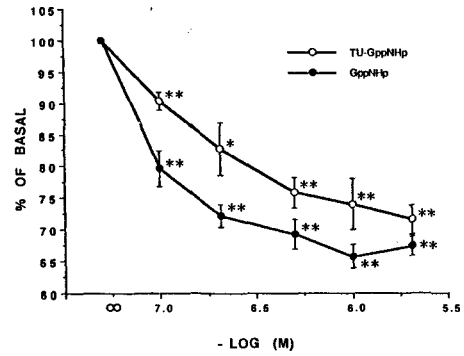


Fig. 3 Inhibition of adenylate cyclase (AC) subsequent to incubation of Tu-GppNHp or GppNHp with rat cerebral cortical membranes. Membranes were incubated with the indicated concentration of Tu-GppNHp or GppNHp. After 3 min of incubation at 23 C, the membranes were washed twice, resuspended, and AC was assayed at 23 C for 10 min. The values are mean±SEM of four experiments. *, **: P<0.05, P<0.01 compared with the basal activity.

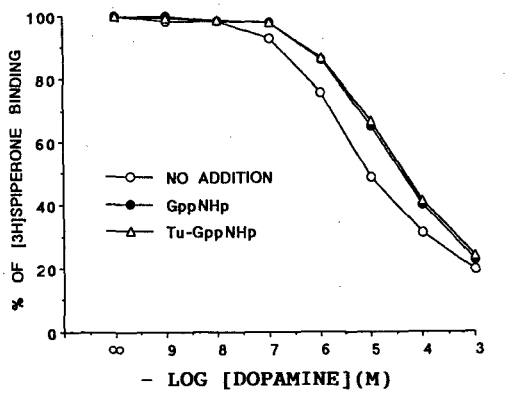


Fig. 4 Competition curve of dopamine on [^{3}H]spiperone binding in the absence or presence of GppNHp (10^{-6} M) or Tu-GppNHp (10^{-6} M) in rat striatal membranes. The concentration of [^{3}H]spiperone used was 0.5 nM. The values are mean(±SEM) of four experiments.

239 ヒト死後脳における加齢に伴うＧＴＰ結合蛋白質の変化

橋本恵理[1]、小澤寛樹[1]、片村能也[1]、斎藤利和[1]、八田慎一[2]、P. Riederer[3]、高畑直彦[1]
[1]札幌医科大学神経精神医学講座・[2]薬理学講座，[3]Wurzburg大学精神医学講座

〔要約〕
ヒト死後脳におけるＧＴＰ結合（Ｇ）蛋白質の加齢に伴う変化について検討した。immunoblottingでは加齢に伴う変化としてGiα, Gqα subunitに対する免疫反応性の減少が認められた。機能面からの評価のために行なった photoaffinity GTP [azidoanilido GTP (AAGTP)] 結合実験ではGsα, Gi/oα subunit 相当領域の結合量は加齢により漸減傾向を示したものの有意な相関は認められず、またGsαとGi/oαの AAGTP 結合量の比はほぼ一定であった。これらの結果から、ヒト死後脳では加齢に伴うＧ蛋白質の量的変化に対して機能面で何らかの代償性、補償性の調節が働いていることが示唆された。

[目的]
Youngらは、ヒト死後脳におけるＧ蛋白質について、加齢に伴う変化としてparietal cortexのGsα及びGiα subunit の減少を(4)、また躁鬱病患者においてfrontal, occipital cortexのGsα subunit の増加を報告している(5)。しかしながらヒト組織におけるＧ蛋白質レベルでの変化については未だ確立されておらず、その詳細については不明な点も多い。今回我々は、老化に関連する種々の疾病病理過程を考えるうえでの基礎実験として、ヒト死後脳を用いて 生理的加齢におけるＧ蛋白質の量及び機能の検討を行なった。
[方法]
２１才から８９才までの精神神経疾患の既往のないヒト死後脳膜標本(frontal cortex, temporal cortex, parietal cortex, occipital cortex, caudate nucleus, amygdaloid body)を実験に用いた。
Gel-electrophoresis and immunoblotting: 10%SDSポリアクリルアミドゲルにて蛋白質電気泳動(PAGE)後、ニトロセルロース膜に転写し、5000倍に希釈したＧ蛋白質の抗体(Gsα, Giα, Goα, Gqα, β subunit に対しそれぞれ RM/1, AS/7, GC/2, QL, SW/1)を用いて免疫染色した。検出システムとしてECL(Enhanced Chemiluminescence;Amersham)法を用いた。
Photoaffinity labelling: [^{32}P]-AAGTPは Pfeuffer(2) 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。膜標本を[^{32}P]-AAGTPと1mM $MgCl_2$を含む2mM HEPES(pH 7.4) buffer 中で23℃, 5分間インキュベートした。インキュベート後、同bufferにて洗浄、遠心し、次いで UV を５分間照射した後、4mM 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、SDS-PAGE を行ない、次いでオートラジオグラフィーを行なった。
Adenylate cyclase (AC) assay: [^{32}P]-ATP を基質として用い、Salomon(3) の方法に従って測定した。
[結果及び考察]
immunoblotting では、いずれの領域においても加齢に伴う変化としてGiα, Gqα subunit に対する免疫反応性の明らかな減少が認められた。他のＧ蛋白質(Gsα, Goα, β subunit) では有意な変化傾向は認められなかった(Fig. 1)。AAGTP 結合実験ではGsα, Gi/oα subunit 相当領域の AAGTP 結合量は加齢により漸減傾向を示したが有意な相関は認められず(Fig. 2)、また GsαとGi/oα の AAGTP 結合量の比はほぼ一定であった。temporal cortex で測定したAC値も年齢による差異は認められなかった(Fig. 3)。これらの結果より、加齢に伴ったＧ蛋白質の量的変化（特に Giα, Gqα の減少）が認められたものの、それが直接機能的変化に結びついておらず、何らかの代償性、補償性調節が働いていることが示唆される。即ち、個体におけるＧ蛋白質の役割を評価する際に、各Ｇ蛋白質間の機能的バランスを考えることが重要と思われる。

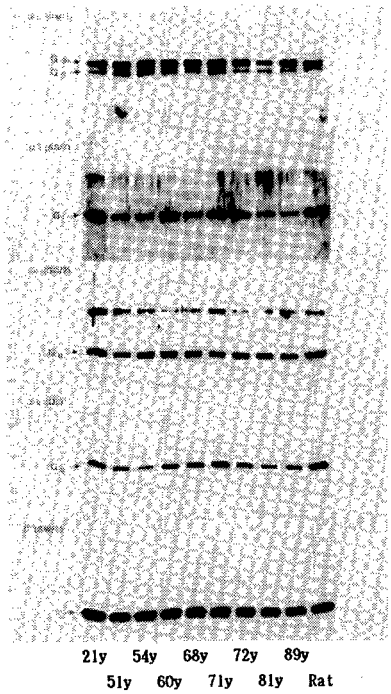


Fig. 1. Immunoblots for specific G protein subunits in human occipotal cortex membrane.

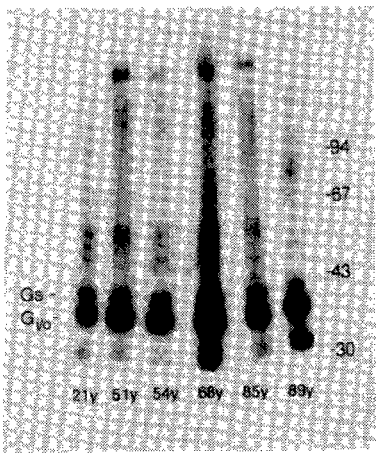


Fig. 2. AAGTP binding autoradiogram in human occipital cortex membrane.

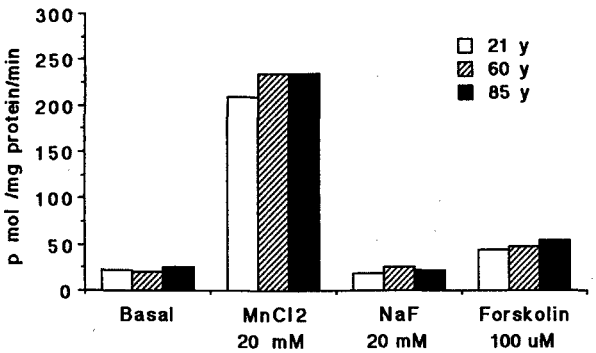


Fig. 3. Alterations of AC activity with aging in human temporal cortex membrane.

[文献]

1. Gordon, J. H. and Rasenick, M. M. (1988) FEBS Lett. 235, 201-206
2. Pfeuffer, T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7224-7234
3. Salomon, Y. (1979) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 10, 35-54
4. Young, L. T. et al (1991) Dev. Brain Res. 61, 243-248
5. Young, L. T. et al (1991) Brain Res. 553, 323-326

240 G蛋白質γサブユニットの多様性とその生理活性

森下理香、加藤兼房、浅野富子
（愛知県コロニー・研・生化）

〔要約〕G蛋白質のγサブユニットを変性下で精製するとウシ脳より３種類、肺、脾臓よりそれぞれ５種類が単離されるが、脳のγのうち２種類は肺、脾のγと共通であった。脳の３種と肺、脾の主なγはすべてゲラニルゲラニル化されていた。つぎに非変性下でウシの脳よりγの異なる３種類のβγサブユニット複合体（βγ-b1、βγ-b2、βγ-b3）を分離精製した。またウシの脾より脳には存在しないγをもつβγ複合体（βγ-s）を１種類精製した。これらのβγはどれもγとして単一で、βはβγ-b2とβγ-b3ではほとんど36 kDaβのみで、βγ-b1とβγ-sでは35 kDaと36 kDaのβの混合物であった。これら４種類のβγ複合体と、網膜に特異的なγと36 kDaβから成っているトランスデューシンのβγ複合体（βγ-t）を用い、その生理活性を比較検討した。百日咳毒素によるGoのαサブユニットのADP-リボシル化はどのβγによってもほぼ同程度に促進された。カルモジュリン依存性アデニル酸シクラーゼに対するβγの阻害効果を、ラットの網膜膜標品を用いて調べると、カルモジュリン依存性の活性が脳と脾のβγによって完全に阻害されたが、βγ-t はわずかな阻害しか示さなかった。ラット網膜膜標品へのβγの結合を調べると、βγ-t は他のβγに比べはるかに少ないので、アデニル酸シクラーゼ阻害の差の一部は、βγの膜への結合のしやすさの差を反映しているものと考えられる。

G蛋白質はα、β、γの3つのサブユニットから構成されているが、βとγは生理的条件下では常に結合した状態で存在している。βγは、機能の中心と考えられているαの濃度調節の役目以外に、アデニル酸シクラーゼ、ホスホリパーゼ、K^+ チャンネルなどの効果器に直接作用することが示されてきた。βは35 kDaと36 kDaの２種類の蛋白質しか見いだされていないが、γは少なくとも５種類の存在が認められている。γはC末端にイソプレニル化の修飾を受けており、トランスデューシン（Gt）のγにはファルネシル基（C_{15}）が、脳の一部のγにはゲラニルゲラニル（GG）基（C_{20}）が結合している(1,2)。我々はγの多様性を検討するためすでに、ウシ脳、肺、脾臓の各γサブユニットを変性下で解析し、一部のγのC末端修飾も明らかにした（図１参照）(3)。そこで今回、まず、また明らかにされていないγについても、イソプレニル化されているかどうかを調べた。ついで、γの異なるβγ複合体を非変性下で精製し、その生理活性の差異を検討した。

［実験方法］

<u>βγの精製</u>：βγ-t はウシ網膜よりFukada らの方法で精製した(4)。ウシ脳および脾からのβγの精製は、組織膜標品のコール酸抽出液を調製後、DEAE、ゲルろ過、Heptylamine-Sepharoseの各クロマトグラフィーを順次行った。γの異なるβγの分離は、phenyl-5PWおよびDEAE-5PWクロマトグラフィーで行い、脳より３種類、脾より脳には存在しないγを含むβγを得た。<u>γの精製</u>：精製βγを逆相HPLCにかけると、図１のようにγが溶出された。このカラムからβは溶出されなかった。<u>γのC末端修飾の解析</u>：γをRaney-Nickelで還元したのち、遊離したイソプレノイドをペンタンで抽出しこれをガスクロマトグラフィー/質量分析計（GC/MS）で解析した。<u>カルモジュリン（CaM）依存性アデニル酸シクラーゼ</u>：ラット網膜の膜標品の調製はSanoらの方法(5)に準じて行い、ついでGTPを含む緩衝液で数回洗浄した。アデニル酸シクラーゼ活性は30°C、10分行い、産生されたcAMPをRIAで測定した。反応液中の膜結合および遊離のβγの測定は遠心して膜標品と上清に分け、膜標品はコール酸で可溶化したのち、イムノアッセイで測定した。

［結果］

ウシ脳、肺、および脾から精製したβγを逆相HPLCにかけると、図１のように複数のγが溶出され、どの組織でも主要なγ（B2, L5, S5）は同一であった(3)。またB1, L2, S2も同一と思われる。一方、肺と脾は同じ種類のγを含んでいると考えられる(3)。B1, B2, L5, S5はC末端がGG化されていることが判明している(2,3)。そこで、脳に特異的なγ（B3）、肺や脾にのみみられるγ（L1, S1）もイソプレニル化されているか、されているならファルネシル化かGG化かを明らかにするため、これらのγをRaney-nickelで還元し、GC/MSで分析した。すでにGG化されていることが判明しているB2を同時に分析した。図２に示すようにすべてGG化されていた。

このようなγの多様性の意義を検討するため各種γの生理活性を比較した。非変性下ではβとγは複合体の形で存在するので、これら４種類のγをもつβγ複合体をウシ脳および脾から分離精製した。その結果、B1, B2, B3, S1をそれぞれもつβγすなわちβγ-b1, βγ-b2, βγ-b3, βγ-sを単離した。これらのβγはγとしては単一で、βはβγ-b2とβγ-b3ではほぼ36 kDaβのみであるが、βγ-b1とβγ-sでは35 kDaと36 kDaの混合物であった。さらに36 kDaβと網膜に特異的なγから成るGtのβγ-tも精製し、５種類のγの異なるβγを用いて比較した。これらβγが百日咳毒素によるGoαのADP-リボシル化反応に与える影響を調べると、図３のようにβγ-t がわずかに低い値を示したが、他はどれもほぼ同程度の効果であった。つぎにCaM依存性アデニル酸シクラーゼに対するβγの阻害効果を、ラット網膜膜標品を用いて調べると、CaM依存性の活性が脳と脾のβγによって完全に阻害されたが、

βγ-t ではわずかしか阻害しなかった（図4）。このとき加えたβγのラット網膜膜標品への結合を調べると、脳や脾のβγは加えた量の約50%が結合しているのに対し、βγ-t は10%しか結合していなかった。

［考察］

γサブユニットは少なくとも5種類蛋白質として精製され、そのC末端修飾が明らかにされた。Gtのγのみがファルネシル化されており、他のG蛋白質のγはすべてGG化されていた。これらのγの機能的な差を検討するためには非変性下で精製する必要があるが、この場合、常にβが結合したβγ複合体で存在するため、生理的な実験はβγとして行わなければならない。従って、得られた結果はβの影響もあることは当然である。しかし、今回用いたβγのうちβγ-t、βγ-b2、βγ-b3 はどれも36 kDaのβのみをもっており、Gtのβと脳の36 kDaβはおそらく同一と考えられているので、少なくともこの3種類のβγに関しては、γのみが異なっていると考えられる。CaM依存性アデニル酸シクラーゼに対する阻害作用で、βγ-t が他のβγと比べ著しく弱かったのは、一部は、膜結合性が弱いためと考えられる。これはファルネシル基とGG基の差が大きく関与していると想像される。βγ-t は他のβγの1/5位しか膜に結合しないが、その阻害効果は1/100程度であるので、βγ分子自身の阻害効果も他のものより弱いと考えられる。今回の結果では脳、脾の4種類のβγ間には明かな差がみられなかった。今後は受容体との共役など他の系においてこれらのβγの作用を比較したいと考えている。

本研究は、深田吉孝、松田孝彦（京大・理）、吉澤透（電通大）、丹羽正武、益田勝吉（名城大・薬）の諸氏との共同研究である。

［文献］1) Fukada, et al. (1990) Nature 346, 658. 2) Yamane, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. sci. USA 87, 5868. 3) 森下ら (1991) 生化学 63, 891. 4) Fukada, et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 5937. 5) Sano (1985) Brain Res. 345, 337.

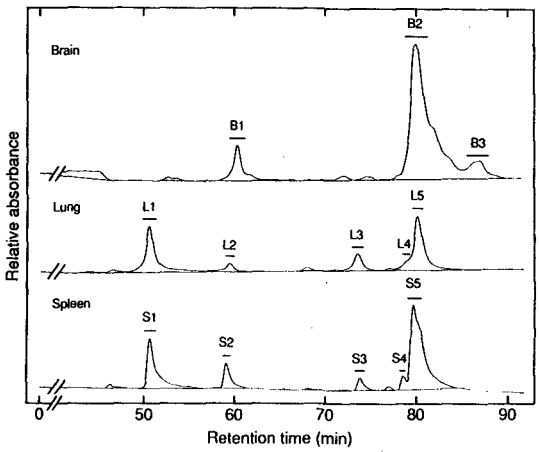


図1　逆相HPLCによるβγ複合体からのγの単離。溶出曲線は 214 nm の吸光度。

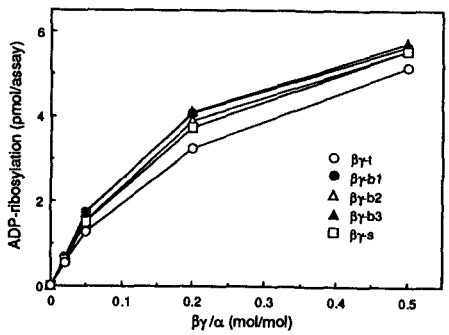


図3　百日咳毒素によるGoαのADP-リボシル化に対する各種βγの影響

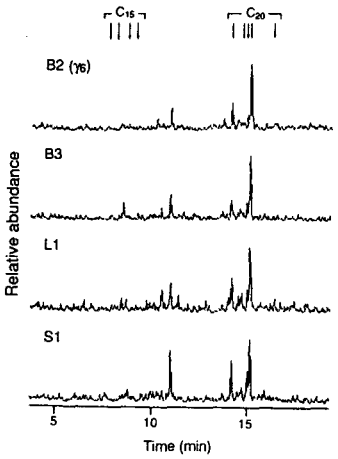


図2　種々のγからRaney-nickelで遊離してきた物質のGC/MS による分析。m/z 69 のイオンを検出。authentic standardのC15-とC20-イソプレノイド（cis-trans isomerの混合物）のピークを最上段に矢印で示した。

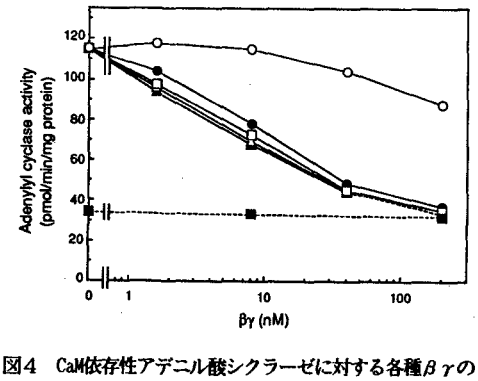


図4　CaM依存性アデニル酸シクラーゼに対する各種βγの影響。（○, ●, △, ▲, □）CaM + $CaCl_2$ + βγ, （■）CaM + EGTA + βγ-b2。シンボルは図3に同じ。

241

ウシ副腎クロマフィン細胞における百日咳毒素による分泌促進作用

大島岳夫　二宮光義　郷保正
塩野義製薬（株）研究所

[要約]

ウシ副腎クロマフィン細胞を百日咳毒素（PTX）で処理すると三種類のG蛋白がADPリボシル化されると同時に各種刺激に対するカテコールアミン（CA）放出が増強されることが知られている（1、2）。そこで、さらにCA分泌におけるPTXの影響について検討し、次のような結果を得た。1.クロマフィン細胞をPTXで処理するとアゴニスト特異的にCA放出が促進され、脱分極性の刺激に対して強い促進作用が見られた。2.このCAの放出促進は細胞外Ca^{2+}依存性であり、新規の蛋白の合成を伴うことによるものでも、cAMPを介する系やPTXによる細胞膜の直接的な刺激によるものでもない。3.Patch-clamp法によって脱分極時のCa^{2+}電流を測定したところ、刺激時の全体のCa^{2+}電流の大きさはPTX処理非処理に関わらず変化がなかったが、N型様の早く減衰する成分が増加していた。4.脱分極刺激に対するL型Ca^{2+}チャンネルブロッカー結合活性の上昇がPTXの処理により減少した。5.脱分極刺激に対するCA分泌はL型チャンネルブロッカーにより用量依存的に阻害されるが、PTX処理による分泌促進部分は阻害されなかった。この一部はN型チャンネルブロッカーであるω-コノトキシンで阻害された。これらの結果はクロマフィン細胞のCa^{2+}チャンネルはPTX感受性のG蛋白によって調節されており、PTX処理後に見られるチャンネルの変化は分泌促進の一部に関与している可能性が考えられる。

[結果]

<u>各種刺激によるCA放出に対するPTXの影響</u>

細胞をPTXで処理すると刺激依存性のCA放出が増大したが、その程度は刺激の種類により大きな差があった。最も強力な促進はヒスタミンとブラジキニンで、続いてニコチンと高K^+刺激であり、フォルボールエステルやイオノマイシンによる刺激ではCAの分泌促進は顕著ではなかった。また、permeabilizeした細胞のCa^{2+}刺激に対する分泌もPTXによる促進を余り受けなかった。ヒスタミンやブラジキニンはPLCを活性化するが細胞の脱分極も引き起こし、L型Ca^{2+}チャンネルを活性化する（3）。高K^+刺激とニコチンは膜電位依存性のCa^{2+}チャンネルを活性化する。つまり、PTXによる分泌促進は脱分極刺激によるCa^{2+}チャンネルの活性化を起こす刺激で強く見られ、Ca^{2+}チャンネルを活性化しない刺激では分泌促進は弱いものであった。

<u>PTX処理による分泌促進の性質</u>

分泌促進はPTXのAプロトマーまたはBオリゴマー単独では見られず、AプロトマーとBオリゴマーを再構成したものにのみ分泌促進が見られた。このPTXによる分泌促進は高K^+刺激とヒスタミンのいずれの刺激でもPTX添加後2時間から観察され、6時間でプラトーに達し、その後16時間以上維持された。また、この分泌促進は転写阻害剤であるアクチノマイシンDや翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドなどで阻害されなかった。つまり、作用発現には数時間を要するが、PTXによる分泌促進は新たな蛋白合成とは無関係であり、PTX感受性のG蛋白のリボシル化によって細胞内に備わった構成要素が機能的な変化を受けたためであると考えられる。

<u>PTXのCa^{2+}電流に与える影響</u>

PTX処理後の分泌促進には細胞外液のCa^{2+}を絶対的に必要とする。また、クロマフィン細胞ではCa^{2+}チャンネルの活性化がCA分泌と強く結び付いていることが知られていることから（3,4）、PTXがCa^{2+}チャンネルの性質に変化を与え、その結果として分泌を促進する可能性がある。そこでPatch-clamp法を用いてPTX処理がCa^{2+}チャンネルに及ぼす影響を検討した。PTX非処理細胞ではholding potentialである-80mVから約0mVまで脱分極

させると内向きのCa^{2+}電流が観察された。この電流は二相性で始めに早く減衰する成分とゆっくりと減衰する成分で構成されていた。細胞をPTX処理した時の最も著名な変化はCa^{2+}電流の形であり、全体のCa^{2+}電流の大きさには殆ど変化がなかったが早く減衰する成分が増加した。また、このPTX処理により増加する早く減衰する成分はω-コノトキシンに感受性があり、ゆっくりと減衰する成分はニカルジピンに感受性があったので、それぞれN型様、L型チャンネルであると判断された。

PTXのCa^{2+}チャンネルブロッカー結合活性に与える影響

PTX処理によるL型 Ca^{2+}チャンネルの性質の変化を調べるためにジヒドロピリジン型Ca^{2+}チャンネルブロッカーのPN200-110の結合活性について調べた。PTX非処理細胞では無刺激に対してヒスタミン、高K^{+}刺激した時にPN200-110の結合活性は上昇する。しかし、PTX処理するとそれぞれの刺激状態でのPN200-110結合活性の上昇が減少した。これらのことはPTX処理によりL型Ca^{2+}チャンネルの刺激応答性が低下していることが考えられる。

CA分泌におけるCa^{2+}チャンネルブロッカーの影響

つぎにCA分泌に対するCa^{2+}チャンネルブロッカーの影響を調べた。高K^{+}刺激やヒスタミン刺激時にはニカルジピンやベラパミルは用量依存的にCA分泌を阻害するが、その阻害の程度はPTX処理非処理に関わらず変化はなかった。即ち、PTX処理後に増大した分泌はこれらのL型チャンネルブロッカーに耐性であると思われた。N型Ca^{2+}チャンネルブロッカーであるω-コノトキシンはPTX非処理細胞ではCAの分泌には余り影響を与えなかったが、PTX処理細胞での刺激依存性の分泌の一部を抑制した。即ち、PTXによって促進されたCA分泌の一部はω-コノトキシン感受性であると推察された。

[結論]

PTX処理後に見られる刺激依存性のCA放出促進はG蛋白のリボシル化を介した機能的な変化によるものと考えられた。このPTXによる分泌促進は膜電位依存性Ca^{2+}チャンネルを活性化する刺激で強いこと、PTX処理がN型様のCa^{2+}電流の成分を増加させること、ω-コノトキシンがCA分泌促進の一部を阻害することなどを考えあわせると、PTXによる分泌促進の少なくとも一部はG蛋白を介した膜電位依存性のCa^{2+}チャンネルの修飾、即ち、N型様Ca^{2+}チャンネルの活性化が関与している可能性がある。

[文献]

1. Tanaka, T,. Yokohama, H., Negishi, M., Hayashi, H., Ito, S., and Hayaishi, O. (1987) *Biochem. Biophy. Res. Comm.* 144, 907-914
2. Sontag, J.M., Thierse, D., Rout, B., Aunis, D., and Bader, M.F. (1991) *Biochem. J.* 274, 339-347
3. Goh, Y., and Kurosawa, A. (1991) *J. Neurochem.* 57, 1249-1527
4. Burgoyne, R.D., (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1071, 174-202

242 笑気鎮痛の耐性発現と細胞内情報伝達系変化

田和聖子、石川敏三、重冨美智男、仲西　修、坂部武史
（山口大学医学部麻酔・蘇生学教室）

〔要約〕

ラットを用い、N2O 鎮痛効果およびその耐性発現に関与する局所脊髄、脳の細胞内情報伝達系変化について、in vitro autoradiographyにより検討した。N2O (75%) の初回吸入後鎮痛効果（tail-flick潜時：%MPE）は30分で最大75%、2時間で40% であった。吸入停止1時間後に再吸入させた場合対照と差がなく、耐性が発現した。初回吸入2時間では、^{3}H-clonidine 結合（alpha-2 receptor）は脊髄後角（SC）で対照に比べ150%、視床で16% 高値であった。^{3}H-GTP 結合は変化しなかったが、^{3}H-forskolin 結合（adenylate cyclase系）はSCで20% 低値であった。再吸入2時間後には ^{3}H-forskolin 結合が中脳周囲灰白質で12% 低値となった以外はすべて対照群と差がなかった。以上から、ラットによるN2O 鎮痛には耐性が発現し、この場合効果発現時にみられた脊髄後角におけるalpha-2 受容体活性亢進とadenylate cyclase 系抑制が修復することが分かった。

【はじめに】　最近、麻酔薬・鎮痛薬の効果発現機序において、受容体活性のみならずGTP 結合蛋白質やセカンドメッセンジャーなど細胞内情報伝達系の果たす役割が注目されている。たとえば、最も研究されているmorphineをはじめopioidの鎮痛作用には、ポリモーダル受容器の刺激や侵害刺激によるsubstance P 遊離の抑制作用のほか、最近では脊髄や下位脳幹におけるμおよびalpha-2 受容体と共役するGTP 結合蛋白質[1]やadenylate cyclase （ＡＣ）活性の抑制作用が関与すると[2]報告されている。さらに、しばしばその効果は耐性発現がみられるが、この場合μ受容体活性のdown-regulation のみならず、pertusis toxin sensilive G-protein（Gi）のADP リボシル化が関与することが示唆され[3]、注目されている。morphine同様、強力な鎮痛作用を有する笑気（N2O）にも耐性が発現することが報告されているが、その作用機序についてはほとんど知られていない。そこで、本研究ではN2O 鎮痛の耐性発現におけるalpha-2 受容体、GTP 結合蛋白質およびＡＣ系の変化について、in vitro autoradiographyにより検討した。

【実験方法】　ウイスター系雄ラット（250-350g）を用いた。鎮痛効果を検討する実験では、ラットを対照群とN2O 群とし、プラスチック製箱の中に入れ空気（N2:75%, O2:25%）を吸入させ安静な状態とした。N2O 群ではN2O （75%）を初回吸入2時間後、一度吸入を停止し、再吸入を2時間行った。各吸入期間で15、30、60、90、120分にtail-flick潜時（Cut off 時間は10秒）を測定し、その評価判定には%MPEを計算した。対照群では空気を5時間吸入させ、N2O 群と同じ時間に測定した。細胞内情報伝達系を検討する実験では、ラットをN2O 初回吸入2時間後および再吸入2時間後で断頭する群、および空気吸入2時間後、5時間後に断頭する（対照）群に分けた。断頭後は脳を凍結し、クリオスタットを用いて脊髄および脊髄上位の凍結組織切片（20um）を作成したのち、真空乾燥させた。受容体結合実験は以下のようにin vitro autoragiogfraphy で行った。^{3}H-clonidine（^{3}H-CLO）結合は、室温でKrebs-phosphate buffer(pH7.4, 100uM Na, GTP 含む）でpreincubation したのち、1 nM ^{3}H-CLO を含む0.17M tris HCl(pH7.6, 10 mM MgCl2)) でincubationした。洗浄と乾燥ののち、4℃ で4週間 ^{3}H-Hyperfilm に ^{3}H-microscaleと共に感光させた。得られたautoradiogram はコンピュータを接続した画像解析装置で特異的結合(fM/ug) を測定した。^{3}H-GTP 結合は、50 mM tris-HCl(pH7.9, 2.5mM MgCl2, 1mM EDTA, 0.1% Lubrol PX, 0.01%PEI)でpreincubation したのち、室温でPEI を除く400 nM ^{3}H-GTP を含む同一bufferでincubationした（4日間の感光）。^{3}H-forskolin 結合（^{3}H-FRS)は、10 nM ^{3}H-FRS を含む50 mM tris HCl(pH 7.7, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl2)でincubationした（2週間に感光）。局所部位は、脊髄後角（Rexed I-II: SC)，青斑核(LC)、中脳水道灰白質(PAG)、延髄巨大細胞網様核(Gi)、延髄傍巨大細胞網様核(PGi)、視床後核(To)、大脳皮質(CT)について測定した。測定結果の統計は、一元配置分散分析を行い、有意なものについては最小有意較差法で多重比較した（$p < 0.05$を有意とした）。

【結果】　N2O の鎮痛効果：図1にN2O 吸入後の鎮痛効果（%MPE）を対照群と比較して示す。対照群では、測定期間中（5時間）変化しなかったが、N2O 吸入では30分で75%、120 分では40% であった。吸入停止後は30分以内に元に戻り、その後再吸入では最高14% となったが対照群と比べ有意でなかった。細胞内情報伝達系：対照群

における各受容体結合の中枢神経系内分布はほぼ従来の報告と符合していた。^{3}H-CLO 結合は、LC, PAG, SC の順に、^{3}H-GTP 結合はSC, PAG , LCの順に、また ^{3}H-FRS 結合はCT, LC, PAG の順に高値であった。N2O 初回吸入では、SCで ^{3}H-CLO 結合は50% 増加し、^{3}H-GTP 結合は変化しなかったが、^{3}H-FRS 結合は20% 減少した。Toで ^{3}H-CLO 結合が20% 増加したが他の受容体結合は変化しなかった。一方、再吸入ではSCの変化は対照と差がなくなり、PAG の ^{3}H-FRS 結合が12% 減少したのみであった（最も変化の著しかったSCの結果について表１に示す）

【考察】　われわれは、N2O の鎮痛効果はnaloxoneで拮抗されず、脊髄後角および青斑核のalpha-2 受容体の活性亢進が関与すること（未発表）、また鎮痛効果は耐性が発現し、この場合脊髄後角のsubstance P (SP)の放出抑制の修復が関与することを明らかにしてきた[4]。本研究ではさらにN2O 鎮痛の耐性発現における局所脊髄、脳についてalpha-2 受容体の活性と細胞内情報伝達系の変化について、^{3}H-CLO 、^{3}H-GTP および ^{3}H-forskolin をプローベとするin vitro autoradiographyにより、詳細に検討したものである。本研究から、N2O の最初吸入では脊髄後角でalpha-2 受容体の活性亢進とＡＣ系の抑制を起こすが、再吸入によりこれらは修復することが分かった。このことは青斑核や脊髄後角に局在するalpha-2 受容体が侵害刺激情報伝達の調節に関与することが知られており、本結果はN2O 鎮痛の耐性発現にalpha-2 受容体活性の亢進およびsecond messenger系の抑制が起きたものと考えられる。この中で、^{3}H-forskolin の結合については強力なＡＣの活性剤であるところから、その結合は酵素の触媒単位に高い親和性を有し、ＡＣの酵素活性型の反応を示すとされており、Giと共役したalpha-2 受容体の活性抑制と連鎖した反応かどうかは不明であるが、本研究でN2O の最初吸入により ^{3}H-forskolin が20% 減少したことは、その説明にＡＣ系の構成成分の合成抑制あるいは構成成分の分解抑制を起こしたことが考えられる。一方ではNAがβ受容体に作用し、そのalpha-2 との競合により活性型ＡＣ系の抑制が起きたことも推察されるが、本研究からでは明らかでない。また、morphine の慢性投与による鎮痛効果の耐性にはG(i)結合蛋白質の ADPリボシル化が起きることが知られているが、本研究で検討した ^{3}H-GTP 結合ではN2O 吸入で変化しなかった。このことは、morphineとは異なる機序が働いているのか、あるいは ^{3}H-GTP 結合はGi, Go, Gs結合蛋白質の複合として表されるので、著しい変化でなければGiだけを同定できなかったためと考えられる。このように、N2O 鎮痛の場合細胞内情報伝達には著しい変化を起こさなかったことは、その機序がopioid鎮痛と異なるためかも知れない。以上のことから、N2O 鎮痛の耐性発現では、脊髄後角におけるalpha-2 受容体の低下およびsecond messenger 系抑制の修復が関与した可能性がある。Ishikawa[4] は、同様なモデルを用いN2O 鎮痛の耐性発現には、脊髄後角substance P の放出量抑制作用の修復が関与することを示したが、今回の結果からalpha-2 受容体の活性低下がsubstance P のシナプス前抑制を減弱させたため起きたものと考えられる。

【参考文献】 1) Aghajanian GK etal: Brain Res (1986) 371:390, 2) Tirone F etal: Biochem Pharm (1988) 37:1039, 3) Wong CS, etal: Anesthesiology (1990) 73:716, 4) Ishikawa T: J Neurosurg Anesth (1989) 1:316

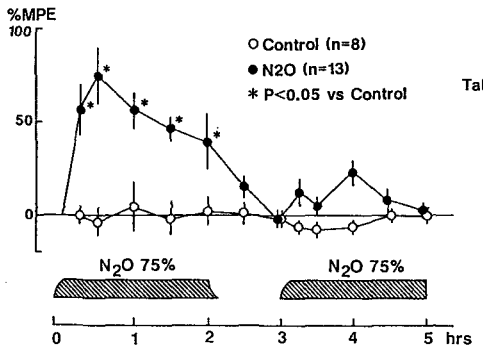


Fig. 1.

Table 1. Effects of nitrous oxide (75%) on intracellular signal transducing system in the rat spinal cord.

	First exposure 2h		Second exposure 2h	
	Control	Nitrous oxide	Control	Nitrous oxide
^{3}H-clonidine	2.74±0.18	4.18±0.76*	3.87±0.46	4.07±0.44
^{3}H-GTP	7.69±0.19	7.99±0.49	7.69±0.43	8.03±0.40
^{3}H-Folskoline	0.88±0.10	0.69±0.05*	0.87±0.12	1.14±0.10

Values are mean±SEM (fmol/ug)
*Significantly different from control ($p<0.05$)

243 C6グリオーマ細胞における ホルボールエステルのタウリン流出促進作用

中村博彦、黄縄好*、高倉公朋*
(都立駒込病院・脳神経外科、東京大学*)

〔要約〕

C6ラッドグリア細胞におけるタウリン(Tau)流出(efflux)に関して、ホルボールエステルを用いてプロテインキナーゼC(Cキナーゼ)の関与の有無を検討した。C6細胞に取り込まれた(^{3}H)-Tauは、phorbor-12, 13-dibutylate (PDBu)を含むKrebs-Hepes液(PH 7.4)により時間、濃度依存性にeffluxが増加し、投与30分後には1μMで最高コントロールの95%まで増加した。Cキナーゼ阻害剤であるH-7 (100 μM)はTauのeffluxに影響を与えないが、30分前に投与するとPDBuによる30分後のTauのeffluxの増加のEC_{50}が37 nMから75 nMに上昇した。Isoproterenol (ISP, 1μM)は30分後にTauのeffluxが73%増加するが、PDBuと併用すると135%増加し相加作用を示した。Ca^{2+}を含まないKrebs-Hepes液を用いると、Tauの$efflux$はCa^{2+}を含む場合より305%増加しISPにより更に68%増加したがPDBuの増加作用は消失した。これらの結果よりC6細胞のTauのeffluxはcyclic AMPをセカンドメッセンジャーとするAキナーゼの系だけでなくCキナーゼを介する系も関与していることが明らかになり、またeffluxが増加する機序についてはそれぞれ異なっている可能性が示唆された。

(目的) タウリン(Tau)はグルタミン酸とともに脳内に豊富に存在するSH基を含む分子量125のアミノ酸であるが、抑制性神経調節因子(inhibitory neuromodulator)、抗痙攣作用、抗オキシダント作用、浸透圧調節因子などの作用が想定されている。グリア及びグリオーマ細胞では、Tauはcyclic AMPの上昇により細胞外への流出(efflux)が促進するが[2,4]、cyclic AMPをセカンドメッセンジャーとするAキナーゼの系とは異なるもう一つの重要な細胞内刺激伝達系を担っているプロテインキナーゼC(Cキナーゼ)のTauのeffluxへの関与について検討した。

(方法) C6細胞を10%胎仔血清(FCS)を含むEagle's minimum essential medium (MEM)で35mmのculture dish (Nunc/AS, Denmark)に培養し、飽和状態に達した後PBSで1回洗浄後37 kBq/mlの(^{3}H)-Tau (740 GBq/mmol、アマシャム・ジャパン)を含む1.5ccのKrebs-Hepes (PH 7.4)液(NaCl 130 mM、KCl 5 mM、$MgSO_4$ 0.5 mM、HEPES 10 mM、$CaCl_2$ 1 mM、D-glucose 5mM)に交換した。60分後に冷PBSで3回洗浄した後再び1.5ccのKrebs-Hepes液に交換し、Tauのeffluxが一定した後(30分後)にphorbor-12, 13-dibutylate (PDBu)、H-7、Isoproterenol (ISP)などの薬剤を含むKrebs-Hepes培養液に交換し、3分おきにHolopainen et al.[1]の方法で細胞外へ流出した(^{3}H)-Tauを測定しコントロール(Krebs-Hepes液のみ)のeffluxと比較した。60分後細胞を1ccの0.5 N NaOHで溶解して細胞内に残存した(^{3}H)-Tauを測定し細胞内に取り込まれた(^{3}H)-Tauの量を計算した。Ca^{2+}を含まないKrebs-Hepes液は、$CaCl_2$ 1m Mの代わりに3 mMのSourceを用いて浸透圧を一定にした。

(結果) 細胞内に取り込まれた(^{3}H)-Tauは、コントロールのC6細胞では約1%/15分の一定の割合で細胞外に流出し、PDBu (1μM)を投与すると数分以内にeffluxが増加し始め30分後には最大に達した(Fig. 1)。PDBu (1μM)により30分後にはコントロールの95%、ISP (1μM)は73%増加し、PDBuとISPを同時に投与すると135%増加し相加作用を示した(Table 1)。Ca^{2+} (–)の緩衝液を用いるとeffluxがコントロールの約4倍と著しく増加するが、ISPはCa^{2+} (–)の緩衝液でも更に68%増加し相加作用を示すのに対して、PBDuはCa^{2+} (–)の緩衝液では増加作用を示さなかった。Cキナーゼの阻害剤であるH-7 (100 μM)は

(^{3}H)-Tau の efflux に影響を与えないが、PDBu を投与する30分前に投与すると PDBu (1μM) による Tau の efflux の増加の EC_{50} が 37 nM から 75 nM に上昇した (Fig. 2)。

Table 1 Relative taurine efflux from C6 glioma cells at 30 min.

	Ca^{2+} (+)	Ca^{2+} (-)
Control	100±3(%)	405±10
PDBu (1μM)	195±5	382± 8
ISP (1μM)	173±4	473± 9
PDBu + ISP	235±4	458±11

n = 3

(考察) 細胞外からの刺激を細胞内へ伝達する系として、cyclic AMP をセカンドメッセンジャーとする A キナーゼの系とともに C キナーゼを介する系が重要な役割を担っていることが知られているが、本研究でホルボールエステルの刺激により Tau の efflux が増加し、ラット C6 グリオーマ細胞からの Tau の efflux に A キナーゼとともに C キナーゼの系も関与している可能性が示唆された。C6 グリオーマ細胞は S100蛋白が存在するなどグリアの特徴を有しグリア及びグリオーマのモデルとして使用されている細胞であり、星状膠細胞や他のグリオーマ細胞についても同様な系が存在すると推測される。

グリア及びグリオーマ細胞における Tau の efflux と C キナーゼについて言及している報告は少なく、Skwish らがラット LRM 55 細胞でエタノールと diolein により Tau の efflux が増加すると同時に C キナーゼの細胞膜への転位が生じることを示し[5]、Philibert らがラット小脳の astrocyte の primary culture でホルボールエステルを投与すると細胞内の Tau が減少し efflux も減少することを報告しているにすぎない[3]。Philibert らの報告は、今回の実験結果からホルボールエステルにより Tau の efflux が増加したために細胞内の Tau の量が減少し、48時間後には efflux が減少したと推察できる。

ホルボールエステルによる C キナーゼの活性化により Tau の efflux が増加する機序については不明であるが、ISP により A キナーゼの系を同時に刺激することにより相加効果をかすことと、Ca^{2+} を含まない培養液では C キナーゼの系のみ抑制されるために、A キナーゼの系とは異なり Ca^{2+} チャンネルの関与が示唆された。

(文献)

1) Holopainen, I., Kontro, P., and Oja, S. (1985) Neurochem. Res. 10, 123-131
2) Shitara, N., Tsujita Y., Nakamura, H., Genka, S., and Takakura, K. (1987) Shinkeikenkyu No Shinpo 31, 1005-1014
3) Philibert R., and Dutton G.R. (1988) Neurosci. Lett. 95, 323-328
4) Shain W. G., Madelian V., Martin D.L., Kimelberg, H.K., Perrone, M. and Lepore, R. (1986) J Neurochem 46, 1298-1303
5) Skwish S., and Shain W. (1990) Life Sci. 47, 1037-1042

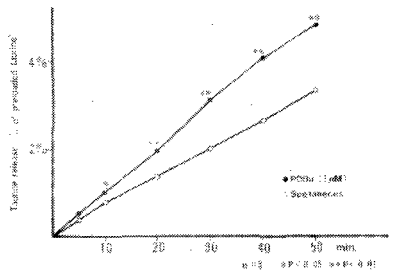


Fig.1 Release of ^{3}H-Taurine from C6 Glioma Cells

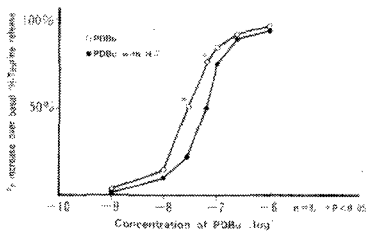


Fig.2 Inhibitory Effect of H-7 on PDBu-stimulated Taurine Release

244 神経特異的リン酸化タンパク質（PNP 14）の情報伝達複合体

中条茂男、塚田和彦、中谷一泰
（昭和大学・薬学部・生物化学）

〔要約〕
PNP 14はEGF受容体やp60^{v-src}でチロシン残基がリン酸化され(1)、種々の精製Ser/Thr-キナーゼの中ではcalmodulin-dependent kinase II(CaM-kinase II)によりSer残基がリン酸化されることが判明した。さらに、[^{32}P]H_3PO_4で標識した単離シナプトソーム、およびneuroblastoma cellsから免疫沈降法によりリン酸化されたPNP 14を検出した。また、牛脳の可溶性画分を試料としてPNP 14-affinity chromatographyを行った結果、src抗体と反応する分子量約60,000のタンパク質を見いだした。さらに、ラット大脳の可溶性画分から抗PI3-kinase抗体で免疫沈降したimmunocomplex中にPNP 14を、また抗PNP 14抗体を用いたimmunocomplex中にPI3-kinase活性を検出した。以上の結果は、PNP 14は生理的条件下でもリン酸化されること、およびp60^{src}やPI3-kinaseと情報伝達複合体を形成している可能性を強く示唆している。

PNP 14は、脳においてシナプスに局在し、軸索やグリア細胞には存在しないことから(2)、シナプス形成や神経機能の調節に重要な役割を演じていると考えられる。また、本タンパク質はEGF受容体やp60^{v-src}でチロシンリン酸化される(1)ことから、その生理機能の調節にリン酸化反応が関与していることが示唆される。今回、PNP 14が生理的条件下でリン酸化されるかどうかを、ラット大脳から単離したシナプトソーム、および種々のneuroblastoma cellsを用いてリン酸化反応について検討を行うとともに、PNP 14結合タンパク質の解析を、PNP 14-affinity column、および免疫沈降法とイムノブロットにより行った。

【実験方法】
PNP 14は既報(3)に従って牛大脳から精製した。シナプトソーム、およびneuroblastoma cellsのリン酸化は、ラット大脳から調製したシナプトソーム、あるいは培養細胞に[^{32}P]H_3PO_4 (mCi/ml)を加え、37℃で2時間、インキュベートして行った。リン酸化後、1% Triton x-100を用いてシナプトソーム、および培養細胞を可溶化し、抗PNP 14抗体による免疫沈降を行った。PNP 14-Sepharose(2 mg PNP 14/ml Sepharose)はSepharose 4BをBrCNで活性化して結合させた。PI3-kinase活性の測定は既報(4)に従って行った。

【実験結果】
CaM-kinase IIを用いてin vitro kinase 反応を行ったところ、PNP 14はカルシウムイオン存在下においてリン酸化された（図1．A）。リン酸化されたPNP 14をゲルから切り出し、そのリン酸化アミノ酸を分析した結果、Serのみがリン酸化されていた（図1．B）。一方、^{32}Pで標識したシナプトソームを可溶化後、抗PNP 14抗体で免疫沈降を行った結果、^{32}P-PNP 14を検出した（図2．A）。同様にneuroblastoma cellsであるNeuro2a, IMR32およびPC12を用いて解析した結果、三種類の培養細胞中IMR32ではリン酸化の程度が最も低かったが、いずれの培養細胞からも^{32}Pで標識されたPNP 14を同定することができた（図2．B）。

PNP 14と複合体を形成しているタンパク質を解析するため、PNP 14-Sepharose columnによるaffinity chromatographyを行った。その結果、図3．Aに見られるように6 Mグアニジン塩酸、pH 8.0でタンパク質のピークが認められた。このピークをSDS-PAGEで分析したところ、分子量約6万にバンドが認められ、このタンパクは抗p60^{v-src}モノクローナル抗体と反応した（図3．B）。

また、ラット大脳から調製した可溶性画分を抗PNP 14抗体で免疫沈降を行い、その免疫沈降物中のPI3-kinase活性を測定した（図4．A）。PI3-kinase活性は、正常血清を用いた場合に比べ特異抗体で有意に増加した。そこで、抗PI3-kinase抗体で免疫沈降を行った免疫沈降物中にPNP 14が存在しているかどうかを調べた。図4．Bはそのイムノブロットの結果である。PNP 14は抗PI3-kinase抗体のimmunocomplex中に検出され、それらはお互いに複合体を形成しているものと推定される。

【考察】
[^{32}P]H_3PO_4を用いてmetabolic labelを行ったシナプトソームやneuroblastoma cellsにおいても^{32}P-PNP 14が検出されたことから、PNP 14は生理的条件下でもリン酸化されることが明らかになった。in vitroではEGF受容体や

$p60^{v\text{-}src}$、およびCaM-kinase IIにより、それぞれチロシン、セリン残基がリン酸化されるが、現在まで生理的条件下でいずれの酵素がそのリン酸化反応に関与しているかは明かではない。また、PNP 14は$p60^{src}$およびPI3-kinaseと新しい情報伝達複合体を形成しているものと考えられ、中枢神経での役割としてリン酸化反応を介した新たな情報伝達系に関与しているものと推察される。

【謝辞】

CaM-kinase IIを供与して頂いた東京都神経研・山内卓博士に感謝致します。また、PI3-kinaseに関しては東大福井泰久博士との共同研究である。

【文献】

1) 中条茂男、塚田和彦、古山泰雄、中村泰治、中谷一泰 (1991) 神経化学、30, 282-283.
2) 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 (1991) 神経化学、30, 516-517.
3) Nakajo, S. et al., (1990) J. Neurochem. 55, 2031-2038.
4) Fukui, Y., Kornbluth, S., Jong, S,M., Wang, L.H. and Hanafusa, H.(1989) Oncogene Res., 4, 283-292.

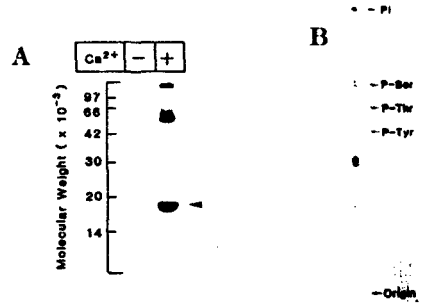


図1. CaM-kinase IIによるPNP 14のリン酸化
A) リン酸化反応後、SDS-PAGEを行った。そのautoradiogram。
B) リン酸化アミノ酸分析

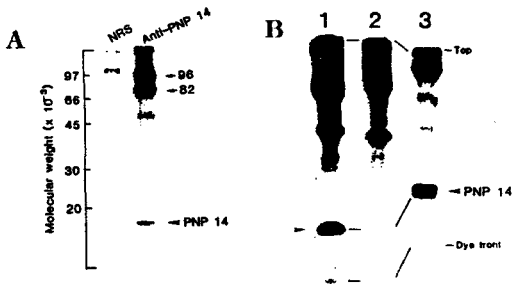


図2. 単離シナプトソーム、および培養細胞におけるPNP 14 のリン酸化
A) 単離シナプトソームを[^{32}P]H_3PO_4で標識後、PNP 14抗体で免疫沈降を行った。
NRS, normal rabbit serum.
B) 種々の培養細胞を[^{32}P]H_3PO_4で標識後、PNP 14抗体で免疫沈降を行った。
lane 1: Neuro2a, lane 2: IMR32, lane3: PC12

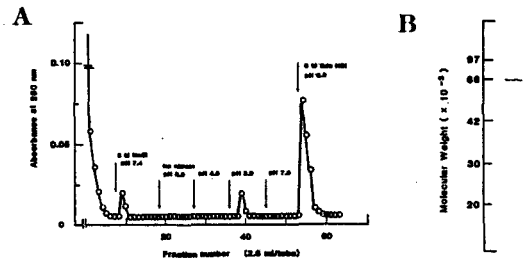


図3. 牛脳可溶性画分のPNP 14-affinity column chromatography
A) PNP 14-Sepharose column (1 x 5 cm) の溶出パターン
B) 6 M Gdn-HCl (pH 8.0)で溶離したタンパク質の$p60^{src}$抗体によるimmunoblot

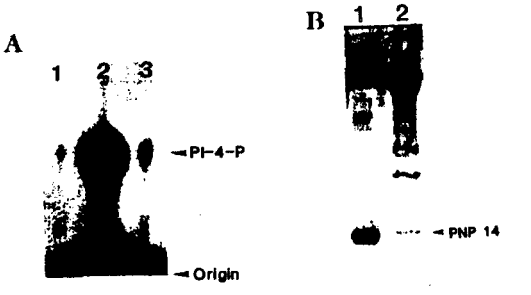


図4. PNP 14とPI3-kinaseの複合体形成
A) ラット大脳の可溶性画分をnormal rabbit serum (lane 1), anti-PI3-kinase serum (lane 2), anti-PNP 14 serum (lane 3)で免疫沈降を行い、それぞれの沈降物中のPI3-kinase活性を測定した。
B) ラット大脳の可溶性画分をanti-PI3-kinase serumで免疫沈降を行い、その沈降物をanti-PNP 14 serumを用いてimmunoblotを行った(lane 2)。
lane 1: authentic PNP 14

245

線条体内c-fos mRNA発現に対するアセチルコリン系作用薬の影響

周 希誠[1]*, 小川紀雄[1], 浅沼幹人[1], 平田 洋[1,2], 森 昭胤[1]
(岡山大医・分子細胞医学研・神経情報学部門[1], 第三内科[2])

〔要約〕 Dopamine(DA), acetylcholine(ACh)のgenotrophicな効果の相互作用を明らかにする目的で, L-DOPA投与によるラット線条体内 c-fos mRNAの発現に及ぼす muscarinic ACh receptor(mACh-R)の agonist carbachol及び antagonist trihexyphenidyl投与の影響について検討した. ラット腹腔内へのL-DOPA, carbacholあるいはtrihexyphenidylの単剤投与, さらにcarbacholあるいはtrihexyphenidylとL-DOPA(100 mg/kg)の混剤single bolus投与を行った. L-DOPA単剤投与により用量依存性にc-fosmRNAの発現増加がみられたが, carbachol, trihexyphenidyl単剤投与後の発現は, 溶媒投与群に比して有意な変化は認められなかった. しかし, carbacholとL-DOPAとの混剤single bolus投与では, carbachol 0.1mg/kg 以上ではL-DOPA単剤投与群に比べ有意にc-fos mRNA発現は抑制されていた. また, trihexyphenidylとL-DOPAとの混剤投与では, L-DOPA単剤投与群に比べc-fos mRNAが逆に増加する傾向が認められた. cholinergic agonistおよびantagonistは, 単剤投与ではc-fos mRNA発現に影響しなかったが, L-DOPAとの混剤投与では, L-DOPAによるc-fos mRNA発現をそれぞれ抑制, 増強したという本実験の結果は, receptor間あるいはsecond messenger系間の相互作用を介してACh系がDA-Rを介するc-fos mRNAの発現を修飾し, 結果的に他の遺伝子発現を調節している可能性を示唆する.

[目的] c-fos及びその発現産物であるFos蛋白は細胞の分化, 増殖や正常機能に関した情報をsecond messenger系から核内の種々の遺伝子に伝達するthird messengerである. c-fosは他の細胞性癌遺伝子の一つであるc-junと共に, 様々な刺激直後に急速に一過性に発現し, 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遺伝子の転写制御を行うと考えられている(2). 中枢神経細胞において様々な刺激, ストレスによりc-fosは急速に発現する(4-8). さらに近年 dopamine receptor(DA-R)を介したラット線条体内c-fos mRNAの発現が報告されたが(9), in vivoでのacetylcholine(ACh)系とc-fos発現に関する報告は少ない. 一方, DA系とACh系の相互作用はParkinson病をはじめとする大脳基底核障害において重要な役割を果たしていると考えられる. そこで今回我々は, DA, AChの genotrophic な効果の相互作用を明らかにする目的で, DA-R agonistであるL-DOPA投与による線条体内 c-fos mRNA の発現に及ぼすmuscarinic ACh receptor(mACh-R)の agonist carbachol及びantagonist trihexyphenidyl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SD系ラット(BW 280-290g)を用い, 処置時以外は静穏な環境下に置き, 薬剤は腹腔内投与した. ラットを以下の7群に分けた. ①無処置群, ②溶媒(0.5% metylcellulose)投与群, ③L-DOPA(L-DOPA:carbidopa=10:1)投与群, ④carbachol投与群, ⑤trihexyphenidyl投与群, ⑥L-DOPA+carbachol複剤投与群, ⑦L-DOPA+trihexyphenidyl複剤投与群. 単剤投与群のc-fos mRNA発現の時間経過をみるために, metylcellulose, L-DOPA(100 mg/kg), carbachol(0.1 mg/kg), trihexyphenidyl(10 mg/kg)を投与し, それぞれ15, 30, 60, 90, 120分後に断頭屠殺した. 一方, 各単剤群のc-fos mRNA発現の用量依存性についての検討では, L-DOPA: 25, 50, 75, 100 mg/kg; carbachol: 0.004, 0.02, 0.1, 0.5 mg/kg; trihexyphenidyl: 0.01, 0.1, 1.0, 10 mg/kgの用量を投与し, carbacholあるいはtrihexyphenidylとL-DOPA(100 mg/kg)の混剤single bolus投与においては, 単剤投与群での各用量を混合投与し, それぞれ30分後に断頭屠殺した. Northern blot analysisは 既報に従い行った(8). 屠殺後線条体からtotal RNAをAGPC法(3)により抽出し, 6.7% paraformaldehydeで変性させ, 1% agarose gelで電気泳動(10 μg/lane)し, nylon membraneにblotし固定した. 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 42℃で18時間hybridizeさせ, washの後5日間のautoradiographyに供した.

[結果および考察] 各単剤投与群の時間経過の検討では, 無処置群に比較して一過性の線条体 c-fos mRNAの発現が認められ, 15分後より有意に発現し, 30分後で最大であった. 一方, 各単剤投与群のc-fos mRNA発現の用量依存性についての検討では, L-DOPA(25-100mg/kg)単剤投与により用量依存性に発現の増加がみられ, この発現はRobertsonらの報告と一致していた(9). carbachol(0.004-0.5 mg/kg), trihexyphenidyl(0.01-10 mg/kg)単剤投与後のc-fos mRNA発現は対照溶媒投与群に比

して有意な変化は認められなかった．ところが，carbachol(0.004-0.5 mg/kg)とL-DOPA(100 mg/kg)との混剤single bolus投与で，carbachol 0.02 mg/kg以下ではc-fos mRNA発現に影響は認められなかったものの，carbachol 0.1mg/kg以上ではL-DOPA単剤投与群に比べ有意にc-fos mRNA発現は抑制されていた(Fig. 1)．また，trihexyphenidyl(0.01-10 mg/kg)とL-DOPA (100 mg/kg)の混剤投与では，L-DOPA単剤投与群に比べc-fos mRNAが逆に増加する傾向が認められた(Fig. 1)．線条体ではDA含有神経とACh含有神経が独立して同一の神経細胞に投射しており，さらに線条体でのDA放出はDA神経終末に存在するM1-Rを介して調節されているという報告がある(1,10)．cholinergic agonistおよびantagonistは，単剤投与ではc-fos mRNA発現に影響しなかったが，L-DOPAとの混剤投与では，L-DOPAによるc-fos mRNA発現をそれぞれ抑制，増強したという本実験の結果から，ACh系がDA-Rを介してc-fos mRNAの発現を修飾し，他の遺伝子発現を調節していることが明らかになった．この修飾はDA-RとmACh-Rとのreceptor間相互作用あるいはそれらのsecond messenger系での相互作用を介したものであると考えられ，この詳細な検討は，異なった神経伝達物質系の相互関係を知るための重要な課題と考えられる．

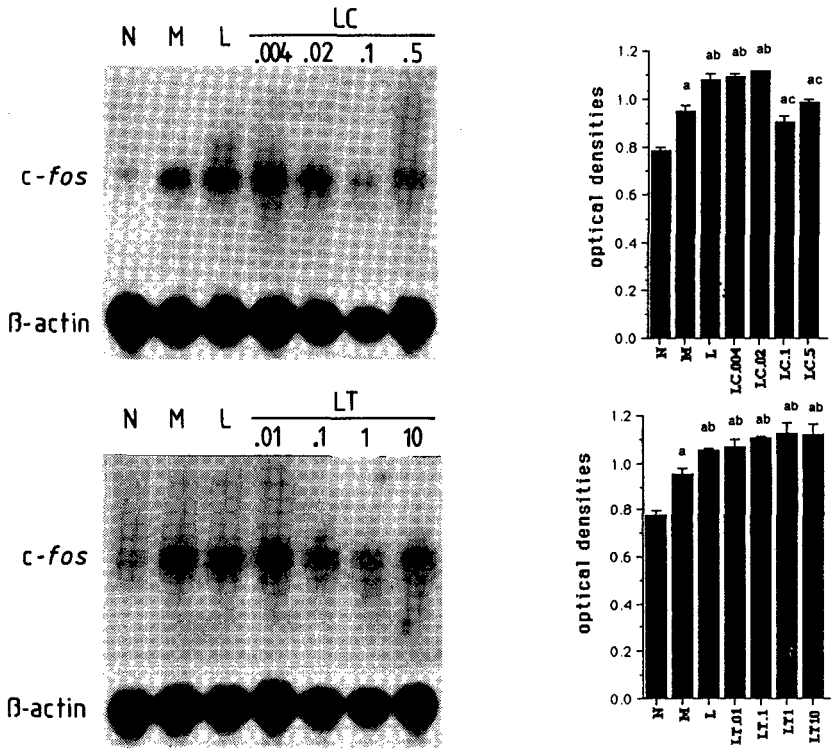


Figure 1 : *Effects of either combined treatment with L-DOPA+carbachol or combined treatment with L-DOPA+trihexyphenidyl compared with L-DOPA treated alone.* Left, Northern bolts of striatal c-fos and b-actin mRNA induction 30 min after single injection of one of the following agents; methylcellulose (0.5%), L-DOPA (100 mg/kg), L-DOPA (100 mg/kg) + carbachol (0.004-0.5 mg/kg) or L-DOPA (100 mg/kg) + trihexyphenidyl (0.01-10 mg/kg). N, non-treated; M, methylcellulose ; L, L-DOPA; LC.004, L-DOPA + carbachol 0.004 mg/kg; LC.02, L-DOPA + carbachol 0.02 mg/kg; LC.1, L-DOPA + carbachol 0.1 mg/kg; LC.5, L-DOPA + carbachol 0.5 mg/kg; LT.01, L-DOPA + trihexyphenidyl 0.01 mg/kg; LT.1, L-DOPA + trihexyphenidyl 0.1 mg/kg; LT1, L-DOPA + trihexyphenidyl 1.0 mg/kg; LT10, L-DOPA + trihexyphenidy 10mg/kg. Right, each value is mean ± S. E. M. (N=5) of optical densities obtained from signals on blots (c-fos mRNA/ b-actin mRNA). a, $p < 0.05$ compared with the non-treated group; b, $p<0.05$ compared with the methylcellulose treated group; c, $p<0.05$ compared with the L-DOPA treated group

1. Chang, H. T. (1988) Brain Res. Bull., 21, 295-304. 2. Chiu, R. et al. (1988) Cell, 54, 541-552. 3. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem., 162, 156-9. 4. Miller, J. C. (1990) J. Neurochem., 54, 1453-5. 5. Morgan, J. et al. (1987) Science, 237, 192-7. 6. Nakajima, T. et al. (1989) Epilepsy Res., 4, 156-9. 7. Nakajima, T. et al (1989) Brain Res., 501, 307-14. 8. Onodera, H. et al. (1989) Neurosci. Lett., 98, 101-4. 9. Robertson, G. S. et al. (1990) Brain Res., 523, 288-90. 10. Xu, M. et al. (1989) Brain Res., 495, 232-42.

246 ムスカリン受容体刺激によるzif268遺伝子発現について：PC12dにおけるPKC依存性経路

海老原　達彦、伊藤　和光、David W. Saffen
（東京大学医学部脳研生化学）

〔要約〕

神経伝達物質の受容体刺激によるzif268の発現機構を明らかにするために、PC12dを用いて、ムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)を介するzif268の発現を、mRNA、タンパクおよびそのDNA結合活性について調べた。

この結果、1)mAChRの刺激によりzif268のmRNA、タンパク、DNA結合活性は一過性に増加し、これはmAChRのアンタゴニストで阻害される。2)mAChRの刺激によるzif268の発現の時間経過は、NGF受容体刺激の場合よりもピークが早くmRNAの量も少なかった。3)zif268 mRNAの発現は百日咳毒素あるいは細胞内cAMPを増加させる薬物の前処理で阻害されなかった。それに対して、ホルボールジアセテートの前処理によりPKCをダウンレギュレートした場合は、mAChRを介したmRNAの発現は完全に抑制されたが、NGF受容体刺激の場合は部分的にしか抑制されなかった。

以上のことから、mAChRの刺激とNGF受容体刺激によるzif268のmRNAの発現は、少なくとも部分的に独立した二つの経路を介して起こることが示唆された。

［目的］

中枢神経系における記憶や学習の分子機構を解明する有力なモデルとして、長期増強(LTP)が近年広く注目されている。また最近、外的刺激に対して一過性に発現する前初期遺伝子群の研究が進み、それらの中でただひとつzif268のみがLTPの誘導と相関して発現することが知られている(1)。

神経伝達物質の受容体を介したzif268の発現機構を解明する基礎的実験として、我々は、ラット褐色細胞腫由来のPC12dを用いて、mAChR刺激によるZif268発現の調節および発現の経路を調べた。

［方法］

アセチルコリン受容体アゴニストのカルバコール(Carb)，NGF等の刺激を培地に加えて、所定の時間後に細胞を集め、RNAまたはタンパクを回収した。zif268 mRNAの発現を調べるために、zif268のcDNAを^{32}P標識したものをプローブとしてNorthern解析を行なった。また、Zif268タンパクの発現を調べるために、Zif268のC末端合成ペプチドに対する抗血清を用いてWestern解析を行い、さらにDNA結合活性をゲルシフト分析で調べた。なおPC12dは、NGF応答性の速やかなPC12系の株である(2)。

［結果］

NGF 5ng/ml, Carb 1mM, mAChRアゴニストのオキソトレモリン(Oxo)50μMで刺激すると、zif268 mRNAの発現がみられた。このCarb,Oxoによる発現はmAChRアンタゴニストのアトロピンで抑制されたので、これらの刺激がムスカリン性受容体を介して起こっていることが分かった。次に上記濃度によるmRNA発現の経時変化を調べたところ、発現のピークは45分前後にあった。ただしNGF刺激とは異なり、mAChRの刺激ではピークの後急速に発現が抑えられた。またNGF刺激と比較して、mAChR刺激によるmRNAの発現量が少なかった。さらにタンパクレベルでのZif268の発現を見るために、Western解析及びゲルシフト分析を用いて調べた結果、Carb,NGFによってZif268タンパクの発現が確認できた。また、Zif268タンパクは、Carb,NGF共に刺激後30分から発現するものの、Carb刺激ではNGF刺激の場合よりも発現抑制が早く始まり、Carb刺激後2時間で発現が抑制された。

マウス神経芽腫由来のN1E-115細胞株でもmAChR刺激でzif268が発現することが知られており、さらにこの発現が、Giを遮断する百日咳毒素やフォルスコリンによる処理で阻害されることが知られている(3)。PC12dについても同様の発現経路を想定し、PTXの影響を調べたところ、この阻害効果はなかった。また、フォルスコリンを投与してcAMP濃

度を上昇させても、発現抑制は見られなかった。そこでPC12dでは、GiではなくGqを介した発現経路が想定されるため、PKCの関与を調べた。ホルボールエステルPDA10μMで一日処理してPKC活性を抑制したときのzif268の発現について調べたところ、mAChR刺激の経路は完全に抑制された。しかしNGFの経路ではzif268の発現が部分的にしか抑制されなかった。

［考察］

RNAレベルでの解析からPC12dにおけるzif268のmRNAは、mAChRからPKCを介する経路で一過性に発現し、N1E-115と異なり、この発現経路はGi阻害の影響を受けないこと、またNGFによる発現経路にはPKCに独立な経路もあることが分かった。さらにmRNA,タンパクレベル共にmAChR経由のzif268発現が、NGFに比べて早く抑制されることが分かった。

このことより、mAChR刺激とNGF刺激によるzif268遺伝子の発現は、部分的に独立した発現経路を持っていることが考えられた。また、PC12dのmAChR刺激によるzif268発現の経路に百日咳毒素感受性Gタンパクが関与していないことも分かった。

［謝辞］PC12dを提供頂いた 佐野　護博士（愛知県コロニー研）に感謝致します。

［文献］

1.Cole,A.J., Saffen,D.W., Baraban,J.M.,& Worley,P.F.(1989) Nature 340,474-476
2.Kato-Semba,R., et al.(1987) J. Neurosci. Res. 17,36
3.Saffen,D.W., Erol,E.S., Worley,P.F.& Baraban,J.M.(1990) 生化学 62,856

図1.刺激によるzif268 mRNA発現の経時変化に見られる2つのパターン

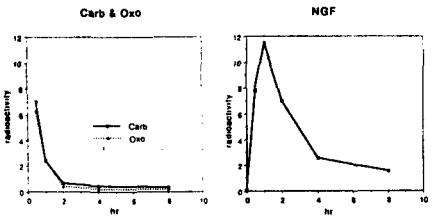


図2.Zif／268蛋白発現の経時変化

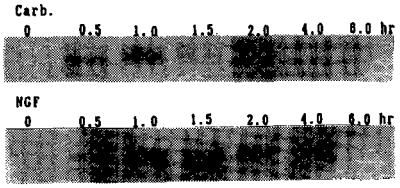


図3.百日咳毒素がzif268 mRNA発現に及ぼす効果

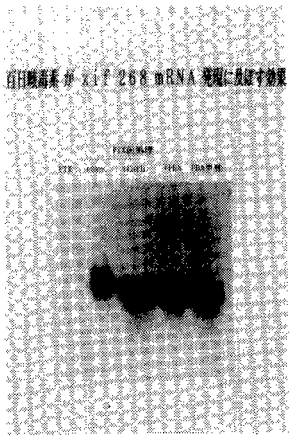
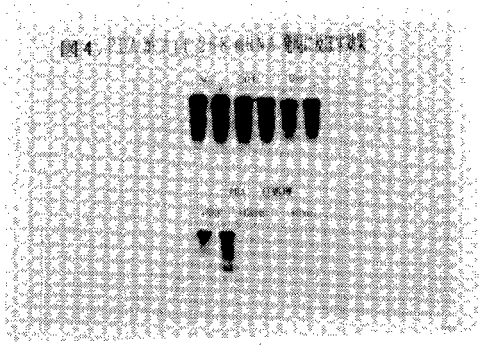


図4.



247 5HT2受容体アゴニスト刺激による5HT2受容体結合数、イノシトールリン脂質代謝とmRNAの変化

稲吉條太郎 1), D.-M.Chuang 2)

1) 大分医科大学 精神神経科
2) Molecular Neurobiolgy, Biological Psychiatry Branch, NIMH

〔要約〕

ラットのcerebellar granule cellは、イノシトールリン脂質(PI)代謝を介するセロトニン(5HT)$_2$受容体を持つ。5HTおよび5HT$_2$受容体アゴニストDOI (2,5-dimethoxy-4-iodophenylisopropylamine)は、5HTに対するイノシトールリン脂質(PI)代謝反応を継時的に脱感作した。しかし、[^{3}H] ketanserin結合は逆に継時的に増加した。24hr後には、この結合のBmaxおよびKdも有意な増加を示していた。ノーザンブッロトにより示された5HT$_2$受容体mRNA も5HT$_2$受容体結合数増加と同様増加していた。total RNA, m3ムスカリニック受容体mRNA やβactin mRNA には有意な変化はなかった。これらの結果は、5HT$_2$受容体結合部位とそのmRNAは持続的なアゴニスト刺激に対してパラドキシカルな誘導を受けることを示している。

〔諸言〕

抗うつ薬の慢性投与が5HT$_2$受容体結合数を減少させることにより、うつ病において5HT$_2$受容体は重要な役目を果たしていると考えられている。最近この受容体の遺伝子がクローニングされたことにより、受容体刺激による詳細なメカニズムの解明が期待されている。そこで我々は、ラットのcerebellar granule cellを用いて5HT$_2$受容体のイノシトールリン脂質代謝、[^{3}H] ketanserin結合、ノーザンブロットをおこなったので報告する。

〔方法〕

cerebellar granule cellの培養

生後8日目のSprague-Dawleyラットから小脳を取り出し、Eagle培養液を用いて6%CO_2の条件下で培養した。培養8日目の5HT$_2$レセプターのアゴニストである10μM 5HTおよびDOIを継時的に24時間投与した。

イノシトールリン脂質代謝の測定

[^{3}H] myo-inositol (2.5μCi/dish)を加え24時間インキュベートした。生理食塩水で洗浄し、その後 5mM LiClで30分間プレインキュベートした。5HTおよび5HTアゴニストを加え37℃、45分間インキュベートした。メタノールを加えて反応を止め、[^{3}H] -IP1の蓄積はAG-1 x 8樹脂にて分離し、その放射活性を測定した。

[^{3}H] ketanserin結合数の測定

cerebellar granule cellを生理食塩水で洗浄し、ポリトロンでホモジナイズし遠心分離した。その後沈査を30,000g、15分間で2回遠心分離、懸濁をおこなった。[^{3}H] ketanserin結合実験は 1μM methysergide存在下の結合量を非特異的結合量とした。膜標品 0.1mlに[^{3}H] ketanserinを加え（総容量1.0ml）インキュベートした後、Whatmann GF/Bフィルター上で吸引ろ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測定した。

ノーザンブロット

Guanidine isothiocyanate/Cesium chloride法で調整したRNAをフォルムアルデヒド中で電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写後^{32}P-標識プローブと56℃で18時間ハイブリダイズさせた。

〔結果・考察〕

5HTおよびDOI刺激により、[^{3}H] -IP1の蓄積は500-700%増加し、EC_{50}はそれぞれ80, 29nMであった。10μM 5HTおよび DOIによる継時的刺激は[^{3}H] -IP1の蓄積において脱感作を示した(図1)。しかし[^{3}H] ketanserin結合数は 5HTおよび DOIによる継時的刺激により増加した(図2)。また 5HT$_2$受容体mRNAも[^{3}H] ketanserin結合と同様に継時的に増加を示した(図3・4)。しかしtotal RNA、m3ムスカリニック受容体mRNAやβactin mRNAには有意な変化はなかった。

持続的な5HTアゴニストによる5HT$_2$受容体刺激は、5HT$_2$受容体mRNAの増加をもたらしたが、これはtranscriptionまたはpost-transcriptionを介して5HT$_2$受容体結合数の増加をもたらしたと考えた。しかし5HTによるイノシトールリン脂質代謝は継時的に低下することより、5HT$_2$受容体の増加はイノシトールリン酸やdiacylglycerolの遺伝子調節とは単純に結びつかないように思われる。

〔文献〕

(1) Roth, B.L. et al. (1987) Life Sci 41, 1051.
(2) Conn, P.J. et al. (1987) J. Pharmacol. Exp. Ther. 242, 552.
(3) Xu, J. et al. (1987) Biochem. Phemacol. 36, 2353.

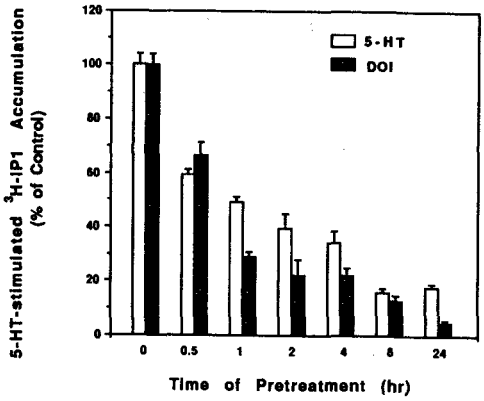


Fig. 1. Time-course of 5-HT and DOI-induced desensitization of 5-HT-induced PI turnover. Cells were pretreated 10 μM of 5-HT or DOI for the indicated time periods and then washed 3 times with PSS. The pretreated cells were challenged with 100 μM 5-HT for induction of [^{3}H]-IP_1 accumulation. The values are the mean ± SEM of a quadruplicate experiment which has been repeated three times with similar results.

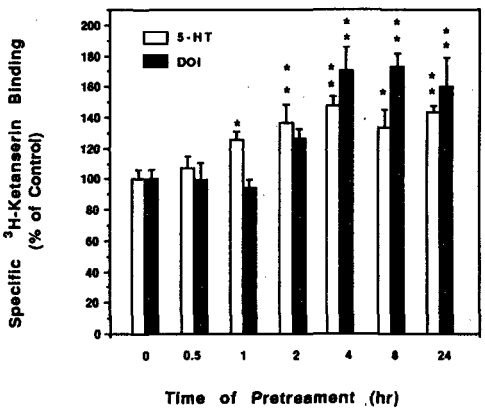


Fig. 2. 5-HT or DOI-induced increase of [^{3}H]-ketanserin binding to 5-HT_2 receptors in crude membranes. Cells were pretreated with 10 μM of 5-HT or DOI for the indicated time periods. Crude membranes were prepared and binding of [^{3}H]-ketanserin (2 nM) to 5-HT_2 receptors was performed. The values are the mean ± SEM of a quadruplicate experiment repeated three times with nearly identical results. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ when compared with their respective 0 time control.

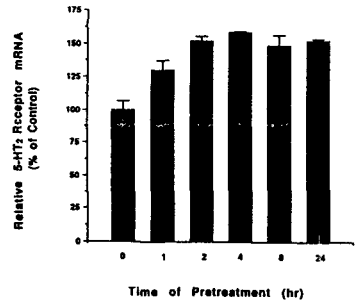


Fig. 3. Time-course of changes of 5-HT_2 receptor mRNA following treatment with 10 μM 5-HT. Quantification by a Betagen blot analyzer of the autoradiograms. Levels of 5-HT_2 receptor mRNA have been normalized to total cellular RNA at each time point. The data represent the mean ± SD of duplicate samples.

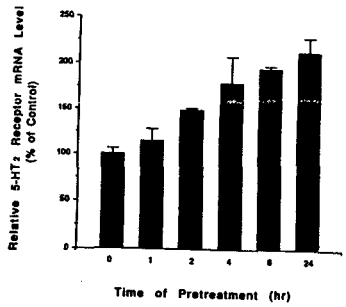


Fig. 4. Time-course of changes of 5-HT_2 receptor mRNA following treatment with 10 μM DOI. Quantification by Betagen blot analyzer of the autoradiograms. Levels of 5-HT_2 receptor mRNA have been normalized to total cellular RNA at each time point. The data represent the mean ± SD of duplicatesamples.

248 cAMP依存性プロテインキナーゼの糖脂質による活性化反応

荒金 太[1)2)]、福永浩司[1)]、阿部幸子[3)]、荒木恵子[3)]、佐武 明[3)]、宮崎康二[2)]、岡村 均[2)]、宮本英七[1)]
(熊本大学・医・[1)]第一薬理、[2)]産婦人科、[3)]新潟大学・脳研究所)

〔要約〕

1) ラット脳の膜分画可溶化上清分画を DEAE-セルロースカラムに展開し、各分画について、アメフラシの皮膚及び神経線維から均質な状態にまで精製した糖脂質の効果を調べた。cAMP 依存性プロテインキナーゼ（A-キナーゼ）のタイプⅡ活性ピークに一致して糖脂質活性ピークが認められた。 2) 同上清分画をあらかじめ cAMP で飽和後、DEAE-セルロースカラム上に展開し、調節サブユニットと触媒サブユニットに分離してキナーゼ活性を調べると、糖脂質依存性活性ピークは消失した。 3) 触媒サブユニットに対する効果は認めなかった。 4) ゲルろ過カラム上でも、A-キナーゼに一致して糖脂質依存性活性ピークを検出した。 5) 今回用いた7種の糖脂質の中で、皮膚由来の SGLⅡが最も強い効果を持ち、10^{-5}M cAMP 刺激時の約 60 %の活性を示した。 6) SGLⅡは A-キナーゼを濃度依存性に活性化し、Ka は 32.2 μM であった。 7) SGLⅡ依存性活性の基質特異性は、cAMP 刺激時の A-キナーゼとは若干の差異を示した。 8) SGLⅡは調節サブユニットの触媒サブユニットに対する抑制効果を cAMP と同様に、解除した。9) SGLⅡは、A-キナーゼの cAMP に対する結合部位に対して、阻害効果を示さなかった。

以上の結果は、糖脂質が、A-キナーゼに対して cAMP とは異なる結合部位に結合し、活性化することを示唆している。

【目 的】

A-キナーゼは、さまざまな細胞に存在し、細胞内情報伝達に重要な役割を担っている (1)。また、近年、細胞膜に存在する糖脂質は、膜の構成成分としてだけでなく、細胞機能上重要な役割を担っていることが注目されており、ガングリオシドではキナーゼ活性を調節していることが報告されている (2)。今回、我々は、アメフラシ由来の糖脂質が、A-キナーゼを活性化することを見いだし、その活性化反応について検討した。

【実験方法】

糖脂質は、既報 (3 – 7) により精製した。A-キナーゼはラット脳から核分画を除く10万×g 沈殿分画を調整し、0.5 % Nonidet P-40 で可溶化後上清分画を DEAE-セルロースカラム、硫安分画 (50%)、及び、セファクリル S-300 カラムのゲルろ過により部分精製した。A-キナーゼの活性は、合成ペプチドであるケンプタイド及び基質蛋白質を用いて測定した。

【結果と考察】

ラット脳の膜分画可溶化上清分画を DEAE-セルロースカラムに展開させ、NaCl 濃度勾配 (50–400 mM) で溶出した。各分画をケンプタイドを基質として、糖脂質 (SGLⅡ) 依存性活性ピークと cAMP 依存性 A-キナーゼ活性ピークは、0.24 M NaCl 濃度付近に一致していた (図1)。ついで、活性分画を集め、濃縮してゲルろ過カラムに展開させた。SGLⅡと cAMP の効果を比較すると、活性ピークは、一致していた。可溶化上清分画をあらかじめ cAMP とインキュベイトした後、cAMP で飽和した

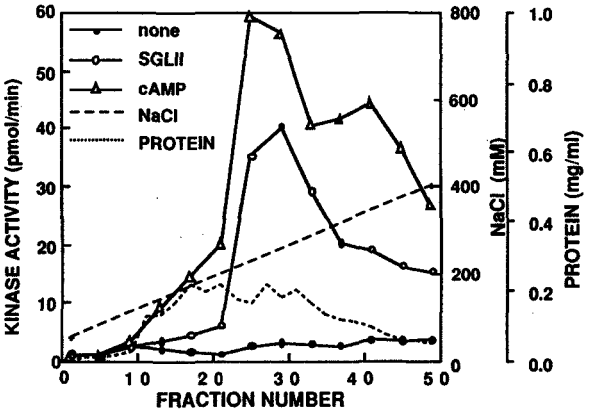


図1 イオン交換カラムにおける cAMP-キナーゼ活性

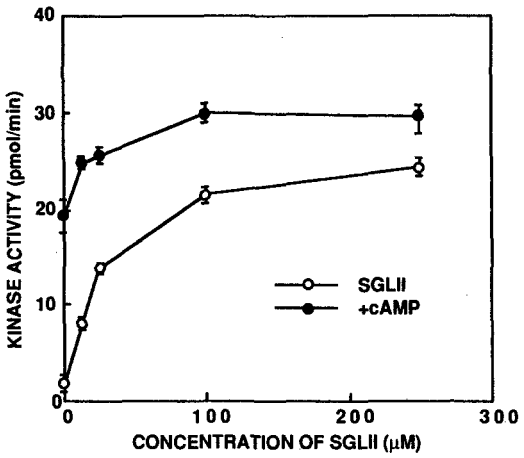


図2　SGLⅡ濃度依存性と cAMP 相加的効果

Substrate	Kinase activity (pmol/min)	
	SGLII (–)	SGLII (100μM)
MAP2	0.15	0.62
Synapsin I	0.45	0.82
MBP	1.48	3.46
Histone H1	5.50	4.16
Casein	3.60	3.75

図3　基質蛋白質の SGLII によるリン酸化

カラムに展開し、cAMP を含む緩衝液で酵素を溶出した。A-キナーゼのホロ酵素は解離し、酵素の触媒サブユニットの活性ピークは約 0.10 M NaCl で溶出された。この時、SGLⅡ依存性活性化のピークも 0.24 M NaCl 付近から消失し、触媒サブユニットのみの活性ピークが認められた。このことから SGLⅡは、cAMP の非存在下において、A-キナーゼを活性化することが示唆された。

今回実験に用いた糖脂質は、アメフラシ皮膚及び神経線維に由来し、その分子中に 1 ないし 3 個のアミノホスホン酸 (AEP) を持ち、GalAc→3Gal→4Glu の共通の分子骨格を持っている。皮膚由来のものには、SGLⅠ、SGLⅠ'、SGLⅡがあり、神経線維由来のものには、F21、FGLⅡa、FGLⅡb、及び、FGLV がある。調べた全ての糖脂質が A-キナーゼを活性化し、その中で、SGLⅡが最も強い効果を持っていた。ケンプタイドを基質として、10^{-5} M cAMP 活性化時の約 60 %の活性が認められた。SGLⅡの活性化反応は、濃度依存性で、Ka は 32.2 μMであった。SGLⅡは、至適濃度以下の cAMP 存在下で活性化された A-キナーゼに対して相加的な効果を示した (図2)。SGLⅡは CaM キナーゼⅡ及びプロテインキナーゼCに対し、活性化効果は持たなかった。

SGLⅡ依存性活性の基質特異性を調べると (図3)、MAP2、シナプシン I、ミエリン塩基性蛋白質は、基質として役立つことが解った。しかし、カゼインは、ほとんどリン酸化されなかった。特に、ヒストンH1 については、cAMP による A-キナーゼでよくリン酸化されるにも関わらず、SGLⅡ依存性活性ではリン酸化されなかった。A-キナーゼの活性化反応において、SGLⅡと cAMP を用いたときの基質特異性に差がみられることがわかった。

SGLⅡの活性化反応を解明するために、調節サブユニットと [^{3}H]cAMP を用いて実験を行った。調節サブユニットは、cAMP 非存在下において触媒サブユニットと結合することにより、A-キナーゼを不活化している。しかし、cAMP が結合すると、両者は解離を起こし、活性化される。SGLⅡは、調節サブユニットの触媒サブユニット活性に対する抑制効果を強く阻害した。すなわち、cAMPの酵素に対する活性化反応と類似していた。また、SGLⅡは、[^{3}H]cAMP の A-キナーゼへの結合を阻害しなかった。

以上の結果から、糖脂質が、A-キナーゼを活性化することが明らかになった。cAMP 結合実験の結果から、糖脂質が調節サブユニットの cAMP とは異なる部位に結合して活性化することが示唆された。

【文 献】

1) Chan K. F. (1987) J. Biol. Chem. 262, 5248-5255.
2) 宮本英七、太田安隆 (1990) 蛋白質・核酸・酵素 35, 1054-1063.
3) Araki S., Abe S., Odani S., Ando S., Fujii N. and Satake M. (1987) J. Biol. Chem. 262, 14141-14145.
4) Araki S., Abe S., Ando S., Fujii N. and Satake M. (1987) J. Biochem. 101, 145-152.
5) Araki S., Satake M., Ando S., Hayashi A. and Fujii N. (1986) J. Biol.Chem. 261, 5138-5144.
6) Araki S., Abe S., Satake M., Hayashi A., Kon K. and Ando S. (1991) Eur. J. Biochem. 198, 689-695.
7) Abe S., Araki S., Satake M., Fujiwara N., Kon K. and Ando S. (1991) J. Biol. Chem. 266, 9939-9943.

249 イノシトール燐脂質代謝における Ethopropazineおよび三環系薬物の効果

大金信夫, 斉藤康成, 藤沢悦子, 鬼頭直美, 中村博, 八木－中川勇三
(雪印・生物科学研究所・神経化学グループ)

〔要約〕

Phenothiazine 系薬物(ethopropazine(ETH), chlorpromazine, fluphenazine, promethazine), および三環系抗うつ薬(amitryptyline(AMI), imipramine)は、ラット海馬スライスまたはNB-OK1細胞のイノシトール燐脂質代謝を促進させた。ETH のED_{50}値は海馬スライスにおいて400 μMであるのに対して、NB-OK1細胞においては30 μMであった。一方、carbamazepine, phenothiazine, tetrahydroaminoacridine(THA), physostigmine などの三環系薬物はいずれの系においてもイノシトール燐脂質代謝に対して有意な変化を及ぼさなかった。ETH はコリンエステラーゼ阻害活性を示したが(IC_{50} = 150 μM) 、そのイノシトール燐脂質代謝促進作用はatropineによって拮抗されなかった。更に、NB-OK1細胞において、noradrenaline, serotonin, histamine はイノシトール燐脂質代謝促進作用を示さなかった。ETH によるイノシトール燐脂質代謝促進効果はN-ethylmaleimido(NEM) によって用量依存的に拮抗されたが、pertussis toxin(PTX)前処理によって影響を受けなかった。以上の結果より、ある種の側鎖を持った三環系薬物は、特定の受容体を介する経路とは異なり、独立して、NEM 感受性、PTX 非感受性G蛋白を刺激することによりイノシトール燐脂質代謝を促進することが示唆された。

〔緒言〕

近年、三環系向精神薬およびある種のコリンエステラーゼ阻害薬が、ラット脳スライスにおいてイノシトール燐脂質代謝を促進させること(1, 7)、またはG蛋白へ直接作用すること(1, 3)が報告されている。しかしながら、その作用機序や構造活性相関については、未だよく解明されていない。今回、我々は側鎖または骨格の異なる三環系薬物を用いて、ラット海馬スライスおよびニューロブラストーマNB-OK1細胞におけるイノシトール一リン酸の蓄積に対するる効果を検討した。

〔方法〕

1. ラット海馬スライスにおけるイノシトール一リン酸蓄積の測定

Sprague-Dawley系雄性ラット脳の海馬を摘出し、Mcllwain Tissue Chopper により厚さ400 μm のスライスを調製した。スライスは ^{3}H-myo-inositol(30 μCi/ml)と酸素飽和の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) 中で37° C 、90分間インキュベートされ、クレブスバッファーで洗浄された。LiCl(10mM)存在下、15分間前処理後、薬物により80分間反応させた。Atropine、prazosin、NEM は薬物添加の10分前に添加した。10% TCA で反応停止後、Berridgeの方法を修飾した既報(4) の方法によりイノシトール一リン酸の蓄積を測定した。

2. NB-OK1細胞におけるイノシトール一リン酸蓄積の測定

NB-OK1細胞は既報(4) の方法により培養し、実験に供した。^{3}H-myo-inositol (1 μCi/ml)を加え20時間ラベルしたNB-OK1細胞を、10 mM LiClを含むクレブスバッファーで30分間5%CO_2 存在下でインキュベートした後、薬物を加え60分間反応させた。PTX 処理は薬物添加前、18時間行った。6% TCAによる反応停止後、既報(4) の条件に準じて行った。

3. コリンエステラーゼ阻害活性の測定

ヒト赤血球由来アセチルコリンエステラーゼ(Sigma、Type XIII, 0.05U/ml) に薬物を添加しトリスバッファー (50mM Tris-HCl, 125mM NaCl, pH 7.4)中、37° C 、30分間インキュベートした後、1mM ^{3}H-acetylcholine を基質として、37° C 、30分間反応させた。反応停止液(1M $ClCH_2COOH$, 2M NaCl, 0.5M NaOH)を添加した後、Johnson and Russell の方法を修飾した既報(5, 6)の条件に準じて行った。

〔結果〕

1. ラット海馬スライスにおけるイノシトール一リン酸蓄積

Phenothiazine 系薬物および三環系抗うつ薬は濃度依存的にイノシトール一リン酸の蓄積を上昇させた。これら薬物のED_{50}値は200 － 400 μMであった。一方、最高濃度800 μMのphenothiazine, carbamazepine, THA, physostigmineによるイノシトール一リン酸の蓄積には有意な変化は認められなかった。ETH 500 μMによるイノシトール一リン酸の蓄積の上昇はNEM によって濃度依存的に拮抗された(IC_{50} = 100 μM) が、atropine、prazosinによって影響されなかった(図1)。

2. NB-OK1細胞におけるイノシトール一リン酸蓄積

ETH は濃度依存的にイノシトール一リン酸の蓄積を上昇させた (ED_{50} = 30 μM) 。ETH, およびAMI (各々 30 μM) によるイノシトール一リン酸蓄積の上昇は pertussis toxin (10, 30ng/ml)の前処理によって影響されなかった。Carbachol 30 μMは顕著なイノシトール一リン酸蓄積の上昇を示し、atropine 1 μMによって拮抗されたが、ETH の効果は拮抗されなかった。また、noradrenaline, serotonin, histamine, phenothiazine, carbamazepine, THA, physostigmine (各々100 μM) はイノシトール一リン酸の蓄積に対して影響しなかった (図2)。

3. コリンエステラーゼ阻害活性

Phenothiazine 系の薬物、ETH, chlorpromazine, fluphenazine, promethazine の IC_{50} は順に150 、250 、250 、450 μMであり、三環系抗うつ薬 AMI, imipramine のそれは共に800 μM以上であった。一方、THA のIC_{50}は 0.8μMであった(図3)。

[考察]

脂肪属側鎖を持つphenothiazine 系薬物 ETH、三環系抗うつ薬 AMIは in vitro の二つの異なる系、脳スライスおよびニューロブラストーマにおいてイノシトール燐脂質代謝を促進させた。しかし、両者の系における ETHのED_{50}値が、10倍以上異なった。おそらく、二つの系の間において、膜透過性、並びに薬物の物理的反応性が異なること、G蛋白の種類、分布が異なることなどに起因するものと考えられる。、一方、phenothiazine 自身や側鎖の短い、または側鎖をもたない三環系薬物は、いずれの系においてもイノシトール一リン酸の蓄積に対して影響を示さなかった。これは、ある長さを持った脂肪属やピペリジン側鎖が、イノシトール一リン酸の蓄積を上昇させる作用機構において、構造的に重要な役割を持つ可能性を示唆している。ETH のイノシトール燐脂質代謝促進作用は、ムスカリン性アンタゴニスト、α_1-アンタゴニストで拮抗されないこと、NB-OK1細胞においては、noradrenaline, serotonin, histamine 刺激によりイノシトール一リン酸の蓄積に影響がないこと、更には、薬物のコリンエステラーゼ阻害効果とイノシトール一リン酸の蓄積上昇の効果の間には直接的な相関が認められないことなどから、特定の受容体を介さない情報伝達経路を刺激してこの反応を引き起こすことが示唆される。インタクトな組織や膜をアルキル化剤 NEMにより処理すると、G蛋白が不活化されることが報告されている(2). 今回、海馬スライスを NEMで前処理しておくと、ETH のイノシトール一リン酸蓄積上昇作用は NEMの濃度依存的に拮抗された。一方、G_i およびG_oの一部を不活化するとされるPTX でNB-OK1細胞を前処理しても、ETH のイノシトール一リン酸蓄積上昇の効果は影響を受けなかった。以上の結果より、ETH は特定の受容体を介さずに、NEM 感受性、PTX 非感受性のG蛋白を直接的に刺激することにより、イノシトール燐脂質代謝を促進する可能性が考えられる。

[文献]

1. Baubichon, D., Bourjaillat, M., Kerhoas, F., and Blanchet, G. (1988) Trav. Scient. 0, 111-112
2. Chad, J., and Wheal, H. (1991) Molecular Neurobiology, Oxford Univ. Press, p105
3. 三国雅彦. (1991) 臨床精神医学 20, 415-420
4. Nakagawa-Yagi, Y., Saito, Y., Takada, Y., and Nakamura, H. (1992) BBRC 182, 45-54
5. Ogane, N., Giacobini, E., and Messamore, E. (1992) Neurochem. Res. 17, 489-495
6. Ogane, N., Giacobini, E., and Struble, R. (1992) Brain Res. (in press)
7. Osborne, N. N. (1988) Neurochemm. Res. 13, 105-111

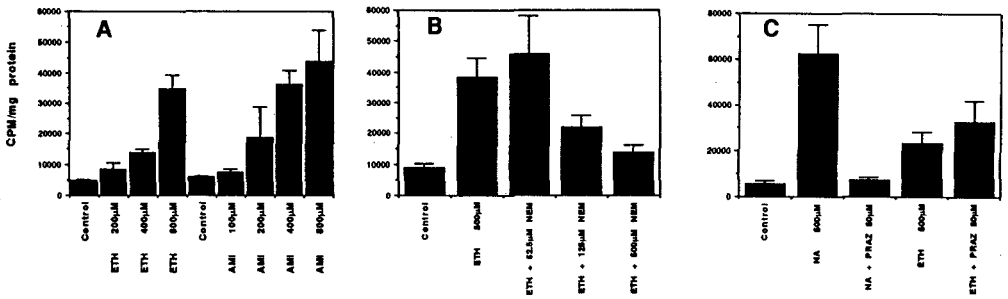


図1. ラット海馬スライス、IP_1 蓄積における ETH, AMI (A)、NEM (B)、および Prazosin (C)の効果

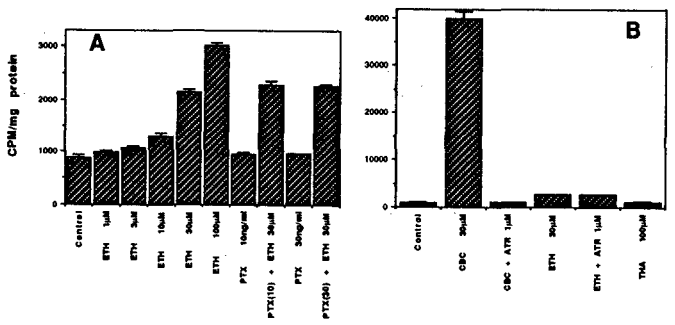


図2. NB-OK1細胞、IP_1 蓄積における ETH, PTX (A)、Atropine (B) の効果.

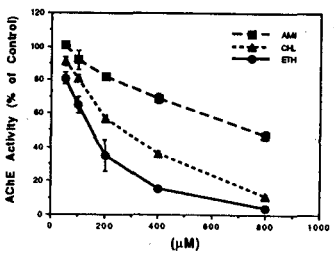


図3. AMI, Chlorpromazine, ETH の コリンエステラーゼ阻害効果.

250 塩酸ビンコナート(OM-853)のラット脳内イノシトールリン脂質代謝系に及ぼす影響

桂 昌司、飯野年昭、栗山欣弥
(京都府立医大・薬理)

〔要約〕

塩酸ビンコナート(OM-853)の脳内イノシトールリン脂質(PI)代謝系に及ぼす影響について、ラット大脳皮質切片および脳膜画分を用い、PI代謝回転および膜結合型／細胞質遊離型phospholipase C(PL-C)活性を指標として検討した。OM-853(10^{-7}～10^{-3} M)は、[^{3}H]inositol phosphate([^{3}H]IP)生成を濃度依存的に亢進させた。このOM-853による[^{3}H]IP 生成の増加は、10μMのatropineの存在下においても約50 %の阻害しか認められなかった。 OM-853による[^{3}H]IP生成増加作用は、低K^+(20 mM)、あるいはαおよび5-HT受容体拮抗薬であるphentolamine(10μM) およびketanserin(10μM)によってもまったく影響を受けなかった。 また、carbachol(car.)による[^{3}H]QNB結合の阻害反応に対するGTP(100μM)の効果は、OM-853(20μM)添加により消失した。 一方、OM-853は膜結合型および細胞質遊離型のいづれのPL-C活性も濃度依存的に増強した。したがって、OM-853によるPI代謝系の亢進には、一部ムスカリン(M)受容体の活性化が関与するが、M受容体とGTP結合蛋白質(G蛋白)との共軛系、あるいはPL-Cへの直接作用によっても生じる可能性が示唆される。

［目的］

特異的リガンドにより諸種の受容体が活性化されると、PI代謝の亢進が起こることはよく知られている。近年、ラット脳内ポリホスホイノシチド(PPI)が虚血により速やかに減少することが報告[5]されて以来、 神経細胞の部位別選択的脆弱性に脂質代謝が深く関与することが示唆されるようになった。また、ラット大脳皮質、海馬および線条体においても、老化に伴い、M_1受容体・百日咳毒素非感受性G蛋白質(Gp)・PL-C 機能の低下が報告[10]されており、これらが学習や記憶の障害の原因となることが推察されている。[(±)-methyl-3-ethyl-2,3,3a,4-tetrahydro-1H-indolo[3,2,1-de][1,5]naphthyridine-6-carboxylate monohydrochloride, OM-853] は、indolonaphthyridine 骨格を有する新規化合物であり、これまでの薬効薬理学的解析[1,7,8,11]により、 脳代謝改善薬としての有用性が期待される薬剤である。そこで、今回我々はOM-853の脳内情報伝達系へ及ぼす作用について、PI代謝系を中心として検討した。

［方法］

実験には、体重200gのWistar系雄性ラット（日本エスエルシー㈱、静岡）を使用した。

1)[^{3}H]IP生成量の測定：[^{3}H]IP生成量はOhkumaらの方法[9]を若干改変することにより行った。すなわち、常法により作製した大脳皮質切片(200μm)を、5 mM LiClおよび0.25μM [^{3}H]myo-inositolを含むKrebs-Ringer(K-R)液中で37℃、60 minのプレインキュベーションを行った。反応は、OM-853および対照薬の存在下もしくは非存在下に、5 mM LiClを含むK-R液中で37℃、30 minインキュベーションすることにより行った。反応の停止は、methanol 添加後速やかに超音波破砕を行うことにより行った。 つぎに、得られた試料に chloroform および蒸留水を添加して脂質抽出を行った後、 水層をanion exchange resin(Dowex 1-X8)を充填したカラムに適用した。[^{3}H]IPの溶出は、Berridgeらの方法[4]に従って行い、溶出液中に存在する[^{3}H]IPの放射活性を測定した。

2)[^{3}H]QNB結合実験：Car.による[^{3}H]QNB結合の阻害反応に対するGTPの効果は、 常法により作製したラット脳膜画分をcar.(10^{-9}～10^{-3} M)および0.2 nM[^{3}H]QNBの存在下に30℃、60 minインキュベーションすることにより検討した。

3)膜結合型／細胞質遊離型PL-C活性の測定：膜結合型PL-C活性の測定は、 Bergersらの方法[3]を改変することにより行った。すなわち、ラット脳膜画分を1 mM $CaCl_2$および100 mM KClを含む20 mM Tris-HCl緩衝液を用いて作製した。なお、酵素活性は[^{3}H]phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 存在下に、37 ℃にて3 min インキュベーションした時に生成する[^{3}H]inositoltriphosphate 量により算出した。細胞質遊離型PL-C活性の測定は、Bennettらの方法[2]を若干改変することにより行った。すなわち、ラット脳を 5 mM $MgCl_2$、1 mM EDTA および250 mM sucrose を含む10 mM Tris-HCl緩衝液にてホモゲナイズして得られた上清を用いた。 なお、酵素活性は 10 mM $CaCl_2$、100 mM KCl、10 % glycerolおよび[^{14}C]PI存在下に、37 ℃にて3 minインキュベーションした時に生成する[^{14}C]diacylglycerol量により算出した。

［結果および考察］

中枢においてアセチルコリン神経系は、学習や記憶の成立や維持に重要な役割を果たしていることはよく知られている。脳代謝改善薬を薬効薬理学的に評価する場合、老齢ラット、高齢者、アルツハイマー病ならびに脳血管性痴呆患者脳などにおいて、主としてアセチルコリン神経系を賦活させることに主眼がおかれて来た。近年、ラット大脳皮質、海馬および線条体において、老化に伴い、M_1受容体・Gp・PL-C 機能の低下が報告[10]され、これらも学習や記憶の障害の原因となり得ることが報告された。 そこで、 今回OM-853の作用をPI代謝系を中心とした脳内における細胞内情報伝達系の面から解析し、OM-853の脳代謝改善薬としての特徴について検討した。

OM-853は、これまでにM受容体のアゴニストであることが報告[8]されているので、同じM受容体アゴニストであるcar.を対照として、大脳皮質切片における[^{3}H]IP生成に及ぼす影響について検討した。OM-853(10^{-7}～10^{-3} M)は[^{3}H]IP生成を濃度依存的に増大し、10^{-3} M作用時においては約172 %の増大が認められた。同様に、car.(10^{-7}-10^{-2} M)によっても、[^{3}H]IP生成量は濃度依存的に増大した。

そこで、OM-853による[^{3}H]IP生成の増大が、car.と同様M受容体を介したものなのかどうかについて、先ずatropineによる阻害効果の面から検討した。1 mM OM-853による[^{3}H]IP生成の増大は、atropine の添加により濃度依存的に阻害されたが、10μM atropineの存在下においても、約50 %の阻害しか認められなかった(Fig. 1)。一方、1 mM car.による[^{3}H]IP生成の増大も、atropineの添加により濃度依存的に阻害されたが、10μM atropine の存在下においてほぼ100 %の阻害が認められた(Fig. 1)。

つぎに、OM-853による[^{3}H]IP生成の増大がM受容体刺激のみを介したものなのかについてさらに検討を加えた。1 mM car.による[^{3}H]IP生成の増大(183 %)の程度は、低K^+(20mM)の存在下[6]においてさらに増強された(265 %)が、1 mM OM-853による[^{3}H]IP生成の増大(160 %)に対しては、低K^+に伴う増強作用は認められなかった。また、PI代謝回転を亢進させる他の受容体についても検討したところ、1 mM OM-853 による[^{3}H]IP生成の増大は、phentolamine(10μM) およびketanserin(10μM)により何ら影響を受けなかった。以上の成績より、OM-853による[^{3}H]IP生成の増大には一部M受容体が関与するが、PI代謝回転と共軛する受容体を介さない作用機序も存在することが強く示唆された。

つぎに、OM-853のM受容体を介さない[^{3}H]IP生成促進作用について検討するために、M受容体とG蛋白との共軛系および膜結合型／細胞質遊離型PL-C活性に及ぼす影響について検討を加えた。Car.による[^{3}H]QNB結合の阻害反応に対するGTP(100μM)の効果は、OM-853(20μM)添加により消失した。さらに、OM-853(10^{-6}～10^{-2} M)は、膜結合型PL-C活性を濃度依存的に増強し、10^{-2} M作用時においては約200 %の増強が認められた(Fig. 2)。同様に、細胞質遊離型PL-C活性に対してもOM-853(10^{-4}～10^{-3} M)は濃度依存的な増強作用を示した。なお、car.は膜結合型および細胞質遊離型のいづれのPL-C活性に対しても何ら影響を及ぼさなかった。

以上の成績より、OM-853によるPI代謝系の亢進には、一部M受容体が関与するが、M受容体とG蛋白との共軛系、あるいはPL-Cへの直接作用によっても生じる可能性が示唆された。したがって、本薬物はPI代謝系を中心とした脳内における細胞内情報伝達系の面から解析した場合においても、脳代謝改善薬としての有効性がある薬物であると考えられる。

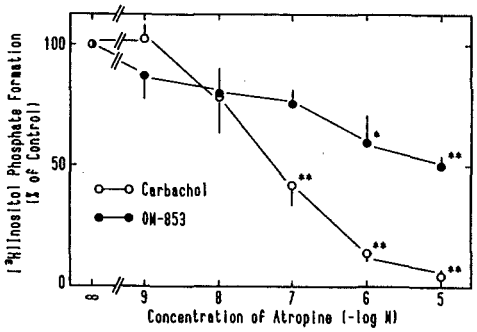


Fig. 1 Effect of atropine on carbachol- and OM-853-induced phosphatidylinositide hydrolysis in cerebralcortical slices.

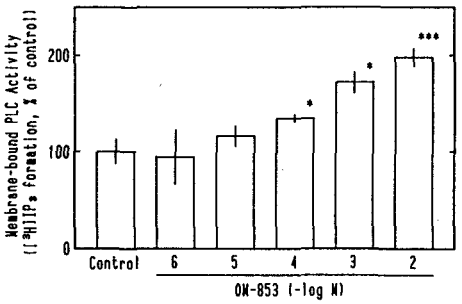


Fig. 2 Effect of OM-853 on membrane-bound phospholipase C (PLC) activity in rat brain.

[文献]

1) Araki, T., Nishioka, K., Yuki, S. and Kogure, K. (1989) Acta Neurol. Scand. 81, 173-176
2) Bennett, C. F., Mong, S., Wu, H-L. W., Clark, M. A., Wheeler, L. and Crooke, S. T. (1987) Mol. Pharmacol. 32, 587-593
3) Bergers, M., Landl, S. and Mier, P. D. (1989) Lipids 24, 13-16
4) Berridge, M. J., Downes, C. P. and Hanley, M. R. (1982) Biochem. J. 206, 587-595
5) Dawson, R. M. C. and Eichberg. J. (1985) Biochem. J. 96, 634-643
6) Eva, C. and Costa, E. (1986) J. Neurochem. 46, 1429-1435
7) Koda, H., Hashimoto, T., Katsura, M. and Kuriyama, K. (1989) Japan. J. Pharmacol. 49, 413-421
8) Koda, H., Hashimoto, T. and Kuriyama, K. (1989) Eur. J. Pharmacol. 162, 501-508
9) Ohkuma, S., Kishi, M., Ma, F-H. and Kuriyam, K. (1990) Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sec. 189, 277-285
10) Ohnuki, T. and Nomura, Y. (1991) Japan. J. Pharmacol. 57, 483-493
11) Saletu, B., Grunberger, J., Linzmayer, L. and Witter, R. (1984) Arch. Gerontol. Geriatr. 3, 127-146

251 新規M_1アゴニストＹＭ７９６の神経化学的性質

日高 和幸，秋保 啓，中村 ゆき江，山口 時男
（山之内製薬・中央研）

〔要約〕新規M_1アゴニストとして創製されたＹＭ７９６の神経化学的性質を検討した。ＹＭ７９６は、ラット大脳皮質のM_1受容体および心臓のM_2受容体結合実験より、M_1受容体に高親和性・選択性を認めた。またラット海馬のＰＩ水解を促進したが、その作用はパーシャルアゴニスト性であった。ラット心臓のＡＣ活性に対してもパーシャルアゴニスト的に抑制したが、その作用はＰＩ水解促進作用よりも高濃度で認められた。一方ＹＭ７９６は、アセチルコリン合成，遊離，分解，再取り込み系には影響を及ぼさなかった。さらにムスカリン受容体以外の神経伝達物質受容体にもほとんど親和性を認めなかった。したがって、ＹＭ７９６はM_1受容体に選択性を有するパーシャルアゴニストである事が明らかになった。

【緒言】

近年老年性痴呆症が重大な社会問題となってきており、アルツハイマー型痴呆の治療薬が切望されている。ムスカリン受容体サブタイプの１つであるM_1受容体は、病態の神経病理学的特徴であるアセチルコリン神経の脱落が認められるアルツハイマー型痴呆症の患者の脳において減少せず保存されていることが報告されている。またM_1受容体は記憶・学習と関連が深い海馬や新皮質に高分布を認め、末梢組織では少ない。したがって、M_1受容体作動薬は痴呆症状改善薬となる可能性をもっている。ＹＭ７９６（(-)-S-2,8-dimethyl-3-methylene-1-oxa-8-azaspiro[4.5]decane L-tartarate monohydrate）は山之内製薬株式会社中央研究所でM_1アゴニストとして創製された薬物であり、ラットの学習障害改善作用が報告されている(1,2)。そこで本研究では、ＹＭ７９６のムスカリン受容体作用を含めた神経化学的特徴について検討した。

【実験方法】

受容体結合：　M_1受容体結合実験はラット大脳皮質膜標本への［^{3}Ｈ］ピレンゼピン結合、M_2受容体結合実験はラット心臓膜標本への［^{3}Ｈ］ＱＮＢ結合によって検討した。受容体結合阻害曲線は、logit-logプロットによりHill係数を、one-siteもしくはtwo-siteモデルの非線型解析により高親和性部位へのＫｉ値を算出した。ムスカリン受容体以外の受容体結合実験には、ラット脳の各部位の膜標本を用いた。

細胞内情報伝達系：　M_1受容体刺激作用として、ラット海馬スライスにおけるフォスファチジルイノシトール（ＰＩ）の水解促進作用を測定した。M_2受容体刺激作用としては、ラット心臓ホモジネートにおけるアデニレートシクラーゼ（ＡＣ）活性の抑制作用を測定した。

アセチルコリン合成・遊離・分解・再取り込み：　アセチルコリンの合成，分解は、それぞれラット大脳皮質より調整した酵素分画を用いてＣｈＡＴ，ＡｃｈＥ酵素活性を測定した。アセチルコリン遊離はラット大脳皮質においてマイクロダイアリシス法で、再取り込みはラット大脳皮質のシナプトソームへのコリンの取り込みを測定した。

【結果】

ラット大脳皮質のM_1受容体結合実験において、ＹＭ７９６は比較的高い親和性を認めた。その親和性は、ラット心臓のM_2受容体への親和性よりも高かった。受容体結合実験によるM_1選択性を各種ムスカリン作動薬と比較すると、ＹＭ７９６は最もM_1選択性に優れていた(Table 1)。ＹＭ７９６は、M_1受容体と共役するＰＩ水解を低濃度より促進した。しかしながらその作用はパーシャルアゴニスト性であった。またM_2受容体と共役する抑制性ＡＣに対してもパーシャルアゴニスト作用を示した(Table 2)。一方、ＹＭ７９６の光学異性体である(+)ＹＭ７９６はM_1およびM_2受容体刺激作用を認めなかった。

YM796はアセチルコリン合成酵素であるChAT活性および分解酵素であるAchE活性には影響をおよぼさなっかた（IC_{50}＞100μM）。また無麻酔無拘束下のラット大脳皮質におけるアセチルコリン遊離（10mg/kg po）に対しても、シナプトソームへのコリン再取り込み（IC_{50}＞100μM）に対しても作用を認めなかった。

YM796はラット脳のニコチン，α_1，α_2，β，D_1，D_2，5-HT_{1A}，5-$HT_{1B,C,D}$，5-HT_2，μ-オピオイド，ベンゾジアゼピン，アデノシン$_1$受容体結合実験においてほとんど受容体親和性を示さなかった（Ki≧85μM）。

【考察】

近年の分子生物学の発展に伴い、ムスカリン受容体はm1～m5の5つの遺伝子がクローニングされている。今回我々が検討したM_1受容体はm1に、M_2受容体はm2に相当する。m1およびm2遺伝子を導入し受容体を発現させた細胞を用いた実験では、YM796はm1受容体に選択性が高くパーシャルアゴニスト性を示す事が報告されている(3)。今回の実験、すなわちラット組織に発現しているムスカリン受容体に対するYM796の作用は、受容体遺伝子を発現させた実験の結果と一致した。

YM796はスコポラミンおよび無名質破壊によるラット学習障害に対して低用量から広い用量範囲で改善作用を認めるが、末梢作用の発現は弱い。今回の実験結果よりYM796のムスカリン受容体刺激作用様式は、既知のムスカリン作動薬のうち最も高いM_1選択性を有し、パーシャルアゴニスト性である事が明らかになった。またムスカリン受容体直接刺激以外の神経化学的作用は認められなかった。したがって、YM796の広い用量範囲で認められる学習障害改善作用は、M_1受容体のパーシャルアゴニスト活性に基づくと考えられる。

Table 1. Comparison in the affinty of YM796 and other muscarinic ligands to bind M_1 and M_2 receptors.

	M_1 receptor			M_2 receptor			M_1 selectivity[1]
	nH[2]	%H[3]	K_{iHIGH}	nH[2]	%H[3]	K_{iHIGH}	(carbachol=1)
YM796	0.89	37	0.42 ±0.13 μM	0.70	49	0.91 ±0.12 μM	2.1 (5.0)
RS86	0.86	52	0.099±0.009μM	0.62	46	0.12 ±0.05 μM	1.2 (2.8)
AF102B	0.91	55	0.19 ±0.09 μM	0.70	47	0.16 ±0.02 μM	0.85 (2.0)
Carbachol	0.58	55	0.087±0.014μM	0.44	60	0.038±0.011μM	0.43 (1.0)
Pilocarpine	0.78	46	0.068±0.009μM	0.71	48	0.056±0.005μM	0.82 (1.9)
Arecoline	0.73	46	0.094±0.015μM	0.52	61	0.017±0.002μM	0.17 (0.41)
Oxotremorine	0.79	45	9.8 ±2.4 nM	0.51	60	0.81 ±0.15 nM	0.082(0.19)
(+)YM796	1.04	100	5.9 ±0.2 μM	0.98	97	36 ±4 μM	6.2
Atropine	1.07	108	0.22 ±0.03 nM	1.05	99	1.3 ±0.1 nM	5.8
Pirenzepine	1.03	100	3.0 ±0.1 nM	0.97	98	660 ±30 nM	220
AFDX-116	1.02	100	0.51 ±0.01 μM	1.04	100	0.086±0.008μM	0.17

[1] M2/M1 K_{iHIGH} ratio [2] Hill coefficient [3] % of high affinity state

Table 2. Effects of YM796 and other muscarinic ligands on 2nd messenger system.

	PI hydrolysis		inhibition of AC	
	MEC[1]	E_{max}[2]	EC_{50}[3]	E_{max}[2]
YM796	10	11	54	49
RS86	10	27	6.2	64
AF102B	>1000	NE	6.4	35
Carbachol	10	100	3.5	100
(+)YM796	>1000	NE	>1000	NE

[1] Minimum effective concentration, μM
[2] Relative to carbachol=100 [3] μM

【引用文献】

(1) Wanibuchi F., et al. (1990)
Eur. J. Pharmacol., 187, 479-486

(2) Wanibuchi F., et al. (1991)
Society for Neurocience abstracts, 17, 1234

(3) Wei H. et al. (1992)
Life Sci., 50, 355-364

252 神経伝達物質およびシアル酸化合物刺激依存性の白鼠交感神経節内トランスグルタミナーゼ活性発現の細胞局在性

安藤正人・國井修一・立岑廷族・永田　豊　（藤田保健衛生大・医・生理）

[要約]白鼠上頸交感神経節(SCG)の transglutaminase (TG)活性は、脱分極性神経伝達物質 acetylcholine(ACh)刺激により極めて短時間にかつ著明に増大するが、過分極性伝達物質 norepinephrine (NE)添加により急速に低下することが認められている(2)。このようなシナプス伝達刺激に伴って変動するSCG内TG活性発現の細胞局在を探るために、節前神経を切断してその神経末端を変性させ、神経節細胞を残存させたdenervated SCGと、節後神経を切断して神経節細胞の変性と反応性グリア細胞増殖を生じたaxotomized SCGとを用い、AChとNEのみならず、TG活性を修飾することが知られているGM1-ganglioside (GM1)や合成 sialyl cholesterol(SC) を添加して、SCG内TG活性を測定し、これらを非手術 intact SCGの成績と比較検討した。①脱分極性 ACh(0.1mM)刺激によるTG活性の著明な増大効果は、denervated SCGでも充分に保持(3.6倍)されて認められたが、この上昇は、atropine のみならずhexamethonium によって強力に阻止された。②Denervated SCGでは、NE(10μM) 添加刺激による交感性ニューロンの過分極状態に対応したTG活性の有意な抑制効果(51%)が示されたが、propranololあるいはprazosinやyohimbineの同時添加では、この効果は有意に回復した。③一方、axotomy後の神経節では AChとNEによるTG活性の促進と抑制の相反効果は完全に消失し、各種神経伝達遮断剤の同時添加も無効であった。従って、神経伝達刺激依存性 SCG内TG活性の発現は明かに節後ニューロンに局在して、神経細胞膜の興奮とその回復過程に対応して調節される現象であることが明確となった。④興奮性のシナプス伝達を修飾するGM1あるいはSCは、SCG内TG活性を著明に促進するが、この効果は denervated SCGでは全く示されず、axotomy神経節では充分保持されて認められた。つまり、シアル酸化合物は明かに SCG内の節前末端部位に作用して、TG活性化応答を引き起こしている可能性が推定された。

[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、脱分極性神経伝達物質のAChを含む生理溶液中で好気的にインキュベートすると、SCG内可溶性タンパクの非流動化(固定)反応をCa^{2+}-依存性に触媒するTG酵素活性は急速(30分以内) にしかも著明に増大することが認められている。さらに、交感性神経伝達物質のNEで SCGを過分極状態にすると組織内TG活性は急速にかつ有意に抑制される現象が示された。 つまり、神経伝達刺激によるニューロン膜の興奮(脱分極) あるいはその抑制(過分極)の極く短い時間経過に対応して、SCG内 TG活性は急激な上昇あるいは低下を示す相反した変動が引き起こされていることが示された(2)。今回は、予めdenervation 手術を施行後1週間経過して節前神経末端のワーラー変性を生じさせても神経節細胞は保存されている標本、ならびに axotomy手術によって交感性ニューロンの逆行性変性による脱落と反応性に周辺グリア細胞の増殖を来した SCG標本をそれぞれ作製し、術後の SCG内TG活性のAChとNE刺激による変動を測定して、非手術SCG で示されたTG活性の変化と比較して、TG酵素活性発現がSCG内の節前末端か、節後神経細胞体か、あるいはグリア細胞の何れで応答したのかを検討した。一方、シナプス部位に濃縮して局在する糖脂質のGM1や合成 sialyl cholesterol (SC)はSCG内TG活性を著明に上昇させることが知られている(3)。またGM1やSCは脱分極刺激依存性の TG活性を修飾(促進あるいは抑制)する(1)ので、これらシアル酸化合物作用点の細胞局在性も同様な手術後神経節標本を用いて検索した。

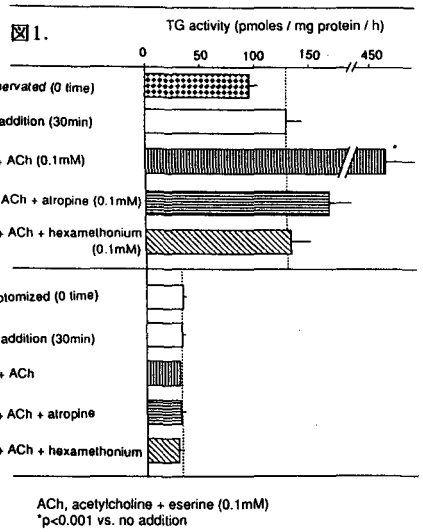
[実験材料および方法]①成熟白鼠を用い、SCGの denervation およびはaxotomy 手術、さらに神経節の摘出方法は既報(5)に従い実施した。②術後1週間経過して摘出した SCG組織内TG活性、また種々の薬剤を含む生理溶液中でインキュベーション(1-3)後の神経節標本内酵素活性は、何れもLorandらの方法(4)に準じて測定した。

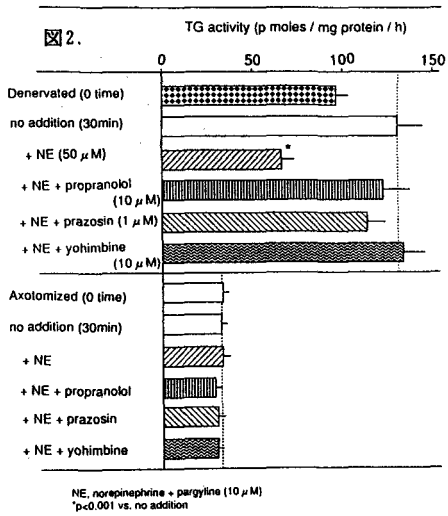
[実験成績および考察]①<u>Denervation あるいは axotomy手術後のSCG内TG活性におよぼすAChおよびNE神経伝達物質の添加効果</u>: 術後1週間目のTG活性は、denervated SCG では非手術対照値(120 pmoles/mg protein/h)の約80%に保たれていたが、axotomized SCGでは対照レベルの1/8 以下に低下していた。従って、損傷刺激で変動する節内のTG活性はコリン作動性節前末端ではなくて、交感性のニューロン内に限局することが強く考えられた。そこで、術後1週間目の摘出SCG標本を、ACh(0.1mM) あるいはNE(50μM)を添加した生理溶液中で好気的に30分間インキュベーションを行った後に、これらSCG内TG活性を測定した。その結果は、非手術intact SCGで認められたACh脱分極刺激によるTG活性の著明な増大効果(2)は、denervated SCG でも充分保持(3.6倍)されていた(図1)。そして、この ACh刺激依存性のTG活性の上昇は、intact SCG の場合と同様 muscarinic cholinergic blocker の atropine (0.1mM)を添加すると、有意に抑制されるのが認められた。また、nicotinic antagonistのhexamethonium (0.1mM)を同時添加すると、AChによるTG活性化レベルは atropineよりも強力に完全に非刺激活性値迄拮抗されることが見られた(図1)。一方、NEを添加してSCG細胞膜を過分極状態にすると非手術神経節内TG活性が有意に低下する(2)が、denervation 後のSCGではさらに著明な抑制効果(51%)が認められた(図2)。この時、adrenergic のβ受容体を特異的に遮断するpropranolol(10μM)をさらにNEと共に添加すると、NE刺激依存性TG活性の低下はほぼ対照値に迄回復した。同様に、adrenergic α_1-antagonist のprazosin (1μM)あるいはα_2-blockerのyohimbine(10μM)の同時添加は何れもNEによる SCG内TG活性の抑制効果を有意に消失させたが、その程度は後者でより著明であった(図2)。しかし、axotomy 手術を施行した神経節では、ACh のみならずNE によるTG活性変動の相反効果は完全に消失した(図1および2)。このような反応性の消失状態では、さらにintact SCGで見られたようなcholinergicあるいは adrenergic の各種受容体遮断剤を添加して生ずるSCG内TG活性変動効果も全く示されなかった(図1および2)。つまり、節後ニューロンの脱落と反応性にグリア細胞が増殖したaxotomy 後の神経節では、非手術SCGで認められたAChあるいはNE神経伝達物質の相反したTG活性調節は完全に消失したことから、グリ

ア細胞内のTG活性化の関与は否定的と考えられる。しかし、節前神経末端は変性するが節後ニューロンは完全に保持されているdenervated SCGでは、非手術神経節標本の場合と同様に神経伝達物質が節後ニューロン膜上のそれぞれの受容体を介し生ずるTG活性変動と質的に類似した傾向が見られた。今回の実験成績から、ACh は明かに節後ニューロン膜上のmuscarinic よりも nicotinic受容体と結合する結果、節後交感性ニューロン膜の興奮(脱分極)を引き起こしてニューロン内の TG活性の上昇を引き起こしたことが考えられた。一方、交感性ニューロンに抑制状態を生じさせるNE刺激によって SCG内TG活性は低下したが、この一連の反応調節もまた節後ニューロン膜に限局していることが明瞭となった。 ②シアル酸化合物依存性のSCG内TG活性発現の細胞局在性: シナプス部位に濃縮して存在するGM1はintact SCG内TG活性を短時間内で著明に活性化することを認めている(図3)(3)。また、GM1 や 合成SCは 膜のK^+-channel を直接活性化する 高KCl(50mM) 条件あるいは Na^+-influx を増大する veratridine 刺激脱分極に依存した SCG内TG活性をそれぞれ抑制あるいは促進する作用を引き起こすことが明かとなっている。このように、興奮性のシナプス伝達の過程をもシアル酸化合物は積極的に修飾している可能性が示唆された(1)。 そこで、術後のSCG標本を用いてGM1(5nM)とSC(20μM)添加によるTG活性化効果を検索したところ、denervated SCG標本では両シアル酸化合物刺激は何れも無効であったが、axotomy手術を施したSCGでは有意なTG活性の上昇が認められた(図3)。今回の成績から、シアル酸化合物は明かにSCG内の節前末端部位に作用した結果、TG活性化応答を引き起こす可能性が強く推定された。しかし、axotomy 手術で増殖した非ニューロン性グリア細胞で発現するTG活性の生理的な意義は不明であり、今後の解析が必要と思われる。

[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)の援助に依った。

[文献](1)Ando and Nagata(1992) Mol.Chem.Neuropathol.(in press).(2)Ando et al.(1991)Neurosci. Res. 12:356-365 (3)Ando et al.(1991)J. Neurochem.57:1848-1854(4)Lorand et al.(1972)Anal.Biochem. 72:248-252 (5)Nagata et al.(1987)J. Neurochem. 49:296-302.





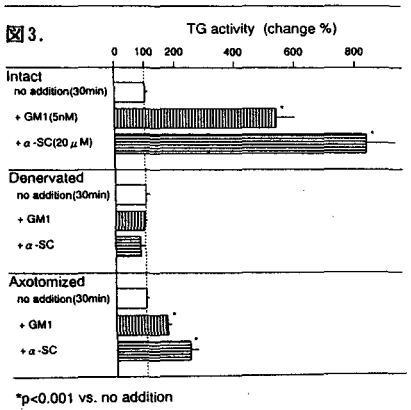


図1. Denervation あるいは axotomy 後の SCG 内TG活性におよぼすAChおよび拮抗剤の添加効果

図2. Denervation あるいは axotomy 後の SCG 内TG活性におよぼすNE および拮抗剤の添加効果

図3. Denervation あるいは axotomy 後の SCG 内TG活性におよぼすGM1 あるいは SC の添加効果

253 ラット脳におけるプロサポシンの分布

近藤啓次、佐野輝、柿本泰男、松田正司*、阪中雅広*
愛媛大学医学部　神経精神医学教室、*第二解剖学教室

〔要約〕 スフィンゴ脂質活性化蛋白質前駆体（プロサポシン）のラット脳における分布を検討した。ラット脳を7部位に分けた部位別のウェスタンブロットにおいて、プロサポシン（分子量約72 kDa）は海馬、脳幹、小脳、線状体、視床下部に豊富に存在し、成熟型サポシン（分子量約10 kDa）はどの部位においても観察されなかった。免疫組織化学的手法による結果はウェスタンブロットと同様に、皮質下に多くの反応が見られた。その反応のほとんどは神経細胞体および線維に見られ、グリア細胞にはほとんど観察されなかった。コリン作動性ニューロンが多いとされる神経核に反応が強く見られ、それらの神経核が投射する部位において、神経線維が陽性に染色された。とりわけ、聴覚系では、2次又は、3次ニューロンまでの神経細胞体、線維が陽性に観察された。中枢神経系では、前駆体のプロサポシンとしてそのほとんどが存在し、神経細胞体において合成され、軸索内をターミナルへと運ばれることが考えられた。

［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。四種の活性化蛋白質であるサポシンA, B, C, Dは、プロサポシンという同一の前駆体から生じることが核酸レベルの研究から判明した[1]。また、プロサポシンは、ラット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[2]。SGP-1は精子形成の分化過程に関与し、何らかの制御機能を担っている物質と考えられている。胎生期ラットでは脳幹と性殖隆線にSGP-1が強く発現していること[3]も同様の機能を想定させる。我々は成熟ラットでプロサポシンが脳や筋肉組織に豊富に存在し[4]、サポシンへとリソゾームでプロセスされる以外に、前駆体プロサポシン自身が細胞外へ分泌されること[5]を証明してきた。さらに、ヒト母乳からプロサポシンを単離精製し、その特徴を明らかにした[6]。前駆体であるプロサポシンが、脳および脳脊髄液に多量に存在することから、中枢神経系におけるプロサポシンの意義を明らかにする目的で、免疫組織化学的検討を行なった。

［方法］1）ウェスタンブロット法：ラット脳は、Glowinski and Iversenの方法[7]により分割した後、10 mMリン酸緩衝液でホモジナイズし、10000g X 30 minで遠心後の上清をウェスタンブロットのサンプルとした。抗体は、既報のとおりウシ脾臓から精製されたサポシンCを免疫原として家兎に注射して得られた抗血清を抗原カラムを用いて、精製した[4]。2）免疫組織化学：ラットをペントバルビタール麻酔下、経心臓的に、Zamboni液で灌流固定し、2日後マイクロスライサーを用いて50 μmの厚さにスライスした。5% normal swine serum (NSS) and 5% BSA in PBS中にて blockingしさらに、5% BSA, 1% NSS and 0.25% carrageenan in PBS中に浸透させた後、1 μg/mlの濃度の抗体と1昼夜4 ℃にて反応させ、その後はcobalt-glucose oxidase-diaminobenzidine法を用いた[8]。

［結果］1）ウェスタンブロット：ラット脳のどの部位においてもサポシンCは検出されなかった（図1）。約72 kDaの主なバンドと約100 kDaのバンドがいくつかの部位に検出された。脳幹、視床下部、小脳、線状体、そして海馬に豊富に見られ、大脳皮質には、ほとんど見られなかった。

2）免疫組織化学：図2に、prosaposin-like immunoreactivity (PS-IR)の分布を示した。（ニューロンは● で、線維は・で示す。）皮質下に多くの反応が見られ、ウェスタンブロットの結果と一致した。またPS-IRは、神経細胞体や線維に検出され、グリア細胞には、ほとんど観察されなかった。コリン作動性ニューロンとされる神経核（マイネルトの基底核、脳神経核等）にほぼ一致して反応が見られた。他に網状視床核が特に強く、小脳Purkinje細胞は細胞体やその突起に陽性の反応が観察された。それらの神経核が投射する部位において、神経線維が陽性に染色された。聴覚神経系では、2次又は、3次ニューロンまでの神経細胞体、線維が陽性に観察された。

［考察］約72 kDaのバンドは、ヒト母乳のプロサポシンとその分子量が一致し[6]、SGP-1ともほぼ一致し

プロサポシンと考えられた。約100 kDaのバンドもいくつかの部位で検出されたが、糖鎖の違いと考えた。ラット脳では、サポシンは検出されない程度の量しか存在せず、そのほとんどが、前駆体のプロサポシンとして存在していた。また、大脳皮質は他の領域に比べ、含有量が少なかった。プロサポシンはある種の特定の神経核にのみ存在し、その投射している領域にプロサポシン免疫陽性な顆粒が観察されるという免疫組織化学の結果から、軸索内を細胞体から、ターミナルへと輸送されていることが強く示唆された。また、海馬でCA1,2,3領域の錐体細胞層の周囲にプロサポシン免疫陽性のターミナルが多数検出されたことから、シナプスにおいてプロサポシンが分泌される可能性も考えられた。既に報告したように、生後ラット脳でプロサポシンは増加し[4]、各種の分泌液、特に脳脊髄液に多く含まれている[5]。以上の結果から、前駆体であるプロサポシン自身が生体内とりわけ中枢神経系において、何らかの生理活性を有すると考えられた。

[文献]

1). O'Brien J.S. et al. (1988) Science 241, 1098-1101
2). Collard M. W. et al. (1988) Biochemistry 27, 4557-4564
3). Levy H. et al. (1991) Dev. Neurosci. 13, 352-362
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). Kondoh K. et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm. 181, 286-292
7). Glowinski J. and Iversen L. (1966) J. Neurochem. 13, 655-669
8). Sakanaka M. et al. (1987) J. Comp. Neurol. 260, 256-298

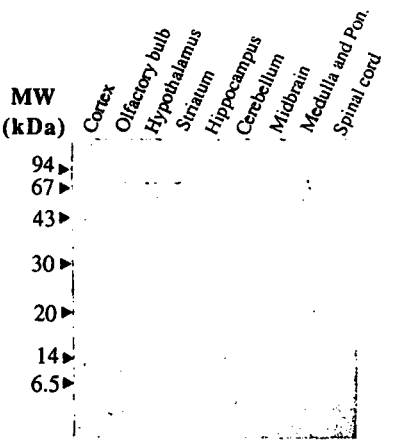


図1　ラット脳部位別ウエスタンブロット (20 μg protein /lane)

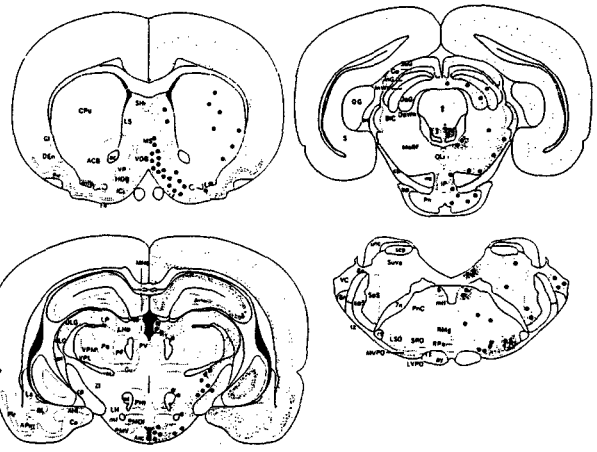


図2　Prosaposin-like immunoreactivity (PS-IR) のラット脳内分布

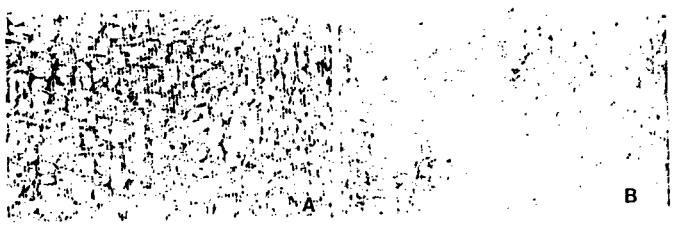


図3　脳幹におけるプロサポシン陽性ニューロンと吸収抗体を用いた対照実験
(A: anti-bovine saposin C Ab, B:antibovine saposin C Ab + saposin C)

254 desipramine連続投与によるマウス脳内tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase免疫反応性の減少 －半定量的免疫組織化学的検討－

園見由佳理[1)]、山岡功一[1)]、小森　薫[1)]、内藤　宏[1)]、山岡久也[1)]、伊藤哲彦[1)]、笠原　嘉[1)]、永津郁子[2)]
[1)]藤田保健衛生大学医学部精神医学教室
[2)]藤田保健衛生大学医学部第二解剖学教室

〔要約〕

抗うつ薬の作用機序として、その連続投与後の、5-HT_2, β-adrenaline受容体の減少やnoradrenaline sensitive adenylate cyclase活性の減少というpost synaptic adaptive change が考えられている。また6-hydroxydopamineによって青斑核でのカテコールアミン合成を阻害した動物ではこの抗うつ薬によるβ-adrenaline受容体のdown regulationは起らないとの報告もある。このことから抗うつ薬はnoradrenalineの代謝、合成にも影響を与えている可能性が考えられる。

今回、我々はストレスに関連性の深い青斑核に着目し、カテコールアミン系生合成の律速酵素であるtyrosine hydroxylase チロシン水酸化酵素（以下TH）、aromatic L-amino acid decarboxylase 芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素（以下AADC）のdesipramine連続投与による変化を、免疫組織化学的手法を用いて形態学的に観察した。加えて、従来の組織化学的検索では、その変化自身を定量化しえないという欠点をもっていたが、その欠点を補い客観的評価を行うために、画像処理解析装置 (Nikon社、LUZEX 2D) を用いて、免疫組織化学法の定量化への試みを行った。

＜方法＞

実験には体重31-34g のDDY系雄性マウスを用いた。抗うつ薬としてdesipramineを用い、マウスに20 mg/kgを腹腔内に14日間連続投与した。生理的食塩水を同様に投与したマウスを対照とした。マウスは薬物の最終投与24時間後にネンブタール麻酔し、開胸後、左室より4%パラフォルムアルデヒド固定液を注入し、灌流固定した。その後大脳を取り出し、同固定液にて一昼夜振盪し後固定した。後固定後、庶糖加リン酸緩衝液にて洗浄を加え、凍結包埋し、クリオスタットで40μmの連続切片を作製し、PAP法の手順に従い、免疫染色を行った。

この際用いた抗体は、共同研究者である永津らのグループにより、IgG分画まで精製されたTH及びAADCに対する抗体であり、純度、抗体価ともに高く信頼のおけるものである。

＜結果＞

抗TH抗体を使用した対照群の青斑核における免疫組織学的反応ではTH陽性細胞が認められた。desipramine投与群の青斑核のTHの免疫反応性は対照群に比して低下していた。

抗AADC抗体による免疫組織学的反応では対照群においてAADC陽性細胞が認められた。同じくdesipramine投与群ではTH同様に免疫反応性の低下を認めた。

この様にTH、AADC両者の免疫組織化学的反応は対照群に比し、desipramine投与群では、明らかに低下を示していた。さらに、その染色性も均一ではなく青斑核内で不均一な傾向を示した。また、desipramine投与群において、脳内の他の部位で、神経細胞の変性及び脱落像等の病理学的な変化は認められなかった。

ついで、画像処理解析装置 (Nikon社、LUZEX 2D) を用いて、免疫組織化学法の半定量的測定を行った。このシステムは、光学顕微鏡を通してＴＶモニター上に画像として投影し、各領域ごとの透光性に伴う平均染色濃度をコンピューターで測定するものである。また、小脳皮質は特異的には染色されないため、小脳皮質の染色性をコントロールとして、青斑核と小脳皮質の濃度差を測定値とした。本機の基礎検討として、クリスタルバイオレットの段階希釈の透光性測定を行った結果、濃度に比例する反応が得られ、本機の有効性が確認された。

先に示した免疫組織化学法の結果について微量測光システムを用いて、半定量的測定を行った。この結果としてdesipramine投与群は対照群に比し、THは75%程度、AADCでは、約80%程度の免疫反応性の低下を認めた。

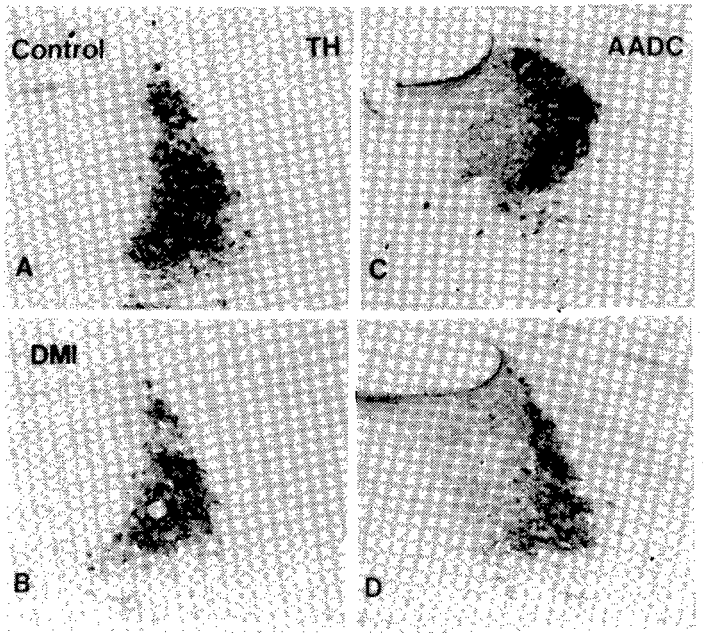


Fig.1 上段が対照群、下段がdesipramine投与群。tyrosine hydroxylase (TH), aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) の免疫組織反応像。ともにdesipramine投与群で対照群に比し反応性の低下を示す。

＜考察＞

我々の今回の結果は、マウス青斑核においてdesipramineによってカテコールアミン合成の第一段階及び第二段階である、TH、AADCの酵素免疫反応性が明らかに低下したことを示している。

desipramine連続投与によるTH活性の減少は古くから報告されている(Segal)。さらに近年抗うつ薬のTH mRNAへの影響に関して報告されている。Nestlerら (1990) は、各種抗うつ薬の連続投与や電気けいれん療法の処置が特異的に青斑核のTH蛋白を減少させることを報告した。さらに彼等はimipramine連続投与によって青斑核におけるTH mRNA量が減少することを報告している。Schulzbergら(1991)はdesipramineはreserpine投与によって増加したラット青斑核のTH mRNA量は減少させるがdesipramine単独投与ではその量的変化は引き起こさないことを報じている。このように現在の所、抗うつ薬によるTH mRNA量の変化に関しての報告は一定していない。

現在、抗うつ薬によるTH減少のメカニズムはわかっていないが、今回示したTH、AADCの免疫反応性の低下は、おそらく細胞内の酵素蛋白自身の減少を示唆するものである。これはdesipramineによるTH活性低下の背景に存在する機序である可能性を示唆する。従来の知見と併せて、抗うつ薬はノルアドレナリン情報伝達系にシナプス前後で抑制をかけていると考えられ、desipramineの作用機序の一因をなしていると思われる。

＜文献＞

1)Segal D.S., Kuczenski R. and Mandel A.J. (1974):Biol. Psychiatry 9, 147-159

2)Schulzberg M., Austin M.C., Crawley S.M. and Paul S.M.(1991):Molecular Brain Resarch 10, 307-314

3)Nestler E.J., McMahon A., Sabban E.L., Tallman J.J. and Duman R.S.(1990):Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 87, 7522-7526

255

An Immunohistochemical Study of Copper-Zinc Superoxide Dismutase in Rat Hippocampus after Transient Cerebral Ischemia

Xiao-Hong Liu, Hiroyuki Kato, Naoki Nakata, Kenshi Murase
Yong Liu, Ting Chen and Kyuya Kogure
Department of Neurology, Institute of Brain Diseases,
Tohoku University School of Medicine, Sendai

SUMMARY

We investigated the distribution and changes of Copper-Zinc superoxide dismutase (Cu-Zn SOD) in rat hippocampus after 5 and 10 min cerebral ischemia by 4-vessel occlusion. The CA1, CA3 pyramidal neurons and subgranular layer of the dentate gyrus showed intense immunostaining of Cu-Zn SOD in normal condition. CA1 pyramidal neurons reduced the enzyme staining 1 day after 10 min ischemia when no histological damage was observed, and totally lost the staining after 7 days, when CA1 neurons were completely damaged. The reactive astrocytes produced this enzyme after ischemia, which may help reducing the injuries to the neurons from the free radicals and clearing away the debris.

INTRODUCTION

Superoxide, generated during the monovalent metabolic reduction of oxygen, is toxic to the cells in which it is produced. The radicals have the capacity to initiate destructive reactions on biological membrane and cellular structures by activating lipid peroxidation and altering membrane phospholipid components, and also to increase output of excitatory amino acid thereby triggering the delayed neuronal death following transient cerebral ischemia. (1, 2, 3). Superoxide dismutase (SOD), a scavenger of superoxide, plays an important role in protection against superoxide anion radical-mediated cell injury. Cu-Zn SOD is one major form of intracellular SOD existing in cytoplasm. The purpose of this study is to investigate the distribution and changes of Cu-Zn SOD after ischemia in the rat hippocampus by immunohistochemistry.

MATERIALS AND METHODS

Thirty adult male Wistar rats were used. Forebrain ischemia was induced for 5 and 10 min by 4-vessel occlusion followed by survival of 1 and 7days. Body temperature was maintained at 37°C during the operation. The brains were perfusion-fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (pH 7.2). Frozen brain sections at 20 um thickness were prepared and used for immunohistochemistry. Antihuman polyclonal Cu-Zn SOD antibody (Ab) (The Binding Site Ltd Birmingham, UK) and avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Labs, Burlingame, CA. U.S.A.) were used. The sections were incubated with the Cu-Zn SOD Ab (1:500) overnight at 4°C, with biotinylated Ab 1h at room temperature, and with ABC 1h at room temperature, and developed in substrate medium containing 0.03% diaminobenzidine and 0.006% H_2O_2 in PBS for 3.5 min at room temperature. (4). We also stained the sections with glial fibrillary acidic protein (GFAP) and cresyl violet.

RESULTS

The control brains were well stained with Cu-Zn SOD in the whole hippocampus especially in CA1 and CA3 pyramidal neurons and subgranular layer of the dentate gyrus (Fig. 1). However, the animals subjected to 5 and 10 min ischemia showed reduced Cu-Zn SOD immunoreactivity in the CA1 neurons 1 day after ischemia. Seven days after ischemia, we observed complete loss of Cu-Zn SOD positive CA1 pyramidal neurons, but appearance of many Cu-Zn SOD positive cells distributed in CA1, most of which were irregular in shape and located near the capillaries. Some looked like reactive astrocytes and accumulated in the dendritic and pyramidal layers of CA1 (Fig. 2). The GFAP immunostaining showed proliferation of GFAP positive cells after ischemia and GFAP positive

astrocytes in normal hippocampi had a ramified form with many fine branches, but those in ischemic hippocampi contracted their processes and acquired stouter morphology (Fig. 3 and 4). The distribution of GFAP positive astrocytes in the 10 min ischemia group was similar to that of Cu-Zn SOD positive cells after 7days of survival (Fig. 2 and 4).

DISCUSSION

The present result showed that normal CA1 pyramidal neurons contain high Cu-Zn SOD activity, but Cu-Zn SOD begins to be reduced in CA1 pyramidal cells by 24h after 5 and 10 min ischemia. We also found that the production of Cu-Zn SOD in the hippocampus 24h after ischemia is partly provided by glial cells, and 7 days after ischemia, proliferative astrocytes have Cu-Zn SOD activity in CA1. The mobilization of astrocytes for production of Cu-Zn SOD may help clearing away the debris and maintain fundamental metabolism of surviving neurons after ischemia. However, it should be emphasized that Cu-Zn SOD activity was lost before histological neuronal destruction took place. Thus, the reduction of the SOD activity may play a critical role in delayed neuronal death of CA1 pyramidal cells after ischemia. Therefore, it may be possible that *treatment* with SOD protects the neurons against ischemic neuronal damage. Further studies are necessary to clarify the precise role of Cu-Zn SOD in ischemic neuronal damage.

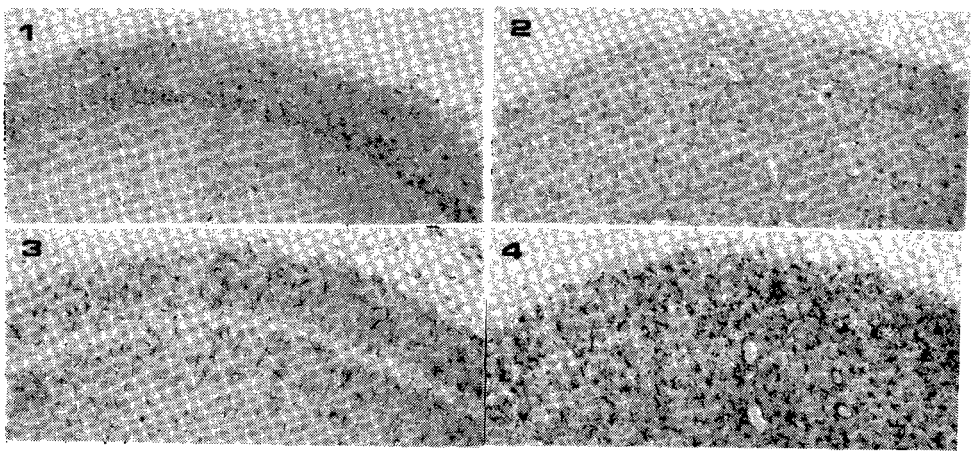


Fig. 1 Cu-Zn SOD immunohistochemistry in normal CA1 subfield of the hippocampus. The pyramidal neurons are well stained with Cu-Zn SOD which locates in the cytoplasm. (x100)

Fig. 2 Cu-Zn SOD immunohistochemistry in CA1 7 days after 10 min ischemia. The pyramidal neurons totally lost Cu-Zn SOD, but Cu-Zn SOD positive cells are observed in CA1, most of them look like reactive astrocytes. (x100)

Fig. 3 GFAP immunohistochemistry in normal CA1 subfield of the hippocampus. The GFAP reactive astrocytes homogeneously distribute in this area. (x100)

Fig. 4 GFAP immunohistochemistry in CA1 7 days after 10 min ischemia. The reactive astrocytes change their forms compared with non-ischemic astrocytes. (x100)

References:
1. Uyama. O., et al. (1992) Stroke, 23 (1) 75-81
2. Kitagawa. K., et al. (1990) Neuroscience, 35 (3): 551-551-558
3. Sutherland. G., et al. (1991) Neuroscience letters, 128: 169-172
4. Larry. G., et al. Journal of Neurocytology, (1986) 15: 337-343

256 一側の後脊髄動脈枝焼灼手術後の脊髄内遊離アミノ酸含量とトランスグルタミナーゼ活性の変動

藤田公和・安藤正人・安達一真＊・永田　豊
（藤田保健衛生大学・医学部・生理、＊脳神経外科）

［要約］　ラットの脊髄背側を走行する後脊髄動脈右側枝の焼灼手術を行なうことによって、脊髄右側に分布する介在ニューロンの変性・脱落を生じさせた。脊髄組織中のＴＧ活性値は、術後一日目で非手術側の143.3(pmoles/mg protein/h)に対して手術側では458.4 pmolと３倍以上の有意な($p<0.001$)増加が観察された。その後時間経過に伴って、この活性値は徐々に減少していく傾向を示したものの、術後30日目でも非手術側と比較して約1.6倍の有意な($p<0.05$)増加が見られた。一方、焼灼手術側の脊髄組織内遊離アミノ酸含量は、術後３日目では対照側と比較して大きな変動が見られなかった。しかし、術後７日目では手術側のグルタミン酸（Glu）、アスパラギン酸（Asp）、およびγ-アミノ酪酸(GABA)の有意な減少が観察された。また、脊髄組織の染色像(H-EおよびK-B染色)では、術後３日目では少なくとも肉眼的には脊髄の左右で何等の変化も観察されなかったが、30日後では顕著な組織の傷害が見られた。従って、血管焼灼手術によってアミノ酸作動性介在ニューロンが変性（細胞死）を生じ、この神経変性の極めて初期の段階でＴＧ活性が顕著な増加を示すことが認められた。このことから、アミノ酸作動性の介在ニューロン変性の早期指標としてＴＧ活性が利用できることが明かとなった。同時に、これらの興奮性アミノ酸が脊髄内の介在ニューロンの伝達物質として利用されていることが強く示唆された。

［目的］　細胞質に局在するトランスグルタミナーゼ（transglutaminase; EC 2.3.2.13:TG）は異なるポリペプチド鎖間の cross-linkageを増大させるために、それらのグルタミン残基へのポリアミンの付加反応を触媒して、細胞内タンパクの流動性ないし細胞構造の生理的な統合性を失わせるように働いていることが明かとなっている(1,2)。したがって、何らかの傷害刺激が生体に加えられた時に、その後に進行する細胞の退行・変性過程を生化学的に検知するうえで、組織内のＴＧ活性の変動は有用な指標となることが考えられる。従来、神経細胞死とＴＧ活性との関連性については、主としてSCG（コリン作動性神経）を用いた実験成績が報告されており(3)、他の神経組織（細胞）の変性過程とＴＧ活性との関係についてはほとんど検討されていない。一方、哺乳動物の後脊髄動脈焼灼手術後には、脊髄背側部に局在する介在ニューロンが選択的に変性・脱落する事がよく知られている(4)。また、このような焼灼手術を行った後の脊髄組織で、興奮性の遊離アミノ酸含量が減少することも示唆されている。そのため今回の実験では、後脊髄動脈枝を焼灼することによって脊髄背側のアミノ酸作動性神経の変性・脱落を生じさせた後、神経細胞内のＴＧ活性の変動を調べ、神経細胞死とＴＧ活性の経時的な関連性について検討しようと企図した。

［実験材料および方法］　本実験には体重200g前後のウイスター系成熟ラットを用いた。ペントバルビタール(30mg/kg)をラットの腹腔内に注射して麻酔した後、ラットの頸部背側皮膚を切開して、第６頸髄（C_6）から第４胸髄（T_4）部位の脊椎を剥離した。そしてこの部位を走行する後脊髄動脈の右側の枝を先端の尖った電気メスで焼灼・閉塞した。このような手術を行った後、再び背側の皮膚を縫合して麻酔から回復させた。その後一定期間経過した後、ウレタンを腹腔内に注射してラットを再び麻酔した後、断頭して手術部位の脊髄組織を摘出した。取り出した脊髄は一部を組織学的検索に用い、その他は左右に分割した後、生化学的分析まで-80℃で凍結保存した。

a)ＴＧ活性の測定は0.32M sucroseと1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl緩衝液中で磨細した脊髄標本を用いて、N,N'-dimethylcaseinタンパクに取り込まれる〔^{3}H〕putrescine(1110GBq/mmol)の放射活性から算出するLorandの方法(5)に準じて行った。すなわち、1.3mM $CaCl_2$、70mM dithiothreitol(DTT)、5mg/ml caseinおよび0.4mM(18KBq)putrescineを含む50mM Tris-HCl　緩衝液(0.7ml)中に酵素標品を添加してインキュベーションし、一定時間および単位蛋白量当たりに取り込まれた反応基質(^{3}H-putrescine)の付加量を放射活性より計算して表した。脊髄組織中のタンパク定量は牛血清アルブミンを標準試料としてBradfordの方法(6)で行った。

b)脊髄組織中の遊離アミノ酸含量は、組織片を70%エチルアルコールで除蛋白した抽出液をアミノ酸自動分析器（日立 835型）を用いて分離定量した。

［結果および考察］　ラットの脊髄背側を走行する後脊髄動脈右側枝の焼灼手術を行って、脊髄右側に分布する介在ニューロンの変性脱落を生じさせた。脊髄組織中のＴＧ活性値は、術後一日目で非手術側の143.3(pmoles/mg protein/h)に対して手術側では458.4 pmolと３倍以上の有意な($P<0.001$)増加が観察された。その後時間経過に伴って、この活性値は徐々に減少する傾向にあるものの、術後30日目でも非手術側と比較して約1.6倍の有意($p<0.05$)に高い活性値が維持されていた（図１）。また脊髄組織中の内因性ＴＧ活性値（酵素の量的指標）の比は非手術側と比較して、術後１日目で1.6倍に増加し、７日後には非手術側とほぼ同じ数値まで減少した。その後30日目には、内因性ＴＧ活性値は非手術側の60%にまで低下した（表１）。これは焼灼手術によって、手術側に局在する脊髄介在ニューロンが変性（細胞死）していく過程の中で、この変性の比較的初期の段階でＴＧ活性が著明に増加したことを示唆している。また術後30日目でも観察された活性値の増加は、神経組織の変性が依然持続されていることを示唆するものかもしれない。一方、術後１日目でＴＧ酵素量が顕著に増加したものの、30日後にはこの部位の介在ニューロンが脱落した結果、脊髄組織全体に含まれる酵素量が減少したものと考えられる。焼灼手術側の脊髄組織内遊離アミノ酸含量は、

3日後では対照側と比較して大きな変動が見られなかった。しかし、術後7日目では手術側のグルタミン酸、アスパラギン酸、γ-アミノ酪酸の有意な減少が観察された（表2）。したがってこれらの遊離アミノ酸含量の減少は介在ニューロンの変性・脱落の進行状態を示唆するものと考えられる。また、脊髄組織のH-EおよびK-B染色像では、術後3日目では少なくとも肉眼的には何等の変性も観察されなかったが、30日後では顕著な組織変性が見られた。従って、血管焼灼によるアミノ酸作動性介在ニューロンにおいて、変性の極めて初期の段階でＴＧ活性が顕著な増加を示し、その後の神経変性および脱落に伴って徐々に減少していくことから、アミノ酸作動性の介在ニューロンの変性過程の進行度を示す標識酵素として、ＴＧ活性が利用できることが明かとなった。また、これらの興奮性アミノ酸(GluおよびAsp)が、脊髄内の介在ニューロンの伝達物質として利用されている可能性が強く示唆された。

［文献］(1)Gilad et al(1985)J.Neurochem.44.1385-1390.(2)Fesus,L. and Thomazy,V.(1988)Adv.Exp.Biol.231.119-134.(3)Ando et al(1991)J.Neurochem.57.1848-1854.(4)Miyata et al(1975)J.Neurochem.25.239-244.(5)Lorand et al(1972)Anal.Biochem.50.623-631.(6)Bradford.M.M.(1976)Anal.Biochem.72.248-252.

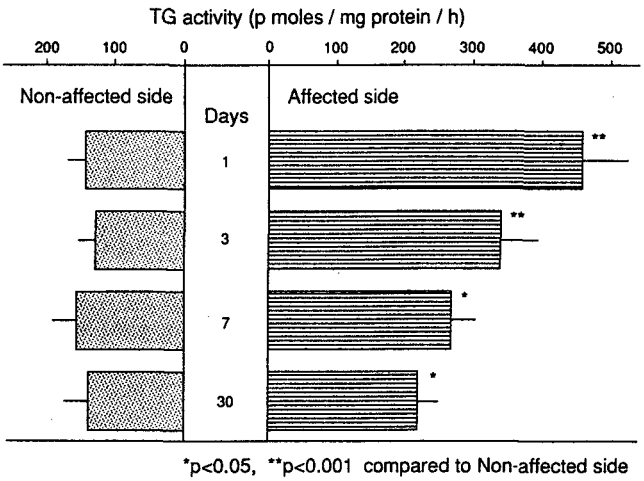


図１．ラットの後脊髄動脈の右側枝を焼灼・閉塞した後のＴＧ活性の変動

Days after operation	1	3	7	30
Non-affected side(left)	100	100	100	100
Affected side(right)	158*	142*	109	59*

*p<0.001

表１．焼灼手術後の内因性ＴＧ活性値の比
（酵素の量的指標）

表２．焼灼手術後７日目の脊髄内遊離アミノ酸含量
（μmol/g w.w）

	Asp	Glu	Tau	Gly	GABA
Non-affected side (left)	1.34±0.27	2.89±0.44	1.47±0.30	2.68±0.46	1.16±0.22
Affected side (right)	1.02±0.20*	2.38±0.32*	1.71±0.43	2.40±0.38	0.87±0.26*

*p<0.05　(n=10)

257 オクラトキシンA投与によるマウス胎仔脳の脂質過酸化の亢進とストレス蛋白様ポリペプチドの誘導

田丸 政男，平田ゆかり**，松谷天星丸***，永田 豊****
（鈴鹿医療科学技術大・医用情報，藤田保健衛生大・医・**法医，****同生理，***川村学園大）

［要約］ Slc:ICR系マウスの妊娠11日にカビ毒の一つであるochratoxin A (OA, 3 mg/kg)を腹腔内投与すると，投与後1及び2日目において活性酸素の一つのO_2^-の消去にあずかるsuperoxide dismutase (SOD)活性の有意な上昇を示した。投与2日目以後ではSOD活性は対照値への回復傾向を示したが，過酸化脂質(LPO)量は反対に有意に上昇しはじめ，胎仔脳の脂質過酸化の亢進が示唆された。胎仔脳のin vitroにおける^{3}H-ロイシンの酸不溶性画分への取り込みを，二次元アクリルアミドゲル電気泳動を用いて検索したところ，投与後36時間目に酸性(pI=5.0～5.2)の分子量 約30kD前後のストレス蛋白(HSP)様ポリペプチドの誘導が最も強く見られた。これらのことから，OA投与後の初期の胎仔脳においては，SOD活性の上昇が脂質過酸化の亢進を抑制し，投与2日目以後に見られたLPO量の上昇は，SOD活性の上昇が抑制されたためと考えられ，胎生期においても活性酸素の消去系が機能していることが示唆された。またHSP様ポリペプチドの誘導には，活性酸素の産生の亢進が関与した可能性が示唆され，発育脳における化学的ストレス環境下における防御機能の一端が示された。

［はじめに］ 培養細胞，組織または生体を生理的環境温度より高温に暴露したり，遷移金属イオン，アミノ酸アナログあるいはエタノールなどの化学的ストレスを与えたりすると，特定のいくつかの蛋白質の合成が起こるが，これらは熱ショック蛋白質(HSP)あるいはストレス蛋白質と呼ばれている[1]。またこのHSPはグルコース飢餓，電子伝達系の阻害剤[1]あるいはsuperoxide anion(O_2^-), hydroxylradical(・OH)や過酸化水素 (H_2O_2)などの活性酸素によっても誘導されることが知られている[2]。カビ毒の一種であるOAを妊娠動物に投与すると，仔動物に水頭症や小頭症などの奇形が発現することが知られている[3,4]。本実験では，OAによる胎仔脳の障害時における，活性酸素の産生状態及びそれらの消去酵素系の変化とHSP誘導の有無について検索し，化学的ストレス環境下における胎仔脳の生化学的な防御機能を検討した。

［実験方法］ 妊娠11日目（plug dayを妊娠1日目）のSlc:ICRマウスに0.1M $NaHCO_3$に溶解したOA(Makor Chemical) 3mg/kgを腹腔内投与し，投与後1日目より5日目まで経時的に母獣を屠殺し，胎仔脳を摘出し脳内物質の測定に供した。OA投与後18，24，36及び48時間目の胎仔脳を，^{3}H-Leucine(7.4MBq/ml)含有のRinger液中で37℃，90分間，pulse-labeling を行い，胎仔脳を尿素及び sodium dodecylsulfate含有のgel bufferで可溶化した後，60万cpmの試料を二次元電気泳動法[5](pI 4.5～8.5, MW 20～200kD)で分離し，fuluorogram により新生されたポリペプチドの分布パターンを検索した。また，HSP70ファミリーの誘導の有無は，SDS-PAGEで分離した試料をニトロセルロース膜にウェスタンブロットし，HSP72のモノクローナル抗体（アマシャム製）を用いて検出した。胎仔脳内のSOD活性はOyanaguiら[6]の亜硝酸法で，LPO量はOhkawaら[7]の方法でmalondialdehyde量として求め，何れも酵素源として脳の水ホモジェネイトを用いて測定した。

［［結果］ 1．胎仔脳内SOD活性及びLPO量の変化： 胎仔脳内SOD活性は，OA投与後1日目において既に対照の約1.3倍の有意な増加を示し，その後SOD活性の上昇は徐々に抑制されたが，投与2日目においても対照の約1.2倍を示した（図1-A）。一方，胎仔脳内LPO量は，OA投与後1日目では対照との間に差がなかったが，2日目より対照に比し増加を示し，投与後 3及び4日目においては，それぞれ対照の約1.3及び1.4倍の有意な上昇を示した（図１－Ｂ）。

2．胎仔脳におけるHSP様ポリペプチドの誘導： 図２（Ａ，Ｂ）は，何れも 60万cpmの試料を二次元電気泳動で分離したfluorogramである。OA投与後36時間目において，酸性の（pI＝約5.0～5.2)の分子量（MW）約30kDのHSP様ポリペプチドの誘導が最も強く見られ（図２－Ａ），投与24及び48時間後においてもわずかな誘導が観察されたが（data示さず），対照では何れの時期においても新生されたポリペプチドは見られなかった（図２－Ｂ）。また，HSP70ファミリーの誘導は何れの時期においても見られなかた（data示さず）。

［考察］ ミトコンドリアは酸素消費の主要な場であるが，O_2^-，・OHやH_2O_2などの活性酸素も同時に生成される。O_2^-の生成は，主にミトコンドリアのNADH脱水素酵素系で行われ，また発生したO_2^-やH_2O_2は，それぞれSODやcatalase及びglutathion peroxidase によって除去される[8]。本実験では，OA投与後24時間目において既にSOD活性が約1.3倍の上昇が見られたが，この SODはO_2^-を発生させるパラコートや酸素

暴露などで誘導される誘導酵素の一つである[9]。このことから，SOD活性の有意の上昇が酵素誘導による可能性も示唆されるが明らかでない。何れにしても間接的に O_2^- の産生の亢進が示唆された。SOD活性の有意な増加は，投与後24～48時間で見られたが，反対にこの時期のLPOは有意の増加を示さなかった。このことは，活性上昇をしたSODが，O_2^- の除去に働いたために，投与後24時間目まではLPOが著しく増加しなかったものと考えられた。また，OA投与後24時間以後のLPOの上昇は，SOD活性上昇の抑制によって活性酸素の産生が亢進し，その結果48時間目以後に脂質過酸化が促進したものと考えられた。

HSPは生物種によって異なるが，その分子量から大きく４つのグループ（ファミリー）に分けられ，その機能の一つには細胞にとって有害な環境に対する防衛反応に関与しているものと考えられている[1]。本実験ではこのHSPの４つのグループ中の最も特徴的な HSP70ファミリーの誘導は見られなっかたが，低分子量（15～30kD）のHSPに類似した酸性の分子量約30kDのポリペプチドが，投与後36時間に最も強く誘導された。このOA投与後の36時間目は，胎仔終脳の脳室細胞の核濃縮像の出現のピークであり[3]，また生化学的にもこの時期に一致してDNA量の低下，及びライソゾーム酵素活性上昇が観察されている[4]。この様に既に報告[3,4]されているOAによる胎仔脳への障害時期のピークに一致して，HSP様ポリペプチドが誘導されたことから，この時期がOAによる化学的ストレスの最も強い時期であることが示唆された。また，HSPは活性酸素あるいは電子伝達系の阻害剤によっても誘導されることが知られている[1,2]。本実験のHSP様ポリペプチド誘導時には，SOD活性の有意な増加から間接的に O_2^- の上昇が示唆される。O_2^- はSODによって H_2O_2 に分解され，発生した H_2O_2 はcatalase及びglutathione peroxidaseによって除去される[8]。本実験のcatalase活性は，OA投与後 24～48時間目では変動しないことから（data示さず），この時期のSOD活性の増加によって，その代謝産物の H_2O_2 が過剰に蓄積していることが考えられ，これがHSP様ポリペプチドの誘導の要因の一つとなった可能性が示唆された。

【文献】 1)矢原一郎ら(1988)蛋白核酸酵素 33:29-41. 2)Courgeon,A.M. et al. (1988) Eur. J. Biochem. 171:163-170. 3)Fukui, Y. et al.(1983) Environ. Med. 27:41-49. 4)Tamaru,M. et al. (1988) Neurochem. Res. 13:1139-1147. 5)O'Farrel, P.H.(1975)J. Biol. Chem. 250:4007-4021. 6)Oyanagi, Y.(1984) Anal. Biochem.142:290-296. 7)Ohkawa, H. et al.(1979) Anal. Biochem. 95: 351-358. 8)西田俊朗，田川邦夫(1988) 蛋白核酸酵素 32:2717-2725. 9)Loven, D.P. et al. (1985) Cancer Res. 45:3029-3033.

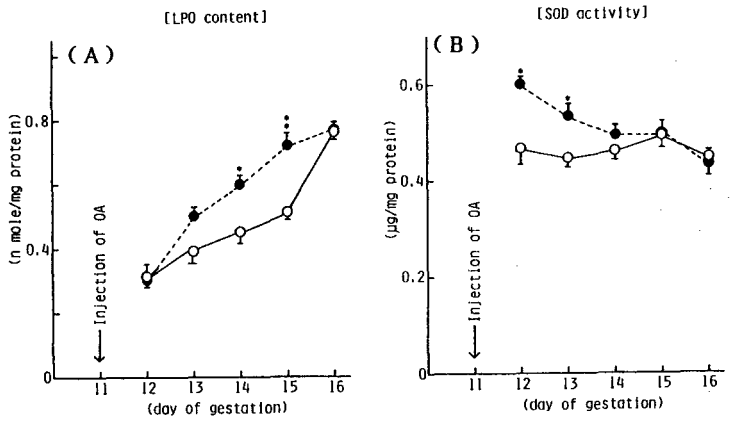


図１　胎仔脳内のLPO量及びSOD活性の変化
各値は5例の平均値±SEMで表した．
○：対照群，●：OA群
*p<0.05 or **p<0.01 VS controls

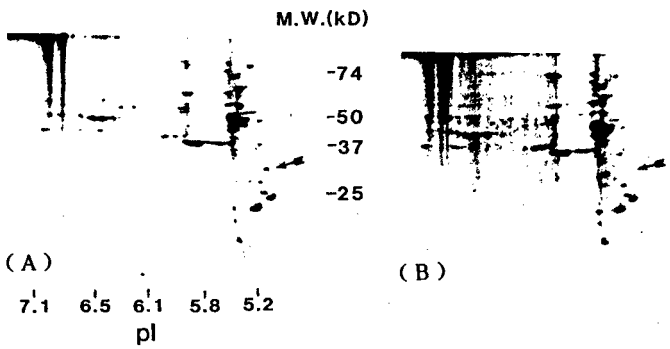


図２　胎仔脳におけるHSP様ポリペプチドの誘導
(A)：OA投与後36時間目
(B)：溶媒の $NaHCO_3$ 投与後24時間目

258 スナネズミ前頭皮質における monoamine oxidase の酵素化学的特性

森岡大地、上田結子、泉順吉、稲垣昌博、橋本みゆき、木内祐二、小口勝司
(昭和大学・医・第一薬理)

〔要約〕

スナネズミの脳内monoamine の主要代謝酵素である *monoamine oxidase* (MAO) の特性を明らかにするために、前頭皮質 homogenate を用いて酵素化学的検討を行なった。Serotonin (5-HT), benzylamine (Bz), tyramine (Tyr) に対する Km はそれぞれ 191.5±4.8, 20.9±2.2, 109.4±13.9 (μM) で、また 同様にVmax は 3.11±0.67, 0.06±0.01, 0.92±0.04 (nmol/mg protein/min) であり、5-HT に比べ Bz に対する MAO活性は著しく低い値を示した。Type A 及び type B 特異的MAO阻害剤の clorgyline, deprenyl による阻害曲線はいずれの基質に対しても *single sigmoid* 型を示したが、Tyr と 5-HT に対しては clorgyline が、Bz に対しては deprenyl が高い感受性を示した。一方、肝 homogenate を用いた同様の阻害実験において clorgyline, deprenyl のTyr に対する阻害曲線はいずれも double sigmoid 型を示した。以上より、スナネズミ前頭皮質における両 type MAO の酵素化学的性質は他の哺乳動物に類似しているが、MAOの殆どが type Aであるため Tyr は 主にtype A によって代謝される可能性が示唆された。

〔緒言〕

MAOは多くの哺乳動物の諸器官に存在し、脳内においては dopamine, serotonin, noradrenaline 等の神経伝達物質の代謝に深く関与している。また、type A と type B の2種の subtype の存在が知られており、各臓器内に含まれる両 type MAO の比率は種によって異なり、さらには個体内でも臓器によって大きく異なるということが報告されている(2)。

スナネズミは Willis動脈輪の形成が不完全であることから、近年、脳虚血モデルとしての有用性が高まっている。虚血性脳障害の進展には monoamine が深く関与していることが知られている(1)が、スナネズミにおいてはその主要代謝酵素である MAO の特性に関して、組織化学的な研究(4)は報告されているものの、生化学的な研究はなされていない。そこで今回、我々は種々の基質を用いて、生化学的手法によりスナネズミ脳の MAO について酵素化学的性質を検討したので報告する。

〔方法〕

80～100gのスナネズミを断頭後すみやかに脳を摘出し、9 部位に分割した。そのうち前頭皮質のみを用い、0.01 M phosphate buffer (pH 7.8) を加えて homogenize し、50 mg tissue/ml とした。同時に肝も生理食塩水にて灌流後摘出し、同様に homogenize して 10 mg tissue/ml とした。

MAO活性の測定は Wurtman and Axelrod (6) の方法に準じて radiometric assay で行なった。基質として 100 μM [^{14}C] 5-HT, Bz, Tyr を用い、5-HT と Tyr は 2 μCi/ml に、Bz は 4 μCi/ml に調整した。Type A MAO阻害剤として clorgyline (10^{-3}～10^{-11}M)を、type B MAO阻害剤として deprenyl (10^{-3}～10^{-11}M)を用いた。組織 homogenate、基質、阻害曲線作製時は阻害剤を含む 0.1 M phosphate buffer (pH7.8) 100 μl を 37℃で 20分間（肝の場合は 10分間）incubate した。3N HCl 20 μl にて酵素反応を停止させた後、ethylacetate-toluene (1:1 v/v) 1 mlを加え metabolite を抽出した。遠心分離後その上清 0.5 ml に scintillator (Omnifluor) 10 ml を加え、Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer にて [^{14}C]metabolite の radioactivity を測定した。酵素反応はタンパク量と反応時間に比例していることを確認した。各基質の抽出効率は、5-HT で 74.4%, Bz で 86.8%, Tyr で 92.4% とした(6)。タンパク定量には Lowry変法(5)を用い、Km, Vmax の算出には非線形最小二乗法を用いた。

統計学的解析は Student's t-test を採用した。

〔結果〕

5-HT, Bz, Tyr に対する前頭皮質MAO の Km、Vmax を table 1 に示した。Bz に対する Km は他の基質に比べて低い値を示し、また Vmax もきわめて低値となったが、benzylamine oxidase (BzO) 阻害剤である semicarbazide (10^{-3}M) を添加して同様の assay を行なったところ、Km は有意に増大し、Vmax に変化はみられなかった。

種々の濃度の特異的MAO阻害剤 clorgyline, deprenylによる MAO活性の阻害曲線を fig.1 に示した。5-HT, Bz, Tyrに対する clorgylineの阻害曲線は single sigmoid 型を示し、5-HT と Tyr の場合、clorgyline 10^{-9}～10^{-8}M という比較的低濃度で阻害がみられ、10^{-7}～10^{-6}M で完全に阻害された（fig.1a)。しかし、Bz に対しては clorgyline は低感受性を示し、10^{-3}M という高濃度においても 24.5%の活性が残った。一方、deprenyl による阻害曲線は3基質いずれに対しても single sigmoid 型を示したが、5-HT と Tyr に対して deprenyl は低感受性を示し、10^{-6}M でも約10%しか阻害しなかった（fig.1b)。Bz に対しては 10^{-9}M という比較的低濃度で阻害し始めたにもかかわらず、10^{-3}M でも完全に阻害することはできず20%程度の活性が残った。しかし、BzO阻害剤である semicarbazide の存在下では、Fig.1a, b でみられた Bz に対する MAOの残存活性は、clorgyline では高濃度で、deprenyl では比較的低濃度でほぼ完全に阻害された。

次に肝 homogenate を用いて Tyr を基質として同様の阻害実験を試みたところ、clorgyline, deprenyl どちらに対しても阻害曲線は 10^{-7}～10^{-6}M で platcau 部分をもつ double sigmoid 型を示した。(Fig.2) 阻害曲線より求めた type A と type B MAO の比率は、clorgyline を用いた場合では 60 : 40、deprenyl では 55 : 45 であった。

Table 1 Kinetic parameters of MAO in the frontal cortex of gerbil towards various substrates.

Substrates	Km	Vmax
tyramine	109.4 ± 13.9	0.92 ± 0.04
5-HT	191.5 ± 4.8	3.11 ± 0.47
benzylamine	20.9 ± 2.2	0.06 ± 0.01
benzylamine + semicarbazide	64.3 ± 3.3*	0.06 ± 0.01

Km and Vmax are expressed in μM and nmol/mg protein/min, respectively.
All values represent the mean ± SD of 3 gerbils.
* p< 0.001 compared to benzylamine.

[考察]

ラット脳における研究では、5-HT は type A の、Bz はtype B の、Tyr は両 type MAO の基質となることが知られている(3)。

今回の阻害実験の結果から 5-HT は type A、Bz は type B MAO の基質となり、5-HT と Bz に対する基質選択性はラットと一致することが示唆された。また、5-HT に比べ Bz を基質としたときの MAO活性は著しく低い値となったことから、スナネズミ前頭皮質における type B MAO の活性は著しく低いと思われる。阻害剤存在下でも残存したBz に対する代謝活性は semicarbazide 添加で消失したことより、BzO活性が混在していたと考えられる。5-HT に対する Km は 191.5 μM、semicarbazide 添加時の Bz に対する Km は 64.3 μM であることから、type A MAO 同様 type B MAO も低活性ではあるがラットを含む他の哺乳動物と類似した酵素化学的性質を持つと思われる。

Konradi ら(3)はスナネズミ青斑核を用いた組織化学的な実験において、Tyr は type A MAO のみによって代謝を受けると報告している。本研究で Tyr を基質とした場合、前頭皮質 homogenate においてどちらの阻害剤によっても阻害曲線は single sigmoid 型を示したが、肝においては いずれもdouble sigmoid 型を示した。この差異は両 type MAO の存在比率の差に起因するものと考えられる。

以上のことからスナネズミ前頭皮質において、両 type MAO とも他の哺乳動物と類似した酵素化学的性質を持つが、MAO のほとんどが type A であるためTyr は主に type A によって代謝を受けていることが示唆された。

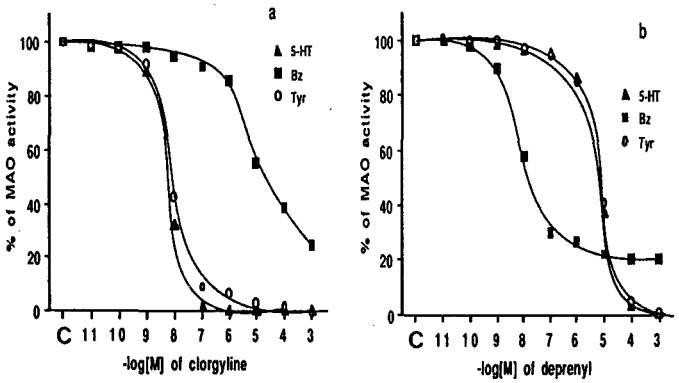


Fig. 1 Inhibition of MAO activity in the frontal cortex of gerbil towards 5-HT, Bz and Tyr by various concentrations of **a** : clorgyline or **b** : deprenyl. Values are expressed as percent of control MAO activities (**C**). Each point represents the mean of 5 gerbils.

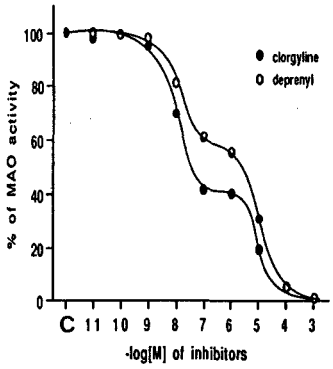


Fig.2 Inhibition of MAO activity in gerbil liver towards Tyr by various concentrations of clorgyline or deprenyl. See the legend of fig.1 for detail.

[参考文献]

(1) Hara, H., Kato, H. and Kogure, K. (1990) Brain Res. 510, 335-338.
(2) 杵鞭宏育、上條一也 (1980) 蛋白質 核酸 酵素 25,1069-1086.
(3) 杵鞭宏育、上條一也 (1981) 蛋白質 核酸 酵素 26, 1425-1437.
(4) Konradi, C., Jellinger, K., Riederer, P. and Nagatsu, T. (1987) J. Neural Transm. 70, 369-376.
(5) Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L. and Tolbert, N. E. (1978) Anal. Biochem. 87, 206-210.
(6) Wurtman, R. J. and Axelrod, J. (1963) Biochem. Pharmacol. 12, 1439-1441.

259 Isoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferaseの組織分布と成長、加齢に伴う変化

溝渕睦彦、 村尾孝児*、 武田良平、 柿本泰男
(愛媛大学医学部神経精神医学教室、*香川医大第一内科)

〔要約〕
ラットIsoaspartyl Protein Carboxyl Methyltransferaseの組織分布と成長、加齢変化をmRNAレベルと酵素活性を指標に測定した。ノーザンブロット法では、本遺伝子は脳と睾丸にもっとも多く、心臓、筋肉、肺で少量発現され、肝臓では検出されなかった。 酵素活性でも、同様な組織分布を示した。 脳と睾丸では、生後次第に増加し、5ケ月で最高に達した。 脳でのmRNA量と酵素活性は、老齢ラット(25ケ月)では比較的維持されているが、睾丸では生下時レベルまで低下していた。 この脳と睾丸での違いは、本酵素の生理作用である老化蛋白修復機能の組織差を反映しているかもしれない。

[はじめに]
蛋白のカルボキシメチル化酵素は、1) グルタミン酸残基のγ-カルボキシル基のメチル化、 2) L-イソアスパラギン酸、アスパラギン酸残基のβ-カルボキシル基のメチル化、 3) C末端システインのメチル化の3種類に分類される[1]。 本メチル化酵素(PIMT)は2) であり、蛋白中のイソアスパラギン酸、アスパラギン酸残基のカルボキシル基に、S-adenosyl-L-methionineからのメチル基を転移させる反応を触媒する。 蛋白のラセミ化やアイソマー化により生じたこれらの基質は、PIMTでメチル化された後、脱メチル化を受けるとともに元の正常蛋白にもどる。 従って、このPIMTは、加齢にしたがい増加する損傷蛋白を修復する作用があると推定されている。 本実験では、報告されているcDNA配列をもとに、PCRでプローブを作成しノーザンブロットを行なうとともに酵素活性を測定し、組織分布ならびに成長、加齢変化を検討した。

[方法]
動物は0、7、14、21、30、150、750日齢Wistar系ラットを用い、各組織からのtotal RNAはChomczynskiらの方法[2]で抽出した。cDNAはこれらのRNAから逆転写酵素を用いて得た。プローブに用いたcDNA部位(124 bp)は、報告されている配列[3]をもとに、核酸や低分子のメチル化酵素と共通なドメイン部分[4]を避けて選んだ。ノーザンブロットやプローブラベリング法は既報の方法[5,6]を用いた。 PIMT酵素活性は、アルカリ処理したオブアルブミンを基質[7]に、各組織からcytosol粗分画を調製し[8]、Johnsonらの方法[9]を用いて測定した。

[結果と考察]
生後150日齢ラットの各組織におけるPIMT mRNA量をノーザンブロット法で分析した結果が図1である。4種類のRNA (1.1, 1.7, 2.5と4.0 kb) が存在し、脳と睾丸にもっとも多く、心臓、筋肉、肺で少量発現され、肝臓では検出されなかった。 同様な傾向が酵素活性においても認められる (図2)。次に、ラットの成長加齢に伴うmRNA量を、生後0、7、14、21、30、150、750日の脳と睾丸で比較した (図3)。脳と睾丸では、生後次第に増加し、150日で最高に達する。脳のPIMT mRNA量は、老齢ラット(750日)では比較的維持されているが、睾丸では生下時レベルまで低下していた。 酵素活性の変化も、mRNA量と同じ傾向を示している (図4)。 老齢ラットにおけるmRNA量と酵素活性の脳と睾丸での違いは、本酵素の生理作用である老化蛋白修復機能の組織差を反映しているかもしれない。

[文献]
1. Barten, D. M. and O'Dea, R. F. (1990) Life Sience 47, 181-194
2. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159
3. Sato, M., Yoshida, T. et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 342-347
4. Henzel, W. J., Stults, J. T. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 15905-15911
5. Mizobuchi, M. and Frohman, L. A. (1992) Biotechniques 12, 350-353
6. Mizobuchi, M., Frohman, M. A. et al. (1991) Mol. Endocrinol. 5, 476-484

7. Johnson, B. A., Freitag, N. E. et al. (1985) J. Biol. Chem. 260, 10913-10916
8. Johnson, B. A., Shirokawa, J. M. et al. (1991) Neurobiol. Aging 12, 19-24
9. Johnson, B. A., Ngo, S. Q. et al. (1991) Biochem. Int. 24, 841-847

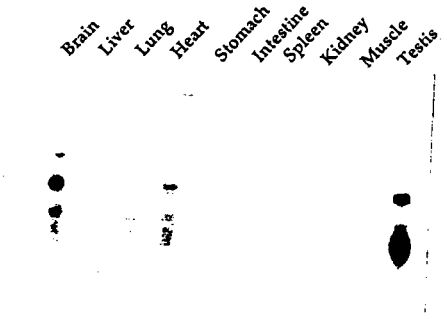


図1．各組織におけるPIMT mRNAのノーザンブロット分析

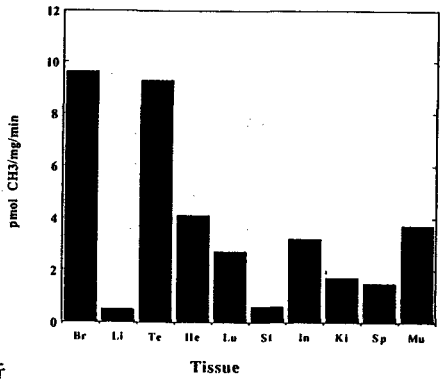


図2．各組織におけるPIMT酵素活性

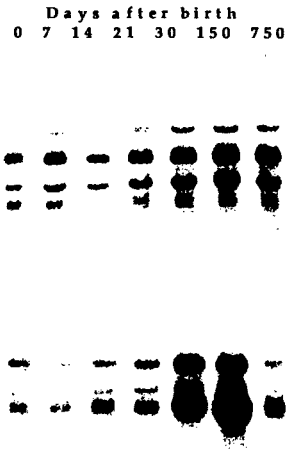


図3．脳(上段)と睾丸(下段)におけるRNAレベルの成長、加齢変化

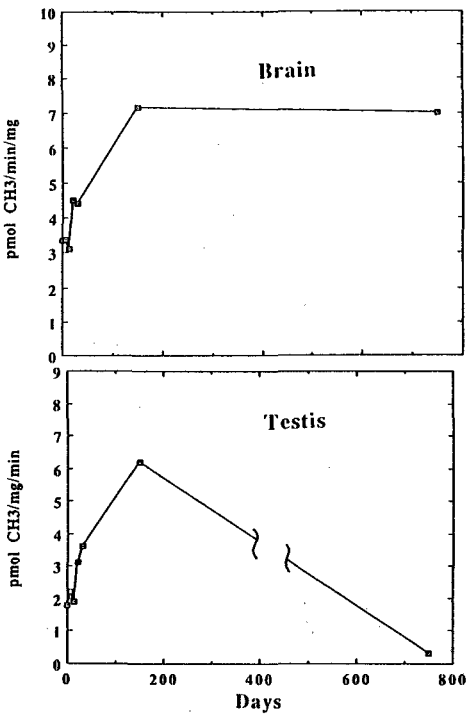


図4．脳(上段)と睾丸(下段)におけるPIMT酵素活性の成長、加齢変化

260 ラット脳の膜リン酸化タンパク質７２ｋＤａ

○中岡隆志、浜本敏郎、辻　崇一
（理研　国際フロンテイア・糖遺伝情報）

〔要約〕

ラット脳膜画分に存在するリン酸化基質タンパク質（７２ｋＤａ）は、ＣＨＡＰＳにより可溶化できる事が明かとなった。そこでＣＨＡＰＳ可溶化画分をDEAE-Sepharose Fast Flow、DEAE-Sephacel, Octyl-Sepharoseを用いて部分精製し、最終的に調製的２次元電気泳動にて単一のスポットとして精製する事ができた。

目的

我々は、タンパク質リン酸化に対するガングリオシドの調節作用について検討してきたが、７２ｋＤａのリン酸化がガングリオシドにより調節されていることが示唆された（1）。 今回、さらに検討を加えるために、本タンパク質の精製を試みた。

方法

1　７２ｋＤａの同定法

７２ｋＤａの精製をするために^{32}P-７２ｋＤａをトレーサーとした。トレーサーは、膜画分をγ-^{32}P-ＡＴＰで予めリン酸化させ、DEAE-Sephacelを用いて部分精製したものを用いた。DEAE-Sephacel 以降のクロマトグラフィーにおいて、得られた各フラクションをSDS-PAGE電気泳動し、ゲルをタンパク質染色後、オートラジオグラフィーをし、当該タンパク質を同定した。

2　膜画分の可溶化

200匹の3週令のオスのウイスターラット脳の膜画分（タンパク濃度 7 mg/ml、約700 ml、P_2、P_3画分、2）に10 % CHAPS を終濃度2 %になるように加え、1時間インキュベートした。10000 x gで超遠心後の上清を可溶性画分とした。

3　DEAE-Sepharose Fast Flow　クロマトグラフィー

可溶性画分を3回に分けてバッファーＡで平衡化したカラム（2.6 x 25 cm）にのせ、3倍量の0.1M塩化ナトリウムを含んだバッファーＡで洗浄後、3倍量の0.25M塩化ナトリウムを含んだバッファーＡで溶出した。

4　DEAE-Sephacel　クロマトグラフィー

溶出画分を脱塩、濃縮後、バッファーＢで平衡化したカラム（2.6 x 20 cm）にのせ、総量1200 mlの0.12M－0.35M塩化ナトリウムのグラジエントで溶出した。

5 Octyl-Sepharose　クロマトグラフィー

溶出画分を濃縮後、硫酸アンモニウムを終濃度15%になるように加え、15%硫酸アンモニウムを含んだバッファーCで平衡化したカラム（1.6 x 20 cm）にのせ、3倍量のバッファーCで洗浄後、バッファーDで溶出した。

6　調製的2次元電気泳動

溶出画分を*調製的2次元電気泳動にかけ（3）、ゲルをタンパク染色した。７２ｋＤａに相当するスポットを切り出し、Extraphor（Pharmacia-LKB）を用いて電気的に溶出し、精製した。

バッファーA：50 mM イミダゾール塩酸, 0.5 mM DTT, 0.4 % CHAPS, pH 7.1.
バッファーB：50 mM イミダゾール塩酸, 0.5 mM DTT, 20 mM オクチルグルコシド, pH 7.1.
バッファーC：20 mM PIPES, 0.5 mM DTT, 20 mM オクチルグルコシド, pH 7.0.
バッファーD：20 mM PIPES, 0.5 mM DTT, 0.4 % CHAPS, pH 7.0.
バッファーE：50 mM トリス、50 mM グリシン、0.1 % ドデシル硫酸リチウム、pH8.9.

結果及び考察

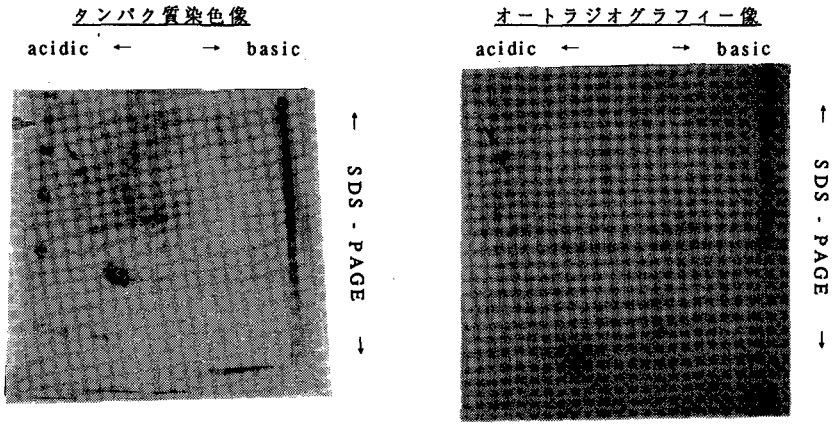
1　終濃度２％CHAPSで７２ｋＤａは電気泳動上の放射能活性で見るかぎり７０％以上可溶化される。７２ｋＤａは終濃度2%前後まではCHAPSにより濃度依存的に可溶化された。　別の界面活性剤、例えば２％ NP-40では約８０％、２％オクチルグルコシドでは５０％以下が可溶化された。NP-40よりもCHAPSの方が、７２ｋＤａの可溶化に関して選択性が高い事から、以下の実験ではCHAPSを用いた。

2　２００匹のラットの脳より目的タンパク質を約200 μg単離精製することができた。精製したタンパク質より決定された部分アミノ酸配列より、７２ｋＤａは未知のリン酸化タンパク質であることが示唆された。　現在のところ、その生理的意義は不明であるが、神経系の情報伝達の一端、あるいはガングリオシドの何らかの生理活性を解明する目的でその遺伝子のクローニングを試みている。

文献

1　Nakaoka T., Tsuji S., and Nagai Y. (1992) J. Neurosci. Res. 31, 724-730.
2　Gray E.G., and Whittaker V.P. (1961) J. Anat. (Lond) 96, 79-88.
3　O'Farrell P.H. (1975) J.B.C. 250, 4007-4021.

Octyl-Sepharoseクロマトグラフィー精製後画分の２次元電気泳動像



261 脳血管攣縮における髄液PAF濃度、PAF-acetylhydrolaseの意義

平島　豊、遠藤俊郎、加藤傢子、大森友明、高久　晃

（富山医科薬科大学・医・脳神経外科）

〔要約〕

脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血(SAH)後の症候性血管攣縮発生群(W/SV)8例と非発生例(W/O SV)9例の髄液中の血小板活性化因子(PAF)濃度とPAF-acetylhydrolase活性を測定した。PAF濃度はクモ膜下出血後から徐々に増加し、極大値を示して減少した。極大値を示す日はDay3からDay13の間であった。逆にPAF-acetylhydrolase活性はSAH後より徐々に減少し、極小値を示して、増加に転じた。極小値を示す日はDay1からDay8であった。この傾向は両群で差は無かった。PAF-acetylhydrolaseのKm値、Vmax値は90.8μM、0.2nmol/min/mgであった。至適pHは6.5であり、反応温度に関しては25° Cから45° Cまで温度依存的に活性が増加した。1mM EGTAはPAF-acetylhydrolaseを阻害した。酵素反応速度論的にPAF-acetylhydrolaseの阻害物質が髄液中に存在する事が予測され、Sephacryl S-200HRゲルろ過で13kDaの蛋白質である事がわかった。

［はじめに］

PAFは虚血(5)、外傷後(1)の神経細胞および微少脳循環の障害に関与する事が知られている。また我々はSAH後の脳血管攣縮へのPAFの関与を実験的に示した(3)。本研究では、SAH患者髄液中のPAF濃度の調節機構を検討する目的で経時的にSAH髄液中のPAF濃度とPAF-acetylhydrolase活性を測定した。また同時に、本酵素のcharactarizationも行った。

［方法］

1990年10月から1992年1月までの間に入院した17例のSAH患者を対象とした。うち8例は W/SV群に属し、9例は W/O SV群に属した。PAF濃度測定はHanahan & Weintraub の方法(2)で測定し、PAF-acetylhydrolase活性はMiwa等の方法(4)によった。25μlの［^{3}H］acetyl-PAF(25μci/μmol,50nmol)と25μlの0.2M MOPS緩衝液(pH6.5)に髄液を50μl混合し、37° C、30分間反応した。28%TCA 50μlで反応を停止し、さらに50μlの5mg/ml BSAを混ぜ、遠心後上清の放射能を測定した。患者髄液を凍結乾燥し約10倍に濃縮し、sephacryl S-200HR columnによってPAF-acetylhydrolase阻害物質を分離した。阻害活性は既知のPAF-acetylhydrolase 活性を有する反応系に各fractionの溶出液を混合して、減少した反応量とした。

［結果］

SAH後の髄液中PAF濃度はW/SV群、W/O SV群いずれもSAH後徐々に増加し、極大値をDay3からDay13で示した後、減少した。W/SV群の極大値は5.98±1.31pmol/ml,(M±S.D, n=7)。またW/O SV群は6.11±3.01pmol/mlで両者に差を認めなかった（図１）。PAF-acetylhydrolaseの至適pHは6.5であった（図２）。Km、Vmax値はそれぞれ90.8μM、0.2nmol/min/mgであった。反応温度に関しては25° Cから45° Cの間で温度依存的であった（図３）。また髄液を約10日間37° Cで保温し、経時的に活性を測定したが興味ある事に、保温時間に依存して活性が増加した（図４）。各薬剤の同酵素への影響を調べたが1mM EGTA以外は影響がなかった（表１）。髄液中のPAF-acetylhydrolase活性の経時的変化はSAH後徐々に減少し、ある時点で極小値を示して、その後増加した。W/SV群、W/O SV群で極小値の時期、活性に差を認めなかった（図５）。極小値を示した時期の髄液を既知のPAF-acetylhydrolase活性の存在する反応系に混合量を変えて加え、反応させた結果、同髄液中に阻害物質の存在が疑われた（図６）。次に150mlの髄液を凍結乾燥し、濃縮後、Sephacryl S-200HRカラムで分離を行った結果、阻害物質はvoid volume と13kDaの部位に溶出した（図７）。これらは非常に不安定で3日間の4° C保存で阻害活性は完全に消失した。

［考察］

SAH後の脳血管攣縮はmultifactiotorialな現象と考えられているが、我々はPAFも脳血管攣縮の病態に関与している事を示した(3)。今回はSAH患者の髄液中のPAF濃度を測定したが脳血管攣縮の時期に一致して増加する事がわかった。またPAFの分解酵素であるPAF-acetylhydrolase活性も髄液中で測定可能で、この経時的な変化はPAF濃度の変化とmirror imageの関係にあった。この事からSAH後の髄液中でもPAF-acetylhydrolaseがPAF量の調節を行っている事が示唆された。さらに同酵素を阻害する物質が今回認められ、多重に髄液中PAF濃度が調節されている事が考えられた。髄液中のPAF-acetylhydrolaseは血しょう由来と考えられるが、これを阻害する物質の由来は今の所不明である。今後、この阻害物質のcharacterization、またその由来につき解明しなければならぬ事が多い。

［文献］

1. Frerichs, K. U., Lindsberg, P. J., Hallenbeck, J. M., et. al. (1990) J. Neurosurg. 73, 223-233.
2. Hanahan, D. J., Weintraub, S. T. (1985) In: Methods of Biochemical Analysis. (Glick, D., ed.), New York, Wiley and Sons, pp. 195-219.
3. 平島　豊，遠藤俊郎，大辻常男，他（1991）神経化学，30，130-131.
4. Miwa, M., Miyake T., Yamanaka, T., et. al. (1988) J. Clin. Inves. 82, 1983-1991.
5. Panetta, T., Marcheselli, V. L., Braquet, P., et. al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 149, 580-587.

Fig. 1 PAF Levels of CSF in SAH Patients

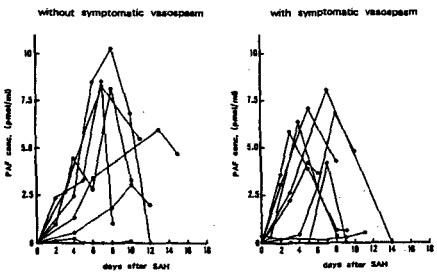


Fig.5 CSF PAF acetylhydrolase Activity in SAH Patients

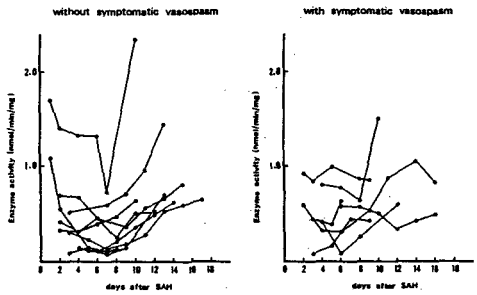


Fig.4 Effect of Incubation Period on PAF acetylhydrolase Activity

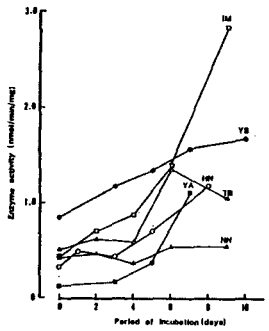


Fig.2 pH Profile of PAF acetylhydrolase

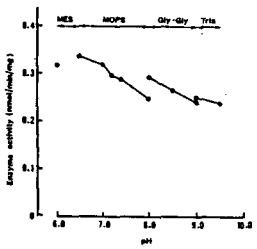


Fig.3 Effect of Incubation Temperature on the Activity of PAF acetylhydrolase

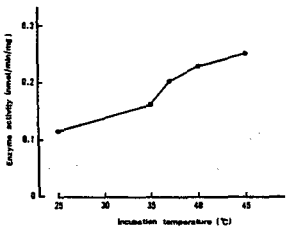
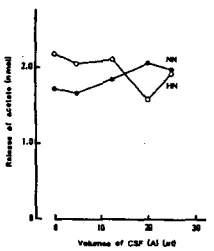


Fig.6 Effect of CSF (A) volume on PAF acetylhydrolase



Sequential Changes of CSF PAF acetylhydrolase

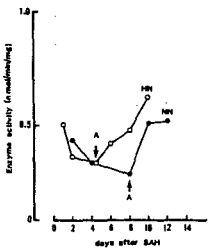


Fig.7 Elution Profile of the Inhibitory Activity for PAF acetylhydrolase through Sephacryl S-200HR Column

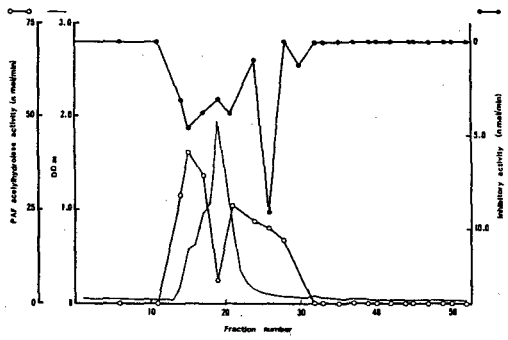


Table 1

Effect of Various Compounds on PAF acetylhydrolase Activity

Addition		% of control
None		100
Ca^{2+}	(1 μM)	103
	(1 mM)	104
EGTA	(1 mM)	43
Nicardipine	(0.025 mg/ml)	105
	(0.25 mg/ml)	102
Papaverine	(1 mg/ml)	110
	(10 mg/ml)	107
Ascorbic acid	(0.4 mg/ml)	99
	(4.0 mg/ml)	103
Sodium nitrite	(0.25 mM)	106
	(2.5 mM)	105
Urokinase	(12 IU/ml)	102
	(120 IU/ml)	106
t-PA	(0.02 mg/ml)	101
	(0.2 mg/ml)	106

262 トリプトファン水酸化酵素の急激な失活の機構について

長谷川宏幸，大黒一哉，市山新*
（西東京科大・バイオサイエンス，*浜松医大・生化学第一）

トリプトファン水酸化酵素の過酸化水素による急激かつ非可逆的な失活の機構を解析した．Fe^{+2}を含まない系では酵素の失活は起こらない．この失活はカタラーゼと，基質のひとつであるトリプトファン，それぞれによって濃度依存的に阻止される．この失活はFe^{+2}と過酸化水素の共存を必須条件とする事から還元型酸素のうち$^{\cdot}OH$が直接の攻撃因子であると推定される．トリプトファンの保護作用の濃度依存特性が，トリプトファン水酸化酵素の基質としての濃度依存性ときわめて類似することから，トリプトファンは基質結合部位に結合することによって保護作用を示すことが示唆された（みかけの解離定数= 48 μM）．これらから，攻撃因子の生成部位がFe^{+2}の結合部位である活性中心であり，被攻撃部位が酵素の基質結合部位またはそのきわめて近傍であると推定される．

はじめに

中枢神経系以外のセロトニン分泌細胞のトリプトファン水酸化酵素の大きな特長は，抽出後すみやかに（可逆的に）活性を失うが，高濃度のディチオスレイトール(DTT)の存在下にFe^{+2}によって，抽出時をはるかに上まわるレベルにまで活性化できることである．しかし，この活性化した酵素は，酸素存在下に急激に非可逆的に失活する．この活性化の生理的意味が不明であった．最近になって，DTTによるトリプトファン水酸化酵素の活性化の実体は酵素に対する2価鉄の供給であって，すぐれて生理的な過程であることが明らかになってきた(1)．このことは純粋に実験上のアーティファクトと考えられてきたこの急激な酵素の失活にも生理的な慨然性が認められる可能性を示唆している．本実験ではこの酵素の急激かつ非可逆的な失活の機構を解析した．

材料，方法

酵素はマウス肥満細胞腫（P-815）から，Nakata and Fujisawa (2)の方法を基礎として改変した方法によって，95%以上純化精製した標品を用いた．酵素の活性化，酵素活性の測定は基本的にはすでに紹介した方法(3)に従った．活性化酵素の失活の解析に当たっては次のように行った，すなわち，酵素を活性化溶液（50 mM Tris-HCl, 20 mM DTT）に溶かし，ツンベルグ管中，30℃，窒素気中，15分間，保温して活性化する．失活の解析には一定量の酵素液で酵素活性を測定し（失活 0-time），これと同時に一定量を等量の空気と平衡した（トリプトファンなどの検討対象の試料化合物を含む）緩衝液と混合して，これを好気条件放置とした．所定の時間後に酵素反応液に移して，酵素活性を測定し，0-timeと比較して失活量をもとめた．

実験結果

1）本酵素の鉄イオンに対する親和性は鉄-酵素としては異様に低く，精製標品での鉄分析では，化学量論的に有意な値を示さない．しかし，酵素反応測定時にはコンタミ程度の鉄イオンを有効に拾うために，通常，鉄に対する絶対的な依存性を実験的に示すのは困難を伴う．鉄イオンに対する結合定数は未知であるが，結合定数の既知である，金属キレーターと比較することによって，ある程度推定できる．Fe^{2+}に対する安定定数Log(LM)が14.33であるEDTAは本酵素の酵素反応液にくわえれば鉄イオンを奪って，酵素反応は即座に停止するが，安定定数が11.92であるEGTAでは酵素反応にほとんど影響しない．このことから，トリプトファン水酸化酵素の鉄に対する親和性はEDTAとEGTAの中間であり，その交換速度はきわめて速いと推定される．このことから，酵素を100%鉄飽和に保つために，活性化のためにDTTとともに保温するにさいしては 50 μM 程度のFe^{+2}イオン（$FeSO_4(NH_4)_2SO_4$）を添加する．

2）この鉄イオンの添加を行わない（内在またはコンタミの鉄は存在する）場合には活性化後の失活は緩やかである．この緩やかな失活はH_2O_2（50 μM）の添加によって，著しく促進される．2 mg/ml以上のカタラーゼ，または1 mg/ml のグルタチオンペルオキシダーゼ（および30 mM 還元型グルタチオン）は有効に酵素を保護する．また，5 mg/ml のスーパーオキシドディスムターゼは有意な保護効果を示さない．これらの事実から，酵素を失活させるのは過酸化水素またはそれから精製するものである事が示唆される．ただし，過酸化水素がスーパーオキサイドから生成されるか否かはわからない．

3）鉄を除去したアポ酵素では 10 mM という高濃度のH_2O_2もなんら酵素を傷害しない．このことから，酵素の失活にはFe^{+2}が必要であることが示された．従って，本酵素の失活には還元型の酸素（$O_2^{\cdot}$，$^{\cdot}OH$，またはH_2O_2）が関与すると考えられる．

4）1分間に80%といった急速な失活が進行しつつある酵素について，速度一定の活性測定が可能なことからも推定できるように，経験的に最適化された酵素の活性測定条件は酵素を安定化している．この条件を構成する成分のうち，カタラーゼは有効成分であったが，pH 6.9 条件では更に強力な保護効果をもつ成分があるはずである．ジヒドロプテリヂン還元酵素，NADH，テトラヒドロプテリンはいずれも保護効果を示さず，基質であるトリプトファンが有効に失活を阻止する事が見いだされた．活性化酵素を空気に曝す失活条件下で1分後に残った酵素活性を，トリプトファン濃度に対してプロットしたものが図1（左）である．この曲線は双曲線であったので，失活阻止能力の濃度依存成分について両逆数プロットを行った．トリプトファンのごく低い濃度の値を除いてプロットはみごとに直線であった．(図1　右）トリプトファンは活性化された酵素に対して結合解離の平衡状態にあり，結合型の酵素は失活せず解離型の酵素は1次反応の様式で失活すると仮定すれば直線のかたむきの逆数は解離定数を示すこととなり，その値は 48 μM であった．この値は本酵素の酵素反応における見かけのKmとちかい値である．図に示す曲線が双曲線であることから本酵素のトリプトファン結合サイトは1つであると考えるのが妥当であり，従って，トリプトファンの結合サイトは基質結合部位そのものであると考えられる．

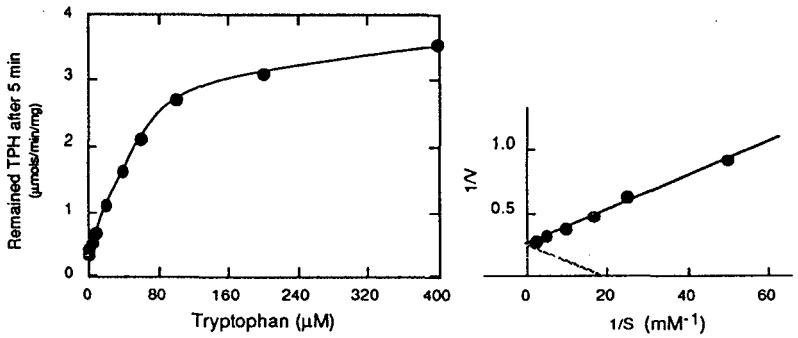


図1　トリプトファン水酸化酵素の失活に対するトリプトファンの保護作用

トリプトファン水酸化酵素をDTT存在下，嫌気的な条件下でFe^{+2}により活性化した．この酵素を好気条件下でいろいろな濃度のトリプトファンを含む リン酸緩衝液 (pH 6.9) と混合し，30℃，5分後に残っている酵素活性を測定した．図（左）からも読めるとおり，トリプトファンを添加しない条件では5分後には初期値の90%が失活している．右の図は左のデータの逆数プロットである．x 軸との交点の逆数は 48 μMである．

考察

トリプトファン水酸化酵素は比較的温和な還元状態でFe^{+2}をえて活性化されるが，好気的条件下では急激に失活する．本酵素はFe^{+2}に対して，速い交換速度で結合平衡しているという特長を持つ．このことはFe^{+2}結合部位が著しく裸出していることを示すかも知れない．実験結果は酵素に結合しているFe^{+2}が過酸化水素と反応してヒドロキシラジカル（$^{\cdot}OH$）を生成しこれが酵素タンパク質を非可逆的に修飾して失活にいたらしめる事を示している．

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \text{ --> } Fe^{+3} + {}^{\cdot}OH + {}^{-}OH$$

このフェントン反応の重要な生成物 $^{\cdot}OH$ は反応性に富み，きわめて短い距離の移動が可能であるという．いま，反応発生部位がFe結合部位であり，トリプトファンによる有効な保護が基質結合部位であることから，本酵素の活性中心またはそのごく近傍に$^{\cdot}OH$の受容部位が存在することが示唆される．

最近，Stadtmanらはフェントン反応による特異的アミノ酸の修飾がタンパク質アミノ酸の修飾反応として比較的普遍的であるとし，この反応はタンパク質のターンオーバーを調節する，ラベル貼り効果である，として多数の論文を報告している(4)．トリプトファン水酸化酵素の失活の機構の詳細は未知であるが同様の反応を予測できる．その生理的意義は細胞内における酵素タンパク質の代謝回転の調節であると予測することができるが今のところ不明である．

文献

1. Hasegawa, H. Kobayashi, K. and Ichiyama, A. (1991) in "Pterins and Biogenic Amines in Neurology, Pediatrics, and Immunology" pp. 245-254 (Lakeshore Publishing Co.)
2. Nakata, H. and Fujisawa, H. (1982) Eur. J. Biochem., 124. 595-601
3. Hasegawa, H. and Ichiyama, A. (1987) Methods. Enzymol., 142. 88-92
4. Stadtman, E. R. and Oliver, C. N. (1991) J. Biol. Chem. 266. 2005-2008

263 新しいグリア性プロテオグリカン，１Ｇ２－ＰＧ
－大脳の発達に伴う発現部位の変化－

大平敦彦，松井ふみ子，前田信明*
（愛知コロニー・発達障害研・周生期，基礎生物学研・感覚情報処理*）

〔要約〕

ラット脳の可溶性プロテオグリカンを免疫原として作製したモノクローナル抗体1G2(MAb-1G2)は、コア蛋白質の分子量が220 K および150 K のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(1G2-PG)を認識する。２つのコア蛋白質のＮ末端アミノ酸配列は相互に異なっており、また、既知の蛋白のいずれとも一致しなかった。MAb-1G2 を用いて、いろいろな発達段階にあるラットの大脳を免疫染色した。その結果、MAB-1G2 の染色は、形成されはじめたばかりの大脳皮質原基を取り囲む領域にみられるようになること、分化途上の海馬のneuropilが濃染されること、および、幼若脳では体性感覚野に存在するbarrelの内側が染色されないことがわかった。1G2-PGが、培養条件下でも発現しているのかを調べるため、新生仔ラット大脳新皮質由来の初代培養系を、MAb-1G2 を用いて免疫染色したところ、おもに、GFAP陽性の大型細胞が染色された。

以上の結果から、1G2-PGは、おもにグリア細胞が産生する、新しいプロテオグリカン分子種であること、および、海馬やbarrel領域の発達に関与している可能性があることが示された。

脳には、コア蛋白質の分子量が異なる多くの種類のプロテオグリカンが存在し(1, 2)、神経突起形成の制御など、いろいろな機能を果たしていると考えられている(3, 4)。個々のプロテオグリカンの構造と機能を調べるためには、それぞれのプロテオグリカンを単離する必要がある。しかし、これらは、互いに物理化学的な性質が似かよっているので、一般的な生化学手法で個々に分離することは、事実上不可能である。私達は、個々のプロテオグリカンを識別する道具としてモノクローナル抗体の開発を行っている。すでに、250 kDa のコア糖蛋白質を持つコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを認識する抗体(MAb-6B4) を作製し、このプロテオグリカン(6B4-PG)が、ラットの小脳においては苔状線維系に特異的に存在することを明かにした (5)。また、別の抗体(MAb-1G2) は、220 kDa と150 kDa のコア蛋白質をもつ２つの脳特異プロテオグリカン(1G2-PG)を認識することも明らかにした（昨年度の本学会）。今回は、1G2 エピトープが、いろいろな発達段階にあるラットの大脳のどういう部位に存在しているのかを、免疫組織化学的に調べた。

〔材料および方法〕

<u>部分アミノ酸配列の決定</u>

生後10日のラット脳から、可溶性プロテオグリカン混合物を精製し、コンドロイチナーゼ消化をすることにより、コア糖蛋白質を調製した (1)。これを、そのまま、あるいはBrCN処理によりペプチド断片にした後、SDS-PAGEにより分離した。各ペプチドは、PVDF膜に転写後、ペプチドシーケンサーにより、部分アミノ酸配列を調べた。

<u>免疫組織化学</u>

胎生16日から成獣にいたるまでのラットの脳をCarnoyの固定液で固定後、通常のパラフィン切片を作製した。組織切片は、Vectastain ABC Kitを使用して、染色した。

<u>大脳新皮質細胞の初代培養</u>

新生仔ラットの大脳新皮質から、0.25% トリプシン／0.01% DNase I により解離細胞を調製し、ポリリジン処理したカバーガラス上で、10% FBS ／5mg/mlグルコースを含むMEM を用いて培養した、１週間後に3%パラホルムアルデヒドによって固定後、Vectastain ABC Kitを用いて、染色した。

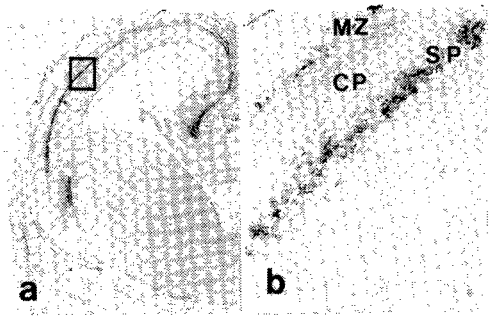


図１．胎生16日ラット終脳を MAb-1G2で免疫染色した。図ｂは、図ａの四角で囲んだ領域を拡大したもの。CP, 皮質原基; MZ, marginal zone; SP, subplate.

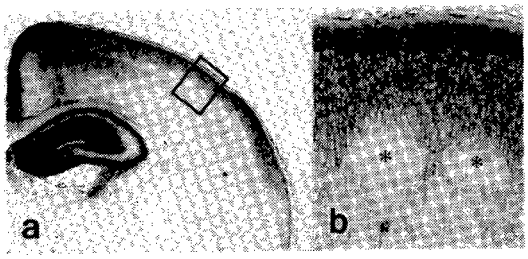


図２．生後10日ラット大脳を MAb-1G2で免疫染色した。図ｂは、図ａの四角で囲んだ領域を拡大したもの。海馬が濃染されること、およびbarrelの内部（＊印）は染色されないことがわかる。

[結果と考察]

220 kDa および150 kDa のコア糖蛋白質とも、N末端のアミノ酸配列は、既知の蛋白とは一致しなかった。このことから、1G2-PGは、新しいプロテオグリカン分子種であることが確認された。

220 kDa と150 kDa をBrCN処理して得られたペプチドには、共通のものおよび一方にしか存在しないものがあった。一部のペプチドの部分アミノ酸配列を調べたが、やはり既知の蛋白とは一致しなかった。ただし、両方のコア糖蛋白質から共通に得られる25 kDaのアミノ酸配列は、 EGFに類似していることがわかった。結合組織に広く分布するバーシカンと呼ばれるプロテオグリカンは、 EGF様アミノ酸配列を持つことが知られており(6) 、1G2-PGは、バーシカンファミリーの一員である可能性がある。

MAb-1G2 を用いて、いろいろな発達段階にあるラットの大脳を免疫染色し、1G2-PGの発現部位を調べた。 MAb-1G2は、胎生16日(E16) の終脳において、形成されはじめた大脳皮質原基をとりかこむ領域(marginal zoneとsubplate) を濃染した（図１）。 E20になると、染色される領域は、subplate側より大脳皮質の内部へ広がっていた。生後10日では、barrel領域をのぞき、大脳皮質全体にneuropilが染色された（図２）。分化途上の海馬も濃染されることがわかった。成獣では、海馬、大脳新皮質とも、全体的にneuropilが弱くdiffuse に染色された。1G2-PGは、すくなくとも、海馬の発生や、ヒゲとバレルとの間の神経回路形成に関与しているものと思われる。

新生仔ラット大脳新皮質から調製した初代培養系には、おおまかに、３種の細胞が識別される。第１は、抗ニューロフィラメント抗体で染色される長い突起をもった細胞群、第２は、抗ガラクトセレブロシド抗体で染色される網目状の細胞突起を持った細胞群、第３は、抗GFAP抗体による染色に陽性の大型細胞である。このうち、 MAb-1G2は、おもに、GFAP陽性の大型細胞をdiffuse に染色した。このことから、1G2-PGは、脳内で、おもにアストロサイトによって産生されると考えられる。

[文献]

1．Oohira, A., Matsui, F., Matsuda, M., Takida, H., and Kuboki, Y. (1988) J. Biol. Chem., 263:10240-10246.

2．Herndon, M. E. and Lander, A. D. (1990) Neuron, 4 : 949-961.

3．Maeda, N. and Oohira, A. (1991) Trend. Glycosci. Glycotechnol., 3 : 28-34.

4．Oohira, A., Matsui, F., and Katoh-Semba, R. (1991) J. Neurosci., 11 : 822-828.

5．Maeda, N., Matsui, F., and Oohira, A. (1992) Dev. Biol., 151 : in press.

6．Zimmermann, D. and Rouslahati, E. (1989) EMBO J., 8 : 2975-2981.

264 in vitro におけるグリアフィラメント様構造の再構成と特性

伊藤仁一、増田真理、田中亮
（名市大・医・生化Ⅰ）

〔要約〕ラットアストロサイトよりグリアフィラメント画分をファロイジン（30 μg/ml）存在下で抽出し、10 mM $MgCl_2$ と 100 mM NaCl で in vitro において再構成した。再構成グリアフィラメント様構造はネットワーク構造を形成し、主要構成タンパク質であるビメンチンとグリア線維酸性タンパク質（GFAP）に加えてマイクロフィラメントの構成タンパク質であるアクチンやその他多くのマイナーなタンパク質を含んでおり、in vivo において多くのグリアフィラメント関連タンパク質の存在を示唆した。再構成系においてグリアフィラメントは Ca^{2+} により重合速度が促進された。一方重合温度を4℃、25℃、37℃にして比較すると37℃においてより大きなフィラメント形成が認められた。また尿素は濃度依存的にグリアフィラメント重合を抑制し、5Mでは重合を完全に阻害した。しかしながら、5M尿素存在下においてもグリアフィラメント抽出液中に含まれているアクチンの重合は大きく抑制されることはなかった。

培養ラットアストロサイトは偏平で石垣状の形態をもつ細胞で、細胞内に分布するグリアフィラメントはネットワーク構造を形成する。アストロサイトがグリア細胞成長因子で刺激されるとDNA合成と細胞分裂が誘導され、続いて24時間以降徐々に細胞体が収縮し、グリア突起が伸展して細胞分化するようになる。こうした細胞分化に対応して細胞内ではグリアフィラメントが束化し太い繊維状構造を形成するようになる[1]。このようなアストロサイトの細胞分化とグリアフィラメントの構造変化との相関はdBcAMPで刺激された場合にも観察され、グリアフィラメントの構造変化がアストロサイト形態分化に重要な役割を担っていることが示唆される。そこで、私たちはアストロサイトの形態分化におけるグリアフィラメントの関与を調べるために、培養ラットアストロサイトよりグリアフィラメントを脱重合抽出しin vitro 再構成を試み、特性を検討した。

（実験方法）

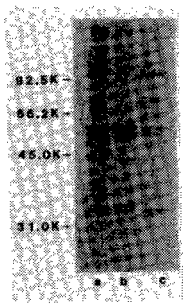
1. ラットアストロサイトの培養：髄膜を除去した胎性16日目のラット胎児大脳を 0.1% トリプシンで処理し、これを 20% FCS/DMEM 培地にて1週間の一次培養を行った。さらに 10% FCS/DMEM で1週間の二次培養を経て、アストロサイトを調製し実験に供した[2]。
2. グリアフィラメント構成タンパク画分の調製：培養ラットアストロサイトをラバーポリースマンで採取した。これを Tris-HCl/saline, pH 7.5 ,で洗浄後、0.15% Triton X-100/PHEM buffer で2分間処理し、16,000 x g, 20 min の遠心沈殿を細胞骨格画分として得た。2mM Tris-HCl, 0.2mM Na_2ATP, 0.5mM 2-mercaptoethanol, phalloidin (30 μg/ml)を用いて抽出し、グリアフィラメント画分とした。
3. グリアフィラメント様構造の in vitro 再構成：グリアフィラメント画分を 0.15 M NaCl, 10mM $MgCl_2$ で重合した。グリアフィラメントの重合は O.D. 350 nm の吸収にて測定した。また再構成されたグリアフィラメント様構造を酢酸ウランで negative staining し、透過型電子顕微鏡にて観察した。

（実験結果および考察）

本実験でラットアストロサイトより抽出され再構成されたグリアフィラメント様構造にはビメンチンおよびＧＦＡＰのグリアフィラメント構成タンパク質の他にアクチンや分子量約１００Ｋ、３７Ｋ、３３Ｋ、３１Ｋなどのマイナーなタンパク質が認められた（Fig.1）。これらのタンパク質はアストロサイト細胞内においてグリアフィラメント関連蛋白として機能していることが示唆された。ファロイジンにより総細胞骨格画分におけるマイクロフィラメントを固定化したにもかかわらず、本実験での抽出条件で一部のアクチンが可溶化されグリアフィラメント抽出液中に混入した。また再構成系においてアクチンがグリアフィラメントに組み込まれたことからグリアフィラメントとマイクロフィラメントとの強い相互作用が示唆された（１９９２年神経化学抄録）。また再構成グリアフィラメント様構造は、negative staining による電顕観察により in vivo 同様にネットワーク構造を形成した（Fig.2）。再構成系におけるグリアフィラメント様構造の形成は、その重合率においては重合温度には影響を受けないが、４℃のような低温に比べ３７℃においてより大きなフィラメント形成が認められた（Fig.3）。

（文献）

1) J. Ito et al.,: Neurochem. Int., 16, 133-140, 1990
2) J. Ito et al.,: Brain Res., 243, 309-314, 1982



a : intermediate filament extracts
b : reconstituted intermediate filaments
c : residual supernatants

Fig. 1 In vitro reconstitution of intermediate filaments of rat astrocytes

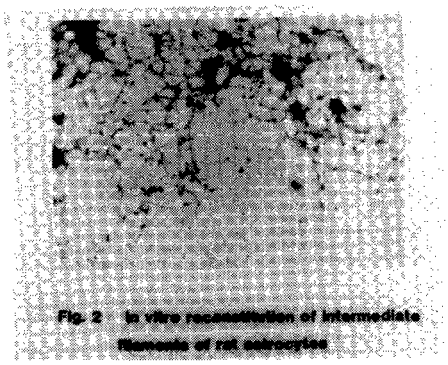


Fig. 2 In vitro reconstitution of intermediate filaments of rat astrocytes

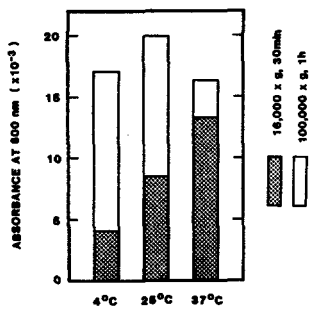


Fig. 3 Temperature dependency of I F polymerization

265 アストロサイト由来マイクロフィラメントの in vitro 再構成におけるα-シアロシルコレステロールの影響

増田真理、伊藤仁一、田中亮
（名市大・医・生化Ⅰ）

〔要約〕
培養ラットアストロサイトよりマイクロフィラメント構成タンパク質を脱重合抽出し、in vitro でのフィラメント再構成におけるα－シアロシルコレステロール（α-ＳＣ）の影響を検討した。抽出されたマイクロフィラメント画分は KCl(100 mM)と $MgCl_2$(10 mM)の添加により重合したが、同時にα-ＳＣを加えると重合は抑制され、ｐＨ７－８でα-ＳＣは最も強い重合抑制活性を示した。α-ＳＣはマイクロフィラメント画分が低濃度(15 μg/200 μl)であるほど強い重合抑制作用を示し、反応温度による差は認められなかった。しかしながら高濃度(26 μg/200 μl)においては低温度ほどよく抑制された（４℃＞２５℃＞３７℃）。α-ＳＣの重合抑制作用は、骨格筋Ｇ-アクチンにおいてもマイクロフィラメントと同様の濃度依存性がみられることから、α-ＳＣはアクチン分子に直接作用することが示唆された。一方、再構成されたマイクロフィラメントにα-ＳＣを添加すると脱重合の促進がみられた。

α-ＳＣで刺激されたラットアストロサイトは、偏平で石垣状の形態から多数のグリア突起をもつ成熟型アストロサイト様形態へと変化する。一方細胞内マイクロフィラメント構造は、形態変化に伴ってコントロール細胞にみられたストレスファイバーが破壊され細胞膜裏打ち構造へと変化していく[1]。ラットアストロサイトより抽出されたマイクロフィラメント画分は主要構成タンパク質であるアクチンの他に、中間径フィラメント構成タンパク質であるビメンチン、ＧＦＡＰなど複数のタンパク質から成り in vitro 再構成系においてマイクロフィラメント様構造を形成することは既に昨年報告した[2]。本研究では、こうした in vivo でのα-ＳＣによるアストロサイト形態変化とマイクロフィラメントの構造形成との相関関係を解明すべく、ラットアストロサイトよりマイクロフィラメント画分を脱重合抽出し、その再構成系におけるα-ＳＣの作用を分析した。

（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日目のラット胎児大脳を0.1% トリプシンで処理し、これを20% FCS/DMEM 培地にて１週間の一次培養を行った。さらに 10% FCS/DMEM で１週間の二次培養を経て、アストロサイトを調製し実験に供した[3]。
2. マイクロフィラメント構成タンパク画分の調製：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、16,000 x g, 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, 0.5mM 2-mercaptoethanol, pH 5.0 溶液で脱重合抽出し、100,000 x g, 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. マイクロフィラメント再構成：抽出されたマイクロフィラメント画分を 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ および各種濃度のα-ＳＣ存在下で重合した。フィラメント重合は O.D. 350 nm の吸収にて測定した。また重合したフィラメントは 100,000 x g, １時間遠心分離し、その沈澱画分を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画分はin vitro再構成系において、α-シアロシルコレステロール（α-SC）により濃度依存的に重合が抑制された（Fig.1）。α－SCのマイクロフィラメント重合抑制活性はpH7－8、低温度（4℃＞25℃＞37℃）において強く、また、より低濃度のマイクロフィラメント画分に対して強い重合抑制作用を示した。一方、再構成されたフィラメントは、α-SCにより脱重合された。骨格筋G-アクチンに対しても同様にα-SCは重合抑制作用を示すことから（Fig.2）、α-SCがアクチン分子に直接作用し、重合抑制と脱重合促進によって、マイクロフィラメントの構造形成を制御し、in vivoにおいてはアストロサイトのストレスファイバー崩壊を導くものであることが示唆された。またG-アクチンとマイクロフィラメント画分のα-SCの重合抑制作用に対する感受性に大きな差が認められないことから、マイクロフィラメント関連タンパク質がα-SC存在下におけるマイクロフィラメントの安定性に積極的に関与していないことが示唆された。

（文献）

1)T. Kato et al.,: Brain Res., 438, 277-285, 1988
2)伊藤ら: 神経化学, 30, 376-377, 1991
3)J. Ito et al.,: Brain Res., 243, 309-314, 1982

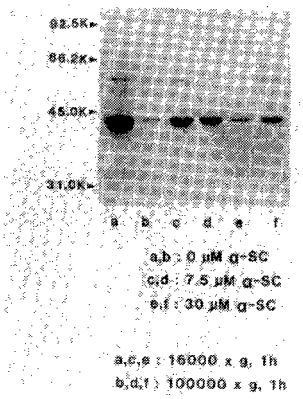


Fig. 1 Effect of α-SC on polymerization of microfilament components

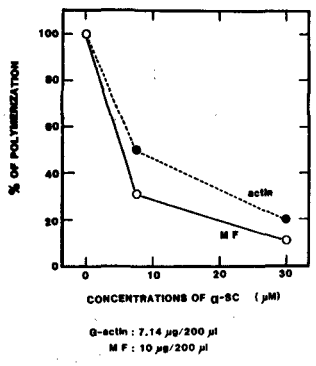


Fig. 2 Effect of α-SC on M F or G-actin polymerization

266 抗キネシン抗体による運動ニューロン疾患脊髄の検討

豊島至＊、小松眞史＊、正宗研＊、DC Anthony＊＊、CH Martenson＊＊、MP Sheetz ＊＊＊
（＊秋田大医第一内科、＊＊Duke大医病理、＊＊＊Duke大医細胞生物）

〔要約〕

運動ニューロン疾患（MND）における速い軸索内輸送を検討する目的で、運動蛋白質の１つであるキネシンに対しモノクロナル抗体を作成した。精製した鶏胚脳キネシンでマウスを免疫し、キネシン軽鎖（ＫＬＣ）に対し3個、キネシン重鎖（ＫＨＣ）に対し１２個を得た。１５個のうち２個のＫＬＣ抗体と７個のＫＨＣ抗体が哺乳類のキネシンとイムノブロットで反応した。２個のＫＨＣ抗体は脳と肝キネシンに同等に反応したが、５個は前者に強く反応しＫＨＣの変異が示唆された。イムノブロットによりキネシンは諸組織の中では神経組織のみに多量に検出され、大脳、小脳皮質に多く、脊髄白質、灰白質にやや少なく、末梢神経に最も少なく見られた。免疫組織染色で、ヒト脊髄運動ニューロンの神経細胞体、樹状突起、軸索が染まった。ＭＮＤ脊髄では軸索腫大が、他の部位より強く染まった。この結果はMND脊髄における速い順行性の軸索内輸送の障害を示唆している。

〔目的〕

これまで私達は、運動ニューロン疾患（ＭＮＤ）の脊髄にみられる軸索腫大内に、遅い軸索内輸送の成分であるニューロフィラメント蛋白質（ＮＦＰ）が蓄積し、高燐酸化されていることを示した（1）。ついで、微小管構成蛋白質のチューブリン、ＭＡＰ１ａ、ＭＡＰ１ｂが一部の軸索腫大に蓄積することを見ている。今回は、ＭＮＤにおける速い軸索内輸送を検討する目的で、運動蛋白質の１つであるキネシンに対しモノクロナル抗体を作成した。

〔方法〕

抗キネシンモノクロナル抗体は、ＳＵＫ－４抗ウニキネシン重鎖抗体によるイムノアフィニティーカラムで１２日鶏胚脳からキネシンを精製し、Ｂａｌｂ／ｃマウスに免疫して得た。６５３ミエローマ細胞と融合させＥＬＩＳＡでスクリーニングしクローニングした。イムノブロットはＡＩＰ染色、免疫組織染色はＡＢＣ法とした。

〔結果〕

鶏胚脳キネシンに対して１５個のモノクロナル抗体が得られ、キネシン軽鎖（ＫＬＣ）に対し3個（ＣＫＬＣ1－3）、キネシン重鎖（ＫＨＣ）に対し１２個（ＣＫＨＣ１－１２）であった。これらのうち、２個のＫＬＣ抗体と７個のＫＨＣ抗体が哺乳類の脳キネシンとイムノブロットで反応した。さらに、肝キネシンを微小管アフィニティーで部分精製し交差性を検討した（図１）。ＣＫＬＣ３は脳キネシン軽鎖である７２ｋＤａ成分と反応したのに対し肝では８０ｋＤａ成分と反応した。ＣＫＬＣ２でも同様であった。ＣＫＨＣ３とＣＫＨＣ６は脳と肝のＫＨＣとほぼ同等に反応したが、ＣＫＨＣ７、８、９、１０、１１は脳ＫＨＣと強く反応した。イムノブロットで、反応時間が短いと肝ＫＨＣとはほとんど反応しなかったが、長いとき弱い反応性がみられた。ウサギで、脳、肺、肝、心、腎、脾のキネシンの可溶成分を同一湿重量あたりの含量としてＣＫＨＣ３のイムノブロットで比較すると、脳でのみ高濃度のＫＨＣが検出された。ヒトの神経系各部から凍結乾燥切片を作成し、同一重量を切り出してＣＫＨＣ３とＣＫＨＣ９のイムノブロットでキネシン

濃度を比較した（図２）。大脳、小脳皮質で高濃度で、脊髄灰白質、白質は中間で、末梢神経で低い反応を示した。正常ヒト脊髄を急速凍結し、クリオスタットで薄切後アセトン固定しＣＫＨＣ３とＣＫＨＣ９で免疫組織染色した（図３）。運動ニューロンの全ての部分、細胞体、樹状突起、軸索が染色された。後角のニューロンも同様で白質の軸索も染色された。ＭＮＤ脊髄を同様にして検討した（図４）。ＭＮＤ脊髄は急速凍結標本２個と、ホルマリン固定パラフィン包埋標本５個を用いた。連続切片を高燐酸化ＮＦＰ抗体で染色して軸索腫大を同定した。運動ニューロンの染色性は正常対照と同様であったが、軸索腫大が他の部より強く染色された。

［考察］

ＫＨＣ抗体により、ウサギ脳と肝のキネシンの反応性にちがいが見られた。これまで副腎ＫＬＣが脳ＫＬＣと異なることが報告され（２）、また、脳ＫＬＣがスプライシングのちがいにより３種の分子から成ることが示されているが（３）、ＫＨＣにおいても臓器間に差異のあることが示唆された。組織切片でキネシンの分布が検討されたことはない。培養細胞での染色態度は報告者により異なっている（4-6）。ＭＮＤ脊髄での軸索腫大内にキネシンが存在することは、速い軸索内輸送の障害を示唆している。大部分のキネシンは可溶性であるので、その機序の解明は今後の課題である。

［文献］

1) Toyoshima I et al J Neurol Sci 89:269-277,1989.2) Murofushi H et al.J Biol Chem 263:12744-12750, 1988.
3) Cyr JL et al Proc Natl Acad Sci USA 88:10114-10118, 1991. 4) Pfister KK et al J Cell Biol 108:1453-1463, 1989.
5) Hollenbeck PJ J Cell Biol 108:2335-2342, 1989. 6) Okuhara K et al Cell Motil Cytoskel 12:71-78, 1989.

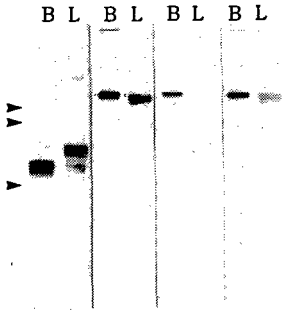


図１　ウサギ脳(B)と肝(L)のキネシンに対する抗体の反応性
ペア左から；ＣＫＬＣ３、ＣＫＨＣ３、
ＣＫＨＣ９（２ｈ反応）、ＣＫＨＣ９（１５ｈ反応）
マーカー：１１６ｋ、９７ｋ、６６ｋ



図２　ヒト神経系各部のキネシン相対濃度
ＣＫＨＣ９によるイムノブロット
左から；大脳皮質、小脳皮質、被殻、淡蒼球、
脊髄灰白質、脊髄白質、坐骨神経

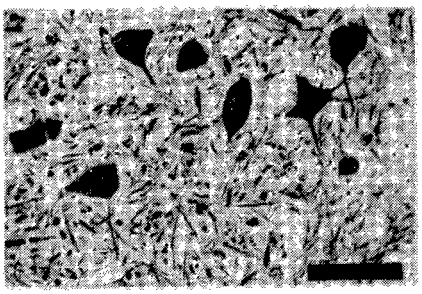


図３　正常ヒト脊髄前角のＣＫＨＣ９による免疫染色
バー：１００μｍ（図４も同拡大）

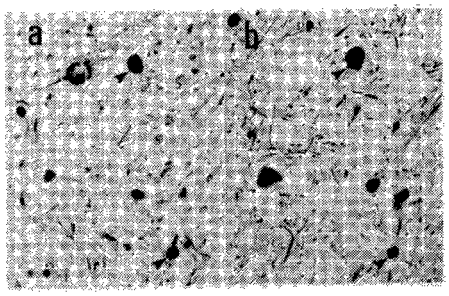


図４　ＭＮＤ脊髄前角のＣＫＨＣ９による免疫染色（ａ）
矢頭：軸索腫大　　ｂ：高燐酸化ＮＦＰ染色

267 非神経細胞に誘導発現されたドレブリン蛋白による突起形成及び細胞骨格の変化

池田圭朗[2)]、白尾智明[1)]、浅田英穂[1)]、Peter Kaub[1)]、戸谷重雄[2)]、植村慶一[1)]
（慶應義塾大学・医・生理[1)]、脳神経外科[2)]）

〔要約〕
神経発生関連蛋白ドレブリンは神経組織の発生過程で特異的に出現するアクチン結合能をもつ蛋白質である[1,2]。すでに我々は、遺伝子導入によりドレブリンを一過性に発現させた線維芽細胞が樹状突起様の突起を形成することを報告したが[3]、今回、その神経細胞様突起および細胞膜近傍にドレブリンとアクチンが共在していることを明らかにした。更に、形質転換によってドレブリンを安定的に発現する細胞及びCd誘導ベクターをもつドレブリン陽性発現クローンを確立し、ドレブリン発現線維芽細胞における細胞骨格の変化をとくにドレブリンの発現量に注目して解析した。ドレブリン発現量の少ない細胞では、ドレブリンとF-アクチンが細胞質内にび慢性に分布して突起形成はほとんどみられなかったが、一部にドレブリンとF-アクチンが細胞質内に太い束状になって蛇行する像が見られた。また、誘導ベクターをもつドレブリン陽性クローンではドレブリン発現量の増加に伴って突起を形成する細胞が増加した。そして、一部の突起形成細胞では細胞体および突起の細胞膜近傍にドレブリンとF-アクチンが強く局在した。このことから、ドレブリンはその発現量の変化に伴ってアクチンの細胞内局在を変化させ、神経細胞の突起形成に関与している可能性が示唆された。

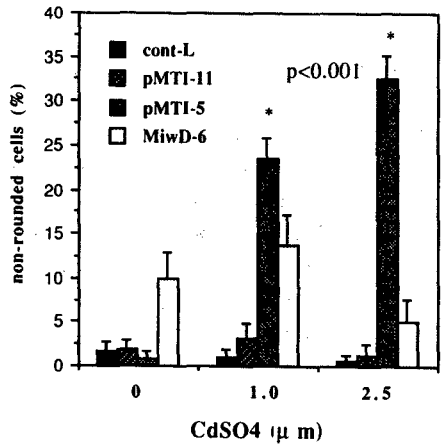
〔緒言〕
ドレブリンはアクチン結合能をもつ蛋白質であり、線維芽細胞に発現させると細胞突起を形成することから、細胞骨格の変化に関与すると推測されている。今回、我々は、メタロチオネインプロモーターを持つベクターにドレブリンA cDNAを組み込んだベクターを用いて安定な形質転換L細胞を確立し、ドレブリンの発現量と突起伸展の定量的解析を試みた。また、得られたドレブリン陽性発現クローンMTI-5にドレブリンを発現させた場合の細胞形態の変化、及びドレブリンとアクチンの細胞内局在の変化を観察したので報告する。

〔実験方法〕
形質転換はβ-actinあるいはmetallothionein- promotorを持った発現ベクターにラットドレブリンAのcDNAを組み込んだベクターを用いてリン酸カルシウム法によって行った。Transformant作製にあたってはpST NeoBをco-transfectし、G418を用いて選択した。細胞培養はプラスチック組織培養ディッシュ及びpoly-L-lysineでコーティングしたカバースリップ上でDMEM,10%FCSにて細胞密度3×10^{5}個／mlで24時間培養した。それぞれに種々の濃度の$CdSO_4$ (0 μM, 1.0 μM, 2.5 μM, 5.0 μM)を添加してさらに24時間培養した後、以下の実験を行った。1：倒立顕微鏡下、最低10視野における突起伸展細胞数を計測し、全細胞数に対する比率を算出した。2：細胞を回収し、sample bufferを添加してホモジナイズし、50 μg wet weight tissue/ μlに試料を調整した。Laemmliの方法に準じてSDS-PAGEを行った後、ドレブリン抗体M2F6を用いたウエスタンブロット法を行ってドレブリン発現量の半定量化を行った。3：3.7%ホルムアルデヒド、0.9%NaCl、20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で15分間固定後、トライトン処理し、抗ドレブリンモノクロナール抗体M2F6とその二次抗体Rhodamine標識抗マウスIgG、および細胞骨格蛋白F-actinを認識するNBD-Phallacidinを用いた免疫細胞化学二重染色を行ってドレブリン、アクチンの細胞内局在を観察した。

〔結果〕
ドレブリンを一過性に発現させることにより樹状突起様の突起伸展をした線維芽細胞においては、その細胞突起および細胞膜近傍にドレブリンとアクチンが強く局在した。明らかな突起伸展を起こしていない細胞でもドレブリンとF-アクチンが細胞質内に太い束状に分布してストレスファイバーに変化の見られる細胞が存在した。次に、β－アクチンのプロモーターを持つドレブリンA発現ベクター（MIW-DA）をL細胞にtransfectionしてドレブリン陽性細胞(MIW-D-6)を、metallothionein-I promotorを持つドレブリンA発現ベクター(pMTI-DA)をL細胞にtransfectionしてドレブリン陽性発現クローンMTI-5、及びコントロールとしてドレブリンを発現していないクローンMTI-11を確立した。MIW-DAのtransformantではドレブリン発現量は少なく、細胞質内にび慢性に分布していた。MTI-5に$CdSO_4$ を作用させたときの突起伸展細胞の割合はCd濃度の増加に伴って増加したが、その他の細胞における突起伸展細胞はCd濃度にかかわらずごく少数であった（図－１）。次に、MTI-5にCdを作用させたときのドレブリン発現量はM2F6を用いたウエスタンブロット法においてCd濃度の増加に伴って増加した。一方、L細胞、ドレブリン陰性クローンMTI-11ではドレブリンの発現は見られず、MIW-D-6では有意な変化は認められなかった。次に、MTI-5にM2F6とNBD-Phallacidinを用いた免疫細胞化学二重染色を行ったところ、Cd添加前にはドレブリンは細胞質にび慢性に分布し、しかも少量であったが（図－２）、Cd添加後は細胞突起にドレブリン、アクチンが強く局在する細胞が出現した（図－３）。

〔考察〕
ドレブリンを一過性に多量に発現して樹状突起様の突起伸展をした細胞ではドレブリンとアクチンがその細胞突起および細胞膜近傍に、また、発現量の少ない細胞では細胞質にび慢性に局在したが、両者の分布が一致していたことからドレブリンがマイクロフィラメント上に存在して細胞形態の変化に関わっていることが推測される。さらにドレブリン発現量の増加に比例して突起伸展細胞の数が増加したことはドレブリン発現量の変化に応じてマイクロフィラメントの状態が変化する可能性を示している。

MIW-DAのtransformantでみられたドレブリンとF-アクチンが細胞質内に太い束状になって蛇行している細胞はドレブリン発現量の増加に伴ってドレブリンとアクチンが細胞質全体から膜近傍へと変化する中間過程における局在を示している可能性があり、ドレブリンがマイクロフィラメントの配向を変化させて突起伸展へと関わって行く様子を現していると考えられる。つまり、ドレブリン発現量の増加に伴い、ドレブリンはアクチンとともに細胞質全体から膜近傍へと局在を変化させ、細胞突起形成を促すと考えられる。現在、ドレブリンがアクチンの局在を変化させるメカニズムについて検討中であり、細胞突起形成過程におけるドレブリンと他の細胞骨格(Microtubule, Neurofilament)の関係についても検討を進めて行きたい。

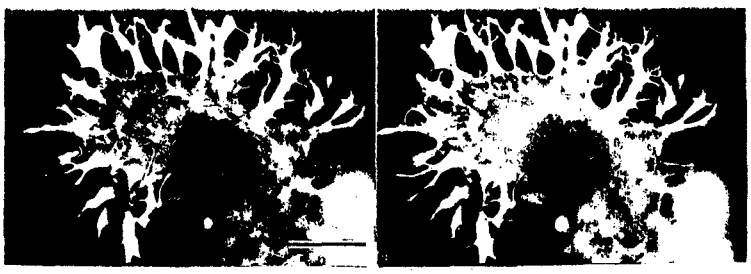


図－1　pMTI-5、pMTI-11、L細胞、及びMIW-D-6にCd添加24時間後の突起伸展細胞数(non-rounded cells)／全細胞数

図－2　Cd添加前におけるpMTI-5細胞のM2F6（右）及びNBD-phallacidin（左）の二重免疫細胞化学染色
Scale bar,10 μm.



図－3　Cd2.5 μM添加24時間後におけるpMTI-5細胞のM2F6（右）及びNBD-phallacidin（左）の二重免疫細胞化学染色。
Scale bar,10 μm.



〔文献〕

1）Shirao,T. and Obata,K.(1985) J.Neurochem. 44 : 1210-1216
2）Shirao,T.,Kojima,N.,Nabeta,Y. and Obata,K.(1989) Proc. Japan Acad. 65 Ser.B : 169-172
3）Shirao,T.,kojima,N. and Obata,K.(1992) NeuroReport 3 : 109-112

268 Methamphetamine・Phencyclidine急性投与のラット脳皮質CCKmRNAレベルに及ぼす効果

吉川武男[1]、国嶋千代子[2]、山田和男[3]、渋谷治男[3]、融道男[3]

(生理学研究所・神経化学[1]、東邦大学・理[2]、東京医科歯科大学・精神[3])

幻覚惹起物質であるMethamphetamine (MAP) 及びPhencyclidine (PCP) をラットに投与し、Frontal Cortex (FC)、temporal cortex・entorhinal cortex・amygdala等を含むPosterior Cortex (PC)、Hippocampus (HPC) の3部位でCholecystokinin (CCK) mRNAレベルをNorthern blotにより調べた。その結果、FCではMAP、PCPいずれもCCKmRNAの有意な変動はきたさなかったが、PC、HPCでは両薬物は投与後の時間によってCCKmRNAの減少をきたした。それらの変化は、投与後30分という短時間後からみられ、MAPを投与したときのHPCでは投与後48時間の時点でも減少が続いていた。このように、辺縁皮質におけるCCKmRNAレベルがMAP、PCP投与に感受性を示す結果は、CCKの抗精神病作用、分裂病での辺縁皮質の構築異常・CCK含量の変化等の報告を勘案すると興味が持たれる。

〔はじめに〕

MAP、PCPは、ヒトで連用すると分裂病類似の幻覚妄想状態をきたすことが知られている。一方、神経ペプチドの一つであるCCKは中枢神経系に広く多量に分布しており、抗精神病作用としての可能性も示唆されている。そこで我々は、MAP・PCPのCCK代謝に及ぼす効果をmRNAレベルでFC、PC、HPCの皮質3部位で検討した。昨年の第15会日本神経科学大会でこれらの結果の一部を報告したが(1)、今回は、slot blotからNothern blotへ、X線フィルムによるオートラジオグラフィーからイメージアナライザー(FUJIX BAS2000)を用いたバンドの定量へ、またRNA量の内部コントロールとしてactinでなくより条件によって変化を受けにくいといわれているglyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) (2) を用いるなど方法論的に洗練を加え、また投与後断頭までの時間の設定を増やしより詳細に検討を加えた。

〔方法〕

動物はWistar系雄性ラット(180-240g)を各群3-6匹用いた。

(1) 薬物投与

MAP 0.5mg/kg、PCP 7.5mg/kgをそれぞれ各動物群に腹腔内投与し、前者については投与後30分、150分、48時間後の時点で断頭した。後者については、投与後30分、150分、24時間48時間、4日後の時点で断頭した。対照群としては、生理食塩水を投与し1時間後に断頭したものを用いた。

(2) total RNAの抽出

断頭後速やかに脳を取り出し、Frontal Cortex (FC)、Posterior Cortex (PC)、Hippocampus (HPC) の3部位に分割し、直ちにアセトンードライアイスに浸し凍結させた。RNAの抽出に関しては、Chomczynskiらのacid guanidinium thyocyanate-phenol-chloroform法(3)にしたがった。

(3) Northern blot

RNAを18%フォルムアルデヒド、1%アガロースを含む変性ゲルで電気泳動した後、ナイロンメンブレン(Schleicher and Schuell, Inc.)にcapillary transferした。プローブであるCCKcDNAは新潟大学遺伝実験施設の桑野良三博士より供与されたもので、ランダムプライマーキット(宝K. K)をもちいて[α-32P] dCTP (3000Ci/mmol) でラベルし、カラムで精製した(比活性5-7×10^8cpm/ug of DNA)。ハイブリダイゼーション手順はS&S社のプロトコールに従った。メンブレンを、6×SSPE/0.2%SDSで室温で15分×2回、1×SSPE/0.2

％ＳＤＳで３７℃１５分×２回、１×ＳＳＰＥ／０．２％ＳＤＳで６５℃３０分×１回洗浄し、ＢＡＳ２０００（ＦＵＪＩＸ）に露光しバンドを定量した。その後プローブをはがしＧＡＰＤＨｃＤＮＡによるハイブリダイゼーションをＣＣＫの場合と同条件で行った。結果は、ＣＣＫの値をＧＡＰＤＨの値で割ったもので表示した。

〔結果および考察〕

Ｆｉｇ．１にＭＡＰの結果を、Ｆｉｇ．２にＰＣＰの結果を示してある。以前我々は、ドーパミン作動薬の投与で３０分－１時間の短時間後にＣＣＫ免疫活性の変化を認めたので（４）、今回も比較的短時間と、それとは対照的に長時間後の断頭時間を設定した。ＦＣではＣＣＫｍＲＮＡはＭＡＰ・ＰＣＰ投与共に有意な変化はきたさなかった。これに対して、ＨＰＣではＭＡＰ投与後３０分からＣＣＫｍＲＮＡの減少がみられ、同じ減少巾が４８時間後にも認められた。ＰＣＰ投与では３０分後に減少がみられたが、その後は回復している。ＰＣではＣＣＫｍＲＮＡはＨＰＣと類似した変化であるが、ＭＡＰ投与に対しては作用時間が短く、ＰＣＰ投与に対しては長いといえる。分裂病死後脳で、Ｒｏｂｅｒｔｓら（５）は、ｔｅｍｐｏｒａｌ　ｃｏｒｔｅｘ，ａｍｙｇｄａｌａ，ｈｉｐｐｏｃａｍｐｕｓでＣＣＫ－８の有意な減少を報告したが、今回ラット脳で同じ部位が、分裂病類似の幻覚妄想状態を引き起こすＭＡＰ・ＰＣＰに感受性を示したことは興味深いと思われる。

〔文献〕
1. Yoshikawa T et al (1991) Neuroscience Res. Supp. 16. S34.
2. Marty FL et al (1985) Nucl. Acid. Res. 13. 1431-1442.
3. Chomczynski P & Sacchi N (1987) Anal. Biochem. 162. 156-159.
4. Yoshikawa T et al (1989) Neuropeptides 13. 103-105.
5. Roberts GW et al (1983) Brain Res. 288. 199-211

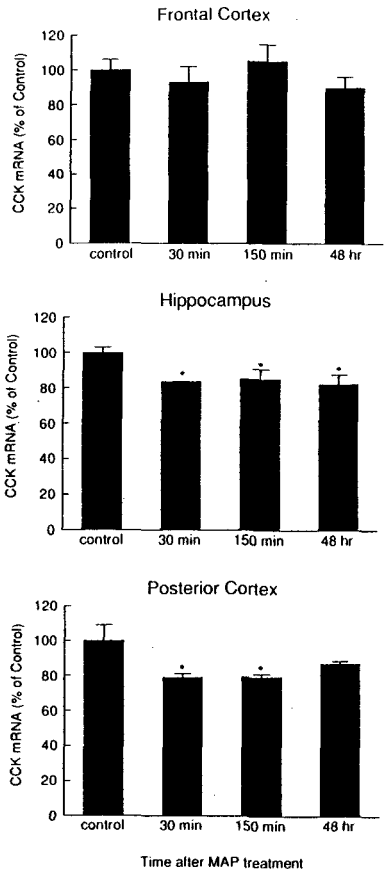


Fig. 1

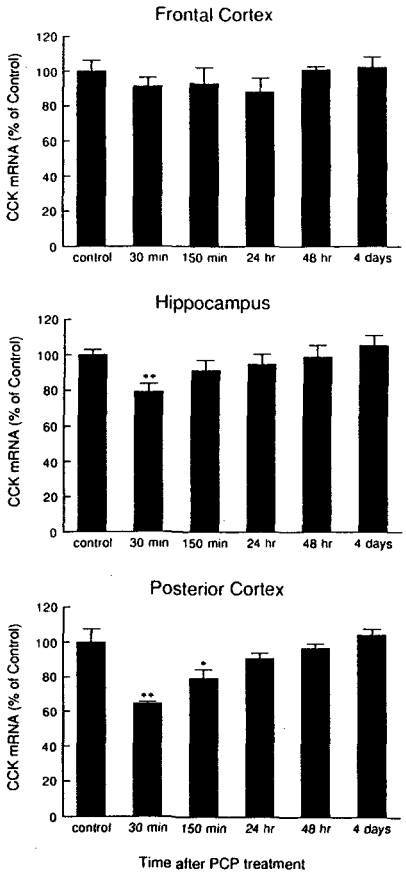


Fig. 2

269 神経興奮性ペプチドａｃｈａｔｉｎ－Ｉの作用

竹内　宏．金　嘉慧．劉　国君．ディビナ・サントス．
荒木陽子．安田好美*．南方宏之*．野本享資*
（岐阜大・医・第一生理；（財）サントリー生有研*）

〔要約〕 D-phenylalanine を含む tetrapeptide, achatin-I (Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp)は，先にアフリカマイマイ (Achatina fulica Férussac) 神経節から，分離・同定された．このペプチドは，多くの Achatina 巨大神経細胞に興奮作用を示した．その作用は，Na^+ の膜透過性上昇による．さらにこのペプチドは，ある種の classical neurotransmitter の作用を増強した．すなわち achatin-Iは，これら神経細胞の excitatory neurotransmitterであると同時に，neuromodulatorとしても働いている．

［はじめに］Achatin-I は岐阜大学医学部，（財）サントリー生有研，サントトマス大学（フィリピン，マニラ市）の共同研究により，神経興奮性ペプチドとして Achatina 神経節より分離・同定された（１）．その後このペプチドの作用について，Achatina巨大神経細胞を用いて，研究が続けられた（２，３）．本研究では，今までに得られたこのペプチドの作用について報告する．

［実験方法］Achatina fulica はマニラ市より空輸された．同定されている神経細胞のうち，主として PON (periodically oscillating neurone), TAN (tonically autoactive neurone), v-RCDN (ventral-right cerebral distinct neurone)の３種が実験に用いられた（４）．Achatin-I とその誘導体は，圧による局所投与 (pneumatic pressure ejection) (2 Kg/cm^2, 400 msec, 10^{-3} M) あるいは bath投与により，神経細胞に与えられた．実験には主として微小電極を２本細胞内に刺入することによる，膜電位固定法が用いられた．用量・作用曲線は，probit法により解析された．

［結果と考察］膜電流固定により，achatin-I を圧により局所投与し，１６種の巨大神経細胞に対する作用を検定した．このペプチドは，これらのうち７種の神経細胞に興奮作用を呈した (Fig. 1) ．このペプチドが抑制作用を示す細胞は，見付からなかった．膜電位固定下で，achatin-I とその立体異性体７種の作用を，bath投与により比較した．PON, TAN, v-RCDN３種の細胞ともに，７種の立体異性体のなかでは，[D-Ala^3]-achatin-I のみが興奮作用を示したが，その作用は achatin-I よりかなり弱かった (Table 1, A, B)．同様の実験条件により，achatin-I の構造類似体の作用が検定された．これらのなかでは，Gly-achatin-I, Gly-lacking achatin-I, [Asn^4]-achatin-Iの３種のみが興奮作用を呈したが，その作用は achatin-Iよりかなり弱かった (Table 1, C - G) ．Achatin-I を含めて，合計５種の有効ペプチドの用量・作用曲線が測定された．その解析結果を，Table 2 に要約する．この結果より，achatin-I の作用は，stereospecificかつ structure-specific である．膜電位固定下で，上記３種の神経細胞の電流・電圧曲線を記録し，これに achatin-Iを bath 投与すると，広い膜電位にわたって，内向き電流 (I_{in})が発生する．しかし細胞外液からNa^+ を除去すると，I_{in} は発生しない．このことより，achatin-I の興奮作用は，Na^+ に対する膜透過性上昇によると結論される．最近 achatin-Iが，それ自身直接作用を示すよりも薄い濃度で，ある種の classical transmitterの作用を増強することを観測した．またある種の抗ヒスタミン剤が，achatin-I に拮抗作用を示す．

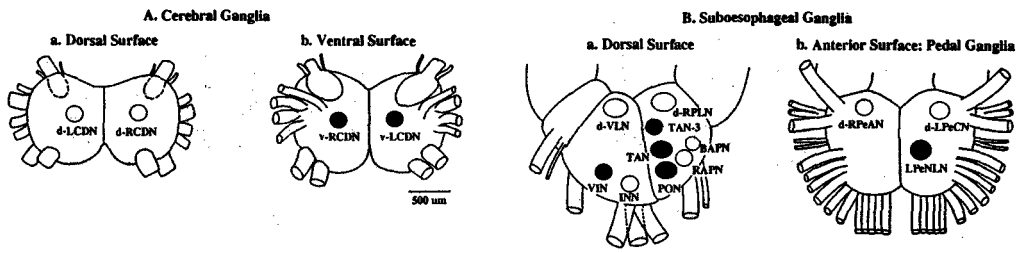


Figure 1. Ganglia and identifiable giant neurones of Achatina fulica Férussac. (●), neurones sensitive (excited) to achatin-I.

Table 1. Effects of achatin-I and its derivatives on the Achatina neurons (PON, TAN and v-RCDN).

No.	Peptide	Effects	No.	Peptide	Effects
	A. Achatina naturally occurring peptides				
1.	Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp (Achatin-I)	E	2.	Gly-L-Phe-L-Ala-L-Asp (Achatin-II)	(-)
	B. Stereoisomers				
3.	Gly-D-Phe-D-Ala-L-Asp	SE	4.	Gly-D-Phe-D-Ala-D-Asp	(-)
5.	Gly-D-Phe-L-Ala-D-Asp	(-)	6.	Gly-L-Phe-D-Ala-L-Asp	(-)
7.	Gly-L-Phe-D-Ala-D-Asp	(-)	8.	Gly-L-Phe-D-Ala-L-Asp	(-)
	C. N-terminus elongations				
9.	Acetyl-Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp	(-)	10.	Gly-Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp	SE
	D. N-terminus deletions				
11.	D-Phe-L-Ala-L-Asp	SE	12.	L-Ala-L-Asp	(-)
	E. D-Phe[2] residue modifications				
13.	Gly-D-Tyr-L-Ala-L-Asp	(-)	14.	Gly-D-Trp-L-Ala-L-Asp	(-)
15.	Gly-D-His-L-Ala-L-Asp	(-)	16.	Gly-D-Leu-L-Ala-L-Asp	(-)
17.	Gly-Gly-L-Ala-L-Asp	(-)			
	F. L-Ala[3] residue modifications				
18.	Gly-D-Phe-L-Val-L-Asp	(-)	19.	Gly-D-Phe-L-Ser-L-Asp	(-)
20.	Gly-D-Phe-Gly-L-Asp	(-)			
	G. L-Asp[4] residue modifications				
21.	Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp-NH_2 (Achatin-I amide)	(-)	22.	Gly-L-Phe-L-Ala-L-Asp-NH_2 (Achatin-II amide)	(-)
23.	Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asn	SE	24.	Gly-D-Phe-L-Ala- -Ala	(-)
25.	Gly-D-Phe-L-Ala-L-Glu	(-)	26.	Gly-D-Phe-L-Ala-L-Glu-NH_2	(-)
27.	Gly-D-Phe-L-Ala-L-Gln	(-)			

E, excitatory effects. SE, slifgtly excitatory effects. (-), no effect.
(3), modified by authors.

Table 2. ED_{50} (95 % confidence limit), Hill coefficient, E_{max} (mean ± S.E.M.), and equiactive molar ratio vs. achatin-I (EMR) of achatin-I and its effective analogs, applied by bath, on the three Achatina neurons.

No.	Peptide	ED_{50} (95% conf. lim.) (10^{-5} M)	Hill coeff.	E_{max} (nA)	EMR	n
	A. PON					
(1)	Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp	0.20 (0.14-0.26)	0.62	5.46±0.22	1	8
(3)	Gly-D-Phe-D-Ala-L-Asp	#15.46 (11.09-21.56)	0.71	***2.00±0.17	>1500	6
(10)	Gly-Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp	#2.82 (2.33-3.41)	0.80	**3.63±0.19	60	4
(11)	D-Phe-L-Ala-L-Asp	#3.28 (2.05-5.23)	0.84	***2.75±0.13	1500	4
(23)	Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asn	#3.22 (2.32-4.47)	0.79	***1.94±0.05	>1500	4
	B. TAN					
(1)	Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp	1.47 (1.19-1.81)	0.66	5.02±0.44	1	6
(3)	Gly-D-Phe-D-Ala-L-Asp	#3.13 (3.07-3.19)	0.74	***1.75±0.10	>200	6
(10)	Gly-Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp	#2.76 (2.07-3.68)	0.82	*3.44±0.14	8	4
(11)	D-Phe-L-Ala-L-Asp	#3.29 (2.78-3.88)	0.81	**2.69±0.10	200	4
(23)	Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asn	#2.96 (2.27-3.87)	0.79	***1.97±0.07	>200	4
	C. v-RCDN					
(1)	Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp	1.15 (0.83-1.58)	0.63	6.33±0.68	1	6
(3)	Gly-D-Phe-D-L-Ala-L-Asp	#3.94 (3.54-4.38)	0.83	***2.04±0.25	>250	6
(10)	Gly-Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asp	#3.05 (2.48-3.76)	0.82	**3.63±0.06	28	4
(11)	D-Phe-L-Ala-L-Asp	#2.63 (2.00-3.46)	0.87	**2.81±0.14	>250	4
(23)	Gly-D-Phe-L-Ala-L-Asn	#2.82 (2.57-3.09)	0.83	***2.13±0.21	>250	4

#, Significantly different vs. achatin-I calue. Student's t-test vs. achatin-I value (*, $p < 0.05$; **, < 0.01; ***, < 0.001). n shows the numbers of experiments performed. (3), modified by authors.

(1) Kamatani, Y. et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun., 160, 1015-1020.
(2) Kim, K.H. et al. (1991) European J. Pharmacol., 194, 99-106.
(3) Kim, K.H. et al. (1991) Life Sci., Pharmacol. Lett., 48, 91-96.
(4) Takeuchi, H. et al. (1987) In "Neurobiology Molluscan Models", ed. by Boer, H.H et al., Elsevier North-Holland Publishing Co., Amsterdam, P.P. 100-104.

270 下垂体前葉細胞からのLHRH刺激性LH放出機構の加齢変化

宮本 篤，木村 永一，大鹿 英世
（札幌医大・薬理）

〔要約〕
下垂体前葉細胞からのLHRH刺激によるLH放出機構の加齢変化を、成熟（６～７ヵ月齢）および老齢（２３～２４ヵ月齢）ラット下垂体前葉より調製した単層培養細胞において検討した。成熟および老齢ラットの細胞への10^{-10}M～10^{-7}M LHRHは、用量依存的にLH放出を引き起こし、ほぼ10^{-7}Mで最大効果を示した。老齢ラット細胞へのLHRH刺激によるLH放出の程度は、成熟ラット細胞に比較し有意に減少した。成熟および老齢ラット細胞への10^{-7}M phorbol myristate acetate (PMA)および10^{-5}M A23187は、LH放出を有意に増加した。加齢による細胞からのLH放出減弱は、10^{-7}M PMAと10^{-5}M A23187の併用により改善された。老齢ラット下垂体前葉より調製した膜分画において、LHRHの安定アナログ[^{125}I]buserelinの結合は、成熟ラットのそれに比較し有意に減少していた。これは、下垂体前葉細胞からのLHRH刺激性LH放出機構の加齢変化にその受容体量の減少が一部関与している可能性が示唆された。

〔緒 言〕
脳下垂体前葉は、LH（黄体ホルモン）などのペプチドホルモンを合成・分泌する極めて重要な内分泌器官である。下垂体は、上位中枢である視床下部から放出される種々の下垂体ホルモン分泌刺激あるいは抑制物質により、また末梢の内分泌器官で生成分泌される各種のホルモンによりフィードバック機構を介して複雑な調節を受けている。一方、細胞からのホルモン分泌機構は未だ明かではないが、それぞれの受容体を介したイノシトールリン酸生成，Ca^{2+} 動員，プロテインキナーゼ C活性化など、情報伝達系の重要性が指摘されている。我々は、老化研究の一端(1,2,3,4,5,6)として、内分泌器官としての下垂体前葉細胞からのLH放出機構の加齢変化について検討した。

〔実 験 方 法〕
実験には、成熟（６～７ヵ月齢）および老齢（２３～２４ヵ月齢）雄Wistarラットを使用した。ラットを断頭屠殺し下垂体後葉部を除去後、前葉部を摘出し0.1M PBS液(pH 7.4)中で細切した。なお本実験には、下垂体正常ラットのみを使用し、下垂体腫瘍ラットを排除した。細胞の浮遊化は、精製コラゲナーゼ(Worthington)，ヒアルロニダーゼ(Sigma)，BSA(Miles)を含む0.1M PBS液中にて行なった。浮遊化した細胞は、10% dextran charchol-treated calf:rat serum (1:2, v/v)を含む培養液(DMEM)で洗浄後、0.2mM glutamineを添加し一晩95% O_2-5% CO_2気相下でインキュベートした。その後、serum-free DMEMで～10^5 cells/wellに調製した細胞浮遊液を４８時間インキュベーター内で単層培養した。培養液中に放出されたLHは、National Hormone and Pituitary Agencyより供与されたラットホルモンおよび血清を用いた２抗体法ラジオイムノアッセイによって測定した。実験成績は、NIHのラットLH RP2標準品で表示した。
下垂体前葉の膜分画の調製は、Limontaら(7)の方法に従った。蛋白は、BSAを標準としてLowry法で定量した。LHRH受容体の測定には、Dr. K. von Richtenbergより供与されたLHRH degradation resistant analogue, D-ser(t-Bu)^6-des-Gly^{10} EA (buserelin)をchloramine T法でiodinate後、HPLC systemにより精製して使用した。実験成績は、computer assisted curve-fitting program (LUNDON-1)で解析した。

〔実 験 結 果 と 考 察〕
１）LH放出の加齢変化
成熟および老齢ラット下垂体前葉の単層培養細胞からのLHRH刺激によるLH放出量の変化を表１に示す。LHの自発的放出は、老齢ラットより得られた細胞で低値を示した。LHRHの４時間の刺激は、両培養細胞において10^{-10}Mより用量依存的にLHを放出し、10^{-7}Mで最大効果を示した。用量反応性は、いずれの用量においても老齢下垂体細胞で低下していた。この結果は、下垂体前葉細胞のLHRH刺激性LH放出機構に加齢変化が生じていることを示している。図１はPMAとA23187刺激によるLH放出量の変化を示す。10^{-7}M LHRHによる老齢ラット培養細胞からのLH放出量は、成熟ラット培養細胞への刺激に比較し約30%有意に低下していた。PKCを活性化することが知られるPMA(10^{-7}M)およびCa^{2+}イオノフォアA23187(10^{-5}M)４時間の処置は、両培養細胞においてLH放出を有意に増加させた。しかしこの両薬物効果は10^{-7}M LHRH刺激による放出と比較し低値であった。また両薬物の併用(PMAとA23187)は、単独時より有意にLH放出を増大させた。これらの結果は、正常老化過程の下垂体細胞内PKC活性化機構に加齢変化は生じていないことが考えられる。最近、下垂体前葉細胞からのLH放出には、細胞内からのCa^{2+}動員ばかりでなく細胞外

からのCa^{2+}流入の増加も重要であることが示唆されている（8)。本実験で得られたA23187の成績より、老齢下垂体細胞からのLH放出の低下は外液Ca^{2+}流入量の低下によるものではなく、むしろCa^{2+}流入以降の放出機構障害が考えられる。PMAとA23187併用によるLH放出増強効果は加齢変化の原因と関連して興味深いが、その機構は明かではない。

2）LHRH受容体の加齢変化

LHRHの安定アナログbuserelinを放射性標識し、成熟および老齢ラット下垂体前葉より調製した膜分画において結合性を検討した。そのsaturation bindingの成績を図2に示す。[^{125}I]Buserelinの結合量は、下垂体前葉細胞において加齢によって有意に減少した。しかしその結合親和性に有意な変化は認められなかった。老齢ラット下垂体前葉におけるLHRH受容体は、不変であるという報告(9)と減少するという報告(7)があり未だ一定の傾向が示されたとはいえない。我々の成績は、後者と一致していた。これは、下垂体前葉細胞からのLHRH刺激によるLH放出の加齢変化（放出減少）にその受容体量の減少が一因を担っていることを示唆している。

表1 培養細胞からのLHRHによるLH放出の用量反応性

	LHRH-stimulated LH release (ng/2x10^5 cells/4 h)				
	Vehicle	10^{-10}M	10^{-9}M	10^{-8}M	10^{-7}M
Adult	2.55	3.62	4.23	4.48	4.49
Old	2.11	3.19	3.58	3.75	3.82

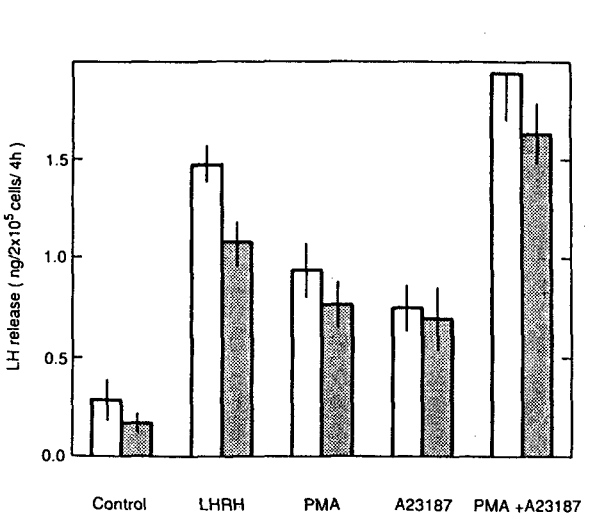


図1 LHRH, PMA, A23187によるLH放出
(Open bars, 6-7 mo.; Filled bars, 23-24 mo.)

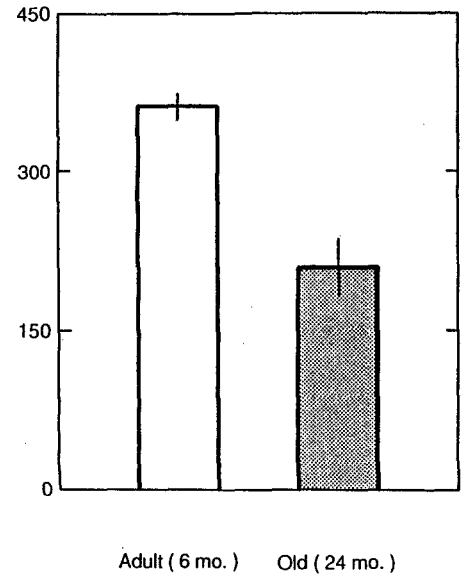


図2 [^{125}I]Buserelin結合量の変化

[参 考 文 献]

1. Miyamoto, A. and Ohshika, H. (1989) *Gen. Pharmacol.* 20, 647-651
2. Miyamoto, A. et al. (1990) *J. Neurochem.* 55, 70-75
3. Miyamoto, A. et al. (1992) *Exp. Gerontol.* 27, 211-219
4. Miyamoto, A. et al. (1992) *Am. J. Physiol.* 262, C1181-C1188
5. Miyamoto, A. et al. (1992) *Exp. Gerontol.* in press
6. Villalobos-Molina, R. et al. (1992) *Eur. J. Pharmacol.* in press
7. Limonta, P. et al. (1988) *Life Sci.* 42, 335-342
8. Holl, R. W. et al. (1989) *Mol. Cell. Endocrinol.* 64, 105-110
9. Sonntag, W. E. et al. (1984) *Endocrinology* 114, 1657-1664

271 カエル下垂体後葉における神経ペプチドの共存

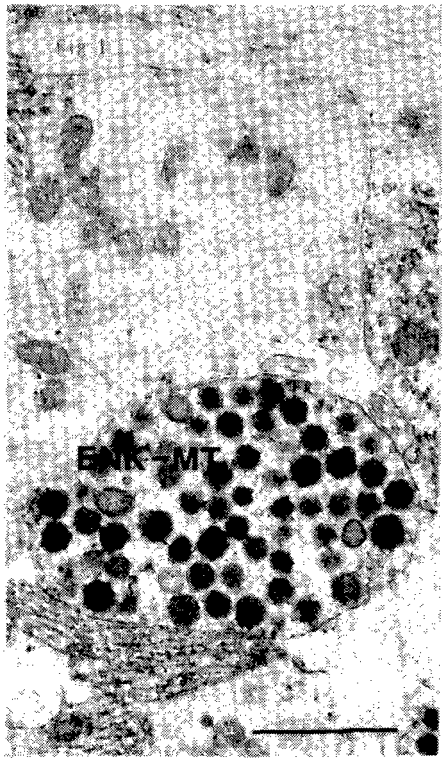
竹田二美代、竹田 稔、塩田清二*、中井康光*
（昭和大学・医・第一生化学、第一解剖学*）

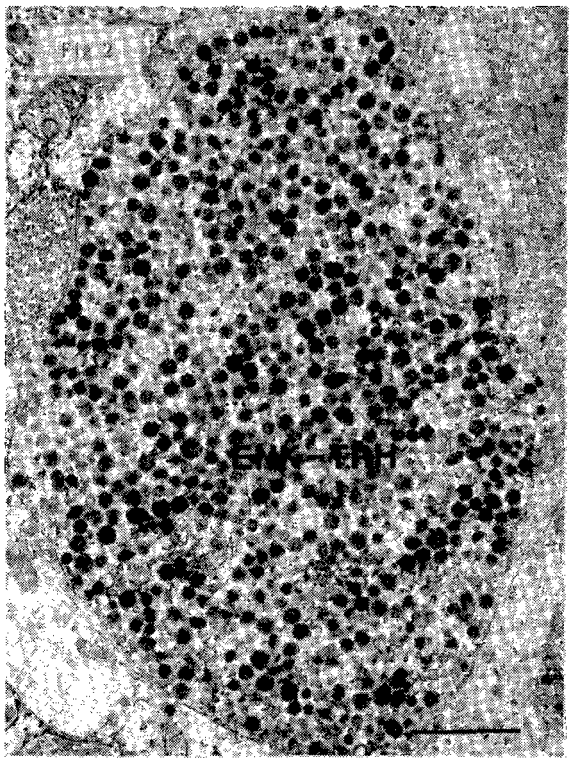
〔要約〕
カエル及びラットの視床下部－下垂体後葉系に於けるメチオニンエンケファリン（Met-ENK）と甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）の存在様式を免疫組織化学的に調べ、更にラジオイムノアッセイ（RIA）法で下垂体後葉内の Met-ENK と TRH の濃度を測定した。カエル下垂体後葉の Met-ENK、メソトシン（MT）、TRH、バソトシン（VT）様免疫反応の超微局在と、これら神経ペプチドの共存を二重免疫電顕法にて観察した。RIA により Met-ENK の含有量を測定した結果、カエル下垂体後葉内での Met-ENK の含有量が他の脳内各部位に比べ最も多かった。MT様免疫陽性反応は大型の神経分泌果粒を含む終末に限局し、三重免疫電顕法による観察の結果同一神経分泌果粒内に Met-ENKとMT および TRH の共存することが分かった。一方 VT様免疫陽性反応は別個の神経終末内にみられた。

〔はじめに〕
カエル下垂体後葉には多数の大型の神経分泌果粒（直径 120～ 200nm）を含む神経終末のほかに、小型の果粒小胞（直径 80～ 130nm）を含む神経終末が分布している。後葉内には、後葉ホルモンである VT や MT の他に、TRH や Met-ENK も高濃度に含まれていることが、生化学的に知られている（1）、（2）。今回、後葉ホルモン（VT、MT）と TRH や Met-ENK の終末内における共存様式を調べるために、包埋前 PAP 法と包埋後金コロイド法の組み合せ法を用いて免疫電顕的に観察した。さらにこれらのペプチドの脳および下垂体における含有量を RIA 法により測定し、これらのペプチドの共存の生化学的、生理学的意義について検討したので報告する。

〔方法〕
免疫組織化学
雄性 SD ラット（150 ～ 200g）及びトノサマガエル（15～25g）を麻酔下で、4% パラホルムアルデヒド、0.4% グルタールアルデヒドを含む混合溶液で灌流固定後、ビブラトーム切片を作成し、多重免疫染色を行った。即ち、包埋前 PAP 法により免疫染色した標本を樹脂包埋し、さらに超薄切片上で金コロイド法による免疫染色を行い、同一切片上で二種類あるいは三種類の抗原を染め分けた。Met-ENK 抗体及び TRH 抗体を包埋前 PAP 反応に、VT 抗体及び MT 抗体を包埋後金コロイド法で反応させた。
RIA 法
雄性 SD ラット（150～200g）及びトノサマガエル（15～25g）は断頭後、ただちに脳の各部位（前脳、視床下部、下垂体前葉、下垂体中後葉）に分け、ドライアイスで凍結後、酸でペプチドを抽出し、RIA法を行った(3)。

〔結果と考察〕
カエル下垂体後葉の神経終末には、大、小の神経分泌果粒を別個に含有するものがみられ、二重免疫電顕法による観察では、（Fig 1）に示すように大型の分泌果粒内に Met-ENK と MT が共存していることが分かった。しかし同じく後葉ホルモンである VT は Met-ENK とは共存せず、VT 固有の終末がみられた。（Fig 2）では Met-ENK と TRH が同一の大型の分泌果粒内に共存しているのがみられた。そこで、Met-ENK は MT のみならず TRH とも共存している可能性を考えて、同一超薄切片上で三重免疫染色を行い、電顕的観察を行った結果、（Fig 3）で示すように、これら 3種のペプチドが同一の大型分泌果粒内に共存しているのが観察された。これらの結果から、今後は Met-ENK と、MT、TRH が何故大型の分泌果粒に共存しているのか、又、なぜ VT は MT の様に Met-ENK や TRH と共存していないのかについて、これら後葉ペプチドの生化学的及び、生理学的役割を明らかにして行きたいと考えている。





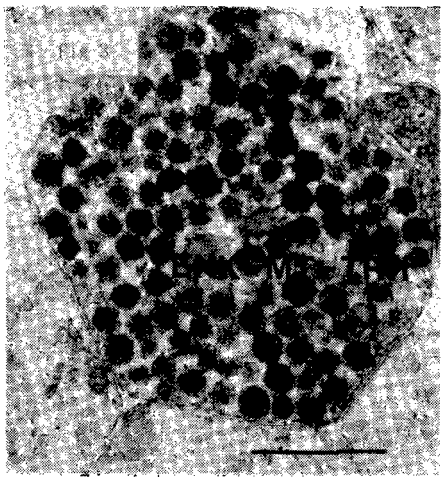


Fig 1: Double immunostaining with pre-embedding PAP(Met-ENK) and post-embedding IGS(MT). Both PAP-labeled Met-ENK and IGS-labeled MT are co-localized in the same axons (ENK-MT). Bar=1μm

Fig 2: Double immunostaining with pre-embedding PAP(Met-ENK) and post-embedding IGS(TRH). Met-ENK and TRH are co-localized in the same axons. (ENK-TRH). Bar=1μm

Fig 3: Triple immunostaining PAP-labeled Met-ENK, IGS-labeled MT and TRH-like immunoreactivity are found in the same large dense neurosecretory granules.(ENK-MT-TRH).Bar=1μm

[文献]
(1)Seki,T.,Nakai,Y.,Shioda,S.,Mitsuma,T.,and Kikuyama,S.(1983)Cell Tissue Res. 233,507-516
(2)Takeda,F.,Takeda,M.,Sato,T.,Shioda,S.,and Nakai,Y.(1990)Neuroscience Letters 119,86-89
(3)竹田二美代、竹田稔、丸山麻理、紺野邦夫、加藤武 (1982)神経化学 21,186-188

272 軟体動物ペプチドのAchatina神経細胞に対する作用

劉　国君，ディビナ・サントス，荒木陽子，竹内　宏
（岐阜大・医・第一生理）

〔要約〕アフリカマイマイ (Achatuna fulica Férussac) 神経節中に同定される巨大神経細胞が，軟体動物から抽出されたペプチドに対してどのような作用があるか，電気生理学的に検討した．Achatin-I は多くの細胞に興奮作用を呈し，APGW-amide, FMRFamide, Ser_2-MIP は抑制作用を呈した．Oxytocin, SCP_Bは少数の細胞に興奮作用を呈し，CARPは抑制作用を示した．α-BCP, ELH は，ほとんど作用を示さなかった．

［はじめに］軟体動物巨大神経細胞は，多様な神経伝達物質候補に対して感受性を示すので，neurone model として，これらの受容機構解明のために使用される．本研究は，これら一連の仕事の１つとして計画された．

［実験方法］実験動物である Achatina fulicaは，フィリピン，マニラ市より空輸された．神経節を摘出し，trypsin 処理のもとに神経細胞群を覆う結合組織を除去し，神経細胞が露出された状態で実験が行われた．神経細胞の同定（１）および生理溶液の処方については，すでに報告されている．ペプチドを fast green とともに生理溶液に溶かして，微小毛細管に詰め，圧投与 (pneumatic pressure ejection)により被検細胞に局所投与した．その条件は，2 Kg/cm², 400 msec, 10^{-3} M (ELH のみ 3 x 10^{-4} M)であった．ガラス毛細管微小電極（2M K acetate充填）を神経細胞に刺入し，主として current clampの状態で実験を行った．実験の一部では，細胞内に２本の電極を刺入して，voltage clamp を行った．

［結果と考察］１６個の Achatina 巨大神経細胞 (Fig. 1) に対する，Achatin-I （３，４），APGW-amide（５，６）FMRFamide （７），[Ser^2]-Mytilus inhibitory peptide (Ser^2-MIP)（８，９），Catch-relaxing peptide (CARP)（１０），Oxytocin（１１），Small cardioactive peptide B (SCP_B) （１２），α-bag cell peptide (α-BCP)（１３），Egg-laying hormone (ELH)（１４）の作用を検定した．これらペプチドのアミノ酸配列を Table 1に記し，また得られた結果を Table 2に要約した．

これらペプチドのうち，Achatin-I と APGW-amide は，Achatina神経節中に存在することが確認されている．従ってこれら神経細胞にとって，Achatin-I は興奮性神経伝達物質，APGW-amideは抑制性伝達物質と考えられる．FMRFamide, Ser^2-MIP はその存在が確認されていないので，抑制性伝達物質あるいはその agonistであろう．

これらペプチドの興奮作用（脱分極性）の大部分は，membrane conductance increase 型であり，Na^+ に対する膜透過性上昇による．しかし SCP_B の興奮作用は conductance decrease 型であり，K^+ の関与を考えねばならない．抑制作用（過分極性）の大部分は conductance increase 型であり，K^+ に対する膜透過性の上昇によると考えられる．

アミン，アミノ酸などのいわゆる classical neurotransmitter candidate では，１つの神経伝達物質候補が，大抵は神経細胞の種類により，興奮作用と抑制作用の双方を示す．これに反して今回検定された peptide transmitter candidate では，多くの種類の神経細胞に対して，興奮作用あるいは抑制作用の一方のみを示した．このことから，peptide transmitter では，それがリンクしているイオン・チャネルの種類が，classical transmitter の場合よりも単純なのであろう．

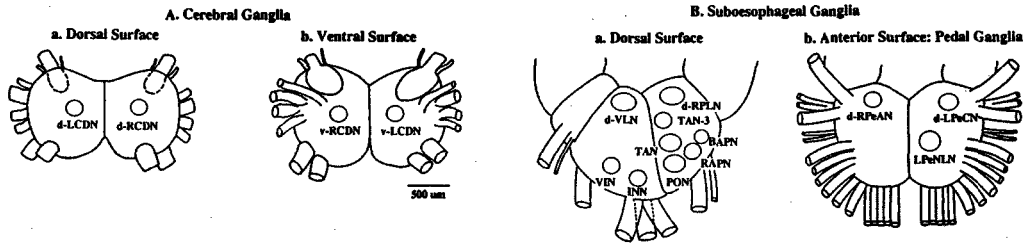


Figure 1. Ganglia and identifiable giant neurones of Achatina fulica Férussac.

Table 1. Amino acid sequence of molluscan peptides examined in the present study.

1. Achatin-I (from Achatina fulica Férussac in 1989)
   Gly-D-Phe-Ala-Asp
2. APGW-amide (from Fusinus ferrugineus in 1990 and Achatina fulica in 1991)
   Ala-Pro-Gly-Trp-NH_2
3. Ser^2-MIP (from Mytilus edulis in 1988)
   Gly-Ser-Pro-Met-Phe-Val-NH_2
4. FMRF amide (from Macrocallista nimbosa in 1977)
   Phe-Met-Arg-Phe-NH_2
5. CARP (from Mytilus edulis in 1987)
   Ala-Met-Pro-Met-Leu-Arg-Leu-NH_2
6. Oxytocin (oxytocin like peptides: from Lymnaea stagnalis in 1985)
   Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH_2
7. SCP_B (from Aplysia californica in 1982)
   Met-Asn-Tyr-Leu-Ala-Phe-Pro-Arg-Met-NH_2
8. α-BCP (from Aplysia californica in 1983)
   Ala-Pro-Arg-Leu-Arg-Phe-Tyr-Ser-Leu
9. ELH (from Aplysia californica in 1979)
   Ile-Ser-Ile-Asn-Gln-Asp-Leu-Lys-Ala-Ile-Thr-Asp-Met-Leu-Leu-Thr-Glu-Gln-Ile-Arg- Glu-Arg-Gln- Arg-Tyr-Leu-Ala-Asp-Leu-Arg-Gln-Arg-Leu-Leu-Glu-Lys-NH2

Table 2. Effects of molluscan peptides on the identifiable giant neurones of Achatina fulica Férussac.

No.	Neurones	Achatin-I	APGW-a	FMRFa	Ser-MIP	CARP	Oxytocin	SCP_B	α-BCP	ELH
	I. Suboesophageal ganglia									
1.	PON	E	(-)	(-)	(-)	(-)	E	(-)	(-)	(-)
2.	TAN	E	I	I	I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3.	TAN-3	E	I	I	I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4.	RAPN	(-)	I	I	I	I	(-)	(-)	(-)	(-)
5.	BAPN	(-)	I	I	(-)	(-)	(-)	E	(-)	(-)
6.	d-RPLN	(-)	I	(-)	I	(-)	SE	(-)	(-)	(-)
7.	INN	(-)	I	I	I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8.	VIN	E	(-)	(-)	(-)	(-)	E	(-)	(-)	(-)
9.	d-VLN	(-)	I	(-)	I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10.	d-LPeCN	(-)	I	I	I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11.	LPeNLN	E	(-)	I	I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
12.	d-RPeAN	(-)	(-)	I	I	(-)	(-)	E	(-)	(-)
	II. Cerebral ganglia									
13.	d-LCDN	(-)	(-)	I	I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
14.	d-RCDN	(-)	(-)	I	I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15.	v-LCDN	E	I	I	I	I	(-)	E	(-)	SI
16.	v-RCDN	E	I	I	I	I	(-)	E	(-)	SI

E, excitatory effects. SE, slightly excitatory effects. I, inhibitory effects. SI, slightly inhibitory effects. (-), no effect.

(1) Takeuchi, H. et al. (1987) In "Neurobiology Molluscan Models", ed. by Boer, H.H. et al., Elsevier North-Holland Publishing Co., Amsterdam, P.P. 100-104.
(2) Takeuchi, H. et al. (1973) C. R. Soc. Biol. (Paris), 167, 598-602.
(3) Kamatani, Y. et. al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun., 160, 1015-1020.
(4) Kim, K.H. et al. (1991) European J. Pharmacol., 194, 99-106.
(5) Kuroki, Y. et al. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun., 167, 273-279.
(6) Liu, G.J. et al. (1991) Biochem. biophys. res. commun., 177, 27-33.
(7) Price and Greenberg (1977) Science (New York), 197, 670-671.
(8) Hirata, T. et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun., 152, 1376-1382.
(9) Yongsiri, A. et al. (1989) European J. Pharmacol., 171, 159-165.
(10) Hirata, T. et al. (1987) Brain Res., 422, 374-376.
(11) Ebberink, R.H.M. and Joosse, J. (1985) Peptide, 6/Suppl. 3, 451-457.
(12) Morris, H.R. et al. (1982) Nature (London), 300, 643-645.
(13) Rothman, B.S. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 5753-5757.
(14) Chiu, A.Y. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, 6656-6601.

273 [1-^{13}C]D-glucose 投与による 脳内アミノ酸代謝の機能的意義の検討

金松知幸　高原ひろみ　平野修助　塚田裕三
(創価大学・生命科学研究所)

[要約]　[1-^{13}C]D-glucose (^{13}C-Glc)を動物の腹腔に投与した後、脳内アミノ酸への^{13}Cの組み込み量を核磁気共鳴装置（MRS)を用いて分析測定し、^{13}C-Glcの代謝動態と脳機能との相関性を検討した。成鼠脳にでは、^{13}C-Glcからの^{13}Cは、グルタミン酸(Glu)の4位、グルタミン(Gln)の4位、γーアミノ酪酸（GABA)の2位、アスパラギン酸(Asp)の2及び3位、アラニン(Ala)の3位に、各々優先的に組み込まれていた。一方、成鼠肝ではAlaの3位、及びGlnにわずかな組み込みが見られ、それら以外のアミノ酸への組み込みは認められなかった。ラット脳の発育過程を追ってみると、生後10-15日目で成鼠脳で見られるアミノ酸への^{13}Cの組み込みのパターンが認められた。一方、早成性の鳥（鶏）の脳では、孵化後3時間ですでに成鼠脳のパターンとほぼ同様のパターンを示した。このように^{13}C-Glcからの成熟脳及び鳥脳内のアミノ酸への^{13}Cの組み込みパターンは、脳特有のものであることから、脳機能発現と密接に関連しているものと考えられた。そこで、脳発育障害を示す、小頭症ラット(MAM)の脳における^{13}C-アミノ酸の代謝動態を検討した所、全脳では対照群との間に明確な差異は認めらなっかた。

[はじめに]　我々は、脳内でのブドウ糖からアミノ酸への代謝の特長を明かにするため^{13}C-Glc (99%^{13}C)を動物に投与した後、脳内アミノ酸を抽出し、各アミノ酸への^{13}C組み込み量を分析測定してきた。前回、本学会でラットの胎仔及び生後1日目の脳では^{13}C-Glcからのアミノ酸への^{13}Cの組み込みはAlaで高く、その他のアミノ酸への組み込みが低いことを報告した。今回は、ラットの生後の発育過程を経時的に追うと共に、早成性である雛鳥の脳について孵化後の経時的変化を追い、両者を比較検討した。また、肝組織での代謝パターンと比較することにより脳での代謝パターンが特異なものであることが明かとなり、脳機能発現との関連を追及した。

Table-1. Relative enrichments of ^{13}C amino acids and lactate labeled from [1-^{13}C]D-glucose in liver and brain of 22-day-old rat

	ppm	Liver	Brain
α-Glc	94.43	100	19.33
β-Glc	98.25	73.01	12.23
Lact-3	22.41	17.24	46.19
Ala-3	18.5	5.55	5.63
Gln-3	28.61	3.86	15.33
Gln-4	33.17	2.82	27.77
Gln-2	56.45	4.32	17.48
Glu-3	29.31	ND	49.34
Glu-4	35.8	ND	100
Glu-2	56.95	ND	47.27
GABA-3	25.99	ND	7.24
GABA-2	36.72	ND	14.33
GABA-4	41.96	ND	6.42
Asp-3	38.9	ND	21.00
Asp-2	54.52	ND	17.23

[方法]　実験動物としては、SD系ラットの胎生19日、生後3, 10, 22日令及びホワイトレグホン（鶏）の孵化後3, 12時間後及び1, 3週令のものを用いた。実験方法は前回報告した方法に従った[1]。今回は、アミノ酸定量用内部標準として0.4mMメチオニンスルホンを、またNMR分析のための内部標準として1%尿素を加えた75% EtOH溶液を抽出液として用いた。NMRによる測定は外部標準であるTSPのピーク高に対する各アミノ酸の各位炭素及び尿素の相対ピーク高を求め、尿素のピーク高で補正して、脳組織1g当たりの各アミノ酸各位炭素のピーク値を求めた。遊離アミノ酸量は抽出サンプルをPICT化した後、ウオーターズHPLCピコタグカラムにて分離定量した。

[結果および考察]　生後22日令ラットに、^{13}C-Glc (1mg/g B.W.)を腹腔に投与し、30分後に肝及び脳内アミノ酸への組み込みを見てみると、肝では、Alaの3位、Glnの2, 3, 4 位にほぼ同程度の組

み込みが認められたが、いずれも乳酸の3位の1/3以下と低い値を示しGluへの組み込みは認められなかった。脳では、Gluの4位に最も強い組み込みが認められ、次にGlnの4位に、それに次いで、GABAの2位、Aspの2,3位に、次にAlaの3位への順に組み込まれていた(Table 1)。^{13}C-Glc投与後30分には、Gluの2,3位、Glnの2,3位、GABAの3,4位にも組み込みが認められるが、今回はglucose-TCA回路に直結したGluの4位への組み込みに注目した。Table 1に示すように、脳では^{13}C-GlcからTCA回路を介しての各アミノ酸への^{13}Cの移行が旺盛であると考えられた。特にα-ケトグルタル酸からのGluの合成が活発であり、そのGluがさらにGln, GABAへと活発に代謝されていること、オキザロ酢酸やピルビン酸へのアミノ基転移反応によるAspやAlaの合成も認めらた。これらの代謝パターンは脳特有のものと思われ、肝では代謝パターンは全く異なっていた。

ラット脳で発育に伴う変化を見てみると(Fig. 1, A)、胎生期ではAlaへの^{13}Cの組み込みが高く、Glu, Gln, GABAへの組み込みは著しく低値であったが、生後10日になるとGlu, Gln, GABAへの組み込みが盛んとなり、成鼠脳のパターンを示すようになった。これは脳内遊離アミノ酸含量の変化とも相関していた(Fig. 2, A)。

Fig. 1

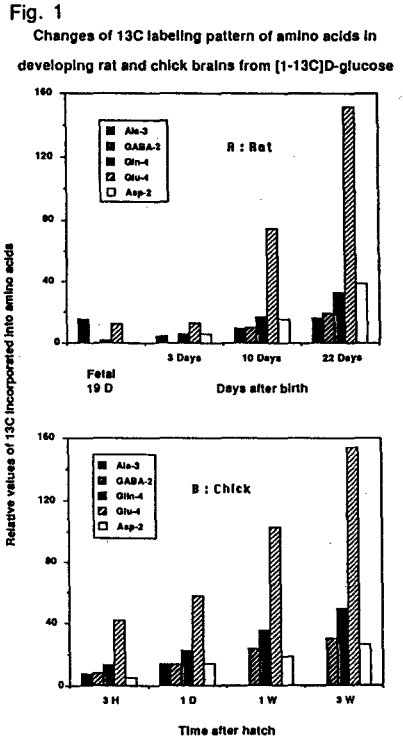
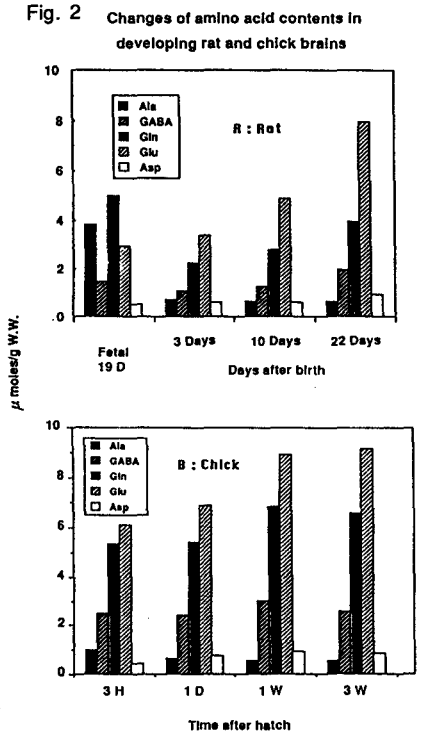


Fig. 2



しかし、胎生期ではアミノ酸含量と^{13}C組み込みとは相関せず、脳内アミノ酸代謝は成鼠脳のものと異なることをうかがわせた。次に、鶏の孵化後の脳内アミノ酸代謝の経時的変化(Fig. 1, B)を検討してみると、孵化後3時間後で既に、孵化後3週令のものと同一の^{13}Cの組み込みパターン(Fig. 1, B)及び脳内遊離アミノ酸含量(Fig. 2, B)を示しており、これは成鼠に見られるパターンとほぼ等しいものであった。このことは早成性の鳥では孵化後数時間で、既に脳機能の発現が見られることを考えさせる。これらの結果は、脳内での^{13}C-Glcからのアミノ酸への^{13}Cの組み込みパターンは脳機能と密接に関連していることを思わせるものである。次に、脳発育障害のモデルとして、MAMラット[2)]を用いて^{13}C-Glcからのアミノ酸への組み込みパターンを検討した。しかし、全脳での組織重量当たりの各アミノ酸への^{13}Cの組み込みパターンには変化が認められなかった。今後は脳部位別の検討を行なう予定である。

[文献] 1) 金松ら (1991) 神経化学 : 30, 74-75. 2) Matsutani, T. et al. (1980) J. Neurochem. : 34, 950-956

274 ヒトスフィンゴミエリナーゼ及びニーマンピック病の分子生物学的検討

井田博幸，衛藤義勝
（東京慈恵会医科大学 小児科）

〔要約〕
ニーマンピック病（NPD）で欠損しているヒト酸性スフィンゴミエリナーゼ（ASM）のcDNAをオリゴヌクレオタイドを用い，正常ヒト胎盤cDNA λgt11ライブラリーより分離した。この全長cDNA（hPSM55）は2376bpで，122bpの5′-UTR，1884bpのORF，370bpの3′-UTRをもっていた。このcDNAは尿から精製したヒトASMのトリプシン分解産物より演繹されるオリゴペプチドをすべて含んでいたが，pCDE，CHO細胞を用い発現させたところ酵素活性は認められなかった。そこで酵素活性を有するcDNAであるpASM-FL[1]の塩基配列と比較したところ，463T→C:155Cys→Argのミスセンス変異が認められた。さらにこの全長cDNAをプローブとしてNPD患者のノザーンブロットを行なったところ，神経症状を呈するタイプAの1例のみにおいてバンドが認められなかった。しかし，この患者のRT-PCR法を用いた実験では，正常者と同様なフラグメントが増幅可能であり，エクソンの塩基配列にも異常は認められなかった。以上より463T→Cの変異はASM活性に影響を及ぼすと考えられた。またこの日本人A型NPDではイントロン-エクソン接合部の異常が推察された。

1. 目 的

NPDはASMの欠損によって生じるリピドーシスの1つであり，発症年令，神経症状の有無によりA型とB型に大別される。すなわちA型は乳児期に発症し全例において神経症状を伴なうのに対し，B型は幼児～成人発症で，ほとんどの例で神経症状は伴なわない。この神経症状の有無という臨床的異質性を解決するには生化学的には困難で遺伝子工学的アプローチが必要と考えられる。そこで我々はヒトASM cDNAの単離ならびにNPD患者の遺伝子変異の同定を試みたので報告する。

2. 方 法

精製したヒト尿ASMをトリプシン分解して得られたペプチドから演繹されるオリゴヌクレオチドを用いてλgt 11ヒト胎盤ライブラリーをスクリーニングして得られた部分長cDNAを用いて，再度同じライブラリーを用い常法によりスクリーニングした。プローブのラベルはγ-ATPを用いるリン酸置換反応による5′末端標識法及びランダムプライマー法を用いた。最終的に59個のクローンを同定し，そのうち最長の約2.4kbのcDNAをM13ベクターにサブクローニングしSanger法にて塩基配列を決定した。さらにこの全長cDNAをpCDE，pRC/CMVベクターにサブクローニングし，リポフェクチン法を用いそれぞれCOS-7，CHO細胞にトランスフェクトし発現させた。酵素活性を〔メチル-^{14}C〕スフィンゴミエリンを用い測定した。さらにCHO細胞，NPD患者皮膚線維芽細胞からAGPC法によりRNAを抽出しノザーンブロッティングを行なうとともに，RT-PCR法を用い，患者cDNAの塩基配列を決定した。

3. 結 果

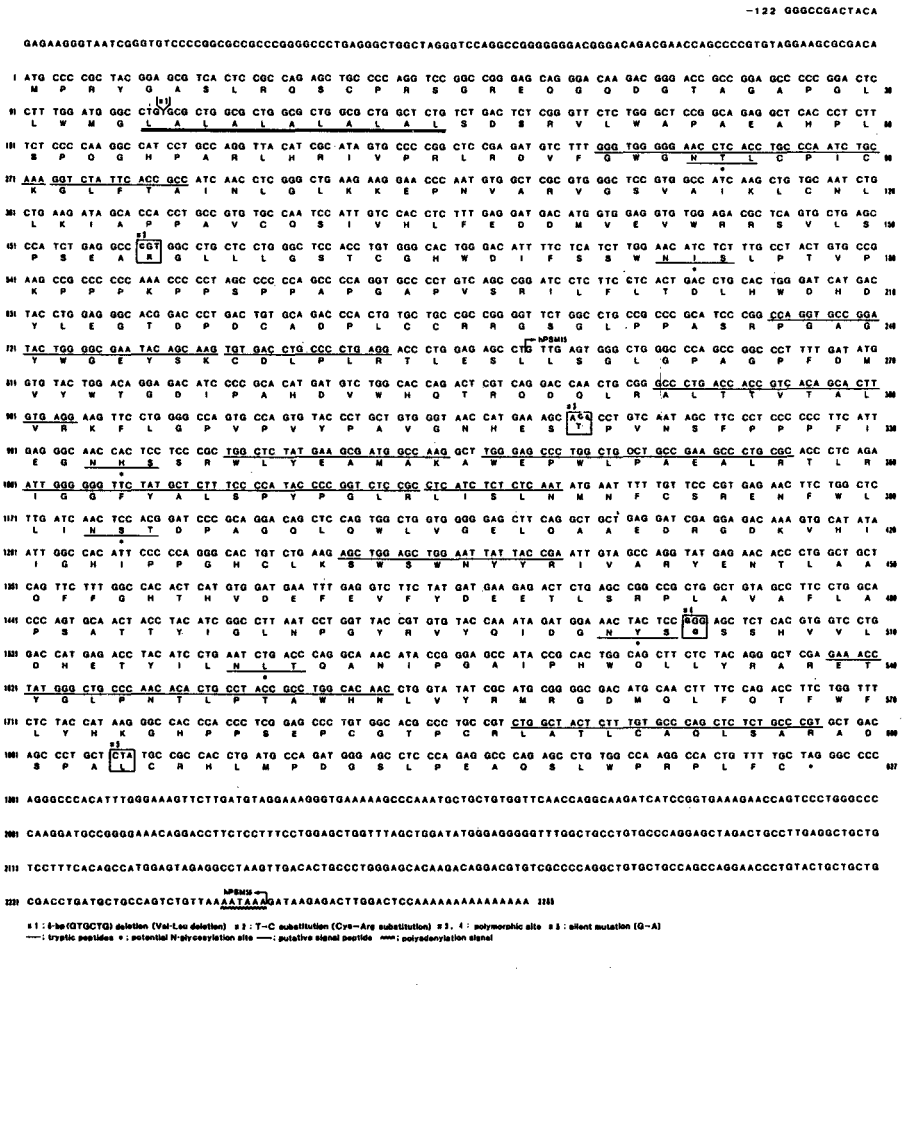
ヒト全長ASM cDNAは2376bpで，122bpの5′-UTR，1884bpのORF，370bpの3′-UTRから成り，ヒト尿ASMをトリプシン分解して得られたオリゴペプチド12個をすべて含んでいた（図1）。しかし発現実験においては酵素活性の有意の上昇は認められなかった。トランスフェクトしたCHO細胞においてhPSM55をプローブとしてノザーンブロットを行なったところ，CHO細胞，アンチセンスcDNAをトランスフェクトしたCHO細胞においてはバンドは認められなかったが，センスcDNAをトランスフェクトしたCHO細胞では2.5kbに相当する部分に明確なバンドを認めた。そこで最近同定された酵素活性をもつASM cDNA（pASM-FL）とその塩基構造を比較したところ，図1に示す#1～#5の相違が認められた。患者皮膚線維芽細胞を用いたhPSM55をプローブとするノザーンブロットによる解析では，正常人，カフカズ人A型，B型，及び日本人B型においては2.4kbに相当するバンドが認められたが，日本人A型の1例においては認められなかった。RT-PCR法により，全長cDNAを3分割し増幅したところ，この日本人A型患者では正常者と同様な大きさのフラグメントが認められ，cDNAの全塩基配列も正常者と同じであった。

4. 考　察

今回我々の分離したヒトASM cDNAにおいて，pASM-FLと＃1～＃5の相違点が認められたが，＃2を除けば，いずれもpolymorphic siteないしsilent mutationであり酵素活性発現には影響せず，＃2の463T→C：155Cys→Argのミスセンス変異がヒトASMの酵素発現に影響を及ぼしていると考えられた。ミスセンス変異の原因はクローニングアーチファクトの可能性が高いが，この変異はいまだ患者において同定されておらず，ASM酵素活性に影響を及ぼすcDNAの塩基配列部位の同定という意味で重要と考えられた。トランスフェクトしたCHO細胞にてmRNAが存在するので，この変異蛋白のcharacterizationが重要と思われるが，ヒトASMに対する抗体が現在ないことから，今後の課題と考えられた。また日本人NPDA型の1例において，ノザーンブロットにてバンドが認められないにもかかわらず，RT-PCR法にて正常と同様に増幅可能であり，さらにエクソン全域の塩基配列に異常を認めなかったことより，本患児における異常としては，エクソン-イントロン接合部の異常が推察された。　現在genomic DNAの塩基配列を検討中である。

今後，これら変異の結果を集積することにより，NPDにおける神経症状の発現機序が明らかになっていくものと思われる。

(1) Schuchman, E.H., Suchi M., Takahashi T., Sandhoff K and Desnick R.J.(1991) J.Biol.Chem. 266 ; 8531-8539



275 パーキンソン病患者脳内におけるN-メチルドーパミンの検出

梶田光春[1]，丹羽利充[2]， 武田直仁[3]，吉住秀夫[3]，立松 晃[3]，永津俊治[4]
（名古屋大学・小児科[1]、同・分院内科[2]
名城大学・薬学部[3]、藤田保健衛生大学[4]）

〔要約〕

今回我々は、N-メチルドーパミン（エピニン）がパーキンソン病患者および正常人脳内に存在することをGC/MSを用いて初めて発見した。またN-メチルドーパミンとフォルムアルデヒド，アセトアルデヒドをinvitroで反応させ，各々N-メチルノルサルソリノール、N-メチルサルソリノールが生成することを証明した。NMSALはサルソリノールのN-メチル化により生成されると考えられているが、別の生成経路として、N-メチルドーパミンとアセトアルデヒドとのPictet-Spengler縮合反応が考えられた。

〔目的〕

1983年、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)が、ヒトにパーキンソン病を起こすことが報告され[1]てから、内因性や外因性のMPTP類似物質の存在が考えられれた。その候補の一つとして、我々は1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline(TIQ)をパーキンソン病患者および正常人脳内に発見し[2]、TIQをサルに皮下投与するとパーキンソン病症状を来すことを確認した[3]。さらにTIQ関連化合物として1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-TIQ(N-メチルサルソリノール;NMNSAL)および2-methyl-6,7-dihydroxy-TIQ(N-メチルサルソリノール;NMSAL)をヒト脳内に初めて発見し[4]，NMSALは1-methyl-6,7-dihydroxy-TIQ(サルソリノール;SAL)が脳内でN-メチル化されてin vivoで生成されることを証明した[5]。NMSALの別の生成経路として、N-メチルドーパミン（エピニン）とアセトアルデヒドとの縮合反応が考えられる。そこで今回我々は、GC/MSを用いてN-メチルドーパミンがパーキンソン病患者および正常人脳内に存在するかどうか検討した。また、N-メチルドーパミンとフォルムアルデヒド、アセトアルデヒドをin vitroで反応させ、各々NMNSAL，NMSALが生成するかどうか検討した。

〔方法〕

①N-メチルドーパミンの検出：試料としてパーキンソン病患者 5例と神経病理学的に正常な 5例の剖検脳を用いた。前頭葉1gにEDTA(0.1%% w/v)を含む0.1M HCl 2.5mlを加え0 ℃で10分間ホモゲナイズした。ホモジネートを4℃で15分間12000gで遠心分離した。上清を移し、沈渣を再度ホモゲナイズ、遠心分離した。上清を集め凍結乾燥し残渣をエタノール0.5mlで溶解した液を，13.21gの硫酸アンモニウムを0.11M NaOH 100mlに溶解した溶液4mlでpH8.5に調節し、直ちにフェニルボロン酸カートリッジ(Analytichem International,100mg/ml)に添加した。蒸留水とメタノール各4mlで洗浄後、ジオール化合物を1M 酢酸／メタノールで抽出し、溶出液を窒素液流で乾固した。残渣にアセトニトリル10μlとPFPAまたはHFBA10μlを加え、70℃で30分間反応させ、PFPまたはHFB誘導体化した。GC/MSには島津ガスクロマトグラフ(GC-9A)-マススペクトロメーター(9020-DF)を用いて測定した。GCカラムはDB-17キャピラリーカラム(30mx0.32mmI.D.)を用いた。注入口温度は280℃、カラム温度は110℃-170℃の5℃/分の昇温、イオン源温度250℃，EIエネルギー70eV、 トラップ電流60μA、加速電圧3kVの条件で選択イオン検出(SIM)法を行った。化学イオン化(CI)は反応ガスにイソブタンを用い、CIエネルギー200eV、エミッション電流200μAで行った。
②NMSAL、NMNSALのIn vitroにおける合成:1M N-メチルドーパミンを含む0.1Mリン酸バッファー(pH7.4)に1Mフォルムアルデヒドまたは1Mアセトアルデヒドを加え最終容量2.5mlとし、37℃で24時間反応させた。反応液から上記と同様の方法で抽出した。残渣に1%TMCSを含むBSTFA20μlを加え70℃で30分間反応させTMS誘導体化した。NMSALとNMNSALの検出には、GCカラムにDB-17(30mx0.25mmI.D.)を用いた。カラム温度は170℃から3℃/分の昇温とし、他の条件はN-メチルドーパミンの場合と同様とした。

〔成績〕

図１にN-メチルドーパミンのPFP誘導体のEI(a)およびCI(b)マススペクトルを示す。脳抽出物中のN-メチルドーパミンを検出するためにSIMを行った。図２にN-メチルドーパミンのPFP誘導体(a)とパーキンソン病患者(b)および正常(c)脳抽出物のEIマススペクトルを示す。脳抽出物において、標品と同じ保持時間6.2分にピークを認め、m/z428,429([M-$NCH_2PFP^{\cdot}$])と442(M-$OPFP^{+}$)ピーク高比もほぼ一致した。またHFB誘導体を用いた検討においても同様にN-メチルドーパミンの存在が確認された。さらにCI-SIMではm/z306([M+H]$^{+}$)をモニターし、保持時間6.2分にピークが検出され、同定を確認した。N-メチルドーパミンはパーキン

ソン病患者および正常人各 5例の脳抽出物すべてに検出され、その量は約10ng/g wet tissueであった。

次にN-メチルドーパミンとフォルムアルデヒドの反応生成物のTMS誘導体のピークは保持時間9.8分にみられ、マススペクトルもNMNSALのTMS誘導体のものと一致した。同様にアセトアルデヒドとの反応生成物のTMS誘導体のピークは保持時間10.0分にみられ、マススペクトルもNMSALのTMS誘導体のものと一致した。

〔考察〕

N-メチルドーパミン（エピニン）はラットの神経節などに存在することが報告されている[6]が，ヒト組織中に存在するという報告はない．今回我々は、N-メチルドーパミンがパーキンソン病患者および正常人脳内に存在することをGC/MSを用いて初めて証明した。また、N-メチルドーパミンとフォルムアルデヒド、アセトアルデヒドをinvitroで反応させ，各々NMNSAL,NMSALが生成することを示した（図3）。N-メチルドーパミンはドーパミンのアゴニストで交感神経刺激作用があり[7]，その前駆薬剤であるIbopamineは鬱血性心不全などの治療に用いられている[8]．N-メチルドーパミンのヒト脳内における分布および生理的役割，パーキンソン病患者と正常者での定量的検討、invivoでのNMSAL合成などについて今後さらに検討してゆく必要がある．

図1

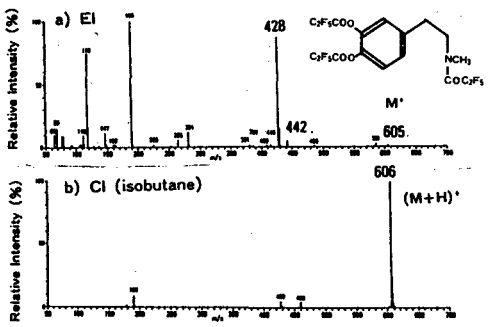


図1. EI (a) and CI (b) mass spectra of the PFP derivative of N-methyldopamine.

図2

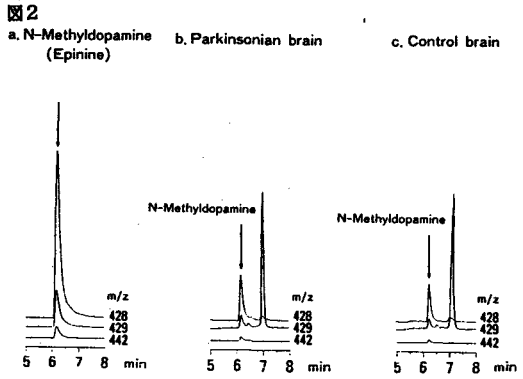


図2. EI-SIM chromatograms of the PFP derivative of N-methyldopamine (a), and the PFP-derivatized extracts from parkinsonian frontal lobe (b) and normal frontal lobe (c).

図3

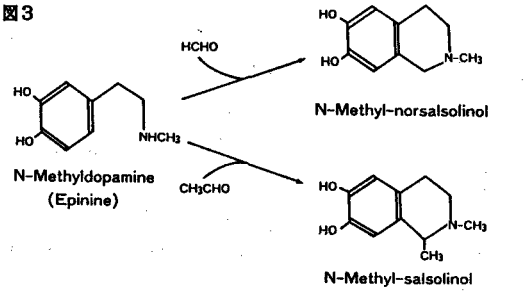


図3. Metabolic pathway of N-methyldopamine to NMNSAL and NMSAL.

〔文献〕

1. Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W. & Irwin, I. (1983) *Science* 219, 979-980.

2. Niwa, T., Takeda, N., Kaneda, N., Hashizume., & Nagatsu, T. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 1084-1089.

3. Yoshida. M., Niwa. T. & Nagatsu. T.(1990) *Neurosci. Lett.* 119, 109-113.

4. Kajita, M., Niwa, T., Wada, Y., Takeda, N., Yoshizumi, H., Tatematsu, A., Naoi, M. & Nagatsu, T. (1992) *Abstracts of 1st IUBMB Conference, Biochemistry of Diseases.* p.334.

5. Niwa. T., Maruyama. W., Nakamura. D., Wada. Y., Kajita., Takeda. N.,Yoshizumi. H., Tatematsu. A., Naoi. M. & Nagatsu. T. (1992) *Abstracts of 1st IUBMB Conference, Biochemistry of Diseases.* p.334.

6. Foppen, F.H., Liuzzi, A. & Kopin, I.(1977) *Experientalia.* 33, 596-598.

7. Ventresca, G.P. & Lodola, E.(1988) *Arzneim,-Forssch./Drug Res.* 38(II), 1175-1180.

8. Holmbrusch, C. & Just, H. (1990) *Cardiology.* 77(supple 5), 1-8.

276 鉛ニューロパチーの脊髄におけるエネルギー代謝特性

加藤 尚彦，赤林 朗，横山 和仁*，荒記俊一*
（横浜市立大医第一生化，東大医公衆衛生）

〔要約〕
酢酸鉛水の長期（15 週）経口投与による慢性の鉛ニューロパチーのラット脊髄前角（主な構成要素は脊髄運動ニューロンである）は，鉛による細胞膜や各種の酵素障害作用の結果，その glucose 取り込み活性やエネルギー利用速度が低下し，活動度は18 % 阻害された．脊髄白質（その主な構成要素であるグリア細胞）は鉛の影響を受け難く，活動の阻害は明かではなかった．また運動ニューロンの軸索骨格蛋白の生成またそれを輸送する遅い軸索流も，鉛によりそれぞれ 48 及び 40 % 低下し，軸索の変性に伴うエネルギー生成の低下を示唆していた．

慢性の鉛中毒は大脳の変性萎縮・出血による種々の中枢神経障害を起こす事が知られている．末梢神経の炎症や変性による筋麻痺や知覚障害も見られ，実験的な神経変性疾患の一つのモデルとして適当と思われる．そこで鉛中毒時の脊髄変性状態を取り上げ，神経細胞の活動度を表す指標であるglucose（glc）の利用速度（glc利用率：GUR,Glucose Utilization Rate）の超微量測定法(1)と GUR についての新理論(2)を用いて，変性脊髄の前角や白質のエネルギー代謝特性を解析を試みた．同時にエネルギー代謝により駆動される運動神経の遅い軸索流の変化を検討した(8)．

実験方法 ラット（オス，6 週齢，Sprague-Dawley および Wistar 系）に 2 または 2.5 重量 % の酢酸鉛を含む水を15 週間飲用させた．SDラットに glc のanalogueである2-deoxyglucose (DG)を静注し，2 および 4 分後に動物を液体窒素中に投入して瞬間凍結し，その凍結乾燥腰髄切片（厚さ 10-20 μm)を調製して，顕微鏡下で脊髄前角と近傍の白質（0.7-2.3 μg乾燥重量）を切り出し試料とした(4)．既報の超微量測定法を用いて DG と DG 6-phosphate (DG6P)，glc，glc 6-phosphate(G6P) を測定し，これらの濃度を乾燥重量当りで表した．並行して凍結心臓血塊（左心室）の DG，glc濃度を測定し，試料の DGと glcの取り込み活性を表す DV (Distribution Volume [ml/g]：試料内濃度[mol/g]／動脈血漿内濃度[mol/ml] 比）を求めた．別に13週目にWistarラットの腰髄を露出し200 μCiの^{35}S-methionine を注入して，15 週目に前根-座骨神経根を取り出し，6 mm毎に切断して400 μlの 2.3%SDS，5% 2-mercaptoethanol溶液中でhomogenize し抽出した蛋白質を解析した(8)．

結果及び考察 [体重および血液濃度] SD ラットの体重は鉛水飲用により 25 %減少し，鉛の血中濃度は in vivo でもin vitro でも脳の種々の酵素活性に影響を与えるのに十分の濃度であった（表１；3,6）．血管内皮細胞もこの濃度で培養すると，4 日で 15-47 % 減少する事が知られており(5)，血管の障害を介して神経組織の変性が起きる事も考えられる．

[glc 代謝の定常性] DG 静注後4分迄は，対照および鉛中毒ラットの血漿のglc とDG濃度は不変で，脊髄前角および近傍の白質でも，glc と DG 濃度は一定であり，一方DG6P は時間に比例して増加した（data 示さず）．即ち glc代謝は準定常状態にあり，新理論に基づき (2) GUR と DG 及びglc の DV を計算出来た（図１）．

[DG 及び glc の取り込みと GUR] glc 濃度は対照・中毒ともに前角＞白質となり，G6P も同様であった．前角・白質ともにglc 濃度は対照＞中毒であるのに対し，DG6P は対照＜中毒となった（data 示さず）．glcと DG の取り込み活性を表す DV （それぞれ

	Control	Lead Intoxication
	Mean ± SD	
Body Weight [g]	270 ± 9 (10)	202 ± 8** (9)
Lead Conc. [μ g/dl]	5.27± 2.2	205 ± 43**
[μ M]	0.254± 0.106	9.90± 2.06**
	(10)	(10)

表１．ラットに対する鉛中毒の影響
（ ）内には測定したラットの数を，
＊＊は １ % で有意である事を意味する．

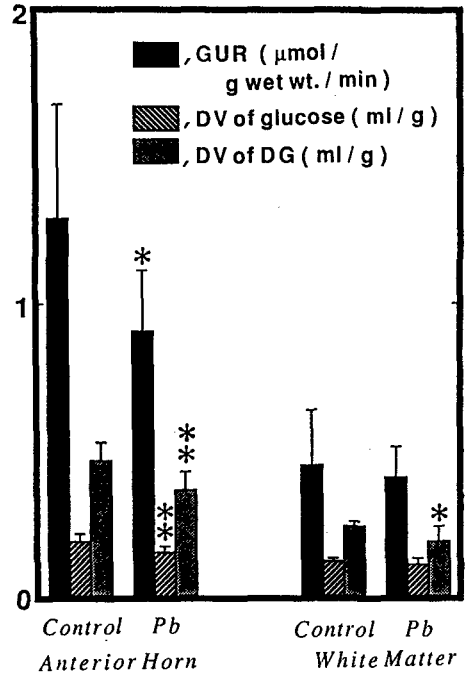


図１．鉛中毒によるエネルギー代謝の変化
バーは対照マウス 10，中毒マウス 9 匹に対する SD を，
＊は 5 %，＊＊は 1 % で有意である事を意味する．

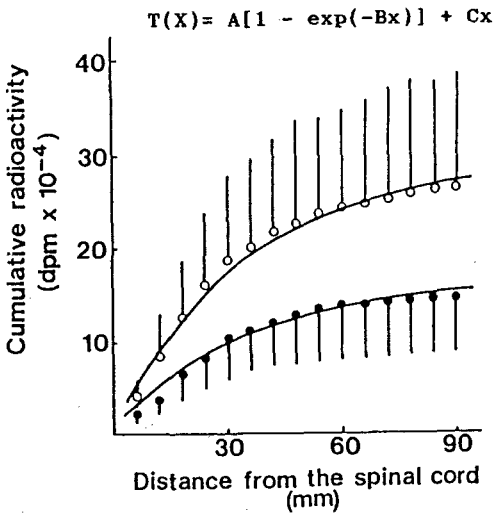


図２．座骨神経軸索流に対する鉛中毒の影響
図上の関数については本文参照．○は対照を，
●は鉛中毒マウスを示し，バーは 8 測定の
SD を表す．

DV(glc) と DV(DG)と記す）は，前角では対照＞中毒となり，白質では DV(DG) のみが対照＞中毒となった．神経活動度を表す GURは前角で対照＞中毒となったが，白質での差は有意ではなかった（図１）．”前角の活動度はニューロンの細胞体よりもニューロピルのそれを表す”と言う最近の結果(2)を考慮すると，鉛中毒脊髄の運動ニューロンの樹状突起は G6P をより高い濃度に保つよう対活発に生成するが，エネルギー代謝酵素活性の低下からエネルギーの生成速度は障害されており，変性過程の影響で活動度が 約18 % 低下しているが明かとなった．また白質は鉛の影響を受けにくく，その主な構成細胞であるグリア細胞は鉛に抵抗性を持っていた．

［軸索流への影響］鉛水を飲用したWistar ラットでは，遅い軸索流の主成分である神経細糸のtriplet や tubulin は，対照が第 3～4 切片に放射能のピークを示したが，中毒の場合は第 2 切片にピークが見られた．各切片内の放射能を加えた値（各切片の放射能の積分カーブ T(x)；x は細胞体から切片までの距離）は，式$T(x)=A(1-\exp(-Bx))+Cx$で表される．鉛中毒により A（運動ニューロン細胞体の軸索流蛋白質の生成能，29.2→15.3 $dpm\times10^{-4}$）；B（流速の逆数の指標，2.78→4.32 $min^{-1}\times10^{2}$）；C （軸索蛋白に非特異的に取り込まれる放射能，13.1→19.4 dpm/min）となり，A と B の変化は有意（$P<0.05$）であった（図２；8）．x が十分大きい時 $x\to\infty$ とすると，$T(x_{1/2})=[T(x\to\infty)-C(x\to\infty)]/2$ となる$x_{1/2}$の値は，軸索流により 13-15 週の 2 週間に全軸索中の半量の放射能が運ばれた距離を表す．$x_{1/2}$を14日で割った値を平均速度 Vmeanとすると，Vmeanは 2.1→1.3 mm/dayと 38 % 減少した．鉛中毒の脊髄では前述の活動度（図１）の低下を反映して，エネルギーを消費して細胞体で骨格蛋白質を生成し，さらに神経末端に輸送する軸索流も，障害を受ける事が明かとなった(7,8)．

文　献

1) Akabayashi,A.,Saito,T. and Kato,T.(1989) Biomed. Res. **10**,173-177 2) Akabayashi,A. and Kato,T.(1992) J. Neurochem. in press; 3) Hacker,H.J., Bannasch,P. and Columbano,A. (1990) Carcinogenesis, 11, 2199-2204 4) Lowry OH and Passonneau,J.V. (1972) A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press,New York, pp. 8-16 and pp.221-260 5) Maxwell,K., Vinters,H.V., Berliner,J.A., Bready,J.V. and Cancilla,P.A. (1986) Toxicol.Appl. Phamacol. **84**, 389-399 6) Schellengberger,M.K. (1984) NeuroToxicology 5, 177-212 7) Yokoyama, K. and Araki,S.(1986) Indust.Health, **4**, 225-231 8) Yokoyama,K. and Araki,S. (1992) Env. Res. in press

277 慢性分裂病死後脳におけるストリキニン非感受性グリシン結合部位に関する研究（第二報）

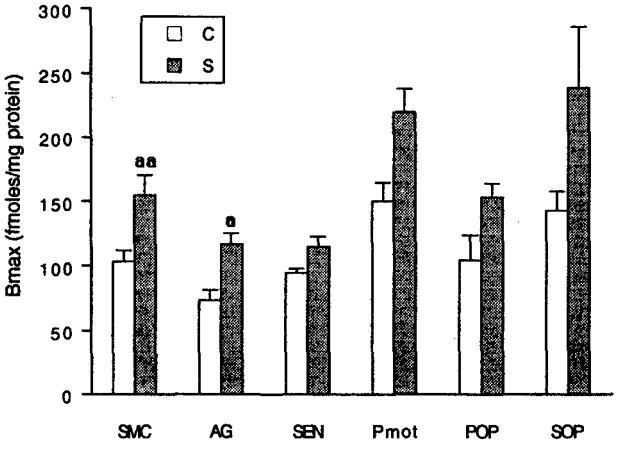
石丸昌彦[1]、車地暁生[2]、融道男[2]
1 東京医科歯科大学難治疾患研究所プロジェクト研究室
2 東京医科歯科大学医学部神経精神医学教室

〔要約〕

先に我々は、慢性分裂病死後脳におけるストリキニン非感受性グリシン結合部位を50nM[^{3}H]glycine を用いて測定し(1)、大脳皮質の6部位で分裂病群が対照群に比較して統計学的に有意に増加していることを見いだした(2)。今回この6部位の脳組織膜標品を用いてScatchard解析を施行したところ、supramarginal cortex（分裂病群、同服薬群 vs 対照群）、angular gyrus（分裂病群、同服薬群、同非服薬群 vs 対照群）、somesthetic cortex（分裂病非服薬群 vs 対照群）、premotor area（分裂病服薬群 vs 対照群）の計4部位で、分裂病群の最大結合数（Bmax）が対照群に比較して有意に増加していたが、結合親和性（Kd）はいずれの部位でも変化がなかった。以上の結果から、慢性分裂病脳内においてストリキニン非感受性グリシン結合部位が増加していること、この変化は分裂病の病態に深く関与しているが、抗精神病薬服用の影響も認められることが示唆された。

［目的］ NMDA受容体の非競合的アンタゴニストであるphencyclidine（PCP）が分裂病に酷似した精神症状を惹起することなどから、分裂病の病態と興奮性アミノ酸神経伝達との関係が注目されている(3)。一方、NMDA受容体にカップルしたストリキニン非感受性グリシン結合部位の活性化は、同受容体を介する生理作用に必須であることが判明しており(4)、このグリシン結合部位の異常が精神分裂病の病態に関与している可能性がある。我々は慢性分裂病死後脳におけるストリキニン非感受性[^{3}H]グリシン結合部位を検索し(1)、50nM [^{3}H]グリシン特異結合が大脳皮質の6部位（supramarginal cortex, angular gyrus, somesthetic cortex, premotor area, visual cortex 1, visual corex 2 & 3）で分裂病群が対照群に比較して統計学的に有意の増加を示したことを報告した(2)。その後我々は、この変化が最大結合数（Bmax）と結合親和性（Kd）のいずれの変化によるものかを検討するため、上記6部位の脳標品を用いてScatchard 解析を行ったので、その結果を報告する。

［方法］ 分裂病群9-11例、対照群7-10例で、死亡時年齢及び死後凍結時間について両群間に差はなかった(6)。4倍容の0.32M sucrose 溶液中に−80°C で凍結保存されていた脳homogenateを室温で融解し、約50倍容のTris/acetate buffer（pH 7.4、4°C）中で Ultra-Turrax T25を用いてhomogenize した後、遠心分離を行った（18,000 rpm、30min.）。同様の遠心分離操作をさらに2回繰り返した後、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、以下の結合実験に供した。すなわち膜標品を10mM strychnine を含む50mM Tris/acetate buffer（pH 7.4、2°C）中で、10−1,000nM [^{3}H]glycine (NEN, 43.0-45.0 Ci/mmol)と2°C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法により停止させた。非特異結合は 1mM glycine 存在下の結合実験によって求めた(4)。統計学的解析は、診断、死亡時年齢、死後凍結時間の三者を回帰変数とする重回帰分析法を用いて行った。



SMC (supra-marginal cortex)
AG (angular gyrus)
SEN (somesthetic cortex)
Pmot (premotor area)
POP (visual area 1)
SOP (visual area 2,3)

Fig. 1 *Maximum number of binding sites (Bmax) in strychnine-insensitive [3H]glycine binding.*
aa ($p<0.005$), a ($p<0.02$) ; control vs. schizophrenia

［結果］ 50nM[^{3}H]glycine をリガンドとする結合実験において、分裂病群が有意の増加を示した上記6部位 (2) における、Scatchard解析の結果を図に示す。ストリキニン非感受性グリシン結合部位の最大結合数（Bmax）は、6部位中2部位（supra-marginal cortex, angular gyrus）で分裂病群が対照群に比較して統計学的に有意な増加を示した。また、分裂病群を非服薬群、服薬群に分けると、6部位中2部位（angular gyrus, somesthetic cortex）で非服薬群が、3部位（supra-marginal cortex, angular gyrus, premotor area）で服薬群が、各々対照群に比較して有意な増加を示した（Fig.1）。これに対して結合親和性（Kd）は、6部位のいずれにおいても分裂病群と対照群との間に有意な差を認めなかった。

［考察］ 上述のScatchard 解析の結果から、慢性分裂病死後脳におけるストリキニン非感受性グリシン結合部位の増加は、最大結合数（Bmax）の増加によるものであることが示唆される。このうち2部位（angular gyrus, somesthetic cortex）では、分裂病の非服薬群が対照群に比較して統計学的に有意なBmaxの増加を示しており、この変化が慢性分裂病本来の病態に関わるものであることが推測される。一方3部位（somesthetic cortex, angular gyrus, premotor area）では分裂病服薬群が対照群に比較して有意なBmaxの増加を示しており、抗精神病薬の服用も上述の変化に影響している可能性がある。

以上の結果は、分裂病の病態に興奮性アミノ酸神経伝達の異常が関与している可能性を強く示唆するものである。

［文献］

(1) 石丸昌彦、車地暁生、融道男 神経化学(30) 1991: 490-491
(2) 石丸昌彦、車地暁生、融道男 脳と精神の医学(3) 1992: (印刷中)
(3) Javitt, D.C., Zukin S.R. American Journal of Psychiatry (148) 1991: 1301-1308
(4) Kleckner N.W., Dingledine R. Science (241) 1988: 835-837
(5) Ogita, K. Suzuki, T. and Yoneda, Y. Neuropharmacology (28) 1989: 1263-1270
(6) Toru, M. et al. Acta Psychiatrica Scandinavia (78) 1988: 121-137

278 ストレス適応と脳内セロトニン動態の関連

武田弘志1)、増田幹生1)、松宮輝彦1,2)、渋谷 健1)
1) 東京医科大学薬理学教室
2) 東海大学医学部薬理学教室

〔要約〕
ストレス適応の形成機構における脳内モノアミン作動性神経系の役割を考究する一環として、単回あるいは反復拘束ストレス負荷時の脳内ノルエピネフリン、ドーパミンおよびセロトニン作動性神経系の動態変化の相違、さらには反復拘束ストレス負荷に対する行動的適応形成時と非形成時のこれら神経系の動態特性について検討した。2あるいは4時間の単回拘束ストレス負荷により成長率、摂食量、摂水量および自発運動量の減少などの行動的ストレス反応が著明に出現した。さらに、このストレス反応の出現は、2時間拘束ストレスを1日1回、7日間反復負荷することにより消失したが、4時間拘束ストレスの反復負荷では維持されていた。2および4 時間の単回拘束ストレス負荷により、大脳皮質前頭部、海馬、中脳－視床、視床下部、線条体、延髄－橋あるいは小脳の各脳部位において、MHPG/NE値の著明な増加が誘発されたが、DOPAC/DA値は 何ら変化を示さなかった。また、大脳皮質前頭部、海馬、中脳－視床および延髄－橋における5-HIAA/5-HT値の有意な増加が認められた。2あるいは 4時間の拘束ストレスを1日1回、7日間反復負荷することにより、単回負荷により誘発される脳内MHPG/NE値の増加が消失することが観察された。一方、5-HIAA/5-HT値の増加は、2時間拘束ストレスの反復負荷によっても維持されていたが、4時間拘束ストレスの反復負荷後では、視床下部を除く各脳部位で消失することが認められた。
以上の所見から、反復拘束ストレスに対する行動的適応の形成要因の１つに、5-HT代謝回転の増加に起因する脳内5-HT作動性神経系の持続的活性亢進が考えられる。

〔目的〕
同一のストレスを反復負荷することにより、ストレス反応が次第に減弱していくことがある。この様な反応性の低下は、ストレスへの慣れ、または適応と呼ばれる現象で、重要な生体防御の１つと考えられる。しかしながら、ストレス適応の形成機構に関する神経化学および神経薬理学的報告(1-4) が少ないことに加えて、相反する報告も見られることなどから、未だ定説はなく、その詳細についてはなお研究すべき点が多いのが現状である。我々は、先に反復拘束ストレス負荷過程における行動的ストレス反応の推移と特徴を吟味し、拘束ストレスに対する適応獲得モデルラットの作製条件を示すとともに、このモデルの脳においてセロトニン作動性神経系の活性亢進が生じていることを報告した(4)。本研究では、ストレス適応の形成機構における脳内モノアミン作動性神経系の役割をさらに、詳細に考究する目的で、単回あるいは反復拘束ストレス負荷により誘発される脳内ノルエピネフリン、ドーパミン、およびセロトニン作動性神経系の動態変化の相違、さらには反復拘束ストレス負荷に対する行動的適応形成時と非形成時のこれら神経系の動態特性について神経化学的に検討した。

〔実験方法〕
1．拘束ストレス負荷
実験には、個別ケージによる２週間の予備飼育期間中に得た、成長率、摂食量、摂水量、および一般行動観察などの諸データから健常と判定した、体重 275~285gのSprague-Dawly系雄性ラットを用いた。単回ストレスの負荷は、室温(23±1℃)で、2あるいは４時間の間、金網ケージ(4.5cm×4.5cm×16.0cm)内に強制拘束することにより施した。また、ストレスの反復負荷は、単回負荷と同様の条件で、1日1回、７日間の間連日繰り返し行った。なお、ストレスに対する適応の形成は、拘束ストレスの負荷により誘発される成長率、摂食量、摂水量および自発運動量の減少などの行動的ストレス反応の消失をもって判定した。

2．脳内catecholamine, indoleamineおよびその関連代謝物の測定
単回あるいは反復拘束ストレスを負荷した後、ラットを断頭により屠殺し、脳を摘出した。さらに、脳は、ドライアイス上にて、大脳皮質前頭部、線条体、海馬、視床下部、中脳－視床、延髄－橋、および小脳の７部位に分割し、組織サンプルとした。各部位組織は、液体窒素内で凍結した後、0.1M perchloric acid, 0.1M ethylenediaminetetraacetic acid, 1M sodium hydrogen sulfate、および内部標準物質(deoxyepinephrine, 5-hydroxy-Nω-methyltryptamine)を含む混合液中にてホモジネートした。その後、遠心分離(20,000×g,15min)を行い、上清液10μlを酸化還元スクリーン検出モードを導入した多重クーロメトリー高速液体クロマトグラフィーシステム(5)に直接注入し、catecholamine[norepinephrine(NE), epinephrine, dopamine(DA)]、indoleamine [serotonin(5-hydroxytryptamine:5-HT)]および関連代謝物[4-hydroxy-3-methoxy-phenylglycol(MHPG), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC), homovanillic acid, 3-methoxytyramine, 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA)]量を同時測定した。また、測定した各物質量からMHPG/NE、DOPAC/DAおよび5-HIAA/5-HTの値を算出し、NE, DAおよび 5-HT代謝回転を解析評価した。

[実験結果]

1．行動的ストレス反応

2時間の単回拘束ストレス負荷により、成長率、摂食量、摂水量および自発運動量の減少などの行動的ストレス反応が著明に出現した。また、2回目の2時間拘束ストレス負荷後、摂水量の回復が認められたが、他のストレス反応の出現は維持されていた。さらに、ストレス反応の出現は2時間拘束ストレスの反復負荷により徐々に減弱し、成長率、摂食量、自発運動量は、それぞれ、4,6および5回目以後でコントロールレベルまで回復し、行動的ストレス反応の出現が消失した。一方、4時間の単回拘束ストレス負荷により、2時間の単回拘束ストレス負荷と同様に、成長率、摂食量、摂水量および自発運動量の有意な減少が生じたが、これらの行動的ストレス反応の出現は、7回の反復負荷によっても消失せず、維持されていた。

2．脳内モノアミン代謝回転

(i) NE代謝回転

2時間の単回拘束ストレス負荷により、大脳皮質前頭部、海馬、中脳－視床、視床下部、延髄－橋および小脳の6部位においてMHPG/NE値の有意な増加が認められた。さらに、4時間の単回拘束ストレス負荷においては、線条体も含めた7部位でMHPG/NE値の著明な増加が生じた。一方、2時間拘束ストレスの7回反復負荷後、いずれの脳部位においてもMHPG/NE値の変化は認められなかった。また、4時間拘束ストレスの反復負荷では、大脳皮質前頭部および線条体でMHPG/NE値の減少が観察されたが、他の脳部位においては何ら変化が生じなかった。

(ii) DA代謝回転

2あるいは4時間の単回拘束ストレス負荷は、検討したいずれの脳部位のDOPAC/DA値にも影響を示さなかった。さらに、2時間拘束ストレスの反復負荷では、中脳－視床および視床下部においてDOPAC/DA値の減少が観察されたものの、他の脳部位においては変化が認められなかった。また、4時間拘束ストレスの反復負荷の後にも各脳部位のDOPAC/DA値に変化が生じることはなかった。

(iii) 5-HT代謝回転

2あるいは4時間の単回拘束ストレス負荷により、共通して大脳皮質前頭部、海馬、中脳－視床および延髄－橋の4部位で、5-HIAA/5-HT値の有意な増加が認められた。また、2時間拘束ストレスの反復負荷後、海馬を除く6部位で有意な5-HIAA/5-HT値の増加が生じた。一方、4時間拘束ストレスの反復負荷では、視床下部のみで5-HIAA/5HT値の有意な増加が観察されたものの他の脳部位では特記すべき変化は認められなかった(Table 1)。

TABLE 1 CHANGES IN SEROTONIN TURNOVER (5-HIAA/5-HT) IN RAT BRAIN REGIONS BY SINGLE OR REPEATED RESTRAINT STRESS

	CONTROL	SINGLE RESTRAINT STRESS		REPEATED RESTRAINT STRESS(7DAYS)		
		2HR	4HR	CONTROL	2HR/DAY	4HR/DAY
FRONTAL CORTEX	0.42±0.09	0.64±0.17*	0.60±0.11*	0.33±0.07	0.60±0.12***	0.36±0.06
HIPPOCAMPUS	0.73±0.13	1.18±0.38*	1.07±0.21*	0.95±0.26	1.03±0.35	1.18±0.40
MIDBRAIN-THALAMUS	0.64±0.11	0.95±0.17*	0.84±0.10*	0.56±0.08	0.90±0.28**	0.66±0.09
STRIATUM	0.88±0.12	0.98±0.10	0.99±0.07	0.67±0.12	0.91±0.10***	0.77±0.24
HYPOTHALAMUS	0.78±0.14	0.89±0.20	0.89±0.15	0.59±0.09	1.11±0.39**	0.88±0.17**
MEDULLA-PONS	0.57±0.06	0.85±0.13*	0.80±0.10**	0.43±0.08	0.89±0.29***	0.46±0.04
CEREBELLUM	0.64±0.11	0.71±0.07	0.78±0.07	0.43±0.08	0.66±0.13**	0.51±0.14

EACH VALUE REPRESENTS THE MEAN±S.D. OF 5-8 ANIMALS.
* : p<0.05, ** : p<0.01 AND *** : p<0.001

[考察]

本研究で得た所見から、拘束ストレスの単回負荷は、脳内NEおよび5-HT代謝回転の増加を誘発すること、また、このNE代謝回転の増加は、拘束ストレスの反復負荷により消失することが明らかとなった。さらに5-HT代謝回転の増加は反復拘束ストレスに対して行動的適応が形成される場合維持されるが、非形成の場合は消失することが明らかとなった。このことから、反復拘束ストレスに対する行動的適応の形成には5-HT代謝回転の増加に起因する脳内5-HT作動性神経系の持続的活性亢進が関与することが示唆された。

[文献]

1) Cohen, R.M., Cohen, M.R. and McLellan, C.A. (1986) Pharmacol. Biochem. Behav. 24, 1587-1592
2) Kennett, G.A., Diclonson, S.L. and Curzpm, G. (1985) Brain Res. 330, 253-263
3) Stone, E.A., Slucky, A.V. and Platt, J.E. (1985) J. Pharmacol. Exp. Ther. 233, 382-388
4) 武田弘志、松宮輝彦、増田幹生、渡辺美由紀、渋谷健(1992)ストレスと人間科学　印刷中
5) Takeda, H., Matsumiya, T. and Shibuya, T. (1990) J. Chromatogr. 515, 265-278

279 Methamphetamine逆耐性ラット側坐核からのdopamine遊離に及ぼすdynorphinの影響

横尾秀康、山田茂人*、吉田真美、田中隆彦、溝口克弘、江本浩幸、古賀千尋、石井秀夫、田中正敏　（久留米大、医、薬理、脳研*）

〔要約〕

ラット側坐核スライスからのdopamineの基礎遊離及び刺激誘発性放出を指標にmethamphetamine (MAP, 6 mg/kg/day, i.p.) 投与 (9日間) 後のdynorphinによる前シナプス性DA放出調節について検討した。Dynorphin (1 - 100 nM) は、無処置群で濃度依存的に側坐核からのDAの基礎遊離及び、刺激誘発性放出を抑制した。MAP投与群においてもDyn (1 - 100 nM) は、濃度依存的に側坐核からのDAの基礎遊離及び、刺激誘発性放出を抑制した。しかし、刺激誘発性DA放出に対するDyn (10, 100 nM) の抑制効果は生食投与群に比べ、MAP投与群において有意な減少を認めた。これらの所見は、dynorphinは側坐核DA放出に対し抑制性の調節をおこなっておりMAP処置はこの抑制機構を減弱する事がしめされた。　MAP投与による逆耐性現象は、dynorphin感受性受容体による側坐核DA放出の抑制機構の減弱した状況が存在することが示唆された。

Methamphetamine (MAP) の連続投与は逆耐性現象を生じてくるが、中枢dopamine (DA) 神経機能の亢進がこの現象に関与していることが知られている。しかし、この現象ににおけるDA神経機能の変化に影響を及ぼす他の神経系の関与に関してはほとんど知られていない。さて、中枢opioid神経系がcatecholamine神経機能に影響を及ぼしていることがしられている (4)。実際、opioid receptor subtypeのcatecholamine放出調節は異なった機構で行なわれており、中枢dynorphin神経系はDA神経系に対して抑制性の調節を行なっている (3,5)。また、mehamphetamine及びapomorphineは、中枢dynorphin神経機能を亢進させるとする報告がなされている。このようにmethamphetamineがdynorphin神経機能に変化を及ぼすとするならば、そのDA神経機能調節に変化を及ぼすものと考え、MAP連続投与後のラット側坐核スライスからのDA放出に及ぼすdynorphinの影響を調べた。

対象と方法

Wistar系雄性ラット（180-250 g）にmethamphetamine (MAP, 6 mg/kg/day)を9日間腹腔内投与し9日間の休薬の後、以下の実験に用いた。対照には、生食 (1 ml/kg/day) の投与を行なった。氷冷Krebs液中で摘出脳から厚さ0.25 mmの側坐核切片を作成し潅流槽に入れ、95 % O_2, 5 % CO_2 で飽和したnomifensine (1 μ M) を含むKrebs液で持続潅流した。潅流開始60分後から7分間、潅流槽から流出する液 (基礎遊離量、SP1) を採取した後、電気刺激 (1 Hz, 2 ms, 20 mA) を2分間おこない、これを含む7分間の流出液 (刺激誘発性放出量、S1) の採取を行なった。その20分後から実験終了までdynorphin A (1 - 13) (Dyn) を含むKrebs液を潅流した。Dyn潅流30分後から7分間流出液 (SP2)の採取をおこない、続いて、S1と同様に2分間の電気刺激をおこない7分間の流出液 (S2) の採取をおこなった。採取したKrebs液からDAを抽出し、HPLC-ECDによってその測定をおこなった。DAの基礎遊離及び、刺激誘発性放出に対する薬物の影響は、1回目と2回目の比 (SP2/SP1, S2/S1) で比較検討した。統計学的検定は、一要因分散分析の後、Scheffe's testをおこなった。また、MAP投与による側坐核からのDA基礎遊離及び、刺激誘発性放出に対する影響は、一要因分散分析の後、Student's t-testを用い検定した。

結果

表1に示すように、MAP投与群では生食投与群に比べ側坐核からのDAの基礎遊離量 (SP1) において有意な増加を認めた。しかし、DAの刺激誘発性放出量 (S1) では両群間に差は認めなかった。またSP2/SP1及び、S2/S1比では、両群間に有意な差は認めなかった。Dyn (1 - 100 nM) は、無処置群で濃度依存的に側坐核からのDAの基礎遊離及び、刺激誘発性放出を抑制した (表1)。同様に、生食投与及び、MAP投与両群においてもDyn (1 - 100 nM) は、濃度依存的に側坐核からのDAの基礎遊離 (図1) 及び、刺激誘発性放出 (図1) を抑制した。しかし、刺激誘発性DA放出に対するDyn (10, 100 nM) の抑制効果は生食投与群に比べ、MAP投与群において有意な減少を認めた (図1)。

考察

側坐核からのDAの基礎遊離は、生食投与群に比べMAP投与群で有意な増加を認めた。その所見は、線条体からのDAの基礎遊離は、生食投与群に比べMAP投与群で有意な増加を認めた我々の報告 (7) と一致した結果であり、MAPによる逆耐性形成ラット側坐核からのDA基礎遊離の増加した状態が生じていることが示唆される。Dyn (1 - 100 nM) は、側坐核からのDAの基礎遊離及び、刺激誘発性放出を濃度依存的に抑制した。Dyn は、中枢 opioid 受容体の中で κ 受容体の agonist (1) として作用するとされている。また、側坐核には、Dyn 含有神経が局在 (2) し、高い値の κ 受容体結合能 (6) が認められる。opioid peptides の中枢 catecholamine 放出調節に関する報告 (4) では、κ 受容体の agonist は、その基礎遊離及び、刺激誘発性放出に対して抑制的に作用するといわれている。今回の結果は、これまでの報告と一致するものであった。Dyn は、MAP逆耐性形成ラット側坐核からのDA基礎遊離及び、刺激誘発性放出を濃度依存的に抑制した。しかし、刺激誘発性 DA 放出に対する Dyn (10, 100 nM) の抑制効果は生食投与群に比べ、MAP 投与群において有意な減少を認めた。MAP 連続投与でラット黒質及び線条体で Dyn の immunoreactivity が増加する(5)こと、また Dyn の immunoreactivityがapomorphine 投与で減少し、その連続投与によって増加を示す (3) とする報告がなされている。これらの所見は、DA agonists が、Dyn の放出を促進させることを示唆していることが推察される。このような機構が作用して MAP 連続投与後に Dyn の DA 放出抑制効果の減少が生じたものと考える。

文献 1) Chavkin C. (1982) Sci. 215, 413-415. 2) Graybiel A.M. et al. (1981) Neurosci. 6, 377-397. 3) Hanson G.R. et al. (1987) Eur. J. Pharmacol. 144, 245-246. 4) Illis P. and Jackish R. (1991)Neurobiology of opioids (O.F.X. Almeida and T.S. Shippenberg, eds.) 213-225. 5) Li S.J. et al. (1988) J. Pharmacol. Exp. Ther. 246, 403-408. 6) Mansour A. et al. (1991) Neurobiology of opioids (O.F.X. Almeida and T.S. Shippenberg, eds.) 169-183. 7) Yamada S. et al. (1991) Eur. J. Pharmacol. 205, 43-47.

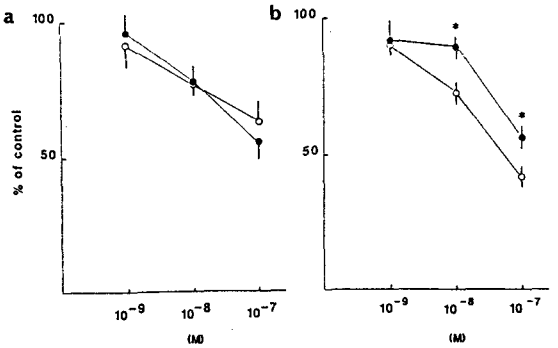


Fig. 1. Effect of dynorphin on spontaneous (a) and electrically-evoked (b) DA release from nucleus accumbens slices of rats pretreated with saline (○) or MAP (●). Each value represents the mean ± S.E.M. % of control SP2/SP1 (a) and S2/S1 (b) ratio. The F scores of S2/S1 are: 10-8M dynorphin F(1,15)=2.68; 10-7M dynorphin F(1,16)=2.56 comparing MAP-pretreatment with saline-pretreatment at individual dynorphin concentration points. *P<0.05.

Table 1. Effect of repeated treatment with saline or MAP on spontaneous and electrically-evoked DA release from nucleus accumbens slices.

	DA release in 7-min fraction	
	spontaneous(SP1)	electrically-evoked(S1)
untreated	0.279 ± 0.023 (n=24)	1.029 ± 0.086 (n=24)
saline-treated	0.310 ± 0.012 (n=32)	1.116 ± 0.053 (n=32)
MAP-treated	0.381 ± 0.016 (n=34)*	1.126 ± 0.061 (n=34)

Each value represents the mean ± S.E.M. of levels of DA release, expressed in ng/mg protein/7-min fraction. *P<0.001 vs saline-treated.

Table 2. Effect of dynorphin on spontaneous and electrically-evoked DA release from nucleus accumbens slices in normal rats.

	SP2/SP1	S2/S1
control	1.002 ± 0.042 (n=10)	0.949 ± 0.036 (n=10)
dynorphin (M)		
10^{-9}	0.864 ± 0.033 (n=8)*	0.787 ± 0.025 (n=8)**
10^{-8}	0.670 ± 0.035 (n=8)**	0.658 ± 0.025 (n=8)**
10^{-7}	0.605 ± 0.041 (n=7)**	0.411 ± 0.041 (n=7)**

Each value represents the mean ± S.E.M. of SP2/SP1 and of SP2/SP1. The F scores of SP2/SP1 are: 10^{-9}M dynorphin F(1,16) =2.48; 10^{-8}M dynorphin F(1,16)=5.83; 10^{-7}M dynorphin F(1,15)= 6.25 vs control. The F scores of S2/S1 are: 10^{-9}M dynorphin F(1,16)=3.54; 10^{-8}M dynorphin F(1,16)=6.37; 10^{-7}M dynorphin F(1,15)=9.82 vs control. *P<0.05, **P<0.01.

280 アンフェタミン惹起初代培養神経細胞 [^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGの増強

山本秀子、山本敏文*、鷺直樹、楊献紅、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〕 生理的条件下でのラット初代培養大脳神経細胞を用いた[^{3}H] TCP INTACT CELL BINDINGは単一結合部位、Kd値は約24.5nM、Bmax値は約7.4pmol/mg proteinであり、チャンネルブロッカーであるMK801存在下では親和性のみが低下してcompetitveに阻害したが、σリガンドであるハロペリドール(HAL)またはDTG存在下では親和性は変化せずに最大結合数が減少するnon-competitiveな阻害様式を示した。4nMの[^{3}H] TCP存在下でのIC$_{50}$はHAL>デシプラミン>MK801>PCP>DTGで、このうちσリガンドによる阻害の強さはσ-1受容体に対する親和性と類似していた。一方、subchronicに20μMアンフェタミン(AMP)で8日間処理した培養神経細胞の4nM[^{3}H] TCP存在下での[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGは増加したが、細胞のドーパミン(DA)取り込み活性に変化はなく、生細胞上の[^{3}H]TCP結合はDA取り込み部位には結合していないことが明かとなった。同一条件の培養細胞由来膜画分を用いた[^{3}H]TCP結合実験では結合の親和性は増加したが、結合量は減少した。HALなどのσリガンドはAMPにより増強した[^{3}H]TCP結合を阻害した。これらの結果はNMDA受容体/イオンチャンネルコンプレックスが生理的条件下ではσ-1受容体により調節を受けている可能性を示した。またsubchronicなAMP処理により[^{3}H]TCP結合の親和性が増加したことはNMDA受容体/イオンチャンネルの構造変化を引き起こしていることを示唆した。

[目的] 近年、幻覚惹起薬として問題とされているPCP、その誘導体TCPまた幻覚惹起作用はヒトではみられないとされているMK801、これらはNMDA受容体のアンタゴニストでNMDA受容体とカップルするイオンチャンネル内に結合部位を有するとされている。しかし、膜画分を用いた結合実験においてσリガンドはこれらのNMDA受容体/イオンチャンネルコンプレックスには親和性を示さない。しかし、電気生理ではDTGによるNMDA受容体刺激の増強とHALによる抑制が報告(1)されており、生細胞ではNMDA受容体/イオンチャンネルコンプレックスとσリガンドが相互作用を持つ可能性が存在する。一方、AMPを海馬切片潅流液に添加するとスパイク域値が低下するとされており(2)、AMPによるイオンチャンネルの修飾が示唆される。前回、我々はラット培養神経細胞上の[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGがAMP処理により顕著に増加することを報告した(3)。今回、AMPによる生細胞上の[^{3}H]TCP結合に及ぼす影響について更に検討を加えたのでその結果について報告する。

[方法] Wistar系ラット18日令胎児の大脳を小倉らの方法により(4)トリプシン処理後、lens paperを通して単細胞化した後、poly-L-lysineコートした96wellに約1x10^6/mm^{2}の濃度で蒔き無血清培養を行った。AMPは20μmのメンブランフィルターで無菌化した後に培地で希釈して加えた。細胞は培養2週間－3週間のものを用いた。培養神経細胞上の[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGははじめに5%CO_2/95%O_2で飽和させた37°C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°C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4nMの[^{3}H]TCPを加え、所定の時間インキュベートした後、速やかにPhosphate buffered saline(PBS)で3回洗浄した。細胞に結合した[^{3}H] TCPは液体シンチレーションカウンターで測定した。Non specific bindingには1mM のPCPを加えた。蛋白量はBioRad Protein Assay Kitを用いて測定した。DA取り込みは[^{3}H]TCP INTACT CELL BINDINGと同じ条件下で[^{3}H]DAの培養細胞への取り込みを測定することにより行った。

[結果及び考察] 生細胞上の[^{3}H]TCP結合は図1に示したように単一部位であり、Kd値は約24.5nM、Bmax値は約7.4pmol/mg proteinであった。3μMのMK801存在下ではKd値42.1nM、Bmax値8.8pmol/mg proteinでcompetitveに阻害したが、3μMのHALまたは10μMのDTG存在下では各々Kd値21.7nM、18.3nM、Bmax値1.9pmol/mg protein、1.3pmol/mg proteinでnon-competitiveに阻害した。4nMの[^{3}H]TCP存在下でのINTACT CELL

BINDINGのIC_{50}はHAL>デシプラミン>MK801>PCP>DTGで0.448, 1.65, 1.81, 7.02, 12.7 μMであり、このうちσリガンドによる阻害の強さはσ-1受容体に対する親和性と相関がみられる。一方、subchronicなAMP(AMP)の培養液への添加は経時的、濃度依存性に4nMの[^{3}H] TCP存在下での[^{3}H] TCP INTACT CELL BINDING結合を増加した。同じ条件下で20 μ MAMP存在下で8日間培養した神経細胞由来膜画分を用いた[^{3}H] TCP結合実験のScatchard解析では結合の親和性は増加したが、結合量は減少した(図2)。このことは4nMの[^{3}H] TCP存在下での[^{3}H] TCP INTACT CELL BINDING結合の増加はTCPに対する親和性の増加によるものであることを示した。同様に20 μ MAMPで8日間処理した培養神経細胞を用いたドーパミン取り込み活性に変化はなく、生細胞上の[^{3}H] TCP結合はドーパミン取り込み部位には結合していないことが明かとなった(図3)。またHALなどのσリガンドはAMP処理にかかわらずAMPにより増強した[^{3}H] TCP結合のBmaxを低下させた。

以上の結果はNMDA受容体/イオンチャンネルコンプレックスが生理的条件下ではσ－1受容体により調節を受けうることを明らかにしており、HAL連投によるPCP受容体のUP-REGULATION(5)が生ずる機構を解明する手段となる可能性を示唆した。またAMPにより[^{3}H] TCP結合の親和性が増加したことはNMDA受容体/イオンチャンネルの構造修飾を示唆し、AMP長期投与による逆耐性現象にNMDA受容体と関連する細胞の興奮性が関与している可能性を示唆した。

(1)Monnet, F.P. et al.,(1990) Eur.J.Pharmacol., 179, 441-445.
(2)Jahromi,S.S. et al.,(1991)Brain Res., 556, 33-43.
(3)山本秀子等、(1991)神経化学, 30巻230-231,
(4)小倉明彦、工藤佳久、(1988)組織培養、14巻14-18.
(5)Byrd, J.C. et al., (1987)Eur.J.Pharmacol., 140, 121-122.

図1 Scatchard Plot Of [^{3}H]TCP Intact Cell Binding Of Primary Cultured Neuron With Or Without 3 μM Of Haloperidol Or MK 801

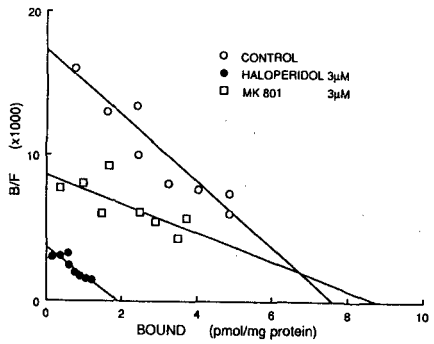


図2 Scatchard Plot Of [^{3}H]TCP Binding In Membrane Fractions Derived From Primary Cultured Neuron Treated With Or Without 20μM Amphetamine

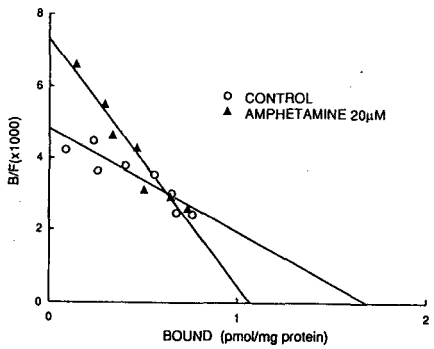
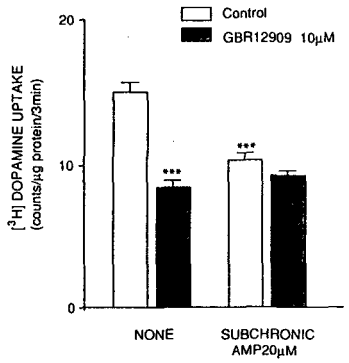


図3 Effect of Amphetamine Treatment on [H] Dopamine Uptake into Primary Neuronal Cultured Cells Derived From Rat Embryo.



Dopamine uptake study was carried out at 25°C using primary serum-free cultured cells treated with or without 20μM of amphetamine for 8days. Statistical significance was compared to NONE. ***, p<0.001.

281 ハロペリドールによるラット線条体スライスからの電気刺激誘発ｄｏｐａｍｉｎｅ遊離増強作用の継時変化

山田茂人、横尾秀康＊、西山浩二、西　彰五郎
（久留米大学医　脳研、薬理＊）

〔要約〕

in vitro灌流法を用いてラット線条体スライスからの電気刺激誘発dopamine(DA)遊離に対するhaloperidolの影響を継時的に観察した。haloperidol灌流15分後には10 nMから3 μMまで濃度依存性に刺激誘発性DA遊離を増強し、それ以上の濃度では増加作用は減弱し、10 μMで増加作用は消失した。灌流30分後には300 nM以上のhaloperidolによる刺激誘発性DA遊離増加作用は灌流15分後のDA遊離増加作用に比べ有意な減少がみられた。すなわちhaloperidolの灌流早期には刺激誘発性DA遊離は増強されるがこの増強作用は時間経過と共に著明な減弱を認め、haloperidolによる刺激誘発性DA遊離増強作用には短時間に耐性が生じることが明らかになった。灌流を低温（25度）で行う場合やカイニン酸前処置によりhaloperidolによる刺激誘発性DA遊離増強作用は60分以上持続し、急性耐性が減弱した。以上の結果はhaloperidolによる刺激誘発性DA遊離増強作用には急性耐性が認められ、その機序に線条体内の神経細胞が関与していることが示唆された。

Seemanらは抗精神病薬が刺激誘発性DA遊離を減少させることを報告しその減少作用と臨床用量に高い相関を見いだし、DA遊離抑制作用が薬物の抗精神病作用に関連があるとの報告をした(1)。その後抗精神病薬はDA神経終末のDA自己受容体を遮断し逆に刺激誘発性DA遊離を増強するとの報告が多く、抗精神病薬の刺激誘発性DA遊離に対する影響について一定の結論は出ていない。そこでラット線条体スライスを持続灌流し電気刺激により遊離される内因性DAを測定する方法を用いて刺激誘発性DA遊離に対するhaloperidolの影響を継時的に観察した。

（方法）

Wistar系雄性ラット(200-300g)を断頭し速やかに脳を取り出し厚さ0.3mmの線条体スライスを作成しアクリル製灌流槽に封入し95%酸素で飽和したKrebs液で0.7 ml/minで持続灌流した。灌流開始60分目、80分目、95分目、125分目に灌流槽の両端に設置したプラチナ電極より20 mA, 2msec dration, 1 Hz 2分間の電気刺激を行い、それぞれの刺激前後7分間の流出液を分取した。それぞれの刺激前のfractionを基礎遊離量としてsp1,sp2,sp3,sp4で表示した。刺激後のfraction中のDA量からそれぞれの基礎遊離量を差し引いた値をS1,S2,S3,S4で表した。2回目の刺激の15分前より種々の濃度のhaloperidolを灌流液に加えDA遊離に及ぼす影響を観察した。また灌流槽の温度は25度、37度、42度の条件で同様の実験を行った。次にDA遊離に対する線条体内神経細胞の影響を調べるため片側線条体に1 ug(1 ul)のカイニン酸を注入し4日目に脳を取り出し同様に刺激誘発性DA遊離に対するhaloperidolの影響を観察した。

（結果）

図１に示すように低濃度のhaloperidol(100nM-1 μM)は灌流開始15分後に電気刺激誘発DA遊離を濃度依存性に増強するが、この増強作用は3 μM以上で減弱し、10 μM以上の濃度では逆に減少させた。また低濃度のhaloperidolでも継時的に検討するとhaloperidol灌流30分後(S3),60分後(S4)にはS2に比べ有意な減少が認められた。すなわちhaloperidolによる刺激誘発性DA遊離増強作用は一過性に認められ、短時間に耐性が生じることが明かとなった。　図２に示すように灌流温度を下げる事によりhaloperidolによる刺激誘発性DA遊離増強作用は60分以上持続し、37度の灌流で見られたような耐性は消失し、この耐性形成が温度依存性であることがわかった。　図３にカイニン酸処置４日目の実験結果を示す。未処置側を対照とした場合カイニン酸処置により刺激誘発性DA遊離は著明な減弱が認められた。haloperidolの刺激誘発性DA遊離増加作用はカイニン酸前処置によって、haloperidol灌流開始60分後も持続し、対照群でみられた耐性形成が認められなかった。

（考察）

in vitroの実験系ではhaloperidolの刺激誘発性DA遊離に対する影響については増強するという報告(

2,3)と抑制する(1,4)という報告があり一定の結論は出ていない。今回の結果からhaloperidolは刺激誘発性DA遊離に対して両方向性の影響を持つことが明かになった。すなわち低濃度短時間の灌流でDA遊離増強作用、高濃度長時間の灌流でDA遊離抑制作用を持っている。これまでの報告の結果のばらつきは薬物濃度、灌流温度、灌流時間などの違いによって説明できると思われる。　D2受容体遮断作用を有する抗精神病薬がDA自己受容体を遮断して刺激誘発性DA遊離を増強することは(-)-sulprideを使った実験で証明されており、今回の低濃度短時間のhaloperidol灌流によるDA遊離増強作用もDA自己受容体遮断作用で説明できるかも知れない。　一方比較的高濃度長時間灌流後の刺激誘発性DA遊離抑制作用の機序は明らかになっていない。Di Chiaraらは脳内灌流法を用いて、抗精神病薬の腹腔内投与によりDA遊離の一過性の増加が起こり、約2時間後には基礎値まで戻り、その後同様の薬物を投与してもDA遊離の増加が認められず、抗精神病薬によるDA遊離増強作用には急性の耐性が生じることを報告している[5]。今回の結果も恐らく同様の現象をin vitroの系で認めたものと考えられる。耐性の形成にある程度の時間がかかる事や、低温下ではこの耐性が生じにくい事、カイニン酸処置により耐性形成が抑制される事から、この耐性の形成には線条体内にある神経細胞を含むneuronal circuitが関与している可能性が示唆された。

（文献）

1) Seeman and Lee (1975) Science, 188, 1217-1219　2) Starke et al (1978) Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pahrmac., 305, 27-36　3) Yamada et al (1991) Eur.J.Pharmacol., 192, 141-145　4) Plotsky et al (1977) Science, 197, 904-906　5)Di Chiara and Imperato(1985) J.Pharmacol.Exp.Ther. 235, 487-494

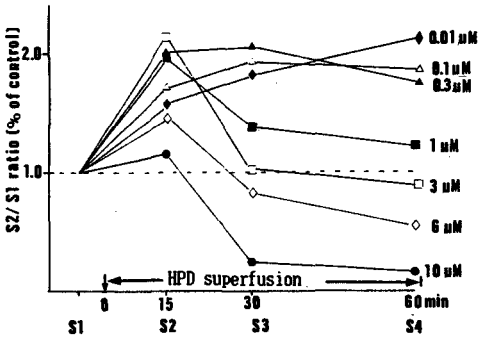


図1　haloperidol添加後の刺激誘発性DA遊離の継時変化

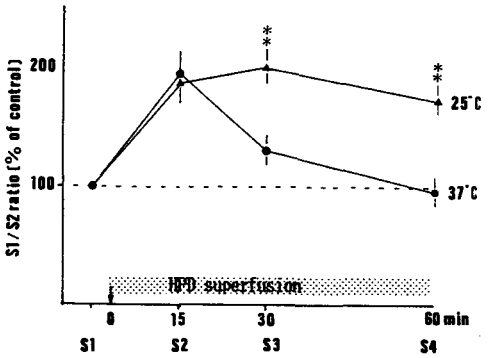


図2　haloperidol(1 μM)による刺激誘発性DA遊離の継時変化に対する灌流温度の影響
* P<0.01 (n=8)

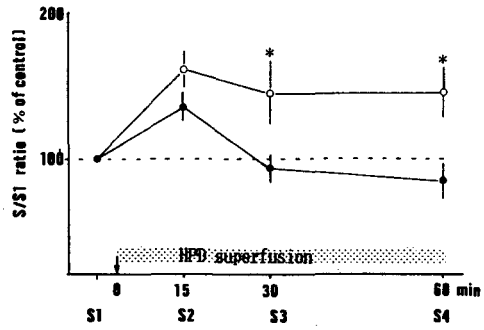


図3　haloperidol(1 μM)による刺激誘発性DA遊離の継時変化に対するカイニン酸前処置の影響。　カイニン酸処置群(○)では対照群(●)で認められるhaloperidolによるDA遊離の減少が消失する(* P<0.05, n=8)。

282 抗うつ薬の作用機序に関わるヒトβ1アドレナリン受容体遺伝子の分子クローニングおよびその構造解析

足立 淳　松井宏晃　伊野美幸　長谷川浩　朝倉幹雄　長谷川和夫

(聖マリアンナ医科大学神経精神科教室)

〔要約〕

うつ病の発症機構を分子レベルで明らかにする目的で，β_1アドレナリン受容体(β_1AR)の遺伝子を分子クローニングし，構造解析を行なった。ヒトβ_1AR構造遺伝子領域にはイントロンが存在しなかった。翻訳開始点より5'上流約1.3-kbまでは，GC含有量が非常に多く，TATAボックスを欠く，いわゆるhouse keeping geneの構造を呈していた。しかし，さらに5'上流には明らかなTATAボックス，CAATボックスが存在し，さらに数か所のGATA結合部位，甲状腺ホルモン応答部位，エストロゲン応答部位，グルココルチコイド応答部位，cAMP応答部位等の転写活性調節部位が存在し，β_1AR遺伝子の複雑な転写活性調節機構の存在が示唆された。加えて，5'非翻訳領域には，アミノ酸残基344からなる未知蛋白質の遺伝子が存在していた。一方，3'非翻訳領域には数か所のポリAシグナル配列やmRNAの安定性に影響する配列が存在し，転写終結部位の差によりβ_1AR mRNAの安定性が異なる可能性が示唆された。

三環系抗うつ薬が精神科臨床に導入されてから30年余り経過したが，いまだに抗うつ薬の作用機序は解明されていない。臨床的に有効な多くの抗うつ薬を投与後，ラット脳β_1アドレナリン受容体(β_1AR)数が減少することが報告された[1)2)]。この抗うつ薬投与後の中枢β_1AR数の減少は，抗不安薬や抗精神病薬の投与では観察されないことから，抗うつ薬に共通で，特徴的な生化学的変化と考えられた。さらに，Asakura et al.[3)]は，非定型抗うつ薬も，β_1AR数を減少させることを見い出し，窪田[4)]は，セロトニン作動性神経系がβ_1AR mRNAの合成を阻害する可能性を報告した。

これらの結果より，うつ病発症に中枢β1ARの過感受性状態の関与，ならびに，中枢β_1AR遺伝子の発現調節機構異常が考えられるようになった。従って，β_1AR遺伝子の構造解析，ならびにその発現調節機構の解明は，抗うつ薬の作用機序のみならず，感情障害の成因を明らかにする上で重要な課題である。

ヒトβ_1AR遺伝子の構造は未だ明らかにされておらず，そのcDNA[5)]の構造が報告されているのみである。そこで今回，うつ病発症の分子機構を明らかにする目的で，抗うつ薬の作用機序に深く関わるヒトβ_1AR遺伝子を分子クローニングし，遺伝子の転写活性調節に重要な5'非翻訳領域，転写物の安定性に関する3'非翻訳領域も含めて広い範囲にわたり構造解析を行ない，その構造特異性を明らかにすることを試みた。

〔方法〕

ヒトβ_1AR cDNA SmaI断片1.3-kbをプローブに用い，2.5×10^6個の独立したクローンから構成されるヒト胎盤ゲノムライブラリーから，プラークハイブリダイゼイション法により，8系列のゲノムクローンを得た。その中で，ゲノムクローン1(G1)は約4-kbの5'非翻訳領域，1.4-kbのβ_1AR構造遺伝子領域，約1.4-kbの3'非翻訳領域にわたる6.8-kb SacI断片を含んでいた。そこで，G1の6.8-kb Sac I 断片をBamHI，SmaI，PstI消化した後，得られた断片をpUC18にサブクローニングし，single-stranded DNA結合蛋白存在下にジデオキシ反応を行ない，試料を6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分離し，塩基配列を決定した。

〔結果および考察〕

ヒトβ_1AR cDNA[5]の構造と比較すると，ヒトβ_1AR構造遺伝子領域にはイントロンが存在しなかった。

翻訳開始点より5'上流約1.3-kbまではGC含有量が非常に多く，数か所のSp1結合部位（GCボックス），AP1結合配列，AP-2結合配列等の転写活性調節因子結合部位が存在したが，明らかなTATAボックスを欠いており，いわゆるHouse keeping geneの構造を呈していた。しかし，さらに5'上流には明らかなTATAボックス，CAATボックスが存在し，さらに数箇所のGATA結合部位，甲状腺ホルモン応答部位，エストロゲン応答部位，グルココルチコイド応答部位，cAMP応答部位等の転写活性調節部位が存在し，β_1AR遺伝子の複雑な転写活性調節機構の存在が示唆された。5'上流非翻訳領域の他の興味ある配列は，processed geneと考えられるヒト性巣特異的phosphoghycerate kinase遺伝子[6]に認められたTATGTTT配列と同一の配列や，類似の配列（TTTGTTT）が，認められた。加えて，5'非翻訳領域には，ヒトβ_1AR構造遺伝子領域からおよそ100塩基の介在をもって，アミノ酸残基344からなる未知蛋白質の遺伝子が存在していた。

一方，3'非翻訳領域には転写終了を意味する数か所のポリAシグナル配列やメッセンジャーRNAの安定性に影響する配列が存在し，転写終結部位の差によりβ_1AR mRNAの安定性が異なる可能性が示唆された。

今回の研究はヒトβ_1AR遺伝子の全貌を明らかにしたものであり，抗うつ薬作用機序研究も含め，今後の研究に重要な基礎的知見を与えるものと考えられる。

〔謝辞〕

稿を終えるにあたり，ヒトβ1AR cDNA SmaI断片を分与していただいたR.J.Lefkowitz教授とM.G.Caron教授（Duke Univ., U.S.A.）に深謝いたします。

なお，本研究は科学研究費補助金(01440048)の援助を受けた。

〔参考文献〕

1) Banerjee, S.et al. (1977) *Nature* **268**, 455-456
2) Sulser, F.(1987) *J. Clin. Psychiatry* **48** [3, Suppl], 12-18
3) Asakura, M.et al. (1987) *European J. Pharmacol.* **141**, 950-100
4) 窪田　博 (1989) *聖マリアンナ医大誌* **17**, 465-473
5) Frielle T.et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7920-7924
6) McCarrey, J. R. and Thomas, K. (1987) *Nature* **326**, 501-505

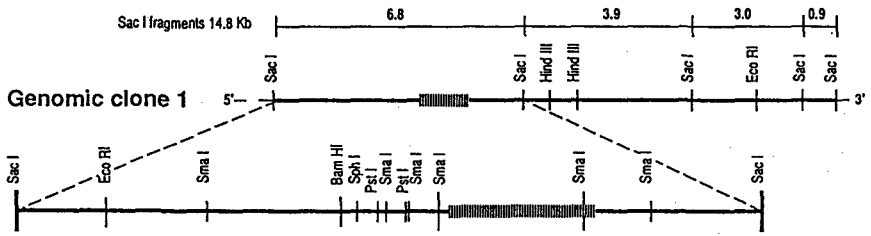


Fig.

Restriction map of genomic clone 1.
Schematic representation of the restriction map of 14.8-kb SacI - SacI fragment of the human β1-adrenergic receptor genomic clone 1. The cleavage sites for major restriction enzymes are shown. The vertical strips on the genomic clone indicates the coding sequence of the β1-adrenergic receptor.

283 [3H]prazosin結合部位の結合特性
－電気けいれんショックおよびイミプラミンの反復処置の効果－

早川　浩*、清水雅美**、西田　朗**、本橋伸高*、山脇成人*
（*広島大学精神科、**国立呉病院臨床研究部）

〔要約〕抗うつ薬や電気けいれんショック(ECS)の反復処置がα_1アドレナリン受容体(α_1受容体)の機能に変化を起こすことから、うつ病との関連が注目されている。最近、α_1受容体アンタゴニストであるWB4101に対する親和性の違いから[3H]prazosinで標識されるα_1受容体をα_{1A}受容体とα_{1B}受容体サブタイプに分類できることが報告されている。今回、ラット脳を用いて、ECSとimipramine(IMP)反復処置後のα_1受容体サブタイプに及ぼす効果を検討した。WB4101に対して高親和性と低親和性の2つの部位がラット前大脳皮質と海馬において異なった比率で存在し、chlorethylclonidine(CEC)処置により、低親和性部位がα_{1B}受容体であることが確認された。前大脳皮質において、ECS反復処置はα_{1B}受容体数を増加させたが、IMP反復処置は逆にα_{1B}受容体数を減少させた。ECSとIMPの反復処置によって引き起こされるα_{1B}受容体数の変化の違いは両者の治療効果の違いと関連している可能性が考えられた。

【目的】

三環系抗うつ薬の反復処置によって電気生理学的および行動学的な実験では中枢のα_1受容体の感受性が亢進すると報告されている(4)。このような受容体機能の変化に対して[3H]prazosinを用いたα_1受容体結合実験の結果は必ずしも一致していない。一方、ECSの反復処置に関してはラットの前大脳皮質においてα_1受容体数を増加させるという一致した報告が多い(1)。最近、[3H]prazosinで標識されるα_1受容体はアンタゴニストであるWB4101やphentolamineに対して、高親和性のα_{1A}受容体と低親和性のα_{1B}受容体サブタイプに分類されている(6)。また、アルキル化剤であるCECがα_{1B}受容体を不活化することが報告されている(5)。そこで今回われわれは[3H]prazosin結合部位の特性を検討し、ECSとimipramine(IMP)反復処置後のα_1受容体サブタイプに及ぼす効果と[3H]prazosin結合部位に対する抗精神病薬の阻害効果を検討したので報告する。

【方法】

1.動物および処置

実験にはWistar系ラット(250-350g)を用いた。ECSは耳介に装着した電極を介して100V、60Hz、1secの電撃を1日1回14日間、IMPは10mg/kgを1日2回14日間腹腔内に投与し、最終処置24時間後に断頭した。

2.[3H]prazosin結合実験

Greengrassの方法(2)に従い[3H]prazosin、粗膜標品および結合阻害物質を1mlの50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0、25℃)中で25℃、30分間インキュベーションした。CEC処置はMinnemanらの方法(5)に準じて行った。[3H]prazosinは0.1%のアスコルビン酸を含むTris-HCl bufferに溶解して用いた。結合飽和実験には0.05-2.4nMの濃度に展開した[3H]prazosinを用い、2nMおよび10μMのWB4101の存在下に非特異的結合部位を決定した。結合阻害実験には0.3nM の[3H]prazosinを用いた。結合阻害曲線および結合飽和曲線は、非線形最小二乗法を用いたコンピュータープログラムにより解析した。

【結果】

1.[3H]prazosin結合部位に及ぼすα_1受容体関連物質の効果

α_1受容体アンタゴニストであるprazosinの阻害曲線は前大脳皮質において一相性となったが、WB4101とphentolamineによる阻害曲線は二相性となった。α_1受容体アゴニストであるnoradrenalin(NA)による阻害曲線も二相性となった。高親和性部位と低親和性部位は前大脳皮質において約3:7の割合で存在し、2nMのWB4101によって高親和性部位は置換された。海馬において高親和性部位と低親和性部位は約9:1の割合で存在し、10nMのWB4101によって高親和性部位は置換された。CEC処置により[3H]prazosin結合部位のWB4101に対する低親和性部位であるα_{1B}受容体が減少し、阻害曲線は左へ移動した(Fig)。

2.ECSおよびimipramine反復処置のα_1受容体に及ぼす効果

[3H]prazosin結合飽和実験のScatchard plotsは直線となった。前大脳皮質においてα_{1A}受容体を2nMのWB4101で置換される部位とし、10μMのWB4101で置換される全特異的結合量からα_{1A}受容体数を除いたものをα_{1B}受容体とした。α_{1A}受容体およびα_{1B}受容体の総和であるα_1受容体数はECSの反復処置により増加し、IMPの反復処置により減少した。α_{1A}受容体数はECSとIMPの反復処置によって変化しなかったが、α_1

$_{1B}$受容体数はECS処置で増加し、IMP処置で減少した。海馬においてはECSおよびIMPの反復処置によりα_1受容体数には変化が認められなかった(Table)。

3.[^{3}H]prazosin結合部位に及ぼす抗精神病薬の効果

抗精神病薬であるspiperoneやzotepineは前大脳皮質の[^{3}H]prazosin 結合部位を強力に阻害し三環系抗うつ薬であるIMP、desipramineや四環系抗うつ薬であるmaprotiline、mianserinは中等度に阻害した。最近抗躁作用が注目されているカルシウム拮抗薬のverapamilは中等度に阻害したが、diltiazemやnicardipineは弱い阻害効果しか示さなかった。

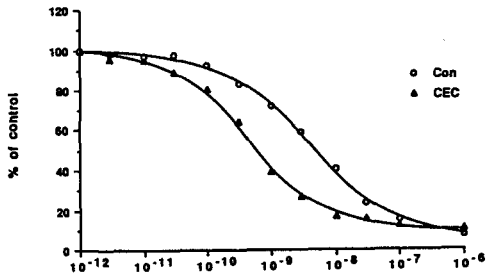
【考察】

今回の結果から、[^{3}H]prazosinで標識される部位はWB4101とphentolamineに対して高親和性と低親和性の2つに分けられ、前大脳皮質と海馬において存在比が異なっていた。[^{3}H]prazosin結合部位のWB4101に対して低親和性部位であるα_{1B}受容体はCEC処置により著明に減少した。ECSの反復処置によって前大脳皮質のα_{1B}受容体数が増加し、IMPの反復処置では逆に減少することが示された。前大脳皮質で認められたα_1受容体数の増加が海馬で認められなかったことは、両部位におけるα_{1B}受容体の存在比の違いによるものと考えられた。以前報告されているECSの反復処置によるα_1受容体数の増加はα_{1B}受容体数の増加を反映しているものと思われた。α_{1B}受容体はイノシトール燐脂質代謝(PI代謝)と連関しており、細胞内Ca^{2+}の貯蔵部位からCa^{2+}の遊離を引き起こすと報告されている(3)。ECSの反復処置後のNA刺激によるinositol-monophosphateの蓄積に関して、また抗うつ薬の反復処置のPI代謝に及ぼす効果も一致した結果が得られていない。今回、PI代謝と連関しているα_{1B}受容体数の増加がECSの反復処置によって認められたが、PI代謝の変化については、今後の検討が必要と思われる。

抗精神病薬、抗うつ薬およびカルシウム拮抗薬に[^{3}H]prazosin結合部位に対する阻害作用が認められたが、共通した臨床効果は認められていない。これらの違いは抗うつ薬が持つNA再取り込み阻害作用が関係しているかもしれない。ECSとIMPの反復処置によって引き起こされるα_{1B}受容体数の変化は両者の治療効果の違いを示している可能性も示唆された。

【文献】

1)Blendy,J.A. et al (1988) Eur. J. Pharmacol., 156:267-270.
2)Greengras,P. and Bremner,R. (1979) Eur. J. Pharmacol., 55:323-326.
3)Han,C. et al (1987) Nature, 329:333-335.
4)Menkes,D.B. and Aghajanian,G.K. (1981) Eur. J. Pharmacol., 74:27-35.
5)Minneman,K.P. et al (1988) Mol. Pharmacol., 33:509-514.
6)Morrow,A.L. and Creese,I. (1986) Mol. Pharmacol., 29:321-330.



Effects of repeated treatment with ECS and imipramine on [^{3}H]prazosin binding sites in the rat frontal cortex

	Total α_1		α_{1A}		α_{1B}	
	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg prot)	KdH	BmaxH	KdL	BmaxL
Control (4)	0.150 ±0.004	203.3 ± 3.2	0.072 ±0.002	66.0 ±1.7	0.288 ±0.001	158.5 ±4.8
ECS (4)	0.143 ±0.015	262.2** ±10.5	0.066 ±0.009	74.6 ±7.9	0.262 ±0.014	212.7** ±9.4
Imipramine (4)	0.174 ±0.013	176.8 ±10.0	0.078 ±0.008	53.0 ±9.0	0.300 ±0.006	133.6* ±4.4

*p<0.05, **p<0.01

284 高血圧自然発症ラットおよびヒト尿中の内因性MAO活性阻害物質、イサチンについて

浜上尚也、遠藤　泰、南　勝
（東日本学園大学薬学部薬理学教室）

〔要約〕 我々は、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP)の血圧と腎 MAO活性が有意な負の相関をすることを既に報告した。正常血圧のウィスター系京都ラット(WKY) に比較して SHRSPの腎 MAO活性は有意に低下し一方、血漿ノルエピネフリン(NE)とセロトニン(5-HT)濃度が有意に上昇していることも報告してきた。 SHRSPの腎芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) 活性は低下していたので MAO活性がモノアミンの濃度の調節に重要であろうと考え研究を進めてきた。ストレスは MAO活性を低下させるとのいくつかの報告がある。内因性MAO活性阻害物質は、Gloverらによって正常なヒトの尿中より最初に見出され、この阻害物質は Sandlerらによりtribulinと命名された。SHRSP の血圧とモノアミン濃度に及ぼす MAO活性の役割を解明するために、tribulinに関連する内因性 MAO阻害物質についての研究を企図した。 SHRSPの脳ならびに尿抽出物質を肝ミトコンドリア MAO 活性の抑制率で比較したところ、WKY の脳や尿から得られた抽出物質より有意に大であった。ラットとヒトの尿から抽出した物質はともにガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー(GC-MS) によりisatinであると同定された。Isatinは競合的にしかも用量に依存してラット肝MAO 活性を阻害した。これらのことから内因性 MAO 活性阻害物質は、SHRSP のNEの運命を延長し SHRSPの血圧維持に関与していることが示唆された。

〔目的〕 SHR では、NEや5-HTの合成系のAADC活性が高齢化とともに減少することを見出したので、我々はSHRやSHRSP の高血圧進展や脳卒中発症時のNEや5-HT濃度上昇には MAO活性が深く関与しているものと考え研究を進めてきた。ヒト尿などで内因性 MAO活性阻害物質が見出されtribulinと命名されたが、この物質の化学構造はすべて決定していない。Tribulinは種々のストレス時に遊離して内因的に MAO活性を阻害し血中ならびに組織のNEの運命を延長させるものと思われている[1]。血圧との関係を追及すべく酢酸エチルを用いて SHRSPの尿や脳からtribulinを抽出し、 MAO活性阻害の相違について WKYのそれと比較検討する。さらに、内因性 MAO活性阻害物質の一つをGC-MS により同定するのが本実験の目的である。

〔方法〕 実験動物として雄性の WKY、SHR および SHRSPを使用した。脳の病理標本を作成後、脳卒中病変の存在が確認されたものをSHRSP-strokeとし、異常の見られなかったものをSHRSP-control とした。MAO 活性測定はキヌラミンを基質としてKraml らの方法[4] にしたがった。AADCのうち、ドパ脱炭酸酵素(DDC) 活性および5-HTP 脱炭酸酵素 (5-HTP-DC) 活性の測定[6] を行なった。カテコールアミンおよびインドールアミン濃度はHPLC-ECDにより測定した。Lowry 法[5] で得たタンパク量により補正した。内因性 MAO活性阻害物質の抽出には塩酸と酢酸エチルを用いてElsworthらの方法[2] にもとづいて行い、その抽出物を常法にしたがって肝ミトコンドリアを用いたMAO 活性測定時に加え、その MAO活性阻害率で示した。 MAO活性阻害物質の同定はGloverらの方法[3] を用い前述の抽出物を誘導化しGC-MS を用いて行なった。さらに外因的に WKYにisatin (50,100,200mg/kg) を腹腔内投与し脳内のカテコールアミンおよびインドールアミン濃度の変動を測定した。

〔結果〕 1）SHR において週令が高じると WKYに比して血圧は有意に上昇するが、一方腎AADC活性は有意に低下していた。血漿NE濃度は WKYの 266.1±114.7 pg/ml に比して SHRSP-control群では 349.1±160.5 pg/ml 、SHRSP-stroke群では 529.0±324.5 pg/ml と高値を示し、stroke群が control群に比較して有意に高値を示した。一方、3群間での腎ミトコンドリアの MAO活性は WKYで 131.4±43.5単位と最も高く SHRSP-controlが72.4±24.4単位、SHRSP-strokeが 62.7 ±24.0単位と順に低値を示した。SHRSP-stroke群において腎の MAO活性と収縮期血圧との間には有意な負の相関が見られた（$r=-0.7007, p<0.02$）。2）30週令の WKYの脳抽出物は肝ミトコンドリアの MAO活性をほとんど抑制しなかったが、同週令の SHRSPでは 8.5±4.5%と有意に低下させた。3） SHRSPの尿抽出物は脳より著明に MAO活性を低下させた(42.6 ±6.5%)。4）WKY、SHRSP ならびにヒトの尿

中 MAO活性阻害物質はGC-MS の結果、ともに分子量 147のインドール化合物の一つisatinであることが判明した（図参照）。Isatinは肝ミトコンドリアの MAO活性を競合的に拮抗し、しかも用量依存的であった。MAO-B の方が MAO-A活性より大きく抑制された。５）Isatinは用量に依存してアミン濃度を上昇させた。200mg/kg,i.p. では脳内のNE濃度 (2.53±0.26→6.27±0.69 ng/mg protein)、5-HT濃度 (4.01±0.42→ 10,74±1.24 ng/mg protein) となり、5-HTのTurnover (5-HIAA/5-HT)は有意に低下していた。

〔考察〕 SHRSP の DDC活性および5-HTP-DC活性は週令が高じると低下してくることから SHRSPのモノアミン濃度の上昇には代謝系の酵素である MAO活性が大きく関与しているものと考え研究を進めた。 SHRSP尿中の内因性 MAO 活性阻害物質がGC-MS の結果isatinであることが判明した。この物質は生体内でストレスなどの刺激により放出されMAO 活性を阻害することによって末梢部位のNEや5-HTの運命を延長させ、その結果血中濃度を高めるものと考えられる。さらに外因的に投与した際の反応性を検討する目的で投与量としては大であるがisatinを投与したところ脳内のアミン濃度は上昇していた。本研究の重要な発見は、 SHRSPの尿で見出した内因性 MAO活性阻害物質がヒトと同じくisatinであったことである。Isatinは従来のtribulinの一つの構成分であろうが、SHRSP は高血圧あるいは脳卒中のモデル動物として有意義であることが再確認できた。今回、報告したisatinは分子量 147の非ペプチド性のものであるが、ペプチド性のtribulinはいまだ化学構造が決まっていない。いずれにせよ、tribulinによって上昇したモノアミンレベルが SHRSPの高血圧の維持にとって重要であることが示唆された。

〔文献〕 (1)Armando,I.,Lemoine,A.P.,Ferrini,M.,Segura,E.T.and Barontini,M.(1989) Cell Mol.Neurobiol., 9,115-122. (2)Elsworth,J.D.,Dewar,D.,Glover,V.,Goodwin,B.L.,Clow,A.and Sandler,M.(1986) J.Neural. Transm.,67,45-56. (3)Glover,V.,Halket,J.M.,Watkins,P.J.,Clow,A.,Goodwin,B.L.and Sandler,M.(1988) J.Neurochem.,51,656-659. (4)Kraml,M.(1965) Biochem.Pharmacol.14,1683-1685. (5)Lowry,O.H.,Rosebrough, N.J.,Farr,A L.and Randall,R J (1951) J.Biol.Chem.193,265-275 (6)Rahman,M.K.,Nagatsu,T. and Kato,T. (1981) Biochem.Pharmacol.30,645-649. (7)Sandler,M.(1982) TIPS,3,471-472.

〔図〕

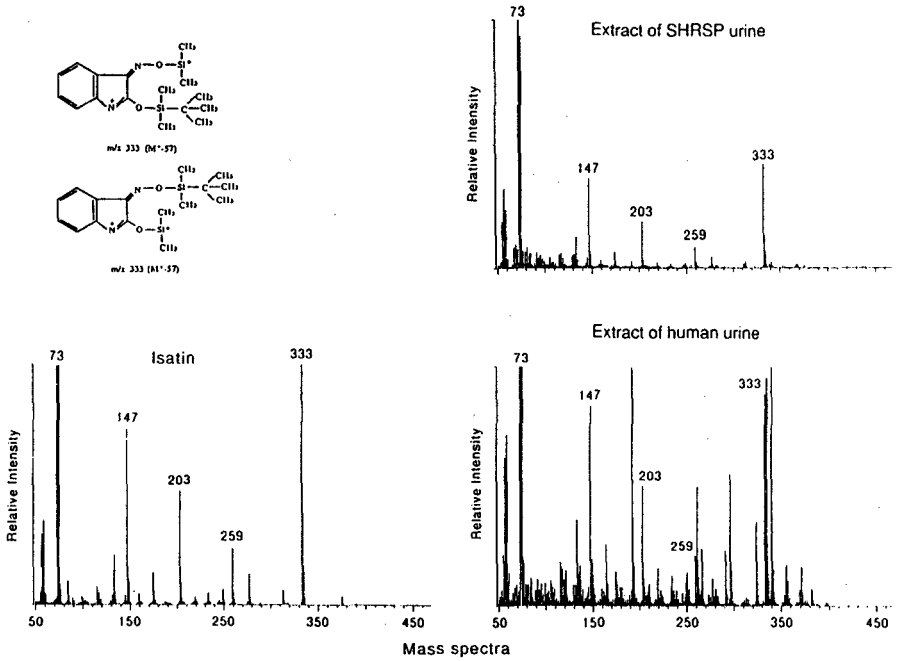


Fig. Mas spectra of isatin and extract of SHRSP and human urine derivatives.

285 近交系４元雑種からの攻撃性モデルマウスの作成と神経伝達物質代謝の変化

盛政忠臣、金行孝雄、河本泰生＊、庄盛敏廉

（岡山大、医学部、神経内科、＊農学部）

〔要約〕

近交系マウスの４系統（BALB/c,C57BL/6,DBA/2,C3H）から四元雑種を作成し、これを基礎集団として開始して、７世代にわたって攻撃性に関する選抜育種を行った。その結果、攻撃性スコアが有意に異なる、攻撃性の高い集団（H系）と低い集団（L系）が分離して得られた。８世代目において、選抜の再評価と神経伝達物質代謝の変化について比較検討を加えた。闘争させない基礎値において、H系はL系に比較するとセロトニン代謝の低下が示され、ノルアドレナレンには変化が僅かであった。それに対して、闘争させて攻撃を示した場合、H系においてはセロトニン代謝の亢進を示す結果が得られた。L系ではその様な顕著な変化は示されなかった。ノルアドレナリン代謝においては両者に顕著な変化は示されなかった。従って、H系は、攻撃性が高いと同時にセロトニン代謝の変化が顕著であり、ストレスや不安のセロトニン関与の行動薬理の実験に有用であることが示唆された。

［緒言］

実験動物において、攻撃性はこれらの動物の本能的な情動行動の一つである。飼育管理上では、攻撃性の少ない系統を選抜飼育するのが常法である。一方、行動薬理学の分野では、攻撃性は、抗不安剤の前臨床評価の重要な指標の一つとして用いられてきた。しかしながら、従来用いられてきた攻撃性のモデルは、攻撃行動を誘発させるために人為的な操作を導入しており、攻撃性以外の要因を多く含むため攻撃性の行動評価に難点があった。

本研究では、生来性の攻撃性を、遺伝負因に注目して強調・強化すべく、選抜育種法により７代にわたって選抜を行って、上述の行動薬理学的な最適モデルの作成を試みた。さらに、選抜されたこれらの動物の攻撃性と不安の背景となる、神経伝達物質代謝の変化ならびに対応について検討を加えた。

［実験方法］

実験動物は、近交系マウスの４系統（BALB/c,C57BL/6,DBA/2,C3H）から四元雑種を作成し、これを基礎集団として、その雄性動物を用いた。７週齢において、open field上で、この動物と雄性ＤＤＹ系マウスを１対１で５分間対峙させ、常法により攻撃する・しないの集団に分けた。この実験操作を７代にわたって選抜分離を行った。８代目において、闘争操作を行わせない動物と、闘争操作を行って再度分離された各々の動物の脳内神経伝達物質と代謝物濃度をＨＰＬＣにより測定した。統計処理には、ANOVA とKruskal-Wallisを用いた。

［結果と考察］

攻撃性に関する選抜育種の効果は明らかに示され（データ省略）、これらの行動の遺伝性の関与[1)]が明らかにされた。表１．に伝達物質代謝の結果を示す。闘争させない基礎値において、H系はL系に対して比較するとセロトニン代謝の低下が顕著に示され、ノルアドレナレンには変化が僅かに示された。それに対して、闘争させて攻撃を示した場合、H系においてはセロトニン代謝の亢進を示す結果が得られた。L系ではその様な変化は顕著には示さ

れなかった。同様に、ノルアドレナリン代謝にも顕著な変化は示されなかった。従って、H系は、攻撃性が高いと同時にセロトニン代謝の変化が顕著であり、ストレスや不安のセロトニン関与[2)]の行動薬理の実験に有用であることが示唆された。

［文献］

1).Crabbe JC and Belknap JK (1992) TIPS. 13 212-219. 2).Traber J and Glaser T (1987) TIPS. 8, 432-437.

表1．攻撃性の高い集団（H）と低い集団（L）におけるセロトニンとノルアドレナリン代謝。
A；闘争場面に晒されない状態における基礎値でHのLに対する比較。B；闘争場面に晒して、闘争に勝った個体の非闘争（A）に対する比較。
ACC;前帯状回、NAC;側坐核、HIP;背側海馬、ENT;内側鼻状こう状回
↑または↓； p< 0.05の増加または減少 (pmol/mg protein, mean±sem, ratio; 5HT/(5HT+5HIAA), NA/(NA+MHPG))

		A			B		
		5HT	5HIAA	5HT/ratio	5HT	5HIAA	5HT/ratio
ACC	H	20.5±1.3	6.97±0.83	0.254±0.028	19.0±1.0	8.17±0.61	0.300±0.010↑
	L	19.6±0.9	8.44±0.53	0.302±0.019	18.6±1.4	8.67±0.22	0.318±0.008
NAC	H	41.4±2.7	11.0±0.80	0.211±0.013↓	41.3±4.7	13.4±1.20	0.249±0.014↑
	L	32.2±4.5	9.87±1.14	0.237±0.007	36.8±4.1	12.0±0.90	0.248±0.007↑
HIP	H	29.4±1.2	13.8±0.80↓	0.319±0.011↓	28.1±2.0	14.2±0.50	0.338±0.011↑
	L	29.5±3.6	17.0±1.50	0.370±0.011	26.5±1.7	16.2±0.80	0.380±0.006
ENT	H	48.9±2.0↑	11.2±1.00	0.185±0.009↓	49.6±2.3	13.7±0.60↑	0.217±0.006↑
	L	39.0±4.5	10.7±0.80	0.222±0.016	41.9±3.0	9.93±0.91	0.192±0.012
		NA	MHPG	NA/ratio	NA	MHPG	NA/ratio
ACC	H	22.0±0.9↓	2.31±0.66	0.093±0.023↑	30.3±2.2↑	2.12±0.29	0.065±0.005↓
	L	35.0±2.4	1.37±0.25	0.038±0.006	38.8±2.5	1.63±0.32	0.041±0.009
NAC	H	18.0±1.1	2.49±0.17	0.158±0.026	21.7±2.8	2.84±0.67	0.160±0.046
	L	21.3±3.2	1.59±0.37	0.259±0.042	30.6±2.6↓	1.94±0.37	0.248±0.040
HIP	H	20.9±0.8	3.45±1.81	0.171±0.108↑	22.3±1.3	2.31±0.40	0.097±0.019
	L	25.9±1.4	1.65±0.34	0.059±0.009	32.6±2.3	1.95±0.05	0.057±0.003
ENT	H	22.0±0.7	1.30±0.14	0.056±0.005	21.0±0.8	2.43±0.30↑	0.104±0.014
	L	21.5±1.6	1.74±0.29	0.074±0.009	22.9±2.9	2.50±0.18	0.106±0.019

人名索引（ABC順）

(A)

阿部啓之……204
阿部幸子……248
阿部輝雄……18
阿部敏明……195
阿部能之……77
阿部田聡……105
足立淳……282
安達一真……256
安喰英夫……114
赤林朗……276
赤川公朗……60
茜谷行雄……95
秋保啓……251
秋元功司……168
秋山治彦……33
秋山一文……185
穐吉條太郎……247
穴井元昭……158
安藤正人……54・252・256
安藤進……222
安藤泰……102
姉崎利治……212
荒金太……248
新井孝夫……81・88
荒川義弘……171
荒木恵子……248
荒記俊一……276
荒木陽子……269・272
有賀純……107・194
浅田英穂……58・156・267
浅井広志……180
浅井清文……67・169・176
朝倉幹雄……56・282
浅野孝雄……97
浅野富子……240
浅沼幹人……143・186・245
芦沢健……238
阿相皓晃……193
粟辻啓之……173

(B)

馬場明道……12・106・149
Bogenmann, E. ……62

(C)

千葉賢三……170
陳大志……73
陳婷 101・136・138・255
千谷晃一……32・88
Chuang, D.-M. ……22・247
周希誠……143・245

(D)

出口武夫……221
土井永史……37
Duchen, M. R. ……225

(E)

海老原達彦……246
枝松礼……126
Eksioglu, Y. ……67・169・176
江本浩幸……279
江本克也……141
永業正美……99・172
遠藤泰……205・284
遠藤俊郎……261
榎戸靖……95
榎本理世……74・230
衛藤和子……236
衛藤義勝……62・274
江嵜英美……195

(F)

Frohman, L. A. ……51
藤原豊……185
藤井恵美子……200
藤井聡……124
藤井敏弘……81
藤森観之助……91
藤森修……29
藤沢悦子……63・218・249
藤澤仁……5・6
藤澤睦夫……128
藤島正敏……103・118・133
藤田公和……256
藤田輿……161
藤田啓介……47
藤嵜泰利……206・232
深間内文彦……22
福井裕行……77・78
福永浩司……2・248
福内靖男……98
古市貞一……68
古川昭栄 168・173・174・179
古川美子……173・179・188

(G)

郷保正……241
後藤希代子……195
後藤幸代……43・44・45・215

(H)

萩原正敏……31
浜田淳……157
濱口勝彦……191・198
浜上尚也……205・284
浜本敏郎……260
濱之上誠……64
韓大健……75・231
花井一光……23・79・129
花岡一雄……197
半田伸夫……132・151
原田博之……38
播口之朗……25・35・36
長谷川浩……282
長谷川宏幸……262
長谷川かおり……43・44・45
長谷川和夫……282
長谷川武史……38
長谷川成人……32・88

長谷川 真 一……39
橋 本 篤……37
橋 本 恵 理……237・239
橋 本 均……12
橋 本 喜次郎……123
橋 本 みゆき……258
橋 本 裕 子……11
橋 本 恒 一……139
橋 本 泰 道……38
橋 本 吉 秀……174
泰 龍 二……151
畠 中 寛……61・95
畠 瀬 修……128
八 田 慎 一 219・237・238・239
服 部 英 幸……150
服 部 成 介……11
早 原 敏 之……46
早 川 浩……141・283
早 川 徹……144・165
林 謙一郎……29・115
林 恭 三……173・174・188
林 一 治……153
林 茂 信……50
林 要喜知……28
日 高 弘 義……17・31
日 高 和 幸……251
東 田 陽 博……221
樋 口 宗 史……20
引 地 充……185
姫 野 明 彦……94
平 井 俊 策……208
平 松 緑……24
平 野 淳 史……67
平 野 誠
……103・118・123・133・236
平 野 修 助……273
平 野 敬 善……169
平 島 豊……261
平 田 洋……143・186・245
平 田 ゆかり……257
平 山 桂 子……197
久 永 真 市……89
本 藤 久 雄……123
堀 耕 治……191・192
堀 川 洋……18
堀 尾 嘉 幸……77・78
堀 田 妙 子……176
堀 内 久 徳……14
細 川 清……46
細 川 武……198
黄 縄 好……243

(I)

井 端 泰 彦……41・80
井 林 雪 郎……103・133
市 川 真 澄……87
市 川 富 夫……50
一 瀬 宏……47
市 山 新……262
井 田 博 幸……274
井 戸 達 雄……76
五十嵐 貢 一……167
井 原 康 夫30・31・88・112・113
飯 野 年 昭……139・250
池 田 圭 郎……58・267
池 亀 守……161
池 本 光 志……19・21
池 中 一 裕……107・108・194
池 内 俊 彦……61
生 田 房 弘……212
今 井 秀 樹……129
今 井 礼 子……84
今 井 嘉 紀……55
今 泉 美 佳……90
猪 股 裕 二……85
稲 垣 昌 博……258
稲 垣 俊 彦……215
稲 熊 裕……43・44・45・215
伊 野 美 幸……282
猪ノ坂 孝 雄……121・122
井 上 明 宏……59・60
井 上 和 秀……91・155・225
井 上 幸 紀……206・232
井 上 順 雄……105
入 江 恒 正……115・187
入 野 誠 郎……191
石 橋 正……149
石 黒 幸 一……89
石 井 昭 男……182
石 井 毅……210
石 井 秀 夫……279
石 川 紘 一……190
石 川 リ カ……168
石 川 敏 三……228・242
石 丸 昌 彦……277
磯 部 一 郎……67・169・176
礒 辺 俊 明……48
板 野 泰 弘……120
板 野 俊 文……128
伊 藤 英 樹……206
井 藤 英 喜……232
伊 東 信……57
伊 藤 和 光……246
伊 藤 朋 子……217
伊 藤 仁 一……83・264・265
伊 藤 憲 一……124
伊 藤 誠 二……78
伊 藤 哲 彦……254
伊 藤 武 彦……126
伊 藤 千 裕……121・122
岩 橋 和 彦……46
岩 森 正 男……197
岩 永 操……86
岩 根 理……167
岩 田 邦 男……157
岩 田 隆 信……145・147
岩 田 宜 芳……148
岩 田 錬……76
泉 順 吉……258

(J)

Jacobowitz, David M. ……7

(K)

門 田 健……16
鹿 川 哲 史……107・108・194

甲斐利弘…… 181・184
貝淵弘三……13
改正善彦…… 167
梶田光春…… 275
柿本泰男……52・253・259
郭　哲輝…… 15・66
鎌田　仁……24
鎌田武信…… 132・151
亀下　勇…… 5
亀谷富由樹…… 35・36・210
亀山正邦……31
神田知之…… 182
上田結子…… 258
上條由美…… 207
神谷稔夫…… 234
金山　巖…… 25・26
金子　厚…… 198
金子嗣郎……37
金子修至…… 169
金松知幸…… 273
金行孝雄…… 285
加納宏行……10
笠原　嘉…… 254
笠井陽子…… 217
笠茂公弘…… 183
柏木久美子……28
春日井　務……40
片村能也…… 237・239
片岡喜由
…… 100・102・104・134・162
片岡泰文……94
片山雅文…… 181・184
片山泰人…… 126
加藤　晃…… 172
加藤英政…… 110・111
加藤宏司…… 124
加藤宏之…… 101・136・138
加藤弘之…… 171・255
加藤兼房
……43・44・45・136・215・240
加藤一夫…… 227
加藤僚子…… 261
加藤泰治……67・169・176
加藤尚彦…… 276
加藤　武……85
勝俣東子…… 179
勝元栄一…… 202
桂　昌司……73・139・250
勝浦五郎……99
Kaub, P.……59・267
川原正博…… 57・87
河本泰生…… 285
川崎　尚……42
川瀬秀明……38
劔物　修…… 226
Kim, S. U. …… 108・194
Kim, K. H. …… 269
木村暁子…… 153
木村　宏…… 23・79
木村　淳……31
木村喜代史…… 117
木村定雄……16
木村康宏…… 221
木下タロウ…… 132
木岡哲郎…… 127
切池信夫…… 206・232
岸本健雄……89
岸野晶祥…… 187
北島理恵…… 159
北嶋省吾……35
北村邦男…… 193・196・198
北村佳久…… 120・175
北村幸彦……40
鬼頭直美……63・218・249
鬼頭昭三…… 153・200
鬼頭純三…… 180
吉川知志……13
木内祐二…… 207・258
木山博資…… 69・77
小林　央…… 112・113
小林和夫…… 57・87
小林正明…… 220
小林雅文……92
古賀千尋…… 279
小暮久也
101・136・138・140・142・146・213・255
鯉淵典之……49・199
小出誠司…… 184
小出　徹…… 137
小池達郎…… 135・152
小泉修一……91
小嶋久子…… 159
児島伸彦…… 125
小島正己……61
小町裕志…… 209
小松眞史…… 266
小宮義璋……84
小森　薫…… 254
甲村英二…… 165
小中隆盛……24
近藤啓次…… 253
近藤俊三…… 217
近藤慶之……81
近藤洋一…… 143・186
金野柳一……37
高坂新一…… 55・64・112
越川憲明……92
腰本裕之…… 157・227
小菅なぎさ…… 115
古武よし子…… 193
小山　司…… 216
小山　豊…… 149
久保浩一…… 191
九穂泰三…… 190
窪田和興…… 195
工藤　喬……25
工藤佳久…… 8
久郷敏明……46
熊谷千尋…… 164
熊谷善弘……27
熊倉鴻之助…… 90・91
熊西敏郎……50
熊代　新……37

國井修一……54・252
国嶋千代子……268
國見由佳理……254
栗原正……50
栗山欣弥73・79・80・139・250
栗山茂樹……107
黒田智子……180
黒田陽子……127
黒田洋一郎……57・87・124
黒川昌子……182
黒木俊秀……236
車地暁生……277
車谷隆宏……26・150
葛谷博磁……161

(L)

LêFei……201
李愛軍……129
劉暁宏101・136・138・255
劉勇101・136・138・255
劉国君……269・272

(M)

前田信明……263
前田裕輔……132
前川喜平……62
前山一隆……40
丸野内棣……65・109
丸山博文……93
丸山敬……27・211
丸山雪子……153
丸山和佳子……39
正宗研……266
増田真理……83・264・265
増田幹生……278
松田啓一……148
松田正司……119・253
松田友宏……234
松田敏夫……106
松田譲……90
松井ふみ子……263
松井英男……105
松井宏晃……282
松井徹……97
松宮輝彦……278
松本明……190
松本出……201
松本和政……110・111
松本清……145・147
松本真知子……224・226
松本昌泰……132・151
松本純枝……167
松本孝……103・118・123・133・236
松永享……77
松永学……171
松尾義則……46
松岡洋夫……121・122
松岡邦枝……48
松島秀行……31
松島宏……62
松下享……99
松谷天星丸……257
McGeer, P. L.……33
美原盤……98
三木直正…15・19・20・21・66
御子柴克彦…68・107・108・194
南方宏之……269
南勝……205・284
箕越靖彦……204
蓑島伸生……50・156
三品昌美……18
三竹重久……29
三浦正幸……193
三谷章……100・102・104
宮川博義……124
宮本篤……270
宮本英七……2・3・248
宮本昌志……168
宮本修……128
宮武正112・113・209・212
宮脇敦史……68
宮崎康二……248
宮澤淳夫……9
三好理絵……153・200
溝淵稔……180
溝渕睦彦……51・52・259
溝口克弘……223・279
水島秀勝……145・147
水谷宏……79
望月大介……233
百枝加奈子……197
桃生勝己……50
毛利哲郎……131・170・214
森昭胤……24・126・143・186・245
森憲作……227
森寿……18
森眞由美……234
森井博史……130
盛政忠臣……285
森岡大地……258
森島真帆……32
森下理香……240
森田御園……195
森田真次……129
森田貴雄……18
諸井佳代子……16
諸治隆嗣……71・280
諸岡啓一……183
本橋伸高……283
撫井弘二……127・202
村上哲英……128
村木彰……216
村木篁……200
村松喬……111
村本和也……87
村本和世……57
村尾孝児……52・259
村瀬健史101・136・138・255
村島善也……183
村田陽介……106
室屋賢康……11
莚井武……117

(N)

鍋島俊隆…… 188
長藤寿昭……97・137
長尾省吾…… 128
長嶋和郎…… 195
永田栄一郎……98
永田晃一……64
永田豊…54・252・256・257
永津俊治…… 39・47・275
永津郁子…… 254
内藤宏…… 254
中原辰雄…… 118・123
中平健祐…… 194
中井康光…… 145・147・271
中嶋一範…… 194
中嶋一行……64・112
中島光業…… 173
中島照夫……38
中条茂男…… 244
中本百合江…… 183
中村博彦…… 243
中村博…63・103・218・249
中村譲治…… 182
中村薫 118・123・133・236
中村和彦……46
中村和生…… 159
中村京子…… 8
中村治…… 197
中村重信…… 42・93
中村俊……11
中村清二……90
中村静雄…… 189
中村洋一…… 134・162
中村ゆき江…… 251
中村祐……26・35・36
中根博…… 118・133
中西亜紀…… 127
中西圭子……67・169・176
中西修…… 228・242
中西聡……90
中野明夫……17
中野紀和男…… 180
中野浩一……20
中尾純治…… 107・108・194
中尾裕史……55
中岡隆志…… 260
中田直樹 101・136・138・255
仲田義啓…… 154
中谷一泰…… 244
中山孝……60
中安博司……79
直井信……39
根木哲郎…… 128
新川久義…… 35・36・150
二宮光義…… 241
西彰五郎…… 281
西須英雄……18
西田朗…… 141・283
西川徹……37
錦織浩治…… 168
西村健 25・26・35・36・150
西尾廣昭…… 154
西山浩二…… 281
新田淳美…… 188
丹羽章……37
丹羽正美……94
丹羽龍史……24
丹羽利充…… 275
野田博行……24
野川茂……98
野口かおり…… 155
野口鉄也…… 116・220
野本享資…… 269
野村恭一…… 198
野村正彦 191・192・196・198
野村靖幸…… 120・164・175
野々村禎昭……90
野路久仁子…… 1・8
能登直……38
野崎博之……98
野沢義則……10
沼地陽太郎…… 121・122
沼澤理絵…… 226

(O)

小幡邦彦…… 125
小田恵夫…… 221
尾形直則…… 134
小川紀雄…… 143・186・245
小川智…… 132・151
荻野敏……77
荻田喜代一
…70・74・75・203・229・230・231・235
小口勝司…… 207・258
小倉明彦…… 8
及川和夫……24
小鹿幸生…29・114・115・187
岡高恵……37
岡田泰士…… 128
岡村均…… 41・80・248
岡野栄之…… 107
岡野孝幸……89
岡野吉晴…… 204
岡崎勝男……17
奥村英一……89
奥野正景…… 206・232
奥野幸子…… 6
奥山典生……48
尾前二三雄…… 174・179
小野光弘…… 185
小野寺宏 140・142・146・213
尾上均……40
大星博明…… 103・133
大江瑞恵……47
大黒一哉…… 262
大平敦彦…… 163・263
大金信夫……63・218・249
大河内正康…… 25・26
大熊誠太郎……73
大森哲郎…… 216
大森友明…… 261
大村裕…… 129
大西博 127・181・184・202
大野知親…… 189

大野和茂……96
大澤圭子……55
大鹿英世……219・238
大島岳夫……241
大杉武……19・21
太田雪子……195
大谷光弘……178
大塚康史……29
大槻秀夫……144・165
大槻俊輔……132・151
尾崎宜洋……202
小澤寛樹……237・238・239
(R)
Riederer, P……237・239
梁淑姫……68
(S)
Saffen. D. W.……246
佐賀寛……12
嵯峨井均……233
鷺直樹……280
佐合正周……178
斎藤秀哉……224・226
斉藤利和……237・238・239
斉藤康成……63・218・249
斎藤茂治……220
坂部武史……228・242
坂口健夫……165
榊原和征……168
坂本秀生……161
坂本安……196
阪中雅広……119・253
崎村建司……18
櫻井映子……40
桜井隆……90
佐野輝……253
佐野護……86
Santos, D. E.……269・272
笹征史……182
佐々田玲子……167
佐々木和男……129
佐々木健……145・147
佐武明……248
佐藤勇……116
佐藤康二……69
佐藤光源……121・122
佐藤伸介……38
佐藤好威……117
澤田誠……65・109
佐渡島省三……103・133
関根陽子……18
関野祐子……124
関山敦生……26
仙波りつ子……136・163
篠崎たき子……183
Shanley, Brian……201
柴山健三……54
渋谷健……278
渋谷匡子……196
澁谷治男……268
重松和人……94
重冨美智男……228・242
嶋津基彦……145・147
嶋津孝……204
清水信義……50
清水博喜……171
清水雅美……141
下濱俊……31
新保清……56
篠田友孝……48
篠原春夫……44・215
新宅治幸……99
新谷麻江……167
塩田千代……194
塩田清二……145・147・271
白井俊孝……98
白尾智明……58・59・156・267
白瀧博通……14
白崎康文……209
宗田靖二……222
Soderlng, T. R.……3
祖父江憲治……82
相馬仁……15
外松明美……208
宋時栄……48
杉本晃……140・141・146
杉本是明……40
杉崎哲朗……116
杉浦弘子……4
杉山英子……160
洲脇寛……46・128
鈴木二郎……183
鈴木政美……32・88
鈴木竹雄……229
鈴木龍雄……1・8
錫村明生……65・109
小豆原秀貴……142
庄盛敏廉……285
(T)
多田博史……183
田所康之……145
多賀千明……38
田口明彦……151
田口淳一……80・191
田口隆久……177
泰地睦夫……166・187
平英一……66
高羽夏樹……66
高寺恒雄……131・214
高原ひろみ……273
高橋昭……39
高橋均……212
高橋清久……37
高橋正身……217
高橋四郎……180
高橋勤……39
高橋康夫……50
高畑直彦……237・239
高久晃……261
高井義美……14
高倉公明……197・243
高松研……220
高仲正……91
高野健太郎……103

高島明彦…… 155
高頭廸明…… 137
高辻功一…… 111
武田篤…… 140・146
竹田二美代…… 271
武田弘志…… 278
武田克道……85
武田雅俊 25・26・35・36・150
竹田稔…… 145・147・271
武田直仁…… 176・275
武田良平……52・259
武田康夫……59
武井延之……55
竹本なぎさ……64
竹村晴夫…… 219
武富保…… 160
竹内宏…… 269・272
竹内裕子…… 130
瀧尾拡士…… 32・88
玉井洋一…… 159
田丸政男…… 257
田中秀和…… 19・21
田中淳一…… 192
田中潤也……82
田中健一…… 143・186
田中喜久子…… 210
田中耕太郎……98
田中真…… 208
田中正敏…… 223・279
田中亮…1・8・83・264・265
田中早苗…… 196
田中秀逸…… 135・152
田中隆彦…… 223・279
田中康一…… 222
種子田護…… 144
谷口隆之……31
谷向知……25・150
谷内一博……76
谷浦秀夫……66
谷山紘太郎……94
田岡万悟……48
田代謙一郎…… 158
田代信維…… 158
田代朋子……84
楯林義孝……25・236
立松晃…… 275
立泰延族……54・252
田和聖子…… 228・242
寺居和宏……79
寺澤求……17
戸田正博……58・156
砥出勝雄…… 157
富樫広子…… 224・226
徳武哲……34
富田博秋…… 185
富山勝則……92
東田道久…… 164
東藤直樹…… 114
東條伸一郎…… 114
遠山正彌… 69・77・110・111
遠山育夫……23
融道男…… 268・277
戸谷重雄…… 156・178・267
豊島至…… 266
津田正明……72
津田基之……13
辻浩司…… 134
辻崇一…… 260
辻省次…30・112・113・212
辻田隆一…… 233
塚田和彦…… 244
塚田泰且…… 170
塚田裕三…… 273
塚島彰…… 118
常岡豊……46
津島宏美…… 234
堤圭介……94
堤哲之 118・123・133・236

(U)

内田庸子……89
内田洋子……30・112・113
内村英幸
…… 103・118・123・133・236
上田周一…… 151
植木靖之…… 114・115
上村宏……38
植村慶一
…… 58・59・156・193・196・267
上野正孝…… 171
魚住徹…… 141
宇佐美美穂子……27
臼杵豊之……46・128

(W)

和田圭司……53
和田謙……14
若本寛起…… 178
脇坂晟…… 124
脇谷健司…… 197
王小平…… 19・21
和中明生…… 110・111
渡辺和人……49
渡辺淳……88
渡辺正人……17
渡辺正知……81
渡辺建彦…… 40・76
渡辺辰也…… 167
渡辺恭良…… 130
渡辺芳徳……23
綿野智一……91
Wenthold, R. J ……53
Wilce, P. …… 201
Winsky, L. …… 7

(Y)

矢田武…… 175
八木－中川勇三……63・218・249
山田和雄…… 144・165
山田和男…… 268
山田恵子…… 219
山田雅司……61
山田茂人…… 279・281
山田慎二…… 233
山田孝…… 116

山　上　　栄
…… 127・181・184・202・206・232
山　形　達　也……57
山　口　和　彦……60
山　口　時　男……96・251
山　口　知　子…… 7
山　口　　務……14
山　国　　徹……48
山　本　秀　子……71・280
山　本　秀　幸…… 3
山　本　纊　子…… 109
山　本　正　彦……29・115
山　本　智　浩…… 177
山　本　敏　文……71・280
山　本　良　隆…… 128
山　西　嘉　晴…… 171
山尾一針ヶ谷和花子……27・211
山　岡　久　也…… 254
山　岡　功　一…… 254
山　岡　貞　夫……49・199
山　岡　由美子……31
山　崎　眞津美…… 170
山　崎　靖　人…… 142・213
山　下　拓　史…… 42・93
山　下　　格…… 216
山　下　樹三裕……94
山　下　法　文…… 158
山　内　　卓…… 4
山　脇　成　人…… 141・283
柳　瀬　尚　人…… 100・104
柳　沢　勝　彦…… 209・212
八　尾　博　史…… 133
安　田　好　美…… 269
安　原　　治……23
安　原　　一…… 207
安　村　美　博……37
矢　崎　貴　仁…… 193
Yoh, K. …… 280
横　尾　秀　康…… 223・279・281
横　谷　　昇……53
横　山　和　仁…… 276
横　山　ちひろ……41
米　田　幸　雄
…70・74・75・203・229・230・231・235
米　沢　裕　次…… 123
吉　田　　明…… 217
吉　田　一　成…… 178
吉　田　真　美…… 223・279
吉　田　寿美子…… 121・122
吉　原　良　浩…… 227
吉　川　和　明……28
吉　川　武　男…… 268
吉　見　建　二…… 148
吉　村　和　法…… 196
吉　岡　　享…… 9
吉　岡　充　弘…… 224・226
吉　住　秀　夫…… 275
油　布　克　己…… 126
湯　口　貴　導…… 144・165

(Z)

章　　龍…… 102
張　　玉　祥…… 42・93

神経化学　第31巻　第1号

平成4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 東京都文京区本駒込5－16－9
財団法人 日本学会事務センター内
印刷所　名古屋大学消費生活協同組合　印刷部